

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05888

研究課題名(和文)新規脂溶性ビタミンの創生と検索

研究課題名(英文)Creation and search of new fat-soluble vitamins

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンD(VD)は様々な疾病予防に関与している。日光浴による生合成は加齢、地理、季節による影響を受け、含有食品は限られるため、摂取不足になりやすい。これに対して、申請者はVD摂取機会の増加を目的として、VD4、5、6、7の生体利用性に関する研究を行ってきた。また、脂溶性成分に対する吸収促進法を適用することで少ない摂取機会での効率的な吸収についても検討を行ってきた。VD5、6、7の有機合成を通じ、新規VDの創製を思いつき、新規VDを2つ有機合成し、物質特許を出願した。この成分は天然に存在し、食経験済みの可能性があること、体内に吸収されて活性化体へ代謝変換されて後、機能を発揮する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規物質のVDを有機合成した。天然に存在・食経験の可能性を想定して出発物質を選んだ。また、腸管細胞モデル実験では、VD3に近い吸収性を示した。天然に存在すれば、食事からのVDの摂取・吸収の機会増加に貢献できる。

VDの機能は吸収後に活性化体へ代謝変換された後に発揮される。計算科学的手法で、既存のVDと同等の機能や低い機能が示されたが、カルシウム吸収能が低い場合は逆に薬品としての利用が想定できる。過去に活性化VD3は、抗がん剤として臨床試験に供されたが、高カルシウム血症などの副作用が出たため、カルシウム吸収能の低いVDが求められたことがある。このように、食品や薬品としての潜在性を有している。

研究成果の概要(英文)：Vitamin D (VD) has been implicated in the prevention of various diseases. Biosynthesis by sun exposure is affected by aging, geography, and season, and foods containing VD are limited, so intake is likely to be inadequate.

In response, the applicant has conducted research on the bioavailability of VDs4,5,6,7 with the aim of increasing opportunities for VD intake. Through the organic synthesis of VDs 5, 6, and 7, we came up with the idea of creating new VDs, and we have synthesized two new VDs and patented them. Two new VDs were synthesized organically and a substance patent was applied for. This component is naturally occurring and may be food-experienced, and may exhibit a function after absorption and metabolic conversion to an activator in the body.

研究分野：食品科学

キーワード：ビタミン 腸管吸収 有機合成 代謝変換 フレイル ロコモティブシンドローム

## 1. 研究開始当初の背景

ビタミン D(VD)は申請者が研究対象としている脂溶性栄養機能成分の1つである。脂溶性成分は水に溶けにくいいため消化管で吸収されにくいという特徴を有しており、その吸収を高める技術開発を研究目的の1つとしている。VDは欠乏するとクル病や骨軟化症を発症するだけでなく、うつ病、免疫力低下、癌(前立腺癌、乳癌、大腸癌)の発症との関係も指摘されている。

VD3は皮膚で日光(正確に言えばUVB)により7-デヒドロコレステロールから生成されるので、日光浴は重要である。日照量が低下する冬季にうつ病が発生しやすく、インフルエンザや風邪に罹患しやすくなることが知られるが、冬季に限らず、紫外線による皮膚がんリスク上昇、美白意識の高まりから日光を浴びる時間は減っていて、体内VD3濃度は低くなっていることが懸念される。季節だけではなく、地理的要因(緯度)でもUVBの強度に差があるので、沖縄、つくば、札幌の3か所間では必要な血中VD濃度に到達するまでに必要な日光浴の時間に大きな差がある。さらに、高コレステロール血症などでスタチン系の薬剤を投与されていると、HMG-CoA活性が阻害されるが、もし、皮膚においても皮脂成分の1つコレステロールの生合成が阻害されてしまうならば、(VD3及びコレステロールの前駆体である7-デヒドロコレステロールの生合成が阻害されるので)当然、日光を浴びてもVD3は生成できないことになる。このような懸念が実際無くても、加齢により皮脂の分泌が低下すると、結果として日光を浴びてもVD3の生合成能は低下する。だから、VDを日光浴にだけ頼ることに注意が必要である。

一方で、VDは食品から摂取できるものの、食材の種類は限られる。VD2はキノコから、VD3は魚介類から摂取できるが、これら以外の食品にはほとんど含まれていない(日本食品標準成分表7訂、現在は8訂)。さらに、福島原発事故以降、放射性物質がキノコや魚に特に濃縮しやすいことが広く知られるようになり、これらの摂取を控えるケースも過去にはあった。そのため、VD欠乏に陥る危険性が危惧される。妊婦のVD欠乏では母乳中のVDが少ないため、新生児の骨形成にも影響が出ることが報告されている。母乳中にもVD欠乏の観点からは注意を払う必要がある。すなわち、食事からの摂取においても不十分である可能性がある。このような問題に対して解決を図っていく必要がある。

## 2. 研究の目的

VDにはVD2とVD3以外にもVD4-VD7があるが、一般的には知られていない。申請者らは、以前、VD2とVD3以外のVD摂取の可能性、すなわちVD4-VD7の生体利用性を研究してきた。これは、VD2とVD3以外の摂取も視野に入れて、VD欠乏に対応しようとするものである。本研究の内容はこれをさらに押し進めて、既知成分ではなく例えば、VD8あるいはVD9となるような新規VD候補の創生によってVD欠乏解消を目指すものである。

(1)有機合成：有機合成によりVDを調製する。調査段階では、新規候補物質の構造を見出しており、これらの有機合成後には物質特許の取得を目指した。よりVD活性(後述のVD様作用)の高いものを創造したいと考えていた。有機合成品は食品産業的には使いにくい。なぜなら、消費者は安全性に関わらず合成品を忌避する傾向が強いからである。しかしながら、新規VDは天然成分を出発物質とするため、有機合成した成分が実はすでに天然に存在しており、我々にとって食経済済みである可能性がある。例えば、サイクロデキストリンは、酵素的に合成された成分であるが、天然に存在していることが合成後に証明された例である。そこで新規VD合成品を標準物質として用い、天然に存在しているかどうかの探索研究も行う。天然に存在が確認できたならば、本研究は学術的のみならず、食品産業への貢献の可能性も出てくる。

(2)腸管吸収：脂溶性栄養機能成分は単に摂取すれば効果が得られるというのではなく、腸管吸収、代謝を経る必要があるため、これらの点も研究課題とする。特に、腸管吸収は、吸収可能な状態(可溶化状態)で検討する必要がある。吸収経路の研究では、使用する腸管細胞の吸収受容体遺伝子をゲノム編集によりノックアウト(KO)した細胞を作製する。

(3)代謝変換：VDは吸収後、肝臓と腎臓等において2段階で活性化体へ代謝変換されて機能を発揮する。新規VD候補成分も同様に活性化体へ変換されなければ栄養機能は発揮できないはずである。そこで代謝についても解析する。トランスウエル(吸収試験で度々用いられる)を流用して肝臓/腎臓細胞株を使って代謝を調べる。

(4)栄養機能性：活性化体の栄養・機能研究についても検討する。活性化体を有機合成出来た場合は、腸管モデル細胞で候補成分活性化体のCa吸収能を調べる(栄養)。合成が出来なかった場合、VD活性化体へ変換可能な前立腺癌の細胞増殖抑制効果を調べる(機能性)。In vitro

での癌細胞増殖抑制効果は基本的な機能性で、これを示すことができれば、経験的に他の機能性（抗肥満効果や抗炎症作用等）も示す可能性が高いため、今後の展開が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規 VD 候補成分の有機合成、分取・精製、機器分析（構造決定）

出発物質を含む天然バルク混合物から各種クロマトグラフィーで出発物質の分取・精製を試みる（代表者）。後々、代謝産物である 25 位に OH が導入可能な側鎖を有する物質を選んでおく。精製後、有機合成を開始する。あるいは、先に混合物で有機合成反応を行い、最終反応生成物から目的成分を単離、構造決定を行う（分担者）。

#### (2) 新規 VD 候補成分の天然存在の探索

出発物質は天然物であり、それ由来の VD が存在している可能性がある。なぜなら、我々が有機合成する VD 候補成分の前駆体が天然に存在したとして、それに屋外で日光が当たればいいからである。このような考え方にに基づき様々な天然物中に新規 VD が存在するかどうか検索する。天然物から抽出・精製、合成 VD を標準品として HPLC で分析・同定を試みる（担当：代表者）。最終的には LC-MS で構造を確認する（担当：分担者）。

#### (3) 新規 VD 候補成分の腸管吸収性の検討

新規 VD 候補成分を腸管吸収形態である可溶性ミセル化した後、腸管モデル Caco-2 細胞での吸収性を評価する。脂溶性ビタミンは、腸管内で一部がコレステロール受容体依存の経路で吸収されることが知られており、その受容体 KO 細胞を使用して依存率を調べる（担当：代表者）。

#### (4) 新規 VD 候補成分の代謝変換の検討

VD は吸収後に代謝変換を受けて機能を発揮するので、新規 VD 候補成分が細胞内で代謝変換されたものを機器分析で確認する。VD は、肝臓と腎臓とで酵素的に 2 段階で代謝されて活性化体へと変換されるが、腎臓以外では、前立腺での変換が知られている。トランスウエルを使つての細胞モデルの組み合わせ、すなわち、Apical 側を肝臓細胞、basal 側を腎臓細胞とすることで、25-OH-VD から 1,25-di(OH)-VD と段階的に生成することが確認できるかもしれない。肝臓モデル細胞に HepG2 を、腎臓細胞は HEK293 で試す。前立腺癌細胞は PC-3 を使う（担当：代表者）。

#### (5) 栄養・機能性のシミュレーションと活性化体の栄養・機能性評価

PASS オンライン検索 (<http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/>) で、活性化体での栄養・機能性をシミュレーションする。例えば、代謝前の構造での VD 様作用は、VD2: 0.865, VD3: 0.790, VD4: 0.882 というような Pa 値が算出され、この値が高いほど活性が高いと見積られる。活性化体でのシミュレーションを行う。活性化体の有機合成が可能であれば（担当：分担者）、腸管細胞にて VD の Ca 吸収能を評価する（栄養試験）。必要量を有機合成で確保できない場合、肝臓細胞で、VD 候補成分を 25-OH-VD に代謝変換させた後に抽出して前立腺癌細胞へ供することを検討する（機能性試験）。前立腺癌細胞内で活性化体（1,25-diOH-VD）へと変換されて、アポトーシス（細胞死）が誘導され、結果として細胞増殖が抑制されると考える。こちらの作用も PASS で見積もることが可能である。増殖抑制効果は MTT アッセイにて行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規 VD 候補成分の合成、分取・精製、機器分析（構造決定）

2019 年度は出発物質を使って有機合成をはじめた。出発物質の入手が困難であった。目的物の構造決定には最終的な有機合成物の純品数 mg 得る必要があり、逆算すると出発物質に 1g は必要である。その量を市販品で入手できない可能性もあった。出発物質を天然から得るには、その天然物と有機溶媒が大量に必要、精製操作も必要で、時間と労力もかかる。天然から精製する方法の文献調査をしつつ、試薬（出発物質）を扱う代理店をあたった。その結果、かなり高額であるが出発物質の市販品を購入できた。

有機合成、精製、構造決定を行い、新規 VD 候補成分を 2 つ得た。2020 年に、これら新規成分の物質特許を出願（特願 2020-112582）した。

#### (2) 天然に新規 VD 候補成分の存在を探索する

結果として、文献調査だけに留まり、実際に天然中に検索するところまでたどり着けなかった。しかしながら、文献調査により、新規 VD 候補成分の前駆体（これに UVB が照射されると、VD に変換される）が天然物中にいくつか報告されていることがわかった。そうした天然物が日光を浴びることで、新規 VD 候補成分がその中に生成する可能性がある。あるいは、その天然物を人為的に日光下に置く、もしくは UVB 照射すれば、新規 VD 候補成分が生成するはずである。今後、研究を継続し、明らかにしていきたい。

### (3) 有機合成した新規 VD 候補成分の腸管吸収性の検討

腸管モデル細胞 Caco-2 を用いて吸収性を調べた。脂溶性成分が吸収されるためには、可溶化されている必要があるため、VD を含む混合ミセルを調製して細胞へ供した。

#### コンベンショナルな方法での腸管吸収（細胞への取込）

一般的な 24 ウェルプレートに細胞をまき、3 週間培養を継続することで分化させて、これを腸管細胞とした。混合ミセルを細胞へ供して、一定時間後に、細胞及び混合ミセルを回収した。2 つの新規候補成分（それぞれ、New1VD、New2VD とする）と VD3 の 3 種類間の吸収を比較した。その結果、New2VD の吸収量が最も多く、VD3、New1VD の順であった。

#### トランスウェルを使つての腸管吸収（細胞への取込、リンパへの透過）

トランスウェルはインサートに細胞を培養し、細胞への取込（Apical 側）とリンパへの透過（Basal 側）の両方を同時に測定できる。ただし、コンベンショナルなプレート使用時と比較して実験が非常に複雑になり、時間と労力が大きくなる。

細胞を 3 週間程度培養して分化させるのは（コンベンショナルなプレート使用時と同じであるが、インサート側の電気抵抗を測定して分化を確認する。しかし、今回、電気抵抗がなかなか上がっていかず、その理由がわからないため、長期に渡るトラブルとなった。

我々が所属する研究室における（電気抵抗が上昇しない）過去の例を調べた結果、培地に使う FBS（ウシ胎児血清）が古いとそのような現象が起こることがわかった。そこで、新しい FBS を購入して、それを使つて培養してみたが、改善されなかった。つまり、今回は FBS が原因ではなかった。

他に考えられる理由として、培養の容器がロットによっては細胞がうまく育たないことがあり、トランスウェルそのものに原因があるのではないかと疑った。研究室のトランスウェルのどれを使つても駄目で、ロット間ではなく、おそらく、トランスウェルの購入から時間が経過しており、手持ちのトランスウェル全てが劣化していることが原因ではないかと思われた。そこで、新しいトランスウェルを注文したが、COVID-19 禍のせいで、納品までかなりの時間がかかり、また納品されても少量しか入手できなかった。このため、実験に時間がかかった。

トランスウェルには、インサートの膜の素材によって、顕微鏡で観察できるもの（ポリエステル）と出来ないもの（ポリカーボネート）がある。顕微鏡で観察できる方は値段が高い。観察できる方も購入し、細胞観察しつつ、電気抵抗を測定した。新しく購入したトランスウェルでは電気抵抗が上昇した。観察により、細胞分化後は細胞間のつなぎ目が不鮮明で一枚膜に見えた（見た目も分化している）。

実験に供した結果、取込はコンベンショナルなプレートを用いた時と同様の傾向であったが、透過については、New2VD と VD3 で差はなく、それらよりは劣って New1VD の順であった。

いずれにしても、新規 VD 候補成分は、腸管細胞に吸収されることが示唆された。

#### 促進拡散に係る因子の KO 細胞の樹立とそれを用いた吸収経路の検討

脂溶性成分の腸管吸収経路には、単純拡散と促進拡散があると考えられている。多くの脂溶性機能成分はコレステロールの受容体 / トランスポーターと共通であることも報告されている。VD も同様である。そこで、新規 VD 候補成分についても、このような促進拡散の関与について検討を考えた。阻害剤や、siRNA など過去に用いてきたが、ゲノム編集による KO 細胞の使用を考え、これを外部に委託して作製を試みた。クローン株が 4 種納品された。それぞれ、目的タンパクが KO されているかどうかをウェスタンブロットで確認したところ、出ないはずのバンドが出てきた（KO されていない可能性）。さらに、DNA シーケンスを調べてみると、KO されていないことが判明した。残念ながら、この細胞を使つて促進拡散を検討することは断念した。

#### リン脂質による VD 吸収促進とそのメカニズムの検討

我々はこれまでに、リゾリン脂質（リン脂質の腸管での加水分解物）がカロテノイドに対して腸管吸収を促進することを示してきた。カロテノイド以外の脂溶性成分として、VD に対しても同様の促進効果を示すことを明らかにした。促進効果のメカニズムが細胞側に起因するため、様々な脂溶性成分に（吸収促進効果を）適応できる可能性がある。そのメカニズムに細胞間（内）コレステロールの関与があることが、文献などから推測された。今回、これを確かめるため、実際にリゾリン脂質を細胞へ添加し、コレステロールを測定することで、これの関与が確認した。これについては論文として 2021 年に発表した（Nutrients, 13, 1126, 2021）。

### (4) 新規 VD 候補成分の代謝変換の検討

VD は肝臓と腎臓で 2 段階の代謝変換を受けて活性化されて機能を発揮する。したがって、新規 VD 候補成分も機能を発揮するためには代謝変換される必要があるはずである。肝臓での代謝

変換はヒト肝臓モデルとして広く利用されている細胞株 HepG2 を用いた。液中乾燥法により培地中に均一に VD を分散させて細胞へ供した。当初、VD2 で実験系を組み立てていたが、文献調査により、VD2 では目的とする代謝産物が HepG2 で生成されない可能性がわかった。VD3 では生成する。この違いの理由は不明なので、候補成分でもうまく代謝されない可能性は残る。また、活性酸素で変換される可能性も指摘されていたため、抗酸化剤 (1,2-dianilinoethane, DPPD) の、また、酵素による変換の確認のため、酵素阻害剤 (ketoconazol, KCZ) を添加し、これらの影響を調べた。

まずは、DPPD と KCZ の細胞毒性を調べた。文献通りの濃度では、特に KCZ の毒性が高かった。細胞毒性は MTT アッセイで検討した。その結果、毒性の出ない濃度 (終濃度) は、DPPD では 100  $\mu$ M、KCZ では 1  $\mu$ M と決定した。代謝処理後の HPLC 分析の結果、VD3 代謝産物と考えられるいくつかのピークが出てきたが、標品の 25-OH-VD3 と同じ位置にピークがあった。スペクトルも同様のパターンを示した。このピークは KCZ 存在下ではほとんど生成しなかった。DPPD 存在下ではわずかに生成量が減少した程度であった。これらの結果から、代謝産物は酵素によって変換されていることが示唆された。この代謝産物が、25-OH-VD3 であることを LC-MS 等の機器分析で決定する予定だったが、期間内にそこまで進めなかった。この実験は継続しており、今後、構造を明らかにする。実験系が出来上がったら、新規 VD 候補成分についても同様に行い、代謝産物の解析を行う。

腎臓での代謝についても検討予定だったが、上で述べたようにトランスウエルのトラブルにより、こちらも期間内に実験が進まなかった。予備試験として、腎臓細胞として使った 293 細胞にて VD2 の代謝産物の何らかのピークが出るところまで確認した。

#### (5) 栄養・機能性シミュレーションと活性化体の栄養・機能性評価

機能性研究を培養細胞とトランスウエルを使って行うことは、上で述べた理由と同じで断念した。PASS オンラインで新規 VD 候補成分の栄養・機能性をシミュレーションした。シミュレーションは、活性化 VD の構造で行い、他の VD2-VD7 (の活性化体) と比較した。その結果、VD に共通して認められるような機能を有することが推測された。VD3 の作用の強さを上回る機能はほとんどなかったが、すでに述べたように、カルシウム吸収能が低い場合は逆に、副作用の低い抗癌剤として期待が持てる面もある。少なくとも、シミュレーション結果は、何らかの機能 (性) 成分としての潜在力があることを示唆していた。今後、細胞試験、動物実験等の機能 (性) 試験に供するだけの価値があると言える。

#### (6) 発表などについて

上記中に述べなかったが、VD については、2021 年に依頼講演を行った。今後、未発表分を論文で公表できた後には、職場での成果展示会 (ポスターもしくはリモート) での発表、研究成果情報 (HP もしくは冊子体) での発表などを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kotake-Nara Eiichi, Komba Shiro, Hase Megumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Uptake of Vitamins D2, D3, D4, D5, D6, and D7 Solubilized in Mixed Micelles by Human Intestinal Cells, Caco-2, an Enhancing Effect of Lysophosphatidylcholine on the Cellular Uptake, and Estimation of Vitamins D' Biological Activities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu13041126	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 セコステロイド構造を有する化合物	発明者 小竹英一、今場司朗	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-112582	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	今場 司朗 (Komba Shiro) (20332273)	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  (82111)	

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
---------	---------