

学位申請論文

メトホルミンとピオグリタゾンの併用によるヒト培養 横紋筋細胞における遺伝子変化の解析

獨協医科大学 内科学 (内分泌代謝)

清水 裕晶

要 旨 横紋筋細胞におけるピオグリタゾンとメトホルミンの単独, 及び併用投与時の遺伝子変化について解析した. 最初に, ヒト横紋筋由来の A673 細胞に対して, 1 mM のメトホルミンと 10 μ M のピオグリタゾンの単独投与群と両剤併用群を作成し一日培養後, 各群にマイクロアレイを施行した. 対照と比較し, 単独及び, 併用投与時には 1000 個を超える遺伝子で 2 倍以上の発現を認めた. 単独投与で発現が増加し, 併用で更に増加した遺伝子群を抽出して階層型クラスター解析と優位機能 Pathway 解析を施行したところ, 階層型クラスター解析では, 単独時と比較して, 併用時で有意なミトコンドリア β 酸化回路の活性化を認めた ($p < 0.05$). また優位機能 Pathway 解析では, CPT-1A を含む β 酸化関連遺伝子の活性化を認めた. 本研究において, 両剤の併用は横紋筋細胞の β 酸化回路を賦活化して, より脂肪燃焼・抗肥満的に作用する可能性が示唆された.

Key Words : 糖尿病, 横紋筋細胞, ピオグリタゾン, メトホルミン, DNA マイクロアレイ

緒 言

ピオグリタゾンとメトホルミンはインスリン抵抗性を主病態とする 2 型糖尿病患者の薬物療法として単独, もしくはしばしば併用して使用されている. 近年, Nathan K. や Barbara B. らはピオグリタゾンが横紋筋において Peroxisome proliferators-activated receptor (以下 PPAR と略す) の部分作動薬として横紋筋細胞の β 酸化回路の賦活化に作用すると報告している^{1,2)}. また, Suwa M. らはメトホルミンが PPAR- γ co-activator-1 α (以下 PGC-1 α と略す) 発現を増加し, 横紋筋のミトコンドリア β 酸化を促進すると報告しており³⁾, 各々の薬剤の作用として, 横紋筋における β 酸化の賦活化が脂肪燃焼的に作用する結果, インスリン抵抗性の改善につながると考えられている. 加えて, 実際の臨床において, 2 型糖尿病患者の治療の一環として運動療法が積極的に導入されている根拠として, 筋細胞は脂肪細胞, 肝細胞と並ぶインスリン感受性臓器の一つであり, 内臓脂肪が運動時の骨格筋のエネルギー源として利用される結果,

インスリン抵抗性が改善すると考えられている.

上述のように, ピオグリタゾン及びメトホルミンの単剤投与による横紋筋細胞内の遺伝子変化に対する知見は様々に報告されている. また, 臨床的にはその効果の増強を期待して両薬剤が併用される機会は多いが, 両薬剤併用による横紋筋細胞の遺伝子変化を単独投与の場合と比較し, インスリン抵抗性改善効果のメカニズムについて論じた報告は少ない. 今回我々は両薬剤の単独投与よりも併用投与時に更に発現が増した遺伝子群を抽出し, それら遺伝子群の主な機能変化や相互作用の詳細を調べることで, 横紋筋に対する両薬剤共通の作用機序・作用点を解明できると仮定した. 方法として DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化を全網羅的に調べることによって, 培養横紋筋細胞における両薬剤の単独投与時と併用時の遺伝子変化の違いについて解析した.

方 法

使用した細胞株及び試薬 : A673 細胞はヒト横紋筋肉腫から, WRL68 はヒト胎児肝より確立された培養細胞株であり, いずれも European Collection of Cell Cultures ; Wiltshire, UK より入手した⁴⁻⁶⁾. これら細胞株の培地としては 10% ウシ胎仔血清 (FCS), ペニシリン-ストレプトマイシンを加えた Dulbecco's Modified Eagles Medium を用いた. メトホルミンの溶媒には滅菌蒸

平成 21 年 10 月 22 日受付, 平成 21 年 12 月 3 日受理
別刷請求先: 清水裕晶

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880
獨協医科大学 内科学 (内分泌代謝)

留水を用いて溶解し1Mの溶液を、ピオグリタゾンにはジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解して10mMの溶液を作成した。

研究方法: A673細胞を、培地として10%ウシ胎仔血清 (FCS), ペニシリン-ストレプトマイシンを加えた Dulbecco's Modified Eagles Medium を用いて37°C, 5% CO₂ 存在下で一週間培養した。それら培養細胞の浮遊液濃度を $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^4$ cells/dish になるよう、上述と同組成の培地で希釈し、滅菌処理済培養シャーレ (94 × 16 mm) 4枚に約20 ml ずつ播種して更に一週間培養した。4つのシャーレ内の細胞が集密的 (confluent) に生育したことを確認した後、それらの内、コントロール群には2 μl のDMSOのみを加え、メトホルミンは1 mM に、ピオグリタゾンは10 μM になるように各々の溶液 2 μl ずつを単独に添加した群と両方添加した群のあわせて4群に分けて培養した。24時間後、各々からRNAを抽出して全群についてDNAマイクロアレイを施行し、コントロール群と比較して単独添加群で発現が増加し、かつ両剤併用で更に増加した遺伝子群を抽出した。今回薬剤濃度を単独濃度のみで用いた理由として、ピオグリタゾンと同じチアゾリジン誘導体であるトログリタゾンでは、肥満ラットの単離筋での食餌負荷に対するCO₂ 産生が0.63~10 μM で濃度依存性に増加したとする報告や¹⁾、メトホルミンについてもラット肝における脂肪酸酸化の亢進が20~2000 μM の間で濃度依存的であったとする報告などに基き決定した⁷⁾。今回、DNAマイクロアレイとしてMicroarray Data Analysis Tool Version 3.0 (Filgen Inc.) を用いて解析を行った。マイクロアレイに関して統計的処理は行わず、コントロール群と比較して2.0倍以上の発現を有意な発現として、Fold Change (FC) 法を用いて遺伝子検索を行った。DNAチップはHuman OpArrayTM (Operon Biotechnologies, Inc.) を用いた。それら遺伝子群に対し、階層型クラスター解析と、優位機能Pathway解析を行って遺伝子の機能変化について検索し、有意な変動を示した上位Pathwayとその制御遺伝子の詳細を調べた。上位Pathway内で、有意な発現増加を認めた遺伝子が両剤併用の際に特異的に変動する遺伝子であると考え、遺伝子発現の再現性を確認する目的で、A673細胞をマイクロアレイの際と同条件で培養し、以下に記載するRT-PCR法を用いて個々の遺伝子の発現について調べた。薬剤投与による遺伝子発現が横紋筋細胞特異的な変動であるかについて確認するために、同じインスリン感受性臓器である肝臓由来のWRL68を用い、同条件で培養して比較した。

RT-PCR法を用いた遺伝子発現の同定: RT-PCR法

表1 PCRで使用した各種ミトコンドリアβ酸化関連遺伝子のプライマー配列

Up-regulated genes		Primer sequences (5'→3')
ACSL3	(F)	³¹⁹⁰ tcttgtgaatatatgcctgtcagtg ³²¹⁴
	(R)	³⁶³⁹ cgcatcagtgcaactagtaa ³⁶¹⁹
ACADM	(F)	¹⁰⁸³ gaagctaccaagatgcccctgaa ¹¹⁰⁶
	(R)	¹⁵¹² ggagctgaaacagtgctgtg ¹⁴⁹¹
EHHADH	(F)	¹⁶⁰⁵ gttgatgtggctgaaatcta ¹⁶²⁷
	(R)	²⁰⁴⁴ gcaaccaactgtggaagca ²⁰²⁵
HADHA	(F)	²¹⁵³ ttccgctgtgacaagatt ²¹⁷²
	(R)	²⁵⁷⁶ tggtcttgctgaagcact ²⁵⁵⁷
CPT-1A	(F)	¹³⁸²⁹⁷⁵² cagatgccggctcaccacctg ¹³⁸²⁹⁷³³
	(R)	¹³⁸²⁹⁴³⁵ acagttcagccatcgtgtg ¹³⁸²⁹⁴⁵⁵

表の5つの遺伝子は、ミトコンドリア脂肪酸β酸化Pathwayを構成し、ピオグリタゾンとメトホルミンの共投与により有意にその発現が増加した。これらの遺伝子についてOLIGO primer analysis software (Takara) を用い、イントロン相同性プライマーを設計した。設計条件として、生物種Homo sapiens, 目的の配列はGen Bankをデータベースに、primer長が約20塩基程度になるよう設計し、これらの遺伝子をPCR法で増幅した。

を用いて総量5 μg RNAを逆転写酵素を用いて増幅した。本研究では特にPathway解析で発現変動した、CPT-1A, ACSL3, ACADM, HADHA, EHHADHなどのβ酸化回路関連遺伝子群を選んで、その発現を調べるために、個々の遺伝子に対するイントロン相同性のプライマーを用いてcDNAを増幅した(表1)。増幅反応は95°Cで1分間、55°Cで1分間、72°Cで2分間に続き、72°Cで10分間の増長反応を計30サイクル施行した。PCR産物はエチジウムブロマイド染色した後、2%アガロースゲルで電気泳動を行って検出した。培養細胞における、個々の遺伝子の発現変動や発現比を定量化するため、βアクチンをポジティブコントロールとして用いた。PCR産物の電気泳動写真における各遺伝子のバンド輝度とベータアクチンのバンド輝度の比をImage-Jを用いて計算し、発現変動を定量評価した。統計解析はJMP7 (SAS Institute Inc., Cary NC) を用いてt-検定を行い、P値は0.05以下を統計的に有意とした。

結 果

DNAマイクロアレイにより37,584個の遺伝子をほぼ全網羅的に解析した。2.0倍以上のUp-regulationを有意な遺伝子の発現と定め、発現変動した遺伝子を抽出したところ、コントロールと比較し、10 μMのピオグリタゾン単独投与で2,243個、1 mMのメトホルミン単独で

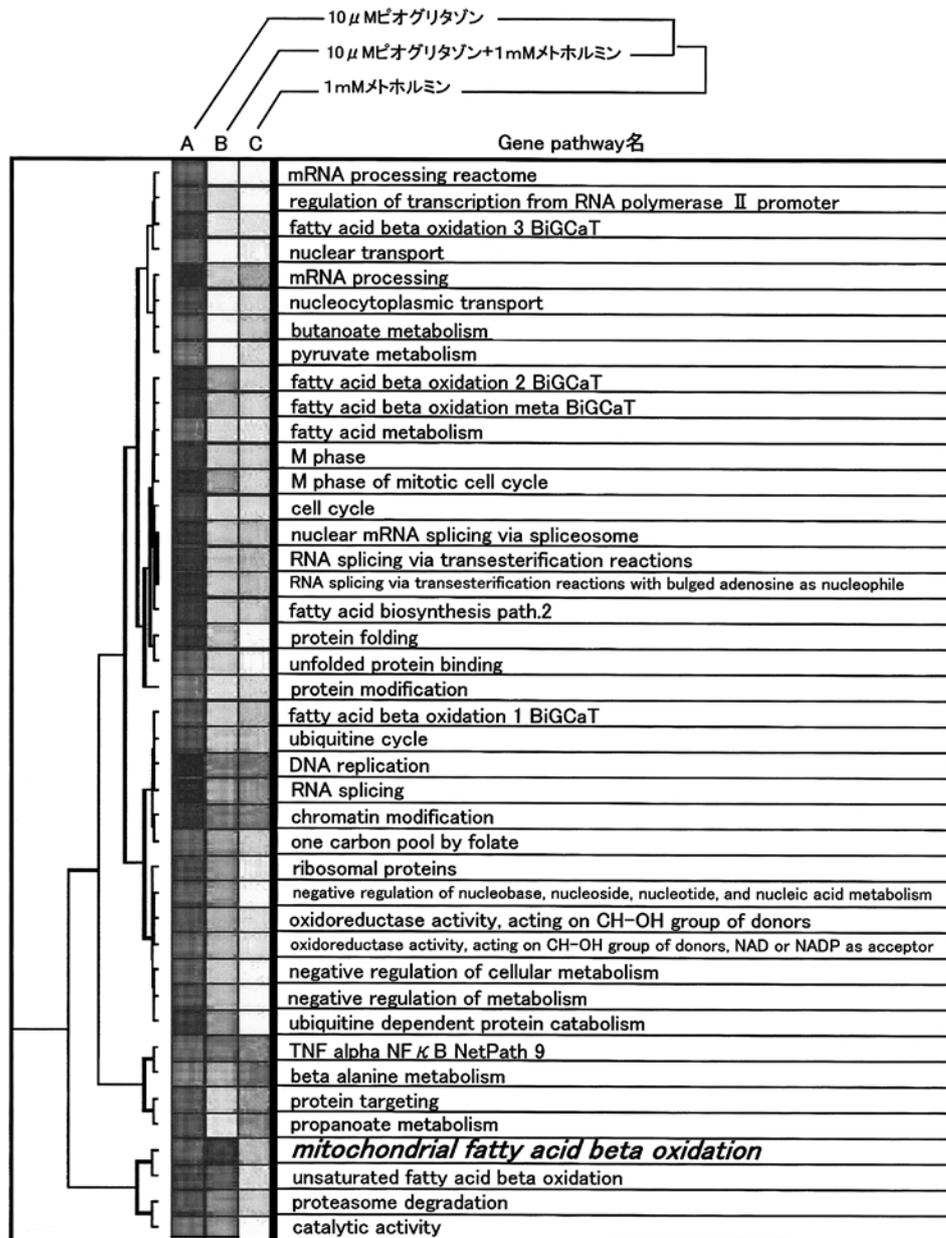


図1 階層型クラスター解析の結果

階層型クラスター解析はJ-Express Pro.2.7 (Molmine AS) をソフトウェアとして用いている。これは Pathway 解析のデータを用いて、コントロール群 (非薬剤投与群) を基準として、各薬剤を投与したことによって、有意な変動を示した遺伝子 Pathway の P 値を濃淡の度合で表示し、濃いほど有意な Pathway であることを示す。また、類縁した機能 Pathway を幾何的に近く配置して樹形図としている。結果としてミトコンドリア脂肪酸β酸化 (*mitochondrial fatty acid beta oxidation* として太字イタリック体で示した) が、ピオグリタゾンとメトホルミンの共投与 (列B) の場合に各々の単独投与時 (列Aと列C) と比較して、より有意な変動を示す Pathway として認められた。

※具体的な P 値は列A: ピオグリタゾン単独 (P=0.021), 列B: 共投与 (P=0.006), 列C: メトホルミン単独 (P=0.164) であった。

1,701 個、両剤併用によって1,843個の遺伝子の有意な発現を認めた。更にそれらの遺伝子に対して Pathway 解析と階層型クラスター解析を行うと、クラスター解析では、ミトコンドリア脂肪酸β酸化の Pathway 変動の P 値

はメトホルミン単独の場合 P=0.164 だが、ピオグリタゾン単独投与の場合は P=0.021 < 0.05 と有意に変動し、両薬剤の併用時では P=0.006 と更に有意な P 値の差を示した (図1)。

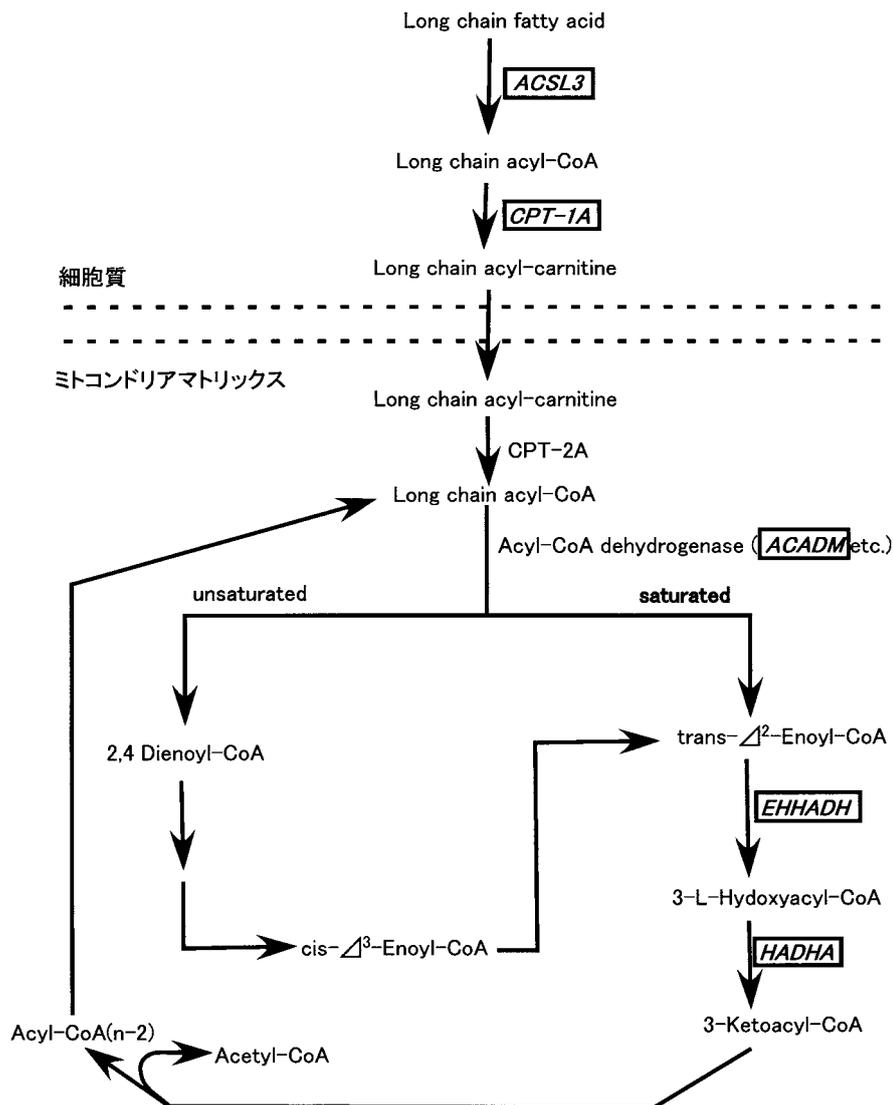


図2 ミトコンドリア長鎖脂肪酸 β 酸化回路

優位機能Pathway解析により、ピオグリタゾンとメトホルミンの共投与はミトコンドリア長鎖脂肪酸 β 酸化に関連する遺伝子群の発現を有意に促進することを示した。本経路マップでは、ピオグリタゾンとメトホルミンの共投与で更にUp-regulationされた遺伝子をイタリック体、黒枠で囲い表示した。

また両剤併用群で更に発現が増した遺伝子に対して行った、優位機能Pathway解析では、ミトコンドリア脂肪酸 β 酸化が上位Pathwayとして機能変化を認め、Carnitine palmitoyl-transferase 1A (CPT-1A)を含む複数の β 酸化回路関連遺伝子群の発現亢進を認めた(図2)。特にCPT-1Aは長鎖脂肪酸をミトコンドリア内へ取り込む際に機能し、カルニチンシャトルを構成する遺伝子の一つである。アレイデータにおけるA673細胞でのCPT-1Aの発現はメトホルミン単独により1.45倍、ピオグリタゾン単独投与で2.35倍、併用投与によって2.42倍に増加した(表2)。更にアレイの結果の確認のため同条件の培養を再度行い、CPT-1A遺伝子に対してRT-PCRを行った。その発現はピオグリタゾンとメトホル

ミンの単独投与によって増加し、両薬剤の共投与では更に発現の増加を認める結果であり、アレイでの変動と同様の変化が認められた。同時に臓器特異性を見るために、同条件の培養実験をヒト肝細胞由来のWRL68でも行いPCRを施行し、 β アクチン遺伝子との発現比を比較したが、コントロール、単独投与、共投与の間にCPT-1A遺伝子の発現の差は認めなかった(図3)。

更に我々はACSL3, ACADM, HADHA, EHHADHなどアレイで有意な変動を示した、他の β 酸化関連遺伝子群についてもRT-PCRを施行した。しかしながら、コントロール群と同等の発現しか認めず、共投与の場合に増加したものや、WRL68(肝)と比較しA673(横紋筋)に特異的な発現変動を示す遺伝子は認めなかった。

表2 薬剤投与の違いによる横紋筋細胞での各ミトコンドリアβ酸化回路関連遺伝子の発現の変動

コントロールと各薬剤投与群との遺伝子発現比					
Gene Symbol	Gene Title	Ensembl gene ID	10 μM Pioglitazone + 1mM Metformin	1 mM Metformin	10 μM Pioglitazone
ACSL3	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 3	00000123983	3.31	4.89	3.13
			Δ = -1.58		Δ = 0.18
ACADM	Acyl-CoA dehydrogenase medium chain specific	00000117054	2.53	1.70	3.15
			Δ = 0.83		Δ = -0.62
EHHADH	Peroisomal bifunctional enzyme	00000113790	1.65	1.16	1.30
			Δ = 0.49		Δ = 0.35
HADHA	Tri-functional enzyme alpha subunit, mitochondrial precursor	00000054754	2.30	3.08	2.17
			Δ = -0.78		Δ = 0.13
CPT1A	Carnitine O-palmitoyltransferase I A	00000110090	2.42	1.45	2.35
			Δ = 0.97		Δ = 0.07

表の5つの遺伝子はDNAマイクロアレイにおいてピオグリタゾンとメトホルミンの投与により有意にそれらの発現が増加した遺伝子群の一部であり、ミトコンドリアβ酸化回路の制御遺伝子として、Pathway解析でも有意な変動を認めた。

表の数値は各遺伝子における、薬剤投与細胞群とコントロールとの遺伝子発現の比を示したものであり、Δ値は両薬剤の共投与による、各遺伝子の発現比と単独投与による遺伝子発現比との差を表す。DNAマイクロアレイではEHHADHとCPT-1Aの2遺伝子が単独投与時よりも共投与時に発現が増加し、Δ値>0となった。

考 察

Wang YXやTanaka T.らは横紋筋細胞における脂肪酸β酸化には核内受容体型転写因子Peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)の活性化が関与していると報告している^{8,9)}。更に、Nathan K.やBarbara B.らはPPARアゴニストであるピオグリタゾンがラットの単離骨格筋において、リン酸化AMPキナーゼを増加させ、アセチル-CoAカルボキシラーゼをリン酸化させることにより、β酸化回路を活性化すると報告している^{1,2)}。このような報告例から、ピオグリタゾンがPPARの部分作動薬として作用するほか、横紋筋細胞でβ酸化回路を賦活化する可能性を示唆する。

一方で、ミトコンドリアβ酸化の主要因子の一つであるPPAR-γ co-activator-1α (PGC-1α)がマウスの骨格筋に発現することがすでに知られており¹⁰⁾、Suwa M.らは、メトホルミンがPGC-1α発現を強化して、マウス横紋筋でミトコンドリアβ酸化を促進すると報告している³⁾。

以上のようにピオグリタゾン及びメトホルミンの単剤投与による横紋筋細胞のβ酸化への影響については複数

の知見が得られている。今回我々は、DNAマイクロアレイと階層型クラスター解析を用いることにより、横紋筋細胞へのピオグリタゾンとメトホルミンの共投与による直接作用として、単独投与の場合と比較して、ミトコンドリア脂肪酸β酸化のPathwayが有意に亢進することがわかった。同時にPathway解析と個々のβ酸化関連遺伝子に対するRT-PCRの結果から両薬剤の共投与により、特にCPT-1A遺伝子の発現が横紋筋細胞特異的に増加することが明らかとなった(図3)。以上よりピオグリタゾンによるPPARアゴニストとしての作用に、メトホルミンのPGC-1α活性化作用が加わり、横紋筋の脂肪酸β酸化のPathwayが亢進した可能性が推察され、かつ両薬剤の共通の作用点としてCPT-1Aの発現を介して、β酸化回路内でも特にカルニチンシャトルの機能が賦活化されている可能性を考えた。

クラスター解析について、ミトコンドリア脂肪酸β酸化のPathway変動のP値がピオグリタゾン単独ではP=0.021、共投与ではP=0.006であり、P<0.05と有意な亢進を認めた一方で、メトホルミン単独ではP=0.164にとどまった理由としては、そもそも両薬剤の主要標的臓器は横紋筋ではなく、筋細胞の脂肪酸β酸化に対する併

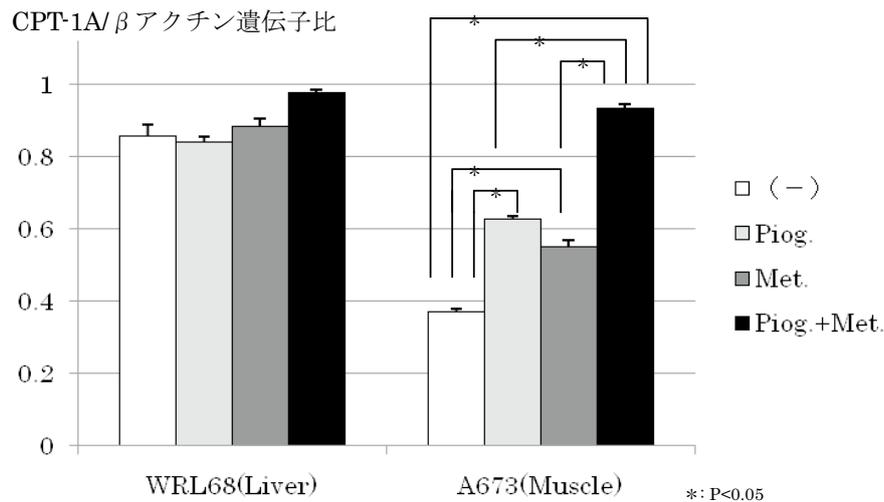


図3 CPT-1A 遺伝子発現の定量的解析

CPT-1A 遺伝子をPCR法によって増幅した。ポジティブコントロールである、 β アクチン遺伝子との発現比と比較することにより、CPT-1A 遺伝子は、同じインスリン感受性臓器である肝細胞と比較して横紋筋細胞で特異的にその発現が増加した。各薬剤の単独投与でも増加したが、単独投与の場合と比較し共投与では更に有意な発現増加を認めた。

結果は培養実験を3回繰り返し ($n=3$)、発現比の平均値 \pm S.E.を示した。* $P < 0.05$ は各培養細胞のコントロール群におけるCPT-1A 遺伝子と β アクチン遺伝子の発現比と比較した値である。

注) 図中 (-) はコントロール (非薬剤投与群)、Pio. はピオグリタゾン投与群、Met. はメトホルミン投与群のCPT-1A 遺伝子発現比。縦軸の β は、CPT-1A 遺伝子と β アクチン遺伝子との発現比を意味する。

用効果はそれらの主作用というよりはむしろ、多面発現的効果 (pleiotropic effect) としての比較的弱い作用であることが考えられた。更に、メトホルミンの作用が濃度依存的であるという報告⁷⁾に加えて、横紋筋に対する脂肪燃焼効果が時間依存性であるとする研究報告¹¹⁾があることなどから、有意差を認めるには本研究の条件よりメトホルミンを高濃度に、長時間加えて培養する必要があった可能性も考えられた。

次にPathway解析 (図2) やマイクロアレイ (表2) において単独投与の場合より共投与で発現が増したミトコンドリア脂肪酸 β 酸化関連遺伝子のうちCPT-1Aを除く4つの遺伝子 (ACSL3, ACADM, HADHA, EH-HADH) は同じ条件で培養した筋細胞でRT-PCRを行ってもコントロール群と差がない発現であり、CPT-1A 遺伝子と同様の変動をしなかった。上述の4つの遺伝子と両薬剤の関連についての既存の報告は少なく、本研究結果からピオグリタゾンとメトホルミン両薬剤はこれらの遺伝子の発現に対してはPCRで検出されるほどの横紋筋特異的な作用を持たない可能性が考えられた。

また、今回ヒト肝細胞由来のWRL68において、薬剤投与の有無に関わらずCPT-1A 遺伝子の発現の有意な変動を認めなかった理由として (図3)、元来肝臓は、横紋筋細胞と比較して細胞内小器官としてのミトコンドリ

アを豊富に有する細胞であり、 β 酸化が盛んな臓器であることから、CPT-1A 遺伝子を常に多く発現している。そのため、薬剤投与による同遺伝子の発現の明らかな差を認めなかったと考えられた。

ピオグリタゾンとメトホルミンは、2型糖尿病の主病態であるインスリン抵抗性を解除する目的としてしばしば併用される。既に両薬剤の合剤が米国で開発され、普及しつつあり、併用する内服薬の種類、量ともに多くなりがちな糖尿病患者のQOLの改善に貢献している。

本研究結果は横紋筋細胞に対して両薬剤がCPT-1A 遺伝子を介した β 酸化回路の賦活化によって、より脂肪燃焼、抗肥満的に作用する可能性を示唆している。しかしながら現段階においては遺伝子発現のレベルしかみていないため、更にマウスなどの動物実験を行うことを計画している。横紋筋細胞内におけるPPARやPGC-1 α 、CPT-1Aなどの蛋白発現の変化や、AMPキナーゼ、アセチル-CoAカルボキシラーゼなど β 酸化回路関連酵素のリン酸化への影響などについても今後確認すべき課題であると考えられた。更に動物実験によって、両薬剤の共投与によるインスリン抵抗性の変化、内臓脂肪の減少率、更に骨格筋に対する運動負荷との関連をみることで薬物併用療法と運動療法との相乗効果を定量的に解析することができ、臨床応用可能な新知見が得られる可能

性が考えられた。

結 論

① ピオグリタゾンとメトホルミンの併用は、横紋筋細胞内のCPT-1A遺伝子の発現を増加させ、 β 酸化回路でも特に、長鎖脂肪酸カルニチンシャトルの機能を賦活化する可能性が考えられた。

② 両薬剤の併用は横紋筋細胞において、より脂肪燃焼、抗肥満的に作用する可能性がある。

文 献

- 1) Nathan L, Meghan K, Tsu-Shuen T, et al : Thiazolidinedione can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291** : E175-E181, 2006.
- 2) Barbara B, Florian G, Susanne N, et al : Direct thiazolidinedione action on isolated rat skeletal muscle fuel handling is independent of peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated changes in gene expression. *Diabetes* **50** : 2309-2315, 2001.
- 3) Suwa M, Egashira T, Nakano H, et al : Metformin increases the PGC-1 α protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol*, **101** : 1685-1692, 2006.
- 4) Donald G, Stuart A, George T, et al : In vitro cultivation of human tumors : establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Nat. Cancer Inst* **51** : 1417-1423, 1973.
- 5) Bryan M, Kathleen P, Roma C, et al : Expression of transforming growth factor- β isoforms in small round cell tumors of childhood. *Am. J. Pathol* **142** : 49-58, 1993.
- 6) Robert M, John M, Jerry F, et al : Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* **24** : 520-526, 1969.
- 7) Zhou G, Robert M, Li Y, et al : Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest*, **108** : 1167-1174, 2001.
- 8) Wang YX, Lee CH, Sambath T, et al : Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* **113** : 159-170 2003.
- 9) Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, et al : Activation of peroxisome proliferator -activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 15924-15929, 2003.
- 10) Miura S, Kai Y, Kamei Y, et al : Isoform-specific increases in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC1- α) mRNA in response to beta2-adrenergic receptor activation and exercise. *Endocrinology* **149** : 4527-4533, 2008.
- 11) Nicolas M, Michael H, Nygren J, et al : Metformin Increases AMP-Activated Protein Kinase Activity in Skeletal Muscle of Subjects With Type2 Diabetes. *Diabetes*, **51** : 2074-2081, 2002.