

## 消化管シグナルのネットワークと糖尿病発症の解析

●山田 祐一郎

京都大学大学院医学研究科 糖尿病・栄養内科学

### ＜研究の目的と進め方＞

糖尿病は、遺伝素因に高脂肪食や運動不足などの環境因子が加わることによりインスリン分泌不全やインスリン抵抗性をきたし発症する。わが国においては、発症早期からのグルコースに対するインスリン分泌反応の低下が特徴である。しかし、インスリン分泌に中心的な役割を有するATP感受性カリウムチャネルKir6.2遺伝子の欠損マウスでも耐糖能低下は軽度である。また、膵β細胞に発現する多くの遺伝子の変異は単独では糖尿病の発症に結びつかない。したがって、糖尿病におけるインスリン分泌不全の出現には膵β細胞以外の因子も関与していることが想定される。

GIP (gastric inhibitory polypeptideまたはglucose-dependent insulinotropic peptideとも称される)は、糖質や脂質の経口摂取に伴い消化管から分泌され、膵β細胞のGIP受容体を介してインスリン分泌を促進し、生体の糖代謝の恒常性を担う一つの因子である。研究代表者は、GIP受容体欠損マウスを作製し、GIP受容体欠損マウスでは食直後のインスリン分泌の低下と耐糖能低下を認め、日本人2型糖尿病と類似した病態を呈することを示した(Proc Natl Acad Sci USA 1999)。一方、このマウスを高脂肪食で長期飼育すると、高脂肪食負荷の野生型マウスで認められる著明な肥満やインスリン抵抗性が消失した。したがって、高脂肪食に伴うインスリン抵抗性の出現と糖代謝の悪化にGIPが必須であることを示した。さらに、少数例であるがヒト糖尿病患者でGIP受容体遺伝子変異を同定し、この変異ではGIP機能が低下することを示している(Diabetes 1996)。このような消化管からのシグナルは、GIP以外にもGLP-1(glucagon-like peptide 1)などの消化管ホルモンも担い、糖尿病発症に密接に関連していると想定される。

以上の実験成績を背景に、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性に加え、GIPなど消化管シグナルの機能障害が糖尿病発症進展の遺伝素因を構成し、これらの変異を併せ持つ個体に糖尿病が発症すると捉え、本研究を着想した(図1)。さらに、消化管シグナルの低下し膵β細胞機能が減弱している症例では、消化管ホルモン投与(すでに海外では治験が試みられている)のよい適応と考えられるが、逆に消化管シグナルの亢進し肥満した症例では消化管ホルモン拮抗薬が適応であることが示唆される。このように、消化管シグナルは治療とも密接に関連している。そこで、ヒトGIPやヒトGIP受容体遺伝子など消化管シグナルに関連する一連の遺伝子でSNPの検索を継続するとともに、糖尿病や肥満患者の臨床所見との相関を解析し、これらの遺伝子と疾病との関連を明らかにすることを目的とする。

従来、糖尿病の発症には、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性の2極が重要であると考えられたため、その候補遺伝子として膵β細胞または筋・脂肪細胞に発現する

遺伝子を中心に検討されてきた。しかし、インスリン分泌や作用に関与する遺伝子の欠損マウスでも、多くはその耐糖能の低下が軽度であり、多因子疾患である2型糖尿病を再現できない。また、多くの遺伝子変異は単独では糖尿病との関連が実証されない。本研究は、研究代表者が世界ではじめて作製した欠損マウスを用いることによりGIPが糖尿病の発症に関連することを示した成績を発展し、消化管シグナルのネットワークの機能障害を糖尿病の多因子の一つと捉える、非常に独創的なものと考えられる。

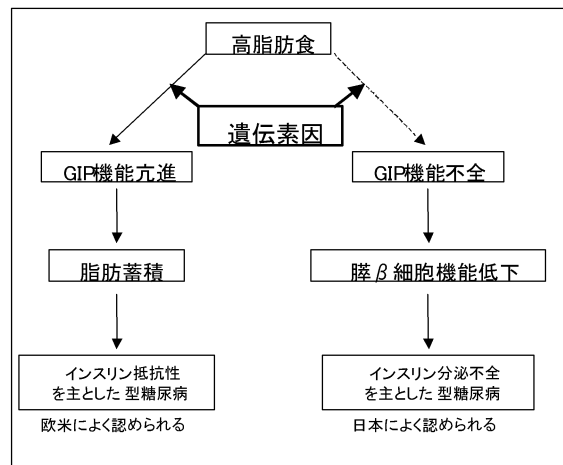


図1 消化管シグナルを介した型糖尿病発症のモデル

### ＜研究開始時の研究計画＞

#### ①消化管シグナルと代謝異常—実験モデルを用いた検討

GIP受容体欠損マウスは食後のインスリン分泌が障害された糖尿病モデル動物である。本マウスにおける糖尿病発症進展について種々のモデルを用いて解析することで、GIPシグナルの糖尿病発症進展への寄与について考察し、この経路に関わる遺伝子群を明らかにする。

#### ①-1他のインスリン分泌障害モデルとの交配

GIPは膵β細胞において、細胞内cAMPを上昇させることでインスリン分泌を増強する。そこで、膵β細胞内のカルシウム濃度上昇に関与するATP感受性カリウムチャネルの構成蛋白であるKir6.2を欠損したマウスと交配することで、インスリン分泌障害がどのようになるか検討する。

#### ①-2遺伝性インスリン抵抗性モデルとの交配

GIP受容体欠損マウスはインスリン分泌障害モデルにつき、遺伝性のインスリン抵抗性モデルと交配させ、多因子遺伝モデルを作成する。

#### ①-3環境によるインスリン抵抗性モデルとの交配

GIP受容体欠損マウスはインスリン分泌障害モデルにつき、高脂肪食(脂肪エネルギー比45%)を摂取させることにより、多因子遺伝モデルを作成する。

#### ②消化管シグナルと代謝異常—遺伝子変異が原因か?

2型糖尿病および肥満患者より抽出したDNAをもとに、

平成13-14年度に単離した消化管シグナル関連遺伝子のSNPを、キャピラリー型シークエンサー (MegaBace)を用いて同定する。得られたSNPを用いてhaplotypeを構築する。各haplotypeまたはSNPと糖尿病や肥満の臨床所見との相関を検索する。SNP解析には、主としてTaqMan法を用いる。特に、消化管シグナルの強弱が、治療にも関連することが予想されるため、活性型GIPやGLP-1の血中濃度との関連も検索する。

### ＜研究期間の成果＞

#### ①-1他のインスリン分泌障害モデルとの交配

GIP受容体欠損マウスとKir6.2欠損マウスを交配し、ダブル欠損マウスを作成した (文献35)。Kir6.2は、膵β細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌のkeyとなるチャネルであるATP感受性Kチャネルの構成因子である。なお、Kir6.2欠損マウスは清野進教授 (神戸大学) に供与いただいた。

その結果、空腹時血糖は変化しないものの、経口糖負荷試験を行うと、ダブル欠損マウスでは、Kir6.2欠損マウスと比較して有意な血糖上昇が得られた (図2)。すなわち、負荷後15分では294+/-20 mg/dl に対し345+/-10 mg/dl、負荷後30分では381+/-26 mg/dlに対し453+/-20 mg/dlで、いずれもP<0.05で有意であった。インスリン反応はダブル欠損マウスではほぼ完全に消失していた。また、単離した膵島を用いてインスリン分泌を検索すると、もう一つのインクレチンであるGLP-1 (glucagon-like peptide-1)に対する反応は保持されており、GIPがATP感受性Kチャネルが障害された状態では主たるインクレチンであることを明らかにすることができた。

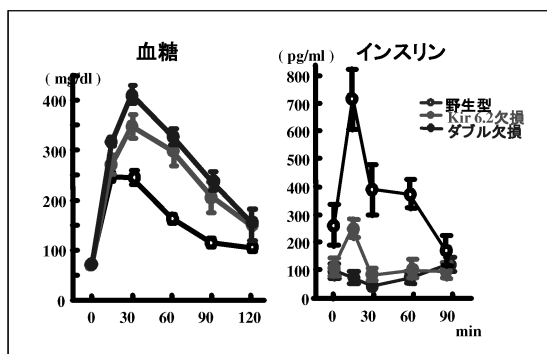


図2 GIP受容体・Kir6.2ダブル欠損マウス

#### ①-2遺伝性インスリン抵抗性モデルとの交配

GIP受容体欠損マウスと遺伝性インスリン抵抗性モデル動物であるIRS-1 (insulin receptor substrate-1)欠損マウスと交配し、ダブル欠損マウスを作成した (文献47)。IRS-1はインスリン受容体からの情報伝達系の構成因子として重要である。なお、IRS-1欠損マウスは門脇孝教授 (東京大学) から供与いただいた。

ダブル欠損マウスで経口糖負荷試験を施行すると、GIP受容体単独欠損と同様に負荷後早期のインスリン分泌は低下していたが、耐糖能そのものについては、ダブル欠損ではIRS-1単独欠損と比較して大きな悪化は認めなかった。そこで、インスリン負荷試験でインスリン感受性を検索したところ、IRS-1単独欠損マウスに比しダブル欠損マウスでは改善を認めた。また、体重には有意差を認めなかったが、内臓脂肪や皮下脂肪の組織重量を比較すると、ダブル欠損マウスで低下し、これは血中レプチン値が低値であることと合致していた。この脂肪重量の原因を探るため、酸素消費量を間接カロリーメータで定量

すると、安静時の脂肪消費量がダブル欠損マウスで亢進していることがわかった。さらに、肝臓においてはPPAR $\alpha$ によって促進されるCD36やUCP2の遺伝子発現が亢進し、骨格筋においては脂肪酸酸化の律速酵素である3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenaseの活性ならびに遺伝子発現が増強し、これらが脂肪の燃焼増加に寄与していることが想定された。

したがって、GIPシグナルは単にインスリン分泌のみならず、脂肪の蓄積に関与し、肝臓や骨格筋の脂肪酸 $\beta$ 酸化に関わる因子と密接に関連していることを明らかにした。

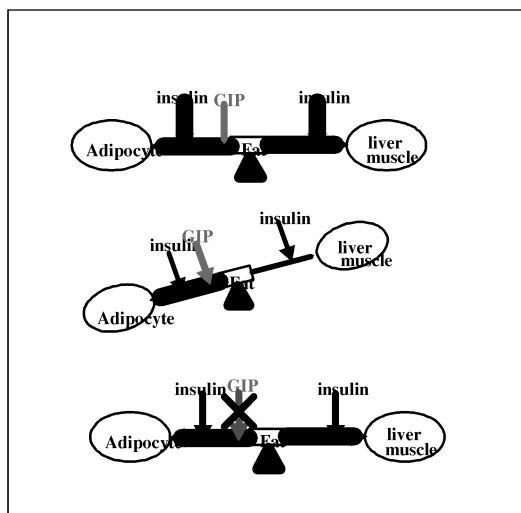


図3 GIPシグナルと脂肪の燃焼・消費バランス  
 上段: 通常状態ではインスリンのシグナルが強くGIPシグナルは軽微  
 中断: インスリンシグナルが弱いとGIPシグナルが相対的に強くなり  
 エネルギー蓄積へ  
 下段: このような状態でGIPシグナルを遮断すると脂肪は燃焼へ

さらに、糖尿病でよく認められるインスリン抵抗性の状態でもGIPシグナルの遮断が脂肪酸の燃焼を介し肥満の治療に繋がることを示した (図3)。

#### ①-3環境によるインスリン抵抗性モデルとの交配

GIP受容体欠損マウスはインスリン分泌障害モデルにつき、高脂肪の環境下でマウスを飼育した多因子遺伝モデルを作成したところ、以下のような結果が得られた (文献22)。



図4 高脂肪食とGIPシグナル

まず、13%脂肪の通常食と比し45%脂肪の高脂肪食で飼育した野生型マウスでは約1年後には35%の体重増加を認める。これはヒトにおいても脂肪摂取の増加と肥満ならびに糖尿病の有病率の増加が相関する疫学研究と合致する結果である。ところが、GIP受容体欠損マウスではこのような体重増加が認められなかった(図4)。また、解剖を行ったところ、高脂肪食摂取野生型マウスでは皮下脂肪・内臓脂肪の増加があるが、高脂肪食摂取GIP受容体欠損マウスではなかった。

組織所見では、高脂肪食摂取野生型マウスで認められる肝臓の脂肪蓄積(Oil red O染色)、脂肪細胞の肥大化が、高脂肪食摂取GIP受容体欠損マウスではいずれも認められなかった。この原因を検索するために、酸素消費量を間接カロリメータで定量すると、GIP受容体欠損マウスで高脂肪食負荷3週間で安静期の呼吸商(酸素消費と二酸化炭素産生の比率)が有意に低下し、さらに3週間飼育すると、安静期の酸素消費量が低下することを明らかにした。

また、GIPの脂肪細胞への直接作用を検討するために、3T3-L1脂肪細胞を用いて検討すると(図5)、GIPは脂肪細胞のグルコース取り込みならびにheparin-releasable lipoprotein lipase (LPL)活性を亢進することがわかった。したがって、GIPは脂肪細胞に直接作用し、栄養素の取り込みを促進することがわかった。

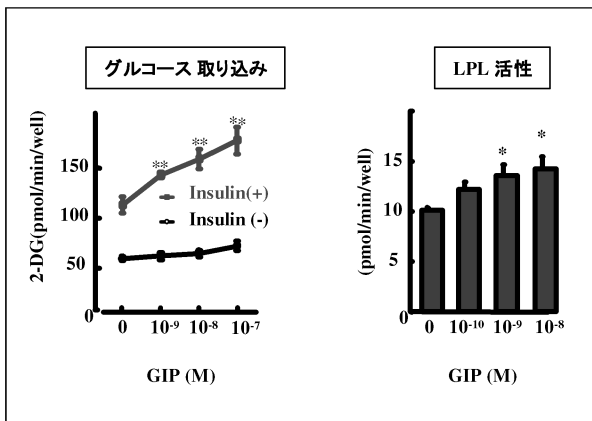


図5 消化管シグナルの脂肪細胞への直接作用

以上の成績は、GIPがインスリン分泌に関与するだけでなく、脂肪細胞を介してインスリン感受性にも直接関与することを示す成績である。そこで、この研究を発展させて、過食モデルのobマウス(レプチン欠損)との交配で得られたダブル欠損マウスを用いてさらに検討を進めた(文献22)。

まず、体重はobマウスでは著明に増加するが、GIP受容体を欠損させることによりその増加が軽減した。さらに、代謝を検討すると、耐糖能は著明に改善、インスリン分泌は有意差なく、インスリン抵抗性の改善が明らかとなった(図5)。また、コレステロールは中性脂肪に関しても、obマウスにおける悪化がGIPシグナル遮断で改善を示した。

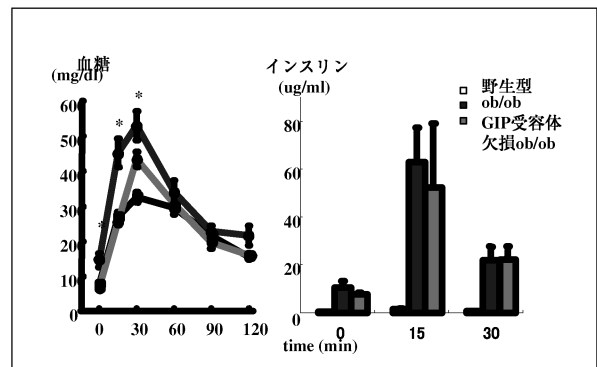


図5 肥満モデルにおけるGIPシグナル遮断の効果

この研究から明らかになったことは、糖尿病の病態、すなわちインスリン分泌障害が主体とした糖尿病の発症にはGIPシグナルが関与する、したがって、治療にあたってはGIP受容体のアゴニストが求められる。一方、インスリン抵抗性を主体とした糖尿病に対しては、GIPシグナルの遮断によるインスリン分泌低下の影響は軽微であり、肥満の改善を介して、糖尿病の治療に繋がる、すなわちGIP受容体アンタゴニストがその治療に求められる。

また、過剰栄養・運動不足など生活習慣の乱れに伴い、内臓肥満から種々の代謝疾患の合併(メタボリックシンドローム)することが昨今注目を浴びているが、GIPシグナルは過剰栄養から肥満蓄積にいたる経路の中で、現在報告されている最も上流のシグナルであり、このシグナルをなんらかの方法(例えば、GIP受容体アンタゴニスト、GIP分泌抑制薬など)で遮断することがメタボリックシンドロームの治療にも繋がることを示すことができた。

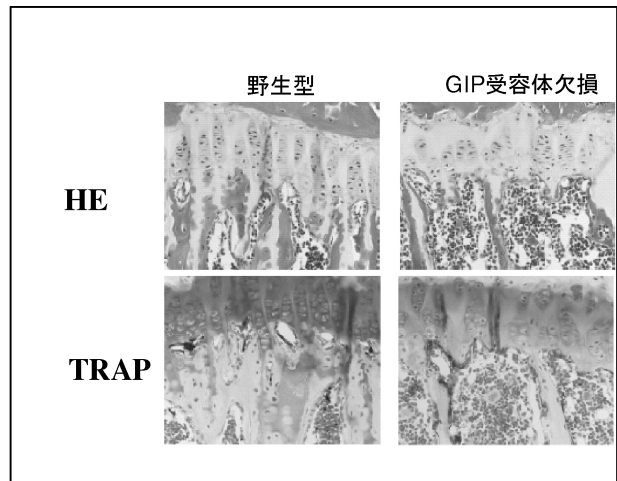


図6 GIPシグナルと骨

本成績から得られた知見は消化管因子GIPが栄養素(糖質や脂質)の蓄積に繋がるということである。生体でもう一つ重要な栄養素はカルシウムである。非常に興味深いことにカルシウム蓄積臓器である骨の骨芽細胞にGIP受容体が発現している。そこで、この発現の意義を次に検討した(文献55)。

GIP受容体欠損マウスは、組織学的に骨梁が細くなっており(図6上段)、尿中deoxypyridinoline値が増加していることから、高回転型の骨粗鬆症を示していた。また、食後の血中カルシウム値は上昇していた。そこで、食事の度に顕著な血中濃度の上昇をみるGIPが、食事によって摂取されたカルシウムの動態、特に骨形成に影響しているのではないかと想定した。アルカリ性ホスファター

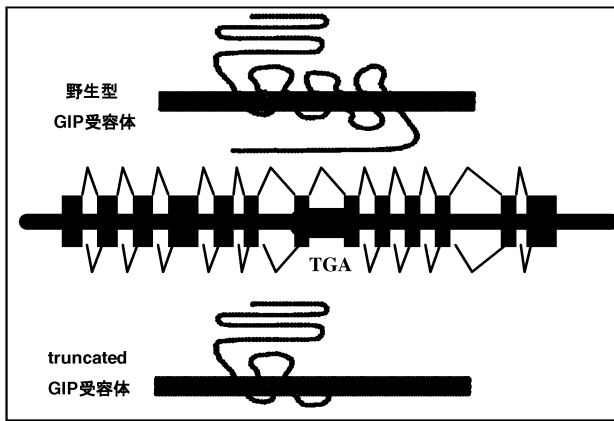


図7 alternative splicingとGIP受容体

ゼ染色により骨芽細胞の免疫染色を、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP、図6下段) 染色により破骨細胞の酵素染色を行なって検討したところ、GIP受容体欠損マウスでは破骨細胞の過剰増殖が認められ、骨芽細胞数は若干減少していた。ピットアッセイにより破骨細胞へのGIPの作用を観察したところ、GIPは破骨細胞への直接作用を持たないことが判明したため、次に破骨細胞機能を調節している骨芽細胞に着目し、ヒト骨芽細胞であるSaos-2細胞を用いて解析を進めた。Saos-2細胞にはGIP受容体mRNAの発現が認められ、GIPによる細胞内cAMPの上昇がみられた。このことから、Saos-2細胞は機能的なGIPRを発現しているといえる。骨芽細胞は骨のリモデリングの際にその多くがアポトーシスにより消滅し、骨芽細胞のアポトーシスを減少させることが、間欠的副甲状腺ホルモン投与による骨形成促進作用の機序として明らかになっている。同様の手法を用いて、Saos-2骨芽細胞にGIPを前投与することで、GIPの濃度依存性に、エトポシドによる骨芽細胞のアポトーシスを減少させた。このことから、GIPは骨芽細胞に直接作用して骨形成を促進することにより、抗骨粗鬆症作用を有していると考えられた。GIP受容体欠損マウスで骨粗鬆症がみられることから、GIPシグナルの欠損は糖尿病性骨減少症の一因である可能性が考えられる。

GIPは破骨細胞への直接作用を持たないが、骨芽細胞への直接的な増殖性作用を介して、食事由来のカルシウムを骨へ沈着させるのに重要な役割を果たしていると考えられる。すなわち、GIPは糖代謝や脂肪代謝のみならず、カルシウム代謝にも関与し、gut-derived nutrient-saving polypeptideとして栄養素の生体への蓄積に重要な役割を有していることが想定された。

#### ②消化管シグナルと代謝異常—遺伝子変異が原因か？

GIP遺伝子ならびにGIP受容体の遺伝子について、各エクソンならびにプロモータ領域ならびにSNPを網羅的に解析したが、糖尿病などと相関する遺伝子変異は認められず、遺伝子変異そのものが糖尿病の発症進展に関与していることは否定的と考えられた。しかしながら、諸外国からGIP投与に伴うインスリン分泌が2型糖尿病のみならず、境界型や臍性糖尿病でも低下していることが報告されるようになり、遺伝子変異以外にGIP反応性が低下する分子機構の探索を進めた。

その結果、マウスの膵島にはすべてのイントロンがスプライスされた野生型のGIP受容体mRNA以外に、第7イントロンがスプライスされないmRNAが存在することを明らかにした(図7)。スプライスされなかったmRNAには、途中でストップコドンが存在するため、C端が欠失

したGIP受容体が生成されると考えられた。

野生型GIP受容体とtruncated GIP受容体の発現を膵島で比較すると、ほぼ同程度発現していることがわかった。次に、その機能を検討するため、その発現plasmidを作製し、COS-7細胞に発現させた。その結果、野生型GIP受容体はGIPに対して用量依存的に細胞内cAMP濃度を上昇させるのに比し、truncated GIP受容体は高濃度のGIPによっても全くcAMP産生が認められなかった。次に、一定量の野生型GIP受容体存在下に異なる量のtruncated GIP受容体を発現させたところ、truncated GIP受容体の量が増加するに伴い、cAMP産生能で評価したGIPの反応性(ED50)が悪化し、truncated GIP受容体は野生型GIP受容体に対しdominant negativeとして作用することが明らかとなった。

そこで、高脂肪食を摂取したマウスの膵島におけるtruncated GIP受容体の役割を検討した。高脂肪食摂取で、単離膵島のGIP応答性は、細胞内cAMP濃度ならびにインスリン分泌能で評価すると亢進していた。これは高脂肪食での代償的なインスリン分泌亢進に合致する所見である。GIP受容体のトータルな発現は変化していなかったが、野生型GIP受容体に対するtruncated GIP受容体の発現比は減少していた。すなわち、野生型GIP受容体としてスプライスされるGIP受容体mRNAの増加が細胞のGIP反応性の亢進に繋がっていることが示唆され、スプライスの違いが受容体の親和性を規定するという新たな知見が得られた。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

Nature Medicine誌に発表した文献22は、国内外に大きな反響を得た。

##### 主な報道

朝日新聞「太るホルモン解明」(2002年6月17日)

毎日新聞「肥満誘因ホルモン発見」(2002年6月17日)

読売新聞「脂肪の蓄積を促すたんぱく質特定」

(2002年6月17日)

京都新聞「体内の脂肪蓄積ホルモンがカギ」

(2002年6月17日)

日本経済新聞「肥満・糖尿病起す遺伝子」

(2002年6月17日)

Reuters Health Information「Hormone may be new target for anti-obesity drugs」(2002年6月17日)

Kataweb Salute「Si chiama GIP l'ormone accumulagrassi」(2002年6月17日)

##### 学術誌での反響

論文を発表してまだ3年しか経過していないが、2月10日現在で既に63編の論文によって引用されている。

代表的な引用論文を以下に示す。

Gault VA, Irwin N, Green BD, et al. Chemical ablation of gastric inhibitory polypeptide receptor action by daily (Pro(3))GIP administration improves glucose tolerance and ameliorates insulin resistance and abnormalities of islet structure in obesity-related diabetes Diabetes 54 : 2436-2446 2005 本論文においては、肥満モデル動物にGI受容体アンタゴニストを投与することで、耐糖能が改善することを報告しており、geneticな欠失のみならず薬理的にもGIPシグナル遮断が治療薬として有効であることを示している。

Badman MK, Flier JS The gut and energy balance: Visceral allies in the obesity wars. Science 307: 1909-1914 2005

Preitner F, Ibberson M, Franklin I, et al. Gluco-incretins control insulin secretion at multiple levels as revealed in

mice lacking GLP-1 and GIP receptors J Clin Invest 113: 635-645 2004

Drucker DJ Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes Diabetes Care 26: 2929-2940 2003

Conarello SL, Li ZH, Ronan J, et al. Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance Proc Natl Acad Sci USA 100: 6825-6830 2003

Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J Control of body weight: a physiologic and transgenic perspective Diabetologia 46 : 143-172 2003

Kieffer TJ GIP or not GIP? That is the question Trends Pharmacol Sci 24 : 110-112 2003

Korner J, Aronne LJ The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment J Clin Invest 111 : 565-570 2003

Ballinger A Gastric inhibitory polypeptide links overnutrition to obesity Gut 52 : 319-320 2003

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

糖尿病の発症進展に及ぼす消化管因子の役割については、本研究を通じて多くのことを解明することができ、消化管因子の重要性を示すことができた。一つはインスリン分泌促進における役割であり、もう一つは肥満促進における役割である。これらの解明は、糖尿病の治療へと密接に関連している。さらに、消化管因子がカルシウムの蓄積に重要な役割を有していることを明らかにし、gut-derived nutrient savingが本因子の有する本来の役割であることを示すことができた。したがって、予想以上の成果を上げることができた。

一方、2型糖尿病患者における解析では、思ったような結果をあげることができなかった。これは、GIPやGIP受容体に糖尿病発症進展と関連する遺伝子変異が同定できなかったこと、GIP受容体が発現する膵β細胞ならびに脂肪細胞ではGIPシグナルに特異的な因子はなかったこと、GIPが発現する消化管K細胞については、消化管に存在するため細胞レベルの解析が遅れ、特異性が確認できなかったことによる。消化管K細胞の解析は次の課題の一つであるが、遺伝子変異だけではなく、alternative splicingによって産生されたtruncated GIP受容体がGIPシグナルを調節することを見出した。ただし、このalternative splicingの分子機構については、ほとんど解明できなかった。

#### 〈今後の課題〉

今回、解明できた主な成果は以下の4点である。

1)GIPシグナルは食後早期のインスリン分泌促進に関与する

2)GIPシグナルは摂取した脂肪の脂肪細胞への蓄積に関与する

3)GIPシグナルは摂取したカルシウムの骨への蓄積に関与する

4)GIPシグナルは標的細胞において、受容体のalternative splicingによってその強さが調節される

これらに対応して、今後の課題は以下の通りである。

1-3)GIPのシグナルを調節する分子機構

本研究で最も遅れたのが、GIPシグナルそのものの強さを決定する分子機構である。GIPの分泌は、糖や脂肪の刺激に応じていること、しかしながら、既知の糖認識の分子機構であるATP感受性Kチャネルには依存しないこと、から全くことなる糖認識・脂肪認識の分子機構が存在する可能性があり、その解明は非常に大きなインパ

クトがあるものと想定される。

4)GIP受容体alternative splicingの分子機構

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文／プロシーディング

1 Ban N, Yamada Y, Someya Y, Ihara Y, Adachi T, Kubota A, Watanabe R, Kuroe A, Inada A, Miyawaki K, Sunaga Y, Shen ZP, Iwakura T, Tsukiyama K, Toyokuni S, Tsuda K, Seino Y:Activating transcription factor-2 is a positive regulator in CaM kinase IV-induced human insulin gene expression.Diabetes 49(7): 1142-1148, 2000.

2 Fujimoto S, Tsuura Y, Ishida H, Tsuji K, Mukai E, Kajikawa M, Hamamoto Y, Takeda T, Yamada Y, Seino Y:Augmentation of basal insulin release from rat islets by preexposure to a high concentration of glucose.Am J Physiol 279(4): E927-E940, 2000.

3 Toyokuni S, Yamada S, Kashima M, Ihara Y, Yamada Y, Tanaka T, Hiai H, Seino Y, Uchida K:Serum 4-hydroxy-2-nonenal-modified albumin is elevated in the patients with type 2 diabetes mellitus.Antiox Redox Signal 2(4): 681-685, 2000.

4 Ihara Y, Yamada Y, Toyokuni S, Miyawaki K, Ban N, Adachi T, Kuroe A, Iwakura T, Kubota A, Hiai H, Seino Y:Antioxidant  $\alpha$ -tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes.FEBS Lett 473(1): 24-26, 2000.

5 Iwakura T, Fujimoto S, Kagimoto S, Inada A, Kubota A, Someya Y, Ihara Y, Yamada Y, Seino Y:Sustained enhancement of Ca<sup>2+</sup> influx by glibenclamide induces apoptosis in RINm5F cells.Biochem Biophys Res Commun 271(2): 422-428, 2000.

6 Mukai E, Ishida H, Fujimoto S, Kajikawa M, Okamoto Y, Fujita J, Hamamoto Y, Tsuura Y, Yamada Y, Furukawa N, Ohta T, Seino Y:The insulinotropic mechanism of the novel hypoglycaemic agent JTT-608: direct enhancement of Ca<sup>2+</sup> efficacy and increase of Ca<sup>2+</sup> influx by phosphodiesterase inhibition.Br J Pharmacol 129(5): 901-908, 2000.

7 Nunoi K, Yasuda K, Tanaka H, Kubota A, Okamoto Y, Adachi T, Shihara N, Uno M, Xu LM, Kagimoto S, Seino Y, Yamada Y, Tsuda K:Wotmannin, PI3-kinase inhibitor: promoting effect on insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells through a cAMP-dependent pathway.Biochem Biophys Res Commun 270(3): 798-805, 2000.

8 Miura T, Kato O, Iwamoto N, Yamada Y, Ishida T, Seino Y, Tanigawa K:Effect of epinephrine on GLUT2 protein content in mouse liver.Biol Pharm Bull 23(11): 1374-1376, 2000.

9 Adachi T, Yasuda K, Okamoto Y, Shihara N, Oku A, Ueta K, Kitamura K, Saito A, Iwakura I, Yamada Y, Yano H, Seino Y, Tsuda K:T-1095, a renal Na<sup>+</sup>-glucose transporter inhibitor, improves hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats.Metabolism 49(8): 990-995, 2000.

10 Yamada Y, Kuroe A, Li Q, Someya Y, Kubota A, Ihara Y, Tsuura Y, Seino Y:Genomic variation in pancreatic ion channel genes in Japanese type 2 diabetic patients.Diabetes Metab Res Rev 17(3):

- 213-216, 2001.
- 11 Shiraishi A, Yamada Y, Tsuura Y, Fijimoto S, Tsukiyama K, Mukai E, Toyoda Y, Miwa I, Seino Y: A novel glucokinase regulator in pancreatic beta cells: precursor of propionyl-CoA carboxylase  $\beta$  subunit interacts with glucokinase and augments its activity. *J Biol Chem* 276(4): 2325-2328, 2001.
  - 12 The Study Group of Comprehensive Analysis of Genetic Factors in Diabetes Mellitus: S20G mutation of the amylin gene is associated with type II diabetes in Japanese. *Diabetologia* 44(7): 906-909, 2001.
  - 13 Sugawara F, Yamada Y, Kuroe A, Someya Y, Kubota A, Ihara Y, Takahashi K, Seino Y: Human TSC-22 gene: no association with type 2 diabetes. *Intern Med* 40(10): 993-997, 2001.
  - 14 Taniguchi T, Okamoto M, Ueno H, Tanaka J, Okamoto M, Hamasaki A, Yamada Y, Seino Y: Use of the insulin sensitivity index obtained from oral glucose tolerance test in Japanese subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 54(2): 143-144, 2001.
  - 15 Hamamoto Y, Tsuura Y, Fujimoto S, Nagata M, Takeda T, Mukai E, Fujita J, Yamada Y, Seino Y: Recovery of function and mass of endogenous  $\beta$ -cells in streptozotocin-induced diabetic rats treated with islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 287(1): 104-109, 2001.
  - 16 Shihara N, Yasuda K, Moritani T, Ue H, Uno M, Adachi T, Nunoi K, Seino Y, Yamada Y, Tsuda K: Synergistic effect of polymorphisms of uncoupling protein 1 and  $\beta$ 3-adrenergic receptor genes on autonomic nervous system activity. *Int J Obes* 25(6): 761-766, 2001.
  - 17 Shen ZP, Nishimura M, Tsuura Y, Fujimoto S, Mukai E, Yamada Y, Seino Y: Distinct effect of diazoxide on insulin secretion stimulated by protein kinase A and protein kinase C in rat pancreatic islets. *Diabetes Res Clin Pract* 53(1): 9-16, 2001.
  - 18 Takeda T, Tsuura Y, Fujita J, Fujimoto S, Mukai E, Kajikawa M, Hamamoto Y, Kume M, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Yamada Y, Seino Y: Heat shock restores insulin secretion after injury by nitric oxide by maintaining glucokinase activity in rat islets. *Biochem Biophys Res Commun* 284(1): 20-25, 2001.
  - 19 Yu L, Wei Q, Jin L, Nishigori H, Nishigori T, Tomura H, Fujita J, Yamada Y, Seino Y, Takeda J: Genetic variation in the hepatocyte nuclear factor (HNF)-3 $\alpha$  gene does not contribute to maturity-onset diabetes of the young in Japanese. *Horm Metab Res* 33(3): 163-166, 2001.
  - 20 Kajikawa M, Fujimoto S, Tsuura Y, Mukai E, Takeda T, Hamamoto Y, Takehiro M, Fujita J, Yamada Y, Seino Y: Ouabain suppresses glucose-induced mitochondrial ATP production and insulin release by generating reactive oxygen species in pancreatic islets. *Diabetes* 51(8): 2522-2529, 2002.
  - 21 Ban N, Yamada Y, Someya Y, Miyawaki K, Ihara Y, Hosokawa M, Toyokuni S, Tsuda K, Seino Y: Hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  recruits the transcriptional co-activator p300 on the GLUT2 gene promoter. *Diabetes* 51(5): 1409-1418, 2002.
  - 22 Miyawaki K, Yamada Y\*, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst JJ, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T, Seino Y (\*M.K. and Y.Y. equally contributed to the study): Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nature Med* 8(7): 738-742, 2002.
  - 23 Shang W, Yasuda K, Takahashi A, Hamasaki A, Takehiro M, Nabe K, Zhou H, Naito R, Fujiwara H, Shimono D, Ueno H, Ikeda H, Toyoda K, Yamada Y, Kurose T: Effect of high dietary fat on insulin secretion in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats. *Pancreas* 25(4): 393-399, 2002.
  - 24 Fujimoto S, Mukai E, Hamamoto Y, Takeda T, Takehiro M, Yamada Y, Seino Y: Prior exposure to high glucose augments depolarization-induced insulin release by mitigating the decline of ATP level in rat islets. *Endocrinology* 143(1): 213-221, 2002.
  - 25 Taniguchi A, Nagasaka S, Fukushima M, Sakai M, Okumura T, Yoshii S, Watanabe T, Ogura M, Yamadori N, Nin K, Kuroe A, Yamada Y, Seino Y, Nakai Y: C-reactive protein and insulin resistance in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism* 51(12): 1578-1581, 2002.
  - 26 Ikebukuro K, Adachi Y, Yamada Y, Fujimoto S, Seino Y, Oyaizu H, Hioki K, Ikehara S: Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats. *Transplantation* 73(4): 512-518, 2002.
  - 27 Kuroe A, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Nakai Y, Taniguchi A, Matsuura T, Suzuki H, Kurose T, Yasuda K, Yamada Y, Seino Y: Impaired  $\beta$ -cell function and insulin sensitivity in Japanese subjects with normal glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract* 59(1): 71-77, 2003.
  - 28 Suzuki H, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Taniguchi A, Nakai Y, Matsuura T, Kuroe A, Yasuda K, Kurose T, Seino Y, Yamada Y: Factors responsible for development from normal glucose tolerance to isolated postchallenge hyperglycemia. *Diabetes Care* 26(4): 1211-1215, 2003.
  - 29 Sugawara F, Yamada Y, Watanabe R, Ban N, Miyawaki K, Kuroe A, Hamasaki A, Ikeda H, Kurose T, Usami M, Ikeda M, Seino Y: The role of the TSC-22 (-396) A/G variant in the development of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 60(3): 191-197, 2003.
  - 30 Hamamoto Y, Fujimoto S, Inada A, Takehiro M, Nabe K, Shimono D, Kajikawa M, Fujita J, Yamada Y, Seino Y: Beneficial effect of pretreatment of islets with fibronectin on glucose tolerance after islet transplantation. *Horm Metab Res* 35(8): 460-465, 2003.
  - 31 Taniguchi A, Nishimura F, Murayama Y, Nagasaka S, Fukushima M, Sakai M, Yoshii S, Kuroe A,

- Suzuki H, Iwamoto Y, Soga Y, Okumura T, Ogura M, Yamada Y, Seino Y, Nakai Y: Porphyromonas gingivalis infection is associated with carotid atherosclerosis in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism* 52(2): 142-145, 2003.
- 32 Pamir N, Lynn FC, Buchan AM, Ehses J, Hinke SA, Pospisilik JA, Miyawaki K, Yamada Y, Seino Y, McIntosh CH, Pederson RA: Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor null mice (GIPR<sup>-/-</sup>) exhibit compensatory changes in the enteroinsular axis. *Am J Physiol* 284(5): E931-E939, 2003.
- 33 Inada A, Hamamoto Y, Tsuura Y, Miyazaki J, Toyokuni S, Ihara Y, Nagai K, Yamada Y, Bonner-Weir S, Seino Y: Overexpression of inducible cyclic AMP early repressor inhibits transactivation of genes and cell proliferation in pancreatic  $\beta$  cells. *Mol Cell Biol* 24(7): 2831-2841, 2004.
- 34 Hansotia T, Baggio LL, Delmeire D, Hinke SA, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y, Holst JJ, Schuit F, Drucker DJ: Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory action of DPP-IV inhibitors. *Diabetes* 53(5): 1326-1335, 2004.
- 35 Tsukiyama K, Yamada Y, Miyawaki K, Hamasaki A, Nagashima K, Hosokawa M, Fujimoto S, Takahashi A, Toyoda K, Toyokuni S, Oiso Y, Seino Y: Gastric inhibitory polypeptide is the major insulinotropic factor in KATP null mice. *Eur J Endocrinol* 151(3): 407-412, 2004.
- 36 Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Nakai Y, Taniguchi A, Matsuura T, Suzuki H, Kurose T, Yamada Y, Seino Y: Insulin secretion and insulin sensitivity at different stages of glucose tolerance: a cross-sectional study of Japanese type 2 diabetes. *Metabolism* 53(7): 831-835, 2004.
- 37 Suzuki H, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Taniguchi A, Nakai Y, Matsuura T, Yasuda K, Hosokawa M, Seino Y, Yamada Y: IGT with fasting hyperglycemia is more strongly associated with microalbuminuria than IGT without hyperglycemia. *Diabetes Res Clin Pract* 64(3): 213-219, 2004.
- 38 Takehiro M, Fujimoto S, Shimodahira M, Shimono D, Mukai E, Nabe K, Radu RG, Kominato R, Aramaki Y, Seino Y, Yamada Y: Chronic exposure to  $\beta$ -hydroxybutyrate inhibits glucose-induced insulin release from pancreatic islets by decreasing NADH contents. *Am J Physiol* 288(2): E372-E380, 2005.
- 39 Radu RG, Fujimoto S, Mukai E, Takehiro M, Shimono D, Nabe K, Shimodahira M, Kominato R, Aramaki Y, Nishi Y, Funakoshi S, Yamada Y, Seino Y: Tacrolimus suppresses glucose-induced insulin release from pancreatic islets by reducing glucokinase activity. *Am J Physiol* 288(2): E365-E371, 2005.
- 40 Miki T, Minami K, Shinozaki H, Matsumura K, Saraya A, Ikeda H, Yamada Y, Holst JJ, Seino S: Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility. *Diabetes* 54(4): 1056-1063, 2005.
- 41 Yorifuji T, Nagashima K, Kurokawa K, Kawai M, Oishi M, Akazawa Y, Hosokawa M, Yamada Y, Inagaki N, Nakahata T: The C42R mutation in the Kir6.2 (KCNJ11) gene as a cause of transient neonatal diabetes, childhood diabetes, or later-onset, apparently type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 90(6): 3174-3178, 2005.
- 42 Beguin P, Mahalakshmi RN, Nagashima K, Cher DH, Takahashi A, Yamada Y, Seino Y, Hunziker W: 14-3-3 and calmodulin control subcellular distribution of Kir/Gem and its regulation of cell shape and calcium channel activity. *J Cell Sci* 118(9): 1923-1934, 2005.
- 43 Beguin P, Mahalakshmi RN, Nagashima K, Cher DH, Kuwamura N, Yamada Y, Seino Y, Hunziker W: Roles of 14-3-3 and calmodulin binding in subcellular localization and function of the small G protein Rem2. *Biochem J* 390(1): 67-75, 2005.
- 44 Kawasaki Y, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Kurose A, Ohya M, Nagasaka S, Yamada Y, Inagaki N, Seino Y: Soluble TNF receptors and albuminuria in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 37(10): 617-621, 2005.
- 45 Ueno H, Yamada Y, Watanabe R, Mukai E, Hosokawa M, Takahashi A, Hamasaki A, Fujiwara H, Toyokuni S, Yamaguchi M, Takeda J, Seino Y: Nestin-positive cells in adult pancreas express amylase and endocrine precursor cells. *Pancreas* 31(2): 126-31, 2005.
- 46 Suzuki H, Fukushima M, Okamoto S, Takahashi O, Shimbo T, Kurose T, Yamada Y, Inagaki N, Seino Y, Fukui T: Effects of thorough mastication on postprandial plasma glucose concentrations in non-obese Japanese subjects. *Metabolism* 54(12): 1593-1599, 2005.
- 47 Zhou H, Yamada Y, Tsukiyama K, Miyawaki K, Hosokawa M, Nagashima K, Toyoda K, Naitoh R, Mizunoya W, Fushiki T, Kadowaki T, Seino Y: Gastric inhibitory polypeptide modulates adiposity and fat oxidation under diminished insulin action. *Biochem Biophys Res Commun* 335(3): 937-942, 2005.
- 48 Wei FY, Nagashima K, Ohshima T, Lu YF, Matsushita M, Yamada Y, Mikoshiba K, Seino Y, Matsui H, Tomizawa K: A novel therapeutic target for hyperglycemia: CDK5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nat Med* 11(10): 1104-1108, 2005.
- 49 Shimono D, Fujimoto S, Mukai E, Takehiro M, Nabe K, Radu RG, Shimodahira M, Kominato R, Aramaki Y, Nishi Y, Funakoshi S, Yamada Y, Seino Y: ATP enhances exocytosis of insulin secretory granules in pancreatic islets under Ca<sup>2+</sup>-depleted condition. *Diabetes Res Clin Pract* 69(3): 216-223, 2005.
- 50 Nishi Y, Fukushima M, Suzuki H, Mitsui R, Ueda N, Taniguchi A, Nakai Y, Kawakita T, Kurose T, Seino Y, Yamada Y: Insulin secretion and insulin sensitivity in Japanese subjects with impaired fasting glucose

and isolated fasting hyperglycemia. *Diabetes Res Clin Pract* 70(1):46-52, 2005.

- 51 Beguin P, Mahalakshmi RN, Nagashima K, Cher DH, Ikeda H, Yamada Y, Seino Y, Hunziker W: Nuclear sequestration of  $\beta$ -subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for  $Ca^{2+}$  channel regulation. *J Mol Biol* 355(1):34-46, 2006.
  - 52 Mitsui R, Fukushima M, Nishi Y, Ueda N, Suzuki H, Taniguchi A, Nakai Y, Kawakita T, Kurose T, Yamada Y, Inagaki N, Seino Y: Factors responsible for deteriorating glucose tolerance in newly diagnosed type 2 diabetes in Japanese men. *Metabolism* 55(1):53-8, 2006.
  - 53 Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Yamada Y, Fukuda K, Shibata T, Kasai Y, Maekawa T, Wada H, Nakamura T, Tanaka K: Successful islet transplantation from non-heart-beating donor pancreata using modified Ricordi islet isolation method. *Transplantation* (in press), 2006.
  - 54 Sassa M, Fukuda K, Fujimoto S, Toyoda K, Fujita Y, Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Ohara T, Okamoto M, Tanaka K, M.D., Seino Y, Inagaki N, Yamada Y: A single transplantation of the islets can produce glycemic stability and reduction of basal insulin requirement. *Diabetes Res Clin Pract* (in press)
  - 55 Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, Harada N, Kawasaki Y, Ogura M, Bessho K, Li M, Amizuka N, Sato M, Udagawa N, Takahashi N, Tanaka K, Oiso Y, Seino Y: Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation following food ingestion. *Mol Endocrinol* (in press)
- 2) データベース/ソフトウェア  
なし
- 3) 特許など
- 56 清野裕, 宮脇一真, 山田祐一郎, 坂信広, 鏑本義治, 武田基弘, 橋本洋幸, 山下篤行, 城森孝仁 インスリン抵抗性及び/又は肥満の予防剤もしくは改善剤、特願2001-144416、平成13年5月15日出願
- 4) その他顕著なもの
- 57 2000年5月 日本栄養・食糧学会奨励賞『糖代謝における消化管因子の役割に関する研究』
  - 58 2004年5月 日本糖尿病学会リリー賞『消化管シグナルによる膵 $\beta$ 細胞・脂肪細胞の機能連関とその破綻』