

# トランスポータNPC1 L1を介した難水溶性物質の 消化管吸収改善への新規アプローチ

佐藤 夕紀

北海道大学大学院薬学研究院 助教

## 緒 言

近年、我が国は生活習慣病の増加、超高齢社会などの背景から、国民医療費は年々増大し、もうまもなく40兆円に到達しようとしている<sup>1)</sup>。その高騰する国民医療費の削減を期待して、「予防医療」が注目されており、特定保健用食品(トクホ)をはじめとする多様な健康食品が開発、利用されている。予防医療において健康食品・サプリメント等の経口投与は、使用者の簡便性・安全性などから最も汎用されている投与形態である。特に難水溶性で脂溶性の高い成分が体内に吸収されるには、小腸で胆汁などにより乳化、ミセルを形成する必要がある。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、近年、小腸cholトランスポータとしてNPC1 L1(Niemann-Pick C1 Like 1)の関与が報告された<sup>2)</sup>。トランスポータはある特定の成分を認識して、細胞内(あるいは外)へ基質を輸送するタンパク質である。NPC1 L1は、cholのようなステロール骨格を持つ物質を認識して細胞内へ取り込むと考えられていたが、ステロール骨格を持たない $\alpha$ -トコフェロールやルテインなどの消化管吸収にNPC1 L1が関与していることが報告された<sup>3,4)</sup>。NPC1 L1はクラスリン介在性エンドサイトーシスにより、基質を細胞内へ取り込むと考えられているものの<sup>5)</sup>、基質認識性など十分には明らかにされていない。また、ミセルは粒子内にこのような成分を保持していると考えられるが、cholトランスポータNPC1 L1の基質がミセル化された場合、NPC1 L1はどのように基質を認識しているかを明確に示した報告はない。

そこで本研究では、まずミセル中のNPC1 L1の基質がどのように細胞内に取り込まれているかを検討する。また、吸収性の低い難水溶性物質の乳剤調製時に、cholをはじめとするNPC1 L1の基質となる成分を組み込むことで、難水溶性物質の吸収を改善しうる新しいアプローチに着手し、これまでに低吸収性が問題となり製剤

化できなかった成分の新たな吸収改善法を提案し、製剤開発の一助とすることを目標とする。

## 実験方法

### 1. 実験材料

コレステロール(非ラベル体)は、北海道和光純薬工業より、アイソトープ標識コレステロール [ $1\alpha$ ,  $2\alpha$ - $^3\text{H}(\text{N})$ ] Cholesterol (53.0 Ci/mmol) は、パーキンエルマー社より、購入した。蛍光色素で標識されたコレステロール Chol-NBD (25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)methyl]amino]-27-norcholesterol) およびリン脂質 LPC-BODIPY (LPC(lysophosphatidylcholine)-BODIPY (4,4-Difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid saccinimidyl ester) は、Avanti Polar Lipid社より入手した。5(6)-carboxy-fluoresceinはSIGMA-Aldrich社より入手した。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. 使用細胞

ヒト結腸癌由来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。

### 3. 実験動物

実験動物はWistar系雄性ラットを6週齢で三協ラボサービス株式会社より購入し、環境に順応させるため1週間以上飼育した後、体重200-350gのものを用いた。飼育は、温度 $23\pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 内で行った。水は新鮮水道水、餌はローデントラボダイエット5L37を自由摂食させた。

### 4. 乳剤の調製

コレステロールを主成分とし、界面活性剤成分とし

表1 transport bufferの組成

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

てタウロコール酸ナトリウムを終濃度が500  $\mu$ Mとなるように添加し、超音波ホモジナイザーを用いて乳剤 (oil成分として isopropyl myristate 1%、transport buffer成分99%) を調製した。Transport bufferの組成は表1の通りである。

## 5. リポソームの調製

卵黄ホスファチジルコリン20 mg (26  $\mu$ mol) と NPC1 L1の基質であるコレステロール3.9 mg (10  $\mu$ mol) を50 mL容すり付ナスフラスコに入れ、2 mLのクロロホルムを加えて溶解させた。その溶液をロータリーエバポレーターで1時間減圧留去し薄膜形成させた。さらに3 mLジエチルエーテルと0.5 mLのフルオレセインナトリウム溶液を加えて、浴槽型ソニケーターで4 $^{\circ}$ C、5分間ソニケーションにより攪拌した。続いて、ロータリーエバポレーターで3~5分間減圧留去し、transport buffer 2.5 mLを加えて10~15分間ボルテックスにより攪拌した。さらに、エーテル臭がなくなるまでロータリーエバポレーターで減圧留去し、リポソーム溶液を得た。このリポソーム溶液をSephadex G-50カラムを用いてゲル濾過し、リポソーム画分のみを実験に用いた。

## 6. 顕微鏡による観察

Caco-2細胞をガラスベースディッシュ (IWAKI) に  $2 \times 10^5$  cells/wellとなるように播種して培養し、サブコンフルエント以上の状態になったものを実験に使用した。

メディウムを除去し、5  $\mu$ g/mL Hoechst 33342溶液1 mLを加え、10分間、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で静置し、核を染色した。溶液を除去し、transport buffer 1 mLで2回洗浄し、NPC1 L1の基質成分として蛍光標識されたChol-NBDの濃度が4  $\mu$ g/mLとなるように添加した溶液を用いてcholの取り込み実験を行った (取り込み時間5分)。取り込み終了後、蛍光観察のためにメディウム2 mLに置換した。その後共焦

点レーザー顕微鏡FV10i (OLYMPUS) で観察した (対物レンズ60倍)。画像はXY画像またはZ軸画像を取得し、コントラストなどを調整した。

## 7. 取り込み実験および濃度測定

### 1) Cholesterol

メディウム吸引後にtransport buffer 1 mLで2回洗浄し、250  $\mu$ Lのchol溶液 (18.9 nM, 1  $\mu$ Ci/mL) を添加した。その後、3、5、10、15、30分の時点で、それぞれchol溶液を吸引し、氷冷したtransport buffer 1 mLで2回洗浄した。取り込み終了後にCell lysis solution (1% SDS in 0.2 N NaOH) 250  $\mu$ Lで細胞を溶解し、milliQ水400  $\mu$ Lを加え、回収した。測定は液体シンチレーション法により行い、Lowry法により求めたタンパク質量で補正して取り込み量を算出した。また、NPC1 L1の阻害剤であるエゼチミブを加えた実験に関しては、エゼチミブの濃度を0、5、10、25  $\mu$ Mとなるように薬液を調製し、1時間プレインキュベートした後に、上記と同様の方法で取り込みを行った。

### 2) Coenzyme Q10 (CoQ10)

「乳剤の調製」で調製した乳剤に、難吸収性物質としてCoQ10の終濃度が300  $\mu$ g/mLとなるように添加した溶液を用いてCoQ10の取り込み実験を行った (取り込み時間15分)。Chol-free、Chol-free with ezetimibe、Chol 1  $\mu$ M、Chol 1  $\mu$ M with ezetimibeの4種類の条件で実験を行い、比較検討した。取り込み終了後、メディウムを吸引し、氷冷したtransport buffer 1 mLで2回洗浄した。細胞破碎液 (リン酸バッファー300  $\mu$ L) を加え、Scheme 1に示すような手順でサンプルを調製し、表2に示した条件でHPLCを用いて濃度を測定した。また、Lowry法により求めたタンパク質量で補正して取り込み量を算出した。

### 3) 5(6)-Carboxyfluorescein

メディウム吸引後にtransport buffer 1 mLで2回洗浄し、10  $\mu$ g/mL 5(6)-carboxyfluoresceinを含むリポソーム溶液250  $\mu$ Lを添加した。その後、5、15、30、60、120分の時点で、それぞれリポソーム溶液を吸引し、氷冷したtransport buffer 1 mLで3回洗浄した。取り込み終了後に0.1 N NaOH 250  $\mu$ Lで細胞を溶解し、このうち200  $\mu$ LをBD Falcon black plateに分取し、マイクロプレートリーダー TECAN Infinite M200 (TECAN Japan Co., Ltd.) で、蛍光 (励起波長490 nm, 測定波長520 nm) を測定した。また、Lowry法により求めたタ

Scheme 1 CoQ10 extraction method

Sample 100  $\mu$ L  
 ↓ Added to 400  $\mu$ L of methanol  
 ↓ Mixed vigorously by a vortex mixer 30 s  
 ↓ Added to 2 mL of Hexane  
 ↓ Mixed vigorously by a vortex mixer 30 s  
 ↓ Centrifugation 3500 rpm for 10 min at 20°C  
 1.8 mL of the organic phase  
 ↓ Evaporated to dryness for 30 min at 40°C  
 Residue  
 ↓  
 Reconstituted in 100  $\mu$ L of HPLC mobile phase

表2 HPLC condition for CoQ10

Eluent	Methanol/ethanol=35/65 (v/v)
Column	Inertsil ODS-4
Flow rate	0.4 mL/min
Wavelength	UV 275 nm
Column temperature	40°C
Injection Volume	40 $\mu$ L

ンパク質量で補正して取り込み量を算出した。

結 果

1. Caco-2細胞におけるNPC1 L1遺伝子の確認と条件検討

検討に先立ち、Caco-2細胞におけるNPC1 L1遺伝子の発現確認を行った。その結果、Caco-2細胞においてNPC1 L1遺伝子が発現していることが示された (data not shown)。また、Caco-2細胞でのchol取り込みの経時的变化を検討したところ、cholの取り込みは15分までは直線性を保つという結果が得られた (図1A)。測定感度の観点などから以降は、cholの取り込み時間を5分とすることとした。さらに、NPC1 L1の阻害剤としてエゼチミブが挙げられる。このエゼチミブの濃度を振って、十分に差がみられる阻害条件を検討した。その結果、エゼチミブの濃度が25  $\mu$ Mでコントロールと比較して有意にcholの取り込みが抑制された (図1B)。このことから、以降のエゼチミブによる阻害は、25  $\mu$ Mとして検討を進めてゆくこととした。

2. NPC1 L1によるChol輸送機構の検討

続いて、NPC1 L1の基質を含むミセルの取り込み挙動を明らかにすべく、界面活性成分であるLPCの蛍光標識体であるLPC-BODIPYを用いることでcholの有無によるLPC-BODIPYの取り込み量の変化を検討した。膜付近でミセルが崩壊しcholが単独でNPC1 L1により

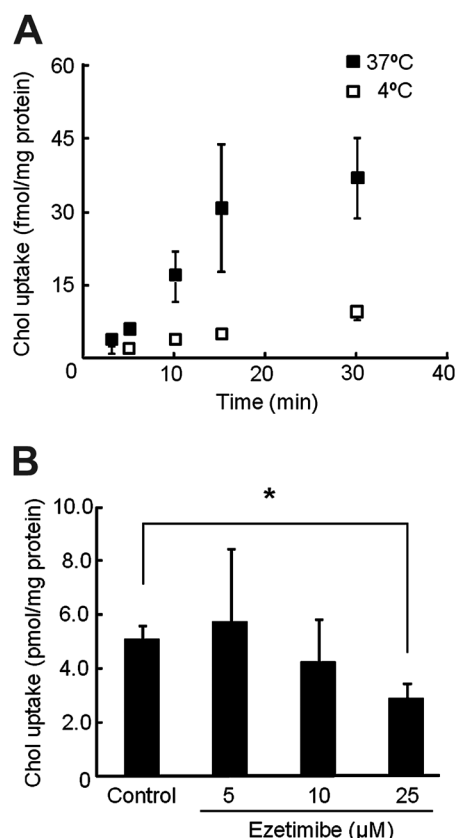


図1 Caco-2細胞へのコレステロールの取り込みにおける温度の影響 (A)、NPC1 L1阻害薬エゼチミブによる阻害効果 (B)

輸送されると仮定するとcholの有無によってLPC-BODIPYの取り込みが変化しないと考えられる。一方でcholを含んだミセルの状態のままNPC1 L1により輸送されると仮定するとcholを加えることでLPC-BODIPYの取り込みが増大し、さらにその増大分がNPC1 L1選択的阻害剤であるエゼチミブによって抑制されると考えた。その結果、LPC-BODIPYの取り込みを測定したところ、cholを加えることで蛍光色素量は有意に増大し、さらにその増大分がエゼチミブによって阻害されるという結果が示された (図2)。また、実際にcholが細胞内に輸送されているかを視覚的に確認するために核染色およびcholの蛍光物質を使用し、共焦点顕微鏡観察を行った。その結果、核と同一平面上にCholの蛍光が観察されたことから、先ほど検討した条件でCholは細胞内に輸送されていることが示された (図3)。

3. NPC1 L1を介した難吸収性物質の乳化による吸収改善

前項までの検討で、cholを含んだミセルの状態のまま

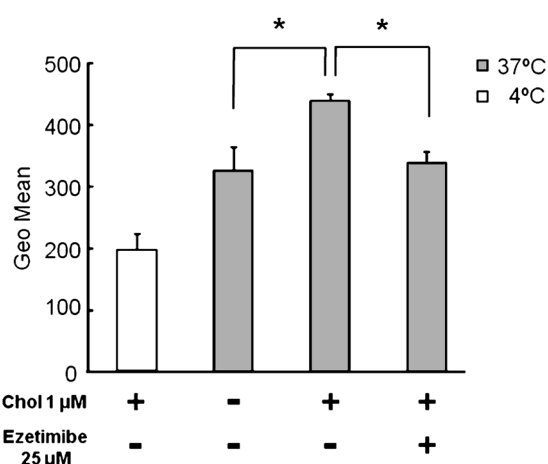


図2 Caco-2細胞へのLPC-BODIPYの取り込みにおけるコレステロールとエゼチミブの影響

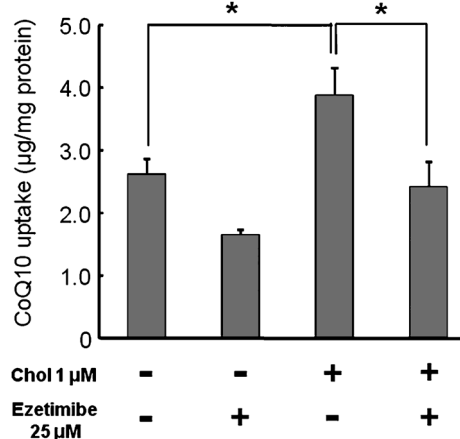


図4 Caco-2細胞へのCoQ10の取り込みにおけるcholとエゼチミブの影響

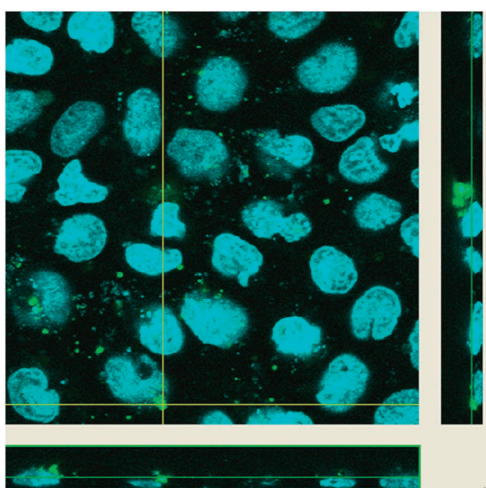


図3 Caco-2細胞内への蛍光標識cholの取り込みの顕微鏡観察 (緑: chol-NBD、青: 核)

NPC1 L1によって輸送されると仮定すると、NPC1 L1の基質であるcholを含むミセルに何らかの難水溶性物質を封入することでその物質の吸収を改善できるのではないかと我々は考え検討した。今回は当研究室でそのバイオアベイラビリティが10%以下であることを明らかにした<sup>6)</sup>難吸収性物質としてCoQ10を選択した。その結果、先ほどと同様にCoQ10の取り込みはcholを加えることで増大し、さらにその増大分がエゼチミブによって抑制された (図4)。

#### 4. NPC1 L1による難吸収性 (水溶性) 物質のリポソームによる吸収改善

続いて、NPC1 L1を介した水溶性物質の吸収改善が可能か否かを明らかにするため、cholを構成成分とする

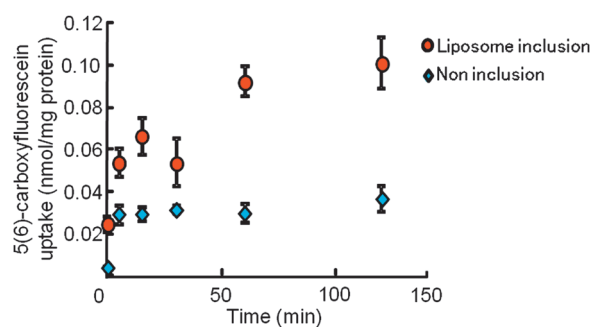


図5 Caco-2細胞へのリポソーム封入および非封入5(6)-carboxyfluoresceinの取り込みの違い

リポソーム内に5(6)-carboxyfluoresceinを封入したものとしていないもののCaco-2細胞内への取り込み量を比較した。その結果、リポソームに封入していない場合と比較して、cholを含むリポソームにより、5(6)-carboxyfluoresceinの取り込み量は増大することが確認された (図5)。

#### 考 察

NPC1 L1は、小腸と肝臓に主に発現し、cholを基質とした取り込み系トランスポーターであり、その選択的阻害剤であるエゼチミブが脂質異常症治療薬として汎用されていることなどから注目を集めている。今回、我々は、NPC1 L1をターゲットとして、ミセル分子がどのように細胞内に取り込まれるか、またその明らかにした機構を利用した吸収改善が可能か否かを検討した。図2の結果より、cholを加えることで細胞内に取り込まれた蛍光色素量は有意に増大し、さらにその増大分がエゼチミブによって阻害されるという結果が示された。LPC



そのものがNPC1 L1の基質である可能性も考えられるが、LPCの加水分解前であるPC (phosphatidylcholine) がNPC1 L1の基質ではないという報告もあることから<sup>7)</sup>、PCよりも親水性のあるLPCはNPC1 L1の基質ではないと考えた。以上のことから、cholはNPC1 L1によって乳化したミセルの状態のまま輸送される可能性が示された。

また、図4の結果より、乳剤にcholを加えることで、難水溶性物質であるCoQ10の細胞内取り込み量は有意に改善できることが示された。また、その増大分はエゼチミブで抑制された。cholを含まない乳剤においてもエゼチミブでプレインキュベーションすることによりCoQ10の取り込みが有意差は確認されないものの減少傾向にあることなどから、CoQ10はNPC1 L1の基質である可能性も考えられる。現在までに、CoQ10がNPC1 L1の基質であるという報告はされていないものの、CoQ10と類似した構造を持つ $\alpha$ -トコフェロールはNPC1 L1の基質であるという報告がされていることから<sup>3)</sup>、CoQ10がNPC1 L1の基質である可能性も考えられる。このことを明らかにするために、我々はNPC1 L1のsiRNA、NPC1 L1の過剰発現細胞などを用いて詳細に検討するべきであると考えている。また、汎用性の拡大を期待して、NPC1 L1の基質ではないと報告されているレチノール<sup>3)</sup>等を用いて、同様の検討を行い、NPC1 L1の基質とならない物質でも本研究で検討した機構を利用して吸収改善が可能であるかを検討したいと考えている。

さらに、我々は水溶性物質をリポソームに封入してNPC1 L1をターゲットとした吸収改善が可能か否かを検討した。本来ならば、実際に汎用されている医薬品成分等を用いるべきと考えたが、その扱いなどが少々複雑な場合も多いことから、まずは測定のしやすさなどの観点より低吸収性を示す水溶性物質として5(6)-carboxyfluoresceinを用いて、吸収改善効果を確認したいと考えた。その結果、図5より、5(6)-carboxyfluorescein溶液の場合はほとんど取り込まれたのが観察されなかったのに対して、chol含有リポソーム溶液の方が5(6)-carboxyfluoresceinが取り込まれていることが確認された。

これらの結果から、コレステロールを構成成分とするリポソームに水溶性物質を封入することで、NPC1 L1を介して吸収を改善できる可能性が示唆された。今後は、実際に水溶性ではあるが、膜低下性が低いことで製品化が難しいとされている成分等他の物質でも同様に検討し、取り込み量を数値化するなど本現象を十分に検証し、本研究で得られた知見が実際に応用可能か否かを明らかにしていきたい。

## 要 約

本研究により、小腸コレステロールトランスポーターであるNPC1 L1の基質を含む乳剤粒子は、ミセル粒子ごと細胞内へ取り込まれることが示唆された。また、その機構を利用して、難吸収性物質の吸収を改善できないか、モデル物質として乳剤中にCoQ10を加えて検討した結果、cholを含む乳剤粒子により、その細胞内取り込み量を改善することができた。また、水溶性物質である5(6)-carboxyfluoresceinをリポソームに封入する際、cholを膜成分として組み込むとその細胞内取り込みが改善する可能性が示された。今後は汎用性を拡大できるような他の物質でも同様に検討し、低吸収性が問題となっている成分の製剤化の一助となるよう検証してゆきたい。

## 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三島海雲記念財団、ならびに関係の皆様様に深く感謝申し上げます。また、本研究の実施において種々の検討にご協力いただいた北海道大学薬学部竹川悠人氏、篠原紹宏氏に心から感謝いたします。

## 文 献

- 1) 厚生労働省：平成24年度国民医療費の概況
- 2) S. W. Altmann, et al.: *Science*, **303**, 1201–1204, 2004.
- 3) K. Narushima, et al.: *Mol. Pharm.*, **74**, 42–49, 2008.
- 4) Y. Sato, et al.: *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **15**, 256–264, 2012.
- 5) L. Ge, et al.: *Cell Metab.*, **7**, 508–519, 2008.
- 6) Y. Sato, et al.: *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 2012–2017, 2013.
- 7) J. H. Zhang, et al.: *J. Biol. Chem.*, **286**, 25088–25097, 2011.