

Niemann-Pick C1 Like-1 (NPC1L1) を利用した難吸収性食品成分の 消化管吸収改善法の開発

北海道大学大学院 薬学研究院

佐藤 夕紀

1. 研究の目的と背景

近年, 我が国では生活習慣病の増加などに伴う心疾患・脳血管疾患のリスク増大等の観点から, 予防医療が重要視され, 現在, 疾病の予防や進行防止を目的とした様々な機能性食品やその成分を利用したサプリメント等が開発, 消費されている. 経口的に摂取された成分の小腸からの吸収は, それらが体内へ入る第一段階であり, トランスポータをはじめ様々な動態関連因子により制御されている. 難水溶性で脂溶性の高い成分の吸収は, 小腸で胆汁と混ざり乳化されることにより促進される. 従来, コレステロール (chol) などの脂溶性の高い物質は, 受動拡散により吸収されると考えられてきたが, 小腸 chol トランスポータとして NPC1L1 (Niemann-Pick C1 Like 1) が報告された¹⁾. NPC1L1 は消化管管腔側に発現するタンパク質であり, chol をはじめとして脂溶性ビタミンなどの様々な脂溶性物質の細胞内取り込みに関与していることが報告されている²⁻⁴⁾. 申請者らはこれまでに脂溶性の高い食品成分であるルテインに関して, その極めて低い経口吸収率を乳化により改善できること, 乳化されたルテインの消化管吸収に NPC1L1 が一部関与していることを明らかにした^{5,6)}. 現在, NPC1L1 の基質認識性に関しては明確には解明されていないことから, 申請者は, このようなミセル中に chol などの基質を封入することで, 難水溶性で低吸収性を示す成分を吸収改善できないかと考えた.

そこで本研究では, どのような機能性食品成分の吸収に NPC1L1 が関与しているかを明らかにし, NPC1L1 を利用した難吸収性物質の消化管吸収改善が可能かどうかを種々検討した.

2. 研究の方法

2-1 実験材料

コレステロール (非ラベル体), および α -tocopherol (α -toc) は, 北海道和光純薬株式会社より購入した. また, コレステロールおよびレチノール (ラベル体) は, 日本アイソトープ協会より入手した. その他, 実験に用いる試薬は, 試薬特級相当, また HPLC 級のものを用いた.

2-2 使用細胞

ヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞は, 理化学研究所バイオリソースセンターより購入し, 継代数 45-60 のものを使

用した. Caco-2 細胞の培養は 37°C, 5% CO₂-95% air インキュベーター内で行い, 予め 56°C で 30 分間加熱処理することにより血清中の補体を非働化した 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum), 100 IU/mL ペニシリン -100 μ g/mL ストレプトマイシン, 0.1 mM NEAA (non-essential amino acids), 4 mM L-グルタミンを含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) を培養液とした. 培養液を 1-2 日おきに交換し, 播種 5-7 日後に継代を行った. 継代は, 滅菌 PBS で細胞を 2 回洗浄後, トリプシン-EDTA 溶液 (0.25% トリプシン, 0.02% EDTA in PBS) により細胞を遊離させて行った.

2-3 細胞内への取り込み実験のための薬液調製

Retinol 溶液は, transport buffer:[³H]-all trans Retinol (ARC, 1 mCi/mL, Ethanol cont D- α -tocopherol) = 1:999 (薬液中の終濃度 0.05 μ M) で混合し, 10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後, 30 秒間混合し薬液とした. また, Chol 非含有および含有乳剤の組成は Table 1, 2 に示した. 乳剤原料は SARSTEDT 製 5 mL チューブに混合し, 10 秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した. その後 30 秒間超音波ホモジナイザー (Amplitude 40, cycle) によって攪拌し, これを乳剤とした. なお, transport buffer (TB) と液体シンチレーションカクテルの組成をそれぞれ Table 3, 4 に示す.

Table 1 Chol 非含有乳剤の組成

乳剤原料	濃度(終濃度)	調製量
Retinol in IPM (Cold 体)	100 (1) μ M	10 μ L
TCNa in TB	50 (0.5) mM	10 μ L
[³ H] - Retinol in Ethanol	50 μ M (50 nM)	1 μ L
up to 1000 μ L (TB)		

Table 2 Chol 含有乳剤の組成

乳剤原料	濃度(終濃度)	調製量
Chol in IPM (Cold 体)	100 (1) μ M	10 μ L
TCNa in TB	50 (0.5) mM	10 μ L
[³ H] - Retinol in Ethanol	50 μ M (50 nM)	1 μ L
up to 1000 μ L (TB)		

Table 3 transport buffer の組成

成分	濃度
NaCl	140 mM
KCl	5.4 mM
CaCl ₂	1.8 mM
MgSO ₄	0.8 mM
D-Glucose	5 mM
HEPES (pH 7.5/Tris)	25 mM

Table 4 液体シンチレーションカクテルの組成

DPO	45 g
POPOP	2.25 g
Toluene	3 L
Triton X-100	1.5 L

2-4 取り込み実験

コンフルエントになった Caco-2 細胞のメディアを吸引後に transport buffer 1 mL で 1 回洗浄し, 0, 25 μ M エゼチミブ溶液 1 mL を加え, 1 時間プレインキュベートした。その後溶液を吸引し, transport buffer 1 mL で 1 回洗浄したのち, 250 μ L の薬液を添加して 15 分間インキュベートした。一定時間経過後, 薬液を吸引し, 氷冷した transport buffer 1 mL (1 mM TcNa 含有) で 3 回洗浄し

た。測定は Cell lysis solution (1% SDS in 0.2 N NaOH) 250 μ L で細胞を溶解し, 液体シンチレーション法により行った。BCA 法に準拠して BSA を標準タンパク質として用い, 補正して取り込み量を算出した。

2-5 動物実験のための薬液調製および経口投与

α -toc を, オリーブ油に 10 mg/ml となるように溶解させ, 5 分間超音波処理したものを 1 mL/kg weight とし, 投与量 10 mg/kg weight として Wistar 系雄性ラットへ投与した。エゼチミブは, ゼチーア[®] 1錠 (エゼチミブ含量 10 mg) を粉碎し, 1 mL の DMSO に溶解させ, これを室温で 13,000 \times g, 2 分間遠心分離した。この上清を用時 100 倍希釈し, DMSO 終濃度 1% で 1 mL/kg weight とし, 投与量 0.1 mg/kg weight として投与した。いずれも 15-20 時間絶食させたラットに胃ゾンデ法により強制的に胃内投与した。適宜頸静脈より血液約 350 μ L を採取し, 直ちに微量のヘパリンナトリウムと混和した。採取した血液は 750 \times g, 4°C で 10 分遠心分離し, 上清を血漿サンプルとして回収し -20°C で保存した。

2-6 抽出方法および測定方法1) α -tocopherol

Scheme 1 に従って抽出を行い, Table 6 に示す条件で HPLC 法によって濃度を測定した。

Scheme 1 α -tocopherol の抽出方法

Sample 100 μ L
↓ Added to 100 μ L of 0.1 M Na ₂ HPO ₄
↓ Added to 200 μ L of methanol (containing 1 μ g/mL δ -tocopherol (as an internal standard))
↓ Extracted with 1100 μ L of hexane/dichloromethane=4/1 (v/v)
↓ Mixed vigorously by a vortex mixer for 1.5 min
↓ Centrifugation 3000 rpm for 10 min at room temperature
900 μ L of the organic phase
↓ Evaporated to dryness at 40°C
Residue
↓ Added 200 μ L of eluent
↓ Mixed vigorously by a vortex mixer for 10 sec
HPLC sample

Table 6 α -tocopherol の HPLC 条件

Column	Inertsil [®] ODS-4
Eluent	Methanol/distilled water=98/2 (v/v)
Flow rate	0.4 mL/min
Light excitation	298 nm
Light emission	325 nm
Column temp.	30°C
Injection volume	15 μ L
Internal standard	δ -tocopherol

2) coenzyme Q10

Scheme 2 に従って抽出を行い, Table 7 に示す条件で HPLC 法によって濃度を測定した。

取り込み量は Lowry 法に準拠して BSA を標準タンパク質として算出されたタンパク質量で補正した。

Scheme 2 CoQ10 の HPLC サンプル調製手順

Sample 100 μ L
↓ Added 100 μ L of hexane
↓ Added 400 μ L of methanol
↓ Mixed vigorously by a vortex mixer for 30 sec
↓ Added 2 mL of hexane
↓ Mixed vigorously by a vortex mixer for 30 sec
↓ Centrifugation $2,330 \times g$ for 10 min at 20°C
1.8 mL of the organic phase
↓ Evaporated to dryness for 30 min at 40°C
Residue
↓ Added 100 μ L of eluent
↓ Mixed vigorously by a vortex mixer for 10 sec
HPLC sample

Table 7 CoQ10 の HPLC 測定条件

Column	Inertsil® ODS-4
Eluent	Methanol:Ethanol=35:65 (v/v)
Flow rate	0.4 mL/min
Wavelength	UV 275 nm
Column temperature	40°C
Injection Volume	40 μ L

3. 研究内容および研究の実施経過と考察

はじめに本検討が妥当かどうかについて, NPC1L1 の基質であることが報告されている α -toc³⁾ を用いて, in vivo における NPC1L1 の寄与を確認することとした。当初 siRNA による NPC1L1 のノックダウンを試みたが, まずは NPC1L1 選択的阻害剤であるエゼチミブを用いてその機能に与える影響を評価した。

その結果, NPC1L1 の機能を抑制した状態と比較すると, α -toc 単独で投与した場合は血漿中濃度推移に増大が認められた (Fig. 1)。また, このデータをもとに, 血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) を算出したところ, 有意に α -toc の吸収が増大することが示された (Table 8)⁷⁾。この結果から, NPC1L1 の機能が確認されたと判断し, 続いてより明確に結果を得るために, 消化管上皮モデルとして汎用されている Caco-2 細胞を用いて, 脂溶性の食品成分として coenzyme Q10 (CoQ10) をモデルとして検討を行った。

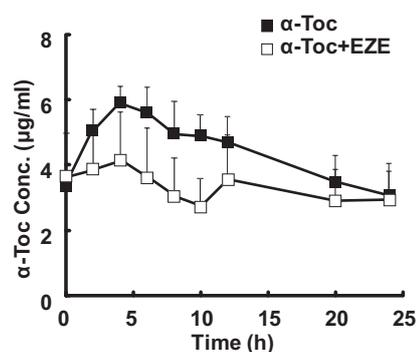


Fig. 1 α -トコフェロール経口投与後の血漿中濃度推移 (mean with S.D., n=5-6) 経口投与後 24 時間まで経時的に採血した。なお, α -トコフェロールの投与量は 10 mg/kg weight, エゼチミブの投与量は 0.1 mg/kg weight である。

Table 8 エゼチミブのあり・なしの α -トコフェロール経口投与後の AUC

AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	
α -Toc	106.53 \pm 11.22
α -Toc+EZE	76.23 \pm 29.60

(n=5-6) Fig. 1 のデータより, 台形公式により AUC を算出した。

その結果, cholなしの乳剤と比較して, cholを含む乳剤のCoQ10の取り込み量は有意に増大した (Fig. 2). なお, この検討で用いた乳剤の平均粒子径を動的光散乱法により算出したところ, cholなし乳剤の場合は 236.8 ± 3.4 nm, cholありの場合 232.2 ± 11.0 nmであったことから, 粒子径の大小による取り込みの差ではないことが考えられる. また, cholなし・ありそれぞれの場合において, エゼチミブを併用するとその取り込み量は減少したことから, CoQ10もNPC1L1の基質となることが示唆された (現在までにCoQ10が基質であることを報告した例はない). さらに, in vivoでもこの吸収改善効果がみられるかどうかについて, 検討を行うこととした. Cholありの場合では, cholの終濃度が 10 mg/mLとなるように加えてCoQ10の乳剤を調製して投与した.

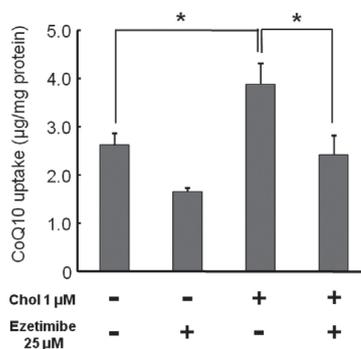


Fig. 2 Caco-2細胞内へのcholなし/ありの乳剤中のCoQ10の取り込み量

(n=4-7) Caco-2細胞へcholなし/あり,かつ,エゼチミブ 25 µMなし/ありのCoQ10乳剤を15分間取り込ませて検討した. CoQ10の終濃度は 300 µg/mLである. *は有意な差を示している ($p < 0.05$).

その結果, cholを加えることで最大血漿中濃度 (C_{max})に大きな変化は見られなかったものの, 9, 12, 24時間におけるCoQ10血漿中濃度を増大させる傾向が観察された (Fig. 3). なお, 乳剤ではないCoQ10を投与 (原末のCoQ10を0.5%メチルセルローズに分散させて投与) した場合は, 血漿中濃度推移の増大がほぼ見られないことは

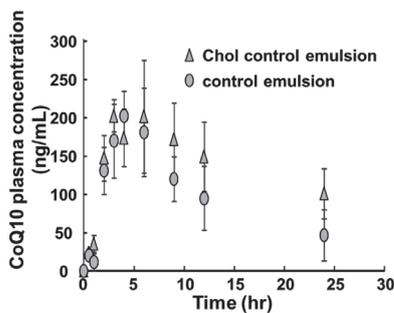


Fig. 3 Chol control emulsion, control emulsion 経口投与におけるCoQ10血漿中濃度推移

(mean with S.E., n=5-8) 経口投与後24時間まで経時的に採血した. なお, CoQ10の投与量は 25 mg/kg weightである.

確認済みである (データは示さない). このことから, 難吸収性の吸収改善に, 乳剤化は極めて有効な製剤であり, cholを含む乳剤は難吸収性物質の吸収をさらに改善させる可能性が示された.

また, これまでの検討を受け, エゼチミブと同時投与することで, CoQ10の血漿中濃度がどのように変化するかどうかについて検討した.

その結果, エゼチミブと同時投与することでCoQ10の血漿中濃度は大きく低下し, control emulsionでの血漿中濃度推移も下回ることが示された (Fig. 4). 本来は, cholの吸収が抑制されるはずと予想していたが, CoQ10の吸収も抑制されたことから, 乳剤粒子ごと細胞内へ取り込まれ吸収されていること,あるいは, CoQ10もNPC1L1の基質となりうることを示唆された. また, In vivo, in vitroの結果を合わせて, CoQ10がNPC1L1の基質である可能性が示されたため, 基質かどうかを明確にして再検討する必要があると考えている.

さらに, NPC1L1の基質ではないことが報告されているレチノール³⁾を用いて, 同様に吸収改善が可能かどうかCaco-2細胞内への取り込み量を比較して, 評価した.

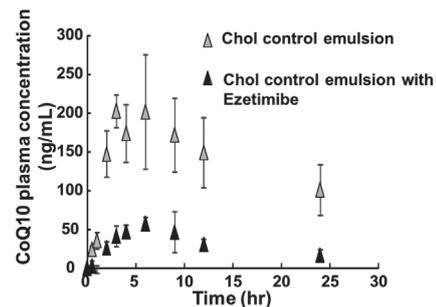


Fig. 4 エゼチミブの有無によるchol control emulsion 経口投与後のCoQ10の血漿中濃度推移

(mean with S.E., n=6-8) 経口投与後24時間まで経時的に採血した. なお, CoQ10の投与量は 25 mg/kg weightである.

その結果, cholを含まない乳剤と比較して, cholを含む乳剤を用いた場合のレチノールの取り込み量は, 増大することが示された (Fig. 5). また, 既報の通りNPC1L1阻害剤であるエゼチミブでその取り込みは抑制されなかった.

これらのことから, 乳剤中にNPC1L1の基質を含有させると, 難吸収性物質の取り込み量は増大することが示唆された.

4. 研究から得た結論

本研究より, 難吸収性物質の吸収改善のために, 乳剤は非常に有用な製剤であること, この乳剤中にNPC1L1の基質であるcholを含有させることで, その吸収をさらに改善できることが示された.

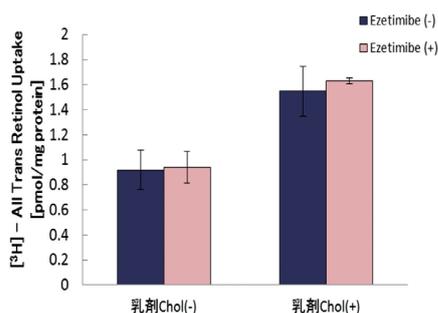


Fig. 5 Caco-2 細胞内への chol の有無による乳剤中レチノールの取り込み量

(n=3) Caco-2 細胞へ chol なし/あり、かつ、エゼチミブ 25 μ M なし/ありの all trans retinol 乳剤を 15 分間取り込ませて検討した。

5. 残された問題, 今後の課題

本研究の成果から, 乳剤中に NPC1L1 の基質を含有させることにより, 乳剤粒子ごと細胞内へ取り込まれることでその吸収を改善できる可能性が示された。今回は, NPC1L1 の基質であることが種々報告されている chol を用いて検討した。しかし, chol は本来積極的に吸収されることが望ましい成分ではないため, α -toc のような NPC1L1 基質を用いて同様の検討を行うことで, より有用な製剤開発の基礎的情報の一助となると考えている。

また, 今回得られた結果により, CoQ10 も NPC1L1 の基質となることが示唆された。今回データには示していないが, Caco-2 細胞には NPC1L1 の発現しているもののその活性は強くはないであろう結果も一部得られていることから, 現在, NPC1L1 の発現系を構築しており, その関連をより詳細に評価する必要あると考えている。

また, これらの成果を含めた研究内容について, 現在論文を執筆中である。

謝辞

本研究にあたり, 多大なる研究助成, 御支援を賜りました公益財団法人 東洋食品研究所, ならびに関係の皆様へ深く感謝申し上げます。また, 本研究において種々の検討にご協力いただきました北海道大学薬学部 竹川悠人学士, 梨本俊亮学士, 八巻義朗氏に心から感謝いたします。

参考文献

- 1) Altmann S. W., Davis H. R., Zhu L. J., Yao X., Hoos L. M., Tetzloff G., Lyer S. P., Maguire M., Golovko A., Zeng M., Wang L., Murgolo N., Graziano M. P., Niemann-Pick C1 Like 1 Protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 303, 1201-1204 (2004).
- 2) During A., Dawson H. D., Harrison E. H., Carotenoid

transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J. Nutr.*, 135, 2305-2312 (2005).

- 3) Narushima K., Takada T., Yamanashi Y., Suzuki H., Niemann-Pick C1-Like 1 mediates α -tocopherol transport. *Mol. Pharmacol.*, 74, 42-49 (2008).
- 4) Takada T., Yamanashi Y., Konishi K., Yamamoto T., Toyoda Y., Masui Y., Yamamoto H., Suzuki H. NPC1L1 is a key regulator of intestinal vitamin K absorption and a modulator of warfarin therapy. *Sci. Transl. Med.* 7, 275ra23
- 5) Sato Y., Kobayashi M., Itagaki S., Hirano T., Noda T., Mizuno S., Sugawara M., Iseki K. Pharmacokinetic properties of lutein emulsion after oral administration to rats and effect of food intake on plasma concentration of lutein. *Biopharm. Drug Dispos.*, 32, 151-158 (2011).
- 6) Sato Y., Suzuki R., Kobayashi M., Itagaki S., Hirano T., Noda T., Mizuno S., Sugawara M., Iseki K. Involvement of cholesterol membrane transporter Niemann-Pick C1 Like-1 in the intestinal absorption of lutein. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 15, 256-264 (2012).
- 7) Nashimoto S., Sato Y., Takekuma Y., Sugawara M. Inhibitory effect of ezetimibe can be prevented by an administration interval of 4 h between α -tocopherol and ezetimibe. *Biopharm. Drug Dispos.*, 38, 280-289 (2017).