

# Effects of Sulfonylureas and Biguanides on the Lipogenic Activities in 3T3-L1 Adipocytes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8386">http://hdl.handle.net/2297/8386</a>

## スルフォニル尿素剤およびビグアナイド剤の 脂肪細胞分化に及ぼす影響

—培養 3T3-L1 前脂肪細胞を用いての検討—

金沢大学内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

箕 俊 成

(平成4年7月13日受付)

スルフォニル尿素剤 (sulfonylureas, SU 剤) は肥満インスリン非依存型糖尿病患者における体重増加を助長する性質を有する一方、ビグアナイド剤には逆に体重減少効果があることが報告されている。両薬剤の単独あるいは併用投与が脂肪蓄積に及ぼす影響を培養脂肪細胞を用いて検討した。飽和状態の培養 3T3-L1 前脂肪細胞をデキサメサゾン、イソブチルメチルキサンチン、インスリンで2日間処理し分化を誘導すると同時に、種々の濃度のトルブタミド、グリベンクラミド、ブフォルミンを単独又は併用で培地に加え培養した。Oil Red O 染色により評価した中性脂肪顆粒の蓄積はトルブタミド、グリベンクラミドで処理した細胞で顕著であり、SU 剤とブフォルミンの併用群で最低であった。SU 剤による分化促進作用はインスリンの存在下でのみ認められた。細胞内中性脂肪含量は1 mM トルブタミド、10  $\mu$ M グリベンクラミド処理により各々コントロールの2.3, 2.6倍に増加したが、100  $\mu$ M ブフォルミン単独処理では有意な変化は認められなかった。ブフォルミンはトルブタミド、グリベンクラミドによる中性脂肪含量の増加を各々54%, 30%抑制した。脂肪細胞分化の指標としてグリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (glycerol-3-phosphate-dehydrogenase, GPDH) 活性をジヒドロキシアセトンリン酸からグリセロール-3-リン酸が生成される過程におけるニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド (還元型) の酸化を追跡することにより測定した。トルブタミド、グリベンクラミドは容量依存性に GPDH 活性を上昇せしめ、各々 500  $\mu$ M, 50  $\mu$ M で比活性は最大に達した。分化誘導6日目における GPDH 活性は1 mM トルブタミド、10  $\mu$ M グリベンクラミド処理により各々コントロールの3.5倍, 3.7倍に上昇した。これら SU 剤は GPDH 活性を増大するのみならず、細胞の分化誘導過程をも促進していた。ブフォルミンは単独では GPDH 活性に有意の影響を及ぼさなかったが、分化誘導6日目におけるトルブタミド、グリベンクラミドによる GPDH 活性の上昇を各々75%, 61%抑制した。GPDH mRNA に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションでは、SU 剤は GPDH mRNA の発現を増大せしめ、これらはブフォルミンによって抑制されることが示された。以上の結果より、3T3-L1 細胞の分化過程において SU 剤は明らかな脂肪蓄積促進作用を示すことがわかった。ビグアナイド剤は単独では脂肪蓄積に対し有意の促進あるいは抑制作用を示さなかったが、SU 剤の脂肪蓄積促進作用を著明に抑制した。肥満インスリン非依存型糖尿病への SU 剤投与にあたりビグアナイド剤を併用することが有用である可能性が示唆された。

**Key words** sulfonylurea, biguanide, adipogenesis, 3T3-L1 cell, glycerol-3-phosphate-dehydrogenase

糖尿病はインスリン作用の不足による慢性的高血糖を主徴とし、特有の合併症を伴う一群の疾患である。我が国の糖尿病患者の大多数を占めるインスリン非依存型糖尿病 (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) は膵 $\beta$ 細胞のインスリン分泌能力の低下と標的組織のインスリン作用障害 (インスリン抵抗性) が原因となり引き起こされるものと考えられている。肥満はインスリン抵抗性を増大するため、NIDDM の治療上、肥満を伴う場合はその是正が重要なこととなる<sup>1)</sup>。現在 NIDDM に対する治療薬剤として主に2種類の経口血糖降下

剤、即ちスルフォニル尿素剤 (sulfonylureas, SU 剤) とビグアナイド剤 (biguanides) が用いられているが、SU 剤では時に肥満の助長という治療上好ましくない効果を認めることがある。一方、ビグアナイド剤には逆に体重減少効果があること、または少なくとも体重を増加させることなく血糖コントロールを改善しうる事が報告されている<sup>2-6)</sup>。しかしながら両薬剤の体重調節に及ぼす効果の違いがどのような作用機序の差異に基づくかについて検討した報告は今のところない。今回、SU 剤及びビグアナイド剤が脂肪組織の代謝に及ぼす効果の一端を明らかに

Abbreviations: CMF, calcium-magnesium free; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; G-3-P, Glycerol-3-phosphate; GPDH, glycerol-3-phosphate-dehydrogenase; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NADH, nicotinamide adenine

する目的で、脂肪蓄積や肥満の機序を細胞レベルで検討する上で有用な実験モデルである培養 3T3-L1 前脂肪細胞<sup>7)</sup>を用いて、両薬剤が脂肪細胞の分化に与える影響を検討した。

### 材料および方法

#### I. 試薬類

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (比活性 3000Ci/mmol) はアマシャム・ジャパン(東京)から購入した。これ以外の試薬で特に記載のないものはいずれも和光純薬(大阪)の製品を用いた。

#### II. 細胞培養

マウス線維芽細胞由来の 3T3-L1 前脂肪細胞(国立衛生研究所より供与)を各穴が 35mm 径の 6 穴プレート(Costar 社, Cambridge, USA)に 5000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で播種し、10%牛胎児血清(GIBCO 社, New York, USA), 100U/ml ペニシリン, 0.1mg/ml ストレプトマイシン(GIBCO 社)を含む Dulbecco 改良 Eagle 培地(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)(GIBCO 社)にて培養した。飽和状態(confluence)に達した後、0.5mM デキサメサゾン(dexamethasone)(Sigma 社, St. Louis, USA), 0.25mM イソブチルメチルキサンチン(isobutylmethylxanthine)(Sigma 社), 10 $\mu$ g/ml ブタインスリン(Sigma 社)にて分化を誘導し、2日後に 10 $\mu$ g/ml インスリンを含有する培地に交換し、以後 2日毎に培地を交換した。分化誘導と同時にトルブタミド(tolbutamide)(Hoechst 社, West Germany), グリベンクラミド(glibenclamide)(Hoechst 社), あるいはブフォルミン(buformin)(小玉, 東京)を単独又は併用で加え、さらに 4 から 6 日間培養した。

#### III. 細胞内中性脂肪の染色

蓄積した細胞内中性脂肪(triglyceride, TG)顆粒を Oil Red O 染色<sup>8)</sup>によって観察した。10%ホルマリン/カルシウム、マグネシウム不含磷酸緩衝生理食塩水(calcium-magnesium free phosphate buffered saline, CMF-PBS)で細胞を固定した。0.5% Oil Red O/イソプロピルアルコール溶液と蒸留水を 3:2 の割合で混合し約 10 分間室内放置した後、Whatman No. 1 フィルターで濾過した染色液を固定した細胞に加え約 1 時間染色し、蒸留水で洗浄し風乾させた。

#### IV. 細胞内中性脂肪の定量

細胞内 TG は市販の TG 測定用キットであるリピドス・エース(東洋紡, 大阪)を用い酵素比色法<sup>9)</sup>により定量した。すなわち各ディッシュの細胞を 0.5ml の PBS とともにセルスクレイパー(Costar 社)で剝離、回収し、超音波ホモジナイザー(Tomy Seiko, 東京)で細胞を破壊することにより TG を遊離し、リボプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロールリン酸オキシダーゼ処理により生成された過酸化水素をペルオキシダーゼの作用で 4-アミノアンチピリンと N-エチル-N-(3-スルフォプロピル)-m-アニジンを酸化縮合させ、その際に生じたキノン色素を 540nm における吸光度を測定することにより定量した。

#### V. 細胞内 GPDH 活性の測定

脂肪合成能の指標としてグリセロール-3-リン酸脱水素酵素(glycerol-3-phosphate-dehydrogenase, GPDH)活性を Kozak ら

の原法<sup>10)</sup>を一部改変した方法を用いて測定した。各ディッシュの細胞を冷 CMF-PBS で洗い、0.6ml の 25mM Tris-1mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 緩衝液(pH 7.5)を加え、セルスクレイパーで細胞を剝離し、1.5ml マルチリューブチューブ(フナコシ, 東京)に回収し氷上に置く。超音波ホモジナイザーで細胞を壊し、12,800 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心する。得られた上清液を別の 1.5ml マルチリューブチューブに移し、-70 $^{\circ}$ C で保存した。トリエタノールアミン溶液(0.5M トリエタノールアミン, 10mM EDTA, 10mM 2-メルカプトエタノール, pH 7.5, HCl で調整)100 $\mu$ l, 5mM ジヒドロキシアセトンリン酸(dihydroxyacetone phosphate, DHAP)200 $\mu$ l, 0.5mM ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド(還元型)(nicotinamide adenine dinucleotide-reduced, NADH)400 $\mu$ l を調合した後、最後に粗酵素液 300 $\mu$ l を加え、25 $^{\circ}$ C で反応させた。グリセロール-3-リン酸(Glycerol-3-phosphate, G-3-P)とニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)が生成される過程での NADH の減衰を 340nm における吸光変化量を指標として測定し、蛋白量 1mg あたりの比活性として求めた。すなわち比活性(units/mg)=反応液中の NADH 量(100nanomoles) $\times$ 340nm における吸光変化量( $\Delta$  OD340)/1.25/反応時間 $\Delta$ t (min.)/タンパク量(mg)。

#### VI. 細胞の蛋白量の定量

超音波ホモジナイザーで緩衝液とともに細胞を壊し、12,800 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、得られた上清液の蛋白量を市販の蛋白定量キット BCA Protein Assay Reagent(PIERCE 社, Rockford, USA)を用いて定量した。

#### VII. 全 RNA の抽出ならびにノーザンブロットハイブリダイゼーション(Northern blot hybridization)法

25cm<sup>2</sup>(50ml)組織培養フラスコ(Costar 社)に播種し飽和状態に達した後、前述のごとく各種薬剤で処理した細胞からチオシアン酸グアニジン-フェノール-クロロホルム(acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform)法<sup>11)</sup>により全 RNA の抽出を行い、得られた RNA 量は分光光度計(Beckman 社, Fullerton, USA)を用いて 260nm の吸光度を測定し、1OD=40 $\mu$ g/ml として算出した。1レーン当たり 20 $\mu$ g の全 RNA を 2.3M ホルムアルデヒドと 50%ホルムアミドの存在下に 65 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱し変性させた後、0.66M ホルムアルデヒドをふくむ 1%アガロースゲルを用いて電気泳動した。次に紫外線トランスイルミネーター上で臭化エチジウム染色された 28S, 18S のリボソーム RNA のバンドを確認後、20 $\times$ sodium-sodium citrate (SSC) (1 $\times$ SSC: 3M 塩化ナトリウム, 0.3M クエン酸ナトリウム)をブロットニングバッファーとしてニトロセルロースフィルター(アマシャム・ジャパン, 東京)にトランスファーを行った。次にニトロセルロースフィルターを 80 $^{\circ}$ C で 4 時間加熱して RNA を固定し、プレハイブリダイゼーション液(50%ホルムアミド, 5 $\times$ SSC, 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate, SDS), 5 $\times$ デンハルト液, 200 $\mu$ g/ml 熱変性超音波処理サケ精子 DNA)中で 37 $^{\circ}$ C, 3 時間インキュベートした。その後 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP を標識基質として T4 ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造, 京都)を用いて 5' 末

dinucleotide-reduced; NIDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus; PBS, phosphate buffered saline; PEP, phosphoenolpyruvate; PK, pyruvate kinase; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, sodium-sodium citrate; SU, sulfonylureas; TG, triglyceride

端標識したプローブを加え、37℃、16時間ハイブリダイゼーションを行った。プローブは Ireland ら<sup>19)</sup>により決定されたマウス GPDH 遺伝子配列の第608から第637塩基に相補的なオリゴヌクレオチド (5'-GATGTCTTCCTCAAACACCCACATG-GTCAC-3') を作成することにより得た。終了後フィルターを 3×SSC, 0.1% SDS で室温にて30分間洗浄し、さらに 0.1×SSC, 0.1% SDS で37℃にて30分間洗浄し、XAR-5 フィルム (コダック社, Rochester, USA) を用いて-80℃にてオートラジオグラフィーを行った。

#### Ⅶ. 培地中のブドウ糖の定量

脂肪細胞の糖の取り込みの指標として分化誘導4日目に培地を交換後24時間における培地中のブドウ糖の消費量を富士ドライケムスライド GLU-W (富士フィルム, 神奈川) により定量した。

#### Ⅷ. 細胞内ピルビン酸キナーゼ活性の測定

ピルビン酸キナーゼ (pyruvate kinase, PK) 活性は Beutler らの原法<sup>20)</sup>を一部改変した方法を用いて測定した。各ディッシュの細胞を冷 CMF-PBS で洗い、0.2ml の 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) と 0.4ml H<sub>2</sub>O を加え、GPDH 測定時と同様の処理を行った。0.1 M MgCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ l, 1 M KCl 100 $\mu$ l, 1 M

Tris-HCl 緩衝液 50 $\mu$ l, 2 mM NADH 100 $\mu$ l, 50mM ホスホエノールピルビン酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) 100 $\mu$ l, 30mM ADP 50 $\mu$ l, 60U/ml 乳酸脱水素酵素 100 $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 250 $\mu$ l を調合した後、最後に粗酵素液 150 $\mu$ l を加え、25℃で反応させた。ピルビン酸 (pyruvate) と ATP が生成される過程での NADH の減衰を 340nm における吸光変化量を指標として測定し、蛋白量 1 mg あたりの比活性として求めた。すなわち比活性 (units/mg)=340nm における吸光変化量 ( $\Delta$  OD<sub>340</sub>) $\times$ 1000/12.6 (NADH の分子吸光係数  $6.3 \times 2$ )/反応時間  $\Delta$  t (min.)/酵素量 ( $\mu$ l)/蛋白量 (mg)。

#### Ⅸ. 統計学的処理

成績は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。得られたデータの2群間の有意差判定には対応のない t 検定を用い、P 値が0.05未満の場合に有意差ありと判定した。

### 成 績

#### I. SU 剤およびブフォルミンが細胞内 TG 含量に与える影響

分化した細胞内に蓄積した TG を形態学的に評価するために分化誘導開始6日後の細胞における TG 顆粒を Oil Red O を用

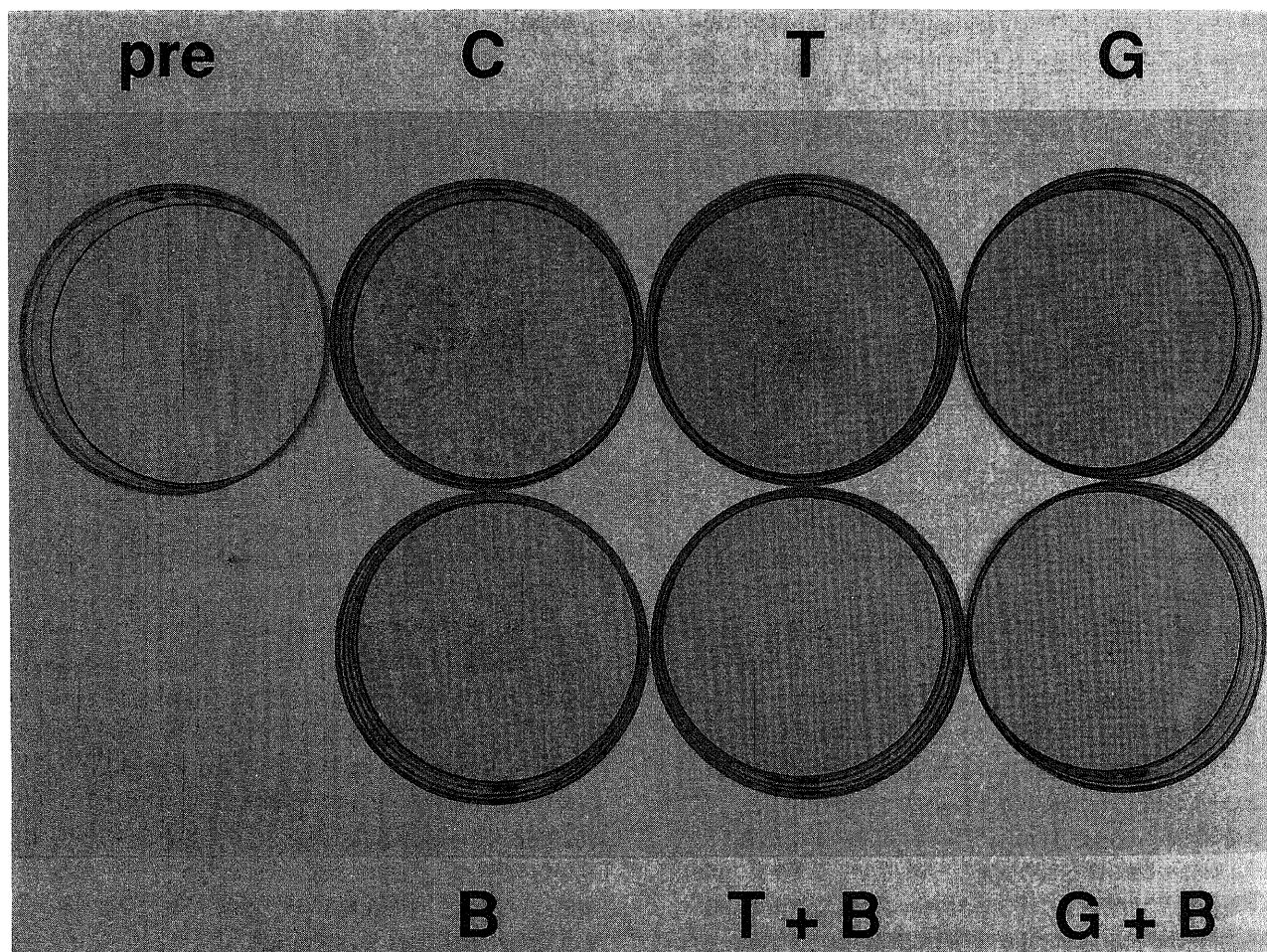


Fig. 1. Lipid accumulation assessed by Oil Red O staining. Confluent 3T3-L1 preadipocytes (pre) were induced to differentiate by treatment with 0.5mM dexamethasone, 0.25mM isobutylmethylxanthine and 10 $\mu$ g/ml insulin for two days, and then with 10 $\mu$ g/ml insulin (C, control cells). At the time of induction, 1 mM tolbutamide (T), 10 $\mu$ M glibenclamide (G) and/or 100 $\mu$ M buformin (B) were added along with the inducers. On the 6th day, cells were fixed with formaldehyde and then stained with Oil Red O as described in *Materials and Methods*. T+B, tolbutamide plus buformin; G+B, glibenclamide plus buformin.

いて染色した(図1)。分化誘導前の細胞(pre)ではTGの染色が認められないのに対し、デキサメサゾン、イソブチルメチルキサンチン、インスリンにて分化を誘導し、2日後にインスリンを含有する培地に交換し、さらに4日間培養した細胞群(C、

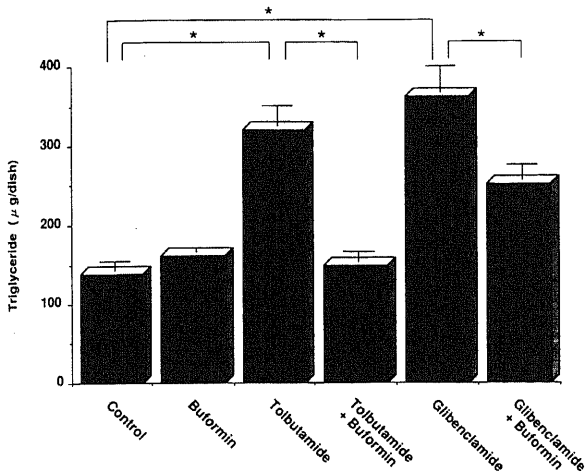


Fig. 2. Effects of sulfonylureas and buformin on intracellular triglyceride (TG) content of 3T3-L1 adipocytes. The cells were treated as described in the legend of Fig. 1. The cellular TG contents were quantitated enzymatically as described in *Materials and Methods*. The values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent cultures in duplicates. \*,  $P < 0.01$ .

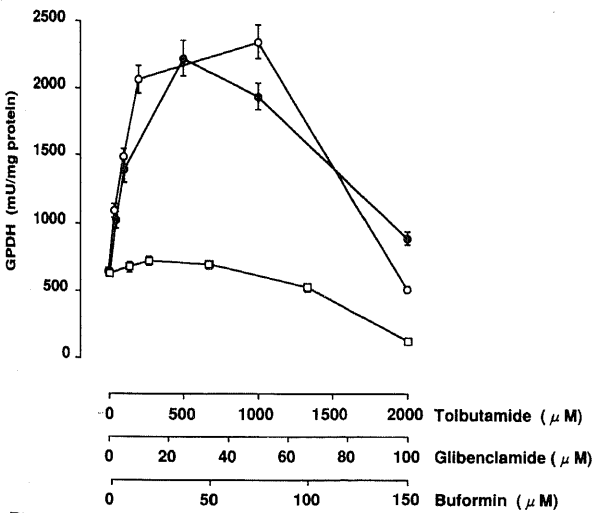


Fig. 3. Dose-dependent effects of sulfonylureas and buformin on glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activities. Confluent 3T3-L1 cells were induced to differentiate by treatment with 0.5mM dexamethasone, 0.25mM isobutylmethylxanthine and 10μg/ml insulin for two days, and then with 10μg/ml insulin. At the time of induction, various concentrations of tolbutamide (●), glibenclamide (○) or buformin (□) were added. GPDH activities were determined by the initial rate of NADH oxidation in the conversion of dihydroxyacetone phosphate to glycerol-3-phosphate on the 6th day after the induction of differentiation. One unit of enzyme activity corresponds to the oxidation of 1nmol of NADH per minute. The results were expressed as milliunits (mU) per milligram protein. The values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent cultures in duplicates.

コントロール)ではTG顆粒がコロニーを形成して染色された。TG顆粒の蓄積はトルブタミド、グリベンクラミドで処理した細胞でコントロールに比し顕著であった。トルブタミド、グリベンクラミドにより促進されたTG顆粒の蓄積はブフォルミンの併用により抑制された。なおインスリン非存在下では各群ともTG顆粒の蓄積はほとんど認められなかったため、以下の実験はすべてインスリンの存在下で行った。

つぎに細胞内に蓄積したTGを定量的に評価するために細胞よりTGを遊離し酵素法により測定した。細胞内TG含量はトルブタミド、グリベンクラミド処理により各々コントロール137.4  $\pm$  12.5 μg/ディッシュの2.3, 2.6倍に増加したが、ブフォルミン単独処理では有意な変化は認められなかった。ブフォルミンはトルブタミド、グリベンクラミドによるTGの増加を各々54%, 30%抑制した(図2)。

### II. SU 剤およびブフォルミンが細胞内 GPDH 活性に与える影響

脂肪蓄積の機序を探るため、解糖系とグリセロール合成系との分岐点に位置する酵素である GPDH の誘導に与える各薬剤の影響を検討した。GPDH は DHAP と NADH を基質として G-3-P と NAD が生成される過程を触媒し、中性脂肪合成の最初のステップに位置する。分化誘導開始 6 日目における検討で

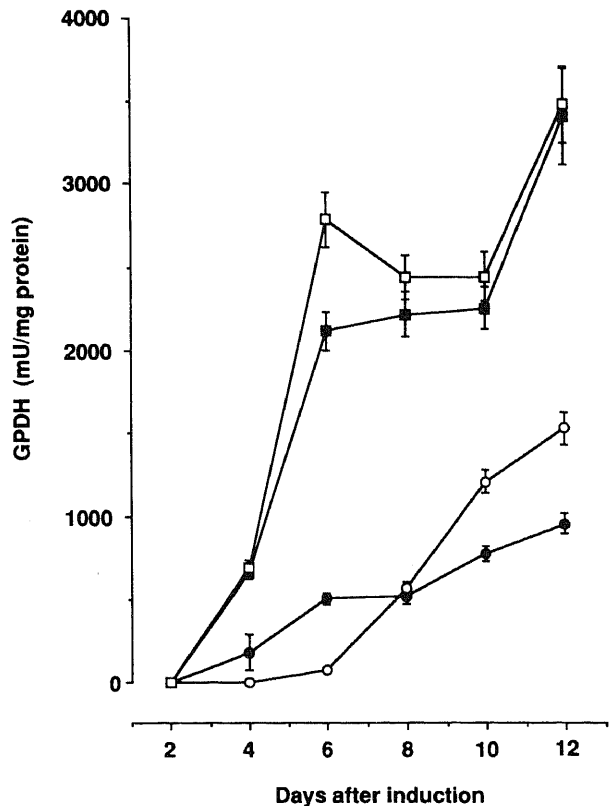


Fig. 4. Development of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activities in the presence of sulfonylureas and buformin. Confluent 3T3-L1 cells were induced to differentiate as described in *Materials and Methods*. From the time of induction, the cells were maintained in the medium containing reagents as follows: ●, no additions; ■, 1mM tolbutamide; □, 10μM glibenclamide; ○, 100μM buformin. Cultures were refed three times a week. The values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent cultures in duplicates.

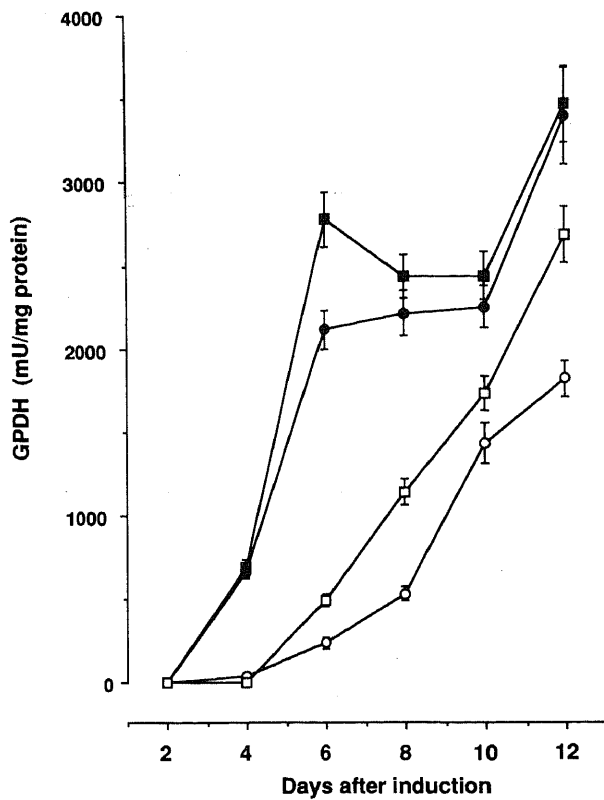


Fig. 5. Effects of buformin on the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activities stimulated by sulfonylureas. From the time of induction, the cells were maintained in the medium containing reagents as follows: ●, 1mM tolbutamide; ○, 1mM tolbutamide and 100µM buformin; ■, 10µM glibenclamide; □, 10µM glibenclamide and 100µM buformin. Cultures were refed three times a week. The values represent the mean±SEM of three independent cultures in duplicates.

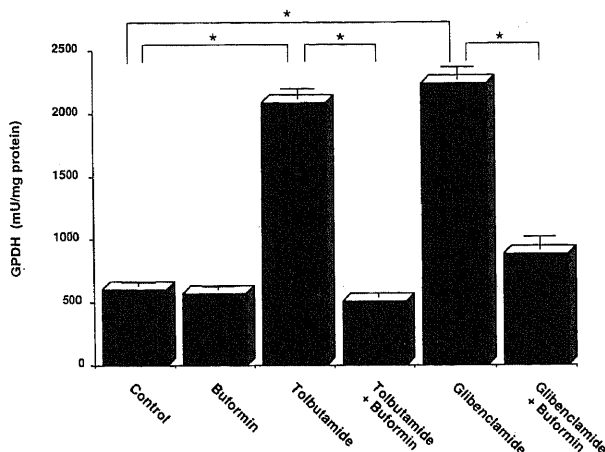


Fig. 6. Effects of sulfonylureas and buformin on the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activities in 3T3-L1 adipocytes. From the time of induction, the cells were maintained in the medium containing 1mM tolbutamide, 10µM glibenclamide, and/or 100µM buformin. Cultures were refed three times a week. GPDH activities were determined as described in *Materials and Methods* on the 6th day after the induction of differentiation. The results were expressed as milliunits (mU) per milligram protein. The values represent the mean±SEM of four to eight replicate cultures in duplicates. \*,  $P < 0.01$ .

は図3のごとくトルブタミド、グリベンクラミドは容量依存性に GPDH 活性を上昇せしめ、各々 500µM, 50µM で比活性は最大に達した。一方、ブフォルミンによる GPDH 活性の上昇は軽度であった。

経時的变化の検討では、GPDH 活性は 1mM トルブタミド、10µM グリベンクラミドにより 4 日目より上昇し、各々 6 日目ではほぼプラトーに達しており、これはコントロールよりも早期であった。すなわち SU 剤は GPDH 活性を増大するのみならず、細胞の分化誘導過程をも促進していた。100µM ブフォルミンによる GPDH の増加はコントロールと比べ有意ではなかった (図4)。

トルブタミド、グリベンクラミドにより刺激された GPDH 活性はブフォルミンの添加により抑制され、その抑制率は分化誘導 4 日後でトルブタミド、グリベンクラミド各々 89%, 83% と最大であった (図5)。

分化誘導 6 日目における GPDH 活性は 1 mM トルブタミド、10µM グリベンクラミド処理により各々コントロール 601.4±26.8mU/mg 蛋白の 3.5 倍、3.7 倍に上昇したが、100µM ブフォルミンの併用により各々 75%, 61% の抑制を認

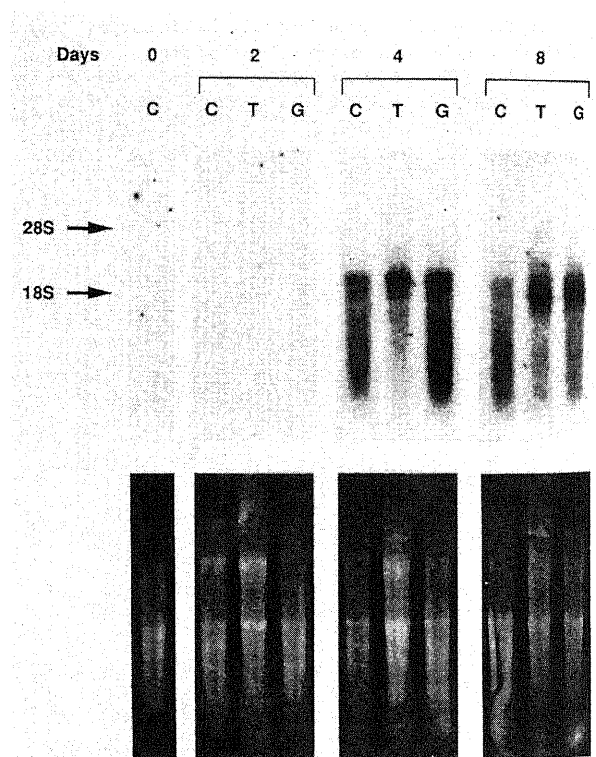


Fig. 7. Time course of the accumulation of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) mRNA in the presence of sulfonylureas. From the time of induction, the cells were maintained in the medium containing 1mM tolbutamide or 10µM glibenclamide. Total cellular RNA was isolated by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction as described in *Materials and Methods*. Twenty microgram of total RNA was subjected to 1% formaldehyde-agarose gel electrophoresis and transferred to a piece of nitrocellulose filter for hybridization with oligonucleotide cDNA probe to mouse GPDH mRNA. Arrows indicate the relative migration of 28S and 18S RNAs run on the same gel. UV transillumination demonstrated equal quantities of RNA applied to the ethidium bromide stained agarose gel (lower).

めた。一方ブフォルミン単独では GPDH 活性の有意の抑制は認められなかった (図 6)。

### Ⅲ. SU 剤およびブフォルミンが GPDH mRNA 発現に与える影響

GPDH の遺伝子発現に与える各薬剤の影響を検討するため、GPDH mRNA に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを用いてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行なった (図 7, 図 8)。Spiegelman ら<sup>14)</sup>は 3T3 脂肪細胞における GPDH mRNA の長さが3500塩基対であることを報告している。今回 28S RNA と 18S RNA の間に認められた 18S RNA に近接したバンドはほぼこの大きさに相当し、GPDH mRNA と考えられる。未分化な脂肪細胞 (day 0), 分化誘導直後の細胞 (day 2) においては GPDH mRNA は発現していなかった。分化誘導 4 日目にはコントロールにおいて GPDH mRNA の発現を認め、トルブタミド、グリベンクラミドとともにインキュベートした細胞ではその発現が著しく増大した。4 日目と 8 日目ではその発現の程度に差はなく、GPDH mRNA の発現は 4 日目以前にプラトーに達するものと思われる (図 7)。分化誘導 4 日目

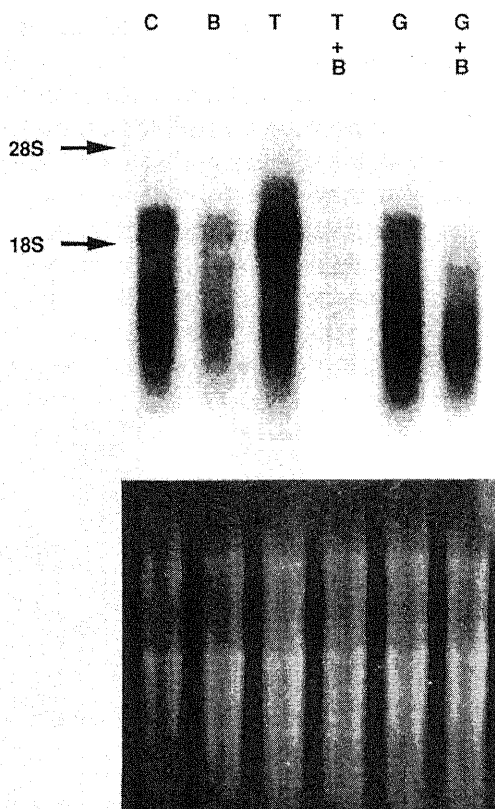


Fig. 8. Effects of sulfonylureas and/or buformin on the accumulation of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) mRNA. From the time of induction, the cells were maintained in the medium containing 1mM tolbutamide, 10 $\mu$ M glibenclamide and/or 100 $\mu$ M buformin. On the 4th day, total RNA was isolated by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, and analyzed by Northern blot hybridization using oligonucleotide cDNA probe to mouse GPDH mRNA as described in *Materials and Methods*. Arrows indicate the relative migration of 28S and 18S RNAs run on the same gel. UV transillumination demonstrated equal quantities of RNA applied to the ethidium bromide stained agarose gel (lower).

における検討ではトルブタミド、グリベンクラミドにより GPDH mRNA の発現はコントロールに比し増大しており、ブフォルミンによってそれらの発現は抑制された (図 8)。

### Ⅳ. SU 剤およびブフォルミンが細胞の生存度 (viability) に与える影響

各薬剤が細胞の生存度に与える影響を評価するため細胞の蛋白量を定量した (図 9, 図 10)。トルブタミド、グリベンクラミド、ブフォルミン単独又は併用により細胞の蛋白量には大きな影響を及ぼさなかった。トルブタミド、グリベンクラミドが GPDH の誘導を促進し、ブフォルミンがそれらを抑制している条件下での脂肪細胞の糖取り込みに与える各薬剤の影響を検討するため分化誘導 4 日目に培地を交換後 24 時間における培地中のブドウ糖の消費量を測定した結果を図 11 に示す。トルブタミド、グリベンクラミド、ブフォルミン処理によりブドウ糖の消費量はコントロール 3.89 $\pm$ 0.12mg/ディッシュに対し各々 85%, 130%, 42% の増加を認めた。トルブタミド、グリベンクラミドにより処理したブドウ糖の消費量はブフォルミンの併用により各々 34%, 18% 抑制された。

### Ⅴ. SU 剤およびブフォルミンが細胞内 PK 活性に与える影響

さらに同様の条件下でグリセロール合成系分岐後の解糖系の動態を検討するため、PEP と ADP を基質としてビルビン酸と

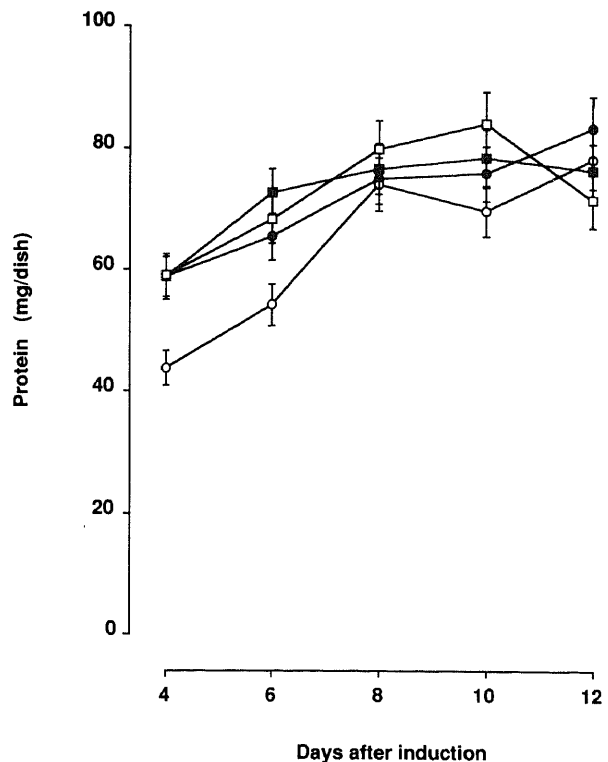


Fig. 9. Influences of sulfonylureas and buformin on the cellular protein contents. From the time of induction, the cells were maintained in the medium containing reagents as follows: ●, no additions; ■, 1mM tolbutamide; □, 10 $\mu$ M glibenclamide; ○, 100 $\mu$ M buformin. Cultures were refed three times a week. On the 2, 4, 6, 8 and 10th day of induction of differentiation, cellular protein was quantitated as described in *Materials and Methods*. The values represent the mean $\pm$ SEM of three independent cultures in duplicates.

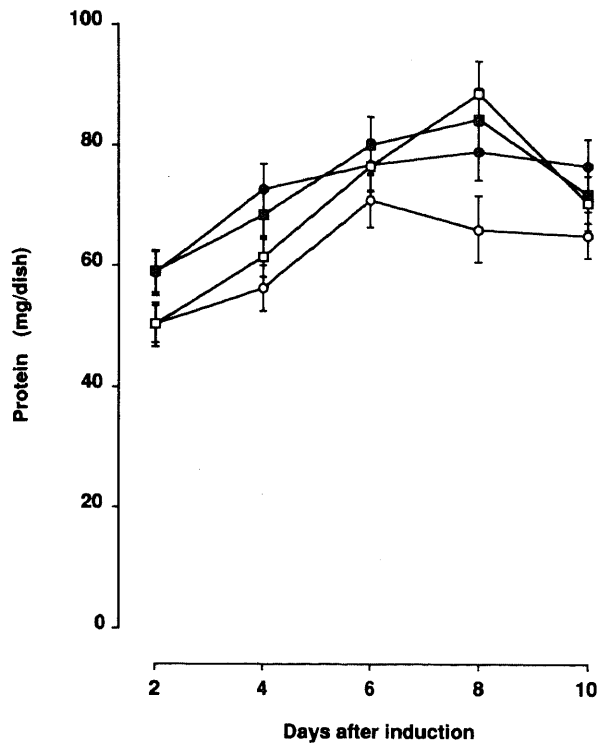


Fig. 10. Influences of buformin on cellular protein contents treated with sulfonylureas. From the time of induction, the cells were maintained in the medium containing reagents as follows: ●, 1mM tolbutamide; ○, 1mM tolbutamide and 100µM buformin; ■, 10µM glibenclamide; □, 10µM glibenclamide and 100µM buformin. Cultures were refed three times a week. On the 2, 4, 6, 8 and 10th day of induction of differentiation, cellular protein was quantitated as described in *Materials and Methods*. The values represent the mean±SEM of three independent cultures in duplicates.

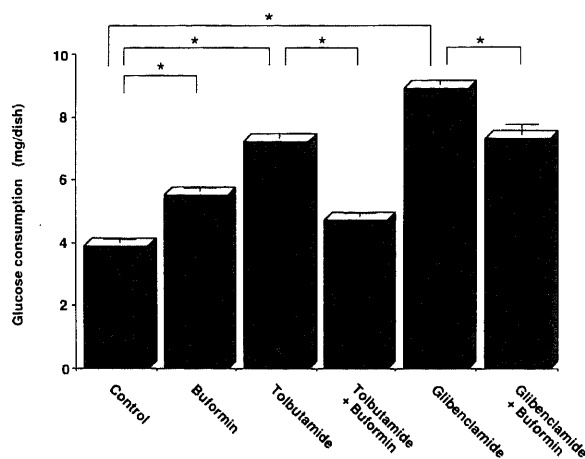


Fig. 11. Effects of sulfonylureas and buformin on the glucose consumption of 3T3-L1 adipocytes. From the time of induction, the cells were maintained in the medium containing 1mM tolbutamide, 10µM glibenclamide, and/or 100µM buformin. Cultures were refed three times a week. On the 4th day after induction of differentiation, glucose consumption during 24 hours was determined as described in *Materials and Methods*. All values represent the mean±SEM of three independent cultures in duplicates. \*,  $P < 0.01$ .

ATP が生成される過程を触媒する PK 活性を測定した。PK によって触媒される反応は生理的には非可逆的であるとみなされており、酵素活性の上昇は解糖系の促進を反映しているものと考えられる。トルブタミド、グリベンクラミド処理により PK 活性はコントロール  $14.2 \pm 0.7 \text{U/mg}$  蛋白に対し各々 101%, 107% の増加を認めた。ブフォルミン単独では PK 活性に優位に影響を与えなかったが、トルブタミド、グリベンクラミドにより増大した PK 活性はブフォルミンの併用により各々 44%, 40% 抑制された (図 12)。

#### 考 察

マウス線維芽細胞由来の 3T3-L1 前脂肪細胞は飽和状態に達した後脂肪細胞に分化し、細胞質内に脂肪滴を蓄積する性質を有している。さらにその分化は種々のホルモンによって修飾されることから脂肪蓄積や肥満の機序を細胞レベルで検討する上で有用な実験モデルであることが知られている<sup>7)</sup>。肥満は、基質の過剰供給による脂肪細胞の肥大のみならず、同時に前脂肪細胞の分化促進による脂肪組織の過形成も生じることにより形成され、持続することが考えられている<sup>10)</sup>。脂肪細胞の代謝を試験管内で研究するにあたり、単離脂肪細胞の初代培養系を用いた実験系ではすでに分化した細胞がさらに脂肪を蓄積して肥大していく過程における変化をみることは可能であるが過形成の過程は検討できない。これに対し培養 3T3-L1 細胞は脂肪細胞の分化の段階から観察できることから、脂肪細胞の肥大のみならず過形成の過程をも検討可能な系と考えられ、肥満のモデルとしてはより適しているものと思われる。そこで今回、SU 剤およびビグアナイド剤が脂肪組織の代謝に及ぼす効果の一端を明らかにする目的で、この培養脂肪細胞を用いて両薬剤の脂肪蓄積におよぼす直接的影響を検討した。

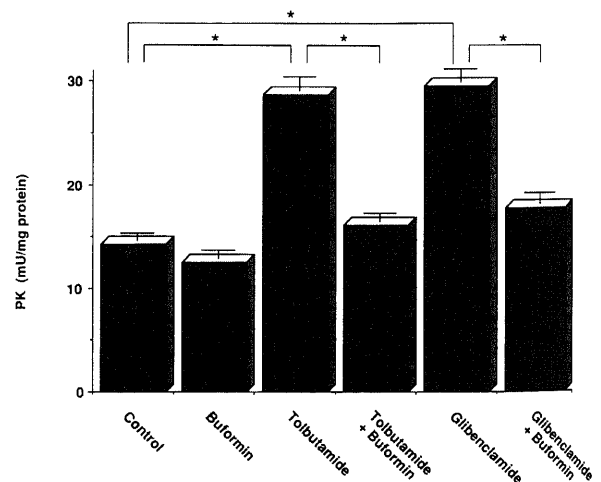


Fig. 12. Effects of sulfonylureas and buformin on the pyruvate kinase (PK) activities in 3T3-L1 adipocytes. From the time of induction, the cells were maintained in the medium containing 1mM tolbutamide, 10µM glibenclamide, and/or 100µM buformin. Cultures were refed three times a week. PK activities were determined by the initial rate of NADH oxidation in the conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate on the 6th day after induction of differentiation. One unit of enzyme activity corresponds to the oxidation of 1nmol of NADH per minute. The results were expressed as milliunits (mU) per milligram protein. The values represent the mean±SEM of three independent cultures in duplicates. \*,  $P < 0.01$ .



SU 剤の血糖降下作用機序として膵β細胞からのインスリン分泌を介する作用のみならず、インスリン標的臓器に働きインスリン作用を増強するいわゆる膵外作用も存在することが知られている<sup>16)</sup>。脂肪細胞への直接的な作用に関してもこれまで種々の検討がなされている。すなわちヒト<sup>17)</sup>および ob/ob マウス<sup>18)</sup>の単離脂肪細胞を用いた実験系より SU 剤はインスリンの存在下で脂肪生成に促進的に働くことが示されている。さらに SU 剤は脂肪分解抑制作用をも有することが示されており<sup>19)</sup>、その機序として脂肪酸酸化に抑制的に作用すること<sup>20,21)</sup>、ラット遊離脂肪細胞の膜分画の低 Km cAMP を活性化すること<sup>22)</sup>等が報告されている。今回の検討で、3T3-L1 細胞の分化過程において SU 剤はインスリンの存在下で容量依存性に脂肪細胞における脂肪蓄積を促進することがわかった。さらに SU 剤は細胞内中性脂肪の蓄積とともに容量依存性に GPDH 活性を増大させ、GPDH mRNA の発現も刺激していたことよりこれらの変化は脂肪細胞への分化の初期に遺伝子発現調節の段階で起こっているものと思われた。Miller ら<sup>23)</sup>は 3T3-L1 細胞においてグリブライド (glyburide) がインスリン存在下でのみ GPDH 活性を増加させることより本剤が脂肪細胞の分化におけるインスリンの作用を増強しうることを報告している。今回著者はトルブタミド、グリベンクラミドにおいても同様の成績を得ており、3T3-L1 細胞における脂肪合成促進作用は SU 剤全般に認められる性質と考えられる。

脂肪細胞の分化の指標として活性を測定した GPDH は DHAP と NADH を基質として G-3-P と NAD が生成される過程を触媒する酵素である。すなわち解糖系とグリセロール合成系の分岐点に位置し、中性脂肪合成の最初のステップに位置する重要な酵素である。その特異活性は脂肪細胞の分化過程で 5000倍以上に上昇し、脂肪細胞の分化、中性脂肪合成の敏感かつ正確な指標となりうるということが報告されている<sup>25)~27)</sup>。さらに Spiegelman ら<sup>14)</sup>は 3T3 脂肪細胞の分化の過程において GPDH mRNA の発現が 200倍以上に増大し、分化誘導 3 日目でのその発現レベルは最大となることを報告している。今回の検討で GPDH mRNA の発現が GPDH の酵素活性の増大に先立って認められ、酵素活性が最大となる 2 日前にすでにプラトーに達していたことより、SU 剤による GPDH の誘導は GPDH mRNA の発現、すなわち遺伝子発現調節の段階で生じていることがわかった。これらの結果より SU 剤は 3T3-L1 細胞の分化および脂肪合成を促進すること、またその作用は分化過程の極めて早期より認められることが示された。

ところでトルブタミド、グリベンクラミドはともに脂肪生成を促進した濃度で培地中のブドウ糖の消費と PK 活性を増大させており、細胞への糖の取り込み、解糖系を促進していることが示唆された。細胞内での糖代謝の第一歩は膜における糖輸送システムであり、SU 剤は脂肪細胞においてインスリンの糖輸送担体への作用を増強することより、糖取り込みを促進することが報告されている<sup>28)~30)</sup>。糖の細胞内への取り込みが増すと解糖は必然的に亢進するが、SU 剤の解糖系への直接的な作用としてラット肝において解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ-I (phosphofructokinase-I) の強力な活性化因子であるフルクトース-2, 6-二リン酸 (fructose-2,6-bisphosphate) を上昇させること<sup>31)</sup>、また脂肪細胞においてインスリンの存在下で <sup>14</sup>C で標識したブドウ糖から二酸化炭素への <sup>14</sup>C の取り込みを促進すること<sup>17)18)</sup>が報告されている。今回の実験で活性の

上昇が認められた PK によって触媒される反応はヘキソキナーゼ (hexokinase) およびグルコキナーゼ (glucokinase)、ホスホフルクトキナーゼ (phosphofructokinase) による反応とともに生理的には非可逆であるとみなされており、酵素活性の上昇は解糖系の促進を反映しているものと考えられる。Altan ら<sup>32)</sup>はラット単離脂肪細胞においてインスリンによるグリコーゲン合成酵素活性化作用をグリブライドが培地のブドウ糖濃度依存性に増強することを報告している。その機序として彼らは糖取り込みと糖利用の亢進に基づく細胞内グルコース-6-リン酸濃度の上昇による合成酵素リン酸化酵素の容量依存性アロステリックな活性化を推測している。今回の SU 剤によるグリセロール合成系の促進にも同様な機序、すなわち解糖系の促進により細胞内 DHAP レベルが上昇し、基質依存性に GPDH が誘導されたことが関与していることもひとつの可能性として考えられる。

一方ビグアナイド剤の作用機序としてこれまで肝における糖新生の抑制<sup>33)4)</sup>、肝、筋におけるグリコーゲン合成の増加<sup>35)36)</sup>、インスリンの受容体への親和性の増加<sup>34)37)38)</sup>、インスリンの受容体自己リン酸化と蛋白チロシンキナーゼ活性の増大<sup>33)39)</sup>、糖輸送担体の細胞内小胞体から形質膜へのトランスロケーションの促進<sup>40)</sup>、インスリン非依存性の糖取り込みの増加<sup>41)42)</sup>、腸管における糖輸送の抑制<sup>43)44)</sup>等が報告されている。しかしながら本剤が脂肪細胞の糖代謝に与える影響についてはあまり検討されておらず不明な点が多い。今回著者はビグアナイド剤のひとつであるブフォルミンが培養脂肪細胞の脂肪蓄積に与える影響を初めて検討した。ブフォルミンは単独では脂肪細胞の糖取り込みは促進するものの、細胞内中性脂肪の蓄積、GPDH 活性に有意な影響を及ぼさなかった。しかし本剤は少なくとも SU 剤のような脂肪細胞分化促進作用を有さないと考えられる。今回の検討でさらに興味深い点は、ブフォルミンが SU 剤による脂肪蓄積促進ならびに GPDH 活性刺激作用を抑制したことにある。その機序は今回の結果のみからは明らかではないが、培地中のブドウ糖の消費量、PK 活性がブフォルミンの併用により SU 剤単独群に比し抑制を受けていることより、細胞の糖取り込みの抑制と解糖系の抑制により GPDH の基質依存性の誘導過程が抑制されたことも可能性の一つとしてあげられる。しかしながら今回用いたブフォルミンの濃度が生理的な範囲にあること、ブフォルミンの添加により細胞の生存度に変化が認められなかったこと、細胞の蛋白量に変化を及ぼさなかったこと、GPDH 活性の経時的変化に示されるごとく SU 剤単独に比し遅れるものの十分な分化が認められたこと等より、ブフォルミンの毒性による酵素活性の抑制とは考え難い。

Clarke ら<sup>35)</sup>はコントロール不良の肥満、非肥満 NIDDM 患者各々に対してクロルプロバミドとメトフォルミンを 12 か月間投与し、ともに同程度の良好な血糖降下が認められにもかかわらず、クロルプロバミド投与では肥満群で +5.2kg、非肥満群で +4.6kg の体重増加を認め、メトフォルミン投与では逆に肥満群で -1.2kg、非肥満群で -1.5kg の体重減少効果が認められることを報告している。同様に Josephkutty ら<sup>4)</sup>は高齢糖尿病患者にトルブタミドあるいはメトフォルミンを 3 か月間投与し、トルブタミド投与群では +1.6kg の体重増加を、メトフォルミン投与群では -2.0kg の体重減少が認められることを報告しており、また Dornan ら<sup>9)</sup>は NIDDM 患者にメトフォルミンを 8 か月間投与し少なくとも体重を増加させることなく良好な血糖コントロールが得られたことを報告している。さらに最近

DeFronzo ら<sup>9)</sup>は NIDDM 患者にメトフォルミンを3か月間投与し、肥満 NIDDM 患者では平均 5 kg の体重減少とともにグルコースクランプ法で評価した全身の糖取り込みの増加を認めたことを報告している。SU 剤による体重増加作用は今回示した SU 剤が細胞レベルで脂肪蓄積を促進しているという事実で説明される可能性が考えられる。またビグアナイド剤による体重減少作用には腸管からの糖吸収を抑制すること、血中インスリン濃度を低下させること、満腹中枢に直接作用すること等が関与していることも示唆されている<sup>10)</sup>が、今回示したごとくブフォルミン単独では少くとも SU 剤のような脂肪細胞分化促進作用を有さないという事実も一部関与しているかもしれない。さらに今回認められた SU 剤の脂肪蓄積促進ならびに GPDH 活性刺激作用のブフォルミンによる抑制作用が生体内でも認められるとすれば、SU 剤とビグアナイド剤を積極的に併用する意義もあろう。今後、臨床的な側面からも SU 剤とビグアナイド剤の併用に関して検討する価値があるものと思われる。

### 結 論

マウス線維芽細胞由来の培養 3T3-L1 前脂肪細胞を用いて SU 剤、ビグアナイド剤が脂肪蓄積に与える影響を検討し、以下の結論を得た。

1. 3T3-L1 細胞の分化過程において SU 剤は明らかな脂肪蓄積促進ならびに GPDH 活性刺激作用を示した。
2. SU 剤は GPDH の誘導を遺伝子発現調節の段階で刺激していた。
3. ビグアナイド剤は単独では脂肪蓄積ならびに GPDH 活性に対し有意の刺激あるいは抑制作用を示さなかった。
4. ビグアナイド剤は SU 剤の脂肪蓄積促進ならびに GPDH 活性刺激作用を著明に抑制した。
5. SU 剤、ビグアナイド剤は単独、併用いずれにおいても細胞の蛋白レベルには影響を与えなかった。
6. SU 剤、ビグアナイド剤は各々単独で脂肪細胞の糖取り込みを促進した。
7. SU 剤は PK 活性刺激作用を示したのに対し、ビグアナイド剤は単独では PK に有意の影響を与えず、SU 剤による PK 活性刺激作用を抑制した。
8. 以上の結果は、SU 剤が 3T3-L1 細胞の分化および脂肪合成を分化過程の早期より促進することを示唆する。また、ビグアナイド剤は単独ではこのような作用を示さないが、SU 剤の脂肪蓄積促進作用を抑制し得る可能性を示唆する。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接の御指導を賜りました大沢謙三博士並びに宮腰久嗣講師に心から感謝致します。さらに本研究遂行に多大の御協力を戴きました金沢大学第一内科第一研究室の諸先生方、生化学第一教室の諸先生方、並びに有益な御助言を戴きましたケースウエスタンリザーブ大学生化学講座 Richard E. Miller 教授に深く感謝いたします。

なお本論文の要旨の一部は、第34回日本糖尿病学会総会(1991年山形)、第14回国際糖尿病学会会議(IDF)(1991年ワシントン、米国)において発表した。

### 文 献

- 1) Henry, R. R., Wallace, P. & Olefsky, J. M.: Effects of weight loss on mechanisms of hyperglycemia in obese

non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes.*, **35**, 990-998 (1986).

- 2) Clarke, B. F. & Duncan, L. J. P.: Comparison of chlorpropamide and metformin treatment on weight and blood-glucose response of uncontrolled obese diabetics. *Lancet*, **1**, 123-126 (1968).

- 3) Clarke, B. F. & Campbell, I. W.: Comparison of metformin and chlorpropamide in non-obese, maturity-onset diabetics uncontrolled by diet. *Br. Med. J.*, **275**, 1576-1578 (1977).

- 4) Josephkuty, S. & Potter, J. M.: Comparison of tolbutamide and metformin in elderly diabetic patients. *Diabetic Med.*, **7**, 510-514 (1990).

- 5) Dornan, T. L., Heller, S. R., Peck, G. M. & Tattersall, R. B.: Double-blind evaluation of efficacy and tolerability of metformin in NIDDM. *Diabetes Care*, **14**, 342-344 (1991).

- 6) DeFronzo, R. A., Barzilai, N. & Simonson, D. C.: Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **73**, 1294-1301 (1991).

- 7) Green, H. & Kehinde, O.: Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*, **1**, 113-116 (1974).

- 8) Preece, A.: *Manual of Histologic Technicians*, 3rd ed., p260, Little, Brown & Co, Boston, 1972.

- 9) Bucolo, G. & David, H.: Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.*, **19**, 476-482 (1973).

- 10) Kozak, L. P. & Jensen, T.: Genetic and developmental control of multiple forms of L-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7775-7781 (1974).

- 11) Chomczynski, P. & Sacchi, N.: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987).

- 12) Ireland, R. C., Kotarski, M. A., Johnston, L. A., Stadler, U., Birkenmeier, E. & Kozak, L. P.: Primary structure of the mouse glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.*, **261**, 11779-11785 (1986).

- 13) Beutler, E.: *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, 2nd ed., p60-63, Grune & Stratton, New York, 1975.

- 14) Spiegelman, B. M., Frank, M. & Green, H.: Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes: Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J. Biol. Chem.*, **258**, 10083-10089 (1983).

- 15) Caro, J. F., Dohm, L. G., Pories, W. J. & Sinha, M. K.: Cellular alterations in liver, skeletal muscle, and adipose tissue responsible for insulin resistance in obesity and type II diabetes. *Diabetes Metab. Rev.*, **5**, 665-689 (1989).

- 16) Olefsky, J. M.: Diabetes mellitus. *In* J. B. Wyngaarden, L. H. Smjth & J. C. Bennett (eds.), *Cecil Textbook of Medicine*, 19th ed., p1291-1310, W. B. Saunders, Philadelphia, 1992.

- 17) Bolinder, J., Ostman, J. & Arner, P.: Reversal of insulin resistance in adipose tissue of non-insulin-dependent diabetics by treatment with diet and sulfonylurea. *Acta Endocrinol.*, **108**, 85-90 (1985).
- 18) Chang, A. Y., Wyse, B. M. & Gilchrist, B. J.: Ciglitazone, a new hypoglycemic agent. II. Effect on glucose and lipid metabolisms and insulin binding in the adipose tissue of C57BL/6J-ob/ob and - +/? mice. *Diabetes*, **32**, 839-845 (1983).
- 19) Allen, D. O., Largis, E. E. & Ashmore, J.: Antilipolytic action of tolbutamide in isolated fat cells of the rat. *Diabetes*, **23**, 51-54 (1974).
- 20) Brown, J. D., Steele, A. A., Stone, D. B. & Steele, F. A.: The effect of tolbutamide on lipolysis and cyclic AMP concentration in white fat cells. *Endocrinology*, **90**, 47-51 (1972).
- 21) Patel, T. B.: Effect of sulfonylureas on hepatic fatty acid oxydation. *Am. J. Physiol.*, **251**, E241-E246 (1986).
- 22) Ebert, R., Hillebrandt, O. & Schwalbe, U.: Role of calcium and cyclic adenosine-3',5'-monophosphate in the antilipolytic effect of tolbutamide and glibenclamide. *Arch. Pharmacol.*, **286**, 181-194 (1974).
- 23) Osegawa, M., Makino, H., Kanatsuka, A. & Kumagai, A.: Activation of membrane-bound low Km cyclic AMP phosphodiesterase by tolbutamide in fat cells. *Biomed. Res.*, **2**, 325-326 (1981).
- 24) Miller, R. E. & Bhandari, B.: Glyburide action in cultured 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Int.*, **13**, 313-319 (1986).
- 25) Kuri-Harcuch, W., Wise, L. S. & Green, H.: Interruption of the adipose conversion of 3T3 cells by biotin deficiency: Differentiation without triglyceride accumulation. *Cell*, **14**, 53-59 (1978).
- 26) Wise, L. & Green, H.: Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **254**, 273-275 (1979).
- 27) Pairault, J. & Green, H.: A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5138-5142 (1979).
- 28) Maloff, B. L. & Lockwood, D. H.: *In vitro* effects of a sulfonylurea on insulin action in adipocytes. *J. Clin. Invest.*, **68**, 85-90 (1981).
- 29) Jacobs, D. B. & Jung, C. Y.: Sulfonylurea potentiates insulin-induced recruitment of glucose transport carrier in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2593-2596 (1985).
- 30) Tordjman, K. & Mueckler, M.: Synergistic effect of tolbutamide and insulin on glucose transporter gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, **37** (suppl. 1), 51 (1988).
- 31) Matsutani, A., Kaku, K. & Kaneko, T.: Tolbutamide stimulates fructose-2,6-bisphosphate formation in perfused rat liver. *Diabetes*, **33**, 495-498 (1984).
- 32) Altan, N., Altan, V. M., Mikolay, L., Larner, J. & Schwartz, C. F. W.: Insulin-like and insulin-enhancing effects of the sulfonylurea glyburide on rat adipose glycogen synthase. *Diabetes*, **34**, 281-286 (1985).
- 33) Meyer, F., Ipaktchi, M. & Clauser, H.: Specific inhibition of gluconeogenesis by biguanides. *Nature*, **213**, 203-204 (1967).
- 34) Jackson, R. A., Hawa, M. I., Jaspan, J. B., Sim, B. M., DiSilvio, L., Featherbe, D. & Kurtz, A. B.: Mechanism of metformin action in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, **36**, 632-640 (1987).
- 35) Purrello, F., Gullo, D., Buscema, M., Pezzino, V., Vigneri, R. & Goldfine, I. D.: Metformin enhances certain insulin actions in cultured rat hepatoma cells. *Diabetologia*, **31**, 385-389 (1988).
- 36) Rossetti, L., DeFronzo, R. A., Gherzi, R., Stein, P., Andraghetti, G., Falzetti, G., Shulman, G. I., Klein-Robbenhaar E. & Cordera, R.: Effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats: In vivo and in vitro correlations. *Metabolism*, **39**, 425-435 (1990).
- 37) Holle, A., Mangels, W., Dreyer, M., Kuhnau, J. & Rudiger, H. W.: Biguanide treatment increases the number of insulin-receptor sites on human erythrocytes. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 563-566 (1981).
- 38) Fantus, I. G. & Brosseau, R.: Mechanism of action of metformin: Insulin receptor and postreceptor effects *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **63**, 898-905 (1986).
- 39) Jacobs, D. B., Hayes, G. R., Truglia, J. A. & Lockwood, D. H.: Effects of metformin on insulin receptor tyrosine kinase activity in rat adipocytes. *Diabetologia*, **29**, 798-801 (1986).
- 40) Matthaehi, S., Hamann, A., Klein, H. H., Benecke, H., Kreymann, G., Flier, J. S. & Greten, H.: Association of metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes. *Diabetes*, **40**, 850-857 (1991).
- 41) Schafer, G.: Guanidines and biguanides. *Pharmacol. Ther.*, **8**, 275-295 (1980).
- 42) Purrello, F., Gullo, D., Brunetti, A., Buscema, M., Italia, S., Goldfine, I. D. & Vigneri, R.: Direct effects of biguanides on glucose utilization *in vitro*. *Metabolism*, **36**, 774-776 (1987).
- 43) Lorch, E.: Inhibition of intestinal absorption and improvement of oral glucose tolerance by biguanides in the normal and streptozotocin-diabetic rat. *Diabetologia*, **7**, 195-203 (1971).
- 44) Caspary, W. F. & Creutzfeldt, W.: Analysis of the inhibitory effect of biguanides on glucose absorption: Inhibition of active sugar transport. *Diabetologia*, **7**, 379-385 (1971).
- 45) Hermann, L. S.: Metformin: A review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Diabetes Metab.*, **5**, 233-245 (1979).

**Effects of Sulfonylureas and Biguanides on the Lipogenic Activities in 3T3-L1 Adipocytes** Toshinari Takamura, Department of Internal Medicine ( I ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 101, 740—750 (1992)

**Key words** sulfonylurea, biguanide, adipogenesis, 3T3-L1 cell, glycerol-3-phosphate dehydrogenase

#### Abstract

The oral hypoglycemic sulfonylureas agents are known to cause weight gain, whereas other biguanides agents do not have such effects and often promote weight loss in non-insulin-dependent diabetic patients. To study the influences of sulfonylureas and biguanides on adipogenesis, the direct effects of these agents on lipogenic activity in 3T3-L1 adipocytes were investigated. Confluent 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate by treatment with dexamethasone, isobutylmethylxanthine and insulin for 2 days, and, at the time of induction, various concentrations of tolbutamide, glibenclamide and/or buformin were also added. Lipid accumulation assessed by Oil Red O staining was markedly increased in the sulfonylureas-treated cells as compared with control adipocytes, and its increase was minimal in the cells treated in combination with sulfonylureas and buformin. The differentiation-promoting effects of sulfonylureas were only seen in the presence of insulin. The cellular triglyceride contents showed a 2.3- and 2.6-fold increase in the cells treated with 1 mM tolbutamide and 10  $\mu$ M glibenclamide, respectively, as compared with control cells, whereas no significant change was observed in the 100  $\mu$ M buformin-treated cells. Buformin suppressed the tolbutamide- and glibenclamide-induced increase of triglyceride contents by 54% and 30%, respectively. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity, the differentiation marker of 3T3-L1 adipocytes, was determined by the initial rate of NADH oxidation in the conversion of dihydroxyacetone phosphate to glycerol-3-phosphate. It was also stimulated with tolbutamide and glibenclamide in a dose-dependent manner, and the highest enzyme activities were observed at the concentrations of 500  $\mu$ M tolbutamide and 50  $\mu$ M glibenclamide. On the 6th day, the expression of GPDH activities increased 3.5-fold with tolbutamide and 3.7-fold with glibenclamide as compared with the control. The time course of the development of GPDH activity showed that sulfonylureas not only increased the expression of GPDH activity, but also accelerated the induction process. The stimulatory effects of tolbutamide and glibenclamide on GPDH activity were inhibited with buformin by 75% and 61%, respectively, whereas buformin alone had little effect on GPDH activity. Northern blot analysis with oligonucleotide cDNA probe to mouse GPDH gene showed that sulfonylureas increased the GPDH mRNA accumulation significantly in the course of adipocyte differentiation, and buformin suppressed the sulfonylureas-induced increase of GPDH mRNA. In conclusion, sulfonylureas stimulated the lipogenic activity of 3T3-L1 adipocytes during the differentiation process. Buformin alone had little effect on the process, but had a significant inhibitory effect on the stimulation of lipogenesis by sulfonylureas. These results suggest that, in clinical situations, biguanides may add some beneficial effect to the treatment of diabetic patients already prescribed with sulfonylureas, by reducing its adipogenic potential.