

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660094

研究課題名(和文)食品抗酸化成分の生体内ナノデリバリーシステム研究

研究課題名(英文)Invention of nano delivery systems with food antioxidants in the body.

研究代表者

宮澤 陽夫(MIYAZAWA, Teruo)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20157639

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):アルツハイマー脳(AD脳)の発症要因に、アミロイドの蓄積凝集と脂溶性抗酸化分子の低値による酸素障害の発生が考えられている(M. Citron, Nature Reviews, 9, 387-398, 2010)。確実なAD治療法は無く、主な理由は、治療薬や抗酸化物質の輸送が血液脳関門(blood brain barrier)により制限されるためである。そこで本研究は、“経口摂取型で血液脳関門を通過できる生体毒性のないナノ粒子”を新たに開発し、これを利用して脳の酸化障害を抑制する抗酸化分子の脳到達を可能にする研究を進めて、AD予防や治療に本研究成果を役立てることを目的とした。

研究成果の概要(英文):Rise of oxidative stress in the brain is enhanced by the aggregation of amyloid-beta protein and decrease of lipophilic antioxidants. This phenomenon is associated as one factor in the generation of Alzheimer's disease (AD). However, there is no certain treatment or cure for AD. This may be due to the blood brain barrier (BBB), which limits brain uptake of various bioactive compounds (including small molecules). Therefore, in the present study, we prepare the “lipophilic antioxidant encapsulated biodegradable nanoparticles” and challenge to improve brain lipophilic antioxidant concentrations (by decreasing oxidative stress in the brain) by oral intake.

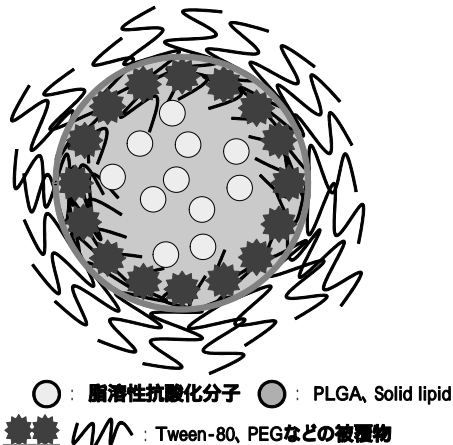
研究分野：食品科学

キーワード：ナノデリバリーシステム ナノ粒子 食品成分 抗酸化物質 動物実験

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門は、脳毛細血管の内皮細胞同士が密着に結合することで化合物の非選択的な脳移行を制限している。近年、ナノ粒子を利用した脳への薬物輸送研究が世界的に試みられているが、投与法は専ら静注による血中への直接注入法である。世界的に経口摂取によるナノ粒子の脳移行に関する研究はほとんど行われていない。さらに、脳をターゲットとした経口摂取型ナノ粒子を活用した脂溶性抗酸化分子の開発の報告は全くない。そこで、本研究では“経口摂取型で血液脳関門を通過できる生体毒性のないナノ粒子”を新たに開発し、脳の酸化障害を抑制する抗酸化分子の脳到達を可能にする研究を進めることで、AD 予防や治療に本研究成果を役立てることを目的とする(参考論文1)。

経口投与によるナノ粒子の脳送達研究は、稀ではあるが過去に数例報告されている。これらの報告では、生分解性高分子の一種であるポリブチルシリアクリレート(PBCA)製のナノ粒子の表面をポリソルベート80(Tween-80)単独でコーティング、あるいはTween-80とポリエチレングリコール(PEG)でダブルコーティングしている(参考論文2)。しかし、PBCAは生体内でエステラーゼによって分解された後の分解物の毒性が懸念される。一方、ポリ乳酸-グリコール酸(PLGA)や固体脂質(Solid-lipid)はその分解物が生体内で比較的安全であることが証明されており、ヒトへの臨床応用が始められている。本研究では、これらの材料で構成されたより低毒性なナノ粒子を作成する(下図1、本研究で調製する粒子)。



ナノ粒子の調製法については様々な報告がされているが、今回は複雑な合成プロセスを経由することなく容易にナノスケールの粒子の調製が可能な溶剤エバポレーション法で行う。ナノ粒子に内包させる脂溶性抗酸化分子には、細胞実験と動物実験でアミロイドβ凝集抑制作用、抗癌作用、抗酸化作用、抗動脈硬化作用といった有用な生理作用が報告され広く認知されているクルクミン(CUR)をまず使用する(参考論文3)。そして、調製した脂溶性抗酸化分子内包ナノ粒

子をラットに経口投与し、脳やその他の臓器への抗酸化分子の経時的移行動態、代謝物の分析、組織の膜リン脂質ヒドロペルオキシドを定量し、抗酸化効果を明らかにする。

2. 研究の目的

- 本研究では次の研究課題の解決を行うことで、上述の目的を達成しようとした。
- (1) 経口摂取によるクルクミンの体内動態、及びその代謝物の検討
 - (2) 生体毒性の低い材質で構成された脂溶性抗酸化分子内包ナノ粒子の調製
 - (3) 細胞実験による吸収・代謝の評価
 - (4) 動物実験による脳脂質やその他の臓器脂質に対する抗酸化効果の検証

3. 研究の方法

- (1) 経口摂取によるクルクミンの体内動態、及びその代謝物の検討
 経口摂取によるクルクミンの生体内への吸収性や、代謝物の理解はナノ粒子の有効性を評価するうえで重要なため、本検討を最初に行う。液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)によるクルクミン代謝物の分析法を開発し、細胞実験(ヒト肝癌細胞(HepG2 cells)、ヒト単球細胞(THP-1 monocyte/macrophage cells))と動物実験(Sprague-Dewley rat)でその代謝挙動の確認を行う。

- (2) 生体毒性の低い材質で構成された脂溶性抗酸化分子内包ナノ粒子の調製
 ソルベントエバポレーション法で、クルクミンを内包させたナノ粒子を調製する。Tween-80の有効性を確認するために、その表面にはTween-80をコーティングしたもの、しないものを使用する。調製した粒子の平均粒径は動的光散乱法と透過型電子顕微鏡で、ゼータ電位は電気泳動光散乱法で評価する。

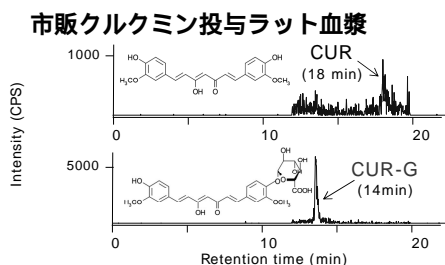
- (3) 細胞実験による吸収・代謝の評価
 本研究では、ナノ粒子の小腸への吸収モデルとしてヒト結腸癌由来細胞(Caco-2 cells)を使用し、その取り込みを確認する。

- (4) 動物実験による脳脂質やその他の臓器脂質に対する抗酸化効果の検証
 調製した脂溶性抗酸化分子内包ナノ粒子をSprague-Dewley ratに経口投与し、経時的に、脳とその他の臓器への抗酸化分子の移行動態、代謝を解析、組織の膜リン脂質ヒドロペルオキシドを定量し、脳脂質やその他の臓器脂質に対する抗酸化効果を定量的に明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 経口摂取によるクルクミンの体内動態、及びその代謝物の検討
 LC-MS/MSによるクルクミン代謝物の分析法を開発した。この分析法を用い、

Sprague-Dewley rat ヘクルクミンを経口投与させた場合の血漿中代謝物を分析すると、グルクロン酸抱合体が主要な代謝物であることを確認した(下図2、LC-MS/MSによるラット血漿中クルクミン代謝物の分析)(参考論文4)



一方で、HepG2 cells や THP-1 monocyte/macrophage cells にクルクミンをインキュベートした場合は、クルクミンがグルクロン酸抱合体へと代謝される割合は低かった(参考論文4,5)。上記の結果から、経口投与ではクルクミンの殆どが抱合化されてその活性を失ってしまうことが示唆されたため、本研究で作成するナノ粒子にクルクミンの抱合化を防ぐ付加価値をつける必要性が見出された。

(2) 生体毒性の低い材質で構成された脂溶性抗酸化分子内包ナノ粒子の調製

ソルベントエバポレーション法により、クルクミンを内包させた PLGA、もしくは Solid Lipid で構成されるナノ粒子を調製した。その粒形は 100-200 nm、ゼータ電位はマイナスで細胞実験及び動物実験に適応しうる調製法であると判断した。

(3) 細胞実験による吸収・代謝の評価

本研究で調製した Solid Lipid ナノ粒子の Caco-2 cells への吸収効果を検証した。結果、ナノ粒子に内包されたクルクミンはエタノールや DMSO に溶解している群(コントロール群)と比較して吸収されづらいことが分かった。しかしながら、エタノールや DMSO は細胞膜の浸透性・流動性を上昇させたりする吸収促進剤としての役目も担っており、食品由来のクルクミンが小腸に達した時の環境を細胞実験で再現できているとは言えない(参考論文6)。以上の結果から、クルクミンのコントロール群を再度検討する必要があると共に、粒子の形状を保持しつつ細胞への吸収量を上昇させるための粒子のサイズ、材質の検討だけでなく細胞膜への接着のしやすさ、吸収部位での滞在時間の延長といった性質についても配慮しつつその現象を明らかにしていく必要があることが分かった。

(4) 動物実験による脳脂質やその他の臓器脂質に対する抗酸化効果の検証

(1)~(3)の結果に基づき、ナノ粒子に内包したクルクミンの吸収・代謝の分析を行って

いる段階である。当初計画では(4)を終える予定であったが、途中となってしまったため、外部資金等を獲得するなどして、継続して今後も(4)を行いたいと考えている。

参考文献

1. M. Citron, Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9, 387-398 (2010)
2. K. Andrieux, P. Couvreur, Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 1, 463-474 (2009)
3. A. Goel, A.B. Kunnumakkara, B.B. Aggarwal, Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 787-809 (2008)
4. M. Shoji, K. Nakagawa, A. Watanabe, T. Tsuduki, T. Yamada, S. Kuwahara, F. Kimura, T. Miyazawa, Comparison of the effects of curcumin and curcumin glucuronide in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Food Chem.*, 151, 126-132 (2013)
5. K. Nakagawa, J.M. Zingg, S.H. Kim, M.J. Thomas, G.G. Dolnikowski, A. Azzi, T. Miyazawa, M. Meydani, Differential cellular uptake and metabolism of curcuminoids in monocytes/macrophages: regulatory effects on lipid accumulation. *Brit. J. Nutr.*, 112, 8-14 (2014)
6. J.H. Chin, D.B. Goldstein, Effects of low concentrations of ethanol on the fluidity of spin-labeled erythrocyte and brain membranes. *Mol. Pharmacol.*, 13, 435-441 (1977)

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)

1. K. Nakagawa, J.M. Zingg, S.H. Kim, M.J. Thomas, G.G. Dolnikowski, A. Azzi, T. Miyazawa, M. Meydani, Differential cellular uptake and metabolism of curcuminoids in monocytes/macrophages: regulatory effects on lipid accumulation. *Brit. J. Nutr.*, 112, 8-14 (2014), 査読有
2. M. Shoji, K. Nakagawa, A. Watanabe, T. Tsuduki, T. Yamada, S. Kuwahara, F. Kimura, T. Miyazawa, Comparison of the effects of curcumin and curcumin glucuronide in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Food Chem.*, 151, 126-132 (2013), 査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. 仲川清隆, 林真貴子, 庄司求, 今野博行, Jean-Mark Zingg, Angero Azzi, Mohsen

Maydani, 宮澤陽夫, クルクミンおよび類縁体の培養細胞への取り込み：細胞内移行と生理作用発現機構の関連性. 日本ビタミン学会第 66 回大会 2014 年 6 月 13-14 日 (兵庫県姫路市)

2. 張替敬裕, 宮澤大樹, 庄司求, 仲川清隆, 藤井智幸, 宮澤陽夫, クルクミン封入ナノ粒子の作製と生物学的利用能向上. 日本農芸化学会平成 26 年度大会 2014 年 3 月 30 日 (神奈川県川崎市)
3. 張替敬裕, 宮澤大樹, 庄司求, 仲川清隆, 藤井智幸, 宮澤陽夫, クルクミンの生物学的利用能向上を目指したナノ粒子作製. 日本油化学会第 53 回年会 2014 年 9 月 9-11 日 (北海道札幌市)
4. 張替敬裕, 宮澤大樹, 庄司求, 仲川清隆, 藤井智幸, 宮澤陽夫, クルクミングルクロン酸抱合体の生理活性とクルクミンナノ粒子作製. 日本農芸化学東北支部第 148 回大会 2013 年 10 月 26 日 (岩手県盛岡市)
5. 宮澤大樹, 仲川清隆, 木村ふみ子, 宮澤陽夫, ルテイン封入ナノ粒子の脳への送達研究. 第 47 回日本栄養・食糧学会東北支部大会 2013 年 10 月 5 日 (秋田県秋田市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/kinoubun/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA, Teruo)
東北大学・大学院農学研究科 教授
研究者番号：20157639

(2)研究分担者

仲川 清隆 (NAKAGAWA, Kiyotaka)
東北大学・大学院農学研究科 准教授
研究者番号：80361145

木村ふみ子 (KIMURA FUMIKO)
東北大学・大学院農学研究科 助教
研究者番号：50321980