

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:55-56.

平成24・25年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 5)肝培養細胞を用いたピオグリタゾンのインスリンおよび脂質代謝シグナルに対する薬理作用の解析

飯田 慎也

5) 肝培養細胞を用いたピオグリタゾンのインスリン  
および脂質代謝シグナルに対する薬理作用の解析

研究代表者 飯田 慎也

【目的】

本邦においても生活習慣病の増加にともない、non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) の患者数は増加している。NAFLD のうち肝硬変、肝癌に進行する可能性のあるものが nonalcoholic steatohepatitis (NASH) と呼ばれ、アルコール性肝炎、ウイルス性肝炎、薬剤性肝障害が否定される肝炎の多くが NASH と推定されている。NASH の発症には、肥満、糖尿病に付随するインスリン抵抗性が関与しているとの報告があるが、様々な発症機序が想定されており治療法については不明な点が多い。インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン (PGZ) は、抗糖尿病薬としてだけでなく NASH の治療にも有効である。PGZ は転写因子である peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) のアゴニストであるが、PGZ の肝臓における詳細な作用メカニズムはいまだ不明である。肝細胞においても PPAR $\gamma$  のサブタイプの 1 つである PPAR $\gamma_1$  の発現が確認されており、PGZ が肝臓において PPAR $\gamma_1$  の活性化を介して、インスリンシグナル伝達系や脂質代謝系に作用している可能性も考えられる。

本研究は、インスリンシグナル系の主要因子である Akt、糖新生や脂肪酸分解に関与することが知られている PKA、グリコーゲン合成、脂肪酸合成に抑制的に作用すると考えられている GSK-3 $\beta$  に対する、PGZ の薬理作用を解析することを目的としている。

[方法]

Akt, GSK-3 $\beta$ , PKA の転写量とリン酸化蛋白質の検出

ヒト肝細胞由来 HepG2 細胞に PGZ を 25 $\mu$ M 添加し 72 時間培養後、各遺伝子の転写量をリアルタイム PCR 法で相対定量した。次に、PGZ 添加 48 時間後の Akt, PKA のリン酸化と、GSK-3 $\beta$  の蛋白質量をウェスタンブロット法で検出した<sup>1)</sup>。

HepG2 細胞内の脂質量

培地にクロロキン (CQ) を 6.25, 12.5, 25 $\mu$ M 添加し、72 時間培養することで HepG2 細胞に脂質蓄積を誘導した。PGZ(25 $\mu$ M) を CQ と同時に添加した場合の細胞内脂質を oil red O を用いて染色し、細胞内脂質量

を吸光度 (540nm) で定量した<sup>2)</sup>。

【結果】

PGZ の作用による Akt, GSK-3 $\beta$ , PKA の転写量とリン酸化の変動

PGZ を 72 時間作用させた HepG2 細胞において、PKA の mRNA 量はコントロールの約 60%、GSK-3 $\beta$  では約 75% に減少していた。一方、Akt の mRNA 量に変動は見られなかった。

PGZ 作用 48 時間後のリン酸化 Akt, PKA 蛋白質量とともに微量であり、PGZ によるリン酸化への影響を検出できなかった。また、GSK-3 $\beta$  の蛋白質量に変動は見られなかった。

CQ により誘導される細胞内脂質蓄積に対する PGZ の効果

CQ により HepG2 細胞内に蓄積される脂質量は微量であるが、PGZ の作用により減少傾向を示した。

【考察】

PGZ の作用により PKA, GSK-3 $\beta$  の転写量に減少傾向が見られた。この結果は、肝細胞中で糖新生が抑制され、グリコーゲン合成や脂肪酸合成が活性化されている可能性を示唆している。一方で Akt, PKA のリン酸化蛋白質量や GSK-3 $\beta$  蛋白質量の有意な変動は検出されなかった。1 点のサンプリングでは、遺伝子の転写量、蛋白質量、細胞内シグナル伝達にともなうリン酸化蛋白質量の継時的変動が検出できていない可能性がある。

CQ はライソゾーム機能を傷害することで細胞内に脂質を蓄積させると考えられている<sup>3)</sup>。本実験から、PGZ が CQ による細胞内脂質蓄積を阻害する可能性が示唆された。PGZ の肝細胞内脂質代謝系への薬理作用を解析するためには、安定した微量脂質量系の確立が必要である。今後は CQ による脂質蓄積誘導のほか、オレイン酸によるものなど、他の細胞内脂質蓄積誘導系の検討を通して、最適な評価系の確立を進めていく必要がある<sup>4)</sup>。

【文献】

- 1) Zhang L.H., Kamanna V. S., et al. :Pioglitazone increases apolipoprotein A-I production by directly enhancing PPARE-dependent transcription in HepG2 cells. J.

Lipid Res. 51, 2211-2222 (2010)

- 2 ) Yan F., Wang Q., et al. :Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activation induces hepatic steatosis, suggesting an adverse effect. PLoS one. 9(6), e99245 (2014)
- 3 ) Park S., Choi Y.J., et al. :In vitro validation of drug-induced phospholipidosis. J. Toxicol. Sci. 37(2), 261-267 (2012)
- 4 ) Cui W., Chen S. L., et al. :Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. Am. J. Transl. Res. 2(1), 95-104(2010)