

(様式 3-1)

## 平成 29 年度 プロジェクト研究費研究実績報告書

平成 30 年 5 月 10 日

代表者 志村 二三夫

研究課題名	肝細胞株におけるインスリンを凌ぐピルビン酸の糖・脂質代謝促進作用とその機構
研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日
共同研究者	倉若美咲樹 (研究協力者: 大学院人間生活学研究科食物栄養学専攻 D2)
1. 今年度の研究概要	
<p>本研究は、エネルギー・物質代謝の中枢をなす肝細胞を標的とし、耐糖能改善を志向する機能性食品素材の探索とその機構解明をめざすものである。今年度は、ピルビン酸(Pyr)がインスリンを凌ぐ強さでヒト肝がん由来細胞株 HepG2 によるグルコースの細胞内取込みを促進するという申請者らの新知見を掘り下げた。Pyr はエネルギー栄養素代謝の重要な中間体として古くから知られ、近年は機能性食品としての利用が研究されている。しかし、Pyr の細胞外作用の実体やその機構はほとんど解明されていない。</p> <p>研究代表者らは、機能性食品等が生活習慣病対策に資するとの観点から、政策決定に寄与できるレギュラトリーサイエンス研究として、同食品の素材の有効性・安全性評価に取り組んでいる。公表論文[カバ, Food Chem Toxicol 46 (2008)被引用件数 18:イチョウ葉, J Pharmacol Sci 109 (2009) 被引用件数 18:コレウス・フォルスコリ, Food Chem Toxicol 50 (2011) 被引用件数 11:その他]の被引用件数によれば研究実績の評価は高い。本研究は、これらを踏まえ、体内代謝の中枢また生体異物主要処理器官である肝臓について細胞レベルで掘り下げる過程で得た上記知見を発展させるものである。肝細胞を標的とし耐糖能改善を志向する機能性食品素材等の探索・開発の基礎となり、ピルビン酸はもとより、類縁作用を有する物質の応用への道を拓き、産学官連携の方向性をもつ研究に当たる。</p> <p>マウス骨格筋由来 C2C12 細胞では、超生理的濃度のピルビン酸がグルコースの細胞内取込みを抑制するという報告(Philp ら:Am J Physiol Cell Physiol 299 (2010))がある。一方、生理的濃度のピルビン酸の培養肝細胞によるグルコース取込みへの影響はこれまでに明らかとなっていない。よって、本研究は、学術的な意義も高い。</p>	
2. 研究の成果	
<p><u>Pyr の HepG2 における糖・脂質に対する作用</u></p> <p>培地に添加した Pyr は、HepG2 による細胞内グルコース取込みを概ね生理的濃度(0.1mM~2mM)で有意に亢進させるという知見を既に得ている。また、最大作用の比較では、Pyr はインスリンを凌ぐ強さを示している。今年度は複数回の追試によりこの結果の再現性を確認した上で、さらに発展させた。</p> <p>①Pyr は培地への添加後 8~12 時間後にグルコースの細胞内取込みを増加させた。すなわち、HepG2 の Pyr への応答はそれ以前に開始していることが明らかとなった。Pyr の作用機序を探る上で必要な時系列的解析の手がかりが得られた。</p> <p>②Pyr の細胞内グルコース取込み促進作用は Pyr に特異的であると推定された。すなわち、Pyr 関連物質である乳酸、酢酸、酪酸等の有機酸はグルコース取込み促進作用を示さなかった。</p> <p>③PAS 法による細胞染色ではグリコーゲン蓄積量への Pyr の明瞭な影響は認められなかった。この点については、高感度微量定量法による検討を要すると考えられた。</p> <p>④OilRedO 染色法による検討で Pyr は細胞内脂肪蓄積を亢進させるように見受けられた。しかし、本法は感度や再現性の等の点で問題があり、高感度微量定量法の確立が求められる。</p> <p>⑤Pyr は基質(グルコース+Pyr)の乳酸への変換率の低下(好氣的代謝の寄与の亢進)をもたらした(予備的知見)。</p> <p>⑥Pyr はミトコンドリア遺伝子の一つミトコンドリア遺伝子の一つ(NADH dehydrogenase subunit 1)のコピー</p>	

数を増加させた。複数遺伝子のコピー数への作用、またミトコンドリア特異染色法による必要であると考えられた。

⑦Pyr の作用の検証に求められる ATP 量の測定に関し、化学発光イメージング解析を応用する手法を確立した。

結論: Pyr は HePG2 によるグルコース取込みの促進という入口に対し、出口に当たる細胞内グリコーゲン・中性脂肪・ATP 量、ミトコンドリア機能、細胞外乳酸量等の諸相の変化をもたらす可能性が示された。これらの成績を批判に耐える堅牢なエビデンスとするためにさらなる追試等がもとめられる。また、Pyr はミトコンドリアの機能を賦活化する結果、上流のグルコース取り込みを促進する可能性がある。今後はこのことを仮説として、Pyr の作用機序解明に向けて、さらに検証を進める必要があると考える。本研究成果は、Pyr 自体あるいは作用上の類縁物質の機能性食品素材の有効性および安全性評価に活用できることから、生活習慣病対策への応用の道が拓かれる可能性があり、産官学連携の方向性も期待される。

### 3. 研究成果の公表実績・予定（年月日、方法）

1) 倉若美咲樹, 舘花春佳, 志村二三夫, 山崎優子: 細胞内 ATP 測定への化学発光イメージング解析の応用. 十文字学園女子大学 紀要 48-2. 印刷中(2018) 査読有

2) ブイ ティ ゴク ハー, 端田寛子, 倉若美咲樹, 舘花春佳, 有田安那, 佐々木菜穂, 志村二三夫, 山崎優子: 食品添加物の安全性評価の手法に準じたアマチャヅル製品の安全性の検討. 十文字学園女子大学 紀要 48-2. 印刷中(2018) 査読有

3) 倉若美咲樹, 舘花春佳, 佐々木菜穂, 志村二三夫: 培養肝細胞株 HepG2 によるグルコースの取り込み: インスリンを凌ぐピルビン酸の促進効果. 第 71 回日本栄養・食糧学会大会(沖縄)平成 29 年 5 月 21 日

4) 倉若美咲樹, 舘花春佳, 但木三恵, 名地佑紀美, 佐々木菜穂, 山崎優子, 志村二三夫: 外因性ピルビン酸が培養肝細胞のエネルギー栄養素の代謝に与える影響. 第 64 回日本栄養改善学会学術総会(徳島)平成 29 年 9 月 14 日

5) 英文学術論文執筆中: インパクトファクター 2 以上が明示されているジャーナル(平成 31 年 3 月)

6) 十文字学園女子大学 紀要 49-1(平成 31 年 3 月)