

論文内容要旨

Effects of Coffee on the Mechanisms Controlling Intestinal Serotonin

(コーヒーによる腸管セロトニン制御機構への影響)

主指導教員：酒井 規雄教授

(医系科学研究科 神経薬理学)

副指導教員：池上 浩司教授

(医系科学研究科 解剖学及び発生生物学)

副指導教員：吾郷 由希夫教授

(医系科学研究科 細胞分子薬理学)

吉川 慧

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【概要】

本論文では、コーヒーが腸セロトニン (5-HT) と、それを制御するセロトニントランスポーター (SERT) に与える影響について基礎的な検討を行ったことを報告し、これまでに得られてきた臨床観察結果に新たな解釈を与え、その複雑性を議論する。また、複数の臓器間連関を再現する共培養系を用いた更なる研究の必要性を強調する。最後に、より多くの研究者が本分野へ参加することを推進するため、安価で再現性のある腸バリア機能評価装置の開発を行った。

以下では、本論文の各章についてその要旨を記載する。

【第1章：腸 5-HT 系について】

末梢組織における 5-HT の大部分は腸上皮組織に存在するエンテロクロマフィン (EC) 細胞により産生・分泌され、腸において蠕動反射、炎症の制御など幅広い生理機能を担う。よって、EC 細胞の受容体は内服薬のターゲットとなってきた。他方、EC 細胞には様々な物理受容器、化学受容体が発現しており、多様な環境からの刺激に反応し 5-HT を分泌することが近年明らかになりつつある。前述の内服薬の一部の効果は、実際には EC 細胞を介したものであったことが判明し、また、消化器系疾患に用いられる漢方薬が EC 細胞を標的としていることが報告されるなど、パラダイムシフトが生じている。

腸上皮細胞で発現する SERT は、利用可能な 5-HT 量を調節している。近年、SERT をコードする SLC6A4 遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランド近傍における DNA メチル化が病態に関与することが報告された。特に、CpG アイランドショアに機能的な CpG サイト (CpG3) が特定されているが、メチル化率変動の原因となる外部要因は特定されておらず、また消化器系疾患との関連は明らかでない。

EC 細胞の活性化、および SERT の発現低下は腸疾患のみならず、代謝・免疫疾患との関連が指摘されており、これらに影響を与える環境因子、生活習慣の特定は急務である。

【第1章：コーヒーと疾患について】

コーヒーは世界で最も消費される嗜好品の一つである。臨床観察結果から、全身の炎症性疾患に対する予防的効能が期待されているが、その有効性、および機序については議論が続いている。特に腸に対しては、摂取後直腸の運動を活性化し、また適度な消費は便秘スコアを低下させること、術後イレウス (POI) の期間を短縮させることが報告されている。他方、習慣的な多量摂取はリスク因子となる可能性があり、また炎症性腸疾患、および過敏性腸症候群患者のコーヒー摂取の是非については、他の炎症性疾患と同じく統一見解は現時点ではない。このような複雑な作用の機序について基礎的な研究は不足しており、未解明な分野であると言える。

【第2章：コーヒーが EC 細胞モデルに与える影響の検討】

EC 細胞モデルであるヒト腭神経内分泌腫瘍由来 QGP-1 細胞株を用い、コーヒーが EC 細胞を介して腸蠕動運動に影響するという仮説を検証した。

EC 細胞からの 5-HT 分泌は細胞内 Ca^{2+} の上昇により誘発される。細胞内 Ca^{2+} インジケータである Fluo-4 AM を用いた半定量的な分析により、レギュラーコーヒー、カフェイン抜きコーヒーが細胞内 Ca^{2+} を瞬時に上昇させることを確認した。

カフェイン抜きコーヒーでも同様の現象が確認されたことから、カフェインの関与が否定された。また複数のインスタントコーヒーで本現象が再現されたことから、インスタントコーヒー生成時に除去される

ジテルペン系化合物の関与が否定された。コーヒーに含まれる主要成分、クロロゲン酸 (5-CQA)、トリゴネリン (TRG) とこれらの代謝物では再現されなかった。異なるコーヒー豆種 (アラビカ種、ロブスタ種) のどちらも細胞内 Ca^{2+} を上昇させ、コーヒー種特異的な成分の関与が否定された。焙煎されていない生豆から抽出した成分は有意な影響を及ぼさず、焙煎に伴って生成される成分の関与が示唆された。

Ca^{2+} フリーバッファーを用いて、本現象における細胞外 Ca^{2+} 流入の関与を検討した。 Ca^{2+} フリーバッファー条件下でもコーヒーによる細胞内 Ca^{2+} 上昇が認められた。

最後に、小胞体 (ER) 局在 Ca^{2+} インジケータ CEPIA1er を用いて、本現象における ER から Ca^{2+} 流出の関与を検討した。コーヒーへの暴露により、ER 内 Ca^{2+} が瞬時に減少した。

本章ではコーヒー摂取が EC 細胞からの 5-HT 分泌を惹起し、腸蠕動運動を誘発し、抗炎症作用を介して POI に治癒的な効果を持つ可能性を示した。

【第 3 章：コーヒーが腸上皮細胞モデル発現 SERT に与える影響の検討】

ヒト結腸腺癌由来 Caco-2 細胞株を分化誘導した状態で使用し、過剰なコーヒー摂取を習慣的に行うことが腸の SERT 発現に与える影響を検討した。

^3H 標識 5-HT 取り込みアッセイにより、レギュラーコーヒー、カフェイン抜きコーヒーに 48 時間暴露することで、SERT 取り込み活性の低下を確認した。この現象はリン酸化などの翻訳後修飾は主要因ではないことを薬理的な検討で確認した。

リアルタイム PCR により、レギュラーコーヒー、カフェイン抜きコーヒーに 48 時間暴露することで、SERT mRNA レベルが著しくかつ用量依存的に減少することを確認した。薬理的な検討により、これまでに腸 SERT 発現を抑制すると報告されたシグナル系、および腸 SERT との機能連関が報告された核内受容体は本現象に関与しないことを確認した。

複数のインスタントコーヒーで本現象が再現されたことから、インスタントコーヒー生成時に除去されるジテルペン系化合物の関与が否定されたコーヒーに含まれる主要成分、5-CQA、TRG とこれらの代謝物、およびカフェインでは再現されなかった。異なるコーヒー豆種 (アラビカ種、ロブスタ種) のどちらも SERT 発現量を低下させ、コーヒー種特異的な成分の関与が否定された。焙煎されていない生豆から抽出した成分は有意な影響を及ぼさず、焙煎に伴って生成される成分の関与が示唆された。

パイロシーケンシングにより、コーヒーが CpG3 のメチル化状態に与える影響を評価した。レギュラーコーヒー、カフェイン抜きコーヒーに 48 時間暴露することにより、CpG3 での過メチル化が誘発され、また他の CpG サイト (CpG4) では有意なメチル化の変動は認められず、この結果は精神疾患と CpG3、CpG4 との関連を報告した Ikegame et al. 2020 の結果と合致する。

最後に、DNA メチル化を伴う SERT 発現低下の性質を調査する為、2 つの追加検討を行った。比較的短時間 (6 時間) のレギュラーコーヒーへの暴露による SERT 発現変動を評価した。意外なことに、この条件でも SERT 発現の有意な減少が認められた。次に、レギュラーコーヒーに 48 時間暴露後、Washout した後の SERT mRNA レベルを評価した。発現量は Washout 後 24 時間で回復し、コーヒーによるメチル化誘導を伴う SERT 機能低下が可逆的であることが示された。

本章では過剰なコーヒー摂取が SLC6A4 遺伝子における DNA メチル化を介し、腸の SERT 発現を減少させ、末梢の 5-HT 調節を乱す可能性を示した。

【第 4 章：安価で再現性のある腸バリア機能評価装置の開発について】

前章までで確認した通り、末梢 5-HT、コーヒーのどちらも広範な、かつ複雑な生理活性を持つ。こうした多臓器・多因子での相互作用を網羅的に解析するためには共培養系の活用が効果的である。その基礎となる腸上皮細胞モデルについては、そのバリア機能を正確に評価することが重要となる。Trans epithelial Electrical Resistance (TER) はラベルフリーの非常に簡便なバリア機能評価法であるが、導入コスト、測定環境による影響、実験条件の制限など課題も多い。

オープンソースラボウェアは、実験機器の設計手法をオープンソース化し、最終的に低コストで高品質なカスタマイズのしやすい科学機器の作成を可能にするという思想である。本章では、オープンソースを用いた安価で再現性のある OpTER: Open-source based TER device を開発し、従来の手法が抱えるいくつかの課題を解決した。

【第 5 章：全体の総括】

本章ではコーヒーによる腸 5-HT 系の変動がもたらす広範な作用について改めてまとめ、更なる研究の必要性を強調している。