

C型肝炎患者における肝発がんと  
血清アディポネクチン濃度との関係

医学系研究科内科学専攻

指導教員：小池和彦

申請者：新野 徹

## 目次

第一章 要旨 .....	3
第二章 緒言 .....	4
第三章 対象と方法 .....	9
3-a) 対象患者 .....	9
3-b) 患者のフォローアップと肝細胞癌の診断 .....	11
3-c) アディポネクチンと高分子量アディポネクチンの分析試料 .....	12
3-d) 免疫組織化学染色 .....	12
3-e) 統計学的手法 .....	13
第四章 結果 .....	14
4-a) 患者背景とアディポネクチン濃度 .....	14
4-b) アディポネクチンと臨床パラメータとの相関関係 .....	14
4-c) アディポネクチン濃度による累積発癌率 .....	18
4-d) 危険因子 .....	20
4-e) 免疫組織化学染色 .....	24
4-f) アディポネクチンアイソフォームの検討 .....	26
第五章 考察 .....	30
第六章 まとめ .....	37
謝辞 .....	38
参考文献 .....	40

## 第一章 要旨

近年の疫学研究から肥満が肝発癌を促進することが判明しつつあり、肥満に伴うアディポネクチン(Adn)分泌低下が発癌を促進する要因であると推察されている。今回我々は、慢性 C 型肝炎患者 325 人の保存血清を用いた後ろ向きコホート研究を行い、低 Adn 血症が発癌を促進するか検証した。Adn 中央値は男性よりも女性の方が、また男女共に健常者よりも慢性 C 型肝炎患者の方が有意に高値を示した。予想外なことに男女共に高 Adn 群で有意に発癌率が高く多変量解析でも高 Adn 血症は独立した危険因子であった。Adn が発癌を促進する作用をもつか、他の因子とは独立して何らかの肝臓の病態を反映している可能性が示唆された。

## 第二章 緒言

肝細胞癌（Hepatocellular Carcinoma、以下 HCC）は全世界の悪性腫瘍の中では 5 番目に多く、全世界的に増加傾向にある[1,2]。最近、疫学的研究で肥満やメタボリック症候群が HCC のリスクを増加させるという報告もみられる[3-5]。肥満やメタボリック症候群の患者数が日本及び欧米諸国で増えているため、肥満と肝発がんには何らかの関係があるのではないかと近年注目されつつある。

肥満やメタボリック症候群が肝発がんにどのように関係するかについては今のところよく分かっていない。しかしながら、脂肪組織から分泌されるサイトカインであるアディポカインの肥満による異常調節がその機序を解明する重要な鍵となると考えられている[6,7]。脂肪細胞はレプチン、アディポネクチン、腫瘍壊死因子アルファ（tumor necrosis factor  $\alpha$  以下 TNF $\alpha$ ）、インターロイキン 6(IL-6)やレジスチンなどのような種々のアディポカインを分泌することにより、他臓器における脂質代謝を制御するが、内臓脂肪が増えるような肥満により、レプチン、TNF $\alpha$ 、インターロイキン 6 やレジスチンなどの分泌量が増加し、アディポネクチンの量が低下する[6,7]。これらのアディポカインは門脈を介して直接肝臓に作用し、肝疾患に影響を与えられている[8]。

アディポネクチンは、アディポカインの一種であり、抗炎症作用やインスリン感受性増強作用を持つサイトカインとして知られており、体重が増加すると

その分泌量が低下することが知られている[9]。低アディポネクチン血症は脂質異常や心血管関連疾患のような肥満関連の疾患の増悪に寄与しているという報告がされている[10-12]。更に、低アディポネクチン血症は動物モデルにおいて肝臓の脂肪変性をもたらすとともに、炎症や線維化を促進して、肝発がんに関与するという報告もある[13-15]。このような動物モデルの実験結果は、特に非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis、以下 NASH)などのようなヒトの肝疾患に応用できると考えられる。確かに、NASH 患者のアディポネクチン量は低く、それが肝における脂肪蓄積や壊死炎症と関連していた[16]。

C 型慢性肝炎ウイルス感染はアメリカ合衆国、南欧州諸国および日本において HCC の主要な原因である[2]。肥満やメタボリック症候群は NASH と同様に C 型慢性肝炎において肝発がんに関連があることが見出されており[5,17]、また低アディポネクチン血症が C 型肝炎ウイルス関連の肝発がんに関連する可能性が考えられる。アディポネクチンが HCV のウイルス量やウイルスのジェノタイプ、抗ウイルス療法に対する反応性、インスリン抵抗性、また肝脂肪化や炎症、線維化のような肝組織の変化などに関連があるという研究が報告されているが、いまだ議論の余地があるところである[10,18-24]。C 型肝炎ウイルス感染そのものが血清アディポネクチン量に影響するかどうかも報告は一致していない[18,19]。肝炎ウイルス関連の肝発がんにおけるアディポネクチンの役割に関し

ても、肝発がんに寄与しないとする報告と、寄与するとの報告があるが、研究そのものの数がまだ少ない[10,20,25]。

我々は背景肝疾患により肝発がんにおけるアディポネクチンの役割が異なるかどうかを検討するため、B 型慢性肝炎発がん患者、C 型慢性肝炎発がん患者、非 B 非 C 型肝炎発がん患者の各群を設定し、発がん時のアディポネクチン値を測定する横断研究を行った。その結果、C 型慢性肝炎による発がん患者の方が、他の因子を有する発がん患者と比較して、有意にアディポネクチン値が高いことが分かった（図 1）。背景肝疾患によりアディポネクチンの役割が異なる可能性があるが、それぞれの背景肝疾患により肝発がんにどのように関連するかを調べる必要がある。

例えば NASH 患者や C 型慢性肝炎患者において、低アディポネクチン血症が将来の肝発がんに関連するかどうかそれぞれ検証ができればよいが、NASH 患者においては将来発がんする可能性の高い、いわゆる高危険群の囲い込みが難しい状況にある。図 1 に示したように、発がん患者のアディポネクチン値は他の背景肝疾患肝発がん患者よりも C 型慢性肝炎の方が高いが、高アディポネクチン値を示す C 型慢性肝炎患者においてアディポネクチンは肝炎重症度を改善する役割があるのではないかと、及び C 型慢性肝炎患者の中でもとりわけアディポネクチン値が低くなるような患者が将来 HCC 生じるリスク因子

になるのではないかという仮説を立てた。このことを実証するため、我々は C  
型慢性肝炎患者における血清アディポネクチン濃度と肝発がんのリスクとの関  
連を解析するための後ろ向きコホート研究を行った。

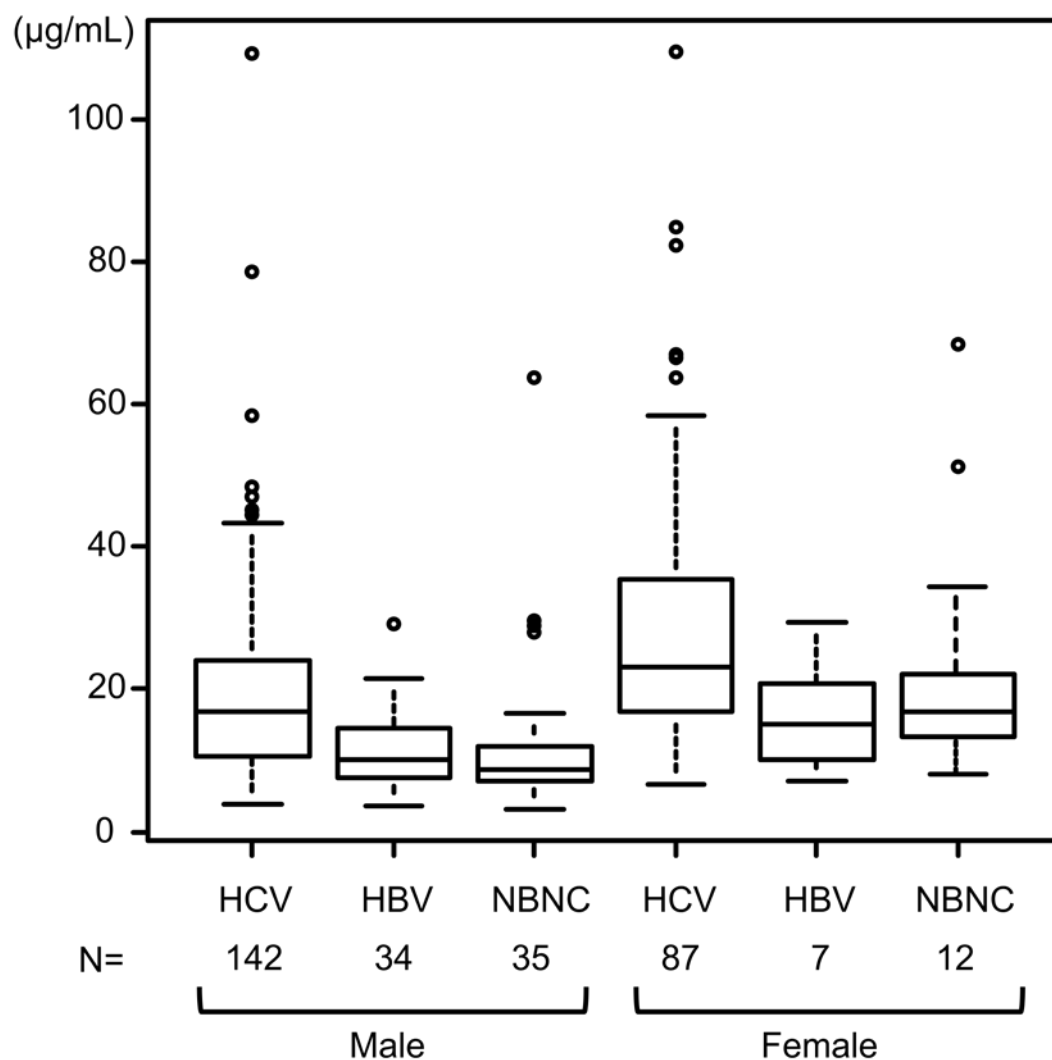


図 1．性別で分けた各背景肝因子別アディポネクチン値(N=320)

男性よりも女性の方がアディポネクチン値は高く、また C 型慢性肝炎患者の方が、他背景肝因子を有する患者よりも有意にアディポネクチン値は高い。



### 第三章 対象と方法

#### 3-a) 対象患者

1994 年 1 月 1 日から 2002 年 12 月 31 日までの間に、HCC を有する患者およびその治療歴のある患者を除いて、1428 人の HCV-RNA 陽性患者が、東京大学医学部附属病院消化器内科の外来を受診した。その中で、インフォームドコンセントを得られ、血清を採取された患者を本研究の対象患者とした。B 型肝炎ウイルス表面抗原(HBs-Ag)陽性者、胆道系疾患を有する患者、血清収集時にインターフェロンの治療を受けていた患者、セカンドオピニオン目的で受診された患者は本研究から除外した。また、経過観察中にインターフェロン療法を行った患者については、インターフェロン治療終了後 24 週以上経過して、HCV アンプリコア定性法で陰性である状態を、持続性ウイルス学的著効(SVR)と定義した。更に血清採取より 1 年以内に HCC を発症した患者は偶然エントリー時に画像で HCC と診断できないような、小さな早期の肝細胞癌を有する可能性を考え、除外した。以上より最終的に 325 人を本研究の対象患者とし、エントリー時点での血清アディポネクチン濃度とその後の HCC 発症率との関連を解析することとした(図 2)。採取された血清が空腹時のものであるかどうかは情報がなかったが、アディポネクチンは食事やサーカディアンリズムに関連しないとの報告があり

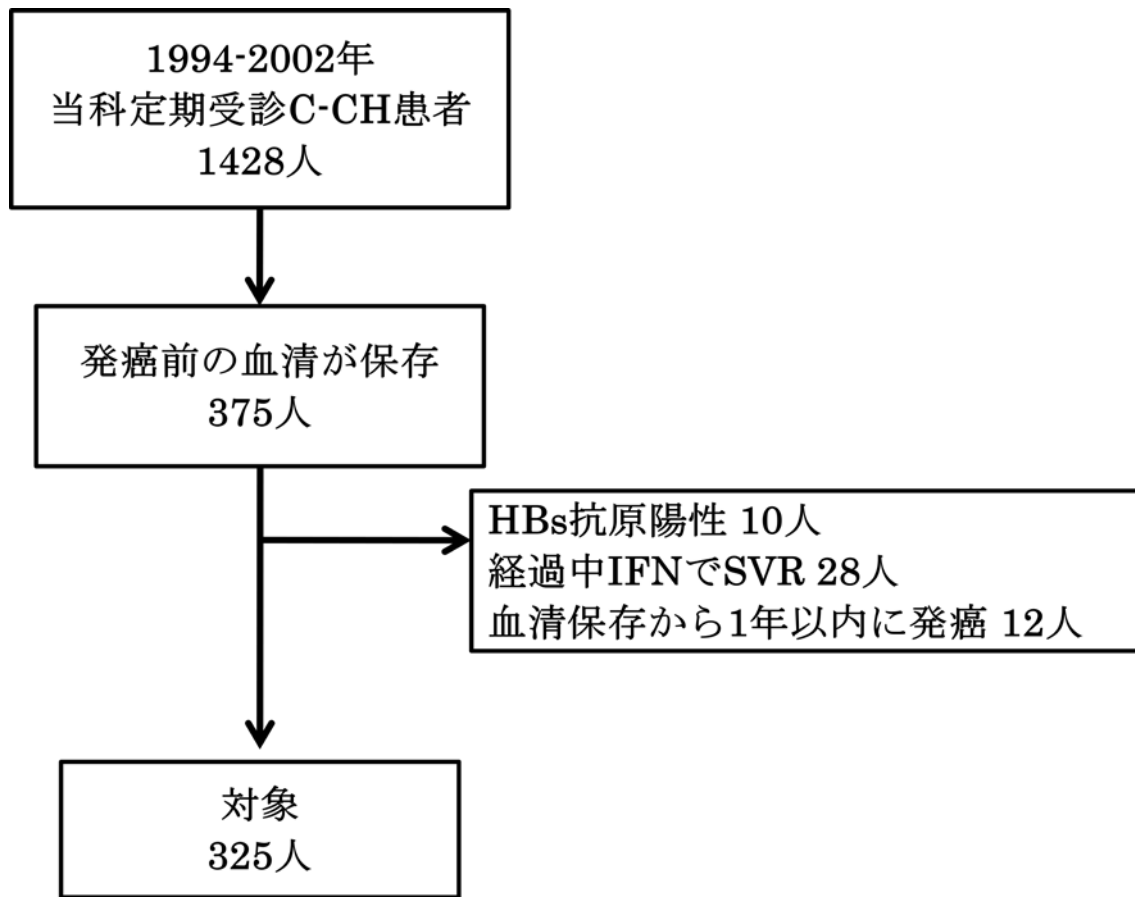


図2. 対象患者の流れ

上記 325 人の保存血清中のアディポネクチン濃度を測定し、肝発がんとの関連について、後ろ向きコホート研究として男女別に検討した。

[26,27]、本研究に適切であると考えられた。すべての血液検査も同じ採血時に行われた。HCV RNA 定量はアンプリコア HCV アッセイ法バージョン 1 (ロシュ社、東京、日本)を、HCV セロタイプはセロタイピングアッセイ(SRL 社、東京、日本)を使用してそれぞれ計測した。肝生検を施行されていない患者では、門脈圧亢進を示すような臨床的もしくは検査上での特徴を有しているもの(内視鏡検査や腹部超音波検査を使用して側副血行路や食道静脈瘤などの存在を示したものを)を臨床的肝硬変として診断した[28]。コントロールとなる血清は年齢と性別をマッチさせた肝疾患を有していない、三井記念病院の健康診断を受けた 70 名の健常者から収集した (三井記念病院 承認番号 : MEC2009-30)。この研究は 1975 年のヘルシンキ宣言に遵守して行われ、東京大学の倫理委員会にて承認された (承認番号 : 3114)。

### 3-b) 患者のフォローアップと肝細胞癌の診断

すべての患者に対して外来初診時に腹部超音波が行われ、HCC と診断された患者はこの研究から除外された。その後、3 ヶ月から 6 ヶ月ごとに外来フォローされた。腫瘍マーカー上昇時あるいは腹部超音波検査にて肝細胞癌出現が疑われた際に造影 CT 検査が行われた。HCC は動脈相の早期濃染と後期相の染まり抜けで診断された。HCC が確診できないときは、超音波ガイド下肝腫瘍生検が行われ、病理学的に Edmondson-Steiner 分類に沿って評価された。HCC 発症まで

の期間は血清採取時より HCC 診断までの期間とした。非発がん患者では、HCC を発症せず亡くなった時点、フォローアップされた最終来院日、またはこの研究期間の終了日を打ち切りとした。最終観察日は、2009 年 1 月 31 日とした。

### 3-c) アディポネクチンと高分子量アディポネクチンの分析試料

採取された患者血清は-70℃で保管された。アディポネクチン濃度は市販されている ELISA キット(R&D Systems, Minneapolis, MN))を使用して計測した。高分子量アディポネクチン濃度は民間試験所(SRL 社)で計測した。中低分子量アディポネクチン濃度は全体のアディポネクチン濃度から高分子量アディポネクチンの値を差し引いたものとして算出した。

### 3-d) 免疫組織化学染色

肝生検で採取された検体は 10%濃度の中性緩衝ホルマリンに固定し、パラフィン包埋し、その後薄片とした。免疫組織化学染色のため、検体は脱パラフィンした後、0.01 モルのクエン酸で賦活化し、その後、3%過酸化水素メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼ活性を抑えた。その後、10%ヤギ血清/2%ウシ血清アルブミン溶液でブロッキングし、第一抗体として抗アディポネクチン抗体(マウスモノクローナル抗体)(Abcam, Cambridge, UK).と 4℃で一晩反応させた。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ポリクローナル抗体(動物種：ヤ

ギ)を加え、発色基質として 3,3'-ジアミノベンジジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を使用し視覚化した。免疫染色の強弱について、臨床データをブラインドされている 1 人の観察者によって判断した。

### 3-e) 統計学的手法

グループ間のアディポネクチン濃度の差異は Student's t-test にて評価した。両側検定で P 値 0.05 未満を有意差ありと判定した。累積 HCC 発癌率は Kaplan-Meier 法にて評価し、ログランクテストでグループ間の差異を評価した。肝発がんに対するリスク因子を解析するため、エントリー時点で得られた変数(年齢、BMI、飲酒量、アルブミン濃度、総ビリルビン濃度、ALT、AST 濃度、プロトロンビン時間、血小板、AFP 濃度、糖尿病の併存疾患、アディポネクチン濃度)について、Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量および多変量解析で評価した。更に、高分子アディポネクチンおよび中低分子量アディポネクチンについても Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析で評価した。各変数との相関関係はスピアマンの順位相関係数にて分析した。糖尿病の罹患については、既往の診断または 75gOGTT 試験に基づき判定した[29]。データの解析には、解析ソフト S-PLUS 2000 (MathSoft Inc. Seattle, WA)と SAS Software version 9.1 (SAS Institute Inc. Cary, NC).を使用した。

## 第四章 結果

### 4-a) 患者背景とアディポネクチン濃度

対象患者は 325 人(146 人が男性、179 人が女性)であり、エントリー時の平均年齢は 58.0 歳であった (表 1)。BMI の中央値は男性で 22.7 kg/m<sup>2</sup>、女性で 22.3 kg/m<sup>2</sup>、糖尿病の罹患率は男性で 15.8%、女性で 8.4%であった。組織学的もしくは臨床的肝硬変の患者は男性で 45 人 (30.8%)、女性で 56 人(31.8%)であった。アディポネクチン濃度は、健常者間においても C 型肝炎患者間においても男性よりも女性のほうが有意に高かった (図 3)。そのため以後の解析はすべて男女別に行った。また、男女ともに健常者よりも C 型慢性肝炎患者の方が有意に高値を示した (図 3)。

### 4-b) アディポネクチンと臨床パラメータとの相関関係

C 型慢性患者におけるアディポネクチンの臨床的意義を明らかにするため、アディポネクチン濃度と他の臨床パラメータとの相関関係を調べた(表 2, 3)。男性では、血清アディポネクチンは年齢と正の相関、BMI および血小板と負の相関を示した。女性では、年齢と正の相関を示し、糖尿病と診断された患者のアディポネクチン濃度は低かった。ウイルス量やセロタイプとアディポネクチン濃度は相関がなかった。

表 1. 患者背景

Variable	全体 (n=325)	男性 (n=146)	女性 (n=179)
年齢(歳) <sup>a</sup>	60 (52–65)	60 (51–66)	60 (53–65)
血小板数( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) <sup>a</sup>	147 (106–187)	148 (109–182)	144 (105–193)
総ビリルビン値(mg/dl) <sup>a</sup>	0.7 (0.5–0.9)	0.7 (0.6–0.9)	0.6 (0.5–0.8)
血清アルブミン値(g/dl) <sup>a</sup>	4.0 (3.8–4.2)	4.0 (3.8–4.2)	4.0 (3.8–4.2)
AST 値 (IU/l) <sup>a</sup>	53 (36–81)	54 (42–76)	52 (32–83)
ALT 値 (IU/l) <sup>a</sup>	59 (33–96)	65 (47–100)	51 (30.5–92.5)
AFP 値(ng/ml) <sup>a</sup>	5.0 (3.0–11)	6.0 (3.0–11.4)	5.0 (3.5–10.5)
プロトロンビン活性(%)	85.5 (74.3–100)	85.7 (73.8–97.4)	85.1 (74.4–100)
飲酒量 >50 g/日, n (%)	46 (14.2)	42 (28.8)	4 (2.2)
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) <sup>a</sup>	22.5 (20.4–24.6)	22.7 (20.9–24.6)	22.3 (20.3–24.7)
糖尿病, n (%)	38 (11.7)	23 (15.8)	15 (8.4)
HCV セロタイプ 1, n (%)	241 (74.2)	113 (77.3)	128 (71.5)
IFN 治療を受けた患者, n (%)	49 (15.1)	21 (14.4)	28 (15.6)

<sup>a</sup> 中央値 (第 1 四分位点 – 第 3 四分位点)

図 3.

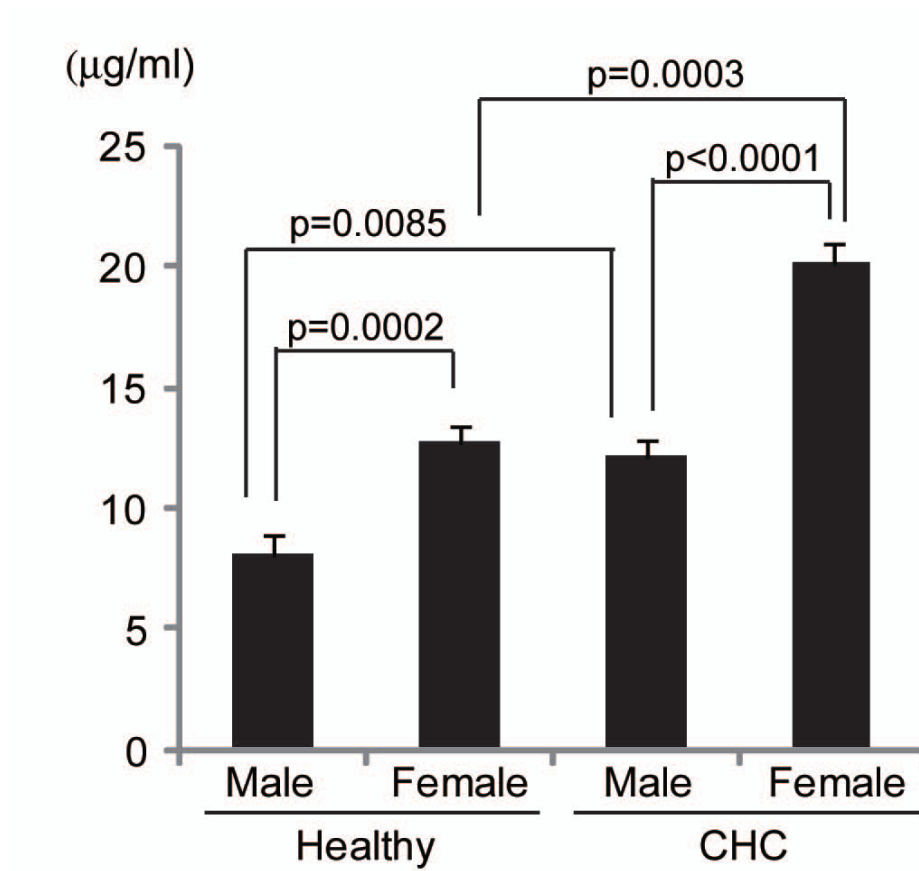


図 3. 健常者(男性 30 名、女性 40 名)および C 型慢性肝炎患者の血清アディポネクチン濃度。データは平均および標準偏差を示している。



表 2. 血清アディポネクチン濃度と他の臨床パラメータとの相関関係 (連続変数)

Variables	男性		女性	
	スピアマン相関係数	p	スピアマン相関係数	p
年齢	0.325	<0.0001	0.224	0.003
血小板数	-0.189	0.023	-0.127	0.089
総ビリルビン値	0.033	0.77	0.05	0.46
血清アルブミン値	-0.152	0.059	-0.077	0.27
AST 値	0.115	0.17	0.05	0.5
ALT 値	0.012	0.89	-0.001	0.98
AFP 値	0.028	0.77	0.087	0.27
プロトロンビン活性	-0.12	0.12	-0.013	0.77
BMI	-0.392	<0.0001	-0.105	0.16

表 3. 血清アディポネクチン濃度と他の臨床パラメータとの相関関係 (群間比較)

Variables		男性		女性	
		血清アディポ ネクチン濃度	p	血清アディポ ネクチン濃度	p
糖尿病	あり <sup>a</sup>	10.8±8.2	0.22	15.0±11.6	0.04
	なし <sup>a</sup>	12.4±7.7		20.6±6.5	
飲酒量	>50 g/日 <sup>a</sup>	11.2±7.5	0.25	14.4±9.9	0.28
	≤50 g/日 <sup>a</sup>	12.5±7.8		20.2±11.8	
HCV ウイルス量			0.56		0.35
HCV セロタイプ 1		12.2±7.2	0.83	20.3±11.5	0.77
他のセロタイプ		11.9±9.3		19.8±12.3	

<sup>a</sup> 平均 ± 標準偏差

#### 4-c) アディポネクチン濃度による累積発癌率

平均 9 年の観察期間中、36 人(男性 19 人、女性 17 人)がフォローアップから脱落した。観察期間終了時までには 122 人(男性 67 人、女性 55 人)が発癌した。累積発癌率は男性においては 5 年で 31.5%,10 年で 42.0%(1 人年あたり 5.5%)、女性においては 5 年で 17.3%,10 年で 29.3%(1 人年あたり 3.2%)であった。血清アディポネクチン値の中央値(男性 10.5 $\mu$ g/ml、女性 16.7 $\mu$ g/ml)をカットオフとして、それぞれ高アディポネクチン群と低アディポネクチン群の 2 群に分けた。その結果、男女ともに高アディポネクチン群で有意に発癌率が高かった (男性  $p=0.032$ 、女性  $p=0.01$ ) (図 4)。男性患者の低アディポネクチン群での累積発癌率は 5 年で 21.9%、10 年で 37.7%であるのに対し、高アディポネクチン群では 5 年で 41.1%、10 年で 51.0%であった。女性患者の低アディポネクチン群では、5 年で 12.4%、10 年で 19.3%であるのに対し、高アディポネクチン群では 5 年で 22.2%、10 年で 39.2%であった。

図 4.

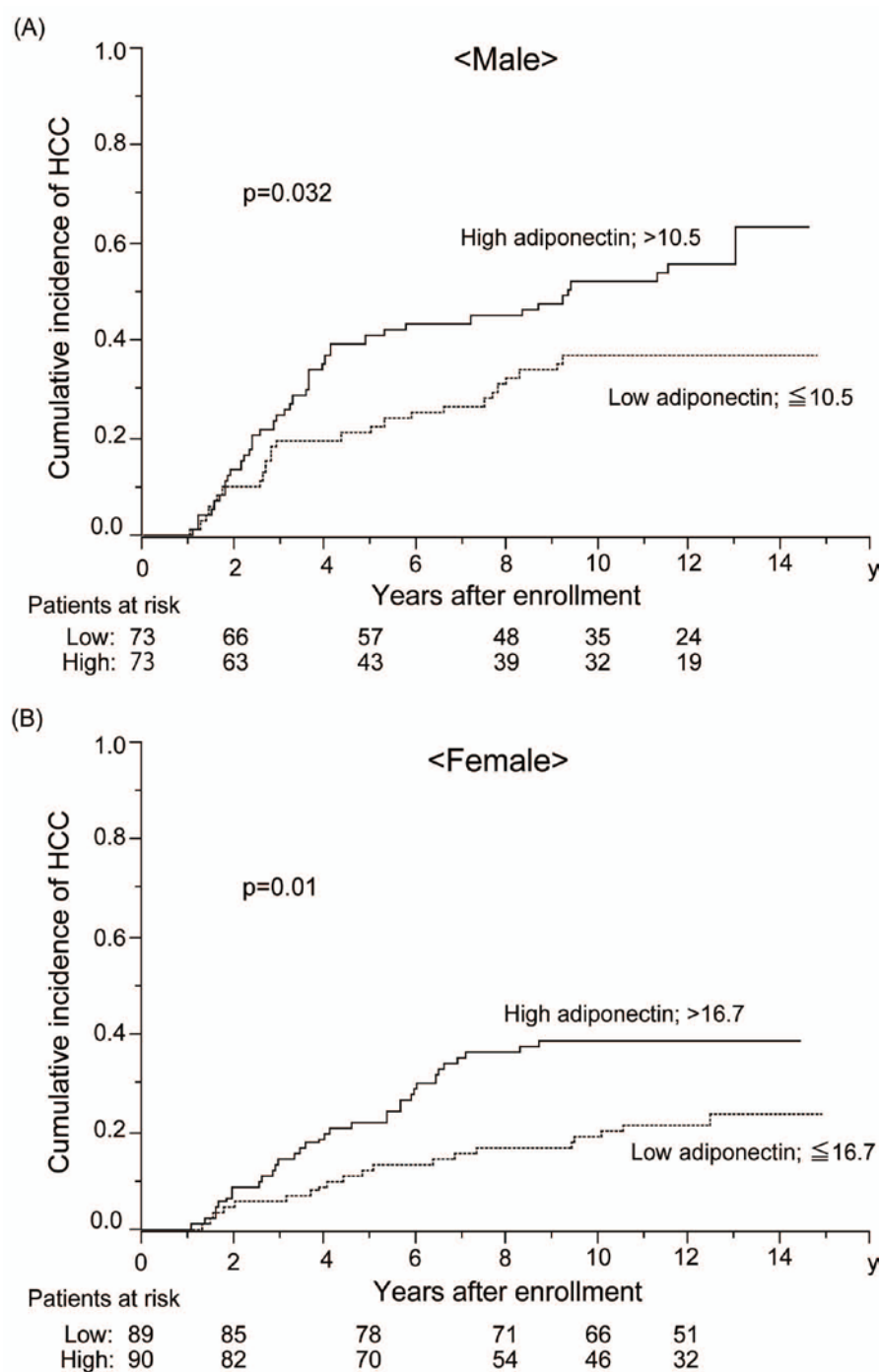


図 4.性別で分けたアディポネクチン値の中央値で 2 群に分けた HCC 発がんの

累積発癌率(男性中央値：10.5 $\mu$ g/ml、女性中央値：16.7 $\mu$ g/ml)。

(A)：男性患者、(B)：女性患者

#### 4-d) 危険因子

HCC 発がんに対するリスク因子の解析はすべて男女別に行った。単変量解析では高アディポネクチン血症であること(男性  $>10.5\mu\text{g/ml}$ 、女性  $>16.7\mu\text{g/ml}$ )は HCC に対する有意な危険因子であった(表 4)。他、年齢、血清 AFP 値、血清アルブミン値のような肝疾患の進行を示唆するような臨床パラメータも HCC 発がんのリスク因子であった。男性患者において、アルコール消費量、糖尿病罹患はリスク因子であり、女性患者において、BMI 高値はリスク因子であった。多変量解析(比例ハザード分析)では、女性患者において高アディポネクチン血症は独立した危険因子であることが分かった (ハザード比(HR)2.07、95%信頼区間 1.06-4.04;P=0.031、表 4)。男性患者において高アディポネクチン血症の p 値は境界値であった。(HR 1.82、95%信頼区間 1.00-3.33;p=0.050)。年齢、プロトンビン時間、血清 AFP 値は男女共に独立した危険因子であった。アルコール消費量は男性患者においてのみ独立した危険因子であった。女性患者において BMI が、また男性患者において糖尿病がそれぞれ HCC 発がんに対するリスク因子に関連する傾向を認めた (HR 1.09、95%信頼区間 0.99-1.19;p=0.061、HR 1.81、95%信頼区間 0.96-3.44 ; P=0.066)。

表 4.HCC 発がんに対する危険因子：単変量/多変量解析

Variable	単変量解析	p	多変量解析	p
	ハザード比(95% CI)		ハザード比(95% CI)	
男性				
年齢 (/歳)	1.07 (1.04–1.10)	<0.0001	1.05 (1.02–1.09)	<0.0001
血小板数 (/ 10 <sup>3</sup> /μl)	0.987 (0.982–0.992)	<0.0001	0.995 (0.990–1.001)	0.13
総ビリルビン値 (/0.1 mg/dl)	1.05 (1.00–1.12)	0.057	0.99 (0.92–1.07)	0.96
血清アルブミン値(/0.1 g/dl)	0.87 (0.81–0.93)	<0.0001	1.01 (0.94–1.09)	0.72
AST 値(/1 IU/l)	1.005 (1.001–1.008)	0.005	1.00 (0.99–1.02)	0.22
ALT 値(/ 1 IU/l)	1.002 (0.999–1.005)	0.21	0.99 (0.98–1.00)	0.41
AFP 値 >10 ng/ml	3.58 (2.19–5.86)	<0.0001	2.99 (1.70–5.24)	0.0001
プロトロンビン活性(per 1%)	0.94 (0.92–0.96)	<0.0001	0.95 (0.93–0.97)	<0.0001
飲酒量 >50 g/day	1.76 (1.07–2.89)	0.025	1.88 (1.04–3.37)	0.034
BMI (per 1 kg/m <sup>2</sup> )	0.97 (0.90–1.04)	0.44	1.01 (0.93–1.09)	0.76
糖尿病 (yes)	1.89 (1.06–3.37)	0.029	1.81 (0.96–3.44)	0.066
アディポネクチン濃度 >10.5 μg/ml	1.69 (1.03–2.76)	0.034	1.82 (1.00–3.33)	0.050
女性				
年齢 (/歳)	1.12 (1.07–1.16)	<0.0001	1.11 (1.06–1.17)	<0.0001
血小板数 (/ 10 <sup>3</sup> /μl)	0.976 (0.969–0.982)	<0.0001	0.98 (0.97–0.99)	0.004
総ビリルビン値 (/0.1 mg/dl)	1.15 (1.08–1.23)	<0.0001	0.86 (0.76–0.97)	0.015
血清アルブミン値(/0.1 g/dl)	0.82 (0.77–0.89)	<0.0001	0.94 (0.85–1.04)	0.27
AST 値(/1 IU/l)	1.008 (1.004–1.012)	<0.0001	0.99 (0.98–1.00)	0.32
ALT 値(/ 1 IU/l)	1.004 (1.001–1.007)	0.019	1.00 (0.99–1.01)	0.83
AFP 値 >10 ng/ml	10.51 (5.96–18.53)	<0.0001	4.85 (2.38–9.90)	<0.0001
プロトロンビン活性(per 1%)	0.91 (0.89–0.93)	<0.0001	0.94 (0.91–0.98)	0.018
飲酒量 >50 g/day	0.47 (0.17–1.30)	0.15	0.85 (0.33–2.20)	0.74
BMI (per 1 kg/m <sup>2</sup> )	1.15 (1.08–1.23)	<0.0001	1.09 (0.99–1.19)	0.061
糖尿病(yes)	1.78 (0.84–3.77)	0.13	0.84 (0.35–1.99)	0.69
アディポネクチン濃度 >16.7 μg/ml	2.02 (1.16–3.50)	0.012	2.07 (1.06–4.04)	0.031

女性患者において、高アディポネクチン血症および高 BMI であることは、両因子が負の相関関係にあるにも関わらず、どちらも肝発がんのリスク因子であることが上記の結果で示された。そのため、女性患者において、BMI で層別化してアディポネクチンが肝発がんにどう影響しているのか調べることにした。

その結果、BMI>25 の過体重の女性患者において、高アディポネクチン血症である患者の方がより肝癌の累積発癌率が高かった( $p=0.0036$ )。一方で、BMI が 25 以下の女性患者では、その差は有意ではなかった( $p=0.094$ )(図 5)。このような結果から、アディポネクチンは C 型肝炎患者の中で特に過体重である患者にとって肝発がんに関連することが示された。

図 5.

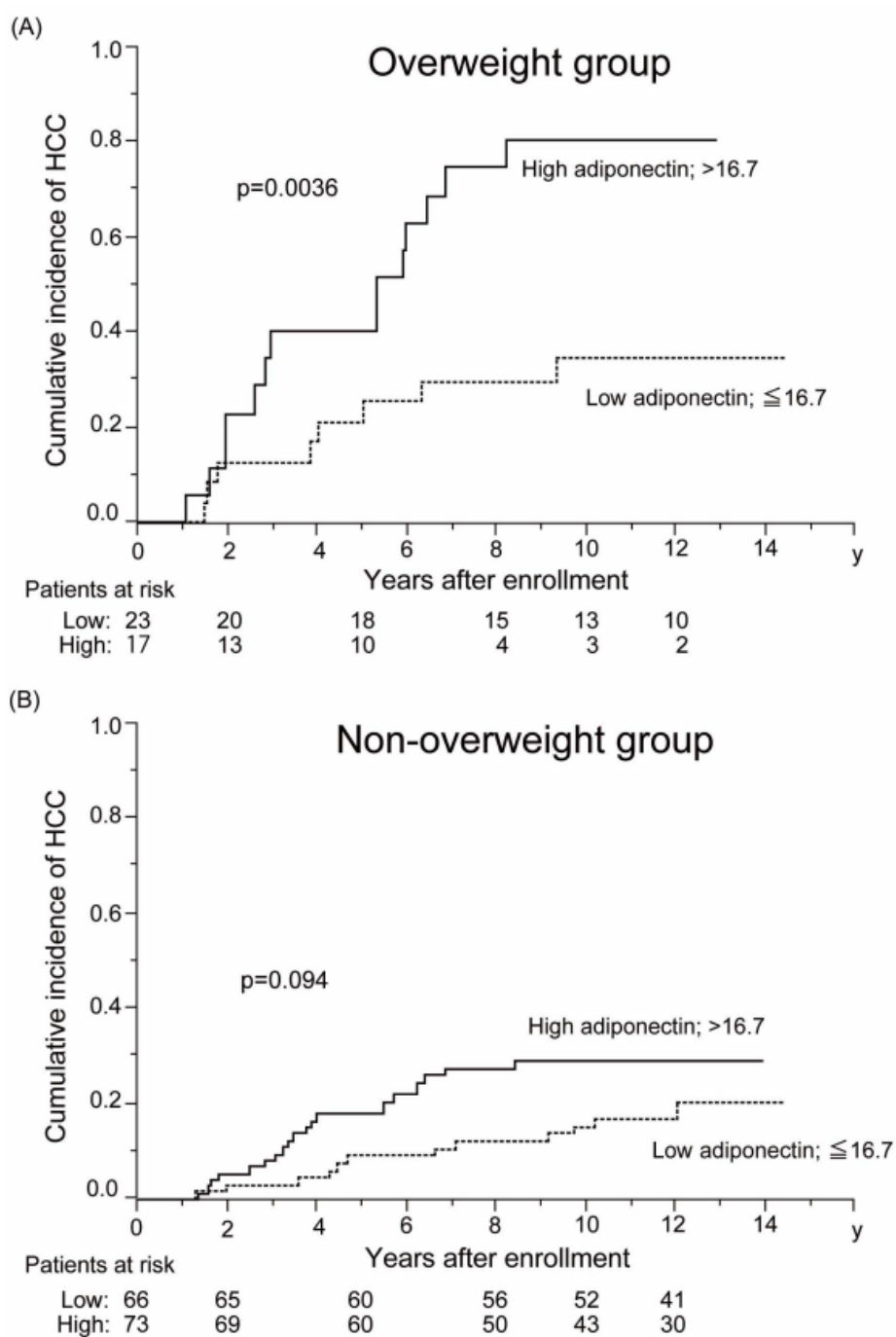


図 5. BMI で層別化した女性患者のアディポネクチン値の中央値で 2 群に分けた HCC 発がんの累積発癌率のサブグループ解析

(A) : BMI>25 の過体重患者、(B) : BMI $\leq$ 25 の非過体重患者

#### 4-e) 免疫組織化学染色

アディポネクチンの肝内の局在を調べるため、我々は肝生検組織を使用してアディポネクチンの免疫組織化学染色を行った。325 人のうち、64 人が血清収集時期と同時期に肝生検が取られており、うち 35 人のパラフィン包埋された検体を利用することができた(F0-2, n=9; F3, n=10; F4, n=16)。アディポネクチンは主に肝細胞内に染色され、その染色度合いは線維化がより進行した症例の方が強い傾向にあった(図 6)。また、肝臓におけるアディポネクチンの染色度合いが弱い患者よりも強い患者の方が、血清アディポネクチン濃度は高かった (図 6)。



図 6.

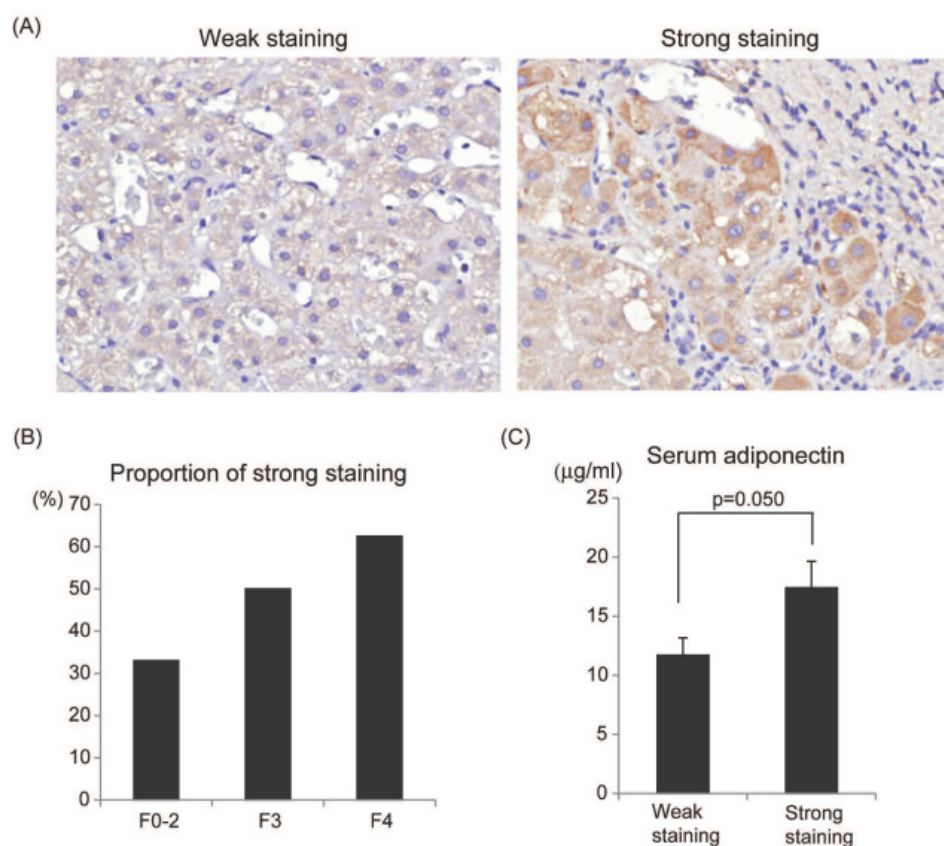


図 6. 肝臓組織内のアディポネクチンの免疫組織化学染色

(A)免疫組織化学染色の典型像。茶色に染まっているところがアディポネクチンの局在を示している。左図は肝線維化が軽度(F2)である患者で肝細胞が弱く染まっている(weak staining)。右図は肝線維化が強い(F4)患者で線維組織ではない肝細胞が強く染まっている(strong staining)。(B)線維化のステージ別に分けたアディポネクチン strong staining の割合。線維化が進行するにつれ、strong stain の率が高くなる。(C)weak and strong staining 別に分けた血清アディポネクチン濃度との関係。データは平均および標準偏差を示している。

#### 4-f) アディポネクチンアイソフォームの検討

アディポネクチンにはいくつかのアイソフォームが存在しており、3 量体を形成している低分子量、6 量体を形成している中分子量、12~18 量体を形成している高分子量があり、それぞれが異なった役割がある[9]。最近の研究では、高分子量アディポネクチンはインスリン感受性に関連して生物学的に機能することが報告されている[30]。高アディポネクチン対総アディポネクチン比 (the ratio of HMW adiponectin to total adiponectin ; HMWR)がインスリン抵抗性、メタボリック症候群、心血管関連疾患発症の予測因子となることが報告されている[31,32]。アディポネクチンのアイソフォームを調べるため、我々は、高アディポネクチン血症が HCC 発がんの独立した危険因子であった女性患者において健常者および C 型慢性患者の血中濃度を測定することにした。その結果、高分子量アディポネクチン量も中低分子量アディポネクチン量も健常者女性と比較して C 型慢性肝炎女性患者の方が、有意に高値であり(図 6 A)、どちらも総アディポネクチン量と有意に相関していた(各々 Spearman's  $\rho=0.928$ ;  $p<0.0001$ , Spearman's  $\rho=0.985$ ;  $p<0.0001$ )一方で、HMWR の比率は C 型慢性肝炎女性患者で有意に低かった(図 6 B)。肝発がんとの関連を調べるため、高分子量アディポネクチンおよび中低分子量アディポネクチンを(総)アディポネクチンの代わりに使用してリスク因子を解析しなおした。

図 7.

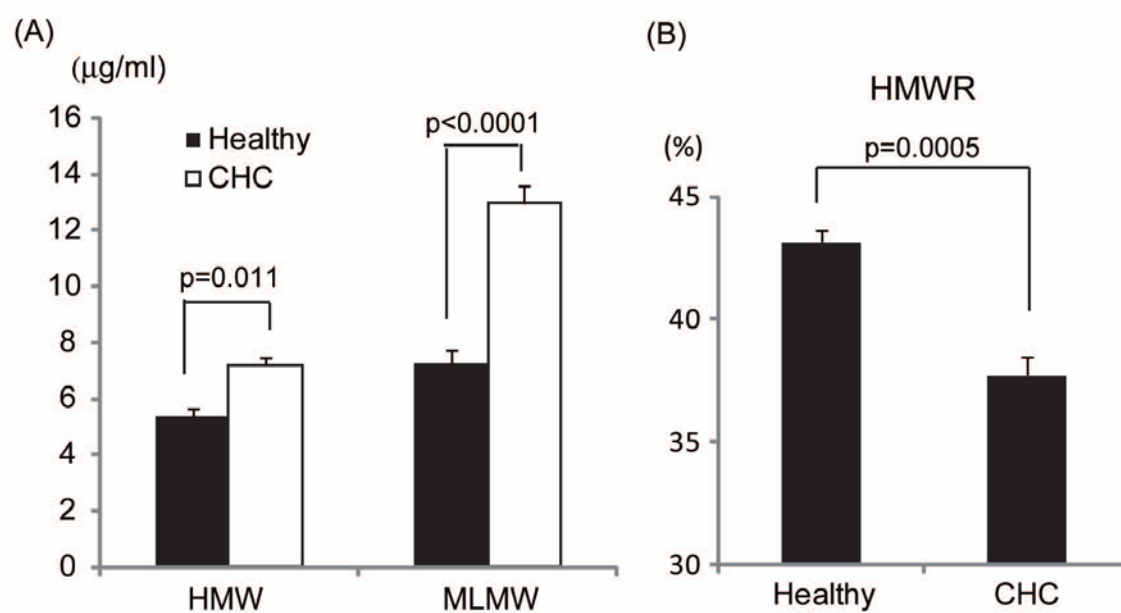


図 7. 女性健常者および女性 C 型慢性肝炎患者のアディポネクチンアイソフォーム。(A):高分子量アディポネクチンおよび中低分子量アディポネクチン濃度。

(B): 総アディポネクチン濃度に対する高分子量アディポネクチン濃度の比率。

データは平均および標準偏差を示している。

C 型慢性肝炎女性患者の高分子量アディポネクチン値および中低分子量アディポネクチンのそれぞれの中央値(5.96 $\mu$ g/ml、10.6 $\mu$ g/ml)をカットオフとして、それぞれ 2 群に分けた。単変量解析において、高分子量アディポネクチンの高いことと中低分子量アディポネクチンの高いことがどちらも肝発がんの有意なリスク因子であることが示されたが、多変量解析において、中低分子量アディポネクチンの高いことのみが独立した危険因子として残った(HR: 1.96; 95% CI: 1.06–3.60; p=0.029; 表 5).

表 5. C 型慢性肝炎女性患者での HCC 肝発がんに対する高分子量アディポネクチンおよび中低分子量アディポネクチンの単変量/多変量解析

Variable	単変量解析		多変量解析	
	ハザード比 (95% CI)	p	ハザード比 (95% CI)	p
高分子量アディポネクチン>5.96 μg/ml	1.99 (1.15–3.45)	0.014	N.S.	
中低分子量アディポネクチン>10.6 μg/ml	1.97 (1.14–3.42)	0.015	1.96 (1.06–3.60)	0.029

N.S.: 有意差なし

## 第五章 考察

アディポネクチンはメタボリック症候群において重要な因子であると考えられており、低アディポネクチン血症がメタボリック症候群に関連する多くの疾患と関連することが報告されてきた[10-12]。しかしながら、本研究は血清アディポネクチン濃度が高い方が肝細胞癌発がんのリスクが高いことが示された。我々の知り得る限り、血清アディポネクチン濃度と肝発がんとの正の相関関係を示した最初の研究である。

アディポネクチンはアディポネクチン受容体 1 と受容体 2 という 2 つのレセプターを介して機能すると報告されている[33]。アディポネクチン受容体 1 は骨格筋や他の組織で発現しているが、アディポネクチン受容体 2 は主に肝臓に発現している。アディポネクチン受容体 1 は AMP キナーゼを活性化させる一方で、アディポネクチン受容体 2 はペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) を活性化させ、インスリン感受性を増強し炎症を抑える[30]。しかしながら、アディポネクチンのアイソフォームにより異なった働きをすると最近報告されている。例えば、高分子量アディポネクチンはインスリン感受性に関する重要な因子であると考えられている一方で、中低分子量アディポネクチンは脳血液関門を通り、視床下部にある AMP キナーゼを活性化させ、むしろ食欲増進に働くと言われている[34]。Hui の研究グループでは中分子量アディポネクチンは B

型慢性肝炎患者で上昇しており、抗ウイルス療法を施行された、特に持続性ウイルス学的著効（SVR）が得られた患者では極端に下がることが報告されている[35]。我々の研究では、高分子量アディポネクチンおよび中低分子量アディポネクチンが共に C 型慢性肝炎患者では上昇しており、とりわけ中でも中低分子量アディポネクチンが高いことが、肝発がんの独立した危険因子であることを示した。このような結果から中分子量もしくは低分子量アディポネクチンは他の臨床パラメータとは独立して、肝臓のある特定の状態を表している可能性が示唆される。しかしながら、高分子量アディポネクチンおよび中低分子量アディポネクチンは総アディポネクチンとの強い正の相関関係があるため、総アディポネクチンでも肝発がんとの関係进行评估するには代用可能であると考えられる。

肝線維化の進んだ患者において血清アディポネクチン濃度が上昇しているとの既報もある[35]。なぜなら、アディポネクチンは肝臓で大部分は代謝されるため[36]、血清アディポネクチン濃度は肝代謝が落ちることにより上昇する。また、血小板数と逆相関するため、血清アディポネクチン濃度は肝線維化のサロゲートマーカーを表現しているかもしれない。しかしながら、本研究で多変量解析の結果、C 型慢性肝炎女性患者において高アディポネクチン血症は肝発がんの独立した危険因子となった。最近の横断研究の報告によると、高アディポネク

チン血症は慢性 B 型肝炎患者の肝細胞癌リスクと独立して相関している[25]。

更に、我々の免疫組織化学染色分析では既報と一致して[35]、線維化の進んだ肝組織にアディポネクチンが集積することを明らかにした。これらの結果からアディポネクチンは線維化を起こした肝組織に集積し、その後何らかの発がん性の働きをしている可能性はある。

最近の報告によるとアディポネクチンは免疫細胞内で  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  が活性化、また IL-6 や  $\text{TNF}\alpha$  が分泌されることにより抗炎症性の性質を発揮しているとの報告がある[37,38]。また、アディポネクチンはマクロファージ由来の IL-6 に依存して肝臓で IRS2 を増加させ、インスリン感受性を亢進させるとの報告もある[39]。IL-6 は肝発がんにおける炎症性サイトカインとして知られており、今回の研究を行う前に同じコホート集団の血清を用いて、IL-6 と肝発がんとの関係を調べている。その結果、IL-6 の濃度が高い群の方が将来肝発がんになることと相関性があることを報告した[40]。そのため、IL-6 とアディポネクチンとの間に何らかの相関関係があると考えたが、我々の研究では明らかな相関関係はなかった(スピアマン相関係数 $-0.018$   $p=0.81$ )(data not shown)。多変量解析の結果、アディポネクチンおよび IL-6 はそれぞれ肝発がんに対する独立した危険因子であった(アディポネクチン値 $>16.7$   $\mu\text{g/ml}$ : ハザード比: 2.05; 95%信頼区間: 1.04–4.03;  $p=0.035$  and IL-6: ハザード比: 1.49; 95%信頼区間: 1.03–2.16; per



log unit increase;  $p=0.033$ )。

アディポネクチンは抗炎症性の性質を有していると考えられているが、関節炎や子宮子癰前症、また末期腎不全において上昇していることを報告している研究もある[41-43]。更に、血清アディポネクチン濃度が高いことが慢性腎臓病の進行の有意な予測因子であることも示されている[44]。齧歯類の肝障害モデルでは、アディポネクチンは虚血再灌流障害によってある条件下で肝臓にダメージを与えることが示されている[45]。本研究では、血清アディポネクチン濃度は健常者と比較して、C 型慢性肝炎患者で高かったことは今までの既報と一致している[19]。一方で血清アディポネクチン濃度は健常者と比較して非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)患者の方が有意に低い(unpublished observation)。このことから、アディポネクチンは炎症や感染および NASH を含む代謝性疾患では異なる役割があると考えられる。我々は低アディポネクチン血症が NASH の発病のイニシエーターと仮説を立てていたが、アディポネクチンは肝線維化の進行によりむしろ C 型慢性肝炎患者では上昇しており、実質的に病態の進行に影響を与えているかもしれない。また、HCC 発がんが高アディポネクチン血症が関連している可能性としては、アディポネクチン受容体のダウンレギュレーションによるアディポネクチン抵抗性が上昇していることも考えられ得る。しかしながら、アディポネクチンと肝発がんの直接的な因果関係は本研究では評価で

きず、今後の研究が必要とされる。

HCC セルラインを In vivo 及び in vitro で異種移植モデルに使用して肝発がんに対してアディポネクチンが protective に働く内容の論文が 2 つ出ており、本研究と異なった結果である[46,47]。確かに異種移植モデルや cancer cell line に対してアディポネクチンがどのように分布するかを調べることで、がん細胞の増殖やアポトーシス、転移に対する影響を調べることができるが、肝発がん全体のプロセスに対するアディポネクチンの影響を調べることはできない。C 型慢性肝炎患者においては慢性炎症により線維化が進行してその後肝細胞癌が発症するといった流れが一般的であり、それ故背景肝疾患の状況も肝発がんにとっては重要な因子である。アディポネクチンががん細胞に対して抑制的に働く可能性はあるが、炎症といった周囲を取り巻く環境が修飾されることにより、総合的に腫瘍促進に働くかもしれない。事実、血清アディポネクチン濃度は肝臓の組織炎症と正の相関関係にあることが報告されている[21]。

Nkontchou らがアディポネクチンではなく、HOMA index の高いことが C 型慢性肝炎患者における肝発がんの危険因子であることが単変量および多変量解析にて報告した[46]。彼らの研究と本研究の大きな違いは、彼らの研究では肝生検で肝硬変であることを全ての患者で確認していることに対し、本研究では全症例の 3 分の 1 の患者で臨床的肝硬変と診断したことである。このように 2 つ

の研究間での結論の違いから言えることは、アディポネクチンが慢性肝炎の進行において何らかの役割を果たしており、肝疾患の進行度合いを表すサロゲートマーカーであるかもしれない。一方で、血清アディポネクチン濃度および他の臨床パラメータとの相関関係はどちらの研究でもほぼ同じであった。例えば、血清アディポネクチン濃度は男性患者よりも女性患者の方が高いが、肝細胞癌の発がん率は女性患者よりも男性患者の方が有意に高かった。このことから、性別で層別化して分析すれば、本研究と同様のような結論に達するかもしれない。

既報と一致しているが、BMI が高いこと及び糖尿病を有していることは本研究のコホート集団でも肝細胞癌発がんのリスクと関連していた[17]。C 型慢性肝炎患者において肥満やメタボリック症候群が肝発がんを促進するメカニズムはまだ明らかではないが、今回の研究データからは低アディポネクチン血症が主要な因子ではないかもしれない。レプチンや  $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6、レジスチン、インスリン抵抗性によるインスリン値の上昇、インスリン様成長因子、肝内脂肪集積などのような因子が、肥満関連肝発がんと関係している可能性がある。

本研究では以下のような限界がある。まず第 1 に肝生検が全体の 5 分の 1 しかなかったり、血清アディポネクチン濃度と肝組織との関係が十分に調べられていないことである。次に、Homeostasis Model Assessment 指数を用いたイ

ンスリン抵抗性を利用できないことである。C 型慢性肝炎患者におけるアディポネクチンとインスリン抵抗性との関連はいまだ意見の一致が見られていないところであり、今後更なる研究が必要とされる。

## 第六章 まとめ

以下に本研究の要旨を箇条書きにして羅列する。

- ・血清アディポネクチン濃度は、男女ともに健常者(男性 7.6 $\mu$ g/ml、女性 13.1 $\mu$ g/ml) よりも C 型慢性肝炎患者(男性 10.5 $\mu$ g/ml、女性 16.7 $\mu$ g/ml)の方がそれぞれ有意に高値を示した (図 3)。

- ・多変量解析で、女性患者において高アディポネクチン血症は独立した肝発がんの危険因子であった (ハザード比(HR)2.07、95%信頼区間 1.06-4.04;P=0.031、表 4)。

- ・女性患者においてアディポネクチンアイソフォームを評価したが、多変量解析において中低分子量アディポネクチンの高いことのみが独立した肝発がんの危険因子として残った(HR: 1.96; 95% CI: 1.06–3.60; p=0.029; 表 5)。

以上のことから結語として、C 型慢性肝炎患者でアディポネクチン濃度が高いことは肝発がんのリスクが高く、特に女性患者において高アディポネクチン血症は肝発がんの独立したリスク因子であることが示された。アディポネクチンアイソフォームを評価したが、中低分子量アディポネクチンが重要な危険因子であった。アディポネクチンは何らかの腫瘍促進因子を有しているか、他の臨床パラメータとは独立した肝疾患状態を反映している可能性がある。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学消化器内科  
小池和彦教授に謹んで御礼を申し上げます。

本研究の遂行にあたり以下の先生方に特に多大なるご協力を賜りましたこと  
を以下に記し、深く感謝申し上げます。

東京大学名誉教授

小俣政男先生

東京大学消化器内科

中川勇人先生、建石良介先生、内野康志先生、榎奥健一郎先生、

後藤絵理子先生、増崎亮太先生、浅岡良成先生、近藤祐嗣先生、

五藤忠先生、椎名秀一朗先生、多田稔先生、吉田晴彦先生

東京大学肝胆膵外科学教授

國土典宏先生

東京大学代謝・栄養病態学准教授

植木浩二郎先生

東京大学医科学研究所疾患制御ゲノム医学ユニット特任准教授

加藤直也先生

東京大学医療評価室・安全・研修部講師

田村純人先生

社会福祉法人三井記念病院総合健診センター所長

山門 實先生

最後に本研究は東京大学消化器内科の皆様のご支援とご協力の賜物であります。皆様に深く御礼を申し上げます。本当にありがとうございました。

## 参考文献

1. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*.127(5 Suppl 1):S5-S16.2004
2. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*.132(7):2557-2576.2007
3. Ioannou GN, Splan MF, Weiss NS, McDonald GB, Beretta L, Lee SP. Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*.5(8):938-945, 945 e931-934.2007
4. Muto Y, Sato S, Watanabe A, Moriwaki H, Suzuki K, Kato A, Kato M, Nakamura T, Higuchi K, Nishiguchi S, Kumada H, Ohashi Y. Overweight and obesity increase the risk for liver cancer in patients with liver cirrhosis and long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules inhibits liver carcinogenesis in heavier patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res*.35(3):204-214.2006
5. Ohki T, Tateishi R, Sato T, Masuzaki R, Imamura J, Goto T, Yamashiki N, Yoshida H, Kanai F, Kato N, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Obesity is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Clin Gastroenterol Hepatol*.6(4):459-464.2008
6. Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol*.43(11):811-822.2008
7. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*.50(3):957-969.2009
8. Ohki T, Tateishi R, Shiina S, Goto E, Sato T, Nakagawa H, Masuzaki R, Goto T, Hamamura K, Kanai F, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Visceral fat accumulation is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma recurrence after curative treatment in patients with suspected NASH. *Gut*.58(6):839-844.2009
9. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*.116(7):1784-1792.2006
10. Chen MP, Tsai JC, Chung FM, Yang SS, Hsing LL, Shin SJ, Lee YJ. Hypoadiponectinemia is associated with ischemic cerebrovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.25(4):821-826.2005
11. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men.



- Arterioscler Thromb Vasc Biol.*23(1):85-89.2003
12. Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab.*87(6):2764-2769.2002
  13. Asano T, Watanabe K, Kubota N, Gunji T, Omata M, Kadowaki T, Ohnishi S. Adiponectin knockout mice on high fat diet develop fibrosing steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.*24(10):1669-1676.2009
  14. Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S, Fukushima J, Kiso S, Fukui K, Igura T, Maeda N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Shimomura I, Hayashi N. Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *J Hepatol.*47(4):556-564.2007
  15. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, Fukui K, Maeda N, Nishizawa H, Nagaretani H, Okamoto Y, Kihara S, Miyagawa J, Shinomura Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology.*125(6):1796-1807.2003
  16. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology.*40(1):46-54.2004
  17. Chen CL, Yang HI, Yang WS, Liu CJ, Chen PJ, You SL, Wang LY, Sun CA, Lu SN, Chen DS, Chen CJ. Metabolic factors and risk of hepatocellular carcinoma by chronic hepatitis B/C infection: a follow-up study in Taiwan. *Gastroenterology.*135(1):111-121.2008
  18. Cua IH, Hui JM, Bandara P, Kench JG, Farrell GC, McCaughan GW, George J. Insulin resistance and liver injury in hepatitis C is not associated with virus-specific changes in adipocytokines. *Hepatology.*46(1):66-73.2007
  19. Hung CH, Lee CM, Chen CH, Hu TH, Jiang SR, Wang JH, Lu SN, Wang PW. Association of inflammatory and anti-inflammatory cytokines with insulin resistance in chronic hepatitis C. *Liver Int.*29(7):1086-1093.2009
  20. Hung CH, Wang JH, Hu TH, Chen CH, Chang KC, Yen YH, Kuo YH, Tsai MC, Lu SN, Lee CM. Insulin resistance is associated with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol.*16(18):2265-2271.2010
  21. Jonsson JR, Moschen AR, Hickman IJ, Richardson MM, Kaser S, Clouston AD, Powell EE, Tilg H. Adiponectin and its receptors in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.*43(6):929-936.2005
  22. Liu CJ, Chen PJ, Jeng YM, Huang WL, Yang WS, Lai MY, Kao JH, Chen DS. Serum adiponectin correlates with viral characteristics but not histologic features in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.*43(2):235-242.2005
  23. Petit JM, Minello A, Jooste V, Bour JB, Galland F, Duvillard L, Verges B, Olsson NO,

- Gambert P, Hillon P. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to steatosis in hepatitis C virus-infected patients. *J Clin Endocrinol Metab.*90(4):2240-2243.2005
24. Siagris D, Vafiadis G, Michalaki M, Lekkou A, Starakis I, Makri M, Margaritis V, Christofidou M, Tsamandas AC, Labropoulou-Karatza C. Serum adiponectin in chronic hepatitis C and B. *J Viral Hepat.*14(8):577-583.2007
  25. Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, Liu CH, Chen CL, Kao JH, Chen DS. High serum adiponectin correlates with advanced liver disease in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Int.*3(2):364-370.2009
  26. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*20(6):1595-1599.2000
  27. Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101(28):10434-10439.2004
  28. Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sato T, Ohki T, Imamura J, Goto T, Kanai F, Kato N, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology.*49(6):1954-1961.2009
  29. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.*15(7):539-553.1998
  30. Yamauchi T, Kadowaki T. Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *Int J Obes (Lond).*32 Suppl 7:S13-18.2008
  31. 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. *Diabetes Care.*29(6):1357-1362.2006
  32. von Eynatten M, Humpert PM, Bluemm A, Lepper PM, Hamann A, Allolio B, Nawroth PP, Bierhaus A, Dugi KA. High-molecular weight adiponectin is independently associated with the extent of coronary artery disease in men. *Atherosclerosis.*199(1):123-128.2008
  33. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi

- M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*.423(6941):762-769.2003
34. 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
  35. Hui CK, Zhang HY, Lee NP, Chan W, Yueng YH, Leung KW, Lu L, Leung N, Lo CM, Fan ST, Luk JM, Xu A, Lam KS, Kwong YL, Lau GK. Serum adiponectin is increased in advancing liver fibrosis and declines with reduction in fibrosis in chronic hepatitis B. *J Hepatol*.47(2):191-202.2007
  36. Halberg N, Schraw TD, Wang ZV, Kim JY, Yi J, Hamilton MP, Luby-Phelps K, Scherer PE. Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin. *Diabetes*.58(9):1961-1970.2009
  37. Neumeier M, Weigert J, Schaffler A, Wehrwein G, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Wrede C, Buechler C. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J Leukoc Biol*.79(4):803-808.2006
  38. Haugen F, Drevon CA. Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin. *Endocrinology*.148(11):5478-5486.2007
  39. Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kubota N, Kaneko K, Kobayashi M, Iwane A, Sasako T, Okazaki Y, Ohsugi M, Takamoto I, Yamashita S, Asahara H, Akira S, Kasuga M, Kadowaki T. Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. *Cell Metab*.13(4):401-412.2011
  40. Nakagawa H, Maeda S, Yoshida H, Tateishi R, Masuzaki R, Ohki T, Hayakawa Y, Kinoshita H, Yamakado M, Kato N, Shiina S, Omata M. Serum IL-6 levels and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients: an analysis based on gender differences. *Int J Cancer*.125(10):2264-2269.2009
  41. Haugen F, Ranheim T, Harsem NK, Lips E, Staff AC, Drevon CA. Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.290(2):E326-333.2006
  42. Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*.65(9):1198-1201.2006
  43. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS,

- Bonanno G, Seminara G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Buemi M, Nicocia G, Tanaka S, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*.13(1):134-141.2002
44. Kollerits B, Fliser D, Heid IM, Ritz E, Kronenberg F. Gender-specific association of adiponectin as a predictor of progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease Study. *Kidney Int*.71(12):1279-1286.2007
  45. Massip-Salcedo M, Zaouali MA, Padrisa-Altes S, Casillas-Ramirez A, Rodes J, Rosello-Catafau J, Peralta C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology*.47(2):461-472.2008
  46. Nkontchou G, Bastard JP, Ziol M, Aout M, Cosson E, Ganne-Carrie N, Grando-Lemaire V, Roulot D, Capeau J, Trinchet JC, Vicaud E, Beaugrand M. Insulin resistance, serum leptin, and adiponectin levels and outcomes of viral hepatitis C cirrhosis. *J Hepatol*.53(5):827-833.2010
  47. Saxena NK, Fu PP, Nagalingam A, Wang J, Handy J, Cohen C, Tighiouart M, Sharma D, Anania FA. Adiponectin modulates C-jun N-terminal kinase and mammalian target of rapamycin and inhibits hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*.139(5):1762-1773, 1773 e1761-1765.2010