

200907007A

厚生労働科学研究費  
創薬基盤推進研究事業

体脂肪減少因子を用いた2型糖尿病の治療に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 純

平成22年(2010) 5月

## 【目次】

1 総括研究報告	_____	2
----------	-------	---

「体脂肪減少因子を用いた2型糖尿病の治療に関する研究」  
岐阜大学大学院医学系研究科 内分泌代謝病態学

武田 純（代表）

堀川幸男

鈴木英司

2 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	10
------------------	-------	----

3 研究成果の刊行物	_____	15
------------	-------	----

## 【 1 】 総括研究報告

体脂肪減少因子を用いた2型糖尿病の治療に関する研究

主任研究者 武田 純

岐阜大学大学院医学系研究科

分子構造学講座 内分泌代謝病態学分野 教授

研究要旨

日本人の2型糖尿病はインスリン分泌不全を一義的な病態とし、インスリン抵抗性の付加に対して十分な代償が得られないために耐糖能が破綻する。従って、軽度の肥満であってもその分泌負荷は大きく、先ず初期分泌から障害されて食後血糖の上昇をきたす。血糖の適正化にはインクレチンなど液性因子が重要な働きを担っている。そこで、トランスクリプトーム研究により、血糖値に関する液性因子の探索スクリーニングを実施した。その結果、発現プロファイルの比較解析により、体脂肪蓄積を減少させると共に、血糖を低下させる 32kDa 分泌蛋白を発見した。本研究では、同蛋白の作用機序の解明と共に、糖脂質代謝異常の診断法の開発と治療への応用を目指す。前年度までの発現実験では、血糖降下の機序として肝臓での糖取込みが重要である可能性が示唆されている。そこで、肝の糖脂質代謝に関連する肝因子 ChREBP の解析も平行して行った。32kDa 蛋白を過剰発現する実験動物の作成も試み、治療薬への展開も模索した。さらに、ヒトにおける血中測定系を開発し、表現型における意義や早期診断マーカーの可能性についても臨床的に検討を加えた。一方、インクレチン GLP-1 も血糖低下と体重減少の両効果を併せ有するので、インクレチン経路に関する遺伝子多型も解析し、液性因子の感受性体質の検討モデルとした。

分担者

岐阜大学医学部附属病院

医療連携センター

堀川幸男（準教授、副センター長）

健康障害半減講座（岐阜県）

鈴木英司（准教授）（平成21年度に  
岐阜県総合医療センターへ異動）

A 研究目的

日本人の2型糖尿病は比較的やせ型であり、インスリン分泌不全を主たる病態とする。初期の潜在的な分泌不全に軽度の抵抗性が重なることにより、代償能が不十分な体質では耐糖能異常が惹起される。従って、2型糖尿病の治療や予防において肥満の有無やその程度は大きな検討課題である。

最近の日本人の病態を知るために岐阜市で実施された糖尿病の実態調査（40歳以上から無作為抽出の1,070人を対象とした75g経口糖負荷試験

GTT) では、日本人の病態はインスリン分泌不全であり、特に初期分泌から障害されて食後血糖の上昇が始まることが確認された (insulinogenic index は境界型 (男性:  $0.5 \pm 0.4$ 、女性:  $0.5 \pm 0.4$ ) の段階で既に正常型 (男性:  $0.9 \pm 2.4$ 、女性:  $1.0 \pm 6.0$ ) の約半分に低下していた)。肥満の有無に影響されなかったため、これは日本人に特有な基本病態と考えられた。しかも、合併する肥満やインスリン抵抗性が軽度であり (糖尿病型 HOMA-R: 男性  $2.1 \pm 1.3$ 、女性  $2.8 \pm 2.7$ )、補完するインスリン分泌能が備わっていないことも確認された (欧米人のような HOMA- $\beta$  高値は見られなかった)。食事療法による減量は長期の努力を要するが、十分な改善を見るに至らない場合が多く、運動療法はインスリン抵抗性の改善に欠かせないが、心機能の低下、腎障害、増殖網膜症、関節障害、リハビリなどを有する状態では困難である。従って、効率的な体脂肪減が望め、しかも血糖改善を同時に見込める治療は理想的である。

我々は、膝島トランスクリプトーム研究の過程において、特に分泌蛋白をコードする遺伝子に焦点を当ててきた。その理由は、患者の血中測定と治療的な投与が容易であり、臨床応用に直結するからである。正常と糖尿病における発現プロフィール解析から、幾つかの変化遺伝子に着目した。実験動物の肝で過剰発現させたところ、生理機能が不明な 32kDa 分子が血糖値を低下させ、興味深いことに体脂肪減少も観察された。

本研究では、同分子について作用機序を解明すると共に、同じく血糖低下と体脂肪減を生じる他の液性因子についても検討を加えた。

近年、内臓脂肪型肥満を基盤とし、耐糖能障害、脂質異常症、高血圧などを合併した病態はメタボリック症候群とよばれ、心血管障害の危険因子として広く知られる。高炭水化物及び高脂肪食により誘発される臓器内脂肪蓄積はインスリン感受性

の低下の原因として注目される。この際の脂肪合成はインスリンとグルコースによる相乗効果とされる。近年我々はグルコース活性化転写因子に注目し、ChREBP の機能抑制が耐糖能、脂肪肝、肥満などの病態が改善することを明らかにした。ChREBP は cAMP および AMP により転写活性が抑制され、肥満糖尿病モデルマウスで脂肪肝が改善することが報告されている。さらに脂肪肝が生じた際に部分的な効果として求心性の迷走神経シグナルを介した脂肪燃焼作の存在が報告されていることから、同病態では肝臓からのある種の分泌蛋白が放出されると考えた。

本年度の研究では、食後血糖の改善に関する上記の液性因子の解析と肝臓での糖脂質代謝との関連について解析する。さらに、GLP-1 も同様に血糖低下と体脂肪を減少させる効果を併せ有するので、本研究の一環としてインクレチン経路の関連遺伝子解析も実施した。

## B 研究方法

### 32kDa 蛋白トランスジェニックマウスの作成

CMV プロモーターを用いて全身に 32kDa 蛋白を過剰発現させた。すなわち、pCXN2 (pCAGGS) に human 32kDa 蛋白 cDNA を入れ、pCXN2-hLT を用いて TG マウスを作成した。

### 32kDa 蛋白と臨床表現型との相関解析

対象は、当院に入院中の糖尿病患者男性 67 人、女性 38 人、計 105 人 (1 型糖尿病 5 人、2 型糖尿病 100 人)。年齢は 20-83 歳 (平均  $58.9 \pm 13.5$  人)、平均 BMI  $25.2 \pm 5.5$ 、平均 HbA1c  $8.8 \pm 1.7\%$  である。早朝空腹時と朝食後 2 時間後に採血し、血糖値 (mg/dl)、C ペプチド (ng/ml)、32kDa 蛋白 (ng/ml) を測定した。そのほかに、腎機能の指標として eGFR ( $\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ ) と、動脈硬化の指標として baPWV (上腕-足首間脈波伝播速度) および総頸動脈内中膜複合体厚 (IMT) を解析に用いた。

## ChREBP の肝における糖脂質代謝の解析

ChREBP の機能抑制はメタボリックシンドロームの病態改善につながることから、本計画では ChREBP の活性制御による肥満糖尿病の治療法を確立することを目指し、以下の目標を立てている。1) ChREBP の転写活性を抑制する新規薬剤の開発

Mlx は ChREBP とヘテロダイマーを形成し、核内で ChRE (Carbohydrate response element) に結合する。そこで、Mlx の機能変異体はデコイとして ChREBP の転写活性抑制をおこなえると考えた Mlx を 4 つの細胞内ドメインでわけ、変異体のスクリーニングを行い、抑制的デコイとなる可能性を検討した。

2) ChREBP により発現調節をうける分泌蛋白の探索と発現機序の解明

グルコース活性化転写因子 (ChREBP) は、肝臓における脂肪合成の約 60% を制御する転写因子であり、代謝症候群の肝臓では ChREBP の活性が亢進する。ChREBP の機能抑制は肥満糖尿病の改善につながることから、本申請計画は ChREBP の活性制御による肥満糖尿病治療法を確立することを目指した。本年度は、ChREBP 過剰発現マウスを用いた DNA マイクロアレイにより発現増加のみられた分泌蛋白を複数獲得した。FGF-21 は血糖降下作用、肥満改善効果を有しているため、ChREBP との相互作用について検討した。

3) ChREBP 転写活性抑制薬のスクリーニング

グルコース反応性遺伝子発現能が保存されているラット膵β細胞株 INS-1E 細胞を用いて、免疫染色 (核内への移行)、two hybrid アッセイ (ChREBP と Mlx の分子間結合をみる)、CHIP アッセイ (ChREBP と ChoRE の結合をみる)、レポーターアッセイ (実際の転写活性) の組み合わせを検討した。

## インクレチン関連遺伝子多型と関連解析

今年度はインクレチン (GLP-1) の合成と分解に関連する経路の責任遺伝子についても検討を加え

た。GCG、GLP1R、DPP4、PCSK1、GIP、GIPR の全 79 エクソン領域について、2 型糖尿病 86 人のサンプルを用いて直接シーケンスにより変異スクリーニングを行い、ミスセンス変異に関しては正常対照を最大 567 人までシーケンスし比較した。また関連解析については、SNP-200 と SNP-232 について、新たに 2 型糖尿病 743 人、正常 442 人を用いた遺伝子パネルを用いて関連解析を行い、再現性を検討した。また機能解析として、MIN6 を用いたレポーターアッセイにて、SNP-232 の転写活性への影響について検討した。

## 倫理面への配慮

全ての実験はヘルシンキ宣言と研究指針を遵守して行われる。本計画は医学部の遺伝子解析と臨床研究に関する倫理審査委員会の承認を既に受けている。DNA と血液試料はインフォームドコンセントを取得した後に提供を受け、連結可能匿名化で保存されている。匿名化 DNA はさらにプレート番号のみで表されるので二重に匿名化され、被験者のプライバシーは完全に保護される。

個人情報はずべて本研究に関わらない秘守義務を負う識別管理者 (倫理委員会の指定者) が管理する。保存コンピュータはインターネットに連結せず、専用で独立である。

## C 研究結果

### 32kDa 分子のトランスジェニックマウスの作成

CMV プロモーターを用いて全身に 32kDa 蛋白を過剰発現させた。生まれた仔のゲノムタイピングの結果、得られたファウンダーラインは 5 系統であった。そのうち、3 系統が次の世代でタイピング陽性 (#68, 90, 118) であった。残念ながら発現レベルは対照に比して有意差なく、大きな表現型の違いは見出すことができなかった。その考察として、第一に、全身で発現するプロモーターを使用

したので、胎生期に高発現動物は致死性であった可能性がある。ヒトと比べてマウスでは血中レベルが高いことも関連すると思われる。そこで、もとより豚島で同定された分子であるので、発現分子が門脈に放出されて肝臓で機能を発揮するモデル作成のために、新たにインスリンプロモーターを有するベクター(pINS)を用いた TG マウスを作成することに変更した。

#### 32kDa 蛋白と臨床表現型との相関解析

血中 32kDa 濃度は、空腹時 1 型糖尿病では平均  $8.6 \pm 5.2$  ng/ml、2 型糖尿病で  $9.8 \pm 7.4$  ng/ml、食後 2 時間で 1 型糖尿病では平均  $7.4 \pm 4.0$  ng/ml、2 型糖尿病で  $9.2 \pm 6.7$  ng/ml であり、1 型と 2 型の間で有意差を認めなかった。男女別では空腹時で男性  $10.3 \pm 8.4$  ng/ml、女性  $8.8 \pm 4.5$  ng/ml、食後 2 時間で男性  $9.5 \pm 7.4$  ng/ml、女性  $8.4 \pm 4.6$  ng/ml であり、男女間で有意差を認めなかった。

全体群では年齢、BMI、罹病年数、eGFR、血糖値、C ペプチド、HbA1c、baPWV、平均 IMT と空腹時および食後 2 時間での血中 32kDa 値に相関は見られなかった。次に対象症例のうち SU 薬とインスリンを使用していなかった 28 人（男性 15 人、女性 13 人）のみについて、同様の解析を行った。その結果、少ないサンプル数ではあるが、食後 2 時間での血中 32kDa 値と血中 C ペプチド濃度の間に相関を認めた ( $p=0.0046$ 、 $r=0.513$ )。

#### ChREBP の肝における糖脂質代謝の解析

(1) ChREBP の転写活性調節抑制能を有する Mlx 機能変異体の同定

N 端及び DNA 結合領域である basic 領域を欠失させた変異体には、ChREBP 転写活性の抑制作用があることがわかった。同変異体をアデノウイルスにより肝細胞で強発現させたところ、transketolase (ChREBP の活性化物質である Xylulose-5-phosphate の合成酵素) や ChREBP のグルコースによる誘導が阻害された。すなわち、

グルコースによる ChREBP の活性化には positive feedback loop が存在することが明らかとなった。また、同変異体を糖尿病予備軍である加齢マウスに過剰発現させたところ、血糖降下と中性脂肪減少がみられた。その際、肝臓内 Elovl-6 や glucose-6-phosphatase の発現は低下した。Elovl-6 抑制は肝内脂肪組成の不飽和脂肪酸含量を減少させ、インスリン感受性を改善することや G-6Pase の発現低下は肝糖放出を抑制することから、Elovl-6 および G-6-Pase の発現抑制は血糖降下作用の一部を説明すると考えられた。

(2) ChREBP による血糖降下作用を有する分泌蛋白 FGF21 の発現調節機構の解明

ラット肝細胞において、グルコース刺激および ChREBP の過剰発現により FGF-21 の発現が顕著に誘導されること、かつ ChREBP の転写活性を阻害する優性阻害 Mlx (dn-Mlx) の過剰発現によりグルコースによる FGF21 の誘導が阻害されることを明らかにした。さらにマウス FGF-21 プロモーターの機能解析により FGF21 遺伝子のグルコース反応領域を同定した。次に、FGF-21 発現アデノウイルス感染マウスを作成し、肝臓で強発現させたところ血糖降下作用および ChREBP 標的遺伝子の発現レベルが低下した。また FGF21 をラット肝細胞に過剰発現した場合は in vivo での成績と異なり、ChREBP の標的遺伝子の発現レベルは不変であった。従って、ChREBP は FGF21 の発現を転写レベルで制御するが、FGF21 は全身での血糖降下作用により間接的に ChREBP の転写活性を抑制することが明らかになった。

(3) ChREBP 転写活性抑制薬のスクリーニング法の確立

ChREBP の活性化には、脱リン酸化、Mlx との結合、核内移行、標的遺伝子の ChoRE (Carbohydrate response Element) への結合の各ステップが必要である。ChREBP に作用する薬剤をスクリーニング

する際に、どのステップに作用するかがわかれば、作用機序から副作用をふくめた作用が予想できると考えた。そこで、グルコース反応性遺伝子発現能が保存されているラット膵β細胞株 INS-1E 細胞を用いて、核内移行の免疫染色、two hybrid アッセイ、CHIP アッセイ、レポーターアッセイを組み合わせた検出系を構築した。同法により、ChREBP の転写活性能への影響だけでなく薬剤の作用部位の同定まで 系統的にかつ迅速におこなうことが可能となった。

#### インクレチン合成と作用経路の関する遺伝子多型

GLP-1 は体重減少効果と血糖低下作用を有する液性因子である。関連遺伝子のエクソン領域の直接シーケンスにて新規の 40 個を含む 108 個の変異を検出した。ミスセンス変異は 21 個で、うち 3 個は正常対照群に認められず、他は患者群と対照群に頻度に有意差を認めなかった。SNP-200 と SNP-232 についての関連解析の結果は、年齢、性別、BMI にて補正を行うと、SNP-200 では有意差を見なかったが、SNP-232 で  $p=0.056$  と有意な傾向を認め、パネル 1 と 2 を合計すると (DM 1,303 人、対照 1,018 人)  $p=0.044$  (OR 0.869 : 95%CI 0.758-0.996) とボーター領域の有意差を認めた。レポーターアッセイによる機能解析では SNP-232 のアリル 1 はアリル 2 に比べ転写活性が 0.77 倍に低下していた。

SNP-232 はイントロン多型であるが、独立 DNA パネルにて再現性が確認されたこと、機能解析でアリルによる転写活性の相違を認めたことから、SNP-232 は転写活性を介して GLP-1 分泌に影響し、糖尿病発症に関連する可能性が示唆された。現在、正常ボランティアにおける SNP-232 と食前後の血中 GLP-1 濃度との相関について解析を行っている。

#### D 考察

高血糖と過体重の解消は重要であるが、食事療法と運動療法を中心とした治療は不断の長期努力を

要し、十分な改善に至らない場合が多い。特に高齢者では運動制限がある場合が多く、効果的な減量と耐糖能の改善を同時に見込める治療は理想的である。

32 kDa 分子は主として肝臓の糖代謝に作用して血糖値を低下させる可能性が考えられるが、全身に高発現させる TG マウスの解析は功を奏さなかった。もとより膵島で同定された分子であるので、同細胞での発現と門脈への放出が自然であり、戦略が不適切であった可能性がある。現在、膵島で発現させる修正方向で研究戦略を再構築している。一方、ヒトでの検査成績はゲッ歯動物の生理学的解析結果と異なる部分が多く認められた。これは種差に起因するものと考えられるので、実験動物から得られた成績の解釈は慎重になるべきである。臨床応用においては、今後は臨床解析を中心に行うことが重要であると認識した。一方、患者解析では、32 kDa 分泌がインスリン分泌のサロゲートマーカーとなる可能性が示唆されたので、もし変化が病態に先行するならインスリン分泌不全の予知的マーカーとなりうると考え、現在検討数を増やしている。

本邦においても、DPP4 阻害薬と GLP-1 受容体作動薬による 2 型糖尿病の新たな治療が開始され、体脂肪減少因子であり、血糖改善薬でもある GLP-1 についての研究の重要性は益々高まる。我々は、GLP-1 関連 4 遺伝子 (*GCG*, *GLP1R*, *DPP4*, *PCSK1*) の多型について関連解析を行い、有意な関連を示した 2 個の SNP (SNP-200、SNP-232) を見出したが、今回更にその解析を進めることができた。これらの遺伝マーカーは薬剤感受性の指標となる可能性が期待される。

#### E 結論

血糖低下と体重減少に関わる 3 種類の液性因子 (32kDa 蛋白、FGF21、インクレチン) について研



究を進めてきた。前2者については臨床診断マーカーの可能性のみならず、治療薬の可能性も期待されるので、今後も臨床応用を視野に捉えた研究を継続する。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### 論文発表

Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y.  
Hepatic overexpression of dominant negative Mlx improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 379: 499-504, 2009

Kuroda E, Horikawa Y, Enya M, Oda N, Suzuki E, Iizuka K, and Takeda J.  
Identification of minimal promoter and genetic variants of Kruppel-like factor 11 gene and association analysis with type 2 diabetes in Japanese.  
Endocr. J. 56: 275-286, 2009.

Miyake K, Yang W, Hara K, Yasuda K, Horikawa Y, Osawa H, Furuta H, Ng MCY, Hirota Y, Mori H, Ido K, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Takeda J, Maeda E, Yamamoto K, Tokunaga K, Ma RCW, So WY, Chan JCN, Kamatani N, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with

strong evidence of the association. .  
J. Hum. Genet. 54: 236-241, 2009.

Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y.  
Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes.  
FEBS Lett. 583: 2882-2886, 2009

### 学会発表

堀川幸男  
2型糖尿病感受性遺伝子同定の軌跡  
第43回糖尿病学の進歩、松本、2月、2009

飯塚勝美、堀川幸男、武田 純  
転写因子Mlxの肝糖脂質代謝調節における役割  
第52回日本糖尿病学会、大阪、5月、2009

塩谷真由美、堀川幸男、西村英尚、武田 純  
全ゲノム関連解析により獲得された2型糖尿病感受性SNPsの統合的解析  
第52回日本糖尿病学会、大阪、5月、2009

徳永あゆみ、堀川幸男、秋田悦子、沖田孝平、岩橋見、下村伊一郎、武田 純、山県和也  
日本人非肥満2型糖尿病患者において、HNF-4 $\alpha$ 遺伝子P2プロモーター領域のSNPがインスリン分泌と関連する  
第52回日本糖尿病学会、大阪、5月、2009

武田 純  
日本人2型糖尿病と食後血糖の管理  
第82回日本内分泌学会、前橋、4月、2009

武田 純  
糖尿病の薬物特性に基づく最新薬物療法

$\alpha$  グルコシダーゼ阻害薬の特性と病態の予防効果  
について

第82回日本内分泌学会、前橋、4月、2009

武田 純

日本人の体質を考えた2型糖尿病の治療

第45回日本内科学会生涯教育講演会、名古屋、  
6月、2009

武田 純

日本人2型糖尿病におけるインスリン抵抗性をど  
う考えるか？

第46回日本内科学会生涯教育講演会、岐阜、6  
月、2009

## H 知的財産権の出願・登録

### 1 特許取得

なし

### 2 実用新案登録

なし

### 3 その他

なし

## 【2】研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	ページ	出版年
E. Kuroda, et al.	Identification of minimal promoter and genetic variants of Kruppel-like factor 11 gene and association analysis with type 2 diabetes in Japanese.	Endocrine Journal	56	275-286,	2009
K. Iizuka, et al.	Hepatic overexpression of dominant negative Mlx improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice.	Biochemical and Biophysical Research Communications	379	499-504	2009
K. Miyake, et al.	Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on eleven genes with strong evidence of the association.	Journal of Human Genetics	54	236-241	2009
K. Iizuka, et al.	Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in	FEBS Letter	583	2832-2836	2009

	rat hepatocytes.				
M. Ishiyama et al.	Associations of coronary artery calcification and carotid intima-media thickness with plasma concentrations of vascular calcification inhibitors in type 2 diabetic patients.	Diabetes Research and Clinical Practice	85	189-196	2009
T. Watanabe et al.	Sonographic evaluation of the median nerve in diabetic patients: comparison with nerve conduction studies.	Journal of Ultrasound Medicine	28	727-734	2009
T. Watanabe et al.	Sonographic evaluation of the peripheral nerve in diabetic patients :the relationship between nerve conduction studies, echo intensity, and cross-sectional area	Journal of Ultrasound Medicine	29	697-708	2010
飯塚勝美, 堀川幸男	グルコース感受性転写因子 : ChREBP,	細胞工学	28	780-783	2009

堀川幸男	全ゲノム関連解析 (GWAS) の成果をふま えた 2 型糖尿病遺伝 子同定の現状と課題,	Diabetes Journal	37	95-103	2009
堀川幸男, 安田和基.	オーダーメイド医療 の将来-糖尿病治療の 新しい展開	文光堂		118-125	2009
堀川幸男 武田 純	ビグアナイドとチア ゾリンの使い分け	日本医事新報	4446	76-77	2009
堀川幸男 塩谷真由美	これからの糖尿病遺 伝子同定戦略	医学のあゆみ	232	1201-1206	2010
堀川幸男 武田 純	SU 薬でコントロール 不良患者の対応	日本医事新報	4478	94-95	2010
堀川幸男 武田 純	インスリン抵抗性: 第 一選択薬は抵抗性改 善薬かインクレチン か?	治療	92	611-617	2010
塩谷真由美 堀川幸男 武田 純	DPP-4 阻害薬 Q&A	薬局	61	78-82	2010

## 書籍

堀川幸男 武田 純	日本人の糖尿病治療における DPPIV 阻害剤の位置づけ	DPPIV 阻害剤 のすべて	先端医学社	pp155-162	2010
堀川幸男 塩谷真由美 武田 純	インクレチン・エンハンサーとその作用 我が国の糖尿病治療においてインクレチン製剤をどのように使うか	Progress in Medicine	ライフ・サイ エンス	Pp345-352	2010

### **【3】研究成果の刊行物・別刷**



## Identification of Minimal Promoter and Genetic Variants of Kruppel-like Factor 11 Gene and Association Analysis with Type 2 Diabetes in Japanese

EIJI KURODA\*, YUKIO HORIKAWA\*\*\*, MAYUMI ENYA\*, NAOHISA ODA\*\*\*, EIJI SUZUKI\*, KATSUMI IIZUKA\*\* AND JUN TAKEDA\*

\*Department of Diabetes and Endocrinology Division of Molecule and Structure, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan

\*\*Laboratory of Medical Genomics, Biosignal Genome Resource Center, Institute for Molecular and Cellular Regulation; Gunma University, Maebashi, Japan

\*\*\*Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine, Aichi, Japan

**Abstract.** Genetic analysis of the KLF11 gene revealed two rare variants, A347S and T220M, segregating in families with early-onset type 2 diabetes, and one frequent polymorphic Q62R variant significantly associated with type 2 diabetes in Northern Europeans. Furthermore, it has been reported that over-expression of KLF11 has a deleterious effect on insulin promoter activity. Thus, an altered expression level of KLF11 may contribute to the occurrence of type 2 diabetes. To investigate the contribution of KLF11 to type 2 diabetes in Japanese, we surveyed the 5' flanking region of *KLF11* by reporter assay and identified the minimal promoter region of the gene. The promoter region from –250 to +162 bp including five Sp1 binding sites showed basal promoter activity both in MIN6-m9 and HepG2 cells. We also examined the entire region of *KLF11* to detect genetic variants. A total of 19 polymorphisms, six of which are novel, were identified, but none of them showed association with the occurrence of type 2 diabetes. Two of the identified polymorphisms, R29Q and S124F, are novel coding variants. Functional analyses of these variants were performed, and similarly reduced effects on transcriptional activities of insulin, catalase1, and the Smad7 gene were found. We conclude that variants of *KLF11* are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese. The promoter region of *KLF11* identified in the present study should be useful in further elucidation of the transcriptional regulation mechanism of the gene and genetic analyses of type 2 diabetes.

*Key words:* KLF11, SNP, association study, promoter, type 2 diabetes

(Endocrine Journal 56: 275–286, 2009)

**KRUPPEL-LIKE** transcription factor (KLF)11 (also known as TIEG2) is a member of the Sp1-like transcription factor family, which is defined by the presence of three conserved DNA-binding C-terminal zinc finger domains and variant N-terminal domains [1–4]. In contrast with Sp1, one of the best-characterized transcriptional activators, KLF11 behaves as a potent transcriptional repressor. KLF/Sp1-like transcription

regulation may participate in many aspects of cellular function, including cell proliferation, apoptosis, differentiation, and neoplastic transformation [5–8].

The KLF11 gene is located at chromosome 2p25 [9], and is ubiquitously expressed in human tissues with an abundance in pancreas and muscle [4]. KLF11 has elicited significant attention due to its role as a negative regulator of exocrine cell growth by decreasing growth and increasing apoptosis via a mechanism that involves down-regulation of the oxidative stress genes SOD2 and catalase1 [10], which also are expressed in pancreatic islets, and an increased susceptibility to oxidative insult [11]. The Smad-regulated transcriptional pathway plays a central role in TGF- $\beta$

Received: October 21, 2008

Accepted: December 12, 2008

Correspondence to: Yukio HORIKAWA, M.D., Ph.D., Department of Diabetes and Endocrinology, Division of Molecule and Structure, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan

induced cell growth inhibition [12]. Smad signaling activity is potentiated by KLF11 in normal epithelial cell lines through termination of the negative feedback loop imposed by Smad7, which requires binding to GC-rich promoter boxes of the Smad7 promoter [13], and the TGF- $\beta$  signaling pathway is a major regulator of endocrine cell fate [14–16].

The role of KLF11 within the endocrine pancreas remains to be elucidated. Recently, Neve *et al.* reported that KLF11 binds to the insulin promoter and up-regulates its activity in beta-TC3 cells. Genetic analysis of *KLF11* revealed two rare variants (Ala347Ser and Thr220Met) that segregate with diabetes in families with early-onset type 2 diabetes (T2DM) and significantly impair its transcriptional activity [17]. On the other hand, Niu *et al.* reported that over-expression of hKLF11 inhibits the activity of human insulin promoter in INS-1E and beta-TC3 cells in a dose-dependent and glucose-independent manner [18]. Furthermore, it has been reported that a *KLF11* promoter variant has a deleterious effect on insulin sensitivity via STAT3-mediated up-regulation of *KLF11* [19]. Thus, an altered expression level of KLF11 may contribute to the occurrence of type 2 diabetes.

In this study, we surveyed the 5' flanking region of *KLF11* and identified the minimal promoter region of the gene, which should be useful in further genetic and functional analyses of type 2 diabetes. We also examined all of the regions of *KLF11* in twelve Japanese subjects to detect genetic variants, evaluated the pattern of linkage disequilibrium to infer haplotypes in the gene, and performed association studies with type 2 diabetes patients.

## Material and Methods

### Subjects

A total of 182 Japanese subjects with clinical diagnosis of early-onset type 2 diabetes (70 males and 112 females; onset age  $11.9 \pm 3.1$  yr, BMI,  $23.9 \pm 6.2$  kg/m<sup>2</sup>; onset HbA1c  $8.8 \pm 3.1\%$ , HbA1c  $7.1 \pm 2.3\%$ ) were screened for mutations by direct sequencing of PCR products. Patients with glutamic acid decarboxylase (GAD) antibodies and other types of diabetes were excluded on the basis of clinical data.

A total of 553 Japanese patients with late-onset T2DM [310 males and 243 females; age at testing,

$61.1 \pm 10.6$  yr; BMI,  $23.9 \pm 4.1$  kg/m<sup>2</sup>; glycosylated hemoglobin (HbA1c),  $7.7 \pm 3.5\%$ ] and 563 controls (224 males and 339 females; age at testing  $67.4 \pm 6.0$  yr; BMI,  $22.9 \pm 2.9$  kg/m<sup>2</sup>; HbA1c,  $5.0 \pm 0.4\%$ ) were examined for association study. The diagnosis of T2DM was based on medical records or 75 g oral glucose tolerance test according to the criteria of the Japan diabetes Society [20]. Informed consent was obtained from all of the diabetic subjects and volunteer controls. The study was approved by the ethics committee of Gifu University.

### SNP identification in *KLF11*

Genomic DNA was extracted from samples of whole blood using QIAamp DNA blood kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Twelve of the random control samples (24 alleles) were used to detect SNPs in *KLF11*. Primers for PCR experiments were designed by Primer3 (available from [http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/preimer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/preimer3_www.cgi)) on the basis of the genomic contig sequence (GenBank ID: NT\_005334.15, nt 5016199–5029771 bp) of the *KLF11* region. The mixture for PCR was 20  $\mu$ l in 10 ng template DNA, 0.5 mM of each dNTP, 2.5 pmol of each forward and reverse primer, 0.5 U ExTaq polymerase (Takara, Kyoto, Japan), and 2  $\mu$ l of 10  $\times$  PCR buffer or 0.4 U KOD FX (TOYOBO, OSAKA, JAPAN) and 10  $\mu$ l of 2  $\times$  PCR buffer for KOD FX. The reaction conditions with Ex Taq polymerase were an initial denaturation step of 94°C for 1 min and a subsequent 35 cycles of reaction at 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 1 min; the reaction conditions with KOD FX were an initial denaturation step of 94°C for 2 min and a subsequent 35 cycles of reaction at 98°C for 10 sec, 60°C for 30 sec, and 68°C for 1 min. After purification, each PCR product was subjected to cycle sequencing with BigDye Terminator cycle sequencing FS (Applied Biosystems, Foster City, CA) using each forward and reverse primer. Reaction products were purified by ethanol precipitation and sequenced by ABI PRISM 3130 sequencer (Applied Biosystems).

### Estimation of haplotype frequencies and evaluation of pattern of LD in *KLF11*

Haplotypes comprising tag SNPs and haplogotypes were inferred by the expectation-maximization

method by Haploview (<http://www.broad.mit.edu/personal/jcbarret/haploview>) and PHASE 2.1.1 (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>), respectively.

#### *Mutation screening and genotyping of frequent polymorphisms in KLF11*

We examined all of the coding regions and the putative promoter region of *KLF11* in 182 early-onset T2DM, 96 of the 553 late-onset T2DM patients (56 males and 40 females; age  $63.2 \pm 11.0$  yr, BMI,  $24.5 \pm 5.4$  kg/m<sup>2</sup>; HbA1c  $7.9 \pm 1.6\%$ ) and 96 of 563 control subjects (35 males and 61 females; age  $67.6 \pm 5.8$  age yr; BMI,  $22.8 \pm 2.8$  kg/m<sup>2</sup>; HbA1c  $4.9 \pm 0.3\%$ ). We performed an additional screening for R29Q and S124F mutations in all late-onset T2DM patients and controls.

Association study was performed for tag SNPs (SNP2, -3, -5, -6) in the promoter region with 96 subjects each from 552 late-onset T2DM and 563 controls by direct sequencing. As it was extremely difficult to amplify the promoter region due to its high GC content, only 96 subjects from each group were examined. Association study for tag SNP 13 (rs6432053) was performed in the 552 late-onset T2DM patients and 563 controls by TaqMan assay (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 7900HT sequence detector (Applied Biosystems). Thermal cycling conditions followed the manufacturer's instructions.

#### *Cell lines*

MIN6-m9 cells were maintained in DMEM containing 25 mM glucose, 10% heat-inactivated FBS, 50 mM 2-mercaptoethanol, 100 mg/l streptomycin sulfate, and 60.5 mg/l penicillin G under a humidified condition of 5% CO<sub>2</sub>-95% air at 37°C [21]. HepG2 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 mg/l streptomycin sulfate, and 60.5 mg/l penicillin G under a humidified condition of 5% CO<sub>2</sub>-95% air at 37°C.

#### *Identification of the minimal promoter region of human KLF11*

To establish the promoter activity of the 5' flanking region of *KLF11*, we designed luciferase expression vectors including a series of 5' deletion fragments.

Three different length fragments, from -1389 to +162 bp, -896 to +162 bp and -250 to +162 bp relative to the transcription start site, were prepared by PCR and inserted into the firefly luciferase reporter vector, pGL4.12-Basic (Promega, Madison, WI). The MIN6-m9 cells or HepG2 cells were seeded in 6-well culture plates. The confluency was 50–70% at the time of transfection. The reporter constructs (500 ng) were transfected to cells by using a ExGEN 500 *in vitro* Transfection Reagent (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). Transcriptional activity was normalized with a co-transfected control thymidine kinase (TK)-regulated Renilla luciferase vector, pRL-TK 17 ng (Promega). Transactivation activity was measured using Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega).

#### *Subcloning of human KLF11 and variants*

A cDNA identical to *KLF11* was retrieved from a human islet cDNA library and subcloned in pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) after amplification with Pfu (Stratagene, La Jolla, CA) and transferred for expression to pcDNA6.2-DEST (Invitrogen). The R29Q and S124F mutations were introduced by site-directed mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA) with pENTR/d-TOPO wild-type *KLF11* as template and confirmed by sequencing.

#### *Functional analysis of KLF11 mutant proteins*

The reporter constructs for insulin, catalase1, or Smad7 promoter-pGL3 were prepared by cloning the human insulin (-365 ~ +40 bp) [18], catalase1 (-734 ~ +11 bp) [10], or Smad7 (-836 ~ +74 bp) [11] gene promoter into the pGL3-Basic vector (Promega, Madison, WI). The MIN6-m9 cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were seeded in 6-well culture plates. The confluency was 50–70% at the time of transfection. Constructed plasmids, pcDNA6.2 wild-type hKLF11, or pcDNA6.2 mutant-type hKLF11 and each reporter construct were transfected to MIN6-m9 cells using ExGEN 500 *in vitro* Transfection Reagent (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). Transcriptional activity was normalized with a co-transfected control thymidine kinase (TK)-regulated Renilla luciferase vector, pRL-TK (Promega). Transactivation activity was measured using Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega).

### Statistical analyses

Statistical difference in allele frequencies between late-onset T2DM and control subjects was assessed by  $\chi^2$  test or logistic regression analysis adjusted for relevant covariates, and other categorical clinical variables were compared using *t* test. Statistical analysis was performed with StatView 5.0 software (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Comparison of estimated haplotype frequencies was performed by conducting separate one-degree of freedom tests for a series of  $2 \times 2$  contingency tables testing the frequency of each specific haplotype vs all others between cases and controls, and omnibus testing of differences in haplotype frequency profiles between the cases and controls (statistical significance assessed empirically via permutation testing with PHASE 2.1.1 software). The present study had about 33–50% power to detect an OR of 1.20 when the frequency of a risk allele was 10–20% and *P*-value was less than 0.05 under a multiplicative model with 553 patients and 563 controls, while it had only 10–13% power to detect an OR of 1.20 when the frequen-

cy of a risk allele was 10–20% and *P*-value was less than 0.05 under a multiplicative model with 96 each of patients and controls.

## Results

### Identification of polymorphisms in *KLF11*

Twelve of the random controls were examined to detect genetic variations in the entire region of *KLF11* including all 4 exons. A total of 17 polymorphisms, four of which are novel, were found as shown in Table 1; the locations of these polymorphisms are shown in Fig. 1 in relation to the genomic structure of *KLF11*. The additional two variants, R29Q and S124F were found by screening a large number of type 2 diabetic patients. Two coding variants, R29Q and S124F, are novel. In the 1552 bp (from –1389 to +162 bp) region of the *KLF11* promoter, a total of seven polymorphisms including four novel ones were identified.

**Table 1.** Polymorphisms identified in *KLF11* region in this study

SNP No.	Position genome	db SNP ID	Variation	Location	Frequencies of minor allele
1	–1348	rs4669520	G>A	5' flanking	0.134
2	–1025	rs35035311	ins G	5' flanking	0.132
3	–530	novel	(CCG)*	5' flanking	4: 0.744 2: 0.139 5: 0.117
4	–499	novel	del (CCCCGCCG)	5' flanking	0.114
5	–446	novel	del/ins (CCCCCTCCG)	5' flanking	0.276
6	–278	novel	del/ins (GGCCGGGCACG)	5' flanking	0.138
7	–86		del/ins (GCC)	5' UTR	0.128
8	1467	rs6717092	C>G	Intron 1	0.136
9	2477	novel	G>A (R29Q)	Exon2	n.d
10	3992	novel	C>A (S124F)	Exon3	n.d
11	4806	rs11687357	T>A (V395V)	Exon3	0.133
12	5856	rs6432052	C>T	Intron 3	0.129
13	5992	rs6432053	T>C	Intron 3	0.268
14	6272	rs6721191	G>A	Intron 3	0.128
15	6741	rs4614909	T>A	Intron 3	0.263
16	8199	rs2487	T>C	Intron 3	0.135
17	10349	rs4669522	C>T	3' UTR	0.145
18	10644	rs7632	C>T	3' UTR	0.274
19	11224	rs6432055	C>T	3' flanking	0.259

\*Triallelic variant with 2, 4, 5 CCG repeats. The nucleotide indicates the location of the SNP relative to the A of ATG of the initiator Met of *KLF11* (GenBank No. NT\_005334.15). The frequencies of minor alleles in this table are observed in 96 random control samples except SNP 9, and 10. n.d; not detected.