

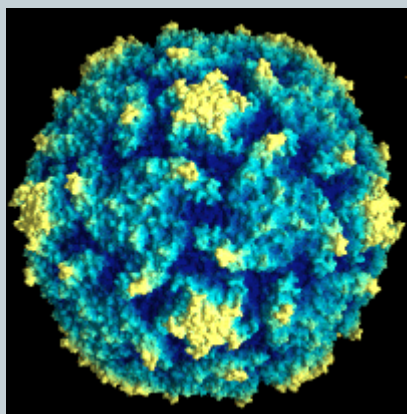
Er type 1 diabetes en virussykdom?

Hva vi har lært av pankreasbiopsier



OVERLEGE/STIPENDIAT
LARS KROGVOLD

Barnemedisinsk avdeling



Disposisjon

2

1. Bakgrunn, studiedesign og kliniske erfaringer
2. Funksjonsanalyse av levende betaceller
3. Betennelse /insulitis
4. Påvisning av virus i bukspyttkjertelen

Type 1 diabetes er en alvorlig sykdom



- Ca 350 barn får diabetes hvert år i Norge.
- 241 pasienter som fikk diabetes før 15 års alder mellom 1973 and 2013 er nå døde
- Standard Mortalitets Rate er 3,6 ganger økt.
- 69% av pasientene når ikke behandlingsmålet med $\text{HbA}_{1c} < 7,5\%$ (som i stor grad forebygger komplikasjoner)

*Gagnum V, et al. Diabetologia 2015
Skrivarhaug T et al, Norwegian Childhood Diabetes Register 2013.*

Hva er årsakene til T1D?

Arv

- Noen gener, særlig HLA klasse II-gener, er

Virus

Ernærings
faktorer

Genes

HLA-DRB1*04-DQB1*0302,
DRB1*03-DQB1*0201

Andre
infeksjoner

Andre
miljøfaktorer??

??

??

- Lista over gener utvides stadig.....

Miljø

Noe i maten?

Kumelk

Gluten

Andre proteiner?

Noe du mangler?

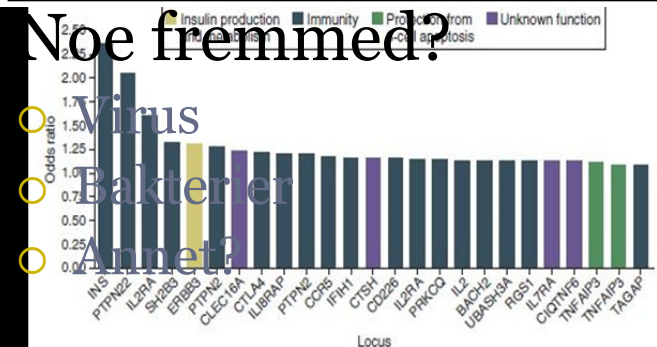
Vitamin D

Noe fremmed?

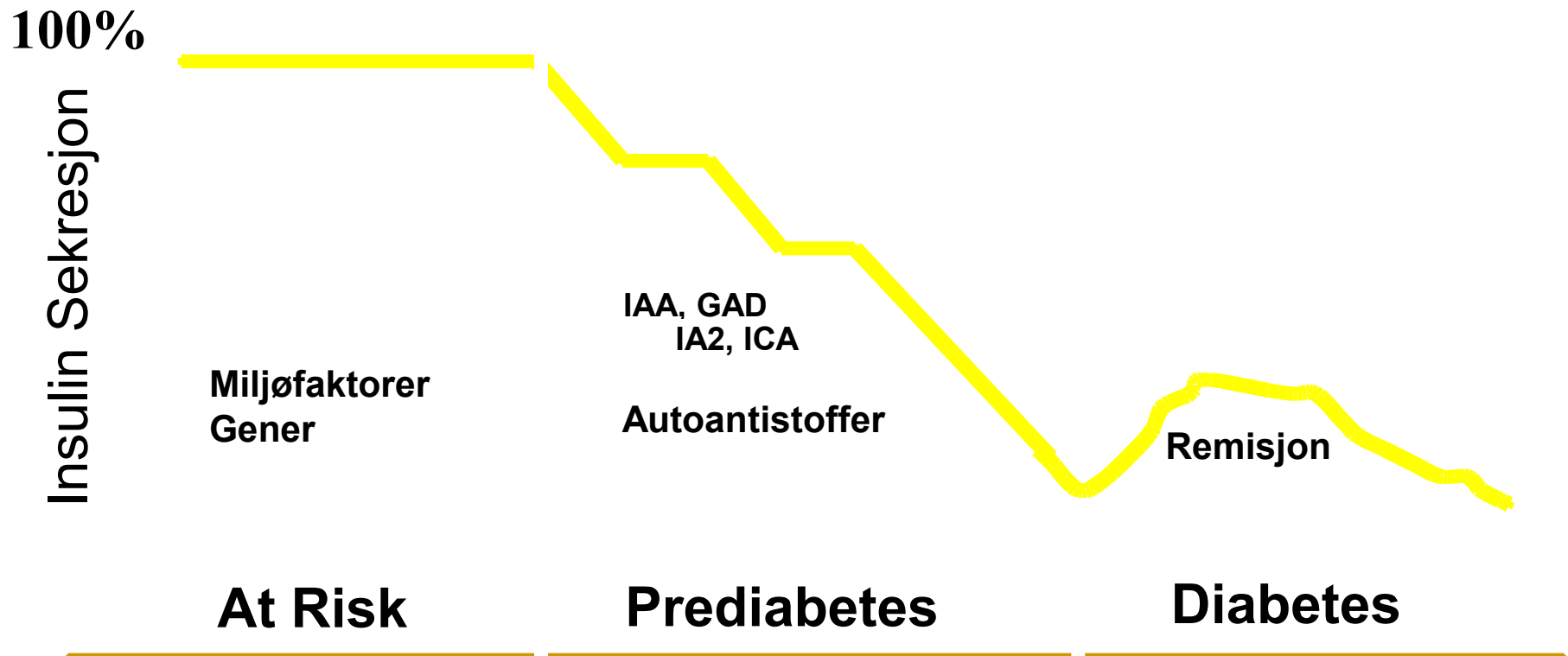
Virus

Bakterier

Anneth



Utviklingen av type 1 diabetes



Et paradoks



Vi vet ikke årsaken til sykdommen

- Men vi undersøker ikke det syke organet ved diagnose-tidspunktet

The Diabetes Virus Detection study (DiViD)

- Første studie som har samlet tilstrekkelig friskt vev fra pankreas
- Minimal laparoskopisk pancreas-hale reseksjon
- Voksne pasienter (18-40 år) med nyopptaget type 1 diabetes



Klinisk karakterisering av patientene

8

Case	Age	Sex	BMI	Weeks from diagnosis until biopsy	HbA1c at biopsy % (mmol/mol)	Insulin (U/kg/day)	Anti GAD (<0.08 ai)	Anti-insulin (<0.08 ai)	anti-ZnT8 (<0.12 ai)	Anti IA2 (< 0.10 ai)	HLA risk alleles*	Seconds until snap-freezing of pancreatic tissue
1	25	F	21.0	4	6.7 (50)	0.5	1.76	0.7	0.28	0.16	Yes	110
2	24	M	20.9	3	10.3 (89)	0.35	0.79	<0.01	0.44	>3	Yes	150
3	34	F	23.7	9	7.1 (54)	0.17	1.77	< 0.05	1,45	> 3	Yes	150
4	31	M	25.6	5	7.4 (57)	0.4	0.77	0.1	< 0.01	2.54	Yes	160
5	24	F	28.6	5	7.4 (57)	0.36	0.46	0.1	0.06	>3	Yes	240
6	35	M	26.7	5	7.1 (54)	0.52	1.85	< 0.05	< 0.01	< 0.04	Yes	190

* Presence of HLA DR3, HLA DR4 or both

Komplikasjoner og etikk

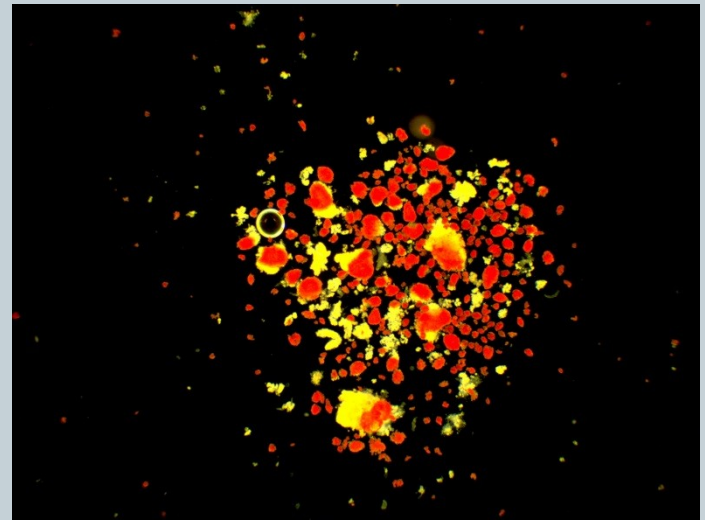
9

- To pasienter (case 5 og 6) fikk postoperativ forbigående lekkasje
- For alle som bedriver klinisk forskning, er det viktig å fortløpende gjøre en vurdering av prosjektets fordeler og risiko
- Beslutningen om å stoppe videre rekruttering var enkel og logisk

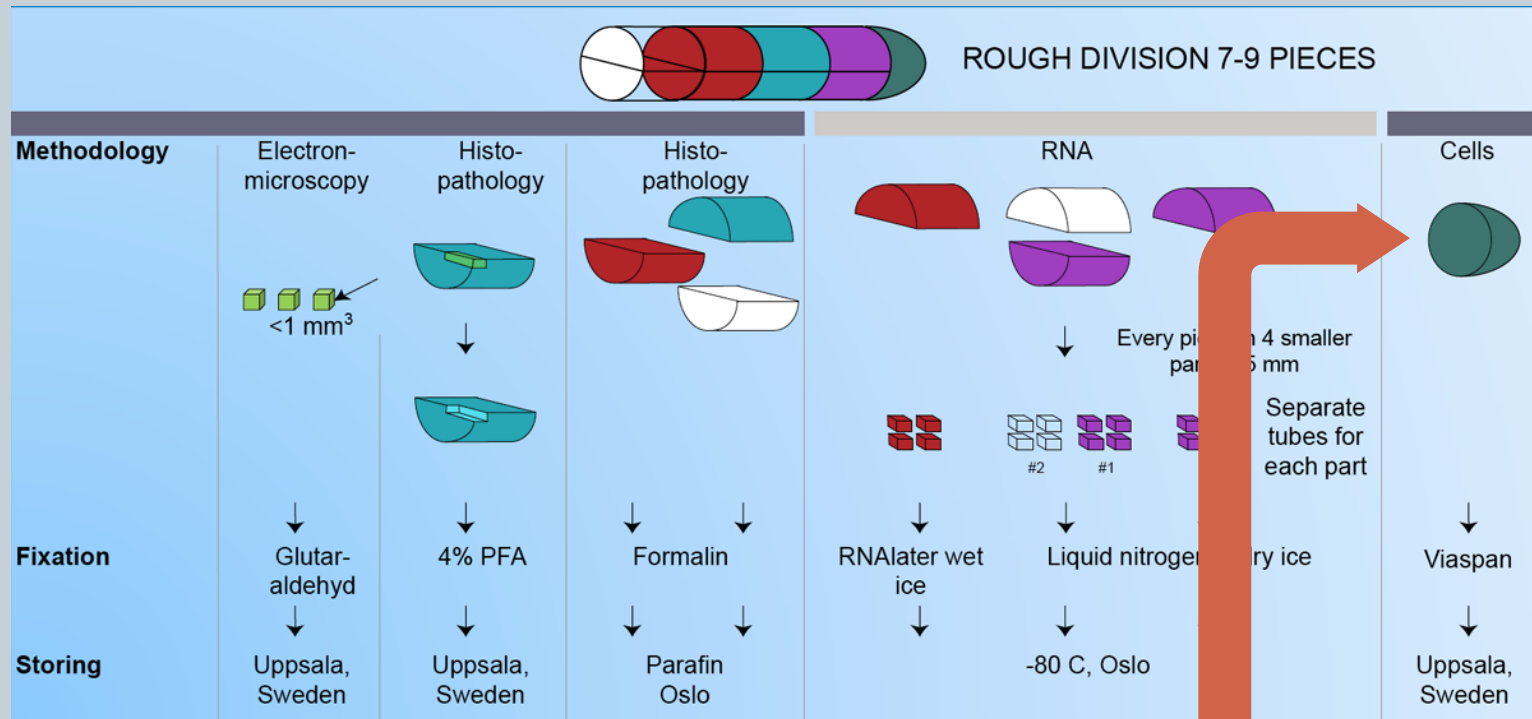
Betacelle-funksjon



- Utført i Uppsala
- Håndplukkede øyer isolert fra alle seks pasientene
- Dyrket i cellekultur i 1, 3, og 6 dager
- Glucose-stimulert insulin sekresjon (GSIS) målt i et dynamisk perfusjon system
 - Glukose i forskjellige konsentrasjoner ledes gjennom celle-løsningen
 - Insulin konsentrasjon målt hvert 6. minutt

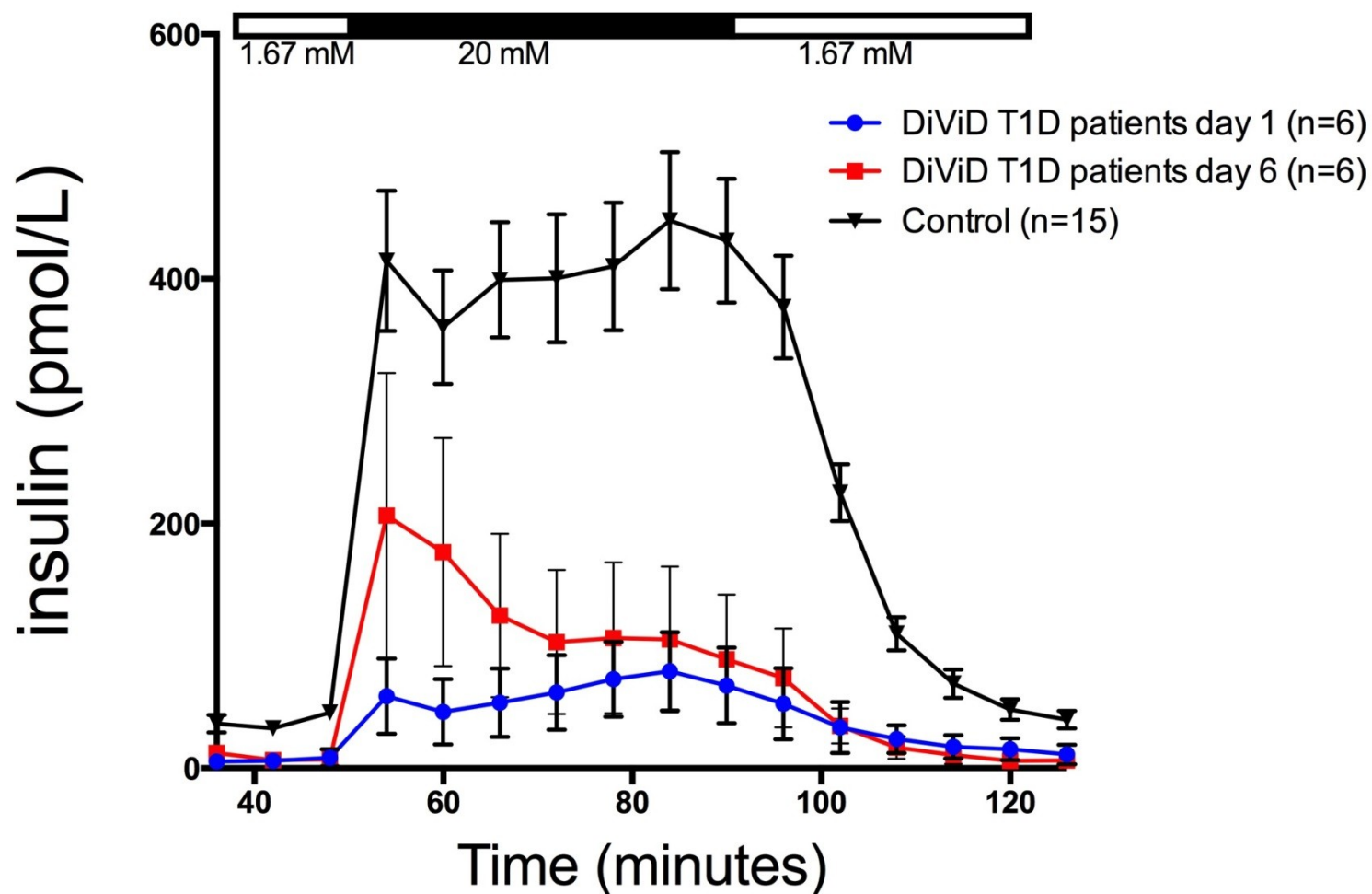


Materiale brukt for studier av betacell-funksjon

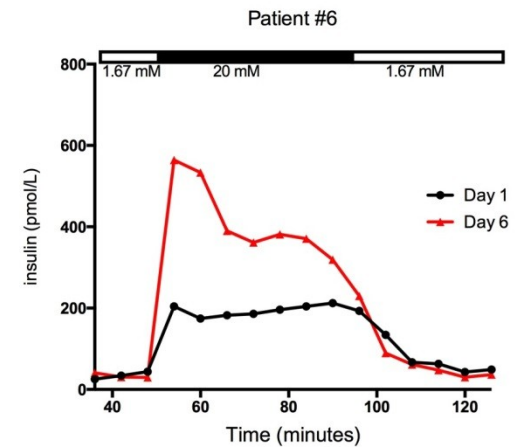
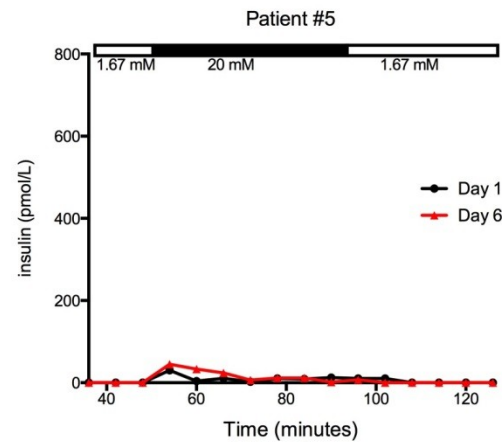
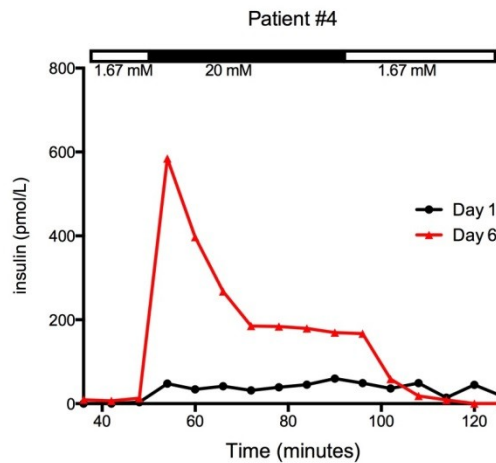
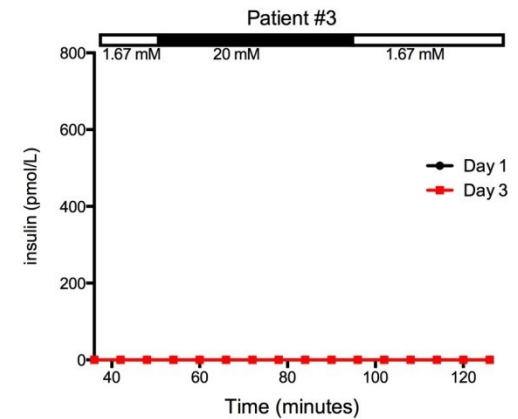
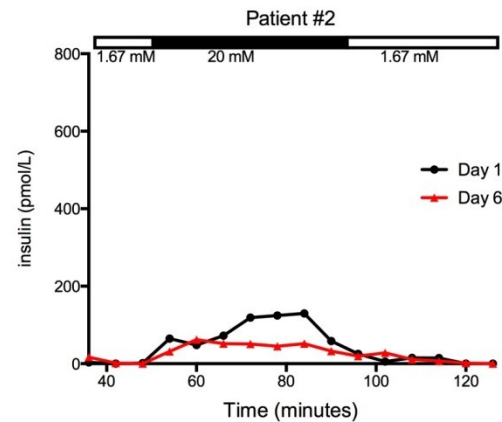
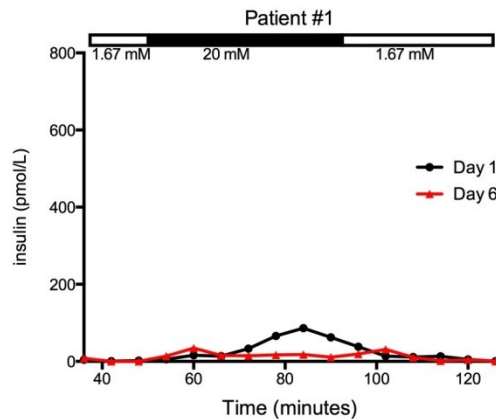


Live tissue (as transplant), express air courier Oslo-Uppsala

Insulin sekresjon ved glukose perifusjon



Insulin sekresjon ved glukose perifusjon



Konklusjon:



- Signifikant reserve kapasitet for insulinproduksjon ved diagnose-tidspunkt – mye igjen å redde !
- Funksjonell reserve som bedret seg etter dyrkning i et «ikke-diabetogent» miljø

Definisjon av insulitis

15

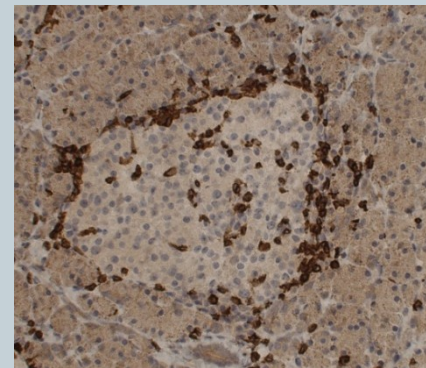
- Et lymfocytt-infiltrat omrking eller i de Langerhanske øyer
- ≥ 15 CD45+ celler/islet i flere enn 3 øyer

Diabetologia (2013) 56:2541–2543
DOI 10.1007/s00125-013-3043-5

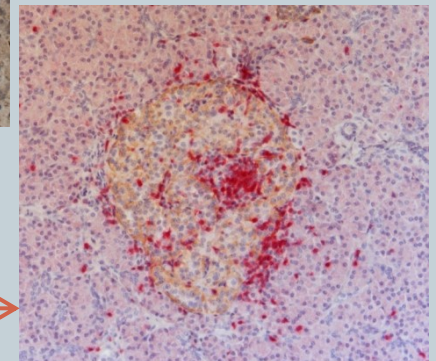
LETTER

The diagnosis of insulitis in human type 1 diabetes

M. L. Campbell-Thompson • M. A. Atkinson • A. E. Butler • N. M. Chapman •
G. Frisk • R. Gianani • B. N. Giepmans • M. G. von Herrath • H. Hyöty •
T. W. Kay • O. Korsgren • N. G. Morgan • A. C. Powers • A. Pugliese •
S. J. Richardson • P. A. Rowe • S. Tracy • P. A. In't Veld



Peri-insulitis

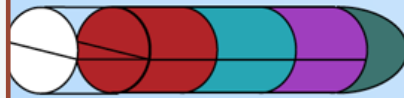


Intra-insulitis

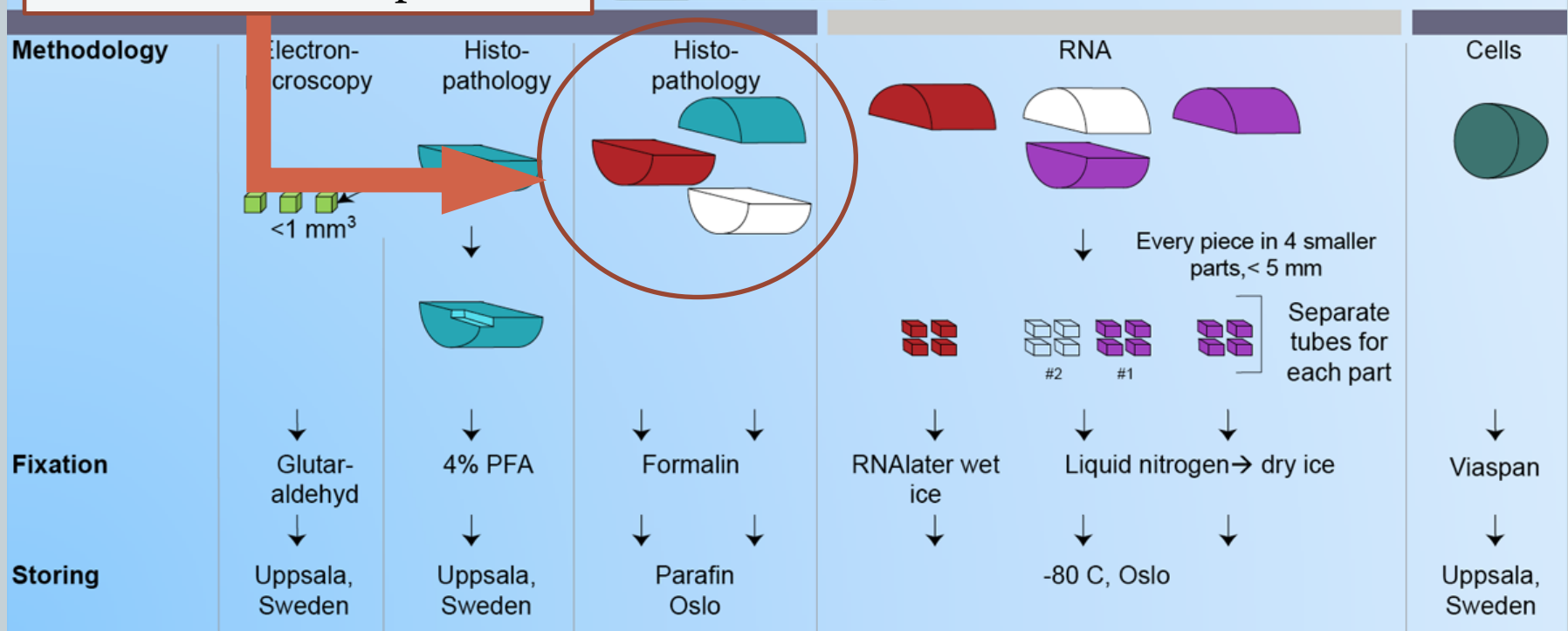
Materiale brukt til studier av insulitis



Formalin-fiksert vev,
to blokker fra hver pasient

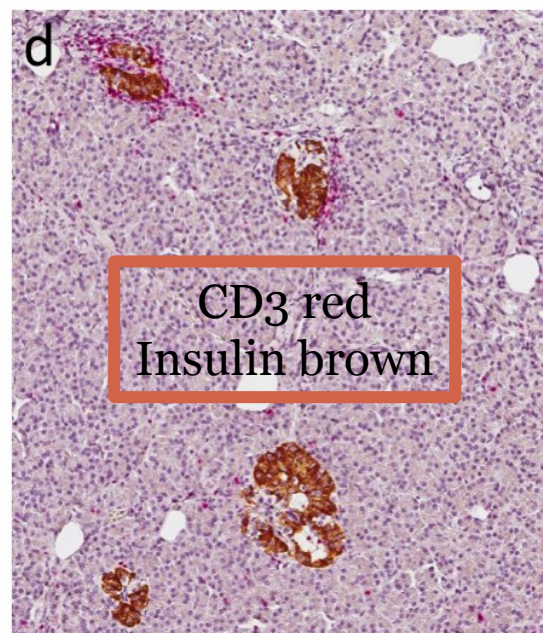
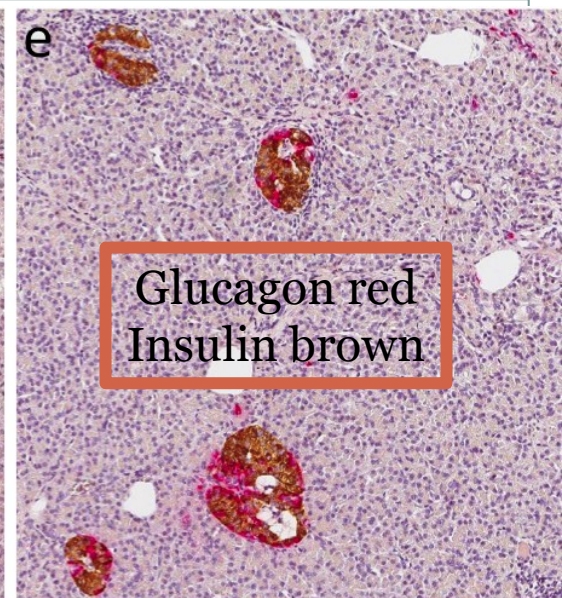
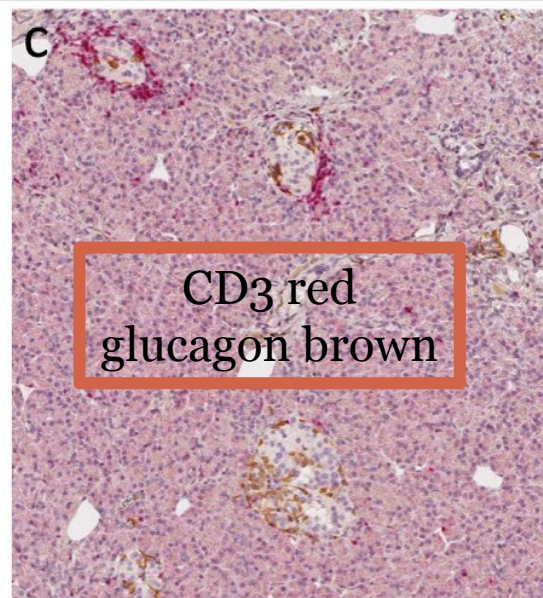


ROUGH DIVISION 7-9 PIECES



Tre påfølgende
snitt ble
dobbeltfarget
for:

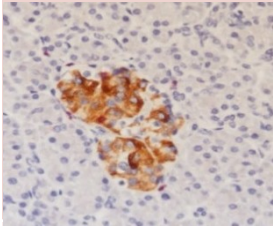
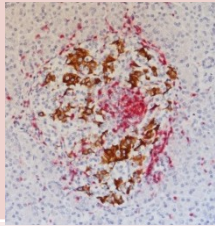
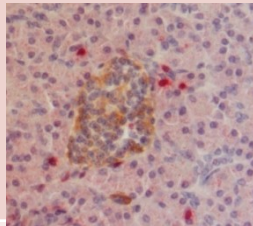
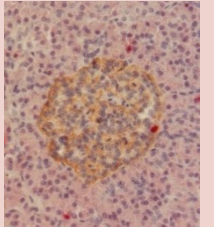
CD3+glukagon
CD3+ insulin
glukagon + insulin



Utviklingen og forekomsten av insulitt

(n=1596 øyer/12 snitt fra alle caser)



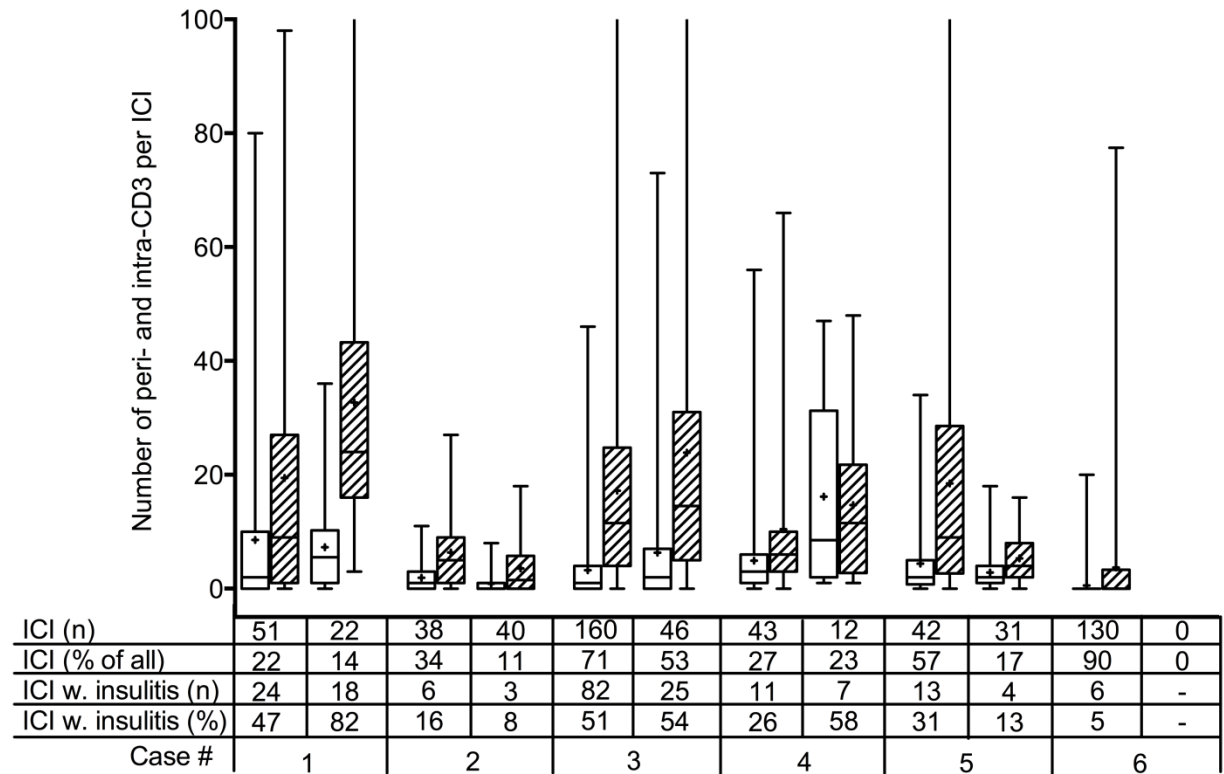
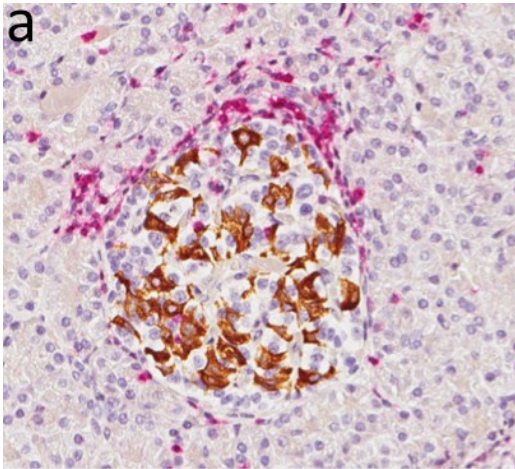
	A	B	C	D
Insulin	+	+	-	-
Inflammation	-	+	+	-
				
Staining	Insulin: brown CD3: red	Insulin: brown CD3: red	Glucagon: brown CD3: red	Glucagon: brown CD3: red
Percentage of islets (insulitis ≥ 15 cells)	27	9	2	62

Flest T-celler lokalisert perifert

19

Peri-insulitis, hatched bars

Intra-insulitis, open bars



Konklusjoner

20

- 36% (15-94 %) av alle øyer inneholdt insulin
- Alle 6 pasienter fyllte kriteriene for insulitt
- 11% av alle øyer var affisert av insulitt

Virus og T1D, noe helt nytt?

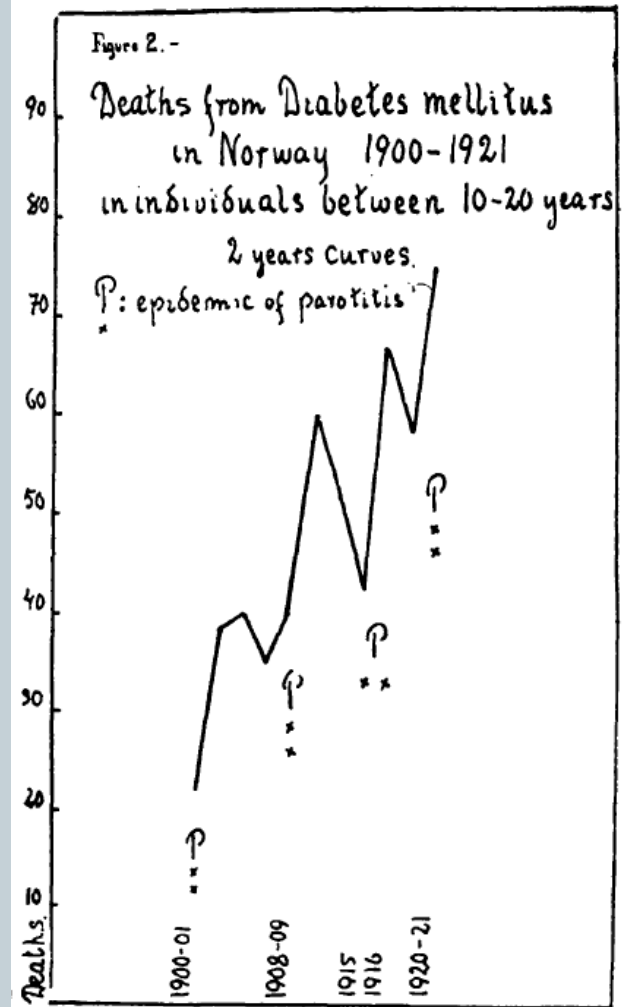
IS DIABETES OF INFECTIOUS ORIGIN?

EDVARD GUNDERSEN

From the Army Bacteriological Laboratory, Oslo, Norway

Among the large series of etiological factors ascribed to diabetes mellitus, serious attention has not been paid to its possible infectious origin, inasmuch as diabetes does not bear the stamp of an infectious disease. Yet in late years the epidemiology of diabetes mellitus has frequently been considered, especially since the incidence of this disease has rapidly increased in certain localities, to the extent that its infectious nature has been seriously considered. It is with this aspect of the disease that the following remarks are made.

The Journal of Infectious Diseases, Vol. 41, No. 3
(Sep., 1927), pp. 197-202



ORIGINAL ARTICLE

ARCHIVE

Virus-Induced Diabetes Mellitus — Isolation of a Virus from the Pancreas of a Child with Diabetic Ketoacidosis

Ji-Won Yoon, Ph.D., Marshall Austin, M.D., Ph.D., Takashi Onodera, Ph.D., and Abner Louis Notkins, M.D.

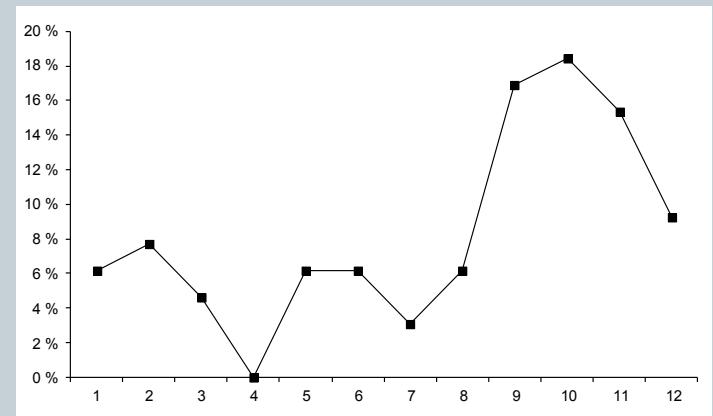
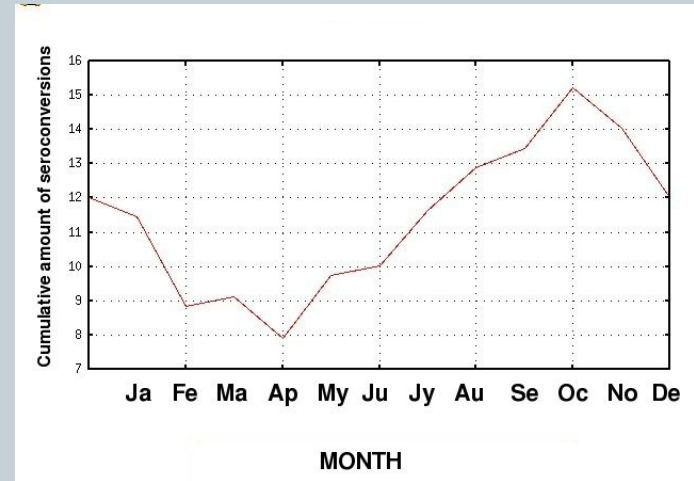
N Engl J Med 1979; 300:1173-1179 | May 24, 1979

Et ble undersøkt oppdaget type 1 diabetes og ketoacidose
innleggelse i diabetisk ketoacidose

- Coxsackie B4 virus ble isolert fra pancreas
- Viruset ble inokulert i mus
- Musene utviklet deretter type 1 diabetes

Samvariasjon mellom enterovirus i avføring og påvisning av autoantistoff, DIPP-studien

- Sesongvariasjon i tidspunkt for utvikling av autoantistoffer
 - Lavest på våren
 - Dobling i løpet av høsten
- Helt tilsvarende sesongvariasjon i enterovirus RNA-positive avføringsprøver



Epidemiologiske studier viser sammenheng mellom enterovirus i blod og T1D

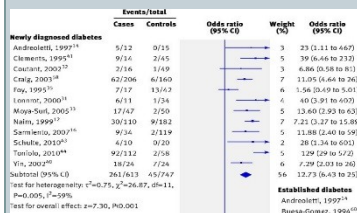
BMJ

BMJ 2011; 342:d35

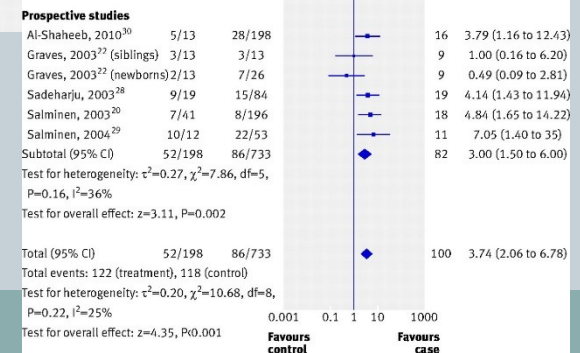
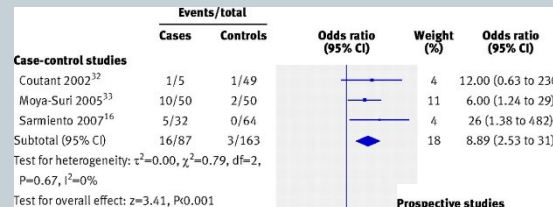
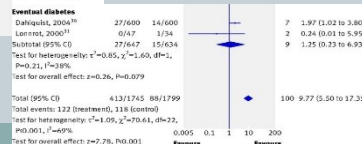
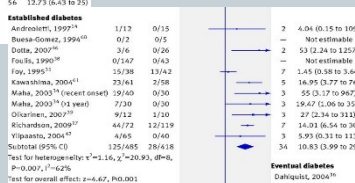
RESEARCH

Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies

Wing-Chi G Yeung, medical student,¹ William D Rawlinson, professor,^{1,2} Maria E Craig, associate professor^{2,3,4}



Diabetes
OR = 9.77
(5.50 to 17.35)



Prediabetes
OR = 3.74
(2.06 to 6.78)

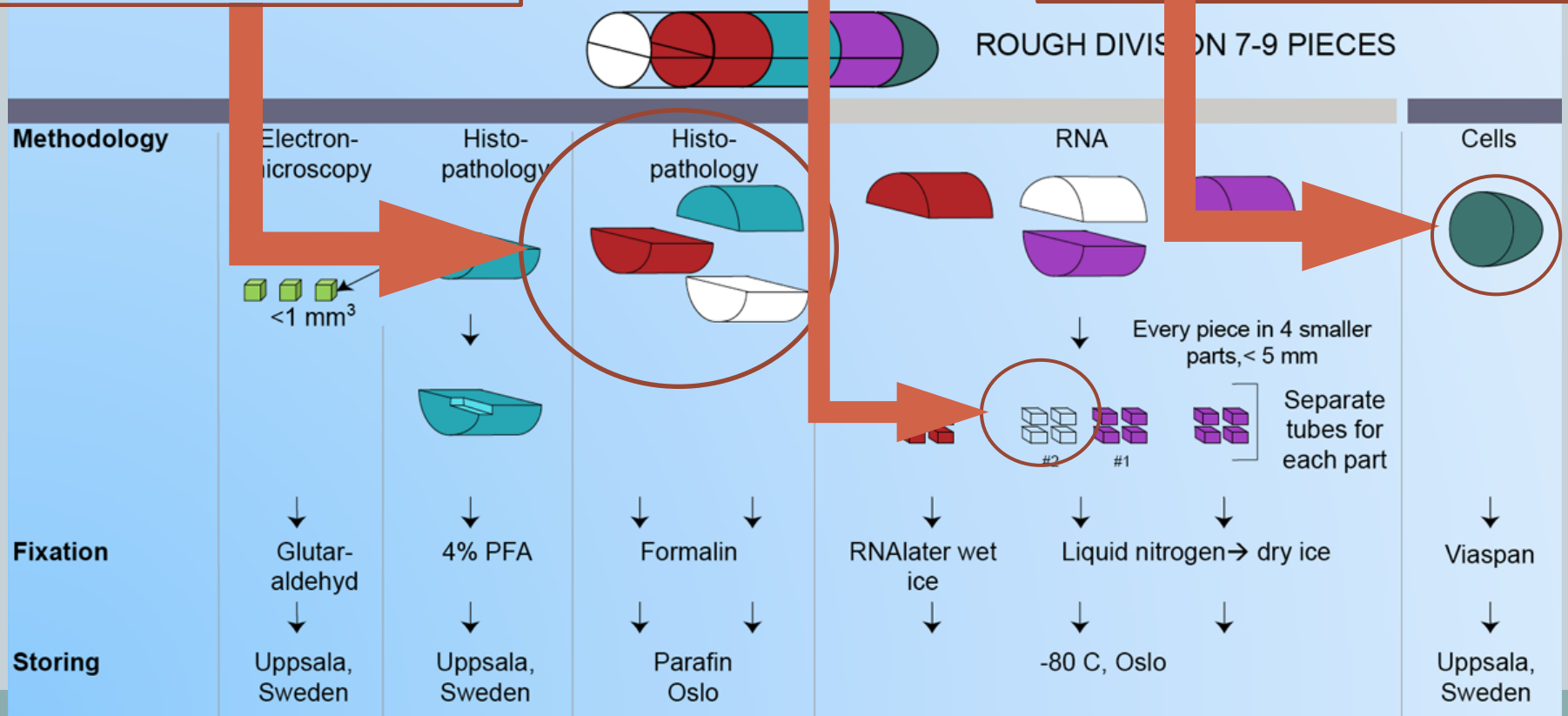
Materiale brukt i virusstudiene

25

Formalin-fixated tissue for immunohistochemistry, two blocks from each patient

Snap-frozen specimen for RNA-extraction, PCR and sequencing

Live isolated islets and exocrine cell clusters for culturing and PCR of culture medium



Kontrollgrupper



Immunhistokjemi

- 9 organdonores uten diabetes fra nPOD-registeret
- Alle uten diabetes-antistoffer
- Alder 25 år (18-38)

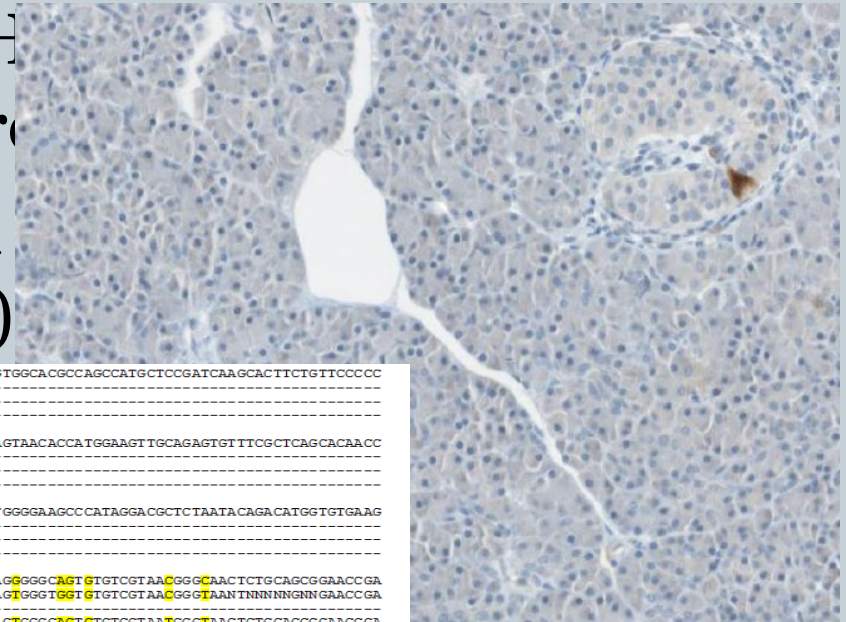
PCR

- 6 organdonores fra Uppsala
- Alle uten diabetes-antistoffer
- Alder 67 år (55-70)

Resultater fra pankreasundersøkelsene

27

- VP1 funnet i øyer fra alle type 1 diabetes pasientene (2 av 9 kontroller)
 - 1.7 % av øyene inneholdt VP1 positive celler
- Hyperexpression av class I i HLA i øyene fra alle pasientene (1 av 9 kontroller)
- Enterovirus spesifikke RNA i øyene fra alle pasienter (0 av 6 kontroller)



Res

Case2	GTACCTTTGTGCGCTGTTTATTACCCCTCCCTAACTGTAACTTAGAAGTAATACACCCGATCAACAGTAAGTGTGGCAGCCAGCCATGCTCCGATCAAGCACTTCTGTTC
Case4	-----
Case5	-----
Case6	-----
Case2	GGACCAGATATCAATAGACTGCCCCACGCGGTTGAAGGAGAAAGTGTCCGTTATCCGCGCAACTACTTCGAGAAGCCAGTAAACACCATGGAAAGTTGCAGAGTGTTCGCTCAGCACAA
Case4	-----
Case5	-----
Case6	-----
Case2	CCAGTGTAGATCAGGTGATGAGTCACTGCATACCCCACGGGTGACCGTGGCAGTGGCTGCGTGTGGCGGCGCTGCTATGGGGAAGCCCATAGGACGCTCTAATACAGACATGGTGTGAAG
Case4	-----
Case5	-----
Case6	-----
Case2	AGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCTCCCGGCCCTGGAATGCGGCTAATCTAACTGTGGAGCATACGCCCTCAATCCAGGCGGCTGTGTGCTGAACGGCAACTCTGCAGCGGAACCGA
Case4	-----
Case5	-----
Case6	-----
Case2	CCCTGAATGCGGCTAATCTAACTGTGGAGCATATGCCCAAAACCAAGTGGGTGGTGTGTGCTGAACGGCTAANNNNNNNGNNGAACCGA
Case4	-----
Case5	-----
Case6	-----
Case2	CCCTGANTGCGGCTAATCTAACTGTGGAGCATATGCCCAAAACCAAGTGGGCACTGTGTGCTAATGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGA
Case4	-----
Case5	-----
Case6	-----
Case2	CTAC-----
Case4	CTACTTTGGGTGTCGCTGTTCTATTATTCCTATACNGC-----
Case5	-----
Case6	-----
Case2	-----
Case4	-----
Case5	ACAGACTGCCCACTGGCTTGTGGGTTNCTGCTCCGCAGTAGGATTA
Case6	ACAGACTGCCCACT-----

Virus påvist hos alle pasientene



	Enterovirus VP1 protein expression		Enterovirus genome			Class I HLA expression
Methodology	IHC		Enterovirus specific RT-PCR			IHC
Tissues	Pancreatic islets		Supernatant from cultured purified pancreatic islets	Snap-frozen pancreas 30 mg		Pancreatic islets
Laboratory	Tampere	Exeter	Uppsala	Tampere	Tampere and Uppsala	Exeter
Case						
1	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative	Hyper expression
2	Positive	Positive	Positive ^c	Positive ^a	Negative	Hyper expression
3	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative	Hyper expression
4	Positive	Negative	Positive ^c	Positive ^a	Negative	Hyper expression
5	Positive	Positive	Positive ^b	Positive ^b	Negative	Hyper expression
6	Positive	Positive	Negative*	Positive ^b	Positive	Hyper expression

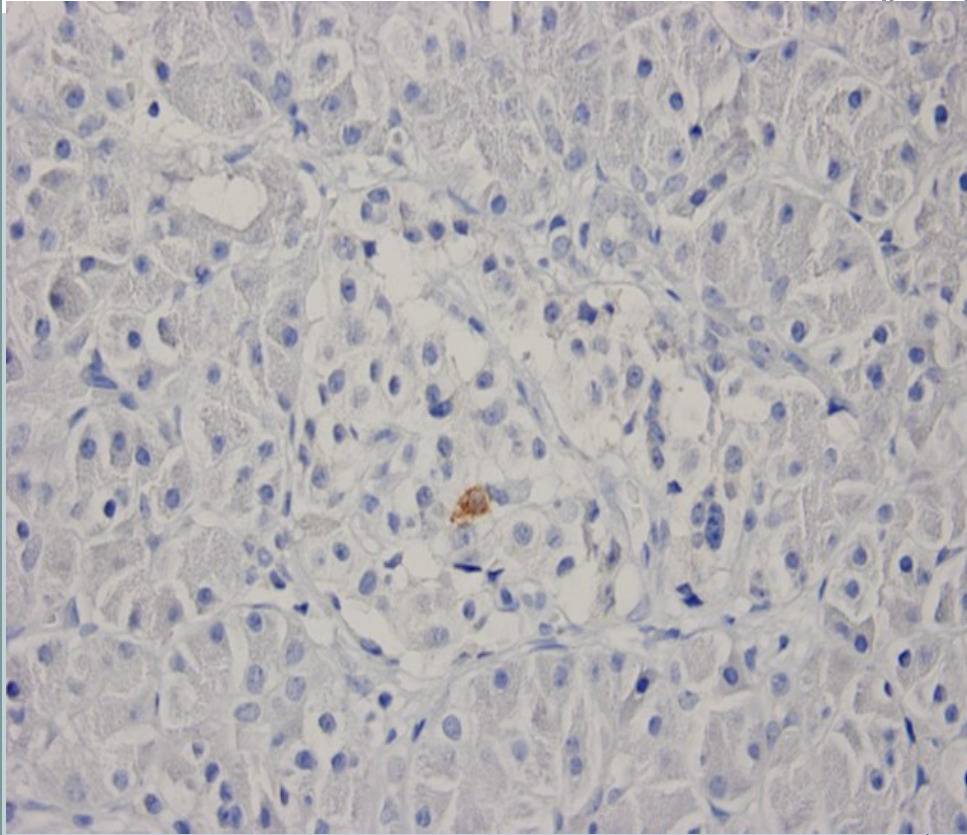
* Positive in RNA extracted from culturing of the remaining cells, containing both exocrine and unknown number of islets

^a Positive day 1

^b Positive day 3

^c Positive day 1 and 3

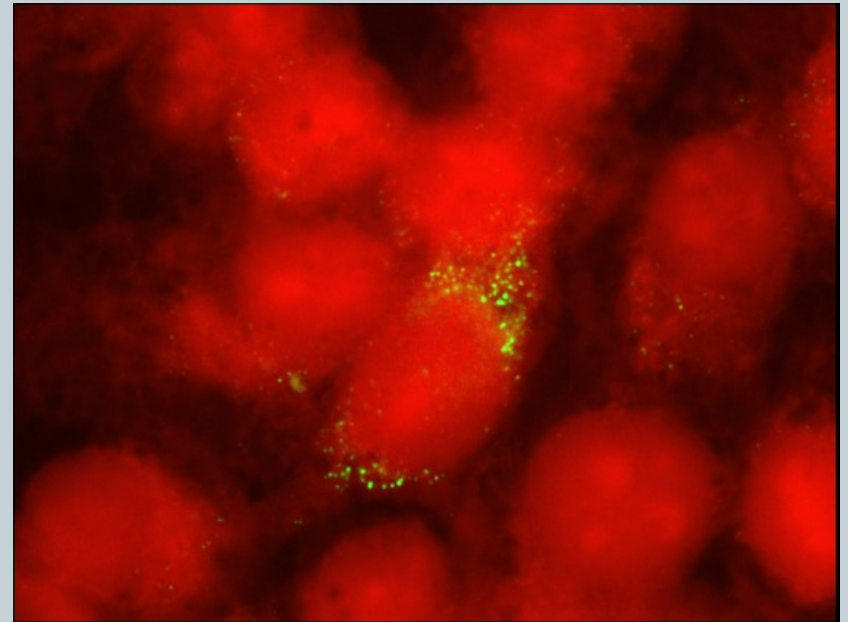
Antall VP1-positive øyer og celler



- Totalt 2492 øy-snitt funnet i to snitt fra hver pasient.
- 42 øyer inneholdt totalt 60 positive VP1+ cells
- Det betyr at bare $(42/2492) = 1.7\%$ av øyene var VP1-positive

Ny, mer sensitiv PCR-teknikk

- Pankreas-cellene spredd utover epitelceller for dyrkning av mulig virus
- Deretter ekstrahert RNA fra disse kulturene
- Gjort PCR på RNA, samt farget epitelcellene mtp VP1
- Alle 6 positive:
 - VP1
 - Enterovirus genom



Virus i annet vev

31

- En pasient var EV-positiv i:
 - pankreasvev
 - duodenal biopsi
 - PBMC
 - Avføring
- I tillegg fant vi EV i avføring til en pasient, som var negativ i alle andre prøver
- Serum: alle negative
- Andre vira (rhino-, parecho-, rota-, og norovirus) var alle negative

Viursfunn, oppsummert

32

Case	Pancreas			PBMC	Serum	Duodenal biopsy	Stool
	Purified islets	Snap frozen tissue	RNAlater tissue				
1	Neg	Neg	No sample	Neg	Neg	Neg	Neg
2	50	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	10⁶
4	50	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	No sample
5	100	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
6	50	10	140	20	Neg	10³	10⁵

Positiviteten vist med antall RNA-kopier ved PCR

Case 6

33

- En serotype i frossen pancreas, duodenum, PBMCs og avføring
 - Akutt infeksjon ved diagnose?
- En annen serotype i øykulturen
 - Kronisk persisterende infeksjon før diagnosis?

Purified islets	CCTGANTGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCANATACCCACAA	CCAGTGGGCAGTCTGTCGTAATGGGTA	ACTCTGCAGCGGA
Pancreas	CCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCAGATACCCACACG	CCAGTGGGCAGTCNGTCGTAACGGGCA	ACTTCGCANNGGA
Stool	CCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCAGATACCCACACG	CCAGTGGGCAGTCTGTCGTAACGGGCA	ACTTCGCAGCGGA

Nucleotide alignment of part of the 5'UTR of viral genome.

Viral «footprints»



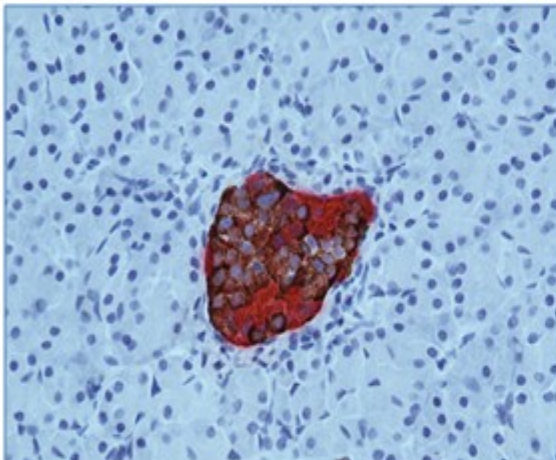
- Med viral footprints menes tegn og spor på virus-påvirkning:
 - Hyperekspresjon av HLA I
 - Spor etter interferon; STAT-1 oppregulering
 - Ekspresjon av gener involvert i virusforsvar

Hyper ekspresjon av HLA klasse 1

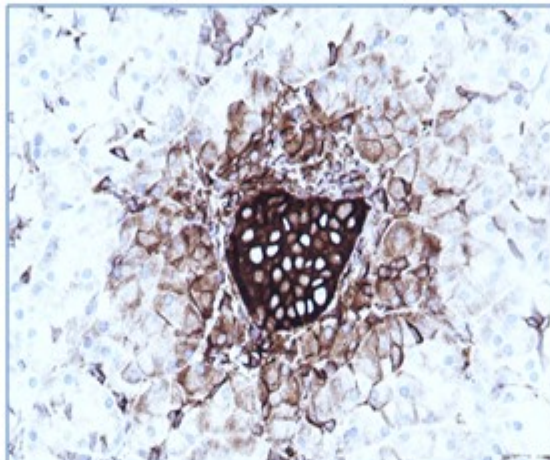


- Ansett å være en vevsrespons til viral infeksjon
- Vi fant hyperekspresjon i øyene til alle seks pasientene, og hos en av ni kontroller ($p < 0.01$)

A.



B.



C. VP1-positive cells.

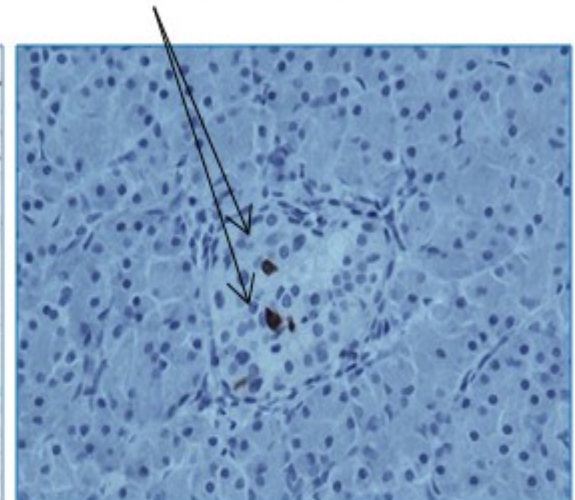
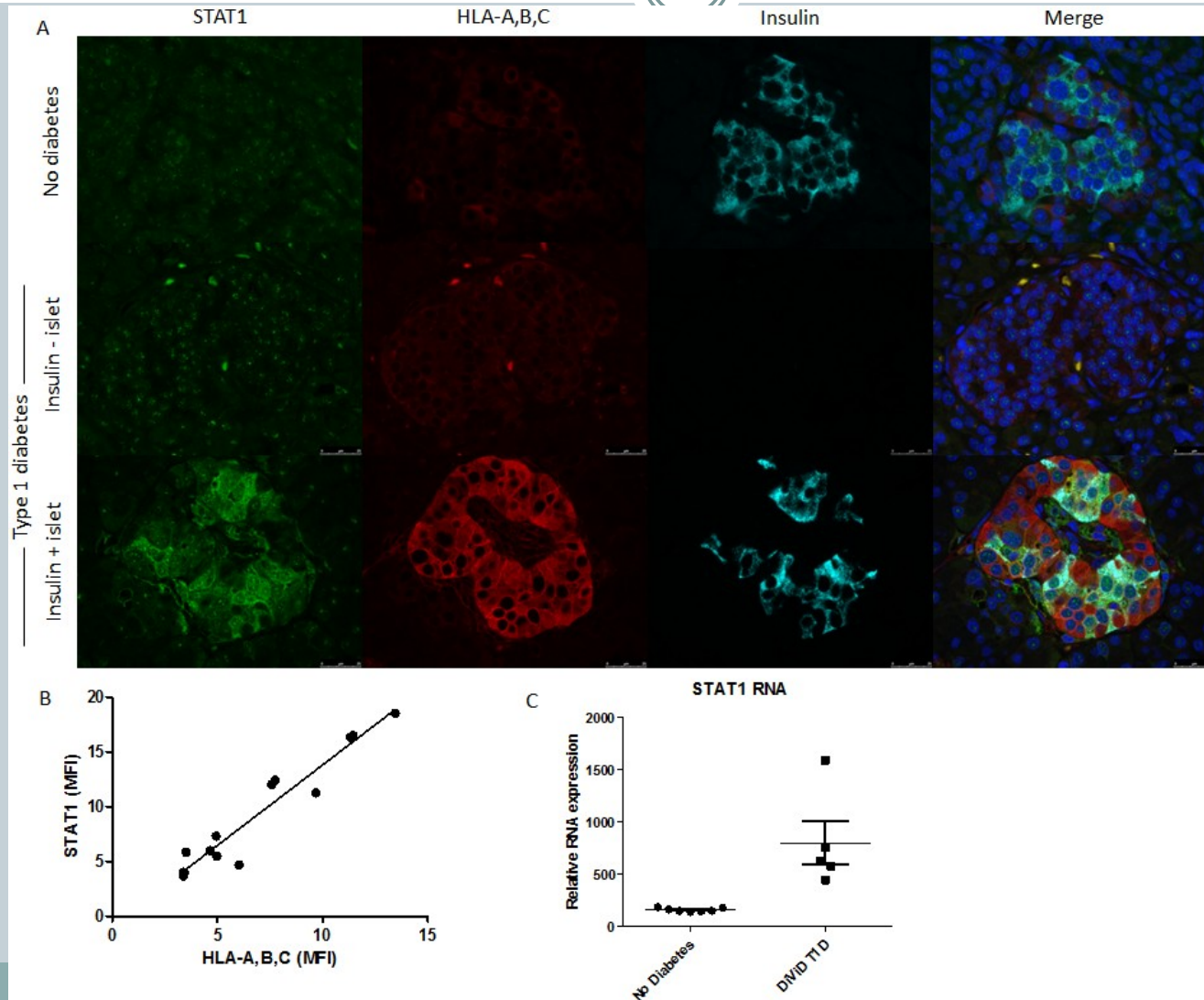


Figure 1 Pancreatic islet from one of type 1 diabetic patient, stained for insulin (brown) and glucagon (red) (A), HLA class 1 molecules (B) and enterovirus protein VP1 (C). (Cells positive for enterovirus protein are marked by arrows)

STAT1 oppregulering korrelerer med HLA I i øyer med insulin



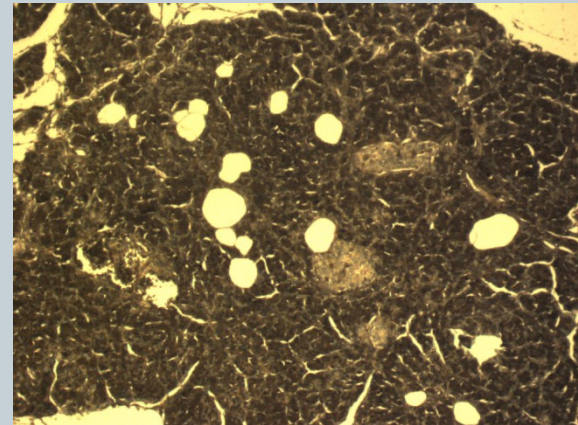
Genekspresjon i laser captured mikrodisekerte øyer

Metode for å isolere
spesifikke celler/vev av
interesse fra
mikroskopiske snitt

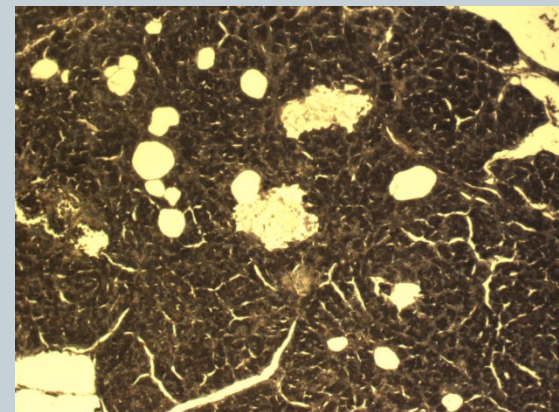
Marselli et al, Methods Mol Biol, 2009 560:87–98



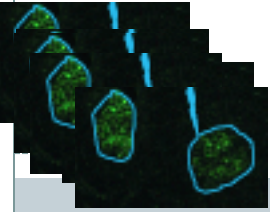
Før LCM



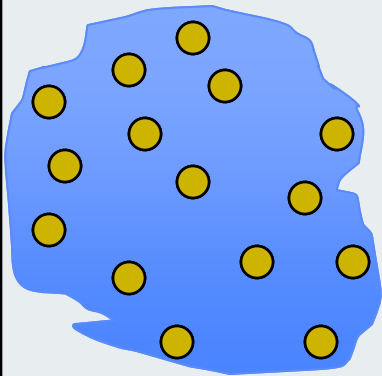
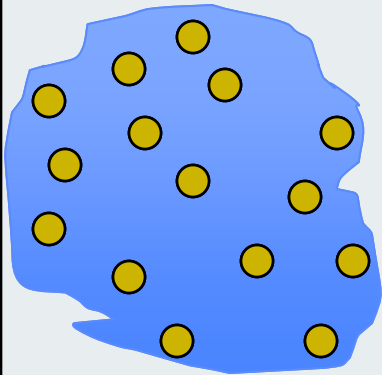
Etter LCM



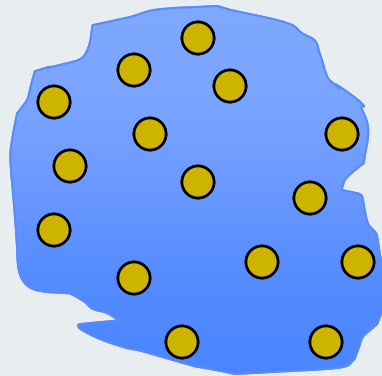
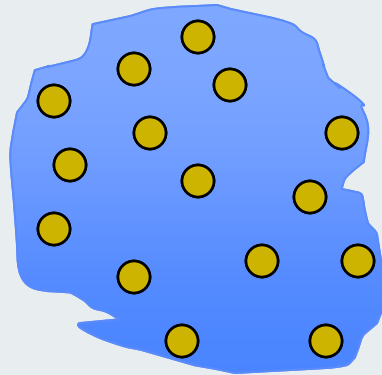
Laser capture



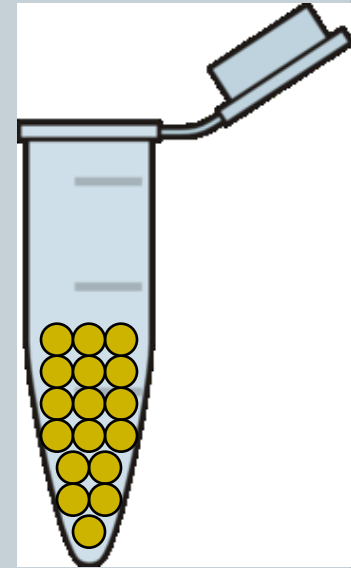
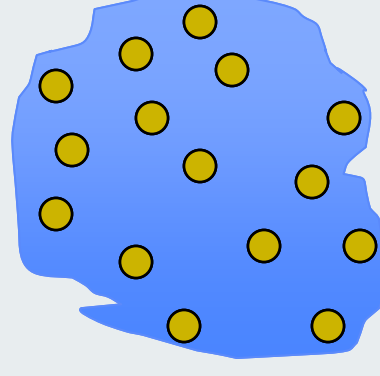
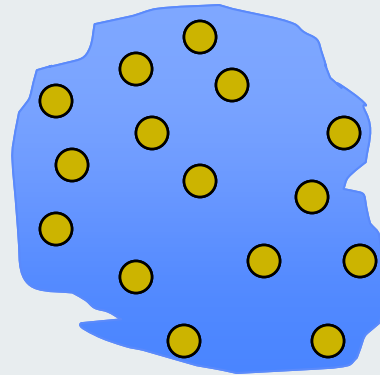
**Donor Pancreas
#xxxx
Serial sections
#1-2**



**Donor Pancreas
#xxxx
Serial sections
#3-4**



**Donor Pancreas
#xxxx
Serial sections
#5-6**



Statistiske analyser identifiserte 500 genes ulikt uttrykt

39

Test Description

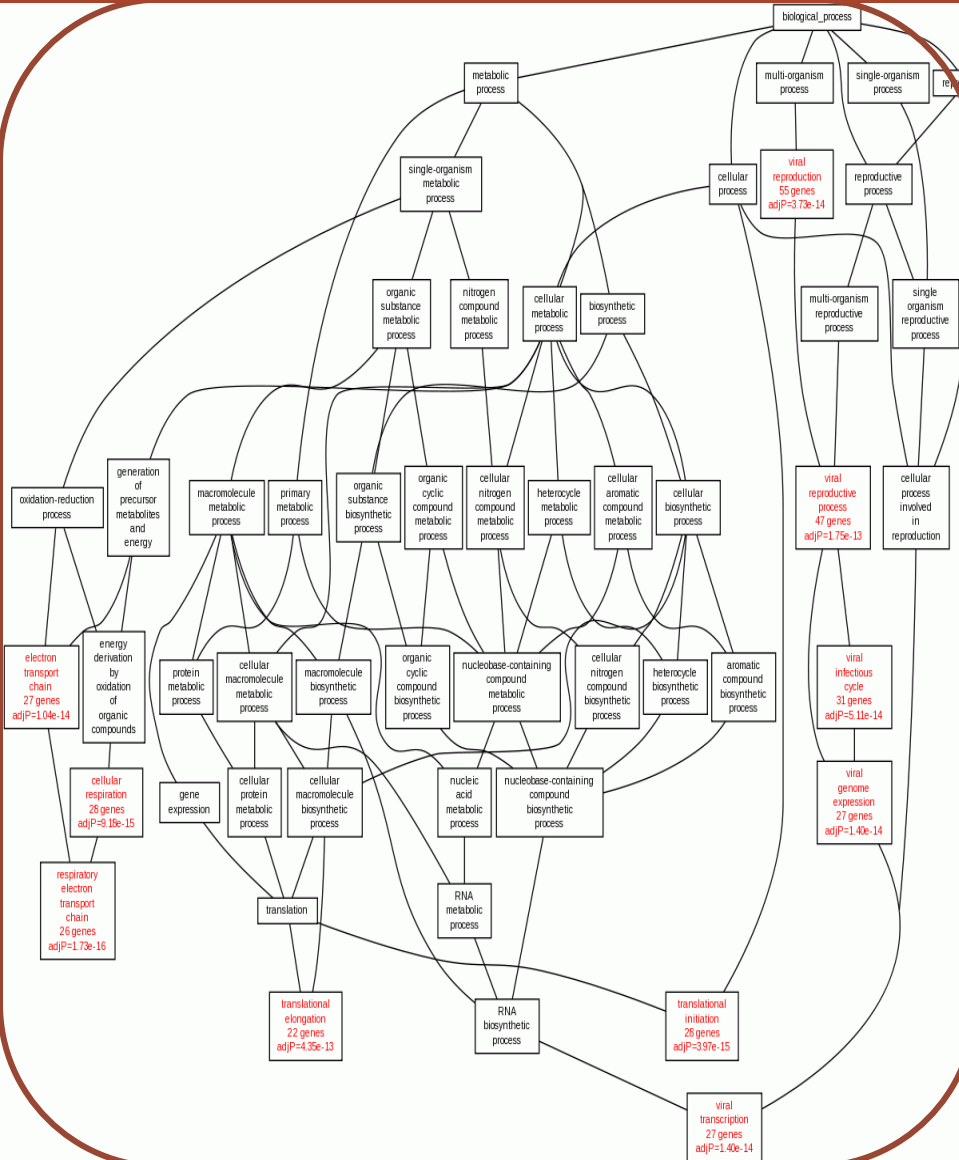
Selected Test : T Test unpaired
p-value computation: Asymptotic
Multiple Testing Correction: Benjamini-H

Result Summary

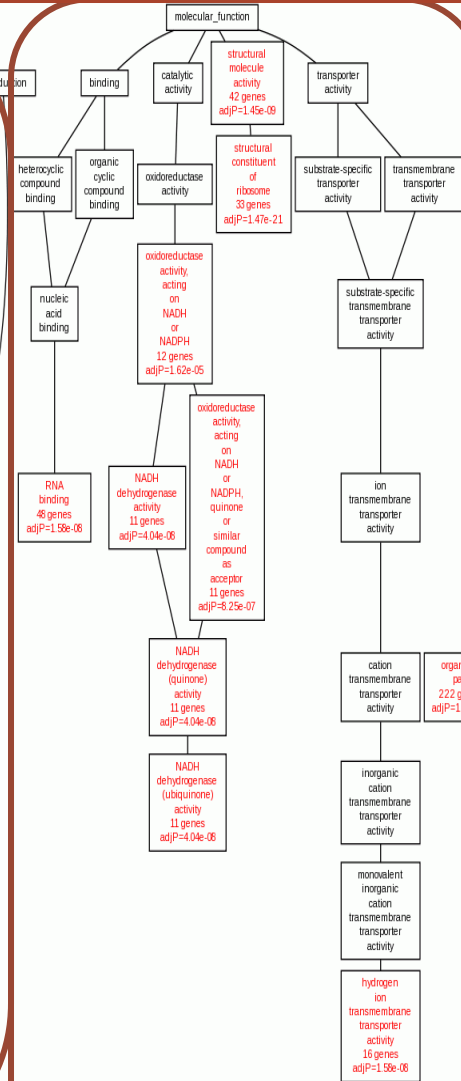
	P all	P < 0.01	P < 0.0050	P < 0.0010	
FC all	21625	1909	1276	500	00
FC > 1.1	13630	1909	1276	500	
FC > 1.5	1649	949	745	361	
FC > 2.0	297	203	172	96	
FC > 3.0	54	42	34	22	
Expected by chance		19	6	0	

Gene Ontologies (500 genes Control vs DiViD cases)

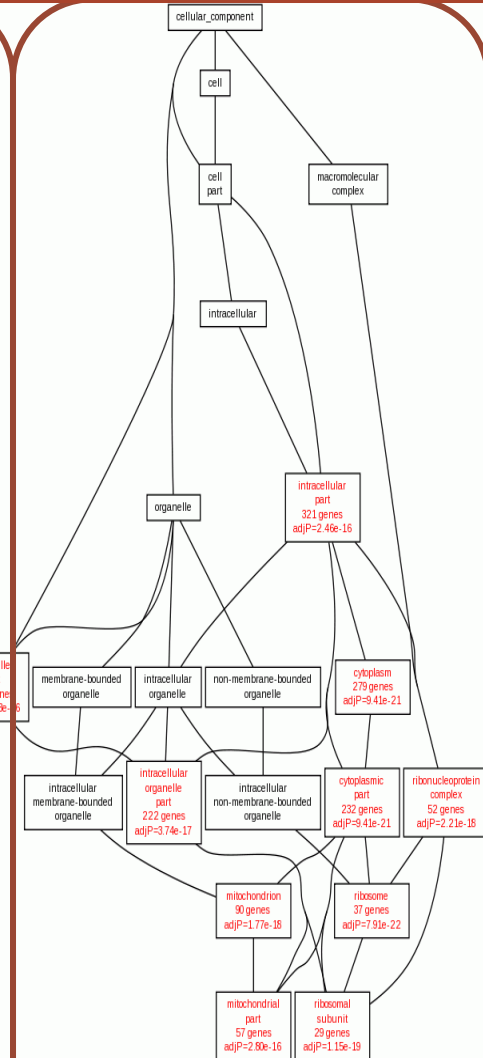
Biological Process



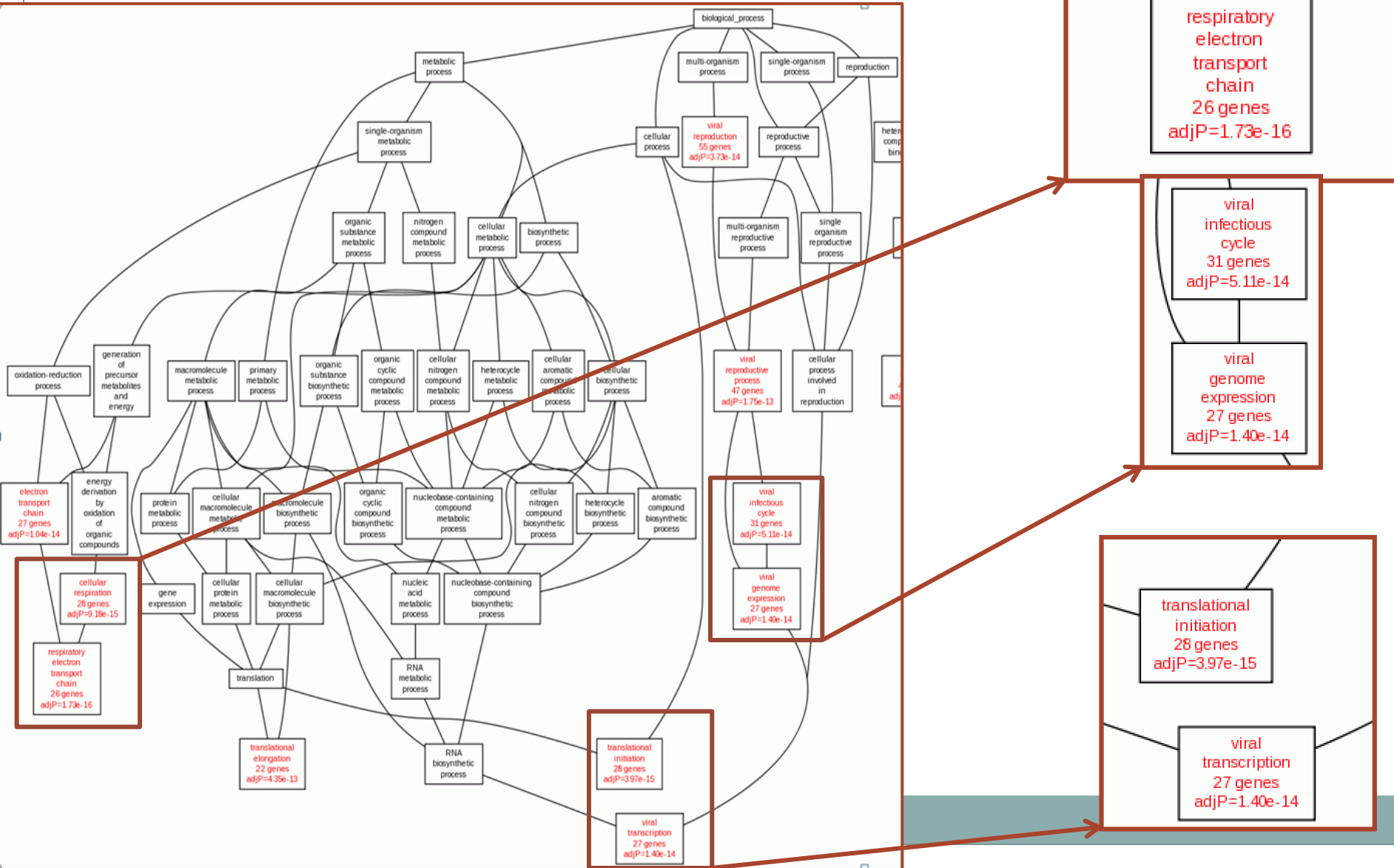
Molecular Function



Cellular Component



Biological processes

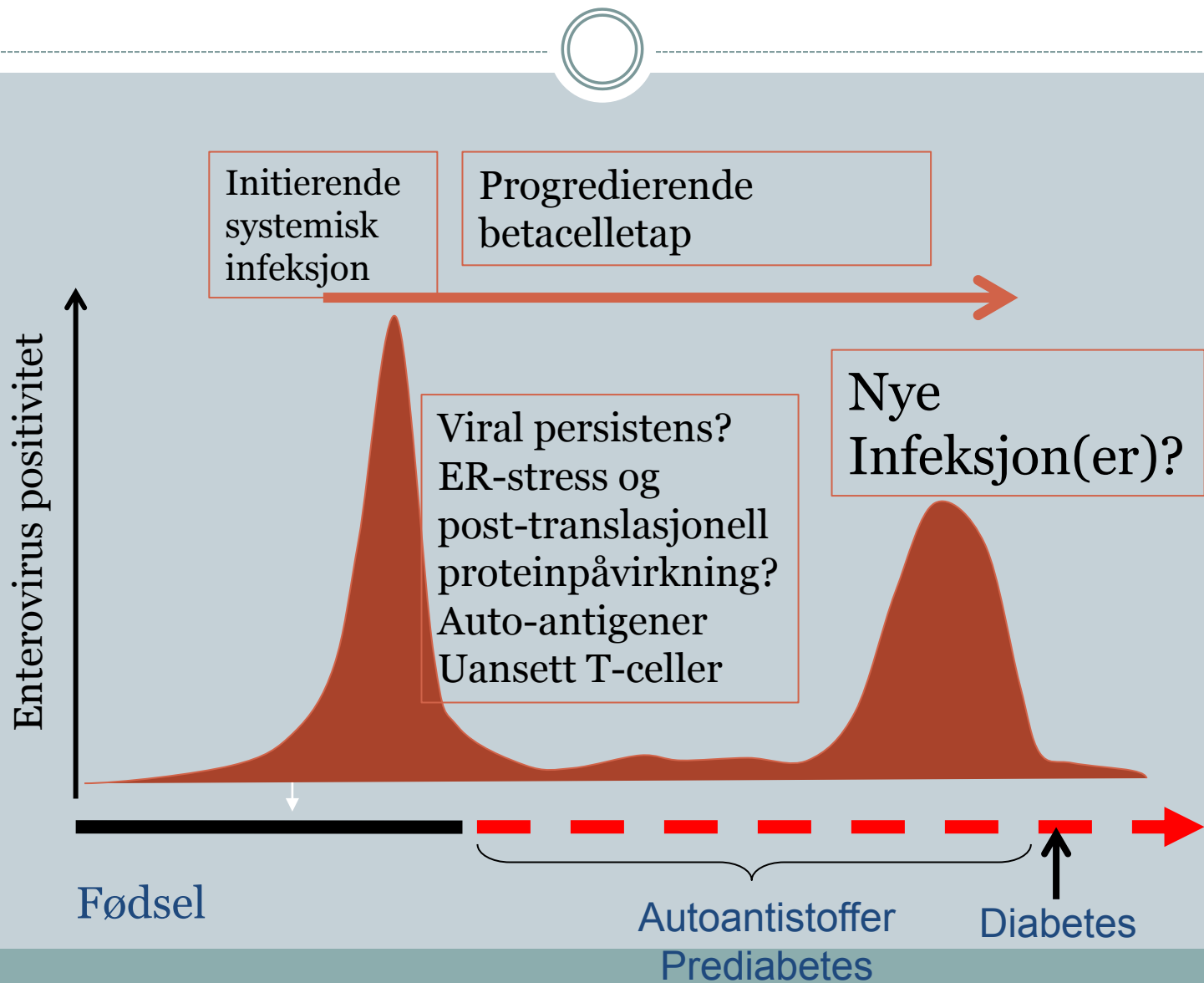


Oppsummering, viral footprints



- Hyperekspresjon av klasse I HLA proteiner
- Signifikant oppregulering av interferoner som er viktige i virus bekjempelse
- Signifikant oppregulering av gener involvert i virus reproduksjon/infeksjonssyklus
- Mitochondriell dysfunksjon
- Endoplasmatisk reticulum stress
 - Apoptose og betacelle-død
 - Produksjon av abberante, antigene proteiner som kan gi opphav til autoantistoffer

Modell for enterovirus induisert diabetes



Konklusjoner



- DiViD
 - den første studien av pankreas hos levende pasienter med nyoppdaget diabetes
 - påvist enterovirus ved hjelp av multiple teknikker i flere uavhengig laboratorier,
- Beviser ikke formelt sett årsaks-sammenhengen mellom enterovirus infeksjon og type 1 diabetes
- Endelig bevis ville være en påvist behandlingseffekt av antivirale midler eller vaksine

Veien videre?



- For å avklare om virus induserer T1D, bør man nå prøve i et RCT om anti-viral behandling kan bevare restproduksjonen av insulin ved diagnosetidspunktet.
- Det ville i så fall gi disse pasienter et mildere sykdomsforløp og minsket risiko for alvorlige diabetes senkomplikasjoner.
- Utvikle vaksiner mot de aktuelle virus for om mulig å kunne forebygge type 1 diabetes i fremtiden.

Takk til:

Veiledere:

- Knut Dahl-Jørgensen
(Principal investigator)
- Kristian F. Hanssen



Samarbeidspartnere

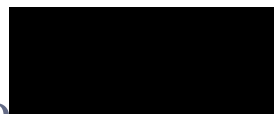
- Heikki Hyöty
- Sami Oikarinen
- Maarit Oikarinen
- Jutta Laiho
- Olle Korsgren
- Oskar Skog
- Gun Frisk
- Mahesh Anagandula
- Noel Morgan
- Sarah Richardsson



UNIVERSITY
OF TAMPERE



UPPSALA
UNIVERSITET



Oslo University Hospital,
kirurgis avdeling:

- Trond Buanes
- Bjørn Edwin



Trine Roald,
spesialsykepleier



Pasientene som deltok