

様式3

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

令和 2 年 4 月 30 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

下記のとおり令和元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	申請者らはエピゲノム修飾に注目した PCR 技術により、循環血中の膵 β 細胞や脂肪細胞特異的 DNA の定量的検出を可能とした。血管内皮細胞特異的に発現する Roundabout homolog 4 (ROBO4) 遺伝子の CpG 配列は血管内皮細胞特異的にエピジェネティックに制御されている。申請者らは同様な手法を用いて血管内皮細胞由来遺伝子を検出して動脈硬化との関連を検討する。			
3. 共同研究期間	平成31年 4月 1日 ~ 令和 2 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	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	准教授	研究の総括	
(分担研究者) 山田美鈴	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	特任助教	DNA 解析、結果解析	
松久宗英	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	教授	臨床研究の遂行、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 DNA 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。申請者らはエピゲノム修飾に注目した PCR 技術により、循環血中の臍/細胞や脂肪細胞に特異的な DNA の定量的検出に成功した。内皮細胞傷害のマーカーとして内皮細胞で特異的に発現する ROBO4 遺伝子の非メチル化状態について、同様な手法を用いて非メチル化 ROBO4 遺伝子を検出することで内皮細胞傷害を見出し、臨床データと比較検討する。具体的に対象は徳島大学病院に通院中の 20 歳以上の 1 型糖尿病患者 106 名。9mL の血液サンプルより 1ml の血清を用いて cfDNA を抽出して Bisulfite 処理を行う。血管内皮細胞由来の ROBO4 遺伝子は非メチル化状態であることを利用して ARMS PCRを行い、連続した 2 回のメチル化パターン依存的 PCR により、標的遺伝子配列中 4 か所の非メチル化した CpG 配列のみを特異的に増幅定量する。定量したデータは身体計測データ、臨床検査データ、および頸動脈エコー内中膜複合体厚と比較検討する。

7. 共同研究の成果

対象は男性 34/女性 72 例の 1 型糖尿病患者。血中非メチル化 ROBO4 遺伝子濃度は 49.6 コピー/mL であり cfDNA 総量に占める割合は 1.96%という結果となった。非メチル化 ROBO4 遺伝子濃度と関連が認められた臨床指標としては年齢(歳) ($r=0.26$, $p=0.01$), 罹病期間(年) ($r=-0.28$, $p=0.01$), 拡張期血圧 (mmHg) ($r=0.22$, $p=0.04$), HbA1c (%) ($r=-0.27$, $p=0.01$), 中性脂肪 (mg/dL) ($r=0.28$, $p=0.01$), 頸動脈エコーにおける max IMT (mm) ($r=0.23$, $p=0.03$)で有意な単相関を認めた。一方で、動脈硬化のサロゲートマーカーとなる max IMT と有意な単相関を示した指標として年齢 ($r=0.65$, $p<0.01$), 収縮期血圧 ($r=0.28$, $p=0.01$), 拡張期血圧 ($r=0.39$, $p<0.01$), 中性脂肪 ($r=0.23$, $p=0.04$) が ROBO4 非メチル化遺伝子濃度と同じく選択された。max IMT を規定する因子について重回帰分析により検討してみたところ、ROBO4 非メチル化遺伝子濃度は、性別、年齢とともに検討した結果、有意な関連がみられたが、さらに BMI、収縮期血圧を加えて多変量解析を行うと年齢に次いで関連を示したものの、有意な関連性は消失した。血圧によるダメージや肥満による血管の炎症などが交絡因子として示唆された。今後、本共同研究を発展させるため、導入が遅れていたヒト ROBO4 発現マウスでの基礎的検討を行うにあたり、高血圧あるいは肥満誘導モデルを加えた解析を行い、血管内皮由来 cfDNA の血中放出機構をさらに解明していく方針である。

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

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

AKIO KURODA, MISUZU YAMASHITA YAMADA, YUICHI TAKASHI, MAMI OHISHI, HIROYASU MORI, MASASHI ISHIZU, REIKO SUZUKI, OTSUKA YINHUA, YUKARI TOMINAGA and MUNEHIDE MATSUHISA. Detection of Vascular Endothelial Cell DNA in the Circulation Using Dual Amplification Refractory Mutation System PCR The 79th America Diabetes Association 415-P: 2019