

機関番号：82111

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780138

研究課題名 (和文) ナノスケール化と細胞内輸送の修飾による機能性因子の効率的送達システムの確立

研究課題名 (英文) Development of delivery systems of functional food factors by vesiculation and modulation of transepithelial transport

研究代表者

渡辺 純 (WATANABE JUN)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 主任研究員

研究者番号：10374729

研究成果の概要(和文):本研究では、フラボノイドのベシクル担持条件を最適化するとともに、小腸上皮の細胞内輸送を修飾することで食品中の機能性成分とりわけフラボノイドを効率よく吸収させて、その機能を最大限に発揮させるためのシステム構築を目指した。均一サイズのベシクルにフラボノイドを分配させることにより、フラボノイドが飽和溶解度を超えて安定に分散化可能であること、Caco-2 細胞を用いた評価系においてヘスペレチンの腸管透過性が向上する可能性を示した。さらに、水相中で不安定なケルセチンの安定化が可能であった。これらの作用機序をフラボノイドの分配挙動の解析および蛍光標識ベシクルを用いた解析より考察した。Caco-2 細胞のジペプチド Trp-Gly 処理により発現変動する遺伝子群を明らかにし、食品成分による小腸上皮細胞内輸送の修飾の作用点となる可能性を示した。

研究成果の概要 (英文) : In this research, we aimed to enhance the absorption of functional food factors, especially flavonoids, by optimization of vasiculation condition of flavonoids and by modulation of transepithelial transport in the intestine. When flavonoids were incorporated to vesicles, flavonoids were stably suspended beyond their saturated concentrations, and quercetin was protected from degradation in aqueous media. Permeated hesperetin across the Caco-2 cell monolayer was significantly increased when hesperetin coexisted with lipid vesicles. Several genes related to intracellular transport were down- or up-regulated by the treatment with dipeptide Trp-Gly in Caco-2 cells, suggesting that these genes possibly become the target for modulation of transepithelial transport by food components.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ナノスケール化、細胞内輸送、フラボノイド、Caco-2 細胞、ヘスペレチン、ベシクル

1. 研究開始当初の背景
食品中には種々の生体調節機能を有する

多様な機能性成分が存在しており、これらを
経口的に摂取した場合にも生理機能が発揮

される例が多く報告されている。しかしながら、経口摂取した機能性成分の血中濃度は、静脈内投与などにより全身性に投与された場合よりも低く、吸収を促進することで機能性の促進が期待される。一方、特に薬学分野においては薬剤を効率よく送達するためのデリバリーシステムが広く研究されており、ベシクルに担持したインスリンは経口投与でも活性を保持したまま吸収されて血糖値低下を示すことが報告されている。このようなデリバリーシステムの中には食品用途にも利用可能な手法が存在するにも関わらず、研究はあまり行われていなかった。

申請者らは、薄膜法により作製した脂質ベシクルにフラボノイドの1種であるヘスペレチンが脂質二重膜に分配されること、細孔径の異なる膜にベシクルを強制透過することで種々の粒径をもつ粒径分布の狭いベシクルが調製可能であることを明らかにしている。また、ベシクルはその脂質組成により、胆汁酸をはじめとする消化管内環境に耐性を示すことも報告されている。

ナノスケールに粒子化した機能性成分の吸収経路として、小腸上皮細胞の細胞内輸送が考えられる。例えば、抗アレルギー薬クロモグリク酸ナトリウムはベシクル化により経口投与した場合の吸収性が向上するが、この作用機序は細胞内輸送の促進によることが報告されている。すなわち、細胞内輸送を促進することによって、ナノスケールに粒子化された機能性因子の吸収促進が期待できる。申請者らは、小腸上皮からの物質吸収モデルである Caco-2 細胞単層膜を用いて、巨大分子の輸送に影響する Trp-Gly をはじめとするペプチドを低アレルゲン化小麦粉、脱脂ゴマ種子といった食品素材から単離・同定している。Trp-Gly の作用機序の解析により明らかとなる小腸上皮細胞内輸送修飾の作用点は、機能性成分の吸収性向上の新たなターゲットとなり得ると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、食品中の機能性成分を効率よく吸収させてその機能を最大限に発揮させるためのシステムを構築するための科学的基盤を解析することを目的とした。具体的には：

(1) 機能性成分とりわけフラボノイド類の吸収を促進するためのベシクル担持の条件を最適化し、吸収促進機構を解明するために消化管内動態の解析を行うこと

(2) 申請者らが同定した小腸上皮細胞内輸送を修飾するペプチドの作用機序を分子レベルで解析すること

(1)および(2)の解析により、高効率に生体調節機能を発揮する「ナノスケール化食品素材」という技術概念の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) ベシクルへの分配によるフラボノイドの安定分散化と分配挙動の解析

卵黄ホスファチジルコリンを構成脂質とするベシクルを脂質薄膜水和法で作製し、エクストルージョン法でサイズを均一化した。フラボノイド（ヘスペレチンおよびケルセチン）溶液を添加し、ベシクルに分配させた。分配ベシクルの粒子径を動的光散乱法により測定した。超遠心分離によりベシクルに分配したヘスペレチンと水相中のヘスペレチンを分離し、それぞれのヘスペレチン量を定量して分配係数を求めた。また、ヘスペレチンの飽和溶解度を求めた。ケルセチン分配ベシクルをリン酸緩衝液(pH 7.4)中で保持し、一定時間経過後の残存量を定量した。

(2) ベシクルへの分配によるフラボノイドの消化管吸収性への影響

ヒト結腸ガン由来細胞株 Caco-2 を透過性メンブレン上に培養し、小腸上皮様に分化させた。上側のチャンバーに(1)で調製したヘスペレチン分配ベシクルを添加し、一定時間後に下層チャンバー内液を回収し、ヘスペレチンを定量した。また、(1)で調製したベシクルにコール酸を添加して24時間静置した後に動的光散乱法により粒子径を測定し、ベシクルのコール酸耐性を評価した。

(3) FRET 標識ベシクルの調製とその消化管吸収性の解析

脂質溶液に蛍光色素 (DiI および DiO) を添加し、(1)と同様に薄膜水およびエクストルージョン法により粒子径が約 50, 100, 200nm の FRET 標識ベシクルを調製した。この Caco-2 細胞単層膜の透過性を(2)と同様に調べた。

(4) Trp-Gly 処理による Caco-2 細胞の遺伝子発現変化の解析

Trp-Gly 存在下および非存在下で透過性メンブレン上に培養した Caco-2 細胞を処理し、総 RNA を抽出した。DNA マイクロアレイを用いて発現量の変化する遺伝子を検索した。

4. 研究成果

(1) ベシクルへの分配によるフラボノイドの安定分散化と分配挙動の解析

エクストルージョン法により 50, 100, 200nm 程度のサイズに制御されたベシクルが得られた。さらに、50nm 程度のベシクルを超音波処理することにより 30nm 程度までサイズを小さくできた。これらのベシクルを用いてフラボノイドを高濃度に安定分散化できた。とりわけ水系への溶解性の低いヘスペレチンについてベシクルへの分配挙動を詳細

に解析した。その結果、ベシクルサイズが小さくなるほど分配係数は減少し、ベシクル構成脂質にコレステロールを添加することによっても分配係数が減少した。分配係数と飽和溶解度から水相に溶解、ベシクルに分配、あるいは析出しているヘスペレチンの量比を見積もった (図1)。その結果、例えば脂質濃度 10mM、サイズ 100nm のベシクルを用いると、ヘスペレチンは飽和溶解度である 0.32mM を超えて 1.8mM 程度まで安定に分散化可能であると考えられた。ケルセチンは中性付近の pH の緩衝液中では速やかに分解されたが、ベシクルと共存することによって安定性が向上した (図2)。

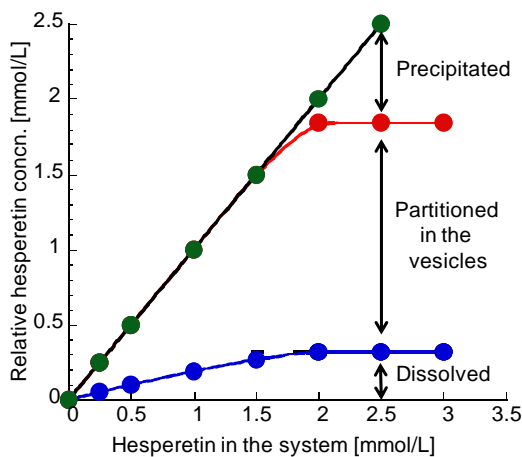


図1 ベシクル存在下でのヘスペレチンの存在形態

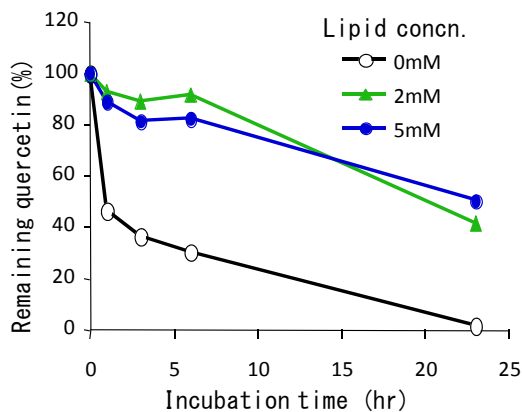


図2 ベシクル共存によるケルセチンの安定化効果

(2) ベシクルへの分配によるフラボノイドの消化管吸収性への影響

ヘスペレチンのベシクルへの分配によって、腸管からの吸収性が促進される可能性が示され、この吸収性促進は粒子サイズに依存する可能性が示された (図3)。ヘスペレチンの飽和溶解度以下の添加濃度では、ヘスペレチン透過率はベシクル非共存下と比較して共存下で低く、飽和溶解度以上の濃度ではベ

シクル共存系で透過量が増大した。これは、ヘスペレチンの下部チャンバーへの透過速度は上部チャンバーの水相中に溶解したヘスペレチン濃度が規定し、透過により減少した分のヘスペレチンの供給速度がベシクル共存系で速いからであると推察された。ベシクル構成脂質へのコレステロール添加によってベシクルへのヘスペレチンの分配係数は減少したが、コール酸耐性は顕著に増大し、卵黄ホスファチジルコリン：コレステロールの比が3:1のベシクルは生理的濃度の胆汁酸に対して安定であると考えられた。以上より、飽和溶解度を超過してフラボノイドを安定的に分散化し、さらに消化管内で容易に崩壊せずにフラボノイドの吸収促進効果を示す送達系を作製するための技術的基盤が構築できたと考えている。

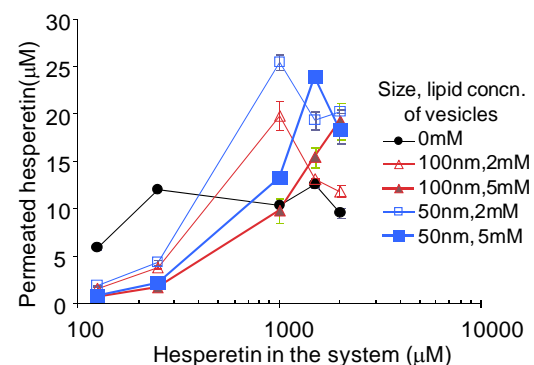


図3 ベシクル存在下でのヘスペレチンのCaco-2細胞単層膜透過量

(3) FRET 標識ベシクルの調製とその消化管吸収性の解析

Caco-2細胞単層膜を通過し、下部チャンバー内液に FRET が観察されたことより、一部のベシクルが腸管から吸収される可能性が示された。透過量はベシクルサイズが小さいほど大きかったが、(2)で観察されたベシクル共存下でのヘスペレチン透過促進を説明できる程度ではなく、ベシクル共存によるヘスペレチン透過促進にベシクル自体の透過による寄与は小さいものと考えられた。

(4) Trp-Gly 処理による Caco-2 細胞の遺伝子発現変化の解析

Caco-2細胞の Trp-Gly 処理により、複数の細胞内輸送関連遺伝子 (RAB12, RAB6 interacting protein2, syntaxin binding protein) の発現が減少した。また、細胞骨格関連遺伝子 (tubulin β -polypeptide, gelsolin, ankyrin repeat domain37) の発現増大が見られ、Trp-Gly の細胞内輸送修飾のターゲットとなる可能性が示唆された。

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)

①Asuka Ikeyama, Maki Kikugawa, Seigo Sato, Jun Watanabe, Sosaku Ichikawa, Preparation and characterization of lipid vesicles containing a hydrophobic flavonoid, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **108**(S1), S145 (2009).

他投稿中3件

〔学会発表〕(計4件)

①池山明日香、喜久川真記、佐藤誠吾、渡辺純、市川創作、脂質ベシクル共存下におけるフラボノイドのCaco-2細胞単層膜透過特性、日本農芸化学会2010年度大会

② Jun Watanabe, Asuka Ikeyama, Maki Kikugawa, Sosaku Ichikawa, Coexistence of lipid vesicles modulates transepithelial transport of flavonoids, International conference on Food Applications of Nanoscale Science - Japan 2010

③Asuka Ikeyama, Maki Kikugawa, Seigo Sato, Jun Watanabe, Sosaku Ichikawa, Preparation and characterization of lipid vesicles containing a hydrophobic flavonoid, Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009.

④大泉祐樹、池山明日香、喜久川真記、佐藤誠吾、渡辺純、市川創作、フラボノイドに対する脂質ベシクルの安定化効果、日本農芸化学会2011年度大会

〔図書〕(計1件)

① 渡辺純、CMC出版、食品素材のナノスケール化が経口摂取した際の生体応答性に及ぼす影響、「フードナノテクノロジー」(中嶋光敏、他編)、2009、pp.232-238

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 純 (WATANABE JUN)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品機能研究領域 主任研究員

研究者番号：10374729

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

市川 創作 (ICHIKAWA SOSAKU)

筑波大学大学院 生命環境科学研究科 准教授

研究者番号：00292516