

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。「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」の3つについて、平成 29 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 bioSourceS and InformatiON of Dibabetes 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 29 年度、及び研究開始時からのエントリー数は、それぞれのべ 180 例、のべ 420 例となった。うち入退院時ペアで採血ができた症例は約 310 例 (73.8%) である。過去に当科の研究に協力いただいた既取得サンプルをパネルに組み込んだ結果、5 回以上の入院時試料を研究用に得られた症例も存在した。
- ・ NCGM バイオバンクとの連携:改めてバイオバンクの説明・同意取得を行い、約半数近くで、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することとし、平成 30 年 1 月から収集を開始した。

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、MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification) 法を導入し、*HNF1B* 遺伝子全体のヘテロ欠失による MODY5 を診断することができた。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を継続した。
- ・ 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継続し、入院介入による変化や、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 (CGMs)、などを 15-25 症例、研究開始からの累計 20-40 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継続した。

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、血糖コントロール不良で入院した患者を中心に、入院前後の血液中の終末糖化産物 (AGEs) や関連物質の測定を行い、介入前後の比較、血糖コントロールや合併症進行度などとの関連を検討した。

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 Dialetes 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 420 cases since March, 2016. We also encouraged the participants to donate part of their samples to the biobank operated by NCGM (NCGM-BB). Considering the importance of gut microbiome in metabolic disorders, we started optional collection of stool from the participants, in January, 2018.

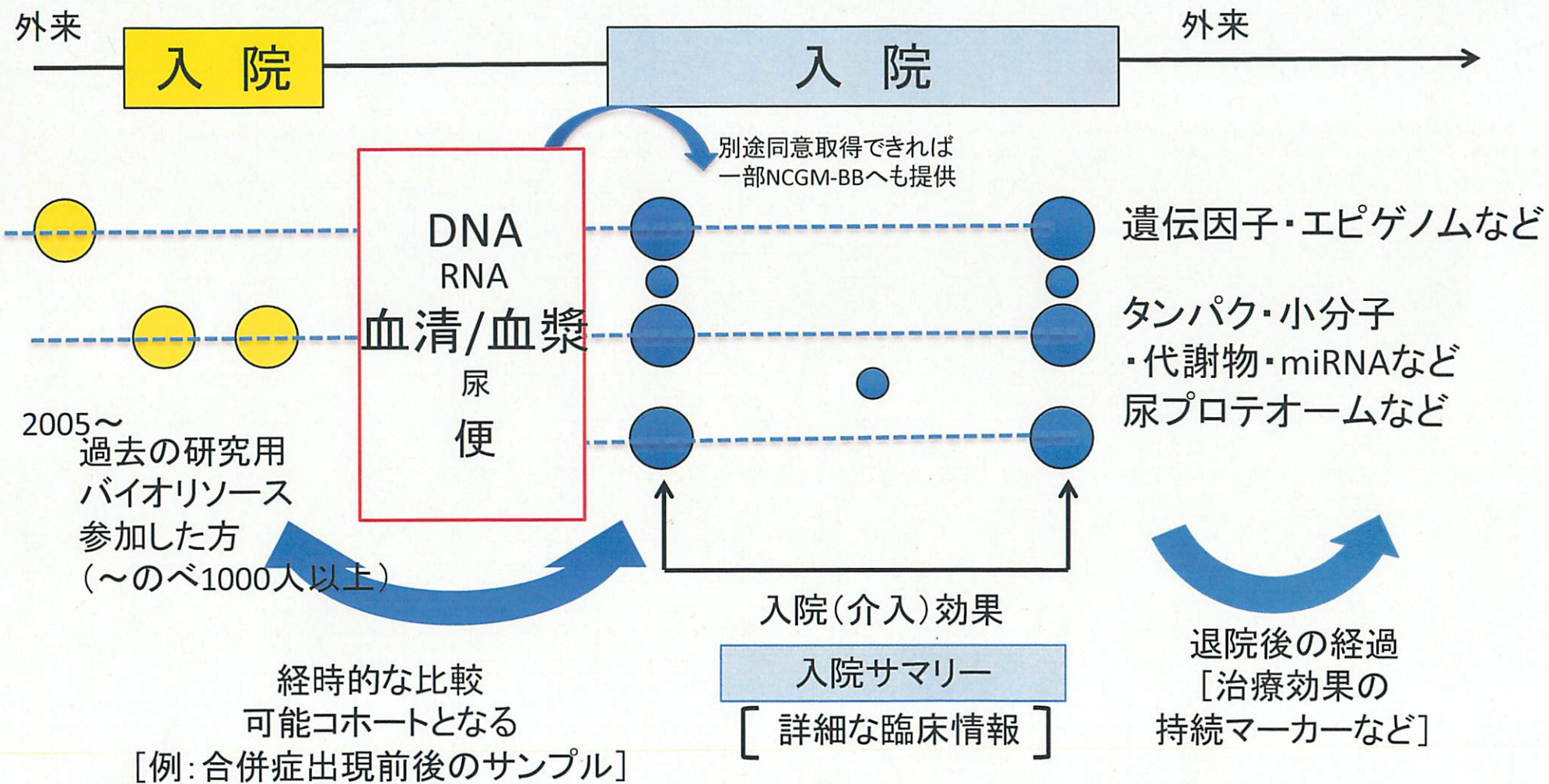
[B] We initiated omics analyses using collected samples. 1) Genetics: We introduced MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification) method, and identified heterozygous deletion of the whole *HNF1B* gene (MODY5) in one young onset diabetic patient. 2) Epigenetics: We continued evaluating DNA methylation levels with genomic DNA by pyrosequencing in several candidate loci. 3) With paired serum samples of in-patients, we measured bioactive substances related to metabolic disorders by Luminex method using BioPlex 3D, and investigated inter-individual variability and the effects of short-term intervention.

[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 total of 20-40 type 1 diabetic (T1D) patients.

We measured serum levels of hormones including glucagon and somatostatin at five different timepoints with T1D patients. We also measured advanced glycation endproducts (AGEs) and AGE receptor (RAGE) levels in poorly-controlled diabetic patients before and after admission for diabetes treatment and investigated the relationship with phenotypes including diabetic complication.

Researchers には、分担研究者を記載する。

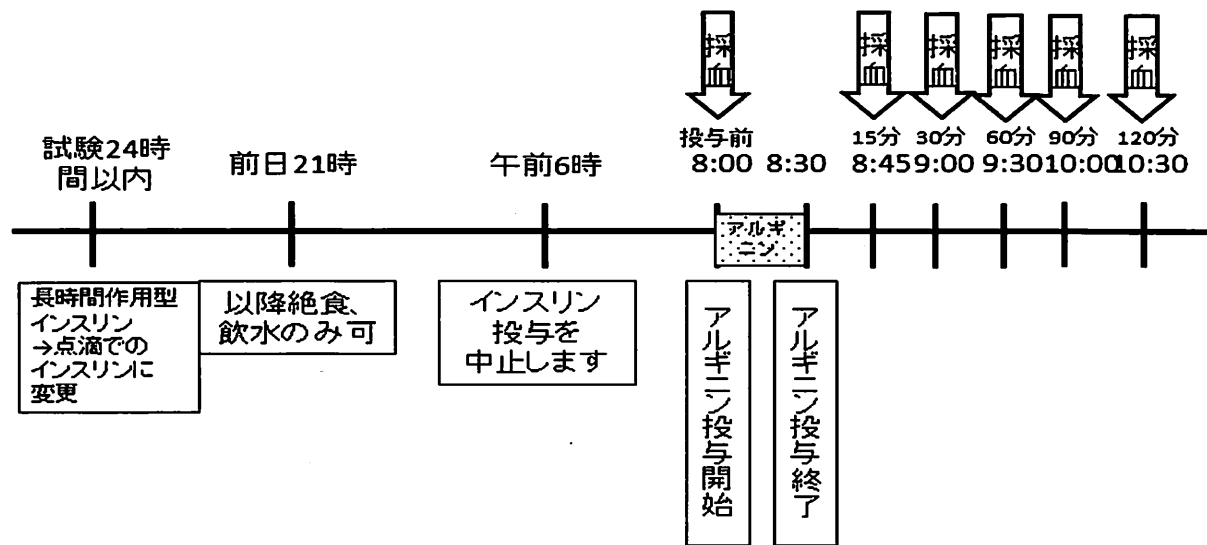
図1: 糖尿病内分泌代謝科バイオリソース(MISSION-DM-ENDO)



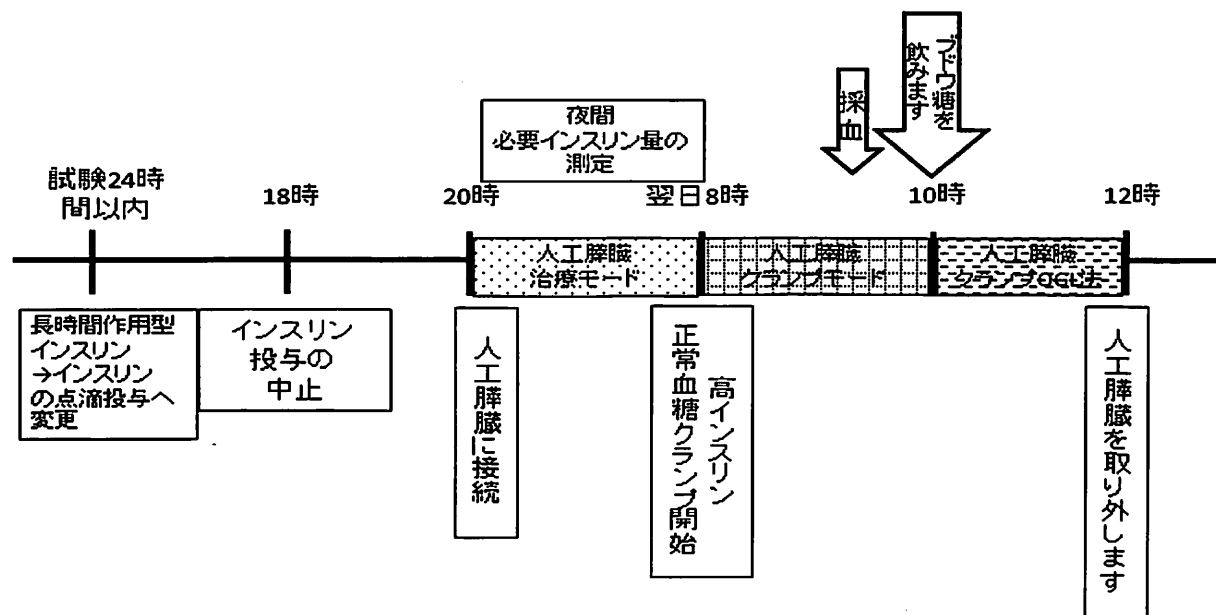
- ◎血液を中心とした多層オミックス解析、便もオプションで2018.1より収集開始
 - ※「空腹」で統一⇒メタボローム、ホルモンの解析にも有用)
 - ※多層的疾患オミックス(2010~2015)の経験活用(肥満症、NAFLD・NASH)
- ◎短期/長期の経時変化を検討可能
- ◎投薬内容その他を含めた詳しい臨床情報

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 : 研究統括、試料のオミックスデータ取得と統合解析

分担研究者名 : 安田和基

キーワード : バイオリソースパネル、オミックス、単一遺伝子病、Luminex 法

研究成果 : 本分担研究では、「入院患者の入院時、退院時ペア血液試料を中心とした、専門的な生体情報をともなうバイオリソースバンク構築」と、「生体試料を用いたオミックス解析、病態解明とバイオマーカー候補の取得」を行う。平成 29 年度の成果を以下に示す。

A バイオリソースパネルの確立（「MISSION-DM-ENDO (Management of Integrated bioreSourceS and Information of Diabetes Mellitus and ENDOcrine disorders)」) :

- ・ 「入退院時ペア血清・DNA」のパネル作成:年間 150~200 例程度のエントリーを予定していたが、平成 28 年 3 月より収集を開始し、平成 29 年度末まで (25 ヶ月) に、のべ 420 例のエントリーがなされた、このうち入退院時ペアで採血ができた症例は約 310 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については、同意を得て既取得サンプルをパネルに組み込み、長期をカバーする経時的なパネルを構築しつつある。
- ・ バイオバンクとの連携:本研究にエントリーした方には、バイオバンクについての概略を説明し、趣旨に賛同いただいた方には、バイオバンクの専属コーディネータが改めて説明・同意取得を行い、本研究で収集した試料と情報の一部をバイオバンクに提供する流れとなった。空腹時採血、整備された臨床情報など、バイオバンクでも利用価値の高い試料と考えられる。
- ・ 便の採取オプションの追加:糖尿病を含めた代謝疾患において、腸内細菌叢の関与が最近注目されているが、短時間の治療介入(食事、薬物)で、同一人でどのように変化するかはよくわかっていない。本研究のオプションとして、「入院直後と退院直前の便」の研究用の収集を倫理委員会に申請し、平成 29 年に承認され、平成 30 年 1 月より収集を開始した。

B オミックス解析:

- ・ ゲノム解析としては、平成 29 年度は、単一遺伝子病タイプ、具体的には MODY 及びインスリン受容体異常症が疑われた合計 4 症例について、解析の同意を得た上で、予想される候補遺伝子の全エクソン領域の配列解析(リシークエンシング)を行い、明らかな異常は認めなかった。一方、エクソンの欠失などを同定できる MLPA(multiple ligation-dependent probe amplification)法を導入したところ、1 例で HNF1B 遺伝子のヘテロ全欠失による MODY5 を新たに診断することができた。この症例は、腎障害などをもたない、HNF1B 異常によく合致する。一方、糖尿病患者全体について、臨床像の細分化を行うために、GWAS により同定された糖尿病遺伝子のタイピングを開始した。
- ・ エピゲノム解析(DNA メチル化)については、ゲノム全体のメチル化レベルを反映する LINE-1、通常メチル化率 50%となるインプリント遺伝子、レプチンや RXR α などはじめ代謝関連遺伝子領域などを主な対象とし、バイサルファイト処理後パイロシークエンス法(キアゲン社 PyroQ24 を用いる)にて定量的に解析する系を構築し、一部試料で測定を行った。
- ・ 入退院時ペア血清についてのオミックス解析を継続した。血中生理活性物質の測定には、Luminex 法を用いた液相多項目同時測定[BioPlex3D(バイオラッド社)を使用]により、少量の試料から系統的なプロファイルを効率的に取得した。同社より販売されているプリフィックスされたパネルとして「Human Diabetes kit (10-plex)」「Human Adiponectin kit」を用いた検討の結果、入院前後での変化や治療薬の効果もみられるものの、短期的な変化よりは個人の違いがより大きいことが明らかになった。

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。平成 29 年度は、前年度構築した体制を元に、症例の集積を主に行い、また下記の検査を実施した。

1) 膵 α/β 細胞機能評価のためのアルギニン負荷試験 : 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。平成 29 年度は、前年度に検査した 20 例に加えてさらに 1 型糖尿病症例 20 例を対象として検査を施行し、計 40 例のデータを集積した。

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） : 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。平成 29 年度は 1 型糖尿病症例に対して新たに計 17 件施行し、前年度と合わせて計 30 例に達した。

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） : 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。平成 29 年度は 1 型糖尿病症例に対して新規に 14 例施行し、前年度と合わせて計 25 例に達した。

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） : 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変化を評価した。平成 29 年度は 1 型糖尿病症例 計 15 件に施行し、前年度と合わせて計 30 例に達した。

5) 持続血糖モニタリング (CGMs) による血糖変動評価 : 3 日間の持続的な血糖変動などを評価した。平成 29 年度は新たに 1 型糖尿病症例計 25 件施行し、前年度と合わせて計 40 件のデータを得た。

1)-5) で得られたデータを元に、日本人 1 型糖尿病において、1) で得られた膵 α 細胞予備能と、2)、3)、4)、5) それぞれとの関係性を解析した（第 78 回米国糖尿病学会にて発表予定）。また、劇症 1 型糖尿病 1 症例における、1) で評価された膵 α 細胞予備能の短期間の特徴的な変化をとらえ、その結果を Journal of Diabetes Investigation 誌に投稿し受理された。

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 : 平成 29 年度に 1 型糖尿病症例計 20 件生体試料を取得し、前年度と合わせて合計 40 例となった。

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継続した。平成 29 年度は新たに 17 症例の登録を行い、前年度と合計して 47 例より、計 127 検体の取得を達成した。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、グルカゴン値、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、GLP-1、somatostatin) の関係性を検討した。また、糖尿病患者における血液中の終末糖化産物 (AGEs) を測定し、血糖コントロールや合併症の進行度との関係、入院治療介入の影響などの解析を行った。

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
Plasma adiponectin levels, APOA2 variants, and incidence of type 2 diabetes: a nested case-control study.	Goto A, Noda M, Goto M, <u>Yasuda K</u> , Mizoue T, Yamaji T, Sawada N, Iwasaki M, Inoue M, Tsugane S.	Diabetes Res Clin Pract	127: 254-264.	2017
A type 2 diabetes-associated SNP in KCNQ1 (rs163184) modulates the binding activity of the locus for Sp3 and Lsd1/kdmla, potentially affecting CDKN1C expression.	Hiramoto M, Udagawa H, Ishibashi N, Takahashi E, Kaburagi Y, Miyazawa K, Funahashi N, Nammo T, <u>Yasuda K</u>	Int J Mol Med	41(2): 717-728	2018
Slowly-Growing Adrenal Mass: A 20-Year Incubation.	Takahashi N, Tanabe A, Yamazaki Y, Sasano N, and <u>Kajio H</u> .	The American Journal of Medicine	130(11): e479-e483.	2017
Insulinoma presenting with reactive hypoglycemia: evaluating the effect of tumor resection via continuous glucose monitoring.	Kikuchi T, Chujo D, Takahashi K, Takahashi N, Tanno Y, Tonoike M, Ihana N, Tsujimoto T, Tanabe A, <u>Kajio H</u> .	Intern Med	56(22): 3067-3071	2017
High risk of renal dysfunction in patients with fulminant type 1 diabetes.	Takahashi N, Tsujimoto T, Chujo D, <u>Kajio H</u> .	J Diabetes Investig	9(1): 146-151	2018

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
「糖尿病の遺伝素因-最新のトピックスと展望-」	<u>安田和基</u>	第5回Diabetes Research Conference in Tochigi	宇都宮	2017年6月
先端巨大症徴候出現から約10年後に下垂体卒中で見られたGH産生下垂体腺腫の1例	高橋 信行, 田辺 晶代, 橋本 真紀子, 丸山 浩司, 上野 圭祐, 仲村 朋香, 野田 龍一, 岡本 幸一郎, 辻本 哲郎, 坊内 良太郎, 大杉 満, 中條 大輔, 植木 浩二郎, <u>梶屋 益</u>	第18回 日本内分泌学会 関東甲信越地方会	群馬	2017年9月

研究発表及び特許取得報告について

自家膵島移植2例における人工膵臓を用いた膵島注入時の血糖管理	高橋 信行, 中條 大輔, 川邊 秋津, 霜田 雅之, 高野 太輔, 黒川 敏昭, 枝元 良広, 大杉 満, 植木 浩二郎, 梶尾 裕	第17回 先進糖尿病治療研究会	新潟	2017年10月
「肥満や関連疾患の遺伝素因は、どこまでわかったのか」	安田和基	肥満と糖尿病を考える会	佐倉	2017年12月
「リラグルチドが有効であったMODY5疑いの1例」	寺川 瞳子, 中條大輔, 仲村明香, 菊地 智彦, 上野圭佑, 濱野 頌子, 安田和基, 植木浩二郎, 梶尾 裕	第55回日本糖尿病学会関東甲信越地方会	新潟	2018年1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
「発症遺伝子の解析」	安田和基	『糖尿病専門医研修ガイドブック改訂第		2017年5月
ベッドサイド型 人工膵臓取り扱いマニュアル ISBN: 9784787822987 (分担執筆)	中條 大輔, 山田 和彦 編	ベッドサイド型 人工膵臓取り扱いマニュアル		2017年5月15日 発行
企画編集『糖尿病の「体質」：発症する人としていない人の違いはなにか?』	安田和基	月刊糖尿病19巻7号 (P7-P109)		2017年7月
「DTC(direct-to-consumer)検査としての遺伝子検査」	安田和基	糖尿病診療マスター15巻7号		2017年7月
「糖尿病の研究から実臨床へ向けて：展望と課題」	安田和基	第41回糖尿病診療-最新の動向- (国立国際医療研究センター)		2017年9月
肥満を合併した1型糖尿病患者に対する減量手術	高橋 信行	武田製薬 公式ホームページ https://www.takedamed.com/		2017年10月発行
2型糖尿病患者における減量手術後の細小血管症発症のリスクに関する長期的な効果：レガシー効果のエビデンス	高橋 信行	武田製薬 公式ホームページ https://www.takedamed.com/		2017年10月発行

研究発表及び特許取得報告について

生活習慣に対する強化介入と約10年後の脳および白質高信号域の容量との関係	高橋 信行	武田製薬 公式ホームページ https://www.takedamed.com/		2017年10月発行
2型糖尿病患者の減量手術後における血糖コントロールの改善と食物に対する報酬系などの神経活動との関連	高橋 信行	武田製薬 公式ホームページ https://www.takedamed.com/		2017年10月発行
SGLT2阻害薬の病態生理に及ぼす影響～特にケトン体産生亢進の是非について～	高橋 信行、植木 浩二郎	月刊糖尿病		2017年12月発行
「2型糖尿病全ゲノム解析の現状と今後の展望」	安田和基	Medical View Point 39巻 3号, P1-2		2018年3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
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と。