

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19736

研究課題名（和文）中性脂質に対する高感度ハイスループット定量法の開発と動脈硬化予防への臨床応用

研究課題名（英文）Development and application of high-throughput sensitive quantitative assays for neutral lipids to prevent atherosclerosis

研究代表者

森田 真也（Morita, Shin-ya）

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：20449870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：中性脂質であるアシルグリセロール（モノアシルグリセロール・ジアシルグリセロール・トリアシルグリセロール）やコレステロールは、生命活動の維持において重要な役割をしていることが明らかとなっている。血中におけるトリアシルグリセロールやコレステロールは、脂質異常症やメタボリックシンドロームの診断基準となっている。しかし、アシルグリセロールやコレステロールに対して特異性が明確な高感度ハイスループット定量法は存在しなかった。本研究課題では、中性脂質としてアシルグリセロールを区別する酵素蛍光定量法ならびにコレステロールに対する酵素蛍光定量法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で開発した酵素蛍光定量法は、従来の方法と比べて非常に高感度で、主な操作はピペットによる試料と反応液のマイクロプレートへの分注であり、定量に要する時間は短時間で、ハイスループット定量が可能である。本酵素蛍光定量法は、動脈硬化性疾患についての研究だけでなく、動物実験や植物・微生物実験を含む生化学研究分野や栄養科学分野、薬理・創薬科学分野など生命科学全般に応用されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Acylglycerols (monoacylglycerol, diacylglycerol and triacylglycerol) and cholesterol play important roles in biological activities. The plasma levels of triacylglycerol and cholesterol are diagnostic criteria for dyslipidemia and metabolic syndrome. However, there is no high-throughput assay for quantifying acylglycerols or cholesterol with high sensitivity and specificity. In this study, we developed the specific enzymatic fluorometric assays to specifically measure acylglycerols and cholesterol.

研究分野：脂質生化学

キーワード：中性脂質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

中性脂質であるアシルグリセロールは、グリセロールに脂肪酸がエステル結合したものである。その脂肪酸鎖の数によりモノアシルグリセロール・ジアシルグリセロール・トリアシルグリセロールと名付けられている。さらに、その脂肪酸鎖の炭素数および二重結合数の違いにより、それぞれの中性脂質の分子種は無数に存在する。中でもトリアシルグリセロールは、脂肪細胞内では脂肪滴として多量に存在し、血漿中ではカイロミクロンや超低密度リポタンパク（VLDL）、低密度リポタンパク（LDL）、高密度リポタンパク（HDL）などのリポタンパクの構成成分であり、エネルギー源として生命の維持に必要不可欠な役割を担っている。コレステロールは、ステロイド核にヒドロキシ基と炭化水素鎖が結合した構造をしているステロールの一種であり、脂肪酸が結合したコレステリルエステルとしても存在している。コレステロールは、細胞膜に存在し、膜流動性を調節している。また、コレステロールとスフィンゴミエリンは、ともに密集することで、膜流動性が低下した脂質ラフトと呼ばれるマイクロドメインを形成している。血中において、コレステロールは、主にコレステリルエステルとして低密度リポタンパク（LDL）や高密度リポタンパク（HDL）などのリポタンパクの主要成分となっている。アシルグリセロールやコレステロールは、それらの役割に加え、さまざまな膜タンパク質の活性や局在を調節し、細胞内シグナル伝達やホルモン産生などに関わることで生命活動の維持において重要な役割をしていることが、近年しだいに明らかとなってきた。そして、血液検査において、LDLやHDLに含まれるコレステロールやトリアシルグリセロールの値は、脂質異常症やメタボリックシンドロームの診断基準となっている。しかし、アシルグリセロールやコレステロールの血中濃度や細胞内濃度と各種疾患との定量的関係については、はっきりとしていない。その原因の一つに、アシルグリセロールやコレステロールに対して、特異性が明確になった高感度で多数の試料を一度に扱えるハイスループット定量法が存在しなかったことが挙げられる。

従来、中性脂質の種類ごとの同定と定量は、薄層クロマトグラフィー（TLC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）または質量分析により行われてきた。TLCは、操作工程が複雑で長時間を要し、感度が低いため、多量の試料が必要である。また、HPLCを用いた中性脂質の定量では、分子内の脂肪酸鎖二重結合の紫外吸収で検出するため、脂肪酸鎖の種類による影響を強く受け、定量性は乏しくなる。質量分析では、中性脂質に対して、脂肪酸鎖の種類を区別した分子種ごとに極めて高感度に検出する一方で、モノアシルグリセロール・ジアシルグリセロール・トリアシルグリセロールとしての定量や比較は困難である。例えば、トリアシルグリセロールに関して、3本の脂肪酸鎖の組み合わせにより100種類以上の分子種が存在し、質量分析ではそれぞれがイオン化効率の異なるピークとして検出されるため、ピークごとにスタンダード曲線が必要となる。このように、従来の方法では、生体試料中の中性脂質を定量解析するには十分でなかった。

2. 研究の目的

現在、臨床において行われているトリアシルグリセロール測定は、酵素法によりモノアシルグリセロール・ジアシルグリセロール・トリアシルグリセロールの合計量を求めるものである。このため、現在の検査結果でトリアシルグリセロールが高い患者の中には、トリアシルグリセロールが増加している患者以外に、ジアシルグリセロールやモノアシルグリセロールが増加している患者が混在していることが予想される。トリアシルグリセロールと分解産物であるジアシルグリセロールとモノアシルグリセロールでは、生理的役割が全く異なるため、これらを区別して定量し、疾患の発症に与える影響を評価するべきであると考えられる。

本研究課題では、中性脂質としてアシルグリセロールの種類（モノアシルグリセロール・ジアシルグリセロール・トリアシルグリセロール）を区別する酵素蛍光定量法の確立を目標とする。また、コレステロールに対しても高感度かつハイスループットな酵素蛍光定量法を確立し、その特異性を明確にする。酵素蛍光定量法は、従来の方法と比べて非常に高感度であり、主な操作はピペットによる試料と反応液のマイクロプレートへの分注で、非常に簡便であり、定量に要する時間は短時間で、ハイスループット定量が可能である。さらに、大型の特殊装置は必要でなく、キット化することで自動測定も可能となる。

3. 研究の方法

これまでに、我々は、各種リン脂質クラスに対して特異的な定量法の網羅的開発に着手し、主要リン脂質クラスの定量法を完成させている。酵素蛍光定量法とは、複数の酵素反応と化合物を組み合わせ、測定対象の分子から特異的な蛍光強度の増加を導くことにより定量を行う方法である。

それぞれのアシルグリセロール（モノアシルグリセロール・ジアシルグリセロール・トリアシルグリセロール）やコレステロールに対して特異的な酵素蛍光定量法の反応経路について考案し、

検討を進めた。まず、脂質の精製標準品を用いて、定量に利用可能な酵素を検討した。同じ反応を進める酵素でも、複数の生物由来のものを試し、その中から最適なものを選択した。そして、最適反応条件(温度・時間・濃度など)を決定し、感度・精度や特異性に関して精査を行った。

4. 研究成果

本研究では、新たな中性脂質定量法の開発に取り組み、試行錯誤を繰り返した結果、数十ピコモルオーダーの中性脂質を定量分析することが可能となった。本定量法は、非常に簡便であり、定量に要する時間は短時間で、ハイスループット定量が可能である。

モノアシルグリセロールに対する定量法について条件検討を繰り返した結果、モノアシルグリセロール濃度に対して高い直線性を有する検量線を得ることができた。そして、検出限界として10ピコモル程度までのモノアシルグリセロールを定量することが可能となった。この定量法は、測定対象のモノアシルグリセロールに対して特別な標識が必要でなく、様々な実験系で利用できる。そこで、本定量法を培養細胞実験に利用できるか、妥当性について検証を行った。HEK293細胞の抽出脂質サンプルに既知量のモノアシルグリセロールを加える添加回収試験において、添加したモノアシルグリセロールを100%近く定量することができた。また、細胞抽出脂質サンプルの希釈試験を行ったところ、希釈率に比例した非常に高い直線性が得られた。これらの結果より、培養細胞実験におけるモノアシルグリセロール酵素蛍光定量法の妥当性を確認できた。さらに、モノアシルグリセロール酵素蛍光定量法の特異性について、様々な脂質分子種を用いて詳細な確認を行った。

また、コレステロールに対する高感度ハイスループット酵素蛍光定量法を確立し、その特異性を詳細に評価した。コレステロール酵素蛍光定量法では、コレステロールに酵素を作用させて過酸化水素を発生させ、蛍光性化合物により検出する。このコレステロール酵素蛍光定量法の検出限界は、従来の酵素発色法と比べて数十倍高感度であった。このコレステロール定量法の特異性について検討したところ、コレステロール前駆体や種々オキシステロール・植物ステロールが、コレステロールと同等に検出された。一方、胆汁酸や一部のコレステロール前駆体やオキシステロールは検出されないことが明らかとなった。

次に、培養細胞からの抽出脂質に対するコレステロール酵素蛍光定量法の利用について、添加回収試験ならびに希釈試験により妥当性を確認した。また、本コレステロール酵素蛍光定量法を応用して、動脈硬化を誘発する脂質異常症の治療に用いられるスタチン系薬物やフィブラート系薬物の作用を、培養細胞(HepG2細胞)を用いて比較した。その結果、フィブラート系薬物による細胞内コレステロール量に対する影響は認められなかった。一方で、スタチン系薬物により細胞内のコレステロール量は低下したが、スタチン系薬物の種類によってその作用に強弱が見られた。

本研究課題で開発した酵素蛍光定量法は、動物実験や植物・微生物実験を含む生化学研究分野や栄養科学分野、薬理・創薬科学分野など生命科学全般に及ぶブレイクスルーをもたらすことが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 森田真也	4. 巻 21
2. 論文標題 新規酵素蛍光法による細胞内全主要リン脂質クラスの高感度ハイスルーブット定量分析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 オレオサイエンス	6. 最初と最後の頁 313-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/oleoscience.21.313	査読の有無 無
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 Tokuji Tsuji, Tatsushi Yuri, Tomohiro Terada, Shin-ya Morita	4. 巻 238
2. 論文標題 Application of enzymatic fluorometric assays to quantify phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin in human plasma lipoproteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Phys. Lipids	6. 最初と最後の頁 105102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemphyslip.2021.105102	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 Tokuji Tsuji, Shin-ya Morita, Yoshinobu Nakamura, Yoshito Ikeda, Taiho Kambe, Tomohiro Terada	4. 巻 11
2. 論文標題 Alterations in cellular and organellar phospholipid compositions of HepG2 cells during cell growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 2731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81733-3	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 森田真也	4. 巻 98
2. 論文標題 全主要リン脂質クラスに対する酵素蛍光定量法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 485-489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 森田真也	4. 巻 50
2. 論文標題 新規酵素蛍光法による全主要リン脂質クラスの定量	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 12-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Shin-ya Morita, Tokuji Tsuji, Tomohiro Terada	4. 巻 21
2. 論文標題 Protocols for enzymatic fluorometric assays to quantify phospholipid classes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21031032	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 Shin-ya Morita, Yoshito Ikeda, Tokuji Tsuji, Tomohiro Terada	4. 巻 67
2. 論文標題 Molecular mechanisms for protection of hepatocytes against bile salt cytotoxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 333-340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-01029	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 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 由利龍嗣, 森田真也, 寺田智祐
2. 発表標題 酵素定量法によるスタチン系およびフィブラート系薬物の細胞内コレステロールへの影響評価
3. 学会等名 膜シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 由利龍嗣, 森田真也
2. 発表標題 細胞の増殖・分化に伴うリン脂質クラス組成変化
3. 学会等名 第1回トランスポーター研究会関西西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田真也
2. 発表標題 全リン脂質クラス高感度ハイスループット定量法の開発
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 由利龍嗣, 森田真也
2. 発表標題 酵素法によるコレステロール定量の特徴評価
3. 学会等名 日本膜学会第43年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田真也
2. 発表標題 リン脂質クラス高感度ハイスループット定量法の開発と生命科学研究への応用
3. 学会等名 大阪府立大学第35回ケミカルバイオロジー研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田真也
2. 発表標題 新規全リン脂質クラス高感度定量法の基礎・臨床研究への応用
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻徳治，森田真也，中村吉伸，寺田智祐
2. 発表標題 酵素蛍光定量法を用いた細胞増殖に伴う細胞内リン脂質組成変化の定量分析
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田真也
2. 発表標題 リン脂質クラス高感度ハイスループット定量法の基礎・臨床研究への応用
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 由利龍嗣，森田真也，寺田智祐
2. 発表標題 コレステロール酵素定量法の特徴評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tokuji Tsuji, Shin-ya Morita, Yoshito Ikeda, Tomohiro Terada
2. 発表標題 Quantitative analysis of major phospholipid classes in cells and organelles by novel enzymatic fluometric methods
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin-ya Morita, Tokuji Tsuji, Yoshito Ikeda, Tomohiro Terada
2. 発表標題 Development of novel enzymatic fluorometric assay for quantifying phosphatidylinositol
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻徳治, 森田真也, 池田義人, 寺田智祐
2. 発表標題 酵素蛍光法を用いたオルガネラ膜における主要リン脂質クラスの定量分析
3. 学会等名 日本膜学会第41年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田真也
2. 発表標題 新規リン脂質酵素蛍光定量法を用いた胆汁酸によるABCB4活性調節メカニズムの解明
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田真也, 辻徳治, 池田義人, 寺田智祐
2. 発表標題 新規リン脂質酵素蛍光定量法を用いた細胞内ホスファチジルイノシトール合成関連酵素の機能解析
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田真也, 辻徳治, 中村吉伸, 寺田智祐
2. 発表標題 主要リン脂質クラス酵素蛍光定量法の開発と細胞実験への応用
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田真也, 辻徳治, 寺田智祐
2. 発表標題 新規ホスファチジルイノシトール酵素蛍光定量法の開発と応用
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田真也, 辻徳治, 中村吉伸, 寺田智祐
2. 発表標題 新規酵素蛍光定量法を用いた細胞内オルガネラのリン脂質代謝解析
3. 学会等名 膜シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田真也
2. 発表標題 新規全主要リン脂質クラス酵素蛍光定量法によるバイオマーカー探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin-ya Morita, Tokuji Tsuji, Yoshito Ikeda, Tomohiro Terada
2. 発表標題 Novel enzymatic fluorometric measurements of all major cellular phospholipid classes
3. 学会等名 59th International Conference on the Bioscience of Lipids（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田真也
2. 発表標題 主要リン脂質クラス一斉定量法の開発と応用
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田真也
2. 発表標題 主要リン脂質クラス一斉定量法の開発と基礎研究・臨床研究への応用
3. 学会等名 第73回国立循環器病研究センター(NCVC)研究者交流会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田真也
2. 発表標題 新規全リン脂質クラス酵素蛍光定量法の開発と生命科学・臨床研究への応用
3. 学会等名 第5回医療と介護の総合展メディカルジャパン大阪（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田真也
2. 発表標題 新規全主要リン脂質クラス酵素蛍光定量法の開発と臨床研究への応用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 森田真也（新井洋由，清水孝雄，横山信治/編）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 310
3. 書名 実験医学別冊 脂質解析ハンドブック 脂質分子の正しい理解と取扱い・データ取得の技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

滋賀医科大学 医学部附属病院 薬剤部 https://www.shiga-med.ac.jp/~hqpharm/

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
研究 分 担 者	池田 義人 (Ikeda Yoshito) (40736980)	滋賀医科大学・医学部・客員助教 (14202)	

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