

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591070

研究課題名（和文）

2型糖尿病発症における転写因子TFAP2B、KLF7の関与とその分子機構

研究課題名（英文）

Molecular mechanism for the contribution of TFAP2B and KLF7 to the onset of type 2 diabetes.

研究代表者

前田 士郎 (MAEDA SHIRO)

独立行政法人理化学研究所・内分泌・代謝疾患研究チーム・チームリーダー

研究者番号：50314159

研究成果の概要：

本研究は当研究チームで発見した新規2型糖尿病疾患感受性遺伝子TFAP2B、KLF7の2型糖尿病発症に関わる分子機構の解明を目的とした。ハムスター由来のインスリン分泌細胞(HIT-T15)を用いてインスリン分泌を検討したところ、TFAP2B、KLF7ともグルコースによるインスリン分泌を著明に抑制した。このTFAP2Bのインスリン分泌抑制効果は一部GLUT2、Kir6.2、HNF4A発現減少を介している事も明らかとなった。さらにTFAP2Bの膵β細胞特異的トランスジェニックマウスを作成し解析を開始しているが現時点では耐糖能異常等の表現形は認められていない。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：2型糖尿病、膵β細胞、インスリン分泌、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

我が国における糖尿病患者数は増加の一途をたどっている。糖尿病患者の90%以上を占める2型糖尿病患者の成因には、骨格筋、脂肪など末梢でのインスリン抵抗性と膵β細胞からのインスリン分泌不全が関与するがその正確な分子メカニズムに関しては未だ明らかでは無い。一方2型糖尿病の発症には何らかの遺伝子の関与が重要とされており、研究代表者らはゲノムワイドな遺伝学的アプローチにより、Kruppel like factor 7

(KLF7) および Transcription factor activating protein 2 beta (TFAP2B)を新たな2型糖尿病関連遺伝子として同定し、これらの遺伝子発現が脂肪細胞の分化とともに変動する事を明らかにしてきた。最近KLFやAP2といった種々の転写因子ファミリーが脂肪細胞分化などの細胞機能の調節に関わる事が報告されている。しかしながらKLF7やTFAP2Bが2型糖尿病発症にどのように関わるかは明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究は上記の背景に基づき、KLF7, TFAP2B の膵β細胞等での作用を明らかにすると共に、その分子機構を解明する事により、新規の糖尿病治療標的としての意義を明確にする事を目的とするものである

3. 研究の方法

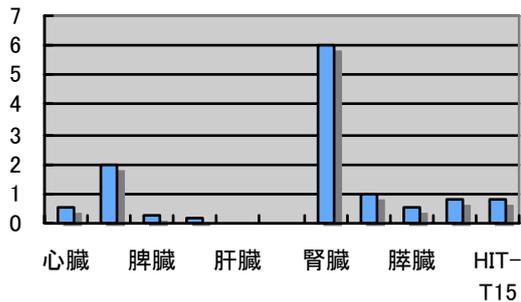
(1) インスリン分泌細胞における TFAP2B の作用の解明

ハムスターインスリン分泌細胞(HIT-T15)におけるインスリン発現およびインスリン分泌能の検討をアデノウイルスベクターによる TFAP2B 過剰発現細胞で行った。また、インスリン分泌への TFAP2B の関与について、その機序を詳細に知るためにインスリン分泌に関与する遺伝子の発現変化を定量 PCR 法で、タンパク発現変化をウェスタンブロット法で解析した。

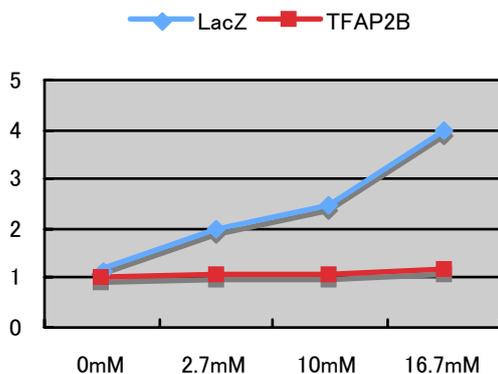
4. 研究成果

(1) インスリン分泌細胞における TFAP2B の作用の解明

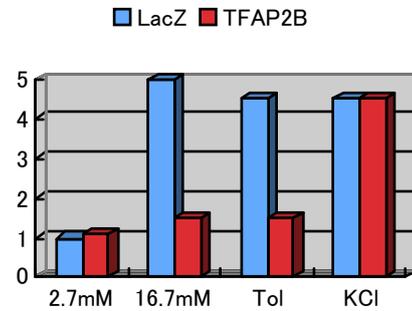
①ヒト膵臓組織および HIT-T15 細胞において TFAP2B mRNA の発現が認められた。



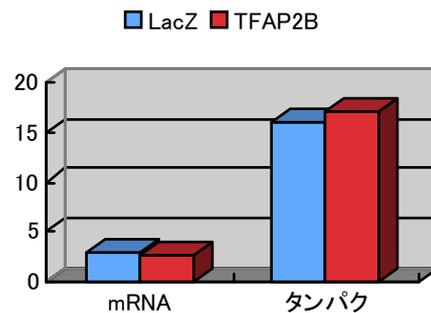
②HIT-T15 にアデノウイルスベクターを用いて TFAP2B を過剰発現すると LacZ 過剰発現細胞 (コントロール) に比しグルコース刺激によるインスリン分泌は完全に抑制された。



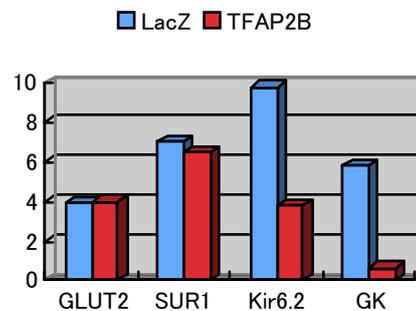
③TFAP2B 過剰発現 HIT-T15 細胞ではグルコース刺激時(16.7mM)のインスリン分泌が著明に抑制された。Tolbutamide 刺激 (Tol:300 μM)によるインスリン分泌も著明に抑制されたが、KCl(30mM)によるインスリン分泌は抑制されなかった。



③インスリン mRNA 発現量および細胞内インスリン量は TFAP2B 過剰発現細胞とコントロールの lacZ 過剰発現細胞との間で差は認められなかった。



④ TFAP2B 過剰発現 HIT-T15 細胞では Kir6.2 およびグルコキナーゼ(GK) mRNA およびタンパク質発現量が有意に低下していた。GLUT2 および SUR1 発現量には差を認めなかった。



(2) TFAP2B 膝β細胞特異的トランスジェニックマウス作成
ラットインスリンプロモーター1 (RIP1) の下流に TFAP2B cDNA を挿入したベクターを複製し以後の過程は外部委託した。
200個の卵にマイクロインジェクションし、35匹のF0マウスのうちサザンハイブリダイゼーション法により2匹の陽性雄マウスが得られた。交配を行い27匹のF1マウスが得られ陽性マウス13匹(雄6匹、雌7匹)を得、その後しばらく飼育したが尿糖陽性等の変化は認められていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

① Zobel D, Andreasen C, Burgdorf K, Andersson E, Sandbæk A, Lauritzen T, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Maeda S, Nakamura Y, Eiberg H, Pedersen O, Hansen T. Variation in the gene encoding Kruppel-like factor 7 influences body fat: studies of 14,818 Danes. *Eur J Endocrinol.* 160: 603-609, 2009 査読有り

② Kondo M, Maegawa H, Obata T, Ugi S, Ikeda K, Morino K, Nakai Y, Nishio Y, Maeda S, Kashiwagi A. Transcription factor AP-2β: a positive regulator of MCP-1 gene expression *Endocrinology* 150: 1654-1661, 2009 査読有り

③ Omori S, Tanaka Y, Takahashi A, Hirose H, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S. Association of CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8 and KCNJ11 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetes*, 57: 791-795, 2008 査読有

④ Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, Ng DPK, Holmkvist J, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Sandbæk A, Lauritzen T, Hansen T, Nurbaya S, Tsunoda T, Kubo M, Babazono T, Hirose H, Hayashi M, Iwamoto Y, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Tai ES, Pedersen O, Kamatani N, Kadowaki T,

Kikkawa R, Nakamura Y, Maeda S. SNPs in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nat Genet* 40: 1097-1102, 2008 査読有り

⑤ Omori S, Tanaka Y, Horikoshi M, Takahashi A, Hara K, Hirose H, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Kadowaki T, Nakamura Y, Maeda S. Replication study for the association of new meta-analysis derived risk loci with susceptibility to type 2 diabetes in 6,244 Japanese individuals. *Diabetologia*, 2009 *in press* 査読有り

⑥ 前田 士郎 : "ゲノムサイエンスからみた脂肪細胞", *The Lipid* 19, 64-70, 2008 査読無し

[学会発表] (計17件)

① Kondo M, Maegawa H, Ikeda K, Fuke T, Ugi S, Nishio Y, Maeda S, and Kashiwagi A : "Transcription Factor AP-2β, A Novel Candidate Gene for Metabolic Syndrome, Accelerates MCP-1 Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes", American Diabetes Association 67th Scientific Sessions, June 22 – 26, 2007

② Tsukada S, Unoki H, Maegawa H, Kashiwagi A, Maeda S. Transcription Factor AP-2 β Inhibits Glucose-Induced Insulin Secretion in Cultured Insulin-Secreting Cell Lines American Diabetes Association 68th Scientific Sessions, June 6 – 10, 2008

③ Omori S, Tanaka Y, Takahashi A, Hirose H, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S. Polymorphisms within CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8 and KCNJ11 Are Associated With Susceptibility to Type 2 Diabetes in a Japanese Population American Diabetes Association 68th

Scientific Sessions, June 6 – 10, 2008

④ Omori S, Tanaka Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Kawamori R, Kaku K, Nakamura Y, Maeda S. CDKN2A/B polymorphism is associated with susceptibility to type 2 diabetes, but not with its expressions in the subcutaneous adipose in the Japanese. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), Sep. 8 – 11, 2008

⑤ 小林 正明,前川 聡,塚田 修市,柏木 厚典, 前田 士郎: "皮下および内臓脂肪組織における 2 型糖尿病関連遺伝子 WNT5B、TFAP2B、KLF7 遺伝子発現の検討", 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 5 月 24-26 日、2007

⑥ 池田 和弘,前川 聡,卯木 智,近藤 基之,西尾 善彦,前田 士郎,柏木 厚典: "皮下および内臓脂肪組織生検によるアディポサイトカイン調節機構の解明", 第50回日本糖尿病学会年次学術集会, 5月24-26日、2007

⑦ 近藤 基之,前川 聡,池田 和弘,森野 勝太郎,卯木 智,西尾 善彦,前田 士郎,柏木 厚典: "肥満 2 型糖尿病発症候補遺伝子 AP-2 β は、MCP-1 分泌を正に制御する", 第50回日本糖尿病学会年次学術集会, 5 月 24-26 日、2007

⑧ 小林 正明,前川 聡,山本 寛,塚田 修市,内藤 弘之,谷 徹,柏木 厚典,前田 士郎: "皮下および内臓脂肪組織における 2 型糖尿病関連遺伝子 WNT5B、TFAP2B、KLF7 遺伝子発現の検討", 日本人類遺伝学会第52回大会, 9 月 12-15 日、2007

⑨ 塚田 修市,前田 士郎,中村 祐輔: "2 型糖尿病疾患感受性遺伝子 TFAP2B は膵 β 細胞からのインスリン分泌調節に関与する", 日本人類遺伝学会第52回大会, 9 月 12-15 日、2007

⑩ 前田 士郎 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子 update 第42回糖尿病学の進歩、2月15-16日、2008

⑪ 大森慎太郎、田中逸、柏木厚典、加来浩平、広瀬寛、河盛隆造、中村祐輔、前田士郎 日本人集団における CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8, KCNJ11 遺伝子多型と 2 型糖尿病疾患感受性との関連 第51回日本糖尿病学会年次学術集会, 5 月 22-24 日、2008

⑫ 卯木浩之、塚田修市、柏木厚典、加来浩平、門脇孝、河盛隆造、吉川隆一、中村祐輔、前田士郎 SNPを用いたゲノムワイドケースコントロール相関解析による 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子の同定 第51回日本糖尿病学会年次学術集会, 5 月 22-24 日、2008

⑬ 塚田修市、卯木浩之、前川聡、柏木厚典、前田士郎 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子 TFAP2B は膵 β 細胞からのインスリン分泌調節に関与する 第51回日本糖尿病学会年次学術集会, 5 月 22-24 日、2008

⑭ 近藤基之、前川聡、福家智也、池田和弘、森野勝太郎、小畑利之、卯木智、西尾善彦、前田士郎、柏木厚典 肥満 2 型糖尿病発症候補遺伝子は MCP-1 分泌をプロモーターレベルから正に制御する 第51回日本糖尿病学会年次学術集会, 5 月 22-24 日、2008

⑮ 福家智也、前川聡、近藤基之、池田和弘、森野勝太郎、小畑利之、卯木智、西尾善彦、前田士郎、柏木厚典 肥満 2 型糖尿病発症候補遺伝子は レプチン遺伝子発現を負に制御する 第51回日本糖尿病学会年次学術集会, 5 月

22-24日、2008

⑩卯木浩之、塚田修市、柏木厚典、加来浩平、
門脇孝、河盛隆造、吉川隆一、中村祐輔、前田士郎 SNPを用いたゲノムワイド相関解析
による2型糖尿病疾患感受性遺伝子の探索
第53回日本人類遺伝学会、9月28-30日、2008

⑪大森慎太郎、田中逸、柏木厚典、加来浩平、
広瀬寛、河盛隆造、中村祐輔、前田士郎 欧
米人GWASのmeta-analysisで同定された2型
糖尿病感受性領域の日本人集団での検討 第
53回日本人類遺伝学会、9月28-30日、2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 士郎 (MAEDA SHIRO)

独立行政法人理化学研究所・内分泌・代謝
疾患研究チーム・チームリーダー

研究者番号：50314159