

図1 n- $\beta_2$ -mあるいはr- $\beta_2$ -mを用いたfA $\beta_2$ -m伸長反応のpH依存性

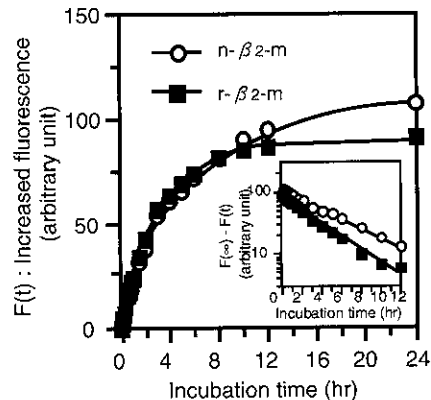


図2 n- $\beta_2$ -mあるいはr- $\beta_2$ -mを用いたfA $\beta_2$ -m伸長反応の経時変化

より起こる反応であることが明らかとなった。一方、伸長した線維の超微形態観察では、幅9~16 nmの典型的なアミロイド線維の明らかな伸長が認められた。強拡大の観察では、これらの線維は2本あるいはそれ以上の細線維によるツイスト構造を形成しており、2本の細線維で構成された線維のらせん周期は120~150 nm、幅は9~12 nmを示していた。

### 2. AGEs- $\beta_2$ -mを用いたfA $\beta_2$ -m伸長反応

DG修飾あるいは3-DG修飾 $\beta_2$ -mによるfA $\beta_2$ -m伸長反応では、各々n- $\beta_2$ -mに比較してfA $\beta_2$ -mの伸長はごくわずかであった。一方、n- $\beta_2$ -mとAGEs- $\beta_2$ -mとの共存では、AGEs- $\beta_2$ -mはn- $\beta_2$ -mによるfA $\beta_2$ -m伸長反応を用量依存的に阻害することが示された。したがって、透析アミロイドーシスでみられるAGE修飾はアミロイド形成後に二次的に発生したもので、 $\beta_2$ -mのAGEs修飾は線維の形成には抑制的に作用する可能性が示唆された。

### 3. r- $\beta_2$ -mを用いたfA $\beta_2$ -m伸長反応

r- $\beta_2$ -mを用いたfA $\beta_2$ -m伸長反応では、反応の至適pHは2.5~3であり、n- $\beta_2$ -mの場合と同様に酸性領域でのみ線維の伸長がみられた。pH 2.5におけるfA $\beta_2$ -m伸長反応の経時変化では、r- $\beta_2$ -mでは蛍光の立ち上がりやや早く、より短時間で平衡化する傾向がみられたが、n- $\beta_2$ -mとほぼ同様の反応を示した。また、反応初速度におけるseed (fA $\beta_2$ -m)濃度依存性あるいは $\beta_2$ -mモノマー依存性も良好な直線性を示し、r- $\beta_2$ -mを用いたfA $\beta_2$ -m伸長反応も一次反応速度論モデルに従うことが明らかとなった。また、r- $\beta_2$ -mを用いて伸長された線維

の超微形態も明瞭なツイスト構造を有した線維が観察され、ツイスト周期が120~150 nm、線維幅12~16 nmを示しており、n- $\beta_2$ -mにより伸長された線維と形態学的にも同様な線維が形成されていた。したがって、試験管内fA $\beta_2$ -m伸長反応にはr- $\beta_2$ -mを利用可能であり、今後さらに精度の高い試験系を構築できる可能性が示された。

## 結 論

$\beta_2$ -mを用いた試験管内fA $\beta_2$ -m線維伸長反応により、アミロイド線維の伸長が観察され、ThT蛍光定量法により、その伸長反応は一次反応速度論モデルに従うことが明らかとなった。また、本試験系はアミロイド線維形成機構および線維形成に影響を及ぼす生体分子の解析に有用であり、r- $\beta_2$ -mを用いることでより精度の高い試験系を構築できる可能性が示された。

## 参考文献

- 1) Naiki H, Hashimoto N, Suzuki S, Kimura H, Nakakuki K, Gejyo F. Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 1997; 4: 223-232.
- 2) Niwa T, Katsuzaki T, Momoi T, et al. Modification of  $\beta_2$ -m with advanced glycation end products as observed in dialysis-related amyloidosis by 3-DG accumulation in uremic serum. *Kidney Int* 1996; 49: 861-867.
- 3) Horiuchi S, Araki N, Morino Y. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction: Evidence for the

- presence of a common structure. *J Biol Chem* 1991; 266 : 7329-7332.
- 4) Ikeda K, Higashi T, Sano H, et al. Ne- (carboxymethyl) lysine protein adduct is a major immunological epitope in protein modified with advanced glycation end products of the maillard reaction. *Biochemistry* 1996; 35 : 8075-8083.
  - 5) Pras M, Zucker-Franklin D, Rimón A, Franklin EC. Physical, chemical, and ultrastructural studies of water-soluble human amyloid fibrils. *J Exp Med* 1961; 130 : 777-791.
  - 6) Naiki H, Higuchi K, Nakakuki K, Takeda T. Kinetic analysis of amyloid fibril polymeization in vitro. *Lab Invest* 1991; 65 : 104-109.

Analysis of dialysis-related ( $\beta_2$ -m) amyloid fibril formation model *in vitro*

by

Fumitake GEJYO\*

Itaru YAMAGUCHI\*\*, Kazuhiro HASEGAWA\*\*,

Norikazu HASHIMOTO\*\*\*, Hironobu NAIKI \*\*\*\*

from

\*Second Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine

\*\*Department of Clinical and Laboratory Medicine, Fukui Medical University

\*\*\*Department of Clinical and Laboratory, Fukui Medical University

\*\*\*\*Department of Pathology, Fukui Medical University

We developed dialysis-related amyloid fibril (fA  $\beta_2$ -m) extension model *in vitro*, and examined the mechanism of fA  $\beta_2$ -m formation. 1) The thioflavine T (ThT) fluorescence spectroscopic quantitative analysis revealed that fA  $\beta_2$ -m extension was occurred at acidic condition (maximum : among pH 2.5~3.0) and the fA  $\beta_2$ -m can be explained by a first order kinetic model. 2) We studied the effect of advanced glycation end products (AGEs) modified  $\beta_2$ -m treated with glucose or 3-deoxyglycosone on the fA  $\beta_2$ -m extension. The modification of  $\beta_2$ -m with AGEs showed inhibitory effects to fA  $\beta_2$ -m extension. 3) We compared with recombinant  $\beta_2$ -m (r- $\beta_2$ -m) and native  $\beta_2$ -m (n- $\beta_2$ -m) on the fA  $\beta_2$ -m extension reaction. Both  $\beta_2$ -ms showed similar reaction on the fA  $\beta_2$ -m extension. We have established the higher quality of amyloid fibril formation model with r- $\beta_2$ -m for fA  $\beta_2$ -m.

## 透析アミロイドーシスの骨病変に対するetidronate disodiumによる治療の試み

研究者 原 茂 子 乳 原 善 文 山 田 明

### 目 的

透析アミロイドーシスによりもたらされる骨病変としては破壊性脊椎関節症(DSA), 関節周囲の骨における骨嚢胞が挙げられ, これが長期透析患者における生命予後と日常生活動作に影響を与えることになる。この骨病変の特徴は骨周囲で椎間板をはじめとする部位に $\beta$ 2MGによるアミロイドの沈着が生じ, これがAGE化をうけると, それを処理するために出現したマクロファージがIL-1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ 等のサイトカインの産生を介して破骨細胞の活性化を引き起こし, アミロイド周囲の骨梁をまで破壊することが原因とされている。そこで骨の石灰化前線に取り込まれ, それを貪食した破骨細胞がアポトーシスを起して破骨細胞の活性を低下させるetidronate disodiumを用いて, 破骨細胞活性を抑えることにより骨破壊を予防しようという試みが今回の目的である。

### 対 象

対象は血液透析10年以上の症例20名(男12名, 女8名)である。平均年齢 $60 \pm 8.4$ 歳, 平均透析年数 $19 \pm 6.1$ 年。

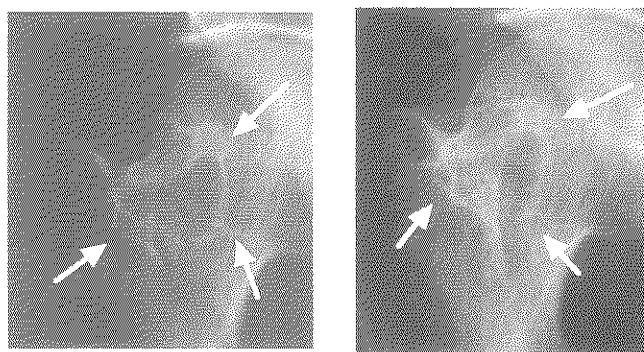
### 方 法

etidronate disodium 200mg/日を2週投与した後10週休薬するといったサイクルで治療を継続する。治療効果の判定となる観察項目として, 単純X-Pによる骨嚢胞(上腕骨骨頭, 大腿骨骨頭, 手根骨)と頸

椎DSAの推移をそのサイズを測定することにより比較した。さらに血清学的なマーカーとしては骨吸収マーカーとしてのI-CTP(1型プロコラーゲンC末端プロペプチド)とTRAP(酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ)を測定し, 同時にintact-PTH, BGPをも測定して比較検討した。統計処理はpaired t-testにて行った。

### 結 果

本薬剤による治療を開始して4クール行い, 丁度1年経過したところで今回比較検討した。治療前にDSAを認めた症例は9例で, 経過観察中に悪化2例, 変化なし7例, 新たな出現なし0例, 改善例0例。上腕骨骨頭嚢胞5例で, 悪化3例, 変化なし2例, 新たな出現なし0例, 改善例0例。大腿骨骨頭嚢胞は7例で, 悪化1例, 変化なし6例, 新たな出現なし0例, 改善例0例。手根骨骨嚢胞および手指変形拘縮5例で, 悪化1例, 変化



治療前

治療1年後

図1 大腿骨骨嚢胞

表1 血清学的骨マーカーの推移

	前	6ヶ月後	1年後	前 vs 6ヶ月後	6ヶ月後 VS 1年後
I-CTP(ng/ml)	37.8±17.3	45.6±18.6	45.8±18.4	P<0.01	NS
TRAP(U/l)	8.5±1.3	9.0±1.7	8.4±1.8	P<0.05	P<0.05
iPTH(pg/ml)	195±206	287±235	178±189	P<0.05	P<0.05
BGP(ng/ml)	77.8±71	109±78	115±112	P<0.05	NS
I-CTP/iPTH	0.37±0.31	0.36±0.41	0.39±0.26	NS	NS
TRAP/iPTH	0.12±0.14	0.07±0.09	0.10±0.11	NS	NS
BGP/iPTH	0.57±0.44	0.67±0.63	0.96±0.60	NS	NS

なし4例, 新たな出現なし0例, 改善例0例で, 合計するとアミロイド骨病変26箇所のうち, 悪化7箇所, 変化なし19箇所, 新たな出現なし0箇所, 改善例0例であった。変化のみられなかった1例を図1に示す。血液透析歴30年の男性患者で経年的に大腿骨骨嚢胞の増大傾向がみられていたが, 本剤投与1年前後の比較で骨嚢胞のサイズに増大傾向がみられなくなったのみならず, 周囲の骨梁線の増加がみられはじめています。明らかに骨の反応が見られ始めていることがわかる。

血清学的骨マーカーの推移を表1に示す。

I-CTP, TRAP, iPTH, BGPは治療6ヶ月後に有意に上昇したが, 1年後はTRAP, iPTHは低下し, I-CTP, BGPは不変であった。iPTHとの比でみたI-CTP, TRAP, BGPは不変であった。本剤を投与したことによる合併症は1例もみられなかった。

### 考 察

透析アミロイドーシスは約10年以上の長期透析症例に高頻度にみられ, 進行を続ける合併症の一つである。現在透析技術の改善,  $\beta$ 2MG吸着療法といった予防法は試みられているが, 積極的な治療法は確立されていない。治療を目的に本法を1年施行した。経過観察中, 改善例はなく, 一部では進行を認めたが, 進行を抑えられた症例や新たな出現がみられなかったことは一つの成果と考えた。本剤は破骨細胞活性を抑えることによりアミロイド周囲の骨破壊の抑制をねらって投与されたが, 実際に血清学的には破骨細胞活性を十分に抑

えられていないという結果がでた。同時に骨形成を反映するマーカーも上昇したことから, PTHの影響が大きく血清学的なI-CTPやTRAPの推移をみかけ上相殺している可能性も考えられた。本剤の投与量は透析患者に使用する場合の安全量と考えられている量を投与したが, 1年で効果を示すには本剤の投与量がやや少なかった可能性もある。しかし本剤は組織結合性が強く容易に代謝されないという特性から, 投与を続けていくと今後徐々に破骨細胞活性を低下させることにより, アミロイド骨病変の治療になる可能性が考えられた。

### 結 論

本法の透析アミロイドーシスに対する治療効果を判定するには, 期間的にも1年は不十分であり, もう少しの観察期間が必要である。さらに本剤の投与量の見直しも, 合併症に留意しながら今後検討する必要があると思われた。

## The management by etidronate disodium for dialysis-related amyloidosis

by

Shigeko HARA

Yoshifumi UBARA, Akira YAMADA

from

Kidney Center, Toranomon Hospital

In Japan where renal transplantation from cadaveric donors are not popular, dialysis-related amyloidosis is one of severe complications in patients receiving long-term dialysis, in particular, longer than 10 years, and is identical to  $\beta_2$ -microglobulin.

Its management is yet unsatisfactory. We aimed to treat this problem using etidronate disodium which suppress osteoclastic activity. Not only the size of tumorous cysts of shoulders and hips etc. measured by bone radiograph, but also serological markers showing osteoclastic activity including cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) were compared before and one year after treatment.

Although 7 spots enlarged among 26 spots showing tumorous cyst, 19 spots fell to progress, and new lesion has not appeared. TRAP tended to decrease, but ICTP did not reveal significant decrease.

These findings suggest that this drug may be effective in suppressing amyloid-related bone lesion.

## 慢性腎不全透析方法と透析アミロイドーシス臨床病理学的検討

研究者 原 茂子\* 乳原善文\* 高川竜子\*\*  
原 満\*\*

### はじめに

透析アミロイドーシスの成因に関しては種々の因子があげられている。遺伝因子、透析ダイアライザーの透析膜の生体適合性、 $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ -m) の除去能、透析液のエンドトキシンなど多因子があげられている。腎不全の治療としてCAPD (持続携行式腹膜透析)、およびHD (血液透析) が施行されている。CAPDでは、自己の腹膜を用いるために生体膜適合性は良好である、さらにHDに比しアシドーシスがないことがその特徴である。アシドーシス下で培養細胞からの $\beta_2$ -m産生が増強するとの実験成績の報告もあり、アシドーシスのみられないCAPDでは、アミロイドーシスの合併が抑制されうることが推測される。アミロイド発症予防に関し、CAPDの有用性が推測されている海外からの報告がみられているが、HD歴に比しCAPD治療歴は短期間であり、その確信がえられていない。本邦でのCAPD治療では10年以上例も散見されている。そこで今回はアミロイドーシスの発症および進展に関して、長期CAPD例とHD例とで差がありうるか否かを検討した。

### 対象および方法

1) CAPD, HD治療例で透析期間, 年齢, 透析導入時期をマッチングさせ, 透析アミロイドーシスの合併頻度に関しその臨床症状出現頻度を対比した。

CAPD 26例 (男14, 女12例.年齢 $54.8 \pm 11.9$ 才.透析期間 $7.6 \pm 3.4$ 年)

HD 26例 (男14, 女12例.年齢 $56.3 \pm 11.5$ 才.透析期間 $7.9 \pm 4.0$ 年)

臨床症状としてはCTS (手根管症候群) 開放術の有無, X-Pによる骨嚢胞, DSA (破壊性脊椎関節症) の有無を検索した。

2) 病理組織学的には, 5年以上の透析歴を有し剖検を施行しえたHD, CAPD例で, 椎間板における $\beta_2$ -mアミロイド沈着の有無を検索した。

### 結 果

1. CAPD とHDでの透析アミロイドーシス臨床像の対比 (表1)

手根管症候群に対して開放術施行の頻度は

表1 透析方法と透析アミロイドーシス合併頻度の対比

	CAPD (n: 26)	HD (n: 26)
手根管症候群 開放術	1/26例	2/26例
破壊性脊椎関節症		
(-)	24例	19例
(±)	2	3
(+)	0	4
骨嚢胞	154関節	154関節
(-)	146	115
(±)	1	13
(+)	7	26

骨嚢胞  $\chi^2$ 検定  $P < 0.01$

\* 虎の門病院 腎センター

\*\* 同 病理

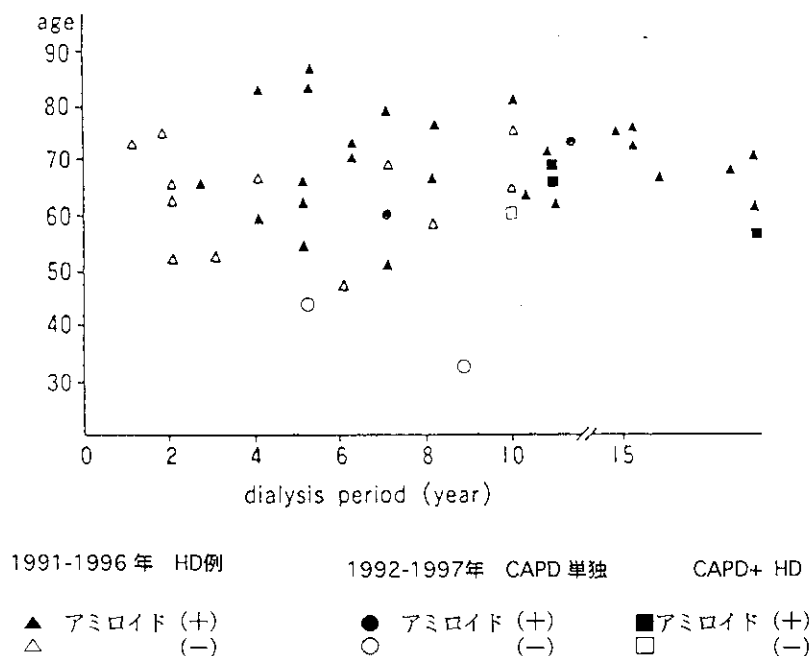


図1 剖検例における脊椎椎間板への $\beta_2$ -mアミロイド沈着と剖検時期、年齢、透析方法との対比

CAPD26例中1例のみで、その1例はHD7年後にCAPDに移行し、CAPD12年継続例で全透析期間19年の症例である。HD26例中2例で開放術を施行しており両治療法での手術頻度には有意な差はみられていない。

骨嚢胞の合併頻度は、HDでは総関節数154関節中、骨嚢胞(-)115関節、(±)13関節、(+)26関節であり、CAPD154関節では各々146, 1, 7関節であり、CAPD例では有意( $\chi^2$ 検定,  $P < 0.01$ )に骨嚢胞の合併はCAPD例で低頻度であった。破壊性脊椎関節症は、HD26例中(-)は19例で、(±)は3例であり、(+)は4例であった。CAPD例では各々が24例, 2例, 0例であり、両治療法ではその合併頻度に統計学的な有意差は認められなかったが、CAPD群でのDSA合併頻度は低値であった。

## 2. 剖検例での椎間板におけるアミロイドーシスの有無(図1)

CAPD8例で検索を施行しているが、CAPD単独治療は4例で、その治療期間は5~13年で平均8.3年である。他3例はHD(5~8年)後にCAPD5年以上施行(5~14年)であり、残る1例ではCAPD7年施行後にHD3年施行した症例である。

これらの症例での椎間板でのアミロイド沈着は8例中5例(62.5%)である。一方、HD例では1976~1989年に剖検施行しえた5年以上の透析例では23例中19例であり、82.6%である。 $\beta_2$ -microglobulin( $\beta_2$ -m)の除去効率の高いダイアライザー導入以後の1991~1996年間の剖検施行例で5年以上透析歴の27例中22例(81.4%)にアミロイドの沈着がみられた。HD例に比しCAPD例では陽性頻度が低値を示した。CAPD療法は本邦で導入され15年の経過である。そこで透析期間を5~15年のCAPD単独治療例と5~15年のHD例とでさらに比較すると、アミロイド沈着の頻度はCAPD単独治療の4例中では2例でみられている。一方1991~96年の間に剖検しえたHD例では23例中18例(78.2%)に認められている。

CAPDではHD例に比較してその合併頻度は低値であった。CAPD例ではアミロイドの発症を防止しえていないが、透析アミロイドーシスの臨床像の頻度、および剖検例での病理組織学的所見からはHDに比しその程度が軽度であり、CAPD療法はアミロイドーシスの進展を抑制しうると考えられる。腹膜は自己膜であり生体適合性がよいこと、持続治療のためにアシドーシスがないことが、ア



ミロイドーシスの進展抑制に関与していると考えられる。今後長期症例でさらに多数例での検討が必要である。

## 結 論

CAPDは透析アミロイドーシスの発症を防止することはできないが、アミロイドーシスの臨床像、剖検所見から合併頻度の検討では、進展を軽減させることが示唆された。今後は多数例での検討とさらにHD治療におけるアシドーシス管理によりアミロイド沈着の軽減が得られるか否か、今後の検討課題と考えられる。

## 文 献

- 1) 柴田猛、小川浩之、原茂子、他. 中空糸高密度充填型 reverse Flux Dialyzer の開発・第43回 日本透析医学会学術総会 1998年 5月29-31日
- 2) 原茂子、小林フミコ. 透析アミロイドーシス診断と臓器障害 その他の診断法・透析アミロイドーシス— 成因・診断・治療—斎藤明、鈴木正司 編.1995;121-125.
- 3) Nomoto Y, Kawaguchi Y, Hara S, et al. Carpal Tunnel Syndrome in Patients Undergoing CAPD:A collaborative Study in 143 Centers. Am J Nephrol 1995;15: 295-299.
- 4) Sonikian M, Gorgusev J, et al. Potential Effect of Metabolic Acidosis on  $\beta_2$ -microglobulin Generation . In Vivo and In Vitro Studies. J Am Soc Nephrol 1996 ;7: 350-356.

The investigation of risk factors on the progression of dialysis amyloidosis by the clinicopathological study of dialysis amyloidosis on HD and CAPD patients

by

Shigeko HARA\*

Yoshifumi UBARA\* , Ryuuko TAKAGAWA\*\*, Mituru HARA\*

from

\*Kidney Center , Toranomom Hospital

\*\*Department of Pathology, Toranomom Hospital

The risk factor on the progression of dialysis amyloidosis was investigated on CAPD (Continuous ambulatory peritoneal dialysis) and HD (Hemodialysis) patients. As clinical findings of dialysis amyloidosis, operation for CTS (Carpal tunnel syndrome) , DSA and bone cyst were investigated on 26 cases of CAPD and 26 cases of HD .

And the frequencies of clinical findings were compared to HD and CAPD therapy. CAPD cases and HD cases were mated on age, the date of start on dialysis therapy and duration of dialysis. And the findings of  $\beta_2$ -m amyloid detection on vertebral region were compared CAPD to HD autopsy cases with duration of 5-15 years dialysis therapy .

No difference on frequency of operation for CTS was observed between CAPD and HD. The frequency of bone cyst was more high with significant difference ( $P<0.01$ ) on HD cases compared to CAPD. DSA was observed more frequently on HD to CAPD with no significant difference. The pathological findings of the detection for  $\beta_2$ -m amyloid is observed in 78.2% of 23 HD patients and in 50% of 4 cases were treated with only CAPD therapy. CAPD therapy is useful for prevention of progression of  $\beta_2$ -m amyloidosis.

The effect of the prevention is related to no acidosis and good membrane compatibility of CAPD therapy. As the treatment for prevention, correction of acidosis and biocompatibility of dialyzer are important factors.

## 変異導入マウスを用いたアミロイドーシス発症機構の解析

研究者 前 田 秀一郎\* 碓 井 郁 夫\* 加 藤 靖 子\*\*  
河 野 裕 夫\*\*\* 伊 藤 禎 洋\* 大 野 伸 一\*\*  
石 原 得 博\*\*\*

### 目 的

家族性アミロイドポリニューロパチー (Familial Amyloidotic Polyneuropathy; FAP)では、血清蛋白質、トランスサイレチン (TTR) の1アミノ酸が置換した異型TTRがアミロイドを形成して、全身種々の臓器に沈着する。FAPの病因は、*ttr*遺伝子上の点変異であることが明らかにされているが、発症機構は不明である。現在、FAPの治療法として、TTRの主要産生臓器である患者の肝を切除し、正常肝を移植する方法が行われている。肝移植により症状の進行を止めることができ、現在、唯一の有効な治療法である。しかし、肝移植後に主要症状である神経障害がどれほど改善するかについては、今後、長期に亘る検討が必要と考えられる。また、TTRは肝の他、脳の脈絡叢や眼の網膜などで合成されることから、肝移植後に硝子体にアミロイドが沈着し、視力障害をきたす場合があること、移植は危険を伴い、ドナーの確保が難しく、多大の費用を要することなど問題点も多い。

FAPの治療法や発症を遅らせる手だてを開発するためには、実験操作の容易なマウスで疾患モデルを作り、発症に関与する因子を明らかにすることが必要と考えられる。そこで、先に我々は、FAPの病因である点変異を持つヒト*ttr*遺伝子をマウス受精卵に注入する方法で、FAPのトランスジ

ェニックマウスモデルを作製した。これらマウスでは、FAP患者と同様の種々の臓器に、ヒト異型TTRから成るアミロイドが沈着する。しかし、この方法ではマウス内在性の*ttr*遺伝子の機能は正常のままで、FAP患者に特徴的な末梢神経へのアミロイド沈着がなく、神経障害を認めない<sup>1,3)</sup>。マウス末梢神経へのアミロイド沈着には、マウスの異型TTRによるアミロイド形成が必要かもしれない。そこで本研究は、標的遺伝子組換え法を用いて、よりFAPに近似した疾患モデルマウスや特定の遺伝子に目的の変異をもつマウスを作製し、これらマウスを用いて神経障害を含めたFAPの発症機構を明らかにし、発症を遅らせる手だてや治療法を確立することを目的に遂行する。

### 方 法

標的遺伝子組換え法を用いて作製した一対の血清アミロイドP成分(*sap*)遺伝子の双方に挿入変異をもつ無SAPマウス株<sup>4)</sup>と対照野生型マウスとにAAアミロイドーシスを惹起し、これらマウスでのAAアミロイドの構成成分を光学顕微鏡を用いて、免疫組織化学的に比較解析し、またその超微細構造を電子顕微鏡を用い、急速凍結・ディープエッチング法で比較観察する<sup>5)</sup>。AAアミロイドーシスは、1mlのFreund's complete adjuvant, 1mlのPBS及び25 mgの加熱殺菌した*M. butyricum*菌体から成るエマルジョンをマウスの腹腔内に体重10 gあたり0.1 ml注射して惹起する。さらに、無SAPマウス

\* 山梨医科大学医学部生化学第一講座

\*\* 山梨医科大学医学部解剖学第一講座

\*\*\* 山口大学医学部病理学第一講座

株と対照野生型マウス株とに沈着したAAアミロイドの吸収実験<sup>6)</sup>を行い、両者でアミロイドの吸収速度に明確な差異があるかどうかを調べる。吸収実験は、以下のように行う。マウスに0.6 mlの5%カゼイン(0.3 M NaHCO<sub>3</sub>溶液)を毎日1回、週に6日間、9週の間連続皮下投与して、脾にAAアミロイドーシスを惹起させた後、脾を部分切除し、この生検脾のアミロイド沈着程度を光学顕微鏡で観察する。その後、カゼイン投与を中止して、60日間飼育を続けたマウスを屠殺後、摘出した脾のAAアミロイド沈着程度を60日前の同一マウスの沈着程度と比較する。

### 結果及び考察

種々のアミロイドーシスで沈着する異なるアミロイドに共通の微量構成成分、SAPがアミロイド沈着を促進することを示唆する知見が報告されていたが<sup>7)</sup>、*in vivo*での実験的裏付けは無かった。そこで、我々は先に、標的遺伝子組換え法を用いて、一对の*sap*遺伝子の双方に挿入変異をもつ無SAPマウス株を作製し、無SAPマウスでは、対照野生型マウスに比べAAアミロイドーシスが有意に遅れて惹起されることを見出した<sup>8)</sup>。英国のPepys博士らも、筆者らとは、独立に無SAPマウス株を作製し、同様の結果を報告している<sup>9)</sup>。一方、従来SAPは、種々のアミロイド細線維の表面に結合し、アミロイドが分解されるのを阻害すると考えられてきた<sup>7)</sup>。しかし最近、組織中のAAアミロイドの超微細構造を電子顕微鏡で観察した結果では、SAPがAAアミロイドの中心部分に存在することが、示唆されている<sup>9,10)</sup>。無SAPマウスに沈着するAAアミロイドと野生型マウスに沈着するAAアミロイドとは、光学顕微鏡では、識別できない<sup>4,8)</sup>。そこで、AAアミロイドの分子構造を明らかにするため、まず、野生型及び無SAPマウスにエマルジョンを投与して惹起した脾アミロイドを光学顕微鏡による免疫組織化学法で調べ、以下の結果を得た。

- (I) 野生型及び無SAPマウスのアミロイドは共に抗マウスAA抗体と反応した。
- (II) 予想通り、野生型マウスのアミロイドは、抗マウスSAP抗体と反応したが、無SAPマウスのアミロイドは、反応しなかった。

- (III) 抗マウスヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)抗体とは、野生型及び無SAPマウスのアミロイド共に反応した。前者の反応は、組織切片をトリプシンで処理すると著しく増強したが、後者の反応はトリプシン処理でわずかに増強するに止まった。
- (IV) 一方、抗マウスAA抗体とアミロイドとの反応は、トリプシン処理により、野生型及び無SAPマウスのアミロイド共にやや減弱した。
- (V) 野生型マウスのアミロイドと抗マウスSAP抗体との反応は、トリプシン処理により、抗マウスAA抗体とアミロイドとの反応より、一層顕著に減弱した。

トリプシンは、アミロイドの構成成分のうち、表面に近く存在する物をより効果的に分解すると考えられる。従って、上記の結果は、AAアミロイドにおいて、HSPGが、その中心部分に存在し、その表面に、AA線維が存在し、SAPは、最表面に結合していることを示唆すると考えられる。

次に、野生型及び無SAPマウスの脾アミロイドの超微細構造を急速凍結・ディープエッチング法で比較観察し、以下の結果を得た。

- (I) 野生型マウスで観察されるAAアミロイド線維の直径は、平均約13.7 nmで、無SAPマウスで観察されるAAアミロイド線維(平均直径、約7.5 nm)に比べ、明らかに太かった。
- (II) 無SAPマウスのアミロイド線維の表面には、細い線維状の構造物を認めるのに対し、野生型マウスのアミロイド線維の表面には、これを認めず、かわりに数珠状の突起を認めた。

この結果と上記、光学顕微鏡による免疫組織化学的解析結果とから、野生型マウスのアミロイド線維の表面の数珠状の突起には、SAPが含まれ、その内側の線維状の構造物は、AA線維を含み、さらにその内側の中心部かその近傍にHSPGが存在すると考えられる。それでは従来考えられてきたように、SAPは、アミロイド線維の表面に結合し、アミロイドの分解、吸収を阻害するのだろうか。そこで、無SAPマウス株と対照野生型マウス株とに沈着した脾AAアミロイドの吸収実験を行い、以下の結果を得た。

- (I) 野生型マウス及び無SAPマウスの各々8匹に

**Table 1. Effect of SAP on the Resorption of Experimental Murine AA Amyloid**

Genotype	Histological grade of amyloid deposition	
	Biopsy	Autopsy
+/+ (Wild-type)	5	4
	4	4
	4	4
	3	2
	2	2
	2	2
	1	1
	1	1
	1	1
-/- (SAP-deficient)	4	4
	4	4
	3	3
	3	3
	3	3
	2	1
	2	2
	2	2
	2	2

The grading of amyloidosis expressed in the modification from Christensen and Hjort (Acta Pathol Microbiol Scand, 47: 140, 1959) is as follows: Grade 0: No amyloid deposit. Grade 1: Small nodular or lineal amyloid deposits in the perifollicular zone. Grade 2: Appearance of rings of amyloid deposits in the perifollicular zone. Grade 3: Broad bands of amyloid deposits in the perifollicular zone and occasional amyloid deposits in the red pulp. Grade 4: Amyloid deposits in the red pulp is more pronounced and the follicles are reduced to feebly staining reticulum cells. Grade 5: Complete loss of structure and the spleen consists mainly of amyloid deposits.

9 週の間、カゼインを連続皮下投与して、部分摘脾し、この生検脾中のAAアミロイドの沈着程度を調べた。沈着程度には個体差を認めしたが、野生型マウス及び無SAPマウスでの平均沈着程度は、共にgrade 3で両者間での有意な差異は認めなかった (Table 1)。

(II) これらマウスは、その後カゼインを投与せずに、60日間飼育後、屠殺し、摘出した脾のAAアミロイド沈着程度を60日前の同一マウスの沈着程度と比較した。この結果、無SAPマウスと野生型マウスとで、AAアミロイドの吸収速度に明確な差異を認めなかった (Table 1)。

無SAPマウスには何ら異常を認めない<sup>4,5)</sup>。従って、SAPがマウスのAAアミロイド沈着ばかりでなく、FAPやアルツハイマー病でのアミロイド沈着も促進するのであれば、血中のSAPレベルを下げることで、これらアミロイドーシスの発症を遅らせることができるかも知れない。しかし今回の実験結果は、血中のSAPレベルを下げる方策は、アミロイドーシスの予防法としては有効かも知れないが、一旦沈着したアミロイドを吸収され易くするための治療法としては、有用とは考えにくいことを示唆する。

### 結 論

1. 無SAPマウス及び対照野生型マウスの脾AAアミロイドの超微細構造を解析し、SAPは、AAアミロイドの表面に結合し、SAPの内側にAA線維が存在し、そのさらに内側に、HSPGが結合していることを示唆する結果を得た。
2. 野生型マウス及び無SAPマウスの脾AAアミロイドの吸収実験を行い、両者でアミロイドの吸収速度に明らかな差異を認めなかった。

### 参 考 文 献

- 1) Shimada K, Maeda S, Murakami T, et al. Transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy. Mol Biol Med 1989; 6: 333-343.
- 2) Yi S, Takahashi K, Naito M, et al. Systemic amyloidosis in transgenic mice carrying the human mutant transthyretin (Met 30) gene. Am J Pathol 1991; 138: 403-412.

- 3) Kohno K, Palha JA, Miyakawa K, et al. Analysis of amyloid deposition in a transgenic mouse model of homozygous familial amyloidotic polyneuropathy. *Am J Pathol* 1997 ; 150 : 1497-1508.
- 4) Togashi S, Lim S, Kawano H, et al. Serum amyloid P component enhances induction of murine amyloidosis. *Lab Invest* 1997 ; 77 : 525-531.
- 5) Yoshimura A, Ohno S, Nakano K, et al. Three-dimensional ultrastructure of anionic sites of the glomerular basement membrane by a quick-freezing and deep-etching method using a cationic tracer. *Histochemistry* 1991 ; 96 : 107-113.
- 6) Hanai N, Ishihara T, Uchino F, Imada N, Fujihara S, Ikegami J. Effects of dimethyl sulfoxide and colchicine on the resorption of experimental amyloid. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1979 ; 384 : 45-52.
- 7) Pepys MB, Booth DR, Hutchinson WL, Gallimore JR, Collins PM, Hohenester E. Amyloid P component. A critical review. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 1997 ; 4 : 274-295.
- 8) Botto M, Hawkins PN, Bickerstaff MCM, et al. Amyloid deposition is delayed in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene. *Nature Med* 1997 ; 3 : 855-859.
- 9) Inoue S, Kisilevsky R. A high resolution ultrastructural study of experimental murine AA amyloid. *Lab Invest* 1996 ; 74 : 670-683.
- 10) Inoue S, Kuroiwa M, Tan R, Kisilevsky R. A high resolution ultrastructural comparison of isolated and in situ murine AA amyloid fibrils. *Amyloid : Int J Exp Clin Invest* 1998 ; 5 : 99-110.

Molecular basis of familial amyloidotic polyneuropathy:  
Analysis by using the mice carrying targeted mutations

by

Shuichiro MAEDA\*

Ikuo USHII\*, Yasuko KATO\*\*, Hiroo KAWANO\*\*\*, Sadahiro ITO\*,  
Shin-ichi OHNO\*\*, Tokuhiko ISHIHARA\*\*\*

from

\*Department of Biochemistry , Yamanashi Medical University

\*\*Department of Anatomy , Yamanashi Medical University

\*\*\*First Department of Pathology , Yamaguchi University School of Medicine

Every type of amyloid deposit examined, including A $\beta$  deposits of Alzheimer disease, contained serum amyloid P component (SAP). SAP inhibits proteolysis of amyloid fibrils *in vitro* and is thereby speculated to contribute to persistence of amyloid *in vivo*. Thus, we and other research group generated a unique strain of mice carrying a null mutation at the sap locus. The SAP-deficient mice displayed no obvious phenotypic abnormalities. Using the SAP-deficient mice, we and other research group showed that, although not essential in the deposition of AA amyloid, SAP significantly promotes the amyloid deposition. Thus, SAP enhances the induction of murine AA amyloidosis and may play an important role in the pathogenesis of human amyloidosis.

Murine AA amyloid fibrils observed *in situ* by electron microscopy were reported to contain a core which was composed of SAP subunits. The ultrastructure of isolated amyloid fibrils, however, is significantly different from that observed *in situ* and, based on the reversible calcium-dependent binding property of SAP to amyloid fibrils, SAP has been speculated to protect amyloid fibrils from degradation by coating their exterior surface.

To assess the ultrastructure of *in situ* AA amyloid fibrils and potential ways of treating individuals with amyloidosis, we examined the ultrastructure and persistence of splenic AA amyloid fibrils in the SAP-deficient and wild-type mice. The ultrastructural analysis by quick-freezing and deep-etching method revealed significant difference in the structure of amyloid fibrils *in situ* between the two types of mice. Binding of SAP to the exterior surface of AA amyloid fibrils was suggested by the light microscopic immunohistochemical analysis, following trypsin treatment, and also by the electron microscopic analysis. However, no enhancement in the rate of regression of splenic AA amyloid was observed in the SAP-deficient mice relative to wild-type mice. These results suggest that dissociation of bound SAP from AA amyloid deposits would not significantly accelerate regression of the deposits *in vivo*.

## I型FAPアミロイド形成の分子メカニズムと環境要因について

研究者 榊 佳之\* 高岡 裕\* 大田 美香\*\*  
鈴木 操\*\* 山村 研一\*\* 宮川 和久\*\*\*  
高橋 潔\*\*\*

### はじめに

Met30 TTR (hMet30)のアミロイドーシスは、TTRのN末端から30番目のValのMetへの1アミノ酸置換がアミロイド形成に至るかどうかを規定している。つまり、アミロイド形成のプロセスを分子レベルで解析する上で重要なポイントの一つは、正常型と変異型TTR分子の物理化学的性質の相違である。そこで我々は、正常TTRとMet30 TTRを大腸菌を用いて大量に産生させ<sup>1)</sup>、X線結晶解析法により高次構造を検討した<sup>2)</sup>。その結果、正常TTRではβ鎖A上にある10番目のシステイン (Cys10) 残基の側鎖 (-SH) が高次構造の内側でβ鎖D上の57番目のグリシン (Gly57) の側鎖と水素結合しているのに対して、hMet30ではCys10側鎖とGly57側鎖間の水素結合が形成不能となることが示された。以上の知見をもとに、我々はMet30 TTRでは高次構造の外側に存在するCys10の側鎖がアミロイド形成に関与しているとの仮説を提唱した。

これまでにhMet30遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおいてヒトの病態に類似したアミロイド沈着が確認されている<sup>3,4)</sup>。そこで、この疾患モデルマウスの実験系を用いてこの仮説を検証することとし、新たに10番目のアミノ酸をCysと分子構造が類似しているが化学的性質の異なるセリン (Ser) になるように人工変異を加えたMet30

TTR遺伝子 (hSer10Met30)を導入したトランスジェニックマウスを作製し、アミロイド沈着形成におけるCys10側鎖の役割について検討することにした。

ところで、今回実験に用いたマウスは全て8ヶ月間 SPF (specific pathogen free: 特定病原体除去) 環境で飼育の後、conventional (Cvn) な環境に移された。さらに、これまで全期間SPF環境下で飼育したマウスにアミロイド沈着は生じない、つまりSPF環境はアミロイド沈着を抑制するらしいとの指摘がなされている。そこで、SPF環境下での飼育期間とアミロイド沈着との関連を明確にすべく、異なる期間SPFで飼育した後Cvnな環境に移したマウスについても検討を加えた。

### 材料・方法

トランスジェニックマウス作出には、アミロイド沈着への遺伝的背景の影響を排除し、これまでにアミロイド沈着の実績のある近交系のC57BL/6Jマウスを選択した。

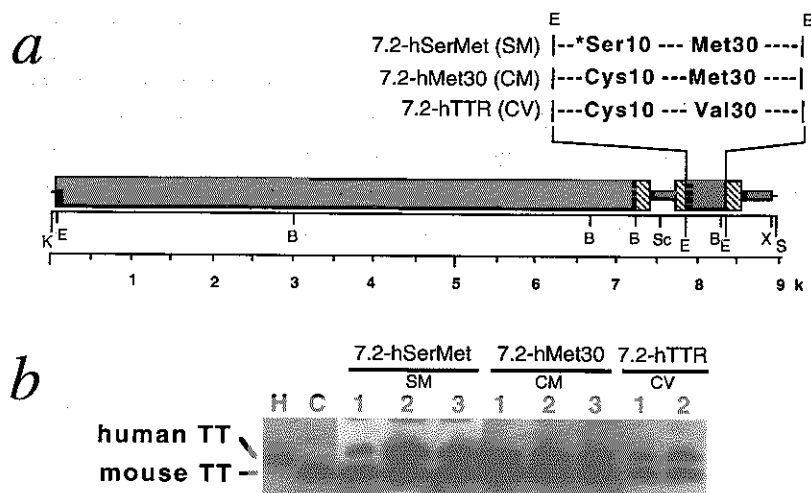
10番目のCysのアミロイド沈着との関連を検討するために、10番目を別のアミノ酸に置換した遺伝子を用いた。その際、アミノ酸置換による分子構造の変化を最小限にするために、人工変異にはCysと分子構造が類似しているが化学的性質の異なるSerを選択した (SerMet遺伝子)。両者の構造上の違いは側鎖が-SHか-OHかのみである。その他に、沈着を引き起こすhMet30遺伝子、コントロールと

\* 東大医科研・ヒトゲノム解析

\*\* 熊大・医・遺伝発生研

\*\*\* 熊大・医・二病理





**Fig. 1 a**, Structures of three transgenes in human TTR (hTTR) transgenic mice.

Each transgene contains 7.2kb of the human TTR promoter region and rabbit beta-globin gene with three hTTR cDNAs which encode Ser10Met30 as an artificial hTTR without Cys10, Met30 as an amyloidgenic mutant hTTR and normal hTTR, respectively. The closed box indicates hTTR cDNA that is inserted into rabbit beta globin gene exon (indicated by the striped box) and intron (indicated by the bold line) to produce the cDNA gene. After construction, the vector was digested by *Kpn* I and *Sac* II to exclude plasmid sequence as a transgene. Two or three strains in each line of transgenic mice were chosen by high hTTR concentration in sera. The asterisk shows the artificial substitution, Ser10.

Symbols for restriction endonucleases are as follows: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; K, *Kpn*I; S, *Sac* II; Sc, *Sca*I; X, *Xho*I

**b**, Detection of human TTR in mouse sera by immunoblotting. The serum of transgenic mice was separated on SDS-PAGE and stained with anti-human TTR antibody. All strains of each transgenic mouse line, 7.2-hSerMet mice (SM1-3), 7.2-hMet30 mice (CM1-3), and 7.2-hTTR mice (CV1-2), contain the mouse TTR and the human TTR.

Lane H, human serum; lane C, wild mouse serum.

して正常TTR遺伝子も用い、合計3種類のマウスを作出することにした。

導入遺伝子は7.2kbのヒトTTRプロモーター領域に、ウサギβ-グロビン遺伝子を利用したcDNA発現配列を連結し、前述の各種ヒトTTR cDNAを組み込むことにより作製した (Fig. 1a)。

1コンストラクトにつき400個の受精卵に遺伝子導入を行った。出生した仔は、7.2-hSerMetが74匹、7.2-hMet30が36匹、7.2-hTTRが32匹であった。そのうちサザンハイブリダイゼーションにより、それぞれ14匹、15匹、9匹がトランスジェニックマウスであることを確認した。次に、ウエスタンブロット法によりトランスジェニックマウスのうち血液中に導入遺伝子産物を確認したのは、それぞれ6匹、10匹、4匹であった。体外受精によるSPF化作業の後、7.2-hSerMetマウスではline SM1, SM2, SM3, 7.2-hMet30マウスはline CM1, CM2, CM3, 7.2-hTTRマウスはline CV1, CV2の各系統を用いた (Fig. 1b)。

体外受精によるSPF化作業を行った影響で、こ

れまでの報告例とは異なり、全マウスは8月齢に達するまでSPF環境下で飼育された後、Cv<sub>n</sub>な条件下に移され飼育された。そこで、Cv<sub>n</sub>な環境で飼育した期間の違いがアミロイド沈着に及ぼす影響を調べるため、14月齢までSPF環境下で飼育後Cv<sub>n</sub>な条件下に移したマウスと24月齢に達するまでSPF環境下でのみ飼育したマウスについても検討を加えることにした。

マウスの血清中ヒトTTR蛋白質濃度は、line SM1, SM2, SM3でそれぞれ、4.5±0.8 mg/dl (Mean ± S.D.), 7.8±2.0 mg/dl, 5.5±3.2 mg/dl, line CM1, CM2, CM3では4.8±2.2 mg/dl, 5.7±2.4 mg/dl, 5.5±2.7 mg/dl, line CV1, CV2では3.8±1.1 mg/dl, 5.3±2.7 mg/dlであった。実験に用いたマウスの血清中のヒトTTR蛋白質は3.8±1.1 mg/dl~7.2±2.0 mg/dlの間であり、過去に沈着を生じた実績のある0.6-hMet30マウスの濃度である2.1mg/dlよりも高濃度であり、実験に用いるのに適当である。また、実験に用いた導入遺伝子群間の血清導入ヒトTTR濃度に有意な差はなかったことから、各群間のア

Table 1 Tissue Distribution of Amyloid Deposits at the age of 24 months group

Mice Line(Str)	environment SPF + Cv (months)	Amyloid / total	Incidence (%)	Age of mice (months)	Brain	Heart	Thyroid	Liver	Kidney	Spleen	upper Stomach	Large intestine	Small intestine
7.2-hMet30 (CM1)	8+16	2/7	29	22, 24	-	±	++	±	++	±	+	-	++
7.2-hMet30 (CM2)	8+16	2/7	29	23, 24	-	±	+	±	++	-	±	+	++
7.2-hMet30 (CM3)	8+16	2/5	40	21, 22	NT	±	NT	NT	++	NT	NT	NT	NT
7.2-hSerMet (SM1)	8+16	0/6	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.2-hSerMet (SM2)	8+16	1/25	4	27	-	-	-	±	++	-	-	-	-
7.2-hSerMet (SM3)	8+16	0/6	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.2-hTTR (CV1)	8+16	0/4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.2-hTTR (CV2)	8+16	0/19*	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.2-hMet30 (SPF14)	14+10	1/14	7	24	-	-	-	±	++	-	-	+	+
7.2-hMet30 (SPF24)	24+0	0/17	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amyloid deposits are absent, -; limited to the wall of small vessels, ±; observed in the wall of small vessels and their surrounding regions, +; moderate in the interstitium, ++; marked in the interstitium and parenchyma, +++; NT, Not tested. Line CM5, CM29 and CM 34 are 7.2-hMet30 mice. Line SM25 is 7.2-hSerMet mice; SPF, Specific Pathogen Free; Cv, conventional; \*. The data of four mice at 30 months are included; The statistical difference ( $P<0.005$ ) is present in frequency of amyloid deposits at 24 months of age between 7.2-hSerMet mice group and 7.2-hMet30 group.

ミロイド沈着の比較が可能である。実験に用いた全てのマウスの導入遺伝子発現はRT-PCRによる検討の結果、脳と肝臓において認められた。

### 結果及び考察

まず正常ヒトTTRを発現している7.2-hTTRマウスを7.2-hMet30マウスに対するコントロール群として、Met30変異とアミロイド沈着の関連について検討した。アミロイド沈着の同定は、 $KMnO_4$ による前処理の後Congo red染色を行うWright法による染色の後、偏光下で緑色の複屈折を確認することで行った。

その結果、7.2-hMet30マウスと7.2-hTTRマウス共に16月齢までは全ての系統に沈着がみられなかったが、24月齢では7.2-hMet30マウスの3系統全てにアミロイド沈着が認められた (Table 1)。しかし7.2-hTTRマウスでは30月齢まで全く沈着は見られなかったことから、マウスの系でもヒトの場合と同様にアミロイド沈着の原因はTTRにおけるMet30変異の存在であることが今回はじめて示された (Table 1)。なお7.2-hMet30マウスは24月齢に達するまでに衰弱するものが多かったため、21月齢から24月齢のマウスを合算して、24月齢群とした。

次に、7.2-hMet30マウスのアミロイド沈着出現頻度と7.2-hSerMetマウスのそれを比較すること

で、Cys10のアミロイド沈着への関与を検討することにした。その際、各マウス系統間の導入遺伝子由来hTTR血中濃度の比較にしたところ統計学的に有意な差がみられなかったことから、アミロイド沈着出現頻度の比較が可能であると考えた。7.2-hMet30マウスにおけるアミロイド沈着の出現頻度は精査したマウスの29~40%であったのに対して、7.2-hSerMetマウスのそれは3系統中1系統に沈着が生じたのに過ぎず、しかも25匹中わずか1匹のみ(4%)であった。そして、これら2系統間のアミロイド沈着出現頻度には統計学的に有意な差( $P<0.005$ )がみられた(Table 1)。しかも、この沈着を生じた7.2-hSerMetマウス1匹のみは27月齢と、比較した7.2-hMet30マウスの21~24月齢に比べ老齢であった。沈着組織は、7.2-hMet30マウスでは心臓、甲状腺、肝臓、腎臓、脾臓、胃上部、小腸であり、このうち甲状腺、腎臓、小腸では間質にかなりの沈着がみられた。7.2-hSerMetマウスでは肝臓、腎臓のみと沈着を生じている組織も少なく沈着の程度も軽度であった(Table 1)。いずれにおいても、これまで同様に末梢神経系へは全く沈着を生じていなかった。また、沈着出現頻度に雌雄差はみられなかった。

ところで、Cys10がアルギニン(Arg)に置換されたFAP患者(Arg10)が報告されている<sup>5)</sup>。このことは、Cys10が必ずしもアミロイド形成に必須では

ないことを示している。既に50種類以上の変異型TTRにおいてアミロイド原性が報告されており、TTRの何らかの構造変化がアミロイド形成の誘発因子であり、Arg10もその一つと考えられる。我々が検討したMet30によるFAPにおけるCys10の役割は、Met30変異により誘発されたアミロイド形成反応の促進因子と考えるのが妥当と思われる。実際、FAPの発症時期が30歳前後であるhMet30の場合とは異なり、Arg10の患者では発症年齢が高齢(59歳~68歳)であることやアミロイド沈着の程度が軽度であること、そしてFAPの臨床症状も軽度であるなどのことが報告されている。

ここで問題となるのは、Cys10をSer10に置換したことによるTTR分子の構造変化とそのアミロイド原性の関係である。ArgはCysやSerに比べて側鎖が大きく、また電荷をもつ荷電アミノ酸であり、このCys10→Arg10変異により蛋白質の構造や電気的性質が変わる可能性が高い。一方我々が今回選択した人工変異導入異型TTR (Ser10Met30 TTR)ではCys10をCysと同じ極性アミノ酸であるSerに置換しており、この両者の違いはCys側鎖がSとSer側鎖がSと同じ6B族のOである。また、Sの電気陰性度が2.44であるのに対してOでは3.5と高いことから、-SHに比して-OHは反応性が非常に乏しい。しかも、Cys10はTTR分子内部におけるCys同士のジスルフィド結合による立体構造形成に関与していないことから、Cys→Serの置換によるTTRの高次構造への影響は極めて低いと思われる<sup>67)</sup>。以上のことから、hMet30のCys10の-SH側鎖のアミロイド沈着への関与に関しては、人工的にCys10をSer10置換したhMet30を比較対象として用いた今回の実験結果から、Cys10がアミロイド形成の促進因子として働いていると考えるのは妥当であると考えられる。

また、7.2-hMet30マウスを生後14ヶ月間SPF環境下で飼育した場合、24月齢では14匹中1匹にのみアミロイド沈着がみられ、また24月齢までの全期間SPF環境下で飼育した場合はこれまでの指摘と同様に17匹の全てにアミロイド沈着を生じなかった。すなわち、SPF環境での飼育期間が8ヶ月、14ヶ月、24ヶ月となるのに伴い24月齢でのアミロイド沈着出現頻度は、それぞれ29%、7%、0%と低下していた(Table 1)。これらのことは、ある一定

の期間以上Cvnな条件下で飼育することがアミロイド沈着に必要であることを示している。

今回の研究により示されたCys10の-SH側鎖のアミロイド沈着への関与は、酸化反応のアミロイド沈着への関連をうかがわせている。このことを支持する結果として、興味深いことにFAP患者では酸化ストレスの指標の一つである過酸化脂質が健康人に比べて増加していたとの報告<sup>68)</sup>や、活性酸素を消去する酵素であるextracellular superoxide dismutase (EC-SOD) 遺伝子に変異を有するFAP患者において、通常よりも重篤なアミロイド沈着を生じていた<sup>69)</sup>との報告がなされている。これらの報告は我々の結果と同様に、このアミロイド形成における酸化還元反応の重要性を示唆していると思われる。

また、環境の違いによるアミロイド沈着の有無と併せて考えると、アミロイドーシス治療の可能性を示していると考えられる。例えば、生体内環境を還元状態下におくことでアミロイドーシスの進行を抑制できるかもしれない。その際、グルタチオンや、N-アセチル-L-システイン、アスコルビン酸、 $\alpha$ トコフェノールといった、抗酸化作用のある薬物を投与し生体内環境の酸化を抑制可能にすることで、アミロイド沈着を低下させることも可能ではないかと考えている。今後、これら薬剤を投与した7.2-hMet30マウスの系におけるアミロイド沈着抑制の可能性について検討する必要があると考えている。

## 結 論

Met30-TTRに起因するアミロイドーシスでは、Cys10がアミロイド蛋白形成の促進因子であることを示した。さらに、環境と発症の関連も考えられた。

## 文 献

- 1) Furuya H, Saraiva MJ, Gawinowicz MA, et al. Production of recombinant human transthyretin with biological activities toward the understanding of the molecular basis of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Biochem* 1991;30:2415-2421.
- 2) Terry CJ, Damas AM, Oliveira M, et al. Structure of Met30 variant of transthyretin and its amyloidogenic implications. *EMBO J* 1993;12:735-741.

- 3) Takaoka Y, Tashiro F, Yi S, et al. Comparison of amyloid deposition in two lines of transgenic mouse that model familial amyloidotic polyneuropathy, type I. *Transgenic Res* 1997;6(4):261-269.
- 4) Kohno K, Palha JA, Miyakawa K, et al. Analysis of amyloid deposition in a transgenic mouse model of homozygous familial amyloidotic polyneuropathy. *Am J Pathol* 1997;150:1497-1508.
- 5) Uemichi T, Murrell JR, Zeldenrust S, Benson MD. A new mutant transthyretin(Arg 10) associated with familial amyloid polyneuropathy. *J Med Genet* 1992;29:888-891.
- 6) Sharmila SM, Parsonage D, Claiborne A, Hol WGJ. Crystallographic analysis of NADH peroxidase Cys42Ala and Cys42Ser Mutants: Active site structures, mechanistic implications, and an unusual environment of Arg 303. *Biochem* 1995;34:6985-6992.
- 7) Smith CJ, Marnett LJ. Effects of Cysteine-to-Serine mutations on structural and functional properties of prostaglandin endoperoxide synthase. *Arch Biochem Biophys* 1996;335:342-350.
- 8) Ando Y, Nyhlin N, Suhr O, et al. Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:497-502.
- 9) Sakashita N, Ando Y, Yamashita T, et al. Familial amyloidotic polyneuropathy type I with extracellular superoxide dismutase mutation: a case report. *Human Pathol* 1998;29: 1169-1172.