

Thesis

アンギオテンシンタイプ1受容体拮抗薬オルメサルタンの
PPAR γ 2プロモータへの転写活性増加作用¹⁾埼玉医科大学 内科学内分泌・糖尿病内科部門²⁾埼玉医科大学 内科学内分泌・生理学教室金沢 健太¹⁾, 井上 郁夫¹⁾, 池田 正明²⁾, 片山 茂裕¹⁾**Angiotensin Type 1 Receptor Blocker, Olmesartan Induces Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ mRNA Level Through Promoter of PPAR γ 2**

Kenta Kanazawa¹⁾, Ikuo Inoue¹⁾, Masaaki Ikeda²⁾, Shigehiro Katayama¹⁾ (Division of Endocrinology and Diabetes, Department of Internal medicine¹⁾, Department of Physiology²⁾, Saitama Medical University, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Background: Angiotensin type 1 receptor (AT₁R) blockers (ARBs) have been shown to reduce the incidence of type 2 diabetes mellitus by an unknown molecular mechanism. The peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is the central regulator of insulin and glucose metabolism improving insulin sensitivity. We investigated the regulation of PPAR γ function by ARB, olmesartan.

Methods and Results: The ARB, olmesartan dose dependently (from 0 to 50 nmol/L) significantly enhanced in mRNA expression of PPAR γ in human kidney cell, human renal proximal tubule cells (RPTEC), by method of quantitative real-time polymerase chain reaction (olmesartan:2.15 \pm 0.25-fold induction). In addition, in transcription reporter assays, olmesartan (from 0 to 10 μ mol/L) induced transcriptional activity of promoter of PPAR γ 2 by 1.29 \pm 0.22-fold (P<0.05) and induced the gene expression level of PPAR γ 2 by 2.52 \pm 0.69-fold (P<0.05). More over, olmesartan, dose dependently, induced transcriptional activity of promoter of cellular retinol-binding protein II (CRBP II) which is known as one of the target genes of PPAR γ . Olmesartan induced PPAR γ mRNA level through promoter of PPAR γ 2, resulting in stimulateing the target gene of PPAR γ .

Conclusions: The present study demonstrates that olmesartan induces PPAR γ activity through promoter of PPAR γ 2, resulting in enhancing of target of PPAR γ . Our results demonstrate new pleiotropic actions of olmesartan, providing a potential mechanism for their insulin-sensitizing/antidiabetic effects.

Keywords: Olmesartan, Angiotensin type 1 receptor (AT₁R) blocker (ARB), Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), Cellular retinol-binding protein II (CRBPII)

緒言

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptors: PPARs) は、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子であり¹⁾、脂質代謝や糖代謝のみ
医学博士 甲第1028号 平成18年6月23日 (埼玉医科大学)

ならず、発癌、骨代謝、炎症、線維化、細胞増殖およびアポトーシスなど多方面の基本的生理機能を調節し、高脂血症、糖尿病、高血圧、肥満などのメタボリックシンドロームや癌、炎症性疾患、動脈硬化症など多くの疾患の成因への関与が明らかになり注目されている。PPARsには3つのサブタイプが存在し¹⁾、PPAR α はフィブラート系薬剤によって活性化され²⁾、主に脂

質代謝や抗動脈硬化作用に関与し, PPAR β/δ は脂肪燃焼やエネルギー代謝の調節に重要な役割を果たすと言われている³⁾. 一方, PPAR γ はプロスタグランジンやチアゾリジン誘導体はそのリガンドとして知られており⁴⁾, 主に糖代謝に関連し糖尿病治療薬として注目されている. また, PPAR α とPPAR γ それぞれの作用を増強するとともにPPAR γ の副作用である体重増加などの副作用を軽減することが可能である点から, PPAR α および γ に働くデュアルアゴニストが注目され, 現在精力的に研究が行われている^{5,6)}.

アンジオテンシンタイプ1受容体(AT₁R)拮抗薬(ARB)は, 今日高血圧症や高血圧に関連した心血管系疾患の治療薬として広く臨床的に使用されている. ARBは近年, 降圧作用のみならずpleiotropic effectを有することが注目され, 最近の大規模臨床試験のValue study⁷⁾でARBであるバルサルタンが2型糖尿病の新規発症を低下させるとの報告がなされた. 加えて, バルサルタンは動物モデルにおいてインスリン抵抗性を改善させ, インスリン感受性を増加させることも示されている⁸⁾. しかしながら, ARBによるインスリン感受性改善作用, および抗糖尿病作用の機序は現在不明である. さらに最近, 他のARBsのテルミサルタンがPPAR γ 活性を増加させ, 同時にインスリン抵抗性を改善させるとの興味深い報告がなされた⁹⁻¹¹⁾.

一方, 他のARBであるオルメサルタンは最も強い降圧作用を有する新たなARBで, さらに, 総コレステロールやlow density-lipoprotein (LDL)-コレステロールを低下させ, high density-lipoprotein (HDL)-コレステロールをも増加させることも報告されている¹²⁾.

そこで今回我々は, ARBであるオルメサルタンの抗糖尿病作用の機序を解明するために, ヒト腎細胞由来である近位尿細管上皮細胞のprimary cultureであるhuman renal proximal tubule cells(RPTEC)とヒト腎細胞のcell lineである293T細胞を用いてオルメサルタンのPPAR γ 作用の効果について, その転写活性および遺伝子発現を測定することで評価した.

方法

材料: オルメサルタンはその活性体であるオルメサルタンメドキシミル(olmesartan medoxomil)を使用し, これは三共株式会社より入手した.

細胞培養: ヒト腎細胞のprimary cell lineであるRPTECはCambrex BioScience Walkersville, Inc.より, 293T細胞はInvitrogen corporationからそれぞれ購入した. なお, RPTECは第3世代まで継代し使用した. RPTECと293T細胞は100-mm ディッシュにそれぞれ100 units/mlのpenicillinと100 μ g/mlのstreptomycin, また10% FCSを含むRenal Epithelial cell Basal Medium (REBM) (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.)とDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen)を

用い培養し, 細胞に1 nMから1 μ MのOlmesartan medoxomilを添加しさらに24時間インキュベーションし評価した.

リアルタイムpolymerase chain reaction(PCR): PPAR γ とglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のmRNAはreal-time RT-PCR (Applied Biosystems, 7700 real-time PCR system)によって検討した. またcDNAはtotal RNA 1 μ gから1x Superscript buffer (Gibco)や, 1 mM dNTP, 20 ng random hexamers, 10 mM DTT, 20 U RNAase inhibitorsを含む20 μ lのreaction volume containingと, 200 U reverse transcriptase (Gibco)を用いて生成した. 42°Cで50分間インキュベーションした後, 70°Cで10分間とし反応停止させた. PPAR γ とGAPDHのPCR増幅はSyber PCR master mixと以下のprimer sequences: PPAR γ (Applied Biosystems, TaqMan[®] Gene Expression Assays Assay ID:Hs00234592_ml); GAPDH (Applied Biosystems, TaqMan[®] Gene Expression Assays Assay ID:Hs99999905_ml)を使用した. 最適なPCRの条件として, ABI Prism 7700 Sequence detection system (Qiagen)を使用し, 95°Cを15秒間, その後60°Cを1分間, 合計40サイクル増幅させた. なお, PPAR γ の遺伝子発現はGAPDHにて補正し評価した.

ヒトPPAR γ 2プロモータの分析: ヒトPPAR γ プロモータ活性を評価するため, 我々はヒトPPAR γ 2プロモータを分離, クローニングした. クローニングした部位は, ヒトPPAR γ プロモータの蛋白コーディング領域を含むその上流900bpフラグメントを, PCR法にて分離し, pCR[®] 2.1 Vector (Invitrogen)のEcoRV領域に挿入しPPAR γ 2-900^{wt}とした.

Cellular retinoid-binding protein II (CRBP II)プロモータ活性の分析: 我々は以前クローニングしたPPAR γ の標的遺伝子のCRBP IIプロモータ¹³⁾と, さきに述べたPPAR γ 2-900^{wt}を使用し, pGL3-Basic vector (Promega)のluciferase上流, Kpn I/Nco I領域にそれぞれをライゲーションし, pCRBP II-Luc¹³⁾, pPPAR γ 2-900-Lucとした. CRBP IIプロモータは, 5つのPPARが結合する塩基配列(5'-AG(G/T)TCA-3'), peroxisome proliferator response element (PPRE)を有しているが¹³⁾, 我々はpCRBP II-Lucプラスミドのなかのこの5つの塩基配列をすべて欠失させ, これをdel-0-pCRBP II-Lucとした.

pCRBP II-Luc, del-0-pCRBP II-Luc, pPPAR γ 2-900-LucとRenilla luciferase expression vector (pRL-TK)はあとで述べるように, 細胞内に同時にコトランスフェクションし, 24-wellプレートをを用い培養した. 最終的にpCRBP II-Luc, del-0-pCRBP II-Luc, pPPAR γ 2-900-Lucのluciferase活性はRenilla luciferase activityで標準化し示した. なお, 上記の活性は製品説明書に従い測定した (Promega).

コトランスフェクション: 293T細胞とRPTEC細胞

はそれぞれ24-well プレートに10% FCS を添加した状態でDMEMとREBMを培養液として40-50%コンフルエントの状態に播種した。これらに以前よりクローニングした pCI-PPAR γ ¹³⁾ と pCI-RXR α ¹³⁾ を存在下もしくは非存在下でpCRBPII-Lucあるいはdel-0-pCRBPII-Lucを350 ng, pPPAR γ 2-900-Lucを50 ng, およびpRL-TKを50 ng, それぞれコトランスフェクションした。細胞はcalcium phosphate precipitation 法もしくはelectrophoresis 法でトランスフェクションし実験に用いた。1% lipoprotein-depleted serumとともに使用されるメディアムは様々なオルメサルタン濃度(1 nMから10 μ M)を細胞に添加し, さらに24時間インキュベートした。

DNAシーケンス: PCR産物のシーケンスは自動シーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Perkin Elmer, USA)を用いて検討した。

統計分析: 結果は平均±標準誤差にて表記し, 統計学的有意差はt検定によって計算した。

結果

RPTEC細胞において, オルメサルタンがPPAR γ mRNAの発現を増加させるか否かを検討するためにreal time PCR法にてその遺伝子発現を測定した。その結果, オルメサルタンは濃度依存的にPPAR γ mRNAの発現を増加させた(Fig. 1)。

次にPPAR γ 発現量を経時変化として検討するためにタイムコースにてreal time PCR法にて検討した。その結果, オルメサルタン投与後1時間よりその発現量は増加し12時間まで持続した(Fig. 2)。

PPAR γ のisoformとして現在PPAR γ 1とが γ 2と知られている。これはPPAR γ 遺伝子の遺伝子のなかのどこでスプライシングされるか, もしくはどこでプロモータとして作用するかによってそれぞれ異なるPPAR γ mRNAを産生し, それによりPPAR γ 1とPPAR γ 2に蛋白を形成する¹⁴⁾。そこで我々はオルメサルタンによるPPAR γ 活性上昇はPPAR γ 1, PPAR γ 2のどちらのプロモータを介するかを明らかにするため, PPAR γ 1, PPAR γ 2のそれぞれのプロモータ遺伝子の発現量を検討した。オルメサルタン添加によってPPAR γ 1プロモータ遺伝子の発現量は明らかな上昇は認められず(Fig. 3), PPAR γ 2プロモータの発現量は経時的に上昇し, オルメサルタン投与12時間および24時間後, コントロールと比較し有意に上昇した(Fig. 4)。以上の結果はオルメサルタンによるPPAR γ のmRNA発現の増加は, PPAR γ 2プロモータを介していることを示唆している。

実際, 293T細胞で, RXR α と PPAR γ をコトランスフェクトし, PPAR γ 2プロモータの転写活性を測定したところ, オルメサルタンの濃度依存的にその活性が上昇し, オルメサルタン無添加のものに対して

1 μ M, 5 μ M, 10 μ Mそれぞれにおいて有意に増加した(p < 0.05 vs 0 nM)(Fig.5)。

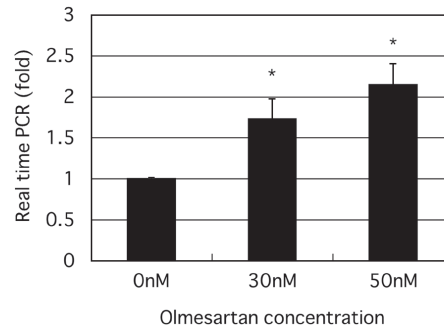


Fig. 1. Olmesartan dose (from 0 to 50 nmol/L) dependently significantly enhances in mRNA expression of PPAR γ in human renal proximal tubule cells (RPTEC), by method of quantitative real-time polymerase chain reaction. Each data is shown as fold of control. Values are mean \pm SE of 4 experiments. *p < 0.05 vs. 0 nM.

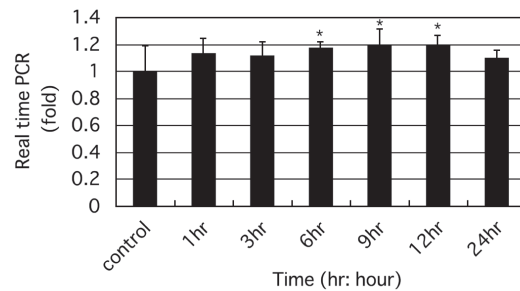


Fig. 2. Olmesartan (50 nmol/L) significantly enhances expression of PPAR γ in time course (from 1 to 24 hours), by method of quantitative real-time polymerase chain reaction in human kidney cell, 293T cell. Each data is shown as fold of control. Values are mean \pm SE of 4 experiments. *p < 0.05 vs. control.

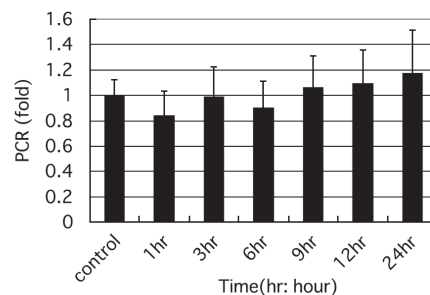


Fig. 3. Olmesartan (500 nmol/L) doesn't significantly enhance expression of PPAR γ 1 promoter in time course (from 1 to 24 hours), by method of polymerase chain reaction in human kidney cell, 293T cell. Each data is shown as fold of control. Values are mean \pm SE of 4 experiments. There is no significance in each sample compared to control.

次に、我々はPPAR γ の標的遺伝子であるCRBP-IIプロモータの転写活性についてオルメサルタンが作用するか検討した。CRBP-IIプロモータにはAGGTCAの塩基配列PPREを有し、オルメサルタンにより増加したPPAR γ が作用する可能性がある。そこで、そのPPREをすべて欠失させ、オルメサルタンによるCRBP-IIプロモータの転写活性の増加が、PPREを介するか否かも検討したところ、欠失させたdel-0-pCRBP-II-Lucではオルメサルタンの濃度依存的にその転写活性が低下傾向を示し(Fig.6-a)、PPREを有するpCRBP-II-Lucでは濃度依存的にその転写活性が有意に増加した(Fig.6-b)。

考察

ARBは今日その降圧効果のみならず、pleiotropic effectが報告されており広く臨床の場で用いられている。ARBの1つであるテルミサルタンはPPAR γ 活性を上昇させるとの報告がなされている⁹⁻¹¹。また、テルミサルタンはglucose uptakeとGLUT4蛋白発現を増強させるという報告もなされている¹⁵。そこで今回我々は同じARBの他の薬剤であるオルメサルタンを用い、

その効果とともにさらに詳細に検討する目的で、オルメサルタンのヒトPPAR γ プロモータへの作用も含めて検討した。

テルミサルタンのPPAR γ への効果としてはリガンドとしての作用であり、インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンと同様な機序が作用していると報告されている^{9,10}。しかしながら、今回行った我々のデータはPPAR γ 2プロモータの転写活性をオルメサルタンの濃度依存的に増加させ、PPAR γ 発現量がオルメサルタンの濃度依存的に増加することが明らかとなったことよりテルミサルタンのそれとは異なる機序が作用していると考えられた。さらに興味深いのは、PPAR γ 2プロモータの転写活性で増加を認めたオルメサルタン濃度(Fig. 5)は、その標的遺伝子であるCRBP-IIのプロモータ転写活性で上昇を認めたオルメサルタン濃度(Fig. 7)よりもはるかに高濃度であることである。今後、これらの違いが臨床的にどのような意味を有しているか、今後明らかにしていく予定である。また、オルメサルタンによるPPAR γ のmRNAの発現量は添加後6時間後の比較的短時間よりその効

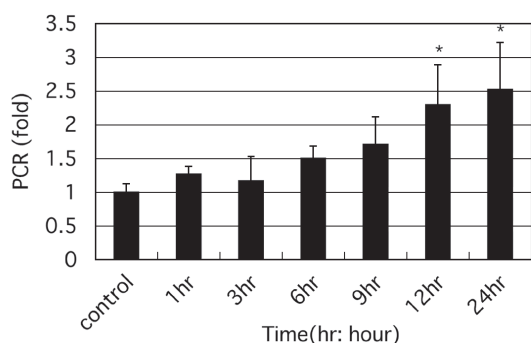


Fig. 4. Olmesartan (500 nmol/L) significantly enhances expression of PPAR γ 2 promoter in time course (from 1 to 24 hours), by method of polymerase chain reaction in human kidney cell, 293T cell. Each data is shown as fold of control. Values are mean \pm SE of 4 experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

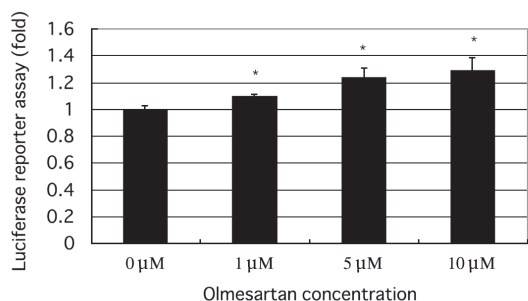


Fig. 5. Effect of olmesartan with various concentrations (1, 5, 10 μ M) on PPAR γ 2 promoter activity by luciferase reporter assay in 293T cell. This data shows significant enhancement in each concentration compared to 0 μ M of olmesartan. Each data is shown as fold of control. Values are mean \pm SE of 4 experiments. * $p < 0.05$ vs. 0 μ M.

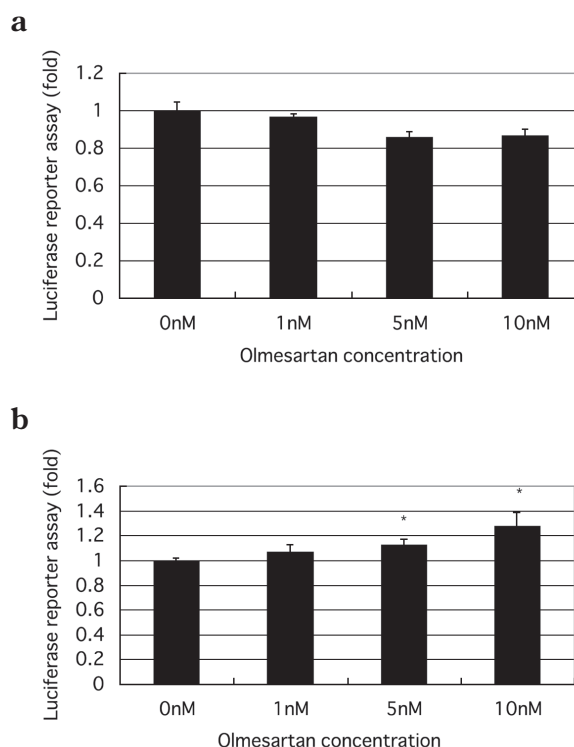


Fig. 6. Effect of olmesartan with various concentrations (1, 5, 10 nM) on del-0-pCRBP-II-Luc activity (a), pCRBP II (b) by luciferase reporter assay in 293T cell. Del-0-pCRBP II is the product of fully deleted bases of AGGTCA from the promoter of CRBP-II. Fig. 6-a shows non significant change in all concentrations compared to 0 μ M of olmesartan. Fig. 6-b shows significantly enhancement in 5 nmol/L and 10 nmol/L compared to 0 μ M of olmesartan. Each data is shown as fold of control. Values are mean \pm SE of 5 experiments.

果が認められる (Fig. 2) のに対し、オルメサルタンによる PPAR γ 2 プロモータの遺伝子発現量の増加は比較的長時間、添加 12 時間を必要とする結果であった (Fig. 4)。以上より、オルメサルタンによる PPAR γ の mRNA を増加させる機序としては、結合詳細部位は現在のところ明らかではないが、テルミサルタン同様に PPAR γ のリガンドとして作用するのに加え、プロモータの遺伝子の発現量をも増加させることによってその作用を発揮することが示唆された (Fig. 7)。

さきに述べたように PPAR γ の標的遺伝子である CRBP II プロモータ領域には PPRE が存在する。我々の成績である欠失実験において、PPRE をすべて欠失している del-0-pCRBP II-Luc プロモータではオルメサルタンの転写活性は低下した (Fig. 6-a)。逆に、PPRE を有すると、その転写活性はオルメサルタンの濃度依存的に増加傾向を示した (Fig. 6-b)。以上の結果より、オルメサルタンの PPAR γ の PPRE を介する作用は、PPRE が含まれない状態では何らかの corepressor が関与して negative feedback 機構が働くことも示唆される。

PPAR γ による転写活性は、corepressor である nuclear receptor corepressor (NcoR) および silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT) によりその活性が抑制され¹⁶⁾、また coactivator である cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/p300, steroid receptor coactivator (SRC)-1, transcriptional intermediary factor 2 (TIF2) などにより、その活性が増加すると言われている。Del-0-pCRBP II-Luc プロモータではオルメサルタンの濃度依存的な転写活

性は低下し (Fig. 6-a)、PPRE を有すると、その転写活性はオルメサルタンの濃度依存的に増加傾向を示した (Fig. 6-b) ことは、主に上記にあげた corepressor の作用がオルメサルタンにより亢進し、あるいは coactivator の作用がオルメサルタンにより抑制されている可能性はある。

最近、ARB の投与により蛋白尿が減少し、糖尿病性腎症の進展予防が期待できるとの報告がある¹⁷⁻²⁰⁾。これらの機序としては ARB のメサングウム細胞への作用が考慮されるが、その他の機序として、ARB の近位尿細管における再吸収への機序も考えられる。糸球体で濾過された小中分子蛋白は近位尿細管刷子縁膜のクラスリン皮覆小窩に存在する megalin (gp 330) と結合してエンドサイトーシスされ、リソソームにてアミノ酸まで分解され血液中にもどることで尿中蛋白は消失または減少することが知られている²¹⁾。興味深いことに、ラットにアンジオテンシン II を投与すると megalin の発現が減少し、アルブミンのエンドサイトーシスが減少することが報告されている²²⁾。一方、糖尿病性腎症の患者では近位尿細管でのレニン、Angiotensin converting enzyme (ACE)、アンジオテンシノーゲンの発現が亢進しており²³⁾、ACE 阻害薬や ARB で糖尿病性腎症初期のラットを治療することで、糖尿病により減少していた megalin の発現が回復し、アルブミンの近位尿細管における再吸収が改善する²⁰⁾との報告もある。今回我々が用いた近位尿細管上皮細胞である RPTEC 細胞におけるオルメサルタンの作用、つまり PPAR γ の mRNA の増加作用がどのように近位尿細管上皮細胞での蛋白のエンドサイトーシスを改善させるか近位尿細管でのアンジオテンシン II 作用を抑制する機序以外に興味深い。

今後オルメサルタンのアンジオテンシン II 抑制作用に加え、この薬剤の PPAR γ に対する作用が高血圧症のコントロールならびに糖尿病性腎症の発症抑制にどのように関連するか非常に興味深いと思われた。

要約

オルメサルタンは、ヒト腎細胞 (293T) ならびに近位尿細管上皮細胞 (RPTEC) においてヒト PPAR γ 2 のプロモータを介して PPAR γ の発現を増加させ、さらに PPAR γ の標的遺伝子の発現を調節していることが示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、御協力を頂きました埼玉医科大学内分泌・糖尿病内科学教室教室員各位に深謝いたします。

本研究の一部は The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (2006 年福岡) において発表し、Young Investigator's Award を受賞した。

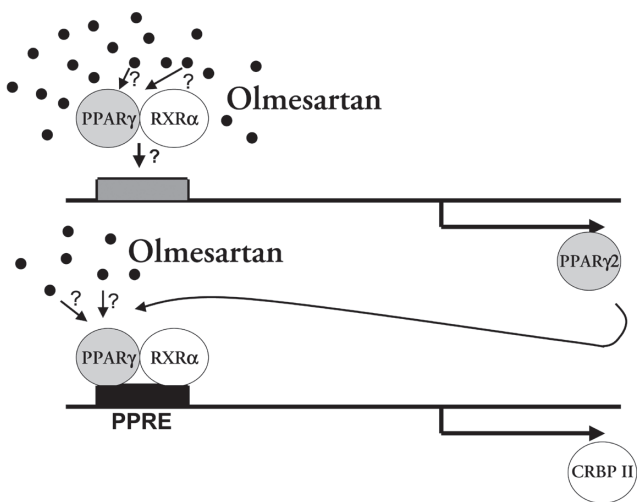


Fig. 7. It is indicated that olmesartan enhances the transcriptional activity of promoter of PPAR γ 2 with binding to unknown lesion in its promoter in detail as well as the expression of the promoter itself. In addition, olmesartan enhances the transcriptional activity of CRBP II which is the target gene of PPAR γ through peroxisome proliferator response element (PPRE).

引用文献

- 1) Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-50.
- 2) Mandard S, Muller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell Mol Sci* 2004;61:393-416.
- 3) Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15924-9.
- 4) Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* 2001;70:341-67.
- 5) Miyauchi H. Recent progress in research on peroxisome proliferator-activated receptor α -selective ligands. *IDrugs* 2004;7:746-54.
- 6) Henke BR. Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha\gamma$ dual agonist for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem* 2004;47:4118-27.
- 7) Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, et al. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* 2004;363:2022-31.
- 8) Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK, Krekler M. Selective angiotensin II receptor antagonism reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension* 2001;38:884-90.
- 9) Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity. *Circulation* 2004;109:2054-7.
- 10) Benson SC, Pershadshingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, et al. Identification of Telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR γ -modulating activity. *Hypertension* 2004;43:993-1002.
- 11) Pershadshingh HA, Kurtz TW. Insulin-sensitizing effects of Telmisartan. *Diabetes Care* 2004;27:1015-6.
- 12) 市川秀一, 高山嘉朗, 荻原俊男. 軽症・中等症本態性高血圧症におけるアンジオテンシンII受容体拮抗薬 CS-866(Olmesartan Medoxomil)の血圧日内変動・血清脂質・循環動態・耐糖能に及ぼす影響. *臨床医薬* 2004;20:33-60.
- 13) Inoue I, Shinoda Y, Ikeda M, Hayashi K, Kanazawa K, Nomura M, et al. CLOCK/BMAL1 is Involved in Lipid Metabolism via Transcription of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Response Element. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:169-74.
- 14) Meirhaeghe A, Fajas L, Gouilleux F, Cottel D, Helbecque N, Auwerx J, et al. A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPAR γ 3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population. *Arterioscler Thromb Basic Biol* 2003;23:289-94.
- 15) Fujimoto M, Masuzaki H, Tanaka T, Yasue S, Tomita T, Okazawa K, et al. An angiotensin II AT₁ receptor antagonist, telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2004;576:492-7.
- 16) Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR γ . *Nature* 2004;429:771-6. Erratum in: *Nature* 2004;430:921.
- 17) Mizuno M, Sada T, Kato M, Koike H. Renoprospective effects of blockade of angiotensin II AT₁ receptors in an animal model of type 2 diabetes. *Hypertens Res* 2002;25:271-8.
- 18) Burnier M, Brunner HR. Comparative antihypertensive effects of angiotensin II receptor antagonists. *J Am Soc Nephrol* 1999;10 Suppl 12:278-82.
- 19) Ruilope LM, Luno J. Angiotensin blockade in type 2 diabetic renal disease. *Kidney Int Suppl* 2002;82:61-3.
- 20) Rodgers JE, Patterson JH. Angiotensin II-receptor blockers: clinical relevance and therapeutic role. *Am J Health Syst Pharm*. Erratum in: *Am J Health Syst Pharm* 2001;58:1658.
- 21) 藤乗嗣泰, 小野里マリステラ リカ:尿細管におけるRASのはたらき. *Angiotensin Research* 2005;2:1-7.
- 22) Tojo A, Onozato ML, Kurihara H, Sakai T, Goto A, Fujita T. Angiotensin II blockade restores albumin reabsorption in the proximal tubules of diabetic rats. *Hypertens Res* 2003;26:413-9.
- 23) Lai KN, Leung JC, Lai KB, To WY, Yeung VT, Lai FM. Gene expression of the renin-angiotensin system in human kidney. *J Hypertens* 1998;16:121-31.