

論 文 内 容 要 旨

題目 Novel method utilizing bisulfite conversion with dual amplification-refractory mutation system polymerase chain reaction to detect circulating pancreatic β -cell cfDNA
(バイサルファイト変換と ARMS PCR を用いた膵 β 細胞傷害の新規定量法)

著者 Asami Okada, Misuzu Yamada-Yamashita, Yukari Tominaga, Kyoka Jo, Hiroyasu Mori, Reiko Suzuki, Masashi Ishizu, Motoyuki Tamaki, Yuko Akehi, Yuichi Takashi, Daisuke Koga, Eisuke Shimokita, Fuminori Tanihara, Kiyoe Kurahashi, Sumiko Yoshida, Yukari Mitsui, Shiho Masuda, Itsuro Endo, Ken-ichi Aihara, Shoji Kagami, Masahiro Abe, Kevin Ferreri, Yoshio Fujitani, Munehide Matsuhisa, Akio Kuroda
令和4年4月9日 Journal of Diabetes Investigation
巻・頁未定 doi:10.1111/jdi.13806.

内容要旨

1 型糖尿病では、自己免疫機序による膵 β 細胞破壊が月単位～年単位で進行し、膵 β 細胞量が健常時の約 20%以下に低下したときに高血糖に伴う症状が出現して発見されることが多く、インスリン補充療法が治療の基本となる。近年では、抗 CD3 抗体などの免疫抑制作用を持つ生物学的製剤を中心に、早期からの疾患の進展阻止をめざした治療法の開発研究が進められ、臨床応用が期待されている。そこで、1 型糖尿病の発症を早期に予測し、病態の進展を予防する介入を行うため、膵 β 細胞死を直接反映するバイオマーカーの開発が求められている。

近年では、デジタル PCR (Droplet Digital PCR : ddPCR) や次世代シーケンス (Next Generation Sequencing : NGS) を用いて、遊離 DNA 中のインスリン遺伝子の膵 β 細胞特異的 CpG 非メチル化を定量することにより膵 β 細胞傷害を定量評価する方法がいくつかの研究グループから報告されている。しかし、ddPCR では標的とする CpG サイトが 1～2 か所と少ないため特異度が十分でなくバックグラウンドシグナルを考慮する必要があり、NGS では特異度は高いが特殊なシーケンサーが必要で、出力データの読み取りが複雑であるという課題があった。

様式(8)

以上のことを踏まえ、通常のリアルタイム PCR を用いて計測可能な、膵β細胞傷害の新規定量法を開発した。

今回の研究では、バイサルファイト処理と Amplification Refractory Mutation System (ARMS) PCR を組み合わせた膵β細胞傷害の新規検出法を用いて、1型糖尿病患者における遊離 DNA 中の膵β細胞特異的インスリン遺伝子の非メチル化を定量し、その有用性を検証した。

1型糖尿病患者 114名（年齢の中央値 41.5 歳、罹病期間の中央値 8.3 年）とボランティアの健常成人 31名（年齢の中央値 35.0 歳）を対象とした。血清より遊離 DNA を単離し、バイサルファイト処理を行い、すべての細胞由来のインスリン DNA を非特異的に増幅する nested PCR を行った後に、PCR 産物に含まれるそれぞれ 2 か所の CpG 配列をインスリン産生細胞のみで特異的に増幅する ARMS プライマーを用いた PCR を 2 回連続して行い、ターゲットとする 4 か所すべての CpG が非メチル化状態である膵β細胞由来インスリン DNA のみを増幅した。得られた Ct 値より、非メチル化インスリン DNA コピー数を算出した。

得られた結果は以下のごとくである。

- (1) 非メチル化コントロール DNA をヒト血液ゲノムに混合するスパイクインテストにて、本法は高い直線性を示した。また、本法にて非メチル化コントロール DNA を 1 コピーから検出することができ、高い感度を示した。
- (2) 1型糖尿病患者において、非メチル化インスリン DNA は約 30%の患者で検出され、その陽性率及びコピー数は健常成人との間で有意差を認めなかった。
- (3) 非メチル化インスリン DNA 陽性例においては、そのコピー数は罹病期間と逆相関した ($P=0.015$)。

今回の研究では、1型糖尿病患者および健常成人において膵β細胞由来インスリン DNA を定量的に検出することができた。健常成人で膵β細胞由来インスリン DNA を検出したことは、本法が膵β細胞の生理的ターンオーバーを捉える感度を有する可能性が示された。発症後の 1型糖尿病患者においては、残存膵β細胞量がごく僅かであるため陰性者が多かったが、罹病期間の短い一部の症例では残存膵β細胞に緩徐な破壊が続いている可能性が示唆され、本法を用いて 1型糖尿病の病態を評価できる可能性が示された。