

**MATERIALS AND METHODS**

**Database structure**

The DB system consists of an internal GWAS DB and a public GWAS DB. For a maximum of 1 year, or until the acceptance of publication, submitted data are stored in the internal GWAS DB and can be accessed only by the research team that submitted the data for greater convenience in data sharing among research team members living in various locations. Currently, the DB systems are implemented using mysql version 5.0 (<http://dev.mysql.com/downloads/mysql/5.0.html>), and some of the statistical analysis results are also accumulated in a distributed annotation system (DAS) server. A schematic drawing of the GWAS DB is shown in Figure 1.

In this DB, three types of data access, namely, (1) public access, (2) authorized access accompanied by a data use application, and (3) authorized access accompanied by a data use application and its review by a data access committee, are possible. Principally, frequency data of genotypes and alleles and statistical analysis results can be accessed freely. However, automatic access and frequent access are restricted to prevent the release of frequency data of genome-wide genotypes and alleles, as such a large volume of genotype/allele data leads to the specification of whether the given genome is contained in the case or in the control group, as reported previously.<sup>8</sup> These genome-wide frequency data can be obtained by submitting a data use application to the data access committee. For the use of genotype or raw data, an application that

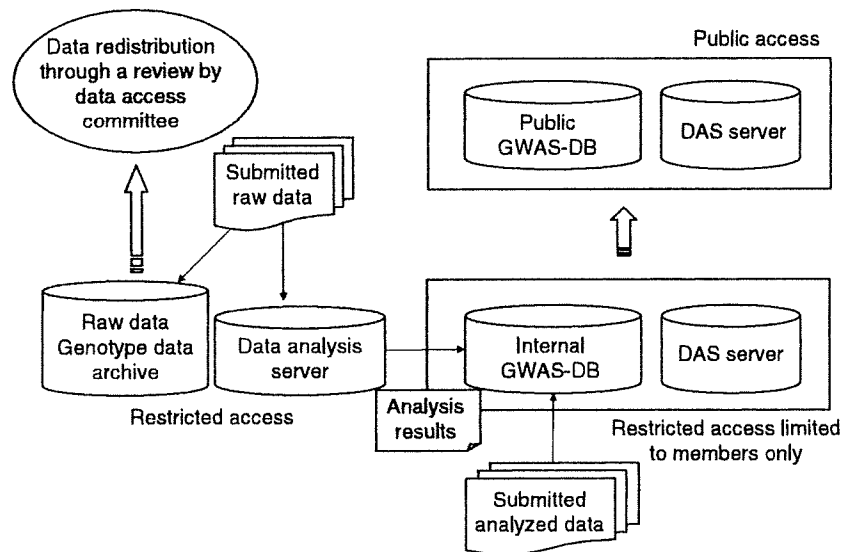


Figure 1 Schematic drawing of genome-wide association study (GWAS) database (DB) systems.

Table 1 Summary of database contents

Contents	Data sources
<b>Statistics</b>	
Frequencies of genotypes, alleles and haplotypes	
<b>Statistical genetic analysis</b>	
P-values and odds ratios on genotypic model and allelic model	
P-values and odds ratios on trend model, additive model and recessive model	
Permutation test results	
Bonferroni's corrections and false discovery rate for multiple testing using	
Akaike information criterion	
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Haplotype-based $\chi^2$ -test	
Epistasis	
Linkage disequilibrium parameters ( $r^2$ , $D'$ , Lod)	
<b>Other data</b>	
mRNA, amino-acid sequence of each gene	NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
mRNA, genome-mapped position	UCSC Hg. 18 ( <a href="http://hgdownload.cse.ucsc.edu/">http://hgdownload.cse.ucsc.edu/</a> )
SNP position and SNP kind (cSNP, sSNP, rSNP and so on)	NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
<b>OMIM</b>	NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
Copy number variation	DGV ( <a href="http://projects.tcag.ca/variation/">http://projects.tcag.ca/variation/</a> )
Gene function	Gene ontology ( <a href="http://www.geneontology.org/">http://www.geneontology.org/</a> )
Microsatellite polymorphism	UCSC ( <a href="http://hgdownload.cse.ucsc.edu/">http://hgdownload.cse.ucsc.edu/</a> )
Manually curated disease-related mutation information	

describes the research purpose and lists the research team members must be submitted to the data access committee. The data access committee deliberates on whether the applicant's research purpose meets the content of the consent form. Only applicants approved by the review committee can use individual genotype data and raw data in accordance with the data handling security rules required by the data access committee and following data use restrictions on the basis of informed consent.

Individual data and raw data are accumulated in the server in a secured computer environment that is different from the public DB server. Only authorized persons can access this server.

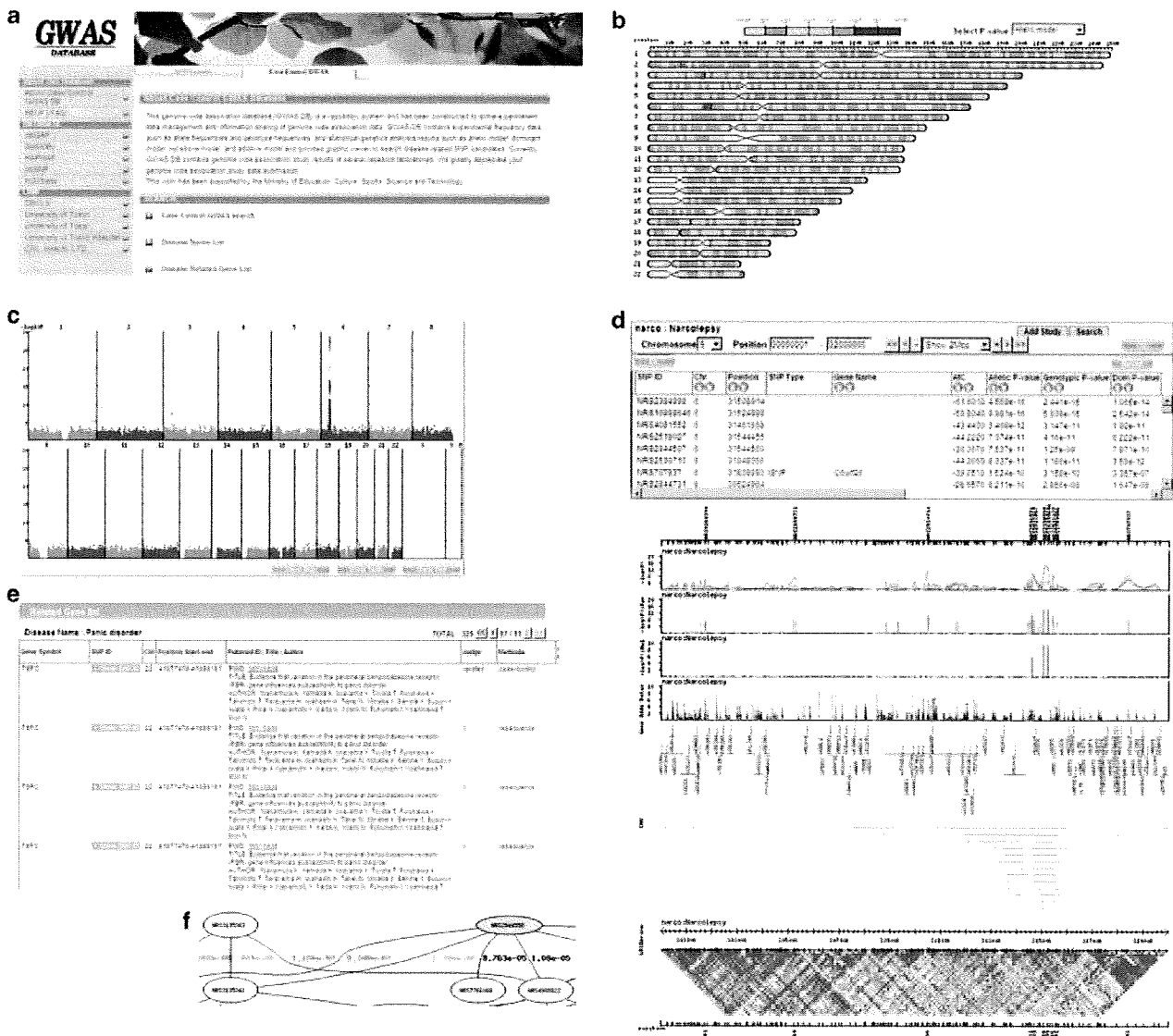
**Data submission**

In principal, both analysis results and unanalyzed data can be submitted. When data have already been analyzed, the analyzed data are accumulated in this DB, along with a detailed description of the analysis protocols. When data have not been analyzed yet, they are analyzed in our site, and the results are accumulated in this DB. When raw data are redistributable under certain conditions, they are

also submitted with the contents of the consent form. All data must be submitted with documents explaining the design of the study, as well as ethical consideration.

**Data cleaning for quality control**

When data are submitted as individual data without analysis results, they are analyzed as follows: (1) SNPs with a call rate < 95% and samples with a call rate < 95% are removed. (2) SNPs, the Hardy-Weinberg equilibrium test result of which in a control group is less than 0.001 or the minor allele frequency of which is less than 0.05, are removed. (3) The principle component analysis (PCA) of these case-control data, along with HapMap data, is carried out using EIGENSTRAT<sup>9</sup> or other programs so that sample outliers and samples with a possible ethnic mixture or a different ethnicity are removed on the basis of the PCA result. Sample outliers in the plot of heterozygosity versus call rate are also removed. The quantile-quantile plot based on the allelic model is calculated and checked. When only genotype frequency data are submitted, PCA and heterozygosity checks are skipped.



**Figure 2** Snapshots of the genome-wide association study (GWAS) database. (a) Top page, (b) bird's-eye view, (c) Manhattan plot, (d) region table and graph, (e) disease-related gene/single-nucleotide polymorphism (SNP) lists (public data) and (f) SNP network based on epistasis.

as they require individual data. The cleaning results are linked from 'study details' on the web.

### Data analysis

Standard statistical genetic analyses are performed by plink<sup>10</sup> and Haploview.<sup>11</sup> Additional analyses such as the Akaike information criterion, epistasis and more complicated ones (for example, genetic analysis considering potential case samples existing in the control samples, which sometimes becomes a concern for diseases that develop in old age) are calculated by internally developed programs. The major statistics include *P*-values based on an allelic model, genotypic model, trend model, dominant model, recessive model and permutation test results of these models, and Bonferroni's correction and false discovery rate for multiple testing. These methods are also shown in 'study details.' When submitted data consist of only genotype frequency data, the genome-wide permutation test is skipped.

### Database contents and utility

The DB contents (as of April 2009) are summarized in Table 1.

User data other than GWAS data, such as expression data and epigenetic data, are also accumulated and can be displayed on the graph. Although clinical data are not currently accumulated in the DB, they can be added if submitted. Major tables are summarized in Supplementary Table 1.

A snapshot of the GWAS DB is shown in Figure 2. Figure 2a shows the top page of the GWAS DB. When the 'SNP control' tab is selected, the interface jumps to the SNP control DB, which is affiliated to the GWAS DB and contains allelic frequencies, genotypic frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium tests and estimated haplotype frequencies of Japanese control samples. Bird's-eye view (Figure 2b) and Manhattan plot (Figure 2c) are provided to draw *P*-values of each model. A genome region can be selected from both (Figures 2b and c), and the results of statistical genetic analysis along with other information such as exon-intron information and copy number variations (CNVs) can be displayed in tables and graphs to facilitate the identification of disease-related SNPs, as shown in Figure 2d. Furthermore, comparisons among various study results obtained by different institutions and/or different platforms can be carried out easily by plotting their graphs on the web (using the 'add study' function in Figure 2d). When the published disease-related gene or SNP is registered as shown in Figure 2e, data are plotted as a known disease-related gene/SNP in the graph (Figure 2d). Epistasis data are also accumulated and drawn as a network graph using Graphviz (<http://www.graphviz.org/>), as shown in (Figure 2f). Data can be searched by SNP ID (dbSNP ID #rs, affymetrix SNP ID and so on), gene name, disease name and so on. The study design and analysis protocols can also be browsed.

Statistical results are also accumulated on a DAS server, and they can be browsed using the Gmod Gbrowse ([http://gmod.org/wiki/Main\\_Page](http://gmod.org/wiki/Main_Page))-based browser (<http://gwas.lifesciencedb.jp/cgi-bin/gbrowse/snpdb/>). Furthermore, as a function of the DAS server, data on other DAS servers such as Ensemble can be called up. This function is useful to superimpose data from other DBs onto GWAS data. The GWAS DB is designed to be user friendly for researchers unfamiliar with GWAS to promote disease-related studies.

### Further development

A recent topic of interest is genome-wide association analysis coupled with other data such as pathway data<sup>12</sup> to compensate for the low statistical power in disease-associated candidate SNPs. The function to browse or calculate SNP/SNP pair *P*-values on the basis of the GWAS result, along with other data, will be added to this DB to facilitate the generation and understanding of user hypotheses.

The relationships between CNVs and diseases have begun to emerge in recent studies.<sup>13</sup> Although concerns remain about the quality of detected CNVs, genomic locations and frequencies of CNV regions and their case-control association study results will be incorporated into this DB. Furthermore, in the near future, new high-throughput techniques such as short-read sequencing will be applied for GWAS, and this DB will be improved to suit the new experimental techniques.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the contract research fund 'Integrated Database Project' from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nussbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G. et al. The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304–1351 (2001).
- The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* **437**, 1299–1320 (2005).
- Barrett, J. C. & Cardon, L. R. Evaluating coverage of genome-wide association studies. *Nat. Genet.* **38**, 659–662 (2006).
- Manolio, T. A., Brooks, L. D. & Collins, F. S. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J. Clin. Invest.* **118**, 1590–1605 (2008).
- Zeggini, E., Scott, L. J., Saxena, R., Voight, B. F., Marchini, J. L., Hu, T. et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **40**, 638–645 (2008).
- Houlston, R. S., Webb, E., Broderick, P., Pittman, A. M., Di Bernardo, M. C., Lubbe, S. et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat. Genet.* **40**, 1426–1435 (2008).
- Homer, N., Szlinger, S., Redman, M., Duggan, D., Tembe, W., Muehling, J. et al. Resolving individuals contributing trace amounts of DNA to highly complex mixtures using high-density SNP genotyping microarrays. *PLoS Genet.* **4**, e000167 (2008).
- Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A. & Reich, D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* **38**, 904–909 (2006).
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D. et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263–265 (2005).
- Baranzini, S. E., Galwey, N. W., Wang, J., Khankhanian, P., Lindberg, R., Pelletier, D. et al. Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies in multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2078–2090 (2009).
- McCarroll, S. A. Extending genome-wide association studies to copy-number variation. *Hum. Mol. Genet.* **17** (R2), R135–R142 (2008).

Supplementary Information accompanies the paper on Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/jhg>)

## 基礎的観点から 2

# 疾患感受性遺伝子とゲノムワイド関連解析

西田奈央 徳永勝士

にしだ なお, とくなが かつし: 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野

### ● はじめに

単一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を検出する技術の進展に伴って, ヒトのさまざまな多因子疾患に関わる遺伝子を探索する戦略として, ゲノムワイド関連研究 (genome-wide association study: GWAS) が近年大きな注目を浴びている。2007年5月には, 90万種を超えるSNP解析用プローブ, およびCNV (copy number variation) 解析用の94万種を超えるプローブを搭載したキットが市販された (Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0: SNP Array 6.0)<sup>1)</sup>。われわれの教室に設置したヒトSNPタイピングセンターでは, いくつかの多因子疾患についてSNP Array 6.0によるゲノムワイド関連分析を実施している。

SNP Array 6.0に搭載されたSNPは, 公共のSNPデータベースおよびPerlegen社に登録された約220万種のSNPから遺伝学的情報量が最大化されるように, また連鎖不平衡やHapMapプロジェクトからの情報も考慮して選択された約44万種のSNPに, Tag SNP, X染色体およびY染色体に存在するSNP, ミトコンドリアSNPなどを加えた全909,622種のSNPである。これらのSNPについて, HapMapの3集団 (Caucasian, African, Asian) におけるマイナーアレル頻度 (minor allele frequency: MAF) の平均は, それぞれ19.6%, 20.6%, 18.2%

である。

しかしながら, HapMapプロジェクトでは45検体の日本人しか解析していないため, MAFの低いSNPについては正確な頻度推定ができない。そこで, われわれはSNP Array 6.0を用いて日本人健常者200検体を解析し, 日本人を対象としたGWASにおいて統計解析に用いることのできるSNP数を算出することを試みた。また, SNP Array 6.0は遺伝子型を決定するためにBirdseedアルゴリズムを用いるが, Birdseedアルゴリズムを用いた遺伝子型決定の精度を上げることが, ゲノムワイド関連分析における偽陽性関連を効果的に排除することにつながる。そこで, 日本人健常者200検体のタイピング結果を用いて, Birdseedアルゴリズムによる正確な遺伝子型決定方法を検討した。

### ● ゲノムワイド関連研究の動向

ゲノムワイド関連研究は日本の研究者によって先駆的に行われ, これまでにいくつかのヒト多因子疾患の感受性遺伝子を特定することに成功している<sup>2,3)</sup>。また, 日本では2003年からオーダーメイド医療実現基盤を構築することを目標とした「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」が開始され, 30万人の日本人を対象とした遺伝情報解析が行われている<sup>4)</sup>。2008年には, 日本における2大プロジェクトである「オー

「ダーメイド医療実現化プロジェクト」と「ミレニアムゲノムプロジェクト」から、それぞれ独立に2型糖尿病に関連する遺伝子である *KCNQ1* を発見したという報告がなされた<sup>5,6)</sup>。また、われわれの研究室においても、*CPT1B* 遺伝子と *CHKB* 遺伝子の間に存在する SNP が睡眠障害のひとつであるナルコレプシーと関連していることを発見し、2008年に報告をした<sup>7)</sup>。

SNP 解析技術の著しい進展によって、近年、大規模なゲノムワイド関連研究が計画・実施されてきている。2007年には、WTCCC(The Wellcome Trust Case Control Consortium) は7種類の common diseases〔双極性感情障害 (BD)、冠動脈疾患 (CAD)、クローン病 (CD)、高血圧 (HT)、関節リウマチ (RA)、1型糖尿病 (T1D)、2型糖尿病 (T2D)〕について、それぞれ2,000人の患者とコントロールとして健常者3,000人

の計17,000人を対象とした大規模なゲノムワイド関連研究を行った<sup>8)</sup>。また、大規模な疫学研究として知られる Framingham Heart Study で収集された試料のうち9,000検体について、心、肺、血液、睡眠疾患に関連する遺伝子変異を探索する計画が発表され、ゲノムワイド関連分析およびゲノムワイド連鎖解析などを行った結果が2007年にまとめて報告された<sup>9)</sup>。

### ● 日本人健常者 200 検体を用いたゲノムワイド SNP タイピング

SNP Array 6.0 によるゲノムワイド SNP タイピングでは、1検体につき500 ng のゲノム DNA を使用する(図1)。制限酵素 (StyI, NspI) を用いたゲノム DNA 断片化反応において、ゲノム DNA 量を250 ng となるように調整することが、タイピングの精度に大きな影響を与える

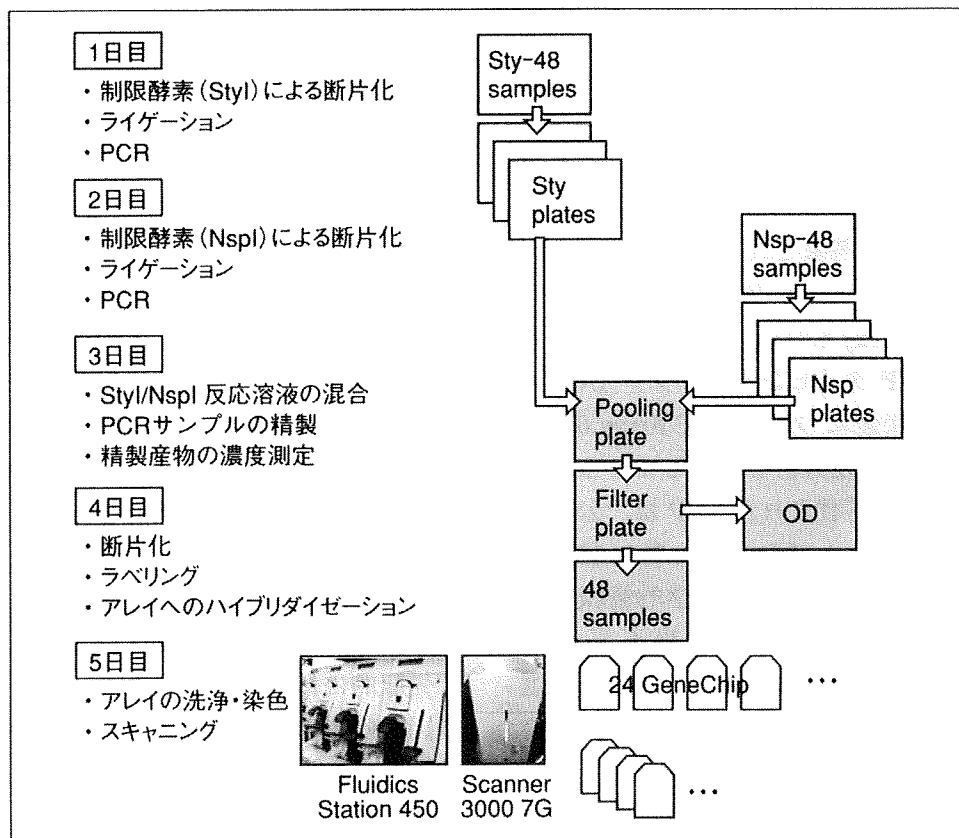


図1 Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0 による SNP (単一塩基多型) タイピングの流れ

制限酵素 (StyI, NspI) による断片化反応から GeneChip のスキャンニングまで、全5日の工程で SNP タイピングが行われる。1検体につき500 ng のゲノム DNA を用いて、全909,622種の SNP をタイピングすることができる。

ことが明らかとなっている<sup>10)</sup>。

日本人健常者 200 検体のうち 195 検体のゲノム DNA 濃度は規定濃度 (50 ng/ $\mu$ L) を満たしており、平均 54.8 ng/ $\mu$ L (45.0~57.8) であったが、残る 5 検体は規定濃度を下回り平均 41.1 ng/ $\mu$ L (38.2~44.5) であった。そこで、規定濃度を下回った 5 検体は制限酵素によるゲノム DNA 断片化反応に 6  $\mu$ L を持ち込み、ゲノム DNA の総量が 250 ng となるように調整してタイピングを行った。日本人健常者 200 検体の SNP タイピングを行った結果、クオリティーコントロール(QC)コール率は平均 97.37% となった (図 2a)。ここで QC コール率とは、タイピングデータの質を評価するために用いられる指標で、SNP Array 6.0 に搭載された 3,022 SNPs

についてのコール率を示す。これら 3,022 SNPs の遺伝子型は DM アルゴリズム (confidence score=0.17) で決定され、コール率が 86% 以下となった検体は解析対象から除外する。日本人健常者 200 検体のタイピングデータのうち、QC コール率が 86% を下回った 2 検体を除外し、86% を上回った 198 検体について Birdseed アルゴリズムを用いて全 909,622 SNPs の遺伝子型を決定したところ、Overall コール率は平均 99.58% (96.42~99.90) となった (図 2b)。

#### ● Birdseed アルゴリズムによる正確な遺伝子型決定方法

膨大な SNP データを取り扱うゲノムワイド関連分析において、タイピングエラーが原因で

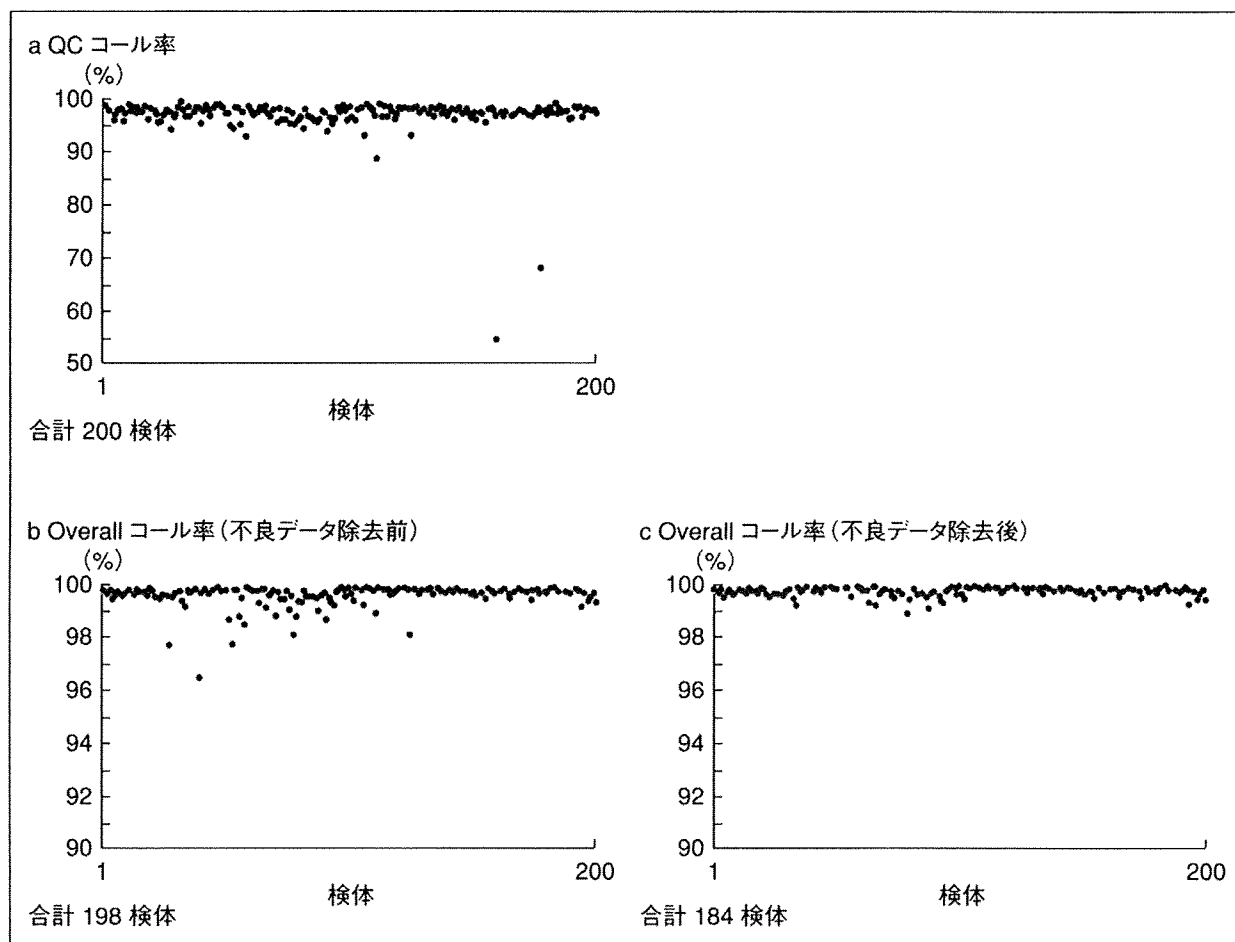


図 2 Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0 による日本人健常者 200 名のタイピング結果  
a : クオリティーコントロール (QC) としてタイピングされた 3,022 SNPs (単一塩基多型) のコール率を示す。  
b : QC コール率が 86% を上回った 198 検体を用いて決定された全 909,622 SNPs のコール率を示す。  
c : QC コール率を指標として不良データを除去した後の 184 検体を用いて遺伝子型を決定した際の全 909,622 SNPs のコール率を示す。

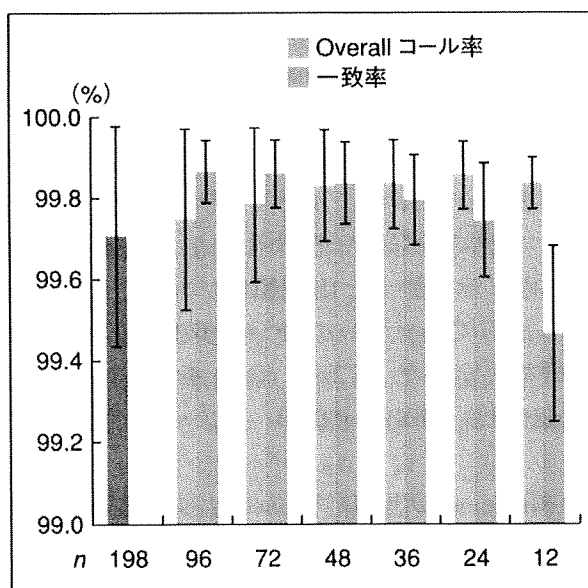


図3 Birdseed アルゴリズムによる遺伝子型決定の精度

日本人健常者 198 検体のなかからランダムに 12 検体を選択し、その 12 検体を含む 6 つの異なるサンプルサイズ (12, 24, 36, 48, 72, 96 検体) で決定した遺伝子型を、198 検体で決定した際の遺伝子型と比較した。各サンプルサイズで遺伝子型を決定した際の、その 12 検体の Overall コール率および遺伝子型一致率 (concordance) を示す。

生じる偽陽性関連は解析を進めるうえで大きな障害となる。そこで、SNP Array 6.0 に搭載された全 90 万種の SNP について、できるだけ多くの SNP の遺伝子型を正確に決定する必要がある。遺伝子型決定に用いる Birdseed アルゴリズムの特性を知るために、日本人健常者 198 検体のなかからランダムに 12 検体を選択し、その 12 検体を含む 6 つの異なるサンプルサイズ (12, 24, 36, 48, 72, 96 検体) で決定した遺伝子型を、198 検体で決定した際の遺伝子型と比較した<sup>10)</sup>。

その結果、12 検体だけで遺伝子型を決定した際の Overall コール率は平均 99.84% [信頼区間 (CI) 99.62~99.92] となり、検体数が増えていくと Overall コール率は下がり、198 検体で決定した際には平均 99.71% (CI 98.07~99.89) となった (図 3)。一方、12 検体だけで決定した遺伝子型と 198 検体で決定した遺伝子型を比較した際の一致率 (concordance) は、平均 99.47% (CI 98.37~99.67) と最も低く、サン

ルサイズが大きくなるにつれて一致率は上昇し、96 検体で遺伝子型を決定した際の一致率は平均 99.87% (CI 99.40~99.92) となった (図 3)。この結果から、Birdseed アルゴリズムはサンプルサイズが小さくても遺伝子型を決定できるものの、高いタイピング精度を得るためには多くのサンプルを用いて遺伝子型を決定する必要があることがわかった。

Birdseed アルゴリズムによる遺伝子型決定において、サンプルサイズが大きくなるにつれて Overall コール率が低くなるという現象の原因として、QC コール率が 86% 以上という閾値では十分に不良データを取り除けていないということが考えられる。日本人健常者 200 検体のタイピング結果から、QC コール率と Overall コール率との間には強い相関があることがわかったため、QC コール率の閾値をより厳しくして不良データの除去を行った。QC コール率の閾値を 95% とすると 188 検体が閾値を上回り、Overall コール率は平均 99.65% (CI 95.66~99.92) となった。しかし、厳しい閾値をパスした検体のなかにも、Overall コール率がより悪くなるものがみられた。それらをさらに除外し、最終的にすべての検体で Overall コール率が上昇するまで不良データの除去を繰り返したところ、184 検体が残りに、Overall コール率は平均 99.71% (CI 98.87~99.92) となった (図 2c)。

#### ● 日本人を対象とした SNP Array 6.0 による GWAS の有用性

日本人健常者 200 検体の SNP タイピングの結果から、SNP Array 6.0 に搭載された全 909,622 SNPs のうち、約 20% に相当する 180,859 SNPs において多型性がみられなかった。また、遺伝子型が決定された SNP のなかにはタイピング精度の悪い SNP が一部含まれており、それらの SNP は偽陽性関連の原因のひとつになると考えられる。これについては、MAF, ハーディー・ワインバーグ平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium : HWE) および SNP コール率 (各 SNP について、タイピングした全検体のうち遺伝子型を決定できた検体の割合) を指標と

して、タイピング精度の悪い SNP の大部分を排除することができる<sup>11)</sup>。

われわれの解析では、MAF>5%、HWE  $p$  値>0.001、SNP コール率>95%を満たす SNP は、590,248 SNPs となり、また、MAF>1%、HWE  $p$  値>0.001、SNP コール率>95%を満たす SNP は 661,559 SNPs となった。SNP Array 6.0 で統計解析が可能であることがわかった約 59 万種の SNP について、ゲノムカバー率を算出すると約 75%となり、50 万種の SNP を搭載した Mapping 500K Array でのゲノムカバー率 66%を上回ることが明らかになった<sup>12)</sup>。

### ● SNP タイピングデータのデポジット

文部科学省の「統合データベースプロジェクト」において、われわれは SNP タイピングデータの半永続的な集約管理と研究者間の情報共有をめざして、日本人健常者のデータを登録した標準 SNP データベース、日本人健常者のコピー数多型 (CNV) を登録した CNV データベース、およびゲノムワイド関連解析のデータベース (GWAS-DB) を構築している<sup>13)</sup>。

GWAS-DB は、研究概要、品質基準などの情報とともに、遺伝子型頻度やアレル頻度、および遺伝統計解析の結果を登録している。また、GWAS-DB は SNP だけでなくマイクロサテライトや CNV の疾患関連解析の結果も登録・閲覧することができ、エクソン情報や CNV などの情報と遺伝統計解析の結果を重ね合わせて可視化する機能を備えている。疾患関連 SNP の候補を多面的に選択できるよう、複数の機関が産出した同一疾患のデータ、および異なるプラットフォームの解析結果を比較したり、メタ解析を行ったりする機能を搭載し、専門家以外にも利用しやすいデータベースの構築をめざしている。

本研究でタイピングした日本人健常者 200 検体の SNP 情報は、標準 SNP データベースに登録され、遺伝子型頻度やアレル頻度といった頻度情報は公開されている。また、今回タイピングした日本人健常者 200 検体のデータは、さまざまな多因子疾患を対象とした GWAS にお

いて共通のコントロール集団として用いられることが期待される。

### ● おわりに

日本人健常者 200 検体を対象として SNP Array 6.0 による SNP タイピングを行った結果、QC コール率を指標として不良データを取り除いたうえで、48 検体以上を用いて Birdseed アルゴリズムで遺伝子型を決定することにより、99.5%以上の Overall コール率、99.8%以上の遺伝子型一致率 (concordance) が得られることがわかった。また、SNP Array 6.0 に搭載された 909,622 種の SNP のうち、約 20%に相当する 180,859 SNPs において多型性がみられないことが明らかとなった。さらに、SNP コール率、MAF、HWEなどを指標としてタイピング不良 SNP の除去をすると、計 590,248 SNPs が SNP コール率>95%、MAF>5%、HWE  $p$  値>0.001 の条件を満たすことがわかった。この約 59 万種の SNP によりヒトゲノムの約 75%をカバーできることから、日本人においても SNP Array 6.0 を用いたゲノムワイド関連解析が有用であることが期待される。

また、われわれはゲノムワイド関連分析によって検出された候補領域において、第一義的な疾患感受性遺伝子多型の特定に適する技術として DigiTag2 法を確立した<sup>14,15)</sup>。現在、いくつかの多因子疾患を対象とした多施設共同研究グループと協力してゲノムワイド関連分析を進めており、さまざまな集団に共通する遺伝因子だけでなく、日本人あるいはアジア人に特徴的な遺伝子の特定をめざしている。

### 文献

- 1) Affymetrix, Inc. [<http://www.affymetrix.com/index.affx>].
- 2) Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, et al. A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J Hum Genet* 2001; 46: 471-7.
- 3) Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 2002; 32: 650-4.
- 4) 文部科学省リーディングプロジェクト「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」 [<http://www.biobank.jp>].



- org/].
- 5) 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* 2008 ; 40 : 1098-102.
  - 6) Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, et al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 1092-7.
  - 7) Miyagawa T, Kawashima M, Nishida N, et al. Variant between CPT1B and CHKB associated with susceptibility to narcolepsy. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 1324-8.
  - 8) The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007 ; 447 : 661-78.
  - 9) Cupples LA, Arruda HT, Benjamin EJ, et al. The Framingham Heart Study 100K SNP genome-wide association study resource : overview of 17 phenotype working group reports. *BMC Med Genet* 2007 ; 8 : s1.
  - 10) Nishida N, Koike A, Tajima A, et al. Evaluating the performance of Affymetrix SNP Array 6.0 platform with 400 Japanese individuals. *BMC Genomics* 2008 ; 9 : 431.
  - 11) Miyagawa T, Nishida N, Ohashi J, et al. Appropriate data cleaning methods for genome-wide association study. *J Hum Genet* 2008 ; 53 : 886-93.
  - 12) Barrett JC, Cardon LR. Evaluating coverage of genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006 ; 38 : 659-62.
  - 13) 文部科学省「統合データベースプロジェクト」  
[<https://gwas.lifesciencedb.jp/>].
  - 14) Nishida N, Tanabe T, Hashido K, et al. DigiTag assay for multiplex single nucleotide polymorphism typing with high success rate. *Anal Biochem* 2005 ; 346 : 281-8.
  - 15) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, et al. Further development of multiplex single nucleotide polymorphism typing method, the DigiTag2 assay. *Anal Biochem* 2007 ; 364 : 78-85.

## 5. 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

西田奈央・徳永勝士

ヒトゲノム計画をはじめとするゲノム情報解析の成果として、公共のデータベースに蓄積された1100万種類を超える単一塩基多型（SNP）のうち、数十万～百万種類のSNPを同時にタイピングすることのできる手法が近年になって実用化された。われわれは、最新のプラットフォームを用いてSNPタイピングを効率的に行うためのシステムを構築し、いくつかの多因子疾患を対象としてゲノムワイド関連解析を行っている。本稿では、日本人における最新のプラットフォームの有用性を評価した結果を報告し、最後に将来の展望についても触れたい。

### はじめに

単一塩基多型（SNP）タイピング技術の進展に伴って、ヒトの様々な多因子疾患にかかわる遺伝子を探索する戦略としてゲノムワイド関連解析（genome-wide association study：GWAS）が近年大きな注目を浴びている。2007年5月には、90万種類を超えるSNP解析用プローブおよびCNV（copy number variation）解析用の94万種類を超えるプローブを搭載したキットが市販された（Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0：以下SNP Array 6.0）<sup>1)</sup>。関連分析の代表であるケースコントロール関連分析法は非血縁の患者群と健常対照群を対象として、疾患遺伝子と多型マーカーの連鎖不平衡（linkage disequilibrium）を検出する手法であり、これをゲノム全域にわたって適用するGWASでは数十万種類以上のSNPが必要となる。SNP Array 6.0はGWASに適したプラットフォームの1つとして考えられており、われわれはSNP Array 6.0プラットフォームを用いてSNPタイピングを効率的に行

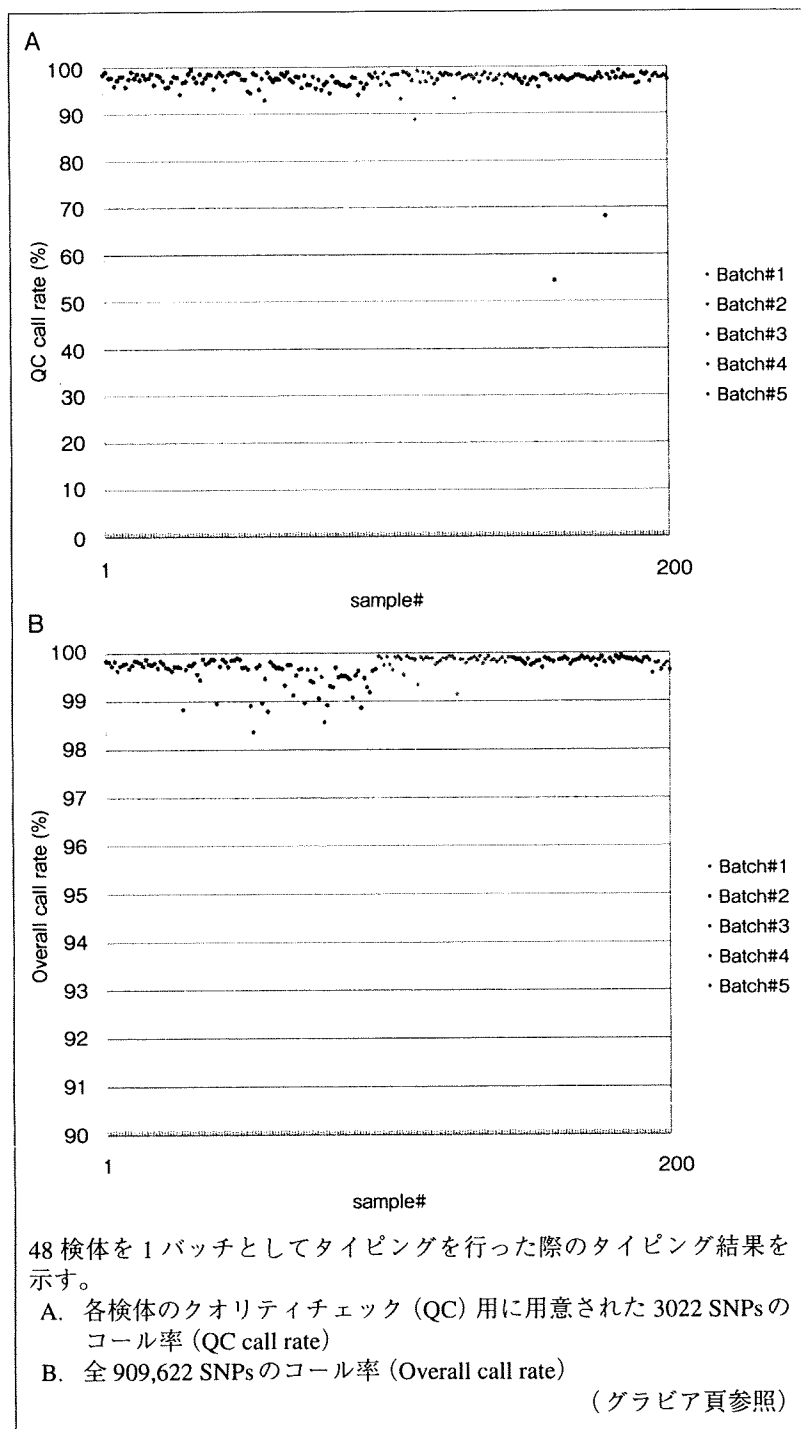
うためのシステムを構築し、いくつかの多因子疾患を対象としたGWASを実施している。

SNP Array 6.0に搭載されたSNPは、公共のSNPデータベースおよびPerlegen社に登録された約220万種のSNPから遺伝学的情報量が最大化されるように、また連鎖不平衡やHapMapプロジェクトからの情報も考慮して選択された約44万種のSNPに、Tag SNP、X染色体およびY染色体に存在するSNPなどを加えた全909,622種類のSNPである。全90万種のSNPについて、HapMapの3集団（Caucasian, African, Asian）の平均マイナーアリル頻度（MAF）は、それぞれ19.6%、20.6%、18.2%である。しかしながら、HapMapプロジェクトではわずか45検体の日本人しか解析していないため、MAFの低いSNPについては正確な頻度推定ができない。そこで、われわれはSNP Array 6.0を用いて日本人200検体のSNPタイピングを行い、日本人を対象としたGWASにおいて統計解析に用いることのできるSNP数を算出することを試みた。また、約50万種のSNPを搭載したMapping 500K

### key words

SNP, ゲノムワイド関連解析, GWAS, ケースコントロール関連分析, 多因子疾患, 統合データベース, 絞り込み, CNV

図1 日本人健常者 200 検体の SNP タイピング結果



除することにつながる。そこで、日本人 200 検体のタイピング結果を用いて、Birdseed アルゴリズムによる正確な遺伝子型決定方法を検討した。

### I. ゲノムワイド関連研究の動向

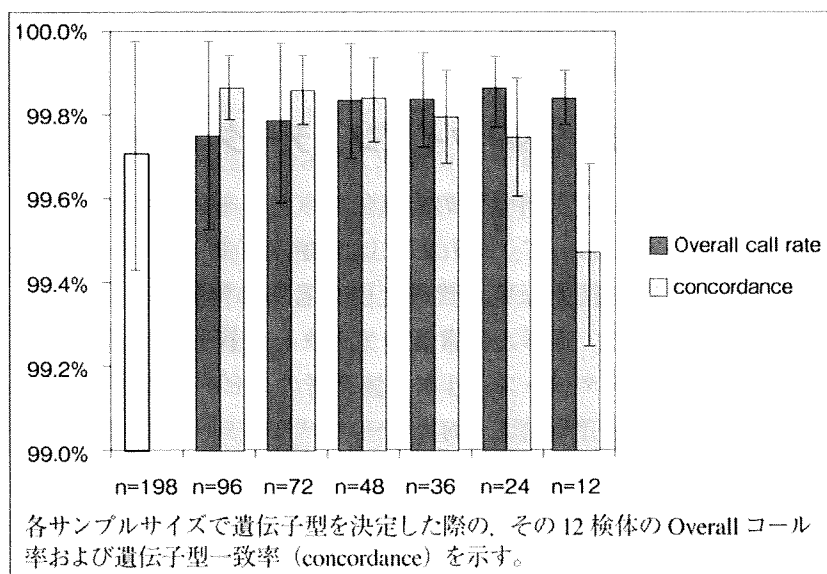
GWAS は日本の研究者によって先駆的に行われ、これまでいくつかのヒト多因子疾患の感受性遺伝子を特定することに成功している<sup>3)4)</sup>。また、日本では 2003 年からオーダーメイド医療実現基盤を構築することを目標とした「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」が開始され、30 万人の日本人を対象とした遺伝情報解析が行われている<sup>5)</sup>。2008 年には、日本における 2 大プロジェクトである「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」と「ミレニアムゲノムプロジェクト」からそれぞれ独立に 2 型糖尿病に関連する遺伝子である *KCNQ1* を発見したという報告がなされた<sup>6)7)</sup>。

近年の SNP 解析技術の著しい進展によって、昨年来、欧米を中心として大規模な GWAS の成果が次々に報告されている。例を挙げると、WTCCC (The Wellcome Trust Case Control Consortium) は 7 種類の common diseases (双極性感情障害、冠動脈疾患、クローン病、高血圧、関節リウマチ、1 型糖尿病、2 型糖

Array を用いた GWAS の結果、有意な関連がみられた上位 100 種類の SNP のうちの 45% がハーディー・ワインバーグ平衡からずれたという報告がある<sup>2)</sup>。SNP Array 6.0 は遺伝子型を決定するために Birdseed アルゴリズムを用いるが、Birdseed アルゴリズムを用いた遺伝子型決定の精度を上げることが、GWAS における擬陽性関連を効果的に排

尿病) について、それぞれ 2000 人の患者とコントロールとして健常者 3000 人の計 17000 人を対象とした大規模な GWAS を行った<sup>8)</sup>。また、大規模な疫学研究として知られる Framingham Heart Study で収集された試料のうち 9000 検体について、心、肺、血液、睡眠疾患に関与する遺伝子変異を探索する計画が発表され、ゲノムワイド関連解析およ

図② Birdseed アルゴリズムによる遺伝子型決定の精度



載された 3,022 SNPs についてのコール率を示す。これら 3,022 種の SNP の遺伝子型は DM アルゴリズム (confidence score=0.17) で決定され、コール率が 86% 以下となった検体は解析対象から除外する。日本人健常者 200 検体のタイピング結果から、QC コール率が 86% を下回った 2 検体を除外し、86% を上回った 198 検体について Birdseed アルゴリズムを用いて全 909,622 SNPs の遺伝子型を決定したところ、Overall コール率は平均 99.58% (96.42 ~ 99.90) となった (図① B)。

びゲノムワイド連鎖解析などを行った結果が 2007 年にまとめて報告された<sup>9)</sup>。

## II. SNP Array 6.0 を用いたゲノムワイド SNP タイピング

### 1. 日本人健常者 200 検体を用いた SNP タイピングの結果

SNP Array 6.0 による SNP タイピングでは、1 検体につき 500 ng のゲノム DNA を使用する。StyI 制限酵素および NspI 制限酵素を用いたゲノム DNA 断片化反応において、ゲノム DNA 量を 250 ng となるように調整することが SNP タイピングの精度に大きな影響を与えることがこれまでの実験から明らかとなっている<sup>10)</sup>。日本人健常者 200 検体のうち 195 検体のゲノム DNA 濃度は規定濃度 (50 ng/ $\mu$ L) を満たしており、平均 54.8 ng/ $\mu$ L (45.0 ~ 57.8) であったが、残る 5 検体は規定濃度を下回り平均 41.1 ng/ $\mu$ L (38.2 ~ 44.5) であった。そこで、規定濃度を下回った 5 検体は制限酵素によるゲノム DNA 断片化反応に 6  $\mu$ L を持ち込み、ゲノム DNA の総量が約 250 ng となるように調整してタイピングを行った。日本人健常者 200 検体の SNP タイピングを行った結果、QC コール率は平均 97.37% となった (図① A)。ここでの QC コール率とは、タイピングデータのクオリティを評価するために用いられる指標で、SNP Array 6.0 に搭

### 2. Birdseed アルゴリズムによる正確な遺伝子型決定方法

膨大な SNP データを取り扱う GWAS において、タイピングエラーが原因で生じる擬陽性関連は解析を進めるうえで大きな障害となる。そこで、SNP Array 6.0 に搭載された全 90 万種の SNP について、できるだけ多くの SNP の遺伝子型を正確に決定する必要がある。遺伝子型決定に用いる Birdseed アルゴリズムの特性を知るために、日本人健常者 198 検体の中からランダムに 12 検体を選択し、その 12 検体を含む 6 つの異なるサンプルサイズ (12, 24, 36, 48, 72, 96 検体) で決定した遺伝子型を、198 検体で決定した際の遺伝子型と比較した<sup>10)</sup>。その結果、Overall コール率は 12 検体だけで遺伝子型を決定した際には平均 99.84% (99.62 ~ 99.92) となり、検体数が増えていくと Overall コール率は下がり、198 検体で決定した際には平均 99.71% (98.07 ~ 99.89) となった (図②)。一方、12 検体だけで決定した遺伝子型と 198 検体で決定した遺伝子型を比較した際の一致率 (concordance) は平均 99.47% (98.37 ~ 99.67) と最も低く、サンプルサイズが大きくなるにつれて一致率は上昇し、96 検体で遺伝子型を決定した際の一致率は平均 99.87% (99.40 ~ 99.92) となった。この結果から、Birdseed アルゴリズムはサンプルサイズが小さくても遺伝子型を決定できるものの、高いタイピング精度を得るため

には多くのサンプルを用いて遺伝子型を決定する必要があることがわかった。

Birdseed アルゴリズムによる遺伝子型決定において、サンプルサイズが大きくなるにつれて Overall コール率が低くなるという現象の原因として、QC コール率 86% という閾値では十分に不良データを取り除けていないということが考えられる。日本人健常者 200 検体のタイピング結果から QC コール率と Overall コール率との間には強い相関があることがわかったため、QC コール率の閾値をより厳しくして不良データの除去を行った。QC コール率の閾値を 95% とすると 188 検体が閾値を上回り、Overall コール率は平均 99.65% (95.66 ~ 99.92) となった。しかし、厳しい閾値をパスした検体の中に Overall コール率がより悪くなるものがみられた。それらの不良データをさらに除外し、最終的にすべての検体で Overall コール率が上昇するまで不良データの除去を繰り返したところ、184 検体が残り、Overall コール率は平均 99.71% (98.87 ~ 99.92) となった。

### 3. 日本人を対象とした SNP Array 6.0 による GWAS の有用性

日本人健常者 200 検体の SNP タイピングの結果から、SNP Array 6.0 に搭載された全 909,622 SNPs のうち約 20% に相当する 180,859 SNPs において多型性がみられなかった。また、遺伝子型が決定された SNP の中にはタイピング精度の悪い SNP が一部含まれており、それらの SNP は擬陽性関連の原因の 1 つになると考えられる。これについては、マイナーアレル頻度 (MAF)、ハーディー・ワインバーグ平衡 (HWE) および SNP コール率 (各 SNP について、タイピングした全検体のうち遺伝子型を決定できた検体の割合) を指標として、タイピング精度の悪い SNP の大部分を排除することができる<sup>13)</sup>。われわれの解析では、MAF > 5%, HWE p 値 > 0.001, SNP コール率 > 95% を満たす SNP は 590,248 SNPs となり、また MAF > 1%, HWE p 値 > 0.001, SNP コール率 > 95% を満たす SNP は 661,559 SNPs となった。SNP Array 6.0 で統計解析が可能であることがわかった約 59 万種の SNP について、ゲノムカバー率を算出すると約

75% となり、50 万種の SNP を搭載した Mapping 500K Array でのゲノムカバー率 66% を上回ることがわかった<sup>12)</sup>。

## III. SNP タイピングデータのデポジット

文部科学省の「統合データベースプロジェクト」において、われわれは SNP タイピングデータの半永続的な集約管理と研究者間の情報共有をめざして、日本人健常者のデータを登録した標準 SNP データベース、日本人健常者のコピー数多型 (CNV) を登録した CNV データベース、およびゲノムワイド関連解析のデータベース (GWAS-DB) を構築している<sup>13)</sup>。GWAS-DB は、研究概要、品質基準などの情報とともに、遺伝子型頻度やアレル頻度、および遺伝統計解析の結果を登録している。また、GWAS-DB は SNP だけでなくマイクロサテライトや CNV の疾患関連解析の結果も登録・閲覧することができ、エクソン情報や CNV などの情報と遺伝統計解析の結果を重ね合わせて可視化する機能を備えている。疾患関連 SNP の候補を多面的に選択できるよう、複数機関が産出した同一疾患のデータ、および異なるプラットフォームの解析結果の比較や、メタ解析を行ったりする機能を搭載し、専門家以外にも利用しやすいデータベースの構築をめざしている。

本研究でタイピングした日本人健常者 200 検体の SNP 情報は、標準 SNP データベースに登録され、遺伝子型頻度やアレル頻度といった頻度情報は公開されている。また、今回タイピングした日本人健常者 200 検体のデータは、様々な多因子疾患を対象とした GWAS において共通のコントロール集団として用いられることが期待される。

## おわりに

日本人健常者 200 検体を対象として SNP Array 6.0 による SNP タイピングを行った結果、QC コール率を指標として不良データを取り除いたうえで、48 検体以上を用いて Birdseed アルゴリズムで遺伝子型を決定することにより、99.5% 以上の Overall コール率、99.8% 以上の遺伝子型一致率が得られることがわかった。また、SNP Array 6.0 に搭載さ

れた 909,622 種の SNP のうち、約 20% に相当する 180,859 SNPs において多型性がみられないことが明らかとなった。さらに、SNP コール率、MAF、HWEなどを指標としてタイピング不良 SNP の除去をすると、計 590,248 SNPs が SNP コール率 > 95%、MAF > 5%、HWE > 0.001 の条件を満たすことがわかった。この約 59 万種の SNP によりヒトゲノムの約 75% をカバーすることができることから、日本人においても SNP Array 6.0 を用いた GWAS が有用で

あることが期待される。また、われわれは GWAS によって検出された候補領域において、第一義的な疾患感受性遺伝子多型の特定（絞り込み）に適する技術として DigiTag2 法を確立した<sup>14)15)</sup>。現在、いくつかの多因子疾患を対象とした多施設共同研究グループと協力して GWAS を進めており、様々な集団に共通する遺伝因子だけでなく、日本人あるいはアジア人に特徴的な遺伝因子の特定をめざしている。

#### 参考文献

- 1) <http://www.affymetrix.com/index.affx>
- 2) Hua J, et al : Bioinformatics 23, 57-63, 2007.
- 3) Ohnishi Y, et al : J Hum Genet 46, 471-477, 2001.
- 4) Ozaki K, et al : Nat Genet 32, 650-654, 2002.
- 5) <http://www.biobankjp.org/>
- 6) Unoki H, et al : Nat Genet, Advanced online publication, 2008.
- 7) Yasuda K, et al : Nat Genet, Advanced online publication, 2008.
- 8) The Wellcome Trust Case Control Consortium : Nature 447, 661-678, 2007.
- 9) Cupples LA, et al : BMC Med Genet 8, s1, 2007.
- 10) Nishida N, et al : BMC Genomics 9, 431, 2008.
- 11) Miyagawa T, et al : J Hum Genet 53, 886-893, 2008.
- 12) Barrett JC, Cardon LR : Nat Genet 386, 59-662, 2006.
- 13) <https://gwas.lifesciencedb.jp/>
- 14) Nishida N, et al : Anal Biochem 346, 281-288, 2005.
- 15) Nishida N, et al : Anal Biochem 364, 78-85, 2007.

#### 参考ホームページ

- ・ Affymetrix 社  
<http://www.affymetrix.com/index.affx>
- ・ 文部科学省リーディングプロジェクト「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」  
<http://www.biobankjp.org/>
- ・ 文部科学省「統合データベースプロジェクト」  
<https://gwas.lifesciencedb.jp/>

#### 西田奈央

- 1998年 東京理科大学理工学部物理学科卒業  
東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻修士課程入学
- 2000年 同博士課程進学
- 2003年 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野学術支援研究員
- 2004年 オリnpas株式会社入社  
東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室客員研究員
- 2007年 同人類遺伝学分野特任助教

## Autoantibodies to Insulin, Insulinoma-Associated Antigen-2, and Zinc Transporter 8 Improve the Prediction of Early Insulin Requirement in Adult-Onset Autoimmune Diabetes

Eiji Kawasaki, Kan Nakamura, Genpei Kuriya, Tsuyoshi Satoh, Hironaga Kuwahara, Masakazu Kobayashi, Norio Abiru, Hironori Yamasaki, and Katsumi Eguchi

Department of Metabolism/Diabetes and Clinical Nutrition (E.K., K.N.), Nagasaki University Hospital, Nagasaki 852-8501, Japan; Department of Endocrinology and Metabolism (G.K., T.S., H.K., M.K., N.A., K.E.), Unit of Translational Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8523, Japan; and Center for Health and Communicating Medicine (H.Y.), Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan

**Objective:** The aim of this study was to identify the predictive marker for early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes in the Japanese populations.

**Design/Patients:** We analyzed insulin autoantibodies (IAA), insulinoma-associated antigen-2 (IA-2) autoantibodies (IA-2icA), and zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibodies (ZnT8A) by radioimmunoassay in 47 Japanese patients with adult-onset autoimmune diabetes who were identified by native GAD autoantibody (nGADA) screening of approximately 3000 non-insulin-requiring diabetes patients and 302 nGADA-negative type 2 diabetes patients. Furthermore, GAD65 autoantibody-specific epitopes were also analyzed using GAD65/GAD67 chimeric constructs.

**Results:** The prevalence of IAA, IA-2icA, and ZnT8A in nGADA-positive patients was 26, 15, and 19%, respectively, which was significantly higher than that in nGADA-negative type 2 diabetes (2, 2, and 2%;  $P < 0.0001$ ). Among nGADA-positive patients, 38% had one or more of IAA, IA-2icA, or ZnT8A, and 15% had two or more of these autoantibodies, compared with none of the nGADA-negative patients ( $P < 0.0001$ ). Thirty-six percent of nGADA-positive patients subsequently required insulin therapy; and high nGADA titer (log-rank  $P = 0.003$ ), middle epitope recognition of GAD65A ( $P = 0.002$ ), and the presence of one or more of IAA, IA-2icA, or ZnT8A ( $P = 0.002$ ) at diagnosis marked the risk for early requirement of insulin therapy. Multivariate logistic regression analysis showed the multiple islet autoantibodies to be independently associated with the risk for insulin requirement (odds ratio = 13.77; 95% confidence interval, 2.77–68.45;  $P = 0.001$ ).

**Conclusions:** These results indicate that the determination of IAA, IA-2icA, and ZnT8A improves the prediction of a future insulin insufficiency in adult-onset autoimmune diabetes, which appears to be superior to GADA titer and GAD65A-specific epitopes. (*J Clin Endocrinol Metab* 95: 707–713, 2010)

**A**utoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD) identify the subset of adult-onset patients with type 2 diabetes who initially do not require insulin treatment but who may develop insulin dependency within a few

years after diagnosis. This form of diabetes is variably referred to as latent autoimmune diabetes in adults (1), slowly progressive type 1 diabetes (2), or adult-onset autoimmune diabetes (3). Although the high titer of GAD

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197  
Printed in U.S.A.

Copyright © 2010 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2009-1733 Received August 12, 2009. Accepted November 23, 2009.

First Published Online January 8, 2010

Abbreviations: CI, Confidence interval; CV, coefficient of variation; GAD, glutamic acid decarboxylase; GADA, GAD autoantibodies; IA-2, insulinoma-associated antigen-2; IA-2A, IA-2 autoantibodies; IAA, insulin autoantibodies; IA-2icA, cytoplasmic region of IA-2 (aa601-979) autoantibodies; nGADA, native GADA; RR, relative risk; TBST, Tris-buffered saline/Tween 20; ZnT8, zinc transporter 8; ZnT8A, ZnT8 autoantibodies.

autoantibodies (GADA) has been reported as a predictive marker of insulin dependency, there are a certain number of patients with high titer of GADA who do not progress to insulin dependency for many years, indicating that there are other markers that distinguish the nonprogressors from progressors (2, 4). It has been reported that the determination of GADA epitopes in patients with type 2 diabetes helps to define type 1 diabetes phenotypes, and the presence of GADA binding to middle plus COOH-terminal epitope is strongly associated with a type 1 diabetes phenotype (5, 6). Japanese patients with slowly progressive type 1 diabetes with insulin treatment have GADA that recognize NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal epitopes, suggesting that NH<sub>2</sub>-terminal epitope may be associated with the immunological characteristics of slowly progressive type 1 diabetes (2). Adult-onset autoimmune diabetes is solely identified by the detection of islet autoantibodies, with GADA being the antibody marker with the highest prevalence, followed by autoantibodies to insulinoma-associated antigen-2 (IA-2) and insulin, which are detected in 15–20% of GADA-positive cases (3, 7, 8), and their presence increases the relative risk of these patients for requiring insulin therapy (8, 9). Recently, the zinc transporter 8 (ZnT8) has been identified as a novel autoantigen in type 1 diabetes, but the clinical relevance of ZnT8 autoantibodies (ZnT8A) in adult-onset autoimmune diabetes is uncertain. The aim of the present study was to identify the predictive marker for early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes using insulin autoantibodies (IAA), IA-2 autoantibodies (IA-2A), and ZnT8A together with GAD65A-specific epitope recognition.

## Subjects and Methods

### Subjects

All patients investigated were participants in the West Japan Study for GAD Autoantibody-Positive Diabetes, a prospective

nationwide study in the west part of Japan (Kyusyu, Yamaguchi, and Osaka areas), conducted with the aim of assessing the predictive markers for early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes (10). The following criteria were used for enrollment in the project: more than 30 yr of age at diagnosis, nonketotic diabetes, no requirement for insulin treatment at the time of native GADA (nGADA) screening, and an initial diagnosis of type 2 diabetes based on the criteria of the National Diabetes Data Group (11). Patients with other types of diabetes were excluded. Overall, 349 Japanese patients with initial non-insulin-requiring diabetes, including 47 nGADA-positive patients and 302 nGADA-negative patients, were studied. nGADA-positive patients were identified by nGADA screening in approximately 3000 non-insulin-requiring diabetes recruited between April 1996 and December 1999 and were prospectively followed up to 9 yr. nGADA-negative patients were randomly selected from nGADA-negative type 2 diabetes. The clinical characteristics of the subjects at the time of nGADA screening are shown in Table 1. All subjects were informed of the purpose of the study, and their consent was obtained. Protocols were approved by the ethics committee of the Nagasaki University. Sera were stored at –20 C until use.

### GADA screening

GADA RIA used for screening of autoimmune diabetes was anti-GAD RIA kit using <sup>125</sup>I-labeled porcine brain native GAD, which contains both GAD65 and GAD67 isoforms (RIP anti-GAD Hoechst; Hoechst-Behring, Tokyo, Japan) as previously described (12). Sera were considered as nGADA-positive if they contained more than 5 U/ml of autoantibody, which is 3 SD above the mean value in 140 normal control subjects. In the fourth GAD antibody workshop, this assay had 100% specificity and 100% sensitivity.

### GAD65A and GAD67A detection

GAD65A and GAD67A were detected by quantitative radio-ligand binding assay using full-length human islet GAD65 and GAD67 cDNA as previously described (13). “Positive” was based on the 99th percentile of sera from 204 healthy control subjects without family history of diabetes. The cutoff indices were an index of 0.028 for GAD65A and 0.071 for GAD67A. The interassay coefficient of variation (CV) and intraassay CV

**TABLE 1.** Clinical characteristics of adult-onset diabetes

	nGADA-positive diabetic patients	nGADA-negative type 2 diabetes patients	P value
n	47	302	
Males	22 (47%)	139 (46%)	N.S.
Age at diagnosis (yr)	48.1 ± 12.5	53.6 ± 11.0	<0.005
Duration of diabetes (yr)	4.9 ± 5.8	8.0 ± 6.8	<0.001
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	22.0 ± 4.1	23.0 ± 3.4	<0.05
HbA <sub>1c</sub> (%)	8.1 ± 2.2	8.1 ± 7.5	N.S.
IAA	12 (26%)	5 (2%)	<0.0001
IA-2icA	7 (15%)	5 (2%)	<0.0001
ZnT8A	9 (19%)	6 (2%)	<0.0001
≥1 autoantibodies <sup>a</sup>	17 (36%)	16 (5%)	<0.0001
≥2 autoantibodies	7 (15%)	0 (0%)	<0.0001
3 autoantibodies	4 (9%)	0 (0%)	<0.0001

Data are expressed as means ± SD or number (percentage). N.S., Not significant; HbA<sub>1c</sub>, glycosylated hemoglobin.

<sup>a</sup> Positive for one or more of IAA, IA-2icA, or ZnT8A.



were 3.3 and 5.3% for GAD65A and 4.1 and 8.8% for GAD67A. In the Diabetes Autoantibody Standardization Program 2005 (DASP 2005), the GAD65A assay had sensitivity of 74% and specificity of 98%.

### IA-2A detection

The cDNAs used for the detection of IA-2A were the complete cytoplasmic region of IA-2 (aa601-979; IA-2ic). IA-2icA were detected by radioligand binding assay as previously described (14). “Positive” for IA-2icA was based on the 99th percentile of sera from 204 healthy control subjects, and the cutoff index was 0.018. In the DASP 2005, the IA-2icA assay had a sensitivity of 68% and specificity of 96%, respectively. Patients were also tested for IA-2<sub>256–760</sub>A, which has been recently reported as a sensitive marker for the detection of islet autoimmunity in adult-onset diabetes (7). The cutoff index for IA-2<sub>256–760</sub>A was 0.097, which was based on the 99th percentile of sera from 102 healthy control subjects.

### IAA detection

IAA assay was carried out by a micro-IAA assay as previously described (15), with some modification. Briefly, in Tris-buffered saline/Tween 20 [TBST; 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1.0% BSA, 0.15% Tween 20], <sup>125</sup>I-insulin (Amersham International, Buckinghamshire, UK) was incubated at 4°C overnight with 5 μl of serum (at a 1:25 dilution) with and without cold human insulin, respectively. After the incubation, 50 μl of a 50% protein A/8% protein G-Sepharose 4FF (Pharmacia, Freiburg, Germany) in TBST was added to the reaction in a Multi-Screen-DV 96-well filtration plate (Millipore, Burlington, MA). After the incubation and washing with cold TBST (0.1% BSA), radioactivity was counted by β-counter in counts per minute. Based on the difference in counts per minute between wells without and with cold insulin, an index was determined with a positivity criterion of 0.010 based on the 99th percentile of sera from healthy control subjects. The interassay CV and intraassay CV were 6.8 and 1.4%, respectively. In the DASP 2005, this assay had sensitivity of 58% and specificity of 98%.

### ZnT8A detection

ZnT8A were determined by radioligand binding assay using human ZnT8 cDNA as described previously (16). The human ZnT8 cDNA construct used in this study was a fusion of the cytoplasmic carboxy-terminal domains (aa268-369) of ZnT8 carrying either 325Trp (TGG) or 325Arg (CGG) with an Ig Cγ3 hinge sequence with three glycine (PSTPPGSSGGG) as linker peptide (pJH4.1). The cutoff index for ZnT8A was 0.007, which was based on the 99th percentile of sera from 139 healthy control subjects. The interassay CV and intraassay CV were 9.6 and 4.6%, respectively.

### GAD65A-specific epitope analysis

Reactivity to conformational epitopes of GAD65 was determined by radioligand binding assays using *in vitro* transcribed and translated <sup>35</sup>S-GAD65/GAD67 chimeric fusion proteins with unlabeled recombinant GAD67 protein as previously described (13). To evaluate the immunoreactivity to the NH<sub>2</sub>-terminal region of GAD65, we used the chimeric constructs designated as GAD65<sub>1–245</sub>/GAD67<sub>253–594</sub>, GAD65<sub>1–360</sub>/GAD67<sub>369–594</sub>, and GAD65<sub>1–245</sub>/GAD67<sub>253–451</sub>/GAD65<sub>443–585</sub>. The middle region epitope was evaluated by GAD67<sub>1–253</sub>/GAD65<sub>245–360</sub>/

GAD67<sub>369–594</sub>, GAD67<sub>1–253</sub>/GAD65<sub>245–585</sub>, and GAD65<sub>1–360</sub>/GAD67<sub>369–594</sub> constructs. The COOH-terminal epitope was evaluated by GAD67<sub>1–451</sub>/GAD65<sub>443–585</sub>, GAD65<sub>1–245</sub>/GAD67<sub>253–451</sub>/GAD65<sub>443–585</sub> and GAD67<sub>1–253</sub>/GAD65<sub>245–585</sub> constructs. To absorb the reactivity to GAD67 epitopes, sera were preincubated with the excess amount (~30 μg) of bacterially produced and purified unlabeled recombinant GAD67, followed by the addition of *in vitro* translated <sup>35</sup>S-labeled to each chimeric protein. Autoantibody levels were expressed as indices using the same positive and negative control serum for all chimeric molecules. The cutoff indices, defined as the 99th percentile of 102 healthy control sera, were an index of 0.036, 0.041, 0.020, 0.024, 0.001, and 0.003 for GAD65<sub>1–245</sub>/GAD67<sub>253–594</sub>, GAD67<sub>1–253</sub>/GAD65<sub>245–585</sub>, GAD67<sub>1–451</sub>/GAD65<sub>443–585</sub>, GAD65<sub>1–360</sub>/GAD67<sub>369–594</sub>, GAD67<sub>1–253</sub>/GAD65<sub>245–360</sub>/GAD67<sub>369–594</sub>, and GAD65<sub>1–245</sub>/GAD67<sub>253–451</sub>/GAD65<sub>443–585</sub>, respectively. To correct for the interassay variation, all GADA-positive samples were analyzed in a single assay. The intraassay CV was 9.0% for GAD65<sub>1–245</sub>/GAD67<sub>253–594</sub>, 7.5% for GAD67<sub>1–253</sub>/GAD65<sub>245–585</sub>, 14.7% for GAD67<sub>1–451</sub>/GAD65<sub>443–585</sub>, 4.6% for GAD65<sub>1–360</sub>/GAD67<sub>369–594</sub>, 2.3% for GAD67<sub>1–253</sub>/GAD65<sub>245–360</sub>/GAD67<sub>369–594</sub>, and 4.6% for GAD65<sub>1–245</sub>/GAD67<sub>253–451</sub>/GAD65<sub>443–585</sub>, respectively.

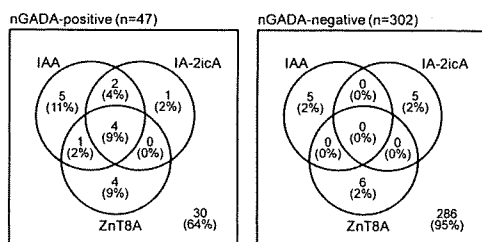
### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using StatView statistical software (version 5.0; SAS Institute, Cary, NC). Results were expressed as mean ± SD unless otherwise indicated. Autoantibody prevalence was compared using the χ<sup>2</sup> test, Fisher’s exact test, and Cochran-Armitage’s test where appropriate. Differences in nonparametric data were tested by Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis test. Kaplan-Meier analysis of time to starting insulin therapy in relation to autoantibody status with a log-rank test was performed. Relative risks (RRs) were calculated from frequency tables comparing multiple autoantibody-positive groups with those negative for all three autoantibodies in nGADA-positive diabetes. Multivariate logistic regression analysis was performed to assess the importance of a high titer of nGADA, the recognition of middle GAD65A epitope, and the presence of multiple islet autoantibodies to the requirement for insulin in nGADA-positive patients. All variables were entered simultaneously into the model. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Clinical characteristics and prevalences of IAA, IA-2icA, and ZnT8A in nGADA-positive and -negative adult-onset diabetes

Clinical characteristics at the time of nGADA screening and the prevalence of IAA, IA-2icA, and ZnT8A in nGADA-positive and -negative patients are shown in Table 1. The adult-onset patients with nGADA were significantly younger at diagnosis and had lower body mass index than nGADA-negative patients with type 2 diabetes (*P* < 0.05; Table 1). The prevalence of IAA, IA-2icA, and ZnT8A in nGADA-positive patients was 26, 15, and 19%, respectively, and was significantly higher than the preva-



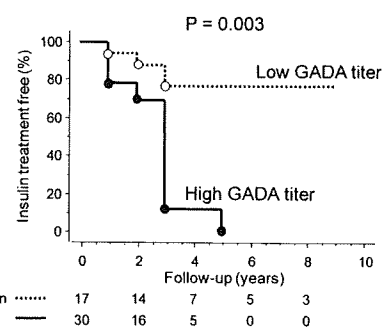
**FIG. 1.** The frequencies of IAA, IA-2icA, and ZnT8A in nGADA-positive and -negative adult-onset diabetes patients initially diagnosed as having type 2 diabetes.

lence in nGADA-negative patients ( $P < 0.0001$ ; Table 1). Among nGADA-positive patients, 30 (64%) patients had positive results for nGADA alone and 17 (36%) for nGADA with one or more of IAA, IA-2icA, or ZnT8A (Table 1 and Fig. 1). However, none of the nGADA-negative patients had a positive result for more than one of these autoantibodies (Fig. 1).

#### GAD65A-specific epitope reactivity in nGADA-positive patients

Sixteen of 47 (34%) nGADA-positive patients had a GAD67A index above the 99th percentile of healthy controls. Because construction of the chimeras for expression of GAD65 epitopes incorporated regions of GAD67, all samples positive for GAD67A were preincubated with the excess amount of recombinant GAD67 protein before the GAD65A-specific epitope analyses. The most frequent epitope pattern was reactivity to both the COOH-terminal (amino acids 443-585) and middle regions (amino acids 245-360) [30 of 47 (64%)] and seven of 30 (23%) patients also had reactivity to the NH<sub>2</sub>-terminal region (amino acids 1-245). One (2%) and 13 (28%) of 47 nGADA-positive patients recognized the middle and COOH-terminal region alone, respectively. No reactivity to any of the epitopes of GAD65 could be detected in three patients.

nGADA titers were associated with the recognition of GAD65A-specific epitopes. The median titer of nGADA in patients reacted with the middle (168.0 U/ml) and NH<sub>2</sub>-terminal (300.0 U/ml) epitope region was significantly higher than in patients without reactivity (10.0 U/ml,  $P < 0.0001$ ; and 38.0 U/ml,  $P < 0.05$ , respectively) (Supplemental Table 1, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). Of note, all of the patients reacted with NH<sub>2</sub>-terminal epitope had nGADA titer above the 50th percentile of nGADA-positive patients (43.0 U/ml). Furthermore, the number of epitopes was also associated with nGADA titer, *i.e.* patients with all three epitopes had the highest nGADA titer (Supplemental Table 2). However, there were no associations between GAD65A-epitope recognition and clinical phenotypes among nGADA-positive patients. Moreover, no significant dif-



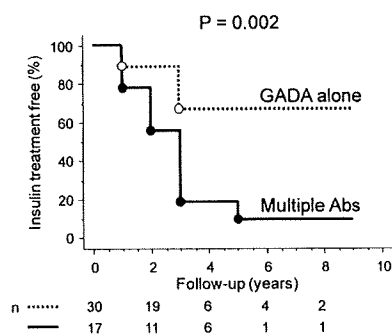
**FIG. 2.** Kaplan-Meier plot of the proportion of nGADA-positive patients requiring insulin therapy classified according to the titer of nGADA. High GADA titer, nGADA of at least 20 U/ml; low GADA titer, nGADA below 20 U/ml.  $P$  value was evaluated by a log-rank test.

ferences were seen in the frequencies of IAA and/or IA-2icA and/or ZnT8A between patients with and without NH<sub>2</sub>-terminal, middle or COOH-terminal region reactivity as well as number of epitopes (Supplemental Tables 1 and 2).

#### Relationship of humoral autoreactivity to disease progression

Seventeen of 47 (36%) nGADA-positive patients subsequently required insulin therapy during the follow-up period (median, 2.0 yr, range, 1.0–9.0 yr). “Insulin requirement” was defined as the clinical need to commence insulin therapy in patients whose glycemic control became unacceptable despite oral hypoglycemic agents. As expected, high titer of nGADA was associated with the requirement of insulin therapy (log-rank  $P = 0.003$ ; Fig. 2) (10). Furthermore, the middle epitope recognition of GAD65A marked the risk for requirement of insulin therapy (log-rank  $P = 0.002$ ; Supplemental Fig. 1). However, the presence or absence of NH<sub>2</sub>- or COOH-terminal epitope was not associated with early insulin requirement (data not shown).

The prevalence of nGADA-positive patients who had been started on insulin therapy during the follow-up was 75% (nine of 12), 71% (five of seven), or 67% (six of nine) in IAA-, IA-2icA-, or ZnT8A-positive patients, respectively. The presence of IAA was marginally associated with the early requirement of insulin therapy in nGADA-positive patients by Kaplan-Meier analysis (log-rank  $P = 0.04$ ). However, the presence of either IA-2icA or ZnT8A was not associated with increased risk of disease progression (data not shown). Given the combined analysis of IAA, IA-2icA, and ZnT8A, the risk of early insulin requirement in patients with one or more of these autoantibodies significantly increased *vs.* patients with nGADA alone (log-rank  $P = 0.002$ ; Fig. 3). The prevalence of nGADA-positive patients who had been started on insulin therapy was 17% (five of 30) in patients with nGADA alone, compared with 70% (seven of 10), 67% (two



**FIG. 3.** Kaplan-Meier plots of the proportion of nGADA-positive patients requiring insulin therapy classified according to the simultaneous presence of one or more of IAA, IA-2icA, or ZnT8A. GADA alone, nGADA single positive; multiple Abs, IAA and/or IA-2icA and/or ZnT8A positive in addition to nGADA. P value was evaluated by a log-rank test.

of three), or 75% (three of four) in patients with one, two, or three of IAA, IA-2icA, and ZnT8A, respectively. IA-2<sub>256–760</sub>A were detected in 16 of 47 (34%) nGADA-positive patients, a higher percentage *vs.* IA-2icA (15%; *P* < 0.05) as recently reported (7), but were not associated with the risk for insulin requirement (data not shown). The prevalence of IA-2<sub>256–760</sub>A in nGADA-negative patients was 10.9% (33 of 302), which is significantly lower than that in nGADA-positive patients (*P* < 0.0001).

Next, we analyzed the relationship of the risk of early insulin requirement to nGADA titer, the recognition of GAD65A-specific epitopes, and the presence of multiple islet autoantibodies (Table 2). The prevalence of insulin-requiring diabetes in patients with multiple islet autoantibodies (IAA, IA-2icA, ZnT8A) was significantly higher than that in nGADA single-positive patients both in the high nGADA titer group [RR, 3.81; 95% confidence interval (CI), 1.30–11.13; *P* = 0.004] and in the middle GAD65A epitope-positive group (RR, 3.56; 95% CI, 1.21–10.48; *P* = 0.007). Multivariate logistic regression analysis of the likelihood of requiring insulin showed that only the presence of multiple islet autoantibodies was a significant predictor (odds ratio, 13.8; 95% CI, 2.77–68.45; *P* = 0.001) in nGADA-positive patients (Table 3).

**TABLE 3.** Multivariate logistic regression analysis for the association of islet autoantibody status with early insulin requirement among nGADA-positive patients

Variable	Insulin requirement		
	OR	95% CI	P value
High GADA titer	0.61	0.05–6.91	0.652
Middle GAD65A epitope-positive	12.03	0.64–224.9	0.096
Multiple islet autoantibody-positive	13.77	2.77–68.45	0.001

All variables were entered simultaneously into the model. High GADA titer, nGADA ≥ 20 U/ml; multiple islet autoantibody-positive, positive for one or more of IAA, IA-2icA, or ZnT8A in addition to nGADA. OR, Odds ratio.

### Discussion

This study shows that: 1) the presence of two or more of IAA, IA-2icA, and ZnT8A is highly specific for nGADA-positive patients; 2) the middle and NH<sub>2</sub>-terminal epitopes are associated with high nGADA titer; and 3) the presence of one or more of IAA, IA-2icA, or ZnT8A marks the risk for insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes.

Among 47 patients with nGADA, 15–25% had positive results for IAA, IA-2icA, or ZnT8A, and 36% for one or more of these autoantibodies. However, none of the nGADA-negative patients had a positive result for more than one of these autoantibodies. These results indicate that the presence of two or more of IAA, IA-2icA, and ZnT8A is highly specific and screening of these autoantibodies will be helpful only among those nGADA-positive patients, suggesting that GADA may still be the first screening tool and the other autoantibodies will be the second tool. Furthermore, this study demonstrated that IAA and ZnT8A, reported as autoantibodies associated with childhood-onset type 1 diabetes, are also useful markers to be analyzed in patients with adult-onset autoimmune diabetes initially diagnosed as having type 2 diabetes.

Anti-islet autoantibodies including GADA are polyclonal, and determination of conformational epitopes of GAD65A has been suggested as a method for differenti-

**TABLE 2.** Prevalence of insulin-requiring diabetes in patients with high nGADA titer or GAD65A middle epitope subdivided for presence of IAA, IA-2icA, and ZnT8A

	Insulin-requiring diabetes, n (%)		RR	95% CI	P value
	Multiple islet autoantibody-positive	nGADA single-positive			
Total	12/17 (71%)	5/30 (17%)	4.24	1.80–9.98	0.0002
High GADA titer	10/13 (77%)	4/17 (24%)	3.81	1.30–11.13	0.004
Middle GAD65A epitope-positive	10/13 (77%)	5/18 (28%)	3.56	1.21–10.48	0.007

High GADA titer, nGADA ≥ 20 U/ml; multiple islet autoantibody-positive, positive for one or more of IAA, IA-2icA, or ZnT8A in addition to nGADA.

ation of disease and/or progression in adult-onset diabetes (2, 5). Autoantibody epitopes on GAD65 engage conformational determinants that are widely distributed over the linear sequence of the NH<sub>2</sub>-terminal, middle, and COOH-terminal domains (17–19). We demonstrated that major GAD65A epitopes in adult-onset autoimmune diabetes locate in the middle and COOH-terminal domains and the reactivity to NH<sub>2</sub>-terminal epitope is essentially associated with higher titer of nGADA. Our findings contrasted with some previous studies in which NH<sub>2</sub>-terminal epitope was associated with nondiabetic subjects, but not in patients with type 1 diabetes, in a Caucasian population (4, 17–20). The discrepancy between these findings and those of the present study could be related to the elimination of GAD67A-positive sera (4), determination of GAD65A epitopes without preabsorbing the GAD67A reactivity (4, 5) in the previous studies, or different genetic background. Indeed, none of the GAD67A-negative sera bound to NH<sub>2</sub>-terminal epitope in our study. However, our data are consistent with the evidence that GAD65/67 reactive sera have broader epitope reactivity than GAD65-specific sera (20), that the presence of NH<sub>2</sub>-terminal GAD65A was strongly associated with that of GAD67A and high levels of GAD65A (5), and that NH<sub>2</sub>-terminal GAD65A-positive sera were also positive for both GAD65A middle- and COOH-terminal epitopes (5).

Identification of better predictive markers associated with disease progression in patients with adult-onset autoimmune diabetes could assist with maintenance of good glycemic control and hence avoidance of diabetic complications. It has been reported that high titer of GADA and GAD65A epitope act as predictive markers of future insulin insufficiency in adult-onset autoimmune diabetes (5, 10, 21, 22). Here, we demonstrated that the presence of middle-epitope GAD65A and multiple islet autoantibodies is associated with early insulin requirement (Fig. 3 and Supplemental Fig. 1). Furthermore, our study showed that more than 90% of patients with middle-epitope GAD65A have a high titer of GADA (Supplemental Table 1), which may explain the previously identified association between the GADA titer and future insulin insufficiency. The additional determination of IAA, IA-2icA, and ZnT8A might discriminate the higher risk patients for early requirement of insulin therapy independent of high GADA titer or middle GAD65A epitope. However, the number of patients with GADA studied is relatively small, which could bring on the low statistical power to assess the risk for insulin requirement especially in IA-2icA- and ZnT8A-positive subjects. Therefore, further studies using a larger number of subjects are required to establish the strategy for the prediction of future  $\beta$ -cell failure in adult-onset autoimmune diabetes.

## Acknowledgments

This paper is reported on behalf of the West Japan (Kyushu, Yamaguchi, and Osaka) Study for GAD Autoantibody-Diabetes; the list of participating centers and physicians has been previously published (10, 14). We thank Masaki Miwa for his skillful technical assistance. Vector pJH4.1 and IA-2<sub>256–760</sub> cDNA were kindly provided by Dr. John Hutton and Dr. George Eisenbarth (Barbara Davis Center for Childhood Diabetes, University of Colorado at Denver and Health Sciences Center, Aurora, CO), respectively.

Address all correspondence and requests for reprints to: Eiji Kawasaki, M.D., Ph.D., Department of Metabolism/Diabetes and Clinical Nutrition, Nagasaki University Hospital, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan. E-mail: eijkawa@nagasaki-u.ac.jp.

This study was partly supported by a grant from the Ministry of Education, Culture, Science, Sports and Technology of Japan.

Disclosure Summary: All authors have nothing to disclose.

## References

- Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, Lang DA 1994 Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med* 11: 299–303
- Kobayashi T, Tanaka S, Okubo M, Nakanishi K, Murase T, Lernmark A 2003 Unique epitopes of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in slowly progressive type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4768–4775
- Buzzetti R, Di Pietro S, Giacari A, Petrone A, Locatelli M, Suraci C, Capizzi M, Arpi ML, Bazzigaluppi E, Dotta F, Bosi E 2007 High titer of autoantibodies to GAD identifies a specific phenotype of adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Care* 30:932–938
- Desai M, Cull CA, Horton VA, Christie MR, Bonifacio E, Lampasona V, Bingley PJ, Levy JC, Mackay IR, Zimmet P, Holman RR, Clark A 2007 GAD autoantibodies and epitope reactivities persist after diagnosis in latent autoimmune diabetes in adults but do not predict disease progression: UKPDS 77. *Diabetologia* 50:2052–2060
- Falorni A, Gambelunghe G, Forini F, Kassi G, Cosentino A, Candeloro P, Bolli GB, Brunetti P, Calcinaro F 2000 Autoantibody recognition of COOH-terminal epitopes of GAD65 marks the risk for insulin requirement in adult-onset diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 309–316
- Maioli M, Alejandro E, Tonolo G, Gilliam LK, Bekris L, Hampe CS, Obinu DA, Manconi A, Puddu L, Lynch K, Lernmark A 2004 Epitope-restricted 65-kilodalton glutamic acid decarboxylase autoantibodies among new-onset Sardinian type 2 diabetes patients define phenotypes of autoimmune diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5675–5682
- Tiberti C, Giordano C, Locatelli M, Bosi E, Bottazzo GF, Buzzetti R, Cucinotta D, Galluzzo A, Falorni A, Dotta F 2008 Identification of tyrosine phosphatase 2(256–760) construct as a new, sensitive marker for the detection of islet autoimmunity in type 2 diabetic patients: the non-insulin requiring autoimmune diabetes (NIRAD) study 2. *Diabetes* 57:1276–1283
- Kasuga A, Maruyama T, Nakamoto S, Ozawa Y, Suzuki Y, Saruta T 1999 High-titer autoantibodies against glutamic acid decarboxylase plus autoantibodies against insulin and IA-2 predicts insulin requirement in adult diabetic patients. *J Autoimmun* 12:131–135
- Bottazzo GF, Bosi E, Cull CA, Bonifacio E, Locatelli M, Zimmet P,