

Title	NODマウスの糖尿病発症におけるレトロウイルスの役割に関する研究：特に腓島におけるgag蛋白p30の存在について
Author(s)	中川, 智左
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37673">https://hdl.handle.net/11094/37673</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#"></a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	なか	がわ	ち	さ
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9811	号	
学位授与の日付	平成3年	5月	28日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文名	NODマウスの糖尿病発症におけるレトロウイルスの役割に関する研究 —特に膵島におけるgag蛋白p30の存在について—			
論文審査委員	(主査) 大手前病院顧問	垂井清一郎		
	(副査) 教授	羽倉	明	教授 藤田 尚男

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

インスリン依存型糖尿病 (IDDM) は、現在、遺伝因子を背景として、自己免疫機序やウイルス感染などの環境因子の関与により発症に至ると考えられている。IDDMのモデル動物であるNon-obese diabetic mouse (NOD マウス) は、胎生期より膵 $\beta$ 細胞特異的にウイルス様粒子の出現することが報告されており、本粒子は形態学および免疫組織学的検討によりレトロウイルスと推定されている。しかしながら、生化学的に本ウイルスの存在を検索した成績はこれまでに見あたらない。また、このウイルス様粒子は、NODマウスの糖尿病発症を促進させるシクロフォスファミドの投与により増加することが報告されている。そこで、本研究は、NODマウスの膵島炎および糖尿病の発症におけるウイルスの関与を検討する目的で、NODマウスにシクロフォスファミド投与を行い、膵島における膵島炎の変化、ウイルス様粒子の変化、ウイルス蛋白の発現を検討した。

### 〔方法ならびに成績〕

1) マウス。5～17週齢のNOD/shiマウスをシクロフォスファミド投与群と非投与群に分け、投与群にはシクロフォスファミド150mg/kgを腹腔内投与し、3日後に同量を再投与した。非投与群には、生理食塩水のみを同様に投与した。対照として同週齢の雌ICR/Jclマウスを用いた。

2) 光学顕微鏡による膵島炎の組織学的検討。14週齢のシクロフォスファミド投与NODマウス5匹、非投与マウス5匹の膵を中性ホルマリン緩衝液で固定、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、各々のマウスにつき50個の異なった膵島を観察し、膵島炎の程度別に頻度を調

べ平均値を求めた。膵島炎の程度は、Grade 0：膵島への浸潤像なし、Grade I：浸潤細胞が膵島周囲に局限、Grade II：浸潤細胞が膵島の50%未満、Grade III：浸潤細胞が膵島の50%以上、とした。その結果、シクロフォスファミド投与群では、Grade 0の減少とGrade Iの増加が有意に認められ、Grade II、IIIも増加傾向を示し、膵島炎の促進が観察された。

3) 電子顕微鏡によるレトロウイルス様粒子の出現頻度の検討。シクロフォスファミドを投与した5週齢のNODマウス5匹と非投与のマウス5匹の膵を3.0% glutaraldehyde (pH 7.4) で灌流固定を行い、細切後実体顕微鏡下に膵島を摘出して超薄切片を作製し、電顕にて各マウス5個ずつの膵島を観察、観察した全膵 $\beta$ 細胞に対して、同ウイルス粒子が細胞内に1個以上観察された $\beta$ 細胞数の割合を求めた後、各群5匹の平均出現頻度を求めた。その結果、ウイルス様粒子は膵 $\beta$ 細胞粗面小胞体腔内に観察され、超微形態学的にC型レトロウイルスと考えられ、その出現頻度はシクロフォスファミド投与群 $30 \pm 6\%$ 、非投与群 $12 \pm 4\%$ であり、シクロフォスファミド投与により有意に増加した。

4) ウェスタン・イムノブロットング法による検討。6~17週齢のNODマウスシクロフォスファミド投与群、非投与群、およびICRマウスの膵島をコラゲナーゼ消化により単離し、RIPA (0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl, 1% Triton X-100, 1% Deoxycholate, 0.1% Sodium lauryl sulfate [SDS], Trasylol 150 KIU/ml, pH 7.5) 溶液中でホモジネートして用いた。抗レトロウイルス抗体として、ポリクローナルな抗レトロウイルス抗血清3種、抗レトロウイルスp30抗血清4種(いずれもヤギ血清)を、対照として正常ヤギ血清を用いた。

① 免疫沈降反応による検討。膵島ホモジネート液 (40 $\mu$ g protein) 中に7種の抗レトロウイルス抗血清を加え、Protein-G-sepharoseにて免疫複合体を回収し、加熱により再度分離させたものをSDS-PAGE電気泳動後、蛋白をイモビロン-P膜に転写し、7種の抗レトロウイルス抗血清を反応させた。その結果、<sup>125</sup>I-Protein Gを用いたオートラジオグラフィでは、シクロフォスファミド投与NODマウスのみで30kDの位置にバンドが検出された。ビオチン化第2抗体を用いたアビジン・ビオチン・アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色ではシクロフォスファミド投与、非投与両群のNODマウスで、同位置にバンドが検出された。正常ヤギ血清ではバンドは認められなかった。

② TCA (Trichloroacetic acid) 処理による検討。膵島ホモジネート溶液 5 $\mu$ g proteinに終濃度10%のTCAを加え、生じた沈澱をアセトンにて洗浄し、SDS-PAGE電気泳動後、蛋白をニトロセルロース膜に転写し、前述の7種の抗血清のうち最も高い抗体価を示した抗レトロウイルスp30抗血清と反応させ、ビオチン化第2抗体、アビジン・ビオチン・ALP染色を行った。その結果、NODマウスでは、シクロフォスファミド投与群、非投与群ともに30kDの位置にバンドを認めた。このバンドは、抗p30抗血清をMoloneyマウス白血病ウイルスにて前吸収すると消失したことより、レトロウイルスに由来するp30蛋白である可能性が強く示唆された。ICRマウス膵島、NODマウス肝、脾ではこのバンドは検出されず、正常ヤギ血清でも認められなかった。

## 〔結 語〕

NODマウスでは、膵島特異的にレトロウイルスのgag蛋白の1つであるp30の発現していること

が示され、膵 $\beta$ 細胞特異的に認められるウイルス様粒子はレトロウイルスであることが強く示唆された。シクロフォスファミドはNODマウスの糖尿病発症を促進することが知られているが、本物質は膵島炎を増強し、同時に膵 $\beta$ 細胞特異的に認められるレトロウイルスの発現も増加させることより、レトロウイルスがNODマウスの膵島炎およびIDDMの発症に少なからず関与していることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

インスリン依存型糖尿病（IDDM）は、遺伝因子を基盤に、環境因子ことにウイルス感染が膵 $\beta$ 細胞に対する自己免疫の成立に関与し、発症に至ると考えられている。本研究は、IDDMモデル動物で、形態学的に膵 $\beta$ 細胞にウイルス様粒子の認められるNODマウスを用い、存在するウイルス様粒子がレトロウイルスgag蛋白p30を含むか否かをWestern blotting法によって検討したものである。その結果、膵島にp30の存在を証明するとともに、Cyclophosphamideにより糖尿病の発症が促進されるのに一致して同蛋白の発現が増加することを、初めて明かにした。つまり、形態学的にのみ推定されていたレトロウイルスの存在を、産生蛋白レベルで証明したものであり、重要な知見を報告した論文として学位に値すると思われる。