

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

報告番号	甲医第 1535 号	氏 名	岡田 朝美
審査委員	主査 佐田 政隆 副査 阪上 浩 副査 親泊 政一		

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年発行 Journal of Diabetes Investigation に掲載予定
 (主任教授 漆原 真樹)

要旨

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には、膵 β 細胞死を直接反映するバイオマーカーが有用であると考えられている。

近年では、digital PCR や次世代シーケンサーを用いて、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報告されている。しかし、前者は特異度に課題があるとされ、後者は特殊なシーケンサーと結果の解析技術を要するものである。

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、1型糖尿病患者に本法を適用して、その有用性を検証した。

1型糖尿病患者 114名（罹病期間の中央値 8.3年）と健常成人 31名を対象とした。血清より遊離 DNA を単離し、バイサルファイト処理を行い、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 (Amplification-refractory mutation system) 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通りである。

- (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、本法は高い定量性を示した。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 ($P=0.015$)。

以上の結果から、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非メチル化インスリン DNA 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。

本研究は、1型糖尿病の発症早期に膵β細胞傷害を定量評価することができる可能性を示唆するものであり、今後の免疫抑制剤等による病態の進展阻止治療の実現に貢献することが期待される。その臨床的意義は大きく、学位授与に値すると判定した。