

博士論文

野菜由来成分による薬物代謝関連転写因子の
活性化に関する研究

吉 田 和 敬

目次

略称一覧	1
序章.....	3
第一章：ブロッコリースプラウトの熱水抽出物がラット肝臓の薬物代謝に及ぼす影響	7
第一節 緒言	7
第二節：実験方法	8
第三節：結果	16
第四節：考察	25
第二章： AhR 依存的転写活性評価系の確立	29
第一節：緒言	29
第二節：実験方法	30
第三節：結果	35
第四節：考察	44
第三章：AhR 依存的転写活性を有する野菜由来成分の探索	46
第一節：緒言	46
第二節：実験方法	47
第三節：結果	53
第四節：考察	59
第四章：6-ショウガオールの AhR リガンド特性の解明	63
第一節：緒言	63
第二節：実験方法	64
第三節：結果	68
第四節：考察	74
総合討論	80
参考文献	90
論文内容の要旨	100
謝辞.....	104

略称一覧

ABCG 2	ATP-binding cassette transporter subfamily G, member 2
AhR	aryl hydrocarbon receptor
ALT	alanine aminotransferase
APAP	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -aminophenol
APS	ammonium persulfate
ARE	antioxidant response element
ARNT	aryl hydrocarbon nuclear translocator
AST	aspartate aminotransferase
BSA	bovine serum albumin
BHT	butylated hydroxytoluene
CAR	constitutive androstane receptor
CYP	cytochrome P450
DAVID	Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
FARMS	Factor Analysis for Robust Microarray Summarization
FBS	fetal bovine serum
FDR	false discovery rate
FICZ	6-formylindolo[3.2-b]carbazole
GCLC	glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
GO	gene ontology
GST	glutathione S-transferase
HAH	halogenated aromatic hydrocarbon
IgG-HRP	immunoglobulin G-horseradish peroxidase
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
ITE	2-(1 <i>H</i> -indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester
IVT	<i>in vitro</i> transcription
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein1

KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LXR	liver X receptor
3MC	3-methylcholanthrene
MOE	Molecular Operating Environment
NAH	<i>N</i> -acetyl-L-histidine
Nrf2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbon
PBS	phosphate buffered saline
PDB	Protein Data Bank
PLIF	protein-ligand interaction fingerprints
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PVDF	polyvinylidene difluoride
PXR	pregnane X receptor
RP	rank products
RPL	ribosomal protein large-subunit
RPS	ribosomal protein small-subunit
SAhRMs	selective AhR modulators
SDS	sodium dodecyl sulfate
SULT	sulfotransferase
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substances
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEMED	tetramethylethylenediamine
TFA	trifluoroacetic acid
UGT	uridine diphosphate glucuronosyl transferase
XRE	xenobiotic-responsive element

序章

野菜を摂取することの重要性

野菜を摂取することは、我々の健康を良好に維持するために非常に重要である。野菜には、食品の一次機能、即ち栄養機能を担う成分であるビタミン・ミネラル・食物繊維といった栄養成分が豊富に含まれている。それらの成分を十分量摂取することによる健康増進の観点から、厚生労働省の21世紀における国民健康づくり運動(健康日本21)においては、日本人の野菜摂取目標量を350gに設定している。一方で、日本では1980年代半ばに実施された特定研究「食品機能の系統的解析と展開」において、食品の一次機能、二次機能(感覚機能)に加え、三次機能(生体調節機能)の概念が提唱された。また、1990年に始まった米国国立がん研究所の「デザイナーフーズ・プログラム」においては、植物に多く含まれる非栄養素である「ファイトケミカル」によるがんの予防作用の視点が盛り込まれた。このような食品の機能性研究の発展の中で、ポリフェノールやカロテノイドなどのファイトケミカルの様々な生体調節機能が明らかになってきている。上述の通り野菜は、食の一次機能および三次機能の双方において非常に重要な役割を担っているにも関わらず、平成29年国民健康栄養調査における日本人の1日当たりの平均野菜摂取量は約288gであり、目標に遠く届いていない状況である。低迷する野菜の摂取量を増やすために、野菜に含まれるファイトケミカルを初めとした成分の生体調節機能を明らかにするとともに、それを正しく理解し人々に伝えることで、野菜摂取の意義、動機づけに繋げることが重要である。

野菜の成分による生体異物の解毒排出

Lampe は、野菜摂取による疾病予防の主要なメカニズムの1つとして、生体異物の解毒排出を挙げている。また、生体異物の解毒作用を有する可能性のある野菜の成分として、クレソンなどのアブラナ科野菜に含まれるイソチオシアネートやインドール化合物、タマネギやニンニクなどのネギ属野菜に含まれる有機硫黄化合物を挙げている[1]。生体内に取り込まれた外来異物は、主に肝臓や小腸において、薬物代謝酵素により水溶性の物質に代謝され、その後体外に排出される。外来異物の代謝は、一般的に、第1相、第2相、第3相の3段階の薬物代謝酵素の反応によって行われる[2, 3]。第1相反応は、外来異物の酸化プロセスであり、主に cytochrome P450 (CYP) ファミリーの酵素(第1相薬物代謝酵素)

が担う。この反応の結果、もとの成分よりも毒性や反応性の高い物質が産生される場合もある。第 2 相反応においては、第 1 相反応により産生した反応性の高い物質が、グルクロン酸、硫酸、グルタチオンなどに抱合され、水溶性の低毒性の物質に変換される。第 2 相反応は、glutathione-S-transferases (GSTs)、 sulfotransferases (SULTs)、uridine diphosphate glucuronosyltransferases (UGTs) などの抱合化酵素 (第 2 相薬物代謝酵素) によって行われる。第 3 相反応は、40 種類以上の ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターファミリー (第 3 相薬物代謝酵素) で構成されており、外来異物やその代謝物の細胞外への排出に関与している。上述の解毒作用を有する可能性のある野菜の成分は、これらの薬物代謝酵素の発現を亢進することで解毒作用を発揮すると考えられている。

薬物代謝酵素の発現誘導に関与する転写因子

薬物代謝酵素の発現制御には、種々の転写因子が関与している。薬物代謝酵素の発現を誘導する代表的な転写因子として、pregnane X receptor (PXR)、constitutive androstane receptor (CAR) などの核内受容体や、リガンド依存性転写因子である aryl hydrocarbon receptor (AhR) がある[3]。一般的に、これらの転写因子はリガンドが結合すると活性化して核内に移行し、標的となる薬物代謝酵素遺伝子のプロモーター領域にある応答配列のヒストンに結合する。するとヒストンアセチルトランスフェラーゼがリクルートされ、それまでアセチル化され転写能を持たなかったヘテロクロマチンの構造が変化し、ユークロマチンになる。その結果 RNA polymerase II がプロモーター領域に結合できるようになり、薬物代謝酵素の mRNA の転写が開始する[3]。

上記のリガンドの結合により活性化される転写因子以外に、細胞内のレドックス状態を感知して活性化する転写因子である nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) も、薬物代謝酵素の発現制御に重要な役割を果たしている。Nrf2 は定常状態では細胞内で抑制性因子である Kelch-like ECH-associated protein1 (Keap1) と 2 量体を形成している。求電子や酸化によるストレスが細胞内に加わると、Keap1 の Cys 残基のチオール基が修飾される。その結果、Nrf2 と Keap1 の 2 量体が解除され、遊離した Nrf2 が核内に移行し、Maf などのタンパク質と 2 量体を形成して antioxidant response element (ARE) に結合し、薬物代謝酵素の発現を制御する[3]。

AhR

AhRは、生体内の多くの組織に分布するリガンド依存性転写因子であり、薬物代謝のキーレギュレーターの一つである[4]。リガンドの結合により活性化すると、AhRは核内に移行し、aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) と2量体を形成する[5]。このAhR/ARNT複合体は、薬物代謝酵素の遺伝子上流のプロモーター領域に存在するxenobiotic responsive element (XRE) に結合し、第1相薬物代謝酵素であるCYP1A1、CYP1A2、第2相薬物代謝酵素であるUGT1A1、UGT1A6、第3相薬物代謝酵素であるATP-binding cassette transporter subfamily G, member 2 (ABCG 2) などの遺伝子発現を誘導する[3, 6-10]。

一方で、AhRは薬物代謝の制御以外の生体調節にも関与していることが報告されてきている。免疫細胞の多くにはAhRが発現しており、免疫応答に関連する多くの遺伝子のプロモーター領域にはXRE配列が存在しているため、AhRは免疫調節においても重要な役割を果たしている[11]。マクロファージの生存を促進することによる細菌感染からの防御[12]、制御性T細胞 (Treg) と炎症促進性T helper 17細胞 (Th17) の分化制御[13]、腸管上皮細胞間リンパ球数の維持[14]など、自然免疫系、獲得免疫系、腸管免疫系といった多岐にわたる免疫調節への関与が報告されている。また、XREを介さないAhRの生体調節として、リガンド依存性E3ユビキチンリガーゼ活性が知られている[15]。AhRはこのメカニズムにより、大腸がんなどの腫瘍組織に蓄積するタンパク質である β -cateninを分解し、腸管腫瘍の抑制に重要な役割を果たしていることが報告されている。天然のAhRリガンドであるインドール-3-カルビノールや3,3'-ジインドリルメタンなどのインドール化合物には、腸管腫瘍を抑制する作用があることが報告されている[16]。以上を踏まえると、AhRは、薬物代謝の制御以外の生体調節機能を発揮することで、生体防御やホメオスタシスの維持においても重要な役割を果たしていると考えられる。

AhRのリガンド

典型的なAhRリガンドとしては、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を初めとしたハロゲン化芳香族炭化水素 (halogenated aromatic hydrocarbons, HAHs) や、3-methylcholanthrene (3MC) 等の多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) といった環境汚染物質が知られている[17, 18]。これらの物質は、AhRを強力に活

性化し、内分泌を攪乱したり、第1相薬物代謝酵素の発現を顕著に誘導して発がん性の代謝中間体を産生することで、生体に有害な影響を与えることが知られている[19]。

上述のような環境汚染物質とは異なり、食品由来の天然のAhRリガンドも数多く存在する。トリプトファンの代謝物である6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) や、ブロッコリーなどのアブラナ科野菜に豊富に含まれるインドール-3-カルビノールやその代謝物である3,3-ジインドリルメタンなど、食品成分の代謝物がAhRリガンドであることが分かっている[20-22]。また、ケルセチン、ケンフェロール、ナリンゲニンなどのフラボノイド[23-26]、クルクミン[27]など、野菜に含まれる成分そのものが天然のAhRリガンドとなることも示されている。これらの食品由来のAhRリガンドに関しては、上述のインドール化合物による腸管腫瘍の抑制作用[16]の他、ケルセチンによるベンゾ[a]ピレンの排出[10]、ナリンゲニンによるTregの誘導[25]など、AhRを介して生体に対して有益な作用をもたらす可能性も示されている。

本研究の目的

本研究では、野菜由来の成分による薬物代謝への影響を明らかにすることを目的とした。中でも AhR については、薬物代謝の調節にとどまらない多様な生体調節機能への関与が明らかになってきており、野菜由来の成分による AhR の活性化を評価することで、野菜成分による新たな生体調節機能の発見や、生体調節機能の新たなメカニズムの発見に繋がることが期待される。一方で、AhR は TCDD や 3MC などの毒性発現のメカニズムにも関与しているため、それらの成分と野菜成分の AhR リガンドとしての特性の違いを把握することも必要である。

そこで本研究では、まず第一章において、含硫化合物やインドール化合物、ポリフェノールなどを含む野菜であるブロッコリースプラウトを対象に、その熱水抽出物が肝臓の薬物代謝に与える影響を動物試験により詳細に解析した。第二章では、野菜の成分による AhR の活性化作用を詳細に解析するため、AhR 依存的転写活性を評価する細胞評価系を構築した。第三章では、第二章において確立した AhR 依存的転写活性の評価系を用い、各種野菜抽出物による AhR 活性化への影響を評価するとともに、その活性成分の同定を行った。第四章では、第三章で見出された AhR 活性化物質である 6-ショウガオールの AhR 活性化のメカニズムなど、AhR リガンドとしての特性を解析した。

第一章：ブロッコリースプラウトの熱水抽出物がラット肝臓の薬物代謝に及ぼす影響

第一節 緒言

上述の通り、アブラナ科野菜はインドール化合物やイソチオシアネートを豊富に含んでおり、解毒作用を有すると考えられている。中でもブロッコリーの新芽であるブロッコリースプラウトは、抗腫瘍作用を有することが知られており[28, 29]、その抗腫瘍作用には、ブロッコリースプラウトの主要成分であるスルフォラファンによる Nrf2 の活性化を介した薬物代謝酵素の誘導が関与していると考えられている[30]。さらに、ブロッコリースプラウトは、ブロッコリーやカリフラワーなど他のアブラナ科野菜と同程度にインドール化合物を含んでおり[31, 32]、ケルセチンやケンフェロール等のフラボノイドも含まれている[32]。これらの成分は AhR リガンドとして働くことが報告されているため[20, 21, 23-25]、ブロッコリースプラウトによる薬物代謝の亢進には AhR も関与している可能性がある。しかし、ブロッコリースプラウトが AhR の活性化に与える影響はほとんど評価されていない。

そこで本研究では、DNA マイクロアレイ解析を用いて、ブロッコリースプラウトの経口摂取が、薬物代謝に関連するどのシグナルに影響を与えているか詳細に解析することとした。DNA マイクロアレイは、細胞や組織における遺伝子の発現変化を網羅的に解析することが可能な実験手法である[33]。近年、DNA マイクロアレイを用いて、食品成分が細胞や様々な組織における遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析することで、食品の機能性の立証やそのメカニズムを解明する試みがなされるようになってきた。ブロッコリースプラウトに関しては、その主要成分であるスルフォラファンが肝臓の遺伝子発現に与える影響を DNA マイクロアレイにより解析した研究はあるものの[34, 35]、ブロッコリースプラウトそのものを摂取した際の影響を DNA マイクロアレイで解析した報告は無い。

本章では、DNA マイクロアレイを用いて、ブロッコリースプラウト熱水抽出物 (broccoli sprout extract : BSEx) の摂取がラット肝臓の遺伝子発現に与える影響を詳細に解析するとともに、肝臓の解毒作用に与える影響を把握するため、薬物誘導性肝障害の誘導物質として知られているアセトアミノフェン (*N*-acetyl-*p*-aminophenol : APAP) [36]誘導性肝障害に与える影響を調べた。

第二節：実験方法

1. 試験飼料の調製

(1) 試薬

カゼイン、コーンスターチ、スクロース、コーン油、ミネラル混合、ビタミン混合、セルロースはオリエンタル酵母より、重酒石酸コリンは Sigma より購入した。

(2) BSEx の調製

村上農園より購入したブロッコリー種子を水で 2 時間浸漬した後、温度 20-25°C、湿度 80%の育苗室で 18 時間発芽させたブロッコリースプラウトを熱水抽出に用いた。ブロッコリースプラウトを 95°C の熱湯中で 1 時間抽出し、不織布でろ過して残渣を取り除き、BSEx を得た。BSEx を真空エバポレーターで濃縮し、MF-ミリポアフィルターでろ過後、アルミパウチに密封し、飼料調製時まで-20°C で保存した。濃縮後の BSEx 中に含まれるグルコラファニン（スルフォラファン配糖体）濃度は 54.45 mg/g であった。

(3) 試験飼料の調製

AIN-76 飼料に準じて作製した飼料（通常飼料）及び BSEx を混餌した飼料（BSEx 飼料）は、Table 1-1 に示した組成で調製した。予備検討の結果より、340 mg/100 g のグルコラファニンを含む飼料を用いることで、肝臓における薬物代謝酵素の活性が亢進することが示唆されていたため、BSEx 飼料中のグルコラファニン濃度が 340 mg/100 g となるよう BSEx を混餌した。

Table 1-1 試験飼料の組成（単位は g/100 g）

	通常飼料	BSEx 飼料
カゼイン	25.00	25.00
コーンスターチ	40.10	33.86
スクロース	20.00	20.00
コーン油	5.00	5.00
ミネラル配合	3.50	3.50
ビタミン配合	1.00	1.00
重酒石酸コリン	0.40	0.40
セルロース	5.00	5.00
BSEx	-	6.24

2. DNA マイクロアレイ

(1) 試薬

TRIzol は Invitrogen より、Nuclease-Free Water、Magnetic Stand は Ambion より、RNeasy Plus Mini Kit は Qiagen より購入した。GeneChip 3' IVT Express Kit、GeneChip rat genome 230 2.0 array、GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit、GeneChip Scanner 3000、GeneChip Command Console software は Affymetrix より購入した。

(2) 動物飼育

SPF 環境で飼育された 7 週齢雄の Wistar ラット 12 匹を日本 SLC より購入し、動物試験に用いた。動物試験は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づき、カゴメ株式会社の動物・生体試料実験施設管理運営委員会の承認を得て実施した。Wistar ラットは、温度 20 - 24°C、湿度 45 - 65%、明暗サイクル 12 時間周期 (7:00 - 19:00 明期) の環境下で飼育した。水及び飼料の摂取は自由とした。CE-2 固形飼料 (日本クレア) による 5 日間の馴化の後、各群の体重がほぼ同等となるよう、6 匹ずつ Control 群と BSEx 群の 2 群に分け、Control 群に通常飼料を、BSEx 群には BSEx 飼料を 10 日間自由摂取させた。摂取期間終了後、ネンブタール麻酔下で肝臓を摘出し、液体窒素にて急速凍結後、-80°C で保存した。

(3) 肝臓からの Total RNA の抽出

各群 6 匹のうち、体重および摂食量が平均値に近い 4 匹ずつから採取した肝臓を用い、マイクロアレイ用の Total RNA を抽出した。凍結保存した肝臓から切り出した約 50 mg の肝臓塊に、2 mL の TRIzol を加えた。氷上でポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、ホモジネートのうち 1 mL を 1.5 mL エッペンチューブに取り、そこに 200 μ L のクロロホルムを加え、激しく攪拌した。室温で 2-3 分間静置後、4°C、15,000 $\times g$ で 15 分間遠心し、水層 (最上層) を 400 μ L 回収した。そこに同量の 2-プロパノールを混合して軽く攪拌した後 10 分間静置し、4°C、15,000 $\times g$ で 10 分間遠心して RNA の沈殿を得た。上清を除去し、70%エタノール 1 mL を加えた後、4°C、15,000 $\times g$ で 5 分間遠心し、すぐに上清を除いた。この操作をもう一度繰り返した後、エタノールを蒸発させ、Nuclease-Free Water 100 μ L に沈殿を溶解し、Total RNA 溶液を得た。Total RNA の DNase 処理は、

RNeasy Plus Mini Kit を用いて行った。

(4) cDNA の合成

DNA マイクロアレイ用の cDNA の合成、及びビオチン標識増幅 RNA (aRNA) の合成と断片化には、GeneChip 3' IVT Express Kit を用いた。Nuclease-Free Water で 20 ng/ μ L の濃度に希釈した RNA 水溶液 5 μ L (RNA 100 ng) に、First-Strand Buffer Mix 4 μ L と First-Strand Enzyme Mix 1 μ L を加えた。混合液を 42°C で 2 時間インキュベートし、10 μ L の First-Strand cDNA を得た。さらに、Nuclease-free Water 13 μ L、Second-Strand Buffer Mix 5 μ L、Second-Strand Enzyme Mix 2 μ L を加え、16°C で 1 時間インキュベートし、その後 65°C で 10 分間さらにインキュベートすることで、30 μ L の Second-Strand cDNA を得た。

(5) *in vitro* transcription (IVT) 反応による aRNA 合成と断片化

30 μ L の Second-Strand cDNA に、IVT Biotin Label 4 μ L、IVT Labeling Buffer 20 μ L、IVT Enzyme Mix 6 μ L を加え、40°C で 16 時間インキュベートすることで、60 μ L の aRNA を得た。60 μ L の aRNA に、RNA Binding Beads 10 μ L、aRNA Binding Buffer Concentrate 50 μ L を加えた。混合液をキットに付属の U-Bottom Plate のウェルに入れ、120 μ L のエタノールを加え、ピペッティングで軽く攪拌した。プレートシェイカーで 500 rpm 程度の強度で 2 分間穏やかに攪拌することで、aRNA を RNA Binding Beads に吸着させた。その後、U-Bottom Plate を Magnetic Stand の上に 5 分間置くことで、RNA Binding Beads を U-Bottom Plate の底に凝集させた。RNA Binding Beads を乱さずに上清を除去し、U-Bottom Plate を Magnetic Stand から下ろし、100 μ L の aRNA Wash Solution をウェルに加え、プレートシェイカーで 900 rpm、1 分間攪拌し、上記と同様に RNA Binding Beads を凝集させた後、上清を除去した。同様の洗浄作業をもう 1 度繰り返した後、U-Bottom Plate をプレートシェイカーで 1,200 rpm、1 分間攪拌し、エタノールを完全に蒸発させた。予め 55°C に加熱しておいた aRNA Elution Solution を 50 μ L 加え、プレートシェイカーで 1,200 rpm、3 分間攪拌し、RNA Binding Beads を完全に分散させた。さらに、上記と同様に RNA Binding Beads を凝集させた後、上清を回収し、精製 aRNA を得た。15 μ g 分の精製 aRNA に、5 \times Array Fragmentation Buffer を 8 μ L 加え、さらに Nuclease-free

Water を加えて 40 μL にメスアップした。混合液を 94°C で 35 分間インキュベートすることで、断片化 aRNA を得た。

(6) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションには GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit を用いた。断片化された aRNA 33.3 μL (12.5 μg) に 3 nM Control Oligonucleotide B2 を 4.2 μL 、20 \times Eukaryotic Hybridization Controls (bio B, bio C, bio D, cre) を 12.5 μL 、2 \times Hybridization Buffer を 125 μL 、dimethyl sulfoxide (DMSO) を 25 μL 、Nuclease-free Water を 50 μL 混合し、250 μL の Hybridization cocktail を調製した。GeneChip rat genome 230 2.0 array に Hybridization Buffer を 200 μL 注入し、45°C、60 rpm で 10 分間回転させ、Genechip を平衡化した。Hybridization cocktail を 99°C で 5 分間静置し、引き続き 45°C で 5 分間静置した後、13,000 rpm で 5 分間遠心した。GeneChip から Hybridization Buffer を抜き、Hybridization cocktail の遠心上清 200 μL を GeneChip に注入し、45°C、60 rpm で 16 時間ハイブリダイズさせた。

(7) 洗浄、染色、スキャニング

ハイブリダイゼーション終了後のプローブアレイの洗浄と染色は、GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit の洗浄液、染色液と GeneChip Fluidics Station 450 を使い、付属のプロトコールに従って行った。その後、GeneChip Scanner 3000 によりスキャニングを行い、GeneChip Command Console software を用いてプローブセットごとの発現データ (CEL ファイル) に変換した。

(8) データ解析

スキャンして得られたマイクロアレイデータ (CEL ファイル) は、統計解析言語「R」[37] (フリーソフトウェア) および Bioconductor[38] (<http://www.bioconductor.org/>よりダウンロード) によるマイクロアレイデータ解析用パッケージ群を用いて解析を行った。データの正規化は、Factor Analysis for Robust Microarray Summarization (FARMS) アルゴリズム[39]により行った。また、Control 群と BSEx 群間で発現が異なる遺伝子を選抜するための方法としては、FARMS と相性が良いとされている rank products (RP) 法を

採用した[40-42]。BSEx 群で有意に発現が変動した遺伝子の機能分類は、Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) [43] (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) を用いて、Gene Ontology (GO) 解析と Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway 解析により行った。発現変動遺伝子に関連する機能を抽出するためのエンリッチメント解析には、Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) [44]で多重比較補正された EASE score[45]を用いた。

さらに、BSEx 群において発現が有意に増加した遺伝子に関連した既知のシグナル経路、生物学的機能を探索するため、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) [46]を用いた解析を行った。IPA は、Ingenuity 社によりライセンスされているソフトウェアであり、論文情報から構築されたデータベースに基づき、遺伝子発現変化と関連するシグナル経路、生物学的機能の検出が可能なツールである。遺伝子発現変化と関連するシグナル経路や生物学的機能の順位付けにおいては、right-tailed Fisher's exact testにより算出した P 値を用いた。

3. Real-time RT-PCR

(1) 試薬

PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)、SYBR Premix Ex Taq II はタカラバイオより購入した。MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate、7900HT Fast Real-Time PCR System は、Applied Biosystems より購入した。

(2) Total RNA の抽出

マイクロアレイ解析に用いたものと同じ各群 6 匹のラットの肝臓を用いて、2.と同様の方法で total RNA を抽出した。

(3) cDNA の合成

cDNA の合成には PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time) を使用し、全て氷上で行った。Total RNA 2 μg に相当する液量に、Nuclease-Free Water を加え、32 μL にメスアップした。その後、5 \times PrimeScript® RT Master Mix 8 μL を加え、静かに混合した。遠心機で軽く遠心してスピンドウンした後、37°C のヒートブロックの上で 15 分間イ

ンキュベートした。その後、85°C で 5 秒間加熱することで逆転写酵素を失活させ、氷上に回収して反応を停止させた。合成した cDNA は 30°C で保存した。

(4) Real-time RT-PCR

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate の各ウェルに、2 × SYBR Premix Ex Taq II 10 μL、Forward プライマー 0.8 μL、Reverse プライマー 0.8 μL、50 × ROX Reference Dye 0.4 μL、Nuclease-Free Water 6 μL、cDNA 2 μL を混合し、プレートを経心機で約 10 秒間フラッシュし、混合液をプレートの底に落とした。PCR に用いたプライマーの配列は、Table 1-2 に示した。PCR 反応には、7900HT Fast Real-Time PCR System を用いた。プレートを機器に入れ、95°C で 30 秒間熱変性させた後、「熱変性を 95°C で 5 秒間、アニーリングと伸長反応を 60°C で 30 秒間」の PCR 反応を 40 サイクルと、「95°C で 15 秒間、60°C で 60 秒間、95°C で 15 秒間」の解離反応を行った。各遺伝子の発現量は、ハウスキーパー遺伝子である *Actb* (*β-actin*) の発現量に対する相対値を算出し、Control 群の発現量を 1 として算出した。

(5) 統計解析

結果は平均値±標準偏差で表した。Control 群と BSEx 群との間の有意差検定には Student's *t*-test を用い、有意水準 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

Table 1-2 Real-time RT-PCR で用いたプライマー

Gene	Sequence (5'→3')	
<i>Actb</i> (β -actin)	Forward	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	Reverse	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG
<i>Rpl10a</i>	Forward	GAAGAAGGTGCTGTGTTTGGC
	Reverse	TCGGTCATCTTCACGTGGC
<i>Arbp</i>	Forward	GGCGACCTGGAAGTCCAATA
	Reverse	CATTGTCTGCTCCACAATGAA
<i>Rpl15</i>	Forward	GCTTTAGTAGCAGCTGGTGTGTGA
	Reverse	ACCCAAGACGAATTGATTGGAA
<i>Rps16</i>	Forward	TCCAAGGGTCCGCTGCAGTC
	Reverse	CGTTCACCTTGATGAGCCATT
<i>Rpl3</i>	Forward	TGTATTGGAGCTTGGCATCCTG
	Reverse	ACCATCCTTGATGAGGTAGCCTTG
<i>Rps18</i>	Forward	AAGTTTCAGCACATCCAGCGAGTA
	Reverse	TTGGTGAGGTCAATGTCTGCTTTC
<i>Rps3</i>	Forward	GATCATGTGAGCATTGTGGAACCTA
	Reverse	CTCCAGATGCAGCTGCCAAG
<i>Cyp1a2</i>	Forward	TCAACCTCGTGAAGAGCAGCA
	Reverse	GTCCTGGATACTGTTCTTGTGAAGTC
<i>Gstm3</i>	Forward	TTCGTGCAGACATTGTGGAGA
	Reverse	CTTGCCCAGGAACTCAGAGTAGA
<i>Gclc</i>	Forward	GTGGACACCCGATGCAGTATTC
	Reverse	CATCCACCTGGCAACAGTCATTAG
<i>Gsta3</i>	Forward	AATAGGCTGAGCAGGGCTGATG
	Reverse	GGTTGCTGACTCTGGTTCTCAGG
<i>Gstt3</i>	Forward	ATGCCTTTGCCAGGTGAAC
	Reverse	GTGTGCTGCCAAGCCAGGTA
<i>Gstp1</i>	Forward	GAGGACCTTCGATGCAAATATGGTA
	Reverse	CTGGGACAGCAGGGTCTCAA

4. APAP誘導性急性肝障害モデル

(1) 試薬

APAPは Sigmaより購入した。トランスアミナーゼCII-テストワコーは、和光純薬工業より購入した。Total Glutathione Quantification Kitは、同仁化学研究所から購入した。

(2) 動物実験

34匹の6週齢雄Wistarラットを日本SLC社より購入し、試験に用いた。試験飼料には、1.で調製した通常飼料及びBSEx飼料を用いた。動物飼育条件及び馴化の方法は、DNAマイクロアレイの方法に準じた。馴化後、ラットはControl群 (n=6)、BSEx群 (n=8)、

APAP 群 (n = 10)、APAP+BSEx 群 (n = 10) の 4 群に分け、Control 群と APAP 群には通常飼料を、BSEx 群と APAP+BSEx 群には BSEx 飼料を 10 日間給餌した。10 日後、APAP 群と APAP+BSEx 群には、1%メチルセルロースに溶解した APAP を 1000 mg/kg 経口投与することで肝障害を誘導した。Control 群と BSEx 群には、1%メチルセルロースのみを経口投与した。APAP または 1%メチルセルロース投与 24 時間後に、ラットを麻酔し、血液及び肝臓を採取した。血液を $2,000 \times g$ で 10 分間遠心することで血清を調製し、aspartate transaminase (AST) と alanine transaminase (ALT) の測定に用いた。肝臓は生理食塩水で洗浄し、速やかに液体窒素で凍結後、その後の解析まで -80°C にて凍結保存した。

(3) 血清及び肝臓マーカーの解析

血清ASTおよびALTレベルは、トランスアミナーゼCII-テストワコーを用いて測定した。肝臓中グルタチオン (GSH) 濃度は、約100 mgの肝臓に1.0 mLの5% 5-スルフォサリチル酸を加えて氷上でホモジナイズし、遠心分離 ($8,000 \times g$, 10分, 4°C) により得られた上清を用いて、Total Glutathione Quantification Kitにより測定した。肝臓のGST活性は、Habigらの方法により測定した[47]。約0.5 gの肝臓を、10倍量の100 mMリン酸カリウム水溶液 (pH7.4) でホモジナイズし、遠心分離 ($12,000 \times g$, 20分, 4°C) により得られた上清を回収した。上清100 μL に、500 μL の200 mMリン酸カリウム、100 μL の10 mM GSH、100 μL の10 mM 1-chloro- 2,4-dinitrobenzeneを加え、340 nmの吸光度を3分間モニターすることで、GST活性を測定した。肝臓のthiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) 濃度は、Kikugawaらの方法[48]により測定した。約0.5 gの肝臓に9倍量の10 mM Tris-HCl (pH7.4)を加えてホモジナイズし、遠心分離 ($12,000 \times g$, 20分, 4°C) により得られた上清0.2 mLに、0.65 mLの反応溶液 (0.04 mLの5.2% sodium dodecyl sulfate (SDS) 、0.01 mLの0.8% butylated hydroxytoluene氷酢酸溶液、0.28 mLの0.8% TBA、0.32 mLの超純水) 、0.15 mLの20% 酢酸を加え、全量を1.0 mLとした。混合液を 100°C で60分間加温し、室温まで冷却した後、1.0 mLの1-ブタノール/ピリジン (15:1) 混合液で抽出した。抽出液の532 nmにおける吸光度を測定することで、TBARS濃度を算出した。

第三節：結果

1. BSEx により発現が変動した遺伝子の GO 解析

Control 群と BSEx 群間の FDR が 0.05 以下であったものを、群間の発現量に差があるものと定義した。RP 法と FARMS の組合せにより、BSEx 群で発現が増加した 403 遺伝子、発現が減少した 515 遺伝子が見出された。それらのうち、重複が見られたプローブセットや遺伝子が定義されていないプローブセットを除いたところ、BSEx 群で発現が増加した遺伝子は 356 遺伝子、発現が減少した遺伝子は 426 遺伝子となった。さらに、DAVID を用いて、BSEx 群で発現が増加または減少した遺伝子を、GO 解析により機能カテゴリーに分類した。発現が増加または減少した遺伝子の GO 解析の結果、 $P < 0.05$ であった GO term を、それぞれ Table 1-3 と 1-4 に示した。BSEx 群で発現が増加した遺伝子の GO term を P 値が低い順に並べると、‘翻訳伸長 (translation elongation)’、‘有機物への応答 (response to organic substance)’、‘傷害への応答 (response to wounding)’、‘無機物への応答 (response to inorganic substance)’、‘外的刺激への応答 (response to external stimulus)’、‘リボソーム発生 (ribosome biogenesis)’ であった (Table 1-3)。同様に、BSEx 群で発現が減少した遺伝子の GO term は、‘カルボン酸代謝プロセス (carboxylic acid metabolic process)’、‘脂質代謝プロセス (lipid metabolic process)’、‘アルコール代謝プロセス (alcohol metabolic process)’、‘有機物への応答 (response to organic substance)’、‘補酵素代謝プロセス (coenzyme metabolic process)’、‘グルコース代謝プロセス (glucose metabolic process)’ であった (Table 1-4)。

2. BSEx により発現が変動した遺伝子の KEGG pathway 解析

KEGG pathway 解析により、発現変動した遺伝子の機能分類を行った。発現が増加した遺伝子については 3 つの pathway が、発現が減少した遺伝子については 18 の pathway が見出された (Table 1-5)。発現が増加した遺伝子に関連する pathway は、‘リボソーム (Ribosome)’、‘cytochrome P450 による生体異物の代謝 (Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450)’、‘薬物代謝 (Drug metabolism)’ であった。“Ribosome”には、リボソームタンパク質をコードする約 40 種類の遺伝子が含まれており、“Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450”と“Drug metabolism”には、*Cyp*、*Gst*、*Ugt* などの第 1

相及び第 2 相薬物代謝酵素をコードする遺伝子が含まれていた。発現が減少した KEGG pathway は、脂質及び糖の代謝に関連するものが中心であった。

3. BSEx により発現が増加した遺伝子の IPA 解析

発現が増加した 356 遺伝子を IPA 解析に供したところ、 $P < 0.05$ を示す 15 のパスウェイが見出された。Table 1-6 に示すように、‘EIF2 シグナル (EIF2 signaling)’、‘eIF4 及び p70S6K シグナルの制御 (regulation of eIF4 and p70S6K signaling)’、‘mTOR シグナル (mTOR signaling)’ が特に P 値の低いパスウェイとして見出され、これらにはリボソームタンパク質をコードする遺伝子が含まれていた。一方、15 のパスウェイのうち 6 つ、すなわち、‘NRF2 を介した酸化ストレス応答 (NRF2-mediated oxidative stress response)’、‘cytochrome P450 による生体異物の代謝 (metabolism of xenobiotics by cytochrome P450)’、‘グルタチオン代謝 (glutathione metabolism)’、‘アрил炭化水素受容体シグナル (aryl hydrocarbon receptor signaling)’、‘生体異物代謝シグナル (xenobiotic metabolism signaling)’、‘ペントースとグルクロン酸の相互変換 (pentose and glucuronate interconversions)’ は、薬物代謝と関連するものであった。これらには、*Cyp*、*Gst*、*Ugt*、*glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (Gclc)* といった、第 1 相や第 2 相薬物代謝酵素やグルタチオン合成酵素をコードする遺伝子が含まれていた。

4. Real-time RT-PCR による DNA マイクロアレイの再現性

DNA マイクロアレイ解析により、BSEx 群ではタンパク質合成や薬物代謝、グルタチオン代謝に関連する遺伝子の発現が増加していることが明らかとなった。そこで、これらの遺伝子の発現が実際に増加しているか否かを明らかにするため、より定量性の高い Real-time RT-PCR により mRNA 発現量の定量を行った。なお、BSEx 群の 1 個体については、内部標準である β -actin の発現量が異常値を示したため、解析から除外した。Table 1-7 に、DNA マイクロアレイ解析における各遺伝子の FDR 値、及び、Real-time RT-PCR による相対発現量の変化を示した。DNA マイクロアレイ解析で $FDR < 0.01$ であった Ribosome に関連する 7 つの遺伝子のうち、*ribosomal protein small-subunit (Rps) 3* の発現量のみが BSEx 群で有意に増加 ($P < 0.05$) しており、その他の遺伝子の発現量は増加していなかった。一方、薬物代謝またはグルタチオン代謝に関連する 6 つの遺伝子のうち、

Cyp1a2、*Gclc*、*Gsta3*の3つの遺伝子の発現量が BSEx 群で有意に増加していた。

5. BSEx が APAP 誘導性急性肝障害に与える影響

Control 群と BSEx 群の間には、いずれの指標においても有意な差はなく、摂食量にも群間で差は見られなかった（データは示していない）。一方、肝臓の GST 活性や GSH 濃度については、有意な差はないものの、Control 群と比較し BSEx 群で平均値が高い値を示した（Table 1-8）。APAP 群においては、体重、肝重量、肝重量/体重、肝臓の GSH 濃度が Control 群に比べて有意に低下したが、それらの低下は、APAP+BSEx 群においては有意に抑制された。また、APAP 群の AST、ALT、TBARS は Control 群比とべて有意に上昇したが、それらの上昇は、APAP+BSEx 群においては有意に抑制された（Table 1-8）。

Table 1-3 BSEx の撮取で発現が有意に増加した遺伝子の GO 解析の結果 ($P < 0.05$ の中で P 値が低いカテゴリーを選抜)。†は P 値が 0.05 以上の GO term を、*はツリーの最下層に位置する GO term を示す。

GO ID	GO term	No. of genes	FDR-corrected P value
0008152	Metabolic process	176	2.44×10^{-7}
0051186	Cofactor metabolic process*	13	4.54×10^{-2}
0042180	Cellular ketone metabolic process*	26	1.66×10^{-2}
0019752	Carboxylic acid metabolic process	25	2.65×10^{-2}
0006575	cellular amino acid derivative metabolic process*	12	3.49×10^{-2}
0006807	Nitrogen compound metabolic process	67	2.91×10^{-2}
0019538	Protein metabolic process	81	6.40×10^{-3}
0006412	Translation	45	6.25×10^{-15}
0006414	Translation elongation*	38	9.81×10^{-34}
0071840	Cellular component organization or biogenesis†		
0042254	Ribosome biogenesis	13	7.21×10^{-5}
0042273	Ribosomal large subunit biogenesis*	4	2.12×10^{-2}
0042274	Ribosomal small subunit biogenesis*	7	2.15×10^{-5}
0006364	rRNA processing*	10	6.95×10^{-4}
0032502	Developmental process	84	8.83×10^{-3}
0048513	Organ development	63	7.72×10^{-4}
0001889	Liver development*	8	2.82×10^{-2}
0030323	Respiratory tube development*	10	2.81×10^{-2}
0009888	Tissue development	33	7.37×10^{-4}
0030855	Epithelial cell differentiation*	10	2.51×10^{-2}
0042692	Muscle cell differentiation	11	1.30×10^{-2}
0055002	Striated muscle cell development*	7	3.47×10^{-2}
0050896	Response to stimulus	110	3.65×10^{-2}
0009628	Response to abiotic stimulus*	21	2.14×10^{-2}
0042221	Response to chemical stimulus†		
0010035	Response to inorganic substance	23	1.72×10^{-5}
0010038	Response to metal ion*	16	7.65×10^{-4}
0042493	Response to drug*	18	3.01×10^{-2}
0010033	Response to organic substance	52	2.39×10^{-7}
0009725	Response to hormone stimulus	26	8.85×10^{-3}
0048545	Response to steroid hormone stimulus	20	2.00×10^{-3}
0051384	Response to glucocorticoid stimulus*	11	1.66×10^{-2}
0009605	Response to external stimulus*	42	6.71×10^{-5}
0006950	Response to stress	61	2.11×10^{-5}
0009611	Response to wounding	32	9.51×10^{-7}
0042060	Wound healing*	12	4.39×10^{-2}
0006954	Inflammatory response	19	1.62×10^{-4}
0002526	Acute inflammatory response*	15	1.72×10^{-6}
0002376	Immune system process†		
0019724	B cell mediated immunity	8	6.61×10^{-3}
0006958	Complement activation, classical pathway*	5	2.83×10^{-2}
0019882	Antigen processing and presentation†		
0002495	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class II*	5	1.03×10^{-2}
0002682	Regulation of immune system process	25	3.31×10^{-4}
0050776	Regulation of immune response*	15	1.56×10^{-2}
0065007	Biological regulation†		
0051726	Regulation of cell cycle*	15	3.46×10^{-2}
0048518	Positive regulation of biological process	64	1.33×10^{-2}
0010942	Positive regulation of cell death	18	3.55×10^{-2}
0043065	positive regulation of apoptosis*	18	3.22×10^{-2}
0045639	Positive regulation of myeloid cell differentiation	6	2.98×10^{-2}
0002763	positive regulation of myeloid leukocyte differentiation*	5	2.83×10^{-2}
0065008	Regulation of biological quality	50	1.28×10^{-2}
0034101	Erythrocyte homeostasis*	7	2.76×10^{-2}
0048519	Negative regulation of biological process*	54	3.61×10^{-2}

Table 1-4 BSEx の摂取で発現が有意に減少した遺伝子の GO 解析の結果 ($P < 0.05$ の中で P 値が低いカテゴリーを選抜)。†は P 値が 0.05 以上の GO term を、*はツリーの最下層に位置する GO term を示す。

GO ID	GO terms	No. of genes	FDR-corrected P value
0008152	Metabolic process	219	2.82×10^{-14}
0044238	Primary metabolic process	177	1.12×10^{-6}
0006629	Lipid metabolic process	79	1.78×10^{-28}
0008202	Steroid metabolic process	24	7.11×10^{-9}
0006694	Steroid biosynthetic process*	10	5.09×10^{-3}
0008610	Lipid biosynthetic process	26	4.24×10^{-6}
0044255	Cellular lipid metabolic process	58	1.33×10^{-20}
0006641	Triglyceride metabolic process*	12	3.02×10^{-6}
0006631	Fatty acid metabolic process	40	3.39×10^{-22}
0019395	Fatty acid oxidation	15	1.39×10^{-10}
0006635	Fatty acid beta-oxidation*	11	8.03×10^{-8}
0009062	Fatty acid catabolic process*	14	3.77×10^{-10}
0001676	Long-chain fatty acid metabolic process*	7	2.18×10^{-4}
0005975	Carbohydrate metabolic process	29	1.37×10^{-3}
0006006	Glucose metabolic process*	19	3.62×10^{-5}
0044281	Small molecule metabolic process†		
0006766	Vitamin metabolic process*	10	6.41×10^{-3}
0006066	Alcohol metabolic process*	41	2.28×10^{-11}
0044237	Cellular metabolic process	179	1.73×10^{-9}
0019752	Carboxylic acid metabolic process	75	3.78×10^{-31}
0043648	Dicarboxylic acid metabolic process*	10	2.86×10^{-5}
0046394	Carboxylic acid biosynthetic process*	19	3.78×10^{-6}
0051186	Cofactor metabolic process	20	6.22×10^{-5}
0051187	Cofactor catabolic process*	7	5.33×10^{-3}
0006732	Coenzyme metabolic process	19	9.64×10^{-6}
0006084	Acetyl-CoA metabolic process*	10	2.32×10^{-5}
0034754	Cellular hormone metabolic process*	10	1.49×10^{-3}
0006091	Generation of precursor metabolites and energy*	18	5.98×10^{-3}
0050896	Response to stimulus†	113	
0031667	Response to nutrient levels*	20	5.39×10^{-3}
0010033	Response to organic substance	56	3.22×10^{-7}
0009725	Response to hormone stimulus	32	3.99×10^{-4}
0043434	Response to peptide hormone stimulus*	17	8.14×10^{-3}
0042493	Response to drug*	24	6.31×10^{-4}

Table 1-5 BSEx の摂取により発現が変動した遺伝子の KEGG pathway 解析の結果 ($P < 0.05$)。

	KEGG ID	Pathway	P value
Up-regulated	rno03010	Ribosome	3.97×10^{-43}
	rno00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1.19×10^{-3}
	rno00982	Drug metabolism	4.01×10^{-3}
Down-regulated	rno00071	Fatty acid metabolism	2.42×10^{-17}
	rno03320	PPAR signaling pathway	2.42×10^{-12}
	rno00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	5.75×10^{-8}
	rno00620	Pyruvate metabolism	8.79×10^{-7}
	rno01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	8.34×10^{-7}
	rno00650	Butanoate metabolism	1.21×10^{-6}
	rno00830	Retinol metabolism	5.97×10^{-6}
	rno00982	Drug metabolism	7.15×10^{-6}
	rno00640	Propanoate metabolism	1.06×10^{-5}
	rno00020	Citrate cycle (TCA cycle)	4.94×10^{-5}
	rno00120	Primary bile acid biosynthesis	5.63×10^{-5}
	rno00140	Steroid hormone biosynthesis	7.09×10^{-4}
	rno00561	Glycerolipid metabolism	7.78×10^{-4}
	rno00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	3.66×10^{-3}
	rno00380	Tryptophan metabolism	3.95×10^{-3}
	rno00983	Drug metabolism	4.29×10^{-3}
	rno00500	Starch and sucrose metabolism	9.28×10^{-3}
rno00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	2.46×10^{-2}	

Table 1-6 BSEx の摂取により発現が増加した遺伝子の IPA 解析の結果、 $P < 0.05$ を示した pathway

Ingenuity Canonical Pathways	P-value
EIF2 Signaling	3.16×10^{-23}
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	2.69×10^{-8}
mTOR Signaling	3.24×10^{-7}
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	1.41×10^{-4}
Metabolism of Xenobiotics by Cytochrome P450	1.45×10^{-4}
Glutathione Metabolism	1.32×10^{-3}
Arachidonic Acid Metabolism	8.13×10^{-3}
Acute Phase Response Signaling	1.00×10^{-2}
B Cell Development	1.66×10^{-2}
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1.91×10^{-2}
ERK/MAPK Signaling	2.75×10^{-2}
Xenobiotic Metabolism Signaling	2.75×10^{-2}
Eicosanoid Signaling	2.75×10^{-2}
Complement System	2.75×10^{-2}
Pentose and Glucuronate Interconversions	2.75×10^{-2}

Table 1-7 BSEx の摂取により発現が変化した遺伝子の Real-time RT-PCR の結果

Gene Symbol	FDR-corrected P value	Control		BSEx		
		Mean	SD	Mean	SD	
Ribosome						
<i>Rpl10a</i>	0.0018	1.00	0.06	0.82**	0.05	
<i>Arbp</i>	0.0056	1.00	0.13	0.86	0.24	
<i>Rpl15</i>	0.0058	1.00	0.14	0.80	0.23	
<i>Rps16</i>	0.0058	1.00	0.11	0.75*	0.18	
<i>Rpl3</i>	0.0068	1.00	0.12	1.07	0.20	
<i>Rps18</i>	0.0086	1.00	0.06	1.00	0.17	
<i>Rps3</i>	0.0096	1.00	0.05	1.34*	0.27	
Xenobiotic/glutathione metabolism						
<i>Cyp1a2</i>	0.0001>	1.00	0.32	2.43**	0.66	
<i>Gstm1</i>	0.0001>	1.00	0.13	1.23	0.30	
<i>Gclc</i>	0.0014	1.00	0.06	1.32*	0.23	
<i>Gsta3</i>	0.0018	1.00	0.13	1.58*	0.43	
<i>Gstt3</i>	0.0018	1.00	0.19	1.03	0.05	
<i>Gstp1</i>	0.0287	1.00	0.14	0.94	0.30	

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Control (Student's *t*-test)

Table 1-8 BSEx 摂取が APAP 誘導性肝障害モデルラットの生体マーカーに与える影響

Marker	Control		BSEx		APAP		APAP+BSEx	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Body Weight (g)	188.45	10.38	190.90	11.36	172.39	9.91	183.63	8.87
Body weight gain after i.p (g)	3.88 ^a	1.77	3.59 ^a	1.53	-11.21 ^b	3.3	-1.05 ^c	2.84
Liver Weight (g)	8.46 ^{ac}	0.44	9.13 ^a	0.69	6.90 ^b	0.58	8.11 ^c	0.85
Liver /Body	0.045 ^{ac}	0.001	0.048 ^a	0.002	0.040 ^b	0.002	0.044 ^c	0.003
AST (IU/L)	71.41 ^a	6.99	59.98 ^a	8.46	5614.41 ^b	1997.83	70.91 ^a	15.74
ALT (IU/L)	12.51 ^a	0.57	9.81 ^a	1.84	1297.71 ^b	447.33	11.78 ^a	2.08
GST activity (U/g tissue)	61.78 ^{ab}	4.95	77.89 ^a	4.62	51.90 ^b	16.85	93.19 ^c	16.55
TBARS(μmol/g tissue)	462.68 ^a	36.57	420.95 ^a	23.66	751.12 ^b	220.87	496.63 ^a	37.21
GSH(nmol/g tissue)	2.73 ^a	0.26	2.99 ^a	0.29	1.66 ^b	0.59	2.61 ^a	0.75

異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)。

第四節：考察

動物試験における BSEx の投与方法について

本試験では、BSEx がラット肝臓の薬物代謝に与える影響を解析するために、BSEx 飼料を 10 日間ラットに継続摂取させた。その結果、BSEx を摂取することによる体重への有意な影響は見られず (Table 1-8)、摂食量も通常飼料を摂取した群と差が無かった (データは示していない)。一方で既報においては、ブロッコリースプラウト抽出物を含有する飼料を摂取したマウスは、通常飼料を摂取するマウスよりも体重が増加しにくく、その理由として、ブロッコリースプラウトの苦い香味により、摂食量が減少することが挙げられていた [49]。既報と異なる本試験の結果に関しては、2 つの要因が関与していると考えている。1 つは、ブロッコリースプラウトの熱水抽出時の温度の影響である。既報においては、ブロッコリースプラウトを 60°C で緩やかに加熱するか、または 5 分間スチームすることで抽出物を得ていた [49]。そのような加工条件ではミロシナーゼは失活しないため、グルコシノレートが辛味を呈するイソチオシアネートに変換されたものと考えられる。2 つ目の要因は、ブロッコリースプラウトの発芽日数である。我々は、発芽 1 日後のブロッコリースプラウトを用いて抽出物を調製したが、既報においては、発芽 6 日後のブロッコリースプラウトを用いていた [49]。ブロッコリースプラウトに含まれるフェノール性化合物の含量は、その発芽段階に応じて増加することが報告されており [50]、発芽 6 日後のブロッコリースプラウトは、苦味成分であるフェノール性化合物の含量が、発芽 1 日後のものより多いと考えられる。以上より、既報の試験においては、イソチオシアネートやフェノール性化合物の香味により、ラットがブロッコリースプラウト抽出物を含有する飼料を摂取するのを避けたが、今回の試験ではそれらの成分による香味への影響が少なく、摂食量や体重に影響を与えなかったと推測される。

BSEx の投与量に関しては、予備検討の結果も踏まえ、100 g 飼料当たり 340 mg のグルコラファニンを含むように BSEx を混餌し試験に用いた。ラットの 1 日当たりの摂餌量が 15 g 程度であること、及びラットの体重が 200 g 程度であることを考えると、ラットは約 200-300 mg/kg 体重のグルコラファニンを毎日摂取していたと推測される。既報において、30-60 mg/kg 体重のグルコラファニンの投与は、臓器にダメージを与えることなく第 2 相薬物代謝酵素である NQO1 の発現を増加させるが、120-240 mg/kg 体重のグルコラファニン

の投与はラットの肝臓において酸化ストレスを引き起こす可能性が報告されている[51, 52]。しかし本試験においては、BSEx の投与により AST、ALT、TBARS の増加や GSH の減少は見られなかった (Tables 1-8) ことから、本試験における BSEx の投与量は妥当であったと考えられた。

BSEx による肝臓の遺伝子発現変化について

DNA マイクロアレイ及び Real-time RT-PCR 解析の結果、BSEx 飼料の摂取により、ラット肝臓の第 1 相及び第 2 相薬物代謝酵素の遺伝子発現が亢進することが示された (Table 1-3、Table 1-5、Table 1-7)。また、IPA 解析の結果より、Nrf2 や AhR が、BSEx による薬物代謝酵素関連遺伝子の発現誘導に寄与していることが示唆された (Table 1-6)。Nrf2 と AhR は薬物代謝酵素の発現誘導に関与する代表的な転写因子である[3]。BSEx の摂取により、Nrf2 の活性化と AhR の活性化が共に起こり、その結果、薬物代謝酵素の発現が誘導されたと考えられる。

BSEx の摂取により発現量が減少した遺伝子として、脂質代謝に関連する遺伝子が多く見出された (Table 1-4、Table 1-5)。Nrf2 欠損マウスのプロテオミクス解析により、Nrf2 の欠損により脂質代謝に関連する多くのタンパク質の発現が増加することが示されており[53]、脂質代謝関連の遺伝子発現は Nrf2 によりネガティブな制御を受けることが示唆されている。この報告を踏まえると、BSEx による Nrf2 の活性化が脂質代謝関連遺伝子の発現減少に寄与している可能性があるが、本試験の結果からはその関連性については解析できなかった。

ブロッコリースプラウト中の AhR 活性化物質について

本試験に用いた BSEx に含まれるグルコシノレートのプロファイルは完全に明らかに出来ていないが、既報[28, 30, 54, 55]によってそれを推測することは可能である。既報においては、ブロッコリースプラウトに含まれるグルコシノレートのうち約 70%はグルコラファニンであり、本試験の BSEx 中の主要なグルコシノレートもグルコラファニンであると考えられる。グルコラファニンは、生体内で配糖体が切れてスルフォラファンに変換される。スルフォラファンは、Nrf2 を介して第 2 相薬物代謝酵素の発現を誘導することが知られており[28, 32, 56, 57]、BSEx 投与による肝臓での Nrf2 シグナルの誘導には、体内において

グルコラファニンから産生されたスルフォラファンが関与している可能性がある。

一方、スルフォラファンによる AhR の活性化については、報告はあるものの[58]、その数は非常に少なく、BSEx による AhR の活性化にはスルフォラファン以外の成分が関与している可能性がある。ブロッコリースプラウトには、グルコラファニンに比べると少ない割合ではあるが、グルコイベリン、グルコエルシン、4-メチルチオブチルイソチオシアネート及び複数のインドールグルコシノレートが含まれており[28, 30, 54, 55]、それらが本試験で用いた BSEx にも含まれていた可能性がある。上記のうち、インドールグルコシノレートやその変換体は AhR を活性化することが知られている[59, 60]。また、ブロッコリースプラウトには、ケルセチンやケンフェロールなどのフラボノイドも含まれており[32]、それらの成分は AhR を活性化するという報告がある[26, 61]。以上より、インドールグルコシノレートやケルセチン、ケンフェロール等が、BSEx に含まれる AhR 活性化物質の有力な候補であると考えられる。

BSEx による APAP 誘導性肝障害の抑制について

APAP は肝臓中の GSH の減少と酸化ストレスの亢進を介して、肝障害を誘導することが知られている[62]。さらに APAP 誘導性肝障害においては、肝臓の GST 活性が減少することが報告されている[63]。本試験において、APAP 摂取により、肝臓中の TBARS の増加、GSH 量と GST 活性の低下が確認されており (Table 1-8)、これらは APAP 誘導性肝障害の特徴を示す結果であると考えられる。一方、BSEx は APAP 誘導性肝障害を抑制し、肝臓中の TBARS 濃度、GST 活性、GSH 濃度を改善させた (Table 1-8)。遺伝子発現解析により、グルタチオン合成の律速酵素の一つである *Gclc* の遺伝子発現が BSEx の摂取により増加していた。この *Gclc* の発現増加が、抗酸化作用を有する GSH 濃度の低下を抑制し、酸化ストレス (TBARS) の改善に寄与していると考えられる。また、APAP の反応中間体である高毒性の *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine は、GST により、グルタチオンで抱合され無毒化されることが知られている[64]。BSEx の摂取により肝臓の *Gst* 遺伝子発現量が増加していたことから、BSEx の摂取は肝臓の *Gst* 遺伝子の発現を増加させるとともに GST 活性を亢進させ、APAP 誘導性肝障害を抑制したことが示唆された。

第一章では、薬物代謝を亢進する代表的な野菜であるブロッコリースプラウトの熱水抽

出物の摂取により、ラット肝臓の薬物代謝が亢進することを示した。さらに、そのメカニズムとして、これまでにブロッコリースプラウトの作用メカニズムとして知られていた Nrf2 の他、AhR が関与していることが示唆された。ブロッコリースプラウトに含まれる AhR 活性化物質であると考えられるインドール化合物やフラボノイドは、野菜に広く含まれる成分であるため、他の野菜においても、AhR を活性化させる作用が見られる可能性があると考えられた。一方で、AhR を活性化する野菜素材や成分を見出すためには、多数の野菜抽出物や野菜由来成分の AhR への影響を効率的に評価する必要がある。そこで第二章では、AhR を活性化する素材や成分を効率的に探索するため、AhR 依存的転写活性の評価系を確立することとした。

第二章： AhR 依存的転写活性評価系の確立

第一節：緒言

第一章において、スルフォラファンやインドール化合物、フラボノイドを含む野菜であるブロッコリースプラウトの熱水抽出物を動物に経口投与することにより、Nrf2やAhRの標的となる薬物代謝関連遺伝子の発現が肝臓において亢進することが明らかとなり、ブロッコリースプラウトによる肝臓での薬物代謝の亢進において、AhRも重要な役割を果たしている可能性が考えられた。一方、ブロッコリースプラウト中のAhR活性化物質であると考えられるインドール化合物やフラボノイドは、ブロッコリースプラウト以外の野菜にも広く含まれる成分である。従って、他の野菜を摂取することで、AhRの活性化を介した効果が見られる可能性がある。AhRの活性化が種々の生理作用と関連していることを考えると、野菜素材や野菜由来の成分によるAhR活性化を研究することは、野菜摂取による生体調節機能を解明する上で重要であると考えられる。

AhRを活性化する野菜やその成分を見出すには、AhRの活性化を効率的に評価する必要がある。これまで、AhRの活性化の評価には、プロモーター配列に複数のXREを含むCYP1A1の転写活性を指標とした系が用いられてきた[65-67]。しかし、AhRの活性化は、必ずしもCYP1A1の転写活性と一致しないことが分かっている[68, 69]。

そこで本章では、AhR依存的な転写活性をより特異的かつ安定に評価するため、ルシフェラーゼ遺伝子上流にXRE配列をタンデムに導入したAhR応答性ベクターと、ヒトAhRのオープンリーディングフレームを導入したAhR発現ベクターを、ヒト肝がん由来細胞株HepG2に安定的に共トランスフェクションしたAhR応答性安定HepG2細胞株を樹立することとした。また、樹立した細胞株を用い、各種のAhRリガンドに対する応答性を確認した。

第二節：実験方法

1. AhR応答性安定HepG2細胞株の構築

(1) ベクター (Figure 2-1)

ベクターは、東京大学食糧化学研究室で作製されたものを用いた。pcDNA-hAhR (AhR発現ベクター) は、*Eco* RVサイトを導入したプライマー (5-ATAAGCTTTGGGCACCATGAACAGC-3) と、*Hind* IIIサイトを導入したプライマー (5-CCGATATCTCAGGAATCCACTGGATGTC-3) を用いて、HepG2細胞からPCRで増幅したヒトAhRオープンリーディングフレームを、pcDNA3.1/myc-Hisベクター (Invitrogen) にライゲーションしたものを用いた (Figure 2-1 A)。pGL3-XRE (AhR応答ベクター) は、XRE配列 (GCGTG) をタンデムに3つアレンジしたオリゴDNAをアニーリングさせ、*Kpn* I、*Xho* IによるDigestionを行ったpGL3プロモーターベクター (Promega) にライゲーションすることで構築した (Figure 2-1 B)。

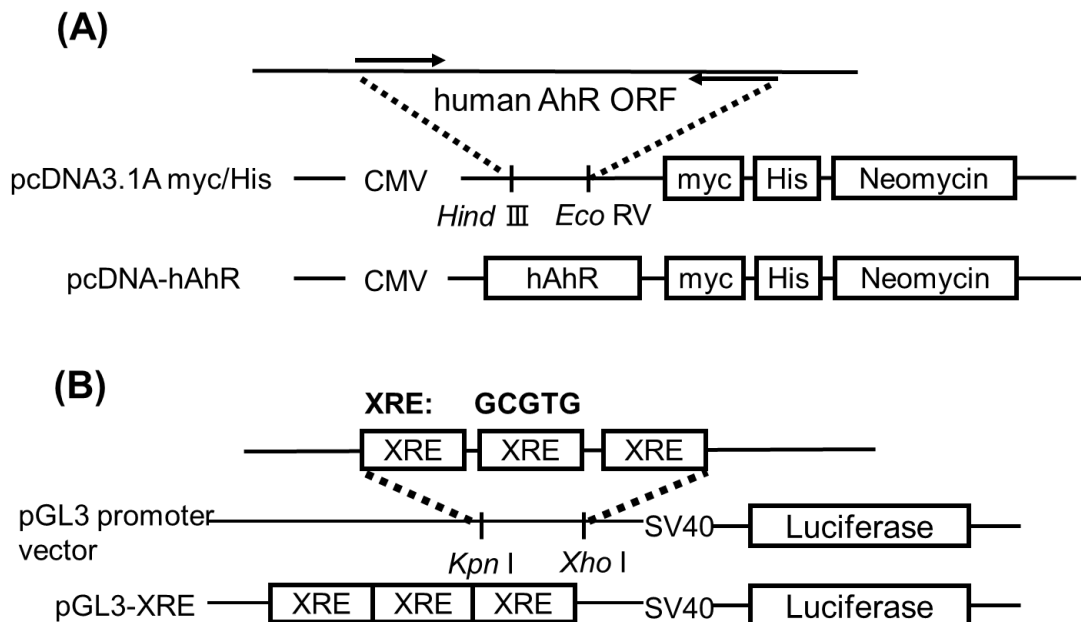


Fig. 2-1 (A) pcDNA-hAHR (AhR発現ベクター)、(B) pGL3-XRE (AhR応答ベクター)

(2) 細胞

ヒト肝臓癌由来株化細胞である HepG2 細胞は American Type Culture Collection より購

入した。

(3) 器具、試薬

ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium、DMEM) 高グルコースは和光純薬工業より購入した。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum、FBS) は旭テクノグラスより購入した。Phosphate buffered saline (PBS) (-) 粉末は日水製薬より購入した。G418 disulfate はナカライテスクより購入した。Lipofectamine、PLUS reagent、0.25% Trypsin-EDTA、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液は Gibco より購入した。コラーゲン type I-C は、新田ゼラチンより購入した。24 ウェルプレートは Corning-Costar より購入した。

(4) 試薬類の調製

PBS (-) は、PBS (-) 粉末 4.8 g を超純水 500 mL に溶かし、オートクレーブ (121°C、20 分) することで調製した。HepG2 細胞用培地は、FBS (56°C で 30 分間不活化処理したもの) 56 mL、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (ペニシリン濃度 10,000 U/mL、ストレプトマイシン濃度 10 mg/mL) 2 mL を、500 mL の DMEM 高グルコースに混合することで調製した。

(5) プレートのコラーゲンコーティング

コラーゲン type I-C 溶液を 0.02 N HCl で 15 倍希釈したものを、24 ウェルプレートに 250 μ L ずつ加え、30 分静置した。その後、コラーゲンを取り除き、PBS(-) 500 μ L で 2 回洗浄した。

(6) 細胞培養

培養には 100 mm ディッシュを用い、HepG2 細胞用培地にて、5% CO₂、37°C の環境下にて培養を行った。培地は 1 日ないし 2 日おきに新しいものと交換し、細胞が 80% コンフルエントに達したら、以下の通り継代を行った。

100 mm ディッシュより培地を除いて 10 mL の PBS (-) で細胞を洗浄後、0.25% Trypsin-EDTA を 2 mL 加え、37°C インキュベーター内で 3 分程度放置した。細胞が完全にデ

ディッシュから剥がれたら、培地を9 mL加えて細胞を50 mL遠沈管に回収した。十分にピペッティングした後、40 μ Lを細胞数計測用に分け、トリパンプルー溶液で5倍希釈し、細胞数の計測を行った。残りの細胞懸濁液を300 $\times g$ で3分間遠心し細胞を沈殿させた。上清を除去後、新しい培地を加えて 2.0×10^5 cells/mLの細胞懸濁液を作製し、100 mmディッシュに、 $4.0 \times 10^5 \cdot 1.0 \times 10^6$ cells/wellになるよう細胞を播種した。

(7) 遺伝子導入

AhR 発現ベクターと AhR 応答ベクターは、既報[66]の方法に準じ、Lipofectamine と PLUS reagent を用いたリポフェクタミン法により、HepG2 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入の前日に、 2×10^5 cells の細胞を 60 mm ディッシュに播種し、50-60%コンフルエントに達したら、ディッシュ中の培地を無血清培地に交換した。1 時間後、プラスミド DNA 2 μ L と PLUS reagent 8 μ L を 250 μ L の無血清培地で希釈し、軽くボルテックスした後、室温で 15 分間インキュベートした (溶液 A)。次に、Lipofectamine 12 μ L を 250 μ L の無血清培地で希釈し、溶液 A と混合した後軽くボルテックスし、室温で 15 分間インキュベートした (溶液 B)。HepG2 細胞のディッシュ中の培地を 2 mL の無血清培地に交換した後、500 μ L の溶液 B をディッシュに加えてインキュベートし、3 時間後に通常の HepG2 細胞用培地に交換した。

(8) 発現株の選択とコロニーの単離

遺伝子導入に引き続き、プラスミド DNA が安定的に導入されたコロニーを選抜するため、ネオマイシン選択を行った。遺伝子導入後の細胞がコンフルエントになるのを待って継代し、遠心後に得られた細胞を通常の HepG2 細胞用培地 1 mL に懸濁して、あらかじめ 10 mL の培地を入れておいた 100 mm ディッシュ 5 枚に細胞懸濁液をそれぞれ 200 μ l 加え、コンフルエントになるまで培養した。その後、ネオマイシンアナログである G418 を 500 μ g/mL の濃度で含む HepG2 細胞用培地 (選択培地) に交換し、コロニーが現れるまで 2 週間培養した。

選択培地で培養を続けたディッシュのうち、各コロニーが十分に離れているものを選んでペニシリンキャップ法によりコロニーを単離した。まずディッシュに培養した細胞を PBS (-) で洗浄し、グリースをつけた金属キャップを単離するコロニーに被せて固定した。

次にキャップ内にトリプシンを適量滴下し、細胞が剥離するまでインキュベートした。続いてキャップ内に選択培地を適量滴下し、あらかじめ 500 μ l の選択培地を入れておいたコラーゲンコート済みの 24 ウェルプレートに細胞懸濁液を回収 (1 ウェルあたり 1 コロニー) して培養し、コンフルエントになったら 48 ウェルプレートに継代した。48 ウェルに培養した際に、ルシフェラーゼアッセイを行うのに十分な細胞数 (50%コンフルエント/well 以上) を示したコロニーを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。

2. ルシフェラーゼアッセイ

(1) 器具、試薬

Dual-luciferase reporter assay system は Promega より購入した。ルミノメーターは Berthold Technologies 製のもの (LB9507 Lumet ルミノメーター) を用いた。ルミノメーターチューブはアシストより購入した。

3MC は Sigma より購入した。ベンゾ[a]ピレン (BEN)、インディゴ (IND)、2-(1H-インドール-3-yl カルボニル)-4-チアゾールカルボキシ酸メチルエステル (ITE)、FICZ は和光純薬工業より購入した。各化合物は、DMSO に 10 mM の濃度で溶解し、試験に用いるまで冷凍保存した。

(2) 細胞へのサンプル処理

AhR 応答性安定 HepG2 細胞の培養は、HepG2 細胞用培地に 500 μ g/mL の G418 を混合したものを用い、HepG2 細胞と同様の方法で培養した。細胞をコラーゲンコート済みの 24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/ウェルの密度で播種して一晩培養後、試験サンプルを含む培地に交換した。試験サンプルは、培地中の DMSO の終濃度が 0.1%を超えないよう、目的のサンプル濃度、処理時間で培養した。

(3) ルシフェラーゼ活性の測定

細胞を 500 μ L の PBS で 2 回洗浄し、100 μ L の $1 \times$ lysis buffer を加え、15 分間室温にてシェイカーで振盪した。細胞懸濁液を 1.5 mL エッペンチューブに回収し、15,000 $\times g$ 、4°C で 5 分間遠心し、上清を回収してルシフェラーゼ活性の測定に供した。ルシフェラーゼ活性の測定には、dual-luciferase reporter assay を用い、蛍光強度の測定は LB9507 Lumet

ルミノメーターで行った。50 μL の Luciferase Assay Reagent II に、各ウェルより 10 μL の細胞懸濁液上清を混合し、測定時間を 10 秒に設定して蛍光強度を測定することで、ルシフェラーゼ活性を測定した。

3. Real-time RT-PCR

ルシフェラーゼアッセイと同様の方法でAhR応答性安定HepG2細胞へサンプルを処理し、24時間培養した。Total RNAの抽出、cDNAの合成は、第一章の方法に準じ、以下の方法で行った。500 μL のPBS (-) で細胞を2回洗浄し、500 μL のTRIzol Reagentを用いて細胞を懸濁、回収し、total RNAを抽出した。さらに、1 μg のRNAに相当する水溶液をNuclease-Free Waterで16 μL にメスアップし、5 \times PrimeSript RT Master Mix 4 μL を加え、cDNAを合成した。Real-time RT-PCRは、第一章と同じ方法で行った。各遺伝子のプライマーの配列は、Table 2-1に示した。各遺伝子のmRNA発現量は、 *β -actin*のmRNA発現量で標準化した。

Table 2-1 Real-time RT-PCR に用いたプライマーの配列

Gene	Sequence (5'→3')	
<i>β-actin</i>	Forward	TGGCACCCAGCACAATGAA
	Reverse	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA
<i>CYP1A1</i>	Forward	AGATGGTCAAGGAGCACTACA
	Reverse	CTGGACATTGGCGTTCTCAT
<i>UGT1A1</i>	Forward	TGGCTGTTCCCACTTACTGCAC
	Reverse	AGGGTCCGTCAGCATGACATC
<i>ABCG2</i>	Forward	TGCCCAGGACTCAATGCAAC
	Reverse	TCGATGCCCTGCTTTACCAAATA

4. 統計解析

データは平均値 \pm 標準偏差で表した。時間依存性と濃度依存性の検定は、one-way ANOVA後にポストホック検定としてTukey-Kramer検定を用いた。コントロール群と化合物処理群との多重比較検定はDunnnett検定により行った。AhR依存的転写活性とAhR標的遺伝子発現の相関解析は、ピアソンの積率相関係数により解析した。いずれの解析においても、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

第三節：結果

1. AhR 応答性安定 HepG2 細胞株の構築

G418 抵抗性を示す 48 のコロニー（コロニー No. 1-48）を選択し、十分な細胞成長を示す 24 のコロニーを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。24 のコロニーのうち、3 つのコロニー（コロニー No. 5、13、37）において、3MC 処理によってルシフェラーゼ活性が 1.5 倍以上に亢進された（Figure 2-2）。これら 3 つのコロニーのうち、コロニー No. 13 のみが 3MC の濃度依存的なルシフェラーゼ活性の亢進を認め、その強度も最も強かった（Figure 2-3）。このことから、コロニー No. 13 を AhR 応答性安定 HepG2 細胞株として選択した。

2. AhR 応答性安定 HepG2 細胞への 3MC 処理が AhR 依存的転写活性に与える影響

ルシフェラーゼ活性は、3MC 処理後 24 時間まで時間依存的に亢進され、その後徐々に減衰した（Figure 2-4 A）。従って、その後の反応時間は 24 時間に設定した。また、0-10 μM の濃度で 3MC を処理したところ、2.5 μM までは、3MC の濃度依存的にルシフェラーゼ活性が亢進され、それ以上の濃度（ $\sim 10 \mu\text{M}$ ）では、活性強度は同等であった（Figure 2-4 B）。

3. AhR 応答性安定 HepG2 細胞への 3MC 処理が AhR 標的遺伝子の発現に与える影響

CYP1A1 mRNA 発現量は、1 μM で飽和に達し（Figure 2-5 A, B）、10 μM まで発現量が維持された。*UGT1A1* mRNA 量は、2.5 μM で飽和に達し、10 μM まで発現量が維持された（Figure 2-5 C）。*ABCG2* mRNA 量は、2.5 μM で飽和に達し、10 μM まで発現量が維持された（Figure 2-5 D）。

4. AhR 応答性安定 HepG2 細胞への各種 AhR リガンドの処理が AhR 依存的転写活性と AhR 標的遺伝子の発現に与える影響

本試験では、3MC、BEN、IND、ITE、FICZ を代表的な AhR リガンドとして評価に供した[70]。AhR 応答性安定 HepG2 細胞を、それらの AhR リガンドで 24 時間処理したところ、ルシフェラーゼ活性の亢進が見られた（Figure 2-6）。3MC、BEN、FICZ は、IND や ITE よりも顕著にルシフェラーゼ活性を亢進した。特に、FICZ は、3MC や BEN よりも低

濃度でルシフェラーゼ活性が飽和に達した。

3MC、BEN、FICZ は、AhR 応答性安定 HepG2 細胞の AhR 標的遺伝子の発現を IND や ITE よりも強く亢進していた (Figure 2-7)。この結果は、ルシフェラーゼ活性の結果と同じ傾向であった。相関解析の結果より、種々の AhR リガンドを添加した際の AhR 依存的転写活性と AhR 標的遺伝子の発現量の間には、正の相関関係が確認された (Figure 2-8)。

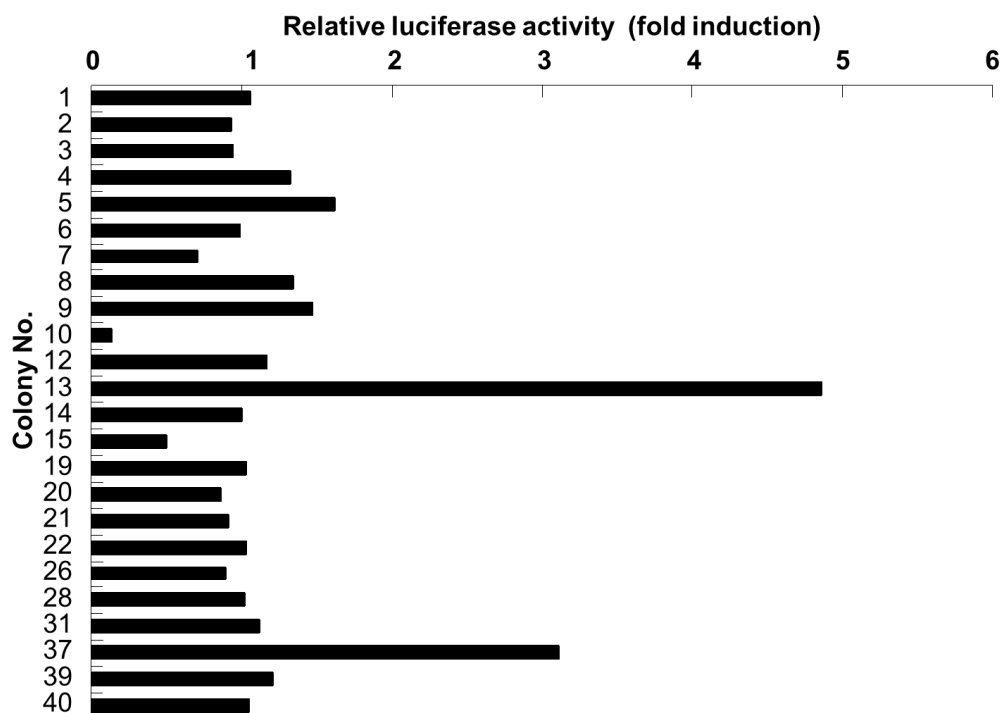


Figure 2-2 G418 耐性コロニーへの 3MC 処理が AhR 依存的転写活性に与える影響

各コロニーを、コラーゲンコート済みの 24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well の密度で播種した。一晚培養後、細胞を $5 \mu\text{M}$ の 3MC または 0.05% の DMSO で 24 時間処理し、実験方法に記載の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。データは DMSO 処理時の値を 1 とした時の相対値で表した。各コロニーにつき、 $n=2$ の平均値を示した。

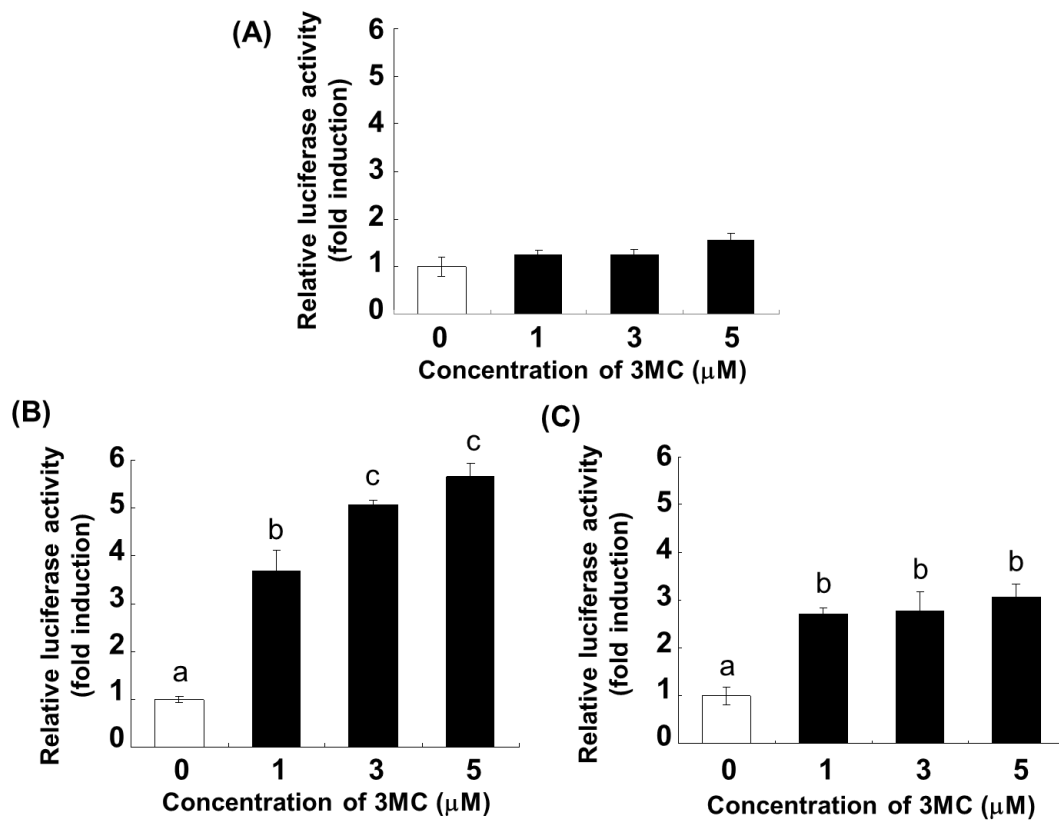


Figure 2-3 3MC 処理がコロニーNo. 5 (A)、No. 13 (B)、No. 37 (C) における AhR 依存的転写活性に与える影響

各コロニーを、コラーゲンコート済みの 24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well の密度で播種した。一晚培養後、細胞を 1、3、5 μM の 3MC または 0.05% の DMSO (3MC 0 μM) で 24 時間処理し、実験方法に記載の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。データは 0 μM の値を 1 とした時の相対値で表した。

各値は平均値 \pm SD、各群 $n = 3$ 、異符号間に有意差あり ($P < 0.05$ by Tukey-Kramer test)

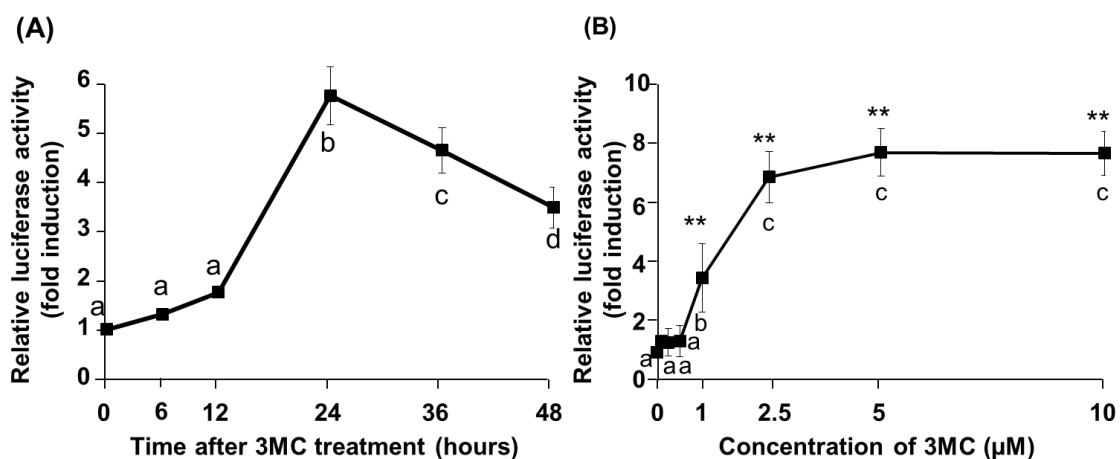


Figure 2-4 AhR 応答性安定 HepG2 細胞への 3MC 処理が AhR 依存的転写活性に与える影響 (A) 時間依存性、(B) 濃度依存性

AhR 応答性安定 HepG2 細胞を、コラーゲンコート済みの 24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well の密度で播種した。一晚培養後、(A) 2.5 μM の 3MC または 0.025% の DMSO を 0-48 時間処理、(B) 0.1-10 μM の 3MC または 0.1% の DMSO (3MC 0 μM) を 24 時間処理し、実験方法に記載の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。データは DMSO 処理時の値を 1 とした時の相対値で表した。

各値は平均値 \pm SD、各群 n = 3、異符号間に有意差あり ($P < 0.05$ by Tukey-Kramer test)

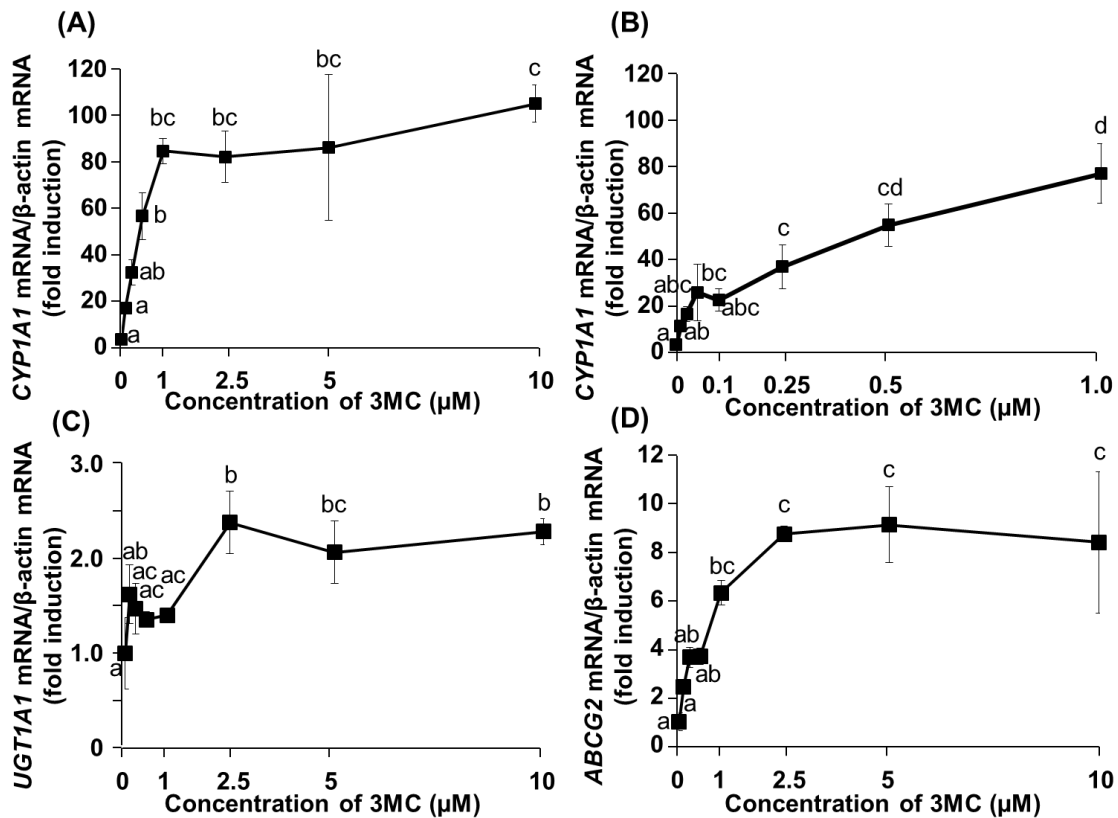


Figure 2-5 AhR 応答性安定 HepG2 細胞への 3MC 処理が AhR 標的遺伝子の発現に与える影響

AhR 応答性安定 HepG2 細胞を、コラーゲンコート済みの 24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well の密度で播種した。一晚培養後、0.1-10 μM の 3MC または 0.1% の DMSO (3MC 0 μM) を 24 時間処理し、実験方法に記載の方法で (A) *CYP1A1* (3MC 0-10 μM)、(B) *CYP1A1* (3MC 0-1 μM)、(C) *UGT1A1* (3MC 0-10 μM)、(D) *ABCG2* (3MC 0-10 μM) の mRNA 発現量を測定した。各遺伝子の発現量は、 β -actin の mRNA 発現量で補正し、0 μM における発現量を 1 とした時の相対値で表した。

各値は平均値 \pm SD、各群 $n = 3$ 、異符号間に有意差あり ($P < 0.05$ by Tukey-Kramer test)

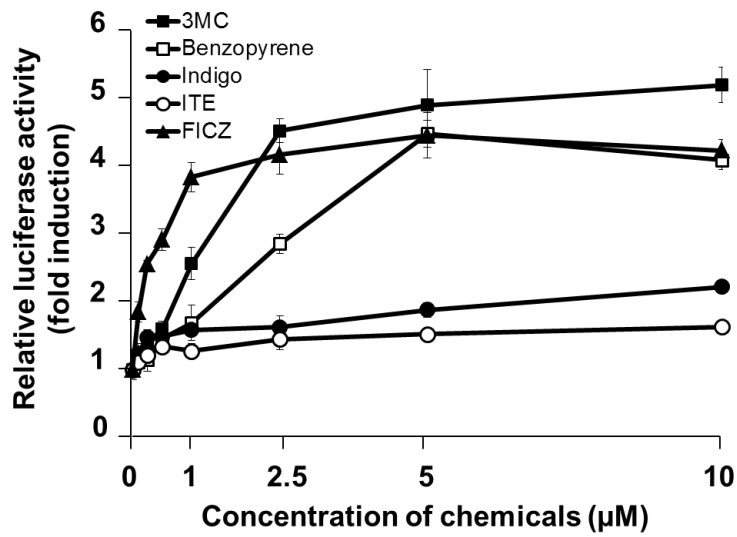


Figure 2-6 AhR 応答性安定 HepG2 細胞への各種 AhR リガンドの処理が AhR 依存的転写活性に与える影響

AhR 応答性安定 HepG2 細胞を、コラーゲンコート済みの 24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well の密度で播種した。一晚培養後、0.1-10 μM の各種 AhR リガンドまたは 0.1% の DMSO (0 μM) を 24 時間処理し、実験方法に記載の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。データは 0 μM のルシフェラーゼ活性の値を 1 とした時の相対値で表した。

各値は平均値 \pm SD、各群 n = 3。

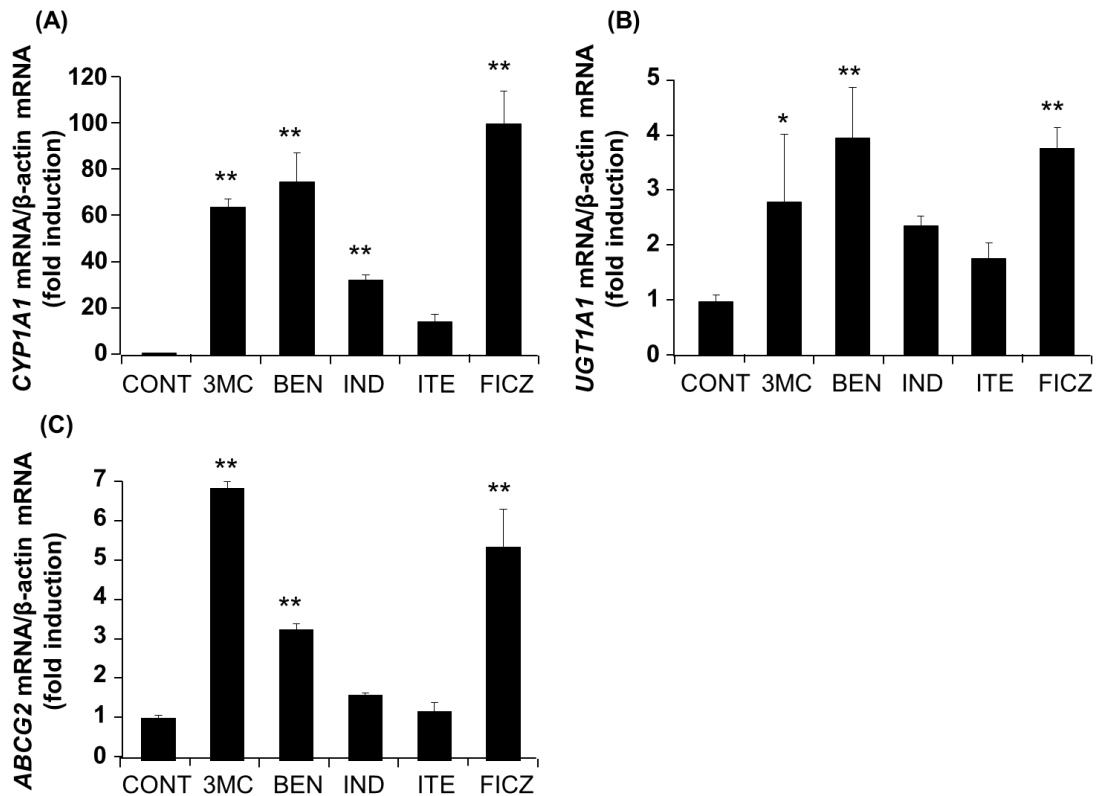


Figure 2-7 AhR 応答性安定 HepG2 細胞への各種 AhR リガンドの処理が AhR 標的遺伝子の発現に与える影響

AhR 応答性安定 HepG2 細胞を、コラーゲンコート済みの 24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well の密度で播種した。一晚培養後、5 μ M の各 AhR リガンドまたは 0.05% DMSO (コントロール) を 24 時間処理し、実験方法に記載の方法で (A) *CYP1A1*、(B) *UGT1A1*、(C) *ABCG2* mRNA の発現量を測定した。各遺伝子の発現量は、*β-actin* の mRNA 発現量で補正し、コントロールの発現量を 1 とした時の相対値で表した。

各値は平均値 \pm SD、各群 n = 3、* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. コントロール by Dunnett's test.

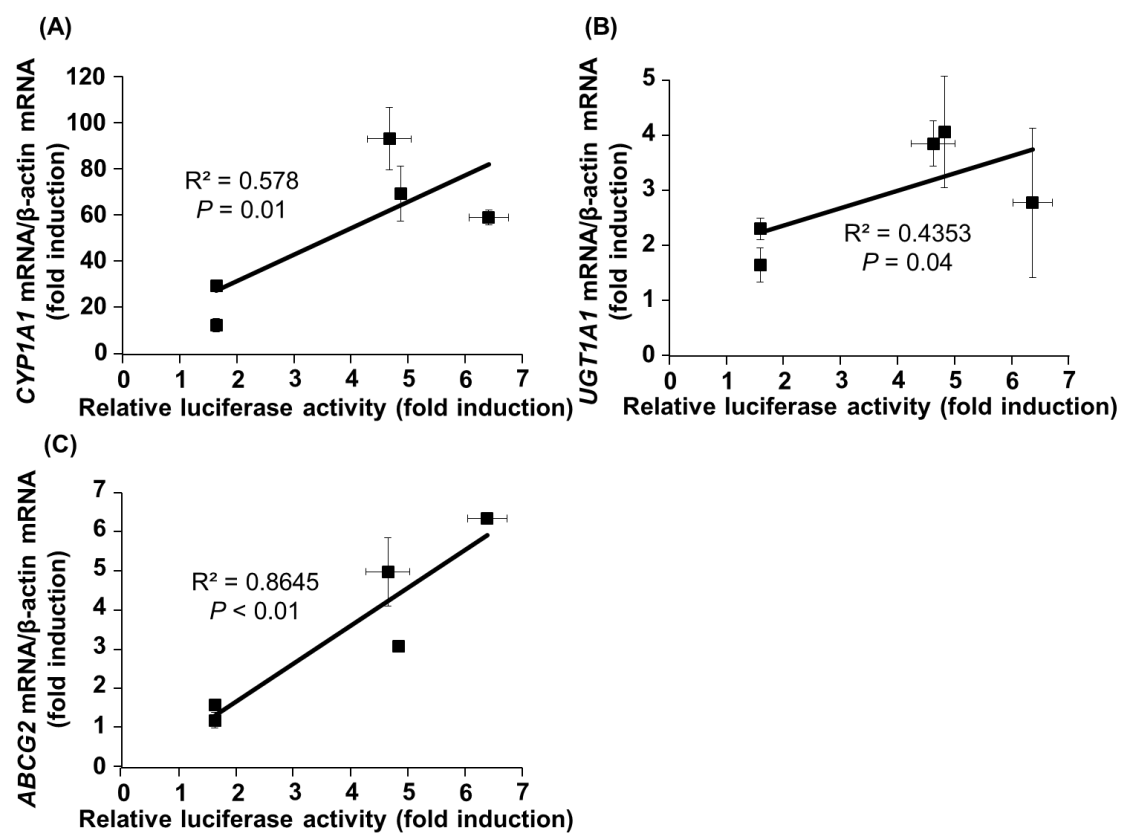


Figure 2-8 各種 AhR リガンドの処理による AhR 依存的転写活性と (A) *CYP1A1*、(B) *UGT1A1*、(C) *ABCG2* mRNA 発現量の相関

第四節：考察

本章では、AhR 応答性ベクターと AhR 発現ベクターを HepG2 細胞に安定的に共トランスフェクションすることで、AhR 応答性安定 HepG2 細胞株を樹立した。また、AhR の代表的リガンドである 3MC を用いて、AhR 依存的転写活性への影響を評価したところ、3MC を AhR 応答性安定 HepG2 細胞に処理することにより、時間及び濃度依存的な AhR 依存的転写活性の亢進が見られた (Figure 2-4)。なお、予備実験では HepG2 細胞の他に、ヒト結腸癌由来株化細胞 LS180 も用いてベクターの導入のしやすさ、応答の良さを検討したが、LS180 細胞では、3MC を同じ条件で添加しても HepG2 細胞ほど応答がみられず、ばらつきも大きかった (データは示していない)。よって、評価系の構築には HepG2 細胞を用いることとした。

本試験で見られた 3MC による AhR 依存的転写活性の亢進は、*CYP1A1* の転写活性を評価した既存の評価系[65, 71]の結果と同様の傾向であった。従って、既存の *CYP1A1* の転写活性に基づいた評価系と本評価系の違いは、3MC のような AhR を強く活性化する単一の成分を処理した際には、あまり問題にならないと考えられる。しかし、*CYP1A1* の発現は、AhR 以外の転写因子、例えば、CAR、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α 、liver X receptor (LXR) などの転写因子によっても制御されうる[72-75]。従って、例えば食品の粗抽出物など、AhR 以外の上述の転写因子を活性化するような物質を含む可能性のあるサンプルを評価に供した場合は、*CYP1A1* の転写活性に基づいた評価系と本評価系の違いは無視できないものになる恐れがあるため、AhR を介した効果を評価するためには、本試験で確立した評価系を用いることが有効であると考えられる。

本試験で確立した AhR 応答性安定 HepG2 細胞株は、3MC および他の既知の AhR リガンドに対して応答し、ルシフェラーゼ活性を亢進した (Figure 2-4、Figure 2-6)。このことは、本試験で樹立した AhR 応答性安定 HepG2 細胞株は、様々な AhR リガンドの AhR 依存的転写活性を評価しうる系であることを示唆している。AhR リガンドの中で、FICZ による AhR 依存的転写活性は、他の AhR リガンドよりも低濃度 (1 μ M) で飽和に達していた (Figure 2-6)。FICZ の AhR への親和性は、本試験で用いた他の AhR リガンドよりも高く、低濃度で AhR を強く活性化することが報告されており[70]、本評価系でもその傾向が確認された。また、3MC や他の AhR リガンドは、AhR の標的遺伝子である *CYP1A1*、

UGT1A1、*ABCG2*の発現を亢進した (Figure 2-5、Figure 2-7)。さらに、種々の AhR リガンドによる AhR 依存的転写活性の亢進と AhR 標的遺伝子の mRNA 発現の亢進との間には、有意な正の相関が確認された (Figure 2-8)。このことは、本試験で樹立した AhR 応答性安定 HepG2 細胞株が、AhR リガンドによる AhR 標的遺伝子発現への影響も予測できることを示唆している。一方、遺伝子の種類によって AhR リガンドによる発現亢進の程度や相関の強さが異なる傾向が見られた。*CYP1A1* プロモーターの 892-1,252 bp 上流には、複数の XRE 配列が存在しており、*CYP1A1* の発現制御において重要な役割を果たしている [65, 71, 76]。一方、*UGT1A1* に関しては、プロモーター配列の 3,299-3,424 bp 上流に、*ABCG2* に関しては、プロモーターの 2,333-2,357 bp 上流に、それぞれ XRE 配列が存在している [7, 77]。この XRE 配列の存在部位や数の違いが、上記の違いの理由と推察される。

第二章では、AhR 応答性ベクターと AhR 発現ベクターを HepG2 細胞に安定的に共トランスフェクションすることで、AhR の活性化を既存の評価系よりも特異的に評価可能な評価系を確立した。本評価系は、食品の粗抽出物のような、多種類の成分を含む素材による AhR の活性化を評価し、その関与成分を探索するのに有用なツールであると考えられる。

第三章では、本章で確立した AhR 応答性安定 HepG2 細胞株を用いて、種々の野菜の抽出物が AhR 依存的転写活性に与える影響を評価するとともに、その活性成分の同定を行った。

第三章：AhR 依存的転写活性を有する野菜由来成分の探索

第一節：緒言

第一章において、インドール化合物やフラボノイドを豊富に含む野菜であるブロッコリースプラウトの熱水抽出物の摂取により、肝臓において AhR を介した薬物代謝の亢進が起こることを見出した。第二章では、野菜素材や野菜由来成分による AhR 活性化をより特異的に、かつ効率的に評価するため、AhR 発現ベクターと AhR 応答性ベクターを HepG2 細胞に安定的に共トランスフェクションした、AhR 応答性安定 HepG2 細胞株を樹立した。

AhR リガンド活性を有するインドール化合物やフラボノイドは、ブロッコリースプラウト以外の野菜にも広く含まれる。また野菜には、これまでに AhR を活性化することが知られていない、新規の AhR 活性化物質が含まれる可能性もある。そこで第三章では、ブロッコリースプラウトを初めとする 23 種類の野菜を対象に、各種野菜抽出物の AhR 依存的転写活性を評価し、野菜に含まれる AhR 活性化物質を見出すことを目的とした。

第二節：実験方法

1. 野菜抽出物の調製

野菜からの抽出物の調製は、Figure 3-1に示した方法で行った。試験には、栃木県那須塩原市のスーパーより購入した23種類の生鮮野菜を用いた (Table 3-1)。各野菜は、ブランチング後破碎し、4倍量の熱水中で1時間煮沸した。得られた熱水抽出液を、室温で8,000 × g、10分間遠心し、残渣を取り除いた遠心上清のうち40 mLを凍結乾燥し、得られた粉末を熱水抽出物 (HWE) とした。HWEは粉末の状態で-30°Cで保管した。余った上清のうち約100 mLを、2M塩酸を用いてpH3.0に調製し、等量の酢酸エチルを加えた。混合液を分液漏斗の中で激しく攪拌後に静置し、酢酸エチル層と水層に分離した。この抽出操作を4回繰り返した。酢酸エチル層は全て回収し、真空エバポレーターで酢酸エチルを蒸発乾固させた。この乾固物を、酢酸エチル抽出物 (EAF) とした。EAFは100 mg/mL の濃度でDMSOに溶解させ、-30°Cで保管した。水層は、全量を2 M水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH5.5に調製し、凍結乾燥させた。この凍結乾燥粉末を、水抽出物 (WF) とした。WFは粉末の状態で-30°Cで保管した。

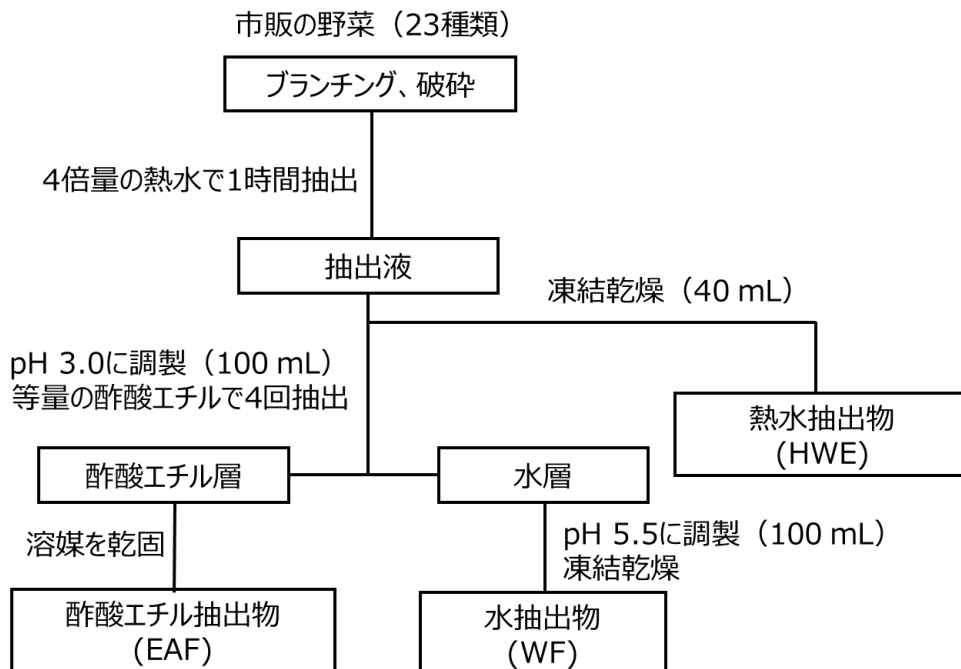


Figure 3-1 野菜抽出物の調製方法.

Table 3-1. 試験に用いた野菜のリスト

野菜	学名	産地
アシタバ	<i>Angelica keiskei</i>	茨城
アスパラガス	<i>Asparagus officinalis</i> L.	栃木
ビーツ	<i>Beta vulgaris</i> L. ssp. <i>vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i>	長野
ブロッコリー	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> L.	長野
ブロッコリースプラウト	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> L.	静岡
ゴボウ	<i>Arctium lappa</i> L.	栃木
キャベツ	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.	群馬
ニンジン	<i>Daucus carota</i> L.	千葉
セロリ	<i>Apium graveolens</i> L.	長野
ハクサイ	<i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>Pekinensis</i>	茨城
ナス	<i>Solanum melongena</i> L.	高知
ショウガ	<i>Zingiber officinale</i>	宮崎
コマツナ	<i>Brassica rapa</i> var. <i>perviridis</i>	栃木
レタス	<i>Lactuca sativa</i> L.	長野
モロヘイヤ	<i>Corchorus olerarius</i> L.	栃木
タマネギ	<i>Allium cepa</i> L.	佐賀
赤ピーマン	<i>Capsicum annuum</i> cv.	千葉
パセリ	<i>Petroselinum crispum</i> Nym.	長野
カボチャ	<i>Cucurbita maxima</i> L.	栃木
ホウレンソウ	<i>Spinacia oleracea</i> L.	栃木
トマト	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	栃木
クレソン	<i>Nasturtium officinale</i> R. Br.	栃木
ダイコン	<i>Raphanus sativus</i> L.	北海道

2. ルシフェラーゼアッセイ

(1) 細胞培養

第二章で確立した AhR 応答性安定 HepG2 細胞、および、空ベクターを HepG2 細胞株に安定的に導入した HepG2/mock 細胞を試験に用いた。細胞培養用培地は、HepG2 細胞培養用培地にネオマイシンアナログである G418 を 500 µg/mL の濃度で加えたものを用いた。その他の培養方法は、第二章の HepG2 細胞の培養方法と同様とした。

(2) 試薬

3MCはSigmaより購入した。6-ショウガオール、6-ジンゲロール、8-ジンゲロール、10-

ジンゲロールは和光純薬工業より購入した。8-ショウガオール、10-ショウガオールは ChromaDexより購入した。3MCは10 mM、それ以外の化合物は、50 mMの濃度でDMSO に溶解させ、-30°Cで保管した。

(3) 細胞へのサンプル処理

AhR 応答性安定 HepG2 細胞または HepG2/mock 細胞を、コラーゲンコート済みの 24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well の密度で播種して一晩培養後、サンプル処理を行った。HWE 及び WF は培地に各濃度で溶解し、0.20 μ m のフィルターでろ過し、細胞に処理した。EAF は、100 mg/mL の DMSO 溶液を培地で各濃度まで希釈して細胞に処理した。DMSO に溶解した各種化合物は、培地で各濃度まで希釈し、細胞に処理した。なお、全ての試験サンプルの処理において、培地中の DMSO の終濃度は 0.1%を超えないようにした。

(4) ルシフェラーゼ活性の測定

試験サンプル処理の24時間後に、第二章と同様の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。

3. ショウガEAFのHPLC解析

ショウガEAFは10 mg/mLの濃度で、6-ショウガオール、6-ジンゲロールは、5 mMの濃度で、それぞれメタノールに溶解させた。HPLC解析は、フォトダイオードアレイ検出器 L-2455 (HITACH)、PEGASIL-B ODS C18カラム (250 mm \times 4.6 mm、4.6 μ m、センシユー科学) を用いて行った。移動相は、0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) を含むメタノール (A液) 及び、0.1% TFAを含む超純水 (B液) とした。カラム温度は35°C、流速は0.5 mL/min とし、グラジエント条件は、20% A液 (0分) \rightarrow 80% A液 (50分) \rightarrow 100% A液 (55分) \rightarrow 0% A液 (60分) とした。

4. Real-time RT-PCR

ルシフェラーゼアッセイと同様の方法で6-ショウガオールを処理し、24時間培養後、第二章と同様の方法でReal-time RT-PCRを行った。

5. ウェスタンブロット解析

(1) 器具、試薬

phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)、sodium orthovanadate、protease inhibitor cocktail、ammonium persulfate (APS)、tetramethylethylenediamine (TEMED) はSigmaより購入した。BIO-RAD Protein Assay反応液はBIO-RADより購入した。RIPA lysis buffer、electrophoresis sample bufferは、Santa Cruz Biotechnologyより購入した。ECL Prime Western Blotting Detection Reagentは、GE Healthcareより購入した。Can Get Signal 1、Can Get Signal 2は、Toyoboより購入した。

(2) 抗体

マウスモノクローナルCYP1A1抗体 (sc-25304)、マウスモノクローナル β -actin抗体 (sc-47778) はSanta Cruz Biotechnologyより購入した。抗マウスimmunoglobulin G-horseradish peroxidase (IgG-HRP) 抗体 (NA931) は、GE Healthcareより購入した。

(3) 器具、機器

Immobilon polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は、Milliporeより購入した。電源装置には、CROSS POWER 1000 (ATTO) を用いた。画像解析ソフトには、LAS-1000 mini image analyzer、Multi Gauge Ver2.0 (富士フィルム) を用いた。

(4) HepG2細胞へのサンプル処理

Type I-Cコラーゲンでコラーゲンコート済みの6ウェルプレートに、HepG2細胞を 1×10^6 cells/ wellの密度で播種した。一晚培養後、培地を6-ショウガオールを含む培地に交換し、24時間培養後、タンパク質抽出を行った。培地中のDMSOの終濃度は0.1%を超えないようにした。

(5) HepG2細胞からのタンパク質抽出

細胞を2 mLの冷PBSで2回洗浄後、細胞をセルスクレイパーで回収し、1 mLの冷PBSに懸濁した。1,000 \times g、4°C、5分間遠心し、得られた沈殿物に、0.1 mLのRIPA lysis buffer (0.1 mM PMSF、0.1 mM sodium orthovanadate、0.1% protease inhibitor cocktailを含む) を加え、氷上で25 Gニードルでホモジナイズし、20分間静置した。ホモジネートを18,000

×g、4°C、5分間遠心して上清を回収し、そのうち5 μLをタンパク質量の定量に用いた。残りの上清に等量のelectrophoresis sample bufferを加え、95°Cで5分間加熱、変性させ、ウェスタンブロッティング用のサンプルとした

(6) タンパク質量の定量

タンパク質抽出物5 μLに超純水45 μLを加えることにより10倍希釈し、希釈液を96ウェルプレートに10 μLずつ入れた。また、検量線用に、標準タンパク質として牛血清アルブミン (bovine serum albumin、BSA) を0-500 μg/mLの濃度で超純水に溶解したものを10 μLずつ入れた。5倍希釈したBIO-RAD Protein Assay反応液を各ウェルに200 μLずつ加え、室温で5分間反応させた後、吸光光度計で595 nmの吸光度を測定した。

(7) SDS-PAGE

ゲル調製用に、A溶液 (29.2%アクリルアミド+0.8% *N,N*-メチレン-ビスアクリルアミド)、B溶液 (1.5 M Tris-HCl、pH8.8、0.4% SDS)、C溶液 (0.5 M Tris-HCl、pH6.8、0.4% SDS)、10% APSをあらかじめ調製した。

ゲルの作製及びSDS-PAGEは、BIO-RADのミニプロティアン3システムを用いた。0.75 mmスペーサー付ガラスプレートとショートガラスプレートをキャスティングフレームで挟み、キャスティングスタンドにセットした。蒸留水2 mL、A溶液2.5 mL、B溶液1.5 mL、10% APS 50 μL、TEMED 10 μLを混合し、分離ゲル溶液 (12.5%アクリルアミド) を調製し、速やかにガラス板の間に流し込んだ。その上から超純水を流し込み、ゲルが固まるまで15分程度静置した。ゲルが固まったら、超純水を除いた。続いて、蒸留水2.4 mL、A溶液0.6 mL、C溶液1.0 mL、10% APS 25 μL、TEMED 10 μLを混合し、濃縮ゲル (4.5%アクリルアミド) を調製し、分離ゲルの上から速やかに流し込み、気泡を取り除いてコームをさした。15分程度静置し、ゲルが固まったらコームを抜き、泳動槽にセットした。泳動バッファー (25 mM Tris、192 mMグリシン、0.1% SDS) を泳動槽に注いでゲルを完全に満たした後、30 μgのタンパク質を含むサンプルを各レーンに添加した。CROSS POWER 1000を用いて、ゲル1枚当たり20 mAの電流を流し、約90分間泳動を行った。

(8) ブロッティング

PVDF膜を適当な大きさに切り、メタノールに20秒程度浸した後、ブロッキングバッファー（100 mM Tris、192 mM glycine、20% methanol）に15-20分程度浸した。ゲルからPVDF膜への転写は、BIO-RADのタンク式ブロッキング装置を用い、CROSS POWER 1000を用いて、200 mA の定電流で120分間行った。

(9) ブロッキング

ブロッキング後、PVDF膜を、0.1%のTween-20を含むPBS (-) (PBS-T) で一度洗浄し、ブロッキングバッファー（5%のスkimミルクを含むPBS-T）に浸し、4°C で一晩静置した。

(10) 抗体反応

ブロッキングをしたPVDF膜をPBS-Tで5分間×3回洗浄後、一次抗体反応を行った。CYP1A1は、マウスモノクローナルCYP1A1抗体をCan Get Signal 1で100倍希釈したもの、 β -actinは、マウスモノクローナル β -actin抗体をCan Get Signal 1で200倍希釈したものを反応溶液とし、洗浄したPVDF膜を浸して室温で2時間インキュベートした。一次抗体反応後、PVDF膜をPBS-Tで5分間、3回洗浄した後、抗マウスIgG-HRP抗体をCan Get Signal 2で2,000倍希釈したものを反応溶液とし、室温で1時間インキュベートすることで二次抗体反応を行った。

(11) ECL反応

二次抗体反応を終えたPVDF膜を、PBS-Tで5分間、3回洗浄した後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagentに5分間浸した。その後、余分な反応液を除き、LAS-1000 mini image analyzerとMulti Gauge Ver2.0でタンパク質のバンドを検出し、解析を行った。

第三節：結果

1. 各種野菜抽出物が AhR 依存的転写活性に与える影響

11 種類の HWE がルシフェラーゼ活性を有意に亢進させた (Figure 3-2 A)。そのうち、コントロールと比較してルシフェラーゼ活性を 2 倍以上亢進した HWE は、ショウガ (2.68 倍)、モロヘイヤ (2.30 倍)、パセリ (2.34 倍)、ホウレンソウ (2.27 倍)、アシタバ (2.01 倍) の 5 種類であった (Figure 3-2 A)。さらに、上記 5 種類の HWE による AhR 依存的転写活性の亢進を裏付けるため、各 HWE のルシフェラーゼ活性を HepG2/mock 細胞でも評価し、AhR 非特異的なルシフェラーゼ活性の亢進を検出した。各 HWE による AhR 応答性安定 HepG2 細胞株におけるルシフェラーゼ活性を、HepG2/mock 細胞におけるルシフェラーゼ活性で割った値を算出したところ、5 種類の HWE は、いずれもルシフェラーゼ活性を有意に亢進していた (Figure 3-2 B)。

さらに、Figure 3-2 C に示すように、ショウガの EAF がルシフェラーゼ活性を顕著に亢進し (5.07 倍)、モロヘイヤ及びアシタバの EAF も、ルシフェラーゼ活性を有意に亢進した (それぞれ 1.56 倍、1.52 倍)。WF に関しては、ショウガの WF のみがルシフェラーゼ活性を有意に亢進した (1.69 倍)。

2. ショウガ EAF の HPLC 解析

ショウガ EAF の HPLC 解析の結果、保持時間約 38 分と 46 分の 2 つの特徴的なピーク (peak 1、peak 2) が検出され (Figure 3-3 A)、その保持時間は 6-ショウガオールと 6-ジンゲロールの保持時間と同じであった (Figure 3-3 B)。さらに、peak 1、peak 2 の UV スペクトル (Figure 3-3 C) は、6-ジンゲロール、6-ショウガオールの UV スペクトルと、それぞれ一致した (Figure 3-3 D)。

3. ショウガオール類とジンゲロール類が AhR 依存的転写活性に与える影響

AhR 応答性安定 HepG2 細胞を 6-ショウガオールで 24 時間処理したところ、ルシフェラーゼ活性が有意に亢進し、その活性は 50 μ M まで濃度依存的に上昇した (Figure 3-4 A)。一方、6-ジンゲロールは、50 μ M の濃度までルシフェラーゼ活性に影響を与えなかった (Figure 3-4 B)。

AhR 応答性安定 HepG2 細胞を 6-ショウガオール、8-ショウガオール、10-ショウガオールで 24 時間処理したところ、ルシフェラーゼ活性を有意に亢進し、特に 6-ショウガオールと 8-ショウガオールがルシフェラーゼ活性を強く亢進した (Figure 3-4 C)。一方、6-ジングロール、8-ジングロール、10-ジングロールは、いずれもルシフェラーゼ活性を亢進しなかった。

5. 6-ショウガオールが AhR の標的遺伝子およびタンパク質の発現に与える影響

6-ショウガオールは、50 μM の濃度まで濃度依存的に *CYP1A1* の mRNA 発現量を増加させた (Figure 3-5 A)。また、50 μM の 6-ショウガオール処理においては、*UGT1A1*、*ABCG2* の mRNA 発現量も有意に増加した (Figure 3-5 B, C)。さらに、25 及び 50 μM の 6-ショウガオール処理によって、*CYP1A1* のタンパク質発現量が 2 倍以上まで亢進した (Figure 3-5 D)。

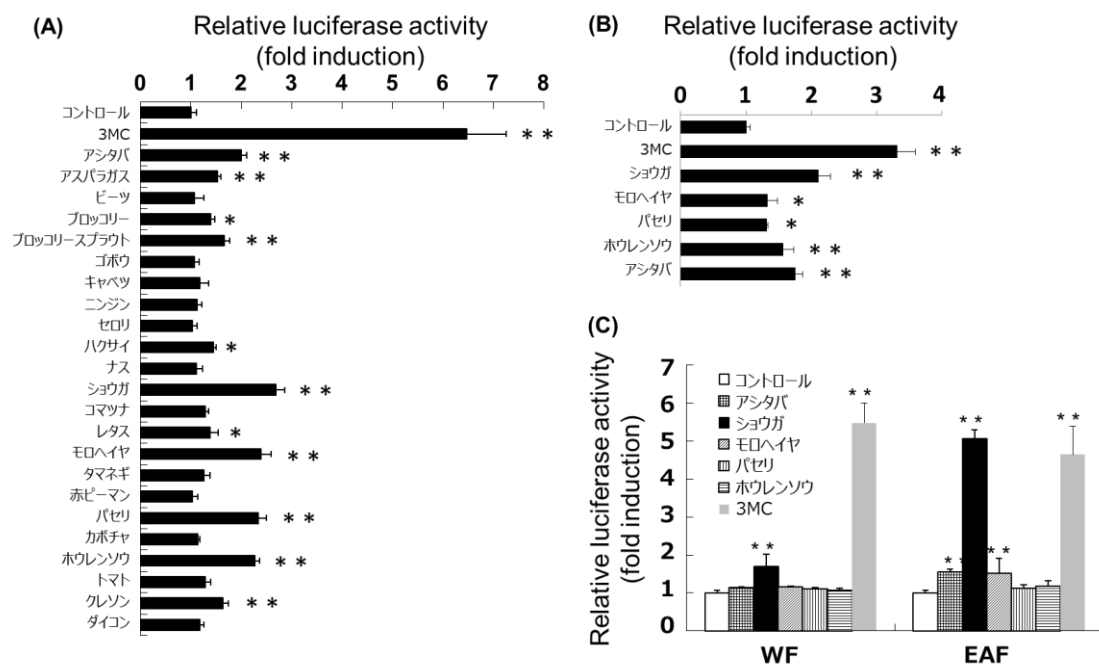


Figure 3-2

(A) 各野菜の熱水抽出物 (HWE) が AhR 依存的転写活性に与える影響。AhR 応答性安定 HepG2 細胞を 0.5 mg/mL の HWE で 24 時間処理後、ルシフェラーゼアッセイを行った。コントロールは未処理の培地を処理した。

(B) ショウガ、モロヘイヤ、パセリ、ホウレンソウ、アシタバの HWE の AhR 依存的転写活性を、AhR 非特異的な転写活性で補正した結果。AhR 応答性安定 HepG2 細胞または HepG2/mock 細胞を 0.25 mg/mL の各 HWE で 24 時間処理し、ルシフェラーゼアッセイを行った。AhR 応答性安定細胞におけるルシフェラーゼ活性を、HepG2/mock 細胞におけるルシフェラーゼ活性で割った値を算出し、活性値とした。コントロールは未処理の培地を処理した。

(C) ショウガ、モロヘイヤ、パセリ、ホウレンソウ、アシタバの水抽出物 (WF)、酢酸エチル抽出物 (EAF) が AhR 依存的転写活性に与える影響。AhR 応答性安定 HepG2 細胞を 100 µg/mL の WF または EAF で 24 時間処理後、ルシフェラーゼアッセイを行った。WF のコントロールは未処理の培地、EAF のコントロールは DMSO 0.1% を含む培地を処理した。

データはコントロールのルシフェラーゼ活性の値を 1 とした時の相対値で表した。3MC (5 µM) はポジティブコントロールとして用いた。

各値は平均値±SD、各群 n = 3、* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. コントロール by Dunnet's test

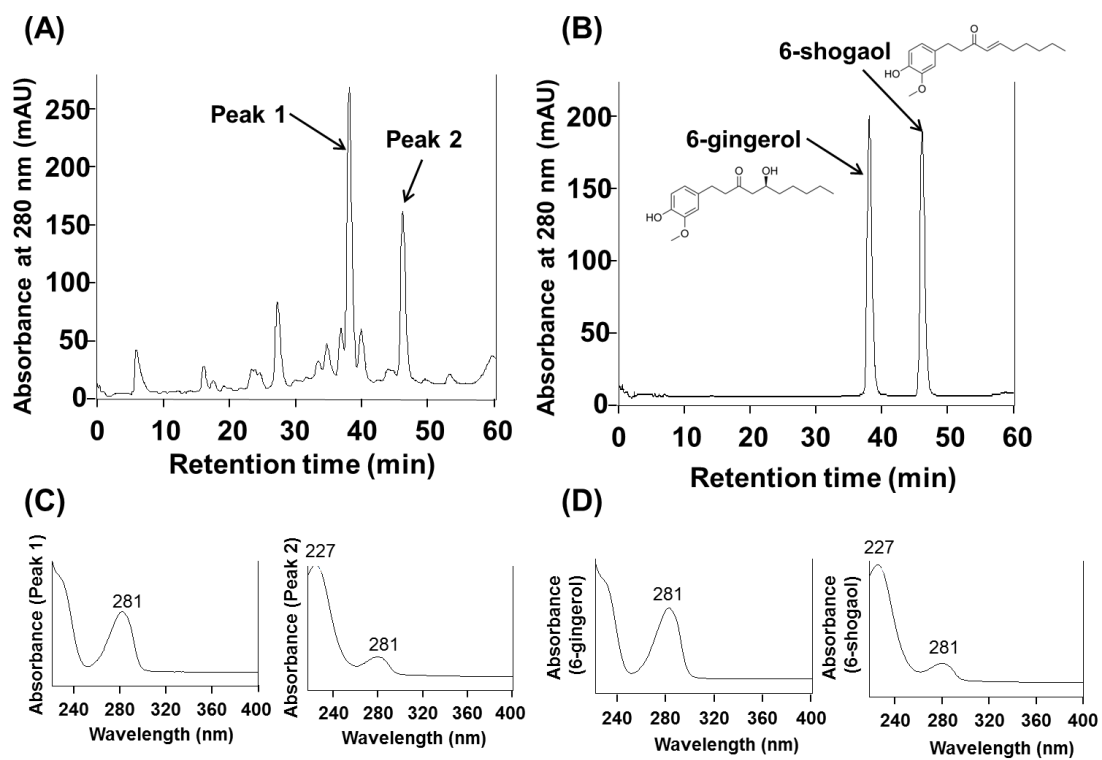


Figure 3-3 (A) ショウガ EAF の HPLC 分析結果、(B) 6-ジンゲロールと 6-ショウガオール
 の構造及び HPLC 分析結果、(C) Peak1 (左) と Peak 2 (右) の UV スペクトル、(D)
 6-ジンゲロール (左) と 6-ショウガオール (右) の HPLC スペクトル。

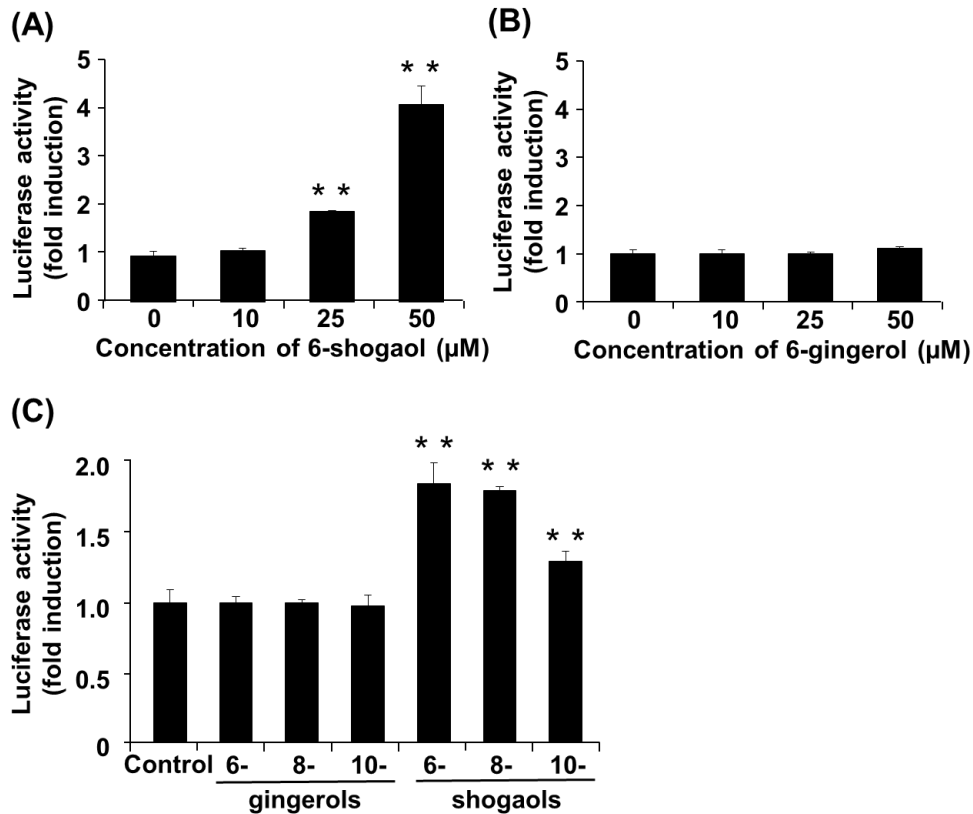


Figure 3-4 (A) 6-ショウガオールと (B) 6-ジンゲロールが AhR 依存的転写活性に与える影響。AhR 応答性安定 HepG2 細胞に 6-ショウガオールまたは 6-ジンゲロールを各濃度で 24 時間処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。0.1%の DMSO を処理した場合をコントロールとした。(C) ジンゲロール類とショウガオール類が AhR 依存的転写活性に与える影響。AhR 応答性安定 HepG2 細胞に各成分を 25 μM の濃度で 24 時間処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。0.05%の DMSO を処理した場合をコントロールとした。

データはコントロールのルシフェラーゼ活性値を 1 とした時の相対値で表した。

各値は平均値±SD、各群 n = 3、** $P < 0.01$ vs. コントロール by Dunnet's test

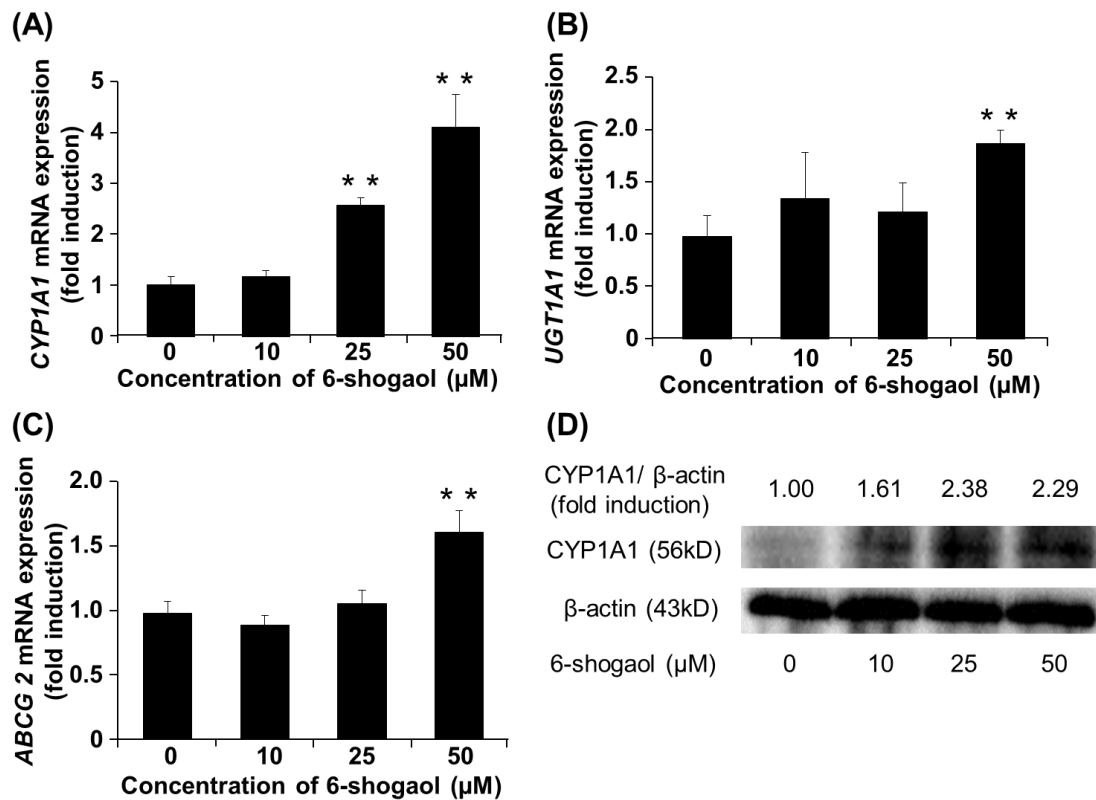


Figure 3-5 6-ショウガオールが *CYP1A1* (A)、*UGT1A1* (B)、*ABCG2* (C) の mRNA 発現および CYP1A1 のタンパク質量 (D) に与える影響。

(A) (B) (C) HepG2 細胞を、6-ショウガオールで 24 時間処理後、Real-time RT-PCR により、各遺伝子の mRNA 発現量を測定した。0.1%の DMSO を処理した場合を 0 μM とした。各遺伝子の発現量は、β-actin mRNA の発現量で補正し、0 μM の mRNA 発現量を 1 とした時の相対値で表した。

各値は平均値±SD、各群 n = 3、***P* < 0.01 vs. 0 μM by Dunnet's test。

(D) 6-ショウガオールが HepG2 細胞の CYP1A1 タンパク質量の発現に与える影響。HepG2 細胞を、6-ショウガオールで 24 時間処理後、タンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングにより CYP1A1 タンパク質量を測定した。0.1%の DMSO を処理した場合を 0 μM とした。CYP1A1 タンパク質量は、β-actin のタンパク質量で補正し、0 μM の CYP1A1 タンパク質量を 1 とした時の相対値で表した。

第四節：考察

各種野菜抽出物が AhR の活性化に与える影響について

既報において、緑茶や紅茶、プロポリスなどの粗抽出物が AhR の天然のアンタゴニストとして働くことが報告されている[78-80]。さらに、非細胞系において、モロヘイヤなどの野菜のアルコール抽出物が、AhR のトランスフォーメーションを抑制することが報告されている[81]。しかしこれらの報告は、食品の抽出物が AhR に対して抑制的に働くことを報告したものである。De Waard らの報告では、柑橘パルプやグレープフルーツジュースの抽出物が天然の AhR アゴニストを含むことを示唆している[82]。しかし、野菜の抽出物による AhR 活性化作用を詳細に評価した例はこれまでに報告されていない。我々は、AhR 応答性安定 HepG2 細胞株と HepG2/mock 細胞株を用いて、様々な野菜の HWE が AhR 依存的転写活性に与える影響を評価した。その結果、ショウガ、モロヘイヤ、パセリ、ハウレンソウ、アシタバの HWE が AhR 依存的転写活性を有意に亢進した (Figure 3-2 A, B)。さらに、これらの HWE は、第一章で AhR を活性化することが示唆されたブロッコリースプラウトの HWE よりも強く AhR 依存的転写活性を亢進した。上記 5 種類の野菜のうち、モロヘイヤのアルコール抽出物は AhR アンタゴニストであることが示唆されている[81]にも関わらず、本試験においては、モロヘイヤの HWE は AhR 依存的転写活性を亢進した。モロヘイヤはケルセチンを豊富に含んでいる[83]が、ケルセチンは AhR のアンタゴニスト[24]、アゴニスト[25, 26]両方に働くという報告がある。既報[81]では TCDD とモロヘイヤ抽出物が共存した場合のアンタゴニスト作用を評価しており、ケルセチンのような両方の作用を持つ成分の影響により、アンタゴニスト作用を示したと考えられる。

続いて、EAF 及び WF の AhR 依存的転写活性を評価した。なお、HWE の活性評価においては、夾雑物による AhR 非特異的なルシフェラーゼ活性の影響を排除するために、空ベクターを導入した HepG2/MOCK 細胞を並行して用いたが、Figure 3-2 B の結果より、非特異的なルシフェラーゼ活性の影響は小さかった。従って、EAF と WF の活性評価以降においては、HepG2/MOCK 細胞は用いなかった。EAF と WF を用いた活性評価においては、ショウガの EAF が顕著に AhR 依存的転写活性を亢進した。モロヘイヤとアシタバの EAF も AhR 依存的転写活性を有意に亢進したが、ショウガの EAF と比較するとその程度はかなり小さく、パセリとハウレンソウは、いずれの抽出物も AhR 依存的転写活性を亢進しな

かった (Figure 3-2 C)。従って、ショウガ EAF に、AhR 依存的転写活性を強く亢進する成分が含まれると考えられた。

ショウガ EAF の分析結果について

ショウガオール類とジンゲロール類は、ショウガやショウガ加工品に含まれる主要な成分であり、その中でも 6-ショウガオールと 6-ジンゲロールの含量が多いことが知られている[84-87]。そこで、HPLC を用いてショウガ EAF、6-ショウガオール、6-ジンゲロールの分析を行った。ショウガ EAF には、保持時間 38 分と 46 分に主要なピークが確認され (Figure 3-3 A)、それらのピークが、それぞれ 6-ジンゲロールと 6-ショウガオールと一致することが示された (Figure 3-3 B, C, D)。ショウガオール類は、ジンゲロール類の加水分解によって生じる成分であり、生のショウガの塊茎にはほとんど存在しないとされている[84, 85]。また、生のショウガの主要成分であるジンゲロール類は不安定であり、保管や加熱過程においてショウガオール類が生成することが知られている[84, 85]。従って、ショウガ EAF 中に検出された 6-ショウガオールは、熱水や酢酸エチルによる抽出の過程で 6-ジンゲロールより変換されたものであると推測される。

ショウガオール類とジンゲロール類が AhR 依存的転写活性に与える影響

AhR 応答性安定 HepG2 細胞を 6-ショウガオールで 24 時間処理することで、濃度依存的な AhR 依存的転写活性の亢進が見られた (Figure 3-4 A)。6-ショウガオールが AhR を介した転写活性を亢進するという報告は過去にはなく、本試験において新たに確認された知見である。さらに興味深いことに、6-ショウガオールと非常に近い構造を有する 6-ジンゲロールは、AhR 依存的転写活性を亢進しなかった (Figure 3-4 B)。6-ショウガオールと 6-ジンゲロールとの間で生理作用が異なる例として、6-ショウガオールは 6-ジンゲロールよりもがん細胞の成長を阻害する作用が強いとの報告がある[88-90]。AhR のアゴニストががん細胞の成長を阻害するという報告[91, 92] を踏まえると、6-ショウガオールと 6-ジンゲロールのがん細胞の成長抑制作用の違いは、AhR 活性化作用の違いに起因する可能性も考えられる。

ショウガには、6-ショウガオールや 6-ジンゲロール以外のショウガオール類、ジンゲロール類も含まれる。そこで、8-ショウガオール、10-ショウガオール、8-ジンゲロール、10-

ジンゲロールが AhR 依存的転写活性に与える影響も評価した。その結果、8-ショウガオールは 6-ショウガオールと同程度の AhR 依存的転写活性を示した (Figure 3-4 C)。しかし、8-ショウガオールは、Figure 3-3 A に示したショウガ EAF の HPLC 分析では検出されなかったため、ショウガオール類、ジンゲロール類の中では、6-ショウガオールが最も主要な AhR 活性化物質であることが示された。

6-ショウガオールによる薬物代謝酵素の発現亢進について

6-ショウガオールは、AhR の標的である *CYP1A1*、*UGT1A1*、*ABCG2* の mRNA 発現及び *CYP1A1* のタンパク質発現を亢進した (Figure 3-5)。近年、6-ショウガオールが薬物代謝の亢進に関与している報告が複数なされてきているが、それらはいずれも転写因子である Nrf2 の活性化を介した作用であるとされており [93-95]、AhR の標的遺伝子となる薬物代謝酵素の発現亢進に関しては、本試験が初めての報告となる。AhR と Nrf2 をともに活性化するような、第 1 相と第 2 相の薬物代謝酵素を両方誘導する性質を有する成分は、bi-functional inducer と呼ばれており [96, 97]、異物からの生体防御に対して効果的に働く可能性も示唆されている [97]。本試験の結果や近年の報告を踏まえると、6-ショウガオールも bi-functional inducer の 1 つであると考えられ、生体異物に対する防御作用についても、今後検証の必要があると考えられる。

第三章では、第二章において確立した評価系を用い、各種野菜抽出物による AhR 依存的転写活性への影響を評価した。その結果、ショウガ EAF に強い活性亢進が見られた。さらに、ショウガ EAF に含まれる主要な AhR 活性化物質の 1 つとして、6-ショウガオールを見出した。また、6-ショウガオールは、HepG2 細胞において、AhR の標的である *CYP1A1*、*UGT1A1*、*ABCG 2* の遺伝子発現及び *CYP1A1* のタンパク質発現を亢進した。

以上の結果は、6-ショウガオールによる AhR の活性化を明らかにした初めての結果である。今後、6-ショウガオールが *in vivo* においても AhR を活性化させるかどうかの検討は必要だが、本研究の結果より、6-ショウガオールによる AhR を介した生理作用が期待される。一方で、AhR のリガンドは極めて多様であり、中には TCDD や 3MC のように、AhR を活性化することで毒性を発揮する化合物も存在している。従って、6-ショウガオールの AhR リガンドとしての特性をより詳細に解析し、毒性化合物との違いを見出す必要がある。

そこで第四章では、6-ショウガオールは AhR への親和性の強さや、代表的な第 1 相酵素である CYP1A1 遺伝子への影響を毒性化合物と比較するとともに、AhR の活性化メカニズムを明らかにすることで、6-ショウガオールはリガンドとしての特性を解明することとした。

第四章：6-ショウガオール の AhR リガンド特性の解明

第一節：緒言

第三章において、23 種類の野菜抽出物を用いたスクリーニングにより、ショウガ熱水抽出物の酢酸エチル抽出物に強い AhR 活性化作用が確認された。また、ショウガに含まれる主要な AhR 活性化物質は 6-ショウガオールであることが明らかとなった。

AhR はリガンドの種類により異なる制御を受け、リガンド特異的な生理作用を発揮する例が報告されている[19]。AhR の典型的なリガンドとして、TCDD や 3MC などの毒性化合物が知られており、AhR を強力に活性化し、内分泌の攪乱や第 1 相薬物代謝酵素の顕著な発現誘導により、生体に有害な影響を与えることが報告されている[19]。従って、これらの環境汚染物質と 6-ショウガオール の AhR リガンド特性の違いを明らかにする必要がある。

本章では、6-ショウガオール のリガンド特性を明らかにするため、6-ショウガオール の AhR 依存的転写活性や *CYP1A1* 遺伝子発現への影響を、3MC などの毒性化合物と比較することとした。また、リガンド特異的に AhR が制御される理由として、リガンドと AhR のリガンド結合部位 (Ligand Binding Domain、LBD) との相互作用の違いが考えられており[19]、6-ショウガオール の AhR リガンド特性を明らかにするためには、AhR との相互作用も詳細に解析する必要がある。そこで本章では、*in silico* によるシミュレーションなどにより、6-ショウガオール と、AhR-LBD に含まれるアミノ酸残基との相互作用を解析した。

第二節：実験方法

1. ルシフェラーゼアッセイ

(1) 試薬

6-ショウガオールは和光純薬工業より購入し、DMSOに50 mMの濃度で溶解させ、-30°Cで保管した。3MCはSigmaより購入し、DMSOに10 mMの濃度で溶解させ、-30°Cで保管した。

(2) 細胞培養

第二章で確立した AhR 応答性安定 HepG2 細胞を試験に用いた。細胞培養の方法は、第三章と同様とした。

(3) 細胞へのサンプル処理

第三章と同様とし、DMSO に溶解した各種化合物を培地で各濃度まで希釈し、細胞に処理した。全ての試験サンプルの処理において、培地中の DMSO の終濃度は 0.1%を超えないようにした。

(4) ルシフェラーゼ活性の測定

試験サンプル処理の24時間後に、第二章と同様の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。

2. Real-time RT-PCR

ルシフェラーゼアッセイと同様の方法で6-ショウガオールまたは3MCを処理し、24時間培養後、第二章と同様の方法でReal-time RT-PCRを行い、*CYP1A1* mRNAの発現量を測定した。

3. *in silico*解析

(1) ホモロジーモデリング

第二章で確立した AhR 依存的転写活性の評価系には、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 を用いているため、*in silico* ではヒト AhR-LBD の立体構造を用いて相互作用解析を行うこと

が望ましいが、ヒト AhR-LBD の立体構造は現時点で明らかになっていない。そのため、ヒト AhR-LBD とリガンドとの相互作用解析においては、相同性の高いタンパク質を雛型としたホモロジーモデリングにより立体構造を構築する方法が一般的に用いられている [98-100]。本章では、ホモロジーモデリングにより AhR の立体構造を構築し、6-ショウガオールとの相互作用解析を行った。

ホモロジーモデリングは、MOLSIS 社の Molecular Operating Environment (MOE) を用いて行った。既報[98]に基づき、AhR の配列には UniProt Knowledgebase (UniProtKB) ID P35869、雛型タンパク質には、Protein Data Bank (PDB) ID 4F3LA (Chain A, Crystal Structure Of The Heterodimeric Clock:bmal1 Transcriptional Activator Complex、以下 CLOCK/BMAL dimer) の Per-Arnt-Sim (PAS) -B ドメインを用いた。

(2) ドッキングシミュレーション

(1)で構築した AhR の立体構造を用いて、ドッキングシミュレーションを行った。評価に用いたリガンドは、細胞試験で AhR 依存的転写活性を評価した 3MC、6-ショウガオール、6-ジングロールとし、各成分の構造をあらかじめリガンドデータベースに登録しておいた。MOE の Site Finder を用いて、AhR-LBD のリガンド結合部位を予測、検出した後、リガンドデータベースの情報を読み込み、ドッキングシミュレーションを行った。ドッキングの方法としては、AhR-LBD のアミノ酸側鎖のフレキシビリティを考慮する Induced Fit を採用した。リガンドと AhR-LBD の結合親和性の評価においては、リガンドと受容体との相互作用エネルギー値を示す S 値を指標とした。

(3) protein-ligand interaction fingerprints (PLIF) 解析

各リガンドと AhR-LBD との結合に重要なアミノ酸残基を抽出するため、PLIF 解析を行った。AhR-LBD の構造とドッキングシミュレーションの結果を読み込み、各リガンドと AhR-LBD の各アミノ酸残基の相互作用の有無及びその状態を検出した。また、相互作用の中から活性に重要な相互作用を検出するため、S 値が-8 以下の場合を活性状態、-8 より大きい場合を不活性状態として、活性状態の解析を行った。

(4) π - π 相互作用の解析

π - π 相互作用については、MOE で相互作用を直接解析することが困難であるため、 π 電子をもつ sp^2 性の原子に限定した接触表面積として評価した。なお、 π - π 相互作用の解析においては、計算の精度を高めるため、(2)と同様の方法でドッキングシミュレーションを行った後にエネルギーの極小化計算を行った。

4. 6-ショウガオール、6-ジンゲロールと N-Acetyl-L-histidine (NAH) との反応

(1) 試薬

6-ショウガオール、6-ジンゲロール、NAH は和光純薬工業より購入した。6-ショウガオール、6-ジンゲロールは、DMSO に 100 mM の濃度で、NAH は PBS (-) に 100 mM の濃度で溶解させた。いずれも、 -30°C で使用時まで冷凍保管した。

(2) 反応条件

1.5 mL エッペンチューブの中で、PBS (-) に、6-ショウガオール、6-ジンゲロール、NAH を各濃度で溶解させ、PBS (-) で 200 μL にメスアップした。エッペンチューブをローテーター (RT-30mini, TAITEC) にセットし、 37°C のインキュベーターの中で回転しながら、インキュベートした。ローテーターの回転数は約 7~8 r/min に設定した。

(3) HPLC 分析

(2)で調製した反応物を用い、第三章と同様の方法で HPLC 分析を行った。

(4) LC/MS 解析

(2)で調製したサンプルを用い、LC/MS 解析を行った。HPLC の設定パラメーターおよびグラジエントの条件は第三章と同様とし、検出器には UV-VIS 検出器 (島津 CBM-20A) を用いた。MS システムは LCQ Fleet イオントラップ型 (Thermo scientific) を用い、MS の設定パラメーターは、次ページの Table 4-1 に示した条件とした。

Table 4-1. MS の設定パラメーター

Ion source type	ESI
Ion Polarity	Positive
Scan Range	100 to 1000 <i>m/z</i>
Capillary Temp.	275°C
Capillary voltage	45 V
Tube Lens	125 V
Aux Gas Flow Rate	5 L/min

第三節：結果

1. AhR 依存的転写活性と *CYP1A1* mRNA 発現への影響

6-ショウガオールおよび 3MC が AhR 依存的転写活性及び *CYP1A1* mRNA 発現量に与える影響を評価した。AhR 依存的転写活性については、6-ショウガオールは 3MC に比べて高い濃度でルシフェラーゼ活性を亢進し (Figure 4-1 A)、6-ショウガオール、3MC の EC50 値はそれぞれ 19.1 μM 、0.73 μM であった。*CYP1A1* mRNA 発現量については、3MC は 1 μM 程度の低濃度においても、0 μM 処理時の 60 倍程度まで顕著に発現を亢進した。一方、6-ショウガオールは 25 μM で 2 倍程度、50 μM で 4 倍程度の亢進であった (Figure 4-1 B)。

2. PLIF 解析

4F3LA を雛型としたホモロジーモデリングにより、AhR-LBD の立体構造を構築した (Figure 4-2 A)。構築した立体構造を用いてドッキングシミュレーションを行い、PLIF 解析を行ったところ、3MC については 16 パターン、6-ショウガオール、6-ジングロールについてはそれぞれ 30 パターンの相互作用が検出された。各リガンドは、アミノ酸残基のうち、特に His 残基 (His291、His337) と相互作用する傾向が見られた。特に、6-ジングロールは His291 と相互作用 (表面接触) する傾向が強く見られた (Figure 4-2 B)。続いて、各相互作用の活性/不活性状態を解析し、各アミノ酸残基の活性への寄与を評価した。その結果、リガンドと His291 との相互作用は、不活性に関与する傾向が見られた (Figure 4-2 C)。

3. π - π 相互作用の解析

3MC は 22 パターン、6-ショウガオールは 31 パターン、6-ジングロールは 30 パターンの相互作用状態がそれぞれ検出され、各相互作用状態における接触表面積をプロットした。His291 残基のみを対象として接触表面積を評価したところ、3MC と 6-ショウガオールの接触表面積はほぼ同程度であり、6-ジングロールは接触表面積が小さい傾向が見られた (Figure 4-3 A)。一方、 π 電子が多く存在する芳香族アミノ酸である His、Phe、Tyr を対象として接触表面積を評価したところ、3MC、6-ショウガオール、6-ジングロールの順に接触表面積が大きくなる傾向が見られた (Figure 4-3 B)。各成分と AhR-LBD とのドッキング図の例を、Figure 4-3 C、D、E に示した。

4. 6-ショウガオール、6-ジンゲロールと NAH との反応物の解析

6-ジンゲロールと NAH を反応させた場合には、6-ジンゲロール以外の物質は検出されなかった (Figure 4-4 A)。一方、6-ショウガオールと NAH を反応させた場合には、6-ショウガオール以外の物質 (Peak X) が、保持時間 31 分付近に新たに検出された (Figure 4-4 B)。Peak X は、6-ショウガオールと NAH の反応時間依存的に増加し (Figure 4-4 C)、6-ショウガオールのみをインキュベートした場合には検出されなかった (Figure 4-4 D)。Peak X の LC/MS 解析の結果、 $m/z=474.30$ の親ピークが検出された (Figure 4-4 E)。

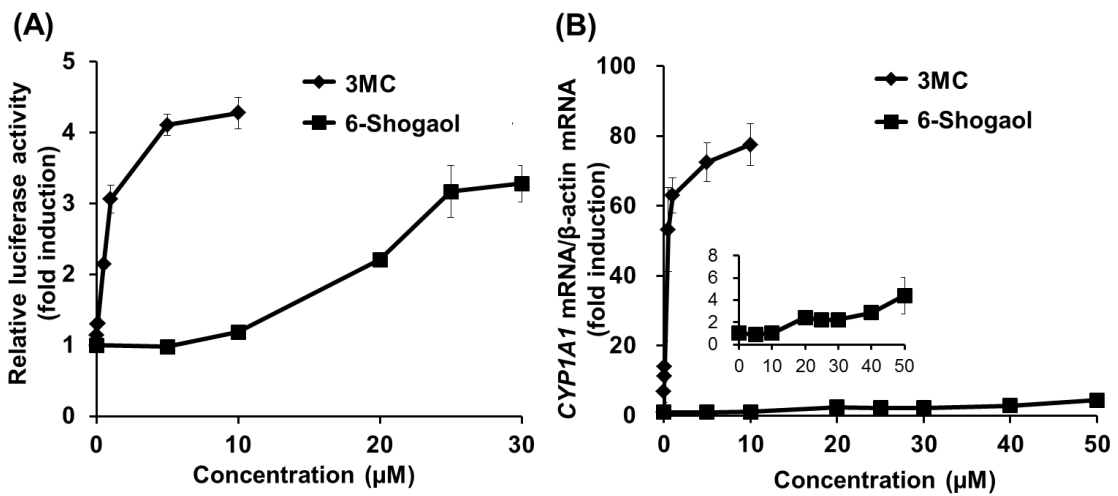


Figure 4-1 6-ショウガオールおよび 3MC が AhR 依存的転写活性(A)及び *CYP1A1* mRNA 発現 (B) に与える影響。

(A) AhR 応答性安定 HepG2 細胞に、6-ショウガオールまたは 3MC を各濃度で 24 時間処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。0.1%の DMSO を処理した場合を 0 μM とし、0 μM のルシフェラーゼ活性の値を 1 とした相対値で表した。

(B) HepG2 細胞に、6-ショウガオールまたは 3MC を各濃度で 24 時間処理し、RNA を抽出し、Real-time RT-PCR により、*CYP1A1* の mRNA 発現量を測定した。0.1%の DMSO を処理した場合を 0 μM とした。*CYP1A1* mRNA の発現量は、β-actin mRNA の発現量で補正し、0 μM の mRNA 発現量を 1 とした相対値で表した。

各値は平均値±SD、各群 n = 3。

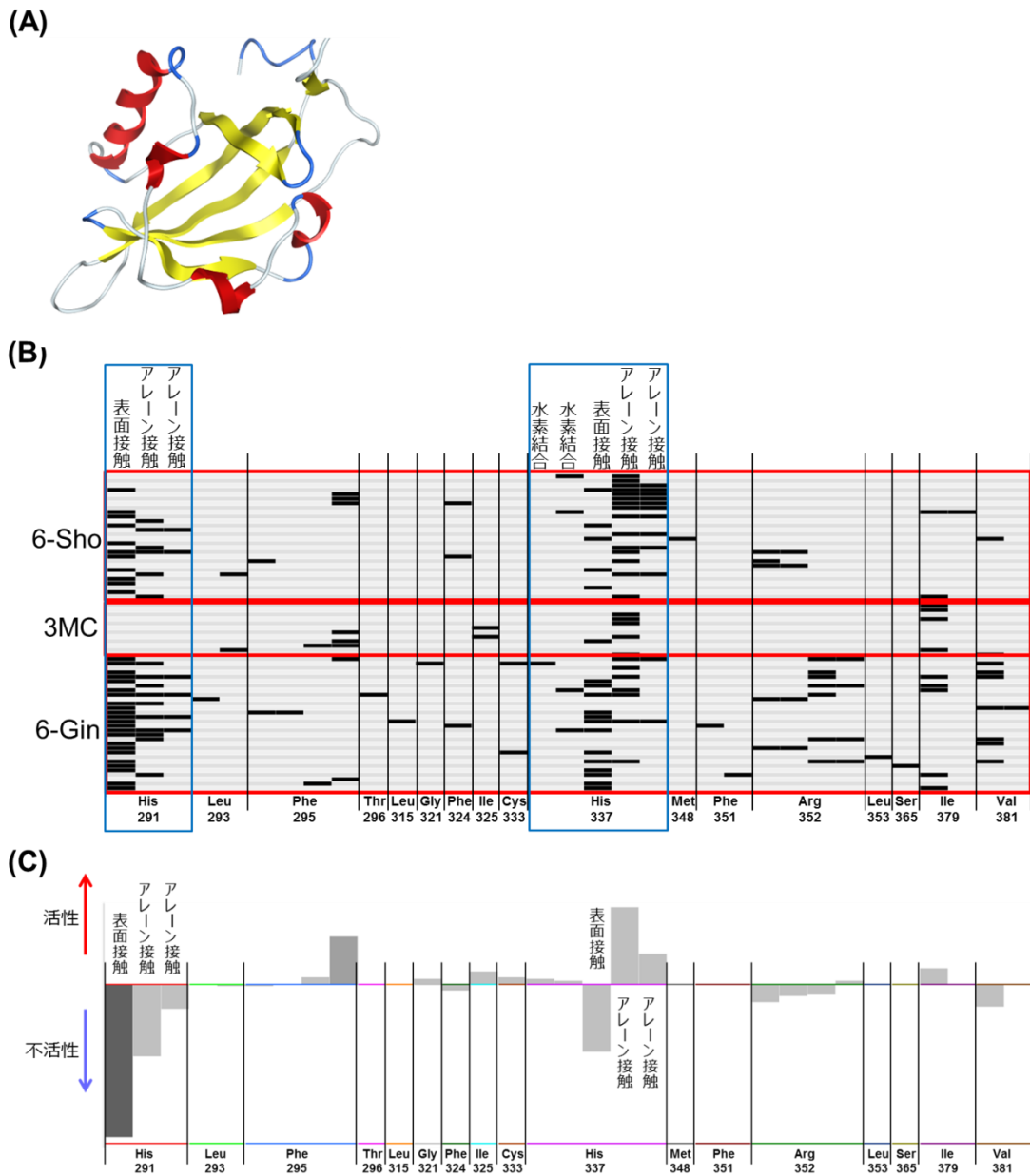


Figure 4-2 (A) 4F3LA を雛型としたホモロジーモデリングにより構築した AhR-LBD の立体構造。(B) 3MC、6-ショウガオール、6-ジンゲロールと AhR-LBD 中のアミノ酸残基との相互作用解析。(C) 各相互作用の活性、不活性への影響の解析。スコア S 値が-8 以下のものを活性、-8 より大きいものを不活性とした。

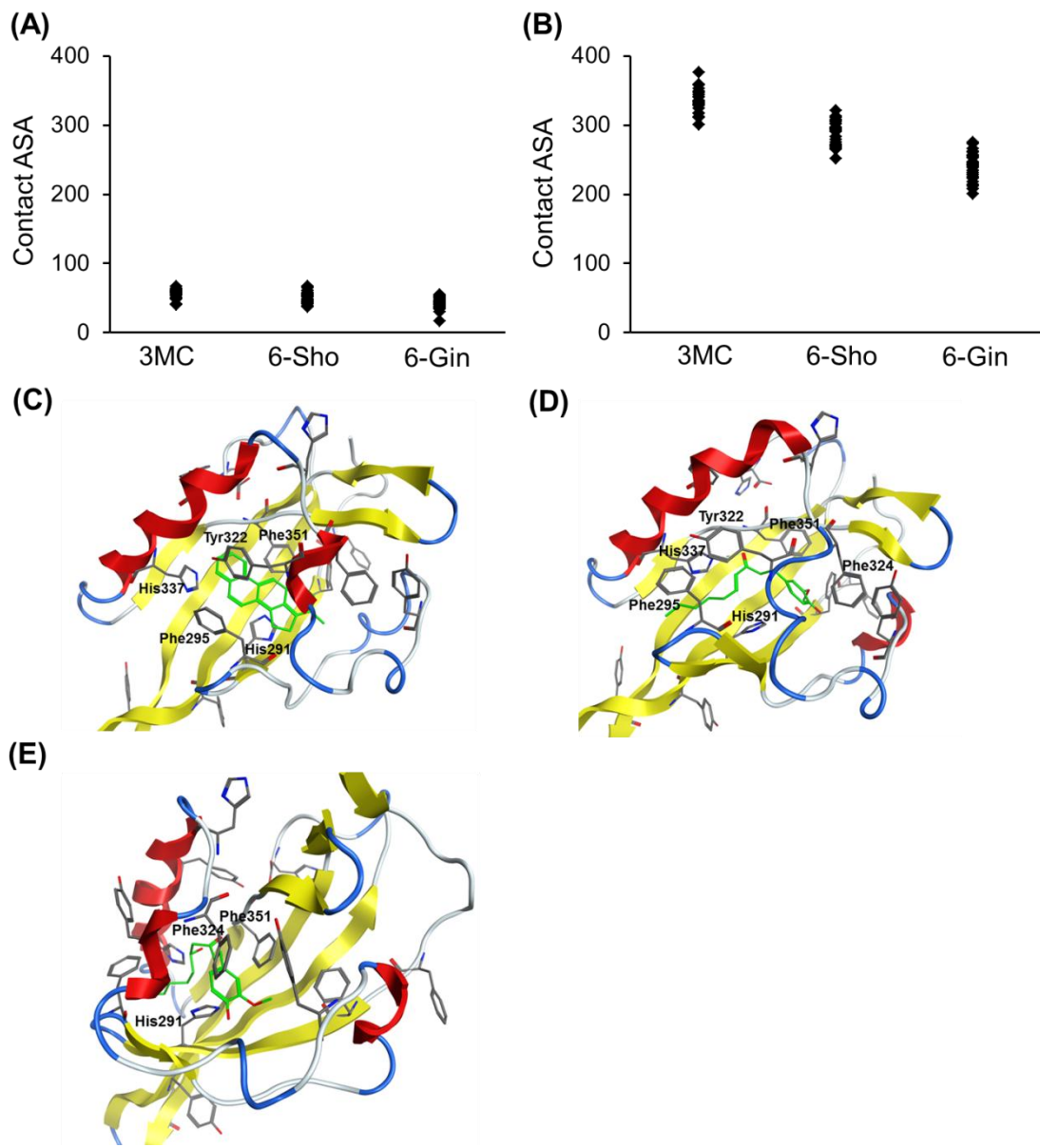


Figure 4-3 3MC、6-ショウガオール、6-ジンゲロールと (A) His291 残基のみ、(B) His、Phe、Tyr 残基との接触表面積の分布。(C) 3MC、(D) 6-ショウガオール、(E) 6-ジンゲロールと AhR-LBD とのドッキング図。

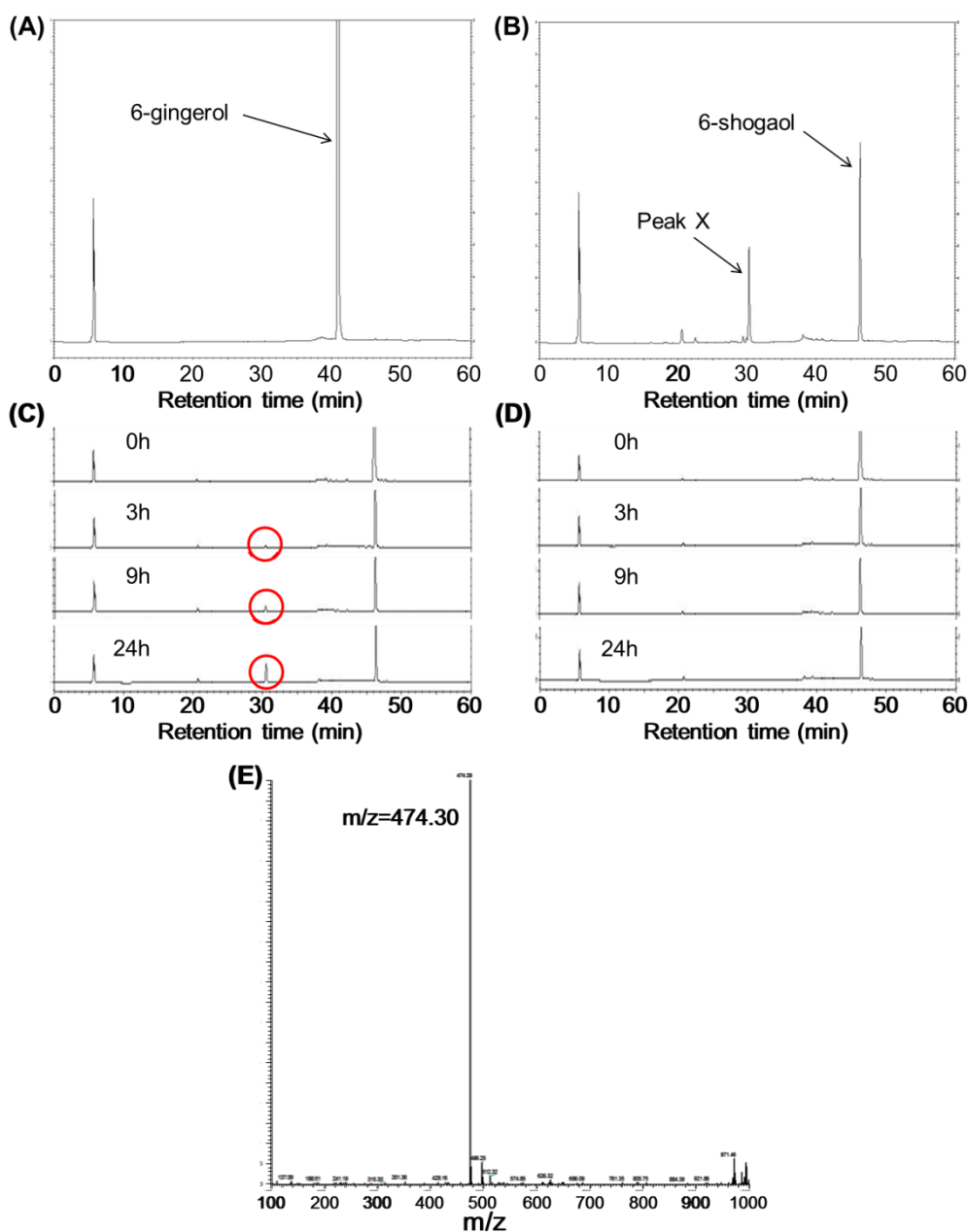


Figure 4-4 (A) 6-ジンゲロール、(B) 6-ショウガオールと NAH との反応後の HPLC 分析結果。6-ジンゲロールまたは 6-ショウガオール 10 mM と NAH 10 mM を PBS (-) 中で 37°C、24 時間反応させ、HPLC 分析を行った。反応液中の DMSO 濃度は終濃度 10%とした。(C) 6-ショウガオール 5 mM と NAH 5 mM、(D) 6-ショウガオール 5 mM のみを PBS (-) 中で 37°C、0、3、9、24 時間反応させた際の HPLC 分析結果。反応液中の DMSO 濃度は終濃度 5%とした。(E) Peak X の LC/MS 解析。

第四節：考察

6-ショウガオールの AhR との親和性および *CYP1A1* 遺伝子発現への影響

AhR には極めて多種のリガンドが存在することが知られており、その中には、TCDD のように AhR に対し非常に親和性が高く極めて強い毒性を示す物質や、3MC のように親和性は TCDD よりも低い、CYP による代謝中間体が毒性を有するような成分も含まれている。従って、第三章で見出された AhR 活性化物質である 6-ショウガオールと AhR との親和性および *CYP1A1* 遺伝子発現への影響が、毒性物質と顕著に異なるか否かについて検討を行った。なお、TCDD については実験室での使用が困難であり、過去に多数の報告があるため、既報の値を引用した。

ルシフェラーゼアッセイによる検討の結果、6-ショウガオールは 3MC に比べて高濃度で AhR 依存的転写活性を亢進しており (Figure 4-1 A)、その EC50 値 (19.1 μM) は、3MC の EC50 値 (0.73 μM) と比較して約 25 倍高かった。また、本試験と同様細胞株を用いて TCDD の AhR 依存的転写活性について評価した既報では、TCDD の AhR 依存的転写活性の EC50 値は 6-ショウガオールよりも 10,000 倍以上高いとの報告もあった[23]。以上の結果より、毒性を有する TCDD や 3MC は、6-ショウガオールと比較すると AhR と極めて強い親和性を有することが示された。

CYP1A1 の mRNA 発現への各物質の影響を評価したところ、6-ショウガオールは 25 μM で 2 倍程度まで *CYP1A1* mRNA 発現を亢進した一方、3MC は 1 μM で 60 倍程度まで顕著に発現を亢進した (Figure 4-1 B)。また、HepG2 細胞株における TCDD による *CYP1A1* mRNA の発現亢進は、既報の値では 5 nM で 600 倍程度となっている[101]。各成分による *CYP1A1* mRNA 発現亢進の違いに関しては、上記の AhR への親和性の違いが関与していると考えられるが、その他に成分の代謝特性の違いが影響している可能性がある[19]。6-ショウガオールは、種々の培養細胞株において、2-4 時間程度で大部分が還元され構造が変化する[102]ため、6-ショウガオールによる AhR の活性化や *CYP1A1* 発現への影響は一過的であると考えられる。3MC は、HepG2 細胞において代謝を受け、6 時間で半分以上が代謝物に変化するが、代謝物が AhR 非依存的に *CYP1A1* の発現を誘導することが報告されている[71]。従って、3MC そのものによる AhR を介した経路と、代謝物による AhR 非依存的な経路の両方が活性化されることで、3MC は *CYP1A1* を持続的にかつ強力に誘導すると

考えられる。TCDDは、非常に代謝されにくい特性を持っており、持続的にかつ強力に AhR を活性化し、*CYP1A1* の発現を誘導することが知られている[19]。以上のように、6-ショウガオール、3MC、TCDDは、AhR への親和性や代謝特性が顕著に異なっているため、AhR 依存的転写活性への影響や *CYP1A1* 発現への影響が大きく異なると考えられる。

PLIF 解析

AhR は、準平面構造を持つ多環の脂溶性物質に対する親和性が高く、リガンドの分子サイズは、12 Å 程度の長さがあり、かつ $14 \times 12 \times 5$ Å 以下であることが望ましいとされている [103-105]。例えば、AhR を活性化する TCDD やフラボノイドは、平面構造であり、AhR のリガンド結合部位に結合しうる分子サイズであることが報告されている[23]。6-ショウガオールの安定状態にでの分子サイズを計算したところ、 $13.7 \times 4.9 \times 5.1$ Å であり、上記のサイズ条件をほぼ満たしていた。一方、6-ショウガオールは1つの芳香環しか有しておらず、複数の芳香環を有している TCDD やフラボノイドとは立体構造が異なると考えられるため、AhR-LBD と実際に相互作用するか否かを詳細に解析する必要があると考えられた。従って、6-ショウガオールと AhR-LBD との相互作用の解析を、ホモロジーモデリングを用いた *in silico* 解析により行った。

ヒト AhR-LBD のホモロジーモデリングに用いる雛型タンパク質としては、本試験で用いた CLOCK/BMAL dimer に含まれる PAS-B ドメインの他、hypoxia inducible factor (HIF) -2 α (PDB ID: 1P97) や ARNT (PDB ID: 2B02) の PAS-B ドメインが用いられている [98-100]。本試験では、まずは ARNT の PAS-B ドメイン[100]を用いてホモロジーモデリングを行い、ドッキングシミュレーションを行った。しかし、ポジティブコントロールである 3MC が AhR-LBD に収まり切らず、評価をすることが困難であった (データは示していない)。理由として、当手法を用いていた既報では、AhR リガンドとして Flavipin を用いていたが、3MC はそれと比較して分子サイズがかなり大きいことが考えられた。そこで、3MC をリガンドとして用いた既報[98]に準じ、CLOCK/BMAL dimer の PAS-B を雛型タンパク質として用いてホモロジーモデリングを行い、ヒト AhR-LBD の立体構造を構築した (Figure 4-2 A)。

PLIF 解析の結果、3MC、6-ショウガオール、6-ジンゲロールは、AhR-LBD の His291 などの His 残基と相互作用しやすいことが示され、特に 6-ジンゲロールが His291 残基と

相互作用する傾向が見られた (Figure 4-2 B)。また、活性化状態の解析より、His291 残基と相互作用した場合は不活性化状態となる傾向が強かった (Figure 4-2 C)。従って、3MC や 6-ショウガオールは、6-ジンゲロールと比べて、不活性化に関与する His291 残基と相互作用しにくいことで、AhR を活性化している可能性が見出された。一方、これまでに、ヒト AhR-LBD 中の His291 (またはそれに相当するマウス AhR-LBD の His285) を他のアミノ酸に置換する評価系において、His291 は AhR の活性化に重要であることが複数報告されている[106-109]が、His291 が AhR の不活性化に関与するという報告は見られていない。上記の報告の中には、今回の試験と同様、3MC をリガンドとした試験も存在することから、本試験の PLIF 解析で見出された結果はそれと矛盾するものであり、*in silico* の評価方法の妥当性を改めて検証する必要があると考えられた。

π - π 相互作用の解析

PLIF 解析の結果が既報と矛盾したことから、*in silico* 解析の方法の見直しを行った。これまでの細胞試験の結果より、AhR 活性化の強さは、3MC > 6-ショウガオール > 6-ジンゲロール ($\div 0$) であり、二重結合の数に依存していることから、AhR の活性化に π 電子数が関与している可能性が考えられた。環状構造を有し、 π 電子を豊富に含む His は、同じく環状構造を有する物質と π - π 相互作用しやすく、それがタンパク質-リガンド複合体の安定化に寄与しているとされている[110]。AhR リガンドの 1 つである indirubin は、AhR-LBD の His291 残基と π - π 相互作用することで AhR を活性化しているという報告もあり[109]、AhR リガンドによる AhR の活性化には、AhR-LBD の His 残基などとの π - π 相互作用が重要な役割を果たしている可能性がある。そこで、 π 電子を豊富に含む芳香族アミノ酸として His、Tyr、Phe 残基を対象とし、3MC、6-ショウガオール、6-ジンゲロールと AhR-LBD 中のそれらアミノ酸残基との π - π 相互作用の解析を行った。

His291 のみを対象とした解析の結果、 π - π 相互作用の代替指標である接触表面積は、細胞試験における活性の順番通りではなかった (Figure 4-3 A) ことから、3MC や 6-ショウガオールによる AhR の活性化は、His291 残基との π - π 相互作用のみでは説明できないと考えられた。一方、芳香族アミノ酸残基全て (His、Phe、Tyr) を対象とした解析の結果では、接触表面積と細胞試験における活性で矛盾のない結果となった (Figure 4-3 B)。従って、6-ショウガオールによる AhR の活性化には、His291 だけではなく、Phe や Tyr 残基も含

む芳香族アミノ酸残基との π - π 相互作用が重要であると考えられた。なお、同様に π -H 相互作用についても解析を行ったが、細胞試験における活性を再現できなかったため（データは示していない）、AhR の活性化における π -H 相互作用の寄与は大きくないものと考えられた。

AhR の活性化における AhR-LBD 中の Tyr 残基や Phe 残基の重要性については、マウスの AhR-LBD の Tyr または Phe 残基を他のアミノ酸に置換することで、リガンドによる AhR の活性化が消失する例が複数報告されている。具体的には、Phe289（ヒトでは Phe295 に相当）[108, 111]、Tyr316（ヒトでは Tyr322 に相当）[111, 112]、Phe318（ヒトでは Phe324 に相当）[108, 113]、Phe345（ヒトでは Phe351 に相当）[111]といったアミノ酸残基が、AhR の活性化に重要であることが報告されている。本試験においては、Phe295、Tyr322、Phe324、Phe351 といったアミノ酸残基が、3MC や 6-ショウガオールに近い近傍に存在することが示されている（Figure 4-3 C, D）。これらのアミノ酸残基とリガンドが実際に π - π 相互作用をしているかは今後の検討が望まれるが、6-ショウガオールがこれらアミノ酸残基との π - π 相互作用を介して AhR を活性化している可能性はあると考えられる。

6-ショウガオールによる AhR 活性化における共有結合の寄与の可能性の検討

1,2-Naphthoquinone (1,2-NQ) や *tert*-butyl-1,4-benzoquinone (tBQ) などの α - β 不飽和カルボニル構造を有する親電子性の高い化合物は、チオール基を有するタンパク質と反応しやすく、Keap1/Nrf2 パスウェイのような親電子性シグナルを誘導しやすいことが知られている[114]。近年、これら親電子性の化合物は、AhR の代表的な標的遺伝子である *Cyp1a1* の遺伝子発現を誘導することが示された[115]。さらに、1,2-NQ は、AhR を共有結合的に修飾するとともに、Cys327 を Ser に置換することで、1,2-NQ による *Cyp1a1* の発現誘導が減衰することが示された[115]。このことは、Cys327 残基に 1,2-NQ のような親電子性化合物が共有結合することで影響を受けることを示唆するものである。以上の結果より、AhR の活性化は、非共有結合的な相互作用のみでなく、アミノ酸残基に親電子性の化合物が共有結合することも関与している可能性が考えられた。

本研究で見出された AhR 活性化物質である 6-ショウガオールを初めとしたショウガオール類は、上述の親電子性化合物と同様、 α , β -不飽和ケトン構造を有する親電子性の高い物質である[116]。一方、AhR 活性化作用が見られなかったジゲロール類は、 α , β -不飽和ケト

ン構造を持たず、親電子性は低い。6-ショウガオール、6-ジンゲロールによる AhR の活性化の違いと親電子性の違いが関連していると考え、それぞれの物質が AhR の活性化に関与する主要なアミノ酸である His と反応性を有するか検討を行った。

His の誘導体である NAH と、6-ショウガオールまたは 6-ジンゲロールとの反応性を検討した結果、6-ショウガオールと NAH を反応させた場合のみ、別の物質による Peak X が確認された (Figure 4-4 A, B)。また、Peak X は NAH との反応時間依存的に増加し、6-ショウガオールのみ存在下では生成しなかった (Figure 4-4 C, D)。さらに、Peak X の LC/MS 分析の結果、親ピークの z/m が 474.30 となった (Figure 4-4 E)。LC/MS の結果を踏まえた構造解析までは至っていないが、6-ショウガオールの分子量が 276.37、NAH の分子量が 197.19 であることを踏まえると、親ピークは 6-ショウガオールと NAH が結合した物質である可能性が高いと考えられた。以上の結果より、6-ジンゲロールは NAH と共有結合しないが、6-ショウガオールは NAH と共有結合することが示唆され、6-ジンゲロールと 6-ショウガオールは His との反応性に違いがあると考えられた。AhR-LBD 中の His 残基に共有結合して AhR を活性化する物質は今のところ報告が無い。しかし、例えば vitamin D receptor のように、親電子性化合物が His 残基に共有結合してタンパク質の活性を制御している例もあり [117]、AhR の活性制御にリガンドによる His 残基への共有結合が関与している可能性はあると考えられる。現時点では、6-ショウガオールと His との反応性と AhR の活性化との関連は不明であるため、6-ショウガオールと AhR との共有結合の解析や、His 残基の AhR 活性化における寄与などを明らかにしていく必要がある。

第四章の結果より、6-ショウガオールは TCDD や 3MC などの毒性を有するリガンドと比較し、AhR 依存的転写活性や CYP1A1 遺伝子の発現を緩やかに亢進することが示された。また、*in silico* 解析により、6-ショウガオールによる AhR の活性化メカニズムとして、AhR-LBD 中の芳香族アミノ酸である His、Tyr、Phe との π - π 相互作用が関与している可能性が考えられ、その相互作用の強さの違いが、リガンド間の活性の違いに繋がっている可能性が考えられた。一方、6-ショウガオールの構造的特徴より、AhR-LBD 中の His などのアミノ酸残基と共有結合することで AhR を活性化している可能性も見出された。3MC は、構造上これらのアミノ酸残基と共有結合する可能性は低いため、この場合は成分間で AhR 活性化のメカニズムが異なると考えられる。第四章の結果より、6-ショウガオールに

よる AhR 活性化のメカニズムとして複数の可能性が示された。今後は、それぞれの可能性をより詳細に検討し、メカニズムを解明していく必要があると考えられる。

総合討論

野菜に含まれるファイトケミカルを初めとした成分の生体調節機能を明らかにするとともに、それを正しく理解し、人々に伝えることは、野菜摂取の意義、動機づけにおいて重要である。野菜の主要な生体調節作用の 1 つとして生体異物の解毒作用があり、それには多くの薬物代謝関連転写因子が関わっている。その中で、AhR は、薬物代謝の制御に深く関連するとともに、免疫調節など、他の生体調節機能にも深く関わっており、生体防御やホメオスタシスの維持において重要な役割を果たしている転写因子である。AhR のリガンドとしては TCDD や 3MC といった毒性物質が古くから知られており、それらの成分の毒性発現に関与するとされてきた。一方で近年は、食品由来の天然リガンドも多く報告されてきており、それらのリガンドにより生体に有益な作用をもたらすことも分かってきた。AhR の天然リガンドとして、野菜に含まれるフラボノイドやインドール化合物などが知られているため、野菜には AhR を介した生体調節機能が期待される。そこで本研究では、野菜由来の成分が AhR を初めとした薬物代謝関連転写因子に与える影響に着目した。

第一章では、薬物代謝に影響を与える成分を豊富に含むブロッコリースプラウトを対象とし、その熱水抽出物が肝臓の遺伝子発現や解毒作用に与える影響について、動物試験により解析した。ブロッコリースプラウトの熱水抽出物を含む飼料をラットに 10 日間自由摂取させ、肝臓の遺伝子を抽出し、DNA マイクロアレイによる解析を行った結果、薬物代謝に関連する遺伝子の発現が亢進しており、それに関連するシグナルとして転写因子である AhR と Nrf2 が見出された。また、ブロッコリースプラウトの熱水抽出物は薬物誘導性の肝障害を抑制し、それには上記で見られた薬物代謝の亢進が関与していると考えられた。以上より、ブロッコリースプラウトの熱水抽出物の摂取により、ラット肝臓の薬物代謝が亢進することが示され、そのメカニズムとして、これまでに知られていた Nrf2 を介したものだけでなく、AhR を介した経路も存在することが明らかとなった。一方、ブロッコリースプラウトに含まれる AhR 活性化物質であると考えられるインドール化合物やフラボノイドは、野菜に広く含まれる成分であるため、他の野菜においても、AhR を活性化させる作用が見られる可能性があると考えられた。

第二章では、野菜や野菜由来の成分の AhR 活性化作用をより詳細に検討するためのルシフェラーゼアッセイ系の確立を行った。これまで、AhR の活性化を評価する評価系として

は、プロモーター配列に XRE を含む *CYP1A1* の転写活性を指標に、AhR 依存的な転写活性が評価されていたが、AhR 依存的な転写活性は必ずしも *CYP1A1* の転写活性と一致しないことが分かっていた。そこで、AhR 依存的な転写活性をより特異的かつ安定に評価可能な評価系として、ルシフェラーゼ遺伝子上流に XRE 配列をタンデムに導入した AhR 応答性ベクターと、ヒト AhR のオープンリーディングフレームを導入した AhR 発現ベクターを、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 に安定的に共トランスフェクションした AhR 応答性安定 HepG2 細胞株を樹立した。また、当細胞株において、3MC を初めとした AhR リガンドに対する応答性を確認した。本評価系は AhR 以外の転写因子の影響を受けにくいと考えられるため、食品の粗抽出物のような、多種類の成分を含む素材の AhR 活性化を評価し、AhR 活性化物質を探索するのに有用なツールであると考えられた。

第三章では、第二章において確立した AhR 依存的転写活性の評価系を用い、ブロッコリースプラウトを初めとする 23 種類の野菜の抽出物による AhR 活性化への影響を評価した。野菜の熱水抽出物を用いた評価により、ショウガ、モロヘイヤ、パセリ、ハウレンソウ、アシタバの 5 種類の野菜の熱水抽出物に特に強い AhR 依存的転写活性の亢進が確認され、その強さはブロッコリースプラウトの熱水抽出物よりも強いものであった。さらに、それらの熱水抽出物から酢酸エチル抽出物と水抽出物を抽出し、評価を行ったところ、ショウガの酢酸エチル抽出物に、顕著に強い AhR 依存的転写活性の亢進作用が見られた。ショウガの酢酸エチル抽出物を HPLC で分析したところ、6-ショウガオールと 6-ジンゲロールがその主要成分として見出された。さらに、それぞれの成分の AhR 依存的転写活性を評価した結果、6-ショウガオールのみ AhR 依存的転写活性の亢進が確認されたことから、6-ショウガオールが、ショウガの主要な AhR 活性化物質であると考えられた。

第四章では、6-ショウガオールの AhR リガンドとしての特性を詳細に評価した。6-ショウガオールは、TCDD や 3MC などの毒性物質と比べると、AhR への親和性や *CYP1A1* の遺伝子発現への影響は小さいことが明らかとなった。また、6-ショウガオールによる AhR 活性化のメカニズムを *in silico* でシミュレーションにより解析したところ、AhR-LBD 中の芳香族アミノ酸である His、Tyr、Phe との π - π 相互作用が関与している可能性が考えられ、その相互作用の強さの違いが、リガンド間の活性の違いに繋がっている可能性が考えられた。一方、6-ショウガオールの構造的特徴より、AhR-LBD 中の His などのアミノ酸残基と共有結合することで AhR を活性化している可能性も見出され、3MC のような芳香族

炭化水素とは異なるメカニズムで AhR を活性化している可能性も示された。

本研究を総括した上で、総合討論では、①ブロッコリースプラウト中の AhR 活性化物質、②6-ショウガオールによる AhR 活性化を介した生理作用の可能性、③6-ショウガオールによる AhR 活性化のメカニズム、④野菜の成分が AhR を活性化することの意義についてそれぞれ考察を進める。

ブロッコリースプラウト中の AhR 活性化物質

第一章において、ブロッコリースプラウトの熱水抽出物が AhR 関連シグナルを活性化することを明らかにした。また、その活性成分として、インドール化合物やフラボノイドの関与が考えられた。そこで、第二章において樹立した AhR 応答性安定 HepG2 細胞株を用いて、ブロッコリースプラウトに含まれる AhR 活性化物質の推定を行った。活性成分の同定に至らなかったため、本論中では紹介していないが、以下に概要を記載する。

まず、ブロッコリースプラウト熱水抽出物の AhR 活性化作用は、スプラウトの発芽日数依存的に高くなることが分かった (Figure 5-1 A)。ブロッコリースプラウト中のスルフォラファン、インドール化合物、ポリフェノール、カロテノイド、クロロフィルなどの成分含量は、発芽の過程において変化することが報告されている[50, 55, 118]。このような、発芽段階に応じて含量が変化する成分がブロッコリースプラウトの AhR 依存的転写活性に影響を与え、発芽段階による活性の変化を引き起こしていることが示唆された。さらに、ブロッコリースプラウト中の AhR 活性化物質を同定するために、イソチオシアネートや、ブロッコリースプラウトに含まれる成分が AhR 依存的転写活性に与える影響を評価した。その結果、既知の AhR 活性化物質であるケルセチン、ケンフェロール、インドール-3-カルビノールが AhR 依存的転写活性を亢進した一方、ブロッコリースプラウト中の主要成分であるスルフォラファンは、AhR 依存的転写活性を亢進しなかった (Figure 5-1 B)。

さらに、ブロッコリースプラウトの熱水抽出物を Figure 5-2 A に示したように分画し、活性画分である Fr. 2 (クロロホルム 100%画分)、Fr. 3 (クロロホルム：メタノール=80：20 画分) を得た。各 Fr. の HPLC 解析により、Fr. 3 には、ケルセチン、ケンフェロール、インドール-3-カルビノールが含まれることが示されたことから (Figure 5-2 C)、ブロッコリースプラウトに含まれる AhR 活性化物質の一部は、ケルセチン、ケンフェロール、インドール-3-カルビノールであることが示唆された。一方、Fr. 2 には、ケルセチン、ケンフェ

ロール、インドール-3-カルビノール以外の未知の AhR 活性化物質が含まれることも示唆された (Figure 5-2 B)。また、その未知成分の UV 極大吸収波長は 270 nm 付近であったため、未知の活性成分は芳香族化合物であると考えられた。当該成分のブロッコリースプラウト中の含量は非常に微量であり、細胞試験に供するだけの成分の分取が困難であったため、成分の同定には至らなかったが、ブロッコリースプラウトには、既知の AhR リガンドであるケルセチン、ケンフェロール、インドール-3-カルビノール以外の AhR 活性化物質が含まれると考えられた。

6-ショウガオールによる AhR を介した生理作用の可能性

第三章では、6-ショウガオールが AhR を活性化すること、第 1 相から第 3 相の薬物代謝酵素の発現を誘導することが明らかとなった。この結果より、6-ショウガオールによる AhR を介した生理作用の可能性として、肝臓などでの解毒作用の亢進が考えられる。6-ショウガオールや、6-ショウガオールを含むショウガ抽出物による肝臓での解毒作用に関しては、動物試験においてアルコール[95]や、APAP[119, 120]による肝障害を抑制するという報告があり、これらの *in vivo* での効果には、6-ショウガオールによる解毒作用が関わっている可能性がある。一方で、6-ショウガオールによる解毒作用の亢進は、Nrf2 を介したものであると報告されており[93, 94]、上述の 6-ショウガオールによる解毒作用においては、AhR のみではなく Nrf2 の寄与も大きい可能性がある。AhR の寄与が大きいと考えられる解毒作用として、AhR の標的遺伝子である ABCG 2 の発現亢進によるベンゾピレンの排泄が考えられる。ABCG 2 は、スルフォラファンなどの Nrf2 活性化物質の処理下では発現が亢進しないが、インドール-3-カルビノールやケルセチンなど、AhR、もしくは AhR と Nrf2 両方に作用する成分を処理した際には発現が亢進し、ベンゾピレンの代謝物の排泄が高まるという報告がある[10]。本試験において、6-ショウガオールは ABCG 2 の発現を亢進することが明らかになっており、ベンゾピレンのように、その代謝物が ABCG 2 の基質となっているものに対しては、6-ショウガオールによる AhR を介した解毒作用が発揮される可能性がある。

AhR を介した薬物代謝以外の主要な生理作用として免疫調節作用があるが、6-ショウガオールによる免疫調節作用の報告は、細胞試験でマスト細胞からの脱顆粒を評価した例[121]、アレルギー性皮膚炎への影響を評価した例[122]など、わずかである。また、AhR を介した免疫調節の作用機序である Treg の分化に与える影響を評価した例はほとんどない。

従って、6-ショウガオールが Treg の分化やアレルギーに与える影響を評価すれば、新規性の高い研究になると考えられる。フラボノイドの一種であるナリングeninは、AhR を活性化して Treg の分化を制御することが報告されている[25]。本試験と同じ評価系でナリングeninと AhR 依存的転写活性への影響を比較し、同等の活性が見られれば、Treg の分化を制御する可能性があると考えられる。

6-ショウガオールの生体内での機能を考える上で、その作用濃度を考えることは重要である。本試験において、6-ショウガオールによる AhR 依存的転写活性亢進作用の EC50 値は 19.1 μM であった、一方、既報において、マウスにショウガ抽出物を 250 mg/kg 体重の量で経口投与した際の 6-ショウガオール（抱合体として）の最高血中濃度は、約 0.14 $\mu\text{g/mL}$ （約 0.52 μM ）であると報告されている[123]。また、ヒトがショウガパウダーを 2 g (7.4 mg の 6-ショウガオールを含む) 摂取した際の 6-ショウガオール（抱合体として）の最高血中濃度は 0.15 $\mu\text{g/mL}$ （約 0.54 μM ）であるとされている[124]。従って、マウスやヒトにおける 6-ショウガオールの血中濃度と比較すると、本試験における作用濃度は、非常に高い濃度である。一方で、既報で 6-ショウガオールを用いて行っている細胞試験においては、がん細胞の増殖抑制作用については 5 - 10 μM [88, 90, 125]、抗炎症作用については 20 - 30 μM [126]、解毒作用については 20 μM [94]程度で有意な効果が見られており、本試験で 6-ショウガオールによる AhR の活性化が見られた濃度が、他の生理作用を検証した報告と比較して高いとは言えない。上記の細胞試験の中で、解毒作用のように、動物試験においても 6-ショウガオールの効果が確認されている例[94]があることを考えると、*in vivo*においても、6-shogaol が AhR を介した生理作用を発揮する可能性はあると考えられる。

6-ショウガオールによる AhR 活性化のメカニズム

第四章において、6-ショウガオールによる AhR 活性化のメカニズムとして、複数の可能性が提示された。すなわち、*In silico*でのシミュレーションにおいては、芳香族アミノ酸(His、Tyr、Phe) との π - π 相互作用が関与している可能性が見出された。また、親電子性の高い 6-ショウガオールが、His 残基などと共有結合して AhR の活性化に関与している可能性も示された。今後は、活性化に関与するアミノ酸残基と相互作用をより詳細に決定していく必要がある。

活性化に関与するアミノ酸残基を決定するには、関与の可能性のあるアミノ酸残基を他

のアミノ酸に置換した際の活性への影響を評価することが有効であると考え。第四章より、 π - π 相互作用に関与している可能性のあるアミノ酸残基としては、His291、Phe295、Tyr322、Phe324、Phe351 が挙げられる。一方、共有結合の関与の可能性を考えた場合には、第四章で評価を行った His 残基の他、親電子性化合物との反応性の高い Cys 残基も候補となる。His 残基については上述の His291、Cys 残基については Cys333 が AhR の活性化に関与しているとの報告がある[106, 107]。以上に挙げたアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換する評価系を用いることで、6-ショウガオールによる AhR 活性化のメカニズムの詳細を明らかにしていきたい。

野菜の成分が AhR を活性化することの意義

序章でも述べた通り、AhR は生体に様々な影響を与えていることが明らかになっており、かつ、そのリガンドも非常に多岐に渡っている。TCDD や 3MC のようなリガンドは、AhR を介して生体に害を与える一方、食品由来の天然リガンドであるインドールやフラボノイドは、生体に対して有益な影響を与えることが報告されている。このような AhR の持つ二面性を考慮し、本研究では、毒性成分と 6-ショウガオールの AhR リガンドとしての特性の違いを検討した。

本研究においては、TCDD、3MC、6-ショウガオールの 3 成分間で、AhR への結合親和性や代謝特性が顕著に異なり、標的遺伝子である *CYP1A1* の遺伝子発現への影響も異なることを示した。6-ショウガオール以外の野菜成分については、本研究では AhR リガンドとしての特性を評価していないが、各種ポリフェノールの AhR 活性化作用をルシフェラーゼアッセイにより評価した結果より、ポリフェノールの EC50 値は 10-100 μ M の間であり [23]、本研究における 6-ショウガオールの EC50 値 (19.1 μ M) に近いことが推測される。また、代謝特性に関しても、ポリフェノールは体内で速やかに代謝される [127] ため、6-ショウガオールと同様、AhR を一過的に活性化することが推測される。少なくとも、6-ショウガオールやポリフェノールなどの、野菜に含まれる成分に関しては、TCDD や 3MC のように、AhR を強く持続的に活性化し、内分泌を攪乱したり第 1 相薬物代謝酵素の遺伝子発現を顕著に亢進する可能性は低いと考えられる。

一方で、AhR リガンドとしての特性を考える際には、上記の結合親和性や代謝特性以外の要因も考慮する必要がある。Nault らは、4 種類の AhR リガンドが、Hepa1c1c7 細胞お

よび C57BL/6 マウスの肝臓の遺伝子発現に与える影響を DNA マイクロアレイにより解析した結果より、各成分の代謝特性以外の要因が遺伝子発現に影響している可能性を示した [128]。このような、AhR リガンドによる遺伝子発現への影響の違いの理由として、リガンドの種類により、コアクチベーターやコリプレッサーなどの転写調節因子への影響が異なることが挙げられる。構造や代謝特性が類似している 5 種類の HAHs 間での比較において、AhR のコアクチベーターへの影響の違いが見られており [129]、AhR への結合親和性や代謝特性が類似していても、コアクチベーターへの影響が異なり、下流のシグナルが異なる可能性がある。野菜由来の AhR リガンドの 1 種であり、抗腫瘍作用が知られている 3,3'-ジインドリルメタンは、他の AhR リガンドである β -naphthoflavone と同等に *CYP1A1* の XRE 配列へ AhR をリクルートするが、転写調節因子である RNA ポリメラーゼ II (Pol II) のリクルートが少ないため、*CYP1A1* の mRNA 発現をほとんど亢進しない [130]。このように、*CYP1A1* などの生体に対してネガティブな因子に対して影響を与えずに、AhR を介した免疫調節作用や腫瘍抑制作用を有する物質は selective AhR modulators (SAhRMs) と呼ばれ、その生理作用が注目を浴びており [131-133]、ケルセチン、ナリンゲニンなど、野菜に含まれるフラボノイドが SAhRMs として働く可能性も示されている [134]。

AhR は、結合親和性や代謝特性が顕著に異なる多様なリガンドが存在するだけでなく、リガンド依存的にその調節が異なる。従って、野菜の成分が AhR を活性化することの意義を一面的に評価することは困難であり、AhR を活性化させるという事実だけではなく、成分の代謝特性や、活性化後の調節も含めた多面的な評価が必要である。このような複雑な AhR の調節機構を理解した上で、今後、野菜の成分による AhR の活性化の解析を進めていきたい。

総括

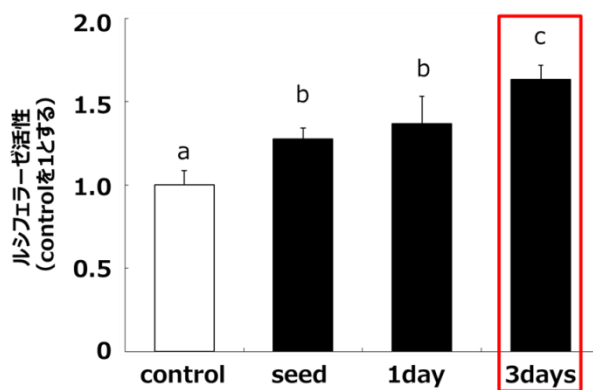
本研究では、野菜成分による生体調節機能の新たなメカニズムの発見や、新たな生体調節機能の発見に繋げることを目的とし、薬物代謝や免疫調節など、生体防御やホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしている AhR の活性化への影響を評価した。

その結果、ショウガやブロッコリースプラウトを初めとする野菜には AhR を活性化させる作用があることを明らかにした。また、ショウガに含まれる AhR 活性化成分として 6-ショウガオールを同定し、その結合親和性や代謝特性、第 1 相薬物代謝酵素の発現への影

響が、TCDD や 3MC といった毒性物質と顕著に異なることを明らかにした。さらに、6-ショウガオールによる AhR 活性化のメカニズムに関して、AhR-LBD 中の芳香族アミノ酸 (His、Tyr、Phe) 残基との π - π 相互作用、His や Cys 残基との共有結合の 2 つの可能性を見出した。本研究の結果は、6-ショウガオールによる AhR 活性化を初めて明らかにし、そのリガンド特性を解明した研究として非常に価値があると考えられる。今後は、6-ショウガオールによる AhR 活性化作用を介した *in vivo* における解毒作用や免疫調節作用について検証するとともに、AhR 活性化のメカニズムをより詳細に明らかにしていく必要がある。

AhR は、非常に多様性に富んだリガンドと複雑な調節機構を有し、ポジティブな面とネガティブな面の二面性を有するため、各リガンドの特性を十分に検証する必要がある。野菜由来の成分には、本研究で見出された 6-ショウガオールを初め、AhR リガンドとなる成分が多く存在するため、そのリガンド特性を詳細に評価することは、野菜による生体調節機能を解析する上で重要であると考えられる。本研究がその一助となり、野菜の成分による AhR 活性化作用に関する理解、さらには野菜の生体調節作用に関する理解が深まることを期待し、本研究の総括とする。

(A)



(B)

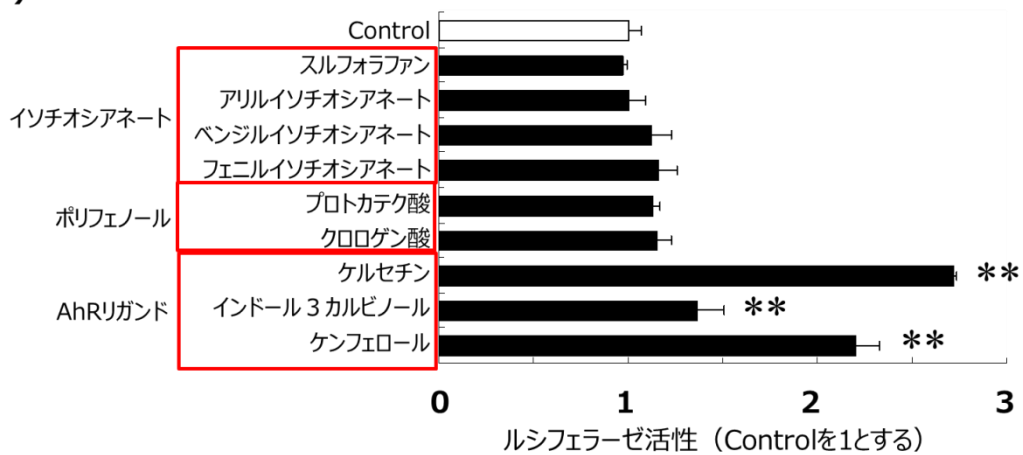


Figure 5-1 (A) 発芽段階別のブロッコリースプラウト熱水抽出物が AhR 依存的転写活性に与える影響。各値は平均値± SD、各群 n = 3、異符号間に有意差あり、 $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test。 (B) 各種ブロッコリースプラウト関連成分が AhR 依存的転写活性に与える影響。各値は平均値± SD、各群 n = 3、** $P < 0.01$ vs. Control by Dunnet's test。

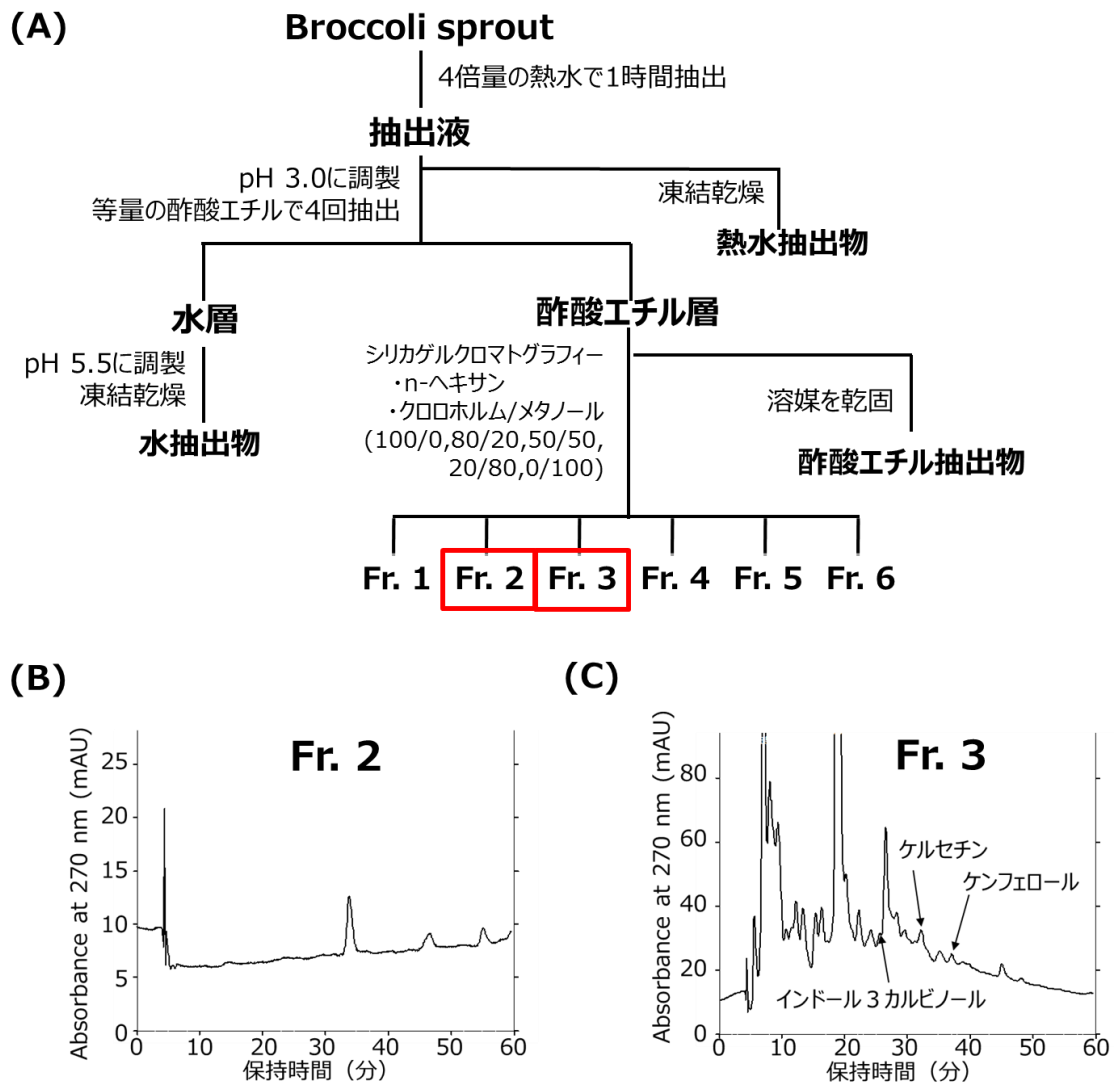


Figure 5-2 (A) ブロッコリースプラウト抽出物の分画方法。(B) Fr. 2 の HPLC 分析結果、
(C) Fr. 3 の HPLC 分析結果。

参考文献

1. Lampe, J.W., *Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(3 Suppl): p. 475s-490s.
2. Liska, D.J., *The detoxification enzyme systems*. Altern Med Rev, 1998. **3**(3): p. 187-98.
3. Nakata, K., et al., *Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems*. Drug Metab Pharmacokinet, 2006. **21**(6): p. 437-57.
4. Pohjanvirta, R. and J. Tuomisto, *Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(4): p. 483-549.
5. Crews, S.T., *Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins*. Genes Dev, 1998. **12**(5): p. 607-20.
6. Whitlock, J.P., *Induction of cytochrome P4501A1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 103-25.
7. Yueh, M.F., et al., *Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 15001-6.
8. Auyeung, D.J., F.K. Kessler, and J.K. Ritter, *Mechanism of rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6 induction by oltipraz: evidence for a contribution of the Aryl hydrocarbon receptor pathway*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(1): p. 119-27.
9. Tan, K.P., et al., *Aryl hydrocarbon receptor is a transcriptional activator of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. Mol Pharmacol, 2010. **78**(2): p. 175-85.
10. Ebert, B., A. Seidel, and A. Lampen, *Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[a]pyrene-3-sulfate*. Toxicol Sci, 2007. **96**(2): p. 227-36.
11. Kerkvliet, N.I., *AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 746-60.
12. Kimura, A., et al., *Aryl hydrocarbon receptor protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production*. Int Immunol, 2014. **26**(4): p. 209-20.
13. Quintana, F.J., et al., *Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 65-71.
14. Li, Y., et al., *Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation*. Cell, 2011. **147**(3): p. 629-40.

15. Ohtake, F., et al., *Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase*. Nature, 2007. **446**(7135): p. 562-6.
16. Kawajiri, K., et al., *Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13481-6.
17. Fernandez-Salguero, P.M., et al., *Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 1996. **140**(1): p. 173-9.
18. Sogawa, K. and Y. Fujii-Kuriyama, *Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor*. J Biochem, 1997. **122**(6): p. 1075-9.
19. Denison, M.S., et al., *Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor*. Toxicol Sci, 2011. **124**(1): p. 1-22.
20. Heath-Pagliuso, S., et al., *Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites*. Biochemistry, 1998. **37**(33): p. 11508-15.
21. Degner, S.C., et al., *Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3,3'-diindolylmethane in breast cancer cells*. J Nutr, 2009. **139**(1): p. 26-32.
22. Hubbard, T.D., I.A. Murray, and G.H. Perdew, *Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation*. Drug Metab Dispos, 2015. **43**(10): p. 1522-35.
23. Amakura, Y., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using in vitro reporter gene assay*. Biol Pharm Bull, 2003. **26**(4): p. 532-9.
24. Zhang, S., C. Qin, and S.H. Safe, *Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context*. Environ Health Perspect, 2003. **111**(16): p. 1877-82.
25. Wang, H.K., et al., *Dietary flavonoid naringenin induces regulatory T cells via an aryl hydrocarbon receptor mediated pathway*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(9): p. 2171-8.
26. Ciolino, H.P., P.J. Daschner, and G.C. Yeh, *Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially*. Biochem J, 1999. **340** (Pt 3): p. 715-22.
27. Ciolino, H.P., et al., *Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells*. Biochem Pharmacol, 1998. **56**(2): p. 197-206.
28. Fahey, J.W., Y. Zhang, and P. Talalay, *Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of*

- inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10367-72.
29. Suzuki, R., et al., *Preventive Effects of Powdered Broccoli Sprout on Azoxymethane-induced Rat Colonic Aberrant Crypt Foci.* Journal of toxicologic pathology, 2004. **17**(2): p. 119-126.
 30. Zhang, Y., et al., *Induction of GST and NQO1 in cultured bladder cells and in the urinary bladders of rats by an extract of broccoli (Brassica oleracea italica) sprouts.* J Agric Food Chem, 2006. **54**(25): p. 9370-6.
 31. Pellegrini, N., et al., *Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration, and antioxidant capacity of raw and frozen brassica vegetables.* J Agric Food Chem, 2010. **58**(7): p. 4310-21.
 32. Fahey, J.W. and P. Talalay, *Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes.* Food Chem Toxicol, 1999. **37**(9-10): p. 973-9.
 33. Barrett, J.C. and E.S. Kawasaki, *Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression.* Drug Discovery Today, 2003. **8**(3): p. 134-141.
 34. Hu, R., et al., *In vivo pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat.* J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(1): p. 263-71.
 35. Hu, R., et al., *Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice.* Cancer Lett, 2006. **243**(2): p. 170-92.
 36. Tuñón, M.J., et al., *An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure.* World J Gastroenterol, 2009. **15**(25): p. 3086-98.
 37. 2006., R.F.f.S.C. *R: a Language and Environment for Statistical Computing.* 2006; Available from: <http://www.gbif.org/resource/81287>.
 38. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.* Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
 39. Hochreiter, S., D.A. Clevert, and K. Obermayer, *A new summarization method for Affymetrix probe level data.* Bioinformatics, 2006. **22**(8): p. 943-9.
 40. Breitling, R., et al., *Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments.* FEBS Lett, 2004. **573**(1-3): p. 83-92.
 41. Breitling, R. and P. Herzyk, *Rank-based methods as a non-parametric alternative of the T-statistic for the analysis of biological microarray data.* J Bioinform Comput Biol, 2005. **3**(5): p. 1171-89.
 42. Kadota, K., Y. Nakai, and K. Shimizu, *Ranking differentially expressed genes from*

- Affymetrix gene expression data: methods with reproducibility, sensitivity, and specificity.* Algorithms Mol Biol, 2009. **4**: p. 7.
43. Huang, d.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.* Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
 44. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing.* Journal of the royal statistical society. Series B (Methodological), 1995: p. 289-300.
 45. Hosack, D.A., et al., *Identifying biological themes within lists of genes with EASE.* Genome Biol, 2003. **4**(10): p. R70.
 46. Thomas, S. and D. Bonchev, *A survey of current software for network analysis in molecular biology.* Hum Genomics, 2010. **4**(5): p. 353-60.
 47. Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.* J Biol Chem, 1974. **249**(22): p. 7130-9.
 48. Kikugawa, K., et al., *Protective effect of supplementation of fish oil with high n-3 polyunsaturated fatty acids against oxidative stress-induced DNA damage of rat liver in vivo.* J Agric Food Chem, 2003. **51**(20): p. 6073-9.
 49. Bricker, G.V., et al., *Isothiocyanate metabolism, distribution, and interconversion in mice following consumption of thermally processed broccoli sprouts or purified sulforaphane.* Molecular nutrition & food research, 2014. **58**(10): p. 1991-2000.
 50. Waje, C.K., et al., *Seed viability and functional properties of broccoli sprouts during germination and postharvest storage as affected by irradiation of seeds.* J Food Sci, 2009. **74**(5): p. C370-4.
 51. Perocco, P., et al., *Glucoraphanin, the bioprecursor of the widely extolled chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli, induces phase-I xenobiotic metabolizing enzymes and increases free radical generation in rat liver.* Mutat Res, 2006. **595**(1-2): p. 125-36.
 52. Lai, R.H., et al., *Evaluation of the safety and bioactivity of purified and semi-purified glucoraphanin.* Food Chem Toxicol, 2008. **46**(1): p. 195-202.
 53. Kitteringham, N.R., et al., *Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver.* J Proteomics, 2010. **73**(8): p. 1612-31.
 54. Mewis, I., et al., *UV-B irradiation changes specifically the secondary metabolite profile in broccoli sprouts: induced signaling overlaps with defense response to biotic stressors.* Plant Cell Physiol, 2012. **53**(9): p. 1546-60.
 55. Pereira, F.M., et al., *Influence of temperature and ontogeny on the levels of*

- glucosinolates in broccoli (Brassica oleracea Var. italica) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes.* J Agric Food Chem, 2002. **50**(21): p. 6239-44.
56. Gerhäuser, C., et al., *Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes.* Cancer Res, 1997. **57**(2): p. 272-8.
 57. McMahon, M., et al., *The Cap 'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes.* Cancer research, 2001. **61**(8): p. 3299-3307.
 58. Anwar-Mohamed, A. and A.O. El-Kadi, *Sulforaphane induces CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity levels via an AhR-dependent pathway in murine hepatoma Hepa 1c1c7 and human HepG2 cells.* Cancer Lett, 2009. **275**(1): p. 93-101.
 59. Jellinck, P.H., et al., *Ah receptor binding properties of indole carbinols and induction of hepatic estradiol hydroxylation.* Biochem Pharmacol, 1993. **45**(5): p. 1129-36.
 60. Renwick, A.B., et al., *Effect of some indole derivatives on xenobiotic metabolism and xenobiotic-induced toxicity in cultured rat liver slices.* Food Chem Toxicol, 1999. **37**(6): p. 609-18.
 61. Li, L., et al., *Bioactive terpenoids and flavonoids from Ginkgo biloba extract induce the expression of hepatic drug-metabolizing enzymes through pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and aryl hydrocarbon receptor-mediated pathways.* Pharm Res, 2009. **26**(4): p. 872-82.
 62. Hinson, J.A., D.W. Roberts, and L.P. James, *Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis.* Handb Exp Pharmacol, 2010(196): p. 369-405.
 63. Acharya, M. and C.A. Lau-Cam, *Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat.* Journal of biomedical science, 2010. **17**(1): p. S35.
 64. Henderson, C.J., et al., *Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase Pi.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12741-5.
 65. Garrison, P.M., et al., *Species-specific recombinant cell lines as bioassay systems for the detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-like chemicals.* Fundam Appl Toxicol, 1996. **30**(2): p. 194-203.
 66. Natsume, Y., et al., *In vitro System for Assessing Dioxin Absorption by Intestinal Epithelial Cells and for Preventing this Absorption by Food Substances.* Cytotechnology, 2005. **47**(1-3): p. 79-88.

67. Hamada, M., et al., *TCDD-induced CYP1A1 expression, an index of dioxin toxicity, is suppressed by flavonoids permeating the human intestinal Caco-2 cell monolayers.* J Agric Food Chem, 2006. **54**(23): p. 8891-8.
68. Aix, L., et al., *Thiabendazole is an inducer of cytochrome P4501A1 in cultured rabbit hepatocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **202**(3): p. 1483-9.
69. Denison, M.S., et al., *Carbaryl, a carbamate insecticide, is a ligand for the hepatic Ah (dioxin) receptor.* Toxicol Appl Pharmacol, 1998. **152**(2): p. 406-14.
70. Nguyen, L.P. and C.A. Bradfield, *The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor.* Chem Res Toxicol, 2008. **21**(1): p. 102-16.
71. Fazili, I.S., et al., *Persistent induction of cytochrome P4501A1 in human hepatoma cells by 3-methylcholanthrene: evidence for sustained transcriptional activation of the CYP1A1 promoter.* J Pharmacol Exp Ther, 2010. **333**(1): p. 99-109.
72. Kaczynski, J.A., et al., *Functional analysis of basic transcription element (BTE)-binding protein (BTEB) 3 and BTEB4, a novel Sp1-like protein, reveals a subfamily of transcriptional repressors for the BTE site of the cytochrome P4501A1 gene promoter.* Biochem J, 2002. **366**(Pt 3): p. 873-82.
73. Sérée, E., et al., *Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR-alpha and 2 PPRE sites.* Gastroenterology, 2004. **127**(5): p. 1436-45.
74. Yoshinari, K., et al., *Constitutive androstane receptor transcriptionally activates human CYP1A1 and CYP1A2 genes through a common regulatory element in the 5' -flanking region.* Biochemical pharmacology, 2010. **79**(2): p. 261-269.
75. Shibahara, N., et al., *Human cytochrome P450 1A1 is a novel target gene of liver X receptor α .* Drug Metab Pharmacokinet, 2011. **26**(5): p. 451-7.
76. Fujii-Kuriyama, Y., et al., *Regulation of CYP1A1 expression.* FASEB J, 1992. **6**(2): p. 706-10.
77. Tompkins, L.M., et al., *A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells.* Biochem Pharmacol, 2010. **80**(11): p. 1754-61.
78. Williams, S.N., et al., *Comparative studies on the effects of green tea extracts and individual tea catechins on human CYP1A gene expression.* Chem Biol Interact, 2000. **128**(3): p. 211-29.
79. Fukuda, I., et al., *Black tea extract suppresses transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin.* Biofactors, 2004. **21**(1-4): p. 367-9.
80. Park, Y.K., et al., *Suppression of dioxin mediated aryl hydrocarbon receptor transformation by ethanolic extracts of propolis.* Biosci Biotechnol Biochem, 2004. **68**(4): p. 935-8.

81. Nishiumi, S., et al., *Molokhia (Corchorus olitorius L.) extract suppresses transformation of the aryl hydrocarbon receptor induced by dioxins*. Food Chem Toxicol, 2006. **44**(2): p. 250-60.
82. de Waard, W.J., et al., *Gene expression profiling in Caco-2 human colon cells exposed to TCDD, benzo[a]pyrene, and natural Ah receptor agonists from cruciferous vegetables and citrus fruits*. Toxicol In Vitro, 2008. **22**(2): p. 396-410.
83. Azuma, K., et al., *Phenolic antioxidants from the leaves of Corchorus olitorius L.* J Agric Food Chem, 1999. **47**(10): p. 3963-6.
84. Govindarajan, V.S. and D.W. Connell, *Ginger—chemistry, technology, and quality evaluation: part 1*. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 1983. **17**(1): p. 1-96.
85. Ravindran, P.N. and K.N. Babu, *Ginger: the genus Zingiber*. 2016: CRC Press.
86. Shao, X., et al., *Quantitative analysis of ginger components in commercial products using liquid chromatography with electrochemical array detection*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(24): p. 12608-14.
87. Ali, B.H., et al., *Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe): a review of recent research*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**(2): p. 409-20.
88. Rhode, J., et al., *Ginger inhibits cell growth and modulates angiogenic factors in ovarian cancer cells*. BMC Complement Altern Med, 2007. **7**: p. 44.
89. Kim, J.S., et al., *Cytotoxic components from the dried rhizomes of Zingiber officinale Roscoe*. Arch Pharm Res, 2008. **31**(4): p. 415-8.
90. Sang, S., et al., *Increased growth inhibitory effects on human cancer cells and anti-inflammatory potency of shogaols from Zingiber officinale relative to gingerols*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(22): p. 10645-50.
91. Koliopanos, A., et al., *Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer*. Oncogene, 2002. **21**(39): p. 6059-70.
92. Peng, T.L., et al., *Potential therapeutic significance of increased expression of aryl hydrocarbon receptor in human gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(14): p. 1719-29.
93. Peng, S., et al., *Activation of Nrf2 target enzymes conferring protection against oxidative stress in PC12 cells by ginger principal constituent 6-shogaol*. Food Funct, 2015. **6**(8): p. 2813-23.
94. Chen, H., et al., *Ginger compound [6]-shogaol and its cysteine-conjugated metabolite (M2) activate Nrf2 in colon epithelial cells in vitro and in vivo*. Chem Res Toxicol, 2014. **27**(9): p. 1575-85.
95. Zhuang, X., et al., *Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver*

- damage*. J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 28713.
96. Prochaska, H.J. and P. Talalay, *Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver*. Cancer Res, 1988. **48**(17): p. 4776-82.
97. Yun, J.H., et al., *Bi-functional induction of the quinone reductase and cytochrome P450 1A1 by youngiasides via Nrf2-ARE and AhR-XRE pathways*. Biol Pharm Bull, 2010. **33**(10): p. 1650-7.
98. Tripathi, V.K., et al., *Monocrotophos induces the expression and activity of xenobiotic metabolizing enzymes in pre-sensitized cultured human brain cells*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91946.
99. Szollosi, D., et al., *Access Path to the Ligand Binding Pocket May Play a Role in Xenobiotics Selection by AhR*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146066.
100. Hanieh, H., et al., *Novel Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist Suppresses Migration and Invasion of Breast Cancer Cells*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0167650.
101. Kamenickova, A., et al., *Pelargonidin activates the AhR and induces CYP1A1 in primary human hepatocytes and human cancer cell lines HepG2 and LS174T*. Toxicol Lett, 2013. **218**(3): p. 253-9.
102. Chen, H., et al., *Metabolism of [6]-shogaol in mice and in cancer cells*. Drug Metab Dispos, 2012. **40**(4): p. 742-53.
103. Gillner, M., et al., *Interactions of indoles with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver*. Mol Pharmacol, 1985. **28**(4): p. 357-63.
104. Gasiewicz, T.A., et al., *Analysis of structural requirements for Ah receptor antagonist activity: ellipticines, flavones, and related compounds*. Biochem Pharmacol, 1996. **52**(11): p. 1787-803.
105. Waller, C.L. and J.D. McKinney, *Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: model validation and Ah receptor characterization*. Chem Res Toxicol, 1995. **8**(6): p. 847-58.
106. Pandini, A., et al., *Structural and functional characterization of the aryl hydrocarbon receptor ligand binding domain by homology modeling and mutational analysis*. Biochemistry, 2007. **46**(3): p. 696-708.
107. Bisson, W.H., et al., *Modeling of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand binding domain and its utility in virtual ligand screening to predict new AhR ligands*. J Med Chem, 2009. **52**(18): p. 5635-41.
108. Soshilov, A.A. and M.S. Denison, *Ligand promiscuity of aryl hydrocarbon receptor agonists and antagonists revealed by site-directed mutagenesis*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(9): p. 1707-19.

109. Tkachenko, A., et al., *Nuclear transport of the human aryl hydrocarbon receptor and subsequent gene induction relies on its residue histidine 291*. Arch Toxicol, 2018. **92**(3): p. 1151-1160.
110. Cauet, E., et al., *Histidine-Aromatic Interactions in Proteins and Protein-Ligand Complexes: Quantum Chemical Study of X-ray and Model Structures*. J Chem Theory Comput, 2005. **1**(3): p. 472-83.
111. Pandini, A., et al., *Detection of the TCDD binding-fingerprint within the Ah receptor ligand binding domain by structurally driven mutagenesis and functional analysis*. Biochemistry, 2009. **48**(25): p. 5972-83.
112. Backlund, M. and M. Ingelman-Sundberg, *Different structural requirements of the ligand binding domain of the aryl hydrocarbon receptor for high- and low-affinity ligand binding and receptor activation*. Mol Pharmacol, 2004. **65**(2): p. 416-25.
113. Goryo, K., et al., *Identification of amino acid residues in the Ah receptor involved in ligand binding*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(2): p. 396-402.
114. Kumagai, Y., et al., *The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2012. **52**: p. 221-47.
115. Abiko, Y., A. Puga, and Y. Kumagai, *Covalent binding of quinones activates the Ah receptor in Hepa1c1c7 cells*. J Toxicol Sci, 2015. **40**(6): p. 873-86.
116. Talalay, P., *Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis*. Adv Enzyme Regul, 1989. **28**: p. 237-50.
117. Yoshizawa, M., et al., *Identification of the Histidine Residue in Vitamin D Receptor That Covalently Binds to Electrophilic Ligands*. J Med Chem, 2018.
118. Gu, Y., et al., *Physiological and biochemical metabolism of germinating broccoli seeds and sprouts*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(1): p. 209-13.
119. Ajith, T.A., U. Hema, and M.S. Aswathy, *Zingiber officinale Roscoe prevents acetaminophen-induced acute hepatotoxicity by enhancing hepatic antioxidant status*. Food Chem Toxicol, 2007. **45**(11): p. 2267-72.
120. Abdel-Azeem, A.S., et al., *Hepatoprotective, antioxidant, and ameliorative effects of ginger (Zingiber officinale Roscoe) and vitamin E in acetaminophen treated rats*. J Diet Suppl, 2013. **10**(3): p. 195-209.
121. Makchuchit, S., R. Rattarom, and A. Itharat, *The anti-allergic and anti-inflammatory effects of Benjakul extract (a Thai traditional medicine), its constituent plants and its some pure constituents using in vitro experiments*. Biomed Pharmacother, 2017. **89**: p. 1018-1026.
122. Park, G., et al., *6-Shogaol, an active compound of ginger, alleviates allergic dermatitis-like skin lesions via cytokine inhibition by activating the Nrf2 pathway*.

- Toxicol Appl Pharmacol, 2016. **310**: p. 51-59.
123. Mukkavilli, R., et al., *Absorption, Metabolic Stability, and Pharmacokinetics of Ginger Phytochemicals*. *Molecules*, 2017. **22**(4).
124. Zick, S.M., et al., *Pharmacokinetics of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008. **17**(8): p. 1930-6.
125. Ling, H., et al., *6-Shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor-kappaB activation*. *Br J Pharmacol*, 2010. **161**(8): p. 1763-77.
126. Park, S.J., et al., *TBK1-targeted suppression of TRIF-dependent signaling pathway of Toll-like receptors by 6-shogaol, an active component of ginger*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009. **73**(7): p. 1474-8.
127. Del Rio, D., et al., *Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(14): p. 1818-92.
128. Nault, R., et al., *Comparisons of differential gene expression elicited by TCDD, PCB126, betaNF, or ICZ in mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells and C57BL/6 mouse liver*. *Toxicol Lett*, 2013. **223**(1): p. 52-9.
129. Zhang, S., C. Rowlands, and S. Safe, *Ligand-dependent interactions of the Ah receptor with coactivators in a mammalian two-hybrid assay*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. **227**(2): p. 196-206.
130. Hestermann, E.V. and M. Brown, *Agonist and chemopreventative ligands induce differential transcriptional cofactor recruitment by aryl hydrocarbon receptor*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(21): p. 7920-5.
131. Murray, I.A., et al., *Development of a selective modulator of aryl hydrocarbon (Ah) receptor activity that exhibits anti-inflammatory properties*. *Chem Res Toxicol*, 2010. **23**(5): p. 955-66.
132. Narayanan, G.A., et al., *Selective aryl hydrocarbon receptor modulator-mediated repression of CD55 expression induced by cytokine exposure*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012. **342**(2): p. 345-55.
133. Yin, X.F., et al., *A selective aryl hydrocarbon receptor modulator 3,3'-Diindolylmethane inhibits gastric cancer cell growth*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012. **31**: p. 46.
134. Xue, Z., et al., *Mechanisms and therapeutic prospects of polyphenols as modulators of the aryl hydrocarbon receptor*. *Food Funct*, 2017. **8**(4): p. 1414-1437.

論文内容の要旨

論文題目：野菜由来成分による薬物代謝関連転写因子の活性化に関する研究

氏名：吉田 和敬

指導教員：内田 浩二

背景と目的

野菜の主要な生体調節作用の1つとして生体異物の解毒作用があり、それには多くの薬物代謝関連転写因子が関わっている。その中で、aryl hydrocarbon receptor (AhR) は、薬物代謝の調節に深く関連するとともに、免疫調節など、他の生体調節機能にも深く関わっており、生体防御やホメオスタシスの維持において重要な役割を果たしている転写因子である。AhR のリガンドとしては、ダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD) などの毒性物質が古くから知られており、それらの毒性発現に関与するとされてきた。一方で近年は、食品由来の天然リガンドも多く報告されてきており、それらのリガンドにより生体に有益な作用をもたらすことも分かってきた。AhR の天然リガンドとして、野菜に含まれるフラボノイドやインドール化合物などがある。そのため、野菜由来の成分による AhR の活性化を評価することで、野菜成分による新たな生体調節機能の発見や、生体調節機能の新たなメカニズムの発見に繋がることが期待される。そこで本研究は、野菜由来の成分が AhR を初めとした薬物代謝関連転写因子に与える影響を明らかにすることを目的とした。

第一章 ブロッコリースプラウトの熱水抽出物がラット肝臓の薬物代謝に及ぼす影響

第一章では、薬物代謝に影響を与える成分を豊富に含むブロッコリースプラウトを対象とし、その熱水抽出物 (BSEx) が肝臓の薬物代謝に与える影響を動物試験により解析した。BSEx の摂取がラット肝臓の遺伝子発現に与える影響を詳細に解析するため、DNA マイクロアレイを用いて網羅的な解析を行った。BSEx の濃縮物を混餌し、7 週齢雄の Wistar ラットに 10 日間投与後、肝臓より抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、BSEx は、cytochrome P450 (*Cyp*) や glutathione S-transferase (*Gst*) など、薬物代謝に関連する遺伝子群の発現を亢進することが見出された。また、薬物代謝に関連するシグナルとして、転写因子である AhR や Nrf2 を介したシグナルの関与が示唆された。

続いて、BSExによる肝臓での解毒作用を評価するため、薬物性肝障害に与える影響について評価を行った。上記と同様の方法でBSExをラットに10日間摂取させ、その後アセトアミノフェン（APAP）を経口投与し、肝障害を誘導した。その結果、BSExの摂取は、APAPにより誘導される肝障害を抑制することが示された。さらに、BSExを摂取した群では、摂取しなかった群と比較して肝臓中のグルタチオン濃度やGST活性が高い値を示しており、マイクロアレイ解析により明らかにされた遺伝子発現変化との関連が認められた。

BSExは、これまでにブロッコリースプラウトの作用メカニズムとして知られていたNrf2だけでは無く、AhRを介して肝臓での薬物代謝を亢進していることが示唆された。一方、ブロッコリースプラウト中のAhR活性化物質であると考えられるインドール化合物やフラボノイドは野菜に広く含まれる成分であるため、他の野菜もAhRを活性化する可能性があると考えられた。そこで第二章では、AhRを活性化する野菜素材や成分を効率的に探索するため、AhR依存的転写活性の評価系を確立することとした。

第二章 AhR依存的転写活性評価系の確立

野菜素材や野菜の成分によるAhR活性化作用を詳細に解析するため、AhR依存的転写活性の評価系の確立を行った。ヒト肝臓がん由来細胞であるHepG2細胞に、AhR発現プラスミドベクターと、ルシフェラーゼ遺伝子上流にAhRの応答配列であるxenobiotic responsive element (XRE)をタンデムに3つ並べたAhR応答プラスミドベクター（pGL3-XRE）を共トランスフェクションし、AhR応答性安定HepG2細胞株を樹立した。この細胞株は、既知のAhRリガンドに対して応答し、ルシフェラーゼ活性を亢進した。さらに、AhRリガンドによるルシフェラーゼ活性の亢進と、AhRの標的遺伝子である薬物代謝関連遺伝子の発現量変化との間に有意な相関関係が確認された。以上のことから、AhR応答性安定HepG2細胞株は、AhRを活性化する成分を探索するのに有用な系であると考えられた。

第三章では、本章で確立したAhR応答性安定HepG2細胞株を用いて、種々の野菜の抽出物がAhR依存的転写活性に与える影響を評価するとともに、その活性成分の同定を行った。

第三章 AhR依存的転写活性を有する野菜由来成分の探索

ブロッコリースプラウトなどの23種類の野菜の熱水抽出物がAhR依存的転写活性に与える影響を評価した。その結果、ショウガ、モロヘイヤ、パセリ、ハウレンソウ、アシタバの5種類の

野菜の熱水抽出物に特に強い AhR 依存的転写活性の亢進が確認され、その活性はブロッコリースプラウトの熱水抽出物よりも強いものであった。さらに、それらの熱水抽出物から得た酢酸エチル抽出物と水抽出物について評価を行ったところ、ショウガの酢酸エチル抽出物に顕著に強い AhR 依存的転写活性の亢進が見られた。ショウガの酢酸エチル抽出物を HPLC で分析したところ、6-ショウガオールと 6-ジンゲロールがその主要成分として見出された。さらに、それぞれの成分の AhR 依存的転写活性を評価した結果、6-ショウガオールのみが AhR 依存的転写活性を亢進し、AhR の標的となる遺伝子やタンパク質の発現も亢進した。以上より、6-ショウガオールはショウガの主要な AhR 活性化物質であると考えられた。

第三章の結果より、6-ショウガオールには、AhR を介した解毒作用などの生理作用が期待された。一方で、AhR のリガンドの中には、TCDD や 3-methylcholanthrene (3MC) のように、AhR を活性化することで毒性を発揮する化合物も存在している。従って、6-ショウガオールの AhR リガンドとしての特性をより詳細に解析し、毒性化合物との違いを見出すことも重要であると考えられた。そこで第四章では、6-ショウガオールの AhR リガンドとしての特性を評価した。

第四章 6-ショウガオールの AhR リガンド特性の解明

6-ショウガオールおよび 3MC が AhR 依存的転写活性及び *CYP1A1* mRNA 発現量に与える影響を比較した。AhR 依存的転写活性については、6-ショウガオールと 3MC の EC50 値はそれぞれ 19.1 μ M、0.73 μ M であった。*CYP1A1* mRNA 発現量については、3MC は 1 μ M の低濃度においても 60 倍程度まで顕著に発現を亢進したが、6-ショウガオールは 25 μ M で 2 倍程度の亢進であった。以上の結果より、6-ショウガオールは 3MC などの毒性物質と比べると、AhR への親和性は低く、*CYP1A1* の遺伝子発現への影響は小さいことが明らかとなった。

続いて、6-ショウガオールの AhR 活性化メカニズムを、*in silico* によるシミュレーションにより検討した。ヒト AhR リガンド結合部位 (AhR-LBD) の立体構造は、PDB ID: 4F3LA

(CLOCK/BMAL dimer) の Per-Arnt-Sim (PAS) -B ドメインを雛型としたホモロジーモデリングにより構築した。構築した AhR-LBD の立体構造を用いて、6-ショウガオールによる AhR 活性化のメカニズムを *in silico* でのシミュレーションにより解析したところ、AhR-LBD 中の芳香族アミノ酸である His、Tyr、Phe との π - π 相互作用が関与しており、その相互作用の強さの違いがリガンド間の活性の違いに繋がっている可能性があると考えられた。一方、親電子性の高い 6-ショウガオールが、AhR-LBD 中の His や Cys などのアミノ酸残基と共有結合することで AhR

を活性化している可能性も見出され、3MCのような芳香族炭化水素とは異なる結合様式で AhR を活性化していることも考えられた。

総括

本研究では、摂取した野菜由来成分による生体への影響の新たなメカニズムの発見や、新たな生体調節機能の発見に繋げることを目的とし、薬物代謝や免疫調節など、生体防御やホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしている AhR の活性化への影響を評価した。その結果、ショウガやブロッコリースプラウトを等の野菜には AhR を活性化させる作用があることを明らかにした。また、ショウガに含まれる機能性成分である 6-ショウガオールによる AhR 活性化を初めて明らかにし、そのリガンド特性の一端を解明した。

AhR は、非常に多様性に富んだリガンドと複雑な調節機構を有し、ポジティブな面とネガティブな面の二面性を有する転写因子であるため、各リガンドの特性を十分に検証する必要がある。野菜由来の成分には、本研究で見出された 6-ショウガオールを初め、AhR リガンドとなる成分が多く存在するため、そのリガンド特性を詳細に評価することは、野菜の生体内での機能を推測する上で重要であると考えられる。本研究がその一助となり、野菜の成分による AhR 活性化作用に関する理解が深まることを期待したい。

謝辞

本学位論文を作成するにあたり、終始変わらぬ御懇意な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科教授 内田浩二先生ならびに前教授 清水誠先生、前准教授 戸塚護先生、前助教 薩秀夫先生に衷心より感謝の意を表します。

さらに、本研究の共同研究者として貴重な御意見と御助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科教授 阿部啓子先生、前准教授 中井雄治先生、助教 石島智子先生、芝浦工業大学生命科学研究科教授 越阪部奈緒美先生、教授 須原義智先生に心から感謝申し上げます。

本研究の機会を与えてくださいましたカゴメ株式会社社長 寺田直行氏、前総合研究所長 児玉弘仁氏、前研究開発本部長 佐藤邦彦氏、前イノベーション本部長 山口聡氏、イノベーション本部長 上田宏幸氏、ならびに前総合研究所主席研究員 稲熊隆博博士、矢嶋信浩博士に深く感謝いたします。

本研究の推進に当たり、貴重な御指導と御助言ならびに過大なご支援を賜りましたカゴメ株式会社イノベーション本部自然健康研究部長 菅沼大行博士、課長 相澤宏一博士、マーケティング本部商品開発部長 矢賀部隆史博士、カゴメアクシス総務健康サービス部課長 砂堀諭氏に心から感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なご協力を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科食糧化学研究室、同 ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」、前橋工科大学工学部生物工学科食品生理機能工学研究室、芝浦工業大学生命科学研究科創薬化学研究室の皆様は厚く御礼申し上げます。さらに、日々の研究生活において大変お世話になりました自然健康研究部の皆様に深く感謝いたします。

最後に、現在に至るまで多大なる支援をしてくださいました両親、常に私を理解し支えてくれた妻 史に感謝いたします。

2018年10月12日