

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500962

研究課題名(和文)カロテノイドの選択的吸収機構と生体利用性に関する研究

研究課題名(英文)Selectivity in the intestinal absorption of carotenoids and their bioavailability

研究代表者

小竹 英一(Kotake, Eiichi)

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素材科学研究領域・主任研究員

研究者番号：20547236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトは40種類ものカロテノイドを食品から摂取するが、組織に蓄積されるものは限られている。生体にはカロテノイドに対する選択的吸収機構が存在し、生体利用性と密接に関わっていると仮説を立て、腸管細胞モデルを使って3つの観点から研究を行った。吸収受容体が選択性に影響を与える1要因であることがわかったが、全吸収における依存率は多いケースで20-30%であった。受容体を介さない単純拡散も併存しており、その寄与率の方が高いことがわかった。排泄トランスポーターも選択性に与える因子と予想したが、その関与を見出すまでには至らなかった。一方、吸収を制御する食品成分を見出し、吸収促進メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although no less than 40 carotenoids are ingested under usual dietary habits, several carotenoids and their metabolites have been found in human tissues. We hypothesized that there are selectivity in the intestinal absorption, and then studied the three points: the absorption receptor, excretion transporters, and absorption control by food components. Absorption mediated by receptor was 20-30% of total absorption. Both facilitated diffusion and simple diffusion would mediate the intestinal absorption, but the contribution of simple diffusion is higher than that of facilitated diffusion. The excretion transporters may also participate in the selectivity of intestinal absorption. However, we have not found the participation. On the other hand, we found that some dietary compound lipids affected the absorption of carotenoids. These lipids enhanced the absorption by decreasing the intercellular barrier integrity by cell-to-cell/cell-matrix adhesion.

研究分野：細胞生化学

キーワード：カロテノイド 腸管吸収 グリセロ糖脂質 生体利用性

1. 研究開始当初の背景

カロテノイドのような食品機能性成分は消化管から吸収されて体内組織に到達し、はじめて様々な生活習慣病予防効果を発揮できる。ヒトに必須のビタミンA、その前駆体である β -カロテンの栄養効果は良く知られているが、近年、様々な種類の非プロビタミンAカロテノイドの有する癌細胞増殖抑制作用、抗肥満効果、抗アレルギー作用を含む多様な機能性が注目されている。しかし、脂溶性であるカロテノイドの生体利用性は低く、吸収・蓄積機構に関しては不明な点が多い。フコキサンチンとネオキサンチンはアレン結合のような特徴的な化学構造を有しており、ワカメ由来フコキサンチン、ホウレンソウ由来ネオキサンチンには強力な癌細胞増殖抑制作用がある[1,2]。これらカロテノイドの吸収・蓄積については、マウスでフコキサンチンとネオキサンチンが β -カロテンと同じレベルで吸収される一方、ヒトがワカメやホウレンソウを摂取した場合にはこれらに含まれる β -カロテンやルテインは吸収されるが、フコキサンチンとネオキサンチンの血中濃度は定量限界以下であった[3]。このような選択的な吸収のメカニズムは不明であった。

脂溶性のカロテノイドの小腸上皮細胞への取り込み機構は従来考えられてきたような受動拡散以外にも、近年、コレステロール吸収受容体の1つ、Scavenger Receptor class B Type 1 (SR-B1)を通じた能動拡散がカロテノイドの腸管吸収や組織への移行に部分的に関わっていることが明らかにされつつある。SR-B1 ノックアウトマウスにおいてカロテノイドの吸収が完全に抑制できていないことから、受動拡散及び SR-B1 両方が同時に関与していると推測される。受動拡散による吸収は、カロテノイドの極性と相関関係がある[4]が、一方の能動拡散におけるカロテノイドの極性や化学構造との関係について今後、その詳細を明らかにする必要がある。また、吸収受容体だけでは説明できない部分も多く、トランスポーターによる管腔側への排泄の関与も調べる必要がある。

申請者は、カロテノイドの腸管吸収を促進する食品因子を複数見出している。様々な種類のリン脂質[5,6]、葉緑体でカロテノイドと共存する糖脂質の加水分解物、モノアシル型糖脂質がカロテノイドの腸管吸収を促進することを予備試験的に見出していた。その吸収促進機構は、腸管細胞膜の流動性亢進と考えられていたが[7]、実際メカニズムは不明であった。選択性及び吸収促進のメカニズムについて明らかにすることはカロテノイドの生体利用性向上につながる。

2. 研究の目的

ヒトは40種類ものカロテノイドを食品から摂取するが、組織に蓄積されるものは限られている。生体にはカロテノイドに対する選

択的吸収・蓄積機構が存在し、生体利用性と密接に関わっていると考えられるが、その機構については未解明である[8]。消化管でのカロテノイドに対する選択的吸収機構を解明し、カロテノイドの生体利用性向上を図るため、本研究では、(1)吸収受容体によるカロテノイド吸収選択性、(2)排泄トランスポーターによるカロテノイド排出選択性、(3)カロテノイドの腸管吸収を高める食品因子の探索・作用機構、これら3点について解析する。

3. 研究の方法

ヒト腸管モデル細胞として分化 Caco-2 (3週間培養)を、必要に応じてヒト肝臓細胞モデル HepG2 を使用した。カロテノイドはタウロコール酸、オレイン酸、モノオレイン、リゾリン脂質から構成される腸管混合モデルミセル中に可溶化させて細胞へ添加し、37、2時間インキュベート後に細胞への取込み量を HPLC で定量した。(1)吸収受容体によるカロテノイド吸収選択性については、吸収受容体阻害剤や siRNA を用いて受容体依存率を解析する。(2)排泄トランスポーターがカロテノイドの吸収選択性に及ぼす影響についても阻害剤や siRNA 等を用いて解析する。(3)カロテノイドの腸管吸収を高める食品因子の探索・作用機構については、我々が日常的に葉物野菜からカロテノイドと一緒に摂取しているグリセロ糖脂質について検討する。これらの脂質が細胞膜透過性に影響を与えて吸収を高める可能性を検討するため、蛍光プローブを封入したりポソームを使用した。さらに、細胞間結合性がカロテノイドの吸収に与える影響を調べるため、通常は3週間培養する Caco-2 を1-5日培養にしたものや、トリプシン処理して分散した Caco-2 細胞(細胞間結合無し) 必要に応じて本来細胞間結合を有さない浮遊細胞を用いてカロテノイドの吸収を調べた。

4. 研究成果

(1) 吸収受容体 SR-B1/トランスポーター NPC1L1 の吸収に与える影響について

いくつかの極性の異なるカロテノイドについて、SR-B1/NPC1L1 の阻害剤であるエゼチミブを用いてその依存率(促進拡散依存率)を算出した。極性の高い種類ほど SR-B1/NPC1L1 依存率は低くなり、 β -カロテン>ルテイン>アスタキサンチン>ネオキサンチン \geq フコキサンチン=フコキサンチノールとなった。 β -カロテンでは依存率が20-30%、フコキサンチンではほぼ0%であった。カロテノイドの種類により SR-B1/NPC1L1 経路での吸収に差があるため、このことが選択的吸収の1つの要因であることが明らかとなった。阻害剤では SR-B1 と NPC1L1 のどちらが関与しているかがわからないため、siRNA によるノックダウン試験を検討した。しかしながら、細胞密度が低いときにリポフ

エクシオンで siRNA 導入を行う一般的な手法が、3 週間の培養後に使用する Caco-2 細胞には適用が難しいという問題に直面した。コントロール siRNA を用いてリポフェクション試薬の種類や条件を変えたり、細胞密度を変えたりしたが、タンパクレベルでのノックダウン率は約 50%程度であったため、この手法での検討は断念した。

また、 β -カロテンでの促進拡散による吸収が 20-30%ということは、残りの 70 - 80% は単純拡散によると考えられる。すなわち、カロテノイドの吸収には促進拡散と単純拡散が並存しているが、単純拡散が主要な経路である。このため、どのような極性のカロテノイドでも一部は単純拡散経路で吸収されるはずであり、ヒトの血液中に全く見出せない理由は他にも存在すると予想できる。

(2) 排泄トランスポーターがカロテノイドの吸収選択性に及ぼす影響

摂取しているが血中に検出されない理由として、排泄トランスポーターが特定のカロテノイドを管腔側へ排出している可能性を考えると説明がつく。植物ステロール等はかなり量を摂取しているが、排泄トランスポーター ABCG5/8 により排出されていると考えられており、健康者の血中にはほとんど検出されない。実際に ABCG5/8 に異常があると植物ステロールが吸収されるが代謝できないため、シトステロール血症という病気になる。

本研究では代表的な排泄トランスポーターである MDR1 と、ABCG5/8 について影響を調べた。MDR1 の阻害剤は様々あるが、ベラパミルを用いて MDR1 の基質となるローダミン 123 の吸収阻害を確認してから使用した。しかしながら、カロテノイドの吸収におけるベラパミルの阻害効果は全く認められなかった。HepG2 を使っても同様の結果であった。次に、ABCG5/8 の関与について検討した。ABCG5/8 の生理的な基質と考えられる植物ステロールを阻害剤として利用して調べた。しかし、この場合でもカロテノイドに対する吸収への関与は認められなかった。これらの結果から、カロテノイドの吸収選択性に他の排泄トランスポーターが関与している可能性が考えられた。あるいは全く別のメカニズムが関与しているのかもしれない。

(3) カロテノイドの腸管吸収を高める食品因子の探索・作用機構

選択的吸収に関わる受容体は分かったが、排泄経路に関しては未知のままである。我々は、メカニズムは不明ながら、カロテノイドの吸収促進を促す成分についての研究も行ってきた。特にホスファチジルコリンが吸収を抑制する一方で、その加水分解物であるリゾホスファチジルコリンの促進効果が顕著であった。様々な他のリン脂質の効果を調べた結果、これらの物質の持つ両親媒性の性質が吸収に影響を与えていることを見出して

いた[6,7]。本研究ではグリセリン脂質に似た構造と同様の両親媒性を有するグリセロ糖脂質に着目した。これは葉物野菜などでカロテノイドと一緒に摂取している成分であることから、その吸収に大きな影響を与えていることが予想できる。

グリセロ糖脂質として、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG)、これらのリゾ体 (MGMG、DGMG、SQMG) の計 6 種類について検討した。その結果、ジアシル型の DGDG と SQDG は細胞によるカロテノイド (カロテン及びルテイン) 吸収を抑制した。分光光度計によりスペクトル解析を行ったところ、ホスファチジルコリンとこれらのジアシル型糖脂質存在下では混合ミセル中でカロテノイドが凝集体・多量体を形成しており、その結果、ミセルからカロテノイドが遊離しにくくなって結果として腸管細胞による吸収が抑制されていることがわかった。一方、リゾホスファチジルコリンやリゾ脂質の DGMG と SQMG は、カロテノイドの吸収促進効果を示した。また、MGDG と MGMG はどちらも促進効果はほとんど示さないか、わずかであった。

次にリゾ脂質によるカロテノイド吸収促進メカニズムを検討した。最初にこれらの脂質が細胞膜透過性を高めて吸収促進した可能性を調べた。蛍光プローブ入りのリポソーム (細胞膜モデル) にこれらの脂質を添加して漏れ出た蛍光色素の量を測定した。その結果、MGMG > DGMG > SQMG となり、吸収促進効果とは一致しなかった。すなわち、この効果に細胞透過性以外の要因が関与していることがわかった。

そこで次に、細胞間結合の関与を調べた。上記方法で述べたような細胞間結合の少ない、及び全く無い細胞を用意して、カロテノイドの吸収を調べた。その結果、浮遊細胞や分散細胞では対照ミセルからのカロテノイドの吸収量が一番多いという意外な結果となった。しかし、培養日数が長くなり、細胞間結合が強くなるにつれて、その吸収量は低下していった。一方で、DGMG、SQMG、リゾホスファチジルコリン含有混合ミセルからのカロテノイドの吸収は細胞間結合の有無に関わらず、ほぼ一定であり、細胞がコンフルエントになると、対照ミセルと比較して吸収促進効果が現れた。この結果は細胞間結合性がカロテノイドの吸収促進効果に大きな影響を及ぼす要因であることを示していた[9]。その他、これらの脂質がカロテノイドの細胞基底側への透過・分泌についても促進効果があることも明らかにしている[10]。

これらの成分の研究から細胞間結合が無い、あるいは少ない状態では、前出の文献[4]で報告したようなカロテノイドの極性と吸収に相関 (極性が低いものほど吸収されやすい) が認められなかった。このような関係に

細胞間結合が関わっていることも見出した。ただし、この場合でもヒト血中に全く見出せないカロテノイドが存在する理由については説明できない。やはり排泄トランスポーターの関与の証明が重要である。血中に検出できないカロテノイドに対しては、上記の吸収促進成分を用いて吸収を高めるよりも、排泄経路を明らかにして排泄トランスポーターの阻害による吸収促進を考えていく必要がある。

<引用文献>

Kotake-Nara E, Asai A, Nagao A, Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells, *Cancer Lett.*, 220, 2005, 75-84

Kotake-Nara E, Kushiro M, Zhang H, Sugawara T, Miyashita K, Nagao A, Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells, *J. Nutr.*, 131, 2001, 3303-6

Asai A, Yonekura L, Nagao A, Low bioavailability of dietary epoxyxanthophylls in humans, *Br. J. Nutr.*, 100, 2008, 273-7

Sugawara T, Kushiro M, Zhang H, Nara E, Ono H, Nagao A, Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells, *J. Nutr.*, 131, 2001, 2921-7

Yonekura L, Tsuzuki W, Nagao A, Acyl moieties modulate the effects of phospholipids on beta-carotene uptake by Caco-2 cells, *Lipids*, 41, 2006, 629-36.

Kotake-Nara E, Yonekura L, Nagao A, Effect of glycerophospholipid class on the beta-carotene uptake by human intestinal Caco-2 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2010, 209-11

Kotake-Nara E, Nagao A, Effects of mixed micellar lipids on carotenoid uptake by human intestinal Caco-2 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 2012, 875-82

Kotake-Nara E, Nagao A, Absorption and metabolism of xanthophylls, *Mar. Drugs*, 9, 2011, 1024-37.

Kotake-Nara E, Yonekura L, Nagao A, Glyceroglycolipids affect uptake of carotenoids solubilized in mixed micelles by human intestinal Caco-2 cells, *Lipids*, 2015, in press
DOI 10.1007/s11745-015-4033-9

Kotake-Nara E, Yonekura L, Nagao A, Lysoglyceroglycolipids improve the intestinal absorption of micellar fucoxanthin by Caco-2 cells, *J. Oleo Sci.*, 2015 投稿準備中

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2件)

小竹英一、脂溶性機能成分の可溶化と腸管吸収 カロテノイドの吸収促進 , *New Food*

Industry, 査読無, 57, 2015, in press

Kotake-Nara E, Yonekura L, Nagao A, Glyceroglycolipids Affect Uptake of Carotenoids Solubilized in Mixed Micelles by Human Intestinal Caco-2 Cells, *Lipids*, 査読有, 2015, in press, DOI :10.1007/s11745-015-4033-9.

[学会発表](計3件)

小竹 英一、カロテノイドの腸管吸収、代謝と機能、平成 27 年度日本農芸化学会東北支部シンポジウム(岩手県、盛岡市、岩手大学)、2015年7月11日

小竹 英一、カロテノイドの消化吸収と代謝、第 21 回植物油栄養懇話会講演(東京、如水会館)、2013年11月1日

小竹 英一、Yonekura Lina、長尾 昭彦、ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 によるカロテノイドの取込みに対するグリセロ糖脂質の影響、日本農芸化学会 2013 年度大会(宮城県、仙台、東北大学)、2013年3月26日

[その他]

小竹 英一、長尾 昭彦、脂質による脂溶性機能成分の生体利用性向上、食品試験研究成果情報、26号、2014、54-55

http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/nfri/2013/nfri13_s11.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小竹 英一 (Kotake Eiichi)

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素材科学研究領域・主任研究員

研究者番号：20547236

(2)研究分担者

長尾 昭彦 (Nagao Akihiko)

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素材科学研究領域・上席研究員

研究者番号：40353958