

カルシウム拮抗薬アゼルニジピンの3T3-L1脂肪細胞における インスリン感受性改善効果

辰巳 文則

川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 長時間作用型ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬アゼルニジピン (AZE) は、ヒトや実験動物において、降圧効果に加えて、アディポサイトカイン分泌改善、インスリン抵抗性改善などの効果を示すと報告されているが、その機序は未だ不明である。本研究では、培養3T3-L1脂肪細胞を用いて、脂肪細胞のインスリン感受性やアディポネクチン分泌に対する AZE の効果を解析し、その分子メカニズムについて検討を加えた。

3T3-L1脂肪細胞を AZE (50 nM) で24時間刺激すると、インスリン反応性ブドウ糖輸送能および脂肪細胞からのアディポネクチン分泌の有意な増加を認めたと、脂肪細胞分化や脂肪細胞分化関連遺伝子発現には影響はみられず、PPAR γ 活性化を介さない経路によるものであることが示唆された。また、これらの効果は、対照薬として用いたニフェジピン (NIF) (100 nM) による処理では認められなかったことより、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の class effect ではなく、AZE に固有の性質であると考えられた。3T3-L1脂肪細胞の AZE 処理によるアディポサイトカイン遺伝子発現を解析したところ、アディポネクチン遺伝子発現の有意な増加を確認したが、レプチン、レジスチン、MCP-1、TNF- α の発現に有意な影響は認めなかった。一方、酸化ストレス関連の遺伝子発現解析において、NADPH oxidase subunit である p22^{phox}、p67^{phox} 遺伝子の発現は有意に低下し、抗酸化酵素である SOD1 や Catalase の遺伝子発現が有意に増加していた。以上の結果より、AZE の脂肪細胞におけるインスリン感受性増強、アディポネクチン分泌増加作用には、抗酸化作用を介したアディポネクチン遺伝子発現亢進が関連している可能性が示唆された。

(平成23年10月24日受理)

キーワード：アゼルニジピン、アディポサイトカイン、インスリン感受性、酸化ストレス、脂肪細胞、肥満

緒言

近年、生活習慣の西洋化などを背景として、肥満患者や2型糖尿病患者数が世界規模で急増し、大きな社会問題となっている^{1,2)}。脂肪組織はそもそも生体におけるエネルギー貯蔵庫であると理解されてきたが、最近の研究により、最大の内分泌臓器としての役割を担っているこ

とが明らかとなってきた。脂肪細胞から分泌されるさまざまな生理活性物質は、総称してアディポサイトカインと呼ばれ、特にアディポネクチンは抗炎症、インスリン感受性亢進、抗動脈硬化作用を有する代表的なアディポサイトカインとして知られている。肥満は脂肪細胞の肥大化と増加により、アディポサイトカイン分泌

別刷請求先
辰巳文則
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学

電話：086 (462) 1111
ファックス：086 (464) 1046
Eメール：tat@med.kawasaki-m.ac.jp

異常をもたらすとともに、酸化ストレスや炎症を生じ³⁻⁵⁾、脂肪組織のみならず全身のインスリン抵抗性、糖代謝異常の大きな原因の一つとなることが明らかとなっており^{6,7)}、さらに、肥満に伴うこれらの変化が心血管疾患や脳卒中などの動脈硬化性疾患の発症・進展に強く関連することが示されている^{8,9)}。また、肥満や2型糖尿病は同じく動脈硬化性疾患のリスクファクターである高血圧症、脂質異常症、脂肪肝症を高頻度に合併するため、糖代謝のみならず、血圧、脂質代謝、肥満などのすべてのリスク因子に対する積極的な集約的治療の重要性が喚起されている¹⁰⁾。

糖尿病合併高血圧症への薬物治療にはレニン・アンジオテンシン系拮抗薬やカルシウム拮抗薬の使用が推奨されている¹¹⁾。カルシウム拮抗薬の中でも、長時間作用型ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬 (dihydropyridine calcium channel blockers: DHPs) は広く使用されており、アゼルニジピン (AZE) はこれに含まれる。AZE は脂溶性の高さ、作用時間の長さ、L型カルシウムチャンネルへの特異性のほか¹²⁾、DHPsの中でも心拍数増加を伴わない降圧効果をもつことを特徴とする¹³⁾。また、AZEの投与による心筋梗塞後の心筋リモデリングや脳卒中後の神経障害^{14,15)}、高血圧性や糖尿病性の腎機能障害の予防効果など^{16,17)}、多面的な効果が報告されている。さらに、近年の報告で、ヒトへのAZE投与によって、血中アディポネクチン濃度の増加や^{18,19)}、全身のインスリン感受性を改善する可能性が示唆されている²⁰⁾。これらの報告は、AZEの脂肪細胞に対する直接作用を示唆するものと考えられるが、脂肪細胞におけるAZEの効果とその分子メカニズムについては報告されていない。

本研究では、培養3T3-L1脂肪細胞を用いてインスリン感受性、アディポサイトカイン分泌に対するAZEの直接作用を解析し、その分子生物学的機序について検討を加えた。

材料と方法

3T3-L1細胞の培養と脂肪細胞分化

マウス3T3-L1線維芽細胞 (Human Science Research Resources Bank, 大阪, 日本) を、10%胎児仔ウシ血清 (fetal bovine serum; FBS)、1%ペニシリン / 0.5 mg/dl ストレプトマイシン (GIBCO, Langley, OK, USA) を添加したDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma chemical, St. Louis, MO, USA) 中で、37°C、5%CO₂の環境下で培養を行った。細胞がコンフルエント状態に達したことを確認後、2日間培養を行い、5 μM インスリン、0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX)、0.25 μM デキサメサゾンを追加したDMEM/10% FBS中で72時間培養し、脂肪分化誘導を行った^{21,22)}。各薬剤の脂肪分化への影響を検討する実験では、分化誘導開始時より8日間、50 nM AZE、対照薬として100 nM ニフェジピン (NIF)、2.5 μM ピオグリタゾンを経験して追加した。尚、ピオグリタゾンは強力な脂肪細胞分化促進作用を有する陽性対照として用いた。そのほかの検討では分化誘導開始後8~14日目の成熟脂肪細胞を使用。血清無添加のDMEMに、50 nM AZE、100 nM NIFをそれぞれ追加し、2もしくは24時間刺激を行い (2時間刺激実験では血清無添加DMEMで22時間培養後に薬剤を添加)、以下の実験に供した。対照は、同量のdimethylsulfoxide (DMSO) を使用した。

形態学的観察

分化誘導後8日目の3T3-L1脂肪細胞を10%パラホルムアルデヒド (室温, 30分間) で固定後、Oil Red O 溶液 (Sigma-Aldrich, 東京, 日本) 中に10分間室温孵置し、中性脂肪滴の染色を行った。リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline (PBS); 10 mM phosphate buffer, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl; Sigma P4417) (pH7.4) で洗浄後、細胞の100%メタノール抽出液の吸光度 (570 nm) を測定し、トリグリセリド蓄積量を半定量化した。

細胞生存率はCellQuanti-3-[4,5-dimethylthiazol

-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)TM Cell Viability Assay Kits (BioAssay Systems, Foster City, CA, USA) を用いて評価した。細胞数及び面積は ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて測定した。

2-deoxy-D-[³H]-Δ3, 4-glucose uptake

[³H] で標識したグルコースを用いて、3T3-L1 脂肪細胞へのインスリン感受性糖取込み能に対する薬剤介入による影響を検討した。血清無添加の培養液に各薬剤を添加して22時間培養後、各薬剤を添加した Krebs-Ringer phosphate (KRP) buffer (12.5 mM HEPES, 120 mM NaCl, 6.0 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.0 mM CaCl₂, 0.4 mM NaH₂PO₄, 0.6 mM Na₂HPO₄) (pH7.4) で2時間孵置し、一方には100 nM インスリンによる刺激を30分間行い、2-deoxy-D-[³H]-Δ3, 4-glucose (1 μCi/well) (GE Healthcare Bio-sciences Co., Buckinghamshire, UK) を含む KRP buffer を用いて37℃、5分間でブドウ糖輸送を測定した。AZE もしくは NIF は、starvation 時およびインスリン添加と同時に加え、ブドウ糖取り込み反応終了まで継続して添加した。100 μM cytochalasin B, 0.3 mM phloretin, 10 mM D-glucose を含む ice-cold PBS にて反応を停止し、10 mM D-glucose を含む PBS で3回洗浄した後に、0.5 N NaCl 800 μl を用いて細胞を可溶化した。得られた抽出液をバイアルに採取し、5 ml に調整後、AccuFLEX Lxc 7400 (ALOKA, 東京, 日本) を用いて各群の radioactivity の測定を行った。インスリン反応性の糖取込み能を評価するため、インスリン存在下の糖取り込み/非存在下の糖取り込み比で評価し、対照群として DMSO を投与した細胞を用いた。

アディポネクチン分泌

3T3-L1 脂肪細胞を各実験条件下で培養後、培養液を1,000 rpm で30秒間遠心し、得られた上清を用いて、Adiponectin ELISA kit (Otsuka Pharm., Co., Ltd., 東京, 日本) にて培養液中のアディポネクチン濃度を測定し、対照群と比較

検討した。

Real-time RT-PCR 法

成熟3T3-L1脂肪細胞を PBS で洗浄後、全細胞を採取し RNeasy lipid tissue mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA から mRNA 2 μg 相当を TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて逆転写反応させ、cDNA を作成した。RT-PCR は Gene Amp1 PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用し、25℃ 10分、37℃ 60分、37℃ 60分、85℃ 0.05分増幅反応を行った。Real-time PCR には SYBR Green (Takara, 滋賀, 日本) を用い、7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用し、Stage1 (50℃ 2分)、Stage2 (95℃ 10分)、Stage3 (95℃ 15秒、60℃ 1分) 40サイクルで行った。内部対照として36B4を用いて遺伝子発現を定量化し、2^{-ΔCT} を計算した。

使用した primer の塩基配列 (順に sense strand, antisense strand) を以下に示す。

p27^{phox} 5' -TGGCTACTGCTGGACGTTTCAC, 5' -CTCCAGCAGACAGATGAGCACAC;
p67^{phox} 5' -ACTACTGCCTGACTCTGTGGTGTG A, 5' -CTGAGGCTCCGTAGTCTGCTTACTG;
Superoxide dismutase 1 (SOD1) 5' -GGCCCG GCGGATGA, 5' -CCGTCCTTTCCAGCAGTCA;
Catalase 5' -GCTGAGAAGCCTAAGAAC GCAAT, 5' -CCCTTCGAGCCATGTG;
Adiponectin 5' -CGGCAGCACTGGCAAGTT, 5' -CCGTGATGTGGTAAGAGAAGTAGTAGA;
Leptin 5' -AACCTCATCAAGACCATTGTCA, 5' -CCTCTGCTTGGCGGATACC;
Tumor necrosis factor (TNF-α) 5' -CACAAAGATG CTGGGACAGTGA, 5' -TCCTTGATGGTGGTG CATGA;
Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 5' -C TTCCTCCACCACCATGCA, 5' -CCAGCCGG CAACTGTGA;

AP2 5'-AAAGACAGCTCCTCCTCGAAGGTT,
5'-TGACCAAATCCCCATTACGC
36B4 5'-TTCCAGCTTTGGGCATCA, 5'
-ATGTTACAGCATGTTACAGCAGTGTG

統計学的手法

全てのデータは平均±標準誤差 (mean ± SEM) で表記した。群間の比較は Kruskal-Wallis test を、多重比較には Tukey test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計検定には StatView- ver. 5 (SAS, NC, USA) を使用した。

結果

動物あるいはヒトで報告されている AZE 投与による全身性インスリン感受性の改善効果における脂肪細胞の影響を検討する目的で、培養脂肪細胞のモデルとして汎用されている 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、分子細胞生物学的検討を加えた。具体的には、3T3-L1 線維芽細胞をコンフルエント状態まで培養後、常法に従ってインスリン、isobutylmethylxanthine (IBMX)、デキサメサゾン を 3 日間添加して脂肪分化誘導し、分化誘導後 8-14 日目の成熟脂肪細胞を用いて以下の実験を行った。

なお、以下の実験に先行して 3T3-L1 脂肪細胞において AZE、NIF の濃度検定を行い、1~500 nM の濃度範囲で (両薬剤のヒト血漿中濃度を含む) 形態学的に細胞分化・増殖を評価し、細胞の viability に有意な影響がないことを確認した上で、ヒトでの使用時の血漿中濃度に従って AZE 50 nM、NIF 100 nM をそれぞれ使用することとした。

アゼルニジピンの脂肪細胞インスリン感受性に対する作用

脂肪細胞へのブドウ糖取り込み活性は、インスリン刺激により有意な増加を示し、その magnitude が脂肪細胞のインスリン感受性指標の一種と理解されている。本研究では、3T3-L1 脂肪細胞へのブドウ糖取り込み能のインスリンによる活性化の magnitude に対する AZE による影響を、2-deoxy-D-[³H]- Δ 3, 4-glucose を用いて測定した。

AZE 非添加の対照細胞では、100 nM インスリン 30 分間の刺激により、非刺激時と比べて約 2.46 倍のブドウ糖輸送活性の増加が認められた ($p < 0.05$, vs. 対照群 - インスリン非刺激時)。50 nM AZE 24 時間の添加により、インスリン刺激時のブドウ糖輸送活性は約 3.55 倍に増加した ($p < 0.05$, vs. 対照群 - インスリン刺激時)。一方、100 nM NIF 刺激では、相加的なブドウ糖輸送活性増強効果を認めなかった (表 1)。

以上、培養 3T3-L1 脂肪細胞を用いた検討により、AZE による全身のインスリン感受性改善効果の少なくとも一部は、脂肪細胞でのインスリン感受性改善によってもたらされるものであることが明らかとなった。

アゼルニジピンのアディポネクチン分泌に対する作用

AZE によってもたらされた脂肪細胞のインスリン感受性増強効果の機序を検討する目的で、脂肪細胞からのアディポネクチン分泌に対する AZE の影響を検討した。アディポネクチンは脂肪細胞内で合成され分泌されるアディポサイトカインの一種であるが、その合成や分泌は脂肪細胞および全身のインスリン感受性と密

表 1 インスリン感受性ブドウ糖輸送に対するジドロピリジン系カルシウム拮抗薬の影響

	対照	AZE	NIF
Fold increase (insulin/basal)	2.46 ± 0.11	3.55 ± 0.24 *	2.30 ± 0.46

各薬剤を添加した FBS 無添加培養液 (DMEM) で 22 時間培養後、各薬剤を含む KRP buffer で 2 時間孵置し、一方をインスリン刺激後 (100 nM, 30 分)、37°C で 5 分間の 2-deoxy-D-[³H]- Δ 3, 4-glucose (1 μ Ci/well) 輸送を測定。AZE もしくは NIF は、反応終了まで継続して添加した。100 μ M cytochalasin B, 0.3 mM phloretin, 10 mM D-glucose/PBS にて反応を停止後、0.5 N NaCl で可溶化し、液体シンチレーションカウンターにて radioactivity を測定。インスリン存在下の糖取り込み/非存在下の糖取り込み比を示す。AZE: アゼルニジピン, NIF: ニフェジピン (n=6, *: $p < 0.05$ vs. 対照群)

接に関連している。すなわち、良質な（インスリン感受性が良好で小型の）脂肪細胞からは十分なアディポネクチン分泌がみられ、脂肪細胞から分泌されたアディポネクチンは筋、血管、脂肪細胞自身などにはたらき、良好な糖・脂質代謝の形成、抗動脈硬化に作用する。AZEにより、脂肪細胞のアディポネクチン分泌が刺激された結果、脂肪細胞自身のインスリン感受性が改善した可能性を考慮し、以下の実験を行った。

成熟3T3-L1脂肪細胞を50 nM AZE または100 nM NIF を添加した培養液中で、2時間または24時間培養を行い、その間に培養液中に分泌されたアディポネクチン濃度を測定した。両群とも2時間刺激では培養液中のアディポネクチン濃度に変化は認めなかったが、24時間刺激後AZE投与群では対照群に比較して約1.3倍のアディポネクチン分泌の増加を認めた ($p < 0.05$)。一方、NIFによる24時間刺激では、アディポネ

クチン分泌に変化を認めなかった (表2)。

以上より、AZEは脂肪細胞においてアディポネクチン分泌を刺激することが明らかとなったが、これはDHPsに共通するclass effectではなく、AZEに特異的な性質である可能性が示唆された。

アゼルニジピンの脂肪細胞分化への影響

脂肪細胞からのアディポネクチン分泌増加のメカニズムとしては、(1)脂肪細胞分化の亢進による脂肪細胞サイズの小型化と細胞数の増加、(2)アディポネクチン遺伝子発現の増加、のいずれかもしくは両者が関与するものと考えられる²³⁾。AZEの脂肪細胞分化に対する影響を検討する目的で、3T3-L1線維芽細胞の脂肪分化に際し、通常分化誘導薬に加えてAZE、NIFを添加し、形態学的観察によりその分化促進効果を検討した。陽性かつ強力な脂肪細胞分化促進作用を有するチアゾリジン誘導体 (2.5

表2 ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の3T3-L1脂肪細胞アディポネクチン分泌に対する影響

	対照	AZE	NIF
2時間	1	1.01 ± 0.07	0.92 ± 0.06
24時間	1	1.30 ± 0.17*	1.01 ± 0.13

50 nM AZE, 100 nM NIF で刺激した3T3-L1脂肪細胞の培養上清を採取し、ELISAにてアディポネクチン濃度を測定。値は対照に対するfold increase (n=10)。AZE：アゼルニジピン、NIF：ニフェジピン (* : $p < 0.05$ vs. 対照群)

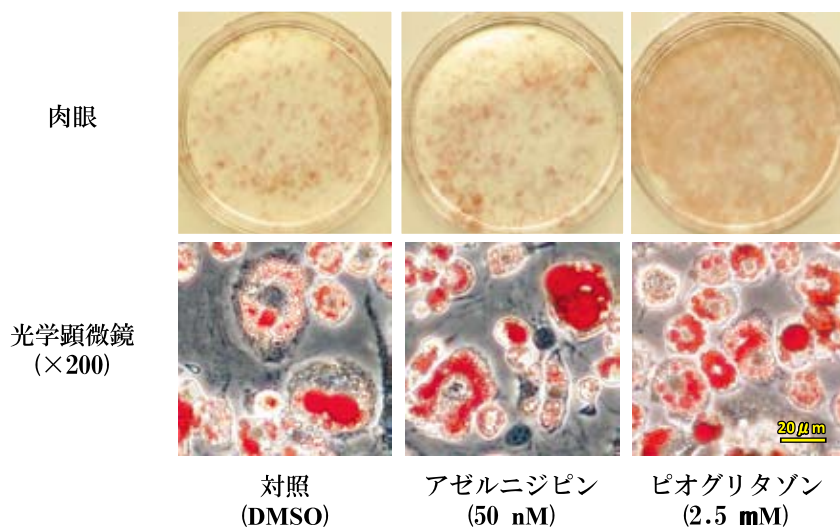


図1 3T3-L1細胞分化に対するアゼルニジピンの作用 (Oil Red O 染色)

上段：肉眼所見，下段：光学顕微鏡増，左：対照細胞，中：アゼルニジピンを投与した細胞，右：ピオグリタゾン投与した細胞。

μM ピオグリタゾン) を陽性対照として使用した。

分化開始後8日目に施行した肉眼的・光学顕微鏡的観察の結果、いずれの細胞も round shape に変化し、細胞質部分に大小の脂肪滴を含む脂肪細胞への分化が確認された。同時に、いずれの条件においても Oil red O により赤染する中性脂肪滴の沈着を認め、成熟脂肪細胞が形成されていることが示された。ピオグリタゾンを追加して分化誘導を行った場合、肉眼的、光学顕微鏡的に、脂肪細胞の有意な小型化と細胞数の増加を認めた(図1, 表3)。一方、AZE もしくは NIF の存在下で分化誘導した場合には、通常のインスリン、IBMX, デキサメサゾンによる分化に比較して、成熟脂肪細胞数および面積には有意差を認めなかった(表3)。また、沈着した中性脂肪滴量を半定量化する目的で、抽出した Oil red O の吸光度を測定したところ、対照群、AZE 刺激、NIF 刺激の間に有意差を認めなかった。

以上より、AZE および NIF は脂肪分化過程には有意な影響を及ぼさないことが示された。

アゼルニジピンのアディポサイトカイン遺伝子発現に対する作用(表4)

次に、AZE 刺激によるアディポネクチン分泌増加が、遺伝子レベルでの作用を介するものかどうかを検討するため、3T3-L1脂肪細胞を 50 nM AZE または 100 nM NIF により24時間処理し、同細胞から mRNA を抽出して Real-time RT-PCR を施行した。50 nM AZE 24時間刺激により、アディポネクチン mRNA は約1.2倍の増加を認めた。一方、100 nM NIF 24時間刺激では、同 mRNA 発現に変化を認めなかった。

また、糖代謝・肥満などへの関与が示唆されているその他のアディポサイトカインに関しても、同様の検討を加えたところ、レプチン、レジスチン、MCP-1 の発現については、AZE、NIF の影響は見られなかった。また、AZE については TNF- α の発現に有意な影響がないことも確認された。

以上より、AZE は、脂肪細胞において、アディポネクチン遺伝子発現の増強を介して、同細胞からのアディポネクチン分泌を増加させることが示された。また、これは、他のアディポサイ

表3 ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬刺激(8日間)による3T3-L1脂肪細胞の形態学的変化

	対照	AZE	NIF	Pio
細胞数	106±12	113±16	101±17	141±9*
細胞面積(μm ²)	594±171	694±161	648±159	346±101*
Oil Red O 吸光度	1	0.98±0.14	1.02±0.03	4.40±0.71*

3T3-L1線維芽細胞を、5 μM インスリン、0.5 mM IBMX、0.25 μM デキサメサゾンおよび各薬剤の存在下で分化誘導し、分化誘導後8日目の細胞数及び面積を ImageJ を使用して測定。成熟3T3-L1脂肪細胞は、10% パラホルムアルデヒド(室温、30分間)で固定後、Oil Red O 染色し、100% メタノール抽出液の吸光度(570 nm)の測定によりトリグリセリド蓄積量を半定量化した。Oil Red O 吸光度は対照に対する fold increase。AZE: アゼルニジピン、NIF: ニフェジピン、Pio: ピオグリタゾン(陽性対照)(n=8, * : p<0.05 vs. 対照群)

表4 ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬刺激(24時間)による3T3-L1脂肪細胞遺伝子発現

	対照	AZE	NIF
<i>adiponectin</i> mRNA (n=10)	1	1.21±0.03*	1.10±0.06
<i>leptin</i> mRNA (n=4)	1	0.95±0.05	0.89±0.05
<i>resistin</i> mRNA (n=3)	1	1.04±0.09	1.00±0.12
<i>TNF-α</i> mRNA (n=5)	1	0.81±0.19	
<i>MCP-1</i> mRNA (n=4)	1	0.99±0.03	0.86±0.05
<i>AP2</i> mRNA (n=3)	1	1.03±0.04	0.99±0.03

成熟3T3-L1脂肪細胞より total RNA を抽出後、mRNA 2 μg 相当より逆転写反応にて cDNA を作成し、SYBR Green にて Real-time PCR を施行した。内部対照として36B4を用い、2^{-ACT} を計算した。値は対照に対する fold increase。AZE: アゼルニジピン、NIF: ニフェジピン(* : p<0.05 vs. 対照群)

トカイン発現や分泌に影響しない、アディポネクチンを特異的なターゲットとした作用であることが示唆された。

アゼルニジピンの脂肪細胞酸化ストレス改善作用

以上の結果より、AZE 投与は3T3-L1脂肪細胞のインスリン感受性、アディポネクチン遺伝子の発現を増強することが示されたが、チアゾリジン誘導体によってもたらされる同様の効果とはその機序が異なり、脂肪細胞分化促進すなわち PPAR γ の活性化を伴わないものであることが示唆された。そこで、AZE についてヒトで報告されている抗酸化作用が、脂肪細胞のレベルでも発揮されており、細胞レベルでの酸化ストレスへの効果がインスリン感受性の改善に関与している可能性を考慮し、検討を行った。

成熟3T3-L1脂肪細胞を50 nM AZE または100 nM NIF で24時間刺激後に RNA を抽出し、酸化ストレス関連遺伝子の発現について DMSO を投与した対照群と比較検討を行ったところ、NADPH oxidase subunit である $p22^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ mRNA 発現は、AZE の投与による有意な抑制が認められたが (n=4, p<0.05, vs. 対照群)、NIF 投与はこれらの遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。また、抗酸化酵素である *SOD1*、*Catalase* mRNA の発現は AZE の投与による有意な上昇を示した (n=4, p<0.05, vs. 対照群) (表5)。以上より、AZE は脂肪細胞において抗酸化作用を有すること示されたが、この作用についても、DHPs に共通する class effect ではなく、AZE に特異的な性質である可能性が示された。

また、脂肪細胞での酸化ストレスの軽減が、インスリン感受性改善に影響を及ぼす可能性が示唆された。

考 察

アンジオテンシン II 受容体拮抗薬に、脂肪細胞小型化作用を認めるとの報告があり、低レベルながら脂肪細胞での peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ 活性化がインスリン感受性改善に関与する可能性が示唆されている²⁴⁾。また長時間作用型ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬 AZE をヒトに投与した場合、循環血中アディポネクチンの増加が認められるとの報告がある¹⁸⁾。本研究は、AZE が *in vitro* で脂肪細胞のインスリン反応性ブドウ糖輸送活性改善効果を有すること (表1)、脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を有意に増加させること (表2) を明らかにした。これらの結果は、AZE が脂肪細胞からのアディポネクチン分泌増加を介してインスリン感受性改善をもたらす可能性を示唆するものである。

一般に肥満者では脂肪細胞の肥大化によるアディポサイトカインの分泌調節異常がみられる。すなわち肥大脂肪細胞ではアディポネクチン産生が低下する一方、TNF- α 、Interleukin (IL)-6、MCP-1等の炎症性サイトカインやレジスチン、レプチンの産生が増加する。その結果、インスリンのシグナル伝達が障害され、インスリン抵抗性が惹起される²⁵⁻²⁷⁾。インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体は、核内受容体 PPAR γ のリガンドとして、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ を活

表5 脂肪細胞の酸化ストレス関連遺伝子発現に対するジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の影響

	対照	AZE	NIF
$p22^{phox}$ mRNA (n=4)	1	0.81 ± 0.09 *	0.98 ± 0.06
$p67^{phox}$ mRNA (n=4)	1	0.76 ± 0.06 *	0.92 ± 0.04
<i>SOD1</i> mRNA (n=4)	1	1.26 ± 0.26 *	
<i>catalase</i> mRNA (n=4)	1	1.23 ± 0.37 *	

成熟3T3-L1脂肪細胞より total RNA を抽出後、mRNA 2 μ g 相当より逆転写反応にて cDNA を作成し、SYBR Green にて Real-time PCR を施行した。内部対照として36B4を用い、 $2^{-\Delta CT}$ を計算した。値は対照に対する fold increase。AZE：アゼルニジピン、NIF：ニフェジピン (*：p<0.05 vs. 対照群)

性化することで脂肪細胞分化の促進とともに、肥大脂肪細胞のアポトーシスが促進され、結果的に脂肪細胞の平均サイズの減少につながる。脂肪細胞の小型化によって、障害されていたアディポサイトカイン合成・分泌調節機構が是正され、これらがチアゾリジン誘導体によるインスリン感受性改善機序として重要視されている²⁸⁾。脂肪細胞におけるアディポネクチンの発現機序としては、リガンド結合により活性化されたPPAR γ が、レチノイドX受容体 (retinoid X receptor: RXR) とヘテロダイマーを形成して、アディポネクチン遺伝子上流に存在するPPAR response element (PPRE 配列) に結合することによって、アディポネクチン遺伝子の転写が活性化される機序が知られている^{29, 30)}。

しかしながら、本研究では、ピオグリタゾンでみられた脂肪細胞分化の促進や脂肪細胞の小型化や成熟脂肪細胞の代表的な分子マーカーであるAP2遺伝子の発現変化は、AZE刺激では認めなかった(図1, 表3, 4)。この結果は、AZEによるアディポネクチン分泌増加が、チアゾリジン誘導体やアンジオテンシンII受容体拮抗薬でみられるPPAR γ 活性化を介したアディポネクチン遺伝子転写の亢進とは、異なるメカニズムによるものであることを強く示唆するものである。これらの一連のAZEによる作用は、他の長時間作用型ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬であるNIFでは認められず、AZEの特有の作用と考えられた。

AZEは降圧作用以外に、ヒト大動脈内皮細胞において7-ketocholesterolやTNF- α 処理による活性酸素種の増加を抑制し、2型糖尿病患者における赤血球膜の過酸化脂質を低下させるなどの、抗酸化効果を有することが報告されている^{31, 32)}。一方、肥満は脂肪組織での酸化ストレスを誘導すること、酸化ストレスによるアディポサイトカイン異常を惹起する経路の存在、c-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化によるinsulin receptor substrate (IRS) - 1のチロシンリン酸化阻害などを介してインスリン抵抗性の一因となることなどが報告されている³³⁻³⁶⁾。培養

脂肪細胞を過酸化水素処理すると、アディポネクチン遺伝子発現低下やplasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 遺伝子発現増加がみられること、低下したアディポネクチン遺伝子発現が抗酸化薬であるN-acetyl-l-cysteine (NAC)投与により回復することも確認されている^{37, 38)}。一方で、気管支平滑筋細胞においてTGF- β 投与による酸化ストレスは炎症性サイトカインIL-6を増加させるが、NAC投与によって改善したとの報告もある³⁹⁾。これらの分子機構の詳細は明らかではないが、本研究においても、AZEは脂肪細胞における酸化ストレス遺伝子発現を抑制し、抗酸化酵素遺伝子の発現を増加させており、AZEによるアディポネクチン分泌増加は、抗酸化効果作用を介する可能性が示唆された。

脂肪細胞におけるアディポネクチン産生・分泌増加機序の主たる経路は、上述のごとく、PPAR γ 活性化によるアディポネクチン遺伝子転写の亢進であり、その際、脂肪分化が促進されるため、同時に脂肪細胞の小型化を伴うものと理解されてきた^{29, 30)}。一方、PPAR γ 活性化を介さずに脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を増加させる経路についての報告も散見され、当教室でも、スルホニル尿素薬グリメピリドが、protein kinase A (PKA) 活性抑制を介してアディポネクチン産生を増加させ、これは脂肪細胞形態の変化を伴わないことを既に報告している²²⁾。また、最近では、PPAR γ による脂肪細胞分化にはcyclin-dependent kinase 5 (Cdk-5)のリン酸化が必要であり、Cdk-5リン酸化能を欠くPPAR γ リガンドを培養脂肪細胞やインスリン抵抗性マウスに投与すると、脂肪細胞でのPPAR γ 発現増加や脂肪分化促進を伴わずに、アディポネクチンの遺伝子発現を増加させることが報告され、注目を浴びている⁴⁰⁾。本研究においても、3T3-L1脂肪細胞に対するAZE投与が、脂肪細胞分化には影響しない経路でアディポネクチン分泌を増加させることが示されており、今後、AZEの脂肪細胞におけるPKA活性化やCdk-5リン酸化などに対する作用や、

抗酸化作用との関連などを含めて、更なる検討が必要と考えられる。

本研究では、培養脂肪細胞のインスリン感受性とアディポネクチン分泌に対する AZE の作用とその分子機序の解析を行った。その結果、他の長時間作用型ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬と異なり、AZE は、脂肪細胞において、インスリン感受性及びアディポネクチン分泌の改善効果を有し、その機序の一部として、脂肪細胞での抗酸化作用が関与する可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御高閲を賜りました川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学教室の加来浩平教授に深甚なる謝意を表します。また、終始多くの御助言を賜りました同教室柱本満講師に、実験遂行にあたり、ご助力いただいた同教室員並びに研究補助員の皆様に深謝申し上げます。

尚、本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金(21591153) および川崎医大プロジェクト研究費(21-501)の援助により行われた。

引用文献

- 1) Aschner P: Metabolic syndrome as a risk factor for diabetes. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 8: 407-412, 2010
- 2) Haffner SM: Relationship of metabolic risk factors and development of cardiovascular disease and diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 14S3: 121S-127S, 2006
- 3) Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB: The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95: 2111-2119, 1995
- 4) Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G: Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E745-E751, 2001
- 5) Wellen KE, Hotamisligil GS: Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119, 2005
- 6) Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB: Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801, 2006
- 7) Shoelson SE, Herrero L, Naaz A: Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132: 2169-2180,

2007

- 8) Maahs DM, Ogden LG, Dabelea D, Snell-Bergeon JK, Daniels SR, Hamman RF, Rewers M: Association of glycaemia with lipids in adults with type 1 diabetes: modification by dyslipidemia medication. *Diabetologia* 53: 2518-2525, 2010
- 9) Iglseider B, Mackevics V, Stadlmayer A, Tasch G, Ladurner G, Paulweber B: Plasma adiponectin levels and sonographic phenotypes of subclinical carotid artery atherosclerosis: data from the SAPHIR Study. *Stroke* 36: 2577-2582, 2005
- 10) Ray KK, Seshasai SR, Wijesuriya S, Sivakumaran R, Nethercott S, Preiss D, Erqou S, Sattar N: Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* 373: 1765-1772, 2009
- 11) 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会, 編: 二次性高血圧. 高血圧ガイドライン 2009. 東京, ライフサイエンス出版. 2009, pp97-112
- 12) Wellington K, Scott LJ: Azelnidipine. *Drugs* 63: 2613-2621; discussion 2623-2624, 2003
- 13) Shokoji T, Fujisawa Y, Kiyomoto H, Rahman M, Sun GP, Fan YY, Kimura S, Kohno M, Abe Y, Nishiyama A: Effects of a new calcium channel blocker, azelnidipine, on systemic hemodynamics and renal sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 28: 1017-1023, 2005
- 14) Nishiya D, Enomoto S, Omura T, Matsumoto R, Kusuyama T, Izumi Y, Iwao H, Takeuchi K, Yoshiyama M: The long-acting Ca²⁺-channel blocker azelnidipine prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci* 103: 391-397, 2007
- 15) Lukic-Panin V, Kamiya T, Zhang H, Hayashi T, Tsuchiya A, Sehara Y, Deguchi K, Yamashita T, Abe K: Prevention of neuronal damage by calcium channel blockers with antioxidative effects after transient focal ischemia in rats. *Brain Res* 1176: 143-150, 2007
- 16) Kurashige T, Abe K, Furusu A, *et al.*: Renoprotective effect of azelnidipine in rats. *Biol Pharm Bull* 31: 2237-4224, 2008
- 17) Nakamura T, Inoue T, Fujiwara N, Kawagoe Y, Sugaya T, Ueda Y, Koide H, Node K: Additional renoprotective effects of azelnidipine combined with angiotensin receptor blockers in patients with diabetic nephropathy.

- Clin Nephrol 70: 385-392, 2008
- 18) Ogawa S, Mori T, Nako K, Ito S: Combination therapy with renin-angiotensin system inhibitors and the calcium channel blocker azelnidipine decreases plasma inflammatory markers and urinary oxidative stress markers in patients with diabetic nephropathy. *Hypertens Res* 31: 1147-1155, 2008
 - 19) Ueshiba H, Yoshino G: Effect of the long-acting calcium channel blocker azelnidipine on insulin resistance and adrenal androgen. *Ther Res* 26: 2327-2332, 2005
 - 20) Iwai M, Li HS, Chen R, *et al.*: Calcium channel blocker azelnidipine reduces glucose intolerance in diabetic mice via different mechanism than angiotensin receptor blocker olmesartan. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1081-1087, 2006
 - 21) Fujimori K, Aritake K, Urade Y: A novel pathway to enhance adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by up-regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase mediated by liver X receptor-activated sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 282: 18458-18466, 2007
 - 22) Kanda Y, Matsuda M, Tawaramoto K, Kawasaki F, Hashiramoto M, Matsuki M, Kaku K: Effects of sulfonylurea drugs on adiponectin production from 3T3-L1 adipocytes: implication of different mechanism from pioglitazone. *Diabetes Res Clin Pract* 81: 13-18, 2008
 - 23) Gustafson B: Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 17: 332-341, 2010
 - 24) Benson SC, Pershad Singh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW: Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension* 43: 993-1002, 2004
 - 25) Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK: Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 54: 2939-2945, 2005
 - 26) Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B: Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2084-2089, 2002
 - 27) Sartipy P, Loskutoff DJ: Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7265-7270, 2003
 - 28) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, *et al.*: The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem* 276: 41245-41254, 2001
 - 29) Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I: Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52: 1655-1663, 2003
 - 30) Kubota N, Terauchi Y, Kubota T, *et al.*: Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 281: 8748-8755, 2006
 - 31) Naito Y, Shimozawa M, Manabe H, Nakabe N, Katada K, Kokura S, Yoshida N, Ichikawa H, Kon T, Yoshikawa T: Azelnidipine, a new calcium channel blocker, inhibits endothelial inflammatory response by reducing intracellular levels of reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol* 546: 11-18, 2006
 - 32) Ohmura C, Watada H, Shimizu T, Sakai K, Uchino H, Fujitani Y, Kanazawa A, Hirose T, Kawamori R: Calcium channel blocker, azelnidipine, reduces lipid hydroperoxides in patients with type 2 diabetes independent of blood pressure. *Endocr J* 54: 805-811, 2007
 - 33) Bloch-Damti A, Potashnik R, Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Rudich A, Bashan N: Differential effects of IRS1 phosphorylated on Ser307 or Ser632 in the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Diabetologia* 49: 2463-2473, 2006
 - 34) Lo YY, Wong JM, Cruz TF: Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* 271: 15703-15707, 1996
 - 35) Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS: A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333-336, 2002
 - 36) Berdichevsky A, Guarente L, Bose A: Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK. *J Biol Chem* 285: 21581-21589, 2010
 - 37) Kamigaki M, Sakaue S, Tsujino I, Ohira H, Ikeda D, Itoh N, Ishimaru S, Ohtsuka Y, Nishimura M: Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res*

- Commun 339: 624-632, 2006
- 38) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-1761, 2004
- 39) Michaeloudes C, Sukkar MB, Khorasani NM, Bhavsar PK, Chung KF: TGF- β regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300: L295-304, 2011
- 40) Choi JH, Banks AS, Kamenecka TM, *et al.*: Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR γ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* 477: 477-481, 2011

Anti-hypertensive Azelnidipine-Induced Improvement of Insulin Sensitivity in 3T3-L1 Adipocytes.

Fuminori TATSUMI

*Division of Diabetes, Endocrinology and Metabolism, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan*

ABSTRACT Azelnidipine (AZE), one of dihydropyridine calcium channel blockers has besides its blood-pressure-lowering effects, actions to improve whole body insulin sensitivity and increase circulating adiponectin levels in human and experimental animal models. However, the molecular mechanisms underlying such metabolic actions remain unknown. In this study, we investigated the effect of AZE upon insulin sensitivity and adiponectin secretion in cultured 3T3-L1 adipocytes to see whether AZE showed direct effects in adipocytes and to analyze the molecular mechanisms involved in the metabolic actions in adipocytes.

We found that AZE (3.55 x by insulin, $p < 0.05$ vs. control), but not nifedipine (NIF) (2.30 x), significantly increased the magnitude of insulin-stimulated glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes, compared with control (2.46 x), suggesting that AZE enhanced insulin sensitivity through its direct action in adipocytes. Furthermore, incubation of cells with AZE (1.30 x, $p < 0.05$ vs. control), but not NIF (1.01 x), over a 24 hour period significantly stimulated adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes. This was associated with significant increases in adiponectin mRNA expression (1.21 x, $p < 0.05$ vs. control), measured by real-time RT-PCR, in 3T3-L1 adipocytes.

Nevertheless, unlike the extremely potent actions of thiazolidinediones upon adipocytes, AZE-induced increase in adiponectin secretion was not associated with acceleration of adipocyte differentiation, and normally along with the activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , and the resultant downsizing of adipocytes, which were demonstrated by morphological analysis of adipose differentiation process in the presence of AZE or pioglitazone.

The expression of other metabolic adipocytokines including leptin, resistin, interleukin-6, tumor necrosis factor- α , and monocyte chemoattractant protein-1 were also neither affected by AZE stimulation. These results suggested that AZE enhanced insulin sensitivity and increased adiponectin secretion in 3T3-L1 adipocytes independently of activation of PPAR γ .

Finally, we investigated the antioxidative effect of AZE in 3T3-L1 adipocytes and found that expression of *p22^{phox}* and *p67^{phox}*, NADPH oxidase subunits, were significantly decreased, in contrast to upregulation of antioxidative enzymes, such as *SOD1* and *catalase*, by stimulation of 3T3-L1 adipocytes with AZE for 24 hours.

In conclusion, these results demonstrated that AZE significantly enhanced insulin sensitivity and increased adiponectin secretion in 3T3-L1 adipocytes, independently of PPAR γ activation, which were unique characteristics of AZE and not a class effect of dihydropyridine calcium channel blockers. In addition to this, we suggest the possibility that antioxidative effects of AZE would be involved in its metabolically preferable actions in adipocytes.

(Accepted on October 24, 2011)

Key words : **Adipocytokine, Azelnidipine, Insulin sensitivity, Oxidative stress, Adipocyte, Obesity**

Corresponding author

Fuminori Tatsumi

Division of Diabetes, Endocrinology and Metabolism,
Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki,
701-0192 Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 464 1046

E-mail : tat@med.kawasaki-m.ac.jp