

<平成26年度助成>

## クルクミンおよび類縁体の培養細胞への取り込み量の評価： 細胞内移行と生理作用発現機構の関係解明に向けて

仲川 清隆

(東北大学大学院農学研究科)

### 1. クルクミンおよび類縁体の培養細胞への取り込み量の評価

ウコンに含まれるクルクミン (CUR) は、脂質低下などの生理作用が知られる<sup>1-8)</sup>。ヒトや動物が CUR を摂取すると、体内で代謝され、クルクミングルクロン酸抱合体 (CURG) が主要代謝物として血中に認められる (Fig.1)<sup>9-11)</sup>。しかし、CURG が生理作用の主体かは不明な点が多い。先に我々は、CUR と CURG の生理作用を培養細胞試験で調べ、CURG は CUR に比べてヒト肝ガン細胞 HepG2 にあまり影響しないことを報告した (Fig.1)<sup>12)</sup>。また、我々の別の実験では、CUR とともに類縁体デメトキシクルクミン (DMC)、ビスデメトキシクルクミン (BDMC) をヒト白血球単球細胞 THP-1 に加えると、細胞から専ら CUR が検出された

(Fig.2)<sup>13)</sup>。これらのことから、CUR は何らかの機構で積極的に細胞内に取り込まれ、生理機能を示すと予想された。

この証明に向けて、はじめに本研究では、CUR や CURG、還元代謝物 (テトラヒドロクルクミン (THC))、類縁体 (DMC や BDMC、合成類縁体) を HepG2 および THP-1 に加え、取り込み量や代謝を比較し、CUR の選択的な取り込みの有無を明らかにしようとした (Fig.3)。CUR や CURG、THC を細胞に処理し、細胞抽出物を HPLC 分析すると、HepG2 や THP-1 からは CUR が多く検出され、CURG は検出限界以下で、THC もほとんど認められなかった (Fig.4；HepG2 の解析例)。続いて、CUR とさらに構造の類似した化合物 (DMC や BDMC、および合成類縁体) の取り込み

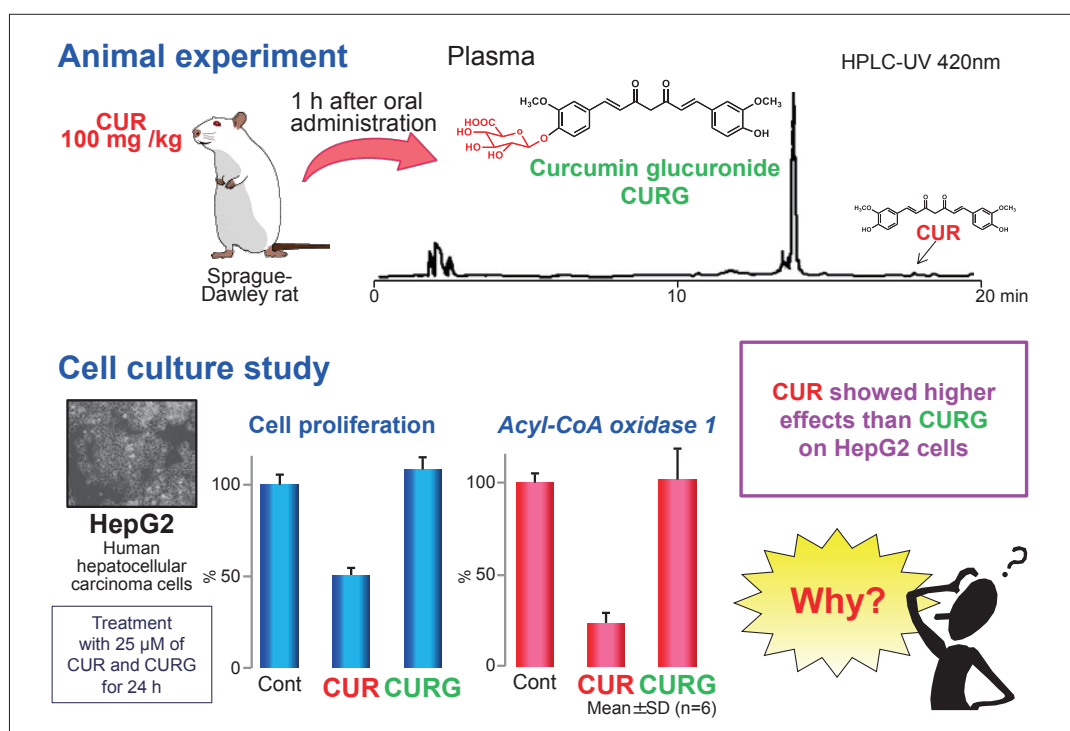


Fig. 1 Comparison of effects of CUR and metabolites

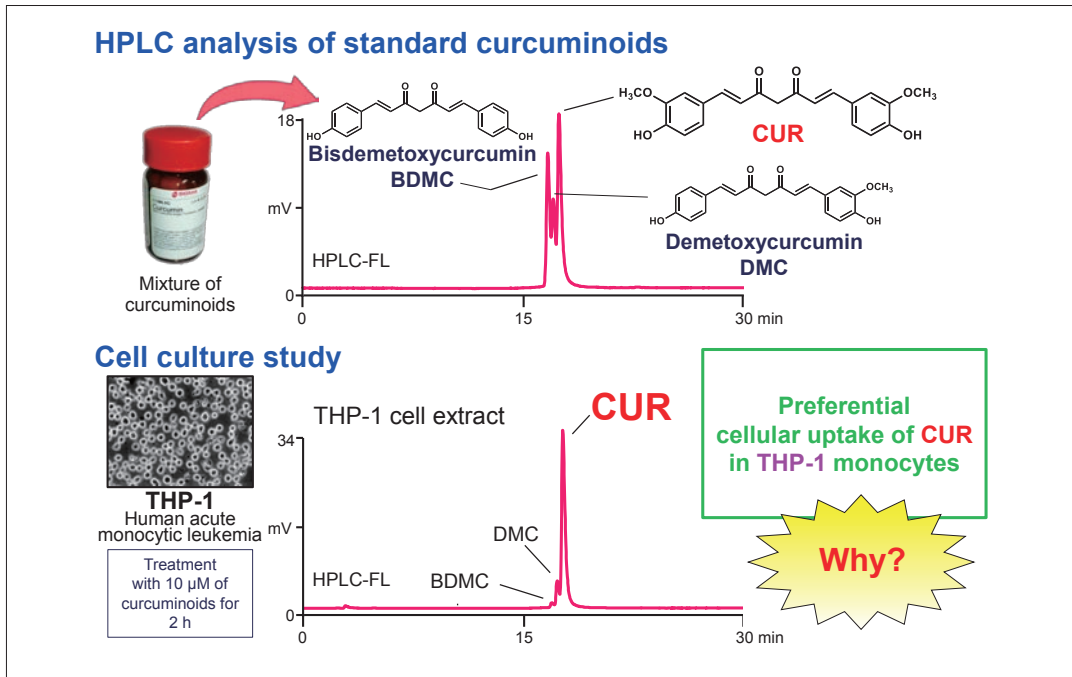


Fig. 2 Differential cellular uptake of curcuminoids

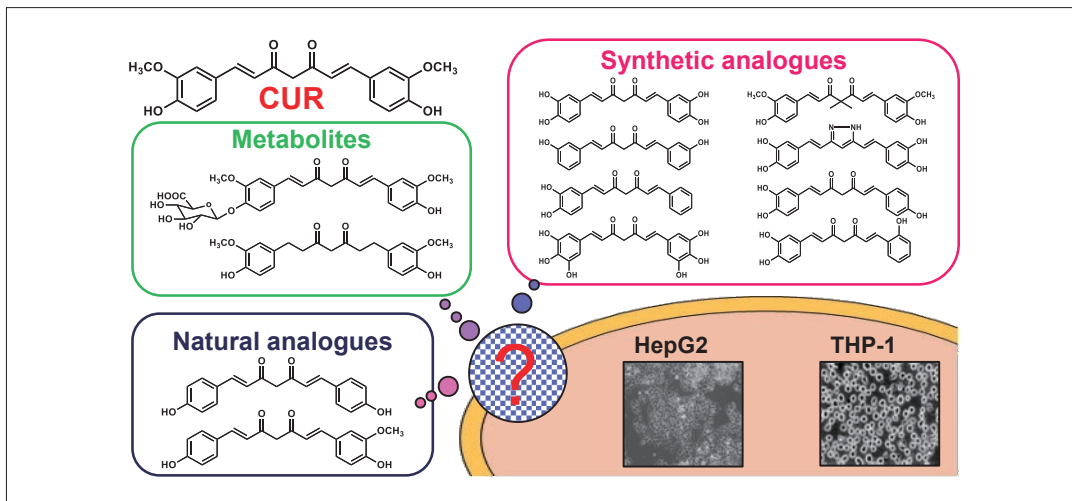


Fig. 3 Comparison of cellular uptake of CUR and other related molecules in order to gain insight on mechanism of CUR activities

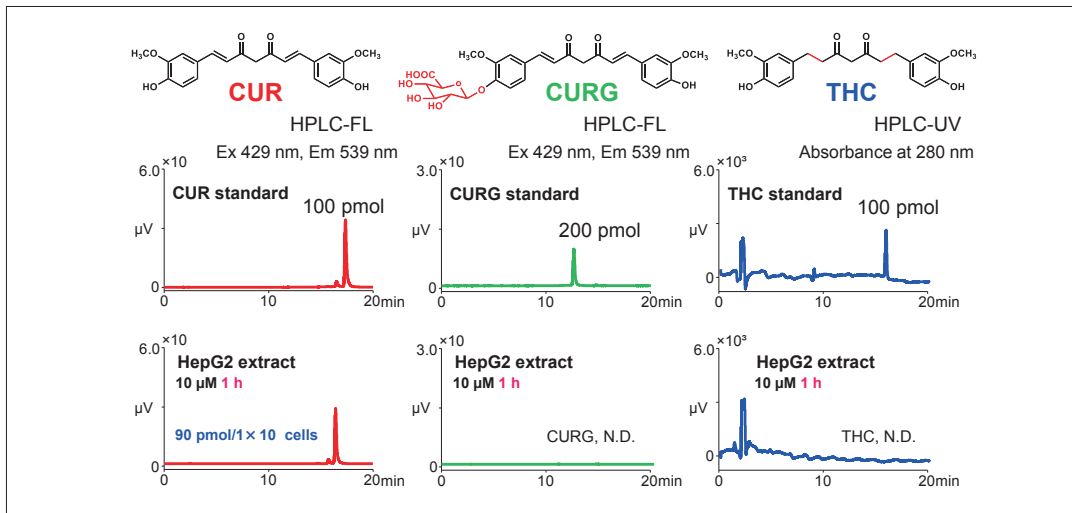


Fig. 4 Differential cellular uptake of CUR, CURG, and THC

を調べたが、いずれも細胞からきわめて微量しか検出されない、あるいは検出限界以下であった (Figs.5, 6; いずれも HepG2 の解析例)。以上より、CUR は代謝物および類縁体と区別されて積極的に細胞に取り込まれている可能性が新たに示唆された。

## 2. クルクミンの細胞内移行機構の解明：生理作用発現機構との関係性

上述の知見から、CUR を特異的に認識できるタンパク質 (CUR レセプター) の存在を想定して、

種々の阻害剤を用いた実験を現在進めている。具体的には、ある種のポリフェノールや脂溶性ビタミンの細胞内移行に関わるとされるトランスポーター (カチオントランスポーター、アニオントランスポーター) の阻害剤 (glibenclamide、probenecid、等) を細胞に処理し、その後に CUR を細胞に加え、阻害剤の影響を調べている。これらの実験において、ある阻害剤の有用性を認めつつあり、重点的に解析を進めている。

ちなみに、CUR のレセプターを示唆する論文は

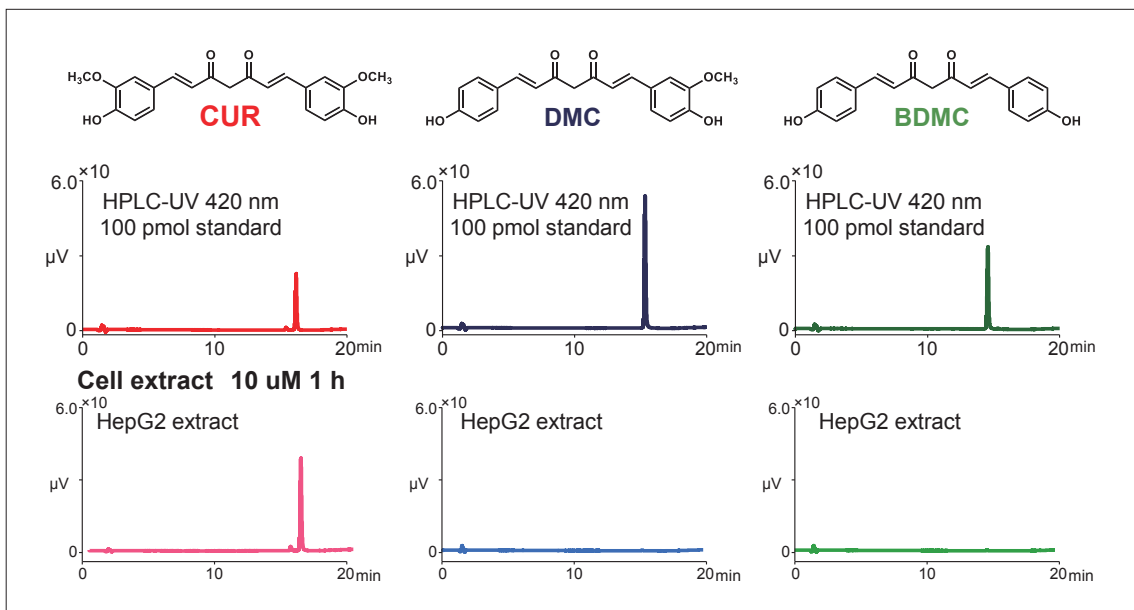


Fig. 5 Differential cellular uptake of CUR, DMC, and BDMC

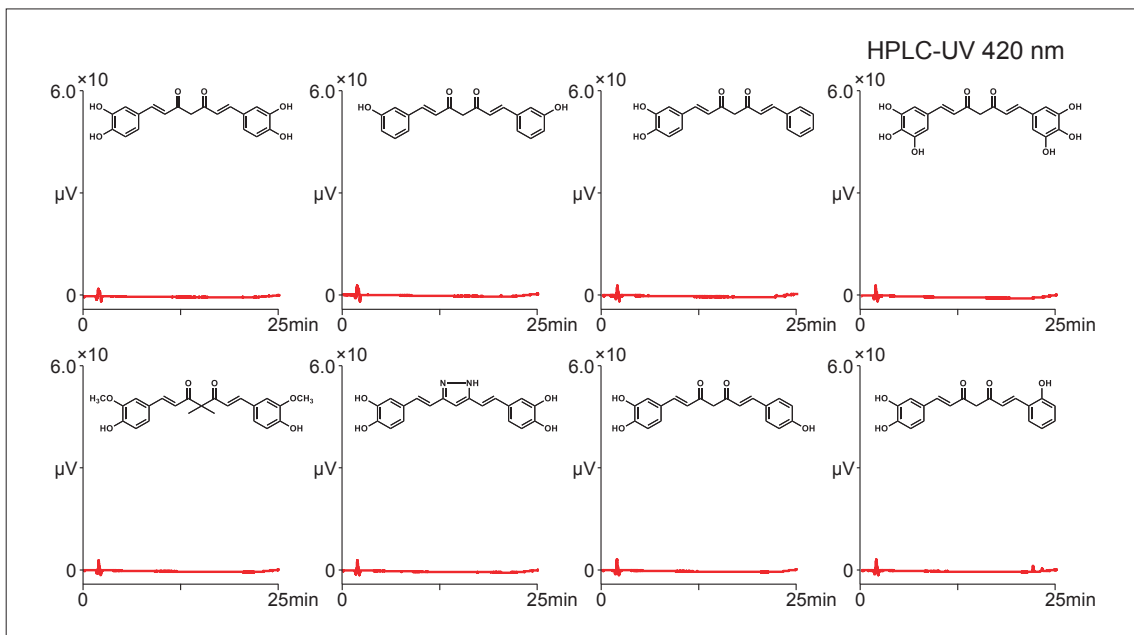


Fig. 6 Differential cellular uptake of synthetic CUR analogues

過去にひとつあるが、この論文は取り下げられている。したがって、CURレセプターの存在は未だ明らかにされていない。今後も本研究を推進してCURレセプターの存在を証明し、CURレセプターの発現を増強できれば、CUR作用のより効果的な享受法の構築へと展開でき、CURの健康機能に関する新しい方法論の提供が可能になると期待される。例えば、“レセプターの発現増強を介したCUR作用を受け取りやすい食事の提案”、あるいは“レセプターの発現機構の違いによるCUR

作用の個人差とその解決策の構築”、等々、従来に無い着想と方法論を世界に提案できると考えている。

### 3. クルクミン封入ナノ粒子の吸収代謝の評価：生理作用発現機構との関係性

昨今、CURの生物学的利用能の改善に向けてCURをナノ粒子に封入する試みが行われている<sup>14-21)</sup>。そこで、本研究を進める過程で、ナノ粒子作製に広く用いられる生分解性ポリマー（ポリ乳酸・グリコール酸共重合体：PLGA）を用いて

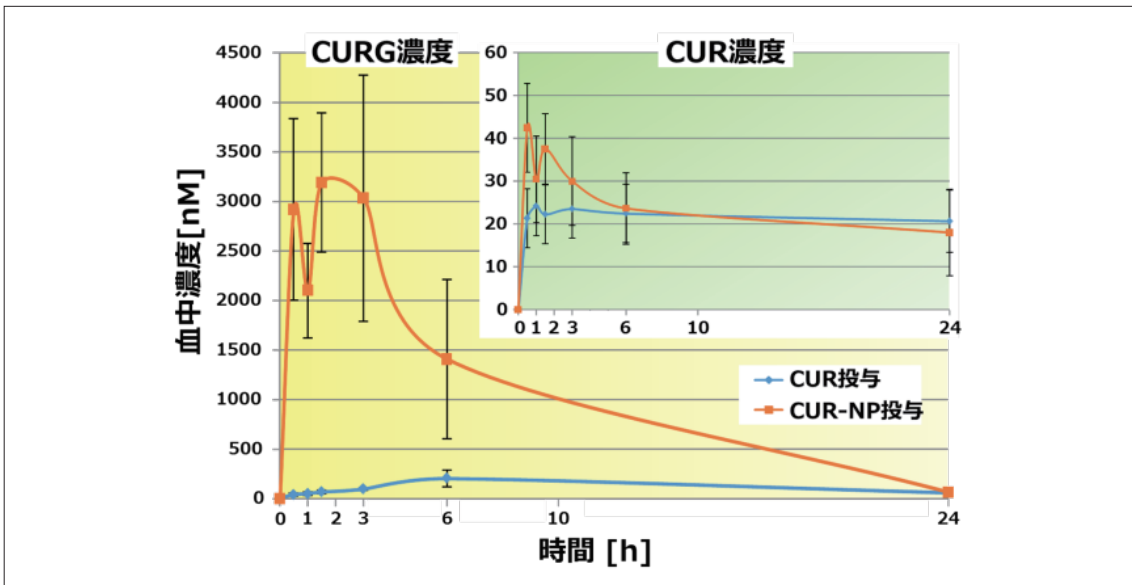


Fig. 7 Comparison of *in vivo* plasma concentration vs. time profiles

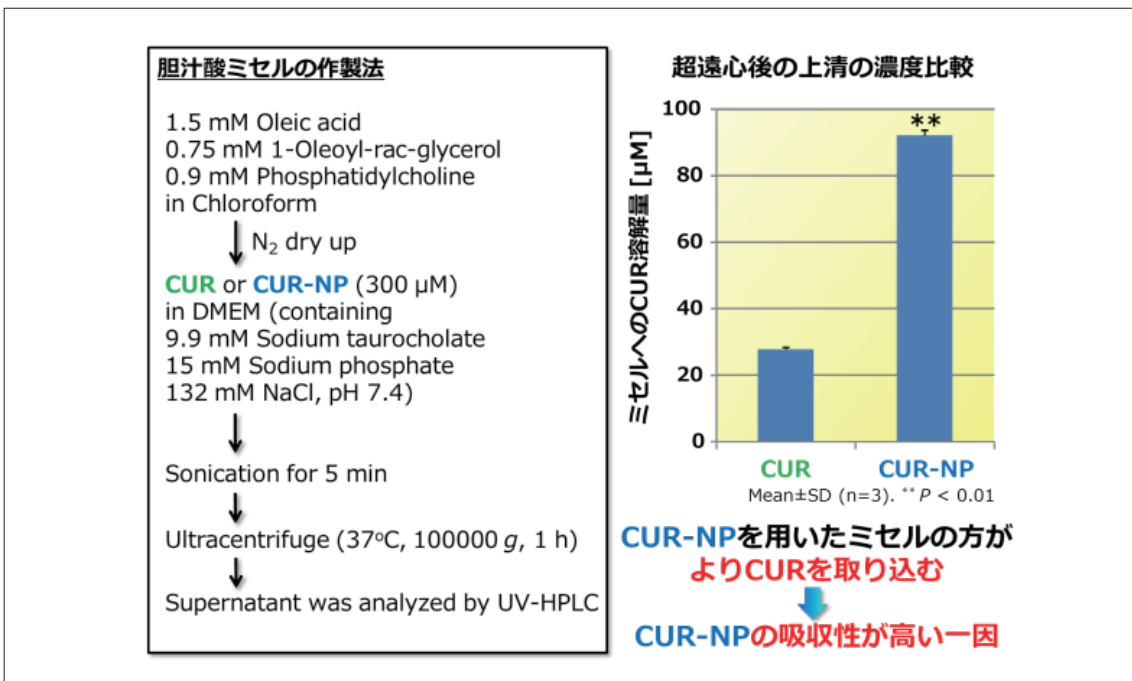


Fig. 8 Comparison of CUR concentration in micelles

CUR封入ナノ粒子(CUR-NP)を調製し、その細胞への取り込み試験も行ったところ、確かに、細胞への取り込みが見られた。現状で、CUR-NPの体内への取り込み量やCUR代謝におよぼす影響は未だ不明な点が多いことから、本研究において *in vivo* および *in vitro* 試験を行い、CUR-NPの吸収代謝を明らかにしようとした。

その結果、CUR-NPを投与したラット血漿からは多量にCURGが検出されたものの、CURは微量であることがわかった。他方、CURを与えたラット血漿のCURG濃度は低く、CURはほとんど存在しなかった(Fig.7)。したがって、CUR-NPはCURの吸収性を高めるが、ほとんどCURGに代謝されると考えられた。*In vitro* 試験では、CURを用いて調製したミセルよりも、CUR-NPを用いたミセルの方がCUR溶解量が多く(Fig.8)、このことからラットにおけるCUR-NPとCURの吸収性の違いは、両者の胆汁酸ミセルへの取り込まれ易さの違いと予想された。これらのことから、CURの吸収性を高めるには、CURをナノ粒子に封入することは有効であるが、ナノ粒子化による生理作用向上に関しては更なる研究が必要と考えられた。

#### 4. おわりに

CURをはじめとする多くのポリフェノール等の食品成分は、吸収代謝と生理作用発現機構の関係について、十分な解明がなされているとは言えない面がある。こうした中で、本研究の成果は、CURの吸収・代謝的特性を明確にし、食品の新しい機能発見に繋がり、疾病予防に役立つので、社会的意義が大きいと思われる。

#### 謝 辞

本研究の実施に当たり、研究助成を頂きました(公財)浦上食品・食文化振興財団に心より御礼申し上げます。今後も、引き続き本研究を進めていく所存です。

#### 文 献

- 1) Asai, A & Miyazawa, T (2001) Dietary curcuminoids prevent high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue. *J Nutr* **131**, 2932-2935
- 2) Sharma, RA, Gescher, AJ & Steward, WP (2005) Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* **41**, 1955-1968.
- 3) Ejaz, A, Wu, D, Kwan, P & Meydani, M (2009) Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *J Nutr* **139**, 919-925.
- 4) Zingg, JM, Hasan, ST & Meydani, M (2013) Molecular mechanisms of hypolipidemic effects of curcumin. *Biofactors* **39**, 101-121.
- 5) Zingg, JM, Hasan, ST, Cowan, D, Ricciarelli, R, Azzi, A & Meydani M (2012) Regulatory effects of curcumin on lipid accumulation in monocytes/macrophages. *J Cell Biochem* **113**, 833-840.
- 6) Sawada, H, Saito, Y & Noguchi, N (2012) Enhanced CD36 expression changes the role of Nrf2 activation from anti-atherogenic to pro-atherogenic in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* **225**, 83-90.
- 7) Kou, MC, Chiou, SY, Weng, CY, Wang, L, Ho, CT & Wu MJ (2013) Curcuminoids distinctly exhibit antioxidant activities and regulate expression of scavenger receptors and heme oxygenase-1. *Mol Nutr Food Res* **57**, 1598-1610.
- 8) Gupta, SC, Sung, B, Kim, JH, Prasad, S, Li, S & Aggarwal, BB (2013) Multitargeting by turmeric, the golden spice: from kitchen to clinic. *Mol Nutr Food Res* **57**, 1510-1528.
- 9) Pan, MH, Huang, TM & Lin, JK (1999) Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* **27**, 486-494
- 10) Asai, A & Miyazawa, T (2000) Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sci* **67**, 2785-2793.
- 11) Anand, P, Kunnumakkara, AB, Newman, RA & Aggarwal BB (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* **4**, 807-818.
- 12) Shoji, M, Nakagawa, K, Watanabe, A, Tsuduki, T, Yamada, T, Kuwahara, S, Kimura, F & Miyazawa, T (2014) Comparison of the effects of curcumin and curcumin glucuronide in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Food Chem* **151**, 126-132.
- 13) Nakagawa, K, Zingg, JM, Kim, SH, Thomas, MJ, Dolnikowski, GG, Azzi, A, Miyazawa, T & Meydani, M (2014) Differential cellular uptake and metabolism of curcuminoids in monocytes/macrophages: regulatory effects on lipid accumulation. *Br J Nutr* **112**, 8-14.
- 14) Sun, M, Su, X, Ding, B, He, X, Liu, X, Yu, A, Lou, H & Zhai, G (2012) Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine (Lond)* **7**, 1085-1100.
- 15) Maradana, MR, Thomas, R & O'Sullivan, BJ (2013) Targeted delivery of curcumin for treating type 2 diabetes. *Mol Nutr Food Res* **57**, 1550-1556

- 
- 16) Ghalandarlaki, N, Alizadeh, AM & Ashkani-Esfahani, S (2014) Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy. *Biomed Res Int.* 2014, 394264.
- 17) Ahmad, MZ, Akhter, S, Mohsin, N, Abdel-Wahab, BA, Ahmad, J, Warsi, MH, Rahman, M, Mallick, N & Ahmad, FJ (2014) Transformation of curcumin from food additive to multifunctional medicine: nanotechnology bridging the gap. *Curr Drug Discov Technol* **11**, 197-213.
- 18) Lee, WH, Loo, CY, Young, PM, Traini, D, Mason, RS & Rohanizadeh, R (2014) Recent advances in curcumin nanoformulation for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* **11**, 1183-1201.
- 19) Hu, L, Pang, S, Hu, Q, Gu, D, Kong, D, Xiong, X & Su, J (2015) Enhanced antitumor efficacy of folate targeted nanoparticles co-loaded with docetaxel and curcumin. *Biomed Pharmacother* **75**, 26-32.
- 20) Leung, MH, Harada, T, Dai, S & Kee, TW (2015) Nanoprecipitation and spectroscopic characterization of curcumin-encapsulated polyester nanoparticles. *Langmuir* **31**, 11419-11427.
- 21) Yallapu, MM, Nagesh, PK, Jaggi, M & Chauhan, SC (2015) Therapeutic applications of curcumin nanoformulations. *AAPS J* **17**, 1341-1356.



## Cellular uptake of curcumin and structurally related compounds: its relation to biological activity

Kiyotaka Nakagawa

Graduate School of Agricultural Science

Tohoku University

Curcumin (CUR), also known as diferuloylmethane (IUPAC name (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione), is obtained from the rhizome of turmeric (*Curcuma longa* L.) and is present in dried turmeric powder at a concentration of 2–5%. CUR has been known to have anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-tumor and lipid-lowering activity *in vivo*. Our laboratory also reported that CUR decreases accumulation of triglyceride in rat liver by up-regulating the expression of acyl-CoA oxidase mRNA and promoting peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation. However, several studies have reported that the bioavailability of CUR is very low because of its low absorption rate and rapid metabolism. We also previously reported that when CUR is absorbed through intestinal cells in rats, most of the CUR is conjugated as curcumin glucuronide (CUR-G). Unmetabolized CUR is found in blood at extremely low levels. Thus, it is still unclear whether CUR itself and/or CUR conjugate are responsible for above biological activities of CUR inside the body.

In our recent study, we confirmed again that CURG is the major metabolite of CUR found in the plasma after oral administration of CUR in rats. And, we synthesized CURG and compared the effects of CUR and CURG on gene expression in a human hepatoma cell line (HepG2). We found that the effects of CURG are weaker than those of CUR and that this difference is related to relative absorption rates of CUR and CURG into HepG2 cells. In another study, we found that CUR is readily taken up by THP-1 monocytes. By contrast, the uptake of structurally related compounds (demethoxycurcumin (DMC) and bisdemethoxycurcumin (BDMC)) was low. From these results, it is hypothesized that CUR is readily taken up by cells, which determine its biological activity. To evaluate the hypothesis, in this study, we performed cell culture studies.

Liquid chromatography with UV, fluorescence, and mass spectrometric detection revealed that CUR is readily taken up by HepG2 cells and THP-1 monocytes. By contrast, the uptake of CUR metabolite (CURG) and structurally related compounds (DMC, BDMC, and synthesized related compounds) was low. Hence, it is possible to deduce that CUR uptake into cells determines its biological activity. The remarkable differential cellular uptake of CUR, relative to CURG, DMC, BDMC, and other similar molecules, may imply that the CUR uptake into cells may occur via a transporter. Despite the fact that the existence of a CUR transporter appears to be the best explanation for the transport specificity, other possibilities (e.g., simple diffusion of curcuminoids into cells due to their different polarities and/or solubilities) cannot be ruled out. Obtaining direct evidence of a CUR transporter is part of ongoing studies, involving saturation kinetic analyses, inhibitor usage and temperature dependence of the phenomenon. In addition to the ongoing studies, we are performing experiments about CUR nanof ormulation in order to increase bioavailability of CUR.