

Title	若年非糖尿病肥満患者における肥満・糖尿病関連遺伝子resistinの血中濃度と遺伝子多型の検討
Sub Title	
Author	東, 宏一郎(Azuma, Koichiro) 猿田, 享男(Saruta, Takao)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.2 (2005. 6) ,p.T39- T54
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050601-0039

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

若年非糖尿病肥満患者における肥満・糖尿病関連遺伝子
resistin の血中濃度と遺伝子多型の検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

あずま 東 こういちろう 宏一郎

(平成 16 年 5 月 13 日受付)

Key Words : resistin, obesity, insulin resistance, body composition, single nucleotide polymorphism

背景

インスリンは血糖降下に働く唯一のホルモンである。血糖に応じた膵臓からのインスリン分泌と、インスリン作用臓器である筋肉・肝臓などでのインスリン感受性がバランスされることによって、血糖値は正常に維持される。インスリン分泌またはインスリン感受性の低下により両者のバランスがくずれると、高血糖となり糖尿病を発症する。最近の急激な糖尿病患者の増加の原因の一部は、肥満人口の増加で説明される¹⁾。肥満によりインスリン抵抗性が増大し、相対的なインスリン作用不足を生ずるためと考えられているのである。

肥満とインスリン抵抗性が関連する機序として、脂肪組織から分泌されるサイトカインが注目されている。従来、脂肪組織は単なるエネルギー貯蔵庫と考えられていた。しかし、遺伝子解析から実際にはその発現蛋白の約 20-30% が分泌蛋白であり²⁾、摂食抑制に働く leptin、インスリン抵抗性改善、抗動脈硬化に働く adiponectin、逆にインスリン抵抗性を惹起する tumor necrosis factor- α (以下 TNF- α と略す)、interleukin-6 (以下 IL-6 と略す)、血栓形成に関係する plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) などを分泌する生体最大のホ

ルモン臓器であることが明らかになった。これら脂肪組織由来のサイトカインは総称して adipocytokine と呼ばれ、肥満により脂肪組織が増大した結果、adipocytokine の発現が変化することが、インスリン抵抗性につながると考えられている³⁾。

Resistin はマウスにおいて、インスリン抵抗性改善薬のチアゾリジン系薬剤で発現が抑制される遺伝子のクローニングにより発見された adipocytokine である⁴⁾。脂肪細胞の成熟や、マウスの肥満化で発現が増大し、リコンビナント投与でインスリン抵抗性を惹起し、抗体投与でインスリン抵抗性を改善することも同時に示され⁴⁾、肥満とインスリン抵抗性を結び付けるホルモンと考えられている。当初は、肥満モデルマウスで resistin messenger RNA (以下 mRNA と略す) 発現が低下することや⁵⁾、マウス白色脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞でみたインスリン、糖、ステロイドの投与に対する resistin 発現の変化は報告により異なることから、その意義には不明の部分が多かった⁶⁾。しかし最近になり、resistin がインスリンによる肝臓の糖新生の抑制を阻害する⁷⁾、骨格筋における glucose transporter-4 (GLUT-4) 非依存性の糖とりこみを阻害する⁸⁾など、インスリン抵抗性改善の機序に関する報告がなされ、また生理的な血糖調

本論文は Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T : Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res* 11 : 997-1001, 2003 の一部, Azuma K, Oguchi S, Matsubara Y, Mamizuka T, Murata M, Kikuchi H, Watanabe K, Katsukawa F, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T : Novel resistin promoter polymorphisms : association with serum resistin level in Japanese obese individuals. *Horm Metab Res* 36 : 564-570, 2004 の一部, 東宏一郎, 勝川史憲, 小口修司, 佐々木誠一, 小熊祐子, 成田和穂, 木下訓光, 石田浩之, 大西祥平, 山崎元, 島田朗, 猿田享男: 肥満者におけるレジスチンと運動耐容能の検討. *日本臨床スポーツ医学会誌* 12 : 260-265, 2004 の一部および NCBI SNP database rs3219175-3219178 (ss4480589-4480592) を含む。

節への関与も示され⁹⁾, Stepan らの報告⁴⁾の裏付けがなされつつある。

一方, ヒトでの resistin の意義には不明な点が多い。ヒトでも, 脂肪組織中の resistin mRNA がインスリン抵抗性指数と関連する報告や¹⁰⁾, resistin mRNA が大腿脂肪に比べ腹部脂肪に多く含まれ, resistin と中心型肥満やインスリン抵抗性との関連を示唆する報告^{11), 12)}がある。しかし, 遺伝子および蛋白レベルでヒト resistin とマウス resistin の相同性は 60%にすぎず¹³⁾, その機能, 発現部位が大きく異なる可能性も指摘されている¹⁴⁾。またヒトでの resistin のインスリン抵抗性改善メカニズムの報告はなく, resistin と肥満, インスリン抵抗性との関連を否定する報告や^{15), 16)}, ヒトでは resistin は脂肪細胞より単球系細胞で主に発現しているとする報告もある^{15), 16), 17), 18), 19)}。

Resistin 遺伝子多型については, 糖尿病患者と非糖尿病患者の間での多型頻度の比較が行われており, 差があるとする報告^{20), 21)}, ないとする報告^{22), 23), 24)}がある。また遺伝子多型と, 空腹時血糖・インスリンより求められるインスリン抵抗性指標との関連^{22), 25)}, body mass index (以下 BMI と略す) との関連²⁶⁾も報告されている。

本研究では, インスリン抵抗性に関して 75 g 糖負荷試験による食後血糖・インスリンの評価, 体組成に関して水中体重秤量法を用いた体脂肪率・体脂肪量の評価, および腹部 CT スキャンを用いた体脂肪分布の評価など, 対象の表現型をより詳細に検討したうえで, resistin 遺伝子多型の探索, resistin 血中濃度の測定を行い, 表現型との関連を検討することを目的とした。上記 resistin 遺伝子多型と表現型の関連は, 非糖尿病患者で関連が強いこと^{22), 26)}, 肥満者で関連が強いこと^{20), 22)}が示唆されており, 本研究では非糖尿病肥満患者を対象とした。さらに, 一部の症例では, 1.5 年の食事と運動による介入前後の長軸的検討や運動耐容能の検討もあわせて行った。

対 象

対象は当院肥満外来通院中の日本人男女 70 名 (男 36/女 34) である。全例, 無投薬の症例で, 75 g 糖負荷試験を施行して糖尿病でないことを確認した。また, 事前に十分な説明と同意によるインフォームドコンセントを得た。

1. Resistin 血中濃度の臨床的検討は, 再診患者を除いた 64 名 (男 31/女 33) を対象とし, 非肥満者 15 名とも比較した。64 名中 35 名 (男 17/女 18) で, 食事と運動による介入前後の長軸的検討を行い,

64 名中 38 名 (男 13/女 25) で, 運動耐容能との関連を検討した。

2. Resistin 遺伝子の解析を, 70 名中 60 名 (男 30/女 30) で行い, 対象をインスリン抵抗性指数をもとにインスリン感受性群とインスリン抵抗性群各 30 名にわけて比較した。遺伝子解析研究は慶應義塾大学医学部倫理審査委員会にて承認を得た。

方 法

1. Resistin 血中濃度の臨床的検討

体組成および体脂肪分布

体組成は, 水中体重秤量法 (AD-6204; A&D 社, 東京) を用いて評価した。すなわち, 水中体重より体密度を求め, 下記に示す Brozek の式より体脂肪を算出した。

$$\text{体脂肪率 (\%)} = (4.570 / \text{体密度} - 4.142) \times 100$$

腹部体脂肪分布は, 臍部レベルでの腹部 CT スキャンを用いて評価した。すなわち, 臍高部レベルの断面の脂肪面積 (-150~-50 Hounsfield units) を内臓脂肪と皮下脂肪にわけて求めた。

インスリン感受性の評価および各種血液指標

180 分の 75 g 糖負荷試験を全例に行い, 血糖, 血中インスリン (IRI) をそれぞれ 0, 30, 60, 90, 120, 180 分, 0, 30, 60, 120, 180 分に測定し, インスリン感受性を評価した。平均血糖と平均 IRI は, それぞれ 180 分間の糖負荷試験中の血糖, IRI 曲線面積を 180 (分) で割って算出したもので, 負荷試験中のそれぞれの平均を表し, 平均 IRI はインスリン抵抗性の指標の一つである²⁷⁾。Homeostasis model assessment を用いたインスリン抵抗性指標 (以下 HOMA-IR と略す)²⁸⁾も下記の式より算出した。

$$\text{HOMA-IR} = \text{空腹時血糖 (mg/dl)} \times \text{空腹時 IRI (\mu\text{U/ml})} / 405$$

各種血液サンプルは空腹時に採血を行った。血糖は glucose oxidase 法を, IRI は enzyme immunoassay (EIA) kit (東ソー社, 東京) を用いて測定した。

Resistin 血中濃度は, enzyme-linked immunosorbent assay (以下 ELISA と略す) kit (Biovendor 社, Czech Republic) を用いて測定した。TNF- α , IL-6 血中濃度も ELISA kit (Golden Bridge 社, USA) を用いて測定した。

運動負荷試験

症候限界性運動負荷試験は独自に作成したプロトコル

ルで行った^{29), 30)}。すなわち 3.2 km/hr, 0%の傾斜より開始し, 2分間毎に傾斜を3%ずつ増加させ, Stage5にて12%の傾斜となった後, Stage6以降は速度を0.8 km/hr ずつ増加させた。本プロトコルは, 初期負荷量および負荷量の増加を最初小さく設定しており, 生活習慣病の予防・治療の対象となる幅広いフィットネスレベルの患者で評価が可能なプロトコルである³¹⁾。

運動後60分以上休憩し, 安静時心拍数に戻ったのを確認したのち, 1.5%の傾斜でトレッドミルで歩行させ, 50%心拍予備能の速度を確認した。50%心拍予備能は1998年のアメリカスポーツ医学会のガイドライン³²⁾に照らして肥満者における運動処方として適した強度と考えられ, 以下の式で計算される。

$$50\% \text{心拍予備能} = \text{安静時心拍数} + (\text{最大心拍数} - \text{安静時心拍数}) \times 0.5$$

運動耐容能の指標として, 最大負荷時までの走行時間は身体的フィットネスの最も一般的な指標である最大酸素摂取量と強い正の相関があることが報告されており³³⁾, このプロトコルでの運動継続時間および50%心拍予備能での歩行速度を, 運動耐容能の指標とした³⁴⁾。

1.5年後の再評価

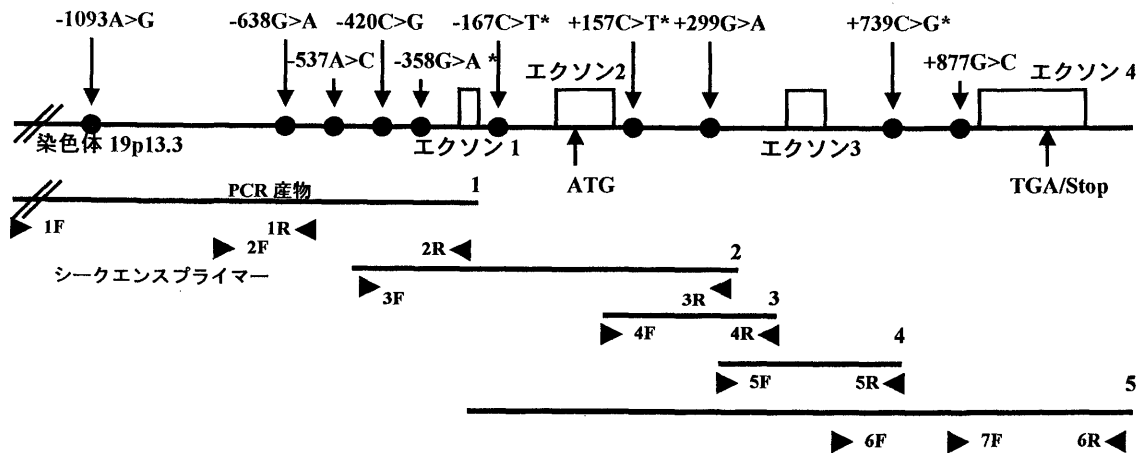
35名で, 1.5年間の食事と運動による介入後に上記

指標を再評価した。介入方法は, 食事は摂取エネルギー量を現在より500-1000 kcal減らすこと, 脂肪のエネルギー比率を20%にすることを指導した。運動は週に2-3回, 30分間, 50%心拍予備能の強度でウォーキングすることと, ほぼ毎日, 合計で30分以上身体活動を増やすことを指導した。1ヶ月毎の診察時に食事日記, 運動日記も用いて評価した。

2. Resistin 遺伝子の解析

Resistin-塩基遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism, 以下 SNP と略す) の同定

第1図, 第1表に示すように5対の polymerase chain reaction (以下 PCR と略す) 用のプライマーと13個のシーケンスプライマーを用いて resistin 遺伝子全体をシーケンスし, resistin SNPs の探索を行った。resistin エクソン1, 2, 3およびイントロン1, 2は, GenBank #AF325730のデータよりPCRプライマー2, 3, 4(第1表参照)を作成しPCR産物を得た。反応組成は0.5 μlの全血, 25 pmolの forward/reverse プライマー, 10 nmol/lの deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 10 μlの 5×Ampdirect (島津製作所, 大阪), 10 μlの 5×Ampaddition-1, 1.25 Uの Taq polymerase (東洋紡, 大阪)で, 蒸留水を加えて全量を50 μlとした。PCRはGene Amp PCR sys-



第1図 Resistin 遺伝子の構造と遺伝子多型の部位。

5'末端部位は翻訳開始部位を+1として定義した。Resistin 遺伝子は19番染色体に位置し, 3つの翻訳領域のエクソンと5'末端川の非翻訳領域の1つのエクソンよりなる (GenBank accession no. AF 325730)。黒線はPCR産物1-5を, 黒三角はシーケンスプライマー1F-7F, 1R-6F(第1表参照)の位置を, それぞれ表している。黒丸同定した遺伝子多型の部位を示し, そのうち*印のついた多型はNCBI SNP databaseに以前報告している (Reference SNP ID: rs3219175-3219178, NCBI Assay ID: ss4480589-448059s)。 (Azuma K, et al: Horm Metab Res (in press) の Figure 1 を許可を得て転載)

第1表 PCRプライマーとシーケンスプライマー塩基配列3

PCR プライマー		塩基数
プライマー1 (プロモーター)	Forward 5' GGCAGTGGTGGCTACATAACA 3' (-2134/-2114) Reverse 5' CGCAGGAGCAGCTGTCACCTTAC 3' (-184/-205)	1951
プライマー2 (エクソン1, 2)	Forward 5' ACTCTGCTTGTCTACCTGTT 3' (-507/-488) Reverse 5' TGTCTTGAGTTGGGTGTTTT 3' (365/346)	872
プライマー3 (イントロン2)	Forward 5' GAGAGGATCCAGGAGGTCG 3' (88/106) Reverse 5' GTGAGACCAAACGGTCCCT 3' (460/442)	373
プライマー4 (エクソン3)	Forward 5' CCCGCTCTCACTCCAAACCT 3' (315/334) Reverse 5' GAGGCTCCAACCACTGAATG 3' (774/755)	460
プライマー5 (エクソン2, 3, 4)	Forward 5' GGAATTCGTGTGCCGATTTT 3' (-248/-229) Reverse 5' CCATAGGAGGAAGGCGATG 3' (1259/1278)	1526
シーケンスプライマー		
プライマー1F	Forward 5' AAAGGCCCGTTGTACTGGAA 3' (-1271/-1252)	プロモーター
プライマー1R	Reverse 5' TTGCTAGGCATGGTGC GGAC 3' (-555/-574)	
プライマー2F	Forward 5' GCTCATGGGCATTTGGGTAT 3' (-776/-757)	プロモーター
プライマー2R	Reverse 5' CCTCTCGGTGGGCTCAGCTA 3' (-206/-225)	
プライマー3F	Forward 5' GGGCACCACTCCTGAAACAG 3' (-456/-437)	エクソン1, 2
プライマー3R	Reverse 5' TTGGGTTTGGAGCCGTGGAT 3' (312/293)	
プライマー4F	Forward 5' GAGAGGATCCAGGAGGTCG 3' (88/106)	イントロン2
プライマー4R	Reverse 5' GTGAGACCAAACGGTCCCT 3' (460/442)	
プライマー5F	Forward 5' CCCGCTCTCACTCCAAACCT 3' (315/334)	エクソン3
プライマー5R	Reverse 5' GAGGCTCCAACCACTGAATG 3' (774/755)	
プライマー6F	Forward 5' CGCCCATTTCTGTTC AAGT 3' (599/618)	エクソン4
プライマー7F	Forward 5' TGTGTTCCGGGCTGCAGGCT 3' (876/894)	
プライマー6R	Reverse 5' GTAGAAAGTCGCGGTGTCCC 3' (1253/1234)	
SNuPe プライマー		
-1093	Reverse 5' GCACCATAGCAAGACTCCA 3' (-1074/-1092)	プロモーター
-638	Forward 5' TGTGATCATAAGTCACTGTAGCTTC 3' (-663/-639)	プロモーター
-420	Forward 5' CCTGACCAGTCTCTGGACATGAAGA 3' (-445/-421)	プロモーター
-358	Reverse 5' CCCACATCCGGGGCCAAGAGGAAGC 3' (-333/-357)	プロモーター
-167	Forward 5' GCGCTTGCCATGGCACCAAG 3' (-186/-168)	イントロン1
157	Forward 5' GGCAAGCTCCCAAGGGTCT 3' (137/156)	イントロン2
739	Forward 5' CTGGACACTGGTGTCCACCCCTCACT 3' (714/738)	イントロン3
877	Forward 5' CCCAGCTCAGAGTCCACGCTCCT 3' (854/876)	イントロン3

(Azuma K, et al : Horm Metab Res (in press) の Table 2 を許可を得て転載)

tem 2400 (Perkin Elmer 社, USA) を用いて, 80°C 15分1サイクル, 94°C4.5分1サイクル, 94°C0.5分/56°C1分 (プライマー2, 3) もしくは60°C1分 (プライマー1)/72°C1分を40サイクル, 72°C7分を1サイクルで行った. プロモーター領域およびエクソン4は上述の方法でPCR増幅できなかったため, ゲノムDNAを末梢血より抽出・精製の上, 前者はEx Taq polymerase (タカラ酒造, 東京), 後者はKOD plus (東洋紡)+5%dimethyl sulphoxide (DMSO) を polymeraseとして用いた. 前者の反応プロトコールは94°C4.5分1サイクル, 94°C0.5分/65°C1分/72°C1分を35サイクル, 72°C4分1サイクルで, 後者は94°C

2分1サイクル, 94°C0.25分/60°C0.5分/68°C2分を35サイクルとした. PCR産物を精製後, DYEnamic ET dye terminator kit (Amersham Pharmacia Biotech 社, USA) を用いて MegaBACE1000 (Amersham Pharmacia Biotech 社) でダイレクトシーケンスを行い, 塩基の決定を行った. 見出されたSNPs候補につき, MegaBACE SNuPe Genotyping kit (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いて第1表に示すSnuPeプライマーでSNPsタイピングを行った. なお, -537A>C, +299G>A多型に関してはこの方法でタイピングは行っておらず, ダイレクトシーケンスによる確認のみである.

Resistin プロモーター領域の SNPs による転写調節

900 塩基対の DNA 断片 (-1094/-194 塩基) を PCR で増幅した後、TA cloning kit (Invitrogen 社, USA) を用いてプラスミドを作成し、Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE 社, USA) を用いて-638G 塩基から-638A 塩基、-420C 塩基から-420G 塩基への点突然変異を有するプラスミドを作成した。-638G>A、-420C>G 塩基のみ異なる 4 種類のプラスミドをそれぞれ、ホタル由来の発光物質 (firefly luciferase) を発現するレポータープラスミドでプロモーターやエンハンサーをもたない pGL3-Basic (Promega 社, USA) と、制限酵素断端 (Mlu1 および Xho1, 東洋紡) を用いてライゲーションし、4 種類のレポータープラスミド、すなわち pGL3 (-638G/-420C), pGL3 (-638A/-420C), pGL3 (-638G/-420G), pGL3 (-638A/-420G) を作成した。ダイレクトシーケンスで-638G>A および-420C>G 以外に変異のないことも確認した。

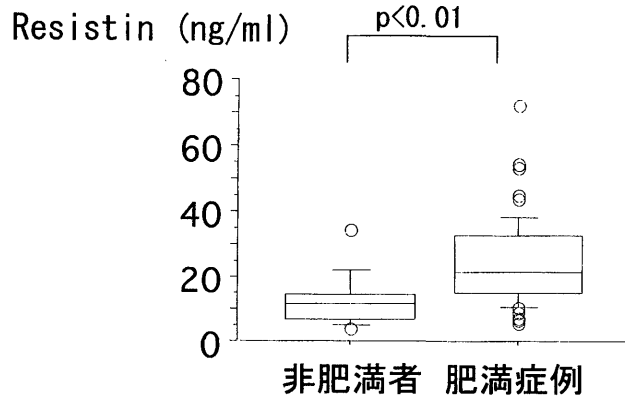
ヒトでは、resistin はマウスとちがいで、脂肪細胞よりむしろ単球系細胞から発現されていると報告されている^{14), 17), 18), 19)}。そこで 3T3-L1 細胞 (American Type Culture Collection CCL92.1; ATCC, USA) だけでなく、ヒト単球系細胞由来の THP-1 細胞 (American Type Culture Collection TIB202; ATCC) およびヒト脂肪細胞 (F-SP-F; Zen-Bio 社, USA) へ FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics 社, USA) を用いてトランスフェクション法により遺伝子導入を行った。Luciferase 活性の測定は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用いてマニュアルにそって行った。4 種類の pGL3 プラスミドのほかに、pGL3-Basic と、エンハンサーおよびプロモーターをもつ pGL3-Control を luciferase 活性比をみるために用い、さらに、ウミシイタケ由来の発光物質 (renilla luciferase) を発現するレポータープラスミドを pGL3 プラスミドと共にトランスフェクションさせることで、トランスフェクション効率の補正を行った。トランスフェクション 48 時間後にホタルおよびウミシイタケの発光度 (luciferase 活性) を測定し、4 種類の pGL3 プラスミドに対応した resistin プロモーターの転写活性を下記のように計算した; luciferase 活性 (relative luciferase activity, %) = $\frac{\text{(pGL3 プラスミド)} - \text{(pGL3-Basic)}}{\text{(pGL3-Control)} - \text{(pGL3-Basic)}} \times 100$ 。THP-1 細胞, 3T3-L1 細胞の両者で、予備実験において、pGL3 (-638A/-420G) の luciferase 活性はその他 3 種類の pGL3 プラスミドの活性より高い

ことを確認した上で、pGL3 (-638A/-420G) と pGL3 (-638G/-420C) の luciferase 活性をくり返し測定した。PGL3 (-638A/-420G) は変異 P, pGL3 (-638G/-420C) は正常 P と定義した。

統計

統計解析は Macintosh 用の Stat View プログラム (version 5.0-J; SAS Insutitute 社, USA) で行った。すべてのデータは平均値±標準偏差として表し、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と解釈した。

(対応のない) 2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を、対応のある 2 群間の比較 (介入前後での比較) には Wilcoxon 検定を、(対応のない) 3 群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を用いた。2 変量の相関の検討は Spearman's correlation coefficient を用いた。年齢や性での補正など、Stepwise 回帰分析を行う際には、データを対数化して、Shapiro-Wilk's W 検定で正規性を確認したのち、解析を行った。比率の比較には χ^2 検定を用いた。連鎖不平衡 (δ) は文献^{35), 36)}に従い求めた。Luciferase 活性は正常 P と変異 P の間で、トランスフェクションした日時による変動を除くためこれを共変量として共変量分散分析で比較した。



第2図 Resistin 血中濃度の比較。

Resistin 血中濃度 (平均±標準偏差) は肥満症例で 24.6 ± 12.9 ng/ml (5.6~72.4) と、非肥満者 12.8 ± 8.3 ng/ml (3.7~34.6) と比較して有意に高値であった。(Azuma K, et al: *Obes res* 11: 997-1001, 2003 の Figure 1 を許可を得て転載)

第2表 患者背景ならびに血中濃度との相関

	平均±標準偏差	範囲	ρ	p
性別 (男/女)	31/33		-	-
年齢 (歳)	32±10	20~53	-0.14	0.27
BMI	32.9±5.6	24.9~56.2	0.14	0.26
体脂肪率 (%)	36.6±8.1	17.8~55.3	0.24	0.06
体脂肪量 (kg)	33.6±11.6	13.9~79.8	0.17	0.18
除脂肪体重 (kg)	57.2±11.9	34.5~89.3	-0.11	0.41
内蔵脂肪面積 (cm ²)	145±54	65~272	0.08	0.55
皮下脂肪面積 (cm ²)	365±135	151~655	0.19	0.14
空腹時血糖 (mg/dl)	93±9	62~113	-0.01	0.95
空腹時 IRI (μU/ml)	14±7	3~33	0.12	0.36
HOMA-IR	3.2±1.8	0.6~7.8	0.12	0.36
平均血糖 (mg/dl)	127±19	88~172	0.11	0.39
平均 IRI (μU/ml)	75±39	27~176	0.14	0.26
TNFα (pg/ml)	2.23±2.57	0.76~21.2	0.04	0.77
IL-6 (pg/ml)	0.81±1.37	<0.15~7.54	0.17	0.18
Resistin (ng/ml)	24.6±12.9	5.6~72.4	-	-
(非肥満者)				
性別 (男/女)	10/5			
年齢 (歳)	36±10	24~52		
BMI	21.1±1.3	18.8~23.7		
Resistin (ng/ml)	12.8±8.3	3.7~34.6		

(Azuma K, et al : Obes res 11 : 997-1001, 2003 の Table 1 の一部を許可を得て転載)

第3表 介入前後の臨床的特徴の変化 (35名, 男17/女18)

	前値	介入後	変化率 (%)	
			平均±標準偏差	範囲
BMI	33.1±6.2	31.6±5.8*	-4.0±9.8	-22.7~16.8
体脂肪率 (%)	36.3±9.1	34.4±7.7*	-5.4±13.8	-34.5~24.5
体脂肪量 (kg)	33.4±13.7	30.0±10.9*	-6.5±21.2	-35.2~40.8
除脂肪体重 (kg)	57.0±11.7	56.3±11.7	-1.2±5.5	-17.5~6.6
内蔵脂肪面積 (cm ²)	144±55	130±60	-4.3±39.7	-65.6~90.7
皮下脂肪面積 (cm ²)	353±137	327±131*	-4.5±22.2	-46.5~49.5
空腹時血糖 (mg/dl)	97±9	92±12*	-4.0±11.8	-26.7~48.4
空腹時 IRI (μU/ml)	15±8	12±7*	-10.4±42.1	-70~100
HOMA-IR	3.40±1.94	2.24±1.19*	-11.1±50.5	-75~129.3
平均血糖 (mg/dl)	135±21	126±22	-9.2±18.6	-67~15.4
平均 IRI (μU/ml)	86±44	68±41*	-16.8±30.4	-65~42.6
TNFα (pg/ml)	2.6±3.4	2.1±2.9*	-16.3±35.2	-77.4~78.0
IL-6 (pg/ml)	1.1±1.7	1.5±2.5	91.0±372.7	-100~2000
Resistin (ng/ml)	24.06±15.64	22.74±15.00	-1.4±40.5	-49.5~162.6

*印は介入前後の値を Wilcoxon 検定を用いて比較し有意差を認めたものを示した (p<0.05).

(Azuma K, et al : Obes res 11 : 997-1001, 2003 の Table 2 の一部を許可を得て転載)

結 果

1. Resistin 血中濃度の臨床的検討

肥満症例の resistin 血中濃度は非肥満者に比し高値であった (24.58±12.93 ng/ml ; n=64 vs. 12.83±8.30 ng/ml ; n=15 ; p<0.01, 第2図). 非肥満者と肥満症例を合わせた検討でも resistin 血中濃度は BMI と正相関し, 年齢と性で補正してもなお有意であった (p<0.01).

しかし, 肥満症例に限った断面的検討では resistin 血中濃度は年齢, 性, BMI, 体組成, 体脂肪分布, HOMA-IR, 75 g OGTT 中の平均血糖・平均 IRI, TNF-α, IL-6 のいずれとも相関しなかった (第2表). ただし, resistin 血中濃度は体脂肪率とは弱い正の相関が示唆された (p=0.06).

このうち 35 名で 1.5 年の食事と運動による減量介入を行った. 平均 4% の体重減少があり, 全体として体組成やインスリン抵抗性の著明な改善を認めた (第3表). 減量プログラム後に体重増加を認めるものもあり, 体脂肪量が 1 kg 以上減少したものを改善群 (21 名), 減少しなかったもしくは増加したものを非改善群 (14 名) として 2 群にわけると, 改善群では体重は平均 10% 減少しており, 非改善群では平均 5% 体重増加を認めた. Resistin 血中濃度は介入の前後で, 全体として変化しなかったが, 改善群では有意に低下し (-17±19%, p<0.01), 非改善群では増加した (23±52%, 第3図). そして, resistin 血中濃度の変化率は BMI, 体脂肪率, 体脂肪量, 内臓脂肪面積, 平均血糖, 平均 IRI のそれぞれの変化率と正相関し, 年齢, 性および介入前の体重で補正してもなお有意であった (第4表). Stepwise 回帰分析を行うと resistin 血中濃度の変化率は体脂肪量の変化率とのみ有意に相関した (R²=0.286).

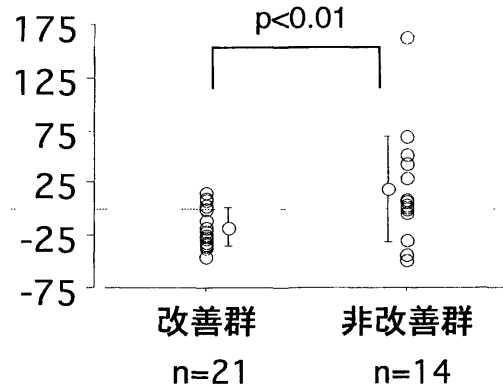
第5表に示した 38 名で, 前述のプロトコールでの運動継続時間は平均 16.4 分で, 50% 心拍予備能での歩行速度は 4.9 km/hr であり, 両者には有意な正相関があった (r=0.65, p<0.01). 運動継続時間, 歩行速度ともに, 体組成の指標である BMI, 体脂肪率, 体脂肪量, および皮下脂肪面積と負の相関があった (第6表). また, 歩行速度は身長および除脂肪体重と正相関し, 一方運動継続時間は体重と弱い負の相関があった (第6表). インスリン抵抗性の指標である空腹時 IRI, HOMA-IR, 平均 IRI と, 運動耐容能との関連をみると, 歩行速度が空腹時 IRI と弱い負の相関を示したほかは, 相関がなかった (第6表). Resistin 血中濃度も運動継続時間, 歩行速度と相関しなかった (第6表).

2. Resistin 遺伝子の解析

Resistin SNPs の同定

対象は若年 (平均年齢 32±10 才), 非糖尿病かつ肥満 (平均 BMI 33±5) の 60 名であった (第7表参照). 全例での resistin 遺伝子全体のシーケンススクリーニングおよび SNP タイピングの結果, プロモーター領域に 5 個, イントロン領域に 5 個, 計 10 個の non-coding resistin SNPs を同定した (第1図). このうち,

Resistin変化率 (%)



第3図 改善群と非改善群

1.5 年の食事と運動による介入後, 体脂肪量が 1 kg 以上減少した場合を改善, 減少しなかったもしくは増加した場合を非改善とすると, 改善群では resistin 血中濃度は有意に低下し (-17±19%, p<0.01), 非改善群では増加した (23±52%).

第4表 Resistin の変化率と各種パラメータの変化率との相関

	ρ	p	p*
BMI	0.39	0.02	<0.01
体脂肪率	0.4	0.03	<0.01
体脂肪量	0.44	0.02	<0.01
除脂肪体重	0.2	0.26	
内臓脂肪面積	0.5	<0.01	0.01
皮下脂肪面積	0.32	0.06	
空腹時血糖	0.29	0.08	
空腹時 IRI	0.26	0.12	
HOMA-IR	0.27	0.11	
平均血糖	0.4	0.02	0.03
平均 IRI	0.5	<0.01	0.01
TNFα	0.25	0.14	
IL-6	0.13	0.45	

p*は stepwise 回帰分析を用いて性, 年齢, BMI で補正した値を示した. (Azuma K, et al : Obes res 11 : 997-1001, 2003 の Table 3 の一部を許可を得て転載)

第5表 運動耐容能検討症例

	平均±標準偏差
性別 (男/女)	13/25
年齢 (歳)	33±9
BMI	33.1±4.8
体脂肪率 (%)	38.2±6.9
体脂肪量 (kg)	33.5±8.9
除脂肪体重 (kg)	53.7±9.9
内蔵脂肪面積 (cm ²)	147±48
皮下脂肪面積 (cm ²)	375±139
運動継続時間 (分)	16.4±3.1
歩行速度 (km/hr)	4.9±0.6
空腹時血糖 (mg/dl)	94±10
空腹時 IRI (μU/ml)	15±7
HOMA-IR	3.5±1.6
平均血糖 (mg/dl)	132±21
平均 IRI (μU/ml)	80±41
Resistin (ng/ml)	24.3±14.4

(東宏一郎, 他: 日本臨床スポーツ医学会誌 12: 260-265, 2004 の表2の一部を許可を得て転載)

第6表 運動耐容能と各種パラメータとの相関

	継続時間		歩行速度	
	ρ	p	ρ	p
年齢	0.03	0.85	0.16	0.34
身長	0.27	0.11	0.62	<0.01
体重	-0.35	0.04	-0.22	0.18
BMI	-0.57	<0.01	-0.67	<0.01
体脂肪率	-0.56	<0.01	-0.79	<0.01
体脂肪量	-0.61	<0.01	-0.70	<0.01
除脂肪体重	0.02	0.92	0.35	0.04
内蔵脂肪面積	-0.10	0.54	-0.05	0.76
皮下脂肪面積	-0.56	<0.01	-0.71	<0.01
空腹時血糖	0.06	0.71	0.14	0.40
空腹時 IRI	-0.22	0.20	-0.38	0.03
HOMA-IR	-0.19	0.26	-0.26	0.12
平均血糖	0.11	0.72	-0.11	0.35
平均 IRI	-0.24	0.73	-0.12	0.33
Resistin	<-0.01	0.99	-0.11	0.52

(東宏一郎, 他: 日本臨床スポーツ医学会誌 12: 260-265, 2004 の表3の一部を許可を得て転載)

第7表 Resistin 遺伝子検討症例

	インスリン感受性群	インスリン抵抗性群	p
年齢 (歳)	31.9±9.7	32.3±9.6	NS
性別 (男/女)	15/15	15/15	
BMI	32.6±4.9	32.8±4.6	NS
体脂肪率 (%)	36.2±7.8	36.7±6.9	NS
体脂肪量 (kg)	32.9±9.2	33.0±9.1	NS
除脂肪体重 (kg)	58.0±12.9	56.5±10.6	NS
内蔵脂肪面積 (cm ²)	156.5±51.9	138.3±50.2	NS
皮下脂肪面積 (cm ²)	353.4±130.2	363.8±131.9	NS
空腹時血糖 (mg/dl)	89.7±7.5	96.6±7.9	p<0.001
空腹時 IRI (μU/ml)	10.1±4.3	17.8±6.0	p<0.001
HOMA-IR	2.22±0.98	4.22±1.40	p<0.001
平均血糖 (mg/dl)	119.5±15.4	132.4±18.2	p<0.001
平均 IRI (μU/ml)	56.6±24.5	90.1±38.8	p<0.001
総コレステロール (mg/dl)	202.4±41.8	203.8±34.2	NS
中性脂肪 (mg/dl)	116.1±53.4	127.1±62.0	NS
HDL コレステロール (mg/dl)	47.2±2.1	47.6±2.2	NS
LDL コレステロール (mg/dl)	130.2±27.9	132.0±37.0	NS
TNFα (pg/ml)	1.80±0.79	1.88±0.83	NS
IL-6 (pg/ml)	1.00±1.94	0.56±0.55	NS
Resistin (ng/ml)	23.8±9.1	24.0±15.1	NS

第 8 表 SNP とインスリン感受性

		Genotypes, n			p 値	Alleles, n		p 値
-1093A>G		AA	AG	GG	0.18	A	G	0.2
	IR	27	3	0		57	3	
	IS	22	8	0		52	8	
-638G>A		GG	GA	AA	0.86	G	A	0.82
	IR	18	11	1		47	13	
	IS	20	9	1		49	11	
-537A>C		AA	AC	CC	>0.99	A	C	>0.99
	IR	28	2	0		58	2	
	IS	28	2	0		58	2	
-420C>G		CC	CG	GG	0.78	C	G	>0.99
	IR	11	18	1		40	20	
	IS	12	16	2		40	20	
-358G>A		GG	GA	AA	0.86	G	A	0.82
	IR	18	11	1		47	13	
	IS	20	9	1		49	11	
-167C>T		CC	CT	TT	0.49	C	T	0.49
	IR	30	0	0		60	0	
	IS	29	1	0		59	1	
157C>T		CC	CT	TT	0.3	C	T	0.32
	IR	27	3	0		57	3	
	IS	24	6	0		54	6	
299G>A		GG	GA	AA	0.29	G	A	0.25
	IR	9	18	3		36	24	
	IS	15	13	2		43	17	
739C>G		CC	CG	GG	0.7	C	G	0.58
	IR	10	9	11		29	31	
	IS	11	11	8		33	27	
877C>G		CC	CG	GG	0.39	C	G	0.21
	IR	20	8	2		48	12	
	IS	15	11	4		41	19	

IR：インスリン抵抗性群

IS：インスリン感受性群

-358G>A 多型, -167C>T 多型, +157C>T 多型, +739C>G 多型の 4 つの SNPs は, National Center for Biotechnology Information (以下 NCBI と略す) SNP database へ新しい SNPs として登録を行った (Reference SNP ID : rs3219175 - 3219178, NCBI Assay ID : ss4480589-4480592).

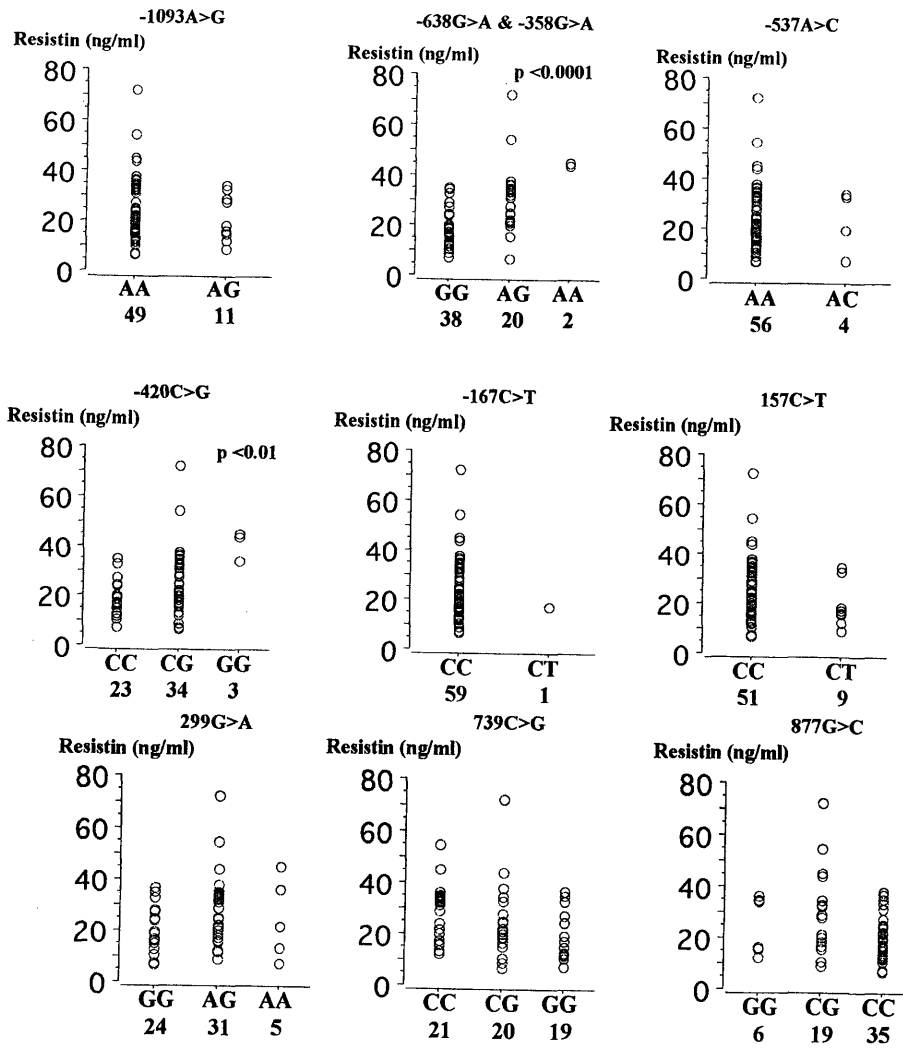
なお, 本症例での -638G>A 多型, -358G>A 多型の allele 頻度 (0.20) は, 白人での報告に比べ (0.01 以下) 極めて高かったが, 白人での報告同様に両多型は 100%連鎖不平衡した。299G>A, 877G>C の allele 頻度も白人での報告に比して高かった (0.34, 0.74)。

Resistin SNPs とインスリン抵抗性, 体組成との関連

インスリン感受性群とインスリン抵抗性群の比較では, インスリン抵抗性指標をのぞき年齢, 性別, 体組成, 体脂肪分布にほとんど差を認めなかった (第 7 表)。両群間でこれら 10 個の SNPs の頻度の違いを検討したが, いずれの SNPs も genotype/allele 頻度に両群間で差がなかった (第 8 表)。さらに, それぞれの SNP で genotype 毎に各種指標の群間比較を行ったが, 各 SNP と各種指標の間に明らかな関連は認められなかった。

Resistin SNPs と resistin 血中濃度の関連

プロモーター領域の多型である -638G>A/-358G>



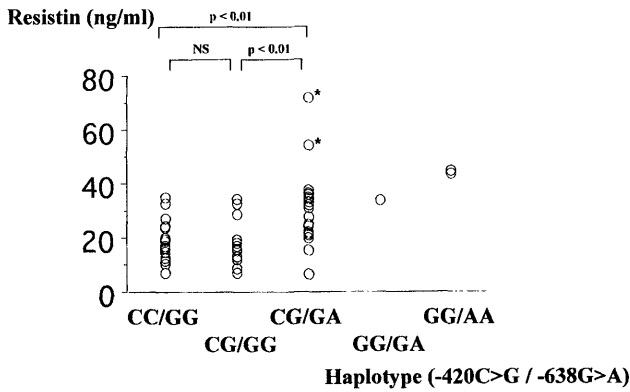
第4図 Resistin 遺伝子多型と血中濃度の関連.

各々の遺伝子型の下に数字はそれぞれの人数を表す. Mann Whitney U 検定もしくは Kruskal-Wallis 検定を行い, p 値を求めた. -638G>A 多型, -420C>G 多型, および -358G>A 多型と resistin 血中濃度の間に有意な相関があった. -638G>A 多型と -358G>A 多型は 100%連鎖していた. (Azuma K, et al : Horm Metab Res 36 : 564-570, 2004 の Figure 2 を許可を得て転載)

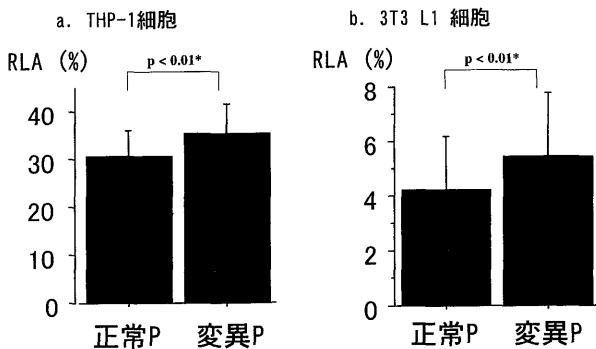
A 多型および -420C>G 多型と resistin 血中濃度との間に有意な関連が認められた (第4図). これをさらに詳しくみると, -638G>A/-358G>A 多型は -420C>G 多型と強い連鎖不平衡があり ($\delta=0.71$), -420C>G 多型単独では resistin 血中濃度と相関せず, -638G>A/-358G>A 多型との組み合わせで血中濃度と相関した (第5図).

-638G>A 多型と -420C>G 多型の組み合わせが resistin 転写活性におよぼす影響: *in vitro* での検討

まず, 100%連鎖不平衡している -638G>A 多型と -358G>A 多型について, 転写因子結合部位予測ソフトの TF search (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) を用いて検討すると, -638G から -638A への変異は 2 箇所の heat shock transcription factor (HSF) の認識部位の消失をもたらすのに対して, -358G から -358A への変異は転写因子結合部位の増加,



第5図 Haplotype (-420C>G/-638G>A) と resistin 血中濃度。
-420C>G 多型と-638G>A 多型は連鎖しており ($\delta = 0.71$)、両者を組み合わせて血中濃度との関連をみると、両多型ともに変異のある-420CG/-638GA 群は-638G>A 多型に変異のない-420CC/-638GG 群もしくは-420CG/-638GA 群と比較して血中濃度が高値であった。この違いは*印で示した血中濃度高値の2例を除いて検討しても優位であった。一方で、-420C>G 多型にのみ変異を認める-420CG/-638GG 群は両多型に変異のない-420CC/-638GG 群と血中濃度に差を認めなかった。



第6図 -420C>G 多型と-638G>A 多型のプロモーター解析
THP-1 細胞 (a) と 3T3 L1 細胞 (b) において luciferase アッセイを用いて転写活性を測定した。pGL3 (-638G/-420C) は正常 P, pGL3 (-638A/-420G) は変異 P と定義した。Luciferase 活性は、RLA (relative luciferase activity) = $\frac{(\text{正常 P もしくは変異 P}) - (\text{pGL3-Basic})}{(\text{pGL3-Control}) - (\text{pGL3-Basic})} \times 100$ として求めた。統計は、トランスフェクションを行った日時を共変量として共変量分散分析を用いた。P 値は Fisher's PLSD より求めた。(Azuma K, et al: Horm Metab Res 36: 564-570, 2004 の Figure 3 を許可を得て転載)

消失を引き起こさなかった。ゆえに、プロモーター解析は-638G>A に限って行った。

そして、luciferase アッセイの結果、変異 P の luciferase 活性は、THP-1 細胞、3T3-L1 細胞のいずれにおいても正常 P の活性に比べて高く (第6図 a, b), *in vitro* でも-638G>A 多型と-420C>G 多型の組み合わせが resistin 転写活性に影響をおよぼすと考えられた。ヒト白色脂肪細胞を用いた場合には、pGL3-Control の活性も低く、両プラスミド間で luciferase 活性の差はなかった。

考 察

本研究では、肥満およびインスリン抵抗性との関連が示唆されている肥満・糖尿病関連遺伝子 resistin について、若年非糖尿病肥満者を対象としてその表現型を詳細に検討した上で、resistin 血中濃度、resistin SNPs との関連を検討した。

非肥満者をふくめた断面的検討で resistin 血中濃度は BMI と正相関し、肥満症例の長軸的検討で、resistin 血中濃度の変化率は BMI の変化率だけでなく、体脂肪量の変化率ともっともよく正相関する結果が得られた。肥満症例に限った断面的検討で、resistin 血中濃度と体組成、体脂肪分布との間に相関がなかったのは、症例がすべて肥満で、体組成がかなり均一な集団であったためと考えられた。

長軸的検討で、resistin 血中濃度の変化率と平均 IRI の変化率も正相関した。インスリン抵抗性の指標として HOMA-IR がより一般的であるが、食後高インスリン血症も反映する平均 IRI は本症例のように正常耐糖能ないし軽度耐糖能異常の症例ではインスリン抵抗性を表す指数として最も優れた指標の1つであると考えられている²⁷⁾。本症例では空腹時血糖が正常にもかかわらず食後高血糖を示す症例が30%にも達しており、空腹時 IRI に比べ、平均 IRI がきわめて高値で、食後高血糖による食後高インスリン血症がみられた。さらに、1.5年間の食事と運動による減量介入の前後で、平均 IRI の変化率(改善率)は HOMA-IR の変化率より大きく(17%, 11%), 減量にともなうインスリン感受性の変化をより敏感に反映していた。なお断面的検討で resistin 血中濃度と平均 IRI が相関しなかった理由として考えられるのは、インスリン抵抗性にはさまざまな要因が関係し個人差が大きいことである。実際に肥満とインスリン抵抗性の関連について個人の長軸的な体重変化にともなって認められるインスリン抵抗性の変化は、集団の断面的検討で認

められる両者の関連の2.4~4.5倍大きいことが報告されている^{37), 38)}。

Resistin 血中濃度については、我々の報告³⁹⁾と同様に体組成やインスリン抵抗性と関連があるとする報告^{40), 41), 42), 43), 44), 45), 46)}がある一方、ないとする報告^{47), 48), 49), 50), 51), 52)}もあり、一定の見解を得ていない。少数例の検討が多いこと、断面的検討が多いことなどがその原因として考えられる。

運動耐容能と resistin の関連はこれまで検討されておらず、本研究では、運動耐容能の指標として運動継続時間、歩行速度を用いて行った。運動継続時間、歩行速度は、全身的な体脂肪蓄積の指標 (BMI, 体脂肪率, 体脂肪量, 皮下脂肪面積) と負の相関があったが、インスリン感受性とは関連を認めなかった。対象者数が少なく体組成やインスリン感受性に関して比較的均一な集団であること、男女別の検討を行っていないことなどがその理由としてあげられる。Resistin 血中濃度も、運動継続時間、歩行速度と相関せず、体組成、体脂肪分布、インスリン抵抗性の指標とも相関しなかった。Adiponectin についても運動によるインスリン抵抗性改善機序との関連は明らかでなく^{53), 54)}、運動とインスリン抵抗性との関連は adipocytokine 以外の因子を介したものと推察された。今後、正常体重者を含め症例数を増やし、かつ縦断的な検討を行うことが必要と考えた。

ResistinSNPs と表現型との関連では、同一の SNPs (-420C>G, +299G>A) の解析でも、体組成や糖尿病のリスクと関連する報告^{26), 20)}、しない報告^{10), 23)}があり、一定の見解を得ていない。我々の検討では、10個の resistin SNPs を同定したが、いずれも、表現型との間に明らかな関連がなかった。同定した SNPs はいずれも non-coding region の SNPs で、蛋白の機能に直接影響を与える変異ではなかったこと、対象が体組成などに関して比較的均一で、60名という少数例での検討であり、検出力が十分でなかったことが影響している可能性が考えられた。

ResistinSNPs と resistin 血中濃度の関連では、発現量に影響を与えるプロモーター領域で同定された -638G>A 多型および -420C>G 多型と resistin 血中濃度との間に有意な関連があった。-420C>G 多型が脂肪組織中の mRNA 発現量と関連するとの報告があるが¹⁰⁾、我々の検討では -420C>G 多型単独ではなく、-420C>G 多型と -638G>A 多型の組み合わせが重要であることが、luciferase アッセイを用いた *in vitro* の検討でも示された⁵⁵⁾。-638G>A 多型が白人ではきわめてまれであることが相違の原因として考えられた。

Resistin はマウスでインスリン抵抗性をひきおこす adipocytokine として同定されたものの、マウスとヒトでは相同性が低く¹³⁾、ヒト resistin は、19番染色体の炎症関連遺伝子座にあること¹³⁾、マウスと異なり脂肪細胞でなく単球からの発現が多いこと^{17), 18), 19)}、などからインスリン抵抗性よりむしろ炎症との関連が指摘されている。しかし、最近になり炎症とインスリン抵抗性や肥満は相互に非常に強く結びついていることも明らかになってきている。たとえば脂肪組織中の単球は、BMI や脂肪細胞の大きさに比例して増加し⁵⁶⁾、TNF- α 、IL-6 といったインスリン抵抗性を惹起する adipocytokine を分泌することが報告されている^{17), 56)}。脂肪前駆細胞が一定の条件下で単球になるとする報告もある⁵⁷⁾。さらに、チアゾリジン系薬剤によるインスリン抵抗性改善作用の一部は単球由来の TNF- α 、IL-6 の発現が抑制されることによる可能性も報告されている⁵⁸⁾。また肥満に伴う炎症が、インスリン抵抗性に先だてて生じることや⁵⁹⁾、ヒト resistin は炎症に関連したインスリン抵抗性と関連があるとする報告もなされている⁶⁰⁾。本研究では、TNF- α 、IL-6 血中濃度の検討をあわせて行ったが、後者の血中濃度は測定感度以下という症例も多く、resistin 血中濃度、遺伝子多型との関連は明らかでなかった。今後脂肪組織局所での発現の評価も行う必要があると思われた。最近では、resistin は血管内皮細胞に作用して血管の炎症に関連するとの報告もあり^{61), 62)}、ヒト resistin が、TNF- α や IL-6 と同様、炎症を介して体組成、インスリン抵抗性ひいては糖尿病・動脈硬化と関連する可能性が示唆されている。今後、正常者を含めた症例数を増やすとともに、長軸的検討を行い、炎症、酸化ストレス関連、動脈硬化関連の指標との関連も明らかにしていく必要があると考えられた。

総 括

肥満・糖尿病関連遺伝子 resistin に注目し、若年非糖尿病肥満患者 70 名を対象として、水中体重秤量法を用いた体脂肪率・体脂肪量、腹部 CT スキャンを用いた体脂肪分布、75 g 糖負荷試験による血糖・インスリンなどの測定を行い、表現型と、resistin 血中濃度との関連を 70 名中 64 名で検討した。一部の症例では、1.5 年の食事と運動による介入前後の長軸的検討 (35 名) や運動耐容能の検討 (38 名) もあわせて行った。また 70 名中 60 名で resistin 遺伝子多型の探索を行い、表現型および resistin 血中濃度との関連を検討し、以下の結果を得た。

1. 肥満症例の resistin 血中濃度は非肥満者に比し高値であり、非肥満者を含めると resistin 血中濃度は BMI と正相関した。

2. 断面的検討では、resistin 血中濃度は体組成やインスリン抵抗性の指標と相関しなかったが、長軸的検討では、resistin 血中濃度の変化率は BMI、体脂肪率、体脂肪量、内臓脂肪面積、平均血糖、平均 IRI のそれぞれの変化率と正相関し、stepwise 回帰分析を行うと体脂肪量の変化率とのみ相関がみられた。

3. Resistin 血中濃度は、運動耐容性の指標である運動継続時間、歩行速度と相関しなかった。

4. Resistin 遺伝子全体のシーケンススクリーニングおよび SNP タイピングを行い、プロモーター領域に 5 個、イントロン領域に 5 個、計 10 個の non-coding resistin SNPs を同定した。

5. Resistin SNPs と体組成、インスリン抵抗性との関連は明らかでなかったが、プロモーター領域の多型である -638G>A/-358G>A 多型および -420C>G 多型と resistin 血中濃度との間に有意な関連が認められ、いずれも変異型で resistin 血中濃度が有意に高値であった。ただし、-420C>G 多型の変異のみでは、血中濃度に変化はなかった。

6. Luciferase アッセイにおいても、-638G>A 多型と -420C>G 多型の変異型同士の組み合わせ (-638A/-420G) で luciferase 活性が高く、-638G>A 多型と -420C>G 多型の組み合わせが resistin 転写活性に影響をおよぼすと考えられた。

以上のことから、ヒト resistin は体組成、特に体脂肪量と関連があり、インスリン抵抗性とも関連しうることが示唆された。また、プロモーター領域の SNPs である -638G>A 多型と -420C>G 多型の組み合わせが、転写活性に影響をおよぼし、resistin 発現を規定する遺伝的因子の 1 つと考えられた。

本稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深謝いたします。また、直接御指導くださり、論文の御高閲をいただきました慶應義塾大学スポーツ医学研究センター山崎元教授、勝川史憲講師、研究を御指導いただきました慶應義塾大学医学部内科学教室村田満講師、松原由美子先生、慶應義塾大学医学部中央臨床検査部小口修司先生、多くの御助言をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室島田朗講師、研究に御協力いただいた教室、中央臨床検査部、スポーツ医学研究センターの諸先生に感謝いたします。

本研究の一部は、第 23, 24 回日本肥満学会、第 13 回日本臨床スポーツ医学会学術集会において報告した。

文 献

- 1) 吉池信男, 西信雄, 松島松翠, 伊藤千賀子, 池田義雄, 檜原英俊, 吉永英世, 小倉浩, 小峰慎吾, 佐藤祐造, 佐藤則之, 佐々木陽, 藤岡滋典, 奥淳治, 雨宮禎子, 坂田利家, 井上修二: Body Mass Index に基づく肥満の程度と糖尿病, 高血圧, 高脂血症の危険因子との関連—多施設共同研究による疫学的検討. 肥満研究 6: 4-17, 2000
- 2) Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K: Analysis of an expression profile of human adipose tissue. *Gene* 190: 227-235, 1997
- 3) Bays H, Mandarino L, DeFronzo R: Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 463-478, 2004
- 4) Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312, 2001
- 5) Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR Jr, Willson TM, Klier SA, Hotamisligil GS: Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 276: 22651-22653, 2001
- 6) Banerjee RR, Lazar MA: Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med* 81: 218-226, 2003
- 7) Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Adipose e-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111: 225-230, 2003
- 8) Moon B, Kwan JJ, Duddy N, Sweeney G, Begum N: Resistin inhibits glucose uptake in L6 skeletal muscle cells independent of changes in insulin signaling components and Glut-4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E105-115, 2003
- 9) Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Stepan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA: Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303: 1195-1198, 2004
- 10) Smith SR, Bai F, Charbonneau C, Janderova L, Argyropoulos G: A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. *Diabetes* 52: 1611-1618, 2003
- 11) McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S: Resistin, central obesity, and

- type 2 diabetes. *Lancet* 359 : 46-47, 2002
- 12) McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH, Kumar S : Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 2407-2410, 2002
 - 13) Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA : A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 502-506, 2001
 - 14) Yang RZ, Huang Q, Xu A, McLenithan JC, Eison JA, Shuldiner AR, Alkan S, Gong DW : Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 310 : 927-935, 2003
 - 15) Nagaev I, Smith U : Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 285 : 561-564, 2001
 - 16) Janke J, Engeli S, Gorzelnjak K, Luft FC, Sharma AM : Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* 10 : 1-5, 2002
 - 17) Fain JN, Cheema PS, Bahouth SW, Lloyd HM : Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 300 : 674-678, 2003
 - 18) Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S : Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 50 : 2199-2202, 2001
 - 19) Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA : Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300 : 472-476, 2003
 - 20) Ma X, Warram J, Trischitta V, Doria A : Genetic variants at the resistin locus and risk of type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 4407-4410, 2002
 - 21) Tan MS, Chang SY, Chang DM, Tsai JC, Lee YJ : Association of resistin gene 3'-untranslated region +62G>A polymorphism with type 2 diabetes and hypertension in a Chinese population. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 1258-1263, 2003
 - 22) Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC : Human resistin gene : molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 2520-2524, 2002
 - 23) Osawa H, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Nishimiya T, Kato K, Shimizu I, Fujii Y, Ohashi J, Makino H : Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the resistin gene : the absence of evidence for the association of three identified single nucleotide polymorphisms with Japanese type 2 diabetes. *Diabetes* 51 : 863-866, 2002
 - 24) Sentinelli F, Romeo S, Arca M, Filippi E, Leonetti F, Banchieri M, Di Mario U, Baroni MG : Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes : mutation analysis and population study. *Diabetes* 51 : 860-862, 2002
 - 25) Pizzuti A, Argiolas A, Di Paola R, Baratta R, Rauseo A, Bozzali M, Vigneri R, Dallapiccola B, Trischitta V, Frittitta L : An ATG repeat in the 3'-untranslated region of the human resistin gene is associated with a decreased risk of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 4403-4406, 2002
 - 26) Engert JC, Vohl MC, Williams SM, Lepage P, Loredon Osti JC, Faith J, Dore C, Renaud Y, Burt NP, Villeneuve A, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC, Despres JP, Gaudet D, Hudson TJ : 5' flanking variants of resistin are associated with obesity. *Diabetes* 51 : 1629-1634, 2002
 - 27) Yeni-Komshian H, Abbasi F, Carantoni M, Reaven GM : Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulin-mediated glucose disposal in 490 healthy nondiabetic volunteers. *Diabetes Care* 23 : 171-175, 2000
 - 28) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC : Homeostasis model assessment : insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28 : 412-419, 1985
 - 29) 石田浩之, 中村芳郎 : 循環器疾患患者の生活指導. *現代医療* 25 : 2386-2391, 1993
 - 30) 小熊祐子, 石田浩之, 勝川史憲, 木下訓光, 大西祥平, 山崎元 : 中高年者の運動療法を目的としたトレッドミルプロトコールとその臨床応用. *日本臨床スポーツ医学会誌* 8 : 252-259, 2000
 - 31) 勝川史憲 : 若年成人肥満者. *臨床スポーツ医学* 20 : 696-702, 2003
 - 32) Pollock ML, Gaesser GA, Butcher JD, Despres JP, Dishman RK, Franklin BA, Garber CE : ACSM Position Stand : the recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness and flexibility in healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* 30 : 975-991, 1998
 - 33) Pollock ML, Foster C, Schmidt D, Hellman C, Linnerud AC, Ward A : Comparative analysis of physiologic responses to three different maximal graded exercise test protocols in healthy women. *Am Heart J* 103 : 363-373, 1982
 - 34) 東宏一郎, 勝川史憲, 小口修司, 佐々木誠一, 小熊祐子, 成田和穂, 木下訓光, 石田浩之, 大西祥平, 山崎元, 島田朗, 猿田享男 : 肥満者におけるレジスチンと運動耐容能の検討. *日本臨床スポーツ医学会誌* 12 : 260-265, 2004

- 35) Chakravarti A, Buetow KH, Antonaraki SE, Waber PG, Boehm CD, Kazazian HH : Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster. *Am J Hum Genet* 36 : 1239-1258, 1984
- 36) Humphries S, Temple A, Lane A, Green F, Cooper J : Low plasma levels of factor VIIc and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter (-323) insertion than the glutamine 353 variant. *Thromb Haemost* 75 : 567-572, 1996
- 37) Swinburn BA, Nyomba BL, Saad MF, Zurlo F, Raz I, Knowler WC, Lillioja S, Bogardus C, Ravussin E : Insulin resistance associated with lower rates of weight gain in Pima Indians. *J Clin Invest* 88 : 168-173, 1991
- 38) Hoag S, Marshall JA, Jones RH, Hamman RF : High fasting insulin levels associated with lower rates of weight gain in persons with normal glucose tolerance : the San Luis Valley Diabetes Study. *Int J Obes* 19 : 175-180, 1995
- 39) Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T : Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res* 11 : 997-1001, 2003
- 40) Zhang J, Qin Y, Zheng X, Qiu J, Zou DJ : Serum resistin level in essential hypertension patients with different glucose tolerance. *Diabet Med* 20 : 828-831, 2003
- 41) Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS : Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentration in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 1730-1736, 2003
- 42) Yang J, Li M, Wu CY, Wang H, Xu QS, Deng JY : Reduced resistin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 83 : 1471-1474, 2003
- 43) Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K, Jones R, Zhu Q, Considine RV : Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 5452-5455, 2003
- 44) Youn BS, Yu KY, Park HJ, Lee NS, Min SS, Youn MY, Cho YM, Park YJ, Kim SY, Lee HK, Park KS : Plasma resistin concentration measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 89 : 150-156, 2004
- 45) Fujinami A, Obayashi H, Ohta K, Ichimura T, Nishimura M, Matsui H, Kawahara Y, Yamazaki M, Ogata M, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Nakano K, Ohta M : Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin : resistin concentration in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 339 : 57-63, 2004
- 46) Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BLG, Murphy LJ : Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects : correlation with insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 149 : 331-335, 2003
- 47) Fehmann HC, Heyn J : Plasma resistin levels in patients with type 1 and type 2 diabetes and in healthy controls. *Horm Metab Res* 34 : 671-673, 2002
- 48) Furuhashi M, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Shimamoto K : Circulating resistin levels in essential hypertension. *Clin Endocrinol* 59 : 507-510, 2003
- 49) Monzillo LU, Hamdy O, Horton ES, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, Porter S, Ovalle K, Moussa A, Mantzoros CS : Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance. *Obes Res* 11 : 1048-1054, 2003
- 50) Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R, Orlova C, Mantzoros CS : Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration : cross-sectional and interventional studies in normal, insulin resistant and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 4848-4856, 2003
- 51) Kielstein JT, Becker B, Graf S, Brabant G, Haller H, Fliser D : Increased resistin blood levels are not associated with insulin resistance in patients with renal disease. *Am J Kidney Dis* 42 : 62-66, 2003
- 52) Pflutzner A, Langenfeld M, Kunt T, Lobig M, Forst T : Evaluation of human resistin assay with serum from patients with type 2 diabetes and different degrees of insulin resistance. *Clin Lab* 49 : 571-576, 2003
- 53) Boudou P, Sobngwi E, Mauvais-Jarvis F, Vexiau P, Gautier JF : Absence of exercise-induced variations in adiponectin levels despite decreased abdominal adiposity and improved insulin sensitivity in type 2 diabetic men. *Eur J Endocrinol* 149 : 421-424, 2003
- 54) Hulver MW, Zheng D, Tanner CJ, Houmard JA, Kraus WE, Slentz CA, Sinha MK, Pories WJ, MacDonald KG, Dohm GL : Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283 : E861-865, 2002
- 55) Azuma K, Oguchi S, Matsubara Y, Mamizuka T, Murata M, Kikuchi H, Watanabe K, Katsukawa F, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T : Novel resistin promoter polymorphisms : association with serum resistin level in Japanese obese individuals. *Horm Metab Res* 36 : 564-570, 2004
- 56) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW : Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112 : 1796-1808, 2003
- 57) Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L : Preadipocyte conversion to macrophage, evidence of plasticity. *J Biol Chem* 278 :

- 9850-9855, 2003
- 58) Jiang C, Ting AT, Seed B : PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391 : 82-86, 1998
- 59) Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112 : 1821-1830, 2003
- 60) McEernan PG, Fisher FM, Valsamakis G, Chetty R, Harte A, McEernan CL, Clark PM, Smith SA, Barnett AH, Kumar S : Resistin and type 2 diabetes : regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 6098-6106, 2003
- 61) Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA : Resistin promotes endothelial cell activation : further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 108 : 736-740, 2003
- 62) Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R : Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells : a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 314 : 415-419, 2004
-