

課題番号 : 28指1201

研究課題名 : 糖尿病・内分泌・代謝疾患解析のためのバイオリソースバンクの構築 (MISSION-DM-ENDO) と、オミックス解析

主任研究者名 : 安田 和基

分担研究者名 : 安田 和基、梶尾 裕

キーワード : 糖尿病・代謝疾患、内分泌疾患、バイオリソース、オミックス、人工膵臓

研究成果 : 糖尿病・内分泌・代謝疾患の病態解明及び克服を目指し、入院患者の網羅的登録及び試料の経時的収集により、研究基盤としての生体試料・臨床情報パネル (バイオリソースバンク) を構築するとともに、オミックス解析や専門的な生体情報取得を行う。さらに NCGM-BB との有機的連携を実現する。本研究を構成する柱は以下の3つである。

A 入院患者のバイオリソースバンク構築

B 生体試料に対するオミックス解析と、病態解明と創薬標的・バイオマーカー候補の取得

C 通常診療で得られない、専門性の高い生体情報の取得

以下、それぞれの初年度の成果を記す。

A 糖尿病内分泌代謝科の入院患者を悉皆的に対象とし、入退院の2ポイントで、原則「早朝空腹時」の採血を行い、ゲノムDNA、血清、血漿、必要に応じて尿、などを分離し、詳細な臨床情報を完備したバイオリソースバンク「MISSION-DM-ENDO (Management of Integrated bioreSourceS and InformatiON of Diabetes Mellitus and ENDOcrine disorders)」を作成した。

- ・ 「入退院時ペア血清・DNA」のパネル作成:平成28年度末までに、約240例のエントリーがなされ、このうち入退院時ペアで採血ができた症例は約200例である。過去に当科の研究に協力して試料提供を行ったことのある症例では、過去のサンプルはパネルに組み込んだ。
- ・ NCGM バイオバンクとの連携:約半数近くで、改めてバイオバンクの説明・同意取得を行い、本研究試料と情報の一部をバイオバンクに提供することとなった。
- ・ 便の追加:腸内細菌叢の関与が糖尿病を含めた代謝疾患においても注目されるため、便もオプションとして研究用に収集可能とし、倫理委員会で承認された(平成29年3月)。

B 血液試料を用いたオミックス解析としては、以下を行った。

- ・ ゲノム解析としては、MODY及びインスリン受容体異常症が疑われた合計5症例について予想される候補遺伝子のリシークエンシング)を行った。エピゲノム解析(DNAメチル化)については、定量的に解析する系を構築しパイロット的な検討を開始した。
- ・ 入退院時ペア血清について、Luminex法を用いた多項目同時測定を開始した。日本人におけるキットの有用性、個人間のvariationについて予備的データを得た。

C 専門的な生体情報の収集の体制構築と解析

1型糖尿病を中心に、1) 膵 α/β 細胞機能評価のためのアルギニン負荷試験、2) インスリン感受性評価のための高インスリン正常血糖クランプ法(人工膵臓)、3) 肝糖取り込み評価のための経口糖負荷併用グルコースクランプ法(クランプ OGL法;人工膵臓)、4) 安静時絶対的インスリン必要量・パターンの評価(人工膵臓)、5) 持続血糖モニター(continuous glucose monitoring system (CGMs))、などを10-20症例で行い、生体試料も取得した。また、内分泌疾患における日内変動、手術・化学療法の前後での生体試料取得も開始した。

さらに、グルカゴンも含めた多くのホルモンを測定し、血糖などとの相関を検討した。また、パネルAを用いた臨床像との関連の解析として、糖尿病患者において血糖コントロール前後の血液中の終末糖化産物(AGEs)や関連物質の変化に関して測定を開始した。

Subject No. : 28D1201

Title : Establishment of bio-resource bank for diabetes mellitus and endocrine disorders, and its application for biomedical research.

Researchers : Kazuki Yasuda, Hiroshi Kajio, and others

Key word : Diabetes mellitus; endocrine diseases; omics; bio-resources; detailed phenotyping

Abstract : This study consists of three major parts.: A: The construction of bio-resource bank

B: Omics analysis of human samples in order to elucidate pathophysiology of the disorders, and to search for disease biomarkers and drug target candidates. C: Detailed phenotyping of specific cases by innovative tools.

The progress of each part during the first year is summarized below.

[A] Construction of a bio-resource bank of from patients of diabetes mellitus and endocrine disease. [MISSION·DM·ENDO(Management of Integrated bioreSourceS and InformatiON of Diabetes Mellitus and ENDOcrine disorders)] :

Paired samples (serum, plasma and DNA) before and after the admission were collected in an exhaustive manner and we recruited about 240 cases. We also encouraged the participants to donate part of their samples to the biobank operated by NCGM (NCGM-BB). Since gut microbiome has been attracting more and more attention in relation to metabolic disorders, we included optional collection of stool from the participants, and got an approval by IRB.

[B] We initiated omics analyses using collected samples. 1) Genetics: With five cases who were suspected to have monogenic disorders such MODY, we resequenced all the exons and flanking regions of candidate genes, but so far no apparent pathogenic mutations were found. 2)

Epigenetics: We evaluated DNA methylation levels by pyrosequencing using PyroMark Q 24, and screened several candidate loci. 3) With paired serum samples of in-patients, we initiated measuring bioactive substances by Luminex method, using BioPlex 3D. Our preliminary data using “Human Diabetes kit (10-plex)” (Bio-Rad) showing that inter-individual variability of metabolic hormones is basically larger than the effects of short-term diabetes treatment.

[C] Detailed phenotyping of patients with diabetes mellitus and endocrine disorders was performed using innovative tools such as artificial pancreas STG-55 (Nikkiso). The tests include:

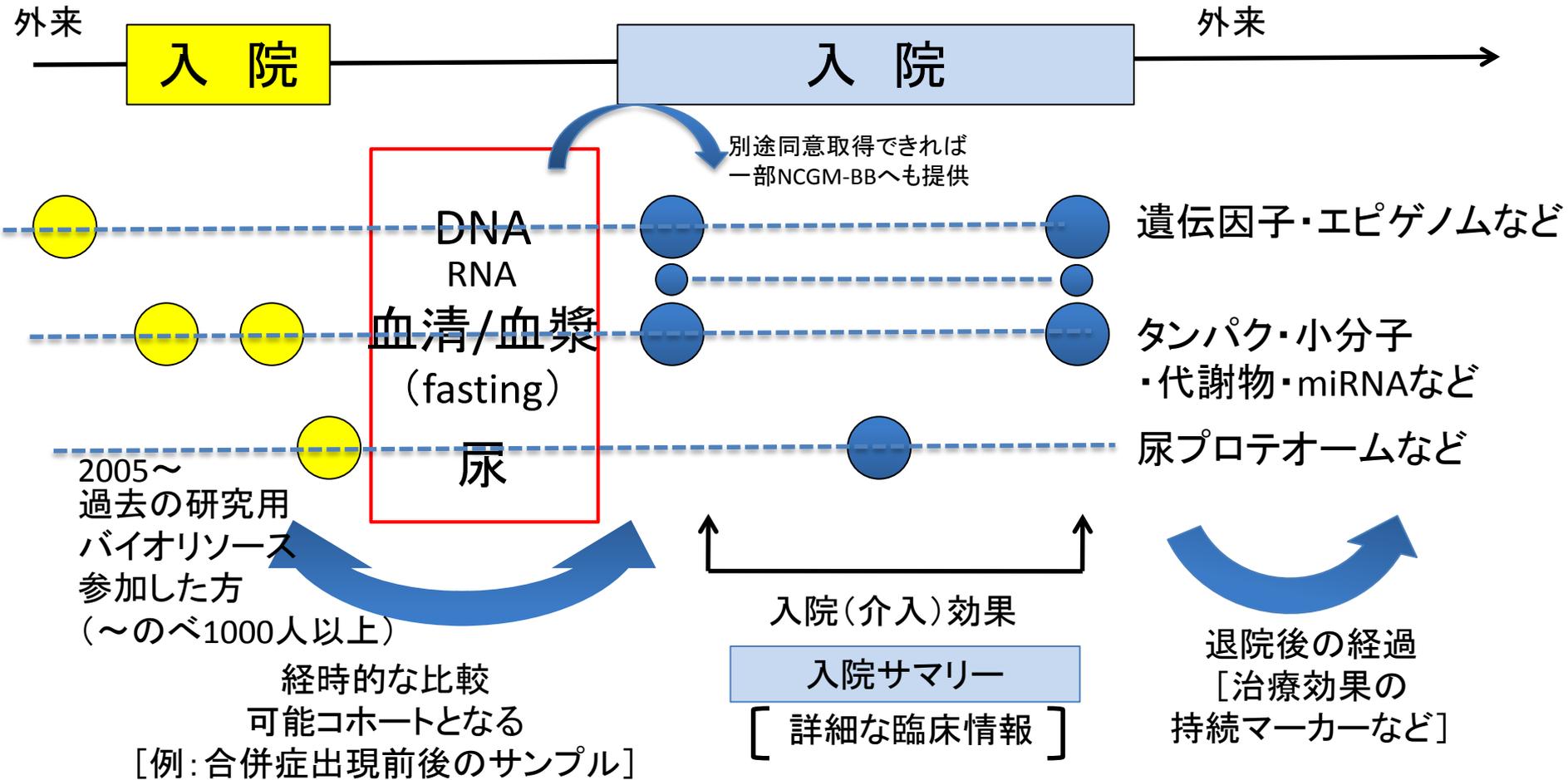
1) Arginine test for the assessment of the function of pancreatic alpha and beta cells. 2)

Hyperinsulinemic euglycemic clamp for the assessment of insulin sensitivity. 3) Hyperinsulinemic clamp with oral glucose load (OGL) for the assessment of hepatic glucose uptake. 4) Assessment of basal insulin requirement. and 5) Continuous glucose monitoring. These tests were performed with 10-20 type 1 diabetic (T1D) patients.

Researchers には、分担研究者を記載する。

We measured serum levels of hormones including glucagon and somatostatin at five different timepoints with T1D patients. We also initiated measuring advanced glycation endproducts (AGEs) and AGE receptor (RAGE) levels before and after admission for diabetes treatment.

図1: 糖尿病内分泌代謝科バイオリソース(MISSION-DM-ENDO)



◎血液を中心とした多層オミックス解析、便もオプションで追加(2017.3)

※「空腹」で統一⇒メタボローム、ホルモンの解析にも有用)

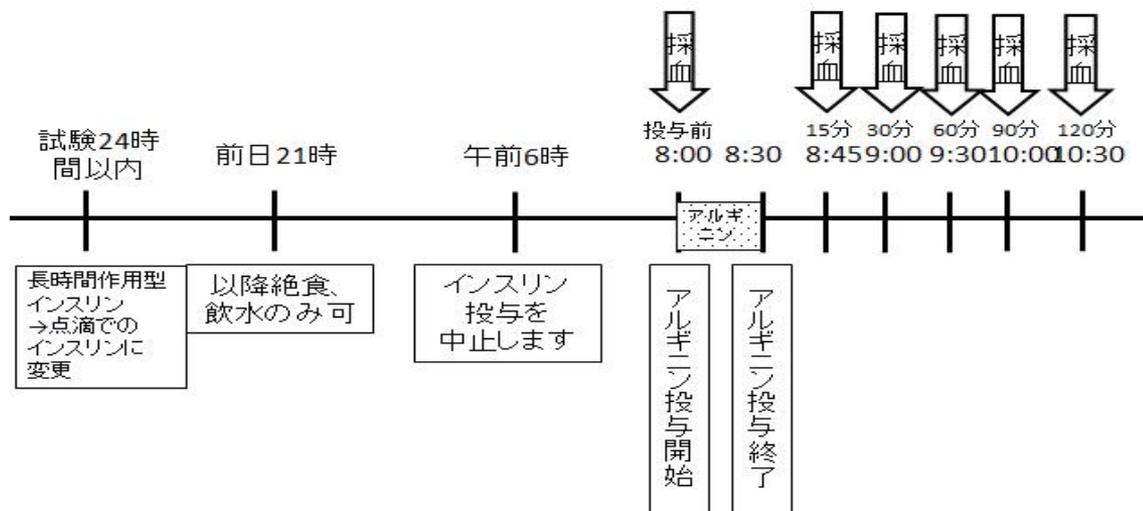
※多層的疾患オミックス(2010~2015)の経験活用(肥満症、NAFLD・NASH)

◎短期/長期の経時変化を検討可能

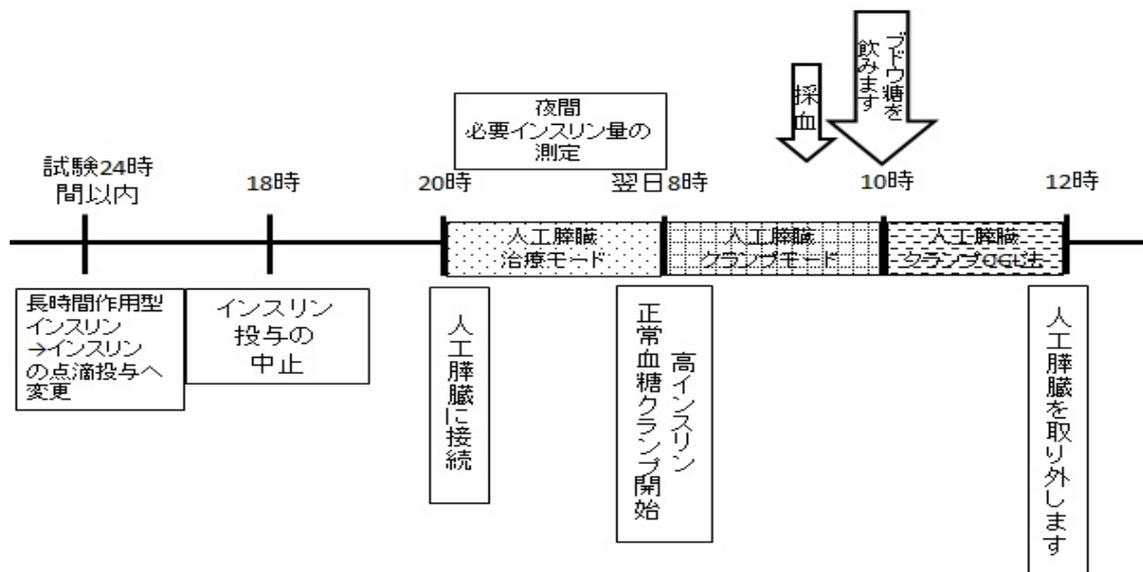
◎投薬内容その他を含めた詳しい臨床情報

図2: 1型糖尿病患者を主とした、代謝評価試験

アルギニン負荷試験 概要



人工膵臓による検査概略図



課題番号 : 28指1201
研究課題名 : 糖尿病・内分泌・代謝疾患における生体試料・専門的生体情報の取得と臨床像との関連の解析
主任研究者名 : 安田和基
分担研究者名 : 梶尾 裕

キーワード : 糖尿病・内分泌・代謝疾患、生体情報・生体試料、アルギニン負荷試験、高インスリン正常血糖クランプ法（人工膵臓）、持続血糖モニター

本研究は、糖尿病・内分泌・代謝疾患において、人工膵臓や持続血糖モニターといった最新の機器を駆使した専門的生体情報および特殊状況下の生体試料を取得し、臨床像やゲノム情報との関連を解析することで、創薬標的・バイオマーカーのシーズを取得することを目的としている。本研究の初年度として、専門的生体情報・生体試料の取得体制の構築を主に行った。

当センター病院において、下記の検査を実施する体制・環境を整備し、これらすべての検査を患者に対して実施できた。

1) 膵 α/β 細胞機能評価のためのアルギニン負荷試験

2016 年年度で 1 型糖尿病症例 計 20 件施行した。アルギニン 30g/300ml を 30 分かけて点滴静注し、その前、15, 30, 60, 90, 120 分後に採血を行い、C peptide 値、血漿グルカゴン値を測定することで膵 α/β 細胞の予備能を評価した。

2) インスリン感受性評価のための高インスリン正常血糖クランプ法（人工膵臓）

2016 年年度で 1 型糖尿病症例に計 13 件施行した。人工膵臓を用いて血清インスリン値が $200 \mu\text{U/ml}$ となるようなプロトコールでインスリンを持続静注し、その際のブドウ糖投与量を GIR (mg/kg/min) として、インスリン感受性指標として評価した。

3) 肝糖取り込み評価のための経口糖負荷併用グルコースクランプ法（クランプ OGL 法；人工膵臓）

2016 年年度で 1 型糖尿病症例計 11 件施行した。河盛らの提唱した方法に準じて、上記高インスリン正常血糖クランプ法に引き続き、ブドウ糖 0.2 g/kg を経口投与し、その際に低下した GIR 値を評価することで肝ブドウ糖取り込み能として評価した。

4) 安静時絶対的インスリン必要量・パターンの評価（人工膵臓）

2016 年年度で 1 型糖尿病症例 計 15 件に施行した。夜間から早朝にかけて（20 時-8 時）人工膵臓の治療モードによって血糖値を 80-110mg/dl にし、必要インスリン量の夜間から早朝の変化を評価した。

5) 持続血糖モニター

2016 年年度で 1 型糖尿病症例計 15 件施行した。continuous glucose monitoring system (CGMs) を用いて、間質液中の電気抵抗から推定する持続的な血糖値を 3 日間評価し、血糖変動などを評価した。

6) アルギニン負荷試験、人工膵臓検査中の生体試料の取得

2016 年年度で 1 型糖尿病症例計 20 件生体検体を取得した。

内分泌疾患においては、日内変動、手術・化学療法の前後での生体試料の取得を開始した。初年度の症例数は 30 症例の登録を行い、年間目標症例数を達成した。特に、糖尿病症例(1 型、2 型、膵性糖尿病)を対象として、安静臥床空腹時における血糖値と ELISA kit で測定されたグルカゴン値、そのほかの血糖動態に影響を与えるホルモン値 (GH, IGF-1, ACTH, cortisol, カテコラミン値, GLP-1, somatostatin) を、臨床的に必要な採血に追加して 5 回連続で測定し、それぞれの群における血糖値とそれらの項目の関係性、また各群間の差を検討した。また、糖尿病患者における血糖コントロール前後の血液中の終末糖化産物の変化に関して測定を開始した。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：28指1201

研究課題名：糖尿病・内分泌・代謝疾患解析のためのバイオリソースバンクの構築(MISSION-DM-ENDO)と、オミックス解析

主任研究者名：安田 和基

論文発表

| 論文タイトル | 著者 | 掲載誌 | 掲載号 | 年 |
|--|--|-------------------|----------------|------|
| Genome-wide association studies in the Japanese population identify seven novel loci for type 2 diabetes. | Imamura M, Takahashi A, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, et al | Nature Commun | 7: 10531 | 2016 |
| Improvement of glycemic control without severe hypoglycemia in a type 1 diabetes patient undergoing hemodialysis after a change from insulin glargine to insulin degludec | Takahashi N, Tsujimoto T, Inoue K, Kishimoto M, Kajio H | J Diabetes Invest | 7(5):805-6 | 2016 |
| Genome-wide DNA methylation analysis during non-alcoholic steatohepatitis-related multistage hepatocarcinogenesis: Comparison with hepatitis virus-related carcinogenesis. | Kuramoto J, Arai E, Tian Y, Funahashi N, Hiramoto M, Nammo T, Nozaki Y, Takahashi Y, Ito N, Shibuya A, Ojima H, Sakeda A, Seki Y, Kasama K, Yasuda K, Kanai Y. | Carcinogenesis | 38(3): 261-270 | 2017 |

学会発表

| タイトル | 発表者 | 学会名 | 場所 | 年月 |
|---|--|-------------------|----|---------|
| 「糖尿病等遺伝素因探索の現状と先制医療への展望」(会長特別企画『先制医療の実現に向けて』) | 安田和基 | 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 | 京都 | 2017年5月 |
| 「ゲノム網羅的解析結果を用いた膵島代償機序の検討」 | 南茂隆生、宇田川陽秀、舟橋伸昭、川口美穂、上番増喬、平本正樹、西村渉、安田和基 | 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 | 京都 | 2016年5月 |
| 「脂肪細胞培養上清によるグルココルチコイド受容体を介した膵β細胞機能変化」 | 宇田川 陽秀、舟橋伸昭、西村 渉、平本 正樹、川口 美穂、南茂隆生、安田 和基 | 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 | 京都 | 2016年5月 |
| 「高齢者糖尿病におけるインスリン・リラグルチド併用療法の有効性についての検討」 | 外池美恵、中條大輔、野田光彦 | 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 | 京都 | 2016年5月 |
| 「当院におけるSAP (Sensor Augmented Insulin Pump) の使用経験」 | 高橋一久、中條大輔、菊地智彦、高橋信行、丹野優希、仲村朋香、外池美恵、井花庸子、辻本哲郎、田辺晶代、梶尾 裕 | 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 | 京都 | 2016年5月 |
| 「糖尿病治療目的の入院後の血糖コントロールに影響を受ける因子の検討」 | 菊地 智彦、辻本哲郎、高橋 一久、高橋 信行、丹野 優希、外池美恵、井花 庸子、中條 大輔、田辺 晶代、梶尾 裕 | 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 | 京都 | 2016年5月 |

研究発表及び特許取得報告について

| | | | | |
|---|--|---------------------|----|----------|
| 「日本人高度肥満症由来NASH肝のトランスクリプトーム解析」 | 舟橋伸昭、宇田川陽秀、南茂隆生、上番増喬、西村渉、平本正樹、松本健治、関洋介、笠間和典、安田和基 | 第3回肝臓と糖尿病・代謝研究会 | 金沢 | 2016年7月 |
| 「腫瘍増大および潜在性コルチゾール過剰分泌が疑われ副腎癌との鑑別に苦慮した副腎海綿状血管腫(疑い)の一例」 | 高橋信行、田辺晶代、菊地智彦、辻本哲郎、中條大輔、飯塚俊彦、山田大介、久米春喜、笹野公伸、春日雅人、梶尾 裕 | 第20回内分泌病理学会 | 東京 | 2016年9月 |
| 「NASH由来肝発がん過程におけるゲノム網羅的DNAメチル化解析」 | ・ 藏本純子、新井恵吏、田迎、平本正樹、南茂隆生、高橋順子、尾島英知、安田和基、金井弥栄 | 第75回日本癌学会学術総会 | 横浜 | 2016年10月 |
| 「高度肥満患者および肥満マウス由来内臓脂肪・皮下脂肪発現遺伝子の比較解析」 | 宇田川陽秀、南茂隆生、舟橋伸昭、平本正樹、西村渉、松本健治、関洋介、笠間和典、安田和基 | 第37回日本肥満学会 | 東京 | 2016年10月 |
| 「1型糖尿病におけるグルカゴン分泌反応と晝現象および各種臨床指標との関連. 第14回1型糖尿病研究会」 | 高橋信行、中條大輔、辻本哲郎、田辺晶代、大杉 満、植木浩二郎、春日雅人、梶尾 裕 | 第14回1型糖尿病研究会 | 鳴門 | 2016年11月 |
| 「血清中のフェリチン濃度とアディポカインとの関連」 | 木村安美、安田和基、黒谷佳代、Shamima Akter、檜野いく子、早瀬仁美、佐藤匡央、溝上哲也 | 第27回日本疫学会学術総会 | 甲府 | |
| 「ヒト糖尿病・代謝疾患関連遺伝子：現状と展望」 | 安田和基 | 大橋糖尿病カンファレンス | 東京 | 2017年1月 |
| 「インスリンデグルデクの分割投与により血糖コントロールが改善した1型糖尿病の1例」 | 高橋信行、中條大輔、辻本哲郎、大杉 満、田辺晶代、植木浩二郎、春日雅人、梶尾 裕 | 第54回日本糖尿病学会関東甲信越地方会 | 横浜 | 2017年1月 |
| 「家族歴濃厚で著明なインスリン抵抗性を呈した若年発症糖尿病の1例」 | 丸山浩司、中條大輔、安田和基、松下真弥、高橋信行、大杉満、田辺晶代、植木浩二郎、梶尾 裕 | 第54回日本糖尿病学会関東甲信越地方会 | 横浜 | 2017年1月 |
| 「コルチゾール産生副腎皮質癌により血糖コントロール増悪を来した1例」 | 松下真弥、田辺晶代、菊地智彦、大杉 満、田辺晶代、植木浩二郎、中條大輔、梶尾 裕 | 第54回日本糖尿病学会関東甲信越地方会 | 横浜 | 2017年1月 |
| 「メトホルミンによるビタミンB12欠乏症が疑われた2型糖尿病の1例」 | 松本 道宏、辻本哲郎、梶尾 裕 | 第630回日本内科学会関東地方会 | 東京 | 2017年2月 |

研究発表及び特許取得報告について

| | | | | |
|------------------------------------|--|------------------|----|---------|
| 「発症6ヶ月で膵α細胞機能の著明な低下を呈した劇症1型糖尿病の1例」 | 高橋信行、中條大輔、船戸有未、丸山浩司、辻本哲郎、田辺晶代、大杉満、植木浩二郎、梶尾 裕 | 第631回日本内科学会関東地方会 | 東京 | 2017年3月 |
| | | | | |

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

| タイトル | 発表者 | 発表先 | 場所 | 年月日 |
|---|------|--|------------------|----------|
| 「ショートレクチャー：生活習慣の改善におけるサイエンス～エビゲノムの視点から」 | 安田和基 | 糖尿病診療マスター14巻8号 | | 2016年8月 |
| 「インスリン分泌不全の感受性遺伝子のゲノム検索」 | 安田和基 | Diabetes Frontier 27巻4号 特集：糖尿病の遺伝素因の解明研究 | | 2016年8月 |
| 「糖尿病の『体質』と、最近の薬の課題」 | 安田和基 | 2016年度第11回、同志社女子大学薬学部卒後教育講演 | 同志社女子大学、京田辺キャンパス | 2016年10月 |

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

| 発明名称 | 登録番号 | 特許権者(申請者) (共願は全記載) | 登録日(申請日) | 出願国 |
|------|------|-----------------------|----------|-----|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと