

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08989

研究課題名(和文)トランス脂肪酸が細胞膜の機能を変化させる仕組みの解明

研究課題名(英文)Methods development to examine the effects of trans fatty acids on cellular membrane functions related to lipoprotein metabolisms

研究代表者

袴田 秀樹 (Hakamata, Hideki)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70284750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トランス脂肪酸の過剰な摂取は、低比重リポタンパク質コレステロールを増加させ、同時に高比重リポタンパク質コレステロールを低下させると報告されている。これらの報告から、トランス脂肪酸は心臓病の危険因子と見なされている。しかし、どのようにしてトランス脂肪酸が低比重リポタンパク質コレステロールを増加させ、一方で高比重リポタンパク質コレステロールを低下させるのか、仕組みについては十分には解明されていない。本研究では、これらの仕組みの解明に寄与できる実験方法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は三つに大別できる。一つはハイコンテンツイメージングシステムという装置を利用して、低比重リポタンパク質の細胞への取り込みを観察する実験方法を開発したことである。二つ目は、細胞と細胞外のアポタンパク質A-1が相互作用して、幼若な高比重リポタンパク質ができる場所を観察する実験方法を構築したことである。三つ目は、質量分析法を利用して、トランス脂肪酸を含有する脂質を分析する方法を開発したことである。これらの実験方法は、トランス脂肪酸の作用を明らかにする研究の進展に寄与できると期待される。

研究成果の概要(英文)：An excess intake of trans fatty acids has been reported to lead to the increase of low density lipoprotein cholesterol and the decrease of high density lipoprotein cholesterol in the blood. Based on these reports, trans fatty acids is considered to be a risk factor for heart diseases. However, it is not fully understood how trans fatty acids increase low density lipoprotein cholesterol and decrease high density lipoprotein cholesterol. In this study, several methods have been developed that will contribute to solve mechanisms for the effects of trans fatty acids.

研究分野：分析化学

キーワード：トランス脂肪酸 低比重リポタンパク質 高比重リポタンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トランス脂肪酸は、炭素鎖の構造中に一つ以上のトランス型の炭素-炭素二重結合を有する脂肪酸の総称である。食品に含まれるトランス脂肪酸の生成経路は二つに大別され、天然由来のものと工業的に生成するものがある。天然由来のものは、牛や羊などの反芻動物の胃に生息する微生物が発現するシス-トランスイソメラーゼの作用によって合成され、乳製品等に含有される。一方、工業的には常温で液体の油に部分的に水素を付加して油脂(部分水素添加油脂)を製造する工程などで生成する。部分水素添加油脂は、マーガリンやショートニングの製造に利用されており、これらの油脂製品やこれらを用いて製造されたお菓子等にも含有される。

食品に含まれるトランス脂肪酸の摂取が心臓病の危険因子になるのでは、という指摘は50年以上前からあり、様々な研究が行われてきた。1980年代後半から1990年代初頭にかけて行われた臨床研究において、栄養管理されたトランス脂肪酸摂取群での低比重リポタンパク質(LDL)コレステロールの上昇と、高比重リポタンパク質(HDL)コレステロールの低下が示された。その後の複数の臨床研究もこの結果を支持したので、2000年代以降は、トランス脂肪酸は動脈硬化を促進して心臓病の危険因子となるという考え方が定着している。これを踏まえ、世界保健機関WHOや欧州連合EUは、食品中のトランス脂肪酸に関する規制を開始し、この数年は規制強化を進めている。

これらの背景のもとで、本研究を着想した時点で問題と考えられた点は、国際機関や各国政府が食品中のトランス脂肪酸を規制するのは、トランス脂肪酸がLDLコレステロールを上昇させ、HDLコレステロールを低下させるからであり、それ以上踏み込んだ機序の解明が進んでいないことであった。成書や総説などでは、トランス脂肪酸の生物活性に関してインスリン抵抗性の増悪、催炎症性、LDL代謝やHDL代謝への作用などについて、臨床研究をベースとする議論が展開され、それらが複合的に関与することによって動脈硬化を促進すると結論している。一方、LDL代謝やHDL代謝へのトランス脂肪酸の作用に関する細胞レベルや分子レベルの知見は乏しく、基礎医学研究の情報は不足していた。本研究では、細胞実験によってLDL代謝とHDL代謝を評価できるアッセイ系の構築に加え、トランス脂肪酸を側鎖に含有するリン脂質の定量法の開発を行い、これらの問題点に取り組むことにした。

2. 研究の目的

トランス脂肪酸がLDLコレステロールを増加させ、HDLコレステロールを減少させる機構に関する細胞レベル、分子レベルの知見を得るためには、トランス脂肪酸が細胞に取り込まれた後の細胞応答を評価する必要がある。本研究では、細胞応答の中でも細胞のLDL代謝とHDL代謝に与える影響と、細胞膜の脂質組成の変化に着目し、これらを観察するための方法論の開発に取り組んだ。

(1) 蛍光標識 LDL の細胞取り込み活性測定法の開発

細胞のLDL代謝、特にLDL受容体活性やLDLの細胞取り込み、細胞分解を観察する実験法として、放射標識したLDL(^{125}I -LDL)を用いる方法が一般的に行われてきた。近年は、蛍光官能基で標識したLDLを用いる方法も普及してきている。本研究は、蛍光標識LDLを利用する新たな細胞取り込み活性測定法を開発し、トランス脂肪酸の影響を観察することを目的とする。

(2) アポタンパク質 A-1 による cholesterol efflux (HDL 新生) 活性測定法の開発

アポタンパク質 A-1 と細胞膜 ABCA1 との相互作用による HDL 新生は、従来、細胞のコレステロールをトリチウムで放射標識し、アポタンパク質 A-1 と培養した後に培地中へ放出される放射活性を測定し、評価されてきた。本研究では、ノンラベルでコレステロールを超高感度に測定する蛍光酵素法による cholesterol efflux 活性の測定法を開発し、トランス脂肪酸の影響を観察することを目的とする。

(3) 液体クロマトグラフィー-質量分析法によるトランス脂肪酸含有リン脂質定量法の開発

トランス脂肪酸が細胞に取り込まれた後の代謝経路は複数あるが、その中で細胞膜組成と機能に影響を及ぼす可能性があるのは、細胞膜に豊富に存在するリン脂質の側鎖を構成した場合と考えられる。そこで本研究では、液体クロマトグラフィー-イオントラップ/飛行時間型質量分析法 LC-IT-TOF-MS による、トランス脂肪酸を側鎖に含有するホスファチジルコリンの定量法を開発し、トランス脂肪酸の影響を観察することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 蛍光標識 LDL の細胞取り込み活性測定法の開発

ヒト肝がん由来の細胞株である HepG2 細胞を培養し、蛍光標識 LDL と反応させ、その細胞取り込みを蛍光プレートリーダー又はハイコンテンツイメージングシステム Operetta CLS

High-Content Analysis System (PerkinElmer 社) によって観察する。蛍光標識 LDL の濃度依存性や時間依存性などの結果が得られた後、トランス脂肪酸による HePG2 細胞の前処置方法や条件の検討を行なう。

(2) アポタンパク質 A-1 による cholesterol efflux (HDL 新生) 活性測定法の開発

マウスマクロファージ系の細胞株である J774.1 細胞を、アセチル化修飾した LDL と保温して泡沫化した後、アポタンパク質 A-1 と反応させる。培養条件の検討後、培地中のコレステロール定量を行う。コレステロールの定量は、コレステロールオキシダーゼとペルオキシダーゼの酵素反応をカップリングして行う酵素蛍光法を利用する。

(3) 液体クロマトグラフィー-質量分析法によるトランス脂肪酸含有リン脂質定量法の開発

代表的なトランス脂肪酸として、エライジン酸 C18:1 (9-*trans*) に着目し、エライジン酸を側鎖に持つホスファチジルコリン並びに構造の類似したホスファチジルコリンとの分離定量法を LC-IT-TOF-MS によって開発する。また、細胞のリン脂質分子の構造は多様であるため、液体クロマトグラフィーに加え、超臨界流体クロマトグラフィーの基礎的な検討も行う。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識 LDL の細胞取り込み活性測定法の開発

研究計画では、蛍光標識 LDL として DiI-LDL と DiO-LDL の二つを利用し、これらを順番に細胞と保温して蛍光共鳴エネルギー移動を観測し、LDL 受容体活性の評価法を構築することとしていた。試行錯誤の結果、DiI-DiO 間の蛍光共鳴エネルギー移動の発光が弱く、細胞内外の蛍光標識 LDL を判別できなかったため、DiI-LDL と DiO-LDL の系で細胞と LDL の相互作用を観察するのは困難であった。

そこで、pH 感受性の官能基で修飾した LDL の利用を考案し、中性 (pH7.4 付近) の培地中では弱い蛍光しか発しないが、弱酸性 (pH5~6) では蛍光強度が増大する pHrodo Red LDL を選択した。96 穴プレートに播種した HepG2 を pHrodo Red LDL と保温後、Operetta CLS High-Content Analysis System を用いて蛍光スポットを計数したところ、図 1 に示すように pHrodo Red LDL の濃度に依存した蛍光の増加が観察され、その蛍光は過剰量の高濃度 LDL によって抑制された。蛍光スポットは、細胞内に取り込まれて弱酸性の環境 (エンドソーム、ライソソーム) にある pHrodo Red LDL に由来すると考えられた。以上から、ハイコンテンツイメージングシステムを用いる蛍光標識 LDL の細胞取り込み活性測定法を開発することができた。

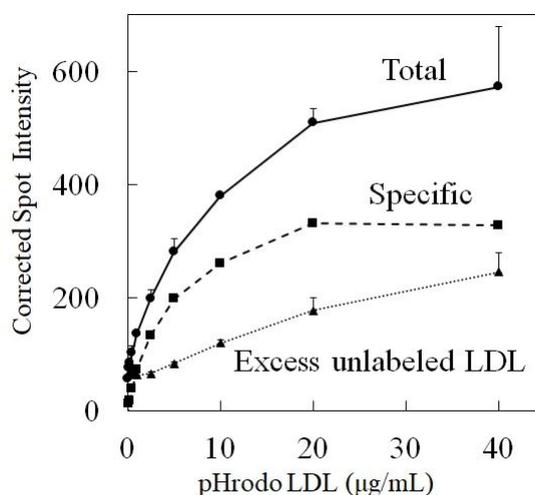


図 1 pHrodo Red LDL の HepG2 細胞による細胞取り込み

(2) アポタンパク質 A-1 による cholesterol efflux (HDL 新生) 活性測定法の開発

アポタンパク質 A-1 によって引き抜かれた培地中の微量のコレステロールを定量するためには、高感度なコレステロール定量が求められる。培地中のコレステロール定量に適用可能な種々の方法を比較したところ、感度と多検体への適用性の観点から、コレステロールオキシダーゼとペルオキシダーゼを利用し、生成したレゾルフィンの蛍光を測定する酵素蛍光法を選択することにした。ヒト血清から超遠心分離した LDL を無水酢酸でアセチル化し、これをマクロファージ系の細胞である J774.1 細胞と保温してマクロファージ様細胞由来の泡沫細胞に変化させた。泡沫細胞とアポタンパク質 A-1 を保温し、培地中のコレステロールを酵素蛍光法によって定量すると、アポタンパク質 A-1 の添加によって培地中のコレステロール濃度が増加し、アポタンパク質 A-1 による cholesterol efflux (HDL 新生) 活性を測定できたと考えられた。ただし、本細胞実験系は、アポタンパク質 A-1 非添加時に観察される蛍光のバックグラウンドが比較的高く、改良の余地は残っている。

(4) 液体クロマトグラフィー-質量分析法によるトランス脂肪酸含有リン脂質定量法の開発

研究計画では、LC-IT-TOF-MS によるトランス脂肪酸含有脂質の定量法を開発する予定であった。一方、予備的な検討で超高速液体クロマトグラフィー-四重極 / 飛行時間型質量分析法 UHPLC-Q-TOF-MS と LC-IT-TOF-MS を比較したところ、未知化合物の構造推定が求められるノンターゲットリピドミクスのような定性分析には LC-IT-TOF-MS が優れていたが、定性分析と定量分析を同時に行うことができるといった観点からは、UHPLC-Q-TOF-MS も有効と考えられた。今回開発する方法は細胞試料へ適用して、一部の既知のトランス脂肪酸含有リン脂質は

定量し、その他の脂質は必要に応じて定性分析する。この目的のためには、LC-IT-TOF-MS よりも UHPLC-Q-TOF-MS の方が適すると考えられた。そのため、UHPLC-Q-TOF-MS によるトランス脂肪酸含有リン脂質の定量法を開発することにした。測定対象物質として、代表的なトランス脂肪酸であるエライジン酸を側鎖に持つホスファチジルコリン (PC 18:1 9-*trans*)、エライジン酸と同じ位置の二重結合がシス型のオレイン酸を側鎖に持つホスファチジルコリン (PC 18:1 9-*cis*)、飽和脂肪酸であるステアリン酸を側鎖に持つホスファチジルコリン (PC 18:0)、オレイン酸とステアリン酸を側鎖とするホスファチジルコリン (PC 18:0/18:1)、内標準物質としてヘプタデカン酸を側鎖に持つホスファチジルコリン (PC 17:0) を選択した。条件検討の結果、分離カラムは ODS カラム、移動相はギ酸アンモニウムを含む水 / アセトニトリル混液 (1:1, v/v) と 2-プロパノール / アセトニトリル混液 (9:1, v/v) のグラジエント溶出、検出はプロトン付加分子の ESI-positive での選択イオンモニタリングとし、測定条件を最適化できた。その条件下で、PC 18:1 9-*trans*、PC 18:1 9-*cis*、PC 18:0、PC 18:0/18:1、PC 17:0 は 25 分以内に完全分離し、5 nmol/L から 5 μ mol/L の濃度範囲で、相関係数 0.993 以上の直線性を示した。繰り返し測定 (n=6) の併行精度は 2.76% 以下、室内再現性 (n=3) は 4.83% 以下であり、精度にも優れていた。以上の結果から、本法は適切な試料前処理法と組み合わせることによって、細胞試料へ適用可能と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto Kazuhiro, Machida Koichi, Kotani Akira, Hakamata Hideki	4. 巻 69
2. 論文標題 Emerging Separation Techniques in Supercritical Fluid Chromatography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 970～975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c21-00306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hakamata Hideki	4. 巻 69
2. 論文標題 Foreword	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 945～946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c21-ctf6910	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 法央, 袴田 秀樹
2. 発表標題 電気化学検出超臨界流体クロマトグラフィーによるパーム油及びマーガリン中のビタミンEの分離定量
3. 学会等名 令和元年度 日本分析化学会関東支部大会 若手交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 千尋, 山本 法央, 町田 晃一, 小谷 明, 袴田 秀樹
2. 発表標題 HepG2細胞を用いるin vitro NAFLD/NASHモデルにおける抗酸化ビタミンの効果
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 法央, 山本 千尋, 小池 祐貴, 町田 晃一, 小谷 明, 袴田 秀樹
2. 発表標題 NAFLD/NASHの治療薬開発のためのin vitro評価系の構築
3. 学会等名 第37回 メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 法央, 小池 祐貴, 山本 千尋, 町田 晃一, 小谷 明, 袴田 秀樹
2. 発表標題 HepG2細胞を用いたin vitro NAFLD/NASHモデルにおけるビタミン類の細胞内トリグリセリド減少効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福嶋 由樹, 山本 法央, 町田 晃一, 小谷 明, 袴田 秀樹
2. 発表標題 HPLC-MSによる脂肪酸の網羅的定量法の開発と細胞実験への応用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本分析化学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 260
3. 書名 改訂6版 分析化学データブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京薬科大学薬学部分析化学教室
<https://www.ps.toyaku.ac.jp/bunsekikagaku/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------