

- 小鳥真司、海老原 健、益崎裕章、奥 正次郎、大島秀武、志賀利一、細田公則、中尾一和。改良 Dual VF-BIA 法による経時的内臓脂肪蓄積測定メタボリックシンドローム診療における臨床的意義。第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
2. 富田 努、細田公則、小鳥真司、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、海老原 健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和。G 蛋白共役型-脂肪酸受容体 GPR40 の糖尿病でのインスリン分泌調整異常における病態生理的意義の検討。第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
 3. 野口倫生、細田公則、藤倉純二、富田 努、小鳥真司、森 栄作、泰江慎太郎、石井崇子、海老原 健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和。脂肪細胞分化および糖代謝における ROCK-II の意義。第 45 回日本臨床分子医学会学術集会、2008/7/24-25、神戸
 4. 森 栄作、細田公則、野口倫生、小鳥真司、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和。脂肪萎縮症に対する脂肪組織移植治療に関する検討。第 29 回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
 5. 野口倫生、細田公則、曾根正勝、田浦大輔、森 栄作、本間康一郎、富田 努、藤倉純二、中尾一和。ヒト iPS 細胞における脂肪細胞分化誘導系の確立。第 106 回日本内科学会、2009/4/10-12、東京
 6. 小鳥真司、細田公則、富田努、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、森 栄作、内藤雅喜、海老原健、益崎裕章、中尾一和。新規の G 蛋白共役型受容体 GPR119 の臨床的意義：ヒトにおける遺伝子発現の検討。第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
 7. 富田 努、細田公則、小鳥真司、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、森 栄作、内藤雅喜、海老原健、益崎裕章、中尾一和。G 蛋白共役型受容体 40 (GPR40) の肥満・糖代謝異常における意義の検討。第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
 8. 野口倫生、細田公則、曾根正勝、森 栄作、田浦大輔、本間康一郎、富田 努、小鳥真司、内藤雅喜、藤倉純二、中尾一和。ヒト iPS 細胞からの脂肪細胞分化。第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
 9. 森 栄作、細田公則、野口倫生、藤倉純二、富田 努、小鳥真司、内藤雅喜、海老原健、益崎裕章、中尾一和。脂肪萎縮症に対する脂肪組織移植治療の検討。第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
 10. 森 栄作、野口倫生、中尾一和、田浦大輔、曾根正勝、山本祐二、富田 努、藤倉純二、海老原健、細田公則、中尾一和。ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞を用いた脂肪萎縮症に対する細胞治療の開発。第 83 回日本内分泌学会、2010/3/25-28、京都
 11. 小鳥真二、富田 努、藤倉純二、日下部徹、海老原健、細田公則、中尾一和。新規の G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR119 の臨床的意義。第 7 回 GPCR 研究会、2010/5/7-8、東京
 12. 小鳥真司、富田 努、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、内藤雅喜、日下部徹、海老原健、細田公則、中尾一和。摂食抑制作用を有する脂質、オレオイルエタノールアミドをリガンドとする G 蛋白共役型受容体 GPR119 のインスリン分泌調節での意義。第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010/5/27-29、岡山
 13. 富田 努、細田公則、小鳥真司、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、日下部徹、海老原健、益崎裕章、中尾一和。膵β細胞に高発現し、中・長鎖の遊離脂肪酸をリガンドとする G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR40 の遺伝性肥満モデルの膵島での発現調節。第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010/5/27-29、岡山
 14. 野口倫生、細田公則、森 栄作、曾根正勝、藤倉純二、海老原健、中尾一和。ヒト iPS/ES 細胞からの脂肪細胞分化とヒト iPS/ES 細胞由来脂肪細胞の移植に関する検討。第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010/5/27-29、岡山
 15. 内藤雅喜、藤倉純二、野口倫生、富田 努、森 栄作、小鳥真司、日下部徹、山本祐二、宮本理人、海老原健、益崎裕章、細田公則、中尾一和。インスリン分泌低下型糖尿病を来す Akita マウスにおけるレプチンの治療効果の検討。第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010/5/27-29、岡山
 16. 野口倫生、細田公則、森 栄作、中根舞子、中尾一和、山本祐二、曾根正勝、藤倉純二、海老原健、中尾一和。ヒト iPS・ES 細胞由来脂肪細胞の分化と移植に関する検討。第 31 回

日本肥満学会、2010/10/1-2、群馬

17. 富田 努, 細田公則, 小鳥真司, 藤倉純二, 岩倉 浩, 野口倫生, 日下部徹, 海老原健, 益崎裕章, 中尾一和. 新規の G 蛋白共役型一脂脂肪酸受容体 GPR40 の遺伝子肥満モデルの膵島での発現調節. 第 31 回日本肥満学会、2010/10/1-2、群馬
18. 内藤雅喜, 藤倉純二, 海老原健, 宮永史子, 日下部徹, 宮本理人, 山本祐二, 野口倫生, 富田 努, 孫 徹, 細田公則, 中尾一和. Leptin Transgenic Akita mouse を用いたインスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチン治療. 第 31 回日本肥満学会、2010/10/1-2、群馬
19. 田中智洋, 益崎裕章, 泰江慎太郎, 米本崇子, 荒井直樹, 富田 努, 藤倉純二, 海老原健, 箕越靖彦, 細田公則, 中尾一和. マウス視床下部 CB1 受容体発現調節に及ぼす高脂肪食とニコチンの影響. 第 31 回日本肥満学会、2010/10/1-2、群馬
20. 森 栄作, 細田公則, 野口倫生, 藤倉純二, 富田 努, 小鳥真司, 内藤雅喜, 山本祐二, 日下部徹, 海老原健, 中尾一和. 脂肪萎縮症に対する脂肪組織移植の治療効果に関する検討. 第 31 回日本肥満学会、2010/10/1-2、群馬
21. 小鳥真司, 富田 努, 藤倉純二, 野口倫生, 森 栄作, 内藤雅喜, 日下部徹, 海老原健, 細田公則, 中尾一和. 新規の G 蛋白共役型一脂質受容体 GPR119 の臨床的意義. 第 31 回日本肥満学会、2010/10/1-2、群馬

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
平成 20～22 年度 分担研究報告書

生活習慣病におけるトランスレーショナルリサーチ
GLP-1 製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性の検討
－ 2 型糖尿病モデル、STZ/HFD マウスにおけるレプチン抵抗性および糖代謝改善作用－

分担研究者：日下部 徹

京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 助教

研究要旨 一般の肥満者ではレプチン抵抗性の状態にあると考えられる。2 型糖尿病では肥満が原因で発症しているものも多く、レプチンの臨床応用にはレプチン抵抗性を改善する治療法の開発が重要である。近年、GLP-1 製剤をはじめとするインクレチン製剤が我が国でも承認され、広く臨床の現場で糖尿病治療における有用性が認識されるようになった。特に GLP-1 は膵β細胞における末梢作用のみならず、食欲抑制や体重抑制などの中枢作用が注目されている。そこで本研究では GLP-1 製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性を、レプチン抵抗性モデル、高脂肪食負荷マウスおよび 2 型糖尿病モデル、ストレプトゾトシン (STZ) /高脂肪食 (HFD) 負荷マウスを用いて検討した。レプチン単独では摂食抑制や体重減少が認められない高脂肪食負荷マウスにおいて、exendin-4 との共投与により摂食抑制および体重減少が増強されたことから、exendin-4 にはレプチン抵抗性改善作用があることが示唆された。またインスリン分泌能についてもレプチンと exendin-4 の共投与でさらなる増強効果が認められ、糖尿病治療におけるレプチンと GLP-1 製剤の共投与の有用性が示された。

A. 研究目的

我々はこれまでに脂肪萎縮性糖尿病、インスリン分泌低下型（1 型）糖尿病および非肥満 2 型糖尿病におけるレプチンの治療薬としての有用性を報告してきた (*Diabetes* 50: 1440-8, 2001、*Diabetologia* 46: 1329-37, 2003、*Diabetologia* 52: 675-83, 2009)。一方、レプチンは脂肪細胞より分泌されるホルモンであり、血中レプチン濃度は体脂肪量に比例して上昇する。一般の肥満者では血中レプチン濃度が上昇しているにもかかわらず肥満状態が是正されず、レプチン抵抗性の状態にあると考えられる。2 型糖尿病では肥満が原因で発症しているものも多く、糖尿病領域におけるさらなるレプチンの臨床応用拡大にはレプチン抵抗性を改善する治療法の開発が重要である。近年、GLP-1 製剤をはじめとするインクレチン製剤が我が国でも承認され、広く臨床の現場で糖尿病治療における有用性が認識されるようになった。特に GLP-1 は膵β細胞における末梢作用のみならず、食欲抑制や体重抑制などの中枢作用が注目されている。そこで本研究では GLP-1 製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性を、レプチン抵抗性モデル、高脂肪食負荷マウス

および 2 型糖尿病モデル、ストレプトゾトシン (STZ) /高脂肪食 (HFD) 負荷マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

GLP-1 製剤として DPP-4 による分解を受けない GLP-1 受容体アゴニストである exendin-4 を用いて検討した。まず、exendin-4 がレプチンの体重減少作用において高脂肪食負荷（45%高脂肪食、5 週間）により誘導したレプチン抵抗性を改善する作用があるかどうかを検討した。高脂肪食負荷マウスに対してレプチン単独、exendin-4 単独あるいはレプチン+exendin-4 を肩甲骨間皮下に留置した浸透圧ミニポンプを用いて 2 週間、持続投与を行い、摂食量、体重の変化と同時に糖脂質代謝についても検討を行った。次に、我々はこれまでにインスリン分泌低下型 2 型糖尿病モデル、Akita マウスにおいてレプチンが膵β細胞保護作用を有することを報告してきたことから、レプチン抵抗性とインスリン分泌低下を併せ持つ 2 型糖尿病モデル、STZ/HFD マウスを用いて、レプチンと exendin-4 共投与のインスリン分泌に及ぼす影響を検討した。

C. 研究結果

5 週間の高脂肪食負荷を行った C57BL/6J マウスにレプチン 500ng/g/day を 2 週間持続皮下投与しても生食投与群と比べ明らかな摂食量および体重に明らかな変化を認めなかった。一方、exendin-4 20ng/g/day の 2 週間持続皮下投与では、有意な摂食量の減少とともに明らかな体重の減少が観察された。さらにレプチン 500ng/g/day と exendin-4 20ng/g/day の共投与では、exendin-4 20ng/g/day よりさらに有意な摂食量と体重の減少が観察された。これらのことから exendin-4 にはレプチン抵抗性改善作用があるものと考えられた。また糖代謝についてもレプチン単独投与では生食投与群と比べ明らかな血糖値の改善は認められず、exendin-4 単独投与では有意な血糖低下が認められ、レプチンと exendin-4 の共投与ではさらなる血糖の低下が観察された。この時、レプチン単独投与では生食投与群と比べ明らかなインスリン感受性の改善は認められず、exendin-4 単独投与では有意なインスリン感受性の改善が認められ、レプチンと exendin-4 の共投与ではさらなるインスリン感受性の改善が観察された。一方、exendin-4 は膵β細胞に発現する GLP-1 受容体に作用することによりグルコース応答性インスリン分泌を増強することが知られている。そこで次の、STZ/HFD マウスを用いて膵β細胞機能に対するレプチンと exendin-4 共投与の治療効果を検討した。2 週間のレプチン単独投与によりインスリン分泌能の改善が認められたが、レプチンと exendin-4 の共投与によりさらなるインスリン分泌能の増強が観察された。

D. 考察

レプチン単独では摂食抑制や体重減少が認められない高脂肪食負荷マウスにおいて、exendin-4 との共投与により摂食抑制および体重減少が増強されたことから、exendin-4 にはレプチン抵抗性改善作用があることが示唆された。またインスリン分泌能についてもレプチンと exendin-4 の共投与でさらなる増強効果が認められ、糖尿病治療におけるレプチンと exendin-4 共投与の有用性が示された。レプチンは膵β細胞において脂肪毒性の解除を介したインスリン分泌能の改善作用が報告されており、GLP-1 製剤は膵β細胞に発現する GLP-1 受容体に作用することによりグルコース応答性インスリン分泌を増強することが知られている。今後、膵β細胞におけるレプチン

と GLP-1 製剤の相互作用についてさらなる検討が望まれる。

E. 結論

高脂肪食負荷マウスやストレプトゾトシン/高脂肪食負荷マウスの検討から、レプチン抵抗性を伴う 2 型糖尿病におけるレプチンと GLP-1 製剤の併用治療の有用性が示された。今後、相互作用におけるメカニズムのさらなる検討が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kusakabe T, Tanioka H, Ebihara K, Hirata M, Miyamoto L, Miyanaga F, Hige H, Aotani D, Fujisawa T, Masuzaki H, Hosoda K, Nakao K.. Beneficial effects of leptin on glycaemic and lipid control in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and a high-fat diet. *Diabetologia*. 52: 675-683, 2009.

2. 学会発表

国際学会

1. Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Hideki Tanioka, Masakazu Hirata, Lichit Miyamoto, Fumiko Miyanaga, Hideki Hige, Daisuke Aotani, Takeshi Fujisawa, Hiroaki Masuzaki, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Beneficial effects of leptin on glycemic and lipid control in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and a high-fat diet. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting, in Washington, D.C, June 10- 13, 2009
2. Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Takeru Sakai, Daisuke Aotani, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Yuji Yamamoto, Megumi Aizawa-Abe, Lichit Miyamoto, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Gene analysis of congenital generalized lipodystrophy in Japan. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, Japan, March 26- 30, 2010
3. Takeru Sakai, Toru Kusakabe, Ken Ebihara,

- Daisuke Aotani, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Takeshi Fujisawa, Yuji Yamamoto, Megumi Aizawa-Abe, Licht Miyamoto, Takashi Miyazawa, Kiminori Hosoda and Kazuwa Nakao. Gene analysis of congenital generalized lipodystrophy in Japan. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
4. Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Licht Miyamoto, Takeru Sakai, Daisuke Aotani, Yuji Yamamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Megumi Aizawa-Abe, Junji Fujikura, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Amylin enhances the effect of leptin on AMPK activity and energy metabolism in diet-induced obese mice. KEYSTONE SYMPOSIA, Whistler in Canada, April 12-17, 2010.
5. 谷大介、片岡祥子、山本祐二、阿部 恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和. アミリンによるレプチンの糖脂質代謝亢進作用の増強効果に関する検討. 第 53 日本糖尿病学会年次学術集会、2010/5/27-29、岡山
7. 目下部徹、海老原健、五百川仁見、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、山本祐二、阿部 恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和. LMNA 遺伝子異常を伴った部分性脂肪萎縮症に対するレプチン治療の効果. 第 53 日本糖尿病学会年次学術集会、2010/5/27-29、岡山
8. 目下部徹、海老原健、中尾一和. レプチンと膵β細胞由来ホルモン、アミリンの共投与による肥満治療の検討. 第 31 回日本肥満学会、2010/10/1-2、群馬
9. 伊賀那津子、目下部徹、海老原健、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、五百川仁見、海老原千尋、阿部 恵、山本祐二、藤倉純二、細田公則、中尾一和. 第 31 回日本肥満学会、第 20 回臨床内分泌代謝 Update、2011/1/28-29、北海道

国内学会

1. 目下部徹、海老原健、青谷大介、宮本理人、髭秀樹、藤澤武、山本祥子、益崎裕章、細田公則、中尾一和. レプチンの2型糖尿病治療薬としての有用性に関する検討. 第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
2. 目下部徹、海老原健、平田雅一、宮本理人、青谷大介、髭秀樹、山本祥子、益崎裕章、細田公則、中尾一和. 2型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての可能性に関する検討. 第 46 回日本臨床分子医学会学術集会、2009/4/12-13、東京
3. 目下部徹、海老原健、青谷大介、宮本理人、髭秀樹、藤澤武、山本祥子、益崎裕章、細田公則、中尾一和. 2型糖尿病とレプチン治療の意義. 第 10 回糖尿病と生活習慣病治療研究会、2009/6/27、京都
4. Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Hiroaki Masuzaki, Junji Fujikura, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Translational Research of Leptin in Type 2 diabetes. 第 14 回アディポサイエンス研究会シンポジウム、2009/8/22、大阪
5. 目下部徹. 2型糖尿病におけるレプチン治療の有用性に関する検討. 第 17 回臨床医科学フォーラム、2009/9/12、京都
6. 酒井 建、目下部徹、海老原健、宮本理人、青

E. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
平成 20～22 年度 分担研究報告書

脂肪萎縮症におけるトランスレーショナルリサーチ
—低用量ストレプトゾトシン/高脂肪食負荷マウスを用いた2型糖尿病におけるレプチンの治療薬としての有用性に関する検討—

分担研究者：益崎 裕章

京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 講師

研究要旨 これまでに我々は脂肪萎縮性糖尿病やインスリン分泌低下型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての有用性を報告してきた。本研究では、2型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての可能性について検討した。8週齢 C57BL/6J 雄性マウスにストレプトゾトシンと高脂肪食を負荷して2型糖尿病モデルマウス（STZ/HFD マウス）を作製し、レプチンの治療効果を検討した。STZ/HFD マウスでは、体脂肪量の増加、インスリン抵抗性およびインスリン分泌低下を伴う高血糖、脂質代謝異常、肝臓および骨格筋中性脂肪含量の増加が認められた。2週間のレプチン持続皮下投与（20ng/g/hr）により、STZ/HFD マウスにおいて摂食抑制、約5%の体重減少、インスリン感受性の改善を伴う血糖値の低下（ $487 \pm 21 \text{mg/dl}$ vs. $327 \pm 24 \text{mg/dl}$, $P < 0.01$ ）が認められた。また血中中性脂肪、遊離脂肪酸濃度は正常マウスと同等レベルにまで改善し、総コレステロール濃度の有意な低下が認められた。さらに脂肪酸酸化に関わる骨格筋 $\alpha 2$ -AMPKの活性上昇とともに肝臓および骨格筋中性脂肪含量の低下が認められた。今回の投与量で得られた血中レプチン濃度（30.8ng/ml）は、レプチンの臨床試験においても認められる濃度であることから、今回の検討により、2型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての可能性が示された。

A. 研究目的

脂肪細胞から分泌されるレプチンは、摂食抑制およびエネルギー消費亢進による体重減少作用やインスリン感受性亢進を伴う糖脂質代謝亢進作用など多彩な生理作用を有する。これまでレプチンの糖脂質代謝亢進作用に着目してモデル動物を用いた検討を行い、脂肪萎縮性糖尿病やインスリン分泌低下型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての可能性を報告し、さらにこれらの成果を踏まえて、ヒトの脂肪萎縮性糖尿病症例において長期のレプチン治療の有用性および安全性を証明した。本研究では、レプチンの抗糖尿病薬としての更なる臨床応用を目指して、2型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての可能性を2型糖尿病モデルマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

2型糖尿病モデルマウスは、8週齢の C57BL/6J 雄性マウスに、膵 β 細胞破壊によりインスリン分泌低下を来たすストレプトゾトシン（120 $\mu\text{g/g}$ ）と肥満およびインスリン抵抗性を誘導する高脂肪食（45kcal%）を負荷して作製した。このモデルマウス（STZ/HFD マウス）に対して浸透圧ミニボ

ンプを用いて2週間のレプチン持続皮下投与（20ng/g/hr）を行い、摂食量、体重、血中糖脂質代謝パラメータ（血糖、インスリン、中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール）、耐糖能試験、肝臓および骨格筋内中性脂肪含量、脂肪酸酸化に関わる酵素でレプチン感受性マーカーである AMPK の骨格筋における活性に対するレプチンの効果を評価した。

C. 研究結果

STZ/HFD マウスでは、正常マウスと比較して摂食量は1.3倍、体脂肪量は1.8倍の増加が認められ、平均血中レプチン濃度は8.6ng/mlで正常マウスの約2倍であった。これはヒトでは日本肥満学会判定基準の肥満1度（BMI 25 kg/m²以上 30kg/m²未満）に相当する。また高脂肪食負荷によりインスリン抵抗性が誘導されたが、高脂肪食のみ負荷したマウスと比較して血中インスリン濃度は40-50%減少しており、自由摂食下での平均血糖値は490mg/dlにまで上昇した。さらに血中中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール濃度の上昇、肝臓および骨格筋内中性脂肪含量の増加が認められた。レプチン投与中の STZ/HFD マウスの平均

血中レプチン濃度は 30.8ng/ml であり、既にヒト脂肪萎縮性糖尿病症例におけるレプチン治療において安全性が確認されている血中レプチン濃度範囲内であった。2 週間のレプチン持続投与により STZ/HFD マウスの摂食量は抑制され、約 5% の体重減少が認められた。さらに自由摂食下での平均血糖値は 327mg/dl にまで改善した。レプチン投与中、耐糖能試験ではインスリン分泌の増加はないがブドウ糖負荷後の血糖上昇が有意に抑制された。以上の所見より、レプチンがインスリン感受性を亢進させ耐糖能を改善したものと考えられた。また血中中性脂肪、遊離脂肪酸濃度は正常マウスと同等レベルにまで改善し、総コレステロール濃度も有意な低下が認められた。さらにレプチン持続投与により肝臓および骨格筋内中性脂肪含量はそれぞれ 35%、38%の低下が認められ、骨格筋 α 2-AMPK 活性は 1.8 倍に上昇していた。レプチン持続投与による骨格筋における脂肪酸酸化亢進が組織内中性脂肪含量低下に関与した可能性が示唆された。Pair-feeding 実験では、レプチン持続投与による摂食量の減少に加えて、摂食抑制作用とは独立したレプチンの糖脂質代謝改善作用が示めされた。

D. 考察

脂肪細胞由来ホルモンであるレプチンの血中濃度は体格指数 (BMI) や体脂肪量と良好な正相関を示す。したがって肥満者では一般に血中レプチン濃度の上昇が認められる。しかしながら肥満者では血中レプチン濃度が上昇しているにもかかわらず肥満が是正されないことから「レプチン抵抗性」の状態にあると考えられている。実際、平均 BMI 30.7 の肥満者を対象としたレプチン臨床試験 (JAMA 282: 1568-1575, 1999) ではレプチン治療により十分な減量効果が得られないことが報告されている。一方、今回の検討では血中レプチン濃度が 2 倍程度の肥満、すなわち BMI 25~30 程度の肥満を伴う 2 型糖尿病ではレプチン治療が効果を発揮することが明らかとなった。日本人 2 型糖尿病の大多数は BMI 30 未満であり、またレプチンは血糖値のみならず、減量効果や脂質代謝改善効果も有することから新しい糖尿病治療薬として期待される。

E. 結論

ストレプトゾトシンおよび高脂肪食負荷により作製したインスリン抵抗性、インスリン分泌低下、

肥満を伴う 2 型糖尿病モデルマウスを用いた検討により、2 型糖尿病においてレプチンが抗糖尿病薬として有用である可能性が示された。今後、2 型糖尿病におけるレプチンの新規抗糖尿病薬としての臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Y.S. Lee, A.Y. Kim, J. W. Choi, M. Kim, S. Yasue, H. J. Son, H. Masuzaki, K.S. Park, J.B. Kim. Dysregulation of Adipose GPx3 in Obesity Contributes to Local and Systemic Oxidative Stress. *Mol Endocrinol.* 9:2176-2189, 2008
2. N. Kobayashi, H. Masuzaki, T. Tanaka, S. Yasue, T. Ishii, N. Arai, T. Tomita, T. Miyawaki, T. Komeda, Y. Fukuda, N. Satoh, T. Kusakabe, M. Noguchi, J. Fujikura, F. Miyanaga, K. Ebihara, M. Hirata, K. Hosoda, H. Miyata, T.S. Sato, K. Nakao. Index of Systemic Balance of End Products of Glucocorticoid Metabolism in Fresh Urine from Humans: Its Potential Usefulness in the Evaluation of Obesity-Related Diseases. *Obes Res Clin Pract in press*, 2009
3. T. Ishii-Yonemoto, H. Masuzaki, S. Yasue, S. Okada, C. KOzuka, T. Tanaka, M. Noguchi, T. Tomita, J. Fujikura, Y. Yamamoto, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Nakao. Glucocorticoid reamplification within cells intensifies NF κ B and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes. *Am J Endocrinol Metab.* 298: E930-E940, 2009.

2. 学会発表

国際学会

1. H. Masuzaki, K. Nakao. Adiposcience-Based Approach toward Novel Therapies of the Metabolic Syndrome. The 65th KSBMB Annual Meeting Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology. in Seoul, Korea,

May 8, 2008

2. H. Masuzaki, K. Nakao. Central Melanocortin Signaling and Leptin Resistance. The First Meeting of the Japan Branch of the International Neuropeptide Society, in Tokyo, Japan 31st of August, 2008

国内学会

1. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、野口倫生、富田 努、田中智洋、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. マクロファージや未分化脂肪細胞における 11 β -HSD1 の向炎症的役割と病態的意義. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
2. 泰江慎太郎、益崎裕章、岡田定規、石井崇子、藤倉純二、平田雅一、海老原健、森本尚樹、細田公則、鈴木茂彦、中尾一和. 脂肪細胞組織由来レニン・アンジオテンシン系のメタボリックシンドロームにおける病態. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
3. 田中智洋、益崎裕章、泰江慎太郎、石井崇子、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. 高脂肪食下ニコチン投与は視床下部摂食調節神経核のエンドカナビノイド受容体発現を増加させる. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
4. 岡田定規、益崎裕章、泰江慎太郎、石井崇子、野口倫生、日下部徹、髭 秀樹、青谷大介、小鳥真司、森 栄作、富田 努、田中智洋、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. ヒト、マウス培養脂肪細胞を用いたアンジオテンシノジェン発現調節へのアプローチと脂肪組織 RAS の意義. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
5. 益崎裕章、中尾一和. レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 と糖尿病・肥満症：最近の知見. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
6. 益崎裕章. 肥満と RA 系の関係を探る. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
7. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、森 栄作、小鳥真司、髭 秀樹、青谷大介、日下部徹、野口倫生、富田 努、田中智洋、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. マクロファージや未分化脂肪細胞における 11 β -HSD1 の向炎症的役割と病態的意義. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
8. 泰江慎太郎、益崎裕章、岡田定規、石井崇子、日下部徹、髭 秀樹、青谷大介、小鳥真司、海老原健、平田雅一、藤倉純二、森本尚樹、内藤素子、細田公則、鈴木茂彦、中尾一和. 脂肪組織由来レニン・アンジオテンシン系のメタボリックシンドローム病態における意義. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
9. 岡田定規、益崎裕章、泰江慎太郎、石井崇子、野口倫生、日下部徹、髭 秀樹、青谷大介、小鳥真司、森 栄作、富田 努、田中智洋、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. ヒト、マウス培養脂肪細胞系を用いたアンジオテンシノジェン発現調節機構の解析. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
10. 益崎裕章、中尾一和. 脂肪組織 endocrine, intracrine system と全身の糖脂質代謝調節. 第 26 回日本内分泌代謝学サマーセミナー、2008/7/11-12、愛知
11. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、小塚智沙代、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. NF κ B や MAPK 活性化を介した細胞内グルココルチコイド活性化酵素の向炎症作用. 第 45 回日本臨床分子医学会学術集会、2008/7/24-25、神戸
12. 泰江慎太郎、益崎裕章、岡田定規、石井崇子、海老原健、平田雅一、藤倉純二、森本尚樹、小堀浩幸、細田公則、鈴木茂彦、中尾一和. 肥満における脂肪細胞由来アンジオテンシノジェン分泌 (A-AGT-S) の病態的意義. 第 45 回日本臨床分子医学会学術集会、2008/7/24-25、神戸
13. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、小塚智沙代、田中智洋、山本祐二、日下部徹、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. NF κ B・MAPK 活性化を介した肥満脂肪組織におけ

- る細胞内グルココルチコイド活性化酵素の向炎症作用のメカニズム. アディポサイエンス研究会シンポジウム、2008/8/22、大阪
14. 益崎裕章、泰江慎太郎、石井崇子、岡田定規、田中智洋、野口倫生、日下部徹、山本祐二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. ヒト脂肪組織バイオプシーによるメタボリックシンドロームの病態解析. アディポサイエンス研究会シンポジウム、2008/8/22、大阪
 15. 益崎裕章、田中智洋、中尾一和. Central Melanocortin Signaling and Leptin Resistance. 第35回日本神経内分泌学会、2008/8/31、東京都
 16. 益崎裕章、田中智洋、泰江慎太郎、海老原健、石井崇子、岡田定規、小塚智沙代、野口倫生、日下部徹、富田努、山本祐二、藤倉純二、平田雅一、細田公則、中尾一和. 中枢神経系と脂肪組織のコミュニケーション機構: 病態解明と創薬の展望. 千里ライフサイエンスセミナー、208/10/3、大阪
 17. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、小塚智沙代、野口倫生、富田努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. 肥満・脂肪細胞 NF κ B,MAPK シグナル活性化を介する脂肪細胞グルココルチコイド活性化酵素の pro-inflammatory な作用機構の解明. 第23回日本糖尿病合併症学会、2008/10/3-4、東京
 18. 泰江慎太郎、益崎裕章、岡田定規、石井崇子、山本祐二、藤倉純二、平田雅一、海老原健、森本尚樹、小堀浩幸、細田公則、鈴木茂彦、中尾一和. 肥満症における脂肪組織レニン・アンジオテンシン系の臨床的意義. 第29回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
 19. 岡田定規、益崎裕章、泰江慎太郎、石井崇子、小塚智沙代、田中智洋、山本祐二、日下部徹、野口倫生、富田努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. ミネラルコルチコイド受容体を介した新規の脂肪細胞アンジオテンシノジェン発現調節機構. 第29回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
 20. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、小塚智沙代、田中智洋、山本祐二、日下部徹、野口倫生、富田努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. NF κ B,MAPK 活性化を介する脂肪細胞グルココルチコイド活性化酵素の proinflammatory な作用機構. 第29回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
 21. 益崎裕章、海老原健、田中智洋、平田雅一、日下部徹、野口倫生、富田努、藤倉純二、細田公則、中尾一和. メタボリックシンドローム克服へのアプローチ 脂肪細胞ホルモン作用の賦活化によるメタボリックシンドローム克服の展望. 第29回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
 22. 益崎裕章、泰江慎太郎、野口倫生、田中智洋、日下部徹、富田努、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. Adiposcience-Based Approach toward Novel Therapies of the Metabolic Syndrome. 第29回日本肥満学会、第4回日韓合同シンポジウム、2008/10/17-18、大分
 23. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、小塚智沙代、田中智洋、山本祐二、日下部徹、野口倫生、富田努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. NF κ B・MAPK 活性化を介した肥満脂肪組織における細胞内グルココルチコイド活性化酵素の向炎症作用. 第45回日本糖尿病学会近畿地方会、2008/11/22、神戸
 24. 益崎裕章、泰江慎太郎、田中智洋、石井崇子、岡田定規、小塚智沙代、日下部徹、野口倫生、富田努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. 脂肪組織における細胞内グルココルチコイド活性化酵素の病態的役割とメタボリックシンドローム治療標的としての可能性. 第16回日本ステロイドホルモン学会学術総会、2008/11/22、福井
1. 益崎裕章、泰江慎太郎、田中智洋、石井崇子、岡田定規、小塚智沙代、日下部徹、野口倫生、富田努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. アディポサイエンスからメタボリックシンドローム治療を考える. 第12回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2008/11/29、熊本
- E. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (中尾一和)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Hotta, Y. Nakata, T. Matsuo, S. Komohara, K. Kotani, R. Komatsu, N. Itoh, I. Mineo, J. Wada, H. Masuzaki, M. Yoneda, A. Nakajima, S. Miyazaki, K. Tokunaga, M. Kawamoto, T. Funahashi, K. Hamaguchi, K. Yamada, T. Hanafusa, S. Oikawa, H. Yoshimatsu, K. Nakao, T. Sakata, Y. Matsuzawa, K. Tanaka, N. Kamatani, and Y. Nakamura.	Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese.	J. Hum. Genet	53	546-553	2008
H. Ariyasu, H. Iwakura, G. Yamada, K. Nakao, K. Kangawa, and T. Akamizu.	Efficacy of ghrelin as a therapeutic approach for age-related physiological changes.	Endocrinology	149	3722-3728	2008
K. Hotta, M. Kanamura, Y. Nakata, T. Matsuo, S. Kamohara, K. Kotani, R. Komatsu, N. Itoh, I. Mineo, J. Wada, H. Masuzaki, M. Yoneda, A. Nakajima, S. Miyazaki, K. Tokunaga, M. Kawamoto, T. Funahashi, K. Hamaguchi, K. Yamada, T. Hanafusa, S. Oikawa, H. Yoshimatsu, K. Nakao, T. Sakata, Y. Matsuzawa, K. Tanaka, N. Kamatani, and Y. Nakamura.	INSIG2 gene rs7566605 polymorphism is associated with severe obesity in Japanese.	J. Hum. Genet	53	857-862	2008
N. Oyamada, M. Sone, K. Miyashita, K. Park, D. Taura, M. Inuzuka, T. Sonoyama, H. Tsujimoto, Y. Fukunaga, N. Tamura, H. Itoh, and K. Nakao.	The role of mineralocorticoid receptor expression in brain remodeling after cerebral ischemia.	Endocrinology	149	3764-3777	2008
K. Nakao, A. Yasoda, K. Ebihara, K. Hosoda, M. Mukoyama.	Translational research of novel hormones: lessons from animal models and rare human diseases for common human diseases.	J Mol Med.	87	1029-1039	2009
M. Iwanishi, K. Ebihara, T. Kusakabe, W. Chen, J. Ito, H. Masuzaki, K. Hosoda, K. Nakao.	Clinical characteristics and efficacy of pioglitazone in a Japanese diabetic patient with an unusual type of familial partial lipodystrophy.	Metabolism	58	1681-1687	2009
G. Yamada, H. Ariyasu, H. Iwakura, H. Hosoda, T. Akamizu, K. Nakao, K. Kangawa.	Generation of Transgenic Mice Overexpressing a Ghrelin Analog.	Endocrinology	151	5935-5940	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Inuzuka, N. Tamura, N. Yamada, G. Katsuura, N. Oyamada, D. Taura, T. Sonoyama, Y. Fukunaga, K. Ohinata, M. Sone, <u>K. Nakao</u> .	C-type natriuretic peptide as a new regulator of food intake and energy expenditure.	Endocrinology	151	3633-3642	2010
H. Ariyasu, H. Iwakura, G. Yamada, N. Kanamoto, M. Bando, K. Kohno, T. Sato, M. Kojima, <u>K. Nakao</u> , K. Kangawa, T. Akamizu.	A postweaning reduction in circulating ghrelin temporarily alters growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing hormone in male mice but does not affect somatic growth.	Endocrinology	151	1743-1750	2010

雑誌 (海老原健)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
N. Yamada, G. Katsuura, I. Tatsuno, T. Asaki, S. Kawahara, <u>K. Ebihara</u> , Y. Saito, K. Nakao.	Orexin decreases mRNA expressions of NMDA and AMPA receptor subunits in rat primary neuron cultures.	Peptides	29	1582-1587	2008
N. Yamada, G. Katsuura, I. Tatsuno, S. Kawahara, <u>K. Ebihara</u> , Y. Saito, K. Nakao.	Orexins increase mRNA expressions of neurotrophin-3 in rat primary cortical neuron cultures.	Neurosci Lett	450	132-135	2009
X. Rong, Y. Li, <u>K. Ebihara</u> , M. Zhao, W. Aini, T. Kusakabe, M. Hirata, L. Miyamoto, M. Murray, K. Nakao.	An adipose tissue-independent insulin-sensitizing action of telmisartan: a study in lipodystrophic mice.	J Pharmacol Exp Ther	331	1096-1103	2009
X. Rong, Y. Li, <u>K. Ebihara</u> , M. Zhao, T. Kusakabe, T. Tomita, M. Murray, K. Nakao.	Irbesartan treatment up-regulates hepatic expression of PPARalpha and its target genes in obese Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats: a link to amelioration of hypertriglyceridaemia.	Br J Pharmacol	160	1796-1807	2010
X. Rong, Y. Li, <u>K. Ebihara</u> , M. Zhao, J. Naowaboot, T. Kusakabe, K. Kuwahara, M. Murray, K. Nakao.	Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice.	Diabetologia		In press	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H. Iwakura, H. Ariyasu, Y. Li, N. Kanamoto, M. Bando, G. Yamada, H. Hosoda, K. Hosoda, A. Shimatsu, K. Nakao, K. Kangawa, T. Akamizu	A mouse model of ghrelinoma exhibited activates growth hormone-insulin-like growth factor I axis and glucose intolerance.	Am J Physiol Endocrinol Metab	297	E802-E811	2009
D. Taura, M. Noguchi, M. Sone, K. Hosoda, E. Mori, Y. Okada, K. Takahashi, K. Homma, N. Oyamada, M. Inuzuka, T. Sonoyama, K. Ebihara, N. Tamura, H. Itoh, H. Suemori, N. Nakatsuji, H. Okano, S. Yamanaka, K. Nakao.	Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells.	FEBS Lett	583	1029-1033	2009
H. Iwakura, Y. Li, H. Ariyasu, H. Hosoda, N. Kanamoto, M. Bando, G. Yamada, K. Hosoda, K. Nakao, K. Kangawa, T. Akamizu.	Establishment of a novel ghrelin-producing cell line.	Endocrinology	151	2940-2945	2010
S. Okada, C. Kozuka, H. Masuzaki, S. Yasue, T. Ishii, Yonemoto, T. Tanaka, Y. Yamamoto, M. Noguchi, T. Kusakabe, T. Tomita, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, H. Sakaue, H. Kobori, M. Ham, YS. Lee, JB. Kim, Y. Saito, K. Nakao.	Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity.	Metabolism	59	1241-1251	2010
K. Tomiyama, R. Maeda, I. Urakawa, Y. Yamazaki, T. Tanaka, S. Ito, Y. Nabeshima, T. Tomita, S. Odori, K. Hosoda, K. Nakao, A. Imura, Y. Nabeshima	Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo.	Proc Natl Acad Sci U S A.	107	1666-1671	2010
S. Yasue, H. Masuzaki, S. Okada, T. Ishii, C. Kozuka, T. Tanaka, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, A. Katsurada, N. Ohashi, M. Urushihara, H. Kobori, N. Morimoto, T. Kawazoe, M. Naitoh, M. Okada, H. Sakaue, S. Suzuki, K. Nakao.	Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy.	Am J Hypertens	23	425-431	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Kusakabe, H. Tanioka, K. Ebihara, M. Hirata, L. Miyamoto, F. Miyanaga, H. Hige, D. Aotani, T. Fujisawa, H. Masuzaki, K. Hosoda, K. Nakao.	Beneficial effects of leptin on glycaemic and lipid control in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and a high-fat diet.	Diabetologia	52	675-683	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Y.S. Lee, A.Y. Kim, J. W. Choi, M. Kim, S. Yasue, H. J. Son, H. Masuzaki, K.S. Park, J.B. Kim.	Dysregulation of Adipose GPx3 in Obesity Contributes to Local and Systemic Oxidative Stress.	Mol Endocrinol	22	2716-2189	2008
N. Kobayashi, H. Masuzaki, T. Tanaka, S. Yasue, T. Ishii, T. Tomita, T. Miyawaki, T. Komeda, Y. Fukuda, T. Kusakabe, M. Noguchi, J. Fujikura, K. Ebihara, M. Hirata, K. Hosoda, N. Satoh, M. Nakajima, Y. Okabayashi, T. S. Satoh and K. Nakao.	Index of the systemic balance of end products of glucocorticoid metabolism in fresh urine from humans. Its potential usefulness in the evaluation of obesity-related diseases.	Obesity Research and Clinical Practice	3	53-63	2009
T. Ishii-Yonemoto, H. Masuzaki, S. Yasue, S. Okada, C. Kozuka, T. Tanaka, M. Noguchi, T. Tomita, J. Fujikura, Y. Yamamoto, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Nakao.	Glucocorticoid reamplification within cells intensifies NF κ B and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes.	Am J Physiol Endocrinol Metab	298	E930-E940	2009

Variations in the *FTO* gene are associated with severe obesity in the Japanese

Kikuko Hotta · Yoshio Nakata · Tomoaki Matsuo · Seika Kamohara · Kazuaki Kotani · Ryoya Komatsu · Naoto Itoh · Ikuo Mineo · Jun Wada · Hiroaki Masuzaki · Masato Yoneda · Atsushi Nakajima · Shigeru Miyazaki · Katsuto Tokunaga · Manabu Kawamoto · Tohru Funahashi · Kazuyuki Hamaguchi · Kentaro Yamada · Toshiaki Hanafusa · Shinichi Oikawa · Hironobu Yoshimatsu · Kazuwa Nakao · Toshiie Sakata · Yuji Matsuzawa · Kiyoji Tanaka · Naoyuki Kamatani · Yusuke Nakamura

Received: 22 January 2008 / Accepted: 9 March 2008 / Published online: 1 April 2008
© The Japan Society of Human Genetics and Springer 2008

Abstract Variations in the fat-mass and obesity-associated gene (*FTO*) are associated with the obesity phenotype in many Caucasian populations. This association with the obesity phenotype is not clear in the Japanese. To investigate the relationship between the *FTO* gene and obesity in the Japanese, we genotyped single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *FTO* genes from severely obese subjects ($n = 927$, body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m²) and normal-weight control subjects ($n = 1,527$, BMI < 25 kg/m²).

A case-control association analysis revealed that 15 SNPs, including rs9939609 and rs1121980, in a linkage disequilibrium (LD) block of approximately 50 kb demonstrated significant associations with obesity; rs1558902 was most significantly associated with obesity. *P* value in additive mode was 0.0000041, and odds ratio (OR) adjusted for age and gender was 1.41 [95% confidential interval (CI) = 1.22–1.62]. Obesity-associated phenotypes, which include the level of plasma glucose, hemoglobin A1c, total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and blood pressure were not associated with the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10038-008-0283-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. Hotta (✉)
Laboratory for Obesity, SNP Research Center,
RIKEN, 1-7-22 Suehiro, Tsurumi-ku, Yokohama,
Kanagawa 230-0045, Japan
e-mail: kikuko@src.riken.jp

Y. Nakata · T. Matsuo · K. Tanaka
Institute of Health and Sport Sciences,
University of Tsukuba, Ibaraki, Japan

S. Kamohara
Medicine and Health Science Institute,
Tokyo Medical University, Tokyo, Japan

K. Kotani · T. Funahashi · Y. Matsuzawa
Department of Metabolic Medicine,
Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

R. Komatsu
Rinku General Medical Center, Osaka, Japan

N. Itoh
Toyonaka Municipal Hospital, Osaka, Japan

I. Mineo
Otemae Hospital, Osaka, Japan

J. Wada
Department of Medicine and Clinical Science,
Okayama University Graduate School of Medicine
and Dentistry, Okayama, Japan

H. Masuzaki · K. Nakao
Department of Medicine and Clinical Science,
Kyoto University Graduate School of Medicine,
Kyoto, Japan

M. Yoneda · A. Nakajima
Division of Gastroenterology, Yokohama City University
Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan

S. Miyazaki
Tokyo Postal Services Agency Hospital,
Tokyo, Japan

K. Tokunaga
Itami City Hospital, Hyogo, Japan

M. Kawamoto · N. Kamatani
Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University,
Tokyo, Japan

rs1558902 genotype. Thus, the SNPs in the *FTO* gene were found to be associated with obesity, i.e., severe obesity, in the Japanese.

Keywords Fat-mass and obesity-associated gene · Obesity · Japanese population · Association · SNP

Introduction

Obesity is the most common nutritional disorder in developed countries, and it is a major risk factor for hypertension, cardiovascular disease, and type 2 diabetes (Kopelman 2000; Wilson et al. 2003). Genetic and environmental factors contribute to obesity development (Maes et al. 1997; Barsh et al. 2000; Rankinen et al. 2006). Recent progress in single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping techniques has enabled genome-wide association studies on common diseases (Herbert et al. 2006; Frayling et al. 2007; Scuteri et al. 2007; The Wellcome Trust Case Control Consortium 2007; Hinney et al. 2007). Using a large-scale case-control association study, we found that secretogranin III (SCG3) (Tanabe et al. 2007) and myotubularin-related protein 9 (MTMR9) (Yanagiya et al. 2007) are involved in susceptibility to the obesity phenotype. Genome-wide association studies have shown that the fat-mass and obesity-associated gene (*FTO*) is also associated with the obesity phenotype (Frayling et al. 2007; Scuteri et al. 2007; Hinney et al. 2007). This association was also

found in many Caucasian and Hispanic American populations (Frayling et al. 2007; Scuteri et al. 2007; Dina et al. 2007; Field et al. 2007; Andreassen et al. 2008; Wählén et al. 2008; Peeters et al. 2008), whereas it was not found in the Chinese Han population (Li et al. 2008). Among Japanese, body mass index (BMI) was higher in subjects who had the A allele of rs9939609, similar to that observed in Caucasians; however, this finding was not significant (Horikoshi et al. 2007). Another group reported that rs9939609 was associated with BMI in the Japanese (Omori et al. 2008). Thus, the association of SNPs in the *FTO* gene with obesity in the Japanese remains controversial.

To investigate the relationship between the *FTO* gene and obesity in the Japanese, we performed a case-control association study using patients with severe adult obesity (BMI ≥ 30 kg/m²) and normal-weight controls (BMI < 25 kg/m²); we found that SNPs in intron 1 of the *FTO* gene were associated with severe adult obesity.

Materials and methods

Study subjects

The sample size for severely obese Japanese subjects (BMI ≥ 30 kg/m²) was 927 (male:female ratio 419:508, age 48.7 ± 14.2 years, BMI 34.2 ± 5.4 kg/m²), whereas that for Japanese normal weight controls (BMI < 25 kg/m²) was 1,527 (male:female ratio 685:842, age 48.1 ± 16.5 years, BMI 21.7 ± 2.1 kg/m²). The severely obese subjects were recruited from among outpatients of medical institutes. Patients with secondary obesity and obesity-related hereditary disorders were not included, and neither were patients with medication-induced obesity. The normal-weight controls were recruited from among subjects who had undergone a medical examination for screening of common diseases. Clinical features of the subjects are illustrated in Table 1. Additionally, 1,604 subjects were recruited (male:female ratio 803:801, age 48.7 ± 16.9 years, BMI 22.66 ± 3.16 kg/m²) from the Japanese general population. Each subject provided written informed consent, and the protocol was approved by the ethics committee of each institution and that of RIKEN.

DNA preparation and SNP genotyping

Genomic DNA was prepared from the blood sample of each subject by using the Genomix (Talent Srl, Trieste, Italy). We searched for dbSNPs with minor allele frequencies (MAF) > 0.10 in the *FTO* gene of Japanese people. We selected 90 SNPs and were able to construct Invader probes (Third Wave Technologies, Madison, WI)

K. Hamaguchi
Department of Community Health and Gerontological Nursing,
Faculty of Medicine, Oita University, Oita, Japan

K. Yamada
Division of Endocrinology and Metabolism,
Department of Medicine, Kurume University, Fukuoka, Japan

T. Hanafusa
First Department of Internal Medicine,
Osaka Medical College, Osaka, Japan

S. Oikawa
Division of Endocrinology and Metabolism,
Department of Medicine, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

H. Yoshimatsu · T. Sakata
Department of Anatomy, Biology and Medicine,
Faculty of Medicine, Oita University, Oita, Japan

N. Kamatani
Laboratory for Statistical Analysis,
SNP Research Center, RIKEN, Tokyo, Japan

Y. Nakamura
Laboratory for Molecular Medicine, Human Genome Center,
The Institute of Medical Science, University of Tokyo,
Tokyo, Japan

Table 1 Clinical characterization of obese and control subjects

	Obese	Control	<i>P</i> value
Gender (M/F)	419/508	658/842	
Age (year)	49.1 ± 14.2	48.2 ± 16.5	0.049
Body mass index (kg/m ²)	34.50 ± 5.39	21.65 ± 2.08	<0.000001
Glucose (mg/dl)	129.2 ± 49.6	97.7 ± 23.9	<0.000001
HbA1c (%)	6.5 ± 1.8	5.1 ± 0.6	<0.000001
Total cholesterol (mg/dl)	209.9 ± 37.9	201.2 ± 36.4	<0.000001
Triglycerides (mg/dl)	153.2 ± 99.5	104.0 ± 73.2	<0.000001
High-density lipoprotein cholesterol (mg/dl)	53.1 ± 18.9	65.1 ± 15.7	<0.000001
Systolic blood pressure (mmHg)	136.4 ± 18.1	123.4 ± 17.8	<0.000001
Diastolic blood pressure (mmHg)	83.8 ± 12.0	76.0 ± 11.1	<0.000001

P values were analyzed using Mann–Whitney *U* test. Data are mean ± standard deviation

for them (Supplementary Table 1). SNPs were genotyped using Invader assays as described previously (Ohnishi et al. 2001; Takei et al. 2002). Nine SNPs (rs9937053, rs9939973, rs9940128, rs7193144, rs8043757, rs9923233, rs9926289, rs9939609, and rs9930506) reported in a previous genome-wide association study (Scuteri et al. 2007) were genotyped using TaqMan probes (C_29910458_10, C_11776771_10, C_29621384_10, C_29387650_10, C_29387665_10, C_29693738_10, C_30270568_10, C_30090620_10, and C_29819994_10; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

Genotype or allele frequencies were compared between cases and controls in three different modes. In the first mode, i.e., the additive mode, χ^2 test was performed according to Sladek et al. (Sladek et al. 2007). In the second mode, i.e., the minor allele recessive mode, frequencies of the homozygous genotype for the minor allele were compared using a 2×2 contingency table. In the third mode, i.e., the minor allele dominant mode, frequencies of the homozygous genotype for the major allele were compared using a 2×2 contingency table. A test of independence was performed using Pearson's χ^2 method. *P* values were corrected by Bonferroni adjustment and $P < 0.00017$ [(total SNP number)/3 (number of modes)] was considered significant. The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were calculated by Woolf's method. We coded genotypes as 0, 1, and 2, depending on the number of copies of the risk alleles. OR adjusted for age and gender was calculated using multiple logistic regression with genotypes, age, and gender as independent variables. Hardy–Weinberg equilibrium was assessed using the χ^2 test (Nielsen et al. 1998). Haplotype blocks were determined using Haploview (Barrett et al. 2005). Simple comparison of the clinical data among the different genotypes was performed using one-way analysis

of variance (ANOVA). Simple comparison of the clinical data between case and control groups was analyzed using Mann–Whitney *U* test. Difference in BMI between genotypes was analyzed using a multiple linear regression, with BMI as the dependent variable and genotype as the independent variable, and with gender and age as covariates for BMI. Statistical analyses were performed using StatView 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Power was calculated by the Monte Carlo method.

Results

Case-control association studies

We searched for dbSNPs with MAF > 0.10 in the *FTO* gene. By using Invader and TaqMan assay, we successfully genotyped 99 SNPs spanning the *FTO* gene (Supplementary Table 1). Using these SNPs, we performed tests of independence between the phenotype and genotypes of obesity at each SNP by using severely obese subjects (BMI ≥ 30 kg/m²) and normal weight controls (BMI < 25 kg/m²). For each SNP, the lowest *P* value among the three different modes was selected as the minimum *P* value. All SNPs, including rs1421084, were in Hardy–Weinberg equilibrium ($P > 0.01$) (Supplementary Table 1).

The power of the test was calculated by Monte Carlo method with different MAFs and different effect sizes. Effect of the risk allele on penetrance was assumed to be multiplicative; i.e., the penetrances for three genotypes were assumed to be a , ar , and ar^2 , respectively, where a and r denote the lowest penetrance and genotype relative risk, respectively. Supplementary Table 2 shows the calculated values of the power of the test with different MAFs and different genotype relative risks (r). The lowest penetrance (a) was calculated for each gender by assuming the affection rates of 2.3% for men and 3.4% for women (Yoshiike et al. 2002). Genotype relative risk (r) was assumed to be

the same for both genders. Supplementary Table 2 shows that the test has significant power at relative high risk allele frequency when genotype relative risk is >1.7 .

As shown in Fig. 1 and Supplementary Table 1, 15 SNPs demonstrated significant associations with the obesity phenotype; the threshold of significance using Bonferroni correction was $P < 0.00017$. These SNPs included rs9939609 (Frayling et al. 2007) and rs1121980 (Hinney et al. 2007) that were reported to be significantly associated with the obesity phenotype in the Caucasian population, as determined by genome-wide association studies; rs9930506 (Scuteri et al. 2007) showed marginal association with obesity in the Japanese. Linkage disequilibrium (LD) analysis revealed that these 15 SNPs were in almost complete LD ($D' > 0.98$, $r^2 > 0.80$) and were located within the same LD block of approximately 50 kb (Fig. 1). The most significant association was observed for rs1558902 [additive mode, $P = 0.0000041$ and allele-specific OR (95% CI) adjusted for age and gender was 1.41 (1.22–1.62)]. The minor alleles of rs9939609 (MAF = 0.24) and rs1121980 (MAF = 0.26) were significantly more frequent in the obese group than in the normal-weight control group (additive mode, $P = 0.000012$ and $P = 0.000051$, respectively), and ORs were 1.38 (95% CI = 1.20–1.59) and 1.33 (95% CI = 1.16–1.52), respectively (Table 2, Supplementary Table 1). The MAF of both SNPs in the control group was 0.18; this was consistent with data obtained from the haplotype map of the human genome (HapMap) (Supplementary Table 1). Our data indicated that the SNPs in the

FTO gene were associated with severe obesity in the Japanese.

Analysis of various quantitative phenotypes with rs1558902

To investigate whether the genotypes of SNP rs1558902 are associated with the phenotypes of metabolic disorders, we compared the following among the different genotypes in the cases, controls, and combined groups: ANOVA results, BMI, levels of fasting plasma glucose, hemoglobin A1c (HbA1c), total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol, and blood pressure. As rs1558902 showed the most significant association with obesity and its call rate was the highest, we analyzed various quantitative phenotypes by using this SNP. The quantitative phenotypes regarding BMI and the levels of fasting plasma glucose, HbA1c, total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol, and blood pressure were not found to be significantly associated with the genotypes at rs1558902 in either the case or control group (Table 3). Although there was no significant difference in BMI values among genotypes in either the control or case group, the direction of the difference (AA > AT > TT) was in accordance with the association between the qualitative obesity phenotype and the genotype shown.

Finally, we examined the BMI distribution of rs1558902 in the Japanese general population and found that rs1558902 genotype was significantly associated with BMI

Fig. 1 Linkage disequilibrium (LD) mapping, polymorphisms, and *P* values obtained in the test of independence between the phenotype and genotypes of obesity at various single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the fat-mass and obesity-associated gene (*FTO*) gene. *P* values are expressed as negative logarithm of the minimum *P* values obtained in the three models (additive, minor allele dominant, and minor allele recessive modes). LD coefficients (D') between each pair of SNPs were calculated and are displayed as a strand in the LD blocks. Minor allele frequencies of all SNPs used in this analysis are $\geq 10\%$. The genomic structure is shown in the upper. The gray bar marks the LD block associated with obesity

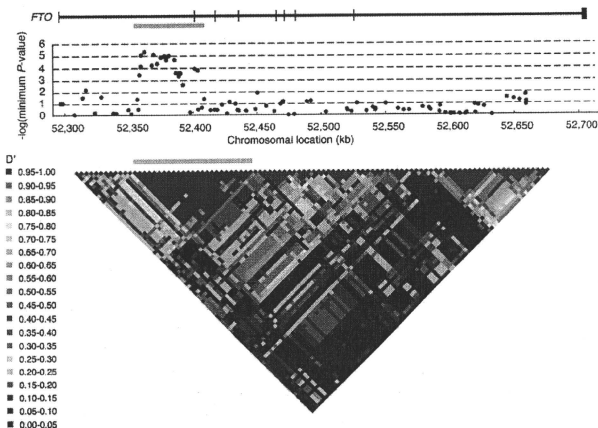


Table 2 Associations of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the fat-mass and obesity-associated gene (*FTO*) gene with obesity existing in the 50-kb linkage disequilibrium (LD) block

dbSNP ID	Allele	Genotype						Case						Control						Additive mode						Recessive mode						Dominant mode					
		1/2		11		12		22		Sum		11		12		22		Sum		OR (95% CI)		χ^2		P value		OR (95% CI)		χ^2		P value		OR (95% CI)		χ^2		P value	
		1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	OR	(95% CI)	χ^2		P	value	OR	(95% CI)	χ^2		P	value	OR	(95% CI)	χ^2		P	value
rs9937053	A/G	59	360	494	913	63	414	773	1250	1.31	(1.13–1.51)	12.3	0.00047	2.0	0.16	1.30	(0.90–1.88)	13.0	0.00031	1.37	(1.16–1.63)																
rs9939973	A/G	61	367	496	924	75	504	941	1520	1.32	(1.15–1.51)	15.7	0.000077 ^a	3.0	0.081	1.36	(0.96–1.93)	16.1	0.000061 ^a	1.40	(1.19–1.66)																
rs9940128	A/G	60	366	498	924	75	500	941	1516	1.31	(1.15–1.50)	15.2	0.00010 ^a	2.6	0.11	1.33	(0.94–1.89)	15.9	0.000068 ^a	1.40	(1.19–1.65)																
rs1421085	C/T	49	338	537	924	57	443	1019	1519	1.38	(1.20–1.59)	19.6	0.000011 ^a	3.3	0.068	1.44	(0.97–2.12)	20.0	0.0000078 ^a	1.47	(1.24–1.74)																
rs1558902	A/T	48	341	536	925	52	449	1021	1522	1.41	(1.22–1.62)	21.2	0.0000041 ^a	4.6	0.032	1.55	(1.04–2.31)	20.8	0.0000052 ^a	1.48	(1.25–1.75)																
rs1121980	A/G	61	367	499	927	73	504	947	1524	1.33	(1.16–1.52)	16.5	0.000051 ^a	3.6	0.059	1.40	(0.99–1.99)	16.5	0.000050 ^a	1.41	(1.19–1.66)																
rs7193144	C/T	49	339	532	920	55	447	1014	1516	1.39	(1.21–1.61)	20.4	0.0000067 ^a	4.0	0.044	1.49	(1.01–2.22)	20.3	0.0000057 ^a	1.47	(1.24–1.74)																
rs8043757	T/A	48	319	541	908	54	436	1027	1517	1.36	(1.18–1.57)	17.4	0.000037 ^a	4.2	0.040	1.51	(1.02–2.25)	16.4	0.000052 ^a	1.42	(1.20–1.69)																
rs8050136	A/C	51	336	538	925	56	450	1018	1524	1.38	(1.20–1.59)	19.4	0.000012 ^a	4.7	0.031	1.53	(1.04–2.26)	18.5	0.000017 ^a	1.45	(1.22–1.71)																
rs3751812	T/G	51	340	534	925	55	458	1013	1526	1.38	(1.20–1.59)	19.6	0.0000098 ^a	5.1	0.024	1.56	(1.06–2.31)	18.5	0.000017 ^a	1.45	(1.22–1.71)																
rs9923233	C/G	51	335	533	919	55	449	1010	1514	1.38	(1.20–1.60)	19.8	0.0000093 ^a	5.0	0.025	1.56	(1.06–2.30)	18.7	0.000015 ^a	1.45	(1.23–1.72)																
rs9926289	A/G	50	323	531	904	56	425	993	1474	1.37	(1.19–1.58)	18.7	0.000020 ^a	3.9	0.047	1.48	(1.00–2.19)	18.1	0.000021 ^a	1.45	(1.22–1.72)																
rs9939609	A/T	51	334	534	919	56	443	1005	1504	1.38	(1.20–1.59)	19.5	0.000012 ^a	4.5	0.034	1.52	(1.03–2.24)	18.7	0.000015 ^a	1.45	(1.23–1.72)																
rs7185735	G/A	51	340	536	927	55	455	1014	1524	1.38	(1.20–1.59)	19.9	0.0000089 ^a	5.0	0.025	1.55	(1.05–2.30)	18.8	0.000014 ^a	1.45	(1.23–1.72)																
rs9931494	G/C	64	363	494	921	71	504	942	1517	1.35	(1.18–1.55)	18.4	0.000018 ^a	5.6	0.018	1.52	(1.07–2.15)	16.9	0.000039 ^a	1.42	(1.20–1.67)																
rs17817964	T/C	62	361	500	923	68	524	930	1522	1.30	(1.14–1.49)	13.5	0.00022	5.8	0.016	1.54	(1.08–2.19)	11.4	0.00075	1.33	(1.13–1.57)																
rs9930506	G/A	67	365	488	920	82	521	913	1516	1.28	(1.12–1.46)	12.8	0.00038	3.5	0.061	1.37	(0.98–1.92)	12.1	0.00051	1.34	(1.14–1.58)																
rs9932754	C/T	66	368	491	925	78	525	919	1522	1.29	(1.13–1.48)	13.6	0.00023	4.2	0.040	1.42	(1.01–2.00)	12.6	0.00040	1.35	(1.14–1.59)																
rs9922619	T/G	66	368	489	923	78	529	919	1526	1.29	(1.13–1.48)	13.5	0.00024	4.3	0.038	1.43	(1.02–2.01)	12.3	0.00044	1.34	(1.14–1.58)																
rs7204609	C/T	134	418	373	925	273	717	529	1519	0.83	(0.73–0.93)	9.68	0.0022	5.0	0.025	0.77	(0.62–0.97)	7.5	0.0063	0.79	(0.67–0.94)																
rs12149832	A/G	53	349	525	927	62	480	982	1524	1.33	(1.15–1.53)	15.2	0.000098 ^a	3.5	0.061	1.43	(0.98–2.08)	14.8	0.00012 ^a	1.39	(1.17–1.64)																

The odds ratio (OR) for each SNP was adjusted simultaneously for age and gender using additive model

CI confidence interval, χ^2 chi-square

^a Significant P value ($P < 0.00017$)

Table 3 Comparison of various quantitative phenotypes among different genotypes at single nucleotide polymorphism (SNP) rs1558902 in obese and control subjects

	Obese			Control		
	AA (n = 48)	AT (n = 341)	TT (n = 536)	AA (n = 52)	AT (n = 448)	TT (n = 1022)
Age (year)	49.8 ± 15.3	49.6 ± 14.3	48.8 ± 14.1	46.9 ± 15.4	46.9 ± 16.7	48.8 ± 16.5
P value		0.64			0.098	
BMI (kg/m ²)	35.16 ± 5.70	34.61 ± 5.43	34.39 ± 5.33	21.94 ± 2.23	21.62 ± 2.10	21.65 ± 2.06
P value		0.58			0.56	
Glucose (mg/dl)	142.8 ± 54.8	125.4 ± 43.2	130.8 ± 53.3	101.7 ± 44.1	96.3 ± 18.1	98.2 ± 24.7
P value		0.054			0.34	
HbA1c (%)	6.9 ± 2.1	6.4 ± 1.7	6.5 ± 1.8	5.1 ± 1.2	5.0 ± 0.5	5.1 ± 0.7
P value		0.19			0.15	
Total cholesterol (mg/dl)	215.1 ± 46.7	211.3 ± 38.8	208.6 ± 36.6	195.6 ± 38.8	201.4 ± 37.8	201.4 ± 35.6
P value		0.37			0.53	
Triglycerides (mg/dl)	171.7 ± 119.5	151.3 ± 102.1	153.2 ± 96.0	111.7 ± 70.6	102.0 ± 71.4	104.4 ± 74.2
P value		0.42			0.63	
HDL cholesterol (mg/dl)	53.2 ± 13.8	54.8 ± 24.0	52.0 ± 15.4	62.1 ± 14.2	65.1 ± 15.9	65.3 ± 15.6
P value		0.14			0.53	
SBP (mmHg)	134.2 ± 20.4	137.0 ± 17.8	136.2 ± 18.2	122.7 ± 17.3	123.2 ± 18.8	123.5 ± 17.5
P value		0.61			0.91	
DBP (mmHg)	80.3 ± 11.7	84.1 ± 12.0	83.9 ± 12.0	75.5 ± 11.1	75.2 ± 11.7	76.3 ± 10.9
P value		0.14			0.22	

Data of each quantitative phenotype were compared among different genotypes at the rs1558902 in obese and control subjects. *P* values were analyzed using analysis of variance in each group of obese and control subjects. Data are mean ± standard deviation.

HDL high-density lipoprotein, *SBP* systolic blood pressure, *DBP* diastolic blood pressure.

Table 4 Association of body mass index (BMI) with rs1558902 genotypes in the Japanese general population

	AA	AT	TT	<i>P</i> value (additive model) ^a
BMI (kg/m ²) (n)	23.17 ± 3.20 (59)	22.79 ± 3.26 (482)	22.57 ± 3.11 (1063)	0.041

^a The difference in BMI according to genotypes was analyzed using a multiple linear regression, with BMI as the dependent variable and genotype as the independent variable and with gender and age as covariates for BMI. Data are represented as mean ± standard deviation

(Table 4). This result would confirm the association of rs1558902 with obesity.

Discussion

Recent genome-wide association studies have shown that the *FTO* gene is associated with obesity (Frayling et al. 2007; Scuteri et al. 2007; Hinney et al. 2007). The associations between variations in the *FTO* gene and the obesity phenotype have been observed in many Caucasian subjects (Frayling et al. 2007; Scuteri et al. 2007; Dina et al. 2007; Field et al. 2007; Andreasen et al. 2008; Wåhlén et al. 2008; Peeters et al. 2008). However, these associations were controversial with regard to Asian subjects (Horikoshi et al. 2007; Li et al. 2008; Omori et al. 2008). BMI values did not significantly differ among the genotypes in the general population of Chinese and

Japanese (Horikoshi et al. 2007; Li et al. 2008). We performed a case-control association study with regard to severe obesity and found that the SNPs in the *FTO* gene were significantly associated with severe obesity. Although the SNPs demonstrated the most significant association in the Japanese, which was different from that in Caucasians, the significantly associated SNPs existed in a similar block as that in Caucasians. Therefore, the *FTO* gene could also contribute to the development of severe obesity in the Japanese.

BMI was modestly different among rs1558902 genotypes in the general population in this study; rs9939609 was not significantly associated with BMI in the general population (AA 23.22 ± 3.14 vs AT 22.79 ± 3.25 vs TT 22.58 ± 3.13, *P* = 0.063). In the Japanese population, rs1558902 may be more tightly associated with BMI than rs9939609. The National Nutrition Survey of Japan reported that the prevalence of subjects with a BMI of

$\geq 30 \text{ kg/m}^2$ is only 2.3% in men and 3.4% in women aged 20 years and older (Yoshiike et al. 2002), and the mean BMI was approximately 23 kg/m^2 for ages 15–84 years (Yoshiike et al. 1998). Inconsistency in the results of effects of variations in the *FTO* gene on BMI between Japanese and Europeans may be due to the relatively small mean and variance of BMI in the former than the latter.

The significant SNPs were located in intron 1 of the *FTO* gene. The rs1558902 and other significant SNPs, for example, rs9939609 and rs1121980, would affect transcriptional activity of the *FTO* gene, although further investigation is necessary. The precise mechanism by which the *FTO* gene leads to obesity development is unclear (Gerken et al. 2007; Sanchez-Pulido et al. 2007). However, the *FTO* gene is expressed in the hypothalamus and regulated by fasting and leptin (Frayling et al. 2007; Gerken et al. 2007). Using large-scale case-control association studies, we determined that the *SCG3* (Tanabe et al. 2007) and *MTMR9* (Yanagiya et al. 2007) genes are involved in susceptibility to the obesity phenotype. These two genes are expressed in the hypothalamus. Genetic studies in mice have suggested that mutations in several genes, such as those encoding leptin, proopiomelanocortin, and melanocortin-4 receptor, are implicated in a monogenic form of inherited obesity (Barsh et al. 2000; Rankinen et al. 2006). Such mutations have also been reported in obese humans. As most such genes are expressed in the hypothalamus and have been indicated to play important roles in the regulation of food intake, genes expressed in the hypothalamus are likely to be good candidates for susceptibility to obesity.

In summary, we have identified the genetic variations in the *FTO* gene that may influence the risk of severe obesity in the Japanese.

Acknowledgments We thank Dr. Chisa Nakagawa (Otemae Hospital), Dr. Hideki Asakawa (Itami City Hospital), Ms. Yuko Ohta, Mr. Fumitaka Sakurai, Mr. Michihiro Nakamura, and Ms. Chiaki Ohkura for their contribution to our study. This work was supported by a grant from the Japanese Millennium Project and Takeda Science Foundation (KH).

References

- Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, Torkov SS, Wegner L, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, Borch-Johnsen K, Rasmussen SS, Clausen JO, Sandbaek A, Lauritzen T, Hansen L, Jørgensen T, Pedersen O, Hansen T (2008) Low physical activity accentuates the effect of the *FTO* rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 57:95–101
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265
- Barsh GS, Farooqi IS, O’Rahilly S (2000) Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404:644–651
- Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, Carlsson LMS, Kiess W, Vatin V, Lecoœur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Stunff CL, Bougnères P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chèvre JC, Froguel P (2007) Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39:724–726
- Field SF, Howson JM, Walker NM, Dunger DB, Todd JA (2007) Analysis of the obesity gene *FTO* in 14,803 type 1 diabetes cases and controls. *Diabetologia* 50:2218–2220
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JRB, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJF, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CNA, Doney ASF, Morris AD, Smith GD, The Wellcome Trust Case Control Consortium, Hattersley AT, McCarthy MI (2007) A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316:889–894
- Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GSH, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA, Galvanovskis J, Rorsman P, Robins P, Prieur X, Coll AP, Ma M, Jovanovic Z, Farooqi IS, Sedgwick B, Barroso I, Lindahl T, Ponting CP, Ashcroft FM, O’Rahilly S, Schofield CJ (2007) The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318:1469–1472
- Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, Heid IM, Pfeuffer A, Illig T, Wichmann HE, Meitinger T, Hunter D, Hu FB, Colditz G, Hinney A, Hebebrand J, Koberwitz K, Zhu X, Cooper R, Ardlie K, Lyon H, Hirschhorn JN, Laird NM, Lenburg ME, Lange C, Christman MF (2006) A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science* 312:279–283
- Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Brønner G, Müller TD, Grallert H, Illig T, Wichmann HE, Rief W, Schäfer H, Hebebrand J (2007) Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (*FTO*) variants. *PLoS ONE* 2:e1361–e1365
- Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T (2007) Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50:2461–2466
- Kopelman PG (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635–643
- Li H, Wu Y, Loos RJ, Hu FB, Liu Y, Wang J, Yu Z, Lin X (2008) Variants in the fat mass- and obesity-associated (*FTO*) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. *Diabetes* 57:264–268
- Maes HHM, Neale MC, Eaves LJ (1997) Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 27:325–351
- Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y (2001) A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J Hum Genet* 46:471–477
- Omori S, Tanaka Y, Takahashi A, Hirose H, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S (2008) Association of CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8 and KCNJ11 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetes* 57:791–795
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* 14:529–644
- Nielsen DM, Ehm MG, Weir BS (1998) Detecting marker-disease association by testing for Hardy–Weinberg disequilibrium at a marker locus. *Am J Hum Genet* 63:1531–1540