

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度
論モデルの開発、および生理的重合阻害分子なら
びに非ペプチド性重合阻害剤の探索班

平成12年度研究報告書

平成13年3月

主任研究者 内木 宏延

福井医科大学医学部病理学第二講座

目次

研究班構成	3
総合研究報告	7
福井医大第二病理	内木 宏延
総括研究報告	17
福井医大第二病理	内木 宏延
分担研究報告	
全身性 AL アミロイドーシス剖検例の集積、及び臨床的・病理学的解析	25
福井医大第一内科	上田 孝典
信州大医学部第三内科	池田 修一
天理よろづ相談所病院病理	宮川 文、弓場 吉哲
京都民医連中央病院病理	藤田 葉子、若田 泰
熊本大医学部第一内科	寺崎 久泰、安東 由喜雄
山口大医学部第一病理	星井 嘉信、河野 裕夫、石原 得博
京都大医学部附属病院病理部	奥野 知子、北市 正則、山邊 博彦
浜松医大第二病理	馬場 聡
愛知がんセンター	大野 竜三
金沢大医学部神経内科	山田 正仁
東京医歯大医学部保健衛生学科	窪田 哲朗
新潟大医学部第二内科	下条 文武
福井医大第二病理	内木 宏延
新鮮凍結臓器からの AL アミロイド線維ならびに AL 蛋白の精製、及び電顕的・生化学的解析	35
新潟大医学部第二内科	下条 文武
福井医大第二病理	高橋 直生、長谷川 一浩、山口 格、 内木 宏延
試験管内 AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析、及び線維伸長に影響を及ぼす種々の生体分子ならびに有機化合物の探索	43
福井医大第二病理	内木 宏延、高橋 直生、長谷川 一浩、 山口 格
新潟大医学部第二内科	下条 文武
研究成果の刊行に関する一覧表	51

研 究 班 構 成

研 究 班 構 成

区 分	氏 名	所 属	職名
主任研究者	内木 宏延	福井医科大学医学部第二病理	教授
分担研究者	下条 文武 上田 孝典	新潟大学医学部第二内科 福井医科大学医学部第一内科	教授 //
(事務局) 経理事務連絡担当責任者	内木 宏延	福井医科大学医学部第二病理 〒910-1193 福井県吉田郡松岡町 下合月 TEL: 0776-61-3111 (内線: 2235) ダイヤルイン0776-61-8320 FAX: 0776-61-8123	教授

平成 10～12 年 度

総 合 研 究 報 告

研究課題名：試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論
モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに
非ペプチド性重合阻害剤の探索

主任研究者氏名：内木 宏延

試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索

主任研究者 内木宏延 福井医科大学病理学第二講座教授

研究要旨

試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルを確立するため、全身性 AL アミロイドーシス症例臓器あるいは患者尿を3年間で13例集積し、臨床的、及び種々の特殊染色を含め病理組織学的に解析した。次に、上記症例中5症例の新鮮凍結臓器より AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を精製し、生化学的に解析した。さらにこれらを用いて、蛍光色素チオフラビン T を用いたヒト AL アミロイド線維の分光蛍光定量法を確立し、同法により AL アミロイド線維の試験管内伸長が一次反応速度論モデル、つまりすでに存在する線維断端に、AL 蛋白が立体構造を変えながら次々に結合することにより起こるといふモデルにより説明できることを明らかにした。最後に、上記実験系を用いて線維伸長に及ぼす種々の生体分子および有機化合物の影響を解析した。その結果、AL アミロイド線維伸長が、アミロイド共存分子のアポ E、 α_1 -ミクログロブリン、及びフィブロンネクチンにより阻害され、デルマタン硫酸により促進された。また、抗酸化剤 NDGA が線維伸長を阻害した。

分担研究者

下条文武 新潟大学医学部第二内科教授
上田孝典 福井医科大学第一内科教授

A. 研究目的

全身性 AL アミロイドーシスは、日本における代表的アミロイドーシスであるが、他のアミロイドーシス同様、有効な治療法はおろか発症機構の詳細は解明されていない。われわれは本プロジェクトで、AL アミロイド線維形成・沈着機構の解明、及び沈着阻害剤開発のため、以下の3項目を研究目的とした。(1) 全身性 AL アミロイドーシス症例臓器あるいは患者尿を集積する。(2) 試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルを確立し、AL アミロイド線維形成・沈着の分子機構を解明する。(3) 試験管内アミロイド線維形成を阻害する生体分子、及び有機化合物を探索する。

B. 研究方法

症例の集積：

全身性 AL アミロイドーシス症例の剖検があった場合、必要十分量のアミロイド沈着新鮮凍結臓器を採取・収集出来るように、全国の関連する病理医、及び臨床家に呼びかけた。

AL アミロイド線維の精製：

新鮮凍結組織を解凍、はさみにて小片に切断後、Pras法にて粗抽出し、さらに $10^5 \times g$ 超遠心、及び50-60%不連続ショ糖密度勾配超遠心によりALアミロイド線維を精製した。

AL 蛋白の精製：

精製 AL アミロイド線維の一部を6M尿素で可溶化後、ゲルろ過クロマトグラフィーで分子量別に単体 AL 蛋白を分画、精製

した。

AL 蛋白の高純度精製：

中性 pH 域でも十分な線維伸長を認めた症例 2、7 については、HPLC による高純度精製を行った。精製線維の一部を 8 M グアニジン塩酸で可溶化、6 M 尿素への脱塩置換後、陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、カラム素通り画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分子量別に分画した。

AL アミロイド線維の電顕的解析：

精製 AL アミロイド線維の形態は、1% 燐タングステン酸 (pH 7.0) でネガティブ染色後、透過電顕 (Hitachi H-7000) にて観察した。加速電圧は 75 kV であった。

AL アミロイド線維、及び AL 蛋白の電気泳動、及びウェスタンブロッティングによる解析：

精製 AL アミロイド線維、及び AL 蛋白の蛋白組成は、還元条件下あるいは非還元条件下に Tricine-SDS-PAGE 法により解析した。ウェスタンブロッティングは定法に従い、PVDF 膜 (ミリポア社) に転写した蛋白バンドを、抗 κ 、抗 λ 、抗 apoE、及び抗 SAP の各抗体を用いて検出した。

高純度 AL 蛋白のアミノ酸一次配列、及び二次構造の解析：

症例 2、7 の高純度精製 AL 蛋白を電気泳動後 PVDF 膜に転写し、CBB 染色後主要バンドを切り出し、エドマン分解を用いたアミノ酸一次配列の解析を行った。また症例 2 の高純度精製 AL 蛋白を用い、遠紫外域 CD スペクトルを測定した。

AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析：

(i) 各症例より得られた精製 AL 蛋白画分を、単独で、あるいは超音波により断片化した精製 AL アミロイド線維と共に 37°C

で反応させた。反応溶液は容量 30~50 μ l で 60~100 μ g/ml の AL アミロイド線維、30 μ M AL 蛋白、50 mM バッファー (pH 1.5~9.0)、100 mM NaCl、及び 0.3-0.5 M 尿素を含んでいた。(ii) アミロイド線維形成・伸長を、電顕観察、及びチオフラビン T (ThT) を用いた分光蛍光定量法により評価した。精製 AL アミロイド線維を、ThT 溶液と混和し、極大励起・蛍光波長、及び至適 pH を分光蛍光光度計を用いて測定した。(iii) 伸長反応の至適 pH、及び伸長初速度に及ぼすアミロイド線維の数濃度、あるいは AL 蛋白濃度の影響の検討も行った。

線維伸長反応に及ぼす各種生体分子ならびに有機化合物の影響解析：

中性 pH 域でも十分な線維伸長を認めた症例 2、7 の pH7.5 における伸長反応溶液に、種々のアミロイド共存分子 (アポ E、SAP、フィブロンネクチン、 α_2 -マクログロブリン、 α_1 -アンチキモトリプシン、アプロチニン、デコリン、ヘパラン硫酸、及びデルマトン硫酸)、血清蛋白 (α_1 -ミクログロブリン)、及び有機化合物 (nordihydroguaiaretic acid (NDGA)、リファンピシン、デキサメサゾン、ドキシソルピシン、及び高濃度の DMSO) を加え、反応開始 6 ならびに 24 時間後の電顕像、及び ThT 蛍光量を評価した。

C. 研究結果

(1) 3 年間で集積した計 13 例の全身性 AL アミロイドーシス症例について臨床的、病理学的に解析した。患者は女性 9 例、男性 4 例で平均年齢は 58.8 才、 λ 型 7 例、 κ 型 5 例、及び現在検討中 1 例であった。尿中 BJP は、症例 2、7、8 を除き全例に認められた。骨髄形質細胞比率は、症例 3、5、10 で 10% を越え、多発性骨髄腫に合併した AL アミロイドーシスと位置付けられた。初発症状は、うっ血性心不全症状が最も多く、労作時呼吸困難 (症例 2、4、6)、全身浮腫 (症

例 7) を認めた。症例 3、8、11 はネフローゼ症候群で、症例 9 は下肢のしびれ感を認めた。直接死因は、症例 8、10-12 を除き心アミロイドーシスを基盤としており、症例 1、2 は左房内血栓に起因した脳梗塞により、症例 2、3、5、6、9 は心室細動等の不整脈により、症例 4 は慢性左心不全による肺うっ血ならびに続発性肺炎により、症例 7 はうっ血性心不全による胸水貯留、呼吸不全により死亡していた。また、症例 8 は腎不全、症例 10 は多臓器不全により死亡していた。症例 8、10-13 を除き全例とも臨床症状を反映して心に高度のアミロイド沈着を認めた。さらに、症例 1、2 では肺に、症例 3、8、9 では腎に、症例 6、7、10、13 では肝に、症例 3、6-9 では脾に、症例 5 では舌・皮膚に、症例 9 では坐骨神経に、それぞれ高度のアミロイド沈着を認めた。今回、上記症例のうち 4 例の全身性 AL アミロイドーシス剖検例(症例 2 : 57 歳女性、症例 3 : 44 歳女性、症例 6 : 55 歳男性、症例 7 : 68 歳女性、いずれも λ 型) 並びに生体肝移植症例(症例 13 : 55 歳男性、 κ 型) の新鮮凍結臓器(症例 2 : 肺、症例 3 : 脾、症例 6 : 脾、症例 7 : 脾、症例 13 : 摘出肝) より AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を精製した。

(2) 上記精製法により、電顕観察にて、幅約 10 nm の典型的アミロイド線維を得た。還元条件下に Tricine-SDS-PAGE 法を行い、各精製 AL アミロイド線維溶液中に複数のバンドを認めた。ウェスタンブロッティングを行い、各症例とも 57 kDa 以外のバンドは抗ヒト λ ・ κ 抗体で陽性に染色された。

(3) 症例 2、7 の高純度 AL 蛋白のアミノ酸一次配列を解析したところ、いずれも λ 鎖可変領域 N 末端に一致した。さらに、症例 2 の高純度 AL 蛋白の二次構造を遠紫外域 CD スペクトルで解析したところ、中性 pH 域で既にかなりランダムな構造を取っており、pH を変化させても明らかな構造変化を認めなかった。

(4) AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析 :

(i) 線維伸長反応の至適 pH は、ほとんどの症例で酸性域(症例 2 : pH 2.5、症例 3 : pH 3.5、症例 6 : pH 2.0、症例 13 : pH 2.5) にあったが、症例 7 では中性域(pH 7.5-8.0) にあった。また、症例 2、7 は酸性域、中性域に二峰性のピークを示し、症例 2 は中性域でも線維伸長を認めた。さらに、ほぼ完全な軽鎖に比べ、そのフラグメントである低分子量 AL 蛋白を用いた方が反応が起こりやすかった。(ii) 上記全症例において、低分子量 AL 蛋白を用いた線維伸長反応を解析したところ、いずれも反応開始後蛍光はラグタイム無く増加し、やがて平衡に達した。個々の症例により平衡に達するまでの時間は異なった。従って、反応開始後蛍光が直線的に増加する範囲で伸長初速度を求めた。この結果、1) 伸長初速度は AL アミロイド線維の数濃度に比例し、2) 重合初速度は AL 蛋白濃度に比例し、3) 各 AL 蛋白濃度での伸長初速度は、重合初速度と脱重合速度(一定)の和で表された。以上より、AL アミロイド線維伸長が普遍的に一次反応速度論モデルに従う事を証明した。(iii) 電顕観察により、症例 2、7 以外の 3 症例においても、中性 pH 域で線維伸長が起こることを確認した。(iv) 症例 2、7 において、低分子量 AL 蛋白単独でインキューベートする事で線維形成が起こることを確認した。

(5) AL アミロイド線維伸長は、アミロイド共存分子のアポ E、 α_1 -ミクログロブリン、及びフィブロンネクチンにより阻害され、デルマタン硫酸により促進された。また、抗酸化剤 NDGA が線維伸長を阻害した。

(6) われわれは本研究課題と共に、透析アミロイドーシス、及びアルツハイマー病におけるアミロイド線維形成の反応速度論的解析を並行して遂行している。そして、各々の成果を他のアミロイドーシス研究に

フィードバックすることにより、個々のアミロイドーシスの特殊性と共に、ヒトアミロイドーシス全般に共通する発症機構・因子を明らかにすることをグループの主要な研究目標としている。3年間で以下の成果を上げた。1) 透析アミロイドーシスでは、 $A\beta 2M$ 線維が中性 pH 反応液中でオリゴマー以下まで脱重合を起こすとともに、アポ E がその脱重合反応を濃度依存性に抑制することを明らかにした。また、各種グリコサミノグリカン(GAGs)およびプロテオグリカン(PGs)が $A\beta 2M$ 線維形成・分解に及ぼす影響を検討したところ、GAGs および PGs は、試験管内での $A\beta 2M$ 線維形成・分解反応において二相性の影響を示した。すなわち、GAGs、PGs は、線維伸長反応において $\beta 2$ -ミクログロブリン($\beta 2$ -m)分子に作用した場合には線維伸長反応を抑制するが、関節に存在する PGs の一部は、 $\beta 2$ -m からの $A\beta 2M$ 線維形成反応を惹起し、さらに一端形成された $A\beta 2M$ 線維を強く安定化させ分解を抑制する事から、長期的には $A\beta 2M$ 線維形成・沈着に対し促進的に作用していると考えられる。2) アルツハイマー病では、アポ E、及び種々の抗酸化剤の β アミロイド線維(fA β)形成に及ぼす阻害機構が異なること、及び試験管内で $A\beta(1-42)$ と $A\beta(1-40)$ が共存する場合、相互作用をした上で fA β 形成を行うことを明らかにした。また、生体により近いモデルとして、系外から $A\beta$ 蛋白が供給され続ける開放反応系を、表面プラズモン共鳴法を用いて構築し、fA β の伸長、及び脱重合機構を解析した。その結果、開放反応系においても、fA β 伸長過程が一次反応速度論モデルに従うことを証明した。また、 $A\beta$ 蛋白を含まない緩衝液を添加すると fA β が脱重合することを示し、重合速度と脱重合速度が均衡する濃度(臨界モノマー濃度)を直接測定したところ、約 0.2 μM であった。

D. 考察

各症例から精製された AL アミロイド線維の生化学的解析の結果、いずれのアミロイド線維もほぼ完全な $\lambda \cdot \kappa$ 鎖を含む複数のフラグメントから構成され、しかも症例ごとに各フラグメントの分子量が異なっていた。一般に AL アミロイドーシスは、腫瘍性形質細胞の分泌するモノクローナルな軽鎖が蛋白分解酵素による限定分解を受けた後にアミロイド線維に重合し、組織に沈着するとされている。上記結果は、AL 蛋白の一次構造が症例ごとに異なっているため、蛋白分解酵素による限定分解に多様性が生じたことを示唆している。さらに上記結果は、分子量の異なる複数の $\lambda \cdot \kappa$ 鎖フラグメントが、アミロイド線維形成に不可欠の共通領域(おそらく可変領域の一部)を介して1本のアミロイド線維を構成することを示唆しており大変興味深い。それを裏付けるように、解析した AL 蛋白のアミノ酸配列は、いずれも免疫グロブリン λ 鎖可変領域 N 末端に一致した。しかし、各分子量の $\lambda \cdot \kappa$ 鎖フラグメントが、それぞれ単一な蛋白組成のアミロイド線維を形成し、全体として蛋白組成の異なるアミロイド線維の集合が組織に沈着している可能性も否定できず、さらに検討を加える必要がある。

線維伸長反応は、ほとんどの症例で酸性 pH 域にそのピークを認めたが、症例 7 では中性域にピークを認めた。症例 2 の高純度 AL 蛋白は、中性 pH 域で既にかなりランダムな構造を取っており、pH を変化させても明らかな構造変化を認めなかった。これは、プロテアーゼによるフラグメント化により、免疫グロブリン軽鎖のコンパクトな立体構造がほぐれたためと考えられ、このことが、いずれの症例においても、程度の差こそあれ酸性・中性の両方で線維伸長を認める要因なのではないかと考えている。

$\lambda \cdot \kappa$ タイプを問わず解析した全 5 症例

において、アミロイド線維伸長が一次反応速度論モデルにより説明できた。われわれはこれまでに、種々のヒト・マウスアミロイド線維伸長も同モデルで説明できることを明らかにしているが、今回の結果より、同モデルがアミロイド線維形成の普遍的モデルであることが明らかになった。

抗酸化剤 NDGA が線維伸長を阻害した。抗酸化剤のモチーフを持つ有機化合物がアミロイド線維形成を阻害することが知られているが、上記結果は、このモチーフを基に合成展開を行い、AL アミロイド線維形成阻害剤を開発できる可能性を示唆している。また今回開発した実験系は、これらの阻害剤をスクリーニングする際の基本的分析手段として利用できる。さらに、AL アミロイド線維伸長過程が種々の生体分子により修飾を受けていることが明らかになった。現在作業仮説として、生体におけるアミロイドの沈着は、前駆蛋白からの線維形成・沈着の各段階における様々な生体分子の促進・阻害効果の総和として起こると考えている。

E. 結論

全身性 AL アミロイドーシス症例臓器あるいは患者尿を 3 年間で 13 例集積し、臨床的、及び病理学的に解析した。次いでこれら 13 症例のうち 5 例の新鮮凍結臓器より AL アミロイド線維および AL 蛋白を精製し、AL 蛋白の一次・二次構造解析を含めた種々の生化学的解析を行った。さらにこれらの AL アミロイド線維および AL 蛋白を用いて、AL アミロイド線維伸長が普遍的に一次反応速度論モデルに従う事を証明し、多くの場合伸長の至適 pH が酸性域にあるものの、中性 pH 域でも線維伸長が起こりうることを明らかにした。最後に、線維伸長が種々の生体分子による修飾を受け、有機化合物により阻害されうることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Naiki H, Hasegawa K, Yamaguchi I, Nakamura H, Gejyo F and Nakakuki K. Apolipoprotein E and antioxidants have different mechanisms of inhibiting Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* 37:17882-17889, 1998

Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C and Yanagisawa K. Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid β -protein in cell culture. *J. Biol. Chem.* 274:15110-15114, 1999

Naiki H and Gejyo F. Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Methods Enzymol.* 309:305-318, 1999

Hashimoto N, Naiki H and Gejyo F. Modification of β 2-microglobulin with D-glucose or 3-deoxyglucosone inhibits A β 2M amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid* 6:256-264, 1999

Hasegawa K, Yamaguchi I, Omata S, Gejyo F and Naiki H. Interaction between A β (1-42) and A β (1-40) in Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* 38:15514-15521, 1999

Yamaguchi I, Hasegawa K, Naiki H, Mitsu T, Matuo Y and Gejyo F. Extension of A β 2M amyloid fibrils with recombinant human β 2-microglobulin. *Amyloid* (in press)

2. 学会発表

内木宏延、中久木和也
アポ E、及び抗酸化剤の、アルツハイマー

病 β アミロイド線維形成阻害機構の比較解析

第 87 回日本病理学会総会 1998 年 4 月 14-16 日 広島、日病会誌 87(1), 321, 平成 10 年 3 月

内木宏延、中久木和也

アポ E および抗酸化剤の、アルツハイマー病 β アミロイド線維形成阻害機構の比較解析

日本基礎老化学会第 21 回大会 1998 年 6 月 17-19 日 東京、基礎老化研究 22(1), 72, 平成 10 年 6 月

Naiki H, Gejyo F and Nakakuki K

Apolipoprotein E and antioxidants have different mechanisms of inhibiting Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro.

VIII International Symposium on Amyloidosis, August 7-11, 1998, Rochester, Abstracts 186, Kyle RA and Gertz MA (ed.): Amyloid and Amyloidosis 1998, Parthenon Publishing, 470-472, July 1999

Gejyo F, Naiki H and Hashimoto N

Inhibitory effect of advanced glycation end products (AGE)-modified β 2-microglobulin on amyloid fibril polymerization model of dialysis-related amyloidosis.

VIII International Symposium on Amyloidosis, August 7-11, 1998, Rochester, Abstracts 213, Kyle RA and Gertz MA (ed.): Amyloid and Amyloidosis 1998, Parthenon Publishing, 492-496, July 1999

内木宏延、下条文武、上田孝典、池田修一、長谷川一浩、山口 格

試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索 I—蛍光色素チオフラビン T を用いた、ヒト AL アミロイド線維分光蛍光定量

法の開発—

厚生省特定疾患代謝系疾患調査研究班アミロイドーシス分科会平成 10 年度総会 1998 年 12 月 1-2 日 京都、同プログラム・抄録集 重点研究事業、同 1998 年度研究報告書 171-174, 1999 年 3 月

長谷川一浩、小俣三郎、内木宏延

アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内伸長反応における β ペプチド 1-42 と 1-40 の相互作用の検討

第 88 回日本病理学会総会 1999 年 4 月 6-8 日 東京、日病会誌 88(1), 165, 平成 11 年 3 月

長谷川一浩、内木宏延

アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成反応における β ペプチド 1-42 と 1-40 の相互作用

日本基礎老化学会第 22 回大会 1999 年 6 月 16-18 日 京都、基礎老化研究 23(1), 19, 平成 11 年 6 月

内木宏延

アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析

第 42 回日本神経化学会大会 1999 年 9 月 15-17 日 広島、神経化学 38(3), 232, 平成 11 年 9 月、Neurochem. Res. 25(7), 1004-1005, 2000 年 8 月

長谷川一浩、小俣三郎、内木宏延

アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内伸長反応における β ペプチド 1-42 と 1-40 の相互作用解析

第 37 回日本生物物理学会総会 1999 年 10 月 2-5 日 和光

内木宏延

アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析—アルツハイマー病 β アミロイドを中心に

大阪大学蛋白質研究所セミナー タンパク質のフォールディング問題—その物理学的基礎と生物学的意義 1999年11月25-26日 大阪

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、下条文武、上田孝典、内木宏延

試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索 II—試験管内線維伸長の反応速度論的解析—

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班平成 11 年度研究報告会 2000年2月3-4日 東京、同プログラム・抄録集 重点研究事業 1

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、下条文武、内木宏延

β 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維 (fA β 2M) の中性 pH 反応液における脱重合反応とアポリポプロテイン E (ApoE) の fA β 2M 安定化作用

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班平成 11 年度研究報告会 2000年2月3-4日 東京、同プログラム・抄録集 演題番号 9、同平成 11 年度研究報告書 33-35、平成 12 年 3 月

長谷川一浩、山口 格、下条文武、内木宏延

アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成反応における β ペプチド 1-42 と 1-40 の相互作用

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班平成 11 年度研究報告会 2000年2月3-4日 東京、同プログラム・抄録集 演題番号 24、同平成 11 年度研究報告書 97-102、平成 12 年 3 月

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、内木宏延

β 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維 (fA β 2M) の中性 pH 反応液における脱重合反応とアポリポプロテイン E (ApoE) の fA β 2M 安定化作用

第 89 回日本病理学会総会 2000年4月11-13日 大阪、日病会誌 89(1), 276、平成 12 年 3 月

内木宏延

アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析—透析アミロイドーシスを中心として— 第 45 回日本透析医学会学術集会・総会 シンポジウム 透析アミロイドーシス 2000年6月16-18日 福岡、同プログラム・抄録集 598

内木宏延、小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁

アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成及び分解機構の解明

文部省特定領域研究 C「先端脳」平成 12 年度班会議 2000年12月22-23日 東京、同プログラム・抄録集 96

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、上田孝典、下条文武、内木宏延

試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索

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班平成 12 年度研究報告会 2001年2月1-2日 東京、同プログラム・抄録集 重点研究事業 1

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、下条文武、内木宏延

β 2-ミクログロブリン関連アミロイドーシスにおけるグリコサミノグリカン及びプロテオグリカンの影響

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班平成 12 年度研究報告

会 2001 年 2 月 1-2 日 東京、同プログラム・抄録集 演題番号 6

小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁、内木宏延

開放反応系を用いたアルツハイマー病 β アミロイド線維形成及び分解機構の解明

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班平成 12 年度研究報告

会 2001 年 2 月 1-2 日 東京、同プログラム・抄録集 演題番号 19

平成 12 年 度
総 括 研 究 報 告

研究課題名：試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論
モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに
非ペプチド性重合阻害剤の探索

主任研究者氏名：内木 宏延

試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索

主任研究者 内木宏延 福井医科大学病理学第二講座教授

研究要旨

今年度は、全国より新たに5症例の全身性ALアミロイドーシス症例臓器あるいは患者尿を集積し、3年間で集積した計13症例について臨床的、及び種々の特殊染色を含め病理組織学的に解析した。次に、上記症例中5症例の新鮮凍結臓器よりALアミロイド線維、及びAL蛋白を精製し、生化学的に解析した。さらにこれらを用いて、蛍光色素チオフラビンTを用いたヒトALアミロイド線維の分光蛍光定量法を確立し、同法によりALアミロイド線維の試験管内伸長が一次反応速度論モデル、つまりすでに存在する線維断端に、AL蛋白が立体構造を変えながら次々に結合することにより起こるといふモデルにより説明できることを明らかにした。最後に、上記実験系を用いて線維伸長に及ぼす種々の生体分子および有機化合物の影響を解析した。その結果、ALアミロイド線維伸長が、アミロイド共存分子のアポE、 α_1 -ミクログロブリン、及びフィブロネクチンにより阻害され、デルマトン硫酸により促進された。また、抗酸化剤NDGAが線維伸長を阻害した。

分担研究者

下条文武 新潟大学医学部第二内科教授
上田孝典 福井医科大学第一内科教授

A. 研究目的

全身性ALアミロイドーシスは、日本における代表的アミロイドーシスであるが、他のアミロイドーシス同様、有効な治療法はおろか発症機構の詳細は解明されていない。われわれは本プロジェクトで、ALアミロイド線維形成・沈着機構の解明、及び沈着阻害剤開発のため、試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの確立を目指している。今年度は、以下の3項目を研究目的とした。(1)全身性ALアミロイドーシス症例臓器あるいは患者尿のさらなる集積を行う。(2)試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論モデルを確立し、ALアミロイド線維形成・沈着の分子機構を解明する。(3)試験管内

アミロイド線維形成を阻害する生体分子、及び有機化合物を探索する。

B. 研究方法

症例の集積：

昨年度同様、全身性ALアミロイドーシス症例の剖検があった場合、必要十分量のアミロイド沈着新鮮凍結臓器を採取・収集出来るように、全国の関連する病理医、及び臨床家に呼びかけた。

ALアミロイド線維の精製：

新鮮凍結組織を解凍、はさみにて小片に切断後、Pras法にて粗抽出し、さらに $10^5 \times g$ 超遠心、及び50-60%不連続ショ糖密度勾配超遠心によりALアミロイド線維を精製した。

AL蛋白の精製：

精製ALアミロイド線維の一部を6M尿素で可溶化後、ゲルろ過クロマトグラフィ

一で分子量別に単体 AL 蛋白を分画、精製した。

AL 蛋白の高純度精製：

中性 pH 域でも十分な線維伸長を認めた症例 2、7 については、HPLC による高純度精製を行った。精製線維の一部を 8 M グアニジン塩酸で可溶化、6 M 尿素への脱塩置換後、陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、カラム素通り画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分子量別に分画した。

AL アミロイド線維の電顕的解析：

精製 AL アミロイド線維の形態は、1% 燐タングステン酸 (pH 7.0) でネガティブ染色後、透過電顕 (Hitachi H-7000) にて観察した。加速電圧は 75 kV であった。

AL アミロイド線維、及び AL 蛋白の電気泳動、及びウェスタンブロッティングによる解析：

精製 AL アミロイド線維、及び AL 蛋白の蛋白組成は、還元条件下あるいは非還元条件下に Tricine-SDS-PAGE 法により解析した。ウェスタンブロッティングは定法に従い、PVDF 膜 (ミリポア社) に転写した蛋白バンドを、抗 κ 、抗 λ 、抗 apoE、及び抗 SAP の各抗体を用いて検出した。

高純度 AL 蛋白のアミノ酸一次配列、及び二次構造の解析：

症例 2、7 の高純度精製 AL 蛋白を電気泳動後 PVDF 膜に転写し、CBB 染色後主要バンドを切り出し、エドマン分解を用いたアミノ酸一次配列の解析を行った。また症例 2 の高純度精製 AL 蛋白を用い、遠紫外域 CD スペクトルを測定した。

AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析：

(i) 各症例より得られた精製 AL 蛋白画分を、単独で、あるいは超音波により断片化

した精製 AL アミロイド線維と共に 37°C で反応させた。反応溶液は容量 30~50 μ l で 60~100 μ g/ml の AL アミロイド線維、30 μ M AL 蛋白、50 mM バッファー (pH 1.5~9.0)、100 mM NaCl、及び 0.3-0.5 M 尿素を含んでいた。(ii) アミロイド線維形成・伸長を、電顕観察、及びチオフラビン T (ThT) を用いた分光蛍光定量法により評価した。(iii) 伸長反応の至適 pH、及び伸長初速度に及ぼすアミロイド線維の数濃度、あるいは AL 蛋白濃度の影響の検討も行った。

線維伸長反応に及ぼす各種生体分子ならびに有機化合物の影響解析：

中性 pH 域でも十分な線維伸長を認めた症例 2、7 の pH7.5 における伸長反応溶液に、種々のアミロイド共存分子 (アポ E、SAP、フィブロネクチン、 α_2 -マクログロブリン、 α_1 -アンチキモトリプシン、アプロチニン、デコリン、ヘパラン硫酸、及びデルマタン硫酸)、血清蛋白 (α_1 -ミクログロブリン)、及び有機化合物 (nordihydroguaiaretic acid (NDGA)、リファンピシン、デキサメサゾン、ドキシソルピシン、及び高濃度の DMSO) を加え、反応開始 6 ならびに 24 時間後の電顕像、及び ThT 蛍光量を評価した。

C. 研究結果

(1) 今年度は全国より新たに 5 症例の全身性 AL アミロイドーシス症例臓器あるいは患者尿を集積し、3 年間で集積した計 13 症例について臨床的、病理学的に解析した。患者は女性 9 例、男性 4 例で平均年齢は 58.8 才、 λ 型 7 例、 κ 型 5 例、及び現在検討中 1 例であった。尿中 BJP は、症例 2、7、8 を除き全例に認められた。骨髓形質細胞比率は、症例 3、5、10 で 10% を越え、多発性骨髓腫に合併した AL アミロイドーシスと位置付けられた。初発症状は、うっ血性心不全症状が最も多く、労作時呼吸困難 (症

例 2、4、6)、全身浮腫(症例 7)を認めた。症例 3、8、11 はネフローゼ症候群で、症例 9 は下肢のしびれ感を認めた。直接死因は、症例 8、10-12 を除き心アミロイドーシスを基盤としており、症例 1、2 は左房内血栓に起因した脳梗塞により、症例 2、3、5、6、9 は心室細動等の不整脈により、症例 4 は慢性左心不全による肺うっ血ならびに続発性肺炎により、症例 7 はうっ血性心不全による胸水貯留、呼吸不全により死亡していた。また、症例 8 は腎不全、症例 10 は多臓器不全により死亡していた。症例 8、10-13 を除き全例とも臨床症状を反映して心に高度のアミロイド沈着を認めた。さらに、症例 1、2 では肺に、症例 3、8、9 では腎に、症例 6、7、10、13 では肝に、症例 3、6-9 では脾に、症例 5 では舌・皮膚に、症例 9 では坐骨神経に、それぞれ高度のアミロイド沈着を認めた。今回、上記症例のうち 4 例の全身性 AL アミロイドーシス剖検例(症例 2: 57 歳女性、症例 3: 44 歳女性、症例 6: 55 歳男性、症例 7: 68 歳女性、いずれも λ 型)並びに生体肝移植症例(症例 13: 55 歳男性、 κ 型)の新鮮凍結臓器(症例 2: 肺、症例 3: 脾、症例 6: 脾、症例 7: 脾、症例 13: 摘出肝)より AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を精製した。

(2) 上記精製法により、電顕観察にて、幅約 10 nm の典型的アミロイド線維を得た。還元条件下に Tricine-SDS-PAGE 法を行い、各精製 AL アミロイド線維溶液中に複数のバンドを認めた。ウェスタンブロッティングを行い、各症例とも 57 kDa 以外のバンドは抗ヒト λ ・ κ 抗体で陽性に染色された。

(3) 症例 2、7 の高純度 AL 蛋白のアミノ酸一次配列を解析したところ、いずれも λ 鎖可変領域 N 末端に一致した。さらに、症例 2 の高純度 AL 蛋白の二次構造を遠紫外域 CD スペクトルで解析したところ、中性 pH 域で既にかなりランダムな構造を取っており、pH を変化させても明らかな構造変化を認めなかった。

(4) AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析 :

(i) 線維伸長反応の至適 pH は、ほとんどの症例で酸性域(症例 2: pH 2.5、症例 3: pH 3.5、症例 6: pH 2.0、症例 13: pH 2.5)にあったが、症例 7 では中性域(pH 7.5-8.0)にあった。また、症例 2、7 は酸性域、中性域に二峰性のピークを示し、症例 2 は中性域でも線維伸長を認めた。さらに、ほぼ完全な軽鎖に比べ、そのフラグメントである低分子量 AL 蛋白を用いた方が反応が起こりやすかった。(ii) 上記全症例において、低分子量 AL 蛋白を用いた線維伸長反応が普遍的に一次反応速度論モデルに従う事を証明した。(iii) 電顕観察により、症例 2、7 以外の 3 症例においても、中性 pH 域で線維伸長が起こることを確認した。(iv) 症例 2、7 において、低分子量 AL 蛋白単独でインキューベートする事で線維形成が起こることを確認した。

(5) AL アミロイド線維伸長は、アミロイド共存分子のアポ E、 α_1 -ミクログロブリン、及びフィブロネクチンにより阻害され、デルマタン硫酸により促進された。また、抗酸化剤 NDGA が線維伸長を阻害した。

(6) われわれは本研究課題と共に、透析アミロイドーシス、及びアルツハイマー病におけるアミロイド線維形成の反応速度論的解析を並行して遂行している。そして、各々の成果を他のアミロイドーシス研究にフィードバックすることにより、個々のアミロイドーシスの特殊性と共に、ヒトアミロイドーシス全般に共通する発症機構・因子を明らかにすることをグループの主要な研究目標としている。今年度は、以下の成果を上げた。1) 透析アミロイドーシスでは、これまでに確立した試験管内 $A\beta$ 2M 線維重合・伸長反応系、及び脱重合反応系を用い、各種グリコサミノグリカン(GAGs) およびプロテオグリカン(PGs)が、 $A\beta$ 2M 線維形成・分解に及ぼす影響を検討した。

GAGs および PGs は、試験管内での A β 2M 線維形成・分解反応において二相性の影響を示した。すなわち、GAGs、PGs は、線維伸長反応において β 2-ミクログロブリン (β 2-m)分子に作用した場合には線維伸長反応を抑制するが、関節に存在する PGs の一部は、 β 2-m から A β 2M 線維形成反応を惹起し、さらに一端形成された A β 2M 線維を強く安定化させ分解を抑制する事から、長期的には A β 2M 線維形成・沈着に対し促進的に作用していると考えられる。2) アルツハイマー病では、生体により近いモデルとして、系外から A β 蛋白が供給され続ける開放反応系を、表面プラズモン共鳴法を用いて構築し、 β アミロイド線維(fA β)の伸長、及び脱重合機構を解析した。その結果、開放反応系においても、fA β 伸長過程が一次反応速度論モデルに従うことを証明した。また、A β 蛋白を含まない緩衝液を添加すると fA β が脱重合することを示し、重合速度と脱重合速度が均衡する濃度(臨界モノマー濃度)を直接測定したところ、約 0.2 μ M であった。

D. 考察

各症例から精製された AL アミロイド線維の生化学的解析の結果、いずれのアミロイド線維もほぼ完全な λ ・ κ 鎖を含む複数のフラグメントから構成され、しかも症例ごとに各フラグメントの分子量が異なっていた。一般に AL アミロイドーシスは、腫瘍性形質細胞の分泌するモノクローナルな軽鎖が蛋白分解酵素による限定分解を受けた後にアミロイド線維に重合し、組織に沈着するとされている。上記結果は、AL 蛋白の一次構造が症例ごとに異なっているため、蛋白分解酵素による限定分解に多様性が生じたことを示唆している。さらに上記結果は、分子量の異なる複数の λ ・ κ 鎖フラグメントが、アミロイド線維形成に不可欠の共通領域(おそらく可変領域の一部)を介して1本のアミロイド線維を構成する

ことを示唆しており大変興味深い。それを裏付けるように、解析した AL 蛋白のアミノ酸配列は、いずれも免疫グロブリン λ 鎖可変領域 N 末端に一致した。しかし、各分子量の λ ・ κ 鎖フラグメントが、それぞれ単一な蛋白組成のアミロイド線維を形成し、全体として蛋白組成の異なるアミロイド線維の集合が組織に沈着している可能性も否定できず、さらに検討を加える必要がある。

線維伸長反応は、ほとんどの症例で酸性 pH 域にそのピークを認めたが、症例 7 では中性域にピークを認めた。症例 2 の高純度 AL 蛋白は、中性 pH 域で既にかなりランダムな構造を取っており、pH を変化させても明らかな構造変化を認めなかった。これは、プロテアーゼによるフラグメント化により、免疫グロブリン軽鎖のコンパクトな立体構造がほぐれたためと考えられ、このことが、いずれの症例においても、程度の差こそあれ酸性・中性の両方で線維伸長を認める要因なのではないかと考えている。

λ ・ κ タイプを問わず解析した全 5 症例において、アミロイド線維伸長が一次反応速度論モデルにより説明できた。われわれはこれまでに、種々のヒト・マウスアミロイド線維伸長も同モデルで説明できることを明らかにしているが、今回の結果より、同モデルがアミロイド線維形成の普遍的モデルであることが明らかになった。

抗酸化剤 NDGA が線維伸長を阻害した。抗酸化剤のモチーフを持つ有機化合物がアミロイド線維形成を阻害することが知られているが、上記結果は、このモチーフを基に合成展開を行い、AL アミロイド線維形成阻害剤を開発できる可能性を示唆している。また今回開発した実験系は、これらの阻害剤をスクリーニングする際の基本的分析手段として利用できる。さらに、AL アミロイド線維伸長過程が種々の生体分子により修飾を受けていることが明らかになっ

た。現在作業仮説として、生体におけるアミロイドの沈着は、前駆蛋白からの線維形成・沈着の各段階における様々な生体分子の促進・阻害効果の総和として起こると考えている。

E. 結論

平成 11 年度までに集積した全身性 AL アミロイドーシス 8 症例に加え、今年度は新たに 5 症例を追加集積した。次いでこれら 13 症例のうち 5 例の新鮮凍結臓器より AL アミロイド線維および AL 蛋白を精製し、AL 蛋白の一次・二次構造解析を含めた種々の生化学的解析を行った。さらにこれらの AL アミロイド線維および AL 蛋白を用いて、AL アミロイド線維伸長が普遍的に一次反応速度論モデルに従う事を証明し、多くの場合伸長の至適 pH が酸性域にあるものの、中性 pH 域でも線維伸長が起こりうることを明らかにした。最後に、線維伸長が種々の生体分子による修飾を受け、有機化合物により阻害されうることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamaguchi I, Hasegawa K, Naiki H, Mitsu T, Matuo Y and Gejyo F.

Extension of A β 2M amyloid fibrils with recombinant human β 2-microglobulin.

Amyloid (in press)

2. 学会発表

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、内木宏延

β 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維 (fA β 2M) の中性 pH 反応液における脱重合反応とアポリポ蛋白 E (ApoE) の fA β 2M 安定化作用

第 89 回日本病理学会総会 2000 年 4 月

11-13 日 大阪、日病会誌 89(1), 276, 平成 12 年 3 月

内木宏延

アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析—透析アミロイドーシスを中心として—
第 45 回日本透析医学会学術集会・総会 シンポジウム 透析アミロイドーシス 2000 年 6 月 16-18 日 福岡、同プログラム・抄録集 598

内木宏延、小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁

アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成及び分解機構の解明

文部省特定領域研究 C「先端脳」平成 12 年度班会議 2000 年 12 月 22-23 日 東京、同プログラム・抄録集 96

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、上田孝典、下条文武、内木宏延

試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索

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班平成 12 年度研究報告会 2001 年 2 月 1-2 日 東京、同プログラム・抄録集 重点研究事業 1

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、下条文武、内木宏延

β 2-ミクログロブリン関連アミロイドーシスにおけるグリコサミノグリカン及びプロテオグリカンの影響

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班平成 12 年度研究報告会 2001 年 2 月 1-2 日 東京、同プログラム・抄録集 演題番号 6

小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁、内木宏延

開放反応系を用いたアルツハイマー病 β ア
ミロイド線維形成及び分解機構の解明
厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドー
シスに関する研究班平成 12 年度研究報告
会 2001 年 2 月 1-2 日 東京、同プログ
ラム・抄録集 演題番号 19