

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790893

研究課題名（和文） アディポネクチン単量体の病態生理的役割の解明

研究課題名（英文） Clarification of pathophysiological role of monomer adiponectin

研究代表者

岩嶋 義雄 (IWASHIMA YOSHIO)

独立行政法人国立循環器病研究センター 高血圧・腎臓科・医長

研究者番号：80448068

研究成果の概要（和文）：アディポネクチン（ADPN）は脂肪細胞より分泌され、肥満、糖尿病と関連する。血中 ADPN 濃度が著しく低下した症例の DNA 配列を検討し、新規の一塩基多型（SNP）を検出した。この新規 SNP は著明な ADPN レベル低下と関連するものの、疾患との関連は認めなかった。この新規 SNP は野生型と異なる単量体 ADPN を発現しており、組成解析の結果、ADPN の病態生理的役割の解明には修飾部位解析やアミノ酸配列の検討が重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Adiponectin is an adipose tissue-specific collagen-like factor, and was previously reported to be associated with obesity and diabetes. A genetic investigation revealed one new polymorphism which more frequently showed lower concentrations of adiponectin, but not associated with hypoadiponectinemia-related diseases. This mutant protein showed a different oligomerization state of its monomer to the wild-type as determined by SDS page. The results of composition analysis suggested the importance of post-translational modifications analysis as well as amino acid sequences to clarification of pathophysiological role of adiponectin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：内分泌学

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織由来生理活性物質（アディポサイトカイン）の一つであるアディポネクチン（Acrp 30）は、脂肪組織に特異的に発現する遺伝子 apM1（adipose most abundant gene transcript）の産物として 244 個のアミノ酸より成る分泌蛋白である。その血中レベルと

肥満、糖尿病、インスリン抵抗性、動脈硬化との関連が様々な研究により報告されている。血中では三量体を基本構造として、これがさらに会合した多量体（高分子量・中分子量・低分子量）を形成している。血中 Acrp 30 レベルが極度に低い症例を対象に、Acrp30 の DNA をダイレクトシーケンスを

行い新規 SNP を数個検出した。これらのうち、transcription factor に影響を与えると考える部位に共通して検出された新規 SNP に注目し、検討したところ、mutation 群の血中 Acrp 30 レベルは著明に低下していた。また、この新規 SNP の mutation を有する者に、肥満、糖尿病、冠動脈疾患の合併を認めなかった。次に、Acrp 30 の 3 つのドメイン (Variable region、Collagen like domain、Globular domain) に特異的な抗 Acrp 30 モノクローナル抗体を用いて SDS page を行ったところ、mutation では低分子量 Acrp 30 の形成を認めず、還元条件下での単量体 (monomer) は野生型や他の mutation と異なっていた。これまでに、高分子量 Acrp 30 の抗動脈硬化作用についての検討は多いが、最小構成単位である単量体 Acrp 30 については少ない。著明な Acrp 30 レベル低下をもたらすが関連疾患を発症させない新規 SNP を発見し、その単量体に相違を見出した。すなわち、野生型と mutation と一致して発現する単量体 Acrp 30 がその重要な生理的役割を有する可能性があることから、本研究を企画した。

2. 研究の目的

- (1) 遺伝子解析研究を行い、血中 Acrp 30 レベル・関連疾患を規定する SNP を同定する。
- (2) タンパクの組成解析として、非還元・還元条件下での 2D Page により変異群と野生・健常群を比較する。
- (3) MS/MS イオンサーチ法などを用いたプロテオーム解析により、多量体および単量体 Acrp 30 のタンパク同定とともに生理学的結合を検討する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子解析研究:

- ① DNA シークエンス: Acrp 30 レベルが極度に低い症例の DNA について、ダイターミネーター法を用いて Acrp 30 遺伝子の全長直接シーケンスを行った。
- ② 関連解析 (SNP 解析): SNP 検出のため TaqMan PCR 法を用いて SNP タイピングを行った。他施設の保有する一般住民集団約 2000 名を対象に、SNP と疾患との関連を検討した。TaqMan でのタイピングが不能な SNP については制限酵素断片長多型 (RFLP) に基づく PCR-RFLP を用いた。

(2) タンパク質の組成解析:

二次元電気泳動 (2D page): MARS カラム (Human-14) を用いて血清サンプル

をアルブミン・IgG 除去処理し、限外ろ過にて濃縮した。その後、還元・加熱処理を行い、脱塩、再溶解、タンパク定量した。タンパク定量には、Bradford 法を用いた。2D page でのスポット検出の方法として、SYPRO Ruby 染色・銀染色とウェスタンブロットを行った。ウェスタンブロットでの一次抗体には、市販のポリクローナル抗体と Acrp 30 Globular domain に特異的な抗 Acrp 30 モノクローナル抗体を用いた。Progenesis SameSpot (nonlinear dynamics) で比較解析した。

(3) プロテオーム解析:

銀染色した SDS-PAGE ゲルから、目的のバンド (5 バンド分) を切り出した後、ゲル片を脱色し、Trypsin 消化した。その後、消化液のほぼ全量を LC-MS/MS 分析に供した。分析により得られた MS/MS イオンから Mascot を用いてデータベース検索を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子解析研究:

- ① DNA シークエンス: Acrp 30 レベルが極度に低い症例の DNA について、イントロンを含む全長直接シーケンスを行ったが、Acrp 30 遺伝子の大きな Deletion/Insertion (欠失/挿入) 多型は検出しなかった。
- ② 関連解析: 今回検出した新規 SNP と疾患との関連について、これまで見出された結果が他集団でも同様か検討した。他施設との共同研究の体制を構築し、約 2000 人の一般住民集団を対象に、SNP と疾患との関連を検証して、同様の結果を得た。すなわち、今回検出した新規 SNP は著明な Acrp 30 レベル低下をもたらすものの、関連疾患を発症させないことを再確認した。

(2) タンパク質の組成解析:

SYPRO Ruby 染色・銀染色を行い、変異群と野生・健常群を比較したが、2 倍以上の発現差異のあるスポットは検出できなかった (図 1、2)。次に、2D page したのち、ポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、両群に発現差異は認めなかった。さらに、2D page したのち、Acrp 30 Globular domain 特異的なモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行っている (進行中)。

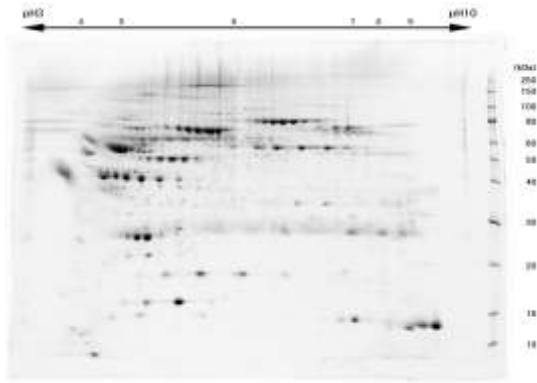


図 1: 野生・健常群の SYPRO Ruby 染色

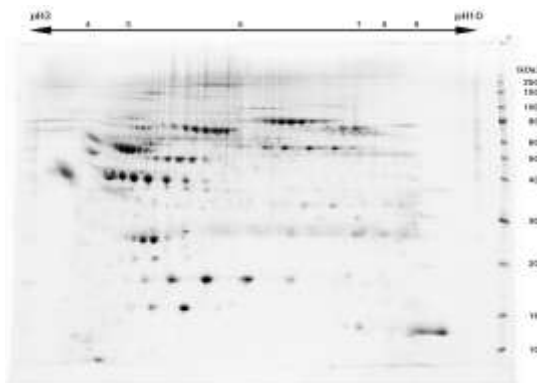


図 2: 変異群の SYPRO Ruby 染色

(3) プロテオーム解析:

LC-MS/MS 分析で、ヒットしたタンパク質を抽出したが、目的とするタンパク質は検出できなかった。そこで、Acrp 30 のアミノ酸配列と消化に用いたトリプシンを 1 つのプライベートデータベースとし、分析により得られた MS/MS イオンから Mascot を用いてプライベートデータベース検索を行った。1 バンドが一致したものの、Ions score は極めて低く、MS/MS スペクトルを確認したところ、非常に小さいピークでの一致であった。サンプルの抽出方法が問題であると考え、次に、アッセイ方法を変更してゲルろ過分析を用いて再抽出している(進行中)。

以上により、今回検出した新規 SNP と疾患との関連について再確認した。ポリクローナル抗体を用いた 2D page のウェスタンブロットの結果から、Acrp 30 の病態性的役割の解明には修飾部位解析やアミノ酸配列の検討が重要であることを示唆する結果が得られた。今後も命題の解明に向けた検討を進めていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 21 件)

- ① Horio T, Iwashima Y, Kamide K, Tokudome T, Yoshihara F, Nakamura S, Kawano Y, Chronic kidney disease as an independent risk factor for new-onset atrial fibrillation in hypertensive patients, *Journal of Hypertension*, 査読有、28 巻、2011、1738-1744、DOI: 10.1097/HJH.0b013e32833a7dfe
- ② Kawano Y, Horio T, Kamide K, Iwashima Y, Yoshihara F, Nakamura S, *Blood Pressure and Medication During Long-Term Antihypertensive Therapy Based on Morning Home SBP in Hypertensive Patients: Hypertension Control Based On Home Systolic Pressure (HOSP) Substudy, Clinical and Experimental Hypertension*, 査読有、32 巻、2010、239-243、DOI:10.3109/10641963.2010.491889
- ③ Jesmin S, Mowa C, Sultana S, Shimojo N, Togashi H, Iwashima Y, Kato N, Sato A, Sakuma I, Hiroe M, Hattori Y, Yamaguchi N, Kobayashi H, VEGF signaling is disrupted in the hearts of mice lacking estrogen receptor alpha, *European Journal of Pharmacology*, 査読有、641 巻、2010、168-178、<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.05.020>
- ④ Iwashima Y, Horio T, Kawano Y, Role of Adiponectin in Obesity, hypertension, and Metabolic Syndrome, *Current Hypertension Reviews*, 査読有、6 巻、2010、110-117、DOI:<http://dx.doi.org/10.2174/157340210791171029>
- ⑤ Iwashima Y, Horio T, Kamide K, Tokudome T, Yoshihara F, Nakamura S, Ogihara T, Rakugi H, Kawano Y, Additive interaction of metabolic syndrome and chronic kidney disease on cardiac hypertrophy, and risk of cardiovascular disease in hypertension, *American Journal of Hypertension*, 査読有、23 巻、2010、290-298、DOI:10.1038/ajh.2009.253.
- ⑥ Jesmin S, Yamaguchi N, Zaedi S, Sultana S, Iwashima Y, Sawamura A, Gando S, Time-dependent expression of endothelin-1 in lungs and the effects of TNF- α blocking peptide on acute lung injury in an endotoxemic rat model, *Biomed Res*, 査読有、32 巻、2011、

- 9-17、
[DOI:10.2220/biomedres.32.9](https://doi.org/10.2220/biomedres.32.9)
- ⑦ **Iwashima Y**, Horio T, Suzuki Y, Takagi T, Kamide K, Ohishi M, Ogihara T, Yoshikawa J, Kawano Y, Rakugi H, Impact of concomitant diabetes and chronic kidney disease on preload-induced changes in left ventricular diastolic filling in hypertensive patients, *Journal of Hypertension*, 査読有、29 巻、2011、144-153、
[DOI:10.1097/HJH.0b013e32833f387c](https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833f387c)
- ⑧ Nishida H, Horio T, Suzuki Y, **Iwashima Y**, Tokudome T, Yoshihara F, Nakamura S, Kawano Y, Interleukin-6 as an independent predictor of future cardiovascular events in high-risk Japanese patients: comparison with C-reactive protein, Cytokine, 査読有、53 巻、2011、342-346、
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2010.12.005>
- ⑨ Kamide K, Kokubo Y, Yang J, Takiuchi S, Horio T, Matsumoto S, Banno M, Matayoshi T, Yasuda H, Miwa Y, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, **Iwashima Y**, Oguro R, Ohishi M, Rakugi H, Okamura T, Miyata T, Kawano Y, Association of intima-media thickening of carotid artery with genetic polymorphisms of the regulator of G-protein signaling 2 gene in patients with hypertension and in the general population, *Hypertension Research*, 査読有、34 巻、2011、740-746、
[DOI:10.1038/hr.2011.25](https://doi.org/10.1038/hr.2011.25)
- ⑩ **Iwashima Y**, Kawano Y, Measurement and clinical evaluation of blood pressure in the management of hypertension, *Nihon Rinsho*, 査読無、69 巻、2011、1943-1949、
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22111312>
- ⑪ Jesmin S, Zaedi S, Islam AM, Sultana SN, **Iwashima Y**, Wada T, Yamaguchi N, Hiroe M, Gando S, Time-Dependent Alterations of VEGF and Its Signaling Molecules in Acute Lung Injury in a Rat Model of Sepsis, Inflammation, 査読有、35 巻、2012、484-500、
[DOI:10.1007/s10753-011-9337-1](https://doi.org/10.1007/s10753-011-9337-1)
- ⑫ **Iwashima Y**, Yanase M, Horio T, Seguchi O, Murata Y, Fujita T, Toda K, Kawano Y, Nakatani T, Serial Changes in Renal Function as a Prognostic Indicator in Advanced Heart Failure Patients with Left Ventricular Assist System, *Ann Thorac Surg*, 査読有、93 巻、2012、816-823、
[DOI:10.1016/j.athoracsur.2011.11.058](https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2011.11.058)
- ⑬ Jesmin S, Islam R, Islam S, Mia S, Sultana SN, Zaedi S, Yamaguchi N, **Iwashima Y**, Hiroe M, Watanabe T, Comprehensive Assessment of Metabolic Syndrome among Rural Bangladeshi Women, *BMC Public Health*, 査読有、12 巻、2012、49、
[DOI:10.1186/1471-2458-12-49](https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-49)
- ⑭ **岩嶋義雄**, 堀尾武史, 河野雄平, Ca 拮抗薬最大投与量での降圧不十分症例を対象にした Ca 拮抗薬+ARB 併用療法の降圧効果についての検討-Trial of combination-therapy of olmesartan and azelnidipine: COOLA trial-, 血圧, 査読有、18 巻、2011、54-58、
<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201102299144070688>
- ⑮ **岩嶋義雄**, 河野雄平, 高血圧治療ガイドラインのクリニカルクエスチョン 原発性アルドステロン症の診断と治療は J S H 2 0 0 9 で良いか? , 循環器内科, 査読無、70 巻、2011、389-394、
http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=201102275626531805
- ⑯ **岩嶋義雄**, 河野雄平, 禁煙をはじめとする動脈硬化性因子の管理-A S O の診療は, 血流障害だけではない! -高血圧症専門医の立場から, 治療, 査読無、93 巻、2011、612-615、
http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=201102277040790537
- ⑰ **岩嶋義雄**, 服薬アドヒアランスと脳卒中-REGARDS 試験, 血圧, 査読無、18 巻、2011、1188-1189、
<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ae6keatd&vo=18&nu=12>
- ⑱ **岩嶋義雄**, 睡眠時間と高血圧, 血圧, 査読無、18 巻、2011、524-525、
<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ae6keatd&vo=18&nu=6>
- ⑲ **岩嶋義雄**, 河野雄平, 高血圧-新しいガイドラインに基づくこれからの治療 J S H 2 0 0 9 を再評価する 最近市販された合剤, カレントセラピー, 査読無、28 巻、2010、677-682、
http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=201002297060976312
- ⑳ **岩嶋義雄**, 河野雄平, C a 拮抗薬 U p - t o - D a t e C a 拮抗薬との併用療法: ベストコンビネーションは?, 血圧, 査読無、17 巻、2010、59-64、
http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=201002255012047984

- 21 **岩嶋義雄**、メタボリックシンドロームとCKD合併と心血管リスク、血圧、査読無、17巻、2010、486-487、
<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ae6keatd&vo=17&nu=6>

[学会発表] (計8件)

- ① **岩嶋義雄**、Serial Changes in Renal Function as a Prognostic Indicator in Advanced Heart Failure Patients with Pulsatile Left Ventricular Assist System Serial Changes in Renal Function as a Prognostic Indicator in Advanced Heart Failure Patients with Pulsatile Left Ventricular Assist System、第76回日本循環器学会総会、2012年3月18日、福岡
- ② **岩嶋義雄**、本態性高血圧における臓器障害評価としての腎血流測定の有用性、第9回腎と高血圧 Update、2011年12月3日、東京
- ③ **岩嶋義雄**、Ca拮抗薬最大投与量での降圧不十分症例におけるCa拮抗薬+ARB併用療法の降圧効果についての検討、第34回日本高血圧学会総会、2011年10月21日、宇都宮、
- ④ **岩嶋義雄**、高血圧患者での糖尿病・慢性腎臓病合併と心臓左室拡張能障害について、第19回大阪臨床高血圧研究会、2011年7月7日、大阪、
- ⑤ **岩嶋義雄**、高血圧患者の心血管系疾患予測因子としての心臓左室拡張機能障害について、第12回KK21 抗老化・高血圧研究会、2011年4月28日、大阪、
- ⑥ **岩嶋義雄**、Effect of Left Ventricular Assist System Implantation on Doppler Measurements of Renal Circulation in Patients with Advanced Heart Failure、第76回日本循環器学会総会、2011年3月18日、横浜、
- ⑦ **岩嶋義雄**、メタボリックシンドロームとCKDの合併と心血管疾患リスクとの関係、第18回大阪臨床高血圧研究会、2010年7月8日、大阪、
- ⑧ **岩嶋義雄**、メタボリックシンドロームと慢性腎臓病を合併した高血圧の心血管病リスクとその機序の解明、2010年7月3日、第二回腎疾患と高血圧研究会、東京、

[図書] (計3件)

- ① **岩嶋義雄**、福田哲也、河野雄平、診断と治療社、原発性アルドステロン症診療マニュアル、2011、111、115、146、
- ② **岩嶋義雄**、河野雄平、診断と治療社、内分泌画像検査・診断マニュアル、2011、184-199、

- ③ **岩嶋義雄**、メディカルレビュー社、予防とつきあい方シリーズ ～脂質異常症・肥満～動脈硬化～、2011、164-165、

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩嶋 義雄 (IWASHIMA YOSHIO)

独立行政法人国立循環器病研究センター

高血圧・腎臓科・医長

研究者番号：80448068

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：