

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 19 年度博士課程 進学  
氏 名 濱田 美影  
指導教員名 清水 誠

### 論文題目

腸管上皮における転写因子 AhR を介したフラボノイドの認識、代謝機構に関する研究

### 序章

生体において外界との境界に位置する腸管上皮は、食品成分の吸収を司る器官であるが、侵入した外来異物や微生物を認識し応答する器官でもある。特に細胞内に単純拡散的に侵入する脂溶性異物に対しては、受容体による認識や、薬物代謝酵素による酸化（第一相）、抱合化（第二相）、トランスポーターによる排出（第三相）という一連の解毒排出システムが存在する。

近年、環境汚染物質が大きな問題となっている。中でも免疫毒性、発ガン性、催奇形性など多岐にわたる毒性を有しているダイオキシン類は生物の体内に蓄積しやすく、食品と共に日常的に曝露されている内分泌攪乱物質である。最も強い毒性を有する 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は受容体型転写因子である aryl hydrocarbon receptor (AhR) にリガンドとして結合・活性化して、cytochrome P450 (CYP) 1A1 に代表される薬物代謝酵素を誘導することが知られており、さらに AhR の活性化はダイオキシンの毒性発現に関与することが示唆されている。

一方、野菜や果物から摂取している食品因子にフラボノイドがある。フラボノイドは抗酸化作用、抗ガン作用、抗アレルギー作用など多くの生理活性が報告されており、様々な疾患を予防しうる食品因子として注目されている。フラボノイドも生体に脂溶性生体異物として認識されることから、AhR や核内受容体 PXR のリガンドになって薬物代謝酵素の発現を制御し、一方でそれ自身が薬物代謝酵素による代謝を受けることが報告されている。

本研究では、受容体型転写因子 AhR に着目し、ダイオキシンとフラボノイドという 2 種

類の外來異物に対する腸管上皮細胞の認識・応答を解析することを目的とした。

## 第1章 TCDDによって誘導される AhR の活性化とそれに伴う CYP1A1 発現亢進に対するフラボノイドの抑制効果

これまでフラボノイドは AhR に対するアンタゴニスト作用などが報告され、ダイオキシンの毒性発現を抑制することが示唆されている。しかし腸管吸収時に代謝を受けその生理作用が失われてしまう可能性は十分考えられる。そこで、腸管上皮モデルとしてヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞を用い、その単層を透過したフラボノイドの AhR 抑制活性について検討した。

始めに TCDD による CYP1A1 の転写活性亢進を抑制するフラボノイドを探索した。ヒト CYP1A1 プロモーター約 1.6kbp をルシフェラーゼ遺伝子の upstream に挿入したプラスミドが安定に導入されているヒト肝臓ガン由来細胞 HepG2 (HepG2-LUC) にフラボノイドと TCDD を添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。またフラボノイド類と TCDD を添加したマウス肝腫瘍由来 Hepa-1c1c7 細胞の核タンパク質中の活性型 AhR を AhR のヘテロダイマーパートナーである AhR nuclear translocator (Arnt) の抗体で検出する SW-ELISA を用いて、TCDD による AhR の活性化に対するフラボノイドの影響についても検討をおこなった。その結果、7種のフラボノイドに TCDD によって誘導された CYP1A1 転写活性及び AhR 活性化を有意に抑制する活性を見出した。

フラボノイドの腸管における吸収・代謝を検討するため、透過性膜上で培養した Caco-2 細胞層の apical 側にフラボノイドを添加し、basal 側に透過した試料を用いて実験をおこなった。その結果、腸管上皮細胞層を透過した flavone、galangin、tangeretin は TCDD によって誘導された CYP1A1 転写活性、mRNA、タンパク質発現を有意に抑制することを確認した。

また C57BL6J マウスに、ダイオキシンのリガンドである 3-methylcholanthrene (3MC) とフラボノイドを胃内投与し、肝臓と腸管全長の粘膜の CYP1A1 mRNA 発現を調べた。その結果、3MC で誘導された CYP1A1 の mRNA 発現が flavone によって有意に抑制されることが確認できた。

以上の結果よりフラボノイドは腸管上皮で吸収・代謝を受けた後においても、ダイオキシンの毒性発現を抑制することが示唆された。

## 第2章 腸管上皮におけるフラボノイドの吸収・代謝とダイオキシンの影響

腸管での TCDD とフラボノイドの相互作用を考慮にいれ、TCDD と同時に Caco-2 細胞層を透過させたフラボノイド及び TCDD を含む培地で培養した後の Caco-2 細胞層を透過させたフラボノイドの CYP1A1 転写活性に与える影響を調べた。その結果、TCDD と同時に Caco-2 細胞層を透過したフラボノイドの抑制効果は、フラボノイドを単独で透過させたときの抑制効果と比較して低下し、TCDD 前処理においてもフラボノイドの抑制作用の低下が

みられた。これよりダイオキシンは腸管上皮におけるフラボノイドの吸収量あるいは代謝産物の構造を変化させていることが考えられた。そこで特に大きな影響がみられた galangin について代謝産物の解析をおこなった。

TCDD 前処理した Caco-2 細胞と未処理の Caco-2 細胞によって生じた galangin の代謝産物を比較した結果、TCDD 前処理によって酸化体である kaempferol とそのグルクロン酸抱合体が増加し、galangin の 2 種類のグルクロン酸抱合体が減少した。また TCDD 前処理により発現が亢進した CYP1A1 によって galangin が kaempferol へ代謝されていることが示された。第 1 章の結果より、kaempferol にはほとんど AhR へのアンタゴニスト活性がないことから、galangin は TCDD によって発現亢進した CYP1A1 によって kaempferol に代謝されたため、AhR に対するアンタゴニスト活性が低下したことが示唆された。

### 第 3 章 腸管上皮細胞におけるメトキシフラボノイド tangeretin の吸収・代謝

メトキシフラボノイドである tangeretin は Caco-2 細胞を透過後、最も強い AhR 抑制活性を示したことから、他のフラボノイドとは異なる吸収や代謝がおこなっている可能性が考えられた。しかしメトキシフラボノイドの腸管上皮における吸収・代謝の報告はほとんどないため、Caco-2 細胞やヒト小腸マイクロソーム等を用いて tangeretin 代謝産物の解析をおこなった。

LC/MS/MS を用いて代謝産物の解析をおこなったところ、ジメチル化、酸化、グルクロン酸抱合化などをうけた 9 種類の代謝産物が得られ、ほとんどの代謝物は脂溶性の高い構造を有していた。またこれらの代謝には主に CYP1A1 や CYP3A4 が関与していることが示された。さらに透過性膜上に培養した Caco-2 細胞を用いて各代謝物の apical 及び basal 側への細胞外排出をみたところ、いくつかの代謝産物の排出に極性があることが確認された。

これらの結果より、tangeretin の代謝産物は高い脂溶性を維持したものが多いため、腸管上皮透過後も AhR アンタゴニスト活性を有していると考えられた。

### 総合討論

本研究では、生理機能の異なる 2 種の AhR 相互作用因子である TCDD（環境因子）とフラボノイド（食品因子）を用いて、腸管上皮細胞における外来異物認識・代謝応答に関して解析をおこなった。フラボノイドは、TCDD による CYP1A1 の発現亢進に対する抑制作用を有しているが、腸管上皮での吸収や代謝を考慮することで、より生体内で機能的なフラボノイドを探索できることが示唆された。一方で TCDD は腸管上皮細胞の薬物代謝酵素、特に CYP1A1 の発現を亢進することでフラボノイドの代謝に影響を与え、フラボノイドの生理機能に変化を与えることが示された。すなわち TCDD のような環境因子は腸管上皮の代謝機能を攪乱し、フラボノイドなどの食品因子の機能性を変化させるというダイオキシンの新たな毒性と捉えられる知見を提示した。本研究は、「フラボノイドが腸管上皮で多彩な代謝物となり、その吸収率や代謝産物の変化が生理機能を反映する」という薬物動態的

な観点で食品因子の機能性を明らかにすると共に、それに及ぼす環境汚染物質の影響を示したもので、食の機能性と安全性に関わる重要な知見を与えたものと考えている。

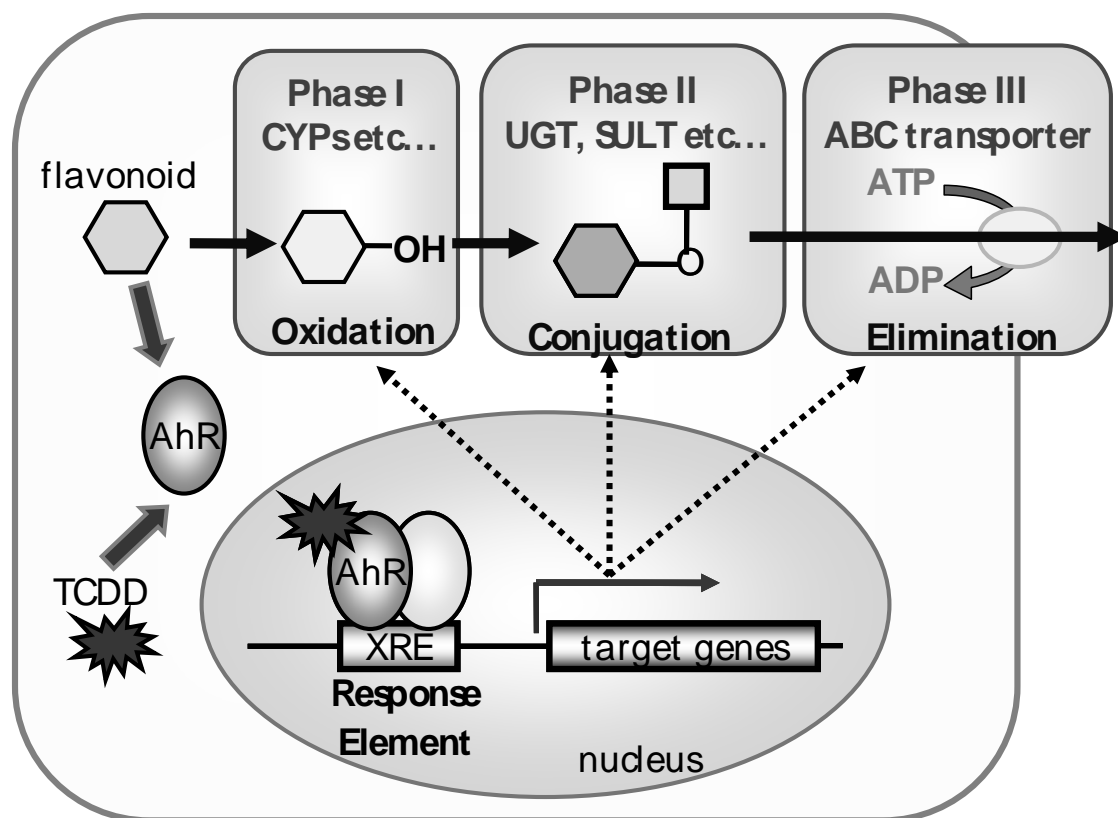


図 AhRを介した外来異物解毒排出機構

発表論文

1. Hamada, M., Satsu, H., Natsume, Y., Nishiumi, S., Fukuda, I., Ashida, H., Shimizu, M. "TCDD-induced CYP1A1 expression, an index of dioxin toxicity, is suppressed by flavonoids permeating the human intestinal Caco-2 cell monolayers" *J. Agri. Food Chem.* 54 (23) 8891-8898 (2006)
2. Hamada, M., Satsu, H., Ashida, H., Sugita-Konishi, Y., Shimizu, M. "Metabolites of Galangin by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-inducible Cytochrome P450 1A1 in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells and their Antagonistic Activity toward Aryl Hydrocarbon Receptor" *Chem. Res. Toxicol.*, submitted.