

2009J6082A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

多施設共同研究：

劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と診断基準確立に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 花房 俊昭

平成22(2010)年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 多施設共同研究：劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と  
診断基準確立に関する研究・・・・・・・・・・・・・1  
花房 俊昭

### II. 分担研究報告

1. 多施設共同研究：劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と  
診断基準確立に関する研究・・・・・・・・・・・・・7  
小林 哲郎
2. 劇症1型糖尿病の疾患感受性遺伝子解析と診断への展開・・・・・・・・・・・・・9  
池上 博司
3. 糖尿病新診断基準（案）の劇症1型糖尿病における検討・・・・・・・・・・・・・12  
今川 彰久
4. GWASの実施・・・・・・・・・・・・・14  
徳永 勝士・西田 奈央
5. GWAS結果の解析及びサイトカイン測定に関する研究・・・・・・・・・・・・・18  
安田 和基
6. 多施設共同研究：劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と  
診断基準確立に関する研究・・・・・・・・・・・・・21  
大澤 春彦
7. 1型糖尿病の遺伝子因子の研究・・・・・・・・・・・・・23  
粟田 卓也
8. 成人1型糖尿病の予知に関する研究・・・・・・・・・・・・・24  
川崎 英二  
(資料)表1・図2・表2
9. 多施設共同研究：劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と  
診断基準確立に関する研究・・・・・・・・・・・・・28  
島田 朗
10. 自己抗原・インスリンと1型糖尿病の発症機序ならびに治療展開・・・・・・・・・・・・・31  
永田 正男
11. 劇症1型糖尿病解析における数式処理ソフトによる具体例の構成と計算・・・・・・・・・・・・・33  
西村 保一郎

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・35

### IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・41

# I . 總括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

多施設共同研究：劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と診断基準確立に関する研究

研究代表者 花房 俊昭（大阪医科大学医学部 第一内科 教授）

研究要旨：劇症1型糖尿病の診断マーカー候補を明らかにするため、劇症1型糖尿病、自己免疫性1型糖尿病、健常者においてgenome wide association解析を施行し、複数の関連するSNPを見出した。また、我が国における劇症1型糖尿病患者数を、1) 研究分担施設および研究協力施設に通院中の劇症1型糖尿病患者数とインスリン注射施行患者数から、2) 愛媛地区における患者登録からそれぞれ推計した結果、5,000-7,000人であると考えられた。

研究分担者

小林哲郎  
山梨大学医学工学研究部  
第三内科 教授

池上博司  
近畿大学医学部  
内分泌・代謝・糖尿病内科 教授

今川彰久  
大阪大学大学院医学系研究科  
内分泌・代謝内科学 特任講師

徳永勝士  
東京大学大学院医学系研究科  
人類遺伝学 教授

西田奈央  
東京大学大学院医学系研究科  
人類遺伝学 特任助教

安田和基  
国立国際医療センター研究所  
代謝疾患研究部 部長

大澤春彦  
愛媛大学大学院医学系研究科  
分子遺伝制御内科学 教授

栗田卓也  
埼玉医科大学 内分泌・糖尿病内科 教授

川崎英二  
長崎大学医学部・歯学部附属病院  
生活習慣病予防診療部 准教授

島田 朗  
慶應義塾大学 内科  
講師

永田正男  
神戸大学大学院医学研究科  
内科学講座 老年内科学  
准教授

西村保一郎  
大阪医科大学医学部 数学  
教授

A. 研究目的

劇症1型糖尿病は、発症前後の短期間で膵β細胞の殆どが消失するが、自己免疫が主病態である一般の1型糖尿病とは病態が異なり、自己抗体は陰性である。すなわち、本疾患の診断マーカーは確立しておらず、暫定的な診断基準には合致しない症例も多い。そこで本研究では、世界で唯一体系的な症例登録をしている本邦において、ゲノムワイド関連解析を中心に、劇症1型糖尿病の原因・病態の鍵となる分子を同定し、特異的な診断マーカーの確立とそれを用いた診断基準の作成を目指す。また、新規診断基準に立脚した患者数と病像の把握が最終的な目的であるが、本年は暫定診断基準を用いて患者数を把握する。

B. 研究方法

全ゲノム関連解析 (GWAS) による鍵分子候補の同定

Affymetrix社製 SNP Array 6.0 アレイを用いて全ゲノム領域の SNP 関連解析を行う。劇症1型糖尿病患者群100名と健常対照群100名に加え、β細胞が破壊されるがその機序が劇症1型糖尿病とは異なる自己免疫性1型糖尿病200名（うち、急性発症100名、緩徐発症100名）の3群

の相関解析を1セットとし、異なる3セットを準備する。

本年度は、第1セットで90万SNPの相関解析を行い、有意水準を1%として関連が有意になることが予想されるSNP、および機能的に関連すると予想される遺伝子のうち有意水準5%で関連するSNP、両者の合計約1000SNPを選定する。なお、今回の劇症1型糖尿病患者選定に際しては、現在暫定的に用いられている日本糖尿病学会劇症型糖尿病調査委員会による診断基準(表1)を用いる。

表1 劇症1型糖尿病診断基準(2004)

下記1~3のすべての項目を満たすものを劇症1型糖尿病と診断する。

1. 糖尿病症状発現後1週間前後以内でケトosisあるいはケトアシドーシスに陥る(初診時尿ケトン体陽性、血中ケトン体上昇のいずれかを認める)。
2. 初診時の(随時)血糖値が288mg/dl(16.0mmol/l)以上であり、かつHbA<sub>1c</sub>値<8.5%である。
3. 発症時の尿中Cペプチド<10μg/day、または、空腹時血清Cペプチド<0.3ng/ml かつグルカゴン負荷後(または食後2時間)血清Cペプチド<0.5ng/mlである。

<参考所見>

- A) 原則としてGAD抗体などの膵島関連自己抗体は陰性である。
- B) ケトosisと診断されるまで原則として1週間以内であるが、1~2週間の症例も存在する。
- C) 約98%の症例で発症時に何らかの血中膵外分泌酵素(アミラーゼ、リパーゼ、エラスターゼ1など)が上昇している。
- D) 約70%の症例で前駆症状として上気道炎症状(発熱、咽頭痛など)、消化器症状(上腹部痛、悪心・嘔吐など)を認める。
- E) 妊娠に関連して発症することがある。

### 劇症1型糖尿病患者数の検討

次の2つの方法により日本における患者数を推計する。

1) インスリン自己注射施行患者数からの推計

日本糖尿病学会劇症型糖尿病調査委員会により作成された暫定診断基準(表1)を用い

て、研究分担施設および研究協力施設に通院中の劇症1型糖尿病患者数を明らかにする。次いで各施設におけるインスリン自己注射施行患者を明らかにし、インスリン自己注射施行患者における劇症1型糖尿病患者の割合を明らかにする。日本人においてインスリン自己注射施行患者数は110-120万人と推計されていることから、日本における劇症1型糖尿病患者数を推計する。

2) 地域糖尿病患者登録レジストリからの推計

上記の劇症1型糖尿病暫定診断基準が作成されてから地域糖尿病患者登録レジストリである「愛媛スタディ」\*において、全糖尿病患者における劇症1型糖尿病患者割合を明らかにする。厚生労働省による平成17年の患者調査の概況では、継続的な治療を受けていると推測される患者数は246万9000人と報告されている。この数値と「愛媛スタディ」における患者割合より、日本における劇症1型糖尿病患者数を推計する。

\*Murao S, et al: Differences in the contribution of HLA-DR and -DQ haplotypes to susceptibility to adult- and childhood-onset type 1 diabetes in Japanese patients. *Diabetes* 53: 2684-2690, 2004.

(倫理面への配慮)

全ゲノム関連解析における検体の収集は、静脈血採血によるもののみであり、被験者への負担は軽微であると考えられるが、細心の注意をもって検体採取をおこなうとともに十分なインフォームドコンセントを得たうえで実施する。また、本研究の施行に関しては既に日本糖尿病学会倫理委員会の承認を得ているが、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日策定、平成16年12月28日全部改正、平成17年6月29日一部改正)、疫学研究に関する倫理指針(平成14年6月17日策定、平成16年12月28日、平成19年8月16日全部改正)、臨床研究に関する倫理指針(平成15年7月30日策定、平成16年12月28日、平成20年7月31日全部改正)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、所定の手続終了後研究を開始した。

## C. 研究結果

### 全ゲノム関連解析 (GWAS) による鍵分子候補の同定

GeneChip システムを用いて全ゲノム領域の SNP 関連解析を実施した。劇症 1 型糖尿病患者群 100 名と健常対照群 100 名に加え、 $\beta$  細胞が破壊されるがその機序が劇症 1 型糖尿病とは異なる自己免疫性 1 型糖尿病 200 名（急性発症 100 名と緩徐発症 100 名）の 4 群の相関解析を 1 セットとし、異なる 3 セットの検体を準備した。このうち、第 1 セットで 90 万 SNP の相関解析を行い、現在候補 SNP を選定中である。

表 2 一次スクリーニング結果 (一部)

No	遺伝子 (SNP)	染色体	自己免疫性との重複	P 値
F1	AJ005	chr 1	yes	1.95E-05
F2	PR107	chr 1	no	5.87E-05
F3	HM184	chr 1	no	6.29E-05
F4	HH209	chr 1	no	2.42E-05
F5	DY072	chr 2	yes	7.10E-05
F6	BI128	chr 2	no	6.43E-05
F7	RB030	chr 3	no	3.57E-05
F8	CC046	chr 3	no	1.04E-05
F9	IR002	chr 5	no	6.95E-05
F10	RN019	chr 6	no	4.86E-05
F11	LA130	chr 6	no	1.30E-05
F12	SV138	chr 7	yes	6.00E-05
F13	IM058	chr 8	no	4.19E-05
F14	PV119	chr 11	no	1.51E-04
F15	PP028	chr 12	no	1.37E-05
F16	CO110	chr 13	no	7.55E-05
F17	CB048	chr 16	no	5.57E-05
F18	FL030	chr 17	no	3.89E-05
F19	MA070	chr 18	no	8.87E-05
F20	ZF050	chr 20	no	2.11E-05

### 劇症 1 型糖尿病患者数の検討

### 1) インスリン自己注射施行患者数からの推計

研究分担施設および研究協力施設に通院中の劇症 1 型糖尿病患者数とインスリン施行患者を調査した結果を表 3 に示す。インスリン自己注射施行患者における劇症 1 型糖尿病患者の割合は、極端に比率の高い 1 病院を除くと 0.39-1.75 % (平均 0.61 %) であった。日本人においてインスリン自己注射施行患者数は 110-120 万人と推計されていることから、日本における劇症 1 型糖尿病患者数は 4290-21000 (7015) 人と推計できる。

表 3 劇症 1 型糖尿病患者数

施設名	劇症 1 型患者数	インスリン治療患者数	患者割合 (%)
国立国際医療センター	3	732	0.41
東京女子医大糖尿病センター	30	7700	0.39
慶應義塾大学附属病院	10	1730	0.58
長崎大学附属病院	6	400	1.50
長岡赤十字病院	4	683	0.59
虎の門病院	11	1350	0.81
虎の門病院分院	10	1500	0.67
山梨大学附属病院	6	765	0.78
埼玉医大附属病院	5	1200	0.42
社会保険埼玉中央病院	13	1800	0.72
鷹ノ子病院	1	165	0.61
愛媛県立中央病院	20	599	3.34
KKR 高松病院	1	210	0.48
近畿大学附属病院	5	1278	0.39
大阪大学附属病院	13	1121	1.16
大阪医科大学附属病院	13	741	1.75
合計	159 (139)	23458 (22859)	0.68 (0.61)

括弧内は愛媛県立中央病院を除いた数字

## 2) 地域糖尿病患者登録レジストリからの推計

「愛媛スタディ」において、全糖尿病患者における劇症1型糖尿病患者割合は0.2%であった。継続的な治療を受けていると推測される患者数246万9000人の0.2%が劇症1型糖尿病患者であるとすれば、日本における劇症1型糖尿病患者数4938人であると推計できる。

## D. 考察

### 全ゲノム関連解析(GWAS)による鍵分子候補の同定

現在までの解析の結果、自己免疫性1型糖尿病において、class II HLA 遺伝子領域のSNPが最もP値の低い候補遺伝子としてあげられている。これは候補遺伝子アプローチを用いた既報(Kawabata Y et al. Diabetes 2005 など)とも完全に一致し、結果の妥当性を示すものである。また、class II HLA 以外の領域の候補SNPは劇症1型糖尿病と自己免疫性1型糖尿病で異なるものを多数含んでいた。以上の結果は、本研究が当初の構想どおり順調に進行していることを裏付けるものと考えられる(表2)。このように、劇症1型糖尿病患者と健常人の比較のみならず、自己免疫性1型糖尿病患者の比較が可能な本研究のデザインは、研究の信頼性、妥当性を検証する上で有効であると考えられる。

### 劇症1型糖尿病患者数の検討

1) インスリン自己注射施行患者数からの推計で検討した施設は糖尿病診療に関する中核施設であり、劇症1型糖尿病患者数は比較的多いことが推測される。このことと2) 地域糖尿病患者登録レジストリからの推計結果を勘案すると、劇症1型糖尿病患者数は5000-7000人であると推測するのが妥当と思われる。

劇症1型糖尿病の患者数が明らかになったことは、今後の治療戦略を検討する基盤が整ったことを意味し、その社会的意義は大きい。また、今後国際比較を行う基礎資料であり、学術的にも大きな意義をもつ。2つの方法による患者数の推計値がほぼ一致したが、その

理由として、本疾患の概念がよく把握され、均質な患者集団として抽出できたことがあげられる。

## E. 結論

暫定診断基準を用いた日本における劇症1型糖尿病患者数は5000-8000名と推計された。

ゲノムワイド関連解析は検体の収集と一次スクリーニングを終了し、解析方法が適切であることが確認された。また、劇症1型糖尿病診断の鍵となる分子の候補を抽出することができた。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 今川彰久、花房俊昭 劇症1型糖尿病 糖尿病 52(8):669-671, 2009

2) Kawabata Y, Ikegami H, Awata T, Imagawa A, Maruyama T, Kawasaki E, Tanaka S, Shimada A, Osawa H, Kobayashi T, Hanafusa T, Tokunaga K, Makino H; on behalf of the Committee on Type 1 Diabetes, Japan Diabetes Society. Differential association of HLA with three subtypes of type 1 diabetes: fulminant, slowly progressive and acute-onset. Diabetologia 52(12): 2513-2521, 2009.

3) Imagawa A, Hanafusa T. Fulminant type 1 diabetes as an important exception to the new diagnostic criteria using HbA(1c)-response to the International Expert Committee. Diabetologia. 52(11) 2464-2465, 2009

4) Shibasaki S, Imagawa A, Tauriainen S, Iino M, Oikarinen M, Abiru H, Tamaki K, Seino H, Nishi K, Takase I, Okada Y, Uno S, Murase-Mishiba Y, Terasakiki J, Makino H, Shimomura I, Hyoty H, Hanafusa T Expression of Toll-like Receptors in the Pancreas of Recent-onset Fulminant Type 1 Diabetes. Endocrine. 57 (3) : 211-219, 2010

## 2. 学会発表

### 【国内】

- 口頭発表 6件
- 原著論文による発表 0件
- それ以外の発表 17件

そのうち主なもの

- 1) 第52回日本糖尿病学会年次学術集会  
2009.5.23 (大阪)  
堤千春、今川彰久、池上博司、牧野英一、小林哲郎、花房俊昭 劇症1型糖尿病における Class IIHLA 遺伝子型の検討
- 2) 第15回小児・思春期糖尿病シンポジウム 2009.7.12 (東京)  
花房俊昭: 特別講演「1型糖尿病の病因・病態－劇症1型糖尿病を中心に－」
- 3) 第23回日本臨床内科医学会  
2009.10.11 (大宮)  
花房俊昭: 特別講演「見逃してはいけない糖尿病－劇症1型糖尿病－」

### 【海外】

- 口頭発表 3件
- 原著論文による発表 25件
- それ以外の発表 2件

そのうち主なもの

学会発表

- 1) Tsutsumi C, Imagawa A, Ikegami H, Makino H, Kobayashi T, Hanafusa T,  
The Research Committee of Type 1 Diabetes in the Japan Diabetes. Class II HLA genotype in fulminant Type 1 diabetes.  
69<sup>th</sup> Annual meeting of the American Diabetes Society. New Orleans, USA. Jun 5-9, 2009

## H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 特許取得  
なし
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
なし



## II . 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

多施設共同研究：劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と診断基準確立に関する研究

研究分担者 小林 哲郎（山梨大学医学部 第三内科 教授）

**研究要旨**：発症直後の劇症1型糖尿病（FT1D）患者においてAlpha2A アミラーゼ自己抗体を測定したところ、81%に陽性者をもとめた。本自己抗体はFT1Dの診断マーカーとなりうる可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

劇症1型糖尿病（Fulminant type 1 diabetes : FT1D）における特徴的なマーカーはいまだ不明である。そこで研究分担者らが発見したAlpha 2A アミラーゼ（AMY2）自己抗体のFT1Dにおける検出頻度を検討した。

#### B. 研究方法

我々が、自己免疫性膵炎患者血清をプローブとしてクローニングしたAMY2A自己抗体をELISA法を用いて、発症直後のFT1D患者（n=27）で検出されるか否かを検討した。なお、本研究は山梨大学医学部倫理委員会の承認を得ておこなわれた。

#### C. 研究結果

81%（22/27）のFT1D患者にAMY2A自己抗体が検出された。なお22%（9/42）の急性発症1型糖尿病患者でも陽性者がみとめられた。100例の非糖尿病患者では陽性者患者では陽性者はみとめられなかった。

#### D. 考察

FT1Dはエンテロウイルス感染が膵島および膵外分泌腺に感染する場合におこることがある（文献1）。このような免疫反応の結果、FT1D

では膵外分泌腺の主要抗原であるAMY2A自己抗体が出現する可能性がある。今後の研究の方向としては、FT1Dの発症後の抗体価の時間的経緯、さらには妊娠時発症したFT1D例でもAMY2A自己抗体が出現するか否かが課題であろう。急性発症1型糖尿病例の22%にAMY2A自己抗体がみとめられたことは、急性発症1型糖尿病例の一部にもFT1Dと同様な発症機序が関係する可能性を示唆するものと考えられた。

#### E. 結論

AMY2A自己抗体は、自己免疫性膵炎の診断マーカーのみならず、FT1Dの診断マーカーとなる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tanaka S, Nishida Y, Aida K, Maruyama T, Shimada A, Suzuki M, Shimura H, Takizawa S, Takahashi M, Akiyama D, Arai-Yamashita S, Furuya F, Kawaguchi A, Kaneshige M, Katoh R, Endo T, Kobayashi T. Enterovirus infection, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10), and CXCR3 circuit: a

mechanism of accelerated beta-cell failure in fulminant type 1 diabetes. Diabetes. 2009 Oct;58(10):2285-91. Epub 2009 Jul 29.

2) Takizawa S, Endo T, Wanja X, Tanaka S, Takahashi M, Kobayashi T. HSP 10 is a new autoantigen in both autoimmune pancreatitis and fulminant type 1 diabetes. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Aug 14;386(1):192-6.

3) Endo T, Takizawa S, Tanaka S, Takahashi M, Fujii H, Kamisawa T, Kobayashi T. Amylase alpha-2A autoantibodies: novel marker of autoimmune pancreatitis and fulminant type 1 diabetes. Diabetes. 2009 Mar;58(3):732-7. Epub 2008 Nov 10.

## 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案特許 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

多施設共同研究：劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と診断基準確立に関する研究

劇症1型糖尿病の疾患感受性遺伝子解析と診断への展開

研究分担者 池上 博司（近畿大学医学部内分泌・代謝・糖尿病内科教授）

研究要旨：劇症1型糖尿病の成因・病態の解明ならびに診断マーカー確立を目的として、候補遺伝子アプローチ、ランダムマーカーアプローチ（ゲノムワイド関連解析）の両面から疾患感受性遺伝子の同定・解析を進めた。候補遺伝子HLAとの関連は劇症1型糖尿病と自己免疫性1型糖尿病で質的な違いを認めた。ゲノムワイド関連解析では一次スクリーニングの結果、HLAが全ての病型とゲノムワイドの有意水準で関連を示した。HLA以外で関連が示唆されるSNPには、①病型を超えて共通して関連を示すSNPと、②各病型に固有のSNP、の2種類の存在が示唆された。これらに関して二次パネルを用いた解析を進めている。

#### A. 研究目的

劇症1型糖尿病の成因・病態の解明ならびに診断マーカー確立を目的として、候補遺伝子アプローチ、ランダムマーカーアプローチ（ゲノムワイド関連解析）の両面から疾患感受性遺伝子の同定・解析を進めた。

#### B. 研究方法

【対象】日本糖尿病学会劇症型糖尿病調査委員会による診断基準を用いて全国調査した劇症1型糖尿病患者、自己免疫性1型糖尿病患者（急性発症典型例、緩徐進行1型糖尿病）および健常対照者を対象とした。

##### 【方法】

##### ① 候補遺伝子アプローチ

HLAクラスII（DRB1, DQB1）、クラスI（A, B, C）遺伝子をDNAタイピングするとともに、8.5Mbにわたる拡張HLA領域に存在する101個の候補SNPの遺伝子型を1型糖尿病患者545名（劇症80名、急性発症338名、緩徐進行127名）を対象として解析した。

##### ② ランダムマーカーアプローチ（全ゲノム関連解析[GWAS]）

一次パネルとして1型糖尿病患者400名（劇症97名、急性発症203名、緩徐進行100名）を対象として、全ゲノムにわたる90万個の一塩基多型（Single nucleotide polymorphisms: SNPs）に関してAffymetrix社製SNP Array 6.0アレイを

用いて遺伝子型を決定、解析した（解析センター：東京大学遺伝学教室、分担研究者 徳永・西田）。

##### （倫理面への配慮）

本研究の施行に関しては日本糖尿病学会倫理委員会の承認を得ているが、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、所定の手続終了後研究を開始し、対象者からは十分なインフォームドコンセントを得たうえで実施した。

#### C. 研究結果

##### ① 候補遺伝子アプローチ

劇症1型糖尿病、急性発症1型糖尿病、緩徐進行1型糖尿病のいずれの病型においてもHLAクラスII遺伝子は疾患感受性と強い関連を示したが、劇症1型糖尿病と関連を示すHLAは急性発症典型例とは質的に差異を認めた。即ち、急性発症1型糖尿病の疾患感受性に強く関連するDRB1\*0802-DQB1\*0302 および疾患抵抗性のDRB1\*1501-DQB1\*0602 ハプロタイプが劇症1型糖尿病とは関連を認めなかった。また、HLAクラスIや拡張HLA領域の候補遺伝子多型との関連に関しても急性発症典型例とは関連を示す多型に差異を認めた。一方、緩徐進行1型糖尿病

と関連を示す HLA は急性発症 1 型糖尿病と質的には同じであったが量的に差を認め、急性発症 1 型糖尿病では感受性ハプロタイプが 2 つ存在する場合に疾患との関連を認めるのに対して、緩徐進行 1 型糖尿病では感受性ハプロタイプが 1 つでも疾患との関連を認めた。

## ② ランダムマーカーアプローチ (全ゲノム関連解析 [GWAS])

Affymetrix 社製 SNP Array 6.0 アレイを用いた 90 万 SNP との全ゲノム関連解析の結果、class II HLA 領域に存在する複数の SNP が最も低い P 値を示し ( $P < 1 \times 10^{-26}$ )、一次スキャンのみでゲノムワイドの有意水準を満たした。

HLA 以外の領域に関しては一次スキャン単独でゲノムワイドの有意水準を満たす SNP は存在しなかった。そこで、 $P < 1 \times 10^{-4}$  の有意水準で関連が示唆された SNP の中で P 値の低いもの、連続した SNP が関連を示すものから優先順位をつけて二次パネルを用いた再現性解析用 SNP として抽出した。これらの SNP には、①異なる病型間で共通のもの、と②病型間で異なるもの、の 2 種類が存在した。上記候補 SNP に加えて、P 値においては上記有意水準をやや下回るが機能的に関連すると予想される遺伝子を追加した 623 の SNP を再現性解析に供する SNP として選定した。

二次パネルの解析法としては迅速かつ大量検体処理が可能な DigiTag2 (東京大学人類遺伝学解析センター) を用い、抽出した全 623 SNP の散布図を確認、問題のなかった 606 SNP に関して二次パネル解析へと供した。

二次パネルの対象として、1 型糖尿病症例 454 例 (劇症 117 例、急性発症 216 例、緩徐進行 121 例) ならびに健常対照者 357 例を集積、優先順位の高い 96 SNP からタイピングを進めている。

### D. 考察

候補遺伝子アプローチによる劇症 1 型糖尿病の疾患感受性遺伝子同定を目的として、1 型糖尿病の全サブタイプに関して同時に HLA との関連を詳細に解析した結果、①劇症 1 型糖尿病と関連を示す HLA は急性発症 1 型糖尿病・緩徐進行 1 型糖尿病と質的に異なること、②緩徐進行 1 型糖尿病に関連する HLA は急性発症 1 型糖尿病と質的には同じであるが量的に差を認める (dose effect) こと、が明らかとなった。①の

結果は急性発症と緩徐進行がいずれも自己免疫性という共通の発症機序であるのに対して、劇症 1 型糖尿病が他の 2 つのサブタイプとは異なる成因に基づく特発性であることを遺伝的にも示す結果であり、劇症 1 型糖尿病の遺伝素因を明らかにする本プロジェクトの遂行が劇症 1 型糖尿病の成因・病態解明ならびに診断マーカーの確立という全体プロジェクトに大きく貢献することを示す結果と考えられる。これとは対照的に、緩徐進行 1 型糖尿病の HLA は急性発症典型例と質的には同じであるが量的に差を認めた。このことは急性発症と緩徐進行が病因論的には同じ自己免疫性であるが、膵  $\beta$  細胞破壊の強さ・速さが異なるという量的な違いであることに一致する結果と考えられる。

ゲノムワイド関連解析の結果、劇症 1 型糖尿病においても急性発症 1 型糖尿病・緩徐進行 1 型糖尿病と同様に HLA 領域に最も強く関連を示す疾患感受性遺伝子が存在すること、これに匹敵する遺伝子は HLA 領域以外には存在しないこと、HLA 領域以外で関連が示唆された SNP には①異なる病型間で共通のもの、と②病型間で異なるもの、の 2 種類が存在することが示唆された。

従来の候補遺伝子解析で 1 型糖尿病の疾患感受性に強く関与することが証明されている HLA 領域が今回のゲノムワイド関連解析で確実に同定されたことは、今回用いた対象・方法の妥当性を証明する結果といえる。現在進めている二次パネルにおける再現性確認ならびに各サブタイプと真に関連を示す SNP の同定が、劇症 1 型糖尿病の成因・病態・診断解明に大きく貢献することが期待される。

### E. 結論

候補遺伝子アプローチによる HLA 領域の詳細な解析ならびにランダムマーカーアプローチによるゲノムワイド関連解析の両面から劇症 1 型糖尿病の疾患感受性遺伝子を自己免疫性 1 型糖尿病 (急性発症、緩徐進行) と比較解析し、病型間で共通する遺伝子と各病型に固有の遺伝子が存在する可能性が示された。

### F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kawabata Y, Ikegami H, Awata T, Imagawa A, Maruyama T, Kawasaki E, Tanaka S, Shimada A, Osawa H, Kobayashi T, Hanafusa T, Tokunaga K, Makino H; on behalf of the Committee on Type 1 Diabetes, Japan Diabetes Society. Differential association of HLA with three subtypes of type 1 diabetes: fulminant, slowly progressive and acute-onset. Diabetologia 52: 2513-2521, 2009.

2) Takeuchi F, Ikegami H, et al: Confirmation of multiple risk loci and genetic impacts by a genome-wide association study of type 2 diabetes in the Japanese population. Diabetes 58:1690-1699, 2009  
Takeuchi F, Ikegami H, et al: Common variants at the GCK, GCKR, G6PC2-ABCB11, and MTNR1B loci are associated with fasting glucose in two Asian populations. Diabetologia 53:299-308, 2010

3) Babaya N, Fujisawa T, Nojima K, Itoi-Babaya M, Yamaji K, Yamada K, Kobayashi M, Ueda H, Hiromine Y, Noso S, Ikegami H: Direct evidence for susceptibility genes for type 2 diabetes on mouse chromosomes 11 and 14. Diabetologia 2010 (in press)

4) Kishi A, Kawabata Y, Ikegami H, et al: The onset of diabetes in three out of four sisters: a Japanese family with type 1 diabetes. a case report. Endocrine J 56: 767-772, 2009

### 2. 学会発表

#### 【国内】

- 1) 守口将典、池上博司ほか  
「自己免疫性甲状腺疾患(AITD)と糖尿病との関連—膝島関連自己抗体と遺伝子解析に

よる検討—」

第 106 回日本内科学会総会 東京、4/12, 2009, 日本内科学会雑誌 VOL. 98 臨時増刊号 2009 P227

2) 守口将典、池上博司ほか  
「自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) 患者における膝島自己免疫の実態及び臨床的・遺伝的背景の検討」第 82 回日本内分泌学会学術総会、前橋、4/23, 2009, 日本内分泌学会雑誌 VOL. 85 2009 P 268

3) 池上博司: シンポジウム  
日本における 1 型糖尿病診療・研究の将来展望  
「遺伝子・成因: 1 型糖尿病の遺伝 2009」第 7 回 1 型糖尿病研究会、栃木、11/7, 2009

4) 池上博司: 会長講演  
「1 型糖尿病の分子遺伝学: モデル動物からのメッセージ」  
第 24 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、大阪、1/22, 2010

#### 【海外】

1) Kawabata Y, Ikegami H et al. High density SNP analysis of extended HLA region in susceptibility DR-DQ haplotypes in Japanese population. 10th International Congress of the Immunology of Diabetes Society, Malmo, Sweden. May 17, 2009

2) Noso S, Ikegami H et al. Association study of FCRL3, a susceptibility gene to multiple autoimmune diseases, with type 1 diabetes. 10th International Congress of the Immunology of Diabetes Society, Malmo, Sweden. May 17, 2009

## H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

多施設共同研究：劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と診断基準確立に関する研究

糖尿病新診断基準（案）の劇症1型糖尿病における検討

研究分担者 今川彰久（大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学 特任講師）

**研究要旨：**劇症1型糖尿病の診断基準策定に資する目的で、アメリカ糖尿病協会、ヨーロッパ糖尿病学会連合、世界糖尿病機構の合同委員会が提唱している新糖尿病診断基準（案）について検討した。その結果、この基準を満たさない患者が55.6%存在することが明らかになった。日本人の糖尿病診断基準にはHbA1c以外の基準が必要であると考えられた。

#### A. 研究目的

劇症1型糖尿病は非常に急激でほぼ完全な膵β細胞傷害により、インスリン分泌の枯渇をきたして発症する1型糖尿病と定義され、日本人急性発症1型糖尿病の約20%をしめると推定されている。最近、アメリカ糖尿病協会、ヨーロッパ糖尿病学会連合、世界糖尿病機構の合同委員会では、HbA1c測定は、慢性高血糖状態を正確に反映して、糖尿病合併症のリスクとよく相関し、検査法として血糖測定に比べ優れることから、1) HbA1c  $\geq 6.5\%$ であれば糖尿病と診断、2) 診断確定にはHbA1cを複数回測定する、3) 血糖値  $>200 \text{ mg/dl}$  で症状があれば、複数回の測定は必要ではない、などを骨子とする新しい診断基準を提唱した。しかし、劇症1型糖尿病は発症時に非常に急激に血糖が上昇するため、HbA1cがあまり上昇せず、この診断基準では糖尿病と診断されないことが想定される。そこで、劇症1型糖尿病の診断基準策定に資する目的で、新糖尿病診断基準（案）の劇症1型糖尿病診断における妥当性を検証する本研究を行った。

#### B. 研究方法

全国から日本糖尿病学会劇症1型糖尿病調査委員会に登録された劇症1型糖尿病患者のうち、HbA1cの標準物質がJDS Lot2に切り替わった2001年3月以降（～2006年6月）に発症した99名を対象とした。既報文献(Diabetes Res Clin Pract 2009)よりデータを抽出する手法を用いた。方法として、1) 発症時HbA1cを検討し、2) 発症時HbA1c  $< 6.2\%$ の患者の特徴を検討した。なお、HbA1c  $6.2\%$ をcut-offとしたのは、米国などにおけるHbA1c  $6.5\%$ はJDS Lot 2を標準

物質として用いた場合、HbA1c  $6.2\%$ に相当するという理由による。

#### (倫理面への配慮)

今回の研究では既報論文の匿名化されたデータベースよりデータを抽出する方法を用いたため、特に倫理面での問題はないと判断される。

#### C. 研究結果

1) 劇症1型糖尿病患者99名中、新糖尿病診断基準（案）を満たさない患者は55名(55.6%)であり、うち5名では口渇症状も認めなかった。2) 随時血糖値はすべての患者で  $200 \text{ mg/dl}$  以上であった。3) 新糖尿病診断基準(案)を満たさない群(HbA1c  $< 6.2\%$ )では満たす群(HbA1c  $\geq 6.2\%$ )に比べ、発症年齢、血中Cペプチドが有意に低値であった。

#### D. 考察

劇症1型糖尿病は発症時に非常に急激に血糖が上昇するため、HbA1cがあまり上昇せず、新診断基準（案）をみたさない症例が存在すると考えられた。このうち5名は口渇などの高血糖症状も認められず、HbA1c値に症状を加えただけの診断基準では診断できない糖尿病患者が存在すると考えられた。一方、随時血糖値が  $200 \text{ mg/dl}$  以下の患者は存在せず、血糖値を診断基準に取り入れる必要性が示唆された。

#### E. 結論

劇症1型糖尿病では、HbA1cのみを用いた新診断基準（案）は有用ではないことが明らかになった。日本人の糖尿病診断基準

には HbA1c 以外の基準が必要であると考  
えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Imagawa A, Hanafusa T.  
Fulminant type 1 diabetes as an  
important exception to the new  
diagnostic criteria using  
HbA1c-response to the  
International Expert Committee.  
Diabetologia. 2009;52(11):2464-5.

2. 学会発表

今川彰久、花房俊昭 糖尿病新診断  
基準（案）の劇症 1 型糖尿病におけ  
る検討 第 48 回日本糖尿病学会近畿  
地方会 2009.11.3（大阪）

H. 知的所有権の出願・取得状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

多施設共同研究：劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と診断基準確立に関する研究

分担研究課題：GWASの実施

研究分担者：徳永勝士（東京大学大学院医学系研究科 教授）

西田奈央（東京大学大学院医学系研究科 特任助教）

**研究要旨**：劇症1型糖尿病の病因・病態の鍵となる分子の同定を目指し、臨床指標とともにSNPおよび診断マーカー候補を用いた特異的な診断基準を作成することを目的として、1型糖尿病患者群合計371検体と健常対照群184検体について、90万種類以上のSNPを対象としたゲノムワイド関連解析を実施した。ゲノムワイド関連解析により検出された候補遺伝子領域から合計606種類のSNPを選択し、2次パネル（1型糖尿病患者群合計438検体、健常対照群357検体）を用いたReplication studyを開始した。これまでに96種類のSNPを解析した結果、劇症1型糖尿病の発症と関連する有望な遺伝子領域（*Gene X*、 $P$ 値 $=3.84 \times 10^{-6}$ 、OR=1.77）などが検出された。

#### A. 研究目的

日本人糖尿病患者から新しく発見された疾患単位である劇症1型糖尿病（N Engl J Med 2000）は、その病因・病態の鍵となる分子が不明で、暫定的な診断基準は存在するが、現段階では感度・特異度が不十分である。

本研究では、ゲノムワイド関連解析（GWAS）を中心として、劇症1型糖尿病の病因・病態の鍵となる分子の同定を目指し、臨床指標とともにSNPおよび診断マーカー候補を用いた特異的な診断基準を作成することを目的とする。

#### B. 研究方法

90万種類以上のSNP解析用プローブが搭載されたAffymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0（以下、SNP Array 6.0）を用いて、劇症1型糖尿病患者群、および対照群として、自己免疫性1型糖尿病患者群と健常対照群のSNPタイピングを行い、ゲノムワイド関連解析を実施した。

本研究では、まずゲノムワイド関連解析により候補遺伝子領域を検出し、引き続いて2次パネル

を用いた再現性検討（Replication study）を実施することにより、疾患感受性遺伝子の探索を行った（図1）。

ゲノムワイド関連解析における偽陽性関連の発生を効果的に抑えるために、(1)QC call rateが95%以上となったタイピングデータのみを用いて、(2)対象群と対照群を合わせてGenotyping Console ver3ソフトウェアによる遺伝子型を決定した。続いて、SNP Array 6.0に搭載された全90万SNPの中に含まれる、日本人では頻度が低く統計解析に不適切なSNPやタイピング精度の低いSNPなどをSNP filteringにより除去した。最後に、統計解析の結果から $P$ 値 $<10^{-4}$ となったSNPについてタイピング生データである散布図を確認し、偽陽性関連が疑われるSNPを除去した。

ゲノムワイド関連解析は、われわれが開発したGeneChip analysis ver2.0.10ソフトウェアを用いて実施した。ゲノムワイド関連解析で検出された疾患感受性候補遺伝子領域において、有意水準 $P < 0.001$ を満たすSNPおよび機能的に関連すると予想される遺伝子のうちで有意水準 $P < 0.05$

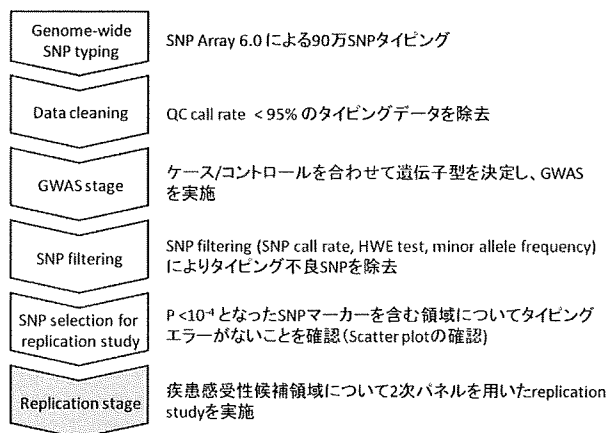


図1 ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子同定までの流れ

を満たす SNP を選択し、DigiTag2 法を用いた Replication study を実施した (図 2)。DigiTag2 法は、複数か所の SNP を同時に解析することができるため、ゲノムワイド関連解析で検出された複数の疾患感受性遺伝子候補領域の中から、真の疾患感受性遺伝子を効率よく特定することができる。

DigiTag2 法は、(1)マルチプレックス PCR、(2)エンコード反応、(3)ラベリング反応、(4)DNA チップを用いた検出の 4 つの工程でマルチプレックス SNP タイピングを行う。エンコード反応では、マルチプレックス PCR 産物内に存在する SNP 特異的配列上に設計した SNP 特異的な上流プローブ (5' クエリープローブ) と下流プローブ (3' クエリープローブ) のライゲーション反応を行う。2 種類のプローブには 23 塩基長のオリゴ DNA タグ (図 2 中、ED および D1) が付加されており、ラベリング反応ではオリゴ DNA タグをプライマーとした PCR を行う。この際、アレルタイプに応じて異なる波長を持った蛍光分子が導入される。最後に、SNP の種類に応じたオリゴ DNA タグ (D1<sub>i</sub>) を検出用プローブとして固定した DNA チップを用いて、ラベリング産物のハイブリダイゼーションを行うことにより、各 SNP の遺伝子型が異なるスポットから遺伝子型に応じた色 (赤: アレル1 ホモ、緑: アレル2 ホモ、黄: ヘテロ) で

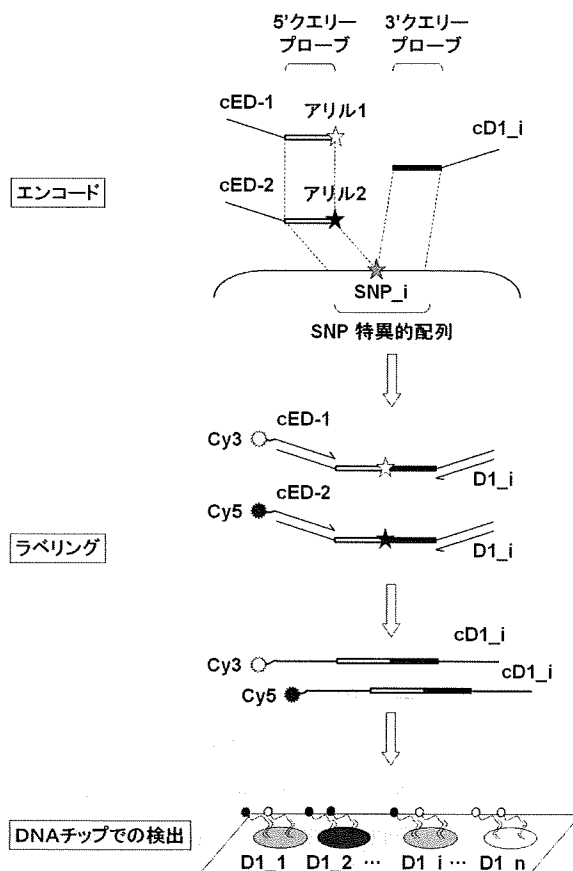


図2 DigiTag2 法による Multiplex SNP typing

96 種 (もしくは 32 種) の SNP の遺伝子型をオリゴ DNA タグ (ED および D1) に変換することで、高い精度で複数の SNP を同時に解析する

検出される。

解析対象となる SNP の遺伝子型を決定するためのソフトウェアとして、われわれは SNP Star ver0.1.0.0 ソフトウェアを開発した。決定された遺伝子型に基づいて、アレル頻度、遺伝子型頻度、劣性モデル、優性モデルの 4 つの統計解析結果を得ることができる。

(倫理面への配慮)

SNP Array 6.0 で解析した検体はすべて連結不可能匿名化されたものである。また、本研究の施行に関しては既に日本糖尿病学会倫理委員会の承認を得ているが、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日策定、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 17 年 6 月 29 日一部改正)、疫学研究に関する倫理指針 (平成

14年6月17日策定、平成16年12月28日、平成19年8月16日全部改正)、臨床研究に関する倫理指針(平成15年7月30日策定、平成16年12月28日、平成20年7月31日全部改正)および申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を順守するとともにあらかじめ当該研究機関の長等の承認、提出、確認等が必要な研究については、所定の手続きが終了後に研究を開始した。

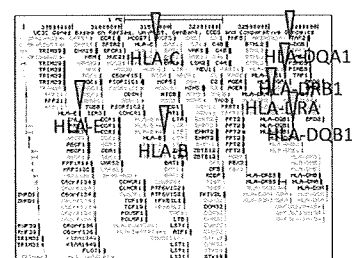
### C. 研究結果

劇症1型糖尿病患者群97検体と日本人健常対照群200検体に加えて、β細胞が破壊されるがその機序が劇症1型糖尿病とは異なる自己免疫性1型糖尿病患者群299検体(急性発症例203検体と緩徐発症例96検体)の4群を1セットとして、SNP Array 6.0による90万種類のSNPタイピングを実施した。解析した患者群合計396検体のうち、371検体(急性発症例191検体、緩徐発症例89検体、劇症1型糖尿病91検体)はQC call rateが95%以上となり、QC call rateは平均97.77%となった。また、健常対照群では、200検体のうち184検体のQC call rateが95%以上となり、QC call rateの平均は97.59%となった。

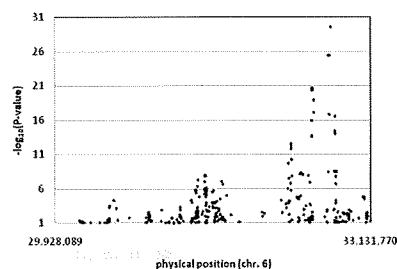
QC call rateが95%以上となった患者群合計371検体のタイピングデータを用いてゲノムワイド関連解析を実施したところ、自己免疫性1型糖尿病において、Class II HLA遺伝子領域から強い関連を示すSNPが数多く検出された(図3)。この結果は、候補遺伝子アプローチを用いた既報(Kawabata Y et al. Diabetes 2005など)の結果と合致し、結果の妥当性を示すものである。また、劇症1型糖尿病患者群91検体と健常対照群184検体を用いたゲノムワイド関連解析の結果、Class II HLA遺伝子領域以外の領域から検出された候補SNPは劇症1型糖尿病と自己免疫性1型糖尿病とで異なるものが多く含まれることが明らかとなった(図3)。

劇症1型糖尿病患者群91検体、急性発症例203

遺伝子地図



急性発症例  
(191症例)



劇症1型糖尿病  
(91症例)

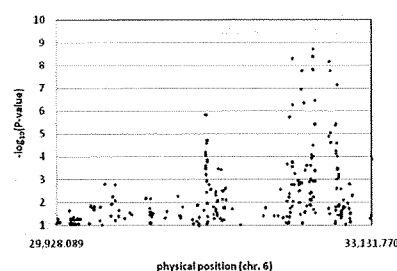


図3 HLA領域のゲノムワイド関連解析結果

自己免疫性1型糖尿病患者群(急性発症例)191検体および劇症1型糖尿病患者群91検体と日本人健常対照群184検体とでそれぞれゲノムワイド関連解析を実施した

検体、緩徐発症例89検体および健常対照群184検体を用いたゲノムワイド関連解析の結果から、有意水準 $P < 0.001$ を満たすSNPおよび機能的に関連すると予想される遺伝子のうちで有意水準 $P < 0.05$ を満たすSNPを選択し、合計606種類のSNPを対象としてReplication studyを開始した。

Replication studyでは、GWASで用いた371検体とは独立の劇症1型糖尿病患者群117検体、急性発症例207検体、緩徐発症例114検体および健常対照群357検体の4群を1セットとして、DigiTag2法によるSNPタイピングを実施した。DigiTag2法を用いてまず96種類のSNPを対象としたSNPタイピングを実施した結果、Gene X遺伝子上に存在するSNPが $P$ 値 $=1.47 \times 10^{-2}$ 、OR $=1.47$ (1.08-2.01)と有意な関連を示すことが明らかとなった(表1)。また、GWASの結果と合わ

Nearest gene	MAF (allele)	Allele (1/2)	Stage	劇症1型糖尿病患者群			健常対照群			OR (95% CI)	P-value
				11	12	22	11	12	22		
Gene X	0.38 (G)	A/G	GWAS	48 (52.7)	41 (45.1)	2 (2.2)	57 (31.0)	95 (51.6)	32 (17.4)	2.32 (1.56-3.44)	$2.42 \times 10^{-5}$
			Replication	51 (43.6)	56 (47.9)	10 (8.5)	119 (33.3)	180 (50.4)	58 (16.2)	1.47 (1.08-2.01)	$1.47 \times 10^{-2}$
			Combined	99 (47.6)	97 (46.6)	12 (5.8)	176 (32.5)	275 (50.8)	90 (16.6)	1.77 (1.39-2.26)	$3.84 \times 10^{-6}$

表 1 Gene X 遺伝子と劇症 1 型糖尿病との関連解析結果

せると、 $P$ 値は  $3.84 \times 10^{-6}$  ( $OR=1.77$ ,  $1.39-2.26$ ) となり、ゲノムワイド有意水準 ( $P$ 値= $1.14 \times 10^{-7}$ ,  $0.05/439,753$ ) には達さないものの、Gene X 遺伝子は劇症 1 型糖尿病と関連する有望な遺伝子であることが分かった。

#### D. 考察

自己免疫性 1 型糖尿病を対象としたゲノムワイド関連解析から、疾患感受性遺伝子領域として既に報告のある Class II HLA 遺伝子領域からゲノムワイド有意水準を満たす強い関連を示す SNP が数多く検出された。この結果は、本研究が当初の構想どおりに進行していることを裏付けるものと考えられる。

また、ゲノムワイド関連解析において劇症 1 型糖尿病および自己免疫性 1 型糖尿病 (急性発症例、緩徐発症例) との関連が示された疾患感受性候補領域について、2 次パネルを用いた Replication study を実施したところ、Gene X 遺伝子近傍の SNP が劇症 1 型糖尿病発症と関連を示した。引き続き、ほかの候補 SNP についても Replication study を実施する予定である。

#### E. 結論

ゲノムワイド関連解析で検出された合計 606 種類の候補 SNP について、DigiTag2 法による Replication study を実施し、劇症 1 型糖尿病や自己免疫性 1 型糖尿病に関連する新規 SNP の探索を継続する。また、日本人以外のアジア集団でも関連が再現されるかどうか注目される。

F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Koike A., Nishida N., et al.: Genome-wide association database developed in the Japanese Integrated Database Project, J. Hum. Genet., 54(9): 543-546 (2009)
- 2) Kawabata Y., Ikegami H, et al.: Differential association of HLA with three subtypes of type 1 diabetes: fulminant, slowly progressive and acute-onset, Diabetologia, 52(12): 2513-2521 (2009)
- 3) 西田奈央、徳永勝士: 疾患感受性遺伝子とゲノムワイド関連解析, 治療学, 43(3): 13-18 (2009)
- 4) 西田奈央、徳永勝士: テーラーメイド医療をめざした疾患感受性遺伝子のゲノムワイド探索、遺伝子医学 MOOK: 191-195 (2009)

##### 2. 学会発表

該当なし

#### H. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし