

学位論文

ヒト小腸上皮様細胞株 Caco-2 における
小腸型アルカリホスファターゼ活性および
その遺伝子発現調節について

Regulation of intestinal alkaline phosphatase
activity and gene expression
in human intestinal epithelial-like cell line Caco-2

日本女子大学大学院

人間生活学研究科 人間発達学専攻（博士課程後期）

野田 聖子

目次

序論	8
----	---

第1章：ビタミン K₂ のアルカリホスファターゼ活性および

その遺伝子発現への影響

第1章 緒言	13
--------	----

研究1：コンフルエント前（未分化）の Caco-2 細胞における、ビタミン K₂ のアルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

・ 要約	16
・ 目的	17
・ 方法	18
・ 結果	26
・ 考察	37

研究2：小腸上皮様細胞（Caco-2）における、ビタミン K₂ の

アルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

・ 要約	40
・ 目的	41
・ 方法	42
・ 結果	46
・ 考察	53

第1章 結語	56
--------	----

第2章：ビタミンDのアルカリホスファターゼ活性および

その遺伝子発現への影響

第2章 緒言	58
--------	----

研究3：コンフルエント前（未分化）のCaco-2細胞における、ビタミンDの アルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

・ 要約	61
・ 目的	62
・ 方法	64
・ 結果	68
・ 考察	85

研究4：小腸上皮様細胞（Caco-2）における、ビタミンDの

アルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

・ 要約	89
・ 目的	90
・ 方法	91
・ 結果	95
・ 考察	109

第2章 結語	112
--------	-----

第 3 章：ヒト小腸型アルカリホスファターゼ遺伝子の発現ベクター

の構築とその遺伝子導入による一過性発現の影響

第 3 章 緒言	115
----------	-----

研究 5：ヒト小腸型アルカリホスファターゼ遺伝子の発現ベクターの構築と

Caco-2 細胞への IAP-a 発現ベクターのトランスフェクションによる

一過性発現の影響

・ 要約	116
・ 目的	118
・ 方法	119
・ 結果	126
・ 考察	139

第 3 章 結語	142
----------	-----

総括	143
----	-----

Summary	147
---------	-----

参考文献	150
------	-----

List of Figures and Tables

Chapter 1 : The influences of vitamin K₂ on ALP activity and gene expression.

Fig. 1-1	Chemical structure of vitamin K.....	15
----------	--------------------------------------	----

Study 1: The influences of vitamin K₂ on ALP activity and gene expression in pre-confluent Caco-2 cells.

Table 1-1	PCR oligonucleotide primers and predicted size of PCR products.....	23
Table 1-2	Inhibitory effects on alkaline phosphatase of Caco-2 cells (%).....	31
Fig. 1-2	Effect of MK-4 concentration on ALP activity in the Caco-2 cells.....	27
Fig. 1-3	Caco-2 cells on coverslips were stained for ALP activity on day 7.....	29
Fig. 1-4	The relative expression levels of mRNA for hIAP or hSI of Caco-2 cells.....	34
Fig. 1-5	The nucleotide sequences of PCR products from Caco-2 cells using hIAP primers are compared to the human intestinal ALP sequence (NCBI GenBank Accession No.: NM_001631) (top sequence).....	35

Study 2: The influences of vitamin K₂ on ALP activity and gene expression in differentiated Caco-2 cells.

Table 2-1	Inhibitory effects on alkaline phosphatase of Caco-2 cells (%).....	49
Fig. 2-1	Effects of the MK-4 concentration on ALP activity in Caco-2 cells.....	47
Fig. 2-2	The relative expression levels of mRNA for hIAP or hSI of Caco-2 cells.....	51

Fig. 2-3	Detection by RT-PCR of hSXR mRNA in the human adult small intestine or hTNSALP mRNA in the human adult kidney as a positive control.....	52
----------	--	----

Chapter 2 : The influences of vitamin D on ALP activity and gene expression.

Fig. 3-1	Chemical structure of vitamin D.....	60
----------	--------------------------------------	----

Study 3: The influences of vitamin D on ALP activity and gene expression in pre-confluent Caco-2 cells.

Table 3-1	PCR oligonucleotide primers and predicted size of PCR products.....	66
Table 3-2	Inhibitory effects on alkaline phosphatase of Caco-2 cells (%).....	73
Fig. 3-2	Effects of the 1, 25(OH) ₂ D ₃ concentration on ALP activity in Caco-2 cells.....	69
Fig. 3-3	Caco-2 cells on coverslips were stained for ALP activity on day 7.....	71
Fig. 3-4	The genomic organization and structure of alternatively spliced transcripts of human IAP.....	75
Fig. 3-5	(A) Detection by RT-PCR of RNAs of the variants aAug10 and bAug10 in the human adult small intestine using specific primers..... (B) (C) The nucleotide sequence of the PCR product (hIAP-a and hIAP-b) from the human small intestine using the specific primers for the variant aAug10 was compared with the human ALPI mRNA sequence [NCBI GenBank Accession No. NM_001631] (top sequence).....	76 77
Fig. 3-6	The relative expression level of mRNA for hIAP (A), hIAP-a (B), hIAP-b (C), or hVDR (D) in Caco-2 cells.....	81

Study 4: The influences of vitamin D on ALP activity and gene expression in differentiated Caco-2 cells.

Table 4-1	PCR oligonucleotide primers and predicted size of PCR products.....	93
Table 4-2	Inhibitory effects on alkaline phosphatase of Caco-2 cells (%).....	100
Fig. 4-1	Effects of the 1, 25(OH) ₂ D ₃ concentration on ALP activity in Caco-2 cells.....	96
Fig. 4-2	Caco-2 cells on coverslips were stained for ALP activity on day 7.....	98
Fig. 4-3	Intestinal ALP isozymes of the Caco-2 cells on day 7 separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis.....	102
Fig. 4-4	The relative expression levels of mRNA for hIAP (A), hVDR (B), hSI (C), or hDPP-4 (D) in Caco-2 cells.	105

Chapter 3 : Construction of IAP-a expression vector and the influences of transient IAP overexpression by gene transfection.

Study 5: Construction of human intestinal ALP gene expression vector and the influences of transient overexpression of IAP-a expression vector in Caco-2 cells.

Table 5-1	PCR oligonucleotide primers and predicted size of PCR products.....	124
Fig. 5-1	(A) Image of pCR4-TOPO vector.....	120
	(B) Image of pcDNA3 expression vector.....	121
Fig. 5-2	(A) The nucleotide sequences of IAP-a expression vector using Sp6 or T7 primers are compared to the human intestinal ALP sequence (NCBI GenBank Accession No.: NM_001631) (top sequence).....	127
	(B) The nucleotide sequence of the IAP-a expression vector.....	128
Fig. 5-3	Transient transfected Caco-2 cells with the human IAP gene or Mock were used to study the influence of IAP overexpression on ALP activity.....	130
Fig. 5-4	Caco-2 cells on coverslips were stained for ALP activity on day 3.....	132
Fig. 5-5	Intestinal ALP isozymes of the Caco-2 cells on day 7 separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis.....	134
Fig. 5-6	The relative expression levels of mRNA for hIAP (A), hIAP-a (B), hIAP-b (C) in Caco-2 cells.....	136

序論

アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase ; ALP ; EC 3.1.3.1) は、細菌から高等動物まで広く生物界に存在し、骨、肝臓、腎臓、小腸、胎盤など種々の組織に存在する酵素である。アルカリ性に至適 pH を有し、リン酸エステルを無機リン酸とアルコールに加水分解する反応を触媒している。大腸菌からマウス、ラット、ヒトに至るまで、ALP の基本構造は共通で同一の祖先から進化した可能性が示されており、ALP がリン酸エステルの加水分解を通じて、さまざまな生理作用に関与していることが推察されている[1]。

ヒトにおいて、ALP は骨、肝臓、腎臓などに存在する組織非特異型 ALP (tissue-nonspecific ALP ; TNSALP)、小腸に局在する小腸型 ALP (intestinal ALP ; IAP)、胎盤型 ALP、生殖細胞型 ALP の少なくとも 4 型に分類されている[2-5]。IAP は、胎盤型 ALP と 87%アミノ酸相同性を示し、TNSALP とは 57%アミノ酸相同性を示すことが知られており[6]、アミノ酸のホモロジーの研究より、原始 ALP の遺伝子から、まず *TNSALP* 遺伝子が生じ、さらに IAP の遺伝子、そして霊長類では胎盤型 ALP 遺伝子が進化の過程で出現してきたと考えられている[1]。

ヒトの TNSALP は、全長 50 kb 以上の長さの *TNSALP* 遺伝子によりコードされ、第一染色体上に存在する。*TNSALP* 遺伝子の欠損により引き起こされる低ホスファターゼ症 (Hypophosphatasia ; HPP) の研究から、TNSALP は骨組織における石灰化に深く関与していることが示されている[7, 8]。近年、Goseki-Sone et al.により、日本人高齢女性において、*TNSALP* 遺伝子多型 (787T>C) (rs3200254)と骨密度が関連していることが明らかとなった[9]。

ヒトの IAP は *ALPI* 遺伝子によりコードされ、第二染色体上に存在する。IAP

は小腸上皮細胞の刷子縁膜に高濃度に存在しており、腸の分化マーカーの 1 つとして用いられている[10, 11]。IAP に関し、マウスを用いた先行研究で、絶食により十二指腸の ALP 活性が低下するが、食物摂取により ALP 活性が上昇したこと[12]、野生型のマウスに比べ、IAP 遺伝子のノックアウトマウスで長期間の高脂肪食摂取により顕著に体重が増加したこと[13]、低脂肪食摂取でも IAP 遺伝子のノックアウトマウスでは耐糖能異常や内臓脂肪の蓄積などが認められ[14]、IAP が脂質代謝に深く関連していることが示唆されている。そのメカニズムの 1 つとして、腸管での長鎖脂肪酸の輸送の調節に関与しているスカベンジャー受容体の 1 つである Cluster of differentiation 36 (CD36) を IAP が脱リン酸化することにより、長鎖脂肪酸の取り込みを促進している可能性が示されている [15]。さらに、グラム陰性菌の細胞壁の構成成分で、内毒素として知られるリポ多糖 (lipopolysaccharide ; LPS) を IAP が脱リン酸化することで、粘膜防御因子としての作用が報告されている[12]。IAP が LPS の受容体である Toll 様 receptor 4 (toll-like receptor 4 ; TLR4) 経路を介した保護作用により、マウスにおける大腸炎を改善することやアルコール誘発性の脂肪肝を減弱させることなどが報告されている[16, 17]。さらに、マウスにおける IAP の経口投与が腸の IgA レベルを増加させること、幼少期のマウスに抗生物質と IAP を経口投与した研究において、成熟したマウスでメタボリックシンドロームの罹患を予防したことなどから、IAP は腸内細菌との関わりが深いことが示唆され[18, 19]、IAP が管腔のヌクレオチド三リン酸濃度を低下させることで、腸内細菌の増殖を促進させることが報告されている[20]。このように、近年、マウスなど動物モデルを用いて、IAP の生理作用の解明の研究が進められてきているが、食事性因子がヒト IAP 活性やその遺伝子発現に及ぼす影響、ヒト IAP をコードする *ALPI* 遺伝子発現調節のメカニズムについては、ほとんど検討されていない。

ヒトの IAP 発現を検討するために、本研究ではヒト小腸上皮様細胞株である Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来であるが、培養により小腸上皮様細胞に分化することが知られている。ヒト小腸の初代培養細胞は入手困難であることから、小腸における腸管機能をスクリーニング的に探索する細胞モデルとして、グルコースの吸収抑制作用や薬物の消化管透過性などの研究分野で広く用いられている[21]。Matsumoto et al.は、Caco-2 細胞について、コンフルエント直後は小腸上皮様細胞に分化しておらず、コンフルエントから 14 日後は小腸上皮様細胞に分化した状態であるとしている[22]。ALP を含む小腸上皮細胞で発現される加水分解酵素（スクラーゼ・イソマルターゼ、ジペプチジルペプチダーゼIVなど、後述）は、腸の分化マーカーとして用いられており、これら酵素活性の上昇により分化が特徴づけられている[10, 11]。

本論文では、様々な生理作用が示唆されている IAP が、ヒトにおいてどのような機序で作用しているのか、ヒト Caco-2 細胞を用いて IAP の発現調節について検討することを目的とし、以下の 3 章から構成した。

第 1 章：ビタミン K₂ のアルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

第 2 章：ビタミン D のアルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

第 3 章：ヒト小腸型アルカリホスファターゼ遺伝子の発現ベクターの構築とその遺伝子導入による一過性発現の影響

まず、IAP が食事性因子と関わりが深いことから、食事性因子の Caco-2 細胞における IAP への影響を検討するために、第 1 章および第 2 章では、脂溶性ビ

タミンである「ビタミン K₂」や「ビタミン D」による ALP 活性およびその遺伝子発現について検討を行った。

さらに、第 3 章では、ヒト小腸型アルカリホスファターゼ遺伝子の発現ベクターの構築とその発現ベクターの Caco-2 細胞へのトランスフェクションによる一過性発現の影響についても検討を行った。

第 1 章

ビタミン K₂ のアルカリホスファターゼ活性
およびその遺伝子発現への影響

第 1 章：諸言

ビタミン K は 1, 4-ナフトキノン環を共通構造とし、ビタミン K₁ (phylloquinone ; PK) とビタミン K₂ (menaquinone ; MK) が天然に存在する。ビタミン K₁ は側鎖にフィチル基を有し、ほうれん草、小松菜、ブロッコリーなどの緑色野菜に多く含まれる。ビタミン K₂ は、側鎖にイソプレン鎖を有し、その側鎖の繰り返し構造の長さにより MK-1~14 に分類される。本研究で用いた MK-4 (メナテトレノン) は、日本において骨粗鬆症治療薬として使用されており、肉類や鶏卵などの動物性食品に多く含まれる[23]。また、MK-7 は納豆に多く含まれている。食事由来のビタミン K は主に PK であるが、PK は体内において側鎖が除去され、MK-4 に変換される[24, 25]。Fig. 1-1 (A), (B) に PK および MK-4 の化学構造式を示した[26]。

ビタミン K は γ -グルタミルカルボキシラーゼ (gamma-glutamyl carboxylase ; GGCX) の補酵素としての役割を果たし、血液凝固作用だけでなく、骨の石灰化にも関わる重要な栄養素であり、肝癌再発や進展の予防効果作用、冠動脈疾患リスクの軽減作用なども報告されている[27-29]。また、近年、ビタミン K₂ が骨芽細胞系において、 γ -カルボキシル化の作用とは別に、核内受容体であるステロイド X 受容体 (steroid and xenobiotic receptor ; SXR) を介して、TNSALP を始めとする骨代謝関連遺伝子の発現調節を行っていることが示されている[30]。さらに、ビタミン K₂ が SXR を活性化させることにより、肝細胞癌の増殖や運動性を抑制することも報告されている[31]。

本研究室の以前の研究で、ラットやマウスにおいて、ビタミン K 混餌食の長期摂取やビタミン K の経口投与によって小腸の ALP 活性が上昇したことから、ビタミン K が IAP 活性調節に関与していることを示した[32-34]。しかし、ビタ

ミン K がヒト IAP へ及ぼす影響については検討されていなかった。そこで今回、ヒト小腸上皮様細胞株 Caco-2 細胞を用いてビタミン K による IAP 発現への影響について検討することとした。Caco-2 細胞は、コンフルエントから 14 日後に小腸上皮様細胞に分化することから[22]、＜研究 1＞において、コンフルエント前の Caco-2 細胞におけるビタミン K の ALP 活性およびその遺伝子発現への影響を検討し、＜研究 2＞において、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞におけるビタミン K の ALP 活性およびその遺伝子発現への影響を検討した。

さらに、IAP と同様に腸の分化マーカーであるスクラーゼ・イソマルターゼ (sucrase-isomaltase ; SI ; EC 3.2.1.10) の遺伝子発現におけるビタミン K の影響についても検討を行った。

(A)

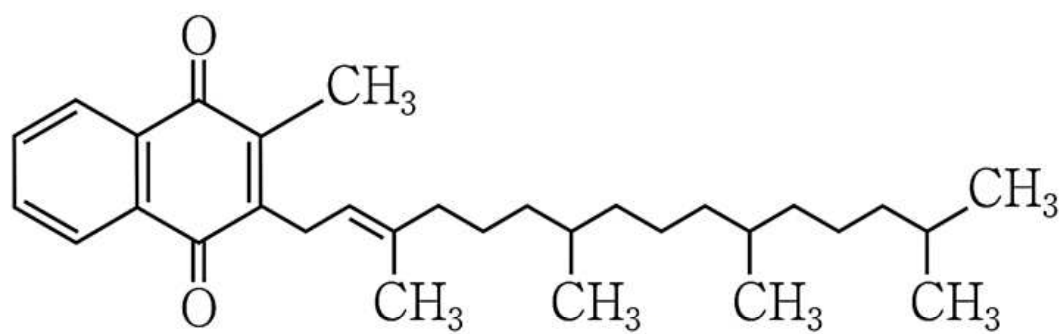


Fig. 1-1 (A) Chemical structure of vitamin K₁ (phylloquinone).

(B)

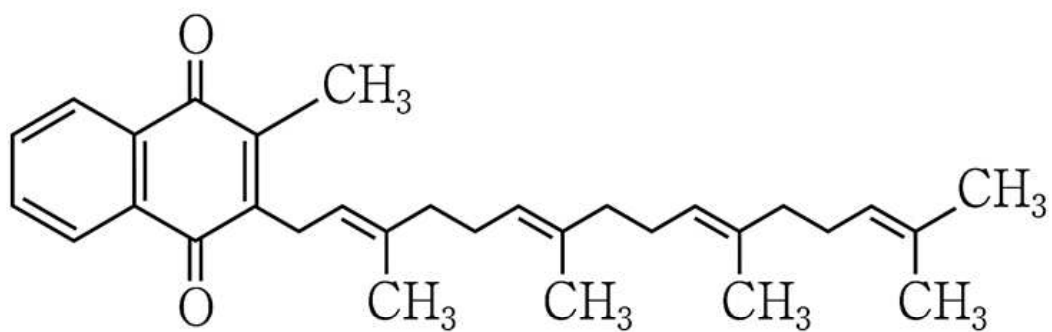


Fig. 1-1 (B) Chemical structure of menaquinone-4 (MK-4).

第 1 章

研究 1 : コンフルエント前 (未分化) の Caco-2 細胞における、 ビタミン K₂ のアルカリホスファターゼ活性およびその 遺伝子発現への影響

要約

本研究では、ビタミン K₂ の中でも生体内において高い生理活性を示す MK-4 (menaquinone-4) による Caco-2 細胞での ALP 活性およびその遺伝子発現への影響について検討を行った。

MK-4 を添加した培地 (MK-4 濃度 : 0、1、5、10 μ M) での培養 3、7、11 日目において、MK-4 濃度 1 μ M における ALP 活性が、MK-4 濃度 0 μ M (コントロール) と比較し、有意に高値を示した。Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 分析により遺伝子発現を比較したところ、MK-4 添加培地での培養 3 日目において、ヒト小腸型 ALP 遺伝子の mRNA 発現量が、MK-4 濃度 1 μ M で MK-4 濃度 0 μ M に比べ、有意に高値を示した。また、MK-4 添加培地での培養 7 日目において、腸の分化マーカーとして知られるスクラーゼ・イソマルターゼの遺伝子の mRNA 発現量が、MK-4 濃度 1 μ M で MK-4 濃度 0 μ M に比べ、有意に高値を示した。

Caco-2 細胞においてビタミン K₂ により IAP mRNA 発現が誘導されることが今回初めて明らかとなった。今後さらに IAP の生理機能に関する研究を行うことで、ビタミン K の新たな生理作用に関する有用なデータが得られることが期待される。

目的

先行研究において、動物モデルを用いてビタミン K により小腸の ALP 活性が上昇したことが報告されている[32, 33]。しかし、ビタミン K によるヒトの小腸の ALP 活性への影響に関しては報告がない。そこで、本研究では、コンフルエントに達していない未分化の Caco-2 細胞に MK-4 を添加し、ALP 活性への影響とその ALP アイソザイムの同定、ALP 遺伝子および SI 遺伝子発現への影響について検討することを目的とした。

方法

(1) 細胞培養

ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を RIKEN Cell Bank (RCB0988) (独立法人理化学研究所バイオソースセンター, Ibaraki, Japan) より購入した。D-MEM : Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Grand Island, NY USA) に 10% の FBS : fetal bovine serum (Gibco), 1% の NEAA : Non-Essential Amino Acid (Gibco), 1% の抗生物質 (ペニシリン : 100U/mL, ストレプトマイシン : 100 µg/mL) を加えた培地で, 5%CO₂ 存在下, 37°C で培養を行った。

Caco-2 細胞を 35 mm 培養ディッシュ (Tissue Culture Dish Easy Grip 35 x 10 mm style, FALCON, Bedford, USA) に播種し (2~5 x 10⁴ 個 cells / cm²), その 2 日後 (60~70%コンフルエントの状態) に MK-4 添加培地 (0、1、5、10 µM) へと交換し、それぞれの培養条件で培養後、0、3、7、11 日目に細胞を採取した。

今回の実験に使用した MK-4 はエーザイ株式会社 (Tokyo, Japan) よりご提供いただいた。MK-4 はエタノールで溶解し、エタノールの最終濃度を培地の 0.1% となるように調整し、培地は 2 日おきに交換した。

(2) サンプルの調整

サンプルについて PMSF [Phenylmethylsulfonyl Fluoride (Wako, Osaka, Japan) と BENZANMIDINE (SIGMA, Steinheim, Germany) を 99.9%エタノールに溶かしたもの] が 1 mM になるように加えた TBS 溶液 [10mM Tris-buffered saline (pH7.4) 0.9%NaCl を含む] を 0.5 ml / dish 加えて細胞を剥がし、ホモジナイズした (POLYTRON PT1200, KINEMATICA AG,

Switzerland)。1%になるように TritonX-100 (SIGMA) を加えて、10 分間室温で攪拌し、1,000 x g で 5 分間遠心分離を行い、得られた上清を酵素抽出液とした。

(3) アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定

マイクロタイタープレート [PVC Micro titer “U” Bottom Plates : No,2101 (DYNEXTECHNOLOGIES, INC, VA, U.S.A)] の各ウェルに、酵素抽出液 50 μ l、*p*-NPP 基質液 [10 mM *p*-nitrophenyl phosphate disodium salt (Wako) , 5 mM MgCl₂, 100 mM 2-Amino-2-methyl 1,3-propandiol HCl buffer (pH10.0)] 150 μ l を加え、室温にて一定時間反応させた。その後、2N NaOH を 50 μ l 加えて反応を停止させ、405 nm にて吸光度測定を行った [Lab systems Multiskan BICHROMATIC (Thermo Lab systems Helsinki, Finland)]。

ALP 活性を以下の式にて算出した。

ALP activity (mU/ml)

$$= A_{405} / 60.4 / \text{反応時間(min.)} / \text{サンプル量(ml)} \times \text{希釈率}$$

A_{405} : 測定波長 405nm での吸光度

サンプル量 : 反応させた酵素抽出液の量(ml)

1 U=100 mU=1 μ mol *p*-nitro phenol formed/min.

なお、タンパク質含量は、BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) を用いて測定した[35]。

(4) アルカリホスファターゼ (ALP) 酵素組織化学染色

培養細胞から培地を除き、10 mM TBS で 3 回洗浄した後、10%ホルマリン (Wako, Osaka, Japan) を 2 ml 入れ、10 分間細胞を固定した。さらに 10 mM TBS で 3 回洗浄した後、染色液 [Naphyl AS-MX phosphate (SIGMA)、N,N, dimethylfolmamide (Wako)、20 mM MgCl₂ を含む 0.4 M Tris-HCl buffer、Fast Red Violet LB salt (SIGMA)] を 2 ml 入れ、室温で反応させた。その後、細胞を Fast Violet LB salt (Sigma-Aldrich) で染色を行った[36]。

(5) アルカリホスファターゼ (ALP) 阻害実験

阻害剤 (Levamisole) および熱による阻害実験を既報[37]に従い行った。基質液 [0.1 M *p*-nitrophenyl phosphate, 50 mM MgCl₂, 1M 2-Amino-2-methyl 1-1, 3-propandiol HCL buffer (pH10.0)] 130 μ l に阻害剤を加え反応させ、その後 2N NaOH 50 μ l で反応を停止させた。熱阻害実験は、サンプルを 56°C で 10 分間加熱処理し、基質液を加えて反応させた。そしてコントロールの吸光度を 100%として残存率を算出した。

コントロール：サンプル 30 μ l + H₂O 40 μ l + 基質液 130 μ l

Levamisole：サンプル 30 μ l + 阻害剤 40 μ l + 基質液 130 μ l

56°C 10 分加熱：熱処理サンプル 30 μ l + H₂O 40 μ l + 基質液 130 μ l

(6) RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 分析

① RNA 抽出

チオシアン酸フェノール-クロロホルム法[38]にて RNA Zol (CS104 RNAzolTMB, TEL-TEST, INC., TX, U.S.A) を用いて細胞サンプルの total RNA を抽出した。

② cDNA (complementary DNA) 作製

2 µg の total RNA を採取し、DEPC (diethyl-pyrocardonate) 処理水を加え、全量を 32 µl として 65°C で 10 分間加熱を行った。その後氷上で急冷し、これを Ready-to-Go (27-9264-01 Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England) のチューブに入れ、50 ng/µl Random Primer (Gibco BRL, MD, U.S.A) を 1 µl 加えて 37°C で一晩反応させた。

③ PCR 法による DNA の増幅

Takara Taq (R001B, Takara, Shiga, Japan) を用いて PCR を行った。上記 cDNA 2 µl に 10×Buffer 5 µl、2.5 mM each dNTP 4 µl、5 U/µl Taq ポリメラーゼ 0.3 µl、超純水 36.5 µl、forward・reverse プライマー 各 1 µl を加え、PCR 装置 (SimpliAmpTM Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific) を用いて変性・プライマーのアニーリング・伸長反応のステップをそれぞれ行い、増幅させた。

PCR condition :

(94°C-5min) × 1, (94°C-1min, 50°C1min, 72°C1min) × 5, (94°C-30sec, 55°C-30sec, 72°C-30sec) × 25, (72°C-10min), 4°C-∞

PCR プライマーは、hIAP : human intestinal alkaline phosphatase[39]、hSI : human Sucrase-Isomaltase[40]、hSXR : human steroid and xenobiotic receptor[31]、hTNSALP : human tissue non-specific alkaline phosphatase[41]、GAPDH : Glyceraldehyde phosphatase dehydrogenase を用いた。forward ・ reverse プライマーは **Table 1-1** に示した。

Table 1-1 PCR oligonucleotide primers and predicted size of PCR products.

Primer		Length	Position [*]
hIAP forward	5' CACGACACGCGGCAATGAGGTC 3'	708 bp	422-1129
hIAP reverse	5' TGGTCAGCGGTGACGAGGGTCA 3'		
hSI forward	5' CATCCTACCATGTCAAGAGCCA 3'	196 bp	5070-5265
hSI reverse	5' GCTTGTTAAGGTGGTCTGGTTT 3'		
hSXR forward	5' CAAGCGGAAGAAAAGTGAACG 3'	442 bp	378-819
hSXR reverse	5' CTGGTCCTCGATGGGCAAGT 3'		
hTNSALP forward	5' AAGGAGGCAGAATTGACCACG 3'	195 bp	998-1192
hTNSALP reverse	5' CAAAGATAGAGTTGCCACGGG 3'		
GAPDH forward	5' ACCACAGTCCATGCCATCCAC 3'	452 bp	525-976
GAPDH reverse	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'		

^{*}The A in the ATG of the initiator Met codon is denoted as nucleotide +1.

④ ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PCR 産物 8 μ l にゲルローディングバッファー [sample Buffer Solution A (50% glycerol, 0.25%BPB, 0.25% xylen cyanol) : Sample Buffer Solution B (5% SDS, 0.1M EDTA) =1 : 1] 2 μ l を加え、5.25%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動 (100V, 20min.) を行った。その後、エチジウムブロマイド染色し、脱色後ポラロイド写真撮影 (FP-6000 型, フナコシ, Tokyo, Japan) を行った。

⑤ デンシトメーターによる計測

デンシトメーター (ATTO Densitograph software library, Macintosh 版 Version4.0 アトー株式会社, Tokyo, Japan) を用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動後のバンド濃度測定を行い、RNA 発現量を比較した。なお、全ての測定値は、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH で標準化した。

(6) DNA 塩基配列の確認

Caco-2 細胞で発現されたヒト小腸型 ALP 遺伝子の PCR 産物 (hIAP) については、ダイレクトシーケンス法により、BigDyeR Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) にて塩基配列の確認を行った。

(7) 統計処理

実験結果は、平均値 (the mean) \pm 標準誤差 (S.E.) で示した。統計ソフト IBM SPSS Statistics 22 (日本アイ・ビー・エム (株), Tokyo, Japan) を使用し、ALP 活性分析および阻害実験における各データの有意差検定については、

一元配置分散分析後、Dunnet の検定を行った。また、RT-PCR 分析において、MK-4 濃度 0 μ M および 1 μ M の 2 群間の平均値の検定には、Student's t 検定を行った。なお、危険率 5%を有意差ありとした。

結果

(1) ALP 活性

Fig. 1-2 に採取した Caco-2 細胞の ALP 活性を示した。

培地中の MK-4 濃度を 0、1、5、10 μM の 4 種類とし、培養後 0、3、7、11 日目の Caco-2 細胞の ALP 活性の経時的変化を示した。

MK-4 添加培地での培養 3 日目において、MK-4 濃度 1 μM における ALP 活性は、0 μM と比べて有意に高値を示した ($p < 0.01$)。

MK-4 添加培地での培養 7 日目において、MK-4 濃度 1、5、10 μM における ALP 活性は、0 μM と比べていずれも有意に高値を示した (それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$)。

MK-4 添加培地での培養 11 日目において、MK-4 濃度 1 μM における ALP 活性は、0 μM と比べて有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

なお、データには示していないが、MK-4 濃度 1、5、10 μM と 0 μM 間でのタンパク質濃度に有意な差は認められなかった。

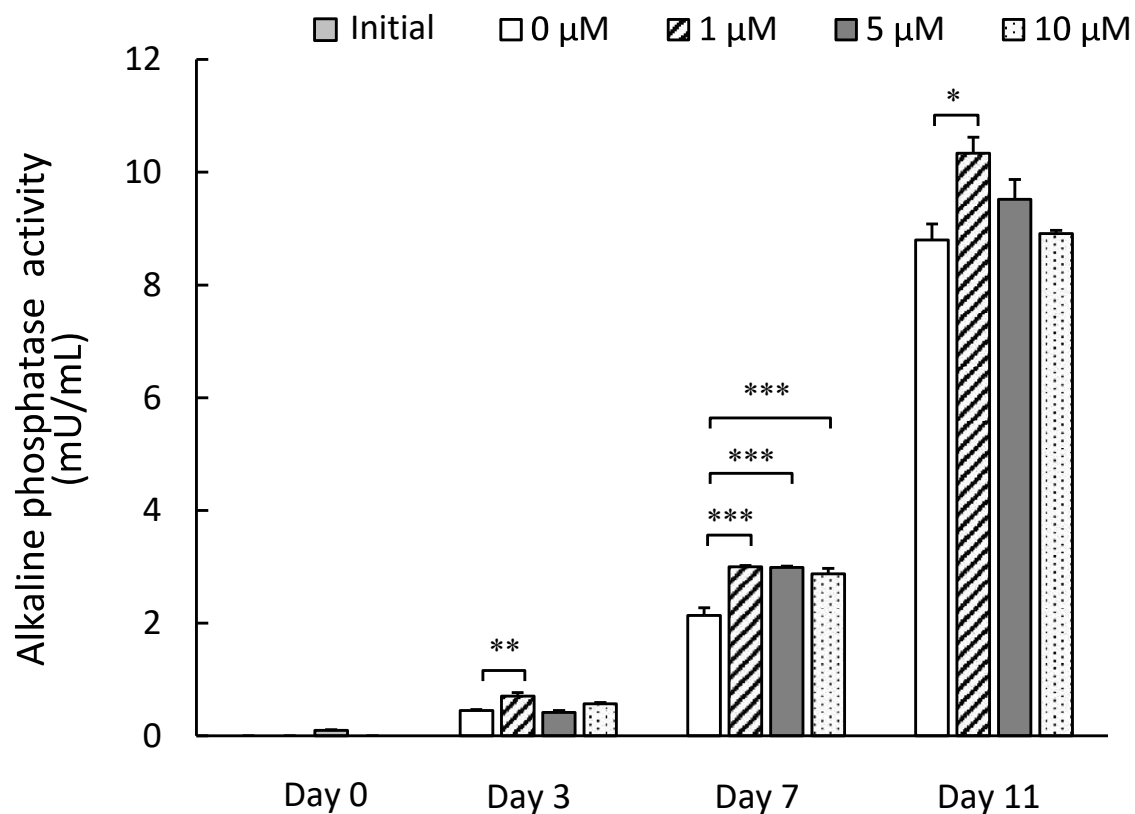


Fig. 1-2 Effect of MK-4 concentration on ALP activity in the Caco-2 cells. The Caco-2 cells was cultured in various concentrations of MK-4 in the medium for 3, 7, and 11 days.

Results are the mean \pm S.E. from triplicate experiments.

Dunnett's multiple comparison test was used after ANOVA to compare the significance of differences among MK-4 concentrations of 0, 1, 5, and 10 μ M (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

(2) ALP 酵素組織化学染色

ALP 活性で有意差が認められた MK-4 添加培地での培養 7 日目における MK-4 濃度 0、1、5、10 μM について、ALP 酵素組織化学染色を行った結果を **Fig. 1-3 (A)~(D)**に示した。

赤く染色された ALP 酵素染色細胞は、MK-4 を添加した Caco-2 細胞で、0 μM 培地での Caco-2 細胞に比べてより多く観察されたが、MK-4 処理群において小腸上皮様に分化した形態学的特徴は認められなかった。

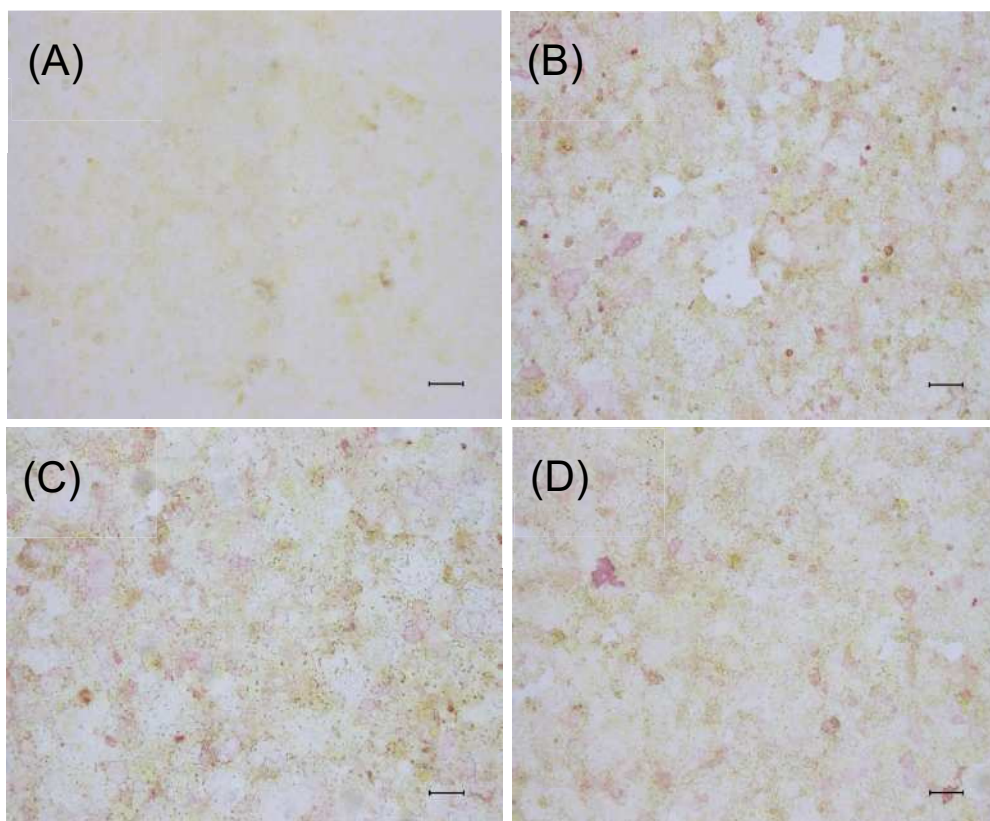


Fig. 1-3 Caco-2 cells on coverslips were stained for ALP activity on day 7.

Light micrograph of the monolayer of confluent Caco-2 cells (x 100).

Cells were stained for ALP activity (stained red) as described in Materials and Methods.

(A) MK-4: 0 μ M.

(B) MK-4: 1 μ M.

(C) MK-4: 5 μ M.

(D) MK-4: 10 μ M.

Bar=100 μ m

(3) ALP の酵素特性

MK-4 添加 7 日目の MK-4 濃度 0、1、5 μM における ALP の酵素特性について、レバミゾールによる阻害実験と加熱実験を行った (**Table 1-2**)。

MK-4 濃度 1 μM または 5 μM におけるレバミゾールおよび加熱処理後の ALP 活性残存率は、0 μM に比べてそれぞれ有意な差は認められなかった。

Table 1-2 Inhibitory effects on alkaline phosphatase of Caco-2 cells (%)

MK-4 concentrations		Levamisole (1 mM)	Heat inactivation (56°C 10 min)
Caco-2 cells	0 μ M	29.0 \pm 6.4	100.0 \pm 0.0
	1 μ M	39.2 \pm 2.0	100.0 \pm 0.0
	5 μ M	33.9 \pm 1.2	97.8 \pm 1.2

ALP activity was assayed by the rate of hydrolysis of *p*-nitro-phenylphosphate.

The effect of the inhibitor was determined in the presence of 5 mM MgCl₂ in the assay mixture.

Activities of non-treated controls were designated as 100%.

Cultured cells were treated with MK-4 (0, 1, or 5 μ M) for 7 days.

Each value represents the means \pm S.E. of triplicate experiments.

(4) RT-PCR 分析

MK-4 添加培地での培養 3、7、11 日目の MK-4 濃度 0 μM と 1 μM について、RT-PCR 分析を行った。

MK-4 添加培地での培養 3 日目の Caco-2 細胞において、ヒト小腸型 ALP 遺伝子の mRNA の PCR 産物 (hIAP ; 708 bp) について、MK-4 濃度 0 μM では検出されなかったが、1 μM において検出され、デンシトメーターにてバンド濃度を測定した結果、hIAP mRNA の発現量は、MK-4 濃度 1 μM で、0 μM に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$) [Fig. 1-4 (A)]。ヒト SI 遺伝子の mRNA (hSI ; 196 bp)、ヒト SXR 遺伝子の mRNA (hSXR ; 442 bp)、ヒト TNSALP 遺伝子の mRNA (hTNSALP ; 195 bp) の PCR 産物は、検出されなかった。

MK-4 添加培地での培養 7 日目の Caco-2 細胞においては、hIAP の PCR 産物は培養 3 日目と異なり、MK-4 濃度 0 μM と 1 μM で、ほぼ同じ濃さのバンドが検出された。また、hSI の PCR 産物については、MK-4 濃度 0 μM と比較し、1 μM で濃いバンドが検出され、デンシトメーターにてバンド濃度を測定した結果、hSI mRNA の発現量は、1 μM で 0 μM に比べ有意に高値を示した ($p < 0.01$) [Fig. 1-4 (B)]。hTNSALP の PCR 産物は僅かに検出され、MK-4 濃度 0 μM と 1 μM では同じ濃さのバンドが検出された。hSXR の PCR 産物は検出されなかった。

MK-4 添加培地での培養 11 日目の Caco-2 細胞においては、hIAP および hSI の PCR 産物は、MK-4 濃度 1 μM で 0 μM と比較し、やや濃いバンドが検出されたが、デンシトメーターによる解析の結果、有意な差は認められなかった。hSXR の PCR 産物は僅かに検出され、hTNSALP の PCR 産物は検出されなかった。

なお、**Fig. 1-5** (A), (B)に示したように、コントロール群 (MK-4: 0 μ M) と MK-4 添加群 (1 μ M) のヒト小腸型 ALP 遺伝子の PCR 産物 (hIAP) の塩基配列は、NCBI GenBank において公表されているヒト IAP mRNA の塩基配列 (Accession No. : NM_001631) と一致していることを確認した。

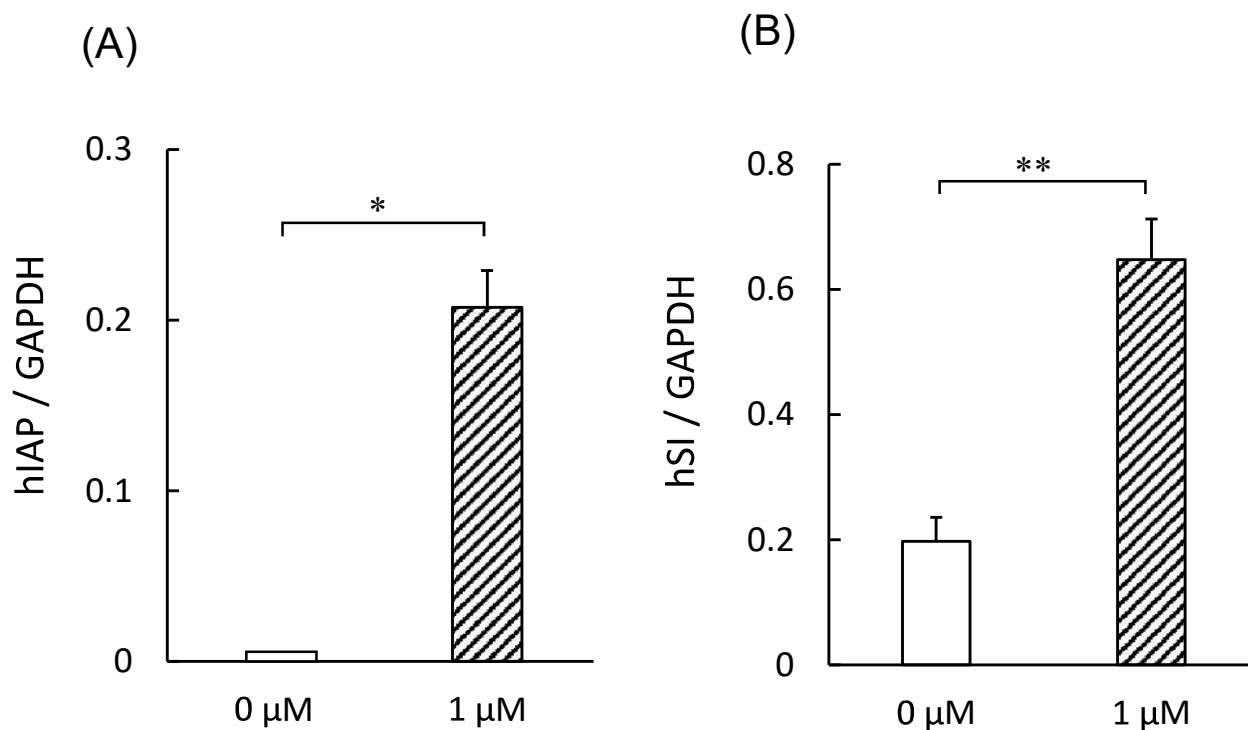


Fig. 1-4 The relative expression levels of mRNA for hIAP or hSI of Caco-2 cells. All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH.

Results are the mean \pm S.E. from triplicate experiments.

Comparisons between the MK-4-treated (1 μ M) and control (0 μ M) groups were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test (*: $p < 0.05$, *: $p < 0.01$).

(A) The relative expression levels of mRNA for hIAP in Caco-2 cells on day 3.

(B) The relative expression levels of mRNA for hSI in Caco-2 cells on day 7.

hIAP: human intestinal alkaline phosphatase,

hSI: human sucrase-isomaltase.

(A)

```

422~
hIAP:  CACGACACGCGGCAATGAGGTCATCTCCGTGATGAACCGGGCCAAGCAAGCAGGAAAGTC
      *****
Caco-2: CACGACACGCGGCAATGAGGTCATCTCCGTGATGAACCGGGCCAAGCAAGCAGGAAAGTC

482~
hIAP:  AGTAGGAGTGGTGACCACCACACGGGTGCAGCACGCCTCGCCAGCCGGCACCTACGCACA
      *****
Caco-2: AGTAGGAGTGGTGACCACCACACGGGTGCAGCACGCCTCGCCAGCCGGCACCTACGCACA

542~
hIAP:  CACAGTGAACCGCAACTGGT.....GACCATGGTCATCATGAGGG
      *****
Caco-2: CACAGTGAACCGCAACTGGT.....GACCATGGTCATCATGAGGG

1022~
hIAP:  TGTGGCTTACCAGGCACTCACTGAGGCGGT CATGTT CGACGACGCCATTGAGAGGGCGGG
      *****
Caco-2: TGTGGCTTACCAGGCACTCACTGAGGCGGT CATGTT CGACGACGCCATTGAGAGGGCGGG

1082~
hIAP:  CCAGCTCACCAGCGAGGAGGACACGCTGACCCTCGTCACCGCTGACCA
      *****
Caco-2: CCAGCTCACCAGCGAGGAGGACACGCTGACCCTCGTCACCGCTGACCA

```

Fig. 1-5 The nucleotide sequences of PCR products from Caco-2 cells using hIAP primers are compared to the human intestinal ALP sequence (NCBI GenBank Accession No.: NM_001631) (top sequence).

The nucleotide sequences of hIAP primers are underlined.

Matches among the two sequences are marked by asterisks.

(A) The PCR products for hIAP in the control group.

hIAP: human intestinal alkaline phosphatase.

The A in the ATG of the initiator Met codon is denoted nucleotide +1.

(B)

```
422~
hIAP: CACGACACGCGGCAATGAGGTCATCTCCGTGATGAACCGGGCCAAGCAAGCAGGAAAGTC
*****
Caco-2: CACGACACGCGGCAATGAGGTCATCTCCGTGATGAACCGGGCCAAGCAAGCAGGAAAGTC

482~
hIAP: AGTAGGAGTGGTGACCACCACACGGGTGCAGCAGGCCTCGCCAGCCGGCACCTACGCACA
*****
Caco-2: AGTAGGAGTGGTGACCACCACACGGGTGCAGCAGGCCTCGCCAGCCGGCACCTACGCACA

542~
hIAP: CACAGTGAACCGCAACTGGT.....GACCATGGTCATCATGAGGG
*****
Caco-2: CACAGTGAACCGCAACTGGT.....GACCATGGTCATCATGAGGG

1022~
hIAP: TGTGGCTTACCAGGCACTCACTGAGGCGGTGATGTTGACGACGCCATTGAGAGGGCGGG
*****
Caco-2: TGTGGCTTACCAGGCACTCACTGAGGCGGTGATGTTGACGACGCCATTGAGAGGGCGGG

1082~
hIAP: CCAGCTCACCAGCGAGGAGGACACGCTGACCCTCGTCACCGCTGACCA
*****
Caco-2: CCAGCTCACCAGCGAGGAGGACACGCTGACCCTCGTCACCGCTGACCA
```

Fig. 1-5 The nucleotide sequences of PCR products from Caco-2 cells using hIAP primers are compared to the human intestinal ALP sequence (NCBI GenBank Accession No.: NM_001631) (top sequence).

The nucleotide sequences of hIAP primers are underlined.

Matches among the two sequences are marked by asterisks.

(B) The PCR products for hIAP in the MK-4-treated group.

hIAP: human intestinal alkaline phosphatase.

The A in the ATG of the initiator Met codon is denoted nucleotide +1.

考察

先行研究において、マウス骨髄細胞で MK-4 添加により ALP 活性が上昇し [42]、ヒト骨髄細胞でも MK-4 濃度 (0.5~10 μ M) 依存的に ALP 活性の染色コロニーが増加することが示されており [43]、MK-4 が骨芽細胞様細胞への分化を調節している可能性が示唆されている [44]。一方、Caco-2 細胞における MK-4 の ALP 活性への影響に関する報告はなく、MK-4 がヒトの IAP や細胞の分化へ及ぼす影響について、コンフルエント前の Caco-2 細胞、すなわち小腸上皮様細胞に分化していない Caco-2 細胞を用いて検討を行った。

本研究において、コンフルエント前の Caco-2 細胞に MK-4 を添加し、培養 3、7、10 日目に 1 μ M における ALP 活性が 0 μ M に比べ有意に増加しており、ALP 活性の上昇に最適な MK-4 濃度は 1 μ M であることが示された。さらに、MK-4 添加群の ALP 活性レベルが経時的に上昇した。また、TNSALP は易熱性でレバミゾールにより強く阻害され、IAP は耐熱性を示すことが報告されており [37]、レバミゾールによる阻害実験や加熱実験の結果から、MK-4 により誘導された Caco-2 細胞の ALP は、典型的な小腸型 ALP と考えられた。RT-PCR 分析では、培養 3 日目において MK-4 により hIAP mRNA 発現が増強され、Caco-2 細胞での小腸型 ALP 遺伝子の PCR 産物(hIAP)の塩基配列を確認したところ、hIAP mRNA の塩基配列と一致した。さらに、培養 7 日目においては、MK-4 により hSI mRNA 発現が増強された。Pinto et al.は ALP や SI 活性はコンフルエント前の Caco-2 細胞では非常に低く、コンフルエント後に ALP 活性が上昇し、SI はコンフルエントから数日後に上昇することが報告されており [11]、今回の結果とほぼ一致していた。ALP および SI は腸の分化マーカーであることから、MK-4 によりそれら遺伝子の発現が増強されたことは、Caco-2 細胞の小腸

上皮様細胞への分化を誘導している可能性が推察された。

これまでに、本研究室の先行研究で、マウスやラットにおいて、脂質、ビタミン K、ラクトースなどの食事性因子により小腸の ALP 活性が上昇したことを報告した[27, 32, 33, 45]。小腸上皮様細胞の刷子縁に高レベルに局在する ALP 活性は、栄養素の輸送との関連が推察される。ラットに PK あるいは MK-4 混餌食を与えた結果、小腸の ALP 活性が有意に上昇した[32]。さらに、マウスを用いてビタミン K の経口投与を行ったところ、PK あるいは MK-4 の経口投与によってもコントロールと比べ、小腸の ALP 活性および IAP mRNA 発現が有意に上昇した[33]。また、PK または MK-4 経口投与によるマウス小腸の PXR (pregnane X receptor : ヒトにおいては SXR) mRNA 発現の上昇についても確認することができた [33]。SXR は主に肝臓や小腸で発現している核内受容体の一つであり、近年、ビタミン K のリガンドとして働き、標的遺伝子の調節を行うというメカニズムが報告されている[30, 46]。骨芽細胞系において、ビタミン K₂ 依存性 SXR 標的遺伝子の 1 つである tsukushi は、コラーゲン蓄積と関わっており、ビタミン K₂ が SXR 活性化を通して骨形成を増強することに寄与している[47]。また、ビタミン K₂ が SXR を活性化することにより、肝細胞癌の細胞の増殖や運動性を抑制したことも報告されており、癌細胞においてビタミン K₂ が SXR を介して効果を発揮していることが示唆されている[31]。SXR は大腸にも発現が多い受容体であるが、大腸癌臨床組織では発現の低下や欠如が観察され、HT29 大腸癌細胞では SXR の発現は欠如していると報告されている[48]。本研究における RT-PCR 分析では、MK-4 添加における hSXR mRNA や hTNSALP mRNA の発現は非常に弱かった。そのため、コンフルエント前の Caco-2 細胞において、IAP の転写調節に SXR が関与している可能性は低く、MK-4 によってヒト SXR 活性を介して IAP の発現が制御されているとは考えに

くい。ビタミン K の様々な作用は、Gla 化タンパク質修飾を介した作用、SXR を介した転写調節作用の他にも、プロテインキナーゼ系によるリン酸化タンパク質修飾を介した作用も存在する。今後は、MK-4 がどのような経路で IAP を誘導するのかを詳細に検討していく必要があるだろう。

本研究において、ビタミン K₂ が Caco-2 細胞の IAP mRNA レベルを増強させることが明らかとなった。ビタミン K₂ が *in vivo* で腸の分化を調節している可能性があり、さらにビタミン K₂ に関連した IAP 代謝との相互作用が、脂質吸収調節や、脱リン酸化による内毒素誘発性の炎症を制御している可能性も示された。今後、IAP 誘導の転写調節について詳細に検討することで、ビタミン K およびヒト IAP の生理作用に関する有用なデータとなることが期待される。

第 1 章

研究 2 : 小腸上皮様細胞 (Caco-2) における、ビタミン K₂ のアルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

要約

本研究では、ヒト結腸癌由来細胞で、培養後に小腸上皮様細胞に分化する Caco-2 細胞を用いて、MK-4 (menaquinone-4) が ALP 活性およびその遺伝子発現へ及ぼす影響について検討を行った。コンフルエント後 14 日間培養し、Caco-2 細胞に MK-4 を添加 (MK-4 濃度 : 0、1、10 μ M) した結果、MK-4 濃度が 1 または 10 μ M の ALP 活性が 0 μ M と比べて、それぞれ有意に高値を示した。さらに、ヒト小腸型 ALP 遺伝子の mRNA 発現量も、MK-4 濃度 1 μ M で 0 μ M と比べて有意に高値を示した。本研究において、ヒト小腸上皮様細胞での MK-4 による小腸型 ALP 発現の増強作用について初めて示すことができた。今回の結果は、小腸型 ALP 発現調節を介したビタミン K₂ の新たな生理作用の解明につながることを期待された。

目的

＜研究 1＞において、未分化の Caco-2 細胞を用いて、MK-4 により ALP 活性ならびにヒト小腸型 ALP 遺伝子の mRNA の発現が増強されることが明らかになった。しかしながら、コンフルエントから 14 日後の小腸上皮様細胞に分化した Caco-2 細胞における MK-4 の ALP 活性への影響については、これまでに検討されていない。そこで本研究では、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞を用いて、ヒトの小腸上皮様細胞におけるビタミン K₂ による ALP 活性およびヒト小腸型 ALP 遺伝子発現への影響について検討を行った。

方法

(1) 細胞培養

使用した培地組成および培養条件は、＜研究 1＞と同様である。

Caco-2 細胞を 35 mm 培養ディッシュに播種し (2~5 x 10⁴ 個 cells / 35 mm dish)、コンフルエント後 14 日間培養した。その後、MK-4 添加培地 (0、1、5、10 μM) へと交換し、それぞれの培養条件で培養後、0、1、3、5、7 日目に細胞を採取した。＜研究 1＞と同様、今回の実験に使用した MK-4 はエーザイ株式会社よりご提供いただいた。MK-4 はエタノールで溶解し、エタノールの最終濃度を培地の 0.1%となるように調整し、培地は 2 日おきに交換した。

(2) サンプルの調整

＜研究 1＞と同様に行った。

(3) アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定

マイクロタイタープレート [PVC Micro titer “U” Bottom Plates : No,2101 (DYNEXTECHNOLOGIES, INC, VA, U.S.A)] の各ウェルに、酵素抽出液 50 μl、*p*-NPP 基質液 [10 mM *p*-nitrophenyl phosphate disodium salt (Wako) , 5 mM MgCl₂, 100 mM 2-Amino-2-methyl 1,3-propandiol HCl buffer (pH10.0)] 150 μl を加え、室温にて一定時間反応させた。その後、2N NaOH を 50 μl 加えて反応を停止させ、405 nm にて吸光度測定を行った [Lab systems Multiskan BICHROMATIC (Thermo Lab systems Helsinki)]。

ALP 活性を以下の式にて算出した。

ALP activity (mU/ml)

$= A_{405} / 60.4 / \text{反応時間(min.)} / \text{サンプル量(ml)} \times \text{希釈率}$

A_{405} : 測定波長 405nm での吸光度

サンプル量 : 反応させた酵素抽出液の量(ml)

1 U=100 mU=1 μmol *p*-nitro phenol formed/min.

なお、タンパク質含量は、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した[36]。ALP 活性およびタンパク質含量から、ALP 比活性 (U/mg protein) を算出した。

(4) アルカリホスファターゼ (ALP) 阻害実験

阻害剤 (Levamisole、L-phenylalanine) および熱による阻害実験を既報[37] に従って行った。基質液 [0.1 M *p*-nitrophenyl phosphate, 50 mM MgCl₂, 1M 2-Amino-2-methyl 1-1, 3-propandiol HCL buffer (pH10.0)] 130 μl に阻害剤を加え反応させ、その後 2N NaOH 50 μl で反応を停止させた。熱阻害実験は、サンプルを 56°C で 10 分間加熱処理し、基質液を加えて反応させた。そしてコントロールの吸光度を 100% として残存率を算出した。

コントロール : サンプル 30 μl + H₂O 40 μl + 基質液 130 μl

Levamisole : サンプル 30 μl + 阻害剤 40 μl + 基質液 130 μl

L-phenylalanine : サンプル 30 μl + 阻害剤 40 μl + 基質液 130 μl

56°C 10 分加熱 : 熱処理サンプル 30 μl + H₂O 40 μl + 基質液 130 μl

(5) RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 分析

① RNA 抽出

＜研究 1＞と同様に行った。

なお、ヒト小腸 total RNA およびヒト腎臓 total RNA は Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA, USA) より購入した。

② cDNA (complementary DNA) 作製

2 μ g の total RNA を採取し、cDNA 合成キット (PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis Kit, タカラバイオ (株), Shiga, Japan) を用いて、total RNA から相補的な DNA (complementary DNA ; cDNA) を作製した。

③ PCR 法による DNA の増幅

＜研究 1＞と同様に行った。

④ ポリアクリルアミドゲル電気泳動

＜研究 1＞と同様に行った。

⑤ デンシトメーターによる計測

＜研究 1＞と同様に行った。

(6) 統計処理

実験結果は平均値 (the means) \pm 標準誤差 (S. E.) で示した。統計ソフト IBM SPSS Statistics 22 (日本アイ・ビー・エム (株)) を使用し、ALP 活性分析における各データの有意差検定については、一元配置分散分析後、Dunnet または Tukey の検定を行った。また、阻害剤や加熱による阻害実験および RT-PCR 分析において、MK-4 濃度 0 μ M および 1 μ M の 2 群間の比較として、Student's t 検定を行った。なお、危険率 5% を有意差ありとした。

結果

(1) ALP 活性

Caco-2 細胞がコンフルエントに達してから 14 日後に MK-4 添加培地に交換した。培地中の MK-4 濃度を 0、1、10 μM の 3 種類とし、MK-4 添加 0、1、3、5、7 日目の ALP 活性の経時的変化を **Fig. 2-1** に示した。

MK-4 添加 1 日目において、MK-4 濃度 1、10 μM における ALP 活性は 0 μM と比較し、有意に高値を示した（それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ ）。

さらに、タンパク質当たりの ALP 比活性についても算出した結果、MK-4 濃度 1 μM では 54.6 ± 0.4 mU/mg protein であり、0 μM の 50.0 ± 0.3 mU/mg protein と比べて、有意に高値を示した（ $p < 0.01$ ）。

なお、コントロール（0 μM ）における ALP 活性について 0、1、3、5、7 日目で比較したところ、有意な差は認められなかった。

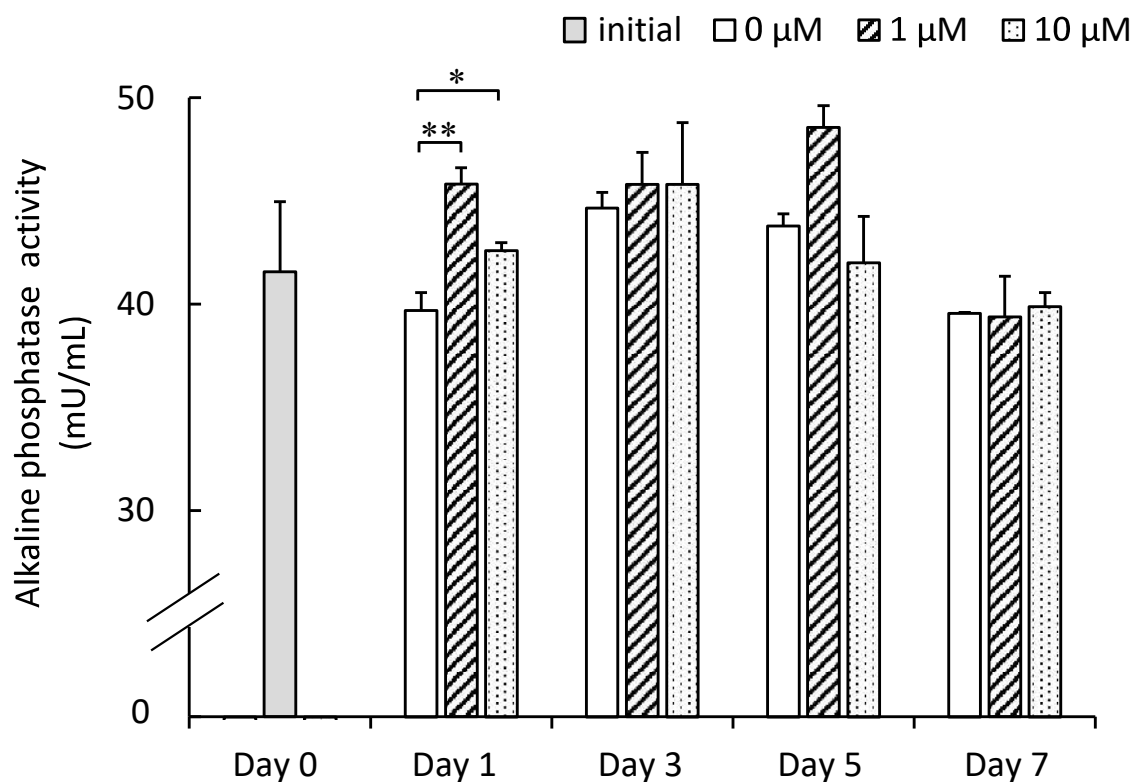


Fig. 2-1 Effects of the MK-4 concentration on ALP activity in Caco-2 cells. Cells were incubated for 14 days after confluency, and desired concentrations of MK-4 (0, 1, and 10 μ M) were added.

The Caco-2 cells were assayed on days 0, 1, 3, 5, and 7 after the addition of MK-4. Results are the means \pm S.E. from triplicate experiments.

Dunnett's multiple comparison test was used after ANOVA to compare the significance of differences among MK-4 concentrations of 0, 1, and 10 μ M (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

(2) ALP の酵素特性

MK-4 添加 1 日目に、MK-4 (1 μM) 処理を行った Caco-2 細胞の ALP 活性が 0 μM と比較して有意に高値を示したことから、MK-4 添加 1 日目の 0 および 1 μM における ALP の酵素特性について、レバミゾールや L-フェニルアラニンによる阻害実験と加熱実験を行った (**Table 2-1**)。MK-4 濃度 1 μM におけるレバミゾール、L-フェニルアラニンあるいは加熱処理後の ALP 活性残存率については、0 μM に比べてそれぞれ有意な差は認められなかった。

Table 2-1 Inhibitory effects on alkaline phosphatase of Caco-2 cells (%)

MK-4 concentrations		Levamisole	L-phenylalanine	Heat
		(1 mM)	(20 mM)	inactivation
				(56°C 10 min)
Caco-2 cells	0 μ M	42.9 \pm 2.7	16.0 \pm 1.0	100.0 \pm 0.0
	1 μ M	40.8 \pm 2.5	13.3 \pm 3.1	100.0 \pm 0.0

ALP activity was assayed by the rate of hydrolysis of *p*-nitro-phenylphosphate.

The effects of the inhibitor were determined in the presence of 5 mM MgCl₂ in the assay mixture.

Activities of non-treated controls were designated as 100%.

Cultured cells were treated with MK-4 (0 or 1 μ M) for 1 day.

Each value represents the means \pm S.E. of triplicate experiments.

The unpaired two-tailed Student's *t*-test was used to compare the significance of differences between MK-4 concentrations of 0 and 1 μ M.

(3) RT-PCR 分析

MK-4 添加 1 日目に、MK-4 (1 μ M) を添加した Caco-2 細胞の ALP 活性が 0 μ M と比較して有意に高値を示したことから、MK-4 添加 1 日目における MK-4 濃度 0 μ M と 1 μ M について、RT-PCR 分析により mRNA の発現量を比較した。

MK-4 添加 1 日目において、ヒト小腸型 ALP 遺伝子の mRNA の PCR 産物 (hIAP ; 708 bp) について、MK-4 濃度 1 μ M で 0 μ M に比べて濃いバンドが検出され、デンストメーターによりバンド濃度を測定した結果、**Fig. 2-2 (A)**に示したように、hIAP mRNA 発現量は、MK-4 濃度 1 μ M において 0 μ M と比較し、有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

また、MK-4 添加 1 日目において、ヒトの SI 遺伝子の mRNA の PCR 産物 (hSI ; 196 bp) についても、1 μ M で 0 μ M よりも濃いバンドが検出され、デンストメーターにより hSI mRNA 発現量を比較したところ、**Fig. 2-2 (B)**に示したように、MK-4 濃度 1 μ M において 0 μ M と比べて、有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

一方、ヒト SXR 遺伝子の mRNA (hSXR ; 442 bp) やヒト TNSALP 遺伝子の mRNA (hTNSALP ; 195 bp) の PCR 産物は、MK-4 濃度 1 μ M において、0 μ M と同様にほとんど検出されなかった。そこで、hSXR や hTNSALP のポジティブコントロールとして、ヒト小腸 total RNA やヒト腎臓 total RNA について同じ条件で PCR を行った結果、それぞれで PCR 産物の検出が確認された(**Fig. 2-3**)。

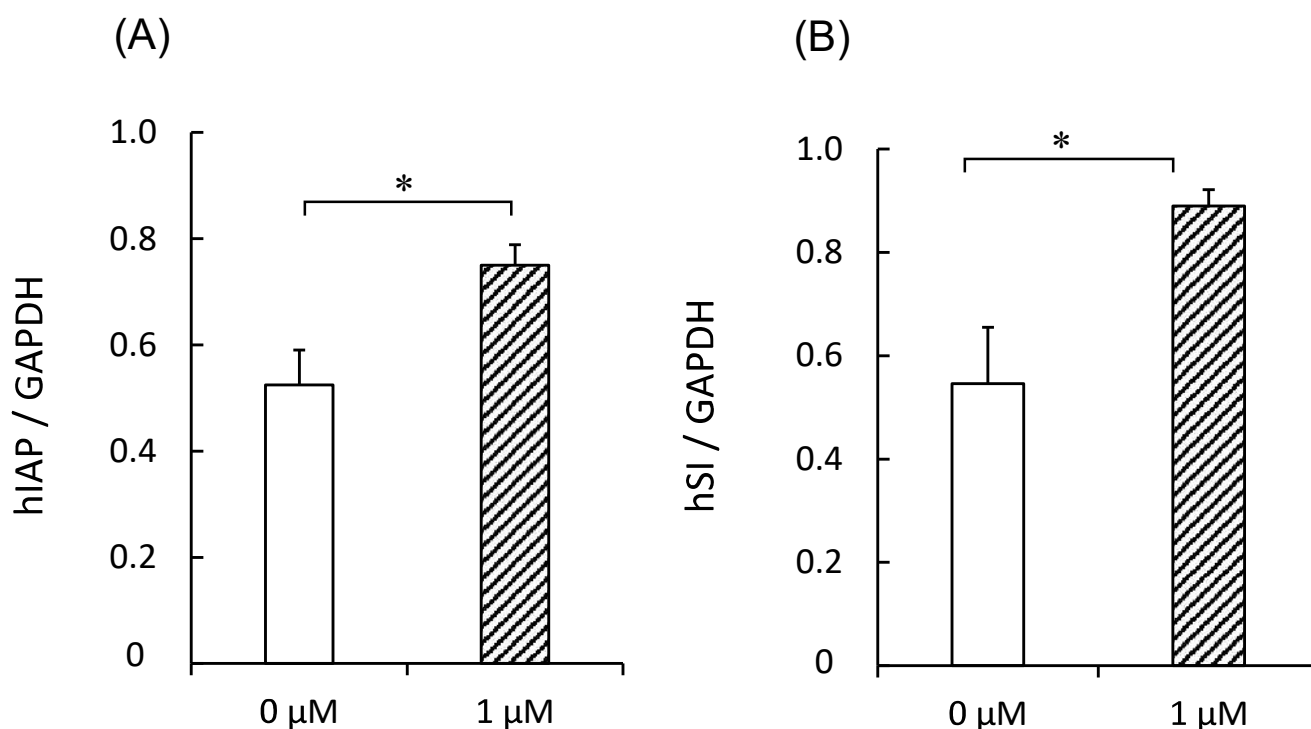


Fig. 2-2 The relative expression levels of mRNA for hIAP or hSI of Caco-2 cells. All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH.

Results are the means \pm S.E. from triplicate experiments.

Comparisons between the MK-4-treated (1 μ M) and control (0 μ M) groups were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test (*: $p < 0.05$).

(A) The relative expression levels of mRNA for hIAP in Caco-2 cells on day 1.

(B) The relative expression levels of mRNA for hSI in Caco-2 cells on day 1.

hIAP: human intestinal alkaline phosphatase,

hSI: human sucrase-isomaltase.

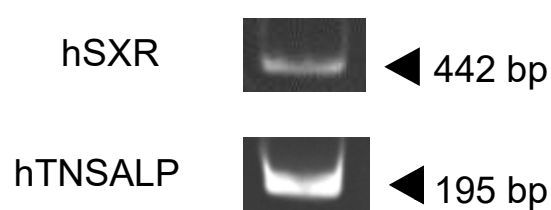


Fig. 2-3 Detection by RT-PCR of hSXR mRNA in the human adult small intestine or hTNSALP mRNA in the human adult kidney as a positive control.

The PCR products were electrophoresed in a 5.25% polyacrylamide gel.

hSXR: human steroid and xenobiotic receptor,

hTNSALP: human tissue non-specific alkaline phosphatase,

考察

小腸上皮様細胞に分化した Caco-2 細胞における MK-4 の ALP 活性への影響については、これまでに検討されておらず、本研究ではコンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞を用いて、MK-4 添加による ALP 活性への影響を検討した。

コントロール (MK-4 : 0 μ M) の ALP 活性について、0、1、3、5、7 日目で比較したところ有意な差は認められず、ほぼプラトーの状態を維持しており、すでに分化した状態であることが示唆された。また、RT-PCR 分析において、1 日目で hIAP mRNA だけでなく、同じ腸の分化マーカーである hSI mRNA の発現も確認することができた。なお、今回の結果には示さなかったが、他の分化マーカーとして、腸で発現している膜結合型プロテアーゼの 1 つであるジペプチジルペプチダーゼ IV (dipeptidyl peptidase IV ; DPP-4 ; EC 3.4.14.5) 遺伝子の mRNA 発現[49]についても 1 日目の 0 μ M で確認することができた。

MK-4 添加 (1、10 μ M) により、ALP 活性は、1 日目において 0 μ M と比較し、有意に高値を示した。＜研究 1＞では、コンフルエントに達する前の未分化の Caco-2 細胞で、MK-4 添加 (1 μ M) により、3、7、11 日目いずれにおいても ALP 活性の誘導が認められたのに対し、コンフルエントに達して 14 日後の Caco-2 細胞では、MK-4 添加 1 日目でのみ ALP 活性の有意な上昇が認められた。このような相違の理由としては、コンフルエントに達して 14 日後の Caco-2 細胞では、すでに ALP 活性がプラトーに達していたため、MK-4 による ALP 活性の上昇作用が 1 日目のみに限定され、3 日目の ALP 活性レベルとほぼ同様となったことが推察された。また、1 日目において ALP 活性が MK-4 添加 (1、10 μ M) により有意に増加したが、10 μ M では 1 μ M と比べて ALP 活性の上昇作用が弱かった理由については、細胞毒性やフィードバック制御の可能性も

考えられた。

RT-PCR 分析では、1 日目において、MK-4 添加 (1 μ M) により、0 μ M と比較し、hIAP mRNA および hSI mRNA 発現量が有意に高値を示した。hIAP mRNA の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の mRNA 発現量で標準化した相対的な結果を示しており、MK-4 による hIAP mRNA の発現量の増加率と ALP 活性の増加率との関連については、さらに IAP の 2 量体形成や糖鎖の付加などの翻訳後修飾への MK-4 の影響も含めて検討する必要があるだろう。

また、レバミゾールおよび L-フェニルアラニンによる阻害実験や加熱実験により ALP の酵素特性を検討したところ、TNSALP は易熱性でレバミゾールにより強く阻害され、IAP は耐熱性で L-フェニルアラニンにより活性が強く阻害されるため[37]、今回の結果から、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞において、MK-4 により活性が上昇した ALP は典型的な小腸型であることが示唆された。

今回の結果より、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞においても、未分化の細胞と同様に MK-4 添加 (1 μ M) により ALP 活性、ヒト IAP 遺伝子発現およびヒト SI 遺伝子発現が増強されることが明らかとなった。

また、＜研究 1＞と同様に、本研究においても SXR mRNA の発現について検討した。＜研究 1＞において、未分化の Caco-2 細胞における SXR mRNA の PCR 産物は、MK-4 添加 (1 μ M) 後 11 日目で僅かに検出されたが、本研究でのコンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞では MK-4 添加 1 日目の 0 μ M あるいは MK-4 添加 (1 μ M) いずれにおいても、hSXR mRNA の PCR 産物はほとんど検出されなかった。ヒト小腸組織の RNA では明らかな SXR mRNA の発現が確認できており、ヒトの小腸組織と Caco-2 細胞での SXR の発現量の相違については、小腸上皮様細胞に分化する他の細胞株やヒトの小腸組織を用いた *in vivo*

系や *in vitro* 系での検討を行い、MK-4 が SXR あるいは他のどのような転写制御を介して ALP 活性を誘導するのか今後明らかにする必要があるだろう。

これまでの先行研究により、マウスやラットにおけるビタミン K、脂質、ラクトースなどの食事性因子による小腸の ALP 活性への影響が明らかとなり [32-34, 37, 45, 50]、MK-4 混餌食あるいは MK-4 経口投与による小腸の ALP 活性および IAP 遺伝子発現の上昇が認められたこと [32-34] や、高脂肪食条件下においても、MK-4 摂取により小腸の ALP 活性の上昇が認められたこと [50] から、ヒトの小腸においても MK-4 が ALP 活性を上昇させ、さらには脂質吸収の調節や、腸の恒常性の維持に寄与している可能性が考えられた。

本研究において、コンフルエントから 14 日後のヒト小腸上皮様細胞を用いて、MK-4 が ALP 活性および小腸型 ALP 遺伝子発現を増強させることを初めて示すことができた。今回得られた MK-4 による ALP への影響が MK-4 に特異的であるかどうかについては、他の脂溶性ビタミンなどによる影響についても比較検討することが望ましいと考えられる。また、MK-4 による ALP へ及ぼす作用メカニズムの詳細については、未分化の Caco-2 細胞とコンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞での ALP 活性誘導メカニズムの違いも含めて検討していく必要があるだろう。さらに、様々な食事性因子による ALP への影響や、その作用機序について検討することにより、小腸型 ALP 発現調節を介したビタミン K をはじめとする栄養因子の新たな生理作用の解明につながることが期待される。

第 1 章 結語

本章では、 γ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) の補酵素としての役割を果たし、血液凝固作用だけでなく、骨の石灰化にも関わる重要な栄養素であるビタミン K が IAP へ及ぼす影響について検討した。

研究 1：コンフルエント前の、小腸上皮様細胞に分化していない Caco-2 細胞における MK-4 の ALP 活性およびその遺伝子発現への影響について検討を行った。その結果、MK-4 添加培地での培養 3、7、11 日目において、MK-4 添加 (1 μ M) により ALP 活性が上昇し、培養 3 日目における IAP の遺伝子発現も増強された。

研究 2：コンフルエントから 14 日後の、小腸上皮様細胞に分化した Caco-2 細胞における MK-4 の ALP 活性およびその遺伝子発現への影響について検討を行った。その結果、MK-4 添加培地での培養 1 日目において、MK-4 添加 (1 μ M) により ALP 活性および IAP 遺伝子発現が増強された。

本章では、小腸上皮様細胞に分化していない Caco-2 細胞およびコンフルエントから 14 日後の小腸上皮様細胞において、MK-4 により IAP 発現が増強されることが明らかとなった。未分化の Caco-2 細胞と分化した Caco-2 細胞での ALP 活性誘導メカニズムの違いや、MK-4 による ALP へ及ぼす作用メカニズムについて検討することにより、小腸型 ALP 発現調節を介したビタミン K をはじめとする栄養因子の新たな生理作用の解明につながることが期待される。

第 2 章

ビタミン D のアルカリホスファターゼ活性
およびその遺伝子発現への影響

第 2 章：諸言

ビタミン D は骨の形成や成長に重要な栄養素であり、食事から供給されるビタミン D と、紫外線照射により皮膚で生成されるビタミン D の 2 つの供給源がある。食事からは主に、キノコ類に含まれるビタミン D₂ (エルゴカルシフェロール) と、魚肉及び魚類の肝臓に含まれるビタミン D₃ (コレカルシフェロール) に分類される。**Fig. 3-1 (A), (B)**にビタミン D₂およびビタミン D₃の化学構造式を示した[51]。ビタミン D₂とビタミン D₃は、側鎖構造のみが異なる同族体であり、両者の分子量はほぼ等しく、体内で同様に代謝される。ビタミン D は、肝臓で 25-ヒドロキシビタミン D₃ [25-hydroxyvitamin D₃ ; 25(OH)D₃] に変換され、続いて腎臓で活性型である 1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ [1, 25-dihydroxyvitamin D₃ ; 1, 25(OH)₂D₃] に変換される。1, 25(OH)₂D₃ は、標的細胞の核内にあるビタミン D 受容体 (vitamin D receptor ; VDR) と結合し、標的遺伝子の発現制御を行っている。ビタミン D は腸管からのカルシウムおよびリンの吸収を促進して骨代謝を調節するだけでなく、筋肉や骨由来のホルモンを調節している。また、ビタミン D の欠乏はメタボリックシンドローム、腸バリア機能不全や腸の炎症に関連することが報告されている[52, 53]。本研究室の以前の研究で、ラットにおいて、高脂肪食摂取時のビタミン D 制限により小腸の ALP 活性が著しく減少したこと[54]、また、卵巢摘出術を施したラットにおいても、高脂肪食摂取時のビタミン D 制限により小腸の ALP 活性および IAP mRNA 発現が減少したことを報告した[55]。これらより、ビタミン D 制限が ALP 活性を減少させることで腸のホメオスタシスに影響を及ぼしている可能性が示唆された。

Caco-2 細胞におけるビタミン D の ALP 活性へ及ぼす影響については、

Halline et al.の研究において、コンフルエント前の Caco-2 細胞で $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により ALP 活性が上昇したことが報告されている[56]。また、Giuliano et al. は、Caco-2 細胞を播種してから 5 日目（コンフルエント前）および 11 日目（コンフルエント後）の細胞に $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10 nM) を添加し、ALP 活性が増加したことを報告している[57]。そこで、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による Caco-2 細胞で発現される ALP 活性およびその遺伝子発現について、より詳細な検討を行うため、＜研究 3＞では、コンフルエント前の Caco-2 細胞におけるビタミン D による ALP 活性およびその遺伝子発現への影響を検討し、＜研究 4＞においては、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞におけるビタミン D による ALP 活性およびその遺伝子発現への影響を検討した。

(A)

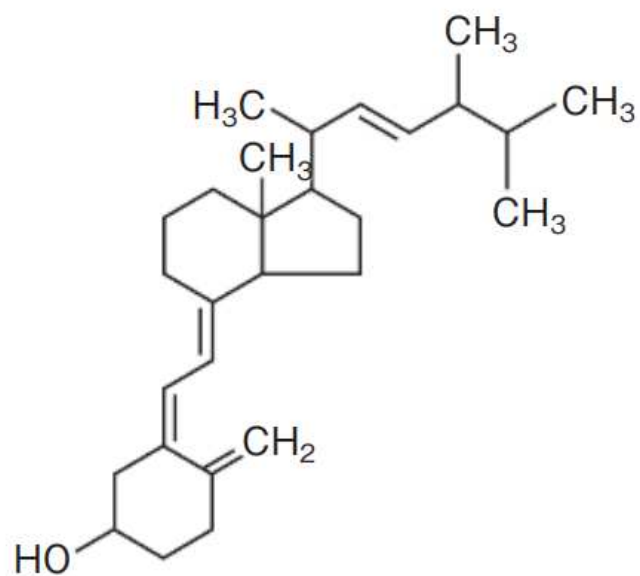


Fig. 3-1 (A) Chemical structure of vitamin D₂.

(B)

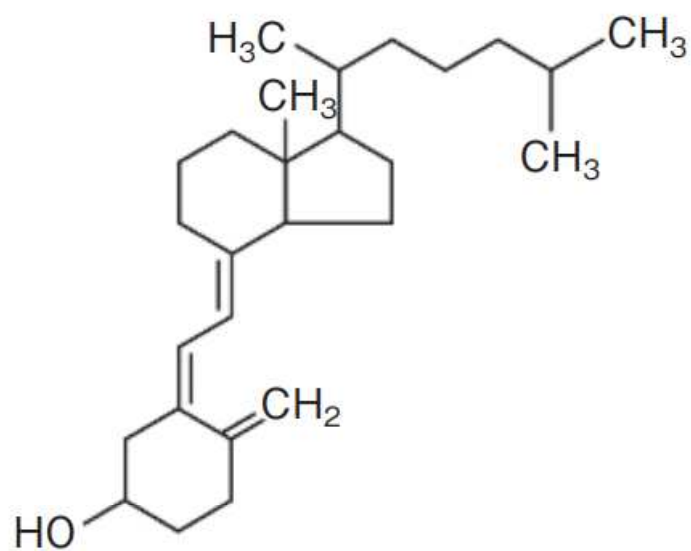


Fig. 3-1 (B) Chemical structure of vitamin D₃.

第2章

研究3：コンフルエント前（未分化）の Caco-2 細胞における、

ビタミン D のアルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

要約

ビタミン D は腸管からのカルシウム吸収を促進する役割があり、ビタミン D の欠乏はくる病（小児）や骨軟化症、さらには骨粗鬆症リスクの増加や骨格筋機能の低下にも関連している。本研究では、コンフルエント前の Caco-2 細胞における、ビタミン D のヒト *ALPI* 遺伝子から転写される 2 種類の alternative mRNA の発現への影響を検討した。ビタミン D の活性型である 1, 25(OH)₂D₃ の添加後、Caco-2 細胞における ALP 活性は有意に増加し、阻害実験や加熱実験において、1, 25(OH)₂D₃ により誘導された ALP アイソザイムが小腸型 ALP の特性を示した。Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 分析において、*ALPI* 遺伝子から転写された 2 種類の alternative mRNA variant の発現量を比較したところ、1, 25(OH)₂D₃ によりいずれも増強されており、ビタミン D が腸のホメオスタシスにおけるヒト *ALPI* 遺伝子発現の重要な調節因子である可能性が示された。

目的

本研究室の以前の研究で、ビタミン D を制限した食餌を与えたラットの小腸の ALP 活性が有意に減少したことから、ビタミン D の制限が ALP 活性レベルを減少させることで腸のホメオスタシスに影響を与えている可能性を示した [54, 55]。また、Caco-2 細胞を用いた先行研究において、ビタミン D の活性型である $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により ALP 活性が上昇したことが報告されている [56, 57]。

マウス、ラット、ウシでは数種類の IAP アイソザイムが同定されている [58-61]。ラットの IAP では 2 種類の遺伝子が同定されており、それぞれの mRNA (IAP-I、IAP-II) の大きさは IAP-I が 2.7kb、IAP-II が 3.0kb である [59, 60, 62]。また、同じげっ歯類であるマウスの IAP についても、*Akp3* と *Akp6* の 2 種類の mRNA が同定されている。マウス *Akp3* は、ラットの IAP-II に相当すると考えられ、そのホモロジーは 83% であり [58, 63, 64]、ヒトの IAP 遺伝子 *ALPI* とのホモロジーは 80% となっている [65]。*Akp3* ノックアウトマウスによる研究から、*Akp3* は脂質吸収の調節に関連していることが示唆されており [17]、IAP-II についても脂質投与により強く発現することが報告されている [66]。一方、マウス *Akp6* は、ラットの IAP-I に相当すると考えられ [58]、そのホモロジーは 91% である [64]。

ヒトにおいては、*ALPI* 遺伝子が第二染色体上に存在し、ポリアデニル化の違いから長さの違う mRNA が報告されている [3]。NCBI の AceView によると、ヒト *ALPI* 遺伝子から 2 種類の alternatively spliced mRNA [variant aAug10 (NM_001631) および variant bAug10 (M31008)] が報告されているが [67]、これら 2 種類の alternative mRNA variant の食事性因子による発現調節に関する検討は行われておらず、本研究では、2 種類の IAP alternatively spliced mRNA

の特異的なプライマーを作製し、ビタミン D による ALP 発現調節作用について検討することを目的とした。

方法

(1) 細胞培養

使用した培地組成および培養条件については、＜研究 1＞と同様である。

Caco-2 細胞を 35 mm 培養ディッシュに播種し (1×10^4 個 cells / cm²)，その 2 日後 (60～70%コンフルエントの状態) に 1, 25(OH)₂D₃ 添加培地 (0、1、10、100 nM) へと交換し、それぞれの培養条件で培養後、0、1、3、5、7 日目に細胞を採取した。今回の実験に使用した 1, 25(OH)₂D₃ は Merck Life Science (Darmstadt, Germany) より購入した。1, 25(OH)₂D₃ はエタノールで溶解し、エタノールの最終濃度を培地の 0.1% となるように調整し、培地は 2 日おきに交換した。

(2) サンプルの調整

＜研究 1＞と同様に行った。

(3) アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定

＜研究 1＞と同様に行った。

(4) アルカリホスファターゼ (ALP) 酵素組織化学染色

＜研究 1＞と同様に行った。

(5) アルカリホスファターゼ (ALP) 阻害実験

＜研究 2＞と同様に行った。

(6) RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 分析

① RNA 抽出

＜研究 1＞と同様に行った。

なお、ヒト小腸 total RNA は Clontech Laboratories, Inc. より購入した。

② cDNA (complementary DNA) 作製

＜研究 2＞と同様に行った。

③ PCR 法による DNA の増幅

PCR に用いた試薬や方法、条件等については、＜研究 1＞と同様である。

PCR プライマーは、hIAP : human intestinal alkaline phosphatase[39]、hVDR : human vitamin D receptor[68]、GAPDH : Glyceraldehyde phosphatase dehydrogenase を用いた。*ALPI* 遺伝子から転写される 2 種類の alternatively spliced mRNA のプライマーに関して、variant aAug10 は hIAP-a : human intestinal alkaline phosphatase-a とし、variant bAug10 は hIAP-b : human intestinal alkaline phosphatase-b としてプライマーを設計し、シーケンスで塩基配列を確認した。forward・reverse プライマーは **Table 3-1** に示した。

Table 3-1 PCR oligonucleotide primers and predicted size of PCR products.

Primer		Length	Position [*]
hIAP forward	5' CACGACACGCGGCAATGAGGTC 3'	708 bp	422-1129
hIAP reverse	5' TGGTCAGCGGTGACGAGGGTCA 3'		
hIAP-a forward	5' GCAACCTTGCAACCCACCCAAGGAG 3'	276 bp	2101-2376
hIAP-a reverse	5' CCAGCATCCAGATGTCCCGGGAG 3'		
hIAP-b forward	5' GCTGACCTGATCTCTACTCT 3'	407 bp	118-524
hIAP-b reverse	5' ACCTCATTGCCGCGTGTCGT 3'		
hVDR forward	5' AGCCTCAATGAGGAGCACTCCAAG 3'	207 bp	1174-1380
hVDR reverse	5' ACGGGTGAGGAGGGTGCTGAGTA 3'		
GAPDH forward	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'	452 bp	525-976
GAPDH reverse	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'		

^{*}The A in the ATG of the initiator Met codon is denoted as nucleotide +1.

④ ポリアクリルアミドゲル電気泳動

＜研究 1＞と同様に行った。

⑤ デンシトメーターによる計測

＜研究 1＞と同様に行った。

(6) DNA 塩基配列の確認

ヒト小腸 total RNA で発現されたヒト *ALPI* 遺伝子からの variant aAug10 および bAug10 の PCR 産物 (hIAP-a および hIAP-b) について、＜研究 1＞と同様に、塩基配列の確認を行った。

(7) 統計処理

実験結果は、平均値 (the mean) ± 標準誤差 (S.E.) で示した。統計ソフト IBM SPSS Statistics 22 (日本アイ・ビー・エム (株)) を使用し、ALP 活性分析における各データの有意差検定については、一元配置分散分析後、Dunnet の検定を行った。また、阻害実験および RT-PCR 分析において、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度 0 nM および 100 nM の 2 群間の平均値の検定には、Student's *t* 検定を行った。なお、危険率 5% を有意差ありとした。

結果

(1) ALP 活性

培地中の 1, 25(OH)₂D₃ 濃度を 0、1、10、100 nM の 4 種類とし、培養後 0、1、3、5、7 日目の Caco-2 細胞の ALP 活性の経時的変化を **Fig. 3-2** に示した。

1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 3 日目において、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 10 nM、100 nM における ALP 活性は、0 nM と比べて有意に高値を示した（それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ ）。

1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 5 日目において、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 1 nM、10 nM、100 nM における ALP 活性は、0 nM と比べていずれも有意に高値を示した（それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$ ）。

1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 7 日目において、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 1 nM、10 nM、100 nM における ALP 活性は、0 nM と比べて有意に高値を示した（いずれも $p < 0.001$ ）。

なお、データには示していないが、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 1、10、100 nM と 0 nM 間でのタンパク質濃度に有意な差は認められなかった。

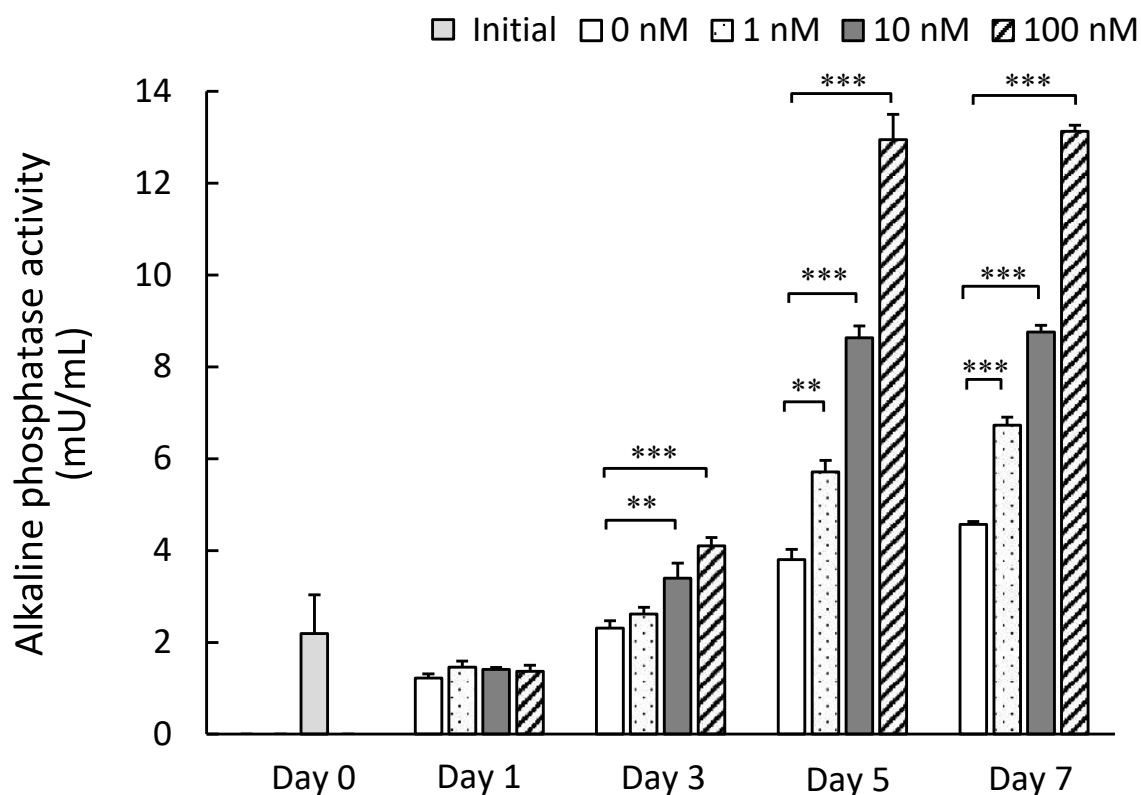


Fig. 3-2 Effects of the 1, 25(OH)₂D₃ concentration on ALP activity in Caco-2 cells.

Caco-2 cells were cultured in several concentrations of 1, 25(OH)₂D₃ in the medium for 1, 3, 5, and 7 days.

Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments.

Dunnett's multiple comparison test was used after ANOVA to compare the significance of differences among 1, 25(OH)₂D₃ concentrations of 0, 10, and 100 nM (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

(2) ALP 酵素組織化学染色

ALP 活性で有意差が認められた 1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 7 日目における 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0、1、10、100 nM について、ALP 酵素組織化学染色を行った結果を **Fig. 3-3 (A)~(D)** に示した。

赤く染色された ALP 酵素染色細胞は、1, 25(OH)₂D₃ を添加した Caco-2 細胞で、0 nM 培地での Caco-2 細胞に比べてより多く観察されたが、1, 25(OH)₂D₃ 添加群において小腸上皮様に分化した形態学的特徴は認められなかった。

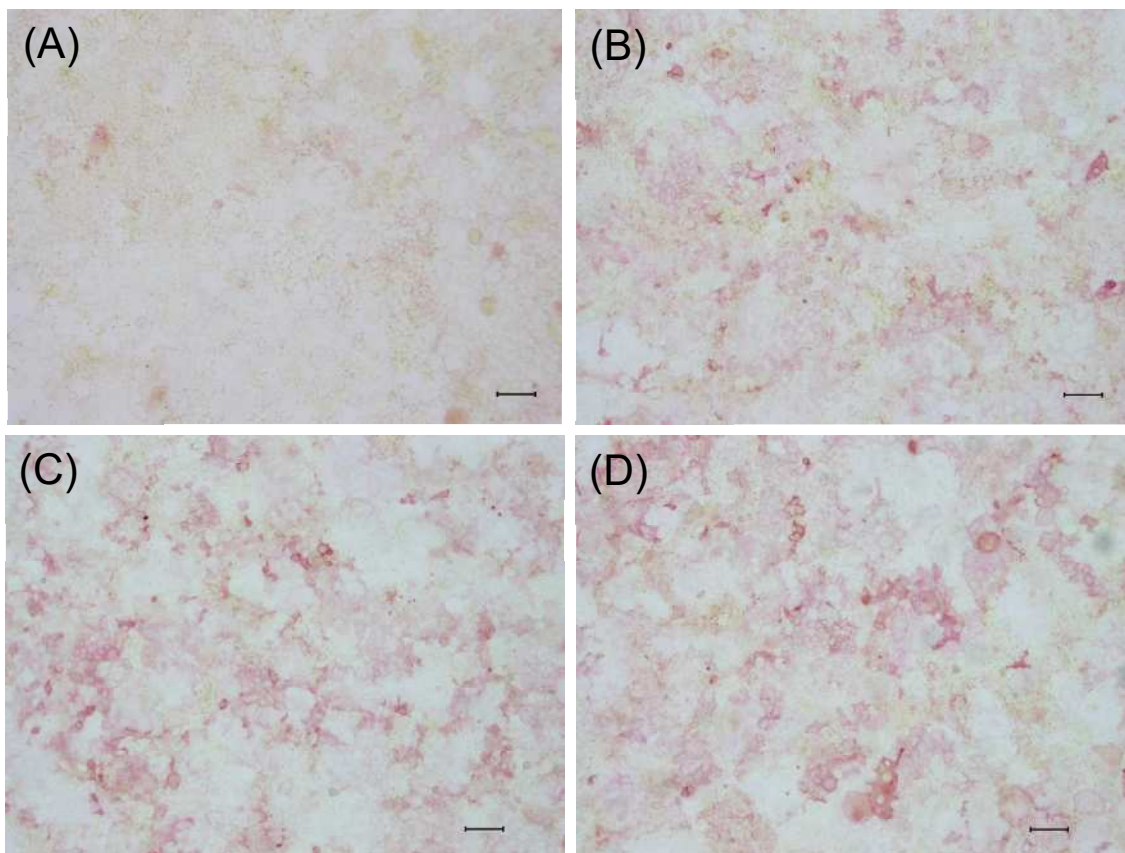


Fig. 3-3 Caco-2 cells on coverslips were stained for ALP activity on day 7.

Light micrograph of the monolayer of confluent Caco-2 cells (x 100).

Cells were stained for ALP activity (stained red) as described in Materials and Methods.

(A) 1, 25(OH)₂D₃: 0 nM.

(B) 1, 25(OH)₂D₃: 1 nM.

(C) 1, 25(OH)₂D₃: 10 nM.

(D) 1, 25(OH)₂D₃: 100 nM.

Bar=100 μm

(3) ALP の酵素特性

1, 25(OH)₂D₃ 添加 7 日目の 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM および 100 nM の ALP の酵素特性について、レバミゾール、L-フェニルアラニンによる阻害実験と加熱実験を行った (**Table 3-2**)。

1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM におけるレバミゾール、L-フェニルアラニンおよび加熱処理後の ALP 活性残存率は、0 nM に比べてそれぞれ有意な差は認められなかった。

Table 3-2 Inhibitory effects on alkaline phosphatase of Caco-2 cells (%)

1, 25(OH) ₂ D ₃ concentrations		Levamisole (1 mM)	L-phenylalanine (20 mM)	Heat inactivation (56°C 10 min)
Caco-2 cells	0 nM	55.7 ± 1.2	18.0 ± 2.8	99.7 ± 0.3
	100 nM	58.2 ± 2.7	16.7 ± 1.5	99.8 ± 0.1

ALP activity was assayed by the rate of hydrolysis of *p*-nitro-phenylphosphate.

The effects of the inhibitor were determined in the presence of 5 mM MgCl₂ in the assay mixture.

Activities of non-treated controls were designated as 100%.

Cultured cells were treated with 1, 25(OH)₂D₃ (0 or 100 nM) for 7 days.

Each value represents the means ± S.E. (n=3) of triplicate experiments.

The unpaired two-tailed Student's *t*-test was used to compare the significance of differences between 1, 25(OH)₂D₃ concentrations of 0 and 100 nM.

(4) ヒト IAP alternatively spliced variants の検出と塩基配列の確認

ヒト *ALPI* 遺伝子から 2 種類の alternatively spliced mRNA variants (variants aAug10 および bAug10) の発現を確認するため、それぞれに特異的なプライマー [aAug10 : hIAP-a (2,101-2,376)、bAug10 : hIAP-b (118-524)] を作製し、RT-PCR を行った。

Fig. 3-4 にヒト IAP の alternatively spliced mRNA の構造を示した。Variant aAug10 は 10 個のイントロンと 11 個のエキソンから構成される全長 2,550 bp の mRNA である。Variant bAug10 は 9 個のイントロンと 10 個のエキソンから構成される全長 1,884 bp の mRNA である。hIAP の PCR 産物 (708 bp : 423-1,130) の塩基配列は、2 種類の alternatively spliced mRNA variants (variants aAug10 および bAug10) に共通している部分である。

Fig. 3-5 (A)に示したように、RT-PCR 分析によりヒトの成人の小腸 total RNA から、2 種類の alternatively spliced mRNA の PCR 産物が検出された (hAIP-a および hIAP-b)。これらの PCR 産物 (hIAP-a および hIAP-b) の塩基配列を確認したところ、NCBI GenBank において公表されているヒト IAP mRNA の塩基配列 (Accession No. : NM_001631 および M31008) と一致していることを確認した[**Fig. 3-5 (B), (C)**]。

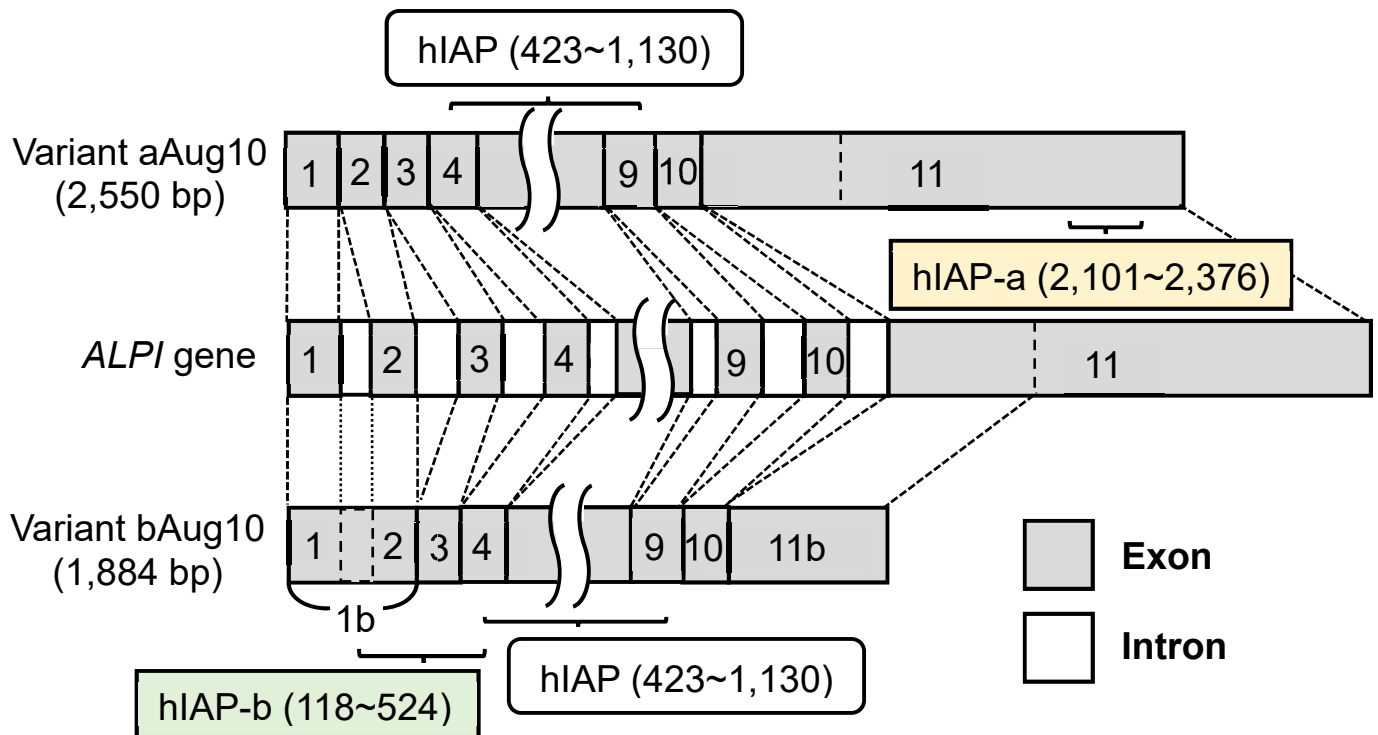


Fig. 3-4 The genomic organization and structure of alternatively spliced transcripts of human IAP.

The human *ALPI* gene (NCBI, GenBank Accession No.J03930) is located on chromosome 2 [3], and it contains 10 distinct introns. It was reported that transcription produces 2 alternatively spliced mRNAs [variant aAug10 (NM_001631) and variant bAug10 (M31008)] (NCBI, AceView) from the human *ALPI* gene [67]. The main *ALPI* variant aAug10 is 2,550 bp long, and the variant bAug10 is 1,884 bp long. The 2 spliced mRNAs putatively encode proteins (528 and 438 amino acids, respectively), comprising 2 different isoforms, containing the ALP domain and some transmembrane domains. Exons are depicted as closed boxes. It also shows the location of the PCR product (hIAP-a or hIAP-b) for the variant aAug10 or bAug10. The nucleotide sequence of the PCR products of hIAP (708 bp: 423-1,130) is common to the two types of alternatively spliced mRNA variants (variants aAug10 and bAug10).

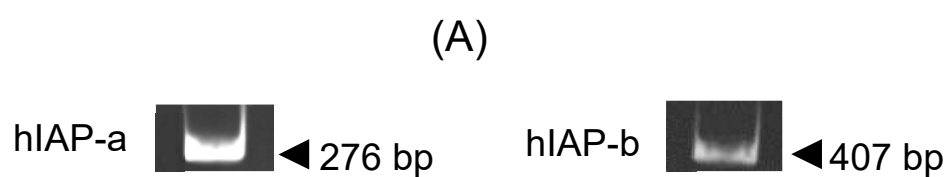


Fig. 3-5 (A) Detection by RT-PCR of RNAs of the variants aAug10 and bAug10 in the human adult small intestine using specific primers. The PCR products [hIAP-a (276 bp) and hIAP-b (407 bp)] were electrophoresed in a 5.25% polyacrylamide gel.

(B)

```

2101~
aAug10: GCAACCCTGCAACCCACCCAAGGAGGCTACTGGATCGGGGATTCCCAGGGGGGCTTTGAC
          *****
hIAP-a:  GCAACCCTGCAACCCACCCAAGGAGGCTACTGGATCGGGGATTCCCAGGGGGGCTTTGAC

2161~
aAug10: ACAGTCCTCTGCTGTCTCCCACTAGGATCATTCCACACCCCTGCACCTGACCAAGGGAC
          *****
hIAP-a:  ACAGTCCTCTGCTGTCTCCCACTAGGATCATTCCACACCCCTGCACCTGACCAAGGGAC

2221~
aAug10: CAATGAGGCAGAGGCTTGCC.....CCCCCAGTGCCCATTCCAGG
          *****
hIAP-a:  CAATGAGGCAGAGGCTTGCC.....CCCCCAGTGCCCATTCCAGG

2291~
aAug10: TCACCAGATCCAAGGAGCGCTTGAGGAGCTCTGGGTACAGGGCAGCAACCCAGAGCCCAT
          *****
hIAP-a:  TCACCAGATCCAAGGAGCGCTTGAGGAGCTCTGGGTACAGGGCAGCAACCCAGAGCCCAT

2351~
aAug10: GGGCCCTCCCGGGACATCTGGATGCTGG
          *****
hIAP-a:  GGGCCCTCCCGGGACATCTGGATGCTGG

```

Fig. 3-5 (B) The nucleotide sequence of the PCR product (hIAP-a) from the human small intestine using the specific primers for the variant aAug10 was compared with the human ALPI mRNA sequence [NCBI GenBank Accession No. NM_001631] (top sequence).

The nucleotide sequences of the primers are underlined. Matches between the two sequences are marked by asterisks.

The A in the ATG of the initiator Met codon is denoted as nucleotide +1.

(C)

```
118~
bAug10: GCTGACCTGATCTCTACTCTCCCCCTGGCCAGCTGAGGAGGAGAACCCGGCCTTCTGGAA
*****
hIAP-b: GCTGACCTGATCTCTACTCTCCCCCTGGCCAGCTGAGGAGGAGAACCCGGCCTTCTGGAA

178~
bAug10: CCGCCAGGCAGCTGAGGCCCTGGATGCTGCCAAGAAGCTGCAGCCCATCCAGAAGGTCGC
*****
hIAP-b: CCGCCAGGCAGCTGAGGCCCTGGATGCTGCCAAGAAGCTGCAGCCCATCCAGAAGGTCGC

238~
bAug10: CAAGAACCTCATCCTCTTCC.....AGCCACAGCCACGGCCTACC
*****
hIAP-b: CAAGAACCTCATCCTCTTCC.....AGCCACAGCCACGGCCTACC

438~
bAug10: TGTGCGGGGTCAAGGCCAACTTCCAGACCATCGGCTTGAGTGCAGCCGCCGCTTTAACC
*****
hIAP-b: TGTGCGGGGTCAAGGCCAACTTCCAGACCATCGGCTTGAGTGCAGCCGCCGCTTTAACC

498~
bAug10: AGTGCAACACGACACGCGGCGGAATGA
*****
hIAP-b: AGTGCAACACGACACGCGGCGGAATGA
```

Fig. 3-5 (C) The nucleotide sequence of the PCR product (hIAP-b) from the human small intestine using the specific primers for the variant bAug10 was compared with the human ALPI mRNA sequence [NCBI GenBank Accession No. M31008] (top sequence).

The nucleotide sequences of the primers are underlined. Matches between the two sequences are marked by asterisks.

The A in the ATG of the initiator Met codon is denoted as nucleotide +1.

(5) RT-PCR 分析

1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 3、5、7 日目の 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM と 100 nM について、RT-PCR 分析を行った。

ヒト *ALPI* 遺伝子から転写される 2 種類の mRNA に共通している部分である hIAP mRNA の PCR 産物 (708 bp) について、1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 3 日目では、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM において、0 nM と比較し、濃いバンドが検出され、デンストメーターにて解析解析したところ、**Fig. 3-6 (A)**に示したように、hIAP mRNA 発現量は 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM で、0 nM に比べ有意に高値を示した ($p < 0.01$)。

Variant aAug10 mRNA の PCR 産物 (hIAP-a ; 276 bp) についても、1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 3 日目では、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM において、0 nM と比較し、濃いバンドが検出され、デンストメーターにて解析したところ、**Fig. 3-6 (B)**に示したように、hIAP-a mRNA 発現量は 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM で、0 nM に比べ有意に高値を示した ($p < 0.001$)。

Variant bAug10 mRNA の PCR 産物 (hIAP-b ; 407 bp) については、1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 3、5、7 日目で、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM において、0 nM と比較し、いずれも濃いバンドが検出され、デンストメーターにて解析したところ、**Fig. 3-6 (C)**に示したように、hIAP-b mRNA 発現量は 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM で、0 nM に比べ有意に高値を示した (それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。

ヒト VDR 遺伝子の mRNA の PCR 産物 (hVDR ; 207 bp) については、1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 3、5、7 日目で、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM において、0 nM と比較し、やや薄いバンドが検出され、デンストメーターにて解析したところ、**Fig. 3-6 (D)**に示したように、hVDR mRNA 発現量は、1, 25(OH)₂D₃

添加培地での培養 5 日目において、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM で、0 nM に比べ有意に低値を示した ($p < 0.01$)。

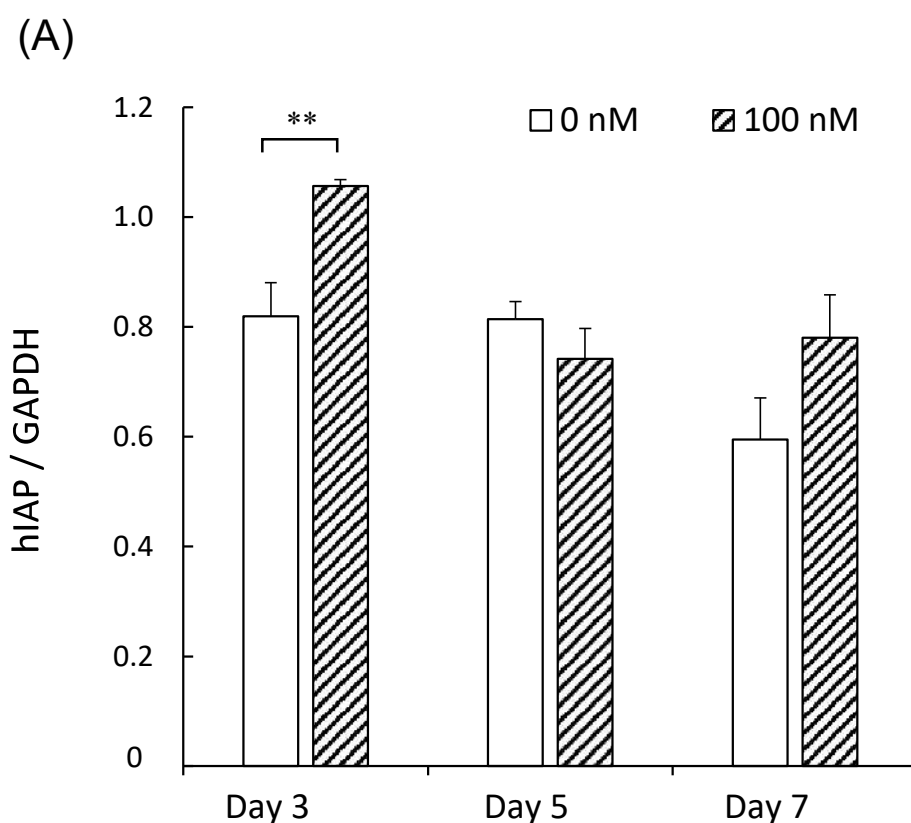


Fig. 3-6 (A) The relative expression level of mRNA for hIAP in Caco-2 cells. All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments. Comparisons between the 1, 25(OH)₂D₃-treated group (100 nM) and control group (0 nM) were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test. Significant difference between the 1, 25(OH)₂D₃-treated group (100 nM) and control group (0 nM) on day 3 (**: $p < 0.01$).

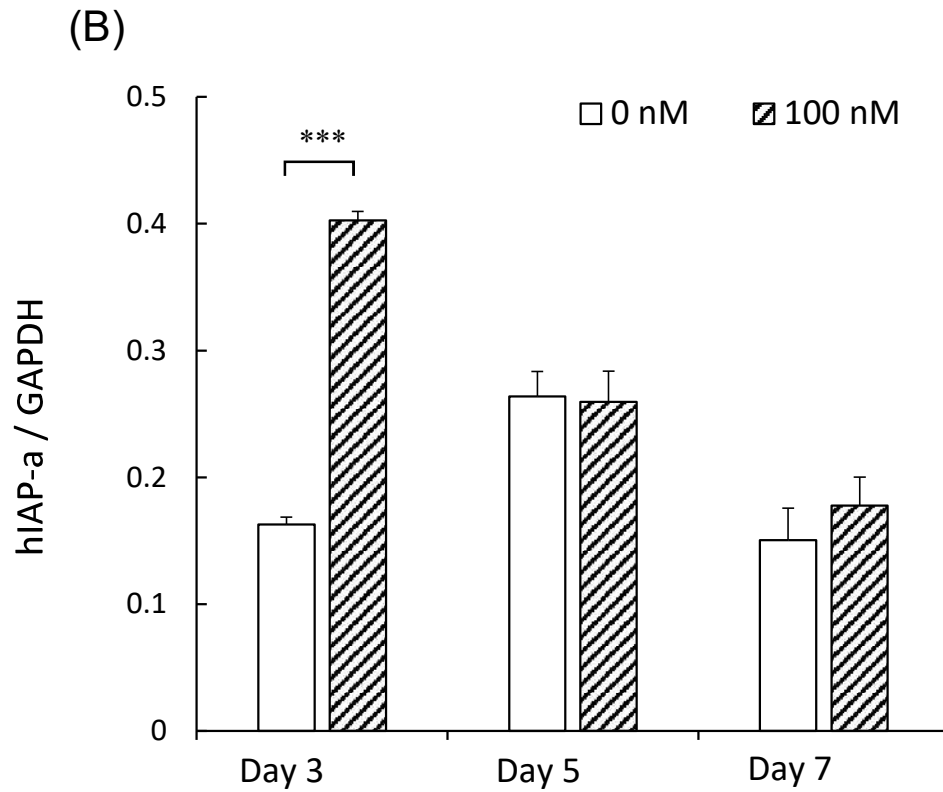


Fig. 3-6 (B) The relative expression level of mRNA for hIAP-a in Caco-2 cells.

All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments. Comparisons between the 1, 25(OH)₂D₃-treated group (100 nM) and control group (0 nM) were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test.

Significant difference between the 1, 25(OH)₂D₃-treated group (100 nM) and control group (0 nM) on day 3 (***: $p < 0.001$).

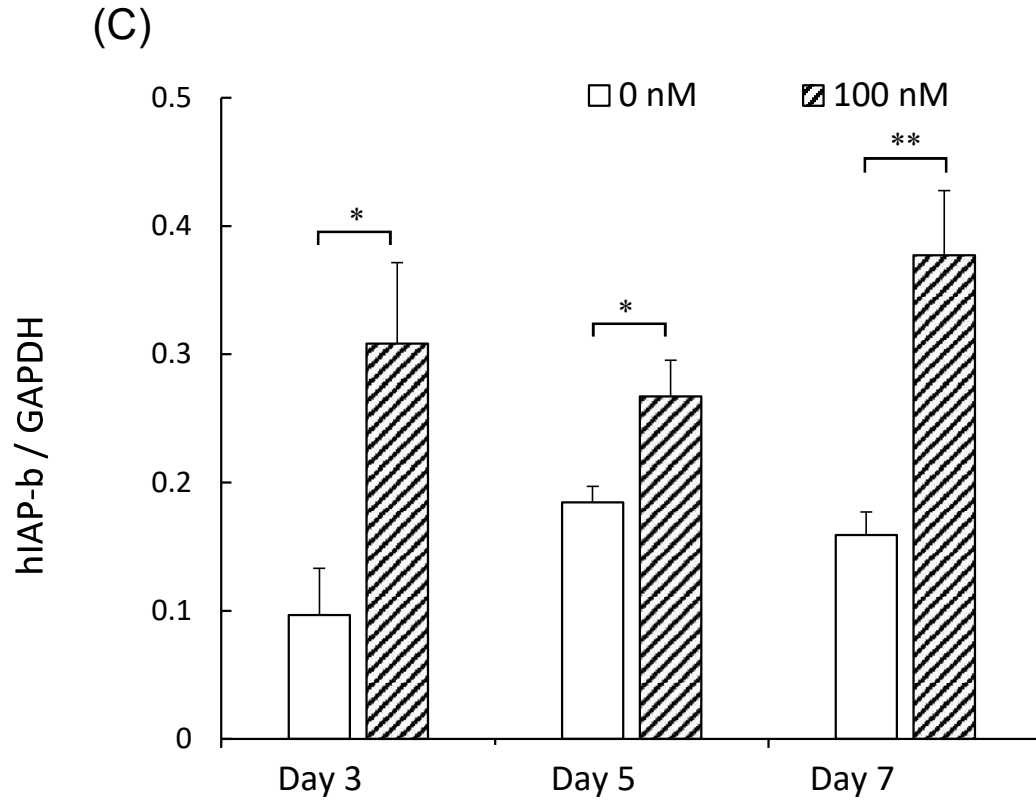


Fig. 3-6 (C) The relative expression levels of mRNA for hIAP-b in Caco-2 cells.

All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments. Comparisons between the 1, 25(OH)₂D₃-treated group (100 nM) and control group (0 nM) were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test.

Significant difference between the 1, 25(OH)₂D₃-treated group (100 nM) and control group (0 nM) on days 3, 5, and 7 (*: $p < 0.05$, *: $p < 0.05$, and **: $p < 0.01$, respectively).

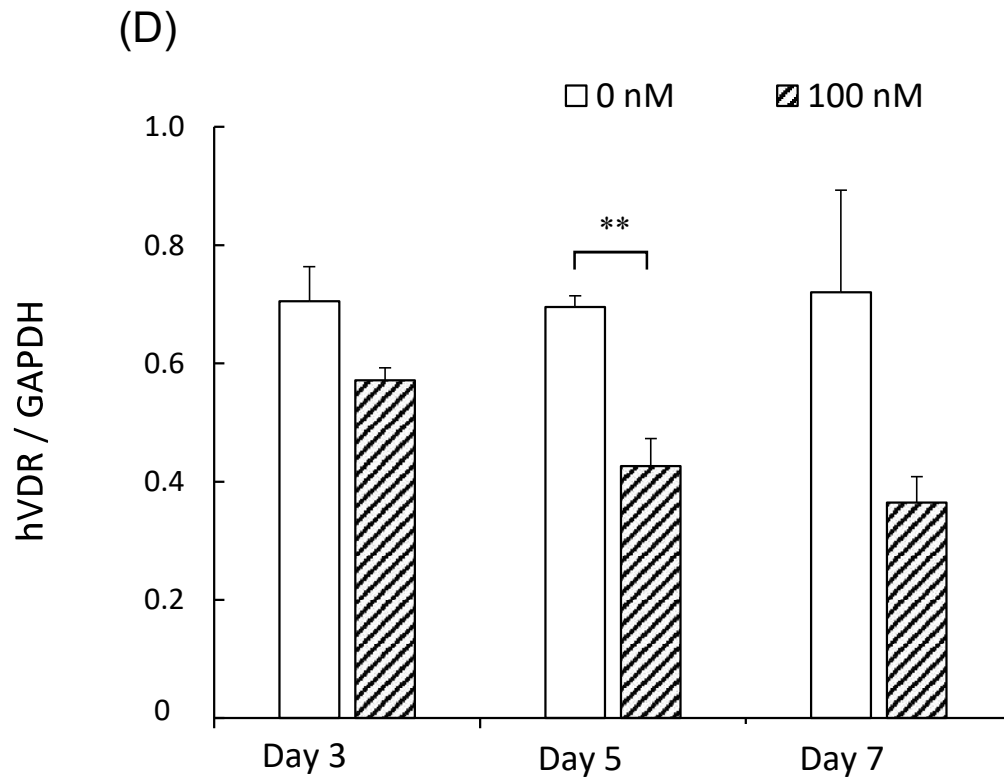


Fig. 3-6 (D) The relative expression levels of mRNA for hVDR in Caco-2 cells.

All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments. Comparisons between the 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ -treated group (100 nM) and control group (0 nM) were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test.

Significant difference between the 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ -treated group (100 nM) and control group (0 nM) on day 5 (**: $p < 0.01$).

考察

本研究では、コンフルエント前の Caco-2 細胞において、1, 25(OH)₂D₃ による ALP 活性への影響と、ヒト *ALPI* 遺伝子から転写される 2 種類の IAP alternatively spliced mRNA の発現調節について検討を行った。その結果、未分化の Caco-2 細胞において、1, 25(OH)₂D₃ により ALP 活性が有意に増加し、1, 25(OH)₂D₃ により誘導された ALP アイソザイムは、典型的な小腸型 ALP の酵素化学的性質を示した。さらに、RT-PCR 分析において、ヒト小腸型 ALP 遺伝子の PCR 産物が、1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 3 日目以降で検出され、培養 3 日目において 1, 25(OH)₂D₃ により有意に増強された。

ヒト骨芽細胞様細胞を用いた研究において、24, 25(OH)₂D₃ ではなく 1, 25(OH)₂D₃ により、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 (0.1~100 nM) 依存的に ALP 活性および TNSALP mRNA 発現が増加したことが報告されている[69]。この結果は、1, 25(OH)₂D₃ が骨芽細胞様細胞における細胞の分化や機能を調整している可能性を示唆している[69, 70]。ヒト TNSALP は IAP とは 57%ホモロジー、胎盤型 ALP とは 52%ホモロジーを示す[3]。TNSALP 遺伝子の欠損により引き起こされる低ホスファターゼ症の研究から、TNSALP は石灰化を阻害するピロリン酸濃度をコントロールすることにより、骨組織における石灰化に深く関与していることが示されている[7, 8]。

ヒト *ALPI* 遺伝子は、転写により 2 種類の alternatively spliced mRNA (variant aAug10 および bAug10) がつくられる。主な variant である aAug10 は 2, 550 bp であり、小腸や直腸、視床などの組織から単離され、bAug10 は腎臓や視床などの組織から得られた 1,884 bp の mRNA である[67]。Variant bAug10 は 150 bp の upstream open reading frame (uORF) を含んでいる。

タンパク質の翻訳は main ORF の上流で開始される短い転写産物 (uORF) の存在により制御され[67]、細胞の分化や代謝に必要な遺伝子の発現を調節してタンパク質の翻訳に影響を与えていることが報告されている[71]。Caco-2 細胞における、1, 25(OH)₂D₃ のこれら 2 種類のヒト IAP alternatively spliced variant の発現への影響についての報告はなく、aAug10 および bAug10 の mRNA に特異的なプライマー (それぞれ hIAP-a および hIAP-b) を作製した。まず、ヒト小腸組織 total RNA からこれらの PCR 産物を検出し、PCR 産物の塩基配列を確認した。1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM における hIAP-a および hIAP-b 発現量はほぼ同量であり、1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 3 日目において、1, 25(OH)₂D₃ により hIAP-a および hIAP-b mRNA 発現が増強されていた。興味深いことに、培養 5、7 日目において、hIAP-a mRNA 発現量は 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM と 100 nM 間において有意差は認められず、一方、hIAP-b mRNA 発現量は 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM において、0 nM と比較し有意に増加した。このような variant aAug10 と bAug10 の遺伝子発現時期の相違は、ヒト *ALPI* 遺伝子の転写調節作用の違いを示しているのかもしれない。

ALP のような刷子縁膜酵素が高い活性を示すことは、Caco-2 細胞の分化の特徴と考えられている[11]。Halline et al.の研究では Caco-2 細胞において 1, 25(OH)₂D₃ により ALP 活性が誘導されたこと、1, 25(OH)₂D₃ が Caco-2 細胞の増殖を減少させ、小腸上皮様細胞への分化を促進したことを報告している[56]。

本研究では、ビタミン D の活性型である 1, 25(OH)₂D₃ に特異的に結合する核内ホルモン受容体の VDR の mRNA 発現についても検討した。VDR は 1, 25(OH)₂D₃ に結合した後、標的遺伝子に存在する特異的な塩基配列であるビタミン D レスポンスエレメント (vitamin D response element ; VDRE) に作用し、様々な生理機能を発現している。先行研究において、1, 25(OH)₂D₃ を添加

した未分化の Caco-2 細胞でのヒト VDR mRNA レベルは、コントロールと比べて差がなかったことが報告されている[56, 72]。本研究においては、1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 5 日目の hVDR 発現は、1, 25(OH)₂D₃ により有意に減少した。ヒト *TNSALP* 遺伝子プロモーターには古典的な VDRE は存在しないが[2]、Owen et al.は VDRE に類似した配列を同定している[73]。Orimo et al.により、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞株である MG-63 における *TNSALP* と 1, 25(OH)₂D₃ 間の関係について検討されており、VDRE に類似した塩基配列を含むレポータープラスミドを MG-63 細胞に過剰発現させても 1, 25(OH)₂D₃ により転写は活性化されず、1, 25(OH)₂D₃ は mRNA 安定性を増加させることで *TNSALP* 活性およびその mRNA 発現を転写後に制御していることが報告されている[74]。ヒト *ALPI* 遺伝子にも古典的な VDRE 配列は存在せず[3]、ビタミン D による転写制御について、ヒト *ALPI* 遺伝子上の VDRE に類似した塩基配列に直接 VDR が結合し作用するのか、あるいは VDR に依存しないメカニズムが存在するのかは明らかではない。今後、*ALPI* 遺伝子プロモーター領域の解析などにより、ビタミン D によるヒト *ALPI* 遺伝子発現上昇メカニズムの解明につながることを考えられる。

本研究の実験条件として、ヒト骨芽細胞様細胞を用いた先行研究[70]を参考に、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0~100 nM における影響を検討した。しかし、**Fig. 3-2** に示したように 1, 25(OH)₂D₃ 濃度依存的に ALP 活性の増加が認められ、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM において最も高い ALP 活性レベルとなったため、Caco-2 細胞での ALP 発現における 1, 25(OH)₂D₃ の影響を評価するために、より高濃度の 1, 25(OH)₂D₃ 添加培地における検討も必要であると考えられた。また、IAP の生理機能の 1 つである腸ホメオスタシスの維持における 1, 25(OH)₂D₃ の ALP 発現への影響について確認するためには、小腸上皮様細胞に分化する他

の細胞株やヒトの小腸組織を用いた *in vivo* 系や *in vitro* 系での検討を行うことが必要であろう。

本研究において、1, 25(OH)₂D₃ により Caco-2 細胞でのヒト IAP の 2 種類の *alternatively spliced mRNA variant* の発現がいずれも誘導されることが明らかとなった。今後、ヒト IAP の生理機能や IAP の誘導に関わる転写調節についての詳細な研究を進めることで、ビタミン D の新たな生理作用に関する有益なデータが得られよう。

第 2 章

研究 4 : 小腸上皮様細胞 (Caco-2) における、ビタミン D のアルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

要約

本研究では、ヒト結腸癌由来細胞で、培養後に小腸上皮様細胞に分化する Caco-2 細胞を用いて、ビタミン D が ALP 活性とその遺伝子発現、腸の分化マーカーである他の加水分解酵素の発現に及ぼす影響について検討を行った。コンフルエント後 14 日間培養し、Caco-2 細胞に 1, 25(OH)₂D₃ を添加 (1, 25(OH)₂D₃ 濃度 : 0、10、100 nM) した結果、添加後 3、5、7 日目において 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM の ALP 活性およびヒト小腸型 ALP 遺伝子の mRNA 発現量が 0 nM と比べて有意に高値を示した。一方、スクラーゼ・イソマルターゼおよびジペプチジルペプチダーゼ IV の遺伝子発現は 1, 25(OH)₂D₃ により増強されなかった。本研究において、ヒト小腸上皮様細胞でのビタミン D による小腸型 ALP 発現の増強作用について示すことができ、小腸型 ALP 発現調節を介したビタミン D の新たな生理作用の解明につながることを期待される。

目的

＜研究 3＞において、未分化の Caco-2 細胞を用いて、1, 25(OH)₂D₃ により ALP 活性ならびにヒト小腸型 ALP 遺伝子の mRNA の発現が増強されることが明らかになった。Giuliano et al.は、Caco-2 細胞を播種してから 5 日目（コンフルエント前）および 11 日目（コンフルエント後）の細胞に 1, 25(OH)₂D₃ (10 nM) を添加し、ALP 活性が上昇したことを報告している [50]。しかしながら、小腸上皮様細胞に分化した Caco-2 細胞における 1, 25(OH)₂D₃ の ALP 活性および小腸型 ALP 遺伝子への影響については、検討されていなかった。そこで本研究では、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞を用いて、ヒトの小腸上皮様細胞における 1, 25(OH)₂D₃ による ALP 活性およびヒト小腸型 ALP 遺伝子発現への影響について検討を行った。

さらに、IAP と同様に小腸上皮細胞で発現される複合体の加水分解酵素で、腸の分化マーカーである SI および腸で発現している膜結合型プロテアーゼの 1 つであるジペプチジルペプチダーゼIV (dipeptidyl peptidase IV ; DPP-4 : EC 3.2.1.10) の遺伝子発現におけるビタミン D の影響についても検討を行った。

方法

(1) 細胞培養

使用した培地組成および培養条件については、＜研究 1＞と同様である。

Caco-2 細胞を 35 mm 培養ディッシュに播種し (6×10^5 個 cells / 35 mm dish)、コンフルエント後 14 日間培養した。その後、1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 添加培地 (0、10、100 nM) へと交換し、それぞれの培養条件で培養後、0、1、3、5、7 日目に細胞を採取した。＜研究 3＞と同様、今回の実験に使用した 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ は Merck Life Science より購入した。1, 25(OH) $_2$ D $_3$ はエタノールで溶解し、エタノールの最終濃度を培地の 0.1% となるように調整し、培地は 2 日おきに交換した。

(2) サンプルの調整

＜研究 1＞と同様に行った。

(3) アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定

＜研究 2＞と同様に行った。

(4) アルカリホスファターゼ (ALP) 酵素組織化学染色

＜研究 1＞と同様に行った。

(5) アルカリホスファターゼ (ALP) 阻害実験

＜研究 1＞と同様に行った。

(6) SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下にて、10%ポリアクリルアミドゲル (プレキャストゲル Cat. 161-J321V, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) による電気泳動を行った[75]。分子量スタンダードには、Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad Laboratories) を用いた。電気泳動後のゲルは、Fast Violet B salt (Wako) を用いて、 β -ナフチルリン酸法[36]にて ALP 活性染色を行った。

(7) RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 分析

① RNA 抽出

<研究 1>と同様に行った。

② cDNA (complementary DNA) 作製

<研究 2>と同様に行った。

③ PCR 法による DNA の増幅

PCR に用いた試薬や方法、条件等については、<研究 1>と同様である。

PCR プライマーは、hIAP : human intestinal alkaline phosphatase[39]、hTNSALP : human tissue non-specific alkaline phosphatase[41]、hVDR : human vitamin D receptor[68]、hSI : human Sucrase-Isomaltase[40]、hDPP-4 : human dipeptidyl peptidase IV[76]、GAPDH : Glyceraldehyde phosphatase dehydrogenase を用いた。forward・reverse プライマーは **Table 4-1** に示した。

Table 4-1 PCR oligonucleotide primers and predicted size of PCR products.

Primer		Length	Position [※]
hIAP forward	5' CACGACACGCGGCAATGAGGTC 3'	708 bp	422-1129
hIAP reverse	5' TGGTCAGCGGTGACGAGGGTCA 3'		
hTNSALP forward	5' AAGGAGGCAGAATTGACCACG 3'	195 bp	998-1192
hTNASALP reverse	5' CAAAGATAGAGTTGCCACGGG 3'		
hVDR forward	5' AGCCTCAATGAGGAGCACTCCAAG 3'	207 bp	1174-1380
hVDR reverse	5' ACGGGTGAGGAGGGTGCTGAGTA 3'		
hSI forward	5' CATCCTACCATGTCAAGAGCCA 3'	196 bp	5070-5265
hSI reverse	5' GCTTGTTAAGGTGGTCTGGTTT 3'		
hDPP-4 forward	5' CCTTCTACTCTGATGAGTCACTGC 3'	312 bp	716-1027
hDPP-4 reverse	5' GTGCCACTAAGCAGTTCCATCTTC 3'		
GAPDH forward	5' ACCACAGTCCATGCCATCCAC 3'	452 bp	525-976
GAPDH reverse	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'		

[※]The A in the ATG of the initiator Met codon is denoted as nucleotide +1.

④ ポリアクリルアミドゲル電気泳動

＜研究 1＞と同様に行った。

⑤ デンシトメーターによる計測

＜研究 1＞と同様に行った。

(6) 統計処理

実験結果は平均値 (the means) ± 標準誤差 (S. E.) で示した。統計ソフト IBM SPSS Statistics 22 (日本アイ・ビー・エム (株)) を使用し、ALP 活性分析における各データの有意差検定については、一元配置分散分析後、Dunnet または Tukey の検定を行った。また、阻害剤や加熱による阻害実験および RT-PCR 分析においては、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM および 100 nM の 2 群間の比較として、Student's *t* 検定を行った。なお、危険率 5%を有意差ありとした。

結果

(1) ALP 活性

Caco-2 細胞がコンフルエントに達してから 14 日後に 1, 25(OH)₂D₃ 添加培地に交換した。培地中の 1, 25(OH)₂D₃ 濃度を 0、10、100 nM の 3 種類とし、1, 25(OH)₂D₃ 添加 0、1、3、5、7 日目の ALP 活性の経時的変化を **Fig. 4-1** に示した。

1, 25(OH)₂D₃ 添加 1 日目において、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM における ALP 活性は 0 nM と比較し、有意に高値を示した ($p < 0.05$)。さらに、1, 25(OH)₂D₃ 添加培地での培養 3、5、7 日目において、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 10 nM、100 nM における ALP 活性は、0 nM と比較し、有意に高値を示した(それぞれ $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$)。

さらに、タンパク質当たりの ALP 比活性についても算出した結果、ALP 活性と同様の結果となった (データは示さず)。

なお、コントロール (0 nM) における ALP 活性について 0、1、3、5、7 日目で比較したところ、有意な差は認められなかった。

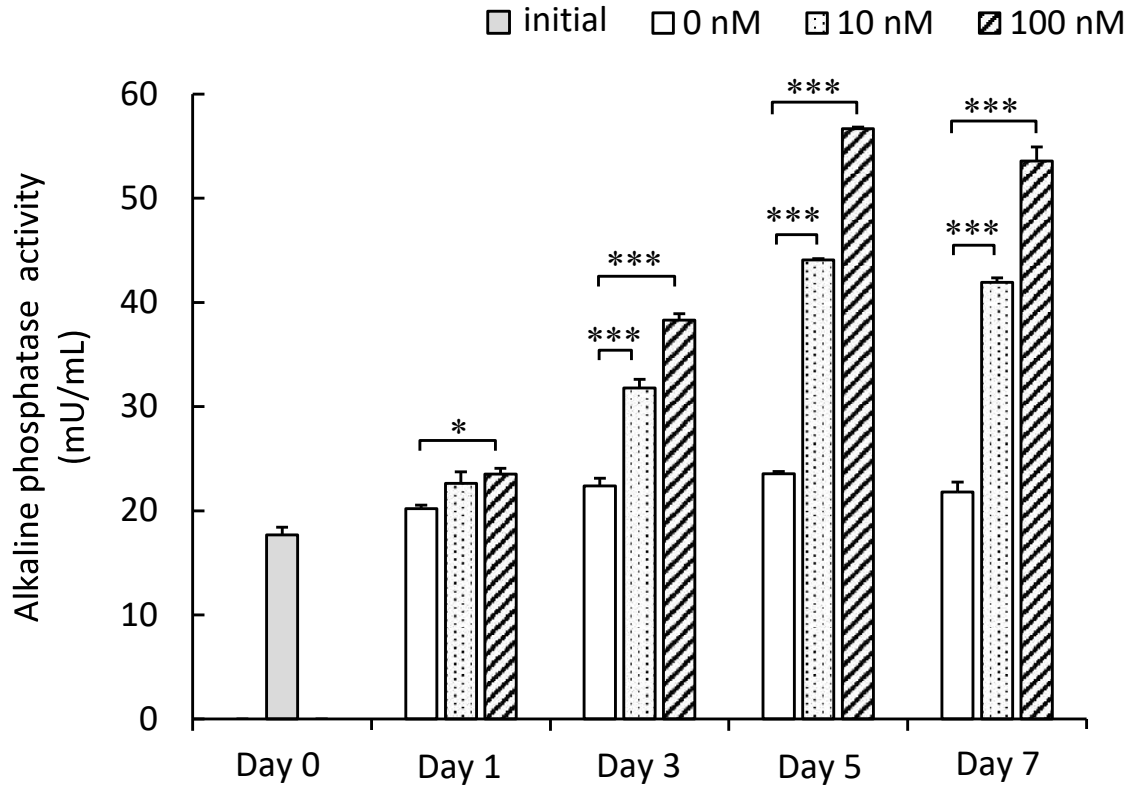


Fig. 4-1 Effects of the 1, 25(OH)₂D₃ concentration on ALP activity in Caco-2 cells. Cells were incubated for 14 days after confluency, and desired concentrations of 1, 25(OH)₂D₃ (0, 10, and 100 nM) were added. The Caco-2 cells were assayed on days 0, 1, 3, 5, and 7 after the addition of 1, 25(OH)₂D₃.

Results are the means ± S.E. from triplicate experiments.

Dunnett's multiple comparison test was used after ANOVA to compare the significance of differences among 1, 25(OH)₂D₃ concentrations of 0, 10, and 100 nM (*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$).

(2) ALP 酵素組織化学染色

1, 25(OH)₂D₃ 添加 7 日目の細胞に ALP 酵素組織化学染色を行い、光学顕微鏡で観察した。**Fig. 4-2 (A)~(C)**に示したように、1, 25(OH)₂D₃ (10 nM または 100 nM) を添加した Caco-2 細胞では、赤く染色された ALP 酵素染色細胞が多く認められた。

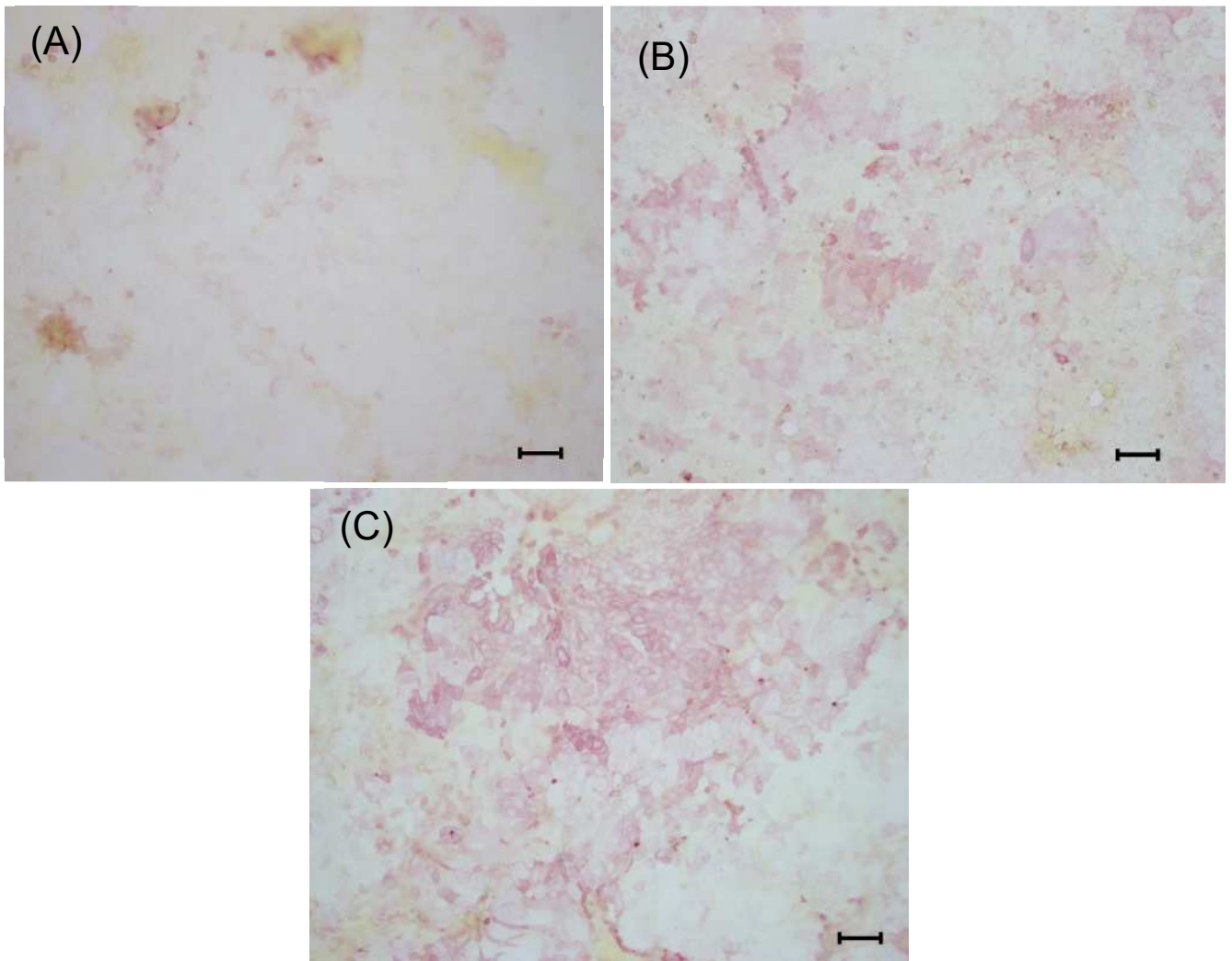


Fig. 4-2 Caco-2 cells on coverslips were stained for ALP activity on day 7.

Light micrograph of the monolayer of confluent Caco-2 cells (x 100).

Cells were stained for ALP activity (stained red) as described in Materials and Methods.

(A) 1, 25(OH)₂D₃: 0 nM.

(B) 1, 25(OH)₂D₃: 10 nM.

(C) 1, 25(OH)₂D₃: 100 nM.

Bar=100 μm

(3) ALP の酵素特性

1, 25(OH)₂D₃ (100 nM) を添加した Caco-2 細胞の ALP 活性が 0 nM と比較して有意に高値を示したことから、1, 25(OH)₂D₃ 添加 7 日目の 0 nM または 100 nM における ALP の酵素特性について、レバミゾールによる阻害実験と加熱実験を行った (Table 4-2)。1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM におけるレバミゾールあるいは加熱処理後の ALP 活性残存率については、0 nM に比べてそれぞれ有意な差は認められなかった。

Table 4-2 Inhibitory effects on alkaline phosphatase of Caco-2 cells (%)

1, 25(OH) ₂ D ₃ concentrations		Levamisole (1 mM)	Heat inactivation (56°C 10 min)
Caco-2 cells	0 nM	48.4 ± 0.4	93.5 ± 0.8
	100 nM	47.5 ± 0.6	88.6 ± 1.2

ALP activity was assayed by the rate of hydrolysis of *p*-nitro-phenylphosphate.

The effects of the inhibitor were determined in the presence of 5 mM MgCl₂ in the assay mixture.

Activities of non-treated controls were designated as 100%.

Cultured cells were treated with 1, 25(OH)₂D₃ (0 or 100 nM) for 7 days.

Each value represents the means ± S.E. (n=3) of triplicate experiments.

The unpaired two-tailed Student's *t*-test was used to compare the significance of differences between 1, 25(OH)₂D₃ concentrations of 0 and 100 nM.

(4) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

1, 25(OH)₂D₃ 添加 7 日目の 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM および 100 nM の ALP 抽出サンプルについて、SDS-PAGE を行った。**Fig. 4-3** に示したように、0 nM および 100 nM において 1 本の ALP 活性バンドが検出され、分子量は 100 kDa と算定された。100 nM では、0 nM よりも濃い ALP 活性のバンドが示された。



Fig. 4-3 Intestinal ALP isozymes of the Caco-2 cells on day 7 separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

The gels were stained for ALP activity with a β -naphthyl-phosphoric acid monosodium salt, Fast violet B salt.

(5) RT-PCR 分析

1, 25(OH)₂D₃ 添加 1、3、5、7 日目に、1, 25(OH)₂D₃ (100 nM) を添加した Caco-2 細胞の ALP 活性が 0 nM と比較して有意に高値を示したことから、1, 25(OH)₂D₃ 添加 1、3、5、7 日目における 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM と 100 nM について、RT-PCR 分析により mRNA の発現量を比較した。

ヒト小腸型 ALP 遺伝子の mRNA の PCR 産物 (hIAP ; 708 bp) について、1, 25(OH)₂D₃ 添加 1、3、5、7 日目において、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM で 0 nM に比べて濃いバンドが検出された。デンシトメーターにて解析したところ、**Fig. 4-4 (A)**に示したように、hIAP mRNA 発現量は、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM で 0 nM と比較し、1 日目において高値傾向を示し ($p=0.079$)、3、5、7 日目においては有意に高値を示した (それぞれ $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$)。

ヒト TNSALP 遺伝子の mRNA の PCR 産物 (hTNSALP ; 195 bp) は 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM において、0 nM と同様にほとんど検出されなかった(データは示さず)。

ヒト VDR の遺伝子の mRNA の PCR 産物 (hVDR ; 207 bp) については、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM および 100 nM でバンドが検出されたが、培養期間により 0 nM と 100 nM でのバンドの濃さが異なった。デンシトメーターにて解析したところ、**Fig. 4-4 (B)**に示したように、hVDR mRNA 発現量は、いずれの期間においても 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM および 100 nM 間で有意な差は認められなかった。

ヒトの SI 遺伝子の mRNA の PCR 産物 (hSI ; 196 bp) については、1, 25(OH)₂D₃ 添加 1、3、5、7 日目で、100 nM と比較し、0 nM においてやや濃いバンドが検出された。デンシトメーターにて解析したところ、**Fig. 4-4 (C)**に示したように、hSI mRNA 発現量は、5 日目に 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM では

0 nM と比べて、有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

ヒトの DPP-4 遺伝子の mRNA の PCR 産物 (hDPP-4; 312 bp) については、1, 25(OH)₂D₃ 添加 1、3、5、7 日目において、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM と 100 nM におけるバンドの濃さは同様であり、デンストメーターにて解析したところ、**Fig. 4-4 (D)**に示したように、hDPP-4 mRNA 発現量は、いずれの期間においても 1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM および 100 nM 間で有意な差は認められなかった。

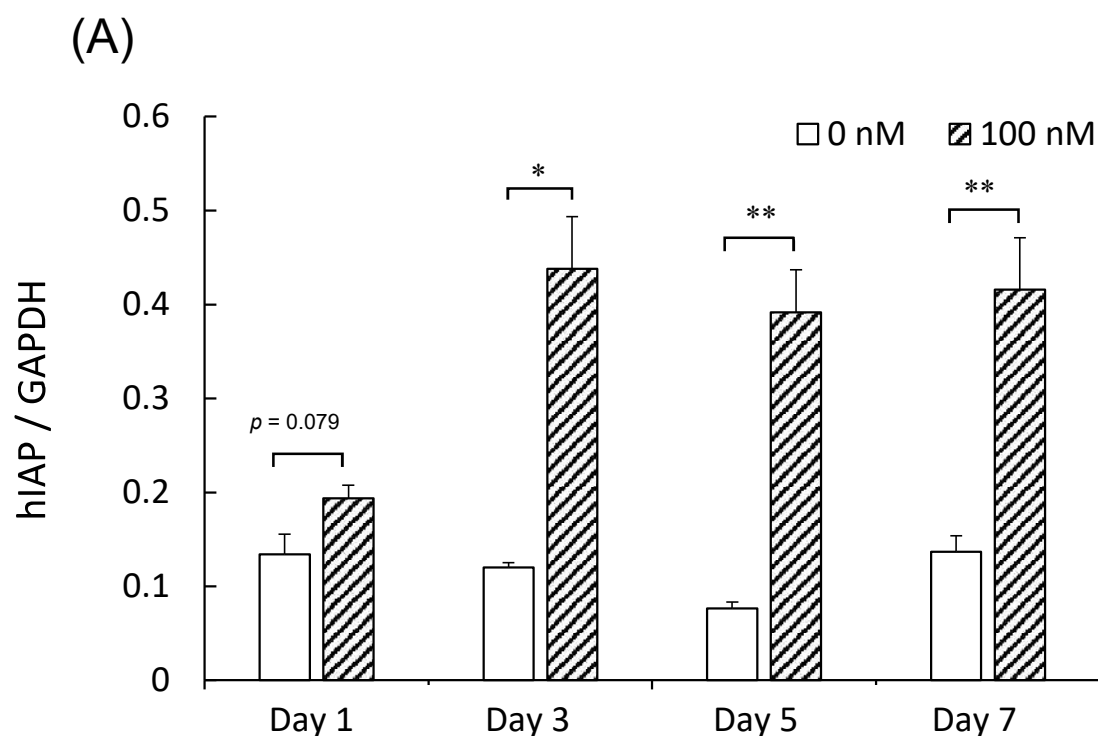


Fig. 4-4 (A) The relative expression levels of mRNA for hIAP in Caco-2 cells.

All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments. Comparisons between the 1, 25(OH)₂D₃-treated group (100 nM) and control group (0 nM) were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test.

Significant difference between the 1, 25(OH)₂D₃-treated group (100 nM) and control group (0 nM) on day 3, 5, 7 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, **: $p < 0.01$, respectively).

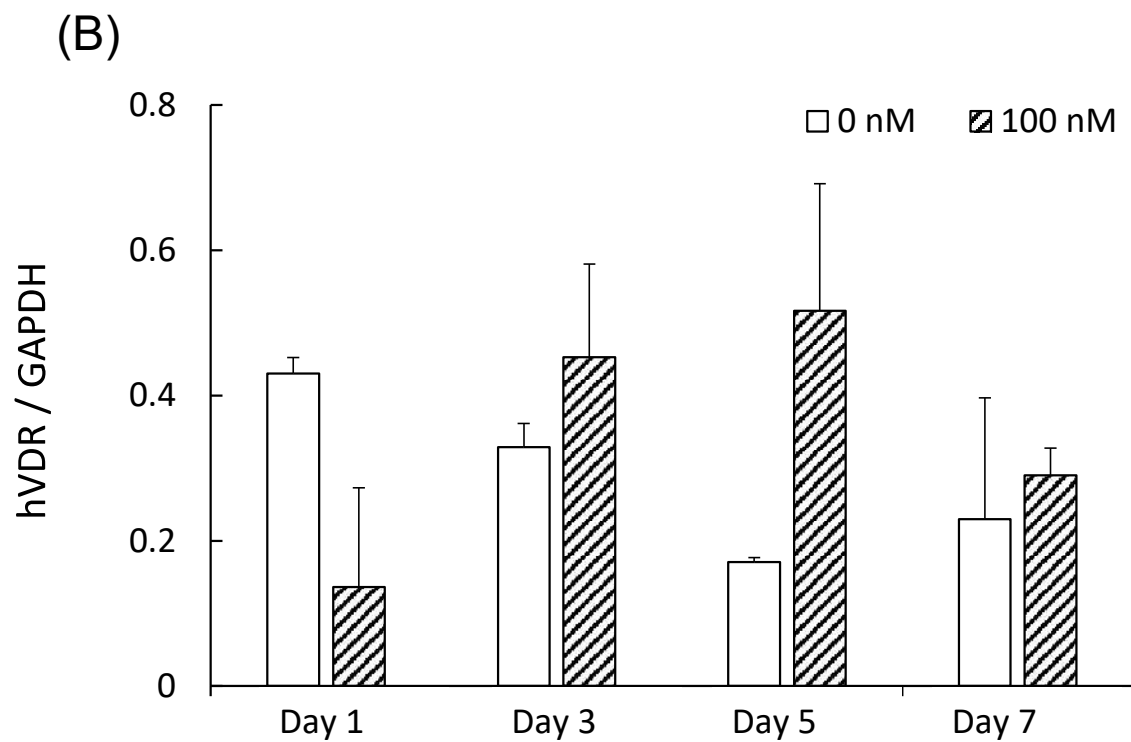


Fig. 4-4 (B) The relative expression levels of mRNA for hVDR in Caco-2 cells.

All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments.

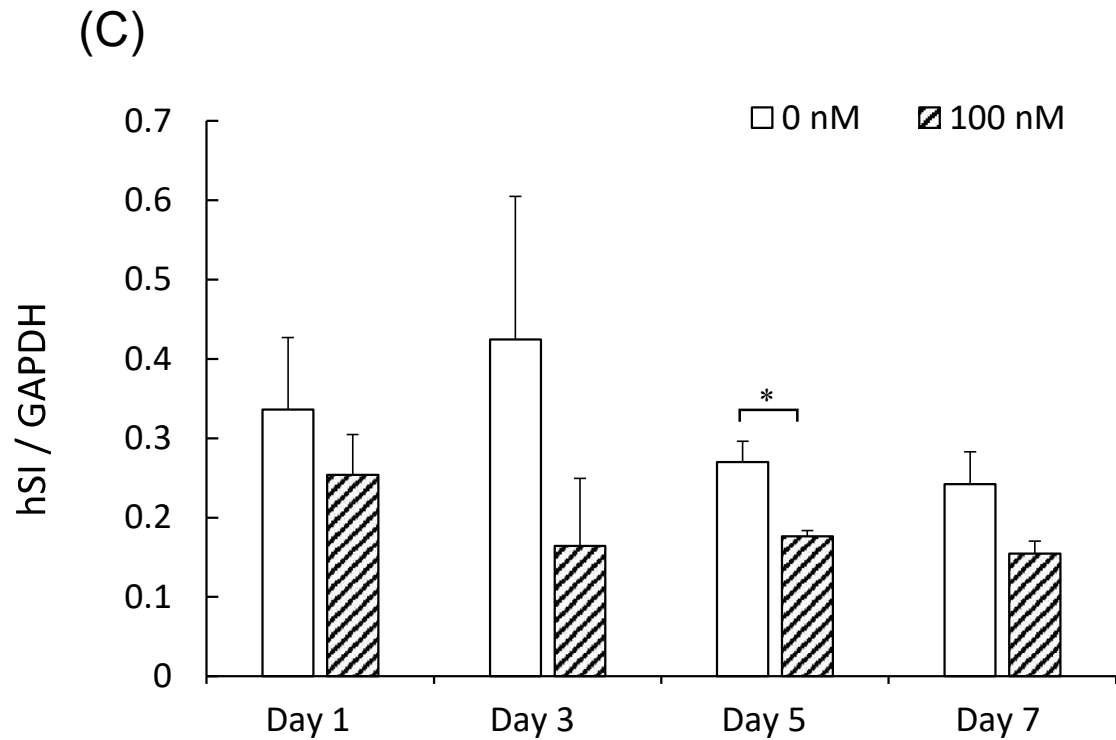


Fig. 4-4 (C) The relative expression levels of mRNA for hSI in Caco-2 cells. All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments. Comparisons between the 1, 25(OH)₂D₃-treated group (100 nM) and control group (0 nM) were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test. Significant difference between the 1, 25(OH)₂D₃-treated group (100 nM) and control group (0 nM) on day 5 (*: $p < 0.05$).

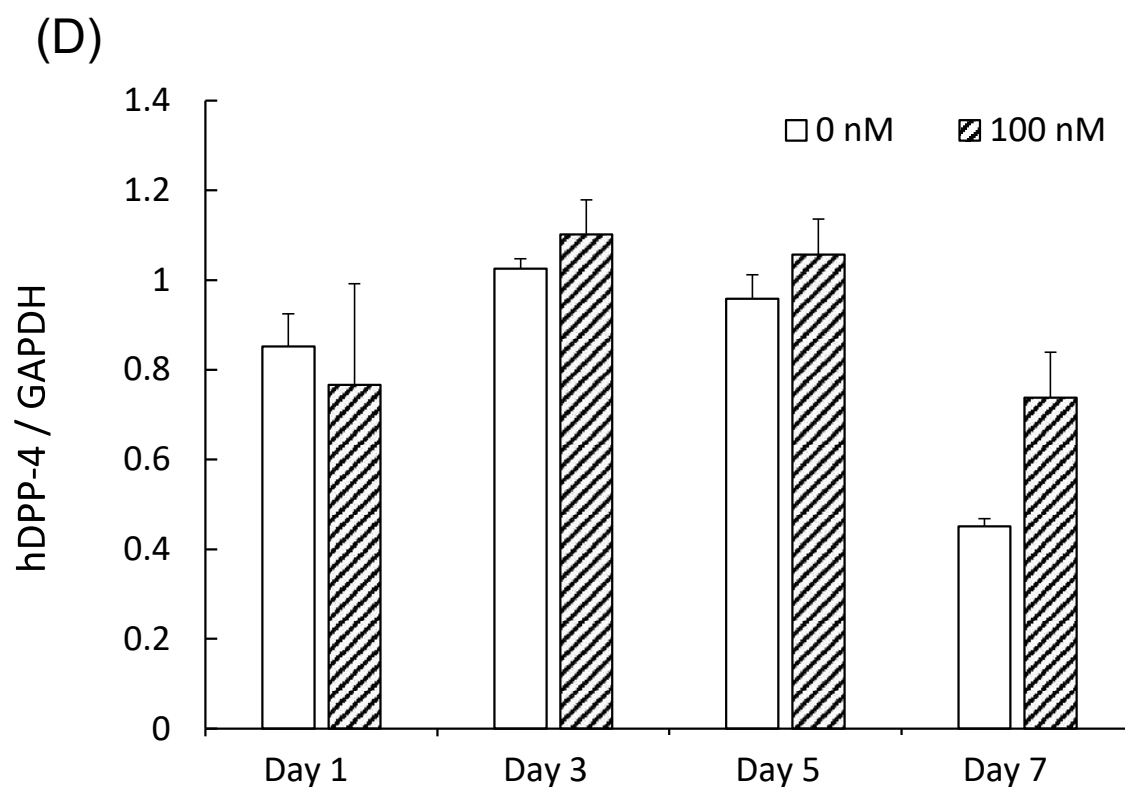


Fig. 4-4 (D) The relative expression levels of mRNA for hDPP-4 in Caco-2 cells.

All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments.

考察

本研究では、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞において、1, 25(OH)₂D₃ が ALP 活性およびその ALP 遺伝子発現へ及ぼす影響について検討した。

コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞において、1, 25(OH)₂D₃ (100 nM) 添加後、0 nM と比較して ALP 活性が有意に高値を示し、ALP の酵素化学的性質を検討したところ、典型的な小腸型 ALP の特性であることが示唆された。さらに、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM および 100 nM の ALP 抽出サンプルについて、SDS-PAGE 解析を行ったところ、分子量 100 kDa のバンドが検出され、100 nM のバンドは 0 nM よりも濃いバンドが認められた。本研究室の以前の研究において、SD 系雄ラットの十二指腸の ALP について SDS-PAGE による解析を行い、分子量 110 kDa および 100 kDa の 2 本のバンドを検出した[54]。また、卵巣摘出を施したラットの十二指腸の ALP についても SDS-PAGE による解析と RT-PCR 分析によるラット IAP- I およびラット IAP- II の発現について検討を行っており、分子量 110 kDa の産物は IAP- II の産物に、分子量 100 kDa の産物は IAP- I の産物にそれぞれ一致する可能性を示唆した[55]。小腸型 ALP には膜結合型と可溶型の 2 種類が知られており、本研究で Caco-2 細胞において検出された分子量 100 kDa のバンドは、分子量の小さい可溶型の小腸型 ALP であることが推察された。さらに、小腸型 ALP 遺伝子の mRNA 発現を比較したところ、1, 25(OH)₂D₃ 添加 (100 nM) により、0 nM と比較し hIAP mRNA 発現量が有意に高値を示した。hIAP mRNA の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の mRNA 発現量で標準化した相対的な結果を示しており、1, 25(OH)₂D₃ による hIAP mRNA 発現量の増加率と ALP 活性の増加率との関連

については、さらに IAP の 2 量体形成や糖鎖の付加などの翻訳後修飾への 1, 25(OH)₂D₃ 添加の影響も含めて検討する必要があるだろう。

IAP と同様に腸の分化マーカーとして用いられている SI については、先行研究により、コンフルエント前の Caco-2 細胞に 1, 25(OH)₂D₃ を添加したところ、SI 活性が阻害されたが、コンフルエント後の Caco-2 細胞においては差がなかったことが報告されている[57]。今回用いたコンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞における、1, 25(OH)₂D₃ 添加 5 日目の hSI mRNA の発現量を比較したところ、1, 25(OH)₂D₃ 添加により有意に低値を示した。先行研究によると、全ての加水分解酵素が同じように応答するとは限らないことが報告されている[57, 77, 78]。そこで、SI と同様に腸への分化により活性が上昇することが示されている DPP-4 についても、その遺伝子発現について比較検討を行った。その結果、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞において、1, 25(OH)₂D₃ 添加により hDPP-4 mRNA 発現量に差は認められなかった。先行研究で、Caco-2 細胞と同様のヒト腸上皮様細胞株である HT-29 細胞において、SI 活性はある一定期間を過ぎるとゆるやかな上昇がみられたが、DPP-4 活性は上昇し続けたことが示されている[49]。本研究では、SI や DPP-4 遺伝子発現の比較を行ったが、それぞれの酵素活性については測定を行っておらず、今後タンパク質レベルでも確認する必要がある。また、本研究では Semiquantitative (半定量的) RT-PCR 分析を行ったが、今後はさらにリアルタイム PCR 法により、より精度の高い定量的解析を行うことが望ましいと考えられる。

<研究 3>と同様、本研究でも、1, 25(OH)₂D₃ と結合する核内受容体の VDR の遺伝子発現について検討を行った。Caco-2 細胞を播種してから 15、18 日目に 1, 25(OH)₂D₃ を添加し、21 日目に採取し VDR 発現を調べた先行研究で、コントロールと比べて 1, 25(OH)₂D₃ を添加した細胞での VDR 発現が有意に減少

していたという報告がある[72]。＜研究 3＞においては、未分化の Caco-2 細胞に 1, 25(OH)₂D₃ を添加したところ、培養 5 日目において 1, 25(OH)₂D₃ 処理で hVDR mRNA 発現が有意に減少していた。本研究では、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞において、1, 25(OH)₂D₃ 添加による hVDR mRNA 発現量には差がなかった。Caco-2 細胞の培養期間や時期によっても、ビタミン D による VDR mRNA 発現への影響が異なったため、ビタミン D による転写調節が直接 VDR を介して起こるのか、あるいは VDR を介していないのかなど詳細については不明である。ビタミン D は腸の炎症とも関連があり、Caco-2 細胞の単層において、1, 25(OH)₂D₃ 添加により LPS 誘導性の上皮タイトジャンクション障害が保護されていることも報告され[79]、近年、ビタミン D の腸バリア機能への影響が VDR シグナル経路を介していることも示された[80]。今後、ALPI 遺伝子プロモーター領域の解析などにより、ビタミン D による ALPI 遺伝子発現の上昇メカニズムの解明につながることが考えられる。

本研究において、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞を用いて、1, 25(OH)₂D₃ 添加により IAP の遺伝子発現が増強されることを初めて示すことができ、ヒトの小腸において 1, 25(OH)₂D₃ が ALP 活性を増強することにより、脂質吸収の調節や、腸の恒常性の維持などに関与している可能性が推察された。今後さらに、様々な食事性因子による ALP への影響や、その作用機序について検討することにより、小腸型 ALP 発現調節を介したビタミン D をはじめとする栄養因子の新たな生理作用の解明につながることが期待される。

第 2 章：結語

第 1 章でビタミン K によりヒト IAP 発現が増強されることを示した。本章では、腸管からのカルシウムおよびリンの吸収を促進し骨代謝を調節するだけでなく、筋肉や骨由来のホルモンを調節するビタミン D が IAP 発現へ及ぼす影響について検討した。

研究 3：コンフルエント前の、小腸上皮様細胞に分化していない Caco-2 細胞における $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の ALP 活性およびその遺伝子発現への影響について検討を行った。 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加培地での培養 3、5、7 日目において、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (100 nM) により ALP 活性が上昇した。また、ヒト *ALPI* 遺伝子から転写される 2 種類の IAP mRNA variant の発現についても検討したところ、main variant の aAug10 の発現は培養 3 日目において、また、bAug10 の発現は培養 3、5、7 日目において、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (100 nM) により増強された。

研究 4：コンフルエントから 14 日後の、小腸上皮様細胞に分化した Caco-2 細胞における $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の ALP 活性とその遺伝子発現への影響について検討を行った。その結果、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加後 1、3、5、7 日目において $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (100 nM) により ALP 活性が上昇し、培養 3、5、7 日目における IAP の遺伝子発現も増強された。

本章では、小腸上皮様細胞に分化していない Caco-2 細胞およびコンフルエントから 14 日後の小腸上皮様細胞において、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により ALP 活性およ

び IAP の遺伝子発現が増強されることが明らかとなった。2 種類の IAP mRNA variant の発現について、初めて示すことができ、1, 25(OH)₂D₃ 添加による ALP へ及ぼす作用メカニズムについて転写・翻訳レベルで検討することにより、小腸型 ALP 発現調節を介したビタミン D をはじめとする栄養因子の新たな生理作用の解明につながることを期待される。

第 3 章

ヒト小腸型アルカリホスファターゼ遺伝子の
発現ベクターの構築とその遺伝子導入による
一過性発現の影響

第 3 章：緒言

これまでに、Caco-2 細胞やヒト結腸癌由来 T84 細胞を用いて、ヒト IAP 遺伝子を過剰発現させた研究が報告されている[81]。IAP 過剰発現によりタイトジャンクション形成や制御に関与している zonula occludens-1 (ZO-1) および ZO-2 mRNA レベルが増強されたことから、IAP がタイトジャンクションタンパク質と極性を制御することで腸上皮バリア機能を改善し、腸管粘膜透過性の調節因子となっていることが推察されている[81]。

＜研究 3＞で、ヒトにおいて、*ALPI* 遺伝子から 2 種類の variant が転写されていることを示した。Variant aAug10 は小腸組織からクローニングされた全長 2,550 bp の mRNA であり、IAP タンパク質をコードする mRNA であると報告されている。一方、Variant bAug10 は腎臓組織からクローニングされた全長 1,884 bp の mRNA であることが報告されている。＜研究 3＞では、これら 2 種類の mRNA の発現が 1, 25(OH)₂D₃ により増強され、食事性因子により制御され得ることも示した。また、variant aAug10 の PCR 産物である hIAP-a と variant bAug10 の PCR 産物である hIAP-b の発現レベルに差が認められたことより、variant aAug10 と variant bAug10 がヒト *ALPI* 遺伝子発現の転写調節に重要な役割を有することが示唆された。しかし、これら 2 種類の IAP mRNA variant の詳細については明らかになっていない。そのため、＜研究 5＞では、2 種類の mRNA のうち main の IAP の完全長 cDNA を組み込んだ IAP-a 発現ベクターを構築し、Caco-2 細胞に一過性発現させることにより、ALP 活性および IAP mRNA variant 発現への影響を検討した。

第3章

研究5：ヒト小腸型アルカリホスファターゼ遺伝子の発現ベクターの構築と Caco-2 細胞への IAP-a 発現ベクターのトランスフェクションによる一過性発現の影響

要約

ヒトにおいて、IAP をコードする *ALPI* 遺伝子から 2 種類の alternatively spliced mRNA (variant aAug10 および bAug10) が同定されているが、それぞれの mRNA の機能については不明な点が多い。本研究では、2 種類の mRNA のうち main の IAP の完全長 cDNA を組み込んだ IAP-a 発現ベクターを構築し、IAP を一過性発現させた Caco-2 細胞における 2 種類の variant 発現への影響について検討を行った。Caco-2 細胞への IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後、3～10 日目まで、ALP 活性が Mock と比較し有意に高値を示し、特に 7 日目では、Mock の 2～3 倍の高値を示した。Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 解析では、variant aAug10 の PCR 産物 (hIAP-a) は、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 1、3 日目において、Mock と比べて有意に高値を示し、同様に 2 種類の IAP mRNA variant の共通部分の PCR 産物 (hIAP) も、1、3 日目において Mock と比較し有意に高値を示した。一方、variant bAug10 の PCR 産物 (hIAP-b) は、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 7、10 日目に Mock と比べ有意に高値を示した。これらから、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクションによる一過性発現が variant bAug10 の発現にも影響を及ぼしている可能性

が示された。今後さらに、**variant aAug10** および **bAug10** のそれぞれの発現への影響や相互作用について検討することにより、**IAP** の転写や翻訳過程での **RNA** 間ネットワークの解明につながり、さらには **IAP** の生理作用の解明のための重要なデータを得られることが期待される。

目的

ヒトにおいて、IAP は *ALPI* 遺伝子によりコードされ、*ALPI* 遺伝子から 2 種類の alternatively spliced mRNA が同定されている[67]。本研究では、IAP タンパク質をコードする main の IAP の完全長 cDNA を組み込んだ IAP-a 発現ベクターを構築し、Caco-2 細胞に一過性発現させ、ALP 活性への影響や、2 種類の alternatively spliced mRNA (variant aAug10 および bAug10) の発現への影響、それらの相互作用について考察することを目的とした。

方法

(1) 発現ベクターの構築

Human intestinal alkaline phosphatase の完全長 cDNA のクローン (I.M.A.G.E. Full Length cDNA clone Purified Plasmid / sequence verified / 2,259 bp, Clone ID: 40146700 (ALPI), DNAFORM, Kanagawa, Japan) を購入した。プラスミドを増やし、精製した (QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25), QIAGEN, Maryland, USA)。EcoR I による制限酵素処理を行って、pCR4-TOPO vector (Life Technologies, Carlsbad, CA) [Fig. 5-1 (A)] から、インサート DNA を精製した (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)。さらに、pcDNA3 expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) [Fig. 5-1 (B)] にライゲーション試薬 (Ligation high, 東洋紡, Osaka, Japan) を用いて、インサート DNA を組み込み、IAP-a 発現ベクターを構築した。

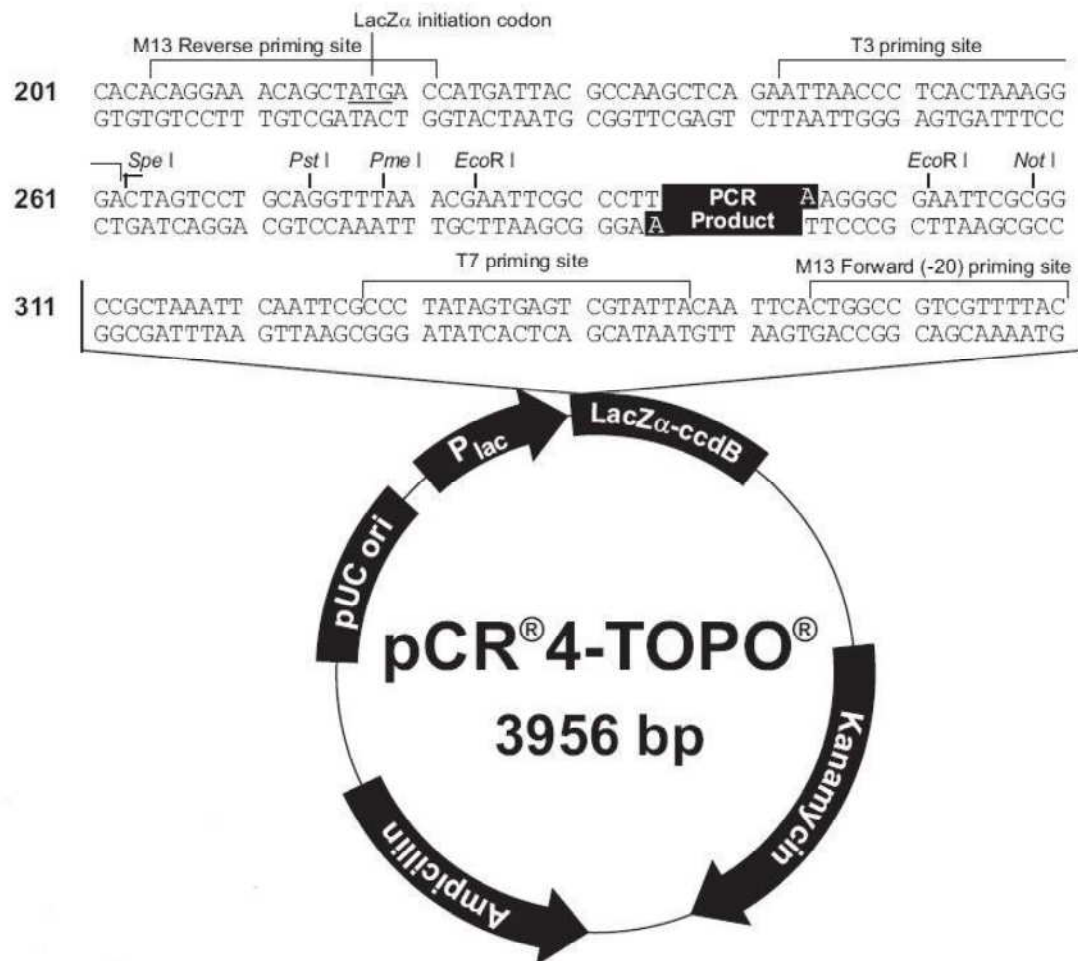


Fig. 5-1 (A) Image of pCR4-TOPO vector.

Xenbase

(<http://www.xenbase.org/common/ViewImageActionNonAdmin.do?imageId=40966>)

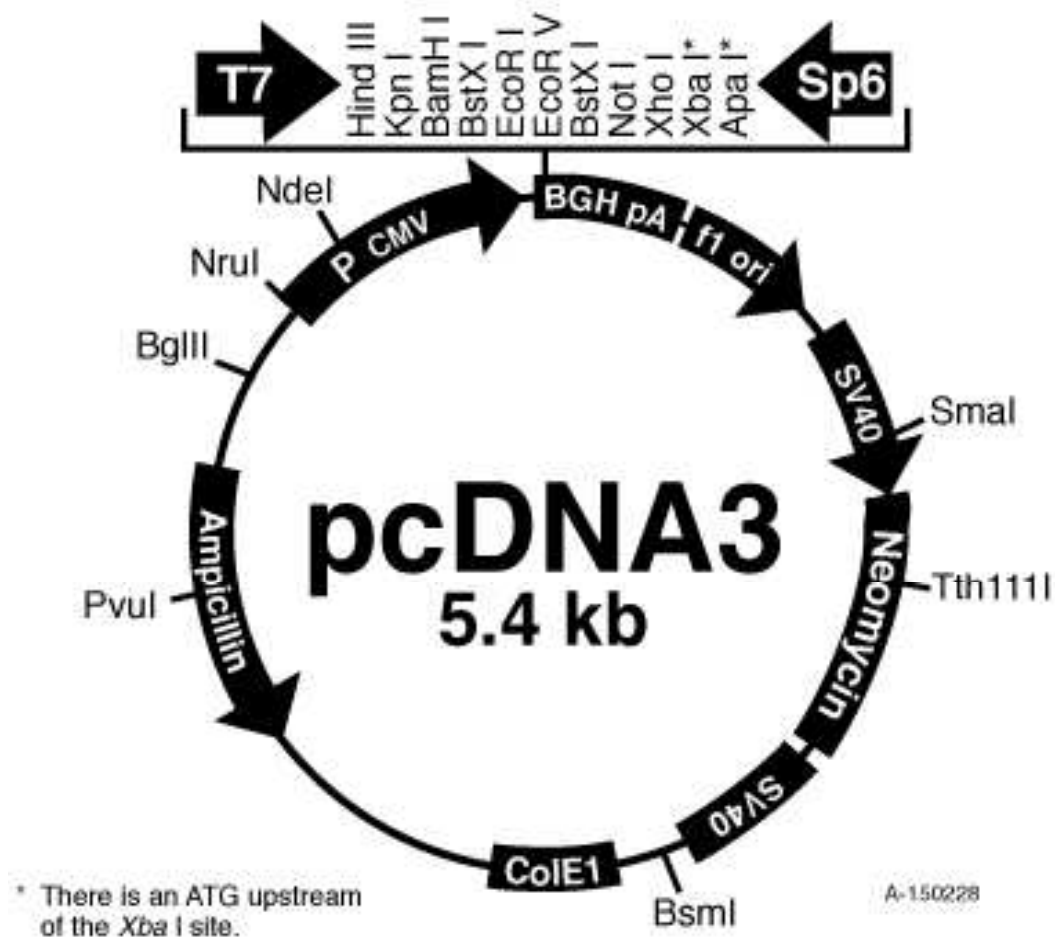


Fig. 5-1 (B) Image of pcDNA3 expression vector.
Addgene (<https://www.addgene.org/12980/>)

(2) プラスミドの塩基配列の確認

構築した IAP-a 発現ベクターのプラスミドの DNA について、＜研究 1＞と同様に、全塩基配列の確認を行った。

(3) Caco-2 細胞の培養

培養条件は、＜研究 1＞と同様である。

(4) トランスフェクション

Caco-2 細胞を 35 mm 培養ディッシュに播種し (5×10^5 個 cells / 35 mm dish)、一晩置いた。1 μ g / 35 mm dish の IAP-a 発現ベクターあるいは Mock の DNA と D-MEM、Lipofectamine&Plus (Life Technologies) の Mixture を作製し、細胞に D-MEM および Mixture を加え 3 時間 37°C にて反応させ、一過性にトランスフェクションを行った。トランスフェクション後、1、3、5、7、10 日間培養を行った細胞を採取した。培地は 2 日おきに交換した。

(5) サンプルの調製

＜研究 1＞と同様に行った。

(6) アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定

＜研究 1＞と同様に行った。

(7) アルカリホスファターゼ (ALP) 酵素組織化学染色

＜研究 1＞と同様に行った。

(8) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

＜研究 4＞と同様に行った。

(9) RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 分析

① RNA 抽出

＜研究 1＞と同様に行った。

② cDNA (complementary DNA) 作製

＜研究 2＞と同様に行った。

③ PCR 法による DNA の増幅

PCR に用いた試薬や方法、条件等については、＜研究 1＞と同様である。

PCR プライマーは、hIAP : human intestinal alkaline phosphatase[39]、
hIAP-a : human intestinal alkaline phosphatase-a、hAIP-b : human intestinal
alkaline phosphatase-b、GAPDH : Glyceraldehyde phosphatase
dehydrogenase を用いた。forward・reverse プライマーは **Table 5・1** に示した。

Table 5-1 PCR oligonucleotide primers and predicted size of PCR products.

Primer		Length	Position [※]
hIAP forward	5' CACGACACGCGGCAATGAGGTC 3'	708 bp	422-1129
hIAP reverse	5' TGGTCAGCGGTGACGAGGGTCA 3'		
hIAP-a forward	5' GCAACCCTGCAACCCACCCAAGGAG 3'	276 bp	2101-2376
hIAP-a reverse	5' CCAGCATCCAGATGTCCCGGGAG 3'		
hIAP-b forward	5' GCTGACCTGATCTCTACTCT 3'	407 bp	118-524
hIAP-b reverse	5' ACCTCATTGCCGCGTGTCGT 3'		
GAPDH forward	5' ACCACAGTCCATGCCATCCAC 3'	452 bp	525-976
GAPDH reverse	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'		

[※]The A in the ATG of the initiator Met codon is denoted as nucleotide +1.

④ ポリアクリルアミドゲル電気泳動

＜研究 1＞と同様に行った。

⑤ デンシトメーターによる計測

＜研究 1＞と同様に行った。

(10) 統計処理

実験結果は、平均値（mean）±標準誤差（S.E.）で示した。統計ソフト IBM SPSS Statistics 22（日本アイ・ビー・エム（株））を使用し、各データの有意差検定については、Student's *t* 検定を行った。なお、危険率 5%を有意差ありとした。

結果

(1) プラスミドの塩基配列

Human intestinal alkaline phosphatase の完全長 cDNA の IAP-a 発現ベクターについて、サイクルシーケンス法により塩基配列を確認した。なお、**Fig. 5-2 (A)**の上段は既報の IAP variant aAug10 (NM_001361) の塩基配列を示し、下段には Sp6、T7 あるいは特異的なプライマーを用いて確認した塩基配列を示した。また、**Fig. 5-2 (B)**にはシーケンスの波形データの一部を示した。

(A)

```

1~
aAug10: ACTTCGCCTCCTCCTGCTGCCCCAAGACATGCAGGGGCCCTGGGTGCTGCTGCTG
*****
IAP-a:  ACTTCGCCTCCTCCTGCTGCCCCAAGACATGCAGGGGCCCTGGGTGCTGCTGCTG

61~
aAug10: GGCCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCGTCATCCCAGCTGAGGAGGAGAACCCGGCCTTC
*****
IAP-a:  GGCCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCGTCATCCCAGCTGAGGAGGAGAACCCGGCCTTC

121~
aAug10: TGAACCGCCAGGCAGCTGAGGCCCTGGATGCTGCCAAGAAGCTGCAGCCATCCAGAAG
*****
IAP-a:  TGAACCGCCAGGCAGCTGAGGCCCTGGATGCTGCCAAGAAGCTGCAGCCATCCAGAAG

181~
aAug10: GTCGCCAAGAACCTCATCCTCTTCCTGGGCGATGGGTTGGGGTGCCACGGTGACAGCC
*****
IAP-a:  GTCGCCAAGAACCTCATCCTCTTCCTGGGCGATGGGTTGGGGTGCCACGGTGACAGCC

241~
aAug10: ACCAGGATCCTAAAGGGGCA.....ACACGACACACCCAGACCGC
*****
IAP-a:  ACCAGGATCCTAAAGGGGCA.....ACACGACACACCCAGACCGC

2041~
aAug10: GTGCCCCACCGTCTTAGCTTCAATCCTGGCAGCACCTGGTAGACCCAAGGACTTGGGTGG
*****
IAP-a:  GTGCCCCACCGTCTTAGCTTCAATCCTGGCAGCACCTGGTAGACCCAAGGACTTGGGTGG

2101~
aAug10: ATCAGGACACCTGAAGAAGAGAAGCTTCGGGAACCTGCAACCCACCCAAGGAGGCTAC
*****
IAP-a:  ATCAGGACACCTGAAGAAGAGAAGCTTCGGGAACCTGCAACCCACCCAAGGAGGCTAC

2161~
aAug10: TGGATCGGGGATTCCAGGGGGGCTTTGACACAGTCCTGTGCTCTCCCACTAGGATC
*****
IAP-a:  TGGATCGGGGATTCCAGGGGGGCTTTGACACAGTCCTGTGCTCTCCCACTAGGATC

2221~
aAug10: ATTCCACACCCCTGCACCTGACCAAGGGACCAATGAGGC
*****
IAP-a:  ATTCCACACCCCTGCACCTGACCAAGGGACCAATGAGGC

```

Fig. 5-2 (A) The nucleotide sequences of IAP-a expression vector using Sp6 or T7 primers are compared to the human intestinal ALP sequence (NCBI GenBank Accession No.: NM_001631) (top sequence).

Matches among the two sequences are marked by asterisks.

IAP-a: human intestinal alkaline phosphatase-a.

The A in the ATG of the initiator Met codon is denoted nucleotide +1.

(B)

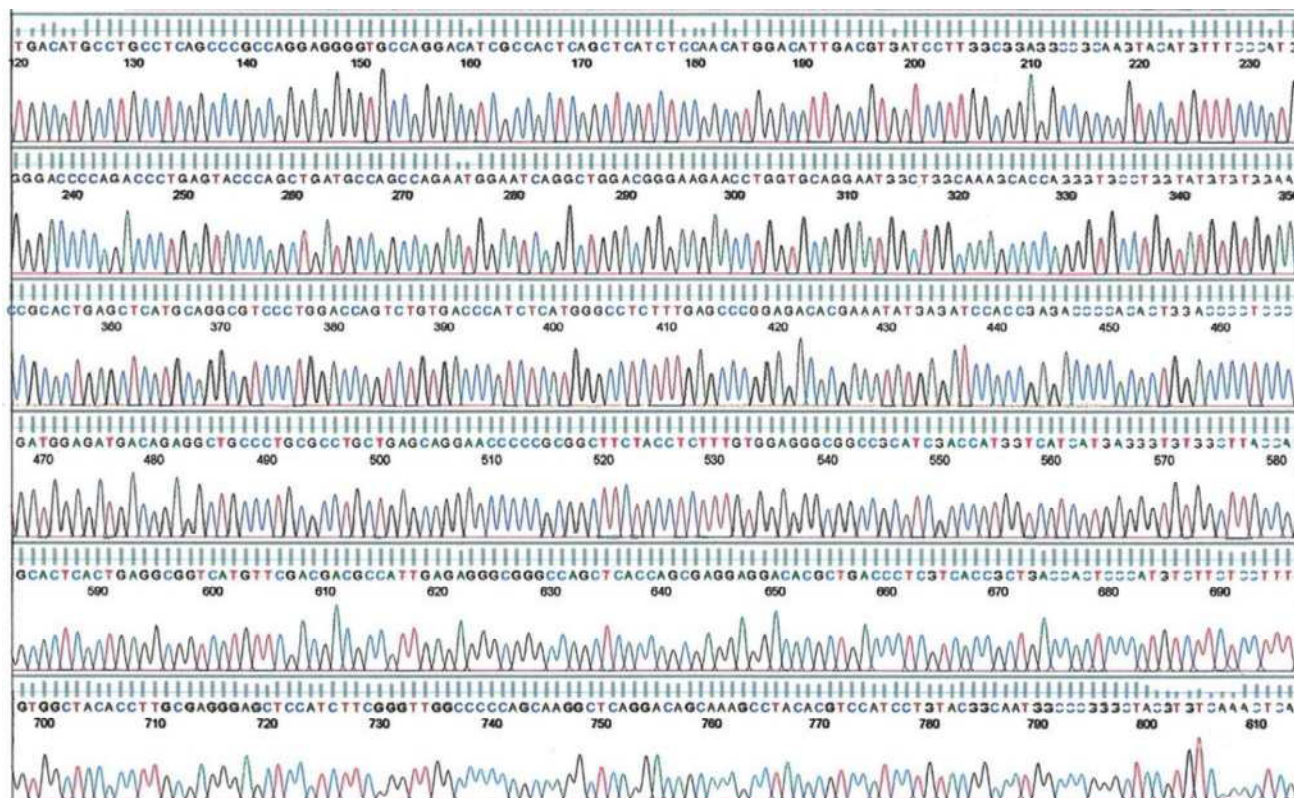


Fig. 5-2 (B) The nucleotide sequence of the IAP-a expression vector.

(2) ALP 活性

Fig. 5-3 に、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 1、3、5、7、10 日目の細胞の ALP 活性の経時的変化を示した。

IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 3、5、7、10 日目において、Mock に比べて有意に高値を示した（それぞれ $p < 0.001$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$ ）。

なお、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 7 日目での ALP 活性が最も高値を示し、Mock と比較し約 3 倍高い値を示した。

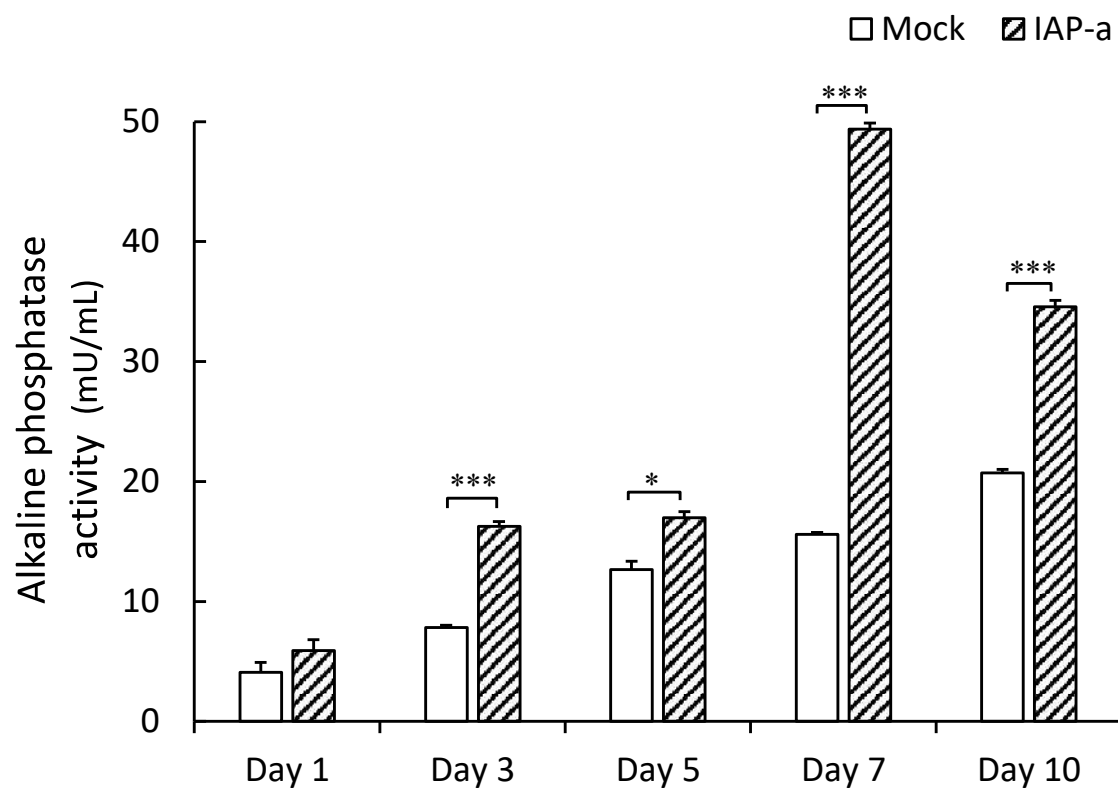


Fig. 5-3 Transient transfected Caco-2 cells with the human IAP gene or Mock were used to study the influence of IAP overexpression on ALP activity. Results are the means \pm S.E. from triplicate experiments. Comparisons between Mock and IAP-a were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test (*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$).

(3) ALP 酵素組織化学染色

IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 3 日目の細胞の ALP 酵素組織化学染色を行った結果を **Fig. 5-4 (A), (B)**に示した。

IAP-a 発現ベクターをトランスフェクションした Caco-2 細胞において、ALP 活性部位が赤く染色された。

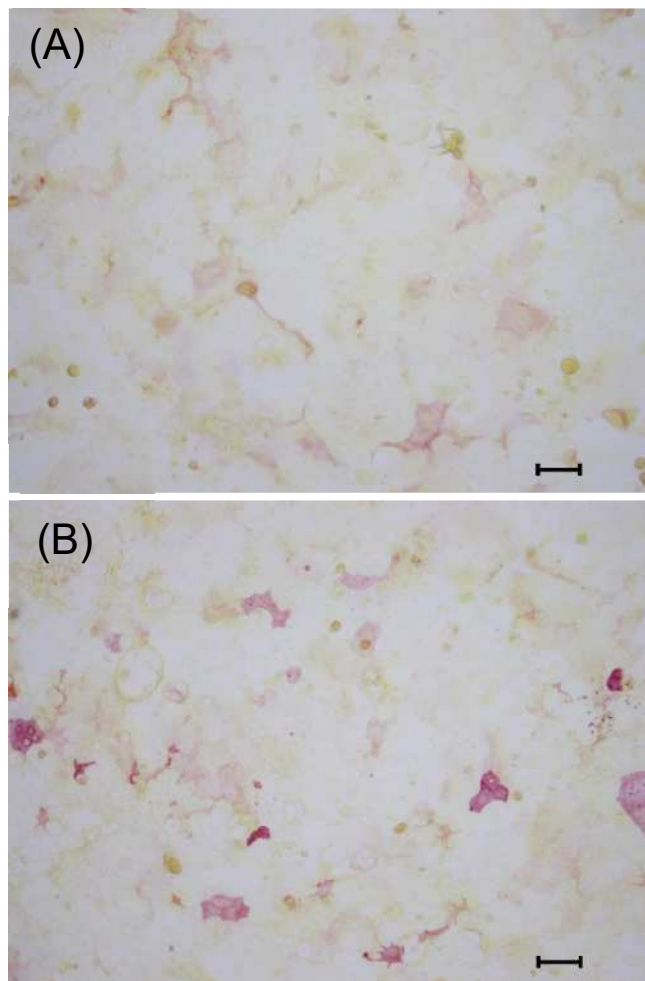


Fig. 5-4 Caco-2 cells on coverslips were stained for ALP activity on day 3. Light micrograph of the monolayer of confluent Caco-2 cells (x 100). Cells were stained for ALP activity (stained red) as described in Materials and Methods.

(A) Mock.

(B) IAP-a.

Bar=100 μ m

(4) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 7 日目の細胞の ALP 抽出サンプルについて、SDS-PAGE を行った結果を **Fig. 5-5** に示した。

IAP-a 発現ベクターをトランスフェクションしたサンプルにおいて 1 本の ALP 活性バンドが検出され、分子量は 100 kDa と算定された。IAP-a 発現ベクターをトランスフェクションした Caco-2 細胞では、Mock よりも濃い ALP 活性のバンドが示された。



Fig. 5-5 Intestinal ALP isozymes of the Caco-2 cells on day 7 separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were stained for ALP activity with a β -naphthyl-phosphoric acid monosodium salt, Fast violet B salt.

(5) RT-PCR 分析

IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 1、3、5、7、10 日目について RT-PCR を行い、電気泳動を行った後に、デンシトメーターにてバンド濃度を測定した結果を、**Fig. 5-6 (A)~(C)**に示した。

2 種類の variant に含まれる共通の部分の PCR 産物 (hIAP ; 708 bp) について、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 1、3、5、7、10 日目において、Mock と比較し、有意に高値を示した (それぞれ $p<0.001$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.05$) [**Fig. 5-6 (A)**]。

Variant aAug10 mRNA の PCR 産物 (hIAP-a ; 276 bp) についても、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 1、3、5、7 日目において、Mock と比較し、有意に高値を示した (それぞれ $p<0.001$ 、 $p<0.001$ 、 $p<0.001$ 、 $p<0.01$) [**Fig. 5-6 (B)**]。

Variant bAug10 mRNA の PCR 産物 (hIAP-b ; 407bp) については、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 7、10 日目において、Mock と比較し、有意に高値を示した (いずれも $p<0.05$) [**Fig. 5-6 (C)**]。

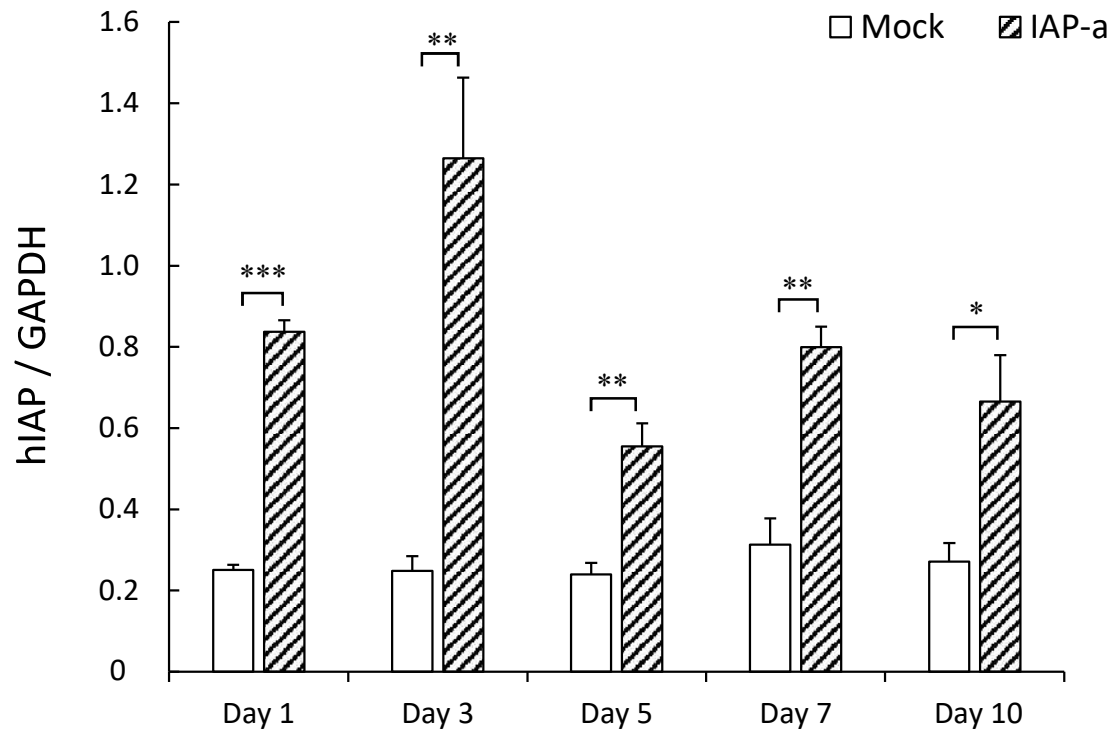


Fig. 5-6 (A) The relative expression levels of mRNA for hIAP in Caco-2 cells.

All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments.

Comparisons between Mock and IAP-a were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

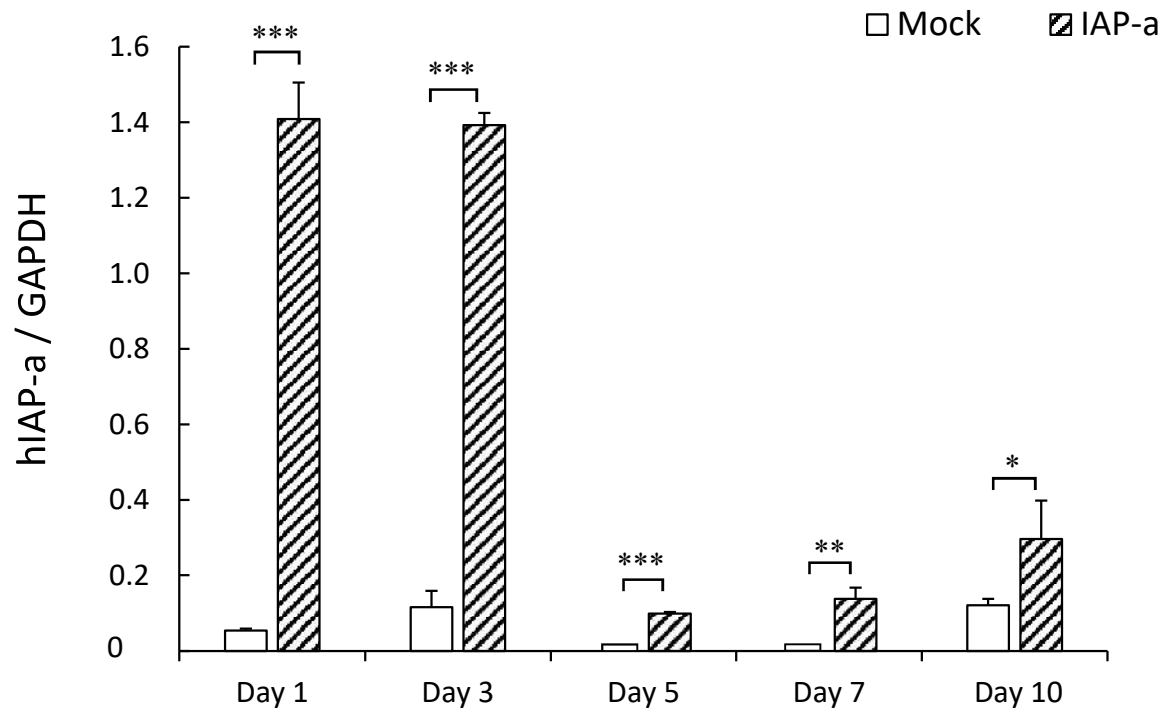


Fig. 5-6 (B) The relative expression levels of mRNA for hIAP-a in Caco-2 cells.

All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments.

Comparisons between Mock and IAP-a were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

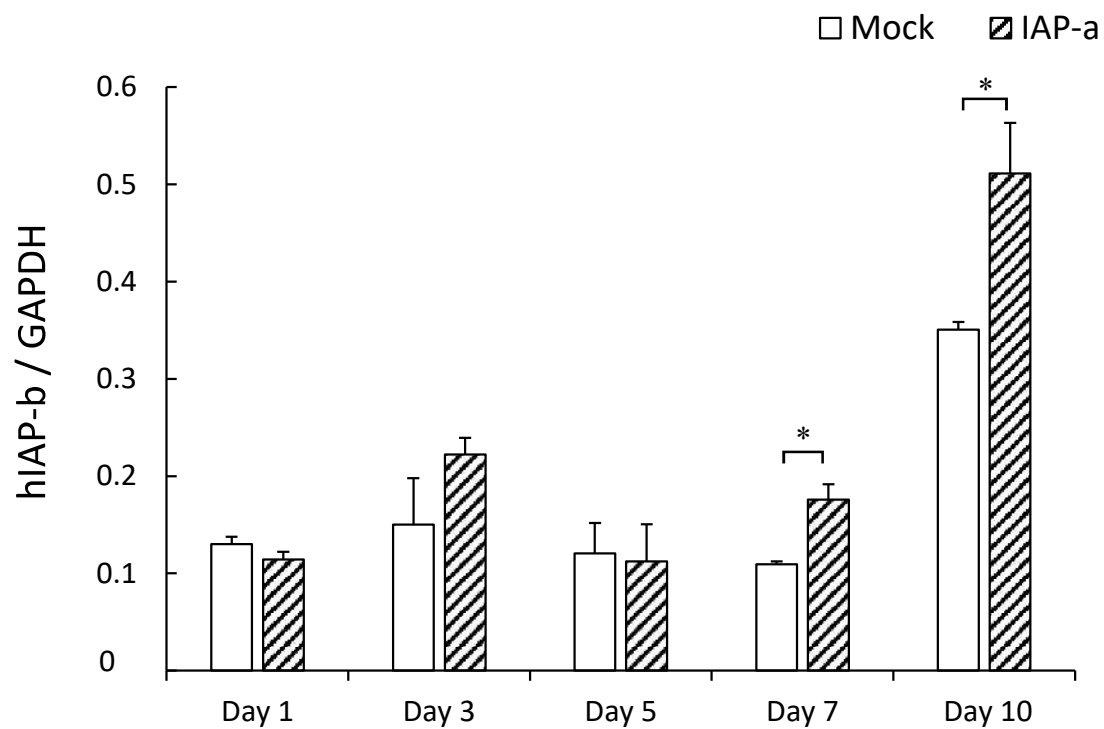


Fig. 5-6 (C) The relative expression levels of mRNA for hIAP-b in Caco-2 cells.

All values are normalized to the housekeeping gene GAPDH. Results are the means \pm S.E. (n=3) from triplicate experiments.

Comparisons between Mock and IAP-a were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test (*: $p < 0.05$).

考察

本研究では、2種類の IAP mRNA variant のうち、main の IAP の完全長 cDNA を組み込んだ IAP-a 発現ベクターを構築し、Caco-2 細胞へ IAP を一過性発現させ、ALP 活性および 2 種類の variant への影響について検討した。

IAP の完全長 cDNA を組み込んだ IAP-a 発現ベクターの塩基配列を確認したところ、2 種類の variant のうち、main の variant aAug10 mRNA の塩基配列と一致した。IAP-a 発現ベクターを用いてトランスフェクションを行った結果、3、5、7、10 日目における ALP 活性が、Mock と比較し、有意に高値を示した。特に、トランスフェクション後 7 日目における ALP 活性の値は Mock と比較し、約 3 倍高い値を示していた。ALP 酵素組織化学染色では、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 3 日目において赤く染色された細胞が多く観察された。また、SDS-PAGE 解析において、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 7 日目における 100 kD のバンドが Mock と比べ、より濃く検出された。さらに、RT-PCR 分析では、2 種類の variant に共通の部分の PCR 産物である hIAP と、2 種類の variant の PCR 産物である hIAP-a および hIAP-b について検討した。遺伝子導入には一過性 transient 発現と安定的 stable 発現がある[82]。今回行った一過性発現では、トランスフェクション後 1、3 日目で hIAP-a および hIAP の発現量の増強が認められた。一方、variant bAug10 の PCR 産物である hIAP-b についても、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクション後 7、10 日目に Mock と比べ有意に高値を示した。これらの結果より、IAP-a 発現ベクターのトランスフェクションによる一過性発現が variant bAug10 の発現に影響を及ぼしたことが推察された。

近年、タンパク質をコードしない RNA である non-coding RNA (ncRNA) の

中に、アポトーシスと浸潤の調節等に関与する機能的な ncRNA が存在することが明らかになっている[83]。ncRNA には、20 塩基程度の小さな RNA である micro RNA (miRNA) が存在し、標的 mRNA の 3'非翻訳領域に結合し、mRNA の翻訳抑制を誘導することで標的遺伝子の発現を負に制御することが明らかとなっている[84, 85]。さらに、数百から数万塩基長の RNA である long non-coding RNA (lncRNA) も存在する。lncRNA の機能については不明な点が多く残されているが、約 6000 塩基長の lncRNA である Hox transcript antisense RNA (HOTAIR) は、標的遺伝子のプロモーターに結合し、ヒストン H3K27 のメチル化を誘発させて遺伝子発現を抑制することが知られている[86]。また、タンパク質をコードする mRNA の翻訳を抑制する miRNA を吸着し保護することで、標的遺伝子の発現を増強させる RNA を competing endogenous RNA (ceRNA) と呼び、その中には腫瘍形成や、骨格筋分化の促進に関与する long intergenic non-coding RNA (lincRNA) の存在も近年明らかとなっている[87, 88]。これらのことから、IAP タンパク質を発現させる過程において、variant aAug10 および bAug10 の mRNA あるいはそれ以外の RNA が相互に作用し、RNA 間ネットワークが形成され、発現が制御されている可能性が推察された。今後は、2 種類の IAP mRNA の相互作用を詳細に検討していく必要がある。

本研究において、ヒト *ALPI* 遺伝子から転写される main の IAP の Caco-2 細胞への一過性発現により、ALP 活性が上昇し、variant bAug10 mRNA 発現も増強され、2 種類の alternatively spliced mRNA が IAP 活性を調節している可能性が推察された。＜研究 3＞で、Caco-2 細胞において、1, 25(OH)₂D₃により 2 種類の IAP variant の発現が増強され、食事性因子が IAP の 2 種類の mRNA 発現を制御していることが示唆された。これらより、今後、様々な食事性因子がこの 2 種類の IAP mRNA 発現へ及ぼす影響や、2 種類の mRNA とその他の

mRNA との相互関係について詳細に検討することにより、ヒト *ALPI* 遺伝子の転写調節および IAP タンパク質の翻訳過程における RNA ネットワークコミュニケーションの解明、さらには IAP の生理作用の解明のための重要なデータとなることが期待される。

第3章：結語

IAP はヒト *ALPI* 遺伝子によりコードされている。ヒト *ALPI* 遺伝子からは 2 種類の alternatively spliced variant mRNA の存在が報告されている。本章では、2 種類の variant のうち、main である IAP の完全長 cDNA を組み込んだ IAP-a 発現ベクターを構築し、Caco-2 細胞に一過性発現させることによる ALP 活性および 2 種類の IAP variant への影響を検討した。

研究5： Caco-2 細胞に IAP-a 発現ベクターを一過性にトランスフェクション後、ALP 活性が Mock と比較し、有意に高値を示した。また、2 種類の IAP variant mRNA の発現も Mock と比べて有意に高値を示した。

IAP-a 発現ベクターのトランスフェクションによる一過性発現により、2 種類の IAP variant が ALP 活性を調節していることが示唆された。今後さらに、2 種類の IAP variant の mRNA 発現への影響や相互作用について詳細に検討することにより、IAP の転写や翻訳過程での RNA 間ネットワークの解明につながり、さらには IAP の生理作用の解明のための重要なデータを得られることが期待されよう。

総括

アルカリホスファターゼ (ALP) は、アルカリ性に至適 pH を有し、リン酸エステルを無機リン酸とアルコールに加水分解する反応を触媒する酵素である。ヒトにおいて、ALP は、骨、肝臓、腎臓などに存在する組織非特異型 ALP (TNSALP)、小腸に局在する小腸型 ALP (IAP)、胎盤型 ALP、生殖細胞型 ALP の少なくとも 4 型に分類されている。いずれのアイソザイムにおいても、ALP がリン酸エステルの加水分解を通じて、様々な生理作用に関与していることが推察されている。

IAP は小腸上皮細胞の刷子縁膜に高濃度に存在し、腸の分化マーカーとしても知られている。マウスにおいて、絶食により IAP 活性が低下するが、食物摂取により IAP 活性が上昇したことが報告され、さらに、IAP のノックアウトマウスでは野生型のマウスに比べ、顕著に体重が増加し、耐糖能異常や内臓脂肪の蓄積などが認められ、IAP が脂質代謝に深く関連していることが示唆されている。さらに、グラム陰性菌の細胞壁の構成成分で、内毒素として知られるリポ多糖 (LPS) を IAP が解毒することから、粘膜防御因子としての作用も報告されている。これらのように、近年、マウスなど動物を用いた研究により、IAP の生理作用の解明が進められているが、食事性因子がヒト IAP に及ぼす影響や、ヒト IAP をコードする *ALPI* 遺伝子の詳細な研究は少なく、不明な点も多く残されたままである。食事性因子がヒト IAP へ及ぼす影響や IAP 発現調節作用を検討することで、食事性因子および IAP の新たな生理作用の解明につながり、ヒト *ALPI* 遺伝子の転写調節のメカニズムを明らかにする重要なデータが得られることが期待される。そこで本研究では、ヒト結腸癌由来の小腸上皮様細胞株である Caco-2 細胞を用いて、ヒト IAP 活性やその遺伝子発現の調節作用につ

いて検討を行うことを目的とした。

本論文は、以下の 3 章から研究をまとめた。

第 1 章：ビタミン K₂ のアルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

ビタミン K は γ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) の補酵素としての役割を果たし、血液凝固作用だけでなく、骨の石灰化にも関わる重要な栄養素である。ビタミン K₂ の中で最も強い生理活性を示すのがメナキノン-4 (MK-4) であり、日本において骨粗鬆症治療薬として使用されている。これまでに MK-4 がヒト IAP へ及ぼす影響について検討されていなかった。そこで、＜研究 1＞では、コンフルエント前の未分化の Caco-2 細胞に MK-4 を添加し、ALP 活性およびその遺伝子発現について検討を行った。その結果、MK-4 により ALP 活性が上昇し、IAP の遺伝子発現も増強された。＜研究 2＞では、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞に MK-4 を添加したところ、小腸上皮様細胞に分化した Caco-2 細胞においても、MK-4 により ALP 活性が上昇し、IAP の遺伝子発現も増強されることが明らかとなった。

第 2 章：ビタミン D のアルカリホスファターゼ活性およびその遺伝子発現への影響

ビタミン D は、骨の形成や成長に重要な栄養素であり、腸管からのカルシウムおよびリンの吸収を促進して骨代謝を調節するだけでなく、筋肉や骨由来のホルモンを調節している。ビタミン D の活性型である 1, 25(OH)₂D₃ による ALP 活性およびその遺伝子発現への影響について、より詳細な検討を行うため、＜研究 3＞では、コンフルエント前の Caco-2 細胞における 1, 25(OH)₂D₃ による

IAP 発現への影響を検討した。その結果、1, 25(OH)₂D₃により ALP 活性が上昇し、ヒト *ALPI* 遺伝子から転写される 2 種類の IAP variant の発現も増強された。＜研究 4＞では、コンフルエントから 14 日後の Caco-2 細胞に 1, 25(OH)₂D₃ を添加したところ、小腸上皮様細胞に分化した Caco-2 細胞においても 1, 25(OH)₂D₃により ALP 活性および IAP の遺伝子発現が増加することが示された。

第 3 章：ヒト小腸型アルカリホスファターゼ遺伝子の発現ベクターの構築とその遺伝子導入による一過性発現の影響

＜研究 3＞により、1, 25(OH)₂D₃ が IAP の 2 種類の alternatively spliced mRNA (variant aAug10 および variant bAug10) の発現を増強させ、食事性因子により制御され得ることが示された。この IAP の 2 種類の variant については不明な点が多く残されている。そこで、＜研究 5＞では、2 種類の variant のうち aAug10 の完全長 cDNA を組み込んだ IAP-a 発現ベクターを構築し、IAP を Caco-2 細胞に一過性発現させることによる ALP 活性およびその遺伝子発現への影響を検討した。IAP-a 発現ベクターのトランスフェクションにより、ALP 活性が上昇し、2 種類の IAP variant とともに mRNA 発現が増強され、2 種類の variant が相互に作用して IAP の発現を制御している可能性が推察された。

以上の結果から、ビタミン K₂ の一種である MK-4 およびビタミン D の活性型である 1, 25(OH)₂D₃ といった食事性因子が、Caco-2 細胞で発現されるヒト小腸型 ALP 活性や IAP の遺伝子発現を調節していることを明らかにすることができた。また、ヒト *ALPI* 遺伝子から転写される 2 種類の variant への影響についても検討することができた。今後、様々な食事性因子がこの 2 種類の IAP mRNA 発現へ及ぼす影響や、2 種類の mRNA とその他の mRNA との相互作用について

て詳細に検討することにより、*ALPI* 遺伝子の転写調節および IAP タンパク質の翻訳過程での RNA ネットワークコミュニケーションの解明、さらには IAP の生理作用の解明のための重要なデータとなることが期待される。

Summary

Regulation of intestinal alkaline phosphatase activity and gene expression in human intestinal epithelial-like cell line Caco-2

Alkaline phosphatase (ALP) hydrolyzes a variety of monophosphate esters into inorganic acid and alcohol. In humans, four kinds of ALP isozyme have been identified: tissue-nonspecific ALP, intestinal ALP (IAP), placental ALP, and germ cell ALP. IAP is expressed at a high concentration in the brush border membrane of intestinal epithelial cells, and is known to be affected by several kinds of nutrients such as lipids, but little is known about the influences of dietary factors on human gut ALP activity. The aim of this study was to examine the regulation of intestinal alkaline phosphatase activity and its gene expression in the human intestinal epithelial-like cell line Caco-2.

This manuscript consists of three chapters.

Chapter 1 (Studies 1 and 2): The influences of vitamin K₂ on ALP activity and gene expression.

In **Study 1**, we examined the influences of vitamin K₂ (MK-4) on the level of ALP activity and expression of ALP mRNA in pre-confluent Caco-2 cells. It was demonstrated that vitamin K₂ enhanced IAP expression in undifferentiated Caco-2 cells. In **Study 2**, we examined the influences of MK-4 on the level of ALP activity and expression of ALP mRNA in Caco-2 cells, were incubated them for 14 days after confluency. It was revealed that vitamin K₂ enhanced IAP expression in differentiated Caco-2 cells.

Chapter 2 (Studies 3 and 4): The influences of vitamin D on ALP activity and gene expression.

In **Study 3**, we examined the influences of vitamin D [1, 25(OH)₂D₃] on the ALP expression in pre-confluent Caco-2 cells. It was demonstrated that 1, 25(OH)₂D₃ enhanced the expression of two types of alternative mRNA variants encoding the human alkaline phosphatase, intestinal (*ALPI*) gene in undifferentiated Caco-2 cells. In **Study 4**, we examined the influences of 1, 25(OH)₂D₃ on the ALP activity and expression of ALP mRNA was

examined in Caco-2 cells, were incubated them for 14 days after confluency. It was revealed that expression of IAP is enhanced by 1, 25(OH)₂D₃ in differentiated Caco-2 cells.

Chapter 3 (Study 5): Construction of IAP-a expression vector and the influences of transient IAP overexpression by gene transfection.

In **Study 5**, we examined the influences of IAP overexpression on the ALP activity and expression of two types of alternatively spliced mRNA variants encoding the human *ALPI* gene. It was shown that ALP activity and the expression of two types of IAP variant mRNA in Caco-2 cells were enhanced by IAP-a expression vector transfection. It was suggested that the two variant mRNAs of IAP may regulate expression in a coordinated manner.

These studies (**Studies 1-5**) clarified the effects of vitamin K and vitamin D on IAP expression in Caco-2 cells, and the two variant mRNAs of IAP suggest the importance of the transcriptional regulation of human *ALPI* gene expression. These results provide useful data for elucidating the expression mechanism and physiological function of IAP.

参考文献

- [1] 五関正江, 大井田新一郎, 佐々木哲 (1990) 骨のアルカリホスファターゼの構造と生理的機能. 日本骨代謝学会雑誌 **8**, 9-19.
- [2] Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H (1988) Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* **263**: 12002-10.
- [3] Henthorn PS, Raducha M, Kadesch T, Weiss MJ, Harris H (1988) Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* **263**: 12011-9.
- [4] Millán JL (1987) Promoter structure of the human intestinal alkaline phosphatase gene. *Nucleic Acids Res* **15**: 10599.
- [5] Knoll BJ, Rothblum KN, Longley M (1988) Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene: Evolution of the 5' flanking region by deletion/substitution. *J Biol Chem* **263**: 12020-7.
- [6] Henthorn PS, Raducha M, Edwards YH, Weiss MJ, Slaughter C, Lafferty MA, Harris H (1987) Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase : Close homology to placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1234-8.
- [7] Whyte MP. Hypophosphatasia. In: Peck WA, editors. Bone and Mineral Research. New York: Elsevier Science Publishers; 1989, p. 319-22.
- [8] Goseki-Sone M, Orimo H, Iimura T, Miyazaki H, Oda K, Shibata H, Yanagishita M, Takagi Y, Watanabe H, Shimada T, Oida S (1998)

- Expression of the mutant (1735T-DEL) tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene from hypophosphatasia patients. *J Bone Miner Res* **13**: 1827-34.
- [9] Goseki-Sone M, Sogabe N, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Orimo H, Suzuki T, Nakamura H, Orimo H, Hosoi T (2005) Functional analysis of the single nucleotide polymorphism (787T>C) in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene associated with BMD. *J Bone Miner Res* **20**: 773-82.
- [10] Mariadason JM, Barkla DH, Gibson PR (1997) Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. *Am J Physiol* **272**: G705-12.
- [11] Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* **47**: 323-30.
- [12] Goldberg RF, Austen WG Jr, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, McCormack M, Eberlin KR, Nguyen JT, Tatlidede HS, Warren HS, Narisawa S, Millán JL, Hodin RA (2008) Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 3551-6.
- [13] Narisawa S, Huang L, Iwasaki A, Hasegawa H, Alpers DH, Millán JL (2003) Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol Cell Biol* **23**: 7525-30.

- [14] Kaliannan K, Hamarneh SR, Economopoulos KP, Nasrin Alam S, Moaven O, Patel P, Malo NS, Ray M, Abtahi SM, Muhammad N, Raychowdhury A, Teshager A, Mohamed MM, Moss AK, Ahmed R, Hakimian S, Narisawa S, Millán JL, Hohmann E, Warren HS, Bhan AK, Malo MS, Hodin RA (2013) Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 7003-8.
- [15] Lynes M, Narisawa S, Millán JL, Widmaier EP (2011) Interactions between CD36 and global intestinal alkaline phosphatase in mouse small intestine and effects of high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**: R1738-47.
- [16] Hwang SW, Kim JH, Lee C, Im JP, Kim JS (2018) Intestinal alkaline phosphatase ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 4-dependent pathway. *Eur J Pharmacol* **820**: 156-166.
- [17] Hamarneh SR, Kim BM, Kaliannan K, Morrison SA, Tantillo TJ, Tao Q, Mohamed MMR, Ramirez JM, Karas A, Liu W, Hu D, Teshager A, Gul SS, Economopoulos KP, Bhan AK, Malo MS, Choi MY, Hodin RA (2017) Intestinal Alkaline Phosphatase Attenuates Alcohol-Induced Hepatosteatosis in Mice. *Dig Dis Sci* **62**: 2021-34.
- [18] Lassenius MI, Fogarty CL, Blaut M, Haimila K, Riittinen L, Paju A, Kirveskari J, Järvelä J, Ahola AJ, Gordin D, Härma MA, Kumar A, Hamarneh SR, Hodin RA, Sorsa T, Tervahartiala T, Hörkkö S, Pussinen PJ, Forsblom C, Jauhiainen M, Taskinen MR, Groop

- PH, Lehto M; FinnDiane Study Group (2017) Intestinal alkaline phosphatase at the crossroad of intestinal health and disease-a putative role in type 1 diabetes. *J Intern Med* **281**: 586-600.
- [19] Economopoulos KP, Ward NL, Phillips CD, Teshager A, Patel P, Mohamed MM, Hakimian S, Cox SB, Ahmed R, Moaven O, Kaliannan K, Alam SN, Haller JF, Goldstein AM, Bhan AK, Malo MS, Hodin RA (2016) Prevention of antibiotic-associated metabolic syndrome in mice by intestinal alkaline phosphatase. *Diabetes Obes Metab* **18**: 519-27.
- [20] Malo MS, Moaven O, Muhammad N, Biswas B, Alam SN, Economopoulos KP, Gul SS, Hamarneh SR, Malo NS, Teshager A, Mohamed MM, Tao Q, Narisawa S, Millán JL, Hohmann EL, Warren HS, Robson SC, Hodin RA (2014) Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **306**: G826-38.
- [21] van Breemen RB, Li Y (2005) Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **1**: 175-85.
- [22] Matsumoto H, Erickson RH, Gum JR, Yoshioka M, Gum E, Kim YS (1990) Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology* **98**: 1199-207.
- [23] Suttie JW (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev*

Biochem, **54**: 459-77.

- [24] Okano T, Shimomura Y, Yamane M, Suhara Y, Kamao M, Sugiura M, Nakagawa K (2008) Conversion of phylloquinone (vitamin K₁) into menaquinone-4 (vitamin K₂) in mice: Two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *J Biol Chem* **283**: 11270-9.
- [25] Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, Okuda N, Shimomura Y, Suhara Y, Okano T (2010) Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* **468**: 117-21.
- [26] 厚生労働省「日本人の食事摂取基準（2015 年版）」策定検討会報告書（2014） p. 180-2.
- [27] Price PA (1988) Role of vitamin-K-dependent proteins in bone metabolism. *Annu Rev Nutr* **8**: 565-83.
- [28] Sakon M, Monden M, Gotoh M, Kobayashi K, Kanai T, Umeshita K, Endoh W, Mori T (1991) The effects of vitamin K on the generation of des-gamma-carboxy prothrombin (PIVKA-II) in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* **86**: 339-45.
- [29] Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MH, van der Meer IM, Hofman A, Witteman JC (2004) Dietary intake of menaquinon is associated with a reduced risk of coronary heart disease; the Rotterdam Study. *J Nutr* **134**: 3100-5.
- [30] Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grün F, Errandi J, Romero K, Pham

- H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B (2003) Vitamin K₂ regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* **278**: 43919-27.
- [31] Azuma K, Urano T, Ouvhi Y, Inoue S (2009) Vitamin K₂ suppresses proliferation and motility of hepatocellular carcinoma cells by activating steroid and xenobiotic receptor. *Endocr J* **56**: 843-9.
- [32] Sogabe N, Maruyama R, Hosoi T, Goseki-Sone M (2007) Enhancement effects of vitamin K₁ (phylloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) on intestinal alkaline phosphatase activity in rats. *J Nutri Sci Vitaminol* **53**: 219-24.
- [33] Haraikawa M, Sogabe N, Tanabe R, Hosoi T, Goseki-Sone M (2011) Vitamin K₁ (phylloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) induces intestinal alkaline phosphatase gene expression. *J Nutri Sci Vitaminol* **57**: 274-9.
- [34] 祓川摩有, 曾我部夏子, 田辺里枝子, 五関 - 曾根 正江 (2015) ラットにおけるビタミン K₁ またはビタミン K₂ 経口投与によるアルカリホスファターゼ活性への影響. 日本栄養・食糧学会誌 **68**, 217-23.
- [35] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- [36] Kurahashi Y, Yoshiki S (1972) Electron microscopic localization of alkaline phosphatase in the enamel organ of the young rat. *Arch Oral Biol* **17**: 155-63.

- [37] Goseki-Sone M, Oida S, Iimura T, Yamamoto A, Matsumoto HN, Omi N, Takeda K, Maruoka Y, Ezawa I, Sasaki S (1996) Expression of mRNA encoding intestinal type alkaline phosphatase in rat liver and its increase by fat-feeding. *Liver* **16**: 358-64.
- [38] Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-9.
- [39] Baltes S, Nau H, Lampen A (2004) All-trans retinoic acid enhances differentiation and influences permeability of intestinal Caco-2 cells under serum-free conditions. *Dev Growth Differ* **46**: 503-14.
- [40] Gu N, Adachi T, Takeda J, Aoki N, Tsujimoto G, Ishihara A, Tsuda K, Yasuda K (2006) Sucrase-isomaltase gene expression is inhibited by mutant hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 α and mutant HNF-1 β in Caco-2 cells. *J Nutr Sci Vitaminol* **52**: 105-12.
- [41] Goseki-Sone M, Iimura T, Takeda K, Nifuji A, Ogata Y, Yanagishita M, Oida S (1999) Expression of mRNA encoding tissue-nonspecific alkaline phosphatase in human dental tissues. *Calcif Tissue Int* **64**: 160-2.
- [42] Takeuchi Y, Suzawa M, Fukumoto S, Fujita T (2000) Vitamin K(2) inhibits adipogenesis, osteoclastogenesis, and ODF/RANK ligand expression in murine bone marrow cell cultures. *Bone* **27**: 769-76.
- [43] Koshihara Y, Hoshi K, Okawara R, Ishibashi H, Yamamoto S (2003) Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *J Endocrinol*

176: 339-48.

- [44] Akedo Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Mizuno Y, Kaneki M, Nakamura T, Ouchi Y, Orimo H (1992) Vitamin K₂ modulates proliferation and function of osteoblastic cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 814-20.
- [45] Sogabe N, Mizoi L, Asahi K, Ezawa I, Goseki-Sone M (2004) Enhancement by lactose of intestinal alkaline phosphatase expression in rats. *Bone* **35**: 249-55.
- [46] Zhou C, Verma S, Blumberg B (2009) The steroid and xenobiotic receptor (SXR), beyond xenobiotic metabolism. *Nucl Recept Signal* **7**: e001.
- [47] Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S (2006) Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K₂-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* **281**: 16927-34.
- [48] Ouyang N, Ke S, Eagleton N, Xie Y, Chen G, Laffins B, Yao H, Zhou B, Tian Y (2010) Pregnane X receptor suppresses proliferation and tumorigenicity of colon cancer cells. *Br J Cancer* **102**: 1753-61.
- [49] Darmoul D, Lacasa M, Baricault L, Marguet D, Sapin C, Trotot P, Barbat A, Trugnan G (1992) Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. *J Biol Chem* **267**: 4824-33.

- [50] 祓川摩有, 田辺里枝子, 曾我部夏子, 山田麻子, 五関-曾根 正江 (2015) 高脂肪食摂取ラットのアルカリホスファターゼ活性に及ぼすビタミン K₂ (メナキノン) 摂取の影響. 日本栄養・食糧学会誌 **68**, 271-7.
- [51] 厚生労働省「日本人の食事摂取基準 (2015 年版)」策定検討会報告書 (2014) p. 170-5.
- [52] Botella-Carretero JJ, Alvarez-Blasco F, Villafruela JJ, Balsa JA, Vázquez C, Escobar-Morreale HF (2007) Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin Nutr* **26**: 573-80.
- [53] Assa A, Vong L, Pinnell LJ, Avitzur N, Johnson-Henry KC, Sherman PM (2014) Vitamin D deficiency promotes epithelial barrier dysfunction and intestinal inflammation. *J Infect Dis* **210**: 1296-305.
- [54] 中岡加奈絵, 田辺里枝子, 奥裕乃, 山田麻子, 野田聖子, 星野亜由美, 祓川摩有, 五関 - 曾根 正江 (2016) 高脂肪食摂取ラットにおけるビタミン D 制限がアルカリホスファターゼ活性に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌 **69**, 57-63.
- [55] Nakaoka K, Yamada A, Noda S, Goseki-Sone M (2018) Vitamin D-restricted high-fat diet down-regulates expression of intestinal alkaline phosphatase isozymes in ovariectomized rats. *Nutr Res* **53**: 23-31.
- [56] Halline AG, Davidson NO, Skarosi SF, Sitrin MD, Tietze C, Alpers DH, Brasitus TA (1994) Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on proliferation and differentiation of Caco-2 cells. *Endocrinology* **134**:

1710-7.

- [57] Giuliano AR, Franceschi RT, Wood RJ (1991) Characterization of the vitamin D receptor from the Caco-2 human colon carcinoma cell line: effect of cellular differentiation. *Arch Biochem Biophys* **285**: 261-9.
- [58] Narisawa S, Hoylaerts MF, Doctor KS, Fukuda MN, Alpers DH, Millán JL (2007) A novel phosphatase upregulated in *Akp3* knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**: G1068-77.
- [59] Lowe M, Strauss AW, Alpers R, Seetharam S, Alpers DH (1990) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the membrane-associated rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta* **1037**: 170-7.
- [60] Strom M, Krisinger J, DeLuca HF (1991) Isolation of a mRNA that encodes a putative intestinal alkaline phosphatase regulated by 1, 25-dihydroxy vitamin D₃. *Biochim Biophys Acta* **1090**: 299-304.
- [61] Besman M, Coleman JE (1985) Isozymes of bovine intestinal alkaline phosphatase. *J Biol Chem* **260**: 11190-3.
- [62] Yeh K, Yeh M, Holt PR, Alpers DH (1994) Development and hormonal modulation of postnatal expression of intestinal alkaline phosphatase mRNA species and their encoded isozymes. *Biochem J* **301**: 893-9.
- [63] Narisawa S, Hofmann MC, Ziomek CA, Millán JL (1992) Embryonic alkaline phosphatase is expressed at M-phase in the

- spermatogenic lineage of the mouse. *Development* **116**: 159-65.
- [64] Millan JL. Mammalian alkaline phosphatase : From biology to applications in medicine and biotechnology. Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag. 2006, p.1-322
- [65] Manes T, Glade K, Ziomek CA, Millán JL (1990) Genomic structure and comparison of mouse tissue-specific alkaline phosphatase genes. *Genomics* **8**: 541-54.
- [66] Young GP, Yedlin ST, Alpers DH (1981) Distribution of soluble and membranous forms of alkaline phosphatase in the small intestine of the rat. *Biochim Biophys Acta* **676**: 257-65.
- [67] Homo sapiens gene ALPI, encoding alkaline phosphatase, intestinal. AceView genes database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&term=ALPI&submit=Go>; 2012 [accessed 16.07.01].
- [68] Mocharla H, Butch AW, Pappas AA, Flick JT, Weinstein RS, De Togni P, Jilka RL, Roberson PK, Parfitt AM, Manolagas SC (1997) Quantification of vitamin D receptor mRNA by competitive polymerase chain reaction in PBMC: lack of correspondence with common allelic variants. *J Bone Miner Res* **12**: 726-33.
- [69] Beresford JN, Gallagher JA, Russell RG (1986) 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ and human bone-derived cells in vitro: effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology* **119**: 1776-85.
- [70] Iimura T, Oida S, Ichijo H, Goseki(-Sone) M, Maruoka Y, Takeda K,

- Sasaki S (1994) Modulation of responses to TGF- β by 1, 25 dihydroxyvitamin D₃ in MG-63 osteoblastic cells: possible involvement of regulation of TGF- β type II receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 918-23.
- [71] Wethmar K, Barbosa-Silva A, Andrade-Navarro MA, Leutz A (2014) uORFdb—a comprehensive literature database on eukaryotic uORF biology. *Nucleic Acids Res* **42**: D60-7.
- [72] Fan J, Liu S, Du Y, Morrison J, Shipman R, Pang KS (2009) Up-regulation of transporters and enzymes by the vitamin D receptor ligands, 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and vitamin D analogs, in the Caco-2 cell monolayer. *J Pharmacol Exp Ther* **330**: 389-402.
- [73] Owen TA, Bortell R, Yocum SA, Smock SL, Zhang M, Abate C, Shalhoub V, Aronin N, Wright KL, van Wijnen AJ, Stein JL, Curran T, Lian JB, Stein GS (1990) Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9990-4.
- [74] Orimo H, Shimada T (2006) Posttranscriptional modulation of the human tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in MG-63 osteoblastic osteosarcoma cells. *Nutr Res* **26**: 227-34.
- [75] Weber K, Pringle JR, Osborn M (1972) Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods*

- Enzymol* **26**: 3-27.
- [76] Darmoul D, Voisin T, Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Salomon R, Wang Y, Swallow DM, Laburthe M (1994) Regional expression of epithelial dipeptidyl peptidase IV in the human intestines. *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 1224-9.
- [77] Beaulieu JF, Quaroni A (1991) Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J* **280**: 599-608.
- [78] Trugnan G, Rousset M, Chantret I, Barbat A, Zweibaum A (1987) The posttranslational processing of sucrase-isomaltase in HT-29 cells is a function of their state of enterocytic differentiation. *J Cell Biol* **104**: 1199-205.
- [79] Chen SW, Wang PY, Zhu J, Chen GW, Zhang JL, Chen ZY, Zuo S, Liu YC, Pan YS (2015) Protective effect of 1,25-dihydroxyvitamin d₃ on lipopolysaccharide-induced intestinal epithelial tight junction injury in Caco-2 cell monolayers. *Inflammation* **38**: 375-83.
- [80] Liu W, Chen Y, Golan MA, Annunziata ML, Du J, Dougherty U, Kong J, Musch M, Huang Y, Pekow J, Zheng C, Bissonnette M, Hanauer SB, Li YC (2013) Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis. *J Clin Invest* **123**: 3983-96.
- [81] Liu W, Hu D, Huo H, Zhang W, Adiliaghdam F, Morrison S, Ramirez JM, Gul SS, Hamarneh SR, Hodin RA (2016)

Intestinal Alkaline Phosphatase Regulates Tight Junction Protein Levels. *J Am Coll Surg* **222**: 1009-17.

- [82] 折茂英生 (2011) 遺伝子導入と発現 (1). 日医大医会誌 7 : 92-6.
- [83] Khaitan D, Dinger ME, Mazar J, Crawford J, Smith MA, Mattick JS, Perera RJ (2011) The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion. *Cancer Res* **71**: 3852-62.
- [84] Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**: 862-4.
- [85] Ambros V (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* **107**: 823-6.
- [86] Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY (2007) Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**: 1311-23.
- [87] Huarte M, Rinn JL (2010) Large non-coding RNAs: missing links in cancer? *Hum Mol Genet* **19**: R152-61.
- [88] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chonappi M, Tramontano A, Bozzoni I (2011) A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* **147**: 358-69.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧なる御指導と御高閲を賜り、研究生活全般にわたって多大なるご教示をいただきました、日本女子大学教授 五関正江先生に深く感謝申し上げます。さらに、本論文をご高閲いただいた同大学教授 佐藤和人先生、准教授 太田正人先生、ならびに東京医科歯科大学大学院教授 江石義信先生に心より御礼を申し上げます。

本研究にあたり、御助言や御協力をいただいた日本女子大学助教 山田麻子先生、学術研究員の田辺里枝子先生、大学院生の中岡加奈絵さんをはじめ、栄養学研究室の皆さまに深く御礼を申し上げます。

最後に、長年の学生生活を常に暖かく支え続けてくれた家族に、心より感謝します。