

令和元年6月25日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00896

研究課題名(和文) ビタミンDの腸管吸収特性と栄養・機能性に関する研究

研究課題名(英文) Study on intestinal absorption characteristics and nutrition/functionality of vitamin D

研究代表者

小竹 英一 (KOTAKE, Eiichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：20547236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： ビタミンDは腸管吸収後に肝臓及び腎臓等で活性化されて栄養機能を発揮する。VD不足を起因とするロコモティブシンドロームが懸念されている。代表的なVD2、VD3の他、D4-D7についても吸収特性や代謝を調べ、吸収向上を図った。

VDの種類によって吸収性が他に比べて低いものが認められたが、リゾリン脂質による吸収促進効果が認められた。阻害剤実験により、一部は受容体経路の吸収が示唆された。さらに、受容体ノックアウト細胞をゲノム編集により作製したが、期間内に実験に供することができなかった。肝臓や腎臓モデルでの代謝と代謝産物の機能については、PASS onlineで代謝産物の機能をシミュレートした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VDはきのこ(VD2)と魚(VD3)、特定の食材からのみ摂取できる。肉食主義者ではVDが不足する他、日焼けや皮膚がんリスク低減のため、日光を避けているとVD3は不足する。また、コレステロール合成経路でVD3は生合成されるが、スタチンなどのコレステロール合成阻害剤を投与されている場合もVD3は不足する懸念がある。これらに対して本研究は、摂取機会を増やし、吸収量を向上させる食品加工技術開発につながる。

VD5、6、7については市販品が無いが、本研究では市販の植物ステロールを出発物質として、これらを合成できた。今後は安価に合成でき、試薬として学術研究にも使用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)： Vitamin D (VD) is activated in the liver and kidneys after intestinal absorption and exerts a trophic function. There is concern about locomotive syndrome caused by VD deficiency. In addition to well-known VD2 and VD3, VD4-VD7 were also examined for absorption characteristics and metabolism to improve absorption.

Depending on the type of VD, the absorption was lower than the others, but the absorption promoting effect by lysophospholipid was observed. An inhibitor experiment suggested, in part, absorption of the receptor pathway. In addition, the receptor knockout cells were prepared by genome editing but could not be subjected to experiments within the time frame. The metabolic and functions in liver and kidney models could not be examined within the time frame either, but the metabolite functions were simulated in PASS online.

研究分野：食品科学

キーワード：ビタミン 腸管吸収

1. 研究開始当初の背景

ビタミン D (VD) 欠乏は骨の異常を引き起こし、うつ病や免疫力低下との関係も指摘されている。VD3 はコレステロール合成経路にて生合成可能であるものの、完成には日光が必要であり、日焼けや皮膚がんリスクから日光は忌避される。さらに、スタチンのようなコレステロール合成阻害薬の投与では VD3 の生合成が阻害される懸念がある。VD2 と VD3 は限られた食物(キノコと魚)からしか摂取できない上に、このような脂溶性成分は(水に溶けにくく)一般的に生体利用性が低い性質を有しており、現代社会は VD 欠乏が起こりやすい環境にある。

2. 研究の目的

本研究では、VD 欠乏に伴う各種疾病やロコモティブ症候群の予防を図るため、ほとんど知られていない VD4-VD7 をも含む VD 類の腸管吸収メカニズムを解明し、それらの生体利用性向上を図り、これらの代謝産物/活性化体の栄養・機能性について解析する。

3. 研究の方法

(1)VD ライブラリー

市販品を購入、購入できないものは天然物から精製するか合成することで入手する。

(2)吸収試験

入手できた VD について、腸管吸収特性を評価する。腸管モデル Caco-2 細胞を 3 週間培養して分化させる。VD は胆汁酸モデルミセルに可溶化させて細胞へ供する。一定時間後、細胞を回収して VD を抽出、HPLC 分析を行う。細胞はタンパク量を測定し、吸収量はタンパク量で補正する。

(3)促進拡散の関与の検討(その1)

一般的に、脂溶性成分は単純拡散で吸収されると考えられることが多いが、近年、促進拡散の関与が多く報告されている。阻害剤を使って促進拡散の関与の割合を調べる。

(4)促進拡散の関与の検討(その2)

促進拡散に関与する因子のノックアウト細胞を使って検討する。ノックアウト細胞をゲノム編集によりクローンを作製、ワイルドタイプクローンも同時に調製して、両者の吸収量を比較することで、促進拡散の関与の割合を決定する。

(5)吸収促進成分

胆汁酸モデルミセルに極性脂質等を共存させることで、吸収量が増加するかどうか調べる。

(6)吸収特性及び促進メカニズムの検討

6 種類の VD の吸収量に差が出た場合、吸収促進成分の共存で吸収量が増えた場合、そのメカニズムを調べる。先行研究から、細胞間結合が重要であることがわかっており、吸収における細胞間結合の関与を、細胞間結合が無い、もしくは少ない状態で調べる。

(7)代謝産物の検討

VD は吸収後に肝臓と腎臓(もしくは前立腺)で 2 段階の代謝を受けて、栄養機能を発揮する。VD5-7 についても VD2 や VD3 と同様に代謝されるかどうか調べる。肝臓細胞モデルの HepG2 と腎臓細胞に液中乾燥法で VD を添加して代謝産物を抽出、HPLC 分析を行う予定が、期間内に検討できなかった。

(8)代謝産物の機能性

代謝産物は、より一層入手が困難であり、合成も十分量の確保は困難である。今回は、PASS online を使ったシミュレーションのみとした。

4. 研究成果

(1)VD ライブラリー

VD2、VD3、VD4 については市販品があり、容易に入手できた。しかしながら、VD5、VD6、VD7 については市販品が無く、また、前駆体の市販品も無かった。(VD5 はカタログにラインナップされていたが、30 mg の注文が入れば合成開始、納入価格が 89 万円とのことで、実質的に購入できなかった)。

そこで、植物ステロールからの合成を目指した。まず、コレステロール骨格の 7 位に二重結合を導入する必要がある。酵素的な手法も考えたが、そのような酵素も市販品は無く、また高等動物では、そのような酵素は発現していないという文献もあったため、化学合成を行うこととした。この場合も、植物ステロールの純品が g スケールでは入手しにくかった(1 g 開始でも最終合成物は m g スケール)。

市販の植物ステロール混合物から各植物ステロール純品の分離・精製を試みた。g スケールであれば、カラムクロマトで行うしかないが、様々な吸着剤(シリカ、MgO、アルミナ、フロリ

ジル等)を使って試したものの、分離精製は出来なかった。

そこで発想を変え、混合物で合成を行い、VD混合物を分取 HPLC で単離・精製することで 6 種類の VD をそろえた。この方法は下記にも示すが学術論文として報告した。

(2)吸収試験

VD の 6 種類の吸収量を比較すると、1 種類について他と比べて低いものがあった。これを除き、他はほぼ同じ程度の吸収量であった。VD2 と VD4 はきのこ、VD3 は魚から摂取しているが、他のものは次のような報告がある。

VD5 の前駆体はウマノミツバ属の植物や海草、VD6 の前駆体はシャーガス病のトリパノソーマ、VD7 の前駆体はヒマワリ種子油、等で存在が報告されている。これらの前駆体は UV によって VD に変換可能である。トリパノソーマは食べ物ではないので除くが、しかし、VD6 も何らかの食材中に存在する可能性は否定できない(この検索も将来の研究テーマの一つとなる)。つまり、きのこや魚以外からも VD を同程度の量を摂取・吸収することは可能であろう(VD 活性が問題ではあるので、以降で議論する)。

(3)促進拡散の検討(その1)

脂溶性成分の吸収は単純拡散であると考えられることが多かったが、近年は脂溶性成分の吸収に共通する吸収受容体やトランスポーターの関与が示されるようになってきた。VD の 6 種類に関して促進拡散の関与を調べた。化学薬品の阻害剤が市販されており、DMSO に溶解させてプレートキュベートすることで吸収を阻害した。その結果、どの VD も同程度の割合の関与であった。また、100%の阻害ではないことから、促進拡散と単純拡散の経路、両経路で吸収されていることが示唆された。

(4)促進拡散の検討(その2)

阻害剤ではなく、siRNA によるノックダウンも考えたが、上で述べたように、3 週間分化させたのちに細胞を使うため、このような状態ではリポフェクションによる siRNA 導入は難しい。加えて、ノックダウンではノックアウトと違い、発現が完全に抑制されるわけではない。そこで、ゲノム編集によりノックアウト細胞の樹立を試みた。複数のクローンを得たが、タンパクレベルでのノックアウトの確認を未だ終えてすらおらず、吸収研究へ供することは間に合わなかった。しかし、この細胞は今後、様々な脂溶性成分の吸収試験のツールとして活用が期待できる。

(5)吸収促進成分

特定の食材からのみ摂取できる、すなわち、摂取機会が少ないのであれば、その際に極力、吸収量を向上させればよい。吸収促進成分としてはこれまでカロテノイドの吸収促進効果で報告している極性脂質について検討した。その結果、すべての VD で吸収量が増加した。この結果は、この極性脂質の吸収促進効果がカロテノイドだけではなく、VD に対しても効果を有すること(おそらく、どのような脂溶性成分に対しても)を明らかにした。つまり、食べ合わせや食品加工時にこのような極性脂質が共存することで、実際の食事でも VD の吸収が向上することが期待できる。

(6)吸収特性及び促進メカニズムの検討

吸収促進・抑制メカニズムは、ミセル側にその要因がある場合と、細胞側に要因がある場合と 2 つ考えられる。ミセル側の要因は、ミセルからの放出されやすさである。ミセル成分と VD が強固に結びついていると、細胞が VD を取り込みにくくなる。

細胞側に要因がある場合は、これまでの研究から、細胞間結合が関与していることがわかっている。なぜなら、細胞間結合が無い、あるいは少ない実験系では、吸収促進効果が認められないからである。

これらを検討する実験系として考案してきたのは浮遊細胞での吸収試験である。腸管モデル細胞をトリプシン処理して浮遊状態にして、吸収動態を調べる。この状態の細胞は、1 つには、ミセルからの目的成分(この場合は VD)の取り込みやすさを、また細胞間結合が無いのでその影響を調べることが出来ると考えている。その結果、浮遊状態では、6 種類の VD で吸収量に、ほとんど差が無かった。これは、ミセルからの放出されやすさには差が無いことを示唆している。従って、接着状態での吸収試験で吸収量に差が出た(他と比べて吸収量が低いものがあった)理由は、ミセル側にあるのではなく、細胞側にある。接着状態で吸収量が少なかった VD については、おそらく排泄トランスポーター等が関与しているものと想像する。これの証明は将来の研究である。

また、吸収促進成分の効果も、浮遊状態では認められなかっただけでなく、逆に対照よりも吸収量は低くなった。これは、吸収促進成分の存在でミセルからの VD 放出は抑制されているということと、細胞間結合が存在しなければ吸収促進効果が発揮できない、すなわち、細胞間結合のある通常の状態では、対照では細胞で吸収されにくくなり、一方の吸収促進成分が存在する場合には細胞間結合に影響して吸収されやすくなっていることが理解できる。尚、吸収促

進効果のメカニズムとして細胞膜の透過性が関与しているならば、浮遊状態でも吸収は促進されるはずであるが、そうはならなかった。細胞間結合の何が関与しているかであるが、これは細胞内コレステロールが放出されることで細胞間が開いて吸収されやすくなるからと考えられるが、その証明までは至らず、今後の課題である。

(7)代謝産物の検討

肝臓、腎臓での代謝を検討する予定であったが、期間内に検討できなかった。ただ、少なくとも、腸管吸収試験では、HPLC 分析において代謝産物のピークは見出せなかった。

(8)代謝産物の機能性

VD5、VD6、VD7 の VD 活性は VD2 と VD3 に比べて低いことが報告されているが、しかしながらそれはラットの研究である。ヒトとげっ歯類では、吸収、代謝が異なる事が多い事はよく知られている。しかし、実験的に確かめることが出来なかったため、PASS online でのシミュレーションの結果の一部を示す。Pa 値が 1 に近いものほど、活性が高い。ただし、光学異性体を区別できないようで、VD4 と VD7 の結果は同じになっている。

表1 各VDのPASS online による機能性シミュレーションの結果

Pa値	1,25-diOH-VD					
	VD2	VD3	VD4	VD5	VD6	VD7
Vitamin	0.976	0.977	0.985	0.969	0.976	0.985
Vitamin D-like	0.865	0.79	0.882	0.755	0.844	0.882
Vitamin D receptor agonist	0.844	0.701	0.674	0.66	0.738	0.674
Antiestrogenic						
Antiosteoporotic	0.987	0.975	0.976	0.992	0.97	0.976
Bone diseases treatment	0.985	0.977	0.967	0.989	0.966	0.967
Calcium regulator	0.9	0.876	0.867	0.862	0.88	0.867
Bone formation stimulant	0.718		0.623	0.614	0.627	0.623
Apoptosis agonist	0.78	0.742	0.642	0.638	0.765	0.642

活性化 VD3 は白血病細胞の分化誘導能なども有すること、前立腺癌を予防すること等が知られており、このような機能性を活性化 VD5、VD6、VD7 も有するのかどうか興味を持たれる。また、冬季での疾病、日光やうつとの関連性から、免疫や精神疾患との関与も指摘されており、単に骨の正常化といった栄養素としてだけではなく、いわゆる機能性の部分にも大いに期待できる成分である。

ここまでで、ライブラリーの作製に関する研究のみ、論文で報告できたが、ノックアウト細胞の樹立も含めて吸収試験の進行が遅れたため、今後はデータが揃い次第、以降の研究について論文にまとめる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Shiro Komba, Eiichi Kotake-Nara and Wakako Tsuzuki, Simultaneous Synthesis of Vitamins D2, D4, D5, D6, and D7 from Commercially Available Phytosterol, β -Sitosterol, and Identification of Each Vitamin D by HSQC NMR, *Metabolites* (査読有り) 2019, 9, 107; doi:10.3390/metabo9060107

Eiichi Kotake-Nara, Bioavailability and Functions of Lipophilic Components of Food, *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics* (査読有り) 2017, 2(18), 1094-1094.

[その他]

ホームページ等

<http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/nfri/introduction/chart/0503/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：今場 司朗

ローマ字氏名：KOMBA, Shiro

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：食品研究部門

職名：上級研究員

研究者番号（8桁）：20332273

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。