
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

(課題番号 H-11-長寿-028)

平成12年度総括・分担研究報告書

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
脈管病態分野教授

平成13(2001)年4月

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 12 年度総括研究報告書

平成 13 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

目 次

I. 総括研究報告	
アミロイドーシス抑制遺伝子の解析 -----	7
主任研究者 樋口京一	
信州大学医学部加齢適応研究センター	
II. 分担研究報告	
1. ヒト血清中のアミロイドーシス発症促進分子の生化学的解析 -----	15
徳田隆彦	
信州大学第三内科	
2. マウス老化アミロイドーシスの母子間伝播について -----	23
樋口京一	
信州大学医学部加齢適応研究センター	
3. マウス老化アミロイドーシス抑制遺伝子の解析 -----	31
樋口京一	
信州大学医学部加齢適応研究センター	
4. マウス老化アミロイドーシスの病理組織学的解析 -----	43
細川昌則	
京都大学再生医科学研究所	
5. SMXA RI 系を用いたアミロイドーシスの遺伝的解析 -----	51
西村正彦	
名古屋大学医学部動物実験施設	
III. 班構成員名簿 -----	57
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	63

平成12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

マウス老化アミロイドーシス抑制遺伝子の解析

主任研究者 樋口京一 信州大学医学部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には多大な個人差が存在し、アミロイドーシス発症を規定する遺伝的要因を明らかにすることが重要と考えられる。アミロイドーシスの発症を修飾する因子の解析を進め本研究班は本年度以下の成果を得た。①アミロイド好発性遺伝子(Apoa2^C)を持ちながら発症程度が著しく異なる SAMP1(重度沈着)と A/J (軽度) マウス間の交配実験を行い、アミロイドーシス発症を調節する複数の染色体領域を明らかにした。②SMXA リコンビナント系統や SAM マウス系統群にアミロイド線維(AApoAII)を投与することによりアミロイドーシスを誘発し、アミロイドーシス抑制遺伝子の解析を行い、染色体上の位置を明らかにした。③アミロイド発症の環境要因としてアミロイド線維の母子間の伝播の可能性を調べた。④ヒトにおける家族制アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者の発症を修飾する因子として患者血清中や臍帯血中の TTR モノマーの動態を解析した。

研究班構成員

主任研究者

樋口京一（信州大学医学部）

分担研究者

西村正彦（名古屋大学医学部）

細川昌則（京都大学再生医科研）

徳田隆彦（信州大学医学部）

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. 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 intercross; 59 匹), PBc (SAMP1 X F1 backcross; 7 匹), ABc (A/J X F1 backcross; 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 (amyloid index)。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ペンショナル条件下で行われた。全染色体上に 20 cM 間隔になるように 87 のマイクロサテライトマーカーを設定し、F2 マウスのゲノムタイピングを行い Map Manager QT を用いて連鎖解析を行った。

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) の尾静脈投与でアミロイドーシスを誘発し 3 ヶ月後に京都大学再生医科学研究所の細川がアミロイド沈着程度を調べた。誘発アミロイドーシスの程度と SDP 情報とのあいだの相関関係を MapManager ソフトを用いて QTL 解析を行った。

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 週齢マウスの尾静脈に 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. AApoAII アミロイド線維の静注によってアミロイド沈着を誘導した雌 R1.P1-Apoa2^o マウスから出産した仔マウスを生後 21 日で離乳した。生後一定期間経過後に屠殺し、アミロイド沈着レベルの経時変化を調べた。

5. ①FAP 患者群(ATTR; Val30Met)と、Control 群の血清をゲル濾過で分画し、TTR monomer の濃度測定を turbidimetric immunoassay で測定した。②FAP 患者および Control 群の出産時に採取した臍帯血清中の TTR monomer の濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、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、信州大学医学部、名古屋大学医学部、京都大学再生医科学研究所の動物実験指針に基づいて行われた。今回の研究で対象とした患者は全て成人の FAP 発症者で信州大学第三内科を受診した患者である。また被検者から血液あるいは臍帯血を採取するにあたっては、実験の目的と方法の十分な説明を行い informed consent を得た後に検体の採取を実施した。また、新生児の遺伝子診断を施行することは禁止した。

C. 研究結果 D. 考察

1. SAMP1 と A/J マウスの交雑マウス (F2 intercross, A/J X F1 backcross) を作成し、12ヶ月齢で全身のアミロイド沈着を調べた。また各マウスの肝臓より DNA を抽出し、全 F2 intercross マウスのゲノムタイピングを行った。有意な連鎖が認められた領域については A/J X F1 backcross マウスのゲノムタイピングを行った。Amyloid Index を用いて QTL 解析を行った結果、第4染色体の D4Mit33 で significant level を大きく上回る連鎖 (LRS=31.3) が認められた。D2Mit295, D2Mit258, D4Mit89, D19Mit67 では suggestive level での連鎖が認められた。これらの領域についての A/J X F1 backcross の QTL 解析は D19Mit67 (LRS=12.1) と D4Mit89 (LRS=10.7) で suggestive level での連鎖を確認した。昨年度の形質の解析では劣性の抵抗性遺伝

子を示唆していたが、本年度の詳細なゲノムタイピングの結果は多遺伝子による調節であることを明らかにした。今後は、同定された領域の候補遺伝子の解析やコンジェニックマウスを利用した抑制遺伝子の同定を目指す必要がある。

2. 現在までにアミロイド懸濁液投与実験に使用することが出来た系統は A/J および SMXA-1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 30 の 22 系統であるが、現在アミロイド沈着の程度について 1 系統 6 匹以上観察出来たのは SMXA9, 10, 12, 14, 16, 17, 24 の 7 系統であり、それらのマウスの舌の総 2 次乳頭に対するアミロイド沈着 2 次乳頭の割合を計測しアミロイド沈着の指標とした。一方、SMXA RI 系統群の SDP を構成する Mit マーカー数は 371 に達し、平均間隔は 4.2 cM となった。7 系統の上記乳頭比のデータを用いて、MapManager により QTL 解析した結果、Chr. 3, 6, 10, 14, 17, X において LRS13.8 の suggestive level で QTL が存在しそれぞれのマーカーと連鎖していることが分かった。そのうち Chr.10 と 17 上の QTL は A/J 系由来であり、Chr.3, 6, 14, X 上の QTL は SM/J 由来であった。アミロイドーシスのような多因子が絡む複雑な量的形質に対してはリコンビナント近交系が有効な解析手段となる。今後 RI の系統数を増やすことによりアミロイド抑制遺伝子のマッピングが可能であると予測している。

3. SAM 系統群マウスのアミロイド

ーシス誘発にたいする感受性は、高感受性群、中間群、低感受性群に大別され、マウス老化アミロイドーシス自然発症の好発群、中間群、嫌発群に対応した。同じC型のapoA-IIを有するSAMP1とSAMP2系統マウスではSAMP2マウスの方が沈着の程度が軽度であった。発症頻度が高く、定量化しやすい舌標本を用いてアミロイド沈着の組織学的評価方法の検討を行った後、SMXAマウスのアミロイド沈着を調べた。

4. アミロイドーシス発症マウスから出生した仔マウスでは、生後4ヵ月齢において、腸管及び舌に軽度なAApoAIIアミロイド沈着が認められた。6ヵ月齢及び8ヵ月齢マウスではアミロイド沈着レベルは加齢とともに重度化した。対照群では、4ヵ月齢及び6ヵ月齢ではアミロイド沈着は認められず、8ヵ月齢では軽度な沈着が見られたが、投与群との間に有意差が認められた。アミロイドーシス発症マウスから出生した仔マウスにおいて、アミロイドーシス促進現象が認められたことは、アミロイド線維あるいはそれに準ずる物質（protofibril等のアミロイド線維前駆物質）が母子間で伝播したことを示唆するものである。伝播の経路については、今後さらに詳細に検討する必要がある。

5. ①ヒト血清中に微量ながらTTR monomerが存在することを初めて確認した。FAP患者では正常対照者に比べ、TTR monomer濃度が減少していたが、FAP患

者の血清TTR monomer画分では、wild-type TTRに対するvariant TTR monomerの比率が減少していた。アミロイド原性のTTR monomerがヒト血清中にも存在して、かつそれがアミロイド沈着の始まりとなることが示唆された。

②FAP患者1例の出産時に採取した臍帯血中では、total TTR中のTTR monomerの比率が増大していた。この患者の血清中TTRおよび正常対照者の臍帯血中のTTRについては、TTR monomer比率の増大は認めなかった。FAP患者に認められる表現促進現象の原因の一つとして、母子間におけるアミロイド原性TTR monomerの移行が存在するのではないかという可能性が示唆された。症例数が少なく、また胎児由来のTTR monomer可能性が否定できないため、ヒトにおける症例を集積すると同時に、アミロイドーシス発症モデル動物を用いた垂直性伝搬の有無を検討する実験および伝搬が存在する場合はその伝搬を生じさせている分子の同定などが必要であると考えられる。

E. 結論

平成11年度にスタートした研究班は2年目を向かえた。3種のモデルマウスシステム(①A/J X SAMP1、②SMXA、③SAM)を用いたアミロイドーシス抑制遺伝子の解析は①の自然発症アミロイドーシスのシステムでは主要な遺伝子座が明らかにされ、候補遺伝子の解析も進めら

れている。②のアミロイド線維投与による誘発モデルでは①とは違った遺伝子座が明らかにされつつある。今後の発展が期待される。③のシステムではアミロイド沈着の定量に関して貴重な基礎データが得られた。この研究班がスタートするまでアミロイドーシスの発症を調節する主要な単一遺伝子が仮定されていたが、複数の遺伝的要因が関与することが明らかになった。今後はそれぞれの原因遺伝子の単離が重要である。ヒト FAP の高齢者発症の家系の調査ではアミロイドーシス発症を促進するのは遺伝的要因よりも表現促進現象(anticipation)が重要であることを明らかにし、本年度は表現促進現象を説明する機構として母子間の AApoAII アミロイド線維の伝播と TTR monomer の伝播を検証した。今後の詳細な解析が期待される。

アミロイドーシスの発症を規定する最も重要な遺伝因子はアミロイド蛋白遺伝子の変異である。しかし同一の変異の保持者、あるいはリュウマチ等の炎症疾患患者(AA アミロイドーシス)、透析患者(A β 2M アミロイドーシス)、ミエローマ患者(AL アミロイドーシス)でのアミロイドーシス発症の程度は個人間で大きく異なる。さらに高齢化社会を向かえ、正常型蛋白を持ちながらアミロイドーシスを発症する高齢者の増加は避けられず、発症を修飾する遺伝的要因を解明することが重要である。マウスモデルはこのような遺伝的因子を解明するための有力な

システムと考えられる

F. 健康危険情報

アミロイドーシス促進因子(アミロイド線維あるいはそれに準ずる物質)の母子間垂直伝播の可能性が考えられる。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成12年度分担研究報告

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
分担研究報告書

ヒト血清中のアミロイドーシス発症促進分子の生化学的解析

分担研究者 徳田隆彦 関島良樹 池田修一：信州大学第三内科

研究要旨 ヒトの遺伝性アミロイドーシスの代表的疾患である家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)で認められる表現促進現象の発現機構を検討する目的で、その原因物質であるトランスサイレチン(TTR)のヒト血清中における存在形態および母子間のアミロイドーシス発症素因伝達の可能性について検討した。ヒト血清中には低濃度のTTR monomerが存在しており、FAP患者では正常対照者に比べvariant TTR monomer濃度が減少していた。また、FAP患者の出産時に採取した臍帯血中ではTTR monomerの濃度が増加していた。FAP患者のアミロイド沈着は、血清中の微量なvariant TTR monomerが血行性に全身組織に沈着することで始まり、またこのアミロイド原性TTR monomerが母子間で伝搬する可能性が考えられた。

A. 研究目的

アミロイドーシスは線維化し不溶化したアミロイド蛋白が細胞外に沈着し、種々の臓器障害を生ずる病態であり、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は全身性遺伝性アミロイドーシスの代表的な疾患である。FAPはトランスサイレチン(TTR)遺伝子に生じた点突然変異により変異TTRが産生され、諸臓器に沈着することがその原因である^{1,2)}。昨年度の本研究班において我々は、日本におけるFAPの一大集積地である長野

県のFAP患者家系(Met30-TTRを有する)では、FAPが点突然変異が原因で発症する遺伝性疾患であるにもかかわらず、世代を経るに従って患者の発症年齢が早期化する表現促進現象が認められることを報告した³⁾。脳内にアミロイド蛋白が沈着するプリオン病では、沈着の原因となる二次構造の変化したプリオン蛋白がヒトからヒトへ感染することが知られている。また、一部のアミロイドーシスでは、アミロイドーシスの発症素因を有する個体に、アミロイド沈

着の核となる重合したアミロイド原性蛋白質(seed)を注入することにより、その個体のアミロイドーシスの発症が促進されることが実験動物レベルで報告されている⁴⁾。このようにアミロイドーシス一般には、程度の差はあるものの、アミロイドーシス発症の個体間における「伝搬機序」が存在する可能性がある。

今回の研究では、FAP患者に認められる表現促進現象の発現機序を検討する目的で、FAP患者の血清中および臍帯血中に存在する発症促進分子、すなわちアミロイド原性TTR monomerについて生化学的に検討した。

B. 研究方法

対象および方法

①ヒト血清中のTTR monomerの検討

対象としたFAP患者群はATTR Val30Met とwild-type TTR のheterozygoteであるFAP患者10名(8家系、平均年齢: 54.6 ± 20.8 歳、32歳~86歳)で、Control群はWild-type TTR のhomozygoteである同年齢の健常者10名(平均年齢: 54.4 ± 19.9 歳、31歳~83歳)である。

方法は、被検者の血清 2.5mlをHiPrep 16/60 Sephacryl S-200HRカラム (Pharmacia Biotech) を用い

て分離し、TTR monomerの分子サイズに相当するelution volume 75~90 ml を monomer fraction として回収した。回収したmonomer fraction を Centriprep-10 (Millipore, Inc.) を用いた限外濾過で25倍に濃縮し、抗TTR antiserum (DAKO) を用いて immunoblotting を行った。血清中TTR monomer濃度の測定は、turbidimetric immunoassayでTTR濃度を測定したstandard sampleとmonomer画分とをdot blottingした後densitometry (NIH image)を行った。また、血清および濃縮したmonomer画分を抗TTR antiserum を用いて免疫沈降した後DTTで処理し、MALDI/TOF mass spectrometerで解析した。

②ヒト臍帯血中のTTR monomerの検討

対象はFAP患者および正常対照者の出産時に採取した臍帯血で、FAP患者1例は24歳のATTR Val30Met とwild-type TTR のheterozygoteであり、正常対照者はwild-type TTR のhomozygoteである同年齢の正常産婦4名(平均年齢: 29.0 ± 5.5 歳、23歳~36歳)であった。

方法は、臍帯血由来の血清0.5mlをHiPrep 26/60 Sephacryl S-200HRカラム (Pharmacia) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し、

elution volume 90~240 ml を fraction 1-60として回収した。回収したfraction 1-60を dot blottingによりPVDF膜に転写し、抗TTR antiserum (DAKO) を一次抗体として、ECLにより可視化した。発色させたECL filmからdensitometry (NIH image)により各fractionが含有するTTRの相対的濃度を測定した。

C. 研究結果

① ヒト血清中の TTR monomer の検討

i) 血清中のtotal TTR濃度は、FAP患者および正常対照者でそれぞれ、 $158.5 \pm 51.2 \mu\text{g/ml}$ および $264 \pm 50.6 \mu\text{g/ml}$ で、血清中TTR monomer濃度は、FAP患者および正常対照者でそれぞれ、 $284.9 \pm 119.2 \text{ ng/ml}$ および $564.9 \pm 230.9 \text{ ng/ml}$ であった。従って、ヒト血清中にはtotal TTRの約0.2%の低濃度でTTR monomerが存在し、FAP患者では正常対照者に比べ、従来指摘されていた血清中のtotal TTRが減少していただけでなく、TTR monomer 濃度も減少していた。

ii) 質量分析計を用いた検討から、FAP患者の血清TTR monomer画分では、全血清中のTTRと比較して、wild-type TTR monomerに対するvariant TTR monomerの比率が減少していた(variant TTR/ wild-type TTR比;

monomer fraction: 0.523 ± 0.095 、全血清: 0.924 ± 0.114)(図1)。すなわち、FAP患者血清中でのTTR monomer 濃度の減少は、wild-type TTR monomerよりも、variant TTR monomerの減少に起因すると考えられた。

② ヒト臍帯血中の TTR monomer の検討

今回検討した FAP 患者 1 例の出産時に採取した臍帯血中では、total TTR 中の TTR monomer の比率が増大していた(図 2)。この患者の血清中 TTR および正常対照者の臍帯血中の TTR については、TTR monomer 比率の増大は認めなかった。

D. 考察

今回の Met30-TTR を有する FAP 患者および正常対照者の血清を用いた検討では、これらのヒト血清中に微量ながら TTR monomer が存在することを初めて確認した。このことは、近年 in vitro の実験において TTR アミロイド沈着の最初の段階と考えられている TTR tetramer から TTR monomer への解離が、in vivo すなわち生理的条件下のヒト血清中においても生じていることを示していると考えられる。さらに FAP 患者において、この TTR monomer 濃度とく

に variant TTR monomer の濃度が減少していたことは、variant TTR monomer が組織に沈着し消費されている可能性を示唆している。以上からは、変異が生じたために、正常の homotetramer と比較して、不安定になった heterotetramer から生じた TTR monomer の中の variant TTR monomer がアミロイド沈着の最初の病的機転となっている可能性を示唆している。

以上のようにアミロイド原性の TTR monomer がヒト血清中にも存在して、かつそれがアミロイド沈着の始まりとなることが示唆されたので、我々は FAP 患者に認められる表現促進現象の原因の一つとして、母子間におけるアミロイド原性 TTR monomer の移行が存在するのではないかという仮説を考えた。前年度の検討で、FAP 患者家系に認められる表現促進現象が、父由来の遺伝の場合よりも、母由来の遺伝の場合に明らかに認められたことも我々の仮説を支持する知見であると考えられる。このような仮説を検証する目的で、今年度の第 2 の実験として FAP 患者の出産時に得られた臍帯血中の TTR monomer 画分を検討した。今回の我々の結果からは、症例数が少なく preliminary な知見ではあるが、FAP 患者の児由来の臍帯血中には、

正常対照者の児由来の臍帯血と比較して、TTR monomer の比率が増大していた。この増加した TTR monomer の由来については、母体由来のアミロイド原性 TTR monomer である可能性と、あるいは児自身も変異 TTR 遺伝子を有している場合には胎生期の何らかの因子により TTR tetramer の解離が増大している可能性の両者が考えられる。今回の FAP 患者が出産した新生児の遺伝子診断が倫理的な問題から不可能であるために、これらの 2 つの可能性のどちらが生じているのかは明らかにはできないが、前者のような病的状態が生じているのであれば、FAP 患者に認められる表現促進現象の原因の一つは、母子間のアミロイド原性 TTR monomer の「伝搬」による可能性がある。今後はヒトにおける症例を集積すると同時に、アミロイドーシス発症モデル動物を用いた垂直性伝搬の有無を検討する実験および伝搬が存在する場合はその伝搬を生じさせている分子の同定などが必要であると考えられる。

E. 結論

1. FAP 患者および正常対照者血清中に低濃度の TTR monomer が存在していた。
2. FAP 患者では正常対照者に比べ

TTR monomer 濃度、特にvariant TTR monomer濃度が減少していた。

3. FAP患者の出産時に採取した臍帯血中ではTTR monomerの濃度が増加していた。
4. FAP患者のアミロイド沈着は、血清中の微量なvariant TTR monomerが血行性に全身組織に沈着することで始まり、またこのアミロイド原性TTR monomerがFAP患者の胎盤を通じて母子間で伝搬する可能性が考えられた。

F. 倫理面への配慮

今回の研究で対象とした患者は全て成人のFAP発症者で信州大学第三内科を受診した患者である。また被検者から血液あるいは臍帯血を採取するにあたっては、実験の目的と方法の十分な説明を行いinformed consentを得た後に検体の採取を実施した。また、新生児の遺伝子診断を施行することは禁止した。

G. 文献

1. Ikeda S, Hanyu N, Hongo M, et al. Hereditary generalized amyloidosis with polyneuropathy. A clinicopathological study of 65 Japanese patients. *Brain* 110: 315-37, 1987.
2. Tawara S, Nakazato M, Kangawa K,

et al. Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Biochem Biophys Res Commun* 116: 880-8, 1983

3. 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* 35: 23-30, 1998.
4. 樋口京一. C型 apoA-IIはB型 apoA-IIによるアミロイド線維形成を誘導する。厚生省特定疾患対策研究事業 アミロイドーシスに関する研究 平成11年度研究報告書 2000; 126-129.

H. 研究発表

- 1 論文発表
 - a. Tokuda T, Calero M, Matsubara E, Vidal R, Kumar A, Permanne B, Zlokovic B, Smith JD, Ladu MJ, Rostagno A, Frangione B, Ghiso J: Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem J.* 348: 359-365, 2000
 - b. Yazaki M, Tokuda T, Nakamura A, Higashikata T, Koyama J, Higuchi K, Harihara Y, Baba S, Kametani F, Ikeda S: Cardiac amyloid in patients

- with familial amyloid polyneuropathy consists of abundant wild-type transthyretin. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 702-706, 2000
- c. Mochizuki H, Kamakura K, Masaki T, Tokuda T, Yazaki M, Motoyoshi K, Ikeda S: Nodular cutaneous amyloidosis due to amyloidogenic transthyretin His 114 variant. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 2001 (in press)
- d. Sekijima Y, Tokuda T, Kametani F, Tanaka K, Maruyama K, Ikeda S: Serum transthyretin monomer in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 2001 (in press) Sekijima Y, Tokuda T, Kametani F, et al. Serum transthyretin monomer in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid*, 2001 (in press).
2. 学会発表
- a. 関島良樹、徳田隆彦、池田修一：家族性アミロイドポリニューロパチー患者血清中の transthyretin monomer 画分の検討。第 41 回日本神経学会総会 (2000.5.24) 松本
- 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

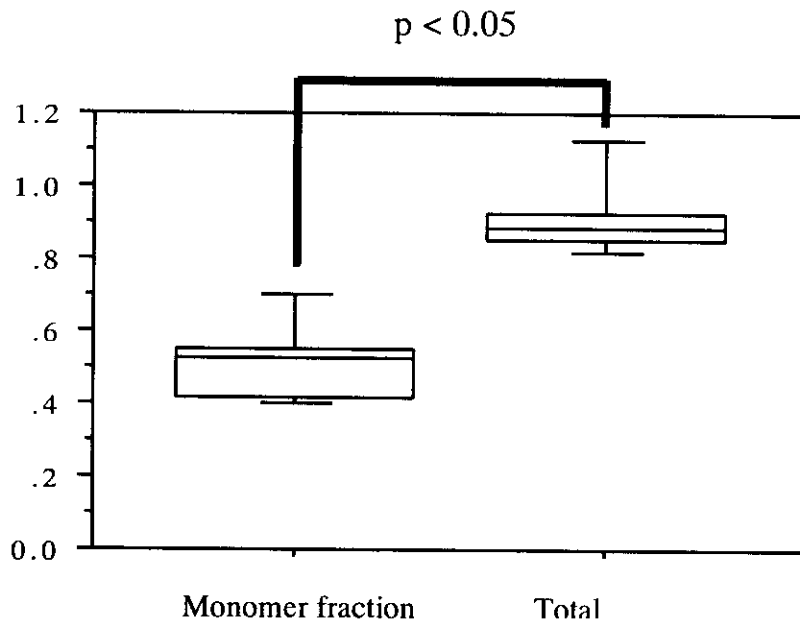


図1: FAP患者血清のTTR monomer fractionおよびtotal serumにおけるvariant TTR / wild-type TTR ratio

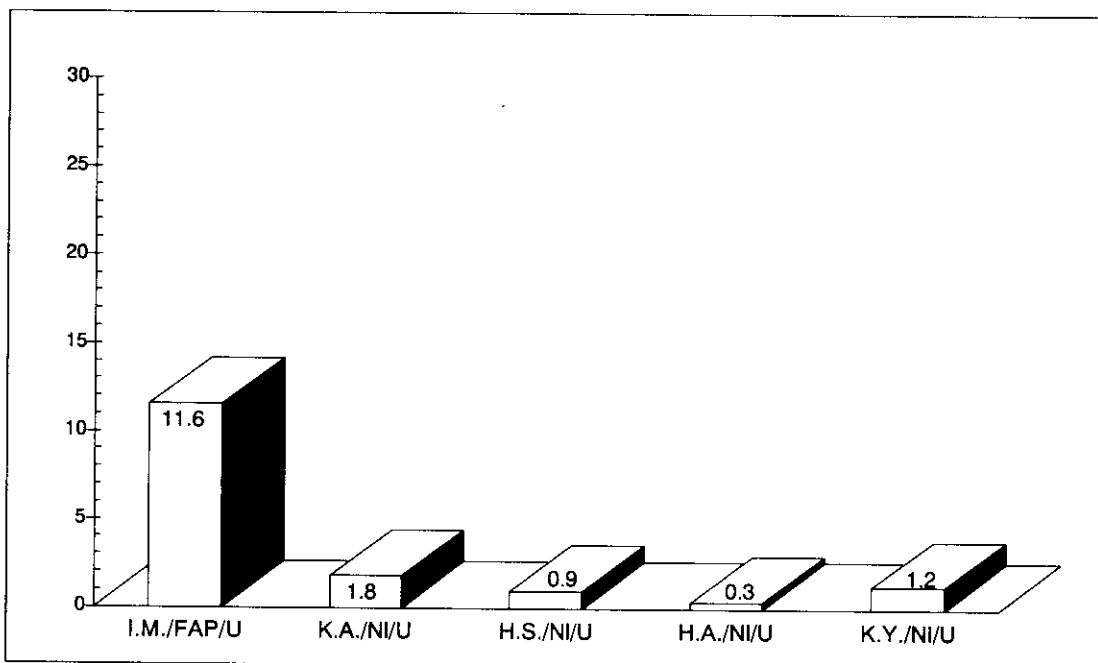


図2: 臍帯血血清中のTTR monomer / total TTR ratio (%)
FAP patients (FAP) vs Control subjects (NI)

マウス老化アミロイドーシスの母子間伝播についての検討

分担研究者 樋口京一 信州大学医学部附属加齢適応研究センター

共同研究者 是永龍巳¹、付笑影¹、森政之¹、松下隆壽²、細川昌則²、

1 信州大学医学部附属加齢適応研究センター

2 京都大学再生医化学研究所

研究要旨 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)では世代の進行に伴い発症年齢が若齢化する傾向(anticipation)が見られることが報告されており、親子間でのアミロイドーシス伝播の可能性が考えられる。本研究では、その現象の解明のために、母子間におけるアミロイドーシス伝播の可能性についてマウス老化アミロイドーシスをモデルに用いて検証した。アミロイド線維投与によりアミロイドーシスを発症したマウスから出生した仔マウスでは、対照群と比較して有意なアミロイドーシス促進現象が認められ、母子間でのアミロイドーシス伝播の可能性が示唆された。この現象は、anticipation を説明する上でも重要な知見と考えられる。

A. 研究目的

これまでに、我々は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伝播の可能性を探り、アミロイドーシス好発系マウスを用いた実験系において、アミロイド線維投与によるアミロイドーシス促進効果を見い出している¹⁾。一方、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)はトランスサイレチン(TTR)の点変異によって生じた変異 TTR がアミロイド線維化し、全身に沈着する疾患であるが²⁾、FAP 発症家系のうち、集積地の家系においては、世代の進行に伴い発症

年齢が若齢化する傾向(anticipation)が見られることが報告されている³⁾。

anticipation の原因は遺伝的要因や環境的要因等、さまざまな理由が考えられるが、我々の実験結果を併せて考えると、その理由の一つとして、FAP 発症家系では親から子へのアミロイドーシスの伝播があり、その結果として発症年齢の若齢化が認められることが考えられる。

このようなアミロイドーシス促進現象の機構の解明はアミロイドーシスの抑制の点からも重要であり、今回、マウス老化アミロイドーシスをモデルを用いて、

母子間におけるアミロイドーシス伝播の可能性について検討する目的で研究を行った。

B. 研究方法

C型 apoA-II を有し AApoAII 好発系である R1P1-*Apoa2*⁺ マウスをモデルとして用いた。このマウスは信州大学医学部附属動物実験施設において兄妹交配によって系統維持されており、重度な老化アミロイドーシスを発症するマウスである。

老齢 R1P1-*Apoa2*⁺ マウス肝臓に沈着した C 型 AApoAII アミロイド線維を Prus の方法に従って抽出し、超遠心分離法によって精製した。このアミロイド線維水分散液を 1mg/ml の濃度に希釈し、超音波処理を行って線維を切断し可溶化した。

2 ヶ月齢の R1P1-*Apoa2*⁺ マウス（雌）に C 型 AApoAII アミロイド線維を静脈注射によって投与(0.1ml)し、3 ヶ月間飼育してアミロイド沈着を誘導した後に雄マウス（アミロイド線維非投与）と交配した。出産した仔マウスを所定の哺育期間である 21 日間哺育させ、離乳した。一方、対照群としてアミロイド線維非投与雌マウス（5 ヶ月齢）を同様に交配し、出産・哺育させた。

仔マウスを生後一定期間経過後に屠殺し、全身臓器を中性緩衝ホルマリンで固定した。組織切片はコンゴレッド染色及び抗 apoA-II 抗体による免疫染色を行い、アミロイド沈着の指標となる Amyloid Index を求め、アミロイド沈着レベルの

経時変化を調べた。

マウスを用いた実験は信州大学医学部の動物実験に関する指針に基づいて行われた。

（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、それぞれ信州大学医学部附属動物実験施設の動物実験に関する指針に沿って行った。

C. 研究結果

アミロイドーシス発症マウスから出生した仔マウスでは、生後 4 ヶ月齢において、腸管及び舌に軽度なアミロイド沈着がコンゴレッド染色により確認された。免疫染色の結果、沈着しているアミロイド線維は AApoAII であることが確認された。6 ヶ月齢及び 8 ヶ月齢マウスについて同様に調べた結果、アミロイド沈着レベルは加齢とともに重度化し（図 1）、沈着組織についても肝臓、脾臓、胃、心臓へと拡大した。対照群については、4 ヶ月齢及び 6 ヶ月齢ではアミロイド沈着は認められず、8 ヶ月齢では軽度な沈着が見られたが、投与群との間にはノンパラメトリック検定(Mann Whitney の U 検定)により有意差が認められた。

D. 考察

我々は既に AApoAII 線維投与によるマウス老化アミロイドーシス促進効果を明らかにしている。ゆえに、アミロイドー

シス発症マウスから出生した仔マウスにおいて、対照群と比較して有意なアミロイドーシス促進現象が認められたことは、アミロイド線維あるいはそれに準ずる物質（protofibril 等のアミロイド線維前駆物質）が母子間で伝播したことを示唆するものである。この現象は、FAP 発症家系においては、母親から子供へアミロイドーシスが伝播する可能性があることをも意味すると考えられる。なお、比較的早期から腸管に沈着が認められたことは、アミロイド線維の経口投与によって得られるアミロイドーシス促進効果と類似しており、母乳経由のアミロイドーシス伝播が考えられるが、伝播の経路については、今後さらに詳細に検討する必要がある。

E. 結論

AApoAII 好発系である R1P1-*Apoa2* マウスにおいて、マウス老化アミロイドーシスの母子間での伝播の可能性が示唆された。今後は伝播経路の解明を目指す。

F. 健康危険情報

アミロイドーシス促進因子（アミロイド線維あるいはそれに準ずる物質）の母子間垂直伝播の可能性が考えられる。

G. 引用文献

- 1) Higuchi K, Kogishi K, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation

dependent. *Lab Invest* 78, 1535-1542 (1998)

- 2) Ikeda S, Hanyu N, Hongo M, et al. Hereditary generalized amyloidosis with polyneuropathy. A clinicopathological study of 65 Japanese patients. *Brain* 110, 315-317 (1987)
- 3) Yamamoto K, Ikeda S., Hanyu N, et al. A pedigree analysis with minimized ascertainment bias shows anticipation in Met30-transthyretin related familial amyloid polyneuropathy. *J Med Genet.* 35, 23-30 (1998)
- 4) Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T. *Anal Biochem.* 177, 244-249 (1989)

H. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Wang J, Matsushita T, Kogishi K, Xia C, Ohta A, Chiba T, Nakamura A, Kondo H, Mori M, Hosokawa M, Higuchi K. Wild type ApoA-II gene does not rescue Senescence-accelerated mouse (SAMP1) from short life span and accelerated mortality. *J Gerontol B Biol Sci* 55A: B432-439. 2000.
 - 2) Guo Z, Toichi E, Hosono M, Hosokawa T, Hosokawa M, Higuchi K, Mori M. Genetic analysis of lifespan in hybrid progeny derived from the SAMP1 mouse