

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安 田 和 基

平成19（2007）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	・ ・ ・ ・ ・ 1
安田 和基	
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	・ ・ ・ 17
安田 和基	
2. インスリン・シグナル伝達のプロテオーム解析	・ ・ ・ ・ ・ 35
鏑木 康志	
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	・ ・ ・ ・ ・ 39
大河内仁志	
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	・ ・ ・ 45
浜崎 辰夫	
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	・ ・ ・ ・ ・ 53
湯尾 明	
6. 糖尿病モデルを用いた個体レベルの病態解析	・ ・ ・ ・ ・ 63
岡村 匡史	
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	・ ・ ・ ・ ・ 71
江崎 治	
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	・ ・ ・ ・ ・ 79
浅島 誠	
III. 研究成果の刊行に関する一覧	・ ・ ・ ・ ・ 85

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）

平成18年度総括研究報告書

**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。「環境因子の分子メカニズム」については運動や食事の効果をシグナル系ごとに吟味した。「膵代償機序とその破綻」については、膵発生の初期段階から、高度に最終分化する段階までの、各ステップを網羅するように解析系の構築を試み、特に膵β細胞の機能的成熟の解析にも力を注いだ。「合併症」では、高グルコースによる内皮障害のメカニズムの解析とともに、網膜症に関与する可能性のある新規分子を同定した。これらを横断した「個体レベルでの解析系」として、非肥満インスリン低下型動物モデル（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。平成19年度は、有望な成果を中心に統合し、成因と病期に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 鏑木 康志
細胞組織再生医学研究部長 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

独立行政法人国立健康・栄養研究所

基礎栄養プログラムリーダー江崎 治

東京大学

大学院総合文化研究科教授 浅島 誠

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。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う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、こうした慢性の経過で生じている現象の解明に挑戦する。具体的には、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、②ES細胞からの分化系、新たな独自の解析モデルなど、世界でもユニークな研究リソースを集結・導入し、

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、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、と考えている。

研究組織としては、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)で、糖尿病に対して国内外で長年研究を続けてきたグループを中心に、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、代謝に及ぼす影響を分子メカニズムを解明する。平成18年度は、運動については、体脂肪減少作用と糖代謝改善作用に共通のシグナル系や特異的なシグナル系を解析した。また食事内容により脂肪肝発症機序が異なることを分子レベルで示す(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を行う(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すでに確立した膵分化系について、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。またより効率的な膵分化系を構築する(浅島)。

(3) 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、膵組織由来の幹細胞、内分泌前駆細胞としての可能性を検討する(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。平成18年度はヒト脂肪組織由来培養細胞への遺伝子導入をおこなった(大河内)。

(5) 膵β細胞の脂肪毒性の系を確立し、その分子機序についてプロテオーム解析をおこなう(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って、膵β細胞における転写制御機構を解析し、また新規のクローンについて膵における発現パターンを検討する(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して、トランスクリプトーム解析をおこなう。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、高グルコース濃度下で分泌される生理活性分子を同定し、病態に寄与する新規な候補分子を得る（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、および腓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、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）。

平成 17 年度までに、運動の長期効果（GLUT4 タンパクの増加、ミトコンドリア増加）における AMP キナーゼ（以下 AMPK）および PGC-1 α の役割を明らかにしてきた。AMPK のドミナントネガティブ（DN）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、高脂肪食負荷時に運動をさせたところ、運動による「体脂肪減少作用」がみられなかった。これは脂質燃焼、脂肪酸の β 酸化が低下しているためであった。運動による筋肉の PGC-1 α には、交感神経の興奮が深く関与しているが、 β 受容体の遮断の実験から、古典的な β 受容体を介する部分、筋の $\beta 4$ 受容体を介する部分、propranolol で抑制されない経路、がそれぞれ3分の一程度ずつ関与していそうである。

食事と脂肪肝の関係では、高スクロース摂取では SREBP-1c 系が、高脂肪食では PPAR γ 系が活性化されて、脂肪肝を生じる、この意義は大きく、魚油の効果も疾患を発症するに至る原因により大きく左右されることになる。

（2）インスリン作用の分子機序（鏑木）。

IRS3 高発現細胞での核抽出液蛋白プロファイルを、二次元電気泳動を用いたディフアレンシャル解析を行い、有意に変化する蛋白を 150 個程度検出した。LC-MS で同

定した蛋白の多くは、RNA 代謝や蛋白合成に関与するものであった。

[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 膵分化系の移植実験 (浜崎)。

平成 17 年度に、マウス ES 細胞の細胞塊を浮遊条件でアクチビン・レチノイン酸で共処理すると、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、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、を示した。この分化誘導した膵組織を、インスリン欠乏型モデルである Akita マウス系の腹腔内に移植したところ、移植後 4—8 日の間、短期間だが、明らかに血糖の低下を認めた。

(2) アフリカツメガエル胚からの膵分化系 (浅島)。

平成 17 年度までに、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、その過程で特異的に発現する遺伝子群の解析を行ってきた。平成 18 年度はさらに分化系を改良し、初期胚に Xnr5、Xnr6 の mRNA をインジェクションして内胚葉化したうえで、いくつかの因子を作用させて、胚全体における膵臓の割合を飛躍的に向上させることができた。この系は「膵臓化」に必要な遺伝子を単離する非常に有力な系と考えられ、ディファレンシャルスクリーニング

や、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検討している。

(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単離した SP (side population) 細胞の性質を詳しく解析した。SP フラクションとしての自己複製能の傾向、および長期継代可能な細胞の存在は見られるが、幹細胞の条件となる、多分化能を保った自己複製はまだ証明できていない。未分化な内分泌前駆細胞の候補ではあるが、非常に不均一であり、インスリン以外の内分泌ホルモンの発現まで誘導可能だが、他の系統の細胞マーカーも強く発現しているなど、古典的な組織幹細胞の概念で理解し切れない可能性もある。

(4) 他の組織由来で分化多能性を有する幹細胞 (大河内)。

平成 17 年度に、ヒト脂肪組織由来の培養細胞に Pdx1 遺伝子を一過性に導入したところ、Pax6 と Pax4 の遺伝子発現がみられたので、本年度は、レトロウイルスベクターに組み込み恒常的に Pdx1 を導入した。浮遊培養などを組み合わせて工夫することで、Pax6 と Pax4 のみならず、Neurogenin3 や Insulin 遺伝子の発現まで認められた。現在、テトラサイクリンによる conditional な制御系での発現を目指している。

(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、プロテオーム解析を行ったところ、ミトコンドリア蛋白が多かったので、ミトコンドリア分画にて改めてプロテオーム解析を行い、変動するスポットを得た。

(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、Vector-capping 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 1 万強クローンの 5'側 one-pass 配列解析を行った。従来の報告と異なる転写開始点、機能未知の遺伝子のほか、non-coding RNA 候補も見つかった。この ncRNA 候補は、膵島でも発現し、糖尿病モデルで発現の変動がみられるもの、ノックダウンでインスリン分泌特性に変化をきたすものもあり、膵β細胞における多彩な「RNA world」の一端が初めて明らかになった。

[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)。

高グルコースが内皮に及ぼす影響として、平成 17 年度までの、細胞内 reactive oxygen species (ROS、AGE (advanced glycation end-product) に加え、GSH (グルタチオン)、内皮索状構造形成能障害、についてモニターし、糖毒性の in vitro 解析系を構築した。この系について、マイクロ

アレイを用いて網羅的な発現解析を行い、いくつかの興味深い遺伝子を得ている。

(2) 霊長類 ES 細胞由来血管内皮細胞 (湯尾)。

前期のような、初代培養細胞の量的・質的限界を補うために、サルおよびヒト ES 細胞から、無フィーダー培養による、効率の高い (10-60%)、継代可能な血管内皮細胞を得た。

(3) 網膜色素上皮細胞由来の、血管新生因子 (安田)。

高グルコース濃度で培養した網膜色素上皮の上清に、網膜血管内皮 (RE) 細胞に対する血管新生促進活性が見られることを新たに発見し、その本体が ANGPTL4 であること、ANGPTL4 は RE 細胞に対して in vitro で VEGF に匹敵する血管新生促進効果を示すこと、網膜症モデル動物である SDT ラットの網膜色素上皮で発現が増加していること、を見いだした (特許申請中)。

[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。8 週齢では膵島に明らかな病理学的な変化はみられないものの、インスリン分泌能に明らかに障害を認めた。そこでこの時期の膵島、肝、腎の遺伝子発現パターンを GeneChip システムで網羅的に解析し、興味深い遺伝子を

得ている。また遺伝子発現パターンからヒントを得て、コレステロールおよび FFA が優位に上昇している脂質異常モデルでもあることが判明した。

(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

本研究班の最大の利点は、各分担研究者が、独自の解析系を有することである。本研究開始後に作成された系に限っても「ツメガエル胚の高効率な *in vitro* 膵分化系」(浅島)、「膵内分泌細胞全長 cDNA ライブラリー」(安田)、「脂肪組織由来細胞の膵内分泌化」(大河内)、「ヒト ES 細胞からの血管内皮分化系」(湯尾)、「網膜症関連物質スクリーニング系」(安田)などがあり、基盤的な新規性、発展性は研究班としてもうまく機能しているといえよう。いずれも世界中で我々だけが保持する、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 つの柱のうち、最も分担研究者の多い「膵 β 細胞」について、研究班がもっている系を整理すると、たとえば図 2 のようになる。「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し、糖尿病

での障害部位としても、この全段階を視野にいれておくべきである。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。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。

当研究班が、この現在もっともチャレンジな課題に対して、ユニークな解析系を用いて全体をカバーしアプローチしていることが明らかである。

生物学の重要な現象を再現する系が一端手に入れば、その分子機構の解明は、現時点ではかなり標準化されたかつ体系的な方法によって可能である。網羅的な遺伝子発現解析ではマイクロアレイがあるし、特定の遺伝子機能の検討ならノックダウンや Morpholino などですぐ可能である。マイクロアレイの利点の一つは、一見異なる系同士の「分子的な比較」ができることである。当研究班でも研究代表者が横糸となってマイクロアレイ解析を行っており、平成 19 年度は図 2 に示した様々な系に関与する遺伝子を一覧とし、 β 細胞の発生分化成熟過程の「分子マップ」を作成して、それらと糖尿病の発症進展との関係を議論し、診療

に役立てたい。

第3の「合併症」についても、血管病としての特徴に着目し、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みようとしており、さまざまな培養細胞や、ES由来細胞で比較することで、血管病としての共通部分と組織特異性部分とが浮き彫りにあるであろう。

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、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」、「隣代償

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) Tsuchiya M, Yoshida T, Taniguchi S, Yasuda K, Maeda A, Hayashi A, Tanaka J, Shigemoto M, Nitta K, Tsuchiya K: *In vivo* suppression of mafA mRNA with siRNA and analysis of the resulting alteration of the gene expression profile in mouse pancreas by the microarray method. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(1):129-135, 2007.

2) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Hasegawa R, Suzuki K, Yanagawa T, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Tohkin M, Sagawa J-I. Genetic variations of the ABC transporter gene *ABCC3* in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet*, *in press*.

3) Kamei Y, Suganami T, Kohda T, Ishino F, Yasuda K, Miura S, Ezaki O, Ogawa Y. *Pegl/Mest* in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an

- isoform-specific manner. FEBS Lett, 581(1):91-6, 2007.
- 4) Yamashita R, Fujiwara Y, Ikari K, Hamada K, Otomo A, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y. Extracellular proteome of human hepatoma cell line, Hep G2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Mol Cell Biochem, *in press*.
- 5) Tsuchiya M, Taniguchi S, Yasuda K, Nitta K, Maeda A, Shigemoto M, Tsuchiya K. Potential roles of large mafs in cell lineages and developing pancreas. Pancreas 32(4):408-16, 2006.
- 6) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Saeki M, Kamatani N, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Sawada J. Novel genetic variations and haplotypes of hepatic nuclear factor 4 α (*HNF4 α*) found in Japanese type II diabetic patients. Drug Metab Pharmacokinet 21(4):337-346, 2006.
- 7) 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 & Differentiation, 48(3):177-88, 2006.
- 8) Kaburagi Y, Okochi H, Satoh S, Yamashita R, Hamada K, Ikari K, Yamamoto-Honda R, Terauchi Y, Yasuda K, Noda M. Role of IRS and PHIP on insulin-induced tyrosine phosphorylation and distribution of IRS proteins. Cell Structure and Function *in press*
- 9) Nakanishi, M., Hamazaki, T. S., Komazaki, S., Okochi, H., Asashima, M. Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro. Differentiation 75: 1-11, 2007.
- 10) Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, Tamaki K, Asashima M, Okochi H. Isolation of Murine Hair-Inducing Cells Using the Cell Surface Marker Prominin-1/CD133. J Invest Dermatol. *in press*
- 11) Nishimura Y, Hamazaki TS, Komazaki S, Kamimura S, Okochi H, Asashima M. Ciliated cells differentiated from mouse embryonic stem cells. Stem Cells. 24:1381-8, 2006.
- 12) Satow, R., Kurisaki, A., Chan, T. C., Hamazaki, T. S., Asashima, M. Dullard promotes degradation and dephosphorylation of BMP receptors and is required for neural induction. Dev. Cell 11: 763-774, 2006.
- 13) Honda M, Kurisaki A, Ohnuma K, Okochi H, Hamazaki TS, Asashima M. N-cadherin is a useful marker for the progenitor of cardiomyocytes differentiated from mouse ES cells in serum-free condition. Biochem Biophys Res Commun. 351:877-882. 2006
- 14) Banas A, Tokuhara M, Okochi H, Ochiya T Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes Hepatology *in press*
- 15) 大河内仁志 皮膚 stem cell による再生医療 臨床皮膚科 60:163-165, 2006

- 16) 大河内仁志 皮膚の幹細胞- 最新の知見と再生医療への応用 日皮会誌 116:1739-1744, 2006
- 17) Yuge L, Kajiume T, Tahara H, Kawahara Y, Umeda C, Yoshimoto R, Wu SL, Yamaoka K, Asashima M, Kataoka K, Ide T. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem Cells Dev.* 15:921-9, 2006.
- 18) Homma M, Inui M, Fukui A, Michiue T, Okabayashi K, Asashima M. A novel gene, BENI is required for the convergent extension during *Xenopus laevis* gastrulation. *Dev Biol.* 303:270-80, 2006.
- 19) Sugimoto K, Okabayashi K, Sedohara A, Hayata T, Asashima M. The Role of XBtg2 in *Xenopus* Neural Development. *Dev Neurosci. in press.*
- 20) Nitta KR, Takahashi S, Haramoto Y, Fukuda M, Onuma Y, Asashima M. Expression of Sox1 during *Xenopus* early embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:287-93, 2006.
- 21) Tashiro S, Sedohara A, Asashima M, Izutsu Y, Maeno M. Characterization of myeloid cells derived from the anterior ventral mesoderm in the *Xenopus laevis* embryo. *Dev Growth Differ.* 48:499-512, 2006.
- 22) Chan T, Satow R, Kitagawa H, Kato S, Asashima M. Ledgerline, a novel *Xenopus laevis* gene, regulates differentiation of presomitic mesoderm during somitogenesis. *Zoolog Sci.* 23:689-97, 2006.
- 23) Inui M, Fukui A, Ito Y, Asashima M. Xapelin and Xmsr are required for cardiovascular development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 298:188-200, 2006.
- 24) Onuma Y, Asashima M, Whitman M. A Serpin family gene, protease nexin-1 has an activity distinct from protease inhibition in early *Xenopus* embryos. *Mech Dev.* 123:463-71, 2006.
- 25) Takahashi S, Onuma Y, Yokota C, Westmoreland JJ, Asashima M, Wright CV. Nodal-related gene Xnr5 is amplified in the *Xenopus* genome. *Genesis.* 44:309-21, 2006.
- 26) Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, Kodama T, Aburatani H, Asashima M, Yoshida N, Nishinakamura R. The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development.* 133:3005-13, 2006.
- 27) Ohnuma K, Yomo T, Asashima M, Kaneko K. Sorting of cells of the same size, shape, and cell cycle stage for a single cell level

- assay without staining. *BMC Cell Biol.* 7:25, 2006.
- 28) Haramoto Y, Takahashi S, Asashima M. Two distinct domains in pro-region of Nodal-related 3 are essential for BMP inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 346:470-8, 2006.
- 29) Yasuhiko Y, Shiokawa K, Mochizuki T, Asashima M., Yokoyama T. Isolation and characterization of *Xenopus laevis* homologs of the mouse *inv* gene and functional analysis of the conserved calmodulin binding sites. *Cell Res.* 16:337-46, 2006.
- 30) Funato Y, Michiue T, Asashima M., Miki H. The thioredoxin- related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled. *Nat Cell Biol.* 8:501-8, 2006.
- 31) Kondow A, Hitachi K, Ikegame T, Asashima M. Bowline, a novel protein localized to the presomitic mesoderm, interacts with Groucho/TLE in *Xenopus*. *Int J Dev Biol.* 50:473-9, 2006.
- 32) Sedohara A, Suzawa K, Asashima M. Comparison of induction during development between *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol.* 50:385-92, 2006.
- 33) Inui M, Asashima M. A novel gene, *Ami* is expressed in vascular tissue in *Xenopus laevis*. *Gene Expr Patterns.* 6:613-9, 2006.
- 34) Ito 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 Expr Patterns.* 6:294-8, 2006.
- 35) 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.* 133:151-61, 2006.
- 36) Ohnuma K, Hayashi Y, Furue M, Kaneko K, Asashima M. Serum-free culture conditions for serial subculture of undifferentiated PC12 cells. *J Neurosci Methods.* 151:250-61, 2006.
- 37) Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y, Ezaki O. Taurine deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrinology* 147(7): 3276-3284, 2006.
- 38) Miura S, Tomitsuka E, Kamei Y, Yamazaki T, Kai Y, Tamura M, Kita K, Nishino I, Ezaki O. Overexpression of peroxisome proliferators-activated receptor γ co-activator-1 α leads to muscle atrophy with depletion of ATP. *Am J Pathol* : 169(4): 1129-1139, 2006.
- 39) Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara, T., Nakamichi, Y., Okamura, T., Akimoto, Y.,

Kawai, J., Matsushima, S., Kawakami, H., Watanabe, T., Akagawa, K., Nagamatsu, S.: Imaging analysis reveals mechanistic differences between first and second phase insulin exocytosis. *J. Biol. Chem. in press.*
40) Doshi M, Koyanagi M, Nakahara M, Saeki K, Saeki K, Yuo A: Identification of human neutrophils during experimentally induced inflammation in mice transplanted with human umbilical cord blood CD34-positive cells. *Int J Hematol* 84:231-237, 2006.

学会発表

(国内)

1) 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-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?-』平成18年2月24日、東京。
2) 前川京子、福島(上坂)浩実、頭金正博、長谷川隆一、梶尾裕、葛谷信明、安田和基、鎌谷直之、鈴木佳寿子、柳川達生、斎藤嘉朗、澤田純一: 「日本人における薬物代謝酵素 CYP2C9 の遺伝子多型の探索及びハプロタイプ解析」日本薬学会、平成18年3月、仙台。
3) 斎藤嘉朗、福島(上坂)浩実、前川京子、長谷川隆一、梶尾裕、葛谷信明、安田和基、鎌谷直之、鈴木佳寿子、柳川達生、頭金正博、澤田純一: 「日本人における薬物代謝酵素 CYP2C19 の遺伝子多型探索及びハプロタイプ解析」、同

上。

4) 安田和基、谷口繁生、泉和生、鎌木康志、杉山雅英、梶陽介: 「INS-1 細胞由来完全長 cDNA ライブラリー作成の試み」、第49回日本糖尿病学会年次学術集会、平成18年5月、東京。
5) 横内裕敬、山本修一、鎌木康志、安田和基: 「高グルコース環境におけるヒト網膜色素上皮細胞の遺伝子発現の検討」、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、鎌木康志、安田和基: 「新生仔ブタ膵臓から単離した SP(side population) 細胞」、同上。
7) 長谷川智恵、須永泰弘、安田和基、清野進: 「インスリン分泌細胞株における cAMP 反応性遺伝子の網羅的解析」、同上。
8) 安田和基: 「ゲノムワイド関連解析による2型糖尿病感受性遺伝子の同定: ミレニアムプロジェクト糖尿病サブチームからの報告」、同上。
9) 安田和基: 「網膜色素上皮細胞における、高グルコースによる遺伝子発現変化の解析」、第5回 Tokyo Diabetes Seminar、平成18年7月、東京。
10) 井狩高平、山下亮、浜田圭子、安田和基、鎌木康志: 「IRS-1, IRS-2 高発現ヒト肝細胞のプロテオーム解析」、日本ヒトプロテオーム機構第4回大会、平成18年7月、東京。
11) 山下亮、井狩高平、浜田圭子、安田和基、鎌木康志: 「尿タンパク質の前処理と 2D DIGE による解析」、同上。
12) 谷口繁生、大河原久子、土谷健、土谷まり子、大河内仁志、鎌木康志、安田和基: 「新生仔ブタ膵臓から単離される SP(side population) 細胞についての検討」、同上。

- 13) 井狩高平、山下亮、浜田圭子、大友明日香、安田和基、鏑木康志：「IRS-1, IRS-2 高発現ヒト肝細胞のプロテオーム解析」、同上
- 14) 浜田圭子、山下亮、井狩高平、大友明日香、安田和基、鏑木康志：「インスリン/IGF 受容体による遺伝子発現制御の比較解析」、同上
- 15) 斎藤嘉朗、福島(上坂)浩実、前川京子、埴岡伸光、成松鎮雄、鎌谷直之、梶尾裕、葛谷信明、野田光彦、安田和基、澤田純一：「日本人における酸化ストレス関連遺伝子多型探索及びハプロタイプ解析」、同上。
- 16) 安田和基、谷口繁生、泉和生、鏑木康志、尾山和信、杉山雅英、梶陽介：「Vector-capping法による INS-1 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの作成と解析」、第 18 回分子糖尿病学シンポジウム、平成 18 年 12 月 9 日、松山
- 17) 岡村匡史、矢延理絵子、谷口繁生、清水有紀子、新矢恭子、安田和基、笠井美雪：「非肥満型糖尿病モデル LEA/SENDAI ラットのインスリン分泌不全病態」、第 21 回日本糖尿病動物研究会、平成 19 年 2 月 8-10 日、盛岡。
- 18) 鏑木康志、山下亮、浜田圭子、安田和基、野田光彦：「IRS 高発現 CHO 細胞の核抽出液でのプロテオーム解析」、第 79 回日本内分泌学会学術総会、2006 年 5 月、神戸
- 19) Agnes Banas、徳原真、寺谷工、Gary Quinn、山本雄介、大河内仁志、落谷孝広 「Human adipose stem cells as a source of functional hepatocytes」第 5 回日本再生医療学会、岡山、3 月、2006
- 20) 伊藤ゆり子、浜崎辰夫、玉置邦彦、浅島誠、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」 日本研究皮膚科学会 第 31 回年次学術大会、京都、5 月、2006
- 21) 伊藤ゆり子 浜崎辰夫、玉置邦彦、浅島誠、大河内仁志 「マウス毛包内 CD133 陽性細胞の分化多能性の検討」第 19 回内藤カンファレンス、平成 18 年 11 月 14 日-17 日、神奈川
- 22) 江崎治：「生活習慣病予防のための食事・運動療法の作用機序に関する研究」学会賞受賞講演、日本栄養・食糧学会 大会：2006. 5. 19：静岡コンベンションアーツセンター グランシップ (静岡県)
- 23) 三浦進司、甲斐裕子、勝又阿貴、田村真弓、亀井康富、江崎治：「運動しても体脂肪が減らないマウス」第 60 回日本栄養・食糧学会大会：2006. 5. 20：静岡県立大学 (静岡県)
- 24) 笠岡(坪山)宜代、所澤千香子、佐野佳代、細川優、江崎治：「タウリンの抗肥満作用メカニズム」第 60 回日本栄養・食糧学会大会：2006. 5. 21：静岡県立大学 (静岡県)
- 25) Kamei Y, Suganami T, Kohda T, Ishino F, Ezaki O, Ogawa Y: 「Increased Peg1/Mest mRNA in Obese Adipose Tissue is Expressed from Paternal Allele in an Isoform-Specific Manner」 The 11th Adipo Science Symposium: 2006. 8. 19: 千里阪急ホテル (大阪)
- 26) 亀井康富、菅波孝祥、幸田尚、石野史敏、江崎治、小野佳宏：「肥満の脂肪組織におけるインプリンティング遺伝子 Peg 1 / M e s t の発現制御機構」第 27 回日本肥満学会 : 2006. 10. 28: 神戸国際会議場 (兵庫県)
- 27) 岡村 匡史、新矢 恭子、矢延 理絵子、三好一郎、笠井憲雪：「新たな非肥満糖尿病モデル LEA/SENDAI ラットの初期病態解析」第 5

3 回日本実験動物学会総会、2006年5月、神戸

28) 岡村匡史：「新しい糖尿病モデル (LEA/SENDAI) ラットの特徵とその有用性」

第14回動物細胞工学シンポジウム、2006年8月、東京

29) 岡村匡史：「新規インスリン分泌低下型糖尿病モデル LEA/SENDAI ラットの解析」第五回東京インスリン分泌研究会、2006年9月、東京

30) 中原正子、松山さと子、過足芳子、中村直子、佐伯晃一、佐伯久美子、湯尾明：「霊長類 (サル・ヒト) ES細胞からの無フィーダー培養による造血細胞・血管内皮細胞分化」日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月、名古屋。

31) 佐伯晃一、米田麻子、中原正子、佐伯久美子、湯尾明：「霊長類ES細胞から分化誘導した好中球の機能解析」日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月、名古屋。

32) 中原正子、佐伯久美子、松山さと子、佐伯晃一、中村直子、過足芳子、近藤 靖、末盛博文、中辻憲夫、湯尾明：「カニクイザルおよびヒトES細胞からの無フィーダー培養による造血細胞」第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。

33) 中村直子、過足芳子、佐伯久美子、中原正子、佐伯晃一、松山さと子、湯尾明：「カニクイザルES細胞からの無フィーダー培養条件下における継代培養可能な血管内皮細胞への分化誘導」第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。

34) 佐伯晃一、米田麻子、中原正子、末盛博文、中辻憲夫、佐伯久美子、湯尾明：「ヒトES細胞から分化誘導した好中球の機能解析」第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。

(国外)

1) Tsuchiya M, Yoshida T, Taniguchi S, Yasuda

K, Maeda A, Shigemoto M, Tsuchiya K. In vivo suppression of MafA mRNA using siRNA and resulting alteration of gene expression profile in mouse pancreas by microarray analysis. 66th Annual Scientific Sessions of American Diabetes Association, Washington, D. C. (USA), Jun, 2006.

2) Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Tohkin M, Kajio H, Yasuda K, Sawada J-I: Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in a Japanese population. (第16回ミクロソームと薬物酸化に関する国際会議、ハンガリー、Sep, 2006)

3) Yasuda K, Taniguchi S, Izumi K, Kaburagi Y, Oyama K, Sugiyama M, Kaji Y. Construction of a full length cDNA library from INS-1 cells by Vector-Capping method. EASD Islet Study Group Symposium 2006, Elsinore (Denmark), Sep, 2006.

4) Kato N, Yanai K, Makaya M, Nabika T, Katsuya T, Fujioka A, Yasuda K, Yamori Y, Kobayashi T, Ogihara T, Yazaki Y. Integrative large-scale candidate gene analysis of atherosclerotic diseases. 国際高血圧学会、2006.

5) Yasuda K, Taniguchi S, Izumi K, Kaburagi Y, Oyama K, Sugiyama M, Kaji Y. Construction of a full length cDNA library from INS-1 cells by Vector-Capping method. Rachmiel Levine Diabetes Symposium 2006, Long Beach (USA), Nov, 2006.

6) Ito Y, Hamazaki TS, Tamaki K, Asashima M, Okochi H. A new surface marker for dermal

papilla cells 67th Annual meeting of the Society of Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, USA, May, 2006

7) Osada A, Iwabuchi T, Kishimoto J, Hamazaki TS, Okochi H: Long term culture of mouse vibrissal dermal papilla cells and de novo hair follicle induction European Hair research Society Annual Meeting 2006, London, United Kingdom, June, 2006

8) Miura S, Kamei Y, Ezaki O: **AMP-Activated Protein Kinase in Skeletal Muscle Is Required for a Reduction of Fat Mass by Exercise Training.** American Diabetes Association, the 66th Scientific Sessions: 2006.6.12: Wahington, D.C.

9) 笠岡(坪山)宜代、所澤千香子、佐野佳代、亀井康富、笠岡誠一、細川優、江崎治: **Taurine deficiency creates a vicious circle promoting obesity**

第10回国際肥満学会: 2006.9.5: オーストラリア (シドニー)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

安田和基、横内裕敬「糖尿病網膜症の治療方法」(特願 2006-295820) 平成 18 年 10 月 31 日に出願

湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子: 「霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法」(出願人: 国立国際医療センター、田辺製薬株式会社)
(特願 2006-303929)

山崎聖美、江崎治: 「肝臓トリグリセリド濃度低下剤」(特願番号: 2007-19573)
平成 19 年 1 月 30 日に出願

図1：慢性疾患としての糖尿病の病態

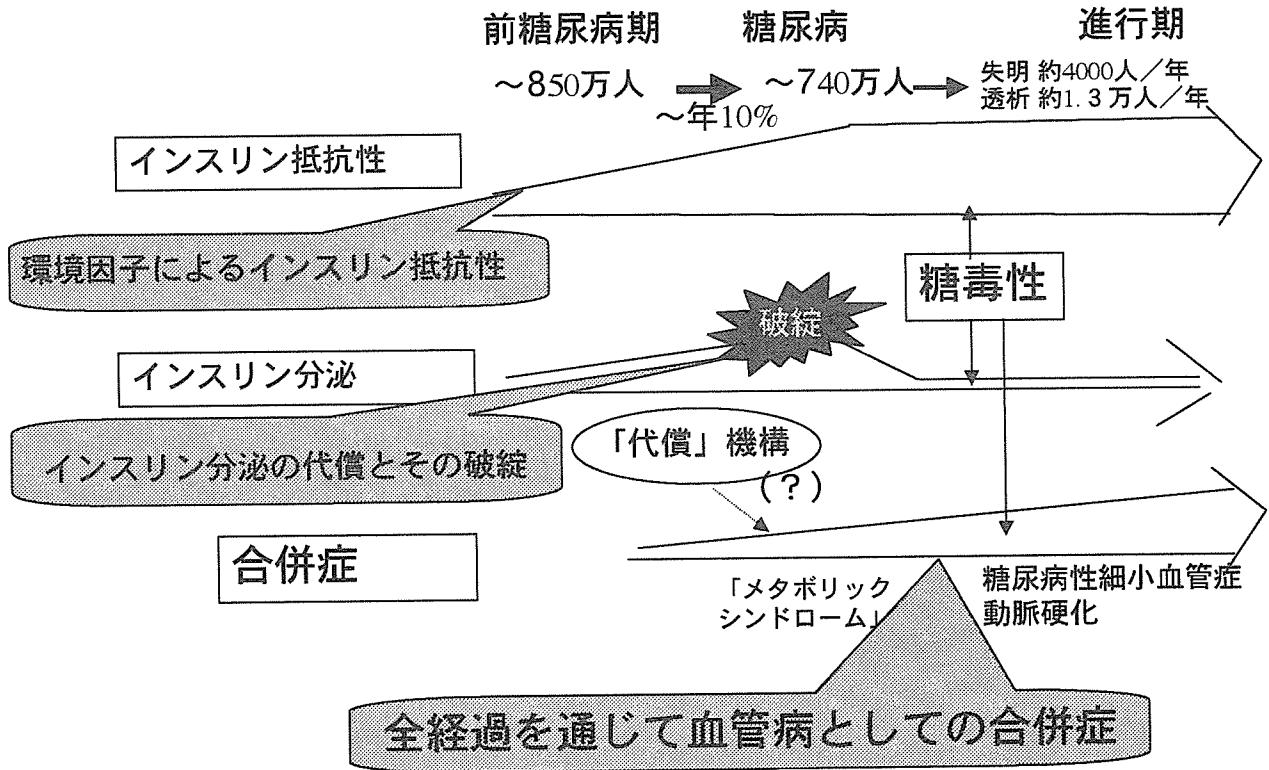
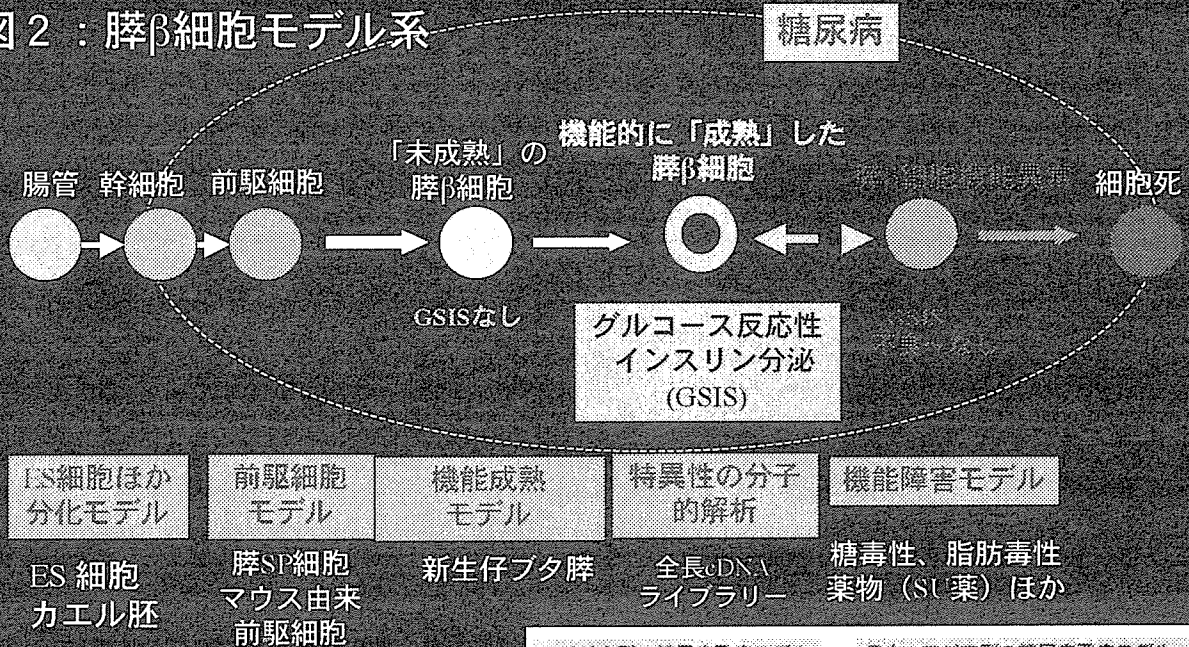
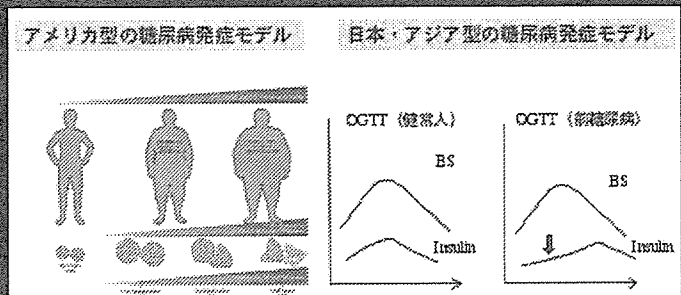


図2：膵β細胞モデル系



日本・アジア型糖尿病：
発症前からインスリン分泌不全
短い代償期、高度肥満を伴わない



II. 分担研究報告書