

# 論文要旨

十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科食物栄養学専攻

倉若 美咲樹

## 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

### 【背景・目的】

ピルビン酸 (Pyr) は解糖系の最終代謝産物、またエネルギー栄養素代謝の岐路に立つ重要な中間体で、血中 (約 0.1 mM) にも存在する。近年は痩身目的等の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。細胞培養では、Pyr は補助的エネルギー源・炭素骨格源として培養液に汎用される (1-2 mM)。しかし、細胞外 Pyr がエネルギー栄養素の代謝に与える影響には、生体丸ごととはもとより、神経・内分泌系等の調節系から独立した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 前脂肪細胞での先行研究でグルコース (Glu) 取り込みへの影響が報告されているが、作用の方向は相反する。さらに Pyr 添加濃度は 50 mM、25 mM であり、血中や細胞培養での濃度と比べて極めて高い。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ぼ不明である。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細胞ガン由来 HepG2 細胞株を用い、細胞外 Pyr の作用について、Glu の細胞内取り込みへの作用とその用量反応性等、Glu の細胞内取込み後の利用への作用、両者を連係する機能を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

まず細胞培養レベルでの各種代謝産物の高感度測定法を検討した。培養液中の乳酸や Pyr、細胞内グリコーゲン量の定量には、基質特異的オキシダーゼにより生成した過酸化水素をペルオキシダーゼ-蛍光原基質 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine で検出する酵素蛍光法を検討した。細胞内 ATP はルシフェリン-ルシフェラーゼを用いる化学発光法と画像解析により定量した。続いてこ

これらの測定系を用いて HepG2 細胞に対する Pyr の影響を調べた。Pyr を 0-2 mM の濃度になるよう培養液に添加し、24 時間培養した。その後培養液と細胞を回収し、各測定を行った。培養液を用いて Glu 取り込み量や乳酸生成量を測定した。回収した細胞はグリコーゲン・中性脂肪 (TG)・ATP・ミトコンドリア由来 DNA (mtDNA) コピー数・遺伝子発現・タンパク質発現の測定、また PAS 染色・Oil Red O 染色・ミトコンドリア染色による組織学的検査に供した。

### 【結果】

Pyr 添加 (1, 2 mM) は HepG2 細胞による Glu の取り込みを有意に促進し、1  $\mu$ M インスリンの作用を凌ぐようであった。Glu 取り込み促進作用は Pyr 濃度依存的で、0.1 mM で有意な作用を示し、0.5-2 mM でほぼ最大となった。リンゴ酸は Pyr と類似の Glu 取り込み促進作用を示した。細胞内に取り込まれた Glu と Pyr の代謝運命に関しては、Pyr は乳酸生成を促進したが、この作用は 0.5 mM で飽和に達した。Glu と Pyr からの乳酸変換率は Pyr 添加により濃度依存的に低下した。細胞内呼吸が専ら解糖系による嫌氣的呼吸からミトコンドリア関与の好氣的呼吸へと部分的にシフトした可能性、Glu や Pyr 等の基質が乳酸以外に変換された可能性が示唆された。細胞内グリコーゲン量への Pyr の影響は、PAS 染色では検知できなかったが、酵素蛍光法では濃度依存的にグリコーゲン量は減少した。TG 量は反対に増加し、Oil Red O 染色では Pyr 添加群で脂肪滴の増加・増大が認められた。肝細胞での TG 合成に必須なミトコンドリアに関しては、Pyr 添加による細胞内 ATP 量および mtDNA コピー数の増加が認められた。また、ミトコンドリアの蛍光染色では、Pyr は濃度依存的に染色を増強し、その作用は 0.1 mM でも確認された。mtDNA コピー数への作用と合わせ、Pyr はミトコンドリア生合成を刺激したと推定された。さらにこれらの結果を受け、解糖系生成物からの TCA 回路中間体への補充反応で重要とされるピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) の遺伝子発現とタンパク質発現を解析した。また、糖新生経路の律速酵素として広く知られているが、近年補充反応にも関与している事が指摘されているホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) の細胞質ゾル型 (PEPCK1) およびミトコンドリア型 (PEPCK2) についても同様に調べた。PC・PEPCK2 の遺伝子・タンパク質発現については整合性ある Pyr の有意な影響は見出せなかったが、PEPCK1 は増加傾向が認められた。

### 【考察】

本研究は、肝臓代替モデル HepG2 細胞において、Pyr が生理的濃度近くで 24 時間培養における Glu の取り込みを促進することを明らかにした。先行研究で

は、50 mM Pyr・72 時間の培養により、C2C12 筋管細胞内への Glu 取り込みは低下した。また、3T3-L1 前脂肪細胞では、25 mM Pyr・72 時間培養がインスリン・デキサメタゾン等の共存下で脂肪細胞への分化を促進し、Glu の取り込みが増加した。本研究の結果は、これら先行研究とは Pyr の用量、作用発現時間の点で大きく異なる新知見である。なお、これらの相異が細胞株由来組織の違いによるのかは検討を要する。本研究ではさらに、細胞外 Pyr により基質から乳酸・グリコーゲンへの代謝の流れが TG 合成へとシフトすることが明らかになった。この Glu の取り込み促進と TG 蓄積とを連係する機能として、ミトコンドリア生合成の刺激を示唆する結果を得た。一方、Glu・Pyr からの TG 生成には、TCA 回路から引き抜かれたクエン酸の補充すなわちアナプレロシスの促進が必須である。本研究では、解糖系中間体からのアナプレロシス反応に関わる PC や PEPCK について調べたが、PC や PEPCK2 の遺伝子・タンパク質発現に Pyr の有意な影響は認められなかった。一方、糖新生系の律速酵素として広く知られている PEPCK1 の発現を Pyr は促進した。ごく最近の報告では、PEPCK1 は糖新生とアナプレロシスに働く二面性を有することが明らかにされた。本研究の結果はこの最新知見と整合するようである。本研究では、Pyr は生理的濃度近くで諸作用を発揮した。よって、Pyr が生体内でも同様の作用を示す可能性も期待される。一方、得られた知見は HepG2 細胞に限定される可能性もある。HepG2 以外の肝細胞株の活用等も視野に入れて研究の発展を図りたい。ピルビン酸によるミトコンドリア生合成および PEPCK1 発現の促進機構の解明も重要課題である。

# Abstract

Department of Food and Nutritional Sciences,  
Graduate School of Human Life Sciences, Jumonji University graduate school

Misaki Kurawaka

## Regulation of carbohydrate and lipid metabolism by exogenous pyruvate in cultured hepatocytes

### 【Introduction】

Pyruvate (Pyr), the terminal product of glycolysis, is a key intermediate located at a crossroads of metabolic pathways of energy nutrients and is also present in the blood (approximately 0.1 mM). In recent years, many research studies have attempted to apply Pyr as supplements improving overweight etc. and as pharmaceuticals ameliorating mitochondrial disease symptoms. Pyr (1-2 mM) is often added to the culture medium in cell culture as an additional source of carbon and energy. However, the effects of extracellular Pyr on the energy nutrient metabolism are poorly understood, not only in the whole organism but also on the cultured cell level isolated from the regulatory system such as the nerve and endocrine systems. In previous studies at supraphysiological concentrations (25-50 mM), Pyr inhibited glucose (Glu) uptake in mouse skeletal muscle-derived C2C12 myotube cells but conversely enhanced uptake in mouse fibroblast-

derived 3T3-L1 preadipocytes. The response direction of the glucose metabolic system to extracellular pyruvate thus appeared to vary depending on the tissue type from which the cell line is derived. Although hepatocytes are the metabolic pivot of energy nutrients, the effects of extracellular Pyr on glucose uptake and its subsequent metabolic fate have not been reported for cultured hepatocytes so far. Based on this background, this study aimed to unravel the pyruvate issue in the human hepatoma-derived cell line HepG2, widely used as an alternative model for the liver.

#### **【Method】**

At the start of this research, the author introduced and assessed high sensitivity enzymatic fluorometries for the quantification of trace amounts of lactate, pyruvate and glycogen, required as indicators in cell experiments. These methods quantified the target substances by detecting fluorophores converted from fluorogenic 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine in the presence of peroxidase and hydrogen peroxide, the latter of which was produced by substrate specific-oxidases. Intracellular ATP was quantified by a chemiluminescence method using luciferin-luciferase and image analysis. Subsequently, the effects of Pyr on HepG2 cells were examined using these measurement systems. The cells were cultured in a medium containing 0-2 mM Pyr for 24 hours. The culture medium

and the cells were collected and Glu uptake, Pyr uptake, lactate production, intracellular glycogen, intracellular triglyceride (TG), intracellular ATP, mitochondrial DNA (mtDNA) copy number, gene and protein expression were measured. The cells were also microscopically examined after staining with PAS for glycogen, Oil Red O for TG, or a specific fluorescent dye for mitochondrial function.

### **【Results】**

Extracellular Pyr (1, 2 mM) significantly increased Glu uptake by HepG2 cells and appeared to surpass 1  $\mu$ M insulin, a positive control. The increase in glucose uptake with Pyr was dose dependent and detectable at 0.1 mM and almost saturated at 0.5-2 mM. Malate, like Pyr, increased Glu uptake. Focusing on the metabolic fate of Glu and Pyr incorporated into the cells, Pyr increased lactate production, and this effect reached a plateau at 0.5 mM Pyr. The lactate conversion ratio from Glu and Pyr decreased in a dose-dependent manner with extracellular Pyr. This Pyr-induced change suggested that Glu and Pyr were converted to metabolites other than lactate and that intracellular respiration partially shifted from anaerobic respiration by glycolysis to aerobic respiration driven by mitochondria. The Pyr effect on intracellular glycogen content was undetectable by PAS staining, but the enzymatic fluorometry showed that Pyr decreased intracellular glycogen

in a dose-dependent manner. Conversely, Pyr increased intracellular TG, and Oil Red O staining showed that pyruvate increased lipid droplets. With respect to mitochondria, essential for TG synthesis in hepatocytes, Pyr increased intracellular ATP and the mtDNA copy number. Mitochondria-specific fluorescent-dye staining showed that Pyr enhanced staining signals in a dose-dependent manner. These results suggested that Pyr probably stimulated mitochondrial biogenesis. Based on these findings, the author analyzed mRNA and the protein expression of pyruvate carboxylase (PC) and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK1), which have roles in anaplerosis to replenish TCA cycle intermediates from glycolytic products. For comparison, mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK2) was also subjected to analysis. Although Pyr showed no significant effect on the mRNA/protein expression of PC/PEPCK2, 1 mM Pyr increased mRNA expression of PEPCK1 significantly and ca.1.5 fold compared to control. In addition, 1 mM Pyr almost significantly ( $P=0.08$ ) increased the protein expression of PEPCK1 as analyzed by Western blotting.

### **【Discussion】**

This study made clear that Pyr of near physiological concentrations increased Glu uptake for 24-h culture in HepG2 cell line, a widely used alternative model for the liver.

In a previous report using C2C12 myotube cells, the addition of 50 mM Pyr decreased Glu uptake after 72-h culture. In 3T3-L1 preadipocytes, 25 mM pyruvate promoted differentiation into adipocytes for 72 h culture with an induction mixture containing insulin and others. In the adipocyte thus differentiated, Pyr increased glucose uptake only with coexistence of insulin. The Pyr effects elucidated in this study significantly differ from those of the previous studies in terms of dose, time of onset of the effect, and independence from other factors such as insulin. It will be a future research topic whether these considerable differences reflect the specificities of the tissues that derived from the cell line. The further finding in this study was that extracellular Pyr shifted the metabolic fate of the substrates from lactate and glycogen synthesis to TG synthesis. The Pyr-stimulated TG accumulation triggered interest in investigating mitochondria, the supply site of the TG synthesis material citrate. As expected, Pyr appeared to stimulate mitochondrial biogenesis, as indicated by the ATP level, mtDNA copy number, and mitochondria-specific fluorescent staining. Besides the mitochondrial citrate supply, TG synthesis from glycolytic products highly depends on anaplerosis to replenish TCA cycle intermediates. In this study, Pyr did not affect gene expression of PC/PEPCK2. On the other hand, Pyr promoted the expression of PEPCK1, which is widely known as a key enzyme in gluconeogenesis. Very recently, however, PEPCK1 was revealed to have



duality and to play roles in both gluconeogenesis and anaplerosis. The present results appear consistent with this latest finding. Pyr-stimulated anaplerosis and mitochondrial biogenesis may cause the metabolic flow of glycolytic products to sink into TG synthesis. In this study, Pyr exerted various effects near physiological concentrations. Therefore, it is expected that Pyr may exhibit similar effects *in vivo*. On the other hand, the findings obtained may be limited to HepG2 cells. The author would like to further develop this research by taking into account the use of other types of hepatocellular lines. It is also a major challenge to elucidate the mechanism by which pyruvate promotes mitochondrial biogenesis and the expression of PEPCK1.