

20010187

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化とヒトアミロイドーシス：加齢依存性発症の分子機構解明

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 柳澤勝彦

平成14 (2002) 年3月

## 目次

I. 総括研究報告書	
老化とヒトアミロイドーシス：加齢依存性発症の分子機構解明	1
柳澤勝彦	
II. 分担研究報告書	
1. $\beta$ アミロイド線維形成に関する細胞生物学的研究	9
柳澤勝彦	
2. 透析アミロイドーシスに関する病態生化学的研究	13
下条文武	
3. アミロイド線維形成に関する試験管内反応速度論的研究	17
内木宏延	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	25

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

老化とヒトアミロイドーシス：加齢依存性発症の分子機構解明

主任研究者 柳澤勝彦 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 部長

研究要旨

老化に関連して発症することが知られている代表的アミロイドーシス（アルツハイマー病、透析アミロイドーシス、および全身性 AL アミロイドーシス）における蛋白異常重合に共通した分子機構を解明することを目標に過去 2 年間の実績を基に、研究活動を展開した。その結果、これらの 3 種のアミロイドーシスはアミロイド原性蛋白の種類が互いに異なるにもかかわらず、蛋白重合過程は共通の反応速度論モデルで説明可能なこと、アミロイド原性蛋白以外の分子が蛋白重合の促進あるいは重合体の安定化に寄与している可能性が高いこと、さらには、一部の蛋白重合は抗酸化剤により有意に抑制されることが明らかとなった。

分担研究者

下条文武	新潟大学医学部 内科学第二講座
内木宏延	福井医科大学 医学部病理学第二講座

A. 研究目的

我が国をはじめとした先進諸国においては急速に人口の高齢化が進み、様々な社会的課題が生じている。医学面では老年人口の増加に伴い高齢者特有の疾患に対する予防法ならびに治療法の確立が求められている。本研究は老化関連疾患の中からアミロイドーシス（アルツハイマー病、透析アミロイドーシスおよび全身性 AL アミロイドーシス）に焦点を当て、その発症機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

（柳澤）

(1) liposome 作製

人工的に脂質二重膜小胞 (liposome) を作製するにあたり、コレステロール (CH)、スフィンゴミエリン (SM)、フォスファチジルコリン (PC)、さらには GM1 ガングリオシド (GM1) を有機溶媒 (クロロフォルム：メタノール) に溶解し、窒素ガス気流にて完全に乾燥させた後、トリス生食緩衝液 (tris-buffered saline : TBS) 内で、凍結・融解を反復後、超音波破碎機を用いて球状の liposome を作製した。

(2) A $\beta$ 凝集、アミロイド線維化の評価

A $\beta$ 凝集によるアミロイド線維化を定量的ならびに定性的に評価するにあたり、アミロイド構造を特異的に認識し、蛍光を発する薬剤である thioflavin T (ThT) を用いた。同時に、インキ

キュベート液を遠心して得られた沈澱物の電子顕微鏡学的観察を行い、形態学的に A $\beta$ 線維の構造を観察した。また、GM1-A $\beta$ および人工的 nucleus としての細断 A $\beta$ アミロイド線維 (fA $\beta$ ) による A $\beta$ 凝集反応の反応速度解析 (kinetics) を行った。さらに、GM1-A $\beta$ の seed 作用の分子機構を明らかにする為、抗 GM1-A $\beta$ 抗体の seed 作用に対する抑制効果を定量的に検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は全て試薬を用いた試験管内実験であり、倫理的問題はない。

(下条)

(1) 酸性 pH におけるヒトリコンピナント $\beta$ 2-m からの A $\beta$ 2M 線維形成反応: 反応溶液は、50 $\mu$ M ヒトリコンピナント $\beta$ 2-m (r- $\beta$ 2-m)、50 mM citrate-100 mM NaCl (pH 2.5) を含み、アグレカン、バイグリカン、デコリン、あるいはヘパリンを添加した。37°C でインキュベート後の A $\beta$  2M 線維形成を、チオフラビン T (ThT) 蛍光値、及び電顕観察により評価した。

(2) 中性 pH における線維脱重合反応: 反応溶液は、150 $\mu$ g/ml A $\beta$  2M 線維、50 mM phosphate-100 mM NaCl (pH 7.5) を含み、apoE、7 種の GAG (コンドロイチン硫酸 A, B, C、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン)、あるいは 6 種の PG (アグレカン、バイグリカン、デコリン、ヘパリン硫酸 PG、デルマタン硫酸 PG、ケラタン硫酸 PG) を添加した。37°C、24 時間インキュベート後の A $\beta$  2M 線維の残存率を、ThT 蛍光値、及び電顕観察により評価した。

(3) 中性 pH における線維伸長反応: A $\beta$  2M 線維伸長反応液 (20 $\mu$ g/ml A $\beta$  2M 線維、50 $\mu$ M r- $\beta$ 2-m、50 mM phosphate-100 mM NaCl, pH 7.5)

に 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) を終濃度 10~25% になるように添加し、37°C でインキュベートした。線維伸長は ThT 蛍光値、及び電顕観察により評価した。また、各 TFE 濃度における r- $\beta$ 2-m の遠紫外域 CD スペクトルを測定した。さらに、上記反応溶液にヘパリンを添加し、線維伸長に及ぼす影響を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、リコンビナント蛋白、及び凍結保存した患者組織より精製したアミロイド線維を使用するため、倫理面の問題は無いと判断される。

(内木)

(1) ピアコアを用いた開放反応系の構築: 測定には表面プラズモン共鳴法 (SPR, BIACORE 1000, 3000) を用いた。最初に A $\beta$  (1-40) より pH 7.5 で fA $\beta$  (1-40) を形成させ、これを重合核としてセンサーチップ上に固定化した。次いで、リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した各種濃度 (0-30 $\mu$ M) の A $\beta$  (1-40) 溶液を連続的に添加し、37°C における fA $\beta$  の伸長及び脱重合過程をリアルタイムで測定した。

(2) 種々の有機化合物およびペプチドの fA $\beta$  分解作用: 最初に、あらかじめ作成した fA $\beta$  を A $\beta$  (1-40) および (1-42) と pH 7.5、37°C で反応させ、十分ほぐれた状態のフレッシュな fA $\beta$  を調製した。次いで、ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した NDGA、RIF、テトラサイクリン (TC)、蒸留水に溶解したポリビニル化合物 (ポリビニルスルホン酸塩 (PVS)、1,3-プロパンジルスルホン酸塩 (1,3-PDS))、または iA $\beta$ 5 を添加後、pH 7.5、37°C における fA $\beta$  の分解過程を ThT 法および電顕を用いて経時的に測定し、分解作用の強さを比較解析した。

(3) AL アミロイドーシス: (a) アミロイド線維、

及び AL 蛋白の精製 : AL アミロイド線維(fAL) は、全身性 AL アミロイドーシスの病理解剖 4 症例(いずれも入型)ならびに生体肝移植 1 症例( $\kappa$  型) より得られた諸臓器から精製した。単体 AL 蛋白は、精製線維の一部を 6M 尿素で可溶化し、ゲルろ過クロマトグラフィー(Sephacryl S200) で分子量別に分画した。また、中性 pH 域でも十分な線維伸長を認めた症例 1、4 については、HPLC (Hitrap SP, Superose 12)による高純度 AL 蛋白精製を行った。(b) fAL 形成の反応速度論的解析 : 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 fAL と共に 37°C で反応させ、fAL 形成・伸長を、電顕観察、及び ThT 法によりモニターした。(c) 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 1、4 の pH 7.5 における伸長反応溶液に、種々のアミロイド共存物質 (アポリポ蛋白 E (apoE)、血性アミロイド P コンポーネント、フィブロネクチン、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、 $\alpha_1$ -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 ( $\alpha_1$ -ミクログロブリン)、及び有機化合物 (NDGA、RIF、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。

(倫理面への配慮)

生体肝移植症例 ( $\kappa$  型) より得られた肝の分析においては、研究に使用することに対する同意を患者本人より文書で得た。

### C. 研究結果

(柳澤)

(1) GM1 含有 liposome の添加により、可溶性 A $\beta$

の重合を示唆する ThT 値上昇が lag time を経ることなく生じ、反応曲線は peak に達した後、plateau を形成した。一方、fA $\beta$ 添加の反応系における ThT 値上昇は、GM1 含有 liposome 添加の場合よりも急峻であったが、peak に達した後、徐々に低下した。両インキュベーション反応溶液の電子顕微鏡観察により、典型的な形態学的特徴を示すアミロイド線維が確認された。

(2) GM1-A $\beta$ の seed 作用の分子機構を検討する為に、抗 GM1-A $\beta$ 抗体を上記反応溶液に添加し、その seed 作用に対する影響を検討した結果、抗 GM1-A $\beta$ 抗体は用量依存的に GM1-A $\beta$ の seed 作用を抑制した。これに対して、合成 A $\beta$ ペプチドを抗原に作製した抗 A $\beta$ 抗体 (4G8 および 6E10) は GM1 含有 liposome の添加による可溶性 A $\beta$ の重合を全く抑制しなかった。

(下条)

(1) 関節軟骨に多く含まれるアグレカン、バイグリン、及びデコリンは、r- $\beta$ 2-m と pH 2.5 で長期間反応させると、重合核形成反応を促進することにより A $\beta$ 2M 線維の形成を惹起した。

(2) A $\beta$ 2M 線維は、中性 pH 反応液中でオリゴマー以下まで脱重合を起こした。一方、apoE、デコリン、バイグリン、及び透析時に使用されるヘパリンは強い A $\beta$ 2M 線維安定化作用を示し、上記脱重合反応を濃度依存性に抑制した。

(3) A $\beta$  2M 線維は pH 7.5 でほとんど伸長反応を示さなかったが、TFE 濃度に依存して伸長反応を示した。遠紫外域 CD スペクトル測定により、TFE 濃度に依存した r- $\beta$ 2-m の 2 次構造変化を認めた。また、ヘパリンは濃度依存性に線維伸長を促進した。

(内木)

(1) 開放反応系の構築 : 表面プラズマ共鳴法 (ピ

アコア) を駆使し、fA $\beta$ 形成・分解をリアルタイムで解析できる開放反応系を確立した。この実験系を駆使し、fA $\beta$ が試験管内でゆっくりと脱重合を起こすこと、及び線維伸長過程と共に脱重合過程も一次反応速度論モデルで説明できることを証明した。

(2) 種々の有機化合物およびペプチドの fA $\beta$ 分解作用 : 50 $\mu$ M の NDGA は、fA $\beta$ 濃度を示す ThT の蛍光量を、4 時間後に初期値の 5% まで低下させ、同濃度の RIF、TC は、72 時間後の蛍光量を初期値の約 20% まで低下させた。一方 iA $\beta$ 5 は、50 $\mu$ M では明らかな分解作用を示さず、1 mM の高濃度で、72 時間後の蛍光量を初期値の約 50% まで低下させた。電顕観察においても、反応時間に依存した fA $\beta$ の分解を確認した。以上のデータより、fA $\beta$ に及ぼす分解作用の強さは、50 $\mu$ M の濃度で NDGA >> RIF  $\approx$  TC > PVS  $\approx$  1,3-PDS > iA $\beta$ 5 の順であった。

(3) AL アミロイドーシス : (a) 線維伸長の至適 pH は、症例 1、2、3、及び 5 で、それぞれ pH 2.5、3.5、2.0、2.5 と著しい酸性域にあったが、症例 4 では pH 7.5 と中性域にあった。また症例 2 は、中性 pH 域において ThT 法により明らかな線維伸長を認めた。さらに電顕観察により、全ての症例で中性 pH 域における線維伸長を確認出来た。(b) 反応速度論的解析は、いずれの症例も至適 pH で行った。症例 1 は pH 7.5 でも行った。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。伸長速度は、アミロイド線維の重合速度と脱重合速度の和で表され、重合速度はアミロイド線維の数濃度、及び AL 蛋白濃度に比例して増加する事を確認した。(c) 症例 1、4 のいずれにおいても、apoE、 $\alpha_1$ -ミクログロブリン、フィブロネクチン、及び NDGA が濃度依存

性に線維伸長を阻害した。一方、デルマタン硫酸は濃度依存性に線維伸長を促進した。

#### D. 考察

生理的には可溶性を保っている蛋白が異常に重合することにより引き起こされる疾患は数多く知られている。その中で、本研究において課題として取り上げたアミロイドーシスの 3 疾患は、個体の「老化」を発症の背景にもつ点で共通している。それらの発症分子機構の解明には、異なるアミロイド原性蛋白の重合過程に共通した分子機構の存在を探索することが有用であると考えられた。今年度の研究により、アミロイドーシスにおける重合体の形成は、一次反応速度論モデルに従い、重合核形成と線維伸長の二相により進行する普遍的な蛋白重合分子過程によることが示唆された。一方、異なるアミロイド原性蛋白の重合にはそれぞれ異なった分子が重合促進あるいは重合体安定化の補助因子として働くことが示唆された。このような重合補助因子の存在は、今後のアミロイドーシス治療薬の開発研究に貴重な示唆を与えるものと考えられる。最後に、老化に関連して発症する 3 種のアミロイドーシスを研究対象としたが、老化がこれらのアミロイドーシス発症に果たす本質的役割については不明であった。ただ、興味深いことに、アルツハイマー病と透析アミロイドーシスにおいては、いずれもそれらの発症率がアポリポ蛋白 E 遺伝子型に関連することが示されており、脂質代謝、とりわけコレステロール代謝との関連が推察され、老化とコレステロール代謝との関係をさらに検討することが重要であると考えられた。

## E. 結論

老化に関連して発症する 3 種のアミロイドーシスにおける蛋白異常重合には共通した分子過程が存在する可能性が示唆された。また、蛋白の異常重合にはアミロイド原性蛋白以外の分子が関わる可能性も示唆された。これらの重合補助分子の役割を検討することは、治療薬開発の戦略上重要な情報を提供しうる可能性が推察された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y and Matsuzaki K.  
Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *J Biol Chem* 276:24985-24990,2001

Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K.  
A novel action of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ): oligomeric  $A\beta$  promotes lipid release. *J Neurosci* 21(18):7226-7235,2001

Fan Q-W., Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and Michikawa M.  
Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture: A review. *AGEJ* 24:1-10,2001

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.  
3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organellae in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*77: 274-280,2001

Sawamura N, Gong J-S, Garver W S, Heidenreich R A, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K and Michikawa M.  
Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem* 276:10314-10319,2001

Fan Q-W, Yu-W, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M.  
Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J Neurochem* 76:391-400, 2001

Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Sudoh S, Shibamoto S, Yanagisawa K and Komano H.  
Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of  $\beta$ -catenin phosphorylation. *Eur J Biochem* 268:3036-3041,2001

Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M.  
Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. *J Neurochem* 80:178-190,2002

Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaiichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K and Komano H.  
Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid  $\beta$ -protein. *J Biol Chem* (in press)

Hayashi H, Igbavoa U, Hamanaka H, Kobayashi M, Fujita S C, Wood W G and Yanagisawa K.  
Cholesterol is increased in the exofacial leaflet of synaptic plasma membranes of human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Neuroreport* (in press)

Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K, Michikawa M.  
Amyloid  $\beta$ -protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: Implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade. *J Neurosci Res* (in press)

Yamaguchi I, Hasegawa K, Takahashi N, Gejyo F and Naiki H.  
Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of  $\beta$ 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry* 40:8499-8507,2001

Kazama J, Maruyama H and Gejyo F.  
Reduction of circulating  $\beta$ 2-microglobulin level for the treatment of dialysis-related amyloidosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 16(Suppl 431-35, 2001

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

Extension of A $\beta$ 2M amyloid fibrils with recombinant human  $\beta$ 2-microglobulin.

Amyloid 8:30-40, 2001

Kazama J, Maruyama H and Gejyo F.

Osteoclastogenesis and osteoclast activation in dialysis-related amyloid osteopathy.

American Journal of Kidney Diseases 38(Suppl 1): 156-160, 2001

Ohhashi Y, Hagihara Y, Kozhukh GV, Hoshino M, Hasegawa K, Yamaguchi I, Naiki H and Goto Y.

The Intrachain Disulfide Bond of  $\beta$ (2)-Microglobulin Is Not Essential for the Immunoglobulin Fold at Neutral pH, but Is Essential for Amyloid Fibril Formation at Acidic pH. J Biochem (Tokyo). 131(1): 45-52, 2002

Kozhukh GV, Hagihara Y, Kawakami T, Hasegawa K, Naiki H and Goto Y. Investigation of a peptide responsible for amyloid fibril formation of  $\beta$ 2-microglobulin by *Acromobacter* protease I. J Biol Chem 277(2): 1310-1315, 2002

Ono K, Hasegawa K, Yoshiike Y, Takashima A, Yamada M and Naiki H.

Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down preformed Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils in vitro. J Neurochem (in press)

Martsev SP, Dubnovitsky AP, Vlasov AP, Hoshino M, Hasegawa K, Naiki H and Goto Y. Amyloid fibril formation of mouse VL domain under acidic pH. Biochemistry (in press)

橋本義一、内木宏延、吉田治義、下条文武  
実験的アミロイド線維伸長と AGE 化  $\beta$ 2-m  
腎と骨代謝 14:31-36, 2001

下条文武

透析アミロイドーシス(1)―手根管症候群―  
透析ケア 7:48-51, 2001

下条文武

$\beta$ 2-microglobulin と透析アミロイドーシス  
臨床病理 49:244-248, 2001

大林弘明、丸山弘樹、下条文武  
透析アミロイドーシスへの対策  
腎と透析 50:685-689, 2001

齋藤徳子、下条文武

透析アミロイドーシス 内科 87:1242-1247, 2001  
下条文武

透析アミロイドーシス Medical Technology  
29:1161, 2001

丸山弘樹、樋口昇、下条文武

透析アミロイドーシスによる関節症の治療(伊藤  
克己、浅野泰、遠藤仁、御手洗哲也、東原英二  
編) Annual Review 腎臓(中外医学社): 240-246,  
2001

下条文武

アミロイドーシス(透析療法合同専門委員会 編)  
血液浄化療法ハンドブック(共同医書出版  
社):388-394, 2001

下条文武

透析アミロイドーシス(荒川正昭、小磯謙吉、浅  
野泰 監修) 腎臓病の最新医療(先端医療技術  
研究所) (in press)

2. 学会発表

柳澤勝彦「アルツハイマー病研究・最新の進歩」  
第43回老年医学会学術集会 教育講演 2001年  
6月13日 大阪

柳澤勝彦、道川誠、林秀樹、澤村直哉、  
松崎勝巳

脂質代謝とアルツハイマー病の分子病理  
第44回日本神経化学会 2001年9月26-28日  
京都

道川誠、范企文、ユウエイ、千田隆夫、  
キョウ建生、ゾウクン、柳澤勝彦  
培養神経細胞におけるコレステロールによる樹  
状突起伸長調節作用の検討  
第44回日本神経化学会 2001年9月26-28日  
京都

駒野宏人、川村勇樹、蔡曉蕊、川市正史、  
北村俊雄、柳澤勝彦

ガンマセクレターゼ活性調節因子 cDNA 同定  
のための新しいスクリーニング法  
第44回日本神経化学 2001年9月26-28日 京  
都

蔡曉蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、  
柳澤勝彦、駒野宏人

$\gamma$ -セクレターゼ活性を促進する因子  
第44回日本神経化学 2001年9月26-28日 京  
都

柳澤勝彦

コレステロールとアルツハイマー病  
第20回日本痴呆学会 シンポジウム 2001年10  
月4日 三重

キョウ 建生、柳澤勝彦、道川 誠  
Amyloid  $\beta$ -protein のコレステロール代謝に対する影響 第 20 回日本痴呆学会 2001 年 10 月 4 日 三重

澤村直哉、キョウ 建生、二宮治明、大野耕策、柳澤勝彦、道川 誠  
ニーマンピック病 C 型モデルマウスにおける MAPK の活性化に伴うタウ蛋白の部位特異的なリン酸化  
第 20 回日本痴呆学会 2001 年 10 月 4 日 三重

駒野宏人、川村勇樹、蔡 曉蕊、川市正史、北村俊雄、柳澤勝彦  
新しいスクリーニング系を用いたガンマーセクレターゼ活性調節因子の同定について  
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

蔡曉蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、柳澤勝彦、駒野宏人  
 $\gamma$ -セクレターゼ活性におよぼす Herp の影響  
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

齋藤徳子、下条文武、宮崎 滋、鈴木正司、森田 俊、平澤由平  
 $\beta$ 2M アミロイド骨関節病変におけるオステオポンチン(OPN)の発現に関する検討  
日本透析医学会 2001 年 6 月 21~24 日 大阪

下条文武  
透析とアミロイド骨・関節病変  
第 31 回日本腎臓学会東部学術大会 2001 年 10 月 26~27 日 山梨

白崎有正、風間 順一郎、大林弘明、上野光博、成田一衛、鈴木栄一、下条文武  
急性腎不全を呈した Bence-Jones(BJ)型多発性骨髄腫に続発するアミロイドーシスの一例  
第 31 回日本腎臓学会東部学術大会 2001 年 10 月 26~27 日 山梨

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、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的解析 第 90 回日本病理学会総会 2001 年 4 月 5-7 日 東京

小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁、内木宏延  
Alzheimer 病  $\beta$ アミロイド線維の試験管内伸長及び脱重合機構の解析 第 42 回日本神経学会総会 2001 年 5 月 11-13 日 東京

小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁、内木宏延  
アルツハイマー病  $\beta$ アミロイド線維に及ぼす抗酸化剤 NDGA の強力な分解作用

第 20 回日本痴呆学会学術集会 2001 年 10 月 4-5 日 津

内木宏延  
アミロイド線維形成・分解機構の反応速度論的解析  
第 74 回日本生化学会大会シンポジウム アミロイド線維形成の分子機構 2001 年 10 月 25-28 日 京都

長谷川一浩、小野賢二郎、山田正仁、内木宏延  
開放反応系によるアルツハイマー病  $\beta$ アミロイド線維の分解機構の解析 第 74 回日本生化学会大会 2001 年 10 月 25-28 日 京都

Yanagisawa K and Matuzaki K.  
Amyloidogenesis and cholesterol. 5th ADPD International Conference Apr.1-6,2001, Kyoto

Yanagisawa K.  
Cholesterol-dependent pathological processes in Alzheimer's disease. Brain Membrane Alteration in Alzheimer's Disease. 7th World Congress of Biological Psychiatry (WCBP), July, 1-6,2001 Berlin, Germany

Michikawa M, Gong J. S., Fan Q-W, Sawamura N and Yanagisawa K.  
A novel action of amyloid  $\beta$ -protein in cellular lipid metabolism in the central nervous system. 31th Society for Neuroscience Annual Meeting, Nov.10-15,2001, San Diego, California, USA.

Yanagisawa K.  
Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: A novel viewpoint from cholesterol metabolism of neurons. The 4th Annual Meeting of The Korean Society for Brain and Neural Sciences. Dec. 1, 2001, Seoul, Korea

Yamaguchi I, Hasegawa K, Takahashi N, Gejyo F and Naiki H.  
Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of  $\beta$ 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. 9th International Symposium on Amyloidosis. 2001 Budapest, Hungary

Takahashi N, Hasegawa K, Yamaguchi I, Gejyo F and Naiki H.  
Establishment of a first-order kinetic model of AL Amyloid fibril extension in vitro. 9th International Symposium on Amyloidosis. 2001, Budapest, Hungary

Gejyo F.

**$\beta$ 2-microglobulin and dialysis-related amyloidosis: pathogenic and therapeutic consideration. 19th Annual Meeting on the International Society of Blood Purification, 2001, Tokyo, Japan**

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

抗 GM1-A $\beta$ 抗体 (4396C) DNA 配列  
(出願中)

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（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

βアミロイド線維形成に関する細胞生物学的研究

主任研究者 柳澤勝彦 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 部長

研究要旨

アルツハイマー病（AD）におけるアミロイドβ蛋白（Aβ）の脳内沈着機構を解明することを目的に、可溶性 Aβの凝集を促進する特異な分子（seeding Aβ）として、本主任研究者らが報告した GM1 ガングリオシド結合型 Aβ（GM1-Aβ）を対象とし、人工的に作製した liposome 上での GM1-Aβ形成を定量的に解析する実験系を確立し、その Aβ凝集における役割を脂質組成の異なる種々の liposome との比較により検討した。GM1-Aβの seed 作用の解析は本研究班の内木班員との共同で行い、GM1-Aβによる可溶性 Aβの凝集促進は一次反応速度論モデルに従うことを確認した。

A. 研究目的

AD の病態を理解するにあたって最も重要な研究課題の一つは、Aβがどのような分子機構によって脳内で凝集するかを解明することである。本主任研究者らは、AD 脳内における Aβ凝集、蓄積の分子機構を解明することを目的に検討した結果、細胞膜を構成する糖脂質分子である GM1 ガングリオシドと結合した Aβ（GM1-Aβ）を見出した。本研究は GM1-Aβの形成機構ならびにその seeding 作用獲得過程を分子レベルで解明することを目的とする。

B. 研究方法

(1) liposome 作製

人工的に脂質二重膜小胞（liposome）を作製するにあたり、コレステロール（CH）、スフィンゴミエリン（SM）、フォスファチジルコリン（PC）、さらには GM1 ガングリオシド（GM1）を有機溶

媒（クロロフォルム：メタノール）に溶解し、窒素ガス気流にて完全に乾燥させた後、トリス生食緩衝液（tris-buffered saline：TBS）内で、凍結・融解を反復後、超音波破碎機を用いて球状の liposome を作製した。

(2) Aβ凝集、アミロイド線維化の評価

Aβ凝集によるアミロイド線維化を定量的ならびに定性的に評価するにあたり、アミロイド構造を特異的に認識し、蛍光を発する薬剤である thioflavin T（ThT）を用いた。同時に、インキュベーション液を遠心して得られた沈澱物の電子顕微鏡学的観察を行い、形態学的に Aβ線維の構造を観察した。また、GM1-Aβおよび人工的 nucleus としての細断 Aβアミロイド線維（fAβ）による Aβ凝集反応の反応速度解析（kinetics）を行った。さらに、GM1-Aβの seed 作用の分子機構を明らかにする為、抗 GM1-Aβ抗体の seed 作用に対する抑制効果を定量的に検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は全て試薬を用いた試験管内実験であり、倫理的問題はない。

### C. 研究結果

(1)GM1 含有 liposome の添加により、可溶性 A $\beta$ の重合を示唆する ThT 値上昇が lag time を経ることなく生じ、反応曲線は peak に達した後、plateau を形成した。一方、fA $\beta$ 添加の反応系における ThT 値上昇は、GM1 含有 liposome 添加の場合よりも急峻であったが、peak に達した後、徐々に低下した。両インキュベーション反応溶液の電子顕微鏡観察により、典型的な形態学的特徴を示すアミロイド線維が確認された。

(2) GM1-A $\beta$ の seed 作用の分子機構を検討する為に、抗 GM1-A $\beta$ 抗体を上記反応溶液に添加し、その seed 作用に対する影響を検討した結果、抗 GM1-A $\beta$ 抗体は用量依存的に GM1-A $\beta$ の seed 作用を抑制した。これに対して、合成 A $\beta$ ペプチドを抗原に作製した抗 A $\beta$ 抗体 (4G8 および 6E10) は GM1 含有 liposome の添加による可溶性 A $\beta$ の重合を全く抑制しなかった。

### D. 考察

A $\beta$ の AD 脳内における凝集機構の解明は、AD 発症病態の理解の上においても、また AD 治療薬・予防薬開発の為に、最も重要な研究課題である。家族性 AD の場合は、原因遺伝子の発現により A $\beta$ の産生が亢進することが知られている。一方、AD 患者の大部分を占める孤発性 AD においては A $\beta$ の産生が亢進していることを示唆する事実はこれまで確認されていない。従って、何等かの A $\beta$ の分子修飾が生じているか、あるいは A $\beta$ のクリアランスが異常となっている可能性がある。

る。

GM1-A $\beta$ は本主任研究者らが、初期 AD 脳に選択的に見出した特異な A $\beta$ 分子であり (Yanagisawa et al, *Mature Med* 1: 1062-1066, 1995)、GM1-A $\beta$ の分子特性、形成機構については国内外の研究者による in vitro の実験により明らかにされつつある、本研究により、GM1-A $\beta$ の seed 作用は、本 A $\beta$ 分子のもつ構造特異性に基づくことが強く示唆された。また、GM1-A $\beta$ の形成に関して、GM1 ガングリオシドが存在する膜内コレステロールが重要な働きをしていることが明らかにされた。最近、コレステロールが AD 発症の危険因子として働いていることを示唆する臨床疫学的ならびに実験生物学的事実が集積している。本研究結果は、コレステロールの AD 発症における意義を、A $\beta$ 凝集との関係で検討する上で新たな視点を与えたと考えられる。

### E. 結論

人工的に作製した liposome を用いて、GM1-A $\beta$ の seeding 作用を反応速度論的に解析し、A $\beta$ の GM1 ガングリオシド結合による構造変化が、seed 作用の基盤をなすことを確認した。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y and Matsuzaki K. Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *J Biol Chem* 276:24985-24990,2001

Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K.

A novel action of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ): oligomeric  $A\beta$  promotes lipid release. *J Neurosci* 21(18):7226-7235,2001

Fan Q-W., Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and Michikawa M.

Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture: A review. *AGE J* 24:1-10,2001

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.  
3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 77: 274-280,2001

Sawamura N, Gong J-S, Garver W S, Heidenreich R A, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K and Michikawa M.  
Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem* 276:10314-10319,2001

Fan Q-W, Yu W, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M.  
Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J Neurochem* 76:391-400,2001

Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Sudoh S, Shibamoto S, Yanagisawa K and Komano H.  
Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of  $\beta$ -catenin phosphorylation. *Eur J Biochem* 268:3036-3041,2001

Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M.  
Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. *J Neurochem* 80:178-190,2002

Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaiichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K and Komano H.  
Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid  $\beta$ -protein. *J Biol Chem* (in press)

Hayashi H, Igavoa U, Hamanaka H, Kobayashi M, Fujita S C, Wood W G and Yanagisawa K.

Cholesterol is increased in the exofacial leaflet of synaptic plasma membranes of human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Neuroreport* (in press)

Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K, Michikawa M.

Amyloid  $\beta$ -protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: Implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade. *J Neurosci Res* (in press)

## 2. 学会発表

柳澤勝彦「アルツハイマー病研究・最新の進歩」  
第43回老年医学会学術集会 教育講演 2001年6月13日 大阪

柳澤勝彦、道川 誠、林 秀樹、澤村直哉、松崎勝巳  
脂質代謝とアルツハイマー病の分子病理  
第44回日本神経化学会 2001年9月26-28日 京都

道川 誠、范 企文、ユ ウェイ、千田隆夫、キョウ 建生、ゾウ クン、柳澤勝彦  
培養神経細胞におけるコレステロールによる樹状突起伸長調節作用の検討  
第44回日本神経化学会 2001年9月26-28日 京都

駒野宏人、川村勇樹、蔡 曉蕊、川市正史、北村俊雄、柳澤勝彦  
ガンマーセクレターゼ活性調節因子 cDNA 同定のための新しいスクリーニング法  
第44回 日本神経化学 2001年9月26-28日 京都

蔡曉蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、柳澤勝彦、駒野宏人  
 $\gamma$ -セクレターゼ活性を促進する因子  
第44回 日本神経化学 2001年9月26-28日 京都

柳澤勝彦  
コレステロールとアルツハイマー病  
第20回日本痴呆学会 シンポジウム 2001年10月4日 三重

キョウ 建生、柳澤勝彦、道川 誠  
Amyloid  $\beta$ -protein のコレステロール代謝に対する影響 第20回日本痴呆学会 2001年10月4日 三重

澤村直哉、キョウ 建生、二宮治明、大野耕策、柳澤勝彦、道川 誠  
ニーマンピック病C型モデルマウスにおけるMAPKの活性化に伴うタウ蛋白の部位特異的な

リン酸化  
第 20 回日本痴呆学会 2001 年 10 月 4 日 三重

なし

駒野宏人、川村勇樹、蔡 曉蕊、川市正史、  
北村俊雄、柳澤勝彦  
新しいスクリーニング系を用いたガンマーセク  
レターゼ活性調節因子の同定について  
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京  
都

蔡曉蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、  
柳澤勝彦、駒野宏人  
γ-セクレターゼ活性におよぼす Herp の影響  
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京  
都

Yanagisawa K and Matuzaki K.  
Amyloidogenesis and cholesterol.  
5th ADPD International Conference  
Apr.1-6,2001, Kyoto, Japan

Yanagisawa K.  
Cholesterol-dependent pathological processes  
in Alzheimer's disease.  
Brain Membrane Alteration in Alzheimer's  
Disease. 7<sup>th</sup> World Congress of Biological  
Psychiatry (WCBP),  
July 1-6,2001 Berlin,Germany

Michikawa M, Gong J. S., Fan Q-W,  
Sawamura N and Yanagisawa K.  
A novel action of amyloid β-protein in cellular  
lipid metabolism in the central nervous system.  
31<sup>th</sup> Society for Neuroscience Annual Meeting,  
Nov.10-15,2001, San Diego, California,USA.

Yanagisawa K.  
Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease:  
A novel viewpoint from cholesterol metabolism  
of neurons.  
The 4<sup>th</sup> Annual Meeting of The Korean Society  
for Brain and Neural Sciences. Dec. 1, 2001,  
Seoul, Korea

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
抗 GM1-Aβ抗体 (4396C) DNA 配列  
(出願中)
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

透析アミロイドーシスに関する病態生化学的研究

分担研究者 下条文武 新潟大学医学部内科学第二講座 教授

#### 研究要旨

われわれは本分担研究で、透析アミロイドーシスの発症および進展に關与する分子機構、特に前駆蛋白である  $\beta 2$ -ミクログロブリン( $\beta 2$ -m)代謝環境の加齢変化の実体を明らかにすることを研究目的とした。(1)透析アミロイドーシスの好発部位である関節軟骨に多く含まれるアグレカン、バイグリカン、及びデコリンは、ヒトリコンビナント $\beta 2$ -m(r- $\beta 2$ -m)と pH 2.5 で長期間反応させると、重合核形成反応を促進することにより透析アミロイド線維 ( $A\beta 2M$  線維) の形成を惹起した。(2)  $A\beta 2M$  線維は、中性 pH 反応液中でオリゴマー以下まで脱重合を起こした。一方、apoE、デコリン、バイグリカン、及び透析時に使用されるヘパリンは強い  $A\beta 2M$  線維安定化作用を示し、上記脱重合反応を濃度依存性に抑制した。(3)  $A\beta 2M$  線維は pH 7.5 でほとんど伸長反応を示さなかったが、2,2,2-trifluoroethanol (TFE)濃度に依存して伸長反応を示した。遠紫外域 CD スペクトル測定により、TFE 濃度に依存した r- $\beta 2$ -m の 2 次構造変化を認めた。また、ヘパリンは濃度依存性に線維伸長を促進した。以上のデータより、種々のアミロイド共存分子、及び関節軟骨マトリクス分子は、重合核形成促進作用および線維安定化作用を及ぼすことにより、透析アミロイドーシスの発症、進展に促進的に作用していると考えられる。

#### A. 研究目的

長期血液透析患者では、血中 $\beta 2$ -ミクログロブリン( $\beta 2$ -m)がアミロイド線維 ( $A\beta 2M$  線維) を形成し組織に沈着する。これらのアミロイド沈着部位には、アポリポ蛋白 E (apoE)、グリコサミノグリカン(GAG)等が共存している。また、透析アミロイドーシスの好発部位である関節組織には、多量のプロテオグリカン(PG)が存在している。従って、これらの多様な生体分子が透析アミロイドーシス発症に何らかの役割を果たしていることが考えられる。

われわれはこれまでに、アミロイド線維形成の重合核依存性重合モデルを独自に確立して来た。本研究では、これまでに確立した酸性 pH 域における  $A\beta 2M$  線維の重合反応系に加え、中性 pH 域における線維伸長および脱重合反応系を新たに開発し、上記生体分子の  $A\beta 2M$  線維形成・沈着に及ぼす機能を解析した。そして、透析アミロイドーシスの発症および進展に關与する分子機構、特に $\beta 2$ -m 代謝環境の加齢変化の実体を明らかにすることを研究目的とした。3 年間の主要成果を報告する。

## B. 研究方法

### (1) 酸性 pH におけるヒトリコンビナント $\beta$ 2-m

からの  $A\beta$ 2M 線維形成反応：反応溶液は、50  $\mu$ M ヒトリコンビナント  $\beta$ 2-m (r-  $\beta$ 2-m)、50 mM citrate-100 mM NaCl (pH 2.5) を含み、アグレカン、パイグリカン、デコリン、あるいはヘパリンを添加した。37°C でインキュベート後の  $A\beta$ 2M 線維形成を、チオフラビン T (ThT) 蛍光値、及び電顕観察により評価した。

### (2) 中性 pH における線維脱重合反応：反応溶液

は、150  $\mu$ g/ml  $A\beta$ 2M 線維、50 mM phosphate-100 mM NaCl (pH 7.5) を含み、apoE、7 種の GAG (コンドロイチン硫酸 A, B, C、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン)、あるいは 6 種の PG (アグレカン、パイグリカン、デコリン、ヘパリン硫酸 PG、デルマタン硫酸 PG、ケラタン硫酸 PG) を添加した。37°C、24 時間インキュベート後の  $A\beta$ 2M 線維の残存率を、ThT 蛍光値、及び電顕観察により評価した。

### (3) 中性 pH における線維伸長反応： $A\beta$ 2M 線

維伸長反応液 (20  $\mu$ g/ml  $A\beta$ 2M 線維、50  $\mu$ M r-  $\beta$ 2-m、50 mM phosphate-100 mM NaCl, pH 7.5) に 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) を終濃度 10~25% になるように添加し、37°C でインキュベートした。線維伸長は ThT 蛍光値、及び電顕観察により評価した。また、各 TFE 濃度における r-  $\beta$ 2-m の遠紫外域 CD スペクトルを測定した。さらに、上記反応溶液にヘパリンを添加し、線維伸長に及ぼす影響を解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、リコンビナント蛋白、及び凍結保存した患者組織より精製したアミロイド線維を使

用するため、倫理面の問題は無いと判断される。

## C. 研究結果

(1) 関節軟骨に多く含まれるアグレカン、パイグリカン、及びデコリンは、r-  $\beta$ 2-m と pH 2.5 で長期間反応させると、重合核形成反応を促進することにより  $A\beta$ 2M 線維の形成を惹起した。

(2)  $A\beta$ 2M 線維は、中性 pH 反応液中でオリゴマー以下まで脱重合を起こした。一方、apoE、デコリン、パイグリカン、及び透析時に使用されるヘパリンは強い  $A\beta$ 2M 線維安定化作用を示し、上記脱重合反応を濃度依存性に抑制した。

(3)  $A\beta$ 2M 線維は pH 7.5 でほとんど伸長反応を示さなかったが、TFE 濃度に依存して伸長反応を示した。遠紫外域 CD スペクトル測定により、TFE 濃度に依存した r-  $\beta$ 2-m の 2 次構造変化を認めた。また、ヘパリンは濃度依存性に線維伸長を促進した。

## D. 考察

関節軟骨を形成する代表的 PG であるアグレカン、パイグリカン、及びデコリンは、酸性 pH 反応液中で、r-  $\beta$ 2-m からの  $A\beta$ 2M 線維形成を惹起した。この事実は、関節組織マトリクス分子が  $\beta$ 2-m の立体構造を変化させ、 $A\beta$ 2M 線維の形成・沈着を開始させ得ることを示唆している。

次に、apoE、及び種々の GAG、PG は、中性 pH 域における  $A\beta$ 2M 線維脱重合反応を抑制した。これは、上記アミロイド共存分子が線維表面に結合し、線維構造を安定化させることにより脱重合を抑制していると考えられ、アミロイド共存分子の線維沈着における役割の一端を示唆している。

さらに、ヘパリンは TFE 存在下の中性 pH 域における  $A\beta$ 2M 線維伸長を促進した。以上の事

実を総合すると、種々のアミロイド共存分子、及び関節軟骨マトリクス分子は、重合核形成促進作用および線維安定化作用を及ぼすことにより、透析アミロイドーシスの発症、進展に促進的に作用していると考えられる。上記生体分子の血中濃度、あるいは間質における濃度が、加齢、及び腎不全の進展により変化していることが多くの研究者により示唆されており、そのような変化の集積が透析アミロイドーシスの発症を惹起していると考えられる。最後に、ヘパリンは透析医療において血液凝固阻止を目的に頻用されているが、上記データより透析アミロイドーシスの発症を促進している可能性が考えられ、これを検証する臨床研究が早急に望まれる。

#### E. 結論

apoE、GAG、PG に代表される種々のアミロイド共存分子、及び関節軟骨マトリクス分子は、重合核形成促進作用および線維安定化作用を及ぼすことにより、透析アミロイドーシスの発症、進展に促進的に作用していると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamaguchi I, Hasegawa K, Takahashi N, Gejyo F and Naiki H  
Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of  $\beta$ 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH.  
*Biochemistry* 40:8499-8507, 2001

Kazama J, Maruyama H and Gejyo F  
Reduction of circulating  $\beta$ 2-microglobulin level for the treatment of dialysis-related amyloidosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 16(Suppl 4):31-35, 2001

Yamaguchi I, Hasegawa K, Naiki H, Mitsu T, Matuo Y and Gejyo F  
Extension of A $\beta$  2M amyloid fibrils with recombinant human  $\beta$ 2-microglobulin.  
*Amyloid* 8:30-40, 2001

Kazama J, Maruyama H and Gejyo F  
Osteoclastogenesis and osteoclast activation in dialysis-related amyloid osteopathy.  
*American Journal of Kidney Diseases* 38(Suppl 1): 156-160, 2001

下条文武  
透析アミロイドーシス(荒川正昭、小磯謙吉、浅野 泰 監修) 腎臓病の最新医療(先端医療技術研究所) (in press)

橋本義一、内木宏延、吉田治義、下条文武  
実験的アミロイド線維伸長と AGE 化  $\beta$ 2-m 腎と骨代謝 14:31-36, 2001

下条文武  
透析アミロイドーシス(1)—手根管症候群—  
透析ケア 7:48-51, 2001

下条文武  
 $\beta$ 2-microglobulin と透析アミロイドーシス  
臨床病理 49:244-248, 2001

大林弘明、丸山弘樹、下条文武  
透析アミロイドーシスへの対策  
腎と透析 50:685-689, 2001

齋藤徳子、下条文武  
透析アミロイドーシス 内科 87:1242-1247, 2001

下条文武  
透析アミロイドーシス *Medical Technology* 29:1161, 2001

丸山弘樹、樋口 昇、下条文武  
透析アミロイドーシスによる関節症の治療(伊藤克己、浅野 泰、遠藤 仁、御手洗哲也、東原英二編) *Annual Review 腎臓*(中外医学社): 240-246, 2001

下条文武  
アミロイドーシス(透析療法合同専門委員会 編) 血液浄化療法ハンドブック(共同医書出版社):388-394, 2001

##### 2. 学会発表

Yamaguchi I, Hasegawa K, Takahashi N, Gejyo F and Naiki H  
Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of  $\beta$ 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH.

9th International Symposium on Amyloidosis.  
2001 Budapest, Hungary

Takahashi N, Hasegawa K, Yamaguchi I,  
Gejyo F and Naiki H  
Establishment of a first-order kinetic model of  
AL Amyloid fibril extension in vitro.  
9th International Symposium on Amyloidosis.  
2001, Budapest, Hungary

Gejyo F.  
 $\beta$ 2-microglobulin and dialysis-related  
amyloidosis: pathogenic and therapeutic  
consideration. 19th Annual Meeting on the  
International Society of Blood Purification, 2001,  
Tokyo, Japan

齋藤徳子、下条文武、宮崎 滋、鈴木正司、森田 俊、  
平澤由平  
 $\beta$ 2M アミロイド骨関節病変におけるオステオポ  
ンチン(OPN)の発現に関する検討  
日本透析医学会 2001年6月21~24日 大阪

下条文武  
透析とアミロイド骨・関節病変  
第31回日本腎臓学会東部学術大会 2001年10  
月26~27日 山梨

白崎有正、風間 順一郎、大林弘明、上野光博、  
成田一衛、鈴木栄一、下条文武  
急性腎不全を呈した Bence-Jones(BJ)型多発性骨  
髄腫に続発するアミロイドーシスの一例  
第31回日本腎臓学会東部学術大会 2001年10  
月26~27日 山梨

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 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（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

アミロイド線維形成に関する試験管内反応速度論的研究

分担研究者 内木宏延 福井医科大学病理学第二講座 教授

#### 研究要旨

アルツハイマー病、全身性 AL アミロイドーシス、及び透析アミロイドーシス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、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旨とした。(1) アルツハイマー病では、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、 $\beta$ アミロイド線維(fA $\beta$ )伸長過程と共に脱重合過程も一次反応速度論モデルで説明できることを証明した。また、種々の有機化合物の fA $\beta$  分解作用をチオフラビン T 法を用いて比較解析し、抗酸化剤 NDGA、次いでリファンピシン、テトラサイクリンが強力な線維分解能を有すること明らかにした。(2) 全身性 AL アミロイドーシスでは、5 例の剖検例を基に線維伸長の一次反応速度論モデルを普遍化し、中性 pH 域における線維伸長反応を重点的に解析した。また、この反応に種々の生体分子が抑制的、あるいは促進的に作用すること、及び NDGA がこの反応を抑制することを明らかにした。

#### A. 研究目的

われわれは、試験管内アミロイド線維の形成反応を説明するモデルとして、核形成過程と線維伸長過程から構成される重合核依存性重合モデルを構築している。このモデルに基づき、透析アミロイドーシス、アルツハイマー病、及び AL アミロイドーシス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、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。本分担研究でわれわれは、上記アミロイドーシスの発症に共通する分子

機構、特にアミロイド前駆蛋白の代謝環境の加齢変化の実体を、試験管内反応速度論的解析系を駆使し明らかにすることを旨とした。3 年間の主要成果を報告する。

まずアルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維(fA $\beta$ )に関し、従来のチオフラビン T(ThT)を用いた分光蛍光定量法に基づく閉鎖反応系に比べより生体に近いモデルとして、系外から A $\beta$  蛋白が供給され続ける開放反応系を構築し、fA $\beta$  の伸長、及び脱重合機構を解析した。

種々のヒトアミロイドーシスの克服に向け、有機化合物によるアミロイド線維の形成抑制および分解が有力な治療戦略として挙げられる。われわれは以前、抗酸化剤の一種であるノルジ

ヒドログアイアレチン酸(NDGA)、及び抗結核剤のリファンピシン(RIF)が、A $\beta$ 蛋白からの fA $\beta$  形成を濃度依存性に抑制することを明らかにした。今回われわれは、fA $\beta$ に対する NDGA の試験管内分解作用を明らかにし、これまでに fA $\beta$  の形成抑制、あるいは分解作用の報告されている種々の有機化合物、ポリビニル化合物、及び  $\beta$ -シートブレーカーペプチド(iA $\beta$ 5)と比較解析した。

さらに全身性 AL アミロイドーシスにおいては、線維伸長の一次反応速度論モデルを普遍化し、中性 pH 域における線維伸長反応を重点的に解析した。さらに、この反応に及ぼす種々の生体分子、及び有機化合物の影響を検討した。

## B. 研究方法

(1) ピアコアを用いた開放反応系の構築: 測定には表面プラズモン共鳴法 (SPR, BIACORE 1000, 3000) を用いた。最初に A $\beta$  (1-40)より pH 7.5 で fA $\beta$ (1-40)を形成させ、これを重合核としてセンサーチップ上に固定化した。次いで、リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した各種濃度 (0-30  $\mu$ M) の A $\beta$ (1-40)溶液を連続的に添加し、37°C における fA $\beta$ の伸長及び脱重合過程をリアルタイムで測定した。

(2) 種々の有機化合物およびペプチドの fA $\beta$  分解作用: 最初に、あらかじめ作成した fA $\beta$ を A $\beta$  (1-40)および(1-42)と pH 7.5、37°C で反応させ、十分ほぐれた状態のフレッシュな fA $\beta$ を調製した。次いで、ジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解した NDGA、RIF、テトラサイクリン(TC)、蒸留水に溶解したポリビニル化合物 (ポリビニルスルホン酸塩(PVS)、1,3-プロパンジルスルホン酸塩(1,3-PDS))、または iA $\beta$ 5 を添加後、pH 7.5、

37°C における fA $\beta$ の分解過程を ThT 法および電顕を用いて経時的に測定し、分解作用の強さを比較解析した。

(2) AL アミロイドーシス: (a) アミロイド線維、及び AL 蛋白の精製: AL アミロイド線維(fAL)は、全身性 AL アミロイドーシスの病理解剖 4 症例(いずれも入型)ならびに生体肝移植 1 症例( $\kappa$ 型)より得られた諸臓器から精製した。単体 AL 蛋白は、精製線維の一部を 6M 尿素で可溶化し、ゲルろ過クロマトグラフィー(Sephacryl S200)で分子量別に分画した。また、中性 pH 域でも十分な線維伸長を認めた症例 1、4 については、HPLC (Hitrap SP, Superose 12)による高純度 AL 蛋白精製を行った。(b) fAL 形成の反応速度論的解析: 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 fAL と共に 37°C で反応させ、fAL 形成・伸長を、電顕観察、及び ThT 法によりモニターした。(c) 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 1、4 の pH 7.5 における伸長反応溶液に、種々のアミロイド共存物質 (アポリポ蛋白 E (apoE)、血性アミロイド P コンポーネント、フィブロネクチン、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、 $\alpha_1$ -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 ( $\alpha_1$ -ミクログロブリン)、及び有機化合物 (NDGA、RIF、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。

(倫理面への配慮)

生体肝移植症例 ( $\kappa$ 型)より得られた肝の分析においては、研究に使用することに対する同意を患者本人より文書で得た。