

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

GWAS 結果の解析及びサイトカイン測定に関する研究

研究分担者 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）

**研究要旨：**劇症1型糖尿病のGWASの1次スクリーニングの上位SNPについて、既報や日本人2型糖尿病のGWASデータ（GeMDBJデータベース）と比較して考察したが、少なくとも遺伝子ベースでは、明らかな類似性は認めなかった。また少量の血清を用いたサイトカインの多項目測定系の検討を行い、良好な見通しを得た。

#### A. 研究目的

劇症1型糖尿病は、膵β細胞の急激な破壊により生じ、診断が遅れると致死的な疾患であり、糖尿病の最重症型として臨床的にきわめて重要な疾患概念であるが、その病因・病態はほとんど不明である。一方、日本人2型糖尿病は膵β細胞障害が進展する特徴があり、何らかの共通する病態が存在する可能性もありうる。本研究では、GWASで得られた遺伝因子を2型糖尿病のGWASの結果と比較するなどして、膵β細胞障害の点から解析する。また血中サイトカインのプロフィールを測定することにより、劇症1型糖尿病の病態の解明や診断や治療に役立つ情報の手掛かりを得ることを目的とする。

#### B. 研究方法

[1] 劇症1型糖尿病91名と対照184名を用いたGWAS（詳細は他の総括・分担報告を参照）により、統計学的に有意な関連を示す上位約100SNPのうち、HLA領域を除き、いわゆる遺伝子領域にassignされるものを抽出し、遺伝子ベースで以下の検討を行った。

1) 白人などから報告されている既報の2型糖尿病関連遺伝子と比較した。

2) 分担研究者自身がデータベース構築に深く寄与したGeMDBJ（Genomic Medicine Database of Japan）を活用し、ミレニアムプロジェクトの日本人2型糖尿病のGWASの集計データと比較検討した。

[<https://gemdbj.nibio.go.jp/dgdb/>]

[2] また少量の血清で血中サイトカインを測定するために、ビーズシステムを用いた多項目ELISA同時測定系のシステムを立ち上げる。

（倫理面への配慮）

本研究の施行に関しては、倫理委員会の承認を得、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針等に準拠し、個人情報に十分な配慮をしている。

#### C. 研究結果

[1] GWASから得た遺伝因子の検討

上記の手順により、NCBIでアノテーションがついている43の遺伝子が抽出された。これ

までに、白人を中心に、主に GWAS により、約 20 の 2 型糖尿病関連遺伝子が報告されている (O'Rahilly et al. Nature2009)。分担研究者自身が日本人で報告した *KCNQ1* も含めて検討したが、今回の劇症 1 型糖尿病の上位遺伝子リストとは、オーバーラップが見られなかった。

次に、日本人の疾患 SNP プロジェクトがデータベース化されている GeMDBJ で、ミレニアムプロジェクトの GWAS (通称 JGS) の集計データの検討を行った。43 遺伝子のうち、JGS で対応する遺伝子領域の SNP が検討されなかったのは、8 つあった。残りの 35 遺伝子について、合計で 578 SNP が JGS の糖尿病解析で有効なデータが得られており、このうち統計的に有意とみなされて 2 次スクリーンへまわったものは 7 つであり、すべて 2 次スクリーニングで統計的に有意でなくなっていた。

#### [2] ELISA による多項目同時測定系の検討

同時多項目システムとしては、バイオラッド社の BioPlex システムを用いた。これは、多種類の抗体を固定したビーズを光学的に検出する、いわゆるサスペンションアレイとよばれるシステムを利用した、多項目 ELISA 同時測定系である。今回はヒトサイトカインパネル (10 種: IL- $\beta$  IL-2 IL-4 IL-5 IL-6 IL-10 IL-12 IL-13 IFN $\gamma$  TNF $\alpha$ )、及び急性反応タンパクパネル (Acute Phase: 8 種:  $\alpha$ 2-macroglobulin CRP Ferritin Fibronogen Haptoglobin SAA SAP TPA) を用いて、既に同意を取得してある 2 型糖尿病及びコントロール血清 4 本を用いた。結果としては、ほぼどの項目も、キットで想定されたダイナミックレンジの中におさまっていた。また、明らかな炎症性疾患でなくても、サイトカインのパターンには若干各個人に特徴がある可能性も示された。

#### D. 考察

日本人糖尿病の大部分を占める 2 型糖尿病は、欧米白人の 2 型糖尿病と異なり、膵  $\beta$  細胞の機能障害が前面に立ち、しかも一般に進行性に増悪することから膵  $\beta$  細胞量の減少が想定されているが、その原因はほとんどわかっていない。劇症 1 型糖尿病と病因的に共通の部分が明らかになれば、両者の病態の理解に資するところが大きい。

今回、白人で報告された 2 型糖尿病関連遺伝子や、日本人の先行する 2 型糖尿病 GWAS のデータと比較して、現時点で共通の遺伝子は見あたらなかった。しかしながら、GWAS で得られる遺伝要因は、一般に単独ではオッズ比が高くなく、1.1~1.4 程度が多い。劇症 1 型糖尿病の GWAS に用いられた症例は 100 人に満たず、ミレニアムプロジェクトでも 187 名であり、GWAS の検出力の点ではどちらも大きな課題があるので、これだけでは共通の遺伝素因の有無は確定できない。また共通の遺伝子であっても SNP や variant の位置により効果が異なる可能性ウイルスなどの外的要因の有無で病態や相対リスクが異なる可能性、さらに一見異なる遺伝子であっても共通の分子パスウェイに属する可能性も考えられる。今後このような視点からも検討してゆきたい。

劇症 1 型糖尿病の膵  $\beta$  細胞破壊の機序について、自己免疫的機序がメインでないことはわかっているが、組織所見などからは様々なサイトカインや疾患関連分子の発現も示されている。本研究により、少量 (15  $\mu$ L) の血清で多くの項目のサイトカイン・炎症関連分子を定量できることが明らかになった。定量性、再現性、血清保存法の影響等、さらに十分な検討を重ねる必要はあるが、発症早期の劇症 1 型糖尿病の

血清は貴重であり、少量の試料から非常に有用な情報が得られる可能性が高い。劇症1型糖尿病の血中で特徴的なサイトカインプロファイルが明らかになれば、病態の解明のみならず診断基準の作成や新たな治療法の開発にも資すると考える。

## E. 結論

劇症1型糖尿病のGWASの結果を2型糖尿病と比較して考察した。また血清サイトカインの多項目測定系の検討を行い良好な見通しを得た。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

1. 論文発表：なし
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  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

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

研究分担者 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）

**研究要旨：**劇症1型糖尿病を含む1型糖尿病の成因における自己免疫の関与を明らかにするため、2型糖尿病患者でインスリン投与を契機として1型糖尿病を発症したと考えられる症例の解析を行った。その結果、全例が日本人1型糖尿病感受性HLAクラスIIとインスリン遺伝子VNTRクラスIを有していた。以上より、2型糖尿病患者の中に、インスリン投与を契機として膵島炎が惹起され、膵β細胞機能の廃絶をきたす症例が存在する可能性が考えられ、その機序として、日本人1型糖尿病感受性遺伝子の関与が示唆された。

**A. 研究目的**

劇症1型糖尿病を含む1型糖尿病の成因としての自己免疫の関与を解明する。

**B. 研究方法**

2型糖尿病患者でインスリン投与を契機として発症したと考えられる1型糖尿病の症例について、臨床的特徴、遺伝子、in vitroにおける自己抗原へのリンパ球の反応性等を解析する。さらに、全国調査により、その実態を明らかにする。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究については、研究計画書及び同意書が愛媛大学大学院医学系研究科の倫理委員会と日本糖尿病学会の倫理委員会により承認された。本申請内容の遺伝子解析にあたり、DNA提供者には、この研究内容につき十分説明し、書面にて同意を求める。既に抽出したDNAサンプルはこの規定に沿って収集したものである。

**C. 研究結果**

今回は6症例（男性4例、女性2例）について解析した。2型糖尿病と診断された年齢は平均59.1歳、平均罹病期間は18.7年であった。インスリン治療開始後、平均8.2ヵ月で全例がインスリン依存状態に陥った。投与されたヒトインスリンは、レギュラーインスリン、中間型インスリンもしくは混合製剤であり、アナログ製剤は使用されていなかった。6症例中3例にインスリン皮下注射部位のアレル

ギー反応を認め、インスリン抗体結合率は平均64.5%と高かった。ICA・GAD・IA-2抗体は、6症例中3例において一部抗体価の上昇を認めた。遺伝子解析では、HLADRB1-DQB1遺伝子型は、全例が日本人1型糖尿病感受性である\*0405-\*0401および\*0901-\*0303のヘテロ、ホモあるいは複合ヘテロであった。また、6例全例にインスリン遺伝子VNTRクラスIに相当する遺伝子型-23A/Aを認めた。

**D. 考察**

インスリン投与を契機として、2型糖尿病から1型糖尿病に転換した6症例の全例が、日本人1型糖尿病感受性HLAクラスIIとインスリン遺伝子VNTRクラスIを有していた。2型糖尿病患者の中に、インスリン投与を契機として膵島炎が惹起され、膵β細胞機能の廃絶をきたす症例が存在する可能性が考えられる。その機序として、日本人1型糖尿病感受性遺伝子の関与が示唆された。

**E. 結論**

インスリン投与を契機として、2型糖尿病から1型糖尿病に転換した6症例全例において、日本人1型糖尿病感受性を高めるHLAクラスIIならびにインスリン遺伝子VNTRの両方を認めた。

**F. 健康危険情報** なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表 なし

## 2. 学会発表

1) H. Makino, W. Nishida, M. Nakamura, Y. Yamada, D. Chujo, A. Imagawa, T. Hanafusa, K. Takahashi, T. Suehiro, Y. Watanabe, H. Moriyama, M. Nagata, K. Yokono, H. Onuma and H. Osawa. Insulin administration may trigger type 1 diabetes in patients with type 2 diabetes having type 1 diabetes high-risk HLA class II. 45th annual meeting of the European Association for the study of diabetes (Sep 29-Oct 02, 2009, Vienna, Austria).

2) 西田 互、中村 舞、鈴木 貴博、高橋 健二、末廣 正、中務 紗綾、今川 彰久、花房 俊昭、鈴木 竜司、島田 朗、山田 裕也、中條 大輔、高田 康徳、大沼 裕、大澤 春彦、牧野 英一。インスリン投与を契機に2型から1型糖尿病に転換した7症例の臨床的特徴。(第52回日本糖尿病学会年次学術集会 2009年5月21-24日 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

1型糖尿病の遺伝子因子の研究

研究分担者 栗田 卓也（埼玉医科大学医学部 教授）

研究要旨：1型糖尿病の遺伝子因子として、IL7R、IFIH1の関与を明らかにした。また、共同研究において、1型糖尿病の各病型と関連するHLAを明らかにした。

A. 研究目的

1型糖尿病の成因を解明するために、遺伝子因子の解析を行う。

B. 研究方法

・対象：多施設共同研究として1型糖尿病およびコントロールを収集。  
・方法：血液から抽出したDNAに対して、TaqManSNPなどにより、1型糖尿病感受性SNP等の解析を行った（倫理面への配慮）

共同研究グループの各施設において、遺伝情報・個人情報の管理などを含んだ研究計画書を倫理委員会に提出し、審査のうえ承認を受けている。

C. 研究結果

IL7Rの非同義SNPであるrs6897932については、日本人1型糖尿病でも弱い関連が認められ、特に緩徐行型と有意に関連していた。一方、IFIH1の非同義SNPであるrs1990760は緩徐進行型と有意に関連していた。

D. 考察

日本人でも、IL7Rのrs6897932は1型糖尿病の弱い感受性遺伝子であり、IL7Rのrs6897932およびIFIH1のrs1990760は1型糖尿病の慢性的な発症過程に関与していることが示唆される。

E. 結論

日本人1型糖尿病の新たな感受性遺伝子を明らかにした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawabata Y 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

2. 学会発表

1) 大崎昌孝、栗田卓也ら。  
IL2、IFIH1、CD226の非同義SNPと日本人1型糖尿病との関連の検討。糖尿病52(Suppl. 1):S-142, 2009

2) 大崎昌孝、栗田卓也ら。  
IL7R、CD226、IL7Rと日本人1型糖尿病との関連の検討。第7回1型糖尿病研究会抄録集、p. 34、2009

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

成人1型糖尿病の予知に関する研究

研究分担者 川崎英二（長崎大学病院 生活習慣病予防診療部 准教授）

研究要旨：成人1型糖尿病の進行予知マーカーの同定を目的とし、食事療法あるいは経口血糖降下薬で治療中の30歳以上発症2型糖尿病患者約3,000例におけるGAD抗体のスクリーニングの結果同定された47例のGAD抗体陽性NIDDMを前向き追跡調査し、進行予測因子について検討した。その結果、GAD抗体の抗体価が高い場合（コスミック社キットで10U/mL以上）、GAD65中央部分のエピトープ（アミノ酸245-360番）を認識する場合、他の膵島関連自己抗体（インスリン自己抗体、IA-2抗体、ZnT8抗体）が陽性の場合に早期にインスリン治療が開始されていることが明らかになった。さらに、この3つの要因の関連を多変量解析により検討したところ、他の膵島関連自己抗体の重複陽性が最も強い独立した予知因子であった。以上より、GAD抗体陽性NIDDMでは、他の膵島関連自己抗体が重複陽性の場合、あるいは進行性に内因性インスリン分泌が低下する場合は、できるだけ早期にインスリン治療などのβ細胞機能を温存する介入を始めることが重要と考える。

#### A. 研究目的

かつて小児発症糖尿病は1型糖尿病、成人発症糖尿病は2型糖尿病とされてきたこともあり、成人1型糖尿病への関心はそれほど高くなかった。しかし、近年における診断検査法開発の進歩により、高感度・特異的に膵島関連自己抗体の測定ができるようになり、成人で発症する1型糖尿病も稀ではないことが確認されている。成人で発症する糖尿病の約5%にGAD抗体陽性例が存在し、これらGAD抗体陽性NIDDMは内因性インスリン分泌が徐々に障害されインスリン依存状態へ陥ることもある。そこで、進行するか否かを事前に知ることは効率的かつ効果的な予防介入につながるため、我々はGAD抗体陽性NIDDMにおける進行予知マーカーを検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### (1) 対象

食事療法あるいは経口血糖降下薬で治療中の30歳以上で発症した2型糖尿病患者約3,000例においてGAD抗体のスクリーニングを実施し、その結果同定されたGAD抗体陽性NIDDM (n=47)を対象とした。

##### (2) 膵島関連自己抗体測定法

GAD抗体のスクリーニングは、ブタ脳GADを抗原として用いているRIA法（ヘキスト・ベーリング、東京）を使用し、GAD65抗体、GAD67抗体、IA-2抗体、インスリン自己抗体（IAA）、およびZnT8抗体は、radioligand binding法にて測定した。

##### (3) GAD65抗体特異的エピトープ解析法

GAD65 抗体特異的エピトープは、GAD65/GAD67 キメラ融合蛋白を用いた radioligand binding 法にて測定した。尚、GAD67 に対する反応を除くため、血清を充分量のリコンビナント GAD67 で吸収したのちに <sup>35</sup>S 標識 GAD65/GAD67 キメラ融合蛋白との反応を検討した。

#### (4) 統計解析法

統計解析は StatView ver.5.0 (SAS Institute, USA) でおこなった。自己抗体陽性率の有意差検定は  $\chi^2$  検定でおこない、ノンパラメトリックデータは、Mann-Whitney U 検定または Kruskal-Wallis 検定でおこなった。また、インスリン開始予知マーカーの検討は、Kaplan-Meier 法および多変量解析を使用した。

### C. 研究結果

#### (1) GAD 抗体陽性 NIDDM の特徴

47 例の GAD 抗体陽性 NIDDM の登録時のデータは、表 1 に示す通りである。また、図 1 に示すように 4 例 (9%) は、IAA、IA-2 抗体、ZnT8 抗体もすべて陽性であり、17 例 (36%) は、これらのいずれかひとつ以上の抗体が重複陽性を示した。残りの 30 例 (64%) は GAD 抗体単独陽性であった。

#### (2) GAD 抗体エピトープ解析結果

GAD 抗体陽性 NIDDM 47 例中 17 例 (34%) が GAD67 抗体陽性であった。また、GAD65 抗体特異的エピトープを、N 末端部 (GAD65-N、アミノ酸 1-245 番)、中央部 (GAD65-M、アミノ酸 245-360 番)、C 末端部 (GAD65-C、アミノ酸 443-585 番) の 3 つの部分に分けると、GAD65-M と GAD65-C を同時認識する患者が 30 例 (64%) と最も多く、このうち 7 例 (23%) は GAD65-N も認識していた。一方、1 例 (2%) は GAD65-M のみ、13 例 (28%) は GAD65-C のみに反応した。GAD 抗体価はエピトープと密接に関連しており、GAD65-N に反応する血清では GAD 抗体が 300U/mL (中央値) と最も高値を示した。すなわ

ち GAD65-N エピトープ陽性は高 GAD 抗体価を示す患者の特徴と考えられる。

#### (3) GAD 抗体陽性 NIDDM における進行予知マーカーの検討

Kaplan-Meier 法にてインスリン治療開始に関連する要因を検討した。その結果、①高 GAD 抗体価、②GAD65-M エピトープ陽性、③IAA、IA-2 抗体、ZnT8 抗体の重複陽性が早期のインスリン開始と関連することが明らかとなった。さらに、この 3 つの要因の関連を多変量解析により検討したところ、他の隣島関連自己抗体の重複陽性が最も強く関連する予知因子であり (オッズ比 13.8、95%CI 2.8-68.5、P=0.001)、GAD65-M エピトープが 2 番目に関連を示す因子であった (オッズ比 12.0、95%CI 0.6-224.9、P=0.096) (表 2)。

### D. 考察

今回の前向き研究から、GAD 抗体陽性 NIDDM の進行予測因子として、①高 GAD 抗体価 (コスミック社キットで 10U/mL 以上に相当)、② GAD65-M エピトープ陽性、③IAA、IA-2 抗体、ZnT8 抗体の重複陽性の 3 つが重要であることが明らかとなった。また、GAD 抗体に加え IAA、IA-2 抗体、ZnT8 抗体が重複陽性である症例は、高抗体価を示す GAD 抗体単独陽性例よりもハイリスクであるということが多変量解析で示された。しかし、今回の研究では GAD 抗体陰性で IAA、IA-2 抗体、ZnT8 抗体が陽性を示す症例の追跡調査を実施していないため、そのような症例のリスクについては評価できない。過去の研究においても高 GAD 抗体価がインスリン分泌不全状態への進行を予知する上で重要であることが示されている。今回、インスリン分泌低下と 2 番目に関連を示した GAD65-M エピトープが陽性を示した症例の 90%以上が高 GAD 抗体価を呈していたことより、先行研究における高 GAD 抗体価とインスリン分泌不全状態への進行との関係は、GAD65-M エピトープに起因することが推測される。



## E. 結論

GAD 抗体陽性 NIDDM では、他の膵島関連自己抗体が重複陽性の場合、あるいは進行性に内因性インスリン分泌が低下する場合は、できるだけ早期にインスリン治療などのβ細胞機能を温存する介入を始めることが重要と考える。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Kuwahara H, Kobayashi M, Abiru N, Yamasaki H, Eguchi K: Autoantibodies to insulin, insulinoma-associated antigen-2, and zinc transporter 8 improve the prediction of early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 95 (2): 707-713, 2010

2) 川崎英二: 1型糖尿病の成因. 糖尿病の療養指導 2009、87-91、2009

3) 川崎英二: 1型糖尿病に合併する自己免疫疾患、月刊 糖尿病、1(6): 98-105、2009

4) 川崎英二: 1型糖尿病. 糖尿病診療マスター、8(1): 20-23、2010

### 2. 学会発表

1) 川崎英二、中村 寛、厨 源平、佐藤 剛、古林正和、桑原宏永、尾崎方子、阿比留教生、山崎浩則、松浦信夫、三浦順之助、内潟安子、江口勝美: 1型糖尿病における ZnT8 抗体の臨床的有用性の検討. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪市、2009

2) 川崎英二、赤澤 諭、植木郁子、中村 寛、堀江一郎、厨 源平、佐藤 剛、古林正和、桑

原宏永、阿比留教生、山崎浩則、江口勝美: GAD 抗体陽性 NIDDM における進展予知マーカーの検討. 第 47 回日本糖尿病学会九州地方会、北九州市、2009

3) 川崎英二、江口勝美: 亜鉛トランスポーター (ZnT8) の一塩基多型と 1 型糖尿病の診断. 第 22 日本微量元素学会学術集会、東京都、2009

4) 川崎英二、江口勝美: 免疫・診断: 自己抗体の量と質をめぐって. 第 7 回 1 型糖尿病研究会、日光市、2009

5) 川崎英二: 1 型糖尿病の成因と分類. 第 44 回糖尿病学の進歩、大阪市、2010

6) Kawasaki E: Anti-islet autoantibodies in Japanese type 1 diabetes. The 15th Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus、韓国、2009

7) Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Ozaki M, Abiru N, Yamasaki H, Matsuura N, Miura J, Uchigata Y, Eguchi K: ZnT8 autoantibodies in patients with three forms of Japanese type 1 Diabetes. 10th International Congress of the Immunology of Diabetes Society (IDS-10)、スウェーデン、2009

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得 なし

2) 実用新案登録 なし

3) その他 なし

表 1 GAD 抗体陽性 NIDDM の登録時のデータ

症例数	47
男：女	22：25
発症年齢 (歳)	48.1 ± 12.5
罹病期間 (年)	4.9 ± 5.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.0 ± 4.1
HbA <sub>1c</sub> (%)	8.1 ± 2.2
IAA 陽性, n (%)	12 (26%)
IA-2 抗体陽性, n (%)	7 (15%)
ZnT8 抗体陽性, n (%)	9 (19%)

図 1 GAD 抗体陽性 NIDDM における IAA、IA-2 抗体、ZnT8 抗体の組み合わせ解析

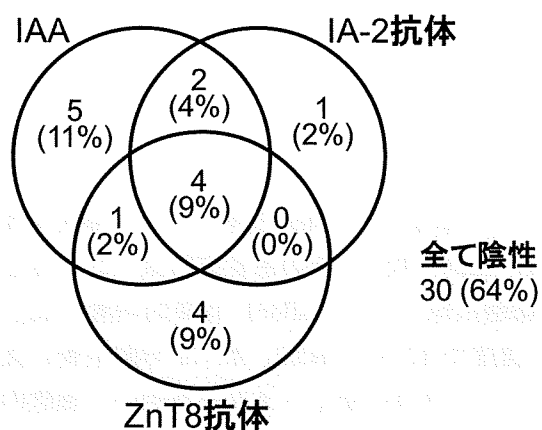


表 2 多変量解析による GAD 抗体陽性 NIDDM における進行予知因子の検討

要 因	インスリン治療開始		
	OR	95% CI	P 値
高 GAD 抗体価	0.61	0.05-6.9	0.652
GAD65-M エピトープ陽性	12.0	0.6-224.9	0.096
他の膵島関連自己抗体重複陽性	13.8	2.8-68.5	0.001

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 島田 朗（慶應義塾大学医学部内科 専任講師）

研究要旨：1型糖尿病の大部分は、T細胞を主体とするリンパ球浸潤が膵島に認められることから、細胞性免疫異常が関与していると考えられているが、臨床の現場では、そのような細胞性免疫異常を的確に検出する方法が確立しておらず、専ら膵島に関連する自己抗原（GAD、インスリンなど）に対する自己抗体の検出に終始しているのが現状である。しかしながら、自己抗体の抗体価が必ずしも疾患活動性を規定しているわけではないことから、細胞性免疫異常の検出が求められている。

今回、われわれは、細胞内サイトカイン染色のシステムを用いて抗原特異的なT細胞の反応性を検出する方法を試み、劇症1型糖尿病を始めとする1型糖尿病患者においてGAD反応性IFN- $\gamma$ 産生CD4細胞が検出されることを見出した。さらに、日本人の1型糖尿病において多く認められるHLAタイプ（DR4、DR9）毎にも検討するのみならず、GADの主要なT細胞エピトープ同定を試みた。

#### A. 研究目的

1型糖尿病の大部分は、T細胞を主体とするリンパ球浸潤が膵島に認められることから、細胞性免疫異常が関与していると考えられている。今回、われわれは、劇症1型糖尿病における細胞性免疫異常の新規検出法を確立する目的で、自己免疫の関与が明らかな「HLA DR9を有する1型糖尿病患者群」に絞り、GAD反応性T細胞につき詳細に検討した。このGAD反応性T細胞の主要エピトープの同定が、劇症1型糖尿病を始めとする1型糖尿病の新規診断法の確立に繋がることは明らかである。

#### B. 研究方法

- 1) 1型糖尿病患者（n=200-300）のうち、（膵島関連）自己抗体（抗GAD抗体）陽性者をリクルートする。抗GAD抗体の測定は、コスミック社のキットを使用する。
- 2) 抗GAD抗体陽性が確認された1型糖尿病患者に対して、倫理委員会の承認をすでに得た書面を使用してインフォームドコンセントを取

得し、HLAタイピングを行う。

3) 2)の結果、HLA DR9を有し、かつ罹病年数の短い症例に絞り、その患者末梢血リンパ球を膵 $\beta$ 細胞抗原（ヒトGAD65）特異的刺激（5 $\mu$ g/mlの濃度で37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、48-72時間培養の条件下）し、フローサイトメーターを用いて細胞内サイトカイン（IFN $\gamma$ 、IL-4）の検出を図る（ヒトGAD65反応性IFN $\gamma$ 産生CD4細胞の検出）。

4) 3)と同時に、1型糖尿病の疾患活動性の指標として有用と考えられる血清IP-10/CXCL10値（T-helper1タイプの活性化された細胞を局所に誘導する因子）も測定し、高値を示す症例を選出する。

5) 抗GAD抗体陽性が確認され、HLA DR9を有し、罹病年数が短く、血清IP-10/CXCL10値の高い1型糖尿病症例を選出後、ヒトGAD65を抗原として、GAD65のT細胞クローンの作成を図る。

6) 一方で、5)の条件を満たす症例において、ヒトGAD65をいくつかのペプチドに分け、各ペプチドに対する反応性を上記の3)と同様に細胞内サイトカイン染色のシステムを用いて検

討し、重要なペプチド部分を絞り込む。

7) 上記の後、抗体陰性例についても同様の検討を行う。

### C. 研究結果

1 型糖尿病患者 (n=200-300) のうち、(臍島関連) 自己抗体 (抗 GAD 抗体) 陽性者をリクルートし、抗 GAD 抗体陽性が確認された 1 型糖尿病患者に対して、倫理委員会の承認をすでに得た書面を使用してインフォームドコンセントを取得し、HLA タイピングを行った。その結果、HLA DR9 を有し、かつ罹病年数の短い (発症 3 年以内の) 症例に絞り、その患者末梢血リンパ球を臍β細胞抗原 (ヒト GAD65) 特異的刺戟 (5μg/ml の濃度で 37 °C、5%CO<sub>2</sub>、48-72 時間培養の条件下) し、フローサイトメーターを用いて細胞内サイトカイン (IFN<sub>γ</sub>、IL-4) の検出を行い (ヒト GAD65 反応性 IFN<sub>γ</sub> 産生 CD4 細胞の検出)、同時に、1 型糖尿病の疾患活動性の指標として有用と考えられる血清 IP-10 / CXCL10 値 (T-helper1 タイプの活性化された細胞を局所に誘導する因子) も測定したところ、高値を示す症例を見出した。さらに、ヒト GAD65 を抗原として、GAD65 の T 細胞クローンの作成を図った。

また、ヒト GAD65 ペプチドに分け、各ペプチドに対する 1 型糖尿病患者末梢血リンパ球の反応性についても細胞内サイトカイン染色のシステムを用いて検討した。

さらに、抗体陰性例についても同様に検討した。現在、患者数を増やして検討を継続中である。

### D. 考察

以上のように本研究では、1 型糖尿病における細胞性免疫能の検出法の確立を試み、細胞内サイトカイン染色を用いた方法や、血清中ケモカインの測定に加えて、主要な自己抗原である GAD の T 細胞エピトープの同定を図っている。今後、絞り込まれたエピトープを用いて、劇症 1 型糖尿病患者における反応の検出を図るとともに、対照として急性、緩徐進行例についても並行して検討を継続する必

要がある。

### E. 結論

以上のように本研究では、1 型糖尿病における細胞性免疫能の新規検出法を検討し、本年度の研究計画を予定通り終了した。

### F. 健康危険情報 なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Shimada A, Oikawa Y, Yamada Y, Okubo Y, Narumi S. The Role of the CXCL10/CXCR3 System in Type 1 Diabetes. Rev Diabet Stud. 2009;6(2):81-4. Epub 2009 Aug 10.
- 2) 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. 学会発表

- 1) 鈴木竜司, 島田朗. 開業医との連携がスムーズであった典型的な劇症 1 型糖尿病の 1 例. 糖尿病 52 巻 6 号 Page 472 (2009. 06)
- 2) 村木絢子, 香月健志, 及川洋一, 島田朗, 伊藤裕, 西本祥仁, 鈴木重明. 重症筋無力症を合併した劇症 1 型糖尿病の 1 例. 糖尿病 52 巻 6 号 Page 470 (2009. 06)

- 3) 多田愛, 及川洋一, 島田朗, 伊藤裕, 橋口明典. 経過より劇症1型糖尿病と考えられた1剖検例. 糖尿病52巻6号 Page469 (2009. 06)

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案特許 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

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

研究分担者 永田正男 加古川市民病院糖尿病内科 副院長  
(旧所属：神戸大学大学院老年内科学 准教授)

研究要旨：1型糖尿病の発症機序の解明と新たな治療法の開発を目的として、インスリンペプチドおよび樹状細胞を用いた1型糖尿病発症抑制効果の研究を行った。その結果、インスリンペプチドにより糖尿病発症の抑制が見られるとともに、樹状細胞の発症抑制効果も確認された。以上より、インスリンペプチドや樹状細胞が1型糖尿病の新たな治療法として有用となる可能性が期待された。

#### A. 研究目的

自己免疫機序による1型糖尿病には、インスリンが自己抗原として必須であることが、内因性インスリン欠失 NOD マウスが糖尿病を発症しないことから明らかにされた。その後の解析から、膵β細胞に対する自己免疫の初期反応の惹起と Targeting にインスリン分子が必須であることが示されている。本研究は、インスリンペプチドおよび樹状細胞を用い、1型糖尿病の発症機序を解明するとともに、治療へ応用することを目的に行った。

#### B. 研究方法

まず、2種類あるマウスインスリン I と II の抗原性についてマウス1型糖尿病モデルを用いて解析を試みた。膵β細胞に CD80 を発現させた F1 (B6xBalb/c) にインスリン・ペプチド B9-23 を免疫し糖尿病を発症させる EAD モデルを解析した。一方、経静脈的にペプチドを投与して deletion を起こさせた。さらに、インスリンのシグナルペプチドである L7-23 は hidden antigen であるが、IFA とエマリュジョンし、NDO マウスに免疫した。

一方、糖尿病発症直後の NOD マウスに、IL-12 p40 を発現させた膵島を移植した。また、TNF- $\alpha$ 、CTLA-4 を発現させた膵島でも移植実験を行った。さらに、1型糖尿病発症以前におけるサイトカイン発現膵島による予防を試みた。

次に、抗原治療ではなく免疫の活性化・抑制を行う樹状細胞による1型糖尿病発症抑制を試みるため、NOD 骨髄細胞を GM-CSF と IL-4 あるいは IL-10、TGF1- $\beta$  と培養し得られた

樹状細胞を NOD マウスへ投与し、糖尿病発症抑制効果を検討した。

#### C. 研究結果

膵β細胞に CD80 を発現させた F1 (B6xBalb/c) にインスリン・ペプチド B9-23 を免疫し糖尿病を発症させる EAD モデルの解析では、Ins 1 は1アミノ酸置換した Ins 2 より糖尿病発症が強い傾向を示し、強い抗原性が示唆された。一方、経静脈的にペプチドを投与して deletion を起こさせた実験では、Ins 2 の方が強い糖尿病発症抑制を示した。インスリンのシグナルペプチドである L7-23 は hidden antigen であるが、IFA とエマリュジョンし、NOD マウスに免疫したところ、幼若期のみならず免疫反応のすすんだ12週齢、糖尿病発症直後においても糖尿病発症抑制あるいは血糖の正常化が認められた。

糖尿病発症直後の NOD マウスに、IL-12 p40 を発現させた膵島を移植することにより、長期の寛解が得られた。また、TNF- $\alpha$ 、CTLA-4 を発現させた膵島でも糖尿病再発抑制が認められた。しかし、1型糖尿病発症以前におけるサイトカイン発現膵島の移植では発症抑制が認められず、TNF- $\alpha$  ではむしろ発症促進作用が認められた。

NOD 骨髄細胞を GM-CSF と IL-4 あるいは IL-10、TGF1- $\beta$  と培養し得られた樹状細胞を NOD マウスへ投与したところ、TGF1- $\beta$  > IL-10 > IL-4 の強さで NOD 糖尿病発症抑制効果が得られた。Fas 変異を有する樹状細胞では、さらに強力に糖尿病発症

を抑制できた。

#### D. 考察

インスリンペプチドを用いた実験の結果から、インスリン自体が1型糖尿病における自己免疫に密接に関与しており、重要なエピトープを操作することにより糖尿病発症をコントロールできる可能性が示唆された。Anti-CD3抗体を用いた臨床介入が欧米で開始されており、ある程度の効果を認めているが、将来より安全な抗原特異的治療が期待される。

樹状細胞を用いた実験結果から、樹状細胞が糖尿病発症を抑制する機序として、他の免疫調節細胞を介さず樹状細胞が自己免疫を抑制することが推測された。1型糖尿病の予防に、修飾を加えた樹状細胞を用いた細胞療法が有効である可能性が考えられる。

#### E. 結論

インスリンペプチドにより糖尿病発症の抑制が見られた。また、樹状細胞の発症抑制効果も確認された。以上より、インスリンペプチドや樹状細胞が1型糖尿病の新たな治療法として有用となる可能性が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Administration of a determinant of preproinsulin can induce regulatory T cells and suppress anti-islet autoimmunity in NOD mice.

Arai T, Moriyama H, Shimizu M, Sasaki H, Kishi M, Okumachi Y, Yasuda H, Hara K, Yokono K, Nagata M.

Clin Immunol. 2010 Mar 30. [Epub ahead of print] PMID: 20359955

2) Regulatory CD8+ T cells induced by exposure to all-trans retinoic acid and TGF-beta suppress autoimmune diabetes.

Kishi M, Yasuda H, Abe Y, Sasaki H, Shimizu M, Arai T, Okumachi Y, Moriyama H, Hara K, Yokono K, Nagata M.

Biochem Biophys Res Commun. 2010 Mar 26;394(1):228-32. Epub 2010 Mar 3. PMID: 20206130

##### 2. 学会発表

該当なし

#### 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

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

研究分担者 西村保一郎 大阪医科大学医学部 数学 教授

**研究要旨：**劇症1型糖尿病の統計解析に資する目的で、以下の研究を行った。数式処理ソフトを援用して、埋め込みの例を構成する技法、埋め込みの特徴を解析する技法などの、数式処理ソフトでの複雑な計算の技法を明らかにした。これらは4次元複素射影空間に埋め込み可能な複素有理曲面に新たな知見を得る基盤となるものである。

**A. 研究目的**

4次元複素射影空間に埋め込まれた複素有理曲面の次数には上限があることが知られているが、上限の最小値は未だ分かっていない。劇症1型糖尿病の統計解析に資するため、埋め込み次数の上限の研究と、新しい埋め込みの具体例の構成を目的とする。

**B. 研究方法**

数式処理ソフト Magma、Singular、Macaulay2 を用いて、知られている埋め込みの例を詳しく計算することを通して、新しい例の構成を模索する方法を採る。

**C. 研究結果**

埋め込みの例を構成する技法、埋め込みの特徴を解析する技法などの、数式処理ソフトでの複雑な計算の技法を獲得してきている。

**D. 考察**

埋め込まれた曲面の斉次座標環の分解は、曲線のその場合には詳しい結果が多くあるのに比して、まだ良く分かっていない。本研究はその方面への寄与も期待できる。

**E. 結論**

最近のコンピュータの進歩に伴って、数式処理ソフトを用いた計算が、従来と比較して複雑なことまで行えるようになってきた。このような計算の実践を通して、複素有理曲面の4次元複素射影空間への埋め込みに関しての新たな知見を目指したい。これらの知見は劇症1型糖尿病の統計解析に有効となる可能性が期待される。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

なし

**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



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

● 書籍 該当なし

● 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
今川彰久、花房俊昭	劇症1型糖尿病	糖尿病	52(8)	669-671	2009
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 J	57(3)	211-219	2010
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	58(10)	2285-91	2009
Takizawa S, Endo T, Wanji A 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	386(1)	192-196	2009
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	58(3)	732-737	2009
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	Differential association of HLA with three subtypes of type 1 diabetes: fulminant, slowly progressive and acute-onset.	Diabetologia	52(12)	2513-2521	2009

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-ABCB1, and MTNR1B loci are associated with fasting glucose in two Asian populations.	Diabetologia	53	299-308	2010
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)
Kishi A, Kawabata Y, Ikegami H, et al	The onset of diabetes in three out of four sisters: a Japanese family	Endocrine J	56	767-772	2009
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	52(11)	2464-2465	2009
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
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
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
Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Kuwahara H, Kobayashi M, Abiru N, Yamasaki H, Eguchi K	Autoantibodies to insulin, insulinoma-associated antigen-2, and zinc transporter 8 improve the prediction of early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes.	J Clin Endocrinol Metab	95 (2)	707-713	2009

川崎英二	1型糖尿病の成因	糖尿病の療養指導 2009		87-91	2009
川崎英二	1型糖尿病に合併する自己 免疫疾患	月刊 糖尿病	1(6)	98-105	2009
川崎英二	1型糖尿病	糖尿病診療マスタ ー	8(1)	20-23	2010
Shimada A, Oikawa Y, Yamada Y, Okubo Y, Narumi S	The Role of the CXCL10/CXCR3 System in Type 1 Diabetes.	Rev Diabet Stud	6(2)	81-84	2009
Arai T, Moriyama H, Shimizu M, Sasaki H, Kishi M, Okumachi Y, Yasuda H, Hara K, Yokono K, Nagata M.	Administration of a determinant of preproinsulin can induce regulatory T cells and suppress anti-islet autoimmunity in NOD	Clin Immunol			2010 (Epub ahead of print)