

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業：
基礎研究成果の臨床応用推進研究

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 門脇 孝

平成20（2008）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	
山内 敏正	9
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
4. 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	
堀越 桃子	18
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21

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高分子量アディポネクチンが高活性型であることを明らかにしている。本研究では、アディポネクチン分画を測定する簡便な方法を開発し、インスリン抵抗性やメタボリックシンドローム実際のヒトの試料を利用して明らかにし、アディポネクチン分画測定による新規のメタボリックシンドローム病態診断法を開発する。本年度はアディポネクチン分画測定を実際に臨床応用するための臨床試験 DI-6101 を立ち上げ、対象者をリクルートし、大まかな解析を行った。

分担研究者

山内 敏正 東京大学医学部附属病院
客員准教授
戸辺 一之 富山大学附属病院内科学
教授
原 一雄 東京大学医学部附属病院
講師
堀越 桃子 東京大学医学部附属病院
助教

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とが急務となっている。本研究は、

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3L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。更に、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℃

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 μ g/mL を含む各分画溶液を準備し 37 $^{\circ}$ C で 5 分間培養後に AMPK の活性化を測定した。また、アディポネクチンは多彩な作用を各臓器で持っており、特に中枢神経系への作用は食欲を調節する因子として重要であると考えられる。そこで本分担研究では、実際の患者検体を利用して、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。

(2) 糖尿病・メタボリックシンドロームのバイオマーカーとしての有用性を検討する臨床試験(DI-6101):

本研究で開発したアディポネクチン分画測定法について医薬品製造販売承認を得る目的で臨床試験 DI-6101 を(株)第一化学と共同で実施し、以下の項目について基礎的なデータを収集した。

① 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血中アディポネクチン分画との相関:

現在簡便に検査可能で臨床において汎用されている homeostasis model assessment (HOMA) の指標では、インスリン治療中や空腹時血糖が 140mg/dL 以上の患者では正確なインスリン抵抗性の評価は困難である。そこで 62 症例についてインスリン抵抗性の指標として Gold standard であるインスリンクランプ法によってインスリン抵抗性を評価し、アディポネクチン濃度・分画との相関を検討することによって、インスリン抵抗性のより正確な診断法として使用できるか検討した。

② MRS によって評価される骨格筋・

肝臓中性脂肪含有量との相関:

インスリン抵抗性が骨格筋に由来するものなのか肝臓に由来するものなのかを MRS によってこれらの臓器の中性脂肪含有量を測定することによって推定することが出来る。骨格筋・肝臓中性脂肪含有量とアディポネクチン濃度・分画との相関を検討することによって、採血でインスリン抵抗性の病態を正確に判定することが出来るか検討した。

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事が示唆されている (*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。今回の研究では、メタボリックシンドロームの基礎的病態である内臓脂肪の蓄積を正確に評価する方法である CT 測定によって得られる内臓脂肪面積(VFA: visceral fat area)とアディポネクチン濃度・分画との相関をメタボリックシンドローム 89 検体、健常者 237 検体を利用して検討し、内臓脂肪蓄積判定法として有用かどうかを確認した。メタボリックシンドロームの診断は NCEP 改変基準(ウェスト周囲径男性で 85cm、女性で 80cm)によるものとした。

(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ため個人情報の保護については厳格に行っている。

(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える。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

(1) アディポネクチン多量体構造の解析:

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應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)。

また、アディポネクチンは多彩な作用を各臓器で持っており、特に中枢神経系への作用は食欲を調節する因子として重要であると考えられる。そこで本分担研究では、実際の患者検体を利用して、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。実際のヒト髄液についても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。髄液においては血中と比較してアディポネクチンの濃度は約 1000 分の 1 程度であった。血中と異なって、LMW あるいは Alb 結合 LMW アディポネクチンが大部分を占めていた。

(2) 糖尿病・メタボリックシンドロームのバイオマーカーとしての有用性を検討する臨床試験(DI-6101): 本研究で開発したアディポネクチン分画測定法については糖尿病、冠動脈疾患患者約 300 名を対象にしたパイロット研究を行い、メタボリックシンドロームの診断に際して高い能力を持つことを報告した (*Diabetes Care* 29:1357-62, 2006)。

① 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血中アディポネクチン分画との相関:

グルコースクランプ法によって得られた GIR (glucose infusion rate) は主に骨格筋におけるインスリン抵抗性を評価可能である。今回 GIR とアディポネクチン分画との相関は傾向に留まり統計学的有意差を認めなかった。

② MRS によって評価される骨格筋・肝臓中性脂肪含有量との相関:

高分子量アディポネクチンと MRS で得られた肝臓における脂肪含量は有意に相関した。これに対して骨格筋における

脂肪含量とは相関を認めなかった。このことは、①ともあわせて考えると我々のモデル動物における検討でアディポネクチンが肝臓における脂肪含量を低下させることによってインスリン抵抗性を改善するというデータと良く合致していると考えられ、アディポネクチンは肝臓におけるインスリン抵抗性という病態を良く評価することが出来ると考えられた。

③ 内臓脂肪蓄積量・メタボリックシンドロームとの関係：

高分子量アディポネクチンは男性(N=209)においても(p=0.0002)、女性(N=117)においても(p=0.0026)内臓脂肪面積と良く相関し、アディポネクチン分画測定法がメタボリックシンドロームの基礎的病態である内臓脂肪蓄積を良く反映したバイオマーカーであることが確認された。

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。このような弱点が今回開発したアディポネクチン分別測定法には認められないと考えられその点で有利である。また、グルコースクランプ法や HOMA の指標ではインスリン抵抗性の原因臓器についての情報は得られない。今回、MRS によって骨格筋・肝臓の脂肪含量とアディポネクチン分画の相関家解析によって、アディポネクチンは肝臓の脂肪含量と良く相関することが判明した。これは我々のメタボリックシンドロームのモデル動物における基礎的検討によって、アディポネクチンは肝臓の脂肪含量を減少させることによってインスリン抵抗性を改善するという結果と完全に合致している。これらの結果からアディポネクチン分画測定によって肝臓でのインスリン抵抗性を検出することが出来ることが明らかになり、インスリン抵抗性の病態診断に有用であることが明らかになった。また、アディポネクチン分画測定は内臓脂肪蓄積を鋭敏に検出できることも明らかになり、メタボリックシンドロームの診断についても有用であることが確認されたと考えられる。また、アディポネクチンを簡便・正確に測定するシステムによって、ヒト髄液でもアディポネクチンの各分画を測定可能であることが実証できたので、今後多数の検体を利用して、食欲の調節などアディポネクチンの中枢作用について基礎的なデータを蓄積していきたい。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Okamoto M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, Kubota T, Wakui M, Nagai R, Noda M, Nagamatsu S, Kadowaki T. Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia*, publication online 2008 Mar 28
- (2) Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiouchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* 6(1):55-68, 2007

- (3) Ebinuma H, Miida T, Yamauchi T, Hada Y, Hara K, Kubota N, Kadowaki T. Improved ELISA for selective measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 53(8):1541-4, 2007

- (4) Ishikawa M, Kitayama J, Yamauchi T, Kadowaki T, Maki T, Miyata H, Yamashita H, Nagawa H. Adiponectin inhibits the growth and peritoneal metastasis of gastric cancer through its specific membrane receptors AdipoR1 and AdipoR2. *Cancer Sci.* 8(7):1120-7, 2007

- (5) 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* 356(2): 487-93, 2007

- (6) 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* 48(2): 149-53, 2007

2. 学会発表

なし

H. 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
分担研究者 山内 敏正 東京大学医学部附属病院 客員准教授

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 3L 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 C2C12 myoblast の培養液に添加し 40℃ 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 1µg/mL を含む各分画溶液を準備し 37℃ 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*, 356(2): 487-93, 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を確認し、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) Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiochi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab*. 6(1):55-68, 2007
- (2) Ebinuma H, Miida T, Yamauchi T, Hada Y, Hara K, Kubota N, Kadowaki T. Improved ELISA for selective measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 53(8):1541-4, 2007
- (3) Ishikawa M, Kitayama J, Yamauchi T, Kadowaki T, Maki T, Miyata H, Yamashita H, Nagawa H. Adiponectin inhibits the growth and peritoneal metastasis of gastric cancer through its specific membrane receptors AdipoR1.

and AdipoR2. *Cancer Sci.* 8(7):1120-7, 2007

なし

(4) Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Ts uchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of a diponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 356(2): 487-93, 2007

(5) 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* 48(2): 149-53, 2007

2. 学会発表

なし

H. 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

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 富山大学附属病院内科学教授

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。また、アディポネクチンは多彩な作用を各臓器で持っており、特に中枢神経系への作用は食欲を調節する因子として重要であると考えられる。そこで本分担研究では、実際の患者検体を利用して、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。

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重要な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

ヒト血清蛋白分解酵素による前処理を 37℃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、前処理を行った場合と行っていない場合についてアディポネクチンを測定することによってアディポネクチンの各分画を測定することが可能である。本法を利用して、19名の匿名化されたヒト髄液を対象にアディポネクチン分画測定法を利用してアディポネクチン各分画の測定を行った。

（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充分に保護されていると考えられる。

C. 研究結果

実際のヒト髄液についても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。髄液においては血中と比較してアディポネクチンの濃度は約1000分の1程度であった。血中と異なって、LMWあるいはAlb結合LMWアディポネクチンが大部分を占めていた。

D. 考察

アディポネクチンを簡便・正確に測定するシステムによって、ヒト髄液でもアディポネクチンの各分画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、食欲の調節などアディポネクチンの中枢作用について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) Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A,

Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* 6(1):55-68, 2007

2. 学会発表

なし

H. 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

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 講師

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。これまでの研究で、抗生活習慣病物質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、高分子量アディポネクチンが高活性型であることを明らかにし、アディポネクチンの各分画を特異的かつ簡便に測定する方法を開発・製品化した。本分担研究では、本測定法がメタボリックシンドロームの病態診断にどのように役立つかについて検討を行った。

A. 研究目的

アディポネクチンの様々な多量体構造の中でもどの分画が最も高活性型であること明らかにし、アディポネクチン分画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。本研究で開発したアディポネクチン分画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し、本測定法がどのようにメタボリックシンドロームの病態診断に役立つかを検討した。

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。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。

C. 研究結果

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 Chemica 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について、対

象者のリクルートを、年度を通じて行った。解析の結果、高分子量アディポネクチンとMRSで得られた肝臓における脂肪含量は有意に相関した。これに対して骨格筋における脂肪含量とは相関を認めなかった。このことは、我々のモデル動物における検討でアディポネクチンが肝臓における脂肪含量を低下させることによってインスリン抵抗性を改善するというデータと良く合致していると考えられ、アディポネクチンは肝臓におけるインスリン抵抗性という病態を良く評価することが出来ると考えられた。また、高分子量アディポネクチンは男性(N=209)においても(p=0.0002)、女性(N=117)においても(p=0.0026)内臓脂肪面積と良く相関し、アディポネクチン分画測定法がメタボリックシンドロームの基礎的病態である内臓脂肪蓄積を良く反映したバイオマーカーであることが確認された。

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簡便にインスリン抵抗性を判断できることが明らかになった。メタボリックシンドロームにおいては脂肪肝によるインスリン抵抗性が日常臨床で頻繁に見られる。今回、肝臓への脂肪蓄積アディポネクチン分画が良く相関したことより、

肝臓におけるインスリン抵抗性の良いバイオマーカーとなり、メタボリックシンドロームの病態診断に役立つことが明らかとなった。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。今回、腹部CTによる正確な内臓脂肪蓄積量とアディポネクチン分画との相関も得られており、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有用であることも示された。既に、本研究によって製品化された測定試薬による受託測定が臨床検査会社によって広く実施されている。

F. 結論

アディポネクチン分画測定が臨床的に有用であることが示された。実際、本法を利用した受託測定が広く行われているという実績がある。

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ebinuma H, Miida T, Yamauchi T, Hada Y, Hara K, Kubota N, Kadowaki T. Improved ELISA for selective measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 53(8):1541-4, 2007
- (2) Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of a

diponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 487-93, 2007

(3) 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* 48: 149-53, 2007

2. 学会発表

H.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

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 堀越 桃子 東京大学医学部附属病院 助教

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。これまでの研究で、抗生活習慣病物質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、高分子量アディポネクチンが高活性型であることを明らかにし、アディポネクチンの各分画を特異的かつ簡便に測定する方法を開発・製品化した。本分担研究では、本測定法がメタボリックシンドロームの病態診断にどのように役立つかについて検討を行った。

A. 研究目的

アディポネクチンの様々な多量体構造の中でもどの分画が最も高活性型であること明らかにし、アディポネクチン分画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。本研究で開発したアディポネクチン分画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し、本測定法がどのようにメタボリックシンドロームの病態診断に役立つかを検討した。

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。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。糖脂質代謝にい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簡便・にインスリン抵抗性を判断できることが明らかになった。メタボリックシンドロームにおいては脂肪肝によるインスリン抵抗性が日常臨床で頻繁に見られる。今回、肝臓への脂肪蓄積アディポネクチン分画が良く相関したことより、肝臓におけるインスリン抵抗性の良いバイオマーカーとなり、メタボリックシンドロームの病態診断に役立つことが明らかとなった。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。今回、腹部 CT による正確な内臓脂肪蓄積量とアディポネクチン分画との相関も得られており、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

して有用であることも示された。既に、本研究によって製品化された測定試薬による受託測定が臨床検査会社によって広く実施されている。

E. 結論

アディポネクチン分画測定が臨床的に有用であることが示された。実際、本法を利用した受託測定が広く行われているという実績がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

特になし

2. 実用新案登録

なし

3. その他