
長寿科学総合研究事業

アミロイドーシス抑制遺伝子の解析

(課題番号 H-11-長寿-028)

平成 11 年度研究報告書

平成 12 年 4 月

主任研究者 樋口 京一
信州大学医学部附属加齢適応センター
脈管病態分野教授

厚生科学研究費補助金

(長寿科学総合研究事業)

アミロイドーシス抑制遺伝子の解析

平成 11 年度総括研究報告書

2000 年 4 月

主任研究者 樋口 京一

信州大学医学部附属加齢適応研究センター

脈管病態分野

平成 1 1 年度総括研究報告

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
アミロイドーシス抑制遺伝子の解析
総括研究報告書

アミロイドーシス抑制遺伝子の解析（平成11年度）

主任研究者 樋口 京一 信州大学医学部教授
（加齢適応研究センター）

研究要旨 アミロイドーシスは微細なアミロイド線維蛋白が細胞外に沈着する病態であり、変性疾患に蛋白質のミスフォールディング病という新たな概念をもたらした。多種類のアミロイドーシスが報告されているが、老化に伴い発症するものがほとんどであり、健全な長寿社会のために解決すべき病態である。アミロイドーシスの発症時期と重症度を規定する遺伝的要因を明らかにするため、①同一のアミロイド原性遺伝子(*Apoa2^c*)を持ちながら発症程度の異なる SAMP1 と A/J マウス間の交配実験を行い、主要なアミロイドーシス抑制遺伝子の存在を明らかにした。現在進行している SMXA リコンビナント系統の解析結果と合わせて、抑制遺伝子の染色体上の位置を明らかにする。②ヒトにおける家族制アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者の発症の年齢的変異について解析し、抑制遺伝子存在の可能性を探る。の主要な2研究を各分野の専門家と共同で実施した。

A. 研究目的

アミロイドーシスは微細なアミロイド線維蛋白が細胞外に沈着する病態であり、変性疾患に蛋白質のミスフォールディング病という新たな概念をもたらした。多種類のアミロイドーシスが報告されているが、老化に伴い発症するものがほとんどであり、健全な長寿社会のために解決すべき病態である。アミロイドーシスの発症時期と重症度を規定する遺伝的要因を明らかにすることが本研究の目的であり、そのため、①マウス老化アミロイドーシスをモデルとして詳細な交配実験を中心とした positional cloning により

アミロイド発症抑制遺伝子（群）の同定を目指す。②ヒトにおけるアミロイドーシス発症の年齢的変異について解析し、抑制遺伝子存在の可能性を探る。の主要な2研究を各分野の専門家と共同で実施する。

B. 研究方法

1. マウス：SAMP1 マウスは C 型の apoA-II を持ち若齢より重篤な AApoAII アミロイドーシスを発症する。A/J マウスは C 型 apoA-II を持ちながら発症は軽度である。A/J マウスのアミロイドーシス抑制遺伝子を同定するために SAMP1

(8 匹), A/J (12 匹), F1 (SAMP1 X A/J; 20 匹), F2 (SAMP1 X A/J; 59 匹), PBC (SAMP1 X F1; 7 匹), ABC (A/J X F1; 91 匹)の各交雑マウスを作成した。12 ヶ月齢で屠殺後、全身臓器の一部を DNA 解析用に保存し、残りの組織切片でアミロイド沈着を調べた。

2. SM/J マウスはC型 apoA-II を持ち重篤なアミロイドーシスが発症する。西村が開発した SMXA リコンビナント系統を用いてアミロイドーシス抑制遺伝子の遺伝的解析を開始した。SM/J と A/J、および SMXA RI 系の 20 数系統を用いて、各系統 8 週令の雄約 10 匹に老化アミロイド線維 (AApoAII) を尾静脈内の投与でアミロイドーシスを誘発し 3 ヶ月後にアミロイド沈着程度を調べる。

3. アミロイドーシス好発系、SAMP1, P2, P7, P8, P10, P11, 嫌発系、SAMP6, SAMR1, R3B, R4, 中間系 SAMP3, P8 系統 10 週令マウスの尾静脈に AApoAII アミロイド線維を静注し、12 週後に屠殺してアミロイド沈着を調べた。

4. 抗酸化効果を有するとされる、AOB (Antioxidant Biofactor) 10% 添加飼料のアミロイドーシス発症抑制効果を SAMP1 で調べた。

5. ①信州大学第三内科で経過を観察している FAP 患者(Met30-TTR)100 例の臨床記録から FAP 患者および高齢発症家系 FAP 患者の発症年齢および臨床症状の検討を行った。②早期発症家系における表現促進現象の検討を行った。

(倫理面への配慮) マウスを用いた実験は飼育状態が良好な環境になるように、屠殺に際しては苦痛が最小限になるように配慮し、信州大学、名古屋大学、京都大学の動物実験に関する指針に基づいて

行われた。家系調査の際に未発症者に遺伝子診断を行う場合には、成人のみを対象として informed consent を得たのちに検査を施行し、未成年には施行しなかった。家系調査の対象とした FAP 家系の構成員には今回の研究の目的と方法を説明して同意を得た後に発症年齢などの臨床的データを収集した。

C. 結果と考察

1. 12 ヶ月齢で SAMP1 と A/J マウスに沈着するアミロイド沈着の相違が最も顕著であることが明らかになったため、交雑マウスを 12 ヶ月齢で屠殺しアミロイド沈着程度を比較した。A/J マウスは 12 ヶ月齢での AApoAII アミロイド沈着は軽度で、amyloid index (AI) は 0.58 ± 0.35 (平均値 \pm 標準偏差)であった。これに対して SAMP1 マウスのアミロイド沈着は重篤で AI は 2.78 ± 0.35 であった。SAMP1 と A/J を交配させた F1 交雑マウスの AI は 2.57 ± 0.57 であり SAMP1 と同程度の沈着を示したがバラツキ (標準偏差) は増大した。PBC マウス (F1 と SAMP1 の戻し交配) の AI は 2.40 ± 0.57 でありこれらの結果はアミロイドーシス抑制遺伝子が劣性に働くことを示唆する。F1 X F1 交配による F2 交雑マウス (59 匹) の AI は 1.86 ± 0.83 で、SAMP1 と A/J マウスの中間の値を示し、度数分布は 2 峰性を示した。ABC マウス (A/J と F1 の戻し交、91 匹) の AI は 1.41 ± 0.66 であり F1 と A/J マウスの中間の沈着程度を示したが、やはり 2 峰性の度数分布を示した。これらの結果は主要遺伝子によりアミロイドーシス発症が調節されていることを示唆している。各交雑群間で顕著に異なっていた肝臓、脾臓、心臓へのアミロイド沈着程

度 (AI: A/J; 0.03, SAMP1; 2.75, F1; 2.18, PBC; 1.95, F2; 1.24, ABC; 0.62) から判断すると F2 と ABC マウスにおける軽度と重度のアミロイド沈着を持つ匹数はそれぞれ、19; 40 と 52; 39 であった。アミロイド沈着の浸透率を 0.9 (39/45) と仮定するとおおむね妥当な匹数を得られるため (F2; $59/4 \times 3 \times 0.9 = 40$)、単一劣性のアミロイドーシス抑制遺伝子が存在すると考えられるが、F2 や ABC マウスでの分散が大きく、多遺伝子に規定された量的形質の可能性も否定できない。今後は今回の実験でえられた交雑マウスの DNA を用いて、マイクロサテライト DNA を遺伝子マーカーとたゲノムマッピングを行い、アミロイド抑制遺伝子の染色体上の位置の迅速な同定と抑制遺伝子そのものの同定を目指す。

2. SMXA RI 系統群で現在までに実験に使用することが出来た系統は SM/J, A/J, および SMXA-1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 24, 25, 26, 29, 30 の 21 系統であり、1 系統あたり 2 から 26 匹にアミロイド線維を投与した。3 ヶ月後に屠殺して臓器の切り出しを行い、染色標本を作成した。SMXA RI 各系統の詳細な SDP (Strain Distribution Patterns) はすでに完成しているので、アミロイドーシスの有無、程度を調べれば、表現型の系統分布パターンから遺伝様式を推定し、更に連鎖する遺伝子マーカーをコンピュータープログラムを用いて解析しアミロイド抑制遺伝子の染色体位置をおおまかに同定できると予測している。

3. AApoAII アミロイド繊維の尾静脈注射と、SAMP9, P7, P6, P3, P 8 系統以外の屠殺が完了し、組織標本の作製とアミロイド沈着の評価を進めている。

4. 一日平均摂食量は 350 日齢まで ABO、

コントロール両群間に差を認めなかったが、ABO 群の寿命が約 11% 延長する傾向を示した。アミロイド沈着の評価を進めている。

5. ① FAP 患者 100 例の臨床症状および発症年齢分布の解析より男性が女性よりも早く発症する傾向があること、また発症年齢には 20-30 歳代と 50-60 歳代の 2 つのピークが存在することが明らかになった。② 高齢発症家系に属する FAP 患者の臨床症状の検討では、従来から知られている早期発症家系の FAP 患者との間に、臨床症状の大きな差は認められなかったが、症状の程度特に自律神経症状が軽度である傾向が認められた。③ Met30-TTR 型 FAP15 家系 68 組の罹患親子について、家系調査に伴う ascertainment bias を可能な限り除外して、親子の発症年齢を比較し早期発症家系における表現促進現象の検討を行った。子の発症年齢が親の発症年齢よりも若年である親子 pair が、両者の発症年齢が等しいかまたは親の発症年齢の方が若年である親子 pair よりも統計的に有意に多く存在し、Met30-TTR 型 FAP 家系における「真の表現促進現象」の存在が確認された。これらの結果から、新規の遺伝子変異を生じやすい蛋白質である TTR が原因である FAP のような疾患では、従来の考えとは異なり、新しく生じた高齢発症の FAP 患者が prototype と言うべき病態であって、特定の地域に存在する早期発症家系においては表現促進現象が加わっているという仮説が成り立つと考えられる。

D. 結論

アミロイドーシスは高齢化社会を迎える中で今後重要性が増す病態である。

今年度の研究でアミロイドーシスの発症を抑制する遺伝的要因が存在し、遺伝学的解析が可能であることが示された。来年度はこの基本的研究成果を発展させ、抑制遺伝子の実態を明らかにできると考えている。主任研究者である樋口と分担研究者の細川、西村の共同研究が効率的に進行し、迅速な遺伝子の同定が期待される。表現促進現象の分子生物学的原因となる triplet repeat が TTR 遺伝子には存在せず、点突然変異が原因で発症する FAP の表現促進現象のメカニズムについては、今後 SAM や TTR transgenic mouse などのアミロイドーシス動物モデル等による遺伝学的・分子生物学的検討が必要であると考えられる。

E. 研究発表

論文発表

- a. Chiba T, Kogishi K, Wang J, et al. Mouse senile amyloid deposition is suppressed by adenovirus-mediated overexpression of amyloid-resistant apolipoprotein A-II. *Am J Pathol* 1999; 155: 1319-1326.
- b. Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. The Senescence-Accelerated Mouse. *Methods Enzymol* 1999; 309: 674-686.
- c. Wang J, Matsushita T, Kogishi K, et al. Wild Type ApoA-II Gene Does Not Rescue Senescence-Accelerated Mouse (SAMP1) from Short Life Span and Accelerated Mortality. *J Gerontol B Biol Sci* 2000; (in press)
- d. Xia C, Higuchi K, Shimizu M, et al. Genetic typing of the senescence-accelerated mouse (SAM) strains with \square microsatellite markers. 1999; 10: 235-258.
- e. Shimizu M, Higuchi K, Bennett B, et al. Identification of peak bone mass QTL in a spontaneously osteoporotic mouse strain. *1999 Mamm Genome* 10: 81-87.
- f. Higuchi K, Kogishi, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation dependent. In *Amyloid and Amyloidosis 1998*, Kyle RA, Gertz MA eds, Parthenon Publishing, 1999; 47-49.
- g. Chiba T, Kogishi K, Wang J, et al. AApoAII amyloid deposition is suppressed by adenovirus-mediated overexpression of type B apolipo-protein A-II gene in the mice. In *Amyloid and Amyloidosis 1998*, Kyle RA, Gertz MA eds, Parthenon Publishing, 1999; 56-58.
- h. 樋口京一、細川昌則。SAM マウス。遺伝子治療開発研究ハンドブック、日本遺伝子治療学会編、エヌ・ティイー・エス、1999 ; 997-999
- i. Takeda N, Tsuboyama T, Kasai R, Takahashi K, Shimizu M, Nakamura T, Higuchi K, Hosokawa M. Expression of *c-fos* gene induced by parathyroid hormone in bones of SAMP6 mice, a murine model for senile osteoporosis. *Mech Ageing Devel* 1999; 108: 87-97.
- j. Fujisawa H, Nishikawa T, Zhu BH, Nishimura Y, Shimizu M, Kimoto M, Higuchi K, Hosokawa M. Amino-guanidine supplementation delays the onset of senescence in vitro in dermal fibroblast-like cells from Senescence-accelerated mice. *J Gerontol* 1999; 54A: B276-282.
- k. Yamamoto K, Ikeda S, Hanyu N, et al. A pedigree analysis with minimised ascertainment bias shows anticipation in Met30-transthyretin related familial amyloid polyneuropathy. *J Med Genet* 1998; 35: 23-30.

学会発表

- a. 樋口京一、中村明宏、千葉卓哉、傅

- 麗、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、細川昌則、森政之：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構。第 88 回日本病理学会 (1999.4.7) 東京
- b. 西川智文、高橋 潤、藤澤裕美、西村泰光、樋口京一、夏 晨、小岸久美子、橋本信夫、細川昌則：老化促進モデルマウス (SAM) に関する実験的研究 115. 骨格筋 Tubular aggregates のマウス系統間分布と加齢変化. 第 88 回日本病理学会総会 (1999.4.7) 東京
- c. 木元光俊、松下隆壽、細川昌則、坪山直生、太田 明、清水基行、笠井宗一郎、中村孝志：老化促進モデルマウス (SAM) に関する実験的研究 116. 変形性関節症の程度と軟骨細胞のアポトーシスの関係について. 第 88 回日本病理学会総会 (1999.4.7) 東京
- d. 樋口京一、森政之、千葉卓哉、中村明宏、傅麗、郭占軍、Xing Yanming, 是永龍巳、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、細川昌則：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構-1：アミロイド核の経口伝播。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都
- e. 西川智文、高橋 潤、松下隆壽、西村泰光、樋口京一、橋本信夫、細川昌則：骨格筋 Tubular aggregates のマウス系統間分布と加齢変化. 日本基礎老化学会第 22 回大会 (1999.6.16) 京都
- f. 木元光俊、細川昌則、清水基行、笠井宗一郎：変形性関節症の程度と軟骨細胞のアポトーシスの関係について—変形性顎関節症モデル SAMP 3 mice を用いた研究. 日本基礎老化学会第 22 回大会(1999.6.16) 京都
- g. Xing Yanming, 中村明宏、小岸久美子、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構-2：糞を介したアミロイド線維核伝播の検証。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都
- h. 傅麗、中村明宏、松山郁生、Xing Yanming、郭占軍、千葉卓哉、是永龍巳、中山淳、森政之、樋口京一：マウス老化 amyloid 蛋白質(apoA-II) mRNA の発現- *in situ* hybridization 法による解析。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都
- i. 王静、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、千葉卓哉、中村明宏、森政之、細川昌則、樋口京一：SAMP1 の促進老化と apoA-II 遺伝子；B 型 apoA-II は促進老化を改善できない。第 15 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会 (1999.7.8) 徳島
- j. Xing Yanming, 中村明宏、是永龍巳、小岸久美子、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス伝播における糞の役割。第 15 回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会 (1999.7.8) 徳島
- k. 梅澤真樹子、新真由美、小部真紀、安井佐和美、樋口京一、松下隆壽、細川昌則：食餌脂肪の老化アミロイド沈着への影響。第 15 回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会 (1999.7.9) 徳島
- l. 木元光俊、細川昌則、清水基行、笠井宗一郎、中村孝志：変形性関節症の程度と軟骨細胞のアポトーシスの関係について—変形性顎関節症モデル SAMP 3 mice を用いた実験。第 15 回老化促進モデルマウス(SAM)研究

協議会(1999.7.9) 徳島

- m. 樋口京一： 老化促進モデルマウス (SAM)を用いた老化アミロイドーシス発症機構の解析。第 42 回日本神経学会、ワークショップアミロイドーシスの分子病理；アミロイド線維形成機序と治療戦略 (1999.9.16) 広島
- n. 武田記和、坪山直生、笠井隆一、高橋健志郎、清水基行、中村孝志、細川昌則： 老年性骨粗鬆症モデルマウス (SAMP6) の骨における副甲状腺ホルモンによって誘発された *c-fos* 遺伝子の発現。第 17 回日本骨代謝学会 (1999)
- o. 清水基行、坪山直生、松下 睦、笠井宗一郎、中村孝志、細川昌則、清水慶彦、樋口京一： 老化促進モデルマウスSAMを用いた骨量制御遺伝子座の解析第 1 回日本骨粗鬆症学会 (1999)

F. 知的所有権の取得状況

無し

G. 特許取得

無し

H. 実用新案登録

無し

I. その他

無し

平成 1 1 年度分担研究報告

目 次

1. SAMP1 X A/J 交雑マウスによるアミロイドーシス抑制遺伝子の遺伝学的解析 (第一報)	15

信州大学医学部加齢適応研究センター 樋口 京一	
2. SMXA 系を用いたアミロイドーシスの遺伝解析に関する研究	23

名古屋大学医学部動物実験施設 西村 正彦	
3. 老化アミロイドーシスの病理学的解析に関する研究	25

京都大学再生医科学研究所 細川 昌則	
3. ヒト老化アミロイドーシス等の症例集積と臨牀的・遺伝学的・生化学的解析	29

信州大学医学部第三内科 徳田 隆彦 山本 寛二	

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
アミロイドーシス抑制遺伝子の解析
分担研究報告書

SAMP1 X A/J 交雑マウスによるアミロイドーシス抑制遺伝子の
遺伝学的解析（第一報）

主任研究者 樋口 京一 信州大学医学部教授
(加齢適応研究センター)

研究要旨 マウスでは加齢にともない apoA-II 蛋白質が老化アミロイド線維 (AApoAII) として全身性に沈着する。第 5 番目のアミノ酸がプロリンからグルタミンに置換した C 型 apoA-II を持つマウス系統では重篤なアミロイドーシスが若齢より発症する。A/J 系マウスは C 型 apoA-II を持ちながら SAMP1 と比較してアミロイドーシス発症が軽度であり抑制遺伝子の存在が示唆されている¹⁾。本年度は SAMP1 と A/J の交雑マウスを作成し、抑制遺伝子の遺伝様式を検討した。現在まで SAMP1 (8 匹), A/J (12 匹), F1 (20 匹), F2 (59 匹), SAMP1 X F1 (PBC; 7 匹), A/J X F1 (ABC; 91 匹) を 12 ヶ月齢で屠殺しアミロイド沈着を調べた。A/J は軽度のアミロイド沈着を示したのに対し、SAMP1, F1, PBC マウスは全て重度の沈着を示した。F2 と ABC での軽度と重度のアミロイド沈着を持つマウス匹数はそれぞれ、19 ; 40, 52 ; 39 であった。これらの結果から沈着促進遺伝子が浸透率約 0.9 の優性遺伝子であると考え現在、ゲノムマッピングで染色体上の位置の同定を行っている。

A. 研究目的

マウス老化アミロイドーシスでは血清高密度リポ蛋白質(HDL)のアポ蛋白質である apolipoprotein A-II (apoA-II) が脳実質を除いた全身に沈着する。マウス系統間には 4 ヶ所でアミノ酸の置換が存在する 3 種の apoA-II 蛋白質 (A, B, C 型、対応する apoA-II 遺伝子の allele は *Apoa2^a*, *Apoa2^b*, *Apoa2^c*) が報告されており、特に C 型 apoA-II を持つマウス系統では著しくアミロイドーシスが重篤化する²⁾。A/J マウスは C 型 apoA-II を持ちながら、アミロイド沈着は SAMP1, SJL/J マウスに比較すると軽度であることが報告され

ている¹⁾。また A/J マウスは実験的 AA アミロイドーシスに対しても抵抗性を示し、劣性単一遺伝子がアミロイドーシス抵抗性を規定すると報告されてきた³⁾。

アミロイド蛋白質に変異を持つアミロイドポリニューロパチー(FAP)等の家族アミロイドーシスにおいては発症時期と沈着程度が個人により大きく異なることが知られており、また老人性全身性アミロイドーシス(SSC)やアルツハイマー病のような加齢に伴うアミロイドーシスでも、発症に個人差が存在し、遺伝的修飾因子の関与が示唆されている。

我々はアミロイド好発性の apoA-II を

持ちながら発症の程度が明らかに異なる SAMP1 と A/J マウスを用いて大規模な交雑マウスを作成し、リバーズジェネティックスの手法でアミロイドーシス抑制遺伝子の同定を目指している。本年度は SAMP1 X A/J 交雑マウスを作成し、12 ヶ月齢でのアミロイド沈着を調べて、来年度の染色体マッピングのための準備を整えることが出来た。

B. 研究方法

マウス：AKR/J マウスは SLC より購入した。SAMP1 マウスは京都大学再生医科学研究所動物実験施設で兄妹交配により維持されているものを用いた。交配及び飼育は京都大学再生医科学研究所動物実験施設のコベンショナル条件下で行われた。作成したマウスは SAMP1 (8 匹), A/J (12 匹), F1 (SAMP1 X A/J; 20 匹), F2 (SAMP1 X A/J; 59 匹), PBC (SAMP1 X F1; 7 匹), ABC (A/J X F1; 91 匹) である。12 ヶ月齢でエーテル麻酔下に心臓より血液を採取することにより屠殺後、解剖し、全身臓器の一部を DNA 分離用に保存し、残りを中性緩衝ホルマリンで固定した。組織切片は H.E 染色、コンゴ赤染色、及び抗 apoA-II 抗体による免疫染色を行い、アミロイド沈着を調べた。

マウスを用いた実験は京都大学と信州大学の動物実験に関する指針に基づいて行われた。

アミロイド沈着；AApoAII アミロイド沈着はコンゴ赤染色された組織切片の緑色偏光と抗 apoA-II 抗体によって確認した。アミロイドの沈着程度を表すために主要臓器（肝臓、脾臓、心臓、胃、皮膚）の amyloid index⁴⁾を算出した。

C. 研究結果

SAMP1 X A/J 交雑マウスの作成：
SAMP1 と A/J マウスに沈着するアミロイド沈着の相違が最も顕著になる月齢を調べるために SAMP1, A/J, F1 マウス数匹ずつを 10, 12, 14, 18 ヶ月齢で屠殺しアミロイド沈着を調べた。その結果沈着の相違が 12 ヶ月齢で最も顕著になることが明らかになったため、以後すべての交雑マウスを 12 ヶ月齢で屠殺しアミロイド沈着の程度を比較することにした。今回解析に用いた交雑マウスの作出方法とマウスの匹数を図 1 に示した。

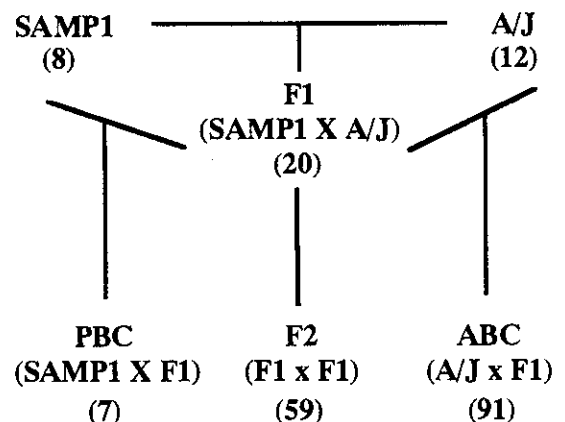


図 1. SAMP1 と A/J 系マウスの交雑系によるアミロイドーシス抑制遺伝子の解析

() 内の数字はアミロイド沈着を調べたマウスの匹数を示す。

交雑マウスにおけるアミロイド沈着： A/J マウスは 12 ヶ月齢での AApoAII アミロイド沈着は軽度であり、調べた 12 匹の amyloid index は 0.58 ± 0.35 (平均値 \pm 標準偏差) であった。これに対して SAMP1 マウスのアミロイド沈着は重篤

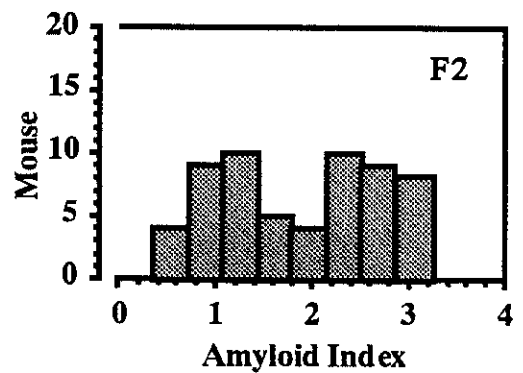
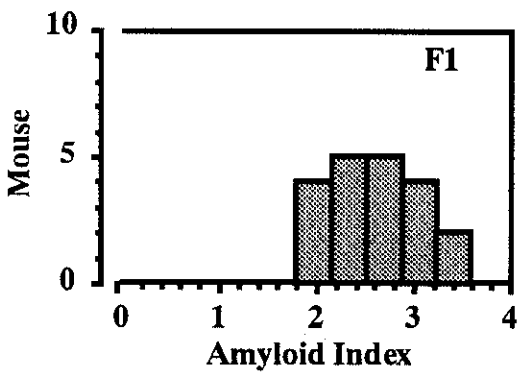
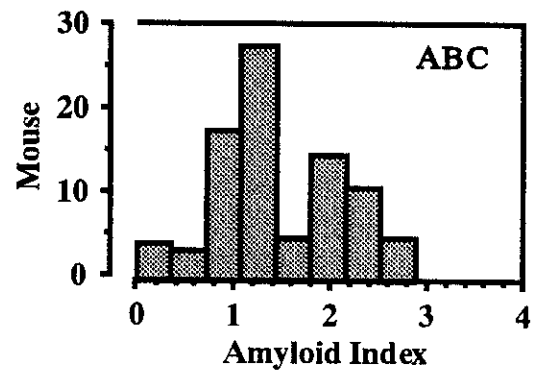
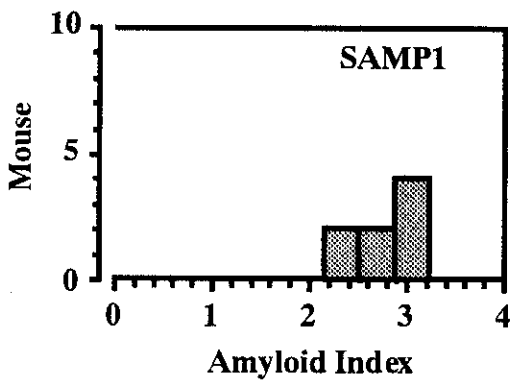
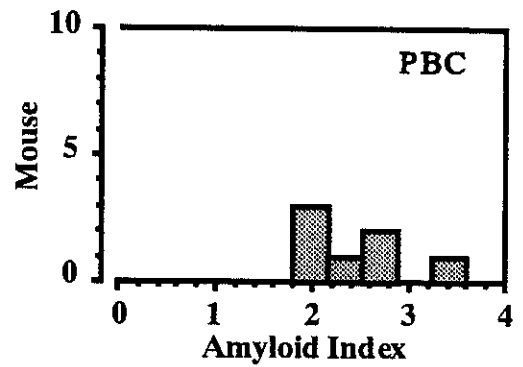
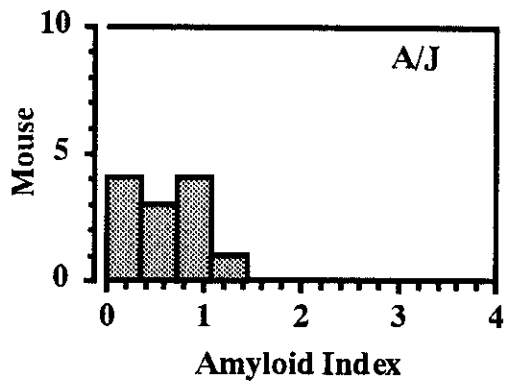


図2. 12ヵ月齢マウスにおけるアミロイド沈着。アミロイド沈着の程度は肝臓、心臓、脾臓、胃、皮膚に沈着したAApoAIIの程度を5段階（0；沈着なし、1、ごく軽度、2、軽度、3、中程度、4、重度）に評価し、5臓器の平均値であるAmyloid Indexで表した。

図3. 12ヵ月齢マウスにおけるアミロイド沈着。アミロイド沈着の程度はAmyloid Indexで表した。
PBC:SAMP1 X F1 戻し交配
ABC:A/J X F1 戻し交配

で amyloid index は 2.78 ± 0.35 であった。図 2 に交雑マウスの度数分布を示したが、A/J と SAMP1 系統間に重なりが観察されず明瞭に区別出来ることが確認された。またこれらの系統においてアミロイド沈着に雌雄差は認められなかった。SAMP1 と A/J を交配させた F1 交雑マウス(20 匹)の amyloid index は 2.57 ± 0.57 であり SAMP1 と同程度の沈着を示したが、バラツキ(標準偏差)は増大した。この結果はアミロイドーシス抑制遺伝子が劣性に働くことを示唆するため、SAMP1 と F1 の戻し交配(PBC)を行い交雑マウスのアミロイド沈着を調べた。PBC マウス(7 匹)の amyloid index は 2.40 ± 0.57 であり匹数は少ないが予想通り SAMP1 と同程度の重度の沈着を示した(図 3)。

F1 X F1 交配による F2 交雑マウス(59 匹)の amyloid index は 1.86 ± 0.83 で、SAMP1 と A/J マウスの中間の値を示し、度数分布は 2 峰性を示した(図 3)。さらに A/J と F1 の戻し交配を行い ABC 交雑マウスのアミロイド沈着を調べた。ABC マウス(91 匹)の amyloid index は 1.41 ± 0.66 であり F1 と A/J マウスの中間の沈着程度を示したが、やはり 2 峰性の度数分布を示した。これらの結果は主要な遺伝子によりアミロイドーシス発症が調節されていることを示しているが、単一遺伝子であるかは明らかでない。

マウス皮膚と胃におけるアミロイド沈着の程度は各交雑群間にほとんど差が認められなかった(A/J; 1.41, SAMP1; 2.88, F1; 3.15, PBC; 3.07, F2; 2.83, ABC; 2.61)。しかし肝臓、脾臓、心臓への沈着程度は各交雑群間で顕著に異なっていた(A/J; 0.03, SAMP1; 2.75, F1; 2.18, PBC; 1.95, F2; 1.24, ABC; 0.62)(図 4)。これらの 3 臓器

における amyloid index から判断すると、F2 と ABC マウスにおける軽度と重度のアミロイド沈着を持つマウス匹数はそれぞれ、19; 40, 52; 39 であった。

D. 考察

アミロイドーシスにはアミロイド蛋白質の変異が主要な原因である FAP 等の遺伝性アミロイドーシスとアルツハイマー病や全身性老化アミロイドーシス、II 型糖尿病等に伴う AIAPP 等の加齢にともなうアミロイドーシスが存在する⁵⁾。いずれの場合でも発症年齢や沈着程度に個人差が存在することが報告されてきた。マウス老化アミロイドーシスでは apoA-II 蛋白質の一次構造が最も重要な遺伝的要因であり、C 型 apoA-II を持つ SAMP1, SJL/J, SM/J, R1P1-Apoa2^c などのマウス系統は重篤なアミロイド沈着を示す^{6,7)}。しかし、我々は以前に A/J マウスでは軽度のアミロイド沈着しか認められないことを明らかにし²⁾、今回 12 ヶ月齢で SAMP1 マウスとの間に顕著な沈着程度の差が存在することを示した。この沈着程度の差はアミロイドーシス抑制遺伝子が担っていると仮定して、SAMP1 と A/J マウス間の交雑マウスを作成し遺伝学的解析を試みた。10 ヶ月齢ではアミロイド沈着が軽度で両系統間の差が明らかでないことや、14 ヶ月齢以降のマウスの死亡による損失や、時間的な非効率性を考慮して 12 ヶ月齢で屠殺しアミロイド沈着を調べた。

SAMP1, F1, PBC マウスが重篤なアミロイド沈着を示し、F2, ABC マウスでの度数分布が 2 峰性を示した結果より劣性に働くアミロイドーシス抑制遺伝子の存在が示唆された。しかし F2 や ABC マウス

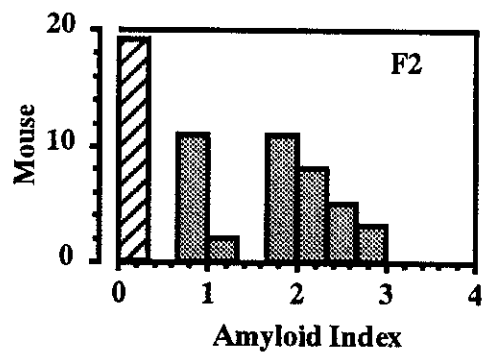
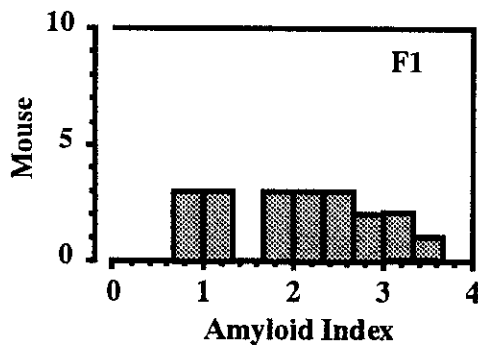
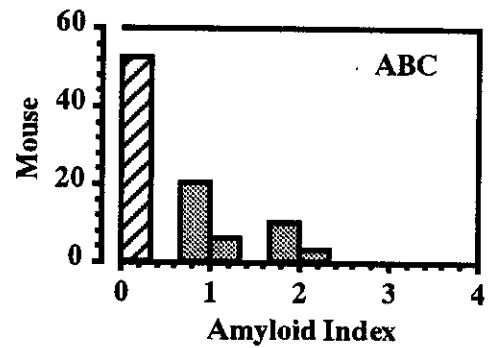
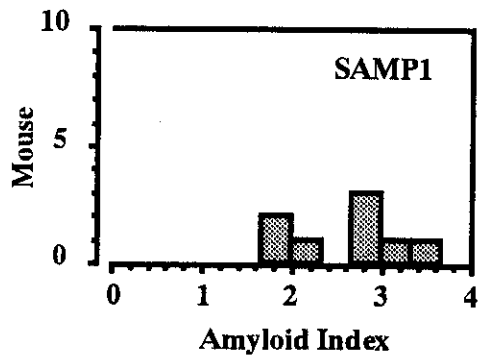
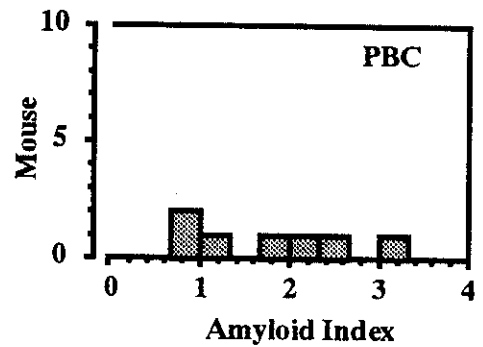
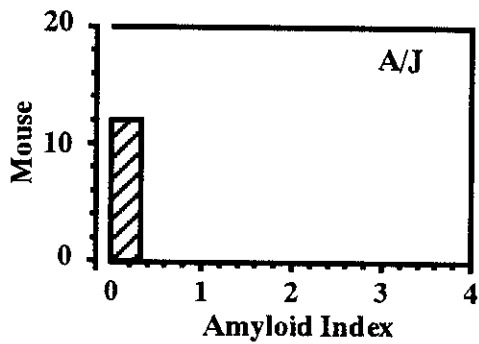


図4. 12ヵ月齢マウスの肝臓、心臓、脾臓におけるアミロイド沈着。アミロイド沈着の程度は肝臓、心臓、脾臓に沈着したAApoAIIの程度を5段階に評価し、3臓器の平均値としてAmyloid Indexを算出した。斜線のカラムはアミロイド沈着が認められなかったマウス匹数を示す。

図5. 12ヵ月齢マウスの肝臓、心臓、脾臓におけるアミロイド沈着。アミロイド沈着の程度は肝臓、心臓、脾臓に沈着したAApoAIIの程度を5段階に評価し、3臓器の平均値としてAmyloid Indexを算出した。斜線のカラムはアミロイド沈着が認められなかったマウス匹数を示す。

での分散が大きく、多遺伝子に規定された量的形質の可能性も否定できない。沈着程度の差が顕著であった、肝臓、心臓、脾臓のアミロイド沈着に注目すると F2 マウスでの沈着陽性と陰性のマウス匹数が 40 : 19、ABC マウスでは 39 : 52 であった。12 ヶ月齢での 3 臓器におけるアミロイド沈着の浸透率 (penetration) を 0.9 (39/45) と仮定するとおおむね妥当な匹数を得られるため (F2; $59/4 \times 3 \times 0.9 = 40$)、単一の劣性のアミロイドーシス抑制遺伝子が存在すると考えられるが、これだけでは結論を出すことが出来ない。

今後は今回の実験でえられた各交雑マウスの DNA を用いて、主としてマイクロサテライト DNA を遺伝子マーカーとして、ゲノムマッピングを行い、アミロイド抑制遺伝子の染色体上の位置の同定を目指す。さらに可能ならば抑制遺伝子そのものの同定を行う予定である。

E. 結論

マウス老化アミロイドーシスを発症しやすい apoA-II 遺伝子を持ちながらアミロイド沈着が軽度な A/J 系マウスに注目しアミロイドーシス抑制遺伝子の解析を行った。SAMP1 系との交雑マウスの解析より常染色体劣性の抑制遺伝子の存在が示唆された。今後は各交雑マウスの DNA を用いてゲノム解析を行い、抑制遺伝子の染色体上の位置を明らかにし、遺伝子の同定を目指す。

F. 倫理面への配慮

実験に供したマウスの飼育状態が良好な環境になるように、また屠殺に際しては苦痛が最小限になるように配慮し、それぞれ京都大学再生医科学研究所動物実験指針に沿って行った。

G. 文献

1. Higuchi K, Naiki H, Kitagawa K, Hosokawa M, Takeda T. Mouse senile amyloidosis; ASSAM amyloidosis in mice is universally present as a systemic age-associated amyloidosis. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1991; 60: 231-239.
2. Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. The Senescence-Accelerated Mouse. *Methods Enzymol* 1999; 309: 674-686.
3. Wohlgethan JR, Cathcart ES. Amyloid resistance in A/J mice is determined by a single gene. 1979 *Nature* 278:453-454.
4. Higuchi K, Matsumura K, Honma A, et al. Systemic senile amyloid in Senescence-Accelerated Mice: A unique fibril protein demonstrated in tissues from various organs by the unlabeled immunoperoxidase method. 1983 *Lab Invest* 48 : 231-240.
5. Cornwell III GG, Johnson KH, Westermark P. The age related amyloids: a growing family of unique biochemical substances. 1995 *J Clin Pathol* 48: 984-989.
6. Higuchi K, Kitagawa K, Naiki H, et al. Polymorphism of apolipoprotein A-II (apo A-II) among inbred strains of mice; relationship between the molecular type of apoA-II and mouse senile amyloidosis. 1991, *Biochem J* 279: 427-433.
7. Higuchi K, Wang J, Kitagawa K, et al. Accelerated senile amyloidosis induced by amyloidogenic apoA-II gene shortens the life span of mice but does not accelerate the senescence. 1996 *J Gerontol* 51, B293-B302.

H. 研究発表

論文発表

- a. Chiba T, Kogishi K, Wang J, et al. Mouse

senile amyloid deposition is suppressed by adenovirus-mediated overexpression of amyloid-resistant apolipoprotein A-II. *Am J Pathol* 1999; 155: 1319-1326.

- b. Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. The Senescence-Accelerated Mouse. *Methods Enzymol* 1999; 309: 674-686.
- c. Wang J, Matsushita T, Kogishi K, et al. Wild Type ApoA-II Gene Does Not Rescue Senescence-Accelerated Mouse (SAMP1) from Short Life Span and Accelerated Mortality. *J Gerontol B Biol Sci* 2000; (in press)
- d. Xia C, Higuchi K, Shimizu M, et al. Genetic typing of the senescence-accelerated mouse (SAM) strains with \square microsatellite markers. 1999; 10: 235-258.
- e. Shimizu M, Higuchi K, Bennett B, et al. Identification of peak bone mass QTL in a spontaneously osteoporotic mouse strain. 1999 *Mamm Genome* 10: 81-87.
- f. Higuchi K, Kogishi, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation dependent. In *Amyloid and Amyloidosis 1998*, Kyle RA, Gertz MA eds, Parthenon Publishing, 1999; 47-49.
- g. Chiba T, Kogishi K, Wang J, et al. AApoAII amyloid deposition is suppressed by adenovirus-mediated overexpression of type B apolipo-protein A-II gene in the mice. In *Amyloid and Amyloidosis 1998*, Kyle RA, Gertz MA eds, Parthenon Publishing, 1999; 56-58.
- h. 樋口京一、細川昌則。SAM マウス。遺伝子治療開発研究ハンドブック、日本遺伝子治療学会編、エヌ・ティエー・エス、1999 ; 997-999

学会発表

- a. 樋口京一、中村明宏、千葉卓哉、傅麗、松下隆壽、小岸久美子、夏

晨、細川昌則、森政之：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構：。第 88 回日本病理学会 (1999.4.7) 東京

- b. 樋口京一、森政之、千葉卓哉、中村明宏、傅麗、郭占軍、Xing Yanming、是永龍巳、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、細川昌則：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構-1：アミロイド核の経口伝播。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都
- c. Xing Yanming, 中村明宏、小岸久美子、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構-2：糞を介したアミロイド線維核伝播の検証。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都
- d. 傅麗、中村明宏、松山郁生、Xing Yanming、郭占軍、千葉卓哉、是永龍巳、中山淳、森政之、樋口京一：マウス老化 amyloid 蛋白質(apoA-II) mRNA の発現- *in situ* hybridization 法による解析。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都
- e. 樋口京一老化促進モデルマウス (SAM)を用いた老化アミロイドーシス発症機構の解析。第 42 回日本神経学会、ワークショップアミロイドーシスの分子病理；アミロイド線維形成機序と治療戦略 (1999.9.16) 広島
- f. 王静、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、千葉卓哉、中村明宏、森政之、細川昌則、樋口京一：SAMP1 の促進老化と apoA-II 遺伝子；B 型 apoA-II は促進老化を改善できない。第 15 回老化促進モデルマウス (SAM)研究協議会(1999.7.8) 徳島

- g. Xing Yanming, 中村明宏、是永龍巳、小岸久美子、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス伝播における糞の役割。第 15 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会(1999.7.8) 徳島
- h. 梅澤眞樹子、新真由美、小部真紀、安井佐和美、樋口京一、松下隆壽、細川昌則：食餌脂肪の老化アミロイド沈着への影響。第 15 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会(1999.7.9) 徳島

I. 知的所有権の取得状況
無し

J. 特許取得
無し

K. 実用新案登録
無し

L. その他
無し

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
アミロイドーシス抑制遺伝子の解析
分担研究報告書

SMXA RI 系を用いたアミロイドーシスの遺伝解析に関する研究

分担研究者 西村 正彦 名古屋大学医学部教授

研究要旨 老化アミロイドーシス発症に抵抗性の A/J と感受性の SM/J とのあいだから育成された SMXA リコンビナント近交 (RI) 系の 20 数系統のセットを用いて、各系統にマウス老化アミロイド繊維 (AApoAII) 溶液を静脈内投与してアミロイド沈着を誘発し全身のアミロイド沈着の程度を調べる実験を計画した。SMXA RI 各系統の詳細な遺伝子地図はすでに完成しているため、誘発アミロイドーシスの有無、程度を調べ、連鎖する遺伝子マーカーを MapManager 等のコンピュータプログラムを用いて検索し、アミロイドーシスの遺伝様式と A/J 系が有すると予想される抑制遺伝子の染色体位置を同定 (マッピング) する目的で研究をおこなった。

A. 研究目的

A/J 系マウスと SM/J 系マウスは共にアミロイドーシスの発症を促進する ApoA2c 遺伝子を持ちながら、老化アミロイドーシス発症は A/J 系は著しく軽度で、SM/J 系は重度という結果が知られており、A/J 系には未知のアミロイドーシス発症抑制遺伝子の存在が推定される。老化アミロイドーシス発症に抵抗性の A/J 系と感受性の SM/J 系のあいだから育成された SMXA リコンビナント近交 (RI) 系の 20 数系統のセットを用いて、各系統にマウス老化アミロイド繊維 (AApoAII) を静脈内投与してアミロイド沈着を誘発し全身のアミロイド沈着の程度を調べることによる遺伝解析を行うこととした。また、微生物クリーン化の実施前と後との間での比較を行い、飼育環境の影響も調べる。

B. 研究方法

両親系統である SM/J 系と A/J 系、および SMXA RI 系の 20 数系統を用いて、各系統 8 週令の雄約 10 匹に信州大学医学部加齢適応研究センターの樋口京一教授より戴いた老化アミロイド繊維 (AApoAII) 溶液を尾静脈内に投与し、3 ヶ月後に過剰麻酔で安楽死

させて後、舌、皮膚、胃、小腸、腎、肺、肝、脾、心、精巣等、全身の臓器を取り出し、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、コンゴレッド染色を施し、鏡検によりアミロイド沈着の程度を調べる。

C. 研究結果

現在までに実験に使用することが出来た系統は SM/J, A/J、および SMXA-1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 24, 25, 26, 29, 30 の 21 系統であり、1 系統あたり 2 から 26 匹に老化アミロイド繊維溶液を投与した。それらを 3 ヶ月後麻酔後解剖して臓器の切り出しを行ったが、まだ染色標本を作成中のため、研究結果は出ていない。

D. 考察

SMXA RI 各系統の詳細な SDP (Strain Distribution Patterns) はすでに完成しているため、アミロイドーシスの有無、程度を調べれば、表現型の系統分布パターンから遺伝様式を推定し、更に連鎖する遺伝子マーカーを MapManager 等のコンピュータプログラムを用いてアミロイド抑制遺伝子の染色体位置をおおまかに同定 (マッピング) できる