

表 2 TaqMan 法によるタイピングエラーの検証

SNP#1	Fulminant			Healthy Ctrl			P-value	OR (95% CI)
	AA	AB	BB	AA	AB	BB		
GWAS	5	38	46	33	102	65	5.63×10^{-4}	0.51 (0.35-0.75)
Replication	10	56	51	58	178	118	0.014	0.68 (0.50-0.93)
Combine	15	94	97	91	280	183	3.63×10^{-5}	0.60 (0.47-0.77)

D. 考察

劇症 1 型糖尿病患者群 214 検体 (1 次パネル、97 検体 ; 2 次パネル 117 検体)、および健常対照群 541 検体 (1 次パネル、184 検体 ; 2 次パネル、357 検体) を用いたゲノムワイド関連解析を実施した結果、 $P < 10^{-5}$ に達する遺伝子領域を含む 5 か所の有望な遺伝子領域を検出することに成功した。検出された有望な遺伝子領域について、タイピング結果の検証を実施したところ、関連が再現されたことから診断マーカーの候補の一つであると考えられる。

また、自己免疫性 1 型糖尿病である急性発症例 419 検体 (1 次パネル、203 検体 ; 2 次パネル、216 検体) および緩徐発症例 (1 次パネル、89 検体 ; 2 次パネル、118 検体) について、健常対照群とのゲノムワイド関連解析を実施した結果、 $P < 10^{-5}$ に達する遺伝子領域をそれぞれ 5 か所検出することに成功した。

E. 結論

ゲノムワイド関連解析で検出された合計 606 種類の候補 SNP のうち、残る 192 種類の SNP (96-plex、2 セット) に対する Replication study を実施し、劇症 1 型糖尿病や自己免疫性 1 型糖尿病に関連する新規 SNP の探索を継続する。また、有望とされる 5 種類の SNP 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。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 西田奈央、徳永勝士 : SNP 解析、バイオチップ実用化ハンドブック : 139-146 (2010)
- 2) 徳永勝士 : ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子・薬剤応答性遺伝子の探索、ファルマシア 46: 421-431 (2010)

2. 学会発表

該当なし

H. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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 国立国際医療研究センター研究所
糖尿病研究センター 代謝疾患研究部 部長

研究要旨：劇症 1 型糖尿病のゲノムワイド関連解析（GWAS）の 1 次スクリーニングの上位 SNP について、新たに報告された日本人 2 型糖尿病の大規模 GWAS のデータと比較して検討したが、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。また平成 21 年度の血清サイトカインに引き続き、微量血清を用いて、糖代謝・肥満関連ホルモンの多項目同時測定系の検討を行い、その有用性ととともに、測定可能範囲に課題があることが示された。

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、ゲノムワイド関連解析（Genome-wide association study：以下 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や代謝関連ホルモンなど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] 大規模 GWAS により同定された新規 2 型糖尿病遺伝因子との比較検討

2 型糖尿病の大規模な GWAS の報告は、これまではすべて白人などを対象としたものであった。平成 22 年度に、分担研究者も関与した、別研究費による多施設共同研究により、理研バイオバンクサンプルから抽出した 2 型糖尿病患者 4000 人を用いた GWAS、及び replication の成果が報告された。これは 2 型糖尿病について、現時点で、アジア人で最も網羅的な GWAS である。そこで、新たに同定された遺伝因子について、本研究班の劇症 1 型での結果と比較した。

[2] 多項目 ELISA 同時測定系の検討

ビーズシステムを用いた多項目 ELISA 同時

測定系を用いて、少量の血清で糖代謝関連ホルモン濃度の測定を試みた。解析機器は、昨年度と同じくバイオラッド社の BioPlex200 システム、キットはマグネティックビーズを用いた「Bio-Plex Pro Human Diabetes Assay Panel」を利用して、主に HbA1c が 9%以上と血糖コントロール不良で入院した糖尿病患者の血清を中心に検討を行った。(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] 2 型糖尿病 GWAS から得られた遺伝因子との比較検討

4,000 人を対象とした GWAS により、*KCNQ1* を初め、これまで報告された 2 型糖尿病遺伝因子の多くが再現されたほか、*UBE2E2*、*C2CD4A-C2CD4B* という新規の遺伝因子が同定された (Yamauchi, et al. Nat Genet 2010)。そこでこれらについて、これは今回の劇症 1 型糖尿病の GWAS データと比較したが、ゲノムワイドな有意水準に達する結果は得られていない。また劇症 1 型糖尿病の一次スクリーニングで有意な SNP のうち、昨年度報告したような手順で抽出された、43 の遺伝子とも、オーバーラップは見られなかった。

[2] ELISA による多項目同時測定系の検討

同時多項目測定システムとして、Luminex テクノロジーが注目されている。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するが、微量の検体で多くの項目の定量が可能のため、特に臨床検体への応用が期待されている。平成 21 年度は、ヒト血清を

対象として「サイトカインパネル」「急性反応タンパクパネル」の 2 種類を使用し、その有用性と、予想外の個人差の存在を確認した。今回用いた「Bio-Plex Pro Human Diabetes Assay Panel」は、合計 14 の糖代謝・肥満関連ホルモン (C-Peptide, Ghrelin, GIP, GLP-1, Glucagon, IL-6, Insulin, Leptin, PAI-1, Resistin, TNF- α , Visfatin, Adiponectin, Adipsin) を、合計 30 μ L 前後の血清 (Adiponectin, Adipsin が別キットを用いるため、15 μ L \times 2 となる) で測定できるキットである。その結果、症例により非常に大きな差が認められた。既知の現象 (Leptin が BMI が大きいほど高値を示す、チアゾリジン使用例で Adiponectin 高値の傾向がある、など) は確かに再現できたが、たとえば BMI22 以下でも Leptin 高値の症例も見られるなど、予想以上に症例の個人差がみられることがわかった。また症例により測定範囲におさまらない項目もみられ、特に Insulin は測定感度以下となる検討が多いことが判明した。非糖尿病患者でも同様の項目がみられており (未発表データ)、日本人におけるこうしたキットの使用には十分な注意が必要と思われる。

D. 考察

劇症 1 型糖尿病の遺伝因子を、インスリン分泌低下という観点から、2 型糖尿病と比較する際には、やはり日本人という同じ民族で比較する必要がある。しかしこれまで日本人 2 型糖尿病の遺伝因子の大規模なゲノム網羅的解析はされていなかった。今回、アジア人では現時点で最大規模のデータが得られたので、これを用いて、今後遺伝学的な異同をより詳しく論じることができると期待される。

現時点で、GWAS の比較からは、劇症 1 型糖尿病と 2 型糖尿病とに病因的に明らかに共通

の部分は、まだ認められていない。しかし、GWASではゲノムワイドな統計学的有意水準が非常に厳しいこと、マーカーとして用いた SNP がすべての SNP の「タグ」として機能する訳ではないこと、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があること、そのため解析プラットフォームが異なると単純な比較はできないこと（本研究班で用いているのはアフィメトリクス社の SNP 6.0 アレイで、上記 2 型糖尿病で用いられたのはイルミナ社のもの）、などから、疾患と関連がある SNP を見逃してしまう可能性もある。今後より詳細にデータを比較検討する必要があるだろう、

糖代謝・肥満関連ホルモンの血中濃度は個人差もダイナミックレンジも大きく、同一希釈では測定可能範囲をはずれるものもあった。特にインスリンで測定下限以下が多かった背景として、白人の 2 型糖尿病ではインスリン抵抗性と代償性のインスリン分泌亢進がしばしば見られるのに対して、日本人を含む東アジア人では、病初期からインスリン分泌低下がみられ、かつ増悪してゆく症例が多いことが考えられる。しかもグローバルな企業で作成されたキットは、白人での「正常値」を基準に作成されており、そのために東アジア人では、下限を下回るケースが多い、と考えられる。こうしたことを反映してか、平成 22 年度後半に、キットを作成した同じ企業（バイオラッド社）から、特に Insulin の測定可能範囲が拡大された新しいバージョンのキットが発表された。今後このキットも試してみる予定だが、劇症 1 型では特にインスリン低値が予想されるため、血清インスリンは必要であれば別途個別に測定を準備するべきだと考えられた。

多くの糖代謝関連ホルモンとサイトカイン

とを、微量の血清で測定・スクリーニングすることが可能となったことで、劇症 1 型糖尿病について、病態や予後の診断に役立つマーカーが抽出できる可能性があり、今後の応用発展が期待される。

E. 結論

劇症 1 型糖尿病の GWAS の結果を、最近報告された、大規模な 2 型糖尿病 GWAS の結果と比較して考察した。また血清サイトカインに引き続き、糖代謝・肥満関連ホルモンの多項目測定系の検討を行い、良好な結果とともに課題を明らかにした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表：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
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

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型糖尿病の発症にDIHS(薬剤過敏症症候群)の病態が関連している可能性が考えられる。本邦におけるDIHSに伴い発症した劇症1型糖尿病既報告例の調査解析を行った。13症例の解析を行った結果、特徴は中年以降の発症で、男女差なく、HHV6ウイルス感染との関連が最も多く認められた。1型糖尿病感受性HLA DR4を約半数が保持し、抵抗性のDR2もみられたがDR9はなかった。劇症1型糖尿病の発症に、DIHS発症と共通の基盤が関与することが示唆された。

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

近年、DIHS（薬剤過敏症症候群）に伴い発症した劇症1型糖尿病の報告が散見され、劇症1型糖尿病の発症にDIHSの病態が関連している可能性が考えられる。

そこで、DIHS（薬剤過敏症症候群）に伴い発症する劇症1型糖尿病についてその特徴を明らかにするため、皮膚科学会、1型糖尿病調査委員会と共同でアンケート調査を計画した。

今回、本邦における既報告例（学会発表、症例報告）に対してアンケート調査を行った。

C. 研究結果

本邦における既報告例13例について解析を行った。

男性6名、女性7名、発症年齢は19歳－77歳（平均54.8歳：男性47.5歳、女性61.7歳）。原因薬剤は、メキシレチン（3名）、カルマバゼピン（2名）、DDS（2名）、ゾニサミド、サラゾスルファピリジン、フェニトイン、アロプリノール、ミノサイクリン各1名であり、原因薬剤不明が1名であった。DIHS発症から糖尿病発症までは平均43.7日、12名が3カ月以内に発症してお

り、そのうち1か月以内に発症した例が8名、6か月を超すものが1名であった。糖尿病発症時の血糖は250 mg/dl－1044 mg/dl、HbA1c（JDS）は5.4%－6.8%であり、内因性のインスリン分泌能は全例で枯渇していた。ウイルス感染に関しては、HHV6が10名に、CMVが3名に、Coxsackie B3が1名に、抗体またはDNAで陽性を認めた。膵島自己抗体を認めた症例はなかった。1型糖尿病感受性HLA DR4を約半数が持っていたがDR9はみられなかった。自己免疫1型糖尿病に抵抗性だが劇症1型には抵抗性ではないと考えられるDR2を3症例で認めた。

D. 考察

DIHSに伴い発症した劇症1型糖尿病症例の特徴は中年以降の発症で、男女差なく、大部分はDIHS発症後3ヶ月以内の発症であった。HHV6ウイルス感染との関連が最も多く認められ、1型糖尿病感受性HLA DR4を約半数が保持し、抵抗性のDR2もみられたがDR9はなかった。

E. 結論

劇症1型糖尿病の発症に、DIHS発症と共通の基盤が関与することが示唆された

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

大沼 裕、牧野英一、今川彰久、藤山
幹子、大澤春彦、小林哲郎、花房俊昭、
1型糖尿病調査委員会。

DIHS に伴い発症する劇症1型糖尿病の
実態調査－本邦既報症例の調査－

(第8回1型糖尿病研究会 2010年10
月10, 11日 長崎)

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

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型糖尿病の遺伝因子としてHLA (*DRB1*, *DQB1*) および非HLA (*INS*, *CTLA4*, *IL2RA*, *ERBB3*, *CLEC16A*, *IL7R*, *IFIH1*) の統合的解析を行い、非HLAは臨床的多様性に影響するが、その関連は全体でもHLAよりもかなり弱いことを明らかにした。また、次世代シーケンスを用いた1型糖尿病感受性遺伝子の解析を行い、その有用性を確認し、今後検討を進める予定である。

A. 研究目的

1型糖尿病の成因を解明するために、遺伝子の解析を行う。

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などの解析を行った。また、当科の1型糖尿病96症例と健常コントロール96例についてIllumina Genome Analyser IIxによる次世代シーケンス解析を行った。

(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

非HLA遺伝子(*INS*, *CTLA4*, *IL2RA*, *ERBB3*, *CLEC16A*, *IL7R*, *IFIH1*)の総合的な効果はHLA(*DRB1*, *DQB1*)と比較してかなり弱く、発症予測モデルへの寄与はあまりなかった。さらに、発症様式や甲状腺自己免疫合併などの臨床的多様性にこれらの感受性遺伝子の一部が関連していた。24遺伝子の次世代シーケンスによる解析では、アミノ酸置換を伴うnsSNPが合計50個以上同定され、そのうちの6割以上ががまれな変異であった。

D. 考察

日本人でも、非HLA遺伝子の関与はHLAと比較して弱いが、発症様式や甲状腺自己免疫の合併などの臨床的多様性に影響していることが考えられる。次世代シーケンスによる解析はまれな変異の検出において有用であった。

E. 結論

日本人1型糖尿病におけるHLAおよび非HLA感受性遺伝子の役割を総合的に明らかにした。さらに、次世代シーケンスの1型糖尿病疾患感受性遺伝子の解析における有用性を明らかにした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

栗田卓也. ゲノムワイド関連解析

(GWAS) で明らかになったSNPを含めた1型糖尿病感受性遺伝子の日本人における統合的解析. 糖尿病 53(Suppl. 1):S-12, 2010

山下富都, 栗田卓也ら. 次世代シーケンスを用いた1型糖尿病感受性遺伝

子エクソン領域の日本人における多型解析. 第8回1型糖尿病研究会抄録集、p.27、2010

Awata T. Susceptibility genes to type 1 diabetes in Japanese. 8th International Diabetes Federation, Western Pacific Region Congress, 2010 (Korea)

Awata T et al. Analysis of the HLA and non HLA susceptibility loci in Japanese type 1 diabetes. 11th IDS 2010 congress, 2010 (Korea)

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 型糖尿病の膵島関連自己抗体に関する研究

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：劇症 1 型糖尿病は、膵島関連自己抗体が検出されないことがひとつの特徴をされているが、新しく発見された ZnT8 抗体については明らかにされていない。今回我々は劇症 1 型糖尿病における膵島関連自己抗体の陽性率を古典的 1 型糖尿病と比較検討した。発症早期劇症 1 型糖尿病 85 例と古典的 1 型糖尿病 114 例において、GAD 抗体、IA-2 抗体、インスリン自己抗体（IAA）、および ZnT8 抗体を測定した。その結果、劇症 1 型糖尿病における陽性率は、GAD 抗体 9%、IA-2 抗体 4%、IAA 6%、ZnT8 抗体 0%であり、古典的 1 型糖尿病ではそれぞれ 82%、58%、55%、50%であった。さらにこの 4 つの膵島関連自己抗体を組み合わせると、劇症 1 型糖尿病の 18%、古典的 1 型糖尿病の 94%がひとつ以上の自己抗体が陽性であった。しかし、古典的 1 型糖尿病では膵島関連自己抗体陽性例の 79%が重複陽性であるのに対し、劇症 1 型糖尿病では 93%が単独陽性であった。以上より、劇症 1 型糖尿病の約 20%は膵島関連自己抗体陽性であるが、その免疫反応は古典的 1 型糖尿病とは異なることが示唆された。

A. 研究目的

1 型糖尿病は膵島 β 細胞自己抗原に対する自己免疫反応の結果、細胞障害性 T 細胞により β 細胞が特異的に破壊されインスリン分泌が進行性に枯渇する自己免疫疾患であり、高血糖で発症する数か月～数年前より血液中に膵島関連自己抗体が検出される。初めて発見された膵島関連自己抗体は、ラ氏島細胞質抗体（ICA）であるが、その後の分子生物学的手法の進歩により ICA の対応抗原が複数同定され、ICA に代わり GAD 抗体、IA-2 抗体、インスリン自己抗体（IAA）が測定されていたが、最近新しい自己抗原として ZnT8 が同定され、ZnT8 抗体の臨床的意義に関する研究も進んでいる。今回われわれは、膵島関連自己抗体が検出されないことがひとつの特徴をされている劇症 1 型糖尿病において 4 つの膵島関連自己抗体を測定し、その陽性率と臨床的意義について古典的 1 型糖尿病と比較検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

我々の施設の 15 例および日本糖尿病学会劇症 1 型糖尿病調査研究委員会より提供された 70 例の劇症 1 型糖尿病（計 85 例）および 114 例の古典的 1 型糖尿病より得られた発症後 2 週間以内の血清を解析対象とした。劇症 1 型糖尿病および古典的 1 型糖尿病の性別（M:F）と発症年齢は、それぞれ 54:31、 43.3 ± 16.1 および 41:73、 24.7 ± 17.8 である。

(2) 膵島関連自己抗体測定法

GAD65 抗体、IA-2 抗体、IAA、および ZnT8 抗体を radioligand binding 法にて測定した。

(3) 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 χ^2 検定で、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。

C. 研究結果

(1) 劇症1型糖尿病における膵島関連自己抗体の陽性率

85例の劇症1型糖尿病における膵島関連自己抗体の陽性率は、図1に示す通りである。GAD抗体の陽性率が最も高く9.4%であり、続いてIAA 5.9%、IA-2抗体 3.5%でZnT8抗体は全例で陰性であった。

(2) 古典的1型糖尿病における膵島関連自己抗体の陽性率

114例の古典的1型糖尿病における膵島関連自己抗体の陽性率を図2に示す。GAD抗体の陽性率が最も高く81.6%であり、続いてIA-2抗体 57.9%、IAA 55.3%、ZnT8抗体 50.0%であった。

(3) 膵島関連自己抗体の組合せ解析

4つの膵島関連自己抗体を組合せて解析すると、古典的1型糖尿病の94%が1抗体以上の陽性となり、23%は4抗体すべて陽性を示した。一方、劇症1型糖尿病では、全体の18%が1抗体以上陽性であったが、抗体の重複陽性例はわずか1例のみで、そのほとんどが単独陽性であった。

D. 考察

劇症1型糖尿病は、発症直前に高率にウイルス感染を疑わせる症状が先行し、ヘルペスウイルスやエンテロウイルスなどの抗体価が上昇する症例も確認されている。また、膵島のみならず膵外分泌組織へのリンパ球浸潤も同定されており、膵組織への非特異的な免疫反応が関与している可能性が高い。しかし、症例によっては発症時に膵島関連自己抗体やTPO抗体などの甲状腺自己抗体が検出される症例も同定されている。今回の検討では、劇症1型糖尿病の18%に膵島関連自己抗体が検出されたが、ほとんどが単独陽性であり、自己抗体出現パターンは古典的1型糖尿病と明らかに異なっていた。

1型糖尿病の疾患感受性HLAを有し発症リスクが高い第1度近親者を対象にした追跡調査では、膵

島関連自己抗体が単独陽性の場合、重複陽性者に比較し発症リスクが著しく低いことが知られており、単独陽性は膵島自己免疫現象を反映していないことが示唆されている。したがって、劇症1型糖尿病において膵島関連自己抗体が検出されても、これが膵島に対する自己免疫現象を反映しているか否かについては、現時点では確定できない。今後、膵島関連自己抗体の質の評価や細胞性免疫の評価などについて古典的1型糖尿病との相違を明らかにする必要があると考えられた。

E. 結論

劇症1型糖尿病の18%に膵島関連自己抗体が検出されるが、出現パターンは古典的1型糖尿病と異なる。

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, Kobayashi M, Kuwahara H, Abiru N, Yamasaki H, Matsuura N, Miura J, Uchigata Y, Eguchi K. Differences in the humoral autoreactivity to zinc transporter 8 between childhood- and adult-onset type 1 diabetes in Japanese patients.

Clin Immunol 138: 146-153, 2011

2. Nakamura K, Kawasaki E, Abiru N, Jo O, Fukushima K, Satoh T, Kuriya G, Kobayashi M, Kuwahara H, Yamasaki H, Ide T, Eguchi K. Trajectories of ant-islet autoantibodies before development of type 1 diabetes in interferon-treated hepatitis C patients. Case reports and a literature review.

Endocr J 57: 947-951, 2010

3. Horie I, Kawasaki E, Shimomura A, Satoh T, Ueki I, Kuwahara H, Ando T, Abiru N, Usa T,

Eguchi K. Emergence of anti-islet autoantibodies in Japanese patients with type 1 diabetes.

Endocr J 57: 623-628, 2010

4. 川崎英二 : チロシンホスファターゼ (ICA512/IA-2) 抗体. 日本臨牀 68、586-589、2010
5. 川崎英二 : 亜鉛トランスポーター8 (ZnT8) 抗体. 日本臨牀 68、590-593、2010
6. 川崎英二 : 1型糖尿病の成因と分類. 糖尿病学の進歩 (第44集) 2010、1-4、2010
7. 川崎英二 : 膵島関連自己抗体. 糖尿病診療 2010、S50-S52、2010
8. 川崎英二 : GAD 抗体. 糖尿病研修ノート、197-199、2010
9. 川崎英二 : 解明が進む1型糖尿病の病態. *Medicina*、1883-1887、2010
10. 川崎英二 : 1型糖尿病. 今日の治療指針 2011年版、626-628、2011

2. 学会発表

1. 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53回日本糖尿病学会年次学術集会、岡山市、2010
2. 川崎英二、村田英美、赤澤 諭、植木郁子、中村 寛、堀江一郎、厨 源平、古林正和、桑原宏永、山崎浩則、阿比留教生 : 1型糖尿病における亜鉛トランスポーター8 (ZnT8) 抗体の検討. 第48回日本糖尿病学会九州地方会、別府市、2010
3. 川崎英二 : 1型糖尿病の遺伝因子と膵島抗原・自己抗体. 第45回糖尿病学の進歩、福岡市、2011
4. Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Kobayashi M, Kuwahara H, Abiru N, Yamasaki

H, Matsuura N, Miura J, Uchigata Y, Eguchi K : Zinc transporter 8 autoantibodies in patients with three forms of Japanese type 1 diabetes. The 70th American Diabetes Association Scientific Sessions、米国、2010

5. Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Kobayashi M, Kuwahara H, Abiru N, Yamasaki H, Matsuura N, Miura J, Uchigata Y : Differences in the humoral autoreactivity to zinc transporter 8 between childhood- and adult-onset type 1 diabetes in Japanese patients. 11th International Congress of the Immunology of Diabetes Society (IDS-11)、韓国、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

図1 劇症1型糖尿病85例における膵島関連自己抗体の組合せ解析

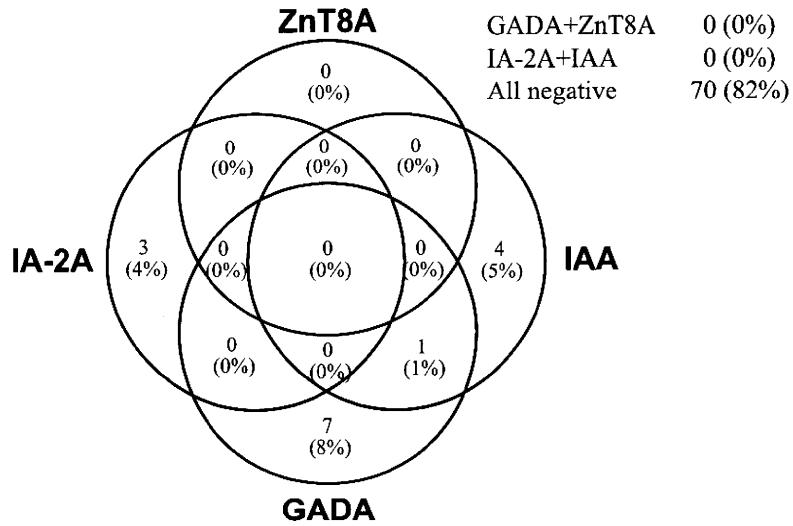
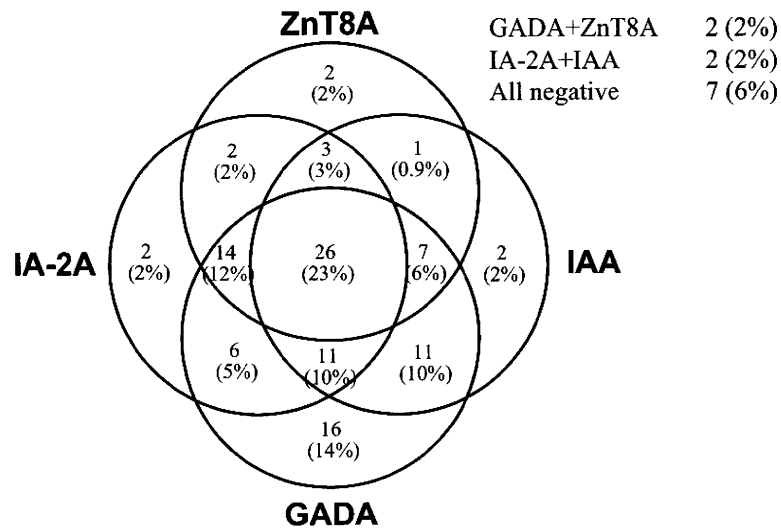


図2 古典的1型糖尿病114例における膵島関連自己抗体の組合せ解析



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 非常勤講師）

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。

昨年、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反応性のIFN- γ 産生CD4細胞（T-helper1細胞）が検出されることを見出した。今回は、さらに、T-helper1細胞の表面上に発現しているCXCR3をマーカーとして、それを有する免疫制御性T細胞についても検討した。

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、T-helper1細胞の細胞表面上に発現しているCXCR3をマーカーとして、それを有する免疫制御性T細胞（CXCR3陽性Treg=Hybrid Treg）につき、検討した。この細胞は、動物モデルにおいて、1型糖尿病の発症制御に極めて重要であることが示されている。このHybrid Tregの評価が、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のが強く期待される。

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) 患者末梢血リンパ球を採取し、CXCR3、CD4、CD25、Foxp3の4カラーにて染色し、フローサイトメーターを用いて解析する。

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）も測定する。

5) 抗GAD抗体、HLA、罹病年数、血清IP-10/CXCL10値と上記フローサイトメーターの解析により得られたHybrid Tregとの関係を詳細に検討する。

6) 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、（膵島関連）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、および対照としてインスリン治療中の抗 GAD 抗体陰性の確認された 2 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、Hybrid Treg (CXCR3+CD4+CD25+Foxp3+) 細胞の検討を行った。その結果、劇症 1 型糖尿病患者を始めとする 1 型糖尿病患者では、Hybrid Treg 数が対照に比して少ない、すなわち、疾患特異的免疫制御に関わる細胞数が少ない可能性が推察された。さらに、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) との関連についても検討中である。また、膵島関連抗原特異的な反応との関係を直接検討するため、昨年より検討している、GAD 反応性 IFN γ 産生 CD4 細胞との関係も合わせて検討中である。

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、血清中ケモカインの測定に加えて、1 型糖尿病の発症を制御するとされる Hybrid Treg に注目してその有用性を検討した。今後、劇症 1 型糖尿病の患者数を増やすとともに、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. 研究発表

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 β -Cell Death in Fulminant Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2011 Feb 2. [Epub ahead of print]

2) 会田薫, 西田頼子, 田中昌一郎, 丸山太郎, 島田朗, 小林哲郎. 感染症と 1 型糖尿病 劇症 1 型糖尿病とウイルス感染. *Diabetes Frontier* 21 巻 3 号 Page 307-313 (2010. 06)

学会発表

1) 鈴木竜司, 島田朗. 78 歳の後期高齢者に発症した劇症 1 型糖尿病の 1 例. 第 47 回日本糖尿病学会関東甲信越地方会 2010. 1 大宮

2) 多田愛, 島田朗, 山田善史, 及川洋一, 伊藤裕, 山田健人. ウイルス感染を trigger とする自己免疫性糖尿病. perforin/granzyme B を介した膵島傷害の可能性. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010. 5 岡山

3) 及川洋一, 島田朗, 山田善史, 大久保佳昭, 嶋原寿一, 成見正作, 伊藤裕. DNA ワクチンによる自己免疫性糖尿病の寛解過程における Hybrid Treg の関与. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010. 5 岡山

4) 会田薫, 西田頼子, 田中昌一郎, 丸山太郎,
島田朗, 小林哲郎. 1型糖尿病の新しい展開 1
型糖尿病の膵病変 劇症1型糖尿病と緩徐進行
1型糖尿病の対比から.

第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5

岡山

G. 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

H. 健康危険情報

特になし

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

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

研究分担者 永田 正男 加古川市民病院副院長

研究要旨：劇症1型糖尿病は突然の高血糖とケトアシドーシスを来たして急激な経過で発症に至る1型糖尿病で、生命予後に大きくかわるため、早期診断、早期治療が臨床的にきわめて重要な疾患である。そのため、確実な診断マーカーを同定し、診断基準を確立することが急務となっている。発症機序としては、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫系が主体である事が示唆されるものの、さまざまな機序を含む可能性も考えられる。そこで、本研究では、自己免疫性1型糖尿病に対して、自然免疫系の重要な細胞のひとつである樹状細胞と自己抗原であるインスリンのシグナルペプチドを用いて発症抑制が可能かどうかを検討し、劇症1型糖尿病の診断においても樹状細胞や自己抗原を介した機序の関与を検討したい。

A. 研究目的

劇症1型糖尿病は突然の高血糖とケトアシドーシスを来たして急激な経過で発症に至る1型糖尿病で、生命予後に大きくかわるため、早期診断、早期治療が臨床的にきわめて重要な疾患である。そのため、確実な診断マーカーを同定し、診断基準を確立することが急務となっている。発症機序としては、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫系が主体である事が示唆されるもののさまざまな機序を含む可能性も考えられる。そこで、本研究では、自己免疫性1型糖尿病に対して、自然免疫系の重要な細胞のひとつである樹状細胞と自己抗原であるインスリンのシグナルペプチドを用いて発症抑制が可能かどうかを検討し、*in vitro*での劇症1型糖尿病の診断においても樹状細胞や自己抗原を介した機序の関与を検討することを最終的な目的としている。

B. 研究方法

1型糖尿病のモデルマウスであるNODマウスに、GM-CSF及びIL-10で培養して樹立したNODマウスの骨髄由来樹状細胞を投与し、NODマウスでの糖尿病発症の抑制が可能かどうかを検討した。また、その抑制機序

についても検討した。

次に、自己抗原であるプレプロインスリンのシグナルペプチドL7-24を、12週齢のNODマウス及び糖尿病発症直後のNODマウスに投与し、NODマウスの糖尿病発症抑制及び糖尿病状態からの改善が可能かどうかを検討した。また、その抑制機序についても検討した。

最後に、隣島自己抗原反応性CD8+T細胞クローン(NY8.3)T細胞受容体遺伝子を導入した8.3NODマウスより得られた自己反応性細胞傷害性CD8+T細胞を、*in vitro*で脾臓由来樹状細胞、自己抗原ペプチドIGRP、TGF- β 及びレチノイン酸とともに培養することにより、自己反応性抑制性CD8+T細胞を樹立することが可能かどうか試みた。

C. 研究結果

(実験1)

GM-CSF及びIL-10で培養して樹立したNODマウスの骨髄由来樹状細胞をNODマウスに投与したところ、有意にNODマウスにおける糖尿病発症を抑制した。その機序についてはflow cytometerで検討したところ、樹状細胞投与によりFoxP3+ CD25+ CD4+抑制性T細胞を誘導していることが明らかとなった。

(実験 2)

自己抗原であるプレプロインスリンのシグナルペプチド L7-24 を、12 週齢の NOD マウスに投与したところ有意に NOD マウスにおける糖尿病発症を抑制した。また、糖尿病発症直後の投与により糖尿病状態からの改善が認められた。その機序は、flow cytometer 及び ELISPOT で検討したところ、L7-24 投与により IL-10 産生の FoxP3+ CD25+ CD4+抑制性 T 細胞を誘導していることが明らかとなった。

(実験 3)

自己反応性細胞傷害性 CD8T 細胞を、in vitro で樹状細胞、自己抗原ペプチド IGRP、TGF- β 及びレチノイン酸との培養により FoxP3+ CD25+ CD8+T 細胞を誘導し、自己反応性 T 細胞と共に NOD-Scid マウスに投与したところ、in vivo で NOD-Scid マウスへの糖尿病の移入を抑制した。また、in vitro でも自己反応性 T 細胞を抑制し、CD8 陽性の自己反応性抑制性 T 細胞を樹立することが可能であった。

D. 考察

本研究により、1 型糖尿病発症における樹状細胞や自己抗原ペプチドの重要性と共に、それらを用いた 1 型糖尿病発症抑制の可能性が明らかになった。さらに、その際に、FoxP3+ CD25+ CD4+抑制性 T 細胞が誘導されており、発症抑制に極めて重要な細胞群と考えられた。また、自己反応性細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞を in vitro にて樹状細胞と自己抗原ペプチドを用いて CD8 陽性自己反応性抑制性 T 細胞に変換することが可能である事を示すとともに、CD8 陽性抑制性 T 細胞が存在する事を明らかにした。

E. 結論

本研究により、自然免疫系の主役である樹状細胞と自己抗原ペプチドの 1 型糖尿病の発症、抑制及び予防における重要性が明らかとなった。自然免疫系が重要であることが示唆される劇症 1 型糖尿病の診断においても、患者様の樹状細胞を用いた細胞性免疫を応用した in vitro 診断法の確立に自己抗原に加えて樹状細胞は極めて重要である事が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. IL-10-Conditioned Dendritic Cells Prevent Autoimmune Diabetes in NOD and Humanized HLA-DQ8/RIP-B7.1 Mice.
Tai N, Yasuda H, Xiang Y, Zhang L, Rodriguez-Pinto D, Yokono K, Sherwin R, Wong FS, Nagata M, Wen L.
Clin Immunol. 2011 (in press)
2. 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 Jul ; 136(1): 74-82.
3. 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.
4. Biguanide, but not thiazolidinedione, improved insulin resistance in Werner syndrome.
Yasuda H, Nagata M, Hara K, Moriyama H, Yokono K.
J Am Geriatr Soc. 2010 Jan;58(1):181-2.
5. 1 型糖尿病の経過中に食道アカラシアを合併した多腺性自己免疫症候群の一例
小林寛和、安田尚史、河野泰博、明寄太一、森山啓明、原 賢太、櫻井 孝、永田正男、横野浩一
糖尿病 2010 53(12): 829-833
6. 膵腎同時移植後に肺クリプトコッカス症を発症した 1 型糖尿病の 1 例
中村 晃、安田尚史、明寄太一、原 賢太、永田正男、横野浩一
糖尿病 2010 53(8): 607-612.

2. 学会発表

1. 膵β細胞mTORC1経路活性化によるNODマウス糖尿病発症に対する影響
佐々木弘智、森山啓明、清水まみ、中村 晃、荒井隆志、来住 稔、濱田水鈴、奥町恭代、安田尚史、原 賢太、永田正男、横野浩一
第53回日本糖尿病学会総会
2010. 5. 29 (岡山)
2. 膵β細胞におけるRheb過剰発現によって誘導されるmTORC1経路活性化がNODマウスに及ぼす影響
佐々木弘智、森山啓明、安田尚史、清水まみ、中村 晃、荒井隆志、原 賢太、永田正男、横野浩一
第8回1型糖尿病研究会 2010. 10. 10 (長崎)
3. 壊死性虚血性腸炎の術後に肺塞栓と持続する菌血症を来した1型糖尿病の一例
荒井隆志、安田尚史、世戸博之、北村龍義、井手 茜、明寄太一、平岡栄治、金澤健司、原 賢太、秋田穂東、横野浩一
第47回日本糖尿病学会近畿地方会
2010. 11. 13 (大阪)

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、種々の有理曲面の複素射影空間への埋め込みの斉次イデアルを解析した。

A. 研究目的

複素有理曲面の複素射影空間への埋め込みの斉次イデアルは、有理曲面の **blow-up** に応じて複雑に変化する。劇症1型糖尿病の統計解析に資するため、斉次イデアルの **blow-up** に応じた挙動を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

数式処理ソフト Magma、Singular、Macaulay2 を用いて、一つの有理曲面とその **blow-up** の埋め込みの斉次イデアルを詳しく計算して比較することを通して、斉次イデアルの挙動を解析する。

C. 研究結果

埋め込みを構成する技法、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イデアルの研究の歴史的は古く、現在に至るまで広範な研究がなされて来ている。しかし、実際に斉次イデアルを計算するにはコンピュータが必要な場合が多く、それが可能になったの

は新しいことである。実際の計算が可能になってきたことから、更に詳細な研究が発展することが期待される。本研究はその方向の寄与を目指している。

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、有理曲面の複素射影空間への埋め込みに関する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

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表