



Restriction fragment length polymorphism analysis of major histocompatibility complex genes in the non-obese diabetic mouse strain and its non-diabetic sister strains

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤島, 百合子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/935

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 82号	学位授与年月日	平成 元年 3月27日
氏名	藤 島 百合子		
論文題目	Restriction fragment length polymorphism analysis of major histocompatibility complex genes in the non-obese diabetic mouse strain and its non-diabetic sister strains (NOD マウスとその非糖尿病姉妹系統マウスにおける主要組織適合抗原遺伝子の RFLP 解析)		

医学博士 藤島百合子

論文題目

Restriction fragment length polymorphism analysis of major histocompatibility complex genes in the non-obese diabetic mouse strain and its non-diabetic sister strains

(NODマウスとその非糖尿病姉妹系統マウスにおける主要組織適合抗原遺伝子のRFLP解析)

論文の内容の要旨

〔目的〕 non-obese diabetic (NOD) マウスはヒトインシュリン依存性糖尿病のモデル動物と考えられている。NODマウスの糖尿病発症には数対の劣性遺伝子が関与するとされ、そのうちの1対は主要組織適合抗原(以下MHCと略す。)と連鎖していることが証明されている。そこで我々はこのMHCに連鎖した「糖尿病遺伝子」を解析する為に、NODマウスと、その姉妹系統であり糖尿病を発症しないJcl: ICR由来近縁系マウス non-obese non-diabetic (NON)、cataract (CTS)、ILIのMHC遺伝子を restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析にて比較検討した。さらにNOD及びNONマウスについてはMHCクラスII遺伝子の発現をノザンプロット法にて検討した。

〔材料と方法〕 1.マウス: NOD、NON、BALB/c、C57BL/6は本学実験動物施設に維持されているマウスを用い、CTSは牧野博士(塩野義油日ラボ)より、ILIは加藤博士(実中研)より恵与を受けた。2.プローブ: クラスII領域: Dr. Steinmetz (Basel Institute for Immunology)より恵与されたジェノミッククローンを制限酵素で切断し、プローブ1~6 (1: A β 、2: A α 、3: E β 、4: E α 5'領域、5: E α 3'領域、6: E α プロモーターから第一エクソンの一部に相当する)を得た。②クラスI領域: ジェノミッククローン (Dr. Steinmetzより恵与された。)よりD~L遺伝子間の一部を切り出して、各々プローブ7 (D-D2の間)、9 (Dの5'上流域)、10 (D3-D4の間)とした。さらに、城石博士(国立遺伝研)より恵与されたL^a遺伝子のジェノミッククローンからプローブLを得た。③クラスIII領域: Slpの γ 鎖遺伝子(金沢大・癌研・高橋教授より恵与された。)をプローブ8として用いた。このプローブはC4ともクロスハイブリダイズする。3.制限酵素: クラスIとクラスII遺伝子の解析にはEcoRI、BamHI、HindIII、KpnI(ベーリンガー)を用い、クラスIII遺伝子の解析には更にPstI、PvuIIも用いた。4.サザンプロット法: マウス脾細胞より高分子DNAを抽出、これを制限酵素で切断後、その20 μ gをアガロース・ゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレン(アマシャム)に転写後、³²P標識したプローブとハイブリダイズした。5.ノザンプロット法: マウス脾細胞よりグアニジン法にて全RNAを抽出、その20 μ gを1.0%アガロース・ホルマリンゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写後、³²P標識したプローブとハイブリダイズした。

〔結果〕 我々のプローブと、最低4種類の制限酵素を使用した限りに於いては、NODマウスのクラスII及びクラスIII遺伝子はCTS、ILIマウスと同じであったが、NONマウスの遺伝子とは全く異なっていた。また、NOD、CTS、ILIマウスのA β 、E β とC4-Slp遺伝子、及びNONマウスのA α 、A β 、E β とC4-Slp遺伝子はBALB/c、C57BL/6マウスのいずれの遺伝子とも異なっていた。クラスI遺伝子の発現に関しては、NONマウスではE α mRNAが認められたが、NODマウスではE α mRNAが認められなかった。これはNODマウスのE α 遺伝子のプロモーターから第一エクソンにかけて欠失が存在する為であることが確認された。また同様の欠失はCTSとILIマウスにも認められた。クラスIのプローブLを用いたRFLPでは、ICR由来マウスの中で比較するとCTSマウスだけが非常に異なったパターンを示した。D領域の遺伝子構成については、NOD、NON、CTS、ILIマウスはD2~Lの遺伝子が認められず、D領域遺伝子は一つしか存在しないことが示唆された。

〔考察〕 血清学的にはNODとILIマウスはK^dD^b、NONマウスはK^bD^bとタイプされるが、我々の施行したRFLPに於いては、NOD、CTS、ILIマウスのクラスII及びクラスIII遺伝子はNONマウスのそれらとは全く異なっており、所謂H-2^Eタイプの交叉は認められなかった。従来はd、bハプロタイプ何れ

とも異なる遺伝子の由来については他のICR由来マウスのMHC遺伝子の検討が必要であろう。さらに、CTSとILIマウスは、NODマウスと同一のクラスII及びクラスIII遺伝子を保有していると考えられるので、この2系統はNODマウスのMHCに連鎖した所謂「糖尿病遺伝子」を研究する上で非常に有用である。

論文審査の結果の容旨

1980年にJcl-ICRマウスより近交系として確立されたNOD(non-obese diabetic)マウスは、雌では約80%(雄では20%)がインシュリン依存性糖尿病(IDDM)を自然発症するため、ヒトのIDDMのモデル動物として注目されている。NODマウスのIDDMの特徴は、膵臓ランゲルハンス島へのT細胞を主体としたリンパ球浸潤(insulinitis)とそれに引き続くB細胞の破壊であり、なぜ自己免疫性にT細胞の浸潤が起こるのかが問題にされていた。

最近、動物交配実験において、NODマウスには、IDDM発症と関連する少なくとも3対の劣性遺伝子があり、そのうち1対は第17染色体上の主要組織適合抗原遺伝子複合体(MHC)と連鎖していることが明らかにされた。T細胞の抗原認識機構において主要組織適合抗原クラスI及びクラスIIの分子が主要な役割を果たすことは広く知られている。そこで、申請者は本学位申請論文となった研究において、NODマウスのMHCと、同じくJcl-ICR由来の近縁系マウスであるが糖尿病を発症しないNON(non-obese non-diabetic)、CTS(cataract)、ILI各マウス、及びBALB/c、C57BL/6のMHCをrestriction fragment length polymorphism(RFLP)解析により比較検討した。

MHCクラスII領域、クラスI領域、クラスIII領域の解析はそれぞれ領域内の各遺伝子或いは部位に相当する6種類、4種類、1種類のプローブと、EcoRI、HindIII、KpnI、BamHI等4種類以上の制限酵素を用いて行われた。実験により得られた主な結果、結論は次の通りである。

- ① NODマウスのクラスII遺伝子は今回のRFLP解析から判断する限り、CTS、ILIと同じであったが、NONの同遺伝子とは全く異なっていた。また、NOD、CTS、ILIのA β とE β 遺伝子、及びNONのA α 、A β 、E β 遺伝子はBALB/c、C57BL/6のいずれの遺伝子とも異なっていた。
- ② NONではクラスIIのA α 、A β 、E α 、E β 遺伝子のmRNAがいずれも検出されるが、NODではこのうちE α が発現されていないことが確認され、さらにこれはE α のプロモーターから第一エクソンにかけて欠失が存在するためであることが明らかとなった。同様の欠失はCTS、ILI、及びC57BL/6でも認められた。以上の結果は、NODではE α の産物とE β の産物のヘテロ二量体であるI-E抗原が検出されないという報告と符合する。最近、B6(E α)^dトランスジェニックマウスとの交配によりNODにI-E抗原を発現させるとinsulinitis発症が阻止されるという報告がなされている。しかし、糖尿病を発症しないCTS、ILI、C57BL/6にも同様の欠失があることから、insulinitis 或いは糖尿病の自然発症には他の遺伝子も関与すると推定された。
- ③ クラスIのD領域の遺伝子構成については、BALB/cのみがD、D₂、D₃、D₄、Lの5種類の遺伝子を保有しており、NOD、NON、CTS、ILI及びC57BL/6ではD₂、D₃、D₄は認められなかった。L遺伝子の5'領域に対するプローブを用いて行ったRFLP解析ではNODはILI、NONとのみよく似たパターンを示し、CTSとは異なっていた。
- ④ クラスIII遺伝子についてのRFLP解析結果は、NODはCTS及びILIと同一であり、NON、BALB/c、C57BL/6とそれぞれ全く異なっていた。

以上により、これまで血清学的にハプロタイプとしてのタイピングが試みられていたNODとその姉妹系統のマウス及びBALB/c、C57BL/6のMHCに関する各遺伝子の多型性が明らかにされた。その結果、NODと同じ由来の糖尿病を発症しない近縁系マウスILIはMHCに関してはNODと殆ど同一であり、「糖尿病発症遺伝子」を研究するうえで有用であることが示唆された。審査委員会においては、以上の口頭発表と提出された主論文について審議した。その結果、これは大変精力的になされた研究であり、さらにヒトIDDMのモデル動物とされているNODの所謂「糖尿病発症遺伝子」研究のために有用と思われる数多くの基礎的な知見が得られていると高く評価された。以上により、本研究は学位授与に十分価すると審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者

主査	教授	市山	新						
副査	副学長	本田	西男	副査	教授	藤田	道也		
副査	教授	吉見	輝也	副査	助教授	鈴木	修		