

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity  |
| Author(s)    | 有田, 幸生  |
| Citation     | 大阪大学, 2001, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/42667">https://hdl.handle.net/11094/42667</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | あり た ゆき お<br>有 田 幸 生  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 第 16065 号   |
| 学位授与年月日    | 平成13年3月23日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究生体制御医学専攻   |
| 学位論文名      | Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity<br>(新規脂肪組織特異的発現蛋白アディポネクチンの肥満症における血中濃度低下) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 松澤 佑次<br><br>(副査)<br>教授 荻原 俊男 教授 谷口 直之   |

## 論文内容の要旨

### 【背景と目的】

近年、わが国において糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病の発症は著明に増加しており、その発症基盤として脂肪組織の過剰蓄積状態、すなわち肥満が重要な役割を果たしている。当教室ではこれまで脂肪組織が Plasminogen activator inhibitor-1 等の様々な生理活性物質を直接血中に分泌し、その血中濃度上昇が様々な病態発症に関与することを明らかにしてきた。アディポネクチンは脂肪組織特異的に高発現する遺伝子 apM1 (Adipose Most Abundant Gene Transcript 1) の転写産物であり、一次構造からは三量体を形成する G-X-Y 繰り返し構造と補体 C1q やコラーゲンⅧ、X と相同性のある球状構造を有する水溶性コラーゲン様蛋白と考えられた。アディポネクチンは分泌蛋白であり、本研究の目的はこの脂肪組織特異的発現蛋白の血中濃度測定系を確立し、病態特に肥満症及びその関連疾患における意義を明らかにすることである。

### 【方法ならびに成績】

#### 1) リコンビナントアディポネクチンの発現

シグナルペプチドを除いたアディポネクチン cDNA を組み込んだ発現ベクターを用い、アディポネクチン蛋白を大腸菌に発現させた。アディポネクチン蛋白は大腸菌封入体に発現しており、これを塩酸グアニジンにより可溶化し、リフォールディング後、陰イオン交換樹脂 HPLC にて分離、精製した。

#### 2) 抗アディポネクチン抗体の作製

抗アディポネクチンモノクローナル抗体および抗アディポネクチンポリクローナル抗体はそれぞれマウスおよびウサギをリコンビナントアディポネクチンで免疫することにより作製した。

#### 3) ヒト血漿におけるアディポネクチンの検出

ヒト血漿サンプルを 2-メルカプトエタノール処理後、SDS-PAGE を用い、抗アディポネクチンモノクローナル抗体 ANOC9108 で Western blot を行い、アディポネクチンは約 30kD の位置にシングルバンドで検出された。

#### 4) ヒト血中アディポネクチン濃度測定系の確立

抗アディポネクチンモノクローナル抗体 ANOC9108 を固相化した 96 穴プレートにサンプルを添加後、抗アディポネクチンポリクローナル抗体 OCT9104 処理し、OPD-HRP 法にて発色させ吸光度を測定する ELISA 法の確立を試みた。この ELISA を用いて無処理のヒト血漿を用いてアディポネクチン濃度を測定したところ、Western blot の結

果から考えられる濃度が得られなかった。そこでヒト血漿のゲル濾過を行い、ANOC9108で Western blot を行ったところ、アディポネクチンは290kD以上のフラクションにも検出され、アディポネクチンが血漿中で多量体を形成し、抗体認識部位がマスクされている可能性が考えられた。そこで血漿サンプルをSDS処理し、5分間の100°C処理を行ったところ、アディポネクチンが測定可能となった。アディポネクチン測定値の intra-assay、inter-assay の CV 値は、それぞれ3.3%、7.4%であった。

#### 5) 正常人における血中アディポネクチン濃度の測定

人間ドック受診者40人において血中アディポネクチン濃度を測定したところ、3.2–27.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲で検出され、平均値は7.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

#### 6) 血中アディポネクチン濃度と体脂肪率との相関

肥満度26.4以下の非肥満症例87例（男性51例、女性36例）および肥満度26.4以上の肥満症例57例（男性32例、女性25例）を対象に血中アディポネクチン濃度の検討を行った。アディポネクチンは脂肪組織特異的発現蛋白であるにも関わらず、血中アディポネクチン濃度は肥満症例群で $3.7 \pm 3.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、非肥満症例群で $8.9 \pm 5.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ と、非肥満症例と比較し、肥満症例において有意に低値を示した ( $p < 0.0001$ )。血中アディポネクチン濃度と肥満度とは有意な負の相関を示し、相関係数は男性 $-0.66$ 、女性 $-0.48$ であった ( $p < 0.0001$ )。また血中アディポネクチン濃度は非肥満症例においては男性 $7.7 \pm 3.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、女性 $10.6 \pm 7.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、また肥満症例においては男性 $2.8 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、女性 $4.8 \pm 4.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、女性と比較し男性において有意に低値を示した ( $p < 0.0001$ )。

#### 【総括】

新規脂肪組織特異的蛋白アディポネクチンは、培養系において大動脈由来内皮細胞の接着分子発現を抑制することが明らかとなっていることから、肥満症における血中アディポネクチン濃度の低下が動脈硬化発症に関与する可能性が示唆された。血中アディポネクチン濃度測定 ELISA はアディポネクチンの生理的あるいは病態発症における意義を検討するために有用であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は新規脂肪組織特異的発現蛋白アディポネクチンの血中濃度測定系を確立し、肥満症において血中アディポネクチン濃度が低下することを報告したものである。糖尿病、高血圧、高脂血症等の生活習慣病の発症基盤として脂肪組織の過剰蓄積状態、すなわち肥満症が重要な役割を果たしている。脂肪組織は様々な生理活性物質を直接血中に分泌しており、これらの分子が動脈硬化発症に関与することが報告されているが、肥満症における動脈硬化の発症機構は未だ十分に解明されていない。ヒト脂肪組織発現遺伝子の解析過程で新たに発見された脂肪組織特異的発現蛋白アディポネクチンはこれまでに、大動脈由来内皮細胞の接着分子発現抑制作用を有することが明らかとなっている。本申請者はヒトにおける血中アディポネクチン濃度測定法を確立し、アディポネクチンの病態における意義を明らかにした。まず、血漿ゲル濾過サンプルを用いた検討により、アディポネクチンは血漿中で約400kDの多量体を形成していることを示し、抗アディポネクチン抗体を用いたヒト血中濃度測定法を ELISA にて確立した。さらにアディポネクチンは脂肪組織特異的発現蛋白であるにも関わらず、血中アディポネクチン濃度は肥満度と有意な負の相関を示し、体脂肪蓄積に伴ない血中濃度が低下することを明らかにした。また血中アディポネクチン濃度が糖尿病あるいは冠動脈疾患患者において低下していることも確認している。

本研究は脂肪組織特異的発現蛋白アディポネクチンの肥満症における血中濃度低下を明らかにしており、本分子が多彩な生理活性を持つことが明らかにされつつあることから、肥満症及びその関連疾患における病態発症機構を解明する上で、極めて意義深く学位に値するものである。