



講師  
鳴海克哉

2011年 北海道大学 大学院生命科学院  
博士課程 修了  
2011年 北海道大学病院 薬剤部 (薬剤師)  
2014年 北海道大学 大学院薬学研究院  
助教  
2021年 同 講師  
2022年 同  
臨床薬学教育研究センター  
副センター長 (兼)

## サケ白子含有成分のヒト小腸吸収特性に基づいた 肝脂質蓄積抑制への応用

### 1. 研究背景と目的

サケ白子抽出物 (SME) は、DNA を構成するヌクレオチドの基本単位「デオキシリボヌクレオチド (dNMPs)」を豊富に含んでおり、近年では脂肪肝モデル動物に対する有用性が示唆されている<sup>1</sup>。また、最近ではヒトを対象とした臨床試験においてもサケ白子 DNA の摂取により脂肪肝の指標となる L/S 比の改善が示されているが<sup>2</sup>、その有効成分に関しては明らかとなっていない。これまで我々は、dNMPs がエクト-5'-ヌクレオチダーゼ (CD73) によって脱リン酸化され、デオキシリボヌクレオシド (dNs) として濃縮ヌクレオシド輸送体 (CNT1-CNT3) を介して腸管上皮細胞に取り込まれることを明らかにしてきた<sup>3,4</sup>。一方で、食事由来の dNMPs が dNs として腸管上皮に取り込まれた後、それらがどのような形で門脈血中に放出されるのかについては、未だ明らかになっていない。

非アルコール性脂肪性肝疾患/脂肪肝炎 (NAFLD/NASH) は炎症や線維化を伴う進行性の肝疾患であるが、未だ治療薬の開発には至っておらず治療の原則は生活習慣の改善に限られる。一般に、NAFLD における肝障害は活性酸素種の増加および抗酸化作用の低下による肝臓内の酸化ストレスによって引き起こされることが提唱されている。現在までに脂肪肝治療に適応のある医薬品は存在しないが、診療ガイドラインでは生活習慣の改善に加えて抗酸化物質「ビタミン E」の投与が強く推奨されている。したがって、抗酸化作用を有する物質は脂質の過酸化を予防する上で有用であると考えられる。

本研究では、*in vitro* 腸管吸収モデルを用いて SME に含まれる核酸成分の吸収性を網羅的に解析し、SME 摂取後に門脈内へ吸収され、肝臓において (過酸化) 脂質の蓄積抑制作用を示す核酸関連物質を同定することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 細胞培養

Caco-2 細胞は、我々の既報に準拠して培養した<sup>5</sup>。マトリゲルでコーティングした 24 ウェルの細胞培養インサートに、1 ウェルあたり  $3.0 \times 10^4$  cells の密度で Caco-2 細胞を播種し、21 日間培養した。

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞 hiSIEC は富士フイルム株式会社より購入し、製品マニュアルに従って培養した。hiSIEC は解凍後、マトリゲルでコーティングした細胞培養インサートに 1 ウェルあたり  $1.0 \times 10^5$  cells の密度で播種し、11 日間培養した。アッセイ直前に Millicell-ERS (Merck Millipore 社) を用いて各ウェルの透過上皮電気抵抗 (TEER) 値を測定し、Kitaguchi らの報告値と一致することを確認した後に試験に使用した<sup>6</sup>。

### 2.2 トランズウェルを用いた透過実験

透過実験は、pH 6.0 または pH 7.4 に調整した Hank's balanced salt solution (HBSS) をインキュベーションバッファーとして用いて実施した。各細胞単層膜のドナー側およびレシーバー側を、それぞれ pH 6.0 および pH 7.4 の HBSS で 2 回洗浄し、37°C で 30 分間プレインキュベートした。ドナー側に pH 6.0 の SME 溶液を添加した後、レシーバー側から 10 分、30 分、60 分後にサンプルを採取した。なお、サンプルは分析まで -30°C で保存した。

### 2.3 超高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (UPLC/MS/MS)

#### 2.3.1 サンプル調製

各サンプルに、内部標準物質 (IS) として 2-クロロアデノシンを含むアセトニトリルを加え、3 分間ボルテックス混合して抽出した。続いて、4°C で  $15,500 \times g$ 、15 分間遠心分離を行った。得られた上清を蒸発乾固し、初期移動相に再溶解した後、PTFE 製メンブレンフィルター (孔径:  $0.22 \mu\text{m}$ ) にてろ過し、dNs の測定に用いた。

#### 2.3.2 UPLC

4 種の dN の分離は、UPLC システム (Waters 社) および ACQUITY UPLC BEH C18 カラム ( $2.1 \times 100 \text{ mm}$ ,  $1.7 \mu\text{m}$ ) を用いて実施した。各サンプルは、0.1%ギ酸水溶液 (移動相 A) および 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液 (移動相 B) を用いたグラジエントプログラムにより、流速  $0.4 \text{ mL/min}$  で溶出させた。グラジエント条件は以下のとおりである: 0–2.5 分 0% B, 2.5–5.0 分 0–5% B, 5.0–6.25 分 5–95% B, 6.25–7.5 分 95% B, 7.5–8.75 分 95–0% B, 8.75–10 分 0% B。注入量は  $10 \mu\text{L}$ 、オートサンプラーの温度は  $10^\circ\text{C}$  に設定した。

#### 2.3.3 Mass spectrometry

各 dN は、ポジティブエレクトロスプレーイオン化モードにおける多重反応モニタリング (MRM) スキャンにより定量した。Waters Xevo TQ-S の動作パラメータは、ソースオフセット  $50 \text{ V}$ 、脱溶媒温度  $500^\circ\text{C}$ 、脱溶媒ガス流量  $1000 \text{ L/h}$ 、コーンガス  $150 \text{ L/h}$ 、

ネブライザーガス 7.0 bar に設定した。各化合物に依存するパラメータは、Table 1 に示す。

Table 1 MRM transitions and corresponding MS/MS tuning parameters.

Analyte	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)	Capillary Voltage (kV)
dAdo	252	136	20	10	2.0
dGuo	268	152	15	10	2.0
dCyd	228	112	20	10	2.0
Thymidine	243	127	20	10	2.0
2-chloroadenosine	302	170	41	20	2.0

dAdo, 2'-deoxyadenosine; dCyd, 2'-deoxycytidine; dGuo, 2'-deoxyguanosine

### 3. 結果と考察

#### 3.1 UPLC/MS/MS を用いた dNs の同時定量法の構築

前述の通り、食事由来の dNMPs は腸管上皮で代謝を受け dNs として腸管上皮細胞に取り込まれる。そこで *In vitro* 腸管吸収モデルを用いた評価に先立ち、4 種の dN (dAdo、dGuo、dCyd および thymidine) の同時定量法の構築を試みた。LC 条件および MS の各パラメータを調整し、各 dN のクロマトグラムを確認した (Fig. 1)。また、4 種の標的分析物において、IS とのピーク面積比と各分析物の濃度 (dAdo: 1–500 nM、dGuo: 2–1000 nM、dCyd および thymidine: 10–5000 nM) との間に良好な直線性 ( $R^2 > 0.99$ ) が確認された (データは示さない)。この定量法を用いて、SME に含まれる核酸成分の腸管吸収性を評価した。

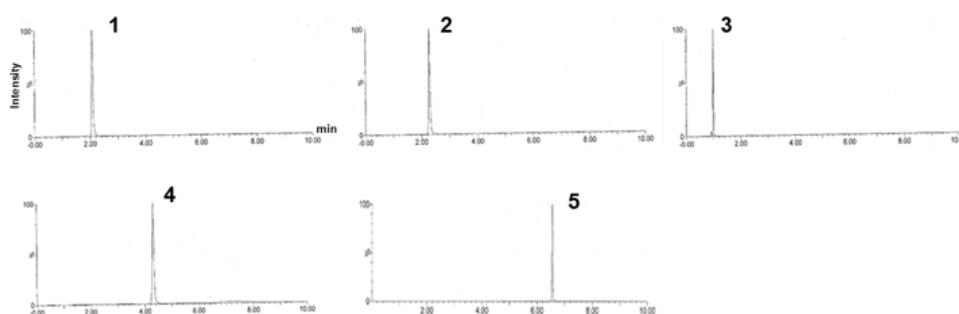
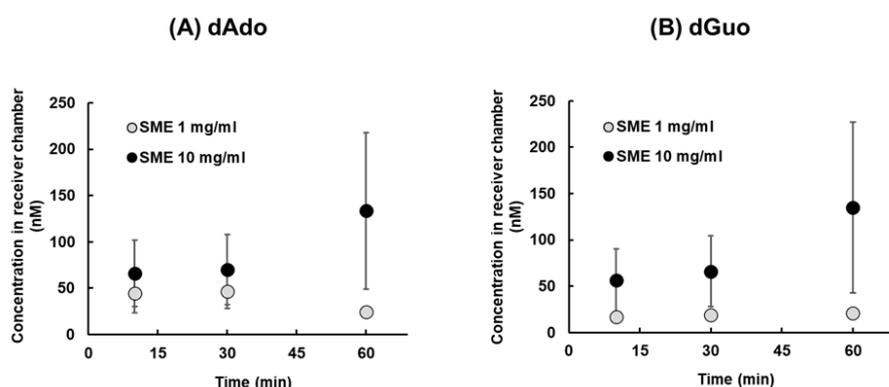


Fig. 1 MRM diagram of five compounds in mixed standard solution

1: dAdo; 2: dGuo; 3: dCyd; 4: Thymidine; 5: 2-Chloroadenosine.

#### 3.2 Caco-2 細胞単層膜を用いた SME の吸収性評価

Caco-2 細胞単層のドナー側に SME を添加後、レシーバー側への dAdo および dGuo の透過が観察された (Fig. 2)。本検討で用いた SME は、各 dN のモノヌクレオチド (dAMP、dGMP、dCMP、dTMP) をそれぞれ 6–9% 程度含有するが、SME 添加後 60 分までのレシーバー側における dCyd および thymidine 濃度は検出限界以下であり、これらピリミジン系 dNs の透過は認められなかった。

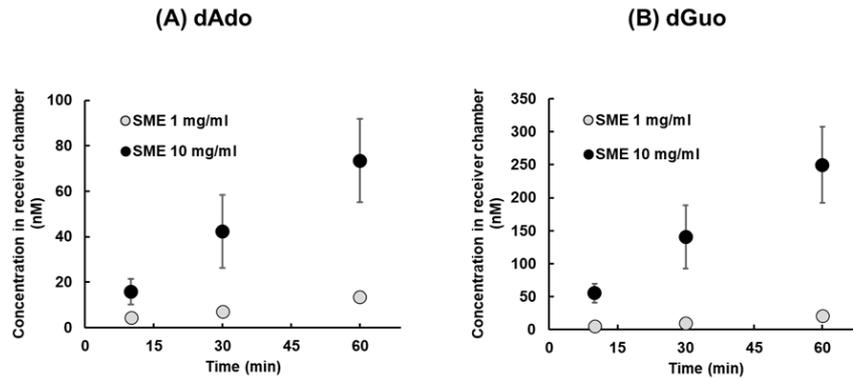


**Fig. 2 Time-dependent permeation of (A) dAdo and (B) dGuo in Caco-2 cells.**

Time course plot of each deoxyribonucleoside concentrations in the receiver side at 10, 30, and 60 min after adding SME (1, 10 mg/mL) to the donor side. Data represent the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments.

### 3.3 hiSIEC 単層膜を用いた SME の吸収性評価

Figure 3 に示すように、SME 添加後 hiSIEC 単層におけるレシーバー側における dAdo および dGuo 濃度の増大が認められた。これらのプリン系 dNs の hiSIEC 単層膜の透過性は、Caco-2 細胞と比較して、より明確な濃度依存性および時間依存性を認めた。dAdo および dGuo の細胞内取り込みに関与する輸送体である CNT2 は、hiSIEC で高発現しており、Caco-2 細胞の約 1000 倍、成人ヒト小腸における発現レベルと同程度であることが報告されている<sup>4,8</sup>。したがって、両単層膜におけるプリン系 dNs の透過挙動の違いは、核酸輸送体の発現の差によって説明できる可能性がある。一方、レシーバー側の dCyd および thymidine 濃度は、SME 添加後 60 分まで検出限界以下であり、*in vitro* ヒト腸管モデルを使用した透過実験では、ピリミジン dN の透過は観察されなかった。したがって、ヒトにおいて SME 経口投与後、外来性 dCyd および thymidine は全身循環に曝露されないことが示唆された。哺乳類においては、食物由来のピリミジンがサルベージ経路における主要な中間体となり、DNA 合成前駆体であるヌクレオチドへと効率的に変換される。ヌクレオチドは、リン酸基に由来する高い電荷を有するため、細胞膜を受動的に通過することができない。この性質に鑑みると、プリンおよびピリミジン由来デオキシヌクレオシド (dN) の腸管透過性の相違は、腸管上皮細胞内におけるデオキシリボヌクレオシドキナーゼによる代謝活性および利用効率の差異に起因する可能性が示唆される。今後は、単なる輸送評価に留まらず、これらの代謝プロセスに関与する主要酵素および中間体の網羅的評価を目的としたメタボロミクス解析等の統合的アプローチが求められる。



**Fig. 3 Time-dependent permeation of (A) dAdo and (B) dGuo in hiSIECs.**

Time course plot of each deoxyribonucleoside concentrations in the receiver side at 10, 30, and 60 min after adding SME (1, 10 mg/mL) to the donor side. Data represent the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments.

#### 4. まとめと今後の展望

本研究では、*in vitro* 腸管吸収モデルを用いて SME に含まれる主要な核酸成分の吸収特性を明らかにした。4 種類の dN を同時に定量することで、SME 摂取後の腸管吸収を評価することが可能となった。外来性のプリン dN (dAdo および dGuo) は腸管上皮を効率的に透過するのに対し、ピリミジン dN である dCyd と thymidine は腸管吸収が限られていることが示された。これらの結果は、腸管における dNs の異なる吸収メカニズムに関する重要な知見を提供し、食事由来の核酸成分のバイオアベイラビリティとその生体機能性に関する将来の研究に貢献することが期待される。

今後は、SME に含まれる核酸成分、特にプリン系核酸関連物質およびその代謝物に着目し、肝臓における抗酸化作用や過酸化脂質の蓄積抑制作用について、より詳細な評価を進める予定である。これにより、SME の核酸成分が有する潜在的な健康機能の解明がさらに進み、将来的には新たな機能性食品や予防医療への応用展開にもつながることが期待される。

#### 6. 謝辞

本研究の遂行にあたりご支援を賜りました 公益財団法人サッポロ生物科学振興財団 に、心より感謝申し上げます。

#### 7. 参考文献

1. Sakurai T., et al. (2019). Dietary salmon milt extracts attenuate hepatosteatosis and liver dysfunction in diet-induced fatty liver model. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1675-1681.
2. Takahashi Y., et al. (2022). Dietary supplementation of deoxyribonucleic acid derived

from chum salmon milt improves liver function in healthy Japanese individuals: a placebo-controlled, randomised, double-blind, parallel-group clinical trial. *Food & Function*, 13(18), 9383-9390.

3. Narumi K., et al. (2019). Mutual role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and concentrative nucleoside transporter 3 in the intestinal uptake of dAMP. *PLoS One*, 14(10), e0223892.
4. Yamamura T., et al. (2021). Characterization of deoxyribonucleoside transport mediated by concentrative nucleoside transporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 558, 120-125.
5. Yamamoto Y., et al. (2023). Oral administration of linoleic acid immediately before glucose load ameliorates postprandial hyperglycemia. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1197743.
6. Kitaguchi T., et al. (2022). Simultaneous Evaluation of Membrane Permeability and UDP-Glucuronosyltransferase-Mediated Metabolism of Food-Derived Compounds Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Small Intestinal Epithelial Cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 50(1), 17-23.
7. Sato T., et al. (2024). Salmon Milt Extract Suppresses Glucose Uptake by Downregulating SGLT1 and GLUT2 Expression in Caco-2 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 47(9), 1477-1483.
8. Kabeya T., et al. (2020). Pharmacokinetic functions of human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 35(4), 374-382.