

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：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

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、末梢血CD4⁺T細胞におけるCTLA-4 発現について検討した。その結果、健常者に対し、感度 90.9%、特異度 73.3%、陽性的中率 71.4%、陰性的中率 91.7%と良好なマーカー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ーシス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る。

CTLA-4 は免疫反応の調節を担う分子として広く知られている。この分子は免疫反応の司令塔である CD4⁺T 細胞上に発現しており、抗原提示細胞上に発現する B7-1/B7-2 と結合することにより、免疫反応を負に制御する。

一方、CTLA-4 は劇症 1 型糖尿病との関連が指摘されている。すなわち私どもは、CTLA-4 遺伝子の CT60 多型のうち AA 多型と劇症 1 型糖尿病に関連を認めること、患者末梢血において可溶性 CTLA-4 が低値を示すことを明らかにしている (Diabetes Care. 2008;31:1608)。

私どもは、劇症 1 型糖尿病患者、1A 型糖尿病、2 型糖尿病、健常者の末梢血 CD4⁺T 細胞における CTLA-4 の発現を検討した。その結果、劇症 1 型糖尿病では、1A 型糖尿病、2 型糖尿病、健常者に比し、CTLA-4 陽性細胞数が有意に低値であった。すなわち、劇

症 1 型糖尿病においては、免疫反応を制御する CD4+T 細胞における CTLA-4 の発現低下を介して、免疫反応が急激に進行するのではないかと推測された。

そこで今回、CD4+T 細胞における CTLA-4 の発現について検討し、診断マーカーとしての考察を加えた。

B. 研究方法

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+T 細胞中の CTLA-4 陽性細胞の割合を測定した。対象は、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 名である、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。

(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た。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

CTLA-4 の発現を解析した結果、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+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

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場合、リンパ球マーカー「CD4+T 細胞における CTLA-4」は感度、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。一方、簡便性において問題を有しており、今後解決すべき課題と考えられた。

E. 結論

劇症 1 型糖尿病の診断に、リンパ球マーカー「CD4+T 細胞における CTLA-4」は感度、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 Sep 30;139(1-2):80-6.

2. 学会発表

Imagawa A.
Symposium “Type 1 diabetes”
Fulminant type 1 diabetes –is it a unique Asian Phenomenon? The 3rd Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Beijing, China, July 23, 2011.

今川彰久

シンポジウム「1 型糖尿病の成因と予防：新しい展開と洞察」1 型糖尿病における膵β細胞傷害機構 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌、5/20, 2011

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

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：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

分担研究課題： GWAS の実施

分担研究者： 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、全606 SNPsのSNPタイピングが終了し、572 SNPs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から8 SNPsを検出し、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からも13 SNPs、7 SNPsをそれぞれ検出した。検出された全28 SNPsのうち、7 SNPsについて3次パネルを用いたReplication解析を実施したが、再現性が確認できなかった。また、新たな4つの方法で、Replication解析の候補SNPsを選択し、現在解析を進めている。

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同定

を目指す(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

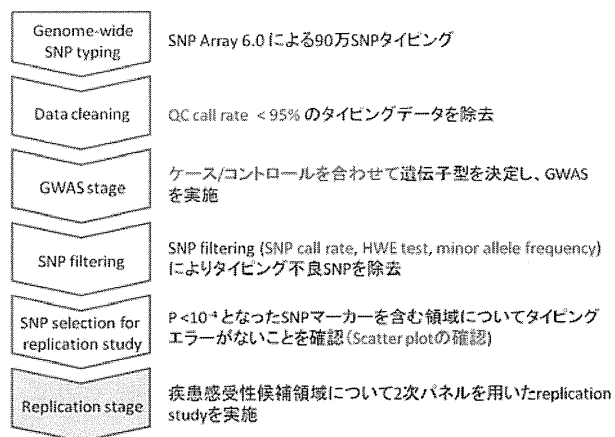


図 1 ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子同定までの流れ

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、ゲノムワイド関連分析が完了している。

本年度は、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 を継続して実施した。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。また、有望な SNP については TaqMan 法を用いて 3 次パネル（糖尿病患者群 498 検体、健常対照群 457 検体）での解析を追加した。

さらに、(1)健常群データを追加した GWAS、(2)Imputation による新規候補遺伝子領域の探索、(3)HLA 層別化 GWAS、(4)他の Population で関連が報告された遺伝子領域の日本人 GWAS における解析結果、などから新たな候補遺伝子を選択した。

（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

DigiTag2 法による全 606 SNPs のタイピングが終了し、606 SNPs のうち 572 SNPs を対象とした統計解析を実施した。1 次パネルと 2 次パネルを用いた統計解析の結果、劇症 1 型糖尿病の発症と関連する有望な遺伝子領域 ($P < 10^{-4}$) から合計 8 SNPs を検出した。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からもそれぞれ 13 SNPs、7 SNPs を検出した。全 28 SNPs の有望な関連を示した遺伝子領域のうち、7 SNPs を対象として 3 次パネルでの解析を TaqMan 法で実施

Plate No.	SNP No.	rs ID	Gene	Subgroup	3rd panel						P-value	OR
					Case			Control				
					AA	AB	BB	AA	AB	BB		
pj210-1	SNP59	rs17597778	FSTL5	Acute, SPID-DM	5	111	380	6	101	350	0.91	0.98
pj210-2	SNP40	rs4069714	USP6	Acute	106	216	176	93	189	173	0.44	1.08
pj210-3	SNP02	rs11692491	OSR1	Acute	231	164	33	235	158	31	0.66	1.05
pj210-4	SNP15	rs11748320	DNAJC18	Acute	70	213	145	73	189	162	0.47	0.93
pj210-4	SNP68	rs6471555	---	Acute, Fulminant	44	187	196	41	179	203	0.55	0.94
pj210-5	SNP29	rs10833367	SLC6A5	Fulminant	224	162	41	226	166	32	0.50	1.07
pj210-5	SNP51	rs7298527	SOAT2	Fulminant	38	171	219	34	201	189	0.20	1.15

表 1 三次パネルを用いた再現性の確認

したが、再現性は確認されなかった (表 1)。

新たに選択した候補遺伝子領域に存在する 32 SNPs の選択が完了し、2 次パネルを用いた Replication 解析を実施するための DigiTag2 セットを現在設計中である。

D. 考察

統計解析を実施した全 572 SNPs のうち、劇症 1 型糖尿病の発症と関連する有望な遺伝子領域から 8 SNPs、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からもそれぞれ 13 SNPs、7 SNPs を検出した ($P < 10^{-4}$)。有望な関連を示した全 28 SNPs のうち、7 SNPs を対象として 3 次パネルを用いた解析を実施したものの、再現性は確認されなかった。現段階では、新たな診断マーカーを同定できていないものの、残る 21 SNPs の候補 SNPs を対象とした Replication 解析を継続することが必要であると考えられる。

GWAS における単点解析の結果から選択した全 606 SNPs について、2 次パネルまでの解析を終了したものの、新規の診断マーカーを同定するには至っていない。Imputation 解析や HLA 層別化解析などの新しい解析手法を取り入れ、これまでに検出できなかった新たな候補遺伝子領域を選択した。これらの SNPs で再現性が確認されれば、Replication 解析に持ち込む SNP の新たな選択方法として確立することが期待される。

E. 結論

Replication 解析で検出された有望な遺伝子領域に存在する全 28 SNPs のうち、3 次パネルでの解析が終了していない 21 SNPs について、TaqMan 法による解析を進め、また 4 つの方法で新たに選択した候補遺伝子領域に存在する SNP を対象とした Replication 解析を進めることで、新たな疾患感受性遺伝子の同定を目指す。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida N, Mawatari Y, Sageshima M, Tokunaga K: Highly Parallel and Short-Acting Amplification with Locus-Specific Primers to Detect Single Nucleotide Polymorphisms by the DigiTag2 Assay. PLoS One. 7(1): e29967 (2012)
- 2) Sugihara S, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, Takubo N, Tsubouchi K, Horikawa R, Kobayashi K, Kasahaera Y, Kikuchi T, Koike A, Mochizuki T, Minamitani K, Takaya R, Mochizuki H, Nishii A, Yokota I, Kizaki Z, Mori T, Shimura N, Mukai T, Matsuura N, Fujisawa T, Ihara K, Kosaka K, Kizu R, Takahashi T, Matsuo S, Hanaki K, Igarashi Y, Sasaki G, Soneda S, Teno S, Kanzaki S, Saji H, Tokunaga K, Amemiya, S, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT) : Genetic Characteristics on HLA-Class II and Class I among Japanese Type1A and Type 1B Diabetic Children and Their Families. Pediatric Diabetes 13(1): 33-44, 2012.

2. 学会発表

- 1) Mawatari Y, Sageshima M, Nishida N, Tokunaga K: Short-acting 192-plex PCR with locus specific primers to detect single nucleotide polymorphisms by DigiTag2 assay. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011

- 2) Tokunaga K: Lessons from genome-wide search for disease-related genes, The 20th Annual Conference of Korean Genome Organization, Gangoe-myeon, Korea, 2011.9.1-2.

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

分担研究課題：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 独立行政法人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、新たに報告されたアジア人 2 型糖尿病 GWAS のメタ解析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、アディポサイトカインなど糖代謝・肥満関連ホルモンの多項目同時測定系について、アジア人血清試料への適応を考慮して改良されたキットの検討を行い、測定可能範囲など有用性が増していることを確認した。このように、ゲノム解析、バイオマーカー探索においてアジア人という人種特異性を考慮する必要性が明らかになった。

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る、糖尿病の最重症型であるが、その病因・病態はほとんど不明である。一方、白人の 2 型糖尿病、肥満・インスリン抵抗性を主徴とするが、日本人 2 型糖尿病は膵 β 細胞機能が進行性に障害される特徴があり、劇症 1 型糖尿病と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。本年度は、2 型糖尿病メタ解析結果との

比較を行う。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。本年度は、アディポサイトカインなど糖代謝・肥満関連ホルモンの多項目同時測定系について、アジア人血清試料への適応を考慮して改良されたキットの検討を行う。

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

東アジア人 2 型糖尿病の大規模な GWAS と

しては、2010年に、分担研究者も関与した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の成果が報告されたのが最初である。2011年には、さらに東アジア人の大規模なメタ解析の結果が報告された(Choi et al., Nat Genet 44(1): 67-72, 2011)。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

我々はこれまで、ビーズシステムを用いた多項目ELISA同時測定系を用いて、少量の血清で古典的なサイトカインや、アディポサイトカインを含む糖代謝関連ホルモン濃度の測定を試みてきており、今年度は、有用性をさらに追求した。解析機器は、昨年度まで用いていたバイオラッド社のBioPlex200システムに比較して、よりスループットを高めて新しく発売された同社「BioPlex3Dシステム」、またキットは同社から最近改良バージョンとしてされた「Bio-Plex Pro Human Diabetes Assay Panel」を用い、2型糖尿病患者、高度肥満者、一般対照者などの血清を用いて検討を行った。

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

2011年に報告された東アジア人2型糖尿病GWASのメタ解析では、8つの解析を合わせることで、1次ステージとして糖尿病6952人、対照11,865人を用いた解析をしている。その後replication studyを経て、従来既報の糖尿病疾患感受性遺伝子の多くが

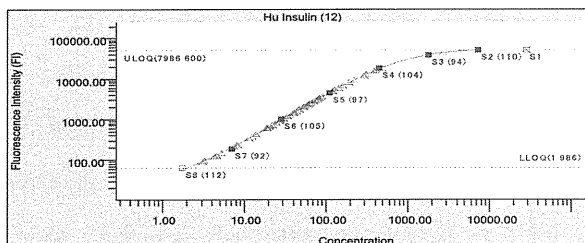
再現されていたほか、新規に *GLIS3*、*PEPD*、*FITM2-R3HDML-HNF4A*、*KCNK16*、*MAEA*、*GCCI-PAX4*、*PSMD6*、*ZFAND3* という8つの新規遺伝因子を同定している。このうちいくつかは、膵β細胞での機能的役割がある程度想定可能な遺伝子だが、β細胞機能との関連が全く報告されていない遺伝子も多い。これらについて、遺伝子ベースで今回の劇症1型糖尿病のGWASデータと比較したが、ゲノムワイドな有意水準に達する結果は得られていない。また劇症1型糖尿病の一次スクリーニングで有意なSNPのうち、前年度までの手順で二次スキャン以降のために抽出された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

多項目同時測定システムとして、多種類のELISA用抗体を固定したビーズを光学的に検出するサスペンションアレイ、いわゆるLuminexテクノロジーとよばれるシステムを利用している。このシステムは微量の検体で多くの項目の定量が可能のため、特に臨床検体解析への応用が期待されている。平成22年度に用いた「Bio-Plex Pro Human Diabetes Assay Panel」は、合計14の糖代謝・肥満関連ホルモンを、2プレート合計30μL前後の血清で測定できるキットであったが、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症例がかなり多いことが判明した。これは、白人を対象に作製されたため、アジア人に最適化されていないと考えられ、大きな課題であった。今回使用したキットは、名称は同じだが、上述の問題点を吟味して使用する抗体を全面的に改良し、かつ項目を厳選して

(10+2) plex で測定するバージョンであった (C-Peptide、Ghrelin、GIP、GLP-1、Glucagon、Insulin、Leptin、PAI-1、Resistin、Visfatin、Adiponectin、Adipsin)。そこでこの有用性を評価した。

使用したのは、日本人高度肥満者、非肥満 2 型糖尿病患者、非糖尿病対照者など合計約 200 名である。従来通り、ほとんどの項目で安定した測定値が得られた。また、試料を duplicate することによる、同一ロット内での intra-assay variation は比較的小さかった。以前のバージョンでもっとも測定不能が多かったインスリン値については、下に示すように測定した試料 (図中の▲) では非常に分布範囲が広いが、インスリン値の高い肥満患者についてはもちろん、一般の日本人 2 型糖尿病患者や対照者についても、多くの場合十分な測定レンジで解析できることがわかり、以前よりはるかに改善されていた。しかし、いくつかの試料ではスタンダードカーブ (図中の■) の両端、とくに下限以下となってしまうものも見られた。



そのほかの項目については、おおむね良好な測定結果を得ることができた。本研究の主目的ではないが、たとえば肥満者で、教育入院その他の治療前後で大きく変化する項目 (例: 減量後のレプチン低下、C ペプチド低下など) もある一方、こうした変化にもかな

り個人差が認められた。

また、異なる日に行った実験を比較すると、ロット間、あるいは inter-assay variation はまだ大きいことがわかり、一つのパネルの試料はなるべく同時に (同一ロットで) 測定するのが望ましいことがわかった。

D. 考察

日本人を含む東アジア人の 2 型糖尿病の大規模な GWAS メタ解析の結果から明らかになったことは、2 型糖尿病の遺伝因子の中には白人と共通のものも多いが、SNP 頻度の差から、GWAS の検出力が異なることがあること、また一部の因子は各民族に特異的であること、である。したがって劇症 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。

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く、個々の効果が弱い多因子疾患の遺伝因子をすべて救い上げられていない (false negative) 可能性がある。これは個々の GWAS で同定されなかった遺伝因子が、メタ解析などで新たに同定されることから明らかである。そのため、サンプル数の少ない劇症 1 型糖尿病の GWAS では、有意水準を少し下げ、遺伝子機能等と合わせて吟味する方法を併用しなくてはならないだろう。

また GWAS では、用いた SNP セットが、ゲノム全体を解析するタグとしてその民族にとって有用かどうかが重要である。現在まで

世界で使用されている SNP プラットフォームは、本研究で用いたアフィメトリクス社の SNP 6.0 アレイも含め、主に白人のゲノム情報をもとに最適化されているが、アジア人では SNP 頻度や連鎖不平衡ブロック構造などが異なる部分が多いため、疾患関連 SNP を見逃してしまう可能性が指摘されてきた。つい最近、HapMap 計画や 1000 人ゲノム計画などのデータからアジア人により最適化されたプラットフォームも発表されている (アフィメトリクス社 Axiom)。劇症 1 型糖尿病の症例収集は、日本が世界を圧倒的にリードしており、今後こうしたプラットフォームで解析できれば、劇症 1 型糖尿病の病態を明らかにできるとともに、と 2 型糖尿病の遺伝的背景とより詳細な比較が可能になると期待される。

病態が十分解明されていない疾患の成因やバイオマーカー探索の方法としては、質量分析計を用いたいわゆるトップダウン型のプロテオーム解析があるが、特に血清などでは、アルブミンや免疫グロブリンなど圧倒的に豊富なタンパクに影響されて、存在量の少ない物質の同定に難があることが知られている。一方、サイトカインやホルモンなど、存在は微量ながら生物学的意義の明確な物質については、限られた臨床試料を用いて多項目同時測定できる Luminex 法の有用性が注目されている。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、以前のバージョンのキットでは特にインスリンで測定下限以下が多かったが、これに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白人が最適化や最適化されていたからだと考えられる。このように、ゲノム解析だけでなく、タンパク・バ

イオマーカー解析においても、その人種の特性を加味して最適の解析系を用いることの重要性が明らかになった。今回、アジア人への適用を考慮した改良バージョンが発売された背景には、我々の提言もある程度貢献したと考えているが、確かにインスリンの測定可能範囲が拡大され有用性が増していた。ただし、劇症 1 型糖尿病では特にインスリン低値が予想されるため、血清インスリンは最終的にはやはり別途個別に測定を準備すべきだと考えられた。

そのほかの項目については、おおむね良好な測定結果を得ることができた。本研究の主目的ではないが、たとえば肥満者で、教育入院その他の治療前後で大きく変化する項目 (例：減量後のレプチン低下、C ペプチド低下など) もある一方、こうした変化にもかなり個人差が認められ、病態評価や治療効果の判定など、個別化医療へ応用できる可能性がある。ただし多項目同時測定系では、各項目の反応条件が最適化されているとは限らないため、単項目の ELISA による測定値と厳密に対応するかどうかについては、別途検証が必要である。すなわち、診断目的ではなくあくまで解析スクリーニングツールとして位置づけるべきであり、疾患や病態の関連が示唆された項目については、個別に単項目測定系で再解析することが望ましい。

こうした研究を進めることで、遺伝因子や、糖代謝関連ホルモン、サイトカインなどを組み合わせることにより、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、大規模な 2 型糖尿病 GWAS のメタ解析の結果と比較したが、現時点では明らかなオーバーラップは認めなかった。またアジア人・特性を考慮して改良された糖代謝・肥満関連ホルモンの多項目測定系の検討を行い、以上より良好な結果を得、バイオマーカー探索に有用と思われた。

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：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

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 教授

研究要旨

劇症 1 型糖尿病および 2 型糖尿病のプール血清を用いて自己抗体のスクリーニングを行った。両血清のいずれにおいても、複数の自己抗体の候補が認められた。

A. 研究目的

血清マーカーとして劇症 1 型糖尿病に特異的な自己抗体を網羅的に探索して同定する。

B. 研究方法

コムギ無細胞タンパク合成系を用いて作成したタンパク質ライブラリーと AlphaScreen 法を組み合わせた高感抗原抗体反応検出系は、本学の遠藤・澤崎らによって開発された技術であり、タンパク質と反応する自己抗体を網羅的に同定できる。この技術を用いて、2 型糖尿病 6 人及び劇症 1 型糖尿病 6 人の各プール血清の自己抗体のスクリーニングを行った。

C. 研究結果

約 2000 種類の抗原からなるライブラリーをスクリーニングした結果、劇症 1 型糖尿病プール血清、2 型糖尿病プール血清のいずれにおいても複数の自己抗体の候補

が認められた。

D. 考察

劇症 1 型糖尿病患者、2 型糖尿病患者のプール血清中には複数の自己抗体の候補が認められた。個別血清を用いた解析が必要であると考えられた。

E. 結論

劇症 1 型糖尿病患者のプール血清中に自己抗体が存在する可能性が示唆された。

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

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

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：1 型糖尿病の遺伝子因子の研究

研究分担者 栗田 卓也 埼玉医科大学医学部教授

研究要旨

1 型糖尿病の遺伝子因子としての HLA (*DRB1*, *DQB1*) および非 HLA 遺伝子の統合的解析は英文原著として発表した。また、次世代シーケンスを用いた変異解析を 1 型糖尿病候補遺伝子について行い、アミノ酸置換を伴う変異を多数同定し、多施設共同研究により 1 型糖尿病との関連の検討を進めている。今後、次世代シーケンスによるエクソーム解析も進める予定である。

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。

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。

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、
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
II x による次世代シーケンス解析を行った。
多数例について、得られた変異の一部を
TaqManSNP により決定し、1 型糖尿病との
関連を検討した。

（倫理面への配慮）

共同研究グループの各施設において、遺
伝情報・個人情報の管理などを含んだ研究

C. 研究結果

24 遺伝子中の 18 遺伝子において、アミ
ノ酸置換を伴う nsSNP が合計 57 個同定され、
そのうちの 38 個 (67%) が rare variant (対
照における $MAF < 0.05$) であった。2 遺伝子
(*IFIH1*、遺伝子 X) について、検出された
rare variant などの関連解析を施行中であ
る。単独で有意差を認めたものはなかった
が、*IFIH1* では OR が 1 以下となる傾向であ
ったが有意差は認めていない、遺伝子 X で
は 4 つの rare variant がやはり OR が 1 以
下であり、1 つの variant について有意差
を認めた。

D. 考察

次世代シーケンスは膨大な配列データが
一挙に得られ、変異・多型を網羅的に解析
する有力な手法である。

rare variant の1型糖尿病感受性に及ぼ
す影響については多数例の検討が必要であ
るが、遺伝子Xの rare variant は1型糖尿
病抵抗性であることが示唆される。

E. 結論

日本人1型糖尿病における、次世代シー
ケンスの1型糖尿病疾患感受性遺伝子の解
析における有用性と今後の課題を明らかに
した。今後、次世代シーケンスによるエク
ソーム解析も進める予定である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamashita H, Awata T, Kawasaki E, Ikegami H,
Tanaka S, Maruyama T, Shimada A, Nakanishi
K, Takahashi K, Kobayashi T, Kawabata Y,
Miyashita Y, Kurihara S,
Morita-Ohkubo T, Katayama S; Japanese Study
Group on Type 1 Diabetes Genetics. Analysis
of the HLA and non-HLA susceptibility loci in
Japanese type 1 diabetes.

***Diabetes Metab Res Rev* 2011;27(8):844-8.**

2. 学会発表

栗田卓也、山下富都

1 型糖尿病の成因と予防 新しい展開と洞
察 次世代シーケンス解析から見えること

第54回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌、
5/20, 2011

栗原進、栗田卓也、山下富都、宮下由美、
森田智子.

次世代シーケンス解析による日本人1型糖
尿病の遺伝解析.

第9回1型糖尿病研究会、大磯、10/30 2011

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

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：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

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

1型糖尿病の診断マーカーとして、これまでに GAD 抗体、IA-2 抗体、インスリン自己抗体、ICA などの膵島関連自己抗体が使用されてきた。最近、インスリン分泌顆粒膜に存在しインスリン分泌顆粒腔内に亜鉛イオンを輸送する ZnT8 が新たな1型糖尿病の自己抗原として報告され、ZnT8 と1型糖尿病に関する研究が進んでいる。今回我々は1型糖尿病の新たな診断マーカーとしての ZnT8 抗体の位置づけについて、発症早期1型糖尿病 111 例（急性発症型 81 例、緩徐発症型 30 例）において、ZnT8 抗体の陽性率、抗体価、epitope を検討した。その結果、ZnT8 抗体の陽性率は急性発症1型糖尿病において有意に高く（58% vs. 20%）、発症年齢 ≤ 10 歳の若年発症例において77%と高率に検出されることを明らかにした。一方、ZnT8 抗体 epitope の解析では、以前より報告されている重要な epitope である 325 番目のアミノ酸以外にも epitope が存在し、325 番目のアミノ酸以外の epitope を有する患者は若年発症例に多いことが明らかとなった。以上より、ZnT8 抗体は急性発症1型糖尿病の新たな診断マーカーであり、膵島 β 細胞破壊の速度にも関連してい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、細胞傷害性 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枯渇する自己免疫疾患であるが、*in vivo* で細胞傷害性 T 細胞を検出するのは困難であるため、自己免疫現象の証明法として膵島関連自己抗体の検出が一般化している。膵島関連自己抗体として、これまで GAD 抗体、IA-2 抗体、インスリン自己抗体 (IAA) が測定されてきたが、最近新しい自己抗原として ZnT8 が同定され、新たな診断マーカーとしての ZnT8 抗体の位置づけについて研究が進められている。ヒト ZnT8 の 369 個のアミノ酸をコードしている遺伝子 (*SLC30A8*) は第 8 染色体に位置し、325 番目のアミノ酸をアルギニン (R) からトリプトファン (W) へ置換する C>T 多型 (rs13266634)

は2型糖尿病の疾患感受性 SNP として知られている。今回われわれは、日本人1型糖尿病における ZnT8 抗体の臨床的意義について検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

劇症1型糖尿病を除く日本人1型糖尿病 111 例 (M:F=43:68、発症年齢 21.9 ± 16.1 歳) である。発症様式で分類したところ、急性発症型 81 例 (M:F=30:51、発症年齢 19.1 ± 14.5 歳)、緩徐発症型 30 例 (M:F=13:17、発症年齢 29.7 ± 18.0 歳) であった。

(2) ZnT8 抗体測定法

ヒト ZnT8 のアミノ酸 268 - 369 をコードする cDNA のうち 325 番目のアミノ酸が R のもの (ZnT8-325R) と W のもの (ZnT8-325W)、および 2 つのハイブリッド cDNA (ZnT8-325RW)

の3種類のcDNAと *in vitro* transcription/translation法を用いて³⁵S標識した抗原を作成し、radioligand binding assayにてZnT8抗体を測定した。抗体価は、assay毎に用いる陽性コントロールの結合率に対するサンプルの結合率の割合をindexとして表わした。カットオフ値は健常人139人から得られたindexの99%をとし、それぞれ0.016、0.018、0.007であった。

(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検定でおこなった。

C. 研究結果

(1) ZnT8-325RW 抗体の陽性率

1型糖尿病におけるZnT8-325RW抗体の抗体価と陽性率は図1に示す通りである。急性発症型における陽性率(58%)は緩徐発症型(20%)に比べ有意に高率であった($p < 0.0005$)。また発症年齢別に検討すると、発症年齢 ≤ 10 歳の症例におけるZnT8-325RW抗体の陽性率(77%)は >10 歳の症例に比べ有意に高率であった(40%、 $p < 0.005$)。

(2) ZnT8-325RW 抗体の抗体価

ZnT8-325RW抗体陽性者における平均抗体価は、急性発症型(0.155 \pm 0.168)と緩徐発症型(0.147 \pm 0.110)の間に有意差を認めなかった。また、発症年齢 ≤ 10 歳および >10 歳の症例においても有意差は見られなかった(0.216 \pm 0.207 vs. 0.125 \pm 0.129)。

(3) ZnT8-325R および ZnT8-325W への反応

対象111例中、血清残量の関係より106例で検討した。ZnT8-325R、ZnT8-325Wへ反応した患者の割合は、それぞれ26%および36%で、42%は少なくとも1つ以上に反応した(図2)。また、両方のZnT8 variantに反応する患者の割合

は、発症年齢 ≤ 10 歳で55%と >10 歳の症例(12%)に比較し有意に高率であった($p < 0.0001$ 、図2)。

D. 考察

本研究により、ZnT8抗体が急性発症1型糖尿病の有用な診断マーカーであること、および発症年齢によりZnT8に対する液性免疫が異なっていることが明らかになった。急性発症1型糖尿病では58%にZnT8抗体が検出され、緩徐発症型の陽性率(20%)に比較し有意に高率であったことから、ZnT8抗体が1型糖尿病における膵島 β 細胞破壊のスピードを反映していることが示唆された。このことはZnT8抗体陽性率が若年発症例に高いことと関連している可能性がある。

一方、ZnT8抗体のepitopeのひとつである325番目のアミノ酸(RまたはW)以外にも重要なepitopeが存在していることも示唆された。すなわち、ZnT8-325RとZnT8-325Wの両方に反応する、いわゆる325番目のアミノ酸非拘束性epitope(非拘束性epitope)が存在し、このepitopeを有する患者が有意に若年発症例に多いことから、非拘束性epitopeが早期発症に関連があることが推定された。この仮説を証明するためには、さらに詳細なepitope mappingや糖尿病発症前期におけるepitope解析が必要である。

E. 結論

ZnT8抗体は急性発症および若年発症1型糖尿病の有用な診断マーカーである。また、発症年齢によりZnT8抗体epitopeが異なることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawasaki E. ZnT8 and type 1 diabetes.

Endocr J, in press

2. Horie I, Kawasaki E, Ando T, Kuwahara H, Abiru N, Usa T, Yamasaki H, Ejima E, Kawakami A. Clinical and genetic characteristics of autoimmune polyglandular syndrome type 3 variant in the Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab*, in press

3. 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 fulminant, acute-onset, and slow-onset patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 27: 895-898, 2011

5. 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 Ttherapy: A nationwide survey in Japan. *Diabetes Care*, 34: 2084-2089, 2011

6. Satoh T, Abiru N, Kobayashi M, Zhou H, Nakamura K, Kuriya G, Nakamura H, Nagayama Y, Kawasaki E, Yamasaki H, Yu L, Eisenbarth GS, Araki E, Mori M, Oyadomari S, Eguchi K. CHOP deletion dose not impact the development of diabetes but suppresses the early production of insulin autoantibody in the NOD mouse. *Apoptosis*, 16: 438-448, 2011

7. 川崎英二: 1型糖尿病と2型糖尿病は何が違うの? 栄養療法は同じでいいの? *Nutrition Care*, 4: 588-589, 2011

8. 川崎英二: 糖尿病は遺伝するの? 栄養療法をきちんと守れば糖尿病は治るの? *Nutrition Care*, 4: 590-591, 2011

9. 川崎英二: 1型糖尿病の遺伝因子と膵島抗原・自己抗体. 糖尿病学の進歩(第45集) 45, 306-310, 2011

10. 川崎英二: 1型糖尿病と膵島関連自己抗体. 内分泌・糖尿病・代謝内科, 32: 554-561, 2011

11. 川崎英二: 緩徐進行1型糖尿病の治療. スマートな糖尿病診断と治療の進め方, 285-288, 2011

12. 川崎英二、三輪昌輝、田中 愛: ELISA法によるGAD抗体、IA-2抗体測定キット(コスミック社)の基礎的・臨床的検討. 医学と薬学, 66: 345-352, 2011

13. 川崎英二: 1型糖尿病の診断. 月刊糖尿病, 3: 36-44, 2011

2. 学会発表

1. 川崎英二. (教育講演) 1型糖尿病の病態と予防. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌市、2011

2. 川崎英二. (シンポジウム) 亜鉛・ZnT8と糖尿病. 第84回日本生化学会大会、京都市、2011

3. 川崎英二. (教育講演) メタボリックシンドロームと栄養. 第15回日本病態栄養学会年次学術集会、京都市、2012

4. 川崎英二. (レクチャー) 1型糖尿病における膵島関連自己抗体の考え方. 第46回糖尿病学の進歩、盛岡市、2012

5. 川崎英二、村田芙美、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、阿比留教生、山崎浩則. 1型糖尿病におけるZnT8抗体の多様性についての検討. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌市、2011

6. 川崎英二、安井順一、諸熊治子、池岡俊幸、村田芙美、赤澤 諭、植木郁子、中村 寛、古林正和、桑原宏永、阿比留教生、山崎浩則、川上純. 抗甲状腺抗体の出現とともにGAD抗体価の再上昇を認めた1型糖尿病の一例. 第49回日本糖尿病学会九州地方会、福岡市、2011

7. Kawasaki E. (シンポジウム) Clinical Utility of Anti-Islet Autoantibodies～Diagnosis and Prediction of Type 1 Diabetes in East Asia～. 16th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus、千葉、2011

8. Kawasaki E, Yasui J, Morokuma H, Ikeoka T, Murata F, Akazawa S, Ueki I, Nakamura K, Kobayashi M, Kuwahara H, Abiru N, Yamasaki H, Kawakami A. Different kinetics of autoantibodies to insulin granule membrane autoantigens, IA-2 and ZnT8, after clinical onset of type 1 diabetes. 16th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus、千葉、2011

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