

## 論文審査結果の要旨

学位申請者氏名：倉若 美咲樹

論文題目：外因性ピルビン酸による培養肝細胞の糖質・脂質代謝の調節に関する研究  
(Regulation of carbohydrate and lipid metabolism in cultured hepatocytes by exogenous pyruvate)

### 研究の背景と目的

ピルビン酸は解糖系の最終代謝産物であり、エネルギー栄養素代謝の岐路に立つ重要な中間体で、血液中には約 0.1 mM の濃度で存在する。近年は痩身を目的とするサプリメントやミトコンドリア病の症状改善薬への利用が研究されている。細胞培養においてピルビン酸は補助的エネルギー源・炭素骨格源として 1~2 mM の濃度で培養液に添加される場合が多い。しかし、細胞外に存在するピルビン酸がエネルギー栄養素の代謝に与える影響については生体全体ではもとより、培養細胞レベルにおいても不明な点が多い。マウス骨格筋由来 C2C12 筋管細胞やマウス由来 3T3-L1 前脂肪細胞で行われた研究でピルビン酸が細胞へのグルコース取り込みに影響することが報告されているが、両細胞で作用は全く異なっていた。さらに、これらの研究でのピルビン酸添加濃度はそれぞれ 50 mM および 25 mM で、血中濃度より極めて高く、細胞培養で通常使われる濃度と比較しても高い。また、エネルギー栄養素代謝の中核である肝細胞への影響はほとんど知られていない。そこで本論文では、肝臓代替モデルとして汎用されるヒト肝ガン由来細胞である HepG2 細胞株を用い、細胞外に添加したピルビン酸が細胞内へのグルコース取り込みに及ぼす影響とその用量反応性等について精査し、さらに細胞内取り込み後のグルコース利用に与える影響について明らかにすることを目的とした。

また、細胞レベルの実験で得られる試料量は動物実験で得られる試料量と比較して少なく、また測定が必要な代謝産物なども微量であることが多く、従来汎用されている比色法では検出不可であることが多い。様々な高感度測定キットも利用できるが、高価であるのみならず特殊な測定機器が必要となる場合も多く、多数のサンプル処理には必ずしも適してはいない。そこで本研究では上述の研究に先立ち細胞レベルの実験に適用可能な代謝産物の高感度測定系の検討・確立を行った。

本論文は第 1 章から第 4 章までで構成される。第 1 章は序論であり、研究の背景・意義等について過去の知見を紹介しながら、簡潔・的確にまとめてある。第 2 章では研究を遂行するために必須となる種々生体内物質（乳酸、ピルビン酸、グリコーゲンおよび ATP）の測定手法の検討・確立を記載している。第 3 章は本論文の中核となる部分でピルビン酸が HepG2 細胞のグルコース利用、ミトコンドリア機能等に与える影響を記載している。

第4章では総括として研究の結果・意義等が的確・簡潔に記載されている。ここでは第2章と第3章の内容の要約と評価を記載し、最後に論文全体の評価について述べる。

## 第2章

### (要約)

本章では乳酸とピルビン酸、グリコーゲンおよびATPの微量定量法について検討した結果が記載されている。(1) 乳酸とピルビン酸の測定原理は、まず乳酸、ピルビン酸をそれぞれ乳酸オキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼで酸化し過酸化水素を発生させる。次に蛍光原基質 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP)を電子供与体とし、発生した過酸化水素を電子受容体とするペルオキシダーゼ反応で、ADHPを酸化し、蛍光色素レソルフィンに変換し、蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定するというものである。詳細な検討で、最適測定条件を確立した。本法の定量範囲は乳酸で2~250 $\mu$ M (2~250 pmol)、またピルビン酸2~2000 $\mu$ M (2~2000 pmol)で、細胞培養液わずか1 $\mu$ Lの容量で測定可能であった。(2) グリコーゲン測定原理は、まず細胞ホモジネートをグルコアミラーゼ処理し、サンプル中のグリコーゲンをグルコースに分解する。ついでグルコースをグルコースオキシダーゼにより酸化し、グルコン酸と過酸化水素を生成させる。ついで(1)で述べたと同様な酵素処理で蛍光色素レソルフィンを生成させ、蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定する。詳細な検討で最適測定条件を確立した。本法の定量範囲は0.1~2 $\mu$ g/mL (0.019~0.38 $\mu$ g)と極めて鋭敏であった。また、本手法を用い細胞培養液へのグルコースの添加の有無でHepG2細胞のグリコーゲン量が大きく変化することを示し、手法の有効性・信頼性が示された。(3) ATPの微量測定法としてルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に伴う生物発光を利用した手法が広く用いられている。しかし、発光強度測定にはルミノメーターのような特殊な装置が必要で、大量サンプル処理も可能な化学発光を測定できるプレートリーダーは極めて高価である。そこで、ここではウエスタンブロットによる免疫化学的タンパク質定量等に汎用されるケミルミネッセンス撮影装置と画像解析ソフトを用いた測定法の検討を行った。本手法では露光時間の調節などで、広範囲の濃度のATP高精度測定が可能であることが示され、また様々な培養細胞に観察される濃度(0.15~30 nmol/mg protein)のATP測定が可能であった。さらに、本手法で測定されたATP量とHepG2細胞数が極めて良い相関を示すこと、また培養液中のグルコース濃度や気層の酸素のなどでのATP量変化の観察に本手法が有効であることが示された。

### (評価)

研究を迅速・効率的に推進していくためには、測定対象となる成分を鋭敏に検出できる信頼性に優れたまた簡便な測定手法の確立が不可欠である。特に、第3章に記載された研究は培養細胞を用いたもので、得られるサンプル量が極めて少なく、第2章で確立された測定手法は第3章の研究に大きく寄与した。ATPおよびグリコーゲン定量法については論文

としてまとめられて投稿され、前者についてはすでに発刊されている。ここに記載されたものは感度・簡便性に優れ、今後多くの研究室における測定手法として採用される可能性があり、高く評価できる研究内容と判断される。

### 第3章

#### (要約)

本章は本博士論文の主体であり、HepG2細胞に対するピルビン酸の作用について第2章で確立した微量定量法も活用し、検討した。ピルビン酸の濃度は細胞培養で汎用される1~2 mMを上限とした。ピルビン酸は細胞内へのグルコース取り込みを濃度依存的に促進し、生理的濃度である0.1 mMでも促進作用が確認された。グルコースの細胞内代謝との関連で、ピルビン酸添加で乳酸生成量は増加する傾向にあり、取り込まれた基質の乳酸変換率は減少した。細胞内グリコーゲン量は濃度依存的に減少し、反対に中性脂肪量は増加した。乳酸変換率低下は細胞内呼吸がミトコンドリアを利用する好氣的呼吸へシフトしていることを示す。また、中性脂肪合成の前駆体はミトコンドリアのクエン酸回路構成分子から供給される必要があることも考慮に入れると、ピルビン酸はHepG2細胞のミトコンドリア数または活性を増大させていること示唆している。

実際、ピルビン酸添加は細胞内ATP量、ミトコンドリアDNAコピー数、ミトコンドリア蛍光染色強度などミトコンドリア活性を示す指標を増加させた。この結果はピルビン酸がHepG2細胞におけるミトコンドリア生合成を増加させることを示唆している。グルコースから中性脂肪を合成するにはクエン酸回路中間体であるクエン酸を引き抜かなければならない。これはクエン酸回路中間体の補充反応（アナプレロシス反応）の増加を伴う必要がある。そこで、クエン酸回路中間体の動態に関与する酵素のmRNAおよびタンパク質発現について解析したところ、ピルビン酸添加により細胞質に存在するホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ1 (PEPCK1) のmRNA発現が有意に増加し、タンパク質発現も増加する傾向を示した。PEPCK1はアナプレロシス反応に関与する可能性が指摘されていることから、PEPCK1発現増加がピルビン酸によるグルコース取込み促進・中性脂肪の蓄積という代謝の流れの中で大きな役割を果たす可能性が示唆された。

#### (評価)

本章で述べられたように、本研究でピルビン酸が生理的濃度で培養肝細胞へのグルコース取り込みを促進することが初めて明らかにされた。ピルビン酸は解糖系によりグルコースから生産される物質であるので、いわゆる正のフィードバック制御機構と言える。さらに、取り込まれたグルコースの代謝運命と関連して、ピルビン酸はグリコーゲン量を減少させるが中性脂肪の蓄積を引き起こすことを明らかにした。これはピルビン酸により細胞内への取り込みが増加したグルコースがミトコンドリアのクエン酸回路でクエン酸に変換され、細胞質に輸送されて脂質合成の基質として使われていることを示すものである。こ

のことに関連して、ピルビン酸がミトコンドリア生合成を促していることが初めて示された。これにより、結果としてグルコース代謝が促進し、脂質合成の基質供給が増加したと結論されている。これと関連して、アナプレロシス反応に関与すると思われる酵素の発現変化なども見出された。ミトコンドリア生合成の変化は細胞の代謝を変化させ、生体全体の機能にも大きな影響を与えるものである。今までに、食品に含まれる因子としてある種のフラボノイド、n-3 脂肪酸などがミトコンドリア生合成を変化させることが見出されているが、生体内でグルコースから容易に作られるピルビン酸がこのような機能を持つことは極めて興味深い。以上のように本章ではピルビン酸の糖・脂質代謝に与える影響について多くの新しい知見を明らかにした。ピルビン酸はグルコースの代謝産物として体全体の細胞に普遍的に存在する物質であるので全身の糖・脂質代謝の調節に重要な役割を果たす可能性もありさらなる研究の発展を期待したい。

#### 全体の評価と結論

前述のように本論文ではピルビン酸の培養肝細胞に与える機能につき糖・脂質代謝の面から多くの新しい知見を明らかにした。ピルビン酸は糖代謝物として細胞には普遍的に存在するものであるが、ここで観察された結果はピルビン酸が代謝調節因子として重要な役割を果たすことを示唆するもので、重要な知見と言える。また、このような研究を行うに先立ち、細胞レベルでの実験に適用できる代謝産物等の微量定量法を確立した。確立された手法は簡便で普遍性に富むものであり多くの研究室での常法として採用される可能性があると思われる。

以上より、審査委員会は、研究課題としての学術的重要性、研究手法の妥当性、分析・考察の深さ・的確性、さらに、独創性について審査した結果、本論文は高く評価でき、博士論文としての要件を十分に満たすものと全員一致で判断した。