

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07448

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傷害の定量法の確立

研究課題名(英文) Novel method utilizing bisulfite conversion with dual amplification-refractory mutation system polymerase chain reaction to detect circulating pancreatic beta cell cfDNA.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞はインスリン遺伝子のCpG配列が脱メチル化状態である。血清中の遊離DNA(cfDNA)の膵細胞特異的CpG配列を増幅するPCR法を開発し、膵細胞死を生体内で検出する。血清よりcfDNAを精製し、bisulfite処理を行い、2か所の膵細胞のCpG配列を特異的に増幅するAmplification Refractory Mutant Systemプライマーを2セット連続してPCRを行った。1型糖尿病患者114例中32例で陽性を認めた。1型糖尿病の陽性群で年齢、罹病期間と膵細胞DNAの検出率は正相関した。本法を用いることで膵細胞死を検出することができる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵細胞の自己免疫による破壊により1型糖尿病が発症するが、その直接的な破壊を定量的に評価する方法はなかった。今回我々は膵細胞のインスリン遺伝子の特徴を利用した極めて精度の高い検出法を開発して膵細胞の破壊を定量的に評価する方法を開発した。同様な方法を用いることであらゆる細胞の破壊を検出することが可能であり医学の発展に大変大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic beta cell death plays a key role in type 1 diabetes (T1D) progression. CpG cytosines in the insulin gene are uniquely unmethylated in pancreatic beta cells in mice and humans. In this report, we used specific and quantitative demethylation-specific amplification refractory mutation system (ARMS) PCR in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice and patients with T1D. Murine beta cell-derived cfDNA was detected after STZ treatment. Thirty-two of 114 T1D patients were positive for beta cell-derived cfDNA. Although 105 copies of methylated insulin DNA were not detected by demethylation-specific ARMS PCR, one copy of unmethylated insulin DNA was detected. The patient age and duration of T1D were negatively correlated with the beta cell cfDNA copy number significantly. The detection of bisulfite-converted cfDNA by ARMS PCR is a novel method of detecting circulating CpG methylation-specific cfDNA and has good sensitivity and specificity with low costs.

研究分野：糖尿病臨床

キーワード：1型糖尿病 細胞死 PCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は約 80%以上の膵細胞が失われてから発症する。現在、1 型糖尿病を予測・診断する指標として膵島関連自己抗体が用いられているが、必ずしもその動態は病状を表すものではない。我々は膵細胞のインスリン遺伝子の CpG 配列は脱メチル化状態であるが、他の組織ではメチル化状態であることを報告してきた(Husseiny et al. PLoS One 2014)。現在まで 1-2 つの CpG 配列の脱メチル化状態であることを指標として膵細胞死を検出したという報告がなされているが、その感度・特異度に疑問が残る。

マウスに対してストレプトゾトシン(STZ)投与によって速やかに膵細胞が破壊されて 1 型糖尿病動物モデルを作成できることはよく知られている。

2. 研究の目的

(1) STZ 投与前後のマウスにおいて血液中でマウス膵細胞 CpG 配列 3 か所を特異的に増幅する PCR を開発すること。(2) 血清中の遊離 DNA(cfDNA)の膵細胞 CpG 配列 4 か所を特異的に増幅する PCR を開発すること。(3) その方法を用いて 1 型糖尿病の病態の原因である膵細胞死を検出することが可能であるかを検討すること。

3. 研究の方法

膵細胞は他の組織と異なりインスリン遺伝子の CpG 配列が特異的に脱メチル化状態であり、その他の組織でのインスリン遺伝子の CpG 配列はメチル化状態である。非メチル化状態の CpG 配列はバイスルファイト処理を行うことで CG UG へと変化するが、メチル化状態である CpG 配列はバイスルファイト処理を行っても CG CG のままである。Amplification Refractory Mutant System (ARMS) PCR とは、この 1 塩基の違いのさらに隣にミスマッチを入れ込んだプライマーを作成しておけば脱メチル化状態である膵細胞のみで 1 ミスマッチであり、その他の細胞では 2 ミスマッチとなるため PCR を増幅することが絶対的に不可能となるという点を利用した特異度の高い PCR 方法である。特にヒト検体ではこの方法を別の CpG 配列に対して 2 度行うことでより特異度を高めた PCR となっている。

(1) STZ (250mg/kg) 投与前後のマウスにおいて血液中でマウス膵細胞 CpG 配列 3 か所(転写開始部位より+311, +338 and +341 bp)を特異的に増幅するプライマーを用いて PCR 行う。またこの時の膵臓器切片を用いて膵島細胞の破壊を確認する。具体的にはマウスにおいては血清 0.2mL より cfDNA を精製し、bisulfite 処理を行い、1/10 量を用いて全ての細胞由来のインスリン遺伝子領域を増幅する nested PCR を 15 サイクル行う。次に膵細胞由来遺伝子のみを増幅する ARMS PCR を 35 サイクル行い、膵細胞由来の遺伝子が増幅されるかを検討する。

(2) ヒトにおける ARMS PCR については具体的には血清 1mL より cfDNA を精製し、bisulfite 処理を行い、1/10 量を用いて全ての細胞由来のインスリン遺伝子領域を増幅する nested PCR を 15 サイクル行う。次にインスリン遺伝子転写開始から+331 および+404 塩基の CpG 配列のみを特異的に増幅する ARMS PCR プライマーを用いて 15 サイクル PCR を行い、さらに PCR 産物を用いて次に遺伝子転写開始から+367 および+374 塩基の CpG 配列を特異的に識別するプライマーを用いて 35 サイクル PCR を行う。

(3) 徳島大学病院内分泌代謝内科および小児科に通院中の 114 名の 1 型糖尿病患者より説明同意を得たうえで各々 9mL 採血して、血清を遠心にて 3000 回転 12 分、4300 回転 12 分で分離する。(2) の方法に従って PCR を行う。

4. 研究成果

(1) 4 例ずつのマウスに STZ 投与前後で血糖値が検討された。平均で投与前血糖値は 125mg/dL から投与後 24 時間で 500mg/dL まで上昇した。STZ 投与前に比して投与 24 時間での膵島の細胞面積は投与前に比して約 40%程度に減少した。ARMS PCR により検出する膵細胞由来 DNA は投与前にはほとんど検出されなかったが、STZ 投与 24 時間後には平均で 300 コピー/mL まで有意に増加した。

(2) (3) 今回のヒトの PCR では 3'末端に ARMS PCR により識別する方法で膵臓細胞に特異的な 4 か所の CpG を検出する。ARMS 法を用いた PCR では膵細胞 1 コピーを検出する Cq 値と同等な Cq 値を得るためには、膵細胞以外の細胞由来の遺伝子を増幅するのは 10^6 コピーの DNA が必要であり、識別能力の高さが確認された。PCR 開始時のインプット cfDNA から考えると約数千コピーと考えられ、本法を用いた手法により必要十分であった。一方で希釈法により理論上 1 コピーのサンプルを PCR してみたところ 9/16 サンプル陽性と判定されたが、逆に 0 コピーのサンプルを PCR してみたところすべてのサンプル 16 サンプルで陰性となった。

発症したての患者を中心とした徳島大学病院内分泌代謝内科および小児科に通院中の 114 名の 1 型糖尿病患者より検査を行い、32 例で陽性であった。年齢、罹病期間は PCR 陽性率と有意な負の相関を示した。大阪大学病院との共同研究では膵臓移植前には陰性であった 1 型糖尿病患者で膵臓移植後翌朝のサンプル 2 例中 2 例で陽性となった。以上のようにこの方法を用いることで膵細胞の破壊を特異的に検出する方法を確立することに成功した。

今回の手法を用いれば全身のあらゆる細胞死を PCR で検出可能であることが示唆された。結

果は現在 PLoS One に投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 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、高土祐一、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、Ferreri Kevin、松久宗英:
2. 発表標題 膵 細胞特異的PCRによる膵 細胞死の検出
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田美鈴、黒田暁生、富永ゆかり、松久宗英:
2. 発表標題 特異的遺伝子メチル化パターンを用いた膵 細胞障害の検出
3. 学会等名 日本糖尿病学会中国四国地方会第56回総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuroda A, Yamada M, Tominaga Y, Suzuki R, Tamaki M, Akehi Y, Takashi Y, Koga D, Shimokita E, Tanihara F, Kurahashi K, Yoshida S, Endo I, Aihara K, Abe M, Kevin F, Matsuhisa M
2. 発表標題 Detection of pancreatic beta cell DNA in the circulation using the amplification refractory mutation system PCR.
3. 学会等名 78th American Diabetes Association Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada M, Kuroda A, Tominaga Y, Matsuhisa M
2. 発表標題 Verification of pancreatic cell injury detection method using serum cfDNA.
3. 学会等名 55th EASD Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuroda A, Yamada M, Okada A, Tominaga Y, Jo K, Oorei N, Ishizu M, Mori H, Matsuhisa M
2. 発表標題 Circulating cell free DNA and its clinical application.
3. 学会等名 The 15th Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences Online (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田美鈴, 黒田暁生, 富永ゆかり, 松久宗英
2. 発表標題 血清細胞外小胞中DNAを用いた膵 細胞傷害検出のマウスによる検証
3. 学会等名 第18回日本先進糖尿病治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田美鈴, 黒田暁生, 富永ゆかり, 松久宗英
2. 発表標題 特異的遺伝子メチル化パターンを用いた膵 細胞障害の検出
3. 学会等名 日本糖尿病学会中国四国地方会第56回総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田美鈴, 黒田暁生, 富永ゆかり, 松久宗英
2. 発表標題 1型糖尿病患者血中循環遊離DNAと関連する因子の解析
3. 学会等名 日本糖尿病学会中国四国地方会第57回総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 細胞の傷害検査方法	発明者 黒田暁生、松久宗英、山田美鈴	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-085689	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 組織特異的な細胞傷害の検査方法	発明者 黒田暁生、松久宗英、山田美鈴	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、666471	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山下 美鈴 (山田美鈴) (YAMADA Misuzu) (90451690)	徳島大学・先端酵素学研究所(糖尿病)・徳島大学専門研究員 (16101)	
研究分担者	松久 宗英 (MATSUHISA Munehide) (60362737)	徳島大学・先端酵素学研究所(糖尿病)・教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------