

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591326

研究課題名(和文) 中鎖脂肪酸の細胞膜透過機構の解明

研究課題名(英文) Determination of cellular permeation of medium chain fatty acids

研究代表者

袴田 秀樹 (Hakamata, Hideki)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70284750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：中鎖脂肪酸は、特定保健用食品の認定を受けた「体に脂肪がつきにくい」食用油中の有効成分(実際はトリグリセライド分子の骨格の一部)として注目されている。本研究は、中鎖脂肪酸の細胞膜透過メカニズムを解明するための第一歩として、中鎖脂肪酸の新たな測定法(定量法)の開発、中鎖脂肪酸の測定精度の推定、並びに透過実験のための細胞培養系の評価を行ったものである。当初の目標であった中鎖脂肪酸トランスポーターの同定には至らなかったが、その目標に向けて幾つかの新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Medium chain fatty acids are known as an active component in functional food referred to as Food for Specified Health Uses approved by Consumer Affairs Agency, Government of Japan. As a first step to elucidate the mechanism for the cellular permeation of medium chain fatty acids, a method for the determination of medium chain fatty acids was developed, the measurement uncertainty was predicted, and a cell culture system for the permeation experiment was evaluated. Although a transporter(s) of medium chain fatty acids has not yet been identified, several findings connecting to the mechanism was obtained.

研究分野：生化学/分析化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：中鎖脂肪酸 CaCo-2細胞

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 中鎖脂肪酸は、炭素数が8~10個の脂肪酸の総称であり、特定保健用食品の「体に脂肪がつきにくい」食用油の中の有効成分や、栄養液中のエネルギー源として利用されている重要な物質である。しかしながら、生体内での利用に際して、どのように細胞内に取り込まれるか、あるいは、どのように細胞外へ放出されるかといった、細胞膜を介する物質移動(細胞膜透過機構)の詳細は解明されていない。
- (2) 代表的な中鎖脂肪酸測定法として、トリメチルシリル化などの揮発性誘導体化を施した中鎖脂肪酸を気相で分離して定量する、ガスクロマトグラフィーが知られている。種々の検出器を連結した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による測定法も報告されているが、検出のために通常は誘導体化が必要であり、試料前処理操作は簡便ではない。

## 2. 研究の目的

- (1) 中鎖脂肪酸の細胞膜透過機構を明らかにする。
- (2) 中鎖脂肪酸の誘導体化を必要としない、液体クロマトグラフィーによる迅速測定システムを開発する。

## 3. 研究の方法

- (1) 中鎖脂肪酸の細胞透過実験を行うための *in vitro* の実験系を構築する。細胞株としては、ヒト大腸がん由来する CaCo-2 細胞を用いる。CaCo-2 細胞は、単層培養すると小腸様の細胞へと分化を遂げることが知られており、ヒト小腸モデルとして頻用されている。分化の程度を評価した上で透過実験に供する必要があるため、まずは分化のための培養条件について検討する。
- (2) 中鎖脂肪酸の定量のために、電気化学検出 HPLC を用いる。キノ系化合物を非緩衝溶液中で電解還元するとき、酸が共存すると、キノ自身の還元波よりも正電位側に新たな還元波が出現する。この還元波を還元前置波と呼んでおり、その波高は酸濃度に比例するため、還元前置波の電流値を計測することによって酸の定量を行うことができる。この原理を利用した電気化学検出 HPLC を構築し、中鎖脂肪酸の迅速測定システムとして開発する。更に、そのシステムを用いて、中鎖脂肪酸の測定精度の推定を行う。

## 4. 研究成果

- (1) CaCo-2 細胞単層培養系はヒト小腸モデルとしてよく知られているが、分化の評価法は論文毎に異なっている。これは、中鎖脂肪酸の細胞透過実験のための *in vitro* の実験系を構築する上で、大きな問題であった。そこでまず、CaCo-2 細胞の分化の程度を評価することに着目し、次のような検討を行った。まず、CaCo-2 細胞の播種細胞数を変化させたり、細胞数に対する培地量を変化させたり、条件を変化させて Transwell (Corning 社製) 上にて培養し、その後のタイトジャンクションの形成と、小腸マーカーの mRNA 発現変化のモニタリングを行った。タイトジャンクションの形成は、Millcell-ERS (Millipore 社製) による経上皮電気抵抗値 (Trans epithelial Electroresistance; TEER) の測定によって評価した。その結果、TEER は経時的に増加して10日目以降に安定な値を示した。この結果から、培養開始後10日目以降はタイトジャンクションが形成されていると考えられた。小腸マーカーの mRNA 発現は、RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) によって検討した。目的 mRNA に対応する PCR 用プライマーの設計には、Primer3 (<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/prime3> [www.cgi](http://www.cgi), accessed on May 15, 2014) を利用した。RT-PCR の結果、代表的な小腸マーカー酵素である Intestinal alkaline phosphatase, N-amino peptidase, Sucrase-isomaltase の mRNA は、10~14 日目以降に高発現していることが示された。更に、CaCo-2 細胞の細胞溶解液中のこれらの酵素の活性を測定すると、Intestinal alkaline phosphatase と Sucrase-isomaltase の酵素活性の経時変化は、RT-PCR による mRNA 発現の結果とほぼ相関することが分かった。これらのことから、CaCo-2 細胞は Transwell での培養後約二週間で小腸上皮様に分化していると考えられた。中鎖脂肪酸が生体内で細胞に取り込まれる状況として、食餌由来の中鎖脂肪酸の腸管吸収と、門脈血中の中鎖脂肪酸の肝細胞への取り込みの過程が知られている。従って、*in vitro* の小腸モデルを用いて細胞膜透過実験を行うことには生物学的な意義があると考え、分化した CaCo-2 細胞単層培養系を用いて中鎖脂肪酸の透過実験を行うことに決定した。
- (2) 中鎖脂肪酸の迅速測定システムを開発するために、二つの検討を行った。まず、測定の手軽化のために、オートサンプラーの組み込みを行った。具体的には、現有装置を改良して、オートサンプラーを

組み込んだ二流路系電気化学検出 HPLC を組み立てた。オートサンプラーの稼働によるスパイクノイズの発生や、充電電流の不安定化によるベースラインノイズレベルの上昇を心配していたが、そのようなことは観察されなかった。中鎖脂肪酸標準溶液の測定では、マニュアルインジェクションと同等の検出感度が得られた。以上から、測定を簡便化することができた。次の検討として、FUMI (function of mutual information) 理論が本測定系に適用できるかを検討した。標準溶液を用いて幾つかの分析能パラメーターについて検討したところ、FUMI 理論が本システムに適用可能であることが分かった。そこで、標準溶液を用いて中鎖脂肪酸のクロマトグラムを日々測定し、ピーク高さ、内標準物質に対するピーク高さの比、FUMI 理論で算出した相対標準偏差(測定精度) 検出限界について、三週間程度モニタリングした。その結果、中鎖脂肪酸のピーク高さは経時的に低くなり、17 日間で約 30%にまで低下した。これは、おそらく電極の汚れのためと考えられた。また、ピーク高さの低下に伴って相対標準偏差と検出限界は3~5倍ほど増加するものの、内標準物質に対するピーク高さの比は一定であることが分かった。一旦電解セルを分解して電極を研磨すると、いずれのパラメーターも初期値に戻った。これらの結果から、適切な測定精度と感度を維持して測定するためには、電極研磨を二週間に一回は行うと良いことが分かった。

- (3) 中鎖脂肪酸の迅速測定システムによる実試料測定の精度推定を試みた。研究成果(2)に記したように、測定システムの開発並びにその維持管理法は確立できている。しかし、試料の前処理を含めた実試料測定の信頼性までは求めていないことから、本システムの実分析法としての有効性は明らかではない。そこで、前処理の個々の操作や、使用する器具の精度を実験的、或いは文献的に求め、どの操作段階が実試料の測定精度に最も寄与するかを明らかにしたいと考えた。現時点ですべての要素を解析しつくしたわけではないが、試料(今回は CaCo-2 の細胞培養用の培地)採取の際のピペット操作は、実試料の測定精度に大きく影響することが示唆された。
- (4) CaCo-2 細胞単層培養系に発現するトランスポーターについて、RT-PCR による mRNA 発現の確認を行った。中鎖脂肪酸トランスポーターの候補分子として、

MCT (monocarboxylate transporter) のサブタイプのうち、MCT5, 6, 7 は中鎖脂肪酸の細胞透過に関与することが示唆されている。予備的な検討において、これらの分子の mRNA が CaCo-2 細胞に発現していることを確認できた。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 6 件 )

Chen, X., Kotani, A., Hakamata, H., Du, S., Wang, J., Kusu, F. (2013) Determination of cryptotanshinone, tanshinone I, and tanshinone IIA in *Salvia miltiorrhiza* by micro HPLC with amperometric detection. *Anal. Lett.* **46**: 605-614. doi:10.1080/00032719.2012.730593  
査読有り

Chen, X., Kotani, A., Hakamata, H., Wang, J., Du, S., Kusu, F. (2012) Three-channel column-switching high-performance liquid chromatography with electrochemical detection for determining bioactive redox components in *Salvia miltiorrhiza*. *J. Chromatogr. A* **1256**: 105-113. doi: 10.1016/j.ab.2011.10.051  
査読有り

Ito, N., Ohtsubo, T., Kusu, F., Hakamata, H. (2012) An ultra performance liquid chromatographic method for determining phytosterol uptake by Caco-2 cells. *Anal. Biochem.* **421**: 86-91. doi: 10.1016/j.ab.2011.10.051  
査読有り

Kotani, A., Hakamata, H., Nakayama, N., Kusu, F. (2011) Picomole level determination of cholesterol by HPLC with electrochemical detection using boron-doped diamond electrode after performance assessment based on the FUMI theory. *Electroanalysis* **23**: 2709-2715. doi: 10.1002/elan.201100223  
査読有り

Hojo, K., Hakamata, H., Kusu, F. (2011) Simultaneous determination of serum lathosterol and cholesterol by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* **879**: 751-755. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.02.017  
査読有り

Hasegawa, M., Hakamata, H., Matsunaga, I., Kusu, F. (2011) Detection of oxysterols in

oxidatively modified low density lipoprotein by MALDI-TOF MS. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **113**: 423-429.

doi: 10.1002/ejlt.201000366

査読有り

〔学会発表〕(計 27 件)

陳 両綿、小谷 明、袴田秀樹、楠 文代、中医薬中抗酸化物質の一斉分析のための 3 流路系電気化学検出 HPLC の開発、電気化学会第 81 回大会、20130328、大阪

羽木順也、袴田秀樹、楠 文代、種々の酸化ステロールのピコリン酸エステル化、第 57 回日本薬学会関東支部大会、20131026、東京

庄司知代、袴田秀樹、楠 文代、ピコリン酸エステル誘導体化による血清コレステロール定量、第 57 回日本薬学会関東支部大会、20131026、東京

江口聡美、袴田秀樹、楠 文代、ステロール組成の異なるリポソーム型アムホテリシン B の動的光散乱測定、日本分析化学会第 62 回年会、20130910、大阪

H. Hakamata, Y. Tsukamoto, A. Kotani, F. Kusu, Monitoring of intestinal marker expression in CaCo-2 cell monolayers by RT-PCR. The Twelfth Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XII), 20130822, 福岡

羽木 順也、袴田 秀樹、楠 文代、酸化ステロールのピコリン酸エステル化反応条件の最適化、第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2014)、20130802、東京

L.M. Chen, A. Kotani, H. Hakamata, F. Kusu, HPLC with electrochemical detection for determining various redox compounds in Shuang-Huang-Lian preparations. 第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2014)、20130802、東京

袴田秀樹、塚本陽介、小谷 明、楠 文代、CaCo-2 細胞単層培養系における小腸マーカー発現の RT-PCR モニタリング、日本薬学会第 133 年会、20130327、横浜

小谷 明、大塚賢司、村山遥佳、袴田秀樹、楠 文代、UV-VIS 検出 HPLC を用いるリガーゼ検出反応生成物の分析法の開発、日本薬学会第 133 年会、20130327、横浜

菅原啓資、石井多門、袴田秀樹、楠 文代、カラム電極によるコレステロールの酸化、第 56 回日本薬学会関東支部大会、20121013、東京

江口聡美、袴田秀樹、楠 文代、リポソーム型アムホテリシン B の調製と紫外可視吸収スペクトル並びに動的光散乱測定、第 56 回日本薬学会関東支部大会、20121013、東京

池田菜々美、林 優子、袴田秀樹、楠 文代、電気化学検出 HPLC による胆汁酸関連物質の定量、第 56 回日本薬学会関東支部大会、20121013、東京

阿津澤 匠、大石 侑、袴田秀樹、楠 文代、電気化学検出 HPLC による培養液中のオクタン酸及びデカン酸の定量、第 56 回日本薬学会関東支部大会、20121013、東京

阿津澤 匠、大石 侑、袴田秀樹、楠 文代、細胞透過実験を志向した培養液中の中鎖脂肪酸の定量、日本分析化学会第 61 年会、20120919、石川

楠 文代、X. Chen、袴田秀樹、J. Wang、小谷 明、3 チャンネル電気化学検出 HPLC システムによる丹参由来酸化還元物質の一斉分析、日本分析化学会第 61 年会、20120919、石川

A. Kotani, X. Chen, H. Hakamata, J. Wang, S. Du, F. Kusu, High-sensitive determination of redox components in a Chinese medicine by liquid chromatography with electrochemical detection. The 63th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE 2012), 20120819, Prague, Czech Republic

袴田秀樹、伊藤奈々子、楠 文代、電気化学検出 HPLC 及び UPLC を用いる植物ステロールの腸管吸収機構の解析、第 25 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2012)、20120808、東京

大坪孝彰、袴田秀樹、楠 文代、CaCo-2 細胞単層培養系を用いたエルゴステロールの細胞取り込み実験法の開発、第 25 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2012)、20120808、東京

袴田秀樹、伊藤奈々子、大坪孝彰、小谷 明、楠 文代、UPLC による植物ステロール定量法の開発と CaCo-2 細胞を用いる取り込み実験への応用、日本薬学会第 132 年

会、20120328、札幌

袴田秀樹、小谷 明、楠 文代、コレステロールの電解酸化を利用する生体試料中のステロールの定量、第 57 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会、20111201、沖縄

21 小原 映、袴田秀樹、楠 文代、リコンビナント酸化ステロール結合タンパク質の精製法の最適化と活性評価、第 55 回日本薬学会関東支部大会、20111008、千葉

22 塚本陽介、大石 侑、袴田秀樹、楠 文代、細胞医実験を志向した中鎖脂肪酸定量法の開発、第 55 回日本薬学会関東支部大会、20111008、千葉

23 大坪孝彰、袴田秀樹、楠 文代、UPLC による血清エルゴステロール定量法の開発、第 55 回日本薬学会関東支部大会、20111008、千葉

24 Hideki Hakamata, Fumiyo Kusu, Electrode oxidation of cholesterol for sterol determination in biological samples. The 62nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 20110911, 新潟

25 大坪孝彰、袴田秀樹、楠 文代、高エルゴステロール食負荷ラットにおける血中エルゴステロールモニタリング、第 24 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2011) 20110831、鳥取

26 Fumiyo Kusu, Akira Kotani, Kiyoko Takamura, Hideki Hakamata, Electrochemical determination of weak acids based on the reduction of quinone. International Symposium on Electroanalytical Chemistry (Shikata Discussion 2011), 20110527, 兵庫

27 Hideki Hakamata, Fumiyo Kusu, Electrochemical determination of lipids and its application to medical and pharmaceutical research. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2012), 20110522, 京都

〔図書〕(計 1 件)

袴田秀樹、脂質、分析化学便覧、日本分析化学会、改訂 6 版、丸善出版株式会社、2011、386-389

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/bunsekikagaku/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

袴田 秀樹 (Hideki Hakamata)  
東京薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：70284750