

論文タイトル Pioglitazone による PPAR γ 活性化に他剤が及ぼす影響の検討

著者 岡村 英利奈¹⁾、内野 卓也¹⁾、男澤 悠貴¹⁾、岡本 かおり¹⁾、江戸 直樹²⁾、宇野 健司¹⁾、盛田 幸司¹⁾、石川 敏夫¹⁾、塚本 和久¹⁾

所属 1) 帝京大学医学部内科学講座

2) 帝京大学医学部臨床研究医学講座

キーワード PPAR γ 、Pioglitazone、Bezafibrate、Telmisartan、レポーター遺伝子アッセイ

抄録 (598 文字)

背景・目的: PPAR γ が pioglitazone (pio) で活性化された際に、PPAR γ を弱いながら活性化する bezafibrate (beza)・telmisartan (tel) の同時投与が及ぼす影響は不明である。今回、pio が誘導する PPAR γ 活性に beza・tel の同時添加が与える影響を調べる目的で実験を行った。

対象・方法: Beza・tel を pio と同時添加し以下を調べた。1) HuH7 細胞に 48 時間添加後の PPAR γ 反応性遺伝子 *PTEN*・*CD36* の mRNA 発現量、2) PPAR γ 反応性ルシフェラーゼ遺伝子を一時的に導入した HuH7 細胞に 24 時間添加後のルシフェラーゼ活性、3) ヒト PPAR γ 発現ベクターと PPAR γ 反応性ルシフェラーゼ遺伝子を安定発現する U2OS 細胞に 24 時間添加後のルシフェラーゼ活性。

結果: 上記の 1) では、*PTEN*・*CD36* 発現は pio・beza・tel 添加で有意に変化しなかった。2) では、ルシフェラーゼ活性は pio で増したが同時投与した beza・tel の影響はなかった。3) では、pio で増したルシフェラーゼ活性が beza・tel の同時添加で有意にそれぞれ増加・減少した。

結論: PPAR γ 過剰発現 U2OS 細胞で pio の効果が beza・tel の同時添加で有意にそれぞれ増加・減少した。細胞種・遺伝子によっては pio の効果が beza・tel の影響を受けると考えられた。

はじめに

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) は核内受容体のひとつであり、脂肪組織で特に多く発現し、腎髄質、膀胱、骨格筋、肝臓、心臓にも発現している。また、低レベルではあるが、血管平滑筋・内皮細胞、肝星状細胞、骨髄間質細胞、単球・マクロファージ、乳癌細胞、大腸癌細胞、前立腺癌細胞、膀胱癌細胞などでも発現が検出されている。PPAR γ にはスプライシングの違いにより γ 1~3の isoform があり、 γ 1・ γ 3は477アミノ酸からなる同じ蛋白を、 γ 2は505アミノ酸からなる蛋白をコードしており、 γ 2と γ 3は脂肪組織で発現が高い¹⁾。リガンドの結合によって活性化された PPAR γ は、RXR α (retinoid X receptor α) なる別の核内受容体とヘテロ二量体を形成して、認識配列 (peroxisome proliferator response element、PPRE) に結合し、下流にある標的遺伝子の転写を促進する¹⁾。

PPAR γ の内因性リガンドとしては長鎖脂肪酸や15d-PGJ₂が知られている¹⁾が、合成リガンドである pioglitazone (pio) はインスリン抵抗性を改善する抗糖尿病薬として臨床的に汎用されている。PPAR γ を活性化する pio 以外の薬物で、臨床で用いられるものとしては bezafibrate (中性脂肪低下作用が強い脂質異常症治療薬で PPAR α ・PPAR γ を活性化する、以下 beza)²⁾ や telmisartan (アンジオテンシンII受容体 type 1を阻害する降圧薬、以下 tel)³⁾ が挙げられる。Beza

や tel は pio と比較すると PPAR γ 活性化能が弱いため、これらは PPAR γ のいわば部分作動薬とみなすことができる。

臨床現場では肥満を基として 2 型糖尿病・高中性脂肪血症・高血圧症を合併する症例は極めて多いため、pio と共に beza・tel の一方あるいは両方を投与される例は少なくない。部分作動薬が完全作動薬と共に投与された場合、例えば tamoxifen (エストロゲン受容体の部分作動薬) と estradiol (エストロゲン受容体の完全作動薬) を同時投与した際にみられるように、前者が後者の効果を増強せず逆に減弱させることがありうる⁴⁾。したがって、beza または tel のの同時投与によって pio の PPAR γ 活性化作用が低下し、結果的に pio の抗糖尿病作用が減弱するという可能性が否定はできない。

そこで今回われわれは、pio が PPAR γ 活性化を介して転写を促進する遺伝子の発現レベルが、beza・tel の同時投与によってどのような影響を受けるか検討した。

材料および方法

1. 化合物、プラスミド

Pio・beza・tel は Sigma-Aldrich (St. Louis、MO、USA) から購入し、培養細胞に添加する際の溶剤として dimethyl sulfoxide を用いた。実験の際に添加する pio・beza・tel の最終濃度は臨床で使用される各薬剤の添付文書を参考に

した。すなわち、健常成人に 30 mg の pio（臨床では最大 45 mg/日まで投与可能）を経口で単回投与後のピーク血中濃度が 1.4 ± 0.2 （平均±標準偏差） $\mu\text{g/ml}^{5)}$ 、200 mg の beza（臨床では通常 200 mg を朝夕に内服）を経口で単回投与後のピーク血中濃度が 3.45 ± 0.32 （平均±標準誤差） $\mu\text{g/ml}^{6)}$ 、80 mg の tel（臨床では最大 80 mg/日まで投与可能）を成人男性に単回投与後のピーク血中濃度が 955.3 ± 431.1 （平均±標準偏差） $\text{ng/ml}^{7)}$ であることを参考にして、今回の実験では pio $1.5 \mu\text{g/ml}$ 、beza $3.5 \mu\text{g/ml}$ 、tel $1.0 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度で添加することとした。ただし、これらの 10 倍の濃度も用いた実験においては、それぞれ「1×」および「10×」と記して区別した。

ヒト PPAR γ 3 発現プラスミド (SC108192) は OriGene (Rockville, MD, USA) から購入した。ホタルルシフェラーゼレポータープラスミド pGL4.26（プラスミド中に hygromycin 耐性遺伝子を有する）、内部標準用ウミシイタケルシフェラーゼレポータープラスミド phRL-CMV、G418 耐性遺伝子を有するプラスミド pCI-neo は Promega (Madison, WI, USA) から購入した。Puromycin 耐性遺伝子を有するプラスミド pBasi-hU6 Pur DNA は TaKaRa（滋賀、日本）から購入した。活性化された PPAR γ に反応してホタルルシフェラーゼ発現を増すプラスミド 4PPRE-pGL4.26 は、pGL4.26 の Kpn I および Bgl II 部位の間に、PPRE 配列 CCTCTCCTTTGACCTATTGAACTATTACCTACATTTGA⁸⁾ を 4 個直列に挿入して作成した。

2. 細胞培養

ヒト肝癌細胞株 HuH7、ヒト骨肉腫細胞株 U2OS は、10% (v/v) のウシ胎児血清と抗菌薬を加えたダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で維持培養した。各実験 (定量的 real-time RT-PCR およびレポーター遺伝子アッセイ) を行う際には、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後に各条件へと変えて培養した。PPAR γ リガンドを極力排除した環境で実験を行うのが望ましいと考えられたが、最も pio 添加の効果を見やすい条件をパイロット実験 (U2OS 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ) で検討した結果、実験の際にはウシ胎児血清非添加の DMEM 中で細胞に pio・beza・tel を添加することとした。

3. 定量的 real-time RT-PCR

HuH7 細胞を各条件下で 48 時間培養した後、TRIzol 試薬 (Thermo Fisher、東京、日本) を用いて RNA を回収した。この RNA を DNase で処理して混入している DNA を除去した後、Random Primers (Promega) および M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用いて逆転写を行い cDNA 化した。発現を調べたい各遺伝子について、以下のプライマーを用いて PCR を行った。ヒト *PTEN* のプライマー配列 (5' -GCTACCTGTAAAGAATCATCTGGA-3' および 5' -CTGGCAGACCACAACTGAG-3') はオンラインプログラム Universal ProbeLibrary System Assay Design (Roche Life Science、Penzburg、ドイツ) を用いて決定

した。また、ヒト *CD36* のプライマー配列 (5' -GGAAGTGATGATGAACAGCAGC-3' および 5' -GAGACTGTGTTGTCCTCAGCG-3') とヒト 18S rRNA のプライマー配列 (5' -GCCCTGTAATTGGAATGAGTCCACTT-3' および 5' -GTCCCCAAGATCCAACTACGAGCTTT-3') は過去の文献^{9, 10)}と同じ配列を用いた。これらのプライマーと SYBR green を用いて、定量的 real-time RT-PCR を LightCycler®Nano (Roche Life Science, Penzberg, ドイツ) で行った。ヒト *PTEEN* および *CD36* の mRNA 発現量を 18S rRNA の発現量で補正して評価した。実験 (n = 3) を行い、コントロール群の平均値を 1.0 として各条件について比較した。

4. ヒト PPAR γ ・PPAR 反応性ホタルルシフェラーゼ遺伝子を安定発現する U2OS 細胞の作成

PPAR γ 反応性ホタルルシフェラーゼ遺伝子 4PPRE-pGL4. 26、PPAR γ 3 過剰発現ベクター SC108192、および内部標準用のウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 phRL-CMV の 3 者を安定発現する細胞を、内因性に PPAR γ を発現していないとされる¹¹⁾ U2OS 細胞を用いて作成した。これら 3 者のプラスミドが染色体上の隣接した部位に組み込まれ互いの発現に影響を及ぼす可能性を避けるため、これらは共導入せず以下のように順次導入した。U2OS 細胞に phRL-CMV を pCI-neo と共に FuGENE HD (Promega) を用いて遺伝子導入した後、細胞を G418 で選択し、ウミシイタケルシフェラーゼを安定発現する細胞群を得た。この細胞群に、4PPRE-

pGL4.26 を FuGENE HD を用いて導入して hygromycin で選択し、ウミシイタケルシフェラーゼに加えて PPAR 反応性にホタルルシフェラーゼを安定発現する単クローンの細胞を 24 個得た。各クローンの細胞に SC108192 を FuGENE HD で一過性に導入し、pio 添加により最もホタルルシフェラーゼ発現が増すクローンを PPRE1ucU20S 細胞と名付けた。PPRE1ucU20S 細胞に、再び FuGENE HD を用いて SC108192 を pBasi-hU6 Pur DNA と共に導入して puromycin で選択し、両ルシフェラーゼ遺伝子に加えてヒト PPAR γ 3 も安定発現するクローンを 37 個得た。そのうち、pio 添加によって最もホタルルシフェラーゼ活性が増すクローンを γ + PPRE1ucU20S 細胞と名付けた。PPRE1ucU20S 細胞を維持培養する際には G418・hygromycin を含む培地を、 γ + PPRE1ucU20S 細胞を維持培養する際には G418・hygromycin・puromycin 含む培地を用いた。なお、PPAR γ とヘテロ二量体を形成する RXR α を U20S 細胞に導入しても PPAR γ 活性化に伴う転写促進の程度は変わらないと報告されている¹¹⁾ため、RXR α 発現プラスミドの導入は行わなかった。

5. レポーター遺伝子アッセイ

内因性の PPAR γ を発現している¹²⁾HuH7 細胞に 4PPRE-pGL4.26 (ないしは PPRE を有さない親プラスミドである pGL4.26) と phRL-CMV を FuGENE HD を用いて共導入して翌日に各条件へと切り替え、24 時間後にホタルおよびウミシイタケのルシフェラーゼ活性を Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて

ルミノメーターで測定した。ホタルルシフェラーゼ活性の測定値をウミシイタケルシフェラーゼ活性の測定値で除した値を補正ホタルルシフェラーゼ活性値として用いた。実験 (n = 6) では、コントロール群の平均値を 1.0 として各条件について比較した。

また、上述した PPRE1ucU20S 細胞および γ + PPRE1ucU20S 細胞を 96 穴プレートに均等に蒔き、pio・beza・tel を単独または複数同時に添加し、24 時間後に両ルシフェラーゼ活性を Dual-Glo Luciferase Assay System とルミノメーターを用いて測定した後に補正ホタルルシフェラーゼ活性値を算出した。実験 (n = 4) では、コントロール群の平均値を 1.0 として各条件について比較した。

6. 統計学的解析

得られたデータに対して、Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いて分散分析 (ANOVA) および Tukey-Kramer テストを行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差があると判断した。

結果

1. HuH7 細胞において pio・bez・tel が *PTEN*、*CD36* の mRNA 発現に与える影響

内因性に PPAR γ を発現している HuH7 細胞に、pio、bez、tel を単剤あるいは複数同時添加して 48 時間後に PPAR γ 依存性の遺伝子である *PTEN* および *CD36* の発現レベルを調べた。*PTEN* の発現は pio ないし beza の単剤添加により増加する

傾向がみられたものの有意差は認められず、また、その他の群においては pio を併せて添加した群を含めて、*PTEN* の発現に増加傾向はみられなかった (Figure 1A)。*CD36* の発現は pio 添加によっても明らかな増加はみられず、また刺激によっては加えると減少する傾向すら見られたが、コントロール群と比較して有意差は認められなかった (Figure 1B)。

2. PPAR γ 反応性レポーター遺伝子を一時的に導入した HuH7 細胞に対する pio・beza・tel の影響

次に、HuH7 細胞に、PPAR γ 活性化に反応するレポーター遺伝子 4PPRE-pGL4. 26 を一時的に導入した後に刺激を与え、レポーター遺伝子アッセイを行った (Figure 2)。Pio、pio+beza、pio+tel、また pio+beza+tel を 24 時間添加すると、コントロール群と比べてホタルルシフェラーゼ活性の有意な増加がみられた (Figure 2A)。Beza・tel の一方あるいは両者を加えても、PPAR γ の活性化は検出されず、また pio 単独添加と比較して pio+beza・pio+tel 添加後には PPAR γ 活性の有意な変化はみられなかった (Figure 2A)。一方、プロモーター上流に PPRE を有さないホタルルシフェラーゼのレポーター遺伝子 (pGL4. 26) を一時的に導入した HuH7 細胞を用いた対照実験においては、pio・beza・tel を単剤あるいは複数同時添加しても、コントロール群に比較して PPAR γ 活性の有意な増加はみられなかった (Figure 2B)。

3. PPAR γ 反応性レポーター遺伝子と PPAR γ を安定発現する γ +PPRElucU20S 細胞に対する pio・beza・tel の影響

上述した HuH7 細胞における内因性の PPAR γ の発現量は PPAR γ を人工的に過剰発現させた細胞に比べれば少ない可能性、また、レポーター遺伝子の一時的な導入実験では結果の誤差が大きくなる可能性を考慮して、PPAR γ 反応性レポーター遺伝子 4PPRE-pGL4.26、PPAR γ 3 過剰発現ベクター-SC108192、および内部標準用のレポーター遺伝子 phRL-CMV の 3 者を安定発現する γ +PPRElucU20S 細胞を作製して実験を行った。対照実験としては、4PPRE-pGL4.26 と phRL-CMV を安定発現するが PPAR γ は発現しない PPRElucU20S 細胞を用いた。これらの細胞に pio、pio+beza、pio+tel、また pio+beza+tel を、これまでの実験と同じ濃度あるいは 10 倍の濃度で 24 時間添加した (Figure 3)。 γ +PPRElucU20S 細胞を使った実験 (Figure 3A) においては、補正ホタルルシフェラーゼ値はコントロール群 (薬剤非添加群) に比べて pio 1 \times 群および pio 10 \times 群で有意に高く、さらに pio 1 \times 群に比べて pio 10 \times 群では有意に高かった。Figure 3A において pio 非投与の 7 条件では、コントロール群に比べて beza 10 \times 、tel 10 \times 、beza 10 \times +tel 10 \times の各群で有意な高値を示した。Pio 1 \times 投与の 7 条件で補正ホタルルシフェラーゼ値を比べると、pio 1 \times 群に比較して pio 1 \times +beza 10 \times 群は有意に高く、pio 1 \times +tel 1 \times および pio 1 \times +tel 10 \times の 2 群は有意に低かつ

た。Pio 10×投与の7条件では、pio 10×群に比べてpio 10×+beza 1×群とpio 10×+beza 10×群は有意な高値を、またpio 10×+tel 1×群とpio 10×+tel 10×群とpio 10×+beza 10×+tel 10×群は有意な低値を示した。一方、PPRElucU2OS細胞を用いた対照実験 (Figure 3B) では、コントロール群とpio 1×群ないしpio 10×群の補正ホタルルシフェラーゼ値に有意差を認めなかった。Pio非投与の7条件では、beza 1×+tel 1×群とbeza 10×+tel 10×群がコントロール群に比べて有意な高値を示した。Pio 1×投与の7条件では、pio 1×群に比べてpio 1×+beza 10×+tel 10×群においてのみ、有意な高値がみられた。Pio 10×投与の7条件では、pio 10×群に比べてpio 10×+beza 10×+tel 10×群でのみ補正ホタルルシフェラーゼ値が有意に高かった。

なお、補正ホタルルシフェラーゼ値の算出時に分母となるウミシイタケルシフェラーゼ値は各条件でほぼ不変であった。分子であるホタルルシフェラーゼ値のみを基にしてグラフを作成すると Figure 3A・3B と全く同傾向を示し、統計学的有意差についても上記と全く同じ結果が得られた (データ未掲載)

考察

今回の研究では、最初に HuH7 細胞を用いて内因性の PPAR γ 反応性遺伝子 (*PTEN*および *CD36*) の mRNA 発現量を指標として、pio・beza・tel 添加による PPAR γ 活性化の検出を試みた。しかし、pioによる *PTEN*発現増加傾向はみられ

たものの、全体的にはこれらの薬剤を単独・複数加えても明確な発現増加傾向はみられなかった (Figure 1)。この理由として、これらの刺激が PPAR γ 以外の経路にも影響を及ぼし、それが *PTEN*・*CD36* の発現に正ないし負の効果を与えうる可能性、HuH7 細胞の PPAR γ 発現量が PPAR γ 過剰発現細胞に比べれば少ないため、その活性化の効果が見にくい可能性、などが考えられた。単純に PPAR γ の活性化のみを調べるため、PPRE を有する/有さないホタルルシフェラーゼ遺伝子を HuH7 細胞に一時的に導入してレポーター遺伝子アッセイを行ったところ、pio 添加による PPAR γ の活性化は明確にみられたが、beza・tel の単独ないし pio との同時投与が PPAR γ 活性に与える影響は検出できなかった (Figure 2)。そこで、上記の問題点と同時に、レポーター遺伝子の一時的導入による誤差を改善するために、PPAR γ と PPRE を有するホタルルシフェラーゼ遺伝子 (4PPRE-pGL4.26) を安定発現する細胞を作成した。その際、一時的導入実験と同様に細胞の数および生存状態を補正するための内部標準レポーターとして必要であるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (phRL-CMV) も安定発現させることとした。また、対照としては PPAR γ を発現していない細胞が望ましいと考え、U2OS 細胞を用いた。phRL-CMV・4PPRE-pGL4.26・PPAR γ 発現プラスミド (SC108192) の 3 者を安定発現する細胞を得る際には、SC108192 を最後としてプラスミドを U2OS 細胞に順次導入したが、このような方法を取ったのは以下の 2 つの理由による。第一に、仮

に phRL-CMV ないし SC108192 (いずれも CMV プロモーターを有する) を 4PPRE-pGL4.26 と同時に導入すると、phRL-CMV ないし SC108192 が 4PPRE-pGL4.26 に染色体上に隣接した状態で組み込まれる確率が極めて高く、強力な CMV プロモーターのために PPRE の機能が影響を受ける可能性があるため、これらが染色体の別の部位に組み込まれることを狙い導入を逐次的に行う必要があった。第二に、 γ + PPRE1ucU20S 細胞と対照である PPRE1ucU20S 細胞の実験結果を厳密に比較可能にするためには、両細胞において phRL-CMV や 4PPRE-pGL4.26 が染色体部位、コピー数、向きなどについて全く同様に組み込まれていることが望ましいため、まず PPRE1ucU20S 細胞を作成し、それを基に SC108192 を安定導入して γ + PPRE1ucU20S 細胞を得る必要があった。

上述のような方法で安定発現細胞を作成したことにより実験の精度が向上し、また厳密な対照実験を行うことが可能となった。 γ + PPRE1ucU20S 細胞において補正ホタルルシフェラーゼ値は pio のみを添加した場合に比較して pio+beza の添加では有意に高くなり、pio+tel の添加では有意に低くなる傾向がみられた (Figure 3A) が、対照細胞である PPRE1ucU20S 細胞ではこのような傾向がみられていない (Figure 3B) ため、この実験では pio によって活性化された PPAR γ 活性は beza の同時添加で増強し、tel の同時添加で抑制される傾向が明らかになった。また、pio 非投与の状態では、10 倍濃度の beza ないし tel は pio に

比べれば弱いながらも確かに PPAR γ を活性化することが示された (Figure 3A)。

10 倍濃度の beza と tel の両者を同時に加えた場合にも補正ホタルルシフェラーゼ値はコントロール群に比べて約 2.4 倍に増した (Figure 3A) が、PPAR γ の発現がない PPRElucU20S 細胞においても補正ホタルルシフェラーゼ値が約 1.7 倍は増している (Figure 3B) ので、前者における約 2.4 倍の増加は、全てが PPAR γ の活性化を介したものではない可能性に留意する必要がある。さらに、既に pio を 1 \times ないし 10 \times で加えているところに beza と tel の両者を 10 \times の濃度で同時添加した場合も PPRElucU20S 細胞において補正ルシフェラーゼ値が有意に高くなる傾向がみられる (Figure 3B) ため、そもそも PPAR γ が不在の状態でも何らかの経路でこの細胞においてホタルルシフェラーゼの発現を増していると考えられる。一方、 γ + PPRElucU20S 細胞においては、pio 1 \times 投与下では 10 \times の beza \cdot tel の同時添加後に補正ホタルルシフェラーゼ値は不変であり、pio 10 \times 投与下では 10 \times の beza \cdot tel の同時添加で補正ホタルルシフェラーゼ値は有意に低下している (Figure 3A)。これらを考え併せると、pio の有無にかかわらず beza \cdot tel の両者を同時添加した際のホタルルシフェラーゼ値の動きについては解釈が難しく、その機序も不明である。

上述の「pio により刺激された PPAR γ 活性が、beza 同時投与により増強する一方、tel 同時投与により減弱する傾向がある」という結果は、これまでの基礎

医学・臨床医学的な報告に照らし合わせると興味深い。過去の基礎医学的文献において、pio または pio の類薬である rosiglitazone（本邦未発売、以下 rosi）に加えて beza を同時投与した場合に PPAR γ 活性が受ける影響を調べた報告は見出せなかったが、rosi と tel を同時に加えた場合の PPAR γ の挙動を検討した論文はある³⁾。この論文の実験では、rosi によって促進された PPAR γ の転写活性が 10 μ M（約 5.1 μ g/mL）以上の高濃度の tel を同時添加すると低下し始めているが、著者らは「実際の tel 内服患者でみられる血中濃度よりもはるかに高い濃度の tel で得られた結果なので、臨床的には tel が rosi の効果を減弱することはないだろう」と考えている。今回のわれわれの実験では pio により増した PPAR γ 転写活性が tel の同時添加で減弱した点はこの論文と一致しているが、実際の tel 内服患者で起こりうる濃度（tel 1 \times 、すなわち 1 μ g/mL）で既にこの減弱効果がみられているため（Figure 3A）、pio の抗糖尿病作用に対して tel が干渉しうるのではないかという臨床的懸念が生じることになる。また、同じ論文³⁾は tel の PPAR γ への結合様式についても言及しており、「PPAR γ のリガンド結合領域に結合した放射能標識 rosi は、高濃度の tel を加えても解離しないので、rosi と tel は競合して PPAR γ 上の同じ部位に結合するのではなく、両者の結合部位は異なるのだろう」と考察している。なお、pio については、rosi の類薬ゆえ当然ではあるが、別の論文において rosi と競合的に PPAR γ 上の同じ部位

に結合することが示されている¹³⁾。したがって、tel は rosi と PPAR γ の結合のみならず、恐らくは pio と PPAR γ の結合に対しても競合的に阻害することはなく、pio と tel は PPAR γ 上の異なる部位に結合するのであろうと推測される。また、もし pio と tel が PPAR γ 上の同じ結合部位を競合的に取り合うのであれば、pio 1 \times に tel 1 \times ないし tel 10 \times を同時添加してみられた PPAR γ 活性の減弱は、pio 添加量を 10 \times へと増すことにより見えにくくなるはずであるが、われわれの実験では pio を 10 \times に増量しても pio 1 \times の場合と同じように tel 1 \times ・10 \times の添加による PPAR γ 活性の減弱が観察されている (Figure 3A)。この結果も pio と tel は PPAR γ の異なる部位に非競合的に結合することを示唆している。同様の視点から改めて beza を pio と同時添加した実験の結果 (Figure 3A) を見ると、pio 投与が 1 \times ・10 \times のいずれでも beza 10 \times の同時添加により PPAR γ 活性はさらに増している。したがって、beza も PPAR γ 上で pio とは異なる部位に結合し、pio により促進された PPAR γ 活性を tel とは逆に増している可能性があるが、参考となる文献が乏しくこれ以上の考察は困難である。

臨床的には、これまでも beza・tel が PPAR γ 活性化を介してもたらず抗糖尿病作用は研究対象とされており、beza に関しては PPAR α を活性化して脂質代謝を改善するだけでなく PPAR γ も活性化するために単独でも血糖低下作用があると報告されていた¹⁴⁾。また tel については、そもそもアンジオテンシン II 受容

体拮抗薬自体が血糖低下をもたらす可能性があるものの¹⁵⁾、特に tel には PPAR γ 活性化作用を介した血糖低下作用があると言われている^{16, 17)}。Beza・tel の両者を同時投与した場合に、単独投与に比べて糖尿病のコントロールがどのような影響を受けたか調べた研究は見当たらなかった。また、pio との併用投与については、pio の抗糖尿病作用が beza あるいは tel を同時投与した際に受ける影響について臨床的に調べた文献は見当たらなかった。Rosi は本邦では上梓されておらず、心血管イベントを増す可能性が指摘された¹⁸⁾ため世界での処方量が減少しているが、冠動脈疾患を持つ糖尿病患者において rosi・beza を単独投与するよりも併用した方が血糖・HbA1c が低下したという報告¹⁹⁾や、rosi 単独投与よりも rosi・tel 併用投与の方が血糖・HbA1c が低下したという報告²⁰⁾がある。この報告²⁰⁾は、上述した「rosi で刺激された PPAR γ の活性は、tel を高濃度ではあるが同時投与すると減弱する」という基礎医学的知見³⁾には合致しておらず、基礎実験で得られた結果の臨床的意義を判断することの難しさを窺わせる。したがって、今回われわれの実験から得られた知見も、あくまで細胞・培地・薬物濃度・PPAR γ 発現量などが人工的に決められた条件で行われた *in vitro* 実験の結果であり、必ずしも「臨床で pio の抗糖尿病作用が beza との併用により増強し、tel との併用により減弱する」ことを示すとは限らないことに留意する必要がある。一方で、tel については糖代謝に好効果をもたらさうる

“metabosartan”²¹⁾としてその薬理的長所を強調するだけではなく、本当に pio の効果に悪影響を及ぼす可能性はないのか、今後慎重に検討する必要がある。

結語

内因性 PPAR γ を発現している HuH7 細胞にレポーター遺伝子を一時的に導入した実験では pio による PPAR γ 活性化は beza ないし tel の同時添加によって影響は受けなかったが、PPAR γ およびその活性化に反応するレポーター遺伝子を安定発現させた γ +PPRElucU20S 細胞を用いた実験では pio による PPAR γ 活性化が beza の同時添加により増強し tel の同時添加により減弱した。今後は、beza・tel が PPAR γ 活性を変化させる機序の基礎的な研究、また実際に pio に beza ないし tel を同時投与した場合の糖尿病のコントロールに関する臨床的な検討などを重ねていく必要がある。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始多大なるご指導ご協力を頂きました村上ひとみ氏・村田一恵氏に心から感謝の意を表します。さらに研究に協力して頂いたその他の方々にも厚く御礼を申し上げます。

文献

- 1) Guan Y, Breyer MD. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int.* 2001 ; 60 : 14-30.
- 2) Tenenbaum A, Fisman EZ. Balanced pan-PPAR activator bezafibrate in combination with statin: comprehensive lipids control and diabetes prevention? *Cardiovasc Diabetol.* 2012 ; 11 : 140.
- 3) Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, et al. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR γ -modulating activity. *Hypertension.* 2004 ; 43 : 993-1002.
- 4) MacNab MW, Tallarida RJ, Joseph R. An evaluation of tamoxifen as a partial agonist by classical receptor theory--an explanation of the dual action of tamoxifen. *Eur J Pharmacol.* 1984 ; 103 : 321-6.
- 5) https://www.info.pmda.go.jp/go/pack/3969007F1024_2_01/
- 6) <https://clinicalsup.jp/druglist/pc/00050612.html>
- 7) https://www.nichiiko.co.jp/medicine/file/90860/attached_pdf/90860_attached.pdf
- 8) Zhang B, Marcus SL, Miyata KS, et al. Characterization of protein-

- DNA interactions within the peroxisome proliferator-responsive element of the rat hydratase-dehydrogenase gene. *J Biol Chem.* 1993 ; 268 : 12939-45.
- 9) Butcher LR, Thomas A, Backx K, et al. Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPAR γ . *Med Sci Sports Exerc.* 2008 ; 40 : 1263-70.
- 10) Wei Y, Puzhko S, Wabitsch M, et al. Transcriptional regulation of the human growth hormone receptor (hGHR) gene V2 promoter by transcriptional activators and repressor. *Mol Endocrinol.* 2009 ; 23 : 373-87.
- 11) Jeninga EH, van Beekum O, van Dijk AD, et al. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor γ function through mutation of a conserved salt bridge (R425C) in familial partial lipodystrophy. *Mol Endocrinol.* 2007 ; 21 : 1049-65.
- 12) Vara D, Morell C, Rodríguez-Henche N, et al. Involvement of PPAR γ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 2013 ; 4 : e618.

- 13) Shuichi Fukuen, Masanori Iwaki, Atsutaka Yasui, et al. Sulfonylurea agents exhibit peroxisome proliferator-activated receptor γ agonistic activity. *J Biol Chem.* 2005 ; 280 : 23653-9.
- 14) Teramoto T, Shirai K, Daida H, et al. Effects of bezafibrate on lipid and glucose metabolism in dyslipidemic patients with diabetes: the J-BENEFIT study. *Cardiovasc Diabetol.* 2012 ; 11 : 29.
- 15) Kitamura N, Takahashi Y, Yamadate S, et al. Angiotensin II receptor blockers decreased blood glucose levels: a longitudinal survey using data from electronic medical records. *Cardiovasc Diabetol.* 2007 ; 6 : 26.
- 16) Yamana A, Arita M, Furuta M, et al. The angiotensin II receptor blocker telmisartan improves insulin resistance and has beneficial effects in hypertensive patients with type 2 diabetes and poor glycemic control. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008 ; 82 : 127-31.
- 17) Honjo S, Nichi Y, Wada Y, et al. Possible beneficial effect of telmisartan on glycemic control in diabetic subjects. *Diabetes Care.* 2005 ; 28 : 498.

- 18)Graham DJ, Ouellet-Hellstrom R, MaCurdy TE, et al. Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone. JAMA. 2010 ; 304 : 411-8.
- 19)Wei J, Tang Q, Liu L, et al. Combination of peroxisome proliferator-activated receptor α/γ agonists may benefit type 2 diabetes patients with coronary artery disease through inhibition of inflammatory cytokine secretion. Exp Ther Med. 2013 ; 5 : 783-8.
- 20)Derosa G, Fogari E, D'Angelo A, et al. Metabolic effects of telmisartan and irbesartan in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome treated with rosiglitazone. J Clin Pharm Ther. 2007 ; 32 : 261-8.
- 21)Nakagami H, Morishita R. Obesity and gastrointestinal hormones-dual effect of angiotensin II receptor blockade and a partial agonist of PPAR- γ . Curr Vasc Pharmacol. 2011 ; 9 : 162-6.

図の説明

Figure 1 HuH7 細胞における pio・beza・tel 添加後の内因性 PPAR γ 反応性遺伝子の発現変化

各薬剤を 48 時間添加した HuH7 細胞における *P TEN* (A) および *CD36* (B) の mRNA 発現を定量的 RT-PCR で調べた (n = 3)。各カラムは平均値 \pm 標準偏差を示す。

Figure 2 4PPRE-pGL4.26 を一時的に導入した HuH7 細胞における pio・beza・tel 添加後の PPAR γ 活性化

HuH7 細胞に 4PPRE-pGL4.26 (A) ないしは PPRE を有さない親プラスミド pGL4.26 (B、対照実験) を一時的に導入し、各薬剤を 24 時間添加した後のウミシイタケルシフェラーゼ値で補正したホタルルシフェラーゼの値を示した (n = 6)。A、B とも薬剤非添加群 (cont) の平均値を 1.0 とした。各カラムは平均値 \pm 標準偏差を示す。* $p < 0.05$ (vs cont)。

Figure 3 γ +PPRElucU20S 細胞における pio・beza・tel 添加後の PPAR γ 活性化

γ +PPRElucU20S 細胞 (A) と PPRElucU20S 細胞 (B、対照実験) に各薬剤を 24 時間添加した後の、ウミシイタケルシフェラーゼ値で補正したホタルルシフェラーゼの値を示した (n = 4)。A、B とも薬剤非添加群 (cont) の平均値を 1.0 とした。各カラムは平均値 \pm 標準偏差を示す。* $p < 0.05$ (vs cont)。† $p < 0.05$

(有意な高値、pio 非投与・pio 1×投与・pio 10×投与の各 7 条件内で vs 最左群)。‡ $p < 0.05$ (有意な低値、pio 非投与・pio 1×投与・pio 10×投与の各 7 条件内で vs 最左群)。

Abstract (244 words)

Background

Pioglitazone (pio) exerts its antidiabetic action by activating PPAR γ . Bezafibrate (beza, an antidyslipidemic drug) and telmisartan (tel, an antihypertensive drug) are also known to weakly activate PPAR γ , and clinically either drug can be prescribed along with pio. However, it is unclear how the activation of PPAR γ by pio can be affected by co-administration of beza and/or tel. Thus, we aimed to investigate the effects of beza and/or tel on pio-induced PPAR γ activity in cultured cells.

Methods

Cells were treated with pio, with or without beza and/or tel, and the following were measured: 1) mRNA levels of endogenous PPAR γ -dependent genes (*PTEN* and *CD36*) in HuH7 cells, after 48-h treatment, 2) Luciferase activity in HuH7 cells transiently transfected with a PPAR γ -responsive firefly luciferase gene, after 24-h treatment, and 3) Luciferase activity in U2OS cells stably expressing both human PPAR γ and a PPAR γ -responsive firefly luciferase gene, after 24-h treatment.

Results

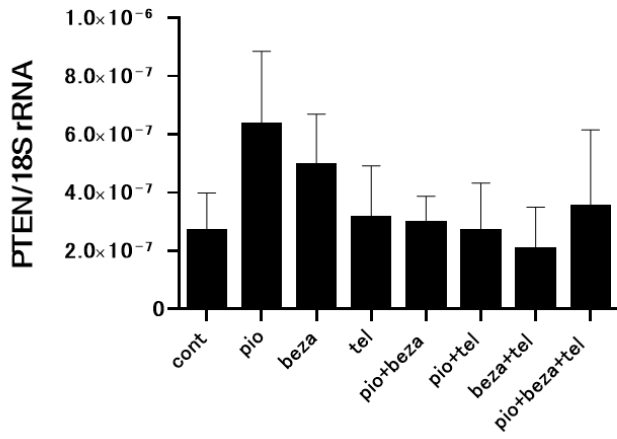
1) *PTEN* and *CD36* mRNA expression levels were not significantly affected by pio, beza, and/or tel. 2) Luciferase activity was elevated by pio, but unaffected by co-treatment with beza and/or tel. 3) Pio-induced luciferase activity was observed, which was significantly increased and decreased by concomitant treatment with beza and tel, respectively.

Conclusions

In our reporter gene assays using U2OS cells, pio-induced PPAR γ activity was enhanced and reduced by beza and tel, respectively. Depending on cell types and genes, the action of pio might be modified by co-administration of other PPAR γ -activating drugs such as beza and tel.

Figure 1

A HuH7細胞 *PTEN*



B HuH7細胞 *CD36*

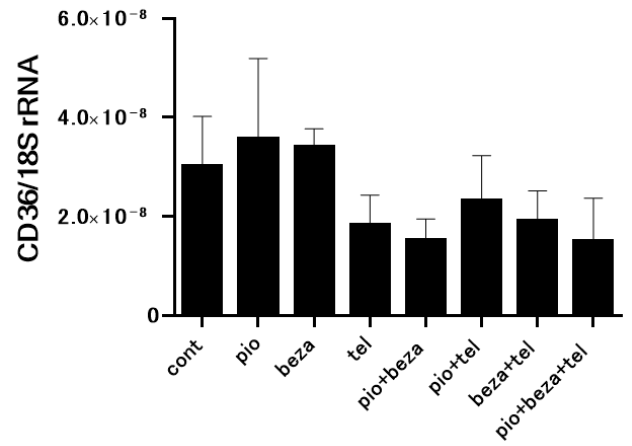
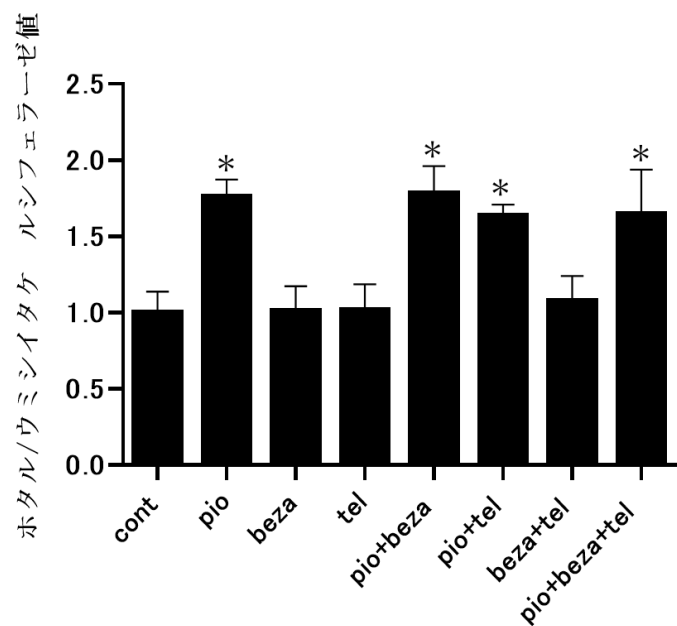


Figure 2

A 4PPRE-pGL4.26を導入したHuH7細胞



B pGL4.26を導入したHuH7細胞

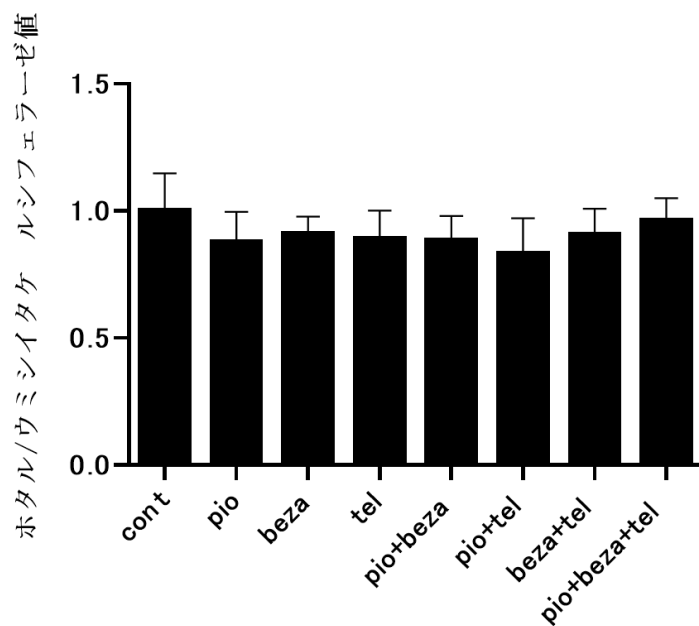
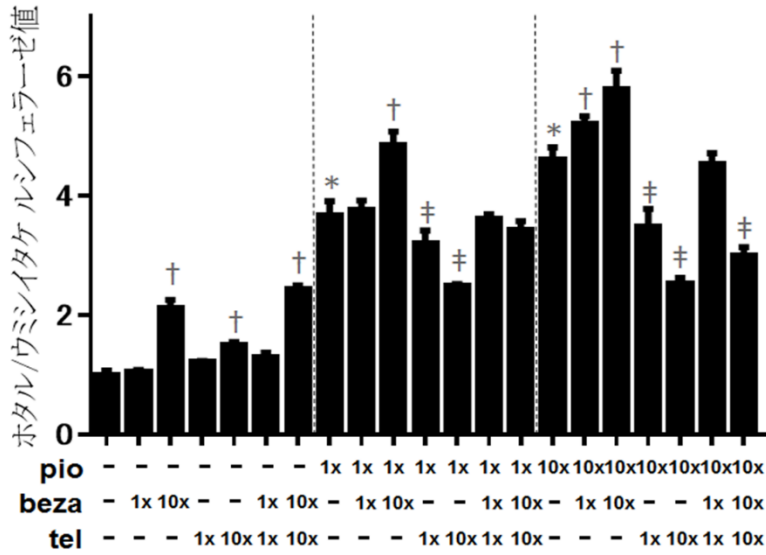


Figure 3

A γ +PPRElucU2OS細胞



B PPRElucU2OS細胞

