

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

慢性疾患としての糖尿病の病期に注目した 病態の解析と、新たな診断・治療法の探索

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安 田 和 基

平成18（2006）年 3 月

目 次

I.総括研究報告	
慢性疾患としての糖尿病の病期に注目した病態の解析と、 新たな診断・治療法の探索 安田 和基	1
II.分担研究報告	
1. インスリン分泌細胞の機能・分化増殖に関する研究、糖尿病網膜症に 関わる新規分子の探索、および統合的解析のための臨床パネルの構築 安田 和基	19
2. インスリン・シグナル伝達のプロテオーム解析 鏑木 康志	37
3. 組織幹細胞の維持・分化増殖機構の解析および膵島細胞 への分化誘導 大河内仁志	43
4. マウス ES 細胞からの膵臓組織分化系の確立と機能解析に関する研究 浜崎 辰夫	49
5. ヒト血管内皮細胞を用いた糖尿病性微小血管症の 発症機構解明と治療法開発 湯尾 明	61
6. 糖尿病モデルを用いた個体レベルの病態解析 岡村 匡史	65
7. モデル系を用いた環境要因の分子メカニズムについての解析 江崎 治	73
8. 膵臓形成に関与する新規遺伝子群のクローニングと解析 に関する研究 浅島 誠	81
III.研究成果の刊行に関する一覧	89

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

慢性疾患としての糖尿病の病期に注目した病態の解析と、新たな診断・治療法の探索

主任研究者 安田 和基 国立国際医療センター研究所・部長

研究要旨：糖尿病の発症・進展は、長い慢性の経過をたどるが、その間に生体内で生じている現象には未知の点が多い。本研究では、大型先行プロジェクトの成果を基盤に、世界でもユニークな解析系を導入し、糖尿病の発症・進展の中でも、これまで特に解析が遅れていた「環境因子の分子メカニズム」、「膵代償機序とその破綻」「合併症」の3点に注目して解析を進めた。また個体レベルでの解析系として、ユニークな動物モデル（Sendai ラット）を解析し、また重層的な解析を可能にするヒト臨床パネルを構築した。これらをもとに、成因とともに、病期にも基づく新しい診断治療法の開発をめざし、糖尿病の真のオーダーメイド医療の実現を目標とする。

分担研究者

国立国際医療センター研究所

代謝疾患研究部室長 鍋木 康志

細胞組織再生医学部長 大河内 仁志

細胞修飾生態反応研究室長 浜崎 辰夫

血液疾患研究部長 湯尾 明

ヒト型動物開発研究室長 岡村 匡史

国立健康・栄養研究所

生活習慣病研究部長 江崎 治

東京大学

教養学部教授 浅島 誠

無症状のまま経過することが多いので、患者の3分の2ほどは病院にて治療を受けていないと推定されるが、薬物反応性や病期、進行のスピードも患者により異なり、現時点では良好な血糖コントロールを得るには専門医でも試行錯誤を必要とする。その結果、さまざまな合併症を生じ、たとえば、年間4,000人が新たに失明し、1.2～1.3万人が新たに透析導入を受け、それぞれ後天的失明や透析導入の原因の第1位である。また虚血性心疾患や脳卒中など動脈硬化性疾患の発症リスクも高く、糖尿病患者の平均寿命は非糖尿病患者に比し、約10～13年短いとされる。このように糖尿病は生命予後やQOLに大きく影響するだけでなく、医療経済上も大きな問題となっている。したが

A. 研究目的

糖尿病は生活習慣の西洋化に伴い日本でも30-50倍に急増しており、「予備軍」を含めると1,500万人以上と推定されている。

って、糖尿病の進展予防、合併症の早期診断・画期的な治療法の確立が急務とされる。

糖尿病の特徴の 1 つは、生活習慣病の中でもその病像が多彩で、しかもきわめて長い経過を経て発症・進展し病態が変遷してゆくことである。すなわち糖尿病は、「成因」に遺伝的側面、環境因子の双方が強く関与し、かつ同一個人でも「病期」により全くことなる臨床像、治療反応性を示す。しかしながら、その数年～数十年に及ぶ長い経過の間に生じている病態については、最も重要なテーマであるにもかかわらず不明の点が多い。

本研究では、これまで進められてきた、ミレニアムプロジェクト、メディカルフロンティア、プロテオームファクトリーなどの研究の成果や方法論を基盤として、新たな独自の解析系を導入し、こうした慢性の経過で生じている現象を解明する。またこれらの成果を統合して、糖尿病の病態に対する画期的な診断／治療法の開発に役立てる。

こうした目的に対し、本研究の特徴は、

- ① 先行するゲノム・ポストゲノムの大型研究（具体的にはメディカルフロンティア（以下 MF-4）、ミレニアムゲノムプロジェクト（以下 MPJ-4）、プロテオームファクトリー（以下 PF）、など）をふまえた、糖尿病病態解析の研究成果を活用し、
- ② ES 細胞からの分化系、独自の解析モデルを中心とした、世界でもユニークな研究リソースを集結し、

- ③ 分子から組織、個体レベルさらに臨床検体までの統合研究プラットフォームを利用して解析することである。

具体的には、糖尿病に対して国内外で長年研究を続けてきた国立国際医療センター及び独立行政法人国立健康・栄養研究所（以下栄養研）のグループに、アクチビンの生理作用の解明などで長年世界の発生研究をリードしている東大浅島教授らのグループ、および再生医学や血液学、実験動物学などの専門家を加えて、多面的なアプローチをおこなう。

近年糖尿病患者数が 50 倍にも増加した事実は、「環境因子」の効果の大きさを示すものであり、その作用メカニズムの解明は急務である。またインスリン抵抗性に対する膵β細胞の「代償とその破綻、進行性の機能低下」は糖尿病進展の根本であるにもかかわらず、メカニズムは不明であり、有効な診断治療法は全くない。さらに高血糖を中心とした長い経過において、細小血管障害を中心としたさまざまな「合併症」を生ずるが、無症状で経過する過程での確な病期や予後診断は難しく、またその詳しい発生メカニズムもほとんど不明である。

本研究はこのように糖尿病の病態の中でも特に慢性の経過の中で生じている現象のうち、上記 3 点に特に注目し、その発症進展のメカニズムに、ユニークなアッセイ系をもとに切り込む。さらにその成果から「病期」に注目した画期的な診断・治療法の開発を目指すものである。

これらにより、「成因」「病期」の両面から糖尿病患者をとらえることで、真のオーダーメイド医療を実現することが、目標である。

なお、研究方法、研究結果の詳細については、各分担研究報告書に譲り、ここでは概要を示すために主な項目を列記しておくにとどめる。

B. 研究方法

[1] 環境因子の分子メカニズムと糖尿病の効果的予防・治療法に関する研究

(1) 環境因子の中でも特に運動（不足）、食事（高脂肪食、高炭水化物食）、に注目し、個体モデルを用いて、それぞれ筋の糖取り込みやエネルギー代謝に関わる遺伝子発現変化、シグナル伝達関連タンパクの発現及び翻訳後修飾の変化を中心に糖脂質代謝・インスリン感受性変化の分子メカニズムを解明する（江崎）。

(2) インスリン作用の分子機序について、とくに IRS（インスリン受容体基質）タンパクのアイソフォーム特異的な作用や細胞内局在に注目し、プロテオーム解析などを含めて解析する（鎚木）。

[2] 膵内分泌細胞の代償とその破綻の分子機序に関する研究

(1) マウス ES 細胞からの in vitro 膵分化系を確立し、その分子機序について解析する（浜崎）。

(2) アフリカツメガエル胚からの多臓器

分化させる系をすでに確立しており、膵分化系について、その発現遺伝子プロファイル解析をおこない、特徴的なパターンを示した遺伝子について、whole mount in situ hybridization を行う（浅島）。

(3) 膵組織由来の幹細胞、内分泌前駆細胞として、新生仔ブタ膵由来 SP 細胞を単離し、その分子的基盤を解析するとともに、内分泌ホルモン産生細胞への分化系を検討する（安田）。

(4) 他の組織由来で分化多能性を有する幹細胞を用いて、膵内分泌細胞への分化の可能性を検討する（大河内）。

(5) 膵 β 細胞の脂肪毒性の系を確立し、その分子機序を解析するとともに、「善玉アディポサイトカイン」の代表であるアディポネクチンが、 β 細胞機能を改善する可能性を検討する（安田、鎚木）

(6) 膵 β 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーを作成し、ショットガン解析を行う（安田）。

[3] 血管内皮細胞を標的とした糖尿病合併症の研究

(1) ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト心臓微小血管内皮細胞、ウシ大動脈内皮細胞などの生体由来血管内皮細胞を用い、高濃度グルコース（25 mM）などによる細胞内の変化を解析し、糖尿病細小血管障害における内皮細胞の障害モデルを構築する。また独自に開発した霊長類 ES 細胞からの血管内皮細胞分化系につい

ても、分子的に解析する（湯尾）。

（２）糖尿病網膜症の分子メカニズム解明のために、網膜色素上皮細胞に注目し、グルコース濃度で調節される分子の網羅的解析を行い、病態に寄与する新規な候補分子を同定する（安田）。

〔４〕 個体レベルでの画期的な病期診断マーカーの開発研究

（１）日本人に類似した、新規非肥満糖尿病モデル Sendai ラットについて、その異常を、個体レベル、臓器レベル、および膵ラ氏島のレベルで経時的に詳しく解析する（岡村）。

（２）２型糖尿病の「病期／ステージ」を個体レベルで解析するために、患者ゲノムおよび血清および詳しい臨床情報をあわせ持った統合的なパネルを構築する（安田）。

（倫理面への配慮）

研究に用いたヒト試料は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」に準拠し、倫理委員会の承認および本人の同意を得て使用した。動物実験については、各施設の実験動物委員会の規則に従い、動物愛護上の配慮をもって実験を行った。

C. 研究結果

〔１〕 環境因子の分子メカニズムと糖尿病の効果的予防・治療法に関する研究

（１）環境因子個体モデル（江崎）。

まず、AMP キナーゼ（以下 AMPK）のドミナントネガティブ型変異体を骨格筋において過剰発現したトランスジェニックマウスを用いて、運動による「体脂肪減少作用」には骨格筋の AMPK、特に $\alpha 2$ AMPK の活性化が必要であること、運動による「糖代謝改善作用」には、体脂肪減少以外の機序も関与していること、そのうちの一つに骨格筋での GLUT4 の発現増加の関与が示唆されること、などの結果を得た。運動による「PGC-1 α 増加」にも $\alpha 2$ AMPK の活性化は関与せず、交感神経系の興奮が関与していることを明らかにした。

一方、砂糖の多量摂取は肥満・糖尿病の罹患を増加させるメカニズムについてはない。高フルクトース摂取マウス、肝特異的 DGAT1 過剰発現マウスを用いて、高フルクトース摂取により、肝からの VLDL 分泌が増加し、血中の中性脂肪値が上昇すること、比較的少量の魚油の摂取がこうした砂糖多量摂取による血中中性脂肪値上昇を抑制すること、及び予想に反してその抑制効果に DGAT1 の発現量は関与していないこと、などを明らかにした。

（２）インスリン作用の分子機序（鏑木）。

IRS 高発現細胞での核抽出液蛋白プロファイルの二次元電気泳動を用いたディファレンシャル解析を行い、有意に変化する蛋白を 51 個同定した。この中には mRNA 代謝に関与し、インスリン刺激により酸性側にシフトするリン酸化蛋白と考えられる蛋白 1 個が含まれ、この蛋白のシフトは

IRS-3 高発現細胞のみで低下していることから、インスリン依存性のリン酸化により増殖促進に関与し、IRS-3 により抑制される可能性が考えられた。

[2] 膵内分泌細胞の代償とその破綻の分子機序に関する研究

(1) マウス ES 細胞からの in vitro 膵分化系 (浜崎)。

胎児期膵原基に発現が認められるアクチビンとレチノイン酸に着目し、ES 細胞の細胞塊を浮遊条件で共処理すると、導管を含む内分泌系・外分泌系の膵組織が培養系で形成されることを見いだした。さらに、アクチビン処理濃度を高めると外分泌系細胞の割合が減少し、内分泌系細胞が大きく増加することも分かった。この分化誘導系を基盤にして、更に効率良くインスリン産生細胞を誘導可能な系の開発は膵代償機序と破綻の解明に重要であると考えられる。

(2) アフリカツメガエル胚からの膵分化系 (浅島)。

ツメガエルのアニマルキャップからアクチビンとレチノイン酸処理による独自の膵形成系を確立した。具体的には、後期胞胚期 (ステージ9) でアニマルキャップを切除したのち、約70%の高効率で膵を誘導する条件 (400ng/ml アクチビン 1 時間処理、生理食塩水 5 時間処理、 10^{-4} mol レチノイン酸 1 時間処理) を確立した。

次にその系を用いて、「400ng/ml アクチビン処理」とのあいだで cDNA のディフ

アレンシャルスクリーニングを行ったところ、未知の遺伝子40個を含む155の陽性クローンを得ることが出来、in situ ハイブリダイゼーションにより膵臓特異的に発現する遺伝子が39遺伝子見出された。

また、上記の膵誘導条件で処理及び非処理のアニマルキャップ由来の mRNA から、Cy3, Cy5 ラベルしたターゲット RNA を合成し、独自に作成したツメガエル cDNA のマイクロアレイを用いて、膵特異的に発現する遺伝子の単離を試みたところ、いくつかの新規遺伝子を単離した。その中には、胎児期に予定膵領域で発現する遺伝子も存在していた。

(3) 新生仔ブタ膵由来 SP 細胞 (安田)。

新生仔ブタ膵からセルソーターを用いて SP (side population) 細胞を単離することにより、いまだ不均一な細胞集団ではあるが、未分化な内分泌前駆細胞の候補を高効率で得ることができた。このなかには長期培養が可能な増殖能をもつ細胞が含まれること、glucagon, somatostatin, PP (pancreatic polypeptide) の発現まで分化を誘導できることを示した。しかし、さまざまな因子を添加しているにもかかわらず、インスリン発現細胞への分化はまだ得られていない。

(4) 他の組織由来で分化多能性を有する幹細胞 (大河内)。

ヒトおよびマウスの皮膚から多能性幹細胞を分離し、浮遊培養して sphere を形成させたのち、マウスでは半年以上の長期継

代に成功した。分化条件の工夫により、多能性を示すことができた。脂肪組織については、コラゲナーゼ処理により成熟脂肪細胞と間葉系幹細胞を容易に分離でき、後者は骨や神経に特異的な分子の発現を誘導できる等、やはり多能性を示すことができた。これらの細胞は sphere にするとネスチンの発現が上昇した。

脂肪組織由来の細胞に、膵組織の細胞分化に重要な転写因子とされる Pdx1 遺伝子を導入して、膵島細胞への分化誘導を検討したところ、Pax6 と Pax4 の遺伝子発現がみられたが、Neurogenin3 や Insulin 遺伝子の発現までは認められなかった。

(5) 膵β細胞の脂肪毒性の系など(安田、鏑木)

膵β細胞株 INS-1D と脂肪酸(パルミチン酸)を用いて、グルコース反応性インスリン分泌が低下するがアポトーシスは増加しないような、可逆性脂肪毒性の系を構築し、「善玉アディポサイトカイン」とされるアディポネクチンがそのβ細胞機能を改善させることを示した。短期あるいは長期のパルミチン酸処理による膵β細胞からのインスリン分泌促進あるいは抑制の分子機構についてもプロテオーム解析にて検索し、短期処理にて有意に増加する蛋白として cofilin を同定したが、RNAi による発現抑制にてインスリン分泌は変化しなかった。

(6) 膵β細胞由来完全長 cDNA ライブラリー(安田)。

膵β細胞特異的な遺伝子発現調節の分子

機序解明のために、V-キャッピング法を用いて、世界で初めて膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーを作成し、約 9000 クローンの 5'側 one-pass 配列解析を行った。その結果、完全長と思われる率は 70% をこえ、従来の報告と異なる転写開始点、機能未知の遺伝子、また少数であるが non-coding RNA 候補も見つかった。

[3] 血管内皮細胞を標的とした糖尿病合併症の研究

(1) ヒト成体由来の内皮細胞(湯尾)。

平成17年度は、細胞内 reactive oxygen species (ROS) と AGE (advanced glycation end-product) についてモニターした。細胞内 reactive oxygen species (ROS) は、ヒト臍帯血静脈内皮細胞とヒト心臓微小血管内皮細胞を用いて測定したところ、何れの内皮細胞においても high glucose (HG: 25 mM) で高い値を得ることができた。また、ヒト臍帯血静脈内皮細胞を用いて AGE (advanced glycation end-product) の測定を行い、high glucose (HG: 25 mM) で高い値を得ることができた。以上より、ヒト血管内皮細胞を用いて、ブドウ糖濃度の上昇に伴う細胞障害につながる細胞内機構が再現され、糖毒性の in vitro 解析系が確立された。

(2) 網膜色素上皮細胞(安田)。

網膜色素上皮に注目して高グルコース濃度で発現が誘導される遺伝子を網羅的に解析し、そのうち分泌タンパクで糖尿病網膜

症に関わる可能性のある新規候補分子を同定した。

〔4〕 個体レベルでの画期的な病期診断マーカーの開発研究

(1) Sendai ラットについて (岡村)。

SENDAI ラットでは加齢と共に、膵島の線維化が雄のみで進行し、インスリン分泌不全型の軽症糖尿病を発症することがわかった。耐糖能異常は若齢 (4 週齢頃) から雌雄とも見られるが、雄ラットでのみ、10-12 週齢で膵島周囲に軽度～中等度の炎症反応が観察された。雌ラットでは、すべての週齢で膵島の線維化は見られなかった。SENDAI ラットは日本人 2 型糖尿病に酷似した非常にユニークなモデルラットであり、インスリン分泌不全型糖尿病の優れたモデルとなることが期待される。

(2) 本研究全体の成果を吟味して臨床へ還元するために、2 型糖尿病の「成因」と「病期／ステージ」個体レベルの統合的な解析を可能にする臨床パネルの構築を行った。(安田)。

D. 考察

本研究の最大の利点は、独自の解析系をいくつも有することである。具体的には、特に、「環境因子解析動物モデル」(江崎)、「マウス ES 細胞からの膵分化系」(浅島、浜崎)、「ツメガエルからの *in vitro* 膵分化系」(浅島)、「膵由来 SP (side

population) 細胞」(安田、大河内)、「膵内分泌細胞全長 cDNA ライブラリー」(安田)、「霊長類 ES 細胞からの血管内皮分化系」(湯尾)、「日本人 2 型糖尿病に酷似したモデル動物 (Sendai ラット)」(岡村)である。これらはいずれも世界中で我々だけが保持するものであり、糖尿病研究において非常にユニークな解析ツールである。

本研究の 3 つの柱の成果についてみると、まず「環境因子やインスリン抵抗性の分子解析」については、「運動」や「食事」など環境因子の効果を発生工学的に mimic する独自の系を用いて新規の知見を報告している。環境因子の効果も従来の定説のように一通りではないという。

「膵 β 細胞の代償と破綻」については、膵 β 細胞の発生・分化という本質的な問題は避けて通れないが、この現在もっともチャレンジングな課題に対して、ユニークな解析系を用いてアプローチしている。発生学との関連では、 β 細胞のみをつくろうという試みが世界的にも多い中、「マウス ES 細胞」(浜崎)「ツメガエル胚」(浅島)からは膵という臓器全体の発生分化の流れのなかでとらえようとしており、生理的な新規のマスター遺伝子を得られる可能性が高い。一方、「膵由来 SP 細胞」(安田)「他臓器由来幹細胞」(大河内)からは、よりインスリン分泌細胞に近い部分のピンポイントした分化をテーマとしているが、いずれも既知の分化誘導因子や転写因子だけではインスリン発現を得られず、予想外

に苦戦している。これらは、ES 細胞からインスリン陽性細胞がなかなか作れない状況とも相通じるものがある。これらは、膵β細胞に特徴的な、非常に精密な遺伝子発現調節機構の存在を示唆するが、「膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリー」では、高度に最終分化した膵β細胞側からその遺伝子調節機構を解明しようとしており、前記アプローチと比較すると、膵β細胞分化をいわばはさみうちにするような、相補う戦略といえる。

第3の「合併症」については、血管病としての特徴に着目し、その血管内皮を直接の解析標的としてグルコースなどの効果を見ようとしている。これを血管病としての合併症の共通部分の解析とすれば、網膜症における網膜色素上皮への着目は、血管をとりまく組織に各臓器合併症の特質を見出そうとする立場であり、やはり相補うものである。

このように、各分担研究は独自に深めつつも相互に特徴を補いあって全体テーマを深めるべく組織されている。

本研究で最も大切なのは、こうした個別の研究を、最終的に個体レベルへどのように統合し、臨床へどのように還元させるか、という点である。これは、生活習慣病研究における永遠のテーマでもあるが、日本人に非肥満インスリン分泌低下型の Sendai ラットはこの点、経時的に臨床像や臓器変化が追えること、しかも比較的高齢まで高血糖が生じにくく、いわゆる糖毒性による

二次的変化の影響が少ないと考えられること、などから、ヒトでなし得ない「病期」の分子的検討については、現時点で最適のモデルの一つであろう。また、ヒト検体については、大型プロジェクトなどで構築された基盤を活かして、糖尿病個体のゲノムや血清・個体の細かい臨床情報・フェノタイプ（フェノーム）、が多数収集されつつあり、平成 18-19 年度以降重層的な解析が可能となる見通しである。

E. 結論

本研究では、糖尿病の慢性の発症・進展の中でも、これまで特に解析が遅れていた「環境因子の分子メカニズム」、「膵代償機序とその破綻」「合併症」の3点に注目して、世界的にもユニークな系を駆使して解析を進めた。また個体レベルでの解析系として、動物モデル（Sendai ラット）を解析し、また重層的な解析を可能にするヒト臨床パネルを構築した。これらをもとに、今後病期に基づく新しい診断治療法の開発をめざしてゆく。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K,

- Yuo A: PPAR γ ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. **Dev Growth Differ** in press, 2006.
- 2) Yanagi Y, Inoue Y, Kawase Y, Uchida S, Tamaki Y, Araie M, Okochi H. Properties of growth and molecular profiles of rat progenitor cells from ciliary epithelium. **Exp Eye Res**. In press
- 3) Nishimura, Y., Hamazaki, T.S., Komazaki, S., Kaminura, S., Okochi, H., Asashima, M. Ciliated Cells Differentiated from Mouse Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, in press.
- 4) Fujimoto M, Kuwano Y, Watanabe R, Asashima N, Nakashima H, Yoshitake S, Okochi H, Tamaki K, Poe JC, Tedder TF, Sato S. B Cell Antigen Receptor and CD40 Differentially Regulate CD22 Tyrosine Phosphorylation. **J Immunol**. 2006 176(2):873-9.
- 5) Itoh, Y., Oinuma, T., Takano, K., Komazaki, S., Obata, S., Asashima, M. CyNodal, the Japanese newt nodal-related gene, is expressed in the left side of the lateral plate mesoderm and diencephalon. **Gene Expression Patterns**, (in press), 1-5, 2005
- 6) Ihara K, Miyako K, Ishimura M, Kuromaru R, Wang HY, Yasuda K, Hara T. A case of hyperinsulinism/hyperammonaemia syndrome with reduced carbamoyl-phosphate synthetase-1 activity in liver: A pitfall in enzymatic diagnosis for hyperammonaemia. **J Inherit Metab Dis** 28(5):681-7, 2005.
- 7) Yamashita R, Saito Y, Satoh S, Aoki K, Kaburagi Y, Sekihara H. Effects of dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2. **Endocrine J**. (2005) 52: 727-733.
- 8) Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 289:E419-E428, 2005.
- 9) Horiuchi A, Yasugi E, Yuo A: Structural requirement of dolichyl phosphate as an

- apoptosis inducer. **J Oleo Science** 54:341-346, 2005.
- 10) Nakatsu M, Doshi M, Saeki K, Yuo A: Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells. **Int J Hematol** 81:32-38, 2005.
- 11) Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H: Characterization and localization of side population cells in mouse skin. **Stem Cells**. 23:834-841, 2005
- 12) Yano S, Okochi H: Long-term culture of adult murine epidermal keratinocytes **Br J Dermatol** 153:1101-4. 2005
- 13) Inoue Y, Yanagi Y, Tamaki Y, Uchida S, Kawase Y, Araie M, Okochi H: Clonogenic analysis of ciliary epithelial derived retinal progenitor cells in rabbits. **Exp Eye Res**. 81:437-445. 2005
- 14) Kagami S, Saeki H, Idezuki T, Yano S, Kawabata Y, Okochi H, Asahina A, Nakagawa K, Tamaki K: Epithelioid Sarcoma Associated with Lung Adenocarcinoma. **J Dermatol** 32:904-908, 2005
- 15) Furue M, Okamoto T, Hayashi Y, Okochi H, Fujimoto M, Myoishi Y, Abe T, Ohnuma K, Sato GH, Asashima M, Sato JD: LIF as an Anti-apoptotic Mitogen for Pluripotent Mouse ES Cells in a Serum-Free Medium without Feeder Cells, **In Vitro Cell Dev Biol Anim**. 41:19-28, 2005
- 16) Michiue, T. and Asashima, M. Temporal and spatial manipulation of gene expression in Xenopus embryos by injection of heat shock promoter-containing plasmids. **Developmental Dynamics**, 232, 369-376, 2005
- 17) Goto, T., L. Davidson, M. Asashima, R. Keller Planar cell polarity genes regulate polarized extracellular matrix deposition during frog gastrulation. **Current Biology**, 15(8), 787-793, 2005
- 18) Qinghua Tao, Yokota, C., Helbert Puck, Matt Kofron, Bilge Birsoy, Dong Yan, Asashima, M., C. C. Wylie, Xinhua Lin, and Janet Heasman Maternal Wnt11 activates the canonical Wnt signaling pathway required for axis formation in Xenopus embryos. **Cell**,

- 120, 857-871, 2005
- 19) Abe, T. , Furue, M. , Kondow, A. , Matsuzaki, K. , Asashima, M. Notch signaling modulates the nuclear localization of carboxyl-terminal-phosphorylated smad2 and controls the competence of ectodermal cells for activin A. **Mechanisms of Development**, 122, 671-680, 2005
- 20) Li, Dong-hui, Chan, T. , Satow, R. , Komazaki, S. , Hashizume, K. and Asashima, M. The role of XTRAP- γ in Xenopus pronephros development. **Int. J. Dev. Biol.**, 49(4), 401-408, 2005
- 21) Honda, M. , Hamazaki, S. T. , Komazaki, S. , Kagechika, H. , Shudo, K. and Asashima, M. RXR agonist enhances the differentiation of cardiomyocytes derived from embryonic stem cells in serum-free conditions. **B. B. R. C.**, 333, 1334-1340, 2005
- 22) Kobayashi, H. , Michiue, T. , Yukita, A. , Danno, H. , Sakurai, K. , Fukui, A. , Kikuchi, A. and Asashima, M. Novel Daple-like protein positively regulates both the Wnt/b-catenin pathway and the Wnt/JNK pathway in Xenopus. **Mechanisms of Development**, 122(10), 1138-1153, 2005
- 23) Yoshida, S. , Furue, M. , Nagamine, K. , Abe, T. , Fukui, Y. , Myoishi, Y. , Fujii, T. , Okamoto, T. , Taketani, Y. and Asashima, M. Modulation of activin a-induced differentiation in vitro by vascular endothelial growth factor in Xenopus presumptive ectodermal cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal**, 41(3), 104-110, 2005
- 24) Kitamoto, J. , Fukui, A. and Asashima, M. Temporal regulation of global gene expression and cellular morphology in Xenopus kidney cells in response to clinorotation. **Advances in Space Research**, 35(9), 1654-1661, 2005
- 25) Nagamine, K. , Furue, M. , Fukui, A. and Asashima, M. Induction of cells expressing vascular endothelium markers from undifferentiated Xenopus presumptive ectoderm by co-treatment with activin and angiopoietin-2. **Zoological Science**, 22, 755-761, 2005
- 26) Kurisaki, A. , Hamazaki, S. T. ,

- Okabayashi, K., Iida, T., Nishine, T., Chonan, R., Kido, H., Tsunasawa, S., Nishimura, O., Asashima, M., Sugino, H. Chromatin-related proteins in pluripotent mouse embryonic stem cells are downregulated after removal of leukemia inhibitory factor. **B. B. R. C.**, 335, 667-675, 2005
- 27) Sugimoto, K., Hayata, T., Asashima, M. XBTg2 is required for notochord differentiation during early *Xenopus* development. **Develop. Growth Differ.**, 47(7), 435-443, 2005
- 28) Onuma, Y., Takahashi, S., Haramoto, Y., Tanegashima, K., Yokota, C., M. Whitman, and Asashima, M. Xnr2 and Xnr5 unprocessed proteins inhibit Wnt signaling upstream of dishevelled. **Developmental Dynamics**, 234, 900-910, 2005
- 29) Asashima, M. Structure and sequential gene expression of in vitro-induced pronephros (kidney) in the amphibian development. **Kidney International**, 68(5), 1963, 2005
- 30) Osafune, K., Takasato, M., Kispert, A., Asashima, M., Nishinakamura, R. Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. **Development**, 133, 151-161, 2005
- 31) Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J: Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. **Nature**: 439: 484-489, 2006
- 32) Kamei Y, Lwin H, Saito K, Yokoyama T, Yoshiike N, Ezaki O, Tanaka H: The 2.3 genotype of ESRRA23 of the ERR α gene is associated with a higher BMI than the 2.2 genotype. **Obes Res**: 13: 1843-1844, 2005
- 33) Nakatani T, Katsumata A, Miura S, Kamei Y. Ezaki O: Effects of fish oil feeding and fasting on LXR α /RXR α binding to LXRE in the SREBP-1c promoter in mouse liver. **Biochim Biophys Acta**: 1736: 77-86, 2005
- 34) Yajima H, Noguchi T, Ikesima E, Shiraki M, Kanaya T, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Oikawa S,

- Kondo K: Prevention of diet-induced obesity by dietary isomerized hop extract containing isohumulones, in rodents. **International Journal Obesity**: 29; 991-997, 2005
- 35) Kamei Y, Suzuki M, Miyazaki H, Tsuboyama-Kasaoka N, Wu J, Ishimi Y, Ezaki O: Ovariectomy in Mice Decreases Lipid Metabolism-Related Gene Expression in Adipose Tissue and Skeletal Muscle with Increased Body Fat. **J Nutr Sci Vitaminol**: 51 110-117, 2005
- 36) Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C, Yano T, Miura S, Ezaki O: Increased VLDL secretion and gonadal fat mass in mice over-expressing liver acyl CoA: Diacylglycerol acyl transferase1. **J Biol Chem**: 280: 21506-21514, 2005
- 学会発表
(安田・鎚木)
- 1) 山下亮、泉和生、野田光彦、安田和基、鎚木康志: 「遊離脂肪酸を長時間刺激した INS-1 細胞のプロテオーム解析」、第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、2005 年 5 月、神戸.
 - 2) 平山愛子、土谷まり子、谷口繁生、安田和基、川上麻理子、梅澤一夫、大河原久子: 「新生仔ブタ腩 (Stem/Precursor) 細胞の分化におよぼすコノフィリンの作用」、同上.
 - 3) 谷口繁生、大河原久子、土谷健、土谷まり子、大河内仁志、鎚木康志、安田和基: 「新生仔ブタ腩臓から単離した SP (side population) 細胞の性質の検討」、同上.
 - 4) 泉和生、野田光彦、岡本昌之、山内敏正、鎚木康志、門脇孝、安田和基: 「腩 β 細胞株 INS-1D の脂肪毒性に対するアディポネクチンの効果」、同上.
 - 5) 横内裕敬、山本修一、武田憲夫、鎚木康志、安田和基: 「高グルコース環境によるヒト網膜色素上皮細胞の遺伝子発現変動の解析」、同上.
 - 6) 谷口繁生、大河原久子、土谷健、土谷まり子、大河内仁志、笹月健彦、鎚木康志、安田和基: 「新生仔ブタ腩臓からの SP 細胞の単離とその性質の検討」第 42 回日本臨床分子医学会学術集会、2005 年 7 月、京都.
 - 7) 山下亮、泉和生、野田光彦、安田和基、鎚木康志: 「遊離脂肪酸を長時間刺激した INS-1 細胞のプロテオーム解析」、第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12

月、福岡

- 8) 安田和基：「慢性疾患としての糖尿病の病期に注目した病態の解析と、新たな診断・治療法の探索」、ヒューマンサイエンス振興財団、ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業研究成果発表会『先端医学研究の進歩と今後ーゲノム解析、遺伝子治療、再生医療研究はどこまで進歩したか？問題はどこにあるのか？』2006年2月、東京

- 9) 鐺木康志、浜田圭子、荒井恵実、山下亮：IRS 高発現 CHO 細胞の核抽出液でのプロテオーム解析、第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡

(大河内・浜崎・浅島)

(国外)

- 1) Yuriko Ito, Shoichiro Yano, Manabu Fujimoto, Tatsuo S Hamazaki, Hitoshi Okochi : SIDE POPULATION CELLS IN THE EPIDERMIS Timberline Symposium 2005 Potland Oregon, USA 2005
- 2) M Komine, S Yano, H Okochi, M Blumenberg and K Tamaki: Mechanical stretch causes the shift to basal and proliferative phenotype in normal human keratinocytes independently from the cell cycle regulation. 66th Annual meeting of the Society of Investigative Dermatology, St. Louis, Missouri, USA, May, 2005
- 3) Okochi H: Skin as a stem cell source,

The annual Dermatological meeting in Taiwan, Taichung, May, 2005

- 4) Okochi H The fate of keratinocyte stem cells in vitro is determined in part by the calcium concentration and physical tension as well as by growth factors MMHCC Epidermal Stem Cells Meeting, Winter Park, Colorado, USA, August 2005
- 5) Ito Y, Hamazaki TS, Asashima M, Okochi H A novel cell surface marker, prominin-1/CD133, of dermal papilla during hair development 15th International Society of Developmental Biologists Congress Sydney, Australia, September 2005
- 6) Yen YT, Kawase Y, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H Efficient neural differentiation from cultured skin stem cells The 23rd meeting of Pacific Skin Research Club Hualien, Taiwan, November, 2005
- 7) Nishimura, Y., Hamazaki, T.S., Komazaki, S., Kamimura, S., and Asashima, M. Differentiation of Ciliated Cells from Murine Embryonic Stem Cells in vitro. 15th International Society of Developmental Biologist Congress (Sydney, Austraria: 2005.9)
- 8) Nakanishi, M., Hamazaki, T.S., Komazaki, S., Okochi, H., and Asashima, M. Differentiation of Pancreatic Tissue

from Murine Embryonic Stem Cells In Vitro. 15th International Society of Developmental Biologist Congress (Sydney, Australia: 2005.9)

(国内)

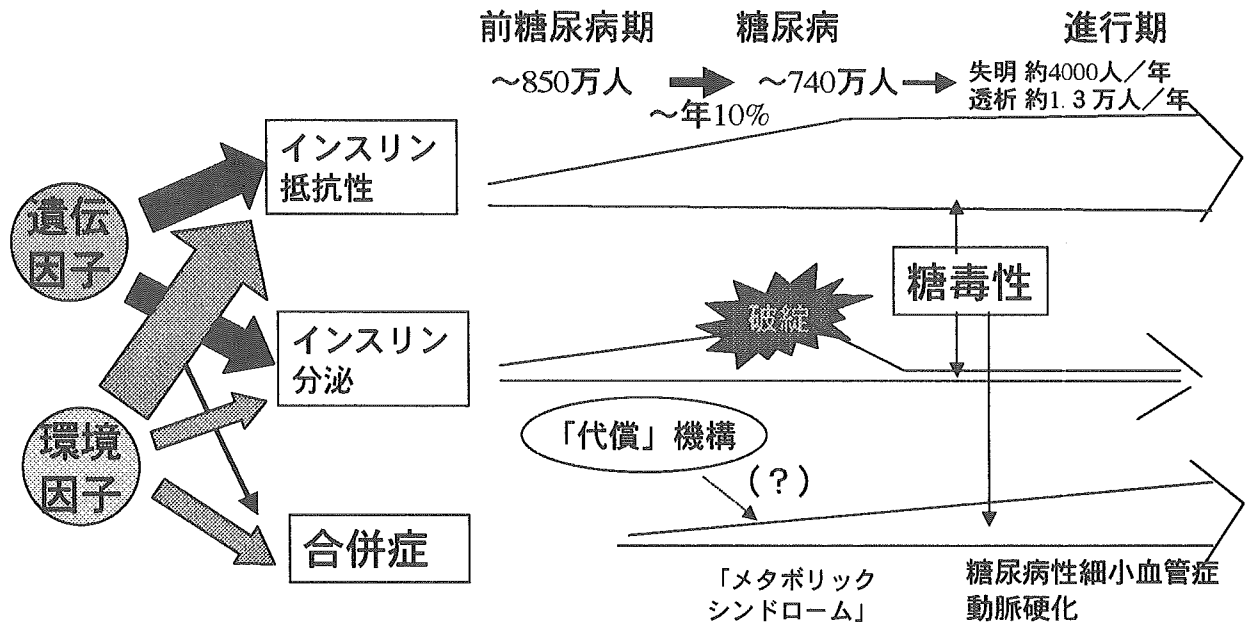
- 1) 大河内仁志：皮膚の多能性幹細胞と毛乳頭細胞について 国立遺伝学研究所・研究集会「上皮・毛器官の形態形成メカニズム」 三島、2月、2005
- 2) 顔育達、河瀬陽子、浜崎辰夫、玉置邦彦、大河内仁志：皮膚由来幹細胞から神経細胞への分化誘導条件の検討 第4回日本再生医療学会、大阪、3月、2005
- 3) 河瀬陽子、徳原真、顔育達、高戸毅、水野博司、浜崎辰夫、大河内仁志：ヒト脂肪細胞からの神経細胞誘導 第4回日本再生医療学会、大阪、3月、2005
- 4) 徳原真、寺島裕夫、斉藤幸夫、清水利夫、河瀬陽子、水野博司、浜崎辰夫、大河内仁志：ヒト大網組織よりの間葉系幹細胞の分離 第4回日本再生医療学会、大阪、3月、2005
- 5) 大河内仁志：皮膚幹細胞 第104回日本皮膚科学会 研究講習会「再生医療」、横浜、4月、2005
- 6) 藤本学、渡辺玲、浅島信子、大河内仁志、玉置邦彦：CD22 のチロシンリン酸化パターンの量的・質的差異によるBリンパ球シグナル伝達制御 第30回日本研究皮膚科学会、横浜、4月、2005
- 7) 大河内仁志 再生医療の現状と将来

東京厚生年金病院フォーラム 東京、7月、2005

- 8) 大河内仁志、皮膚の幹細胞と再生医療 東京大学ティッシュエンジニアリング部 セミナー 東京、7月、2005
- 9) 小宮根真弓、矢野正一郎、南谷洋策、常深祐一郎、大河内仁志、M. Blumenberg 玉置邦彦 表皮細胞における機械的伸展刺激の作用 第20回角化症研究会、東京、7月、2005
- 10) 大河内仁志、再生医療—ES 細胞と組織幹細胞（特に皮膚の幹細胞について）第26回ヒューマンサイエンス基礎研究講習会、東京、9月、2005
- 11) 伊藤ゆり子、浜崎辰夫、大河内仁志 新規毛乳頭細胞表面マーカーの同定と発毛誘導能の検討 第6回 Dermatology research seminar、東京、11月、2005
- 12) 桑野嘉弘、矢澤徳仁、大野祐樹、矢野正一郎、藤本学、大河内仁志、玉置邦彦 円形脱毛患者における血清中ケモカインの検討 日本皮膚科学会第804回東京地方会、東京、12月、2005
- 13) 西村佑介・浜崎辰夫・駒崎伸二・上村慎治・浅島誠：マウス胚性幹細胞からの繊維毛上皮細胞の誘導 日本動物学会第57回関東支部大会（横浜）
- 14) 今野雅允・本多賢彦・石渡勇・内山英穂・浜崎辰夫・浅島誠：マウス胚性幹細胞の中胚葉分化に及ぼす SKG-II 細胞の影響 日本動物学会第57回関東支部大会（横浜）

- 15) 本多賢彦・浜崎辰夫・駒崎伸二・影近弘之・首藤紘一・浅島誠：無血清培養における RXR アゴニストの及ぼすマウス ES 細胞からの心筋細胞分化 第 26 回日本炎症・再生医学会（東京）
- 16) 浜崎辰夫・本郷敏雄：ヒト培養細胞を用いたエストロゲン様物質の簡便な検出法の開発 第 79 回日本薬理学会年会（横浜）
- （江崎）
- （国内）
- 1) 三浦進司、江崎治：慢性運動効果への AMP キナーゼの関与 第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、シンポジウム 5、運動療法の今日的課題（基礎的研究成績と臨床面の問題点）2005. 05. 12 神戸ポートピアホテル（兵庫県神戸市）
- 2) 笠岡誠一、後藤浄子、浅見悦子、小川眞紀子、笠岡(坪山)宜代、江崎治、土屋隆英、中島滋：食事性ヒスチジンは脳内でヒスタミンに変換されたのち摂食量を低下させる 第 59 回日本栄養・食糧学会 2005. 05 東京
- 3) 山崎聖美、江崎治：VLDL 増加による内臓肥満；食事成分の影響 第 26 回日本肥満学会 2005. 10. 14 ホテルロイトン 札幌
- 4) 亀井康富、三浦進司、江崎治：骨格筋における FOXO1 の発現増加は筋量（赤筋）の減少をひき起こす 第 59 回日本栄養・食糧学会 2005. 5. 17 東京
- 5) 亀井康富、高橋真由美、小川佳宏、江崎治：Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes 第 10 回アディポサイエンス 研究会シンポジウム 2005. 8. 19 大阪
- 6) 亀井康富、高橋真由美、小川佳宏、江崎治：インプリンティング遺伝子 Mest/Peg1：新しい脂肪細胞肥大化促進遺伝子 第 26 回日本肥満学会 2005. 10. 13 ホテルロイトン札幌
- （国外）
- 1) Y. Kamei, S. Miura, O. Ezaki：Skeletal muscle FOXO1 (FKHR)-transgenic mice have less skeletal muscle mass, down regulated type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control: The 35th International Congress of Physiological Sciences. 2005. 4. 2, San Diego, USA
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
- なし

図1 慢性疾患としての糖尿病の病態



「病期」＝糖尿病の臨床では十分把握できていない

- ◎ 「環境因子」は糖尿病急増の主因であり、全段階の増悪因子である
- ◎ 「前糖尿病期」から病態は進行/メタボリックシンドロームなど
- ◎ 糖尿病への進行には「膵β細胞の代償とその破綻」が重要
- ◎ 全体を通じて「血管病」としての合併症が進行してゆく

図2 研究班の概要

