

プロモーター領域のシーケンス

増幅範囲が約 1.3kb と大きかったこと、さらに 4051-4070 および 4897-4909 にそれぞれ poly-A 配列が存在することを考慮して、以下のようにシーケンス用のプライマー(1.6pM)を設定した(表).

表 シーケンス用 primer の塩基配列

Primer No.	5' -3' 塩基配列	Primer の向き	解析部位
seq prime r1	TGGAGTTTCGCTCTTGTCGC	R	3736-3900
seq prime r2	GCCAGACCCCATCTCTACAAA (PCR用のprimerと同一のものを使用した)	F	3901-4050
seq prime r3	CGTGCTGTGGAATTGGGTCA	R	4071-4500
seq prime r4	GCGGGATGTCCAAGCTGCTA	F	4501-4897

4910-5000 の領域については 2.6.2 Ex1 のシーケンスの項で述べるように、Ex1 のシーケンスと同時に解析している。表に示した 4 種類の primer でシーケンス解析を行ったところ 3ヶ所の SNP が確認できた。そこで確かに SNP が存在することを逆側の primer を設定して確かめようとしたが、図 6 にも示したようにそれぞれの SNP が poly-A 配列の非常に近くに存在していたため、逆側の primer から変異を確認することはできなかった。そこで両方向から変異を確認することは断念し、SNP の確認できた検体についてはもう 1 度同じ primer を使用して、あるいは同じ向きからでも新たな primer を設定して同じようにシーケンス解析を行い、再現性が得られた場合には確かに SNP の存在が確認できると考えた。4071G/A, 4072T/A の 2ヶ所の SNP は新たに設定した seq primer5(図 7 中に示している)を使用して、4897A/C の SNP は再び同じ primer(seq primer4)を使用して再現性を見て、確実に SNP が存在していることを確認した。

gccaga

3721 ccccatctct acaaaaattt aaaaattagc
cacaaaattt aaaaattaac aacaaaaggg

3781 ccgggtgcgg tggetcaecg ctgtaatccc
agcgctitgg gaggtggat cagaggtca

3841 ggagttcgag accagcctgg ccaagatggt
gaaatcccat ctctactaaa aatacaaaaa
3901 ttagccgggc gtggtggcgg gcgcctgttg
tcccagctac ccaggaggct gaggcaggag
3961 aatcgcttga atccgggagt ctgaggttgc
agtgagccga gatcgcagca ttgcaactcca
4021 gcctggggcga caagagcga actccatctt
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa gtggaagatg
4081 aggaagtiga tcagacatca aggatgagcg
gatgacttaa tagcttctt tgctaagact
4141 tggctgggca ggtgaaagac aaagtgcagg
agtggttatg gtgtggcaca gaagaagggt
4201 cagaggacgg tctttgttac ctcttcatgc
ctgagtttct tctctgtga aatggggata
4261 ataagagccg ccatacaggg aattgctgct
aggatcaaat gagataatgt atgtgaaacg
4321 ctctggctgt aggttctca gcaaatgggc
acgacttgcg gagtggggat ttgaattcac
4381 gtctggcggg atgtccaagc tgetaccctg
accgctaggg agcttcagag gacagggctg
4441 caggtgatca ggaagaggac tggggcaggt
gggagaggaa tgctcccag gagtgaagga
4501 gggggaattc tagtcagcag gatggagtgc
gccaggtaga aacgagggaa aggagacagg
4561 accgatgga acggggaagc caaaggcgag
ggcgtcggag ggttgaatgg tggccggtgc
4621 agctttgaac accgaggtga ggacatgcag
ctgtgtccta ggtcaggac cgtacacgcc
4681 tgaccaatt ccacagcagc gaggggaact
ccaggatccg gccgcgttgc ccacacactt
4741 cgctctcct cccgcctctc gcaagcccct
ccccgtctc cgtccaccga gtgccagcca
4801 atagcagaag cgacagcgca tctgggtgcc
gactcagcca atcgcggctg agtgacgaat
4861 gagccccagg accaatgaga gtgccgccac
catggcaaaa aaaaaaaaaat ccaatggtga
4921 cgagcaggga gaacagagca gctgccaatg
ggcgtgtgcg tttcaggcgg ccaatgggag
4981 gagcgtctc ggcgggggac aagcagtagc
taccgcggg agcggggagg ggtccgggtt
5041 cgagcttgtg tccc

図 ヒト INFRRG 遺伝子におけるプロモーター領域(仮定)の塩基配列

プロモーター増幅の PCR の際に用いた primer () 部位, シーケンス用 primer () 部位, 変異を確認するために新たに設定したシーケンス用 seq primer5 () 部位, poly-A 配列の部位 (), Exon1 の部位の一部 (), SNP の部位を赤文字で、それぞれ示している。

Exon1 のシーケンス

PCR の際に用いたものと同じ Reverse プライマーで 3' 側からシーケンス解析を行ったところ 3ヶ所の SNP が確認できた。そこで Forward プライマーで 5' 側から変異を確認しようとしたところ、poly-A 配列以降のシーケンスが困難だった。そこで新たにシーケンス用のプライマーを設定し、3' 側からシーケンス解析を行った(図 7)。なお、この際にプロモーター領域の 1部(4910-5000)も同時に解析している。

- ④ 上清を除き、室温で遮光して風乾した。
- ⑤ 教育支援センターに依頼し、塩基配列の決定を行った。

遺伝子変異、多型の確認

機能シーケンス編集ツール BioEdit を利用し、遺伝子変異、多型の有無を確認した。

```
atcgcggctg agtgacgaat
4861 gagccccagg accaatgaga gtgcegccac
catggcaaaa aaaaaaaaaat ccaatggtga
4921 cgagcaggga gaacagagca gctgccaatg
ggcgtgtgcg tttcaggcgg ccaatgggag
4981 gaggcgtctc ggcgggggac aagcagtagc
taccgcggg agcggggagg ggtccgggtt
5041 cgagcttgtg ttccccgga agggtagatc
tggacgcggg cgcggaagga gcgcggccgg
5101 aggtcctcag gaagaagccg cggggactgg
ctgcgcttga caggctgcac ttggatggga
5161 gcacctggtg cctcgggact gtcccgatgc
ccggtgggtg cacatcccag ttcccgcct
5221 tgccggccgg gtttagaggt tttgggggga
ggacatgggg gcgtgcagcc ttcccagttg
5281 caaacttcac tccgaccctg tcttcaaagc
tgggtctggg tc
```

図 ヒト INFRRG 遺伝子における Exon1 の塩基配列

Exon1 増幅の PCR の際に用いた primer () 部位, 新たに設定したシーケンス用 primer () 部位, poly-A 配列の部位 (), Exon1 の部位 (), SNP の部位を赤文字で、それぞれ示している。

Exon2 のシーケンス

PCR の際に用いたものと同じ Forward プライマーでシーケンス解析を行ったところ遺伝子変異が見つからなかったため、5' 側からのみの解析を行った。

エタノール/EDTA/酢酸ナトリウム精製

- ① シーケンス反応済み溶液 10 μ l に滅菌蒸留水 10 μ l, 3M 酢酸ナトリウム 2 μ l, 125mM EDTA 2 μ l, 100% エタノール 50 μ l を加えて遮光して室温に 15 分間静置した。
- ② 25 $^{\circ}$ C, 15,000rpm, 20 分間遠心した。
- ③ 上清を除いて、70%エタノールを 60 μ l 加えて、25 $^{\circ}$ C, 15,000rpm, 5 分間遠心した。

C. 研究結果

シーケンス結果

プロモーター領域, Exon1, Exon2 の3つの非翻訳領域のうち, プロモーター領域と Exon1 にそれぞれ3カ所の1塩基置換を認めた. プロモーター領域では 4071G/A, 4072T/A, 4897A/C を認め(図6), Exon1 では 5001A/G, 5062G/A, 5063G/A を認めた(図). また表に SNP の認められた1型糖尿病患者を示す.

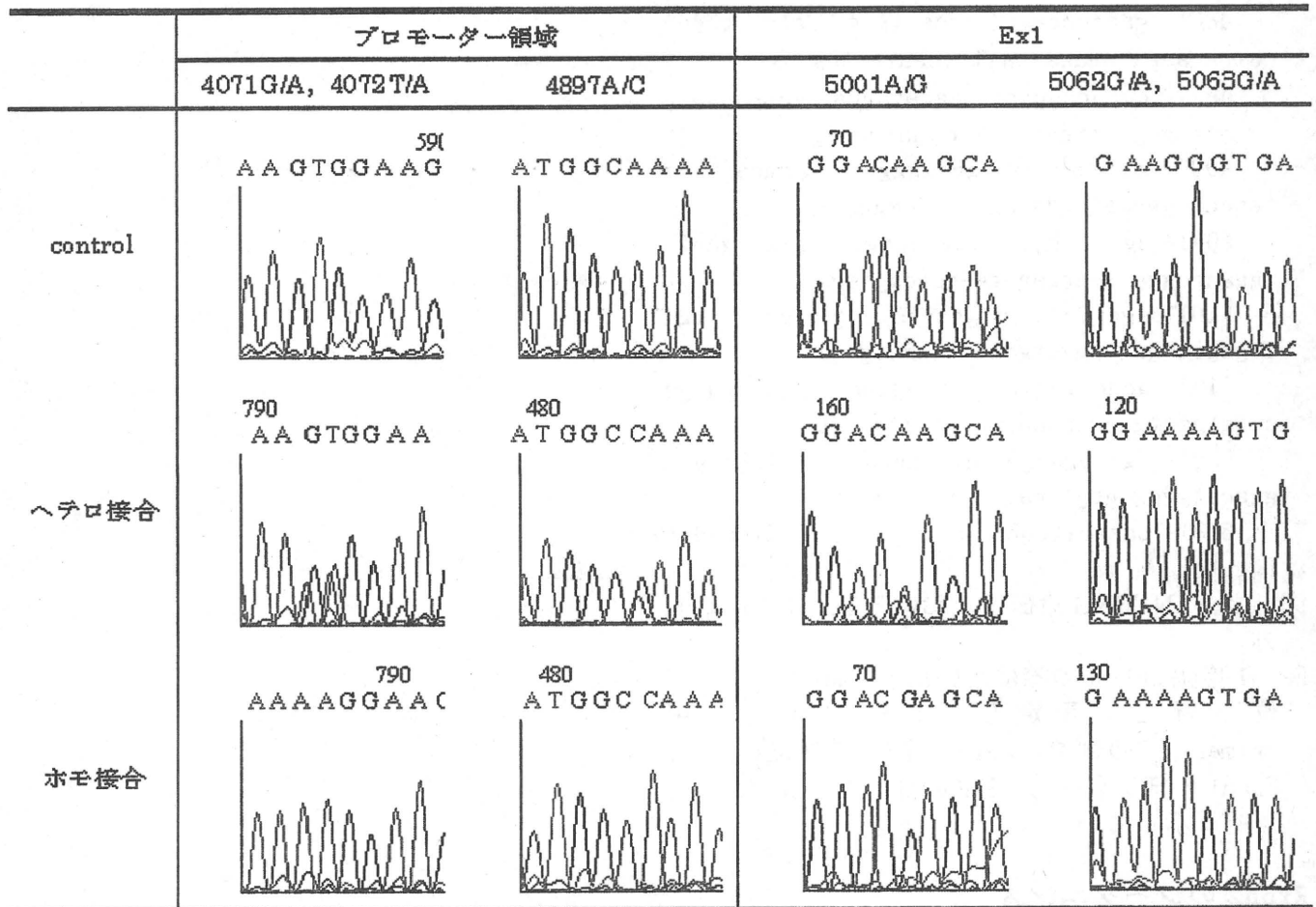


図 プロモーター領域および Exon1 の遺伝子変異

表 SNP が認められた 1 型糖尿病患者および高 IgE 血症患者

患者番号	プロモーター領域の SNP の有無			Exon1 の SNP の有無		
	4071G/A	4072T/A	4897A/C	5001A/G	5062G/A	5063G/A
1						
2	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
3	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
4						
5			ヘテロ			
6			ヘテロ			
7			ホモ			
8	ホモ	ホモ		ホモ	ホモ	ホモ
9						
10	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
11	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
12			ヘテロ			
13	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
14			ヘテロ			
15			ホモ			
16	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
17						
18						
19						
20			ヘテロ			
21						
22			ホモ			

今回検出した 6 ヶ所の SNP のうち、5 ヶ所の SNP(プロモーター領域の 4071G/A および 4072T/A と Exon1 の 5001A/G, 5062G/A, 5063G/A) は 23 検体すべてで同じ変異の形式をとり、同一のハプロタイプ上にあることが示唆された。この変異(以下、変異 1)の頻度はヘテロ接合で 26.1%(6/23 名)、ホモ接合で 4.4%(1/23 名)だった。またプロモーター領域における 4897A/C の変異(以下、変異 2)の頻度はヘテロ接合で 26.1%(6/23 名)、ホモ接合で 13%(3/23 名)だった。変異 1 と変異 2 の両方が認められた患者は患者 11 の 1 名のみだった。また、いずれかの変異を有する患者は 65.2%(15/23 名)と極めて高率だった。今回検出された 6 ヶ所の SNP はいずれも、以前に報告されている Exon6 の 19043C/T および Exon8 の 20597G/T とは、相関を示さなかった。

D. 考察

ヒト INFRFG 遺伝子における非翻訳領域(プロモーター領域, Exon1, Exon2)のうち, プロモーター領域と Exon1 でそれぞれ 3 ヶ所の SNP を検出した. 変異 1(同一のハプロタイプ上に乗っている, プロモーター領域の 4071G/A および 4072T/A と Exon1 の 5001A/G, 5062G/A, 5063G/A)の頻度はヘテロ接合で 26.1% (6/23 名), ホモ接合で 4.4% (1/23 名) だった. また変異 2(プロモーター領域における 4897A/C)の頻度はヘテロ接合で 26.1% (6/23 名), ホモ接合で 13% (3/23 名) だった. いずれかの変異を有する患者は 65.2% (15/23 名) と極めて高率に検出できた. 以上のことから, これらの変異はウイルス誘発性 1 型糖尿病の疾患感受性マーカー因子である可能性が高いと考えられ, 多型マーカーとして疾患の発症に関連する遺伝子を検出するために有用である. ただし, SNP が検出された患者は, 年齢, 性別, 家族歴には相関性が認められなかった. また, 今回は急性または劇症型の 1 型糖尿病という条件だけで対象とする血液検体を選択し, 年齢や性別などの条件は考慮していない. 今後も 1 型糖尿病患者の血液検体の収集を続け, より多数の標本で検討し, 各条件別で SNP の頻度を比較しなければならない. さらに, 1 型糖尿病患者と健常者コントロールにおいて SNP の発生頻度を比較すれば, INFRFG 遺伝子の機能障害の臨床的な意義を明らかにすることができる. したがって, 多数の血液検体を対象とした, ウイルス性 1 型糖尿病感受性の遺伝子同定につながることを期待できる.

今回の SNP の検出は, 簡便でかつ迅速に結果を得られるダイレクトシーケンス法によって行っている. しかし, ダイレクトシーケンス法による SNP の検出はスクリーニングの 1 つに過ぎず, SNP の有無や部位を裏付けるためには RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を行うことも有用である. RFLP 法では, 目的の変異を含む領域を PCR 増幅後に制限酵素処理をし, 切断された断片の鎖長の長さの違いを確認する. したがって, プロモーター領域, Ex1 に SNP があるならば, SNP を含む遺伝子断片を対象とする制限酵素で切断することができる. もし仮に, 対応した制限酵素が存在せず, RFLP 法を行うことができない場合, ミスマッチプライマー法という選択もある. これは, 1~2 個のミスマッチ塩基を設定したプライマーで PCR を行い, 意図的に制限酵素に対応する領域を作成する方法である. ミスマッチプライマーを用いれば, RFLP 法ができない場合でも目的の SNP に対応した制限酵素を見つけられる可能性もある. それでももし制限

酵素を見つけられないならば, RFLP 法を断念しなければならない. 塩基置換を検出できる PCR 法には, RFLP 法の他に PNA クランピング・アリル特異的 PCR がある. PNA はペプチド結合を有し, DNA や RNA に似た構造を成す分子である. PNA にはリン酸部位の電化が存在しないため, DNA 鎖と強力に結合する. よって, 野生型 DNA 鎖に相補的な PNA とプライマーを共存させた状態では, PNA が DNA 鎖と結合して野生型 DNA を増幅することができない. しかし, 変異型では PNA は DNA 鎖に結合することができず, プライマーが DNA 鎖に結合して塩基置換を含む領域以降を増幅することになる. 野生型 DNA 鎖の増幅は PNA によって抑制されるため, ヘテロ接合でも SNP の検出は可能である. PNA クランピング・アリル特異的 PCR 法は感度が高い上に特異的なので, SNP の検出には有用である.

プロモーター領域および Exon1 における SNP 群が確実に存在していれば, その SNP が INFRFG を介した IFN シグナル伝達障害に関与しているかどうかを評価する必要がある. 本研究で SNP を検出したプロモーター領域, Exon1, Exon2 は INFRFG 遺伝子の非翻訳領域である. よって, SNP によるアミノ酸の変化は認められず, INFRFG 遺伝子の機能が変化している可能性は低い. しかし, タンパクの構造や INFRFG 遺伝子の発現などに変化が認められる可能性があり, 一概に変化していないとはいえない. そこでプロモーター領域に検出した SNP が与える INFRFG 遺伝子への影響を次の 2 点について考察する. 第一に, 今回プロモーターだと仮定した領域について, プロモーター配列解析データベース (TRANSFAC) を用いて転写因子結合配列を予測したところ, 次の予測が得られた. 本研究でプロモーター領域に検出された 3 ヶ所の SNP を含む配列は, いずれも FOXD3 と呼ばれる転写因子に認識され, 結合する可能性がある. この FOXD3 と呼ばれる転写因子は DNA 結合モチーフであるフォークヘッドドメインを有している. したがって, この部位に変異が存在すると DNA 結合能が低下し転写が抑制される可能性がある. 第二に, 本研究でプロモーター領域に検出された 3 ヶ所の SNP はいずれも poly-A 配列の非常に近傍に存在している. poly-A 配列は遺伝子の mRNA に安定性を与える役割がある. したがって, この部位に変異が存在すると mRNA の安定性が失われるか, あるいは弱まることによって, INFRFG 遺伝子の構造が変化する可能性がある. これらの可能性を検討するためには, INFRFG 遺伝子の発現を確認しなければならない. つまり, IFN α やウイルスの刺激によって本来産生されるべき PKR, IFN γ などの抗ウイルス作用性のタンパクの産生レベルが, どのように

変化するか評価する必要がある。その方法の1つとして、組み換え DNA を用いた方法がある。SNP を含む遺伝子断片をプラスミド DNA に組み換え、INFRRG 遺伝子を発現させる。そして、その際に産生されたタンパクの分子量を SDS-PAGE やウエスタンブロットなどで測定することで、タンパクの活性の程度を評価することができる。また、患者の白血球を enterovirus などのウイルスで刺激し、産生された抗ウイルス作用性タンパクによってウイルス増殖の抑制が可能かどうか確認する方法もある。もし、INFRRG 遺伝子の機能障害による IFN シグナル伝達障害があるならば、PKR や IFN γ の濃度は健常者よりも低く、ウイルス増殖抑制能が低下することが予想される。このように、INFRRG 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 型糖尿病との関連を検討することが今後の課題である。

E. 結論

感冒症状が先行した急性または劇症 1 型糖尿病患者で INFRRG 遺伝子の非翻訳領域であるプロモーターおよび Exon1 において、65.2% (15/23 名) という高頻度で SNP を検出した。INFRRG 遺伝子の機能障害の臨床的な意義を明らかにするために、1

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

II. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

型糖尿病患者と 2 型糖尿病患者および健常者コントロールにおいて SNP の発生頻度を比較しなければならない。また、SNP の存在を確認し、多数の検体検査につなげるために RFLP 法やミスマッチ PCR 法、あるいは PNA クランピング・アリアル特異的 PCR 法を行う必要がある。さらに、INFRRG 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

なし

1. 論文発表

なし

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 I 型糖尿病のウイルス原因説に関する研究
-INFRRGシグナル経路に関する研究-

分担者 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

研究要旨

Siva-1は、レセプターを介するextrinsicなアポトーシスと、レセプターを介さないintrinsicなアポトーシスの両方を誘導する分子である。Siva-1は、TNFレセプターファミリーであるCD27や、Abl-related gene (ARG)、BCL-X1などと会合し、これらの結合分子はSiva-1のアポトーシス作用を増強させる。Siva-1が、サイトカインのシグナル伝達に必要なキナーゼであるJAKファミリーのひとつであるINFRRGと会合することを見出した。Siva-1のN末がINFRRGとの会合に必要であり、INFRRGはSiva-1の53番目と162番目のアミノ酸残基であるTyrosineをリン酸化する。マウスB細胞由来であるBa/F3細胞株にINFRRGを発現させると、Siva-1によるアポトーシスが亢進する。このアポトーシスの亢進は、Siva-1のリン酸化の状態に関わらず生じるものの、INFRRGとの会合が阻害されると減弱する。つまり、Siva-1とINFRRGの会合がSiva-1のアポトーシス作用を直接亢進することが判明した。Siva-1は、インターフェロンのシグナル伝達に必要な分子であるINFRRGと機能的な複合体を形成し、B細胞の増殖を阻害すると考えられる。

A. 研究目的

アポトーシスは、発生と生体の恒常性維持に中心的な役割を果たしている細胞死の機構である。成体では、寿命の終了や免疫反応により細胞はアポトーシスによる死を迎える。アポトーシスの生理学的な役割は重要であり、その破綻はがん、ウイルス感染、自己免疫疾患をもたらす。

Siva-1 は、レセプターを介する extrinsic なアポトーシスと、レセプターを介さない intrinsic なアポトーシスの両方を誘導すると報告されている。Siva-1 は、もともと TNFR アポトーシスの機構は複雑であり、例えば癌やウイルス感染、あるいは自己免疫疾患により、その機序は異なる。Siva-1 は、TNF レセプタースーパーファミリーの一員であり、T 細胞と B 細胞に発現している CD27 と会合する分子として同定された。Fas や TNFR1 と異なり、CD27 には death ドメインを欠くにも関わらずアポトーシスを誘導可能なことから、death domain と類似の構造 (DDHR) を有する

Siva-1 が CD27 と会合して、細胞死のシグナルを伝達する可能性が想定されていた。

Siva-1 を単独で発現させると、種々の細胞において細胞死が誘導される。しかし、DDHR を欠く Siva-1 のバリエーションを同様に細胞に導入しても、アポトーシスが誘導されないことから、Siva-1 に存在する DDHR が、アポトーシスを誘導する機能領域であると推定されている。また、Siva-1 は種々の病的な病態、例えば、虚血性の疾患やコクサッキーウイルスの感染時に発現が亢進していることが知られており、このような状況の細胞死に Siva-1 が関与していると考えられてきた。

CD27 以外にも種々の分子、例えば、glucocorticoid 誘導 TNFR 関連分子である GITR や ABL-related gene (ARG)、あるいは BCL ファミリーに属し、細胞の生存を誘導する BCL-X_L などが Siva-1 と会合することが報告されている。Siva-1 は T 細胞において NF κ B のシグナルを抑制するとも報告されており、T 細胞レセプターを介する細胞死にも関与する

と考えられてきた。

我々は INFRRG が IFN α による B 細胞の細胞抑制のシグナル伝達に必須であることを過去に報告した。この抑制シグナルは JAK ファミリーの一員である INFRRG により伝達されるものの、STAT は介しておらず、その下流のシグナル伝達経路は不明であった。Tyk2 を介し、B 細胞のアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路を解明するために、INFRRG を bait とし Yeast の two-hybrid 法によるスクリーニングを行った。その結果、Siva-1 を INFRRG と会合する分子として同定した。本研究では、我々は INFRRG が Siva-1 と会合し、Siva-1 を明細化するを示す。

さらに、Siva-1 の特定の Tyrosine は INFRRG によりリン酸化されることを見出した。INFRRG は Siva-1 との会合を介して、B 細胞系の細胞株である バフ 3 細胞に細胞腫を誘導するもののそれらは Siva-1 自身のリン酸化は関与していない。

B. 研究方法

Yeast two-hybrid スクリーニング

ヒト TINFRG の キナーゼ領域 (aa 833-1187) cDNA を Gal DNA-binding domain を有する pGBKT7 (BD Clontech) にサブクローニングしたコンストラクトを bait として、ヒト B リンパ球 cDNA ライブラリーのスクリーニングを、yeast two-hybrid 法により行った (BD Clontech)。ADE2, HIS3, lacZ リポーター遺伝子の発現を指標に、約 1.6×10^6 のコロニーをスクリーニングした。陽性クローンから挿入 cDNA を回収、遺伝子配列を決定した。

プラスミド

ヒト INFRRG cDNA を pCMV-Tag2 vector (N-terminal Flag tag) (Stratagene, Heidelberg, Germany) に挿入した。ヒト Siva-1 cDNA の全長は、5' -cgg ccc cgc ggc cat gcc caa gcg gag ctg ccc ctt-3'、5' -ctt gag cca gcc tca ggt ctc gaa cat ggc aca g-3' のプライマーを用いてヒト骨髄細胞から RT-PCR により作成した。PCR 産物を pCR2.1-TOPO (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad,

CA) にサブクローニングし、引き続き 免疫沈降、ウエスタンブロット

		IP: α INFRRG				IP: α Flag			
iva-1									
(pCMV									
-Tag2									
vector	INFRRG	-	+	-	+	-	+	-	+
) およ	Siva-1	-	-	+	+	-	-	+	+
び									
GFP-Si	Blot: αINFRRG								
va-1									
(pEGF									
PC1vec	Blot: αFlag								
tor (BD									
Clontech))									

を作成した。

図2に示すGFP-Siva-1欠損変異体 (A, C、E—G) は、PCR 法により作成し、pEGFP-C1 ベクターへサブクローニングした。GFP-Siva-1 欠損変異体B、Dは、GFP-Siva-1の全長をApaI またはPstIで切断後、セルフライゲーションして作成した。野生型Siva-1の3か所のチロシン(34, 53, 162)のフェニルアラニンへの置換は、以下のオリゴヌクレオチドにより、transformer site-directed mutagenesis kit (BD Clontech)を用いて行った。Y34F : gcc gag cgc ttc tcg caggag、Y53F : gcc cag gcc ttc ctg gac cac、Y162F : gca gtg aca tgt tcg aga aag tgc。

細胞培養

HEK293T細胞への遺伝子導入は、Caリン酸沈降法により行った。Ba/F3細胞、Ba/F3/INFRRG細胞、Fa/F3/INFRRG V678F細胞への遺伝子導入は、Nucleofector (Amaxa Biosystems GmbH, Cologne, Germany)を用いて行った。

RIPA buffer(10 mM Tris- HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% DOC and 0.1% SDS)を用いて細胞を融解し、以下の抗体を用いて、免疫沈降およびウエスタンブロットを行った。抗 INFRRGAb(C-20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 抗phosphotyrosine, Ab (4G10) (Upstate, Lake Placid, NY), 抗 Flag M2 mAb (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO), BD Living Colors A.V. Peptide Ab (BD Clontech)。

フローサイトメトリー

GFP 陽性細胞にゲートを設定し、FACS Calibur cytofluorimeter (BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて行った。アポトーシス細胞は、APC conjugated Annexin V (BD Biosciences) 陽性細胞を、Cell-Quest software (BD Biosciences)により検出した。

C. 研究結果

図1. INFRRG と Siva-1 の会合

1. INFRRG は Siva-1 と会合する

INFRRG と会合する新たな新規分子を同定するために INFRRG の kinase 領域を Gal-DNA 結合ドメインと融合した分子を bait に用いた yeast の two hybridスクリーニングを行った。ヒトBリンパ球 cDNA ライブラリをスクリーニングし、INFRRG と会合する分子として Siva-1 を同定した。INFRRG と Siva-1 の会合を解析するために、共沈実験を行った。Flag を融合した Siva-1 の全長を、INFRRG の全長または、コントロールベクターとともに 293

細胞に一過性に遺伝子導入した。24 時間後、抗 INFRRG 抗体を用い免疫沈降を行い、抗 Flag 抗体によりウエスタンブロッティングを行った。図1に示すように、INFRRG と Siva-1 の両方を 293 細胞に発現させた場合、Siva-1 と INFRRG の会合が観察された。INFRRG または、コントロールベクターと、Flag 融合 Siva-1 を 293T 細胞に一過性に遺伝子導入した。24 時間後、抗 INFRRG 抗体を用い免疫沈降を行い、抗 Flag 抗体によりウエスタンブロットを行った。INFRRG と Siva-1 の両方を 293T 細胞に発現させた場合にのみ、Siva-1 と INFRRG の

会合が観察される。

2. Siva-1 の N 末領域と IFNRRG が会合する

次に IFNRRG との会合に必須な、Siva-1 の領域の同定を行った。Siva-1 は、N 末領域、中央部の

death domain homology region (DDHR, 48-114 アミノ酸)、およびシステインが豊富な C 末領域の 3 つの領域からなる。さらに、アミノ酸 36-55 の領域は、両親媒性ヘリックス構造と推定されている。これらの Siva-1 の構造を元に、GFP と融合した種々の Siva-1 (GFP-Siva-1) の変異体を作成した (図 2A)。

野生型の GFP-Siva-1、または図 2 に示すその変異体を、Flag と融合した IFNRRG とともに 293T 細胞に遺伝子導入した。24 時間細胞を回収し、抗 Flag

抗体で免疫沈降を行い、引き続き抗 GFP 抗体で免疫染色を行った。図 2b に示すように、野生型の Siva-1 と A、B、C、D の Siva-1 変異体 (これらの変異体はすべて N 末領域を含んでいる) が IFNRRG と会合した。

一方、N 末領域を欠く変異体である、E、G 変異体は IFNRRG と会合しなかった。つまり、Siva-1 は IFNRRG と、その N 末領域を介して会合することが明らかとなった。さらに、Siva-1 の N 末 1 番から 36 番のアミノ酸のみを有する Siva-1 の A 変異体が IFNRRG と会合したことから、Siva-1 の N 末領域は、IFNRRG との会合に必要十分であることが判明した。Siva-1 の F 変異体は IFNRRG と弱く会合したが、F 変異体には Siva-1 の 34 番目から 48 番目のアミノ酸が含まれているため、弱く会合したものと思われた。

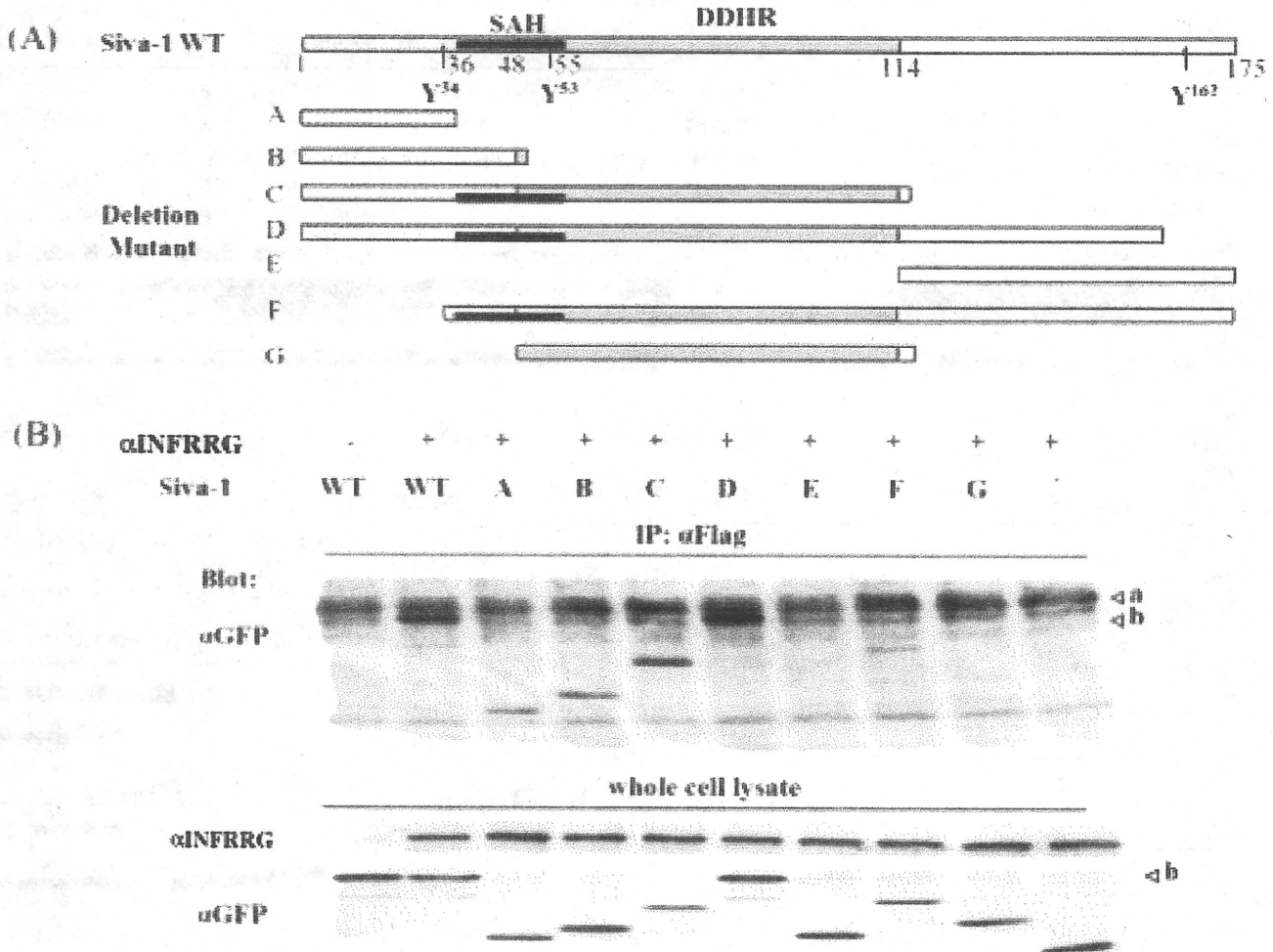


図 2. Siva-1 の N 末領域が、IFNRRG との会合に必須である

(A) Siva-1 変異体の構造

(B) 野生型の GFP-Siva-1、および A-G の変異体を、Flag と融合した IFNRRG とともに 293T 細胞に遺伝子導入した。24 時間細胞を回収し、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行い、引き続き抗 GFP 抗体で免疫染色を行った。a: 免疫グロブリン重鎖 (55kDa), b: GFP-Siva-1 (Wt) (46 kDa)

3. IFNRRG は Siva-1 の 2 つの Tyrosine (Tyr⁵³ と Tyr¹⁶²) をリン酸化する

IFNRRG は Tyrosine キナーゼであるため、次に IFNRRG が Siva-1 をリン酸化するか否かを検討した。Flag と融合した野生型の Siva-1 を 293T 細胞に IFNRRG とともに遺伝子導入をし、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行い、その後抗リン酸化抗体でウェスタンブロットを行った。図 3A に示すように IFNRRG は Siva-1 を細胞内においてリン酸化することが判明した。

次に、Siva-1 蛋白のどの Tyrosine 残基が IFNRRG によってリン酸化されるかを検討した。Siva-1 には 3 つの Tyrosine 残基 (Tyr³⁴, Tyr⁵³, Tyr¹⁶²) が存在する。それぞれの Tyrosine 残基を単独で、あるいはいくつかを組み合わせることでフェニルアラニンに改変した変異体を作成

した。Flag が融合した野生型の Siva-1、あるいは Flag と融合した Tyrosine をフェニルアラニンに改変した Siva-1 を IFNRRG とともに 293T 細胞に遺伝子導入をした。そして、免疫沈降を抗 Flag 抗体により行い、その後、抗リン酸化抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

図 3C に示すように Tyr⁵³ と Tyr¹⁶² をフェニルアラニンに変異した Siva-1 は、すべての Tyrosine をフェニルアラニンに変異した Siva-1 の変異体と同様に IFNRRG によりリン酸化されなかった。

つまり、Siva-1 の 2 つの Tyrosine、Tyr⁵³ と Tyr¹⁶² が、IFNRRG によりリン酸化されることが明らかになった。

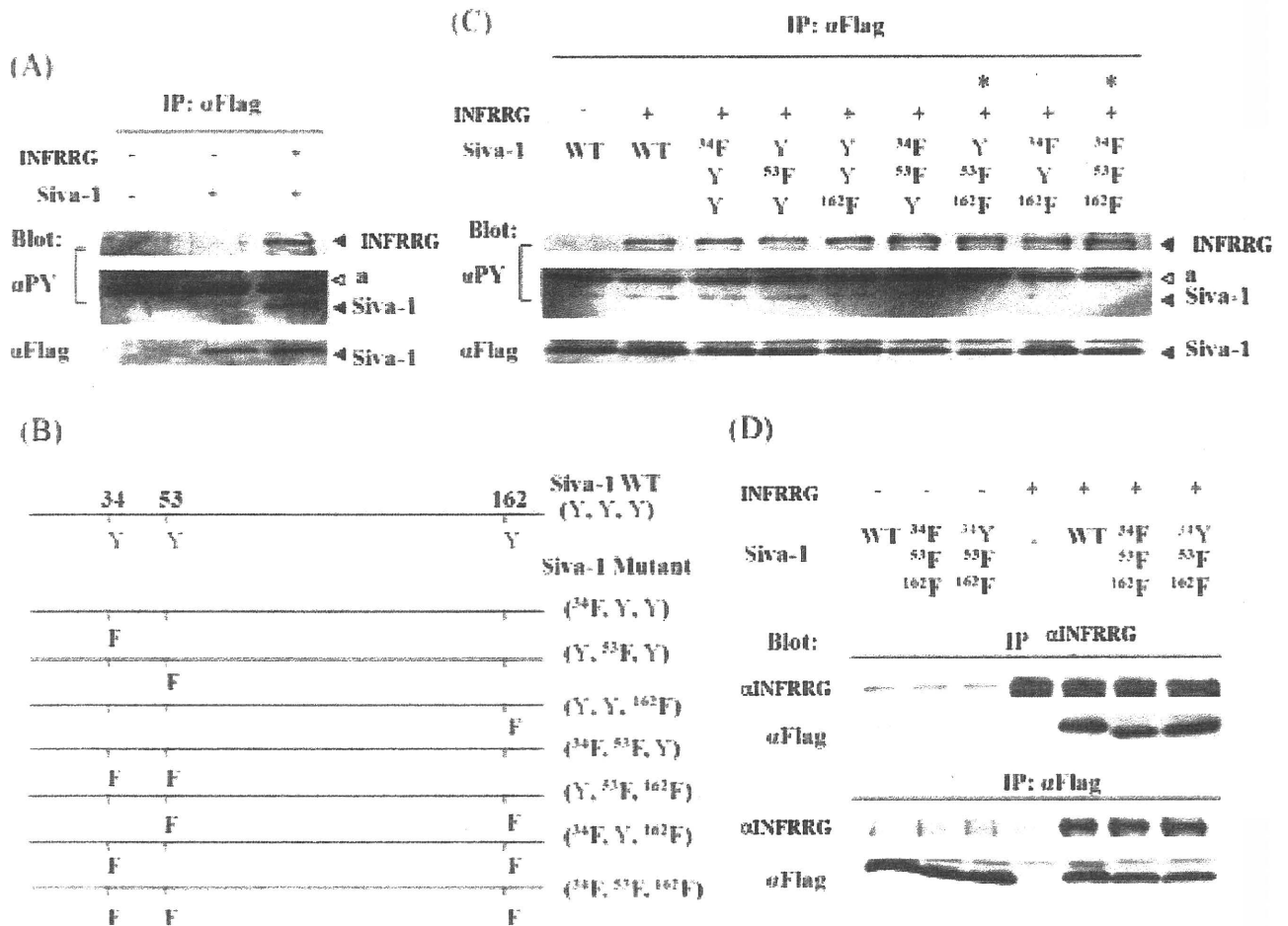


図 3. IFNRRG は、Siva-1 の IFNRRG⁵³、IFNRRG¹⁶² を、T IFNRRG -Siva-1 の会合に依存せず、リン酸化する。(A) Flag-Siva-1 (WT) を 293T 細胞に IFNRRG とともに遺伝子導入し、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行い、その後抗リン酸化抗体でウェスタンブロットを行った。IFNRRG は Siva-1 を細胞内においてリン酸化した。

(B) Siva-1 の 3 つの Tyrosine 残基 (Tyr³⁴, Tyr⁵³, Tyr¹⁶²) を、それぞれ単独で、あるいは組み合わせることでフェニルアラニンに改変した変異体の模式図。

(C) 野生型の Siva-1、あるいは(B)に示す Tyrosine をフェニルアラニンに変異した Siva-1

を、IFNRRG とともに 293T 細胞に遺伝子導入をし、IFNRRG によりリン酸化されるか検討した。Tyr⁵³ と Tyr¹⁶² をフェニルアラニンに変異した Siva-1 は、すべての Tyrosine をフェニルアラニンに変異した Siva-1 の変異体と同様に IFNRRG によりリン酸化されなかった。

(D) Tyk2 よりリン酸化をうけない Siva-1 の変異体、Siva-1(³⁴F, ⁵³F, ¹⁶²F) と Siva-1(³⁴Y, ⁵³F, ¹⁶²F) を、IFNRRG とともに 293T に導入し、IFNRRG との会合の有無を検討した。

4. Siva-1 の Tyrosine リン酸化は、IFNRRG と Siva-1 の会合に影響を与えない

IFNRRG は Siva-1 と会合すること、IFNRRG が Siva-1 の 2 つの Tyrosine を特異的にリン酸化することから、IFNRRG によりリン酸化される Siva-1 の Tyrosine 残基が IFNRRG と Siva-1 の会合に関与しているか否かについて検討した (図 3D)。

IFNRRG によりリン酸化される Siva-1 の Tyr⁵³

5. IFNRRG と Siva-1 の会合は、Siva-1 により誘導されるアポトーシスを亢進させる

Siva-1 はアポトーシスを誘導する分子であると考えられている。そこで、IFNRRG が Siva-1 による誘導されるアポトーシスに及ぼす影響を検討した。

最初に、野生型の IFNRRG (WT IFNRRG 2)、または IFNRRG の 678 番目のアミノ酸であるバリンをフェニルアラニンにより置換 (V678F IFNRRG) することにより、恒常的に活性化される IFNRRG を、それぞれ Ba/F3 細胞に導入した細胞株を樹立した (Ba/F3/ IFNRRG Ba/F3/V678F IFNRRG)。Ba/F3/V678F IFNRRG 細胞において、IFNRRG 2 は (サイトカインの刺激がない状態でも) 活性化されている (図 4A)。

IFNRRG が Siva-1 によるアポトーシスの誘導に及ぼす影響を調べるため、Ba/F3 細胞、

と Tyr¹⁶² をフェニルアラニンに変異したミュータント (Y, ⁵³F, ¹⁶²F) を用いて、このミュータントを IFNRRG とともに 293 細胞に導入した。これらの変異体の Siva-1 はリン酸化されないのにも関わらず、IFNRRG と会合した。つまり、Siva-1 の Tyr⁵³ と Tyr¹⁶² のリン酸化は IFNRRG と Siva-1 の会合には必須ではないことが判明した。

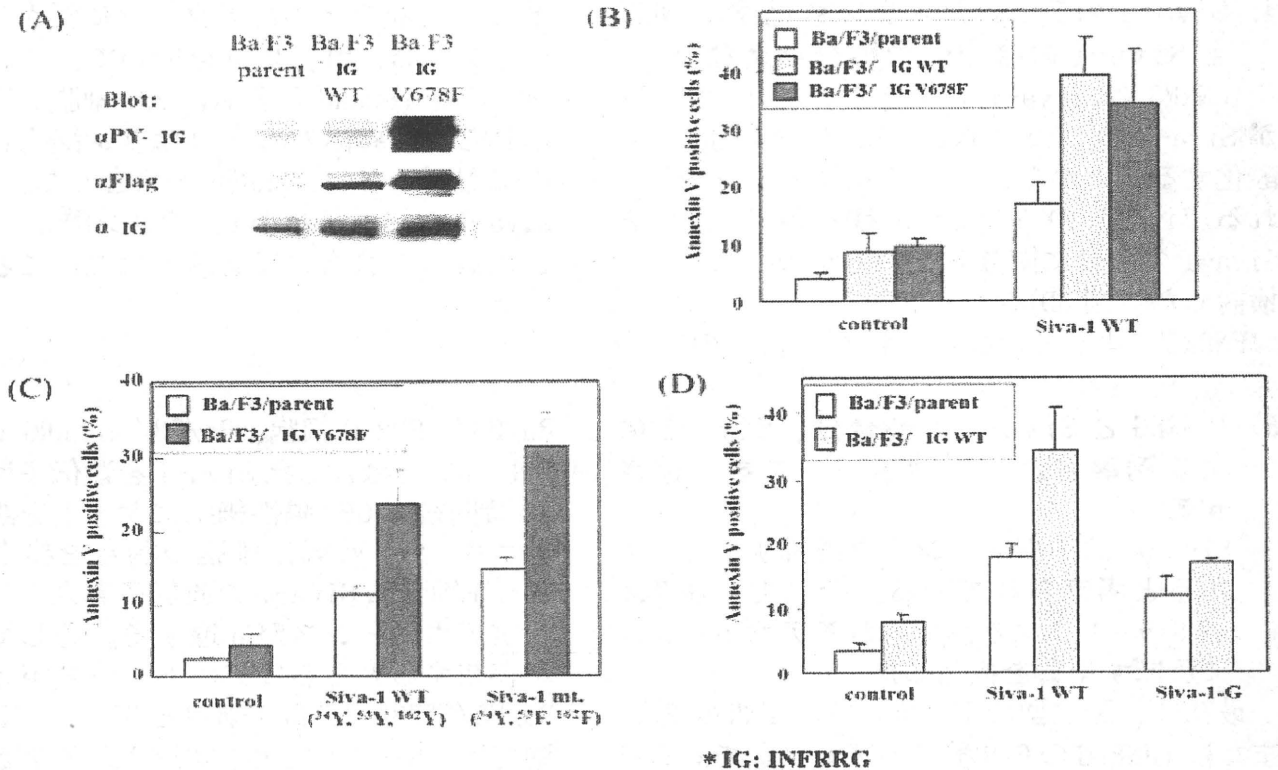
Ba/F3/ IFNRRG 細胞、Ba/F3/ IFNRRG V678F 細胞に GFP と融合した Siva-1 を遺伝子導入した。48 時間後に GFP 陽性細胞にゲートを設定し、アニキシン V 陽性細胞の割合を検索した。Ba/F3 細胞に Siva-1 を遺伝子導入すると、約 4 倍アポトーシスが亢進する。そして、Tyk2 が存在するとさらにアポトーシスが亢進する。Ba/F3/V678F IFNRRG 細胞と Ba/F3/ IFNRRG 細胞では、Siva-1 により誘導されるアポトーシスの程度は同程度であった (図 4B)。

次に、Siva-1 変異体 (³⁴Y, ⁵³F, ¹⁶²F) を、Ba/F3/ IFNRRG 細胞と Ba/F3/ IFNRRG V678F 細胞に導入した。野生型の Siva-1 と同様に、Siva-1 変異体 (³⁴Y, ⁵³F, ¹⁶²F) を Ba/F3/ IFNRRG V678F 細胞に遺伝子導入した場合にも、同程度のアポトーシス亢進が観察された。

以上の結果は、IFNRRG により亢進する Siva-1 誘導アポトーシスには、Siva-1 のリン酸化は必須ではなく、Siva-1 と IFNRRG が重要であることを示している。

このことをさらに確認するために、Siva-1のDDHR領域を欠損し、IFNRRGと会合することができないSiva-1-G変異体を、Ba/F3細胞およびBa/F3/IFNRRG細胞に遺伝子導入した。Ba/F3細胞にSiva-1-G変異体を発現させると、

るものの、IFNRRGによるアポトーシスの亢進作用は見られなかった。このことから、IFNRRGとSiva-1の会合がSiva-1によるアポトーシスの亢進に必須であり、Siva-1のリン酸化は関与していないことを示している。



Siva-1によるアポトーシスの誘導は観察され

図4. IFNRRGとSiva-1は会合すると、Siva-1により誘導されるアポトーシスを亢進させる
 (A) 野生型のIFNRRG (WT IFNRRG)を導入したBa/F3細胞(Ba/F3/IFNRRG)、IFNRRGの678番目のアミノ酸であるバリンをフェニルアラニンにより置換(V678F IFNRRG)し、恒常的に活性化されるようになったIFNRRGを導入したBa/F3細胞(Ba/F3/V678F IFNRRG)を樹立した。Ba/F3/V678F IFNRRG細胞では、IFNRRGの恒常的活性化が観察される。
 (B) Ba/F3細胞、Ba/F3/IFNRRG細胞、Ba/F3/IFNRRG V678F細胞に、コントロールGFPベクター、GFP Siva-1を遺伝子導入した。GFP陽性細胞にゲートを設定し、アニキシンV陽性細胞の割合を検索した。
 (C) コントロールGFPベクター、野生型Siva-1 (³⁴Y, ⁵³Y, ¹⁶²Y)、Siva-1変異体 (³⁴Y, ⁵³F, ¹⁶²F)を、Ba/F3/IFNRRG細胞とBa/F3/IFNRRG V678F細胞に導入した。
 (D) コントロールGFPベクター、野生型Siva-1、Siva-1G変異体 (³⁴Y, ⁵³F, ¹⁶²F)を、Ba/F3/IFNRRG細胞とBa/F3/IFNRRG V678F細胞に導入した。
 (B-D) 24時間後、GFP陽性細胞にゲートを設定し、アニキシンV陽性細胞の割合を検索した。

D. 考察

Siva-1はもともとCD27のリガンドとして

同定されてものであり、TNFレセプターファミリーの一員である。機能的にはSiva-1はアポトーシスを誘導し、CD27を介するアポトーシ

スに重要な役割を果たすと考えられてきた。現在では、Siva-1 はレセプターを介する extrinsic なアポトーシスと、レセプターを介さない intrinsic なアポトーシスの、両方の経路に関与すると考えられており、TNF レセプター以外に、ARG や BCL-X_L などが Siva-1 と会合することが報告されている。

IFNRRG は IFN α のシグナル伝達に必須の分子としてクローニングされた JAK ファミリーの一員である。IFNRRG は、IFN α の B リンパ球細胞増殖抑制作用に必須のシグナル伝達分子であり、また helper T リンパ球の、IL12 による分化に必須なシグナル伝達分子である。IFNRRG の下流に位置し、B リンパ球の細胞増殖抑制シグナルを伝達する分子を同定する目的で、yeast を用いた two hybrid スクリーニングを行い、IFNRRG と会合する新規の分子として Siva-1 をクローニングした。

Siva-1 は、その N 末領域 (aa1~36) を介して IFNRRG と会合する。Siva-1 と BCL-X_L の会合には、Siva-1 の SAH 領域を必要とすることから、IFNRRG と BCL-X_L が会合する Siva-1 の結合領域は、それぞれ異なることが想像される。IFNRRG は JAK ファミリーに属するチロシンキナーゼであるため、IFNRRG が Siva-1 をリン酸化するかを検討した。IFNRRG と Siva-1 を 293T 細胞に発現させると、Siva-1 は IFNRRG によりリン酸化された。Siva-1 の 3 つの Tyrosine 残基 (Tyr³⁴、Tyr⁵³、Tyr¹⁶²) のうち、IFNRRG は Tyr⁵³ と Tyr¹⁶² を特異的にリン酸化する。IFNRRG と同様に Siva-1 と会合する ARG は、Tyr³⁴ をリン酸化することが知られている。これらのことは、Siva-1 は複数の分子と会合するが、その会合領域やリン酸化される Tyrosine は、会合する分子により異なることを示している。

Siva-1 と IFNRRG の会合には、Siva-1 のリン酸化は影響を与えておらず、IFNRRG よりリン酸化される Tyr⁵³ および Tyr¹⁶² が、Siva-1 の N 末領域に位置していないことも、IFNRRG によりリン酸化される Siva-1 の Tyrosine 残基が IFNRRG との会合に関与していないことを支持する所見である。

Siva-1 の発現は、Ba/F3 細胞にアポトーシスを生じさせる。IFNRRG が共存すると、Siva-1 によるアポトーシス作用はさらに亢進

する。しかし、IFNRRG と会合できない Siva-1 の変異体は、IFNRRG と共存してもアポトーシスを亢進しないため、Siva-1 と IFNRRG の直接の会合が Siva-1 によるアポトーシス亢進作用に重要であることが判明した。当初の予想に反して、IFNRRG による Siva-1 のリン酸化は、Siva-1 によるアポトーシスの亢進にほとんど影響を与えなかった。IFNRRG による Siva-1 のリン酸化ではなく、Siva-1 と IFNRRG が結合することのみで、Siva-1 によるアポトーシスの亢進が生じていた。これは、ARG と Siva-1 の会合、ARG による Siva-1 のリン酸化の場合と異なっている。ARG と Siva-1 の会合は、ARG により生じる Siva-1 のリン酸化に依存しており、Siva-1 によるアポトーシスの亢進作用も、ARG のキナーゼ活性に依存している。IFNRRG と ARG はともに Siva-1 に会合し、Siva-1 による細胞死を誘導するものの、その分子機序は 2 つの分子の間で異なっていると思われる。

Siva-1 がアポトーシスにおいて果たす役割についての知見が集まってきている。ARG は Siva-1 によるアポトーシスを亢進させる。一方、抗アポトーシス分子として知られている BCL-X_L の機能は、Siva-1 の存在により抑制される。これらの知見に加え、IFNRRG は Siva-1 と会合し、Siva-1 のアポトーシス誘導を亢進させることが明らかとなった。

E. 結論

IFNRRG は Siva-1 と会合し、Siva-1 のアポトーシス誘導を亢進させること、この作用に、Siva-1 のリン酸化は関与しないことを明らかにした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimoda HK, Shide K, Kameda T, Matsunaga T, Shimoda K: Tyrosine kinase 2 interacts with the proapoptotic protein Siva-1 and augments its apoptotic functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 400

(2):252-7, 2010

Kameda T, Shide K, Shimoda HK, Hidaka T, Kubuki Y, Katayose K, Taniguchi Y, Sekine M, Kamiunntenn A, Maeda K, Nagata k, Matsunaga T, Shimoda K: Absence of gain-of-function JAK1 and JAK3 mutations in adult T cell leukemia/lymphoma. *Int J Hematology* 92(2) 320-325, 2010

Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, Urata S, Yamauchi T, Iwamoto C, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K : JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Blood* 115:334-344, 2010

Muramoto R, Kuroda M, Togi S, Sekine Y, Nanbo A, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T: Functional involvement of Daxx in

gp130-mediated cell growth and survival in BaF3 cell. *Blood* 115:3570-3580, 2010

2. 学会発表

Shide K, Kameda T, Shimoda H, Hidaka T, Katayose K, Kubuki Y, Matsunaga T, Shimoda K: Characterization of JAK2 V617F induced murine MPN model. 1st JSH International Symposium 2010 in Akita 7/16 2010

II. 知的財産の出願・登録状況

なし

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
永淵正法	糖尿病の基礎知識 高脂血症 グリコヘモグロビン ンカラーグラフ	永淵正法	糖尿病治療ハンドブック 鵜	医学出版	東京	2010	14-18, 177-181, 296-299,

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagafuchi S, Katsuta H, Anzai K.	Rituximab, B-Lymphocyte depletion, and beta-cell function.	New England Journal of Medicine	362(8)	761	2010
Inada A, Inada O, Fujii H, Akashi T, Sueishi K, Fukatsu A, Nagafuchi S	Different effects of islet transplantation and Detemir treatment on the reversal of streptozotocin induced diabetes associated with β	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.	Microbiology and Immunology	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

Kameda T, Shide K, Shimoda HK, Hidaka T, Kubuki Y, Katayose K, Taniguchi Y, Sekine M, Kamiunntenn A, Maeda K, Nagata k, Matsunaga T, Shimoda K	Absence of gain-of-function JAK1 and JAK3 mutations in adult T cell leukemia/lymphom a.	Int J Hematolog y	92(2)	320-325,	2010
Shimoda HK, Shide K, Kameda T, Matsunaga T, Shimoda K	Biochem Biophys Res Commun.	Biochem Biophys Res Commun.	400(2)	252-257	2010
Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, Urata S, Yamauchi T, Iwamoto C, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K	JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation.	Br J Haematol,	150	334-344	2010
Muramoto R, Kuroda M, Togi S, Sekine Y, Nanbo A, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T	Functional involvement of Daxx in gp130-mediated cell growth and survival in BaF3 cell.	Eur. J. Immunol	40	3570-3580	2010

糖尿病発症に関わる ウイルス感染

永淵 正法*

糖尿病がウイルス感染によって発症することは、多くの基礎的、臨床的研究によって、支持されている。過去には、重症の全身ウイルス感染症患者に糖尿病が発症し、膵島にウイルスが存在することは繰り返し証明されている。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つつある。さらに、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、膵島細胞障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、患者から分離されたウイルスが実験動物で糖尿病を発症したとする報告は稀であり、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確立していないためである。ウイルス感染症による膵島障害と糖尿病発症機構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。

はじめに

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性(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にもかかわらず、直接の証拠は乏しいのが実情である。本稿では、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概説するとともに、現在の課題、将来展望についても述べたい。

I. 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

*Seiho NAGAFUCHI 九州大学大学院医学研究院保健学部部門病態情報学/教授

2010年

3;4(2):

erococcus
uconostoc
ll, Douglas
infectious
9
suscepti-
pplement.

, et al.:

l): S75~

J Infect

lin Pathol

ei Med J

nfect Dis

ei Med J

emother

J Infect

J Infect

(JANIS)
report/

染症発生
jp/idwr/

et al.:

et al.: J

環境感染

指針.

ractice/

pidemiol

渴する(空腹時血中CPR<0.5ng/mL)患者群を1型糖尿病として分類すると、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、1型糖尿病の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¹⁾。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²⁾。

一方、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と考えられる³⁾。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、水痘帯状疱疹ウイルス、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1)。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

表1 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)

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)による組織障害、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1)。既述のように1型糖尿病患者の80%には膵島関連自己抗体が認められるので、ウイルス感染によって自己免疫が誘導される可能性は十分に考えられる。C型肝炎患者に対するインターフェロン治療を契機として、数多くの自己免疫タイプの1型糖尿病発症が報告されているので、ウイルスに対する免疫応答が膵島細胞に対する自己免疫を誘導する可能性は十分にありうる⁴⁾。一方、ウイルス抗原と自己抗原の交差反応、ウイルス感染によって破壊された自己細胞からの自己抗原の放出をトリガーとして自己免疫が誘導される可能性も残されているが、確実な症例は乏しい。事実、従来、ウイルス感染による1型糖尿病の典型例であると考えられ

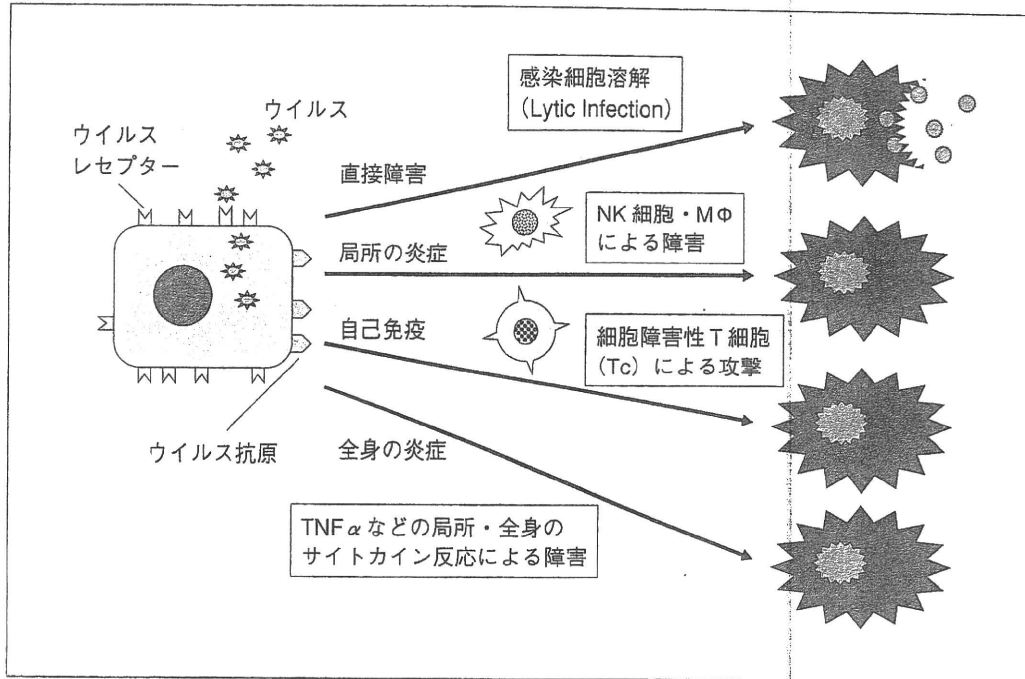


図1 ウイルス感染によって誘導される膵島細胞障害のメカニズム

ていた先天性風疹児の知見では、必ずしも膵島特異的自己抗体が産生されているわけではない⁵⁾。

他方、むしろウイルス感染が、自己免疫糖尿病の発症を抑制するとの報告もあり⁶⁾、ウイルス感染と自己免疫糖尿病発症の関連は複雑である。ウイルスがトリガーであるにしても、自己免疫糖尿病の発症には、樹状細胞レベル、Tリンパ球レベル、Bリンパ球レベルなど、さまざまな免疫応答制御機構と相まって、複合的なメカニズムで、自己免疫応答は誘導されると推測できる^{4,7)}。

なお、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念頭におくべきであろう。

II. 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⁷⁾。疫学的調査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、特に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