




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 296 号	氏 名	岡本 考史
審査委員会委員		主査氏名	
		副査氏名	
		副査氏名	
<p>論文題目 Establishment and characterization of a novel method for evaluating gluconeogenesis using hepatic cell lines, H4IIE and HepG2</p> <p>論文掲載誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics</p> <p>論文要旨</p> <p>脳をはじめとする全身のグルコース要求性に対応する血糖値の調節において肝臓からのグルコース放出は主要因子の一つで、肝細胞における gluconeogenesis はそこで重要な役割を担っている。従ってこの gluconeogenesis は糖尿病に認められる血糖値調節の破綻を治療するターゲットにもなりうるので、本研究ではラット肝細胞株 H4IIE 細胞とヒト肝細胞株 HepG2 細胞を用いた gluconeogenesis 評価系の確立を試み、その妥当性を検討した。</p> <p>H4IIE 細胞を高密度前培養し、高塩濃度下で培養すると、gluconeogenesis の基質となる pyruvate と lactate の存在下で培養細胞からのグルコース放出が有意に亢進し、この亢進は insulin により濃度依存性に抑制された。高密度前培養した HepG2 細胞からのグルコース放出は基質非存在下で塩濃度を増加させると減少し、同条件下で減少せぬ基質存在下での放出より有為に低値を示した。そこで細胞中のグリコーゲン含量を調べると 4 時間後に基質の非存在下では有意に低下したのに対し、基質存在下では有意に増加した。これらの結果から HepG2 細胞から放出されたグルコースが基質非存在化では主にグリコーゲン由来なのに対して、基質存在下では主として gluconeogenesis 由来である可能性が示唆された。</p> <p>Gluconeogenesis に影響を与えるとされる因子の作用をこの系で調べたところ、insulin および gluconeogenesis 阻害効果を持つとされる Metformin は容量依存性にグルコース放出を抑制し、膜透過型 cAMP アナログはグルコース放出を促進した。これらより報告者らが確立したとしている gluconeogenesis 評価系は肝臓における糖代謝を確かに反映している部分があると考えられた。</p> <p>本研究は、培養条件を検討することで肝細胞株からのグルコース放出が増加し、gluconeogenesis 評価系として用いることが可能となり、さらに肝における二三の糖代謝調節を再現することを示したものである。gluconeogenesis に対する薬剤効果の判定等で今後のこの系の有用性が示されることが期待される。よって審査委員は、本論文を学位論文に値するものと判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 岡本 考史

論 文 題 目

Establishment and characterization of a novel method for evaluating gluconeogenesis using hepatic cell lines, H4IIE and HepG2

(肝臓細胞株 H4IIE および HepG2 細胞を用いた新規糖新生評価系の確立とその解析)

要 旨

ア. 緒言 (目的)

肝臓からのグルコース放出すなわち肝糖放出は、血糖値維持に不可欠な反応であり、精妙に調節されている。この調節は糖尿病状態では破綻し、血糖値が上昇する。

糖新生は、この肝糖放出に関与し、ピルビン酸や乳酸等の糖新生基質からグルコースを産生するシステムで、近年創薬ターゲットとしても注目されている。

一方、医薬品候補化合物のスクリーニング等に使用できる簡便な糖新生評価系は、あまり知られていない。そこで、本研究では、ラット肝細胞株 H4IIE 細胞およびヒト肝細胞株 HepG2 細胞を用い、糖新生評価系の構築を行うとともに、試験系の妥当性を証明するための各種試験を行った。

イ. 研究対象及び方法

グルコース放出試験：高密度培養した細胞を培養プレートに播種した。16 時間培養後細胞を洗浄し、0.1% BSA を含む緩衝液を加えて反応を開始した。1 mM ピルビン酸、10 mM 乳酸を糖新生基質として使用した。緩衝液の浸透圧は塩化ナトリウム含量で調節した。糖新生調節因子（インスリン、膜透過性 cAMP アナログおよびメトフォルミン）は、必要に応じ反应用の緩衝液に添加した。

グルコースの定量：反応終了後の培養上清は、過塩素酸による除蛋白と水酸化カリウムによる中和後、フィルターろ過を行った。処理サンプルのグルコース濃度は、蛍光ヘキソキナーゼ法で定量した。

細胞内グリコーゲンの定量：超音波破碎した細胞の上清をアミログルコシダーゼ処理し、分解産物のグルコースを上述の方法で測定した。

遺伝子発現量解析：細胞から RNA を抽出後、オリゴ dT をプライマーとした cDNA 合成を行い、定量 PCR により発現量解析を行った。

ウ. エ. 結果および考察

H4IIE 細胞を高密度前培養し、高浸透圧下で反応を行うと、糖新生基質存在下でのグルコース放出量の増加が認められた。また、この方法は、HepG2 細胞においても適用可能であった。

反応中の HepG2 細胞内グリコーゲン含量を調べたところ、基質のない場合は、グリコーゲン含量の低下が、基質の存在下では、グリコーゲン含量の上昇が認められた。この結果は、HepG2 細胞からのグルコース放出が、基質非存在下ではグリコーゲン分解により補われ、基質存在下では糖新生により供給されていることを示唆している。

発現量解析を行った結果、至適条件では、糖新生関連酵素発現量の増加が認められた。この発現増加が、糖新生基質存在下におけるグルコース放出を亢進させたと考えられた。

糖新生調節因子の作用を調べたところ、インスリンおよび糖新生阻害効果をもつメトフォルミンは、用量依存性にグルコース放出を抑制し、膜透過性 cAMP アナログはグルコース放出を促進した。これらのことより、我々が構築した糖新生測定系は生理的な状態でみられる肝臓の代謝調節を部分的に反映しているものと考えられた。

オ. 結語（まとめ）

我々が構築した糖新生評価系は、栄養素やホルモン等が糖新生に与える影響や、糖新生を調節する分子の機能評価に有用であることが示された。特にヒト由来細胞である HepG2 を用いた評価系は、糖新生抑制効果をもつ抗糖尿病薬の探索にも応用できると考えられた。