

<平成19年度>

機能性食品の開発に貢献する新しい吸収改善理論の 確立と新規配合剤の開発

板垣史郎

(北海道大学大学院薬学研究院)

1. はじめに

超高齢化社会が進行するわが国では国民の最大の関心事は健康維持に関する諸問題にあり、「病気になるように健康を維持する」という予防医学への関心が高まっている。また、高齢化に伴う医療費の高騰を反映し、代替医薬品としての機能性食品市場は拡大の一途を辿っており、直近では1兆円規模を超えたと推測されている。市場拡大に伴い、機能性食品の科学的根拠が重視されるようになってきている。しかしながら、最高レベルのエビデンスを持つ「特定保健用食品」の許可を得るには億単位の試験費用が必要となるため、エビデンスに乏しい製品も未だ多い。

医薬品が疾病の治療を目的とするのに対し、機能性食品は疾病の予防を目的とする。機能性食品は医薬品に比べ効果が穏やかであり、副作用が少なく、マルチターゲットであるなど、医薬品にはない特徴を有する。反面、効果の発現には長期間の摂取を必要とする。経口投与の他にも静脈内投与、経皮・経肺投与など多様な投与方法の存在する医薬品とは異なり、機能性食品の摂取法は「食品」という性質上、経口摂取に限られる。経口摂取された化合物が生体内で効果を発揮するためには消化管から吸収され、標的臓器へと分布する必要がある。しかしながら、コエンザイム Q10 のように試験管レベルで優れた効果を発揮するにもかかわらず、吸収性の低さのため、摂取した場合には期待されたほどの効果が得られない化合物も

多く存在する。機能性食品の開発において、高いエビデンスを求めることと開発費用の増大は表裏一体である。科学的根拠に基づき、多くの健康食品素材に適応可能な吸収性改善理論を確立することは機能性食品の開発費用の削減に大きく貢献する。

従来、小腸上皮の刷子縁膜構造は吸収面積拡大のため物質の吸収を可能にすると解釈されてきた。しかしながら、近年、刷子縁膜構造には様々な栄養物に対してエネルギーを使って吸収する輸送担体、すなわちトランスポーターが存在していることが明らかにされてきた。特に、小腸吸収上皮細胞の刷子縁膜に発現し、食事摂取されたタンパク質の消化産物であるジペプチドやトリペプチドの消化管吸収を担うオリゴペプチドトランスポーター PEPT1 は、ジ-,トリペプチドのみならず、ペプチド類似構造を有する β -ラクタム抗生物質や ACE 阻害薬などの化合物をも輸送することから、吸収改善の有力なターゲットとされている¹⁾。PEPT1 をターゲットとした消化管吸収改善の具体的な応用例として、パーキンソン病治療薬として用いられるレボドパの Phe-ジペプチド誘導体²⁾ や、抗ウイルス薬アシクロビルの Val-エステルプロドラッグ³⁾ 等が挙げられる。本研究ではトランスポーター制御による機能性食品成分の吸収改善方法を構築し、標的トランスポーターを効率的に制御することのできる配合剤の開発へ貢献することを目的とした。

1.1 コエンザイム Q10 とは

本研究では、モデル化合物として健康食品素材として繁用されているコエンザイム Q10 を用いた。コエンザイム Q10 は元来、酸化リン酸化における電子伝達系の補酵素として見出された化合物であり⁴⁾、1973 年には本邦で世界に先駆けてうっ血性心不全治療薬として認可された。その後、2001 年に食薬区分の変更により食品成分としての利用が認可されると⁵⁾、そのエネルギー産生作用と抗酸化作用に注目が集まり、機能的食品のなかでも特に大きな位置を占めるに至っている。

しかしながら、従来医薬品として認可されるも、体内動態に関する知見が重要視されなかった時代に承認されたため、その消化管吸収およびバイオアベイラビリティは非常に低く、また、消化管吸収機構に関する報告も極めて乏しいのが現状である。

1.2 化合物の消化管吸収と排出トランスポータ

小腸上皮細胞の刷子縁膜に発現するトランスポータは栄養成分の吸収のみならず、生体にとって異物となる物質を排出する機能を有している。そのようなトランスポータとして、MDR1/P-glycoprotein や Multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) などが挙げられる⁶⁾。栄養素の吸収を目的とするトランスポータの基質認識性が比較的厳密であるのに対し、自然界に存在する多種多様な物質の排出を目的とするこれらのトランスポータの基質認識性は非常に幅広く、一部の薬物については上皮細胞中に取り込まれた後、血液中に移行する前に、汲み出しによって小腸管腔側へ排出されることが知られている。それ故、排出トランスポータによる汲み出しが吸収性の低さの要因となっている薬物については排出トランスポータの機能制御によって、その吸収性・バイオアベイラビリティを改善できる可能性がある。しかしながら、トランスポータの排出活性を

低下させることは吸収活性を上昇させることよりも遥かに容易であるにもかかわらず、従来のトランスポータを標的とした薬物吸収性改善戦略では PEPT をはじめとする吸収トランスポータをターゲットとしたものがほとんどであり、排出トランスポータに着目した例は極めて少ない。

1.3 本研究の方針

コエンザイム Q10 の消化管吸収性はその構造から予想される値よりも低い。我々はこの点に着目し、コエンザイム Q10 の消化管吸収にはなんらかの排出トランスポータが影響を及ぼしていると仮定した。本研究ではコエンザイム Q10 消化管排出機構の詳細を明らかにした後、その制御による吸収改善方策の構築を行った

2. 実験方法

2.1 使用細胞

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を使用した。理化学研究所バイオリソースセンターより購入した Caco-2 細胞を継代数 45-60 で使用した。Caco-2 細胞の培養には、D-MEM に 10% (v/v) FBS, 0.1 mM NEAA, 2 mM L-グルタミン, 100IU/mL ペニシリン-100 μ g/mL ストレプトマイシンを添加した培養液を用いた。培養は 75cm² フラスコに培養液 15mL を加え、37 $^{\circ}$ C, 5% (v/v) CO₂/O₂ 下で行った。

2.2 Caco-2 細胞によるコエンザイム Q10 輸送活性の測定

コエンザイム Q10 細胞内蓄積量の測定には 12 穴プレートで培養し、コンフルエントに達した細胞を用いた。培養液を吸引除去後、37 $^{\circ}$ C の HBSS で 2 回洗浄し、HBSS を 1 mL 加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分間プレインキュベーションした。HBSS を除去し、37 $^{\circ}$ C のコエンザイム Q10 含有 HBSS 溶液を 1 mL 添加した。一定時間後に氷冷した HBSS 1 mL で 2 回洗浄し、反応を停止させた。0.5mL

の1Nリン酸：メタノール = 1：1溶液により細胞を破碎，回収しサンプルとした。サンプルはヘキササンにて抽出し，HPLCにて定量した。

コエンザイム Q10 経細胞輸送活性の測定には12穴トランスウェルで培養し，TEER値が培養開始時と比較して $300\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上増加した細胞を用いた。培養液を吸引除去後， 37°C のHBSS 0.5 mL (apical) または 1.5 mL (basal) で2回洗浄した後，同量のHBSSを加え， 37°C で10分間プレインキュベーションした。Basal側のHBSSを除去し， 37°C のコエンザイム Q10 含有HBSS溶液を1.5 mL添加した。一定時間後，apical側のHBSSを $100\mu\text{L}$ 採取し，抽出を行い，HPLCにて定量し，輸送量を分析した。

2.3 Caco-2細胞によるローダミン 123 輸送活性の測定

Rho123細胞内蓄積量の測定には12穴プレートで培養し，コンフルエントに達した細胞を用いた。培養液を吸引除去後， 37°C のHBSSで2回洗浄し，HBSSを1 mL加え， 37°C で10分間プレインキュベーションした。HBSSを除去し， 37°C のRho123含有HBSS溶液を1 mL添加した。一定時間後に氷冷したHBSS 1 mLで2回洗浄し，反応を停止させた。0.5 mLの1Nリン酸：メタノール = 1：1溶液により細胞を破碎，回収しサンプルとした。サンプルは遠心分離後，Multilabel counterを用いて測定した。

3. 結果及び考察

3.1 コエンザイム Q10 蓄積量の時間依存性

はじめに，Caco-2細胞内へのコエンザイム Q10 蓄積量のタイムコースを検討した。その結果，細胞内蓄積量は120分まで直線的に増加し，その後緩やかに飽和する傾向が見られた（図1）。この結果より，以降の実験では取り込み時間を120分とした。

3.2 コエンザイム Q10 蓄積量に対する ATP 枯渇の影響

小腸管腔側への化合物の汲み出しは濃度勾配に逆らう現象であるため，何らかのエネルギーを必要とする可能性が高い。そこで，多くの排出系トランスポータの駆動力となるATPに着目し，コエンザイム Q10 の排出にATPを駆動力とするトランスポータが関与しているか否かについて検討した。ATP枯渇剤としてCCCPおよびNaF+NaN₃を用いて，ATP枯渇条件下での細胞内コエンザイム Q10 蓄積量の変化を検討した。その結果，いずれのATP枯渇条件下においてもコエンザイム Q10 蓄積量はコントロールに対して有意に増加した（図2）。この結果より，コエンザイム Q10 の排出に何らかのATPを駆動力とするトランスポータ（ABCトランスポータ）が関与していることが示唆された。

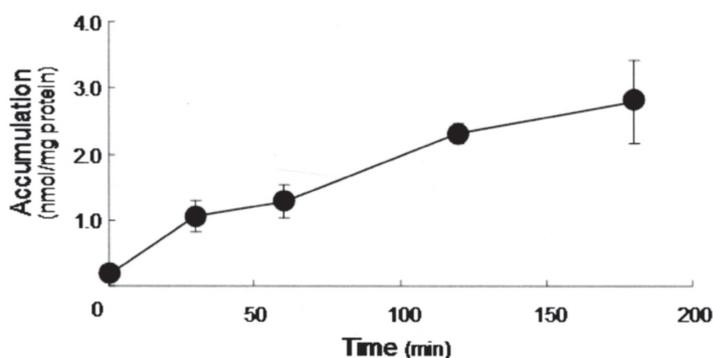


図1 Caco-2細胞へのコエンザイム Q10 取り込みの時間依存性

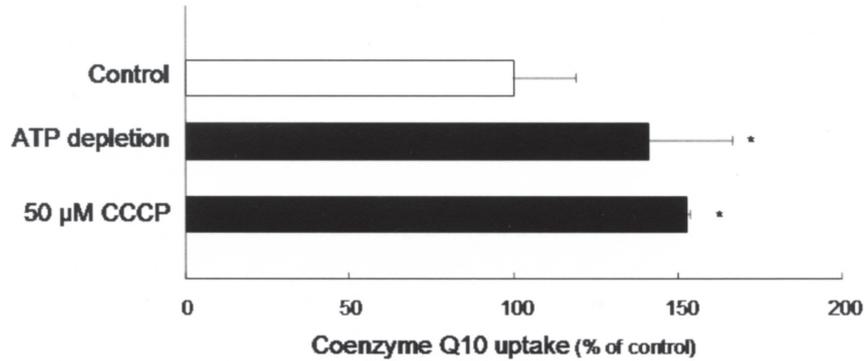


図2 Caco-2細胞へのコエンザイム Q10 の取り込みに対する ATP 枯渇剤の影響

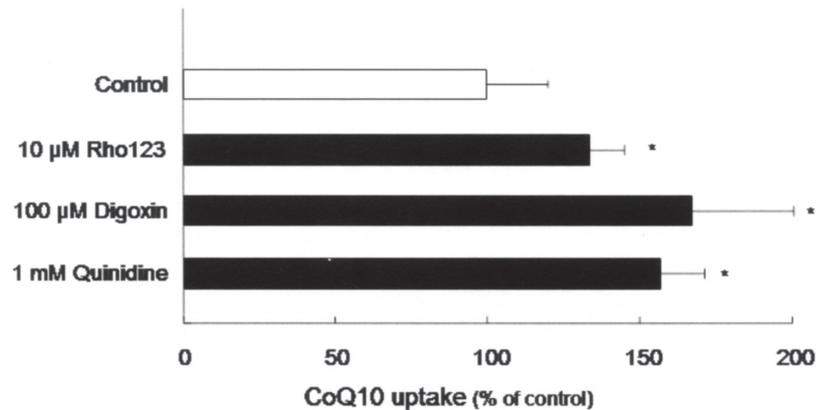


図3 Caco-2細胞へのコエンザイム Q10 の取り込みに対する MDR1 阻害剤の影響

3.3 コエンザイム Q10 蓄積量に対する MDR 阻害剤の影響

Caco-2 細胞刷子縁膜に存在する ABC トランスポーターとしては、MDR1, Mrp2, Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp) が挙げられる。このなかで比較的脂溶性の高い化合物を輸送する MDR1 に着目し、その代表的阻害剤を用いて、コエンザイム Q10 の蓄積量に与える影響を検討した。その結果、ローダミン 123 (Rho123)、ジゴキシン及びキニジンの共存によってコエンザイム Q10 の蓄積量を有意に増加させることが可能であることが明らかとなった (図 3)。この結果より、Caco-2 細胞刷子縁膜におけるコエンザイム Q10 の排出に MDR1 が関与していること、MDR1 がコエンザイム Q10 の吸収改善に際し、有力なターゲットとなる可能性が示唆された。

3.4 コエンザイム Q10 の経細胞透過に対する MDR1 阻害剤の影響

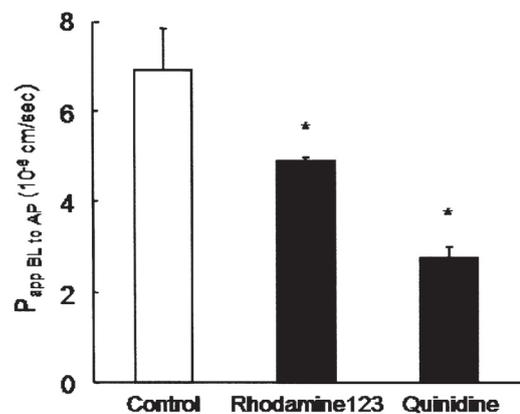


図4 Caco-2細胞における Basal to Apical 方向のコエンザイム Q10 の輸送に対する MDR1 阻害剤の影響

MDR1 は排出トランスポーターであるため、輸送活性の評価として Basal から Apical への経細胞輸送に着目した検討が行われることが多い。そこで、Caco-2 細胞におけるコエンザイム Q10 Basal から Apical への経細胞輸送に対する MDR1 阻害剤の影響を検討した。その結果、MDR1 阻害剤である Rho123 およびキニジンの共

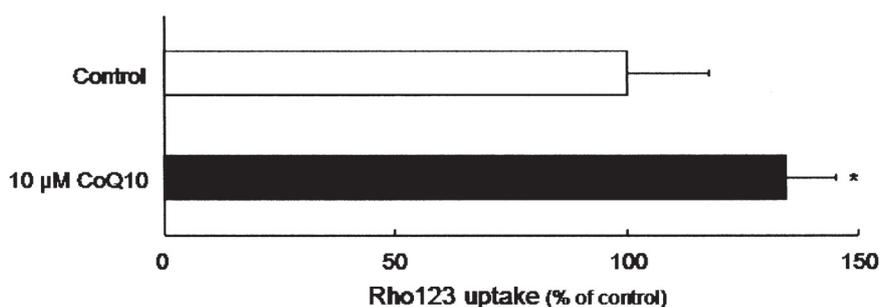


図5 Caco-2細胞へのRho123の取り込みに対するコエンザイムQ10の影響

存により、コエンザイムQ10のBasalからApicalへの透過係数は有意に減少した(図4)。この結果はコエンザイムQ10がMDR1に基質として認識されることを示しており、取り込み実験の結果ともよく合致した。

3.5 MDR1の基質に対するコエンザイムQ10の影響

コエンザイムQ10がMDR1の基質となることが強く示唆されたことから、コエンザイムQ10がMDR1阻害剤としても働くか否かについて検討を加えた。実験としては、MDR1の基質であるRho123のCaco-2細胞内蓄積量に対するコエンザイムQ10の影響を評価した。その結果、Caco-2細胞へのRho123の取り込みはコエンザイムQ10の存在下で有意に増加し、Rho123のapical側への排出が阻害されることが示唆された(図5)。この結果より、コエンザイムQ10はMDR1阻害剤としても働く可能性が示唆された。

4. ま と め

機能性食品は効能効果を表記できないため、企業側はそのエビデンス確立には時間・費用を費やさない傾向にある。本研究では、薬学的視点から消化管吸収の第一段階である細胞への取り込み過程に焦点を当て、機能性食品素材として繁用されているコエンザイムQ10の消化管吸収に排出トランスポーターMDR1が関与していることを明らかにし、その制御によりコエンザイムQ10の取

り込みが増加することを明らかにした。したがって、小腸上皮細胞の刷子縁膜に発現するトランスポーターの機能を制御することが機能性食品素材の吸収性を向上させるアプローチとして十分意義があることを示すことができたと考えている。配合剤など、機能性食品素材としてのトランスポーター機能制御剤を選択する上で重要な点は、高い安全性を有すること、長期的に経口摂取することができること、直接的にトランスポーターの機能を抑制すること、などが挙げられる。これらの点を踏まえ、現在は高いMDR1選択的阻害作用を有する食品成分の探索に取り組んでいる。

近年、薬と機能性食品の組み合わせによる事故が問題になりつつあるなかで、機能性食品に関するさまざまな情報を直接的に医療現場の薬剤師、医師、栄養士、消費現場の消費者(国民)から収集・調査するとともに、臨床解析や科学的な分析・評価を加えてゆく、新たな研究領域が生まれつつある。この領域においては情報の共有が重要な意味を持つため、科学的根拠のある健康食品情報を医療従事者に提供するシステムの構築・運用が試みられている。これらのデータベースでは、主に薬と機能性食品の相互作用による有害事象に焦点が当てられているが、化合物がもたらす副作用と効果は表裏一体であり、機能性食品の薬剤性副作用惹起機構に関する知見から機能性食品の吸収改善という視点での研究を展開することも可能であろう。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる研究助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団並びに関係者各位に心から感謝を申し上げます。それと共に、貴財団の将来にわたる益々のご発展をお祈り申し上げます。

研究助成による成果

Itagaki, S., Ochiai, A., Kobayashi, M., Sugawara, M., Hirano, T. and Iseki K. Interaction of Coenzyme Q10 with the intestinal drug transporter P-glycoprotein. *J. Agric. Food Chem.* 56 : 6923-6927 (2008).

板垣史郎

平成 20 年度 日本薬学北海道支部奨励賞受賞講演「カルボン酸系薬物の消化管吸収・分泌機構の解析」

文 献

- 1) Nakanishi T, Tamai I, Takaki A and Tsuji A, Cancer cell-targeted drug delivery utilizing oligopeptide transport activity. *Int. J. Cancer* 88 : 274-280 (2000).
- 2) Tamai I, Nakanishi T, Nakahara H, Sai Y, Ganapathy V, Leibach FH and Tsuji A, Improvement of L-dopa absorption by dipeptidyl derivation, utilizing peptide transporter PepT1. *J. Pharm. Sci.* 87 : 1542-1546 (1998).
- 3) Balimane PV, Tamai I, Guo A, Nakanishi T, Kitada H, Leibach FH, Tsuji A and Sinko PJ, Direct evidence for peptide transporter (PepT1)-mediated uptake of a nonpeptide prodrug, valacyclovir. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 : 246-251 (1998).
- 4) Crane FL, Hatefi Y, Lester RL and Winder C, Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 25 : 220-221 (1957).
- 5) 平成 13 年 6 月 28 日付食基発第 20 号医薬局食品保健部基準課長通知「〔医薬品の効能効果を標ぼうしない限り食品と認められる成分本質（原材料）〕の取扱いについて」
- 6) Katsura T and Inui K, Intestinal absorption of drugs mediated by drug transporters: mechanisms and regulation. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 18 : 1-15 (2003).

Establishment of the new strategy to improve the intestinal absorption of functional food components and development of the new combination preparation

Shiro Itagaki

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

Coenzyme Q10 (CoQ10) is very widely consumed by humans as a food supplement because of its recognition by the public as an important nutrient in supporting human health. However, CoQ10 is taken up from the intestine into the circulation at a low rate. The absorption of compounds from the gastrointestinal tract is one of the important determinants for oral bioavailability. When the absorption of a drug candidate is poor, various approaches to improve absorption are undertaken. The oligopeptide transporter PEPT1 is predominantly expressed in the brush-border membranes of small intestinal epithelial cells, where it plays pivotal roles in the efficient absorption of di-/tripeptides. PEPT1 has enormous potential as an oral drug delivery target, because it also mediates the intestinal absorption of peptide-mimetic and nonpeptide substrates. Secretory transport limits the oral bioavailability of certain drugs. However, there have been a few studies on the modulation of efflux transporter in order to improve the intestinal absorption of therapeutic agents. We focused on intestinal efflux transporter, MDR1/P-glycoprotein. We tried to improve intestinal absorption of CoQ10 by modulating the efflux transporter. In this study, we used Caco-2 as a model in which to study intestinal absorption of CoQ10. The uptake of CoQ10 into Caco-2 cells was significantly increased in ATP-depleted conditions and in the presence of MDR1 inhibitors. Furthermore, the uptake of rhodamine123 (Rho123), a typical substrate for P-gp, was significantly increased in the presence of CoQ10. Moreover, Rho123 significantly decreased the basal-to-apical transport of CoQ10 by Caco-2 cells. These data have provided a new aspect of the strategy to improve the intestinal absorption of functional food components that merit further investigation.