

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	吉川 慧
学位授与の条件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	伊藤 公訓	印
審査委員	教授	岡 志郎	
審査委員	准教授	田原 優	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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検討した。また、本研究の遂行過程で、新たな腸バリア機能評価装置の開発を試みた。</p> <p>末梢組織の 5-HT の大部分は腸上皮組織の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。EC 細胞には様々な物理受容器、化学受容体が発現し、多様な刺激に反応し 5-HT を分泌する。EC 細胞は、消化器系疾患の内服薬の重要な作用点であることが明らかになりつつある。</p> <p>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 アイランド近傍に機能的な CpG サイト（CpG3）が特定され、DNA メチル化が病態に関与することが報告された。しかしながら、メチル化率を変動させる外部要因は不明で、消化器系疾患との関連は明らかでない。</p> <p>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・免疫疾患との関連もあり、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。</p> <p>コーヒーは世界で最も消費される嗜好品の一つである。全身の炎症性疾患に対する予防的効能が期待されるが、その有効性、機序については不明である。特に腸に対しては、適度な摂取は、直腸の運動を活性化し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健康維持に対してリスクとなる可能性が指摘され、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群患者のコーヒー摂取の是非については、統一見解は得られていない。</p> <p>EC 細胞モデルであるヒト腸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かを検証した。</p> <p>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+} を投与後瞬時に上昇させることを確認した。</p> <p>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も否定された。コーヒーに含まれる主要成分、クロロゲン酸、トリゴネリンとこれらの代謝物ではこの現象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。</p> <p>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+} 上昇が認められたので、細胞外流入による細胞内 Ca^{2+} 上昇は否定的である。</p>			

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 からの 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。

これらの結果から、コーヒー摂取が EC 細胞の小胞体からの動員により細胞内カルシウムを上昇させ、その結果 5-HT 分泌を惹起し、腸蠕動運動を誘発し、POI に治癒的な効果をもたらす可能性が示された。

次に、分化誘導したヒト結腸腺癌由来 Caco-2 細胞株を使用し、過剰なコーヒー摂取が腸の SERT 発現や 5-HT 取り込みに与える影響を検討した。

レギュラーコーヒー、カフェイン抜きコーヒーの 48 時間暴露は、Caco-2 細胞の SERT による取り込み活性を低下させることを、 ^3H 標識 5-HT 取り込みアッセイにより確認した。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も確認した。

レギュラーコーヒー、カフェイン抜きコーヒーの 48 時間暴露は、Caco-2 細胞 SERT mRNA レベルを用量依存的に減少させた。阻害薬の検討により、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 (P38 MAPK)、および腸 SERT との機能連関が報告された核内受容体 (AhR) 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、クロロゲン酸、トリゴネリンとこれらの代謝物、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が、他の CpG サイト (CpG4) では有意なメチル化の変動は認められなかった。

最後に、SERT 発現低下の性質を検討した。6 時間のレギュラーコーヒーの暴露でも SERT 発現の有意な減少が認められた。また、レギュラーコーヒーに 48 時間暴露後、Washout したところ、SERT mRNA 発現量は Washout 後 24 時間で回復した、よってコーヒーによるメチル化誘導を伴う SERT 発現低下は可逆的であることが示された。

これらの結果から、コーヒー摂取は、腸の SERT 発現を減少させ、末梢の 5-HT 調節を乱す可能性が示された。その機序に SLC6A4 遺伝子における DNA メチル化が一部関与している可能性がある。

今後の研究の展開上、腸上皮細胞モデルのバリア機能を正確に評価することが重要となる。Transepithelial Electrical Resistance (TER) は非常に簡便なバリア機能評価法であるが、導入コストなどの課題も多い。

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科学機器の作成を可能にする。本研究では、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することができた。

以上の結果から、本論文は、コーヒーと腸管のセロトニン系との関りを明らかにし、腸疾患に対するコーヒーの効果や治療適用に対して新たな視点を提供した。

よって審査委員会委員全員は、本論文が吉川 慧に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。