

(1) 無血清アミロイドP成分(SAP)マウスを用いたSAP機能の解析

我々は先に標的遺伝子組換え法を用いて、種々のアミロイドーシスで沈着する異なるアミロイドの共通成分、血清アミロイドP成分(SAP)を欠く無SAPマウスを作製し、対照野生型マウスに比べ、AAアミロイドーシスが遅れて惹起されることを見出した。この結果は、SAPがマウスにおいてAAアミロイドの沈着を促進することを示唆している。では、SAPはヒトのアミロイドーシスの発症も促進するだろうか。無SAPマウスとFAPのトランスジェニックマウスモデルとの交配によって得られる、SAPを欠損しFAPの病因となるヒトTTR Met30を合成するマウス株とSAPとヒトTTR Met30の双方を合成する従来のトランスジェニックマウスモデル株とにおけるTTRアミロイド沈着の開始時期や程度を比較解析すれば、FAPの発症にSAPがどう関与するかを明らかにできると考えられる。一方SAPは、マウスの代表的な急性期応答蛋白質で、英国のグループが作製した無SAPマウスでは、高い頻度で抗核抗体と全身性紅斑性狼瘡様の重度の糸球体腎炎を認めると報告されている。しかし我々は、通常の飼育環境下では無SAPマウスに平均寿命の短縮を認めず、外観上にも何ら異常を認めない。無SAPマウスに異常がなければ、上記の方法でSAPがヒトのアミロイドーシスの発症を促進するかどうかを調べることができる。そこで、以下の方法でSAPの機能を解析し、無SAPマウスに自己免疫疾患等の異常があるかどうかを解析した。

(2) SAP及びTTRの遺伝性アミロイドーシス発症に及ぼす効果の解析

SAPは、種々のアミロイドの沈着を促進すると考えられているが、*in vivo*での実験的裏付けはない。そこで下記の方法で、無SAPマウスとFAPのトランスジェニックマウスモデルとを用いて、FAPの発症にSAPがどう関与するかを解析する。またTTRは、*in vitro*でA $\beta$ アミロイドの沈着を抑制することが見出されているが、*in vivo*での証明はされていない。そこで、家族性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデルと我々が確

立した無TTRマウスあるいは無SAPマウスとを用いて下記の方法で、家族性アルツハイマー病の発症にTTRやSAPがどう関与するかを解析する。

(3) FAPの新たなモデルマウス作製の試み

ヒトttr Met30遺伝子で惹起されるFAPは、30~40歳台で発症し、十数年後に死の転帰をとる。一方、ttr Pro55遺伝子や最近我々が見出したttr Lys54遺伝子は、20~30歳台で死亡する若年発症の劇症型FAPを惹起する。ヒトttr Met30遺伝子を運ぶトランスジェニックマウスでは、生後1年半程で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。しかし上記のように、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。そこで、神経障害を来す、よりFAPに近似したトランスジェニックマウスモデルの作製を目指し、ヒトのttr Lys54遺伝子DNAを運ぶトランスジェニックマウスを作製する。

## 方 法

(1) 無SAPマウスを用いたSAP機能の解析

(I) 細菌 (*Salmonella typhimurium*) のリポ多糖体 (LPS) を腹腔内に体重あたり15 mg/kg投与して急性炎症を惹起した無SAPマウスと対照野生型マウスにおける肝のmRNAの種類や量の差異を、Differential Display (DD) 法で検索する。差異のあるcDNAクローンは単離し、その塩基配列構造を決定する。DD法は、Takaraのキットを用いて行う。このキットでは、9種類の下流プライマーと24種類の上流プライマーの組み合わせによる216通りのPCR反応を行う。

(II) 無SAPマウス及び対照野生型マウスの血清中の抗核抗体価を、Hep-2細胞によるキットを用いて蛍光抗体法で測定し、比較する。

(III) 無SAPマウス及び対照野生型マウスの尿中の総蛋白質量を測定、比較し、さらに光学顕微鏡を用いて、糸球体腎炎の有無を調べる。

(2) SAP及びTTRの遺伝性アミロイドーシス発症に及ぼす効果の解析

上記(1)の研究で、無SAPマウスに自己免疫疾患等の異常が認められなければ、無SAPマウス

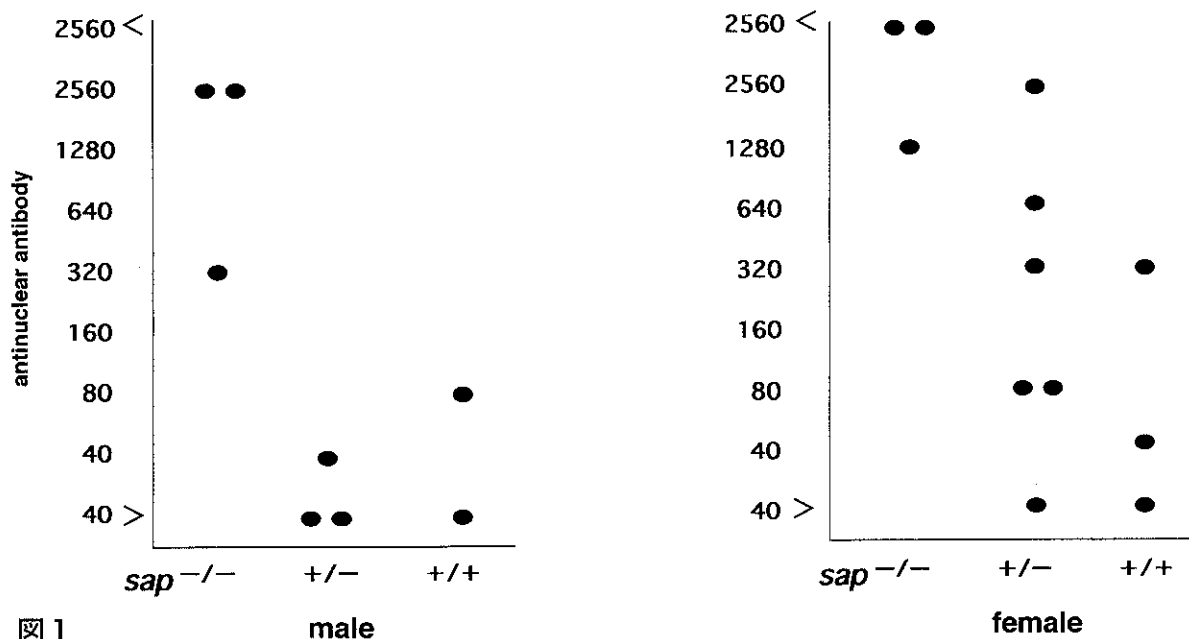


図1

とFAPのトランスジェニックマウスモデルとの交配により、SAPを欠損し、ヒトTTR Met30を合成するマウス株を確立し、このマウス株とSAPとヒトTTR Met30の双方を合成する従来のトランスジェニックマウスモデル株とで、ヒトTTR Met30から成るアミロイド沈着の開始時期や程度に差異があるかどうかを調べる。また、Hsiao博士から、スウェーデンの早期発症型家族性アルツハイマー病の原因となるミスセンス変異をもつヒトのアミロイド前駆体蛋白（APP）遺伝子を運ぶトランスジェニックマウスを供与されている。このトランスジェニックマウスは、脳内Aβアミロイドの沈着と学習、記憶障害の双方を来すと報告されている。そこで同様に、このマウスと我々が確立した無TTRマウスあるいは無SAPマウスとを交配させ、TTR又はSAP欠損APPトランスジェニックマウスと対照野生型APPトランスジェニックマウスとを多数同定、飼育し、脳内Aβアミロイド沈着の開始時期や程度を、月齢を追って比較解析する。

### (3) FAPの新たなモデルマウス作製の試み

劇症型FAPで亡くなった患者肝から全DNAを抽出し、遺伝子ライブラリーを作製し、ヒト全ttr Lys54遺伝子を運ぶ遺伝子断片を単離し、これを用いてトランスジェニックマウスを作製する。

## 結果

### (1) 無SAPマウスを用いたSAP機能の解析

(I) 無SAPマウス及び対照野生型マウス各2匹の腹腔内に、体重当り15 mg/kgのLPSを投与し、24時間後にSAPの産生臓器である肝のmRNAを抽出し、DD法で解析した。上記4匹の肝mRNA由来のcDNAを合計216通りのPCR反応で増幅後、ゲル電気泳動法で差異を比較解析した結果、無SAPマウス肝に特異的な1本のバンドを見出した。

(II) このcDNAバンドをゲルから抽出してサブクローニングし、これをプローブとしてノーザンブロッティング法で調べ、無SAPマウスでは、約2 kbのmRNAの発現量が、対照野生型マウスに比べ、明らかに増加していることを確認した。次にこのcDNAの塩基配列を決定したところ、インターフェロンで誘導される細胞増殖抑制作用を持つ既知の核蛋白質を規定していることが判明した。

(III) sap遺伝子の双方のアレルに挿入変異をもつ無SAPマウス (sap -/-)、一方のアレルにのみ変異をもつヘテロ接合体マウス (sap +/-) 及び対照野生型マウス (sap +/+) の血清中の抗核抗体価を蛍光抗体法で定量した。抗核抗体価は、無SAPマウスにおいて雌雄ともに顕著に上昇していた (図1)。

(IV) 一方、尿中の総蛋白質量は、無SAPマウス及び対照野生型マウスで顕著な差異を認めなか

った。また、何れのマウスの系統にも糸球体腎炎の所見を認めなかった。

(2) SAP及びTTRの遺伝性アミロイドーシス発症に及ぼす効果の解析

SAP欠損マウスとFAPのトランスジェニックマウスモデルとを交配させ、SAPを欠損し、FAPの病因となるヒトTTR Met30を合成するマウス株とSAPとヒトTTR Met30の双方を合成する従来のトランスジェニックマウスモデル株とを多数得た。そして、9ヶ月齢のこれらマウス各6匹におけるヒトTTR から成るアミロイド沈着を調べたが、双方ともに未だアミロイド沈着を認めなかった。また現在、Hsiao博士から供与された家族性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル株と我々が確立した無TTRマウス株あるいは無SAPマウス株とを交配させている。今後この交配によって得られるTTR又はSAP欠損APPトランスジェニックマウスと対照野生型APPトランスジェニックマウスとを多数同定、飼育し、脳内A $\beta$ アミロイド沈着の開始時期や程度を、月齢を追って比較解析する計画である。

(3) FAPの新たなモデルマウス作製の試み

現在、劇症型FAPで亡くなった患者肝から全DNAを抽出し、ラムダファージベクターを用いて遺伝子ライブラリーを作製している。また同じ目的で既に作製した内在性のttr遺伝子にFAPの病因となるMet30変異を持つ10ヶ月齢のマウス6匹についてアミロイド沈着を調べたが、未だアミロイド沈着を認めなかった。

## 考 察

(1) 無SAPマウスを用いたSAP機能の解析

上記の結果は、インターフェロンで誘導され、細胞増殖抑制作用を持つ核蛋白質を規定する遺伝子の発現が、無SAPマウスにおいて対照野生型マウスに比べ増強していることを示している。また、無SAPマウスにおいて対照野生型マウスに比べ、血中の抗核抗体価が顕著に上昇していた。今後何故このような差異が生じたかを解析すれば、SAPの機能を明らかにすることができるであろう。一

方、尿蛋白質の定量、光学顕微鏡を用いた解析からは、英国のグループが報告した結果と異なり、無SAPマウスが糸球体腎炎を惹起し易いとは考え難い。

(2) SAP及びTTRの遺伝性アミロイドーシス発症に及ぼす効果の解析

今後引き続き月齢を追って、遺伝性アミロイドーシスのトランスジェニックマウスモデルにおけるアミロイドの沈着を比較解析する計画である。

(3) FAPの新たなモデルマウス作製の試み

今後ヒト全ttr Lys54遺伝子を運ぶ遺伝子断片を単離し、これを用いてトランスジェニックマウスを作製するとともに、内在性のttr遺伝子にFAPの病因となるMet30変異を持つマウスについて月齢を追ってアミロイド沈着を調べる計画である。

## 結 論

(1) 無SAPマウスを用いたSAP機能の解析

(I) 無SAPマウスでは、インターフェロンで誘導され、細胞増殖抑制作用を持つ核蛋白質を規定する遺伝子の発現が異常に増強していた。

(II) 無SAPマウスにおいて、血清中の抗核抗体価が顕著に上昇していた。しかし、糸球体腎炎の所見は認められず、平均寿命の短縮を認めなかった。従って、ヒトのアミロイドーシスでのアミロイド沈着にSAPがどう関与するかを解析するために、この無SAPマウスを利用可能と考えられる。

今後、無SAPマウスで何故インターフェロンで誘導される核蛋白質遺伝子の発現が増強し、血清中の抗核抗体価が高いかを解析し、SAPの機能を明らかにしたいと考えている。

また、先に無SAPマウスと対照野生型マウスとに沈着した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・デューブエッチング法で比較観察し、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、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)が結合していることを示唆する結果を得た。そこで現在、この結果を確認するため、免疫電顕法により解析している。

## (2) SAP及びTTRの遺伝性アミロイドーシス発症に及ぼす効果の解析

SAPのリガンドの一種であるガラクトースの誘導体を *in vitro* でアミロイドに作用させると、アミロイドからSAPが除去されると報告されている。本研究の結果、SAPがFAPやアルツハイマー病でのアミロイド沈着を促進すれば、遺伝性アミロイドーシスのトランスジェニックマウスモデルを用いて、*in vivo* でアミロイドからSAPを除去する方策を検討することで、アミロイド沈着を抑制する方法を開発し得ると考えられる。

また、アルツハイマー病で認められる脳神経細胞の変性による学習、記憶等の脳高次機能の障害が、 $A\beta$  ペプチドから成るアミロイドの沈着により惹起されるか否かは明らかでない。TTRあるいはSAP欠損APPトランスジェニックマウスと対照野生型APPトランスジェニックマウスとで、脳内 $A\beta$  アミロイド沈着の開始時期や程度に差異を認めれば、これらマウス間で、学習、記憶障害の発症時期に差異が認められるか否かを検討することで、脳内 $A\beta$  アミロイドの沈着が脳神経細胞の変性による脳高次機能の障害に関与するかどうかを明らかにすることができる。

Analysis of molecular basis of familial amyloidoses by using the mice  
carrying targeted mutations

by

Shuichiro MAEDA\*

Toshio TAMAOKI\*\*\*, Hiroo KAWANO\*\*\*, Mihoko SAKAMOTO\*\*\*\*,  
Yoshiie OKADA\*, Sadahiro ITO\*, Shigenobu KANBE\*\*,  
Yukio OZAKI\*\*\*\*, Tokuhiko ISHIHARA\*\*\*

from

\*Department of Biochemistry, Yamanashi Medical University

\*\*Department of Neuropsychiatry, Yamanashi Medical University

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

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

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 amyloidoses.

On the other hand, SAP is a major acute-phase reactant in the mouse. To elucidate the role of SAP in acute-phase response, we compared mRNA species in *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide (LPS)-stimulated livers of SAP-deficient (*sap*<sup>-/-</sup>) and wild-type (*sap*<sup>+/+</sup>) mice by the differential mRNA display technique. The nucleotide sequencing of a clone derived from a differentially amplified product indicated that the clone is interferon-inducible known cDNA. The Northern blot hybridization analysis of the liver RNA in the *sap*<sup>-/-</sup> and *sap*<sup>+/+</sup> with the use of the cDNA as a probe confirmed that the level of mRNA is much higher in the *sap*<sup>-/-</sup> mice relative to the *sap*<sup>+/+</sup> mice. Our data suggest that SAP may play an important role in suppressing the expression-level of the interferon inducible gene in the mouse.

Recently Pepys et al. generated *sap*<sup>-/-</sup> mice and reported that the mice spontaneously develop antinuclear autoimmunity and severe glomerulonephritis, a phenotype resembling human systemic lupus erythematosus. The *sap*<sup>-/-</sup> mice which we generated also spontaneously produced high titers of antinuclear antibody. However, their urine total protein level was normal and they did not suffer from glomerulonephritis. Thus the *sap*<sup>-/-</sup> mice should have immense significance for understanding the role of SAP in the pathogenesis of human amyloidoses.

## マウスAApoAIIアミロイドーシスを用いたアミロイドーシス 伝播機構の解析

研究者 樋口京一\* Xing Yanming\* 是永龍巳\*  
千葉卓哉\* 傅麗\* 中村明宏\*  
森政之\* 松下隆壽\*\* 小岸久美子\*\*  
細川昌則\*\*

### はじめに

アミロイドーシスは本来生理的機能を持つ蛋白質が、突然変異、急激な産生量の上昇、加齢などに伴い、生理的構造から細線維構造（アミロイド線維）へと変換・重合し、細胞間に沈着する疾患の総称である。現在20種類以上のアミロイド蛋白質が報告されているが、共通した線維形成機構が存在すると考えられている。特にアミロイドーシスの発症機構や治療方法を解析する際に注目されているのは、クロイツフェルトヤコブ病(CJD)や狂牛病(BSE)の伝播機構と考えられる核形成依存性重合反応(nucleation dependent polymelization: NDPと略す)モデルである。伝播の主体と考えられている異常構造型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)はアミロイド線維様構造を持つため、アミロイドーシスにもNDPモデルが成り立つか、成り立つならば伝播の可能性があるのかが重要な問題と考えられた。我々はこれまでマウス老化アミロイドーシスをモデルとしてアミロイドーシスの伝播の可能性を探り、微量のアミロイド線維(AApoAII)の静注が、アミロイドーシス発症を著しく促進することを示しNDPモデルが成り立つことを示唆した<sup>1)</sup>。さらに消化管経由のアミロイドーシスの伝播、同一ケージ内飼育のマウス間のアミロイドーシスの伝播

の可能性を示してきた<sup>2)</sup>。今回、マウスアミロイドーシスモデルを用いて、食糞によるアミロイドーシスの伝播、アミロイド線維核投与による野生型アミロイド蛋白質の線維形成、種類の異なるアミロイド線維核投与によるアミロイドーシス誘発などの研究を行い、アミロイドーシス伝播の可能性を検証したので報告する。

### 材料及び方法

#### 1. 動物

加齢にともない重篤なアミロイド沈着を引き起こすC型apoA-II遺伝子(*Apoa2<sup>c</sup>*)をSAMR1マウスに導入したコンジュニックマウスR1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*とSAMR1マウスは信州大学医学部動物実験施設と京都大学再生医科学研究所において兄妹交配で維持され<sup>3)</sup>、コンベンショナルコンディションで飼育された。

#### 2. 糞中アミロイド線維の同定

1ケージに3~5匹の15~20ヶ月齢の高齢R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*及びSAMR1マウスを飼育し、排出後24時間以内の糞を採取した。Prasらの水抽出法と遠心分離法によりアミロイド線維画分を得た<sup>5)</sup>。アミロイド線維画分中のapoA-IIをSDS-PAGE/Western blot法により解析した。さらにアミロイド線維画分(0.1 mg/匹)をR1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*の腹腔内に投与し2ヶ月後に屠殺してアミロイド線維の沈着を調べた。

\*信州大学医学部加齢適応研究センター脈管病態分野

\*\*京都大学再生医科学研究所再生誘導研究分野

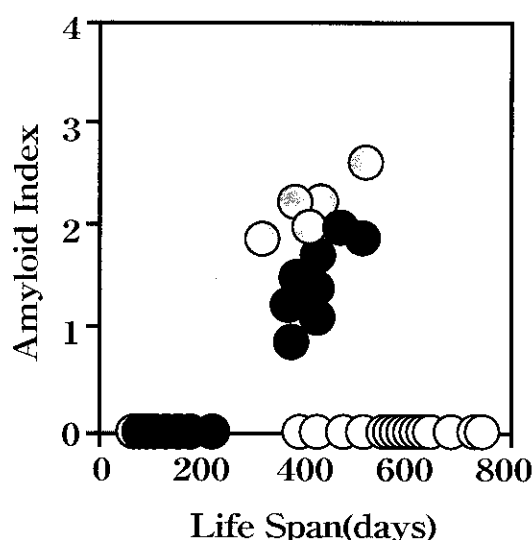


図1 AApoAIIアミロイド線維投与SAMR1 マウスにおけるアミロイド沈着

●はR1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*マウスより分離したAApoAII(C型apoA-II)投与マウス、  
 ●はSAMR1より分離したAApoAII(B型apoA-II)投与マウス、○は蒸留水投与マウス、を  
 表す。Amyloid Indexは肝、脾、胃、小腸、皮膚、心、舌、腎の各臓器に沈着したAApoAIIの沈着程度に0-4の  
 評点を与え、各個体で平均値を求めた。

### 3. SAMR1マウスへのアミロイド線維の投与

B型のapoA-IIを持ちアミロイドーシスをほとんど発症しないSAMR1マウス(2ヶ月齢)にR1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*マウス肝臓より分離したアミロイド線維(C型apoA-IIよりなる)を尾静脈より注入した(0.1mg/匹)。投与後放置し、マウスが死亡した時点で解剖し、アミロイド沈着を調べた。

### 4. ヒトATTR, Aβアミロイド線維投与によるアミロイドーシスの促進

Val30Leu突然変異によるアミロイドポリニューロパチー(FAP)患者心臓よりアミロイド線維を抽出した。合成Aβ1-40ペプチドより試験管内でアミロイド線維形成を行った<sup>9)</sup>。これらのアミロイド線維はソニケーションで細断後、2ヶ月齢のR1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*マウス尾静脈に0.1 g/匹投与、3ヶ月後に屠殺してアミロイド沈着を調べた。

## 結 果

糞を介したアミロイド線維核伝播の検証：

高齢のR1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*マウスより採取した糞アミ

ロイド線維画分の全てで抗apoA-II抗体と反応する6K DaのapoA-IIに相当するバンドが検出された。さらに30K Daのバンドも検出され、apoA-IIのポリマーと考えられた。しかし高齢のSAMR1マウス糞中にはこれらのバンドは検出されなかった。糞より分離したアミロイド線維画分を投与したR1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*マウスでは投与後2ヶ月で10匹中9匹にアミロイドの沈着が観察された(9/10)。しかし蒸留水を投与したマウスではアミロイド沈着は観察されなかった(0/10)。沈着部位は小腸及び舌の粘膜固有層が主であった。

AApoAII線維による正常型apoA-IIの構造変換とアミロイドーシス誘発：

高齢R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*マウスの肝臓より分離されたAApoAII線維を投与されたSAMR1では投与後約1年後からアミロイド沈着が観察され始めた。沈着臓器は小腸、舌の粘膜固有層への沈着が特徴的であった。しかし各臓器の血管周囲、特に子宮の血管周囲や心筋、肺への重篤な沈着も観察された(図1)。重篤なアミロイドが沈着したSAMR1マウスの舌より分離したアミロイド線維画分を2次元電気泳動で分離後、apoA-IIに相当するメジャーな蛋白質のスポットを切り出し、pyroglutamate aminopeptidase処理により、N末端pyrrolidone carboxylic acidを解離した。N末端よりアミノ酸配列を決定した結果、5番目のアミノ酸としてプロリンを同定し、SAMR1に沈着していたAApoAII線維はB型apoA-IIであることが明らかになった。さらにSAMR1の舌と肺より抽出したAApoAIIをSAMR1の尾静脈に投与した結果、投与後約1年でAApoAIIの沈着が観察された。R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*マウスより分離したAApoAIIを投与したマウスと比較すると、沈着の早期化と、心臓への結節状のアミロイド沈着が特徴的であった。

ヒトATTR, Aβアミロイド線維投与によるアミロイドーシスの促進：

ヒト心臓より分離したアミロイド線維(ATTR: Val30Leu)を投与したR1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*マウスでは全例に小腸乳糜管周囲の粘膜固有層と舌粘膜に比較的重篤なアミロイド沈着が観察された。これらのアミロイド沈着はapoA-II抗体で染色され、ヒトTTR

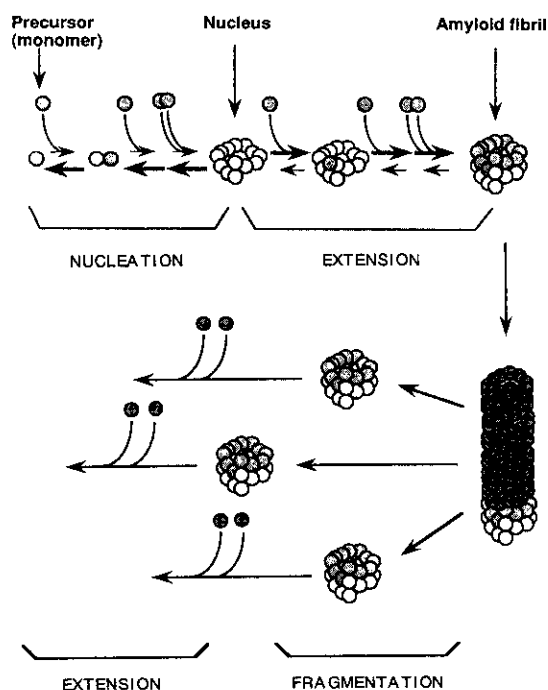


図2 核形成依存性重合反応(nucleation dependent polymerization)モデルによるアミロイド線維形成マウスAApoAIIアミロイドーシスでは少数のapoA-II蛋白質(Precursor)がアミロイド線維核(Nucleus)を形成し(核形成反応;NUCLEATION),この核がapoA-IIと結合し構造変換を引き起こしながら、アミロイド線維の伸長が起こる(伸長反応;EXTENSION)。伸長した線維は断片化し(断片化反応;FRAGMENTATION)新たな線維核となり伸長反応が加速する。線維核が外部から侵入するとアミロイドーシスの伝播が起こると考えられる。

抗体とは反応しなかった。一方蒸留水を投与したR1.P1-Apoa2<sup>c</sup>マウスやATTRを投与したSAMR1マウスではアミロイドの沈着は観察されなかった。内木らの方法で合成A $\beta$ 1-40ペプチドから形成されたアミロイド線維を投与したR1.P1-Apoa2<sup>c</sup>マウスではAApoAIIの沈着が観察されたが、蒸留水を投与したR1.P1-Apoa2<sup>c</sup>マウスやSAMR1マウスでは沈着は観察されなかった。

## 考 察

核構造依存性重合反応(NDP)はCJDやBSEなどのプリオン病やアルツハイマー病のA $\beta$ 蛋白質で提唱された線維形成モデル<sup>7,8)</sup>である。大部分のアミロイドーシスが人生の中・後期で発症すること

は核形成が熱力学的に非常に起こり難い反応であることで説明できると考えられている。これに対し線維伸長反応は迅速に進行する反応で、アミロイド線維核はアミロイド蛋白質と接触しその構造を変換して $\beta$ 構造に富むアミロイド線維が速やかに形成される。伸長したアミロイド線維は断片化し、新たな多数の線維核が作られ、線維形成が雪だるま式に加速すると考えられている(図2)。

プリオン病では消化管を通したプリオン線維の伝播が示唆されているが、外部から侵入したプリオン核(PrP<sup>Sc</sup>)による宿主プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)の構造変換による線維伸長反応はプリオン病伝播の機構を合理的に説明できるとされており<sup>9,10)</sup>、消化管経由のBSEのヒトへの感染が示唆されている<sup>11,12)</sup>。アミロイドーシスでNDPモデルが成り立つならば、プリオンのように伝播が起こる可能性が示唆され、我々はAApoAIIアミロイドーシスの消化管を経由した伝播を示す結果を報告した<sup>2)</sup>。今回は食糞を介したアミロイドーシスの伝播経路の可能性を示した。さらにC型apoA-IIからなるAApoAIIがB型apoA-IIを持ちアミロイドーシスがほとんど発症しないSAMR1マウスにアミロイドーシスを誘発し、さらにSAMR1に沈着したアミロイド線維がSAMR1のアミロイドーシスを誘発することを示した。この結果はAApoAIIアミロイドーシスにおける伝播を示している。ヒトATTRやA $\beta$ アミロイド線維の投与がAApoAII沈着を誘発した結果はアミロイド線維という共通した立体構造がアミロイド蛋白質の構造変換を引き起こす可能性を示唆している。

これらの結果はAApoAIIアミロイドーシスが伝播する可能性を強く示唆している。AApoAIIはプリオンやA $\beta$ の様な激しい神経変成作用が無く、固体に対する毒性はほとんどない。しかも凍結融解や変性剤、オートクレーブにも感受性を示し、伝播性が消失する。これらの点からマウス老化アミロイドーシスはプリオンやアミロイドーシスの伝播機構や治療法を解析する際に安全で有効なモデルであると考えられる。



## 結 語

マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)をモデルとして蛋白質構伝播機構によるアミロイドーシスの伝播の可能性が示された。アミロイド線維構造を持つ物質が体内に存在するか、あるいは外部から侵入した際にアミロイドーシスが促進する可能性を考える必要があると思われる。

## 文 献

- 1) Higuchi K, Kogishi, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation dependent. *Lab Invest* 1998;78: 1535-1542.
- 2) 樋口京一, 森政之, 千葉卓哉, 他。マウス老化アミロイドーシスの伝播機構。厚生省特定疾患代謝系疾患調査研究班アミロイドーシス分科会 1998年度研究報告書 1999;59-61.
- 3) Higuchi K, Kitado H, Kitagawa K, et al. Development of congenic strains of mice carrying amyloidogenic apolipoprotein A-II (*Apoa2<sup>c</sup>*). *Apoa2<sup>c</sup>* reduces the plasma level and the size of high density lipoprotein. *FEBS Lett* 1993;317:207-210.
- 4) 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 rate of senescence. *J Gerontol* 1996;51:B295-B302.
- 5) Higuchi K, Kitagawa K, Naiki H, et al. Polymorphism of apolipoprotein A-II (apoA-II) among inbred strains of mice. Relationship between the molecular type of apoA-II and mouse senile amyloidosis. *Biochem J* 1991;279:427-433.
- 6) Naiki H, Nakakuki K. First-order kinetic model of Alzheimer's beta-amyloid fibril extension in vitro. *Lab Invest* 1996;74:374-383.
- 7) Jarrett JT, Lansbury. PtJr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993;73:1055-1058.
- 8) Kelly JW, Lansbury P. T. Jr. A chemical approach to elucidate the mechanism of transthyretin and  $\beta$ -protein amyloid fibril formation. *Amyloid* 1994;1:186-205.
- 9) Prusiner SB. Prion disease and BSE crisis. *Science* 1997;278:245-251.
- 10) Kocisko DA, Come JH, Priola SA, et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 1994;370:471-474.
- 11) Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996;383:685-690.
- 12) Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, et al. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 1995;375:698-700.

Analysis of the Transmission of Amyloidosis Using Mouse  
AApoAII Amyloidosis (AApoAII)

by

Keiichi HIGUCHI\*

Xing YANMING\*, Tatsumi KORENAGA\*, Takuya CHIBA\*, Fu LI\*,  
Akihiro NAKAMURA\*, Masayuki MORI\*, Takatoshi MATSUSHITA\*\*,  
Kumiko KOGISHI\*\*, Masanori HOSOKAWA\*\*

from

\*Department of Aging Angiology, Research Center on Aging and Adaptation,  
Shinshu University School of Medicine

\*\*Field of Regeneration Control, Institute for Frontier Medical Sciences,  
Kyoto University.

In mouse senile amyloidosis, apoA-II polymerizes to amyloid fibrils (AApoAII) and deposits systemically. Using AApoAII amyloidosis, we studied the transmittability of amyloid fibrils. AApoAII was purified and characterized in the feces of old R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* mice with severe amyloidosis. The intraperitoneal injection of the amyloid fibril fraction of feces containing AApoAII accelerated amyloidosis in R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* mice. Injection of AApoAII amyloid fibrils composed of amyloidogenic (C type) apoA-II induced amyloid deposition in SAMR1 mice that have amyloid-resistant (B type) apoA-II protein. The amino acid sequencing revealed that the deposited amyloid is composed of B type apoA-II. Injection of AApoAII isolated from the tongue of SAMR1 mice induced amyloidosis again in SAMR1. Injections of both ATTR (Met30Leu) isolated from the heart of FAP patient and A $\beta$  amyloid fibrils accelerated AApoAII deposition in R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* mice.

The transmission of amyloid fibril conformation, that is; invasion of exogenous amyloid fibrils act as seeds and change the conformation of endogenous amyloid protein to polymerize into amyloid fibril was shown in AApoAII mouse amyloidosis.

## 脳A $\beta$ アミロイドーシスモデル動物によるA $\beta$ アミロイド 伝播性の基礎的検討

研究者 東海林 幹 夫\* 針 谷 康 夫\* 富 所 康 志\*  
池 田 将 樹\* 金 井 光 康\* 松 原 悦 朗\*  
瓦 林 毅\* 岡 本 幸 市\* 平 井 俊 策\*\*

### 目 的

現在、アルツハイマー病(AD)の発症機序として、まず、アミロイド $\beta$ 蛋白(A $\beta$ )が沈着して脳A $\beta$ アミロイドーシスが起こり、続いて神経原線維変化と神経細胞死などが出現してくるアミロイド・カスケード説が有力視されている。我々は、Initial eventである脳A $\beta$ アミロイドーシスの生成機序の解明や予防が最も重要であると考え、これまで家族性ADの原因遺伝子を発現するtransgenic mice(TG)を作成解析し、これらの検討を行ってきた。

A $\beta$ アミロイドの由来は神経細胞との考えが主流であるが、血液由来説やprion病のように伝播性を有する可能性も指摘されている。最近、PrusinerらはPrion TGを用いて伝播実験を行うと、発症率が著明に高くなり、しかも発症までの期間が著しく短縮することから、この動物モデルがPrion伝播性の高感度アッセイ系であることを示している。今回、我々はADの動物モデルを用いて同様にA $\beta$ アミロイドの伝播性の検討を行った。

本年度は、まず、脳アミロイド沈着と記憶・学習障害を認めるTG(APPsw mice)を神経病理学的、生化学的および行動学的側面から評価しA $\beta$ アミロイドの伝播実験に適切なモデル動物であること

を確認するとともに、これらのマウスを用いて脳A $\beta$ アミロイドの伝播性の実験の基礎的検討を行った。

### 方 法

1. APPsw mice脳内に認められる神経病理学および生化学的変化と記憶学習障害の経時的変化を検討した。

1) 4, 8, 12, 18ヶ月齢のAPPsw mice脳のparaffin切片でmethanamine銀、Gallyas染色を行った。隣接切片を $\beta$  APPC末抗体、A $\beta$ C末断端特異抗体(S40,S42, S43)とN末断端特異抗体(Ab9204, A $\beta$ 1(rD), A $\beta$ 1(iD), A $\beta$ 3(pE), A $\beta$ 11(pE), A $\beta$ 17(L)), リン酸化tau特異抗体(199-serine, 396-serine, 413-serine), 抗 $\alpha$ -synuclein抗体, 抗drebrin抗体を用いて免疫染色を行った。隣接切片をNissl染色, Giemsa染色を行い神経細胞数を測定した。

APPsw mice脳の一部を70%ギ酸で抽出しSandwich ELISA系 (BNT-77/BA-27, BNT-77/BC-05)を用いて経時的に脳内A $\beta$ 40, 42量を測定した。

7ヶ月齢のAPPsw mice5匹, 対照7匹に電気ショックに対する受動的回避試験を行った。具体的には初日にマウスを明室に入れ隣の暗室に入ると3秒間電気ショックを与えた。その後、毎日一回5日間連続で試験を施行し、明室から暗室へ入るまでの時間を反応潜時として測定した。5分以上明室にいる場合は受動的回避反応を習得したものとみな

\*群馬大学医学部神経内科

\*\*東京都立神経病院

### Immunostaining with Antibodies to C-termini of A $\beta$

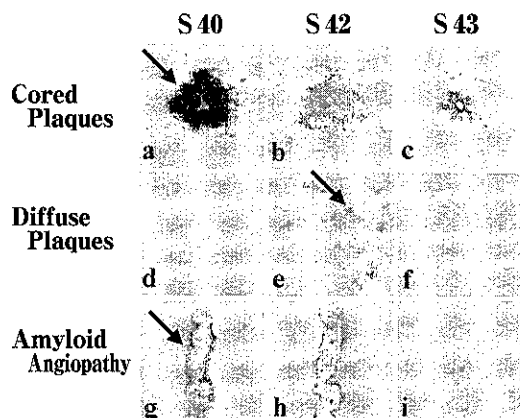


図1. A $\beta$ C末端特異抗体 (S40, S42, S43) による免疫染色  
Cored plaqueはS40, S42一部はS43で染色され, Diffuse plaqueはS42のみに反応した。Amyloid AngiopathyはS40, S42で染色された。

した。その後は毎週一回検査を施行しその反応潜時を測定し比較した。

2. A $\beta$ アミロイドの伝搬性の基礎的検討として, まず, freeのA $\beta$ が老人斑アミロイドと結合しアミロイド形成を促進しうるかどうかを調べた。具体的には15ヶ月齢のAPPsw miceとAD患者の脳から厚さ10 $\mu$ mの凍結切片を作製した。これらの切片を50nMの蛍光標識したA $\beta$  (Fluo-A $\beta$ 1-42あるいはFluo-A $\beta$ 1-40)と室温で10時間反応させた。洗浄後, 蛍光顕微鏡下で観察した。

### 結果および考察

1. ①APPsw miceの8ヶ月齢で巨大なCored plaque(CP)とDiffuse plaque (DP)が大脳皮質, 海馬, 嗅脳に同時に出現し, 加齢とともに増加した。12ヶ月齢でAmyloid Angiopathy (AA)が出現した。②CPはS40,S42一部はS43で染色され, DPはS42のみに反応した。AAはS40, S42で染色された(図1)。③CP, AAはAb9204,A $\beta$ 1(rD)で染色され, 一部はA $\beta$ 1(iD), A $\beta$ 3(pE), A $\beta$ 17(L)に反応した。DPはAb9204のみで染色された。④老人斑周囲のdystrophic neuriteに $\beta$ APPが蓄積していた。dystrophic neuriteは異常リン酸化tau抗体で染色され, 経時的にこの染色性は増加した。神経原線維変化は見られなかった。⑤Nissl染色, Giemsa染

### Passive Avoidance Test

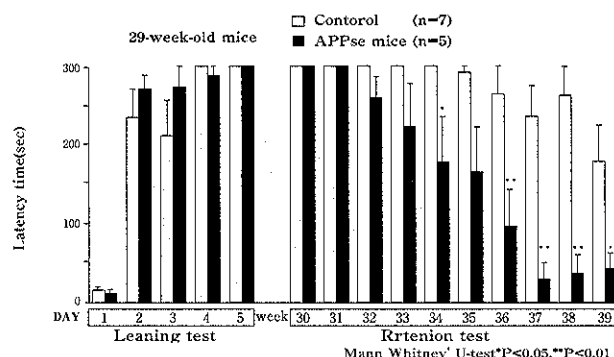


図2. 受動的回避試験

APPsw mice, 対照ともに1回の電気ショックで受動的回避反応が習得された。APPsw miceでは32週齢から回避行動の潜時が短縮し始め, 34週齢から有意差が認められた。

色で神経細胞数を定量すると, 老人斑芯では有意に神経細胞が減少していた。⑥プレシナプス蛋白である $\alpha$ -synucleinやポストシナプス蛋白であるdrebrinの免疫染色では老人斑芯でのシナプス減少が認められた。以上, このマウスではAD脳で見られるび慢性老人斑, 典型的老人斑, amyloid angiopathyが再現され, AD脳と同じA $\beta$ 分子種が蓄積していた。老人斑周囲のdystrophic neuritesに $\beta$ APP, 異常リン酸化tauの蓄積が認められた。老人斑芯では有意に神経細胞とシナプスの減少がみられた。

脳内A $\beta$ をELISAで定量すると, 8ヶ月齢ではA $\beta$ 40とA $\beta$ 42がそれぞれ1,656 pmol/g, 250 pmol/gであり, 以後加速度的に増加し脳に大量のA $\beta$ の蓄積が検出された。組織学的に同定される脳アミロイドは生化学的なA $\beta$ 蓄積量とよく相関していた。

電気ショックによる受動的回避試験では, APPsw mice, 対照ともに1回の電気ショックで受動的回避反応が習得された。その後, いずれの群でも電気ショックの記憶は保持されていたが, APPsw miceでは3週後の32週齢(8ヶ月齢)から回避行動の潜時が短縮し始め, 34週齢(8.5ヶ月齢)から有意差が認められ ( $P<0.05$ ), 加齢とともに著明となった( $P<0.01$ ) (図2)。これらの結果は記憶障害

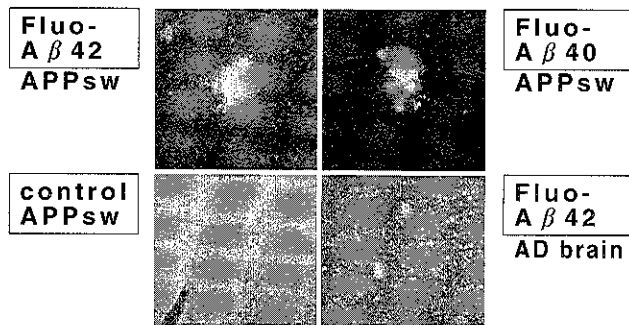


図3. In situ amyloidogenesis

蛍光標識したA $\beta$  (Fluo-A $\beta$  40/42)をプローブとして脳切片と反応させると、APPsw miceやAD患者の脳のplaquesと結合した。Fluo-A $\beta$  42は $\beta$  40よりもplaquesにより多く結合した。

が出現したことを意味している。これまで、APPsw miceでは9~10ヶ月齢でY迷路やモリス水迷路試験で記憶学習障害が報告されているが、今回の我々の検討結果ではA $\beta$ 蓄積の始まる8ヶ月齢から記憶障害が認められたことから、A $\beta$ アミロイド沈着のみでも記憶学習障害がおこることが明らかになった。

以上、APPsw miceでは確実に8ヶ月齢からA $\beta$ 沈着が再現され、記憶学習障害が出現してくることから、脳アミロイドシスの形成機序とそれによって引き起こされる神経細胞・シナプス減少や過剰リン酸化tauの蓄積などを再現可能な動物モデルと考えられた。また、脳アミロイド伝播を評価しうる敏感なモデルと考えられた。

2. 蛍光標識したA $\beta$  (Fluo-A $\beta$  40/42)をプローブとして脳切片と反応させると、APPsw miceやAD患者の脳のplaquesと結合した (in situ amyloidogenesis)。Fluo-A $\beta$  42はA $\beta$  40よりもplaquesにより多く結合した(図3)。以上の結果はfreeのA $\beta$ が老人斑に結合しamyloidogenesisを促進する可能性を示唆している。血中には多量のA $\beta$ の存在が確認されており、このA $\beta$ が血液脳関門を通過して脳アミロイドに取り込まれるかどうかを明らかにする目的で、<sup>125</sup>I radioisotopeラベルしたA $\beta$  1-40/42をAPPsw miceの血管内に投与し

autoradiographyを用いて現在解析を行っている。さらに、現在AD脳からFlow cytometryを用いて老人斑アミロイドコアを精製中であり、今後、硬膜、髄液、血液などとともにAPPswの脳に直接投与し、A $\beta$ 沈着の開始時期やその程度を比較し、A $\beta$ アミロイドの伝播性を明らかにする予定である。

## 結 論

APPsw miceではヒト脳アミロイドシス、神経細胞・シナプス減少、過剰リン酸化tauが再現され、ADのモデル動物として有用であるとともに、脳アミロイド伝播を評価しうる敏感なモデルと考えられた。freeのA $\beta$ はマウス脳切片上の老人斑に結合しamyloidogenesisを促進することを明らかにした。今後、これらのAPPswを用いてA $\beta$ アミロイドの伝播性を明らかにする予定である。

## 文 献

- 1) Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996;274:99-102.
- 2) Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al. Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med* 1996;2:864-870.
- 3) Scott MR, Will R, Ironside J, et al. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:15137-15142.
- 4) Mackic JB, Weiss MH, Miao W, et al. Cerebrovascular accumulation and increased blood-brain barrier permeability to circulating Alzheimer's amyloid beta peptide in aged squirrel monkey with cerebral amyloid angiopathy. *J Neurochem* 1998;70(1):210-215.

- 5) Ghilardi JR, Catton M, Stimson ER, et al. Intra-arterial infusion of [<sup>125</sup>I]A $\beta$  1-40 labels amyloid deposits in the aged primate brain in vivo. *Neuroreport* 1996;7(15-17):2607-2611.
- 6) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, et al. Brain A $\beta$  amyloidosis in APPsw mice induces focal loss of neurons with accumulation of presenilin-1 and tau. *Am J Pathol* (submitted).

Basic analysis of transmissibility of brain amyloid  $\beta$  protein amyloidosis-  
Study of transgenic mice overexpressing  $\beta$  APP with Swedish mutations.

by

Mikio SHOJI\*

Yasuo HARIGAYA\*, Yasushi TOMIDOKORO\*, Masaki IKEDA\*,  
Mitsuyasu KANAI\*, Etsuro MATSUBARA\*, Takeshi KAWARABAYASHI\*,  
Koichi OKAMOTO\*, Shunsaku HIRAI\*\*

from

\*Department of Neurology, Gunma University School of Medicine

\*\*Tokyo Metropolitan Neurological Hospital

To clarify the transmissibility of brain amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) amyloidosis of Alzheimer's disease (AD), we examined the APPsw mice (K Hsiao et al. Science 1996) expressing human  $\beta$  APP695 ANL under the hamster prion promoter.

In the brain of APPsw mice, cored, diffuse plaques and amyloid angiopathy consists of various  $A\beta$  species with both N-and C- terminal modifications, were recognized such as those of AD brains. Accumulation of hyperphosphorylated tau as well as  $\beta$  APP were observed in dystrophic neurites surrounding cored plaques. Neuronal cell loss as well as synaptic loss were found in cored plaques. The levels of  $A\beta$  40 and  $A\beta$  42 in brain at the age of 8 month were 1,656 and 250 pmoles/g brain, respectively and remarkably increased with the evolution of  $A\beta$  amyloidosis. Passive avoidance test revealed that APPsw mice have memory impairment in 8.5-month old. Thus, these mice are useful for examining the mechanism of AD pathology, and the possibility of transmission of brain  $A\beta$  amyloidosis.

We also found that Fluo- $A\beta$  binds to senile plaques on frozen brain sections from APPsw mice as well as AD patients. We are studying autoradiography after injection with radiolabeled  $A\beta$  to APPsw mice. Finally, we will examine whether or not  $A\beta$  amyloid will be able to be transmitted to other brains by using APPsw mice which were injected with amyloid cores from AD brains.

## 各種の粗製アミロイド線維のamyloid enhancing factor (AEF) 効果

研究者 横 田 忠 明\* 河 野 裕 夫\*\* 石 原 得 博\*\*  
 権 藤 俊 一\*\* 星 井 嘉 信\*\* 高 橋 睦 夫\*\*\*  
 瀬戸口 美保子\*\*\*

### はじめに

アミロイドーシス沈着臓器からの抽出物中には実験的マウス・アミロイドーシスの前アミロイド期を著しく短縮させる作用がある物質が存在し、そのような性質がある物質をamyloid enhancing factor(AEF)と呼びならわしているが、その詳細は未だ不明である。AEFはアミロイド線維とは異なる物質と考えられているが、アミロイド線維自体<sup>1)</sup>にもAEF活性が存在することが報告されている。そこで種々の動物に沈着した粗製アミロイド線維を抽出し<sup>2)</sup>、マウスに投与してそのAEF活性の有無を調べた。

### 方 法

白鳥、牛、マウスおよびヒトのアミロイド沈着臓器から粗製アミロイドを抽出した。白鳥、牛、マウスのアミロイドは抗AA抗体と免疫組織化学的に反応し、AAアミロイドーシスであった。ヒトではAA、AL(Aκ, Aλ)が沈着した患者臓器およびカルシトニン由来のアミロイドが沈着していた甲状腺髄様癌患者の甲状腺から抽出した粗製アミロイド線維を用いた。マウス1匹あたり1mgのアミロイド線維を注射し、0.5mlのカゼイン・アジュバ

ント(10%カゼインとcomplete Freund's adjuvantの等量懸濁液)をマウス皮下に注射し、7日目に屠殺した。脾臓を摘出し、アミロイド沈着の有無を調べた。

また、抗AA抗体、抗マウスλ鎖抗体を用いて、免疫組織化学的に沈着アミロイドのタイプを調べた。

### 結 果

牛のAAアミロイドを注射した3/3匹、白鳥、マウスのAAアミロイドを注射した2/3匹、ヒトAA、Aλでは1/2匹、カルシトニン由来アミロイ

表1 アミロイド線維のAEF効果

白 鳥 AA	2/3
牛 AA	3/3
マウス AA	2/3
ヒ ト AA	1/2
ヒ ト Aλ	1/2
ヒ ト Aκ	0/3
カルシトニン	2/3

アミロイド陽性マウス数/全マウス数

ドでは2/3のマウス脾臓にアミロイドの沈着を認めた。Aκを注射したマウスでは3匹中のいずれにもアミロイド沈着は認めなかった(表1)。

沈着したアミロイドは全て抗AA抗体と陽性に反応し、AAアミロイドであった。

\* 社会保険小倉記念病院病理科

\*\* 山口大学医学部病理学第一講座

\*\*\* 山口大学医学部附属病院病理部



## 考 察

種属の異なる動物から抽出したAA アミロイドにはマウスの実験的AAアミロイドーシスを促進させる効果があった。また、ヒトのA $\kappa$ アミロイドには今回の実験ではこの様な効果はなかったが、A $\lambda$ およびカルシトニン由来アミロイドには同様の促進効果を認めた。Niewoldらは<sup>2)</sup>ハムスターを用いた実験的アミロイドーシスでAAアミロイド線維にAEF活性がある事を報告しているが、今回の実験結果は種属および種類の異なるアミロイド線維にもAEF活性があると思われる結果であった。AAアミロイドとは種類の異なるアミロイド線維が、何故AAアミロイドーシスを促進するのか、今後明らかにする必要があが、Naikiら<sup>3)</sup>は試験管内でアミロイド線維とその前駆蛋白を混合するとアミロイド線維が伸長することを報告している。アミロイド線維以外でAEF効果があるとして報告されている物質には、IL6,TNF<sup>4)</sup>,ユビキチン<sup>5)</sup>, さらに最近、蚕が産生する絹の線維にもAEF効果があると報告<sup>6)</sup>されたが、これらは全て不思議なことに $\beta$ 構造に富んだ蛋白質である。種類の異なるアミロイド線維あるいは $\beta$ 構造に富んだ蛋白質を核としてもAAアミロイド線維は形成され得るのか、また、マウスの生体内でも同様の現象が起こるのか興味がある。

また、今回の実験で沈着したアミロイドは全てAAアミロイドであった。AEF効果を持つ物質によって引き起こされるアミロイドーシスはこれまで報告されているかぎりAAアミロイドーシスのみである。他の型のアミロイドーシスにも発症を促進させる物質が存在するのか否かも今後明らかにする課題である。

## 文 献

1. Niewold TA, Hol PR, van Andel ACJ, et al. Enhancement of amyloid induction by amyloid fibril fragments in hamster. *Lab Invest* 1987;56:544-549.
2. Pras M, Zucker-Franklin D, Rimón A, et al. The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J Clin Invest* 1968;47:924-

933.

3. Naiki H, Higuchi K, Nakakuki K, et al. Kinetic analysis of amyloid fibril polymerization in vitro. *Lab Invest* 1991;65:104-110.
4. Niewold TA, Gruys E, Arakawa T, et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha(rhTNF-alpha) and rhTNF-alpha analogue enhance amyloid deposition in the Syrian hamster. *Scand J Immunol* 1991;37:29-32.
5. Alizadeh-Khiawi K, Normand J, Chronopoulos S, et al. Amyloid enhancing factor activity is associated with ubiquitin. *Virchows Arch [A]* 1992;420:139-148.
6. Kisilevsky R, Lemieux L, Boudreau Y, et al. New clothes for amyloid enhancing factor (AEF): silk as AEF. *Amyloid* 1999;6:98-106.

# Amyloid enhancing factor activity of several crude-amyloid fibrils

by

Tadaaki YOKOTA\*

Hiroo KAWANO\*\*, Tokuhiko ISHIHARA\*\*, Toshikazu GONDO\*\*.

Yoshinobu HOSHII\*\* , Mutsuo TAKAHASHI\*\*\*, Mihoko SETOGUCHI\*\*\*

from

\*Department of Pathology, Kokura Memorial Hospital

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

\*\*\*Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital

Amyloid enhancing factor (AEF) activity of several crude amyloid fibrils including AA from swan, mouse, cow and human A $\kappa$ , A $\lambda$  and calcitonin related-amyloid fibrils from a patient with medullary carcinoma of thyroid gland, were tested.

Mice were intraperitoneally injected 1 mg of these crude amyloid fibrils and subcutaneously injected 0.5 ml of a mixture of equal volumes of 10% casein solution and complete Freund's adjuvant, and sacrificed 7 days later. AEF activity was observed in three out of three mice receiving AA from cow, two out of three mice receiving AA from swan and mouse, one out of two mice receiving human AA and human A $\lambda$ , and two out of three mice receiving the calcitonin related-amyloid fibrils. All amyloid deposits reacted positively to anti-AA antibody when examined immunohistochemically. No AEF activity was observed in mice receiving human A $\kappa$ .

Thus, excepting the A $\kappa$  amyloid fibrils, amyloid fibrils from different species and different types of amyloid accelerated the activity of murine AA formation.

## 実験的アミロイドーシスの発症機序

研究者 高橋 睦夫

### はじめに

全身性アミロイドーシスには、その前駆体蛋白の種類により、現在、免疫グロブリン性アミロイドーシス、反応性AAアミロイドーシス、家族性アミロイドーシス、透析アミロイドーシス、老人性TTRアミロイドーシスの5型に分類されている。アミロイドーシスの発症には、①前駆体蛋白の量的な増加（過剰産生）、②前駆体蛋白自体の質的な異常が主な原因として考えられているが、必ずしもこれらの要因だけでアミロイドーシスが発症するとは限らない。実際、免疫性アミロイドーシスあるいは反応性AAアミロイドーシスにおいて、前駆体蛋白が高値を示す患者の中にもアミロイドーシスを発症する患者と発症しない患者が存在する。このような事実から、アミロイドーシスの発症にはこれらの要因以外に前駆体蛋白をアミロイド線維に変える何らかの因子が組織中に存在すると考えられている。

われわれは以前より、実験的マウスアミロイドーシスを用いて、肝、脾などの組織中におけるアミロイド線維の形成過程について検討してきた。そこで本稿では、実験的マウスアミロイドーシスにおけるアミロイド線維の形成機序について、現在までの研究成果と今後の研究方針について述べる。

### I. Kupffer細胞とアミロイド線維

従来、実験的アミロイドーシスの肝臓において、結節状のアミロイド沈着の周囲をKupffer細胞が取  
山口大学医学部附属病院病理部

り囲む像がしばしば認められていた。そのような部を電子顕微鏡で観察すると、アミロイド線維は主にDisse腔などの細胞間隙に沈着している。アミロイド沈着に接したKupffer細胞では、細胞膜の深い陥凹がみられ、その部にアミロイド線維が束状すなわちamyloid bundleを呈して認められる。そのような像を、多くの研究者はKupffer細胞が胞体内でアミロイド線維を合成し、細胞外に放出している像と考えた<sup>1)</sup>。稀に、Kupffer細胞の胞体内で紡錘形を呈した構造物内にアミロイド線維が存在し、その構造物にprimary lysosomeの融合が観察された。それらの胞体内のアミロイド線維を含んだ構造物に酸性フォスファターゼ活性が認められたことにより、アミロイド線維の形成には、lysosomal enzymeが関与していると考えられた<sup>2,3)</sup>。

### II. SAA産生細胞とその細胞内局在

1970年代になって、続発性アミロイドーシスのアミロイド蛋白は、それまでは未知のAA蛋白であることが解明され、さらに血中にその前駆体蛋白SAAが存在することが明らかにされた<sup>4)</sup>。そこで、われわれも実験的アミロイドーシスにおけるSAA産生細胞とその細胞内局在について検討した<sup>5)</sup>。

マウスにアミロイドーシスの惹起注射を行うと、注射後1日目で、抗マウスAA抗体に対する反応産物SAAが肝細胞も胞体内に認められた。肝細胞内のSAAは、注射後1日目が最も多く、経過と共に減少するが、アミロイド沈着期にも相当量認められた。免疫電顕法では、SAAは主としてDisse腔に面した肝細胞の細胞膜表面に存在していた。稀に、肝

細胞のGolgi装置の層板内におよびそれに連続した小胞体に一致してSAAが認められた。マウスにコルヒチンを投与すると、肝細胞内のSAAは主に分泌空胞内にみられるようになり、また弱陽性ながら粗面小胞体にも反応産物が認められた。

一方、Kupffer細胞内では、惹起注射後1日目からSAAは主に細胞膜表面あるいは陥凹部に認められるが、一部では、胞体内の不整形のheterophagosomeと考えられる小器官内にも認められた。しかし、全経過を通じて蛋白の合成に関与する粗面小胞体やGolgi装置等の小器官内にはSAAは認められなかった。以上より、Kupffer細胞の胞体内に存在したSAAは、細胞外より取り込まれたものと考えられた。

### Ⅲ. 脾臓におけるアミロイド線維形成

実験的アミロイドーシスにおいて、アミロイドは最初に脾臓を沈着することがよく知られている。そこで、脾臓におけるアミロイド沈着の初期を検索すれば、アミロイド線維の形成過程を把握することが可能と考えられた。AEFとカゼインをマウスに投与すると、投与後2日目に、免疫組織科学的に抗AA抗体で陽性に染まるdot状の微量アミロイド沈着が濾胞周辺帯に認められた。この時期をImmunogold法による免疫電顕法で検討すると、アミロイド線維は肝臓におけると同様、殆どが細胞外に存在していた。稀に、濾胞周辺帯と白脾髄の境界部で、細胞外にアミロイド沈着がみられない部においても、マクロファージの胞体内のlysosomeと考えられるdense body内にアミロイド線維が認められた。また、マクロファージによっては、線維構造のはっきりしないdense body内にSAAの存在を示唆する金粒子のラベルがみられた<sup>9)</sup>。

このlysosome内にみられたアミロイド線維が、細胞内で形成されたものかあるいは細胞外の線維を貧食したものかを明らかにする目的で、アミロイドの吸収実験を行った<sup>6,7)</sup>。アミロイド吸収期の脾臓では、アミロイドの結節内にマクロファージが侵入し、その胞体内には多数のheterophagosomeと考えられる不整形のdense bodyあるいはvacuoleがみられた。また、マクロフ

ァージの胞体内には、吸収されて間がないと考えられる比較的intactなアミロイド線維も同時に認められた。このように、アミロイド吸収期におけるアミロイド線維を入れた構造物とアミロイド沈着期のそれとは超微形態的に異なることが判明した。このことより、アミロイド沈着期のものは細胞外のアミロイド線維が貧食されたものではなく、胞体内のdense body内で形成されたものであることが確認された。

### Ⅳ. 実験的アミロイドーシスにおけるアミロイド線維の形成機序

以上の実験結果と諸家の報告を参考にして、実験的アミロイドーシスにおけるアミロイド線維の形成機序は以下のように考えられる。

アミロイド惹起刺激により、前駆体蛋白SAAは主として肝細胞で合成・分泌される。血中に放出されたSAAは、アポリポ蛋白に結合してHDLの状態では血中を循環する。このSAAは肝臓のKupffer細胞、脾臓のマクロファージなどの網内系細胞よりreleaseされたelastasetypeのlysosomal enzymeの作用を受け<sup>8)</sup>、AA蛋白に相当する分子量までdegradeされ、細胞外でアミロイド線維となる。しかし、稀に、マクロファージなどの網内系細胞の胞体内でもアミロイド線維の形成が起こりうる<sup>9)</sup>。その際は、SAAは細胞膜面の恐らくreceptorに結合し<sup>10)</sup>、細胞内にpinocytosisの機序によって取り込まれた後、lysosomeの中で酸素の作用を受けて線維となると考えられる。

### Ⅴ. 今後の課題

前述したように、アミロイド線維はSAAがなんらかの作用を受け、AA蛋白の分子量まで切断された後、重合して線維状となったものである。このSAAの切断あるいはその重合の際に作用する因子として、酵素類の他に種々の物質、例えばglycosaminoglycan, P component, amyloid enhancing factorさらにはapolipoproteinEなど<sup>11)</sup>のシャペロン様物質などの関与が考えられている。今後は、これらの物質の作用機序を明らかにしなければならぬが、わたしは酵素類を中心に、ア