

## トピックス

## ビタミン E の生理作用解明に向けたタンパク質との結合に関する研究動向

## Research trends in vitamin E binding to proteins to elucidate its physiological effects

## 1. はじめに

ビタミン E はクロマンオール環に側鎖が結合した構造をしており、飽和のフィテル側鎖を持つトコフェロール (Toc) と、不飽和のイソプレノイド側鎖を有するトコトリエノール (T3) に大別され、クロマンオール環に結合するメチル基の数と位置によって  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - の 4 種類の類縁体が存在する (図 1)。その生理作用については、一般的に知られる抗酸化活性<sup>1)</sup>に加え、抗ガン活性<sup>2)</sup>、コレステロール低下<sup>3)</sup>などが知られている。これらの生理活性は、特に細胞試験において T3 の方が Toc よりも強いことが示されており、T3 の細胞内取り込み量が Toc よりも多くなることがその要因の一つと考えられている<sup>4)</sup>。このような中で、我々は最近、細胞培養液中で T3 が Toc よりも高い親和性でアルブミンと結合することで細胞内へ取り込まれやすくなる現象を見いだした<sup>5)6)</sup>。このようにビタミン E がタンパク質と結合することで生理作用に関与することは幾つかの報告があるが、今回、我々が見いだした知見を含めた近年の研究についてトピックスとして紹介する。

## 2. T3 のエストロゲンレセプター (ER) との結合を介した細胞保護作用

Nakaso らは、T3 がエストロゲンレセプターと結合することで、神経細胞保護作用を有することを報告しており<sup>7)</sup>、その概要と、近年さらに得られている知見について紹介する。

まずヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に、パーキンソン病関連毒である 1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン処理して細胞死を誘導する中で、T3 の各類縁体を添加したところ、全ての T3 類縁体が濃度依存的な細胞保護作用を示した<sup>7)</sup>。同様にパーキンソン病関連毒である MG132 (Z-Leu-D-Leu-Leu-al) やタプシガルギン処理した細胞に各 T3 類縁体を投与すると、その細胞保護効果は  $\gamma$ -T3 と  $\delta$ -T3 で特に顕著にみられた<sup>7)</sup>。これらの試薬は酸化ストレスに関係なく毒性を示すものであり、これらに対する T3 の細胞保護効果は抗酸化によるものでなく、細胞内シグナル伝達に依存的なものであることが仮説として考えられた<sup>7)</sup>。

そこで、T3 による細胞保護に関わる細胞内シグナル伝達を調べるために、MAPK 経路と PI3K/Akt 経路を候補として、これらに関わるタンパク質のリン酸化を調べた。その結果、各 T3 類縁体の SH-SY5Y 細胞への投与で、MAPK 経路に関わるタンパク質 (p-38, JNK) のリン酸化はみられなかったものの、PI3K/Akt 経路に関わるタンパク質 (Akt, Erk1/2) のリン酸化はみられ、特に  $\gamma$ -T3 と  $\delta$ -T3 で顕著であった<sup>7)</sup>。

続いて、神経細胞において PI3K/Akt 経路の上流に位置すると報告されている様々なレセプターの阻害剤や遮断薬を用いた細胞試験を行うと、ER の遮断薬であるタモキシフェンを用いた場合において、T3 による細胞保護作用が阻害されることが分かった<sup>7)</sup>。そこで、ER の放射性リガンドである <sup>3</sup>H-エストラジオール (<sup>3</sup>H-E2) を用いて競合的放射測定結合アッセイを実施した。具体的には、ER $\alpha$  もしくは ER $\beta$  に <sup>3</sup>H-E2 と各 T3 類縁体を添加し、ER と <sup>3</sup>H-E2 の結合が T3 により阻害され

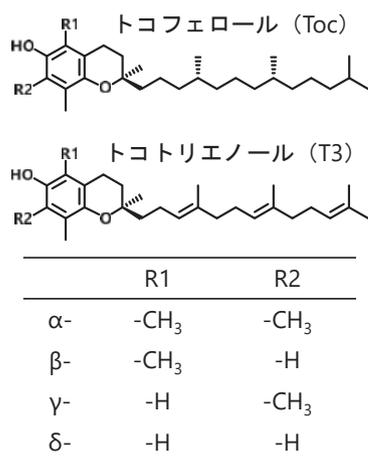


図 1 ビタミン E の分子構造

るかを評価した。その結果、 $\gamma$ -T3と $\delta$ -T3がER $\beta$ の $^3$ H-E2との結合を阻害し、これらはER $\beta$ に結合することが示された<sup>7)</sup>。なお、ER $\beta$ に対する $\alpha$ -T3と $\beta$ -T3の結合や、ER $\alpha$ に対する各T3類縁体の結合は弱いものであった<sup>7)</sup>。さらに、ER $\beta$ をノックダウンすると、 $\gamma$ -T3と $\delta$ -T3による細胞保護作用がみられなくなった<sup>7)</sup>。

このようにT3はERを介して神経細胞保護作用を発揮することが分かった。さらに近年、Horikoshiらは、T3によるヒト表皮角化細胞株であるHaCaT細胞の創傷治癒促進効果についてERが関わり、ERの発現抑制が細胞へのT3の取り込みを抑制することも見いだしつつある<sup>8)</sup>。ERとの結合を介したT3のさらなる生理作用の解明に興味を持たれる。

### 3. $\alpha$ -Tocの67 kDaラミニンレセプター(67LR)との結合を介した生理作用

ここまでT3の生理作用の報告を紹介したが、次はTocの生理作用についての報告を紹介する。Hayashiらは、 $\alpha$ -Tocが腎系球体に発現する67LRと結合しジアシルグリセロールキナーゼ(DGK $\alpha$ )を活性化することで、糖尿病性腎症の改善効果を有することを報告している<sup>9)</sup>。

まず、DDT1-MF2細胞にGFPタグDGK $\alpha$ を発現させて $\alpha$ -Tocを添加した状態を共焦点顕微鏡で観察すると、DGK $\alpha$ 活性化の特徴であるDGK $\alpha$ の細胞膜への移行がみられた<sup>9)</sup>。そして、このような $\alpha$ -TocによるDGK $\alpha$ の細胞膜への移行は、細胞への67LR抗体処理や、67LRのノックダウンで減少することが確認され、 $\alpha$ -TocによるDGK $\alpha$ の活性化に67LRが関わっていることが示された<sup>9)</sup>。

続いて、FLAGタグ67LRを過剰発現させたCos7細胞の破碎液を調製し、Toc結合ピーズを用いたプルダウンアッセイに供すると、 $\alpha$ -Tocと67LRが結合することが分かった<sup>9)</sup>。加えて、 $\alpha$ -Tocを溶解させた0.1% DMSOを含んだ緩衝液に、精製リコンビナント67LR溶液を滴加して等温滴定熱量測定を行うと結合熱が測定されたことから、 $\alpha$ -Tocと67LRが確かに結合することが確認された<sup>9)</sup>。

さらに、 $\alpha$ -Tocと67LRを重水含有の緩衝液中でインキュベートし、タンパク質の一次構造の中で重水素の置換が生じにくい領域を調べることで、67LRの構造における $\alpha$ -Tocの結合部位を調べた。その結果、 $\alpha$ -Tocは67LRの疎水性ポケットに結合することが考えられた。さらに、ドッキングモデル解析を実施することで、 $\alpha$ -Tocの側鎖から67LRの疎水性ポケットに入りこみ結合することが考えられ、見いだした67LR

中の $\alpha$ -Toc結合部位について妥当性が確認された。このように、 $\alpha$ -Tocが67LRと結合することで、DGK $\alpha$ 活性化を誘導し生理活性を発揮する機序が考えられた。

一方で、エピガロカテキンガレート(EGCG)についても、67LRを介して糖尿病性腎症を改善する効果が過去に報告されている<sup>10)</sup>。Hayashiらは、EGCGの67LRの結合部位は親水性の部位であり、 $\alpha$ -Tocの疎水性ポケットとは異なる部位であることも見いだしている<sup>9)</sup>。このように、同じレセプタータンパク質に対してリガンドによって結合部位が異なっても、同様の生理効果を発揮する点について興味を持たれる。なお、67LRを介した生理作用について、T3への言及は無かった。

### 4. $\alpha$ -Tocとアミロイド $\beta$ の結合より期待される生理作用

ここまでは細胞実験を中心とした報告を紹介したが、ここからはin silicoによる解析を中心とした報告を紹介する。アルツハイマー病は神経変性疾患であり、特徴として脳内でアミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )が凝集したA $\beta$ 斑がみられ、その予防に向け様々な化合物についてA $\beta$ の凝集を防ぐ効果があるか調べられている。

そのような中、Aloufiらは近年、 $\alpha$ -Tocを始め、アスコルビン酸、リンゴ酸、システイン、ジチオエリトリール、ジチオスレイトールなどの化合物とA $\beta$ とのドッキングモデル解析を行い、それぞれのドッキングモデルにおける親和性と安定性を評価している<sup>11)</sup>。その結果、各ドッキングモデルにより算出された結合エネルギーは $\alpha$ -Tocが最も低値をとり、高い親和性でA $\beta$ と複合体を形成することが分かった。

さらに、各ドッキングモデルの分子動態シミュレーション解析を行っている<sup>11)</sup>。RMSD(Root Mean Square Deviation)値は、時間に対する複合体構造のずれをシミュレーションした指標となるが、各ドッキングモデルの中でも $\alpha$ -TocとA $\beta$ の複合体が最も低い値を取ったことから、最も安定な複合体であることが分かった<sup>11)</sup>。さらに、RMSF(Root Mean Square Fluctuation)値はタンパク質とリガンドの複合体において、局所的なタンパク質構造の揺らぎを表す指標である。各ドッキングモデルにおいて、 $\alpha$ -TocのA $\beta$ 複合体にてタンパク質の構造が最小限の揺らぎとなる結果となった<sup>11)</sup>。このように $\alpha$ -TocがA $\beta$ に安定的に結合することが予想されることは、A $\beta$ の凝集を防ぐ化合物としてアルツハイマー病予防への活用が期待され、他のビタミンE類縁体の研究についても進展が待たれる。

## 5. ビタミンEとインスリンの結合より期待される生理作用

インスリンはA鎖とB鎖の2つのペプチドから構成され、A鎖とB鎖間に存在するジスルフィド架橋により連結している。インスリンによるシグナル伝達は細胞表面のインスリン受容体と結合することから始まるが、受容体への結合においてインスリンのB鎖C末端のヒンジ領域が大きく開いた構造になることが重要であることが示されている<sup>12)</sup>。近年、Soleymaniらは、 $\alpha$ -TocとビタミンD<sub>3</sub>のインスリンとのドッキングモデル解析を実施し、それぞれが結合した際のインスリンの構造に対する影響を評価している<sup>13)</sup>。

まず、それぞれのドッキングモデルを作製したところ、 $\alpha$ -Tocの方がより多くのアミノ酸残基と相互作用し、結合エネルギーも $\alpha$ -Tocの方が低くなることが分かった<sup>13)</sup>。続いて、各ドッキングモデルの分子動態シミュレーション解析を実施している。その結果、インスリンB鎖のRMSD値において、 $\alpha$ -Tocとインスリンの複合体が、リガンドが無い状態やビタミンD<sub>3</sub>との複合体よりも高い数値を取り、インスリンの構造が $\alpha$ -Tocの結合によって変化することが考えられる結果となっている<sup>13)</sup>。さらに、B鎖C末端のヒンジ領域の角度の時間変動をシミュレーションすると、リガンドが無い状態で最大20°であったのが、 $\alpha$ -Tocの結合で65°まで変化し、インスリン受容体の結合に重要なアミノ酸残基が露出することが分かった<sup>13)</sup>。なお、ビタミンD<sub>3</sub>が結合した際にはヒンジ角度への影響がほとんど無いことも分かった。このように *in silico* による研究で、 $\alpha$ -Tocによるインスリンの活性化が示唆されたことは、ビタミンEの糖尿病に対する治療的アプローチへの活用につながるものと期待される。

## 6. TocとT3のアルブミンとの結合親和性の違いでもたらされる細胞内取り込み量の違い

最後に、我々が最近見いだした知見について紹介する<sup>5)6)</sup>。前述の通り、細胞試験において、T3の細胞内取り込み量がTocよりも多くなることが知られており、T3がTocよりも強い生理活性を示すことの要因と考えられている<sup>4)</sup>。実際に、このようなTocとT3の取り込み量の違いは様々な細胞種で確認されている<sup>14)-20)</sup>。例えば、Jurkat細胞では1.0  $\mu$ Mの $\alpha$ -Tocまたは $\alpha$ -T3と24時間インキュベートすると、 $\alpha$ -T3は $\alpha$ -Tocよりも6.5倍高い細胞内取り込みを示すことが報告されている<sup>15)</sup>。さらに、LNCaP細胞およびPC-3細胞では、50  $\mu$ Mの $\gamma$ -Tocまたは10  $\mu$ Mの $\gamma$ -T3と6時間インキュベートした際においても、 $\gamma$ -T3の細胞内取り込み量は $\gamma$ -Tocよりも高くなることが報告されている<sup>17)</sup>。しかしながら、このような取り込み量の違いを生じるメカニズムは不明な点が多く残されていた。

まず我々は、TocとT3の取り込み量の違いが様々な培地条件中でみられていることから<sup>14)-20)</sup>(表1)、一般的に細胞培養培地に添加される血清がTocとT3の細胞内取り込み量に与える影響を、ヒト単球性白血病細胞株を用いて調べることにした。具体的には、10%ウシ胎児血清(FBS)添加培地、あるいは血清除去培地を用いて、TocおよびT3の各類縁体の細胞内取り込み量を調べた。その結果、10%FBS添加培地を用いた場合、確かにT3の取り込み量はTocよりも多くなり、さらに、TocおよびT3の各類縁体の取り込み量が10%FBS添加培地と血清除去培地で異なることが分かった<sup>5)</sup>(図2)。したがって、TocとT3の細胞内取り込み量の違いには、血清中の何らかの成分の関与が示唆された。

そこで我々は、血清の主要なタンパク質であるアル

表1 過去の報告におけるTocとT3の細胞内取り込み

細胞種	由来	ビタミンEの細胞内取り込み	培地条件
HepG2 <sup>14)</sup>	ヒト肝癌	$\alpha$ -Toc < $\alpha$ -T3 $\gamma$ -Toc < $\gamma$ -T3	10% FBS 添加培地
HDF <sup>16)</sup>	ヒト皮膚繊維芽	$\alpha$ -Toc < 全 T3 類縁体	10% FBS 添加培地
A549 <sup>18)</sup>	ヒト肺癌	$\alpha$ -Toc < $\alpha$ -T3 $\gamma$ -Toc < $\gamma$ -T3	10% FBS 添加培地
PC-3, LNCaP <sup>17)</sup>	ヒト前立腺癌	$\gamma$ -Toc < $\gamma$ -T3	1% FBS 添加培地
Jurkat <sup>15)</sup>	ヒトT細胞性白血病	$\alpha$ -Toc < $\alpha$ -T3	セレン欠乏培地
Caco-2 <sup>19)</sup>	ヒト結腸腺癌	$\alpha$ -Toc < $\gamma$ -T3	無血清培地
NIH-3T3 <sup>20)</sup>	マウス胎児繊維芽	$\alpha$ -Toc < $\alpha$ -T3	無血清培地

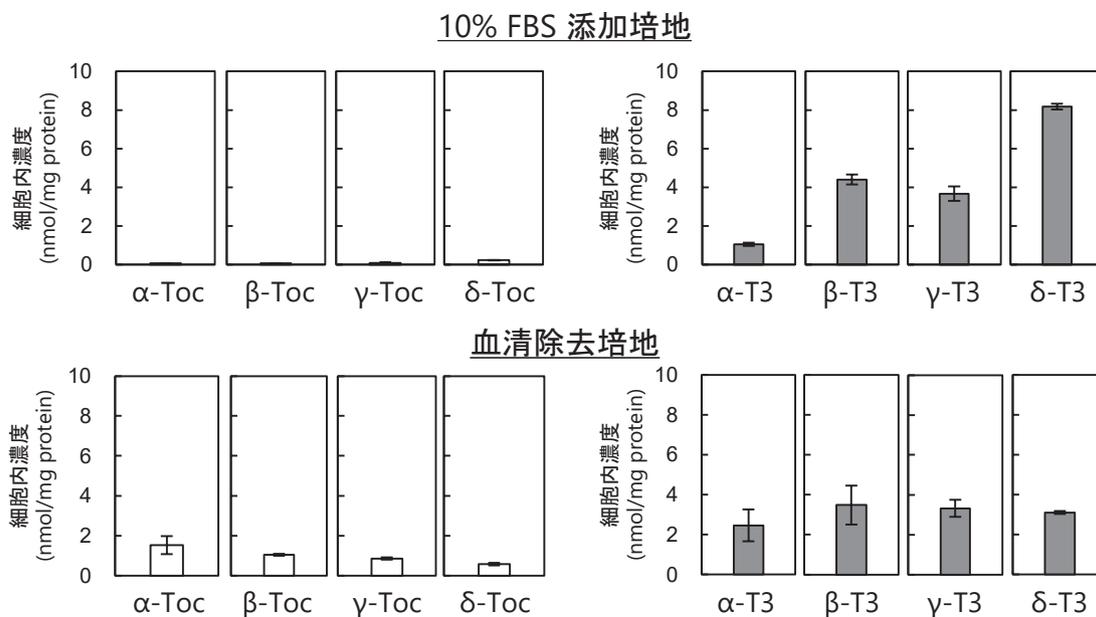


図2 血清が各 Toc・T3 類縁体の細胞内取り込み量に及ぼす影響

THP-1 単球細胞を血清除去培地中で、Toc および T3 の各類縁体 20.0  $\mu$ M と 2 時間培養し、Toc および T3 の細胞内濃度を LC-MS/MS により測定した。数値は 3 回の独立した実験の平均値  $\pm$  標準誤差として表した。

ブミンに着目した。アルブミンは様々な医薬品・食品成分の細胞内取り込みに関わることが知られており<sup>21)</sup>、近年、我々もクルクミノイド類の細胞内取り込み量の違いにアルブミンが関わることを見いだした<sup>22)</sup>。これらのことから、血清除去培地に種々の濃度のウシ血清アルブミン (BSA) を添加して Toc および T3 の細胞内取り込み量を調べた結果、血清除去培地への BSA の添加で T3 の細胞内取り込み量は顕著に増加し、これに対して Toc は減少することが分かった (図3)。特に、10% FBS 添加培地のアルブミン濃度に相当する 32.4  $\mu$ M の BSA を添加した場合に、T3 の顕著な取り込み量の増加がみられた<sup>5)</sup>。これらの結果より、Toc と T3 の細胞内取り込み量の違いには、培地成分の中でも血清の主要なタンパク質であるアルブミンが関与することが強く示唆された。

一般的に、アルブミンが関わる医薬品・食品成分の細胞内取り込みにおいては、医薬品・食品成分とアルブミンの親和性が細胞への取り込み量に関係することが知られている<sup>23)</sup>。そこで続いて我々は、Toc や T3 のアルブミンとの親和性について、蛍光クエンチング法とドッキングモデル解析により評価した<sup>5)</sup>。まず、蛍光クエンチング法において、リン酸緩衝液中の BSA に Toc および T3 の各類縁体を添加することで BSA の固有蛍光が減少し、得られた蛍光スペクトルから結合

パラメーターを求めて比較すると、T3 のアルブミンに対する親和性は Toc よりも高くなる結果となった<sup>5)</sup>。さらに、ドッキングモデル解析を行うと、Toc と T3 は BSA の幾つかのアミノ酸残基と相互作用し、T3 は Toc よりも高い安定性で BSA と結合することが示唆され (図4)、さらなるドッキングモデル解析を行うことで、このような BSA との親和性の違いは Toc と T3 の側鎖構造の違いによりもたらされることが分かった<sup>5)</sup>。これらのことから、T3 はアルブミンと Toc よりも高い親和性で結合し、このことが Toc と T3 の細胞内取り込みの違いを引き起こす要因の一つであると考えられた<sup>5)</sup>。このように培地中のアルブミンとの結合によって引き起こされる Toc と T3 の細胞内取り込み量の違いは、過去に様々な報告されてきた Toc と T3 の生理活性の違いにも関与することを予想しており、さらなる解明が待たれる。

## 7. おわりに

今回、ビタミン E の生理作用研究について、ER<sup>7)8)</sup>、67LR<sup>9)</sup>、A $\beta$ <sup>11)</sup>、インスリン<sup>13)</sup>、アルブミン<sup>5)6)</sup>との結合を介した報告について紹介させて頂いた。ビタミン E は血中では主にリポタンパク質中に含まれるが、今回紹介した報告のようにビタミン E が様々なタンパク質とどのように結合するかを詳細に調べることも、ピ

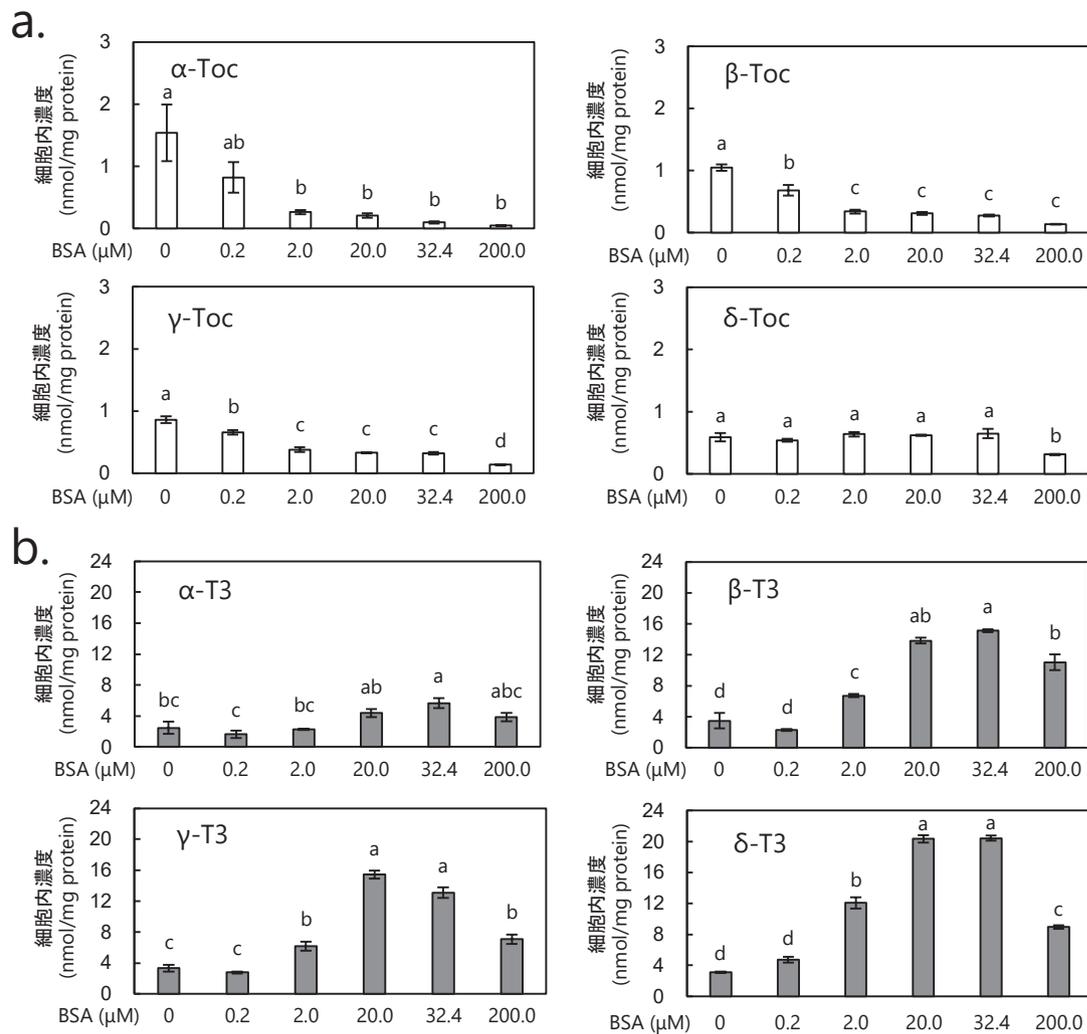


図3 BSAが各Toc・T3類縁体の細胞内取り込みに及ぼす影響

THP-1 単球細胞を、20.0 μM の (a.) Toc および (b.) T3 の各類縁体と 0, 0.2, 2.0, 20.0, 32.4, 200.0 μM の BSA を含む血清除去培地中で 2 時間培養し、Toc および T3 の細胞内濃度を LC-MS/MS により測定した。数値は 3 回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差として表した。異なるアルファベットは有意差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

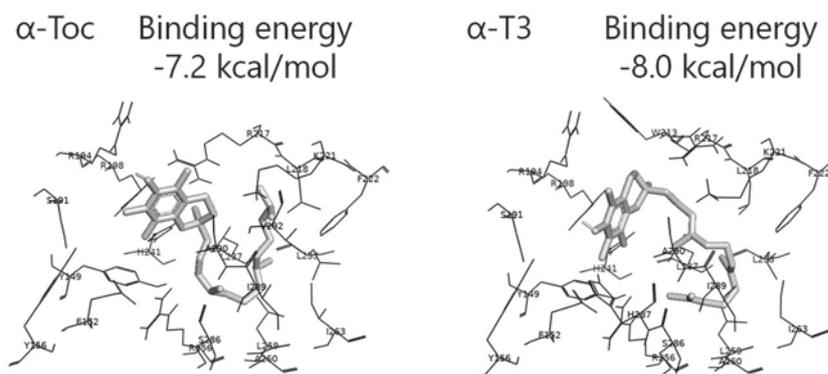


図4 α-Toc と α-T3 の BSA とのドッキングモデル

タミンEが生理作用を発揮する機序を解明する上で重要と考えられる。我々はTocとT3のアルブミンとの異なる親和性で結合することが、細胞内取り込み量の差異に関与することを報告したが<sup>5)6)</sup>、TocとT3の生理作用の違いについても様々なタンパク質との結合の違いが関与するものと予想される。今後、さらなるビタミンEの生理作用の研究において、ビタミンE類縁体ごとに生理作用に関与するタンパク質との結合の詳細を評価することが、ますます欠かせないポイントになるであろう。

## 謝 辞

本トピックスの作成にあたりご協力いただきました、東北大学大学院生命科学研究科 田中良和 教授、東北大学大学院農学研究科 永塚貴弘 准教授、高橋麻由子 博士に、深く御礼申し上げます。

**Key words:** vitamin E, tocopherol, tocotrienol, protein, binding

<sup>1</sup>Laboratory of Food Function Analysis, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 468-1 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8572, Japan

<sup>2</sup>Division of Medical Biochemistry, Department of Pathophysiological and Therapeutic Sciences, Tottori University Faculty of Medicine, 86 Nishi-cho, Yonago 683-8503, Japan

<sup>3</sup>Department of Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, Yasuda Women's University, 6-13-1 Yasuhigashi, Asaminami-ku, Hiroshima 731-0153, Japan.

Takashi Nakatomi<sup>1</sup>, Yosuke Horikoshi<sup>2</sup>, Tatsuya Matsura<sup>2,3</sup>, Kiyotaka Nakagawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東北大学 大学院農学研究科 食品機能分析学分野

<sup>2</sup> 鳥取大学 医学部 生化学分野

<sup>3</sup> 安田女子大学 家政学部

中富 毅<sup>1</sup>, 堀越 洋輔<sup>2</sup>, 松浦 達也<sup>2,3</sup>, 仲川 清隆<sup>1</sup>

利益相反の有無：該当なし

(2024.4.20 受付)

## 引用文献

1) Mutalib MSA, Khaza'ai H, Wahle KWJ (2003) Palm-tocotrienol rich fraction (TRF) is a more effective inhibitor of LDL oxidation

and endothelial cell lipid peroxidation than  $\alpha$ -tocopherol *in vitro*. *Food Research International* **36**, 405–413. doi:10.1016/S0963-9969(02)00173-4

2) Nesaretnam K, Guthrie N, Chambers AF, Carroll KK (1995) Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Lipids* **30**, 1139–1143

3) Theriault A, Wang Q, Gapor A, Adeli K (1999) Effects of  $\gamma$ -tocotrienol on ApoB synthesis, degradation, and secretion in HepG2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 704–712

4) Miyazawa T, Shibata A, Sookwong P, *et al.* (2009) Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol). *J Nutr Biochem* **20**, 79–86

5) Nakatomi T, Itaya-Takahashi M, Horikoshi Y, *et al.* (2023) The difference in the cellular uptake of tocopherol and tocotrienol is influenced by their affinities to albumin. *Sci Rep* **13**, 7392

6) 中富毅, 仲川清隆. ビタミンE類の細胞への取り込み量は大きく異なり, その機構を紐解く. 一般財団法人 食品分析開発センター SUNATEC メールマガジン, <http://www.mac.or.jp/mail/230901/01.shtml> (2023-09-01)

7) Nakaso K, Tajima N, Horikoshi Y, *et al.* (2014) The estrogen receptor  $\beta$ -PI3K/Akt pathway mediates the cytoprotective effects of tocotrienol in a cellular Parkinson's disease model. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1842**, 1303–1312

8) 堀越洋輔, 中富毅, 仲川清隆, 松浦達也, 酒井知恵子, 中曾一裕. (2023) トコトリエノールはエストロゲン受容体との相互作用を介して創傷治癒を促進する. *ビタミン* **97**, 213

9) Hayashi D, Mouchlis VD, Okamoto S, *et al.* (2022) Vitamin E functions by association with a novel binding site on the 67 kDa laminin receptor activating diacylglycerol kinase. *J Nutr Biochem* **110**, 109129

10) Hayashi D, Ueda S, Yamanoue M, Saito N, Ashida H, Shirai Y (2015) Epigallocatechin-3-gallate activates diacylglycerol kinase alpha via a 67 kDa laminin receptor: A possibility of galloylated catechins as functional food to prevent and/or improve diabetic renal dysfunctions. *J Funct Foods* **15**, 561–569

11) Aloufi B, Alshammari AM, Alshammari N, Alam MJ (2022) Molecular dynamics simulation analysis of the beta amyloid peptide with docked inhibitors. *Bioinformation* **18**, 622–629

12) Menting JG, Yang Y, Chan SJ, *et al.* (2014) Protective hinge in insulin opens to enable its receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E3395–E3404

13) Soleymani H, Ghorbani M, Allahverdi A, Shojaeilangari S, Naderi-manesh H (2019) Activation of human insulin by vitamin E: A molecular dynamics simulation study. *J Mol Graphics Modell* **91**, 194–203

14) Irias-Mata A, Sus N, Flory S, *et al.* (2018)  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein does not regulate the cellular uptake and intracellular distribution of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols and -tocotrienols in cultured liver cells. *Redox Biol* **19**, 28–36

15) Saito Y, Yoshida Y, Nishio K, Hayakawa M, Niki E. (2004) Characterization of cellular uptake and distribution of vitamin E.

- Ann NY Acad Sci* **1031**, 368–375
- 16) Jaafar F, Abdullah A, Makpol S. (2018) Cellular uptake and bioavailability of tocotrienol-rich fraction in SIRT1-inhibited human diploid fibroblasts. *Sci Rep* **8**, 10471
  - 17) Jiang Q, Rao X, Kim CY, *et al.* (2012) Gamma-tocotrienol induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells by increasing intracellular dihydrosphingosine and dihydroceramide. *Intl Journal of Cancer* **130**, 685–693
  - 18) Nishio K, Horie M, Akazawa Y, *et al.* (2013) Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. *Redox Biol* **1**, 97–103
  - 19) Tsuzuki W, Yunoki R, Yoshimura H. (2007) Intestinal epithelial cells absorb  $\gamma$ -tocotrienol faster than  $\alpha$ -tocopherol. *Lipids* **42**, 163–170
  - 20) Nakamura T, Noma A, Terao J. (2014) Location of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol to heterogeneous cell membranes and inhibition of production of peroxidized cholesterol in mouse fibroblasts. *SpringerPlus* **3**, 550
  - 21) Miyauchi S, Kim SJ, Lee W, Sugiyama Y. (2022) Consideration of albumin-mediated hepatic uptake for highly protein-bound anionic drugs: Bridging the gap of hepatic uptake clearance between *in vitro* and *in vivo*. *Pharmacol Ther* **229**, 107938
  - 22) Itaya M, Miyazawa T, Zingg JM, *et al.* (2019) The differential cellular uptake of curcuminoids *in vitro* depends dominantly on albumin interaction. *Phytomedicine* **59**, 152902
  - 23) Zhang D, Hop CECA, Patilea-Vrana G, *et al.* (2019) Drug concentration asymmetry in tissues and plasma for small molecule-related therapeutic modalities. *Drug Metab Dispos* **47**, 1122–1135