

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「テーラーメイド医療を目指した
ゲノム情報活用基盤技術」
研究課題「転写調節系の分子解剖による
糖尿病素因の探索」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：武田 純
(岐阜大学大学院医学系研究科、教授)

1 研究実施の概要

【研究の背景】

近年、我が国の糖尿病人口は急増しており、大半を2型糖尿病が占める。将来これら全ての患者を医療機関が治療することは医療経済上困難であるので、病態解明による発症予防は医療行政の負担を大きく軽減するので重要である。

欧米の2型糖尿病が主として「肥満型インスリン抵抗性」であるのに対し、日本人では「非肥満（あるいは軽度肥満）インスリン分泌不全」を特徴とし、疾患発症の遺伝素因には顕著な民族差が存在する。本研究は、日本人に特有な糖尿病素因を同定することによって、罹患者質の解明とテーラーメイド医療の開発を目指す。

常染色体優性遺伝の糖尿病 MODY (maturity-onset diabetes of the young) は非肥満インスリン分泌不全を特徴とするので、日本人糖尿病のモデル疾患である。現在までに6種類の原因遺伝子が同定されており、我々は世界で最初の MODY 遺伝子を含む3種類を発見している。これらの原因遺伝子は一連の HNF 転写因子をコードして (HNF-1 α , -1 β , -4 α , Pdx1, Beta2)、連携ネットワークを形成して膵 β 細胞のインスリン分泌を制御する。続いて、HNF-4 α (MODY1) に結合する転写抑制因子 SHP の異常が逆にインスリン過分泌を介して、出生児過体重、若年肥満、インスリン抵抗性を生じることを明らかにした。一方、HNF-SHP ネットワークは肝の転写ネットワークともリンクして高脂血症や高血圧に関連し、脂質代謝や核内受容体 PPAR γ を介して動脈硬化にも関連することが示された。従って、病態が共通する2型糖尿病の遺伝素因が MODY 転写ネットワークに関連することは疑いない。すなわち、転写調節の重度障害では単一遺伝子異常の糖尿病が惹起され、一方、軽度障害は他因子と協調して2型糖尿病リスクとなるという図式が想定される。

【遺伝子解析シーズと研究戦略】

ゲノム全域スクリーニングではなく、膵 β 細胞の転写調節カスケードに焦点を絞って選別した遺伝子の多型 (SNP) 関連解析である。転写因子を選択した理由は上記の通りであり、候補遺伝子に特化した理由は、表現型 (病態) が生じる機序の解明と理解が比較的容易であろうこと、本研究のミッションであるテーラーメイド医療への応用に直結しやすいことが挙げられる。従って、以下で得られた候補遺伝子多型を用い、疾患発症あるいはサブ表現型との関連解析を主として行なった。続いて、関心遺伝子や標的エフェクター分子を欠失させたモデル動物を用いて発症機序と病態を解析した。

1) 膵島トランスクリプトームを利用した候補遺伝子の選別

本遺伝子解析の基本シーズは独自収集した膵島 EST プールである。転写因子は細胞内で発現を亢進あるいは抑制させると下流標的遺伝子の発現レベルはそれぞれ応答して変化する。そこで本研究では、① 一連の MODY 転写因子の発現を変化させ、EST マイクロアレイ解析により協調因子や下流の標的因子を網羅した。② 細胞特異的な転写因子は、特異的機能であるインスリン合成・分泌に関連する遺伝子発現を制御すると考えられるので、正常細胞とインスリン分泌能を欠失した膵 β 細胞株の mRNA 発現プロファイルと比較して異なる遺伝子を求めた。③ 膵島特異的な遺伝子は特異的転写因子によって制御されるので、膵組織切片と実験動物 EST プローブを用いた大規模 in situ hybridization (ISH) により、転写標的となる遺伝子を求めた。

①② EST プールと発現プロファイル解析

膵 β 細胞の転写制御を網羅的に解析するためには、膵 β 細胞に発現する遺伝子のデー

データベース化と遺伝子発現を解析するためのマイクロアレイの開発は極めて有用である。ヒト、ラット、マウスの膵島と細胞株について約 10 万個の EST を収集し、マウス独立クローンを用いてメンブレンアレイを開発した。

MODY 関連の HNF 転写因子を培養細胞で過剰発現、あるいは siRNA 抑制させて転写下流ターゲットである発現変化遺伝子をアレイ解析によって求めた。一方、膵内分泌に関連する遺伝子は特異的転写因子で制御されていると考えられる。そこで正常膵島細胞とインスリン分泌能を欠失した RINm-5F 細胞を用いて発現プロファイルを比較解析して特異的機能に関連する遺伝子も探索した。

③ 膵島 EST 大規模 in situ hybridization (ISH)

膵島ホルモンの血糖調節を理解するには、膵内分泌特性に関連する遺伝子を網羅解析することが直接的である。次いで、これらの遺伝子プロモーターを認識するトランス因子を解析することは新規の転写因子を獲得することに繋がり、これらの特異的遺伝子および調節因子は糖尿病遺伝子の新たな候補にもなる。我々はハイスループットな EST ISH の解析系を確立し、膵島発現遺伝子の網羅的解析を実施した結果、比較的特異性が高い 178 個の遺伝子を得た。その内 47 候補について、合計 562 エクソンスクリーニングを行ない、605 SNPs を見出して疾患発症との関連解析に供した。

【研究成果の概要】

1) 転写因子遺伝子の変異スクリーニングと多型を用いた関連解析

① 若年糖尿病の遺伝学的解析

15 才以下で発症した非 1 型糖尿病は、MODY のように重度の遺伝子異常の単独あるいは少数によって発症すると想定される。そこで、上記で見出した候補遺伝子について若年糖尿病患者の DNA の全エクソン領域を直接スクリーニングした。その結果、*noc2* (RPH3AL) においてナンセンス変異を見出した。一方、MODY 遺伝子において 2 種類のアレル欠失を見出したので、CNV に起因する若年糖尿病が存在することを明らかにした。

② 2 型糖尿病に関する SNP 関連解析

上記で見出した 58 個の 2 型糖尿病の候補遺伝子 (ISH 遺伝子を除く) と、30 個の動脈硬化の候補遺伝子をスクリーニングし、頻度の高い 264 SNPs を関連解析に供した。その結果、転写因子を含む既知遺伝子 *HIF-1 α* , *LRH-1*, *TCF7L2*, *CDKAL1*, *IGFBP2* において、糖尿病発症と有意の関連を認めた。一方、正常膵島とインスリン分泌能を欠失した RIN 細胞との mRNA 比較解析では、分泌蛋白をコードして血中診断や創薬に応用できる脂質代謝関連分子を見出している。本コード遺伝子の多型は 2 型糖尿病と有意な関連を示したので、種々のサブ表現型と血中レベルとの相関解析は臨床応用の観点から興味深い。尚、上記の ISH 解析で獲得した SNP 解析作業は現在進行中である。

上記遺伝子の内で、特に、SHP の協調因子である *LRH1* については、プロモーター多型によって生じるトランス因子のリクルート有無が疾患発症に関連する。*LRH1* は膵島形成の初期に機能する転写因子を制御する。*LRH1* 欠失マウスの解析により胎生期の膵島形成不全が生じる可能性が示唆されたので、ヒトでは本プロモーター多型により遺伝子発現の量的変化が生じ、膵 β 細胞の分泌予備能の形成不全で疾患感受性を増大する可能性が考えられた。一方、*LRH1* は肝脂質代謝においても HNF 転写因子を介して重要遺伝子を制御するので、他の代謝異常との体質リンクの解析を進めている。

2) 膵β細胞に発現する新規転写因子の同定と欠失マウスの解析

膵β細胞あるいはその発生起源である腸管に発現する一連の転写因子は、膵β細胞の発生・分化および機能維持に重要な働きをしている。

本研究では、①膵β細胞株からクローニングした転写因子 Otx3 の欠失マウスを作製・解析し、② Otx3 との構造相同性から新たに腸管に特異的に発現するホメオドメイン転写因子 Mgx1 を同定し、同じく遺伝子欠失マウスを作製した。

① Otx3 の遺伝子欠失マウスの解析

機能解析の結果、Otx3 は他の Otx ファミリーとヘテロダイマーを構成して転写抑制を示した。また、欠損マウスの解析により、Otx3 が、遺伝性肥満・糖尿病モデルマウスである Ay マウスの肥満・糖尿病の発症に不可欠であることを見いだした。

② 腸管特異的ホメオドメイン転写因子 Mgx1 の同定と欠損マウスの解析

Otx3 遺伝子配列との相同性に基づき、膵原基が発生する前腸を含む腸管に特異的なホメオドメイン転写因子 (Mgx1 と命名) を同定した。Mgx1 欠損マウスでは膵β細胞の明らかな形態異常は認められないが、Mgx1 を膵β細胞株に強制発現させると細胞分化に必須の転写因子 Pdx1 (MODY4) の発現が著明に低下したので、特異性の維持に関与する可能性が示唆された。一方、腸上皮細胞では、脂質トランスポーターの発現が著明に増加していることが観察された。

3) HNF 転写標的である K_{ATP} チャネル遺伝子改変マウスのインスリン分泌解析

HNF-1 α (MODY3) や HNF-4 α (MODY1) は、スルホニル尿素薬 (糖尿病治療薬) の標的である K_{ATP} チャネルの発現を制御することにより膵β細胞のグルコース応答分泌に寄与している。 K_{ATP} チャネル欠失マウスを用いて、種々のインスリン分泌刺激に対する応答を解析したところ、チャネル活性を欠損しても、細胞内 cAMP が増加した状態ではグルコースによるインスリン分泌応答を惹起できることを明らかにした。本知見は、MODY のみならず、グルコース応答性インスリン分泌の失われた日本人 2 型糖尿病をインクレチン療法で治療できる可能性を示す。

4) レプチンと PPAR- γ を介した食欲制御に関する研究

肥満では抑制的な血中レプチン濃度が高いにも関わらず、食欲が低下しない (レプチン抵抗性)。一方、SHP の結合標的である転写因子 PPAR- γ の活性化は脂肪細胞におけるアディポカイン産生を変動させ食欲調節に関与することが示唆されている。群馬大の森チームはこれら 2 点の課題を中心に研究を進めた。

① レプチン抵抗性機構の解明

レプチン抵抗性を解明する目的で、肥満者の血中脂肪酸分画を解析した結果、多価不飽和脂肪酸 EPA が上昇していた。実際、ラット実験では EPA 摂餌で過食、肥満状態を示し、脳脊髄液中のレプチン濃度が低下していた。EPA 含有食の長期摂取はレプチンの血液・脳内関門の移行性を低下させて抵抗性を惹起し、過食、肥満を生じることが示唆された。更に EPA によるレプチン抵抗性発現機序として脳血管内皮細胞間の tight junction を形成する蛋白の一つであるオクルージンの過剰発現の関与を明らかにし、末梢組織からの代謝シグナルの中枢への伝達障害の一つとして脂質代謝異常に起因した血液脳関門機構の変動が存在することを明らかにした。

② 新規の摂食抑制蛋白の発見

PPAR- γ で活性化される新たな食欲調節蛋白を見出した (Nesfatin と命名)。Nesfatin

は視床下部弓状核、室傍核などの摂食調節に関連した神経核に発現を認め、組換え体のラット第三脳室内投与は明らかな摂食抑制を示した。Nesfatin はプロセッシングされ Nesfatin-1 となって摂食抑制作用を有する。作用経路を理解するために、レプチン受容体異常を有するモデル動物の脳室内に投与すると、対照と同様な摂食抑制が観察された。抗体投与は同効果を消失させたが、レプチンによる摂食抑制に影響しなかったことから、Nesfatin-1 による摂食抑制系はレプチン系とは独立すると考えられた。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究は基本的に、転写因子、共役因子、下流標的のエフェクター因子の流れに焦点を絞った候補遺伝子 SNP 戦略であり、研究シーズとして隣島トランスクリプトームを活用する。転写因子という特性から、有力候補の獲得には EST マイクロアレイや EST プローブを用いた ISH などの遺伝子発現のプロフィール解析が有効である。

一方、SNP 関連解析に用いる DNA 試料については、厳選された対照と糖尿病患者の充実した臨床所見が数値化されて整備された。この効率的な状況下で多型を用いた関連解析が展開され、後述のように興味深い知見が多く蓄積された。

当初予定では、MODY 関連の HNF 転写因子すべてについてアレイ解析を行ない、標的遺伝子を網羅する予定であったが、海外グループにより HNF-4 α (MODY1), HNF-1 α (MODY3) の肝と隣島の標的遺伝子が組織特異性をもって網羅され、データベース化された。従って、当初の準備実験の相当部分が回避されたので、計画は特異的遺伝子の選別作業とコード蛋白解析にシフトできて加速されることになった。例えば、大規模 ISH は当初計画に含まれなかったが、経過により新たに着手され完遂することができた。

研究のもう一つの流れである、実験モデル動物を解析して発症機構を理解する計画も順調にこなされている。転写因子の標的遺伝子の改変マウスや自然発症動物を用いた解析などで、新たな転写因子の同定を含め、インスリン分泌の調節機構や食欲制御機能の理解は深まった。

(2) 実施体制 (研究代表：武田 純)

計画の開始当初は、「遺伝素因解析研究グループ (群馬大学)」、「モデル動物解析グループ (千葉大学)」、「ゲノム創薬グループ (株) 三和化学研究所」の 3 グループで構成された。研究代表者らの人事異動に伴い組織を改編した。「遺伝素因解析研究グループ (群馬大学)」は、「遺伝素因解析研究グループ (岐阜大学)」と「遺伝子多型解析研究グループ (群馬大学)」に後述のように区分したが、実質的に代表者が総合指導することによって計画を推進させた。「モデル動物解析グループ (千葉大学)」は分担グループ長の異動に伴い改廃し、「モデル動物解析グループ (神戸大学)」として同じ研究内容を継続した。

* 病態解析と研究総括グループ

分担グループ長：武田 純 (岐阜大学大学院医学系研究科 教授)

研究項目：糖尿病発症に関する遺伝子型・表現型の関連解析と病態解析

研究グループ成績の統合と総合解析

役割分担：候補遺伝子の SNP ハプロタイプを用いて糖尿病の種々の表現型との関連解析を行ない、感受性遺伝子を求める。さらに、大規模 in situ hybridization

(ISH)解析を行ない、膝島特異的な遺伝子を得る。これらの遺伝子のプロモーター解析より、膝島特異性に関する新たな転写因子を同定する。これらの転写因子の標的に関する知見、HNF システムを介したインスリン分泌調節機構に関する知見、耐糖能、合併症、薬剤応答および種々の関連代謝異常の臨床成績を統合することによって、遺伝子診断ツールの開発と創薬対象の獲得を試みる。

最近、心血管イベントの発症素因に民族差が存在することを示唆する成績が得られ、動脈硬化の病態に HNF-SHP 転写因子経路が関与する報告が多く発表された。そこで本研究では、インスリン分泌に関連した日本人素因と血管合併症との体質リンクの解明にも研究を進展させる。

* 遺伝素因解析グループ

分担グループ長：武田 純（岐阜大学大学院医学系研究科 教授）

志原伸幸（群馬大学生体調節研究所 助教）

研究項目：糖尿病候補遺伝子の SNP 解析

役割分担：岐阜大学チームがマイクロアレイ解析および in situ hybridization により得た候補遺伝子について蛋白コード領域、プロモーター、イントロン等の大規模シーケンスにより多型を同定し、岐阜大チームに供給する。本チームは、High-throughput なシーケンス機器を有するので、17年度（代表者：武田と分担者：堀川の両者が岐阜大学に異動して以降）から大量シーケンスを専門に分担するように作業計画を変更したが、最終年度までその方針を継続した。さらに、有意のマーカーを出来るだけ増やすために、岐阜大学分を加えて SNP タイピング作業の比率を上昇させた。

日本人の2型糖尿病は比較的やせ型のインスリン分泌不全を特徴とするが、軽度の肥満やインスリン抵抗性が発症トリガーとなることも事実であり、食行動異常も認められる場合が少なくない。サブグループ（分担：森昌朋）は、転写因子 PPAR γ , Akt を中心としたインスリン作用、肥満とインスリン抵抗性と肥満、食行動異常と食欲制御機構について生理学的研究を進めた。

* モデル動物解析グループ

分担グループ長：三木隆司（神戸大学大学院医学研究科 准教授）

研究項目：遺伝子操作動物の作成と解析

役割分担：膝 β 細胞に発現している K_{ATP} チャンネルは、グルコースによるインスリン分泌制御に重要な分子であるが、ある種の条件下では K_{ATP} チャンネル非依存性にグルコースによるインスリン分泌が調節されることが明らかになった。昨年度の研究により、①グルコースが引き起こす細胞内シグナルが ATP そのものであること、②細胞内 cAMP の上昇により新たなグルコース感知メカニズムが惹起されること、③同メカニズムには細胞膜の電氣的興奮が必須であること、を見いだした。

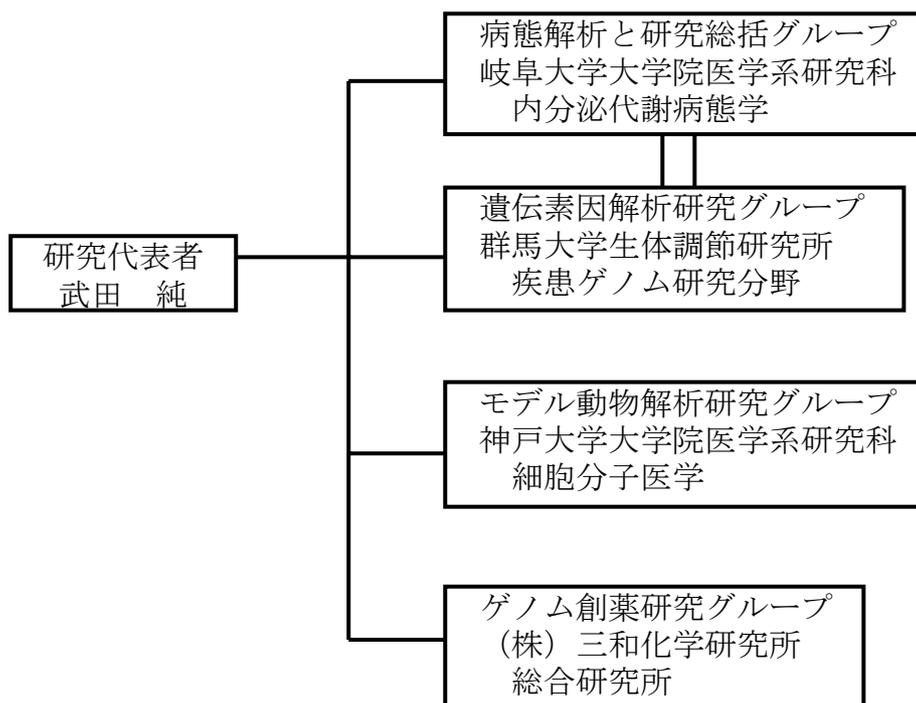
* ゲノム創薬グループ

分担グループ長：城森孝仁（三和化学研究所 所長）

研究項目：液性因子薬剤の開発とインクレチン創薬

役割分担：膝 β 細胞内の cAMP 濃度を増加させる消化管ホルモンである GLP-1 (グルカゴン遺伝子から生成される) の補充療法は現在糖尿病の新たな治療法とし

て注目されている(上記の K_{ATP} チャネル欠失マウスの解析を参照)。血中のGLP-1レベルを上昇させる α -グルコシダーゼ阻害薬は日常的に使用されているが、その有効性についてのインクレチン関連遺伝子のSNP関連解析(岐阜大学が担当)を行なうことによって診断法を開発する。特に、三和化学研究所らが開発した「セイブル(ミグリトール)」や治験中のDPP-IV阻害薬の感受性体質を中心に解析を進める。本知見は、GLP-1を分子標的とした糖尿病治療の感受性体質の解明研究の基盤となると期待される。



3 研究の成果

【発現解析ツールと EST シーズの開発】

(3 チームの合同作業)

1) 膵島トランスクリプトーム

本遺伝子解析の基本シーズは独自収集した膵島 EST (expressed sequence tag) プールである。膵島に関する大型 EST データベースは世界で2つあり、我々のものとヒトを中心とした米国の Endocrine Pancreas Consortium (EPConDB) だけであり、ラットを中心とした実験動物は我々のソースが充実している。

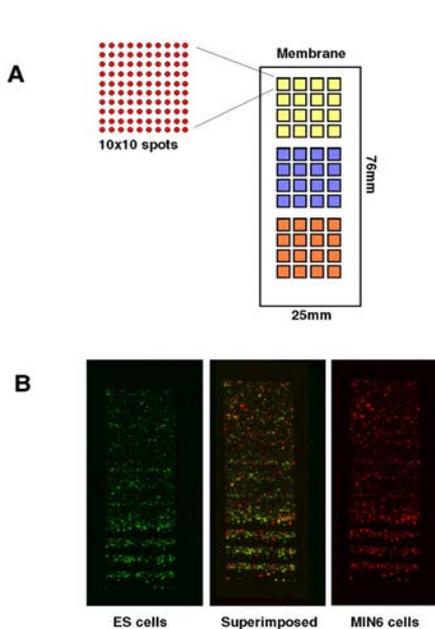
転写因子は、細胞内で発現を亢進あるいは抑制させると下流標的遺伝子の発現レベルはそれぞれ応答して変化するという利点がある。そこで本研究では、① 一連の MODY 転写因子の発現を変化させ、独自開発した EST マイクロアレイ解析により協調因子や下流の標的因子を網羅収集した。② 細胞特異的な転写因子は、特異的機能であるインスリン合成・分泌に関連する遺伝子発現を制御すると考えられるので、正常細胞とインスリン分泌能を欠失した膵 β 細胞株の mRNA 発現プロファイルを相互に比較して発現レベルが異なる遺伝子群を求めた。③ 膵島特異的な遺伝子は細胞特異的な転写因子によ

て発現制御されるので、膵組織切片と実験動物 EST プローブを用いた大規模 in situ hybridization (ISH)により、膵島特異的に発現する遺伝子を求めた。これらの特異的遺伝子のプロモーターのシス配列を in silico 解析することによって新たなトランス因子を推定することが期待できる。

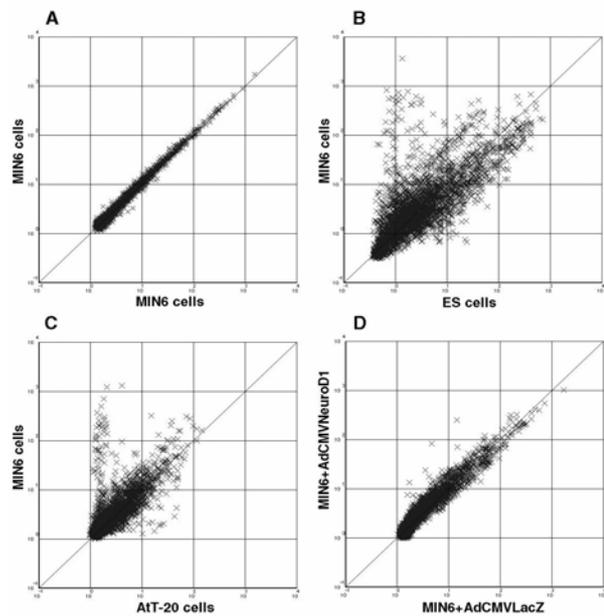
①② EST プールの整備と発現プロフィール解析

膵β細胞の転写制御を網羅的に解析するためには、膵β細胞に発現する mRNA のデータベース化と遺伝子発現を解析するための DNA マイクロアレイの開発は極めて有用である。ヒト、ラット、マウスの正常膵島と細胞株(MIN6, RINm5F)について、約 10 万個の EST を収集した(J Mol Endocrinol 2003, 2005, DNA Res 2004)。特に、遺伝子改変マウスの発現解析に用いるために、8,800 の独立クローンを用いてマウス EST マイクロアレイを開発した(下図)。同アレイの精度解析の結果を下図右に示すが、検出感度も高く、高精度が達成されたと評価する。さらに、合併症である糖尿病網膜症の解析と食欲制御機構とインスリン分泌不全との内分泌リンクの解析のために、それぞれラット網膜 EST (Kitakanto Med J 2005)とラット視床下部 EST (7,173 種類)も収集した(Brain Res 2004)。MODY 関連の転写因子は全て膵島の発生と分化に関与している。その過程を理解するために、インスリン分泌細胞と共通の発生原基であるマウス小腸の EST も同時に収集した。

以上の EST データと遺伝子情報はすべて GenBank と DDBJ で研究開始前から進行に応じて公開されている。



EST マイクロアレイの作成



発現プロフィールの比較解析

MODY 関連の一連の HNF 転写因子を培養細胞で過剰発現、あるいは siRNA 抑制させて転写下流ターゲットである発現変化遺伝子をマイクロアレイ解析によって求めた。

mRNA 抑制は、分担者の北手ら（本学工学部）が開発したダンダリングエンドを修飾した高効率 siRNA ツール(特願 2004-250866)を用いた。この次世代型 siRNA の特徴は、1) ノックダウン効果の発現時間を 1/2 に短縮した、2) 細胞膜透過性が亢進した、3) ヌクレアーゼ耐性が増大した点にある。その結果、従来法の約 100 倍の効率が望める。

一方、膵内分泌に関連する遺伝子は特異的転写因子で制御されていると考えられる。そこで正常膵島細胞とインスリン分泌能を欠失したインスリン細胞株 RINm-5F を用いて発現プロファイルを比較解析して特異的機能に関連する遺伝子も探索した (J Mol Endocrinol 2005)。すなわち、正常とインスリン合成や分泌能が著明に低下した状態とを比較すると、インスリン分泌に関連する mRNA は正常膵島で高発現し、RINm5F 細胞では低下しているはずである。一方、RINm5F 細胞は胎生初期の未分化な膵島細胞の性格を有する。従って、RINm5F 細胞で高頻度に見られる転写因子は、膵β細胞の発生と分化に関与する可能性が考えられる。MODY 関連の転写因子はすべて膵島細胞の発生と分化に関与するので検出された遺伝子は新たな候補となり、次項の胎児膵を用いた ISH 解析に供する。マイクロアレイ解析では低発現レベルの mRNA の発現差異は検出できないので、各々の cDNA ライブラリーから無作為選択した 20,000 個の EST の出現頻度の比較を第一段階の検討とした(下表)。上述のように、これらの特異的遺伝子のプロモーター解析によって新たなトランス因子が期待できる。

**出現頻度が大きく異なる主な遺伝子のリスト (15 回以上のみを表示)
(数字は各々 20,000 個の EST における出現頻度を表す)**

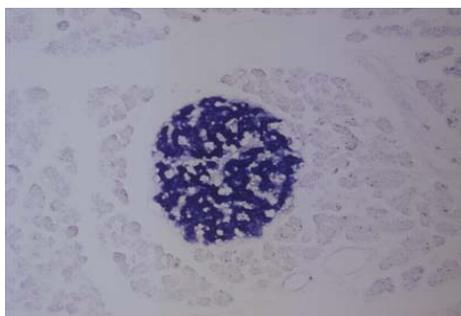
遺伝子	ラット正常膵島	RINm5F 細胞
Insulin	3,734	12
Islet amyloid polypeptide (IAPP)	321	0
CD74	28	0
Follistatin-like protein mac25	24	0
Mesothelin	23	0
Major alpha-globin	23	0
Insulin receptor-related receptor (IRR)	18	0
Osteonectin (SPARC)	17	0
Interferon-related developmental regulator 1	0	53
DNA topoisomerase II	0	43
Proliferating cell nuclear antigen	0	26
Pan-GTPase activating protein 1	0	21
Heat shock 70KD protein 5	0	20
HLA-B associated transcript 2	0	16

③ 膵島 EST 大規模 in situ hybridization (ISH)

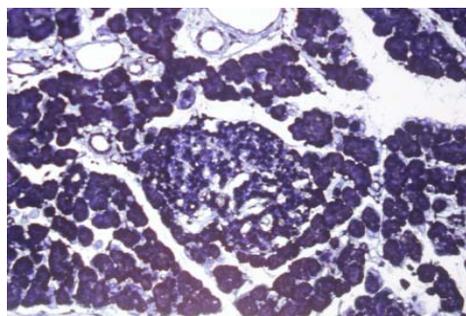
インスリン、グルカゴン分泌による膵島細胞の血糖調節を理解するには、膵内分泌の特異性に関連する遺伝子を網羅解析することが直接的である。次いで、これらの遺伝子のプロモーターを認識するトランス因子を解析することは新規の転写因子を獲得することに繋がる。また、これらの特異的遺伝子および調節因子は糖尿病遺伝子の新たな候補

にもなる。我々はハイスループットな EST ISH の解析系を確立し、ラット EST を用いて膵島発現遺伝子の網羅的解析に着手した。

約 4,000 種類の遺伝子の中で 2,796 個においてシグナルが検出でき、膵内分泌組織に比較的特異性が高い 178 個の遺伝子を得ることができた。

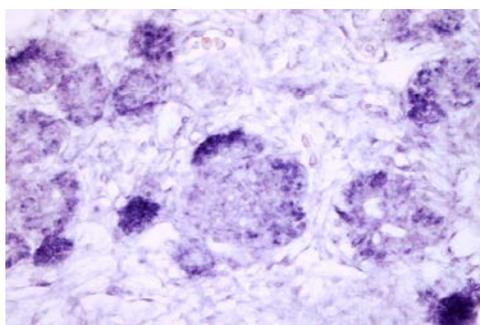


膵島に特異性の高い EST



膵島に特異性の低い EST

その内 47 個の候補遺伝子については、合計 562 エクソンの変異スクリーニングを行ない、605 SNPs (新規 SNP 347 個、ミスセンス変異 112 個) を見出して疾患発症との関連解析を行なっているところである。さらに、有力候補については、ラット胎児膵(胎生 15 週)の組織切片を用いて胎生期からの発生と分化における発現パターンの変遷と意義を ISH 解析している (下図)。



rat embryo 15 day pancreas

2) 遺伝子多型を用いた関連解析： 2型糖尿病群と良質コントロール群の設定

2型糖尿病のケースコントロール解析で最も重要なことは「解析対象の均質性」であるので、先ずコントロールを出来るだけ厳格な条件のもとに選別することが重要であり、次いで2型糖尿病のようなヘテロな疾患集団の均質化が求められる(抵抗性を出来るだけ除外)。特に、コントロール群への罹患素因や関連素因の混入を出来るだけ少なくすることが検出効率の向上において重要である。

2006年に我々が実施した岐阜市の実態調査(約1,000人を対象とした75g経口糖負荷試験(OGTT))では、40歳以上の3人に1人が耐糖能異常を有し(約10%が糖尿病型であり、約20%が境界型であった)、空腹時血糖が正常の者も多くこの耐糖能異常グループに含まれた。この糖負荷試験の調査は自身が糖尿病ではないと自己申告した者を対象として実施し、既に診断されている者は除外されている。この事実は、通常为非糖尿病群として設定されている対照には疾患体質の混入が少なくない可能性を示唆する。そこ

で、自身が糖尿病発症を認識していない軽症例や境界型などの予備軍をできるだけ除外した良質コントロール群を設定することと、糖尿病の病態を亜分類できるように臨床情報を詳細に集積することに努力した（家族歴の有無、発症年齢、抵抗性／分泌不全、合併症（細小血管障害、大血管障害）、治療（食事療法、経口薬治療、インスリン治療）などで分類）。正常コントロールとして採用した条件は、60歳以上、家族歴なし、非肥満（BMI<25）、随時血糖正常、HbA1c 5.5以下、他の代謝異常なしであり、以上を満たすスーパーコントロールのみを用いた。SNP 関連解析を実施するにあたっては、基本的に第1スクリーニングは糖尿病群と対照群の各々576サンプルを用いて実施した（384プレート3枚に半々を搭載）。このサンプル数では母集団での有病率を7.5%と仮定し、multiplicative（相乗）なモデルでOR 1.4、母集団での感受性アリル頻度0.2-0.8なら p 値<0.05とすると検出力 $(1-b)=90-96\%$ となる。その後、他のSNPsとハプロタイプを構築し、LDブロックに基づいた関連解析に供した。この場合も p 値<0.05を有意としている。多重検定の場合は、さらに検定数によりBonferroni補正をかける。

第2スクリーニングとして、上記基準で有意な遺伝子の内で、糖尿病（インスリン分泌不全）との機能リンクが判明している候補は、コード蛋白の*in vitro*発現実験（レポーターアッセイ、蛋白解析、共役遺伝子解析など）、*in vivo*実験（自然発症動物、KOマウス、TGマウス）、臨床調査（量的形質との相関解析など）による病態解析に供し、双方の解析で有意の機能低下（ p 値<0.05）を呈する場合をもって、SNP解析と併せて本研究は疾患感受性遺伝子とした。一方、コード蛋白機能が不明な遺伝子は、別の研究計画で再タイピングを行ない、再現性を追認した。この段階でのサンプル数は、case-controlの約2,000名づつを用いた。

単一遺伝子異常の糖尿病の成因となる可能性も同時に考えて、MODY家系を含む若年発症の症例346人については全エクソンを直接DNAシーケンス解析した。

（動脈硬化の表現型の定量化）

HNF転写因子は、肝の胆汁酸コレステロール、中性脂肪の代謝、VLDLの代謝にも重要であることが明らかとなった。実際、MODY3では低HDLが生じることや、MODY1蛋白であるHNF-4 α のT130Iミスセンス変異がインスリン分泌不全ではなく、2型糖尿病の低HDLと有意の関連を示すことを明らかにした（Diabetologia 2003）。この表現型は膵 β 細胞と肝細胞では転写パートナーが異なることに起因することも明らかにしている。従って、糖代謝と脂質代謝の病態リンクである動脈硬化も同時に考えることが重要となったので、脂肪肝や動脈硬化の患者DNAプレートも本研究に供した。欧米人とは異なりインスリン分泌不全と直接リンクした日本人固有の動脈硬化素因が存在する可能性が疫学的に想定されている。従って、候補SNPとの相関解析を行なうためには、動脈硬化の表現型を定量化して細分類することが必要である。

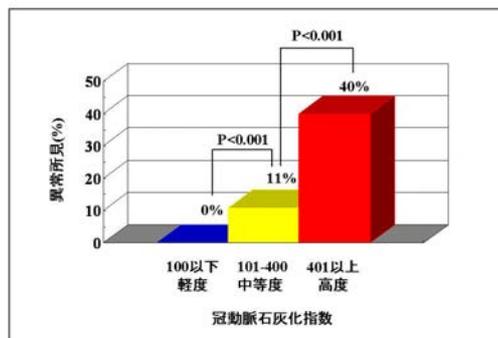
体質診断マーカーへの臨床応用を考えて、相関解析が行なえるように定量的な臨床検査値を整備した（体脂肪組成、冠動脈石灰化度、CT内臓脂肪面積、抵抗性指数HOMA-R、IMTプラークスコア、血管硬化度（ABI、PWV）、アディポサイトカイン（TNF α 、PAI-1、アディポネクチン、IL6）、炎症マーカーhsCRPなど）。

冠動脈の石灰化度は、糖尿病患者では正常に比して顕著に高いことが明らかとなった（糖尿病 288 ± 465 、正常 141 ± 234 ）。しかも、冠動脈の石灰化度は、TNF α や炎症マーカーhsCRPとは互いに関連しないことを明らかにできたので、これらの指標を用いることによって患者群を少なくとも3群（石灰化群、抵抗性群、炎症群）のサブグループに

亜分類することが可能になった。



冠動脈石灰化像



心筋負荷センチとの関連 (文献引用)

(最大 CT 値が 130~199=1、200~299=2、300~399=3、400 以上=4 とスコア化)

【主な遺伝子解析の結果】

1) 転写因子遺伝子の変異スクリーニングと多型を用いた関連解析

① 若年糖尿病の遺伝学的解析

15 才以下で発症した非 1 型糖尿病は、MODY のように重度の遺伝子異常の単独あるいは少数によって発症すると想定される。そこで、上記で見出した候補遺伝子について若年糖尿病者の DNA の全エクソン領域を直接スクリーニングした。その結果、*noc2* (*RPH3AL*) においてナンセンス変異 (C 端 27 アミノ酸欠失) を見出した。一方、MODY 遺伝子において 2 種類のアリル欠失 (*HNF-1 α* 遺伝子のイントロン 1-5 の欠損、*HNF-1 β* 遺伝子の 1.2 Mb の大欠損) を見出したので、CNV (copy number variant) に起因する若年糖尿病が存在することを明らかにした (投稿中)。

本研究では、基本的に全ての候補遺伝子について MODY 遺伝子である可能性を想定して最初に全エクソンの直接解析を行なうが、残念ながら新規の MODY 遺伝子の同定には至っていない。

一方、*HNF-4 α* (*MODY1*) の T130I 多型は 2 型糖尿病と有意に関連した ($p=0.015$, OR 4.3 (1.24-14.98))。サブ表現型との解析では、インスリン分泌能ではなく、血中の HDL と有意に関連した (Thr/Thr vs Thr/Ile 55 ± 18 vs 40 ± 13 , $p=0.006$)。*HNF-4 α* は胆汁酸を直接リガンドとする FXR のコード遺伝子を転写制御するので、肝の表現型と有意の関連を示したと考えられた。実際、変異蛋白の機能解析では、MIN6 では野生型と有意差を示さなかったが、HepG2 および肝細胞 primary culture では有意差を示した。従って、転写因子コンプレックスには組織特異性が存在する可能性が示唆された (*Diabetologia* 2003)。

② 2 型糖尿病に関する SNP 関連解析

上記で見出した 58 個の 2 型糖尿病の候補遺伝子 (*ISH* 遺伝子を除く) と、30 個の動脈硬化の候補遺伝子をスクリーニングし、頻度の高い 264 SNPs を関連解析に供した。その結果、転写因子を含む既知遺伝子 *HIF-1 α* , *LRH-1*, *TCF7L2*, *CDKAL1*, *IGFBP2* において、糖尿病発症と有意の関連を認めた (*J Clin Endocrinol Metab* 2005、*J Hum Genet*

2008、他)。さらに、2,384 症例を用いた多施設共同解析では転写因子と標的因子のコード遺伝子 (TCF1, TCF2, HNF4A, ISL1, IPF1, NEUROG3, PAX6, NKX2-2, NKX6-1, NEUROD1, ABCC8, KCNJ11) をスクリーニングし、ABCC8 において有意な関連を認めた ($p=0.0068$, OR 1.27 (1.07-1.50)) (Diabetes 2006)。一方、正常膵島とインスリン分泌能を欠失した RIN 細胞との mRNA 比較解析では、分泌蛋白をコードして血中診断や創薬に応用できる脂質代謝関連分子を見出している。本コード遺伝子の多型解析では 2 型糖尿病と有意な関連を認めているので、種々のサブ表現型と血中レベルとの相関解析は臨床応用の観点から興味深い。

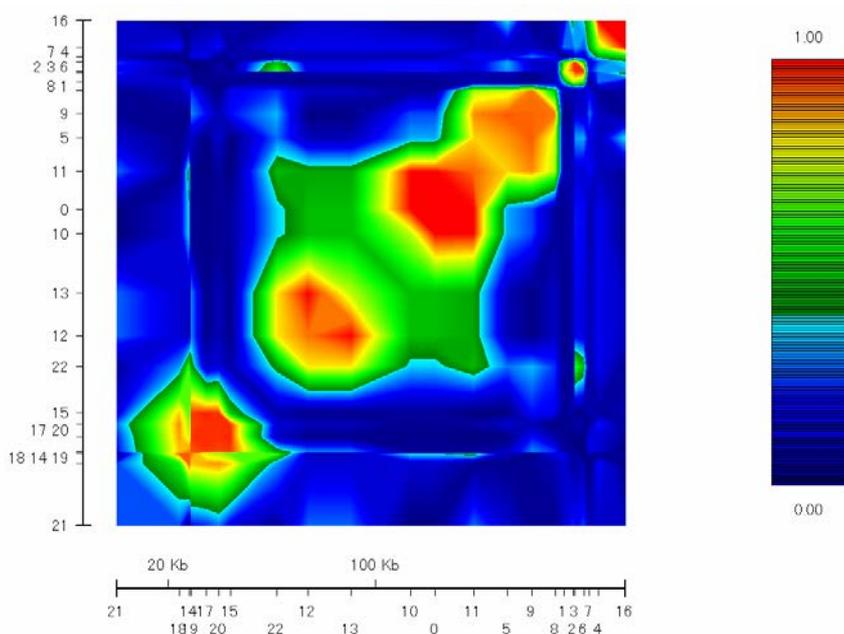
尚、上記の ISH 解析で獲得した 605 SNPs については、残り 3 か月の研究期間で解析を終了させる予定で作業は着実に進んでいる (平成 19 年 1 月現在)。

(オーファン受容体 LRH1 のコード遺伝子多型と 2 型糖尿病の関連)

上記遺伝子の中で、特に、非定型核内受容体 SHP の協調因子であるオーファン受容体 LRH1 については、プロモーター多型によって生じるトランス因子のリクルート有無が疾患発症に関連することが明らかとなった。

LRH-1 遺伝子の転写は HNF-4 α (MODY1)、HNF-1 α (MODY3)、フォークヘッド転写因子 HNF-3 β によって正に誘導されたので、重要な候補となった。先ず、同遺伝子を MODY 遺伝子の候補として MODY 患者 DNA を直接解析したが、発症の原因となる変異は見出せなかった。次いで、LRH-1 遺伝子を 2 型糖尿病の感受性遺伝子の候補としてスクリーニングし、高頻度の 22 個の SNP を同定した。遺伝子領域全体は下図のように 4 つの連鎖不平衡 (LD) ブロックで構成され、5' 端ブロックのハプロタイプ SNP-18, 14, 17 の 111 型は糖尿病と有意に関連した ($p=0.0006$) ; SNP-14 単独では $p=0.0058$ であった。約 200 名づつの関連解析でハプロタイプ型 111/111 と 121/121 は各々防御性と感受性を示した (OR 0.59 [0.42-0.82], 2.64 [1.06-6.62])。SNP-14 (C/T) は LRH-1 遺伝子のプロモーター領域にあり、LD ブロック内には他に成因となりうる SNP 部位は存在しなかったため、SNP-14 を責任サイトと結論した。

LRH1 遺伝子の連鎖不平衡ブロック



そこで、塩基置換の有無が転写効率に及ぼす影響についてレポーター解析を行なった結果、T アリルはC アリルに比して有意に低活性であった ($p < 0.01$)。ゲルシフト解析により、T アリルは結合蛋白をリクルートできないことがその背景であることが判明した。In situ hybridization 解析により、LRH1 mRNA の膵島発現は成人よりも胎生期に強いことが明らかとなった。LRH1 は膵島形成の初期に機能する転写因子を制御する。LRH1 欠失マウスの解析 (名和田らとの共同研究) により胎生期の膵島形成不全が生じる可能性が示唆されたので、ヒトでは本プロモーター多型により遺伝子発現の量的変化が生じ、膵β細胞の分泌予備能の形成不全で疾患感受性を増大する可能性を考えた。興味深いことに、SHP 変異が日本人に特異的に見出されたことと同様に LRH1 プロモーター多型も欧米人に認められなかったので (英国 AT Hattersley 私信)、SHP-LRH1 経路の障害は日本人 (アジア人) に特有である可能性が考えられた。

一方、逆に LRH1 はインスリン分泌に関する HNF-4 α (MODY1) と HNF-1 α (MODY3) の発現をも制御するが、肝脂質代謝においてはこれらの HNF 転写因子を介して重要遺伝子を制御する。従って、高脂血症、脂肪肝、動脈硬化との関連も興味深く、現在は脂質代謝異常リンクの解析を進めている。

(転写因子 Hypoxia inducible factor (HIF)-1 α のコード遺伝子多型と 2 型糖尿病の関連)

日本人は欧米人と比べて血管合併症の増殖網膜症の頻度が高いので、網膜での発現というキーワードを加えることで新たな候補遺伝子の絞り込みが望める。

ハウスキーパーを除去した上で、ラット網膜と膵島の EST を比較し 123 種類の共通遺伝子を同定した (Kitakanto Med J 2005)。その中から、低酸素下に Vascular endothelial growth factor (VEGF) (血管内皮増殖因子) や解糖系酵素を活性化する Hypoxia inducible factor (HIF)-1 α 遺伝子を選択した。VEGF は液性因子として膵島の増殖に関与することが他研究で明らかにされている。VEGF 遺伝子を先ずスクリーニングしたが、同遺伝子には 2 型糖尿病と関連する遺伝子多型は見出さなかった。一方、HIF-1 α 遺伝子は、1993 年に本研究の代表者がヒト膵島 EST の中から cDNA クローンを提供し、その結果、機能解析されて同定された分子という経緯がある。さらに、VEGF 遺伝子の発現を正に誘導する転写因子であるので、HIF-1 α 遺伝子を有力候補としてスクリーニングした。

先ず MODY の成因となる可能性を検証したが、原因となる変異は見出せなかった。スクリーニングの結果、HIF-1 α 遺伝子のエクソンおよび近傍領域に 3 個のミスセンス変異を含む 35 個の SNP を同定することができた。その内の頻度の高い 24 個の SNP についてハプロタイプを考慮し、糖尿病 440 名と正常 572 名を用いて関連解析を行なった結果、2 型糖尿病と有意に関連するハプロタイプ (SNP 13-25) を同定した ($p = 5.536E-11$)。さらに、同ハプロタイプと連鎖不平衡にある転写制御ドメインの P582S ミスセンス変異が疾患と有意に関連することを特定した ($p = 0.0028$)。ロジスティック回帰分析で年齢、性差、BMI で補正しても有意であった ($p = 0.0048$)。さらに同変異は HIF-1 α の標的遺伝子の転写活性を特に低酸素下で上昇させることを VEGF レポーターアッセイで明らかにした (J Clin Endocrinol Metab 2005)。

日本人は欧米人に比較して増殖網膜症の頻度が高いので、日本人に特徴的な網膜症体質との関連性は興味深い。しかし、眼科的に詳細に診断された増殖網膜症の症例が十分ではないことと、罹病歴の長い糖尿病患者において非増殖性の網膜症コントロール数が十

分でないことから、同遺伝子多型が糖尿病網膜症の感受性を増大するかどうかは現時点では明らかではない。

(11 β 水酸化ステロイド脱水素酵素 type 1 のコード遺伝子多型と代謝異常の量的形質との関連)

局所のコルチゾール再活性化機構である11 β 水酸化ステロイド脱水素酵素 type 1 (HSD11B1)・ヘキソース6リン酸脱水素酵素 (H6PD) 両遺伝子と血糖値や内臓脂肪蓄積等との関連を検討した。1,537例(臍部CT解析を行なった症例 812例)で、HSD11B1 /イントロン 3 T/G多型、イントロン 4 C/T多型、H6PD Ala212 G/A多型をタイピングし、疾患・腹部脂肪や脂質代謝について関連を解析した。T/G多型のGアリルは空腹時高血糖(p=0.015)や高血圧(p=0.043)で高頻度、R/Q多型のQアリルも高血圧で高頻度であった。血圧正常者では、T/G多型のGG型で内臓脂肪面積V及びV/皮下脂肪面積比が低値であった。HDLコレステロールはT/G多型のGG型で高値であった。コルチゾールの再活性化能が低いと想定されるアリル(G・Q)保有者は細胞内コルチゾールが相対的に低く、内臓脂肪蓄積が軽度で肝HDL産生能も高いと考えられた。HSD11B1・H6PDの多型は、内臓脂肪蓄積やHDL・高血圧、などいわゆるメタボリック症候群の判断基準に含まれるリスクファクターに関連することが示唆された。

一方、CYP11B2のプロモーター多型-334C/Tは、CC型において患者 LVM (r=0.47, p=0.012)とuNa:Cr ratio (r=0.44, p=0.016)と有意の相関を示したので、高血圧など心血管イベントと関連する可能性が示唆された(J Hypertens 2005)。

2) 膵 β 細胞に発現する新規転写因子の同定と欠失マウスの解析

(モデル動物解析グループ)

膵 β 細胞あるいはその発生起源である腸管に発現する一連の転写因子は、膵 β 細胞の発生・分化および機能維持に重要な働きをしている。実際、既知の MODY 遺伝子はすべて膵島と小腸で共通発現しており、胎生期の膵島形成に関与する。

本研究では、①膵 β 細胞株からクローニングしたホメオドメイン転写因子 Otx3 の欠失マウスを作製・解析し、② Otx3 との構造相同性から新たに腸管に特異的に発現するホメオドメイン転写因子 Mgx1 を同定し、同じく遺伝子欠失マウスを作製した。

① Otx3 の遺伝子欠失マウスの解析

我々は既に膵 β 細胞株から新規ホメオドメイン型転写因子である Otx3 を同定していたが(現在では Dmbx1 と呼ばれる)、本研究では、Otx3 の生理的な役割を明らかにする目的で、Otx3 の細胞生理学的・生化学的機能解析を行ったほか、遺伝子破壊マウスの作製・解析を行った。

Otx3 解析の結果、他の Otx ファミリーとヘテロダイマーを構成して転写抑制を示すことを明らかにした(FEBS Lett 2005)。また、欠損マウスの解析により、Otx3 が、遺伝性肥満・糖尿病モデルマウスである Ay マウスの肥満・糖尿病の発症に不可欠であることを見いだした(Proc Natl Acad Sci USA. 2007)。同欠損マウスでは、膵 β 細胞の明らかな形態異常は認められなかったが、糖負荷時のインスリン分泌は明らかに低値であり膵 β 細胞機能の発現に関与している可能性があり解析を進めている。

2型糖尿病患者 DNA を用いた関連解析では、Otx3 遺伝子において疾患感受性を増大させる多型は見出していない。

② 腸管特異的ホメオドメイン転写因子 Mgx1 の同定と欠損マウスの解析

Otx3 遺伝子配列との相同性に基づき、膵原基が発生する前腸を含む腸管に特異的な新規ホメオドメイン転写因子である Mid-gut homeobox-1 (Mgx1) を同定した。Mgx1 欠損マウスでは膵β細胞の明らかな形態異常は認められないが、Mgx1 を膵β細胞株に強制発現させると細胞分化に必須の転写因子 Pdx1 (MODY4) の発現が著明に低下したため、特異性の維持に関与する可能性が示唆された。一方、腸上皮細胞では、脂質トランスポーターの発現が著明に増加していることが観察された(投稿中)。

2型糖尿病患者 DNA を用いた関連解析では、同遺伝子において疾患感受性を増大させる多型は見出していない。

3) インスリン分泌に関連する遺伝子改変マウスの解析

(モデル動物解析グループ)

① HNF 転写標的である K_{ATP} チャネル欠失マウスの解析とインクレチン経路

MODY 遺伝子にコードされる転写因子は膵β細胞機能に必須な分子の発現制御に重要であるが、中でも膵β細胞の分化発生に重要な転写因子 HNF-1 α (MODY3) や HNF-4 α (MODY1) は、スルホニル尿素 (SU) 薬 (糖尿病治療薬) の標的である K_{ATP} チャネル (SU 受容体と K チャネル Kir6.2 の複合体) の発現を制御することにより膵β細胞にグルコース応答を付与している。上記のように、SNP 関連解析で SU 受容体 ABCC8 (rs1799854) において有意な関連を認めている。従って、同遺伝子の機能バリエーションによって発症するインスリン分泌不全を解析することは、2型糖尿病の発症機構を理解する上で重要である。我々は、 K_{ATP} チャネル欠失マウスを用いて、種々のインスリン分泌刺激に対する応答を解析したところ、チャネル活性を欠損させても、膵β細胞内の cAMP が増加した状態ではグルコースによるインスリン分泌応答を惹起できることを明らかにした (Diabetes 2005)。すなわち、GPCR を介する小腸インクレチン (GLP-1, GIP など) の作用経路はある程度保存されることを意味する。

本知見は、インスリン分泌不全を主徴とする MODY3 や MODY4 のみならず、グルコース応答性インスリン分泌の失われた日本人 2型糖尿病をインクレチン療法で治療できることを示す。本研究の分担者である三和化学研究所チームはインクレチン分解酵素 (DPPIV) の阻害薬を開発し、臨床応用を目指しているところである。

② ダブル遺伝子欠失マウスの解析

膵β細胞のインスリン分泌に重要な Kir6.2 の欠失マウスを、標的組織でのインスリンシグナル伝達に重要なリン酸化基質 IRS1 の欠失マウスと交配させ、インスリン分泌障害と抵抗性を有するダブル異常マウスの作製を試みた (Am J Physiol Endocrinol Metab 2003)。同マウスの耐糖能を糖負荷試験で検討したところ、驚くことに耐糖能障害は全く認められなかった。インスリン負荷試験と骨格筋への糖取込みを調べたところ、ダブル欠失マウスの骨格筋への糖取込みは、正常マウスより明らかに亢進していた。そこで、Kir6.2 遺伝子破壊により糖取込みが亢進するメカニズムを解析した。まず骨格筋の主要な糖輸送担体 GLUT4 の発現と IRS1 下流のインスリン作用シグナル PI3K の活性を調べたが、いずれも Kir6.2 遺伝子破壊による機能亢進は認められなかった。さらに、糖取込みに重要な役割をはたす Akt/PKB のリン酸化と、近年骨格筋での糖取込みの制御分子として注目されている AMP キナーゼを検討したが、両者には異常を認めなかった。以上の結果から、Kir6.2 遺伝子破壊による糖取込みの亢進は、IRS1、PI3K、Akt/PKB を介す

るリン酸化経路とも、AMPK 活性化を介する経路とも異なる新たなメカニズムを介している」と結論された。

③ Noc2 欠失マウスの解析

GTP 結合蛋白 Rab3 は重要な分泌関連蛋白である。Noc2 は、Rab のエフェクター分子である rabphilin3 に相同性のある分子として同定し、その作用は G 蛋白受容体以降の Gi/o シグナルを介する。Noc2 は Rab3 のエフェクターであった。野生型マウスはストレスに対しインスリン分泌を増強して正常血糖を維持するのに対し、Noc2 欠損マウスではストレス下での分泌増強がおこらず、血糖を正常に維持できないことを明らかにした (Proc Natl Acad Sci USA. 2004)。生活ストレスはインスリン過分泌を生じ、その結果生じる膵β細胞の疲弊は糖尿病リスクを増大させるが、本研究で初めてその感受性モデル動物が作成された。さらに、興味深いことに、欠失マウスでは膵外分泌細胞において著明な分泌顆粒の増加をみとめたので、Noc2 は内分泌のみならず外分泌においても重要な機能を有することが明らかとなった。

MODY 家系を対象としてスクリーニングした結果、noc2 遺伝子 (RPH3AL) においてナンセンス変異 (C 端 27 アミノ酸欠失) を 1 家系に見出したが、関連するサブ表現型の病態は不明であり現在詳細な臨床所見を求めて解析中である。

4) レプチンと PPAR- γ を介した食欲制御に関する研究とインスリン応答の研究

肥満では抑制的な血中レプチン濃度が高いにも関わらず、食欲が低下しない (レプチン抵抗性)。一方、SHP の結合標的である転写因子 PPAR- γ の活性化は脂肪細胞におけるアディポカイン産生を変動させ食欲調節に関与することが示唆されている。

群馬大学チーム (森サブチーム) はこれら 2 点の課題を中心に研究を進めた。

① レプチン抵抗性機構の解明

肥満者では血中レプチン濃度が高いにもかかわらず、食欲が低下しない、レプチン抵抗性が存在するが、その機構は不明である。我々は、レプチン抵抗性機構を解明する目的で、肥満者に認められる血液中脂肪酸分画の解析を行い、ラットを用いて次の検討を行った。解析の結果、多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) が上昇しており、実際に EPA 含有の摂餌下のラットは過食、肥満状態を示した。この条件下においては第三脳室内へ投与されたレプチンに対して対照ラットと同様な食欲低下を示したが、末梢投与されたレプチンによる摂食量の抑制は観察されず、EPA 含有食の長期摂取は、脳脊髄液中のレプチン濃度の低下を認めた。これらの結果より、EPA はレプチンの血液・脳内関門の移行性を低下させることによりレプチン抵抗性を惹起し、過食、肥満状態に至ることが明らかになった。更に EPA によるレプチン抵抗性発現機構として脳血管内皮細胞間の tight junction を形成する蛋白の一つであるオクルージンの過剰発現の関与を明らかにし、末梢組織からの代謝シグナルの中枢への伝達機構の障害の一つとして脂質代謝異常に起因した血液脳関門機構の変動が存在することを明らかにした (Cell Metabolism 2005)。

② 新規の摂食抑制蛋白の発見

核内受容体 Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR)- γ の活性化は脂肪細胞におけるレプチンなどのアディポカイン産生を変動させ食欲調節に関与する可能

性が示唆されている。我々は PPAR- γ にて活性化される新たな食欲調節蛋白 N-199 を見出した。N199 はラット視床下部弓状核、室傍核などの摂食調節に関連した神経核にその発現を認め、リコンビナント N199 の第三脳室内投与は、用量反応性に明らかな摂食抑制を示すとともに、N199 に対する IgG 抗体の投与は、単独で食欲促進作用を示した。そこで N199 を Nesfatin (N199-Encoded Satiety- and Fat-Influencing Protein) と命名した (Nature 2006)。Nesfatin は細胞質に局在し、Prohormone Convertase (PC) の局在と一致することから、PC によるプロセッシングがその作用発現に重要である可能性が示唆された。そこで Nesfatin-1、-2、-3 の摂食抑制作用発現について解析を進め、Nesfatin-1 のみが摂食抑制作用を呈することが明らかになり、ラット脳脊髄液中にもその存在が確認された。PC 作用部位の変異 Nesfatin では摂食抑制作用は認められず、Nesfatin はプロセッシングされ Nesfatin-1 となり、摂食抑制作用を有することが示唆される。第三脳室内への Nesfatin-1 持続投与は、体重減少を生じるとともに、第三脳室内への Nesfatin-1 に対する antisense morpholino oligonucleotide の持続投与は有意な体重増加を来した。これらの成績より、Nesfatin-1 の生理的な摂食行動調節への関与が明らかになった。

更に Nesfatin-1 の作用機序の解明の検証を試みた。レプチン受容体に異常を有する Zucker Fatty の脳室内に投与された Nesfatin-1 は、その対照動物と同様な摂食抑制を示した。また抗 Nesfatin-1 抗体の投与は、Nesfatin-1 脳室内投与による摂食抑制を消失させたが、レプチンによる摂食抑制には影響を与えなかった。これらの実験結果より、Nesfatin-1 による摂食抑制系はレプチンとは独立した摂食抑制系の存在が考えられる。一方、メラノコルチン受容体の阻害剤である SHU9119 の前処置により Nesfatin-1 脳室内投与による摂食抑制が完全に消失することより、Nesfatin-1 による摂食抑制機構の下流にはメラノコルチン系の関与が推察された。

③ インスリン応答 Akt2 の GLUT4 発現機構の解明

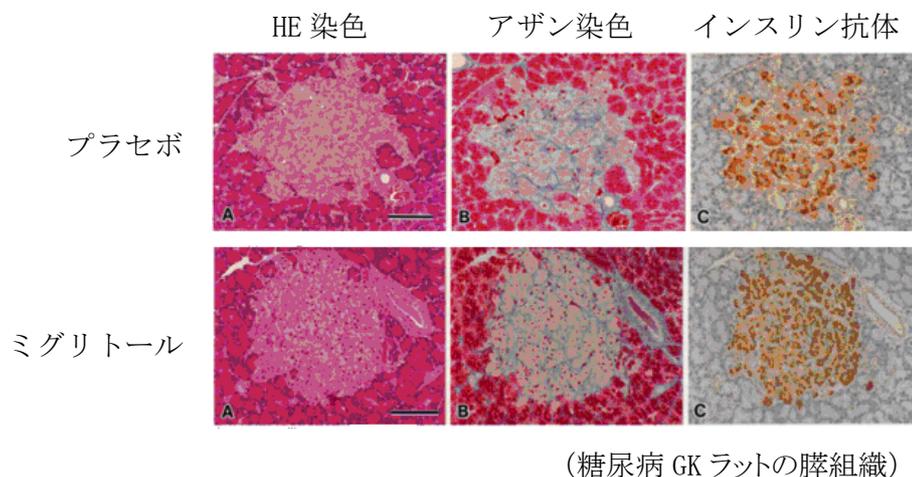
脂肪細胞へのインスリン刺激後に GLUT4 が translation されてブドウ糖の取り込みが促進されるが、その詳細な機構は不明であった。インスリン刺激後に PI3Kinase が活性化され、それに引き続いて Akt2 の磷酸化が惹起されることは良く知られている。GLUT4 の translation に関与し、かつ Akt2 により直接磷酸化される分子の同定を試みた。その結果、GLUT4 の translocation に重要な分子である、Synip が Akt2 により直接磷酸化される新しい事実を明らかにした (J Cell Biol 2005)。

5) インクレチン創薬研究 (三和化学研究所グループ)

従来から、経口投与されたグルコースは経静脈投与されたグルコースよりも多くのインスリンを分泌することが知られ、小腸ホルモンをインクレチンと呼称した。主たる構成分子は、十二指腸の Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) と下部小腸の Glucagon-like polypeptide-1 (GLP-1) である。これらのコード遺伝子は小腸 HNF 転写因子の直接標的でもある。

最近、GLP-1 はグルコース依存性のインスリン分泌亢進作用に加えて、膵島細胞の分化増殖を促進する機能が注目されている。三和化学研究所グループは、自社販売薬である α グルコシダーゼ阻害薬ミグリトール (商品名セイブル) の投与により、上部小腸でのグルコース吸収が遅延することによりインクレチンが GIP から GLP-1 にシフトし、その結果、GLP-1 作用により膵 β 細胞が増殖することを明らかにした (下図)。前記の K_{ATP}

チャンネル欠失マウスの解析結果から、インクレチン経路は別個に保存されている可能性が示唆されたが、本成績はSU薬の二次無効によるアポトーシスそのものをも防御する可能性が考えられた。現在、マイクロアレイを用いて関連する転写因子を網羅的に探索している。



インクレチンであるGIPとGLP-1は分解酵素Dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV)により直ちに血中で分解されて失活する。従って、DPP-IV阻害薬は糖尿病の治療薬となる可能性があり、同グループは糖尿病薬として創薬開発を行なっている。興味深いことに、小腸細胞におけるDPP-IV遺伝子の発現はHNF-1 α (MODY3)とHNF-1 β (MODY5)で直接誘導され、変異によって転写効率や酵素活性が減弱することを明らかにできた(Biochem Biophys Res Commun 2006)。従って、一連のインクレチン関連遺伝子はHNF転写標的でもあり、有力な候補である。そこで、GCG, GLP1R, DPP4, PCSK1について、SNPスクリーニングと2型糖尿病1,152症例について関連解析を行なったが、現在のところ疾患発症との有意の関連を示す多型は認めていない。

4 研究参加者

①病態解析と研究総括グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
武田 純	岐阜大学大学院 医学系研究科	教授	研究の計画と統括	H14.11～H20.3
堀川 幸男	岐阜大学 医学部附属病院	准教授	遺伝情報の総合解析	H14.11～H20.3
北出 幸夫	岐阜大学 工学部	教授	RNAiの開発	H17.10～H20.3
武田 則之	岐阜大学大学院 医学系研究科	客員教授	病態の解析	H15.4～H15.8

宗 友厚	岐阜大学大学院 医学系研究科	准教授	内分泌リンクの解析	H15.4～H20.3
山本 眞由美	岐阜大学 保健管理センター	教授	コホート解析	H15.4～H20.3
永田 千里	岐阜大学大学院 医学系研究科	教授	疫学解析	H17.8～H20.3
石澤 正剛	岐阜大学 医学部附属病院	講師	病態の解析	H15.4～H18.3
加納 克徳	岐阜大学大学院 医学系研究科	講師	病態の解析	H15.4～H20.3
鈴木 英司	岐阜大学大学院 医学系研究科	准教授	動脈硬化の解析	H15.4～H20.3
諏訪 哲也	岐阜大学 医学部附属病院	講師	内分泌リンクの解析	H15.4～H20.3
佐々木 明彦	岐阜大学 医学部附属病院	臨床講師	病態の解析	H15.4～H20.3
丸山 貴子	岐阜大学 医学部附属病院	助手	病態の解析	H15.4～H15.8
川地 慎一	岐阜大学 医学部附属病院	臨床講師	マイクロアレイの解析	H16.4～H20.3
伊藤 勇	岐阜大学 医学部附属病院	助教	患者の臨床解析	H19.4～H19.6
村松 学	岐阜大学 医学部附属病院	非常勤医員	in situ hybridization	H16.4～H19.3
佐久間 博也	岐阜大学 医学部附属病院	非常勤医員	遺伝子発現実験	H16.4～H18.6
塩谷 真由美	岐阜大学 医学部附属病院	助教	関連解析	H16.4～H20.3
夏目 佳幸	岐阜大学 医学部附属病院	非常勤医員	動脈硬化の解析	H16.4～H17.6
廣田 卓男	岐阜大学 医学部附属病院	非常勤医員	動脈硬化の解析	H18.4～H20.3
伏見 宣俊	岐阜大学 医学部附属病院	非常勤医員	動脈硬化の解析	H18.4～H20.3
花本 貴幸	岐阜大学 医学部附属病院	非常勤医員	患者の臨床解析	H19.4～H19.7
黒田 英嗣	岐阜大学大学院 医学系研究科	大学院生	遺伝子発現実験	H17.4～H20.3
セイトハフエ スタカヤ	岐阜大学大学院 医学系研究科	大学院生	病態の解析	H15.4～H15.8
勝田 純	岐阜大学大学院 医学系研究科	大学院生	遺伝子発現実験	H18.4～H20.3

日置 美香	岐阜大学大学院 医学系研究科	CREST 研究 補助員	データ整理と事務補助	H18.4～H20.3
野村 千晴	岐阜大学大学院 医学系研究科	CREST 研究 補助員	動脈硬化実験の補助	H18.4～H20.3
篠田 奈保美	岐阜大学大学院 医学系研究科	CREST 研究 補助員	データ整理と事務補助	H18.6～H20.3
久富 昭子	岐阜大学大学院 医学系研究科	CREST 研究 補助員	データ整理と事務補助	H19.4～H19.9
篠田 巳鶴	岐阜大学大学院 医学系研究科	CREST 研究 補助員	データ整理	H16.5～H16.12
横山 恵子	岐阜大学大学院 医学系研究科	CREST 研究 補助員	DNA タイピング	H16.12～H20.3
栗木 智子	岐阜大学大学院 医学系研究科	CREST 研究 補助員	DNA タイピング	H17.5～H18.6
川田 順子	岐阜大学大学院 医学系研究科	CREST 研究 補助員	DNA タイピング	H17.6～H20.3
山田 真紀	岐阜大学大学院 医学系研究科	CREST 研究 補助員	DNA タイピング	H17.6～H17.12
宮崎 渚	岐阜大学 医学部附属病院	非常勤医員	患者の臨床解析	H19.4～H20.3
鎌倉 理人	岐阜大学 医学部附属病院	非常勤医員	患者の臨床解析	H19.4～H20.3

②遺伝素因解析研究グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
武田 純	群馬大学 生体調節研究所	教授	研究の計画と統括	H14.11～H16.9
堀川 幸男	群馬大学 生体調節研究所	准教授	遺伝情報の総合解析	H14.11～H18.3
志原 伸幸	群馬大学 生体調節研究所	助教	遺伝子発現実験	H14.11～H20.3
森 昌朋	群馬大学大学院 医学研究科	教授	病態の解析	H14.11～H20.3
清水 弘行	群馬大学大学院 医学研究科	講師	病態の解析	H14.11～H17.3
岸 章治	群馬大学大学院 医学研究科	教授	病態の解析	H14.11～H17.3
飯塚 勝美	群馬大学 生体調節研究所	講師 CREST 研究員	動物実験	H18.4～H20.3 H16.10～H18.3

王 虹	群馬大学 生体調節研究所	大学院生	in situ hybridization	H14.11～H17.3
兪 力	群馬大学 生体調節研究所	CREST 研究員	遺伝子発現実験	H14.11～H16.9
宇田 郁美	群馬大学 生体調節研究所	CREST 研究 補助員	DNA シーケンス	H16.4～H19.3
尾池 幸子	群馬大学 生体調節研究所	CREST 研究 補助員	DNA シーケンス	H15.1～H17.3
川上 理恵子	群馬大学 生体調節研究所	CREST 研究 補助員	DNA シーケンス	H15.4～H17.6
柳沼 弥生	群馬大学 生体調節研究所	CREST 研究 補助員	DNA シーケンス	H15.1～H17.3
堤 順子	群馬大学 生体調節研究所	CREST 研究 補助員	DNA シーケンス	H16.5～H17.3
成田 寅雄	群馬大学 生体調節研究所	CREST 技術員	DNA シーケンス	H17.4～H19.3
伊部 靖子	群馬大学 生体調節研究所	CREST 研究 補助員	DNA シーケンス	H17.9～H19.3
石倉 和美	群馬大学 生体調節研究所	CREST 研究 補助員	事務補助	H15.4～H16.3

③モデル動物解析研究グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
三木 隆司	神戸大学大学院 医学研究科	准教授	実験モデル動物の 解析	H14.11～H20.3
高橋 良寿	千葉大学大学院	CREST 研究 補助員	動物の飼育と解析	H15.4～H15.10
渡邊 かおり	千葉大学大学院	CREST 研究 補助員	動物の飼育と解析	H15.4～H15.11
平田 寿子	千葉大学大学院	CREST 研究 補助員	動物の飼育と解析	H15.4～H15.10
田口 直子	千葉大学大学院	CREST 研究 補助員	動物の飼育と解析	H15.4～H15.10
津田 智慧子	千葉大学大学院	CREST 研究 補助員	動物の飼育と解析	H15.4～H15.10

④ゲノム創薬研究グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
城森 孝仁	三和化学研究所 総合研究所	所長	新規ペプチド合成	H14.11～H20.3
浅野 幸康	三和化学研究所 総合研究所	研究主任	アッセイ系の開発	H14.11～H20.3

5 招聘した研究者等

なし

6 成果発表等

(1)原著論文発表（国内誌 2件、国際誌 111件）

【国内】

1. Enya M, Kanoh Y, Mune T, Ishizawa M, Sarui H, Yamamoto M, Takeda N, Yasuda K, Yasujima M, Tsutaya S, Takeda J.
Depressive state and paresthesia dramatically improved by intravenous MgSO₄ in Gitelman's syndrome
Intern Med. 43: 140-144, 2004.
2. Yamada N, Shihara N, Horikawa Y, Wang H, Takeda J, and Kishi S.
Expression profile of 1000 mRNAs from rat retina
Kitakanto Med J. 55:5-12, 2005.

【国際】

1. Horikawa Y, Oda N, Yu L, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, Takeda J.
Genetic variations in *CAPN10* are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese.
2. **J Clin Endocrinol Metab.** 88: 244-247, 2003
Hayashi M, Yamada H, Uehara S, Morimoto R, Muroyama A, Yatsushiro S, Takeda J, Yamamoto A, Moriyama Y.
Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans.
J Biol Chem. 278: 1966-1974, 2003
3. Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Takeda J, Miyagawa J, Matsuzawa Y.
T130I mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type II diabetes mellitus in Japanese subjects.
Diabetologia 46: 567-573, 2003
4. Tanaka T, Ikari K, Furushima K, Okada A, Tanaka H, Furukawa K, Yoshida K, Ikeda T, Ikegawa S, Hunt S, Takeda J, Toh S, Harata S, Nakajima T, Inoue I.
Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses pinpoint the ossification of the

- posterior longitudinal ligament of the spine to *COL6A1* locus on chromosome 21.
Am J Hum Genet. 73: 812-822, 2003.
- 5 . Lin J, Wang H, Narita T, Kikuno R, Ohara O, Shihara N, Nishigori T, Horikawa Y, Takeda J.
 Expression profile of mRNAs from human pancreatic islet tumors.
J Mol Endocrinol. 31: 519-528, 2003
 - 6 . So WY, Ng MC, Horikawa Y, Njolstad PR, Li JK, Ma RC, Bell GI, Chan JC.
 Genetic variants of hepatocyte nuclear factor-1beta in Chinese young-onset diabetic patients with nephropathy.
J Diabetes Complications .17: 369-73, 2003.
 - 7 . Weedon MN, Schwarz PE, Horikawa Y, Iwasaki N, Illig T, Holle R, Rathmann W, Selisko T, Schulze J, Owen KR, Evans J, Del Bosque-Plata L, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Bell GI, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM.
 Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility.
Am J Hum Genet. 73: 1208-1212, 2003.
 - 8 . Zhou YP, Sreenan S, Pan CY, Currie KP, Bindokas VP, Horikawa Y, Lee JP, Ostrega D, Ahmed N, Baldwin AC, Cox NJ, Fox AP, Miller RJ, Bell GI, Polonsky KS.
 A 48-hour exposure of pancreatic islets to calpain inhibitors impairs mitochondrial fuel metabolism and the exocytosis of insulin.
Metabolism .52: 528-534, 2003.
 - 9 . Minami K, Morita M, Saraya A, Yano H, Terauchi Y, Miki T, Kuriyama T, Kadowaki T, Seino S.
 ATP-sensitive K⁺ channel-mediated glucose uptake is independent of IRS-1/phosphatidylinositol 3-kinase signaling.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 285: E1289-1296, 2003.
 10. Gong B, Legault D, Miki T, Seino S, Renaud JM.
 KATP channels depress force by reducing action potential amplitude in mouse EDL and soleus muscle.
Am J Physiol Cell Physiol. 285: C1464-1474, 2003.
 11. Gumina RJ, Pucar D, Bast P, Hodgson DM, Kurtz CE, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Terzic A.
 Knockout of Kir6.2 negates ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 284: H2106-2113, 2003.
 12. Suzuki M, Saito T, Sato T, Tamagawa M, Miki T, Seino S, Nakaya H. Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in mice.
Circulation .107:682-685, 2003.
 13. Saito T, Okada S, Yamada E, Ohshima K, Shimizu H, Shimomura K, Sato M, Pessin JE, Mori M.
 Syntaxin 4 and Synip (syntaxin 4 interacting protein) regulate insulin secretion in the pancreatic beta HC-9 cell.
J Biol Chem. 278: 36718-36725, 2003.

14. Araki O, Morimura T, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M, Murakami M.
Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in corticotropin-secreting mouse pituitary tumor cells is stimulated by glucocorticoid and corticotropin-releasing hormone.
Endocrinology. 144: 4459-4465, 2003.
15. Tsuchiya T, Shimizu H, Shimomura K, Mori M.
Troglitazone inhibits isolated cell proliferation, and induces apoptosis in isolated rat mesangial cells.
Am J Nephrol. 23: 222-228, 2003.
16. Nagai T, Imamura M, Takai Y, Mori M.
Insulinoma accompanied by diabetes mellitus.
Diabetes Res Clin Pract. 60: 19-23, 2003.
17. Nagai T, Imamura M, Iizuka K, Mori M.
Hypoglycemia due to nateglinide administration in diabetic patient with chronic renal failure.
Diabetes Res Clin Pract. 59: 191-194, 2003.
18. Okada S, Mori M, Pessin JE.
Introduction of DNA into 3T3-L1 adipocytes by electroporation.
Methods Mol Med. 83: 93-96, 2003.
19. Kato N, Yashima S, Suzuki T, Nakayama Y, Jomori T.
Long-term treatment with fidearestat suppresses the development of diabetic retinopathy in STZ-induced diabetic rats.
J Diabetes Complications. 17: 374-379, 2003.
20. Shihara N, Horikawa Y, Onishi T, Ono M, Kashimada K, Takeda J.
Identification of a *de novo* case of hepatocyte nuclear factor-1 β mutation with highly varied phenotypes.
Diabetologia. 47: 1128-1129, 2004.
21. Shimamoto Y, Ishida J, Yamagata K, Saito T, Kato H, Matsuoka T, Hirota K, Daitoku H, Nangaku M, Yamagata K, Fuji H, Takeda J, Fukamizu A.
Inhibitory effect of small heterodimer partner hepatocyte nuclear factor-4 mediates bile acid-induced repression of human angiotensinogen gene.
J Biol Chem. 279: 7770-7776, 2004.
22. Kim Y, Kim HJ, Seong HA, Park KC, Sanyal S, Takeda J, Ha H, Shong M, Tsai MJ, Choi HS.
Orphan nuclear receptor SHP, a novel corepressor for a basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor BETA2/NeuroD.
Mol Endocrinol. 18: 776-790, 2004.
23. Kawamoto T, Horikawa Y, Tanaka T, Takeda J, Mikuni M.
Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder.
Mol Genet Metab. 82: 238-245, 2004.
24. Tanaka T, Horikawa Y, Kawamoto T, Kabe N, Takeda J, Mikuni M.
Expression profile of mRNAs from rat hippocampus and its application to microarray.
Brain Res. 129: 20-32, 2004.

25. Echwald SM, Andersen KL, TA Sørensen TA, Larsen LH, Andersen TI, Tonooka N, Tomura H, Takeda J, Pedersen O.
Mutation analysis of *NROB2* among 1,545 Danish men identifies a novel G93D variant with reduced functional activity.
Hum Mut. 24: 381-387, 2004.
26. Gu N, Suzuki N, Takeda J, Adachi T, Tsujimoto G, Aoki N, Ishihara A, Tsuda K, Yasuda K.
Effect of mutations in HNF-1 α and HNF-1 β on the transcriptional regulation of human sucrase-isomaltase (SI) in Caco2 cells.
Biochem Biophys Res Commun. 325: 308-313, 2004.
27. Nishimura M, Miki T, Yokoi N, Horikawa Y, Yoshioka H, Takeda J, Ohara O, Seino S.
Construction of a multi-functional cDNA library specific for normal mouse pancreatic islets and its application to microarray.
DNA Res. 11: 315-323, 2004.
28. Johnson JD, Han Z, Otani K, Ye H, Zhang Y, Wu H, Horikawa Y, Misler S, Bell GI, KS Polonsky KS.
RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets.
J Biol Chem. 279: 24794-802, 2004.
29. Otani K, Han DH, Ford EL, Garcia-Roves PM, Ye H, Horikawa Y, Bell GI, Holloszy JO, Polonsky KS.
Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover.
J Biol Chem. 279: 20915-20920, 2004.
30. Remedi MS, Koster JC, Markova K, Seino S, Miki T, Patton BL, McDaniel ML, CG Nichols CG.
Diet-induced glucose intolerance in mice with decreased beta-cell ATP-sensitive K⁺ channels.
Diabetes. 53: 3159-3167, 2004.
31. Matsumoto M, Miki T, Shibasaki T, Kawaguchi M, Shinozaki H, Nio J, Saraya A, Koseki H, Miyazaki M, Iwanaga T, Seino S.
Noc2 is essential in normal regulation of exocytosis in endocrine and exocrine cells.
Proc Natl Acad Sci USA. 101: 8313-8, 2004.
32. Morita H, Isomura Y, Mune T, Daido H, Takami R, Yamakita N, Ishizuka T, Takeda N, Yasuda K, Gomez-Sanchez CE.
Plasma cortisol and cortisone concentrations in normal subjects and patients with adrenocortical disorders.
Metabolism. 53: 89-94, 2004.
33. Kajita K, Mune T, Kanoh Y, Natsume Y, Ishizawa M, Kawai Y, Yasuda K, Sugiyama C, Ishizuka T.
TNF α reduces the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) via the production of ceramide and activation of atypical PKC.
Diabetes Res Clin Pract. 66: S79-83, 2004.
34. Tsuchiya M, Suzuki E, Egawa K, Nishio Y, Maegawa H, Inoue S, Mitsunami K, Morikawa S, Inubushi T, Kashiwagi A.

- Stiffness and impaired blood flow in lower-leg arteries are associated with severity of coronary artery calcification among asymptomatic type 2 diabetic patients.
Diabetes Care. 27: 2409-2415, 2004.
35. Ishizuka T, Kajita K, Natsume Y, Kawai Y, Kanoh Y, Miura A, Ishizawa M, Uno Y, Morita H, Yasuda K.
Protein kinase C (PKC) β modulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)--effect of overexpression of PKC β on insulin signal transduction.
Endocr Res. 30: 287-99, 2004.
36. Chen HC, Rao M, Sajan MP, Standaert M, Kanoh Y, Miura A, Farese RV Jr, Farese RV.
Role of adipocyte-derived factors in enhancing insulin signaling in skeletal muscle and white adipose tissue of mice lacking Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1.
Diabetes. 53: 1445-51, 2004.
37. Standaert ML, Sajan MP, Miura A, Kanoh Y, Chen HC, Farese RV Jr, Farese RV.
Insulin-induced activation of atypical protein kinase C, but not protein kinase B, is maintained in diabetic (ob/ob and Goto-Kakazaki) liver. Contrasting insulin signaling patterns in liver versus muscle define phenotypes of type 2 diabetic and high fat-induced insulin-resistant states.
J Biol Chem. 279: 24929-24934, 2004.
38. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP, Kanoh Y, Miura A, Braun U, Kruse F, Leitges M, Farese RV.
Protein kinase C- λ knockout in embryonic stem cells and adipocytes impairs insulin-stimulated glucose transport.
Mol Endocrinol. 18: 373-383, 2004.
39. Minami K, Miki T, Kadowaki T, Seino S.
Roles of ATP-sensitive K⁺ channels as metabolic sensors: studies of Kir6.x null mice.
Diabetes. 53: S176-80, 2004.
40. Kane GC, Behfar A, Yamada S, Perez-Terzic C, O'Coilain F, Reyes S, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Terzic A.
ATP-sensitive K⁺ channel knockout compromises the metabolic benefit of exercise training, resulting in cardiac deficits.
Diabetes. 53: S169-75, 2004.
41. Liu XK, Yamada S, Kane GC, Alekseev AE, Hodgson DM, O'Coilain F, Jahangir A, Miki T, Seino S, Terzic A.
Genetic disruption of Kir6.2, the pore-forming subunit of ATP-sensitive K⁺ channel, predisposes to catecholamine-induced ventricular dysrhythmia.
Diabetes. 53: S165-8, 2004.
42. Sekido H, Suzuki T, Jomori T, Takeuchi M, Yabe-Nishimura C, Yagihashi S.
Reduced cell replication and induction of apoptosis by advanced glycation end products in rat Schwann cells.
Biochem Biophys Res Commun. 320: 241-248, 2004.
43. Kawachi S, Takeda N, Sasaki A, Kokubo Y, Takami K, Sarui H, Hayashi M, Yamakita N, Yasuda K.
Circulating insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3

- are associated with early carotid atherosclerosis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25: 617-621, 2005.
44. Morita H, Hirota T, Mune T, Suwa T, Ishizuka T, Inuzuka T, Tanaka K, Ishimori M, Nakamura S, Yasuda K.
 Paraneoplastic neurologic syndrome and autoimmune Addison disease in a patient with thymoma.
Am J Med Sci. 329: 48-51, 2005.
45. Iwasaki N, Horikawa Y, Tsuchiya T, Kitamura Y, Nakamura T, Tanizawa Y, Oka Y, Hara K, Kadowaki T, Awata T, Honda M, Yamashita K, Oda N, Yu L, Yamada N, Ogata M, Kamatani N, Iwamoto Y, Del Bosque-Plata L, Hayes MG, Cox NJ Bell GI.
 Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population.
J Hum Genet. 50: 92-98, 2005.
46. Saito T, Sato T, Miki T, Seino S, Nakaya H.
 Role of ATP-sensitive K⁺ channels in electrophysiological alterations during myocardial ischemia: a study using Kir6.2-null mice.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 288: H352-357, 2005.
47. Choeiri C, Staines W, Miki T, Seino S, and Messier C.
 Glucose transporter plasticity during memory processing.
Neuroscience. 130: 591-600, 2005.
48. Miki T, Minami K, Shinozaki H, Matsumura K, Saraya A, Ikeda H, Yamada Y, Holst JJ, Seino S.
 Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility.
Diabetes. 54: 1056-1063, 2005.
49. Yamada E, Okada S, Saito T, Ohshima K, Sato M, Tsuchiya T, Uehara Y, Shimizu H, Mori M.
 Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles.
J Cell Biol. 168: 921-928, 2005.
50. Isaji M, Mune T, Takada N, Yamamoto Y, Suwa T, Morita H, Takeda J, White PC.
 Correlation between left ventricular mass and urinary sodium excretion in specific genotypes of CYP11B2.
J Hypertens. 23: 1149-1157, 2005.
51. Wang H, Horikawa Y, Jin L, Narita T, Yamada S, Shihara N, Tatemoto K, Muramatsu M, Mune T, Takeda J.
 Gene expression profile in rat pancreatic islet and RINm5F cells
J Mol Endocrinol. 35: 1-12, 2005.
52. Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Iizuka K, Shihara N, Kishi S, Takeda J.
 Genetic Variatiom in the HIF-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese.
J Clin Endocrinol Metab .90: 5841-5847, 2005.
53. Ueno H, Yamada Y, Watanabe R, Mukai E, Hosokawa M, Takahashi A, Hamasaki A, Fujiwara H, Toyokuni S, Yamaguchi M, Takeda J, Seino Y.
 Nestin-positive cells in adult pancreas express amylase and endocrine precursors cells.

- Pancreas.** 31: 126-131, 2005.
54. Tanahashi H, Mune T, Takahashi Y, Isaji M, Suwa T, Morita H, Yamakita N, Yasuda K, Deguchi T, White PC, Takeda J.
Association of Lys173Arg polymorphism with CYP11B2 expression in normal adrenal glands and aldosterone-producing adenomas.
J Clin Endocrinol Metab. 90: 6226-6231, 2005.
 55. Nakano Y, Furuta H, Doi A, Matsuno S, Nakagawa T, Shimomura H, Sakagashira S, Horikawa Y, Nishi M, Sasaki H, Sanke T, Nanjo K.
A functional variant in the human betacellulin gene promoter is associated with type 2 diabetes.
Diabetes. 54: 3560-3566, 2005.
 56. Yamada E, Okada S, Saito T, Ohshima K, Sato M, Tsuchiya T, Uehara Y, Shimizu H, Mori M.
Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles.
J Cell Biol. 168: 921-928, 2005
 57. Liss B, Haeckel O, Wildmann J, Miki T, Seino S, Roeper J.
K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons.
Nat Neurosci. 8: 1742-1751, 2005.
 58. Matsumura K, Miki T, Jhomori T, Gono T, Seino S.
Possible role of PEPT1 in gastrointestinal hormone secretion.
Biochem Biophys Res Commun. 336: 1028-1032, 2005.
 59. Thabet M, Miki T, Seino S, Renaud JM.
Treadmill running causes significant fiber damage in skeletal muscle of KATP channel-deficient mice.
Physiol Genomics. 22: 204-212, 2005.
 60. Miki T, Seino S.
Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes.
J Mol Cell Cardiol. 38: 917-925, 2005.
 61. Kimura K, Miki T, Shibasaki T, Zhang Y, Ogawa M, Saisho H, Okuno M, Iwanaga T, Seino S.
Functional analysis of transcriptional repressor Otx3/Dmbx1.
FEBS Lett. 579:2926-2932, 2005.
 62. Oh-I S, Shimizu H, Sato T, Uehara Y, Okada S, Mori M.
Molecular mechanisms associated with leptin resistance: n-3 polyunsaturated fatty acids induce alterations in the tight junction of the brain.
Cell Metab. 1: 331-341, 2005.
 63. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M.
Inhibition of appetite by nasal leptin administration in rats.
Int J Obes (Lond). 29: 858-863, 2005.
 64. Nagata C, Hirokawa K, Shimizu N, Shimizu H.
Associations of menstrual pain with intakes of soy, fat and dietary fiber in Japanese women.
Eur J Clin Nutr. 59: 88-92, 2005.

65. Nakanishi M, Tanaka N, Mizutani Y, Mochizuki M, Ueno Y, Nakamura KT, Kitade Y. Functional characterization of 2',5'-linked oligoadenylate binding determinant of human RNase L.
J Biol Chem. 280: 41694-41699, 2005.
66. Ueno Y, Kato T, Sato K, Ito Y, Yoshida M, Inoue T, Shibata A, Ebihara M, Kitade Y. Synthesis and properties of nucleic acid analogues consisting of a benzene-phosphate backbone.
J Org Chem. 70: 7925-7935, 2005.
67. Deacon RM, Brook RC, Meyer D, Haeckel O, Ashcroft FM, Miki T, Seino S, Liss B. Behavioral phenotyping of mice lacking the K(ATP) channel subunit Kir6.2.
Physiol Behav. 87: 723-733, 2006.
68. Sun HS, Feng ZP, Miki T, Seino S, French RJ. Enhanced Neuronal Damage After Ischemic Insults in Mice Lacking Kir6.2-Containing ATP-Sensitive K⁺ Channels.
J Neurophysiol. 95: 2590-2601, 2006.
69. Zhang C, Miki T, Shibasaki T, Yokokura M, Saraya A, Seino S. Identification and characterization of a novel member of the ATP-sensitive K⁺ channel subunit family, Kir6.3, in zebrafish.
Physiol Genomics. 24: 290-297, 2006.
70. Shimizu H, Oh-I S, Tsuchiya T, Ohtani K, Okada S, Mori M. Pioglitazone increases circulating adiponectin levels and subsequently reduces TNF- α levels in Type 2 diabetic patients: a randomized study.
Diabet Med. 23: 253-257, 2006.
71. Kasahara T, Tsunekawa K, Seki K, Mori M and Murakami M. Regulation of iodothyronine deiodinase and roles of thyroid hormones in human coronary artery smooth muscle cells.
Atherosclerosis. 186: 207-214, 2006.
72. Iizuka K, Miller B, Uyeda K. Deficiency of a carbohydrate-activated transcription factor, ChREBP, prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin deficient (ob/ob) mice.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 291: E358-364, 2006
73. Yokoi N, Kanamori M, Horikawa Y, Takeda J, Sanke T, Furuta H, Nanjo K, Mori H, Kasuga M, Hara K, Kadowaki T, Tanizawa Y, Oka Y, Iwami Y, Ohgawara H, Yamada Y, Seino Y, Yano H, Cox NJ, Seino S. Association studies of variants in the genes involved in pancreatic β -cell function in type 2 diabetes in Japanese.
Diabetes. 55: 2379-2386, 2006.
74. Gu N, Adachi T, Matsunaga T, Takeda J, Tsujimoto G, Ishihara A, Yasuda K, Tsuda K. Mutant HNF-1 α and mutant HNF-1 β identified in MODY3 and MODY5 downregulate DPP-IV gene expression in Caco-2 cells.
Biochem Biophys Res Commun. 346: 1016-1023, 2006.
75. Gu N, Adachi T, Takeda J, Aoki N, Tsujimoto G, Ishihara A, Tsuda K, Yasuda K. Sucrase-isomaltase gene expression is inhibited by mutant hepatocyte nuclear factor

- (HNF)-1 α and mutant HNF-1 β in Caco-2 cells.
J Nutr Sci Vitaminol .52: 105-112, 2006.
76. Isomura Y, Mune T, Morita H, Suwa T, Takada N, Yamamoto Y, Takeda J.
Physiologic roles of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in kidney.
Metabolism. 55: 1352-1357, 2006.
77. Yoshimura T, Suzuki E, Egawa K, Nishio Y, Maegawa H, Morikawa S, Inubushi T,
Hisatomi A, Fujimoto K, Kashiwagi A.
Low blood flow estimates in lower-leg arteries predict cardiovascular events in Japanese
patients with type 2 diabetes with normal ankle-brachial indexes.
Diabetes Care. 29: 1884-1890, 2006.
78. Sun HS, Feng ZP, Miki T, Seino S, French RJ.
Enhanced Neuronal Damage after Ischemic Insults in Mice Lacking Kir6.2-containing
ATP-sensitive K⁺ channels.
J Neurophysiol 95: 2590-2601, 2006.
79. Deacon RM, Brook RC, Meyer D, Haeckel O, Ashcroft FM, Miki T, Seino S, Liss B.
Behavioral phenotyping of mice lacking the K(ATP) channel subunit Kir6.2.
Physiol Behav. 87: 723-733, 2006.
80. Oyama K, Minami K, Ishizaki K, Fuse M, Miki T, Seino S.
Spontaneous recovery from hyperglycemia by regeneration of pancreatic β -cells in
Kir6.2G132S transgenic mice.
Diabetes. 55: 1930-1938, 2006.
81. Choeiri C, Staines WA, Miki T, Seino S, Renaud JM, Teutenberg K, Messier C.
Cerebral glucose transporters expression and spatial learning in the K-ATP Kir6.2(-/-)
knockout mice.
Behav Brain Res. 172: 233-239, 2006.
82. Kane GC, Behfar A, Dyer RB, O'Coilain DF, Liu XK, Hodgson DM, Reyes S, Miki T,
Seino S, Terzic A.
KCNJ11 gene knockout of the Kir6.2 KATP channel causes maladaptive remodeling and
heart failure in hypertension.
Hum Mol Genet. 15: 2285-2297, 2006.
83. Yamada S, Kane GC, Behfar A, Liu XK, Dyer RB, Faustino RS, Miki T, Seino S, Terzic A.
Protection conferred by myocardial ATP-sensitive K⁺ channels in pressure
overload-induced congestive heart failure revealed in KCNJ11 Kir6.2-null mutant.
J Physiol. 577: 1053-1065, 2006.
84. Kane GC, Lam CF, O'Coilain F, Hodgson DM, Reyes S, Liu XK, Miki T, Seino S, Katusic
ZS, Terzic A.
Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1 K_{ATP} channel imparts fatal susceptibility to
endotoxemia.
FASEB J. 20: 2271-2280, 2006.
85. Okada S, Ohshima K, Uehara Y, Shimizu H, Hashimoto K, Yamada M, Mori M.
Synip phosphorylation is required for insulin-stimulated Glut4 translocation.
Biochem Biophys Res Commun. 356: 102-106, 2006.
86. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M,

- Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M.
Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus.
Nature. 443: 709-712, 2006.
87. Shimizu H, Oh-I S, Tsuchiya T, Ohtani KI, Okada S, Mori M.
Pioglitazone increases circulating adiponectin levels and subsequently reduces TNF- α levels in Type 2 diabetic patients: a randomized study.
Diabet Med. 23: 253-257, 2006.
88. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nagata C, Takeda J, Sarui H, Kawahito Y, Yoshida N, Suetsugu A, Kato T, Okuda J, Ida K, Yoshikawa T.
Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease.
World J Gastroenterol. 13: 1579-1584, 2007.
89. Fujimoto W, Shiuchi T, Miki T, Minokoshi Y, Takahashi Y, Takeuchi A, Kimura K, Saito M, Iwanaga T, Seino S.
Dmbx1 is essential in agouti-related protein action.
Proc Natl Acad Sci USA. 104: 15514-15519, 2007.
90. Miyake A, Yamada K, Kosaka T, Miki T, Seino S, Inagaki N.
Disruption of Kir6.2-containing ATP-sensitive potassium channels impairs maintenance of hypoxic gasping in mice.
Eur J Neurosci. 25: 2349-23463, 2007.
91. Gumina RJ, O'Coirlain DF, Kurtz CE, Bast P, Pucar D, Mishra P, Miki T, Seino S, Macura S, Terzic A.
KATP channel knockout worsens myocardial calcium stress load in vivo and impairs recovery in stunned heart.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 292: H1706-17013, 2007.
92. Nagai T, Imamura M, Mori M.
Metformin use in an obese diabetic patient from weeks 1 to 21 of pregnancy.
J Med. 34: 163-168, 2007.
93. Nagai T, Imamura M, Iwasaki Y, Mori M.
Obstructive sleep apnea syndrome accompanied by diabetes mellitus.
J Med. 34: 23-30, 2007.
94. Ariyama Y, Shimizu H, Satoh T, Tsuchiya T, Okada S, Oyadomari S, Mori M, Mori M.
Chop-deficient mice showed increased adiposity but no glucose intolerance.
Obesity. 15: 1647-1656, 2007.
95. Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, Ariyama Y, Otsuka T, Sohara N, Kakizaki S, Sato K, Mori M.
HGF ameliorates a high-fat diet-induced fatty liver.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 293: G204-210, 2007.
96. Shimizu H, Inoue K, Mori M.
The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure.
J Endocrinol. 193: 1-9, 2007.
97. Tanaka T, Nagata C, Oba S, Takatsuka N, Shimizu H.
Prospective cohort study of body mass index in adolescence and death from stomach

- cancer in Japan.
Cancer Sci. 98: 1785-1789, 2007.
98. Oba S, Nagata C, Shimizu N, Shimizu H, Kametani M, Takeyama N, Ohnuma T, Matsushita S.
 Soy product consumption and the risk of colon cancer: a prospective study in Takayama, Japan.
Nutr Cancer. 57: 151-157, 2007.
99. Nagano H, Wei PZ, Wen CQ, Jomori T, Oku H, Ikeda T, Saito Y, Tano Y.
 Effects of kallidinogenase on ischemic changes induced by repeated intravitreal injections of endothelin-1 in rabbit retina.
Curr Eye Res. 32: 113-122, 2007.
100. Tsuruta T, Oh-Hashi K, Ueno Y, Kitade Y, Kiuchi K, Hirata Y.
 RNAi knockdown of caspase-activated DNase inhibits rotenone-induced DNA fragmentation in HeLa cells.
Neurochem Int. 50: 601-606, 2007.
101. Yamada Y, Sekihara H, Omura M, Yanase T, Takayanagi R, Mune T, Yasuda K, Ishizuka T, Ueshiba H, Miyachi Y, Iwasaki T, Nakajima A, Nawata H.
 Changes in serum sex hormone profiles after short-term low-dose administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) to young and elderly persons.
Endocr J. 54: 153-162, 2007.
102. Moro H, Sato H, Ida I, Oshima A, Sakurai N, Shihara N, Horikawa Y, and Mikuni M
 Effect of SKF-38393, a dopamine D1 receptor agonist on expression of amphetamine-induced behavioral sensitization and expression of immediate early gene are in prefrontal cortex of rats
Pharmacol. Biochem. Behav. 87: 56-64, 2007
103. Umahara M, Okada S, Yamada E, Saito T, Ohshima K, Hashimoto K, Yamada M, Shimizu H, Pessin JE, Mori M.
 Tyrosine phosphorylation of Munc18c regulates PDGF-stimulated Glut4 translocation in 3T3L1 adipocytes.
Endocrinology. 149: 40-49, 2008.
104. Oda N, Imamura S, Fujita T, Uchida Y, Inagaki K, Kakizawa H, Hayakawa N, Suzuki A, Takeda J, Horikawa Y, Itoh M.
 The ratio of leptin/adiponectin can be used as an index of insulin resistance.
Metabolism. (In press)
105. Seino Y, Miki T, Kiyonari H, Abe T, Fujimoto W, Kimura K, Takeuchi A, Takahashi Y, Oiso Y, Iwanaga T, Seino S.
 Intestine specific homeobox (ISX) participates in the maintenance of vitamin A metabolism by regulation of beta-carotene 15, 15'-monooxygenase (bcmo1) expression.
J Biol Chem. (In press)
106. Reyes S, Kane GC, Miki T, Seino S, Terzic A.
 K_{ATP} channels confer survival advantage in cocaine overdose.
Mol Psychiatry. (In press)

- 107 Xu J, Zhang L, Chou A, Allaby T, Belanger G, Radziuk J, Jasmin BJ, Miki T, Seino S, Renaud JM.
K_{ATP} channel deficient pancreatic {beta}-cells are streptozotocin resistant due to lower GLUT2 activity.
Am J Physiol Endocrinol Metab. (In press)
- 108 Shibasaki T, Takahashi H, Miki T, Sunaga Y, Matsumura K, Yamanaka M, Zhang C, Tamamoto A, Satoh T, Miyazaki J, Seino S.
Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP.
Proc Natl Acad Sci USA. (In press)
- 109 Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T.
Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding.
Endocrinology. (In press)
- 110 Miyake K, Horikawa Y, Hara k, Yasuda k, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Makino H, Nanjo K, Kadowaki K and Kasuga M.
Association of *TCF7L2* polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects
J Hum Genet (in press)
- 111 Kakizaki S, Sohara N, Yamazaki Y, Horiguchi N, Kanda D, Kabeya K, Katakai K, Sato K, Takagi H, Mori M.
Elevated plasma resistin concentrations in patients with liver cirrhosis.
J Gastroenterol Hepatol. (In press)

(2)その他の著作物 (国内誌 30件、国際誌 7件)

【国内】

1. 堀川幸男、志原伸行、武田 純
糖尿病と転写因子の異常
日本内科学会雑誌 92: 890-896, 2003
2. 堀川幸男、武田 純
2型糖尿病の遺伝学的解剖
最新医学 58: 124-130, 2003
3. 堀川幸男、志原伸幸、武田 純
多因子病の遺伝子解析におけるハプロタイプ解析の意義
内分泌・糖尿病科 16: 567-572, 2003
4. 志原伸幸、西郡俊絵、西郡秀和、武田 純
遺伝子異常による糖尿病
周産期医学 33: 436-440, 2003
5. 山田思郎、鬼形和道、森川昭廣、堀川幸男、武田 純
MODY
小児内科 34: 1681-1686, 2003

6. 佐々木昭彦、武田 純
糖尿病と遺伝子異常
医学のあゆみ 207: 625-629, 2003
7. 武田 純
糖尿病遺伝子と妊娠
妊娠と糖尿病：診療スタンダード、金芳堂、pp241-244, 2003
8. 武田 純
転写因子遺伝子異常
糖尿病遺伝子診断ガイド (第2版)、日本糖尿病学会、pp54-57, 2003
9. 山本真由美、武田 純
糖尿病
分子予防環境医学、本の泉社、pp454-461, 2003
10. 塩谷真由美、宗 友厚、堀川 幸男、武田 純
SNPs 研究の現状
内分泌・糖尿病科 19: 331-337, 2004
11. 宗 友厚、諏訪哲也、武田 純
Apparent Mineralocorticoid Excess 症候群の現況
ホルモンと臨床 52: 101-107, 2004
12. 武田 純
2型糖尿病の感受性素因
ヒトゲノム 生命システムの理解と医学への展開、中山書店、pp258-265, 2004
13. 武田 純
糖尿病の遺伝相談
遺伝相談、医学書院、pp89-95, 2004
14. 武田 純
MODY
糖尿病診療事典、医学書院、pp45, 2004
15. 川地慎一、武田 純
転写因子による β 細胞機能の調節
別冊医学のあゆみ、医歯薬出版、pp84-87, 2004
16. 塩谷真由美、宗 友厚、堀川幸男、武田 純
Functional Genomics
糖尿病と遺伝子、糖尿病カレントライブラリー 4、pp15-21, 2005.
17. 武田 純
肥満の原因遺伝子
糖尿病の最新医療、先端医療シリーズ、pp43-47, 2005
18. 武田 純
膵 β 細胞の機能調節と転写因子
糖尿病学の進歩 2005、日本糖尿病学会、pp95-98, 2005
19. 堀川幸男
カルパイン 10 遺伝子多型 耐糖能障害
日本臨床 155-159, 2005.

20. 堀川幸男
2型糖尿病感受性遺伝子—カルパイン10遺伝子の分子進化
医学のあゆみ 214: 652-658, 2005.
21. 佐々木昭彦、堀川幸男、武田 純
糖代謝 MODY(1-6型)
日本臨床別冊 新領域別症候群シリーズ No.3 : 54-57, 2006.
22. 堀川幸男
糖尿病とインスリン抵抗性をめぐるトピックス インスリン抵抗性と遺伝素因
Medical View Point 27: 4, 2006.
23. 塩谷真由美、堀川幸男
膝島発現遺伝子のプロファイリング
ゲノム医学 5: 521-525, 2006.
24. 佐久間博也、武田 純
SHPと糖脂質代謝
内分泌・糖尿病科 23 : 52-56, 2006.
25. 宗 友厚、山田亘子、廣田卓男、川地慎一、佐々木昭彦、諏訪哲也、武田 純
食塩感受性遺伝子 食塩と臓器障害
血圧 14: 958-962, 2007.
26. 塩谷真由美、堀川幸男、武田 純.
SHPと糖脂質代謝
最新医学 10: 2347-2352, 2007
27. 飯塚勝美、堀川幸男
カルパイン10
カラー版 糖尿病学 基礎と臨床、西村書店 pp319-22、2007
28. 佐々木昭彦、宗 友厚、武田 純
Carney complex 単一遺伝子病とゲノム
ゲノム医学 7: 53-57, 2007.
29. 宗 友厚
アルドステロンカスケードと遺伝子多型
医学のあゆみ 221: 709-715, 2007.
30. 宗 友厚、山田亘子、廣田卓男、川地慎一、佐々木昭彦、諏訪哲也、武田 純
食塩感受性遺伝子
血圧 14: 958-962, 2007.

【国際】

1. Takeda J.
Plump genes and diabetes: HNF/SHP regulatory network and common metabolic disorders.
Clin Pediatr Endocrinol .12: 29-34, 2003.
2. Smith AN, Lovering RC, Futai M, Takeda J, Brown D, Karet FE:
Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H⁺-ATPase subunit genes.
Mol Cell. 12: 801-803, 2003.

3. Shimizu H, Mori M.
The brain-adipose axis: a review of involvement of molecules.
Nutr Neurosci. 8: 7-20, 2005.
4. Horikawa Y.
Calpain-10 (NIDDM1) as a susceptibility gene for common Type 2 diabetes.
Endocr J. 53: 567-576, 2006.
5. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M.
Leptin resistance and obesity.
Endocr J. 54: 17-26, 2007.
6. Olson TM, Alekseev AE, Moreau C, Liu XK, Zingman LV, Miki T, Seino S, Asirvatham SJ, Jahangir A, Terzic A.
K_{ATP} channel mutation confers risk for vein of Marshall adrenergic atrial fibrillation.
Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 4: 110-116, 2007.
7. Iizuka K, and Horikawa Y.
ChREBP; A glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome
Endoc J (*in press*)

(3) 学会発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待講演 (国内会議 7件、国際会議 1件)

【国内】

1. 武田 純
転写因子病としての糖尿病とその臨床的特徴
第69回日本糖尿病学会中部地方会、浜松、2004年3月
2. 武田 純
遺伝子異常と若年肥満
第25回日本肥満学会、大阪、2004年9月
3. 武田 純
遺伝子異常による糖尿病と臓器形成不全
第20回日本糖尿病・妊娠学会、京都、2004年12月
4. 武田 純
膵β細胞の機能調節と転写因子
第39回糖尿病学の進歩、仙台、2005年2月
5. 武田 純
糖尿病と心血管リスク
2006年プライマリケア関連学会・連合学術会議、名古屋、2006年5月
6. 武田 純
日本人2型糖尿病と心血管イベントリスク
第43回日本糖尿病学会近畿地方会、京都、2006年11月
7. 武田 純
膵島トランスクリプトームと糖尿病遺伝子ハンティング
第27回日本医学会総会、大阪、2007年4月

【国際】

1. 堀川幸男
糖尿病の遺伝学研究の新しい展開
江蘇大学講演会、中国江蘇省鎮江市、2006年6月

②口頭発表（国内会議 26件、国際会議 6件）

【国内】

1. 山田教弘、堀川幸男、武田 純、岸 章治
増殖糖尿病網膜症と2型糖尿病におけるHIF-1 α 遺伝子型の解析関連
第10回日本糖尿病眼学会、福岡、2004年3月
2. 武田 純、山下英俊
糖尿病網膜症診療における遺伝子研究の意義
第11回日本糖尿病眼学会、名古屋、2005年3月
3. 土屋天夫、清水弘行、岡田秀一、上原 豊、根岸真由美、山田英二郎、大井晋介、
有山泰代、Hai Yan、堀川幸男、Graeme Bell、森 昌朋
Calpain-10遺伝子発現低下と関連する新たなハプロタイプの同定
第48回日本糖尿病学会年次学術集会、神戸、2005年5月
4. 今村繁夫、織田直久、下村敦司、千田隆夫、石渡曜子、松本 崇、小野保長、堀田
恵子、加藤大地、永田睦子、小竹素子、早川伸樹、鈴木敦司、堀川幸男、伊藤光泰
糖尿病患者におけるインスリン遺伝子A-2T変異の検討
第48回日本糖尿病学会年次学術集会、神戸、2005年5月
5. 岩崎直子、土屋天夫、堀川幸男、本田正志、織田直久、尾形真規子、鎌谷直之、Graeme
Bell、岩本安彦
CAPN10遺伝子多型の日本人2型糖尿病における意義—多数例による検討
第48回日本糖尿病学会年次学術集会、神戸、2005年5月
6. 飯塚勝美、堀川幸男、Kosaku Uyeda、武田 純
過剰な糖質を脂肪に変換する新規転写因子ChREBPの肝糖および脂質代謝における
意義
ChREBP knockout mouseを用いた解析
第48回日本糖尿病学会年次学術集会、神戸、2005年5月
7. 堀川幸男、夏目 徹
2型糖尿病とカルパイン10関連因子
第28回日本分子生物学会、福岡、2005年12月
8. 村松 学、堀川幸男、武田 純
豚島特異性とリンクした網膜症遺伝子の探索
第12回日本糖尿病眼学会総会、東京、2006年3月
9. 山田教弘、堀川幸男、織田直久、志原伸幸、飯塚勝美、武田 純、岸 章治
2型糖尿病患者を用いたHIF-1 α 遺伝子多型の同定と関連解析
第12回日本糖尿病眼学会総会、東京、2006年3月
10. 宗 友厚、塩谷真由美、村松 学、佐久間博也、川地慎一、佐々木昭彦、諏訪哲也、
加納克徳、堀川幸男、森田浩之、林 慎、山北宜由、武田則之、武田 純
局所コルチゾール代謝機構と糖・脂質代謝・血圧とのリンクについての解析

- 第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月**
11. 大谷健一, 堀川幸男, 清水弘行, 森 昌朋
カルパインはインスリン分泌に影響する
- 第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月**
12. 塩谷真由美, 堀川幸男, 武田 純
糖尿病発症における SHP 遺伝子変異の検討
- 第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月**
13. 飯塚勝美, 堀川幸男, 武田 純, Ueda Kosaku
糖尿病関連病態における CdREBP の寄与
- 第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月**
14. 今村繁夫, 織田直久, 下村敦司, 千田隆夫, 稲垣一道, 関口佐保子, 糸井智子, 松本 崇, 小野保長, 安田啓子, 堀田恵子, 永田睦子, 柿澤弘章, 早川伸樹, 鈴木敦詞, 堀川幸男, 伊藤光泰
インスリン遺伝子 A-2T 変異の At-T20 細胞での検討
- 第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月**
15. 宗 友厚, 諏訪哲也, 村松 学, 武田 純
ミネロコルチド[®]の分子遺伝学
- 第79回日本内分泌学会総会、神戸、2006年5月**
16. 宗 友厚, 塩谷真由美, 村松 学, 佐久間博也, 川地慎一, 佐々木昭彦, 諏訪哲也, 加納克徳, 堀川幸男, 森田浩之, 林 慎, 山北宜由, 武田則之, 武田 純
細胞内コルチゾール再活性化機構と高血圧、糖・脂質代謝、内臓肥満とのリンク
- 第79回日本内分泌学会総会、神戸、2006年5月**
17. 石山雅美, 鈴木英司, 廣田卓男, 伊藤 勇, 後藤 忍, 藤田民夫, 武田 純
糖尿病患者における冠動脈石灰化形成と骨血管相関についての検討
- 第50回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2007年5月**
18. 宗 友厚, 棚橋弘成, 五島英一, 川地慎一, 佐々木昭彦, 諏訪哲也, 堀川幸男, 山本真由美, 武田則之, 安田圭吾, 武田 純
高インスリン血症と遅延型低血糖を認めたインスリン受容体異常
- 第50回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2007年5月**
19. 志原伸幸, 堀川幸男, 飯塚勝美, 武田 純
ラット膵島発現分泌蛋白の探索
- 第50回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2007年5月**
20. 三木隆司
組織間ネットワークによるグルコース恒常性の維持機構
- 第50回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2007年5月**
21. 清水弘行, 大井晋介, 森 昌朋
Nesfatin-1 による摂食調節: レプチン非依存性メラノコルチン系の関与
- 第50回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2007年5月**
22. 橋本貢土, 松本俊一, 佐藤哲朗, 上原 豊, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 清水弘行, 森 昌朋
Liver X receptor (LXR) β 特異的 co-activator の同定
- 第50回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2007年5月**
23. 飯塚勝美, 堀川幸男

- グルコースセンサーChREBP に注目した肥満糖尿病病態の解析
第50回日本糖尿病学年次学術集会、仙台、2007年5月
24. 飯塚勝美、Uyeda Kosaku、堀川幸男
 肝特異的 ChREBP 過剰発現マウスの解析
第50回日本糖尿病学年次学術集会、仙台、2007年5月
25. 佐藤大仁、堀川幸男、飯塚勝美、志原伸幸、大嶋明彦、武田 純、三國雅彦
 視床下部グルコシルチコイド感受性遺伝子の網羅的検索
第80回日本内分泌学会学術総会、東京、2007年6月.
26. 飯塚勝美、志原伸幸、堀川幸男
 カルパイン 10 はグルコース応答性インスリン分泌に関与する
第80回日本内分泌学会学術総会、東京、2007年6月.

【国際】

1. Muramatsu M, Suwa T, Mune T, Takeda J
 Specific expression of disabled-2 in zona glomerulosa and its upregulation by low sodium diet.
31st International Aldosterone Conference, San Diego, June 2005.
2. Mune T, Yamada N, Muramatsu M, Suwa T, Takeda J.
 Polymorphisms in the aldosterone cascade.
ISH Symposium for Aldosterone and Hypertension, Tokyo, October 2006.
3. Mune T, Yamada N, Muramatsu M, Suwa T, Takeda J.
 Common genetic variations in the mineralocorticoid pathway.
International Symposium: The Kidney and Hypertension, Sendai, October 2006.
4. Muramatsu M, Wang H, Enya M, Horikawa Y, Tatemoto K, Suwa T, Mune T, Takeda J.
 Identification of genes specifically expressed in pancreatic islet.
88th Annual Meeting of American Endocrine Society, Boston, June 2006.
5. Suwa T, Muramatsu M, Mune T, Takeda J.
 Zona glomerulosa specific expression of Disabled-2 is regulated by angiotensin II.
88th Annual Meeting of American Endocrine Society, Boston, June 2006.
6. Mune T, Suwa T, Yamada N, Muramatsu M, White PC, Takeda J.
 CYP11B1 polymorphisms and mRNA expression in human adrenals.
89th Annual Meeting of American Endocrine Society, Toronto, June 2007.

③ ポスター発表 (国内 11件、国際 10件)

【国内】

1. 長瀬めぐみ、細江香苗、望月朝味、久保田芳則、古田律子、花木真利子、加藤あさか、中根八千代、安藤勝枝、藤井香、田口泰、竹内道一、浅井富成、杉山貴広、山本真由美、武田 純
 岐阜県恵那保健所館内における境界域糖尿に対する地域保健指導の取り組み方について
第47回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2004年5月
2. 織田直久、今村繁夫、石渡曜子、松本 崇、小野保長、堀田恵子、加藤大也、永田睦子、小竹素子、早川伸樹、鈴木敦司、堀川幸男、伊藤光泰

レプチン/アディポネクチン比とメトフォルミンの効果

第48回日本糖尿病学会年次学術集会、神戸、2005年5月

3. 廣田卓男、鈴木英司、伊藤 勇、石山雅美、後藤 忍、佐々木昭彦、諏訪哲也、武田 純
無症候性糖尿病患者の冠動脈石灰化形成における炎症反応とアディポサイトカインの役割についての検討
第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月
4. 村松 学、堀川幸男、塩谷真由美、諏訪哲也、武田 純
膝島特異的発現遺伝子の同定
第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月
5. 志原伸幸、飯塚勝美、武田 純、堀川幸男
膝β細胞におけるカルパイン10の役割 膝島特異的カルパイン10トランスジェニックマウスを用いた解析
第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月
6. 奥村昇司、丹羽啓之、伏見宣俊、森 昭裕、井上 洋、坂野敦子、大庭志野、武田 純
横断研究による糖尿病患者での大腸癌のリスクに関する検討
第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月
7. 伊藤 勇、鈴木英司、廣田卓男、石山雅美、後藤 忍、佐々木昭彦、諏訪哲也、武田 純
糖尿病患者の心血管合併症予知のための石灰化形成、プラーク病変炎症反応アディポサイトカインの病態識別値と識別能の検討
第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月
8. 佐久間博也、堀川幸男、諏訪哲也、宗 友厚、武田 純
Cab45によるインスリン分泌促進作用
第49回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006年5月
9. 宗 友厚、諏訪哲也、森田浩之、川地慎一、佐々木昭彦、堀川幸男、林 慎、山北宜由、武田則之、武田 純
コルチゾール賦活機構と内臓脂肪蓄積
第104回日本内科学会総会、大阪、2007年4月.
10. 塩谷真由美、堀川幸男、黒田英嗣、武田 純
2型糖尿病におけるGLP-1関連遺伝子多型の検討
第50回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2007年5月
11. 黒田英嗣、堀川幸男、塩谷真由美、武田 純
日本人2型糖尿病患者におけるMODY7 (KLF11)の検討
第50回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2007年5月

【国際】

1. Takami K, Takeda N, Tanahashi T, Yamada A, Sasaki A, Kawachi S, Yasuda K.
Effects of monounsaturated fat rich diet (MUFA) and a high carbohydrate low fat diet (CHO) on circulating levels of adiponection and leptin, and abdominal fat distribution in subjects with impaired glucose tolerance.
63th Annual Meeting of American Diabetes Association, New Orleans, June 2003.

2. Mune T, Ito I, Tanahashi H, Isomura Y, Suwa T, Morita H, Yasuda K.
An intronic polymorphism in the HSD11B1 gene is associated with impaired fasting glucose.
63th Annual Meeting of American Diabetes Association, New Orleans, June 2003.
3. Ishizuka T, Matsumoto M, Kajita K, Sugiyama C, Morita H, Kanoh Y, Ishizawa M, Natsume Y, Sasaki A, Mune T, Takeda J, Yasuda K.
The association of dehydroepiandrosterone with insulin sensitivity of male adults and longevity in Japan.
64th American Diabetes Association Scientific Sessions, Orland, June 2004.
4. Suwa T, Mune T, Muramatsu M, Takeda J.
In situ detection of genes regulated by ACTH in rat adrenal.
87th Annual Meeting of American Endocrine Society, San Diego, June 2005.
5. Muramatsu M, Suwa T, Mune T, Takeda J.
In situ detection of genes regulated by low-sodium diet in rat adrenal.
87th Annual Meeting of American Endocrine Society, San Diego, June 2005.
6. Kajita K, Mune T, Matsumoto M, Sugiyama C, Uno Y, Morita H, Ishizuka T.
Effect of the peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) and AMP activated kinase (AMPK) activity in adipocytes.
87th Annual Meeting of American Endocrine Society, San Diego, June 2005.
7. Yamamoto M, Unemoto T, Suwa T, Sasaki A, Kinoshita Y, Takeda J.
The new e-SMBG system in Gifu University Hospital uniting data for all typer of SMBG machines.
65th American Diabetes Association Scientific Sessions, San Diego, June 2005.
8. Muramatsu M, Wang H, Enya M, Horikawa Y, Tatemoto K, Suwa T, Mune T, Takeda J.
Identification of genes specifically expressed in pancreatic islet.
88th Annual Meeting of American Endocrine Society, Boston, June 2006.
9. Umahara M, Okada S, Oh-I S, Ariyama Y, Shibata A, Uehara Y, Tsuchiya T, Hashimoto K, Shimizu H, Ohshima K, Mori M.
Tyrosine phosphorylation of Munc18c is required for the PDGF-stimulated glucose transporter 4 translocation in 3T3L1 adipocytes.
67th Annual Meeting of American Diabetes Association, Chicago, June 2007.
10. Sato H, Horikawa Y, Iizuka K, Sakurai N, Tanaka T, Shihara N, Oshima A, Takeda J, Mikuni M.
Large-scale analysis of glucocorticoid responsive genes in rat hypothalamus.
37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2007.

(4) 特許出願

①国内出願 (0件)

②海外出願 (0件)

(5) 受賞等

なし

7 研究期間中の主な活動

なし

8 結び

戦略的創造研究推進事業 (CREST) では柔軟な研究活動が展開できたので、目まぐるしく変貌を遂げる世界の研究動向にリアルタイムで対処することができたと言える。硬直した研究費の運用が要求されることが多々ある環境の中で特記すべきことである。その結果、日本人の糖尿病体質の一端を明らかにすることができた。さらに、隣島トランスクリプトーム研究の産物としても、感受性遺伝子以外に、EST マイクロアレイ、隣内分泌関連の遺伝子セット、マイクロ RNA プール、siRNA、液性因子プール、疾患モデル動物、良質の患者情報を搭載した DNA パネルなどが開発された。これらは、本計画が一段落した後にも他計画に発展されて継続していくものであり、一方、類似研究に従事する他の研究者にも提供されるものである。

現在、文部科学省では「ゲノムネットワーク計画」(5年)が進行中であり、近くデータベースとツールソース(全長 cDNA、転写因子、転写開始情報、siRNA など)を構築して完了する。本計画はヒト転写因子に特化したものであることから、糖尿病という疾患を転写因子の角度から扱う本研究の流れには好都合である。同成果の情報プラットフォームを本研究で整備された糖尿病トランスクリプトーム研究へ導入することは、今後の研究を大きく加速させるものであり、実際、既にその融合に着手しているところである。

研究代表者の群馬大学から岐阜大学への人事異動により、研究半ばにおいて主力チームは関東から中部へ大移動をすることになった。さらに、移動してから1年後に岐阜大学医学部の全面移転となり、また大型引っ越しとなって作業の遅滞を招いてしまった。分担代表も千葉大学から神戸大学に異動となり、千葉大学の拠点を閉鎖した。これらの逆境にもめげず、優れた成果を達成してくれた全ての参加者に最後に深謝したい。