

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17～19年度 総合研究報告書

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・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		
門脇 孝	-----	3
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10

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）
（総合）研究報告書
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

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、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

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

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、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 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、

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）
（総合）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、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
客員助教授
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

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

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、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 C2C12 myoblast 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 1µg/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。対象者は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については 2 型糖尿病患者 94 症例、②MRS 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については 62 症例(男性 34 例、女性 28 例)、③内臓脂肪蓄積量・メタボリックシンドロームとの関係については 326 症例(男性 209 例、女性 117 例)である。

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っておりよい。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

(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応用しうる可能性が考えられた (*Biochem Biophys Res Commun*, 356: 487-93, 2007) (論文 1 : 資料 1)。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, 47-53, 2006) (論文 2 : 資料 2)。

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, Shiuichi 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, Miyamoto 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 a diponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 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

(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

II 研究成果の刊行一覧

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
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	Publication-online	2008
Kubota N, Yano W, Kubota T, Ymauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Sato 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 proteinkinase in the hypothalamus and increases food intake.	Cell Metabolism	6	55-68	2007
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.	Clinical Chemistry	53	1541-4	2007
Ishikawa M, Kitayama J, Yamauchi T, Kadowaki T, Maki T, Miyato H, Yamashita H,	Adiponectin inhibits the growth and peritoneal metastasis of gastric cancer through its specific membrane receptors AdipoR1 and	Cancer Science	8	1120-7	2007

Nagawa H.	AdipoR2				
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>	356	487-93	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>	48	149-53	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>Clin Chem 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