

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 濱田 美影

近年、環境汚染物質が問題となっており、中でもダイオキシン類は食品と共に日常的に曝露されている内分泌攪乱化学物質として注目されている。最も強い毒性を有する 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は薬物受容体である aryl hydrocarbon receptor (AhR) にリガンドとして結合・活性化して、cytochrome P450 (CYP) 1A1 などの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フラボノイドは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。

腸管上皮は、食品成分を吸収する器官であるが、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解毒排出システムが存在する。本研究は、薬物受容体 AhR に着目し、ダイオキシンとフラボノイドという 2 種類の生体異物に対する腸管上皮細胞の認識・応答を解析したもので、3 章よりなる。

序章に続き、第 1 章では、TCDD による AhR の活性化とそれに伴う CYP1A1 の転写活性亢進を抑制するフラボノイドの探索をおこなっている。SW-ELISA 及びルシフェラーゼアッセイを用い、抑制活性を有する 7 種のフラボノイドを見出した。さらに、腸管吸収時の代謝による生理作用の変化を考慮し、ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞単層を透過したフラボノイドの抑制活性について検討した。その結果、flavone、galangin、tangeretin は腸管上皮細胞層を透過した後でも、TCDD によって誘導される CYP1A1 の転写活性、mRNA 発現、タンパク質産生を有意に抑制することが見出された。また *in vivo* の系においても、肝臓及び腸管粘膜で誘導された CYP1A1 の mRNA 発現が flavone によって有意に抑制されることを確認し、フラボノイドが腸管上皮で吸収・代謝を受けた後においても、AhR の活性化を伴う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 章では、腸管上皮におけるフラボノイドの吸収・代謝にダイオキシンが与える影響について検討している。galangin は Caco-2 細胞において、2 種のグルクロン酸抱合体と kaempferol、さらには kaempferol グルクロン酸抱合体へと代謝された。一方 TCDD で処理した Caco-2 細胞では CYP1A1 の発現が亢進し、kaempferol への代謝が促進されたため、上皮細胞透過後の galangin では CYP1A1 転写活性に対する抑制活性が低減することが示された。

第 3 章では未だ報告がなされていない tangeretin の腸管上皮細胞における吸収・代謝及び代謝物の排出について Caco-2 細胞及びヒト小腸マイクロソームを用いて解析をおこなっている。LC/MS/MS を用いて解析をおこなったところ、tangeretin の 9 種類の代謝産物が得られ、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 細胞を用いることで、いくつかの代謝産物の排出に極性があること

も確認された。これらの結果より、**tangeretin** は腸管上皮によって多様な代謝物となるが、これらのほとんどは高い脂溶性を維持しており、そのために腸管上皮透過後も **AhR** 活性化に対する抑制作用を有していると考えられた。

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、本研究の結果から示唆された。一方で **TCDD** は腸管上皮細胞の薬物代謝酵素、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可能性が示されたことから、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有害作用も示唆された。

以上要するに、本研究は、各種健康機能が報告されている食品因子フラボノイドの腸管上皮での吸収や代謝が生理機能に影響すること、環境化学物質が食品因子の機能性発現に影響を及ぼすことを分子レベルの解析によって示し、食の機能性と安全性に関わる重要な知見を与えたものであり、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。