

# 厚生労働科学研究研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

アディポネクチンを標的にした糖尿病・メタボリック症候群の  
新規診断法・治療法の臨床応用に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 門脇 孝

平成18（2006）年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
アディポネクチンを標的にした糖尿病・代謝症候群の 新規診断法・治療法の臨床応用に関する研究	3
門脇 孝	
II. 分担研究報告	
1. ヒト血清からのアディポネクチン多量体の精製とその機能解析 —高活性型多量体として的高分子量アディポネクチンの同定—	8
山内 敏正	
2.. 高分子量アディポネクチン測定キットの開発	10
戸辺 一之	
3. 高分子量アディポネクチン測定キットの臨床応用に関する研究	12
原 一雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	16

厚生労働科学研究費補助金（臨床応用基盤研究事業研究事業）  
総括研究報告書  
アディポネクチンを標的にした糖尿病・代謝症候群の新規診断法・治療法の  
臨床応用に関する研究

主任研究者 門脇 孝 東京大学医学部附属病院 教授

研究要旨：糖尿病は日本人における主要な疾患であり、糖尿病に肥満・高脂血症・高血圧が合併するメタボリックシンドロームは、心筋梗塞・脳卒中発症のリスク増大によって国民の健康をおびやかしている。我々は、アディポネクチンは生体内では多様な多量体構造をとっており、その中でも 12~18 量体と高分子量(HMW: high molecular weight) アディポネクチンが他のフォームに比べても高活性型であることを明らかにしている。本研究では、HMW アディポネクチンがインスリン抵抗性・メタボリックシンドロームの病態をどの程度反映しているかを明らかにし、HMW アディポネクチンの血中レベルの測定による新規のメタボリックシンドローム診断法の開発を行なう。本年度では、高分子量アディポネクチンと高分子量アディポネクチンの総アディポネクチンに対する比率(HMWR: high molecular weight ratio)を特異的に測定するキットを開発し製品化した。その上で、本製品のインスリン抵抗性・メタボリックシンドローム診断における感度・特異度を含めた診断能について検討し、HMWR が総アディポネクチンに比べても、インスリン抵抗性・メタボリックシンドロームの診断能の面で優れていることを報告した(*Diabetes Care*, in press, 2006)。

分担研究者

山内 敏正 東京大学医学部附属病院  
客員助教授  
戸辺 一之 東京大学医学部附属病院  
講師  
原 一雄 東京大学医学部附属病院  
助手

とが急務である。本研究は、我々がインスリン感受性物質であることを明らかにしたアディポネクチン、並びに世界に先駆けて単離・同定したアディポネクチン受容体に関してこれまでに得られた研究成果と、それに基づく特許を最大限活用することによって糖尿病の画期的診断法を確実に開発し、よって活力ある高齢化社会の実現に大きく寄与することを目的とする。

A. 研究目的

糖尿病の罹患者数は約740万人とわが国の高齢者における主要な疾患であり、糖尿病に肥満・高脂血症・高血圧が合併するメタボリックシンドロームは心筋梗塞・脳卒中のリスク増大を介して日本人の健康寿命を短縮する最大の原因となっている。今後の本格的な高齢化社会の到来を前にして、医療費の増大を抑制し国民の活力を維持するためには、糖尿病発症・進展の分子メカニズムに立脚した革新的診断法を開発し臨床応用するこ

B. 研究方法

(1)メタボリック症候群を含む患者血清の集積と HMW-Ad(高分子量アディポネクチン)の測定(原、堀越、戸辺):東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科あるいは循環器内科に入院・通院中の患者約300名を対象として本研究に対する同意を得たのちに血清を収集する。

HMW アディポネクチン特異的測定法を利用して総アディポネクチンレベル、HMW-Ad レベルの測定を行う。糖代謝関連指標（空腹時血糖値、空腹時インスリン値、総コレステロール値、HDL-コレステロール値、中性脂肪値、waist-hip 値）並びに冠動脈造影検査を施行された者については冠動脈疾患進展度指数を下記(2)の解析に用いる。

(2)HMW-Ad と臨床的諸指標との関連解析（原、山内）：HMW アディポネクチンとインスリン抵抗性指標との相関を年齢・性別・BMI で補正した上で相関解析を行う。インスリン抵抗性の指標は  $HOMA-IR\{空腹時血糖(mg/dL) \times 空腹時インスリン値(\mu U/mL)\}$  を利用する。HOMA-IR が 2.5 以上をインスリン抵抗性有とした時のインスリン抵抗性診断能について ROC(receiver operator characteristics) 曲線下面積を総アディポネクチンと HMWR について比較する。従来からメタボリックシンドロームの診断基準として一般的に用いられている NCEP-ATPⅢの中でウェスト周囲径のカットオフ値を日本の新基準(2005)を踏まえて男性で 85cm、女性で 90cm とした時のメタボリックシンドロームの診断能について、ROC(receiver operator characteristics) 曲線下面積を総アディポネクチンと HMWR について比較することによって比較する。また、冠動脈疾患の進展度を病変枝数や Gensini のスコアなどによって定量化し、血中 HMW アディポネクチンレベルとの相関を検定する。その際、冠動脈疾患のリスクファクターである高血圧、高脂血症、喫煙による影響をロジスティック回帰分析で補正した後、解析を行う。（倫理面への配慮）

平成15年7月30日に厚生労働省によって策定された「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行する。その具体的な配慮として、臨床研究を実施するに当たり、被験者の個人情報の保護のために、本研究で提供される試料はすべて個人識別情報（カルテ番号，名前，住所など）を除き、連結可能匿名化した上で解析に利用される。連結可能のために対応表は他の一切のコンピューターと切り離された stand alone のコンピューターに専用の ID とパスワードによって厳重に保管される。また、当該コンピューターは民間警備会社によるセキュリティーシステムによって守られ、不特定多数の者の出入りができない専用の部屋に設置される。予測される試料提供者に対する危険や不利益に関して：試料提供は主として前腕の静脈からの採血によっており身体的危険はほとんどないといつてよい。また提供された試料は解析に先立って速やかに匿名化されるので、試料等提供者の尊厳と人権は充分に保護されていると考えられる。

### C. 研究結果

先進国における肥満・糖尿病患者の増加は深刻な社会問題を引き起こしている。我々は脂肪細胞由来アディポネクチンがインスリン感受性ホルモンであることを初めて明らかとしたが (*Nature Medicine* 7:941,2001)、国内外の有力な研究室によって追試されアディポネクチンが糖尿病発症・進展の「鍵分子」であることはもはや世界的なコンセンサスを得ている。アディポネクチンは生体内では分子量の異なるいくつかの分子種として存在していることが分かっているが、そのうちどの分子種の活性が高

いのかも解明されておらず、分子種を分別して測定する方法も確立されていなかった。我々は、アディポネクチンの様々な多量体の中で 12~18 量体の高分子量アディポネクチン (以下 HMW-Ad) のインスリン感受性作用が最も強力であること、HMW-Ad が形成されないようなアディポネクチン遺伝子変異保持者はいずれも 2 型糖尿病を発症していることなどから、HMW-Ad が糖尿病の発症・進展に重要な働きを担っていることが強く示唆された (*J Biol Chem* 278:40352-63, 2003)。そこで、本研究では、HMW アディポネクチンがインスリン抵抗性・メタボリックシンドロームの病態をどの程度反映しているかを明らかにし、HMW アディポネクチンの血中レベルの測定による新規のメタボリックシンドローム診断法の開発を行なった。まず、ヒト血清蛋白分解酵素による前処理を 37°C で 20 分間行なうことによって高分子量アディポネクチン以外の分画、すなわち低分子量アディポネクチン、中分子量アディポネクチンが分解され高分子量アディポネクチンのみが残存することを明らかにした。このことを利用して前処理を行なった場合に HMW アディポネクチンの絶対量が、行なった場合と行なわなかった場合とで比較することによって HMW アディポネクチンの総アディポネクチンに対する比率 (HMWR: high molecular weight ratio) を測定することが可能となった (*Clinica Chimica Acta*, in press, 2006)。更にこの原理を利用した HMW アディポネクチン特異的測定キットを開発し製品化した {(1) A homolog of human adiponectin receptor controls osmotin-induced apoptosis in yeast :

Agents for inducing expression of adiponectin” : 出願番号 : 60/557,708、(2) 「試料の前処理方法及びこれを利用する免疫学的測定方法」 : 出願番号 2003-354715、(3) 「多量体アディポネクチンの分別測定方法」 : 出願番号 2003-354930}。更に、本製品のインスリン抵抗性・メタボリックシンドローム診断における感度・特異度を含めた診断能について東京大学医学部附属病院内科に入院した、糖尿病、冠動脈疾患患者約 300 名を対象に検討を行った。総アディポネクチン並びに HMWR のインスリン抵抗性・メタボリックシンドローム診断におけるカットオフ値を上下させて感度・特異度について ROC(receiver operator characteristics) 曲線を描出した。HOMA-IR と総アディポネクチン、HMW アディポネクチン、HMWR との相関を検討したところ、それぞれ  $P = 0.0280$ 、 $P = 0.0035$ 、 $P = 0.0008$  と有意に相関を示したが、HMWR が最もインスリン抵抗性と強く相関した。HOMA-IR が 2.5 以上をインスリン抵抗性有としたときのインスリン抵抗性の診断に対する ROC 曲線を描出したところ、総アディポネクチンの曲線下面積が 0.615 [95%CI: 0.522 - 0.708] であったのに対して HMWR は 0.713 [95%CI: 0.620 - 0.805] と有意に HMWRの方が大きく ( $P = 0.0160$ )、従って HMWR が総アディポネクチンに比してもインスリン抵抗性の診断能が高いことが明らかになった。NCEP-ATP III の診断基準の中でウェスト周囲径のカットオフ値を男性で 85cm、女性で 90cm とした時のメタボリックシンドロームの診断能について ROC 曲線を描出したところ、男性では総アディポネクチンの曲線下

面積が 0.730 [95%CI: 0.660 - 0.800]であったのに対して HMWR は 0.806 [95%CI: 0.747 - 0.865]と有意に HMWR の方が大きく ( $P = 0.0025$ )、女性でも総アディポネクチンの曲線下面積が 0.637 [95%CI: 0.532 - 0.742]であったのに対して HMWR は 0.743 [95%CI: 0.659 - 0.828]と有意に HMWR の方が大きく ( $P = 0.0458$ )、従って HMWR が総アディポネクチンに比してもメタボリックシンドロームの診断能が高いことが明らかになった。*(Diabetes Care, in press, 2006)*。

### C. 考察

血中の総アディポネクチン濃度によって将来の糖尿病発症を予測できることが欧米人を対象とした研究によって既に報告されている。今回開発したアッセイ系による HMWR レベルの測定が、総アディポネクチン濃度に比べても感度・特異度良くインスリン抵抗性やメタボリックシンドロームを診断できることから、本測定法によって、より正確に糖尿病の発症を予測したり、病態を診断することが出来ると考えられる。既に、本研究によって製品化されたキットは、臨床検査会社に販売され、全国の医療機関からの測定依頼に対応することが可能となっている。

### D. 結論

今後は、本製品で測定した HMW アディポネクチン並びに HMWR とグルコースクランプ法によって測定された正確なインスリン抵抗性の指標、メタボリックシンドロームの診断において必須項目となっているウェスト周囲径と

の相関などについて基礎的データを集積した上で、保険適応を目指す予定である。本研究によって得られる成果は、糖尿病診療水準の大幅な向上につながり、糖尿病に伴う合併症による QOL (生活の質) 低下の防止と心筋梗塞・脳卒中発症率の低下を介し、国民医療費増大の抑制と国民の健康増進に大きく貢献をすることが期待できる。日本における糖尿病罹患者数の多さや今後の増加率を考慮すると、本研究による成果は社会的な波及効果が極めて高いと考えられる。

### E. 健康危険情報

特になし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1: Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Imai Y, Nagai R, Kadowaki T. Measurement of the high-molecular-weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care*, in press, 2006
- 2: Ebinuma H, Miyazaki O, Yago H, Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T. A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases. *Clinica Chimica Acta*, in press, 2006
- 3: Hara K, Horikoshi M, Kitazato H, Ito C, Noda M, Ohashi J, Froguel P, Tokunaga K, Nagai R, Kadowaki T. Association of hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  P2 promoter haplotypes with type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes*, in press, 2006
- 4: Horikoshi M, Hara K, Kitazato H, Miyake K, Ito C, Kasuga M, Nagai R, Kadowaki T. A polymorphism in the AMPK  $\alpha$ 2 subunit gene is associated with insulin resistance and type 2

diabetes in Japanese. *Diabetes*, in press, 2006  
5: Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: Comparison of activation of PPAR alpha, PPAR gamma, and their combination. *Diabetes* 54:3358-3370, 2005

6: Hara K, Horikoshi M, Kitazato H, Yamauchi T, Ito C, Noda M, Ohashi J, Froguel P, Tokunaga K, Nagai R, Kadowaki T. Absence of an association between the polymorphisms in the genes encoding adiponectin receptors and type 2 diabetes.

*Diabetologia* 48:1307-14, 2005

7: Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26:439-51, 2005

8: Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin: an adipokine linking adipocytes and type 2 diabetes in humans. *Curr Diab Rep* 5:136-40, 2005

9: Hara K, Matsushita Y, Horikoshi M, Yoshiike N, Yokoyama T, Tanaka H, Kadowaki K. A proposal for the cutoff point of waist circumference for the diagnosis of metabolic syndrome in the Japanese population. *Diabetes Care*, in press, 2006

## 2. 学会発表

第47回日本糖尿病学会学術総会:

高分子量アディポネクチン測定はメタボリック症候群診断において有用である

堀越 桃子、原 一雄、今井 靖、山内 敏正、野田 光彦、戸辺 一之、赤沼 安夫、山崎 力、永井 良三、門脇 孝

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

(1) A homolog of human adiponectin receptor controls osmotin-induced apoptosis in yeast: Agents for inducing expression of adiponectin":  
出願番号: 60/557,708

(2) 「試料の前処理方法及びこれを利用する免疫学的測定方法」: 出願番号2003-354715、

(3) 「多量体アディポネクチンの分別測定方法」: 出願番号2003-354930

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（臨床応用基盤研究事業研究事業）

分担研究報告書

ヒト血清からのアディポネクチン多量体の精製とその機能解析

—高活性型多量体としての高分子量アディポネクチンの同定—

分担研究者 山内 敏正 東京大学医学部附属病院 客員助教授

研究要旨:アディポネクチンは生体内では多様な多量体構造をとっていることが分かったが、どの様な多量体構造をとっているか、それらの多量体の生理的作用の詳細は不明であった。本分担研究では、ヒト血清からのアディポネクチン多量体の精製とその解析を行って、高活性型多量体としての高分子量アディポネクチンを同定した。

#### A.研究目的

アディポネクチンは生体内では多様な多量体構造をとっていることが分かったが、どの様な多量体構造をとっているか、それらの多量体の生理的作用の詳細は不明であった。本分担研究では、アディポネクチンの多様な多量体構造の精製とそれらの機能的役割について検討を行った。

#### B.研究方法

300人のプールした血漿20mLを使用した。抗体アフィニティークロマトグラフィーにより各多量体を精製し、その物理化学的および生物学的活性を測定した。

（倫理面への配慮）

各人の文書による同意は得られており、更に匿名化を行なっているため個人の特定はできないように配慮されている。

#### C.研究結果

ヒト血漿から抗体アフィニティークロマトグラフィーによりアディポネクチンを分離し、4種類の多量体の存在を見いだした。そこれあの多量体の構造解析の結果、それぞれ3量体の trimer

(LMW)、albumin 結合 trimer (Alb-LMW)、6量体の hexamer (MMW)及び12～18量体の high molecular weight (HMW)であることが判明した。血清を試料とした測定では trimer 以外の3種しか確認されず、血清中には遊離型の trimer はほとんど存在しないことが示唆された。

また、C2C12骨格筋細胞を用いて検討したところ、高分子量体型がアディポネクチン受容体に最も強く結合し、AMPキナーゼを最も強く活性化した（投稿中）。

#### D.考察

ヒト血漿中に含まれる多量体アディポネクチンを選択的精製できる方法を確立し、主に含まれている3種の構造を特定した。また、高分子量体型がアディポネクチン受容体に最も強く結合し、AMPキナーゼを最も強く活性化した。

#### E. 結論

ヒト血清からのアディポネクチン多量体の精製とその解析を行って、高活性型多量体としての高分子量アディポネクチンを同定した。



F. 健康危険情報

特になし

(ウ)その他

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Ebinuma H, Miyazaki O, Yago H, Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases. *Clinica Chimica Acta*, in press, 2006

2: Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26:439-51, 2005

2. 学会発表

第47回日本糖尿病学会学術総会:  
ヒト血中アディポネクチンの多量体の精製と各フォームの活性

羽田 裕亮、山内 敏正、脇 裕典、  
武川 郷、海老沼 宏幸、宮崎 修、  
矢後 弘和、原 一雄、寺内 康夫、  
戸辺 一之、植木 浩二郎、門脇 孝

H. 知的財産権の出願・登録状況

(ア)特許出願

なし

(イ)実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（臨床応用基盤研究事業研究事業）

分担研究報告書

高分子量アディポネクチン測定キットの開発

分担研究者 戸辺 一之 東京大学医学部附属病院 講師

研究要旨：アディポネクチンは生体内では多様な多量体構造をとっており、その中でも 12～18 量体と高分子量(HMW: high molecular weight) アディポネクチンが他のフォームに比べても高活性型であることを明らかにしている。本分担研究では、第一化学と共同で開発した新規測定法が、実際の患者検体で HMW アディポネクチンを特異的に測定可能であることを明らかにした。

#### A. 研究目的

アディポネクチンは生体内では多様な多量体構造をとっており、その中でも 12～18 量体と高分子量(HMW: high molecular weight) アディポネクチンが他のフォームに比べても高活性型であることを明らかにしている。本分担研究では、第一化学と共同で開発した新規測定法が、実際の患者検体で HMW アディポネクチンを特異的に測定可能であることを明らかにする。

#### B. 研究方法

健康男女ボランティア 20 名を対象として、本研究に対する同意を得たのちに血清を収集する。

（倫理面への配慮）

平成 15 年 7 月 30 日に厚生労働省によって策定された「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行する。その具体的な配慮として、臨床研究を実施するに当たり、被験者の個人情報の保護のために、本研究で提供される試料はすべて個人識別情報（名前、住所など）を除き、連結可能匿名化した上で解析に利用される。連結可能のための対応表は他の一切のコンピューターと切り離された stand alone のコンピューターに専用の ID とパスワードによって厳重に保管

される。また、当該コンピューターは民間警備会社によるセキュリティーシステムによって守られ、不特定多数の者の出入りができない専用の部屋に設置される。予測される試料提供者に対する危険や不利益に関して：試料提供は主として前腕の静脈からの採血によっており身体的危険はほとんどないといっていよい。また提供された試料は解析に先立って速やかに匿名化されるので、試料等提供者の尊厳と人権は十分に保護されていると考えられる。

#### C. 研究結果

ヒト血清蛋白分解酵素による前処理を 37°C で 20 分間行なうことによって高分子量アディポネクチン以外の分画、すなわち低分子量アディポネクチン、中分子量アディポネクチンが分解され高分子量アディポネクチンのみが残存することを明らかにした。このことを利用して前処理を行なった場合に HMW アディポネクチンの絶対量が、行なった場合と行なわなかった場合とで比較することによって HMW アディポネクチンの総アディポネクチンに対する比率 (HMWR: high molecular weight ratio) を測定することが可能であることが確

認された。

#### D. 考察

HMW アディポネクチンを簡便・正確に測定するシステムが実際に、患者検体で HMW アディポネクチンを測定可能であることが実証できた。

#### E. 結論

今後多数の検体を利用して、インスリン抵抗性やメタボリックシンドロームの診断能についての基礎的なデータを蓄積していく。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1: Ebinuma H, Miyazaki O, Yago H, Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases. *Clinica Chimica Acta*, in press, 2006

##### 2. 学会発表

第 47 回日本糖尿病学会学術総会：  
ヒト血中アディポネクチンの多量体の  
精製と各フォームの活性

羽田 裕亮、山内 敏正、脇 裕典、  
武川 郷、海老沼 宏幸、宮崎 修、  
矢後 弘和、原 一雄、寺内 康夫、  
戸辺 一之、植木 浩二郎、門脇 孝

厚生労働科学研究費補助金（臨床応用基盤研究事業研究事業）  
分担研究報告書

高分子量アディポネクチン測定キットの臨床応用に関する研究

分担研究者 原 一雄 東京大学医学部附属病院 助手

研究要旨：糖尿病は日本人における主要な疾患であり、糖尿病に肥満・高脂血症・高血圧が合併するメタボリックシンドロームは、心筋梗塞・脳卒中発症のリスク増大によって国民の健康をおびやかしている。我々は、アディポネクチンは生体内では多様な多量体構造をとっており、その中でも 12~18 量体と高分子量(HMW: high molecular weight) アディポネクチンが他のフォームに比べても高活性型であることを明らかにしている。本分担研究では、高分子量アディポネクチンと高分子量アディポネクチンの総アディポネクチンに対する比率(HMWR: high molecular weight ratio)を特異的に測定するキットのインスリン抵抗性・メタボリックシンドローム診断能を検討し、実際の臨床現場における応用における基礎的なデータを得る。

#### A. 研究目的

様々な多量体構造の中で HMW アディポネクチンが最も高活性型であること明らかにし、HMW アディポネクチンを特異的に測定する ELISA システムを第一化学薬品と共同で開発している。分担研究では、本 ELISA システムが、実際にインスリン抵抗性・メタボリックシンドロームの診断に有用かどうかを、実際の患者検体を利用した検討で実証し、本システムの臨床応用へ向けた基礎的データを得る。

#### B. 研究方法

HMW アディポネクチン特異的測定法を利用して総アディポネクチンレベル、HMW-Ad レベルの測定を行う。HMW アディポネクチンとインスリン抵抗性指標との相関を年齢・性別・BMI で補正した上で相関解析を行う。インスリン抵抗性の指標は  $\text{HOMA-IR} \{ \text{空腹時血糖 (mg/dL)} \times \text{空腹時インスリン値} (\mu\text{U/mL}) \}$  を利用する。HOMA-IR が 2.5

以上をインスリン抵抗性有とした時のインスリン抵抗性診断能について ROC(receiver operator characteristic) 曲線下面積を総アディポネクチンと HMWR について比較する。NCEP-ATP III の診断基準の中でウェスト周囲径のカットオフ値を男性で 85cm、女性で 90cm とした時のメタボリックシンドロームの診断能について、ROC(receiver operator characteristics) 曲線下面積を総アディポネクチンと HMWR について比較することによって比較する。また、冠動脈疾患の進展度を病変枝数や Gensini のスコアなどによって定量化し、血中 HMW アディポネクチンレベルとの相関を検定する。その際、冠動脈疾患のリスクファクターである高血圧、高脂血症、喫煙による影響をロジスティック回帰分析で補正した後、解析を行う。(倫理面への配慮)

平成 15 年 7 月 30 日に厚生労働省によって策定された「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行する。そ

の具体的な配慮として、臨床研究を実施するに当たり、被験者の個人情報の保護のために、本研究で提供される試料はすべて個人識別情報（カルテ番号、名前、住所など）を除き、連結可能匿名化した上で解析に利用される。連結可能のために対応表は他の一切のコンピューターと切り離された stand alone のコンピューターに専用のIDとパスワードによって厳重に保管される。また、当該コンピューターは民間警備会社によるセキュリティシステムによって守られ、不特定多数の者の出入りができない専用の部屋に設置される。予測される試料提供者に対する危険や不利益に関して：試料提供は主として前腕の静脈からの採血によっており身体的危険はほとんどないといつてよい。また提供された試料は解析に先立って速やかに匿名化されるので、試料等提供者の尊厳と人権は充分に保護されていると考えられる。

### C. 研究結果

本研究では、HMW アディポネクチンがインスリン抵抗性・メタボリックシンドロームの病態をどの程度反映しているかを明らかにし、HMW アディポネクチンの血中レベルの測定による新規のメタボリックシンドローム診断法の開発を行なった。まず、ヒト血清蛋白分解酵素による前処理を 37°C で 20 分間行なうことによって高分子量アディポネクチン以外の分画、すなわち低分子量アディポネクチン、中分子量アディポネクチンが分解され高分子量アディポネクチンのみが残存することを明らかにした。このことを利用して前処理を行なった場合に HMW アディポネクチンの絶対量が、行なった場合と行なわなかった場

合とで比較することによって HMW アディポネクチンの総アディポネクチンに対する比率(HMWR: high molecular weight ratio)を測定することが可能となった (*Clinica Chemica Acta*, in press, 2006)。更にこの原理を利用した HMW アディポネクチン特異的測定キットを開発し製品化した{(1)A homolog of human adiponectin receptor controls osmotin-induced apoptosis in yeast : Agents for inducing expression of adiponectin” : 出願番号 : 60/557,708、(2)「試料の前処理方法及びこれを利用する免疫学的測定方法」 : 出願番号 2003-354715、(3)「多量体アディポネクチンの分別測定方法」 : 出願番号 2003-354930}。更に、本製品のインスリン抵抗性・メタボリックシンドローム診断における感度・特異度を含めた診断能について東京大学医学部附属病院内科に入院した、糖尿病、冠動脈疾患患者約 300 名を対象に検討を行った。総アディポネクチン並びに HMWR のインスリン抵抗性・メタボリックシンドローム診断におけるカットオフ値を上下させて感度・特異度について ROC(receiver operator characteristics) 曲線を描出した。HOMA-IR と総アディポネクチン、HMW アディポネクチン、HMWR との相関を検討したところ、それぞれ  $P=0.0280$ 、 $P=0.0035$ 、 $P=0.0008$  と有意に相関を示したが、HMWR が最もインスリン抵抗性と強く相関した。HOMA-IR が 2.5 以上をインスリン抵抗性の診断に対する ROC 曲線を描出したところ、総アディポネクチンの曲線下面積が 0.615 [95%CI: 0.522 - 0.708]であったのに対して HMWR は

0.713 [95%CI: 0.620 - 0.805]と有意に HMWRの方が大きく( $P = 0.0160$ )、従って HMWR が総アディポネクチンに比してもインスリン抵抗性の診断能が高いことが明らかになった。従来からメタボリックシンドロームの診断基準として一般的に用いられている NCEP-ATPⅢの中でウェスト周囲径のカットオフ値を日本の新基準(2005)を踏まえて男性で 85cm、女性で 90cm とした時のメタボリックシンドロームの診断能について ROC 曲線を描出したところ、男性では総アディポネクチンの曲線下面積が 0.730 [95%CI: 0.660 - 0.800]であったのに対して HMWR は 0.806 [95%CI: 0.747 - 0.865]と有意に HMWRの方が大きく( $P = 0.0025$ )、女性でも総アディポネクチンの曲線下面積が 0.637 [95%CI: 0.532 - 0.742]であったのに対して HMWR は 0.743 [95%CI: 0.659 - 0.828]と有意に HMWRの方が大きく( $P = 0.0458$ )、従って HMWR が総アディポネクチンに比してもメタボリックシンドロームの診断能が高いことが明らかになった。*(Diabetes Care, in press, 2006)*。

#### D. 考察

血中の総アディポネクチン濃度によって将来の糖尿病発症を予測できることが欧米人を対象とした研究によって既に報告されている。今回開発したアッセイ系による HMWR レベルの測定が、総アディポネクチン濃度に比べても感度・特異度良くインスリン抵抗性やメタボリックシンドロームを診断できることから、本測定法によって、より正確に糖尿病の発症を予測したり、病態を診断することが出来ると考えられる。既に、

本研究によって製品化されたキットは、臨床検査会社に販売され、全国の医療機関からの測定依頼に対応することが可能となっている。

#### E. 結論

今後は、本製品で測定した HMW アディポネクチン並びに HMWR とグルコースクランプ法によって測定された正確なインスリン抵抗性の指標、メタボリックシンドロームの診断において必須項目となっているウェスト周囲径との相関などについて基礎的データを集積していく。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1: Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Imai Y, Nagai R, Kadowaki T. Measurement of the high- molecular-weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care*, in press, 2006
- 2: Hara K, Horikoshi M, Kitazato H, Yamauchi T, Ito C, Noda M, Ohashi J, Froguel P, Tokunaga K, Nagai R, Kadowaki T. Absence of an association between the polymorphisms in the genes encoding adiponectin receptors and type 2 diabetes. *Diabetologia* 48:1307-14, 2005
- 3: Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 26:439-51, 2005
- 4: Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin: an adipokine linking adipocytes and type 2 diabetes in humans. *Curr Diab Rep.* 5:136-40, 2005
- 5: Hara K, Matsushita Y, Horikoshi M, Yoshiike

N, Yokoyama T, Tanaka H, Kadowaki K. A proposal for the cutoff point of waist circumference for the diagnosis of metabolic syndrome in the Japanese population. Diabetes Care, in press, 2006

## 2. 学会発表

第47回日本糖尿病学会学術総会：  
平成17年5月13日（神戸）

高分子量アディポネクチン測定はメタボリック症候群診断において有用である

堀越 桃子、原 一雄、今井 靖、山内 敏正、野田 光彦、戸辺 一之、赤沼 安夫、山崎 力、永井 良三、門脇 孝

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### (ア)特許出願

(1)A homolog of human adiponectin receptor controls osmotin-induced apoptosis in yeast : Agents for inducing expression of adiponectin” :  
出願番号:60/557,708

(2)「試料の前処理方法及びこれを利用する免疫学的測定方法」 : 出願番号2003-354715、

(3)「多量体アディポネクチンの分別測定方法」 : 出願番号2003-354930

### (イ)実用新案登録

なし

### (ウ)その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Imai Y, Nagai R, Kadowaki T.	Measurement of the high-molecular-weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome.	<i>Diabetes Care</i>	In press		2006
Ebinuma H, Miyazaki O, Yago H, Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T	A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases	<i>Clinica Chimica Acta</i>	In press		2006
Hara K, Horikoshi M, Kitazato H, Ito C, Noda M, Ohashi J, Froguel P, Tokunaga K, Nagai R, Kadowaki T.	Association of hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ P2 promoter haplotypes with type 2 diabetes in the Japanese population.	<i>Diabetes</i>	In press		2006
Horikoshi M, Hara K, Kitazato H, Miyake K, Ito C, Kasuga M, Nagai R, Kadowaki T.	A polymorphism in the AMPK $\alpha$ 2 subunit gene is associated with insulin resistance and type 2 diabetes in Japanese.	<i>Diabetes</i>	In press		2006
Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T.	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) $\alpha$ activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: Comparison of activation of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and their combination.	<i>Diabetes</i>	54	3358-3370	2005
Hara K, Horikoshi M, Kitazato H, Yamauchi T, Ito C, Noda M, Ohashi J, Froguel P, Tokunaga K, Nagai R, Kadowaki T.	Absence of an association between the polymorphisms in the genes encoding adiponectin receptors and type 2 diabetes.	<i>Diabetologia</i>	48	1307-14	2005



Kadowaki T, Yamauchi T.	Adiponectin and adiponectin receptors.	<i>Endocr Rev.</i>	26	439-51	2005
Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T.	Adiponectin: an adipokine linking adipocytes and type 2 diabetes in humans.	<i>Curr Diab Rep.</i>	5	136-40	2005
Hara K, Matsushita Y, Horikoshi M, Yoshiike N, Yokoyama T, Tanaka H, Kadowaki K.	A proposal for the cutoff point of waist circumference for the diagnosis of metabolic syndrome in the Japanese population.	<i>Diabetes Care</i>	In press		2006