

海洋深層水は腸管上皮モデルにおいて β -クリプトキサンチンの吸収を促進する

Deep seawater stimulates the absorption of β -cryptoxanthin in the intestinal model cells

向井克之¹・白倉義之¹・柴田雄次²・野村道康²・山田勝久²

Katsuyuki MUKAI¹, Yoshiyuki SHIRAKURA¹, Yuji SHIBATA², Michiyasu NOMURA² and Katsuhisa YAMADA²

Abstract

β -cryptoxanthin (β -CX) is a kind of carotenoids contained in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) and has many health-promoting effects such as the visceral fat reduction, the preventive effect on osteoporosis, and the effect to improve bloodstream. On the other hand, there is a report that deep seawater (DSW) accelerates the absorption of vitamin C by the cells. We investigated the effect of DSW on the absorption of β -CX by a human intestinal model using Caco-2 cells. We found that DSW accelerated the absorption of β -CX by Caco-2 cell remarkably. It is suggested that DSW accelerates the expression of a carotenoid transporter gene, SR-B1. It is also suggested that β -CX is absorbed through SR-B1, because the absorption of β -CX was suppressed by a specific inhibitor of SR-B1 receptor, BLT-1. It is suggested that the accelerative effect to absorb β -CX is specific to DSW, because this effect was not observed by using surface seawater (SSW).

Key Words: β -cryptoxanthin, Caco-2 cell, Deep seawater, SR-B1

要 旨

β -クリプトキサンチン（以下、 β -CX）は温州みかんに多く含まれるカロテノイドで、内臓脂肪低減、骨粗しょう症予防、血流改善などへの作用が知られている。一方、海洋深層水（以下、DSW）にはビタミンCの細胞内への吸収促進を示唆する報告がある。そこで、 β -CXの吸収にDSWが及ぼす影響を、薬剤吸収研究で汎用されるCaco-2細胞による腸管上皮モデルを用いて検証した。その結果、DSWはCaco-2細胞への β -CXの吸収を有意に増加させた。Caco-2細胞の遺伝子発現解析結果から、DSWの添加がカロテノイド吸収に関与する受容体SR-B1などのコレステロール代謝遺伝子の発現を亢進させ、またCaco-2細胞への吸収試験においてSR-B1の阻害剤添加により β -CXの吸収が抑制されたことから、 β -CXの吸収はSR-B1を介していることが示された。DSWの β -CXの吸収促進効果は、表層水（以下、SSW）には見られなかったことから、DSWに特異的な効果であることが示唆された。

キーワード: β -クリプトキサンチン, Caco-2細胞, 海洋深層水, SR-B1

1. 緒 言

ヒトが生命活動を維持するのに必要な栄養素は、蛋白質、脂質、炭水化物、ビタミン類およびミネラ

ルであり、これら5つの栄養素を総称して5大栄養素と呼んでいる。特にビタミン類は、ヒトの体内で合成できないため外部から摂取をせねばならず、主に食物を通して得ている（藤巻, 1924）。ビタミン

¹ 株式会社ダイセル（〒108-8230 東京都港区港南2-18-1 JR品川イーストビル）

² 株式会社ディーエイチシー（〒106-0047 東京都港区南麻布2-8-21 南麻布MICビル7F）

類は、水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンの2つに大別され、さらに体内での働きに応じて、ビタミンA、ビタミンB群やビタミンCを始めとした6種類のビタミン類に細分化されている。ビタミン類は抗酸化能を始めとした生物にとって有益な機能性を有しているため、単なる栄養素としてだけでなく、今日では健康増進を目的としたサプリメントの原料などにも汎用されている。こうした背景の下、我々は未だサプリメントとしての利用が少ない β -CXに着目した。 β -CXはカロテノイドの一種であり、生体内においてビタミンAに置換されて効力を発現することから、プロビタミンAと呼ばれている(眞岡, 2007)。これまで β -CXには抗酸化作用(Burri *et al.*, 2016)、血糖値低減作用(Sugiura *et al.*, 2006)、骨代謝改善作用(Ozaki *et al.*, 2015)、抗肥満作用(Sugiura *et al.*, 2008)、血流改善作用(向井, 2013)やシミ低減作用(Shimoda *et al.*, 2012)などの多様な機能性を有していることが報告されている。 β -CXは温州みかん、柿、びわやパパイヤ等の果物に多く含まれているが、中でも温州みかんの含有量が特に高い(日本食品標準成分表, 2015)。興味深いことにSugiuraら(2002)の報告によれば、冬場になると日本人の β -CXの血中濃度が上昇するが、これは温州みかんの旬の時期と関係があるという。みかんと言えば、「炬燵の上のみかん」であり、典型的な冬の光景として浮かぶほど、日本人にとって非常に馴染み深い果物である。温州みかんほど日本人の生活に根強く定着している果物は他に見当たらない。健康長寿が社会の重要な命題となり、健康増進をもたらす成分に注目が増している昨今においては、日本人に馴染み深い温州みかんに含まれる β -CXは大変に魅力的な成分であると考えられる。しかしながら、温州みかんの収穫時期が限られており、温州みかんから定常的に β -CXを摂取することは困難であるため、サプリメントとして β -CXを摂取するという意義が生じる。さらに我々はDSWがビタミンCの吸収性を向上することを示唆する野村ら(2011)の報告に着目し、DSWを利用した β -CXの効率的な吸収の可能性を検討することとした。

本研究では薬剤吸収の研究で汎用されるCaco-2細胞によるヒト腸管上皮モデルを用いて、DSWが β -CX

吸収にどの様に影響するのかについて調査した。また、 β -CX以外のカロテノイドとしてアスタキサンチンとルテインを選び、DSWの影響を比較検討するとともに、 β -CXの細胞内吸収経路及びDSWの効果について分子生物学的に検討したので本報にて報告する。

2. 材料と方法

2.1 DSW及びSSW

株式会社ディーエイチシーの伊豆赤沢DSW取水施設(静岡県伊東市八幡野1754-114-1)において2014年2月に取水した(水深800 m)。SSWは静岡県伊東市赤沢の沖合5 kmのSSWを2009年11月に採水し、室温暗所に保存したものを使用した。

2.2 腸管上皮モデルの構築

Caco-2細胞(ヒト結腸癌由来HTB-37, ATCC)の培養は、DMEM高グルコース培地(和光純薬)に10%牛胎子血清(以下、FBS; ライフテクノロジーズ)、1%非必須アミノ酸(和光純薬)、0.5%ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB(和光純薬)を添加したものをを用いた。コラーゲンコート(新田ゼラチン)した6ウェルプレート(旭テクノグラス)にCaco-2細胞を 2.0×10^5 個/穴となるように播種後、コンフルエント状態になるまで培養を行った。コンフルエント状態になったCaco-2細胞をさらに8日間培養を継続した後、終濃度0.5% (v/v)のDSWを添加して、2, 3日おきに培地交換を行いながら6日間(計14日間)継続して培養し、腸管上皮モデルとした。

2.3 β -CXの吸収試験

2.2で構築した腸管上皮モデルから、培地を除去してハンクス緩衝液(シグマ)で洗浄後、0.5% (v/v) DSW, 50 μ M タウロコール酸ナトリウム(東京化成)、0.01% (w/v) M-10D(三菱化学フーズ)および終濃度6 μ Mとなるように調製した β -CX(四国八洲薬品)を加えたハンクス緩衝液2 mLを評価試料として添加し、37°Cで2時間インキュベートを行った。この

Table 1. Primers of SR-BI, NPC1L1, ABCA1, and ABCG1 genes for Real-time PCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer
SR-BI	ATGAAATCTGTCCGAGGCATTG	TGCATCACCTTGGGCATCA
NPC1L1	TATGGTCGCCCGAAGCA	TGCGGTTGTCTGGAAATACTG
ABCA1	ATGTCCAGTCCAGTAATGGTTCTGT	CGAGATATGGTCCGGATTGC
ABCG1	CGACCGACGACACAGAGACTC	GAGCACGAGACCCACAAAC

とき、DSWの代わりに精製水を添加したものをコントロールとした。また、比較対照としてはDSWの代わりにSSWを添加した。37°C、2時間のインキュベート後、ハンクス緩衝液を除去し、1 mM タウロコール酸ナトリウム含有PBS (和光純薬) 2 mLで細胞の洗浄を2回行い、さらに氷冷した1 mLのPBSで洗浄した。洗浄後、10%メタノール含有PBSを1 mL添加し、スクレーパー (ファルコン) を用いて細胞をウェルより剥離して溶液と一緒に回収した。回収した細胞懸濁液にヘキサソール (和光純薬, 特級) を2 mL加えて攪拌後、ヘキサソール層を回収した。残余の水層に新しいヘキサソールを2 mL加えて攪拌し、再びヘキサソール層を回収した。この操作を3回繰り返して得られたヘキサソール層を、遠心エバポレーター (CVE-3100, 東京理化機械) で濃縮乾固した後、エタノール (和光純薬, 特級) 200 μ Lに再溶解した。この溶液を高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC; LC-20A, 島津製作所) に供し、50 μ Mの α -トコフェロール (和光純薬, 一級) を含むアセトニトリル (和光純薬, 液体クロマトグラフィー用): メタノール (和光純薬, 液体クロマトグラフィー用): テトラヒドロフラン (和光純薬, 液体クロマトグラフィー用) (55:40:5) に0.1%酢酸 (和光純薬, 特級) を添加した混合溶媒を移動相として逆相カラム (Shim-pack VP-ODS, 島津製作所) を用いて β -CXを定量した (検出波長, 452 nm)。

2.4 β -CXの吸収関連遺伝子の解析

DSWによる β -CXの吸収促進メカニズムを調べるため、カロテノイド吸収における受容体として知られているSR-BI, NPC1L1, ABCA1およびABCG1 (During *et al.*, 2005) の関与を想定し、各種遺伝子発現の影響を調べた。RNA抽出用キット (Isogen, 日本ジーン) のプロトコールに従って、2.2で構築したコンフル

エント状態から14日間培養した腸管上皮モデルの溶解とRNAの抽出を行った。次に逆転写反応キット (PrimerScript™ RT reagent Kit, タカラバイオ) のプロトコールに従い、抽出したRNAから鋳型cDNAを合成した。この鋳型cDNAを基に、リアルタイムPCR用試薬 (SYBR® Premix Ex Taq™ II, タカラバイオ) のプロトコールに準じてリアルタイムPCR (Step oneリアルタイムPCRシステム, ライフテクノロジーズ) を行った。なお、Table 1にリアルタイムPCRに供したプライマー (北海道システムサイエンス) の配列を示した。

2.5 β -CXの吸収経路の解析

β -CXの吸収経路の検討にあたり、選択的吸収経路だけではなく、単純拡散 (Scita *et al.*, 1992) も関与している可能性が推察された。そこで、各々の阻害剤であるBLT-1 (シグマ) 及びアジ化ナトリウム (以下、NaN₃; ナカライテスク) を終濃度が各々20 μ M及び30 mMとなる様に β -CXと一緒に添加し、2.3の方法に準じて細胞への吸収試験を行った。

2.6 他カロテノイドの吸収試験

DSWによる β -CXの吸収促進作用の特異性を調べるために、終濃度6 μ Mに調製したアスタキサンチンおよびルテイン (いずれもエクストラシンテース) の2種のカロテノイドをDSWとともに2.3の方法に準じて細胞に吸収させた後、各々抽出を行った。この抽出液をHPLCに供し、10 μ M酢酸アンモニウム (和光純薬, 特級), 4.5 mMジブチルヒドロキシトルエン (和光純薬, 液体クロマトグラフィー用) および3.6 mMトリエチルアミン (和光純薬, 特級) を含むアセトニトリル: メタノール: ジクロロエタン (和光純薬, 液体クロマトグラフィー用) (75:25:5) の混合溶媒を移動相として逆相カラム (Shim-pack

VP-ODS, 島津製作所) を用いてアスタキサンチン及びビルテイン量の測定を行った。

2.7 解析方法

得られたデータは平均値±標準偏差で表した。なお、2群間の有意差は*t*検定 (Student's *t* test) を用いて検定した。

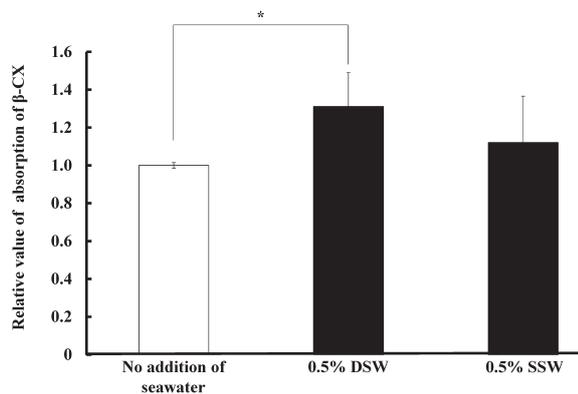


Fig. 1. Effects of DSW and SSW on the absorption of β -CX by Caco-2 cells. β -CX was measured by HPLC method after being extracted from Caco-2 cells cultured with the medium including 6 μ M β -CX ($n=6$, Mean \pm SD). An asterisk indicates a significant increase of the β -CX absorption by the addition of DSW compared with No addition ($p<0.05$). The addition of SSW did not increase the β -CX absorption significantly.

3. 結果

3.1 DSWの β -CX吸収促進効果

2.3の方法で腸管上皮モデルに吸収された β -CX含量を調べた結果、Fig. 1に示すようにDSWは β -CXの吸収を有意に促進した ($p<0.05$)。しかしながら、比較対照のSSWには β -CXの吸収に有意な差は見られなかった。

3.2 β -CXの吸収関連遺伝子の解析

DSWによる β -CX吸収促進のメカニズムを調べるため、2.4の方法でDSWの腸管上皮モデルにおける遺伝子発現への影響を解析した結果、細胞表面に存在するコレステロールの受容体SR-B1, NPC1L1, ABCA1およびABCG1のうち、SR-B1の発現が亢進していることがわかった (Fig. 2)。

3.3 β -CXの吸収経路の解析

2.5の方法で腸管上皮モデルにおける β -CX吸収経路を調べた。その結果、Fig. 3に示すように、コレステロール受容体SR-B1の阻害剤であるBLT-1は、 β -CXの吸収量を大きく減少することがわかった。一方、ATPの合成阻害剤であるNaN₃は β -CXの吸収量に変化を及ぼさなかった。この結果からDSWはコレステロール受容体のSR-B1を介して β -CXの吸収を促進

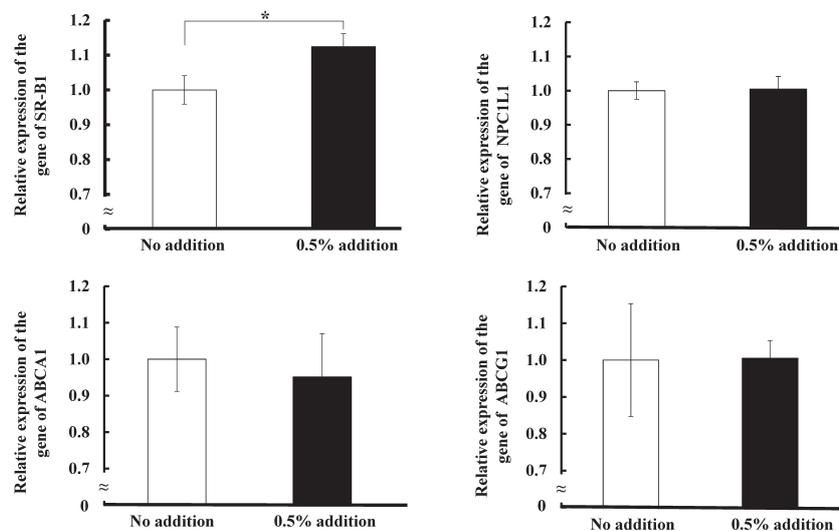


Fig. 2. Effects of DSW on the gene expression of SR-B1, NPC1L1, ABCA1, and ABCG1 in Caco-2 cells. The gene expression of carotenoid receptors, SR-B1, NPC1L1, ABCA1, and ABCG1 was analyzed by Real-time PCR ($n=6$, Mean \pm SD). An asterisk indicates a significant increase of SR-B1 expression by the addition of DSW ($p<0.05$).

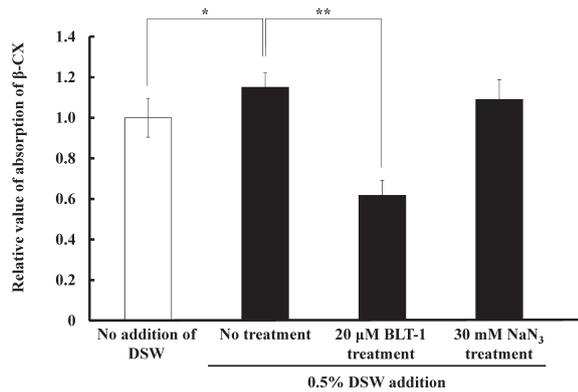


Fig. 3. Effects of two types of inhibitors on the absorption of β-CX by Caco-2 cells. BLT-1 (20 μM) was used as an inhibitor for SR-B1 and NaN₃ was used as an ATP synthesis inhibitor (30 mM). Caco-2 cells were cultured with the medium including 0.5% (v/v) DSW and 6 μM β-CX for 2 hours. β-CX was measured by HPLC (n=6, Mean±SD). Single asterisk indicates a significant difference between 0.5% DSW (No treatment) and control (No addition) (p<0.05). Double asterisks indicate a significant difference between 20 μM BLT-1 treatment and No treatment (p<0.01).

することが示唆された。

3.4 他のカロテノイドの吸収試験

β-CXと同じカロテノイドであるアスタキサンチンおよびルテインに対するDSWの吸収促進効果を調べた結果、β-CXと同様にアスタキサンチンでも吸収量の有意な増加が見られたが、ルテインでは吸収量の変化が見られなかった (Fig. 4)。

4. 考 察

Caco-2細胞による腸管上皮モデルを用いてβ-CXの細胞内への吸収におけるDSWの影響を調べた結果、DSWにはβ-CXの吸収促進効果があることがわかった。β-CXはカロテノイドの一種であり、その吸収経路には選択的吸収と単純拡散の2つの経路が知られている (小竹・長尾, 2012)。選択的吸収ではコレステロール吸収を担う受容体を介してカロテノイドが吸収されることが、Duringら (2005) によるコレステロール受容体の阻害剤を使用した試験より明らかとなっている。このことから、DSWによるβ-CXの吸収

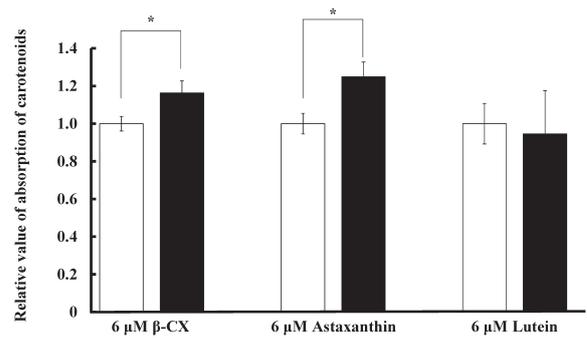


Fig. 4. Effects of DSW on the absorption of various species of carotenoids. The absorption of β-CX and astaxanthin but not lutein was increased by the addition of DSW. An asterisk indicates a significant difference between two indicated groups (n=6, Mean±SD). □, No addition of DSW; ■, 0.5% DSW

促進には単純拡散だけではなく、選択的吸収経路も関与している可能性が推察された。そこで、DSWのβ-CX吸収促進効果の詳細なメカニズムを調べるため、リアルタイムPCR法を用いてコレステロール受容体遺伝子の発現動態について調べた。その結果、DSWは本研究で調べた4種のコレステロール受容体のうち、SR-B1遺伝子の発現のみを亢進させていることが明らかとなった。さらにβ-CXの吸収経路を調べた結果、ATPの合成阻害剤であるNaN₃処理ではβ-CXの吸収量に変化がなかったことから、DSWはATPに依存した吸収経路である単純拡散には関与していないことがわかった。一方、コレステロール受容体SR-B1の阻害剤であるBLT-1で処理するとβ-CXの吸収量が顕著に減少したことから、DSWはSR-B1受容体を介したβ-CXの選択的吸収経路によりβ-CXの吸収促進効果を発現していることが示唆された。以上のことから、DSWがSR-B1遺伝子の発現を亢進することでβ-CXの吸収促進効果が発現されるというメカニズムが推察された。また、DSWによるカロテノイド吸収促進効果の特異性を調べたところ、DSWはβ-CXと同様にアスタキサンチンの吸収も促進することがわかったが、ルテインについては吸収を促進しなかった。これら3種類の化学構造は酸素の数などが異なるもののほぼ類似しており、本研究で得られた吸収促進効果の特異性については今後の研究課題である。

本研究において、DSWに β -CXの吸収促進効果が見出され、この効果はSSWには見られなかった。DSWにはSSWに比べてミネラルが豊富に含まれていることが知られている(藤田・高橋, 2006)。ラット(Noh and Koo, 2003)やヒト(Dijkhuizen *et al.*, 2004)において、亜鉛の欠乏による β -カロテン吸収の減少が報告されており、特定のミネラルの多寡によってもカロテノイド吸収が影響される可能性が推察される。このため、 β -CXの吸収促進効果が亜鉛などのDSW中の微量ミネラルに起因する可能性が考えられる。ただし、SSWとDSWとは採水日が異なっており、こうした採水日のズレが結果に影響を与えている可能性も考えられる。このため、今後同時期のDSWとSSWを用いた吸収試験を行う必要がある。また上述の考察を基に、DSW中に含まれる微量ミネラル類に着目し、DSWの β -CXの吸収促進効果に関与している成分についても詳細な検討を行う予定である。

参考文献

- Burii, B. J., M. R. La Frano and C. Zhu (2016) Absorption, metabolism, and functions of β -cryptoxanthin. *Nutr. Rev.*, 74, 69–82.
- Dijkhuizen, M. A., F. T. Wieringa, C. E. West and Muhilal (2004) Zinc plus beta-carotene supplementation of pregnant women is superior to beta-carotene supplementation alone in improving vitamin A status in both mothers and infants. *Am J. Clin. Nutr.*, 80, 1299–1307.
- During, A., H. D. Dawson and E. H. Harrison (2005) Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is down-regulated in Caco-2 Cells Treated with Ezetimibe. *J. Nutr.*, 135, 2305–2312.
- 藤巻了知 (1924) 食物中に含有するビタミンについて。中央獣醫會雑誌, 37, 523–527.
- 藤田大介・高橋正征 (2006) 海洋深層水利用学：基礎から応用・実践まで。成山堂書店, 東京, 209 pp.
- 小竹(奈良)英一・長尾昭彦 (2012) カロテノイドの腸管吸収と代謝。オレオサイエンス, 12, 495–501.
- 眞岡孝至 (2007) カロテノイドの多様な生理作用。食品・臨床栄養, 2, 3–14.
- 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会編：日本食品標準成分表2015年版(七訂) (2015)。全国官報販売共同組合, 東京。
- 向井克之 (2013) β -クリプトキサンチンの血流改善作用について。Food Style 21, 17, 65–67.
- Noh, S. K. and S. I. Koo (2003) Low zinc intake decreases the lymphatic output of retinol in rats infused intraduodenally with β -carotene. *J. Nutr. Biochem.*, 14, 147–153.
- 野村道康・有賀みずえ・山田勝久・今田千秋・小林武志・濱田(佐藤)奈保子 (2011) 培養ヒト繊維芽細胞のコラーゲン合成に対する伊豆赤沢海洋深層水の効果。海深研, 12, 11–17.
- Ozaki, K., M. Okamoto, K. Fukasawa, T. Iezaki, Y. Onishi, Y. Yoneda, M. Sugiura and E. Hinoi (2015) Daily intake of β -cryptoxanthin prevents bone loss by preferential disturbance of osteoclastic activation in ovariectomized mice. *J. Pharmacol. Sci.*, 129, 72–77.
- Scita, G., G. W. Aponte and G. Wolf (1992) Uptake and cleavage of β -carotene by cultures of rat small intestinal cells and human lung fibroblasts. *J. Nutr. Biochem.*, 3, 118–123.
- Shimoda, H., S. J. Shan, J. Tanaka and T. Maoka (2012) β -cryptoxanthin suppresses UVB-induced melanogenesis in mouse: involvement of the inhibition of prostaglandin E2 and melanocyte-stimulating hormone pathways. *J. Pharm. Pharmacol.*, 64, 1165–1176.
- Sugiura, M., M. Kato, H. Matsumoto, A. Nagao and M. Yano (2002) Serum concentration of β -cryptoxanthin in Japan reflects as the frequency of Satsuma Mandarin (Citrus unshiu Marc.) Consumption. *J. Health Sci.*, 48, 350–353.
- Sugiura, M., M. Nakamura, Y. Ikoma, M. Yano, K. Ogawa, H. Matsumoto, M. Kato, M. Oshima and A. Nagao (2006) The homeostasis model assessment-insulin resistance index is inversely associated with serum carotenoids in non-diabetic subject. *J. Epidemiol.*, 16, 71–78.
- Sugiura, M., M. Nakamura, K. Ogawa, Y. Ikoma, H. Matsumoto, F. Ando, H. Shimokata and M. Yano (2008) Associations of serum carotenoid concentrations with the metabolic syndrome: Interaction with smoking. *Br. J. Nutr.*, 100, 1297–1306.

(2018年9月3日受付：2018年10月12日受理)