

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安田和基

平成20（2008）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 13
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 25
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 29
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 35
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 41
湯尾 明
6. 糖尿病モデルを用いた個体レベルの病態解析 47
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 53
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 61
浅島 誠

- III. 研究成果の刊行に関する一覧 65

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成19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、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A「環境因子の分子メカニズム」、B「膵代償機序とその破綻」、C「合併症」の3点に注目して解析を進めている。本年度は、Aについては運動の抗肥満効果を分子レベルで解明し、またプロテオーム解析の手法でインスリン作用を担う新規分子の同定を試みた。Bについては、膵発生の初期段階から、高度に分化した細胞に成熟するまでの、各段階に対して独自の解析モデルを構築し、トランスクリプトーム解析等により、重要な新規分子や新規 RNA 分子をいくつか同定した。また ES 細胞や他臓器幹細胞からの膵内分泌細胞への分化の可能性を、in vivo を含めて検証した。C では、ES 細胞からの内皮分化系を確立し、同時に高グルコースによる内皮障害に関与する新規分子を同定した。「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）の遺伝解析を行い、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。今後、本研究の成果が、成因と病期に基づく、糖尿病の真のオーダーメイド医療の実現に役立てられることを期待する。

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。非常に不均一な疾患で、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し、その結果、さまざまな合併症を生じる。すなわち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、その数年一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、最も解明が遅れているテーマとして「環境因子のメカニズム」「膵β細胞の代償とその破綻、進行性の機能低下」「血管変化としての合併症」の3点に特に注目する。先行するゲノム・ポストゲノムの大型研究をふまえ、特に、ES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・導入する。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活用して、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) 本年度は、生活習慣のなかでも、定期的な運動トレーニングの抗肥満効果について、βアドレナリン受容体の刺激が関与しているかどうかを、β受容体をもたないマウス(βレスマウス)などで、個体レベルで検討した(江崎)。

(2) プロテオーム解析の手法を用いて、インスリンと同様の効果を持つ内服可能な薬剤の分子標的になりうるタンパクを同定する。具体的には、インスリン受容体やIRS(インスリン受容体基質)タンパクをアイソフォーム特異的に高発現させた細胞株を用い、核抽出液の蛋白プロファイルについて、二次元電気泳動によるディファレンシャル解析(2D-DIGE)を試みる(鎬木)。また、インスリン抵抗性や糖代謝を改善させるアディポネクチンの作用機序についても、プロテオーム解析を行う(鎬木)。

[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) すでに確立した、マウスES細胞からのin vitro膵分化系、あるいは前年度までの有望な結果をうけた、Pdx1の強制発現に

よる脂肪組織由来幹細胞からの内胚葉化の系について、インスリン産生細胞まで効率的に分化させられるか、及び in vivo で血糖降下作用を示すどうかを検討した（大河内、浜崎）。

（2）アフリカツメガエル胚からの膵分化系について、昨年度報告した、分化効率のさらに良い改良型の誘導系を用い、独自にデザインした 44K チップによるマイクロアレイ解析により、膵初期形成に関与する新規分子の同定を目指す（浅島）。

（3）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) 細胞について、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）昨年度までに確立した、膵β細胞がグルコース反応性を獲得する系について、網羅的遺伝子発現解析を行い、変化のあった遺伝子の意義を検討する（安田）。

（5）膵β細胞の質的代償の一つと考えられる、短時間の脂肪酸処理によるインスリン分泌促進機構について、プロテオーム解析の手法にて、アシル化タンパクの関与を検討する（鏑木）。

（6）膵β細胞由来完全長 cDNA ライブラリーについて、平成 18 年度までに約 1 万強クローンの 5'側 one-pass 配列解析を行ってきた。得られた新規クローン、特にいわゆる non-coding RNA について、機能的な意義を検討する（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）種々の臓器由来のヒト血管内皮細胞を用い、高濃度グルコースによる傷害メカニズムを解明する。具体的には、細胞内 reactive oxygen species (ROS)、及び索状構造形成能を指標とし、さらにトランスクリプトーム解析を行う（湯尾）。

（2）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、同様の分子的解析を行う（湯尾、安田）。

[4] 個体レベルでの画期的な病態マーカーの開発研究

（1）日本人 2 型糖尿病に類似した、非肥満糖尿病モデル Sendai ラットについて、特にインスリン分泌不全に注目して、量的形質遺伝子座解析を行った（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)。

β 受容体をもたないマウス (β レスマウス) では、運動による抗肥満効果はみられず、 β 受容体の刺激が重要であることがわかった。また、PPAR α 活性化が、筋で GLUT4 発現を増加させることも見いだした。

(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について 2D-DIGE を行い、インスリン刺激で有意に変化するタンパクを 150 個程度検出した。LC-MS で同定したタンパクの多くは、RNA 代謝やタンパク合成に関与するものであった。

また、AMPK を同様に活性化させるアディポネクチンとメトホルミンで HepG2 細胞をそれぞれ 24 時間処理し、発現タンパクを 2D-DIGE で比較しところ、アディポネクチン処理にて特異的に変動するタンパクスポット数個を認めたので、現在同定にむけて解析中である。

[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) 膵内分泌細胞の作成と in vivo 効果の検討 (大河内、浜崎)

平成 18 年度までに、マウス ES 細胞から導管を含む内分泌系・外分泌系の膵組織を分化させる系は確立していたので、この分化誘導した膵組織を、STZ (streptozotocin) 投与によるインスリン欠乏型糖尿病モデル

の腎皮膜下に移植したところ、血糖に対する効果は部分的であった。また、Pdx1 を導入発現させた脂肪組織由来細胞を、糖尿病モデル動物に尾静脈から移植すると、予備的実験では血糖降下作用が見られた。また遺伝子導入以外の方法で Pdx1 の発現を誘導できる可能性も示した。

(2) 膵初期発生に重要な分子の探索 (浅島)。

改良型の膵分化系でマイクロアレイ解析を行うと、膵誘導条件で 2 倍以上発現変化が見られる遺伝子が 550 あった。このうちいくつかでは、whole-mount in situ ハイブリダイゼーションにより、膵臓を含む前方内胚葉で発現がみられ、「膵臓化」に必要な新規遺伝子の候補と期待された。

(3) 新生仔ブタ膵由来 SP 細胞 (安田)。

未分化な内分泌前駆細胞の候補である、新生仔ブタ膵由来 SP (side population) 細胞についてトランスクリプトーム解析を行った。幹細胞らしさを決める遺伝子の高発現は確認されず、また他の系統、中胚葉系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) 膵 β 細胞成熟過程に関与する遺伝子の探索 (安田) :

GSIS 獲得系と非獲得系とで発現パターンに差がみられた遺伝子のうち、21 コの遺伝子について、ラットに対する siRNA をデザインし、INS-1D 細胞に導入してノックダウンを行い、インスリン分泌、特に GSIS を検

討した。その結果、半分以上の遺伝子について、GSISに明らかな低下が見られ、機能的な意義が示唆された。

(5) 膵β細胞脂肪酸曝露効果のプロテオーム解析の試み(鎗木)

改良 ABE 法にてパルミチル化タンパクの回収系を確立し、予備的実験としてこの方法をヒト由来 HEK293 細胞に用い、LC-MS/MS 解析にて、数個のパルミチル化タンパクの候補を同定することができた。今後、2D-PAGE, 2D LC-MS/MS 等の方法を組み合わせることにより、脂肪酸曝露下膵β細胞への応用も可能になると考えられる。

(6) 膵β細胞由来完全長 cDNA ライブラリー(安田)。

独自の cDNA ライブラリーから得られた、non-coding RNA 候補で、膵島でも発現が確認されたものについて、ノックダウンを行ったところ、インスリン分泌特性に変化をきたす機能的なクローンが発見された。

[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にて、高グルコースにより ROS 産生増加、及び索状構造形成能の低下(機能低下)が観察された。マイクロアレイ解析により、高グルコースにより、Txnip(Thioredoxin-interacting protein)を初めとして、種々の興味深い遺伝子の発現増加が認められた。(湯尾、安田)。

(2) 初代培養細胞の量的・質的限界を補

い、安定した解析系を作成するため、霊長類(サルおよびヒト)ES細胞由来の血管内皮細胞分化系をさらに改良し、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(湯尾)。

[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 ラットのインスリン分泌不全に注目し、若齢で糖負荷試験の血糖値を指標に遺伝解析を行ったところ、少なくとも1つ、ラット1番染色体上に明らかな QTL を認めた。この周辺にはいくつかの糖代謝関係の候補遺伝子が存在している。

(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

本研究班の最大の利点は、各分担研究者がさまざまな研究フィールドを有し、糖尿病研究において世界中で我々だけが保持する、非常にユニークな解析ツールを共有していることである。

特に、膵β細胞や血管内皮細胞への分化・機能解析系は、これまで安定したモデルがない。たとえば、本研究で最も分担研究者の多い「膵β細胞」についても、ごく

初期の膵発生や ES 細胞からの分化の段階から、高度に成熟する段階まで、新規のモデルをそろえている。

さらに、こうしたリソースに対して、網羅的な解析方法で、新規の分子メカニズムを探索する、というスタンスをとっている。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」ができることであり、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いる。また得られた遺伝子の機能解析についても、解析モデル系があれば、ノックダウンや Morpholino などを駆使して可能である。

実際、本研究班により、糖代謝や臓器生理学に重要な、多くの新規分子が同定された。論文や特許申請の関係もあって、本報告書では具体名を示せないものも多いが、これらの病態における意義、診断マーカーや治療標的と今後一つ一つ丁寧に検証する必要がある。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おり、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。

反省としては、個別研究は非常に深いところまで解析をおこなったが、本研究で最も大切な点、すなわち個別の研究を、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、という点が、十分成果をあげきらなかったことである。研究の統合、という点では、たとえば、「マイクロアレイなどで得られた、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」、という計画をもってしたが、途半ばのまま最終年度が終了してしまった。

個体レベル、という点では、幸い日本人に酷似した Sendai ラットなど、経時的に臨床像や臓器変化が追えるリソースもあるので、得られた分子などについて、今後も、ヒトでなし得ない「病期」の分子的検討を行ってゆく予定である。

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）、が多数収集されたので、今後重層的な解析が大いに期待される。

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。本研究終了後も、これらをもとに、病期に基づく新しい診断治療法の開発をめざしてゆきたい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Struct Funct** 32(1):69-78, 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, Sawada J-I. Genetic variations of the ABC transporter gene *ABCC3* in a Japanese population. **Drug Metab Pharmacokinet** 22 (2) 129-135, 2007.
- 3) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Kamatani N, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Sawada J-I. Genetic variations and haplotype structures of transcription factor Nrf2 and its cytosolic reservoir protein Keap1 in Japanese. **Drug Metab Pharmacokinet** 22(3):212-9,2007.
- 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** 298(1-2):83-92, 2007.
- 5) 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.
- 6) Takeuchi F, Yanai K, Inomata H, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Yasuda K, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N. Search of type 2 diabetes susceptibility gene on chromosome 20q. **Biochem Biophys Res Commun**357(4):1100-1106, 2007.
- 7) Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Yasuda K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects. **J Hum Genet** 53(2) : 174-180, 2008.
- 8) Takeuchi F, Ochiai Y, Serizawa M, Yanai K, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Yasuda K, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N. Search for type 2 diabetes susceptibility genes on chromosome 1q, 3q and 12q. **J Hum Genet** 2008, *in press*
- 9) Banas A, Tokuhara M, Okochi H, Ochiya T Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes **Hepatology** 46:219-228, 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**.

127:1052-60, 2007

11) Nakanishi M, Hamazaki TS, Komazaki S, Okochi H, Asashima M. Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro. **Differentiation** 75:1-11, 2007.

12) Kuwano Y, Fujimoto M, Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Komine M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. The involvement of Gab1 and PI 3-kinase in beta1 integrin signaling in keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. 361(1): 224-229, 2007.

13) 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. **Tissue Eng**. 13(5):975-982, 2007.

14) Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A: The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. **J Electrophoresis** 51:1-8, 2007.

15) 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. Cell. Biol.** 177: 695-705, 2007

16) Suzawa K, Yukita A, Hayata T, Goto T, Danno H, Michiue T, Cho KW, Asashima M. Xenopus glucose transporter 1 (xGLUT1) is required for

gastrulation movement in *Xenopus laevis*. **Int J Dev Biol**. 51(3):183-90. 2007

17) Sugimoto K, Okabayashi K, Sedohara A, Hayata T, Asashima M. The role of XBtg2 in *Xenopus* neural development. **Dev Neurosci**. 29(6):468-79. 2007

18) Miura S, Kawanaka K, Kai Y, Tamura M, Goto M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Ezaki O. An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in response to exercise is mediated by β -adrenergic receptor activation. **Endocrinology**. 148(7): 3441-3448, 2007

19) Yamazaki T, Nakamori A, Sasaki E, Wada S, Ezaki O. Fish oil prevents sucrose-induced fatty liver but exacerbates high-safflower oil-induced fatty liver in ddy mice. **Hepatology** 46(6): 1779-1790, 2007

20) Tsuboyama-Kasaoka N, Sano K, Shozawa C, Osaka T, Ezaki O. Studies of UCP2-transgenic and -knockout mice reveal that liver UCP2 is not essential for the anti-obesity effects of fish oil. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 294: (3):E600-E606, 2008.

21) Kamei Y, Miura S, Suganami T, Akaike F, Kanai S, Sugita S, Katsumata A, Aburatani H, UntermanTG, Ezaki O, Ogawa Y. Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of RXR/LXR and FOXO1. **Endocrinology in press**

学会発表

(国内)

1) 岡村匡史、矢延理絵子、新矢恭子、谷口繁生、清水有紀子、安田和基、笠井憲雪：「非肥満型糖尿病モデル LEA/SENDAI ラットを用いた耐糖能異常関連遺伝子の探索」、第143回日本獣医学会学術集会、平成19年4月、つくば

2) 横内裕敬、山本修一、武田憲夫、鎌木康志、安田和基「高グルコース下で誘導されるヒト網膜色素上皮細胞由来血管新生促進因子の検討」第111回日本眼科学会総会、平成19年4月、大阪

3) 谷口繁生、土谷健、大河原久子、土谷まり子、尾山和信、鎌木康志、安田和基：「高グルコース存在下に培養した新生仔ブタ内分泌細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌と遺伝子発現」第50回日本糖尿病学会年次学術集会、平成19年5月、仙台

4) 横内裕敬、山本修一、武田憲夫、鎌木康志、安田和基：「高グルコース下で誘導されるヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) 由来血管新生促進因子の検討」、同上

5) 山下亮、井狩高平、安田和基、関原久彦、鎌木康志：「ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用。」第80回日本内分泌学会学術総会、ポスター発表、平成19年6月、東京

6) 山下亮、井狩高平、安田和基、鎌木康志：「ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用。」第30回日本分子生物学会・第8回日本生化学 合同大会、口演&ポスター発表、平成19年12月、横浜

7) 高橋枝里、岡村匡史、井狩高平、平野久、

安田和基、鎌木康志：「LEA/Sendai ラット血清のプロテオーム解析。」第30回日本分子生物学会・第8回日本生化学 合同大会、ポスター発表、平成19年12月、横浜

8) 安田和基「2型糖尿病発症遺伝子の最近の話題」第2回 四国先端糖尿病研究会、平成20年1月26日、松山

9) 浜田圭子、山下亮、井狩高平、安田和基、鎌木康志：「IRS 高発現 CHO 細胞の核抽出液でのプロテオーム解析」日本ヒトプロテオーム機構第5回大会、ポスター発表、2007年7月、東京

10) 徳原真、福田沙月、今野雅允、梶山弘光、枝元良広、斉藤幸夫、清水利夫、浜崎辰夫、大河内仁志「肝障害に対する脂肪組織由来幹細胞を用いた細胞治療の検討」第7回日本再生医療学会 3月、名古屋、2008

11) 中原正子、過足芳子、佐伯晃一、中村直子、松山さと子、米田麻子、佐伯久美子、湯尾 明：「サル・ヒト ES 細胞からの無フィーダー培養による高効率な血管内皮細胞分化法の開発」第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会・合同総会、2007年10月、横浜。

11) 中原正子、過足芳子、佐伯久美子、佐伯晃一、中村直子、松山さと子、米田麻子、小柳 真、近藤 靖、末盛博文、中辻憲夫、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高効率な血管内皮細胞分化誘導法の開発—各サイトカインの役割の検討及び in vivo での機能評価—」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会、2007年12月、横浜

12) 中村直子、過足芳子、中原正子、佐伯久美

子、小柳 真、松山さと子、小柳明美、八木田秀雄、湯尾 明：「霊長類胚性幹（ES）細胞からの高効率な血管内皮細胞分化」第7回日本再生医療学会総会、2008年3月、名古屋。

13) 岡村匡史、矢延理絵子、清水有紀子、笠井憲雪：「インスリン分泌不全型糖尿病モデルLEA/Sendai ラットの病態解析」第17回LECラット研究会、2007年5月、東京

14) 江崎治 「肥満予防のための骨格筋の役割」第61回日本栄養・食糧学会大会/日本栄養・食糧学会創立60周年記念式典。2007.05.19, 京都

15) 和田智史, 山崎聖美, 中森明子, 佐々木江梨子, 川野因, 江崎治. ゾンデ投与によるアルコール性脂肪肝発症モデルマウスの作成 第61回日本栄養・食糧学会大会. 2007.05.20, 京都

16) 三浦進司, 江崎治. 「運動による筋肉でのPGC-1 α 発現増加は β 2-アドレナリン受容体の活性化を介している」第28回日本肥満学会. 2007.10.20, 東京

17) 亀井康富, 菅波孝祥, 赤池史子, 金井沙綾香, 岡淳一郎, 三浦進司, 江崎治, 小川佳宏.

「骨格筋で転写因子FOXO1を過剰発現させ筋萎縮が生じたマウスでは体脂肪量の増加をきたす」第28回日本肥満学会. 2007.10.20, 東京「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

18) 江崎治. 「栄養素（マクロニュートリエン）摂取制限と運動による体脂肪減少効果：理論と実際」第11回日本病態栄養学会年次学術集会：2008.1.12：国立京都国際会館（京都）

（国外）

1) Yokouchi H, Yasuda K, Takeda N, Kaburagi Y, Yamamoto S. Angiopoietin-like protein 4(ANGPTL4) is induced in retinal pigment epithelial cells by high glucose and exhibits potent angiogenic activity on retinal endothelial cells. Annual Meeting for ARVO(The Association for Research in Vision and Ophthalmology), Fort Lauderdale(USA), May, 2007.

2) Yasuda K, Taniguchi S, Tsuchiya K, Tsuchiya M, Oyama K, Kawaguchi M, Kaburagi Y, Okochi H, Ohgawahara H. Isolation and characterization of side population (SP) cells from neonatal porcine pancreas. EASD Islet Study Group Symposium 2007, Brussels (Belgium), September, 2007

3) Saito Y, Tohkin M, Fukushima-Uesaka H, Maekawa K, Sai K, Hasegawa R, Kamatani N, Suzuki K, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yanagawa T, Yasuda K, Sawada J-I. Haplotype structure of ABCC8 and KCNJ11 genes and their influence on glimepiride efficacy, 国際薬物動態学会 ISSX, Sendai, Oct, 2007.

4) Miura S, Kawanaka K, Ezaki O. Increase in Murine Skeletal Muscle PGC-1 alpha mRNA in Response to Exercise Is Mediated by Beta2-Adrenergic Receptor Activation. An American Diabetes Association, 67th Scientific Sessions. 2007.06.24

5) Zapater J, Zhang W, Unterman A, Larsen P, Kamei Y, Miura S, Ezaki O, Unterman T. Effects of FoxO1 on Gene Expression in Skeletal Muscle. American Diabetes Association, 67th Scientific Sessions. 2007.06.24 Chicago, IL, USA

6) Kubota N, Yano W, Kubota T, Ueki K, Yamauchi T, Itoh S, Terauchi Y, Ezaki O, Tobe K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. Scientific Sessions 67th American Diabetes Association. 2007. 6. 24 Chicago IL, USA

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特許出願

安田和基、ほか8名「遺伝子多型を用いた2型糖尿病の検査方法」（特願2007-325366）出願日：平成19年12月18日

国際特許

発明者：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、田辺三菱製薬株式会社（PCT/JP2007/71811）

Ⅱ. 分担研究報告書

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

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：機能的な膵β細胞が生体内で作られる過程に注目し、「新生仔ブタ膵」を対象に、これまで構築してきた2つの系について、網羅的発現解析をおこなった。セルソーターを用いて単離した SP (side population) 細胞分画は、長期培養が可能で、内分泌細胞への分化も誘導できたが、網羅的な発現解析などにより、内胚葉系以外の分子マーカーも発現するなど、これまで報告のない細胞集団と思われた。次に、新生仔ブタ膵内分泌細胞が、成熟した膵β細胞の指標である「グルコース反応性インスリン分泌 (GSIS)」を獲得する *in vitro* 系において、発現が変動する遺伝子を 23 個抽出した。うち 21 個について siRNA をデザインして INS-1D 細胞にて解析を行ったところ、約半分で、インスリン分泌に影響が見られた。

一方、世界に先駆けて作成した膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの解析から、成熟した膵島に発現し、インスリン分泌に寄与が強く示唆される機能的な non-coding RNA を発見し、膵β細胞における全く新たな「RNA WORLD」の存在を提示することができた。

主任研究者として、本研究全体の成果を吟味して臨床へ還元するために、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引き続き行った。

A. 研究目的

慢性に進行する2型糖尿病の経過において、その発症・進展に最も重要なのは、「膵β細胞の機能障害」である。これは過食・高脂肪食・運動不足などの環境因子によって生じたインスリン抵抗性に対して、膵β細胞が十分に代償できず、相対的インスリン分泌不全を来すことによる。本年度は、昨年度までに引き続き「新生仔ブタ膵」を対象に、前駆細胞からきわめて高度に分化

した「成熟」膵β細胞が作られるステップに注目し、その分子機構の解明を試みた。

こうして生じた、高度に機能分化したインスリン分泌臓器である膵β細胞の、遺伝子発現調節機構については、世界に先駆けて作成した膵β細胞の完全長 cDNA ライブラリーを用いて、昨年度に引き続き、特異的な遺伝子転写調節の分子基盤を解明する。

糖尿病・代謝疾患の病態は非常に複雑であり、こうした基盤的な研究成果を、個体

レベルで検証し臨床へ還元するために、ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームなど各レベルでの成果を統合して解析可能な、真に有用な臨床パネルの作成を行った。

B. 研究方法

1) 膵組織幹細胞・内分泌前駆細胞の単離同定と、その分子的解析（協力研究者：谷口繁生、土谷健）

近年、Hoechst33342色素の高排出能を指標として分離されるSP (side population) 細胞群に、多分化能を有する組織幹細胞が多く含まれると報告され、抗体を用いない簡便で高効率な幹細胞回収法として注目されている。我々は昨年度までに、新生仔ブタ(生後3日以内)膵から、SP細胞の単離方法を確立し、増殖・分化条件の検討を行ってきた。その詳細は昨年度までに報告したので省略する。

SP細胞、ソーティングにかけなかったnon-SP細胞、および培養SP細胞の遺伝子発現プロファイルを、Affymetrix社のGeneChipシステムを用いて解析した。それぞれRNAを抽出したのち、T7による増幅反応を利用したtwo-cycle labeling kitを用いてcRNAプローブを作製し、Porcine Genome Array(約23,250コ)のブタ転写産物を含む)を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

また、GeneChipの結果をもとに、SP細胞について、培養条件を工夫することにより、

ホルモン産生内分泌細胞以外への分化の可能性を検討した。

2) 膵β細胞におけるグルコース反応性インスリン分泌獲得系(in vitro成熟系)の解析(協力研究者:谷口繁生、土谷健、尾山和信、川口美穂)

一般に新生児の膵β細胞は、グルコース反応性インスリン分泌(以下GSIS)が十分発達しておらず、生後急速にGSISを獲得するとされている。そのメカニズムは不明であるが、この「生理的成熟」過程をin vitroで再現できれば、膵β細胞機能の分子基盤の解明に役立つと考えられる。すでにラットでは、こうした膵内分泌細胞の「成熟」に、比較的高濃度のグルコース濃度への曝露が必要ではないか、という古い報告がある。そこで、新生仔ブタ膵を用いて、同様のモデルの作成を試みた。

(1) 生後24時間以内の新生仔ブタ膵から得られた内分泌細胞を、10%FBS、10mM nicotinamide を含み、グルコース濃度が2.8mM(2.8G)または11.1mM(11.1G)のRPMI培地で、7日間培養したのち、インスリン分泌実験を行った。平成18年度の実験により、前者はGSISを示さないままだが、後者はGSISを獲得することを確認している。

(2) 上記の2種類のメディウムで培養した新生仔ブタ膵内分泌細胞について、RNAを抽出し、Affymetrix社GeneChipシステムを用いて網羅的な遺伝子発現解析をおこなった。GSIS獲得系(11.1G)でのみ変化の

見られた遺伝子について、ラットホモログの配列から siRNA をデザインし、膵β細胞株 INS-1D 細胞 (Dr Wollheim、及び東京大学関根信夫博士より供与) へ、リポフェクション法により導入した。48 時間後に TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法にて遺伝子発現量を定量した。ネガティブコントロール siRNA 投与と比較して当該遺伝子発現のノックダウンが確認できた siRNA について、24 穴プレートで改めて細胞に導入し、72 時間後にインスリン分泌アッセイをおこない、GSIS への効果を検討した。

3) 膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの作成とその解析 (協力: 日立計測器サービス (現: 日立ハイテクノロジーズ) グループ)

高度に分化した膵β細胞の機能調節の分子基盤を解明するために、INS-1D 細胞から Vector-capping 法 (DNA Res 12:53-62, 2005) にて、完全長 cDNA ライブラリーを作成し、そのクローンの解析を行った。

(1) ラット INS-1D 細胞から抽出した total RNA 10 μg から、完全長 cDNA ライブラリーを作成し、ランダムピックした約 1.1 万クローンについて、5'-側 one pass シークエンス解析を行った。日立ハイテクノロジーズの協力を得て、クローンをクラスター化したのち、既報の転写産物や転写開始点との比較を行った。

(2) 新規クローンのうち、いわゆる

polyA 型の「non-coding RNA」(以下 ncRNA) の候補で、平成 18 年度に、in situ hybridization (ISH) にて膵における発現を確認したものについて、3 種の siRNA をデザインし、INS-1D 細胞でノックダウンを行い、GSIS に及ぼす影響を検討した。

(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。

C. 研究結果

1) 新生仔ブタ膵由来 SP 細胞の単離とその分子的解析

(1) 網羅的遺伝子発現解析

新生仔ブタ膵からの SP 細胞の単離、増殖及び分化の条件検討については、平成 18 年度までに詳述したので省略する。

SP 細胞は数が少ないので、回収される RNA は微量であるが、two-cycle target labeling 法による増幅の結果、100ng に満たない RNA からでも GeneChip 解析が可能となった。

SP 細胞と non-SP 細胞の比較解析の結果、SP 細胞において発現が 3 倍以上増加している遺伝子が 114 コ、1/3 倍以下に減少している遺伝子が 80 コ見出された。ヒト、マウス、ラットなどの遺伝子から得られる情報をもとに、この 194 コを Gene

Ontology の「Biological process」により分類したところ、細胞の接着、増殖、分化、シグナル伝達に関わる遺伝子に発現の変化が多く見られた。また、

「Molecular function」による分類では、タンパク結合、レセプター活性、レセプター結合、転写因子活性を持つ遺伝子に発現の変化が多く見られた。しかしながら、従来「stemness」との関係の可能性が示唆されている遺伝子には、ほとんど変化が見られなかった。

1 コの SP 細胞から増殖した細胞と non-SP 細胞の比較解析の結果、増殖した SP 細胞において発現が 3 倍以上増加している遺伝子が 186 コ、1/3 倍以下に減少している遺伝子が 60 コ見出された。この 246 コを Gene Ontology における「Biological process」により分類したところ、細胞の増殖やシグナル伝達に関わる遺伝子に発現の変化が多く見られた。また、

「Molecular function」による分類では、DNA 結合、転写因子活性、ATP や GTP 結合能を持つ遺伝子に発現の変化が多く見られた。

SP 細胞 1 コから培養により増殖した細胞と non-SP 細胞との間に発現変化が見られた遺伝子と、新鮮な SP 細胞と non-SP 細胞との間に発現変化が見られた遺伝子では、ほとんど一致するものがなかった。

以上より、新生仔ブタ腭由来 SP 細胞は非常に不均一であり、内胚葉系以外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。

(2) 腭由来 SP 細胞の中胚葉系分化の試み
前述の結果を受けて、SP 細胞が内皮細胞へ分化する可能性を考えた。前年度まで網膜症の研究に用いた血管内皮培養のシステムにて、管腔形成の有無をみた。Non-SP 細胞からは全く管腔形成はみられなかったが、SP 細胞からはある条件で、やや弱いながらも管腔形成と思われる像がみられた(図 1)。

2) 腭β細胞におけるグルコース反応性インスリン分泌獲得系 (in vitro 成熟系) の解析

(1) 網羅的遺伝子発現プロファイル

生後 2 4 時間以内の新生仔ブタ腭から分離した内分泌細胞について、11.1mM グルコース (11.1G) および 2.8mM グルコース (2.8G) 培地で平面培養したところ、培養 7 日目で、後者のみ GSIS が見られた (平成 18 年度に報告したので詳細は省略)。

上記モデルについて、7 日目の 2.8G 群、11.1G 群で、網羅的な遺伝子発現解析をおこなった。その結果、インスリン、およびプロセッシング酵素 PC1/3 が、GSIS を獲得する 11.1G 群で発現が増加していたのに加え、ホルモン分泌調節、シグナル伝達などに関与する興味深い遺伝子 (全部で 23 コ) に発現の変化が見られた。なお平成 18 年度のリアルタイム PCR による個別検討により、グルコースセンサーとされるグルコキ

ナーゼをはじめ、これまでGSISに関係するとされた分子については、両者で変化がないことを確認している。

(2) 遺伝子発現抑制によるGSISへの効果の検討

前項で、GSIS獲得系と非獲得系とで発現パターンに差がみられた遺伝子は23コだったが、インスリン、およびラットにおけるカウンターパートの見つかっていない遺伝子1コを除く、残りの21コの遺伝子について、ラットに対するsiRNAをデザインし、INS-1D細胞に導入して遺伝子ノックダウンを行った。続いて、リアルタイムRT-PCR法により十分なノックダウンが確認できたsiRNAを用いて、該当遺伝子抑制下でインスリン分泌、特にGSISを検討した。その結果、半分以上の遺伝子において、いわゆるnegative controlに比べ高濃度(25 mM)グルコースで刺激した際のインスリン分泌反応に、明らかな低下が見られた(図2)。

3) 膵内分泌細胞由来cDNAライブラリーの作成とその解析

(1) INS-1D細胞由来cDNAライブラリーについて、シーケンスが得られた約9000クローンのうち、インサートが確認され、かつ本法の原理を応用して完全長cDNAと判定されるクローンは約70%にのぼった。全体は3329クラスターに分類され、うちsingletonは約2200であった。これらについて既存のデータベースに対するBLASTサーチなどの検討を行ったうち、明らかなORF

をもたないと見られるnon-coding RNA(ncRNA)の候補について検討を加えた。昨年度ISHにて膵島に発現することを確認した3クローンについて、siRNAをデザイン合成し、INS-1D細胞に導入することにより、インスリン分泌、特にGSISへの影響をみた。図3に示すように、同一クローンに対する複数のsiRNAで、ノックダウンによりGSISが増強するもの(ncRNA-1,2)及び減弱するもの(ncRNA-3)が見られた。現在さらにこのノックダウンした細胞から抽出したRNAを用いた網羅的発現解析を行っている。

4) 臨床パネルの作成

先行する、ミレニアムプロジェクトやプロテオームファクトリー事業等で収集したサンプルと合わせ、臨床情報を整備し、さらに多角的な解析が可能な臨床パネルづくりを進めており(厚生労働省バイオリソースバンク構想)、ゲノムと血清のペア、同一患者での治療入院前後での血清、などを行った。

D. 考察

日本では、研究を目的としたヒト膵組織の大量入手は不可能であるが、この点ブタ膵は、入手する過程で、量の点でもまた倫理的問題がほとんどない。しかも、インスリン分泌反応のパターンがマウスなどに比べてよりヒトに近いとされるので、ヒト膵β細胞の基盤研究の代替材料として非常に