

糖尿病関連遺伝子群の解明

●牧野英一 ◆大澤春彦 ◆大沼 裕

愛媛大学医学部

＜研究の目的と進め方＞

近年、糖尿病患者数は全世界において急増しており、その発症前診断と予防が急務である。しかしながら遺伝子診断に用いることが可能なDNAマーカーは現在のところない。そこで本研究では、日本人の糖尿病感受性マーカーあるいは原因遺伝子を同定することを目的とする。以下の2つを中心として進める。

- 1) SNPなどのマーカーによるハプロタイプや遺伝子型を作成し、候補遺伝子単独あるいは複数の組合せにより糖尿病との関連を解析する。
- 2) インスリン抵抗性の有力候補であるphosphodiesterase 3B (PDE3B)の活性化制御因子をクローニングし、糖尿病との関連を解析する。

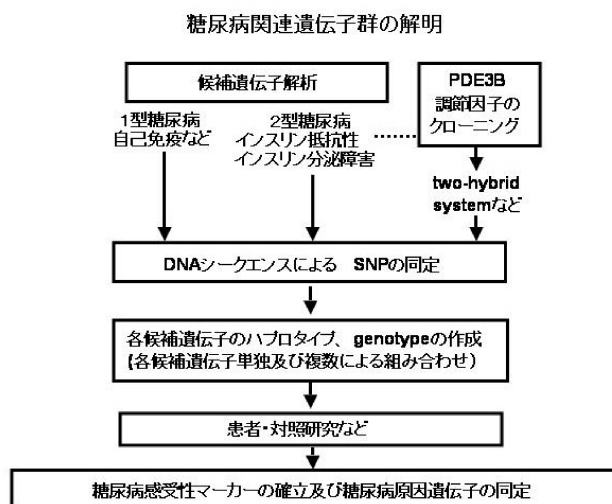


図1. 研究計画

＜研究開始時の研究計画＞

目的1. 糖尿病感受性マーカー及び原因遺伝子の同定

I. DNAサンプルの収集及び倫理面への配慮

愛媛及び千葉県下において、それぞれ1型糖尿病患者300例、2型糖尿病患者及び対照者各1000例を目標に末梢血中の白血球からDNAを抽出する。

倫理面では、本研究は連結可能匿名化、結果非開示の研究として、3省の新基準に準拠した計画書及び同意書が愛媛大学医学部倫理委員会により平成13年8月24日に承認された。DNA提供者には、研究内容につき十分説明した後、書面にて同意を求める。患者に符号を割り振り匿名化すると共に、個人情報、個人情報管理者が管理し、情報が漏れないようにする。

II. 候補遺伝子ごとのSNP及びハプロタイプを用いた相関解析

2型糖尿病はインスリン抵抗性、インスリン分泌、肥満関連、1型糖尿病は自己免疫関連の候補遺伝子を解析する。まず、糖尿病24例の全エクソンを中心にPCR直接シーケンス法によりSNPを探索する。同定したSNPを対

照100名、患者100名について相関解析する。次に、SNP間の連鎖不平衡を検討し、推定ハプロタイプ頻度を比較する。また、PDE3Bの5'上流約2kbについても多型の相関解析を進める。

III. 複数の遺伝子のマーカーの組み合わせを用いた相関解析

SNPをはじめとする複数の候補遺伝子マーカーを組み合わせで遺伝子型を作成する。

目的2. PDE3B調節因子の遺伝子解析

I. 活性化制御因子のクローニング

PDE3Bの活性化制御因子を、PDE3Bと相互作用する蛋白としてイーストtwo-hybrid法によりクローニングする。特に、同定したインスリン依存性PDE3B結合蛋白の解析を進める。アデノウイルスに組み込み細胞内での機能を、またGSTなどで精製した蛋白を用いてPDE3Bのリン酸化や活性化への影響を解析する。

II. 転写調節領域の解析及び転写因子のクローニング

マウス及びヒトPDE3Bプロモーターをクローニングし、転写調節に重要なDNAエレメント及び結合転写因子を同定する。

＜研究期間の成果＞

目的1. 糖尿病感受性マーカー及び原因遺伝子の同定

糖尿病は、大別すると1型糖尿病と2型糖尿病に分類される。1型糖尿病は、インスリンを分泌する膵β細胞が主として自己免疫機序を介して破壊されることにより、通常絶対的インスリン欠乏に至るものをいう。一方、日本人の糖尿病の95%を占める2型糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌障害と、脂肪組織、肝臓、骨格筋といったインスリン標的組織におけるインスリン抵抗性によって特徴づけられる。近年、インスリン抵抗性の一義的組織としては脂肪細胞が注目されている。脂肪細胞は生理活性物質であるアディポサイトカインを分泌している(図2)。インスリン抵抗性を起こす悪玉のアディポサイトカインとして、レジスチンや、PDE3Bがその放出を調整すると考えられる遊離脂肪酸(FFA)がある。本研究では、1型糖尿病の候補遺伝子としてヒト白血球抗原(HLA)、自己抗体の代表としてグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)抗体に注目して大規模に解析した。一方、2型糖尿病の候補遺伝子としては、レジスチン、PDE3B等について解析した。また、もっとも期待される候補遺伝子として、インスリンとインスリン受容体についても解析した。

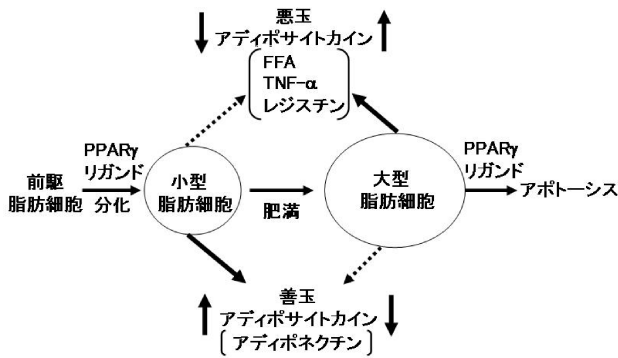


図2. 脂肪細胞のサイズ、アディポサイトカイン、PPAR γ との関係

アディポサイトカインの分泌状態は脂肪細胞の質によって異なる。肥満に伴う大型脂肪細胞では、インスリン抵抗性を惹起する悪玉アディポサイトカインの分泌が増加し、インスリン抵抗性を改善する善玉アディポサイトカインの分泌が低下している。逆に、正常の小型脂肪細胞では、悪玉の分泌が低下し、善玉の分泌が増加している。インスリン抵抗性改善薬のperoxisome proliferator-activated receptor β (PPAR β)リガンドのチアグリジンは、脂肪細胞の分化を促進し、正常の小型脂肪細胞数を増加させる一方で、大型脂肪細胞数をアポトーシスにより減少させる。すなわち、脂肪細胞の質を良くすることにより、全身のインスリン抵抗性を改善すると考えられる。TNF- β , tumor necrosis factor- α ; FFA, 遊離脂肪酸。

I. DNAサンプルの収集及び倫理面への配慮

- 非糖尿病対照者750名(60才以上150名)、2型550名、1型200名を収集した。
- 60才以上の正常者30例、common 2型(15例)をリンパ芽球化した。
- 2型糖尿病の全ゲノム解析用のサンプルと臨床データ(対照、common 2型各140例)を発送した。
- 1型糖尿病の全ゲノム解析用のサンプルを収集した。
- 3省新指針準拠の計画書が倫理委員会で承認された。

II. 候補遺伝子ごとのSNP及びハプロタイプを用いた相関解析

1) 1型糖尿病

a. HLA

劇症1型糖尿病と妊娠、ウイルスによる先行感染、HLADRB1*0405-DQB1*0401が関連する可能性を報告した(15)。

大規模臨床研究の愛媛studyとして、糖尿病患者約5000名のGAD抗体をスクリーニングし、3.8%がGAD抗体陽性であることを見出した(8)。さらに、インスリン依存のGAD抗体陽性者においては、1型糖尿病感受性のHLAハプロタイプであるDRB1*0405-DQB1*0401、*0802*0302、*0901*0303の3種がいずれも対照に比し多かった。一方、インスリン非依存のGAD抗体陽性者では*0405*0401のみが対照に比し多かった。疾患抵抗性の2種はともにインスリン依存のGAD抗体陽性では0.8%にしか認められず、対照に比し著明に少なかった。一方、インスリン非依存のGAD抗体陽性者では*1501*0602のみが対照に比し少なかった。

その後、1型糖尿病を亜型分類し、急性発症におけるHLA遺伝子型と発症年齢との関係を解析した(17)。その結果、*0405*0401および*0901*0303の頻度は対照に比し、

小児期発症群、成人急性発症群でいずれも高かった。小児期発症群、成人急性発症群を比較すると、*0901*0303は成人急性発症群で高頻度であった。さらに、*0901*0303/*0405*0401比は発症年齢が高くなるに従い増加した。

b. AIRE

新たな候補遺伝子として、AIRE(autoimmune regulator)の全エクソンをIDDM93例と対照96例で解析し、ミスセンスSNP4種、sSNP7種を同定した。SNP間の連鎖不平衡とハプロタイプ頻度を決定した。さらにミスセンス変異の機能を*in vitro*で解析した。

2) 2型糖尿病

a. レジスチン

レジスチンは、マウスにおいてインスリン抵抗性を引き起こす悪玉アディポサイトカインである。2型糖尿病の候補遺伝子として、まず、エクソン/イントロン領域のSNPを体系的に解析した。その結果、イントロンにSNP3種を同定したが、2型糖尿病との関連を認めなかった(7)。SNP間の連鎖不平衡とハプロタイプ頻度を解析し、主要ハプロタイプ4種を決定した。

また、頻度の高い299G>Aについてさらに解析したが、2型糖尿病におけるインスリン抵抗性症候群とは関連しなかった(14)。

そこで、転写調節に関わる5' flanking領域のSNPを解析した。その結果、SNP-420のG/G型が2型糖尿病感受性と関連することを見出した(16)。遺伝学的には、連鎖不平衡解析の結果、G/G型そのものが2型糖尿病感受性遺伝子であることが示唆された。さらに、このデータと先行する3論文を統合したメタアナリシスによって、G/G型と2型糖尿病との関連を確認した。

次に、*in vitro*においてSNP-420の機能を解析した。その結果、転写因子Sp1とSp3が、SNP-420にGを有するDNAエレメントを特異的に認識した(図3)。また、Sp1とSp3は、SNP-420にGを有する変異型レジスチンプロモーター活性を増強した(図4)。

さらに、ヒトの表現型について検討した(18)。その結果、2型糖尿病における空腹時血中レジスチン濃度は、対照に比し高かった。SNP-420の遺伝子型による違いをみると、対照、2型糖尿病のいずれにおいても、G/G>C/G>C/C型の順に高かった(図5)。

重回帰分析の結果、血中レジスチン濃度の説明因子として、SNP-420の効果が最も強かった。すなわち、2型糖尿病において、C/C型に比較して、G/G型を有すると10.6 ng/ml、C/G型を有すると4.4 ng/ml、血中濃度が高くなった。また、ロジスティック回帰分析により、血中レジスチン濃度は、年齢、性、過去最大BMIとは独立した2型糖尿病の説明因子であった。

最後に、ヒト単球における意義を健常者23名で解析した。その結果、単球のレジスチンのmRNAは、同時に採血したその血中濃度と正に相関した。SNP-420の遺伝子型と比較すると、単球レジスチンmRNAもG/G>C/G>C/C型の順に高かった(図6)。

以上のことから、レジスチンプロモーターSNP-420が2型糖尿病非感受性のCの場合には、転写因子Sp1/3がそのDNA配列を認識できずに、レジスチンの転写活性は低く抑えられていると考えられる。一方、SNP-420が2型糖尿病感受性のGの場合には、Sp1/3がそのDNA配列を特異的に認識し、レジスチン転写活性を増強すると考えられる。その結果、レジスチンの単球mRNA及び血中濃度を増加させ、全身のインスリン抵抗性を惹起することによ

り、2型糖尿病感受性を高める機序が想定された。

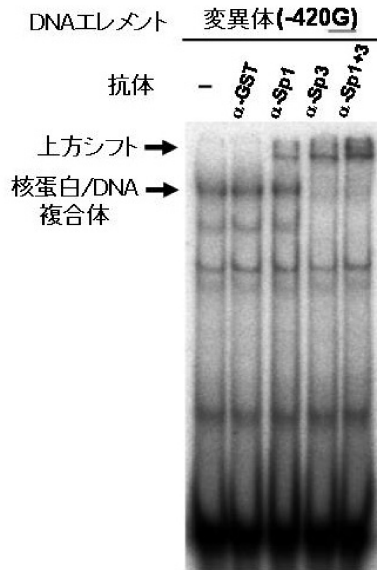


図3. 2型糖尿病感受性の SNP-420G を有する変異 DNA エレメント

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)の結果を示す。DNAプローブを3T3-L1脂肪細胞の核抽出液と反応させ、非変性ゲルで電気泳動した。SNP-420にGを有する変異型(2型糖尿病感受性)DNAプローブに核蛋白が特異的に結合し複合体を形成した。Sp1あるいはSp3の抗体を反応系に加えるとこの複合体は上方にシフトした。なお、SNP-420にCを有する正常型DNAプローブには核蛋白の結合を認めなかった(文献(16)より改変して引用)。

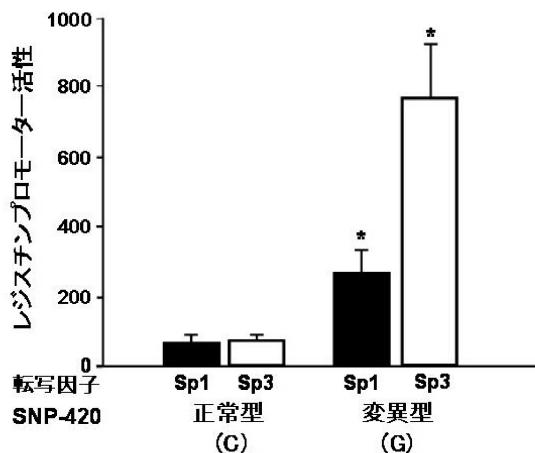


図4. Sp1/3転写因子が-420にGを有する変異DNAエレメントを特異的に認識し、プロモーター活性を増強する

図4. Sp1/3転写因子が-420にGを有する変異DNAエレメントを特異的に認識し、プロモーター活性を増強する

内因性のSp転写因子を発現していないDrosophila SL2細胞を用いてトランスフェクションを行った。エフェクターとしては、Sp1あるいはSp3の発現ベクターを、レポーターとしては、SNP-420がCの正常型レジスチンプロモーターあるいはSNP-420がGの変異型レジスチンプロモーターを有するルシフェラーゼレポーターを用いた。その結果、Sp1とSp3は、正常型に比し変異型レポーターのプロモーター活性を増強した。ANOVA、*、同じエフェクターの正常型のプロモーター活性に対する効果と比べた場合、 $P < 0.05$ 。(文献(16)より改変して引用)。

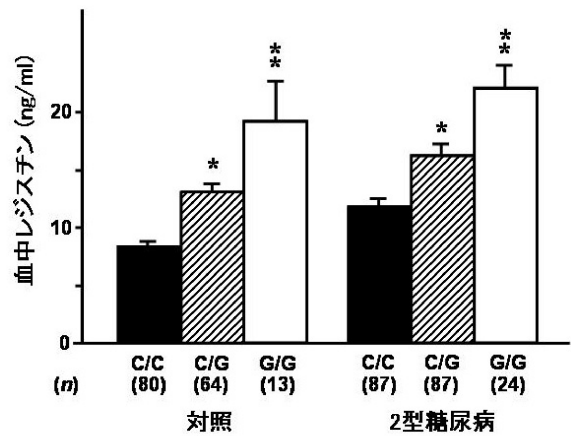


図5. 血中レジスチン濃度は2型糖尿病で高く、C/C<C/G<G/Gの順に高い

空腹時血中レジスチン濃度をELISAにより測定した。対照と2型糖尿病について、SNP-420遺伝子型で分類した場合の結果を示す。ANOVA、*、C/Cと比較した場合 $P < 0.05$, **, C/CあるいはC/Gと比較して $P < 0.05$ 。なお、遺伝子型で分類せずに全体で比較した場合、対照に比し、2型糖尿病で血中レジスチン濃度が高かった(対照 vs 2型糖尿病、mean \pm SE; 11.2 ± 0.5 vs 15.1 ± 0.7 ng/ml, Student's t test, $P < 0.0001$)。(文献(18)より改変して引用)。

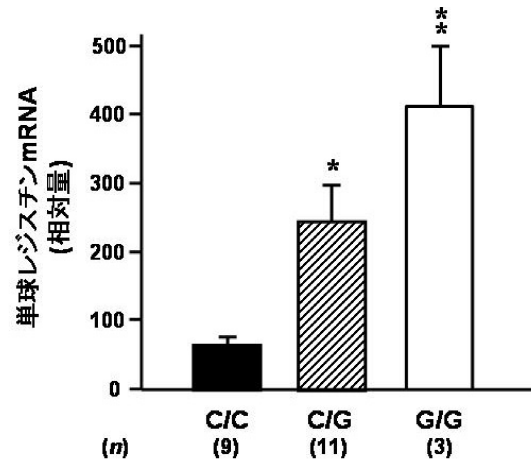


図6. 健康者において単球レジスチン mRNA は C/C<C/G<G/G の順に高い

健康ボランティア23名について、単球のレジスチン mRNA を Taqman RT-PCRにより半定量した。内部標準としては GAPDH を用いた。分化していない THP-1 ヒト単球細胞のレジスチン mRNA 量を GAPDH で補正した値を 1 とし、相対量で示す。ANOVA、C/C と比較した場合、*、 $P < 0.05$, **, $P < 0.005$ 。(文献(18)より改変して引用)。

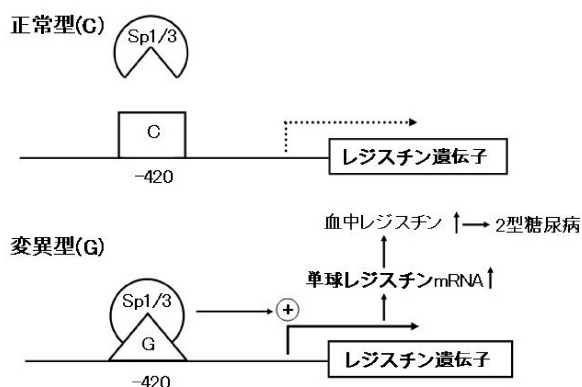


図7. レジスチン SNP-420 とレジスチンの転写活性化、単球 mRNA、血中濃度との関係

SNP-420が2型糖尿病非感受性のCの場合には、転写因子Sp1/3がそのDNA配列を認識できず、レジスチンプロモーター活性は低く抑えられている。一方、SNP-420が2型糖尿病感受性のGの場合には、Sp1/3が特異的にそのDNA配列を認識し、レジスチン転写活性を増強する。その結果、レジスチンの単球mRNA及び血中濃度が上昇し、インスリン抵抗性を介して2型糖尿病感受性が高まると考えられる。(文献(16)より改変して引用)

b. FOXC2

FOXC2は、白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞に転換させる転写因子である。その非コーディング領域に、SNP3種を同定したが、2型糖尿病とは関連しなかった(11)。SNP間の連鎖不平衡とハプロタイプ頻度を解析した。これらのSNPは連鎖不平衡にあり、主要ハプロタイプ4種を決定した。さらに、1種のミスセンス変異のLeu303Metは2型糖尿病に多い傾向を認めた。

c. JNK (cJun N-terminal kinase)

5'領域、エクソン、イントロンにSNPを同定し2型糖尿病との関連を解析した。

d. インスリン

SNP4種を同定した。白人でインスリン分泌低反応と関連する-23T>AのA/A型を日本人の大多数が有することを証明した(4)。

e. インスリン受容体(IR)

SNP22種を同定したが、sSNP9種は2型糖尿病と関連しなかった(6)。

また、IR異常症3例において新たな変異を同定した(1, 20)。

f. GLUT11

新たな糖輸送担体であるGLUT11について、SNP10種を同定した。

Ⅲ. 複数の遺伝子のマーカーの組み合わせを用いた相関解析

レジスチン SNP 299G>AとPDE3B、 β -3-アドレナリン受容体、lysosomal acid lipaseの高頻度のSNPを組合せて解析したが2型糖尿病との関連を認めなかった(14)。

目的2. PDE3B調節因子の遺伝子解析

PDE3Bは脂肪細胞におけるPDEの主要アイソフォームである。インスリンはPDE3Bを活性化することにより、脂肪分解を抑制する。したがってPDE3B遺伝子発現の低下は、FFA増加を介してインスリン抵抗性をもたらす可

能性がある。すなわち、PDE3Bは2型糖尿病の成因の一つであるインスリン抵抗性の有力な候補遺伝子である。

I. 活性化制御因子のクローニング

a. 14-3-3蛋白

PDE3Bと相互作用する蛋白として、酵母two-hybrid法により14-3-3蛋白をクローニングした。さらに、脂肪細胞内でインスリンがこの蛋白間相互作用を増強することを証明した(10)。

さらに14-3-3蛋白のSNPを同定し2型との関連を解析した。

b. 50kDa蛋白

PDE3Bに相互作用し、インスリンによりリン酸化される新たな50kDa蛋白を見出した(19)。

Ⅱ. 転写調節領域の解析及び転写因子のクローニング

a. マウスPDE3Bプロモーター

マウスPDE3Bプロモーターをクローニングし転写開始点を決定した。さらにプロモーター活性が3T3-L1脂肪細胞分化により増強することを見出した(5)。

b. ヒトPDE3Bプロモーター

ヒトPDE3Bプロモーターをクローニングし転写開始点を決定した。さらに体系的SNP解析により、SNP3種と挿入変異2種を同定したが2型との関連を認めなかった(12)。但し、一種のSNPのホモは2型に多い可能性を認めた。

c. 肥満インスリン抵抗性マウス脂肪細胞におけるPDE3B遺伝子発現とPPAR β β β リガンドの効果

PDE3B遺伝子発現は肥満インスリン抵抗性マウスの脂肪細胞において低下していた(2,3)。この低下はインスリン抵抗性改善薬であるPPAR β β β リガンドの投与により回復した。これと一致して、血中FFA及びインスリン抵抗性が改善した。

d. 脂肪細胞サイズ小型化のPDE3B遺伝子発現に対する効果

通常食下で対照に比し小型サイズを呈するIRS-1(+/-)マウスの脂肪細胞では、PDE3B遺伝子発現が増強していた。すなわち、PDE3B遺伝子発現が脂肪細胞のサイズにより負に調節されることが示唆された(9)。

e. PPAR β のPDE3B遺伝子発現に対する効果

通常食下で正常サイズを呈するPPAR β β β KOマウスの脂肪細胞では、PDE3B遺伝子発現が低下していた。すなわち、PDE3B遺伝子発現はPPAR β により正に調節されると考えられた(13)。

f. PDE3B遺伝子発現調節機構

以上より、脂肪細胞PDE3B遺伝子発現は、肥満に伴う大型脂肪細胞において低下し、血中FFAの増加を介してインスリン抵抗性を来たしていると考えられた。この低下はPPAR β リガンド投与により回復し、血中FFAの低下と共にインスリン抵抗性の改善をもたらすと考えられた。さらにその機構として、PDE3B遺伝子発現は脂肪細胞分化・PPAR β β により正に、脂肪細胞サイズにより負に調節されていると考えられた(図8)。

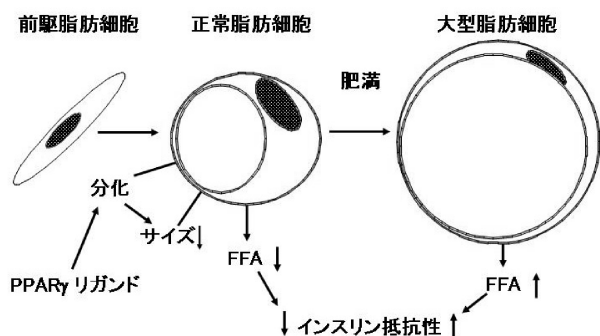


図 8. PDE3B 遺伝子発現は PPAR γ /脂肪細胞分化により正に、脂肪細胞サイズにより負に調節され、血中 FFA を介してインスリン抵抗性に影響する可能性がある(仮説)。

肥満インスリン抵抗性マウスに共通した大きな脂肪細胞では、PDE3B遺伝子発現は低下していた。この低下したPDE3B遺伝子発現は、血中FFAの上昇を介してインスリン抵抗性を惹起すると考えられる。PPAR β リガンドの投与により、PDE3B遺伝子発現は回復し、血中FFAの低下と共にインスリン抵抗性を改善した。PDE3B遺伝子発現は、PPAR β /脂肪細胞分化そのものと脂肪細胞サイズの小型化という2つの因子により増強されると考えられた。

2) 国内外での研究の位置づけ

2型糖尿病候補遺伝子についての関連解析が多数例を用いて再検討された。また、全ゲノム解析により複数の民族で疾患感受性座位が報告された。2型感受性SNPとしては、PPAR β 、カルパイン10、アディポネクチンなどが報告された。また、多民族で共通の感受性座位である20qにおいてHNF4 β のプロモーターSNPと2型との関連が報告された。しかしながら、糖尿病発症予防に用いることが可能なDNAマーカーは現時点ではない。

我々は、1型及び2型糖尿病の候補遺伝子について、独自にシーケンスをすることにより体系的にSNPを探索した。さらにそれらの連鎖不平衡やハプロタイプを解析した。その結果、インスリン抵抗性を引き起こすサイトカインであるレジスチンのSNP-420が2型糖尿病の原因遺伝子であることを遺伝学的に見出した。かつ*in vitro*の機能を証明し、ヒト血中濃度がこのSNPにより決定されていることを証明した。このように一つのSNPが2型糖尿病の発症の過程をうまく説明することを初めて報告した。

<国内外での成果の位置づけ>

2型糖尿病感受性遺伝子の同定は、発症予防やオーダーメイド医療を確立するための鍵である。2004年度、我々は、2型糖尿病原因遺伝子として世界で初めて、SNPから発症までのメカニズムを解明した。この論文は、人類遺伝学の学会誌で最も権威のある米国人類遺伝学会誌(American Journal of Human Genetics)に掲載された。

我々が着目したレジスチンは、マウスにおいては、脂肪細胞から分泌され、インスリン抵抗性と糖尿病を惹起するホルモンとしての意義が確立されている。しかしながら、ヒトでの意義は不明であった。そこで、2型糖尿病の候補遺伝子として、レジスチンのSNPを体系的に解析した。その結果、翻訳開始点から420塩基上流に存在するSNP-420のみが2型糖尿病と有意に関連した。すなわち、マイナーアレルのホモであるG/G型を有すると、メジャーアレルのホモのC/C型に比べて、2型糖尿病のリスク

が約2倍高かった。連鎖不平衡解析により、G/G型そのものが原因遺伝子であることが示唆された。In vitro機能解析の結果、転写因子のSp1及びSp3が、-420にGを持つ変異型DNAエレメントのみを特異的に認識し、プロモーター活性を増強した。これに一致して、患者血中レジスチン濃度は、G/G > C/G > C/C型の順に高かった。以上のことから、Sp1/3は、2型糖尿病感受性である-420のGを特異的に認識し、レジスチン転写活性を増強した。その結果、血中濃度を上昇させ、インスリン抵抗性を介して2型糖尿病を発症させると考えられた。

本論文は、世界に先駆けて、レジスチン遺伝子転写調節領域に存在するSNP-420の一塩基の違いが、特異的転写因子の結合を介して2型糖尿病感受性を決定していることを証明した。これは、2型糖尿病の原因遺伝子として、そのSNPが機能的かつ臨床的にリンクすることを証明した初めての知見であり、同誌のeditorによるthis month in journalで絶賛された。また朝日新聞の夕刊トップ記事をはじめ、マスコミにも広く取り上げられた。そして2004年の年末には、朝日新聞により、“今年の遺伝子”に選定された。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

Common 2型の収集に苦労した。その結果、2型全体としてのサンプル収集が不十分であった。1型全ゲノム解析用のcriteriaも厳しく該当する症例数が少なかった。

<今後の課題>

1) 獲得目標

DNAサンプル

愛媛県下の非糖尿病1000名、2型1000名、1型300名を目標にサンプルを増やす。同時に、表現型を重視し、1型では急性発症、劇症型、緩徐進行、2型糖尿病では、若年発症、高度肥満歴、家族集積例を収集する。また、臨床データとしてサイトカインやインスリンの血中濃度を測定する。

2) 研究計画

1型、2型の新たな候補遺伝子についてSNPを同定し関連解析する。

糖尿病チームの2型糖尿病全ゲノム解析結果により、興味ある感受性領域の解析に参加する。

新たに1型糖尿病全ゲノム解析に参加する。

PDE3Bプロモーターの転写活性化の責任エレメントと結合転写因子を同定する。

PDE3Bと相互作用する14-3-3蛋白以外の陽性クローンの*in vitro*の解析、SNPの同定と2型糖尿病との関連解析を行う。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1. Osawa, H., Nishimiya, T., Ochi, M., Onuma, H., Niiya, T., Kitamura, F., Kaino, Y., Kida, K., and Makino, H. Identification of novel C253Y missense and Y864X nonsense mutations in the insulin receptor gene in type A insulin resistant patients. Clin Genet 59: 194-197, 2001. 0111021819

2. Tang, Y., Osawa, H., Onuma, H., Hasegawa, M., Nishimiya, T., Ochi, M., Sugita, A., and Makino, H. Adipocyte-specific reduction of phosphodiesterase 3B gene expression and its restoration by JTT-501 in obese, diabetic KKAY mouse. Eur J Endocrinol 145: 93-99, 2001. 0111021822

3. Tang, Y., Osawa, H., Onuma, H., Nishimiya, T., Ochi, M., Sugita, A, and Makino, H. Phosphodiesterase 3B gene expression is enhanced in the liver but reduced in the adipose tissue of obese insulin-resistant db/db mouse. *Diabetes Res Clin Pract* 54: 145-155, 2001.
0111091111
4. Osawa, H., Onuma, H., Murakami, A., Ochi, M., Nishimiya, T., Kato, K., Shimizu, I., Fujii, Y., Ohashi, J., and Makino, H. Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the insulin gene: Evidence for a high frequency of g.-23T>A in Japanese subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 451-455, 2001.
0111021624
5. Niiya, T., Osawa, H., Onuma, H., Suzuki, Y., Taira, M., Yamada, K., and Makino, H. Activation of mouse phosphodiesterase 3B promoter by adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *FEBS Lett* 505:136-140, 2001.
011091131
6. Osawa, H., Ochi, M., Nishimiya, T., Onuma, H., Nakamaru, K., Murakami, A, Kato, K., Shimizu, I., Fujii, Y., Ohashi, J., and Makino, H. A systematic search for single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the insulin receptor gene: Association of an sSNP with hyperlipidemia in Japanese type 2 diabetic subjects. *Clin Genet* 60:479-481, 2001.
0203021100
7. Osawa, H., Onuma, H., Murakami, A., Ochi, M., Nishimiya, T., Kato, K., Shimizu, I., Fujii, Y., Ohashi, J., and Makino, H. Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the resistin gene: The absence of evidence for the association of three identified single nucleotide polymorphisms with Japanese type 2 diabetes. *Diabetes* 51:863-866, 2002.
0203021119
8. Takeda, H., Kawasaki, E., Shimizu, I., Konoue, E., Fujiyama, M., Murao, S., Tanaka, K., Mori, K., Tarumi, Y., Seto, I., Fujii, Y., Kato, K., Kondo, S., Takada, Y., Kitsuki, N., Kaino, Y., Kida, K., Hashimoto, N., Yamawaki, T., Onuma, H., Nishimiya, T., Osawa, H., Saito, Y., and Makino, H. Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of adult-onset diabetic patients with GAD autoantibodies in Japan (Ehime Study). *Diabetes Care* 25:995-1001, 2002.
0303281705
- 8'. Kawasaki, E., Osawa H., Makino, H., and Ehime Diabetes Study Group. The clinical heterogeneity of adult-onset diabetic patients with GAD autoantibodies in Japan: Response to Fukui et al. (Letter) *Diabetes Care* 25: 2364-5, 2002.
0303281716
9. Hasegawa, M., Tang Y., Osawa, H., Onuma, H., Nishimiya, T., Ochi, M., Terauchi, Y., Kadowaki, T., and Makino, H. Differential regulation of gene expression and insulin-induced activation of phosphodiesterase 3B in adipocytes of lean insulin-resistant IRS-1 (-/-) mice. *Diabetes Res Clin Pract* 58: 79-85, 2002.
0303281709
10. Onuma, H., Osawa, H., Yamada, K., Ogura, T., Tanabe, F., Granner, D. K., and Makino, H. Identification of the insulin-regulated interaction of phosphodiesterase 3B with 14-3-3 β protein. *Diabetes* 51: 3362-3367, 2002.
0303281714
11. Osawa, H., Onuma, H., Murakami, A., Ochi, M., Nishimiya, T., Kato, K., Shimizu, I., Fujii, Y., Ohashi, J., and Makino, H. Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the FOXC2 gene: The absence of evidence for the association of three frequent single nucleotide polymorphisms and four common haplotypes with Japanese type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 562-567, 2003.
0303281718
12. Osawa, H., Niiya, T., Onuma, H., Murakami, A., Ochi, M., Nishimiya, T., Kato, K., Shimizu, I., Fujii, Y., Ohashi, J., Yamada, K., Liang, S.-J., Manganiello, V.C., Fujita-Yamaguchi, Y., Makino, H. Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the 5' flanking region of the human phosphodiesterase 3B gene: Absence of evidence for major effects of identified polymorphisms on susceptibility to Japanese type 2 diabetes. *Mol Genet Metab* 79: 43-51, 2003.
0404091532
13. Ogura, T., Osawa, H., Tang, Y., Onuma, H., Ochi, M., Nishimiya, T., Kubota, N., Terauchi, Y., Kadowaki, T., and Makino, H. Reduction of phosphodiesterase 3B gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor β (+/-) mice independent of adipocyte size. *FEBS Lett* 542: 65-68, 2003.
0404091536
14. Ochi, M., Osawa, H., Onuma, H., Murakami, A., Nishimiya, T., Shimada, F., Kato, K., Shimizu, I., Shishino, K., Murase, M., Fujii, Y., Ohashi, J., and Makino, H. The absence of evidence for major effects of the frequent SNP 299G>A in the resistin gene on susceptibility to insulin resistance syndrome associated with Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 61: 191-198, 2003.
0404091533
15. Shimizu I., Makino, H., Osawa, H., Kounoue, E., Imagawa, A., Hanafusa, T., Kawasaki, E., and Fujii, Y. Association of fulminant type 1 diabetes with pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract* 62: 33-38, 2003.
0404091516
16. Osawa, H., Yamada, K., Onuma, H., Murakami, A., Ochi, M., Kawata, H., Nishimiya, T., Niiya, T., Shimizu, I., Nishida, W., Hashiramoto, M., Kanatsuka, A., Fujii, Y., Ohashi, J., and Makino, H. The G/G Genotype of a resistin single-nucleotide polymorphism at -420 increases type 2 diabetes mellitus susceptibility by inducing promoter activity through specific binding of Sp1/3. *Am J Hum Genet* 75: 678-686, 2004.
0602082027
17. Murao S, Makino H, Kaino Y, Konoue E, Ohashi J, Kida K, Fujii Y, Shimizu I, Kawasaki E, Fujiyama M, Kondo S, Tanaka K, Tarumi Y, Seto I, Kato K, Ohno K, Kusunoki Y, Ebisui O, Takada Y, Tanabe K, Takemoto K, Onuma H, Nishimiya T, Osawa H. Differences in the contribution of HLA-DR and -DQ haplotypes to susceptibility to adult- and childhood-onset type 1 diabetes in Japanese patients. *Diabetes* 53: 2684-90, 2004.
0602082030
18. Osawa H., Onuma, H., Ochi, M., Murakami, A., Yamauchi, J., Takasuka, T., Tanabe, F., Shimizu, I., Kato, K., Nishida, W., Yamada, K., Tabara, Y., Yasukawa,

M., Fujii, Y., Ohashi, J., Miki, T., and Makino, H. Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 596-602, 2005.

0602082017

19. Onuma, H., Osawa, H., Ogura, T., Tanabe, F., Nishida, W., and Makino, H. A newly identified 50 kDa protein which is associated with phosphodiesterase 3B is phosphorylated by insulin in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 976-982, 2005.

0602082020

20. Hashiramoto M, Osawa H, Ando M, Murakami A, Nishimiya T, Nakano M, Nishida W, Onuma H, Makino H. A Nonsense Mutation in the Arg345 of the Insulin Receptor Gene in a Japanese Type A Insulin-resistant Patient. *Endocr J* 52: 499-504, 2005.

0602082023

2) データベース/ソフトウェア なし

3) 特許など

申請中1件

4) その他顕著なもの なし