

厚生労働科学研究費補助金

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

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 門脇 孝

平成19（2007）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		
門脇 孝	-----	3
II. 分担研究報告		
1. ヒト検体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—		
山内 敏正	-----	10
2. 高分子量アディポネクチン測定キット開発の基礎的データ収集		
戸辺 一之	-----	12
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		
原 一雄	-----	14
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	20

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
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。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実際のヒトの試料を利用して明らかにし、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を開発する。本年度は、昨年度に開発した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について、保健適応を申請するための臨床試験 DI-6101 を立ち上げ、対象者のリクルートを行っている。

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

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

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。

B. 研究方法

1. アディポネクチン多量体構造の解析：Advanced BioServices 社からヒトヒト血漿 3 L を購入し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、Western Blot 法によって各分画を可視化した。PVDF 膜に transfer 後 Edman

degradation 法によってアミノ酸の N 末端の配列を解読した。

^{125}I でラベルした各アディポネクチン分画を C2C12myoblast の培養液に添加し 4°C で 1 時間培養してそれぞれの細胞膜への結合能を測定した。また、アディポネクチンを $1\mu\text{g/mL}$ を含む各分画溶液を準備し 37°C で 5 分間培養後に AMPK の活性化の程度を測定した。

2. 臨床試験 DI-6101: 本研究で開発した高分子量アディポネクチン測定試薬の医薬品製造販売承認申請に必要なと考えられる臨床データを取得するための臨床試験 DI-6101 を (株) 第一化学と共同で実施する。また血中アディポネクチンを上昇させ糖脂質代謝に好ましい効果を持っているとされる降圧薬が HMW アディポネクチンを、総アディポネクチンに比べても特異的に上昇させるかを検討する臨床試験を立ち上げる。

(1) 基準値の設定: 健常者の高分子量アディポネクチンを測定し、分布型(全体、性別)、基準値(全体、性別、年代別)を求める。健常者とは、空腹時血糖値 110mg/dL 未満及び HbA1c 5.5% 未満を満たして糖代謝異常が否定され、HOMA (homeostasis model assessment) によるインスリン抵抗性指数が 1.6 未満とインスリン抵抗性が否定された者と定義する。

(2) グルコースクランプ法による正確なインスリン抵抗性指標との関係: 空腹時血糖値が 140mg/dL 以上やインスリン治療者は現在簡便に検査可能で臨床において汎用されている HOMA の指標によるインスリン抵抗性の正確な評価は困難である。今回の臨床試験では、空腹時血糖値が 140mg/dL 以上やインスリン治療者も含めた対象者について、イ

ンスリンクランプ法でインスリン抵抗性を評価し、HMW ならびに HMWR との相関を検討することによって、HOMA の指標が利用できない対象者にも広くインスリン抵抗性の診断法として使用できるかが明らかになる。

(3) 内臓脂肪蓄積量・メタボリックシンドロームとの関係: 我々の検討で現在使用されているメタボリックシンドロームの診断基準におけるウェスト周囲径のカットオフ値は特に女性においては高すぎることを示唆されている (*Diabetes Care* 29, 1123, 2006)。また中尾らの報告では、女性においては腹部 CT で測定した内臓脂肪面積は 65cm^2 が内臓脂肪蓄積と判断するカットオフ値として妥当であるとしている。メタボリックシンドロームの診断に必須である内臓脂肪蓄積量として正確な評価法と考えられる腹部 CT による内臓脂肪面積 (VFA: visceral fat area) と HMW ならびに HMWR との相関を検討し、内臓脂肪蓄積判定法として有用かどうかを確認する。

(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十分に保護されていると考えられる。

3. 臨床試験 BCAT: また、これまで糖脂質代謝により影響を与えるとされている薬剤が実際にそのようなアディポカインを変化させているかを検証するための臨床試験 (BCAT: Beneficial effect of Candesartan on Adiponectin Trial) を開始する。2型糖尿病における血圧のコントロールの目標値については、最近発表された「糖尿病治療ガイド(平成18年度版)」によると収縮期血圧 130mmHg・拡張期血圧 80mmHg とされている。血圧のコントロールに際してどの降圧薬を第一選択とすべきかについては規定されていない。本試験の試験薬であるカンデサルタンは優れた降圧作用があるとともに、インスリン抵抗性改善作用を持つアディポネクチンの血中レベルを増加させインスリン抵抗性を改善する作用があることが報告されており、インスリン抵抗性を基盤とする2型糖尿病やメタボリックシンドロームにおける血圧コントロール薬として最も好ましいと推測される。今回開発した高分子量アディポネクチン測定試薬を利用して、カンデサルタンがアディポネクチンの中でも高活性型である高分子量アディポネクチンの絶対量やその総アディポネクチンに対する比率を特に上昇させるかどうか、対照薬としてアムロジピンを用いた非盲検ランダム化比較試験にて明らかにす

る。本臨床試験 BCAT に組み入れられる対象者は東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科ないし循環器内科に定期通院中であり、①年齢が20歳以上 70 歳未満で②2型糖尿病患者または境界型 (IGT: impaired glucose tolerance) の条件を満たし、除外基準 (①収縮期血圧が 140 mmHg 以上または拡張期血圧が 90 mmHg 以上、②アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、長時間作用型 Ca チャネル遮断薬を既に服用中のもの、③インスリンによる治療を行なっているもの、④チアゾリジン誘導薬を服用中の者、⑤何らかの理由で空腹時採血が出来ない者、⑥HbA1c10%以上、⑦収縮期血圧が200mmHg 以上または拡張期血圧が110mmHg 以上、⑧腎不全(血清クレアチニンが男性で 2.0mg/dL 以上、女性で 1.5mg/dL 以上)、⑨両側性腎動脈狭窄のある者または片腎で腎動脈狭窄のある者、⑩高カリウム血症、⑪カリウム保持性利尿薬、カリウム補給剤を投与中の者、⑫二次性高血圧症またはその疑いのある者、⑬肝不全、⑭薬剤過敏症の既往歴のある者、⑮妊婦または妊娠している可能性のある者) に当てはまらないものである。主要評価項目は試験終了時の(総アディポネクチン、高分子量アディポネクチン絶対量(HMW)ならびに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)であり、主要な解析はカンデサルタン群とアムロジピン群とで両側 t 検定を行い、両群で差があるかどうか検討する。また、年齢、性別、BMI で調整した分散分析も同時に行い、これらの因子で調整後の差を検討する。
(倫理面への配慮)

1. について：Advanced BioServices 社

から購入したヒト血清については、由来となった個々の対象者から Informed consent が得られていることを FDA(Food and Drug Administration) によって保障されている。

2 および 3 について：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十分に保護されていると考えられる。

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たところ、3 量体の trimer (LMW)、6 量体の hexamer (MMW) 及び 12 ~ 18 量体の high molecular weight (HMW) アディポネクチンを見出していた。今回、分離したそれぞれの

アディポネクチン分画についてアミノ酸の N 末端の配列を詳しく解読したところ、LMW アディポネクチンに 1 分子の albumin が結合した Alb-LMW アディポネクチンの存在を確認した。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。還元条件下ではアルブミン結合 LMW アディポネクチンは 3 量体アディポネクチンとアルブミンに分かれること、アディポネクチン多量体形成は N 末の SS 結合に依存していることから、N 末の Cys 残基によってアディポネクチンはアルブミンに結合していることが推測された。Alb-LMW アディポネクチンの細胞膜への結合能は LMW アディポネクチンと同程度で AMPK の活性化能も同程度であることが分かった。Alb-LMW を含め各多量体アディポネクチンの pH 感受性を調べたところ、pH3 以下ではどの多量体も dimer に変換されるのが認められたことから、総アディポネクチン量を測定する為の前処理に応用しうる可能性が考えられた (*Biochem Biophys Res Commun*, in press, 2007)。純化された 4 種のアディポネクチン LMW, MMW, HMW 及び Alb-LMW アディポネクチンについて、protease による分解の選択性を検討した結果、albumin など血液中に高濃度に存在する蛋白存在下においても、それぞれのフォームを選択的に認識して分解する protease を見出している。それぞれのフォームを認識する特異抗体と protease を用いた選択的測定により HMW 画分を直接的に、その他については間接的に測定する事が出来ることを報告した (*Clinica Chemica Acta.*, 372, 47, 2006)。

既にこの原理を利用したアディポネクチンの分画測定法については製品化し特許を出願している{(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}。また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は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い、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を報告した (*Diabetes Care*, 29, 1357, 2006)。

この HMW アディポネクチン特異的測定試薬の医薬品製造販売承認申請に必要と考えられる臨床データを取得するための臨床試験 DI-6101 について、対象者のリクルートを、年度を通じて行っている。糖脂質代謝によい影響を与えるとされている降圧薬が HMW アディポネクチンを変化させているかを検証するための臨床試験 (BCAT: Beneficial effect of Candesartan on Adiponectin Trial) についても現在対象者について同意を得るための説明を行っているところである。

D. 考察

現時点でインスリン抵抗性を最も正確に測定できるのはグルコースクランプ法である。しかしながら、グルコースク

ランプは数時間拘束され特殊な機器が必要であるためとても日常臨床で使用できるものではない。そこで現在最も汎用されているのは HOMA (homeostasis model assessment) によるインスリン抵抗性指標 HOMA-IR である。HOMA-IR は空腹時血糖値 (mg/dl) に空腹時インスリン値 (mU/ml) をかけ 405 で割った値として算出される。グルコースクランプ法によるインスリン抵抗性指標と良く相関し、空腹時に 1 回だけ採血すれば判定できるため日常臨床でもよく使われる指標である。しかしながら HOMA-IR は血糖値が 140mg/dl 以上となっているような糖尿病症例の場合にはグルコースクランプによるインスリン抵抗性の評価と乖離し不正確になると指摘されている。またインスリン投与中の症例やインスリン自己抗体陽性例では HOMA-IR はインスリン抵抗性の指標としては成り立たない。このような弱点が HMW アディポネクチン測定には認められないと考えられその点で有利である。今年度開始した臨床試験 DI-6101 によってそのような HOMA のインスリン抵抗性指標が利用出来ない症例についても侵襲性が高いグルコースクランプを行わずして簡便・正確にインスリン抵抗性を判断できるか否かが実証されると期待される。また、現在日常臨床の現場で内臓脂肪の蓄積を判定するのはウェスト周囲径であるが、そのどの部位で測定するのが妥当かなど、問題点が多々指摘されている。臨床試験 DI-6101 において腹部 CT による正確な内臓脂肪蓄積量と HMW アディポネクチンとの相関を解析する予定であり、腹部 CT をとらないでも内臓脂肪蓄積を簡便・正確に判定す

ることが出来る指標としての HMW アディポネクチンの意義が明らかになると期待される。

このように HMW アディポネクチンはインスリン抵抗性やメタボリックシンドロームの診断において有用であると考えられる。

C. 結論

臨床試験 DI-6101 並びに BCAT によって HMW アディポネクチン測定が臨床現場でより広汎な対象者に応用可能であることが確認できると期待される。

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。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

1: Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, in press, 2007

2: Hara K, Yamauchi T, Imai Y, Manabe I, Nagai R, Kadowaki T. Reduced adiponectin level is associated with severity of coronary artery disease. *Int Heart J*, in press, 2007

3: 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* 29:1357, 2006

4: 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 Chemica Acta*, 372, 47, 2006

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* 29, 1123, 2006

6: Hara K, Matsushita Y, Horikoshi M, Yoshiike N, Yokoyama T, Tanaka H, Kadowaki T. A proposal for the cutoff point of waist circumference for the diagnosis of metabolic syndrome in the Japanese population. *Diabetes Care* 29, 1123, 2006

7: 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

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

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

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

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし

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（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

ヒト検体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—

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い、LMW, MMW, HMW アディポネクチンの外に、LWW アディポネクチンに1分子のアルブミンが結合した LMW-Alb アディポネクチンの存在を確認した。電気泳動上 LMW-Alb アディポネクチンは MMW アディポネクチンと同程度に泳動されることからゲルろ過法によるアディポネクチン分画の測定時には注意が必要であると考えられた。

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

Advanced BioServices 社からヒトヒト血漿 3 L を購入し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、Western Blot 法によって各分画を可視化した。PVDF 膜に transfer 後 Edman degradation 法によってアミノ酸の N 末端の配列を解読した。

¹²⁵I でラベルした各アディポネクチン分画を C2C12myoblast の培養液に添加し 4°C で 1 時間培養してそれぞれの細胞膜への結合能を測定した。また、アデ

イポネクチンを 1 μg/mL を含む各分画溶液を準備し 37°C で 5 分間培養後に AMPK の活性化の程度を測定した。

(倫理面への配慮)

Advanced BioServices 社から購入したヒト血清については、由来となった個々の対象者から Informed consent が得られていることを FDA(Food and Drug Administration)によって保障されている。

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たところ、3 量体の trimer (LMW)、6 量体の hexamer (MMW) 及び 12 ~ 18 量体の high molecular weight (HMW) アディポネクチンを見出していた。今回、分離したそれぞれのアディポネクチン分画についてアミノ酸の N 末端の配列を詳しく解読したところ、LMW アディポネクチンに 1 分子

の albumin が結合した Alb-LMW アディポネクチンの存在を確認した。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。還元条件下ではアルブミン結合 LMW アディポネクチンは 3 量体アディポネクチンとアルブミンに分かれること、アディポネクチン多量体形成は N 末の SS 結合に依存していることから、N 末の Cys 残基によってアディポネクチンはアルブミンに結合していることが推測された。Alb-LMW アディポネクチンの細胞膜への結合能は LMW アディポネクチンと同程度で AMPK の活性化能も同程度であることが分かった。Alb-LMW を含め各多量体アディポネクチンの pH 感受性を調べたところ、pH3 以下ではどの多量体も dimer に変換されるのが認められたことから、総アディポネクチン量を測定する為の前処理に応用しうる可能性が考えられた。

純化された 4 種のアディポネクチン LMW, MMW, HMW 及び Alb-LMW アディポネクチンについて、protease による分解の選択性を検討した結果、albumin など血液中に高濃度に存在する蛋白存在下においても、それぞれのフォームを選択的に認識して分解する protease を見出すことに成功している。それぞれのフォームを認識する特異抗体と protease を用いた選択的測定により HMW 画分を直接的に、その他については間接的に測定する事が出来た (*Biochem Biophys Res Commun*, in press, 2007)。

D. 考察

ヒト血漿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確立し、主に含まれている 4 種の構造を特定した。電気泳動上 LMW-Alb アディポネクチンは MMW アディポネクチンと同程度に泳動されることからゲルろ過法によるアディポネクチン分画の測定時には注意が必要であると考えられた。

E. 結論

各多量体アディポネクチン濃度を同時に選択的測定できる ELISA system はアディポネクチンのインスリン抵抗性・2 型糖尿病発症における役割の解明に大きく寄与することが期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, in press, 2007

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

2. 学会発表

なし

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

(ウ) その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書
高分子量アディポネクチン測定キット開発の基礎的データ収集

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：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、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。また、アディポネクチンは中枢神経においても何らかの生物学的役割を持っていると考えられるようになってきた。そこでヒト髄液についても本法によってアディポネクチン分画の測定が可能かどうか検討を行った。

B. 研究方法

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。

（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*, 372, 47, 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

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
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た。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、保健適応を申請するための臨床試験を開始する。

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が明らかにし、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。本研究で開発した高分子量アディポネクチン測定試薬の医薬品製造販売承認申請に必要と考えられる臨床データを取得するための臨床試験 DI-6101 を（株）第一化学と共同で実施する。また血中アディポネクチンを上昇させ糖脂質代謝に好ましい効果を持っているとされる降圧薬が HMW アディポネクチンを、総アディポネクチンに比べても特異的に上昇させるかを検討する臨床試験を立ち上げる。

B. 研究方法

(1) 基準値の設定：健常者の高分子量アディポネクチンを測定し、分布型（全体、性別）、基準値（全体、性別、年代別）を

求める。健常者とは、空腹時血糖値 110mg/dL 未満及び HbA1c 5.5% 未満を満たして糖代謝異常が否定され、HOMA (homeostasis model assessment) によるインスリン抵抗性指数が 1.6 未満とインスリン抵抗性が否定された者と定義する。

(2) グルコースクランプ法による正確なインスリン抵抗性指標との関係：空腹時血糖値が 140mg/dL 以上やインスリン治療者は現在簡便に検査可能で臨床において汎用されている HOMA の指標によるインスリン抵抗性の正確な評価は困難である。今回の臨床試験では、空腹時血糖値が 140mg/dL 以上やインスリン治療者も含めた対象者について、インスリンクランプ法でインスリン抵抗性を評価し、HMW ならびに HMWR との相関を検討することによって、HOMA の指標が利用できない対象者にも広くインスリン抵抗性の診断法として使用できるかが明らかになる。

(3)内臓脂肪蓄積量・メタボリックシンドロームとの関係:我々の検討で現在使用されているメタボリックシンドロームの診断基準におけるウェスト周囲径のカットオフ値は特に女性においては高すぎることを示唆されている (*Diabetes Care* 29, 1123, 2006)。また中尾らの報告では、女性においては腹部CTで測定した内臓脂肪面積は65cm²が内臓脂肪蓄積と判断するカットオフ値として妥当であるとしている。メタボリックシンドロームの診断に必須である内臓脂肪蓄積量として正確な評価法と考えられる腹部CTによる内臓脂肪面積(VFA: visceral fat area)とHMWならびにHMWRとの相関を検討し、内臓脂肪蓄積判定法として有用かどうかを確認する。

(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(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十分に保護されていると考えられる。

また、これまで糖脂質代謝により影響を与えるとされている薬剤が実際にそのようなアディポカインを変化させているかを検証するための臨床試験(BCAT: Beneficial effect of Candesartan on Adiponectin Trial)を開始する。2型糖尿病における血圧のコントロールの目標値については、最近発表された「糖尿病治療ガイド(平成18年度版)」によると収縮期血圧130mmHg・拡張期血圧80mmHgとされている。血圧のコントロールに際してどの降圧薬を第一選択とすべきかについては規定されていない。本試験の試験薬であるカンデサルタンは優れた降圧作用があるとともに、インスリン抵抗性改善作用を持つアディポネクチンの血中レベルを増加させインスリン抵抗性を改善する作用があることが報告されており、インスリン抵抗性を基盤とする2型糖尿病やメタボリックシンドロームにおける血圧コントロール薬として最も好ましいと推測される。今回開発した高分子量アディポネクチン測定試薬を利用して、カンデサルタンがアディポネクチンの中でも高活性型である高分子量アディポネクチンの絶対量やその総アディポネクチンに対する比率を特に上昇させるかどうか、対照薬としてアムロジピンを用いた非盲検ランダム化比較試験にて明らかにする。本臨床試験BCATに組み入れられる対象者は東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科ないし循環器内科に定期通院中であり、①年齢が20歳以上70歳未満で②2型糖尿病患者または境界型(IGT: impaired glucose tolerance)の条件を満たし、除外

基準(①収縮期血圧が140 mmHg以上または拡張期血圧が90 mmHg以上、②アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、長時間作用型Caチャンネル遮断薬を既に服用中のもの、③インスリンによる治療を行なっているもの、④チアゾリジン誘導薬を服用中の者、⑤何らかの理由で空腹時採血が出来ない者、⑥HbA1c10%以上、⑦収縮期血圧が200 mmHg以上または拡張期血圧が110 mmHg以上、⑧腎不全(血清クレアチニンが男性で2.0mg/dL以上、女性で1.5mg/dL以上)、⑨両側性腎動脈狭窄のある者または片腎で腎動脈狭窄のある者、⑩高カリウム血症、⑪カリウム保持性利尿薬、カリウム補給剤を投与中の者、⑫二次性高血圧症またはその疑いのある者、⑬肝不全、⑭薬剤過敏症の既往歴のある者、⑮妊婦または妊娠している可能性のある者)に当てはまらないものである。主要評価項目は試験終了時の(総アディポネクチン、高分子量アディポネクチン絶対量(HMW)ならびに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)であり、主要な解析はカンデサルタン群とアムロジピン群とで両側t検定を行い、両群で差があるかどうか検討する。また、年齢、性別、BMIで調整した分散分析も同時にを行い、これらの因子で調整後の差を検討する。

(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(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る。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

昨年度に引き続きアディポネクチンの分画測定法について検討を行い、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、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を報告した(*Clinica Chimica Acta*, 372, 47, 2006)。既にこの原理を利用したHMWアディポネクチン特異的測定試薬を開発し製品化している{(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}。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は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い、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を報告した(*Diabetes Care*, 29, 1357, 2006)。

この HMW アディポネクチン特異的測定試薬の医薬品製造販売承認申請に必要と考えられる臨床データを取得するための臨床試験 DI-6101 について、対象者のリクルートを、年度を通じて行っている。糖脂質代謝により影響を与えるとされている降圧薬が HMW アディポネクチンを変化させているかを検証するための臨床試験(BCAT: Beneficial effect of Candesartan on Adiponectin Trial)についても現在対象者について同意を得るための説明を行っているところである。

E. 考察

現在日常臨床の現場ではインスリン抵抗性の評価は HOMA のインスリン抵抗性指標によって行われているのが通常である。しかしながら HOMA のインスリン抵抗性指標は空腹時血糖値が 140mg/dL 以上である症例やインスリン治療者においては使用できない。今年度開始した臨床試験 DI-6101 によって

そのような HOMA のインスリン抵抗性指標が利用出来ない症例についても侵襲性が高いグルコースクランプを行わずして簡便・正確にインスリン抵抗性を判断できるか否かが実証されると期待される。また、現在日常臨床の現場で内臓脂肪の蓄積を判定するのはウェスト周囲径であるが、そのどの部位で測定するのが妥当かなど、問題点が多々指摘されている。臨床試験 DI-6101 において腹部 CT による正確な内臓脂肪蓄積量と HMW アディポネクチンとの相関を解析する予定であり、腹部 CT をとらないでも内臓脂肪蓄積を簡便・正確に判定することが出来る指標としての HMW アディポネクチンの意義が明らかになると期待される。既に、本研究によって製品化された測定試薬を利用した HMW アディポネクチンの受託測定が臨床検査会社によって行われるようになった。

F. 結論

臨床試験 DI-6101 並びに BCAT によって HMW アディポネクチン測定が臨床現場でより広汎な対象者に応用可能であることが確認できると期待される。

G. 健康危険情報

特になし

H. 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, 29, 1357, 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* 29, 1123, 2006

2. 学会発表

I. 知的財産権の出願・登録状況

(ア)特許出願

特になし

(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

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
Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T	Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	In press	未定	2007
Hara K, Yamauchi T, Imai Y, Manabe I, Nagai R, Kadowaki T.	Reduced adiponectin level is associated with severity of coronary artery disease.	<i>Int Heart J</i>	In press	未定	2007
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>	29	1357-62	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 Chemica Acta</i>	372	47-53	2006
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>	29	1123-4	2006
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



Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma

Yusuke Hada^{a,b}, Toshimasa Yamauchi^{a,b}, Hironori Waki^{a,b}, Atsushi Tsuchida^a, Kazuo Hara^{a,b,c}, Hirokazu Yago^d, Osamu Miyazaki^d, Hiroyuki Ebinuma^d, Takashi Kadowaki^{a,b,*}

^a Department of Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

^b Core Research for Evolutional Science and Technology of Japan Science and Technology Agency, Saitama 332-0012, Japan

^c Department of Clinical Bioinformatics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

^d Diagnostics Research Laboratories, Daiichi Pure Chemicals, 3-3-1 Koyodai, Ryugasaki, Ibaraki 301-0852, Japan

Received 23 February 2007

Abstract

Adiponectin is an adipocyte-derived hormone and known to form several species of multimer, however, the precise components of each multimer have not been fully determined. We purified each multimer adiponectin selectively from human plasma and characterized them by affinity columns using anti-adiponectin, gelatin, or anti-albumin antibody and gel filtration. We found that adiponectin exists as four species of multimers in human plasma. According to their migrating mobility and N-terminal amino acid analysis, we defined them as a trimer, albumin-binding trimer, hexamer, and HMW. Low pH shifted HMW to hexamer, raising the possibility that HMW is a 12 mer or larger multimer. We also showed that HMW had the highest binding activity to the membrane fractions of C2C12 myocytes and activated AMPK most potently. Our results indicate that adiponectin forms diverse multimer species and at least some of the functional properties are dependent on a multimer status.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Diabetes mellitus; Adipocyte; Adiponectin; AMPK; Type 2 diabetes; Multimer formation

Adiponectin is an adipocyte-derived hormone [1–4], which has been shown to play important roles in the regulation of glucose and lipid metabolism [5–8]. Reduced adiponectin levels were shown to be caused by interactions between genetic factors such as SNPs in the adiponectin gene itself [6–8] and environmental factors causing obesity such as a high fat diet [6–9]. Reduced adiponectin actions

also result from the downregulation of adiponectin receptors linked to obesity [6,9]. These reductions in adiponectin actions have been shown to play a crucial causal role in the development of insulin resistance, type 2 diabetes, metabolic syndrome, and atherosclerosis [5–9].

Adiponectin structurally belongs to the complement 1q family [10–12] and is known to form characteristic multimers [13]. The distribution of the multimer forms of adiponectin has been usually analyzed by gel filtration techniques or velocity gradient methods [1,4]. We reported that the multimer forms of adiponectin can be separated by SDS-PAGE under nonreducing and non-heat-denaturing conditions [14]. Adiponectin in human or mouse plasma forms a wide range of multimers from trimers to HMW multimers [13–17]. Previously, we reported that among

Abbreviations: HMW, high molecular weight; MMW, middle molecular weight; LMW, low molecular weight; Alb-LMW, albumin-binding LMW; AMPK, adenosine monophosphate activated protein kinase.

* Corresponding author. Department of Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan. Fax: +81 3 5689 7209.

E-mail address: kadowaki-3im@h.u-tokyo.ac.jp (T. Kadowaki).

0006-291X/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.004

Please cite this article in press as: Y. Hada et al., Selective purification and characterization of adiponectin multimer ..., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007), doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.004