

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

平成11年度研究報告書

肥満、糖尿病、胆石症の新しい関連遺伝子、コレシ

ストキニン-A受容体遺伝子

(H10-長寿-004)

主任研究者 宮坂京子

東京都老人総合研究所臨床生理部門 研究室長

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
（総括）研究報告書

肥満、糖尿病、胆石症の新しい関連遺伝子、コレシストキニン-A 受容体遺伝子

主任研究者 宮坂 京子 東京都老人総合研究所臨床生理部門 研究室長

研究要旨 生活習慣病の発症には、遺伝的背景と生活習慣、環境が深く関与する。我々はコレシストキニン（CCK）-A 受容体遺伝子異常が生活習慣病発症の遺伝的要因のひとつであることを提示し、疫学調査によって成人後の肥満との関係を確認した。環境変化に対応する個体の反応をしらべることが、疾患発症のメカニズムを調べる上で重要であるが、ヒトで行うことには限界があるので、モデル動物を用い、平行して行ってきた。

研究分担者

船越顕博 国立病院九州がんセンター

消化器部 医長

大久保賢治 東京都老人医療センター

消化器科 医員

1. 研究目的

社会の高齢化と食糧事情の変化に伴い、糖尿病など生活習慣病の絶対数も増加し、日本人口の約7%が生活習慣病に罹患しているとされている。生活習慣病の発症には、遺伝的背景+環境因子+生活習慣、個人の性格などの複数の要因が関与する。生活習慣病は、慢性疾患として、長期間の医療を必要とし、医療費の増加をもたらす。肥満のなかには、肥満以外に検査所見に殆ど異常をみとめず、とりたてて治療を必要としない「単純肥満」も存在するが、殆どの場合、肥満は生活習慣病の発症を促進したり、増悪させる方向に働いている。肥満を防ぐには、理論的には、摂取カロリーと消費カロリーのバランスを保てばよいわけであるが、肥満の発症にも、遺伝的背景が関与することがあり、肥満の解消は時に困難となることもある。我々は CCK-A 受容体遺伝子異常が生活習慣病発症の遺伝的要因のひ

ひとつであることを提示し、分子機構を検討している。

糖尿病(NIDDM)実験動物モデルとして開発された OLETF ラットは、CCK-A 受容体遺伝子のプロモーター領域よりエクソン 2 までの約 6.8kb に渡って欠失変異が起っていた。この変異は、常染色体上にある本遺伝子にホモ接合(-/-)で起っていた。その後、OLETF ラットの病態が種々確認された。OLETF ラットは膵外分泌機能異常(特に蛋白分泌能の低下)、膵成長、肥大、再生の遅延、インスリン分泌反応の低下、胃粘膜の肥大、胃酸分泌の亢進、胃排出能の変化、過食、探索活動の低下、生体調節リズム異常<sup>1)</sup>等が観察されている。そこで、これらの病態における CCK-A 受容体遺伝子欠損の占めるわりあいを確認することを最終的な目標とし、CCK-A 受容体単一遺伝子ノックアウトマウスを作成した。

また既知の肥満関連遺伝子として知られているアドレナリンβ3受容体遺伝子多型との関係を比較検討した。

## B. 研究方法

### 1. ヒトにおける CCK-A 受容体遺伝子異常

- 1) ヒトにラットと同様の遺伝子の異常が存在するかどうかを検討した。まず、ヒト CCK-A 受容体の遺伝子クローニングを行い全塩基配列を決定した。
- 2) 各種疾患において、genomic DNA を用いる Southern blotting をおこなった。
- 3) プロモーター領域塩基置換 (G-T: -128, A-G: -81) の有無を PCR-RFLP 法により検出する方法を作製し、住民検診例について解析した。
- 4) 肥満関連遺伝子として認知されているアドレナリンβ 3 遺伝子多型の発生頻度もあわせて検索した。

### 2. CCK-A 受容体遺伝子ノックアウトマウスの表現型を検討した。

- 1) Vater 乳頭部にカニューレを挿入し、膵液胆汁混和液を 30 分毎に採取し、CCK, secretin, neuromedin C, acetylcholin の皮下注射刺激をおこなった。膵液胆汁中のアミラーゼ排出量を膵外分泌機能の、胆汁酸排出量を胆嚢収縮機能のパラメーターとした。
- 2) 17%、10%高脂肪食、1%コレステロール食を 1-3 週間投与し、体重変化、胆石形成の有無を確認した。
- 3) 通常食により 60 週令まで飼育し、屠殺、胆石の有無を検索した。

3. 胎児ラットと成体ラット、また成体ラットの各組織間において、CCK-A 受容体遺伝子発現には大きな差異が見られる。多くの遺伝子は、発生の時期、生育の時期、および臓器、組織間で、メチル化状態で、発現が変化することが知られている。ラット CCK-A 受容体遺伝子プロモーター領域の塩基のメチル化を解析した。

## C. 研究結果

### 1. ヒト CCK-A 受容体の遺伝子

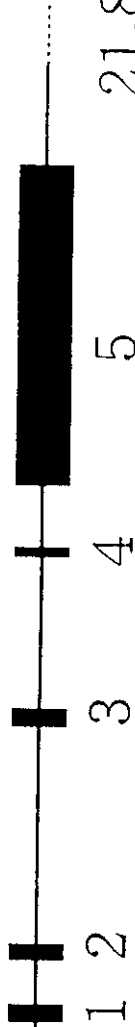
1) ヒト CCK-A 受容体の遺伝子もラットと同じく 5つのエクソン、4つのイントロンから構成されていた。Capsite Hunting により、ヒト CCK-A 受容体プロモーター領域の読み始めを決定した (図 1)。

次頁、図 1 の説明。

Exon mapping and nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the human CCK-A receptor gene. Closed boxes in the genomic DNA show exons each of which is numbered below. The transcriptional initiation site determined by the cap site hunting method was assigned as +1. The positions of sense and antisense primers used for the polymorphism determination are underlined. Asterisks indicate the nucleotide change positions (G to T change in nucleotide -128, and an A to G change in nucleotide -81. Coding region in exon 1 was boxed.

# human CCK-AR

2kb



21.8 kb

1

TGCTGAATG CAAGGCTTCA TGAATGAAGA GGAATCTCA CTAACGTCCTT TTGTAATAAG GACCCAGGTA CCTATGTTCA AAAGTGCCTC -491  
AATCCTAGTT AACRAGGGCA GAGACCACGA GAAACAACAC TGTGTTTAGT AGCAACTTAA CAACCAGCCA GCAGTTCTGT CCACACACAC -401  
ACCACCGGC ATGGTTCCAA AGCTAAAAAG GCACTAATTG CTTTTCTATA AGGAGGTAGA ACACAGTCCC TCCGTGTTCT TTAGGCCCTGA -311  
TGGTCTGCAT TATCGGATCT GTTACCGTGT TAATTGTTCC TGTCTCACAC AGCCGGTTTG GGCCTTCTTC TGCATATGTC TGGGATGGTG -221  
ACGGGTTCT ATATAGAGGA GTACTGGGA AGCCTCTGTG TGTGTGTG TGTCCGTGCA TATGTACACA TGTGTGTA AA AAGCAGCCAC -131  
ACGCTGAGAA TGGTTAACGG GTAGCCAGGC TGTCTGTACT CAGGGCCCTA AGACTGGCCC AGGAAAGGC CGGGGGAGGT GGGGGGGGT -41  
GAAGGTGGAG CGGGCTTGGC TTGTGCTCAC TGCCTTTTCC ACAACAGGAG TACAAATGCT GGAGTGAGTG AGGTGAACTC AAGTCGCCCTT 50  
TAGGAATGCC TGA AAAAGCC CACACCCTGGA AATCACTCCC TCCCTGCTCC TCCACGGCAG GTTGCATCTG CGAGACGCCIT CGGTCAATTAG 140  
AGGAATGAGC CGGGAGTGAG CAATTCACCA GCTCTCCAGC ACTTGGTGA AAGCAGCAGG CAAGGATGGA TGTGGTTGAC AGCCTTCTTG 230  
TGAATGGAAG CAACATCACT CCTCCCTGTG AACTCGGGCT CGAAATGAG ACGCTTTTCT GCTTGGATCA GCCCCGTCCT TCCAAAGGTA 320  
AGTGTGGAA COTGTATTT TAATTCAGGA AACTATTGAG TTGTGGAGA AATCAGCAA GGCAAGGCTG ATAAAAATA TATATAACCA 410

1) Genomic DNA を用いる Southern blotting では正常人及び、糖尿病、胆石症患者間で制限酵素切断フラグメントに差を認めず (図 2)、両群間で大きな遺伝子構造上の差異はないものと思われた。

3) 胆石を有さない胆嚢は胃及び膵疾患で胆嚢摘出施行時に得られた症例を正常対照とし、胆石症胆嚢から得られた RNA を用いる Northern blotting では、一例の胆石症胆嚢において short form の mRNA の発現を認めた。また、アクチン遺伝子の発現との比較から、胆石症胆嚢内 CCK-A 受容体遺伝子発現は有意の低下を認めた ( $33 \pm 5.2\%$ ,  $n=98$ )。よって CCK-A 受容体機能低下による胆嚢収縮不良が胆石形成の一因である可能性が考えられた。また、short form CCK-A 受容体 mRNA の発現を認めた症例の genomic DNA Southern blotting では遺伝子構造に異常を認めず、各エクソン部に primer を設定した PCR 法でエクソン 5 のスプライシング異常が示唆された。即ち、エクソン 5 に primer を設定すると増幅 DNA が得られなかった。この mRNA が正常 CCK-A 受容体蛋白に翻訳されるか否かは不明であるが、エクソン 5 は蛋白コード領域でもあるので、生物活性の弱い CCK-A 受容体への翻訳の可能性は高いと思われる。今後この点の検討も重要である。

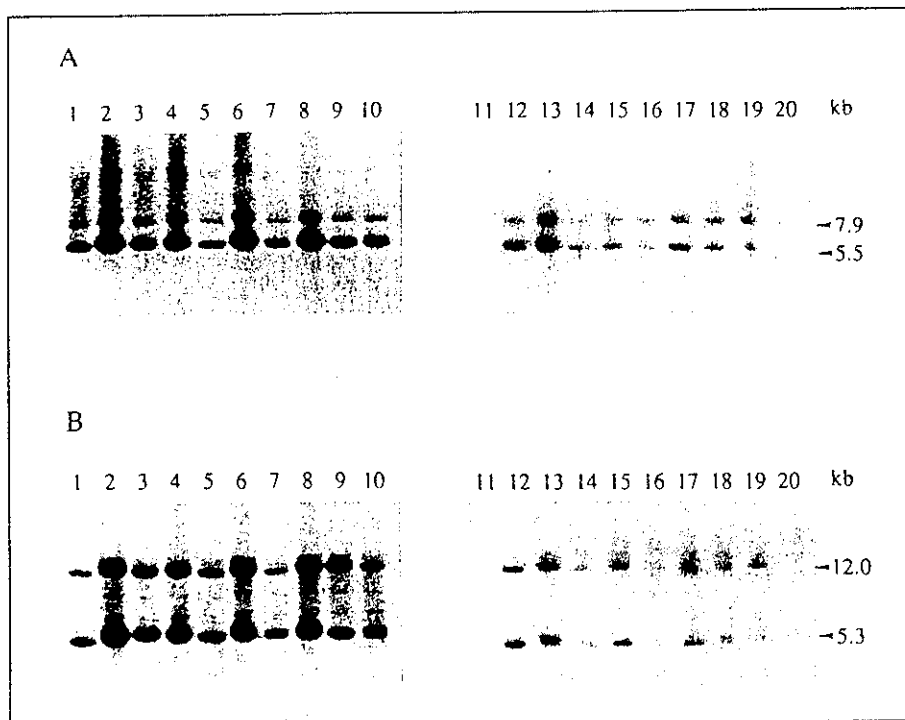


図 2 : 胆石症、糖尿病患者の Southern 解析。A は *EcoRI* 消化、B は *XbaI* 消化。

ヒト CCK-A 受容体遺伝子の各エクソン部位を SSCP 法とシーケンス法で検討した結果、糖尿病 6 症例の異常、膵癌では 1 症例のみの異常を認めた。シーケンスの結果ではイントロン 1 (図 3) の塩基置換ないしはエクソン 3 (図 4) のアミノ酸の異常を伴わない塩基置換を認めたのみで、CCK-A 受容体の機能変化は来さないものと判断された。しかし、胆石症ではほとんど異常を認めなかった。

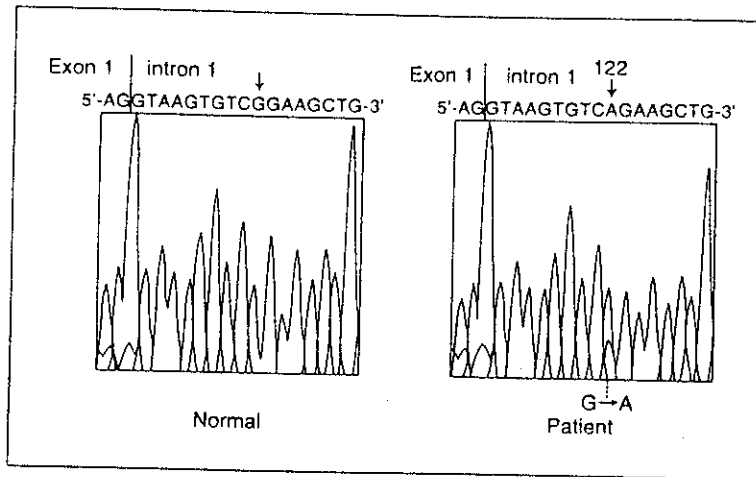


図 3 : Direct sequencing from the variants DNA detected by SSCP analysis

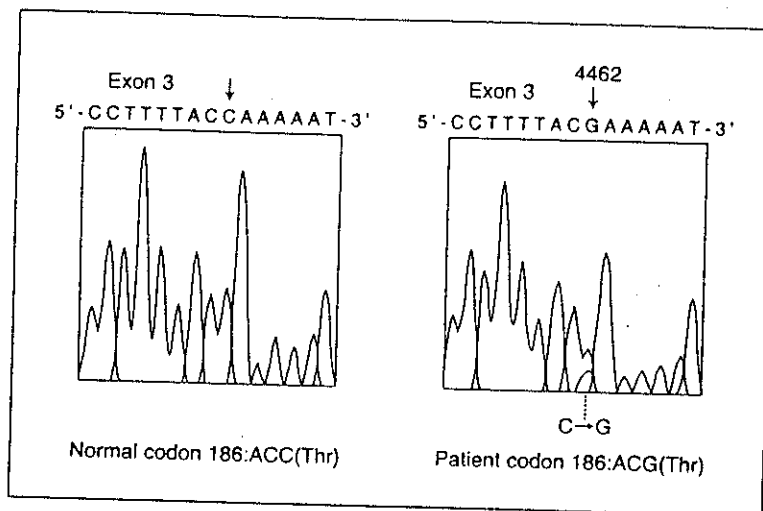


図 4 : Direct sequencing from the variants DNA detected by SSCP analysis

5) プロモーター領域塩基置換 (G-T: -128, A-G: -81) の有無を PCR-RFLP 法により検出した結果、40-70 歳代 1300 人で、多型は約 40% にみとめられた。そのうちホモ異常 (T/T, G/G) は約 2% にみとめられ、体脂肪増加、血清レプチン、インスリン濃度上昇が認められた。

6) 肥満関連遺伝子として認知されているアドレナリン  $\beta$  3 遺伝子多型の発生頻度は、従来の報告と同様、約 30% にみとめられた。年齢による分布の相違は全く認められなかった(表)。

表 1 CCK-A 受容体とアドレナリン  $\beta$  3 遺伝子多型の年齢分布

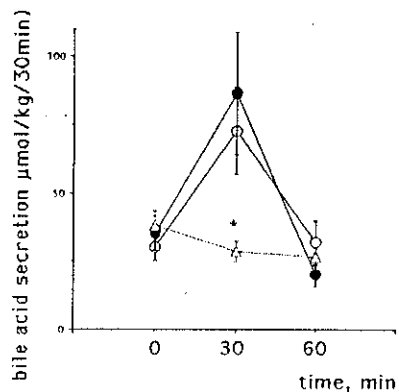
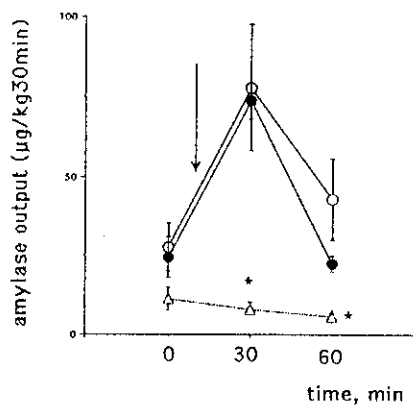
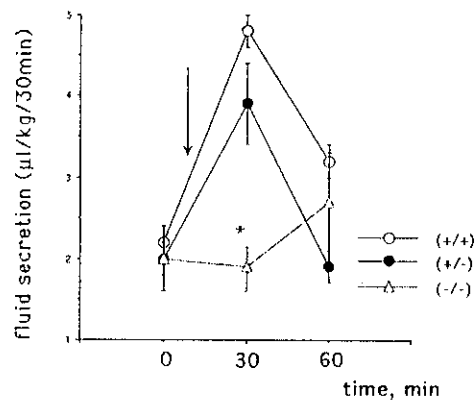
CCK-AR				
	total	type 1(wild)	type 2	type 3
40-70s male	496	300 (60.5%)	70 (14.1%)	4 (0.8%)
female	476	274 (57.6%)	67 (14.1%)	7 (1.5%)
80< male	13	8 (72.7%)	3 (23.1%)	0 (0%)
female	27	15 (56.5%)	6 (21.7%)	1 (4.3%)

type 5	type 7	type 10
98 (19.8%)	16 (3.2%)	8 (1.6%)
106 (22.3%)	9 (1.9%)	13 (2.7%)
1 (9%)	1 (9%)	0 (0%)
4 (17.4%)	0 (0%)	1 (4.1%)

adr- $\beta$ 3				
	total	T/T(wild)	T/A	A/A
40-70s male	218	146 (67.0%)	61 (27.9%)	11 (5.1%)
female	207	138 (66.7%)	60 (29.0%)	9 (4.4%)
80< male	13	8 (61.5%)	4 (30.8%)	1 (2.5%)
female	27	16 (59.3%)	10 (37.0%)	0 (0%)

2. CCK-A 受容体遺伝子ノックアウトマウスの表現型を検討した。

1) CCK-8 刺激により、(+/+),(+/-)マウスでは、有意の液量、アミラーゼ、胆汁酸排出増加が認められた (図5)。しかし (-/-) マウスでは、全く増加反応が認められなかった。以上の結果から、遺伝子のターゲッティングが表現型の欠落を生じていることを確認できた。

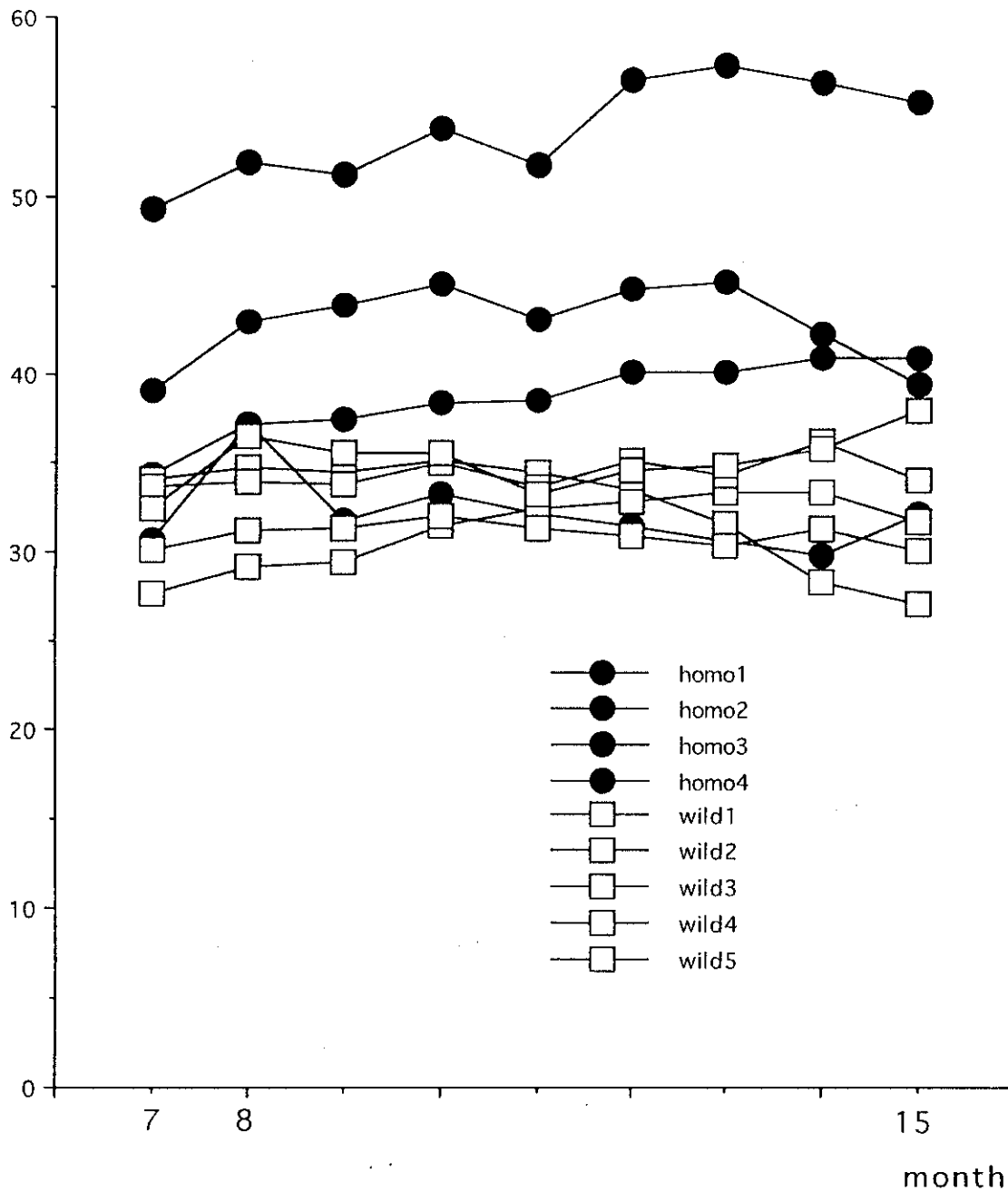




2) 17%、10%高脂肪食、1%コレステロール食を1-3週間投与すると、何れの場合も脂肪肝が先行し、すべての genotype で胆石が形成された。

3) 通常食により60週令まで飼育したところ、(-/-)は4匹生存したが、そのうち3匹は明らかに体重が重く、この3匹は胆石を有していた。しかし、体重の低い1匹と(+/-), (+/+)は胆石がみとめられなかった (図6)。

## body weight



### 3. CCK-A 受容体遺伝子発現調節

胎児ラットと成体ラット、また成体ラットの各組織間において、CCK-A 受容体遺伝子発現には大きな差異が見られる。

多くの遺伝子は、発生の時期、生育の時期、および臓器、組織間で、メチル化状態で、発現が変化することが知られている。ラット CCK-A 受容体遺伝子プロモーター領域の塩基のメチル化を解析した。ラット胎児膵と成体膵では、制限酵素 BSSHII サイトのメチル化が異なっていた (図7)。またこのメチル化の違いは、成体ラットで CCK-A 受容体遺伝子が発現していない肝臓、腎臓にも観察された (図8)。これらの結果から、CCK-A 受容体の遺伝子発現は、メチル化によって、制御されていることが予測された。

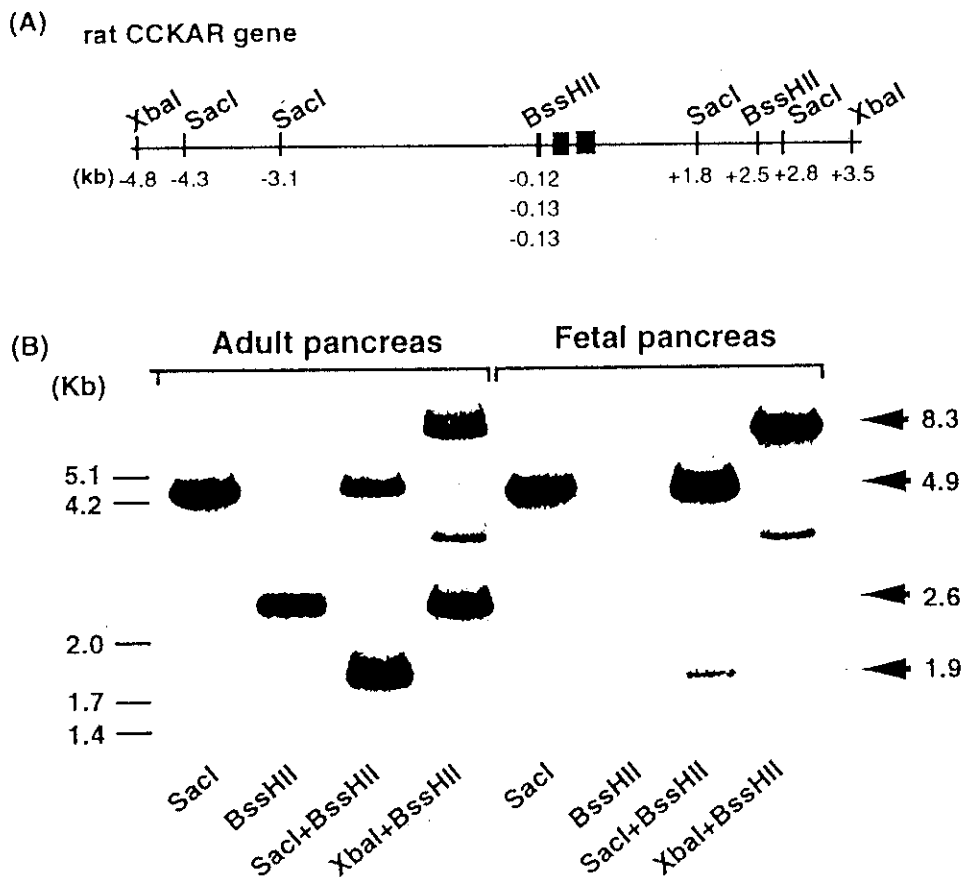
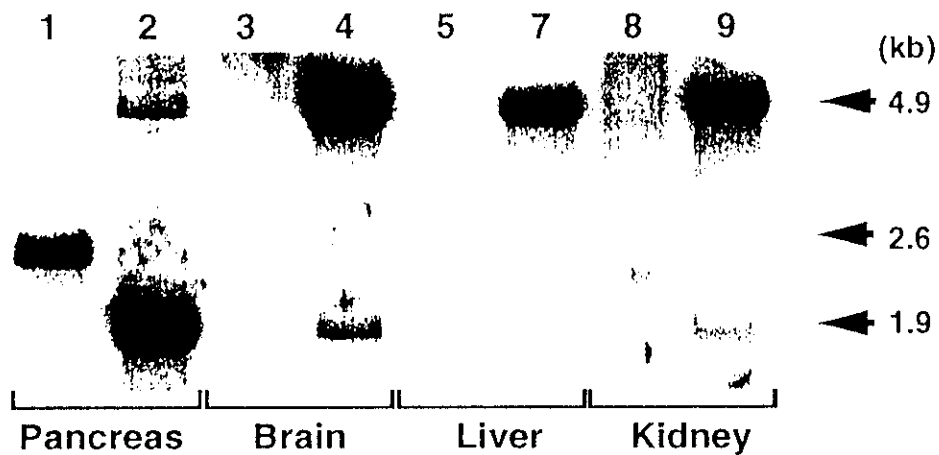


図7 Restriction patterns of CCKAR gene from adult and fetal rat pancreas DNA.

(A) Restriction map of CCKAR gene. Probe for Southern analysis is the 0.3 kb CCKAR cDNA fragment containing exon 1 and 2 (stippled box in the map)

(B) Results of CCKAR gene digested by some restriction enzymes. Genomic DNAs from adult and fetal rat pancreas were digested with SacI, BssH II, SacI + BssHII and XbaI + BssHII. The DNA fragments were fractionated on the 1% agarose gel followed by Southern analysis. Arrow heads represent fragments size recognized with the probe after digestion using each restriction enzymes.



☒ 8 Determination of methylation status of CCKAR gene promoter region in pancreas, brain, liver and kidney of adult rats. Genomic DNA from each tissue was digested with BssHII (lanes; 1, 3, 5 and 8) or SacI + BssHII (lanes; 2, 4, 7, 9). The DNA fragments were fractionated on the 1% agarose gel followed by Southern analysis using a probe described in the Fig. . Arrows represent fragment size resulting with enzyme treatment.

#### D. 考察

遺伝的肥満の典型例として、レプチン欠損 (ob/ob) マウス、およびレプチン受容体欠損 (db/db) が有名であるが、これらは、単一遺伝子の異常に基づく遺伝病である。レプチン欠損 (ob/ob) マウスはほぼ1日中餌を食べ続け、正常のねずみの体重が 20g くらいのところを、60g にもなる。しかし、人間社会では、実験室内の動物のように、近親婚や兄弟交配をくりかえすことはしないので、同様の病態は、ごく稀である。

一方、日本人に多い肥満に関係する遺伝子多型として、アドレナリンβ3受容体があげられる。アドレナリンβ3受容体は脂肪組織に発現し、この受容体にノルアドレナリンが結合すると、脂肪が分解されて、エネルギーとして使われる。遺伝子多型では、遺伝子の塩基が変化したために、受容体蛋白を形成するアミノ酸の1個がトリプトファンからアルギニンに変化してしまい、その結果、脂肪組織からのエネルギー放出効率が悪くなり、脂肪が蓄積しやすくなる。

この多型は最初、アメリカのピマインディアンで報告されたが、ピマインディアンのルーツは、我々日本人と同じと考えられ、日本人における多型の発生頻度は、ヘテロ、ホモをあわせると約40%と高い。ピマインディアンは、アメリカのアリゾナ州とメキシコのシェラマドレ山脈に定住した2つのグループがあり、もともとは、同じ種族であり、共通の遺伝的素因を持つ。1970年代までにアリゾナのピマインディアンは農業からはなれ、アメリカの高脂肪食中心の食生活となり、その結果、成人の多くが肥満を示すようになった。メキシコにすみ、今も農業と酪農を営むピマインディアンは、肥満にはならない。この事実は肥満の発生における遺伝的背景と環境因子の両方の重要性を示唆している。

CCK は脳腸ペプチドとして、中枢、末梢神経および上部消化管に広く分布し、CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-8 等種々の分子種が存在する。脳では主に CCK-4, 8 などの小分子として存在し、神経伝達物質として働く。上部小腸 I cell で合成分泌される CCK は、大分子および小分子の両者が存在し、消化管ホルモンとして働いて、胆嚢収縮、膵外分泌を促す。CCK の遺伝子構造は3エクソンからなり、ヒトでは染色体3に位置し、115アミノ酸のプレプロホルモンから58, 33, 8アミノ酸にプロセッシングされC末端はアミド構造を有する。

CCK の受容体には CCK-A, -B 受容体の2種が存在し、それぞれ別個の遺伝子に由来し、いずれもクローニングされた。胃に発現しているガストリン受容体は CCK-B 受容体と同一構造を持ち、同じ遺伝子に由来する。ヒト CCK-A 受容体遺伝子は染色体4、CCK-B 受容体は染色体11上に存在する。

これらの受容体は膜7回貫通型のG蛋白共役型である。CCK-A 受容体と CCK-B 受容体は50%のhomologyを有し、主に膜貫通部位と第1, 2細胞内ループに共通部位が多い。ラット CCK-A 受容体遺伝子イントロン挿入位置をアミノ酸配列上にプロットすると、7つの膜貫通領域は4つのエクソンに分かれて存在していた。CCK-A 受容体蛋白のN端はエクソン1よりなり、膜貫通領域1-2はエクソン2、膜貫通領域3-4はエクソン3、膜貫通領域5はエクソン4、残りの膜貫通領域5-7とC端部はエクソン5より構成されていた。図1にヒト CCK-A 受容体アミノ酸構造を示す。

CCK-A, B 受容体は臓器特異性の発現を示す。CCK-B 受容体は大脳全体と胃粘膜、およびヒト膵臓に豊富に存在し、CCK-A 受容体は、胆嚢、齧歯類の膵臓、胃、大脳辺縁系の1部に分布する。脳における CCK-A 受容体の分布は、ごく限られており、結合実験により確認されているのは、孤束核、黒質、海馬、視床下部など、辺縁系の一部であるが、満腹効果

(satiety)、探索行動 (exploratory behavior) などを調節している。また、CCK-A 受容体は腹部迷走神経の afferent nerve の胃、腸管側にも存在し、腹部迷走神経求心路末端の CCK-A 受容体が食餌摂取後の満腹効果を仲介することは、よく知られている。Interleukin-1 $\beta$ がこの迷走神経遠心路の CCK-A 受容体の CCK に対する感受性を高め、その結果食欲不振が生じるという報告や、satiety effect を生じる際にレプチンと CCK との間の相乗作用の存在が認められている。

肥満、高脂血症と晩発性インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)を自然発症する系のラットが、うまれつきの遺伝子異常により CCK-A 受容体を持っていないことを発見した<sup>1)</sup>。病態としては CCK-A 受容体欠損に基づく判断される過食、膵酵素分泌、インスリン分泌反応低下、膵の成長の遅延、膵部分摘出後の再生不良などを認めた。一方本系のラットでは、クローニングはされていないが、X 染色体に異常 (ODB-1 遺伝子) が存在することが報告されている。正常 Fisher ラットと交配し、各遺伝子型と耐糖能異常との関係をしらべたところ、野生型、あるいは、それぞれのヘテロ型では、耐糖能異常の出現率は 10%未満であった。それぞれ単一の遺伝子のホモ欠損あるいは異常では耐糖能異常発生率は、それぞれ 20%程度まで増加した。が、統計学的には有意の増加とはいえなかった。しかし両方の遺伝子のホモ接合での異常が存在すると、耐糖能異常の出現率は 35%となり、有意の増加と判定された。

ラットでえられた結果をもとに、CCK-A 受容体欠損または異常という病態は、単独の異常では肥満の原因遺伝子にはなりえないが、肥満、および、生活習慣病発症の増悪因子なのではないかと仮説をたてた。そこで、ヒトにラットと同様の遺伝子の異常が存在するかどうかを検討した。まず、ヒト CCK-A 受容体の遺伝子クローニングを行い全塩基配列を決定した。肥満、糖尿病、胆石症をそれぞれ有する計 300 例において末梢血から DNA を抽出し、サザンプロットをおこなった。が、ヒトでは、上記のラットでみられたような電気泳動パターンの変化を生じさせるような大きな DNA の変異は存在しなかった。

ヒトでは CCK-A 受容体は胆嚢に豊富に発現している。最近では腹腔鏡下胆嚢摘出術が普及したことから、胆嚢組織を入手することが比較的容易となった。胆石もまた、食生活の変化によって、コレステロール結石の発生がビリルビン結石よりも優勢となり、高脂血症、肥満との合併も多い。そこで、肥満、糖尿病、胆石全部を合併し、胆嚢摘出をうけた症例 14 例について、プロモーター領域の direct sequencing をおこなった。すると、14 例中 9 例に 2 箇所の塩基置換 (-128 の G が T、-81 の A が G) が存在していた。次に、Direct sequence 法では、解析速度が能率的でないので、PCR-RFLP 法を開発した。この方法により、理論的に 10 種類の CCK-A 受容体遺伝子多型が区別できる。しかし、type 4,6,8,9 はこれまでに検出されていない。ホモ接合体である type 10(T/T, G/G)の出現頻度は約 2%であった。

肥満を呈し、CCK-A 受容体を欠損するラットは、交配をくり返すことにより樹立された系である。ゆえに、ODB-1 遺伝子を含め、複数の遺伝子異常が存在する可能性がある。そこで、CCK-A 受容体機能の果たす役割を確認する目的で、遺伝子ターゲティングマウスを作製した。ラットでの交配実験から、CCK-A 受容体遺伝子の欠損単独では、肥満、胆石、糖尿病が、発症する可能性は 20%である。そこで、2年間、マウスを飼育し、体重、血糖変化、胆石形成有無の追跡調査を開始した。

アドレナリン $\beta$ 3 受容体遺伝子多型は、受容体を構成するアミノ酸のうちの一つが、トリプトファンからアルギニンに変化しているが、CCK-A 受容体遺伝子多型は、プロモーター領域の塩基置換であるため、受容体蛋白のアミノ酸そのものは変化していないはずである。

CCK-A 受容体遺伝子多型と病態との因果関係を確認するには塩基置換と転写、および蛋白発現の関係をあきらかにすることが必要である。

ラットでは、胎児期の膵臓には B 受容体遺伝子発現があり、生後 B 受容体が消褪して A 受容体が発現する。この CCK-A 受容体遺伝子発現には脱メチル化が重要であることを確認した<sup>7)</sup>。つまり脱メチル化と mRNA 発現量とが相関しており、脱メチル化のない肝臓では発現がない。さらに、CCK-A 受容体 mRNA の定量にむけて、competitive PCR 法の確立を試みている。また、我々は、ヒト CCK-A 受容体プロモーター領域の読み始めを決定することができたので、上記の遺伝子プロモーター領域の塩基置換部位を含むように種々のサイズの DNA 断片を作製し、転写活性を測定する系をつくり、塩基置換の有無による発現の差を比較する。

#### E. 結論

肥満、糖尿病に代表される生活習慣病は動脈硬化を促進し血管障害の原因となり、寿命を縮めるとともに老人の医療費がかさむことの大きな原因のひとつである。生活習慣病は、遺伝的要素と生活習慣の相乗または相加効果によって発症し増悪することはよく知られている。すでに肥満や成人型糖尿病にかかわっているとされる遺伝子異常がいくつか報告されているが、生活習慣病は、単一遺伝子異常によって生じる遺伝病ではない。今回我々が提起した CCK-A 受容体遺伝子多型という病態も、単一の原因とはなりえない。しかしハイリスク群を検出し、生活習慣の改善などの指導をおこなうことにより、疾患の発生を予防することができれば、本人、家族、社会にとって、非常に有意義である。

#### F. 研究発表（次頁以降）

1. 論文発表
2. 学会発表

#### G. 知的所有権の取得状況

II 型糖尿病(NIDDM)遺伝子の検出方法  
(特許整理番号 SG-7-003)

#### 4. 研究成果の刊行

	書籍雑誌名、巻、 <u>論文名</u>	刊行年月 日	刊行書店	執筆者
1	Mechanism of cholecystokinin-A receptor antagonist on human pancreatic exocrine secretion: Localization of CCK-A receptor in the human duodenum. <i>Digestion</i> 1999; 60(suppl 1): 75-80.			Funakoshi A, Fukamizu Y, Miyasaka K.
2	Atropine-resistant secretion of a putative luminal cholecystokinin releasing peptide in conscious rats. <i>Am J Physiol</i> 276: G287-292. 1999.			Miyasaka K, Tateishi K, Masuda M, Jimi A, Funaoshi A.
3	Response of the gastric vagal afferent activity to cholecystokinin in rats lacking type A cholecystokinin receptors. <i>J Auton Nerv Syst</i> 75: 51-59, 1999.			Kurosawa M, Buchinskaite V, Taniguchi T, Miyasaka K, Funakoshi A, Lungeberg T.
4	Impaired learning and memory in OLETF rats without cholecystokinin (CCK)-A receptors. <i>Physiol &amp; Behav</i> 66: 869-872, 1999.			Nomoto S, Miyake M, Ohta M, Funakoshi A, Miyasaka K.
5	Lowered entrainment function in the suprachiasmatic nucleus of Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. <i>Jpn J Pharmacol</i> 80: 85-88, 1999.			Shimazoe T, Maetani M, Nakamura S, Yamanouchi S, Watanabe S, Miyasaka K, Kono A, Funakoshi A.

#### 4. 研究成果の刊行

6	Disruption of cholecystokinin (CCK)-B receptor gene did not modify bile or pancreatic secretion or pancreatic growth. A study in CCK-A receptor gene knockout mice. <i>Pancreas</i> 19:114-118, 1999			Miyasaka K, Shinozaki H, Suzuki S, Sato Y, Kanai S, Masuda M, Jimi A, Nagata A, Matsui T, Noda T, Kono A, Funakoshi A.
7	Molecular cloning and expression of rat antisecretory factor and its intracellular localization. <i>Biochem Cell Biol</i> 77: 223-228, 1999.			Tateishi K, Misumi Y, Ikehara Y, Miyasaka K, Funakoshi A.
8	Role of CCK-A receptor in the regulation of pancreatic bicarbonate secretion in conscious rats: A study in naturally occurring CCK-A receptor gene knockout rats. <i>Pancreas</i> 19: 217-223, 1999.			Miyasaka K, Suzuki S, Kanai S, Masuda M, Funakoshi A.
9	Expression of cholecystokinin type A receptor gene correlates with DNA demethylation during postnatal development of rat pancreas. <i>Biochem Biophys Res Comm</i> 264: 29-32, 1999			Matsusue K, Takiguchi S, Takata Y, Funakoshi A, Miyasaka K, Kono A.
10	Different effects of trypsin inhibitors on intestinal gene expression of secretin and on pancreatic bicarbonate secretion in CCK-A receptor deficient rats. <i>Jpn J Pharmacol</i> 81: 2339-345, 1999			Kawanami T, Suzuki S, Yoshida Y, Kanai S, Takata Y, Shimazoe T, Watanabe S, Funakoshi A, Miyasaka K.
11	Body fat content is related to cholecystokinin A receptor gene promotor polymorphism. <i>FEBS Lett</i> 466: 264-266, 2000.			Funakoshi A, Miyasaka K, Yamamori S, Takata Y, Kataoka K, Takiguchi S, Kono A, Shimokata H.



#### 4. 研究成果の刊行

12	NIDDM自然発症 (OLETF)ラットの脂質の腸管リンパへの輸送の増加とそれに対する食餌制限、運動の効果。消化と吸収。 22: 99-103, 1999.			佐藤裕子、宮坂京子、林洋、船越顕博。
13	老化促進因子の発症機序の解明—ことに肥満、成人型糖尿病の発症と行動異常とコレシストキニン(CCK)-A-レセプター遺伝子異常の関連。ノバルティス老化および老年医学研究基金1996年度受賞者講演。日本老年医学会雑誌 36: 90-94, 1999			宮坂京子、船越顕博
14	加齢と消化吸収。化学と生物 37: 368-374, 1999.			宮坂京子、船越顕博
15	コレシストキニン (CCK)と膵機能。総合臨床 48:1649-1656, 1999.			宮坂京子、船越顕博
16	CCK-A受容体遺伝子の構造異常と疾病。消化器科 28: 598-605, 1999.			船越顕博、瀧口総一、宮坂京子
17	Disrupted cholecystokinin type-A receptor gene in OLETF rats. Obesity and NIDDM. Edited by Shima K. 1999. p.87-98.	Elsevier	1999	Funakoshi A, Takiguchi S, Takata Y, Kono A, Miyasaka K.

#### 4. 研究成果の刊行

18	Morphological changes in the pancreatic islets of the OLETF rats. Obesity and NIDDM. Edited by Shima K. 1999. p.29-36.	Elsevier	1999	7. Jimi A, Miyasaka K, Shinozaki H, Funakoshi A.
	Behavior abnormalities in the OLETF rats. Obesity and NIDDM. Edited by Shima K. 1999. Pp.191-198.	Elsevier	1999	Kobayashi S, Miyasaka K, Funakoshi A.

	書籍雑誌名、巻、論文名 学会発表	刊行年月日	刊行書店	執筆者
1	Daily exercise without food restriction normalized diurnal rhythm of energy expenditure and improved diabetic state in genetically obese diabetic rats.	100th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association May 16-19, 1999. Orlando, Florida		1. Ichikawa M, Miyasaka K, Ohta M, Sato Y, Funakoshi A.
2	Enhanced lymphatic lipid transport in genetically diabetic obese rats, and beneficial effect of weight control by food restriction or exercise.	100th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association May 16-19, 1999. Orlando, Florida		2. Miyasaka K, Hayashi H, Sato Y, Ichikawa M, Ohta M, Imaizumi K, Funakoshi A.
3	Mechanism of human pancreatic exocrine secretion stimulated by CCK.	100th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association May 16-19, 1999. Orlando, Florida		3. Funakoshi A, Shinozaki H, Fukamizu Y, Fujii M, Jimi A, Eriguchi N, Yasunami Y, Ikeda S, Miyasaka K.
4	The presence of leptin and HCGb in human pancreatic cancer tissues.	100th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association May 16-19, 1999. Orlando, Florida		4. Jimi A, Funakoshi A, Wakasugi H, Kono A, Miyasaka K.
5	Luminal administration of octreotide inhibits secretions of luminal CCK-releasing peptide (LCRF), plasma CCK and pancreatic protein in conscious rats.	100th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association May 16-19, 1999. Orlando, Florida		5. Miyasaka K, Masuda M, Kanai S, Suzuki S, Ohta M, Kimura N, Jimi A, Funakoshi A.

6	Enhanced gastric emptying in CCK-B receptor gene knockout mice	100th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association May 16-19, 1999. Orlando, Florida	6. Ohta M, Suzuki S, Kanai S, Masuda M, Miyasaka K, Nagata A, Matsui T, Jimi A, Funakoshi A
7	Interleukin-6 (IL-6) receptor monoclonal antibody improved severe acute pancreatitis in IL-6 transgenic mice.	100th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association May 16-19, 1999. Orlando, Florida	7. Suzuki S, Masuda M, Ohta M, Kanai S, Miyasaka K, Jimi A, Funakoshi A
8	Beneficial effects of long-term voluntary exercise and food restriction in genetically obese and diabetic (OLETF) Rats.	The Third International Conference on Nutrition and Aging. Sep. 21-22, 1999. Tokyo	8. Ichikawa M., Miyasaka K., Ebisawa H., Ozeki T., Ogawara R., Mori H., Kimoto K., Funakoshi A
9	Age-related circadian dynamics of energy metabolism in LETO and OLETF rats.	Third International Conference on Nutrition and Aging. Sep. 21-22, 1999. Tokyo	9. Ichimaru Y., Ichikawa M., Miyasaka K., Kobayashi M., Saito S., Funakoshi A.
10	トリプシンインヒビター (TI) 持続経口投与による重炭酸分泌反応変化。	第76回日本生理学会大会 1999. 3.28-30. 長崎	10. 金井節子、宮坂京子、船越顕博。
11	トリプシンインヒビター (TI) 持続経口投与による重炭酸分泌反応変化。	第85回日本消化器病学会総会 1999. 3.29. 長崎	11. 鈴木伸治、宮坂京子、自見厚郎、船越顕博