

機関番号：32714

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500726

研究課題名（和文） トコトリエノールの体内プロドラッグ作用とその機能解明

研究課題名（英文） The prodrug action and its function of tocotrienol in vivo.

## 研究代表者

清瀬 千佳子 (KIYOSE CHIKAKO)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：60392528

研究成果の概要（和文）：ビタミンEの一種である $\gamma$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコトリエノールは体内で代謝を受けた後、 $\gamma$ -カルボキシエチルヒドロキシクロマン体（ $\gamma$ -CEHC）となって尿中に排泄される。この $\gamma$ -CEHCは代謝物でありながら、ナトリウム利尿性ホルモン様物質として生理活性を持つことが知られている。以前、このようなビタミンE同族体を高食塩食負荷したラットに投与すると体内で $\gamma$ -CEHC体で代謝されることで、体内の過剰なナトリウムを尿中へ排泄する（プロドラッグ作用）ことを明らかにした。そこで、組織中のCEHC体の測定法を確立することで、体内での $\gamma$ -CEHC体の産生とプロドラッグ作用についてさらなる検討を行った。その結果、 $\gamma$ -トコフェロールよりも $\gamma$ -トコトリエノールの方がより多く $\gamma$ -CEHCになることが明らかになり、さらにこのプロドラッグ作用には作用を示すある一定の作用域（高食塩負荷量とビタミンEの投与量）が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：It is known that  $\gamma$ -Tocopherol and  $\gamma$ -tocotrienol, one of the vitamin E analogs, are metabolized to  $\gamma$ -carboxyethyl-hydroxychroman ( $\gamma$ -CEHC) in vivo. On the other hands,  $\gamma$ -CEHC has the physiological activity for sodium excretion into rat urine. Then, this study was further investigated on the pro-drug action and the production of  $\gamma$ -CEHC from  $\gamma$ -tocopherol and  $\gamma$ -tocotrienol in vivo. Consequently, it is clear that  $\gamma$ -tocotrienol is metabolized to  $\gamma$ -CEHC more than  $\gamma$ -tocopherol. Moreover, it is suggested that it may exist the functional domain on the pro-drug action of vitamin E analogs.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：食品科学、栄養化学、ビタミン学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学B

キーワード：ビタミン、栄養学、食品機能、生体機能利用、バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本では食の欧米化、運動不足が重なり生活習慣病の罹患率が益々上昇している。

このような状態の中、日本人の意識は生活習慣病の予防を医薬品に頼るのではなく、食品成分で出来ればという考えにシフトしてきている。そ

の結果、特定保健用食品や機能性食品の市場が急激に拡大化している。脂溶性ビタミンの一種であるビタミン E は天然にトコフェロール類とトコリエノール類が存在し、共にクロマン環のメチル基の位置と数の違いによって、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の4種類に分かれる。また、トコフェロールとトコリエノールの違いはフィチル側鎖に二重結合を有しているか否かの違いである。食品中での分布としては $\alpha$ -トコフェロールや $\gamma$ -トコフェロールが主に植物油や種実類に多く含まれているのが特徴で、トコリエノールはパーム油に特異的に分布している。このように食品中にはトコフェロール類やトコリエノール類が様々に分布しているが、これらの食品を摂取しても体内に存在するのはほとんどが $\alpha$ -トコフェロールである。これは肝臓内に存在する $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質( $\alpha$ -TTP)がビタミン E 同族体を識別し、 $\alpha$ -トコフェロールを優先的に結合するからであると現在推測されている。 $\alpha$ -TTP に結合した $\alpha$ -トコフェロールは膜間輸送され、VLDL に組み込まれて、血中に放出される。この $\alpha$ -TTP と各種ビタミン E 同族体との affinity がビタミン E の生物活性値と強い正の相関を示すことから、ビタミン E の体内動態には $\alpha$ -TTP が大きく関わっていると考えられている。一方、 $\alpha$ -TTP に結合出来なかった非 $\alpha$ -トコフェロール( $\gamma$ -トコフェロールやトコリエノール等)は肝臓内で速やかに代謝されると考えられている。ビタミン E の代謝系に関してはこれまで、ビタミン E の尿中代謝物は E 酸及びそのラクトン体(Simon metabolite)であると考えられていた。この物質はクロマン環が酸化されて開環した後に側鎖が開裂したもので、ビタミン E は体内で抗酸化作用を発揮した後に代謝されると考えられていた。ところが、1995 年になってヒト尿中より 2,5,7,8-tetramethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman ( $\alpha$ -CEHC)を同定され、これはクロマン環が開環せず、側鎖が $\omega$ -oxidation、 $\beta$ -oxidation が起こって生成されたものであり、この CEHC 体がビタミン E の体内状態の真の marker になるのではないかということが示唆された。また、これまでの Simon metabolite は CEHC 体が artifact に酸化されたもので、主要な代謝産物は $\alpha$ -CEHC であると推察された。このように、これまで $\alpha$ -トコフェロールに比べて他のトコフェロールやトコリエノール類は上記に示した理由で体内利用も低いことからあまり重要視されていなかった。しかし、近年トコリエノール摂取による新しい機能性について報告されはじめている。トコリエノールの機能性を

大別すると、ビタミン E の機能として最も popular な「抗酸化作用」としての効果と「beyond antioxidant」としての効果が報告されている。まず、「抗酸化作用」としての効果として、申請者はストレプトゾトシンを投与して非常に酸化ストレスをかけたラットにトコリエノールミックスを摂取させると網膜において $\alpha$ -トコフェロールと同等の過酸化脂質生成抑制効果があったことを報告した。しかし、その時の網膜中のトコリエノールの存在量は $\alpha$ -トコリエノールが若干存在していただけで、他の同族体についてはほとんど検出されなかった。このことから、トコリエノールが何がしかの形で網膜まで輸送されて、抗酸化作用を発揮した可能性が推察された。しかし、トコリエノールの未変化体自体がその時点でほとんど存在しないということから考えると、トコリエノールはかなり早い速度で抗酸化作用を発揮した後に別の形に代謝されてしまっているか、または CEHC 体として網膜まで輸送されて、抗酸化作用を発揮しているかということが推測されるが、この点は明らかになっていない。もう一つの機能性として「beyond antioxidant」としての効果であるが、これも申請者は高食塩食摂取時に $\gamma$ -トコリエノールをラットに投与すると尿中へのナトリウム排泄を促進するという結果、を報告した。これは $\gamma$ -トコリエノールは高食塩食を摂取させた時のみ過剰なナトリウムを排泄してくれることで、さらにそのような体内状態では、 $\gamma$ -トコリエノールから $\gamma$ -CEHC への代謝も促進された。このような結果より、体内の状態によってトコリエノールのターンオーバーが何かによってコントロールされている可能性が示唆された。以上のことから、トコリエノールは未変化体としての機能性とターゲットとなる細胞内もしくは肝臓内で素早く代謝を受けて、生理活性物質(CEHC 体)として機能性を発揮する(プロドラック作用)可能性が推察される。それゆえ、細胞内でどれだけの代謝物(中間代謝物も含む)が存在するか定量的に測定し、未変化体との関係を比較し、トコリエノールの未変化体としての作用とプロドラック作用の機能解明を行う必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

ビタミン E 同族体の中でトコリエノール類は肝臓内に存在する $\alpha$ -TTP との affinity が低いために各抹消組織に輸送されにくいと考えられ、それゆえ生理活性が期待できないと推察されていた。しかし、トコリエノール投与による機能性が少しずつ報告されはじめている。申請者もこれまで、in

vivoにおける酸化ストレスに対する効果として、網膜での過酸化脂質生成の抑制作用を報告した。しかし、効果が確認されたにも関わらず、トコトリエノール自身が網膜を始め、他の組織にほとんど蓄積されておらず、この効果がトコトリエノール自身の効果なのかどうか不明である。一方、「beyond antioxidant」としての機能性として、申請者は高食塩摂取時における $\gamma$ -トコトリエノール投与は体内に蓄積した過剰なナトリウムを体外に排泄される働きを明らかにし、その効果は $\gamma$ -トコトリエノールが体内で $\gamma$ -CEHCに代謝されて、その代謝物が生理活性物質として作用(プロドラッグ作用)していることを報告した。従って、トコトリエノールは未変化体として、また代謝物としてそれぞれ働く可能性が考えられるが、どちらが生理活性物質としての本体なのか、また両方がそれぞれの機能に対して本体であるのか、明らかになっていない。そこで、本研究期間内でトコトリエノールがどのような形態で作用するのか、その生理活性物質としての本体を同定すると同時に上記以外の新規の機能性を発見し、すべてを含めてのトコトリエノールの体内作用機序について明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

#### (1) 組織中 CEHC の定量法の確立

まず、最初に体内における代謝物の産生を見るためには、体内組織中のビタミン E 代謝物の測定系が確立されなければならない。これまで、組織中の CEHC の定量法はほとんど確立されておらず、唯一、LC-MS を使用する測定法しか報告されていない。申請者は以前、尿中ならびに血中の CEHC を HPLC を用いて測定する方法を確立し、報告した<sup>1)</sup>が、この測定方法では組織中の CEHC を安定かつ正確に測定することができない。そこで、この既存の測定方法を改良して組織中の CEHC を測定できるように試みた。検討項目はカラムならびに前処理方法で、最終的にはラットに肝臓、腎臓、脳、脂肪組織を用いて添加回収率を求め、高い回収率が得られたところで、終了とすることにした。

1) C.Kiyose, H.Saito et al., *Lipids*, **36**, 467-472, 2001

#### (2) $\gamma$ -トコフェロール及び $\gamma$ -トコトリエノールの高食塩食負荷ラットにおけるプロドラッグ作用の比較 I

申請時での研究計画での降圧効果に対する検討を行う前に、 $\gamma$ -トコフェロールならびに $\gamma$ -トコトリエノールそれぞれどちらにより強いナトリウム排泄作用があるかどうか、これまで同時に比較検討をしたことがない。そこで、 $\gamma$ -トコフェロール並びに $\gamma$ -トコトリエノールのナトリウム排泄効果の比較検討を行うことにした。今回はラットに摂取させる食塩負荷量を 2% として検討を行うことにした。5 週齢 SD 系雄ラット 24 匹を C 群(コントロール食群)、N 群(高食塩食負荷群 2w/w%)、N $\gamma$  群(高食塩食 +  $\gamma$ -トコフェロール投与群)、N3 群(高食塩食 +  $\gamma$ -トコトリエノール投与群)の 4 群に分け、まずはコントロール食及び高食塩食にて 4 週間飼育した。飼育終了後、各ビタミン E をラット 1 匹あたり 10mg 単回と投与し、投与後すぐに代謝ケージに移し、3 時間毎 24 時間まで採尿を行った。採尿終了後、再び各ビタミン E を 1 匹あたり 10mg 単回投与を行い、投与 12 時間後に解剖し、血液及び各組織を採取した。

#### (3) $\gamma$ -トコフェロール及び $\gamma$ -トコトリエノールの高食塩食負荷ラットにおけるプロドラッグ作用の比較 II

(2) で述べた実験結果を受けて、さらなる検討を行った。5 週齢 SD 系雄ラット 24 匹を C 群(コントロール食群)、C $\gamma$  群(コントロール食 +  $\gamma$ -トコフェロール投与群)、C3 群(コントロール食 +  $\gamma$ -トコトリエノール投与群)、N 群(高食塩食負荷群 2w/w%)、N $\gamma$  群(高食塩食 +  $\gamma$ -トコフェロール投与群)、N3 群(高食塩食 +  $\gamma$ -トコトリエノール投与群)の合計 6 群に分け、まずはコントロール食ならびに高食塩食群で 4 週間飼育した。今回は、実験(2)よりも、食塩負荷量を 5w/w% と、より高食塩負荷状態にして検討を行うことにした。飼育終了後、各ビタミン E をラット 1 匹あたり 10mg 単回投与し、これを 3 日間連続して行った。3 回目の投与終了後、代謝ケージに移し、前回と同様に 3 時間毎 24 時間まで採尿を行った。採尿終了後、再度各ビタミン E を投与し、12 時間後に解剖、血液及び各組織を採取した。

### 4. 研究成果

#### (1) 組織中 CEHC の定量法の確立

CEHC の定量法であるが、以前報告した方法とはまずカラムの径を 2.1mm から 4.6mm にし、そ

れに伴い流速を0.2mL/分から0.8mL/分に引き上げ検討を行うことにした。

前処理に関しては、前回の報告の方法では、組織中のCEHCが前処理中に酸化されてしまっていることが推察されたため、水溶性抗酸化剤のアスコルビン酸の量を5倍にし、さらに脂溶性抗酸化剤のBHTをヘキサン中に添加することでCEHCの酸化抑制を試みたところ、肝臓、腎臓、脳中の $\alpha$ -CEHC並びに $\gamma$ -CEHCがともに90%以上の回収率を得られることに成功したので、この改良法を新たな組織中のCEHC定量法として用いることとした。

## (2) $\gamma$ -トコフェロール及び $\gamma$ -トコトリエノールの高食塩食負荷ラットにおけるプロドラッグ作用の比較 I

図1に、各群における3時間毎24時間までの尿中ナトリウム排泄量を示した。

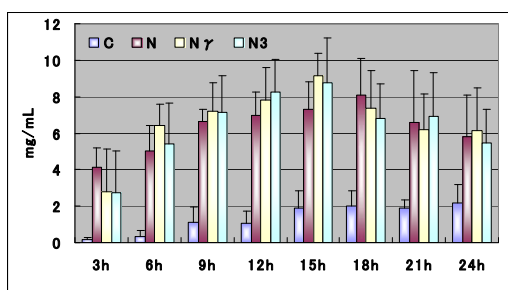


図1. 3時間毎の尿中ナトリウム排泄量

投与12時間から15時間あたりで、 $\gamma$ -トコフェロール及び $\gamma$ -トコトリエノールを投与した $N\gamma$ 群、 $N3$ 群で $N$ 群に比べて若干尿中へのナトリウム排泄が促されているように思われるが、有意な差は見られなかった。しかし、尿中への $\gamma$ -CEHCの排泄量を見たところ、 $N\gamma$ 群よりも $N3$ 群の方が有意に多く代謝物が排泄されていた。

以上の結果より、食塩食負荷が2w/w%では、 $\gamma$ -トコフェロールならびに $\gamma$ -トコトリエノールとも $\gamma$ -CEHCは $\gamma$ -トコトリエノールからの方が多く産生されているものの顕著なナトリウム排泄効果は見られなかった。以前、 $\gamma$ -トコフェロール並びに $\gamma$ -トコトリエノールそれぞれで検討を行ったところ、同物質ともそれぞれ顕著なナトリウム排泄促進を示したことから、この効果が発揮されるにはある一定の作用領域が存在する可能性が考えられた。そこで、食塩負荷量を2w/w%から5w/w%に引き上げて、さらに検討を行うことにした。

## (3) $\gamma$ -トコフェロール及び $\gamma$ -トコトリエノールの高食塩食負荷ラットにおけるプロドラッグ作用の比較 II

図2に各ビタミンE投与から3時間毎24時間までの尿中ナトリウム排泄量を示した。前回の実験と比較すると、投与6時間目あたりで有意な差は見られなかったものの $\gamma$ -トコフェロール及び $\gamma$ -

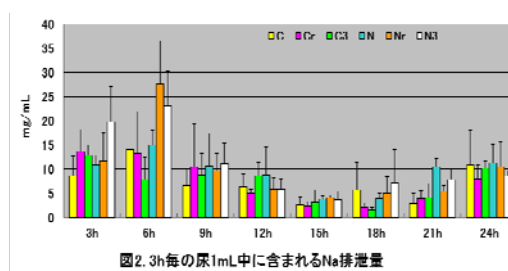


図2. 3h毎の尿1mL中に含まれるNa排泄量

トコトリエノール投与でナトリウム排泄を促す傾向が見られた。そこで、尿中へのカリウムとナトリウム排泄比を示したところ、図3に示すように、 $N$ 群よりも $N3$ 群で有意に高く、 $\gamma$ -トコフェロールより

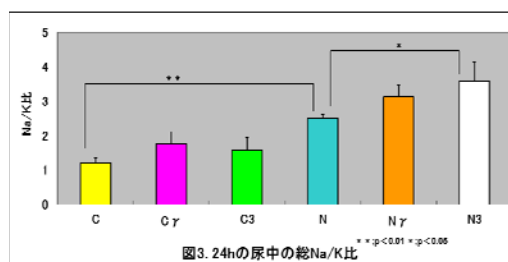


図3. 24hの尿中の総Na/K比

も $\gamma$ -トコトリエノールの方がナトリウム排泄に関しては強い効果があることが明らかとなった。しかし、実験(2)と実験(3)のデータを比較すると、 $\gamma$ -トコフェロール及び $\gamma$ -トコトリエノールがプロドラッグ作用として機能するにはある一定の作用領域がある可能性が示唆され、例えば、高食塩食負荷状態では、かなり高用量の食塩摂取でないところのプロドラッグ作用が現れないことが推察された。最初の研究計画では、降圧効果や糖尿病による網膜への影響等も検討する予定であったが、このようにプロドラッグ作用としての作用域(障害の度合いとビタミンE投与量)が存在するとしたら、それぞれの障害による作用域を見極めてから疾病モデルの検討に入るべきだと思われる。今後、プロドラッグ作用としての作用域の検討を引き続き行っていきたいと考えている。

## 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)

[学会発表](計1件)

- ① 斎藤一輝、池田実可、永沼雄次、谷地理恵子、武藤知衣、五十嵐脩、清瀬千佳子;ラットにおけるビタミンE同族体とその代謝物の体内動態における経時的変化。

第22回ビタミンE研究会、平成22年1月28～29日(京都)。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

清瀬 千佳子(KIYOSE CHIIKAKO)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号:60392528