

原 著 (第47回徳島医学会賞受賞論文)

循環血中遊離 DNA を用いた膵 β 細胞傷害の新規検出法の確立

岡田朝美¹⁾, 山田美鈴²⁾, 森博康²⁾, 明比祐子²⁾, 倉橋清衛³⁾,
吉田守美子³⁾, 遠藤逸朗^{3,4)}, 栗飯原賢一^{3,5)}, 松久宗英²⁾, 黒田暁生²⁾

¹⁾徳島大学病院小児科

²⁾徳島大学糖尿病臨床・研究開発センター

³⁾徳島大学大学院血液・内分泌代謝内科学分野

⁴⁾徳島大学大学院生体機能解析学分野

⁵⁾徳島大学大学院実践地域診療・医科学分野

(令和3年10月29日受付) (令和3年11月29日受理)

はじめに

1型糖尿病では、自己免疫応答により膵 β 細胞の70~80%が破壊されてはじめて高血糖症状が出現し、診断に至る場合が多い¹⁾。限られた残存膵 β 細胞量では、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もつ生物学的製剤を中心に、早期からの疾患の進展阻止を目指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²⁾。そこで、1型糖尿病の発症を早期に予測し、新規治療薬の効果を判定するため、膵 β 細胞傷害を鋭敏に定量評価できるバイオマーカーの開発が求められている。

近年では、糖尿病分野においても、細胞死を反映するマーカーとして遊離DNAが注目されている³⁾。遊離DNAとは、死細胞が循環血液中に放出するDNA断片であり、これまでがんの診断・分類や出生前診断などに用いられてきた。また、膵 β 細胞におけるインスリン遺伝子は、プロモーター領域やエクソン領域においてCpGの脱メチル化を有していることが報告されている⁴⁻⁷⁾。すなわち、 β 細胞以外の細胞においてはインスリン遺伝子のCpGがメチル化されており転写が開始しないが、 β 細胞においては特異的に脱メチル化しておりインスリン遺伝子が発現する。この特徴を用いて、遊離DNA中の脱メチル化インスリン遺伝子DNAを測定することで、膵 β 細胞傷害の程度を推定する試みがなされている³⁾。

DNAのメチル化状態を調べるには、一般的にバイサ

ルフアイト処理が用いられている^{8,9)}。メチル化されたシトシンは重亜硫酸の影響を受けないが、メチル化されていないシトシンはデオキシウラシルに変換されるため、バイサルファイト処理によってメチル化状態の違いが塩基配列の違いへと変換される。バイサルファイト変換した遊離DNAを用いて、デジタルPCR (Droplet Digital PCR: ddPCR)¹⁰⁻¹²⁾や次世代シーケンス (Next Generation Sequencing: NGS)⁴⁾により遊離DNA中の脱メチル化インスリン遺伝子DNAを測定するアッセイがいくつか報告されている。しかし、ddPCRでは標的とするCpGサイトが1~2カ所と少ないため特異度が充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る^{11,12)}、NGSでは特異度は高いが高コストで出力データの読み取りが複雑であるという難点がある。

我々は、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開発した。ARMS PCRは、単一核酸の変異を検出するために開発されたもので、標的配列とプライマーとの間に3'末端で2つ以上のミスマッチがあると伸長反応が停止する現象を利用する方法である^{13,14)}。通常のリアルタイムPCRシステムを用いて、2ステップのARMS PCRを行うことにより、インスリン遺伝子エクソン2の4カ所のCpGを標的とした特異的かつ定量的なアッセイを報告する。

本研究の目的は、1型糖尿病患者において、遊離DNA中の膵 β 細胞特異的なインスリン遺伝子の脱メチル化状

態を検出する配列特異的かつ定量的な PCR 法を用いて、膵β細胞傷害の定量を行い、その有用性を明らかにすることである。

対 象

当院小児科及び内科外来通院中の1型糖尿病患者114名と、ボランティアの健常成人31名を対象とした。研究への参加にあたっては、書面にて本人あるいは保護者からインフォームド・コンセントを得た。血中遊離 DNA 濃度は概日リズムや食事などの影響を受けて変動する可能性が示されている¹⁵⁾が、1型糖尿病患者の通常外来診療において早朝空腹時採血を行うのは低血糖のリスクが高いと判断し、随時採血とした。本研究は、徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会の承認を得て（承認番号：2320）、ヘルシンキ宣言に基づいて実施した。

方 法

・コントロール作製

今回報告する新規膵β細胞傷害検出法では、ヒト膵β細胞由来インスリン遺伝子において比較的特異的に非メチル化している^{4,5)}+331, +367, +371, +404のCpGサイトを標的とした。生体内でのDNA複製においてメチル化情報は維持されるが、PCRシステムにはメチル基転移酵素が存在しないため、メチル化シトシンはPCR増幅後に脱メチル化する。肝臓ゲノムDNAを#1プライマーセット（Forward;5'-ATGGCCCTGTGGATGCGCCTC-3', Reverse;5'-ACAGGGAGCTGGTCACTTTTAGGACGT-3'）で増幅後にバイサルファイト変換して#2プライマーセット（Forward;5'-TTTTGGGGATTTGATTTAGT-3', Reverse;5'-ACTCACCTACAAATCCTCTAC-3'）で増幅し、標的とする4カ所のCpGをTGに変換したプラスミドDNAを脱メチル化コントロールとした。また、ヒト肝臓ゲノムをバイサルファイト変換して#2プライマーセットで増幅し、標的とする4カ所のCpGをCGのままにしたプラスミドDNAをメチル化コントロールとした。各コントロールの4カ所のCpGサイトは、DNAシーケンスで確認した。これらは、検量線作成や最低検出コピー数の検討にも用いた。

・被験者検体からの遊離DNA抽出及びバイサルファイト処理

血清1mLからNextPrep-Mag cfDNA Isolation Kit

(BIOO Scientific Corporation, Austin, TX, USA)を用いて試薬メーカーの指示通りに遊離DNAを抽出し、innuCONVERT Bisulfite Basic Kit (AJ Innuscreen GmbH, Berlin, Germany)を用いてバイサルファイト処理を行い、50μLで溶出した。使用時まで-80℃で保存した。

・Nested PCR

HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Tokyo, Japan)を用いて、INSエクソン2領域の断片(128bp)を増幅するためのNested PCRを行った(Forward;5'-AGTTGTAGTTTTTGTGAATTAATATTTG-3', Reverse;5'-TCACCCTACAAATCCTCTACC-3')。5μLのテンプレートDNAを使用し、T100™サーマルサイクラー(Bio-Rad)を用いて95℃5分間のホットスタート後、94℃30秒、50℃30秒、72℃30秒のプログラムを15サイクル行った。PCR産物はFastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan)を用いてクリーンアップし、25μLで溶出した。

・2ステップ ARMS PCR

ARMS PCR法の原理を示す(Fig 1)。各標的CpGサイトに対応するプライマーの3'末端に、ミスマッチの1塩基とそれに続くチミジンを挿入し、CpGサイトがメチル化されている場合に2つのミスマッチを生じるようプライマーを設計した。ミスマッチの1塩基の種類によりForwardとReverseにそれぞれ3通りのプライマー候補を用意し、脱メチル化コントロールとメチル化コントロールに対するアッセイにおいて最大のThreshold Cycle (Ct) 値差を示したプライマーセットを選択した。1st ARMS PCRでは、+331bpと+404bpのCpGサイトが共に脱メチル化している場合にインスリン遺伝子DNA断片を増幅するようにプライマーを設計した(Forward;5'-TAGTTTTTTGTGAATTAATATTTGTTT-3', Reverse;5'-CCTACAAATCCTCTACCTCCGAA-3')。1μLのテンプレートDNAを用いて、LightCycler96 Instrument (Roche)で95℃10分の初期変性後、95℃10秒、56℃10秒、72℃10秒のプログラムを15サイクル行った。PCR産物を前述のキットでクリーンアップ後、指示

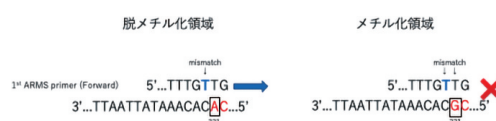


Figure 1. ARMS PCR法の原理

通りに25μLに溶出した。2nd ARMS PCRでは、+367bpと+374bpのCpGサイトを標的とした(Forward; 5'-TTTGGTGGGAAGTTTTTTATTTAGTGTCTG-3', Reverse; 5'-AATCTTAAATATATAAAAAAACC TGAT-3')。プロトコルは1st ARMS PCRと同じであるが、サイクル数を35とした。

脱メチル化インスリン遺伝子 DNA コピー数 (/mL) は、以下の式を用いて算出した。

$$250 \times 10^4 \{ (y_intercept - Ct \text{ 値}) / (-slope) \} \text{ of } 2^{nd} \text{ ARMS PCR} \times 25 / (1^{st} \text{ ARMS PCR の効率})^{15} / (\text{Nested PCR の効率})^{15}$$

PCR産物のシーケンス解析を行い、Ct値35以下を膵β細胞由来インスリン遺伝子 DNA 陽性とした。

・統計解析

連続変数は中央値(下位四分位, 上位四分位)で示した。2群間の差を比較するためにMann-Whitney U検定を用いた。データの分布はShapiro-Wilk検定で評価した。β細胞由来遊離 DNA コピー数と臨床パラメータとの相関関係は、Spearmanの順位相関係数を用いて解析した。

統計解析にはJMP Pro15 (SAS Inc. Cary, NC)を用いた。統計的検定は両側で行い、P値が<0.05の場合に統計的有意性があるとみなした。

結 果

・スパイク(イン)テスト

脱メチル化コントロールDNA(10⁰~10⁵コピー)を4ngのヒト血液ゲノムと混合し、これらのサンプルを用いてNested PCRと2ステップARMS PCRを行い、

コピー数を算出した。脱メチル化コントロールDNA量に応じて、コピー数は直線的に増加した(R²=0.9909)。

・最低検出コピー数の検討

10⁵コピーのメチル化コントロールDNAに、1または0コピーとなるように希釈した脱メチル化コントロールDNAを混合したサンプルを16サンプル用意し、Nested PCRと2ステップARMS PCRを行った。16サンプル中7サンプルで脱メチル化コントロールDNAを1コピー検出し、メチル化コントロールは検出しなかったため、本アッセイにおける脱メチル化インスリン遺伝子DNAの最低検出コピー数は1コピーとした。

・患者背景

患者背景をTable 1に示す。114名の1型糖尿病患者のうち、18歳未満を小児患者、18歳以上を成人患者とした。小児患者26名(罹病期間の中央値3.2年)、成人患者88名(罹病期間の中央値10.7年)であった。BMIは小児期には年齢とともにダイナミックに推移し絶対値では評価できないため、%tileスコアを用いた。

・患者検体での測定結果

膵β細胞由来インスリン遺伝子DNAは、1型糖尿病患者114名中32名、健常成人31名中10名で検出され、その陽性率及びコピー数は両群で有意差を認めなかった(Fig 2)。膵β細胞由来インスリン遺伝子DNA陽性の患者群において、そのコピー数が病態を反映する可能性を考え、臨床パラメータとの関連を検討したところ、小児例では年齢と逆相関を認めた(Table 2)。小児と成人を合わせた患者群全体では、年齢(ρ=-0.458, P=0.005)、罹病期間(ρ=-0.403, P=0.015)と逆相関した。

Table 1. 患者背景

	Pediatric T1D (n=26)	Adult T1D (n=88)	Healthy control (n=31)
Male/Female	11/15	31/57	21/10
Age (years)	10.4(7.1, 14.3)	47.0(35.0, 59.0)	35.0(31.5, 44.8)
Duration (years)	3.2(0.8, 5.1)	10.7(5.0, 23.0)	
BMI (kg/m ²) percentile	69.3(49.8, 82.8)		
BMI (kg/m ²)		22.2(20.7, 24.0)	22.1(20.4, 24.5)
HbA1c (%)	7.9(7.0, 8.5)	7.1(6.6, 8.0)	
Serum CPR (ng/mL)	0.04(0.00, 0.53)	0.05(0.00, 0.32)	
TDD (U/kg/day)	0.79(0.69, 1.08)	0.58(0.46, 0.77)	

BMI, body mass index; CPR, C-peptide; TDD, total daily dose of exogenous insulin; T1D, type 1 diabetes.

Table 2. 膵β細胞由来インスリン遺伝子 DNA 陽性患者におけるコピー数と臨床パラメータとの相関

	Pediatric T1D		Adult T1D	
	ρ	P	ρ	P
Age (years)	-0.810	0.022	-0.060	0.763
Duration (years)	-0.524	0.197	-0.233	0.233
BMI (kg/m ²) percentile	-0.357	0.389		
BMI (kg/m ²)			-0.353	0.071
HbA1c (%)	0.119	0.793	0.277	0.170
Serum CPR (ng/mL)	0.342	0.406	0.228	0.308
TDD (U/kg/day)	-0.357	0.389	0.246	0.235

CPR, C-peptide; TDD, total daily insulin dose; T1D, type 1 diabetes. (Spearman's rank correlation coefficient)

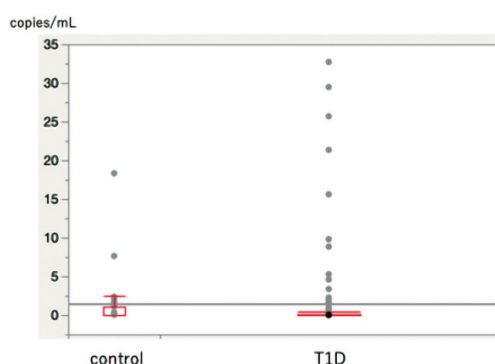


Figure 2. 膵β細胞由来インスリン遺伝子 DNA コピー数

考 察

1型糖尿病患者において膵β細胞傷害を非侵襲的にモニタリングすることは病態把握に有用であり、将来的には近親者に1型糖尿病をもつ者や膵島関連自己抗体陽性者など高リスク者に対して発症をスクリーニングし病態進展阻止治療の導入のタイミングを図るのにも役立つ可能性が考えられる。また、膵臓あるいは膵島移植において、移植組織に対する拒絶反応などの傷害を定量評価することが可能となるかもしれない⁴⁾。

遊離 DNA 中の膵β細胞特異的インスリン遺伝子の脱メチル化を定量することにより膵β細胞傷害を定量するアッセイは、2011年に初めて報告されて以来¹⁶⁾、ddPCRやNGSなどを用いていくつかの研究グループが報告している。アッセイ間で、最適化された血液サンプルの種類・量や収集方法、使用される遊離 DNA 抽出技術、標的 CpG 部位の違いがあることなどにより、測定結果にはばらつきがある¹⁷⁾。膵島移植後に高コピー数の脱メチ

ル化インスリン遺伝子 DNA が検出されることは多くのアッセイで共通して見られる結果であるが^{5, 17)}、1型糖尿病患者を対象とした研究では、発症直後の患者や高リスク者で健常成人と比べて高値であったとする報告^{4, 10, 11)}がある一方で、罹病期間の比較的長い患者においては健常成人と差がなかったとする報告もある¹⁸⁾。また、2型糖尿病においても、その発症に膵β細胞傷害の関与が考えられているが、インスリン遺伝子転写開始点より69塩基上流の CpG 脱メチル化を ddPCR を用いて検討した研究では、成人2型糖尿病患者の脱メチル化インスリン遺伝子 DNA コピー数は、健常者と比較し有意差がなかったと報告されている¹⁹⁾。

我々は、バイサルファイト処理と ARMS PCR 法を組み合わせた膵β細胞由来インスリン遺伝子 DNA の新規検出法を開発し、1型糖尿病患者及び健常成人に適用して、いずれも約30%の症例で検出し得た。健常成人の結果から、本法は生理的レベルの膵β細胞のターンオーバーを捉える感度を有する可能性が示唆された。感度・特異度の高い NGS を用いた既報⁵⁾でも、健常成人において約30%で20コピー/mL程度までの脱メチル化インスリン遺伝子 DNA を検出しており、我々の結果はこれに類似していた。非糖尿病患者において脱メチル化インスリン遺伝子 DNA コピー数が高値となる背景には、若年であること²⁰⁾や肥満²¹⁾による影響が考えられるほか、糖尿病の前段階であることを反映している可能性も考えられ、今後対象者を増やし縦断的に解析していく必要がある。発症後の1型糖尿病においては、残存膵β細胞量の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ことが示唆され、本法にて1型糖尿病の病態を把握できる可能性が示された。

結 語

我々は、通常のリアルタイム PCR システムを用いて施行可能な、バイサルファイト変換と ARMS PCR 法を組み合わせた膵 β 細胞傷害の新規検出法を開発した。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金(15K06910, 18K07748)及び群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究プログラム(18020)の助成を受けて実施した。心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Eisenbarth, G. S.: Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *New England J Med.*, **314** : 1360-8, 1986
- 2) Herold, K. C., Bundy, B. N., Long, S. A., Bluestone, J. A., *et al.*: An Anti-CD3 antibody, Teplizumab, in relatives at risk for type 1 diabetes. *New England J Med.*, **381** : 603-13, 2019
- 3) Liu, Y., Tan, Q., Liu, F.: Differentially methylated circulating DNA: A novel biomarker to monitor beta cell death. *J Diabetes Complications.*, **32** : 349-53, 2018
- 4) Lehmann-Werman, R., Neiman, D., Zemmour, H., Moss, J., *et al.*: Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **113** : E1826-34, 2016
- 5) Husseiny, M. I., Kaye, A., Zebadua, E., Kandeel, F., *et al.*: Tissue-specific methylation of human insulin gene and PCR assay for monitoring beta cell death. *PloS One.*, **9** : e94591, 2014
- 6) Kuroda, A., Rauch, T. A., Todorov, I., Ku, H. T., *et al.*: Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PloS One.*, **4** : e6953, 2009
- 7) Neiman, D., Moss, J., Hecht, M., Magenheim, J., *et al.*: Islet cells share promoter hypomethylation independently of expression, but exhibit cell-type-specific methylation in enhancers. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **114** : 13525-30, 2017
- 8) Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K., Iida, S., *et al.*: Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry.*, **9** : 2858-65, 1970
- 9) Shapiro, R., Braverman, B., Louis, J. B., Servis, R. E., *et al.*: Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem.*, **248** : 4060-4, 1973
- 10) Fisher, M. M., Watkins, R. A., Blum, J., Evans-Molina, C., *et al.*: Elevations in Circulating Methylated and Unmethylated Preproinsulin DNA in New-Onset Type 1 Diabetes. *Diabetes.*, **64** : 3867-72, 2015
- 11) Herold, K. C., Usmani-Brown, S., Ghazi, T., Lebastchi, J., *et al.*: β cell death and dysfunction during type 1 diabetes development in at-risk individuals. *J Clin Invest.*, **125** : 1163-73, 2015
- 12) Usmani-Brown, S., Lebastchi, J., Steck, A. K., Beam, C., *et al.*: Analysis of β -cell death in type 1 diabetes by droplet digital PCR. *Endocrinology.*, **155** : 3694-8, 2014
- 13) Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., *et al.*: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.*, **17** : 2503-16, 1989
- 14) Little, S.: Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. Current protocols in human genetics., **Chapter 9** : Unit 9. 8, 2001
- 15) Ungerer, V., Bronkhorst, A. J., Holdenrieder, S.: Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, **57** (7) : 484-507, 2020
- 16) Akirav, E. M., Lebastchi, J., Galvan, E. M., Henegariu, O., *et al.*: Detection of β cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **108** (47) : 19018-23, 2011
- 17) Speake, C., Ylescupidez, A., Neiman, D., Shemer, R., *et al.*: Circulating unmethylated insulin DNA as a biomarker of human beta cell death: A multi-laboratory assay comparison. *J Clin Endocrinol Metab.*, **105** (3) : 781-791, 2020
- 18) Neiman, D., Gillis, D., Piyanzin, S., Cohen, D., *et al.*: Multiplexing DNA methylation markers to detect circulating cell-free DNA derived from human pancreatic β -cells. *JCI Insight.*, **5** (14) : e136579, 2020
- 19) Arosemena, M., Meah, F. A., Mather, K. J., Tersey, S.

- A., *et al.* : Cell-Free DNA Fragments as Biomarkers of Islet β -Cell Death in Obesity and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci.*, **22**, 2021
- 20) Kushner, J. A. : The role of aging upon β cell turnover. *J Clin Invest.*, **123**(3) : 990-5, 2013
- 21) Saisho, Y., Butler, A. E., Manesso, E., Elashoff, D., *et al.* : β -cell mass and turnover in humans : effects of obesity and aging. *Diabetes Care.*, **36**(1) : 111-7, 2013

Novel method for detection of pancreatic beta cell death using cell-free DNA

Asami Okada¹⁾, Misuzu Yamada²⁾, Hiroyasu Mori²⁾, Yuko Akehi²⁾, Kiyoe Kurahashi³⁾, Sumiko Yoshida³⁾, Itsuro Endo^{3,4)}, Ken-ichi Aihara^{3,5)}, Munehide Matsuhisa²⁾, and Akio Kuroda²⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Tokushima University Hospital, Tokushima, Japan

²⁾Diabetes Therapeutics and Research Center, Institute of Advanced Medical Sciences, Tokushima University, Tokushima, Japan

³⁾Department of Hematology, Endocrinology and Metabolism, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima, Japan

⁴⁾Department of Bioregulatory Sciences, Tokushima University Graduate School of Medical Sciences, Tokushima, Japan

⁵⁾Department of Community Medicine and Medical Science, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima, Japan

SUMMARY

In people with type 1 diabetes (T1D), biomarkers that can sensitively and quantitatively evaluate injury of pancreatic beta cell are required in order to predict the onset of the disease at an early stage and to provide interventions to prevent the progression of the disease. We developed a new method for quantifying pancreatic beta cell-derived insulin DNA in circulation that combines bisulfite conversion and Amplification Refractory Mutation System (ARMS) PCR, which can be performed using a conventional real-time PCR system. We applied this method to T1D patients and healthy adults, both could be detected in about 30% of cases. The results in healthy adults indicate that this method may have sensitivity to detect the turnover of pancreatic beta cells at physiological conditions. In post-onset T1D patients, there were many negatives because the amount of residual pancreatic beta cells was extremely small. However, in some cases with a short duration of the disease, pancreatic beta cell-derived insulin DNA was detected in negative correlation between the duration of the disease, that suggested the residual pancreatic beta cells continue to be slowly destroyed. It was demonstrated that the time course of pathophysiology in T1D could be understood using this method.

Key words : Insulin, DNA methylation, RT-PCR, Type 1 diabetes, cell-free DNA