

平成 28 年度 学 位 論 文

論 文 題 目

〈邦 文〉

3T3-L1 細胞におけるアディポカイン分泌と脂肪蓄積
に関する研究

〈欧 文〉

Adipokine Secretion and Lipid Accumulation in
3T3-L1 Adipocytes

名城大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 博士課程

氏 名

椿井 朋

平成 28 年度 博士論文

3T3-L1 細胞におけるアディポカイン分泌と脂肪蓄積に関する研究

Adipokine Secretion and Lipid Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes

名城大学大学院薬学研究科 薬学専攻

薬物治療科学分野 病態解析学I

学籍番号 124331506

氏名 椿井 朋

目次

はじめに	1
第一章 3T3-L1 細胞におけるレプチン分泌機構	3
1-1. 緒言	5
1-2. 実験材料および実験方法	5
1-2-1. 細胞培養と分化	
1-2-2. 使用薬物と実験条件	6
1-2-3. レプチン濃度の定量 (ELISA 法)	6
1-2-4. レプチン mRNA 発現量の解析 (リアルタイム PCR 法)	6
1-2-5. 細胞傷害性の解析 [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5 (3-carboxymethoxyphenol) -2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium (MTS) assay 法]	7
1-2-6. 統計処理	8
1-3. 実験結果	8
1-3-1. 3T3-L1 細胞におけるインスリンとグルコースによる レプチンの分泌および mRNA 発現への影響	9
1-3-2. グルコース非添加培養培地でのインスリンによるレプチンの分泌 および mRNA 発現における PI3K-Akt シグナル伝達系の関与	9
1-3-3. グルコース非添加培養培地での PDE3B 阻害薬と cAMP による レプチンの分泌および mRNA 発現への影響	9
1-3-4. グルコース非添加培養培地でのアドレナリンによる レプチンの分泌および mRNA 発現への影響	10
1-3-5. グルコース添加培養培地でのレプチンの分泌および mRNA 発現における インスリン受容体を介するシグナル伝達系とアドレナリンの関与	11
1-4. 考察	13
1-5. 小括	15

第二章	第二世代抗精神病薬が脂肪細胞に与える影響	16
2-1.	緒言	16
2-2.	実験材料および実験方法	17
2-2-1.	細胞培養と分化	17
2-2-2.	使用薬物	17
2-2-3.	薬物の曝露	17
2-2-4.	細胞傷害性の解析 [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5 (3-carboxymethoxyphenol) -2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium (MTS) assay 法]	17
2-2-5.	脂肪滴蓄積量の測定 (Oil Red-O 染色法)	18
2-2-6.	アディポカイン濃度の定量 (ELISA 法)	18
2-2-7.	アディポカイン mRNA 発現量の解析 (リアルタイム PCR 法)	18
2-2-8.	統計処理	19
2-3.	実験結果	20
2-3-1.	細胞傷害性の解析	20
2-3-2.	3T3-L1 細胞におけるクロザピンおよびブロナンセリンによる アディポカインの分泌への影響	20
2-3-3.	3T3-L1 細胞におけるクロザピンおよびブロナンセリンによる アディポカインの mRNA 発現への影響	22
2-3-4.	3T3-L1 細胞におけるクロザピンおよびブロナンセリンによる 脂肪滴蓄積への影響	23
2-3-5.	3T3-L1 細胞でのクロザピンによるレプチンの分泌抑制における ヒスタミン H ₁ 受容体およびセロトニン 5-HT _{2c} 受容体の関与	25
2-4.	考察	27
2-5.	小括	29
	総括	30
	謝辞	31
	参考文献	32

論文目録

本学位論文は以下の論文を基盤として作成した。

主論文

Tomomi Tsubai, Akira Yoshimi, Yoji Hamada, Makoto Nakao, Hiroshi Arima, Yutaka Oiso, Yukihiro Noda :

Effects of clozapine on adipokine secretions/productions and lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, in press (2017)

Tomomi Tsubai, Yukihiro Noda, Kazuma Ito, Makoto Nakao, Yusuke Seino, Yutaka Oiso, Yoji Hamada :

Insulin elevates leptin secretion and mRNA levels via cyclic AMP in 3T3-L1 adipocytes deprived of glucose. *Heliyon*, 2, e00194 (2016)

参考論文

Tomomi Tsubai, Yukihiro Noda, Akihiro Mouri, Sakiko Nishikawa, Yoko Hibi, Kiyofumi Yamada, Makoto Nakao :

Practical program to gather patient information from a diversified perspective and provide appropriate therapies in practical hospital training. *YAKUGAKU ZASSHI*, 135, 507-518 (2015)

はじめに

メタボリックシンドロームは、心血管疾患予防を目的としてハイリスクグループを絞り込むために定義された疾患概念である。内臓脂肪の蓄積によりインスリン抵抗性（糖代謝異常）、動脈硬化惹起性リポ蛋白異常、あるいは血圧高値を合併する病態である。これらのリスクファクターが3個以上合併した場合の心血管疾患危険率は健常者の30倍以上であることが報告されている（厚生労働省ホームページ, <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/08/s0826-9d.html>, 2016年11月25日）。

過食と運動不足によるエネルギー過多を原因として内臓脂肪（腹腔内脂肪）が蓄積すると、脂肪細胞より生理活性物質である様々なアディポサイトカイン（アディポカイン）の分泌異常をきたし、糖代謝・脂質代謝異常、高血圧、さらには心血管疾患を惹起する [1]。これらの代謝異常は内臓脂肪蓄積を共通の基盤として持ち、メタボリックシンドロームは体重の減量、特に、内臓脂肪の減量により確実に予防効果が期待できる。しかし、アディポカインの分泌異常の詳細な機序は明らかになっていない。アディポカインには、炎症や免疫疾患の発症に関与する monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) や interleukin-6 (IL-6)、動脈硬化を促進する tumor necrosis factor- α (TNF- α) や plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、動脈硬化を予防するレプチンやアディポネクチンなどがある。脂肪細胞が肥大化すると、炎症性サイトカインの MCP-1 や IL-6 の分泌が促進され、アディポネクチンの分泌は抑制される。逆にレプチンの分泌は促進されるが、肥満による高レプチン血症ではレプチン抵抗性のため、本来の摂食を抑制したり、エネルギー消費を増大したりする作用が期待できない [2]。レプチンの分泌に影響を与える因子として、インスリンやグルココルチコイド、チアゾリジン誘導体などが報告されている [3, 4] が、その分泌・産生機序の詳細は明らかになっていない。

一方、統合失調症などの精神疾患患者は、健常人と比較して有病率や死亡率が高く、平均寿命は健常人より20%程度短い [5-7]。統合失調症患者の死因は、心血管疾患のような身体疾患に起因するものが多く [7]、統合失調症患者は2型糖尿病、高血圧や脂質異常症などのメタボリックシンドロームを発症しやすく、有病率や死亡率を増加させる [8]。

統合失調症の治療薬である第二世代抗精神病薬（second-generation antipsychotics : SGAs）は第一世代抗精神病薬と比較して、体重増加や糖代謝・脂質代謝異常などのメタボリックシンドロームに起因する副作用を発現しやすい [7, 9]。SGAs の中でもクロザピンとオランザピンは、特にメタボリックシンドロームを惹起しやすい [7, 10, 11]。SGAs による体重増加は、食欲増進や脂肪の蓄積、あるいはエネルギー消費の低下によって引き起こされる [12]。近年では、摂食やエネルギー消費の調節に視床下部のヒスタミン H_1 受容体およびセロトニン 5-HT_{2c} 受容体が関与していることが示唆されており [13-15]、これらの受容体の阻害作用により食欲増進や体重増加を誘発する [12, 13, 16, 17]。抗精神病薬におけるヒスタミン H_1 受容体への親和性と、体重増加には正の相関が認められ [18]、ヒスタミン H_1 受容体とセロトニン 5-HT_{2c} 受容体の両方の受容体を阻害する SGAs は、より体重増加を誘発しやすい [15]。体重増加を惹起しやすいクロザピンは、ヒスタミン H_1 受容体およびセロトニン 5-HT_{2c} 受容体に高い親和性を有し [15]、ブロナンセリンやアリピプラゾールのように両受容体への親和性が低い他の SGAs は、体重増加を惹起しにくい [19, 20]。しかし、中枢のヒスタミン H_1 受容体およびセロトニン 5-HT_{2c} 受容体が、SGAs による食欲増進や脂肪の蓄

積、エネルギー消費の低下にどのように関与しているか、また、末梢組織に直接的に作用するのか、その詳細な機序については明らかにされていない。

以上のことから、アディポカインの中でもレプチンは、エネルギー摂取や消費に深く関与していることから、体重増加やメタボリックシンドロームに関連した疾患の発症や増悪に密接に関わっている。抗精神病薬による体重増加や代謝異常についても、末梢の脂肪細胞への直接的な影響を検討することは、抗精神病薬による体重増加に対する機序解明の一助となる。そこで、第一章では、分化脂肪細胞である 3T3-L1 細胞における摂食抑制およびエネルギー消費作用を有するレプチンの分泌機構について検討した。その結果、インスリンとグルコースはレプチンの分泌を促進するが、その機序にはアデニル酸シクラーゼを介する phosphoinositide 3-kinase (PI3K) – serine/threonine protein kinase (Akt) シグナル伝達系が関与していることが見出された。第二章では、3T3-L1 細胞におけるアディポカインの分泌や mRNA 発現、および脂肪滴蓄積へのクロザピンによる直接的な影響について検討した。その結果、クロザピンはアディポカインの中でもレプチンの分泌および mRNA 発現に影響を与えることが見出され、この作用はセロトニン 5-HT_{2c} 受容体を一部介して発現している可能性が示唆された。また、クロザピンは脂肪滴蓄積量を増加させたが、この作用にはセロトニン 5-HT_{2c} 受容体を介さない脂肪細胞への直接的な作用が関与していることが示唆された。

以上の知見を踏まえ、体重増加の機序を解明することは、肥満およびそれに続発するメタボリックシンドロームの発症機序を解明する一助にもなり、体重増加に起因する疾患の新たな予防法や治療薬の開発に繋がることが期待できる。

以下に本研究で得られた知見を各章に分けて記述する。

第一章 3T3-L1 細胞におけるレプチン分泌機構

1-1. 緒言

アディポカインの一つであるレプチンは、成熟脂肪細胞より分泌される生理活性物質であり、視床下部のレプチン受容体を介して食欲の抑制、エネルギー消費の亢進、およびインスリン感受性を高める [21-24]。したがって、レプチンの産生および分泌の抑制は、体重増加の誘因となり、肥満や糖尿病の発症に繋がる。

血清レプチン濃度は体脂肪量と相関する [25] が、肥満による高レプチン血症ではレプチン抵抗性のためレプチン本来の摂食を抑制する、エネルギーを消費する、あるいはインスリン感受性を高める作用は期待できない。レプチンの分泌に影響を与える栄養素やホルモン [26, 27] の中でもインスリンは、レプチンの分泌促進物質として広く知られている [3, 28-36]。一方、レプチンの分泌はインスリンよりグルコース濃度に依存していること [28, 29, 32] や、インスリンによるレプチンの分泌はグルコースには依存していないこと [30, 34, 37]、インスリンによるレプチンの分泌はグルコースの存在に関係なく、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) -phosphodiesterase 3B (PDE3B) シグナル伝達系や cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) を介していること [35, 36, 38, 39] が報告されている。しかし、レプチンの分泌の機序については諸説あり、未だ不明な点が多い。

インスリンや糖代謝は、レプチンの分泌を促進するだけでなく、レプチン合成も促進するかどうかは明らかにされていない。糖代謝の亢進は、脂肪細胞におけるレプチン mRNA 発現やタンパク質合成を促進する [28, 30, 40] が、グルコース非存在下ではレプチン mRNA 発現を低下させる [28]。また、レプチンの分泌にはピルビン酸や糖原生アミノ酸が関与していることが示唆されている [41] が、その詳細な機序については明らかにされていない。

本研究では、脂肪細胞におけるレプチン分泌の促進因子による調節機構の解明を目的として、3T3-L1 細胞を用いてグルコース存在下と非存在下でのレプチンの分泌および mRNA 発現におけるインスリンの役割を検討した。

1-2. 実験材料および実験方法

1-2-1. 細胞培養と分化

3T3-L1 前駆脂肪細胞は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) より購入した。培養培地は 25 mM グルコース含有ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's medium: DMEM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) に 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) と 1% ペニシリンーストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を混合し、37 °C の CO₂ インキュベータにて培養した。24 ウェルプレートに継代し、コンフルエントとなった 2 日後に、最終濃度 10 µg/mL インスリン (Sigma-Aldrich)、2.5 µM デキサメタゾン (Sigma-Aldrich)、および 0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (3-isobutyl-1-methylxanthine: IBMX, Sigma-Aldrich) により分化・誘導し、その 2 日後に 10 µg/mL インスリンを添加した。2~3 日間隔で培養培地を交換し、分化誘導後 10 日目に実験に使用した。なお、用いた 3T3-L1 細胞において脂肪滴の蓄積が確認でき、未熟脂肪細胞では分泌されないレプチンの分泌が認められた場合、成熟脂肪細胞に誘導されたと判断した。

1-2-2. 使用薬物と実験条件

成熟した 3T3-L1 細胞を用いた実験には、新鮮な培地による 2 回の洗浄の後、1% ペニシリンーストレプトマイシンおよび FBS を除外し、3% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA, Wako, Tokyo) を添加した 0、5.5、あるいは 25 mM グルコース濃度の培地を用いた。また、0.5 µM インスリン、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 阻害薬の 0.1、1、あるいは 10 µM BEZ-235 (Selleck, Houston, TX) と 20 µM ウォルトマンニン (Sigma-Aldrich)、serine/threonine protein kinase (Akt) 阻害薬の 0.1、1、あるいは 10 µM MK-2206 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)、phosphodiesterase 3B (PDE3B) 阻害薬の 0.1、0.5、あるいは 1 µM シロスタゾール (Cayman Chemicals)、膜透過性サイクリック AMP アナログの 100、200、あるいは 400 µM dibutyryl cAMP (R&D Systems, Minneapolis, MN)、0.1、1、あるいは 10 µM エピネフリン (アドレナリン) (Sigma-Aldrich)、アドレナリン α₁ 受容体拮抗薬の 10 µM プラゾシン (Sigma-Aldrich)、非選択性アドレナリン β 受容体拮抗薬の 10 µM プロプラノロール (Sigma-Aldrich)、および非競合的アデニル酸シクラーゼ阻害薬の 200 µM SQ 22536 (Sigma-Aldrich) を使用した。

BEZ-235、ウォルトマンニン、MK-2206、シロスタゾール、dibutyryl cAMP、および SQ 22536 は少量のジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO, Kanto Chemical, Tokyo)、アドレナリンは少量の希塩酸、プラゾシンは少量のメタノール、およびプロプラノロールは phosphate buffered saline (PBS) で溶解した後、培養培地で希釈した。各薬物濃度は既報 [42, 43, 44, 45] に従い決定した。

培養培地中へのレプチンの分泌を経時的に測定したところ、8 時間前後で測定可能であったこと、グルコース非存在下および非血清状態での長時間培養は細胞の機能に傷害を与える可能性があることから、薬物の曝露時間を 8 時間と設定した。薬物を 8 時間曝露後に培養培地と細胞を回収し、レプチンの濃度と mRNA 発現を測定した。

1-2-3. レプチン濃度の定量 (ELISA 法)

培養培地のレプチン濃度は、マウスレプチン測定キット (Enzyme-linked Immunosorbent Assay サンドイッチ法: Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin Immunoassay, R&D Systems) を用いて測定した。すなわち、Assay Diluent 50 μ L および薬物への曝露が終了した各ウェル中の培養液 50 μ L をキットの 96 ウェルプレートに添加した。十分に混和し、2 時間静置させた後、各ウェルの溶液を破棄し、洗浄液にて 5 回洗浄した。各ウェルに Conjugate 100 μ L を添加し、2 時間静置させた後、再度洗浄液にて 5 回洗浄し、Substrate Solution 100 μ L を添加した。遮光下で 30 分間静置した後、Stop Solution 100 μ L を加えて反応を停止させた。570 nm の吸光度から 450 nm の吸光度の差分より検量線を作成して定量解析した。本測定ではサンプル量を 2 倍とし Intra-assay と Inter-assay の測定精度はそれぞれが 4.3 % と 7.6 %、感度は 7.8 pg/mL だった。

1-2-4. レプチン mRNA 発現量の解析 (リアルタイム PCR 法)

培養培地を取り除いた細胞から High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics Gmb, Mannheim) を用いて total RNA 抽出を行った。すなわち、PBS 200 μ L および溶解/結合バッファー 400 μ L を加え細胞を剥離、懸濁した後、High Pure フィルターチューブに加え 10,000 rpm (約 8,000 $\times$ g、15 秒間遠心) で分離した。DNase インキュベーションバッファー 90 μ L、DNase I を混合して、分離した溶液に加え 15~25°C で 15 分間インキュベートした。洗浄バッファー I 500 μ L を加え、10,000 rpm (約 8,000 $\times$ g、15 秒間遠心) で分離した後、洗浄バッファー II 500 μ L を加え、10,000 rpm (約 8,000 $\times$ g、15 秒間遠心) で分離した。再度、洗浄バッファー II 200 μ L を加え、11,700 rpm (約 13,000 $\times$ g、2 分間遠心) を分離した。最後に溶出バッファー 50 μ L を加え、10,000 rpm (約 8,000 $\times$ g、1 分間遠心) を分離して、total RNA を抽出した。

PrimeScript RT master Mix (Perfect Real Time, Takara Bio, Otsu) にて cDNA への逆転写をプロトコールにしたがって行った。すなわち、氷上で 5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)、total RNA、および RNase Free dH₂O で逆転写反応液を調製し、攪拌して均一にした。その後、逆転写反応を 37°C で 15 分間、逆転写酵素を熱失活するために 85°C で 5 秒間、4°C で冷却後 -20°C で解析まで保管した。

リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus, Takara Bio) を使用し、Step One Plus System (Applied Biosystems, Foster City, CA) によりレプチンの mRNA 発現を解析した。すなわち、SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$) 10 μ L、PCR Forward Primer (10 μ M) 0.4 μ L、PCR Reverse Primer (10 μ M) 0.4 μ L、ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μ L、cDNA 1 μ L、および RNase Free dH₂O 7.8 μ L を加えて、計 20 μ L の反応液でリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR の条件は、初期変性は 95°C で 30 秒間、PCR 反応は DNA を増幅させるために熱変性を 95°C で 5 秒間行い、プライマーを DNA に結合させるためのアニーリングおよび伸長反応を 60°C で 30 秒間、40 サイクル実施した。発現は $\Delta\Delta$ Ct 法により算出した。なお、これらの mRNA 発現は内部標準として用いた glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) との比較によるリアルタイム PCR 法にて解析した。

Leptin : Forward: 5-tgacaccaaaccctcatca-3, Reverse: 5-tcattggctatctgcagcac-3.

GAPDH : Forward: 5-tccactcatggcaattcaa-3, Reverse: 5-tttgatgttagtgggtctcg-3.

1-2-5. 細胞傷害性の解析 [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5 (3-carboxymethoxyphenol) -2-(4-sulphophenyl) -2H-tetrazolium (MTS) assay 法]

各薬物の細胞傷害性を評価するため、MTS assay 法のプロトコールにしたがって生細胞数を測定した。すなわち、成熟した 3T3-L1 細胞に各薬物を 24 時間曝露させた後、新しい培養培地 200 μ L と交換し、CellTiter 96 Aqueous One Solution ReagentTM (Promega, Madison, WI) を各ウェルに 40 μ L 添加して 37 $^{\circ}$ C の CO₂ インキュベータにて 1 時間培養した。マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, Richmond, CA) にて 490 nm の吸光度を測定した。生細胞数を比較し、各ウェルの細胞活性が同等であることを確認した。

1-2-6. 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。データの統計解析は、一元あるいは二元配置分散分析 (one-way or two-way analysis of variance: ANOVA) を用いて行った。Post hoc テストは Tukey-Kramer の多重比較検定を用い、危険率 5 %未満 ($p < 0.05$) の場合に、統計的に有意差ありとした。

1-3. 実験結果

1-3-1. 3T3-L1 細胞におけるインスリンとグルコースによるレプチンの分泌および mRNA 発現への影響

インスリンとグルコースによるレプチンの分泌および mRNA 発現への影響を検討するために、インスリンを 3T3-L1 細胞に曝露し、レプチンの分泌および mRNA 発現を培養培地のグルコースの濃度で比較した。

インスリン (0.5 μM) をグルコース非添加培養培地 (0 mM) に曝露すると、レプチンの分泌および mRNA 発現を有意に促進した[Fig. 1a: two-way ANOVA, F_{Insulin} (1, 18) = 87.82, $p < 0.01$, F_{Glucose} (2, 18) = 5.52, $p < 0.05$, $F_{\text{Insulin} \times \text{Glucose}}$ (2, 18) = 3.00, $p = 0.075$, b: two-way ANOVA, F_{Insulin} (1, 18) = 42.98, $p < 0.01$, F_{Glucose} (2, 18) = 85.75, $p < 0.01$, $F_{\text{Insulin} \times \text{Glucose}}$ (2, 18) = 27.77 $p < 0.01$]. インスリン (0.5 μM) をグルコース添加培養培地 (5.5 または 25 mM) に暴露すると、レプチンの分泌を有意に促進したが、mRNA 発現は促進しなかった。グルコース非添加培養培地におけるインスリンによるレプチンの mRNA 発現の促進は、グルコースを存在させると消失した。

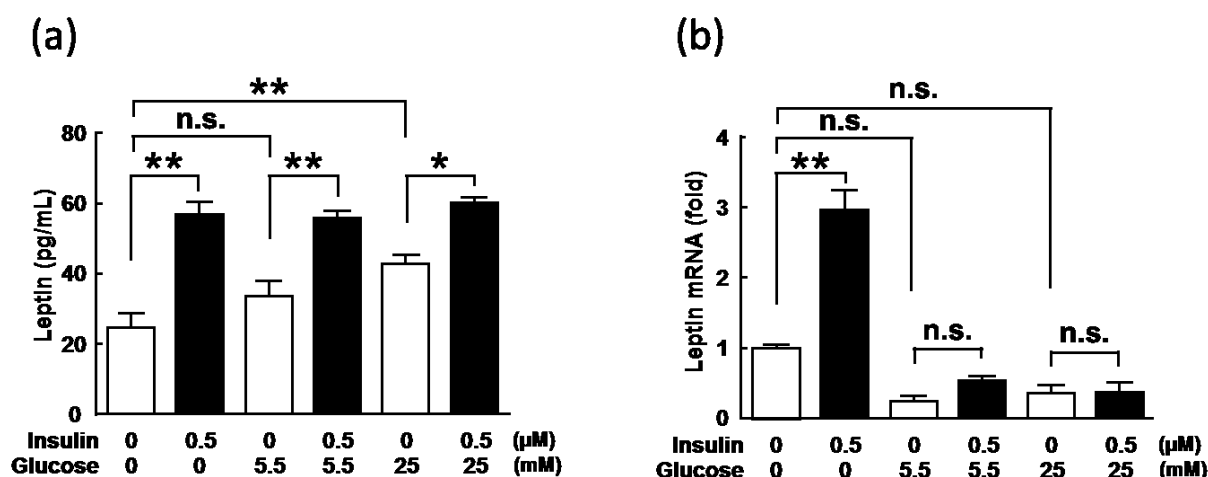


Fig. 1 Effects of glucose concentration and insulin on the secretion (a) and mRNA levels (b) of leptin in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were incubated for 8 h in DMEM containing 0, 5.5, or 25 mM glucose in the presence or absence of 0.5 μM insulin. Values indicate the mean $\pm$ SEM (n = 4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the corresponding insulin 0 μM . n.s., not significant.

1-3-2. グルコース非添加培養培地でのインスリンによるレプチンの分泌および mRNA 発現における PI3K-Akt シグナル伝達系の関与

グルコース非添加培養培地において、インスリンはレプチンの分泌および mRNA 発現を促進させた。インスリン受容体には PI3K-Akt 系が存在していることから、インスリンによるこれらの作用がインスリン受容体-PI3K-Akt シグナル伝達系を介しているかどうか検討した。

PI3K 阻害薬の BEZ-235 は、用量依存的にインスリンによるレプチンの分泌を抑制した[Fig. 2a: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 12) = 70.37, $p < 0.01$]が、mRNA 発現の促進を抑制しなかった[Fig. 2b: one-way ANOVA, F_{group} (3, 10) = 13.38, $p < 0.01$]. 別の PI3K 阻害薬のウォルトマンニンは、インスリンによるレプチンの分泌を抑制した[Fig. 2c: one-way ANOVA, F_{group} (3, 20) = 22.91, $p < 0.01$]. Akt 阻

害薬の MK-2206 は、BEZ-235 と同様にインスリンによるレプチンの分泌を抑制した [Fig. 2d: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 12) = 26.69, p < 0.01$] が、mRNA 発現の促進を抑制しなかった [Fig. 2e: one-way ANOVA, $F_{\text{group}}(3, 11) = 13.78, p < 0.01$]。抑制作用を示した BEZ-235 あるいは MK-2206 の濃度では、非曝露の生細胞数と比較し 10 % 程度の減少であったため (Fig. 2f)、顕著な細胞傷害は惹起しないものと思われる。

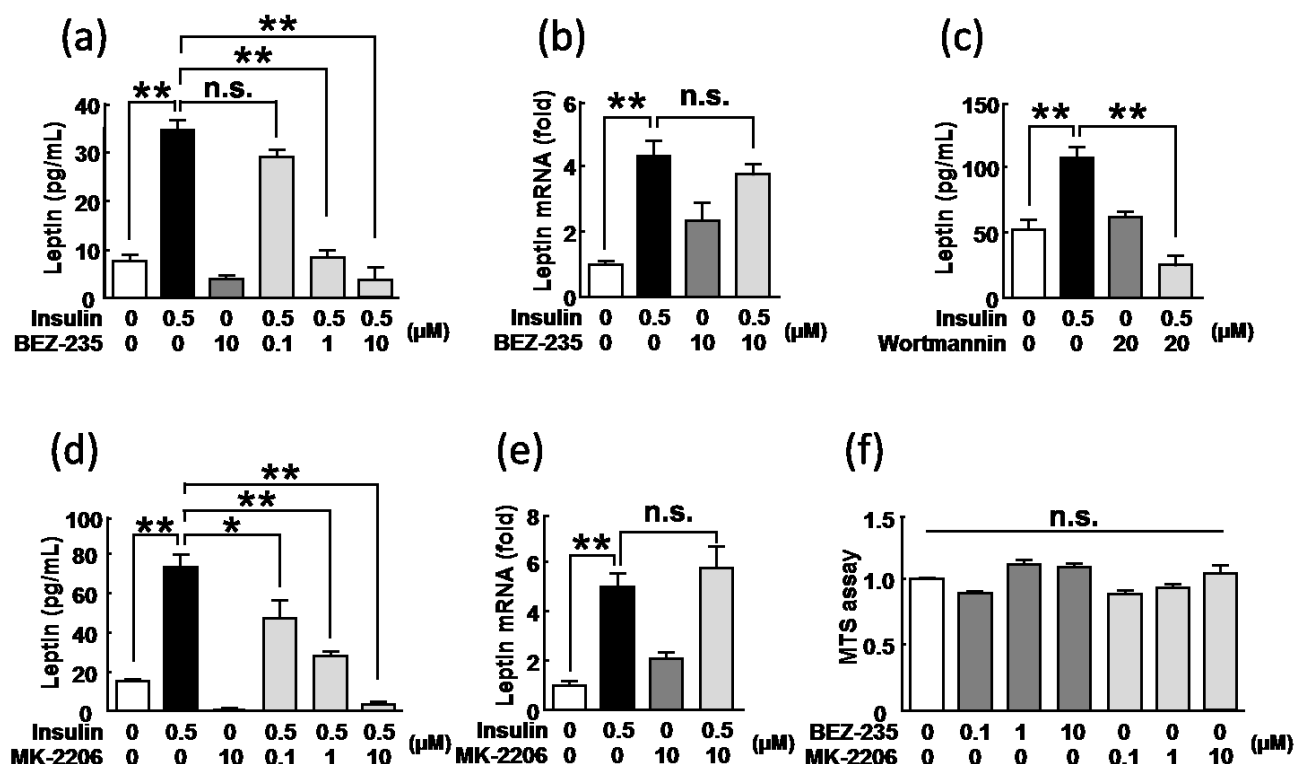


Fig. 2 Regulation of leptin secretion and mRNA levels by the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes under glucose depletion. 3T3-L1 adipocytes were incubated for 8 h in glucose-free DMEM containing insulin (0.5 μM) with or without the PI3K inhibitor BEZ-235 (0.1, 1, or 10 μM), wortmannin (10 μM) and the Akt inhibitor MK-2206 (0.1, 1, or 10 μM). (a and b) Effects of BEZ-235, (c) wortmannin, and (d and e) MK-2206 on leptin secretion and mRNA expression. (f) MTS assay after 24 h-incubation. Values indicate the mean ± SEM (n = 4 or 6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the corresponding insulin 0.5 μM alone. n.s., not significant.

1-3-3. グルコース非添加培養培地での PDE3B 阻害薬と cAMP によるレプチンの分泌および mRNA 発現への影響

インスリン受容体を介する PI3K-Akt シグナル伝達系において、cAMP から AMP へ変換する触媒酵素の PDE3B は、Akt の下流に位置する。そこでレプチンの分泌および mRNA 発現における cAMP の関与を調べるため、レプチンの分泌および mRNA 発現への PDE3B 阻害薬と cAMP の影響を検討した。

PDE3B 阻害薬のシロスタゾールは、インスリンによるレプチンの分泌を抑制した [Fig. 3a: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 12) = 5.435, p < 0.01$] が、mRNA 発現の促進を抑制しなかった [Fig. 3b: one-way ANOVA, $F_{\text{group}}(3, 5) = 8.133, p < 0.05$]。cAMP アナログは、インスリンによるレプチンの分

泌および mRNA 発現促進を抑制した [Fig. 3c: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 10) = 26.45$, $p < 0.01$, d: one-way ANOVA, $F_{\text{group}}(3, 12) = 7.864$, $p < 0.01$].

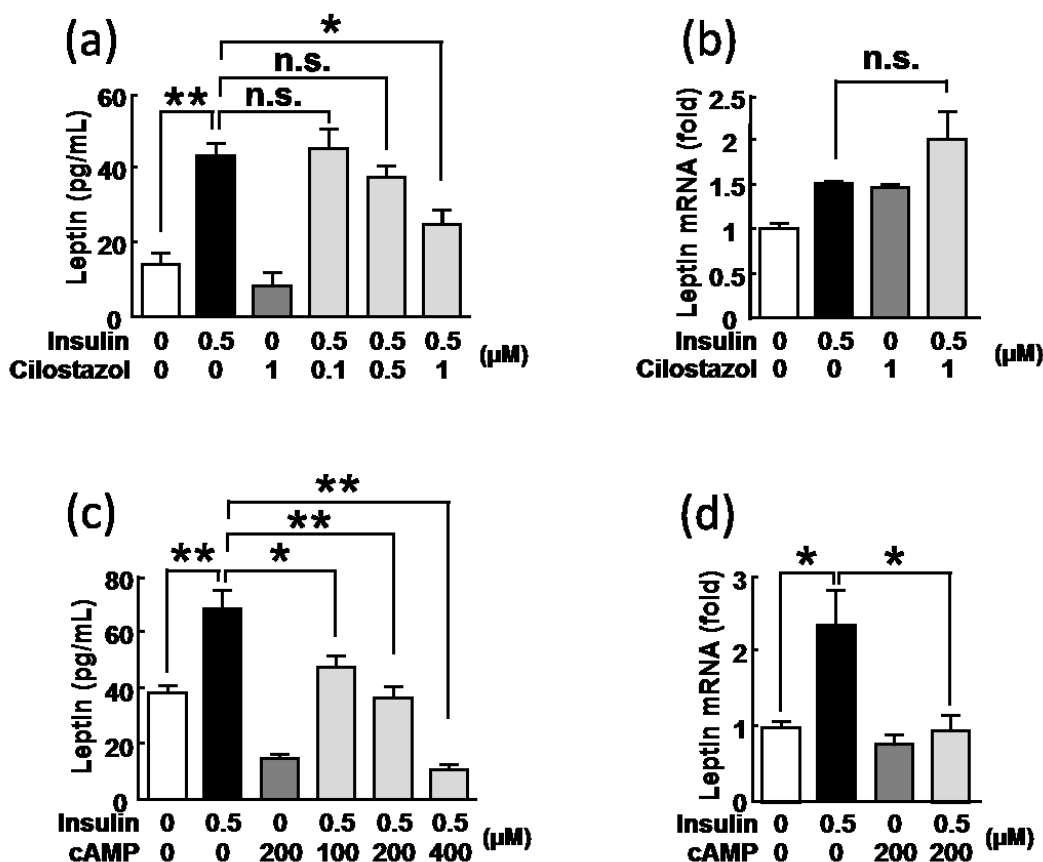


Fig. 3. Effects of the PDE3B inhibitor cilostazol (a and b) or a cyclic AMP analog (c and d) on insulin-induced leptin secretion and mRNA levels in 3T3-L1 adipocytes under glucose-free conditions. 3T3-L1 adipocytes were incubated for 8 h in glucose-free DMEM with each substance at the indicated concentrations. Values indicate the mean $\pm$ SEM ($n = 4$ or 6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the corresponding insulin 0.5 μM alone. n.s., not significant.

1-3-4. グルコース非添加培養培地でのアドレナリンによるレプチンの分泌および mRNA 発現への影響

cAMP アナログは、インスリンによるレプチンの分泌および mRNA 発現の促進作用を抑制することが見出された。アドレナリンは、cAMP をセカンドメッセンジャーとして細胞内シグナル伝達を促すため、アドレナリンもレプチンの分泌および mRNA 発現に影響を与える可能性がある。そこで、レプチンの分泌および mRNA 発現へのアドレナリンの影響について検討した。

アドレナリンは、グルコース非添加培養培地においてレプチンの分泌および mRNA 発現を用量依存的に抑制した [Fig. 4a: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 12) = 21.67$, $p < 0.01$, b: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 12) = 4.822$, $p < 0.05$]. アドレナリンによるレプチンの分泌の抑制は、非選択的アドレナリン β 受容体拮抗薬のプロプラノロールによって緩和されたが、アドレナリン α_1 受容体拮抗薬のプラゾシンでは緩和されなかった [Fig. 4c: one-way ANOVA, $F_{\text{group}}(3, 12) = 8.283$, $p < 0.01$]. アデニル酸シクラーゼ阻害薬の SQ 22536 も分泌抑制を緩和しなかった [Fig. 4f: one-way ANOVA, $F_{\text{group}}(3, 12) = 33.77$, $p < 0.01$].

0.01]。

アドレナリンによるレプチンの mRNA 発現の抑制作用は、プロプラノロールによって緩解されなかった [Fig. 4d: one-way ANOVA, $F_{\text{group}}(3, 12) = 4.997, p < 0.05$]。アドレナリンはインスリンによるレプチンの分泌促進を有意に抑制した [Fig. 4e: one-way ANOVA, $F_{\text{group}}(3, 12) = 99.28, p < 0.01$]。

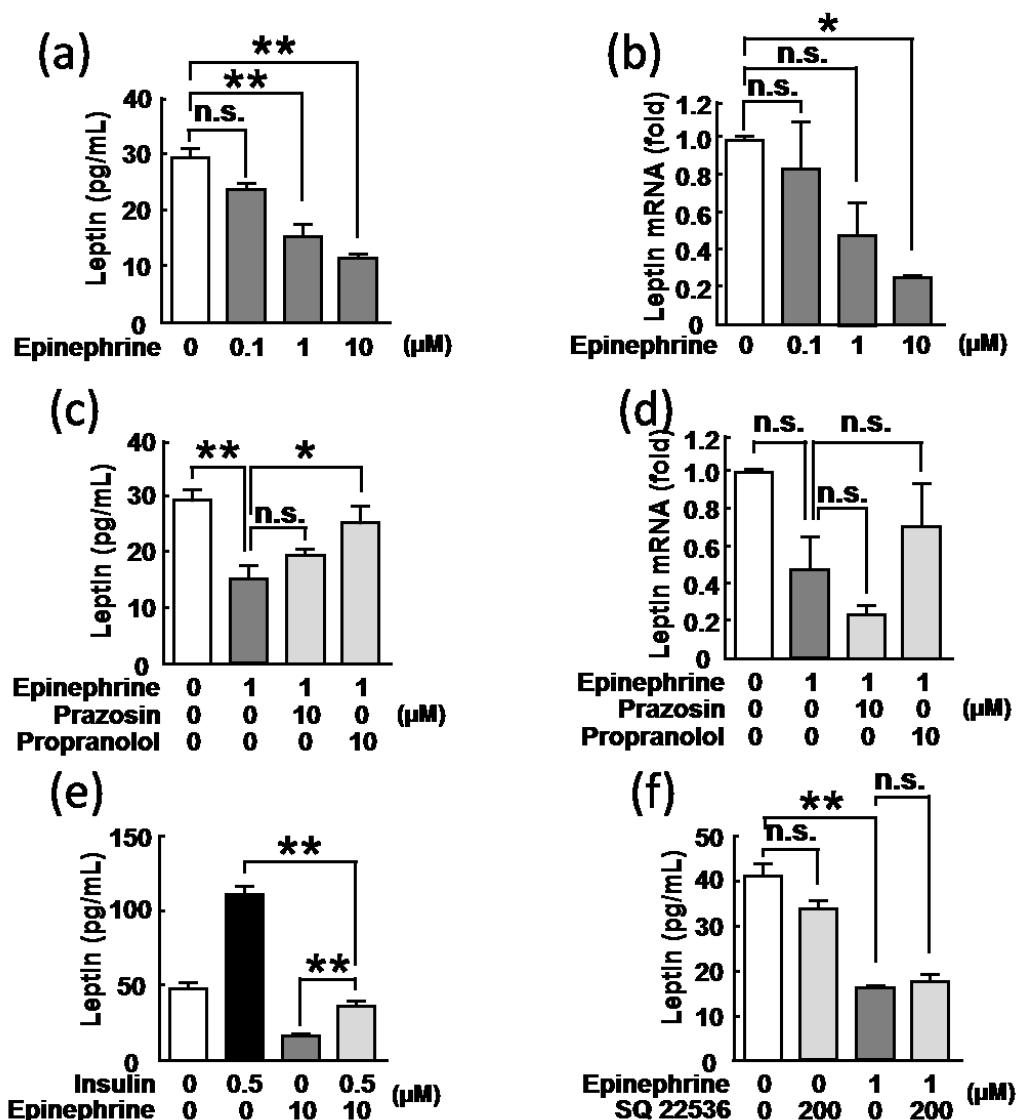


Fig. 4. Effect of epinephrine on leptin secretion and mRNA levels under glucose depletion. 3T3-L1 adipocytes were incubated for 8 h in glucose-free DMEM with epinephrine, an α 1-adrenergic receptor antagonist (prazosin), and a nonselective beta-adrenergic receptor antagonist (propranolol). (a and b) Effects of epinephrine on leptin secretion and mRNA levels. (c and d) Effects of prazosin and propranolol on epinephrine-induced suppression of leptin secretion and mRNA levels. (e) Epinephrine suppresses insulin effects on leptin secretion. (f) Effect of an adenylate cyclase inhibitor, SQ22536, on the epinephrine suppression of leptin. Values indicate the mean $\pm$ SEM ($n = 6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the corresponding the vehicle control (0 μ M), epinephrine 1 μ M alone, or insulin 0.5 μ M alone. n.s., not significant.

1-3-5. グルコース添加培養培地でのレプチンの分泌および mRNA 発現におけるインスリン受容体を介するシグナル伝達系とアドレナリンの関与

グルコース非添加培養培地において、インスリンによるレプチンの分泌促進は、インスリン受容体から PI3K-Akt シグナル伝達系を介して発現することが見出された。また、アドレナリンがレプチンの分泌および mRNA 発現を用量依存的に抑制する結果が見出された。グルコース添加培養培地においても、インスリンによってレプチンの分泌および mRNA 発現が促進されるかどうか検討した。

グルコース添加培養培地におけるレプチンの分泌は、インスリンにより促進され、その促進作用は BEZ-235 あるいは MK-2206 によって抑制された [Fig. 5a: one-way ANOVA, F_{group} (3, 12) = 42.06, $p < 0.01$]。インスリンはレプチンの mRNA 発現に影響を与えなかったが、BEZ-235 あるいは MK-2206 はその発現を抑制した [Fig. 5b: one-way ANOVA, F_{group} (3, 12) = 25.38, $p < 0.01$]。シロスタゾールは、インスリンによるレプチンの分泌促進を抑制しなかった [Fig. 5c: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 10) = 0.292 $p = 0.83$]、cAMP アナログの単独処置は、レプチンの分泌および mRNA 発現を抑制し [Fig. 5d: one-way ANOVA, F_{group} (3, 12) = 24.66, $p < 0.01$, e: one-way ANOVA, F_{group} (3, 12) = 29.65, $p < 0.01$]、かつインスリンによるレプチンの分泌促進を抑制した。アドレナリンの単独処置も同様に、レプチンの分泌および mRNA 発現を抑制した [Fig. 5f: one-way ANOVA, F_{group} (2, 9) = 93.16, $p < 0.01$, g: one-way ANOVA, F_{group} (2, 7) = 36.53, $p < 0.01$, g: one-way ANOVA, F_{group} (2, 7) = 36.53, $p < 0.01$]。

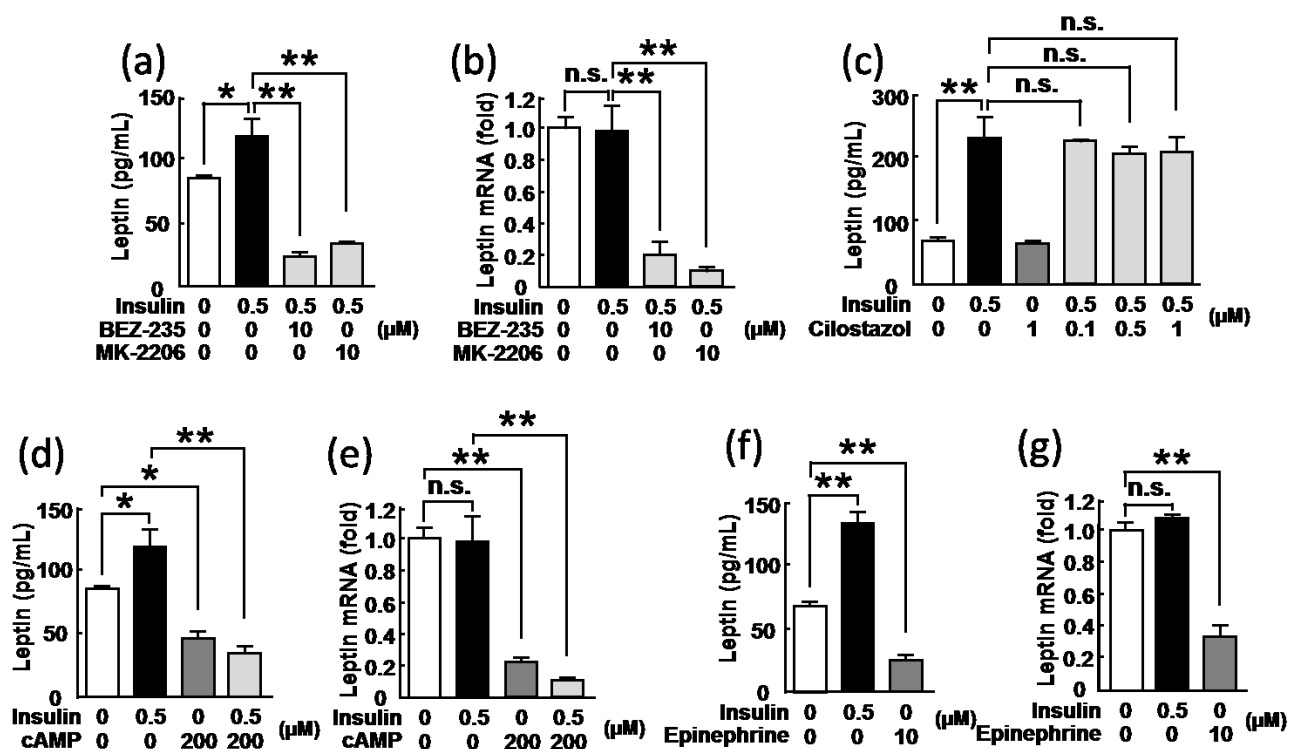


Fig. 5. Effects of the PI3K inhibitor BEZ-235 and the Akt inhibitor MK-2206 (a and b), cilostazol (c), cAMP (d and e), and epinephrine (f and g) on leptin secretion and mRNA levels in 3T3-L1 adipocytes in the presence of 5.5 mM glucose with insulin. 3T3-L1 adipocytes were incubated for 8 h in DMEM containing 5.5 mM glucose with a combination of the substances at the indicated concentrations. Values indicate the mean $\pm$ SEM ($n = 4$ or 6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the corresponding the insulin 0.5 μM alone. n.s., not significant.

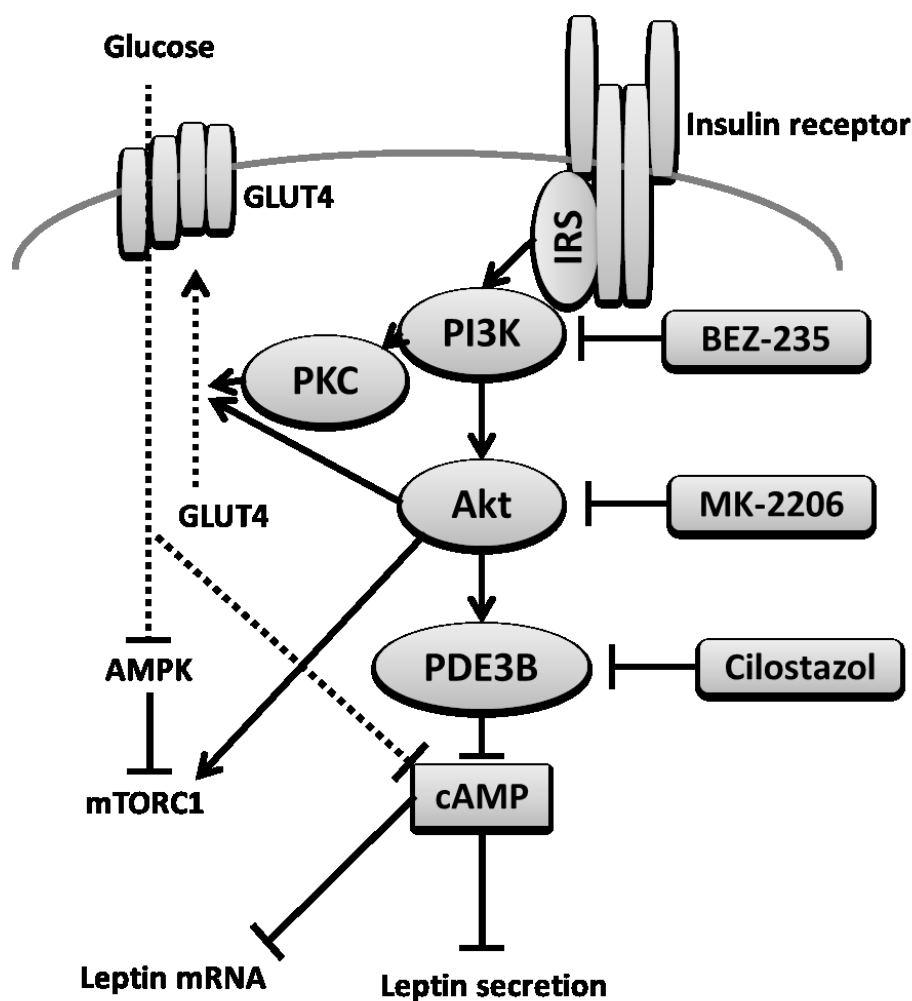


Fig. 6. Hypothetical explanation for insulin-glucose interaction in leptin regulation in adipocytes.

GLUT4: glucose transporter 4, AMPK: AMP-activated protein kinase, mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1, IRS: insulin receptor substrate, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, PKC: protein kinase C, Akt: serine/threonine protein kinase, PDE3B: phosphodiesterase 3B, PKA: protein kinase A.

1-4. 考察

本研究では、3T3-L1 細胞においてグルコース非存在下（グルコース非依存）でインスリンがレプチンの分泌を促進し、この作用は PI3K および Akt 阻害薬によって抑制されることを見出し、以前の報告と矛盾していなかった [30, 34, 37]。一般的に、インスリンによるレプチンの分泌には、血糖上昇に伴うインスリンの分泌によって惹起されることから、グルコースの取り込みの亢進や異化が関与していると示唆されている。しかし、本結果から、グルコースの取り込みの亢進や異化は、インスリンによるレプチンの分泌において必須因子ではないことが示唆された。Cammisotto らは、初代培養脂肪細胞においてグルコース非存在下ではインスリンはレプチンの分泌に影響をおよぼさないと報告している [41]。彼らはグルコースだけでなく、アミノ酸や他の栄養素も除外した Krebs-Ringer buffer を使用していることから、本結果においてはアミノ酸の存在がインスリンによるレプチンの分泌抑制に影響した可能性がある。これらについてはさらに検討する必要がある。

PI3K 阻害薬、Akt 阻害薬、PDE3B 阻害薬、および cAMP アナログは、グルコース非存在下においてインスリンによるレプチンの分泌を抑制した。同様の作用はアドレナリンにも認められ、この抑制作用はアドレナリン β 受容体を介していることが示唆された。一般的にグルコース存在下ではインスリンやアドレナリン β 受容体作動薬は、cAMP 依存的にレプチンを分泌することが示されている [35, 38]。これらの報告から、本結果におけるインスリンによるレプチンの分泌促進には、主に cAMP 濃度の低下に関わるインスリン受容体を介する PI3K-Akt シグナル伝達系が関与しており、それは糖代謝に非依存的な機序であることが示唆される。

本研究では、インスリンに依存しないレプチンの基礎分泌はグルコース濃度に関係していることが示された。解糖系を阻害する 2-デオキシ-D-グルコース (2-deoxy-D-glucose : 2-DG) は、グルコースによるレプチンの分泌を抑制すること [46] や、ピルビン酸や糖原生アミノ酸は、インスリンやグルコース非存在下でレプチンの分泌を強力に促進する [41] ことから、糖代謝にはレプチンの分泌が関与していることが示唆される。インスリンによるレプチンの分泌は、グルコースの濃度依存的に促進されなかったため、インスリンによるレプチンの分泌にはグルコースの場合と異なる機序が関与していると示唆される。すなわち、グルコースはアデニル酸シクラーゼを阻害するため細胞内 cAMP 濃度を低下させ、レプチンの分泌を促進する [47, 48]。一方、インスリンはインスリン受容体のシグナル伝達系を亢進することにより、cAMP 濃度を低下させる。この機序の相違がレプチンの分泌に対するグルコースとインスリンの相加作用を示さなかった理由かもしれない。PDE3B 阻害薬がグルコース存在下においてインスリンによるレプチンの分泌を抑制しなかったのもグルコースの影響によるものと推測される。これらについてはさらに詳細に検討する必要がある。

グルコース非存在下による本研究では、インスリンやグルコースによるレプチンの分泌および mRNA 発現は矛盾する結果が得られている。すなわち、レプチンの分泌とは対照的に、mRNA 発現はグルコース添加により抑制され、インスリンによるレプチン mRNA 発現は認められなかった。グルコース非存在下において、PI3K-Akt シグナル伝達系を阻害するとインスリンによるレプチンの分泌は抑制されるが、レプチン mRNA 発現には影響しなかった。興味深いことに、グルコース存在下では、インスリンがレプチン mRNA 発現を促進しなかったが、PI3K や Akt 阻害薬はインスリンによるレプチン mRNA 発現を抑制した。レプチンは主に脂肪細胞の膜に結合した形で貯蔵され、インスリンにより分泌が促進される。レプチン産生は脂肪細胞のエネルギー貯蔵状態（脂肪細

胞の大きさ)に依存して、レプチンの mRNA 発現により制御されている [49]。したがって、インスリンによるレプチンの分泌には、レプチンの mRNA 発現機構とは異なり、インスリンを含むホルモンや栄養などが関与した機序で制御されているものと示唆される。

レプチンの分泌とその合成における詳細な機序は解明されていないが、AMP activated protein kinase (AMPK) –mammalian target of rapamycin (mTOR) システム (細胞内エネルギー状態に関連した機序) がインスリンによるレプチン合成に影響を及ぼしている可能性がある (Fig. 6)。インスリンは mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) を刺激し、レプチン mRNA の翻訳を促進する [50] ことによって、レプチン遺伝子のプロモーター活性を制御している [51]。加えて、mTORC1 は AMPK によって制御されており [52]、cAMP は脂肪細胞において AMPK を活性化する [53]。したがって、本研究においてグルコース存在下においてインスリンがレプチン mRNA 発現に影響を与えなかったことは、これらの報告と考え合わせると、グルコースの存在により cAMP 濃度が低下している場合は、AMPK を不活化する可能性が考えられる。また、cAMP アナログはグルコースの存在・非存在に関わらずインスリンによるレプチン mRNA 発現を抑制した。しかし、インスリンではレプチン mRNA 発現が促進されず、むしろグルコースの存在によって抑制されたため、AMPK –mTOR の関与は少ないものと示唆される。

本研究において、グルコース存在下ではインスリンはレプチン mRNA 発現を促進せず、PI3K や Akt 阻害薬がインスリンによるレプチン mRNA 発現を抑制した。この一見矛盾する結果を導いた詳細な機序は不明であるが、インスリン以外にも複数の受容体が PI3K –Akt シグナル伝達系に関与しており、インスリン非依存的にレプチン mRNA 発現に影響を与えているかもしれない。

本研究では、糖代謝よりも cAMP がインスリンによるレプチンの分泌に重要な役割を果たしていること、アデニル酸シクラーゼを活性化するホルモンがインスリンによるレプチンの分泌を直接抑制していることを見出した。グルコースの存在・非存在に関わらず、アドレナリンはインスリンによるレプチンの分泌を抑制したが、この作用はアデニル酸シクラーゼ阻害薬によって緩解されなかった。したがって、アドレナリンはグルココルチコイドやグルカゴンと同様に、肥満やメタボリックシンドロームを悪化させ [54–56]、アデニル酸シクラーゼを活性化し、肥満によるレプチン濃度上昇や疾患の病態を悪化させる可能性があることが示唆された。

1-5. 小括

本研究では、3T3-L1 細胞においてエネルギー摂取や消費に深く関与しているレプチンの分泌および mRNA 発現機構について検討した。その結果、脂肪細胞において、糖代謝よりも cAMP がインスリンによるレプチンの分泌に重要な役割を果たしていること、アデニル酸シクラーゼを活性化するホルモンがインスリンによるレプチンの分泌を直接抑制していることが見出された。インスリンによるレプチンの分泌の促進は cAMP を介して制御され、その発現機序としてインスリン受容体－PI3K－Akt シグナル伝達系が関与していることが示唆された。一方、インスリンによるレプチンの mRNA 発現機序は、インスリン受容体－PI3K－Akt シグナル伝達系において、グルコース存在・非存在下で異なるかもしれない。

第二章 第二世代抗精神病薬が脂肪細胞に与える影響

2-1. 緒言

第一章では、脂肪細胞においてインスリンは、インスリン受容体-PI3K-Akt シグナル伝達系を介してレプチンの分泌および mRNA 発現を制御していることが見出された。

一方、脂肪細胞より分泌される生理活性タンパク質のアディポカインには、レプチン、アディポネクチン、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、interleukin-1 (IL-1)、および interleukin-6 (IL-6) などがある。レプチンは成熟脂肪細胞より分泌され、視床下部のレプチン受容体を介して食欲の抑制やエネルギー消費を誘導する [23]。レプチンの産生および分泌の抑制は、食欲抑制作用を低下させるため、過食による体重増加を誘発する要因となる。血中のアディポネクチンは体重増加により減少し、メタボリックシンドロームの発症や増悪と関連している [57]。アディポネクチンはまた MCP-1 や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を抑制し [58]、MCP-1 は肥大化した脂肪細胞より分泌され、IL-1 や IL-6 の産生を誘導する [59]。このようにアディポカインは、エネルギー消費や身体組成あるいは末梢の脂質代謝を調節する重要な役割を担っている [60, 61]。

統合失調症患者における血清レプチン値やトリグリセリド値、および総コレステロール値は、健常人のそれらと比較して高く [62, 63]、クロザピンで治療中の統合失調症患者における血清アディポネクチンは健常人のそれと比較して有意に低い [64]。さらに、サイトカインの産生、サイトカイン量、およびサイトカイン受容体の異常も、統合失調症患者の血液や脳脊髄液において認められている [65]。体脂肪の増加を含めた体重増加により、レプチン、アディポネクチン、MCP-1、あるいは IL-6 などのアディポカインの分泌異常が惹起されるが [57-59, 66]、クロザピンがどのようにアディポカインの分泌や産生に影響をおよぼすか明確にされていない。

本研究では 3T3-L1 細胞においてクロザピンとブロナンセリンによるアディポカインの分泌や産生および脂肪滴の蓄積への影響を確認し、それらへの影響におけるヒスタミン H₁ あるいはセロトニン 5-HT_{2c} 受容体の関与について検討した。

2-2. 実験材料および実験方法

2-2-1. 細胞培養と分化

3T3-L1 前駆脂肪細胞は 1-2-1. に準じ、播種および継代した。2~3 日間隔で培養培地を交換し、分化誘導後 8 日目に実験に使用した。

2-2-2. 使用薬物

実験には、SGAsのクロザピン (clozapine : CLZ, Sigma-Aldrich) とブロナンセリン (blonanserin : BNS, 大日本住友製薬株式会社より提供)、ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬のジフェンヒドラミン (diphenhydramine : DPHM, Tocris Cookson, Bristol)、選択的セロトニン5-HT $_{2C}$ 受容体拮抗薬のSB 242084 (Sigma-Aldrich)、ヒスタミン受容体作動薬のヒスタミン (histamine : HIS, Sigma-Aldrich)、およびセロトニン受容体作動薬のセロトニン (5-hydroxytryptamine : 5-HT, Sigma-Aldrich) を使用した。

クロザピンおよびブロナンセリンは少量のポリエチレングリコール (polyethylene glycol : PEG, Wako) で溶解し、ジフェンヒドラミン、SB 242084、ヒスタミン、およびセロトニンは少量のPBSで溶解した後、培養培地で希釈した。

2-2-3. 薬物の曝露

分化誘導10日目の成熟脂肪細胞の培養培地中にクロザピン (10、20、30、あるいは50 μ M) あるいはブロナンセリン (0.01、0.05、あるいは0.1 μ M) を添加し、2日間培養した (短期間曝露)。同様にヒスタミン受容体作動薬としてヒスタミン10 μ Mあるいはセロトニン受容体作動薬としてセロトニン10 μ Mによるレプチンの分泌量を測定した。なお、受容体拮抗薬は、ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬のジフェンヒドラミン 10 μ Mあるいはセロトニン5-HT $_{2C}$ 受容体拮抗薬のSB 242084 10 μ Mはクロザピンと同時に添加した。一方、分化誘導時からクロザピン (10、20、あるいは30 μ M) あるいはブロナンセリン (0.01、0.05、あるいは0.1 μ M) を培養液中に添加し、培養培地の交換時 (2日おき) に薬物も同時に交換することで成熟脂肪細胞になるまで10日間連続で曝露させた (長期間曝露)。2日間あるいは10日間の薬物曝露後、アディポカイン (レプチン、アディポネクチン、MCP-1、およびIL-6) の培養液中の濃度とmRNA発現、および細胞内の脂肪滴量を測定した。

クロザピンおよびブロナンセリンの濃度は、当該薬物のインタビューフォームに掲載されている臨床血中濃度を参考に用いた (CLOZARIL Tablets http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/1179049F1021_1_13/ [accessed 16.09.30], for LONASEN http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/1179048B1025_1_13/ [accessed 16.09.30])。

2-2-4. 細胞傷害性の解析 [3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -5 (3-carboxymethoxyphenol) -2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium (MTS) assay 法]

各薬物の細胞傷害性を評価するために、成熟した3T3-L1細胞に各薬物を2日あるいは10日間曝露させた後、新しい培養培地200 μ L と交換し、CellTiter 96 Aqueous One Solution ReagentTM (Promega) を各ウェルに40 μ L添加して37 $^{\circ}$ CのCO $_2$ インキュベータにて1時間培養した。マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) にて490 nmの吸光度を測定した。生細胞数を比較し、各ウェルの細胞活性が同等

であることを確認した。

2-2-5. 脂肪滴蓄積量の測定 (Oil Red-O 染色法)

短期間あるいは長期間曝露した 3T3-L1 細胞は、10 %ホルマリンで固定した後、Oil Red-O (Sigma-Aldrich) で染色した。脂肪滴はイソプロパノール (Wako) にて溶解し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) にて 490 nm の吸光度を測定した。なお、細胞は位相差顕微鏡 (200 倍, Olympus CKX41, Tokyo) にて写真撮影した。

2-2-6. アディポカイン濃度の定量 (ELISA 法)

レプチンの分泌量は、レプチン (Enzyme-linked Immunosorbent Assay サンドイッチ法 : Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin Immunoassay, R&D Systems)、アディポネクチン (Quantikine ELISA Mouse/Rat Adiponectin Immunoassay, R&D Systems)、MCP-1 (Quantikine ELISA Mouse/Rat CCL2/JE/MCP-1 Immunoassay, R&D Systems)、あるいは IL-6 (Quantikine ELISA Mouse/Rat IL-6 Immunoassay, R&D Systems) の ELISA キットを用いて測定した。すなわち、Assay Diluent 50 μ L および薬物への曝露が終了した各ウェル中の培養液 50 μ L をキットの 96 ウェルプレートに添加した。十分に混和し、2 時間静置させた後、各ウェルの溶液を破棄し、洗浄液にて 5 回洗浄した。各ウェルに Conjugate 100 μ L を添加し、2 時間静置させた後、再度洗浄液にて 5 回洗浄し、Substrate Solution 100 μ L を添加した。遮光下で 30 分間静置した後、Stop Solution 100 μ L を加えて反応を停止させた。マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) にて 450 nm と 570 nm の吸光度を測定した。測定した吸光度より、検量線を作成し定量解析した。

2-2-7. アディポカイン mRNA 発現量の解析 (リアルタイム PCR 法)

培養培地を取り除いた細胞から High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics Gmb) を用いて total RNA 抽出を行った。すなわち、PBS 200 μ M および溶解/結合バッファー 400 μ L を加え細胞を剥離、懸濁した後、High Pure フィルターチューブに加え 10,000 rpm (約 8,000 $\times$ g、15 秒間遠心) で分離した。DNase インキュベーションバッファー 90 μ L、DNase I を混合して、分離した溶液に加え 15~25°C で 15 分間インキュベートした。洗浄バッファー I 500 μ L を加え、10,000 rpm (約 8,000 $\times$ g、15 秒間遠心) で分離した後、洗浄バッファー II 500 μ L を加え、10,000 rpm (約 8,000 $\times$ g、15 秒間遠心) で分離した。再度、洗浄バッファー II 200 μ L を加え、11,700 rpm (約 13,000 $\times$ g、2 分間遠心) を分離した。最後に溶出バッファー 50 μ L を加え、10,000 rpm (約 8,000 $\times$ g、1 分間遠心) を分離して、total RNA を抽出した。

PrimeScript RT master Mix (Perfect Real Time, Takara Bio) にて cDNA への逆転写をプロトコールにしたがって行った。すなわち、氷上で 5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)、total RNA、および RNase Free dH₂O で逆転写反応液を調製し、攪拌して均一にした。その後、逆転写反応を 37°C で 15 分間、逆転写酵素を熱失活するために 85°C で 5 秒間、4°C で冷却後 -20°C で解析まで保管した。

リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus, Takara Bio) を使用し、Step One Plus System (Applied Biosystems) によりレプチンの mRNA 発現を解析した。すなわち、SYBR Premix Ex

Taq II (2x) 10 μ L、PCR Forward Primer (10 μ M) 0.4 μ L、PCR Reverse Primer (10 μ M) 0.4 μ L、ROX Reference Dye (50 x) 0.4 μ L、cDNA 1 μ L、および RNase Free dH₂O 7.8 μ L を加えて、計 20 μ L の反応液でリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR の条件は、初期変性は 95°C で 30 秒間、PCR 反応は DNA を増幅させるために熱変性を 95°C で 5 秒間行い、プライマーを DNA に結合させるためのアニーリングおよび伸長反応を 60°C で 30 秒間、40 サイクル実施した。発現量は $\Delta\Delta$ Ct 法により算出した。なおこれらの mRNA 発現は内部標準として用いた glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) との比較による RT-PCR 法にて解析した。

Leptin : Forward: 5- attgtcagcaatgcatcctg -3, Reverse: 5- atggactgtggtcatgagcc -3.

Adiponectin : Forward: 5- gttgcaagctctcctgttc -3, Reverse: 5- tctccaggagtgcctctct -3.

MCP-1 : Forward: 5- agagagctgcagcaaaaagg -3, Reverse: 5- ggaaagaggcagttgcaaag -3.

IL-6 : Forward: 5- tgacacaaaaccctcatca -3, Reverse: 5- gaccttggtggatcgacagt -3.

Histamine H₁ receptor : Forward: 5- gaccttggtggatcgacagt -3, Reverse: 5- tgtctggaatgtgagcgaagt -3.

Serotonin 5-HT_{2C} receptor : Forward: 5- gccacgtcgaaagaagaaag -3, Reverse: 5- gttacaggccttccacaaa -3.

GAPDH : Forward: 5- tccactcatggcaaatca -3, Reverse: 5- tttgatgttagtgggtctcg -3.

2-2-8. 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。データの統計解析は、一元あるいは二元配置分散分析 (one-way or two-way analysis of variance: ANOVA) を用いて行った。Post hoc テストは Tukey-Kramer の多重比較検定を用い、危険率 5 %未満 ($p < 0.05$) の場合に、統計的に有意差ありとした。

2-3. 実験結果

2-3-1. 細胞傷害性の解析

クロザピンとブロナンセリンによるアディポカインの分泌および mRNA 発現、脂肪滴蓄積量への影響を確認するため、各薬物の 3T3-L1 細胞に対する細胞傷害性について検討した。

クロザピン (10、20、30、あるいは 50 μM) あるいはブロナンセリン (10 あるいは 20 μM) を短期間あるいは長期間曝露した時、クロザピン 50 μM の長期間曝露を除いていずれの濃度においても薬物非曝露と比較して細胞活性に差はなかった (結果示さず)。したがって、本実験スケジュールにおいて、いずれの薬物も細胞傷害性は認められなかった。

2-3-2. 3T3-L1 細胞におけるクロザピンおよびブロナンセリンによるアディポカインの分泌への影響

SGAs によるアディポカイン (レプチン、アディポネクチン、MCP-1、および IL-6) の分泌への影響を確認するために、3T3-L1 細胞にクロザピンあるいはブロナンセリンを直接的に曝露し、アディポカインの分泌を薬物非曝露と比較した。

クロザピン (10、20、あるいは 30 μM) の短期間曝露は、レプチン、アディポネクチン、および MCP-1 の分泌を薬物非曝露と比較して有意に抑制したが、IL-6 には影響を与えなかった [Fig. 1a: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 13.63, p < 0.01$, b: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 28.11, p < 0.01$, c: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 4.53, p < 0.05$, d: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 19) = 2.08, p = 0.14$]。長期間曝露すると、レプチンおよびアディポネクチンの分泌が有意に抑制されたが [Fig. 1i: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 78.33, p < 0.01$, j: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 58.62, p < 0.01$]、IL-6 には影響を与えなかった [Fig. 1l: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 3.34, p < 0.05$]。逆に、クロザピンの長期間曝露は薬物非曝露と比較して有意に MCP-1 の分泌を促進させた [Fig. 1k: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 18) = 4.60, p < 0.05$]。

ブロナンセリン (0.01、0.05、あるいは 0.1 μM) の短期間あるいは長期間曝露は、レプチン、アディポネクチン、MCP-1、および IL-6 の分泌に影響は与えなかった [Fig. 1e: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 0.21, p = 0.89$, f: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 0.41, p = 0.75$, g: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 1.69, p = 0.20$, h: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 0.60, p = 0.62$, Fig. 1m: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 12) = 1.91, p = 0.18$, n: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 12) = 0.41, p = 0.75$, o: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 10) = 3.34, p = 0.06$, p: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 11) = 1.26, p = 0.33$ 。]

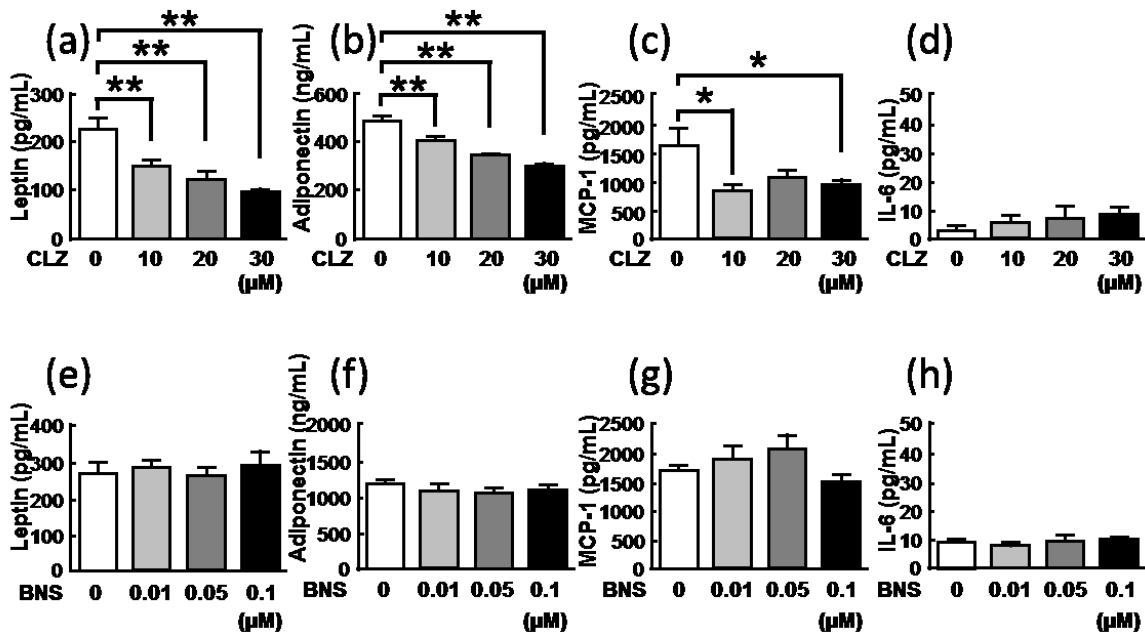
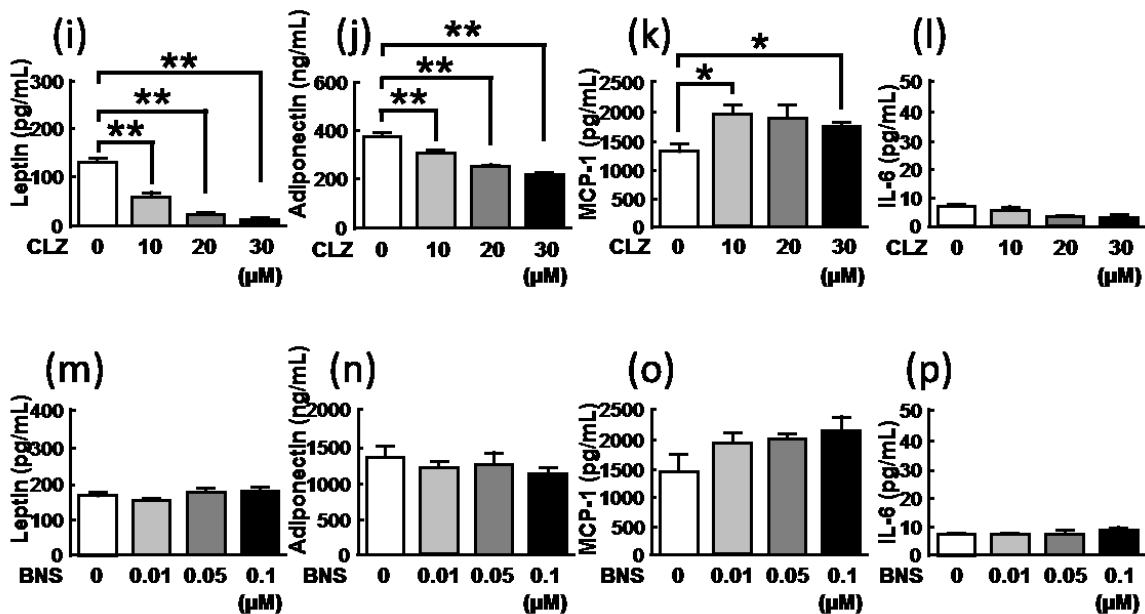
Short-term exposure (2 days)**Long-term exposure (10 days)**

Fig. 1. Effects of clozapine and blonanserin on adipokine secretion.

The effects of clozapine (CLZ: 10, 20, or 30 μM) and blonanserin (BNS: 0.01, 0.05, or 0.1 μM) on secretion of adipokines after short-term exposure: leptin (a and e), adiponectin (b and f), MCP-1 (c and g) and IL-6 (d and h), and long-term exposure: leptin (i and m), adiponectin (j and n), MCP-1 (k and o) and IL-6 (l and p). Values indicate the mean ± SEM (n = 6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the vehicle control (0 μM).

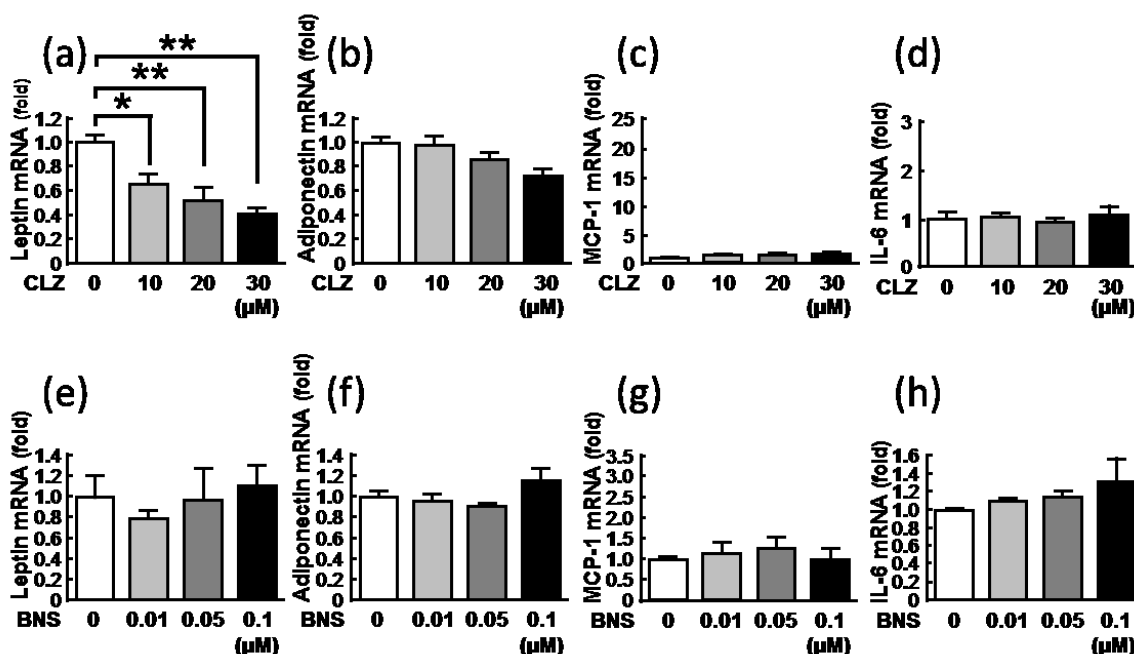
2-3-3. 3T3-L1 細胞におけるクロザピンおよびブロナンセリンによるアディポカインの mRNA 発現への影響

次に、SGAs によるアディポカインの mRNA 発現への影響を確認するために、3T3-L1 細胞にクロザピンあるいはブロナンセリンを直接的に曝露し、アディポカインの mRNA 発現を薬物非曝露と比較した。

クロザピン (10、20、あるいは 30 μM) の短期間曝露は、薬物非曝露と比較してレプチンの mRNA 発現を有意に抑制したが、アディポネクチン、MCP-1 および IL-6 には影響を与えなかった [Fig. 2a: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 18) = 8.95, $p < 0.01$, b: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 17) = 3.01, $p = 0.06$, c: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 18) = 1.53, $p = 0.24$, d: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 18) = 0.30, $p = 0.82$]。長期間曝露すると、レプチンの mRNA 発現を有意に抑制したが、アディポネクチンには影響を与えなかった [Fig. 2i: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 19) = 24.25, $p < 0.01$, j: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 19) = 2.21, $p = 0.12$]。逆に、MCP-1 と IL-6 は mRNA 発現が促進された [Fig. 2k: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 20) = 14.09, $p < 0.01$, l: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 16) = 8.57, $p < 0.01$]。

ブロナンセリン (0.01、0.05、あるいは 0.1 μM) の短期間曝露は、レプチン、アディポネクチン、MCP-1 もしくは IL-6 の mRNA 発現に影響を与えなかった [Fig. 2e: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 19) = 0.38, $p = 0.77$, f: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 19) = 1.81, $p = 0.18$, g: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 19) = 0.39, $p = 0.76$, h: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 19) = 1.54, $p = 0.24$]。長期間曝露すると、レプチン、アディポネクチンの mRNA 発現は有意に抑制され、MCP-1、IL-6 の mRNA 発現が有意に促進された [Fig. 2m: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 11) = 6.60, $p < 0.01$, n: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 12) = 10.44, $p < 0.01$, o: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 12) = 20.32, $p < 0.01$, p: one-way ANOVA, F_{dose} (3, 12) = 13.51, $p < 0.01$]。

Short-term exposure (2 days)



Long-term exposure (10 days)

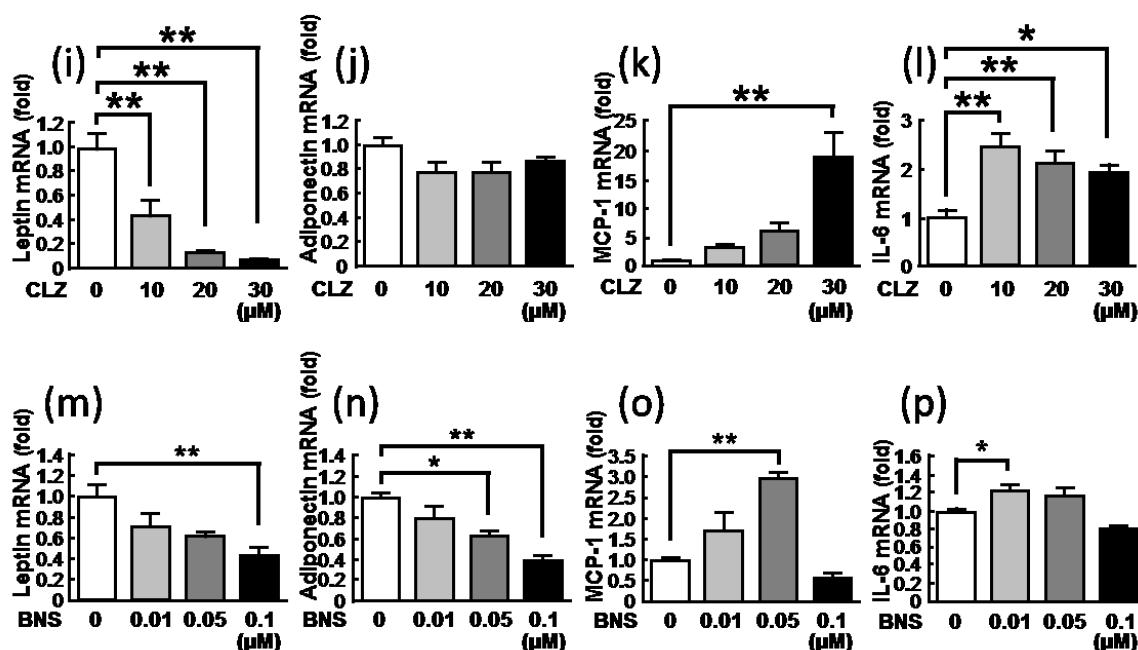


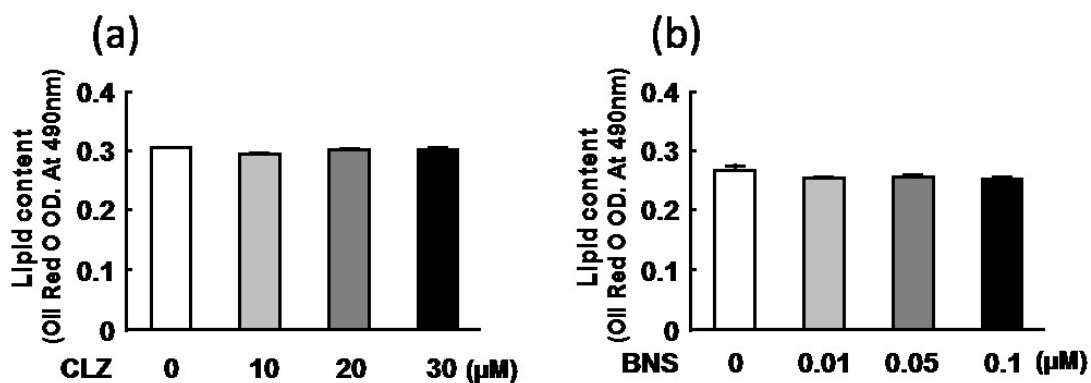
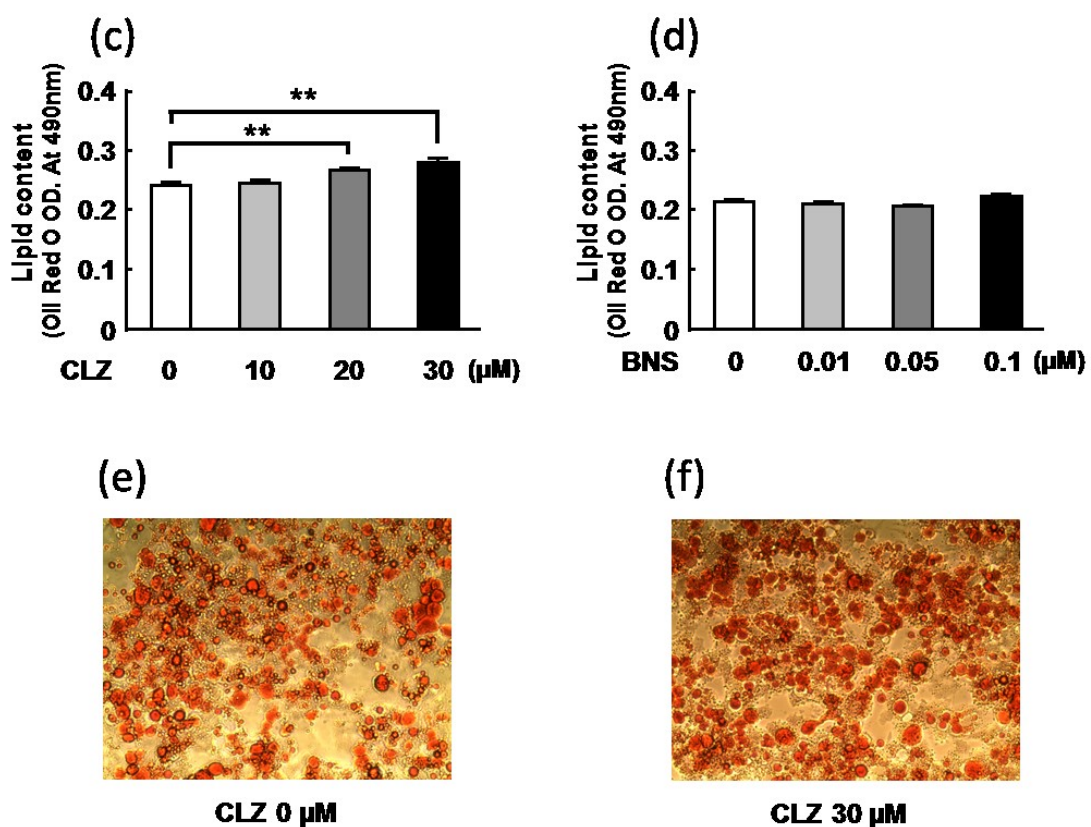
Fig. 2. Effects of clozapine and blonanserin on mRNA expression of adipokines.

The effects of clozapine (CLZ: 10, 20, or 30 μM) and blonanserin (BNS: 0.01, 0.05, or 0.1 μM) on mRNA expressions of adipokines after short-term exposure: leptin (a and e), adiponectin (b and f), MCP-1 (c and g), and IL-6 (d and h), and long-term exposure: leptin (i and m), adiponectin (j and n), MCP-1 (k and o), and IL-6 (l and p). Values indicate the mean ± SEM (n = 6). * p < 0.05, ** p < 0.01 compared to the vehicle control (0 μM).

2-3-4. 3T3-L1 細胞におけるクロザピンおよびブロナンセリンによる脂肪滴蓄積への影響

SGAs により内臓脂肪（腹腔内脂肪）が蓄積すると、様々なアディポサイトカイン（アディポカイン）の分泌異常をきたすことから、クロザピンあるいはブロナンセリンが 3T3-L1 細胞に直接的に作用し、脂肪細胞内の脂肪滴量に影響を与えるかどうか検討した。

クロザピン（10、20、あるいは 30 μM）の短期間暴露は、薬物非暴露と比較して脂肪滴蓄積量に影響を与えなかったが [Fig. 3a: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 8) = 1.83, p = 0.22$]、長期間暴露では、脂肪滴蓄積量を有意に増加させた [Fig. 3c: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 18.65, p < 0.01$]。ブロナンセリン（0.01、0.05、あるいは 0.1 μM）の短期間あるいは長期間暴露は、脂肪滴蓄積量に影響を与えなかった [Fig. 3b: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 2.01, p = 0.14$, 3d: one-way ANOVA, $F_{\text{dose}}(3, 20) = 6.91, p < 0.01$]。

Short-term exposure (2 days)**Long-term exposure (10 days)****Fig. 3. Effects of clozapine and blonanserin on lipid droplets in adipocytes.**

The effects of clozapine (CLZ: 10, 20, or 30 μM) and blonanserin (BNS: 0.01, 0.05, or 0.1 μM) on lipid droplets in adipocytes after short-term exposure (a and b) and long-term exposure (c and d). Photomicrograph (200 $\times$ magnification) of Oil Red O stained 3T3-L1 adipocytes and the vehicle control (0 μM) (e), CLZ 30 μM (f) after long-term exposure. Values indicate the mean $\pm$ SEM (n = 3 or 6). ** $p < 0.01$ compared to the vehicle control (0 μM).

2-3-5. 3T3-L1 細胞でのクロザピンによるレプチンの分泌抑制におけるヒスタミン H_1 受容体およびセロトニン 5-HT_{2c} 受容体の関与

クロザピンによる体重増加には、中枢のヒスタミン H_1 およびセロトニン 5-HT_{2c} 受容体の関与が知られているため、末梢の脂肪細胞でのクロザピンによるレプチンの分泌抑制におけるヒスタミン H_1 およびセロトニン 5-HT_{2c} 受容体の関与について検討した。

最初に、両受容体の mRNA が発現しているかどうかを確認するために、3T3-L1 細胞の分化誘導前 (day0: 前駆細胞)、分化誘導 7 日目 (day 7) および 14 日目 (day 14: 成熟細胞) におけるヒスタミン H_1 受容体あるいはセロトニン 5-HT_{2c} 受容体の mRNA 発現をリアルタイム PCR にて測定した。3T3-L1 細胞の day 0、day 7、あるいは day 14 のいずれの時期においても両受容体の mRNA 発現が認められた。前駆細胞あるいは成熟細胞におけるヒスタミン H_1 受容体 mRNA およびセロトニン 5-HT_{2c} 受容体 mRNA 発現は同程度であり、アドレナリン α_{1D} 受容体の約 1/200 倍、 α_{2A} 受容体の約 1/4 倍、 α_{1A} 受容体の約 1/3 倍、セロトニン 5-HT_{2A} の約 1/2 倍、ドパミン D₄ の約 1/2 倍、ムスカリン M₁ 受容体の約 1/2 倍であった (結果示さず)。セロトニン 5-HT_{2c} 受容体の mRNA は、前駆細胞および成熟細胞いずれにおいても mRNA 発現に差は認められなかった [Fig. 4d: one-way ANOVA, F_{day} (2, 15) = 2.26, $p = 0.14$]。成熟細胞のヒスタミン H_1 受容体の mRNA 発現は、前駆細胞と比較して有意に少なかった [Fig. 4a: one-way ANOVA, F_{day} (2, 14) = 31.94, $p < 0.01$]。

次に、クロザピンによるレプチンの分泌抑制における両受容体の関与について、ヒスタミン H_1 あるいはセロトニン 5-HT_{2c} 受容体の作動薬や拮抗薬を用いて検討した。成熟細胞にクロザピン (30 μM) を短期間曝露すると、レプチンの分泌が有意に抑制された。ヒスタミン受容体作動薬のヒスタミン (10 μM) やヒスタミン H_1 受容体拮抗薬のジフェンヒドラミン (10 μM) を単独で短期間曝露してもレプチンの分泌には影響を与えず [Fig. 4b: two-way ANOVA, F_{CLZ} (1, 12) = 40.22, $p < 0.01$, F_{HIS} (1, 12) = 7.18, $p < 0.05$, $F_{\text{CLZ} \times \text{HIS}}$ (1, 12) = 1.46, $p = 0.25$, c: two-way ANOVA, F_{CLZ} (1, 12) = 18.51, $p < 0.01$, F_{DFH} (1, 12) = 0.73, $p = 0.41$, $F_{\text{CLZ} \times \text{DFH}}$ (1, 12) = 0.07, $p = 0.80$]、クロザピンによるレプチンの分泌抑制にも影響を与えなかった。

セロトニン受容体作動薬のセロトニン (10 μM) やセロトニン 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬の SB 242084 (10 μM) は、単独で短期間曝露すると、レプチンの分泌を有意に抑制させた [Fig. 4c: two-way ANOVA, F_{CLZ} (1, 12) = 40.71, $p < 0.01$, $F_{5\text{-HT}}$ (1, 12) = 10.37, $p < 0.01$, $F_{\text{CLZ} \times 5\text{-HT}}$ (1, 12) = 5.86, $p < 0.05$, f: two-way ANOVA, $F_{\text{CLZ } 30}$ (1, 12) = 56.1, $p < 0.01$, $F_{\text{SB } 242084}$ (1, 12) = 65.74, $p < 0.01$, $F_{\text{CLZ } 30 \times \text{SB } 242084}$ (1, 12) = 4.75, $p < 0.05$, $F_{\text{CLZ } 50}$ (1, 18) = 318.45, $p < 0.01$, $F_{\text{SB } 242084}$ (1, 18) = 99.42, $p < 0.01$, $F_{\text{CLZ } 50 \times \text{SB } 242084}$ (1, 18) = 11.84, $p < 0.01$]。SB 242084 はクロザピンによるレプチンの分泌抑制作用を増強し、クロザピンの用量に依存してレプチンの分泌抑制作用が増強した。

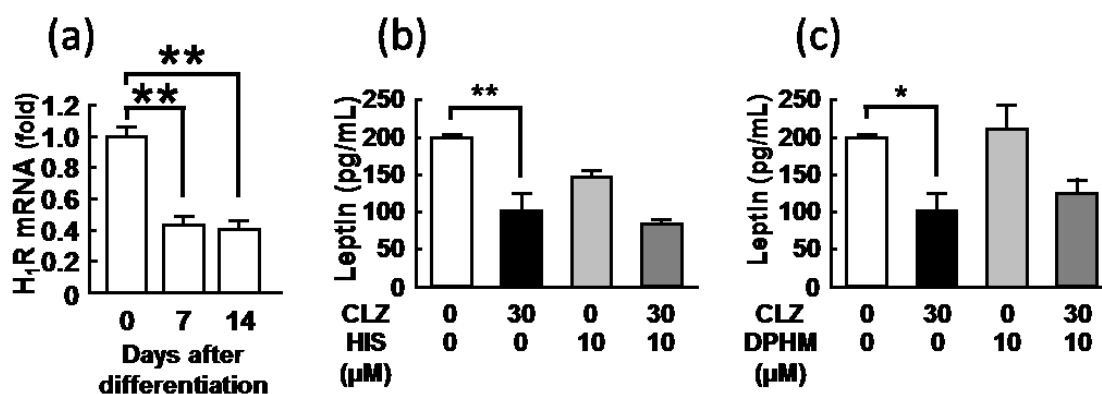
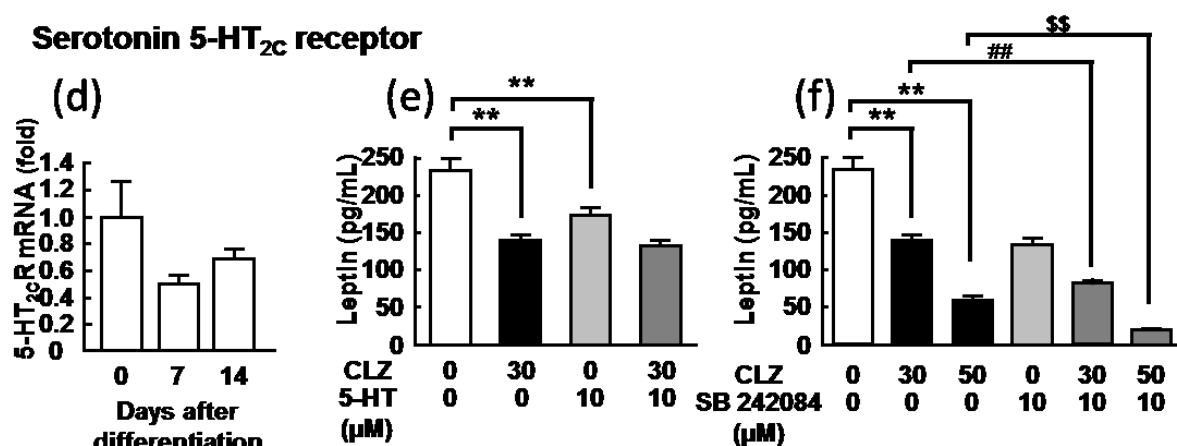
Histamine H₁ receptor**Serotonin 5-HT_{2C} receptor**

Fig. 4. Involvement of histamine H₁ and serotonin 5-HT_{2C} receptors in clozapine-induced decreased leptin secretion.

We examined mRNA expression of the histamine H₁ receptor (H₁R, a) and the serotonin 5-HT_{2C} receptor (5-HT_{2C}R, d) in 3T3-L1 preadipocytes (day 0) and differentiated 3T3-L1 adipocytes after 7 and 14 days. Effects of histamine (HIS, b), diphenhydramine (DPHM, c), serotonin (5-HT, e), and SB 242084 (f) on decreased leptin secretion by clozapine (CLZ) were evaluated. Values indicate the mean $\pm$ SEM (n = 6). * p < 0.05, ** p < 0.01 compared to day 0 or the vehicle control (0 μ M). ## p < 0.01 compared to CLZ at 30 μ M alone. \$\$ p < 0.01 compared to CLZ at 50 μ M alone.

2-4. 考察

本研究において、3T3-L1 細胞を用いて、クロザピンが脂肪細胞の肥大化やレプチン産生・分泌に影響を与えるかどうか、ブロナンセリンと比較検討した。その結果、クロザピンの短期間あるいは長期間暴露は、脂肪滴蓄積量の増加、および摂食抑制ホルモンのレプチンの分泌および mRNA 発現を抑制させた。しかし、ブロナンセリンには、長期間曝露による mRNA 発現を除いて、そのような作用は認められなかった。本結果は、クロザピンは、他の SGAs に比べてメタボリックシンドロームに関連した有害事象の発現や増悪のリスクが高いが [9, 10]、ブロナンセリンはこうした有害事象を発現しにくいという臨床報告と一致していた [67]。脂肪細胞の肥大化や脂肪滴蓄積は、レプチンの分泌を促進すること [68]、レプチンは食欲抑制作用とともに、エネルギー消費増大による体脂肪の減少作用やインスリン感受性改善による抗肥満作用を有している [69]。したがって、脂肪滴蓄積量の増加やレプチンの分泌抑制は食欲抑制作用の低下を誘導することから、クロザピンによるメタボリックシンドロームに関連した有害事象の発現には、脂肪細胞に直接作用することによる脂肪滴蓄積量の増加作用やレプチンの分泌抑制作用が関与しているものと示唆される。

クロザピンの短期間曝露は、脂肪滴蓄積に影響を与えなかったが、レプチンの分泌および mRNA 発現を抑制した。これらの結果から、クロザピンの短期間や長期間曝露によるレプチンの分泌抑制作用には、脂肪細胞の肥大化や脂肪滴蓄積によるレプチンの分泌抑制とは異なる機序が関与しているものと思われる。一方で、ヒスタミン H_1 およびセロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体拮抗作用には、脂質代謝異常に先行する摂食行動異常に関与していることが示唆されている [12-17]。そこで、クロザピンの短期間曝露におけるレプチンの分泌抑制作用の機序を調べるため、ヒスタミン H_1 およびセロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体がレプチンの分泌に関与しているかどうか検討した。最初に両受容体の mRNA が発現しているかどうかを確認したところ、両受容体の mRNA 発現が認められたことから、両受容体が存在することが確認できた。次にレプチンの分泌やクロザピンによる分泌抑制に両受容体の関与について検討したところ、ヒスタミンおよびその H_1 受容体拮抗薬はこれらに影響を与えなかった。しかし、セロトニンおよびその $5-HT_{2c}$ 受容体拮抗薬はレプチンの分泌を抑制し、セロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体拮抗薬はクロザピンの用量に依存して分泌抑制を増強した。クロザピンはセロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体に高い親和性を有することから、クロザピンによるレプチンの分泌抑制作用には、脂肪細胞のヒスタミン受容体ではなく、セロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体が一部関与していることが示唆される。一方で、セロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体作動薬と拮抗薬のいずれもレプチンの分泌に影響を与えた。作動薬としてセロトニンを曝露すると、2~48 時間にレプチンの分泌が一時的に抑制されたことから、セロトニン自体はレプチンの分泌に影響を与えるが、セロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体以外の受容体を介している可能性がある [70]。今後、選択的なセロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体作動薬を使用してレプチンの分泌について検討していく必要がある。

クロザピンはレプチンだけでなくアディポネクチンや MCP-1、IL-6 など、他のアディポカインの分泌にも影響をおよぼす [71]。以前の報告と同様に、クロザピンの長期間曝露は、アディポネクチンの分泌を抑制し、MCP-1 の分泌と MCP-1 と IL-6 の mRNA 発現を促進した。アディポネクチンの分泌抑制や MCP-1 と IL-6 の mRNA 発現の促進は動脈硬化およびインスリン抵抗性を惹起し、メタボリックシンドロームの発症や悪化を誘導する [59, 63]。したがって、クロザピンのメタボリックシンドロームに関連した有害事象の発現や増悪には、脂肪細胞に直接作用するレプチンだけで

なく、これらのサイトカインの分泌および mRNA 発現が関与している可能性が示唆される。一方で、ブロナンセリンは、クロザピンとは異なり、長期間曝露においてレプチンとアディポネクチンの mRNA 発現を抑制、MCP-1 と IL-6 の mRNA 発現を促進させたが、分泌には影響を与えなかった。これはブロナンセリンの長期間曝露がメタボリックシンドローム発症要因になり得る可能性があるが、クロザピンと比較してそのリスクは低いものと示唆される。しかし、抗精神病薬による脂質代謝異常やサイトカインの変化を正確に捉え、メタボリックシンドロームの発症に関わる潜在的な分子機序を明らかにするためには、細胞外の分泌だけでなく、細胞内の mRNA やタンパク質の発現を詳細に解析する必要がある [72]。

クロザピンの長期間曝露により脂肪滴蓄積量が有意に増加し、ブロナンセリンは脂肪滴蓄積量に影響を与えなかった。肥満は脂肪細胞の肥大化（脂肪滴の蓄積）と細胞数の増加に関係していることから、クロザピンはブロナンセリンよりも容易に体脂肪の増加、体重増加、およびメタボリックシンドロームを惹起しやすいことが示唆される。しかし、クロザピンによる脂肪細胞の肥大化および脂肪滴蓄積量の増加の機序と、レプチンの分泌抑制の機序は異なるものと思われる [64]。ヒスタミンとセロトニンは脂肪滴蓄積量を増加させ [73, 74]、ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬のクロルフェニラミンやセロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体拮抗薬の SB 242084 は脂肪滴蓄積量を減少させる [73, 75]。これらの報告から、クロザピンによる脂肪滴蓄積量の増加は、ヒスタミン H_1 やセロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体を介しておらず、他の受容体を介して発現している可能性が示唆される。今後、選択的セロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体作動薬や他のセロトニン受容体サブタイプリガンドを使用して、レプチンの分泌だけでなく脂肪滴蓄積機序を検討する必要がある。

本研究においてクロザピンによるメタボリックシンドロームに関連する有害事象の発現には、中枢神経系を介する摂食調節機構だけでなく、末梢組織の脂肪細胞にも直接作用し、レプチンの分泌および mRNA 発現を抑制し、脂肪細胞を肥大化することを見出した。クロザピンによるレプチンの分泌および mRNA 発現の抑制作用は、セロトニン $5-HT_{2c}$ 受容体を介して発現しているが、脂肪細胞の肥大化には両受容体の関与は少ないことが示唆された。

2-5. 小括

本研究では、脂肪細胞より産生・分泌されるアディポカインの分泌および mRNA 発現、脂肪滴蓄積に対するクロザピンの影響を検討した。クロザピンはアディポカインの中でもレプチンの分泌および mRNA 発現を低下させることを見出した。この作用にはセロトニン 5-HT_{2c} 受容体を一部介して発現している可能性が示唆された。また、クロザピンは脂肪滴蓄積量を増加させたが、この作用にはセロトニン 5-HT_{2c} 受容体を介さない脂肪細胞への直接的な機序が関与していることが示唆された。

総括

2 型糖尿病や心血管疾患などを含むメタボリックシンドロームに起因する疾患により、QOL が低下している患者は少なくない。昨今、代謝異常症に対する治療薬の開発は進んでいるが、その発症の基盤の一つである肥満、特に内臓脂肪の蓄積に対する予防・治療薬は少ない。肥満は、エネルギー摂取過多やエネルギー消費の低下により、エネルギーバランスが崩れた場合に発現する。脂肪細胞は生理活性物質を産生・分泌する重要な末梢組織の一つであり、脂肪細胞への直接的な薬物の作用について検討した研究は少ない。脂肪細胞は、成熟すると善玉アディポカインと呼ばれるレプチンやアディポネクチンを産生・分泌する。一方で、脂肪細胞が肥大化するとアディポカインの分泌は抑制され、悪玉アディポカインと言われる炎症性サイトカインの MCP-1 や IL-6 が産生・分泌される。これらの産生・分泌によってインスリン抵抗性が惹起され、肥満への悪循環サイクルが誘導される。本研究では、末梢組織である脂肪細胞における摂食調節因子であるアディポカイン、特にレプチンに焦点を当て、その分泌・産生の機序を探索するとともに、代謝異常を発現しやすい薬物を脂肪細胞に直接的に曝露することによる影響を検討した。

第一章では、レプチンの分泌および mRNA 発現におけるグルコースとインスリンの影響について検討した。その結果、3T3-L1 細胞においてインスリンは cAMP を介してレプチンの分泌および mRNA 発現を制御していることを見出した。アドレナリンはインスリンによるレプチンの分泌を抑制し、レプチンの分泌にはアデニル酸シクラーゼの活性化が関与していることを見出した。したがって、グルコースはアデニル酸シクラーゼを阻害するため、細胞内の cAMP 濃度を低下させることによりレプチンを分泌させること、レプチンの分泌は、種々の機序により相互に関連しあって調節されていることが示唆された。

第二章では、アディポカインの分泌および mRNA 発現における SGAs の影響について検討した。その結果、体重増加を惹起しやすいクロザピンは、アディポカインの分泌および mRNA 発現を抑制し、特にレプチンの分泌抑制が顕著に認められた。この作用がヒスタミン H_1 やセロトニン 5-HT_{2c} 受容体を介するかどうか検討した。選択的セロトニン 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬はレプチンの分泌を抑制し、クロザピンと併用するとその分泌抑制は増強された。クロザピンは脂肪滴蓄積を増加させたが、その増加作用はいずれの受容体の作動薬や拮抗薬にも影響されなかった。したがって、クロザピンによるレプチンの分泌抑制はセロトニン 5-HT_{2c} 受容体を一部介して発現している可能性があるが、脂肪滴蓄積には関与していないことが示唆された。しかし、ヒスタミン H_1 やセロトニン 5-HT_{2c} 受容体は、アデニル酸シクラーゼを介さないことから、レプチンの分泌および mRNA 発現には、多様な制御機序が存在することが推測される。

本研究では様々な疾患の基盤となる肥満に直接的に関連するアディポカインのうち、レプチンに注目した。本研究で得られた結果は、代謝系の副作用を有する医薬品に対する新しい予防や治療薬の開発ばかりでなく、肥満に関連した疾患、特に糖尿病や心血管疾患の発症および進展を予防する治療薬の開発に繋がるものと思われる。

謝辞

本研究および本論文作成にあたり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました野田 幸裕 本学大学院薬学研究科 病態解析学I 教授に心より御礼申し上げます。本論文をご精読頂き有用なコメントを頂きました平松 正行 本学大学院薬学研究科 薬品作用学研究室 教授、脇田 康志 本学薬学部 医薬連携実務実習部門 臨床薬物治療学II 教授に深謝致します。また、御指導と有益な御助言を賜りました吉見 陽 本学薬学部 病態解析学I 助教に御礼申し上げます。さらに、貴重な御意見、御指導を賜りました濱田 洋司 名古屋大学大学院医学系研究科 糖尿病・内分泌内科 特任准教授、毛利 彰宏 藤田保健衛生大学大学院医療科学専攻 先進診断システム探索 講師に御礼申し上げます。最後に、研究上数々の貴重な御意見と御協力を頂きました病態解析学Iの皆様には感謝いたします。

参考文献

- [1] Iichiro Shimomura, Tohru Funahashi, Masahiko Takahashi, Kazuhisa Maeda, Kazuaki Kotani, Tadashi Nakamura, Shizuya Yamashita, Masakazu Miura, Yoji Fukuda, Kaoru Takemura, Katsuto Tokunaga, Yuji Matsuzawa : Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nature Medicine*, 2, 800—803 (1996)
- [2] José F Caro, Jerzy W Kolaczynski, Mark R Nyce, Joanna P Ohannesian, Irina Opentanova, Warren H Goldman, Richard B Lynn, Pei-Li Zhang, Madhur K Sinha, Robert V Considine : Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*, 348, 159—161 (1996)
- [3] Valarie A Barr, Daniela Malide, Mary Jane Zarnowski, Simeon I Taylor, Samuel W Cushman : Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology*, 138, 4463—4472 (1997)
- [4] Steven M Willi, Adele Kennedy, Penny Wallace, Elizabeth Ganaway, Nikki L Rogers, W Timothy Garvey : Troglitazone antagonizes metabolic effects of glucocorticoids in humans: effects on glucose tolerance, insulin sensitivity, suppression of free fatty acids, and leptin. *Diabetes*, 51, 2895—2902 (2002)
- [5] Urban Ösby, Nestor Correiá, Lena Brandt, Anders Ekblom, Pär Sparén : Mortality and causes of death in schizophrenia in Stockholm county, Sweden. *Schizophrenia Research*, 45, 21—28 (2000)
- [6] Charles H Hennekens, Alissa R Hennekens, Danielle Hollar, Daniel E Casey : Schizophrenia and increased risks of cardiovascular disease, *American Heart Journal*, 150, 1115—1121 (2005)
- [7] Shiv Gautam, Parth Singh Meena : Drug-emergent metabolic syndrome in patients with schizophrenia receiving atypical (second-generation) antipsychotics. *Indian Journal of Psychiatry*, 53, 128—133 (2011)
- [8] Hanna-Maaria Lakka, David E Laaksonen, Timo A Lakka, Leo K Niskanen, Esko Kumpusalo, Jaakko Tuomilehto, Jukka T Salonen : The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *The Journal of the American Medical Association*, 288, 2709—2716 (2002)
- [9] Stefan Leucht, Caroline Corves, Dieter Arbter, Rolf R Engel, Chunbo Li, John M Davis : Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet*, 373, 31—41 (2009)

- [10] Jeffrey A Lieberman, T Scott Stroup, Joseph P McEvoy, Marvin S Swartz, Robert A Rosenheck, Diana O Perkins, Richard SE Keefe, Sonia M Davis, Clarence E Davis, Barry D Lebowitz, Joanne Severe, John K Hsiao : Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *The New England Journal of Medicine*, 353, 1209—1223 (2005)
- [11] Marc De Hert, Vincent Schreurs, Kim Sweers, Dominique Van Eyck, Linda Hanssens, Sebastjan Šinko, Martien Wampers, Andre Scheen, Joseph Peuskens, Ruud van Winkel : Typical and atypical antipsychotics differentially affect long-term incidence rates of the metabolic syndrome in first-episode patients with schizophrenia: a retrospective chart review. *Schizophrenia Research*, 101, 295—303 (2008)
- [12] Meng He, Chao Deng, Xu-Feng Huang : The role of hypothalamic H1 receptor antagonism in antipsychotic-induced weight gain. *CNS Drugs*, 27, 423—434 (2013)
- [13] Laurence H Tecott, Linda M Sun, Susan F Akana, Alison M Strack, Daniel H Lowenstein, Mary F Dallman, David Julius : Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. *Nature*, 374, 542—546 (1995)
- [14] Kenny J Simansky : Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behavioural Brain Research*, 73, 37—42 (1996)
- [15] Stephen M Stahl, L Mignon, JM Meyer : Which comes first: atypical antipsychotic treatment or cardiometabolic risk? *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 119, 171—179 (2009)
- [16] Toshiie Sakata, Mamoru Kurokawa, Akihiko Oohara, Hironobu Yoshimatsu : A physiological role of brain histamine during energy deficiency. *Brain Research Bulletin*, 35, 135—139 (1994)
- [17] Toshiie Sakata, Hironobu Yoshimatsu, Mamoru Kurokawa : Hypothalamic neuronal histamine: implications of its homeostatic control of energy metabolism. *Nutrition*, 13, 403—11 (1997)
- [18] Wesley K Kroeze, Sandra J Hufeisen, Beth A Popadak, Sean M Renock, SeAnna Steinberg, Paul Ernsberger, Karu Jayatilake, Herbert Y Meltzer, Bryan L Roth : H₁-Histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology*, 28, 519—526 (2003)

- [19] Tardieu S, Micallef J, Gentile S, Blin O: Weight gain profiles of new anti-psychotics: public health consequences. *Obesity Reviews*, 4, 129—138 (2003)
- [20] Emma D Deeks, Gillian M. Keating : Blonanserin: a review of its use in the management of schizophrenia. *CNS Drugs*, 24, 65—84 (2010)
- [21] Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269, 543—546 (1995)
- [22] Louis A Tartaglia, Marlene Dembski, Xun Weng, Nanhua Deng, Janice Culpepper, Rene Devos, Grayson J Richards, L Arthur Campfield, Frederick T Clark, Jim Deeds, Craig Muir, Sean Sanker, Ann Moriarty, Karen J Moore, John S Smutko, Gail G Mays, Elizabeth A Wool, Cheryl A Monroe, Robert I Tepper : Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83, 1263—1271 (1995)
- [23] Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *The Journal of Clinical Investigation*, 98, 1101—1106 (1996)
- [24] Hiroaki Masuzaki, Yoshihiro Ogawa, Megumi Aizawa-Abe, Kiminori Hosoda, Junko Suga, Ken Ebihara, Noriko Satoh, Hidenori Iwai, Gen Inoue, Haruo Nishimura, Yasunao Yoshimasa, Kazuwa Nakao : Glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic mice overexpressing leptin with lethal yellow agouti mutation, *Diabetes*, 48, 1615—1622 (1999)
- [25] Robert V Considine, Madhur K Sinha, Mark L Heiman, Aidas Kriauciunas, Thomas W Stephens, Mark R Nyce, Joanna P Ohannesian, Cheryl C Marco, Linda J McKee, Thomas L Bauer, José F Caro : Serum immunoreactive-leptin concentrations in normalweight and obese humans. *The New England Journal of Medicine*, 334, 292—295 (1996)
- [26] Polyxeni Koutkia, Bridget Canavan, Michael L Johnson, Alex DePaoli, Steven Grinspoon : Characterization of leptin pulse dynamics and relationship to fat mass, growth hormone, cortisol, and insulin. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 285, E372—379 (2003)
- [27] Mi-Jeong Lee, Susan K Fried : Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 296, E1230—1238 (2009)

- [28] Wendy M Mueller, Francine M Gregoire, Kimber L Stanhope, Charles V Mobbs, Tooru M Mizuno, Craig H Warden, Judith S Stern, Peter J Havel : Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology*, 139, 551—558 (1998)
- [29] Peter Wellhoener, Bernd Fruehwald-Schultes, Werner Kern, Dorle Dantz, Wolfgang Kerner, Jan Born, Horst L. Fehm, Achim Peters : Glucose metabolism rather than insulin is a main determinant of leptin secretion in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, 1267—1271 (2000)
- [30] María J Moreno-Aliaga, Kimber L Stanhope, Peter J Havel : Transcriptional regulation of the leptin promoter by insulin-stimulated glucose metabolism in 3t3-l1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283, 544—548 (2001)
- [31] Russell CD, Ricci MR, Brodin RE, Magill E, Fried SK: Regulation of the leptin content of obese human adipose tissue. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 280, E399—404 (2001)
- [32] Gabriele E Sonnenberg, Glenn R Krakower, Raymond G Hoffmann, Diana L Maas, Magda MI Hennes, Ahmed H Kissebah : Plasma leptin concentrations during extended fasting and graded glucose infusions: relationships with changes in glucose, insulin, and FFA. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 4895—4900 (2001)
- [33] Philippe G Cammisotto, Ludwik J Bukowiecki : Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 283, C244—250 (2002)
- [34] Walker CG, Bryson JM, Bell-Anderson KS, Hancock DP, Denyer GS, Caterson ID: Insulin determines leptin responses during a glucose challenge in fed and fasted rats. *International Journal of Obesity*, 29, 398—405 (2005)
- [35] Li Cong, Ke Chen, Ji Li, Ping Gao, Qiang Li, Shuhua Mi, Xin Wu, Allan Z Zhao : Regulation of adiponectin and leptin secretion and expression by insulin through a PI3K-PDE3B dependent mechanism in rat primary adipocytes. *Biochemical Journal*, 403, 519—525 (2007)
- [36] Yue Wang, Yusuf Ali, Chun-Yan Lim, Wanjin Hong, Zhiping P Pang, Weiping Han : Insulin-stimulated leptin secretion requires calcium and PI3K/Akt activation. *Biochemical Journal*, 458, 491—498 (2014)
- [37] Anja Zeigerer, Matthew S Rodeheffer, Timothy E McGraw, Jeffrey M Friedmana : Insulin regulates

- leptin secretion from 3T3-L1 adipocytes by a PI3 kinase independent mechanism. *Experimental Cell Research*, 314, 2249—2256 (2008)
- [38] Gettys TW, Harkness PJ, Watson PM: The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology*, 13, 4054—4057 (1996)
- [39] Szkudelski T, Nowicka E, Szkudelska K: Leptin secretion and protein kinase A activity. *Physiological Research*, 54, 79—85 (2005)
- [40] James R Levy, Wayne Stevens : The effects of insulin, glucose, and pyruvate on the kinetics of leptin secretion. *Endocrinology*, 142, 3558—3562 (2001)
- [41] Philippe G Cammisotto, Yves Gélinas, Yves Deshaies, Ludwik J Bukowiecki : Regulation of leptin secretion from white adipocytes by insulin, glycolytic substrates, and amino acids. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 289, E166—171 (2005)
- [42] Tai-An Lin, John C Lawrence Jr : Control of the translational regulators PHAS-I and PHAS-II by insulin and cAMP in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 30199—30204 (1996)
- [43] So Youn Park, Jeong Hyun Lee, Ki Young Kim, Eun Kyoung Kim, Sung Ji Yun, Chi Dae Kim, Won Suk Lee, Ki Whan Hong : Cilostazol increases 3T3-L1 preadipocyte differentiation with improved glucose uptake associated with activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma transcription. *Atherosclerosis*, 201, 258—265 (2008)
- [44] Shixiong Tan, Yvonne Ng, David E James : Next-generation Akt inhibitors provide greater specificity: effects on glucose metabolism in adipocytes. *Biochemical Journal*, 435, 539—544 (2011)
- [45] Maria Serova, Armand de Gramont, Annemiläi Tijeras-Raballand, Célia Dos Santos, Maria Eugenia Riveiro, Khemaies Slimane, Sandrine Faivre, Eric Raymond : Benchmarking effects of mTOR, PI3K, and dual PI3K/mTOR inhibitors in hepatocellular and renal cell carcinoma models developing resistance to sunitinib and sorafenib. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71, 1297—1307 (2013)
- [46] Hiroya Kadokawa, Katsuhiro Aikawa, Koji Kimura, Dominique Blache, Ian H Williams, Graeme B Martin : Links between de novo fatty acid synthesis and leptin secretion in bovine adipocytes. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69, 225—231 (2007)

- [47] Alan Peterkofsky, Celia Gazdar : Glucose inhibition of adenylate cyclase in intact cells of *Escherichia coli* B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 2324 – 2328 (1974)
- [48] Shehla Hashim, Yuan Li, Akira Nagakura, Satoshi Takeo, Madhu B Anand-Srivastava : Modulation of G-protein expression and adenylyl cyclase signaling by high glucose in vascular smooth muscle. *Cardiovascular Research*, 63, 709 – 718 (2004)
- [49] Mi-Jeong Lee, Yanxin Wang, Matthew R Ricci, Sean Sullivan, Colleen D Russell, Susan K Fried : Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 292, E858 – 864 (2007)
- [50] Partha Chakrabarti, Takatoshi Anno, Brendan D Manning, Zhijun Luo, Konstantin V Kandror : The mammalian target of rapamycin complex 1 regulates leptin biosynthesis in adipocytes at the level of translation: the role of the 5'-untranslated region in the expression of leptin messenger ribonucleic acid. *Molecular Endocrinology*, 22, 2260 – 2267 (2008)
- [51] Richard L Bradley, Julia P R Mansfield, Eleftheria Maratos-Flier, Bentley Cheatham : Melaninconcentrating hormone activates signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 283, E584 – 592 (2002)
- [52] Ken Inoki, Joungmok Kim, Kun-Liang Guan : AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 381 – 400 (2012)
- [53] Wu Yin, James Mu, Morris J Birnbaum : Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 3074 – 3080 (2003)
- [54] Asensio C, Muzzin P, Rohner-Jeanrenaud F : Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *International Journal of Obesity*, 28, S45 – 52 (2004)
- [55] Giovanni De Pergola, Francesco Giorgino, Ritanna Benigno, Pietro Guida, Riccardo Giorgino : Independent influence of insulin, catecholamines, and thyroid hormones on metabolic syndrome. *Obesity*, 16, 2405 – 2411 (2008)

- [56] David D'Alessio : The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Obesity and Metabolism*, 13, 126—132 (2011)
- [57] Naoto Kubota, Yasuo Terauchi, Toshimasa Yamauchi, Tetsuya Kubota, Masao Moroi, Junji Matsui, Kazuhiro Eto, Tokuyuki Yamashita, Junji Kamon, Hidemi Satoh, Wataru Yano, Philippe Froguel, Ryozi Nagai, Satoshi Kimura, Takashi Kadowaki, Tetsuo Noda : Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 25863—25866 (2002)
- [58] Elena Zoico, Ulisse Garbin, Debora Oliosio, Gloria Mazzali, Anna M Fratta Pasini, Vincenzo Di Francesco, Anna Sepe, Luciano Cominacini, Mauro Zamboni : The effects of adiponectin on interleukin-6 and MCP-1 secretion in lipopolysaccharide-treated 3T3-L1 adipocytes: role of the NF-kappaB pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 24, 847—851 (2009)
- [59] Uichi Ikeda : Inflammation and coronary artery disease. *Current Vascular Pharmacology*, 1, 65—70 (2003)
- [60] Alice S Ryan, Dora M Berman, Barbara J Nicklas, Madhur Sinha, Ronald L Gingerich, Grady S Meneilly, Josephine M Egan, Dariush Elahi : Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult women with wide ranges of age and obesity. *Diabetes Care*, 26, 2383—2388 (2003)
- [61] Xavier Prieur, Y C Loraine Tung, Julian L Griffin, I Sadaf Farooqi, Stephen O'Rahilly, Anthony P Coll : Leptin regulates peripheral lipid metabolism primarily through central effects on food intake. *Endocrinology*, 149, 5432—5439 (2008)
- [62] Kristina I Melkersson, Anna-Lena Hulting, Kerstin E Brismar : Elevated levels of insulin, leptin, and blood lipids in olanzapine-treated patients with schizophrenia or related psychoses. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 61, 742—749 (2000)
- [63] Sugai Takuro, Suzuki Yutaro, Fukui Naoki, Ono Shin, Watanabe Junzo, Tsuneyama Nobuto, Someya Toshiyuki : Dysregulation of adipocytokines related to second-generation antipsychotics in normal fasting glucose patients with schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 32, 390—393 (2012)
- [64] Francesco Bartoli, Annamaria Lax, Cristina Crocamo, Massimo Clerici, Giuseppe Carrà : Plasma adiponectin levels in schizophrenia and role of second-generation antipsychotics: a meta-analysis.

- Psychoneuroendocrinology*, 56, 179–189 (2015)
- [65] Brian J Millera, Peter Buckley, Wesley Seabolt, Andrew Mellor, Brian Kirkpatrick : Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biological Psychiatry*, 70, 663–671 (2011)
 - [66] Jeffrey M Friedman, Jeffrey L Halaas : Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763–770 (1998)
 - [67] Deepak TS, Raveesh BN, Parashivamurthy BM, Kumar MN, Majgi SM, Nagesh HN: Clinical assessment of weight gain with atypical antipsychotics - blonanserin vs amisulpride. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9, 7–10 (2015)
 - [68] Fabio Panariello, Gina Polsinelli, Carol Borlido, Marcellino Monda, Vincenzo De Luca : The role of leptin in antipsychotic-induced weight gain: genetic and non-genetic factors. *Journal of Obesity*, 2012, 572848 (2012)
 - [69] Toshimasa Yamauchi, Hironori Waki, Junji Kamon, Koji Murakami, Kiyoto Motojima, Kajuro Komeda, Hiroshi Miki, Naoto Kubota, Yasuo Terauchi, Atsuko Tsuchida, Nobuyo Tsuboyama-Kasaoka, Naoko Yamauchi, Tomohiro Ide, Wataru Hori, Shigeaki Kato, Masashi Fukayama, Yasuo Akanuma, Osamu Ezaki, Akiko Itai, Ryozi Nagai, Satoshi Kimura, Kazuyuki Tobe, Hiroyuki Kagechika, Koichi Shudo, Takashi Kadowaki : Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 108, 1001–1013 (2001)
 - [70] AK Stunes, JE Reseland, Ø Hauso, M Kidd, K Tømmerås, HL Waldum, U Syversen, BI Gustafsson : Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13, 551–558 (2011)
 - [71] Kazuhiko Takahashi, Shinji Mizuarai, Hiromitsu Araki, Satoshi Mashiko, Akane Ishihara, Akio Kanatani, Hiraku Itadani, Hidehito Kotani : Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 46654–46660 (2003)
 - [72] Satomi Nimura, Tomohiro Yamaguchi, Koki Ueda, Karin Kadokura, Toshihiro Aiuchi, Rina Kato, Takashi Obama, Hiroyuki Itabe : Olanzapine promotes the accumulation of lipid droplets and the expression of multiple perilipins in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications, 467, 906–912 (2015)

- [73] Minako Kinoshita, Koh Ono, Takahiro Horie, Kazuya Nagao, Hitoo Nishi, Yasuhide Kuwabara, Rieko Takanabe-Mori, Koji Hasegawa, Toru Kita, Takeshi Kimura : Regulation of adipocyte differentiation by activation of serotonin (5-HT) receptors 5-HT_{2A}R and 5-HT_{2C}R and involvement of microRNA-448-mediated repression of KLF5. *Molecular Endocrinology*, 24, 1978–1987 (2010)
- [74] Tran Doan Ngoc Tran, Olga Zolochavska, Marxa L Figueiredo, Hai Wang, Li-Jun Yang, Jeffrey M Gimble, Shaomian Yao, Henrique Cheng : Histamine-induced Ca²⁺ signalling is mediated by TRPM4 channels in human adipose-derived stem cells. *Biochemical Journal*, 463, 123–134 (2014)
- [75] Yoshinori Kawazoe, Satoshi Tanaka, Motonari Uesugi : Chemical genetic identification of the histamine H₁ receptor as a stimulator of insulin-induced adipogenesis. *Chemistry & Biology*, 11, 907–913 (2004)