

• 10 × buffer

• 10 μ M Primer (gene net)

Ex1-L: GTGGGTGGAAGTTGAAGAG

Ex1-R: GTGGATAGACGGATGGATCG

Ex2-L: GGCTGACGGTAGCAAATGAC

Ex2-R: CTGGGGCTTAGCACAGAGTC

Ex3-L: GAAGCTGGTCTGACTCTGTGC

Ex3-R: GCCCCTAAGTCTCCACAA

Ex4-L: CTCTGGGCTAGAGAGGAACG

Ex4-R: GTCTACCCTGGCTCCAGAT

Ex5-L: ACCTGGCTAGTGTGCCTGTT

Ex5-R: TCAGAGGCTAGGGTCAAGGA

Ex6-L: GGAGGTATAAACGGGCATTG

Ex6-R: GGAAATAGCCGTCCACCAG

Ex7-L: GTAGGGGCTGGGCTAGGG

Ex7-R: CCCCTAGGGCTCACAGTCTA

Ex8-L: GGGTATGGGTCCAGAGTGG

Ex8-R: GCAGAGGTGGGAGCAGTAAG

Ex9-L: TACCGCCTGATCCTCACAGT

Ex9-R: GCAGGCATCAAGTCATGGAG

Ex10-L: GTGGGATGTGGCATCTCTCC

Ex10-R: TGAAAGTTAGCAGCTGATCTCC

Ex11-L: TGGGAGATCAGCTGCTAACTT

Ex11-R: GCCACCTCCTCCACAGAC

Ex12-L: GTGTGTCCGTGGAGGAGGT

Ex12-R: GAGGGTTGGGGTACAGATCA

Ex13-L: ATCCAGAGGGCAGAAGCAG

Ex13-R: AGGCTGGTCTCGAACTCCTG

Ex14-L: GTTGGCGTCTGTGCCTCT

Ex14-R: GCGAAAGGAGCAGGGGAAG

Ex15-L: CTTCCCCTGCTCCTTTTAC

Ex15-R: AGAAGGGATGCAGCTTTGAG

Ex16-L: CTCTGGGACTTGACTCTGC

Ex16-R: GCTTATGAATGCCACTGCAA

Ex17-L: TTTGTGACTCCCAAGTGTGG

Ex17-R: CTCAACCCCCAAACTCCTTC

Ex18-L: GGAGTGGTGCAGGGATTG

Ex18-R: TCTAACCACGCCCCCTCA

Ex19-L: CTCTGCTGGGCTCAAGGTAG

Ex19-R: CCCAAGCTGAAGAGGAAGG

Ex20-L: CTCCTGGCTGCTCAGGTC

Ex20-R: CTGGGATCATGCCCTATCAT

Ex21-L: GATCCCCAAGCCCTCAGT

Ex21-R: CCCAGCCTATGCCTTTCTAA

Ex23-L: GCTGGGATTACAGGCATGAG

Ex24-R: CCCTCTCCACAGCAGGATAG

Ex24-L: GACCCCACTATCCTGCTGTG

Ex25-R: CTCCCTCTGCAGCCACTG

サンプル調整・精製試薬

- Buffer PB
- Buffer PE
- Buffer EB
- 5×buffer
- 1.6pM Primer

配列は PCR 試薬の Primer と同じ.

- Big Dye

- 125mM EDTA
- 100% エタノール
- 70% エタノール

対象

対象とする検体として、ウイルス感染が先行して1型糖尿病を発症した19人の患者の血液検体を用いた。検体データは以下のとおりである。

表 対象とする1型糖尿病検体19例

患者No.	性別	先行するウイルス感染の有無	発症様式	備考
1	F	有	急性	
2	F	有	急性	
3	F	不明(発熱あり)	劇症	発症時に急性膵炎を合併
4	F	有	劇症	
5	M	有(インフルエンザ)		好酸球増多症
6	M	有	緩徐(?)	先行して発熱あり
7	F	有	急性	
8	F	有	劇症・急性	
9	F	有	劇症	
10	F	有	急性	
11	F	有	劇症	
12	F	有	急性	
13	F	有		
14	F	有	緩徐	
15	M	有(インフルエンザ)	急性	
16	M	有	劇症	
17	M	有(インフルエンザ)		
18	M	有	劇症	
19	M	有		DM判明半年前に風邪

## C. 研究結果

### (1) INFRRGノックアウトマウスにおける検討

#### ウイルス接種マウスの随時血糖値の推移

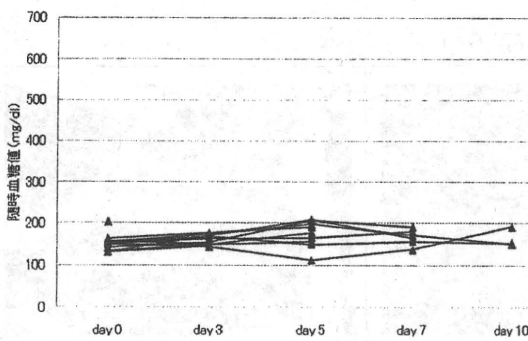
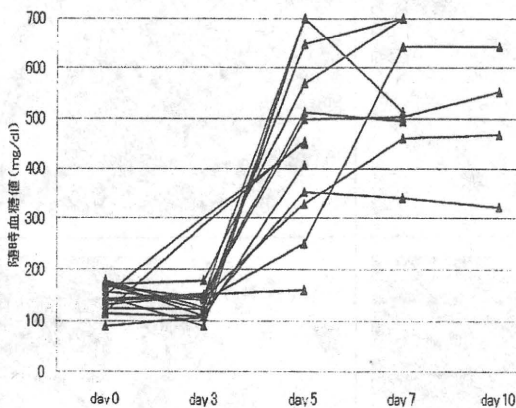


図. NFRRG WT (C57BL/6J) の随時血糖値の推移

図. INFRRG KO (C57BL/6J-N8) の随時血



糖値の推移

EMCV 接種した各遺伝子型マウスの随時血糖値の推移を個体別に示した (図). 非絶食条件下における随時血糖値を 2 回測定し, 平均値を算出した. 個体数は Tyk2 WT マウス (C57BL/6J): day 0 n=3, day 3 n=3, day 5 n=3, day 7 n=3, day 10 n=3 (total n=15), Tyk2 KO マウス (C57BL/6J-N8): day 0 n=3, day 3 n=3, day 5 n=6, day 7 n=4, day 10 n=4 (total n=20) である. 血糖値測定に用いたグルテスト PRO R (三和化学研究所) の測定上限値が 600mg/dl (600mg/dl 以上は”Hi” と表示) であったため, グラフでは 600mg/dl 以上として処理した. 図で示したように, 野生型対照の Tyk2 WT マウスでは EMCV 接種前 day 0 から EMCV 接種後 day 10 まで血糖値に変化は認められなかった. 一方, 図で示したように, Tyk2 KO マウスでは 14 個体中 13 個体で血糖値が著しく上昇し, 糖尿病を発症したうち 6 個体では, 測定機器の上限値を超える 600mg/dl 以上の超高血糖を示した. この高血糖状態は day 10 まで観察した 4 個体すべてで継続した. 以上の結果より, Tyk2 KO マウスはウイルス誘発糖尿病における感受性が高く, 遺伝子型により明らかな有意差があることが認められた.

#### ウイルス接種マウスの膵臓の病理組織学的検討

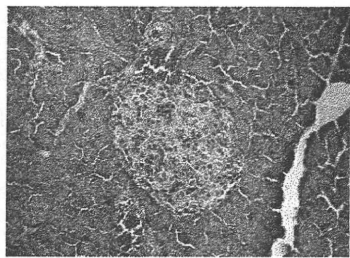
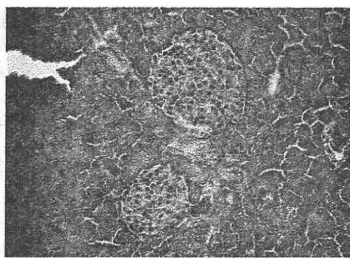
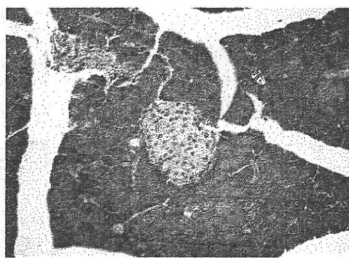
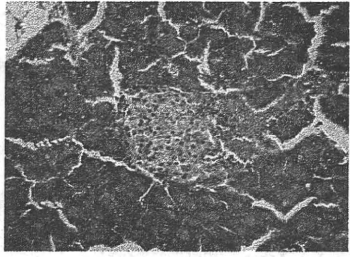
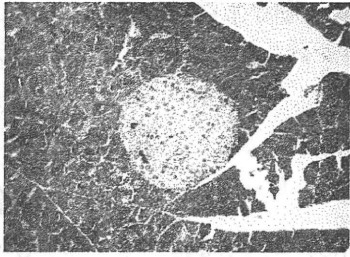
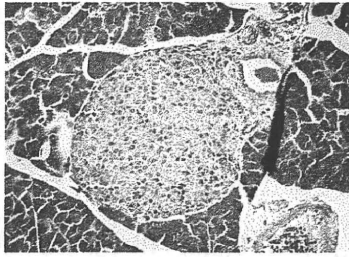
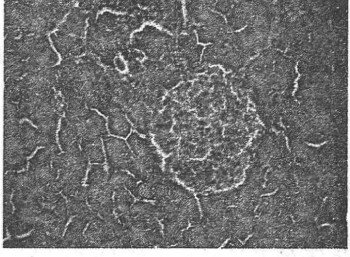
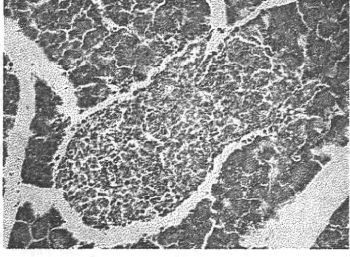
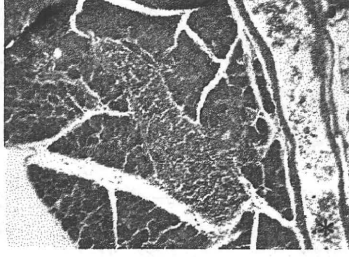
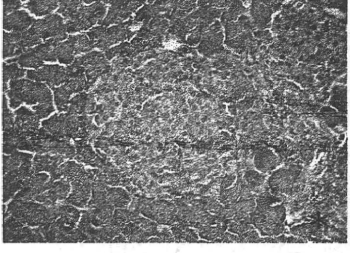
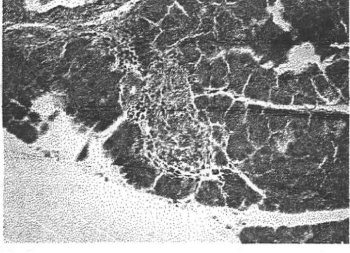
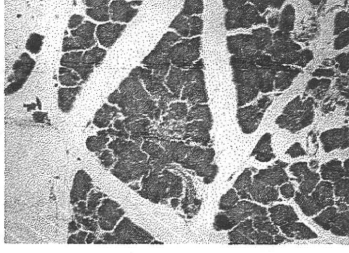
EMCV 接種した各遺伝子型マウス膵臓について, HE染色による経時的観察を行った (図). 各群のうち, WTマウスは膵島が

鮮明であり対照として適切な標本を選択し、膵島に障害を認めた標本を選択して提示した。また、炎症細胞は血管周囲に浸潤す

し、IFNRRG KOマウスは糖尿病を発症し、るため、血管周囲で膵島が観察できる標本を提示した。

図のように、WTマウスでは経時的に膵島障害は観察されなかった。一方、IFNRRG KOマウスではEMCV接種前day 0とEMCV接種後day 3に膵島障害や炎症細胞の浸潤は認め

られなかったものの、糖尿病を発症したday 5から膵島の変形・崩壊・萎縮が認められ、膵島数は減少し、炎症細胞浸潤も認められた。

	INFRRG WT (C57BL6/J)	INFRRG KO (C57BL6/J-N8)	
day 0			
day 3			
day 5			
day 7			

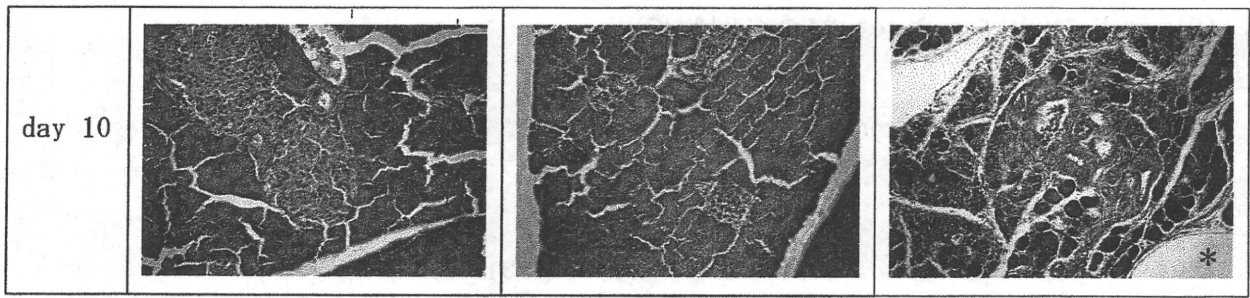
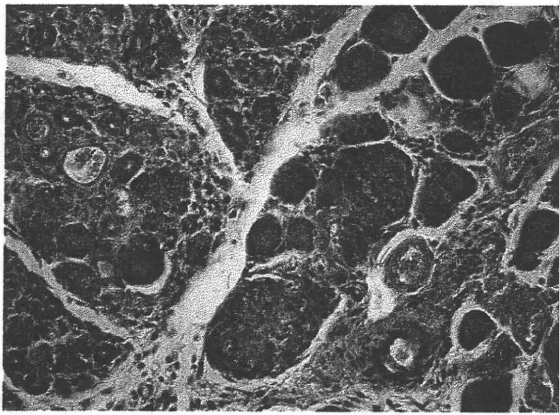


図. C57BL/6J T INFRRG WT&INFRRG KO 膵臓 HE 染色 ×200 (\* : ×100)



特にリンパ球の浸潤が進行していた day 10 を拡大した(左図). リンパ球数が著しく増加し, INFRRG KO マウスにおいて強い浸潤が認められた。

図. C57BL/6J INFRRG KO 膵臓 HE 染色 ×200

## (2) ヒト INFRRG エキソン部の多型解析

対象検体 19 例の 23 の Exon 塩基配列を解析した結果, 2 つの変異が見つかった.

① 14006C/T サイレント変異 ヘテロ 頻度 6/19 (31.6%)

C/T

↓

GAC NGAG

60

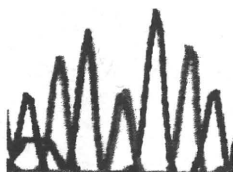


図 4006C/T

② 15560G>T V>F ミスセンス変異 ホモ 頻度 1/19 (5.3%)

G

↓

GG (ATTCGG)

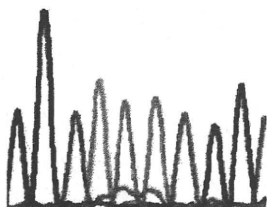


図 7 15560G>T V>F

③ 15560G/T V/F ミスセンス変異 ヘテロ 頻度 8/19(42.1%)

GCATTTCG  
105

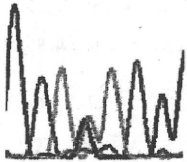


図 15560G/T V/F

それぞれの変異を以下の表にまとめた。なお、ヘテロは○ホモは◎で表示する。

表変異が認められた検体

塩基置換	14006C/T	15560G>T
アミノ酸変化	T	V>F
患者No.		
1	○	
2		
3	○	
4	○	
5	○	
6	○	
7		○
8		○
9		○
10		○
11		○
12		◎
13		○
14		
15		
16		○
17		
18		
19	○	○

#### D. 考察

本研究では、EMCDV を接種した INFRRG KO マウスが INFRRG WT マウスに比較して著しい高血糖状態を呈し、病理組織学的にリンパ球の浸潤による膵炎を認め、遺伝子型により明らかな有意差があることを示した。以上の結果より、INFRRG 遺伝子がウイルス誘発糖尿病における感受性に関わっていることを明らかにした。

ウイルス感染に対する免疫応答には自然免疫と獲得免疫（細胞性免疫）が関与している。自然免疫はマクロファージがウイルスを貪食、NK 細胞が感染細胞を非特異的に破壊することで、Tc 細胞の遅延型反応が活性化されるまでの期間、主要なウイルス防御機構として作用する。獲得免疫はウイルス感染細胞が MHC class I 分子を用いて Tc 細胞へ抗原提示、ウイルスを取り込んだ抗原提示細胞 (antigen presenting cell : APC) が MHC class II 分子を用いてナイーブ Th 細胞 (CD4<sup>+</sup>T 細胞) に抗原提示を行うことで開始する。抗原提示を受けたナイーブ Th 細胞は IL-12 を介して Th1 細胞へと分化・増殖し、Th1 細胞は IFN- $\gamma$  や IL-2 を放出する。IL-2 により活性化された Tc 細胞はウイルス感染細胞を特異的に破壊することで抗ウイルス作用を示す。さらに、ナイーブ Th 細胞から分化した Th1 細胞が IFN- $\gamma$  および IL-2 を介してマクロファージを活性化、IL-2 を介して NK 細胞を活性化する。活性化マクロファージはウイルスの貪食・不活化を行い、IFN- $\alpha$  を放出して

ウイルス感染細胞に作用しウイルス増殖を抑制する。このようにして、自己免疫と獲得免疫は相互に補完し合いながらウイルスに対する免疫応答を行っている。

Shimoda K らは、INFRRG が IFN- $\alpha$  に対する応答と、IL-12 を介する IFN- $\gamma$  の産生およびナイーブ Th 細胞から Th1 細胞への分化に重要であることを明らかにした。また、我々の検討で、INFRRG KO マウスがウイルス誘発糖尿病を高率に発症したので、自然免疫が糖尿病の感受性に関わっている可能性が指摘されてきた。しかし、遺伝背景を均一にしたマウスでの検討は不十分であった。本研究は、INFRRG<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 代の戻し交配を行い、糖尿病発症が INFRRG に依存することを明らかにした。前述した Shimoda K らの報告より、今回のウイルス誘発糖尿病の検討における INFRRG KO マウス (C57BL/6J-N8) では、IFN- $\alpha$  シグナル伝達が不十分なため、ウイルス感染に対する抗ウイルス作用が低下した可能性がある。一方、INFRRG KO によりナイーブ Th 細胞から Th1 細胞への分化・増殖が低下し、獲得免疫が低下した可能性も存在する。すなわち、INFRRG KO により Th1 反応が低下することにより IFN- $\gamma$  産生が低下しマクロファージの活性化が不十分となることで、ウイルス防御能の低下が生じたことも考えられる。今回の INFRRG KO マウス (C57BL/6J-N8) における検討結果より、INFRRG KO では IFN- $\alpha$  依存性の自然免疫の低下、あるいは Th1 反応による獲得免



疫の低下によりウイルス誘発糖尿病を発症した可能性が高いと考えられる。しかし、自然免疫と獲得免疫のどちらが優位にウイルス糖尿病の感受性に関与するのかは不明である。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明らかにするため、今後、獲得免疫が欠如した Rag2 KO および INFRRG Rag2 double KO マウスについて検討する予定である。

糖尿病発症における膵島β細胞の障害について、その機序としてウイルス感染によるネクロシス、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の2つの可能性が考えられる。病理組織学的検索により、リンパ球やマクロファージが膵島に浸潤して炎症を引き起こし障害した、あるいは自己免疫により障害が誘発された可能性も存在すると推測される。マクロファージとNK細胞は自然免疫に関与し、ウイルス感染の場合、マクロファージは侵入したウイルスを貪食、NK細胞はウイルス感染細胞を破壊する。今回はEMCV-Dが膵島β細胞に感染し、この感染β細胞をマクロファージやNK細胞が貪食することで障害、炎症を起こして、結果的にインスリン分泌が枯渇し、1型糖尿病を発症したことも推測される。一方、EMCV-Dはマクロファージに感染するとされている。EMCV-Dの感染によりマクロファージは活性化され、IL-12などのサイトカインを産生する。このマクロファージが膵島β細胞に浸潤することで、β細胞のアポトーシスを誘発すると考えられる。さらに、IL-12はナイーブTh細胞

をTh1細胞に分化・増殖させるサイトカインであり、Th1細胞はIFN- $\gamma$ によりマクロファージを活性化させる。EMCVの感染によりこの循環が過剰に起こり、β細胞のアポトーシスが促進される他、病理組織学的検討で認められたリンパ急性炎症を引き起した可能性もあり得ると推測される。膵島β細胞の障害がネクロシスとアポトーシスのどちらによるものか、あるいはその両方が働くのかなどの課題について、さらなる検討が必要である。

次に、かぜ症状が先行する19例の1型糖尿病の患者でINFRRG遺伝子変異の検討を行い、バリンからフェニルアラニンへアミノ酸が変化するミスセンス変異15560G>Tおよび、アミノ酸変化のないサイレント変異14006C/Tをk同定した。これらの変異は、検索しえた限りではこれまでに報告されてはいなかった。

15560G>Tは頻度47.4%(9/19)、14006C/Tは頻度31.6%(6/19)であり、対象例19人の

うちどちらかの変異または両方の変異を確認できた症例は14人つまり頻度73.7%(14/19)と極めて高率であった。ウイルス感染を先行して1型糖尿病を発症した

症例には高い確率で15560G>Tあるいは14006C/Tの変異を有することから、この変異が

ウイルス誘発性糖尿病の感受性要因である可能性が示唆された。一方、本研究において

塩基置換15560G>Tと14006C/T両方の変

異があった症例は 1 例、頻度は 5.3%(1/19)と

きわめて低率であることから、この2つの変異は独立しているものと考えられる。

これらの変異がウイルス誘発性 1 型糖尿病の疾患マーカーとして意義を有するかどうかを検討するためには、健常者との比較および 1 型糖尿病患者全例について解析を行う必要がある。大量の検体について変異の検索を行うとき、簡便に確認できるように、SNP の検出法として RFLP 法を検討したが、適当な制限酵素が存在しないため RFLP 法を用いることはできない。ただし、類似した配列をもつ制限酵素は存在するため、ミスマッチプライマーを設計し、ミスマッチ PCR 法の 15560G>T および 14006C/T に対するプロトコルを確立できれば、電気泳動によるバンドの確認のみで SNP の存在を把握できるであろう。

本研究において変異が認められなかった症例は 5 例、頻度 26.1%(5/19)であった。この 5 例の 1 型糖尿病の宿主因子の候補として Tyk-2 を考えると、まだ解析していないプロモーター領域およびイントロンにその要因がある可能性が推測され、今後の検討課題である。15560G>T についてはミスセンス変異であるためタンパクレベルにおいても正常とは異なる機能の変化がありうると考えられる。今後、本研究で変異が認められた症例についてタンパクの量的および機能的変化の検討を行う必要がある。本研究で発見された SNP につ

いて上記のような検討が進むと、その意義が明らかになってくるであろう。

47.4%(9/19)、は I 型インターフェロン以下のシグナル伝達に関与し、最終的には抗ウイ

ルス作用に関わるため、INFRRG における SNP はウイルス誘発性 1 型糖尿病に特異的な

疾患マーカーとしての有用性ととも、ウイルスに対する感受性のマーカーとしての

有用性も期待できる。

## E. 結論

本研究で得られた結論は以下の通りであり、INFRRG 遺伝子変異がウイルス誘発糖尿病における感受性に関与することが解明された。ウイルス誘発糖尿病抵抗性系統の C57BL/6J マウスにおいて、INFRRG KO マウスは INFRRG 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。HE 染色による病理組織学的検討において、INFRRG KO マウスではリンパ球の浸潤による膵炎が観察された。Rag2 KO マウスおよび INFRRG Rag2 double KO マウスにおけるウイルス誘発糖尿病の感受性、膵島β細胞障害の機序解明、EMCV 接種マウスの脳および心臓における感染確認など、今後さらなる検討が必要である。

また、風邪症状を先行したヒト 1 型糖尿病患者において、INFRRG 2 つの塩基置換、バリンからフェニルアラニンへアミノ酸が変化するミスセンス変異 15560G>T 頻度 47.4%(9/19)およびアミノ酸変化の

ないサイレント変異 14006C/T を同定した。対象例 19 人のうちどちらかの変異または両方の変異を確認できた症例は 14 人つまり頻度 73.7%(14/19) と高い確率であった。これらの変異はウイルス誘発性 1 型糖尿病の疾患マーカーとなりうる可能性があり、さらに今後、健常者との比較および非ウイルス誘発性 1 型糖尿病患者について解析を行う必要がある。また、多数の検体の SNP を検索するとともに、遺伝子発現への影響やタンパク質の量的異常または機能異常を解析し 1 型糖尿病とウイルス感受性の関連を検討する必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Nagafuchi S, Katsuta H, Anzai K. Rituximab, B-Lymphocyte depletion, and beta-cell function. *N Engl J Med* 362(8):761, 2010

Akari Inada, Oogi Inada, Hiroshi Fujii, Tomoyuki Akashi, Katsuo Sueishi, Atsushi Fukatsu, Seiho Nagafuchi. Different effects of islet transplantation and Detemir treatment on the reversal of streptozotocin induced diabetes associated with  $\beta$  cell regeneration. *Diabetology International* 1(1):49-59, 2010.

永淵正法、近藤しおり. 自己免疫性 1 型糖尿病とウイルス感染. *Diabetes Frontier* 21(3): 314-319, 2010.

永淵正法、塚本浩、新納宏昭、小林隆志. 自己免疫疾患と炎症. *細胞工学* 29(9):769-775, 2010.

永淵正法. 糖尿病発症に関するウイルス感染. *感染症* 40(5):19-24, 2010.

Nagafuchi S. The role of B cells in regulating the magnitude of immune response. *Microbiol Immunol* 54:487- 490, 2010.

永淵正法. ウイルス糖尿病と自己免疫糖尿病. *臨床と微生物* 38(1):57-61, 2011

### 2. 学会発表

藏藤利暢、小川秀一郎、甲斐裕次、高上悦志、和泉賢一、安西慶三、近藤しおり、松尾友仁、栗崎宏憲、勝田仁、永淵正法. マウス脳心筋炎ウイルス (EMCV) 誘発糖尿病における防御機構と性差. 第80回日本感染症学会西日本地方会学術集会. 松山市 2010.11.19

## H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

## 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（分担） 研究報告書

劇症1型糖尿病のウイルス原因説に関する研究  
-MIP-INFRRGトランスジェニックマウスに関する研究-

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

#### 研究要旨

1型糖尿病は、自己免疫の惹起あるいはウイルスなどの環境因子が加わることにより、絶対的インスリン欠乏に至る疾患とされている。1型糖尿病患者で約20%、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が先行することから、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<sup>1)</sup>。この1型糖尿病の疾患感受性遺伝子は現在、20種類以上が報告されているが、我々の研究室ではウイルス感染防御に働くインターフェロンレセプター関連分子である INFRRG (interferon receptor related gene) に着目した研究を進めている。これまでの研究で、INFRRG ノックアウトマウスでウイルス糖尿病の疾患感受性が上昇することが明らかとなった。しかしながら、ウイルス糖尿病で膵島β細胞が傷害されるのは、全身・免疫系に発現している INFRRG が重要なのか、あるいは膵島β細胞に発現する INFRRG が重要なのかは未だ解明されておらず、ウイルス糖尿病における INFRRG の意義を検討するためには、膵島β細胞特異的に INFRRG を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作製が必要である。

シカゴ大学の原真奈美先生よりマウスインスリンプロモーターである MIP (Mouse Insulin Promotor) の制御下に EGFP を導入したコンストラクトである MIP-EGFP-hGH を譲渡して頂き、EGFP 部分 INFRRG に入れ替え MIP-INFRRG hGH を用いてトランスジェニックマウスを作製したところ、膵島β細胞特異的に INFRRG を過剰発現したファウンダーマウスは生まれなかった。マウスが生まれなかった原因の一つとして、INFRRG の過剰発現が細胞の生死に影響していることが考えられることから、今回の研究では、

MIP-INFRRG-hGH を導入することによってβ細胞における INFRRG 遺伝子過剰発現の生死への影響を検討することを目的とした。

まず、保存されている膵島β細胞株である NIT-1 がβ細胞としての機能を持っているか、インスリン産生能で確認するために RT-PCR およびインスリン染色を行った。その結果、実験に用いる NIT-1 がインスリンを産生するβ細胞であることが確認できた。MIP-EGFP-hGH, MIP-INFRRG-hGH をそれぞれ保持している大腸菌よりプラスミド DNA を抽出し、制限酵素による切断でインサート部位を確認した。次いで、トランスフェクション効率の検討のためリポフェクション法で MIP-EGFP-hGH を導入したところ最適条件は 24well 細胞培養ディッシュでは、細胞数  $4.0 \times 10^5$  / well, DNA:Lipofectamine=1:2 であった。このときの導入効率は 27% であった。この導入効率のもと MIP-INFRRG-hGH を導入した細胞と MIP-EGFP-hGH を導入した細胞を用いてトランスフェクション 6, 24, 48, 72, 125 時間後で細胞増殖アッセイを行ったところ、細胞の増殖・生存率に有意差はみられなかったことから、MIP-INFRRG 遺伝子は細胞の生死に影響しないと考えられた。ただし、今回の INFRRG のトランスフェクションは、EGFP トランスフェクションで得られた 27% の導入効率という仮定のもとで行っているため、今後の課題として、トランスフェクションによる INFRRG 遺伝子および蛋白の発現レベルを RT-PCR, ウェスタンブロットおよび免疫染色等で検討する必要がある。

#### A. 研究目的

1 型糖尿病は、自己免疫の惹起あるいはウイルスなどの環境因子が加わることにより、絶対的インスリン欠乏に至る疾患とされている。1 型糖尿病患者で約 20%、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が先行することから、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。この 1 型糖尿病の疾患感受性遺伝子は現在、20 種類以上が報告されているが、我々はウイルス感染防御に働くインターフェロンレセプター関連分子である INFRRG に着目した研究を進めている。

これまでの研究で、INFRRG ックアウトマウスでウイルス糖尿病の疾患感受性が上昇することが明らかとなった。しかしながら、

ウイルス糖尿病で膵島β細胞が傷害されるのは、全身・免疫系に発現している INFRRG が原因なのか、あるいは膵島β細胞に発現する INFRRG が重要なのかは未だ解明されておらず、ウイルス糖尿病における INFRRG の意義を検討するためには、膵島β細胞特異的に INFRRG を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作製が必要である。

シカゴ大学の原真奈美先生よりマウスインスリンプロモーターである MIP (Mouse Insulin Promotor) の制御下に EGFP を導入したコンストラクトである MIP-EGFP-hGH を譲渡して頂き、EGFP 部分を INFRRG に置き換え、MIP-INFRRG-hGH を作製した。この MIP-INFRRG-hGH を用いてトランスジェニックマウスを作製したところ、膵島β細胞特異的に INFRRG を過剰発現したファウンダーマ

ウスは生まれなかった。マウスが生まれなかった原因の一つとして、INFRRG の過剰発現が細胞の生死に影響していることが考えられる。そこで、*in vitro* で膵島β細胞に INFRRG をトランスフェクションによって過剰発現させ、細胞の生死への影響を検討する必要がある。

実験的に糖尿病の領域では、膵島β細胞株として NIT-1 を用いた研究が最も広く行われている。NIT-1 は、NOD/Lt マウス由来の膵島β細胞株で、インスリン遺伝子を発現しインスリンを産生する。そのインスリン産生能を、インスリン染色およびノーザンブロットで確認した報告もある<sup>2)</sup>。

以上のような背景を踏まえ、本研究の目的は、研究室で保存されている実験に用いる NIT-1 がβ細胞としての機能を持っているかインスリン産生能で確認し、さらに NIT-1 に MIP・INFRRG—hGH を導入することによってβ細胞における INFRRG 伝子導入の生死への影響を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

### 細胞

NOD/Lt マウス由来膵島インスリノーマ細胞株である NIT-1 を用いた。RT-PCR においてインスリン遺伝子を発現していないと考えられるネガティブコントロールとしてマウス線維芽細胞 (EF 細胞) を用いた。また、インスリン染色におけるネガティブコントロールは、慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を用いた。

### MIP-INFRRG-hGH プラスミド DNA について

シカゴ大学の原真奈美先生が作製した MIP-EGFP-hGH (図 1) に示すプラスミドベクターの EGFP の部分を mINFRRG に入れ替え、MIP-INFRRG-Hgh プラスミドベクターを作製した。なお、インサート部位の m INFRRG は、スタートコドンからストップコドンの 3791bp が導入されている。

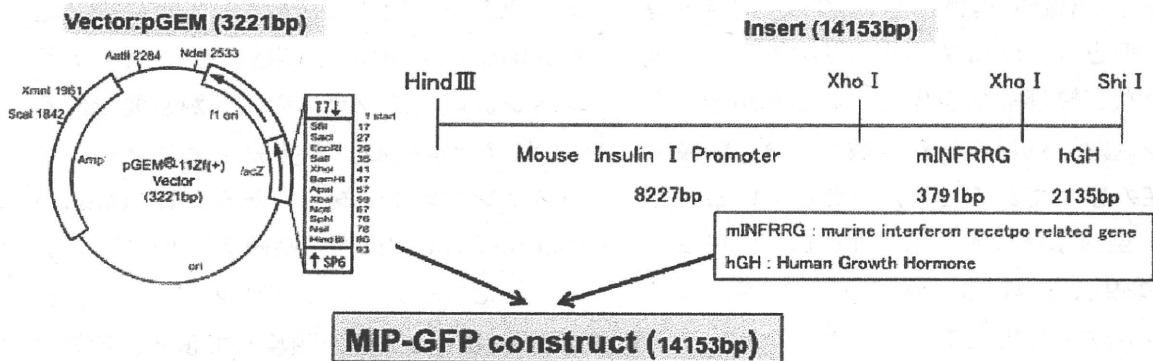


図 1 ベクターと INFRRG インサート

## 細胞培養

### 培養条件

NIT-1 は Ham's F12k medium (GIBCO) + 10% FBS + 1% PcSM (GIBCO LotNo.412045) の培養液で, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した. EF 細胞は DMEM (GIBCO) + 10% FBS + 1% PcSM の培養液で, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した. K562 は RPMI (GIBCO) + 10%FBS + 1%PcSM の培養液で, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した. 培養は全てクリーンベンチ (BIOLOGICAL SAFETY CABINET, CLASS TYPE II A/B3, SANYO)内で行った. 細胞数の検討は光学顕微鏡 (OPTIPHOT, Nikon Japan) を使用し, 培養液内での細胞の状態を観察する際には, 位相差顕微鏡 (TELAVAL31, ZEISS Germany) を使用した. NIT-1 は培地交換を 3 日に 1 回, 継代を 1 週間に 1 回, EF 細胞は培地交換を兼ね, 継代を 3 日に 1 回行った.

### 細胞の継代方法

NIT-1 および EF 細胞は接着性の細胞であるので, 60mm ディッシュで培養した場合は, 培地をアスピレーターで吸引し, 0.25% トリプシン EDTA (GIBCO LotNo.687792) を 2ml 加え 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で 2 分放置して細胞をディッシュから剥離させた. 次いで, 培地 4ml を加えピペッティングで混和させた. 1.5 ml エッペンドルフチューブに染色液 Trypan Blue Stain 0.4% (GIBCO Lot.No.1358966) を 50  $\mu$ l, 細胞含培養液を 50  $\mu$ l 加えピペッティングした. カバーガラスを載せた Burker-Truk

計算板に細胞含染色液を流し込み, 光学顕微鏡下で Burker-Turk 計算板の大区画 4 個に存在する細胞数を数えた. 4 区画の平均細胞数  $\times$  希釈倍率  $\times 10^4$  個/ml の計算により, 細胞数を求めた. 細胞培養液を, 遠心分離機 (テーブルトップ遠心器, 久保田製作所) 800rpm で 7 分間遠心操作後, 上清をアスピレーターで吸引し, 細胞数が  $2.0 \times 10^5$ /ml になるように培地を加えた. 新しいディッシュに 5ml ずつ細胞培養液を添加し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養を続けた.

### 細胞の融解

遠心用チューブに融解する量の 20~40 倍の約 30ml の培地を用意した. 細胞凍結保存用チューブを取り出し, 37°C の恒温槽 (EYELA UNI THERMO SAKER NTS-1300) で急速に融解した. 融解物を培地の入ったチューブに移し, 遠心 (800rpm, 7min) 後, アスピレーターで上清を吸引した. 5ml の培養用培地で懸濁後, 細胞数を計算し  $2.0 \times 10^5$ /ml になるように調整し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した.

### 細胞の凍結保存

細胞を  $5.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^6$ /ml になるように 15ml 遠心用チューブに分注し, 遠心後 (800rpm, 7min) 後, 上清を吸引した. 凍結保存液セルバンカー (血清タイプ, No.608020, 日本全薬工業株式会社) を必要量加え懸濁後, セラムチューブに分注した. あらかじめ 4°C に冷蔵しておいた BICELL (NIHON FREEZER Co.LTD) に入れ, 直ちに -80°C で保存した. ただし, -80°C での保存は数ヶ月の保存が限度であり, 2 年以上の保存の場合は -180°C の液体窒

素で保存した。

## RT-PCR

### 細胞溶解

細胞が全部で  $1.0 \sim 4.0 \times 10^6$  個になるように細胞培養液を遠心用チューブに回収し、遠心(1200rpm, 5min)した。上清を吸引し、室温の滅菌 PBS (-) を加え、懸濁後、再び遠心(1200rpm, 5min)した。上清を吸引し、ISOGEN(株式会社ニッポンジーン, フェノール含有 40%, Lot.39008C)を 1ml 加え、懸濁後、エッペンドルフチューブに移した。室温で 5 分間放置した。長期間保存の場合は、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### RNA の単離

RNA を扱うときは、ゴム手袋やマスクを付け、RNA 取り扱い室で作業を行った。器具類や試薬類も全て、RNA 専用のものを使用した。テーブルや器具は、RNase Zap で拭いた。ISOGEN 溶解液にクロロホルム(Wako)を  $200 \mu\text{l}$  加えた後、15 秒間激しく混和し、室温で 3 分間静置した。遠心(1200rpm, 15min,  $4^{\circ}\text{C}$ )後、水層部分を新しいチューブに移した。2-プロパノール(Wako)を  $500 \mu\text{l}$  加え、数回転倒混和した後、室温で 10 分間静置した。遠心(1200rpm, 10min,  $4^{\circ}\text{C}$ )後、上清を吸引し、70%エタノール(Wako, 99.5%)を 1ml 加え、混和した。遠心(1200rpm, 10min,  $4^{\circ}\text{C}$ )後、上清を吸引し、室温で 10~30 分程度、風乾させた。DEPC water を  $10 \mu\text{l}$  加え、軽く懸濁した後、インキュベーター(AS'IEC BLOCK INCUBATOR)で  $55^{\circ}\text{C}$ 、10 分間、熱を加えた。

### RNA 濃度測定

Nano Drop Spectrophotometer ND-100 (正晃株式会社) を濃度測定器として用いた。Blank に滅菌蒸留水を用い、測定には RNA を  $2 \mu\text{l}$  載せて、吸光度と濃度を測定した。

### cDNA の合成

RNA から cDNA の合成には、High Capacity cDNA Reverse transcription kit(Lot.0703014)を用いた。各検体の RNA 濃度を  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  から  $\mu\text{l}/\mu\text{g}$  に換算するために、 $1 \div \text{RNA 濃度}(\mu\text{g}/\mu\text{l})$  した。RNA に DEPC water を加え、全量  $10 \mu\text{l}$  の template RNA とした。1 検体に  $10 \times \text{RT Buffer } 2 \mu\text{l}$ ,  $100\text{mM dNTP Mix } 0.8 \mu\text{l}$ ,  $50 \mu\text{M OrigodT } 1 \mu\text{l}$ , RNase Inhibitor  $1 \mu\text{l}$ , Malti scribe Reverse Transcriptase  $1 \mu\text{l}$ , Rnase free water  $4.2 \mu\text{l}$ , template RNA  $10 \mu\text{l}$  を PCR 用チューブに入れ、全量  $20 \mu\text{l}$  とした。PCR Thermal Cycler(TaKaRa) で Reverse Transcription-PCR をかけた。反応条件は、 $25^{\circ}\text{C} 10\text{min}$ ,  $37^{\circ}\text{C} 120\text{min}$ ,  $85^{\circ}\text{C} 5\text{sec}$ , とした。

### PCR を用いた Ins1, Ins2 遺伝子の発現

Ins1 遺伝子の発現を見るために、1 検体に  $10 \times \text{PCR Buffer } 5.0 \mu\text{l}$ ,  $25\text{mM dNTP } 4.0 \mu\text{l}$ ,  $25 \text{mM MgCl}_2 3.0 \mu\text{l}$ ,  $10 \mu\text{M forward primer } 1.0 \mu\text{l}$ ,  $10 \mu\text{M reverse primer } 1.0 \mu\text{l}$ , rTag polymerase  $0.5 \mu\text{l}$ , 滅菌蒸留水  $55.0 \mu\text{l}$ , template cDNA  $0.5 \mu\text{l}$  を PCR 用チューブに入れ、全量  $50 \mu\text{l}$  とした。反応条件は図 3.3.1 の通りである。Ins1 の forward primer の配列は、



CCTGTTGGTGCACTTCCTAC', reverse primer の配列は,

TGCAGTAGTTCTCCAGCTGG である.

Ins2 遺伝子の発現を見るために, 10× PCR Buffer 5.0 μl, 25mM dNTP 4.0 μl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 3.0 μl, 10 μM forward primer 1.0 μl, 10 μM reverse primer 1.0 μl, rTag polymerase 0.5 μl, 滅菌蒸留水 35.0 μl, template cDNA 0.5 μl を PCR 用チューブに入れ, 全量 50 μl とした. 反応条件は図 2, 3 の通りである. Ins2 の

94°C	2min Hold	} 35Cycle
94°C	15sec Denature	
57°C	30sec Anneal	
72°C	1min Extend	
72°C	7min	
4°C	∞	

図 2 Ins1 サーマルサイクル

forward primer の配列は,

GCAGCACCTTTGTGGTTCCC, reverse primer の配列は,

TGCAGTAGTTCTCCAGCTGG である.

PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動した. マーカーには Direct Load™1kb DNA

Ladder (SIGMA) を用いた. 泳動後, エチルブロマイドにて 20 分間染色し, E-Graph で撮影した.

94°C	2min Hold	} 35Cycle
94°C	15sec Denature	
58°C	30sec Anneal	
72°C	1min Extend	
72°C	7min	
4°C	∞	

図 3 Ins2 サーマルサイクル

## インスリン染色

### 検体のプレパラート作製

細胞数が  $1.0 \times 10^5$  個になるように遠心用チューブに回収し, 遠心(1200rpm, 5min)した. 上清を吸引し, 滅菌 PBS(-)2ml を加え, 懸濁後, 遠心(1200rpm, 5min)した. この作業を 2 回繰り返した. 上清を吸引し, 滅菌 PBS(-)2ml を加え, 懸濁後, パスツールピペットを用いて, プレパラート (SILANIZED SLIDES, Dako) を装着したサイトスピン器 (TOMY 浮遊細胞収集装置) に細胞液を入れた. 遠心器 (KUBOTA, KN70) で遠心(400rpm, 5min)した. 検体を 95%エタノールで固定した. (1 週間は保存可能).

### 染色用キットについて

一次抗体は Monoclonal Anti-human/bovine/mouse Insulin Antibody (R&D systems), 染色用キットは mouse ABC Staining System: sc-2017 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC) を使用した.

#### [染色キットの構成]

- ・ 1.0ml normal blocking serum : ヤギもしくはロバ正常ブロッキング血清
- ・ 250μg biotinylated secondary antibody : ビオチン標識二次抗体
- ・ 0.5ml each avidin and biotinylated horseradish peroxidase : ビオチン標識 HRP
- ・ 1.0ml 50×peroxidase substrate : ペル

オキシダーゼ基質

- ・ 1.0ml 50×DAB chromoge : DAB 色素源
- ・ 3.0ml 10×DAB substrate buffer : DAB 基質バッファー
- ・ Mixing bottle1~4 : 空ボトル

[前処理]

- ・ Mixing bottle1 : PBS 5ml と normal blocking serum 75 $\mu$ l を入れた。
- ・ Mixing bottle2 : PBS 5ml と normal blocking serum 75 $\mu$ l と 25 $\mu$ l biotinylated secondary antibody を入れた。
- ・ Mixing bottle3 : 100 $\mu$ l avidin and biotinylated horseradish peroxidase (50 $\mu$ l reagent A+50 $\mu$ l reagent B) と 2.5ml PBS を入れた。ただし、使用する前などに混ぜた後は、30 分間静置させておく。
- ・ Mixing bottle4 : 1.6ml 蒸留水と 10×DAB substrate buffer を 5 滴と 50×DAB chromoge を 1 滴と 50×peroxidase substrate を 1 滴入れた。
- ・ 一次抗体の推奨濃度は 0.5~5.0  $\mu$ g/ml であるが、今回は 1.25  $\mu$ g/ml として用いた。原液 500  $\mu$ g/ml を滅菌済み PBS で 400 倍希釈して用いた。

### 染色手順

95%エタノール固定の終わった後は、PBS 洗浄 (10min) を 3 回行った。内因性ペルオキシダーゼの阻止として 0.75%過酸化水素水に 5min 浸し、PBS 洗浄(5min)を 3 回行った。非特異的反応の除去として、Mixing bottle1 試薬を検体に満載し 60min 静置した。60min 後、試薬を吸引した。抗

原抗体反応(一次抗体)として、抗マウスインスリン抗体 (1.25  $\mu$ g/ml) を満載し 30min 室温(湿潤箱)で静置した。30min 後、PBS 洗浄(5min)を 3 回行った。抗原抗体反応(二次抗体)として、Mixing bottle2 試薬を満載し 30min 室温(湿潤箱)で静置した。30min 後、PBS 洗浄(5min)を 3 回行った。抗原抗体反応(ビオチン標識 HRP)として、Mixing bottle3 試薬を満載し 30min 室温(湿潤箱)で静置した。30min 後、PBS 洗浄(5min)を 3 回行った。発色(DAB)として Mixing bottle4 試薬を 1~3 滴滴下し 5 分間静置した。その後、蒸留水で 3min 洗浄した。

検体を取り出し、水滴を取り、免疫組織化学染色試薬 (Perma Fluore Aquous Mounting Medium, Lot43048,Thermo ELECTRON CORPORATION Shandon Imunon)をそれぞれ 1 滴ずつ滴下し、カバーガラス (24 × 24mm,0.12~0.17mm,MATSUNAMI)を気泡が入らないようにのせ、カバーガラスがずれないようにマニユキアで周囲を固定した。

### 大腸菌の大量培養

#### LB 培地

LB 寒天培地は、ミリ Q 水 1 $l$  につき 25g の LB 粉末 (DIFCO, LotNo.2336698) を加え、スターラーで粉末が溶けるまで混合した。LB 培地 1 $l$  につきアガロース (BD, LotNo.4128564) 15g をさらに加えて混ぜた。121°Cで 20 分間オートクレーブ滅菌後、クリーンベンチ内でアンピシリンを培地 100ml につき 100  $\mu$ l 加えて混合し、10cm シャーレに適量分注した。30 分間放置した

後、4°Cで保存した。

LB 液体培地は、ミリ Q 水 1ℓ につき 25g の LB 粉末を加え、スターラーで粉末が溶けるまで混合した。121°Cで 20 分間オートクレーブ滅菌後、クリーンベンチ内でアンピシリンを培地 100ml につき 100 $\mu$ l 加えて混合し、500ml 三角フラスコに 100ml ずつ分注し、4°Cで保存した。

### 大量培養方法

操作は全て安全キャビネット (BIO Clean Bench, SANYO) 内で行った。-80°Cに保存されているグリセロールが混合された大腸菌液をガスバーナーで温めた白金耳で掬い取り、LB 寒天培地に画線塗抹し 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下でオーバーナイトした。翌日、1 コロニーを選択し、新しい LB 寒天培地に画線塗抹し 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下でオーバーナイトした。50ml ファルコンチューブに 5ml の LB 液体培地を入れ、滅菌した爪楊枝で 1 コロニーをピックアップしたあと、爪楊枝ごと用意した LB 液体培地に入れた。37°C 恒温槽で 8 時間振とう培養した。培養した菌液から 200 $\mu$ l をとって、100ml の LB 液体培地が入った 500ml 三角フラスコに加えた。教育支援センターの大型培養シェーカー (BIO Shaker BR-300LF, TAITEC) で 37°C、170rpm で 14 時間振とう培養した。

### プラスミド DNA 抽出 (表 1)

EndoFree<sup>®</sup> QIAGEN Plasmid Maxi kit (QIAFEN Lot.42784764) を用いてプラスミド DNA の抽出を行った。コニカルチューブ遠心機 (M150-IVD, SAKUMA) は、教育支援センターのものを利用した。

スターター培養液を氷上で 50ml ファルコ

ンチューブに分注し、4°Cで 10000rpm、10 分間遠心操作し、バクテリア細胞を収集した。上清を取り除き、バクテリアペレットを 10ml の Buffer P1 に再懸濁した。10ml の Buffer P2 を添加後、4~6 回丁寧に転倒させ十分に混和し、5 分間室温 (15~25°C) に放置した。冷却した Buffer P3 を 10ml 添加後、直ちに丁寧に 4~6 回転倒混和させて十分に混和した後、5 分以上氷上でインキュベートした。50ml ファルコンチューブにキャップをはめた QIA filter cartridge をセットし、インキュベートした溶液を流し入れ、10 分間室温放置した。QIA filter cartridge のキャップを外し、ブランジャーをゆっくり押し菌体を吸着させた。2.5ml の Buffer ER を入れ、10 回転倒混和し、30 分間氷上でインキュベートした。QIAGEN-tip500 に 10ml の Buffer QBT を加え、カラムが空になるまで自然落下させ、カラムを平衡化した。インキュベートした溶液を平衡化した QIAGEN-Tip に流し込んだ。この過程は 2 回繰り返した。落下液は捨てた。QIAGEN-Tip を Buffer QC 30ml で 2 回洗浄した。落下液は捨てた。15ml の Buffer QN で DNA を抽出した。回収した落下液に 10.5ml のイソプロパノール (4°C) を加え、激しく振って混和した。4°C で 10000rpm、15 分間遠心操作し、DNA を沈殿させた。上清をデカントし、DNA ペレットを 5ml の 70%エタノールで洗浄した。4°Cで 10000rpm、10 分間遠心操作し、DNA を沈殿させた。クリーンベンチ内でデカントで上清を捨て、5 分間空気乾燥させ、適量の、滅菌した TE Buffer に解させ、-20°Cで保存した。

表1 各 Buffer の構成成分

Buffer の種類	構成成分	pH
Buffer P1	50mM Tris·Cl(pH8.0) , 10mM EDTA	7.80-8.20
Buffer P2	200mM NaOH , 1% SDS	P1+P2<13.00
Buffer P3	3.0M Potassium Acetate(pH5.5)	5.40-5.60
Buffer QBT	750mM NaCl , 50mM MOPS , 15%Isopropanol	6.80-7.20
Buffer ER	Proprietary formulation	6.80-7.20
Buffer QC	1.6M NaCl , 50mM MOPS , 15%Isopropanol	6.90-7.10
Buffer QN	1.0M NaCl , 50mM MOPS , 15%Isopropanol	6.90-7.20
Buffer TE	10mM Tris(pH8.0) , 1mM EDTA	7.90-8.10

### インサート部分の確認

#### 制限酵素反応

pGEM-MIP-Tyk2-hGh のインサート部分 MIP-Tyk2-hGH を制限酵素 HindIII および Sfi I で切断した。HindIII のみによる切断は、1 検体につき plasmid DNA (1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$  ,  $\times 10\text{M}$  Buffer 5.0  $\mu\text{l}$  , Hind III (TaKaRa, LotNo.1060A) 1  $\mu\text{l}$  , 滅菌水 41.5  $\mu\text{l}$  で全量を 50  $\mu\text{l}$  とした。37°C で 2 時間インキュベートし、-20°C で保存した。Sfi I (TaKaRa, LotNo.K1701BA) のみによる切断は、1 検体につき plasmid DNA (1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$  ,  $\times 10\text{M}$  Buffer 5.0  $\mu\text{l}$  , Sfi I 2.0  $\mu\text{l}$  , 滅菌水 40.5  $\mu\text{l}$  で全量を 50  $\mu\text{l}$  とした。50°C で 2 時間インキュベートし、-20°C で保存した。両酵素で切断する場合は、まず HindIII による切断を行い、次いで Sfi I を 2  $\mu\text{l}$  加えて 50°C で 2 時間インキュベートし、-20°C で保存した。

インキュベートには Block INCUBATOR (ASTECC) を使用した。

#### 電気泳動

0.6% Agarose Gel にて 100V, 約 20 分間

の電気泳動を行った。マーカー 10kbp DNA Ladder (invitrogen) を一番左に泳動し、鎖長の長さの確認に用いた。制限酵素処理をしていないプラスミド DNA をコントロールとし、制限酵素処理を行った産物をその右レーンに流した。

泳動後、エチルブロマイドにて染色し、E-Graph で撮影した。

### トランスフェクション

#### pGEM-MIP-EGFP-hGh 導入によるトランスフェクション効率の検討

Lipfectamine™ 2000 Reagent (SIGMA, LotNO.681939) を用いた。

トランスフェクションの効率を検討するため、細胞数、リポフェクタミン溶液の量を変えて表 2 の様々な条件下でトランスフェクションを行った。作業は全てクリーンベンチ内で行った。

トランスフェクションの前日に、24well 細胞培養ディッシュにそれぞれの細胞数の細胞を抗生物質の含まれていない Ham's F12k medium + 10% FBS 培養液を用いて撒き、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。各 well