

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 I 型糖尿病のウイルス原因説に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 永淵正法

平成24 (2012) 年 4月

## 要旨

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。IFRGG(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。すでにこの遺伝子欠損マウスがウイルス誘発糖尿病に感受性であることは、明らかにした。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。そこで、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、IFRG KO, Rag2 KOおよびIFRG Rag2 double KOマウスを用いた検討を行った。また、放射線照射後の脾臓細胞移入実験を行うことによりIFRG遺伝子の発症制御における意義が、膵島実質細胞であるのか、免疫細胞が重要であるのかについて、検討した。その結果、膵島実質細胞におけるIFRG遺伝子発現が重要であることが明らかとなってきた。さらに、膵島特異的にIFRG遺伝子を発現するmouse insulin promoter (MIP) IFRGトランスジェニックマウスを作成することによりその重要性が確認されつつある。一方、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IFRG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の意義とそのメカニズムも明らかとなってきた。以上、自然感受性系統のマウスで同定したIFRG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。

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IFRGの解析を行った。H23年度は、プロモーター領域の多型を検討した。その結果、あらたな多型を同定した。その意義について、1型糖尿病、2型糖尿病、健常対照で比較検討したところ、驚くべきことにすべての糖尿病群で対照群より、明らかに有意なリスク因子であると判定された。さらに、花房班の協力も得て、劇症1型糖尿病患者で検討したところ、対照群よりこの多型の頻度は高かったが統計的な有意差は認められなかった。今後、花房班のさらなる協力も得て、症例を蓄積し検討することが必要であると考えられた。

## 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

平成23年度 劇症 I 型糖尿病のウイルス原因説に関する研究

目 次

I. 研究代表者研究報告	
実験的ウイルス糖尿病の発症制御メカニズム	5
永淵正法	
II. 分担研究報告	
1. MIP-IFRGトランスジェニックマウスに関する研究	18
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	26
栗崎宏憲	
3. IFRGシグナル経路に関する研究	37
下田和哉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	42
IV. 研究成果の刊行物・別刷	43

## I. 研究代表者研究報告

### 実験的ウイルス糖尿病の発症制御メカニズム

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

#### 要旨

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。IFRG (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。すでにこの遺伝子欠損マウスがウイルス誘発糖尿病に感受性であることは、明らかにした。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。そこで、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、IFRG KO, Rag2 KO および IFRG Rag2 double KO マウス、さらに放射線照射後の脾臓細胞移入実験を行うことにより IFRG 遺伝子の発症制御における意義が、膵島実質細胞であるのか、免疫細胞が重要であるのかについて、検討した。その結果、膵島実質細胞における IFRG 遺伝子発現が重要であることが明らかとなってきた。

#### A. はじめに

1 型糖尿病は、膵島 β 細胞の破壊により絶対的なインスリン欠乏に陥る疾患である。その原因は、特発性のもものと自己免疫によるものに分類されるが、大部分は抗 GAD 抗体や抗 IA-2 抗体などの自己抗体による自己免疫機序に起因するとされている。また、宿主因子に加え、環境因子の関与も重要である。1 型糖尿病の約 20%、劇症 1 型糖尿病の約 70% の症例が発熱、上気道炎などの風邪症状を伴うことから、1 型糖尿病発症の環境因子の 1 つとして、ウイルス感染が挙げられている。加えて、臨床的、実験的研究により、1 型糖尿病の発症とエン

テロウイルス感染の関連が示唆されている。これらの知見から、ヒトと動物におけるウイルス誘発糖尿病の研究が急速に進展しつつある。

これまでのわれわれの研究で、実験的に、ウイルス誘発性のある脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis virus, EMCV) は、獲得免疫ではなく自然免疫が重要であることを示唆してきた。すなわち、2008 年の報告では、活性化マクロファージが EMCV-D 誘発糖尿病の抵抗性に関与しており、T 細胞および B 細胞は重要ではないことを明らかにした。加えて、中和抗体の効果は EMCV-D 感染後 36 時間以内に養子移入さ

れた場合のみ有効であり、自然産生された抗体による糖尿病発症の抑制は不可能であることを示した。これらの所見から、我々は自然免疫によるウイルス誘発糖尿病の防御を考え、宿主側の遺伝因子として IFN シグナル経路の下流に位置する IFRG 遺伝子に着目した。

IFRG は Jak ファミリーの一員であり、その KO マウスがウイルス誘発糖尿病を発症することを示したが、そのメカニズムの詳細、特に、IFRG の重要性が免疫であるのか、あるいは脾臓実質細胞であるのかは不明であった。そこで、今回、獲得免疫を欠損する

Rag2 (Recombination-activating gene 2) KO マウスを用いて検討した。さらに、自然免疫および獲得免疫における IFRG の役割として、実質細胞に発現する INFRRG および免疫細胞に発現する INFRRG の重要性を評価した。本研究では、脾臓キメラマウスと Rag2 欠損マウスを用いた 2 つの実験系を確立した。脾臓キメラマウスは、その作成の過程で X 線照射を行い、一旦体内のほぼすべての免疫細胞を除去するため、移入した脾細胞単独の役割を評価できる。しかし、この致死量 X 線照射はマウス身体に大きな物理的ダメージを与える。これに対し、先天的にリンパ球を欠損する Rag2 欠損マウスは、脾細胞移入に物理的障害を必要としないが、マウス体内に元来存在するリンパ球以外の免疫細胞の影響は残るため、移入脾細胞単独の評価とはし難い。そこで、本研究では 2 つの実験系を組み合わせることで、自然免疫および獲得免疫における IFRG の意義について検討を行った。

- (1) IFRG および Rag2 ダブルノックアウトマウスに関する検討
- (2) 放射線照射マウスを用いた、脾細胞による再構築実験

## B. 方法 マウス

マウスはすべて C57BL/6J の遺伝背景を有する個体とした。C57BL/6J マウスは日本チャールス・リバー株式会社より購入し、EMCV 抵抗性系統として用いた。Tyk2<sup>-/-</sup>マウスは、下田和哉教授（宮崎大学医学部医学科）から分与を受けた Tyk2<sup>+/-</sup>マウスを C57BL/6J マウスに 8 代以上戻し交配して作成した。Rag2<sup>-/-</sup>マウスは小林隆志准教授（慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター）から分与頂いた。さらに、IFRG<sup>-/-</sup>マウスと Rag2<sup>-/-</sup>マウスの交配により、IFRG /Rag2 double-knockout マウスを作成した。Ly5.1 マウスは本研究室で管理、維持されていた個体を用いた。また、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を採取する目的で BALB/cA マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。動物は九州大学生体防御医学研究所感染実験室および九州大学大学院医学研究院附属動物実験施設にて飼育した。

感染実験には 6-12 週齢のマウスを用いた。knockout マウスにおける EMCV 感受性の検討ではオス、メスの両個体を用い (double-knockout マウスはオス個体のみ)、組織病理学的検討、脾臓キメラマウスおよび Rag2 欠損マウスにおけるリンパ球移入実験ではオス個体のみで検討を行った。動物の飼育、維持および感染実験はすべて、九州大学動物実験規則に基づき動物実験委

員会の承認を得て実施した。

### DNA 精製

遺伝子検定用 DNA はマウス Tail からフェノール/クロロホルム法により抽出した。Tail 1 sample 当り DNA Extraction premix 380  $\mu$ l, pk 20  $\mu$ l を加え、インキュベーターで溶解した (55°C, O/N)。フェノール (ナカライテスク株式会社) 400  $\mu$ l を加え、ローターで 1 hr 転倒混和後、15,000 rpm, 5 min で遠心した。再度上清にフェノール 400  $\mu$ l を加え、1 hr 転倒混和後に遠心した (15,000 rpm, 5 min)。上清にフェノール 200  $\mu$ l, クロロホルム (和光純薬工業株式会社) 200  $\mu$ l を加え、30 min 転倒混和後、15,000 rpm, 5 min, 4°C で遠心した。続いて、上清にクロロホルム 400  $\mu$ l を加え、5 min 転倒混和後に遠心した (15,000 rpm, 5 min, 4°C)。上清 250  $\mu$ l に 100% エタノール (和光純薬工業株式会社) 650  $\mu$ l を加え、転倒混和した。凝集した DNA を遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) によりペレットとし、上清を捨て 70% エタノール 1 ml を加えて転倒混和した。再度遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) により上清を除去し、エタノールを蒸発させた後、TE 50  $\mu$ l を加えて DNA 精製物を得た。精製 DNA は 4°C で保存した。

### PCR

knockout (KO) マウスの遺伝子検定は、マウス Tail から精製した DNA を用い PCR により行った。PCR Thermal Cycler Dice Gradient (タカラバイオ株式会社) および GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて DNA を増幅した。

プライマーの合成は株式会社ジーンネットに依頼した。以下に、用いたプライマーの塩基配列を示した。

g IFRG-F6: 5'-TGG AGA AAA TGG AGT GAG TGT AAG-3' (24mer)

g IFRG-R4: 5'-CTG GGT CAT GGC TGG AAA AGC CCA-3' (24mer)

NeoR-F1: 5'-ATT CGG CTA TGA CTG GGC ACA ACA-3' (24mer)

RAG2-1: 5'-TTA ATT CAA CCA GGC TTC TCA CTT-3' (24mer)

RAG2-2: 5'-GCC TGC TTA TTG TCT CCT GGT ATG-3' (24mer)

Neo3': 5'-CCA ACG CTA TGT CCT GAT AGC GGT-3' (24mer)

IFRG の PCR 反応液の組成は、10 $\times$ PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free) (TaKaRa) 2.0  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP Mixture (TaKaRa) 2.0  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> (TaKaRa) 1.6  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Primer g IFRG F6 (Genenet) 1.0  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Primer g IFRG-R4 (Genenet) 1.0  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Primer NeoR-F1 (Genenet) 1.0  $\mu$ l, TaKaRa Taq (rTaq DNA Polymerase) (TaKaRa) 0.5  $\mu$ l, Autoclaved distilled water 9.9  $\mu$ l で Mix を作製し、これに Template DNA 1.0  $\mu$ l を加え Total 20.0  $\mu$ l とした。IFRG の PCR 条件は、94°C 10 min, 94°C 1 min (Denaturation), 62°C 1 min (Annealing), 72°C 2 min (Extension), 30 cycles で行った。IFRG WT allele は 810 bp, KO allele は 1,100 bp のバンドとして検出された。

Rag2 は、WT allele および KO allele のプライマーを混合して PCR を行うと、泳動した際に両 allele のバンドが近接して検出

され、また WT allele が弱く、KO allele が強く検出される傾向があり、判定が困難であった。そこで、allele 別にプライマーを分けて PCR 反応液を作製し、DNA を増幅した。泳動も allele 別に行い、両 allele の有無の組合せで遺伝子型を判定した。Rag2 の PCR 反応液の組成は、WT allele の場合、10×Buffer Mg(-) (TaKaRa) 2.5 µl, dNTP Mix (TaKaRa) 2.5 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2.0 µl, DMSO 2.0 µl, 10 µM Primer RAG2-1 (Genenet) 0.5 µl, 10 µM Primer RAG2-2 (Genenet) 0.5 µl, rTaq (TaKaRa) 0.2 µl, Autoclaved distilled water 13.8 µl で Mix を作製し、これに Template DNA 1.0 µl を加え Total 25.0 µl とした。KO allele の場合、10 µM Primer RAG2-1 に代えて 10 µM Primer Neo3' (Genenet) 0.5 µl を加えた。Rag2 の PCR 条件は、95°C 9 min, 94°C 1 min (Denaturation), 60°C 1 min (Annealing), 72°C 1 min (Extension), 35 cycles で行った。Rag2 WT allele は 1.0 kbp, KO allele は 1.2 kbp のバンドとして検出された。

#### 電気泳動

増幅された PCR 産物の確認はアガロースゲル電気泳動により行った。アガロースゲルは UltraPure™ Agarose (Invitrogen) を 1×TAE 溶液にて加温溶解し、濃度 2.0% となるように作製した。泳動槽は Mupid-2x (ADVANCE) を用いた。また、ゲルロードバッファーとして GelPilot DNA Loading Dye, 5x (QIAGEN), マーカーとして 100 bp Ladder (SIGMA) および 1 kbp Ladder (SIGMA) を用いた。サンプルアプライした 2.0%アガロースゲルを 100 V, 30 min で泳

動後、エチジウムブロマイドで 30 min 染色し、AE-9000N E-Graph (アトー株式会社) により泳動像を得た。

#### マウス胎児線維芽細胞の作成

ウイルスの増殖および定量に用いる目的でマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を採取した。妊娠 10-13 週齢の BALB/cA および C57BL/6J マウスにジエチルエーテル (和光純薬工業株式会社) 吸引による麻酔を施し、頸椎脱臼により安楽死させた。妊娠マウスの腹部を手術用イソジン液 (明治製菓株式会社) で消毒し、アルコールを含ませた脱脂綿で消毒液を拭き取った。無菌的に開腹して子宮を摘出し、60 mm dish (DB Falcon) に移して PBS(-) で洗浄した。羊膜腔から子宮を開いてマウス胎児を摘出し、新しい dish 上で、PBS(-) で洗浄した。マウス胎児から臓器 (胎児の赤い部分は主に肝臓) を除去し、残りの体幹部組織を解剖用ハサミで細かく刻んだ。細片した組織を PBS(-) 20 ml とともに 50 ml フアルコンチューブ (BD Falcon) へ移し、1,200 rpm, 5 min で遠心した。上清を除去し PBS(-) 5 ml で洗浄し、再度遠心した (1,200 rpm, 5 min)。上清を捨て、0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO) 5 ml を加え、恒温槽でインキュベートした (37°C, 5 min)。インキュベート後、ピペッティングして静置すると、Trypsin-EDTA で分解され出てきた MEF が上清に、分解されていない組織片が下層に集まった。ここで上清と下層を分け、上清には氷冷した 10% Fetal Bovine Serum (Thermo Trace), 1% Penicillin Streptomycin (GIBCO) 加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)



(GIBCO) 20 ml を加えて Trypsin-EDTA の反応を止めた。下層は再度 Trypsin-EDTA 5 ml を加えて分解し、ピペティング後上清に集まった MEF を回収して氷冷 DMEM により反応を止めた。この Trypsin-EDTA による分解は 3 times 繰り返した (連続消化)。回収された MEF を遠心し (1,200 rpm, 5 min) 上清を除去、DMEM 20 ml で洗浄した。遠心後 (1,200 rpm, 5 min) 上清を取り除いて、正確に DMEM 10 ml を加えた。回収した細胞浮遊液は PBS(-) で 5 倍希釈、さらに Trypan Blue Stain 0.4% (GIBCO) で 2 倍希釈した。10 倍希釈とした細胞浮遊液は血球計算盤を用いて細胞数をカウントし、MEF 回収量を算出した。

以上の手順で得た MEF は、凍結保存するために 100 mm dish (BD Falcon) に播種して培養した。MEF の凍結保存には、細胞凍結保存液セルバンカー1 (十慈フィールド株式会社)、セラムチューブ (住友ベークライト株式会社)、BICELL (日本フリーザー株式会社) を用いた。

## ウイルス

ピコルナウイルスの一種である脳心筋炎ウイルス D variant (EMCV-D) を用いた。EMCV は Dr. J.-W. Yoon (the University of Calgary) ならびに Dr. A.L. Notkins (NIH, USA) から分与して頂いた。ウイルス増殖にはマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いた。MEF にウイルスを感染させてウイルスを増殖させ、セルスクレーパー M (SUMILON) を用いて dish から細胞を剥離した。感染細胞を 15 ml ファルコンチューブ (BD Falcon) に移し、超音波破砕機 BIORUPTOR (コスモ・バイオ株式会社)

により細胞を破壊した (破砕時間 0.5 min, 休止時間 1.5 min, 6 cycles)。遠心後 (2,000 rpm, 10 min), 上清からウイルス浮遊液を回収した。

ウイルス定量は MEF を用いたプラークフォーミングアッセイによりウイルス価を決定した。プラークフォーミングアッセイを行うにあたり、あらかじめ 35 mm dish (BD Falcon) で MEF を培養し、コンフルエント ( $5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$  cells/dish) にした。培養には 10% Fetal Bovine Serum (Thermo Trace), 1% Penicillin Streptomycin (GIBCO) 加 DMEM (GIBCO) を用いた。-80°C で凍結保存されたウイルス原液を解凍し、PBS(-) で連続希釈して  $10^{-1} \sim 10^{-7}$  の希釈系列を作製した。コンフルエント MEF を PBS(-) で洗浄し、1 dish 当りウイルス希釈液 50  $\mu$ l を感染させ、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で 2 hr 培養した。なお、ウイルス価の決定には MEF に形成されたプラーク数の平均数を用いるため、ウイルス希釈液 1 濃度当りコンフルエント MEF 3 dishes を準備した。続いて 2%メチルセルロース (和光純薬工業株式会社) 加 DMEM 2 ml を重層し、2 days 培養した (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。非感染細胞を染色するため、0.4%ニュートラルレッド (和光純薬工業株式会社) 加 DMEM 2 ml を加えて 2 hr 培養した (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。培養後、重層した 2%メチルセルロース加 DMEM および 0.4%ニュートラルレッド加 DMEM を取り除き、MEF に形成されたプラーク数を肉眼でカウントした。ウイルス価 (plaque forming unit, PFU) は、ウイルス価 (PFU/ml) = 平均プラーク数  $\times$  ウイルス希釈液量 ( $\mu$ l)  $\times$  ウイルス希釈倍数 ( $10^3$ ) より

求めた。

マウスへのウイルス感染は、マウス 1 個体当たり  $1.0 \times 10^3$  PFU/0.2 ml PBS(-)を腹腔内接種により実施した。シリンジおよび注射針はマイJECTA-29G $\times$ 1/2" (テルモ株式会社) を用いた。

### 血糖値測定, 体重測定

非絶食条件下マウスにおける経時的血糖値を測定した。マウス尾静脈に創った傷口から採血を行い、電極法を原理とするグルテスト PRO R (株式会社三和化学研究所) を用いて血糖値を測定した。血糖値が 250 mg/dl (3SD above the mean) を超える個体を糖尿病と判定した。体重測定は HL-200i (株式会社エー・アンド・デイ) を用いた。血糖値データおよび体重データはすべて平均値および標準誤差 (SE) を算出した。

### 組織病理

ジエチルエーテル (和光純薬工業株式会社) 吸引後、安楽死させたマウスから臓器を摘出し、10%ホルマリン溶液 (和光純薬工業株式会社) を用いて臓器を固定した。固定した臓器を 1 hr 流水洗し、パラフィン浸透は本学医学部病理学教室 (第二) 標本作製室に依頼した。臓器をパラフィン包埋し、滑走式マイクロトーム (Leica) により 4  $\mu$ m に薄切して標本作製した。標本に HE 染色を施し、検鏡を行った。

HE 染色の手順は、脱パラフィン: キシレン (和光純薬工業株式会社) 4 min $\times$ 3 times, 100%エタノール (和光純薬工業株式会社) 3 min $\times$ 2 times, 75%エタノール 3 min, 洗浄: 流水洗 3 min, 核染色: マイヤ

ーヘマトキシリン液 (和光純薬工業株式会社) 3-4 min, 色出し: 流水洗 15 min, 対比染色: 0.25%エオシナルコール液 (武藤化学株式会社) 25 sec, 脱水・脱色分別: 95%エタノール, 100%エタノール $\times$ 2 times, 透徹: キシレン $\times$ 3 times, 封入: 疎水性マリノール (武藤化学株式会社) に従い行った。

### X線照射

マウス体内の全免疫担当細胞を除去する目的で X 線照射を行った。X 線照射は、本学大学院医学研究院附属動物実験施設が所有する X 線照射装置 (MBR-1520R-3, 株式会社日立メディコテクノロジー) により実施した。照射条件は、本研究室の予備的検討から管電圧 150 kV, 管電流 15 mA, 被照射体空気カーマ 8.0 Gy に設定した。指示書の記載に従い被照射体位置およびプローブ位置空気カーマ率を登録し、X 線照射準備完了後、マウスを専用のマウスケージに收容して X 線照射を行った。

### 脾細胞の採取および移入

脾細胞は免疫担当細胞であるリンパ球 (T 細胞, B 細胞), およびその他白血球を豊富に含み、免疫応答の各種解析に有用である。本研究では、獲得免疫の再構築を目的とし、X 線照射により体内の全免疫担当細胞を除去したマウスおよび獲得免疫を欠損した Rag2 KO マウスに脾細胞の養子移入を実施した。

安楽死させたレシピエントマウスから無菌的に Spleen を摘出し、Spleen 1 sample 当たり 10% Fetal Bovine Serum (PAA), 1% Penicillin Streptomycin (GIBCO) 加

RPMI Medium 1640 (GIBCO) 5 ml に一時保存した。Spleen を、被膜のみ残るように Cell Strainer 70  $\mu$ m Nylon (BD Falcon) に通し、細片した。浮遊液に RPMI 5 ml, 赤血球溶血剤 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (和光純薬工業株式会社) 1 ml を加え、氷上で 3 min 静置した。1,500 rpm, 4 min, 4°C の遠心により上清を捨て、再度 RPMI 5 ml, 溶血剤 1 ml を加え、氷上で 3 min 静置した。遠心後 (1500 rpm, 4 min, 4°C), 上清を取り除き、RPMI 5 ml で脾細胞を懸濁した。Trypan Blue Stain 0.4% (GIBCO) を用いて細胞液を 10-20 倍希釈し、血球計算盤で細胞数を算定した。細胞液を遠心し (1,500 rpm, 4

min, 4°C) PBS(-) 5 ml で洗浄後、PBS(-) で浮遊液の濃度調整を行った。脾細胞浮遊液作製後、速やかにドナーマウスの尾静脈より移入した (0.2 ml/mouse)。シリンジはテルモシリンジ 1 mL (テルモ株式会社)、注射針は NO.30 デントロニクス注射針 (株式会社デントロニクス) を用いた。

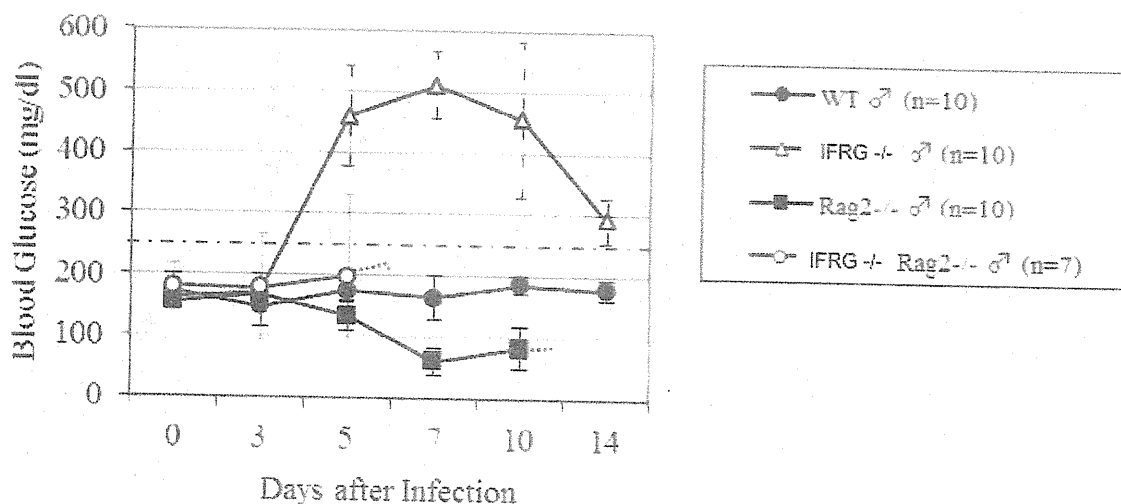
### C. 研究結果

#### single-および double-knockout マウスにおける EMCV 誘発糖尿病の感受性

EMCV 誘発糖尿病の感受性には系統差および性差が存在することが報告されている。EMCV 感染防御に対する IFRG の重要性を評価するため、C57BL/6J の遺伝背景を有する IFRG knockout (KO), Rag2 KO および IFRG/Rag2 double-KO マウスを作成し、

wild-type (WT) マウスとの比較検討を行った。各個体に EMCV  $1.0 \times 10^3$  PFU を接種し、生存率、経時的血糖値および体重変化について 14 days 経過観察を行った (図)。

WT マウスにおける生存率が、day 14 でオス 80%, メス 100%であったのに対し、Tyk2 KO マウスのオスは 30%であった。一方、IFRG KO マウスのメスはすべて day 14



まで生存した。Rag2 KO マウスはオス、メスの両方で生存率が著しく低下し、day 14 までにすべてのマウスが死亡した。IFRG Rag2 double-KO マウスにおける生存率はさらに厳しく、day 5 の時点で70%のマウスが死亡、day 7 までにすべてのマウスが死亡した。

経時的血糖値について、WT マウスのオス、メスおよび IFRG KO マウスのメスでは、14 days を通して血糖値が安定しており、変化は認められなかった。IFRG KO マウスのオスは day 5 で血糖値が著しく上昇し、糖尿病を発症した。また、この高血糖状態は day 5 から day 10 まで持続し、その後 day 14 にかけて血糖値の回復が観察されたが、糖尿病判定基準である 250 mg/dl を下回るマウスは存在しなかった。Rag2 KO マウスはオス、メスともに day 7 から血糖値が低下し始め、糖尿病を発症する個体はいなかった。Tyk2/Rag2 double-KO マウスの血糖値は一定の傾向を示さなかったものの、day 3 で7個体中2個体、day 5 で7個体中1個体が糖尿病を発症した (図)。

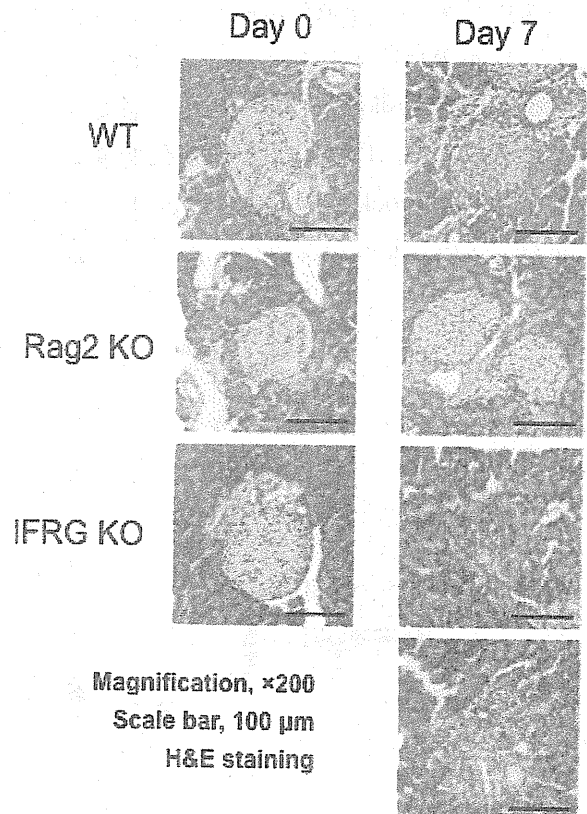
WT マウスのオス、メスおよび IFRG KO マウスのメスでは有意な体重変化は認められず、生存率、経時的血糖値と同様、EMCV 感染に対し抵抗性であることが示された。加えて、Tyk2 KO オスと WT オスで体重に有意差はなく、糖尿病発症と体重変化の関連は認められなかった。Rag2 KO マウスではオス、メスともに体重が著しい減少傾向を示し、マウスの明らかな衰弱が観察された。Tyk2/Rag2 double-KO マウスの体重は血糖値と同様、一定の傾向を示さなかったが、マウスの衰弱が観察された。

以上の結果から、IFRG は EMCV 誘発糖

尿病の感受性に関与し、さらにこの EMCV 感受性には性差があることが示された。これらの所見は、本研究室がこれまでに行ってきた報告と一致している。また、Rag2 欠損マウス (Rag2 KO および IFRG /Rag2 double-KO マウス) は、リンパ球を欠如したことで獲得免疫が失われ、雌雄関係なく EMCV 感染に全身的な脆弱性を示すことが明らかとなった。

### EMCV 感染マウスにおける組織病理学的検討

EMCV 感染による糖尿病発症と膵島障害の関連を明らかにするため、感染マウスにおける膵島組織病理を観察した。WT, IFRG KO および Rag2 KO マウスのオスに対し EMCV を接種し、感染前 day 0 および感染



後 day 3, 5, 7, 10 のマウスにおける膵島組織を HE 染色により評価した (図)。

WT マウスでは、周囲の外分泌腺とは明瞭に区別される楕円形の膵島が認められ、day 0 から day 10 にかけて目立った膵島障害は観察されなかった。Rag2 KO マウスは摘出した膵臓に萎縮傾向が認められたものの (data not shown), 膵島組織は WT マウスと同様、観察期間を通して病理学的変化は起こらなかった。他方、EMCV を感染させた IFRG KO マウスでは、day 5 から炎症性細胞の浸潤を伴う膵島の変形・崩壊・萎縮が観察され、膵島の高度な障害を認め 7 日後にはほぼ完成した病理像を呈した (図)。この所見は、IFRG KO マウスのオスが EMCV 感染後 day 5 に有意に高血糖状態を呈することと一致していた。

組織病理学的検討の結果から、IFRG KO マウスのオスでは EMCV 感染により膵島へ炎症性細胞が浸潤し、ウイルスによる直接障害に加えてこれら炎症性細胞が膵島細胞を広範囲に破壊することで糖尿病を発症したことが強く示唆された。

### 脾臓キメラマウスの作成

これまでの結果から、IFRG が EMCV 誘発糖尿病の感受性に深く関与していることが示された。続いて、IFRG の役割が実質細胞または免疫担当細胞のどちらによるものかを明らかにするため、脾臓キメラマウスを作成した。なお、脾臓キメラマウスにおける EMCV 誘発糖尿病の発症はオス個体のみ検討した。致死量 X 線照射した WT recipient および IFRG KO recipient マウスに対し、WT donor および IFRG KO donor 由来の脾細胞を養子移入した ( $2.0 \times 10^7$

cells/0.2 ml PBS(-)/mouse)。移入リンパ球による獲得免疫の再構築を待つて、リンパ球移入からウイルス接種までの期間を 7 days に設定した。この 7 days は、本研究室における予備実験で検討された期間である。

最初に、WT 由来の脾細胞を有する WT recipient マウス (WT $\leftarrow$ WT) および IFRG KO recipient マウス (IFRG  $-/-$  $\leftarrow$ WT) について検討した。EMCV 接種後、WT $\leftarrow$ WT は day 5 で約 60%、day 7 で約 90% のマウスが死亡し、IFRG  $-/-$  $\leftarrow$ WT は day 5 で約 80%、day 7 ではすべてのマウスが死亡した。加えて、WT $\leftarrow$ WT と IFRG  $-/-$  $\leftarrow$ WT の両方のマウスが Rag2 欠損マウスと同様の著しい体重減少を示し、マウスの衰弱が観察された。IFRG single-KO マウスにおける糖尿病発症が day 5 であったことを考慮すると、この条件では糖尿病発症における実質細胞および免疫担当細胞の意義は検討不可能であると考えられた。

以上の結果から、移入後 7 days にウイルス接種を実施した場合、移入リンパ球による獲得免疫の再構築が不十分であることが考えられた。致死量放射線照射したマウスに同系マウスの造血細胞を静注した場合、顆粒球や巨核球、リンパ球を含む脾コロニーは 12 日目に形成される、との報告がある。そこで、リンパ球移入後の再構築期間を 14 days に変更し、さらなる検討を試みた。

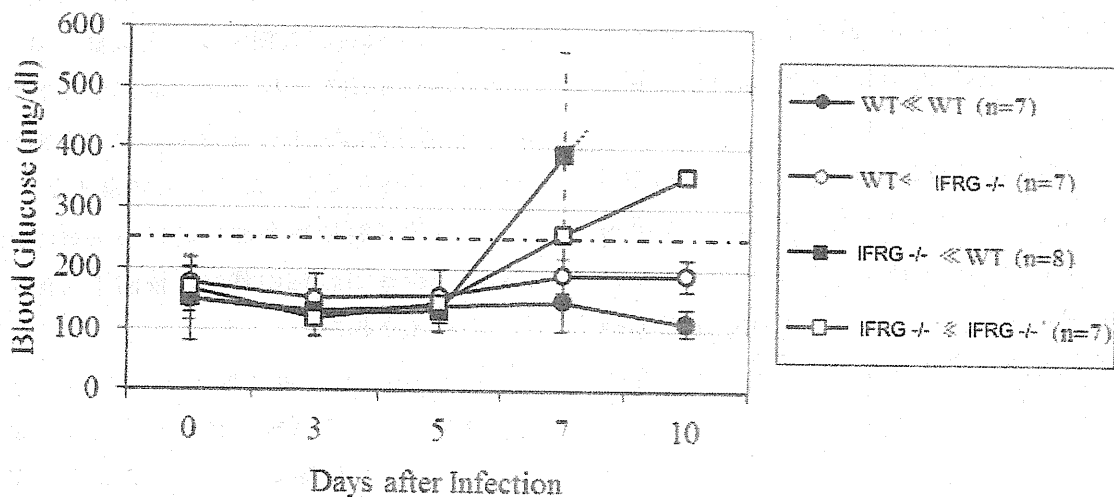
### 脾臓キメラマウスにおける EMCV 誘発糖尿病の発症

リンパ球移入からウイルス接種までの期間を 14 days とし、再度検討を行った。WT

donor 由来脾細胞を有する WT recipient (WT $\ll$ WT) および IFRG KO recipient (IFRG -/- $\ll$ WT) マウス, IFRG KO donor 由来脾細胞を有する WT recipient (WT $\ll$ IFRG -/-) および IFRG KO recipient (IFRG -/- $\ll$ IFRG -/-) マウス, 以上 4 系統の脾臓キメラマウスを作成し, 糖尿病発症をモニターした (Fig. 7 and 8).

WT recipient マウスは, WT リンパ球を移入した場合 (WT $\ll$ WT) と IFRG KO リンパ球を移入した場合 (WT $\ll$ IFRG -/-) の両方で糖尿病を発症した個体はいなかった (図). 一方, IFRG KO recipient マウスでは,

Rag2 single-KO マウスおよび IFRG /Rag2 double-KO マウスで見られたウイルス感染に対する脆弱性を補うため, リンパ球の移入実験を行った. WT マウスおよび IFRG KO マウスから採取されたリンパ球を養子移入することで, 獲得免疫の再構築が期待され, リンパ球の重要性が評価できる. Rag2 欠損マウスのオス個体に対し  $1.0 \times 10^7$  cells/0.2 ml PBS(-) のリンパ球を移入し, 脾臓キメラマウス同様, 移入後 14 days でウイルス接種を行った (Fig. 9A). なお, IFRG KO リンパ球を有する IFRG /Rag2 double-KO マウス (IFRG



WT リンパ球を移入すると (IFRG -/- $\ll$ WT) day 7 で著しく血糖値が上昇し, 糖尿病を発症した (図). IFRG -/- $\ll$ IFRG -/- では, 7 個体中 1 個体ではあるが, day 7 から緩やかに血糖値が上昇し始め, 糖尿病を発症した (図).

従って, 脾臓キメラマウスを用いた検討により, EMCV 誘発糖尿病の発症にはリンパ球ではなく実質細胞の IFRG 欠損が重要であることが明らかとなった.

#### Rag2 欠損マウスにおけるリンパ球の役割

-/-Rag2-/- $\ll$ IFRG -/-) は作成が間に合わず, 今回報告するに至らなかった. このマウス系統については, 今後作成次第検討したい.

Rag2 欠損マウスにリンパ球を移入すると, 明らかな生存率の改善が認められた. 何も移入していない Rag2 KO マウスの day 14 における生存率が 0%であったのに対し, WT リンパ球を移入した場合 (Rag2-/- $\ll$ WT) は 70%, IFRG KO リンパ球を移入した場合 (Rag2-/- $\ll$ IFRG -/-) でも 30%のマウスが生存した. 加えて, Rag2-/- $\ll$ WT では体重の減少傾向が解消さ

れ、目立ったマウスの衰弱はなかった。経時的血糖値は、Rag2<sup>-/-</sup>≪WT では day 0 から day 14 まで血糖値が安定していたのに対し、Rag2<sup>-/-</sup>≪IFRG<sup>-/-</sup>では 7 個体中 3 個体が day 10 から糖尿病を発症した (Fig. 9C and 10B)。また、WT リンパ球を養子移入した IFRG / Rag2 double-KO マウス (IFRG<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>≪WT) は、移入しない場合と比較して生存率が大幅に改善されたが、驚くべきことに、IFRG を欠損しているにも関わらず糖尿病を発症しなかった。

これらの所見から、Rag2 欠損マウスで見られたウイルス感染に対する脆弱性は、リンパ球を欠いたマウス体内で感染が全身性に広がったことに起因すると考えられた。また、IFRG KO リンパ球の移入により、一部のマウスが day 10 以降で中程度の高血糖状態を呈したことから、IFRG KO リンパ球が EMCV 誘発糖尿病の発症に部分的な役割を果たすことが示唆された。

#### D. 考察

本研究では、EMCV 誘発糖尿病における自然免疫および獲得免疫の意義を明らかにし、その発症メカニズムを解析することを目的として、KO マウスおよびキメラマウスを用いた検討を行った。

KO マウスにおける EMCV 誘発糖尿病の感受性と性差の検討では、IFRG KO マウスのオスが day 5 から高血糖状態を呈し、糖尿病を発症した。加えて、組織病理では day 5 以降に炎症性細胞の浸潤を伴う膵島構造の破壊を認めた。これらの所見は、本研究室におけるこれまでの報告と一致している。EMCV-D は膵島β細胞の表面レセプターに高い親和性を有するとされている。また、

ウイルス誘発糖尿病の発症メカニズムとして、ウイルスが直接膵島β細胞を破壊することが報告されている。その一方で、集積された臨床的、実験的証拠により、エンテロウイルス感染においては、膵島を標的とした自己免疫機序が 1 型糖尿病の発症に作用することが示唆されている。これらの報告を踏まえて、IFRG KO マウスのオス個体が示した EMCV 誘発糖尿病に対する感受性は、EMCV が膵島特異的に感染し、膵島β細胞のウイルスによる直接的な破壊、またはウイルスを貪食するマクロファージ等炎症性細胞による間接的な破壊が起こり、インスリンの分泌障害・欠乏に陥ることに起因すると考えられる。今後、EMCV 感染マウスの各臓器におけるウイルス価の測定や、膵島組織における炎症性細胞の染め分けが有効であると考えられる。

本研究室・高上らは 2008 年の報告の中で、マクロファージ活性化免疫増強物質である *Corynebacterium parvum* (CP) を用い、CP 処理した DBA/2N マウス (EMCV 感受性系統) が EMCV 誘発糖尿病の発症を完全に防ぐものの、IFN 産生の活性は増強されていないことを示し、CP 処理マウスにおいては EMCV 感染防御と IFN 産生の関連が乏しいと述べている (14)。本研究で血清 IFN の測定は行っていないが、今後、IFRG を欠損した C57BL/6J マウスにおける血清 IFN のモニターや、IFRG KO マウス由来のマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用い、IFN 刺激に対する抗ウイルスタンパクの産生を解析するなど、発症メカニズムの解明のために in vivo と in vitro の両方における詳細な検討が求められる。

また、Rag2 欠損マウス (Rag2 KO および

IFRG /Rag2-double KO マウス) が EMCV 感染後、雌雄関係なく激しい生存率低下と体重減少を示すことが明らかになったが、これはマウスが先天性にリンパ球を欠くことで獲得免疫が機能せず、全身性にウイルス感染が広がった結果、衰弱したものと考えられた。そこで、後に行った Rag2 欠損マウスに対するリンパ球移入実験には、この脆弱性に対するレスキュー実験としての意味も含めて検討した。

IFRG が EMCV 誘発糖尿病の感受性に関与することを示した次のステップとして、この IFRG の役割が、実質細胞に発現する IFRG、または免疫担当細胞に発現する IFRG のどちらによるものかを検討した。本研究では、脾臓キメラマウスの作成と Rag2 欠損マウスに対するリンパ球移入実験の 2 つの実験系を組合せることで、EMCV 誘発糖尿病における自然免疫および獲得免疫の意義を解析した。脾臓キメラマウスの作成は、X 線照射により体内のほぼすべての免疫担当細胞の影響を排除できる。しかし、致死量 X 線照射は、免疫細胞を除去する他、マウス身体に与える物理的なダメージが大きいと考えられる。一方、Rag2 欠損マウスは先天性にリンパ球を欠損しているため、X 線照射などの障害を与えずにリンパ球を移入できる。しかしながら、Rag2 欠損マウスの体内にはリンパ球以外の免疫細胞も存在するため、これらの影響を無視できず、移入したリンパ球単独の役割を評価することは難しい。以上の理由から、本研究では脾臓キメラマウスと Rag2 欠損マウスの結果を合せて評価した。

脾臓キメラマウスにおける EMCV 誘発糖尿病の発症は、recipient が IFRG KO の場

合に限って認められた。これは、糖尿病発症において、実質細胞に発現する IFRG が重要であることを示す所見である。これと一致して、IFRG KO リンパ球を有する WT recipient はウイルス誘発糖尿病に抵抗性を示した。しかし、Rag2 KO マウスへの移入実験では、IFRG KO リンパ球の移入により、一部のマウスが day 10 以降で中程度の高血糖状態を呈した。IFRG KO リンパ球に関するこれら 2 つの結果を統合すると、免疫細胞上の IFRG と糖尿病発症の関連は完全には否定できず、免疫細胞上の IFRG が EMCV 感染防御に部分的な役割を果たす可能性は残った。また、Rag2 KO マウスの体内では、獲得免疫の欠損により代償性に自然免疫が亢進され、マクロファージや NK 細胞などが自己免疫性に機能している可能性もある。神経親和性コロナウイルスの研究では、養子移入による RAG1 欠損マウスの免疫再構成後、急速にマクロファージの遊走およびミエリンの破壊が起こることが示された。また、C57BL/6N の遺伝背景を有する Rag1 欠損マウスでは、肺と肝臓における NK 細胞の割合と数が増加していることを示し、この増加が T 細胞欠損マウスの NK 細胞活性化につながる可能性に言及した。驚くべきことに、IFRG /Rag2 double-KO に WT リンパ球を移入した系が糖尿病を発症しなかった。この現象を解明するには IFRG KO リンパ球を有する IFRG /Rag2-double KO マウスにおける検討が待たれるが、遺伝的にマウス体内の免疫機構が非常に複雑な系であることから、得られる結果の解釈も多少困難なものになるかもしれない。

加えて、WT リンパ球を移入した Rag2



KO マウスでは、生存率が大幅に改善されたことから、Rag2 欠損マウスの脆弱性は、やはりリンパ球欠損による全身性のウイルス感染が原因であった可能性が高い。いずれにせよ、Rag2 欠損マウスに元来備わっているリンパ球以外の免疫細胞の影響を無視することはできず、今後の EMCV 感受性の検討における有用性はそれほど高くないことが推測される。

本研究により、IFRG がマウスにおけるウイルス誘発糖尿病の感受性に深く関与することが明らかとなった。さらに、IFRG 遺伝子の役割は実質細胞による自然免疫に依存することが強く示唆された。今後、感染マウス体内におけるウイルス増殖の観察、膵島組織の免疫染色による評価、血清検査、

MEF を用いた *in vitro* の解析、マクロファージの機能分析等、発症メカニズムに関するさらなる検討が必要である。これらの検討が進みウイルス誘発糖尿病の発症メカニズムが解明されることを期待したい。

## E. 結論

本研究により IFRG 遺伝子のウイルス糖尿病発症制御には、膵島実質細胞における発現が重要であることが示唆された。

## II. 分担研究報告

### 1. MIP-IFRG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

#### 要旨

これまでの研究により、IFRG 遺伝子が EMCV 誘発糖尿病感受性に関与していることが強く示唆されている。しかしながら、マウス体内のいずれの細胞における IFRG 遺伝子の発現あるいは、その機能障害がこの感受性を左右しているのかは明らかになっていない。本研究では、膵β細胞における IFRG 遺伝子発現の有無が EMCV 誘発糖尿病の感受性にどう影響するのか明らかにすることを目的とした。

EMCV 誘発糖尿病の感受性において IFRG 遺伝子の膵β細胞での発現が重要なのか否かを検討するため、膵β細胞特異的 IFRG 発現マウスを作成し、EMCV-D を用いて感染実験を行った。

結果、膵β細胞特異的 Tyk2 発現マウスではほぼ糖尿病は誘発されず、膵β細胞における IFRG 遺伝子発現の重要性が示唆された。ただ、今回の実験ではマウスの頭数が少なく、また実際に膵β細胞でのみ IFRG が発現しているかの確認を行っていないため、さらなる追加実験が必要である。

#### A. はじめに

1 型糖尿病は膵β細胞の破壊によりインスリン欠乏に陥る自己免疫疾患である。しかしその中には、自己免疫所見に乏しく発症前に風邪症状を伴う症例が存在する。1 型糖尿病患者の約 20%、特に劇症 1 型糖尿病患者の約 70% の症例に、発熱や上気道炎などの風邪症状を先行することから、ウイルス感染が 1 型糖尿病発症の原因の 1 つであることが疑われている。

ウイルス誘発糖尿病の研究において、脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus; EMCV) をはじめとして、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、マウスに対して実験的に糖尿病を誘発できることが知られている<sup>2)</sup>。特に EMCV の D 株 (EMCV-D) は、感受性のマウスに接種すると高頻度に糖尿病を誘発することが知られており、ウイルス誘発糖尿病の研究に広く用いられている。そして、ウイルス誘発糖尿病発症の機序には T 細胞や B 細胞を介した獲得免疫系よりもむしろ、マクロファージやインターフェロンを介した自然免疫系が重要であるとの報告があり<sup>4)</sup>、ウイルスレセプターやシグナル伝達分子などを対象に様々な研究が行われ、ウイルス誘発糖尿病感受性遺伝子の探索が進められている。

1 型糖尿病の感受性に関与するとされる

遺伝子座 (IDDM) は現在 20 種以上報告されているが<sup>5)</sup>、臨床免疫学研究室ではその遺伝子座に存在する遺伝子の中でも特に IFRG (Interferon receptor related gene) に焦点を当てて研究が進められている。IFRG はインターフェロンシグナル分子として自然免疫系の一役を担っている。

EMCV 誘発糖尿病に対して SJL/J 系統のマウスが感受性、C57BL/6J 系統のマウスが抵抗性を示すことが知られている。臨床免疫学研究室におけるこれまでの研究で、EMCV 誘発糖尿病感受性の SJL/J マウスには IFRG 遺伝子に変異が存在し、抵抗性の C57BL/6J マウスには存在しないことが明らかとなっている。また、C57BL/6J 背景の IFRG ノックアウト(KO)マウスにおいても EMCV 誘発糖尿病の発症が認められている。さらに、抵抗性 C57BL/6J 背景で IFRG 遺伝子変異を有するコンジェニックマウスでは EMCV 誘発糖尿病の発症を認め、感受性 SJL/J 背景で野生型 IFRG 遺伝子を有するコンジェニックマウスでは発症が認められていない。これらの知見から IFRG 遺伝子が EMCV 誘発糖尿病感受性に関与していることが強く示唆されている。しかしながら、マウス体内のいずれの細胞における IFRG 遺伝子の発現がこの感受性を左右しているのかは明らかになっていない。したがって、本研究では、膵β細胞での IFRG 遺伝子発現の有無が EMCV 誘発糖尿病の感受性にどう影響するのか明らかにすることを目的とした。

## B. 方法

### 膵β細胞特異的 IFRG 発現マウスの作成

EMCV 誘発糖尿病の感受性において

IFRG 遺伝子の膵β細胞での発現が重要なのか否かを検討するための材料となる、C57BL/6J 背景の膵β細胞特異的 IFRG 発現マウスを、IFRG ノックアウト(KO)マウスと MIP(mouse insulin promoter)-IFRG トランスジェニック(Tg)マウスを用いて作成した。MIP-IFRG 遺伝子は IFRG 遺伝子の cDNA 上流に MIP を組み込んだトランスジーンであり、膵β細胞にのみ IFRG を発現する。したがって、IFRG KO マウスに MIP-IFRG 遺伝子を導入することにより、膵β細胞特異的 IFRG 発現マウスを作成することができる。

#### 【マウス】

IFRG KO マウスは宮崎大学医学部医学科内科学講座消化器血液学分野下田和哉教授より、MIP-IFRG Tg マウスは慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター小林隆志准教授より分与いただき、総合研究棟 8F 吉開研究室感染実験室(コンベンショナル施設)で飼育維持、繁殖を行い使用した。

#### 【交配】

まず、IFRG hetero KO マウス(Tyk2<sup>+/+</sup>)と MIP-IFRG Tg マウス(内在性 IFRG は wild type)を交配し、MIP-IFRG (hetero)を有する IFRG hetero KO マウス(IFRG <sup>+/</sup>/MIP-IFRG <sup>+/</sup>)を作成した。そして、この遺伝子型のマウス同士を交配し MIP-IFRG (hetero or homo)を有する IFRG KO マウス(IFRG <sup>+/</sup>/MIP-IFRG <sup>+/or+/+</sup>)を作成した。このマウスに MIP-IFRG を有していない IFRG KO マウス(IFRG <sup>-/-</sup>)を交配することで、目的の MIP-IFRG (hetero)を有する IFRG KO マウス(IFRG <sup>-/-</sup>/MIP-IFRG <sup>+/</sup>)を作成した(図 1)。

#### 【遺伝子検定】

マウス作成に際し、交配の各段階で産まれた仔マウスに対して遺伝子検定を行い、目的の遺伝子型を有するマウスを選別し次段階の交配に用いた。検定の手順を以下に示す。

#### ①マウス tail からの DNA 抽出

検定を行うマウスの tail を約 1cm 採取した。tail 1 サンプルあたり DNA Extraction Premix 380 $\mu$ l、Proteinase K 20 $\mu$ l を加え、55 $^{\circ}$ Cで一晩溶解した。フェノール(和光純薬工業株式会社)を 400 $\mu$ l 加え、ローテーターで 1 時間転倒混和後、15000rpm で 5 分間遠心した。フェノール層を除去し、上清にフェノールを 400 $\mu$ l 加え、ローテーターで 1 時間転倒混和後、15000rpm で 5 分間遠心した。フェノール層を除去し、上清にフェノール 200 $\mu$ l とクロロホルム(和光純薬工業株式会社)200 $\mu$ l を加え、ローテーターで 30 分間転倒混和後、15000rpm で 5 分間遠心した。フェノール、クロロホルムを除去し、上清にクロロホルムを 400 $\mu$ l 加え、ローテーターで 5 分間転倒混和後、15000rp

で 5 分間遠心した。上清 250 $\mu$ l に 100%エタノールを 650 $\mu$ l 加え、転倒混和し DNA を凝集させた。15000rpm、4 $^{\circ}$ Cで 5 分間遠心し、上清を捨て、70%エタノールを 1ml 加え、転倒混和後、15000rpm、4 $^{\circ}$ Cで 5 分間遠心した。上清を取り除き、30 分風乾後、10mM TE を 100 $\mu$ l 加え、4 $^{\circ}$ Cで保存した。

#### ②PCR

PCR を用いて Tyk2 および MIP-Tyk2 についてそれぞれ検定を行った。試薬は TaKaRa Taq(タカラバイオ株式会社)、PCR 用チューブは MicroAmp 8-Tube Strip(Applied Biosystems)、サーマルサイ

クラーは TaKaRa Thermal Cycler Dice Gradient TP600(タカラバイオ株式会社)および Gene Amp PCR System 9700(Applied Biosystems)を使用した。

DNA 濃度測定は Nano Drop Spectrophotometer ND-1000(Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。プライマーの合成は株式会社ジーンネットの受託サービスを利用した。

#### 【IFRG】

1 サンプル当たり、滅菌水 9.9 $\mu$ l、10 $\times$ PCR Buffer 2 $\mu$ l、2.5mM dNTP Mixture 2 $\mu$ l、25mM MgCl<sub>2</sub> 1.6 $\mu$ l、forward primer(wild allele 用) 1 $\mu$ l、forward primer(KO allele 用) 1 $\mu$ l、reverse primer 1 $\mu$ l、TaKaRa Taq 0.5 $\mu$ l を混合し PCR 用チューブに分注し、100~200ng/ $\mu$ l に調整した DNA を 1 $\mu$ l 加え、サーマルサイクラーにかけた。PCR サイクル条件は、94 $^{\circ}$ C 10 分、(94 $^{\circ}$ C 1 分、62 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 2 分) $\times$ 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 16 分である。プライマーの配列を表 1 に示す。

#### 【MIP-IFRG】

1 サンプル当たり、滅菌水 12.6 $\mu$ l、10 $\times$ PCR Buffer 2 $\mu$ l、2.5mM dNTP Mixture 2 $\mu$ l、25mM MgCl<sub>2</sub> 0.8 $\mu$ l、forward primer 0.6 $\mu$ l、reverse primer 0.6 $\mu$ l、TaKaRa Taq 0.4 $\mu$ l を混合し PCR 用チューブに分注し、100~200ng/ $\mu$ l に調整した DNA を 1 $\mu$ l 加え、サーマルサイクラーにかけた。PCR サイクル条件は、MIP-IFRG 結合部が 94 $^{\circ}$ C 2 分、(94 $^{\circ}$ C 45 秒、52 $^{\circ}$ C 45 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分) $\times$ 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 1 分、IFRG-hGH 結合部が 94 $^{\circ}$ C 2 分、(94 $^{\circ}$ C 45 秒、60 $^{\circ}$ C 45 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分) $\times$ 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 1 分である。プライマーの配列を表 1 に示す。