

201128058B

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 22 - 23 年度 総合研究報告書

平成 24 年 (2012 年) 5 月

研究代表者

永 淵 正 法

目 次

I. 総合研究報告

劇症 I 型糖尿病のウイルス原因説に関する研究
-IFRGノックアウトマウスの病態とウイルス糖尿病感受性遺伝子に関する研究-

研究要旨 ----- 2

序論 ----- 4

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----- 12

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 ----- 25

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 -----33

栗崎宏憲

3. IFRGシグナル経路に関する研究 ----- 44

下田和哉

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 49

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 51

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（総合） 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
-IFRGノックアウトマウスの病態とウイルス糖尿病感受性遺伝子に関する研究-

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β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インターフェロン (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、および、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、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。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遺伝子多型の解析を行った。H22年度にはエキソン部の多型について検討したが、その意義は乏しいことが明らかになった。そこで、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、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。特に、風邪症状先行例、自己抗体陰性例で危険率 (オッズ比) が高かった。このことも、この遺伝子がウイルス糖尿病の感受性遺伝子であることを示唆していると考えられた。一方、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、日本糖尿病学会1型糖尿病の成因、診断、病態、治療に関する調査研究委員会のメンバー協力も得て、全国レベルで症例を蓄積し、さらに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

序論

I) 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

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)

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。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整理するとともに、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概説する。

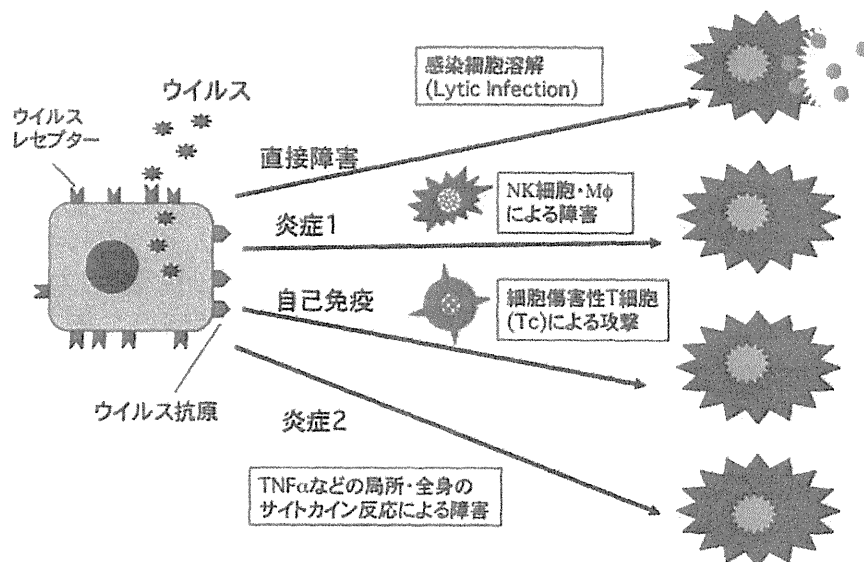
II) 1型糖尿病の発症におけるウイルスの関与

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)。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



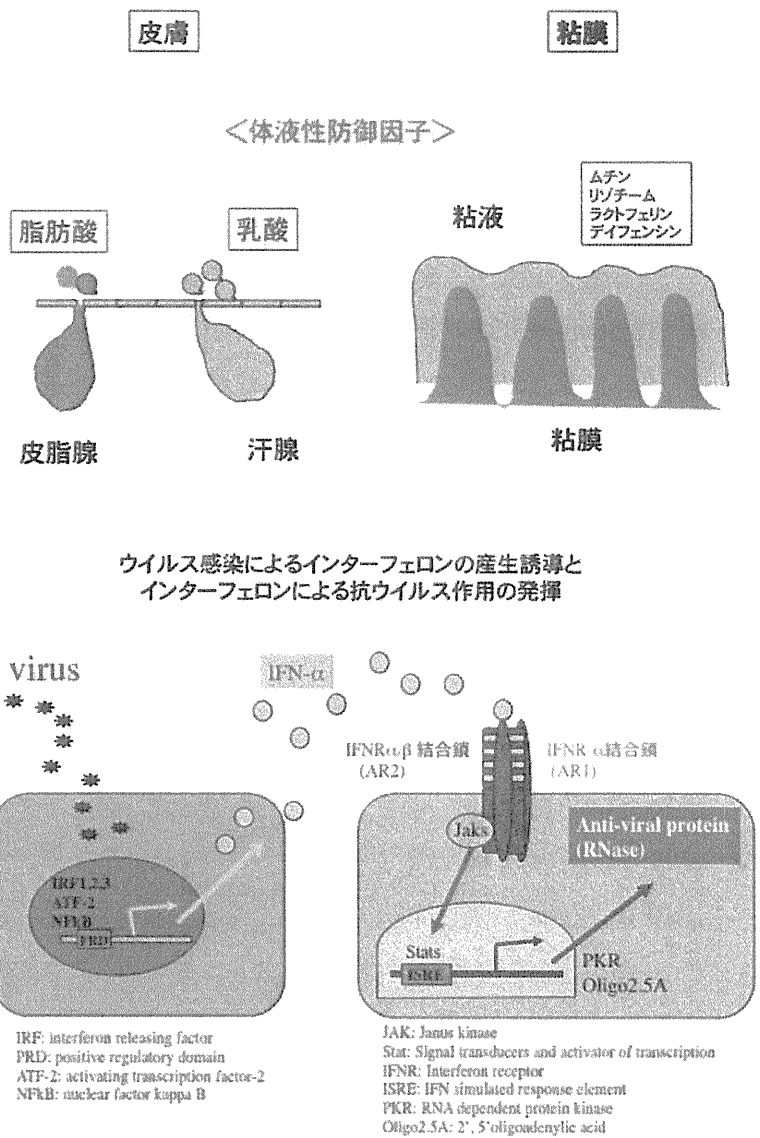
イプが想定できる。第一は細胞溶解性ウイルスによる膵島細胞の直接破壊であり、第二はウイルス感染に伴う炎症性細胞（活性化マクロファージ、NK細胞）による組織傷害、第三にウイルス感染後に誘導される特異的自己免疫による膵島細胞障害、第四は局所あるいは全身の炎症・サイトカイン反応に伴う膵島細胞のアポトーシス誘導である。ただし、糖尿病発症には膵島細胞が80%以上障害されることが必要なので、障害のレベルが軽度であれば臨床的に糖尿病とは診断できないことも留意すべきである。

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膵島細胞に自己免疫が誘導される(膵島細胞自己抗体)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

III) ウイルスに対する感染防御システム

生体は、病原体の感染に対抗するためのメカニズムとして、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、ダイフェ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



ことと、むしろ障害に傾くこともありうる
ことが理解できる。

近年の免疫学の進歩は、非特異的な補体や食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ことが報告され、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、11 種の

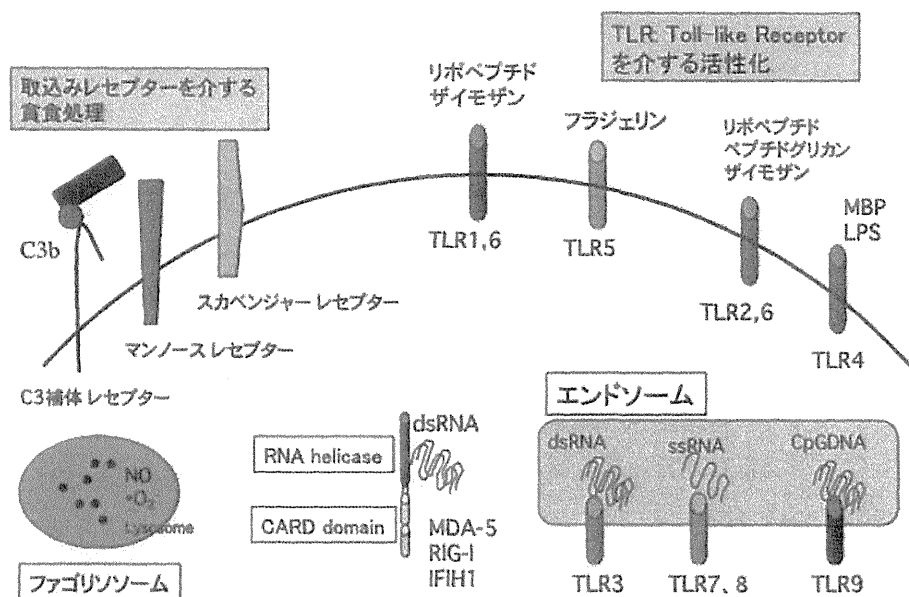
domain) と RNA helicase の構造を有する細胞内ウイルスレセプターである retinoic-acid inducible gene-1:RIG-I、melanoma differentiation-associated gene 5:MDA-5(別名: interferon induced with helicase C, domain 1:IFIH1)、などは、ウイルス由来の二本鎖(ds)RNA を認識して、I 型インターフェロンを誘導する(図)。このように病原体のパターン認識システム: PRR は、自然免疫を誘導するのみでなく、その病原体の排除に働くべき特異免疫

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。

一方、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

マクロファージ・樹状細胞の病原体認識機構(レセプター)



メンバー (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

の4種類が知られている。(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理解されている。

(3) 最近明らかになってきた 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、

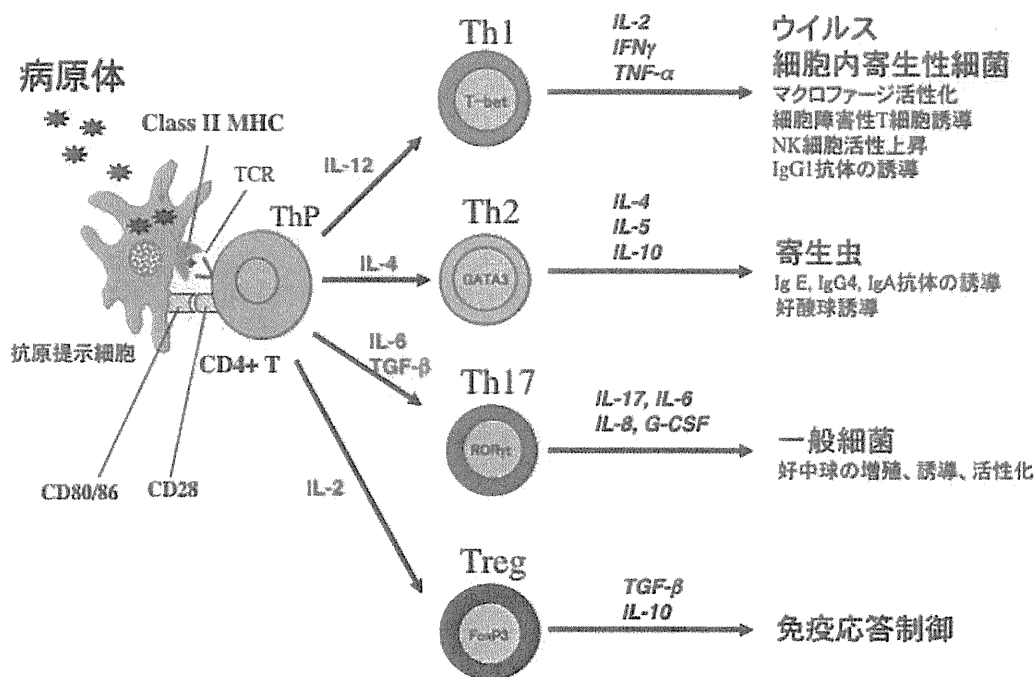
(4) IL-2 によって誘導される転写因子 FoxP3 によって TGF-b が産生され制御性 T 細胞 (Treg) が末梢での免疫応答制御に重要であることが明らかになってきた (図)。ウイルス感染に対する防御は、PRR がウイル

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、Th 1 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。

IV) 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

末梢免疫生体防御システム



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 γ 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 $\alpha\text{V}\beta_3$ 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。

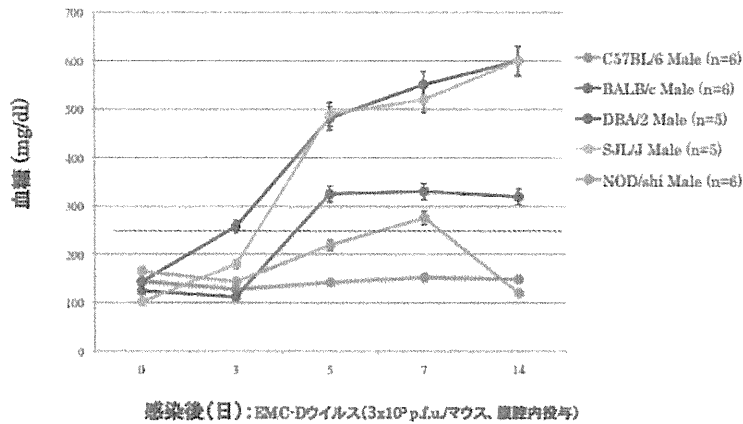
V) 実験的ウイルス糖尿病の発症機構

(1) 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ことが示された。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

ウイルス感染に対するマウスの系統差



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。

(2) 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、比較的少量 (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-1 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。

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。

VI) 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られる。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る。劇症1型糖尿病はウイルスが原因であることが強く示唆されているため、今回の研究では、劇症1型糖尿病患者の感受性遺伝子を探索同定することを目指し、かつ、原因ウイルスを同定するための研究を推進している。

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

研究要旨

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 IFRG 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。さらに、この遺伝子変異が一部のウイルス糖尿病高感受性マウス系統の感受性に関与していることが明らかとなった。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. 研究目的

1 型糖尿病は、膵島 B 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 Rag2KO 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 Rag2KO 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 つの実験系を組合せることで、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。IFRG^{-/-}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 IFRG^{+/-}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^{-/-}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^{-/-}マウスと Rag2^{-/-}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。KO 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 μ l, pk 20 μ 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 μ 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 μ 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 μ l, クロロホルム (和光純薬工業株式会社) 200 μ 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 μ 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 μ l に 100%エタノール (和光純薬工業株式会社) 650 μ 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 μ 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 (Mg²⁺ free) (TaKaRa) 2.0 μ l, 2.5 mM dNTP Mixture (TaKaRa) 2.0 μ l, 25 mM MgCl₂ (TaKaRa) 1.6 μ l, 10 μ M Primer g IFRG F6 (Genenet) 1.0 μ l, 10 μ M Primer g IFRG-R4 (Genenet) 1.0 μ l, 10 μ M Primer NeoR-F1 (Genenet) 1.0 μ l, TaKaRa Taq (rTaq DNA Polymerase) (TaKaRa) 0.5 μ l, Autoclaved distilled water 9.9 μ l で Mix を作製し，これに Template DNA 1.0 μ l を加え Total 20.0 μ 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 MgCl₂ 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 フェルコンチューブ (BD Falcon) に移し, 超音波破碎機 BIORUPTOR (コスモ・バイオ株式会社) により細胞を破壊した (破碎時間 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 μ l を感染させ, 37°C, 5% CO₂ 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% CO₂)。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% CO₂)。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 × ウイルス希釈液量 (μl) × ウイルス希釈倍数 (10³) 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 × 10³ 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 × 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クト 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脾臓を摘出し、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 μm 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 × 3 times, 100%エタノール (和光純薬工業株式会社) 3 min × 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 × 2 times, 透徹: キシレン × 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収容して 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 μ 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% NH_4Cl (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

マウスにおける EMCV 誘発糖尿病の感受性とそのメカニズム

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 1.0×10^3 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、IFRG KO マウスのオスは 30%であった。

