

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報告書

平成 31 年 4 月 26 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 徳島大学先端酵素学研究所
 糖尿病臨床・研究開発センター
 職 名 准教授
 研究代表者 黒田暁生

下記のとおり平成30年度の共同研究成果を報告します。
 記

(課題番号: 18020)

1. 共同研究課題名	循環血中脂肪細胞特異的 DNA の検出とその臨床的意義の検討			
2. 共同研究目的	脂肪細胞の蓄積は、肝臓、骨格筋をはじめ脂肪組織自体や膵臓などの代謝調節臓器の障害を生じる。特に脂肪細胞での炎症がその起点となり他臓器の障害をも惹起すると考えられている。申請者らはエピゲノム修飾に注目した PCR 技術により、循環血中の脂肪細胞特異的 DNA の定量的検出を可能とした。同様に脂肪細胞特異的 DNA 検出技術も確立しつつある。本法により、脂肪組織の炎症による傷害定量化が可能になれば、メタボリックシンドロームの本態を反映する新規のバイオマーカーを創出することになる。			
3. 共同研究期間	平成30年 4 月 1 日 ~ 平成31年 3 月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 黒田暁生	先端酵素学研究所 糖尿病臨床・研究開発センター	准教授	研究の総括	
(分担研究者) 松久宗英	先端酵素学研究所 糖尿病臨床・研究開発センター	教授	臨床研究の遂行、結果解析	
山田美鈴	先端酵素学研究所 糖尿病臨床・研究開発センター	特任助教	DNA 解析、結果解析	
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御分野	氏 名	藤谷 与士夫

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

細胞は傷害を受けるとアポトーシスやネクローシスを来して死滅する。アポトーシスにより凝集し断片化した遊離 DNA (cell-free DNA: cfDNA) はマクロファージにより貪食されるが一部は小胞となり循環血中に放出されることが知られている。断片化された DNA を含むエクソソームなどの小胞から DNA が放出されるメカニズムにより、血中で DNA は検出されることが想定されている。最近当研究室では循環血中に放出された膵β細胞由来 DNA を検出することで膵β細胞の傷害を定量的に検出する方法を開発した。一方で、脂肪細胞の炎症は糖尿病のインスリン抵抗性に大きな影響を示すことが知られており、脂肪細胞の傷害、それに続く炎症がメタボリックシンドロームの病態の中心をなすと考えられている。しかしながら実際の脂肪細胞がどれだけ傷害されているのかの定量方法は現在までのところでは確立されたものはない。肥満者において血中遊離 DNA の濃度が高いことが知られており、その遊離 DNA の起源は脂肪細胞である可能性が推測されている。今回申請する共同研究では、肥満モデルマウスおよびヒトにおいて、脂肪細胞の傷害を血液検体から申請者らの開発した PCR で定量評価することによって、脂肪細胞の傷害程度とグルコースクランプ法により精密評価したインスリン抵抗性や糖尿病病態との関連を明らかにすることを目的とするものである。

7. 共同研究の成果

脂肪細胞特異的な DNA として脂肪細胞に特異的に発現している PPAR γ 遺伝子 (*PPARG2*) はプロモーター近辺の CpG 配列のメチル化により発現が制御されていることが知られている。循環血液中に肥満を伴う2型糖尿病患者で cfDNA 濃度が高値である理由は脂肪細胞の崩壊によると仮定し、2型糖尿病患者の血清を用いて脂肪細胞由来の cfDNA の上昇がその現象の原因であるかを検討した。Nested PCR で増幅した *PPARG2* 転写開始領域から +50, +110, +123bp の3つの CpG サイトでの脱メチル化が健常人脂肪細胞のゲノムで肺、膵臓、血液、肝臓など他の組織に比して特異的に脱メチル化状態であることを確認した。脱メチル化 CpG 配列検出は Amplification Refractory Mutation System (ARMS) PCR を行う。ARMS PCR はプライマーの3'末端における相同配列のミスマッチが2つ以上だと伸長しない DNA ポリメラーゼの特性を利用しており、バイサルファイト処理後の非メチル化 CpG 配列に対し任意の1つのミスマッチを入れ非メチル化配列のみの増幅を行うものである。この PCR を2回行うことで CpG 配列3つ全てが脱メチル化状態である脂肪細胞を検出するシステムを構築した。2型糖尿病において脂肪細胞由来 cfDNA が総 cfDNA コピー数に占める割合は 2.1%と低値であり、また BMI と脂肪細胞由来 DNA コピー比率には相関が見られなかったため、2型糖尿病では肥満と脂肪細胞の崩壊の関連は認めず、cfDNA 濃度の上昇に脂肪細胞の崩壊の影響は小さいと考えられた。

2型糖尿病患者 98例、1型糖尿病患者 108例での血清を用いた検討(徳島大学病院臨床試験管理センター承認番号: 3106)では脂肪細胞由来 cfDNA コピー数と LDL/HDL コレステロール比と有意な正の相関 ($p < 0.01$) を示し、1型糖尿病患者においては平均頸動脈内膜中膜複合体の肥厚度と正の相関 ($p < 0.0001$) を示した。Illumina 社の DNA メチル化状態を公開しているサイトによると *PPARG2* の転写開始領域よりも数千 bp 上流に、より脂肪細胞特異的な脱メチル化 CpG サイトが公開されており、同部位を用いてさらに精度の高い PCR を構築できるか、また現在得られている知見を確認できるかの検討を行っているところである。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

Development of monoclonal mouse antibodies that specifically recognize pancreatic polypeptide.
Hara A, Nakagawa Y, Nakao K, Tamaki M, Ikemoto T, Shimada M, **Matsuhisa M**, Mizukami H, Maruyama N, Watada H, **Fujitani Y**. Endocr J. 2019 Mar 6. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0441. [Epub ahead of print]

②この共同研究に基づくとの記載のある論文