

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22658040

研究課題名（和文） 「腸管の解毒代謝系は食べることで整備される」仮説の検証

研究課題名（英文） Evaluation of a hypothesis that “The intestinal detoxification system can be regulated by eating”

研究代表者

清水 誠 (SHIMIZU MAKOTO)  
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
 研究者番号：30114507

研究成果の概要（和文）：

ダイオキシン類の投与による消化管での解毒酵素（CYP 等）の発現誘導は、フラボノイド（FLA）によって抑制された。一方で、ある種の FLA は CYP 発現を誘導した。DNA マイクロアレイ解析の結果、ダイオキシン類と FLA により誘導される遺伝子発現のパターンが異なることが示され、それは両者の AhR との相互作用の違いによることが示唆された。AhR アゴニスト活性を持つ 8 種の FLA のうち 1 種のみが AhR を介した制御性 T 細胞誘導活性を示すなど、AhR との相互作用のわずかな差が多様な生理機能性の発現を導くと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Dioxin-induced expression of intestinal detoxification enzymes (DTE), such as CYPs, was suppressed by flavonoids. The CYP expression was also induced by certain flavonoids. DNA microarray analysis showed that dioxins and flavonoids caused different gene expression of intestinal DTE. Among eight flavonoids having the AhR agonistic activity, only one of them was able to induce regulatory T cell differentiation via AhR activation, suggesting that a small difference in the AhR/ligand interaction was responsible for the variability of gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学

キーワード：食品、解毒代謝、腸管バリア

## 1. 研究開始当初の背景

腸管には栄養素吸収、シグナル伝達、免疫応答などの機能があるが、異物の侵入に対するバリア機能もきわめて重要である。バリア機能には、タイトジャンクションなどにより形成される物理的バリアと、免疫系に代表される生物的バリアが存在する。一方、腸管上皮細胞には、疎水性異物等を親水性化・弱毒化する第Ⅰ相酵素 (CYP 等)、それを抱合化して無毒化する第Ⅱ相酵素 (GST 等)、そして異物を細胞外に排出する第Ⅲ相トランスポーター (MRP 等) が発現し、これらの解毒酵素類 (DTE) も生体異物に対するバリアとして重要な役割を果たしている。DTE の発現は異物に応答して上昇するが、その応答の調節には AhR, PXR など代表される転写因子が係わることが分かっている。最近、我々は腸管上皮細胞の AhR や PXR が、有害化学物質のみならず、ある種の植物性食品成分 (フラボノイドに代表されるようなフィトケミカル) によっても活性化され、DTE の発現を亢進することを見出した (Satsu ら, J. Agric. Food Chem., 2008 など)。このことは「日常の食品摂取が腸管の解毒系を活性化し、異物侵入を抑える」という合目的調節機構の存在を示唆していると思われるが、その詳細は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、「フラボノイドのような食品成分の日常的な摂取が腸管上皮の解毒系を活性化し、異物侵入に対する腸管バリア機能を強化しているのでは？」という仮説を検証することを目標に計画された。そのためには、フラボノイド等によって誘導される DTE 発現が、ダイオキシン (TCDD) のような有害物質によって誘導される DTE 発現と量的・質的にどのように異なるのかを分子レベルで明らかにすることが必要である。そこで本研究では、いくつかの有害化学物質と食品フラボノイド類を選び、それらが腸管上皮細胞株およびマウス腸管細胞における DTE をはじめとするバリア関連タンパク質の発現に及ぼす影響を、DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析を含めて検討することとした。さらに、AhR などの DTE 関連転写因子が炎症や免疫系に影響を及ぼすことが明らかになってきたことから、当初の計画にはなかったが、AhR 活性化作用を持つフラボノイドが制御性 T 細胞への分化に及ぼす影響を調べることにした。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 を用いて、フラボノイド類が AhR を介して DTE の発現に

及ぼす影響を検証した。DTE としては、第 1 相酵素の CYP1A1、第 2 相酵素の UGT1A1 を選び、Caco-2 におけるこれらタンパク質の産生量を Western 解析により、また AhR, PXR を介した転写活性への影響をレポーターアッセイ系を用いて検討した。

(2) AhR のアゴニスト活性が高いフラボノイドとして tangeretin (Tan) を選び、ダイオキシン (TCDD) と Tan をそれぞれ添加して培養した Caco-2 における遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイ分析によって観察した。

(3) AhR のリガンド結合部位に変異を導入した AhR 変異体を作成し、ヒト肝細胞 HepG2 に発現させた。この細胞が TCDD などの有害化学物質、Tan や quercetin のようなフラボノイドによる刺激に対してどのように応答するかを調べた。指標として DTE を始めとするいくつかの遺伝子の発現変化を見ることとし、Real-time PCR を用いて検討した。

(4) マウスを用いた in vivo 実験によって、TCDD 類似体 (3MC) やフラボノイド類が腸管や肝臓の DTE 発現にどのような影響を及ぼすかを検証した。

(5) マウス脾臓から得られた未分化 T 細胞に AhR アゴニスト活性を持つフラボノイド類を添加し、制御性 T 細胞への分化が誘導されるかどうかを、Foxp3 の発現および T 細胞の増殖抑制活性を指標に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) AhR を制御するフラボノイド

我々は、フラボノイド類やテルペノイド類の中に PXR を活性化するものがあることをすでに報告しているが、本研究の結果、フラボノイドをはじめとする食品因子が、腸管あるいは肝臓での AhR を介した解毒系の活性化に影響することが確認された。TCDD による AhR 活性化を強く抑制することが見出されたフラボノイドのうち、特に Tan のようなメトキシフラボノイドについては、アゴニストとして単独で AhR の活性化を顕著に誘導することが見出された。

そこで、TCDD と Tan による AhR 活性化機構をより詳細に検討することにより、有害化学物質とフラボノイド類の解毒系活性化作用の量的・質的な違いを明らかに出来ると考え以下の実験を行った。

### (2) AhR アゴニストによる処理によって誘導される遺伝子発現変化の網羅的解析

TCDD と Tan により誘導される遺伝子発現変化は多くが共通しており、全体的には顕著な

違いは見出されなかったが、発現亢進した 5 種類の遺伝子の変動パターンを Real-time PCR で再検討したところ、TCDD と Tan ではパターンが異なっていることが見出された。また、発現減少を示した遺伝子に関しても、変化のパターンに違いが見られた。さらに TCDD、Tan 以外の AhR リガンドによる遺伝子発現変化を観察したところ、そのパターンにも違いが見られた。以上の結果から、リガンドによる AhR の刺激には、リガンドに依存する質的な違いが存在することが示唆された。

### (3) AhR の変異体を用いた検討

AhR のリガンド結合部位にアミノ酸の点変異を導入したところ、381 番目の Val の置換が TCDD と FLA に対する応答性を変化させること、新たに導入したアミノ酸の種類によってその変化が顕著に異なることが見出された。

### (4) AhR アゴニスト活性を持つフラボノイドによる制御性 T 細胞の誘導

AhR 結合配列の下流にルシフェラーゼを連結したプラスミドを用いたレポーターアッセイ系でマウス AhR アゴニスト活性を持つフラボノイドを検索したところ、8 種類のフラボノイドが選抜された。これらを用いてマウス脾臓由来の未分化 T 細胞を刺激し、制御性 T 細胞への分化誘導能を調べたところ、1 種類のみ (naringenin) が AhR を介した制御性 T 細胞への分化誘導能を有することが見出された。

上記のような結果から、食品中に含まれるフラボノイドの中には、AhR を活性化し、TDE の発現変動を誘導するものが存在すること、しかし、それが誘導する遺伝子発現は、必ずしも TCDD などの有害化学物質が誘導するそれとは同じではなく、量的には勿論、質的にも異なることが見出された。また、そのような差異は、リガンドと AhR の相互作用の微妙な違いを反映しているものと考えられた。有害異物の侵入に対するバリアとしての解毒酵素系を活性化する上で主体的に働くとされてきた AhR のような転写因子は、フラボノイドのような有益といわれる食品因子によっても活性化されるが、その場合に引き起こされる生体応答は、必ずしも有害化学物質により誘導される応答とは同質ではない有益な応答となることが示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Wang, H-K., Yeh, C-H., Iwamoto, T., Satsu, H., Shimizu, M., Totsuka, M. Dietary flavonoid naringenin induces regulatory T cells via an aryl

hydrocarbon receptor (AhR)-mediated pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 60(9): 2171-2178 (2012)

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. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 8111-8118 (2010)

[学会発表] (計 5 件)

① 王 璽凱、葉 鎮豪、岩本 拓、薩 秀夫、清水 誠、戸塚 護 「柑橘類由来ナリンゲニンにより誘導されるマウス制御性 T 細胞の機能解析」日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 22-25 日 (京都)

② Wang, H-K., Iwamoto, T., Satsu, H., Shimizu, M., Totsuka, M. 「Screening and evaluation of dietary arylhydrocarbon receptors (AhR) ligands inducing differentiation of regulatory T cells」5th International Conference on Functional Foods 2011 年 11 月 21-23 日 (Taipei, Taiwan).

③ Satsu, H., Mizukami, T., Mikubo, A., Tachibana, N., Wanezaki, S., Kohno, M., Hamada, M., Iwayanagi, C., Ogiwara, H., Shimizu, M. 「Induction of detoxification enzymes by equol via activation of pregnane X receptor in human intestinal epithelial cells」5th International Conference on Functional Foods 2011 年 11 月 21-23 日 (Taipei, Taiwan).

④ 王 璽凱、岩本 拓、薩 秀夫、清水 誠、戸塚 護、「Naringenin と食品由来 AHR リガンドによるマウス制御性 T 細胞の誘導機能」日本農芸化学会 2011 年度大会 2011 年 3 月 25-28 日 (京都)

⑤ 三久保 絢之、薩 秀夫、水上 朋彦、濱田 美影、吉田 和敬、牛田 悠介、森 啓信、稲熊 隆博、清水 誠、「ブロッコリースプラウトが AhR に及ぼす影響」日本農芸化学会 関東支部 2010 年度大会 2010 年 10 月 9 日 (千葉)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 誠 (SHIMIZU MAKOTO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教

授

研究者番号：308114507

(2) 研究分担者

なし