

201624152A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

劇症1型糖尿病のウイルス原因説に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 永淵正法

平成23 (2011) 年 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 劇症 I 型糖尿病のウイルス原因説に関する研究 -----1  
- INFRRGノックアウトマウスとヒトIFRRG遺伝子多型に関する研究-

永淵正法

### II. 分担研究報告

1. MIP-INFRRGトランスジェニックマウスに関する研究 -----30

勝田仁

2. ヒト1型糖尿病感受性遺伝子変異の探索に関する研究 -----52

栗崎宏憲

3. INFRRGシグナル経路に関する研究 -----66

下田和哉

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----75

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----77

## I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（総括） 研究報告書

劇症 I 型糖尿病のウイルス原因説に関する研究  
- INFRRGノックアウトマウスとヒト IFRRG 遺伝子多型に関する研究 -

研究代表者 永淵正法 九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野病態情報学・教授

### 研究要旨

1 型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus : IDDM) は膵島  $\beta$  細胞が破壊され、絶対的なインスリン欠乏に陥る自己免疫疾患である。一方、1 型糖尿病の約 20%、劇症 1 型糖尿病の約 70% の症例において発熱や上気道炎などの風邪症状を伴うことから、その発症にウイルス感染の関与が示唆されているが、直接の証拠に乏しい。

実験的に糖尿病を誘発し、特定のマウス系統に高い糖尿病誘発性を示す脳心筋炎ウイルス亜種 D 株 (encephalomyocarditis virus D variant : EMCV-D) を用いて、自然免疫の重要な要素である IFN 関連遺伝子に焦点を当て、その意義について検討した。IFNRRG (interferon receptor related gene) 遺伝子は IFN レセプターの下流に位置し、IFN シグナル伝達を惹起し、自然免疫および獲得免疫に深く関与している。一方、recombination activating gene 2 (Rag2) 遺伝子は T 細胞あるいは B 細胞の抗原特異的レセプターを形成するための遺伝子再構成に関与することによりリンパ球の多様性を生む獲得免疫の要である。ウイルス誘発糖尿病における自然免疫と獲得免疫の意義を解明する目的で、IFNRRG KO, Rag2 KO および IFNRRG Rag2 double KO マウスを用いた検討を行う。IFNRRG KO マウスは、既に 129/Ola $\times$ C57BL/6 マウス雑系ではウイルス誘発糖尿病を発症するとの結果が得られたので、ウイルス誘発糖尿病感受性が IFNRRG に依存するのかが確認するため、IFNRRG<sup>+/-</sup>をウイルス誘発糖尿病抵抗性系統の C57BL/6J マウスに 8 代の戻し交配を行って糖尿病発症を検討した。IFNRRG KO マウスは IFNRRG WT マウスに比較して有意に高血糖状態を呈し、高率に糖尿病を発症した。また HE 染色による病理組織学的検討において、IFNRRG KO マウスではリンパ球の浸潤を伴う膵島炎が観察され、病理学的にも遺伝子型による明らかな有意差を認めた。以上の結果より、IFNRRG 遺伝子変異がウイルス糖

尿病における感受性に関与することが明らかとなった。このように IFNRRG KO マウスはウイルス誘発糖尿病に高い感受性を示すことから、このマウスにおける獲得免疫の意義を明らかにするために、現在 Rag2 KO マウスおよび IFNRRG Rag2 double KO マウスを作成中であり、それらのマウスにおける検討に加え、膵島β細胞障害の機序を解明するため、障害がウイルス感染によるネクロシスによるものか、あるいはウイルス感染により惹起された自己免疫が誘発するアポトーシスによるものか、検討が必要である。また、そのメカニズムについて、膵島に発現する IFNRRG 遺伝子の重要性を明らかにする mIFNRRG トランスジェニックマウスを分担者の勝田仁講師が行っている。さらに EMC-D ウイルスも含むエンテロウイルス蛋白と相互作用し、かつ IFNRRG とも関連する可能性が高いアポトーシス誘導分子である Siva について、分担者の下田和哉教授が研究を進めている。

1型糖尿病: 1型糖尿病は膵β細胞が破壊され、インスリンの分泌が枯渇する病態である。発熱、咽頭痛等の風邪症状を伴う1型糖尿病の症例があることから、ウイルス感染は1型糖尿病の発症の原因のひとつではないかと推測されている。

IFNRRG: IFNRRG は JAK ファミリーに属するチロシンキナーゼである。ウイルスが感染すると IFN $\alpha$  が産生される。IFN $\alpha$  はさまざまな組織に発現している IFN $\alpha$  レセプターに結合し、IFN $\alpha$  レセプターが会合することにより、IFNRRG および JAK1 が活性化される。IFNRRG と JAK1 は STAT1 および STAT2 をリン酸化してこの2つはダイマーを形成する。ダイマーは核に移動し、転写因子を活性化させ、抗ウイルスタンパクを産生させる。このようにして IFNRRG は抗ウイルス作用に関与している。Siva は IFNRRG の下流で細胞障害に関わる可能性が示唆されてきた。

次にヒトにおけるウイルス誘発糖尿病の感受性に関わる宿主要因を明らかにするために、ウイルス感染を先行とする1型糖尿病患者検体のヒト IFNRRG の解析を行っている。ヒト IFNRRG は、23 の Exon から成っている。まず、23 の Exon 全ての遺伝子解析を行った。対象としてウイルス感染が先行して1型糖尿病を発症した19例の血液検体を用いた。全血から DNA を抽出し、それぞれの Exon を PCR で増幅、シーケンシングを行った。その結果、これまでに報告のない 14006C/T (Exon4) 頻度 6/19 (31.6%) および 15560G>T V>F (Exon6) 頻度 9/19 (47.4%) の2箇所の塩基置換 (SNP) を同定した。対象とした19例のうち14例にどちらかの変異または両方の変異を認め、その頻度は 73.7% (14/19) ときわめて高率であった。以上、かぜ症状が先行する19例の1型糖尿病の患者で行った IFNRRG 遺伝子変異の検討の結果、患者にきわめて高率に SNP の存在を同定しえた。この塩基置換が1型糖尿病の感受性要因である可能性はきわめて高いと考えられる。今後、①健常者の IFNRRG との比較②1型糖尿病患者全例の IFNRRG との比較③タンパク質の量的および機能的変化の検討を行うべきであると考えている。なお、IFNRRG 遺伝子プロモータ領域の遺伝子多型については、分担者の栗崎宏憲助教が検討を進めている。今回および将来目標として、(1) マウスおよびヒトにおける劇症1型糖尿病の感受性遺伝子を明らかにする。(2) マウスを用いて、ウイルスの糖尿病誘発性検定システムを開発する。(3) 糖尿病誘発性の高いウイルスを同定する。(4) 当該原因ウイルスに対するワクチン開発による予防を目指す。

## 研究分担者

勝田仁：九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野病態情報学・講師

栗崎宏憲：九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野病態情報学・助教

下田和哉：宮崎大学医学部内科学講座消化器血液学分野・教授

1) はじめに：ウイルス糖尿病について

ウイルスによる糖尿病は日本糖尿病学会の分類では二次性糖尿病の「その他の疾患、条件にともなうものの」(5)感染症に分類されている。

すなわち、風疹ウイルス(先天性風疹)、サイトメガロウイルス、Epstein-Barrウイルス、コクサッキーウイルス、オタフクカゼウイルスなどが糖尿病の原因となりうると認識されている。なかでも、先天性風疹児に併発する糖尿病は、ウイルス原因説の有力な根拠である。一方、1型糖尿病では、自己免疫で発症するタイプAと特発性と称するタイプB分類に分類されているが、タイプBの原因の主な候補として、ウイルスが挙げられる。1型糖尿病の約20%、そのサブタイプである急激な発症様式を示す劇症1型糖尿病患者では約70%の症例に、発熱、上気道炎など風邪症状を伴うことから、いわゆる風邪ウイルスが1型糖尿病発症の原因であることが疑われている。さらに、これまで、多くの糖尿病誘発候補ウイルスに関する研究で、ヒトで糖尿病発症時に感染が認められ、膵島にウイルスが存在することが、繰り返し証明されている。また、実験研究では、脳心筋炎(EMC)ウイルスを用いて、糖尿病誘発性の高い変異株(EMC-D)ウイルスの特性、感染防御、膵島細胞傷害のメカニズムなど、多くの基礎的研究の知見が蓄積されている。このように多くの

臨床的あるいは基礎的研究からウイルスが糖尿病発症の原因であることが強く示唆されるが決定的な証拠は乏しい。その理由は、病原体としての古典的な証明法であるヘンレ・コッホの四原則を満たすような、ウイルスによる糖尿病誘発性の適切な検定システムが欠如しているためである。ウイルス感染症による膵島障害と糖尿病発症メカニズムの全貌を明らかにするためには、ウイルスと宿主要因いずれをも明らかにするための総合的なアプローチが必要である。

ウイルス感染が糖尿病の発症にかかわる可能性は長年にわたり論議的であったが、特に、近年、膵島細胞が高度に破壊されるインスリン依存(1型)糖尿病に、しばしば発熱、上気道炎症状などの感染徴候が先行することから、何らかのウイルスが糖尿病発症に関わるのではないかと再び注目されている。しかしながら、これまで、糖尿病のウイルス原因説に関して数多くの臨床的あるいは実験的な知見が積み重ねられているが、直接の証拠は乏しいのが実情である。これまでの臨床的あるいは実験研究で積み重ねられてきたウイルス糖尿病に関する知見を整理するとともに、ウイルス感染防御に関る、近年、著しい進歩を遂げている生体防御システムに関する最新の知見についても概説する。

2) 1型糖尿病の発症におけるウイルスの関与

膵島細胞が高度に破壊されインスリン分泌が枯渇する（空腹時血中CPR<1.0ng/ml）患者群を1型糖尿病として分類し、その原因は、約80%に膵島自己抗体（抗GAD抗体、抗IA-2抗体）が存在し、特定のHLAハプロタイプが感受性に関わることが明らかであることから、大部分は膵島細胞に対する自己免疫機序が原因であるとされている。一方、1型糖尿病の約20%、そのサブタイプである急激な発症様式を示す劇症1型糖尿病患者では、約70%の症例に発熱、上気道炎など風邪症状を伴うことから、ウイルス感染は単なる随伴病ではなく糖尿病発症の原因であることが疑われている。Notkinsらは、致死的なウイルス感染によって死亡した250例の小児の膵島を細胞病理学的に検索し、コクサッキーB群ウイルス感染7例中4例、サイトメガロウイルス感染45例中20例、重症水痘患者14例中2例、先天性風疹児45例中2例にそれぞれウイルス抗原を検出している。このことは、重症のウイルス感染では、少なくとも一部は膵島でもウイルスが増殖し、ヒト膵島β細胞を障害することを示唆する知見である。しかしながら患者から分離されたウイルスが実験動物に糖尿病を誘発できた報告はきわめて稀であり、1型糖尿病発症ウイルス原因説がなかなか確定できない。

ヒトの1型糖尿病に関連するウイルスとしては、コクサッキーB群ウイルス、

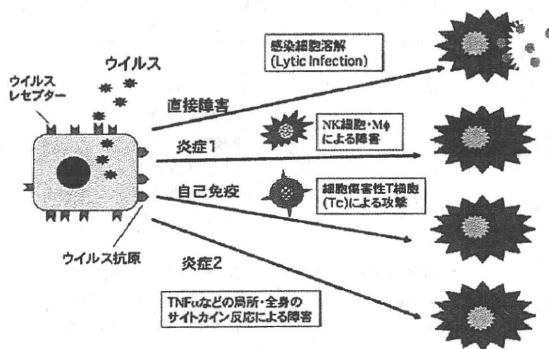
風疹ウイルス、ムンプスウイルス、サイトメガロウイルス、Epstein-Barr (EB)ウイルス、水痘帯状ウイルス、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV6)、レトロウイルス、ロタウイルスなどがあげられる。動物では、脳心筋炎(EMC)ウイルス、コクサッキーB4ウイルス、mengoウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、など、多くのウイルスが実験的糖尿病を誘発できることが知られている(表)。

ヒトおよび動物における糖尿病関連ウイルスのリスト

ヒト	
RNAウイルス	コクサッキーB群ウイルス A型肝炎ウイルス 風疹ウイルス ムンプスウイルス ロタウイルス レトロウイルス
DNAウイルス	サイトメガロウイルス(CMV) エプスタインバーウイルス(EBV) ヒトヘルペスウイルス6 (HHV6)
動物	
RNAウイルス	コクサッキーB群ウイルス 脳心筋炎(EMC)ウイルス Mengoウイルス レオウイルス レトロウイルス 風疹ウイルス
DNAウイルス	Kilhamラットウイルス サイトメガロウイルス(CMV)

一方、lymphocytic choriomeningitis (LCM) virus や mouse hepatitis virus (MHV) は自己免疫糖尿病モデル動物 (BBラット、NODマウス) の糖尿病発症を、おそらく免疫寛容誘導のメカニズムにより、抑制する。

ウイルスによる1型糖尿病の発症メカニズムには膵島細胞障害をもたらす4つのタイプが想定できる。第一は細胞溶解性ウイルスによる膵島細胞の直接破壊であり、第二はウイルス感染に伴う炎症性細胞（活性化マクロファージ、NK細胞）による組織傷害、第三にウイルス感染後に誘導される特異的自己免疫による膵島細胞障害、第四は局所あるいは全身の炎症・サイトカイン反応に伴う膵島細胞のアポトーシス誘導である（図）。

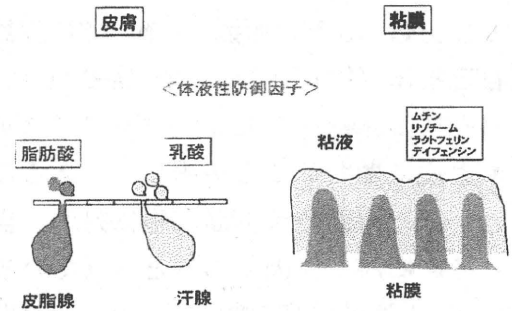


ただし、糖尿病発症には膵島細胞が80%以上障害されることが必要なので、障害のレベルが軽度であれば臨床的に糖尿病とは診断できないことも留意すべきである。

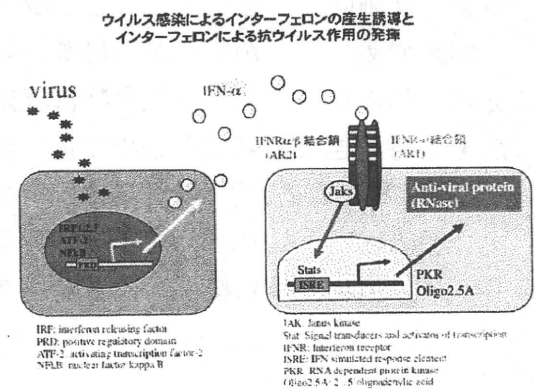
### 3) ウイルスに対する感染防御システム

生体は、病原体の感染に対する第一線の物理的・化学的防御、自然免疫、獲得免疫と、病原体の侵入レベルに対応する連続的な防御システムを構築している。ウイルス感染に抵抗性に関する第一線の防御はいわゆる物理的、化学的障壁である皮膚粘膜である。洗浄作用のある物理的なバリアであるのみでなく、汗や粘液中には、それぞれ乳酸や脂肪酸、ム

チン、リゾチーム、ラクトフェリン、デیفエンシンなどが含まれ、洗浄作用のみならず抗ウイルス作用を発揮する（図）。



次に、自然免疫と称される、食食、インターフェロンなどによるウイルス増殖抑制が挙げられる。細胞がウイルス感染を受けると、細胞内ウイルス受容体によって認識され、その刺激によって誘導される Interferon releasing factor によって活発に遺伝子が発現し、インターフェロンが産生され、細胞外に放出される。遊離したインターフェロンは、インターフェロンレセプターに結合し、その刺激により JAK-Stat 経路を介して RNase などの抗ウイルス因子が産生されることによって抗ウイルス活性が発揮される（図）。

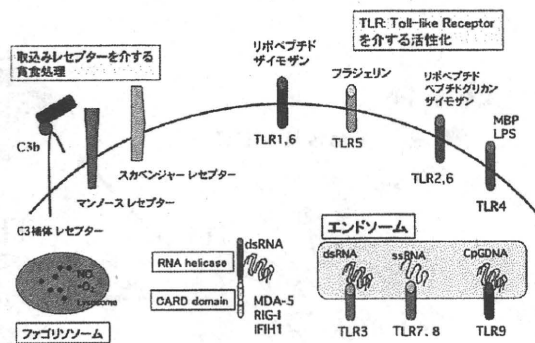




一方、C型肝炎のインターフェロン治療中に脾臓細胞に自己免疫が誘導され(脾臓細胞自己抗体)ることにより1型糖尿病が発症することもよく知られていて、免疫応答の2面性、すなわち、生体を守ることと、むしろ障害に傾くこともありうる事が理解できる。

近年の免疫学の進歩は、非特異的な補体や貪食に関するレセプターなど特異性の乏しい自然免疫から、特異性の高い獲得免疫への橋渡しの生体防御メカニズムとして、病原体をパターンで認識する(PRR)システムが明らかしてきた。その代表は、Toll-like receptor (TLR)である。1996年、ショウジョウバエの研究で、Toll受容体を欠損させると真菌感染に感受性が高まる事が報告され、ほ乳類にもそのホモログがあることが明らかとなって来た。これまでに、11種のメンバ (Toll-like receptor:TLR)が同定され、それぞれ病原微生物の構成成分を認識するPRRであることが明らかになっている。このうち、ウイルスレセプターは細胞表面のみならず細胞内にも存在しているTLR3、7、8、9であり、それぞれウイルスの二本鎖(ds)RNA、一本鎖(ss)RNA、sRNA、CpGDNAを認識する。なお、TLR4は、respiratory syncytial virus (RSV)のfusion proteinと結合することがわかっている。そのほか、CARD(caspase-recruitment domain)とRNA helicaseの構造を有する細胞内ウイルスレセプターであるretinoic-acid inducible gene-1:RIG-、melanoma differentiation-associated

マクロファージ・樹状細胞の病原体認識機構(レセプター)

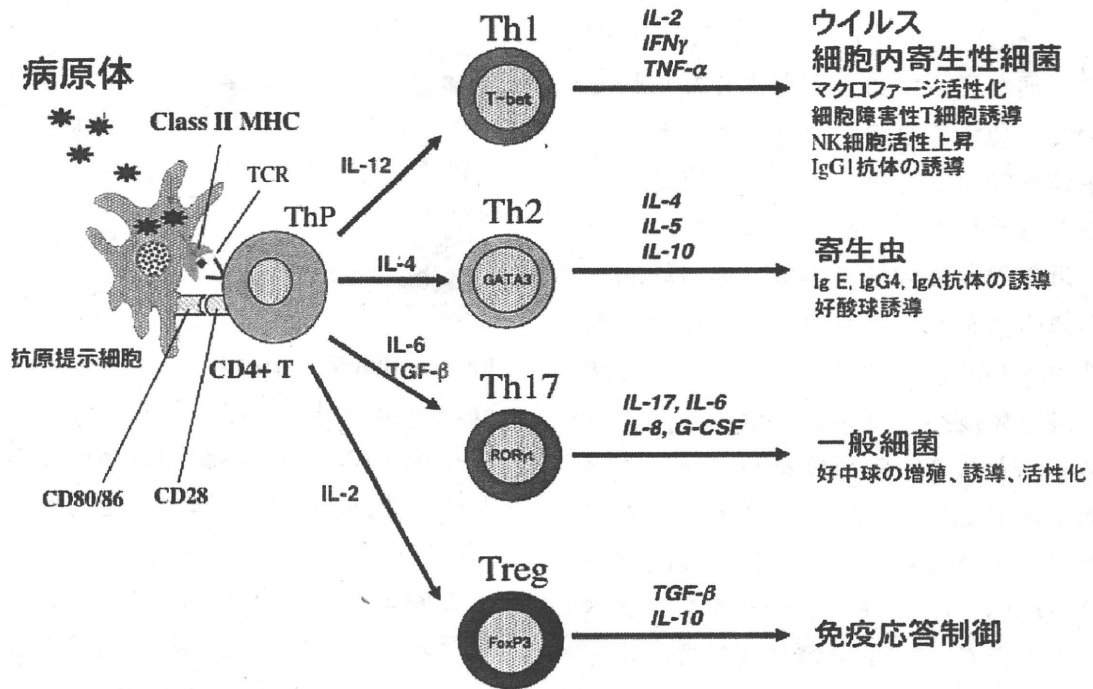


gene 5:MDA-5、interferon induced with helicase C, domain 1:IFIH1、などは、ウイルス由来の二本鎖(ds)RNAを認識して、I型インターフェロンを誘導する(図)。

このように病原体のパターン認識システム:PRRは、自然免疫を誘導するのみでなく、その病原体の排除に働くべき特異免疫の誘導にも関わっている。なお、自然免疫に属するナチュラルキラー(NK)細胞は、細胞表面のClass I主要適合性抗原(MHC)を認識し、抑制的キラー活性を示す。すなわち、ウイルス感染を受けて弱った細胞ではClass I MHCの発現が低下するため、NK細胞による標的細胞障害が誘導され排除される。

特異性の高い獲得免疫は、T細胞の特異性とその機能により発揮される。T細胞はそのレセプター(TCR)抗原提示細胞(樹状細胞やマクロファージ)がClass II MHC上に提示した抗原ペプチドと結合し、抗原提示細胞表面の副刺激分子であるCD80/86とT細胞のCD28を介する共刺激により特異的に活性化される。現在、T細胞が司る免疫応答には、Th1、Th2、Th17、Tregの4種類が

# 末梢免疫生体防御システム



知られている。(1) Th1 反応は IL-12 によって誘導される転写因子 T-bet の作用により T 細胞から IL-2, Interferon g (IFN-g), tumor necrosis factor a (TNF- a) が分泌され、活性化マクロファージや細胞障害性 T 細胞などの細胞性免疫と、主要な IgG 抗体を誘導する。(2) Th2 反応は IL-4 によって誘導される転写因子 GATA3 の働きにより T 細胞から IL-4、IL-5、IL-10、などが分泌され IgE 抗体や好酸球を誘導し、寄生虫の防御に働くと考えられている。(3) 最近明らかにされてきた Th17 反応は、IL-6 と tumor growth factor b (TGF-b) によって誘導される転写因子 RORgt によって、IL-17 が産生され、さらに IL-6、IL-8、granulo-colony stimulating factor (G-CSF) などの作用によって炎症を惹

起し、好中球を動員し、細胞外一般細菌感染防御に働くことが明らかになってきた。また、(4) IL-2 によって誘導される転写因子 FoxP3 によって TGF-b が産生され制御性 T 細胞 (Treg) が末梢での免疫応答制御に重要であることが明らかになってきた (図)。ウイルス感染に対する防御は、PRR がウイルス核酸を認識し、インターフェロンが誘導されたり、樹状細胞がウイルス抗原を処理して T 細胞に提示することにより、Th1 タイプの免疫応答が惹起されることが主体として担われているものと考えられる。図 5 に、病原体の皮膚からの侵入と病原体の認識、局所リンパ節における特異的免疫反応の誘導と増幅、活性化 T 細胞の感染局所への到達とマクロファージの活性化による病原体の除去反応を図式的に示した。

#### 4) エンテロウイルス感染症と糖尿病

糖尿病発症に関与する可能性のあるウイルスとしてエンテロウイルスのなかでもコクサッキーB群ウイルスと echoウイルスがよく知られている。疫学的あるいは免疫学的検査で、1型糖尿病とエンテロウイルス感染症との関連が報告されている。エンテロウイルス、とくに B4 血清タイプに対する IgM 抗体が対照群に比べて、患者群で上昇している。また、コクサッキーB4ウイルスに対する非構造蛋白に対する T 細胞の反応が発症早期の患者群で高い。一方、小児 1 型糖尿病患者では、コクサッキーB4ウイルスに対する Th1 タイプの免疫応答、すなわちウイルス刺激を受けた末梢単核球のインターフェロンの産生や T-bet 遺伝子発現が低下していることが報告されている。さらにいくつかの報告では 1 型糖尿病発症急性期にエンテロウイルス RNA が検出された。しかしながら、健常群と 1 型糖尿病患者でのコクサッキーB群ウイルス感染抗体価には差がないとする報告や、むしろ患者群で抗体価が低いとする報告もあり、解釈は困難である。コクサッキーB4ウイルスにも血清学的には区別できない variant の存在が知られており、それぞれのウイルスサブタイプのウイルス感染を受けたさまざまな宿主反応を、それぞれの研究者が観察しているための多様な結果であることも考えられる。一方、1 型糖尿病患者から分離したコクサッキーウイルスが実験動物の糖尿病を発症したとする報告は稀である。ケトアシドーシス

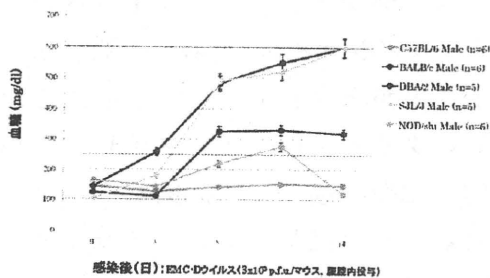
で死亡した小児から分離されたコクサッキーB4ウイルスバリエントが、SJL/Jマウスで糖尿病を誘発したとされている。最近、劇症のコクサッキーウイルス感染で死亡した新生児の膵島細胞にエンテロウイルス抗原が出現していること、外分泌細胞にはウイルス抗原は認められないこと、さらに、ヒト培養膵島細胞にエンテロウイルスの受容体として機能するポリオウイルスレセプターやインテグリン  $\alpha V\beta_3$  が発現していることが示されている。このことからコクサッキーウイルスがヒト膵島細胞に比較的選択的に感染しうると考えられる。ただしヒトコクサッキーウイルスアデノウイルスレセプター (CAR) と 1 型糖尿病感受性との関連の報告はなく、ウイルスレセプターがヒト 1 型糖尿病の感受性、発症制御に関与しているかどうかは不明である。このように多くの臨床的な知見の蓄積にもかかわらず、エンテロウイルス感染による 1 型糖尿病発症メカニズムの全貌は解明されていない。

## 5) 実験的ウイルス糖尿病の発症機構

### (i) ウイルスおよび宿主の糖尿病誘発性の遺伝的決定因子

コクサッキーB4ウイルスは感受性の実験動物に糖尿病を誘発するわけではないが、感受性マウス(SJL/J)のマウス膵島細胞で継代を続けることで糖尿

ウイルス感染に対するマウスの系統差



病誘発性を獲得することが知られている。一方、糖尿病誘発性マウス脳心筋炎(EMC)ウイルスのM variantを、さらにクローニングし、特定のマウス系統に糖尿病誘発性の高いEMC-Dウイルスと、誘発しないEMC-Bが分離された。マウスの系統としては、SJL/J、DBA/2が感受性で、Balb/C、NODが中等度、C57BL/6は抵抗性である(図)。このマウスの感受性には性差もあり、糖尿病発症の感受性は、オスの方が高く、膵島細胞の障害が著しい。マウスの系統依存性の感受性の差については、単一の遺伝子であると報告されているが、感受性を決定する遺伝子は同定されていない。恐らく、ウイルスレセプターの発現を制御している遺伝子ではないかと推測されている。

なお、ウイルス糖尿病高誘発性のEMC-Dウイルスと、誘発しないEMC-Bウイル

スの遺伝子配列研究により、それぞれの株間は14核酸の違いしかないと示された。さらに、遺伝子改変ウイルスを用いた検討により、誘発性を決定しているのは、ウイルスカプシド(VP1)の776番目のアミノ酸がアラニンであること(Thr776Ala)が重要であることが明らかとなった。この部位はウイルスの膵島細胞への接着に重要であることから、ウイルスとウイルスレセプターの関係が、少なくとも一部は、ウイルス糖尿病の誘発を制御していると考えられる。

一方、エンテロウイルス感染症の病態について、ポリオウイルス研究が進展し、ポリオウイルスの組織特異的神経細胞障害メカニズムが解明された。すなわち、ウイルスレセプターの発現、ウイルス蛋白質の翻訳開始機構(Internal Ribosome Entry Site(IRES))による組織選択的翻訳活性、神経細胞におけるインターフェロン誘導能の低さによるウイルス感受性亢進の機序で、その発症機構の大意が説明できる。

しかしながら、エンテロウイルスは、神経皮膚向性とされるコクサッキーA群ウイルス、臓器障害をきたすコクサッキーB群ウイルス、また、エンテロウイルス70は出血性結膜炎をきたすなど、その臨床像は多彩であり、それぞれの発症メカニズムはさらに多様であることが推測される。

### (ii) 実験的ウイルス糖尿病発症の制御機構

ウイルス糖尿病については EMC ウイル

スを用いた研究がもっとも広く行われている。感受性の SJL/J マウスでは、オスでは急激に糖尿病を発症し、死に至るものの、メスでは一旦糖尿病を発症するもののその後は回復する。また、比較的大量( $10^5$ PFU/mouse)のウイルス量の投与により、3日以内の早期に発症するのに対し、少量( $<10^2$ PFU/mouse)のウイルス投与では、マクロファージの活性化が膵島細胞障害の働くことが知られている。一方、われわれは、マクロファージ賦活剤である *Corynebacterium Parvum* を前投与することにより、ウイルス糖尿病発症を完全に阻止できることを明らかにした。T細胞欠損マウス、B細胞欠損マウス、T細胞もB細胞も欠損する Rag-2 ノックアウトマウスいずれも糖尿病発症に影響なく、また、中和抗体の投与は感染後36時間以内の早期移入した場合のみで有効であるので、自然免疫の働きがその防御に重要であると考えている。興味深いことに、トランスジェニックマウスを用いた研究で、膵島細胞特異的にサイトカイン抑制分子を発現したマウスではウイルス増殖が促進されNK細胞による膵島細胞障害が進行し、糖尿病に対する感受性が亢進することが示された。すなわち、膵島細胞におけるサイトカイン防御反応が重要であることが示唆されたが、果たして自然感染でもこのメカニズムが働いているのか、さらに検討が必要であろう。

## 6) まとめ

さまざまな臨床的知見、実験研究の成果から、エンテロウイルス感染がヒトにおける糖尿病の発症に関わっていることが強く示唆されている。しかしながら、ウイルス側の要因、宿主側の感受性因子についての決定的な証拠は乏しい。ウイルス感染による糖尿病として発症するかどうかの要因として、ウイルスの臓器親和性、感染のレベル(重症度)、宿主の自然免疫、獲得免疫の質と速度、応答のレベル、さらには膵島細胞の障害感受性など、多くの要素が関与すると考えられ、高度に複雑な発症機構であることが推測される。

現時点では、ウイルスが糖尿病発症の原因であることを証明するために必要なウイルスの糖尿病誘発性を検定できるシステムがないことが問題であると考える。一方、ウイルスの病原性検定システムの開発には、宿主要因の解明が進まなければならない。ウイルス感染症による膵島障害と糖尿病発症メカニズムの全貌を明らかにするためには、ウイルスと宿主要因いずれをも明らかにするための総合的なアプローチが必要であり、今回の研究計画の立案に繋がった。

## (1) INFRRG ノックアウトマウスに関する研究

### A. 研究目的

ヒト劇症1型糖尿病のウイルス原因説を解明する目的で、まず、ウイルス糖尿病の感受性要因を明らかにし、さらにウイルス側の糖尿病誘発性検定システムを開発することを目指す。エンテロウイルス感染による糖尿病を念頭にマウス実験的脳心筋炎ウイルス誘発糖尿病モデルの系で、マウスの感受性を明らかにし、ヒトのウイルス糖尿病感受性遺伝子探索へ展開する。

具体的には、インターフェロン受容体関連シグナル分子であるINFRRG(interferon receptor related gene)ノックアウトマウスによる糖尿病誘発性を明らかにし、そのメカニズムを検討する。ヒトにおいては、INFRRG遺伝子多型と劇症1型糖尿病、1型糖尿病、健常対照を対象にまず、エキソン部位、さらにプロモーター部位の多型解析へ展開する。本項では、INFRRGノックアウトマウスにおける検討と、ヒトINFRRGエキソン部の多型解析について、これまでの研究成果を報告する。

### B. 研究方法

(1) INFRRGノックアウトマウスにおける検討

(2)

#### マウス

総合研究棟 8F・九州大学生体防御医学研究所感染実験室(コンベンショナル施設)で飼育維持した。C57BL/6Jマウスは日本チャールス・リバーより購入した。Tyk2<sup>+/-</sup>マウスは下田和哉先生より分与

を受け、C57BL/6Jマウスに8代の戻し交配を行った。Rag2 KOマウスおよびTyk2 Rag2 double KOマウスは現在作成中である。すべて6週齢以上のオスとし、C57BL/6Jマウスの遺伝背景を有するTyk2 WTマウス(野生型対照)15個体、Tyk2 KOマウス(N8)20個体の計35個体を用いた。

#### マウス tail からの DNA 精製

DNA精製はフェノール/クロロホルム法により行った。Tail 1sampleあたりにPremix 380  $\mu$ l, pk 20  $\mu$ lを入れ、55°Cの孵卵器で一晩溶解した。フェノール400  $\mu$ lを加えローターで1hr転倒混和後、遠心(15000rpm, 5min)した。上清にフェノール400  $\mu$ lを加え、再度転倒混和と遠心を行った。上清にフェノール200  $\mu$ lとクロロホルム200  $\mu$ lを加えローターで30min転倒混和、遠心(15000rpm, 4°C, 5min)を行い、続いて上清にクロロホルム400  $\mu$ lを加えローターで5min転倒混和後、遠心(15000rpm, 4°C, 5min)した。上清250  $\mu$ lに100%エタノール650  $\mu$ lを加えて転倒混和すると、凝集したDNAがペレットとして認められた。これを遠心(15000rpm, 4°C, 5min)し、上清を捨て70%エタノール1000  $\mu$ lを加えて転倒混和後、遠心(15000rpm, 4°C, 5min)した。上清を取り除きエタノールを蒸発させた後、TE 50  $\mu$ lを入れ4°Cで保存した。

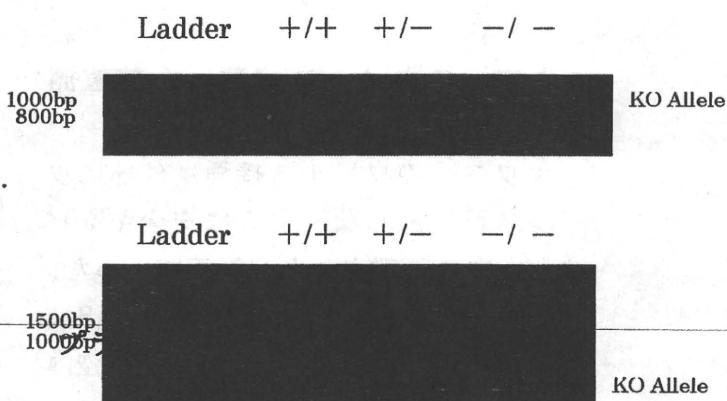
#### PCR・電気泳動

INFRRG および Rag2 について各遺伝子変異マウスの遺伝子型の検定を行った。

IFNRRG は 1sample あたり 10×PCR Buffer (-Mg) (TaKaRa) 2.0 μl, 2.5mM dNTP Mix (TaKaRa) 2.0 μl, 25mM MgCl<sub>2</sub> (TaKaRa) 1.6 μl, 10 μM Primer g IFNRRG -F6 (sense) : 5' -TGG AGA AAA TGG AGT GAG TGT AAG-3' (gnet) 1.0 μl, 10 μM Primer NeoR-F1 (sense) : 5' -ATT CGG CTA TGA CTG GGC ACA ACA-3' (gnet) 1.0 μl, 10 μM Primer gTyk2-R4 (anti-sense) : 5' -CTG GGT CAT GGC TGG AAA AGC CCA-3' (gnet) 1.0 μl, rTaq (TaKaRa) 0.5 μl, dW 9.9 μl を加えた Mix を作製した. Mix をチューブに分注し, Template 1.0 μl を加えた. PCR サイクルは 94°C 10min でホットスタートし, 熱変性 94°C 1min, アニーリング 62°C 1min, 伸張反応 72°C 2min を 30cycles 行い, 72°C 16min, 4°C で保存した. Rag2 は primer を分け, allele 別に PCR と電気泳動を行った. 1sample あたり 10×PCR Buffer (-Mg) (TaKaRa) 2.5 μl, 2.5mM dNTP Mix (TaKaRa) 2.5 μl, 25mM MgCl<sub>2</sub> (TaKaRa) 2.0 μl, DMSO 2.0 μl, 10 μM Primer RAG2-1 (sense) : 5' -TTA ATT CAA CCA GGC TTC TCA CTT-3' (gnet) 0.5 μl または 10 μM Primer Neo3' (sense) : 5' -CCA ACG CTA TGT CCT GAT AGC GGT-3' (gnet) 0.5 μl, 10 μM Primer RAG2-2 (anti-sense) : 5' -GCC TGC TTA TTG TCT CCT GGT ATG-3' (gnet) 0.5 μl, rTaq (TaKaRa) 0.2 μl, dW 13.8 μl を加えた Mix を作製した. Mix をチューブに分注し, Template 1.0 μl を加えた. PCR サイクルは 95°C 9min でホットスタートし, 熱変性 94°C 1min, アニーリング 60°C 1min, 伸張反応 72°C 1min を 35cycles 行い, 72°C 5min, 4°C で保存した.

電気泳動は 2% アガロースゲルを用い, 100V 30min, EtBr 20min 行った. 電気泳動の際, 5×Loading Dye (QIAGEN), 100bp Ladder (SIGMA), 1kbp Ladder (SIGMA) を用いた. 電気泳動像を示した (Fig. 1, Fig. 2). IFNRRG は WT 810bp, KO 1100bp, Rag2 は WT 1000bp, KO 1200bp である.

#### IFNRRG 電気泳動像



#### ウイルス定量

ウイルスは, ピコルナウイルス科の一種で特定のマウス系統に高い糖尿病誘発性を示す脳心筋炎ウイルス亜種 D 株 (encephalomyocarditis virus D variant: EMCV-D) を用いた. このウイルスはカナダ・カルガリー大学の故 Yoon JW 博士, 米国・NIH の Notkins 博士より分与いただいた. -80°C 凍結保存されたウイルスを解凍し, ウイルス原液を 4°C 滅菌済み PBS で連続希釈し 10<sup>-1</sup>~10<sup>-7</sup> の希釈系列を作製した. あらかじめコンフルエント (1.0×10<sup>6</sup>~2.0×10<sup>6</sup> cells/35mm dish) にした EF (マウス胚線維芽細胞) を 37°C 滅菌済み PBS で 1 回洗浄し, 1dish あたりウイルス希釈液 100 μl を接種した. 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で 2hr 培養した後, 2%メチルセル

コース加 DMEM (+2%FBS+1%PcSM) 2ml を重層し, 同条件下で 48hr 培養した. 培養後, 0.4%ニュートラルレッド加 DMEM (+2%FBS+1%PcSM) 2ml を加え, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で 2hr 培養した. 最後に, 重層物を取り除き, 肉眼でプラークを数え, 以下に示した算定式により感染価を求めた.

$$\text{感染価 (pfu/ml)} = \text{平均プラーク数} \times \text{ウイルス希釈液接種量} (\mu\text{l}) \times 10^3$$

#### マウスへのウイルス接種・血糖値測定・膵臓摘出

マウスへのウイルス接種は外部にウイルスが拡散しないように安全キャビネット内の隔離された状況下で行った. マウス 1 個体あたりにウイルス希釈液 0.2ml (感染価:  $1.0 \times 10^3$  pfu) を腹腔内接種した. 接種にはマイジェクター 29G (テルモ) を用いた.

血糖値測定はグルテスト PRO R (三和化学研究所) とグルテストセンサー (三和化学研究所) を用い, マウス尾静脈から採血し, 非絶食条件下における随時血糖値を 2 回測定した. 血糖値測定はウイルス接種前 day 0 とウイルス接種後 day 3, 5, 7, 10 に行い, 随時血糖値が 250mg/dl を超える個体を糖尿病と判定した.

膵臓摘出はマウス安楽死後, 解剖により速やかに膵尾部を摘出した.

#### 包埋・薄切

摘出したマウス膵臓を 10%ホルマリンにて固定 (24hr 以上) し, 1hr 流水洗した. その後, 切り出しを行い, 70%エタノールで置換後, パラフィン浸透を本学医学部病理学教室 (第二) 標本作製室に

依頼した.

依頼した臓器をパラフィン包埋し, シャンツェ型マイクロトームを用いて 2~5  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切した後, 伸展器で標本をスライドガラスに固定した. その後, 水切りと乾燥を行った.

#### HE 染色

脱パラフィンを 100%キシレン (4min) で 3 回行った. その後, 100%エタノール (3min) に 2 回, 75%エタノール (3min) に 1 回浸して固定し, 3min 流水洗を行った. 核染色としてヘマトキシリンに 40sec 浸し, 15min 流水洗した. 対比染色としてエオジンに 5sec 浸した. 脱水は 95%エタノールで 1 回と 100%エタノールで 2 回, 透徹は 100%キシレンで 3 回馴染む程度行った. 最後にマリノールを用いて封入した.

#### (2) ヒト INFRRG エキソン部の多型解析

##### DNA 抽出

全血から DNA を抽出する. DNA 抽出の流れは以下のとおり.

- ① 1.5ml マイクロチューブに EDB を 30  $\mu\text{l}$ , 全血を 200  $\mu\text{l}$ , LDB を 250  $\mu\text{l}$  分注する.
- ② Vortex MIX で 15 秒混和し, 軽く遠心する.
- ③ 56°C 2 分間加温する.
- ④ 99.9%エタノールを 250  $\mu\text{l}$  加える.
- ⑤ Vortex MIX で 15 秒混和し, 軽く遠心する.
- ⑥ 自動核酸抽出システム QuickGene-800 (FUJIFILM 社製) 上のカー



トリッジへ 全量添加し稼動させて DNA の抽出が完了する.

⑦抽出した DNA は 260nm で吸光度を測定し, 濃度を算出して 100ng/ $\mu$ l に調整する.

**PCR**

Exon ごとに異なるプロトコルを用いて

増幅する.

①

Ex. 1. 3. 4. 5. 6. 7. 9. 10. 12. 14. 15. 16. 17. 2

0. 21

以下のように試薬を混合する.

表各試薬の混合量

試薬	$\mu$ l
10 $\times$ buffer	5
2mM dNTP	5
25mM MgSO	1.2
DMSO	1
H <sub>2</sub> O	31.8
KOD (1.0U/1)	1
DNA	2
Primer L	1.5
Primer R	1.5
Total	50

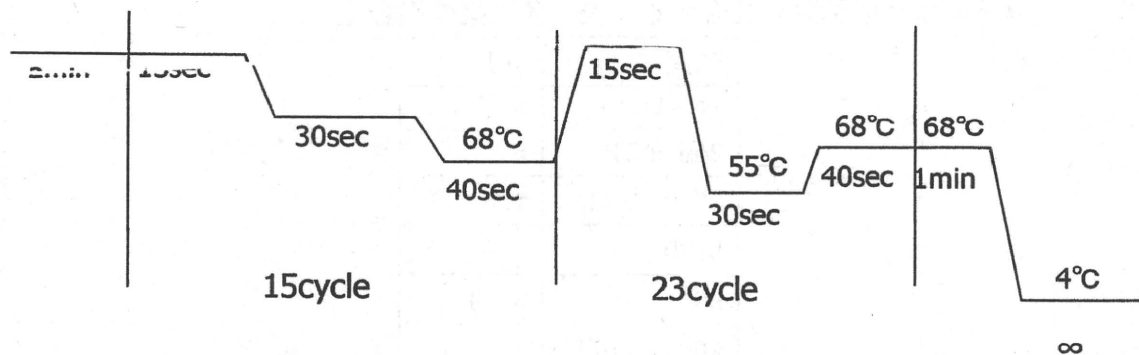


表 各試薬の混合量

試薬	$\mu$ l
10×buffer	5
2mM dNTP	5
25mM MgSO	1.2
DMSO	1
H <sub>2</sub> O	31.8
KOD (1.0U/l)	1
DNA	2
Primer L	1.5
Primer R	1.5
Total	50

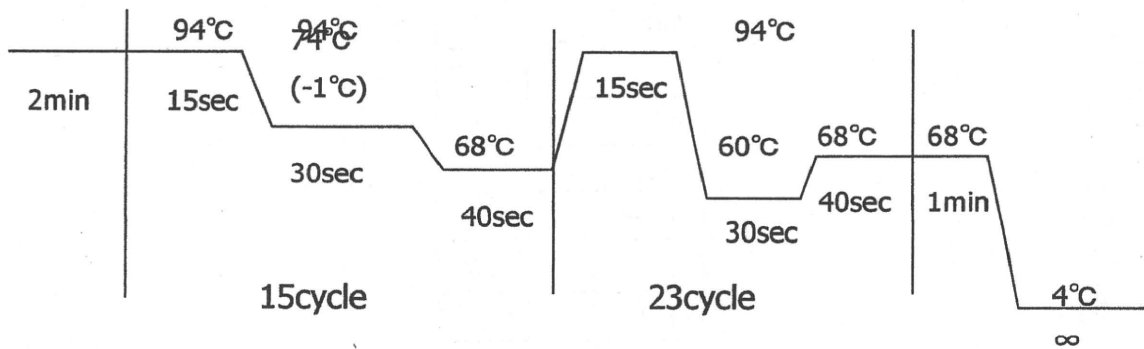


図 ステップダウン PCR 法のサイクル

②Ex. 13. 22. 23

以下のように試薬を混合する。表 各試薬の混合量

試薬	$\mu$ l
10×buffer	5
2mM dNTP	5
25mM MgSO	1.6
DMSO	1
H <sub>2</sub> O	31.4
KOD (1.0U/l)	1
DNA	2
Primer L	1.5
Primer R	1.5
Total	50

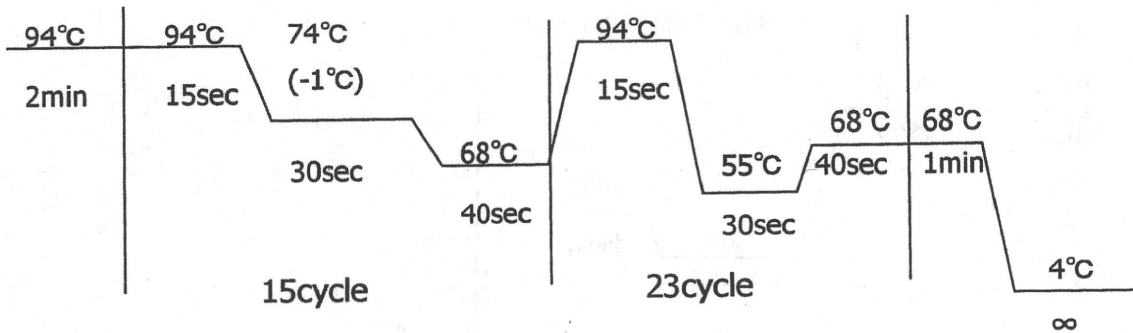


図 ステップダウン PCR 法のサイクル

③Ex. 2. 8. 11. 18. 19

以下のように試薬を混合する.

94°C      94°C      74°C                      94°C

図 ステップダウン PCR 法の(±1°C)クル

ターゲットとしている DNA が正しく増幅されているかを 2%アガロースゲル電気泳動で確認する.

### サンプル調整・精製

- ① 1.5ml マイクロチューブに PCR product を 40  $\mu$ l, Buffer PB を 200  $\mu$ l 分注する.
- ② 全量カラムへうつし 12,000rpm60 秒遠心する.
- ③ カラムを通った Buffer を捨て, Buffer PE を 750  $\mu$ l 加え, 12,000rpm60 秒遠心する.
- ④ カラムを通った Buffer を捨て, 再び 12,000rpm60 秒遠心する.
- ⑤ 1.5ml マイクロチューブにカラムをセットし, Buffer EB を 30  $\mu$ l 分注し 60 秒静置したあと 12,000rpm60 秒遠心する.
- ⑥ 電気泳動を行い, 濃度を推定する.
- ⑦ 下記のように試薬を混合し, サンプル調整のための PCR を行う.

表 各試薬の混合量

試薬	$\mu$ l
DNA (10ng 分)	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	
5×buffer	2
1.6pM primer	1
Big Dye	2
Total	10

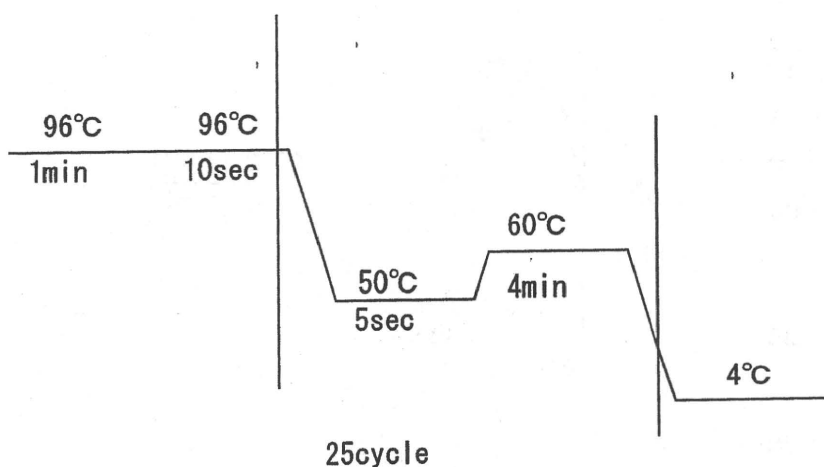


図 ステップダウン PCR 法のサイクル

⑧次に精製を行う。サンプル 10  $\mu$  l に H<sub>2</sub>O, 125mM EDTA 5  $\mu$  l, 100% エタノール 60  $\mu$  l を加えて遮光して 15 分静置する。

⑨4°C 15,000rpm で 20 分間遠心する。

⑩上清を除いて, 70%エタノールを 60  $\mu$  l 加えて 4°C 15,000rpm で 20 分間遠心する。

⑪上清を除き, 遮光して Dry up する。

教育支援センターに依頼し, ダイレクトシーケンスを行う。

## 塩基配列の解析

### 実験装置

- ・自動核酸抽出システム QuickGene-800
- ・TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Model No: TP600, Serial No: D5553)
- ・Mupid 2X Submarine electrophoresis system ADVANCE

### 使用試薬

#### DNA 抽出試薬

- ・EDB
- ・LDB
- ・99.9%エタノール

#### PCR 抽出試薬

- ・1.0U/l KOD-Plus
- ・25mM MgSO
- ・2mM dNTP
- ・DMSO