

SCID-hIL6 transgenic miceでのヒトALアミロイドーシス 発症モデルの研究

研究者 河野道生 石川秀明

目 的

アミロイドーシスの多くはALアミロイドーシスであり、そのALアミロイドーシスの多くは骨髓腫に随伴するものである。しかしながら、骨髓腫に随伴するALアミロイドーシス発症の機序は全く不明であるし、それを実験的に誘発できる動物モデルも確立されていない。本研究は、ヒト骨髓腫患者からの骨髓腫細胞を実験モデルマウス、SCID-hIL6 transgenic mice(SCID-hIL6 Tg mice)に移植生存させ、骨髓腫細胞から産生されるM蛋白がアミロイドとして変性沈着できるかどうかを検討する。特に、マウス個体のマクロファージ機能に注目し、マクロファージを活性化しうるサイトカインを腹腔内に注射して、アミロイド誘発を試みる。

研究方法

- 1) アミロイドーシス合併の骨髓腫患者からの骨髓腫細胞のSCID-hIL6 Tg miceへの移植：アミロイドーシス合併の骨髓腫患者の骨髓穿刺液から既報のごとく骨髓単核球分画を分離して、SCID-hIL6 Tg miceの腹腔内へ0.6% agarose gelとともに注射した。
- 2) マウス腹腔内の骨髓腫細胞の生存増殖の確認：SCID-hIL6 Tg miceの腹腔内へ注射後、6週、8週及び12週にマウスの腹腔内から細胞を回収した。また、腫瘍を形成している場合は腫瘍を摘出した。回収した細胞を、FITC標識CD38抗体、PE標識CD54、MPC-1抗体およびPC5標識CD45抗体で

染色し、フローサイトメーター(EPICS ELITE, Coulter社)で解析した。

- 3) *in vitro*培養での細胞株の樹立：マウス腹腔内より回収した細胞をRPMI-1640培地+10%牛胎仔血清にインターロイキン6(IL-6)添加あるいは非添加で*in vitro*培養した。増殖してきた細胞をクローン化した。

- 4) 株化した骨髓腫細胞株のSCID-hIL6 Tg miceでの移植生存の確認：株化し得た骨髓腫細胞株Y01を0.6% agarose gelとともにSCID-hIL6 Tg miceの腹腔内に注射した後、6週、8週及び12週にマウスの腹腔内から細胞を回収し、生存増殖を確認した。

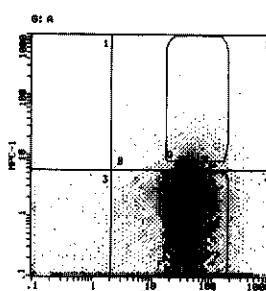
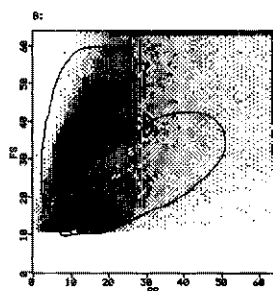
- 5) 組織学的検討：骨髓腫細胞株Y01を移植したマウスからの腫瘍あるいは腹腔組織を採取して、組織学的検討を行なった。

研究結果

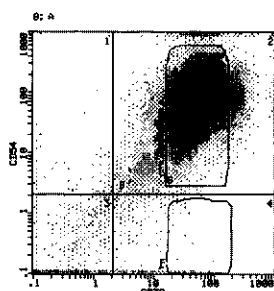
アミロイドーシス合併の骨髓腫患者25例の骨髓穿刺液より、骨髓単核球分画を分離してSCID-hIL6 Tg miceの腹腔内に注射した。25例中9例にて、注射後12週の段階で腹腔内に骨髓腫細胞の生存を確認できた。その内、1例において回収した腹腔内細胞からIL-6非依存性増殖を示す骨髓腫細胞株Y01を樹立することができた。その表面抗原の解析から、MPC-1-CD45+CD49e-の未熟骨髓腫細胞株であった。このY01骨髓腫細胞株(1×10^6 細胞/total)を再度SCID-hIL6 Tg miceの腹腔内に0.6% agarose gel注射すると、約8週で 1×10^7 細胞以上に生存増殖していることを確認した。尚、この細胞株Y01は、*in*

Survival of Y01 cells after ip injection with agarose gel(8W)

CD38/MPC-1



CD38/CD54



CD38/CD45

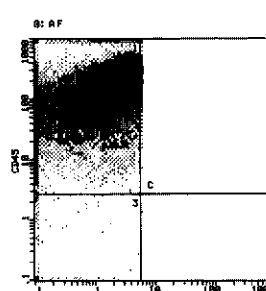


表. Y01骨髄腫細胞株のSCID-hIL6 Tg miceへの移植生存

Y01骨髄腫細胞株をSCID-hIL6 Tg miceの腹腔内に移植後8週におけるマウス腹腔内から回収した細胞の表面抗原解析の結果

*in vitro*培養でIgA- κ M蛋白を安定に分泌産生していることを確認した。また、Y01細胞株を移植したマウスは、移植後20週しても生存可能であった。

なっている。マウスの腹腔内マクロファージを活性化しうるサイトカインの注射も検討している。

考 察

アミロイドーシス合併の骨髄腫患者の骨髄腫細胞より、SCID-hIL6 Tg miceの腹腔内に移植生存・増殖可能な骨髄腫細胞株Y01を樹立することができた。Y01細胞株は今のところ安定してM蛋白を分泌産生しており、ヒトアミロイドーシスのモデルマウスとして利用できる細胞株と考えられる。また、Y01細胞株をSCID-hIL6 Tg miceに移植後、約20週までマウスは生存可能であることも今後のアミロイドーシス誘発実験には大切な点と思われる。現在、Y01細胞株移植マウスにおいて、移植後計時的に腹腔内腫瘍および腹膜組織の組織学的検討を行

結 論

実験ALアミロイドーシスのモデルとして有益なヒト骨髄腫細胞株Y01を樹立できた。アミロイドーシス誘発に、マクロファージを活性化するサイトカイン等を検討すべきであろう。

Establishment of an experimental model inducing human AL amyloidosis
in SCID-hIL6 transgenic mice

by

Michio M. KAWANO, Hideaki ISHIKAWA

from

Department of Immunohematology, Yamaguchi University School of Medicine

The purpose of this project is to establish an experimental model inducing AL amyloidosis in SCID-hIL6 transgenic mice (SCID-hIL6 Tg mice) and to clarify the mechanism how human M protein produced from myeloma cell lines degenerate into amyloid deposit in these mice. We established a human myeloma cell line, MSG-Y01, from a myeloma patient with AL amyloidosis, and this cell line was confirmed to stably secrete IgA- κ of M protein in vitro. We also observed that this cell line was able to be transplanted with agarose gel intraperitoneally in SCID-hIL6 Tg mice and survive after 4 to 12 weeks, and even 20 weeks after injection of this cell line, these mice were still alive. So, we could establish a human myeloma cell line that could be stably implanted in SCID-hIL6 Tg mice. We are now trying to induce amyloid deposition in these SCID-hIL6 Tg mice after intraperitoneal injection of this cell line with various reagents that can activate resident macrophages.

変異導入マウスを用いた遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析

研究者 前田 秀一郎* 伊藤 禎 洋* 河野 裕 夫**
加藤 靖 子*** 杉山 仁 視**** 久保田 正 春*****
坂下 直 実***** 針谷 康 夫***** 大野 伸 一***
神庭 重 信**** 竹屋 元 裕***** 東海林 幹 夫*****
石原 得 博**

目 的

常染色体性優性の遺伝病、家族性アミロイドポリニューロパチー(Familial Amyloidotic Polyneuropathy; FAP)では、血清蛋白質、トランスサイレチン (TTR) の1アミノ酸が置換した異型TTRがアミロイドを形成して全身種々の臓器に沈着する。FAPの病因は、*ttr*遺伝子上の点変異であることが明らかにされているが、発症機構は不明である。現在、FAPの治療法として、TTRの主要産生臓器である患者の肝を切除し、正常肝を移植する方法が行なわれている。肝移植により症状の進行を止めることができ、現在、唯一の有効な治療法である。しかし、肝移植後に主要症状である神経障害がどれほど改善するかについては、今後、長期に亘る検討が必要と考えられる。また、TTRは肝の他、脳の脈絡叢や眼の網膜などで合成されることから肝移植後に硝子体にアミロイドが沈着し、視力障害をきたす場合があること、移植は危険を伴い、ドナーの確保が難しく、多大の費用を要すること、さらに、世界で最も症例数の多いTTR Met30に起因するFAPには有効だが、心にア

ミロイドが沈着する他の異型TTRに起因する症例では、移植後に心へのアミロイド沈着が増加し続けた無効例が見出されていることなど問題点も多い。

一方、*ttr* 遺伝子の同一変異 (Met30) に起因しても発症年齢は、ポルトガル人と日本人の多くは30~40歳台、スウェーデン人は平均56歳と異なっている。また、同一家系内でも、個人によって発症年齢に20~30年にわたる違いがある例がしばしば見出されている。さらに、スウェーデンのFAP家系の人々がアメリカ合衆国に移住して、数世代を経ると早く発症する傾向が認められている。これらのことから発症には、主因となる*ttr*遺伝子変異のほかに、老化、環境因子や他の蛋白質が関与することが予想されている。そこで、FAPの治療法や発症を遅らせる手だてを開発するためには、実験操作の容易なマウスで疾患モデルを作り、発症に関与する因子を明らかにすることが必要と考えられる。先に我々は、FAPの病因であるMet30点変異を持つヒト*ttr*遺伝子をマウス受精卵に注入する方法で、FAPのトランスジェニックマウスモデルを作製した。これらマウスでは、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、この方法ではマウス内在性の*ttr*遺伝子の機能は正常のまま、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¹⁾。

* 山梨医科大学第一生化

** 山口大学第一病理

*** 山梨医科大学第一解剖

**** 山梨医科大学精神神経科

***** 熊本大学第二病理

***** 群馬大学神経内科

そこで本研究では、FAPにより近似したモデルマウスの作製を目指すとともに、既に標的遺伝子組換え法を用いて作製した遺伝子欠損マウスや上記のトランスジェニックマウスモデル等を用いて、FAPにおけるアミロイドの沈着機構を明らかにし、発症に関与する因子を見出して、この遺伝性神経難病の治療法や予防法を確立することを目的とする。

さらに TTR は、*in vitro*でA β アミロイドの沈着を抑制することが見出されている²⁾が、*in vivo*での証明はされていない。一方、Hisao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A β 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³⁾。そこで無 TTR マウスと、この APP トランスジェニックマウスを用いて、TTR が、家族性アルツハイマー病の発症にどう関与するかを明らかにする。

(I) 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) は従来、種々のアミロイド細線維の表面に結合し、アミロイドが分解されるのを阻害すると考えられてきた。しかし最近、AA アミロイドの微細構造を電子顕微鏡で観察した結果、SAP が AA アミロイドの中心部分に存在することが示唆された⁴⁾。そこで先に我々は、AA アミロイドの分子構造を明らかにするため、野生型及び無 SAP マウスに惹起した脾 AA アミロイドの微細構造を光学顕微鏡による免疫組織化学法及び電子顕微鏡による急速凍結・ディープ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、この結果を検討するため、免疫電顕法により解析する。

(II) 先に我々は、FAP に近似した動物モデルの確立を目指し、標的遺伝子組換え法を用いて内在性の *ttr* 遺伝子に FAP の病因となる Met30 変異

を持つマウス株を作製した。これらマウスでの *ttr* 遺伝子の発現やアミロイド沈着の有無を野生型マウスを対照として比較解析する。

(III) SAP は、種々のアミロイドの沈着を促進し、また TTR は、*in vitro*で A β アミロイドの沈着を抑制することが見出されている。そこで、遺伝性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 (APP トランスジェニックマウス) と我々が確立した無 TTR マウス⁵⁾あるいは無 SAP マウス⁶⁾とを用いて、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。

方 法

(I) 脾 AA アミロイドの微細構造を、急速凍結・ディープエッチング法によるレプリカ膜作製試料にコロイド金標識免疫染色法を併用して、電子顕微鏡で解析する。

(II) 内在性の *ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つマウス株につき、正常および変異 *ttr* 遺伝子由来の mRNA 量を RT-PCR 法を用いて比較する。また、内在性の *ttr* 遺伝子の一方あるいは双方のアレルに Met30 変異を持つマウス株における全 TTR mRNA 量を、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法で野生型マウスと比較する。また、生後22~25カ月齢の内在性の *ttr* 遺伝子の一方あるいは双方のアレルに Met30 変異を持つマウス株におけるアミロイド沈着の有無を調べる。

(III) APP トランスジェニック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A β 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。

結 果

(I) 抗 SAP 抗体または抗 AA 抗体を用い、野生型マウスのアミロイド線維をコロイド金法で免疫染色し、電子顕微鏡で解析したところ、両抗体共にアミロイド線維上に金粒子を認めた。しかし、

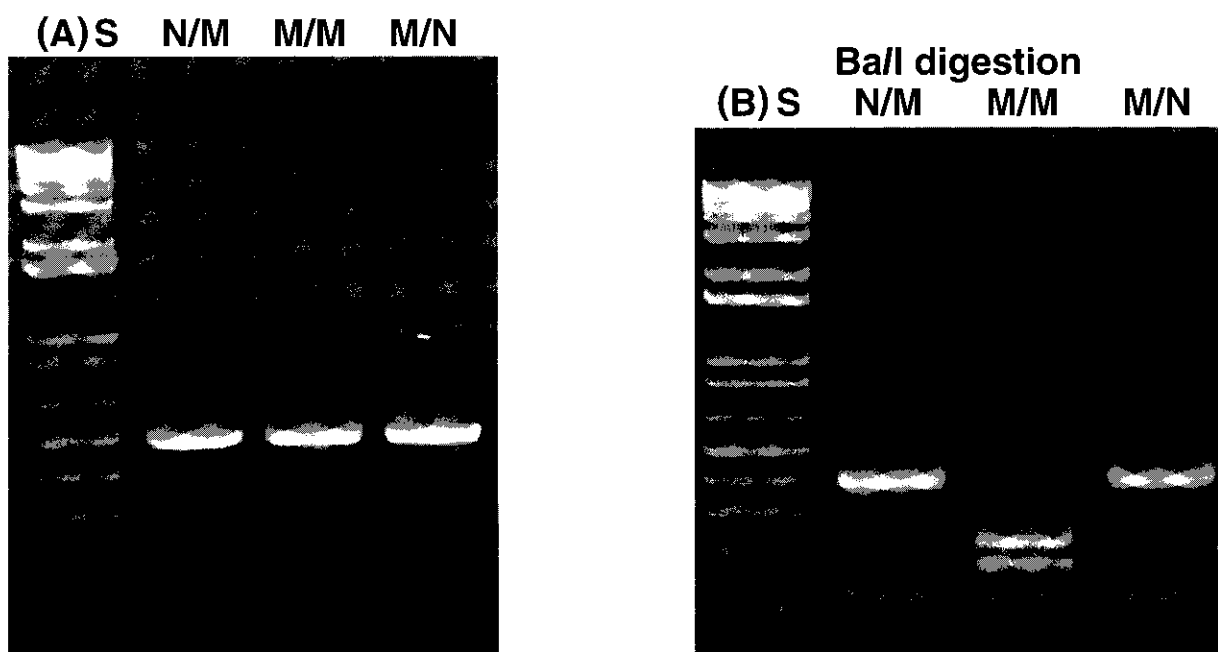


図. RT-PCR 法による脳内正常及び変異 TTR mRNA の量比の解析

(A)：増幅 cDNA(B)：(A)を *BalI* 酵素で切断

S：サイズマーカー

N/N：野生型マウス

M/M：内在性の *ttr* 遺伝子の双方のアレルに Met30 変異を持つマウス

M/N：内在性の *ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つマウス

抗 HSPG 抗体では免疫染色を認めなかった。一方、急速凍結・ディープエッチング法によるレプリカ膜作製試料にコロイド金標識免疫染色法を併用して、SAP 欠損マウスの脾 AA アミロイドの微細構造を、電子顕微鏡で解析したところ、抗 HSPG 抗体で、アミロイド線維上に金粒子を認めた。さらに、このアミロイド線維をトリプシン処理すると、アミロイド線維は細くなるが、抗 HSPG 抗体によるコロイド金標識は増強した。

(II) 内在性の *ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つマウス株の肝及び脳由来の全 mRNA 中の正常及び変異 TTR mRNA の量比を調べるため、マウス TTR mRNA の全翻訳領域と 5'-及び 3'-非領域の一部を含む 476 塩基長の断片を RT-PCR 法を用いて増幅した。得られた cDNA を制限酵素 *Bal I* で切断すると、正常 mRNA 由来の断

片は、388 塩基対と 88 塩基対の 2 断片に、変異 mRNA 由来の断片は、217 塩基対、171 塩基対と 88 塩基対の 3 断片に切断される。図に示すような結果から、肝及び脳由来の全 mRNA 中には、正常および変異 TTR mRNA がほぼ等量存在していることが明らかとなった。また、内在性の *ttr* 遺伝子の一方あるいは双方のアレルに Met30 変異を持つマウスの肝における全 TTR mRNA 量は、野生型マウスとほぼ等量であった。これらの結果から、変異を導入した *ttr* 遺伝子は、正常 *ttr* 遺伝子と同様に発現していると考えられる。また、生後 22~25 ヶ月齢の内在性の *ttr* 遺伝子の一方あるいは双方のアレルに Met30 変異を持つマウス各々 16 匹と対照野生型マウス 5 匹の種々の臓器のアミロイド沈着の有無を調べ、*ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つマウス 2 匹にのみ、心、肝、腎、胃、小

腸、大腸、脾にアミロイド沈着を認めた。今後、このアミロイドの主成分を免疫組織化学的に調べる計画である。

(III) *sap*あるいは、*ttr*遺伝子の一方のアレルに挿入変異をもつAPPトランスジェニックマウスと *sap*あるいは、*ttr*遺伝子の一方のアレルに挿入変異をもつマウスとの交配により、多くの仔マウスを得た。そこで現在この中から、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同定している。

考 察

(I) 1996年に井上らは、AAアミロイドの微細構造を電子顕微鏡で観察した結果、SAPがAAアミロイドの芯に存在し、その周囲をAAやHSPGが囲んでいると報告した⁹⁾。しかし本研究では、レプリカ膜上の形態学的所見、そして免疫電顕の結果から、AAアミロイドの中心部には、HSPGが存在し、その周囲をAAやSAPが囲んでいることが示唆された。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、分解されやすくなることが報告されている。そこで、SAPがヒトのアミロイドーシスの発症を促進することが明らかとなれば、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の開発を促進し得ると考えられる。

(II) 我々が新たに開発した標的遺伝子組換え法で点変異を導入したマウス *ttr* 遺伝子は、正常 *ttr* 遺伝子と同様に発現していた。従ってこの方法は、種々の点変異をマウスの特定遺伝子に導入するための簡便法として有用と考えられる。なお、先に我々は、FAPの病因となるヒト異型TTRを合成するトランスジェニックマウス株を確立している。このマウス株でのアミロイド沈着の開始時期や程度が内在性のTTRにMet30変異をもつマウス株と異なれば、マウスとヒトのTTR Met30タンパク質の構造やアミロイド形成能の比較解析を進め、

アミロイド形成機構を明らかにしたいと考えている。

(III) 現在、TTR又はSAP欠損APPトランスジェニックマウスの多くは、4ヶ月齢に達している。今後これら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 β 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。

結 論

(I) AAアミロイド線維では、中心部分にHSPGが存在し、その周囲をAAやSAPが囲んでいることが示唆された。

(II) 生後22~25ヶ月齢の内在性の *ttr* 遺伝子の一方のアレルにMet30変異を持つマウス16匹中2匹に、心、肝、腎、胃、小腸、大腸、脾にアミロイド沈着を認めた。今後、これら内在性のTTRにMet30変異をもつマウス株とFAPの病因となるヒト異型TTRを合成するトランスジェニックマウス株とで、アミロイド沈着の開始時期や程度を比較解析する計画である。

文 献

- 1) Maeda S, Yamamura K, Shimada K. (in French) Modèles des souris transgéniques avec la mutation Met 30 de la transthyréline associée à la polyneuropathie
- 2) Amyloïde familiale (in English; Mouse models of transthyretin Met 30-associated familial amyloidotic polyneuropathy). Les Amyloses. In Grateau G, Benson MD, Delpech, M. (eds.) (Paris: Medecine-Sciences Flammarion) pp145-151, 2000.
- 3) Schwarzman AL, Goldgaber D. Interaction of transthyretin with amyloid β -protein: binding and inhibition of amyloid formation. Ciba Foundation Symposium 199 The nature and origin of amyloid fibrils. (Chichester: John Wiley & Sons) pp146-164, 1996.
- 4) Hisao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, amyloid

plaques in transgenic mice. *Science* 1996;274:99-102.

- 5) Inoue S, Kisilevsky R. A high resolution ultrastructural study of experimental murine AA amyloid. *Lab Invest* 1996;74:670-683.
- 6) Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, et al. Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2375-2379.
- 7) Togashi S, Lim S, Kawano H, et al. Serum amyloid P component enhances induction of murine amyloidosis. *Lab Invest* 1997;77:525-531.

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

by

Shuichiro MAEDA*

Sadahiro ITO*, Hiroo KAWANO**, Yasuko KATO***, Hitoshi SUGIYAMA****,
Masaharu KUBOTA****, Naomi SAKASHITA*****, Yasuo HARIGAYA*****, Shinichi OHNO***,
Shigenobu KANBA****, Motohiro TAKEYA*****, Mikio SHOJI*****, Tokuhiko ISHIHARA**

from

*Department of Biochemistry, Yamanashi Medical University

**Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

***Department of Anatomy, Yamanashi Medical University

****Department of Neuropsychiatry, Yamanashi Medical University

*****Department of Pathology, Kumamoto University School of Medicine

*****Department of Neurology, Gunma University School of Medicine

To assess the ultrastructure of in situ AA amyloid fibrils, we examined the ultrastructure of splenic AA amyloid fibrils in SAP-deficient and wild-type mice. Ultrastructural analysis by quick-freezing and deep-etching method revealed significant differences in the structure of amyloid fibrils in situ between two types of mice. The light and electron microscopic immunohistochemical analyses, following trypsin treatment, suggested that AA filaments were on the exterior surface of HSPG, and that SAP bound to the most exterior surface of the fibrils.

We generated mice carrying a point mutation (Val 30 Met) in the endogenous ttr gene with the use of a novel gene targeting procedure. We suggest that this procedure may be used to introduce subtle mutations efficiently into most genes in mice. Amyloid deposits were detected in the heart, liver, kidney, stomach, small intestine, large intestine, and spleen in 2 out of 22 to 25 month-old 16 heterozygous mutant mice examined. On the other hand, amyloid deposits were not detected in any of the age-matched 16 homozygous mutant and 5 wild-type mice.

アミロイド線維によるアミロイドーシス誘発： マウスモデルを用いた解析

研究者 樋口京一* 付笑影* 是永龍巳*
松下隆壽** 細川昌則** 馬場聡***
内木宏延**** 石原得博*****

はじめに

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。最近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^{Sc})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。マウス老化アミロイドーシスではapoA-IIが重合したAApoAIIが全身に沈着する。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¹⁾。さらに消化管経由のアミロイドーシスの伝播や同一ケージ内飼育マウス間のアミロイドーシス伝播の可能性を示してきた²⁾。一

方、CJD等では動物種を越えた感染例が報告されており³⁾、プリオン伝播において共通した線維構造の重要性が予想される。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、ヒト及びマウスの各種のアミロイド線維をC型apoA-IIを持ちアミロイドーシス好発系であるR1.P1-Apoa2^cマウスに投与し、アミロイド沈着誘導能について検討した。

また家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)発症家系においては、世代が進行するに従い発症年齢が若齢化する傾向(anticipation)⁴⁾が見られ、母子間におけるアミロイドーシス伝播の可能性も考えられる。このため、予備的ではあるが、アミロイドーシスを発症した雌R1.P1-Apoa2^cマウスから出生した仔マウスのアミロイド沈着を調べ、母子間におけるAApoAIIアミロイド線維伝播についても検討した。

材料及び方法

1. 各種アミロイド線維投与によるアミロイドーシス促進

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^c)をSAMR1マウスに導入したコンジェニックマウスR1.P1-Apoa2^cとSAMR1マウスは信州大学医学部動物実験施設において兄妹交配で維持され^{5, 6)}、クリーンコンベンショナルコンディションで飼育された。2

*信州大学医学部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

***浜松医科大学第一病理

****福井医科大学第二病理

*****山口大学医学部第一病理

ヶ月齢のマウスに蒸留水中でソニケーションした各種アミロイド線維 (100 μ g) を尾静脈より投与し、3, 6ヶ月後に屠殺し、アミロイド沈着を調べた。

各種アミロイド線維の抽出・精製：ヒトAA, ATTR, AL (2種), A β 2M, 及びマウスAA, AApoAIIをPras⁷⁾の方法で沈着組織より抽出しさらに超遠心分離法で精製した。また合成A β 1-40ペプチドからアミロイド線維を作成した⁸⁾。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トランスサイレチンをマウスに投与した。

投与アミロイド線維代謝の解析：ヒトAA蛋白質を2ヶ月齢マウスに静注後、1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24週後に屠殺し、全身臓器からアミロイド線維画分を抽出し、AAとAApoAIIをWestern blot法で検出した。

2. 母子間におけるアミロイド線維伝播の可能性についての検討

2ヶ月齢の雌R1.P1-Apoa2^cマウスにC型AApoAIIを静脈注射し、3ヶ月間飼育し重度なAApoAIIアミロイドーシスを発症させた後に交配、出産させた。仔マウスは離乳まで21日間母親に哺育させた後、分離し、一定期間経過後に屠殺し、全身のアミロイド沈着を調べた。

結 果

1. 各種アミロイド線維投与によるアミロイドーシス促進

アミロイド沈着を最も強く誘導したのは、R1.P1-Apoa2^cマウスに沈着するアミロイド線維であるC型AApoAII (AApoAIIc) を投与した場合であった (表1)。沈着レベルはAApoAIIc投与に比較して軽度であるが、ヒトアミロイド線維投与では、投与後3ヶ月のAA, ATTR, AL(λ)-1を投与された全マウスで、肺、舌および消化管に沈着が認められた。これらのアミロイド線維投与マウスでは6ヶ月後には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。A β 2M及びAL(λ)-2投与マウスでは投与後3ヶ月ではアミロイド沈着はほとんど観察されなかった。しかし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

表1. アミロイド線維投与によるアミロイドーシス誘導 (R1.P1-Apoa2^c)

Amyloid	Source	Amyloid Index	
		3 months	6 months
AApoAII	mouse		3.3
AA	mouse		2.2
A β 1-40	synthesized	0.7	
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
A β 2 M	human	0.1	1.9
Albumin	human	0.0	
Control		0.0	0.0

表2. アミロイド線維投与によるアミロイドーシス誘導 (SAMR1)

Amyloid	Source	Amyloid Index	
		3 months	12 months
AApoAII	mouse	0.0	1.7
A β 1-40	synthesized	0.0	0.0
ATTR(V30L)	human	0.0	0.0
Control		0.0	0.0

度な沈着が確認され、A β 2M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についても、投与後3ヶ月ではアミロイド沈着は見られなかった。これらの結果より、動物種やアミロイド蛋白質が異なっても、アミロイド線維の投与によりアミロイド沈着が促進されたことが示された。

一方、アミロイド沈着を起こしにくいB型apoA-IIを持つSAMR1系マウスにヒトA β やATTRを投与して、12ヶ月経過してもアミロイド沈着は観察されなかった (表2)。投与後3ヶ月の舌および小腸の免疫染色の結果、AApoAII沈着部位に投与線維(ヒト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と共に投与したアミロイド線維が微量検出された。各組織のアミロイド線維画分のWestern blot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。AApoAII線維はまず肺(4週)から検出され、その後舌(8週)や消化管(12週)でも検出されるようになった。これらの結果から、投与したアミロイド線維がまず沈着部位に集積し、AApoAII沈着を誘導したことが示唆される。

2. 母子間におけるアミロイド線維伝播の可能性についての検討

アミロイドーシスを発症させた雌マウスから出生し、4週間同じ母親に保育された、仔マウスにおけるアミロイド沈着を調べた。生後4ヶ月齢において、腸管と舌に軽度なアミロイド沈着が認められたが、非発症マウスの仔には沈着は見られなかった。8ヶ月齢では全身に重度の沈着が観察された。この結果から、アミロイドーシス発症マウスの仔における発症の促進が認められ、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。

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 β 蛋白質で提唱された線維形成モデル^{9,10)}である。NDPではアミロイド線維核がアミロイド蛋白質と接触しその構造を変換させ β 構造に富むアミロイド線維が付加される線維伸長反応が迅速に進行すると考えられる。プリオン病では外部から侵入したプリオン核(PrP^{Sc})による宿主プリオン蛋白(PrP^C)の構造変換による線維伸長反応がプリオン病伝播の機構を合理的に説明するとされており^{11,12)}、BSEやCJDでの動物種を越えた伝播が報告されている。アミロイドーシスでは、1) マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)や変異型TTRのトランスジェニックマウスで飼育環境の改善(SPF化)でアミロイドーシス発症が著しく遅延する。2) リューマチや慢性感染症でSAAが上昇しても、AA線維は一部の患者にのみ沈着する。3) FAPではトリプレットリピートによらない表現促進現象(anticipation)が見

られる。4) AApoAIIアミロイドーシスで*in vivo*でAApoAII線維核の静注や消化管を経由した伝播が報告されている^{1,2)}。これらの事実より、我々は今回、アミロイドーシス発症の引き金を各種アミロイド線維に共通した一次構造が引くという可能性の検証を試み、程度は異なるがヒトアミロイド線維の投与でマウスAApoAIIアミロイドーシスが誘発されることを示した。またアミロイドーシスを発症させた雌の仔マウスで発症促進が認められた。今後は他のアミロイドーシスでこのような機構が成り立つか検討することが重要である。

我々はC型apoA-IIからなるAApoAIIが正常型(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することを示した¹³⁾。しかしヒトアミロイド線維のSAMR1への投与では誘発は起こらず、これらの結果は突然変異やアミロイド蛋白の上昇のようなアミロイドーシス発症の前段階にある個体でのアミロイド線維様物質による誘発の可能性を示唆している。

結 語

マウスAApoAIIアミロイドーシスにおいて、マウスC型AApoAIIによる誘発効果が最も強かったが、それ以外のアミロイド線維によるAApoAII沈着の誘発が認められた。この結果から、アミロイド線維形成では、突然変異などのアミロイド蛋白質の一次構造やアミロイド蛋白質濃度の上昇などが前段階として重要ではあるが、それに加え、共通するアミロイド線維構造物質の存在が線維形成を促進する可能性が示された。また、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。本研究によって得られた知見は、アミロイドーシス発症機構解明に関して有用な情報を与えるものと考えられる。

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) Xing Y, Nakamura A, Chiba T, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest* 2001 (in press).
- 3) Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE 1998; Prion protein biology. *Cell* 93:37-48.
- 4) Yamamoto K, Ikeda S, Hanyu N, et al. A pedigree analysis with minimised ascertainment bias shows anticipation in Met30-trans-thyretin related familial amyloid polyneuropathy. *J Med Genet* 1998;35:23-30.
- 5) Higuchi K, Kitado H, Kitagawa K, et al. Development of congenic strains of mice carrying amyloidogenic apolipoprotein A-II (*Apoa2^c*). *Apoa2^c* reduces the plasma level and the size of high density lipoprotein. *FEBS Lett* 1993;317:207-210.
- 6) 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.
- 7) Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T. *Anal Biochem.* 1989;177:244-249.
- 8) Naiki H, Nakakuki K. First-order kinetic model of Alzheimer's beta-amyloid fibril extension in vitro *Lab Invest* 1996;74:374-383.
- 9) Jarrett JT, Lansbury PtJr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993;73:1055-1058.
- 10) Kelly JW, Lansbury PtJr. A chemical approach to elucidate the mechanism of trans-thyretin and β -protein amyloid fibril formation. *Amyloid* 1994;1:186-205.
- 11) Prusiner SB. Prion disease and BSE crisis. *Science* 1997;278:245-251.
- 12) Weissmann C. Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J Biol Chem* 1999;274: 3-6
- 13) 樋口京一、Xing Yanmin, 是永龍巳、他. 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。厚生省特定疾患対策研究事業：アミロイドーシスモデル動物における発症機構の解明に関する研究1999年度研究報告書 2000; 29-33.

Induction of mouse senile amyloidosis (AApoAII) by the injections of various amyloid fibrils

by

Keiichi HIGUCHI*

Xiaoying FU*, Tatsumi KORENAGA*, Takatoshi MATSUSHITA**,
Masanori HOSOKAWA**, Satoshi BABA***, Hironobu NAIKI****, Tokuhiko ISHIHARA*****

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

*** Department of Pathology, Hamamatsu University School of Medicine

****Department of Pathology, Fukui Medical University

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

In mouse senile amyloidosis, apoA-II polymerizes to amyloid fibrils (AApoAII) and deposits systemically. Using AApoAII amyloidosis, we studied the induction of amyloidosis by various amyloid fibrils. Various amyloid fibrils; mouse AApoAII and AA, human AA, ATTR, two kinds of ALI, and A β 2M were isolated and purified. Amyloid fibrils were formed from synthetic A β 1-40 peptides. Amyloid fibrils were injected intravenously into R1.P1-*Apoa2^c* mice with amyloidogenic type C apoA-II. AApoAII deposition was observed in all R1.P1-*Apoa2^c* mice at 3 months after the injections of all kinds of amyloid fibrils except for one ALI. Kinetics of injected human AA amyloid fibrils were studied by Western blot analysis. Human AA fibrils were first detected in the lungs (1 week) and the tongue (4 weeks) and intestine (8 weeks). AApoAII fibrils were detected in the lungs (4 weeks), the tongue (8 weeks) and intestine (12 weeks). On the contrary, A β nor ATTR did induce amyloidosis in SAMR1 mice with wild type apoA-II. Acceleration of amyloidosis was observed in R1.P1-*Apoa2^c* mice born from the mother mice in which severe amyloidosis was induced by AApoAII injection.

These results suggested that invasion of exogenous substances with amyloid fibrils like structures may act as seeds and trigger the conformational change of endogenous amyloid protein to polymerize into amyloid fibril.

アミロイド線維のアミロイド促進因子 (fibril amyloid enhancing factor)の抑制について

研究者 横 田 忠 明* 河 野 裕 夫** 星 井 嘉 信**
権 藤 俊 一** 瀬 戸 口 美 保 子*** 高 橋 睦 夫***
石 原 得 博**

目 的

昨年度は種族および種類が異なったアミロイド線維の腹腔内投与で実験的マウス・アミロイドーシスの促進効果 (amyloid enhancing factor; AEF 活性) が見られることを報告した¹⁾。また、アミロイド線維の経口投与でもアミロイドーシスの発症が促進されることが報告された²⁾。そこで今年度はアミロイド線維の AEF 活性を失活させる方法について検討した結果を報告する。

方 法

実験1. マウス1匹あたり10 μ gのヒト・カルシトニン (Sigma) と incomplete Freund's adjuvant との懸濁液を4週間の間隔で皮下組織内に2回注射した。2回目の注射から18日目にマウス1匹あたり20 μ gのヒト・カルシトニン由来のアミロイド線維を5匹のマウスの腹腔内に注射し、さらに10%カゼインと complete Freund's adjuvant との懸濁液の0.5mlを皮下に注射した。7日目に屠殺して脾臓を摘出しアミロイド沈着の有無を調べた。

実験2. 100 μ gのヒトAAおよび100 μ gのヒト・カルシトニン由来のアミロイド線維を2mlの抗ヒトAA抗体 (DAKO) および2mlの抗ヒト・カルシトニン抗体 (DAKO) とそれぞれ混和後、1匹あたり

20 μ gのアミロイド線維を各々5匹のマウスの腹腔内に注射し、さらに10%カゼインと complete Freund's adjuvant の懸濁液の0.5mlを皮下に注射した。7日目に屠殺して脾臓を摘出しアミロイド沈着の有無を調べた。

実験3. 100 μ gのヒトAAアミロイド線維を100mgのトリプシンおよび2mlのプロテアーゼK濃縮液 (DAKO) で37 $^{\circ}$ C、24時間処理後、酵素活性を失活させるため15分間煮沸して、1匹あたり20 μ gのアミロイド線維を5匹のマウスの腹腔内に注射し、さらに10%カゼインと complete Freund's adjuvant の懸濁液の0.5mlを皮下に注射した。7日目に屠殺して脾臓を摘出しアミロイド沈着の有無を調べた。

実験4. 100 μ gのヒトAAアミロイド線維を2mlの1N水酸化ナトリウムで37 $^{\circ}$ C、24時間処理後塩酸で中和して、1匹あたり20 μ gのアミロイド線維を5匹のマウスの腹腔内に注射し、さらに10%カゼインと complete Freund's adjuvant の懸濁液の0.5mlを皮下に注射した。7日目に屠殺して脾臓を摘出しアミロイド沈着の有無を調べた。

実験5. 100 μ gのヒトAAアミロイド線維を試験管に入れガスバーナーで15分間焼灼し、1匹あたり20 μ gの焼灼したアミロイド線維を5匹のマウスに注射し、さらに10%カゼインと complete Freund's adjuvant の懸濁液の0.5mlを皮下に注射した。7日目に屠殺して脾臓を摘出しアミロイド沈着の有無を調べた。

* 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

*** 山口大学医学部病院病理部

結果および考察

実験1. 5匹中2匹のマウスにアミロイド沈着を認めた。また、その沈着量は微量であった。

昨年度の本研究班でヒトの甲状腺髄様癌に沈着したカルシトニン由来のアミロイド線維をマウスの腹腔内に投与すると、アミロイドーシスが促進され、アミロイド線維にAEF活性がある事を報告した。今回、ヒト・カルシトニンで免疫したマウスでは、アミロイドーシスの促進が抑制された。アミロイドの前駆蛋白で免疫することによりアミロイド線維のAEF活性をある程度抑制できると考え得る結果であった。

実験2. 各々5匹中5匹のマウスにアミロイド沈着を認めた。また、沈着量は対照と同程度であった。

抗体による処理でアミロイド線維のAEF活性の失活が認められなかったのは、抗体量が不足していた可能性があると思われた。

実験3. 各々5匹中5匹のマウスにアミロイド沈着を認め、沈着量も対照と変わらず、これらの酵素処理ではアミロイド線維のAEF活性の失活は認めなかった。また、15分間の煮沸処理ではAEF活性の失活には効果がないと思われた。

実験4. 5匹中のいずれのマウスにもアミロイド沈着は認めなかった。

1N水酸化ナトリウムの処理でアミロイド線維のAEF活性を完全に失活させることができた。NaOHの濃度をどの程度まで下げて効果があるか、さらに検討したい。

実験5. 5匹中2匹のマウスにアミロイド沈着を認めた。

AEF活性を抑制できたと考え得る結果であり、焼灼処理はAEF活性を失活させるのに有効と思われた。

結 語

1. ヒト・カルシトニンの免疫はカルシトニン由来のアミロイド線維のAEF活性の抑制にある程度の効果があった。
2. 1N水酸化ナトリウム処理でAAアミロイド線維のAEF活性は完全に失活した。

3. AAアミロイド線維の煮沸では効果がないが、線維の焼灼にはAEF活性の抑制効果があった。
4. トリプシンおよびプロテアーゼK処理はAAアミロイド線維のAEF活性には影響しなかった。

文 献

- 1) 横田忠明、河野裕夫、石原得博、他. 各種の粗製アミロイド線維のAmyloid enhancing factor (AEF) 効果. 厚生省特定疾患対策研究事業 アミロイドーシスモデル動物における発症機序の解明に関する研究 1999年度研究報告書 2000;39-41.
- 2) 石原得博、崔 丹、河野裕夫. AAアミロイド線維の経口投与によるAAアミロイドーシス発症促進効果についての検討. 厚生省特定疾患対策研究事業 アミロイドーシスモデル動物における発症機序の解明に関する研究1999年度研究報告書 2000;20-22.

Inhibition of fibril-amyloid enhancing factor

by

Tadaaki YOKOTA*

Hiroo KAWANO**, Yoshinobu HOSHII**, Tosikazu GONDO**, Mihoko SETOGUCHI***,
Mutsuo TAKAHASHI***, Tokuhiko ISHIHARA**

from

*Department of Pathology, Kokura Memorial Hospital

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

***Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital

Development of murine experimental amyloidosis is accelerated by intraperitoneal injection of amyloid fibrils.

Human calcitonin related-amyloid fibril accelerated experimental amyloidosis in mice, but the accelerating activity was partially inhibited in mice immunized with human calcitonin.

Human AA amyloid fibril was treated with either 1N NaOH, trypsin, proteinase K for 24 hour, boiling or burning for 15 minutes. The accelerating activity completely disappeared following treatment with 1N NaOH, but only partially by burning. Trypsin, proteinase K and boiling treatment had no effect.

Conclusion: treatment with 1N NaOH completely inhibited, but immunization with amyloid-related protein and burning treatment only partially inhibited the fibril-amyloid enhancing factor.

A β アミロイドのAPPsw miceにおける沈着機序

研究者 瓦 林 毅 針 谷 康 夫 池 田 将 樹
松 原 悦 朗 東 海 林 幹 夫

目 的

アルツハイマー病 (AD) の発症機序として、アミロイド β 蛋白 (A β) が沈着して脳A β アミロイドーシスが起り、続いて神経原線維変化と神経細胞死が出現するというアミロイド・カスケード説が有力視されている。この説に基づいてアミロイド前駆体タンパク (APP) を過剰産生する transgenic mouse が作成され、AD のモデル動物として期待されている。

Sweden 型の突然変異 APP を過剰産生する APPsw mice、Tg2576 は 1996 年に Karen Hsiao、針谷康夫、Steven Younkin らによって確立された¹⁾。我々は昨年度までの検討から、APPsw mice には脳 A β アミロイドーシスと行動異常が再現され、AD の有用なモデル動物であることを報告してきた。しかし、このマウスにおける変異 APP の過剰発現がどのように A β を蓄積してくるかに関しては未だに不明な所が多い。また、従来 A β アミロイドは細胞外に蓄積するものと思われていたが、近年の培養細胞を用いた検討から細胞内でも A β 凝集が始まることが報告された²⁾。もし AD 脳においても細胞内で A β アミロイド形成が始まるとすれば、細胞外への A β 分泌を抑制するという従来の AD 治療の方法論は転換を迫られることとなる。

本年度我々は APPsw mice を用いて APP および

A β の経時的発現を詳細に解析し、脳アミロイド沈着開始因子としての SDS 不溶性 A β の同定とこれに伴う脳アミロイド沈着の進展経過を明らかにした。また、髄液・血漿 A β の経時的变化を測定することによって AD の診断マーカーとしての有用性の根拠を明らかにした³⁾。さらに脳アミロイドの細胞内早期沈着部位としての lipid rafts を同定した。

方 法

1~25 月齢の APPsw mice の半脳を 2% SDS と 70% ギ酸で連続抽出し、鈴木らによって確立された Sandwich ELISA 系を用いて経時的に A β 40、A β 42 量を測定した⁴⁾。また、A β および APP を immunoblotting で検討した。半脳からは 4% パラフォーム固定パラフィン切片を作成し、A β 40 および A β 42 に対する抗体で経時的に免疫染色を行った。

APPsw mice から血漿と髄液を採取し、Sandwich ELISA 系を用いて経時的に A β 40、A β 42 量を測定し、脳 A β 量との比較検討を行った。

一部の脳は 1% Triton-X で homogenize し、sucrose gradient による fractionation を行い、各 fraction にて A β を経時的に測定した。

結果および考察

1. APPsw mice の発現蛋白を脳 SDS 分画の Western blotting で経時的に解析した。APP C 末抗体に

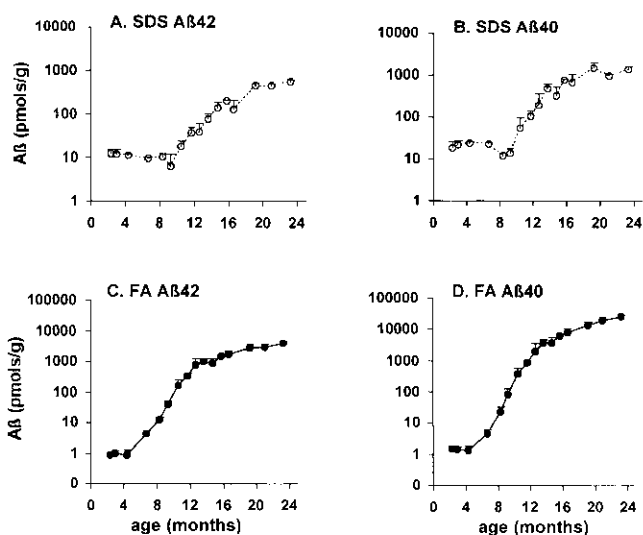


図1. APPswにおける脳Aβ42およびAβ40の経時的ELISA測定

よる染色ではAPPsw miceはnontransgenic miceの7倍のAPP増加を認めた。またamyloidogenic C-terminal fragment (CTF)の著明な増加を認めた。ヒトAPP specificな抗体 (6E10) で染色すると、ヒトAPPおよびamyloidogenic CTFがTg2576のみで同定された。APPおよびCTFの発現自体は若年からAβが沈着する高齢まで変化を認めなかった。よってAPPsw miceのAβ沈着には発現蛋白が7倍ほど恒常的に発現することが必要と思われた。

脳AβのELISAによる測定では、SDS分画中に可溶性Aβ42、Aβ40は若年から高濃度に認められた(図1)。経時的には9月齢以降で上昇を認めた。それに比べてギ酸分画中には当初はAβは認められず、7~8月齢から指数関数的な蓄積を認めた。ギ酸分画中のSDS不溶性Aβの出現と共に8~9月齢にSDS可溶性Aβは一時的に低下を示した。この低下はSpearman's rank correlationでAβ42、Aβ40とも有意であった(Aβ42, p=0.02; Aβ40, p=0.003)。SDS不溶性Aβの出現に伴うSDS可溶性Aβの一時的低下はWestern blottingでも4kDのバンドの低下として確認された。よってAβがSDS不溶性を獲得してギ酸でしか溶けないconformationに変化することが脳Aβアミロイド蓄積の誘因になると考え

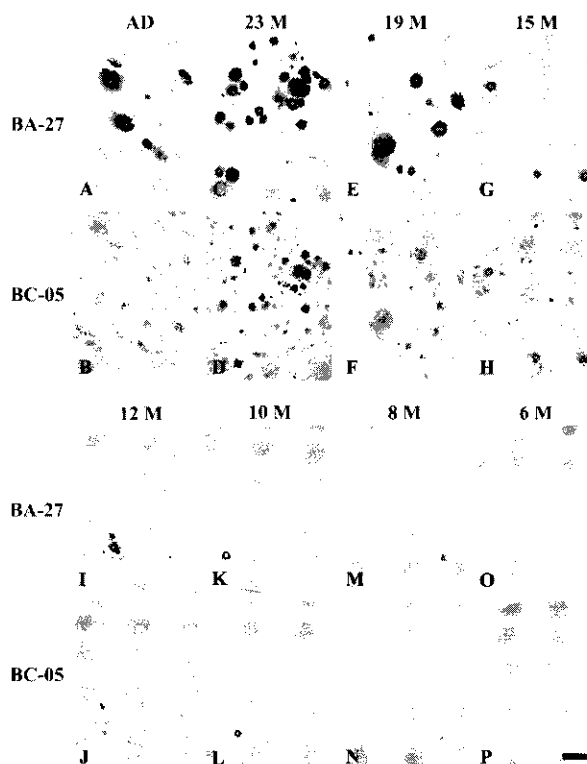


図2. APPsw miceにおけるAβ42およびAβ40の経時的免疫染色

られた。

抗Aβ42抗体、抗Aβ40抗体による免疫染色では、ELISAの検討と同様に8月齢から老人斑が出現し、その数を増やした(図2)。当初から出現するのはAβ42、Aβ40の両方で染まるneuritic plaqueであった。一般的に早期老人斑と言われるAβ42のみに陽性のdiffuse plaqueはこのマウスでは12月齢からの後期に出現する老人斑であった。従来、diffuse plaqueからneuritic plaqueへの移行が考えられてきたが、APPsw miceの所見からは2つの老人斑の起源は異なることが想定された。

2. 我々はこれまでAD患者で早期から髄液および血漿Aβ42が低下することを示し、これらがADの有用な診断マーカーであることを報告してきた⁹⁾。この髄液・血漿Aβの低下の根拠をAPPsw miceにおいて検討した(図3)。脳Aβが蓄積し始める8月齢以降で脳Aβの蓄積に反比例して髄液Aβ42、血漿Aβ42とも有意に低下した(髄液Aβ42, p=0.03; 血漿Aβ42, p=0.008)。Aβ40は血漿のみで有意の低

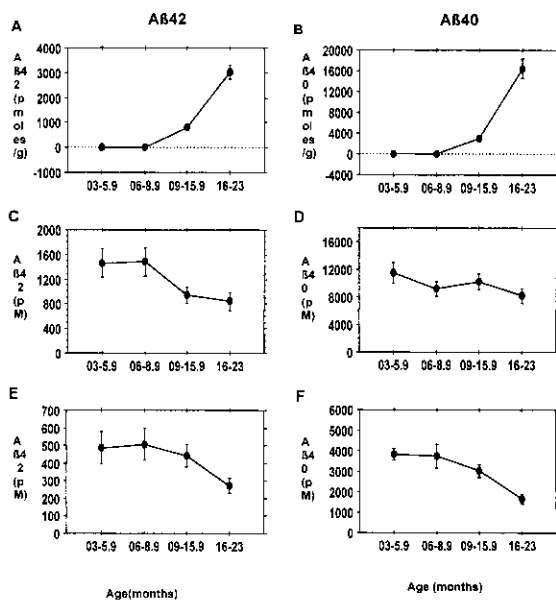


図3. APPsw miceにおける脳、髄液、血漿中Aβ42およびAβ40

下を認めた(p=0.006)。この減少が単に加齢に伴うものかどうか、脳Aβ蓄積を認めないnontransgenic miceで髄液・血漿Aβを測定したが、加齢による減少は認めなかった。よってAPPsw miceの髄液・血漿Aβの低下は加齢でなく、脳Aβ蓄積と相関することが示された。これらがAD脳患者で髄液・血漿Aβ42の低下が生化学的のマーカーとなる理論的根拠であると考えられた。

3. 近年、lipid raftsと呼ばれる界面活性剤で不溶性のsignal transduction moleculeやreceptorが集中する特殊な膜分画にAβが存在することが示されている⁶⁾。我々はlipid raftsがAβの早期沈着部位であるかどうかをAPPsw miceを用いて経時的に検討した。4月齢では全Aβの4分の1がlipid raftsに存在した。加齢と共にlipid rafts中のAβは急速に上昇した。この増加は他のfractionには認められず、したがってlipid raftsがAβの超早期蓄積部位であると考えられた。高齢APPsw miceのWestern blottingでは、Aβはlipid raftsおよび分画の際のpelletに特異的にmonomerおよびdimerのバンドとして認められた。電顕ではpelletにはamyloid fibrilおよびamyloid coreを認めたが、lipid raftsにも少量ながらamyloid fibrilを認めた。したがってlipid raftsにはamyloid fibrilも形成されていることが示

され、ここがAβの超早期の沈着部位と考えられた。

以上、APPsw miceでは7倍のAPPの過剰発現が恒常的に認められた。組織学的にはneuritic plaqueは8月齢から、diffuse plaqueは12月齢から出現し、異なる老人斑の起源が想定された。8月齢で脳AβはSDS可溶性から不溶性となり、このAβの不溶化獲得が脳アミロイド形成の誘因と考えられた。脳Aβの蓄積に反比例して髄液・血漿Aβは減少し、この変化が髄液・血漿Aβの低下がADの生化学的マーカーとなる根拠と考えられた。以上の検討よりAPPsw miceにおいてAβの過剰産生こそが脳アミロイドを再現することが示され、APPsw miceはAD病態の解明および治療法の開発に有用な動物モデルであると考えられた。

APPsw miceではlipid raftsが脳Aβアミロイドの超早期沈着部位であることが示唆された。最近、抗コレステロール薬がADの発症を減らすこと⁷⁾、またADマウスモデルで高コレステロール食が脳アミロイド沈着を促進することが示され⁸⁾、コレステロールがAβ沈着の危険因子として注目されている。lipid raftsは細胞内の主たるコレステロール含有部位であり⁹⁾、さらにin vitroでAβ凝集促進作用をもつGM1 gangliosideの特異的な局在部位である¹⁰⁾。もう一つの脳アミロイドであるprion蛋白はlipid rafts内で凝集性の高いscrapie型に転換することが知られている¹¹⁾。よってAβ沈着におけるlipid raftsの意義を明らかにすることが脳アミロイド沈着機序を解明する上で重要と考えられる。今後、APPsw miceのlipid raftsをさらに詳細に検討し、AD脳でもlipid rafts中のAβ蓄積が起こるかどうかまた、高コレステロール食がlipid rafts中のAβを変化させるかどうか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, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science 1996;274:99-102.
- 2) Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, et al. The oligomerization of amyloid β-protein begins