

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15975

研究課題名（和文）モノカルボン酸トランスポーターのリガンド認識機構を利用したDDS技術の開発

研究課題名（英文）Development of Drug Delivery Systems Based on the Cellular Transport Mechanism of Fatty Acids via Monocarboxylate Transporters

研究代表者

山本 法央（Yamamoto, Kazuhiro）

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20753784

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）：本研究では、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計（HPLC-MS）による遊離脂肪酸の一斉分析法を開発し、ヒトがん由来の細胞株の培養液中における脂肪酸含量の追跡を可能とした。短鎖、中鎖及び長鎖脂肪酸のうち、いくつかの脂肪酸は肺、肝臓や小腸に由来する細胞株において特徴的な吸収を示したことから、脂肪酸の輸送機構を標的とするドラッグデリバリー技術の開発に向けた基礎的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPLC-MS法による短鎖、中鎖及び長鎖脂肪酸の網羅的な定量法を開発した。本法は試料調製時に誘導体化プロセスを必要としないことから、誘導体化プロセスを必要とする一般的な分析法に比べて簡便な前処理方法で生体試料中に含まれる各脂肪酸含量を定量することが可能である。また、ヒト由来細胞株において異なる脂肪酸吸収プロファイルを示したことから、脂肪酸の輸送機構を標的とした薬物送達技術の開発につながるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, high-performance liquid chromatography with mass spectrometry (HPLC-MS) for simultaneous determination of short-, medium-, and long-chain fatty acids was developed and applied for the monitoring of free fatty acid concentrations in the culture media of human carcinoma cell lines. Since the specific absorption profiles were observed in A549, HepG2 and differentiated CaCo-2 cells, these findings lead to the development of drug delivery system targeting fatty acid transporters.

研究分野：分析化学

キーワード：HPLC-MS 遊離脂肪酸

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪酸は構成する炭素鎖の長さや二重結合の有無など、非常に多種多様な化合物である。生体内には短鎖、中鎖、長鎖脂肪酸をはじめとした多くの脂肪酸が存在し、その用途もエネルギー源だけでなく、細胞膜の構成成分やシグナル伝達物質としても利用されていることから生体の機能維持に必要不可欠である。

生体内に存在する脂肪酸の大部分は食餌に由来し、主に小腸で吸収されて体内に移行する。これまで脂肪酸の吸収は濃度勾配に依存した単純拡散であると考えられてきたが、近年では腸管上皮細胞に存在するいくつかのトランスポーターの関与が示唆されている。しかしながら、個々の脂肪酸の輸送に関しては未だ不明な点が多く残されており、その全容は解明されていない。脂肪酸の構造の多様性と生体内での多能性を考慮すると、各脂肪酸の吸収は細胞レベルで精緻にコントロールされているものと考えられる。そこで、本研究では生体内における脂肪酸の認識性に着目した薬物送達を企図した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内における脂肪酸の認識機構を明らかにし、これをドラッグデリバリー技術に応用することである。本研究課題では、薬物の吸収・分布・代謝・排泄に深く関与する臓器を対象として、各臓器に由来する細胞株における脂肪酸の取り込み性の違いについて評価した。

### 3. 研究の方法

#### (1) LC-MS システム

LC-MS システムは、システムコントローラーCBM-20A、送液ユニット LC-20AD、デガッサーDGU-20A3R、カラムオープン CTO-10A、オートサンプラーSIL-20A 及び質量分析計 LCMS-2020 (各ユニットはいずれも島津製作所) で構成した。LC-MS システムの制御並びにデータ解析は LabSolution LC/GC を使用した。

#### (2) 測定対象

プロピオン酸 (C3)、酪酸 (C4)、ヘキサン酸 (C6)、ヘプタン酸 (C7)、オクタン酸 (C8)、ノナン酸 (C9)、デカン酸 (C10)、ラウリン酸 (C12)、ミリスチン酸 (C14)、パルミチン酸 (C16)、パルミトレイン酸 (C16:1)、ステアリン酸 (C18)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2)、 $\alpha$ -リノレン酸 (C18:3, n-3)、 $\gamma$ -リノレン酸 (C18:3, n-6)、エイコサン酸 (C20)、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (C20:3)、アラキドン酸 (C20:4)、エイコサペンタエン酸 (C20:5)、アドレン酸 (C22:4)、ドコサペンタエン酸 (C22:5)、ドコサヘキサエン酸 (C22:6)、リグノセリン酸 (C24) 及びネルボン酸 (C24:1) の脱プロトン化分子を検出した。

#### (3) 細胞培養

ヒト肝臓がん由来細胞株 HepG2 及びヒト大腸がん由来細胞株 CaCo-2 は理化学研究所バイオリソースセンター 細胞材料開発室より入手した。同様に、ヒト肺がん由来細胞株 A549 及びヒト腎臓がん由来細胞株 Caki-1 は医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。各細胞は 10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む D-MEM (低グルコース) を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。

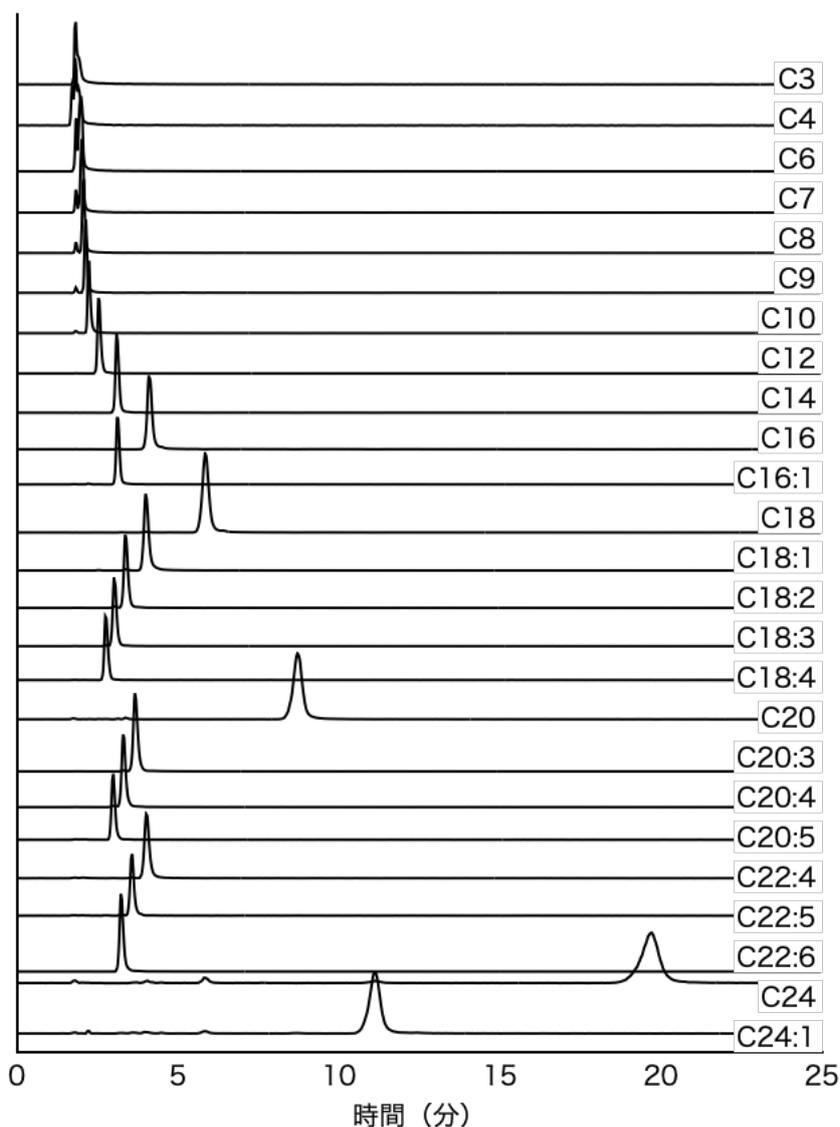
### 4. 研究成果

#### (1) LC-MS による脂肪酸定量法の開発

はじめに脂肪酸を分離するための HPLC 条件について検討した。移動相としてアセトニトリル/水またはメタノール/水を用いて溶媒組成比を変化させて脂肪酸の保持挙動を比較したところ、メタノール/水混液 (95:5) において短鎖脂肪酸～長鎖脂肪酸までを最も短時間で溶出できることが分かった。続いて、カラム固定相は逆相クロマトグラフィーで汎用される一般的なオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) に加えて、分子形状認識能に優れたコレステリル基結合型カラムを検討した。両者における脂肪酸の溶出順序はほとんど同一であり、 $\alpha$ -リノレン酸 (C18:3, n-3) 及び $\gamma$ -リノレン酸 (C18:3, n-6) の分離はいずれも達成できなかった。ただし、その他の脂肪酸の分離においてコレステリル基結合型カラムの方が優れた分離能を示したことから、コレステリル基結合型カラムを選定した。また、MS 部のイオン源はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) とし、ネガティブイオンモードで検出した。その他、ヒートブロック温度を 200~500°C の範囲で変更したが、ほとんど変化が認められなかったことから、ヒートブロック温度の影響は軽微であると判断して 350°C に設定することとした。一方、脂肪酸のイオン化を促進

する目的で酢酸、酢酸アンモニウム、ギ酸、ギ酸アンモニウムの4種類を移動相に添加したところ、いずれも短鎖脂肪酸の検出にはほとんど影響しなかったが、中鎖脂肪酸及び長鎖脂肪酸の検出においては、酢酸アンモニウムまたはギ酸アンモニウムを添加することによってシグナル強度が増加する傾向が認められた。

最適条件下における脂肪酸標準溶液のクロマトグラムは以下の通りであった。測定対象とした25種類の遊離脂肪酸のうち、 $\alpha$ -リノレン酸 (C18:3, n-3) 及び $\gamma$ -リノレン酸 (C18:3, n-6) の共溶出が認められたが、これらを除く23種類の遊離脂肪酸を25分以内に検出することができた。各脂肪酸のシグナル強度は最大1.5~300  $\mu\text{mol/L}$  の濃度範囲において相関係数0.986以上の良好な直線性を示した。また、クロマトグラムにおける各ピークのシグナル強度の併行精度は11.8%以下 (n=6) であった。本法の検出感度 (S/N=3) は脂肪酸によって異なるものの2.8  $\text{nmol/L}$



~2.8  $\mu\text{mol/L}$  の範囲内であり、 $\text{nmol/L}$ ~ $\mu\text{mol/L}$  レベルの遊離脂肪酸を検出することが可能であった。

図 1 脂肪酸のクロマトグラム

## (2) 培養液中の脂肪酸の前処理方法

培養液中に含まれる脂肪酸の抽出を目的として、ヘキサン、酢酸エチル及びクロロホルムなど一般的に用いられる有機溶媒を用いた液液抽出法による前処理法を試みた。培養液0.2 mLに有機溶液及び水1 mLずつを加えて混合し、25°C、700×gで5分間遠心分離した後、有機層を回収した。有機層は窒素下で溶媒を留去し、残渣にエタノール (99.5) 0.2 mLを加えて再溶解した。得られた溶液を孔径0.2  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターでろ過して試料溶液とした。LC-MS法により試料中の脂肪酸を定量したところ、各脂肪酸の抽出率はいずれも50%未満であり、ほとんど抽出されなかった。したがって、ヘキサン、酢酸エチル及びクロロホルムなどの有機溶媒を用いた液液抽出法は不適當であると考えられた。

続いて、除タンパク法による前処理を試みた。有機溶媒によるタンパク質の変性を目的として、培養液0.1 mLに対してアセトニトリル0.9 mLを添加して、30秒間攪拌した後、1分間超音波

照射した。続いて、25°C、1500×g で 10 分間遠心分離した後、上清を回収した。得られた上清を孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過して試料溶液とした。LC-MS 法により試料中の脂肪酸を定量したところ、各脂肪酸の抽出率は約 70%~120%であった。ただし、C24 については抽出率が約 40%程度であり、その他の脂肪酸に比べて大きく抽出率の低下が認められた。そこで、培養液の pH による抽出率への影響を検討するため、試料溶液の調製時に少量の塩酸を加えて酸性条件下とした後、先程と同じ手順で処理した。各脂肪酸の酸性条件下における抽出率は 80~120%の範囲内にあり、十分な実用性が確認された。特に中性条件下では低い抽出率であった C24 についてもおよそ 90%程度の抽出率に改善が認められた。したがって、培養液中の脂肪酸の抽出においては液液抽出法よりも除タンパク法が適しており、適用する際には少量の塩酸を加えて培養液の pH を酸性にすることが望ましいと考えられた。

### (3) ヒト由来細胞株における脂肪酸の取り込み性の評価

A549、HepG2、CaCo-2 及び Caki-1 をそれぞれ培養した後、各種脂肪酸を含む培養液に変更して 24 時間培養した。培養開始時点及び 24 時間経過時点における培養液中の脂肪酸含量を LC-MS 法により定量して比較した。A549 においては、飽和・不飽和を含めた脂肪酸の全体的な減少が認められ、特に C6、C7、C16、C18 や C18:1 などの脂肪酸の減少が顕著であった。また、HepG2 や CaCo-2 においても A549 と同様に各脂肪酸の全体的な減少が認められ、加えて C16 や C18 の著しい減少が認められた。一方、Caki-1 は先の 3 種類の細胞に比べて、ほとんど変化が認められなかった。いくつかの脂肪酸について、わずかな減少傾向が認められたものの、C16:1、C18:1 や C18:2 などの不飽和脂肪酸の含量が増加するなど、その他の細胞とは異なる傾向を示した。

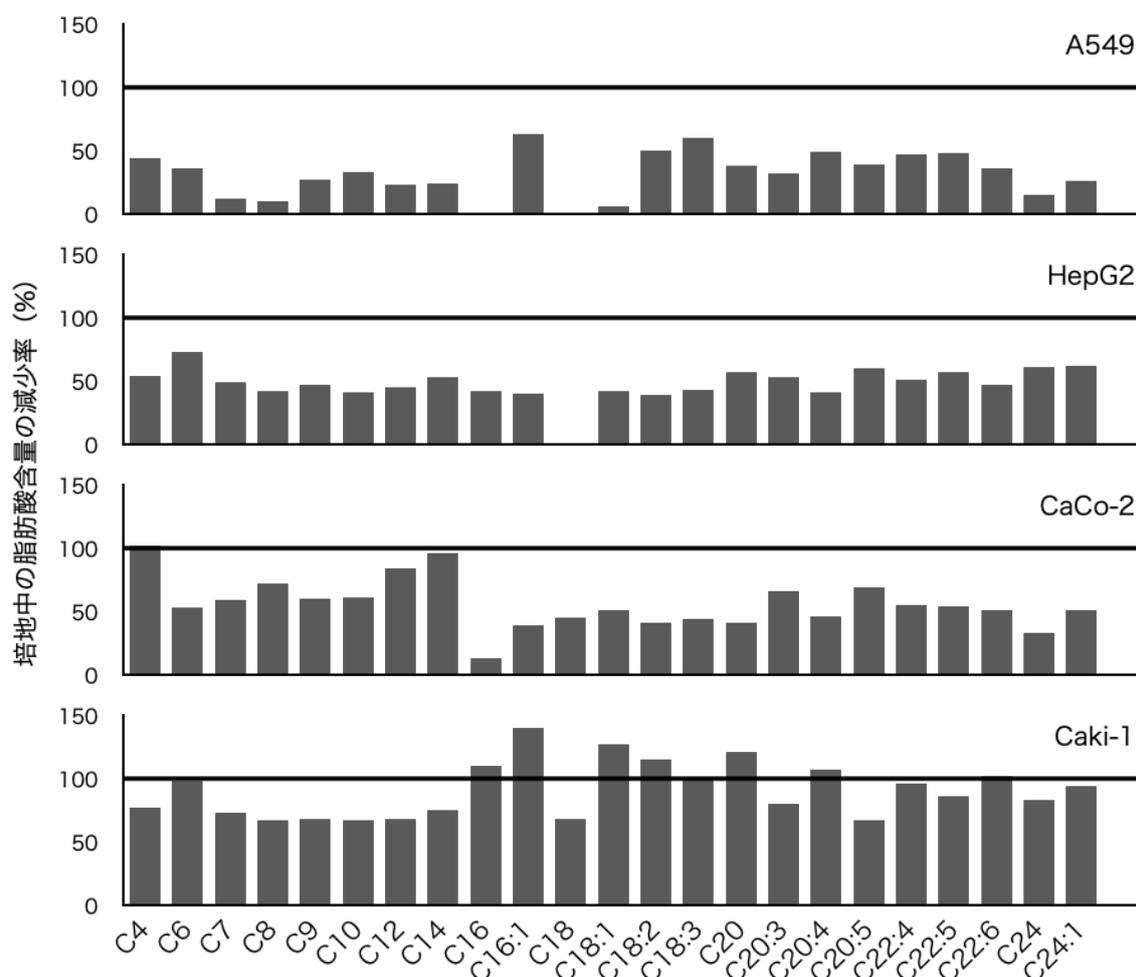


図 2 各細胞における培地中の脂肪酸含量の減少率

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuhiro Yamamoto, Koichi Machida, Akira Kotani, Hideki Hakamata	4. 巻 39
2. 論文標題 Gradient elution of hydroxyacetophenones by supercritical fluid chromatography with electrochemical detection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 761 ~ 765
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s44211-022-00248-7	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 Kazuhiro Yamamoto, Koichi Machida, Akira Kotani, Hideki Hakamata	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kazuhiro Yamamoto, Takuma Nishimura, Koichi Machida, Akira Kotani, Hideki Hakamata	4. 巻 45
2. 論文標題 Supercritical fluid chromatography with post column addition of supporting electrolyte solution for electrochemical determination of tocopherol and tocotrienol isomers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Separation Science	6. 最初と最後の頁 1797 ~ 1805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jssc.202100923	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福高由樹、山本法央、町田晃一、小谷明、袴田秀樹
2. 発表標題 HPLC-MS法による細胞培養液中の脂肪酸含量のモニタリング
3. 学会等名 第34回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福島由樹、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0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京薬科大学薬学部分析化学教室ホームページ  
<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