

乳剤粒子を効率よく細胞内へ取り込む機構を利用した 新しい経口吸収改善法の確立

北海道大学大学院薬学研究院 調査研究者 佐藤 夕紀
共同研究者 菅原 満

(〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目 電話番号011-706-3978)

要旨

小腸からの吸収は、それらの成分が生体へと侵入する第一段階であり、トランスポータをはじめ様々な動態関連因子により制御されている。一般に、経口吸収率の悪い成分は、体内へ入る量に個体間のばらつきが大きく、効果に差が見られやすいことから、その製剤化のためには、安全性の観点からより低い投与量で安定した吸収性を示すことが重要である。本研究では、小腸コレステロールトランスポータ NPC1L1 をターゲットとして、低吸収性を示す成分をより細胞内に効率よく取り込む機構の解明とその機構を利用した新しい吸収改善のためのアプローチに着手した。その結果、本研究により、NPC1L1 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 Coenzyme Q10 を選択して検討した結果、コレステロールを含む乳剤粒子により Coenzyme Q10 の細胞内取り込み量を改善することができた。また、水溶性物質であるフルオレセインナトリウムをリポソームに封入する際、コレステロール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。

1、調査研究目的

近年、我が国は生活習慣病の増加、超高齢社会などの社会背景から、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¹⁾。その高騰する国民医療費の削減を期待して、医療機関を受診する前に自己で医薬品・サプリメント等を使用し健康管理する「セルフメディケーション」が推奨されている。セルフメディケーションにおいて重要な一般用医薬品(OTC)や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 NPC1L1 (Niemann-Pick C1 Like 1) の関与が報告された²⁾。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。NPC1L1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 α -トコフェロールやルテインなどの消化管吸収にNPC1L1が関与していることが報告された³⁴⁾。NPC1L1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⁵⁾、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 NPC1L1の基質がミセル化された場合、NPC1L1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 NPC1L1の基質がどのように細胞内に取り込まれているかを明らかにする。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 NPC1L1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す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。

2、調査研究方法

2-1 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、アイトープ標識コレステロール[1 α , 2 α -³H(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。その他、実験に用いる試薬は、試薬特級相当、また HPLC 級のものを用了。

2-2 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。Caco-2 細胞の培養は 37° C、5% CO₂-95% air インキュベーター内で行い、予め 56° C で 30 分間加熱処理することにより血清中の補体を非働化した 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum)、100 IU/mL ペニシリン -100 μ g/mL ストレプトマイシン、0.1 mM NEAA (non essential amino acids)、4 mM L-グルタミンを含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) を培養液とした。細胞は、75 cm² フラスコ (Corning Inc.) に培養し、培養液を 1-2 日おきに交換し、播種 5-7 日後に継代を行った。継代は、滅菌 PBS で細胞を 2 回洗浄後、トリプシン -EDTA 溶液 (0.25% トリプシン、0.02% EDTA in PBS) により細胞を遊離させて行った。

2-3 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 200-350 g 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ツト 5L37 を自由摂食させた。

2-4 Caco-2 細胞の NPC1L1 発現確認

A) total RNA 抽出

6 穴プレートに Caco-2 細胞を 4.0×10^5 cells/well となるように播種し、コンフルエントの状態に達してから使用した。培養液を吸引除去後、細胞を PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM Na_2PO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4) で洗浄し、スクレイパーを用いて細胞を回収した。1,300 × g、5 分間、 4°C で遠心分離し、PBS を吸引した後に RNAiso を 1 mL 添加し、細胞を溶解するため 5 分間室温でインキュベートした。続いてクロロホルムを 0.2 mL 加え 15 秒間強く転倒混和し、室温で 5 分間インキュベート後に 12,000 × g、15 分間、 4°C で遠心分離した。上層を回収後、イソプロパノール 0.5 mL を添加し、室温で 5 分間インキュベートした後に 12,000 × g、10 分間、 4°C で遠心分離した。上清を除去し 70% エタノールを 1 mL 添加し、7,500 × g、5 分間、 4°C で遠心分離した。再度上清を除去して風乾し、RNase-free H₂O (DEPC-H₂O) 50 μL に溶解して -80°C で保存した。

B) 逆転写反応

前項に記載した方法で得られた total RNA を用いて Table 1 に示す通り反応液を調製し、Table 2 の条件で逆転写反応を行い、cDNA を得た。

Table 1 逆転写反応液組成

total RNA	0.5 μg
5×RT buffer	4 μL
2.0 mM dNTP mix	8.0 μL
5 μM Oligo dT primer	1.0 μL
Rever Tra Ace (100 U/μL)	1.0 μL
DEPC H ₂ O	up to 20 μL
Total	20 μL

Table 2 逆転写反応のための PCR 条件

30°C	10 min	1 Cycle
42°C	60 min	
99°C	5 min	
4°C	∞	

C) RT-PCR 法による NPC1L1 遺伝子発現確認

続いて、上記の方法で得られた cDNA を用いて、Table 3、Table 4 に示すような反応組成、反応条件で PCR を行い、電気泳動にて NPC1L1 のバンドを確認した。なお、ポジティブコントロールとして、ハウスキーピング遺伝子である hGAPDH を用いた。Table 5 に使用した NPC1L1 および hGAPDH のプライマーの配列を示す。

Table 3 PCR 反応液組成

RT product	4.0 μ L
Primer mix	0.5 μ L
2 \times Quick Taq TM HS DyeMix	25 μ L
DEPC H ₂ O	up to 50 μ L
total	50 μ L

Table 4 PCR 条件

94°C	2 min	1 cycle
94°C	30 sec	30 cycle
60°C	30 sec	
68°C	10 sec	
4°C	∞	

Table 5 プライマー配列

名前		Primer 配列	Product size (bp)
hGAPDH	Forward	5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3'	576
	Reverse	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'	
hNPC1L1	Forward	5'-ATGAGTCCCAAGGTGACGAC-3'	166
	Reverse	5'-GTGACCACAGCGAAGACAGA-3'	

2-6 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てタウロコール酸ナトリウムを終濃度が 500 μ 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 Table 6 の通りである。

Table 6 transport buffer の組成

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

2-7 リボソームの調製

卵黄ホスファチジルコリン 20 mg (26 μ mol) と NPC1L1 の基質であるコレステロール 3.9 mg (10 μ 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 °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 (ゲル状になるまで) 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 (1.5 時間程度) 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。

2-8 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 2×10^5 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、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 溶液 1 mL を加え、10 分間、 37°C 、5% CO_2 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、 $800 \mu\text{L}$ のリポソーム溶液もしくは $6.6 \mu\text{M}$ フルオレセイン溶液を添加した。その後 60 分後に溶液を吸引し、氷冷したタウロコール酸ナトリウムを 1 mM 含有する transport buffer 1 mL で 3 回洗浄した。4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で細胞を固定した。HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (KEYENCE Corp.) で蛍光を観察し、XY, XZ, YZ 画像を取得した。対物レンズ 20 倍もしくは 4 倍で観察し、画像を得た。

2-9 取り込み実験および濃度測定

A) cholesterol

メディウム吸引後に transport buffer 1 mL で 2 回洗浄し、 $250 \mu\text{L}$ の chol 溶液 (18.9 nM , $1 \mu\text{Ci}/\text{mL}$) 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) $250 \mu\text{L}$ で細胞を溶解し、milliQ 水 $400 \mu\text{L}$ 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⁶⁾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、NPC1L1 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 μM 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。

B) Coenzyme Q10 (CoQ10)

2-4 乳剤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 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $1 \mu\text{M}$ 、Chol $1 \mu\text{M}$ with ezetimibe 合わせて 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 $300 \mu\text{L}$) を加え、scheme 1 に示すような手順でサンプルを調製し、Table 7 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。

Scheme 1 CoQ10 extraction method

Sample 100 μ L
↓Added to 400 μ L of methanol
↓Mixed vigorously by a vortex mixer 30sec
↓Added to 2 mL of Hexane
↓Mixed vigorously by a vortex mixer 30sec
↓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 μ L of HPLC mobile phase

Table 7 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 μ L

2-10 実験動物への経口投与

ラットをジエチルエーテルで予備麻酔後、CoQ10量として25 mg/kgとなるように乳剤を胃ゾンデ法により強制的に投与し、ケタミン 6.25 mg/100 g weight、ミダゾラム 375 μ g/100 g weight またはペントバルビタールナトリウム 3.0 mg/100 g weight を腹腔内投与して麻酔し、頸部を切開して頸静脈を露出させた。投与 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24 hr 後に血液約 0.3 mL を採取し、微量のヘパリンナトリウムと混和した。採取した血液は 4°C で 750 \times g, 10 分間遠心分離し、100 μ L の血漿を得た。なお実験に使用した Male Wistar ラットは 12 時間に渡り絶食(水を除く)させた後に実験に用いている。また 0 時間後の採血は乳剤を経口投与したラットからではなく、別のラットから blank として血漿を採取したものを使用している。得られた血漿は、測定まで -20°C で保存し、測定は scheme 1 に示すような手順でサンプルを調製し、Table 7 に示した条件で HPLC を用いて濃度を測定した。

3、調査研究成果

3-1 Caco-2 細胞における NPC1L1 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 NPC1L1 遺伝子の発現確認を行った。その結果、Caco-2 細胞において NPC1L1 遺伝子が発現していることが示された (Fig. 1)。また、Caco-2 細胞での chol 取り込みの経時的変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 (Fig.2-A)。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、NPC1L1 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 μM 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 (Fig.2-B)。このことから、以降のエゼチミブによる阻害は、25 μM として検討を進めてゆくこととした。

3-2 NPC1L1 による Chol 輸送機構の検討

続いて、NPC1L1 の基質を含むミセルの取り込み挙動を明らかにすべく、界面活性成分をである 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 NPC1L1 により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 NPC1L1 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 NPC1L1 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 (Fig.3)。

3-3 NPC1L1 による難吸収性物質の吸収改善

前項までの検討で、chol を含んだミセルの状態のまま NPC1L1 によって輸送されると仮定すると、NPC1L1 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⁷⁾ 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 (Fig. 4)。

さらに、この検討結果を踏まえて、in vivo でも同様の現象が確認できるか、実験動物に chol を含む CoQ10 乳剤を経口投与し、血漿中濃度推移を比較することとした。その結果、エゼチミブと同時投与することで CoQ10 の血漿中濃度は大きく低下することが示された (Fig. 5)。

3-4 NPC1L1による難吸収性(水溶性)物質の吸収改善

続いて、NPC1L1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を構成成分とするリポソーム内にフルオレセインナトリウムを封入し、顕微鏡を用いて、Caco-2細胞内への蛍光の取り込みを観察した。Cholを使用したリポソームでは、フルオレセインナトリウム溶液の場合と比較して、XZ、YZ断面より核周囲にフルオレセインが取り込まれていることが確認された(Fig. 6-A)。一方、フルオレセイン溶液では、蛍光の取り込みが観察されなかった(Fig. 6-B)。また、より低倍率で撮影した顕微鏡画像では、これらの画像からも、フルオレセイン溶液と比較して、リポソームにフルオレセインを封入することで、その取り込み量が増大したことが示された(Fig. 6-C, D)。

4、考察

NPC1L1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、NPC1L1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。Fig. 3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NPC1L1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NPC1L1の基質ではないという報告もあることから⁸⁾、PCよりも親水性のあるLPCはNPC1L1の基質ではないと考えた。以上のことから、cholはNPC1L1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、Fig. 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等から、Fig. 5の結果も合わせて考察すると、CoQ10はNPC1L1の基質である可能性も考えられる。現在までに、CoQ10がNPC1L1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 α -トコフェロールはNPC1L1の基質であるという報告がされていることから³⁾、CoQ10がNPC1L1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NPC1L1のsiRNA、NPC1L1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、NPC1L1の基質ではないと報告されているレチノール³⁾等を用いて、同様の検討を行い、NPC1L1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NPC1L1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、OTC成分であるシメチジンの定量条件などは確立していたものの、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フルオレセインナトリウムを用いて、視覚的に吸収改善効果を確認したいと考えた。その結果、Fig. 6より、フルオレセインナトリウム溶液の場合に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XZ、YZ断面より核周囲（つまり細胞内）にフルオレセイン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、NPC1L1を介して吸収を改善できる可能性が示唆された。今後は、フルオレセインナトリウムだけでなく、5(6)-フルオレセインのような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た後、OTCなどのシメチジン等、様々な成分を用いて吸収改善が可能かどうかを検討する予定である。

5、まとめ

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NPC1L1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CoQ10を選択して、検討した結果、cholを含む乳剤粒子により、CoQ10の細胞内取り込み量を改善することができた。また、水溶性物質であるフルオレセインナトリウム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。

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 一般用医薬品セルフメディケーション振興財団、ならびに関係の皆様へ深く感謝申し上げます。また、本研究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、阿部沙也華氏、篠原紹宏氏に心から感謝いたします。

6、調査研究発表（口頭又は誌上発表）

1. 佐藤夕紀. トランスポーターを介した低吸収性成分の吸収改善の可能性. ノーステック財団 研究開発事例報告会, 札幌, 2015.2. 招聘講演
2. 竹川悠人, 佐藤夕紀, 鷺見正人, 武隈洋, 菅原満. Niemann-Pick C1 Like-1 (NPC1L1) を標的とした乳剤化による難吸収性物質の吸収改善. 日本薬学会第135年会, 神戸, 2015.3.

7、引用文献

1. 厚生労働省 平成24年度国民医療費の概況
2. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Lyer SP, Maguire

- M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 303, 1201-1204 (2004).
3. Narushima K, Takada T, Yamanashi Y, Suzuki H. Niemann-Pick C1-Like 1 Mediates α -tocopherol transport. *Mol. Pharm.*, 74, 42-49 (2008).
 4. Sato Y, Suzuki R, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Noda T, Sugawara M, Iseki K. Involvement of cholesterol membrane transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in the intestinal absorption of lutein. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 15, 256-264 (2012).
 5. Ge L, Wang J, Qi W, Miao HH, Cao J, Qu YX, Li BL, Song BL. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metab.*, 7, 508-819 (2008).
 6. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
 7. Sato Y, Mutoh H, Suzuki M, Takekuma Y, Iseki K, Sugawara M. Emulsification using highly hydrophilic surfactants improves the absorption of orally administered coenzyme Q10. *Biol. Pharm. Bull.*, 36, 2012-2017 (2013).
 8. Zhang JH, Ge L, Qi W, Zhang L, Miao HH, Li BL, Yang M, Song BL. The N-terminal domain of NPC1L1 protein binds cholesterol and plays essential roles in cholesterol uptake. *J. Biol. Chem.*, 286, 25088-25097 (2011).

☒

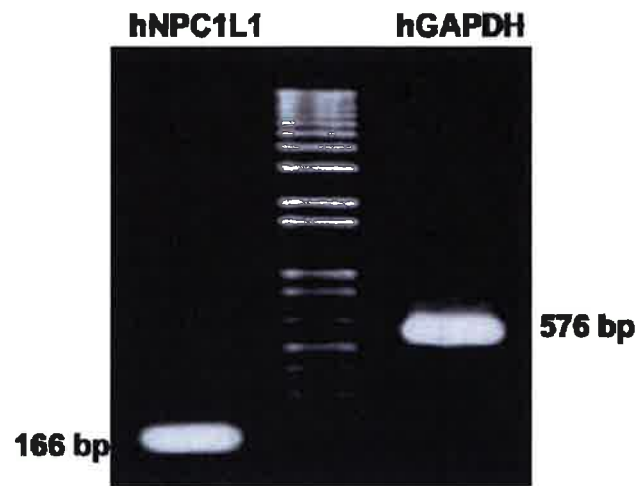


Fig. 1 Expression of NPC1L1 in Caco-2 cells

RT-PCR was performed with total RNA isolated from Caco-2 cells. This data is the typical result from 3 independent experiments.

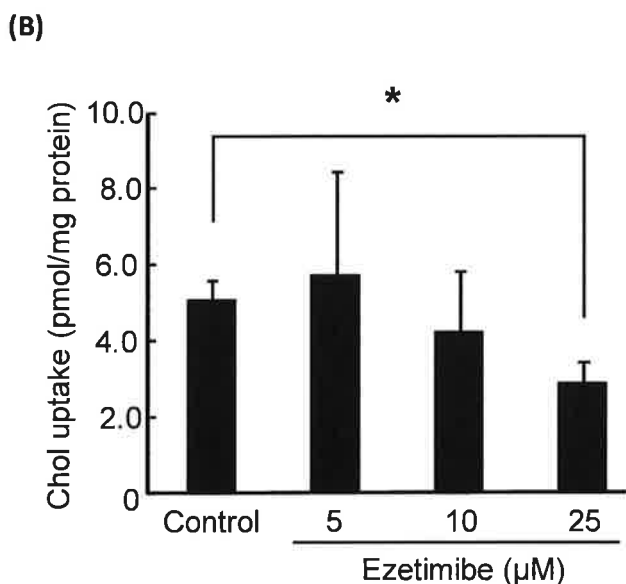
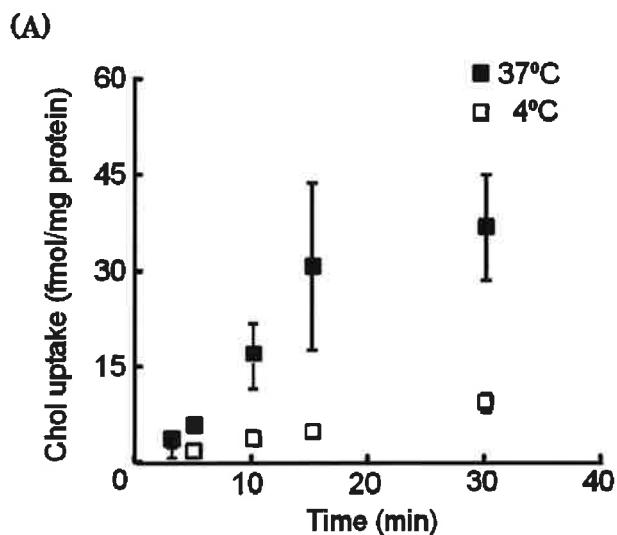


Fig. 2 Time course (A) and inhibitory effect of ezetimibe (B) on the uptake of cholesterol.

(A) The uptake of cholesterol by Caco-2 cells was examined at 37°C (closed square) or 4°C (open square) up to 30 min in a transport buffer containing 1 µM of cholesterol. Each point represents the mean with S.D. of 3 measurements.

(B) The inhibitory effect of ezetimibe on the uptake of cholesterol was examined at 37°C for 5 min with ezetimibe at the indicated concentrations. Each point represents the mean with S.D. of 3-4 measurements. *; significantly different from control at P<0.05.

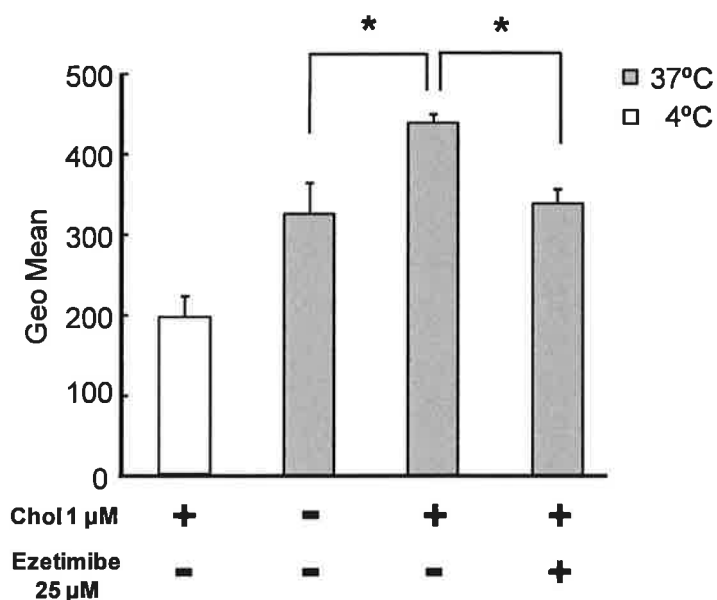


Fig. 3 Effect of cholesterol on the intracellular uptake of LPC-BODIPY into Caco-2 cells.

The uptake of LPC-BODIPY (final concentration of 5 μ g/mL) by Caco-2 cells was examined at 37°C or 4°C for 5 min in an emulsion with or without cholesterol. The inhibitory effect of ezetimibe (25 μ M) on the uptake of cholesterol was examined at 37°C for 5 min. Each column represents the mean with S.D. of 4-5 measurements. *; significantly different at $P < 0.05$.

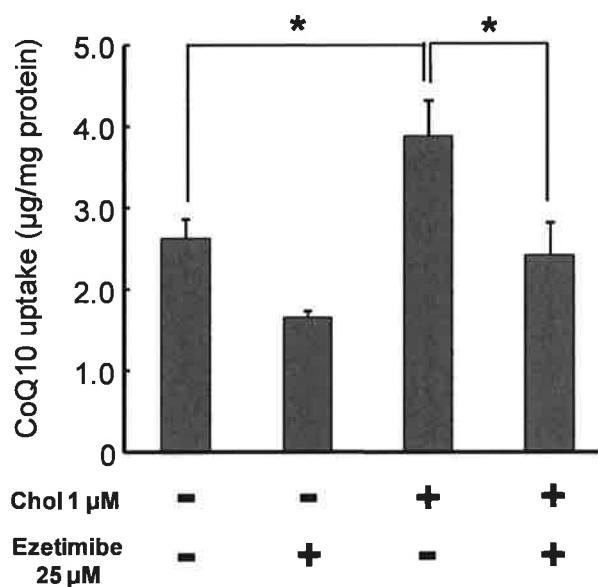


Fig. 4 Effect of cholesterol and ezetimibe on the intracellular uptake of CoQ10 into Caco-2 cells.

The uptake of CoQ10 (final concentration of 300 µg/mL) by Caco-2 cells was examined at 37°C for 15 min in an emulsion with or without cholesterol in the presence or absence of ezetimibe (25 µM). Each column represents the mean with S.D. of 4-7 measurements. *; significantly different at P<0.05.

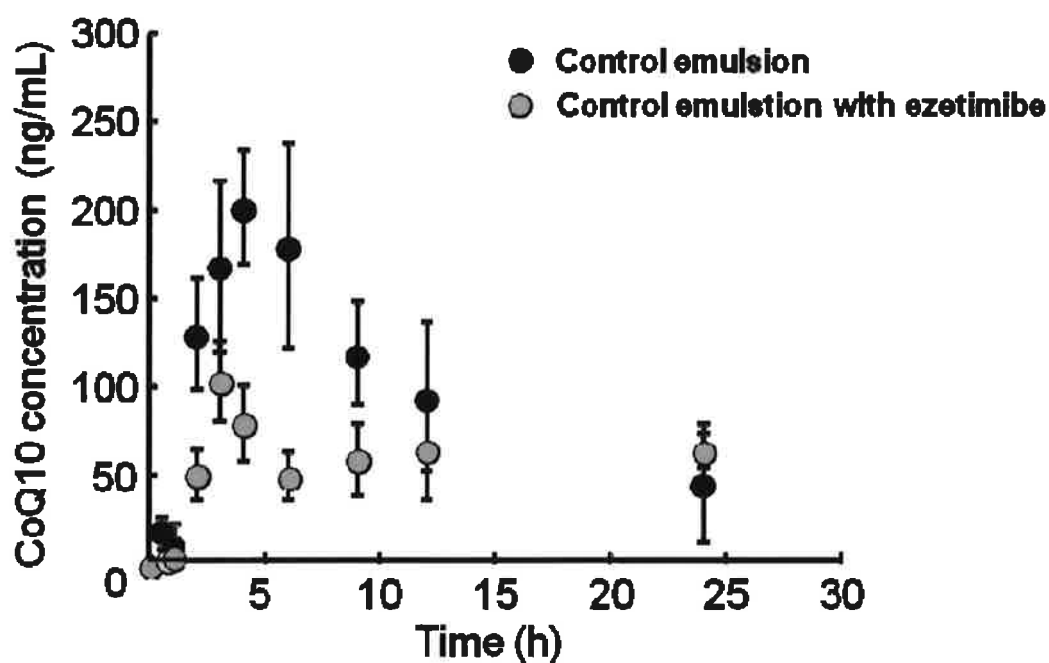


Fig. 5 Plasma concentrations of CoQ10 in rats after oral administration of cholesterol emulsions with and without ezetimibe.

All rats were fasted for 12-16 h before the experiments. CoQ10 (25 mg/kg weight) was administered as an emulsion with cholesterol in the presence or absence of ezetimibe (20 nmol/mL). Blood samples were collected at designated times up to 24 h after administration. Each point represents the mean with S.D. of 6-8 measurements.

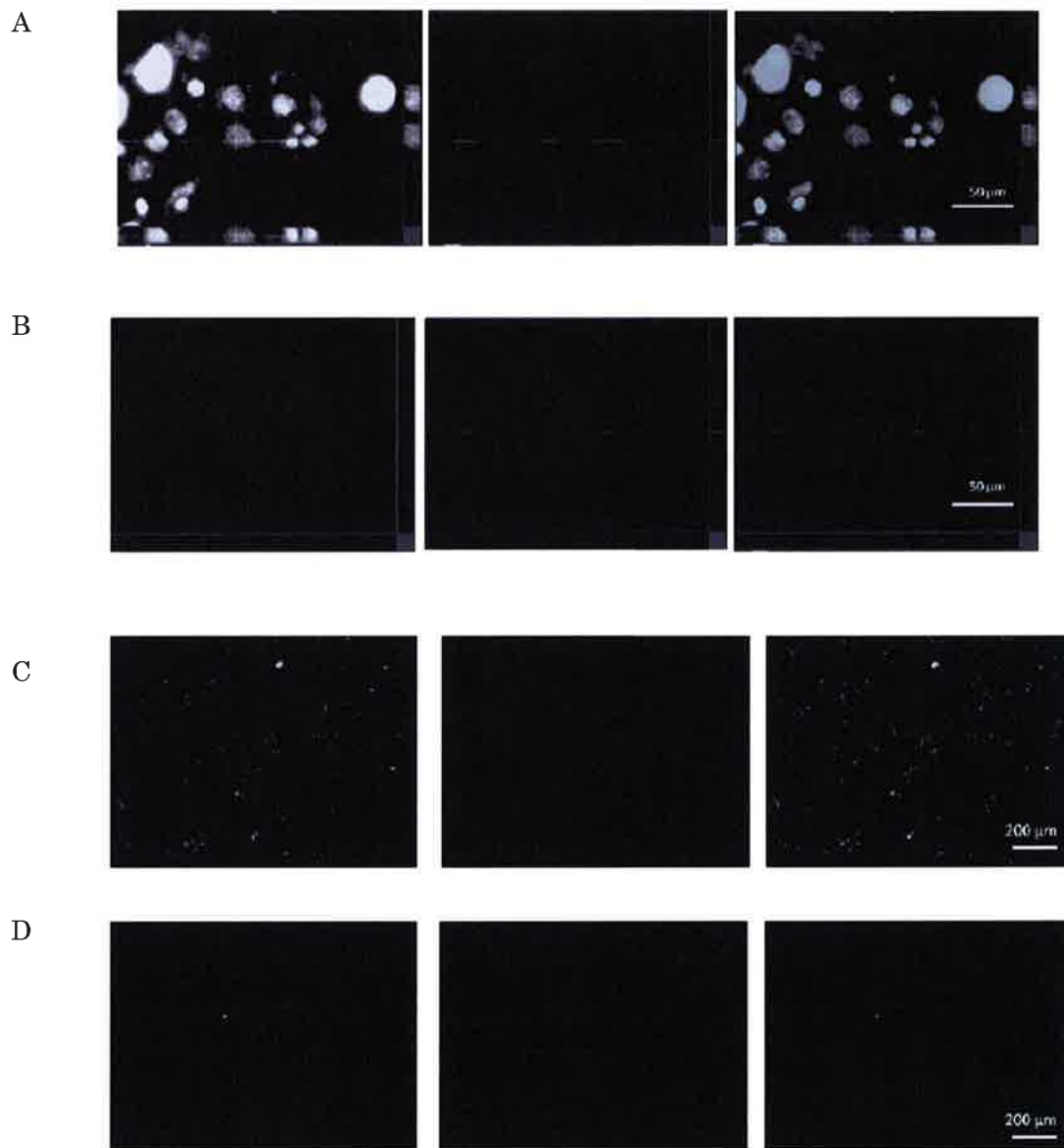


Fig. 6 Observation of intracellular uptake of sodium fluorescein with cholesterol liposome.

Sodium fluorescein (green) encapsulated in a liposome with cholesterol (6.6 μM) was incubated for 60 min with Caco-2 cells. Nuclei were stained by Hoechst 33342 (cyan). After incubation, the labeled cholesterol was observed by a fluorescence microscope.