

201128051A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 花房 俊昭

平成24（2012）年3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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
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・・・・・・・・・・ 11
池上 博司
3. 劇症1型糖尿病患者末梢血 CD4+T 細胞における CTLA-4 発現の検討・・・・・・ 15
今川 彰久
4. GWASの実施・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18
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・・・・・・・・・・ 22
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27
大澤 春彦
7. 1型糖尿病の遺伝子因子の研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
栗田 卓也
8. 1型糖尿病の新たな診断マーカーとしての ZnT8 抗体に関する研究・・・・・・ 31
川崎 英二
9. 劇症1型糖尿病患者末梢血 CD4+T 細胞における CTLA-4 発現の検討・・・・・・ 36
島田 朗
- 1 1. 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・・・・ 39
西村 保一郎

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41

V. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45

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』に関する研究班

平成23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	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	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
	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
	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
	島田 朗	慶應義塾大学 内科	非常勤講師
	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 内科学第三講座 糖尿病センター	教授
	永田 正男	加古川市民病院 内科	副院長
	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	医長
	鴨井 久司	新潟県立大学 人間生活学部	特任教授
	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	心臓病センター榊原病院 糖尿病内科	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	准教授
	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	診療助教
	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
	安田 尚史	神戸大学大学院医学研究科 内科学講座 総合内科学分野	特命講師

平成23年7月現在

II . 總括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

多施設共同研究：劇症1型糖尿病の診断マーカー同定と診断基準確立に関する研究

研究代表者 花房 俊昭（大阪医科大学医学部 内科学 I 教授）

研究要旨

平成23年度には、前年度より引き続き、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) と二次パネルによるreplication study、imputation、HLA層別解析、欧米GWASで同定された候補遺伝子の解析を行った。その結果、複数の新規候補遺伝子マーカーが抽出された。前年度に明らかになった個別研究による候補分子の多数例の検討により、HLA-DR/DQが特異度と陽性的中率において優れていることが明らかになった。これらの結果より、新診断基準を作成した。

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

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

西村保一郎
大阪医科大学医学部 数学 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 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
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

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

A. 研究目的

申請者らが日本人から発見した新しい疾患単位である劇症1型糖尿病(N Engl J Med 2000)は、膵β細胞の急激な破壊によるインスリン欠乏が原因で、診断が遅れると致命的な救急疾患である。診断後も短期間に糖尿病合併症を発症することもあわせると、臨床上きわめて重要な糖尿病の最重症型といえる。しかし、病因・病態の鍵となる分子の解明は緒についたばかりである。研究者らは平成23年度まで難治性疾患克服研究事業として、「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」を行い、推定患者数(5000-7000人)を明らかにした。劇症1型糖尿病は、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、難治性疾患である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、厚生労働省難治性疾患克服研究事業の趣旨に鑑み、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型糖尿病の特異的な診断マーカーを確立し、とそれを用いた診断基準の作成することを目的とした。最終年度である本年度は、前年度から継続して、ゲノムワイド関連解析(GWAS)による鍵分子候補の同定をおこない、あわせて他の個別研究から明らかになった診断マーカー候補の検証を行い、新しい診断基準の策定を目標とした。

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

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623SNPsが選定された。

さらにこの623SNPs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606SNPsを選定した。

本年は、上記606SNPs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、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。

二次パネル有力SNPの中でTaqMan法でも再現性が確認されたSNPに関して三次パネルによるreplication studyを行った。また、これと並行してimputation、SNP間相互作用、HLAによる層別解析を行うとともに、欧米のGWASで同定された遺伝子領域の日本人における関与についても検索を進めた。

遺伝子診断マーカーの測定

分担研究者の今川らはHLA-DR血清型のうち、DR4が高頻度であることを明らかにしていた。HLA-DR4をコードしているHLA-DR遺伝子を多数例で詳細に検討し、同時に連鎖不平衡にあるHLA-DQ遺伝子型を加え、遺伝子診断マーカーとしての感度、特異度を明らかにした。今回の検討では劇症1型糖尿病207名。健常者325名を対象とした。

血清診断マーカーの測定

分担研究者の小林らが明らかにした血清診断マーカーの候補である amylase alpha 2A および heat shock protein (HSP) 10、川崎らが明らかにした可溶性 CTLA-4 の血中濃度を新規対象患者において測定した。amylase alpha 2A, heat shock protein 10 については小林らが開発した ELISA 法により測定した。また、可溶性 CTLA-4 については、ELISA 法を用いた市販の測定キット (MedSystems Diagnostics 社製) により測定した。

リンパ球診断マーカーの測定

分担研究者の今川らが明らかにしたリンパ球診断マーカー候補である CTLA-4 の発現を多数例で測定した。患者末梢血より単核球を分離し、CD4 と CTLA-4 の発現を FACS 法にて解析した。具体的には CD4 陽性のヘルパーT 細胞中の CTLA-4 陽性細胞の割合を測定した。また、同じ対象について CTLA-4 遺伝子の CT60 多型を検討した。陽性細胞比率と遺伝子多型の組み合わせにより、診断の感度及び特異度が上昇する否かを検討した。

マーカーの感度・特異度の検討および診断基準の作成

上記のデータと臨床データを総合的に検討した結果に基づき、新たな診断基準を策定した。

(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 1 Replication study の結果

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	SNP29	no	0.013
pj210-5	SNP51	no	6.04E-04
pj210-5	SNP84	no	3.10E-05
pj210-6	なし	-	-
pj210-7	なし	-	-

2) タイピングデータの検証

上記の 8 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 2 に示す。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2 SNP09 の TaqMan 法による検証結果

* アレル頻度モデルにおけるカイ二乗検定を実施

SNP09	P-value*	OR (95% CI)
GWAS	5.6×10 ⁻⁴	0.51 (0.35-0.75)
Replication	0.01	0.68 (0.50-0.93)
Combine	3.6×10 ⁻⁵	0.60 (0.47-0.77)

3) Imputation による新規候補遺伝子の探索
Genotype imputation による新規候補遺伝子領域の探索を進めた結果、8 遺伝子領域が候補遺伝子領域として抽出された。

4) HLA ハプロタイプによる層別解析

疾患感受性に最も強く関与する HLA DRB1-DQB1 ハプロタイプによる層別解析を行った結果、*DRB1*04:05-DQB1*04:01* で 17 遺伝子領域 (35SNP)、*DRB1*09:01-DQB1*03:03* で 12 遺伝子領域 (31SNP) が新規遺伝子領域として抽出された。

5) 欧米人 GWAS で同定された SNP の検証

欧米人 GWAS で同定された遺伝子領域に存在する 9122SNPs に関して日本人 GWAS における解析結果を検証した結果、29 遺伝子領域に存在する 144 の SNPs に関して関連が示唆された。このうち 3 遺伝子領域は replication study の対象 SNP に入っていたが、残り 26 遺伝子領域が新規に抽出された。

遺伝子診断マーカーの測定

劇症 1 型糖尿病 207 名。対照として健常者 325 名の HLA-DR/HLA-DQ 遺伝子型を検討した。その結果、劇症 1 型糖尿病においては、*DRB1*04:05-DQB1*04:01* のハプロタイプが最も高頻度で 103 名 (50.2%) に認められた。このハプロタイプは健常人では 84 名 (25.8%) において認められた。したがって、遺伝子マーカー *DRB1*04:05-DQB1*04:01* は感度 50.2%、特異度 74.2%、陽性的中率 55.3%、陰性的中率 70.1% であった。さらに *DRB1*04:05-DQB1*04:01* をホモで有する場合には感度 15.0% と低下したが、特異度は 97.5% と向上し、陽性的中率 79.5%、陰性的中率 64.3% も高値であった。他の遺伝子型では、*DRB1*09:01-DQB1*03:03* のみが劇症 1 型糖尿病において有意に高頻度で 83 名 (40.1%) に認められた。このハプロタ

イプは健常人では 85 名 (26.2%) において認められた。したがって、遺伝子マーカー *DRB1*09:01-DQB1*03:03* は感度 40.1%、特異度 73.8%、陽性的中率 49.4%、陰性的中率 65.9% であった。*DRB1*09:01-DQB1*03:03* をホモで有する場合には感度 10.6% と低値であったが、特異度は 98.8% と高値であり、陽性的中率 84.6%、陰性的中率 63.4% も高値であった。さらに、*DRB1*04:05-DQB1*04:01* ハプロタイプと、*DRB1*04:05* 単独とを比較した。後者では感度は、50.2%、特異度 74.5%、陽性的中率 55.6%、陰性的中率 70.1% とほぼ同様の値が得られた。このように遺伝子マーカーは、十分な症例数を用いて検討することができたが、診断基準に組み入れる際の特異度には優れているものの、感度において十分ではないことが明らかになった。また、DR 座のみでも DR-DQ ハプロタイプに劣らない感度/特異度が得られることから、費用面を考慮すれば、DR 座のみの検討で十分であると考えられた。

血清診断マーカーの測定

1) 抗アミラーゼ抗体および抗 HSP10 抗体の結果

劇症 1 型糖尿病患者 10 名および対照として健常者 16 名の患者血清を用いて抗アミラーゼ抗体および抗 heat shock protein 10 (HSP10) 抗体の検討を ELISA で行った。対照から得られた値の平均 + 3 SD 以上を陽性とした。アミラーゼ蛋白の C 端側の約半分のフラグメントおよび HSP10 の全長を抗原とした検討では劇症 1 型糖尿病における抗アミラーゼ alpha2A 抗体および抗 HSP10 抗体の陽性率は各々 40% および 20% であり感度が不十分であった。抗アミラーゼ alpha2A 抗体の感度の改善を目的にアミラーゼ alpha2A の C 端フラグメントを約 20 個のアミノ酸からなるペプチドに分割して検討を行った。その結果一部のフラグメントでは 50% 以上の陽性率が認められた。現在アッセイ法についてさらに検討中である。

2) 可溶性 CTLA-4 の結果 (今川)

劇症 1 型糖尿病患者 15 名の発症直後と 2 週間以上経過した時点での血清をペアで測定した。その結果、前者では 0.51 ± 0.72 ng/ml、後者では 0.63 ± 0.90 ng/ml であり、有意差は認めなかった。また、血清の凍結と解凍を 10 回行い、前後で測定したが、測定値に有意差は認めなかった。

次に劇症 1 型糖尿病患者 33 名と健常対照者 10 名において測定した結果、前者では 1.00 ± 1.32 ng/ml、後者では 0.92 ± 0.84 ng/ml であり、有意差は認めなかった。

同一測定キットを用いて、異なる対象において測定した以前の検討では、劇症 1 型糖尿病患者 36 名と健常対照者 23 名の測定結果は、前者では 0.56 ± 0.24 ng/ml、後者では 0.89 ± 0.76 ng/ml であり、前者が有意に低値であった。この結果は今回の結果とは異なっており、sCTLA-4 を診断マーカーとして用いるには、更なる検討が必要であることが明らかになった。

リンパ球診断マーカーの測定

劇症 1 型糖尿病患者 11 名、対照として健常者 15 名、急性発症 1A 型糖尿病 12 名の末梢血 CD4 陽性ヘルパー T 細胞を用い、CTLA-4 の発現を解析した。陽性細胞比率のカットオフ値を 10%とした場合、陽性患者は劇症 1 型糖尿病患者 10 名、健常者 4 名であった。この場合、感度 90.9%、特異度 73.3%、陽性的中率 71.4%、陰性的中率 91.7%と良好な値を示した。CTLA-4CT60 遺伝子多型を検討したが、劇症 1 型糖尿病で高頻度であることが報告されている AA 型は、今回の対象では、劇症 1 型糖尿病患者 0 名 (0%)、健常者 2 名 (15.4%) で認めるのみであり、末梢血 CD4 陽性ヘルパー T 細胞における発現と遺伝子型を組み合わせても、診断の感度、特異度の向上は認められなかった。一方、急性発症 1A 型糖尿病においては同様のカットオフ値を設定した場合、陽性患者は 3 名であった。したがって、劇症 1 型糖尿病と

の鑑別において、感度 90.9%、特異度 75.0%、陽性的中率 76.9%、陰性的中率 90.0%と良好な値を示した。

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 の候補 SNPs を対象としたタイピングと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。二次パネルを用いた replication study の結果、これらのうちで 8 つの SNP に関して再現性が確認された。再現性が確認された SNP に関して三次パネルによる検証を進めている。また、imputation により新たに同定された遺伝子領域ならびに HLA による層別解析で新たに同定された遺伝子領域に関しても replication study による確認を進め、遺伝子マーカーとしての有用性を確認しているところである。さらに、欧米人 GWAS で同定・報告された SNP の中で劇症 1 型糖尿病との関連が新たに確認された 26 遺伝子領域に存在する SNP も有望な遺伝子マーカーであり replication study による確認解析を進める必要がある。

候補分子の診断マーカーとしての感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を検討した。その結果、遺伝子マーカー「HLA-DR/DQ」が特異度と陽性的中率で優れており、リンパ球マーカー「CD4 陽性 T リンパ球における CTLA-4 発現」が感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率いずれも優れていることが明らかになった。ともに診断マーカーとして有用であると考えられたが、遺伝子マーカーは特に費用において、リンパ球マーカーは簡便性において問題を有しており、今後の解決すべき課題と考えられた。一方、血清マーカーは費用と簡便性において、潜在的に優れているが、高感度測定キットの開発が今後の課題と考えられた。また、HLA を除いては、さらに多数の検体で、検証を続ける必要があると考えられた。

上記を総合的に判定した結果、現時点で

は診断基準の大幅な改定は行わず、多数例での検証が終了した HLA 遺伝子型についての記載のみを 2004 年診断基準の参考所見に付け加えることが妥当であると考えられた。

表 3 劇症 1 型糖尿病新診断基準 (案) (2011)

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 < 10mg/day、または、空腹時血清 C ペプチド < 0.3ng/ml かつ グルカゴン負荷後 (または食後 2 時間) 血清 C ペプチド < 0.5ng/ml である。

<参考所見>

- A) 原則として GAD 抗体などの膵島関連自己抗体は陰性である。
- B) ケトosis と診断されるまで原則として 1 週間以内であるが、1～2 週間の症例も存在する。
- C) 約 98% の症例で発症時に何らかの血中膵外分泌酵素 (アミラーゼ、リパーゼ、エラスターゼ 1 など) が上昇している。
- D) 約 70% の症例で前駆症状として上気道炎症状 (発熱、咽頭痛など)、消化器症状 (上腹部痛、悪心・嘔吐など) を認める。
- E) 妊娠に関連して発症することがある。
- F) HLA *DRB1*04:05-DQB1*0401* との関連が明らかにされている。

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。候補分子の診断マーカーとしての感度、特異度などを総合的に検討した結果、現行診断基準に、「HLA *DRB1*04:05-DQB1*0401* との関連が明らかにされている」という項目を新たに付け加えることが妥当であると考えられた。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamaoka M, Kitamura T, Moriyama H, Shima Y, Haseda F, Okita K, Sakaguchi Y, Iwahashi H, Hanafusa T, Funahashi T, Nagata M, Otsuki M, Imagawa A, Shimomura I.

A case of long-standing autoimmune type 1 diabetes with common variable immunodeficiency.

Diabetol Int 3:50-53,2012

Hotta K, Hanafusa T et al

Genetic variations in the CYP17A1 and NT5C2 genes are associated with a reduction in visceral and subcutaneous fat areas in Japanese women.

Journal of Human Genetics 57:46-51, 2012

Tsutsumi C, Imagawa A, Ikegami H, Makino H, Kobayashi T, Hanafusa T. Class II HLA genotype in fulminant type 1 diabetes –a nationwide survey with reference to GAD antibodies.

J Diabetes Invest. doi:

10.1111/j.2040-1124.2011.00139.x, 2011

Shibasaki S, Imagawa A, Hanafusa T.

Fulminant Type 1 Diabetes Mellitus –a new class of type 1 diabetes. In *Diabetes: An Old Disease, a New Insight* (in press)

Haseda F, Imagawa A, Murase-Mishiba Y, Sano H, Hirano-Kuwata S, Ueda H, Terasaki J, Hanafusa T. Low CTLA-4 expression in CD4(+) helper T-cells in patients with fulminant type 1 diabetes. *Immunol Lett*. 2011;139(1-2):80-6.

Hotta K, Hanafusa T et al Computed tomography analysis of the association between the SH2B1 rs 7498665 single-nucleotide polymorphism and visceral fat area. *J Human Genet* 53: 716-719 2011

Tanimoto K, Hanafusa T et al Intravascular and Intra-atrial Extension of Follicular Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2011 21(11): 1281-1282

Tanimoto K, Hanafusa T et al Hypopituitarism in a patient with transsphenoidal cephalocele: longitudinal changes in endocrinological abnormalities.

Endocrine J 2011 53(3): 193-198

2. 学会発表

【国内】 20件

そのうち主なもの

佐野寛行、寺前純吾、長谷田文孝、堤千春、大西峰樹、三柴裕子、今川彰久、花房俊昭

Exendin-4 は EMC ウイルスによる膵β細胞破壊を抑制する

第 54 回 日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19~21 札幌

堤 千春、今川彰久、池上博司、牧野英一、小林哲郎、花房俊昭

劇症 1 型糖尿病における Class II HLA と臨床的特徴の関連

第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 2011.05 札幌

長谷田文孝、今川彰久、三柴裕子、佐野寛行、上田裕紀、寺前純吾、花房俊昭

劇症 1 型糖尿病患者における CD4+ ヘルパーTリンパ球内の CTLA-4 発現の検討

第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 2011.05 札幌

渡邊 大督、宮脇 正博、宮里 舞、藤澤 玲子、高本 晋吾、忌部 尚、佐野寛行、平岩 哲也、大西 峰樹、寺前 純吾、花房 俊昭

摂食障害を伴い血糖コントロールに苦慮した 1 型糖尿病の一例

第 48 回日本糖尿病学会近畿地方会 2011.10.29 大阪

【国際】

Tsutsumi C, Imagawa A, Ikegami H, Makino H, Kobayashi T, Hanafusa T Heterogeneity of Class II HLA Genotypes in Patients with Fulminant Type 1 Diabetes in Japan.

The 3rd Scientific Meeting of the Asian Association of the Study for Diabetes, Beijing, China, 2011 Jul.

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 さらに LGP2 が強発現し、IFN- α , MHC-class1 分子も発現していた。また CXCL10, IL-18, IFN- γ も発現がみられた。FT1D 患者血中 IFN- γ 濃度も上昇していた。本疾患の発症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, innate immunity 血中 interferon (IFN) - γ 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、 β 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

3例の FT1D 患者の β 細胞には、enterovirus が感染し、innate immunity の受容体である RIG-I, MDA5 さらには LGP2 が強く発現していた。膵島細胞には IFN- α , - β 1, MHC-

class-I が発現していた。さらに cytokine の IFN- γ , IL-18, chemokine の CXCL10 が β 細胞に共発現していた。CD11c+樹状細胞が β 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。 β 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 β 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- γ 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, さらに LGP2 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- γ , IL-18 が β 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, β 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 β 細胞の破壊が急速にする進行する可能性も示唆された. FT1D 患者の血中 IFN- γ 濃度を測定することにより, β 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, LGP2 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, β 細胞自己が炎症性サイトカインを産生することにより急激な β 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 60:884-9.

2) Kobayashi T, Nishida Y, Tanaka S, Aida K. Pathological changes in the pancreas of fulminant type 1 diabetes and slowly progressive insulin-dependent diabetes mellitus (SPIDDM): innate immunity in fulminant type 1 diabetes and SPIDDM *Diabetes Metab Res Rev*. 2011 27:965-70.

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。90万SNPによる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に関して二次パネルによるreplication study、imputation、HLA層別解析、欧米GWASで同定された候補遺伝子の解析を行った結果、複数の新規候補遺伝子マーカーが抽出された。二次パネルで関連が再現されたものに関して三次パネルで検証を進めた。

A. 研究目的

（劇症 117、急性発症 207、緩徐進行 114）
対照 357 名

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。

三次パネル：
患者（1型糖尿病）498名
（小児急性発症典型例）
対照 457名

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：1332名、対照群 998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 200名

二次パネル：

患者（1型糖尿病）438名

【方法】

一次パネルを対象として、全ゲノムにわたるAffymetrix社製SNP Array 6.0アレイ（90万SNP）を用いて遺伝子型を決定、解析（解析センター：東京大学遺伝学教室、分担研究者 徳永・西田）し、ゲノムワイドの有意水準を満たした59SNP（HLA領域）とゲノムワイドの有意水準には達しないが関連が示唆された623SNPを同定し、後者に関して二次パネルを用いてDigiTag2（東京大学人類遺伝学解析センター）による再現性解析を実施し、606SNPに関して結果を得た。二次パネルで有意の関連が再現された26SNPを三次パネルでの確認解析に供した。

これと並行して更なる遺伝マーカーを同定する目的で、一次パネルのGWASデータに関してimputation、HLA層別解析、欧米GWASで同定された候補遺伝子の解析を行

い、新たな候補 SNP を抽出、二次パネルでの再現性解析に供した。

(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

SNP array 6.0 (906,600 SNPs) のうち QC call rate, SNP call rate, 対照における Hardy-Weinberg equilibrium, マイナーアレル頻度の観点から 644,727 個の SNP を採用し、一次パネルを用いた全ゲノム関連解析を行った結果、HLA 領域に存在する 59 SNP がゲノムワイドの有意水準を満たした。ゲノムワイドの有意水準には達しないが関連が示唆される 623 SNP の SNP に関して二次パネル解析を行い、26SNP において有意の関連が再現された。これらのうちで関連の特に強かった 2 つの SNP に関して三次パネルで検証解析を行ったが関連が再現されなかったことから、他の SNP について順次検証を進めている。

これと並行して一次パネルの GWAS データに関して imputation、HLA 層別解析、欧米 GWAS で同定された候補遺伝子の解析を行い、追加のマーカークの抽出を進めた結果、複数のマーカークが新たに抽出されるとともに、欧米で関連が報告されている IL2RA が関連を有することが示唆された。これらに関しても replication, confirmation 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。本研究の結果、HLA 領域の複数の遺伝マーカーが一次パネルの GWAS でゲノムワイドの有意水準を満たし、日本人で最も強い 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子が HLA であること、遺伝マーカーとして最も重要であることがゲノムワイドのレベルで確認された。また、欧米の GWAS で関連が報告されている SNP のうちでは IL2RA 遺伝子領域の SNP が日本人でも関連を示すことが示唆された。これ以外のマーカーに関しては複数の SNP で再現性が確認されているが、厳しいゲノムワイドの有意水準をクリアするまでには至っておらず、三次パネルでの検証解析の結果を待つ必要がある。各サブタイプと真に関連を示す SNP の同定を完結することにより、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こと証明すべく、三次パネルでの検証を進めている。劇症1型糖尿病は他のサブタイプと同様にHLAとの関連が最も強い反面、他の遺伝子に関しては異なるSNPが関連を示すことが示唆されたことから、1型糖尿病のサブタイプ間に遺伝的な共通性と異質性が存在することが示された。共通性の解析から1型糖尿病全般の根本に関わるメカニズムの解明、異質性の解析から劇症1型糖尿病特異的なメカニズムの解明とマーカーの同定、予知・予防への展開が期待される。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Cho YS, Ikegami H et al.:
Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 8 new loci for type 2 diabetes in East Asians.
Nature Genet 44:67-72, 2012

Li H, Ikegami H et al.:
Association of genetic variation in FTO with risk of obesity and type 2 diabetes in up to 96,551 East and South Asians.
Diabetologia 55:981-95, 2012

Ikegami H, Noso S, Babaya N, Kawabata Y:
Genetics and pathogenesis of type 1 diabetes: prospects for prevention and intervention
J Diabetes Invest 2(6):415-420 2011

Nakamura K, Kawasaki E, Imagawa A, Awata T, Ikegami H, Uchigata Y, Kobayashi T, Shimada A, Nakanishi K, Makino H, Maruyama T, Hanafusa T; the Research Committee on Type 1 Diabetes of the Japan Diabetes Society.
Type 1 diabetes and interferon therapy: a nationwide survey in Japan.
Diabetes Care 34:2084-2089, 2011

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 60:761-766, 2011

Takeuchi F, Ikegami H et al.:
Association of obesity susceptibility genetic variants with type 2 diabetes in the Japanese.
Diabetologia 54: 1350-1359, 2011

Hayasaka N, Ikegami H et al.:
Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in Rgs16 knockdown mice.
PLoS ONE 6:e17655, 2011

2. 学会発表

1) 国内学会

池上博司、能宗伸輔、川畑由美子：
シンポジウム6：
「1型糖尿病の遺伝解析：GWAS研究から見えること」
第49回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌、5/20, 2011

池上博司：
教育講演1「1型糖尿病：Up to date」
第48回日本糖尿病学会近畿地方会、大阪、10/29, 2011

池上博司：
「1型糖尿病疾患感受性遺伝子：HLAとnon-HLA」
第9回1型糖尿病研究会、大磯、10/30, 2011

池上博司：
学会賞「米田賞」受賞講演
「自然発症モデル動物を用いた糖尿病の遺伝解析」
第25回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、東京、11/5, 2011

朴忠勇、池上博司ほか
円形脱毛症患者における甲状腺および
び腓島自己免疫疾患合併例の検討
第84回日本内分泌学会学術総会
神戸、4/23, 2010

2) 国際学会

Ikegami H et al. Main Symposium 5
Genetics of type 1 diabetes in east Asia.
16th Japan-Korea Symposium on
Diabetes mellitus, Tokyo, Japan.
October 21, 2011

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし