

令和元年5月31日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08936

研究課題名(和文) 高感度測定GAD抗体とHLAによる新たな糖尿病分類の試み

研究課題名(英文) Classification of diabetes based on high sensitivity anti-GAD antibody and HLA

研究代表者

大沼 裕 (Hiroshi, Onuma)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00294794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：超高感度ELISAによる高感度GAD抗体の測定およびHLAタイピングにより、新たな糖尿病の分類を試みることを目的とする。2型糖尿病において高感度GAD抗体の陽性率は従来のGAD抗体陽性率に比して高率であり、陽性者はインスリン分泌が低下している傾向があった。また、1型糖尿病感受性HLA ClassIIを高率に有していた。高感度GAD抗体の測定、HLAのタイピングすることにより、従来2型糖尿病と考えられていたもののうち、膵細胞の破壊によりインスリン分泌不全に至る症例を抽出できる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA各座位とインスリン分泌能(Cペプチド)、膵細胞障害性(膵島自己抗体)の関連を明らかにして、細胞破壊の指標とHLAの多型に基づいた糖尿病の新たな分類を行うことが可能になれば、臨床経過の予測や治療選択の有用な指標となる。さらに、HLAの多型に基づいた、糖尿病治療関連疾患の新たな治療戦略を見出す可能性も期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to perform the new classification of diabetes based on high sensitivity GAD antibody and HLA typing. High sensitivity GAD (hsGAD) antibody was detected more frequently than GAD antibody measured by the existing system in patient diagnosed as type 2 diabetes (T2D) in current classification. Those with hsGAD antibody had a tendency to have lower serum C-peptide and higher frequency of type 1 diabetes susceptible classII HLA than those without hsGAD antibody. HsGAD antibody and HLA typing might predicted the case deteriorating into insufficiency of insulin secretion in T2D.

研究分野：内科学 糖尿病学

キーワード：GAD抗体 HLA 高感度ELISA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は成因により、1型糖尿病、2型糖尿病、その他特定の機序・疾患による型、に分類される。1型糖尿病は、唯一のインスリン産生・分泌細胞である膵β細胞が破壊されることにより、通常はインスリンの絶対的欠乏（生命維持のためインスリン投与が必須の状態）に至る。1型糖尿病は、膵β細胞の破壊に自己免疫が関与する自己免疫性（A）と自己免疫の関与が認められない特発性（B）に亜分類されている。さらに、臨床的には、絶対的インスリン欠乏に至るまでの経過から、劇症1型糖尿病、急性発症1型糖尿病、緩徐進行1型糖尿病に分類される。日本人糖尿病の90%以上を占める2型糖尿病は、膵β細胞の機能低下に伴うインスリン感受性の低下を特徴とする。現分類では、1型糖尿病および原因が明らかなその他の糖尿病を除いた全ての糖尿病が2型糖尿病に分類される。すなわち、2型糖尿病には多種多様な病因によるものが含まれる。2型糖尿病の発症時には、すでに平均で膵β細胞機能が約50%にまで落ちていることが報告されている。GAD抗体は1型糖尿病のマーカーであり、膵島の破壊を反映するが、1型糖尿病と2型糖尿病が、異なる成因によるものではなく、HLAなどの共通の遺伝的基盤の上に成立し、その発症、病態が膵β細胞破壊の指標であるGAD抗体価と関連することを示唆する。研究分担者らは、従来のアッセイ系に対して100-1000倍の感度を持つEIAアッセイ系を確立して、GAD抗体測定系に応用した(Ann Clin Biochem. 2015 Sep 17. pii: 0004563215609639)。これにより、これまで測定感度以下で陰性とされていたlow titerのGAD抗体が定量可能となった。

### 2. 研究の目的

HLA Class IIは1型糖尿病の最も強い疾患感受性遺伝子である。GAD抗体は1型糖尿病のマーカーであり、膵島の破壊を反映する。HLA Class IIの1型糖尿病感受性のハプロタイプの高頻度の検討から、GAD抗体陽性の非インスリン依存糖尿病がGAD抗体陽性のインスリン依存糖尿病と正常者の中間であるとの報告がある。すなわち、現在の分類の1型糖尿病と2型糖尿病は同じ遺伝的背景に存在し、その発症はGAD抗体などの膵島破壊の指標と関連すると考えられる。申請者らは、超高感度のGAD抗体のアッセイ系を確立し、これまで測定感度以下で陰性とされていたlow titerのGAD抗体の定量を可能とした。本研究では、膵β細胞障害の指標となるlow titerのGAD抗体価とHLAを基盤とした、インスリン分泌能や膵β細胞障害を反映する新たな糖尿病の分類を試みる。

### 3. 研究の方法

1型または2型糖尿病患者約2000名以上、対照として耐糖能正常者約1000名以上よりDNAならびに空腹時血清を採取し解析を行う。HLAのA, B, C, DR, DQ, DP各座位の遺伝子型を解析する。インスリン分泌能の指標の血中Cペプチド、β細胞破壊の指標である血中膵島関連自己抗体(GAD抗体など)を測定する。GAD抗体については、研究分担者が開発した、超高感度EIA法を用いて測定する。これらと臨床情報（発症年齢、過去最大BMIなど）を組み合わせ、臨床上的亜分類を行う。β細胞破壊の指標であるGAD抗体と臨床上の亜分類の関連性について検討する。また、HLA各座位とインスリン分泌能（Cペプチド）、膵β細胞障害性（膵島自己抗体）の関連を解析する。こうして、β細胞破壊の指標とHLAの多型に基づいた糖尿病の新たな分類を試みる。

### HLA タイピング

HLA Class IのHLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA Class IIのDR, DQ, DPの各遺伝子座につい

て行う。HLA 遺伝子のタイピングは、PCR-SSOP (Sequence Specific oligonucleotide Probe) 法により、Luminex 社の xMAP テクノロジーを用いて行う。

#### 超高感度 EIA 法による GAD 抗体の定量

Immune Complex Transfer Enzyme Immunoassay : ICT-EIA にて定量する。

( ICT-EIA は非特異的に吸着した総抗体の中から特異抗体のみを固相から外し、別の新たな固相へ転移させることによりバックグラウンドを大きく減少させる方法である。)

#### 4. 研究成果

1 型または 2 型糖尿病患者 2000 名、一般住民 2000 名の HLA、A, B, C, DR, DQ, DP 各座の遺伝子型タイピングを終了した。一般住民、1 型、2 型糖尿病 3000 名の高感度 GAD 抗体を測定し、2000 名の血中 C ペプチドを測定した。

高感度 GAD 抗体の測定は ICT-EIA 法にて測定した。GAD 抗体濃度が 0.6 U/mL 以下のものを擬陽性、0.6 U/mL 以上を陽性とした。擬陽性のサンプルに抗原に相当する GAD を加え抗原抗体反応を起こさせたのち、さらに GAD 抗体を ICT-EIA 法にて測定し、阻害率を計算した。擬陽性のもののうち阻害率 50% 以上を示したものを GAD 抗体陽性とした。一般住民約 2000 人より採取した血清サンプルにおける高感度 GAD 抗体の陽性率は約 1.56% であった。臨床データが収集されデータベース化された、2 型糖尿病と診断されている 347 名を解析した結果、20 名が高感度 GAD 抗体が陽性であり、陽性率は 5.76% であった。これは、一般住民における陽性率に比べ高率であった。347 名の 2 型糖尿病と診断されている者では、RIA 法による従来の GAD 抗体測定系 GAD 抗体が測定されており、9 名が陽性であり、その陽性率は 2.59 % であった。これは、高感度 GAD 抗体系により測定したものの約半分の頻度であった。2 型糖尿病における高感度 GAD 抗体陽性者は、陰性者に比べインスリン分泌能を反映する血中 C ペプチドは低い傾向あり、1 型糖尿病感受性 HLA アレルを高率に有する傾向があった。

高感度 GAD 抗体の測定、HLA タイピングにより、従来 2 型糖尿病と考えられていたもののうち、膵 細胞の破壊によりインスリン分泌不全に至る症例を抽出できる可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Onuma H, Kawamura R, Tabara Y, Yamashita M, Ohashi J, Kawasaki E, Imagawa A, Yamada Y, Chujo D, Takahashi K, Suehiro T, Takata Y, Osawa H, Makino H. Variants in the BACH2 and CLEC16A gene may be associated with susceptibility to insulin-triggered type 1 diabetes. 2019 Apr 10. doi: 10.1111/jdi.13057. [Epub ahead of print] J Diabetes Investig (PMID:30970177)

査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：高田 康德  
ローマ字氏名： Takata Yasunori  
所属研究機関名：愛媛大学  
部局名：医学系研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：20432792

研究分担者氏名：大澤 春彦  
ローマ字氏名： Osawa Haruhiko  
所属研究機関名：愛媛大学  
部局名：医学系研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：90294800

研究分担者氏名：川村 良一  
ローマ字氏名： Kawamura Ryouichi  
所属研究機関名：愛媛大学  
部局名：医学系研究科  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：90533092

研究分担者氏名：橋田 誠一  
ローマ字氏名： Hashida Seiichi  
所属研究機関名：徳島文理大学  
部局名：大学共同利用機関等の部局等

職名：教授

研究者番号（8桁）：10156268

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。