

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05534

研究課題名(和文)ポリフェノール類の腸管吸収・代謝プロセスの可視化とin situ評価法の構築

研究課題名(英文) In situ visualization of intestinal absorption processes of polyphenols by using MALDI-MS imaging

研究代表者

田中 充 (Tanaka, Mitsuru)

九州大学・五感応用デバイス研究開発センター・准教授

研究者番号：70584209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体組織中の目的成分の局在を多成分同時に可視化することが可能なMALDI-MSイメージング法を用いて、ポリフェノール類の腸管での吸収・代謝挙動を一斉可視化可能な新たな評価系を構築した。本腸管 in situ MALDI-MS イメージング法は、阻害剤を併用することでその吸収経路を特定することが可能であり、腸管組織内の代謝物の一斉可視化を達成した。さらに、腸管を作用場とし、自身は吸収されことなく他の成分の吸収調節作用を示すテアフラビン類が、一旦腸管組織に取り込まれた後に、排出系トランスポーターを介して管腔排出されることが初めて可視化された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの食品成分の吸収性評価は、摂取した成分の血中移行性の評価に終始しているものがほとんどで、実際の吸収を制御する腸管での動態や代謝物を考慮した解析にはほとんど至れていない。対して、本研究にて構築したラット腸管 in situ MALDI-MS イメージング法は、腸管組織での成分の透過過程、並びに、一連の代謝物を可視化することが可能な方法である。すなわち、本法はこれまではブラックボックスとされてきた腸管での吸収動態を可視化という直截的な手法で評価可能であり、生体利用性の解明を基盤とした食機能研究の遂行に極めて有用な評価法であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, MALDI-MS imaging was used as a visualization technique to investigate the intestinal absorption of polyphenols. Nifedipine/phytic acid-aided MALDI-MS imaging was performed to visualize theaflavin-3'-O-gallate (TF3'G) and epicatechin-3-O-gallate (ECG) in the rat jejunum. Non-absorbable TF3'G was successfully visualized at the apical region, whereas absorbable ECG was detected throughout the rat jejunum. MALDI-MS imaging was also performed to determine the transport routes of the target metabolites. The inhibitor aided-intestinal MALDI-MS imaging visualized the behavior in which TF3'G and ECG were incorporated into intestinal tissues, followed by efflux back to the apical compartment. In addition, MALDI-MS imaging analyses suggested that TF3'G was resistant to phase II metabolism during the influx/efflux processes, whereas ECG was susceptible to methylation and sulphation reactions.

研究分野：食品分析

キーワード：MS イメージング 腸管吸収 ポリフェノール 代謝 MALDI-MS

1. 研究開始当初の背景

これまでに様々な食品成分の機能性が報告されているが、*in vitro* で機能性を示す食品成分が生体内で作用発現するか否かは、腸管吸収が前提となる。しかしながら、これまでの食品機能学研究は、腸管への取り込み、代謝・分解、吸収、もしくは、体外排出等の過程(図1)に関する *Bioavailability* 研究が欠落しており、食品成分の吸収研究は薬理学分野と比較して大いに立ち後れているのが現状である。また、本研究で対象とするポリフェノール類については、小腸上皮モデル細胞である Caco-2 細胞を用いた透過性予測がほとんどであるが、その評価には以下の問題がある。

- ポリフェノール吸収・代謝：細胞膜では透過過程は評価できるが、代謝を含む吸収過程を評価することは困難である。
- 非吸収性ポリフェノールの動態解析：細胞膜内への取り込み→透過 or 膜外排出を直接的に評価するアッセイ系がないため、動態解析することは困難である。

以上、ポリフェノール類をはじめとする食品成分の腸管吸収挙動を直截的かつ客観的に評価する分析法がないため、食品成分の腸管吸収研究が大いに立ち後れているのが現状である。

他方、MALDI-MS イメージング法は、抗体等を用いて染色することなく臓器での物質の局在性を可視化することができることから、多成分からなる食品成分の吸収・代謝動態の解明に最適な分析法であるといえる。しかしながら、MS 法はイオン化する物質しか検出できないという最大の欠点を有しており、中性分子種であるポリフェノール類はイオン化効率が低く、このことがポリフェノール類の吸収研究を妨げる大きな障害となってきた。他方、光増感剤をマトリックスとしてポリフェノール類の MS 検出感度向上を達成した実績¹はこれまでの研究障害を覆す成果といえる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、MALDI-MS イメージング法を基本技術として、ポリフェノール類の吸収・代謝動態を視覚的に網羅する「ポリフェノール類の体内吸収・代謝プロセスの可視化と *in situ* 評価法の構築」を目指し、以下の検討を実施した。

- ① ポリフェノール類の腸管吸収経路の可視化
- ② ポリフェノール類の腸管代謝動態の可視化
- ③ ポリフェノール類の体外排出挙動の可視化
- ④ 機能性ポリフェノールの腸管吸収性評価への応用

本法によりラット小腸での吸収・代謝過程が初めて可視化され、評価することができ、さらに、小腸に取り込まれたポリフェノール類およびその代謝物の局在が一斉に可視化されるため、吸収・代謝・排出経路の関与を同時かつ網羅的に特定化できると考えられた。

3. 研究の方法

ポリフェノール類可視化のための MS イメージング条件の最適化

MALDI-MS 検出のためのマトリックス剤 (Nifedipine) ならびに補助剤であるフィチン酸を用いた腸管組織でのポリフェノール類可視化のための検出条件の最適化 (マトリックス量、濃度、レーザー強度等) を実施した。

腸管取り込み経路の可視化

Ussing Chamber system にセットした Sprague-Dawley 系 (SD) ラット摘出小腸膜に対して各種ポリフェノール類 (50 μ M、60 分間) を透過させ、経時的に断面切片を作製し、最適化した MALDI-MS イメージング法に供した。モノカルボン酸トランスポーター (MCT)、有機アニオントランスポーター (OATP)、ならびに小胞輸送 (エンドサイトーシス) を対象取り込み経路として、これら経路の阻害剤 (フロレチン、エストロン-3-硫酸、ならびに wortmannin) 存在下でのポリフェノール類の局在性の変化から吸収経路を可視化評価した。

腸管組織でのポリフェノール類代謝物の一斉可視化

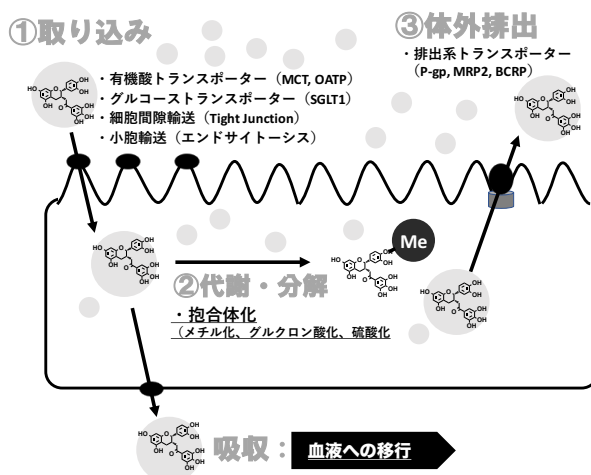


図1. 腸管組織におけるポリフェノール類の吸収代謝

SD ラット小腸膜を用いた透過試験（10～60 分）の後、時間毎の小腸切片を MALDI-MS イメージング解析し、想定されるポリフェノール類代謝物（メチル化、硫酸化、グルクロン酸化、ならびにこれら組み合わせ）の有無、代謝動態、代謝を受ける部位（頂膜側、膜内、側基底膜側）を網羅的に可視化した。側基底膜側の透過液（血液側）を LC-TOF-MS 分析に供し、代謝変換されたポリフェノール類の同定、定量を行い、ポリフェノールあるいは代謝物の吸収動態を定量評価した。

腸管排出挙動の可視化

腸管排出に関わる ABC トランスポーターの阻害剤（シクロスポリン A）存在下におけるポリフェノール透過試験を実施し、腸管からの管腔排出動態の可視化を試みた。

アシル化アントシアニン類の腸管吸収動態の可視化評価

本法を紫人参由来アシル化アントシアニン類の腸管吸収性評価に応用し、アシル化アントシアニン類の腸管吸収動態の可視化を試みた。

4. 研究成果

① ポリフェノール類の腸管吸収経路の可視化

まず、腸管内ポリフェノール類の可視化のための MALDI-MS イメージング法の最適化を実施した。対象成分としては、非吸収性の機能性ポリフェノールである theaflavin-3'-*O*-gallate (TF3'G) および、そのモノマー構成単位であり腸管吸収可能な epicatechin-3-*O*-gallate (ECG)を用いた。申請者らがこれまでに開発したポリフェノール MALDI-MS 検出のための新規マトリックス剤である Nifedipine¹ (20 mg/mL) を用いることで、腸管組織内の ECG が可視化され、さらにマトリックス添加剤としてフィチン酸 (5 mM) を添加することで、そのシグナル強度の増強が確認された。本 MALDI-MS 条件を用いることで、Ussing Chamber 透過試験後の小腸組織切片より、腸管透過過程の ECG が検出され、頂膜側から側基底膜側への透過挙動が可視化された (図 2)。また、本腸管 MALDI-MS imaging 法により、TF3'G 透過試験後の小腸組織切片において TF3'G が頂膜側に局在することが可視化された。透過試験後の透過液中の各ポリフェノールを LC-TOF/MS 分析に供した結果、ECG は腸管膜を透過しているのに対して、TF3'G の吸収は認められなかった (図 2)。このことは、非吸収性ポリフェノールが一度、腸管組織内に取り込まれていることを初めて示すものであった。

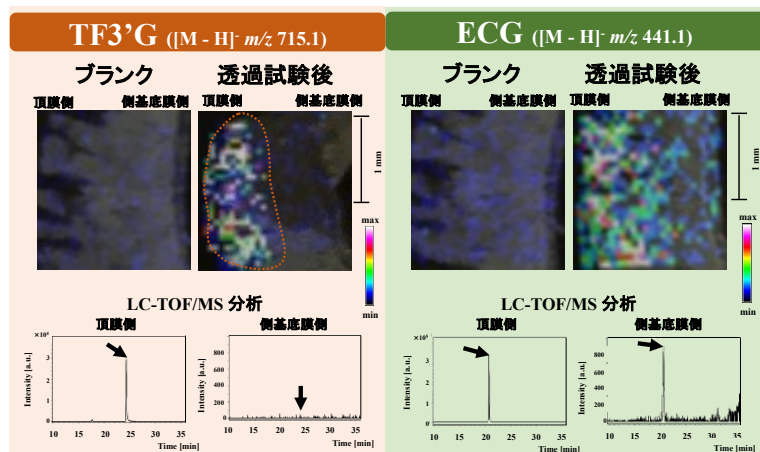


図2. 本研究にて構築した腸管 in situ MALDI-MS イメージングによる TF3'G および ECG の腸管透過過程の可視化

また、阻害剤試験を用いた Ussing Chamber 透過試験において、ECG および TF3'G とともに、モノカルボン酸トランスポーター (MCT) 阻害剤 (フロレチン) および有機アニオントランスポーター (OATP) 阻害剤 (エストロン-3-硫酸) を用いることで、腸管組織において可視化されたポリフェノールの蓄積が明らかに減弱した。したがって、ECG および TF3'G は MCT および OATP を介して、腸管組織に取り込まれることが初めて可視化された。

② ポリフェノール類の腸管代謝動態の可視化

次いで、MALDI-MS イメージング法の最大の特徴である多成分の一斉可視化を、腸管組織内でのポリフェノールの代謝過程の可視化に応用した。ECG を透過させた腸管膜における代謝物としては、主として硫酸化体およびメチル化体が可視化された。さらに、透過試験 60 min までの組織を経時的に採取し、MALDI-MS イメージングに供したところ、ECG は腸管取り込み後に最初に硫酸化を受け、続いてメチル化等の代謝を受けることが示された。

③ ポリフェノール類の体外排出挙動の可視化

さらに、それら取り込まれたポリフェノール類の腸管排出機構について検討を行った。管腔への排出を担う ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーターの阻害剤 (シクロスポリン A) 存在下における透過試験を実施したところ、可視化された TF3'G の蓄積が顕著に増大することが明らかになった。したがって、本 in situ 腸管 MALDI-MS イメージング法により非吸収性の重合

ポリフェノールである TF3'G は一旦、腸管組織内に取り込まれた後、ABC トランスポーターにより排出されることが初めて可視化された。腸管上皮細胞を用いた *in vitro* 評価系では、細胞内への取り込みと細胞表面への吸着を識別することが不可能であることから、本 MALDI-MS イメージング法は管腔排出の実際を評価可能な唯一の手法であると言える。

④ 機能性ポリフェノールの腸管吸収性評価への応用

抗炎症作用など様々な機能が報告されているアントシアニン類は、その体内吸収性ならびに代謝挙動に関する報告例が少なく、天然に存在するアシル化アントシアニン類の体内吸収・代謝動態については、ほとんど明らかになっていない。そこで、本研究にて構築した腸管 *in situ* MALDI-MS イメージング法を適用し、アシル化アントシアニン類の腸管吸収挙動の可視化評価を試みた。その結果、紫人参由来のアシル化アントシアニン類 [cyanidin-3-*O*-(6-*O*-feruloyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopyranoside (Cy3XFGG) など] は、そのままの形で腸管吸収され、ラット循環血へ移行することが明らかになった。さらに、その腸管吸収にはグルコーストランスポーター (GLUT2) および有機アニオントランスポーター (OATP) が関与していることが明らかになった。腸管組織内における代謝・分解物の一斉可視化を試みたところ、Cyanidin が可視化されたことから、アシル化アントシアニンの一部は腸管内においてアグリコンへ分解されることが明らかになった。したがって、本研究により構築した *in situ* 腸管 MALDI-MS イメージング法は、ポリフェノール類の腸管吸収・代謝プロセスを可視化可能な新たな機能評価手法であることが示された。

参考文献

- (1) Nguyen, H.-N.; Tanaka, M.; Komabayashi, G.; Matsui, T. The photobase generator nifedipine as a novel matrix for the detection of polyphenols in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2016**, *51* (10), 938–946.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tae Hun Hahm*, Mitsuru Tanaka*, Huu-Nghi Nguyen, Ayaka Tsutsumi, Koichi Aizawa, Toshiro Matsui	4. 巻 334
2. 論文標題 Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-guided visualization analysis of intestinal absorption of acylated anthocyanins in Sprague-Dawley rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 127586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2020.127586.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 咸 兌勳, 松井利郎, 田中 充	4. 巻 39
2. 論文標題 MALDI-MSイメージング法による食品成分の腸管吸収過程の可視化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 食品加工技術	6. 最初と最後の頁 12-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Huu-Nghi Nguyen, Tae Hun Ham, Toshiro Matsui, and Mitsuru Tanaka	4. 巻 31
2. 論文標題 Detection and Visualization of Food-derived Polyphenols by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 2333-2346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18494/SAM.2019.2371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen Huu-Nghi, Tanaka Mitsuru, Li Baorui, Ueno Tomoya, Matsuda Hideki, Matsui Toshiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Novel in situ visualisation of rat intestinal absorption of polyphenols via matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39405-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Mitsuru, Dohgu Shinya, Komabayashi Genki, Kiyohara Hayato, Takata Fuyuko, Kataoka Yasufumi, Nirasawa Takashi, Maebuchi Motohiro, Matsui Toshiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Brain-transportable dipeptides across the blood-brain barrier in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42099-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 2件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 咸 兌勳, Huu Nghi Nguyen, 田中 充, 堤 彩香, 相澤 宏, Qing Qiang Hu, 松井利郎
2. 発表標題 MALDI-MS Imaging法を用いたアシル化アントシアニン類の腸管吸収挙動の解明
3. 学会等名 第74回日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsuru Tanaka, Toshiro Matsui
2. 発表標題 Importance of the ADME Analysis for Peptide Functionality
3. 学会等名 Frontiers in Chemistry, Biology, and Earth Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuru Tanaka, Tae Hun Ham, Huu-Nghi Nguyen, Toshiro Matsui
2. 発表標題 Visualization of absorption and metabolism of polyphenols in rat intestine by nifedipine aided-MALDI-MS imaging
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 充、グエン フナイ、李宝瑞、松井 利郎
2. 発表標題 腸管を作用場とする機能性ポリフェノールの吸収・代謝挙動の可視化
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019 大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 咸 兌勤, Huu-Nghi Nguyen, 田中 充, Baorui Li, 山本采佳, 松田秀喜, 松井利郎
2. 発表標題 MALDI-MS Imaging法を用いた非吸収性ポリフェノールの腸管分布解析
3. 学会等名 平成30年度 日本食品科学工学会西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsuru Tanaka
2. 発表標題 Analytical methods for evaluation of food compounds
3. 学会等名 The Third International Five-Sense Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清原隼人, Huu-Nghi Nguyen, 田中 充, Baorui Li, 山本采佳, 松田秀喜, 松井利郎
2. 発表標題 MALDI-MS imaging法を用いた ポリフェノール類の腸管吸収挙動の可視化
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第65回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tae Hun Ham, Huu Nghi Nguyen, Mitsuru Tanaka, Ayaka Tsutsumi, Qing Qiang Hu, Koichi Aizawa, Toshiro Matsui
2. 発表標題 Intestinal absorption of visualized anthocyanins in rats by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging technique
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------