

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06910

研究課題名(和文) インスリン遺伝子特異的なエピジェネティック制御に基づく膵細胞障害の定量法の確立

研究課題名(英文) Detection of pancreatic beta cell DNA in the circulation utilizing epigenetic modification

研究代表者

黒田 暁生 (KURODA, Akio)

徳島大学・先端酵素学研究所(糖尿病)・准教授

研究者番号：70571412

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)：一つの生命体を構成する細胞の遺伝子は全て同じ配列である。唯一インスリンを分泌することができる膵細胞ではインスリン遺伝子のCpG配列というものが他の組織と異なり、脱メチル化状態である。循環血液中のDNAの膵細胞特異的CpG配列を増幅するPCR法を開発し、膵細胞死を検出する方法を確立した。1型糖尿病患者60例18例で陽性を認め、2型糖尿病では10例中2例で健常者では21例中8例で陽性であった。1型糖尿病の発症前の早期診断や膵臓・膵島移植後の臓器傷害を検出することができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Genomic DNA sequences of any cells are all the same within a body. Pancreatic beta cells only produce insulin and CpG cytosine in the human insulin gene is uniquely unmethylated in pancreatic beta cells. We have developed a new PCR method, which amplifies only if 4 CpG sites in insulin genes were all unmethylated to detect pancreatic beta cell death in the circulation. There were positive results in 18/60 patients with type 1 diabetes and 2/10 patients with type 2 diabetes and 8/21 normal healthy control subjects. This method is able to be applied for the early diagnosis of type 1 diabetes and the detection of transplanted islet or pancreas tissue injury.

研究分野：1型糖尿病

キーワード：インスリン 遊離DNA PCR bisulfite

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 膵β細胞傷害の非侵襲的 direct 検出法の必要性

膵β細胞は生体唯一の血糖低下ホルモンであるインスリンを合成・分泌する。1型糖尿病では、自己免疫応答により、膵β細胞選択的に破壊される。膵β細胞量が80%以上減少すると、血糖値が上昇する。1型糖尿病の診断は、高血糖及び膵島関連自己抗体の発現により行われる。膵島関連自己抗体は膵細胞の破壊の程度を反映するわけではない。この課題を克服するため、膵細胞傷害を直接反映する非侵襲的指標が望まれる。

### (2) 膵β細胞のDNAメチル化特性

一つの生命体を構成する細胞の遺伝子は全て同じ配列である。唯一インスリンを分泌することができる膵細胞ではインスリン遺伝子の CpG 配列というものが他の組織と異なり、脱メチル化状態であることを研究者は報告した。生物は外来性の生物の侵入から身を守るために制限酵素を保持している。中でも McrBC はメチル化特異的 DNA の切断を行う制限酵素であり、遺伝子の塩基配列の P<sub>um</sub>C(N40-4000)P<sub>um</sub>C (Pu:A(アデニン)、G(グアニン)、N40-4000 (40-4000 塩基) mC(メチル化シトシン))の配列の間で DNA を切断するという特異的な反応を示す制限酵素である。ヒトインスリン遺伝子の中でも特にインスリン転写開始地点から-19、-69塩基の地点での CpG サイトの脱メチル化状態は他の組織には存在しない膵細胞特異的である (Husseiny MI, et al. PLoS One. 2014;9:e94591)。

## 2. 研究の目的

1型糖尿病予知因子が陽性な症例や膵臓移植、膵島移植症例で採血を行い、循環血漿中の DNA を単離する。McrBC で切断されるインスリンプロモーター領域の転写開始地点から-19、-69塩基の上流および下流にそれぞれ 5'および 3'プライマーを設計して PCR を行

う。膵細胞の傷害を受けていない場合には膵細胞以外の細胞は McrBC で切断されるのでその両側にプライマー設定した PCR では検出することが不可能である。一方で1型糖尿病発症時や、膵移植あるいは膵島移植で拒絶反応が起こり膵細胞が傷害を受ける場合には膵細胞を検出できることが想定される。

1コピーまで定量可能な精度の高い TaqMan PCR 法を用いることで循環血中の膵細胞特異的 DNA を検出できれば、免疫抑制療法の効果判定にも応用できると考えられる。また、GAD 抗体弱陽性者(<10U/ml)の1型糖尿病発症のリスク診断が困難とされるが、血液中の膵細胞の DNA が検出により、そのリスク評価が可能となることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 自己免疫性膵島炎が疑われる GAD 抗体陽性者(研究1) および膵臓・膵島移植患者(研究2)を対象に横断的検討と前向き研究を行う。

(2) 対象の血液を 10ml 採取し、遠心により得られた血漿から単離した genomic DNA を用いてメチル化配列を認識して切断する制限酵素 McrBC で処理する。

(3) 1コピーから定量できる TaqMan PCR 法を用いて、McrBC の認識配列を挟むように TaqMan PCR プライマーを設定して、膵細胞の DNA を定量的に検出する。

簡易な採血で膵細胞特異的なエピジェネティック修飾を検出する方法を用いた直接的な膵細胞傷害評価により、GAD 抗体陽性例での1型糖尿病発症までの期間、膵細胞傷害を定量化できるか、膵臓・膵島移植患者での拒絶反応を定量化できるかどうかを明らかにする。

## 4. 研究成果

膵細胞と配列、メチル化状態が同じであるプラスミド DNA および非膵細胞由来 DNA を単

離抽出して McrBC を用いて処理した。PCR で McrBC での切断部位を含む部位の増幅を行ったが McrBC では本来切断されるべき非 細胞由来 DNA が完全には切断されなかった。

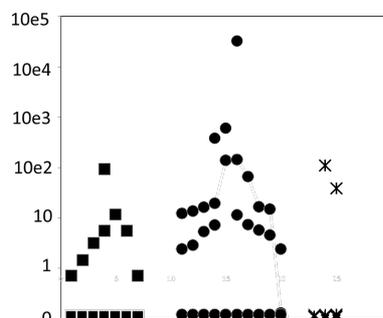
陰性例をより陰性と判定できるようにする新たな方法を検討した。bisulfite 処理によりメチル化、非メチル化 DNA を区別できることが知られている。bisulfite 処理した DNA で関心 DNA 領域に含まれる bisulfite 処理による DNA メチル化特異的切断が可能である 3 つの制限酵素 HinfI, Hpy188I, Acil を用いて処理後に PCR で増幅する方法を導入した。この方法によって検体に含まれる少量の DNA コピー数で陽性陰性判定ができるようになったが陽性 DNA10 コピーの判定が定量の限界であった。われわれの目指している PCR は 0 コピーか 1 コピーかを定量できる必要があった。

大塚製薬診断事業部と共同研究を提携して新たな方法を検討した。膵 細胞特異的のエピジェネティック修飾を組み込んだ二段階の amplification refractory mutation system (ARMS) による高感度 PCR 法を用い、サンプル中の膵 細胞由来インスリン遺伝子を 1 コピーから検出できる方法を開発した。採血を行い、DNA を単離抽出して本 PCR を施行した。研究対象者を下の表に示す。

	Type 1 diabetes	Type 2 diabetes
n	60	10
Age (yrs)	46.6 ± 15.3	53.7 ± 14.8
Duration (yrs)	12.1 ± 9.9	13.3 ± 13.1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.5 ± 4.7	44.9 ± 27.6
GAD-Ab (U/mL)	2644 ± 13931	0
Serum CPR (ng/mL)	0.5 ± 1.3	3.0 ± 2.3
HbA1c (%)	8.1 ± 1.8	8.6 ± 2.0

1 型糖尿病患者 60 例中 18 例で陽性、発症 2 か月以内の症例で強陽性、2 型糖尿病患者 10 例で 2 例陽性、健常者 21 例中 8 例で陽性となった(下図)。いずれのサンプルも DNA sequence により PCR の正確性は確認できている。

Beta cell specific DNA copy numbers / 1 mL of serum



■ : Healthy Control (n=21) ● : Type 1 DM (n=60) \* : Type 2 DM (n=10)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

執筆中

〔学会発表〕(計 2 件)

Akio Kuroda, Misuzu Yamashita-Yamada, Yukari Tominaga, Reiko Suzuki, Motoyuki Tamaki, Yuko Akehi, Yuichi Takashi, Daisuke Koga, Eisuke Shimokita, Fuminori Tanihara, Kiyoe Kurahashi, Sumiko Yoshida, Itsuro Endo, Ken-ichi Aihara, Masahiro Abe, Kevin Ferreri, Munehide Matsuhisa Detection of pancreatic beta cell DNA in the circulation using the dual Amplification Refractory Mutation System PCR. 2102-P Moderated Poster Session. The 78<sup>th</sup> ADA Scientific Meeting June 24<sup>th</sup> Oalando, USA, 2018

黒田暁生、山田美鈴、富永ゆかり、鈴木麗子、田蒔基行、明比祐子、高士祐一、石津将、古賀大輔、井本逸勢、倉橋清衛、吉田守美子、遠藤逸朗、栗飯原賢一、安倍正博、Kevin Ferreri、松久宗英、膵 細胞特異的 PCR による膵 細胞死の検出 口頭発表 第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会 東京, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：膝 細胞の傷害検査方法  
発明者：黒田暁生、山田美鈴、松久宗英  
権利者：徳島大学  
種類：特許  
番号：304020292  
出願年月日：平成30年4月  
国内外の別：国内

取得状況（計0件）

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

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.tokushima-u.ac.jp/dtrc/category\\_introduction/consultation/advanced\\_diabetes\\_consultation.html](http://www.tokushima-u.ac.jp/dtrc/category_introduction/consultation/advanced_diabetes_consultation.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

黒田 暁生 (KURODA, Akio)

徳島大学・先端酵素学研究所・准教授

研究者番号：70571412

### (2)研究分担者

松久 宗英 (MATSUHISA, Munehide)

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

研究者番号：60362737

田蔭基行 (TAMAKI, Motoyuki)

徳島大学・先端酵素学研究所・専門研究員

研究者番号：60624400

### (4)研究協力者

( )