

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## Apoa2<sup>a</sup> allele を持つマウスにおけるアミロイド沈着

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脈管病態

共同研究者 是永龍巳\*、森 政之\*、付 笑影\*、松下隆壽\*\*、細川昌則\*\*

\*信州大学医学部附属加齢適応研究センター脈管病態、

\*\*京都大学再生医科学研究所再生統御

**研究要旨** A型 apo A-II を有する BDF<sub>1</sub> マウスに重度な老化 AApoAII アミロイドーシスを見出し、そのアミロイド線維の性質・構造の解析を行った。BDF<sub>1</sub> より抽出した A 型 AApoAII の構造は、C 型 AApoAII と比較してより微細な線維構造であり、それと関連してチオフラビン T との親和性が弱いことを見出した。A 型 AApoAII は *in vitro* における線維伸長反応での線維核としての作用は見られなかったが、マウスに投与すると投与後 3 ヶ月より舌、消化管、皮膚、心臓にアミロイド沈着を認め、アミロイドーシスの促進効果を有することが判明した。このような微細な線維の沈着あるいはアミロイドーシス誘導は、アミロイド線維形成における protofibril 等のアミロイド線維前駆体の重要性を示す上で大変興味深い知見であると考えられる。

### A. 研究目的

現在までに 20 種類以上のアミロイドーシスが報告されている。このうち、マウス老化アミロイドーシスでは HDL のアポタンパク質である apo A-II がアミロイド線維化した AApoAII が全身に沈着することが知られている。apo A-II には A 型、B 型、C 型の 3 種類の多形が存在するが、これまでに、重度なアミロイド沈着が認められている例は、全て C 型(P 5 Q, D 20 E, M 26 V) apo A-II を有する場合であり、A 型 apo A-II を有するマウスでは沈着がみられる場合でも軽度であった。しかし、今回我々は A 型 apo A-II を有し、正常老化を示すマウスである BDF<sub>1</sub> マウスに重度なアミロイド沈着を見出した。A 型 apo A-II はアミロイド線維を形成しにくいと考えられていた

にもかかわらず、重度なアミロイドーシスが見い出されたことは興味深く、そのアミロイド線維の特徴及び性質の解明はアミロイド線維形成反応機構の解明において極めて重要であると考えられる。アミロイド線維形成機構の解明はアミロイドーシスの治療の点で重要な課題である。このような観点から、今回 A 型 AApoAII の線維構造及び性質について検討した。

### B. 研究方法

東京都老人総合研究所 (SPF 環境下) で飼育された BDF<sub>1</sub> 及び C57BL/6 マウスの全身 (脳、舌、肺、心臓、肝臓、脾臓、胃、腸、腎臓、皮膚、精巣) のアミロイド沈着を免疫組織化学的手法を用いて確認し、アミロイド沈着レベルの指標であ

る Amyloid Index を求め、アミロイド沈着と加齢との関係を解析した。老齢 BDF<sub>1</sub> (29~31 ヶ月齢)及び対照として C 型 apo A-II を有する R1.P1- *Apoa2*<sup>a</sup> より *Pras* の方法によりアミロイド線維を抽出した。SDS-PAGE を行い、クマシーブリリアントブルー(CBB)染色及び Western blotting によってアミロイド蛋白質を同定した。老齢 BDF<sub>1</sub> の腸管、R1.P1-*Apoa2*<sup>a</sup> の腸管および肝臓から得られたアミロイド線維について、透過型電子顕微鏡(TEM)及び原子間力顕微鏡(AFM)を用いて線維構造を比較した。また、アミロイド線維と特異的に結合することが知られている蛍光試薬チオフラビンT(ThT)と AApoAII との親和性を調べた。さらに、抽出したアミロイド線維を線維核として用い、試験管内線維形成能を検討した。

さらに、A 型 apo A-II を有する 2 ヶ月齢マウスにこれらのアミロイド線維を尾静脈投与(0.1mg/ml)し AApoAII 沈着誘導能の有無について検討した。

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

老齢 BDF<sub>1</sub> (25-31 ヶ月齢)及び C57BL/6 (24 ヶ月齢)において、消化管、舌、心臓、皮膚に重度なアミロイド沈着が確認された。しかし、R1.P1- *Apoa2*<sup>a</sup> とは異なり肝臓及び脾臓には沈着が認められなかった。図1にはBDF<sub>1</sub>における月齢とアミロイド沈着レベルの関係を示した。抽出したアミロイド線維の電気泳動の結果から、沈

着しているアミロイドは AApoAII であることが示された。TEM 及び AFM による観察結果から、A 型 AApoAII 線維は C 型 AApoAII (直径~10nm) よりも微細な線維(直径~2nm)であることが判明した(図2)。A 型 AApoAII と ThT との親和性は C 型 AApoAII のそれよりも著しく弱いことが示された。また、A 型 AApoAII を線維核として試験管内で線維伸長反応を試みたが線維伸長は認められなかった。

A 型 apo A-II を有するマウスに A 型 AApoAII 線維を投与した結果、投与後 3 ヶ月で舌、消化管、皮膚、心臓にアミロイド沈着が認められ、6 ヶ月後には肝臓、脾臓にも拡大するとともに沈着が重度化した。さらに 9 ヶ月後には沈着がより重度化した。C 型 AApoAII の投与によっても、AApoAII アミロイドーシスは誘導されたが、沈着レベルは A 型 AApoAII 投与の場合よりも軽度であった。

### D. 考察

従来、沈着が軽度と考えられていたマウス A 型 AApoAII の重度な沈着が明らかになった。A 型 AApoAII の線維構造、性質及び沈着臓器は C 型 AApoAII とは異なることが認められ、これらの相違はアミノ酸置換に由来する可能性が考えられる。また、この線維構造の相違が ThT とアミロイド線維との親和性の相違に影響を与えている可能性が考えられる。

A 型 AApoAII は C 型 AApoAII と比較して微細な線維構造ではあるが、尾静脈投与によってアミロイド沈着が促進されることから、アミロイドーシス誘導能を有することが示される。

このような微細な線維の存在あるいはアミロイドーシス誘導は、近年、アミロイド線維形成において指摘されている protofibril 等のアミロイド線維前駆体の重要性和併せて、大変興味深い知見であると

考えられる。

#### E. 結論

マウス A 型 AApoAII の重度な沈着が見出し、A 型 AApoAII アミロイド線維と C 型 AApoAII 線維との相違点が明らかになった。アミロイド線維形成における protofibril 等のアミロイド線維前駆体の重要性を示す興味深い知見が得られたと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 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 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).

##### 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<sup>d</sup> 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
- 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

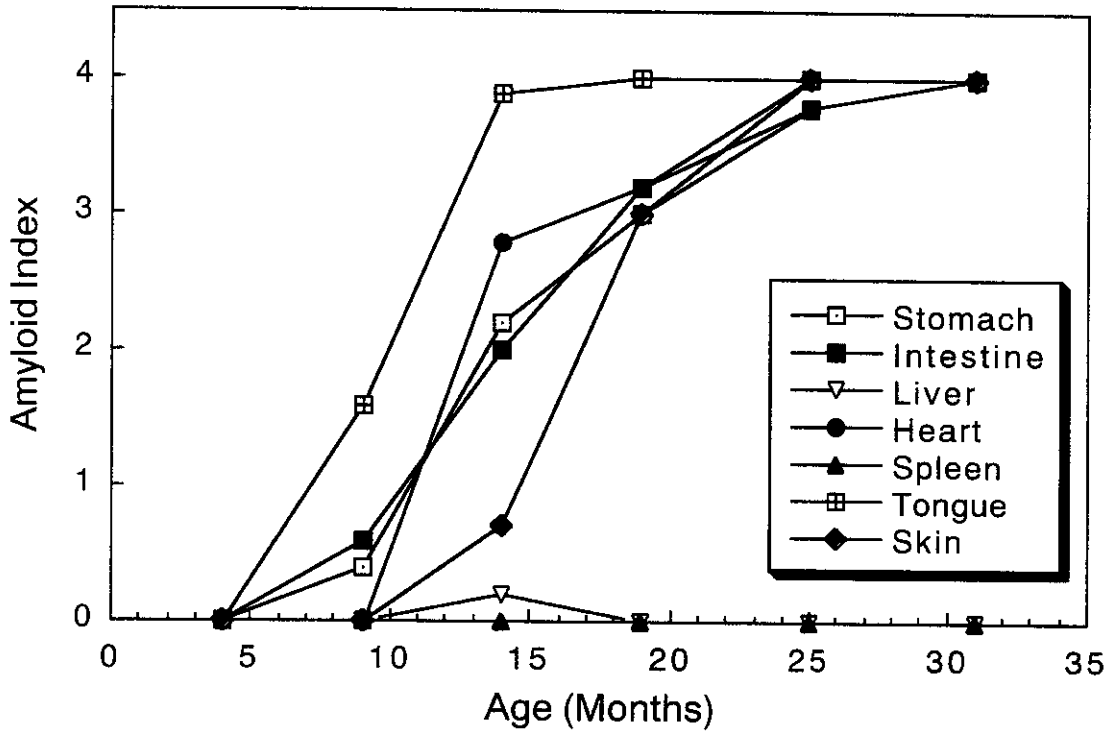


図1 BDF<sub>1</sub>における加齢とアミロイド沈着レベルの関係

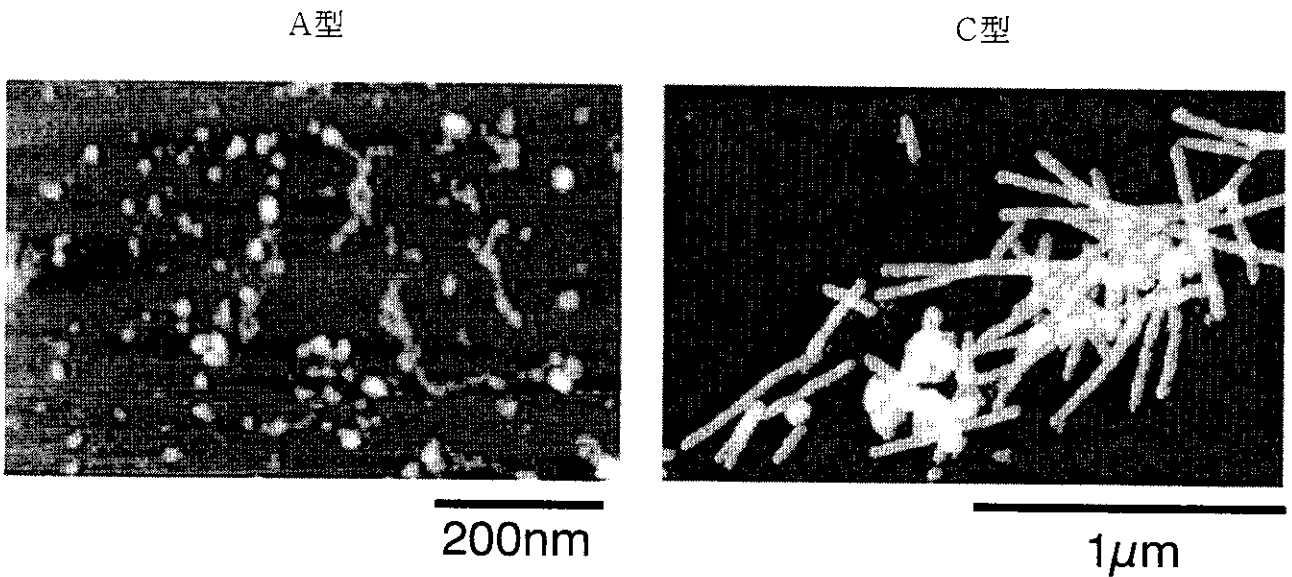


図2 AApoAIIアミロイド線維の構造(AFM画像)

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## 種を超えたアミロイドーシス誘導の可能性； マウスモデルを用いた解析

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脈管病態

共同研究者 是永龍巳\*、付 笑影\*、松下隆壽\*\*、細川昌則\*\*、馬場 聡\*\*\*、  
内木宏延\*\*\*\*、石原得博\*\*\*\*\*

\*信州大学医学部附属加齢適応研究センター脈管病態、

\*\*京都大学再生医科学研究所再生統御、

\*\*\*浜松医科大学第二病理、

\*\*\*\*福井医科大学第二病理、\*\*\*\*\*山口大学医学部第一病理

**研究要旨** アミロイドーシスの伝播における蛋白質構造伝播についてマウス老化アミロイドーシスの実験系で検証した。AApoAII 好発系 R1.P1-*Apoa2*<sup>g</sup> マウスにヒト及びマウスの各種のアミロイド線維を投与すると、投与線維によって差が見られたが、投与後3ヶ月より舌及び消化管に顕著なアミロイド沈着を認めた。病理学的及び生化学的解析から、投与したアミロイド線維がマウス AApoAII の沈着を誘導したことが示された。この結果は、アミロイド蛋白質の一次構造のみならず、共通したアミロイド線維構造の存在が AApoAII 線維形成を促進する可能性を示すものと考えられる。

### A. 研究目的

現在までに20種類以上のアミロイドが報告されているが、これらには共通の線維形成機構が存在すると考えられている。近年注目されているクロイツフェルトヤコブ病(CJD)及びウシ狂牛病(BSE)ではその伝播機構として核形成依存性重合反応(nucleation dependent polymerization model)が考えられているが、その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モデルが成立するのか、成立するならば伝播の可能性についての解明はアミロイドーシス克

服のために重要な課題と考えられる。

マウス老化アミロイドーシスでは apo A-II が会合・線維化した AApoAII が全身に沈着する。我々はこれまでに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、微量のアミロイド線維(AApoAII)の投与によりアミロイド沈着が著しく促進されることを見出し、アミロイドーシスの伝播が示唆される。

一方、CJD等のプリオン病では種を越えた感染例の報告があり、プリオン伝播において共通した線維構造の重要性が示唆される。このような動物種を越えた蛋白質構

造伝播がアミロイドーシスでも成立するかを解析するため(図1)、ヒト及びマウスの各種のアミロイド線維をC型aopoA-IIを持ちAApoAII好発系であるR1.P1-*Apoa2*<sup>o</sup>マウスに投与し、AApoAII沈着誘導能について検討した。

## B. 研究方法

ヒトAA, ATTR, AL(2種), Aβ2M, 及びマウスAA, AApoAIIをPrasの方法によって抽出しさらに超遠心分離法で精製した。また合成Aβ<sub>1-40</sub>ペプチドからアミロイド線維を作成した。2ヶ月齢のR1.P1-*Apoa2*<sup>o</sup>マウスにこれらのアミロイド線維を静注(0.1mg)した。また、対照としてアミロイド線維構造を持たない精製ヒトアルブミンとヒトトランスサイレチンを投与した。3ヶ月及び6ヶ月経過後に全身のアミロイド沈着をコンゴレッド及び免疫染色によって確認し、アミロイド沈着レベルの指標であるAmyloid Indexを求めた。沈着したアミロイド線維を抽出しWestern Blotting法でアミロイド蛋白質を同定した。

投与した線維の代謝を確認するために、ヒトAA線維を2ヶ月齢R1.P1-*Apoa2*<sup>o</sup>マウスに静注(0.2mg)し、投与7日後より全身諸臓器からアミロイド線維を抽出し、Western Blotting法でアミロイド蛋白質を同定した。

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

AApoAIIアミロイドーシスを最も強く

誘導したのは、R1.P1-*Apoa2*<sup>o</sup>マウスに沈着するアミロイドであるC型AApoAIIを投与した場合であった。沈着レベルはC型AApoAII投与より軽度であるが、ヒトアミロイド線維投与では、AL(λ)-2とAβ2Mを除き投与後3ヶ月で舌、消化管に軽度な沈着が確認され、6ヶ月後に沈着が重篤化するとともに、肝臓、脾臓、心臓にも沈着が拡大した。AL(λ)-2、及びAβ2M投与マウスでは投与後3ヶ月ではアミロイド沈着は殆ど観察されなかった。AL(λ)-2投与マウスでは投与後6ヶ月において肺、舌及び消化管に軽度な沈着が確認され、Aβ2Mでは肺、肝臓、脾臓、心臓、舌及び消化管にアミロイド沈着が見られた。これらの結果に対し非投与群ではアミロイド沈着が認められなかった。また、ヒトアルブミン投与群及びヒトトランスサイレチン投与群についても、投与後3ヶ月ではアミロイド沈着が認められなかった。(図2)

投与後3ヶ月の舌及び小腸の免疫組織化学的解析の結果、AApoAII沈着部位に投与線維(AA, ATTR)の存在が認められ、抽出したアミロイド線維画分中にもAApoAIIと共に投与アミロイド線維が微量検出された。各組織から抽出したアミロイド線維画分のWestern Blottingの結果、尾静脈から投与したヒトAAアミロイド線維はまず肺に集積し(投与後1週)、その後、舌や消化管に集積が認められた。その一方で、AApoAII線維は肺(4週)から検出され、その後舌(8週)及び消化管(12週)でも検出された。

## D. 考察

今回、種々のヒト及びマウスアミロイド線維の投与によるマウスAApoAII沈着の促進を示すことに成功した。また、免疫組織化学的及び生化学的解析の結果、投与したアミロイド線維が沈着臓器・部位で

AApoAII 沈着を誘導したことが示唆された。これらの結果は、アミロイドーシス伝播において、アミロイド蛋白質の一次構造だけではなく高次構造（線維構造）の重要性をも示唆するものである。

#### E. 結論

アミロイド線維形成においては、アミロイド蛋白質の一次構造のみならず共通するアミロイド線維構造の存在が線維形成を促進する可能性が示唆される。

#### F. 健康危険情報

アミロイドーシス発症にアミロイド線維様物質の外部からの侵襲が関与する可能性が考えられる。

#### G. 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).
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<sup>o</sup> 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
- 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

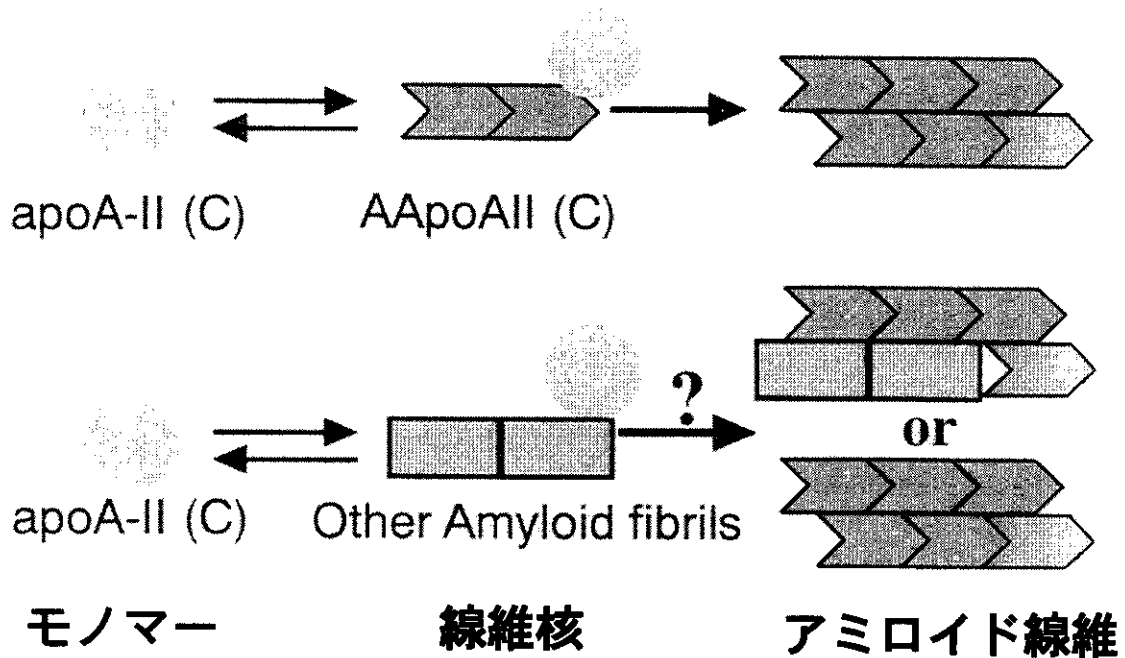


図1 線維核依存型線維伸長反応のモデル図

表1

アミロイド線維等の投与によるアミロイドーシス誘導 (R1.P1-Apoa2<sup>c</sup>)

Protein	Source	Amyloid Index	
		3 months	6 months
Amyloid fibrils			
AApoAII	mouse	2.2	3.3
AA	mouse	0.2	2.2
Aβ <sub>1-40</sub>	synthesized	0.7	1.7*
AA	human	0.8	2.2
ATTR(V30M)	human	0.4	1.6
AL(λ)1	human	0.6	1.5
AL(λ)2	human	0.0	0.7
Aβ <sub>2 M</sub>	human	0.1	1.4
Control			
Albumin	human	0.0	
TTR	human	0.0	
DW		0.0	0.0

\* 12 months

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## 食事脂肪による老化アミロイドーシスの制御 —老化促進モデルマウス (SAM) を用いて—

分担研究者 樋口京一 信州大学医学部加齢適応研究センター脈管病態分野

共同研究者 梅澤眞樹子\*、松下隆寿\*\*、細川昌則\*\*

\* 甲子園大学栄養学部、

\*\*京都大学再生医科学研究所再生誘導研究分野

**研究要旨** 加齢にともなう老化アミロイドーシスを発症する SAMP1 マウスを3群に分け、食餌脂肪としてバター、ベニバナ油、魚油を各々投与したところ、高齢期で魚油投与群は血清中総コレステロールが他の2群より有意に低下し、HDL コレステロールおよびアミロイドの前駆体である ApoA-II蛋白も激減した。さらに HDL 粒子の size 低下が認められた。臓器へのアミロイド沈着程度は、魚油投与群がベニバナ油投与群のおよそ4倍となり、アミロイド沈着の亢進が認められた。以上の結果から、魚油による血清脂質の低下作用が、HDL 代謝に影響し、ApoA-IIの代謝亢進を促した可能性を示唆した。

### A. 研究目的

老化促進モデルマウス SAMP1 の加齢にともなう沈着する老化アミロイドは HDL の ApoA-II蛋白であることが分かっている。食事脂肪でも動物性食品に多く含まれる飽和脂肪酸は高コレステロール血症をまねき、植物性食品に多く含まれる不飽和脂肪酸は血清コレステロールを低下させるなど、脂肪酸の違いが血清脂質代謝に大きく影響することが知られている。今回の研究では SAM マウスを用いて、食餌の脂肪酸の違いが、脂質代謝およびアミロイド沈着にどのような影響を及ぼすかを検討し、老化アミロイドーシス進展機序の手がかりを見出すことを目的とした。

### B. 研究方法

老化アミロイドーシスを発症する6週

齢の老化促進モデルマウス SAMP1 と正常老化をしめし老化アミロイドーシスを発症しにくい SAMR1 の雄を各々3群に分け、飽和脂肪酸を多く含むバター投与群、n-6 系多価不飽和脂肪酸のリノール酸を多く含むベニバナ油投与群、n-3 系多価不飽和脂肪酸の EPA や DHA を多く含む魚油投与群とした。各々の油脂を5% (バターおよび魚油には0.5%のベニバナ油を添加) 含む精製飼料を5ヶ月あるいは8ヶ月間自由摂取させ、1週間毎に体重を測定した。

血清脂質の定量をおこない、血清中の ApoA-I および ApoA-II 蛋白は抗 AApoAII 抗血清を用いたイムノブロット解析によって定量した。

血清中 HDL の size 分布をポリアクリルアミドグラジェントゲルを用いて、電気泳動により分離した。

臓器（心臓、皮膚、肝臓、腎臓、胃、脾臓）へのアミロイド沈着は、コンゴレッド染色と抗AApoAII抗血清反応の免疫組織化学染色法を用いて染色後、沈着程度にグレードをつけた。

### C. 研究結果

マウス体重の増加は、SAMP1では5ヶ月齢以降から魚油<ベニバナ油<バター投与群の順に大きくなり、バターと魚油投与群の差は有意であった。SAMR1は3群に差はなかった。

SAMP1の血清中総コレステロール値は、バター>ベニバナ油>魚油投与群の順に有意となり、8カ月齢の魚油投与群は他の2群の約1/2に激減し、HDLコレステロール値は、ベニバナ油>バター・魚油投与群となり、特に魚油投与群は激減した。また血清中のApoA-II量は、魚油投与群が激減した。SAMR1のコレステロール値は、魚油投与群がもっとも低値を示し、SAMにおける魚油のコレステロール低下作用が認められた。

HDL sizeの分布から、SAMP1の粒子はSAMR1より小さいこと、またSAMP1の魚油投与群は、他の2群よりさらに粒子の小さいことが認められた。

SAMP1の臓器へのアミロイド沈着程度は、魚油投与群が5カ月齢においても他の2群より有意に高く、8カ月齢での沈着程度は、魚油>バター>ベニバナ油投与群の順で有意な差となり、魚油投与群はベニバナ油投与群の約4倍となった。

### D. 考察

これまでにSAMP1の老化アミロイドーシスは、カロリー制限や大豆蛋白投与により発症が抑制され、dietによる制御が認められていた。本研究では、多価不飽和脂肪酸でもn-3系を多く含む魚油投与は血清脂質レベルを減少させ、n-6系を多く含むベ

ニバナ油投与は上昇させることが示され、臓器へのアミロイドの沈着程度は、血清脂質レベルと逆になった。この血清脂質レベルの大きな相違が、HDL粒子sizeの変化などに示唆されるように、HDL代謝、アポ蛋白代謝に影響し、アミロイドの臓器への沈着を制御するのではないかと考えられた。

### E. 結論

SAMP1への魚油投与による臓器へのアミロイド沈着の亢進は、魚油による血清脂質の低下作用が、HDL代謝を変化させた可能性が考えられるが、魚油そのものの影響による可能性も考えられるため同じような血清脂質低下作用のある食用油を用いてさらに検討している。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Umezawa M, Takeda T, Kogishi K, Higuchi K, Matushita 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

#### 2. 学会発表

- 1) 梅澤真樹子、新真由美、小部真紀、安井佐和美、樋口京一：食餌脂肪の老化アミロイドーシスへの影響－老化促進モデルマウス SAMP1 を用いて、第53回日本栄養・食糧学会大会、東京、1999.5.28
- 2) 梅澤真樹子、小岸久美子、樋口京一、細川昌則：老化促進モデルマウスにおける食餌性多価不飽和脂肪酸による血清脂質および寿命への影響、第54

回日本栄養・食糧学会大会、愛媛、  
2000.5.13

なし

2. 実用新案登録

なし

H. 知的所有権の取得状況

3. その他

1. 特許取得

なし

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## 角膜ラクトフェリンアミロイドーシスの同定

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学医学部臨床検査医学  
共同研究者 原岡克樹\*、寺崎久泰\*、安藤正幸\*、中村政明\*\*、大林光念\*\*、  
桂木正一\*\*\*、甲斐広文\*\*\*\*  
熊本大学医学部、\*第一内科、\*\*同神経内科、  
\*\*\*熊本大学薬学部薬理学講座、\*\*\*\*国立菊池病院

研究要旨 睫毛内反・乱生に伴う角膜アミロイドーシスの原因蛋白を同定するため、同症の患者3名の各角膜摘出標本を用いて組織学的、生化学的に解析した。免疫組織染色ではアミロイド沈着部位に一致して抗ラクトフェリン抗体と抗SAP抗体のみに強い染色性を示した。摘出されたアミロイド腫瘍よりアミロイド線維を抽出し、電気泳動、N末端アミノ酸配列分析により解析した結果、主たる構成成分がラクトフェリンであることが示唆された。なお、3名中1名の全アミノ酸配列分析の結果、Ala11ThrとGlu56Aspの遺伝子変異を認めたが、健常者においても同遺伝子変異が高率に存在し、非病原性変異であると考えられた。また、*in vitro*において、還元化した野生型ラクトフェリンからpH7.4におけるアミロイド線維の形成を認めた。以上のことより、本アミロイドーシスの原因蛋白がラクトフェリンであることが同定された。

### A. 研究目的

長期にわたって睫毛内反・睫毛乱生を有する一部の患者の角膜に、アミロイド腫瘍を形成することが知られている。これは角膜のみに限局するアミロイドーシスであるが、その原因蛋白についてはいくつかの議論がなされてきたものの、未だ結論が得られていない。我々は今回、同症患者3名の角膜アミロイド腫瘍の手術摘出標本を、組織学的、生化学的に解析することにより、本アミロイドーシスの原因蛋白を同定した。

### B. 研究方法

#### (1) 光顕による組織学的検討

ホルマリン固定パラフィン切片に対し

てヘマトキシリン・エオジン(HE)、コンゴ赤(過マンガン酸処理含む)、免疫組織化学的染色を行なった。免疫組織化学的染色には一次抗体として、抗TTR抗体、抗免疫グロブリン軽鎖( $\kappa$ 、 $\lambda$ 鎖)抗体、抗アミロイドA蛋白抗体、抗ゲラチン抗体、抗リゾチーム抗体、抗ラクトフェリン抗体、抗血清アミロイドP抗体を用いた。

#### (2) 透過電顕による組織学的検討

グルタルアルデヒド、オスニウム酸により浸漬固定、エポキシ系樹脂包埋して作製した標本を通常観察に用いた。さらにPost-embedding法により免疫電顕を行なった。抗体には抗ラクトフェリン抗体を用い、これにプロテインA-金コロイドを作用させた。

### (3) アミロイド線維の解析

病変部腫瘍より Skinner らの方法を用いてアミロイド線維を抽出した後、6M 塩酸グアニジンおよび 9M 尿素で可溶化し、これを 5 - 20% アクリルアミド濃度のグラジエントゲルにアプライし、SDS-PAGE を行なった。蛋白を分離後、ゲル上の蛋白を PVDF 膜に転写し、抗ラクトフェリン抗体による免疫染色を行なった。また、CBB-G250 による蛋白染色で得られた 78Kda 付近のバンドを切り出し、プロテインシーケンサーを用いて N 末端アミノ酸配列分析を行なった。

### (4) ラクトフェリンのアミノ酸変異の解析

・本症とラクトフェリンのアミノ酸変異との関係を明らかにするために、本研究に用いた 1 症例について全アミノ酸配列 (exon 1~17) 解析を行なった。

・また、アミノ酸変異がみられた exon について、了解が得られた健常者の日本人 38 名を対象に解析し、疫学的検討を行なった。

### (5) アミロイド線維の形成

・Sigma 社の野生型ラクトフェリンを 100mM KCl を含む pH3-7 の 50mM 各 pH バッファーに溶解し、一定期間 incubate した後、チオフラビン T 法を用いてラクトフェリンの線維形成能を検討した。

・さらに DTT による還元、ヨードアセトアミドによる-SH 基のカルボキシルメチル化を施したラクトフェリンについても同様に検討した。

・チオフラビン T の蛍光値が上昇したサンプル (7 日間 incubate) を燐タングステン酸によりネガティブ染色し、電顕で観察した。

## C. 研究結果

(1) 3 症例ともに、HE 染色では角膜実質直下の病変部に一致して無構造な腫瘍

を認め、これに一致して Congo-red 強陽性であった。免疫染色では、全例が抗ラクトフェリン抗体および抗 SAP 抗体のみに反応を示した。

(2) 電顕による通常観察で幅約 14nm の典型的なアミロイド線維を確認した。免疫電顕では、アミロイド線維と抗ラクトフェリン抗体にラベルした金粒子との結合がみられた。

(3) Western blotting の結果、2つの明瞭なバンドが得られた。それぞれ分子量は 78.3KDa および 81.9KDa であり、これらのバンドを N 末端アミノ酸配列分析を行った結果、両バンドともラクトフェリンと一致することが判明した。さらに分子量から、未修飾のラクトフェリンとこれに糖鎖が結合したものであることも判明した。

(4) 30 歳男性のラクトフェリンの解析の結果、exon 2,9,10,15 に塩基変異がみられたが exon 9, 10 の塩基変異は polymorphism でありアミノ酸の変異はなかった。しかし exon 2, 15 ではそれぞれ Ala11Thr, Glu561Asp のアミノ酸置換がみられた。

・38 名の日本人における exon 2, 15 の解析の結果、15.8% に同変異がみられた。

(5) 未処理の野生型ラクトフェリンでは、どの pH 条件下においても蛍光値の変化がみられなかったが、還元/カルボキシルメチル化処理した野生型ラクトフェリンでは、酸性条件下においてごく軽度蛍光値が上昇した。しかし中性条件下において高度の蛍光値上昇がみられ、電顕で幅約 9nm のアミロイド線維の形成を確認できた。

## D. 考察

これまで本アミロイドーシスについてはいくつかの組織学的検討がなされてきたが、線維自体の解析はなされておらず、

今回初めてその構成蛋白がラクトフェリンであることが同定された。さらに、本症患者にラクトフェリンの点変異がみられたが、疫学的検討の結果、無症状の被験者の約 15.8%に同変異がみられたことから、本症と塩基変異の直接的な因果関係は乏しいと考えられる。また、未処理のラクトフェリンからは線維形成が全く見られなかったが、還元し立体構造を変化させたラクトフェリンからは線維形成が認められた。本症の発症誘因である睫毛内反が繰り返す角膜炎へ機械的刺激を与えつづける過程で、角膜に接するラクトフェリンが微細な繰り返す炎症などにより構造変化を来し、アミロイド化した可能性を示唆するものである。アミロイド線維形成機構を考えていく上で大変興味深い事象であると考えられる。

#### E. 結論

睫毛乱生・内反に伴う角膜アミロイドーシスの原因蛋白がラクトフェリンであることを同定した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

外国語原著

- 1) Takashi Nishizaki\*, Keishi Kishikawa\*, Tomoharu Yoshizumi\*, Hideaki Uchiyama\*, Shinji Okano\*, Toru Ikegami\*, Koji Hashimoto\*, Kenich Nomoto\*, Mitsuo Shimada\*, Katsuhiko Yanaga\*, Kenji Takenaka\*, Keizo Sugimachi\*, Yukio Ando, Masayuki Ando. (\*九州大学第2外科)  
Domino liver transplantation from a living related donor.  
Transplantation 70: 1236-1239, 2000

- 2) Sho-ichi Katsuragi\*, Taihei Miyakawa\*, Yukio Ando, Hisayasu Terazaki. (\*熊本大学精神神経科)  
High resolution ultrastructure of amyloid fibrils in familial amyloid olynuropathy.  
Acta Neuropathol, 49: 579-581, 2000
- 3) Nils Nyhlin\*, Intissar Anan\*, Magdy El-Salhy\*, Yukio Ando, Ole Suhr\*. (\*ウメオ大学内科)  
Endocrine cells in the upper gastrointestinal tract in relation to gastrointestinal dysfunction in patients with familial amyloidotic polyneuropathy.  
Amyloid 6: 192-198, 2000
- 4) Taro Yamashita\*, Yukio Ando, Konen Obayashi, Hisayasu Terazaki, Naomi Sakashita\*\*, Koji Uchida\*\*\*, Masayuki Ando, Makoto Uchino\*. (\*熊本大学神経内科, \*\*熊本大学第2病理, \*\*\*名古屋大学農学部)  
Oxidative injury is present in the Purkinje cells in patients with olivopontocerebellar atrophy (OPCA).  
J Neurol Sci 175: 107-110, 2000
- 5) Yukio Ando, Yuki Ohtsu\*, Hisayasu Terazaki, Kazuhiko Kibayashi\*, Masaaki Nakamura\*\*, Eiko Ando\*\*\*, Noriko Matsunaga\*\*\*\*, Konen Obayashi, Makoto Uchino\*\*, Masayuki Ando, Shigeyuki Tsunenari\*. (\*熊本大学法医学, \*\*熊本大学神経内科, \*\*\*熊本大学眼科, \*\*\*\*熊本大学薬学部)  
Japanese monozygotic twins with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) (ATTR Val30Met).  
Amyloid 7: 133-136, 2000
- 6) Nils Nyhlin\*, Yukio Ando, Ryoji Nagai\*\*, Ole Suhr\*, Magdy El-Salhy\*, Hisayasu Terazaki, Taro Yamashita, Masayuki Ando, Seiko Horiuchi\*\*. (\*ウメオ大学内科, \*\*熊本大学第2生化学)



- Advanced glycation end product in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP).  
J Intern Med. 247: 485-492, 2000.
- 7) Naomi Sakashita\*, Yukio Ando, Konen Obayashi, Hisayasu Terazaki, Taro Yamashita\*\*, Mineo Takei\*\*\*, Mitsuru Kinjo\*\*\*\*, Kiyoshi Takahashi\*.  
Familial amyloidotic polyneuropathy (ATTR Ser50Ile): the first autopsy case report.  
Virchows Arch 436:345-50, 2000. (\*熊本大学第2病理, \*\*熊本大学神経内科, \*\*\*原三信病院泌尿器科, \*\*\*\*琉球大学第1病理)
- 8) Charles Mambule, Yukio Ando, Intissar Anan\*, Gosta Holmgren\*, Ola Sandgren\*\*, Torgny Stigbrandt\*, Kazuhiro Tashima\*\*\*, Ole Suhr\*. (\*ウメオ大学内科, \*\*ウメオ大学眼科, \*\*\*熊本大学神経内科)  
Enhancement of AA-amyloid formation in mice by transthyretin amyloid fragments and polyethylene glycol.  
Biochim Biophys Acta. 1474: 331-336, 2000
- 9) Maria R.E. Almeida\*, Hisayasu Terazaki, Yukio Ando, Maria Joao Saraiva\*. (\*ポルト大学生化学)  
Comparative studies of two transthyretin variants with protective effects on familial amyloidotic polyneuropathy: TTR R104H and TTR T119M.  
Biochem Biophys Res Commun. 270: 1024-1028, 2000
- 10) Konen Obayashi, Yukio Ando, Hisayasu Terazaki, Sonoka Yamashita\*, Kazuko Nakagawa\*, Masaaki Nakamura\*\*, Taro Yamashita\*\*, Morotaka Suga, Takashi Ishizaki\*, Makoto Uchino\*\*, Masayuki Ando. (\*熊本大学薬学部, \*\*熊本大学神経内科)  
Effect of sildenafil citrate (Viagra) on erectile dysfunction in a patient with familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Val30Met. J Auton Nerv Syst. 80: 89-92, 2000
- 11) Konen Obayashi, Yukio Ando, Kazuhiro Tashima\*, Taro Yamashita\*, Hisayasu Terazaki, Makoto Uchino\*, Masayuki Ando. (\*熊本大学神経内科)  
Amyloid dependent disturbance of endothelium-dependent vasodilatation in patients with familial amyloidotic polyneuropathy Type I (Met30).  
Muscle Nerve 23: 1084-1088, 2000
- 12) Konen Obayashi, Yukio Ando, Hisayasu Terazaki, Taro Yamashita\*, Masaaki Nakamura\*, Moritaka Suga, Makoto Uchino\*, Masayuki Ando. (\*熊本大学神経内科)  
Mechanism of anemia associated with autonomic dysfunction in rats.  
Auton Neurosci. 82: 123-129, 2000
- 13) Ken-ichiro Misu\*, Naoki Hattori\*, Yukio Ando, Shu-ichi Ikeda\*\*, Gen Sobue\*. (名古屋大学神経内科, \*\*信州大学第3内科)  
Anticipation in early-but not late-onset familial amyloid polyneuropathy (TTR Met 30) in Japan. Neurology 55: 451-452, 2000
- 総説
- 1) 安東由喜雄  
家族性アミロイドポリニューロパチーにおけるアミロイド沈着機構の解析とその治療.  
臨床病理. 48: 425-428. 2000.
- 2) 安東由喜雄, 中村政明\*. (\*熊本大学神経内科)  
閉塞性血栓性血管炎 (Buerger 病). 神経症候群.

- 日本臨床. 29: 322-324, 2000.
- 3) 安東由喜雄  
遺伝性疾患: 遺伝するということ.  
メディカルQOL 2001 in press.
- 4) 安東由喜雄, 中村政明\*. (\*熊本大学神経内科)  
アミロイドポリニューロパチー.  
Clinical Neuroscience in press
- 日本語原著
- 1) 大林光念, 安東由喜雄, 中村政明\*, 寺崎久泰, 内野 誠\*. (\*熊本大学神経内科)  
家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) (ATTR Val30Met) 患者の勃起不全に対するクエン酸シルデナフィルの効果.  
自律神経 37: 425-430, 2000.
- 2) 水野雄二\*, 泰江弘文\*, 小川久雄\*, 辻田賢一\*, 吉村道博\*, 安東由喜雄, 大河原道雄\*, 吉永 秀\*\*. (\*熊本大学循環器内科, \*\*熊本大学病理学第一講座)  
微小血管障害による狭心症で発症した心アミロイドーシスの一例  
Heart View 4: 101-107, 2000.
- 単行書
- 1) 安東由喜雄  
sympathetic flow response (SFR).  
自律神経検査法. 日本自律神経学会編.  
文光堂 p232-235, 2000.
- 2) 寺崎久泰, 安東由喜雄.  
皮膚、粘膜生検.  
自律神経検査法. 日本自律神経学会編.  
文光堂 p372-375, 2000.
2. 学会発表
- 1) 大林光念, 安東由喜雄, 中村政明\*, 寺崎久泰, 内野 誠\*, 安藤正幸. (\*熊本大学神経内科)  
家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者における起立時超早期脈拍変動の検討.  
第 53 回日本自律神経学会総会. 2000. 11. 9-10. 東京.
- 2) 寺崎久泰, 安東由喜雄, 中村政明\*, 大林光念, 田島和周\*, 山下園加\*\*, 松永典子\*\*, 内野 誠\*, 安藤正幸. (\*熊本大学神経内科, \*\*熊本大学薬学部)  
家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者の摘出肝を用いたドミノ肝移植.  
第 41 回日本神経学会総会. 2000. 5. 24-26. 松本市.
- 3) 安東由喜雄, 寺崎久泰, 中村政明\*, 大林光念, 田島和周\*, 山下園加\*\*, 松永典子\*\*, 内野 誠\*, 安藤正幸. (\*熊本大学神経内科, \*\*熊本大学薬学部)  
FAP のアミロイド沈着機構における TTR 及びアミロイド線維 post translational modification (PTM) の重要性.  
第 41 回日本神経学会総会. 2000. 5. 24-26. 松本市.
- 4) 山下園加\*, 安東由喜雄, 中川和子\*, 寺崎久泰, 中村政明\*\*, 松永典子\*, 石崎高志\*, 内野 誠\*\*, 安藤正幸. (\*熊本大学薬学部, \*\*熊本大学神経内科)  
家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者のトランスサイレチン (TTR) 代謝におけるリポ蛋白の重要性について.  
第 41 回日本神経学会総会. 2000. 5. 24-26. 松本市.
- 5) 田島和周\*, 安東由喜雄, 寺崎久泰, 大林光念, 山下太郎\*, 内野 誠\*, 安藤正幸. (\*熊本大学神経内科)  
家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP ATTR V30M) 患者の臨床症状の違い—日本とスウェーデンの比較—.  
第 41 回日本神経学会総会. 2000. 5. 24-26. 松本市.
- 6) 松永典子\*, 安東由喜雄, 中川和子\*, 山下園加\*, 寺崎久泰, 中村政明\*\*, 石崎高志\*, 内野 誠\*\*, 安藤正幸. (\*熊本大学薬学部, \*\*熊本大学神経内科)  
本邦初の家族性アミロイドポリニューロパ

- チー (FAP) の compound heterozygote (FAP ATTR Val30Met/ATTR Arg104His).  
第 41 回日本神経学会総会. 2000. 5. 24-26. 松本市.
- 7) 中村政明\*, 安東由喜雄, 寺崎久泰, 大林光念, 内野 誠\*, 安藤正幸. (\*熊本大学神経内科)  
Baculovirus 発現システムを利用したトランスサイレチン (TTR) 4 量体の分離の試み.  
第 41 回日本神経学会総会. 2000. 5. 24-26. 松本市.
- 8) 大林光念, 安東由喜雄, 寺崎久泰, 田島和周\*, 中村政明\*, 内野 誠\*, 安藤正幸. (\*熊本大学神経内科)  
自律神経障害に伴う貧血の発現機構に関する解析.  
第 41 回日本神経学会総会. 2000. 5. 24-26. 松本市.
- 9) 安東由喜雄, 大林光念, 寺崎久泰, 中村政明\*, 岡部紘明\*\*. (\*熊本大学神経内科, \*\*\*熊本大学臨床検査医学)
- 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の新たなフォーカスの発見と病態解析.  
第 47 回日本臨床病理学会総会. 2000. 11. 2-4. 郡山市.
- 10) 大林光念, 安東由喜雄, 寺崎久泰, 中村政明\*, 岡部紘明\*\*. (\*熊本大学神経内科, \*\*\*熊本大学臨床検査医学)  
自律神経障害に伴う貧血の発現機構に関する解析.  
第 47 回日本臨床病理学会総会. 2000. 11. 2-4. 郡山市.

#### 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

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## *In vitro* selection 法によるアミロイド結合性核酸の探索

分担研究者 馬場 聡 浜松医科大学病理学第二

**研究要旨** アミロイドーシスの診断・治療に結びつ新たな医薬品のベースとなる分子を *in vitro* selection 法を用いて見出すことを目的とし、本年はまずその第一段階として、A $\beta$ <sub>1-40</sub>、TTR、および SAA1 に結合する機能性核酸 (ssDNA) の探索を試みた。10 回の増幅・選択サイクルで得られた ssDNA は ELISA 法で各標的との結合が示唆されたが、力価は低く、組織切片上のアミロイドとは反応しなかった。DNA シークエンスでも一定の配列構造が得られず、選択がまだ不十分であると考えられた。アミロイドーシスの医療に役立つ機能性分子を見出すためには、選択の条件を厳しくするなどの探索法の改善が必要で、今後の課題である。

### A. 研究目的

全身性アミロイドーシスの治療・予防には原因蛋白の血中レベルをゼロにすることが最善であるが、現時点でそれはなかなか困難で、特に原発性アミロイドーシスでは、血中前駆蛋白レベルの上昇がほとんど捕らえられないものもある。そこで次善の策として、アミロイド蛋白に特異的に結合する分子によって、アミロイド蛋白の会合や組織沈着の阻止する方法が考えられる。自然界より新規医薬のベースとなる化合物を探し出すのは容易ではないが、最近考案された *in vitro* selection 法は、PCR と核酸精製を繰り返すという単純な手法で機能性分子を手に入れることができ得る方法である。今回は、この *in vitro* selection 法をアミロイドに適用することで、比較的容易迅速に新たなアミロイド結合性分子 (核酸) を得、診断や治療に応用することが可能なのではないかと考え、その予備実験を試みた。

### B. 研究方法

両端に PCR 増幅のためのプライマー配列、中央部分に 30 mer ( $4^{30} \approx 10^{18}$  種類) のランダム配列をもつランダムオリゴヌクレオチドライブラリーを合成。これ (1 pmol) を鋳型として PCR を行い (片方のプライマーの 5'-端をビオチン化)、ゲルろ過 HPLC で精製後、固相化ストレプトアビジンに結合させ、アルカリ変性させて ssDNA ( $\approx 1$  pmol/ $\mu$ L) を回収した。これを加熱変性し徐々に冷却して高次構造をとらせた後、マイクロプレートに固相化した標的アミロイド蛋白と 37°C、1 時間反応した。非結合性 ssDNA を洗浄除去して結合性 ssDNA を回集し、これを鋳型として再度 PCR 増幅した。このような増幅と選択の過程を反復することでアミロイド蛋白性 ssDNA の濃縮を試みた。得られた ssDNA を、ELISA 法、組織染色、DNA シークエンスで評価した。

### C. 研究結果