

課題番号 : 28 指 1207

研究課題名 : 日本人1型糖尿病の包括的データベースの構築と臨床研究への展開 (第3次)

主任研究者名 : 梶尾 裕

分担研究者名 : 梶尾 裕、花房俊昭

キーワード : 1型糖尿病、データベース、インスリン分泌、自己抗体、遺伝子

研究成果 :

本研究は、平成22年度から準備を開始し、平成27年度まで行っていた「日本人1型糖尿病の包括的データベースの構築と臨床研究への展開(新)」をさらに展開し、疾患亜分類に基づいた日本人1型糖尿病の包括的なデータベースを構築し、治療の最適化に応用するものであり、1) 急性発症1型100名、緩徐進行1型100名、劇症1型50名のデータベース作成を目指し、2) 患者遺伝子(ゲノム)の収集とすでに1型糖尿病と関連が報告されている遺伝子のタイプを決定し、3) 発症時の詳細な経過と臨床データを収集、1年ごとに調査を継続する。研究期間中は4) 標準的な治療である強化インスリン療法を行う。同時に、日本糖尿病学会日本人1型糖尿病調査研究委員会と共同し、「急性発症典型例」「劇症1型糖尿病」「緩徐進行1型糖尿病」のゲノムワイド関連解析研究において新たに見いだされた遺伝子の分析を行う。

データベースおよび症例収集システムとしてJCRACデータマネージメントセンターによる症例登録システムを用いた。

平成27年度までの共同研究施設は15施設であったが、1施設追加して16施設になった。また、症例数は急性発症1型100例、緩徐進行1型100例、劇症1型50例のデータベース登録を目標とするが、平成28年度までに、急性発症1型131例、緩徐進行1型89例、劇症1型33例、合計253例の登録となり、1年目は187例、2年目は125例、3年目は79例、4年目は49例、5年目は8例の追跡調査を完了した。

登録時のデータは、急性発症、緩徐進行、劇症別に性別(男/女)は53/76、41/43、20/13、発症時年齢(歳)は 43 ± 17 、 54 ± 14 、 43 ± 16 ($P < 0.01$; 急性 vs 緩徐)、HbA1c(%)は 8.6 ± 2.4 、 7.9 ± 2.5 、 7.0 ± 1.2 ($P < 0.005$; 急性 vs 劇症、 $P < 0.05$; 緩徐 vs 劇症)、血清CPR(ng/ml)は 0.65 ± 0.71 、 1.54 ± 1.87 、 0.06 ± 0.05 ($P = 0.0001$; 急性 vs 劇症、 $P < 0.0005$; 緩徐 vs 劇症、 $P < 0.0001$; 急性 vs 緩徐)、GAD抗体陽性率(%)は90、96、15 ($P < 0.0001$; 急性 vs 劇症、 $P < 0.0001$; 緩徐 vs 劇症)、IA-2抗体陽性率(%)は55、53、3 ($P < 0.005$; 急性 vs 劇症、 $P < 0.005$; 緩徐 vs 劇症)、ZnT8抗体陽性率(%)は43、27、0であった。

Cペプチドの検討では、昨年に比べ症例が増え、急性発症1型糖尿病においては登録2年後の血中Cペプチド値が登録時に比べ有意に低下し、緩徐進行1型糖尿病でも同様の傾向を認めるものの、劇症1型糖尿病では発症時既に両群に比べ、Cペプチドが低値であり、経時的には変化しないこと、が改めて確認された。

GAD抗体陽性率は、新旧検査法(RIA法、ELISA法)で同時に測定し、臨床データとの比較検討を行った。その結果、緩徐進行1型糖尿病は劇症1型糖尿病と比較してELISA法での陽性率が低下していた。また、インスリン分泌能(Cペプチド)と自己抗体をあわせた検討では、緩徐進行1型糖尿病では、登録時にZnT8抗体陽性群では陰性群に比べ血中Cペプチドが有意に低値であり、IA-2抗体陽性群では陰性群に比べ血中Cペプチドが低値傾向を示した。

また、登録時の腹部画像所見では、緩徐進行1型や劇症1型では、急性発症1型よりも膵異常所見を示す症例が多かった(急性発症4.9%(5/102)、緩徐進行17.1%(12/70)、劇症24.0%(6/25))。さら

に、緩徐進行1型と劇症1型では膵異常所見に特徴があり、緩徐進行1型では膵萎縮、脂肪置換、嚢胞を認めるのに対し、劇症1型では膵腫大や急性膵炎所見を認めた。

以上のように、各病型の登録時の臨床データ、特にインスリン分泌能や膵β細胞に対する自己抗体の特徴や、登録時の画像所見についての所見をまとめることが確認でき、各病型の特徴が明らかにされつつある。追跡調査は、徐々に症例が蓄積しつつある状態である。

新たな候補遺伝子は現時点では明らかになっていないが、劇症1型糖尿病と対照者でアジア人に特異度の高いAxiom ASI Array (60万 SNP) を用いた解析を施行した結果、第6染色体のHLA-DQ、-DR 遺伝子領域 ($P = 1.25 \times 10^{-22}$) が最も強い関連を示すとともに、第6染色体以外に56遺伝子領域において $P < 10^{-4}$ に達する関連を見だし、うち2つのSNPがゲノムワイド有意水準をクリアした。さらにこの領域の fine mapping を行い、複数のSNPでの関連を確認し、現在、急性発症1型糖尿病、緩徐進行1型糖尿病における関連の有無を検討している。また、さらに限局した候補遺伝子領域においては次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析を行っている。各病型における関連の検証後、さらに臨床指標との関連解析を行い、機能的な解析を実施する予定である。

日本人1型糖尿病患者の病型ごとの成因、発症予知・予防・治療法を明らかにするためには、今後とも追跡調査を継続し、データベースをより充実させ、さらに追加検討を加える必要がある。次年度以降、収集されたデータおよび検体を解析することにより、日本人1型糖尿病患者の病型ごとの成因、発症予知・予防・治療法を明らかにする、という本研究目的の達成をめざす。

Subject No.: 25指101

**Establishment of Comprehensive database for Japanese type 1 diabetes and Application for Clinical studies
(Third Trial)**

Hiroshi KAJIO, Toshiaki HANAFUSA

Key words: type 1 diabetes, database, insulin secretion, autoantibody, gene

Introduction

We have been performing the study on the comprehensive database for Japanese type 1 diabetes since 2010. This study is an extended and advanced version. Our aim is to establish this database based on sub-classification of this disease and to apply the database for the investigation of the optimal treatments.

Methods

We have applied several approaches in the study. 1) Establishment of the database classified following the sub-classification of type 1 diabetes: 100 patients with acute onset type 1 diabetes, 100 patients with slowly progressive type 1 diabetes and 50 patients with fulminant type 1 diabetes. 2) Collection of gene (genome) samples and gene (genome) typing of these samples referring to the genes already known to be related with type 1 diabetes. 3) Collection of the clinical data in detail of each patient at the onset and following every year. 4) Performance of the standard treatment, that is, intensive insulin therapy. In collaboration with the Japan Diabetes Society Committee on type 1 diabetes mellitus research, we apply the gene analysis referring to the GWAS results reported by the committee. We made registrations using a patent registration system, RedCap, under the control of JCRAC data management center for the security and the stability of the database.

Results

We added one more institute as the collaboration institutes, totally 16 institutes. The number of the registered patients in each sub-class increased; 131 patients with acute onset type 1 diabetes, 89 patients with slowly progressive type 1 diabetes, 33 patients with fulminant type 1 diabetes, thereby totally 253 registered patients. We performed the follow-up surveillance of 187 patients for one year, 125 patients for two years, 79 patients for three years, 49 patients for four years, and 5 patients for five years year after registration.

We analyzed the data at registration. The data are shown for acute onset type 1 diabetes, slowly progressive type 1 diabetes and fulminant type 1 diabetes, respectively. Gender distributions (male/female) are 53/76, 41/43 and 20/13. The onset ages (year) of diabetes are 43 ± 17 , 54 ± 14 , 43 ± 16 ($P<0.01$; acute vs slowly). HbA1c (%) at registration are 8.6 ± 2.4 , 7.9 ± 2.5 and 7.0 ± 1.2 . Serum CPR (ng/ml) are 0.65 ± 0.71 , 1.54 ± 1.87 and 0.06 ± 0.05 . Positivity of anti-GAD antibody (%) are 90, 96 and 15. Positivity of anti-IA-2 antibody (%) are 55, 53 and 3. Positivity of anti-ZnT8 antibody (%) are 43, 27 and 0.

During the follow-up period, we have been accumulating the data on serum CPR as a marker of insulin secretion and the titers of islet-related autoantigens. Based on the accumulated data of CPR at registration and two years after registration, we confirmed that the serum CPR level at 2nd-year has been revealed to be significantly lower than that at the entry in acute onset type. The same tendency of CPR has been observed in slowly progressive type 1 diabetes. The serum CPR level at the entry in fulminant type 1 diabetes was significant lower compared with those in the other types of type 1 diabetes. The CPR level in fulminant type 1 diabetes has not changed during the observation.

The method of the measuring the titer of anti-GAD antibody was renewed in December, 2015. Using the preserved serum samples collected for the study, we checked the positivity of the samples with both methods, old one (RIA) and new one (ELISA), at once. We evaluated the outcome in terms of clinical aspect. The evaluation revealed that the positivity of anti-GAD antibody from ELISA method was relatively concordant with that from RIA method in acute onset type 1 diabetes. However, the positivity of anti-GAD antibody from ELISA method was quite lower than that from RIA method in slowly progressive type 1 diabetes. Regarding CPR levels in terms of the positivity of islet-related autoantibodies, the serum CPR level of the patients with anti-ZnT8 antibody (+) is lower than that with anti-ZnT8 antibody (-) in slowly progressive type 1 diabetes at the entry. Also, the serum CPR level of the patients with anti-IA-2 antibody (+) has a tendency of lower level compared with that with anti-IA-2 antibody (-) in slowly progressive type 1 diabetes at the entry.

The data derived from abdominal imaging findings at registration revealed that we found the cases with pancreas abnormalities in in slowly progressive type 1 diabetes and in fulminant type 1 diabetes more frequently compared

with acute onset type 1 diabetes. We found pancreas abnormalities in 4.9% (5/102), 17.1% (12/70) and 24.0% (6/25) of the patients with acute onset type 1 diabetes, slowly progressive type 1 diabetes and in fulminant type 1 diabetes, respectively. Moreover, there were distinct differences in the characteristics of the pancreas abnormalities between slowly progressive type 1 diabetes and in fulminant type 1 diabetes. The abnormalities of slowly progressive type 1 diabetes contained atrophy, fat replacement, and cysts of pancreas, while pancreas swelling and acute pancreatitis findings.

Some of our findings confirmed the present consideration about type 1 diabetes. Moreover, our new findings also demonstrated new data contributing to the clarification of the characteristics and the confirmation of the validity of sub-classification in type 1 diabetes. Our cohort study is now going on with accumulating significant evidence.

Regarding gene analysis, we have not made a conclusion for new candidate genes associated with fulminant type 1 diabetes at the moment yet, but we performed the gene analysis using Axiom ASI Array (6 x 10⁵ SNP) with high specificity for Asian population. We found that HLA-DQ and -DR areas at 6th Chromosome (P=1.25×10⁻²²) has the most significant association with fulminant type 1 diabetes. We also found that 56 gene areas at other Chromosomes were significantly associated at the level of P<10⁻⁴. Two SNPs of them were significant for GWAS analysis, and several SNPs of these areas were significant by fine mapping analysis. We are now performing the analysis about the possibility of the association of these SNPs with slowly progressive type 1 diabetes and in fulminant type 1 diabetes. We are performing the sequence analysis for localized candidate gene area with the next-generation sequencer. After investigating the association sub types of type 1 diabetes, we will move to the analysis of the association with clinical indicators and investigate their functional roles.

Conclusion

We thought that we will need to continue our cohort study, accumulating the prospective data, thereby giving us more information on diabetes in Japan. By the analysis of the accumulated data and the use of the samples, we will achieve our object of the clarification of pathogenesis, prediction, prevention and optimal treatment for each subclass of type 1 diabetes in Japanese.

日本人1型糖尿病の包括的データベースの構築と臨床研究への展開(第3次)(28指8)

目的

- 日本人1型糖尿病患者の遺伝情報と臨床情報を統合し、前向き研究の基盤にできるデータベースの構築。
- 3病型(急性発症、劇症、緩徐進行)ごとに臨床データ、血清、DNAを収集し、包括的データベースを構築し、病型ごとの成因解明、発症予知、予防・治療法の開発に資する。

実施施設

日本糖尿病学会

「日本人1型糖尿病の成因、診断、病態、治療に関する調査研究委員会」と

国立国際医療研究センター の共同研究

共同研究者の所属する 16施設

大阪医科大学 長崎大学 大阪大学 埼玉医科大学
近畿大学 岩手医科大学 愛媛大学 山梨大学

東京都済生会中央病院 神戸大学 岩手県立大学

国際医療福祉大学 新古賀病院 昭和大学

冲中記念成人病研究所 国立国際医療研究センター

対象(エントリー基準)

発症後5年以内の糖尿病を有する。

血清CPR < 1.0 ng/ml

膵島関連自己抗体陽性

登録症例数

合計253例

急性発症1型……………131例

緩徐進行1型……………89例

劇症1型……………33例

登録時のデータ

	急性発症	緩徐進行	劇症
性別(男/女)	53/76	41/4	20/13
発症時年齢(歳)	43±17.3	54±13.9	43±15.7
HbA1c(%)	8.6±2.4	7.9±2.5	7.0±1.2
血清CPR (ng/ml)	0.65±0.71	1.54±1.87	0.06±0.05
GAD抗体陽性(%)	90	96	15
IA-2抗体陽性(%)	55	53	3
ZnT8抗体陽性(%)	43	27	0

Cペプチドおよび抗GAD抗体の変化 (登録時から3年後)

	急性発症				緩徐進行				劇症			
	登録時	1年後	2年後	3年後	登録時	1年後	2年後	3年後	登録時	1年後	2年後	3年後
症例数	119	82	57	35	77	51	31	18	31	19	15	12
平均	0.65	0.60	0.37	0.3	1.54	1.06	1.06	1.28	0.06	0.06	0.08	0.11
RIA症例数	103	57	35	19	69	33	19	11	27	15	10	7
陽性率	90	86	80	95	96	88	79	91	15	20	20	43
ELISA症例数	25	29	25	16	16	22	16	7	6	5	6	4
陽性率	84	76	84	63	75	64	63	100	33	20	0	0

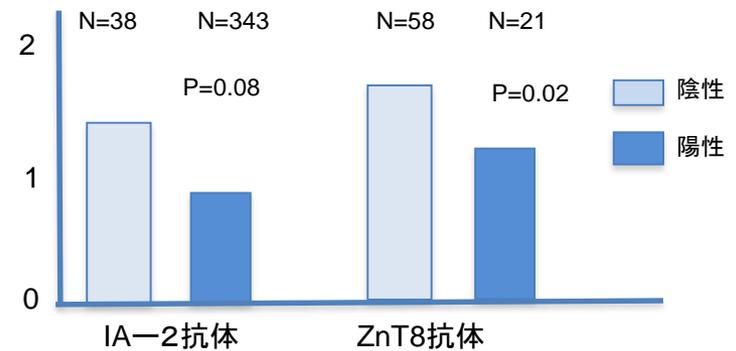
腹部画像所見

		急性発症 (n=102)		緩徐進行 (n=70)		劇症 (n=25)	
		あり	なし	あり	なし	あり	なし
膵異常所見	あり	5	4.9%	12	17.1%	6	24.0%
	なし	97	95.1%	58	82.9%	19	76.0%

	急性発症 (n=5)	緩徐進行 (n=12)	劇症 (n=6)
萎縮	2	2	
脂肪置換		3	
腫大	1		2
主膵管拡大			1
膵炎	1	1 (腫瘤形成性膵炎)	3 (急性膵炎)
嚢胞		5	
膵腫瘍	1	1	

緩徐進行型における抗体と Cペプチド(登録時)

Cペプチド(ng/mL)



遺伝子解析

- 劇症1型糖尿病と対照者でアジア人に特異度の高いAxiom ASI Array(60万SNP)を用いた解析を施行した結果、第6染色体のHLA-DQ、-DR遺伝子領域($P = 1.25 \times 10^{-22}$)が最も強い関連を示した。
- 第6染色体以外に56遺伝子領域において $P < 10^{-4}$ に達する関連を見だし、うち2つのSNPがゲノムワイド有意水準をクリアした。
- この領域のfine mappingを行い、複数のSNPでの関連を確認し、その一部のSNPにおいてのみ、急性発症1型糖尿病との関連を認めた。

考察

- 本データベースの症例数が増加し、新たなエビデンスが出てきている。日本人1型糖尿病の成因、診断、病態、治療の研究に寄与することが期待される。

課題番号 : 28指1207
研究課題名 : 日本人1型糖尿病の包括的データベースの構築と臨床研究への展開(第3次)
主任研究者名 : 梶尾 裕
分担研究者名 : 花房俊昭

キーワード : 1型糖尿病、データベース、遺伝子

研究成果 :

日本人1型糖尿病は「急性発症」「劇症」「緩徐進行」の3亜型に分類されるが、個々の病型の最適治療は確立されていない。本研究では、疾患亜分類に基づき、ゲノム情報と臨床情報の両者を包括的に蓄積したデータベースを構築し、現在の標準治療による発症後経過を明らかにし、最適治療のガイドラインを作成する。また、収集した検体を用いて診断マーカーの開発、発症機構の解明を行い、将来の新規治療法開発の基盤を確立する。

(なお、本研究は平成22年度から春日雅人(主任研究者)、花房俊昭(分担研究者)により同課題名で開始され、平成25年から継続課題として開始、さらに平成28年から継続課題(第三次)として開始された研究である。)

H24年度までに、データベースの構造、調査内容(発症時とフォローアップ期間)などを確定し、実施協力施設として11施設を決定、パイロットスタディとして患者登録し、データベース構築の問題点を修正、候補遺伝子(HLA A, B, C, DR, DQ, DP, insulin, CTLA-4, PTPN22, IL2RA, SUMO-4, vitamin D receptor [VDR])の解析システムを確立し、一部は解析を開始していた。

H28年度は症例の登録をさらにすすめ、現在までに、急性発症1型糖尿病131例、緩徐進行1型糖尿病89例、劇症1型糖尿病33例、合計253例の登録が完了した。2年目の追跡調査は187例、3年目は125例、4年目は49例、5年目は8例を実施した。現在、RedCapを用いたインターネット入力方式の導入を行い、多数例の登録(現在16施設)に対応している。このシステムは順調に稼働しており、全体として予定症例数への到達、脱落例の少ない経年的なフォローという目標はほぼ達成されつつある。

上記以外の新たな候補遺伝子は現時点では明らかになっていないが、劇症1型糖尿病と対照者でアジア人に特異度の高いAxiom ASI Array(60万SNP)を用いた解析を施行した結果、第6染色体のHLA-DQ、-DR遺伝子領域($P = 1.25 \times 10^{-22}$)が最も強い関連を示すとともに、第6染色体以外に56遺伝子領域において $P < 10^{-4}$ に達する関連を見だし、うち2つのSNPがゲノムワイド有意水準をクリアした。さらにこの領域のfine mappingを行い、複数のSNPでの関連を確認し、現在、急性発症1型糖尿病、緩徐進行1型糖尿病における関連の有無を検討している。また、さらに限局した候補遺伝子領域においては次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析を行っている。各病型における関連の検証後、さらに臨床指標との関連解析を行い、機能的な解析を実施する予定である。

次年度以降、収集されたデータおよび検体を解析することにより、日本人1型糖尿病患者の病型ごとの成因、発症予知・予防・治療法を明らかにする、という本研究目的の達成をめざす。

以上、報告する。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 28指1207

研究課題名：日本人1型糖尿病の包括的データベースの構築と臨床研究への展開(第3次)

主任研究者名： 梶尾 裕

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
日本人1型糖尿病の包括的データベースの構築と臨床研究への展開(第5報)	梶尾 裕、花房俊昭、他	第60回日本糖尿病学会年次学術集会	名古屋	2017年5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
該当なし				

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
該当なし				

※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