

201024145A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 花房 俊昭

平成23（2011）年4月

# 目 次

## I. 研究班名簿

## II. 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

## III. 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. 劇症1型糖尿病患者における Class II HLA の検討 . . . . . 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 . . . . . 17  
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 . . . . . 20  
大澤 春彦
7. 1型糖尿病の遺伝子因子の研究 . . . . . 22  
栗田 卓也
8. 劇症1型糖尿病の膵島関連自己抗体に関する研究 . . . . . 24  
川崎 英二  
(資料)図1・図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. 樹状細胞および自己抗原ペプチドを用いた1型糖尿病発症抑制の検討 . . . . . 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 . . . . . 34  
西村 保一郎

## IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 35

## V. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 39

# I . 研究班名簿

## 『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22年度研究班名簿

区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	花房 俊昭	大阪医科大学医学部 内科学 I	教授
研究分担者	小林 哲郎	山梨大学大学院医学工学総合研究部 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	国立国際医療研究センター研究所 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	長崎大学病院 生活習慣病予防診療部	准教授
	島田 朗	東京都済生会中央病院 内科(慶應義塾大学 内科 非常勤講師)	部長
	永田 正男	加古川市民病院 糖尿病内科	副院長
西村 保一郎	大阪医科大学医学部 数学	教授	
研究協力者	内潟 安子	東京女子医科大学 糖尿病センター	教授
	大久保 実	虎の門病院 内分泌代謝科	医長
	梶尾 裕	国立国際医療研究センター 糖尿病・代謝症候群診療部 糖尿病科	医長
	鴨井 久司	新潟県立大学 健康栄養学科	教授
	川畑 由美子	近畿大学医学部 内分泌・代謝・糖尿病内科	准教授
	佐藤 譲	岩手医科大学医学部内科学講座 糖尿病代謝内科分野	教授
	清水 一紀	愛媛県立中央病院 糖尿病内分泌代謝科	部長
	高橋 和真	岩手医科大学医学部内科学講座 糖尿病代謝内科分野	講師
	田中 昌一郎	山梨大学大学院医学工学総合研究部 第三内科	医員
	中西 幸二	フジ虎ノ門整形外科病院 内科	部長
	藤井 寿美枝	石川県立中央病院 糖尿病・内分泌内科	部長
	牧野 英一	白石病院 糖尿病センター	センター長
	丸山 太郎	埼玉社会保険病院 内科	副院長
	村尾 敏	KKR 高松病院 糖尿病内分泌内科	医長
	三浦 順之助	東京女子医科大学 糖尿病センター	助教

※平成22年4月1日現在

## II . 総括研究報告

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 内科学Ⅰ 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、健常者においてゲノムワイド関連解析を引き続き施行した。昨年度見出された複数の関連する SNP において、二次パネルを用いた replication study を施行した。現在得られた5つの候補 SNP について、次年度以降検証を進める予定である。

研究分担者（平成23年3月1日現在）

小林哲郎  
山梨大学大学院医学工学総合研究部  
第三内科 教授

島田 朗  
東京都済生会中央病院 内科 部長  
慶應義塾大学 内科 非常勤講師

池上博司  
近畿大学医学部  
内分泌・代謝・糖尿病内科 教授

永田正男  
加古川市民病院 副院長

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 講師

西村保一郎  
大阪医科大学医学部 数学 教授

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  
国立国際医療研究センター国府台病院  
肝炎・免疫研究センター 上級研究員  
東京大学大学院医学系研究科  
人類遺伝学 客員研究員

安田和基  
国立国際医療センター研究所  
糖尿病研究センター 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

粟田卓也  
埼玉医科大学 内分泌・糖尿病内科 教授

川崎英二  
長崎大学病院 生活習慣病予防診療部 准教授

## 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。

## B. 研究方法

### ゲノムワイド関連解析 (GWAS) による鍵分子候補の同定

昨年度、本研究班において、Affymetrix 社製 SNP Array 6.0 アレイを用いた約 90 万種の SNPs のタイピングを行った。劇症1型糖尿病患者群 97 名と健常対照群 184 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 299 名（うち、急性発症 203 名、緩徐発症 96 名）の3群について、ゲノムワイド関連解析を実施した。

得られた結果から、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 623 SNPs が選定された。

さらにこの 623 SNPs の散布図を確認し、SNP Array 6.0 アレイによる解析に問題がなかったことが確認された 606 SNPs を選定した。

本年は、上記 606 SNPs を対象に、replication study として、DigiTag2 法を用いたタイピングを行った。具体的には 96-plex を 6 セット (pj210-1~6)、32-plex を 1 セット (pj210-7) デザインし、評価実験を行った上で、二次パネル検体 (Replication study 用検体) を用いた解析を行った。二次パネルとして、GWAS (一次パネル) に使用した検体とは別に、新たに劇症1型糖尿病患者群 117 名と健常対照群 357 名、β自己免疫性1型糖尿病 321 名（うち、急性発症 207 名、緩徐発症 114 名）を準備した。

二次パネルでさらに有力と考えられた SNP については、TaqMan 法による SNP タイピングを実施し、Replication study の結果を検証した。ここで用いた検体は、一次パネルと二次パネルを併せたものである。

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) を用いた。

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  $HbA_{1c}$  値  $< 8.5\%$  である。
3. 発症時の尿中 C ペプチド  $< 10\text{ng/day}$ 、または、空腹時血清 C ペプチド  $< 0.3\text{ng/ml}$  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  $< 0.5\text{ng/ml}$  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。

(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

#### ゲノムワイド関連解析 (GWAS) による鍵分子候補の同定

##### 1) 二次パネルの検討結果

DigiTag2 法を用いた Replication study の結果、劇症 1 型糖尿病との関連が認められる複数の遺伝子領域を検出した。

表 2 Replication study の結果 (一部)

No	遺伝子 (SNP)	自己免疫性との重複	DigiTag2 P 値
pj210-1	SNP09	no	0.0146
pj210-2	なし	-	-
pj210-3	SNP44	no	8.43E-03
pj210-4	SNP50	no	2.42E-05
pj210-4	SNP68	no	7.10E-05
pj210-4	SNP80	no	6.43E-05
pj210-5	施行中	-	-
pj210-6	施行中	-	-
pj210-7	なし	-	-

##### 2) TaqMan 法によるタイピングデータの検証

上記の 5 つの SNP において、TaqMan 法によるタイピング結果の検証を実施した。

その一部である SNP09 の結果を表 3 示す。この SNP は GWAS の一般的な有意水準である  $P < 10^{-8}$  レベルには達していないが、診断マーカー候補の 1 つと考えることができる。

表 3 SNP09 の TaqMan 法による検証結果

SNP09	Fulminant			Healthy Ctrl			P-value *	OR (95% CI)
	AA	AB	BB	AA	AB	BB		
GWAS	5	38	46	33	102	65	$5.63 \times 10^{-4}$	0.51 (0.35-0.75)
Replication	10	56	51	58	178	118	0.0140	0.68 (0.50-0.93)
Combine	15	94	97	91	280	183	$3.63 \times 10^{-5}$	0.600.60 (0.47-0.77)

\* アレル頻度モデルにおけるカイ二乗検定を実施

### D. 考察

現在までの解析の結果、ゲノムワイド関連解析により検出された 606 SNPs の候補領域のうち、414 SNPs を対象とした SNP タイピングが終了し、387 SNPs に対する統計解析を実施した。ゲノムワイド関連解析の有意水準に達する遺伝子領域は検出されなかったが、有望な遺伝子領域が複数箇所検出された。

今後は残る 192 SNPs について DigiTag2 法を用いた replication study を進める。また、有望とされる 5 SNPs については、さらに検体数を増やした replication study を実施するとともに、周辺の SNP を含めた更に詳細な解析を行う必要があると考えられる。

### E. 結論

ゲノムワイド関連解析により、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. 研究危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

今川彰久、花房俊昭  
劇症1型糖尿病 臨床病理  
58(3):216-224, 2010

Sano H, Hanafusa T et al. Exenatide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, suppresses pancreatic beta-cell destruction induced by encephalomyocarditis virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;404(3):756-61.

Uno S, Hanafusa T, et al. Expression of chemokines, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) and CXCR3 in the inflamed islets of patients with recent-onset autoimmune type 1 diabetes. *Endocr J.* 2010 Nov 30;57(11):991-6

Shibasaki S, Imagawa A, Terasaki J, Hanafusa T. Endogenous insulin secretion even at a very low level contributes to the stability of blood glucose control in fulminant type 1 diabetes. *J Diabetes Invest* 2010;1(6):283-285.

Koga M, Hanafusa T, et al. Correlation of glycosylated albumin but not hemoglobin A1C with endogenous insulin secretion in fulminant type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Invest* 2010;1(6):279-282.

Koga M, Hanafusa T, et al. Serum 1,5-anhydroglucitol levels in patients with fulminant type 1 diabetes are lower than those in patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem.* 2010 Oct;43(15):1265-7.

Koga M, Hanafusa T, et al. Serum glycosylated albumin to haemoglobin A(1C) ratio can distinguish fulminant type 1 diabetes mellitus from type 2 diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem.* 2010 Jul;47(Pt 4):313-7.

Shibasaki S, Hanafusa T, et al. Expression of toll-like receptors in the pancreas of recent-onset fulminant type 1 diabetes. *Endocr J.* 2010 Apr 2;57(3):211-9.

2. 学会発表

Tsutsumi C, Hanafusa T, et al. Differences in class II HLA haplotype within fulminant type 1 diabetes with or without GAD. 70th scientific sessions of American Diabetes Association, Orlando, FL, USA, 2010 Jun.

Haseda F, Hanafusa T, et al. Reduced expression of intracellular CTLA-4 in regulatory T cells from patients with fulminant type 1 diabetes. 70th scientific sessions of American Diabetes Association, Orlando, FL, USA, 2010 Jun.

Tetsuya H, Ibata R, Tanimoto K, Yamamoto N, Terasaki J, Azuma H, Imagawa A, Hanafusa T. Acute cerebral hemorrhage normalized plasma renin activity in a patient with primary aldosteronism. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan 2010 Mar.

Tanimoto K, Hizuka N, Hiraiwa T, Terasaki J, Hanafusa T. Response of growth hormone compared between growth hormone-releasing peptide-2 test and glucagon stimulation test in adults. The Fifth International Congress of the GRS and IGF Society, New York, USA. 2010 Oct.

Tsutsumi C, Imagawa A, Ikegami H, Makino H, Kobayashi T, Hanafusa T. Relationship between HLA-DR-DQ genotypes and GAD antibody status in Fulminant type 1 diabetes. The 11th International Congress of the Immunology of Diabetes Society, Incheon, Korea, 2010 Nov.

Haseda F, Imagawa A, Kuwata S, Mishiba Y, Ueda H, Terasaki J, Hanafusa T. Reduced Expression of Intracellular CTLA-4 in Regulatory T-cells from Patients with Fulminant Type 1 Diabetes. The 11th International Congress of the Immunology of Diabetes Society, Incheon, Korea, 2010 Nov.

堤 千春、今川彰久、長谷田文孝、谷本啓爾、佐野寛行、中川聖子、澤木秀明、三柴裕子、平岩哲也、大西峰樹、寺前純吾、花房俊昭  
CGMを用いた1型糖尿病における血糖変動指標の評価  
第53回日本糖尿病学会年次学術集会  
2010.5 岡山

大西峰樹、市原登、酒井聡至、上田博文、谷本啓爾、佐野寛行、澤木秀明、平岩哲也、寺前純吾、花房俊昭、上田一仁  
高齢者SPIDDM患者におけるSubcutaneous insulin resistance (SIR)の1例  
第53回日本糖尿病学会年次学術集会  
2010.5 岡山

重本 翔、大西峰樹、寺前純吾、花房俊昭  
妊娠中に発症した自己免疫性1型糖尿病の1例  
第17回小児思春期糖尿病談話会  
2010 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型糖尿病における抗GAD抗体とHLAの関連  
第8回1型糖尿病研究会:2010.10 長

崎

長谷田文孝、今川彰久、三柴裕子、寺前純吾、花房俊昭  
劇症1型糖尿病における末梢血制御性T細胞内のCTLA-4発現の検討  
第8回1型糖尿病研究会:2010.10 長崎

重本 翔、大西峰樹、忌部 尚、高本晋吾、宮脇正博、堤 千春、佐野寛行、三柴裕子、寺前純吾、花房俊昭、藤田大輔、山下能毅、亀谷英輝、大道正英  
妊娠中に発症した自己免疫性1型糖尿病の1例  
第8回1型糖尿病研究会:2010.10 長崎

長澤紗詠子、忌部 尚、宮里 舞、宮脇正博、高本晋吾、堤 千春、佐野寛行、三柴裕子、大西峰樹、寺前純吾、花房俊昭  
インターフェロン $\alpha$  + リバビリン併用療法中に1型糖尿病と間質性肺炎を発症した一例  
第47回日本糖尿病学会近畿地方会  
2010.11 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

### Ⅲ. 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 山梨大学医学部教授

**研究要旨** 発症直後の劇症1型糖尿病（FT1D）患者剖検膵において Enterovirus 感染時の innate immunity に関し検討したところ、膵β細胞にウイルスセンサーである RIG-I, MDA5 が強発現し、IFN- $\alpha$ , MHC-class1 分子が発現していた。また CXCL-10, IL-18, IFN- $\gamma$  も発現がみられた。本疾患に自然免疫の関与が示唆された。

#### A. 研究目的

Enterovirus による劇症1型糖尿病（Fulminant type 1 diabetes : FT1D）における特徴的病理所見、血中 interferon (IFN) - $\gamma$  の所見はいまだ不明である。

#### B. 研究方法

我々がすでに報告した FT1D 患者の剖検膵を用いて、 $\beta$ 細胞における innate immune receptor との下流のマーカーにつき検討した。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

患者 $\beta$ 細胞には、enterovirus が感染し、innate immunity の受容体である RIG-I, MDA5 が強く発現していた。膵島細胞には IFN- $\alpha$ , - $\beta$  1, MHC-class-I が発現していた。さらに cytokine の IFN- $\gamma$ , IL-18, chemokine の CXCL10 が $\beta$ 細胞に共発現していた。CD11c + 樹状細胞が $\beta$ 細胞を貪食する所見が認められた。免疫調節性のT細胞（Treg）は、膵島の中および周囲には認められなかった。 $\beta$ 細胞は、

Fas を発現し、Fas-ligand 陽性細胞が、膵島に浸潤していた。Caspase-8, -9 および、-3 が $\beta$ 細胞に特異的に発現し、apoptosis の像を呈していた。FT1D 患者の末梢血中 IFN- $\gamma$  は健常者の約3倍増加していた。

#### D. 考察

FT1D は、多くの場合ウイルス感染症によって惹起されるが、その最初のステップは RIG-I, MDA5 であることが明らかとなった。さらにこのような受容体を経て、1型インターフェロンの産生が促進され、さらに樹状細胞の活性化、MHC class1 の発現が起こることが明らかとなった。その結果、自己免疫的機序が亢進し、CXCL10, IFN- $\gamma$ , IL-18 が $\beta$ 細胞に発現することによって、Fas-FasL 経路およびその他の経路を経て、 $\beta$ 細胞のアポトーシスに至ることが明らかとなった。また Treg の機能も、低下しているため T 細胞による $\beta$ 細胞の破壊が急速に進行する可能性も示唆された。FT1D 患者の血中 IFN- $\gamma$  濃度を測定することにより、 $\beta$ 細胞の破壊機序が、推計できる可能性が示唆された。

## E. 結論

Enterovirus 感染が関係する FT1D では, innate immunity のセンサーは RIG-I, MDA5 が関係していることが明らかとなった. innate immunity の活性化によって自己免疫的機序が活性化され, 急激な  $\beta$  細胞破壊をきたすことが示唆された.

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Aida K, Nishida Y, Tanaka S, Maruyama T, Shimada A, Awata T, Suzuki M, Shimura H, Takizawa S, Ichijo M, Akiyama D, Furuya F, Kawaguchi A, Kaneshige M, Itakura J, Fujii H, Endo T, Kobayashi T.

RIG-I- and MDA5-Initiated Innate Immunity Linked With Adaptive Immunity Accelerates  $\beta$ -Cell Death in Fulminant Type 1 Diabetes.

*Diabetes*. 2011 Feb 2. [Epub ahead of print]

## 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

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、ランダムマーカーアプローチ（ゲノムワイド関連解析）による疾患感受性遺伝子の同定・解析を進めた。一次スクリーニングの結果、ゲノムワイドの有意水準で関連を示したのはHLAのみであった。ゲノムワイドの有意水準は満たさないが疾患との関連が示唆されるSNPのうちいくつかは二次パネルにおいても関連が再現された。これらが真の疾患感受性遺伝子であるか否かを三次パネルで検証するとともに、微細マッピング・遺伝子同定を進める予定である。

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、昨年度報告した候補遺伝子アプローチによるHLA領域の詳細解析に加えて、ランダムマーカーアプローチ（ゲノムワイド関連解析）による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。

患者群：842名、対照群 541名

一次パネル：

患者（1型糖尿病）396名

（劇症97、急性発症203、緩徐進行96）

対照 184名

二次パネル：

患者（1型糖尿病）438名

（劇症117、急性発症207、緩徐進行114）

対照 357名

【方法】

一次パネルを対象として、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）。一次パネルで関連が示唆されたSNP ( $P < 1 \times 10^{-4}$ ) 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623SNPの散布図を確認、問題のなかった606SNPに関して二次パネル解析へと供した。

（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・遺伝子解析研究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

一次パネルを用いた 90 万 SNP との全ゲノム関連解析の結果、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。

方法の項の基準で抽出した SNP のうちで特に関連の強い SNP をファーストトラックとして二次パネル用を用いた解析に供した結果、複数の SNP と疾患の関連が示唆された。これらが真の関連か否かを三次パネルで検証するとともに、ファーストトラックにかけなかった候補 SNP に関して二次パネルでの解析を進めている。

### D. 考察

1 型糖尿病発症頻度の低いアジア系人種においては症例数に限りがあることからゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行うことは容易でない。このため、これまでの GWAS に関する報告は欧米の 2 グループからのものに集約されており、両者間では一部サンプルの重複も認められている。関連が認められた遺伝子座の微細マッピングならびに遺伝子本体の同定はこれら欧米のサンプルだけでは必ずしも容易ではなく、これを解消するために遺伝背景・連鎖不平衡が異なる人種における GWAS が不可欠である。アジア系人種では世界初となる今回の GWAS 研究は、この点で極めて重要であり、表現型・連鎖不平衡などの点で欧米とは大きく異なる日本人における解析結果が世界の 1 型糖尿病遺伝子研究をも大きく前進させることが期待される。特に、劇症 1 型糖尿病は欧米では極めて稀な疾患で、日本における症例登録が諸外国とは比較にならないほど進んでいることから、劇症 1 型糖尿病の GWAS は我が国においてのみ実現可能な画期的プロジェクトである。各サブタイプと真に関連を示す SNP の同定を今後進めることにより、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

ゲノムワイド関連解析の結果、劇症 1 型糖尿病と最も強く関連を示す疾患感受性遺伝子は HLA 領域に存在すること、これに匹敵する遺伝子は HLA 以外には存在しないことが示された。ゲノムワイドの有意水準は満たさないが疾患との強い関連が示唆される SNP が HLA 以外の領域に複数見いだされ、これらのうちいくつかは二次パネルにおいても関連が再現された。これらが真の疾患感受性遺伝子であるか否かを三次パネルを用いて検証するとともに、微細マッピングから遺伝子の本体同定を今後進める予定である。

### F. 健康危険情報 なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Noso S, Kataoka K, Kawabata Y, Babaya N, Hiromine Y, Yamaji K, Fujisawa T, Aramata S, Kudo T, Takahashi S, Ikegami H:

Insulin transactivator MafA regulates intra-thymic expression of insulin and affects susceptibility to type 1 diabetes.

*Diabetes* 59 (10):2579-87, 2010

Moriguchi M, Noso S, Kawabata Y, Yamauchi T, Harada T, Komaki K, Babaya N, Hiromine Y, Ito H, Yamagata S, Murata K, Higashimoto T, Park C, Yamamoto A, Ohno Y, Ikegami H:

Clinical and genetic characteristics of patients with autoimmune thyroid disease with anti-islet autoimmunity.

*Metabolism* 2011 (in press)

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* 53:1362-1371, 2010

Miyazaki S, Ikegami H, et al.:  
Nuclear hormone receptor RXR  
negatively regulates the  
glucose-stimulated insulin  
secretion of pancreatic  $\beta$ -Cells.  
*Diabetes* 59 (11):2854-61, 2010

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

Takeuchi F, Ikegami H, et al.:  
Association of obesity  
susceptibility genetic variants with  
type 2 diabetes in the Japanese.  
*Diabetologia* 2011 (in press)

## 2. 学会発表

### 1) 国内

池上博司 :

シンポジウム: 1型糖尿病の新しい展  
開

「1型糖尿病の分子遺伝子:  
up-to-date 2010」

第53回日本糖尿病学会年次学術集  
会、岡山、5/27, 2010

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

「1型糖尿病診療・研究の新知見」  
第8回1型糖尿病研究会、長崎、10/10,  
2010

川畑由美子、池上博司ほか

1型糖尿病濃厚発症家系における疾患  
感受性遺伝子解析—rare variantの探  
索—

第53回日本糖尿病学会年次学術集会  
岡山、5/27, 2010

能宗伸輔、池上博司ほか

インスリン転写調節因子MafAは胸腺  
におけるインスリン発現と1型糖尿  
病疾患感受性に関与する  
第60回日本体質医学会総会  
熊本、10/16, 2010

### 2) 海外

Kawabata Y, Ikegami H et al. Genetic  
basis for strong familial  
clustering of type 1 diabetes in a  
rare Japanese multiplex family.  
11th International Congress of the  
Immunology of Diabetes Society,  
Inchon, Korea. October 31, 2010

Noso S, Ikegami H et al. MafA is a  
key regulator of insulin expression  
in the thymus.

46th Annual Meeting of the European  
Association of Study Group of  
Diabetes, Stockholm, Sweden.  
September 21, 2010

## 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

劇症1型糖尿病患者におけるClass II HLAの検討

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 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、Class II HLA 遺伝子型について検討した。その結果、*DRB1\*0405-DQB1\*0401* および *DRB1\*0901-DQB1\*0303*が劇症1型糖尿病において有意に高頻度であることが明らかになった。

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。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HbA1c値<8.5%(JDS値)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、の3項目が現在の診断基準である。しかし、確実な診断のためには特異的なマーカーの開発が必要であり、1つのマーカーだけではなく、複数のマーカーを組み合わせて、より高感度、高特異度の診断基準を作成することが望ましいと考えられる。

Class II HLAは劇症1型糖尿病との関連が指摘されており、劇症1型糖尿病全国調査におけるHLA血清型の調査では、HLA DR4-DQ4を有する患者を多数認めることが報告されている(Diabetologia 2005)。しかし、HLA遺伝子型についての報告は、単独施設の少数の患者を対象としたものが散見されるのみである。遺伝子型は血清型に比べ、詳細な分類が可能で特異度が高いことが予想される。そこで、劇症1型糖尿病におけるClass II HLA遺伝子型の特徴を明らかにし、劇症1型糖尿病の診断基準策定に資する目的で、全国調査を行い、

多数例での検討を行った。

B. 研究方法

医中誌WEB(Ver.4)で検索した2000年6月～2007年2月までに劇症1型糖尿病として報告された症例のうち、劇症1型糖尿病調査委員会による「診断基準」(前述・「糖尿病2005」)を満たし、class II HLA遺伝子型が明記された55例および劇症1型糖尿病調査委員会に登録された106例の計161例の劇症1型糖尿病患者を対象とし、75gOGTTにより正常耐糖能と診断された愛媛地区および大阪地区の343例を健常コントロールとした。

HLA-*DRB1*とHLA-*DQB1*の遺伝子型をタイピングし、解析した。ハプロタイプは既報の連鎖不平衡のデータを各症例に適応して、症例毎に解析した。

(倫理面への配慮)

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

劇症 1 型糖尿病では、*DRB1* は\*0405 (36.3%), \*0901 (23.9%)の順に高頻度で、\*0410 (3.4%)でも有意に高頻度であった ( $p < 0.05$ )。 *DQB1* は\*0401 (34.0%), \*0303 (20.0%)の順に高頻度で、この2つでは有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。 *DRB1-DQB1* ハプロタイプでは、 *DRB1\*0405-DQB1\*0401* (36.3 vs 14.0%), *DRB1\*0901-DQB1\*0303* (23.6 vs 14.1%), *DRB1\*0410-DQB1\*0402* (3.4 vs 1.3%) でのみ有意に高頻度であった ( $p < 0.05$ )。 また、 *DRB1\*1502-DQB1\*0601*, *DRB1\*1501-DQB1\*0602* は有意に低頻度であった (3.7 vs 11.5%, 3.4 vs 7.0%) ( $p < 0.05$ )。 さらに *DRB1\*0405-DQB1\*0401* は homozygotes (14.9 vs 2.3%) , heterozygotes (42.9 vs 23.0%) とともに有意に高頻度に認められたが ( $p < 0.05$ )、 homozygotes でより高いオッズ比 (7.3 vs 2.5) を示した。

### D. 考察

以前に行われた HLA 血清型の調査では、HLA DR4-DQ4 を有する患者を多数認めることが報告されている (Diabetologia 2005)。これに対応する HLA 遺伝子型は *DRB1\*0405-DQB1\*0401* と *DRB1\*0410-DQB1\*0402* である。今回の検討では、 *DRB1\*0405-DQB1\*0401* が多数を占めることが明らかになり、しかも健常コントロールに比べて有意に高頻度であることが明らかにされた。すなわち、劇症 1 型糖尿病の診断マーカーとして *DRB1\*0405-DQB1\*0401* の存在が明らかになった。しかし、このサブタイプは健常人にも多数認められるものであった。

次に今回の検討では、 *DRB1\*0901-DQB1\*0303* も有意に高頻度であることが明らかになった。以前の血清型の調査ではこの遺伝子型に相当する DR9-DQ3 は有意に高頻度であるとされていなかったが、今回は有意に高頻度であった。この差を生じた理由として、今回はより多数の症例を集積できたことがあげられる。

今回の検討では疾患感受性 HLA が明らかになったが、感受性 HLA 遺伝子型はインスリン自己免疫症候群における疾患感受性 HLA とは異なり、健常人にも多く認められるサブタイプであった。従って、今後は疾患

感受性 HLA を含めた診断スコアを作成し、その他のマーカーと組み合わせることより感度・特異度の高い診断基準を作成することが望ましいと考えられた。

### E. 結論

劇症 1 型糖尿病において疾患感受性 class II HLA 遺伝子型が明らかになった。

### F. 健康危険情報 なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Tsutsumi C, Imagawa A, Hanafusa T, et al. Class II HLA genotype in fulminant type 1 diabetes -A nationwide survey with reference to GAD antibodies. (投稿中)

#### 2. 学会発表

シンポジウム「1型糖尿病の新しい展開」劇症1型糖尿病の成因 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010年5月27日 (岡山)

### 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

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 国立国際医療研究センター 上級研究員  
東京大学大学院医学系研究科 客員研究員

研究要旨：劇症1型糖尿病患者群97名、健常対照群184名および自己免疫性1型糖尿病患者群299名（うち、急性発症203名、緩徐発症96名）を対象としたゲノムワイド関連解析により検出された合計606種類のSNPを対象としたReplication studyを実施した。2次パネル（1型糖尿病患者群合計451検体、健常対照群357検体）を用いて、606SNPsのうち414SNPsを対象としたSNPタイピングが終了し、387SNPsを対象とした統計解析を実施した。統計解析の結果、劇症1型糖尿病の発症と関連する有望な遺伝子領域が5か所検出され、また、急性発症1型糖尿病および緩徐発症1型糖尿病の発症と関連する有望な遺伝子領域もそれぞれ5か所ずつを検出した。

### 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

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う（図1）。

昨年度までに、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97検体、および対照群として、自己免疫性1型糖尿病患者群299検体（うち、急性発症203検体、緩徐発症96検体）と健常対照群184検体のSNPタイピングが終了し、ゲノムワイド関連解析が完了している。

本年度は、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

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

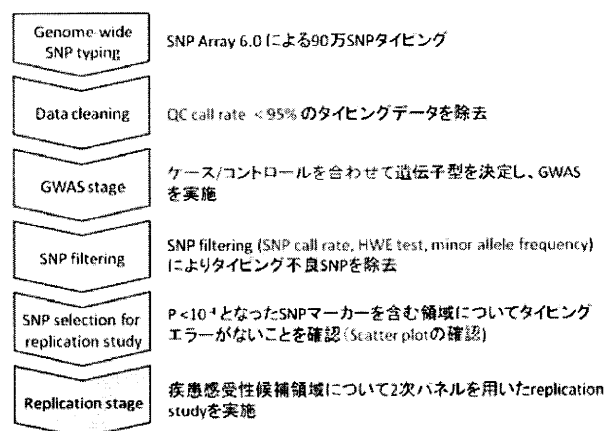


表 1 劇症 1 型糖尿病患者群を対象とした Replication study で検出された SNP の一覧

遺伝子 (SNP)	自己免疫性 との重複	Validation		Replication		Combined	
		P値	OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)
SNP#1	no	$2.42 \times 10^{-5}$	0.43 (0.29-0.64)	0.0146	0.68 (0.50-0.93)	$3.84 \times 10^{-6}$	0.56 (0.44-0.72)
SNP#2	no	$1.28 \times 10^{-4}$	0.37 (0.22-0.62)	$8.43 \times 10^{-3}$	0.56 (0.36-0.86)	$1.07 \times 10^{-5}$	0.48 (0.34-0.67)
SNP#3	no	0.2553	0.66 (0.32-1.36)	0.01203	0.50 (0.29-0.87)	$9.63 \times 10^{-3}$	0.60 (0.40-0.90)
SNP#4	no	0.0121	1.66 (1.11-2.46)	$5.68 \times 10^{-3}$	1.61 (1.15-2.27)	$1.92 \times 10^{-4}$	1.63 (1.26-2.11)
SNP#5	no	0.0905	1.36 (0.95-1.95)	0.04493	1.36 (1.01-1.83)	$5.16 \times 10^{-3}$	1.38 (1.10-1.74)

予想される遺伝子のうちで有意水準  $P < 0.05$  を満たす SNP を対象として、DigiTag2 法を用いた Replication study を実施した。Replication study に用いる 2 次パネルとして、劇症 1 型糖尿病患者 117 検体、自己免疫性 1 型糖尿病患者群 334 検体（うち、急性発症 216 検体、緩徐発症 118 検体）を用意し、1 次パネルと合わせて、DigiTag2 法による SNP タイピング（96-plex、6 セット；32-plex、1 セット）を実施し、統計解析を行った。1 次パネル（Validation）、2 次パネル（Replication）および 1 次パネルと 2 次パネルを合わせた全群（Combine）に対して、4 つの統計モデル（アリル頻度、遺伝子型頻度、劣性、優性）を用いた統計解析結果を取得した。

（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 91 検体、急性発症例 203 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 216 検体、緩徐発症例 118 検体および健常対照群 357 検体の 4 群を 1 セット（2 次パネル）として、DigiTag2 法による SNP タイピングを実施した。

全 606SNPs のうち、414SNPs を対象とした SNP タイピング（96-plex、4 セット；32-plex、1 セット）が終了し、387SNPs を対象とした統計解析を実施した。統計解析の結果、劇症 1 型糖尿病の発症と関連する有望な遺伝子領域（ $P < 10^{-5}$ ）が 5 か所検出され（表 1 参照）、また、急性発症 1 型糖尿病および緩徐発症 1 型糖尿病の発症と関連する有望な遺伝子領域もそれぞれ 5 か所ずつを検出した。Replication study で有望な遺伝子領域として検出された SNP について、TaqMan 法によるタイピング結果の検証を実施したところ、 $P < 10^{-5}$  に達する関連が再度検出されたことからタイピングエラーによる擬陽性関連ではないことが明らかとなった（表 2 参照）。