別紙１－１

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※　　第　　号

氏　　名　川出野絵

論　文　題　目

アスコルビン酸欠乏時の肝臓と腸管での炎症様変化の機構解析

論文審査担当者

主　査　名古屋大学教授　堀尾文彦

委　員　名古屋大学教授　吉村崇

委　員　名古屋大学教授　一柳健司

委　員　名古屋大学准教授　村井篤嗣

委　員　名古屋大学講師　小林美里

別紙１－２

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

当研究室では、ビタミンＣの主なる活性化合物であるL-アスコルビン酸（L-ascorbic acid; AsA）の新たな生理機能の探索を、AsA生合成不能のODS（Osteogenic Disorder Shionogi）ラットを用いて行ってきた。当研究室の先行研究より、AsA無添加飼料を与えてAsA欠乏状態としたODSラットでは、C反応性タンパク質（CRP）などの急性期タンパク質の血中濃度や肝臓での発現レベルが上昇していることが明らかとなっている。急性期タンパク質は炎症の代表的なマーカーであり、感染症などによる炎症反応の際に肝臓で産生されて血中に放出される。よって、AsA欠乏時には炎症反応と同様の変化が体内で起こっていると考えられた。近年になって、ヒトにおいて血中のAsA濃度が減少すると血中のCRP濃度が上昇するというODSラットと同様の結果を示す報告が国内外でなされている。しかし、AsA欠乏によって血中のCRP濃度がどのような機構で上昇するのかは解明されていない。我々はAsAの新たな生理機能として、AsA欠乏による炎症様変化に着目した。本研究ではODSラットを用いて、AsA欠乏時の肝臓で急性期タンパク質発現が上昇する機構を探究することを目的とした。

第１章では、急性期タンパク質の主なる産生臓器である肝臓を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。これによってAsA欠乏時の肝臓で発現変動する未同定の炎症関連因子を見出すことで、急性期タンパク質発現が誘導される機構を明らかにすることを目的とした。この結果、AsA欠乏時の肝臓で発現上昇する炎症関連因子として、Stat3（signal transducer and activator of transcription 3）、Il1r1（interleukin 1 receptor, type I）、Jak3（Janus kinase 3）、Socs3（suppressor of cytokine signaling 3）、Mt1a（metallothionein 1a）、Mt2A（metallothionein 2A）、Lcn2（lipocalin 2）の7遺伝子を見出した。中でもStat3とSocs3は急性期タンパク質発現の誘導に関与するSTAT3シグナル系に属する遺伝子であった。

STAT3はJAK-STAT経路の転写因子であり、IL-6ファミリー等のサイトカインによってリン酸化されて活性化し、急性期タンパク質やSOCS3の発現を誘導する。AsA欠乏8、10、12、14、18日目の肝臓を解析すると、AsA欠乏の12日目以降には肝臓のSTAT3 mRNAレベルと細胞質内のSTAT3タンパク質レベルが上昇していた。また、AsA欠乏12日目以降には肝臓の核内リン酸化STAT3レベルが上昇しており、AsA欠乏時の肝臓でSTAT3の活性化が亢進していることが初めて明らかとなった。また、肝臓の急性期タンパク質（HP、AGP、CRP、A2m）やSOCS3のmRNAレベルも同様にAsA欠乏12日目以降に上昇していた。これらの結果は、AsA欠乏12日目の肝臓でSTAT3の活性化亢進とその制御下遺伝子である急性期タンパク質とSOCS3の発現上昇が同時に起こることを示している。よって、AsA欠乏時の肝臓での急性期タンパク質発現の上昇はSTAT3の活性化が亢進されることで誘導されていると考えられた。

先行研究において、AsA欠乏時には炎症性サイトカインであるIL-6とIL-1βの血

中濃度が上昇することが見出されていた。そのため、AsA 欠乏によりいずれかの組織で産生されたサイトカインが血液を介して肝臓に作用して、STAT3 の活性化と急性期タンパク質発現の上昇を誘導していると推察した。第 2 章では、このサイトカインの産生組織として腸管に着目し、AsA 欠乏時の腸管でのサイトカイン産生の上昇について解析した。腸管に着目した理由は、腸管は門脈を介して肝臓と直接的に繋がっているため、腸管で産生されたサイトカインが門脈血を介して肝臓に作用する可能性があると考えたためである。また、先行研究より AsA 欠乏時には門脈血のエンドトキシン（グラム陰性菌の細胞壁成分、LPS）の濃度が上昇することや回腸の杯細胞数が増加することを見出していたため、腸管でも AsA 欠乏時には炎症様変化が起こっている可能性が高いと考えたためである。また、STAT3 は IL-6 をはじめ複数のサイトカインによって活性化される。そのため、IL-6、IL-7、LIF などの複数のサイトカインについて、AsA 欠乏による腸管での産生上昇について解析した。

AsA 欠乏時には IL-6 の mRNA レベルが空腸と回腸下部で上昇しており、また門脈血の IL-6 濃度も上昇していた。さらに、門脈血の IL-6 濃度と肝臓の STAT3 制御下遺伝子（CRP、A2m、SOCS3）の mRNA レベルとの間にはそれぞれ有意な正の相関が得られた。これらの結果より、AsA 欠乏時には腸管で IL-6 の産生が上昇しており、この IL-6 が門脈血を介して肝臓の STAT3 活性化することで急性期タンパク質発現が上昇すると考えられた。IL-6 以外の STAT3 を活性化するサイトカインについては、IL-7 は結腸、LIF は空腸で AsA 欠乏により mRNA レベルが上昇していた。しかし、門脈血の IL-7 濃度は AsA 欠乏により変動していなかった。門脈血の LIF 濃度は測定を行っていないが、腸管での LIF の発現レベルは低かった。よって、腸管由来の IL-7 と LIF の肝臓 STAT3 活性化への寄与は小さいと推察した。また、IL-9 と IL-11 も mRNA レベルの測定を試みたが検出限界以下となったため、AsA 欠乏により発現変動しないと考えられた。また、IL-6 の主な産生源はマクロファージであるが、AsA 欠乏時に IL-6 発現が上昇した腸管部位ではマクロファージのマーカーである CD68 の mRNA レベルも高値であった。AsA 欠乏時には腸管にマクロファージが集積し、IL-6 を産生していると推察された。

我々は先行研究より、AsA 欠乏時には門脈血のエンドトキシン濃度が上昇することを見出している。エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁成分であり、その本体はリポ多糖類（lipopolysaccharide; LPS）である。LPS の受容体は TLR4（toll-like receptor 4）だが、TLR4 シグナルはサイトカインや急性期タンパク質の発現を誘導することで知られる。よって、AsA 欠乏時には腸管から腸内細菌由来のエンドトキシンが流入し、その LPS が腸管の TLR4 に作用することで IL-6 発現が上昇する可能性や、また、LPS が門脈血を介して直接的に肝臓の TLR4 に作用して急性期タンパク質発現を上昇させる可能性が考えられた。これらの背景から第 3 章では、腸内細菌の存在しない無菌の

ODS ラットにおいて、AsA 欠乏時の腸管と肝臓での炎症様変化が起こるかどうかを検証した。

この結果、無菌の ODS ラットでも AsA 欠乏により空腸とパイエル板で IL-6 mRNA レベルが上昇しており、門脈血中の IL-6 濃度も上昇していた。また、肝臓の STAT3 制御下遺伝子である急性期タンパク質（HP、AGP、CRP、A2m、Lcn2）と SOCS3 の mRNA レベルも、AsA 欠乏時の無菌の ODS ラットで上昇していた。また、無菌の ODS ラットにおける SOCS3、CRP、A2m の mRNA レベルと門脈血の IL-6 濃度の間にはそれぞれ有意な正の相関が得られた。第 2 章において、AsA 欠乏時には腸管で IL-6 産生が上昇しており、この IL-6 が門脈血を介して肝臓に作用して急性期タンパク質発現の上昇を誘導していると考えられたが、これらの AsA 欠乏による炎症様変化は腸内細菌の存在しない無菌の ODS ラットでも引き起こされることが示された。これらの結果から、腸内細菌の有無が関与しない、AsA 欠乏の直接的な作用により腸管と肝臓での炎症様変化が引き起こされることが示された。

また、ヒトでは AsA を全く摂取しないことは稀であり、日々の AsA 摂取量が不足している場合の方が多いと考えられる。そこで第 4 章では、ヒトにおける AsA の不足を想定し、ODS ラットに AsA 不足飼料（AsA 20 mg/kg および 40 mg/kg）を与えて AsA 不足状態とした際に AsA 欠乏時と同様の肝臓と腸管での炎症様変化が起こるかどうかを検討した。また、我々はこれまで成長期である 6 週齢の ODS ラットを用いてきたが、本章では性成熟完了後の 12 週齢の ODS ラットも用いて解析を行った。

この結果、6 週齢と 12 週齢に関わらず、AsA 無添加飼料摂取（AsA 欠乏）と AsA 不足飼料（AsA 20 mg/kg）摂取（AsA 不足）によって、肝臓での急性期タンパク質（HP、AGP、CRP、A2m、Lcn2）発現の上昇や、腸管での IL-6、IL-1β 発現の上昇が起こることが明らかとなった。AsA 欠乏による肝臓と腸管での炎症様変化は成長期と性成熟完了後の ODS ラットの両方で起こり、また、AsA 不足によっても起こることが示された。また、AsA 40 mg/kg 添加飼料摂取時には肝臓や腸管での炎症関連因子の発現変動がほとんど起こらなかったことから、飼料中 AsA 濃度が 20 mg/kg と 40 mg/kg の間で AsA 不足状態となることが示唆された。

以上のように、本論文では、AsA 欠乏時の肝臓で転写因子 STAT3 の活性化が亢進されていることを初めて見出し、肝臓での CRP などの急性期タンパク質発現の上昇は STAT3 により誘導されていると考えられた。さらに、AsA 欠乏時の腸管では STAT3 を活性化するサイトカインである IL-6 の産生が上昇しており、この腸管由来の IL-6 が門脈を介して肝臓に作用して急性期タンパク質の発現を誘導していることが見出された。これらの結果は、AsA（ビタミン C）の新たな生理機能の一面を切り拓く成果である。そして ODS ラットと同様の症状であるヒトでの AsA 不足による血中 CRP 濃度の上昇機構の解明に繋がる新たな知見であり、栄養学的意義が高い。従って、当

審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位を授与するに充分な価値があるものと認め、合格と判定した。