

氏 名 (本籍)	し 清	みず 水	ふみ 文	お 雄
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	1628	号
学位授与年月日	昭和 60 年 2 月 27 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	昭和 52 年 3 月 東北大学大学院歯学研究科 (基礎系専攻微生物学専修) 博士課程修了			
学位論文題目	Virus - induced decrease of insulin receptors in cultured human cells. (ウイルス感染によるヒト培養細胞のインスリン・ レセプターの減少)			

(主 査)

論文審査委員 教授 後 藤 由 夫 教授 涌 井 昭

教授 山 根 績

# 論文内容要旨

## 要 約

Herpes simplex virus (HSV) 及び Vesicular stomatitis virus (VSV) の感染を受けた培養ヒト羊膜 (WISH) 細胞において、約 50% のインスリン結合の減少がみられた。この減少は定量的に調べた結果、インスリン・レセプター (インスリン・R) の親和性の変化ではなく、数の減少によるものであった。インスリン・R の減少は感染後 4~12 時間、すなわちウイルス抗原が細胞膜に挿入される時期に一致してみられた。ウイルス感染によるインスリン・R の減少は糖尿病患者にみられるウイルス感染によって生ずる一過性の糖代謝異常の説明の一つになり得ると考えられる。

## 目 的

ウイルス感染や細菌感染の結果、インスリン依存性糖尿病患者のみならず、健常人においても時に一過性の糖代謝異常が生ずることが知られている。インスリン効果の発現の第一段階はインスリン・R を介して行なわれることから、本研究において、ウイルス感染が細胞膜上に存在するインスリン・R に与える影響を radioreceptor assay で調べた。

## 方 法

① 単層培養 WISH 細胞に各種のウイルスを感染させた。その後、経時的に collagenase (1 mg/ml) と hyaluronidase (0.5 mg/ml) を含んだ PBS で培養して得た剥離細胞をインスリン・R の測定に供した。② インスリン・R の定量は  $^{125}\text{I}$ -ブタインスリンを用いた J. Roth らの radioreceptor assay で行なった。③ WISH 細胞の蛋白合成阻害は cycloheximide (1.8  $\mu\text{M}$ ) 及び puromycine (5.5  $\mu\text{M}$ ) で行ない、その程度は酸不溶性分画に取り込まれた  $^3\text{H}$ -leucine の測定で行なった。

## 結 果

① HSV 感染のインスリン結合への影響：感染後 2 時間から 4 時間で WISH 細胞へのインスリンの特異的結合の減少がみられた。この減少は 8 時間で最高値で、対照に較べ約 40% 減少であった。Scatchard 分析などから、この減少は細胞膜上のインスリン・R の数の減少によるもので、その親和性にほとんど変化がみられなかった。紫外線不活化 HSV を用いた実験から、インスリン結合抑制には感染性ウイルスが必要である。② 他のウイルス感染のインスリン結合への影響：

VSV, encephalomyocarditis (EMC) virus, Sindbis virus 及び measles virus の各ウイルスを WISH 細胞に感染させ、経時的にインスリンの結合を測定した。VSV の場合、感染後 4 時間以内にインスリン結合が減少し、11 時間目で 68% の減少であった。しかし、EMC virus, Sindbis virus, 及び measles virus の場合には特異的結合の減少はみられなかった。③ インターフェロン (IF) のインスリン結合に与える影響: WISH 細胞を  $10^4$  単位/*ml* までの各濃度の IF で培養 (37°C, 30 時間及び 48 時間) 後、 $^{125}$ I・インスリン結合を調べたが、ほとんど変化がみられなかった。④ 蛋白合成阻害剤の影響: cycloheximide 及び puromycine を用いた実験から、WISH 細胞のインスリン・R の半減期 ( $t_{1/2}$ ) は 14~24 時間であった。

## 考 察

ウイルス感染あるいは細菌感染後、糖尿病患者のみならず健常人の糖代謝異常が一過性に生ずることが知られている。その機序として、①ウイルスによる Langerhans 島の  $\beta$  細胞の破壊によるインスリン合成の低下、②感染がストレスとなって生じた種々のホルモンや mediators がインスリン耐性の因子となる、③更には、本実験で示したように、ウイルスが直接末梢細胞に感染し、インスリン・R を変化させる、などが考えられる。

本研究で示したウイルス感染によるインスリン・R の減少の機序として、①感染による宿主の高分子合成阻害、②感染細胞から遊離した mediators (例えば IF, lysosomal enzymes) によるインスリン・R の減少、③感染細胞膜上に生じたウイルス抗原、などが考えられる。EMC virus は感染初期に宿主の高分子合成を阻害するにも拘らず、インスリン・R を変化させないこと、及びインスリン・R の  $t_{1/2}$  が 14~24 時間であることから、ウイルス感染の初期にみられるインスリン・R の減少を高分子合成阻害のみで説明することは困難である。また感染細胞から遊離する IF や lysosomal enzymes によるインスリン結合抑制はないと考えられる。HSV や VSV は、ウイルス抗原を細胞膜に挿入するウイルスであるが、インスリン・R を減少させる。一方、EMC virus は、ウイルス抗原を細胞膜に挿入しないウイルスであるが、インスリン・R を変化させない。以上の結果から、細胞膜に挿入されたウイルス抗原がインスリン・R の変化あるいは masking の原因となると考えられる。

結論として、インスリン・R 測定は感度に秀れ、また定量的であることから、ウイルス感染が細胞膜に与える影響を調べる最適な方法である。またウイルス感染によるインスリン・R の減少は、糖尿病患者にみられる、感染によって生ずる一過性の糖代謝異常の説明の一つになり得るものと考えられる。

## 審査結果の要旨

近年ウイルス感染により糖尿病の起こることが実験的ならびに臨床的に証明されている。糖尿病はインスリン効果が発現しにくい状態であるが、これはインスリンに対するインスリン・レセプターの親和性の減少と数の減少またレセプター以後の効果発現機構の異常などによると考えられる。この研究はウイルス感染によって細胞膜上に存在するインスリン・レセプターに変化が起こるか否かを明らかにするために行ったものである。

方法としては単層培養したヒト羊膜細胞に単純ヘルペスウイルス (HSV), 水疱性口内炎ウイルス (VSV), EMCウイルス, Sindbisウイルス, 麻疹ウイルスを感染させ、その後経時的にコラゲナーゼとヒアルロニダーゼを含んだPBSで培養して得た剥離細胞のインスリンレセプターを radioreceptor assay で測定し、つぎの成績を得ている。

HSV感染2時間より4時間後にインスリンのヒト羊膜細胞への結合の減少がみられ、8時間後には最大となり対照に較べ約40%減少した。この減少は細胞膜上のインスリン・レセプターの数の減少によるものであって親和性にはほとんど変化がみられない。紫外線不活化HSVを用いた実験より、インスリン結合抑制には感染性ウイルスが必要である。VSV感染でも4時間後より結合の減少がみられ11時間後には68%の減少が認められたが、EMCウイルス, Sindbisウイルス, 麻疹ウイルスには特異的結合の減少は認められなかった。ヒト羊膜細胞にインターフェロンを各濃度に添加培養したが、インスリン結合能には変化はみられなかった。また cycloheximide及び puromycine を用いて蛋白合成阻害を行った実験よりヒト羊膜細胞のインスリン・レセプターの半減期は14-24時間であった。

以上の実験をもとに著者は、ウイルス感染によって糖尿病患者や健常者の糖代謝が異常となるのはウイルスが直接末梢細胞に感染してインスリン・レセプターを変化させるためであるとし、その機序としては細胞膜に挿入されたウイルス抗原がインスリン・レセプターの変化あるいは marking の原因となっているとしている。

この研究はウイルス感染による耐糖能の低下あるいは糖尿病の発症機構について重要な知見を加えたものであり、学位授与に値する。