

タカハシ マユコ

氏名（本籍地） 高橋 麻由子（奈良県）

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第1289号

学位授与年月日 令和4年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

研究科，専攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）生物産業創成科学専攻

論文題目 細胞外因子によるクルクミノイドの細胞内移行や生理作用の影響；クルクミノイドの生理作用を向上させるナノ粒子の作成に向けて

博士論文審査委員（主査）教授 仲川清隆

教授 桑原重文

教授 山下まり

博士論文要旨

細胞外因子によるクルクミノイドの細胞内移行や生理作用への影響;

クルクミノイドの生理作用を向上させるナノ粒子の作製に向けて

The evaluation of the effects of extracellular factors on the cellular uptake and physiological effect of CNs to develop nanoparticles that improve CNs bioavailability.

東北大学大学院 農学研究科

生物産業創成科学専攻

高橋 麻由子

指導教員 仲川清隆 教授

緒言

医療技術の発展に伴い、世界人口に占める高齢者人口の増加は加速し、2019年現在では65歳以上の人口は約7000万人に到達し、さらに2050年には約1.5億人まで増加すると推計されている[1]。とりわけ、認知症をはじめとする認知機能の低下は、高齢者自身やその家族にとって経済的・精神的に負担を強いるだけでなく、社会にとっても、医療費や社会保障費の増加に繋がることから社会問題の1つとなっている。こうした背景の下、健康寿命の延伸が求められ、認知機能低下の予防や治療へ活用することを目指し、ナノキャリアや化学修飾を用いて、有用な生理作用を持つ機能性食品成分の脳内移行量を増加させる技術を生み出すため様々な研究が進められてきた[2]。

機能性食品成分の中でも、脂溶性ポリフェノールの1つであるクルクミノイド (CNs) (Fig. 1.) は、ウコン・クミン・コリアンダー等に含まれ、古くから香辛料・着色料・サプリメント・医薬品として用いられてきた[3]。CNsは、 R_1 ・ R_2 のジメチルエーテル基の数の違いにより、クルクミン (CUR)・デメトキシクルクミン (DMC)・ビスデメトキシクルクミン (BDMC) の3種の類縁体から構成され、抗

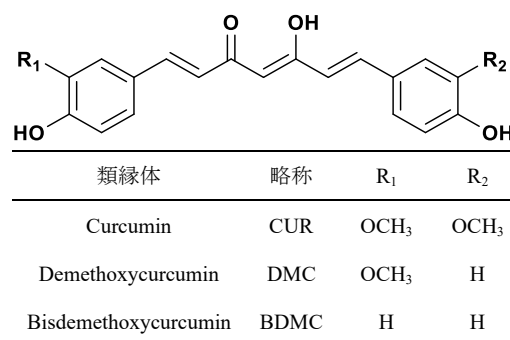
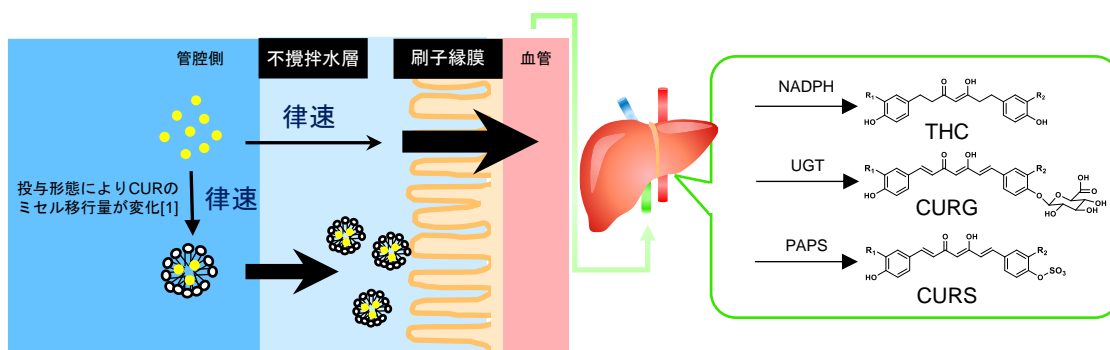


Fig. 1. クルクミノイド (CNs) の構造式

炎症[4]・抗酸化[4]・脂質代謝改善[5]・神経保護作用[6]・抗アルツハイマー病作用[7]・抗腫瘍[8]など、生体にとって有用な生理作用を持つことが報告されている。しかし、*in vivo*試験において、こうした生理作用の有効性は賛否が分かれており、特にCNsの生物学的利用能の低さが課題となっている[9][10]。そこで、CNsの生物学的利用能を向上させる技術開発に役立てるため、本課題を引き起こす要因の解明が進められてきた[9]。それらの報告を集約すると、投与方法に応じて要因が存在することがわかる。例えば、経口投与した場合、CNsの有用性を阻む要因は、腸管吸収率の低さと吸収後の代謝のされやすさという2点に集約できる (Fig. 2.)。つまり、刷子縁膜上の不攪拌水層が、脂溶性ポリフェノールであるCNsの吸収の律速段階となることや、腸管吸収後、最初に到達する肝臓において、ほとんどのCNsが還元型やグルクロン酸・硫酸抱合化されることで、CNsの生理作用の発現が制限されていることが考えられている。こうしたCNsの代謝物は、CNsと類似した生理作用を持つ[4]一方で、CNsと比較した際、臓器へ到達しづらく、その生理作用の強さはCNsよりも弱いと考えられている[11]。一方、静脈投与によるCNsの有用性を阻む要因は、臓器への蓄積量の低さである。静脈投与は、肺への移行を飛躍的に増加する一方で、脳をはじめとするその他の臓器への移行率は低いことが報告されている (Fig. 3.) [12]。このように経口投与・静脈投与ともに、脳をはじめとする臓器移行に課題を抱えるCNsであるが、何がCNsの臓器移行を阻む要因で

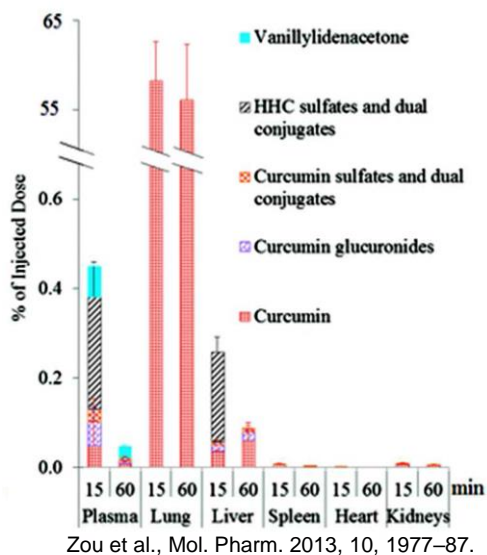
あるかは、これまでのところ明らかにされていない。

一方、過去に当研究室の仲川らは、*in vitro* 試験により、CNs 類縁体にみられる生理作用の強さの違いに着目し、細胞内移行量の大小が関連することを見出した (Fig. 4)。しかし、CNs の細胞内移行量の違いを引き起こす因子は、長年明らかにされていなかった。そこでまず、CNs の細胞内移行の違いを引き起こす因子の特定を進め、血清アルブミン (ALB) との結合が、本現象を引き起こす主要な要因 (第 1 章) であることを突き止めた。ALB は細胞培養培地中だけでなく、血液中に 60–70%含まれる輸送タンパクであるため、*in vitro* における細胞内移行を阻む要因になるだけでなく、*in vivo* においても CNs の臓器移行を阻む要因になることが考えられる。そのため、第 1 章で明らかにした CNs と ALB との結合を標的とする臓器の近くで抑制する手法を構築することで、CNs の臓器移行を増加させ、生理作用の増強に繋がることが予想された。そこで、第 2 章では、*in vitro* により明らかにした要因の影響を抑制する手法を構築し、第 3 章では *in vivo* への応用に向け、脳に集まりやすい CNs 含有ナノ粒子の作製に着手することとした。



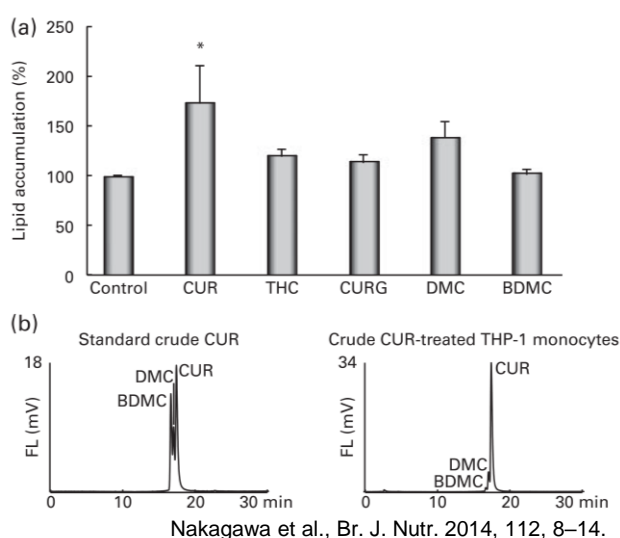
[1] Harigae et al., Int. J. Nanomed. 2016, 11, 3009–22.

Fig. 2. 経口投与した際に CNs の有用性を阻む要因



Zou et al., Mol. Pharm. 2013, 10, 1977–87.

Fig. 3. 静脈投与した際の CNs の臓器分布



Nakagawa et al., Br. J. Nutr. 2014, 112, 8–14.

Fig. 4. THP-1 細胞の生理作用の違いと細胞内移行量

第1章 CNsの細胞内移行の違いを引き起こす要因の特定

【目的】CNsを構成する3種の類縁体（CUR、DMC、BDMC）は、生理作用の発現の強さが異なることが知られている。当研究室では過去に *in vitro* 試験により CUR が最も強い生理作用を発揮することを明らかにし、本現象は CNs の細胞内移行量の違いによって引き起こされることを見出した。しかし、こうした CNs 類縁体間の細胞内移行の違いを引き起こす要因は明らかにされていない。そこで第1章では、この要因として4つの仮説（仮説1：類縁体の極性、仮説2：代謝速度、仮説3：輸送体、仮説4：細胞外因子の影響）を立て、これらが CNs の細胞内移行の違いに影響を与えるかを検証した。

【方法と結果】初めにヒト単球細胞（THP-1）に CNs を添加し、先行研究と同様に CUR が優先的に細胞内へ移行することを FL-HPLC で確認した。仮説1では、細胞表面での CNs の極性の影響を軽減するため、CNs を内包したポリ乳酸グリコール酸共重合体ナノ粒子（CNs-PLGA-NPs）をポリビニルアルコール（PVA）で分散させ、細胞内に移行した CNs を FL-HPLC で調べた。仮説2では、CNs の代謝速度の違いが生じると仮説を立て、CNs を等量ずつ添加した細胞の抽出物を LC-MS/MS で分析し、CUR と比較し、BDMC や DMC の代謝物が多く検出されるかを確認した。仮説3では、CUR の細胞内への輸送・細胞外への排泄に関与することが報告されている有機アニオントランスポーター（OATP1B1）と多剤排泄トランスポーター（MDR1）の阻害剤を用い、CNs の細胞内移行量の違いが緩和されるかを調べた。仮説1-3を検証した結果、類縁体の極性・代謝速度・輸送体は、いずれも CNs 類縁体の細胞内移行の違いに影響を与えなかった。続いて、仮説4では、細胞外因子の中でも、血中での CNs 運搬に関与すると報告されている ALB[13]が CNs 類縁体の細胞内移行の違いに与える影響を検証した。(1) FBS 10% を添加した通常培地、(2) 無血清培地、(3) 無血清培地に牛血清 ALB（BSA）を 10 μ M 添加した培地で培養した細胞に CNs を処理し、細胞内の CNs を FL-HPLC で分析した。結果、FBS10%を含む通常培地と比較し、無血清培地においては、CUR のみならず、BDMC や DMC も細胞内へ取り込まれた。この無血清培地に BSA 10 μ M を添加した場合、通常の培地と同様に CUR が優先的に取り込まれた。以上の結果より、BSA が CNs の細胞内移行の違いに関与することが示唆された (Fig. 5.)。さらに蛍光クエンチング法により、シュテルン・フォルマー定数 (K_{sv}) 及び見かけの結合定数 (K_{app}) を算出し、BSA と CNs の結合の強さの指標として比較した。結果、CUR は DMC や BDMC よりも BSA に対して弱く結合することが明らかとなった (Table 1.)。

【結論・考察】以上の結果より、培地中に含まれる BSA と CNs 類縁体の結合の強さの違いが、CNs の細胞内移行の違いに影響する主要な要因であることが示唆された[14]。つまり、CUR は BDMC や DMC よりも ALB との結合が弱いため、遊離型として存在しやすく、その結果、CUR が優先的に細胞内へ移行し、生理作用を発揮したと考えられる

(Fig. 6.)。一方で、最も強い生理作用を示す CUR であっても生物学的利用能が低いという点から、血中に多量に存在する ALB によって、臓器の移行が妨げられている可能性が示唆された。よって、ALB と CUR の結合を抑制する手法を構築するため、第 2 章の実験へと移った。

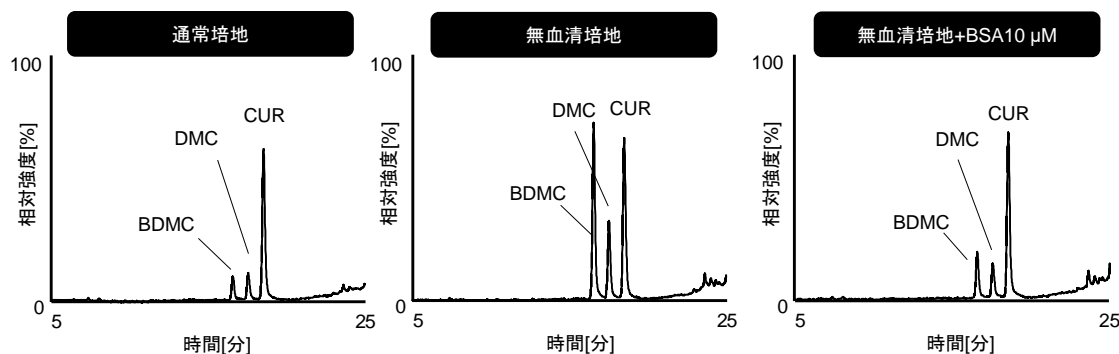


Fig. 5. 異なる培地条件下で CNs を処理した細胞抽出物の蛍光クロマトグラム

Table 1. CNs のシュテルン・フォルマー定数 (K_{sv}) と見た目の結合定数 (K_{app})

類縁体	$K_{sv} [\times 10^5 M^{-1}]$	$K_{app} [\times 10^5 M^{-1}]$
Curcumin	1.2 ± 0.031	2.6 ± 0.36
Demethoxycurcumin	2.7 ± 0.14	16 ± 9.0
Bisdemethoxycurcumin	1.4 ± 0.024	5.2 ± 0.60

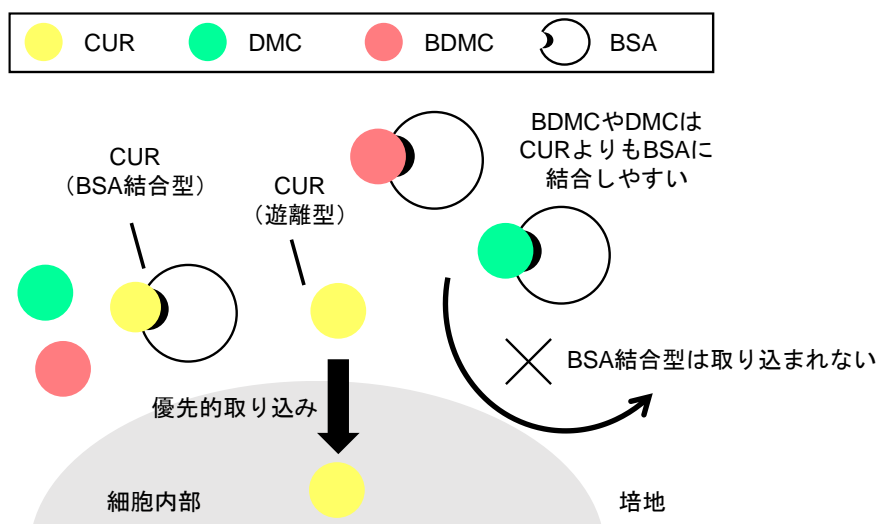


Fig. 6. CNs の細胞内移行の違いを引き起こす機構

第2章 CUR と ALB の結合を抑制する成分の探索

【目的】前章にて、3種類のCNs類縁体の生理作用の発現の強さは、ALBによって引き起こされ、他の類縁体と比較してALBとの結合が弱いCURが優先的に細胞内へ移行することを明らかにした。しかし、*in vitro*の系で細胞内に取り込まれやすく、生理作用が強いとされるCURであっても、生体内では十分に生理作用が発揮されないことが課題とされている[9]。第1章の結果と遊離薬物仮説を踏まえ本課題を考えると、*in vitro*の系に比べ約10倍血中に存在しているALBがCURと結合し、その臓器を構成する細胞への移行を阻むためであることが予想された。こうした背景から、ALBとCURとの結合を抑制することで、CURの細胞移行量を増加させ、ひいてはCURの機能性の向上に繋がることが期待された。この実現に向け、CURよりもALBとの結合が強い化合物を系に共存させ、ALBとCURの結合を競合的に阻害することを着想した。そこで第2章では、CURよりも結合の強い食品由来成分を特定し、特定した成分と共添加した際のCURの生理作用や細胞内移行量の変化を比較することとした。

【方法・結果】CURと、(i) CURの分解物・代謝物（フェルラ酸、バニリン、グルクミングルクロン酸抱合体）、(ii) 生体内に高濃度で存在する化合物（アスコルビン酸、 α -トコフェロール）(iii) CNsと共存させた場合にCNsの機能性の向上が報告されている化合物（ケルセチン、アピゲニン、ピペリン（PIP））の9種の食品化合物を、種々の濃度でBSA 7.5 μ Mと共存させ、蛍光クエンチング法により K_{sv} 及び K_{app} を算出し、BSAとCURの結合の強さの指標として比較した。その結果、CURよりもBSAと強く結合する化合物としてPIPを特定した（Table 2.）。次に、CURの生理作用がPIP共添加時に増強されるかを検証するため、THP-1単球細胞に対する細胞生存率及び、THP-1マクロファージ細胞に対する炎症性サイトカイン（TNF- α ）の発現量の変化をMTTアッセイ、RT-PCRを用いて、それぞれ評価した。結果、2種の細胞に対するCURの生理作用は、PIP共添加により増強した（Fig. 7A., C.）。最後に、確認されたCURの生理作用の増強が、細胞内移行量の増加によって起こることを確認するため、THP-1単球細胞・マクロファージ細胞内のCURを、UV-FL-HPLCで定量した。その結果、仮説通り、CURの細胞内移行量はPIP共添加により増加した（Fig. 7B., D.）。

【結論・考察】CURと比較し、ALBと強く結合するPIPを共添加することで、CURの生理作用は増強し、これはCURの細胞内移行量が増加することによって引き起こされることが明らかとなった。過去の報告にもPIPがCURの生体内での取り込み量や機能性を増大させるという知見があり[15]、その機序として、(1) CURの代謝抑制（グルクロン酸抱合体の生成抑制）、(2) MDRによるCURの排出抑制、に関与すると考えられてきた。これに加え、本研究では新たに、(3) ALBによるCURの細胞内移行抑制を阻害する可能性が示唆された（Fig. 8.）。しかし、*in vivo*へCURとPIPを分散させ、経口

もしくは静脈投与しても、全身に拡散してしまうため、標的臓器へ CUR を到達させることが難しいと考えられる。そこで、次章では脳を標的臓器とし、CUR の移行量を向上させるナノ粒子の開発に向け、実験を行うこととした。

Table 2. CUR と PIP の BSA に対する K_{sv} ・ K_{app} の比較

	$K_{sv} [\times 10^5 M^{-1}]$	$K_{app} [\times 10^5 M^{-1}]$
curcumin	1.8 ± 0.12	6.2 ± 0.33
piperine	3.0 ± 0.17	22 ± 0.14

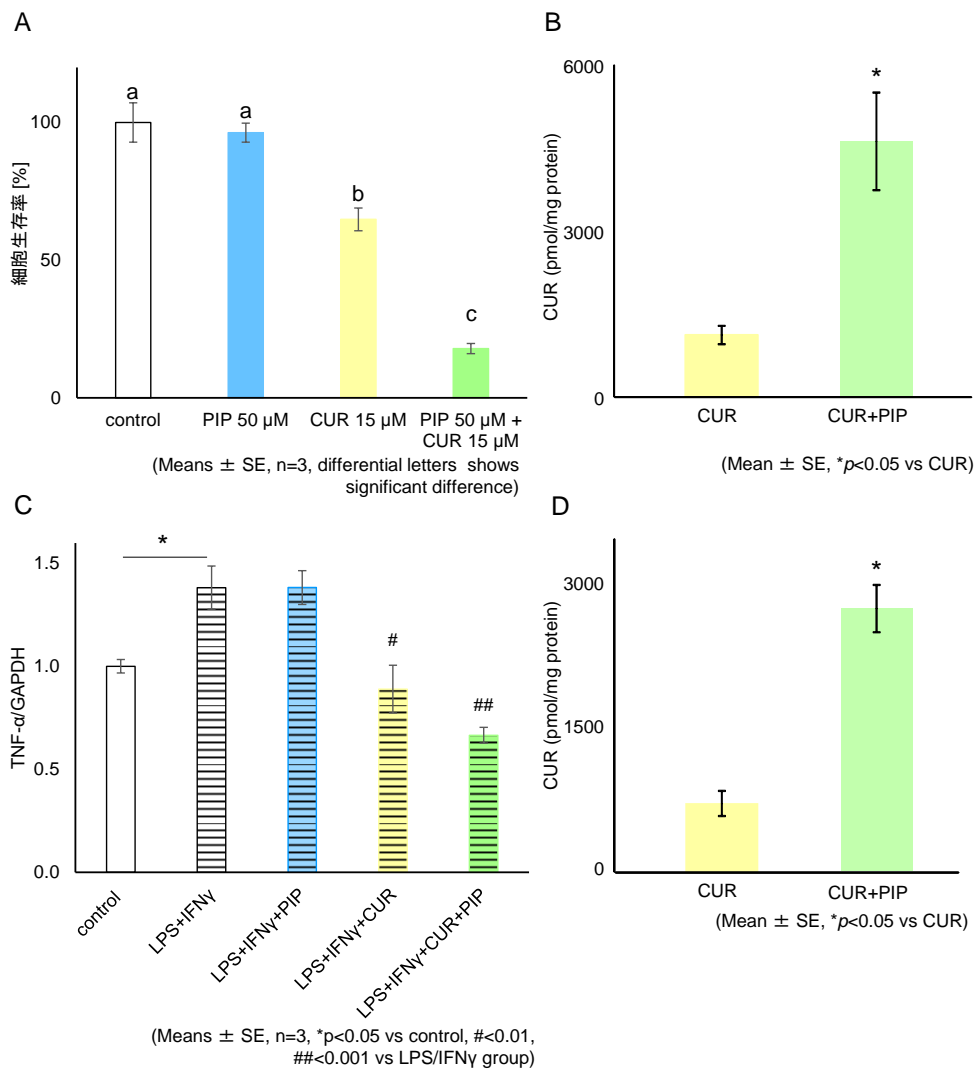
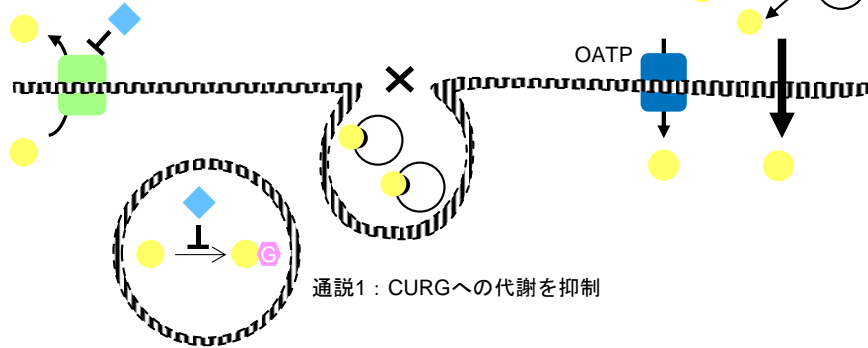


Fig. 7. PIP 共存時の CUR の細胞内取り込み量と生理作用の変化
 THP-1 単球細胞における細胞生存率の変化 (A)、細胞内 CUR 量 (B)
 THP-1 マクロファージ細胞における TNF- α の発現量 (C)、細胞内の CUR 量 (D)

本研究で明らかになったこと
PIPがALBとの結合を抑制することで、遊離型CURとして存在しやすくなり、細胞内移行量が増加

通説2 : MDRによるCURの細胞外流出の抑制



通説1 : CURGへの代謝を抑制

Fig. 8. PIP による CUR の細胞内移行・機能性を向上させる機構

第3章 CUR・PIP含有ポリ乳酸グリコール酸共重合体ナノ粒子の作製

【目的】CURの脳内移行量を増加させるナノ粒子の開発に向け、CUR-PLGA-NPsの表面にAngiopep-2 (A2)を修飾することを考えた。A2は、LRP-1をターゲットとする19のアミノ酸からなるペプチドである[16]。アルツハイマー病などの病理時、脳の血管中のLRP-1の発現量は増加することが報告されており[17][18]、本ペプチドを修飾することで脳の血管壁に蓄積しやすいNPsを作製可能であると考えられる。また、PLGA-NPsは徐放性が高くかつ完全生分解性の高分子[19]であるため、CURは取り込まれる際、一時的に血管壁に露出することが予想される。CURが血管壁に接触する前に、血中のALBと結合して血流に乗り、脳への移行が低減することが課題と考えられたため、PIPをCURとともに内包することで、CURとALBとの結合を抑制できると考えた (Fig. 9)。この「PIPとCURを含むA2修飾NPs (A2-CURPIP-PLGA-NPs)」の作製と有用性の評価を目指し、本研究では(1)NPs作製方法の検討、(2)LRP-1を発現するタイトジャンクション形成細胞を用いた透過試験を行うこととした。

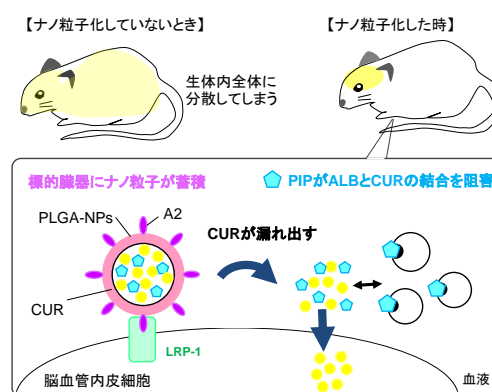


Fig. 9. 作製するNPsの概要

【方法・結果】ソルベントエバポレーション法によりCUR/CURPIP-PLGA-NPsを作製した[20]。次にLC-MSを用いて、Bis(sulfosuccinimidyl)suberate, disodium salt (BS3)とA2の架橋反応が水系において進むことを確認した。その後、A2をNPs表面に修飾させるために分散剤であるPVAにBS3を混合し、BS3-CUR/CURPIP-PLGA-NPsを作製した。作製したNPsをPBSに分散させ、A2 (2等量もしくは20等量)存在下で45分間インキュベートし、洗浄後、凍結乾燥を行いA2-CUR/CURPIP-PLGA-NPsを調整した (Fig. 10.)。作製した8種のNPsの機能性を評価するため、LRP-1を発現するMDCK細胞を用いて、CURの細胞内移行の様子を共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。結果、PIPの共存・A2修飾により、細胞内のCURは増加する傾向がみられた (Fig. 11A.)。さらに、MDCKを6日間培養し、タイトジャンクションを形成させた際のCURやその代謝物の透過量をLC-MS/MSで分析した。結果、PIPの共存・A2修飾により、CURやCURの代謝物 (テトラヒドロクルクミン (THC))の細胞内取り込みは有意に増加した (Fig. 11B.)。今後、動物試験によりPIPの共存およびA2の修飾がCURの脳内移行量に与える影響を評価する予定である。

【結論・考察】A2修飾により、LRP-1を発現することが確認されているMDCKにおいてCURの細胞移行量は増加し、かつCURとその代謝物であるTHCの透過量は増加する傾向がみられた。今後、PIPおよびA2修飾により脳でのCUR移行量が増えるか否か

を動物試験により評価を進めていく予定である。

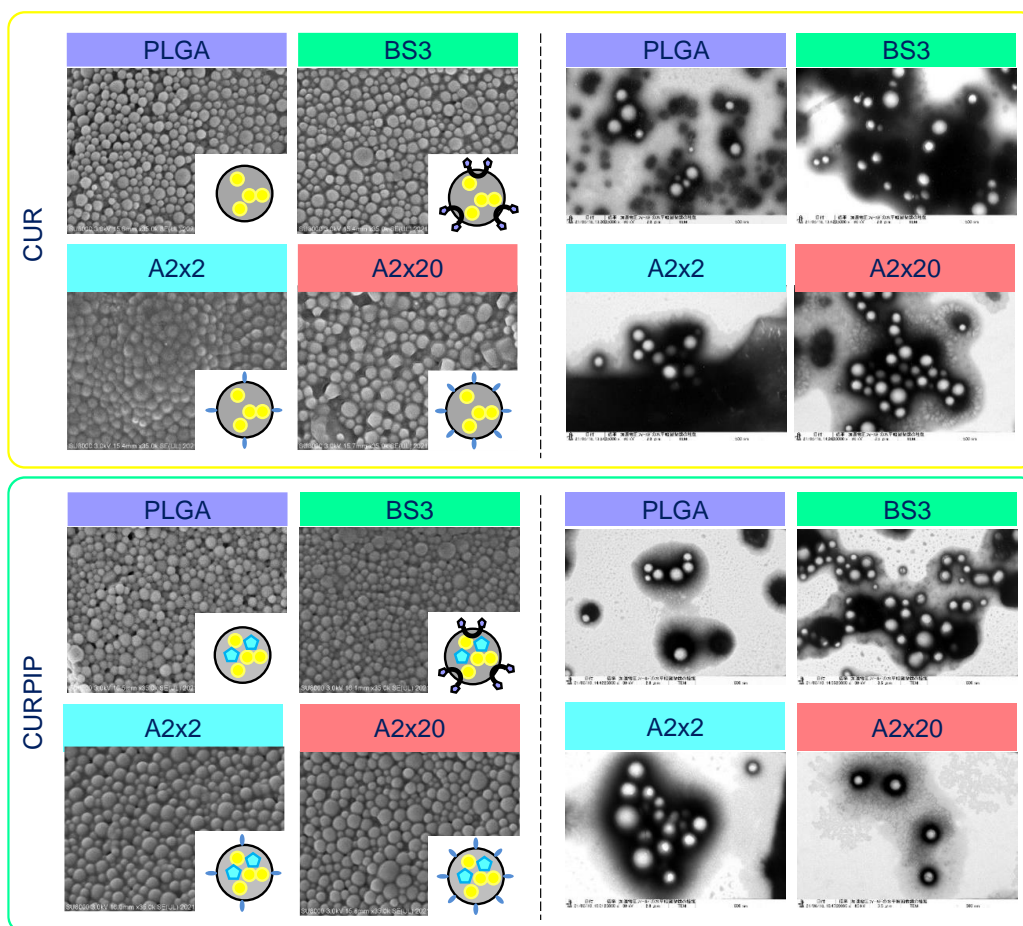


Fig. 10. 走査型・透過型電子顕微鏡による作製したナノ粒子の形状評価

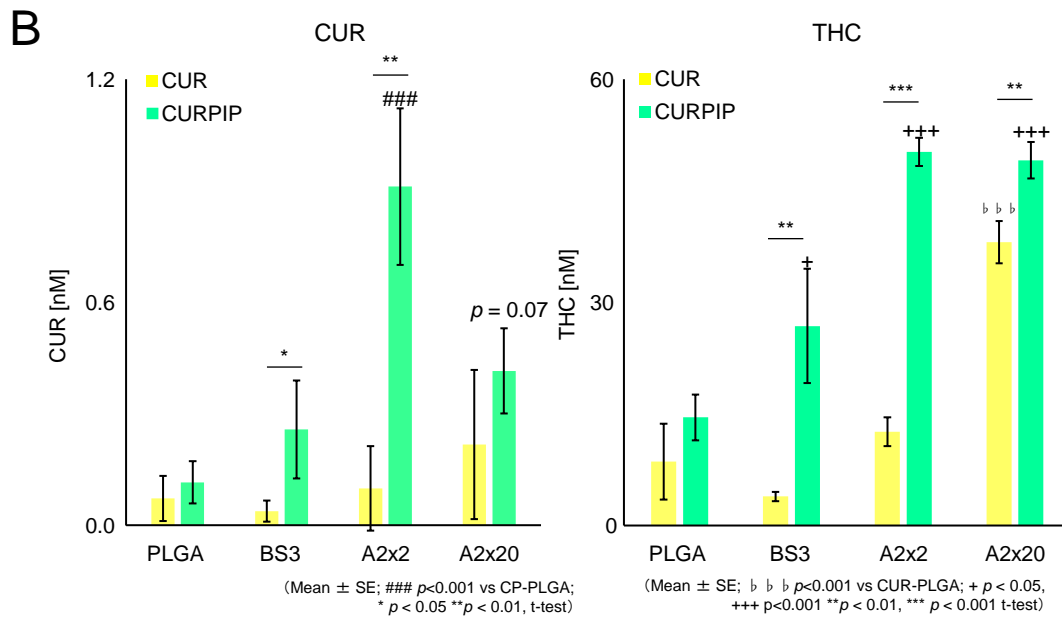
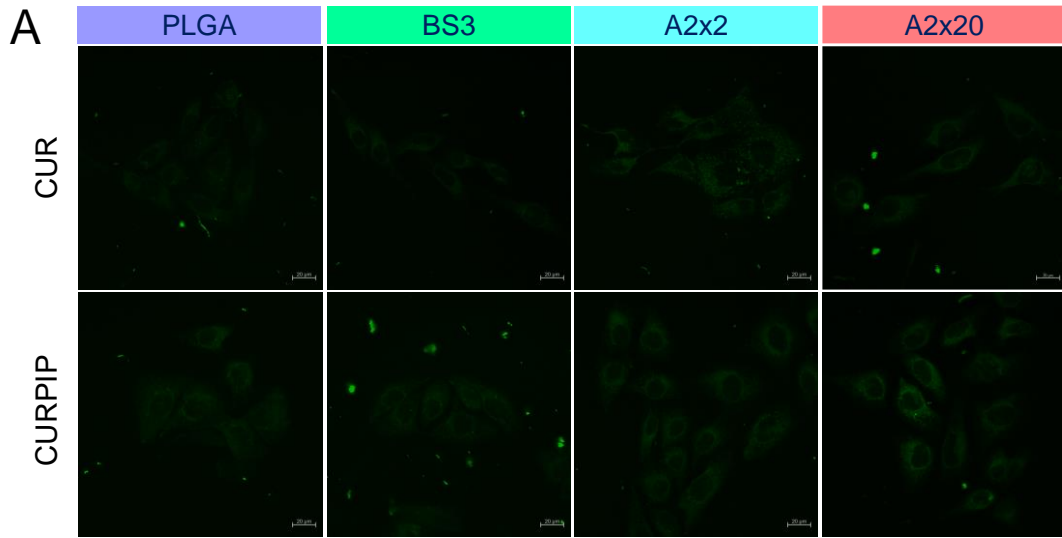


Fig. 11. MDCK 細胞を用いた 8 種の NPs の機能性評価

(A) 共焦点レーザー顕微鏡による CUR の細胞内移行の比較

(B) トランスウェルに培養した MDCK 細胞に 8 種の NPs を処理した際の CUR の細胞透過量の評価

総括

本博士論文の目的は、*in vitro* において CNS の細胞内移行を阻む要因を明らかにし、その知見を基に、*in vivo* においても CNS の臓器移行量を増加させ、効率よく生理作用を発揮させる手法を構築することである。

第 1 章では、ALB との結合の強さの違いが、CNS 類縁体の細胞内移行量の違いに影響し、結果として生理作用の違いを引き起こすことを明らかにした。

第 2 章では、*in vitro* で最も強い生理作用を示すとされる CUR であっても生物学的利用能が低いという課題に対して、第 1 章の結果を踏まえ、ALB と CUR の結合を競合的に阻害することを考案し、該当する食品成分として PIP を特定した。また、PIP を共添加することで CUR の細胞内移行量が向上し、生理作用が増強することを明らかにした。

第 3 章では、CNS の脳内移行量を増加させることを目指し、A2 を修飾した CUR・PIP 含有 NPs の作製に取り組んだ。現段階で、作製した NPs は LRP-1 を発現する MDCK 細胞において CUR の細胞内移行量を増加させ、CUR や CUR 代謝物の細胞透過量を増加させることが明らかとなった。今後、動物試験を用いて、生体内における脳への移行量増加が実現できるかを確認する予定である。

第 1-2 章では、これまで明らかにされていなかった CNS の細胞内移行を阻む要因を特定するとともに、PIP がもたらす CUR の生理作用向上に対する従来の通説に加え、新たに「ALB との結合抑制による細胞内移行の向上」という仮説を提唱することに成功した。今後、提唱した仮説が *in vivo* で成り立つことを証明し、第 3 章のようにナノテクノロジー等を用いることで、CUR の標的臓器への移行を増加させ、疾病予防・治癒に活用できると期待される。

【参考文献】

- [1] United Nations, D.o.E.a.S.A., Population Division. World Population Ageing 2019. (2020)
- [2] Askarizadeh, A.; Barreto, G.E.; Henney, N.C.; Majeed, M.; Sahebkar, A. Neuroprotection by curcumin: A review on brain delivery strategies. *Int. J. Pharm.* **585**, 119476–119495 (2020)
- [3] Esatbeyoglu, T.; Huebbe, P.; Ernst, I. M.; Chin, D.; Wagner, A. E.; Rimbach, G. Curcumin--from molecule to biological function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5308–5032 (2012)
- [4] Sandur, S.K.; Pandey, M.K.; Sung, B.; Ahn, K.S.; Murakami, A.; Sethi, G.; Limtrakul, P.; Badmaev, V.; Aggarwal, B.B. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis* **28**, 1765–1773 (2007)
- [5] Asai A.; Miyazawa T. Dietary curcuminoids prevent high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue. *J. Nutr.* **131**, 2932–2935 (2001)
- [6] Subedi, L.; Gaire, B.P. Neuroprotective effects of curcumin in cerebral ischemia: cellular and molecular mechanisms. *ACS Chem. Neurosci.* **12**, 2562–2572 (2021)
- [7] Serafini, M.M.; Catanzaro, M.; Rosini, M.; Racchi, M.; Lanni, C. Curcumin in Alzheimer's disease: Can we think to new strategies and perspectives for this molecule? *Pharmacol. Res.* **124**, 146–155 (2017)
- [8] Pavan, A.R.; Silva, G.D.; Jornada, D.H.; Chiba, D.E.; Fernandes, G.F.; Man Chin, C.; Dos Santos, J.L. Unraveling the anticancer effect of curcumin and resveratrol. *Nutrients* **8**, 628–678 (2016)
- [9] Ma, Z.; Wang, N.; He, H.; Tang, X. Pharmaceutical strategies of improving oral systemic bioavailability of curcumin for clinical application. *J Control Release* **316**, 359–380 (2019)
- [10] Nelson, K.M.; Dahlin, J.L.; Bisson, J.; Graham, J.; Pauli, G.F.; Walters, M.A. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *J. Med. Chem.* **60**, 1620–1637 (2017)
- [11] Wang, J.; Yu, X.; Zhang, L.; Wang, L.; Peng, Z.; Chen, Y. The pharmacokinetics and tissue distribution of curcumin and its metabolites in mice. *Biomed. Chromatogr.* **32**, e4267–e4276 (2018)
- [12] Zou, P.; Helson, L.; Maitra, A.; Stern, S.T.; McNeil, S.E. Polymeric curcumin nanoparticle pharmacokinetics and metabolism in bile duct cannulated rats. *Mol. Pharm.* **10**, 1977–1987 (2013)
- [13] Gupta, S.C.; Prasad, S.; Kim, J.H.; Patchva, S.; Webb, L.J.; Priyadarsini, I.K.; Aggarwal, B.B. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 1937–1955 (2011)
- [14] Itaya, M.; Miyazawa, T.; Zingg, J.M.; Eitsuka, T.; Azzi, A.; Meydani, M.; Miyazawa, T.; Nakagawa, K. The differential cellular uptake of curcuminoids in vitro depends dominantly

- on albumin interaction. *Phytomedicine* **59**, 152902–152913 (2019)
- [15] Shoba, G.; Joy, D.; Joseph, T.; Majeed, M.; Rajendran, R.; Srinivas, P.S. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* **64**, 353–356 (1998)
- [16] Demeule, M.; Currie, J.C.; Bertrand, Y.; Che, C.; Nguyen, T.; Regina, A.; Gabathuler, R.; Castaigne, J.P.; Beliveau, R. Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *J. Neurochem.* **106**, 1534–1544 (2008)
- [17] Donahue, J.E.; Flaherty, S.L.; Johanson, C.E.; Duncan, J.A. III.; Silverberg, G.D.; Miller, M.C.; Tavares, R.; Yang, W.; Wu, Q.; Sabo, E.; Hovanesian, V.; Stopa, E. G. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **112**, 405–415 (2006)
- [18] Shinohara, M.; Tachibana, M.; Kanekiyo, T.; Bu, G. Role of LRP1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: evidence from clinical and preclinical studies. *58*, 1267–1281 (2017)
- [19] Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Preat, V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J. Control Release* **161**, 505–522 (2012)
- [20] Harigae, T.; Nakagawa, K.; Miyazawa, T.; Inoue, N.; Kimura, F.; Ikeda, I.; Miyazawa, T. Metabolic fate of poly-(lactic-co-glycolic acid)-based curcumin nanoparticles following oral administration. *Int. J. Nanomed.* **11**, 3009–3022 (2016)

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名	高橋 麻由子
審査委員	主査：教授 仲川清隆 副査：教授 桑原重文 教授 山下まり
学位論文題目	細胞外因子によるクルクミノイドの細胞内移行や生理作用の影響；クルクミノイドの生理作用を向上させるナノ粒子の作成に向けて
論文審査の結果の要旨	
<p>医療技術の発展に伴い、認知症患者数は 2050 年までに 1 億人を超えると推計されており、健康寿命の延伸のため、食品成分を活用した疾病予防・治療方法の開発が進められている。そうした食品成分の内、クルクミン (CUR) は抗炎症、抗酸化、神経保護作用をはじめ、生体に有用な生理作用を持つことが報告されている。しかし、CUR は生物学的利用能の低さが課題とされ、その有用な生理作用を効率よく発揮させる手法の開発が求められている。</p> <p>一方、本論文では <i>in vitro</i> 系における CUR と他の類縁体の細胞内移行の違いを引き起こす原因を検証する中で、細胞培養培地に添加する血清中に含まれるアルブミン (ALB) が関与することを明らかにした (第 1 章)。本知見を基に、CUR の生物学的利用能が制限される理由は、生体内の血漿中に多く含まれる ALB により CUR の臓器移行量が制限されるためであると予想された。そこで本論文では、脳の CUR 移行量を増加させ、生理作用を十分に発揮させる手法の構築を目指し、<i>in vitro</i> の系を用いて、ALB との結合を抑制する手法の確立および、CUR の細胞内移行量や透過量を増加させるナノ粒子 (NPs) の作製・評価が行われた。</p> <p>第 1 章では、CUR と他の類縁体の中で細胞内移行が異なる原因として、ALB が関与することを明らかにした。CURs 類縁体の中で最も強い生理作用を示す CUR は、ALB との結合が弱いいため遊離体として存在しやすく、細胞内へ優先的に移行・生理作用を発揮することが示唆された。</p> <p>第 2 章では、<i>in vitro</i> で最も強い生理作用を示す CUR であっても生物学的利用能が制限されるという課題に対して、第 1 章の結果を踏まえ、血漿中に多量に含まれる ALB が CUR の臓器移行を阻むと仮説を立てた。そこで ALB と CUR の結合を競合的に阻害することを考案し、該当する食品成分としてペパーリン (PIP) を特定した。また、PIP を共添加することで CUR の細胞内移行量が増加、生理作用が増強したことか上記の仮説を支持する結果が得られた。</p> <p>第 3 章では、CUR の脳内移行量を増加させることを目指し、認知症発症時に増加するタンパク (LRP-1) を標的とした「ペプチド修飾-CUR・PIP 含有 NPs」の作製・評価に取り組んだ。作製した NPs は LRP-1 を発現する MDCK 細胞において CUR の細胞内移行量を増加、CUR やその代謝物の細胞透過量を増加させたことから、目的の機能性を有することを明らかにした。今後、動物試験による体内動態や疾病モデル動物による生理作用評価等の検証が期待される。</p> <p>ALB は CUR に限らず、様々な食品成分とも結合し臓器内輸送へ影響を及ぼすと考えられる。よって本研究で明らかにされた知見や構築された手法は、有用な生理作用を持つ一方で十分に生理作用を発揮されていない他の食品成分にも応用することが可能と期待される。</p> <p>以上、CUR の生物学的利用能が制限されているという課題に対し、その原因の解明から生体を見据えた応用研究まで、食品科学や薬学の知見を組み合わせながら挑戦的な研究に取り組んでおり、出席した審査員一同は博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認定した。</p>	