

培養肝細胞におけるグルコースの取り込みに対するピルビン酸の促進効果と  
その機構に関する研究

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

14MA003 倉若 美咲樹

要旨

【背景】ピルビン酸は解糖系の代謝産物であると同時にエネルギー栄養素の代謝経路にかかわる重要な中間体である。近年ではミトコンドリア病などの症状改善薬としての研究も進められている。米国ではダイエタリーサプリメントとしても流通しており、日本でもインターネット通販を通して容易に購入することができる。細胞培養にもエネルギー源の補助としてピルビン酸を添加する例もあるが、明確な根拠はない。さらに、ピルビン酸を添加する際の濃度も研究グループによって異なる。そこで本研究ではピルビン酸が細胞内へのグルコースの取り込みや、その後の代謝経路に与える影響について、培養肝細胞を用いて検討した。

【方法】ピルビン酸ナトリウム (Pyr) 存在下 (0~5 mM) でヒト肝癌由来細胞 HepG2 を培養 (~24 時間) した。細胞内へのグルコース取り込み量は、培養前の培養液中のグルコース濃度 (11 mM) から培養後の濃度を差し引いて算出した。培養液中のグルコース濃度は、グルコースオキシダーゼ・ムタロターゼ法で測定した。また、中性脂肪の細胞内蓄積を Oil Red O 染色、ミトコンドリア由来遺伝子のコピー数を Real-time PCR 法、糖代謝関連酵素・輸送体の mRNA 発現を Real-time RT-PCR 法により検討した。

【結果】Pyr 添加後 4 時間では細胞内へのグルコース取り込みを軽度に抑制する傾向にあったが、24 時間では Pyr による取り込みが濃度依存的に有意な促進が認められた。Pyr によるグルコース取り込み促進作用は細胞レベルでの検討であるが、生体内でもあり得る濃度 (0.05 mM) からこの作用を確認することができた。さらに、Pyr 添加後 24 時間で脂肪の蓄積とミトコンドリア由来 DNA 数を有意に増加させた。取り込まれたグルコースを脂肪にするには、一度ミトコンドリアに入り、TCA 回路の一部を利用しなければならない事を踏まえると、ピルビン酸はミトコンドリアの数または活性を増大させている可能性が考えられる。また、24 時間培養において、Pyr はいくつかの糖代謝関連酵素・輸送体の mRNA 発現を誘導した。

【結論】Pyr は培養肝細胞の糖代謝経路やミトコンドリアを活性化させることにより、細胞内へのグルコースの取り込みを促進させた可能性が示唆された。

**The effect of pyruvate on glucose uptake  
and its mechanism in cultured hepatocytes**

Graduate School of Human Life Sciences,

Department of Food and Nutritional Sciences, Jumonji University

Misaki Kurawaka

Abstract

**【Introduction】** Pyruvate is a metabolite of the glycolysis and also a key intermediate involved in the metabolic pathway of energy nutrients. In recent years, several studies have suggested that pyruvate is effective on mitochondria diseases. Pyruvate is distributed as a dietary supplement in the United States, and is easily obtainable via internet shopping in Japan. In cultured cells, pyruvate is often added in culture medium as a supplemental energy source for cells, but there is no clear evidence for its addition. Pyruvate concentrations in culture media differ among researchers. On these basis, the author have investigated the effect of pyruvate on glucose uptake and metabolism using cultured hepatocytes.

**【Materials and methods】** Human hepatoma cells HepG2 were cultured without or with sodium pyruvate (0 – 5 mM) for 24 h. Glucose uptake by cultured hepatocytes was determined by differences in glucose concentrations in the culture medium before and after

culture. Glucose concentration in the culture medium was measured by the glucose oxidase-mutarotase method. The effects of pyruvate on HepG2 were also assessed by the intracellular accumulations of fat (Oil Red O staining), mitochondrial DNA copy number (Real-time PCR), and mRNA expression of glucose metabolism-related enzymes and transporters (Real-time RT-PCR).

**【Results】** Pyruvate significantly and dose-dependently stimulated glucose uptake by HepG2 in 24-h culture, although glucose uptake tended to be suppressed in 4 h culture. This promoting action of pyruvate was observed at 0.05 mM which is close to physiological concentration *in vivo*. Furthermore, pyruvate significantly increased the intracellular accumulations of fat and the number of mitochondrial DNA (24 h). Since TCA cycle in mitochondria is involved in fatty acid synthesis from glucose, it was possible that pyruvate increased the number or activity of mitochondria. In addition, pyruvate induced mRNA expression of some of the glucose metabolism-related enzymes and transporters (24 h).

**【Conclusion】** These results suggested that pyruvate possibly stimulated glucose uptake by activating glucose metabolic pathways and mitochondrial function in cultured hepatocytes.