

氏名	野田 聖子
学位の種類	博士 (学術)
学位記の番号	甲第 214 号
学位授与年月日	2019 (平成 31) 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	主査 五関 正江 (人間発達学専攻 教授) 副査 佐藤 和人 (人間発達学専攻 教授) 副査 太田 正人 (人間発達学専攻 准教授) 副査 江石 義信 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科教授)

論文の内容の要旨

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。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、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 1 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) などの研究から、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[2]。また、近年、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報告された[3]。

ヒトの IAP は ALPI 遺伝子によりコードされ、第 2 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。マウスに

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[4]、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[2]。一方、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[4]。このように、近年、マウスなどの動物を用いて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遺伝子発現についての詳細な研究はほとんど見当たらず、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に及ぼす影響やIAP発現調節作用を検討することで、IAPの新たな生理作用の解明につなが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Caco-2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。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。Caco-2細胞は、コンフルエント直後で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日後に小腸上皮様細胞に分化した状態であることが示されている[5]。

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

<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

<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

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

<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

<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

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

まず、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

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 (phyloquinone ; 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、側鎖にイソプレニル鎖を有し、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。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[6]。ビタミン K は γ -グルタミルカルボキシラーゼ (gamma-glutamyl carboxylase ; GG CX) 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、冠動脈疾患リスクの軽減作用なども報告されている[7, 8]。また、近年、ビタミン K₂ が骨芽細胞において、 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[9]。

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が明らかになったが[10-12]、ビタミン K がヒト IAP へ及ぼす影響については検討していなかった。そこで今回、ヒト小腸上皮様細胞株 Caco-2 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。＜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、0 μ M (コントロール) と比較し、有意に高値を示した。ALP の酵素化学的性質を検討したところ、MK-4 により増加した ALP は典型的な小腸型 ALP の特性であることが示された。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、培養 3 日目において、ヒト ALPI 遺伝子の mRNA 発現が、MK-4 濃度 1 μ M で 0 μ M に比べ、有意に高値を示した。また、培養 7 日目において、IAP と同様に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 (sucrase-isomaltase ; SI ; EC 3.2.1.10) の遺伝子の mRNA 発現が、MK-4 濃度 1 μ M で 0 μ M に比べ、有意に高値を示した。一方、MK-4 添加による SXR 遺伝子の mRNA 発現への影響は認められなかった。

これまでに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

いては報告されておらず、＜研究 2＞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 活性およびその遺伝子発現への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 μM) した結果、MK-4 濃度が 1 または 10 μM の ALP 活性が 0 μM と比べて、それぞれ有意に高値を示した。阻害実験や加熱実験において、MK-4 により増加した ALP は典型的な小腸型 ALP であることが示された。RT-PCR 分析において、ヒト ALPI 遺伝子の mRNA 発現量も、MK-4 濃度 1 μM で 0 μM と比べて有意に高値を示し、ヒト SI 遺伝子の mRNA 発現量についても、MK-4 濃度 1 μM で 0 μM と比べて有意に高値を示した。一方、MK-4 濃度 0 μM あるいは 1 μM において、SXR 遺伝子の mRNA 発現はほとんど認められなかった。

これら＜研究 1＞および＜研究 2＞の結果より、コンフルエント前 (未分化) の 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、ビタミン K₂ により ALP 活性およびヒト ALPI 遺伝子の mRNA 発現が増強されることを今回初めて明らかにすることができた。今後、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 がどのような転写調節を介して ALP 活性を誘導するのか明らかにする必要がある。

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

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。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、標的遺伝子に存在する特異的な塩基配列である vitamin D response element (VDRE) に作用し、様々な生理機能を発現している。

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、ビタミン D の欠乏が腸バリア機能不全や腸の炎症を促進させることも報告されている [13]。以前の研究で、雄ラットにおいて、高脂肪食摂取時のビタミン D 制限が小腸の ALP 活性を著しく減少させたこと、また、卵巣摘出術を施した雌ラットにおいても高脂肪食摂取時のビタミン D 制限が小腸の ALP 活性および IAP mRNA 発現を減少させたことを示した [14, 15]。従って、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された。

ヒト 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、コンフルエント前の Caco-2 細胞で 1, 25(OH)₂D₃ により ALP 活性が上昇したことが報告されている [16]。そこで、

1, 25(OH)₂D₃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 細胞を用いて、ビタミン D がヒト ALPI 遺伝子から転写される 2 種類の alternatively spliced mRNA [variant aAug10 (NM_001631) および variant bAug10 (M31008)] [17] の発現に及ぼす影響を検討した。主な variant である aAug10 は 2,550 bp の mRNA で、小腸粘膜などの組織から単離されており、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 [17]。1, 25(OH)₂D₃ を添加した培地 [1, 25(OH)₂D₃ 濃度 : 0, 1, 10, 100nM] での培養 3, 5, 7 日目で、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 10, 100nM において ALP 活性が有意に増加し、阻害実験や加熱実験において、1, 25(OH)₂D₃ により増加した ALP は小腸型 ALP の特性を示した。RT-PCR 分析において、ヒト ALPI 遺伝子から転写される 2 種類の variant に共通している部分の PCR 産物 (hIAP) は、培養 3 日目で 1,25(OH)₂D₃ 濃度 100nM において、0nM と比較し有意に増加した。同様に、aAug10 の PCR 産物 (hIAP-a) についても、培養 3 日目で 1,25(OH)₂D₃ 濃度 100nM において、0nM と比較し有意に増加した。一方、bAug10 の PCR 産物 (hIAP-b) については、培養 3, 5, 7 日目で、1,25(OH)₂D₃ 濃度 100nM において、0nM 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ことが推察された。また、VDR の mRNA 発現量は、培養 5 日目において、1,25(OH)₂D₃ により有意に減少した。

これまでに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 活性およびその遺伝子発現への影響については検討されておらず、＜研究 4＞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 活性およびその遺伝子発現への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, 100nM] 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 活性が 0 nM と比べて有意に高値を示した。阻害実験や加熱実験の結果から、1,25(OH)₂D₃ により増加した ALP は、典型的な小腸型 ALP であると推察された。さらに、1, 25(OH)₂D₃ 濃度 0 nM および 100nM の ALP 抽出サンプルについて、Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 解析を行ったところ、いずれも分子量 100 kDa のバンドが検出され、100nM のバンドは 0nM よりも濃いバンドが認められた。RT-PCR 分析では、1, 25(OH)₂D₃ 添加後 3, 5, 7 日目において、ヒト ALPI 遺伝子の mRNA 発現量が 1,25(OH)₂D₃ 濃度 100 nM で 0nM と比べて有意に高値を示した。また、VDR の mRNA 発現量については、1,25(OH)₂D₃ による影響は認められなかった。

これら＜研究 3＞および＜研究 4＞から、コンフルエント前（未分化）の 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(OH)₂D₃ により ALP 活性およびヒト ALPI 遺伝子の mRNA 発現が増強されることが明らかとなった。今後、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、1,25(OH)₂D₃ がどのような転写調節を介して ALP 活性を誘導するのか明らかにする必要がある。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を期待された。

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>で、Caco-2 細胞において、ヒト ALPI 遺伝子から転写される2種類の variant の発現が $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により増強され、食事性因子により調節されていることを示した。また、aAug10 の PCR 産物である hIAP-a と bAug10 の PCR 産物である hIAP-b の発現の比較により、aAug10 と 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 variant の詳細については明らかになっていない。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、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 発現ベクターを構築し、塩基配列を確認した。この IAP-a 発現ベクターを用いて Caco-2 細胞に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 と比較して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 活性レベルは Mock と比較し、約3倍高い値を示した。さらに、RT-PCR 分析では、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 と比べて顕著な高値を示し、同様に2種類の variant の共通部分の PCR 産物 (hIAP) も、1、3日目において Mock と比較し有意に増加した。一方、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 と比べ有意に増加した。これらの結果より、<研究5>において、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 bAug10 の発現にも影響を及ぼしている可能性が示され、2種類の variant が相互に作用して IAP の発現を調節している可能性が推察された。

第1章～第3章の結果により、Caco-2 細胞において、MK-4 または $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ がヒト小腸型 ALP 活性やそ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 に及ぼす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ヒト ALPI 遺伝子発現に及ぼす影響や2種類の variant の相互作用について詳細に検討することにより、ALPI 遺伝子の転写・翻訳の調節メカニズムや 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。

<参考文献>

- [1]五関正江ら (1990) 骨のアルカリホスファターゼの構造と生理的機能. 日本骨代謝学会誌8, 9-19.
- [2]Millán JL. Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology. Weinheim: WILEY-VCH; 2006.

- [3]Goseki-Sone Met al. (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.
- [4]Goldberg RF et al. (2008) Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci USA*105: 3551-6.
- [5]Matsumoto H et al. (1990) Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology*98: 1199-207.
- [6]Okano T et al. (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.
- [7]Price PA (1988) Role of vitamin-K-dependent proteins in bone metabolism. *Annu Rev Nutr*8: 565-83.
- [8]Geleijnse J Met al. (2004) Dietary intake of menaquinon is associated with a reduced risk of coronary heart disease; the Rotterdam Study. *J Nutr*134: 3100-5.
- [9]Tabb M Met al. (2003) Vitamin K₂regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem*, 278: 43919-27.
- [10]Sogabe N et al. (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.
- [11]Haraikawa M et al. (2011) Vitamin K₁(phylloquinone) or vitamin K₂(menaquinone-4) induces intestinal alkaline phosphatase gene expression. *J Nutri Sci Vitaminol*57: 274-9.
- [12]祓川摩有ら (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.
- [13]Assa A et al. (2014) Vitamin D deficiency promotes epithelial barrier dysfunction and intestinal inflammation. *J Infect Dis*210:1296-305.
- [14]中岡加奈絵ら (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.
- [15]Nakaoka K et al. (2018) Vitamin D-restricted high-fat diet down-regulates expression of intestinal alkaline phosphatase isozymes in ovariectomized rats. *Nutr Res*53: 23-31.
- [16]Halline A G et al. (1994) Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on proliferation and differentiation of Caco-2 cells. *Endocrinology*134: 1710-7.
- [17]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].

論文審査結果の要旨

アルカリホスファターゼ (ALP :alkaline phosphatase) 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、小腸に局在する小腸型 ALP (IAP :intestinal ALP)、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 活性が上昇することから、IAP は食事・栄養因子と深く関わっていることが考えられている。また、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: lipopolysaccharide) 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。このように、近年、マウスなどの動物を用いて IAP の研究が進められているが、食事・栄養因子がヒト IAP に及ぼす影響やヒト IAP をコードする *ALPI* 遺伝子の発現調節については不明な点が多く、その生理作用の解明が望まれている。

本論文は 3 章から構成されており、まず第 1 章ではヒト結腸癌由来の小腸上皮様細胞株である Caco-2 を用いて、ビタミン K 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についての研究 (研究 1、2)、第 2 章では Caco-2 細胞を用いて、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についての研究 (研究 3、4)、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遺伝子導入による一過性発現の影響 (研究 5) について研究を行ったものである。

ビタミン K は γ -グルタミルカルボキシラーゼ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することが示された。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、その遺伝子発現も増強されることが明らかとなった。

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の吸収を促進し骨代謝を調節するだけでなく、ビタミン D の欠乏が腸バリア機能不全や腸の炎症を促進させることが報告されている。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 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 alternative splicing mRNA (IAP variant) の遺

伝子発現も増強された。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活性およびその遺伝子発現が増強されることが示された。

研究3により、1, 25(OH)₂D₃がIAPの2種類のalternative splicing mRNA (variant aAug10とvariant bAug10)の遺伝子発現を増強させることが示された。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細胞に一過性に発現させることによるALP活性およびその遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。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variantともmRNA発現が増強され、2種類のvariantが相互に作用してIAPの発現を調節している可能性が示唆された。

以上のように、本論文では栄養因子(ビタミンKまたはビタミンD)によるヒト小腸型ALP活性やその遺伝子発現への影響を明らかにすることができた。食事・栄養因子によるヒトIAPへの影響について解析を行った研究は少なく、本研究で得られた結果は貴重であると考えられる。IAPの生理作用については不明な点が多く残されており、リン酸エステルを加水分解することにより、リンの供給だけでなく、脱リン酸化された物質の代謝にも深く関わっていることが推察され、今後のIAPの生理作用の解明のためにも貢献できる重要な研究であると思われる。

本研究は研究目的の重要性、研究方法の妥当性、研究内容の正確性、独創性から審査し、総合的に博士論文として十分な内容に到達していると判断し報告する。