

脂肪細胞におけるアディポネクチンと PAI-1の 分泌異常に対するフィブラート系薬剤と スタチン系薬剤の改善効果

堀江修一^{1,2}、吉野照乃³、香川靖雄^{2,3}

1：相模女子大学 短期大学部 食物栄養学科

2：女子栄養大学 栄養科学研究所

3：女子栄養大学 栄養学部

脂肪細胞におけるアディポネクチンとPAI-1の 分泌異常に対するフィブレート系薬剤と スタチン系薬剤の改善効果

堀江修一^{1,2}、吉野照乃³、香川靖雄^{2,3}

1：相模女子大学 短期大学部 食物栄養学科

2：女子栄養大学 栄養科学研究所

3：女子栄養大学 栄養学部

Desirable Changes in Secretion of Adiponectin and PAI-1 from 3T3-L1 Adipocytes after Treatments with Hypolipidemic Agents, Fibrates and Statins

Shuichi HORIE, Teruno YOSHINO, Yasuo KAGAWA

Abstract

The effects of agents for medical treatment of dyslipidemia on secretions of adiponectin and plasminogen activator inhibitor (PAI-1), known as good and bad adipocytokines, respectively, were examined using adipocytes differentiated from 3T3-L1 cell line.

Treatment of the adipocytes with ligands for PPAR α increased the adiponectin secretion and decreased PAI-1 secretion in the incubation for 24 hrs, and the both effects were prominent when 1 μ M of GW7647 was used as a ligand as shown as increase in 10-folds and decrease in 40%, respectively, from the base lines of the control. These effects were not observed when ligands for PPAR γ were used instead of that of PPAR α . On the other hand, pitavastatin, a third generation of anti-cholesteremic agent known as a potent inhibitor of HMG-CoA reductase, also enhanced both effects remarkably. Compared with the control, it increased secretion of adiponectin by 20-folds and decreased secretion of PAI-1 for 50% at a concentration of 100 μ M.

To understand the mechanism of beneficial effects of GW7647 and pitavastatin on adipocytes, inhibitors of signaling pathway such as cellular phosphorylation, were used. Results showed that the pathways of MEK-MAP (p38) and of MEK-ERK for GW7647 and pitavastatin, respectively, were involved in the enhancement of the transcription of mRNA of adiponectin. However, no changes in a mRNA level

of PAI-1 was observed after treatments with both agents. Further, TNF- α -dependent decrease in adiponectin and increase in PAI-1 were improved when adipocytes were treated with GW7647 or pitavastatin.

These results indicated that GW7647 and pitavastatin prevent the chronic inflammation caused by metabolic syndrome and also suggested their possible usefulness in prevention of the cytokine storm occurred in COVID-19 by SARS-CoV-2.

Key words : adiponectin, PAI-1, hypolipidemic agent, statin, cytokine storm

抄録

培養脂肪を用いて、善玉アディポサイトカインであるアディポネクチンと悪玉のプラスミノゲン活性化阻害因子（PAI-1）の分泌に対する脂質異常症治療薬の影響について調べた。

細胞に対するPPAR α リガンド（GW7647など）の処理により、アディポネクチンの分泌が増加し、逆にPAI-1の分泌は減少した。特に、GW7647による作用は強力で、1 μ Mの処理で24時間後のアディポネクチン分泌量はコントロールの10倍以上に増加した。また、PAI-1の分泌量はコントロールの40%程度になった。しかし、PPAR γ リガンドの処理では有意な変化を認めなかった。一方、コレステロール低下薬のピタバスタチンでもGW7647に匹敵するような顕著な影響が認められ、100 μ Mの24時間処理でアディポネクチンの分泌量は20倍以上に、またPAI-1の分泌量は50%程度に減少した。

この変動の機構について阻害剤を用いて検討したところ、GW7647ではMEKからMAP（p38）キナーゼを介した経路により、またピタバスタチンではMEKからERKの活性化を介した経路により、アディポネクチンの転写促進が進行すると推測された。

さらに、肥満を基盤として発症する糖尿病や動脈硬化、血栓性疾患の病態時で増加する炎症性サイトカインのTNF- α に依存したアディポネクチン分泌の減少とPAI-1分泌の増加は、GW7647とピタバスタチンによって顕著に改善されることが判明した。

以上により、慢性炎症を改善するGW7647とピタバスタチンは、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）によって引き起こされる感染症（COVID-19）の重症化に深く関わるサイトカインストームを防ぐ上で有用性が高いことが示唆された。

I. 緒言

【背景・目的】

メタボリックシンドロームは、生活習慣を基盤として発症する高血圧、脂質異常、耐糖能異常を伴う病態を包括的に捉えた疾患の概念であり、脂質の過剰摂取や運動不足により引き起こされる内臓脂肪の増大は、メタボリックシンドロームを発生させる最上流因子として位置付けられている¹⁾²⁾。脂肪を蓄積する脂肪組織はエネルギーの貯蔵庫であり、生体の要求に応じて脂肪を動因する重要な役割を担っているが、この組織がアディポ(サイト)カインと称される様々な生理活性物質を分泌する内分泌臓器であること³⁾⁴⁾、そしてその分泌異常が様々な病態の発症と深く関わっていることが明らかとされている。すなわち、脂肪組織（脂肪細胞）はメタボリックシ

ンドロームに限らず、様々な疾患の発症予防や治療の標的臓器として重要な研究対象になっている³⁻⁶⁾。

アディポネクチン⁷⁾は抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用、抗炎症作用を併せ持つ代表的な善玉と言われるアディポカインであり⁸⁻¹⁴⁾、逆に血液凝固線溶系の阻害因子として血栓形成や血管病変の進展に関与するプラスミノゲン活性化阻害因子-1（PAI-1）は代表的な悪玉のアディポカイン¹⁵⁻¹⁷⁾と認識されている。従って、脂肪組織において前者の発現や分泌を高め、また後者を減少させる物質は、メタボリックシンドロームを中心とする様々な疾患の発症を予防し、病態を改善するための有力な候補である。

中性脂肪やコレステロールの血中濃度が高い脂質異常症の患者は、メタボリックシンドロームの基準に合致する割合が高く、その治療にはそれぞれフィブラート系薬剤¹⁸⁾とスタチン系薬剤¹⁹⁾が使われる

ことが多い。両薬剤は血管内皮細胞や平滑筋細胞への多面的作用（pleiotropic effect）により、細胞の機能を改善する作用を示すことから、筆者らは両系列の脂質低下薬によって現れる生活習慣を中心とした病態の改善には脂肪細胞を介した効果も関与しているのではないかと推測している。しかしながら、これらの薬剤が脂肪細胞に対してどのような影響を及ぼすのかについては、特に *in vitro* においてほとんど検討されてこなかった。

本研究では、代表的なフィブラート類であるベザフィブラート²⁰⁾、および同じPPAR α のリガンドである Wy14643²¹⁾ と GW7647²²⁾ を用いて、またスタチン類としてはコレステロール低下作用の強力なピタバスタチン²³⁾（商品名：リバロ）を用いて、培養脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンとPAI-1の変動、およびその機構について調べた。

II. 方法

(1) 細胞

マウス胎児由来の3T3-L1細胞（前駆脂肪細胞培養株）は、JCRB細胞バンク（Japanese Collection of Research Bioresources）から購入した。

(2) 細胞培養²⁴⁻²⁶⁾

3T3-L1脂肪細胞の継代用培地Aは、D'MEMにBovine Serum (BS, MP Biomedicals、非動化処理済) を最終濃度10%になるように、また、3T3-L1脂肪細胞の継代用培地Bは、Fetal Calf Serum (FCS, MP Biomedicals、非動化処理済) を最終濃度10%になるように、それぞれ添加して調製した。

分化誘導培地 (No.1) は、85mLのD'MEMにFCS (非動化処理済) を10mL、IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine, SIGMA#15879) を2mL (最終濃度:0.5mM)、DEX (Dexamethasone-Water soluble, SIGMA#D291) を1mL (最終濃度:0.25 μ M)、インスリン (ヒト由来, SIGMA#I-9278) を2mL (最終濃度:0.2 μ M) 加えて用時調製した。また、分化誘導培地 (No.2) は、88mLのD'MEMにFCS (非動化処理済) を10mL、インスリンを2mL (最終濃度:0.2 μ M) 加えて調製した。

3T3-L1前駆脂肪細胞は、凍結細胞株を10cmディッシュで70~80%コンフルエントに増やしてから継代した。培地は継代用培地Aを用い、1:5の比以下で継代してから2~3日後に70~80%コンフルエント程度になるようにして継代した。

3T3-L1細胞の分化誘導は、継代用培地Aを用い

て3日後に交換し、その2日後に培地を継代用培地Bに交換した。さらに、その2日後に、分化誘導培地 (No.1) に交換し (分化誘導初日)、引き続きその2日後に、分化誘導培地 (No.2) に交換した。さらに2日後に、培地を継代用培地Bに戻した。以降1~2日毎に、培地を継代用培地Bで交換した。分化誘導後7~10日のインスリン反応性が低下する前の細胞を実験に供した。なお、実験に供した細胞の分化程度はオイルレッド染色により確認した。

(3) 薬剤の処理

細胞への薬剤の処理は、分化開始7日目の細胞を用いて行った。各薬剤を実験結果に示すそれぞれの濃度で添加し、24時間、一部は48時間CO₂インキュベータ内に静置した。また、脂肪細胞に対する各刺激剤は、添加濃度を2~4点調製して実験に用いた。GW7647を溶解するために用いたDMSOの最終濃度は0.1%とした。ベザフィブラート (キッセイ薬品)、Wy14643 (Sigma)、GW7647 (Sigma)、チアゾリジン系薬剤のトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾン (全て三共製薬)、ピタバスタチン (興和創薬株式会社から供与)、TNF- α (Sigma) を使用した。また、阻害剤 (PD98059 (Promega)、SB203580 (Carbiochem-Novabiochem)、Wortmannin (Sigma)、Genistein (Sigma)、KT5720 (Carbiochem-Novabiochem)、Calphostin C (Sigma)) は、実験結果に示す低濃度(L)と高濃度(H)の2段階に調製した。これらを溶解するために用いたDMSOの最終濃度は0.1%とした。なお、阻害剤は福井医科大学 (現福井大学医学部) の筧田耕治先生に供与いただいた。

(4) 抗原量の測定

アディポネクチンとPAI-1抗原量の測定は、分化した3T3-L1脂肪細胞に薬剤を添加してから24時間、または48時間後に回収した培養上清を試料とした。アディポネクチンはマウス/アディポネクチンELISAキット (大塚製薬株式会社) を利用し、PAI-1は一次抗体 (H34-G6, Anti-Mouse, PAI-1)、二次抗体 (ASMPAI-GF, Rabbit Anti-Murine, PAI-1, IgG Fraction)、三次抗体 (ビオチン化-抗ウサギ IgG, ABCキット) を用いて、すでに報告されているサンドイッチELISA²⁷⁾ の手順に従って定量し、最終的に発色した吸光度をコロナマイクロプレートリーダー (MTP-800AEC) を用いて測定した。

(5) mRNAの発現解析

薬剤を24時間、または48時間処理した3T3-L1脂肪細胞からISOGEN (和光純薬 #311-02501) を用

いて総RNAを抽出し、ランダムプライマーを用いてcDNAの合成を行い、続けてPCR法にてmRNAの発現量を測定した。アディポネクチンのFとRプライマー(5'→3')はそれぞれtggtcctcttaatcctgcccとtctcctttctctccttctc、PAI-1のFとRプライマー(5'→3')はそれぞれtcagagcaacaagttcaacta、tgatggagtcttgacagtgggを用いた。

(6) 統計解析

データは平均と標準偏差(SD)で示した。各平均値間の違いはノンパラメトリック分析(Mann-Whitney test)、および3群間の比較は分散分析で評価した。有意差は $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ の3点とした。

Ⅲ. 結果

アディポネクチンとPAI-1の分泌に及ぼすフィブラート系薬剤の影響

脂質異常症、特に血中中性脂肪の高い患者に対して投与されるフィブラート系薬剤のベザフィブラートを用いて、培養脂肪細胞におけるアディポネクチンとPAI-1の分泌への影響について調べた(図1)。

その結果、3T3-L1細胞から分化させた成熟脂肪細胞(脂肪細胞)の培養液中に分泌されるアディポネクチンの抗原量は、ベザフィブラートの処理により濃度に依存して増加した。ベザフィブラート未処理のコントロール細胞から分泌されるアディポネクチンの抗原量は24時間で 10^6 個細胞当たり $0.8\mu\text{g}$ だったが、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ のベザフィブラート処理によりそれぞれ $1.8\mu\text{g}$ 、 $3\mu\text{g}$ と未処理の約2.3倍、3.8倍に増加した。また、アディポネクチン分泌量は48時間後には24時間後よりも増加していたが、ベザフィブラート未処理に対する処理後の増量は24時間後のものほとんど変わらなかったため、この条件下ではベザフィブラートによる分泌増加の影響は処理後24時間以内に現われるか、あるいはこの薬剤の効果が持続しないものと考えられた。

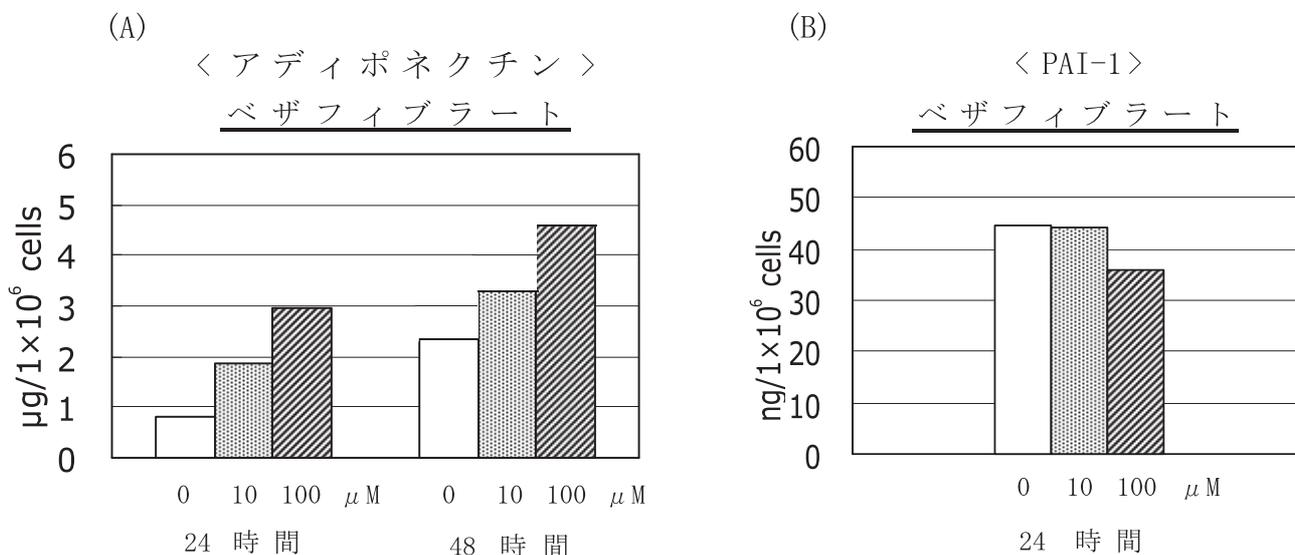


図1 3T3-L1脂肪細胞のアディポネクチンとPAI-1の分泌に及ぼすベザフィブラートの影響

3T3-L1細胞を60mmディッシュに10%BSを含むDMEM培地で70~80%のコンフレントになるまで培養し、10%FBSを含むDMEM培地に交換してから、実験方法に示したようにインスリン、DEX、IBMXにより成熟脂肪細胞に分化させた。分化開始7日目の細胞に対し、ベザフィブラートを $10\mu\text{M}$ 、または $100\mu\text{M}$ の濃度で添加し、24時間と48時間後に培養上清を回収した。コントロールにはベザフィブラートを含まない培地を同様に添加した。上清液中のアディポネクチン抗原量(A)はマウス/アディポネクチンELISAキット(大塚製薬株式会社)により、また、PAI-1抗原量(B)は市販のマウスPAI-1モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAにより定量した。

一方、脂肪細胞から分泌されるPAI-1抗原量は、24時間で 10^6 個細胞当たり45ngで、 $10\ \mu\text{M}$ のベザフィブラート処理では変化しなかったが、 $100\ \mu\text{M}$ の処理により36.5ngと約20%減少した。また、上記のアディポネクチンを定量した同じサンプルを用いて48時間処理後のPAI-1分泌量についても調べたが、24時間で得られた値とほぼ同様の結果 (48時間後のコントロール細胞で 10^6 個細胞当たり50ng) であり、この条件下でPAI-1の分泌はほぼプラトーに達してい

ると考えられた。

フィブラート系薬剤であるベザフィブラートはPPAR α のリガンドであり、PPAR α を活性化することが知られている²⁰⁾。ベザフィブラートが脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を高め、PAI-1分泌を減少させたことから、フィブラート系の化合物でPPAR α のリガンドとしてより作用の強いWy14643とGW7647を用いて同様に検討した (図2)。

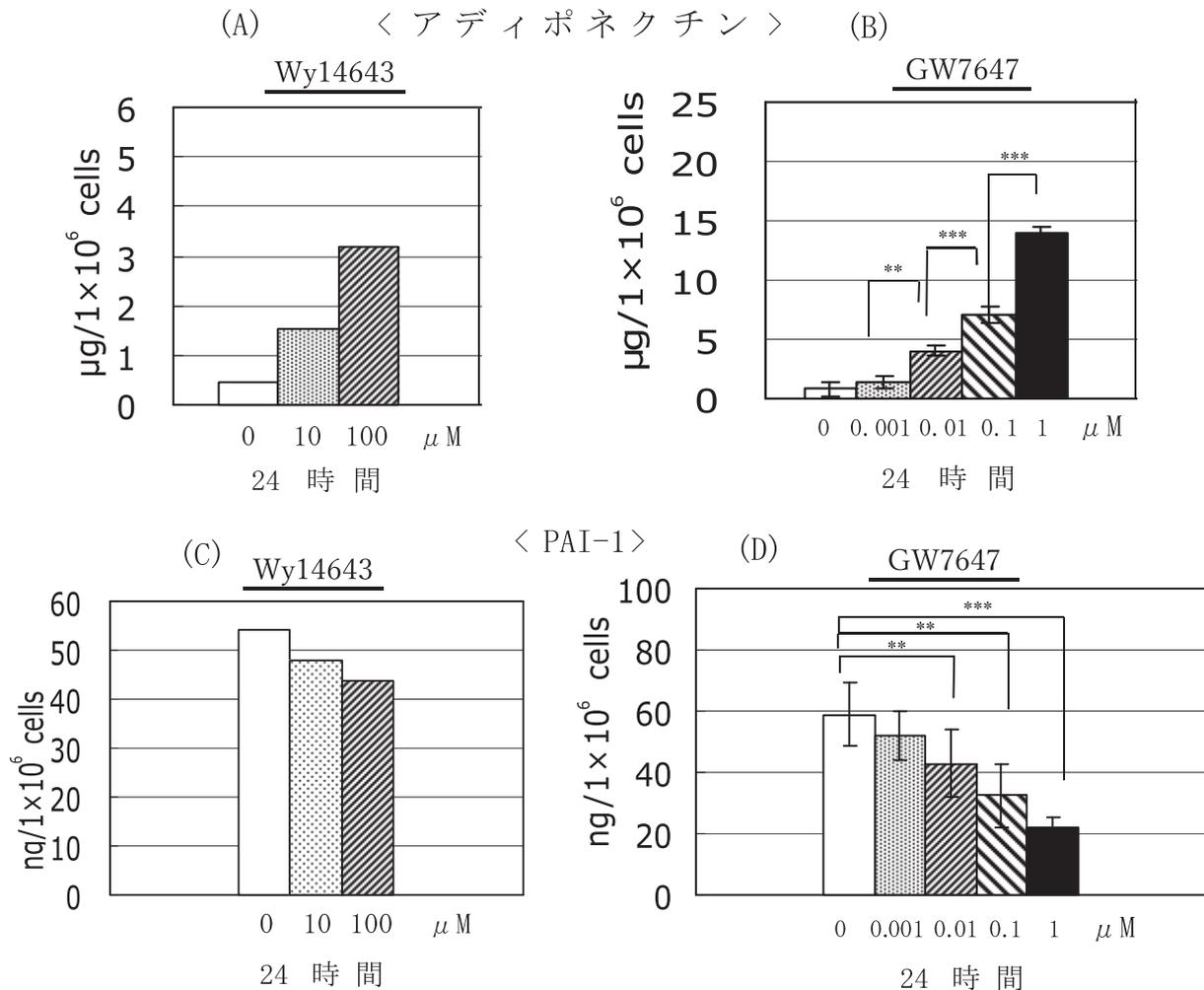


図2 3T3-L1脂肪細胞のアディポネクチンとPAI-1分泌に及ぼすWy14643とGW7647の影響

ベザフィブラートの影響を調べた実験 (図1) と同じ条件下で実験を行った。分化開始7日目の脂肪細胞に対し、Wy14643 ((A), (C)) は $10\sim 100\ \mu\text{M}$ 、GW7647 ((B), (D)) は $0.001\sim 1\ \mu\text{M}$ の濃度で添加し、24時間後に培養上清を回収した。コントロールには両薬剤を溶解するために用いたDMSOを同じ0.1%の最終濃度で添加した。培養上清液中のアディポネクチン ((A), (B)) とPAI-1 ((C), (D)) の抗原量は図1の説明に記載したものと同様の測定法で定量した。GW7647の処理は各3検体とし、結果は平均 \pm SDで表示した。

なお、アディポネクチンでは下位の薬剤濃度に対して有意差のある場合を、またPAI-1の場合は未処理のコントロール細胞に対して有意差のある場合を、以下の危険率で示した。

** : $P < 0.01$ 、*** : $P < 0.001$

その結果、3T3-L1脂肪細胞から培養液中に分泌されるアディポネクチンの抗原量は、Wy14643とGW7647の処理により濃度に依存して増加した(図2(A)と(B))。薬剤未処理のコントロール脂肪細胞と比較して、薬剤処理24時間後におけるアディポネクチンの分泌量は、10 μ Mと100 μ MのWy14643でそれぞれ約3倍と6.4倍に、また0.001~1 μ MのGW7647では1.5~16.4倍に増加した。GW7647については検体数を増やして有意差を調べたところ、

10nM以上の濃度で0.1%または1%以下の危険率で下位の処理濃度に対して有意な増加だった。

3T3-L1脂肪細胞からのPAI-1分泌について同様にWy14643とGW7647の影響を調べた(図2(C)と(D))。その結果、細胞から分泌されるPAI-1抗原量は、Wy14643の濃度に依存して減少し、10 μ Mと100 μ Mでそれぞれ未処理の約0.9倍と0.8倍になった(図2(C))。また、GW7647の場合はより明確にその濃度に依存してPAI-1分泌量が減少し、1 μ Mのと

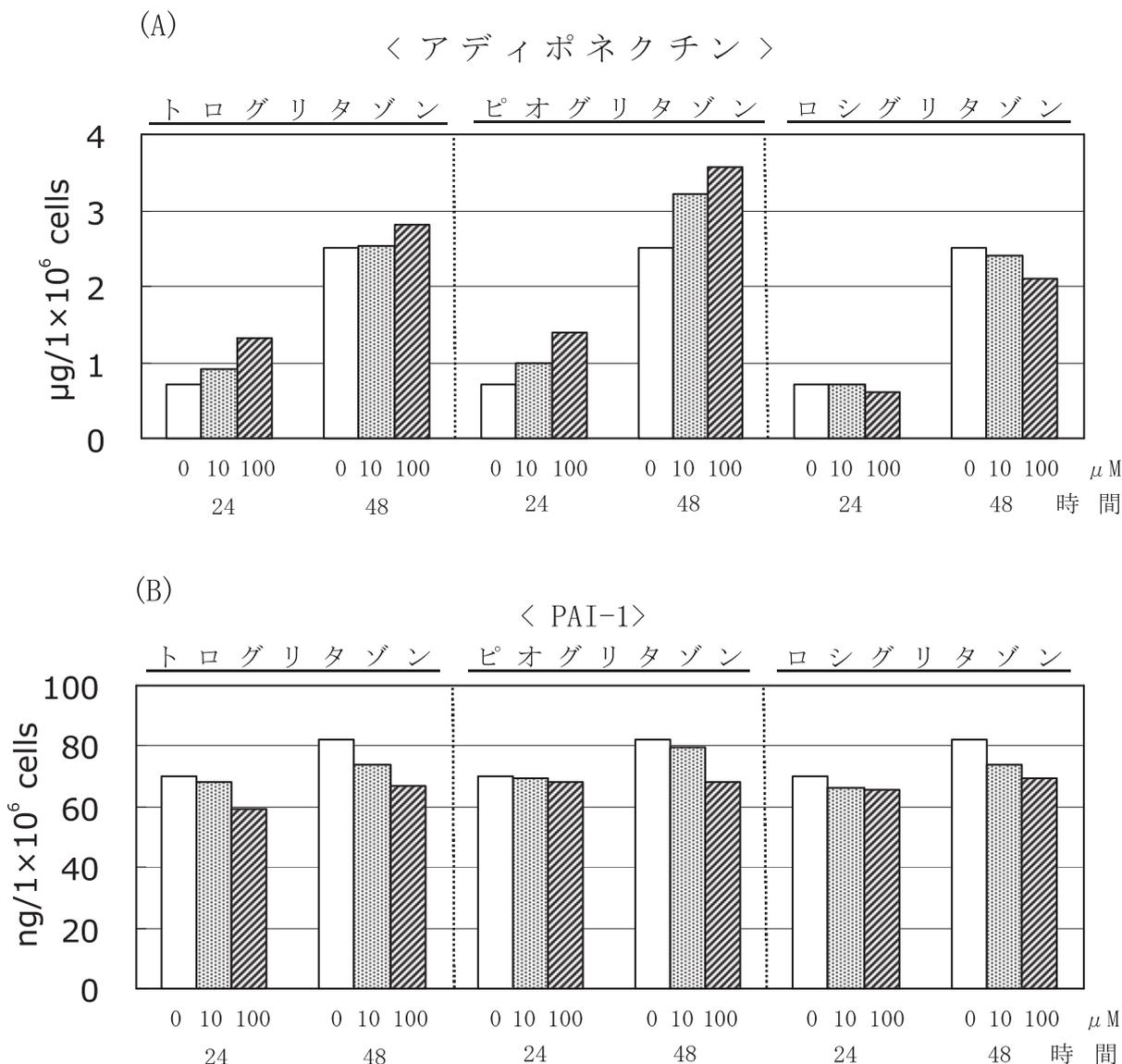


図3 3T3-L1脂肪細胞のアディポネクチンとPAI-1分泌に及ぼすチアゾリジン系薬剤の影響

ベザフィブラートの影響を調べた実験(図1)と同じ条件下で実験を行った。分化開始7日目の脂肪細胞に対し、トログリタゾン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾンを各々10 μ Mと100 μ Mの濃度で添加し、24時間と48時間後に培養上清を回収した。コントロールには両薬剤を溶解するために用いたDMSOを同じ0.1%の最終濃度で添加した。培養上清液中のアディポネクチン(A)とPAI-1(B)の抗原量は図1の説明と同様の測定法で定量した。

きは未処理に対して約60%減少した（図2(D)）。このとき0.001~1 μ Mの範囲で1%以下の危険率でコントロールに対して有意差が得られた。

PPAR α のリガンドである3種類の化合物を用いて検討した結果、3T3-L1脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンの抗原量は増加し、PAI-1の抗原量は減少したことから、次にPPAR γ （PPARのサブタイプ）のリガンドであるチアゾリジン系化合物（トログリタゾン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾン）を用いて同様に検討した（図3）。

その結果、3T3-L1脂肪細胞から培養液中に分泌されるアディポネクチンの24時間後における抗原量は、トログリタゾンとピオグリタゾンの処理により濃度に依存して増加する傾向にあったが、ロシグリタゾンでは変化しなかった（図3(A)）。これら3薬剤の中でロシグリタゾンはPPAR γ の活性化作用が一番強力であること²⁸⁾、また48時間後の結果では24時間後の増量を反映していなかったことから、チアゾリジン系薬剤による脂肪細胞からのアディポネクチンの分泌増加効果は弱く、少なくともPPAR γ

のリガンドに共通の作用であるとは考えられない。

一方、これらPPAR γ リガンドによるPAI-1分泌への影響はどの薬剤も高濃度（100 μ M）を用いたときに減少する傾向が認められたが、いずれも減少量は僅かだった（図3(B)）。

アディポネクチンとPAI-1の分泌に及ぼすスタチン系薬剤の影響

脂質異常症、特に血中LDLコレステロールレベルの高い患者に対して投与されるスタチンを用いて、3T3-L1脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンとPAI-1の抗原量について調べた。本実験ではコレステロール低下作用の強力な第三世代のピタバスタチン²³⁾を用いた（図4）。

その結果、脂肪細胞から培養液中に分泌されるアディポネクチンの抗原量は、ピタバスタチンの処理により濃度に依存して増加した（図4(A)）。すなわち、1 μ M、10 μ M、100 μ Mのピタバスタチン処理によってアディポネクチン分泌量は24時間後で、それぞれ未処理の約2.6倍、9.9倍、24倍と著しく増加

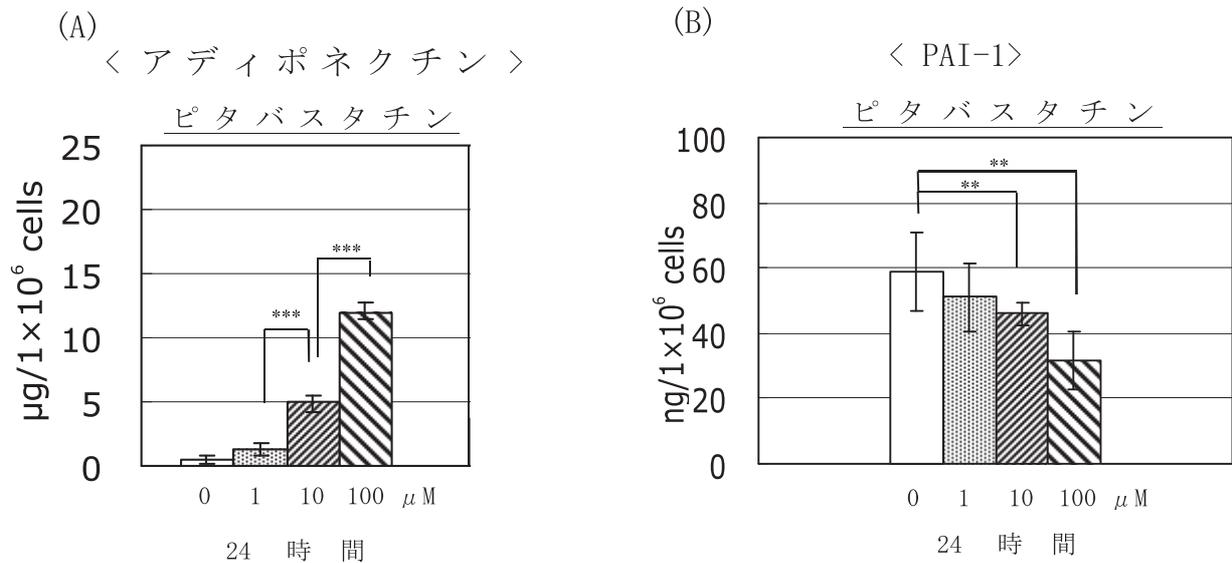


図4 3T3-L1脂肪細胞のアディポネクチンとPAI-1分泌に及ぼすピタバスタチンの影響

ベザフィブラートの影響を調べた実験（図1）と同じ条件下で実験を行った。分化開始7日目の脂肪細胞に対し、ピタバスタチンを1~100 μ M添加し、24時間後に培養上清を回収した。コントロールには両薬剤を溶解するために用いたDMSOを同じ0.1%の最終濃度で添加した。培養上清液中のアディポネクチン(A)とPAI-1(B)の抗原量は同様の測定法で定量した。細胞は各3検体とし、結果は平均 \pm SDで表示した。

尚、アディポネクチンでは下位の薬剤濃度に対して有意差のある場合を、またPAI-1の場合は未処理のコントロール細胞に対して有意差のある場合を、以下の危険率で示した。

** : P<0.01, *** : P<0.001

した。また、48時間後においてもアディポネクチン分泌量はさらに増加しており（データ示さず）、同じ条件下でもPPAR α リガンドの処理と比較して持続的な効果が認められた。

一方、脂肪細胞から分泌されるPAI-1抗原量は、ピタバスタチンの処理により濃度に依存して明らかに減少し、1 μ M、10 μ M、100 μ Mのピタバスタチン処理によりそれぞれ未処理のものから約14%、22%、47%減少した（図4(B)）。10 μ Mと100 μ Mの処理では、未処理に対して1%以下の危険率で有意差のある減少だった。

アディポネクチンとPAI-1の分泌に及ぼすGW7647とピタバスタチンの併用効果

これまでの実験から、GW7647とピタバスタチンは脂肪細胞からのアディポネクチン分泌亢進作用とPAI-1分泌低下作用を併せ持ち、しかも両薬剤はその作用が強力であることが判明した。そこで、それらの効果は両薬剤が同じ機構を介しているのかについて理解するために、両薬剤を同時に処理にしてその影響について調べた（図5）。

その結果、GW7647とピタバスタチンをそれぞれ単独で処理した際に脂肪細胞から分泌されるアディ

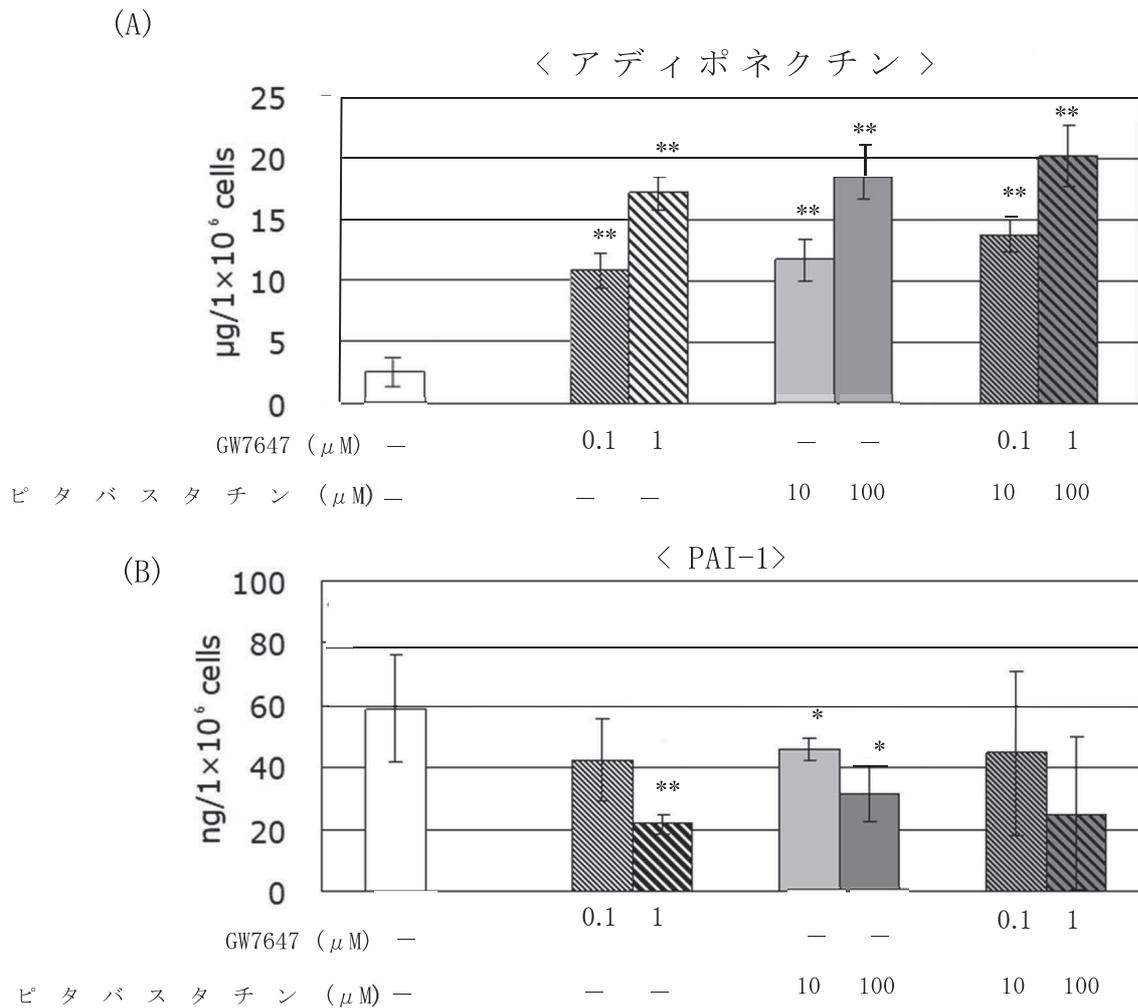


図5 3T3-L1脂肪細胞のアディポネクチンとPAI-1分泌に及ぼすGW7647とピタバスタチンの共存による影響

ベザフィブラートの影響を調べた実験（図1）と同じ条件下で実験を行った。分化開始7日目の脂肪細胞に対し、GW7647は0.1 μ Mと1 μ M、ピタバスタチンは10 μ Mと100 μ Mを添加し、24時間後に培養上清を回収した。コントロールには両薬剤を溶解するために用いたDMSOを同じ0.1%の最終濃度で添加した。培養上清液中のアディポネクチン(A)とPAI-1(B)の抗原量は図1と同様の測定法で定量した。細胞は各3検体とし、結果は平均 \pm SDで表示した。

尚、未処理のコントロール細胞に対して、有意差のある場合を以下の危険率で示した。

* : P<0.05、** : P<0.01

ポネクチンの増加は、両薬剤の併用でさらに増加せず、単独の処理に対して有意差のある増加を示さなかった (図 5 (A))。したがって、両薬剤を非常に低濃度で同時に利用した際に相加効果を生じる可能性はあるものの、基本的に両者を併用してもアディポネクチン分泌がより活性化されることはないものと考えられた。本結果から、両薬剤によるアディポネクチン分泌増加は同じ機構を介していると推測された。

また、PAI-1分泌への両薬剤の併用効果についても同様に調べたところ (図 5 (B))、GW7647とピタバスタチンの共存はそれぞれ単独で処理した際のPAI-1抗原量の減少に対して、それ以上の効果をもたらさないことがわかった。結果のバラツキが大きいことから、両薬剤のPAI-1分泌増加の機構が異なるものなのかについてはさらに検討しなければならないが、アディポネクチンの場合と同様に、それぞれの分泌に対してより強く働くような機構ではなく、両者は同じ作用点を介していると推測された。

GW7647とピタバスタチン処理後のアディポネクチンとPAI-1のmRNAの変動

次に、GW7647とピタバスタチンによる3T3-L1脂肪細胞からのアディポネクチン分泌量の増加と、PAI-1分泌量の減少がmRNAの変動を伴ったものであるのかについて調べた (図 6)。

その結果、アディポネクチン分泌量の増加はGW7647 (1~1000 nM) 処理でも、ピタバスタチン (1~100 μ M) 処理でも細胞内のmRNAの増加を反映していた。一方、PAI-1のmRNA量はどちらの薬剤の処理によっても変化せず、その分泌量の減少は転写を伴ったものでないことがわかった。

GW7647とピタバスタチンによるアディポネクチンの分泌増加とPAI-1の分泌低下に及ぼす各種阻害剤の影響

GW7647とピタバスタチンの処理によるアディポネクチン分泌増加作用とPAI-1分泌減少作用の機構についてさらに理解するために、細胞内シグナル伝達経路を遮断する各種阻害剤を用いて検討した (図 7、図 8)。これまでの結果から、GW7647は1 μ M、ピタバスタチンは100 μ Mを用いることにし、各阻害剤は文献上のIC₅₀を参考にして低濃度とその10倍の高濃度の2点で検討することにした。

その結果、脂肪細胞に対するGW7647処理後のアディポネクチン分泌量の増加は、PD98059とSB203580、Genisteinの処理である程度減少したが、Wortmannin、KT5720、Calphostin Cの処理では、それぞれ高濃度の処理でもほとんど影響がなく、GW7647による増加効果に対して抑制作用は認められなかった (図 7 (A))。したがって、MEK²⁹⁾ からMAP (p38) キナーゼ経路³⁰⁾ やチロシンキナーゼ

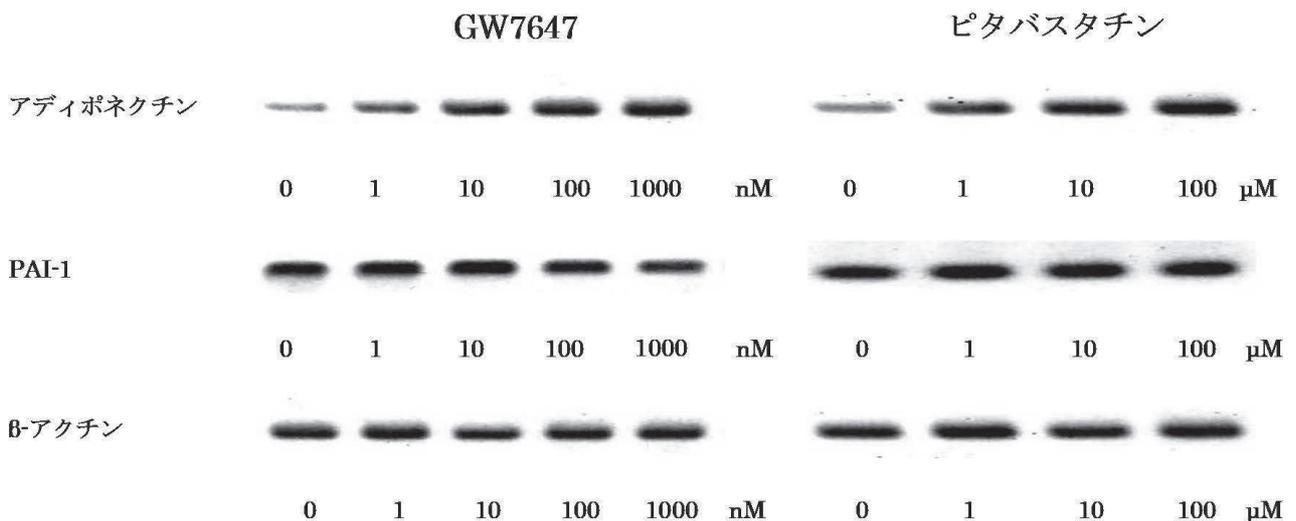


図 6 GW7647とピタバスタチン処理後の脂肪細胞におけるアディポネクチンとPAI-1のmRNAの変化

図 2 (B, D) と図 4 に記載した実験と同じ条件で、培養脂肪細胞にGW7647 (1~1000 nM)、ピタバスタチン (1~100 μ M) を添加し、24時間後に実験方法に示した手順で細胞から総RNAを回収した。RT-PCR法によりRNA量に依存した β -アクチンとアディポネクチン、PAI-1の各cDNAを増幅し、アガロース電気泳動により産物を分離してから、エチジウムブロマイドにて染色した。

経路³¹⁾を阻害するとGW7647によるアディポネクチンの分泌増加作用が一部抑えられるが、PI3³²⁾やPKA³³⁾、PKC³⁴⁾を阻害してもその効果を抑制できないものと考えられた。

本実験で使用した脂肪細胞にはPPAR α の発現が認められたことから(データは示さず)、GW7647は核内PPAR α の活性化を介して脂肪酸の

代謝を活発化させる可能性が考えられるが、さらにMAPキナーゼのリン酸化経路によって、アディポネクチンの転写を促進させる因子の活性化にも関与していると推測される。

一方、GW7647による脂肪細胞からのPAI-1分泌低下作用に対しては全ての阻害剤でほとんど影響が見られず、高濃度の各阻害剤を添加してもGW7647

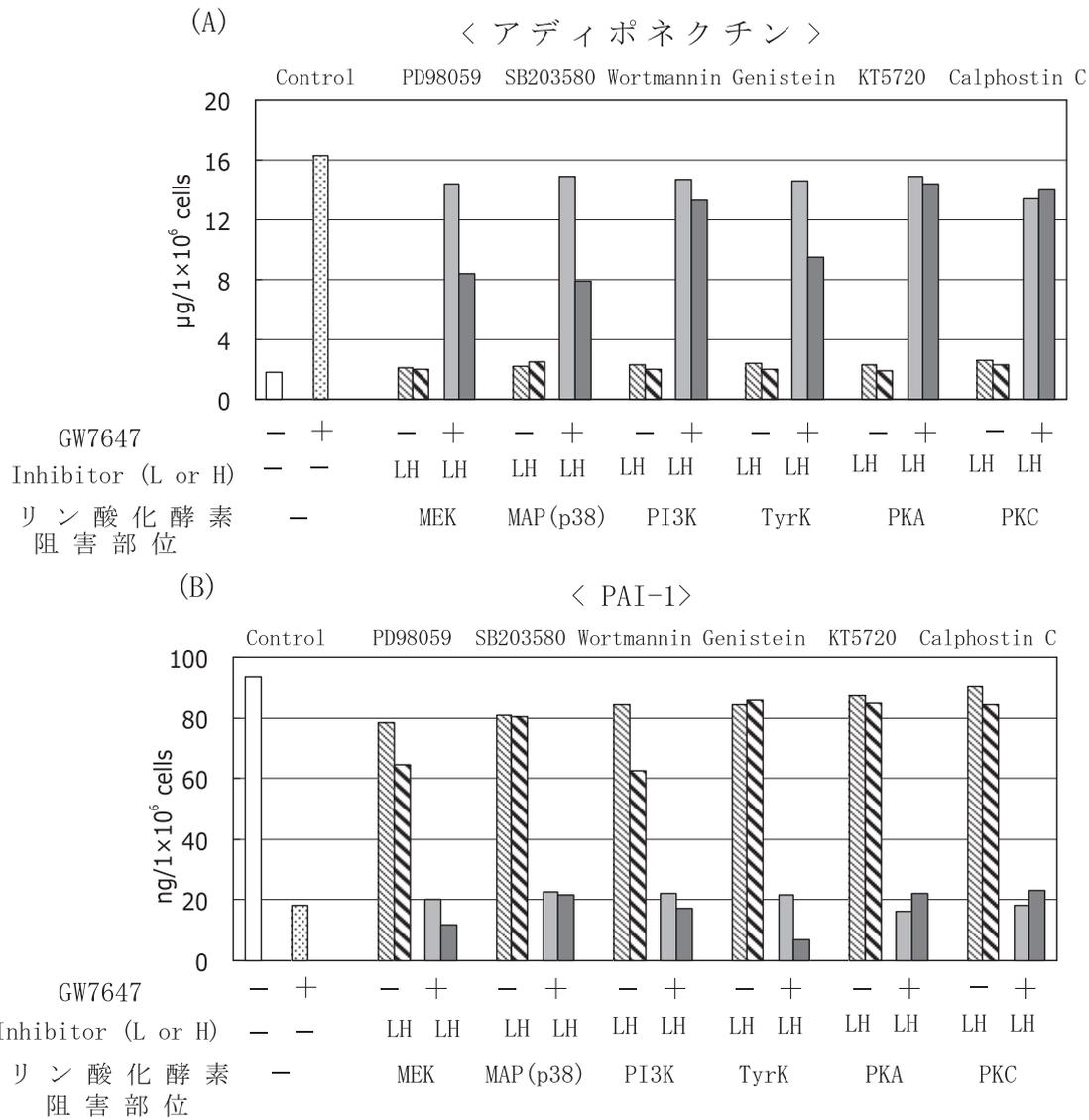


図7 GW7647による3T3-L1脂肪細胞のアディポネクチン分泌増加とPAI-1分泌減少に及ぼす各種阻害剤の影響

実験2と同じ条件下で実験を行った。分化開始7日目の脂肪細胞に対し、1 μ MのGW7647を下記に示した各阻害剤(低濃度(L)、高濃度(H))と同時に添加し、その24時間後に培養上清を回収した。コントロールには両薬剤を溶解するために用いたDMSOを同じ0.1%の最終濃度で添加した。培養上清液中のアディポネクチンとPAI-1の抗原量は同様の測定方法で定量した。細胞は各3検体とし、結果は平均 \pm SDで表示した。実験に用いた各阻害剤の濃度はL、Hの順に次の通りである。PD98059:2, 20 μ M、SB203580:10, 100nM、Wortmannin:2, 20nM、Genistein:2.5, 25 μ M、KT5720:50, 500nM、Calphostin C:50, 500nM

のPAI-1分泌低下が抑制される結果にはならなかった（図7(B)）。したがって、GW7647による脂肪細胞からのPAI-1分泌の低下は、リン酸化などの細胞内の情報伝達を介して行われているのではなく、細胞内プールを増加させたり、細胞内での分解を亢進させることによって生じる可能性が考えられる。この結果は、脂肪細胞のPAI-1 mRNAレベルがGW7647の処理によって変化しなかった結果（図

6）を支持するものだった。

一方、脂肪細胞に対するピタバスタチン処理後のアディポネクチン分泌の増加は、PD98059とWortmannin、Genisteinの高濃度の処理で減少したが、SB203580、KT5720、Calphostin Cの処理ではほとんど影響がなく、ピタバスタチンによる増加効果に対する後者3薬剤の阻害作用は認められなかった（図8）。

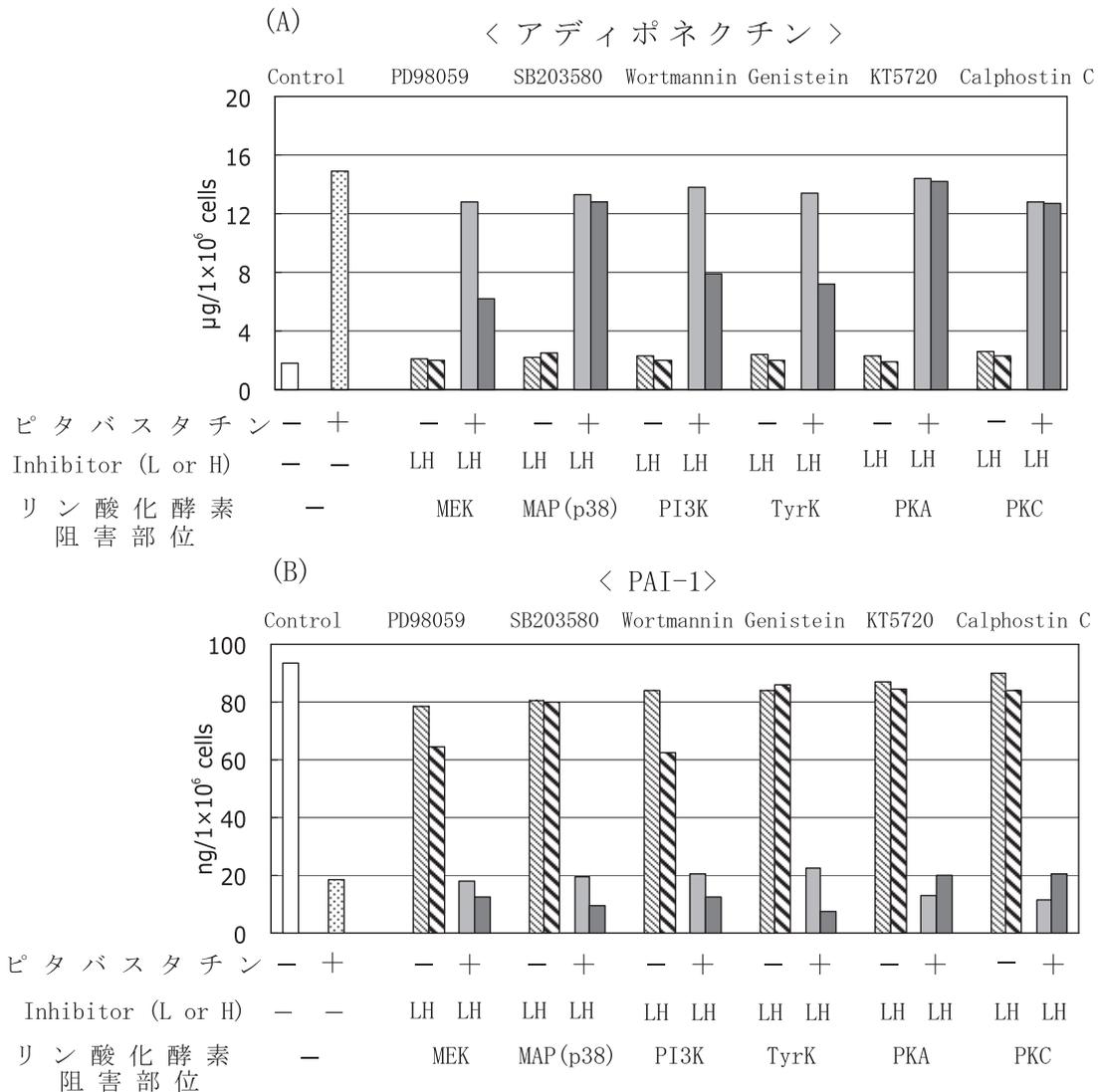


図8 ピタバスタチンによる3T3-L1脂肪細胞のアディポネクチン分泌増加とPAI-1分泌減少に及ぼす各種阻害剤の影響

GW7647添加時の阻害剤による影響を調べた実験（図7）と同じ条件下で実験を行った。分化開始7日目の脂肪細胞に対し、ピタバスタチンを100 μM、各阻害剤を下記に示した低濃度(L)と高濃度(H)に分け同時添加し、24時間後に培養上清を回収した。コントロールには両薬剤を溶解するために用いたDMSOを同じ0.1%の最終濃度で添加した。培養上清液中のアディポネクチンとPAI-1の抗原量は同様の測定方法で定量した。細胞は各3検体とし、結果は平均 ± SDで表示した。PD98059: 2, 20 μM、SB203580: 10, 100 nM、Wortmannin: 2, 20 nM、Genistein: 2.5, 25 μM、KT5720: 50, 500 nM、Calphostin C: 50, 500 nM

GW7647によるアディポネクチンの分泌増加がSB203580で阻害され、Wortmanninで阻害されなかった結果（図7）が、ピタバスタチンでは逆になっていたため、ピタバスタチンによるアディポネクチンの分泌増加はそのシグナルがMEKからMAP（p38）ではなくERK³⁵⁾の活性化に、またそれに加えてPI3キナーゼを介した伝達経路が関与している可能性が考えられた。

一方、ピタバスタチンによる脂肪細胞からのPAI-1分泌の低下作用に対しては、GW7647の場合と同様に全ての阻害剤で影響が見られず、ピタバスタチンが転写レベルでの抑制を介してその分泌を低下させるのではなく、やはり細胞内プールの増加やタンパクの分解亢進を介しているものと推測された。

TNF- α 処理後のアディポネクチンとPAI-1の分泌異常に対するGW7647とピタバスタチンの改善作用

炎症性サイトカインのTNF- α ³⁶⁾を3T3-L1脂肪細胞に添加し、すでに報告されているようなアディポネクチンの分泌低下³⁷⁾³⁸⁾やPAI-1の分泌増加³⁹⁾⁴⁰⁾が再現できるのかどうかについて検討した。図には示さないが、脂肪細胞にTNF- α （2~50 ng/mL）を24、48時間処理したときに、濃度に依存して両アディポカイン分泌の明らかな減少と増加が確認できた。すなわち、脂肪細胞から培養液中に分泌されるアディポネクチン抗原量は、2、10、50 ng/mLのTNF- α 処理24時間後において、それぞれ未処理の約80%、60%、45%に減少した。このとき、24時間後のPAI-1抗原量は、2、10、50 ng/mLのTNF- α 処理によりそれぞれ未処理の約1.1、1.8、2.1倍に増加した。これらの結果は過去の報告³⁷⁾⁻⁴⁰⁾を支持するものだった。

そこで、適応した範囲内にある5と20 ng/mLのTNF- α を脂肪細胞に添加したときの、アディポネクチンとPAI-1の分泌異常に対するGW7647（0.1、1 μ M）とピタバスタチン（10、100 μ M）の単独、あるいは併用による影響について検討したところ、いずれの場合も明らかに改善した。すなわち、24時間の5 ng/mLのTNF- α 処理によって減少した脂肪細胞由来のアディポネクチン抗原量は、0.1 μ MのGW7647、あるいは10 μ Mのピタバスタチンを添加した場合において、また20 ng/mLのTNF- α 処理のときは1 μ MのGW7647、あるいは100 μ Mのピタバスタチンを添加した場合において、ほぼTNF- α 未処理の分泌量までに回復した。

一方、TNF- α 処理によって増加した脂肪細胞由

来のPAI-1抗原量も、5 ng/mLのTNF- α 処理のときは0.1 μ MのGW7647、あるいは10 μ Mのピタバスタチンの添加で、また20 ng/mLのTNF- α 処理のときは1 μ MのGW7647、あるいは100 μ Mのピタバスタチンの添加で、TNF- α 未処理の分泌量に近いレベルにまで回復した（図は示さず）。

IV. 考 察

抗動脈硬化作用を有する脂質異常症の治療薬としては、主に中性脂肪を低下させるフィブラート系薬剤と、主にLDLコレステロールを低下させるスタチン系薬剤が臨床的に広く使用されている。これらの薬剤が投与されると脂質レベルが改善されるだけでなく、全身性の抗炎症作用や血管内皮細胞に対する直接的な抗血栓性作用の亢進などが現われ、多くの細胞の機能が高まることも報告されている⁴¹⁾⁻⁴³⁾。フィブラート系薬剤とスタチン系薬剤は、どちらもメタボリックシンドロームを改善するために使用されており、フィブラート系のPPAR α 活性化剤が脂肪組織の脂肪酸代謝を活性化することや、本研究でほとんど影響のなかったPPAR γ リガンドが血漿中のアディポネクチンレベルを高めることも報告されている⁴⁴⁾。さらに、ベザフィブラートとフェノフィブラートのフィブラート系薬剤がアディポネクチンレベルを高めるとの臨床データも報告されている⁴⁵⁾。しかし、実際に3T3-L1脂肪細胞を用いたこの報告⁴⁵⁾では、ベザフィブラート（10 μ M）、フェノフィブラート（10 μ M）の24時間処理で、それぞれ1.1倍、1.2倍とコントロールに対して有意差はあるが、本研究での結果と同等かあるいはそれよりも増加の割合は小さい程度だった。本研究ではPPAR α リガンドのGW7647を用いた場合に、0.1~1 μ Mの低濃度でコントロールの10倍あるいはそれ以上にアディポネクチン分泌を高める結果が得られたことから、臨床において適切なPPAR α リガンドを利用することにより、血中アディポネクチン濃度をより高められる可能性がある。一方、PPAR α のリガンドが脂肪細胞由来の悪玉アディポカインであるPAI-1分泌を減じる結果は報告されていない。むしろ逆に、PPAR α のリガンドは血管内皮細胞におけるPAI-1分泌を高めるとの報告がある⁴⁶⁾。本研究においても、脂肪細胞からのPAI-1分泌は、ベザフィブラートやPPAR α のリガンドとしてよく利用されるWy14643の処理では、明らかに減少するほどの強いものではなかったが、GW7647を用いたときには

じめて顕著な減少作用が認められた。一方、アディポネクチンのノックアウトマウス、並びに精製アディポネクチン（遺伝子組み換えタンパク質）を用いた実験結果から、アディポネクチンは脂肪細胞のPAI-1産生を直接阻害すると報告された⁴⁷⁾。したがって、本研究で認められたGW7647によるPAI-1分泌の低下作用もPPAR α 活性化を介した作用によるだけでなく、アディポネクチンが著しく増加することによって生じる二次的な現象によることも否定できない。

本研究ではHMG-CoA還元酵素阻害剤スタチン類の中でストロングと呼ばれる第三世代のピタバスタチン（リバロ）²³⁾を用いて、3T3-L1脂肪細胞からのアディポネクチンとPAI-1分泌への影響を調べた。これまでもスタチン系薬剤による血中のアディポネクチンとPAI-1レベルへの影響に関しては数多く報告されている⁴⁸⁾⁻⁵⁵⁾が、そのほとんどは冠動脈疾患や高脂血症の患者に対してプラバスタチン（メバロチン）⁵⁰⁾⁵¹⁾やシンバスタチン（リポバス）⁵²⁾、アトルバスタチン（リピトール）⁵⁵⁾が投与された臨床研究である。それらの研究では、スタチン類の投与により血中のアディポネクチンレベルが顕著ではないものが高まったとするもの⁴⁸⁾と、影響がなかったとするもの⁴⁹⁾が混在している。スタチン類の中でも第三世代の薬剤でストロングと呼ばれるアトルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン（クレストール）は、第一世代のプラバスタチンやシンバスタチン、あるいは第二世代のフルバスタチン（ローコール）やセリバスタチン（バイコール、安全性の問題で現在は使用されていない）と比較してLDLコレステロールを減少させる作用が強く、HDLコレステロールを増加させる作用のあることも知られている²³⁾。臨床での研究でスタチン類がアディポネクチンやPAI-1レベルへの影響に統一した見解が得られていないのは、利用されたスタチンの作用が強力でなかったことによるのかも知れない。本研究結果で用いたピタバスタチンにはアディポネクチンの分泌を高め、PAI-1分泌を減少させる作用が非常に強いことが判明した。また、筆者らの過去の研究では、ピタバスタチンは血管内皮細胞における抗血栓性タンパク質のトロンボモジュリン発現を高める効果がプラバスタチンやフルバスタチンと比較して強力だった⁵⁶⁾。このようなピタバスタチンが有する多面的な効果を考えると、糖尿病や肥満、動脈硬化症などの慢性炎症が起こっているような病態時に血中コレステロールレベルが高い患者に対して、

ストロング系スタチンのピタバスタチンが利用されることは望ましいと考えられる。

臨床では脂質異常症の患者に対してフィブラート系薬剤とスタチン系薬剤が併用されることは珍しい訳ではない。しかし、本研究結果ではGW7647とピタバスタチンの併用によってアディポネクチンとPAI-1分泌へのよりよい効果は認められなかったことから、両薬剤の主な作用点は同じである可能性が高く、実際に臨床において十分量が処方されていれば、アディポサイトカイン類の分泌の点ではどちらかの薬剤の単独利用で十分な効果が発揮されると考えられる。

分泌機構に関して理解するために行ったGW7647とピタバスタチン処理後のアディポネクチンのmRNA量は、細胞培養液中に回収される抗原量の増加とパラレルだったが、PAI-1のmRNA量レベルはPAI-1抗原量のように減少しなかった。従って、両薬剤によるPAI-1分泌減少作用は転写段階の調節を介してPAI-1合成に影響するものではなく、PAI-1抗原の分解亢進や細胞内プールが増加することによると推測された。一方、アディポネクチンでは両薬剤による転写段階での促進が認められ、少なくともその一部はMAPキナーゼ経路によるシグナル伝達の関与が予想された。1990年代頃から哺乳動物の細胞内情報伝達経路としてMAPキナーゼカスケードの重要性が指摘され⁵⁷⁾、そのスーパーファミリーとして3種類のシグナル伝達経路（extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 kinase)が明らかとされてきたが、現在でも様々な病態時にMAPキナーゼ経路が大きく関与していることに変わりはない。脂肪細胞に対する阻害剤を用いた結果から、GW7647ではMEKからMAP (p38) キナーゼ経路³⁰⁾を介して、またピタバスタチンではMEKからERKの活性化経路³⁵⁾を介してその情報伝達がアディポネクチンの転写促進に伝わるものと推測された（図9）。

一般にPPARのリガンドはPPARを活性化して核内でRXRとヘテロダイマーを形成し、特定の塩基配列（PPRE）に結合する結果、局所での転写因子の集合を介してポリメラーゼIIによる転写活性を促進すると考えられており⁵⁸⁾⁵⁹⁾、実際にアディポネクチンの遺伝子上流にはPPREが存在すると報告されている⁴⁵⁾⁶⁰⁾。しかし、アディポネクチンの転写を促進させるPPARのサブタイプは γ であり、PPAR α による作用は強力ではない⁴²⁾。したがって、アディポネクチンの分泌やmRNAレベルの増加が顕

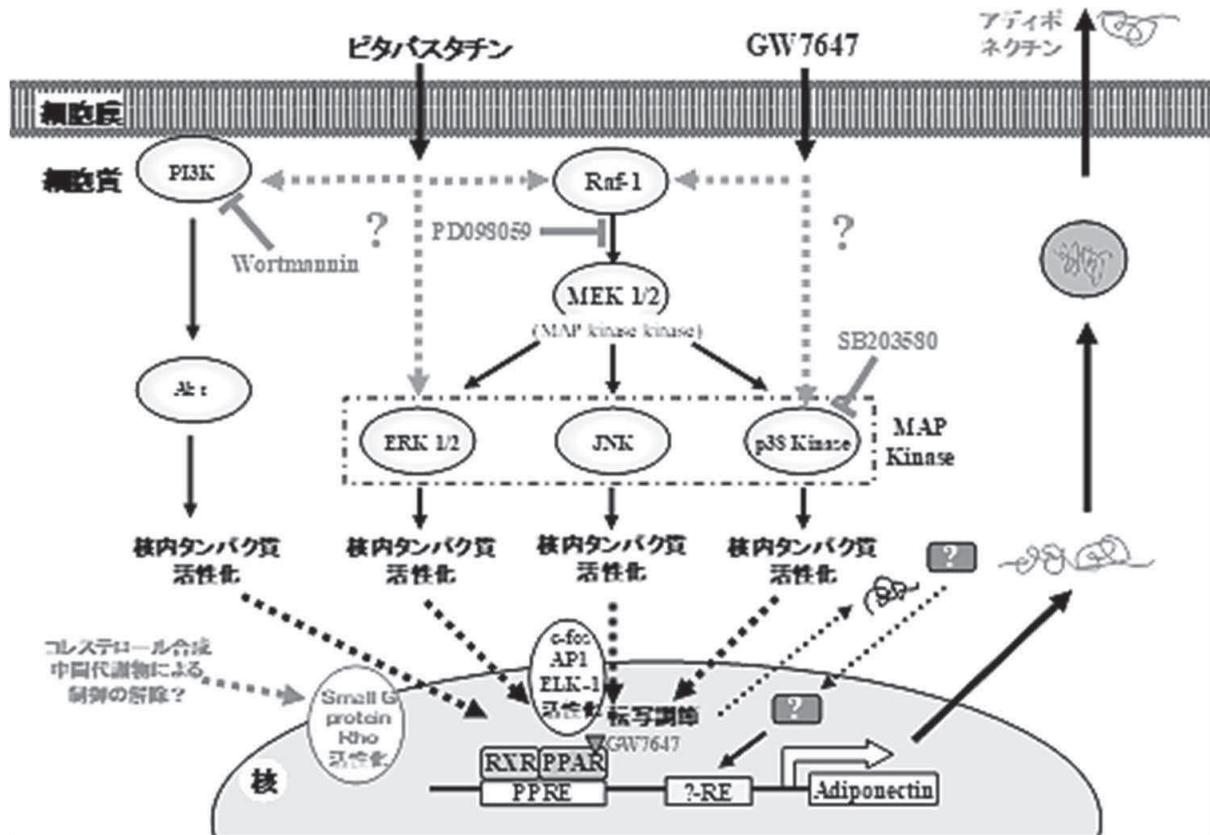


図9 ピタバスタチとGW7647によるアディポネクチン合成と細胞内情報伝達経路

著だったGW7647による脂肪細胞への影響は、PPREとの相互作用を高める結果以外に、上述したMAP (p38) キナーゼを介した転写促進機構³⁰⁾ が大きな役割を果たしているのかも知れない。一方、ピタバスタチンの場合、アディポネクチンの転写促進機構に関連する報告はなく、本研究で得られたERKの活性化を介した経路³⁵⁾ が関与している可能性については新規の結果である。

血中においてアディポネクチン量が高まることで生体にとって悪い作用が生じるとの報告はなく、またPAI-1が極端に低下するのは出血傾向になって、血管壁での傷害を修復する上で必ずしも適当ではないが、一般に病的状態においてPAI-1は顕著に増加することが問題である。すなわち、内臓肥満やインスリン非依存性糖尿病ではPAI-1の血中濃度が高く、内臓脂肪の量とPAI-1値には正の相関があることが報告されている⁶¹⁾⁶²⁾。また、動物実験においても、遺伝的肥満・糖尿病マウスでは血中PAI-1抗原量および脂肪組織におけるPAI-1発現量の増加が認められ、その産生の主体は大型化した脂肪細胞であることも明らかにされている¹⁶⁾。さらに、PAI-1の発現や作用を抑えることが血栓傾向を改善させるだけで

なく、肥満やインスリン抵抗性の進展を抑制できる可能性も指摘されている⁶³⁾⁶⁴⁾。したがって、肥満を基盤として発症する糖尿病、動脈硬化の病態時や悪性腫瘍を含めた生体の炎症時において、また心筋梗塞や脳梗塞などの血栓性疾患が発症しやすい状態下で、血液中的アディポネクチンレベルが低下し、PAI-1レベルが高まることは、生体にとって非常に悪い状況である⁶⁵⁾。このような生体に酸化ストレスの負荷がかかっているような様々な病態時に共通して認められるのが、血中や血管壁の局所でTNF- α 濃度が上昇していることである。実際にTNF- α はアディポネクチンの発現を低下させ、正常なインスリン感受性を損なわせる物質であることが知られており³⁷⁾³⁸⁾、また抗酸化剤の共存下においてはアディポカイン類の分泌が是正されたとの報告もある⁶⁶⁾。本研究では、TNF- α に依存して減少したアディポネクチンの分泌が、GW7647、あるいはピタバスタチンの比較的低濃度の処理によって回復する結果が得られており、臨床応用するための価値のある基礎データが含まれていると考えられる。

一方、アディポネクチンによる生体内での好ましい作用はその受容体の活性化を介して生じることが

知られている⁶⁷⁾。特にアディポネクチンの受容体への結合によってAMPK、SIRT1、PPARが活性化される結果、カロリー消費や生活習慣病の改善が進むと共に、寿命の延長効果が発揮される可能性もあると指摘されている⁶⁸⁾。脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンの受容体としては、主に骨格筋に存在するアディポネクチン受容体-1と肝臓に存在するアディポネクチン受容体-2が知られ⁶⁷⁾⁶⁹⁾、それらの働きが注目されているが、血管内皮細胞のアディポネクチン受容体に関する報告はない。そこで、本研究でヒト臍帯静脈由来の培養血管内皮細胞を用いて調べたところ、アディポネクチン受容体-1と-2のmRNAが共に血管内皮細胞に存在することが判明し、さらに、GW7647の処理でアディポネクチン受容体-1 mRNAの発現量が増加していることが判明した（データ未発表）。

アディポネクチン受容体に低濃度で結合してアディポネクチンと同様の様々な機能活性を高める低分子化合物のアディポロン（AdipoRon、分子量428.52⁷⁰⁾）が開発され、医薬品としての可能性に期待がもたれている。現段階ではアディポサイトカインによるアディポネクチン受容体を介した作用は主に脂肪細胞と肝臓、骨格筋を標的とした報告が中心である。しかし、上記の結果が示すように、血管内皮細胞のアディポネクチン受容体を活性化することを介して血管壁での抗糖尿病作用や抗血栓性作用が発揮されることも想定できる。すなわち、GW7647やピタバスタチンを利用することで、脂肪細胞に加えて血管内皮細胞を標的とした生活習慣病の発症予防や改善に貢献できる可能性がある。

以上により、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンとPAI-1の増減に関する本研究結果では、脂肪細胞と血管内皮細胞を標的としたメタボリックシンドロームの予防・治療戦略に有益な情報が提示できたと考えられる。最近になって、大阪大の岸本らのグループ⁷¹⁾によって、細菌感染によって引き起こされる急性呼吸窮迫症候群だけでなく、新型コロナウイルス（COVID-19）感染症（SARS-CoV-2）の患者では、サイトカイン放出症候群（cytokine release syndrome, CRS）と呼ばれる状態に陥り、PAI-1が顕著に増加する例が報告されている。今回利用したPPAR α リガンドのGW7647やスタチン系薬剤のピタバスタチンは、TNF- α のような炎症性サイトカインに依存した脂肪細胞や血管内皮細胞からの生理活性物質の分泌を正常化する作用を十分に発揮できると考えられ、新型コロナウイルス

（COVID-19）による重症化に関わるサイトカインストーム⁷²⁾に対しても有用性が高いことが示唆される。

V. 謝 辞

ピタバスタチン（商品名：リバロ）を供与してくださり、実験方法についてアドバイスをくださった興和創薬株式会社（現興和株式会社）と同川越営業所の皆様に深謝いたします。

阻害剤を供与してくださいました福井医科大学（現福井大学医学部）の笈田耕治先生に篤く御礼申し上げます。本研究にご協力いただいた女子栄養大学臨床生化学研究室（現千葉県立保健医療大学）の福島真実先生、栄養科学研究所の平石さゆり先生、卒論生の皆様に心より感謝申し上げます。

なお、本研究に関して、全著者の開示すべき利益相反状態は存在しません。

VI. 参考文献

- 1) 松沢祐次：メタボリックシンドローム実践マニュアル。フジメディカル出版（2005）
- 2) 日本肥満学会：肥満症治療ガイドライン2006。肥満研究誌特集号（2006）
- 3) Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., *et al.* : Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue, *Gene*, 190, 227-235 (1997)
- 4) 森 昌朋 編：特集アディポサイトカインUpdate。アディポサイエンス 3（2006）
- 5) Funahashi, T., Nakamura, T., Shimomura, I., *et al.* : Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity, *Intern Med*, 38, 202-206 (1999)
- 6) 西澤 均, 船橋 徹：特集メタボリックシンドロームとアディポサイエンス。アディポサイエンス 2. 63-71（2005）
- 7) Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., *et al.* : cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1), *Biochem Biophys Res Commun*, 221, 286-289 (1996)
- 8) Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., *et al.* : The fat-derived hormone adiponectin reverses

- insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*, 7, 941-946 (2001)
- 9) Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., *et al.* : The adipocyte – secreted protein Acrp30 enhances hepatic Insulin action. *Nat Med*, 7, 947-953 (2001)
- 10) Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., *et al.* : Adipocyte - derived Plasma Protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A Scavenger receptor Expression in human monocyte - derived macrophages. *Circulation*, 103, 1057-1063 (2001)
- 11) Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., *et al.* : Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty- acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 8, 1288-1295 (2002)
- 12) Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., *et al.* : Adipocyte - derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation*, 105, 2893-2898 (2002)
- 13) Nakamura, Y., Shimada, K., Fukuda, D., *et al.* : Implications of adiponectin in patients with concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. *Heart*, 90, 528-533 (2004)
- 14) Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., *et al.* : Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 116, 1784-1792 (2006)
- 15) Samad, F., Yamamoto, K., Loskutoff, D.J. : Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo : induction by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *J Clin Invest*, 97, 37-46 (1996)
- 16) Samad, F., Loskutoff, D.J. : Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Mol Med*, 2, 568-582 (1996)
- 17) 大石勝隆 : 各論 - PAI-1. アディポサイエンス 3. 298-304 (2006)
- 18) Jones, I.R., Swai, A., Taylor, R., *et al.* : Lowering of plasma glucose concentrations with bezafibrate in patients with moderately controlled NIDDM. *Diabetes Care*, 13, 855-863 (1990)
- 19) 日本動脈硬化学会編. 動脈硬化性疾患予防のための脂質異常症治療ガイド2013年版. 日本動脈硬化学会 (2013)
- 20) Tenenbaum, A. Motro, M., Fisman, E.Z., *et al.*: Peroxisome proliferator-activated receptor ligand bezafibrate for prevention of type 2 diabetes mellitus in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 109, 2197-2202 (2004)
- 21) Zhang, W., Sakai, T., Fujiwara, S., *et al.*: Wyl4643, an agonist for PPAR α , downregulates expression of TARC and RANTES in cultured human keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 26, 457-459 (2016)
- 22) Okishio, S., Yamaguchi, K., Ishiba, H., *et al.*: PPAR α agonist and metformin co-treatment ameliorates NASH in mice induced by a choline-deficient, amino acid-defined diet with 45% fat. *Scientific Reports*, 10, AN19578 (2020)
- 23) Hu, M., Tomlinson, B.: Evaluation of the pharmacokinetics and drug interactions of the two recently developed statins, rosuvastatin and pitavastatin. *Expert Opinion Drug Metab. Toxicol*, 10, 51-65 (2014)
- 24) Green, H., Meuth, M. : An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3, 127-133 (1974)
- 25) Green, H., Kehinde, O. : Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell*, 7, 105-113 (1976)
- 26) Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.S. : Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 78, 783-809 (1998)
- 27) Nakano, M., Furutani, M., Shinno, H., *et al.*: Elevation of soluble thrombomodulin antigen levels in the serum and urine of streptozotocin-induced diabetes model rats. *Thromb Res*, 99, 83-91 (2000)
- 28) Mohanty, P., Aljada, A., Ghanim, H., *et al.*: Evidence for a potent antiinflammatory Effect

- of Rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 2728-2735 (2004)
- 29) Frémin, C., Meloche, S.: From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol*, 3, 8 (2010)
- 30) Hutter, D., Chen, P., Barnes, J., *et al.*: Catalytic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 by binding to p38 MAP kinase: critical role of the p38 C-terminal domain in its negative regulation. *Biochem J*, 352, 155-163 (2000)
- 31) Mark, A., Lemmon, M.A., Schlessinger, J.: Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117-1134 (2010)
- 32) Castellano, E., Downward, J.: RAS interaction with PI3K more than just another effector pathway. *Genes Cancer*, 2, 261-274 (2011)
- 33) Knighton, D.R., Zhenglynn, J., Eyck, T.: Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*, 253, 414-420 (1991)
- 34) Sudarsanam, S., Bingham, J., Plowman, G.D., *et al.*: The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: A model for signal transduction in multicellular organisms. *PNAS*, 96, 13603-13610 (1999)
- 35) Kolch, W.: Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 351, 289-305 (2000)
- 36) Cawthorn, W.P., Sethi, J.K.: TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Lett*, 582, 117-131 (2008)
- 37) Kern, P.A., Di Gregorio, G.B., Lu, T., *et al.*: Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. *Diabetes*, 52, 1779-1785 (2003)
- 38) Ruan, H., Lodish, H.F.: Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 447-455 (2003)
- 39) Birgel, M., Gottschling-Zeller, H., Röhrig, K., *et al.*: Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1682-1687 (2000)
- 40) Pandey, M., Loskutoff, D.J., Samad, F.: Molecular mechanisms of tumor necrosis factor- α -mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipocytes. *FASEB J*, 19, 1317-1319 (2005)
- 41) Bellosta, S., Bernini, F., Ferri, N., *et al.*: Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis*, 137, 101-109 (1998)
- 42) Moghadasian, M.H.: Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci*, 65, 1329-1337 (1999)
- 43) Mueck, A.O., Seeger, H.: Statins and direct vascular actions. *Panminerva Med*, 45, 1-6 (2003)
- 44) Yilmaz, M.I., Sonmez, A., Caglar, K., *et al.*: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) agonist increases plasma adiponectin levels in type 2 diabetic patients with proteinuria. *Endocrine*, 25, 207-214 (2004)
- 45) Hiuge, A., Tenenbaum, A., Maeda, N., *et al.*: Effects of peroxisome proliferator-activated receptor ligands, bezafibrate and fenofibrate, on adiponectin level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 635-641 (2007)
- 46) Banfi, C., Auwerx, J., Poma, F., *et al.*: Induction of plasminogen activator inhibitor I by the PPAR α ligand, Wy-14,643, is dependent on ERK1/2 signaling pathway. *Thromb Haemost*, 90, 611-619 (2003)
- 47) Hoo, R.L., Chow, W.S., Yau, M.H., *et al.*: Adiponectin mediates the suppressive effect of rosiglitazone on plasminogen activator inhibitor-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 2777-2782 (2007)
- 48) Miyagishima, K., Hiramitsu, S., Kato, S., *et al.*: Efficacy of atorvastatin therapy in ischaemic heart disease - effects on oxidized low-density lipoprotein and adiponectin. *J Int Med Res*, 35, 534-539 (2007)
- 49) Otto, C., Otto, B., Frost, R.J., *et al.*: Short-term

- therapy with atorvastatin or fenofibrate does not affect plasma ghrelin, resistin or adiponectin levels in type 2 diabetic patients with mixed hyperlipoproteinaemia. *Acta Diabetol*, 44, 65-68 (2007)
- 50) Nakamura, T., Kodama, Y., Takano, H., *et al.* : Increase in circulating levels of adiponectin after treatment with statin and fibrate in patients with coronary artery disease and hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, 193, 449-451 (2007)
- 51) Forst, T., Pfützner, A., Lübben, G., *et al.* : Effect of simvastatin and/or pioglitazone on insulin resistance, insulin secretion, adiponectin, and proinsulin levels in nondiabetic patients at cardiovascular risk-the PIOSTAT Study. *Metabolism*, 56, 491-496 (2007)
- 52) Saito, S., Fujiwara, T., Matsunaga, T., *et al.* : Increased Adiponectin synthesis in the visceral adipose tissue in men with coronary artery disease treated with pravastatin: A role of the attenuation of oxidative stress. *Atherosclerosis*, 199, 378-383 (2007)
- 53) Isaacsohn, J.L., Setaro, J.F., Nicholas, C., *et al.* : Effects of lovastatin therapy on plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels. *Am J Cardiol*, 74, 735-737 (1994)
- 54) Kunieda, Y., Nakagawa, K., Nishimura, H., *et al.* : HMG CoA reductase inhibitor suppresses the expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 induced by angiotensin II in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Res*, 110, 227-234 (2003)
- 55) Li, J.Q., Zhao, S.P., Li, Q.Z., *et al.* : Atorvastatin reduces plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipose tissue of atherosclerotic rabbits. *Clin Chim Acta*, 370, 57-62 (2006)
- 56) Masamura, K., Oida, K., Kanehara, H., *et al.* : Pitavastatin-induced thrombomodulin expression by endothelial cells acts via inhibition of small G proteins of the Rho family. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 512-517 (2003)
- 57) 服部成介 : シグナル伝達入門. 羊土社 (2003)
- 58) Issemann, I., Prince, R.A., Tugwood, J.D., *et al.* : The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie*, 75, 251-256 (1993)
- 59) Gearing, K.L., Göttlicher, M., Teboul, M., *et al.* : Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 1440-1444 (1993)
- 60) Iwaki, M., Matsuda, M., Maeda, N., *et al.* : Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*, 52, 1655-1663 (2003)
- 61) Landin, K., Stigendal, L., Eriksson, E., *et al.* : *Abdominal obesity is associated with an impaired* fibrinolytic activity and elevated plasminogen activator inhibitor-1. *Metabolism*, 39, 1044-1048 (1990)
- 62) Shimomura, I., Funahashi, T., Takahashi, M., *et al.* : Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med*, 2, 800-803 (1996)
- 63) Hoekstra, T., Geleijnse, J.M., Schouten, E.G., *et al.* : Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk, *Thromb Haemost*, 91, 861-872 (2004)
- 64) Lijnen, H.R., Alessi, M.C., Van Hoef, B., *et al.* : On the role of plasminogen activator inhibitor-1 in adipose tissue development and insulin resistance in mice. *J Thromb Haemost*, 3, 1174-1179 (2005)
- 65) Funahashi, T., Matsuzawa, Y.: Metabolic syndrome : Clinical concept and molecular basis. *Ann Med*, 39, 482-494 (2007)
- 66) Araki, S., Dobashi, K., Kubo, K., *et al.* : N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha induced changes in secretion of interleukin-6, plasminogen activator inhibitor-1 and adiponectin from 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci*, 79, 2405-2412 (2006)
- 67) Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., *et al.* : Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*, 13, 332-339 (2007)
- 68) Iwabu, M., Yamauchi, T., Okada-Iwabu, M.,

- et al.* : Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature*, 464, 1313-1319 (2010)
- 69) Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., *et al.* : Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423, 762-769 (2003)
- 70) Okada-Iwabu, M., Yamauchi, T., Iwabu, M., *et al.* : A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature*, 503, 493-499 (2013)
- 71) Kanga, S., Tanaka, T., Inoue, H., *et al.* : IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome. *PNAS*, 117, 22351-22356 (2020)
- 72) Moore, J.B., Carl, H., June, C.H.: Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*, 368, 473-474 (2020)