

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成17年度博士課程 進学
氏名 夏目やよい
指導教員名 清水 誠

論文題目 腸管と多様な生体異物の相互作用に関する解析

腸管は、経口摂取した食品成分の体内への輸送、体外から侵入した異物や微生物に対するバリアー、あるいは外来成分の認識・応答などに関わる器官である。本論文では、体外からの異物侵入や刺激に対する腸管上皮の応答とそこに関わる食品因子について、(1) 吸収機能、(2) 応答機能の2つの視点から研究を進めた。(1) については、有害化学物質であるダイオキシンの腸管透過と食品因子によるその抑制、(2) については、各種刺激によって誘導される腸管上皮細胞における小胞体ストレスと食品因子(ケルセチン)によるその制御を研究対象とし、*in vitro* 実験系を用いてその解析を試みた。

第1章 ダイオキシンの腸管透過に及ぼす食品因子の影響

ダイオキシンは発ガン性、催奇形性、生殖毒性、皮膚疾患など様々な毒性を有し、ごく微量で生体に影響を与えることが知られている。その90%以上が食品とともに経口的に体内に侵入すると言われているが、これまでダイオキシンの腸管吸収やそれに対する食品の影響を調べる場合、実験動物にダイオキシンや食品を投与して排泄物を解析するといった方法しか知られていない。そこで、本研究では、ダイオキシンの腸管吸収やそれに対する食品の影響を簡便に評価しうる *in vitro* の実験系を構築し、食品素材が有するダイオキシンの毒性発現を抑制する効果について検討することとした。

ダイオキシンは、単純拡散的に細胞膜を透過すると、AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) を介して CYP1A1 に代表される様々な薬剤代謝酵素の発現が誘導される。そこで、ルシフェラーゼ遺

伝子上流にヒト CYP1A1 プロモーターを挿入したネオマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドをヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞に導入することにより、ダイオキシン応答性常発現株 (HepG2-LUC) を構築した。

続いて、*in vitro* の腸管上皮細胞モデルと組み合わせることにより、ダイオキシンの腸管透過を評価する実験系を構築した。半透膜上で小腸上皮様に分化させた Caco-2 細胞単層の管腔側にダイオキシン的一种である TCDD (Tetrachloro-Dibenzo-*p*-Dioxin) を含む培地を添加し、一定時間後に基底膜側の培地を回収して HepG2-LUC に添加、更に一定時間後にルシフェラーゼアッセイをおこなった。この実験系において、Caco-2 細胞単層を透過した TCDD 量を検出できることを確認した。

本実験系を用い、既に *in vivo* でダイオキシン吸収抑制効果が知られているクロロフィル及び不溶性食物繊維の効果を検討した。前出の食品成分と TCDD を同時に Caco-2 細胞単層に添加、24 時間後に基底膜側の培地を回収して HepG2-LUC に添加、更に 24 時間後にルシフェラーゼアッセイをおこなった結果、食品成分依存的にルシフェラーゼ活性が減少したことから、本実験系はダイオキシン吸収抑制成分の探索に利用できることが示唆された。

更に、本実験系を用いた予備実験において抑制効果が示唆された茶殻の有効性向上を目指して、凍結融解処理の影響について調べた。走査型電子顕微鏡による表面構造解析の結果、凍結融解処理していない茶殻は滑らかな表面を有していたが、急速凍結処理したものは粗い表面構造を示し、また緩慢凍結処理では大きな構造変化が起きていた。次に、構築した実験系を用いて茶殻試料のダイオキシン毒性発現抑制効果について検討した結果、すべての試料において濃度依存的な抑制効果が認められたが、急速凍結試料において著しく強い抑制効果が見いだされた。

このように本章では、ダイオキシンの腸管透過性が食品成分によって制御されること、その作用は食品成分の構造的性質等によっても左右されることを *in vitro* 実験系を用いて明らかにすることが出来た。

第2章 ケルセチンが腸管上皮に与える影響

ダイオキシンの腸管吸収制御だけでなく、細胞におけるその毒性発現に影響を及ぼす食品成分を第1章で構築した実験系を用いて探索した結果、フラボノイドがダイオキシンの毒性発現抑制にも関わっている可能性が示された。フラボノイドは抗酸化作用や抗炎症作用といった様々な生理作用が報告されているが、経口摂取されたフラボノイドと直接相互作用すると考えられる腸管上皮の機能に及ぼす影響は未だ知見が少ない。そこで、第2章では野菜などに広く分布しているケルセチンに着目し、ケルセチンが腸管上皮細胞機能に及ぼす影響を検索した。まずケルセチンおよびその配糖体がマウス腸管上皮の遺伝子発現に与える影響をマイクロアレイにより網羅的に検討した。

7 週齢の BALB/c マウス (オス) にケルセチン、ケルセチン-3-ラムノシド (ルチン)、ケルセチン-3-グルコシド、ケルセチン-4'-グルコシド (低濃度 : 5mg/kg bw、および高濃度 : 50mg/kg bw の二通り) および 10% DMSO (コントロール) を 2 週間経口投与し、小腸上部の上皮を回収し

た。そして Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて得られたシグナル強度から三つの手法 (MAS 5.0、RMA、dChip) により発現量を算出し、サンプル間クラスタリング結果から手法による違いを検討した。その結果、MAS 5.0 と dChip において「ケルセチン類低濃度投与群」と「コントロールおよびケルセチン類高濃度投与群」で有意に発現プロファイルが異なることが見出された。また、糖の種類や結合部位による違いにはほとんど影響がみられなかった。

次に、検定統計量として「平均発現量の差の絶対値」を用い、帰無仮説 (Ho: 二つのクラスター間に差がない) のもとで 204 個の有意な発現変動遺伝子 (False Discovery Rate = 10%; dChip データ) を見出した。これらを更に遺伝子間クラスター解析に供した結果、低濃度ケルセチン投与によって「発現が抑制される遺伝子 (カルシウムシグナル、代謝関連遺伝子)」「発現が亢進される遺伝子 (薬剤代謝、免疫、リボソーマルタンパク質関連遺伝子)」「変動が小さい遺伝子」の 3 つのクラスターに配された。遺伝子発現に変動が見られた機能は小胞体と関連の深いものが多いことから、ケルセチンは小胞体の機能に何らかの影響を与える可能性が考えられた。そこで、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞および LS180 細胞を用いて、ケルセチンが腸管上皮における小胞体ストレスに与える影響について解析した。

第3章 薬剤による腸管上皮の小胞体ストレスに与えるケルセチンの影響

二週間培養し十分に分化させた Caco-2 細胞、および LS180 細胞に様々な小胞体ストレス誘導剤 (tunicamycin (TM)、A23187、thapsigargin (Tg)、brefeldinA (BRA)) を添加し、小胞体ストレスマーカーである GRP78 と CHOP の mRNA 発現が誘導剤濃度依存的・曝露時間依存的に亢進することを確認した。次に、これらの小胞体ストレス誘導剤とケルセチンを同時に処理してマーカーの発現量の変化を検討した。結果を table. 1 に記す。

また、ケルセチン (Que) が小胞体ストレスセンサータンパク質である IRE1 と PERK の活性に与える影響を調べた。LS180 細胞に A23187 あるいは thapsigargin とケルセチンを同時添加し、RT-PCR により IRE1 活性の指標である XBP-1 mRNA のスプライシングを検討した。結果を table. 1 に記す。PERK 活性の指標として、ウェスタンブロット解析により eIF2 \cdot のリン酸化を、metabolic labeling により新規タンパク質合成のシャットダウンを調べた結果でも、XBP-1 mRNA のスプライシングと同じ傾向が認められた (table. 1)。

続いて、ケルセチンが有する小胞体ストレス抑制作用が抗酸化能に起因するか検討するため、LS180 細胞に代表的な抗酸化物質であるビタミン C 及び E と thapsigargin を同時添加して GRP78 mRNA 量の変化を調べたところ、顕著な抑制効果は認められなかった。ケルセチンは PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) の阻害剤であることが知られているため、次に LS180 細胞に代表的な PI3K 阻害剤である LY294002 あるいは wortmannin と thapsigargin を同時添加して GRP78 mRNA 量の変化を調べた。その結果、PI3K 阻害剤濃度依存的に GRP78 mRNA の発現亢進が抑制された。したがって、カルシウム動態異常による小胞体ストレス環境下では、ケルセチンは PI3K 阻害剤として働くことにより小胞体ストレスを抑制することが示唆された。

table. 1

Caco-2 細胞	TM+Que	A23187+Que	Tg+Que	BRA+Que	Que
GRP78 mRNA	→	↓	↓ (low dose) ↑ (high dose)	→	↑
CHOP mRNA	→	↓	↓ (low dose) ↑ (high dose)	→	-

LS180 細胞	TM+Que	A23187+Que	Tg+Que	BRA+Que	Que
GRP78 mRNA	↓	↓	↓	→	↑
CHOP mRNA	↓	↓	↓	→	-
GRP78 protein	↓	↓	↓	→	↑
XBP-1 mRNA splicing	-	↓	↓ (low dose) ↑ (high dose)	-	↑
eIF2a phosphorylation	-	↓	↓ (low dose) ↑ (high dose)	-	↑
protein synthesis shut down	-	↓	↓ (low dose) ↑ (high dose)	-	↑

本研究は、簡便かつ低コストでのダイオキシン腸管透過の評価を可能にし、食品因子がダイオキシンの腸管透過や毒性発現に与える影響を探索する途を拓いた。また、腸管上皮細胞における小胞体ストレスに対してケルセチンが影響を与えるという新規性の高い発見は、フラボノイドが示す様々な生理作用の分子機構を理解する上での重要な知見を提供するものと考えている。