

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14725

研究課題名(和文)クルクミンの細胞内移行・生理作用発現の分子機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of cellular uptake of curcumin: its relation to biological activity

研究代表者

仲川 清隆 (Nakagawa, Kiyotaka)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：80361145

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)：クルクミン(CUR)には種々の作用が知られるが、生物学的利用能は低く、作用発現機構も不明な点が多い。本知見に関し、我々はCURが何らかの機構で優先的に細胞内に取り込まれ、作用を示すという糸口を得た。そこで本研究は、この解明を目的に研究を行った。HPLC分析により、CURは、構造類縁体よりも種々の培養細胞に積極的に取り込まれることが明確となった。この選択的取り込みには、培地中のアルブミンが重要な因子であることが判明しつつある。他方、CURの生物学的利用能の改善に向けて、CUR封入ナノ粒子を調製し、その体内への移行について調べた。こうした研究成果は、食品機能性の学問領域の進展に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Curcumin (CUR) has been known to have various biological activity, whereas bioavailability of CUR is low. It is still unclear whether CUR itself and/or metabolites are responsible for the biological activity in vivo. We hypothesized that preferential uptake of CUR by cultured cells determine its biological activity. To evaluate this, we performed cell culture studies. Using HPLC, it was revealed the uptake of CUR by cultural cells was high, whereas that of CUR related compounds was low. Hence, the remarkable differential cellular uptake of CUR, relative to the related compounds, would determine the biological activity of CUR. Our ongoing studies showed that the differential uptake may occur via interaction of CUR with a medium component, albumin. In addition, we are performing experiments about CUR nanoformulation in order to increase bioavailability of CUR. Our studies will provide a better understanding of the bioavailability and biological activity of CUR for nutraceutical purposes.

研究分野：農芸化学・食品科学

キーワード：クルクミン 生物学的利用能 ナノ粒子 細胞内移行 アルブミン

1. 研究開始当初の背景

クルクミン(図1)は、主にウコン(*Curcuma longa*)に高含有され、カルダモン、クローブ、クミン、胡椒、コリアンダー、パプリカ、メースなどにも含まれている脂溶性のポリフェノールである。クルクミンの名称の由来は、アラビア語で香辛料という意味をもつ単語「Kourkoum」からという説が有力である。クルクミン研究の歴史は古く、1815年に Vogel らにより初めてクルクミンがウコンから抽出され、その分子式($C_{21}H_{20}O_6$)と化学構造は Miłobędzka らによって1910年に初めて報告された。クルクミンは化学構造中の共役二重結合の存在により黄色を呈することが特徴的で、共役二重結合の数が異なるクルクミンの類縁体(ジヒドロクルクミンやテトラヒドロクルクミン)は異なる特異的吸収波長を呈する。

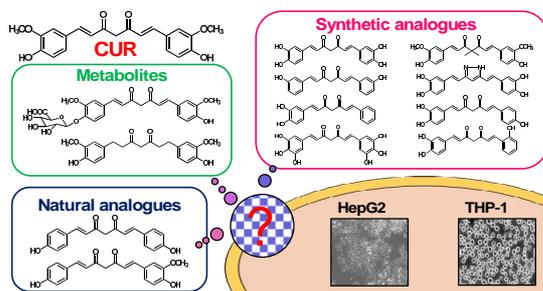


図1 クルクミン(CUR)と代謝物、天然類縁体、合成類縁体の化学構造：これらの細胞内取り込み機構や生理作用発現の分子機構は未だ不明な点が多い。

クルクミン研究への関心については、米国立衛生研究所(National Institute of Health; NIH)が提供する文献データベース Pub Med を用いて1950~2015年の間の「クルクミン(curcumin)」、「ポリフェノール(polyphenol)」および他の代表的なポリフェノールである「アントシアニン(anthocyanin)」、「カテキン(catechin)」の各々を検索キーワードで調べると、1950~1990年にかけてクルクミンは他のポリフェノールと比較してその研究報告の合計数は特に少ないことがわかる。一方で、1990年以降に大きな年間研究報告数の増加が見られ、現在もクルクミンの研究報告数は増加し続けている。これらのことから、クルクミンの研究はポリフェノール研究全体から見ても世界的に盛んに行われていると言える。

クルクミンが注目を集めている大きな理由の一つは、*in vitro* 試験や動物試験において、脂質代謝改善や抗炎症、抗酸化などの多くの有用な健康機能を示す可能性が報告¹⁻⁸⁾されているためであろう。例えば、クルクミンは白色脂肪細胞の Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) や Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) に代表される炎症性アディポカイン

(脂肪細胞から分泌される、生体内の恒常性のバランスを崩す原因となる物質)の発現を抑制し、アディポネクチン(抗炎症性アディポカインとも呼ばれ、生体内の恒常性を調節する)の発現を増加させ、マクロファージ(生体内で不要な物質を取り込み、排除する役割をもつ)の血中脂質濃度調節作用を促進するといった、生体内の恒常性を調節できる効果が報告されている。これらのことから、生活習慣病をはじめとする様々な疾病の予防や治療にクルクミンを役立てる試みが世界中で進められている。

しかしながら、クルクミンがなぜ種々の有用な健康機能を示すのか、その作用発現の機構は未だ不明な点が多く残されている。このことに関して、我々は、クルクミンが何らかの機構で選択的かつ積極的に細胞内に取り込まれ、生理機能を示すという手がかりを得た^{9,10)}。そこで本研究(クルクミンの細胞内移行・生理作用発現の分子機構解明)では、クルクミンの細胞内取り込み機構、さらには生理作用発現の分子機構、これらの解明を目的に研究を実施した。

2. 研究の目的

上述のように、ウコンに含まれるクルクミンは脂質代謝改善や抗炎症をはじめとする多彩な健康機能が知られる。しかし、生理作用発現機構は未だ不明な点が多い。最近、我々は、クルクミンが何らかの機構で選択的かつ積極的に細胞内に取り込まれ、生理機能を示すという手がかりを得た。そこで本研究では、クルクミンの細胞内取り込み機構、さらには生理作用発現の分子機構、これらの解明を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) クルクミンの積極的な細胞への取り込み機構の証明

はじめに、上述の知見「クルクミンが何らかの機構で選択的かつ積極的に細胞内に取り込まれ、生理機能を示すという手がかりを得た」の確定に向けて、種々の細胞にクルクミンや代謝物、天然類縁体、合成類縁体を処理して培養し(図1)得られた細胞や培地を機器分析した。

具体的には、培養細胞として、ヒト肝癌細胞 HepG2 やヒト白血球単球細胞 THP-1、大腸癌細胞株 Caco-2、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用い、これらの細胞に、種々の濃度(0~20 μ M 程度)のクルクミンや代謝物、天然類縁体、合成類縁体を1~24時間処理し、細胞と培地を採取した。得られた細胞(0.5~3.0 $\times 10^6$ cells 程度)に200 μ Lの水を加え超音波処理し、400 μ Lのメタノールを加え、遠心分離(5000 g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C)した。上澄みを回収し、1 mLの水を加え混合し、Oasis HLB カートリッジ(1 mL, Waters)に供した。カー

トリッジを 1 mL の水で洗浄し、2 mL のメタノールで溶出した。なお、培地については、2 mL の培地を直接 Oasis HLB カートリッジに供し、抽出を行った。

得られた抽出物の一部を LC-MS/MS に供し、細胞や培地のクルクミンや代謝物、天然類縁体、合成類縁体を分析した。LC-MS/MS のカラムには、C18 カラム (XBridge C18, 2.1×150 mm; Waters) を用い、40°C で分離を行った。移動相は 0.05% ギ酸水溶液 (pH 3.0) とアセトニトリルのグラジエントとし、流速は 0.2 mL/min で分析した。MS/MS には 4000QTRAP (SCIEX) を用いた。MS/MS の各種条件を最適化し、クルクミンをマルチプレリアクションモニタリング (MRM) モードで検出、定量した。加えて、想定される代謝物 (クルクミングルクロニド、クルクミンサルフェート、クルクミングルクロニドサルフェート、クルクミンジグルクロニド、クルクミンジサルフェート、ジヒドロクルクミン、テトラヒドロクルクミン、ヘキサヒドロクルクミン、オクタヒドロクルクミン、ジヒドロクルクミングルクロニド、テトラヒドロクルクミングルクロニド、ヘキサヒドロクルクミングルクロニド、オクタヒドロクルクミングルクロニド、ジヒドロクルクミンサルフェート、テトラヒドロクルクミンサルフェート、ヘキサヒドロクルクミンサルフェート、オクタヒドロクルクミンサルフェート、等) や天然類縁体、合成類縁体を分析した。また、LC-MS/MS に加えて、LC-UV および LC-蛍光での分析も行った。

(2) クルクミンを特異的に認識できるタンパク質 (レセプター) の評価

仮説 1 「クルクミンを特異的に認識できるタンパク質 (レセプター) の存在」(図 1 および図 2) を想定して、種々の阻害剤を用いた細胞実験へと展開した。他にも、仮説 2 「極性の違いによる影響」、仮説 3 「代謝速度の違い」、仮説 4 「培地成分の影響」といった可能性について検討した。

4. 研究成果

(1) クルクミンの積極的な細胞への取り込み機構の証明

クルクミンや代謝物 (クルクミングルクロニドとテトラヒドロクルクミン) を細胞に処理し、細胞抽出物を各種の LC で分析すると、HepG2 や THP-1、Caco-2、RAW264.7 からはクルクミンが多く検出され、クルクミングルクロニドは検出限界以下で、テトラヒドロクルクミンもほとんど認められなかった (図 3 HepG2 の解析例)。続いて、クルクミンとさらに構造の類似した天然類縁体 (デメトキシクルクミンやビスデメトキシクルクミン) および 8 種の合成類縁体の取り込みを調べたが、いずれも細胞からきわめて微量しか検出されない、あるいは検出限界以下であった (図

4 いずれも HepG2 の解析例)。以上より、クルクミンは代謝物および類縁体と区別されて積極的に細胞に取り込まれていることが明確となった。

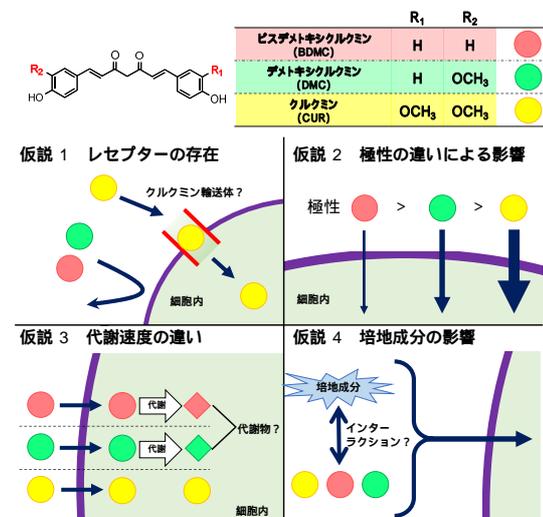


図 2 クルクミン (CUR) と類縁体 (デメトキシクルクミン (DMC)、ビスデメトキシクルクミン (BDMC)) の細胞内取り込み機構の違いに関する仮説

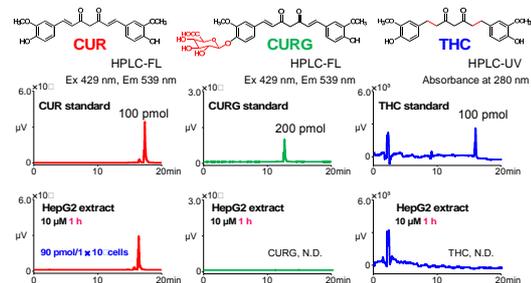


図 3 クルクミン (CUR) や代謝物 (クルクミングルクロニド (CURG)、テトラヒドロクルクミン (THC)) の細胞内移行の評価例

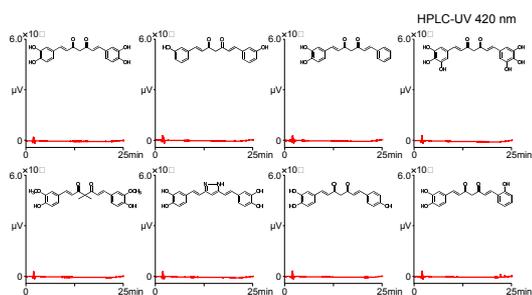
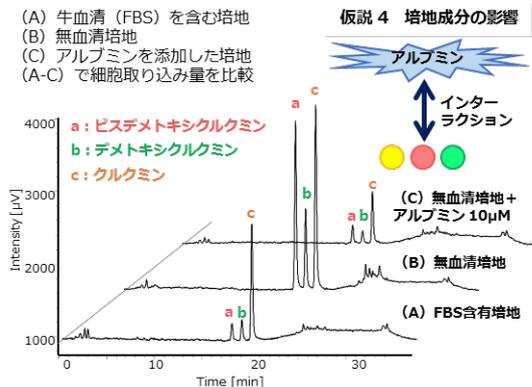


図 4 天然類縁体および合成類縁体の細胞内移行の評価例

(2) クルクミンを特異的に認識できるタンパク質 (レセプター) の評価

上述の知見から、クルクミンを特異的に認識できるタンパク質 (レセプター) の存在を想定して (図 2 仮説 1)、種々の阻害剤を用いた実験を進めた。他にも、仮説 2 「極性の違いによる影響」、仮説 3 「代謝速度の違い」、仮説 4 「培地成分の影響」、これらの可能性についても検討を行った。その結果、仮説 1、

仮説 2、仮説 3 はクルクミンの取り込みに大きく影響しないことがわかった。他方、図 5 に示すように、クルクミンの吸収には培地中の血清成分が関与し、中でも血清中のアルブミンが重要な因子であることを示唆する知見を得た。このように、当初想定していたクルクミンレセプターの発見には繋がらなかったものの、クルクミンの細胞内吸収には、培地成分とのインターアクションが極めて重要であることが初めて明らかとなり、細胞内吸収と生理作用発現の関係性が今後より明確になると期待される。



それぞれの培地でクルクミンと類縁体の細胞取り込み量に違いが生じた (A) と (B) の比較→血清成分が取り込みに関与 (A) と (C) の比較→血清成分の中でもアルブミンが取り込みに関与

図 5 仮説 4 を支持する細胞実験結果

(3) クルクミン封入ナノ粒子の吸収代謝の評価：生理作用発現機構との関係性

他方、クルクミンの生物学的利用能の改善に向けて、クルクミンをナノ粒子に封入する試みが昨今行われている¹¹⁻¹⁸⁾。そこで、本研究を進める過程で、ナノ粒子作製に広く用いられる生分解性ポリマー（ポリ乳酸・グリコール酸共重合体：PLGA）を用いてクルクミン封入ナノ粒子（CUR-NP）を調製し、その細胞への取り込み試験も行ったところ、確かに、細胞への取り込みが見られた。現状で、CUR-NP の体内への取り込み量やクルクミンの代謝におよぼす影響は未だ不明な点が多いことから、本研究において *in vivo* および *in vitro* 試験を行い、CUR-NP の吸収代謝を明らかにしようとした。その結果、CUR-NP を投与したラット血漿からは多量にクルクミングルクロニドが検出されたものの、クルクミンは微量であることがわかった。他方、クルクミンを与えたラット血漿のクルクミングルクロニド濃度は低く、クルクミンはほとんど存在しなかった（図 6）。したがって、CUR-NP はクルクミンの吸収性を高めるが、ほとんどクルクミングルクロニドに代謝されると考えられた。*in vitro* 試験では、クルクミンを用いて調製したミセルよりも、CUR-NP を用いたミセルの方がクルクミンの溶解量が多く（図 7）このことからラットにおける CUR-NP とクルクミンの吸収性の違いは、両者の胆汁酸ミセルへの取り込まれ易さの違いと予想された。これらのことから、ク

ルクミンの吸収性を高めるには、クルクミンをナノ粒子に封入することは有効であるが、ナノ粒子化による生理作用向上に関しては更なる研究が必要と考えられた。

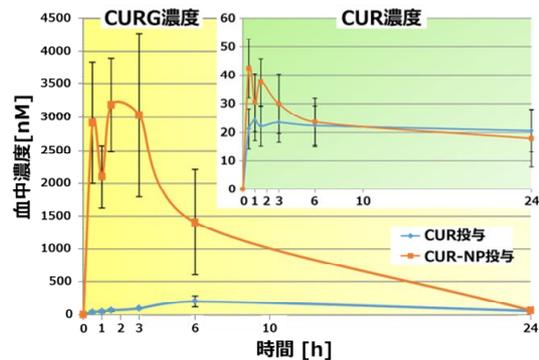


図 6 クルクミン (CUR) およびクルクミン封入ナノ粒子 (CUR-NP) をラットへ単回投与した場合の血漿のクルクミンと代謝物 (クルクミングルクロニド (CURG)) の濃度変化

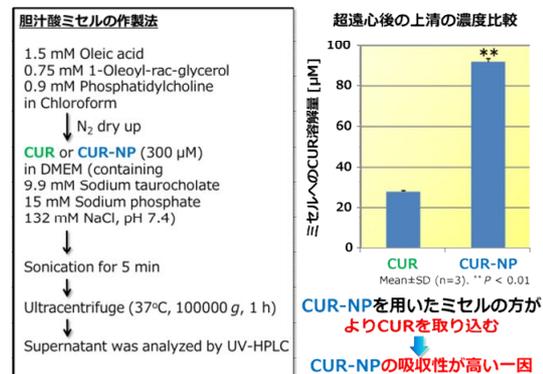


図 7 ミセル溶解性の評価例

最後に、クルクミンをはじめとする多くのポリフェノール等の食品成分は、細胞内吸収および動物における吸収代謝と生理作用発現機構の関係について、十分な解明がなされているとは言えない面がある。こうした中で、本研究の成果は、クルクミンの吸収・代謝的特性を明確にし、食品の新しい機能発見に繋がりが、疾病予防に役立つので、社会的意義が大きいと思われる。

< 引用文献 >

1. Asai, A & Miyazawa, T (2001) Dietary curcuminoids prevent high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue. *J Nutr* 131, 2932-2935.
2. Sharma, RA, Gescher, AJ & Steward, WP (2005) Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 41, 1955-1968.
3. Ejaz, A, Wu, D, Kwan, P & Meydani, M (2009) Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *J Nutr* 139, 919-925.

4. Zingg, JM, Hasan, ST & Meydani, M (2013) Molecular mechanisms of hypolipidemic effects of curcumin. *Biofactors* 39, 101–121.
5. Zingg, JM, Hasan, ST, Cowan, D, Ricciarelli, R, Azzi, A & Meydani M (2012) Regulatory effects of curcumin on lipid accumulation in monocytes/macrophages. *J Cell Biochem* 113, 833–840.
6. Sawada, H, Saito, Y & Noguchi, N (2012) Enhanced CD36 expression changes the role of Nrf2 activation from anti-atherogenic to pro-atherogenic in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 225, 83–90.
7. Kou, MC, Chiou, SY, Weng, CY, Wang, L, Ho, CT & Wu MJ (2013) Curcuminoids distinctly exhibit antioxidant activities and regulate expression of scavenger receptors and heme oxygenase-1. *Mol Nutr Food Res* 57, 1598–1610.
8. Gupta, SC, Sung, B, Kim, JH, Prasad, S, Li, S & Aggarwal, BB (2013) Multitargeting by turmeric, the golden spice: from kitchen to clinic. *Mol Nutr Food Res* 57, 1510–1528.
9. Shoji, M, Nakagawa, K, Watanabe, A, Tsuduki, T, Yamada, T, Kuwahara, S, Kimura, F & Miyazawa, T (2014) Comparison of the effects of curcumin and curcumin glucuronide in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Food Chem* 151, 126–132.
10. Nakagawa, K, Zingg, JM, Kim, SH, Thomas, MJ, Dolnikowski, GG, Azzi, A, Miyazawa, T & Meydani, M (2014) Differential cellular uptake and metabolism of curcuminoids in monocytes/macrophages: regulatory effects on lipid accumulation. *Br J Nutr* 112, 8–14.
11. Sun, M, Su, X, Ding, B, He, X, Liu, X, Yu, A, Lou, H & Zhai, G (2012) Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine (Lond)* 7, 1085–1100.
12. Maradana, MR, Thomas, R & O'Sullivan, BJ (2013) Targeted delivery of curcumin for treating type 2 diabetes. *Mol Nutr Food Res* 57, 1550–1556.
13. Ghalandarlaki, N, Alizadeh, AM & Ashkani-Esfahani, S (2014) Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy. *Biomed Res Int* 2014, 394264.
14. Ahmad, MZ, Akhter, S, Mohsin, N, Abdel-Wahab, BA, Ahmad, J, Warsi, MH, Rahman, M, Mallick, N & Ahmad, FJ (2014) Transformation of curcumin from food additive to multifunctional medicine: nanotechnology bridging the gap. *Curr Drug Discov Technol* 11, 197–213.
15. Lee, WH, Loo, CY, Young, PM, Traini, D, Mason, RS & Rohanizadeh, R (2014) Recent advances in curcumin nanoformulation for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 11, 1183–1201.
16. Hu, L, Pang, S, Hu, Q, Gu, D, Kong, D, Xiong, X & Su, J (2015) Enhanced antitumor efficacy of folate targeted nanoparticles co-loaded with docetaxel and curcumin. *Biomed Pharmacother* 75, 26–32.
17. Leung, MH, Harada, T, Dai, S & Kee, TW (2015) Nanoprecipitation and spectroscopic characterization of curcumin-encapsulated polyester nanoparticles. *Langmuir* 31, 11419–11427.
18. Yallapu, MM, Nagesh, PK, Jaggi, M & Chauhan, SC (2015) Therapeutic applications of curcumin nanoformulations. *AAPS J* 17, 1341–1356.

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. Harigae, T, Nakagawa, K, Miyazawa, T, Inoue, N, Kimura, F, Ikeda, I & Miyazawa, T (2016) Metabolic fate of poly-(lactic-co-glycolic acid)-based curcumin nanoparticles following oral administration. *Int J Nanomedicine* 11, 3009–3022. (査読有り)

〔学会発表〕(計4件)

1. 仲川清隆, クルクミンの吸収と代謝：生理作用発現との関係性. 日本食品科学工学会第63回大会, 2016年8月25-27日, 名城大学天白キャンパス(愛知)
2. 仲川清隆, 張替敬裕, 宮澤大樹, 井上奈穂, 池田郁男, 宮澤陽夫, クルクミン封入ナノ粒子の吸収代謝の評価：バイオアベイラビリティの改善に向けて. 日本ビタミン学会第68回大会, 2016年6月17-18日, 富山国際会議場(富山)
3. 張替敬裕, 宮澤大樹, 井上奈穂, 仲川清隆, 池田郁男, 宮澤陽夫, クルクミンとクルクミン封入ナノ粒子の吸収代謝の評価. 日本栄養・食糧学会東北支部(第49回大会)日本栄養・食糧学会北海道支部(第45回大会)合同支部大会, 2015年10月24-25日, 東北大学農学部(宮城)
4. 仲川清隆, 張替敬裕, 林真貴子, 今野博行, 宮澤大樹, Mohsen Meydani, 宮澤陽夫, クルクミン及び類縁体の培養細胞への取り込み量の評価. 日本食品科学工学会第62回大会, 2015年8月27-30日, 京都大学吉田キャンパス(京都)

〔図書〕(計2件)

1. 仲川清隆, クルクミンの吸収・代謝およ

- び培養細胞への取り込み-生理作用発現機構との関係性. 食品因子による栄養機能制御, 建帛社 114-129 (2015).
2. 宮澤大樹, 張替敬裕, 仲川清隆, クルクミンの吸収代謝と生理作用発現の関係性. 化学と生物 54, 500-507 (2016).

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

とくに無し。

6. 研究組織

(1)研究代表者

仲川 清隆 (NAKAGAWA, Kiyotaka)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：80361145

(2)研究代表者

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA, Teruo)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：20157639

木村 ふみ子 (KIMURA, Fumiko)
尚絅学院大学・総合人間科学部・准教授
研究者番号：50321980