

- strain with accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 118: 35-44. 2000.
- 3) Nishikawa T, Takahashi JA, Matsushita T, Ohnishi K, Higuchi K, Hashimoto N, Hosokawa M. Tubular aggregates in the skeletal muscle of the senescence-accelerated mouse: SAM. *Mech Ageing Dev* 114: 89-99, 2000.
 - 4) Umezawa M, Takeda T, Kogishi K, Higuchi K, Matsushita T, Wang J, Chiba T, Hosokawa M. Serum lipid concentrations and mean life span are modulated by dietary polyunsaturated fatty acids in the Senescence-accelerated mouse. *J Nutr* 130: 221-227. 2000
 - 5) 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.
 - 6) Shoji M, Matsushita T, Higuchi K, Honda Y, Hosokawa M. Senile ocular amyloidosis in SAM and BALB/c strains of mice. *Mech Ageing Dev* 120: 87-94, 2000.
 - 7) Xing Y, Nakamura A, Chiba, T, Kogishi K, Matsushita T, Li F, Guo Z, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest* 2001 (in press).
 - 8) Mori M, Toyokuni S, Kondoh S, Naiki H, Toichi E, Hosokawa M, Higuchi K. Spontaneous loss-of-function mutations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase gene in mice and exploration of the possible implication of the gene in senescence. *Free Rad Biol Med* 2001 (in press).
 - 9) Fu L, Matsuyama I, Chiba T, Xing Y, Korenaga T, Guo Z, Nakayama J, Mori M, Higuchi K. Extra-hepatic Expression of Apolipoprotein A-II in Mouse Tissues: Possible Contribution to Mouse Senile Amyloidosis. *J Histochem Cytochem* 2001 (in press).
 - 10) Mizutani J, Chiba T, Tanaka M, Higuchi K, Mori M, Unique mutation in mitochondrial DNA of Senescence-Accelerated Mouse (SAM) strains. *J Heredity*, 2000 (in press).
 - 11) Higuchi K, Naiki M, Hosokawa M, Takada T. Model of amyloidosis of senescence. *Grateuau G, Benson MD, Delpevh M eds Les Amyloidoses Flammarion Medicine Science Paris pp138-145, 2000*
 - 12) 樋口京一。アミロイド線維蛋白質。永田和宏、森正敬、吉田賢右編、分子シャペロンによる細胞機能制御、シュフリンガー・フェアラーク東京 東京(印刷中2001).
 - 13) 樋口京一、森政之。アミロイドその他。永田和宏編、分子生物学・免疫学キーワード辞典(第2版)、医学書院 東京(印

刷中) 2001.

2. 学会発表

- 1) Mori M, Higuchi K. Genetic approach to Aging Science in Senescence-Accelerated Mouse (SAM). Japan-USA Workshop on Mouse and Monkey Models for Studying Aging: Cardiovascular Disease and Other Age-related Chronic Disorders. (2000.7) Kyoto .
- 2) Mori M, Toyokuni S, Kondo S, Higuchi K. Spontaneous loss-of-function mutations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) gene in mice. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research. (2000. 10) Kyoto.
- 3) Mori M, Higuchi K. Genetic Approach to Aging Science in Senescence-accelerated mouse (SAM). The Annual Meeting of Federation of the Korean Gerontological Societies and The Fall Conference of the Korean Society for Gerontology, 2000 (2000. 11) Seoul
- 4) 樋口京一: 総論。シンポジウム「老化モデル動物の開発、最前線」第17回日本疾患モデル学会総会 (2000.11) 東京
- 5) 付麗、松山郁生、千葉卓哉、中村明宏、Xing Yanming、郭占軍、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89回日本病理学会総会 (2000.4) 大阪
- 6) 小岸久美子、松下隆壽、是永龍巳、細川昌則、鈴木康弘、樋口京一: マウス老化アミロイド線維形成修飾因子の解析。第89回日本病理学会総会 (2000.4)大阪
- 7) Xing Yanming, 付麗、細川昌則、亀谷富由樹、中村明宏、樋口京一: C type apoA-II Amyloid fibril can accelerate amyloidosis in SAMR1 mice. 第89回日本病理学会総会 (2000.4) 大阪
- 8) 水谷順一、森政之、田中雅嗣、千葉卓哉、樋口京一: 促進老化モデルSAM系マウスのミトコンドリアDNAに特異的な突然変異。第23回日本基礎老化学会総会 (2000.6) 大府
- 9) 是永龍巳、Xing Yanming、森政之、付麗、松下隆壽、倉本和直、朱宮正剛、細川昌則、樋口京一: *Apoa2^o* allele を持つマウスにおける老化アミロイド沈着。第23回日本基礎老化学会総会 (2000.6) 大府
- 10) Xing Yanming、付麗、千葉卓哉、中村明宏、亀谷富由樹、細川昌則、是永龍巳、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。第23回日本基礎老化学会総会 (2000.6) 大府
- 11) 中村明宏、徳田隆彦、亀谷富由樹、池田修一、樋口京一: アミロイド結合蛋白の2次元電気泳動による解析。

第72回日本生化学学会 (2000, 10) 横
浜

I. 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

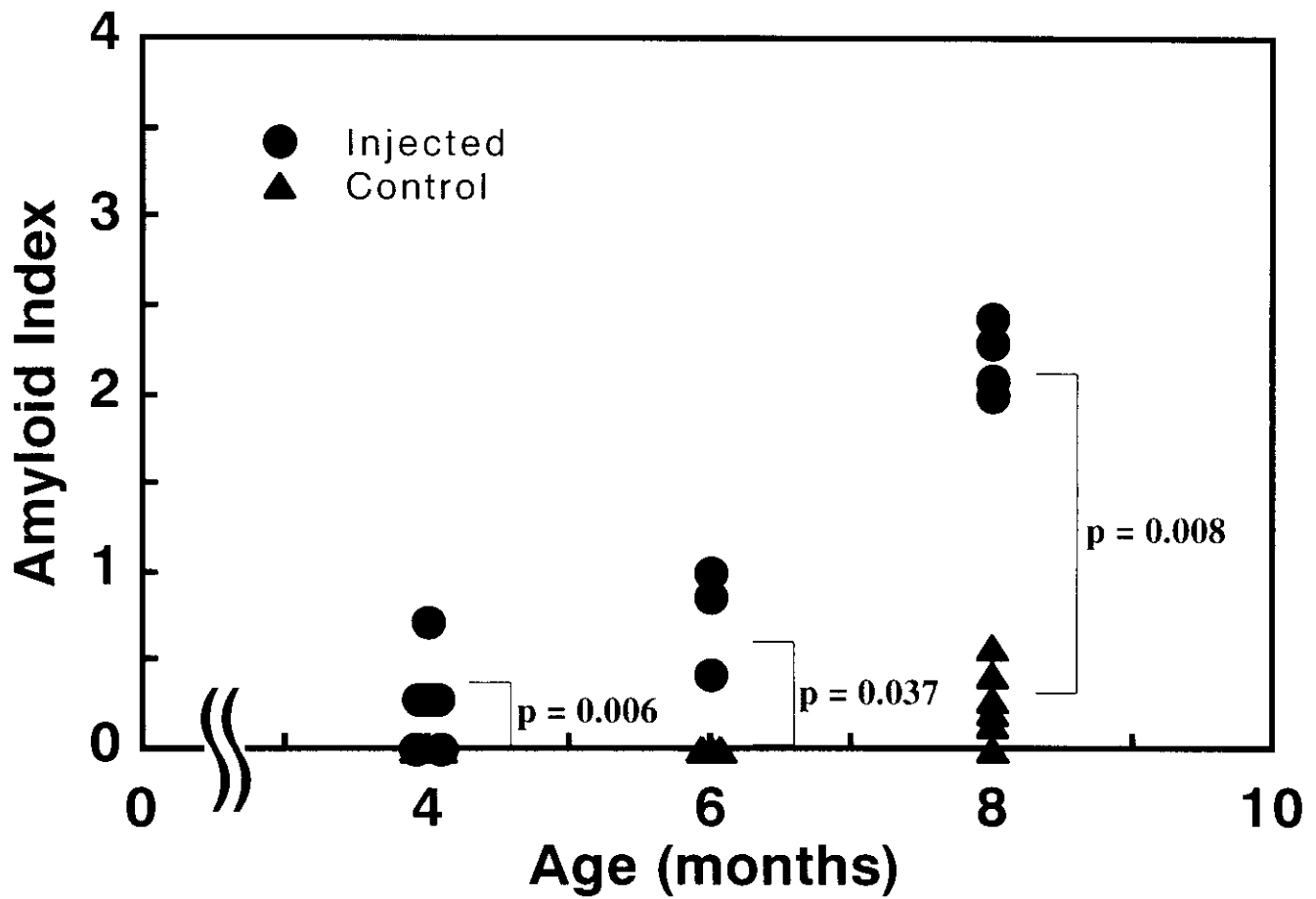


図1 アミロイドーシス発症マウスの仔マウスと非発症マウスの仔マウスの全身のアミロイド沈着レベルの加齢変化

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

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
共同研究者 郭占軍、森政之、是永龍巳、姚俊潔、付笑影、千葉卓哉
信州大学医学部加齢適応研究センター
松下隆壽、細川昌則
京都大学再生医科学研究所再生統御部門

研究要旨 マウスでは加齢に伴い 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 (*Apoa2^C*)を持つマウスでは重篤なアミロイドーシスが若齢より発症する。A/J 系統マウスは C 型 apoA-II を持ちながら SAMP1 と比較して加齢に伴うアミロイドーシス発症が軽度でありアミロイドーシス抑制遺伝子の存在が示唆されている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ヶ月齢で屠殺し、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、全染色体上に 20cM 間隔でマイクロサテライトマーカーを設定し、全 F2 intercross マウスのゲノムタイピングを行った。有意差のあった領域については A/J X F1 backcross マウスのゲノムタイピングを行った。F2 のアミロイド沈着程度(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 A/J X F1 の QTL 解析は D19Mit67 (LRS=12.1)と D4Mit89 (LRS=10.7)で suggestive level での連鎖を示した。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。

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 ヲ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 マウスと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)等の家族性アミロイドーシスにおいては発症年齢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、リバーシ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来た。本年度は 12 ヶ月齢で屠殺した SAMP1 X A/J 交雑マウスのアミロイド沈着とゲノムマッピングを行い量的形質の連鎖解析(QTL)を行った。

B. 研究方法

マウス : AKR/J マウスは日本 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ペ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 intercross; 59 匹), PBc (SAMP1 X F1 backcross; 7 匹), ABc (A/J X F1 backcross; 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、肝臓の一部を 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医学部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。

ゲノムマッピング ; 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た(図 1)。マーカーの多型の解析は 4%アガロース電気泳動で調べた。全 F2 マウスのゲノムタイプングを行い Map Manager QT を用いて連鎖解析を行った。また QTL 領域に存在する幾つかの候補遺伝子について塩基配列を決定し、SAMP1 と A/J マウスで

比較した。

(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、それぞれ京都大学再生医科学研究所と信州大学医学部の動物実験指針に沿って行った。

C. 研究結果

図 2 に各マウス群の 12 ヶ月齢での amyloid index を示した。A/J と SAMP1 マウスには明瞭な差が存在し、F2 は中間、A/J X F1 と SAMP1 X F1backcross はそれぞれ A/J と SAMP1 へ近づいた。しかし F1 マウスは SAMP1 とほぼ等しい沈着程度を示した。京都大学再生研から信州大学への移動の際のマウス組織の損失や炎症等の疾患の発症などから一部のマウスを解析から除外した。最終的にゲノムタイピングを行った F2 intercross マウスは 54 匹、F2 backcross マウスは 76 匹であった。

一部の染色体 (2, 7, 8) を除いて 30 cM 以内の間隔で 87 のマイクロサテライトマーカーを設定し (図 1)、F2 intercross マウスのゲノムタイピングを行い、Map Manager QT を用いて解析した。Amyloid Index と有意な連鎖を認めた遺伝子座を表 1 にまとめた。第 4 染色体のテロメア側に位置するマーカー(D4Mit32, D4Mit13, D4Mit160, D4Mit129, D4Mit33)は高い LRS

を示した。これらの LRS は significant level (LRS>13.2)を大きく上回った。遺伝様式はアミロイド沈着促進に関して劣性を示した。第 19 染色体のテロメア側のマーカー D19Mit67 にも significant level を上回る連鎖が認められた。遺伝様式は相加的効果であった。第 2 染色体上にはアミロイド沈着抑制に優性効果を示す 2 つのマーカー(D2Mit133, D2Mit257)が示された(LRS=11.0, 10.3)。

F2 intercross マウスで有意な連鎖が認められた遺伝子座を中心としてゲノムタイピングを A/J X F1backcross 全マウスで行い、Manager QT を用いて解析した。その結果を表 2 にまとめた。劣性効果を示した D4Mit33 等の領域との連鎖は予想通り認められず、相加的効果が認められた D19Mit67 で suggestive level での連鎖 (LRS=12.1)が確認された。第 4 染色体のセントロメア側の D4Mit89 での suggestive level での連鎖(LRS=10.7)も示された。

D. 考察

アミロドーシスとは本来生理的機能を持つ蛋白質に老化、炎症、癌による過剰生産などの生体変化や、蛋白質の変異 (突然変異、酸化、異性化) によって立体構造の変換がおこり、微細な線維に重合して沈着する病態の総称である。このような特徴からアミロドーシスは蛋白質フォールディング疾患 (protein folding disease) とも呼ばれている⁵⁾。アルツハイマー病での A β 、FAP をはじめとして

ほとんどのアミロイドーシスで発症年齢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、環境要因とともに遺伝的修飾因子の関与が示唆されている。A/J 系統マウスは自然発症アミロイドーシス(AApoAII)や炎症に伴うアミロイドーシス(AA)に抵抗性を示すことが報告されてきた。AA アミロイドーシスでは劣性の単一の抵抗性遺伝子、AApoAII では2つ以上の抵抗性遺伝子を推定している⁶⁾。AApoAII アミロイドーシスの1つの遺伝子はこれまでの我々の研究からアミロイド線維蛋白である apoA-II であることが明らかである²⁾。今回は A/J と同一の apoA-II 遺伝子を持ち、重度のアミロイドーシスを発症する SAMP1 と A/J 間の F2 交雑マウスを作成しアミロイドーシス発症調節遺伝子の解析を行った。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。F2 intercross マウスで最も高い連鎖を示した第4染色体(D4Mit32~D4Mit33)は抵抗性には優性で A/J アリルが1つでもあるとアミロイドーシス発症は軽度である。この領域はヒトの 1q36.1-1q36.3 に相当し、ヘパラン硫酸プロテオグリカンコア蛋白や炎症に関与する分泌型ホスホリパーゼ A2 遺伝子などが存在する。シークエンス解析の結果、A/J マウスでは1塩基挿入突然変異によるフレームシフトが確認され⁷⁾、アミロイドーシス発症との関連が考えられ

る(図3)。この領域の影響を除いて、相加的効果を持つ遺伝子座の調べるために A/J X F1backcross マウスの解析を行った結果、第19染色体 D19Mit67 で suggestive level での連鎖(LRS=12.1)が確認された。この領域はヒト染色体の 1p36.1-1p36.3 に相当する。現在候補遺伝子の検討を行っている。F2 intercross の解析で弱い連鎖が認められた D4Mit89 連鎖が A/J X F1 backcross マウスで確認された(LRS=10.7)。

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(Aβ2M 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。

E. 結論

マウス老化アミロイドーシスを引き起こす C 型 apoA-II を持ちながら発症程度が異なる A/J と SAMP1 系統マウスを用いてアミロイドーシス修飾遺伝子の解明を目指し遺伝解析を行った。複数のアミロイドーシス発症修飾染色体領域が明

らかに、複数遺伝子による調節を受けることが示された。今後は遺伝子の単離を目指しより詳細な解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 引用文献

- 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* 60: 231-239, 1991.
- 2) Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. The Senescence-Accelerated Mouse. *Methods Enzymol* 309: 674-686, 1999.
- 3) Wohlgethan JR, Cathcart ES. Amyloid resistance in A/J mice is determined by a single gene. *Nature* 278: 453-454, 1979
- 4) Higuchi K, Matsumura A, Honma A, Takeshita S, Hashimoto K, Hosokawa M, Yasuhira K, and Takeda T. Systemic senile amyloid in Senescence-Accelerated Mice: A unique fibril protein demonstrated in tissues from various organs by the unlabeled immunoperoxidase method. *Lab Invest* 48: 231-240, 1983.
- 5) Westermark P. The pathogenesis of amyloidosis understanding general

principles. *Am J Pathol* 152: 1125-1127, 1998.

- 6) Chai CK, Lerner C. The inheritance of spontaneous amyloidosis development in mice: a model for hereditary threshold metabolic disorders. *Am J Med Genet* 22: 49-58, 1985.
- 7) Kennedy BP, Payette P, Mudgett J, Vadas P, Pruzanski W, Kwan M, Tang C, Rancourt DE, Cromlish WA. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem* 270: 22378-22385, 1995.

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 strain with accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 118; 35-44. 2000.
- 3) Nishikawa T, Takahashi JA, Matsushita

- T, Ohnishi K, Higuchi K, Hashimoto N, Hosokawa M. Tubular aggregates in the skeletal muscle of the senescence-accelerated mouse; SAM. *Mech Ageing Dev* 114: 89-99, 2000.
- 4) Umezawa M, Takeda T, Kogishi K, Higuchi K, Matsushita T, Wang J, Chiba T, Hosokawa M. Serum lipid concentrations and mean life span are modulated by dietary polyunsaturated fatty acids in the Senescence-accelerated mouse. *J Nutr* 130: 221-227. 2000
- 5) 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.
- 6) Shoji M, Matsushita T, Higuchi K, Honda Y, Hosokawa M. Senile ocular amyloidosis in SAM and BALB/c strains of mice. *Mech Ageing Dev* 120: 87-94, 2000.
- 7) Xing Y, Nakamura A, Chiba, T, Kogishi K, Matsushita T, Li F, Guo Z, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest* 2001 (in press).
- 8) Mori M, Toyokuni S, Kondoh S, Naiki H, Toichi E, Hosokawa M, Higuchi K. Spontaneous loss-of-function mutations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase gene in mice and exploration of the possible implication of the gene in senescence. *Free Rad Biol Med* 2001 (in press).
- 9) Fu L, Matsuyama I, Chiba T, Xing Y, Korenaga T, Guo Z, Nakayama J, Mori M, Higuchi K. Extra-hepatic Expression of Apolipoprotein A-II in Mouse Tissues: Possible Contribution to Mouse Senile Amyloidosis. *J Histochem Cytochem* 2001 (in press).
- 10) Mizutani J. Chiba T, Tanaka M, Higuchi K, Mori M, Unique mutation in mitochondrial DNA of Senescence-Accelerated Mouse (SAM) strains. *J Heredity*, 2000 (in press).
- 11) Higuchi K, Naiki M, Hosokawa M, Takada T. Model of amyloidosis of senescence. Grateuau G, Benson MD, Delpevh M eds *Les Amyloidoses* Flammarion Medicine Science Paris pp138-145, 2000
- 12) 樋口京一。アミロイド線維蛋白質。永田和宏、森正敬、吉田賢右編、分子シャペロンによる細胞機能制御、シュプリンガー・フェアラーク東京 東京 (印刷中 2001).
- 13) 樋口京一、森政之。アミロイドその他。永田和宏編、分子生物学・免疫学キーワード辞典 (第2版)、医学書院 東京 (印刷中) 2001.

2. 学会発表

- 1) Mori M, Higuchi K. Genetic approach to Aging Science in Senescence-Accelerated Mouse (SAM). Japan-USA Workshop on Mouse and Monkey Models for Studying Aging; Cardiovascular Disease and Other Age-related Chronic Disorders. (2000.7) Kyoto .
- 2) Mori M, Toyokuni S, Kondo S, Higuchi K. Spontaneous loss-of-function mutations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) gene in mice. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research. (2000. 10) Kyoto.
- 3) Mori M, Higuchi K. Genetic Approach to Aging Science in Senescence-accelerated mouse (SAM). The Annual Meeting of Federation of the Korean Gerontological Societies and The Fall Conference of the Korean Society for Gerontology, 2000 (2000. 11) Seoul
- 4) 樋口京一：総論。シンポジウム「老化モデル動物の開発、最前線」第17回日本疾患モデル学会総会 (2000.11) 東京
- 5) 付麗、松山郁生、千葉卓哉、中村明宏、Xing Yanming、郭占軍、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 89 回日本病理学会総会 (2000.4) 大阪
- 6) 小岸久美子、松下降壽、是永龍巳、細川昌則、鈴木康弘、樋口京一：マウス老化アミロイド線維形成修飾因子の解析。第 89 回日本病理学会総会 (2000.4)大阪
- 7) Xing Yanming, 付麗、細川昌則、亀谷富由樹、中村明宏、樋口京一：C type apoA-II Amyloid fibril can accelerate amyloidosis in SAMR1 mice. 第 89 回日本病理学会総会 (2000.4) 大阪
- 8) 水谷順一、森政之、田中雅嗣、千葉卓哉、樋口京一：促進老化モデル SAM 系マウスのミトコンドリア DNA に特異的な突然変異。第 23 回 日本基礎老化学会総会 (2000.6) 大府
- 9) 是永龍巳、Xing Yanming、森政之、付麗、松下降壽、倉本和直、朱宮正剛、細川昌則、樋口京一：Apoa2^a allele を持つマウスにおける老化アミロイド沈着。第 23 回 日本基礎老化学会総会 (2000.6) 大府
- 10) Xing Yanming, 付麗、千葉卓哉、中村明宏、亀谷富由樹、細川昌則、是永龍巳、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。第 23 回 日本基礎老化学会総会 (2000.6) 大府
- 11) 中村明宏、徳田隆彦、亀谷富由樹、池田修一、樋口京一：アミロイド結合蛋白の 2 次元電気泳動による解析。第 72 回日本生化学会 (2000, 10) 横浜

1. 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

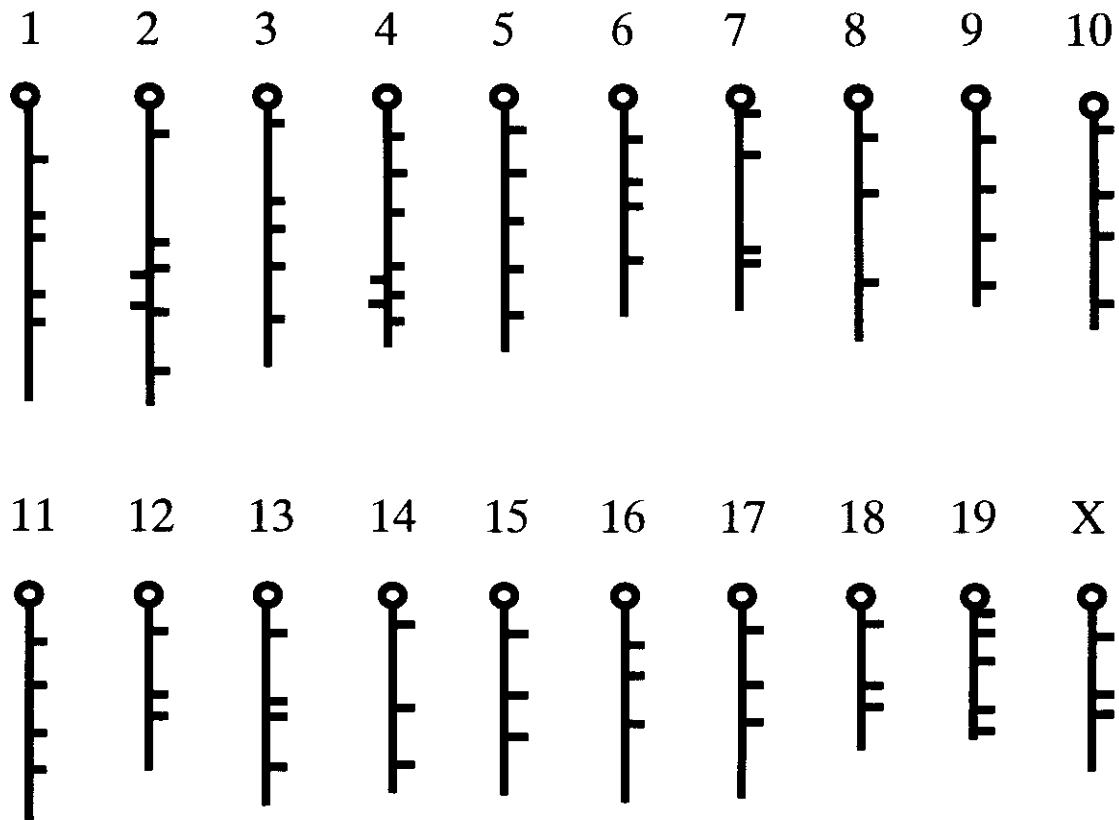


図1. ゲノムタイピングに用いられたマイクロサテライトマーカー
○はセントロメアー、数字は染色体番号を示す。

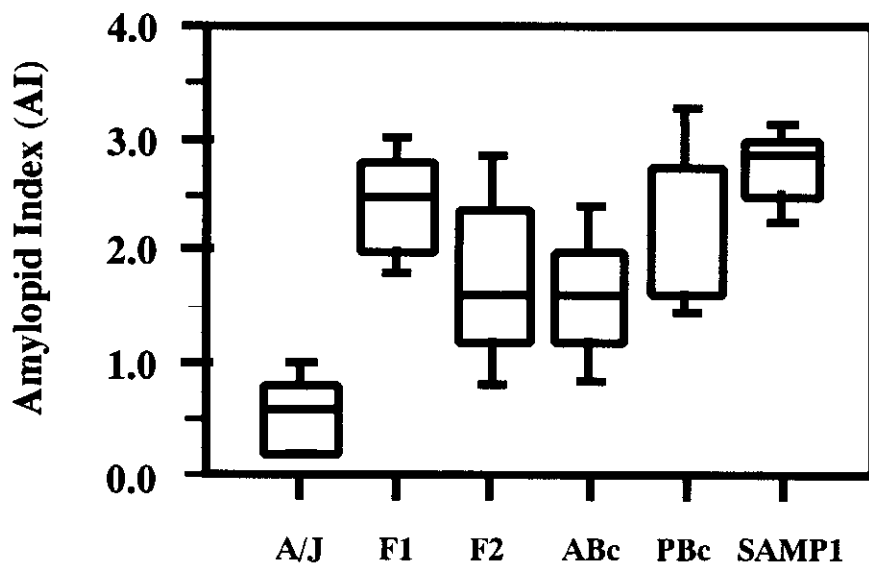


図2. 各マウス群におけるアミロイド沈着程度(Amyloid Index)
F1; A/J X SAMP1, F2; F1 X F1, ABc; A/J X F1, PBc; SAMP1 X F1。
図中の線は上からそれぞれ90, 75, 50, 25, 10パーセンタイルを示す。

表1 F2インタークロスマウスにおいてアミロイドーシス発症に影響を与える遺伝子座のまとめ

Locus	Position	LRS*	mode	meanAI(PP)	mean AI(H)	meanAI(AA)
D2Mit295	17cM	8.0	additive ↓	1.48(n=15)	1.667(n=21)	2.156(n=18)
D2Mit133	66.8cM	11.0	dominant ↓	1.552(n=21)	1.728(n=25)	2.525(n=8)
D2Mit309	71.0cM	7.5	dominant ↓	1.74(n=10)	1.634(n=35)	2.378(n=9)
D2Mit258	78.0cM	10.3	dominant ↓	1.664(n=22)	1.638(n=24)	2.525(n=8)
D2Mit257	75.0cM	10.3	dominant ↓	1.664(n=22)	1.638(n=24)	2.525(n=8)
D2Mit227	98.0cM	4.0	dominant ↓	1.711(n=9)	1.674(n=35)	2.2(n=10)
D4Mit89	18.9cM	6.7	additive ↑	2.03(n=20)	1.767(n=24)	1.3(n=10)
D4Mit32	69.8cM	16.4	recessive ↑	2.414(n=14)	1.594(n=33)	1.371(n=7)
D4Mit13	71.0cM	22.6	recessive ↑	2.554(n=13)	1.545(n=33)	1.475(n=8)
D4Mit160	76.0cM	26.6	recessive ↑	2.65(n=12)	1.541(n=34)	1.475(n=8)
D4Mit129	76.6cM	27.6	recessive ↑	2.65(n=12)	1.475(n=32)	1.7(n=10)
D4Mit33	79.0cM	31.3	recessive ↑	2.667(n=12)	1.414(n=29)	1.769(n=13)
D5Mit80	26.0cM	4.1	additive ↑	2.108(n=17)	1.758(n=19)	1.553(n=15)
D19Mit69	6.0cM	4.9	additive ↑	2.15(n=12)	1.731(n=26)	1.514(n=14)
D19Mit16	15.0cM	4.0	additive ↑	2.091(n=11)	1.793(n=27)	1.573(n=15)
D19Mit67	43.0cM	11.5	additive ↑	2.229(n=14)	1.731(n=32)	1.175(n=8)
D19Mit2	51.0cM	7.3	recessive ↑	2.188(n=16)	1.643(n=28)	1.5(n=10)

*when significant association was detected with more than two models at the same locus, the one with highest LRS was adopted.

表2 F2バッククロスマウスにおいてアミロイドーシス発症に影響を与える遺伝子座のまとめ

Locus	Position	LRS*	mode	meanAI(PP)	mean AI(H)	meanAI(AA)
D4Mit89	18.9cM	10.7	additive ↑		1.781(n=42)	1.331(n=32)
D19Mit67	43.0cM	12.1	additive ↑		1.828(n=36)	1.365(n=40)
D19Mit69	6.0cM	5.3	additive ↑		1.738(n=42)	1.419(n=32)
DXMit79	50.0cM	4.8	additive ↑	1.75(n=20)	1.631(n=32)	1.343(n=21)

*when significant association was detected with more than two models at the same locus, the one with highest LRS was adopted.

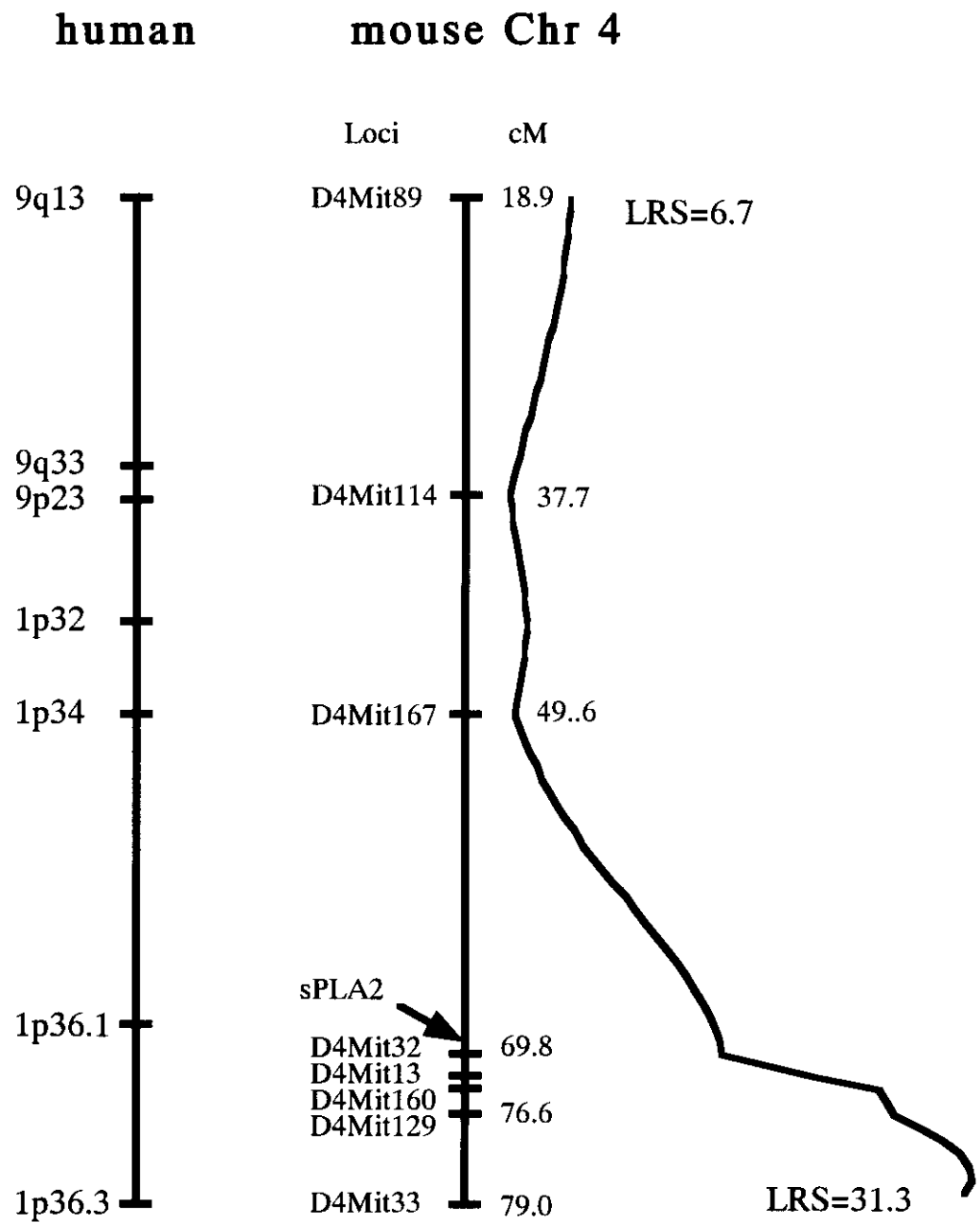


図3 第4染色体のインターバルマップとヒト染色体の相同領域

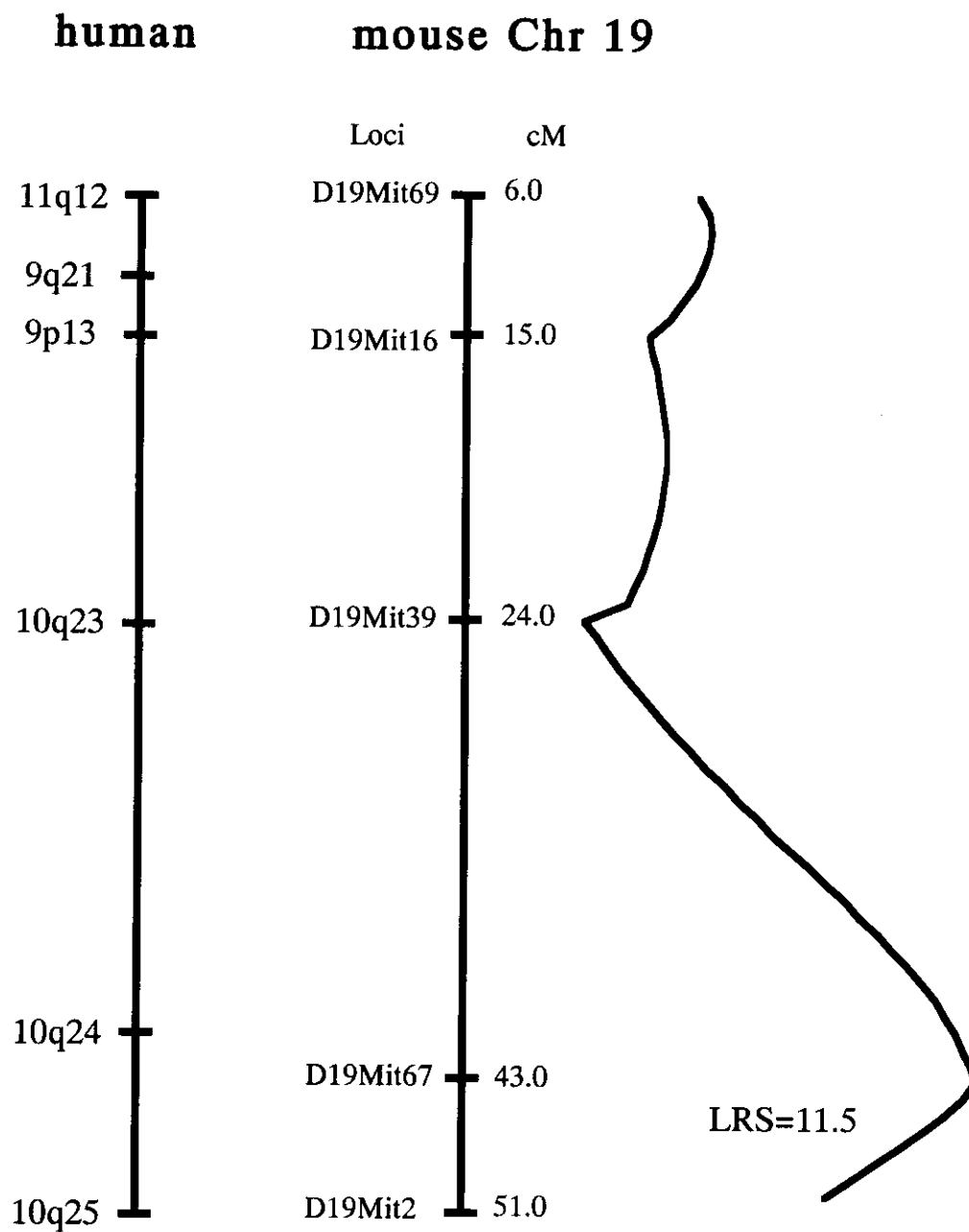


図4 第19染色体のインターバルマップとヒト染色体の相同領域

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

マウス老化アミロイドーシスの病理組織学的解析

分担研究者 細川昌則 京都大学再生医科学研究所助教授
共同研究者 松下隆寿、池田容子、小岸久美子
京都大学再生医科学研究所
樋口京一
信州大学医学部加齢適応研究センター
西村正彦
名古屋大学医学部附属動物実験施設

研究要旨 本研究では、アミロイド症の発症を抑制する遺伝子の探索に向けて、（１）マウス老化アミロイドーシス誘発感受性の遺伝的背景の探索、（２）マウス老化アミロイドの眼組織への沈着の系統差に関する研究を行った。また遺伝的背景を解析するための基本になる、形質の評価法について病理組織学の立場より検討した。今回の実験によりアミロイドーシス誘発への感受性には、マウス老化アミロイドーシス自然発症の主要因子である apoA-II 蛋白質の変異型が関わり、さらに感受性を制御する複数の遺伝子座が存在することが示唆された。

アミロイドーシス誘発感受性の遺伝的背景の探索

A. 研究目的

マウス老化アミロイドーシスは、血清高密度リポ蛋白質 HDL 中のアポ蛋白質 apoA-II が、アミロイド細線維を形成し、血管壁を中心に全身広く沈着することにより発症する。マウス老化アミロイドーシスは、老化促進モデルマウス SAMPl 系統において樋口らにより初めて明らか

にされたが¹⁾、近交系マウス各系統に広く分布すること、各近交系マウスの発症頻度、発症月齢、重篤度には系統差があり、その発症を制御する主要因子は、apoA-II 蛋白質の変異体の型 (A,B,C 型) であることが明らかにされた²⁾。しかしその後、C型 apoA-II 蛋白質を持つ、老化アミロイドーシス好発系マウスにおいても、発症にはかなり系統差が存在し、apoA-II 蛋白質の変異以外にも、マウス

老化アミロイドーシスの発症を制御する遺伝的要因が存在することが示唆されていた³⁾。本研究では3種の apoA-II 蛋白質変異体を持つ、SAM系統群を用いて、精製 AApoAII アミロイド細線維核による誘発実験にたいする感受性の系統差の有無の確認と、その遺伝的背景の考察を行った。

B. 研究方法

動物：マウス老化アミロイドーシス好発系統；C型 apoA-II；SAMP1 (6匹)、SAMP2 (8匹)、SAMP7 (7匹)、SAMP10 (6匹)、アミロイド嫌発系統；B型 apoA-II；SAMR1 (8匹)、SAMR4 (7匹)、SAMP6 (8匹)、中間系統；A型 apoA-II；SAMP3 (8匹)、SAMP8 (8匹)の雄マウスを用いた。マウスはコンベンショナル条件下、 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $50 \pm 10\%$ 湿度、市販飼料 (CE-2；日本クレア)、水道水自由摂取で飼育した。

老化アミロイドーシスの誘発：10週齢マウスの尾静脈に精製 AApoAII 細線維を1mg/mlの濃度に蒸留水に懸濁したものをアミロイド細線維核として0.1ml 1回注入した。12週後マウスをエーテルにて深麻酔下に脱血屠殺し、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、腹部皮膚、舌、胃、小腸各臓器を摘出した。

組織学的検討：各臓器は10%中性ホルマリン液で1週間固定後、脱水、パラフィン包埋し、6 μm 切片を作製した。薄切組織はコンゴ赤染色し (Puchtler法

松下変法)、偏光顕微鏡下にアミロイド沈着の有無を判定した。アミロイド沈着の半定量的評価には、アミロイド指標 (Amyloid Index)⁴⁾を用いた。

(倫理面への配慮)

実験に供したマウスは飼育環境が良好になるように、また屠殺に際しては苦痛が最少限になるように配慮した。実験は京都大学再生医科学研究所動物実験実施要項に沿って計画し、京都大学再生医科学研究所動物実験計画書審査委員会において承認されたものである。

C. 研究結果

SAM各系統間のアミロイド沈着の頻度の差を表1に示す。

表1. SAM各系統のアミロイド沈着の頻度

系統	肝臓	脾臓	心臓	皮膚	舌	胃	小腸
P1	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
P2	8/8	4/8	8/8	6/8	8/8	8/8	8/8
P7	7/7	4/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
P10	6/6	5/6	6/6	0/6	6/6	6/6	6/6
R1	1/8	1/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
R4	1/7	1/7	1/7	0/7	1/7	1/7	1/7
P6	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
P8	4/8	0/8	1/8	0/8	8/8	8/8	8/8
P3	0/8	0/8	0/8	1/8	8/8	7/7	7/7

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。同じ高感受性群においても、SAMP10 系統マウスの皮膚のように、系統特異的な非沈着臓器が存在した。中間群は全臓器において中等度の頻度を示すのではなく、舌、胃、小腸への沈着頻度が高く、それ以外の臓器は低いという2相性をしめした。低感受性群ではすべての臓器で頻度が低かった。SAMR1、SAMR4 系統の各1匹の陽性例は、トリプトファン反応陽性で、皮膚潰瘍をみとめ、炎症による二次的なAA蛋白質の沈着が示唆された。

表2に同じC型のapoA-IIを有するSAMP1、およびSAMP2系統マウスの各臓器へのアミロイド沈着の程度をアミロイド指標(A.I.)の評点で示す。

表2. SAMP1, SAMP2 マウス
各臓器へのアミロイド沈着の程度

	SAMP1	SAMP2
肝臓	3.0±0.0	2.9±0.4
心臓	3.0±0.0	2.5±0.8
脾臓	1.2±0.4	0.5±0.5
皮膚	1.8±0.4	1.0±0.8
舌	4.0±0.0	3.4±0.5
胃	3.0±0.0	2.4±0.5
小腸	3.0±0.0	3.0±0.0
A. I.	2.72±0.10	2.23±0.27

臓器により、また総合的なアミロイド指標においても、SAMP2マウスの方が沈着の程度が軽度であった。

アミロイド沈着の組織学的評価方法の検討を行った。検討には発症頻度が高く、定量化しやすい舌標本を用いた。マウス

としては、本総合研究において西村らの実験に用いられた、C型のapoA-IIを共通に持つ、SMXAリコンビナント近交系統11系統について行った。

評価法1: 舌2次乳頭部粘膜固有層において、沈着乳頭部/総乳頭部を計測した。

評価法2: 樋口等によるアミロイド指標(Amyloid Index)⁴⁾の舌の評価基準を用いた。

評価法3: 新たに以下の評価法を設けた。

Grade 0: no amyloid found
Grade 1: amyloid deposits in a few secondary papillae
Grade 3: amyloid deposits in secondary papillae
Grade 4: amyloid deposition extends to lamina propria
Grade 5: amyloid deposition extends into muscle layers

表3. SMXA各系統舌組織へのアミロイド沈着の程度

系 統	評価法 1	系 統	評価法 2	系 統	評価法 3
9	0.419	9	2.92	9	1.29
19	0.495	18	3.00	19	1.75
18	0.560	19	3.00	4	2.00
4	0.720	4	3.00	25	2.00
12	0.721	14	3.30	18	2.17
14	0.728	12	3.40	14	2.45
16	0.777	16	3.50	12	2.50
17	0.780	17	3.50	16	2.60
10	0.830	10	3.71	17	2.92
24	0.881	24	4.00	24	3.00
25	0.891	25	4.00	10	3.14

これまでの評価との整合性ならびに再現性の点からみて、評価に時間がかかるが、評価方法1が適当と考えられる。

D. 考察

以上のように、アミロイド細線維核によるアミロイドーシス誘発への感受性には系統差が認められ、遺伝的背景が関与することが示された。その中で apoA-II 蛋白質の型は主要な因子になると考えられた。さらに同じ C 型 apoA-II を持つ系統間においても、SAMP1、SAMP2 マウスの 7 臓器への沈着程度ならびに、SMXA RI 系統間の舌組織への沈着程度には違いが認められ、アミロイドーシス誘発への感受性について、複数の制御遺伝子座が存在することが明らかになった。

腎臓組織へのアミロイドの沈着は、腎乳頭先端部にわずかに認められることが多かった。この部分を組織学的に観察することは、通常の薄切方法では困難であり、ルーチンの方法として腎組織を含めることは不適當であると判断された。

マウス老年性アミロイドの眼組織への沈着について

A. 研究目的

SAMP1、SAMR1、BALB/c 系統マウスは加齢に伴い、光受容体細胞、網膜神経節細胞の脱落をともなった、網膜萎縮を示す。これらの系統に加齢とともに沈着する老化アミロイド蛋白質 AApoAII は、全身組織の細胞間、特に血管壁に沈着する。従って網膜栄養血管ならびに脈絡膜血管へのアミロイド蛋白質の沈着は、網膜萎縮の原因に成りうると考えられる。一方アルツハイマー病の発症に係る

β アミロイド前駆蛋白質は網膜にも存在し、光受容体細胞にたいする細胞毒性を有することが知られている。このような背景をふまえて、マウス網膜組織の老化に伴うアミロイド蛋白質の沈着の有無を組織学的に検討した。

B. 研究方法

動物：マウス老化アミロイドーシス好発系 SAMP1 雄マウス（2、6、8、11-15 カ月齢）、嫌発系 SAMR1、BALB/c 雄マウス（3、6、9、12、18、24 カ月齢）を用いた。

病理組織学：マウスをエーテルにて深麻酔下に脱血屠殺し、眼組織を摘出し、オルト液で 24 時間、10% 中性フォルマリン液で 24 時間固定後、脱水、パラフィン包埋し、6 μ m 切片を作製した。薄切組織はコンゴ赤染色し、偏光顕微鏡下にアミロイド沈着の有無を判定した。さらに 4 μ m 連続切片を作製し、抗 AApoAII 抗体、抗 AA（アミロイド A 蛋白質）抗体、ABC キットを用いて、沈着アミロイド蛋白質の同定を免疫組織化学を用いて行った。

（倫理面への配慮）

実験に供したマウスは飼育環境が良好になるように、また屠殺に際しては苦痛が最少限になるように配慮した。実験は京都大学再生医科学研究所動物実験実施要項に沿って計画し、京都大学再生医科学研究所動物実験計画書審査委員会において承認されたものである。