

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

糖尿病発症遺伝子WFS1の機能解明と新規治療法の開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡 芳知

平成19（2007）年 4月

# 目 次

## I. 総括研究報告

糖尿病発症遺伝子WFS1の機能解明と新規治療法の開発に関する研究	1
岡 芳知	

## II. 分担研究報告

1. WFS1の機能解明(膵β細胞維持再生機構)に関する研究	6
片桐 秀樹	
2. 遺伝子解析・モデル動物解析に関する研究	10
谷澤 幸生	
3. WFS1の機能解析(関連遺伝子クローニング)に関する研究	14
浅野 知一郎	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	16
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	19
-----------------	----

糖尿病発症遺伝子WFS1の機能解明と新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 岡 芳知 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

現代の飽食・肥満・運動不足は膵β細胞にインスリン分泌の増加を強要する。糖尿病発症遺伝子WFS1は小胞体ストレス状況下での膵β細胞の維持機構に関わることから、最近の膵β細胞負荷(小胞体ストレス)の状況下で糖尿病増加を解く鍵と考え、WFS1の機能解明を進めた。WFS1欠損マウスの膵β細胞では、翻訳抑制因子としてよく知られているeukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein (4E-BPs)のアイソフォームである4E-BP1の発現が著増しており、これが小胞体ストレスへの反応であることを見出した。この翻訳抑制因子が酵母やショウジョウバエにおいてはストレス状況下で重要な役割を果たしていることはよく知られていたが、哺乳類でのストレス下での反応を見出したのは我々が初めてである。さらに、この発現増加は小胞体ストレスで増加する転写因子ATF4の下にあることを見出した。さらに、WFS1-associated proteinを探索し、転写因子TFII-IがWFS1に結合していることを見出した。興味あることに、TFII-Iの結合は小胞体ストレス下で低下し、WFS1から離れることを見出した。これら、4EBP1, TFII-Iは新たな糖尿病発症関連遺伝子候補である。また、個体は臓器間代謝情報ネットワークを通じ、各臓器が他臓器に影響を与えながら全身の代謝調節を行っていることを明らかにした。この臓器間代謝情報ネットワーク自体が、膵β細胞の小胞体ストレスを軽減させるものであり、代謝情報のもとになる「物質」の同定を目指している。さらに臓器間ネットワークとして肝臓から直接膵β細胞を増加させるシグナルが発せられていることを見出している。このシグナルを利用することで、WFS1欠損マウスの膵β細胞減少を改善する結果を得ており、膵β細胞の減少に基づく糖尿病に対し全く新しい視点からの治療開発につながる成果である。

分担研究者

片桐 秀樹

東北大学・大学院医学系研究科・教授

谷澤 幸生

山口大学・大学院医学研究科・教授

浅野 知一郎

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

A. 研究目的

なぜ糖尿病は増加しているのか。近年のライフスタイルの変化が糖尿病の増加を来していることに疑いはない。しかし、環境と遺伝とに分けてその成因を考えるのではなく、現代の飽食と運動不足がインスリン分泌を強要する環境下で初めて問題となる遺伝的脆弱さに着目することが、最近の糖尿病増加を解く鍵と考え、本研究を進めている。キーワードは、ウオルフラム症候群原因遺伝子WFS1、小胞体ストレス、肥満飽食による膵β細胞負荷である。

本研究の目的は、糖尿病におけるWFS1とその関連遺伝子の機能を解明し、飽食の時代の膵β細胞維持・再生の観点からの新たな治療法を見出すことである。同時に、膵β細胞の負担を軽減する視点からの肥満糖尿病治療を開発する。本研究により、肥満し運動が不足す

ると糖尿病を発症する可能性が高い予備軍を効率よく拾い上げられ、さらには、膵β細胞保護(維持・再生)という、新しいコンセプトの糖尿病治療法の開発につながる。

B. 研究方法

1) WFS1ノックアウトマウスを用いたWFS1蛋白機能解析

WFS1ノックアウトマウスとWFS1欠損膵ラ島を用いて、WFS1機能を解析する。膵ラ島や培養細胞に小胞体ストレスを負荷し、WFS1を含めた小胞体ストレス反応を解析する。また、肥満や過食などの膵β細胞負荷下におき小胞体ストレス反応を検討すると共に、薬剤投与による糖尿病発症抑制を目指す。

2) 膵ラ島におけるDNA microarrayを用いたの検討

ノックアウトマウスと野生型マウスから膵ラ島を単離し、DNA microarrayを用いて発現に違いがある遺伝子を網羅的に見出す。また、単離膵ラ島にERストレスを負荷し、KOマウスと野生型マウス膵ラ島の間で発現変化に違いがみられる遺伝子をDNA microarrayで検出する。

3) WFS1-associated protein の同定

我々が作成した抗WFS1抗体を用いて免疫沈降をおこない、WFS1と共沈する蛋白を質量分析にて解析し、

WFS1に結合している分子を同定し、WFS1機能を明らかにする。また、膵β細胞のアポトーシス経路の重要分子に結合している分子をyeast two hybrid systemで同定し解析する。

#### 4) 臓器間代謝情報ネットワークを用いた膵β細胞負荷の減少、また膵β細胞数増加

腹腔内脂肪組織や肝臓から代謝情報が臓器間情報ネットワークにより、個体の糖・脂質代謝にどのような影響を及ぼすか、また膵β細胞を増殖させるかを、高脂肪食負荷により肥満・糖尿病を発症させたマウスで検討し、新規の治療法開発を目指す。

#### 5) 易糖尿病発症者スクリーニングのための候補遺伝子とそのSNP同定

小胞体ストレスに対し遺伝的脆弱性を有するものは若年で糖尿病を発症する可能性が高い。そこで、一般の糖尿病よりも遺伝因子が濃厚な35歳以下発症2型糖尿病患者を臨床データも含めて収集し患者遺伝子解析から候補遺伝子・SNPを同定する。

### 倫理面への配慮

本研究の中のヒト遺伝子解析研究は、3省庁合同指針「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して計画、実施され、東北大学医学部倫理委員会で承認されている(承認番号2003-265 審査結果通知書添付)。すなわち、人権擁護に十分な配慮がなされており、DNA検体はインフォームド Consentのもとに取得され、非連結匿名化されている。WFS1ノックアウトマウス作製ならびにWFS1機能解析のための組替えDNA実験は東北大学倫理委員会にて承認されている。また、マウス動物実験については、麻酔薬を用いるなど疼痛除去に充分配慮している。

### C. 研究結果

WFS1欠損により膵β細胞では小胞体ストレス応答経路が活性化し、翻訳抑制因子4E-BP1の発現が増加する。

WFS1欠損マウスの膵β細胞では、翻訳抑制因子としてよく知られている eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein (4E-BPs)のアイソフォームである 4E-BP1 の発現が著増しており、これが小胞体ストレスへの反応であることを見出した。この翻訳抑制因子が酵母やショウジョウバエにおいてはストレス状況下で重要な役割を果たしていることはよく知られていたが、哺乳類でのストレス下での反応を見出したのは我々が初めてである。さらに、この発現増加は小胞体ストレスで増加する転写因子 ATF4 の下にあることを見出した。

WFS1-associated proteinとしてTFII-Iを見出した。

膵β細胞からWFS1抗体により免疫沈降し質量分析にかけることで、転写因子TFII-IがWFS1に結合していることを見出した。興味あることに、TFII-Iの結合は

小胞体ストレス下で低下し、WFS1から離れることも見出した。

### 臓器間代謝情報ネットワークを利用した膵β細胞負荷の減少ならびに膵β細胞数の増加

個体は臓器間代謝情報ネットワークを通じ、各臓器が他臓器に影響を与えながら全身の代謝調節を行っていることを示した。特に、内臓脂肪からの食欲調節神経シグナル (Cell Metabolism 2006)および肝臓からの代謝を亢進し肥満を改善する神経シグナル(Science 2006)の存在を世界で初めて明らかにした。この臓器間代謝情報ネットワーク自体が、膵β細胞の小胞体ストレスを軽減させるものであり、代謝情報のもとになる「物質」の同定を目指している。さらに臓器間ネットワークの研究を進めるなかで、我々は肝臓から直接膵β細胞を増加させるシグナルが発せられていることを見出している。このシグナルを利用することで、WFS1欠損マウスの膵β細胞減少を改善する結果を得ており、膵β細胞の減少に基づく糖尿病に対し全く新しい視点からの治療開発が期待できる。

### 易糖尿病発症者スクリーニングのための候補遺伝子

前年までにあげた小胞体ストレス応答遺伝子ならびに関連遺伝子の、WFS1, 4EBP1, GRP78, GRP94, ORP150, IRE1 $\alpha$ ,  $\beta$ , XBP1, TRAF2, PERK, eIF2 $\alpha$ , CHOP, EDEM, HRD1に加え、4EBP1, p21cip1, TFII-I, APEが候補として加えられた。

### D.E. 考察および結論

WFS1蛋白は、小胞体ストレスに対する防御機構を担っており、この機能欠如は、小胞体ストレスによるβ細胞の増殖抑制・アポトーシスの亢進によってβ細胞量の低下に至る結果、糖尿病を発症すると考えられる。したがって、WFS1の機能解明のなかで今年度見出した4EBP1, TFII-I, APEは、有力な糖尿病候補遺伝子であるとともに、膵β細胞維持という新たなコンセプトの創薬につながる点できわめて重要である。

我々が見出した臓器間代謝情報ネットワークは、それ自体が膵β細胞の小胞体ストレスを軽減させるものであり、現在進めている代謝情報のもとになる「物質」の同定は、斬新な新規治療法開発に結びつく可能性がある。さらに、肝臓から直接膵β細胞を増加させるシグナルが発せられていることを見出したが、このシグナルを利用することで、WFS1欠損マウスの膵β細胞減少を改善する結果を得ており、膵β細胞の減少に基づく糖尿病に対し全く新しい視点からの治療開発が期待できる。

### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake C, Tashiro F, Katagiri H, Aburatani H, Miyazaki J-I, Oka Y. WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic  $\beta$ -cells. Hum Mol Genet. 15: 1600-9, 2006
- Takahashi R, Ishihara H, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, Takei D, Katagiri H, Endou H, Oka Y. Cell-type specific activation of metabolism reveals that  $\beta$ -cell secretion suppresses glucagon release from  $\alpha$ -cells in rat pancreatic islets. Am J Physiol Endocrinol Metab. 290:308-316, 2006
- Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Niiijima A, Mano H, Aburatani H, Asano T, Oka Y. Signals from Intra-Abdominal Fat Modulate Insulin and Leptin Sensitivity through Different Mechanisms: Neuronal Involvement in Food Intake Regulation. Cell Metabolism 3: 223-9, 2006
- Nonogaki K, Ohashi-Nozue K, Oka Y. A negative feedback system between brain serotonin systems and plasma active ghrelin levels in mice. Biochem Biophys Res Commun. 341: 703-707, 2006
- Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Sasano H and Oka Y. Cold exposure suppresses serum adiponectin levels via sympathetic nerve activation in mice. Obesity 14: 1132-41, 2006
- Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Iwasaki H, Ishihara H, Sasano H, Inukai K, Mizuguchi H, Asano T, Shiota M, Nakazato M, Oka Y. Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. Science 312: 1656-9, 2006
- Takei D, Ishihara H, Yamaguchi S, Yamada T, Tamura A, Katagiri H, Maruyama Y, Oka Y. WFS1 protein modulates the free  $Ca^{2+}$  concentration in the endoplasmic reticulum. FEBS Lett. 580: 5635-5640, 2006
- Emoto M, Fukuda N, Nakamori Y, Taguchi A, Okuya S, Oka Y, Tanizawa Y. Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor are associated with peripheral oedema in patients treated with thiazolidinedione. Diabetologia. 49: 2217-8, 2006
- Nonogaki K, Nozue K, Oka Y. Hyperphagia alters expression of hypothalamic 5-HT2C and 5-HT1B receptor genes and plasma des-acyl ghrelin levels in

Ay mice. Endocrinology. 147: 5893-5900, 2006

- Nonogaki K, Nozue K, Oka Y. Increased hypothalamic 5-HT2A receptor gene expression and effects of pharmacologic 5-HT2A receptor inactivation in obese A(y) mice. Biochem Biophys Res Commun. 351: 1078-1082, 2006
- Gao J, Katagiri H, Ishigaki Y, Yamada T, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kanzaki M, Yamamoto T, Ishibashi S, Oka Y. Involvement of apolipoprotein e in excess fat accumulation and insulin resistance. Diabetes. 56: 24-33, 2007.
- Takahashi R, Ishihara H, Takahashi K, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, Katagiri H, Oka Y. Efficient and controlled gene expression in mouse pancreatic islets by arterial delivery of tetracycline-inducible adenoviral vectors. J Mol Endocrinol. 38: 127-36, 2007

### 2. 学会発表

第79回日本内分泌学会学術総会 5月19日-21日 神戸市

- 食欲調節におけるセロトニンシグナルと節食関連ペプチドのネットワーク  
野々垣 勝則、岡 芳知
- 骨髄移植を利用した膵 $\beta$ 細胞の再生治療  
荻原 健英、片桐 秀樹、長谷川 豊、岡 芳知

第49回日本糖尿病学会年次学術集会 5月25日-27日 東京

- WFS1 蛋白の結合蛋白の解析及び WFS1 蛋白と transcription factor TFII-I との結合の検討  
山口 賢、石原 寿光、渋川 幸直、田村 明、高橋 累、山田 高弘、佐竹 千尋、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、和田 芳直、岡 芳知
- 膵 $\beta$ 細胞ストレス応答における翻訳抑制因子 4E-BP1 の役割  
石原 寿光、山田 高弘、山口 賢、田村 明、佐竹 千尋、高橋 累、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、岡 芳知
- WFS1 欠損マウス膵島における増殖障害  
山田 高弘、石原 寿光、田村 明、高橋 累、山口 賢、鶴田 藍、佐竹 千尋、檜尾 好徳、荻原 健英、片桐 秀樹、岡 芳知
- 肝におけるインスリン産生細胞の創生と骨髄細胞動員による膵 $\beta$ 細胞の再生  
片桐 秀樹、荻原 健英、今井 淳太、長谷川 豊、岡 芳知
- Heme Oxygenase 遺伝子プロモーター多型と 2 型糖尿病臨床像との関連  
檜尾 好徳、鈴木 進、鈴木 千登世、沖本 久志、角田宇衣子、善積 信介、山田 高弘、平井 完史、

山田 哲也、石垣 泰、石原 寿光、高橋 和眞、荻原 健英、片桐 秀樹、岡 芳知

- Bergman のミニマルモデル法によるインスリン感受性 SI とアディポサイトカイン、肥満関連指標との検討  
鈴木 慎二、赤井 裕輝、鈴木 千登世、福澤 正光、平井 敏、早坂 恭子、岡 芳知
- 肝特異的なガングリオシド糖鎖改変によるインスリン感受性と耐糖能改善の分子機序  
善積 信介、鈴木 進、鈴木 千登世、角田宇衣子、山田 高弘、檜尾 好徳、荻原 健英、片桐 秀樹、山口 壹範、宮城 妙子、岡 芳知
- アデノウィルスベクターの選択的動脈注入によるマウス膵島への高効率遺伝子導入法の開発  
高橋 累、石原 寿光、高橋 和眞、田村 明、山田 高弘、山口 賢、佐竹 千尋、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、岡 芳知
- 肝脂肪蓄積が体内脂肪配分と耐糖能に与える影響  
宇野 健司、片桐 秀樹、山田 哲也、荻原 健英、石垣 泰、今井 淳太、長谷川 豊、高 俊弘、金子 慶三、岩崎 紘子、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知
- 肝細胞における eNOS 過剰発現はミトコンドリアを増加させ耐糖能を改善する  
金子 慶三、片桐 秀樹、山田 哲也、荻原 健英、石垣 泰、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、高 俊弘、岩崎 紘子、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知
- 腹腔内脂肪組織からの神経系を介する視床下部レプチン感受性調節  
山田 哲也、片桐 秀樹、石垣 泰、荻原 健英、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、高 俊弘、金子 慶三、岩崎 紘子、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知
- 日本人 1 型糖尿病における Type 2 Arginase 遺伝子プロモーター多型  
高橋 和眞、丸山 太郎、島田 朗、山田 哲也、石垣 泰、石原 寿光、平井 完史、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、佐藤 譲、岡 芳知
- アポ E 欠損が肥満抵抗性を導く機序の検討  
高 俊弘、片桐 秀樹、石垣 泰、荻原 健英、山田 哲也、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、金子 慶三、岩崎 紘子、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知
- 急性寒冷刺激による交感神経活性化は血清アディポネクチン値を低下させる  
今井 淳太、片桐 秀樹、荻原 健英、石垣 泰、山田 哲也、宇野 健司、長谷川 豊、高 俊弘、金子 慶三、岩崎 紘子、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知
- 5-FU 投与後の骨髄抑制回復に伴う膵  $\beta$  細胞の再生  
荻原 健英、片桐 秀樹、長谷川 豊、石垣 泰、山田 哲也、今井 淳太、宇野 健司、高 俊弘、金子 慶三、岩崎 紘子、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知
- 薬剤性骨髄抑制後の膵  $\beta$  細胞再生における eNOS の役割  
長谷川 豊、片桐 秀樹、荻原 健英、石垣 泰、山

田 哲也、今井 淳太、宇野 健司、高 俊弘、金子 慶三、岩崎 紘子、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知

The 66th scientific sessions of American Diabetes Association 6月9日-13日 Washington, DC, USA

- Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity.  
Katagiri H, Uno K, Yamada T, Oka Y
- Signals from Intra-Abdominal Fat Modulate Insulin and Leptin Sensitivity through Different Mechanisms: Neuronal Involvement in Food Intake Regulation.  
Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Oka Y
- Apolipoprotein E Involvement in Excess Fat Accumulation and Insulin Resistance.  
Gao J, Katagiri H, Ishigaki Y, Oka Y
- The translational suppressor 4E-BP1 is a component of the unfolded protein response and may play a protective role during ER stress in  $\beta$ -cells.  
Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tukiyaama-Kohara K, Sonenberg N, Oka Y

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (第20回国際生化学・分子生物学会) 6月18-23日 京都

- Bone Marrow-derived Cell Recruitment Is Involved in Regeneration after Pancreatic Beta Cell Injury  
Ogihara T, Katagiri H, Hasegawa H and Oka Y

第38回日本動脈硬化学会総会 7月13日-14日 東京

- アポ E 欠損が脂肪蓄積に及ぼす影響に関する検討  
高 俊弘、片桐 秀樹、石垣 泰、山田 哲也、荻原 健英、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、鈴木 進、岡 芳知

第43回日本臨床分子医学会学術集会 7月20-21日 札幌

- 肝臓からの神経を介した臓器間代謝情報ネットワークの解明  
宇野 健司、片桐 秀樹、山田 哲也、荻原 健英、石垣 泰、今井 淳太、長谷川 豊、高 俊弘、金子 慶三、岩崎 紘子、岡 芳知

第27回日本肥満学会 10月27日-28日 神戸

- 腹腔内脂肪組織からの新規神経シグナルによる摂食調節機構  
山田 哲也、片桐 秀樹、石垣 泰、荻原 健英、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、高 俊弘、金子 慶三、岩崎 紘子、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知
- 肝臓からの自律神経を介した代謝亢進シグナル  
宇野 健司、片桐 秀樹、山田 哲也、荻原 健英、石垣 泰、今井 淳太、長谷川 豊、檜尾 好徳、鈴木

木 進、岡 芳知

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

1. 特許取得

米国出願中(出願番号未定)

発明者: Katagiri H, Ogihara T, Hasegawa Y, Oka Y

発明の名称: Pancreatic  $\beta$  cell Regeneration using Myelosuppressive Drugs

出願人: Katagiri H, Ogihara T, Hasegawa Y, Oka Y

出願日: 2006年4月18日

2. 実用新案登録

なし

3. その他(研究に関する新聞記事等)

2006年10月16日朝刊 新聞報道

河北新報 「糖尿病シンポジウム in 宮城」教育講演  
「糖尿病を科学する」

2006年4月11日テレビ報道

テレビ朝日系ニュース Jチャンネル「特集 肥満に対する取り組み」で紹介

2006年6月16日朝刊 新聞報道

朝日新聞 肥満に「体内警告」 東北大教授ら解明  
肝臓から脳へ信号

毎日新聞 肝臓から脂肪燃焼信号 東北大学院教授らが発見 「やせ薬」に応用も

読売新聞 脂肪肝から肥満改善指令 東北大院・片桐教授らが明らかに

産経新聞 肝臓肥満防止に一役 脳に指令 代謝促進—東北大発見

2006年6月16日テレビ報道

ニュース NHK(全国) など

2007年1月12日 新聞報道

科学新聞 「未来のノーベル賞候補者顕彰」 日本学術振興会賞に25氏 臓器間相互作用の意義を初提唱 片桐秀樹・東北大学大学院医学系研究科教授

WFS1の機能解明（膵β細胞維持再生機構）に関する研究  
分担研究者 片桐 秀樹 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

肥満・2型糖尿病の患者では、インスリン抵抗性を生じることによる血糖値の上昇が惹起されるのみならず、膵β細胞からの有効なインスリン分泌の低下が認められることがその発症機序として重要であることが知られている。このことから、肥満の状態は、膵β細胞における小胞体ストレスの増加を引き起こしていることが推察される。つまり、WFS1の変異により生じるWolfram症候群での糖尿病発症メカニズムと共通の機序が、一般の糖尿病でも認められると考えられる。そこで我々は、この膵β細胞における小胞体ストレスの増加の原因となる肥満の病態を明らかとするとともに、新規治療法を開発することを目指した研究を展開している。高脂肪食を負荷することで肥満・糖尿病を惹起させた生活習慣病モデルマウスを用い、肥満・糖尿病を発症させた後、肝にPPAR $\gamma$  遺伝子を導入し、後天的に脂肪肝を誘導したところ、基礎代謝が増加し、肥満、糖尿病が著明に改善するという結果を得た。さらに、この肝臓からの脂肪燃焼シグナルには、肝迷走神経求心路および交感神経遠心路を介していることを見出した。つまり、肝への脂肪蓄積という過栄養信号が生じた際、自律神経ネットワークの働きで基礎代謝を亢進させ脂肪を燃焼させる機構が体内に備わっていることを意味する。このシステムは、過栄養の際に太りすぎを防ぐフィードバック機構として働いていると考えられる。本システムの発見により、体重の恒常性維持機構の理解が深まるのみならず、このシステムの破綻状態と考えられる肥満の病態の解明、さらにはこのシステムを利用する全く新しい視点からの肥満・糖尿病治療法開発につながる可能性が考えられる。このシステムの活性化により、膵β細胞からの糖反応性インスリン分泌の改善も認めており、膵β細胞における小胞体ストレス軽減のつながる糖尿病治療となりうるものと期待される。

A. 研究目的

近年、過食などの生活習慣による肥満に基づく糖尿病患者の増加が社会的な問題になっている。肥満になると、インスリン抵抗性が惹起されるのみならず、膵β細胞での小胞体ストレスが増加することが引き金となって、インスリン分泌が低下することが、糖尿病発症につながるものと考えられる。そこで、我々は、肥満の病態や発症機序を解明し、肥満・糖尿病に対する新規治療法や予防法を開発を目指すことを本研究の目的とする。特に、体内に備わった肥満・糖尿病改善機構を明らかとし、その活性化により肥満を改善することで、膵β細胞における小胞体ストレス軽減のつながる治療開発を目指す。

B. 研究方法

1. PPAR $\gamma$ 2 は多くの肥満脂肪肝モデルで、肝での発言更新が報告され、また、肝 PPAR $\gamma$  欠損マウスは脂肪肝を生じにくいことが報告されている。そこで、高脂肪食負荷により、肥満・糖尿病を発症させたマウスの肝臓に選択的に、アデノウィルスを用いて、PPAR $\gamma$ 2 遺伝子を発現させ、後天的に急性に脂肪肝を誘発させる。その結果、肝以外の臓器・組織の糖・脂質・エネルギー代謝、インスリン抵抗性や膵β細胞からのインスリン分泌に及ぼす影響を検討する。

2. 倫理面への配慮

本年度の研究は細胞及び動物モデルを用いた解析に限られているため、倫理面への配慮が必要な事項に該当しない。動物実験は東北大学動物実験指針に基づいて実施し、東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

食事性肥満・糖尿病モデルマウスの肝臓へ、アデノウィルスを用いて、PPAR $\gamma$  の遺伝子導入を行い、実験的に急速に脂肪肝を誘発させたところ、末梢脂肪組織が著明に縮小し、1週間で約半分の重量となった。組織学的検討により、この脂肪組織の縮小は、各脂肪細胞に蓄積された中性脂肪の減少によるものであることが判明し、血清遊離脂肪酸の上昇とともに、脂肪組織での脂肪分解が亢進していることが明らかとなった。さらに、基礎代謝は約30%の増加を示した。また、脂肪肝が増悪しているにもかかわらず、血糖値の低下・耐糖能の改善・インスリン抵抗性の改善を認めた。このことから、肝臓から発せられる肥満・糖尿病の状態を改善するシステムが体内に備わっていること、急速な脂肪肝の誘導によりこの機構が働いたことが示唆された。

そこで、この内在する肥満・糖尿病改善機構を詳細に検討した。交感神経β作用を遮断すると、脂肪肝誘導時の脂肪組織における脂肪分解が抑えられること、肝からの迷走神経切断や同神経の求心路遮断を行っ



ておくと、PPAR $\gamma$ の遺伝子導入による脂肪肝誘導は同様に起こるにもかかわらず、基礎代謝の増加・糖尿病や肥満の改善などの肝以外の臓器・組織への影響は、完全に抑制され、これらの肝から他臓器・組織への効果は、迷走神経求心路・交感神経遠心路という、自律神経ネットワークにより、伝えられることが明らかとなった。

空腹時の血中インスリン値は、インスリン抵抗性の改善を反映して低下を示したが、糖反応性インスリン分泌は著明に改善し、耐糖能の改善に寄与しているものと考えられた。つまり、高脂肪食を負荷によるERストレスによると考えられる膵 $\beta$ 細胞機能低下状態からの回復を示すものである。このように、肝選択的遺伝子導入による肝での代謝の変化が、脂肪組織・筋組織をはじめとするインスリン感受性組織や膵 $\beta$ 細胞での機能を調節するという臓器間相互作用が存在することを証明した。

脂肪肝は、元来、栄養摂取過多によっておこる生活習慣病の一つである。また、様々な実験動物モデルにより、肝でのPPAR $\gamma$ の発現は、過栄養によって誘発され、脂肪肝を惹起する機序として重要であると考えられている。つまり、我々の得た結果から、肝臓はエネルギー蓄積状態のセンサーとして働き、過栄養状態を感知して迷走神経を介して脳にその信号を送っていることが想定される。脳は、その情報を基に、交感神経を活性化させることにより、脂肪の燃焼・基礎代謝の増加を誘導し、過栄養状態により生じる肥満を予防・改善させている。このような、過栄養に対して、肥満・糖尿病を予防する機構が体には備わっていて、それには自律神経ネットワークが重要な役割を果たしているということが発見された。本機構を活性化する薬剤などの開発は、全く新しい視点からの肥満・糖尿病の治療法となる可能性があるものと期待される。

#### D.E. 考察および結論

肥満症の病態として、インスリン抵抗性とレプチン抵抗性が重要な役割を果たしていることが知られている。インスリン抵抗性は、肥満に基づく糖尿病・高脂血症・高血圧や動脈硬化症の基盤として、注目を集めており、これは、膵 $\beta$ 細胞における負荷・ストレスの増加につながるものである。

本研究では、肝への遺伝子導入により、著明な肥満・糖尿病の改善を認め、末梢インスリン抵抗性や糖反応性インスリン分泌も改善を示した。さらに、神経切断や薬物による遮断の実験から、このシグナルは肝迷走神経求心路・交感神経遠心路からなる自律神経ネットワークの働きによることが示された。この発見は、体重の恒常性維持機構の理解を深めるという生物学的意義として多大であるのみならず、このシグナルの機能不全状態と考えられる肥満という病態の解明の点からも意義深い。さらに重要なことは、本研究で得られた結果のように、この自律神経ネットワークを活性化させることにより、肥満の根本治療につなげることができると考えられ、全く

新しい視点からの治療法開発につながることを期待されることである。

最近、トランスジェニックマウスやの組織特異的遺伝子欠損マウスを用いた発生工学的手法の発展により、一つの臓器での遺伝変化が遺伝子変化を起こしていない臓器における代謝を変化させるという、今まで予期されなかった代謝現象が数多く報告され、体内には我々のまだ知りえていない代謝調節メカニズム、特に、臓器間代謝情報ネットワーク機構が存在するものと考えられる。これまで、臓器間の代謝情報のやり取りについては、インスリンや各種のアディポサイトカインといった液性因子、つまり、血液循環を介した経路が中心に考えられていた。本研究の発見により、この経路に自律神経ネットワークも重要な役割を果たしていることが明らかとなり、臓器間代謝情報ネットワーク全体を考える上で大変意義深いものとする。また、我々は、交感神経の活性化により脂肪組織におけるアディポネクチンの発現が調節されることも報告しており、これらの液性因子と神経シグナルとは、相互に連絡を取り合いながら働いているものと考えられる。これらのターゲットとして、膵 $\beta$ 細胞も重要であり、これら臓器間代謝情報連関を総合的に強化するような手法は、肥満・糖尿病・メタボリックシンドロームの新しい治療法となりうるものとして大いに期待される。

本研究は、Science誌に掲載され、掲載号でのThis Week in Scienceの欄でMetabolic Information Highwayとして紹介された。また、Cell Metabolism誌などのpreviewでも紹介され、その意義が高く評価されている。また、新聞・テレビ・ラジオ等、マスメディアに大きく取り上げられ、話題となっている。我々は昨年度もレプチン感受性を改善する自律神経シグナルについて報告しており、さらに、本年になってアメリカのグループから、我々の見出した肝からの迷走神経シグナルが、ステロイド過剰による糖尿病や高血圧に大きな役割を果たすことが報告され、ますます、注目を集めている。以上から、これらの自律神経ネットワークの全身における代謝調節における意義は大きいものと考え、今後は、この神経シグナルの詳細・分子機序を解明し、この系を活性化する薬剤や手法の開発につなげるべく、この研究を進展させたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Hasegawa Y, Ogihara T, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Uno K, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Sasano H, Nakauchi H, Oka Y, **Katagiri H.** Bone Marrow (BM) Transplantation Promotes Beta Cell Regeneration after Acute Injury through BM Cell Mobilization. *Endocrinology* in press
- Okimoto H, Ishigaki Y, Koiwa Y, Hinikio Y, Ogihara T, Suzuki S, **Katagiri H.**, Ohkubo T, Hasegawa H, Kanai H, Oka Y. A novel method for evaluating

human carotid artery elasticity: possible detection of early stage atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* in press.

- Takahashi, R., Ishihara, H., Takahashi, K., Tamura, A., Yamaguchi, S., Yamada, T., Katagiri, H., Oka, Y. (2007) Efficient and controlled gene expression in mouse pancreatic islets by arterial delivery of tetracycline-inducible adenoviral vectors. *J. Mol. Endocrinol.* 38: 127-36.
- Gao J., Katagiri H., Ishigaki Y., Yamada T., Ogihara T., Imai J., Uno K., Hasegawa Y., Kanzaki M., Yamamoto TT., Ishibashi S., Oka Y. (2007) Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation and insulin resistance. *Diabetes*, 56: 24-33.
- Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Katagiri, H., Maruyama, Y., Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca<sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 580: 5635-40.
- Imai, J , Katagiri, H., Yamada, T , Ishigaki, Y , Ogihara, T , Uno, K , Hasegawa, Y , Gao, J , Ishihara, H , Oka, Y. (2006) Activation of sympathetic nervous system suppresses serum adiponectin levels in mice. *Obesity*. 14, 1132-41.
- Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Iwasaki H, Ishihara H, Sasano H, Inukai K, Mizuguchi H, Asano T, Shiota M, Nakazato M, Oka Y. (2006) Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312, 1656-9.
- Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., Takahashi., R, Yamaguchi, S., Takei., D, Tokita, A., Satake, C., Tashiro, F., Katagiri H, Aburatani, H., Miyazaki, J-I., Oka, Y. (2006) WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic  $\beta$ -cells. *Hum Mol Genet.* 15, 1600-9.
- Yamada, T., Katagiri H, Ishigaki, Y., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Niijima A., Mano, H., Aburatani, H., Asano, T., Oka Y. (2006) Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: Neuronal involvement in food intake regulation. *Cell Metab.* 3, 223-9.

## 2. 学会発表(シンポジウムなど)

- 荻原健英、片桐秀樹、長谷川豊、岡芳知 メインシンポジウム3 骨髄移植を利用した再生医療 骨髄移植を利用した膵 $\beta$ 細胞の再生治療 第79回日本内分泌学会学術総会 2006年5月21日 神戸
- 片桐秀樹、荻原健英、今井淳太、長谷川豊、岡芳知 シンポジウム13 肝におけるインスリン産生細胞の創

- 生と骨髄細胞動員による膵 $\beta$ 細胞の再生 第49回日本糖尿病学会年次学術総会 2006年5月26日 東京
- 片桐秀樹 特別講演 神経系を介した臓器間の協調的代謝調節機構～メタボリックシンドロームの新規治療法の開発をめざして～ 第19回肥満と糖尿病談話会 2006年8月28日 福岡
- 片桐秀樹 特別講演 個体におけるエネルギー代謝調節～臓器間代謝情報ネットワークとその治療応用の可能性～ 第9回Osaka Bay Diabetes Forum 2006年9月16日 大阪
- 片桐秀樹 特別講演 個体におけるエネルギー代謝調節～臓器間代謝情報ネットワークとその治療応用の可能性～第19回東京肥満研究会2006年9月20日 東京
- 片桐秀樹 シンポジウム5 自律神経系を介した協調的エネルギー代謝調節機構 第27回日本肥満学会 2006年10月27-28日 神戸
- 片桐秀樹 シンポジウム 神経系を介した臓器間の協調的代謝調節機構～メタボリックシンドロームの新規治療法の開発をめざして～ 第362回東北医学会例会シンポジウム 2006年12月8日 仙台
- 山田哲也、片桐秀樹、宇野健司、石垣泰、鈴木進、岡芳知 肝臓からの神経シグナルがエネルギー消費と個体のインスリン感受性を調節する 第18回分子糖尿病学シンポジウム 12月9日 松山
- 片桐秀樹 臓器間代謝情報ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節 第2回体温調節、温度受容研究会 2007年1月11-12日 岡崎
- 片桐秀樹 特別講演 臓器間情報ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節 第3回Diabetes Research Conference学術講演会 2007年1月26日 金沢
- 片桐秀樹 特別講演2 臓器間情報ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節 第21回日本糖尿病動物研究会年次学術集会 2007年2月9-10日 盛岡
- 片桐秀樹 招聘講演 臓器間情報ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節 第3回宮崎サイエンスキャンプ 2007年2月16-18日 宮崎
- 片桐秀樹 特別講演 Metabolic Information Highway 第3回META CARE カンファレンス2007年2月21日 東京
- Katagiri H., Uno K., Yamada T., Oka Y. Neuronal Pathway from the Liver Modulates Energy Expenditure and Systemic Insulin Sensitivity. American Diabetes Association, 66th Scientific Sessions, June 9-13 2006 Washington, DC, USA
- Yamada T., Katagiri H., Ishigaki Y., Oka Y. Signals from Intra-Abdominal Fat Modulate Insulin and Leptin Sensitivity through Different Mechanisms: Neuronal Involvement in Food Intake Regulation.

American Diabetes Association, 66th Scientific Sessions, June 9–13 2006 Washington, DC, USA

- Gao J., Katagiri H., Ishigaki Y., Oka Y. Apolipoprotein E Involvement in Excess Fat Accumulation and Insulin Resistance. American Diabetes Association, 66th Scientific Sessions, June 9–13 2006 Washington, DC, USA
- Ogihara T., Katagiri H., Hasegawa Y. Oka Y. Bone Marrow-derived Cell Recruitment Is Involved in Regeneration after Pancreatic Beta Cell Injury. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology June 18–23, 2006 Kyoto, Japan
- Katagiri H. Novel Inter-Organ Communication Involved in Glucose and Energy Homeostasis. The 11<sup>th</sup> Adiposcience Symposium, Aug 19, 2006, Osaka, Japan
- Uno K., Katagiri H., Yamada T., Oka Y. Neuronal Pathway from the Liver Modulates Energy Expenditure and Systemic Insulin Sensitivity. Tohoku University 21st century COE program The 3rd International Symposium Nov. 9–11, 2006 Sendai
- Hasegawa Y., Katagiri H., Ogihara T., Saito T., Oka Y. Bone Marrow Transplantation Promotes  $\beta$  Cell Regeneration after Acute Injury through Bone Marrow Cell Mobilization. Tohoku University 21st century COE program The 3rd International Symposium Nov. 9–11, 2006 Sendai

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

米国出願中(出願番号未定) 発明者:Hideki Katagiri, Takehide Ogihara, Yutaka Hasegawa, Yoshitomo Oka 発明の名称: Pancreatic  $\beta$  cell Regeneration using Myelosuppressive Drugs 出願人: Hideki Katagiri, Takehide Ogihara, Yutaka Hasegawa, Yoshitomo Oka

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他(研究に関する新聞記事等)

2006年4月11日テレビ報道

テレビ朝日系ニュース Jチャンネル「特集 肥満に対する取り組み」で紹介

2006年6月16日朝刊 新聞報道

朝日新聞 肥満に「体内警告」 東北大教授ら解明 肝臓から脳へ信号

毎日新聞 肝臓から脂肪燃焼信号 東北大学院教授らが発見 「やせ薬」に応用も

読売新聞 脂肪肝から肥満改善指令 東北大院・片桐教授らが明らかに

産経新聞 肝臓肥満防止に一役 脳に指令 代謝促進—東北大発見

2006年6月16日テレビ報道

ニュース NHK(全国) など

2007年1月12日 新聞報道

科学新聞 「未来のノーベル賞候補者顕彰」 日本学術振興会賞に25氏 臓器間相互作用の意義を初提唱 片桐秀樹・東北大学大学院医学系研究科教授

遺伝子解析・モデル動物解析に関する研究  
分担研究者 谷澤 幸生 山口大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

“Genetically programmed B-cell death”によるインスリン欠乏型糖尿病と視神経萎縮を主徴とする常染色体劣性遺伝性疾患Wolfram syndromeの原因遺伝子、*WFS1*を欠損する*wfs1*欠損マウスは、膵β細胞障害モデルとして特異である。β細胞障害の発現はマウスの遺伝的背景に依存し、C57BL/6Jを遺伝的背景とする*wfs1*欠損マウス(C57BL/6J-*wfs1*<sup>-/-</sup>)の耐糖能異常は軽度にとどまる。一方、過食のため軽度の肥満とインスリン抵抗性、耐糖能異常をきたすが随時血糖値はほとんど上昇しないyellow agoutiマウス(C57BL/6J-*A<sup>y</sup>/a*)との交配により作出した*wfs1*欠損agoutiマウス(*wfs1*<sup>-/-</sup>*A<sup>y</sup>/a*)では生後16週頃から全個体でインスリン分泌不全による著明な高血糖を来した。ラ氏島ではアポトーシスによりβ細胞が選択的に消失した。単離ラ氏島のウエスタン解析では、Bip蛋白の発現が野生型マウスと比較し、agoutiマウスや*wfs1*欠損マウスで増加していたが、*wfs1*欠損agoutiマウスではさらに増加していた。肥満によるインスリン抵抗性存在下でもβ細胞にはERストレスが惹起される。*wfs1*欠損マウスのβ細胞はERストレスに脆弱であり、肥満によりさらにβ細胞にERストレスが負荷されると、容易にアポトーシスに陥ることが示唆された。興味深いことに、インスリン抵抗性改善薬であるpioglitazoneの投与により、*wfs1*欠損agoutiマウスでのβ細胞のアポトーシスは回避され、糖尿病発症はほぼ完全に抑制された。この時、pioglitazone投与によるラ氏島でのBip蛋白の発現減少はアポトーシスの抑制に比較して顕著でなく、pioglitazoneによるβ細胞保護効果はインスリン抵抗性の改善によるβ細胞でのERストレスの軽減のみでなく、β細胞への直接作用が存在する可能性も示唆された。

肥満によるインスリン抵抗性の発現にTNF-αが関与することが示唆されているが、その機序は十分明らかではない。TNF-αによるインスリン抵抗性の機序として、IKK複合体を介するIRS-1 Ser<sup>307</sup>リン酸化によるインスリンシグナル減弱化が重要であることが知られている。そこで、IKK複合体のscaffold蛋白NEMO(IKK-γ)に着目し、その役割を検討した。

脂肪細胞でNEMOは細胞質に均質に存在するが、インスリンにより細胞膜周辺へ移動した。この移動を制御する蛋白としてMyo1cとactinを同定した。Myo1cのdominant inhibitory (DI) form、shRNAを過剰発現させた脂肪細胞ではインスリンによるNEMOの移動が阻害され、NEMOの移動にはMyo1cが必要と考えられた。IKK複合体はIRS-1と結合することが報告されている。NEMOとIRS-1がインスリン依存性に結合することが免疫沈降法で確認された。さらに、脂肪細胞に野生型Myo1cを導入すると、IRS-1とNEMOとの結合は増強し、Myo1cのDIを過剰発現させると、その結合が阻害された。この結果は、IKK-IRS-1の会合にはMyo1cとNEMOとの結合が必須であることを示唆する。さらに、Myo1cのDIを導入した脂肪細胞では、TNF-αによるIRS-1 Ser<sup>307</sup>のリン酸化が減弱し、TNF-αを作用させてもインスリンによる糖取り込み促進に対する阻害は起こらなかった。

以上の結果から、TNF-αによるインスリン抵抗性発現において、IRS-1、IKK複合体、分子モーターMyo1c、actinなどで構成される高次的シグナルコンプレックス形成の重要性が初めて明らかになった。

A. 研究目的

2型糖尿病はインスリン分泌低下とインスリン抵抗性が種々の割合で存在して発症する。2型糖尿病患者に見られるインスリン分泌低下は、絶対的な欠乏には至らないものの、非常に緩徐に進行する。従来、2型糖尿病患者でのインスリン分泌欠乏はβ細胞機能の障害、とりわけ、ブドウ糖によるインスリン分泌反応の障害が注目されてきた。β細胞量の減少についてはcontroversialであったが、近年、2型糖尿病患者においても膵β細胞量が進行性に減少することはほぼ受け入れられている。2型糖尿病患者でのβ細胞の減少メ

カニズムについては、従来、アミロイドの沈着と関連が示唆されてきた。さらに、「糖毒性」や「脂肪毒性」それらに関連する酸化ストレスの関与が考えられている。私たちは、この過程に小胞体ストレスも関与していると考えている。

Wolfram syndromeの原因遺伝子、*WFS1*を欠損する*wfs1*欠損マウスは特異なモデルである。このモデルを用いて、インスリン抵抗性(肥満)、ERストレス、β細胞死の連鎖について明らかにし、また、この連鎖を断ち切る治療法の開発を目指すことを今回の研究の目的とする。

## B. 研究方法

C57BL/6J を遺伝的背景とする *wfs1* 欠損 yellow agouti マウス(C57BL/6J-*wfs1*<sup>-/-</sup>·*A<sup>y</sup>/a*)は *wfs1* 欠損マウス(C57BL/6J-*wfs1*<sup>-/-</sup>)と yellow agouti マウス(C57BL/6J-*A<sup>y</sup>/a*)を交配し、作出して使用した。

3T3-L1 fibroblast は定法により脂肪細胞に分化導入し、使用した。cDNA は RT-PCR 法により合成、または DNAFORM から購入した。抗体は Cell Signaling、Sigma、Invitrogen、Jackson ImmunoResearch、Upstat、Santa Cruz Biotechnology から購入した。アデノウイルスは AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene) を用いて作成した。NEMO と結合する蛋白は免疫沈降物を二次元電気泳動で展開し、染色後バンドを切り出した後、質量分析を行い、さらに Mascot (Matrix Science)で解析して同定した。

動物実験は山口大学医学部山口大学医学部動物実験指針に基づいて、動物実験委員会の承認を得て行った。組換えDNA実験は山口大学組換えDNA実験安全管理規則に従って実施した。

## C. 研究結果

C57BL/6Jを遺伝的背景とする *wfs1*欠損マウス(C57BL/6J-*wfs1*<sup>-/-</sup>)は、24週齢までの観察では随時血糖はほとんど上昇しなかった。同様に、yellow agoutiマウス(C57BL/6J-*A<sup>y</sup>/a*)は過食のため軽度に肥満するが、やはり随時血糖値の上昇はほとんど見られなかった。両者の交配により作出した *wfs1*欠損agoutiマウス(*wfs1*<sup>-/-</sup>·*A<sup>y</sup>/a*)では生後16週頃から全個体で著明な高血糖を来し、ケトシスをきたして体重も減少に転じた。膵ラ氏島ではアポトーシスによりβ細胞が選択的に消失した。単離ラ氏島での小胞体シャペロンであるBip蛋白の発現をウエスタン法により解析すると、野生型マウスと比較し、agoutiマウスや *wfs1*欠損マウスで増加していた。このことは、肥満によるインスリン抵抗性存在下では、インスリンの産生、分泌亢進のためにβ細胞にERストレスが惹起されることを示す。また、先に示されている通り、*wfs1*欠損マウスのみでβ細胞でBipの発現増加がみられた。*wfs1*欠損agoutiマウスでは、Bipの発現がさらに増加していた。これらの知見より、*wfs1*欠損マウスでは、肥満によりβ細胞にさらにERストレスが負荷されると、ERストレスに対する脆弱性のために容易にアポトーシスに陥ることが示唆された。同様に、高脂肪食負荷による肥満 *wfs1*欠損マウスでも糖尿病の発症が促進された。興味深いことに、インスリン抵抗性改善薬である pioglitazoneの投与により、*wfs1*欠損agoutiマウスでのβ細胞のアポトーシスは回避され、糖尿病発症はほぼ完全に抑制された。この時、pioglitazone投与によるラ氏島でのBip蛋白の発現減少はアポトーシスの抑制に比較して顕著でなく、pioglitazoneによるβ細胞保護効果はインスリン抵抗性の改善によるβ細胞でのERストレスの軽減のみでなく、β細胞への直接作用が存在する可

能性も示唆された。

肥満によるインスリン抵抗性の発現にTNF-αが関与することが示唆されているが、その機序は十分明らかではない。TNF-αによるインスリン抵抗性の機序として、IKK複合体を介するIRS-1 Ser<sup>307</sup>リン酸化によるインスリンシグナル減弱化が重要であることが知られている。そこで、IKK複合体の中でscaffold蛋白として知られているNEMO(IKK-γ)に着目し、その役割を検討した。

TNF-αは脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインで、インスリン抵抗性を惹起するが、その分子メカニズムは十分には明らかとなっていない。TNF-αによってもたらされるインスリン抵抗性のメカニズムとして、IKK複合体を介するIRS-1Ser<sup>307</sup>のリン酸化と、それに伴うインスリンシグナルの減弱化が重要であることが報告されている。

そこで、IKK複体のなかで、scaffoldな蛋白として知られているNEMOに着目し、その役割を検討し、TNF-αによるインスリン抵抗性発現機構の解析を試みた。

まず、3T3-L1脂肪細胞にeGFP-NEMOをエレクトロポレーション法で導入し、細胞内局在を検討した。NEMOはインスリン非存在下では脂肪細胞内で細胞質に均質に存在するが、インスリン添加により細胞質から細胞膜周辺へ移動した。次に、インスリン存在下でNEMOとの結合が促進される蛋白を質量分析法により検索したところ、Myo1cとactinが同定された。そこで、IKK複合体はNEMOを介してMyo1cと結合し移動するという仮説を立てた。

Myo1cのdominant inhibitory (DI)コンストラクトを過剰発現させた脂肪細胞ではインスリン刺激によるNEMOの移動が阻害されたことから、NEMOの移動にはMyo1cが必要であると考えられた。IKK複合体はIRS-1と結合することが既に報告されており、細胞膜近傍へ移動したNEMOが結合する相手分子としてIRS-1を想定した。まず、NEMOとIRS-1との結合を免疫沈降法で確認した。これは、インスリン依存性であった。さらに、脂肪細胞に野生型Myo1cを導入すると、IRS-1とNEMOとの結合は増強し、Myo1cのDIを過剰発現させると、その結合が阻害された。この結果は、IKK-IRS-1の会合にはMyo1cとNEMOとの結合が必須であることを示唆する。さらに、Myo1cのDIを導入した脂肪細胞でインスリンシグナルを検討すると、TNF-αによるIRS-1 Ser<sup>307</sup>のリン酸化が減弱した。Myo1cのDIを過剰発現させた脂肪細胞での糖取り込み実験では、TNF-αを投与しても糖取り込みの低下は起こらなかった。

これらの結果は、NEMOはインスリン存在下でMyo1cのmolecular receptorとして働き、IKK複合体-IRS-1の会合に関与する。このように、NEMOとMyo1cはTNF-αによるインスリン抵抗性の発現に重要な役割を演じる。

## D. 考察

軽度に肥満する *wfs1* 欠損 agouti マウスでは早期から

顕著なβ細胞死による糖尿病を発症した。WFS1 蛋白を欠損するβ細胞はインスリン産生、分泌需要の増大に対して脆弱である。高脂肪食負荷による肥満においても糖尿病の発症促進が認められた。agouti マウスのラ氏島では ER ストレスが亢進しており、インスリン抵抗性によるインスリン産生、分泌需要の増大時にはβ細胞での ER ストレスが亢進することから、*wfs1* 欠損マウスのβ細胞が ER ストレスに脆弱であることが *in vivo* で示された。WFS1 蛋白の機能は十分に解明されていないが、β細胞では ER ストレスに対して防御的な役割を演じると考えられる。

pioglitazone はβ細胞の減少、糖尿病の発症を顕著に抑制した。pioglitazone 投与によりインスリン抵抗性が減じ、β細胞での ER ストレスが減少したためと推測される。しかしながら、pioglitazone を投与した *wfs1* 欠損 agouti マウスのラ氏島での Bip 蛋白の発現は、pioglitazone 非投与コントロールマウスと比較して減少しておらず、ER ストレスは持続しているように見える。Pioglitazone により ER ストレスに対して防御的であるシャペロンの誘導は変化しないのに対して、ER ストレスからのアポトーシス経路が選択的に抑制されているのかもしれない。Pioglitazone のアポトーシス抑制は、ER ストレスによるものに特異的か否かも重要な未解決の課題である。また、インスリン抵抗性の改善を介する間接効果のみではなく、pioglitazone のβ細胞への直接作用の結果である可能性も示唆するもので、最近、proactive study などの臨床研究からも示唆されている pioglitazone のβ細胞保護作用との関連で興味深い。肥満、インスリン抵抗性に伴う ER ストレスを介するβ細胞障害は2型糖尿病のβ細胞機能不全との関連で重要である。また、pioglitazone は直接的なβ細胞保護作用を持つか、また、その機序はいかなるものか。Pioglitazone 治療 *wfs1* 欠損 agouti マウスは優れたモデルとなりうる。

肥満によりインスリン抵抗性を生じるが、そのメカニズムの詳細については必ずしも十分に解明されていない。脂肪細胞により分泌されるTNF- $\alpha$  が関与することが示唆され、IKK複合体を介するIRS-1 Ser<sup>307</sup>リン酸化によるインスリンシグナル減弱化が重要であることが知られている。このメカニズムの詳細を検討する中で、TNF- $\alpha$  からIKK複合体、IRS-1へのシグナル伝達過程に、意外にも細胞骨格、分子モーターが重要な役割を演じることを見いだした。その際、IKK複合体の中でscaffold蛋白として知られているNEMO(IKK- $\gamma$ )がアダプターとして働いている。すなわち、脂肪細胞でNEMO (IKK複合体)は細胞質に均質に存在するが、インスリンにより細胞膜周辺に移動する。この移動にはMyo1cが必要である。IKK複合体はNEMOを介してMyo1cに結合し、細胞膜近傍でIRS-1と結合する。TNF- $\alpha$  によりIKK複合体でリン酸化酵素活性を持つ $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットが活性化され、IRS-1をセリンリン酸化し、インスリンシグナルを減弱するが、この過程にIRS-1、IKK複合体、分子モーターMyo1c、actinなどで構成される高次的シグナルコンプレックス形成の重要性が初めて明ら

かになった。

## E. 結論

肥満、インスリン抵抗性は膵β細胞にERストレスを生じる。軽度に肥満した*wfs1*欠損agoutiマウスでは、β細胞死、糖尿病の発症が著しく加速された。*wfs1*欠損マウスの膵β細胞がERストレスに脆弱であることを*in vivo*モデルで示した。一方、このモデルで見られるβ細胞死はpioglitazoneにより著明に抑制される。これらの知見は、Wolfram症候群での糖尿病発症(β細胞死)の機構を明らかにし、WFS1蛋白の機能解明、治療法開発につながる。加えて、2型糖尿病患者でも存在すると考えられるERストレスによるβ細胞障害と、それからのβ細胞保護に示唆を与えることが期待される。

肥満によるインスリン抵抗性の発現機構も糖尿病の成因解明に重要である。インスリン抵抗性を発現する、TNF- $\alpha$ からIKK複合体、IRS-1へのシグナル伝達過程に分子モーターMyo1c、actinなどで構成される高次的シグナルコンプレックスが重要な役割を演じていることを始めて示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Nakamori Y, Emoto M, Fukuda N, Taguchi A, Okuya S, Tajiri M, Miyagishi M, Taira K, Wada Y, **Tanizawa Y**. Myosin motor Myo1c and its receptor NEMO/IKK- $\gamma$  promote TNF- $\alpha$ -induced serine<sup>307</sup> phosphorylation of IRS-1. *J Cell Biol.* 173: 665-671, 2006.
- Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, **Tanizawa Y**, Koike T. A novel mutation of WFS1 gene in a Japanese man of Wolfram syndrome with positive diabetes-related antibodies. *Diabetes Res Clin Pract.* 73: 215-217, 2006
- 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 beta-cell function in type 2 diabetes in Japanese subjects. *Diabetes.* 55: 2379-86, 2006.
- Emoto M, Fukuda N, Nakamori Y, Taguchi A, Okuya S, Oka Y, **Tanizawa Y**. Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor are associated with peripheral oedema in patients treated with thiazolidinedione. *Diabetologia.* 49: 2217-8, 2006.
- Muraki K, Okuya S, **Tanizawa Y**. Estrogen Receptor alpha Regulates Insulin Sensitivity through IRS-1 Tyrosine Phosphorylation in Mature 3T3-L1 Adipocytes. *Endocrine J.* 53: 841-51, 2006.

## 2. 学会発表

- Akiyama M, Ueda K, Hatanaka M, Tsuru M, Miyazaki M, Oka Y, Tanizawa Y. Increased Insulin Demand Causes Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis in the Wfs1 Knock-Out Mice. 66th Annual Meeting and Scientific Sessions of the American Diabetes Association (Abstract Diabetes 55 suppl 1: 250OR), June 9-13, 2006, Washington DC, USA.
- Nakamori Y, Emoto M, Fukuda N, Taguchi A, Okuya S, Tanizawa Y. Myosin Motor Myo1c and Its Receptor NEMO/IKK- $\gamma$  Promote TNF- $\alpha$  Induced Insulin Resistance Via Phosphorylation of IRS-1 at Serine<sup>307</sup> 6th Annual Meeting and Scientific Sessions of the American Diabetes Association (Abstract Diabetes 55 suppl 1: 1223P), June 9-13, 2006, Washington DC, USA.
- Kawano J, Tanizawa Y, Shinoda K. Distribution of wolframin, the Wfs1(Wolfram syndrome 1) gene product, in the normal mouse visual system. The 16th International Neuro-ophthalmology Society Meeting, (Nov 29-Dec 2) 2006, Tokyo, Japan.
- 福田尚文、江本政広、中森芳宜、田口昭彦、奥屋茂、谷澤幸生 DOC(double C2 domain)b 蛋白はインスリン依存性に GLUT4 膜融合を促進する 第79回日本内分泌学会学術総会(平成18年5月19日、20日、21日 神戸市)
- 河村由美江、江本政広、福田尚文、田口昭彦、中森芳宜、奥屋茂、谷澤幸生 CLIP-170 は GLUT4 小胞の微小管からアクチンへの移動に関与する 第49回日本糖尿病学会年次学術集会(平成18年5月25日、26日、27日 東京都)
- 村木和彦、奥屋茂、谷澤幸生 3T3-L1 脂肪細胞でエストロゲンはエストロゲンレセプター  $\alpha$  を介してインスリン感受性を調節する 第49回日本糖尿病学会年次学術集会(平成18年5月25日、26日、27日 東京都)
- 秋山優、植田浩平、幡中雅行、鶴政俊、宮崎睦子、岡

芳知、谷澤幸生 wfs1 欠損マウスではインスリン需要増大時に膵  $\beta$  細胞が選択的に脱落する 第49回日本糖尿病学会年次学術集会(平成18年5月25日、26日、27日 東京都)

- 中森芳宜、江本政広、福田尚文、田口昭彦、奥屋茂、谷澤幸生 NEMO/IKK  $\gamma$  はモーター分子 Myo1c の Receptor Molecule として TNF- $\alpha$  によるインスリン抵抗性発現に関与する 第49回日本糖尿病学会年次学術集会(平成18年5月25日、26日、27日 東京都)
- 幡中雅行、柳井章江、秋山優、鶴政俊、植田浩平、篠田晃、谷澤幸生 インスリン抵抗性が wfs1欠損マウスの膵  $\beta$  細胞に与える影響—電顕像からの考察— 第44回日本糖尿病学会中国四国地方会(平成18年11月17日、18日 岡山市)
- 田口昭彦、江本政広、福田尚文、中森芳宜、宮本幸子、田部勝也、奥屋茂、岡芳知、谷澤幸生 GPL-linked proteoglycan p69 は細胞膜マイクロドメイン依存症にインスリン依存性糖輸送活性を調節する 第18回分子糖尿病シンポジウム(平成18年12月9日 松山市)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 特願 2005-223696 膵  $\beta$  細胞特異的に発現される人工タンパク質、該タンパク質をコードしたレポーター遺伝子および膵  $\beta$  細胞量の計測方法
- 特願 2007-030130 顕微鏡装置に色光源や色フィルタを設けなくても、標本スライスの原画像の取得の際に色感度を最適に調整できる標本スライス画像の領域抽出システム

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他(研究に関する新聞記事等)

なし

WFS1の機能解析（関連遺伝子クローニング）に関する研究  
分担研究者 浅野 知一郎 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

WFS1遺伝子の変異は、小胞体ストレス等を介してβ細胞のアポトーシスを誘導することにより糖尿病を発症させる。また、持続する高血糖やSU剤治療によってもβ細胞のアポトーシスは引き起こされ、糖尿病の悪化に関係している。一方、膵β細胞のアポトーシス抑制や増殖は、Aktの活性化によって誘導されることから、我々は、昨年までの成果として、Aktの活性調節を解明する目的で、Aktをbaitに用いたyeast two hybrid法を行い、約200kDaからなる新規の結合蛋白APE(Akt Phosphorylation Enhancer)を同定することに成功している。APEはAktに結合し活性を顕著に増加させるが、我々はWFS1遺伝子の変異が、APEの発現低下からAktの活性低下を誘導し、β細胞の機能低下を導いている可能性を考えている。実際、WFS1遺伝子ノックアウトマウスの膵臓におけるAPEの発現量はpreliminaryな結果であるが減少しているようである。そこで、我々は、膵β細胞の脆弱性にAPEの発現量の低下が関与している可能性を考え、APEのノックアウトマウスを世界に先駆けて作成した。まず、APEのノックアウトマウス由来細胞では、抗癌剤等の刺激によるアポトーシスがより低濃度で引き起こされることが明らかとなった。また、APEの発現抑制に伴って、細胞の遊走能の低下やcell cycleの異常も認められた。以上から、APEのノックアウトマウスの膵β細胞も、高血糖や持続的SU剤処理によるアポトーシスに感受性が高い可能性が示唆された。現在、APEノックアウトマウスからランゲルハンス島を単離、培養し、インスリン分泌能の他、アポトーシスへの影響などを詳細に検討している。

A. 研究目的

インスリンの分泌不全には、β細胞のインスリン分泌機能低下と、アポトーシスなどによるβ細胞数の減少が関与している。後者は、β細胞の脆弱性と表現されるが、その分子機構は殆ど不明のまま残されている。β細胞の脆弱性をもたらす遺伝子異常としてはWFS1遺伝子の変異が、後天的要因としては老化や持続する高血糖やSU剤刺激が関与するとされる。従って、このβ細胞の脆弱性の機序を解明し、防止することは高齢化社会における糖尿病治療に極めて重要である。

Akt/PKBはインスリンを含めた多くの成長因子、がん遺伝子産物等によって活性化され、アポトーシスの抑制や細胞増殖等の生命現象に関与している。従って、WFS1遺伝子の変異による膵β細胞のアポトーシス(脆弱性)に、Akt活性化の障害も関与している可能性が考えられる。

我々は、前年度までの成果として、Akt特異的に結合し、Aktのリン酸化を顕著に亢進させる新規タンパクを同定し、APE(Akt Phosphorylation Enhancer)と名付けた。このタンパクは、他のグループによってもAktの作用に重要であることが証明され、胎生初期から発現していること、癌化細胞では発現の増加している株が多いことから、細胞増殖やアポトーシスの抑制に大きな役割を果たしているようである。

そこで、我々は、①APEがWFS1遺伝子の変異によるβ細胞の脆弱性に関与しているか、②APEの遺伝子欠損マウスを作成し、β細胞の機能やアポトーシスにどのような影響を与えるか、を検討する。さらに、③ヒト由来の正

常機能を有するβ細胞株を樹立し、①、②における結果をふまえ、ヒトβ細胞の脆弱性の分子機構解明に役立てる。

これらの結果は、将来的に、ヒトβ細胞の脆弱性の分子機構解明やβ細胞の増殖に応用できる可能性を目指すものである。

B. C. 研究方法及び研究結果

我々は、前年度までの計画で、Aktをbaitに用いるyeast two hybrid systemによって、Akt結合蛋白のクローニングを行い、200kDaの新規タンパクの同定に成功し、AktのT308及びS473のリン酸化を顕著に亢進させることから、Akt Phosphorylation Enhancer(APE)と名付けた。また、APEのマウスにおける発現は、膵臓β細胞を含むほぼすべての臓器において認められた。また、種々のヒトがん細胞株においては、約半数に高い発現が認められた。

逆に、SiRNAを用いて、内因性のAPEの発現量を低下させ、Aktのリン酸化及び活性に対する影響を検討した。HepG2細胞やHela細胞にSiRNAを導入すると、APEの発現量を90%以上、減少させることに成功した。APEの発現抑制によって、Aktのリン酸化が抑制され、Aktのキナーゼ活性も低下し、さらに細胞増殖も抑制された。Akt活性化はβ細胞の増殖やアポトーシス抑制に働くことが知られており、我々は、WFS1遺伝子の変異を含めたβ細胞の脆弱性機序にAPEが関与する可能性を考慮し以下の研究を行った。

①WFS1遺伝子欠損マウスにおけるAPEの発現量の検討——胎児期、12週齢、48週齢の、WFS1遺伝子欠損マ



ウスとコントロールマウスより、腓ランゲルハンス島を分離した。さらに、トリプシン処理とFicollによる細胞分画を行い、両者における $\beta$ 細胞内のAPEの発現量をReal-time PCR法、およびWestern blotting法によって検討した。現在、preliminaryな結果であるが、週令を重ねるにつれ、WFS1遺伝子欠損マウスの腓 $\beta$ 細胞ではAPEの発現量が低下し、Aktの活性も低下する傾向にあることが認められた。従って、さらに検討を重ねる必要があるが、WFS1遺伝子欠損マウスの腓 $\beta$ 細胞の脆弱性にAPEが関与している可能性が示唆された。

②APEノックアウトマウスの作成——APEの発現量低下が腓 $\beta$ 細胞の脆弱性を引き起こすか否かを検討するために、APEのノックアウトマウスを作成した。APEの機能に最重要であるAkt結合部位を含むexonにてノックアウトするコンストラクトを作成し、ES細胞を樹立した。これを元に、ヘテロのノックアウトマウスを樹立し、さらに交配を行い、出生の頻度が少ないながらもホモのAPEノックアウトマウスの樹立に成功した。ホモのAPEノックアウトマウスが生存可能であったことは驚きであったが、Western blotting法によってAPEタンパクの発現は確かに欠損している。まずはMEFを用いた検討を行ったところ、種々の抗ガン剤によるアポトーシスがAPEのノックアウトマウスでは起こりやすいこと、その際にAktの活性が低下していることが認められた。さらに、in vitroでは $\beta$ 細胞を単離した実験、また、種々の刺激によってAPEのノックアウトマウスが $\beta$ 細胞の機能低下を起こしやすいか否かについて検討を行っている段階である。なお、動物実験に関しては、東京大学の定める動物実験指針に基づき、当該施設の管理の下で行っており、本研究計画では、動物愛護上の問題は生じない。

③ヒト由来の正常機能を有する $\beta$ 細胞株を用いた検討——膵臓 $\beta$ 細胞の脆弱性はヒトにおいて強く認められることから、ヒト由来で正常なインスリン分泌機能を有する細胞株を樹立し、これを用いて検討を行うことがベストであろう。そこで、我々は、中絶されたヒト胎児よりランゲルハンス島を分離し、テロメラーゼ遺伝子とSV40遺伝子を導入することで、上記細胞株の樹立を進める予定である。現在、テロメラーゼ遺伝子とSV40遺伝子を導入するためのレトロウイルスの作成に成功している。この細胞株を用いて、WFS1遺伝子やAPE遺伝子が $\beta$ 細胞にどのような役割を果たしているかをさらに検討を進める。本計画は、ヒト胎児を用いる研究であるが、広島大学医学部の倫理委員会の承諾を得、また、日本産婦人科学会の「ヒト胎児を用いた研究に対する指針」に従って遂行される。従って、倫理的また社会的な問題を生じないよう最大の注意を払って行っている。

#### D.E. 考察および結論

以上の結果から、WFS1遺伝子欠損における $\beta$ 細胞の脆弱性にAPEの発現低下が関与している可能性が示唆された。実際、APEの発現量は癌細胞株で増加しているものが半数を占めていることや、APEの発現抑制で細胞

の増殖が低下し、アポトーシスを起こしやすくなることは注目に値することである。しかし、 $\beta$ 細胞におけるAPEの発現低下がアポトーシスや最終的に糖尿病の発症に結びつくか否かは、多数のAPEノックアウトマウスを増やし、長期的に観察する他、種々の薬剤の投与も行って結論を導く必要がある。

また、正常機能を有するヒト $\beta$ 細胞株を樹立し、 $\beta$ 細胞の疲弊、そしてWFS1タンパクとAPEの相互作用について検討を進め、 $\beta$ 細胞の疲弊を防止あるいは再生を誘導する薬剤の開発に結び付けたいと考えている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Asano, T., Sakoda, H., Fujishiro, M., Anai, M., Kushiyama, A., Horike, N., Kamata, H., Kurihara, H., and Uchijima, Y. Physiological significance of resistin and resistin-like molecules in the inflammatory process and insulin resistance. *Current Diabetes Reviews* 2: 449-454, 2006
- Spender, LC., Lucchesi, W., Bodelon, G., Bilancio, A., Karsteql, CE., Asano, T., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Vanhaesebroeck, B and Farrell, PJ. Cell target genes of Epstein-Barr virus transcription factor EBNA-2: induction of the p53(alpha) regulatory subunit of PI3-kinase and its role in survival of EREB2.5 cells. *J. Gen. Virol.* 87: 2859-67, 2006
- Taniguchi, CM., Kondo, T., Sajan, M., Luo, J., Bronson, R., Asano, T., Farese, R., Cantley, LC., and Kahn, CR. Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKClambda/zeta. *Cell Metab.* 3(3):343-53, 2006
- Viana, A., Sakoda, H., Anai, M., Fujishiro, M., Ono, H., Kushiyama, A., Fukushima, Y., Sato, Y., Oshida, Y., Uchijima, Y., Kurihara, H., and Asano, T. Role of hepatic AMPK activation in glucose metabolism and dexamethasone-induced regulation of AMPK expression. *Diabetes Res Clin Pract.* 73(2): 135-42, 2006
- Murakami, A., Tominaga, J., Makita, R., Kurihara, Y., Nakagawa, O., Asano, T. and Kurihara, H. Transcriptional activity of Pax3 is co-activated by TAZ. *Biochem Biophys Res Commun.* 339(2):533-539, 2006

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他(研究に関する新聞記事等)

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake C, Tashiro F, <b>Katagiri H</b> , Aburatani H, Miyazaki J-I, <b>Oka Y</b> .	WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic $\beta$ -cells.	Hum Mol Genet	15	1600-9	2006
Takahashi R, Ishihara H, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, Takei D, <b>Katagiri H</b> , Endou H, <b>Oka Y</b> .	Cell-type specific activation of metabolism reveals that $\beta$ -cell secretion suppresses glucagon release from $\alpha$ -cells in rat pancreatic islets.	Am J Physiol Endocrinol Metab	290	308-316	2006
Yamada T, <b>Katagiri H</b> , Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Niiijima A, Mano H, Aburatani H, <b>Asano T</b> , <b>Oka Y</b> .	Signals from Intra-Abdominal Fat Modulate Insulin and Leptin Sensitivity through Different Mechanisms: Neuronal Involvement in Food Intake Regulation.	Cell Metabolism	3	223-9	2006
Nonogaki K, Ohashi-Nozue K, <b>Oka Y</b>	A negative feedback system between brain serotonin systems and plasma active ghrelin levels in mice.	Biochem Biophys Res Commun	341	703-707	2006
Imai J, <b>Katagiri H</b> , Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Sasano H and <b>Oka Y</b> .	Cold exposure suppresses serum adiponectin levels via sympathetic nerve activation in mice.	Obesity	14	1132-41	2006
Uno K, <b>Katagiri H</b> , Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Iwasaki H, Ishihara H, Sasano H, Inukai K, Mizuguchi H, <b>Asano T</b> , Shiota M, Nakazato M, <b>Oka Y</b> .	Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity.	Science	312	1656-9	2006
Takei D, Ishihara H, Yamaguchi S, Yamada T, Tamura A, <b>Katagiri H</b> , Maruyama Y, <b>Oka Y</b> .	WFS1 protein modulates the free Ca <sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum.	FEBS Lett	580	5635-5640	2006
Emoto M, Fukuda N, Nakamori Y, Taguchi A, Okuya S, <b>Oka Y</b> , Tanizawa Y.	Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor are associated with peripheral oedema in patients treated with thiazolidinedione.	Diabetologia	49	2217-8	2006
Nonogaki K, Nozue K, <b>Oka Y</b> .	Hyperphagia alters expression of hypothalamic 5-HT <sub>2C</sub> and 5-HT <sub>1B</sub> receptor genes and plasma des-acyl ghrelin levels in Ay mice.	Endocrinology	147	5893-5900	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nonogaki K, Nozue K, <u>Oka Y.</u>	Increased hypothalamic 5-HT <sub>2A</sub> receptor gene expression and effects of pharmacologic 5-HT <sub>2A</sub> receptor inactivation in obese A(y) mice.	Biochem Biophys Res Commun.	351	1078-1082	2006
Nakamori Y, Emoto M, Fukuda N, Taguchi A, Okuya S, Tajiri M, Miyagishi M, Taira K, Wada Y, <u>Tanizawa Y.</u>	Myosin motor Myo1c and its receptor NEMO/IKK- $\gamma$ promote TNF- $\alpha$ -induced serine <sup>307</sup> phosphorylation of IRS-1.	J Cell Biol.	173	665-671	2006
Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, <u>Tanizawa Y</u> , Koike T.	A novel mutation of WFS1 gene in a Japanese man of Wolfram syndrome with positive diabetes-related antibodies.	Diabetes Res Clin Pract.	73	215-217	2006
Yokoi N, Kanamori M, Horikawa Y, Takeda J, Sanke T, Furuta H, Nanjo K, Mori H, Kasuga M, Hara K, Kadowaki T, <u>Tanizawa Y</u> , <u>Oka Y</u> , Iwami Y, Ohgawara H, Yamada Y, Seino Y, Yano H, Cox NJ, Seino S.	Association studies of variants in the genes involved in pancreatic beta-cell function in type 2 diabetes in Japanese subjects.	Diabetes.	55	2379-86	2006
Muraki K, Okuya S, <u>Tanizawa Y.</u>	Estrogen Receptor alpha Regulates Insulin Sensitivity through IRS-1 Tyrosine Phosphorylation in Mature 3T3-L1 Adipocytes.	Endocrine J.	53	841-51	2006
<u>Asano, T.</u> , Sakoda, H., Fujishiro, M., Anai, M., Kushiya, A., Horike, N., Kamata, H., Kurihara, H., and Uchijima, Y.	Physiological significance of resistin and resistin-like molecules in the inflammatory process and insulin resistance.	Current Diabetes Reviews	2	449-454	2006
Spender, LC., Lucchesi, W., Bodelon, G., Bilancio, A., Karsteql, CE., <u>Asano, T.</u> , Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Vanhaesebroeck, B and Farrell, PJ.	Cell target genes of Epstein-Barr virus transcription factor EBNA-2: induction of the p53 $\alpha$ regulatory subunit of PI3-kinase and its role in survival of EREB2.5 cells.	J. Gen. Virol.	87	2859-67	2006
Taniguchi, CM., Kondo, T., Sajan, M., Luo, J., Bronson, R., <u>Asano, T.</u> , Farese, R., Cantley, LC., and Kahn, CR.	Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC $\lambda$ /zeta.	Cell Metab.	3	343-53	2006
Viana, A., Sakoda, H., Anai, M., Fujishiro, M., Ono, H., Kushiya, A., Fukushima, Y., Sato, Y., Oshida, Y., Uchijima, Y., Kurihara, H., and <u>Asano, T.</u>	Role of hepatic AMPK activation in glucose metabolism and dexamethasone-induced regulation of AMPK expression.	Diabetes Res Clin Pract.	73	135-42	2006
Murakami, A., Tominaga, J., Makita, R., Kurihara, Y., Nakagawa, O., <u>Asano, T.</u> and Kurihara, H.	Transcriptional activity of Pax3 is co-activated by TAZ.	Biochem Biophys Res Commun.	339	533-539	2006
Gao J, <u>Katagiri H.</u> , Ishigaki Y, Yamada T, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kanzaki M, Yamamoto T, Ishibashi S, <u>Oka Y.</u>	Involvement of apolipoprotein e in excess fat accumulation and insulin resistance.	Diabetes	56	24-33	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi R, Ishihara H, Takahashi K, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, <b><u>Katagiri H, Oka Y.</u></b>	Efficient and controlled gene expression in mouse pancreatic islets by arterial delivery of tetracycline- inducible adenoviral vectors.	J Mol Endocrinol	38	127-36	2007
Hasegawa Y, Ogihara T, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Uno K, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Sasano H, Nakauchi H, <b><u>Oka Y, Katagiri H.</u></b>	Bone Marrow (BM) Transplantation Promotes Beta Cell Regeneration after Acute Injury through BM Cell Mobilization.	Endocrinology			in press
Okimoto H, Ishigaki Y, Koiwa Y, Hinikio Y, Ogihara T, Suzuki S, <b><u>Katagiri H,</u></b> Ohkubo T, Hasegawa H, Kanai H, <b><u>Oka Y.</u></b>	A novel method for evaluating human carotid artery elasticity: possible detection of early stage atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes.	Atherosclerosis			in press