

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860092

研究課題名(和文) 低吸収性を示す機能性食品成分の吸収改善と動態特性を考慮した製剤開発

研究課題名(英文) Improvement of intestinal absorption of poorly-absorbed functional food components based on the property of its pharmacokinetics

研究代表者

佐藤 夕紀 (SATO, Yuki)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00564981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小腸コレステロールトランスポーターとして知られているNPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1)に着目して、その基質候補となる可能性がある脂溶性食品成分の吸収改善が可能かどうかを検証した。その結果、NPC1L1を介して乳剤ミセル粒子ごと細胞内へ取り込まれる可能性が示された。また、その機構を利用して難吸収性を示すコエンザイムQ10の吸収改善に成功した。さらにNPC1L1の基質として知られている トコフェロールのNPC1L1阻害剤エゼチミブの影響について検証し、 トコフェロールとエゼチミブの投与間隔をあけることで、エゼチミブによる吸収抑制を回避できることが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the uptake mechanism of a substrate of NPC1L1 in the lipid emulsion particles and whether these particles containing cholesterol can improve the intestinal absorption of other poorly-absorbed lipophilic (water-insoluble) components via NPC1L1. In this study, our results suggested that not only cholesterol but also some components in lipid particles are taken up into enterocytes via NPC1L1. We also examined an approach to improve intestinal absorption of a poorly absorbed water-insoluble component, coenzyme Q10 (CoQ10), by this mechanism. The uptake of CoQ10 in lipid emulsion particles containing cholesterol was significantly increased compared to that without cholesterol. Its increased uptake was significantly inhibited by ezetimibe. There is a potential for improvement of the absorption of poorly absorbed components by lipid emulsion particles containing cholesterol.

研究分野：医療薬学

キーワード：機能性食品成分 乳剤 小腸 トランスポーター 吸収改善 相互作用

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国は生活習慣病の増加、超高齢社会などの社会背景から予防医療が重要視される中、特に、病気にならないようにする「一次予防」に注目が集まっている。現在、疾病の予防や進行防止を目的とした様々な機能性食品やその成分を利用したサプリメント等が開発、消費され、まもなくその市場規模は3兆円を超えとも予想されている。しかしながら、食品成分は体内動態に関する知見は非常に不足している場合が多く、科学的根拠に基づく適正使用、効率的な摂取法に関する情報は十分とは言えない。予防医療において重要な機能性食品やサプリメント等の経口投与は、使用者の簡便性・安全性などから最も汎用されている投与形態である。特に小腸からの吸収は、それらの成分が生体へ入る第一段階であり、トランスポータをはじめ様々な動態関連因子により制御されている。難水溶性で脂溶性の高い成分が体内に吸収されるには、小腸で胆汁などにより乳化される必要がある。従来、コレステロール(chol)などの脂溶性の高い物質は、受動拡散により吸収されると考えられてきたが、近年、小腸 chol トランスポータとして NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) が報告された (Altmann S.W., et al., Science, 303, 1201-4, 2004)。トランスポータはある特定の成分を認識して、細胞内(あるいは外)へ基質を輸送するタンパク質であるが、小腸 chol トランスポータ NPC1L1 の基質がミセル化された場合、NPC1L1 はどのように基質を認識しているかを明確に示した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、まずミセル中の NPC1L1 の基質がどのように細胞内に取り込まれているかを明らかにすることを目的とした。また、吸収性の低い難水溶性物質の乳剤調製時に、chol をはじめとする NPC1L1 の基質となる成分を組み込むことで、難水溶性物質の吸収を改善しうる可能性を検証し、これまでに低吸収性が問題となり製剤化できなかった食品成分の新たな吸収改善法を提案し、製剤開発の一助とすることを目標とした。

また脂溶性の高い食品成分として知られている トコフェロールは、NPC1L1 の基質になることが報告されている (Narushima K, et al., Mol. Pharmacol., 74, 42-9, 2008)。この NPC1L1 の阻害剤であるエゼチミブは、消化管で chol の取り込みを抑制することから脂質異常症治療薬として汎用されている。本研究では、より安全な薬物治療、効率的な機能性食品の利用のため、トコフェロールとエゼチミブの影響も併せて評価した。

3. 研究の方法

(1) 乳剤の調製と取り込み挙動の評価

oil としてミリスチン酸イソプロピル(終濃度 1%)、界面活性剤成分として LPC, タウロコール酸(終濃度 500 μ M) を使用し、超音波ホモジナイザーを用いて o/w 型の乳剤を調製した。また、乳剤の構成成分である界面活性剤 (lysophosphatidylcholine; LPC) の蛍光色素標識体 LPC-BODIPY を用いて、消化管上皮モデルとして汎用される Caco-2 細胞内の取り込み量をフローサイトメトリー (FACS) により測定した。

(2) 細胞内取り込み量での評価

消化管モデルとして汎用されているヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞を用いて、コエンザイム Q10 (CoQ10) (終濃度 300 μ g/mL) を種々の条件下で取り込ませ、その取り込み量は HPLC 法により定量した (Sato Y., et al., Biol. Pharm. Bull., 36, 2012-7, 2013)。

(3) 実験動物への -トコフェロール/エゼチミブ投与による血漿中・組織濃度への影響

Wistar 系雄性 (6~10 週齢) ラットを用いて、-トコフェロール (10 mg/kg) を olive oil と混和し、単回投与または 2 ヶ月間長期投与した。エゼチミブ投与群は、投与量 0.1 mg/kg とした。適宜採血後、すぐにヘパリンナトリウムと混合し、遠心分離後、血漿サンプルを得た。その血漿サンプルから、抽出操作などを経て、HPLC 法により定量し、血漿中濃度推移を求めた。さらに必要に応じて、血漿中濃度推移から AUC (area under the curve) 等の動態学的パラメータを算出した。

4. 研究成果

(1) NPC1L1 を含む乳剤粒子の取り込み挙動の評価

これまでに申請者は、機能性食品成分として知られているルテインの消化管吸収機構に一部 NPC1L1 が関与していることを明らかにした (Sato Y., et al., J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 15, 256-64, 2012)。ここで、乳剤中の NPC1L1 の基質となる成分はどのように取り込まれているのかをより詳細に明らかにする目的で、乳剤自体の取り込み挙動を FACS にて評価した。その結果、NPC1L1 の基質として chol を含むミセルと比較して、chol を含まないミセルの蛍光物質 (LPC-BODIPY) 量 (Geo Mean 値) は有意に減少した (図 1)。また、chol を含むミセルにエゼチミブをプレインキュベーションすることにより、その取り込み量は有意に減少したことから、界面活性剤成分は NPC1L1 が基質を取り込む際に同時に取り込まれることが考え

られる (Takekawa Y., Sato Y., et al., Biol. Pharm. Bull., 39, 301-7, 2016)。

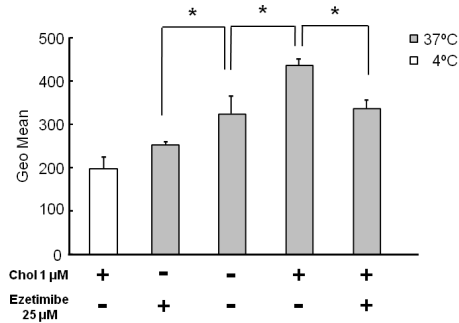


図1 LPC-BODIPYの細胞内取り込みにおけるコレステロールとエゼチミブの影響 (n=4-5, mean with S.D., *;p<0.05)

(2) NPC1L1 を利用した難水溶性物質の吸収改善

(1)での検討で、乳剤中に chol 等の NPC1L1 を含有させると、難水溶性物質の吸収を改善できる可能性が示された。そこでそのことを検証すべく、モデル物質として CoQ10 を用いて、Caco-2 細胞内への取り込み量を比較した。その結果、chol を含まない乳剤の場合と比較して、chol を含む乳剤中の CoQ10 の細胞内取り込み量は有意に増大した。また、その増大分はエゼチミブで抑制された。このことから、乳剤中に chol を加えると(吸収改善させたい)難水溶性物質の吸収改善が可能であることが示唆された(図 2)。なお、いずれの場合も乳剤粒子径に変化はないことは確認済みである。一方で、chol を含まない乳剤においてもエゼチミブで CoQ10 の細胞内取り込み量は減少傾向にあったことから、CoQ10 自身が NPC1L1 の基質となる可能性も考えられる。(Takekawa Y., Sato Y., et al., Biol. Pharm. Bull., 39, 301-7, 2016)。

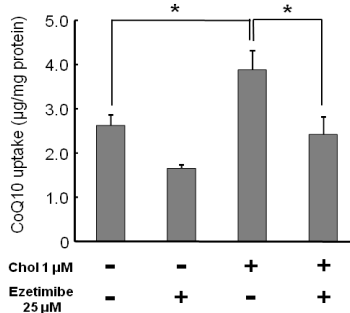


図2 CoQ10 乳剤の細胞内取り込みにおけるコレステロールとエゼチミブの影響 (n=4-7, mean with S.D., *;p<0.05)

(3) トコフェロールの吸収に及ぼす NPC1L1 阻害剤エゼチミブの影響

これまで NPC1L1 を介した難水溶性かつ低吸収性機能性食品成分の吸収改善法について検討してきた。ここで、難水溶性機能性食品成分である トコフェロールについて着目することとした。先にも述べた通り、NPC1L1 阻害剤であるエゼチミブは脂質異常症治療薬として汎用されていることから、エゼチミブを服用している患者が、機能性食品成分・サプリメントとして、また医薬品として トコフェロールを服用している場合、エゼチミブが食餌中の chol だけでなく トコフェロールの吸収を抑制している可能性が考えられる。一般的に、これらの成分は長期間にわたって摂取されるが、その影響を示した報告はない。Knopp らは、エゼチミブ服用患者が、食餌から摂取する トコフェロールには影響がないことを報告している (Knopp R.H., et al., Eur. Heart J., 24, 729-41, 2003) が、サプリメントや医薬品等で摂取している場合の影響は明確にされていない。そこで本研究では、単回だけでなく、2 カ月長期投与してエゼチミブは トコフェロールの吸収に与える影響を明らかにすることと

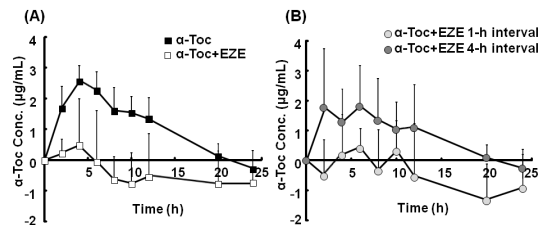


図3 トコフェロールおよびエゼチミブ同時投与時 (A)、投与間隔をあけて投与した時(B)の トコフェロールの血漿中濃度推移 (n=6-9, mean with S.D.)

その結果、トコフェロールは投与後 3 時間程度で血漿中濃度が増大することが観察された。一方でエゼチミブを同時に服用することで、その吸収は抑制されることが示された(図 3-A)。また、トコフェロール単回投与後の組織分布を確認したところ、小腸内には投与 4 時間後には、投与 0 時間とほぼ同程度の濃度であったことから、4 時間後までに吸収されていることが示唆された。また、肝臓中濃度は投与 2 時間程度から増大していることが確認された(図 4)。このことより、投与間隔をずらすことでエゼチミブの トコフェロールの吸収抑制を回避できるのではないかと考えた。そこで、エゼチミブと トコフェロールの投与間隔を 1 時間、または 4 時間あけて トコフェロールの血漿中濃度を

測定した。その結果、投与間隔1時間ではトコフェロールの吸収はエゼチミブにより抑制されたのに対し、投与間隔を4時間あけた群においては、トコフェロールの吸収抑制は確認されなかった(図3-B)。これらの血漿中濃度推移からAUCを算出したところ、トコフェロール単独投与(-tocopherol)群と、トコフェロール+エゼチミブ(-tocopherol+ezetimibe)群、またトコフェロール+エゼチミブ(-tocopherol+ezetimibe)群と、投与間隔を4時間あけてエゼチミブを投与した(-tocopherol+ezetimibe 4-h interval)群では有意な差が観察された。これらのことより、投与間隔をあげることで、吸収抑制が回避できる可能性が示された。

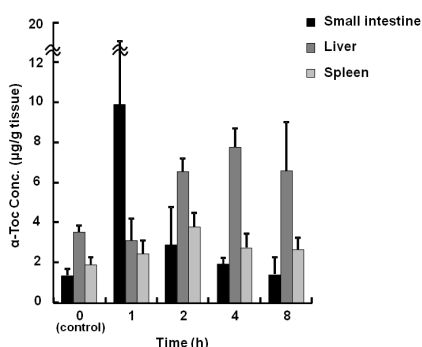


図4 トコフェロール単回投与時における経時的な組織分布量変化 (n=3, mean with S.D.)

(4) トコフェロールの吸収に及ぼすNPC1L1 阻害剤エゼチミブの長期的な影響

前項までの検討で、トコフェロールとエゼチミブの投与間隔をあげることで、トコフェロールの吸収抑制が回避できる可能性が示されたため、2ヶ月間連続投与と同様に組織中濃度を測定した。

その結果、トコフェロールの肝臓中濃度が有意に増大した。また、エゼチミブを同時に投与した群では、その増大した肝臓中濃度が有意に低下した。一方で、投与間隔をあけて投与した群では、1時間の場合、同時投与群と比較してほぼ変わらない値となったが、投与間隔を4時間あけて投与した群では、エゼチミブにより抑制されたトコフェロールの吸収が回避され、トコフェロール単独投与群とほぼ同様の濃度を示した(図5)。これらのことから、投与間隔をあげることで吸収抑制という望ましくない相互作用を回避できる可能性が示された。また、エゼチミブは、腸管循環する薬物であり、長期投与時には、代謝物(主にグルクロン酸抱合体)とともに薬効を発揮していることが考えられる

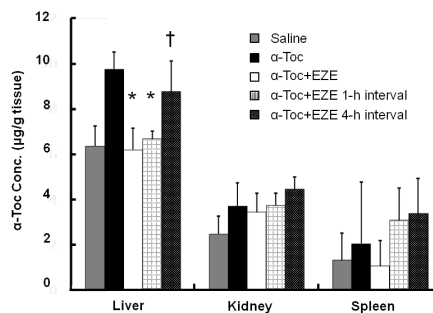


図5 2ヶ月間長期投与時のαトコフェロール・エゼチミブ同時投与または投与間隔をあけて投与したときの組織分布量変化 (n=6-7, mean with S.D., *; p<0.05 vs control, †; p<0.05 vs tocopherol+ezetimibe)

【今後の展望】

NPC1L1の基質であるcholを乳剤に組み込むことにより、NPC1L1の基質ではない物質も吸収改善できることが示され、NPC1L1は難水溶性物質の吸収を向上させる有用なトランスポータであることが示唆された。一方で、モデル物質として用いたCoQ10の吸収にNPC1L1が関与している可能性も示されており、今後CoQ10に関しては、詳細に消化管吸収機構を明らかにする予定である。今後はNPC1L1の基質ではない物質(ビタミンA等)も同様に吸収改善が可能かどうかを検討すること、cholは本来積極的に吸収されてほしくない成分であるため、NPC1L1の基質としてchol以外のトコフェロールに置き換えて同様な吸収改善が可能かどうかを検討することを考えている。また、トコフェロールの吸収に及ぼすエゼチミブの影響に関しては、長期的なchol濃度への影響、エゼチミブまたはエゼチミブ代謝物等の濃度を併せて評価する。本研究で得られた成果を元に、さらに発展させるべく、現在も引き続き鋭意遂行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Takekawa Y., Sato Y., Yamaki Y., Imai M., Noto K., Sumi M., Takekuma Y., Iseki K., Sugawara M. An approach to improve intestinal absorption of poorly absorbed water-insoluble components via Niemann-Pick C1-Like 1. Biol. Pharm. Bull., 39 (3), 301-307 (2016). 査読あり
DOI: 10.1248/bpb.b15-00359.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 梨本俊亮, 佐藤夕紀, 鷺見正人, 武隈洋, 菅原満. 脂質異常症治療薬エゼチミブによる -トコフェロールの消化管吸収抑制とその回避策. 日本薬学会第136年会. 2016年3月28日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
 2. 佐藤夕紀, 八巻義朗, 横山さや香, 竹川悠人, 鷺見正人, 武隈洋, 菅原満. 小腸コレステロールトランスポーターNPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1)を介した Coenzyme Q10 の消化管吸収改善. 第13回日本コエンザイムQ協会研究会. 2016年2月2日. 東京工科大学(東京都八王子市).
 3. 佐藤夕紀. 機能性食品成分の吸収特性を考慮した製剤開発. 農工連携製剤研究会. 2016年1月29日. 宮崎大学(宮崎県宮崎市)【招待講演】.
 4. 佐藤夕紀, 梨本俊亮, 武隈洋, 菅原満. -トコフェロールの吸収動態に及ぼすエゼチミブの影響. 第27回ビタミンE研究会. 2016年1月9日. アルファあなぶきホール(香川県高松市).
 5. 佐藤夕紀, 竹川悠人, 能登数馬, 武隈洋, 菅原満. 乳剤化によるコエンザイムQ10の消化管吸収改善. 日本薬剤学会第30年会. 2015年5月21日. 長崎新聞文化ホール(長崎県長崎市).
 6. 梨本俊亮, 佐藤夕紀, 鷺見正人, 武隈洋, 菅原満. エゼチミブ(ゼチーア®)が機能性食品成分 -トコフェロールの吸収に与える影響. 日本薬剤学会第30年会. 2015年5月21日. 長崎新聞文化ホール(長崎県長崎市).
 7. 竹川悠人, 佐藤夕紀, 鷺見正人, 武隈洋, 菅原満. Niemann-Pick C1 Like-1 (NPC1L1)を標的とした乳剤化による難吸収性物質の吸収改善. 日本薬学会第135年会. 2015年3月27日. 兵庫医療大学(兵庫県神戸市).
 8. 佐藤夕紀. トランスポーターを介した低吸収性成分の吸収改善の可能性. ノーステック財団「研究開発助成事業」研究開発事例報告会. 2015年2月18日. ホテルポールスター札幌(北海道札幌市)【招待講演】.
- 他

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/doutai/index.html>

ヘルスイノベーションカレッジ:

「さっぽろヘルスイノベーション'Smart-H'」事業(2012年7月開始)の一環として、同年10月より「ヘルスイノベーションカレッジ」が開講されている。申請者はベーシック・プログラムの講義の一コマを担当し、医療関係者、管理栄養士等を中心とする食の機能と健康、またその商品開発に関心のある方々などへ本申請研究の内容を一部含めた情報発信を行った(平成27年度まで)。

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 夕紀 (SATO, Yuki)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 00564981

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし