

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 夏目 やよい

腸管は、経口摂取した食品因子の体内への輸送、体外から侵入した異物や微生物に対するバリア、あるいは外来成分の認識・応答などに関わる器官である。食品はその栄養面、嗜好面のみならずさまざまな生理活性を示すことが注目されているが、腸管は摂取した食品が最初に接触する組織であり、ここで食品因子が何らかの生理活性を示すことが期待される。特に、体外から侵入した異物の吸収に対して食品因子が与える影響、及び外来異物や刺激に対する腸管上皮の応答に対して食品因子が与える影響を解析することは、生体防御の観点から重要である。本論文は、腸管上皮におけるダイオキシンの腸管透過性に及ぼす食品因子の影響を、新規に構築したダイオキシンの腸管吸収評価系を用いて検討するとともに、食品が腸管で示す生体防御作用の解明という視点から、腸管上皮における小胞体ストレスに対する食品因子(フラボノイドの一種であるケルセチン)の影響について検討したもので、序章を含む4章と総合討論から構成されている。

序論では、研究の背景になるダイオキシンの汚染状況とその毒性、ケルセチンの代謝機構と生理作用、小胞体ストレスの分子メカニズムと疾患との関連を紹介するとともに、本研究の意義と目的について述べている。

第一章では、ダイオキシンの*in vitro*腸管吸収評価系の構築を試みている。ルシフェラーゼ遺伝子上流にダイオキシンによって発現が強く誘導されるCYP1A1のプロモーター領域を組み込んだプラスミドをヒト肝癌由来株化細胞HepG2細胞に導入した細胞(HepG2-LUC細胞)とヒト結腸癌由来株化細胞Caco-2細胞層とを組み合わせ、*in vitro*でダイオキシンの腸管透過を評価することに成功した。クロロフィルとダイオキシンをCaco-2細胞の管腔側に添加し、基底膜側の培地をHepG2-LUC細胞に添加してルシフェラーゼ活性を測定した結果、クロロフィル濃度依存的にルシフェラーゼ活性が低下した。また、凍結融解処理が茶殻のダイオキシン吸着能を向上させたことから、食物素材のダイオキシン吸収抑制作用を凍結処理により改善できる可能性が示された。

第一章で構築したHepG2-LUC細胞を用いてダイオキシンの毒性発現を抑制する食品因子を、フラボノイドを中心にスクリーニングした結果、摂取頻度の高いケルセチンが抑制効果を示したことを受け、第二章では腸管におけるケルセチンの腸管機能制御作用を調べている。BALB/c マウスにケルセチンとその配糖体(ルチン、ケルセチン3位配糖体、ケルセチン4'位配糖体)を5 mg/kg

体重と 50 mg/kg 体重の二通りの濃度で二週間投与し、腸管粘膜を用いてマイクロアレイ解析をおこなった結果、カルシウムシグナル、代謝関連遺伝子の発現減少、薬剤代謝、リボソームタンパク質、及び免疫関連の遺伝子の発現亢進が観察された。この結果から、小胞体の機能に関連する遺伝子の発現変動が起こっていることに注目した。

第三章では、ケルセチンが腸管上皮細胞における小胞体ストレスに与える影響について調べた。まず、ヒト結腸癌由来株化細胞 Caco-2 細胞及び LS180 細胞に小胞体ストレスを誘導する薬剤とケルセチンを添加し、小胞体ストレスのマーカーである GRP78 と CHOP mRNA の発現変動を検討した。その結果、カルシウム動態を変化させる薬剤を用いてストレスを誘導した場合においてケルセチンの抑制効果が示唆された。次に、カルシウム動態を変化させる薬剤 (A23187 やタブシガラジン) とケルセチンを LS180 細胞に添加し、小胞体ストレスのセンサータンパク質の活性を調べた。その結果、ケルセチンは A23187 による XBP-1 mRNA のスプライシングと eIF2 \cdot のリン酸化、新規タンパク質合成シャットダウンを抑制した。タブシガラジンを用いた場合にも高濃度のケルセチンにより、これらの現象が亢進された。一方、ケルセチンを単独で処理すると穏やかに小胞体ストレスを惹起することも観察された。このことから、ケルセチンは小胞体ストレスを惹起する作用とカルシウム動態異常による小胞体ストレスを抑制する作用の相反する性質を有することが示された。ケルセチンは PI3K 阻害活性を有することが知られている。PI3K 阻害剤である LY294002 や wortmannin も同様に A23187 による GRP78 mRNA 発現亢進を抑制すること、LY294002 とケルセチンは相加的な作用を示さないことから、ケルセチンは PI3K を阻害することにより A23187 が誘導する小胞体ストレスを抑制する可能性が示唆された。

以上要するに、本研究は、腸管におけるダイオキシンの透過性及び薬剤によって誘導される腸管上皮細胞の小胞体ストレスに対して食品中の成分が制御機能を持つことを、新規に構築した *in vitro* 評価系等を利用することによって見出したもので、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。