

図1 カノニカルWntシグナルパスウェイ

Wntシグナル非刺激時には、βカテニンがGSK-3、CK-1α、pERK、APC、axinなどの複合体によってリン酸化を受けたのちユビキチン化され、プロテアソームで分解される。TCFタンパクはターゲット遺伝子のプロモーターに結合し、コリプレッサーを誘導してターゲット遺伝子の転写を抑制する。Wnt刺激により、DvlがGSK-3βを抑制し複合体を破壊する。βカテニンはリン酸化されずに増加し、TCF/LEFと結合し、CBPなどコアクチベーターを誘導してターゲット遺伝子の転写を活性化する。

GSK-3β: glycogen synthase kinase-3β, APC: adenomatous polyposis coli, CK-1α: casein kinase 1α, Dvl: Dishevelled, pERK: phosphorylated ERK, β-TrCP: β-transducin repeat containing protein, LRP: low-density lipoprotein receptor related protein, HDAC: histon deacetylase, CtBP1: C-terminal binding protein 1, Fzd: frizzled.

1. TCF7L2 遺伝子について

TCF7L2は10q25.3に存在し、216kbの領域に17個のエクソンを有する。TCF/LEFファミリーに属する転写因子でHMG boxをもち、カノニカルWntシグナルパスウェイの下流に位置する遺伝子の転写を制御する(図1)。Wntシグナルパスウェイは初期発生や形態形成、器官形成、細胞増殖・分化・運動などを制御しており、糖尿病以外に癌や骨・軟骨疾患、精神神経疾患などとの関連が報告されている。TCF7L2遺伝子の発現はユビキタスであるが、マウスでは腸

上皮、脂肪細胞、中枢神経組織に高発現が認められるのに対し、膵臓にはわずかししか発現していない⁴⁾。ノックアウトマウス(TCF7L2^{-/-})は生後まもなく死亡する。14.5日齢の胎仔の腸上皮では、絨毛間で陰窩となるべき領域に増殖がみられないことから、小腸陰窩の幹細胞の維持に必要なであると考えられている。ノックアウトマウスにおける膵isletの異常については報告されていない^{5,6)}。

TCF7L2の多型がどのようなメカニズムで2型糖尿病の発症リスクを高めるかについては、幾つかの仮説が立てられ、解明に向けて多型と

表現型との関係についての解析や, *in vitro* における機能解析についての報告が相次いでなされつつある。

2. TCF7L2 遺伝子と膵 β 細胞

Shu らは *TCF7L2* の転写抑制により, 2 型糖尿病の β 細胞にどのような影響が現れるかを検討している⁷⁾。まず 2 型糖尿病のヒト膵組織およびモデルラットの islet において, *TCF7L2* のタンパク量と mRNA 発現を調べたところ, タンパク減少に対し mRNA 発現増加という相反する結果がみられた。次に siRNA でヒト islet の *TCF7L2* を抑制したところ (si*TCF7L2*), *GLP1R* と *GIPR* の発現は低下し, 逆に *TCF7L2* を過剰発現させると両者とも発現は増加し, *TCF7L2* と *GLP1R/GIPR* 間に正の相関が認められた。また si*TCF7L2* はグルコース応答性インスリン分泌と同様に, GLP-1 および GIP によるインスリン分泌を低下させるが, KCl 誘発性のインスリン分泌は低下させず, 更に細胞内 cAMP 増加を介したインスリン分泌も保たれていることが示された。つまり *TCF7L2* の低下による β 細胞の機能低下の一部は, GLP-1/GIP 受容体を介するものであると考えられる。また si*TCF7L2* は, GLP-1 と GIP による AKT のリン酸化を抑制することにより, β 細胞の保護作用を低下させることから, *TCF7L2* は β 細胞増殖を刺激し, アポトーシスを減弱させる働きがあると推測されている。

3. TCF7L2 遺伝子多型と 2 型糖尿病発症リスク

TCF7L2 のイントロンに存在する多型が, どのように 2 型糖尿病発症リスクを上昇させるのであろうか。現在推測されている幾つかのメカニズムについて, 当施設での解析結果も交えて概説する。

a. Entero-insular axis および GCG 由来グルカゴン分泌への影響

TCF7L2 はプログルカゴン遺伝子である *GCG* の転写を活性化するが, *GCG* は小腸 L 細胞においては GLP-1 を, 膵 α 細胞ではグルカゴンを

エンコードする。よって *TCF7L2* の多型は, 2 型糖尿病患者における経口負荷後のインスリン, インクレチン反応の低下やグルカゴン高値に影響するのではないかと推測された。しかし実際に rs7903146 のリスクアリルである T アリルのキャリアで, GLP-1 の低下やグルカゴンの上昇は認められていない⁸⁾。

b. PCSK1 と PCSK2 の転写への影響

プロインスリンからインスリンへの変換には, プロホルモン変換酵素である PC1/3 (*PCSK1*) と PC2 (*PCSK2*) によるプロセッシングが必要である。Loos らは, *TCF7L2* の T アリルのキャリアで空腹時のプロインスリン濃度が高いこと, *PCSK1* と *PCSK2* のプロモーター領域に TCF 結合領域が存在することから, β 細胞におけるプロインスリンのプロセッシングに *TCF7L2* が影響することで, 2 型糖尿病になりやすくしている可能性があるとして報告している⁹⁾。著者らも独自に *PCSK1* の多型において 2 型糖尿病関連解析で有意差を認めており (未発表データ), *TCF7L2* 多型との相互作用などについても検討中である。

c. β 細胞におけるインクレチン感受性の低下

Villareal らは 5h-OGTT, およびそれと同じ血糖値プロファイルを再現するように設定された静脈内グルコース注入法における, 血中インスリン分泌量の差からインクレチン効果を算出し, *TCF7L2* の TT/TC ジェノタイプ 8 人とマッチングさせた CC ジェノタイプのコントロール 10 人の比較を施行している⁸⁾。その結果, β 細胞インスリン分泌能は TT/TC 群は CC 群に比べて 50% 低値を示し, インクレチン効果も有意に低値を示した。それに対し, 経口ブドウ糖負荷に対する GLP-1 と GIP の反応には群間に差が認められず, *TCF7L2* の T アリルはインクレチン分泌そのものではなく, β 細胞のインクレチン感受性を低下させることによって, 経口摂取されたグルコースに対するインスリン分泌が低下すると結論づけている。

4. TCF7L2 遺伝子多型と2型糖尿病 関連の表現型

次に、臨床表現型と *TCF7L2* の多型との関係についての報告を紹介する。Lyssenko らはスウェーデンとフィンランドにおける9,663人、中間観察期間22年の大規模な前向きコホートで、rs7903146のTT/TC群がCC群より、rs12255372のGT/TT群がGG群より有意に糖尿病を発症するリスクが高いと報告している(それぞれOR 1.58, 1.42)¹⁰⁾。

Pilgaard らは正常耐糖能の若年白人成人81人において、*TCF7L2* のrs7903146のジェノタイプ(TT/TC vs CC)により、どのような代謝上の特徴がみられるかを詳細に検討し、Tアリルをもつ群で以下のように報告している¹¹⁾。①24時間の血糖値には差がみられないが、血漿インスリン(AUC_{ins24h})、グルカゴン値(AUC_{glucagon24h})は有意に低値であった(図2)。②高インスリン正常血糖クランプでは肝糖新生が有意に高く、血漿グルカゴン値は低かった。③OGTTでは血中インスリン値が低い傾向を示したが、血糖値、GLP-1、GIP濃度で差はみられなかった。④IVGTTでは血糖値、血中インスリンレベルにおいてTT/TCとCCの間に差はみられなかったが、OGTTとIVGTTの総インスリン分泌量の比(AUC_{insOGTT}/AUC_{insIVGTT})は、TT/TC群で低い傾向を示した。⑤ミールテストでは、GLP-1とGIPの分泌は正常で、血糖値もインスリン値も有意差を認めなかったが、食後の血糖値の変化に対するインスリン分泌を計算すると有意に低かった。⑥高血糖クランプ下のGLP-1、GIPによるインスリン分泌反応で、注入後半の75分後、90分後、後期相全体(20-120分)でのインスリン分泌は低値であった。後期相のみでインクレチン誘発性のインスリン分泌が低下する理由については、β細胞膜直下に位置する分泌直前のインスリン分泌顆粒は正常でも、分泌準備段階のインスリン分泌顆粒と *de novo* のインスリン合成が低下するからであろうとし、結論としてrs7903146のTアリルは、グルカゴンは低いな

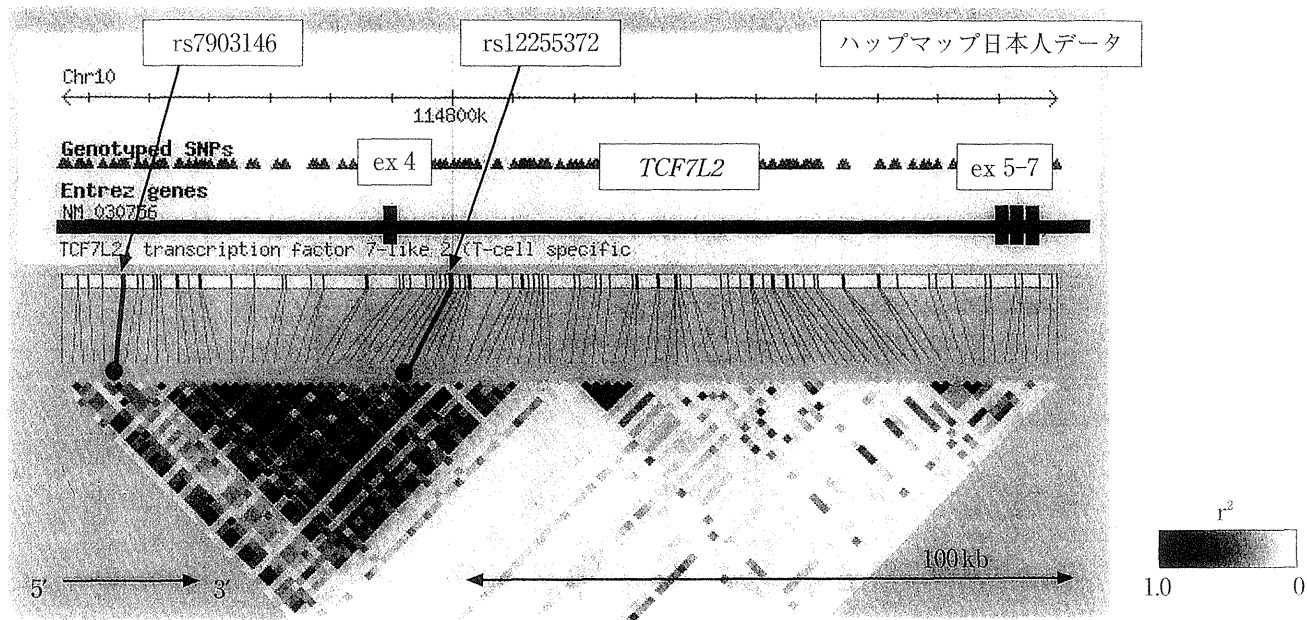
がらも肝糖新生の増加とインクレチン誘発性インスリン分泌能の低下により、2型糖尿病発症のリスクを高めると推測している。

5. TCF7L2 遺伝子多型と 環境因子との関連

TCF7L2 の多型は、環境因子との相互作用の観点からも注目されている。Henri らは、rs7903146のTアリのキャリアは血糖値が高いほどインスリン分泌能が低下し、Tアリのキャリアに9カ月の生活習慣の介入を行うと、介入前にIGTであった群は正常耐糖能群に比べて、インスリン分泌が有意に増加することを報告している¹²⁾。つまりTアリのキャリアにおけるインクレチンによるインスリン分泌能の相対的な低下は、インスリン抵抗性の改善により有意に回復しやすいため、糖尿病の前段階から生活習慣の改善を図ることが重要であると述べている。同じような現象は、DPP(Diabetes Prevention Program)でも認められており、TTジェノタイプ群はCC群よりもIGTから糖尿病に移行しやすいが、生活習慣の介入を行った場合には糖尿病発症率に差がみられなくなっている¹³⁾。

おわりに

TCF7L2 が2型糖尿病発症にどのように影響するか、これまでの報告を簡単にまとめると図3のようになる。*TCF7L2* の機能低下はインスリン抵抗性ではなく、インスリン分泌に影響を与えることは間違いなく、しかもそこにはインクレチンシステムが大きくかかわっていることがわかってきた。しかし、依然として不明な点も多い。イントロンの多型がどのように*TCF7L2* の機能に影響を与えるのか、発現レベルを変化させるのであろうか。どうやって*GLP1R* と *GIPR* の発現に影響を与えるのか。ほかに組織ごとに*TCF7L2* のスプライシングパターンが異なることが報告されており¹⁴⁾、病態との関連が疑われるが、それについても詳細は不明である。今後の解析が待たれる。



rs7903146 ジェノタイプ別の
24時間グルコース、インスリン、グルカゴンの血中濃度

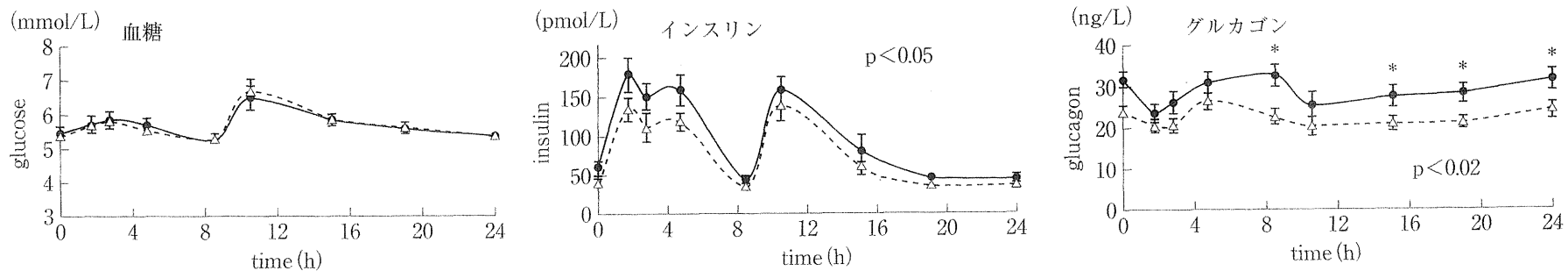


図2 TCF7L2 の rs7903146 周辺の LD マップとジェノタイプ別の 24 時間グルコース、インスリン、グルカゴン血中濃度の比較(グラフは文献¹³⁾より引用)
実線は CC 型、破線は TT/TC 型を示す。

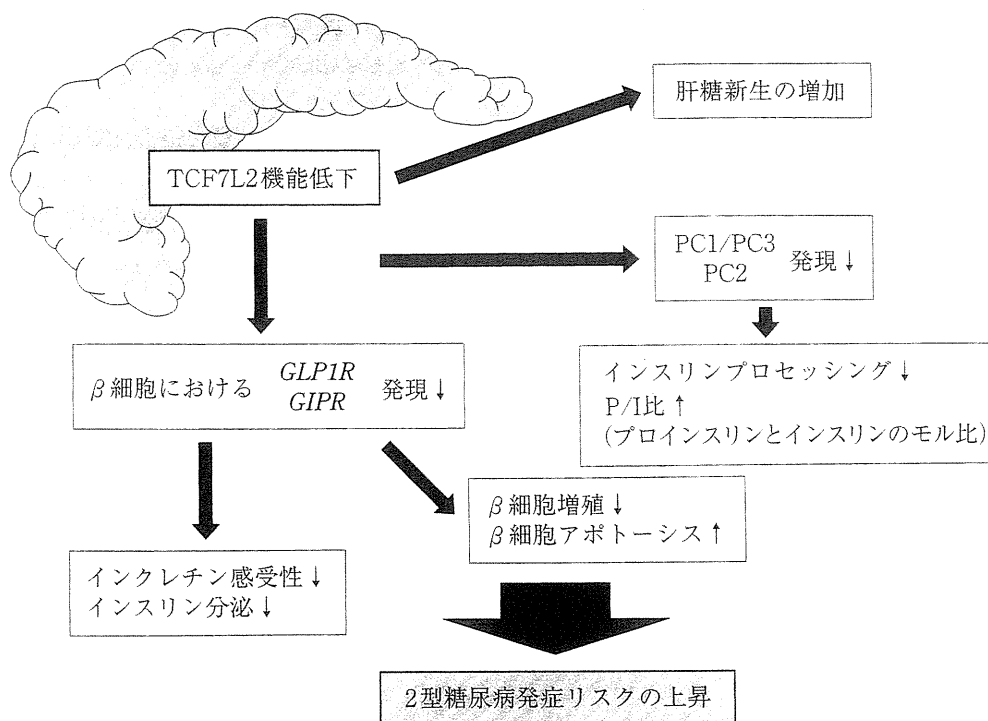


図3 β細胞におけるTCF7L2機能低下がインクレチンなどを介して2型糖尿病発症リスクを高めるメカニズム

■ 文 献

- 1) Grant SF, et al: Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38: 320-323, 2006.
- 2) Miyake K, et al: Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects. *J Hum Genet* 53: 174-180, 2008.
- 3) Yasuda K, et al: Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 40: 1092-1097, 2008.
- 4) Columbus J, et al: Insulin treatment and high-fat diet feeding reduces the expression of three *Tcf* genes in rodent pancreas. *J Endocrinol* 207: 77-86, 2010.
- 5) Korinek V, et al: Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19: 379-383, 1998.
- 6) Gregorieff A, et al: Hindgut defects and transformation of the gastro-intestinal tract in Tcf 4(-/-)/Tcf 1(-/-) embryos. *EMBO J* 23: 1825-1833, 2004.
- 7) Shu L, et al: Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. *Hum Mol Genet* 18: 2388-2399, 2009.
- 8) Villareal DT, et al: TCF7L2 variant rs7903146 affects the risk of type 2 diabetes by modulating incretin action. *Diabetes* 59: 479-485, 2010.
- 9) Loos RJ, et al: TCF7L2 polymorphisms modulate proinsulin levels and beta-cell function in a British European population. *Diabetes* 56: 1943-1947, 2007.
- 10) Lyssenko V, et al: Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest* 117: 2155-2163, 2007.
- 11) Pilgaard K, et al: The T allele of rs7903146 TCF7L2 is associated with impaired insulinotropic action of incretin hormones, reduced 24 h profiles of plasma insulin and glucagon, and increased hepatic

- glucose production in young healthy men. *Diabetologia* **52**: 1298-1307, 2009.
- 12) Heni M, et al: . Glycemia determines the effect of type 2 diabetes risk genes on insulin secretion. *Diabetes* **59**: 3247-3252, 2010.
 - 13) Florez J, et al: *TCF7L2* polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* **355**: 241-250, 2006.
 - 14) Prokunina-Olsson L, et al: Tissue-specific alternative splicing of *TCF7L2*. *Hum Mol Genet* **18**: 3795-3804, 2009.

I ゲノミクス

糖尿病領域におけるGWASと 全ゲノムシーケンシング

岐阜大学大学院医学系研究科内分泌代謝病態学臨床教授

堀川 幸男
Yukio Horikawa

Key Words

GWAS
SNP
次世代ゲノムシーケンサー
エクソーム
エピゲノム

はじめに

人類は、生命設計図であるヒトゲノムを読破したのち、遺伝子タイピング技術を進歩させ、全ゲノム関連解析 (Genome-Wide Association Studies ; GWAS) を可能にした。この大規模関連解析により現在まで約 20 ~ 30 種類の遺伝子多型で 2 型糖尿病発症との関連が認められ、人種、民族を超えた高頻度、低浸透率の糖尿病感受性アリルが存在することが証明された。しかし従来の糖尿病発症の臨床危険因子 (年齢、肥満、家族歴など) に比べて、遺伝子多型の発症予測における有用性は現時点では低く、依然 40 ~ 60 % といわれる遺伝率のほんの数%しか説明できない。今後は、GWAS では獲得できなかったと考えられる低頻度、高浸透率の糖尿病原因アリル同定に関心がシフトすると考えられる。これには、表現型の均質なサンプル集団と革新的技術の結集である次世代シーケンサーが必須であり、全ゲノムシー

クエンス、なかでも全エクソンシーケンシング (エクソーム) による、エクソン変異の探索が鍵となる。もちろん同時に、遺伝子配列変化を伴わないエピゲノム変化も含めて遺伝素因解明を進めていくことが重要であることはいうまでもない。

I . 2 型糖尿病 GWAS の実際

GWAS には適切な検出力 ($1-\beta$) を有するサンプルサイズや有意水準 (α) の設定など研究デザインが重要である。従来 Bonferroni 補正のように 0.05 を検定数で割って α を設定する多重検定補正がよく適応されてきた。

事後オッズ = 事前オッズ × 尤度比
尤度比 = 真の陽性率 / 偽の陽性率 =
検出力 / 有意水準 = 感度 / (1 - 特異度)

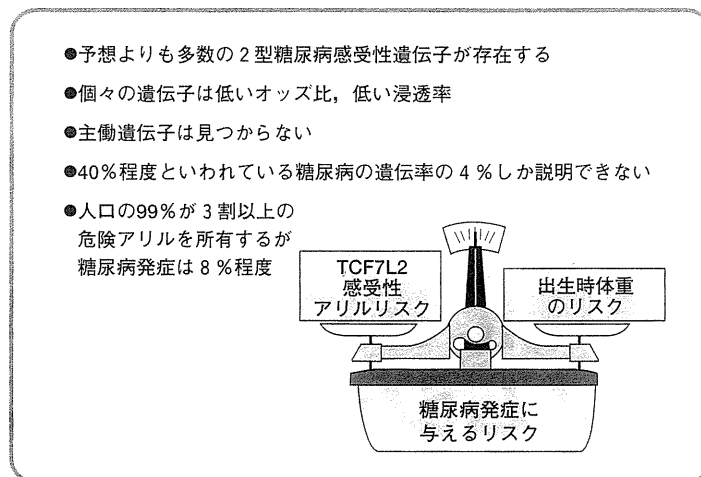


図1. ゲノムワイド関連解析で現在までに判明したこと

で表される。たとえば, ある糖尿病遺伝子多型の事前オッズを 1×10^6 オーダー (百万個) の中から 10 個の遺伝子多型が真の関連があるくらいとすると, 事前オッズは 1×10^{-5} のオーダーと予測される。そのときの検出力 ($1 - \beta$) を 0.5 とし, 有意水準 (α) を 5×10^{-7} と設定すれば, その糖尿病遺伝子多型を検出する事後オッズは 10 となる。すなわち候補として同定された遺伝子多型は約 91%, 真の関連がありうる遺伝子多型ということになる¹⁾。単一の GWAS でこの基準をクリアできたのは, *TCF7L2*, *FTO*, *KCNQ1* のみである²⁾⁻⁵⁾。現在までで最も OR が大きい 1.4 程度を呈する *TCF7L2*, *KCNQ1* で考えてみても, α を前述のように設定すると 80% の検出力を得るためには最低で 1,400 人ずつくらいの患者, 対照者のサンプルが必要になる計算になる。現在ではケース・コントロールそれぞれ 3~5 千人スケールの関連解析が多く報告され検出力は満たしているが, 今度ではかえってサンプルの異質性をあげている可能性についても考慮しなければならない。

II. 2型糖尿病 GWAS から判明したこと

GWAS からわかったことは, 予想に違わず 2 型糖尿病は異質性疾患であり, 当初の予想よりも多くの感受性遺伝子が存在することであった。しかもそれぞれの遺伝子効果 (オッズ比)・浸透率は低く, 「主働遺伝子」は見当たらないことであった (図 1)。

現実には日本人で, 現在まで同定された主要危険アリルの 3 分の 2 以上をもつ人で, 糖尿病発症予測確率が, 7% [糖尿病有病率 (事前確率)] から約 12% (事後確率) に上がるのみである。*KCNQ1*, *TCF7L2*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *GCKR*, *HNF1B*, *KCNJ11*, *PPARG* の糖尿病感受性アリルを用いた日本人の成績では, 代表的な 3 つの臨床形質である年齢, BMI, 性で糖尿病発症は 68% の確からしさで決定できるが, そこに上記の遺伝素因を足してもその確からしさが 72% に上がるのみである⁶⁾。白人のコホートをを用いた検討でも, 疾患発症予測については, 遺伝素因は, 従来の臨床危険因子 (肥満, 家族歴など) より有用性は低かった⁷⁾⁸⁾。しかし臨床危険因子に遺伝素因を足すことにより, わずかながら発症予測率が上がることで, また長期観察期間をおけば遺伝素因による発症予測は臨床危険因子によるそれを上回ることも明らかになった。したがってなるべく早く生下時に遺伝子診断をすることは 2 型糖尿病発症予測に有用であることは間違いないと考えられる (図 2)⁹⁾。

以下に糖尿病 GWAS で同定された新規糖尿病感受性遺伝子のうちでコーカシアンと日本人でそれぞれ最も強い関連が認められた感受性遺伝子 2 つについて概説する。

1 *KCNQ1*

日本における「ミレニアムプロジェクト」の一環として, 10 万 SNP を用いた多段階スクリーニングが行われ, その結果 *KCNQ1* という新しい 2 型糖尿病遺伝因子が得られた。この遺伝

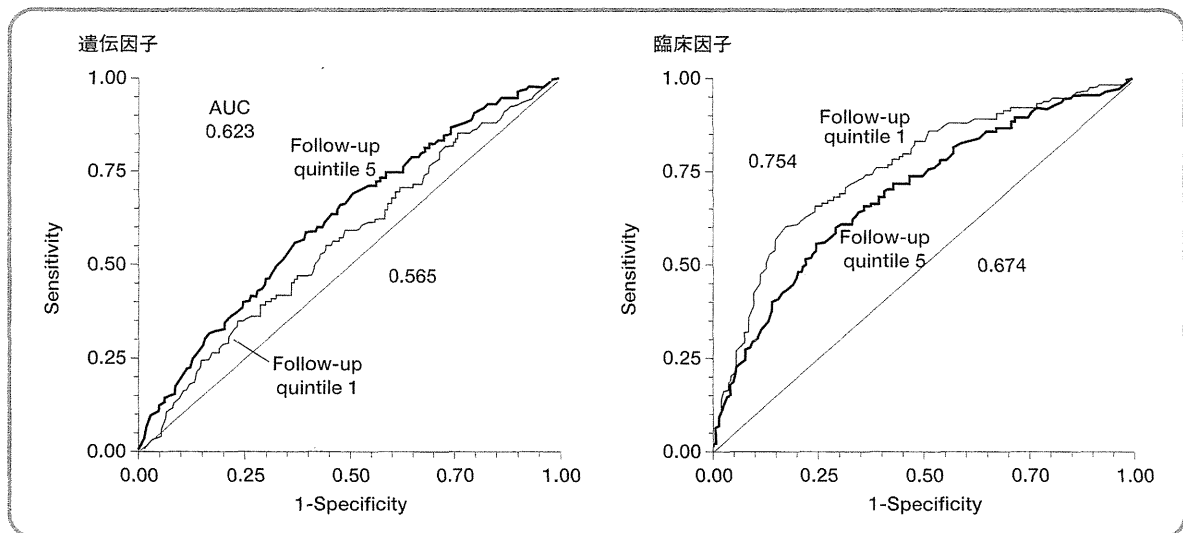


図 2. 糖尿病発症予測への遺伝素因と臨床危険因子の貢献度

観察期間が長い群 (—) : 遺伝因子のほうが効く
 観察期間が短い群 (---) : 臨床因子のほうが効く

(文献 8 より引用改変)

子は、北欧白人でも頻度は低いながらも 2 型糖尿病の遺伝素因であることが明らかになった⁹⁾。全く独立に行われたプロジェクトでも同様の報告があり⁹⁾、日本人 2 型糖尿病において、非常に重要な遺伝素因と思われる。

KCNQ1 は、細胞膜上に存在する電位依存性 K チャネルの 1 つである、Kv7.1 の α サブユニットであり、機能喪失性変異がヒトにおいて QT 延長症候群の原因となることが知られていた。KCNQ1 の感受性 SNP は、インスリン分泌障害を介して 2 型糖尿病の発症リスクを高めると考えられている。KCNQ1 多型がインクレチンを介したインスリン分泌に関連している可能性¹⁰⁾や、全身ロックアウトマウスの解析よりインスリン感受性に関連している可能性も報告されている¹¹⁾。また KCNQ1 の存在する領域は Beckwith-Wiedemann 症候群のインプリンティング領域としても知られているので¹²⁾、感受性アレルの片親由来を決定できれば、真の関連性、効果を判定できると考えられる。標準的な関連解析では、片親由来に特異的効果を示す疾患感受性アレルの場合には検出力が落ち、関連性が確立された場合でも、真の効果は過小評価される。そこで deCODE が合計 2,251 人の 2 型糖尿病サンプルを用いた片親由来別の追加解析を本遺伝子に関して施行したところ、本来遺伝子発現される母親由来の感受性アレルは有意に疾患と関連したが⁹⁾ (OR = 1.30, $p = 0.0084$),

父親由来の場合は関連性を認めなかった (OR = 1.03, $p = 0.71$)。既知の GWAS のデータも、片親由来アレルごとの関連解析の観点で見直す必要があると考えられる (表)¹³⁾。

2 TCF7L2 (transcription factor 7-like 2)

TCF7L2 は TCF7L1 と TCF7like HMG box をもつ転写因子ファミリーを構成しており、WNT (WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY) / β -catenin シグナルパスウェイに属する転写因子であることが知られており、もともと癌との関わりが知られていた。10 種類の 7 回膜貫通型受容体 Fzd とともに受容体複合体を構成するもう 1 つの膜蛋白 LRP-5/6 が WNT シグナルの認識に必須である¹⁴⁾。TCF7L2 ノックアウトマウスは生後すぐ死亡する。新生児の腸上皮は完全に分化した細胞で構成されており、杯細胞も形成されるが、幹細胞から分化する腸内分泌細胞は形成されていない¹⁵⁾。膵 β 細胞においては、その分化・増殖・アポトーシス・インスリン分泌などを直接制御すると考えられている。その後の各国の施設から報告された関連解析 (GWAS を含む) でほぼすべてで、2 型糖尿病との関連が示されており、現在民族を超えた 2 型糖尿病の感受性遺伝子として最も注目されている。この TCF7L2 のリスク C アレル (rs7903146) は DPP (Diabetes Prevention Program) に参加している耐糖能異常

表. rs2237892 (KCNQ1) の片親由来アリルの関連解析

		標準 ケース・コントロール		片親由来アリルのケース・コントロール											
2型糖尿病	コントロール	OR	p	父由来アリル		母由来アリル		2-df	ケースオンリー 父方由来 vs. 母方由来						
				OR	p	OR	p	p	n12 : n21	p					
1,468 (discovery)	vs. 34,706 (Cアリル 92.5%)	1.19	0.044	1.14	0.24	1.24	0.071	0.095	81 : 90	0.51					
783 (replication)						0.87	0.30				1.43	0.024	0.050	35 : 59	0.014
2,251 (combined)						1.03	0.71				1.30	0.0084	0.027	116 : 149	0.054

(文献 13 より引用改変)

の対象者の糖尿病進展にインスリン分泌不全を介して関与していることが明らかとなった¹⁶⁾。その後、TCF7L2のリスクアリルとインスリンの分泌低下、インクレチン作用の低下、糖新生の亢進との間で有意な相関が報告された¹⁷⁾。またヒト膵島でTCF7L2をノックダウンした成績では、GLP-1受容体の発現低下やそれに基づくAKTの不活化、そしてFOXO1の活性化、GSK3の活性化を介した膵β細胞アポトーシスの増加が報告されている¹⁸⁾。

Ⅲ. 今後の糖尿病遺伝子探索法

GWASでは高頻度の遺伝子多型をタイピングしてきたため、依然同定されていないものは、効果の弱い高頻度の感受性アリルか、効果はどうであれ低頻度の感受性アリルである。いま残りの感受性アリルがこれまで同定されている程度のオッズ比と頻度であると仮定すると、2型糖尿病の遺伝率40%を説明するには約800個の感受性アリルが必要となる。もしオッズ比が2~4くらいで頻度がGWASの10分の1くらいの感受性アリルを仮定すれば、残り80個くらいの感受性アリルがあれば説明可能となる¹⁹⁾。

もし低頻度のSNPアレイが利用可能となったなら、既存の全ゲノム関連解析の数千くらいのサンプルで、効果の強い(高浸透率)感受性遺伝子同定は可能となる。しかし、低頻度の感受性アリルは、比較的新しく出現したものであり、民族特異的である可能性が強く種々の人種の関連解析を単純に足して数合わせをすることはできない。また、同一民族においても単に解析するサンプル数を増やすことは、集団の均質性を下げ遺伝子効果を隠すため、むしろ遺伝子同定を困難にすることも考えられる。したがって低頻度で効果の強い感受性アリルは、若年発症あるいは家族性の糖尿病など(MODYなど)、より表現型の均質な集団で探索することが最善と考えられる。

したがって、現時点では高頻度で弱い効果の感受性アリル同定には大規模関連解析が、低頻度で中等度の遺伝子効果の同定にはGWASとそれに続く感受性遺伝子座の特化的ゲノムあるいはエクソンシーケンスが、そしてさらに低頻度の遺伝子効果の強いアリル同定には家族サンプルを用いたSNPアレイを用いた全ゲノム連鎖解析とそれに続く感受性遺伝子座の特化的エクソンシーケンスが最も有用であると考えられる(図3)²⁰⁾。

前述のように、われわれはこれまで、CDCV(Common Disease Common Variant)の仮説をたてて2型糖尿病遺伝子同定を進めて

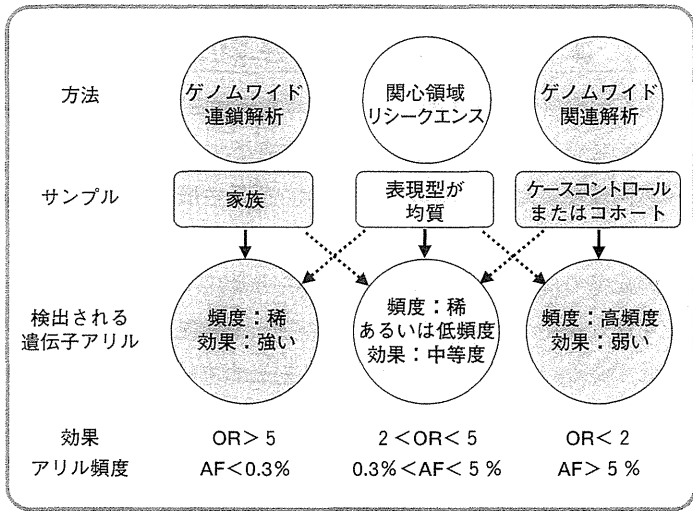


図 3. 感受性遺伝子アリルの頻度と効果に基づいた最適疾患遺伝子同定法

(文献 20 より引用改変)

きたが、低頻度で高浸透率の2型糖尿病アリルがあるとする、高頻度アリルに主目をおいた現在のGWASの方法論では捉えられないことに注意すべきである。こうした頻度の低い、効果の強い糖尿病アリルを捉えるためには、次世代シーケンサーを用いた、エクソンを主体としたゲノムリシーケンスの方法論が必要になる。ここ数年の遺伝子解析技術の革新的進歩とともに、ヒトゲノム解析は飛躍的に進んだ。まず、一度に100万個のSNPがタイピングできるチップアレイが実現され、polygenic型疾患の共通感受性遺伝子多型同定に使われた²¹⁾。また次世代シーケンサーによって大量ゲノムの大規模シーケンスが可能となった²²⁾。同時に大人数の個人全ゲノムシーケンスは依然不可能であるが、約30Mbの約2万個エクソン(蛋白コード領域)に限った大規模シーケンスは今や可能になった(図4)²³⁾。この方法は遺伝子変異効果の強いmonogenic型疾患の原因遺伝子探索に適している。個人の全エクソンシーケンス(エクソ

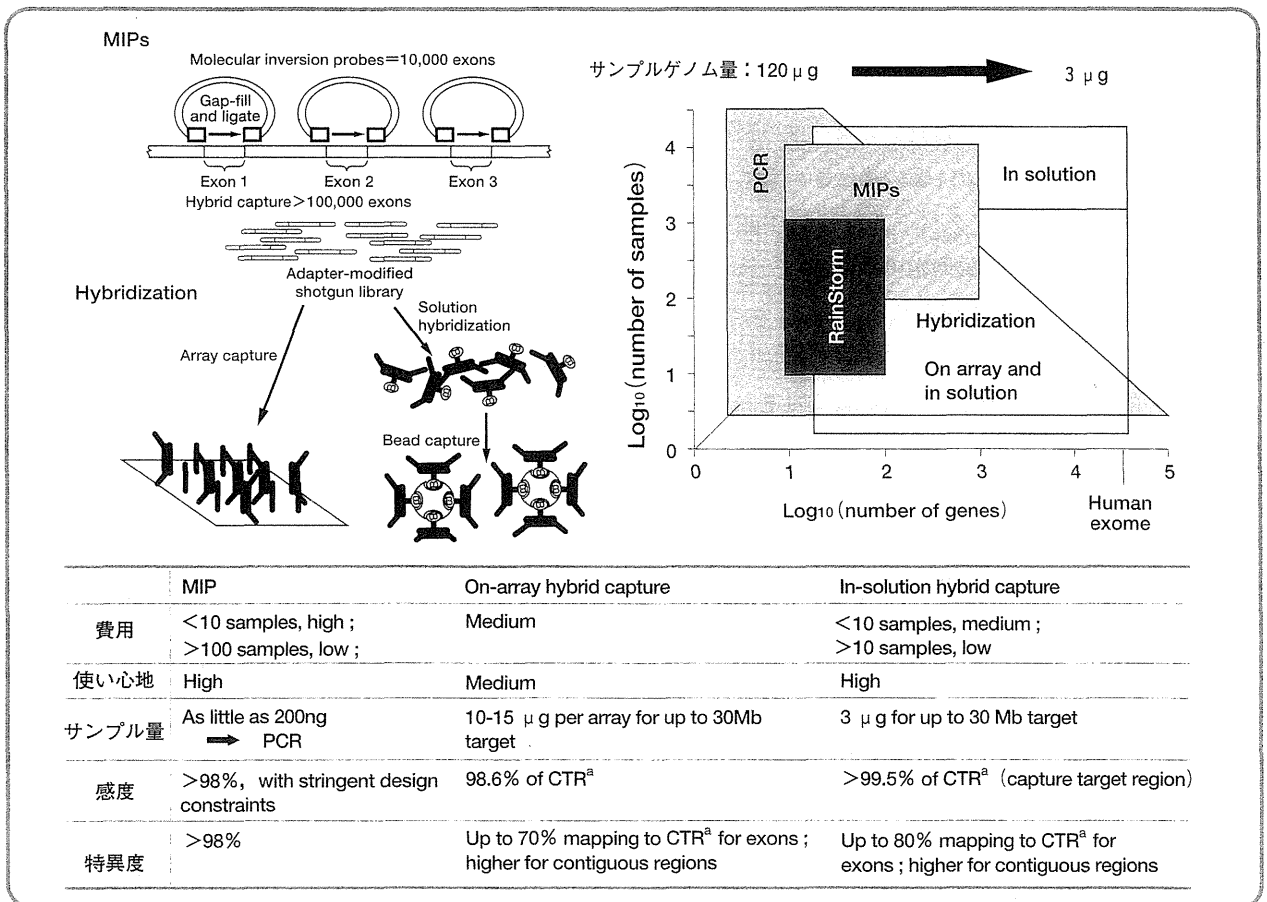


図 4. 最適の領域特化原因遺伝子同定法

(文献 23 より引用改変)

ーム)によって約2万個のcSNPsが同定されるが、その9割は既知のSNPデータベースに認められ、新規のものは約1割程度であること、またデータベースを用いた非特異的cSNPs除去を行わなくても、15~20人の対照者を読み比較することで原因エクソン変異を充分同定できることも報告されている²⁴⁾。しかもin-solution hybrid法を使えば効率良くエクソンを抽出することができ、もし個別のPCRなら120 μ gのゲノムが必要な約30Mbにわたる全エクソンを、3 μ gのゲノムで読み切れるのでサンプル量節約の点からも非常に有用である²³⁾。

病気の原因遺伝子の85%はエクソン変異といわれているが、最近、このエクソーム法が病気の原因遺伝子を同定するのに有用であることが実際に示された。4人の患者と8人のハブマッププロジェクトに使われた正常者を用いて、フリーマンシエルダン症候群(関節拘縮症)の原因遺伝子同定が報告された。また他の家族性疾患においても2,3の成功例の報告がある²⁵⁾⁻²⁷⁾。

このエクソーム法で最も重要なことは、多くのありふれたエクソン多型(cSNPs)から真のエクソン変異を効率良く、しかも確実に選び出すことである。現在は数例の正常者のシーケンスやパブリックな遺伝子多型データベースとの比較により差別化する方法がよく使われているが、最近デンマークのグループは2,000人のデンマーク人での18,654個の遺伝子の全エクソンシーケンスを終了し独自にデータベース化した(LuCamp)。日本人特異的エクソン変異の効率的同定のためにも、日本人においても同様のデータベース構築が待たれる。

また最近は今現在まで施行された複数のGWASを統合した糖尿病発症に関するメタ解析や²⁸⁾、糖尿病量の形質に関連する遺伝子多型を回帰分析(PLINK)で求める成績がよく報告されている²⁹⁾。後者は糖尿病の発症までには1つの遺伝素因で及ばないものでも、糖尿病関連の各表現型と、統計学的に有意な関連を示すものを獲得する方法である。興味深いことに、空腹時血糖やHOMA-Bは感受性アリルが多く同定されるのに対して、空腹時インスリンやHOMA-Rは同定される感受性アリルが少ないなど、同様の遺伝率(約30%)の表現型でもその裏にある遺伝構造は違うことが示唆されている²⁹⁾。今後、量的形質と関連する遺伝素因には、臨床現場において糖尿病関連体質を予測するツールとしての役割が血中マーカー共々期待される。

IV. エピジェネティック的アプローチ

現在の急速な糖尿病患者の増加には脂肪過量摂取、運動不足、ストレスなどのいわゆる生後の生活習慣だけでなく、母体肥満、子宮内環境などの生前の環境因子が、生活習慣に対する代謝応答システム形成を通して影響を与えていることは疑いない³⁰⁾。この記憶の仕組みとして、メチル化など遺伝子の塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな遺伝子発現制御機構が考えられている。DNAのメチル化は、生殖細胞では一旦リセットされると考えられていたし、体細胞では個体発生の時期や癌形成の過程を除いて一生変化することはないといわれてきたが、最近では一部のメチル化は減数分裂でも保たれるとの報告や、生活環境因子によるDNAメチル化状態の変化も報告されており興味深い。これに関しては他稿を参照されたい。

おわりに

GWASで同定された疾患感受性アリルは、疾患との直接の因果関係が証明されていないものも多い。また集団遺伝学として得られたデータを個人レベルに流用、転用するのも困難である。オッズ比はあくまで集団でのデータであり、個々の人においてはその遺伝素因の全貌が明らかにならない限り正確な意味をたないのである。したがって現段階では疾患感受性多型同定意義は発症予測、予防というよりもむしろ疾患発症メカニズム解明の手がかりを与えることであるが、新規治療法の開発などに創薬への展開にとっては重要な役割がある。現代のシーケンサーは100万塩基対/日の配列を決定するのが限界だったが、技術の革新により次世代シーケンサーではその100,000倍のパフォーマンスが可能となった。これによりある疾患で変異している塩基を全ゲノム観点で捉えることが可能になった。また低頻度の感受性アリルを同定し、タイピングすることも容易になっただけでなく、CNV(Copy Number Variant)のようなゲノム構造変異の同定もより簡便になった。

低頻度で高浸透率の遺伝子変異は、まだ多くのものが同定されていないと考えられ、今後、若年発症の家族性糖尿病(MODYなど)のような均質な集団サンプルと次世代シーケンサーによるエクソームをもってはじめて同定されると思われる。GWASでは多くの場合イントロンのアリルが感受性アリルとして同定され病態解明に結びつき難かったが、蛋白コー

域に着目した場合は、遺伝子変異同定後の生理機能解析などから2型糖尿病の病態解明に直結することが考えられる。また糖尿病標的臓器での網羅的遺伝子プロファイリング(トランスクリプトーム)³¹⁾³²⁾や相互作用蛋白を網羅する蛋白ネットワーク解析などプロテオーム的アプローチも補完的に必要であることはいままでのない。さらに、今後のありふれた生活習慣病の遺伝素因解明には、遺伝子配列変異のみならず、エピゲノム変化も含めて解析を進めていかねばならないことも疑いなく³¹⁾、これによりはじめて糖尿病をはじめとする polygenic 型疾患の個人レベルでの素因パズルの解明が可能になると考える。

●文献

1. The Wellcome Trust Case Control Consortium : Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447** : 661-678, 2007
2. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al : A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* **445** : 881-885, 2007
3. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, et al : Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* **316** : 1336-1341, 2007
4. Scott L J, Mohlke KL, Bonnycastle LL, et al : A genome-wide association study of type 2 diabetes in finns detects multiple susceptibility Variants. *Science* **316** : 1341-1345, 2007
5. Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, et al : Variants in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* **40** : 1092-1097, 2008
6. Miyake K, Yang W, Hara K, et al : 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
7. Meigs JB, Shrader P, Sullivan LM, et al : Genotype score in addition to common risk factors for prediction of type 2 diabetes. *N Engl J Med* **359** : 2208-2219, 2008
8. Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, et al : Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med* **359** : 2220-2232, 2008
9. Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, et al : SNPs in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nat Genet* **40** : 1098-1102, 2008
10. Müsigg K, Staiger H, Machicao F, et al : Association of type 2 diabetes candidate polymorphisms in *KCNQ1* with incretin and insulin secretion. *Diabetes* **58** : 1715-1720, 2009
11. Boini KM, Graf D, Hennige AM, et al : Enhanced insulin sensitivity of gene-targeted mice lacking functional *KCNQ1*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296** : R1695-1701, 2009
12. Du M, Beatty LG, Zhou W, et al : Insulator and silencer sequences in the imprinted region of human chromosome 11p15.5. *Hum Mol Genet* **12** : 1927-1939, 2003
13. Kong A, Steinthorsdottir V, Masson G, et al : Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. *Nature* **462** : 868-874, 2009
14. Fujino T, Asaba H, Kang MJ, et al : Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** : 229-234, 2003
15. Korinek V, Barker N, Moerer P, et al : Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19** : 379-383, 1998
16. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, et al : *TCF7L2* polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* **355** : 241-250, 2006
17. Pilgaard K, Jensen CB, Schou JH, et al : The T allele of rs7903146 *TCF7L2* is associated with impaired insulinotropic action of incretin hormones, reduced 24 h profiles of plasma insulin and glucagon, and increased hepatic glucose production in young healthy men. *Diabetologia* **52** : 1298-1307, 2009
18. Shu L, Matveyenko AV, Kerr-Conte J, et al : Decreased *TCF7L2* protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. *Hum Mol Genet* **18** : 2388-2399, 2009
19. Pawitan Y, Seng KC, Magnusson PKE : How many genetic variants remain to be discovered? *PLoS One* **4** : e7969, 2009
20. Gloyn AI, McCarthy MI : Variation across the allele frequency spectrum. *Nat Genet* **42** : 648-650, 2010
21. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES : Genetic mapping in human disease. *Science* **322** : 881-888, 2008
22. Metzker ML : Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* **11** : 31-46, 2010
23. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, et al : Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods* **7** : 111-118, 2010
24. Ng SB, Nickerson DA, Bamshad MJ, et al : Massively parallel sequencing and rare disease. *Hum Mol Genet* **19** : R119-124, 2010
25. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, et al : Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* **461** : 272-276, 2009
26. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al : Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* **42** : 30-35, 2010
27. Choi M, Scholl UI, Ji W, et al : Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** : 19096-19101, 2009
28. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, et al : Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet* **42** : 579-589, 2010
29. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, et al : New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet* **42** : 105-116, 2010
30. Poulsen P, Kyvik KO, Tung YC, et al : Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance-a population-based twin study. *Diabetologia* **42** : 139-145, 1999
31. Jin L, Wang H, Narita T, et al : Expression profile of mRNAs from human pancreatic islet tumors. *J Mol Endocrinol* **31** : 519-528, 2003
32. Wang H, Horikawa Y, Jin L, et al : Gene expression profile in rat pancreatic islet and RINm5F cells. *J Mol Endocrinol* **35** : 1-12, 2005



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Rat glucagon receptor mRNA is directly regulated by glucose through transactivation of the carbohydrate response element binding protein

Katsumi Iizuka^{a,b,*}, Reiko Tomita^a, Jun Takeda^a, Yukio Horikawa^a

^a Department of Diabetes and Endocrinology, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu 501-1194, Japan

^b Gifu University, University Hospital Center for Nutritional Support and Infection Control, Gifu 501-1194, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 December 2011

Available online 16 December 2011

Keywords:

Carbohydrate response element binding protein (ChREBP)

Glucagon receptor

cAMP

G-box

Carbohydrate response element (ChoRE)

Glucagon

ABSTRACT

The glucagon receptor (*Gcgr*) is essential for maintaining glucose homeostasis in the liver and for stimulating insulin secretion in pancreatic β -cells. Glucose induces rat *Gcgr* mRNA expression; however, the precise mechanism remains unknown. We previously have studied the role of the carbohydrate response element binding protein (ChREBP), a glucose-activated transcription factor, in the regulation of glucose-stimulated gene expression. The G-box has previously been reported to be responsible for glucose regulation of *Gcgr* mRNA expression. The G-box comprises two E-boxes separated by 3 bp, which distinguishes it from the carbohydrate response element (ChoRE), which has 5-bp spacing between the two E-boxes. In the rat *Gcgr* promoter, a putative ChoRE (–554 bp/–538 bp) is localized near the G-box (–543 bp/–529 bp). In rat INS-1E insulinoma cells, deletion studies of the rat *Gcgr* promoter show that ChoRE is a minimal glucose response element. Moreover, reporter assays using a pGL3 promoter vector, which harbors ChoRE and chromatin immunoprecipitation assays reveal that ChoRE is a functional glucose response element in the rat *Gcgr* promoter. Furthermore, in contrast, glucagon partly suppresses glucose-induced expression of *Gcgr* mRNA. Thus, ChREBP directly regulates rat *Gcgr* expression in INS-1E cells. In addition, negative feedback looping between ChREBP and GCGR may further contribute to the regulation of glucose-induced gene expression.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) has become a serious health problem worldwide. T2DM is characterized by a decrease in insulin secretion caused by β -cell dysfunction and death and an increase in insulin resistance [1]. The role of glucagon in this process is the focus of much attention in current research [2–4]. In the liver, the actions elicited by glucagon are essential for maintaining a euglycemic state under normal physiological conditions [2–4]. On the other hand, hyperglucagonemia is associated with hyperglycemia and diabetes under pathophysiological conditions [2–4]. A state of chronic hyperglucagonemia is correlated with excess hepatic glucose production and hyperglycemia in diabetic patients [2–4]. Indeed, experimental suppression of hyperglucagonemia has been shown to correct postprandial hyperglycemia in diabetic patients [4]. Similarly, antagonism of the glucagon receptor gene (*Gcgr*) and its deletion improve glucose tolerance in genetically obese mice [5–7]. Interestingly, *Gcgr* mRNA expression is positively regulated by glucose both in vitro and in vivo [8,9]. Elucidation of the mechanisms underlying glucose-in-

duced expression of *Gcgr* mRNA in the liver and pancreatic islets should be of significant value in broadening the approaches to improving effective glycemic control in patients with T2DM [2–4].

We have previously studied the role of the carbohydrate response element binding protein (ChREBP), a glucose-activated transcription factor, in the regulation of glucose-induced gene expression in the liver [10–17]. *ChREBP* mRNA and *Gcgr* mRNA are generally expressed in the same tissues, including liver, kidney, intestinal smooth muscle, brain, adipose tissue, heart, and pancreatic islet β -cells [10,18]. ChREBP binds to the carbohydrate response element (ChoRE) to induce lipogenic gene expression [11–13,16]. ChoRE is composed of two tandem E-boxes separated by 5 bp [10,19–21]. Two CACGTG motifs, separated only by 5 bp, can induce glucose-stimulated gene transcription [19]. It has also been reported that a G-box composed of two E-box motifs separated by 3 bp forms a glucose response element in the rat *Gcgr* promoter [8,22,23]. However, whether this G-box is functional is questionable for the following reasons: (1) the rat G-box is composed of two E-boxes separated by only 3 bp [22,23], (2) the sequence of the rat G-box differs from that of the mouse G-box [22–23], and (3) deletion of one E-box does not affect luciferase activities [22,23]. Since glucagon suppresses ChREBP transactivity through the cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathway in the liver [10,24], we considered that ChREBP directly regulates

* Corresponding author. Address: Department of Diabetes and Endocrinology, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu 501-1194, Japan. Fax: +81 58 230 6376.

E-mail address: kiizuka@gifu-u.ac.jp (K. Iizuka).

Gcgr mRNA expression or that glucagon regulates *Gcgr* mRNA expression through inhibition of ChREBP transactivity.

In this study, we identify a functional ChoRE in the *Gcgr* promoter and a closed loop system between glucose (ChREBP) and glucagon (GCGR) signaling. This mechanism of negative feedback between glucose and glucagon suggests novel strategies for treating fasting and postprandial hyperglycemia in T2DM patients.

2. Materials and methods

2.1. Materials and cell culture

The rat insulinoma cell line, INS-1E, (a gift by C.B. Wollheim, University of Geneva) was maintained under 5% CO₂ at 37 °C in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with antibiotics, pyruvate, mercaptoethanol, and 15% fetal calf serum, as previously described [25]. Glucagon was purchased from Fuji Seiyaku Kohgyo (Toyama, Toyama, Japan).

2.2. RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time reverse transcriptase PCR quantification

Cells were preincubated in RPMI media with 2.5 mM glucose for 12 h. After 12-h incubation with various glucose concentrations, cells were collected and used for RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) analysis, as described previously [12–15]. Relative mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized to rat RNA polymerase II (Pol) mRNA. The real-time PCR primers used were as follows: *Gcgr*-Probe,

5'-FAM-TGCCCCACCTACTGAGCTGGTCTG-TAMRA-3'; *Gcgr*-F, 5'-GCCACCACAACCTAAGCCT-3'; *Gcgr*-R, 5'-GGCCAGCAGGAGTACTTGT C-3'; Pol-Probe, 5'-CAACTGGTGACAGCAAGGTGGTCTCC-3'; Pol-F, 5'-CGGGAAGTGCTCAGGCTCA-3'; Pol-R, 5'-GAGGGAAGGCGAGGGT TGA-3'. Similarly, after preincubation with 2.5 mM glucose for 12 h, cells were incubated in media with 25 mM glucose for 3, 6, and 12 h, when they were collected for RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time RT-PCR analysis, as described previously [14–17]. To test the effect of glucagon, cells were incubated in media including 2.5 or 25 mM glucose with and without final concentrations of 10⁻⁸ M glucagon for 8 h, when they were collected for further analysis of real time quantitative PCR, as described previously [14–17].

2.3. Construction of plasmids and adenovirus vectors

We used pCDNA-daChREBP, Ad-daChREBP, Ad-dnMIX, and pRL-SV40 vectors, as previously described [14–17]. A series of pGL3-promoter vectors were constructed as follows: three fragments, G-box (-548/-524 bp), ChoRE + 6 (-559/-527 bp), ChoRE + 3 (-559/-530 bp), ChoRE (-559/-533 bp), ChoRE-3 (-559/-536 bp), and ChoRE-7 (-559/-540 bp) were cloned into pGL3 vectors upstream of the TK promoter. All plasmid and adenovirus vectors were verified by sequencing analysis.

2.4. Treatment with recombinant adenovirus

INS-1E cells were cultured in 6-well plates in 2 ml RPMI. Adenovirus bearing dominant-active ChREBP (daChREBP) cDNA was used

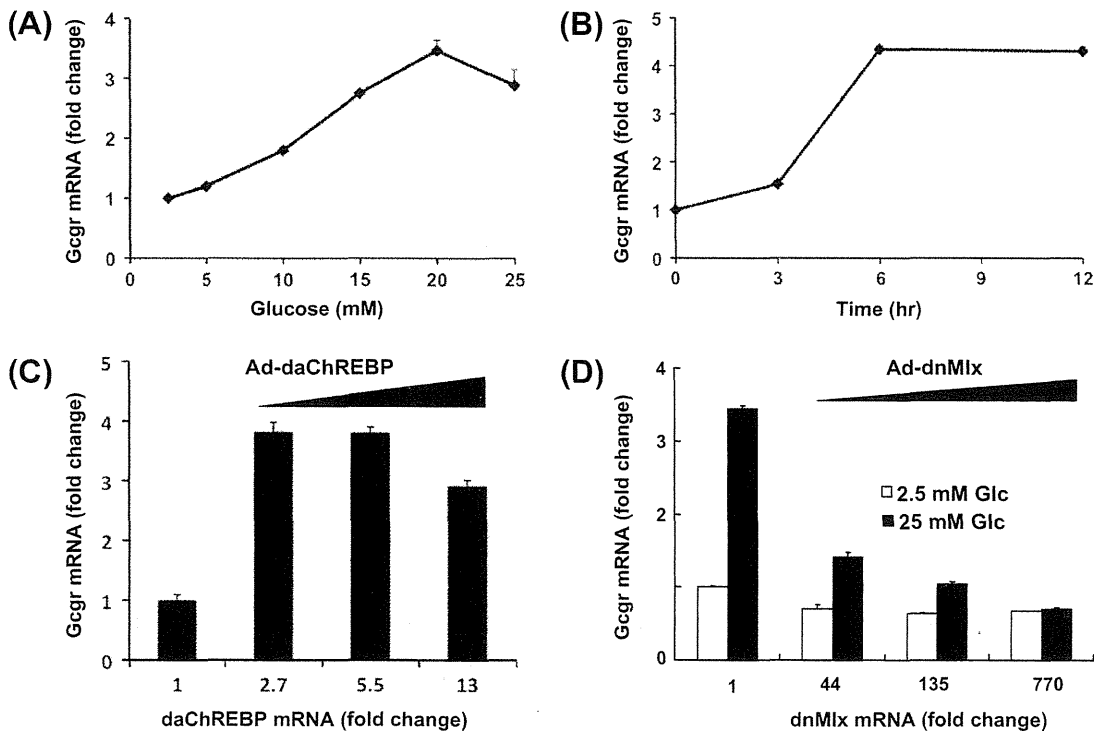


Fig. 1. Glucose induces rat *Gcgr* mRNA expression in a time- and dose-dependent manner. (A) Glucose induces rat *Gcgr* mRNA expression in a dose-dependent manner. INS-1 cells were cultured for 12 h in culture medium containing 2.5, 5.0, 10, 15, 20 or 25 mM glucose. Relative mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized to rat RNA polymerase II (*Pol2*) mRNA as the invariant control. The change in expression level of each normalized enzyme mRNA level was determined with reference to the value for INS-1 cells at 2.5 mM glucose, which was arbitrarily defined as 1. Data represent means \pm S.D. ($n = 3$). (B) Glucose induces rat *Gcgr* mRNA expression in a time-dependent manner. INS-1 cells were cultured in RPMI media including 2.5 mM glucose for 12 h. Media were changed to RPMI media including 25 mM glucose and collected at the indicated hours for Taqman RT-PCR analysis. Data represent means \pm S.D. ($n = 3$). (C) Adenoviral overexpression of dominant active ChREBP causes rat *Gcgr* mRNA expression in INS-1E cells. INS-1 cells were infected with 2, 10, and 50 m.o.i. of Ad-daChREBP for 2 h. After culture in RPMI media with 2.5 mM glucose concentration for 12 h, the cells were collected for Taqman RT-PCR analysis. Data represent means \pm S.D. ($n = 3$). (D) Adenoviral overexpression of dominant negative Mix (dnMlx) causes glucose-stimulated gene expression in INS-1E cells. INS-1 cells were infected with 2, 10, and 50 m.o.i. of Ad-dnMlx for 2 h. After culture in RPMI media with 2.5 mM glucose concentration for 12 h, the cells were incubated in media with 2.5 mM or 25 mM glucose for 4 h and collected for Taqman RT-PCR analysis. Adenovirus bearing green fluorescence protein (GFP) was used as internal control. Values represent means \pm S.D. ($n = 3$). At most points, the error bars are too small to be shown.

to infect INS-1E cells for 2 h. The medium was then removed and the INS-1E cells were incubated in a fresh medium with 2.5 mM glucose for 18 h. Adenovirus bearing dominant-negative Mlx (dnMlx) was used to infect INS-1E cells for 2 h. The medium was then removed and the INS-1E cells were incubated in a fresh medium with 3 mM glucose for 12 h, following which the medium was again removed and the cells were incubated in a fresh medium with either 2.5 or 25 mM glucose for an additional 4 h. Adenovirus bearing green fluorescence protein (GFP) was used as internal control. Cells were then collected and used for RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time RT-PCR analysis, as described previously [14–17].

2.5. Mammalian transfection and reporter assay

Rat INS-1 cells were cultured in 6-well plates in 2 ml RPMI without antibiotics. The cells were transfected with 4 μ l of Lipofectamine[®] 2000 transfection reagent (Invitrogen, California, USA); 1.5 μ g of either pGL3-G-box, pGL3-ChoRE + 6, pGL3-ChoRE + 3, pGL3-ChoRE, pGL3-ChoRE-3, pGL3-ChoRE-7, or pGL3-empty and 0.1 μ g of pRL SV40 vector (Invitrogen, California, USA) [14–17]. After 24 h of incubation with either 2.5 mM or 25 mM glucose, the cells were collected and luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase[®] reporter assay system (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. To determine the glucose dependency of the rat *Gcgr* promoter, cells were transfected with 1.5 μ g of pGL3-ChoRE and 0.1 μ g of pRL SV40 vectors. After 24 h of incubation with various glucose concentrations, the cells were collected for measurement of luciferase activity. To determine the dose dependency of daChREBP overexpression in the rat *Gcgr* promoter, cells were transfected with 0.5 μ g of pGL3-ChoRE, 0.1 μ g of pRL SV40 vectors, and 1.0 μ g of

pcDNA6.2 empty vector and pcDNA-daChREBP vector to adjust total DNA. After 24 h of incubation with either 2.5 mM or 25 mM glucose, the cells were collected for the measurement of luciferase activity. Similarly, after transfection with 1.5 μ g of pGL3-ChoRE and 0.1 μ g of pRL SV40 vectors, the cells were incubated in media with either 2.5 mM or 25 mM glucose containing 10^{-8} mM glucagon for 24 h.

2.6. Chromatin immunoprecipitation assay

A chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was performed with anti-ChREBP antibodies (Novus Biologicals, Littleton, CO) on formaldehyde cross-linked hepatocytes using Magna ChIP G beads (Millipore, Temecula, CA). INS-1E cells were precultured in 10-cm culture dishes with RPMI supplemented with 2.5 mM glucose, 15% FCS, and 100 μ g/ml pen/strep for 12 h, followed by incubation in RPMI supplemented with 2.5 mM or 25 mM concentrations of glucose for 8 h. After incubation, 10% formaldehyde (270 μ l) was added to the culture dishes and the cells were used for ChIP assays according to the manufacturer's protocol. The purified DNA was dissolved in Tris/EDTA (50 μ l, pH 8.0) and used with gene-specific primers for PCR. A buffer solution and normal rabbit immunoglobulin G (Wako Chemical) were used as negative controls. Immunological chromatin samples were amplified by PCR using the primers as follows: *Gcgr*-CHIP-Probe, 5'-CCTCTGCTCCACACACGGTGCA-3'; *Gcgr*-CHI P-F, 5'-CCTCAGAGCGGTCCATTATACC-3'; *Gcgr*-CHIP-R, 5'-TCTGGCT CCTGGGTGAAAGA-3'.

2.7. Data presentation and statistical methods

All data are expressed as mean \pm standard deviation. The listed *n* values represent the number of single experiments performed

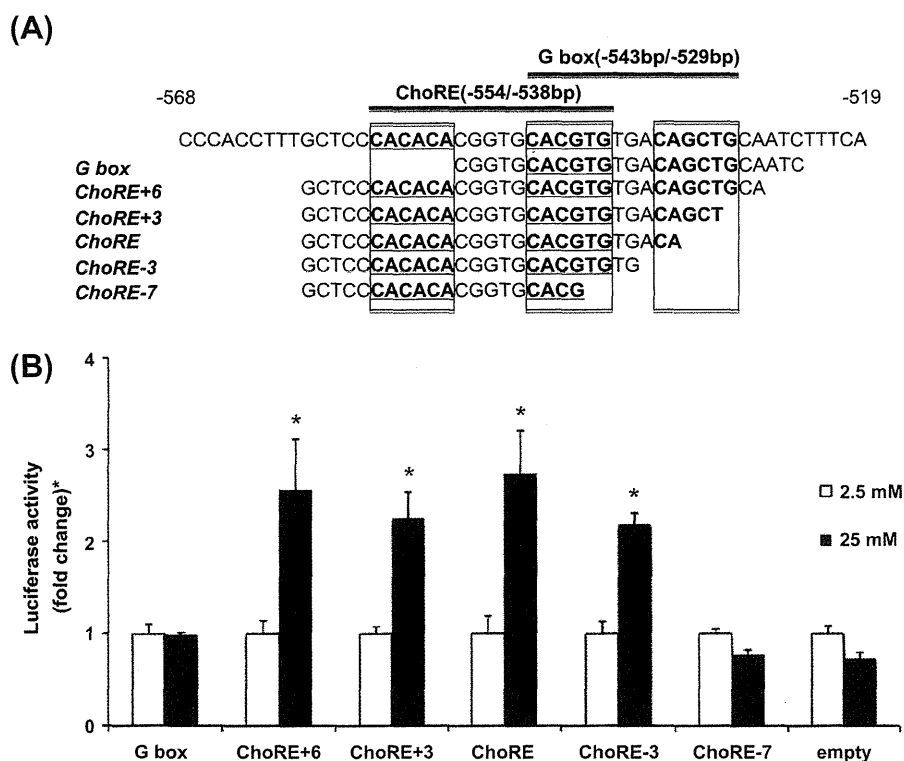


Fig. 2. ChoRE, but not G-box, is a functional glucose response element in the rat *Gcgr*. (A) Schematic representation of the G-box and the putative ChoRE in the rat *Gcgr* promoter. (B) Reporter analysis of deletion mutant of the ChoRE + 6 region (-559/-527 bp). Cells were co-transfected with 1.5 μ g of pGL3 promoter vector inserted with either G-box, ChoRE + 6, ChoRE + 3, ChoRE, ChoRE-3, ChoRE-7, or empty vector and pRL SV40 (0.1 μ g), and incubated in media with either 2.5 mM glucose or 25 mM glucose for 24 h. Cell lysates were collected for measurement of luciferase activities. Data represent means \pm S.D. (*n* = 6). At most points, the error bars are too small to be shown.

(each experiment was duplicated). Comparison between the two groups was performed using the Student's *t*-test and that between multiple groups was performed using the Tukey–Kramer test. A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Glucose stimulation and adenoviral overexpression of dominant active ChREBP causes an increase in rat glucagon receptor mRNA in INS-1E cells

We first ascertained whether glucose stimulation induces *Gcgr* mRNA expression in rat INS-1E cells. In INS-1E cells, glucose induced *Gcgr* mRNA expression in a dose- and time-dependent manner (Fig. 1A and B). Next, to clarify the role of the ChREBP/Mlx complex in *Gcgr* mRNA expression, we tested whether adenoviral overexpression of daChREBP induces *Gcgr* mRNA expression, and observed that adenoviral overexpression of daChREBP dose-dependently induced *Gcgr* mRNA expression in INS-1E cells (Fig. 1C). In accord with this, dnMlx, which acts as a decoy to antagonize ChREBP transactivity, inhibited glucose-induced *Gcgr* mRNA expression in INS-1E cells in a dose-dependent manner (Fig. 1D).

3.2. Identification of ChoRE in the rat glucagon receptor gene promoter

To determine the presence of ChoRE in the rat *Gcgr* promoter, we screened the region and found a putative ChoRE located between –554 and –538 bp, which differs from a G-box (from –543 to –529 bp) (Fig. 2A). To determine the functionality of this putative ChoRE, we performed a reporter assay using the pGL3 promoter vector inserted with deletion mutants of in the *Gcgr* promoter (Fig. 2B). In cells transfected with either pGL3-ChoRE-3, ChoRE, ChoRE + 3, ChoRE + 6 vectors, luciferase activities at 25 mM of glucose concentration were more than twice that at 2.5 mM glucose concentration (Fig. 2B). In contrast, luciferase activities in cells transiently transfected with either pGL3-ChoRE-7, G-box, or empty vectors were not increased by glucose stimulation (Fig. 2B). These data suggest that the rat *Gcgr* promoter contains a functional ChoRE between –554 and –538 bp.

3.3. Glucose and cotransfection of pcDNA-daChREBP increases luciferase activities of pGL3-ChoRE in a dose-dependent manner

Glucose and cotransfection of pcDNA-daChREBP induced luciferase activities in pGL3-ChoRE in a dose-dependent manner (Fig. 3A and B). In accord with this, ChIP assays using anti-ChREBP

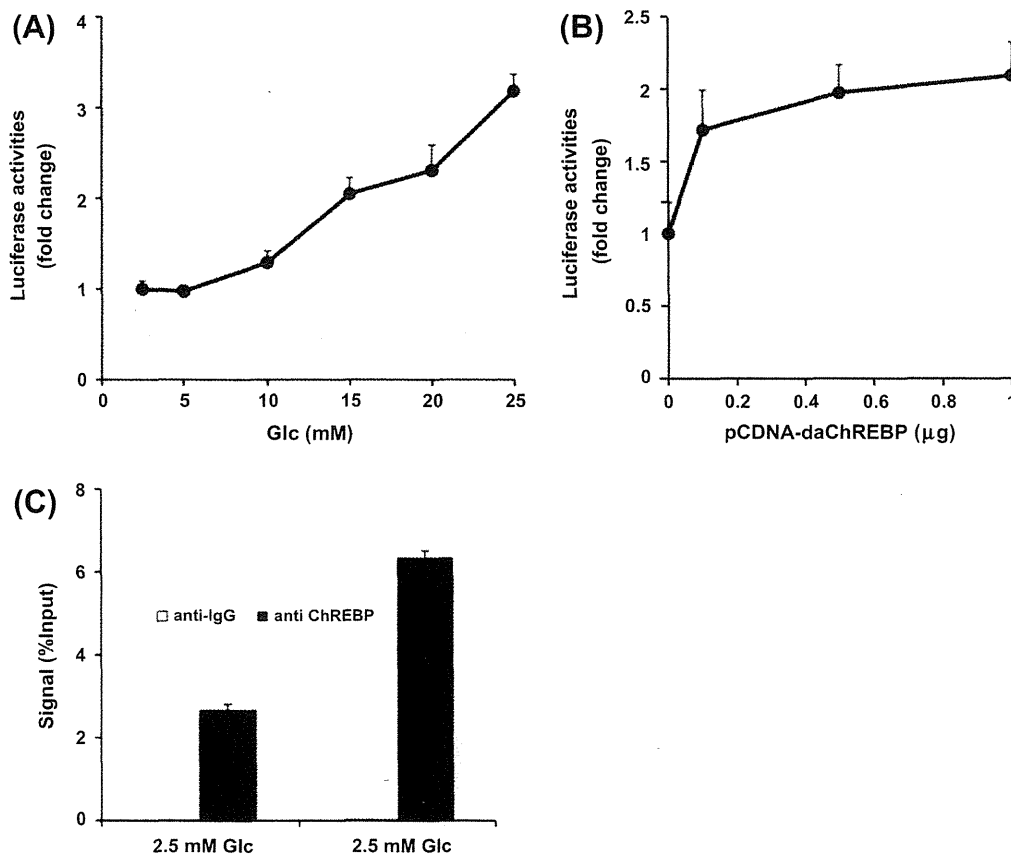


Fig. 3. ChoRE is a functional glucose response element to which ChREBP can bind. (A) Glucose dose-dependently induces luciferase activities in pGL3-ChoRE in INS-1E cells. INS-1 cells were cultured in six-well dishes and transfected with the series of pGL3-ChoRE vector (1.1 µg) and pRL-SV40 (0.4 µg) using Lipofectamine2000 (4 µl). After 24 h incubation in DMEM including several concentrations of glucose, luciferase activities were measured using Dual Luciferase assay kit. Data are mean ± S.D. (*n* = 6) of two independent experiments. At most points, the error bars are too small to be shown. (B) Cotransfection of pcDNA dominant active ChREBP (daChREBP) dose-dependently increases luciferase activities in pGL3-ChoRE in INS-1E cells. The pGL3-ChoRE vector (0.5 µg) and several concentrations of pcDNA daChREBP were cotransfected into INS-1E cells with pRL SV40 (0.1 µg). Total DNA was adjusted with pcDNA 6.2 empty vectors. The relative luciferase activity was expressed as an *n*-fold change with reference to the pcDNA 6.2 empty vector. Data are mean ± S.D. (*n* = 6) of two independent experiments. At most points, the error bars are too small to be shown. (C) ChIP assays reveal that ChREBP binding to ChoRE in 25 mM glucose is enhanced relative to the binding in 2.5 mM glucose. INS-1E cells were precultured in 10-cm culture dishes with RPMI supplemented with 2.5 mM glucose, 15% FCS, and 100 µg/ml pen/strep for 12 h, followed by incubation in RPMI supplemented with 2.5 mM or 25 mM concentrations of glucose for 8 h. After incubation, 10% formaldehyde (270 µl) was added to the culture dishes and the cells were used for ChIP assays according to the manufacturer's protocol. Data represent means ± S.D. (*n* = 3). At most points, the error bars are too small to be shown.

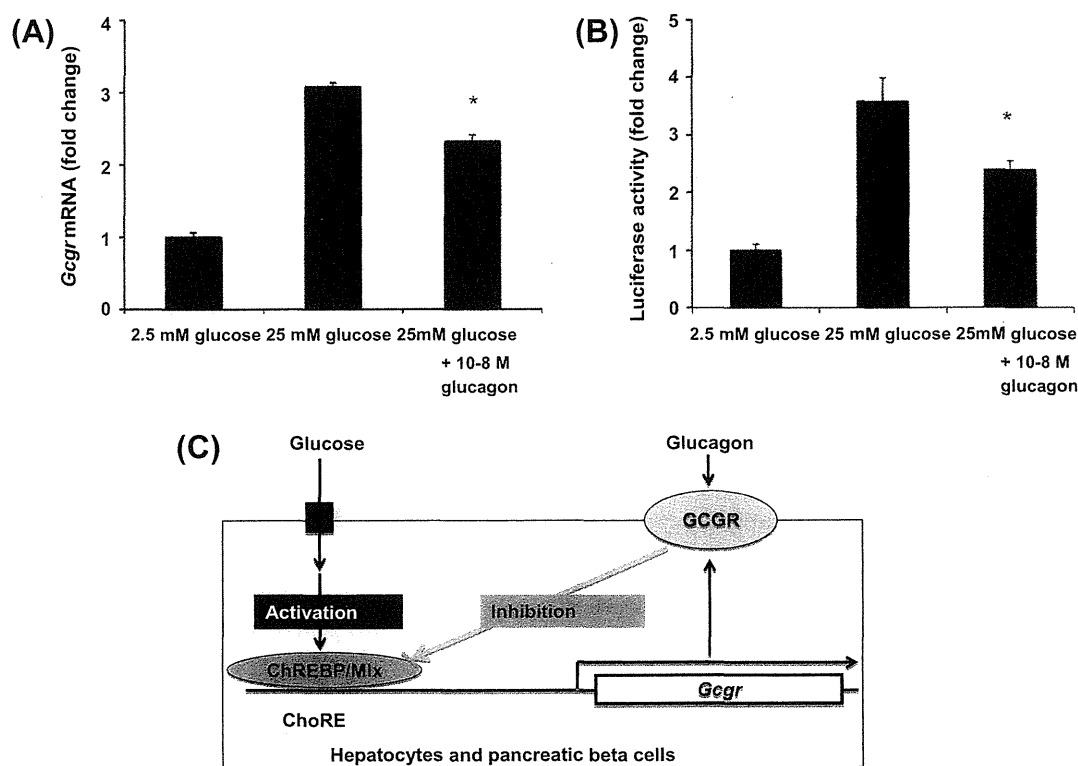


Fig. 4. Glucagon suppresses rat *Gcgr* mRNA expression in INS-1E cells. (A) Addition of 10 nM glucagon partly inhibits glucose-induced *Gcgr* mRNA expression in INS-1E cells. Data represent means \pm S.D. ($n = 3$). * $p < 0.05$ vs. 25 mM glucose. At most points, the error bars are too small to be shown. (B) Addition of 10 nM glucagon partly inhibits glucose-induced luciferase activities in pGL3-ChoRE in INS-1E cells. Data represent means \pm S.D. ($n = 6$). * $p < 0.05$ vs. 25 mM glucose. At most points, the error bars are too small to be shown. (C) Schematic representation of feedback looping between glucose and glucagon signaling in the regulation of *Gcgr* expression.

antibodies showed that ChREBP binds to the region containing ChoRE (Fig. 3C). In contrast, glucose and cotransfection of pcDNA-daChREBP did not increase luciferase activities in the pGL3-G-box (Fig. S3A and S3B). These findings suggest that ChoRE (–554/–538 bp), but not the G-box (–543 bp/–529 bp), is a functional glucose response element.

3.4. Glucagon suppresses ChREBP transactivity in INS-1E cells

In the liver, cAMP activates cAMP-dependent PKA, which in turn inhibits ChREBP transactivity through its phosphorylation. We confirmed that 1 nM of glucagon inhibited glucose-stimulated *Gcgr* gene expression in INS-1E cells (Fig. 4A). In accord with this, glucose-induced luciferase activities in pGL3-ChoRE were partly suppressed by 1 nM glucagon (Fig. 4B). These data suggest a closed feedback loop between glucose and glucagon signaling in the regulation of *Gcgr* expression (Fig. 4C).

4. Discussion

In this study, we found that ChREBP directly regulates rat *Gcgr* mRNA expression by binding to ChoRE in the rat *Gcgr* promoter. Previously, the G-box in the rat *Gcgr* promoter was considered to play a pivotal role in glucose regulation of rat *Gcgr* mRNA expression; however, the results from our reporter and ChIP assays indicate that ChoRE and not the G-box regulates glucose responsiveness on rat *Gcgr* mRNA expression. On the other hand, glucagon inhibits glucose-induced rat *Gcgr* mRNA expression, suggesting a feedback loop system between glucose and glucagon signaling in the regulation of ChREBP target genes such as *Gcgr*.

Glucose induced rat *Gcgr* mRNA expression in INS-1E cells in a dose- and time-dependent manner. This accords with previously reported data [8]. In addition, adenoviral overexpression of daChREBP was found to increase *Gcgr* mRNA expression. Conversely, suppression of ChREBP transactivity by adenovirus expressing dnMlx inhibited glucose-induced *Gcgr* mRNA expression in INS-1E cells. Therefore, glucose stimulation regulates rat *Gcgr* mRNA expression through ChREBP transactivation.

The glucose response element in the rat *Gcgr* promoter was previously known as the G-box [8,22,23]. The sequence of the G-box differs from the consensus recognition sequence of ChoRE (Fig. 2A). The spacing distances between the two E-boxes in the G-box and ChoRE are 3 and 5 bp, respectively (Fig. 2A). From evidence that transcription activity of the glucose response element depends on the spacing distance, we considered that there may be another glucose response element near the G-box in the rat *Gcgr* promoter (Fig. 2A). The consensus sequence for ChoRE (CABGTG-nnCnG-nGnSTG) differs from that of a G-box [20,21]. Interestingly, the ChoRE found in the rat *Gcgr* promoter seems to be a reverse form of the ChoRE motif (CABGTG-nnCnG-nGnSTG). Moreover, deletion studies of the region containing the ChoRE + 6 motifs (–554/–538 bp) show that ChoRE is the minimal functional motif possessing glucose responsiveness. Thus, ChREBP directly regulates rat *Gcgr* mRNA expression through binding to ChoRE (–554/–538 bp).

Glucagon and cAMP inhibit *Gcgr* mRNA expression [24]. Similarly, glucagon and cAMP inhibit ChREBP transactivity through the phosphorylation of cAMP-dependent PKA [10,25]. In accord with these data, our results show that glucagon inhibits *Gcgr* mRNA expression through the inhibition of ChREBP transactivities (Fig. 4A and B). Considered together with glucose-induced *Gcgr* mRNA expression, this suggests that glucose and glucagon

signaling constitutes a closed loop in the regulation of rat *Gcgr* mRNA expression in INS-1E cells (Fig. 4C). Moreover, ChREBP induces transcriptional repressors, such as KLF10 and DEC1, which are regulated by ChREBP itself [14,17]. Furthermore, ChREBP induces hormones with glucose-lowering effects, such as fibroblast growth factor 21 (FGF21) [15], which can suppress ChREBP transactivity by normalizing plasma glucose [26]. Therefore, ChREBP autoregulates its transactivity by inducing the expression of its target genes, such as *Gcgr*, *Klf10*, *Dec1*, and *Fgf21*.

Under normal conditions, glucagon secretion is suppressed postprandially, and increased during fasting [2–4]. We conclude that increased *Gcgr* mRNA expression during the postprandial state increases glucagon sensitivity in pancreatic β -cells during fasting. Moreover, both hyperglycemia and hyperglucagonemia coexist in both the fasted and the fed state in diabetic patients. Increased *Gcgr* mRNA expression may thus contribute to fasting and postprandial hyperinsulinemia in diabetic patients. Other studies also have found that gene deletion of ChREBP in ob/ob mice prevents glucose intolerance, fatty liver, and diet-induced obesity [13,27]. Inhibition of ChREBP transactivity may thus improve glucose tolerance by decreasing *Gcgr* mRNA expression and glucagon signaling.

In conclusion, we have determined the functions of ChoRE in the rat *Gcgr* promoter. Glucagon inhibits *Gcgr* mRNA expression through inhibition of ChREBP transactivity, and a closed loop system between glucose and glucagon signaling contributes to the prevention of increased glucose-stimulated gene expression. Inhibition of hepatic ChREBP transactivity may thus be an attractive treatment option for metabolic syndrome by decreasing *Gcgr* mRNA expression and subsequent suppression of glucagon effects and de novo lipogenesis.

Acknowledgments

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (K. Iizuka), the Kao Research Council for the Study of Healthcare Science (K. Iizuka), and in part by a New Energy and Industrial Technology Development Organization grant (Y. Horikawa).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.042.

References

- [1] G.M. Reaven, Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease, *Diabetes* 37 (1988) 1595–1607 (Review).
- [2] R.A. Rizza, Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy, *Diabetes* 59 (2011) 2697–2707.
- [3] R.H. Unger, L. Orci, Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 16009–16012.
- [4] D.S. Edgerton, A.D. Cherrington, Glucagon as a critical factor in the pathology of diabetes, *Diabetes* 60 (2011) 377–380.
- [5] P.M. Vuguin, M.J. Charron, Novel insight into glucagon receptor action: lessons from knockout and transgenic mouse models, *Diabetes Obes. Metab.* 1 (2011) 144–150.
- [6] S.L. Conarello, G. Jiang, J. Mu, Z. Li, J. Woods, E. Zycband, J. Ronan, F. Liu, R.S. Roy, L. Zhu, M.J. Charron, B.B. Zhang, Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia, *Diabetologia* 50 (2007) 142–150.
- [7] H. Sørensen, M.S. Winzell, C.L. Brand, K. Fosgerau, R.W. Gelling, E. Nishimura, B. Ahren, Glucagon receptor knockout mice display increased insulin sensitivity and impaired beta-cell function, *Diabetes* 55 (2006) 3463–3469.
- [8] L. Portois, B. Maget, M. Tastenoy, J. Perret, M. Svoboda, Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8181–8190.
- [9] R. Burcelin, C. Mrejen, J.F. Decaux, S.H. De Mouzon, J. Girard, M.J. Charron, In vivo and in vitro regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 8088–8093.
- [10] K. Iizuka, Y. Horikawa, ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome, *Endocr. J.* 55 (2008) 617–624.
- [11] K. Iizuka, R.K. Bruick, G. Liang, J.D. Horton, K. Uyeda, Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 7281–7286.
- [12] S. Ishii, K. Iizuka, B.C. Miller, K. Uyeda, Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 15597–15602.
- [13] K. Iizuka, B. Miller, K. Uyeda, Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291 (2006) E358–E364.
- [14] K. Iizuka, J. Takeda, Y. Horikawa, Krüppel-like factor-10 is directly regulated by carbohydrate response element-binding protein in rat primary hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 (2011) 638–643.
- [15] K. Iizuka, J. Takeda, Y. Horikawa, Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes, *FEBS Lett.* 583 (2009) 2882–2886.
- [16] K. Iizuka, J. Takeda, Y. Horikawa, Hepatic overexpression of dominant negative Mix improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2009) 499–504.
- [17] K. Iizuka, Y. Horikawa, Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374 (2008) 95–100.
- [18] M. Svoboda, L. Portois, W.J. Malaisse, Glucose regulation of the expression of the glucagon receptor gene, *Mol. Genet. Metab.* 68 (1999) 258–267.
- [19] H.M. Shih, Z. Liu, H.C. Towle, Two CACGTG motifs with proper spacing dictate the carbohydrate regulation of hepatic gene transcription, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21991–21997.
- [20] L. Ma, L.N. Robinson, H.C. Towle, ChREBP**Mix* is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 28721–28730.
- [21] Y.S. Jeong, D. Kim, Y.S. Lee, H.J. Kim, J.Y. Han, S.S. Im, H.K. Chong, J.K. Kwon, Y.H. Cho, W.K. Kim, T.F. Osborne, J.D. Horton, H.S. Jun, Y.H. Ahn, S.M. Ahn, J.Y. Cha, Integrated expression profiling and genome-wide analysis of ChREBP targets reveals the dual role for ChREBP in glucose-regulated gene expression, *PLoS One* 6 (2011) e22544.
- [22] L. Portois, M. Tastenoy, B. Viollet, M. Svoboda, Functional analysis of the glucose response element of the rat glucagon receptor gene in insulin-producing INS-1 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1574 (2002) 175–186.
- [23] L. Portois, M. Tastenoy, M. Svoboda, Mutational analysis of the glucose regulatory element in the promoter of the glucagon receptor gene, *Ann. NY Acad. Sci.* 921 (2000) 148–156.
- [24] N. Abrahamsen, K. Lundgren, E. Nishimura, Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 15853–15857.
- [25] H. Yamashita, M. Takenoshita, M. Sakurai, R.K. Bruick, W.J. Henzel, W. Shillinglaw, D. Arnot, K. Uyeda, A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 9116–9121.
- [26] S.A. Kliewer, D.J. Mangelsdorf, Fibroblast growth factor 21: from pharmacology to physiology, *Am. J. Clin. Nutr.* 91 (2010) 254S–257S.
- [27] R. Dentin, F. Benhamed, J. Hainault, V. Fauveau, F. Foulle, J.R. Dyck, J. Girard, C. Postic, Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice, *Diabetes* 55 (2006) 2159–2170.

Normalization of fasting hyperglycemia is beneficial for successful introduction of small amount of the GLP-1 analog liraglutide in an obese patient with type 2 diabetes mellitus

Katsumi Iizuka · Reiko Tomita · Tetsuya Suwa · Yukio Horikawa · Jun Takeda

Received: 26 August 2011 / Accepted: 18 October 2011 / Published online: 15 November 2011
© The Japan Diabetes Society 2011

Abstract A 50-year-old diabetic woman was treated with intensive insulin therapy, but her glycemic levels were very high. After fasting hyperglycemia was normalized by intensive insulin therapy (34 U/day) and administration of 1000 mg metformin and 150 mg miglitol. We introduced liraglutide, a GLP-1 analog, and 0.5 mg glimepiride on day 10. Liraglutide was dosed up to 0.9 mg every 3 days. Metabolic data (fasting glucose, *M* values, plasma C-peptide, proinsulin/plasma C-peptide immunoreactivity ratio, obesity, and plasma leptin) improved after liraglutide administration. Interestingly, subcutaneous injection of only 0.3 mg liraglutide for 3 days augmented glucose-stimulated insulin secretion and the proinsulin-to-CPR ratio, and inhibited plasma leptin concentration. Normalization of fasting hyperglycemia was beneficial for successfully introducing liraglutide in an obese patient with type 2 diabetes mellitus.

Keywords Liraglutide · Glucagon-like-peptide-1 · Type 2 diabetes mellitus · Leptin · Adiponectin

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is becoming a social and economic problem worldwide. Intensive insulin therapy (IIT) is a standard therapy for treating T2DM; however,

weight gain and severe hypoglycemia are problems when administering IIT to obese patients with T2DM [1]. Incretin-based therapy based on the effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is now emerging to overcome this problem [2].

GLP-1 is secreted by intestinal L cells after food intake [3]. It potentiates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells while suppressing glucagon secretion [3]. In addition, GLP-1 inhibits acid secretion and gastric emptying in the stomach, and reduces food intake by increasing satiety in the brain [3]. Accordingly, GLP-1 therapy reduces plasma glucose concentration without weight gain [2, 3]. Moreover, GLP-1 has a lower risk of causing hypoglycemia because GLP-1 cannot augment insulin secretion when glucose concentrations are normal [3]. The effect of incretin is attenuated in patients with T2DM, primarily because of a reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide (GIP), whereas the effect of GLP-1 is, relatively, more preserved [2, 3]. The sensitivity of GLP-1 to glucose can be increased to normal levels by infusing a slightly supraphysiological dose of GLP-1. However, the dose–response relationship between GLP-1 and its potentiation of the beta cell response to glucose is impaired in patients with T2DM. Moreover, GLP-1 is easily digested by dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV); however, GLP-1 analogs such as liraglutide and exenatide, which are difficult for DPP-IV to digest, have been developed [2, 3].

This report presents the case of an obese patient with T2DM who underwent successful liraglutide therapy after normalizing plasma glucose concentration by IIT. Interestingly, subcutaneous injection of only 0.3 mg liraglutide for 3 days augmented glucose-stimulated insulin secretion and the proinsulin-to-CPR ratio, and inhibited plasma leptin concentration. Thus, liraglutide is an attractive treatment option for obese patients with T2DM.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13340-011-0052-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. Iizuka (✉) · R. Tomita · T. Suwa · Y. Horikawa · J. Takeda
Department of Diabetes and Endocrinology,
Graduate School of Medicine, Gifu University,
Gifu 501-1194, Japan
e-mail: kiizuka@gifu-u.ac.jp