

図1 急性モデルでの抗IL-6R抗体の効果

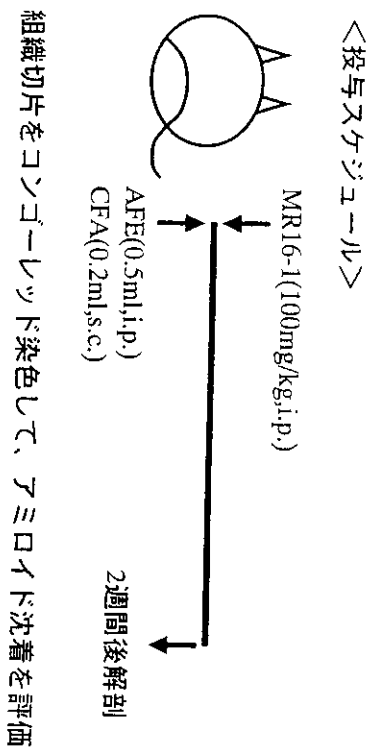


図2 慢性モデルでの抗IL-6R抗体の効果

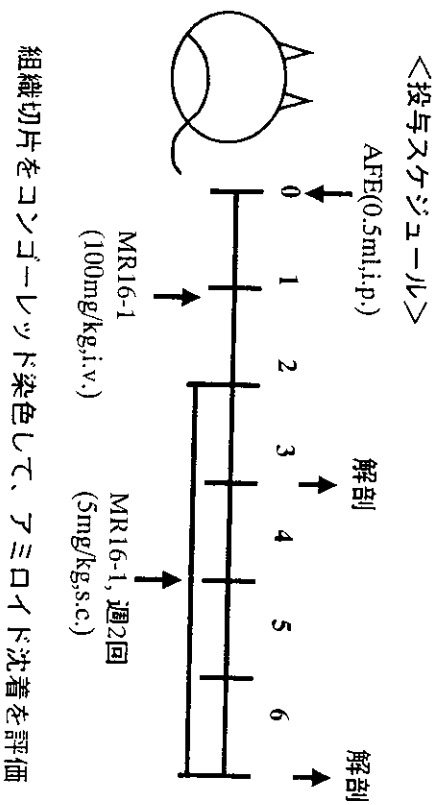


図3 アミロイド沈着スコア

Mouse No.	Control Ab					MRI16-1				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Liver	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0
Spleen	2	1	2	2	2	0	0	0	0	0
Kidney	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Total	4	2	5	5	5	0	0	0	0	0

0:なし, 1:軽微, 2:軽度, 3:中等度, 4:高度  
P<0.05; Control vs. MRI16-1(Wilcoxon 2-sample test)

図4 急性モデルの病理組織像

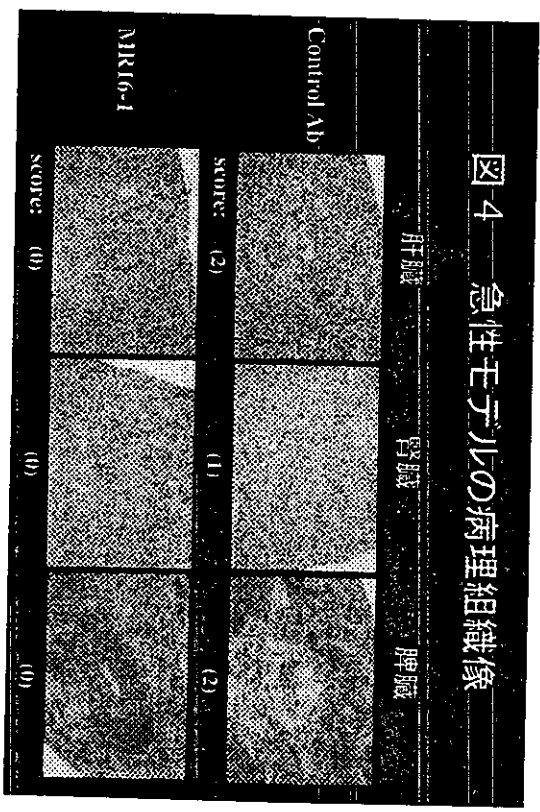


図5 血中SAA濃度

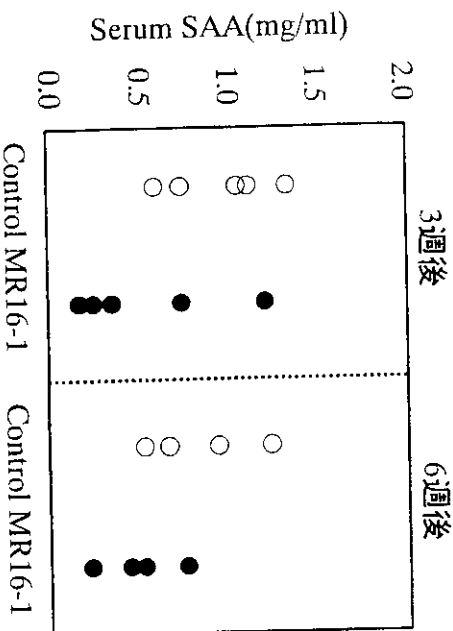


図6 アミロイド沈着スコア (3週後)

Mouse No.	Control Ab					MRI16-1					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Liver	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	2
Spleen	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
Kidney	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1
Stomach	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Duodenum	2	2	2	2	2	2	1	1	0	1	1
Jejunum	1	1	1	1	2	1	1	1	0	0	1
Ileum	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Cecum	2	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0
Colon	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Rectum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adrenal gland	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	1
Heart	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
Thyroid gland	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	1
Total	21	20	20	19	20	15	12	8	3	3	11

0: なし, 1: 軽微, 2: 軽度, 3: 中等度, 4: 高度  
P<0.05, Control vs. MRI16-1 (Wilcoxon 2-sample test)

図7 アミロイド沈着スコア (6週後)

Mouse No.	Control Ab					MRI16-1				
	1	2	3	4	4	1	2	3	4	4
Liver	4	4	4	4	4	2	2	3	2	2
Spleen	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
Kidney	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Stomach	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Duodenum	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
Jejunum	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
Ileum	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
Cecum	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
Colon	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Rectum	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Adrenal gland	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
Heart	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Thyroid gland	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
Total	26	25	25	25	25	17	19	15	18	18

0: なし, 1: 軽微, 2: 軽度, 3: 中等度, 4: 高度  
P<0.05, Control vs. MRI16-1 (Wilcoxon 2-sample test)

図8 慢性モデルの病理組織像

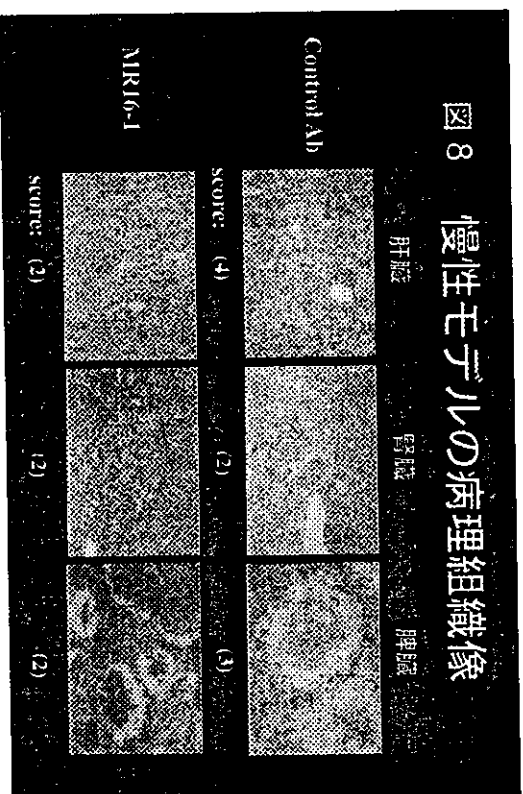
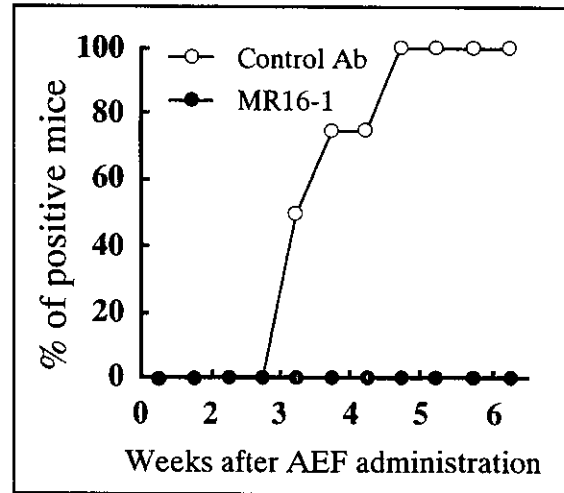
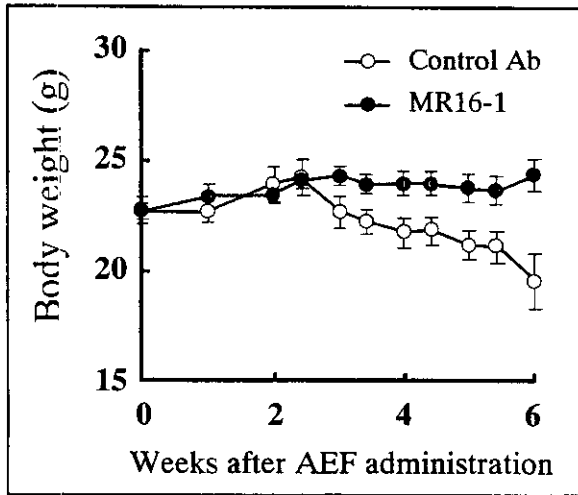


図9 体重変化と尿蛋白陽性率



P<0.05,4-6 weeks,Control vs. MR16-1(t test)

尿蛋白陽性 (>100mg/dL)

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

## AA-アミロイドーシスと SAA1 遺伝子多型

分担研究者 馬場 聡 浜松医科大学医学部第二病理

共同研究者 中井秀紀\*、中村 正\*\*、太田策啓\*\*\*

\*勤医協札幌病院、\*\*熊本リウマチセンター、

\*\*\*浜松医科大学医学部第三内科

研究要旨 SAA1 遺伝子エクソン 3 (SAA1-e3) の  $\alpha \sim \gamma$  多型が関節リウマチ (RA) 患者の AA-アミロイドーシス発症に関連していることを報告してきた。今回は、多施設の RA 患者 (アミロイドーシス合併 117 名、同非合併 508 名) を対象に、SAA1-e3 多型、新たに見出した SAA1 遺伝子 5'-上流 (5'-SAA1) 多型、SAA2 遺伝子エクソン 4 (SAA2-e4) 多型、その他 *IL-1 $\beta$*  等の関連遺伝子の多型も含めて解析し、本症との関係をみた。また、ヘテロ患者 (5'-SAA1-AG/SAA1-e3- $\alpha\gamma$ ) における血中 SAA1 $\alpha$  と SAA1 $\gamma$  の存在比を質量スペクトラムから算出した。さらに、5'-SAA1 多型が SAA1 遺伝子転写活性に影響するかを HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼ・アッセイで調べた。その結果、SAA1-e3 の  $\gamma$  型および 5'-SAA1 の G 型、特にそれらのホモ接合子は本症の強い危険因子であることが示された (オッズ比:  $\gamma\gamma$  型 11、GG 型 9)。その他の遺伝子多型には本症との明らかな関連はみられなかった。SAA1-e3 と 5'-SAA1 の両遺伝子座は強い連鎖不均衡にあって、両多型と本症との関連はほぼ同等であった。ルシフェラーゼ・アッセイで 5'-SAA1 多型の SAA1 遺伝子転写活性への影響はみられず、ヘテロ患者血中 SAA1 $\alpha$  と SAA1 $\gamma$  分子の存在比もほぼ 1:1 であった。以上から、5'-SAA1-G 型が SAA1 発現に促進的に働くことで本症の発症に関与している可能性は低いと考えられた。

### A. 研究目的

AA-アミロイドーシス合併の有無は、RA 患者の生命予後を大きく左右する。我々は SAA1 遺伝子エクソン 3 (SAA1-e3) 多型の 1 つである SAA1 $\gamma$  (SAA1.3) を見出し、これが日本人 RA 患者において AA-アミロイドーシス発症の強い危険因子であることを報告してきた。今回の研究では、我々が新たに見出した SAA1 遺伝子 5'-上流 (5'-SAA1) 多型を含めた疫学的追加調査を多施設研究として行った。さらに、5'-SAA1 多型が SAA1 発現に及ぼす影響を知る目的で 5'-SAA1 多型と血中 SAA1 レベルおよび SAA1 遺伝子転写活

性との関連をみた。

### B. 研究方法

#### 1. 遺伝子多型解析

札幌、浜松、熊本の 3 地域の RA 患者 (アミロイドーシス合併 117 名、同非合併 508 名) を対象とした。全血から DNA を抽出し、PCR-RFLP にて SAA1-e3 の  $\alpha \sim \gamma$  多型と 5'-SAA1 の A~G 多型、SAA2-e4 の  $\alpha \sim \beta$  多型を解析した。さらに、5'-SAA1-GG/SAA1-e3- $\gamma\gamma$ /SAA2-e4- $\alpha\alpha$  型のアミロイドーシス合併 (n = 49) および同非合併 (n = 46) 患者について、*IL-1 $\beta$* 31、*IL-1ra*、

*IL-6-174*、*RAGE+7221* の各遺伝子多型を PCR-RFLP 等で解析した。

## 2. 血中 SAA1 測定

CRP レベルの上昇している RA 患者血清から、抗ヒト SAA ウサギ血清 IgG を用いて SAA を免疫沈降し、MALDI-TOF 型質量分析計 (Voyager DE-STR, PerSeptive Biosystems) で SAA 分子種の質量スペクトラムを得た。

## 3. ルシフェラーゼ・アッセイ

*SAA1* 遺伝子の 5'-上流域 (-323 - +42) を PCR 増幅し、ルシフェラーゼ・アッセイ用ベクター pGV-B2 (東洋インキ) に組み込んだ。内部標準の pRL-TK ベクター (同) と共に、PolyFect (キアゲン) を用いて培養 HepG2 細胞にトランスフェクションし、18 時間後にヒト IL-6 (10 unit/mL) で 6 時間刺激 (または未刺激) した後、細胞を回収してデュアル・レポーター・アッセイを行った。プラスミド精製段階から独立させた 6 回の duplicate 実験を行った。

(倫理面への配慮) 本研究の実施計画は浜松医科大学遺伝子解析研究倫理審査委員会での検討・承認され、それに沿って行った。

## C. 研究結果

### 1. 遺伝子多型解析

対象となった RA 患者のアミロイドーシス合併群 (A 群) と同非合併群 (C 群) を比較すると、男女比は、A: M/F (%) = 6.0/94.0, C: M/F (%) = 9.9/90.1 と差はなく、平均年齢は A: 62 歳 [30-83]、C: 59 歳 [30-83] で A 群が 3 歳高齢であるが有意差はなかった ( $p = 0.076$ )。また、RA の初発年齢は、A: 43 歳 [14-63]、C: 44 歳 [9-70] で A 群が 1 歳若い有意差はなかった ( $p = 0.507$ )。

図 1 に *SAA1* 遺伝子の 5'-*SAA1* 多型と *SAA1-e3* 多型を示すが、A・C 両群ともにこの近接した 2 遺伝子座には明らかな連鎖不均衡が認められ (A: correlation = 0.733,  $\chi^2 = 263.61$ ,  $p = 0.0001$ ; C: correlation = 0.700,  $\chi^2$

=750.37,  $p = 0.0001$ )、5'-*SAA1* locus のハプロタイプ A は *SAA1-e3* locus のハプロタイプ  $\alpha$  に、同 B は  $\beta$  に、同 G は  $\gamma$  に、それぞれ連鎖していた。

*SAA1* 遺伝子の遺伝子型分布は A・C 両群間で大きく異なり、これから求めたオッズ比は、5'-*SAA1* locus の GG で 9、*SAA1-e3* locus の  $\gamma\gamma$  で 11 と非常に高く、次に高い遺伝子型がそれぞれ BG および  $\beta\gamma$  で約 4 であった (表 1)。*SAA2-e4* 多型については A・C 両群間で有意な違いはみられなかった。また、5'-*SAA1*-GG/*SAA1-e3*- $\gamma\gamma$ /*SAA2-e4*- $\alpha\alpha$  型の患者を対象に、SAA 発現に影響すると思われる *IL-1 $\beta$ -31*、*IL-1ra*、*IL-6-174*、*RAGE+7221* の各多型についても調べたが、A・C 両群間で遺伝子型分布に有意な違いはみられなかった。

## 2. 血中 SAA1 測定

*SAA1* ハプロタイプがヘテロ型 (5'-*SAA1*-AG/*SAA1-e3*- $\alpha\gamma$ ) の各患者血清から免疫沈降した SAA 分子の質量スペクトラムから、*SAA1* $\alpha_1$ -104 と *SAA1* $\alpha_2$ -104 のピーク高の和、および *SAA1* $\gamma_1$ -104 と *SAA1* $\gamma_2$ -104 のピーク高の和をそれぞれ求め、その相対比を算出したところ、両者に有意な差は認められなかった (表 2)。

## 3. ルシフェラーゼ・アッセイ

HepG2 細胞を用いたデュアル・ルシフェラーゼ・アッセイの結果、IL-6 刺激は有意に 5'-*SAA1* の転写活性を高めたが、ハプロタイプの違いは 5'-*SAA1* の転写活性およびその IL-6 刺激による活性上昇効果に影響を及ぼすとはいえなかった (図 2)。

## D. 考察

今回の多施設研究により *SAA1* $\gamma$ 、特にその  $\gamma\gamma$ -ホモ接合子が日本人 RA 患者における AA-アミロイドーシスの強い危険因子であるという我々の主張がより確かなものとなった。

5'-*SAA1* の多型を発見した (一昨年度に

我々が報告) ことから、この 5'-SAA1 多型こそが SAA1 の発現に影響することでアミロイドーシス発症に関与し、SAA1-e3 多型の関連は単に連鎖不均衡による現象だけで直接には関与しない、という可能性が考えられた。しかし、今回の研究で、5'-SAA1 多型と SAA1-e3 多型は遺伝子型分布より求めたオッズ比からみてアミロイドーシス発症に対して等価であり、質量スペクトルから算出したヘテロ患者血中の SAA1 $\alpha$  と SAA1 $\gamma$  分子の存在比もほぼ 1 : 1、ルシフェラーゼ・アッセイにおいて 5'-SAA1 多型の SAA1 遺伝子転写活性への関与も示唆されなかった。未だ十分なデータとはいえないが、オッズ比から推測されるような高いリスクの原因が 5'-SAA1 多型にある可能性は低いと思われる。今後、アミノ酸置換を伴う SAA1-e3 多型が及ぼす効果を中心にして、AA-アミロイドーシスの発症メカニズムを解明していく必要があるだろう。

#### E. 結論

1. 日本人 RA 患者における AA-アミロイドーシス発症の遺伝的要因として SAA1 $\gamma$  の重要性が確認された。
2. 5'-SAA1 多型と SAA1-e3 多型は AA-アミロイドーシス発症に同等に関連しており、5'-SAA1 多型の SAA1 発現に対する直接関与は示されなかった。
3. *IL-1 $\beta$ -31*、*IL-1ra*、*IL-6-174*、*RAGE+7221* の各遺伝子多型の AA-アミロイドーシスへの明らかな関連はみられなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) 馬場 聡、筒井祥博、澤口聡子、Patrice D Mangin: 血清アミロイド A (SAA) 遺伝子転写調節領域の多型. *DNA 多型* 8:

49-52, 2000.

- 2) 中村 正、馬場 聡、山村雄治、鶴田敬郎、松原三郎、友田邦彦、東野通志: 慢性関節リウマチに合併する 2 次性アミロイドーシスの多様性に関する一考察. *九州リウマチ* 19: 1-5, 2000.
  - 3) Nakamura T, Baba S, Yamamura Y, Tsuruta T, Matsubara S, Tomoda K, Tsukano M: Combined treatment with cyclophosphamide and prednisolone is effective for secondary amyloidosis with SAA1 $\gamma/\gamma$  genotype in a patient with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 10: 160-164, 2000.
  - 4) Baba S, Nakai H, Nakamura T, Miyamoto S, Ohta Y, Takahashi T, Kasama T, Tsutsui Y: Novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the human serum amyloid A1 (SAA1) gene and an association with reactive AA-amyloidosis. *Amyloid: The Journal of Protein folding disorders* 8 (Suppl 2): 41-42, 2001 (Abst)
2. 学会発表
- 1) Baba S, Nakai H, Nakamura T, Miyamoto S, Ohta Y, Takahashi T, Kasama T, Tsutsui Y: Novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the human serum amyloid A1 (SAA1) gene and an association with reactive AA-amyloidosis. The IXth International Symposium on Amyloidosis, Budapest, Hungary, July 15-21, 2001.
  - 2) 馬場 聡、筒井祥博、中井秀紀、中村 正、太田策啓: AA-アミロイドーシスと遺伝子多型. 第 91 回日本病理学会総会、東京、2001 年 3 月 27 日.

#### 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

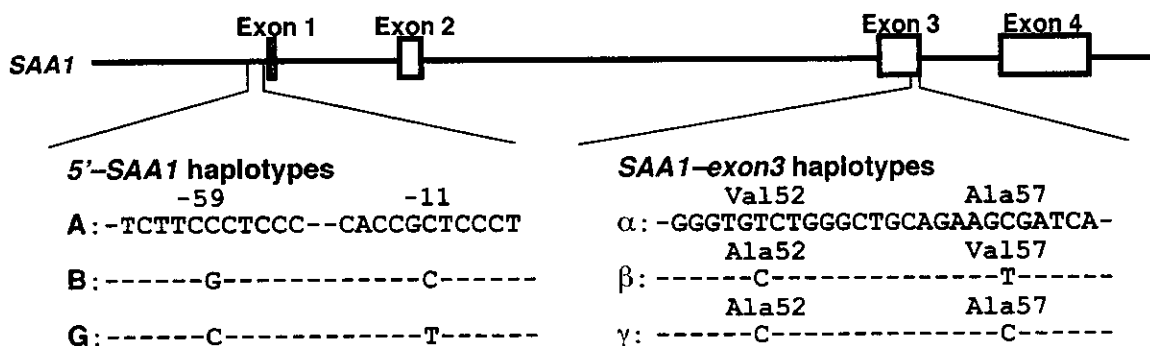


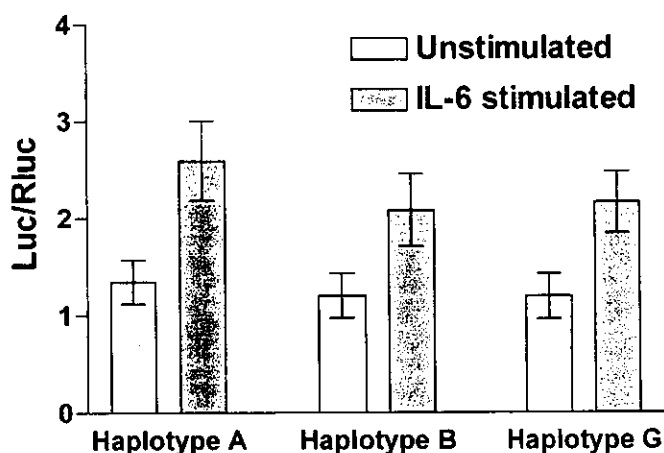
図 1 SAA1 遺伝子の 5'-上流多型とエクソン 3 多型

表 1 AA-アミロイドーシス症例 (n = 117) および対照 (n = 508) における SAA 遺伝子型分布とオッズ比

Locus	Genotype	Cases	Controls	Odds ratio (95% CI)
5'-SAA1	AA	4	50	1.0
	AB	2	99	0.3 (0.0-1.4)
	AG	17	152	1.4 (0.4-4.4)
	BB	6	35	2.1 (0.6-8.2)
	BG	32	96	4.2 (1.4-12.4)
	GG	55	76	9.0 (3.1-26.5)
SAA1-e3	αα	4	49	1.0
	αβ	4	117	0.4 (0.1-1.7)
	αγ	14	137	1.3 (0.4-4.0)
	ββ	11	51	2.6 (0.8-8.9)
	βγ	36	103	4.3 (1.4-12.7)
SAA2-e4	γγ	47	51	11.3 (3.8-33.7)
	αα	90	396	1.0
	αβ	24	105	1.0 (0.6-1.7)
	ββ	3	7	1.9 (0.5-7.4)

表 2 SAA1 ハプロタイプ AGαγ 型の RA 患者血清における SAA1α と SAA1γ の相対比

Case No.	SAA1α (%)	SAA1γ (%)
#390	53.3	46.7
#400	52.3	47.7
#374	49.3	50.7
#373	52.1	47.9
#360	53.2	46.8
#C4	48.2	51.8
#C3	56.1	43.9
Mean	52.07	47.93
SD	2.64	2.64
Sample size	7	7
95% CI min	49.63	45.49
95% CI max	54.51	50.37



Two-way ANOVA (Matching by experiments)

Source of Variation	Df	Sum of Squares	Mean Square	F	% of Total Variation	P value
Interaction	2	0.2208	0.1104	0.65	0.80	0.5337, n.s.
Haplotype	2	0.7749	0.3875	0.40	2.81	0.6763, n.s.
Stimulation	1	9.574	9.574	56.79	34.72	< 0.0001
Matching	15	14.48	0.97	5.72	52.50	0.0008
Residual	15	2.529	0.1686			

図 2 HepG2 細胞における 5'-SAA1 ハプロタイプ と SAA1 遺伝子転写活性



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

## 急速凍結- レプリカ免疫電顕法による SAP 欠損マウス AA およびヒト AL アミロイド線維の超微形態学的解析

分担研究者 池田修一 信州大学医学部第3内科

共同研究者 大野伸一\*、藤井靖久\*、前田秀一郎\*\*、石原得博\*\*\*

山梨医科大学、\*解剖学講座第1教室、\*\*生化学講座第1教室、

山口大学医学部、\*\*\*病理学第1講座

**研究要旨** 電顕超薄切片法及び急速凍結ディープエッチング (QF-DE) 法を用いて、血清アミロイド P 成分 (SAP) 欠損マウスの実験的脾臓内沈着 AA アミロイド線維および原発性アミロイドーシス症例 (AL 型) の肝臓内沈着アミロイド線維の超微形態学的特徴を明らかにし、さらに QF-DE 法とコロイド金標識免疫染色法を併用し、AA アミロイド線維の微細構造を検討した。ジーンターゲット法により作製した SAP 欠損マウスに、実験的 AA アミロイドーシスを惹起した。パラホルムアルデヒド液で灌流固定後、脾臓を摘出し、凍結薄切後カバースリップ付着切片をトリプシン処理、あるいは未処理切片のまま QF-DE 法でレプリカ膜を作製した。さらにレプリカ膜付着試料を SDS で剥離後、抗 heparan sulfate proteoglycan (HSPG) 抗体、抗アミロイド A (AA) 抗体、抗 SAP 抗体とコロイド金標識二次抗体で免疫染色を行った。また原発性アミロイドーシス症例の肝臓より、型のごとく QF-DE 法でレプリカ膜を作製した。トリプシン処理により AA アミロイド線維は細くなり、抗 HSPG 抗体のコロイド金粒子が明瞭に認められた。またヒト AL アミロイド線維においては、束状化したアミロイド線維間に架橋細線維が認められた。以上のように AA アミロイド線維の微量成分である SAP が欠損していても、アミロイド線維は形成された。通常の超薄切片試料では、SAP 欠損マウスと野生型マウスの AA アミロイド線維構造の相違は不明瞭であったが、QF-DE 法により両群のアミロイド線維の微細構造は異なることが明らかになった。またヒト AL アミロイド線維間の架橋細線維は、マウス AA アミロイド線維間の架橋細線維に類似していた。実験的 AA アミロイド線維構造は、内側に HSPG が局在し、AA と SAP がその周囲を取り巻いている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

アミロイド線維の主成分としては、続発性アミロイドーシスにおける AA 蛋白、免疫グロブリン light chain に由来する AL 蛋白などがあり、現在では約 19 種類ものアミロイド前駆蛋白が明らかにされている。また微量成分としては、SAP があり、アミロイド沈着物

に共存して見られる。その他に HSPG、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG)、また、デルマタン硫酸プロテオグリカンなどの局在もいわれている。

1996 年、井上らは低温樹脂包埋した超薄切片による免疫電顕法を用い、アミロイド線維構造は、SAP と CSPG で形成された芯 core

とその周囲を順に HSPG、AA 蛋白が取り巻いていると報告した。したがって SAP が欠損すると生体内では、アミロイド線維の構築ができにくいことが推察される。本研究では、この芯である SAP のノックアウトマウスの脾臓内沈着アミロイド線維について電顕超薄切片法及び急速凍結ディープエッチング (QF-DE) 法を用いて検討した。さらに原発性アミロイドーシス 2 症例 (AL 型) の肝臓内沈着アミロイド線維の超微形態学的特徴についても述べる。

## B. 研究方法

ジーンターゲット法で作製した SAP 欠損マウス群と野生型マウス対照群を使用した。実験的 AA アミロイドーシスを惹起した後、2% パラフォルムアルデヒドで灌流固定した。光顕観察のためには、パラフィン切片によるアミロイド沈着を同定する direct fast scarlet 染色、そしてアルシアンブルー染色を行い、免疫組織化学的検索のためには、抗 HSPG 抗体、抗 SAP 抗体、抗 AA 抗体を使った。電顕観察のためには、通常のエポソド包埋、コロイド金を使った包埋後免疫染色法、脾臓組織の QF-DE 法およびカバースリップレプリカ法により、それぞれ試料を作製した。カバースリップレプリカ法は、グリセロールで氷晶形成防止をして、OCT コンパウンドに包埋し、10–15  $\mu\text{m}$  の厚さで凍結薄切した。さらにカバースリップ付着切片を 0.01% トリプシン処理、あるいは未処理切片のまま QF-DE 法でレプリカ膜を作製した。電顕レプリカ免疫染色法は、さらにレプリカ膜付着試料を SDS で約 30 分間処理して剥離後、抗 HSPG 抗体とコロイド金標識二次抗体で免疫染色を行った。また原発性アミロイドーシス症例肝臓より型のごとく QF-DE 法でレプリカ膜を作製した。

## C. 研究結果

アミロイド沈着物は、direct fast scarlet 染

色では red-brown 色に染色された。アルシアンブルー染色では、トリプシン処理によりさらに染色性が強くなり、これは SAP 欠損マウスでも同様の結果が得られた。図 1 は野生型マウスにおける脾臓内アミロイド沈着物を免疫染色した連続切片光顕像である。トリプシン処理により抗 HSPG 抗体の免疫染色性は強くなり、抗 SAP 抗体は弱くなった。また SAP 欠損マウスでは、トリプシン処理により抗 HSPG 抗体は僅かに強く、逆に抗 AA 抗体は弱くなった。

QF-DE 法によると、SAP が欠損していてもアミロイド線維は形成された (図 2a)。しかし、野生型マウスのアミロイド線維と比較すると (図 2b)、細く、中心部に細線維構造が見られた。一方、野生型マウスでは分枝した太い線維からなり、アミロイド線維間に細線維が認められた (図 2b)。通常のエポソド超薄切片試料では、両群には明らかな相違は認められなかった。図 3 はレプリカ膜上でアミロイド線維の太さを計測した結果である。SAP 欠損マウスは  $7.5 \pm 1.1\text{nm}$ 、野生型マウスは  $13.7 \pm 1.5\text{nm}$  で、両群には明らかに有意差が認められる。また、野生型マウスにおけるアミロイド線維間の細線維の太さは、 $5.9 \pm 1.1\text{nm}$  であった。

図 4 は、野生型マウスの種々アミロイド線維の電顕レプリカ形態像である。一般には、アミロイド線維は分枝せず、太さが 7–10nm の線維と言われているが、沈着部位の中心部から周辺部によって様々な太さと分枝があることが分かる。図 4a は細い線維の局在、図 4b と c は、線維間を架橋している短い細線維、図 4d は分枝している線維、図 4e と f では線維が密に集まっている部位、そして最終的には図 4g のように太くて直線的なアミロイド線維を形成する。図 5 は、SAP 欠損マウスのアミロイド線維の電顕レプリカ形態像である。SAP 欠損マウスにも様々なアミロイド線維の形態像が見られる。図 5a は、細い線維がアミロイド線維の一部を構成して

いる部位、図 5b は線維間を架橋している短い細線維、図 5c と d は分枝しているアミロイド線維、図 5e と f はアミロイド線維が密に集まっている部位、そして最終的には図 5g のような直線的な太いアミロイド線維が形成された。

図 6 は野生型マウスのアミロイド線維を包埋後コロイド金法で免疫染色した結果である。抗 SAP 抗体と抗 AA 抗体でアミロイド線維上に金粒子が認められるが、明らかな相違は見られない。しかし抗 HSPG 抗体による免疫染色では、アミロイド線維上には、ほとんど金粒子は認められなかった。これは超薄切片表面に HSPG 抗原が露出されにくいことを示唆していた。図 7 は、カバースリップレプリカ法による SAP 欠損マウスのアミロイド線維の電顕レプリカ形態像である。トリプシン未処理では、アミロイド線維は太く、トリプシン 5 分間処理では、アミロイド線維は細くなった。また、図 7b 挿入図はトリプシン処理後、抗 HSPG 抗体で免疫染色したもののだが、アミロイド線維は抗体の付着により太くなった。一方トリプシン処理によりアミロイド線維は細くなり、抗 HSPG 抗体免疫染色ではコロイド金粒子が多量に認められた (図 8b)。電顕ステレオ写真を観察することにより (図 9)、レプリカ膜面とそれ以外のコロイド金粒子の局在を三次元的に区別でき、細線維に多く付着してみられた。

次にアミロイド症例の電顕レプリカ形態像を示す (図 10)。70 才、男性で蛋白尿と黄疸があり入院し、腹腔鏡下で肝生検をした。アミロイド沈着があり、免疫染色した結果、AL 蛋白沈着である原発性アミロイドーシスと診断された。この電顕レプリカ形態像では、分枝したアミロイド線維とその間にある架橋細線維が見られた。線維の太さは 13-17nm であり、架橋細線維は 3-6nm であった。さらに消化管出血のため入院し、後に蛋白尿が増悪し、腎不全で亡くなった 60 才男性の肝組織内沈着アミロイド線維も検討し

た。AL タイプの原発性アミロイドーシスであったが、電顕レプリカ形態像では、同様に分枝したアミロイド線維とその間の架橋細線維が見られた。

#### D. 考察

以上のように AA アミロイド線維の微量成分である SAP が欠損していても、アミロイド線維は形成されていた。通常の超薄切片試料では、SAP 欠損マウスと野生型マウスの AA アミロイド線維構造の相違は不明瞭であったが、QF-DE 法により両群のアミロイド線維の微細構造は異なることが明らかになった。またヒト AL 型アミロイド線維間の架橋細線維は、マウス実験的 AA アミロイド線維間の架橋細線維に類似していた。

#### E. 結論

実験的 AA アミロイド線維構造は、内側に HSPG が局在し、AA と SAP がその周囲を取り巻いている可能性が示唆された。これは、すでに報告されたアミロイド線維分子構造モデルとは相違しているが、さらに詳細な検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
投稿準備中
2. 学会発表
  - 1) Ohno, S. Kato, Y. Baba, T. Terada, N. Ueda, H. Takayama, I. Fujii, Y. Maeda, S.: Molecular organization of in situ amyloid fibrils in serum amyloid P component (SAP)-deficient mice revealed by quick-freezing replica method. The American Society for Cell Biology, 39th Annual Meeting, Washington DC, December 11-15th, 1999.

- 2) 大野伸一、加藤靖子、藤井靖久、馬場健、植田秀穂：血清アミロイド P 成分 (SAP) 欠損マウスの脾臓内沈着アミロイド線維の電顕レプリカ免疫染色的検討. 第 41 回日本組織細胞化学会、高知、12 月 7-8 日、2000.
- 3) 大野伸一、高山一郎、藤井靖久、馬場健：急速凍結レプリカ免疫染色法による SAP 欠損マウス脾臓内アミロイド線維の超微形態学的解析. 第 33 回日本臨床電子顕微鏡学会、長崎、9 月 27-29 日、2001.

#### 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

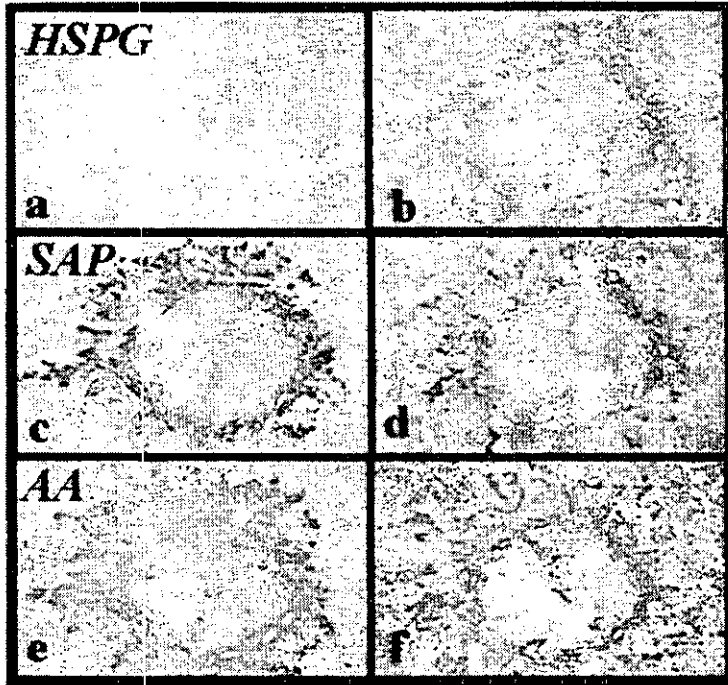


図1. 野生型マウスにおける脾臓内沈着アミロイドの光顕免疫染色像。a, b: 抗HSPG抗体。c, d: 抗SAP抗体。e, f: 抗AA抗体。a, c, e: トリプシン未処理。b, d, f: 0.01%トリプシンで5分間処理。×80

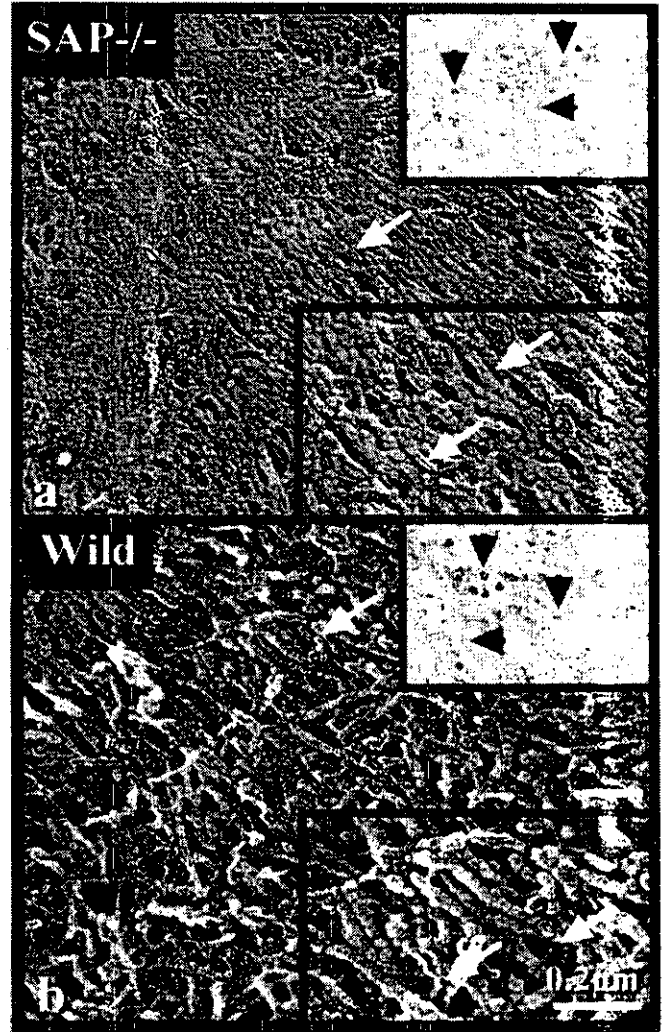


図2. 急速凍結ディープエッチング法によるアミロイド線維の電顕レプリカ形態像。a: SAP欠損マウス。矢印はアミロイド線維を示す。b: 野生型マウス。右下挿入図: 拡大形態像。矢印は細線維を示す。各右上挿入図: 超薄切片形態像。矢頭は横断像と縦断像を示す。

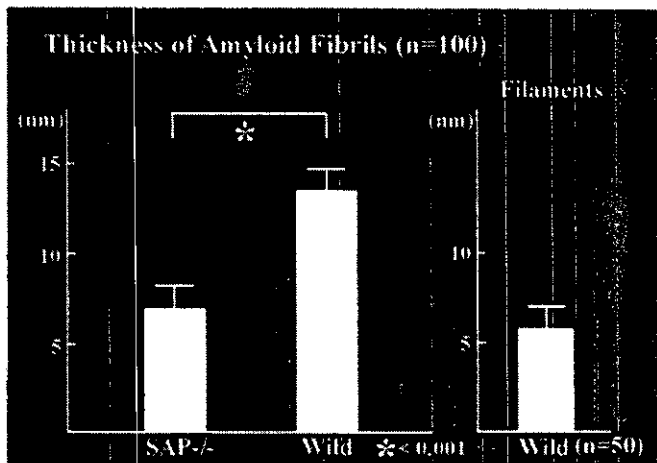


図3. 電顕レプリカ形態像でのアミロイド線維の太さの計測結果。

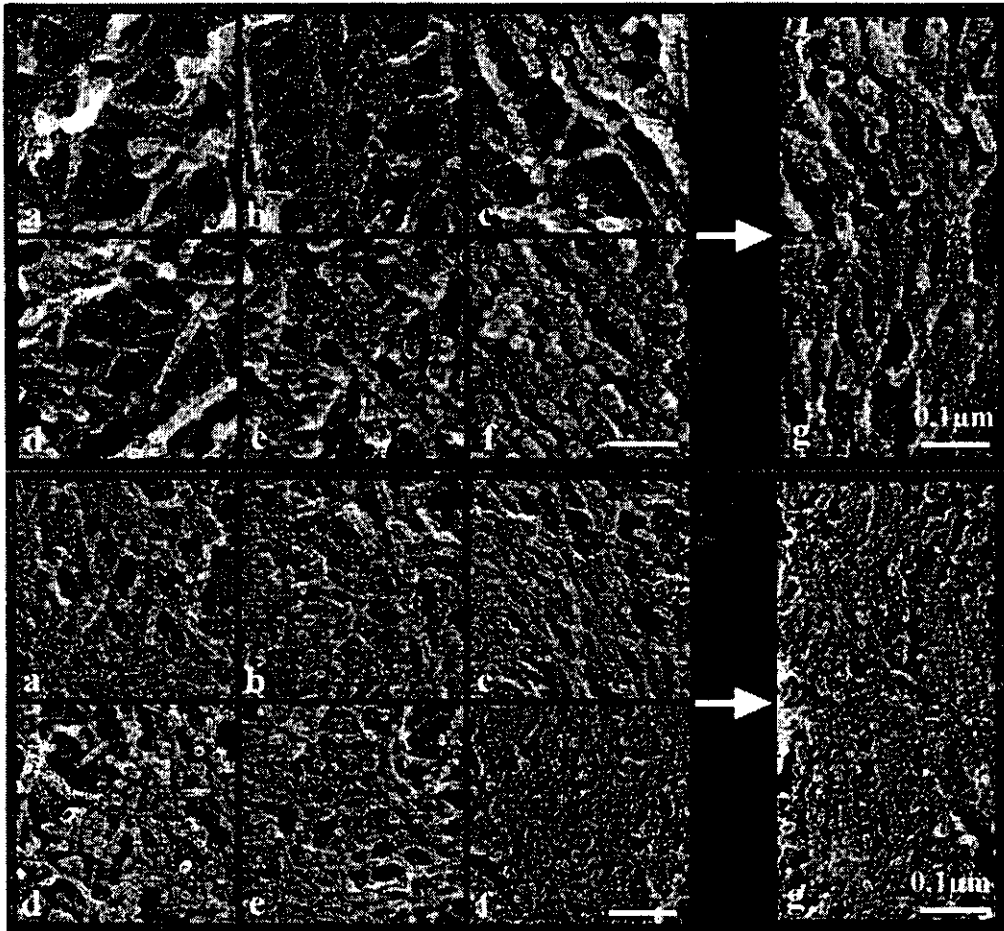


図4. 野生型マウスの種々アミロイド線維の電顕レプリカ形態像。

図5. SAP欠損マウスの種々アミロイド線維の電顕レプリカ形態像。

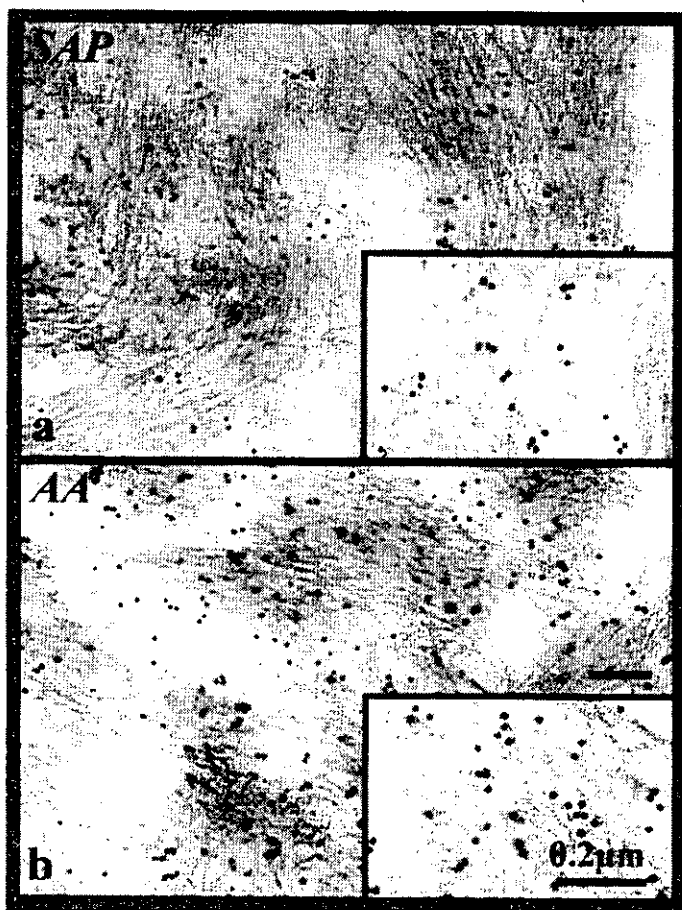


図6. 野生型マウスの脾臓内沈着アミロイド線維の包埋後免疫染色法。a: 抗SAP抗体。b: 抗AA抗体。挿入図: 拡大形態像。

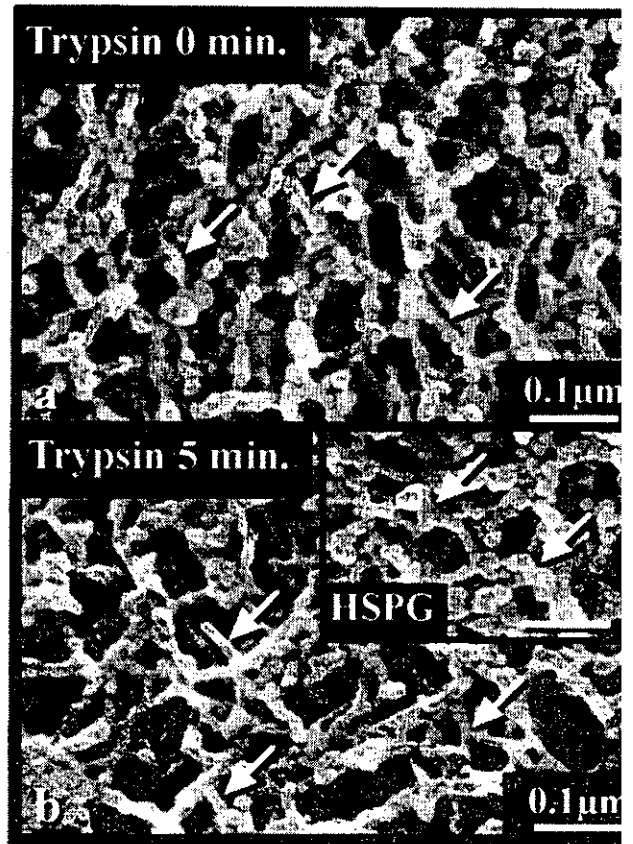


図7. カバースリップレプリカ法によるSAP欠損マウスの沈着アミロイド線維の電顕レプリカ形態像。a: トリプシン未処理。b: トリプシン処理。挿入図: 抗HSPG抗体による免疫染色像 (矢印)。

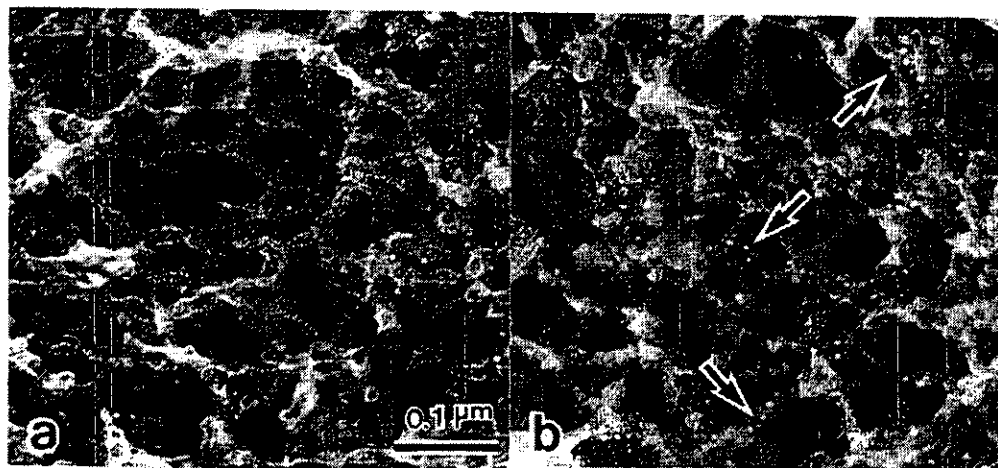


図8. a: トリプシン未処理で抗HSPG抗体とコロイド金免疫染色。b: トリプシン処理後に抗HSPG抗体によるコロイド金免疫染色(矢印)。

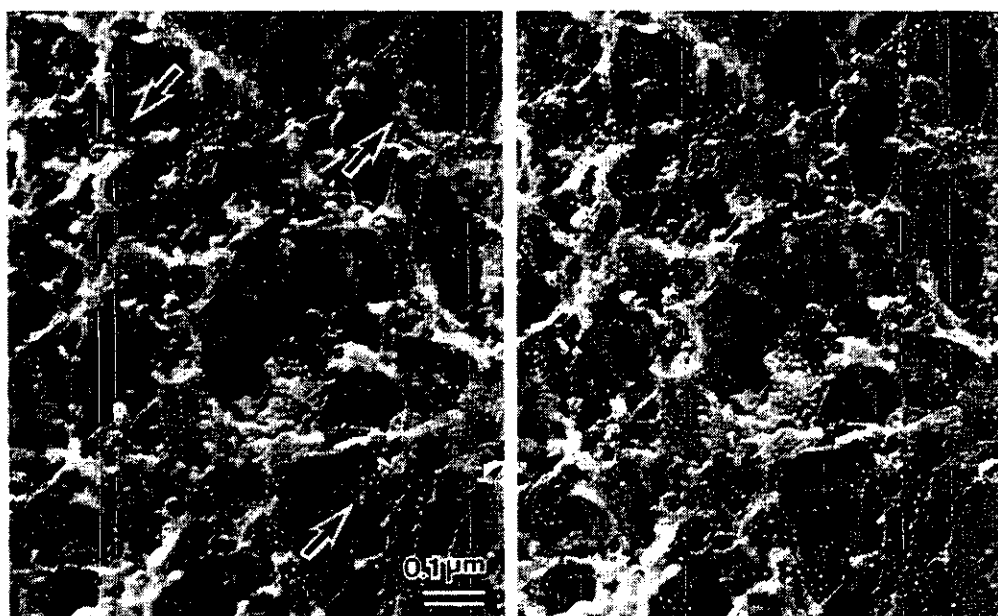


図9. 電顕レプリカ形態像のステレオ写真。抗HSPG抗体によるコロイド金免疫染色(矢印)。

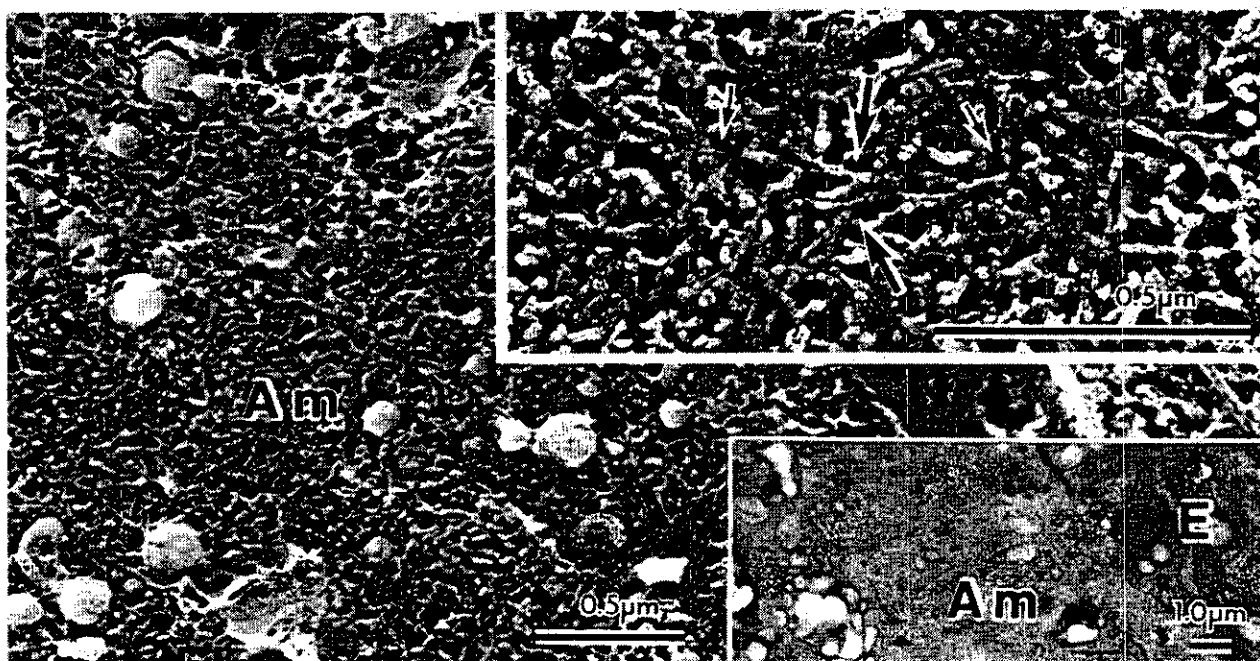


図10. 原発性アミロイドーシス患者の肝臓内沈着アミロイド線維の電顕レプリカ形態像。右上挿入図: 拡大形態像。大矢印: 分枝したアミロイド線維。小矢印: 架橋した細線維。右下挿入図: 超薄切片形態像。Am: アミロイド沈着物。E: 内皮細胞。

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

## 脳 A $\beta$ アミロイドーシスはアルツハイマー病治療のターゲットである

分担研究者 東海林幹夫 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学  
 共同研究者 針谷康夫\*、瓦林毅\*、池田将樹\*、富所康志\*、松原悦朗\*\*、  
 村上哲郎\*\*

\*群馬大学医学部神経内科、\*\*岡山大学大学院医歯学総合研究科  
 神経病態内科学

研究要旨 アルツハイマー病(AD)における脳 A $\beta$  アミロイドーシス(A $\beta$ AM)の病的役割を明らかにし、治療法を開発するため、脳内に A $\beta$ AM と Tauopathy を再現する Transgenic mice(TG)を確立し A $\beta$ AM と Tauopathy のどちらが AD の本質的な病変であるのかを明らかにした。1) APPsw mice では加齢に伴って A $\beta$ AM が再現され、神経細胞とシナプスの消失、リン酸化 Tau の蓄積、脳内アセチルコリンの低下および記憶学習障害が見られた。2) APPsw x Presenilin-1 L286V double TG では著明な A $\beta$ AM の促進が認められ、変異 Presenilin-1 の病的役割は A $\beta$  pathology の促進であることが明らかになった。3) 脳に Tauopathy を再現する Tau R406W mice では A $\beta$ AM は認められなかった。4) APPsw x Tau R406W double TG では Tau 蓄積は促進されなかったが、一部 Gallyas 陽性の神経細胞が認められた。以上から、A $\beta$ AM は AD の他の病理変化をも引き起こす早期の重要な病理変化であり、AD の根本的な治療のターゲットであると考えられた。

### A. 研究目的

現在、アルツハイマー病(AD)の発症機序として、まずアミロイド $\beta$ 蛋白(A $\beta$ )が沈着して脳 A $\beta$ アミロイドーシス(A $\beta$ AM)が起こり、続いて Tau 蛋白からなる神経原線維変化(Tauopathy)と神経細胞死などが出現してくるアミロイド・カスケード説が有力視されている。しかしながら、この A $\beta$ AM がどのように痴呆を発症してくるのか未だ明らかではない。我々は、Initial event である脳 A $\beta$ AM の生成機序の解明や予防が最も重要であると考え、これまで家族性 AD の原因遺伝子を発現する transgenic mice (TG)を作成解析することにより、これらの検討を行ってきた。本年度はこれまで報告してきた A $\beta$ AM と

記憶学習障害を認める TG (APPsw mice)の解析を進めるとともに、新たに Tauopathy を再現する動物モデルを確立し、治療法を開発をする上で A $\beta$ AM と Tauopathy のどちらが AD の本質的な病変であるのかを明らかにした。

### B. 研究方法

#### 1. APPsw mice の解析

脳 A $\beta$ AM を再現する APPsw mice における A $\beta$ 沈着過程と引き続く病理変化(特に神経細胞死、シナプスの減少、リン酸化 Tau の蓄積、アセチルコリンの低下)を明らかにし、このマウスで記憶学習障害の評価を行った(詳細は平成 12 年度本研究報告書参照)。

#### 2. APPsw xPS-1 L286V double TG



家族性アルツハイマー病で発見された原因遺伝子 Presenilin-1(PS-1)の病的役割を明らかにするために L286V 変異を含む PS-1 を Prion promoter につなぎ TG(PS-1 L286V mice) を作製し病理学的・生化学的に解析した。さらにこれらの mice と APPsw mice を掛け合わせ (APPsw x PS-1 L286V double TG)、変異 PS-1 の脳 A $\beta$ AM に及ぼす効果を免疫染色を行い病理学的に検討した。

### 3. Tau R406W mice

AD における神経原線維変化の形成機序と脳 A $\beta$ AM との関係性を明らかにするため Prion promoter を用いて変異 Tau R406W を過剰発現する TG を作製した。病理学的・生化学的に主に解析を行った(詳細は平成12年度本研究報告書参照)。

### 4. APPsw x Tau R406W double TG

Tau R406W mice と APPsw mice を掛け合わせ、病理学的に検索を行い A $\beta$ AM と Tauopathy のどちらが AD により本質的な病変であるかを明らかにした。

## C. 研究結果

### 1. APPsw mice

ELISA で得られた結果と相関して 8 ヶ月齢から A $\beta$ 40, 42 陽性の老人斑が出現し、加齢とともに増加した。TG でみられる老人斑の A $\beta$ 分子種や電顕像は AD 脳の老人斑と同様であった。老人斑芯の部分には ApoE も沈着しており、神経細胞やシナプスの減少がみられ、周囲に変性神経突起を認めた。突起内には神経活性物質やリン酸化 Tau の蓄積が見られた。受動的回避試験では 3 ヶ月齢マウスでは記憶の獲得、保持ともに TG・対照間で差はみられなかった。7 ヶ月齢 TG では 36 日以降で潜時が短縮し、8.5 ヶ月齢から記憶学習障害が出現増強した。このことは脳アミロイドの沈着ともなってこれらの記憶学習障害が現れてくることを示している。試験終了後に脳内各部位毎の Ach 濃度を測定すると、6 ヶ月齢マウスでは TG・対照間に差はみられなかつ

たが、記憶学習障害のみられた 10 ヶ月齢 TG で大脳皮質、海馬で Ach が有意に低下していた。このことは脳アミロイドの蓄積が明らかに神経細胞やシナプスの障害をきたして Ach の低下を引き起こしていることを示している(詳細は平成12年度本研究報告書参照)。

### 2. APPsw x PS-1 L286V double TG

PS-1 L286V mice ではアミロイド沈着や神経原線維変化などの病理所見は見られなかった。APPsw x PS-1 L286V double TG では 2 ヶ月齢から A $\beta$ 沈着が始まり、APPsw mice に比べて、約 4 倍の速度で沈着した。抗 Tau 抗体染色では、APPsw mice 同様、老人斑周囲の変性神経突起にリン酸化 Tau の蓄積が見られるのみであった。

### 3. Tau R406W mice

10 ヶ月齢 TG のヒト特異 Tau154 免疫染色では大脳皮質、白質、海馬、扁桃体に広範な Tau の沈着が見られた。強拡大像では、神経細胞胞体、神経突起、軸索内に大量の Tau 蛋白の蓄積が認められた。同部位に著明な gliosis がみられ、巨大なアストロサイトが多数認められた。TG の扁桃体では神経細胞の明らかな減少が認められた。A $\beta$ アミロイドの沈着は認められなかった(詳細は平成 12 年度本研究報告書参照)。

### 4. APPsw x TauR 406W double TG

10 ヶ月齢 TG でみられた A $\beta$ 42 陽性の老人斑は APPsw mice のものと比較して大きさ、数ともに差は見られなかった。連続切片を抗 Tau 抗体で染色すると周囲の変性神経突起や神経細胞が濃染したが Gallyas 染色では陰性であった。しかし、老人斑とかけ離れた海馬の顆粒細胞の近傍に Gallyas 染色陽性の神経細胞や神経突起が観察された。A $\beta$ や Tau の蓄積の著明な促進はみられなかった。

## D. 考察

APPsw mice では AD 脳で見られるび慢性老人斑、典型的老人斑、Amyloid angiopathy

が再現され、AD 脳と同じ A $\beta$ 分子種が蓄積していた。老人斑芯では神経細胞とシナプスの有意の減少がみられた。老人斑周囲の変性神経突起に神経伝達物質、異常リン酸化 Tau の蓄積が認められた。神経原線維変化の再現にまで至ってはいないが、A $\beta$ 蓄積が明らかな記憶障害や脳内 Ach 量の低下をも引き起こすことから、脳 A $\beta$ AM は AD における痴呆発症のもっとも重要な factor であると考えられた。APPsw x PS-1 L286V double TG の結果は、変異 PS-1 は A $\beta$ カスケードを介して AD を引き起こしてくるのであり、神経細胞死や Tau pathology が primary な変化ではないことを示している。さらに、APPsw mice と Tau R406W mice の掛け合わせると、A $\beta$ アミロイドが老人斑周囲の変性神経突起にリン酸化 Tau を蓄積させ、海馬で Gallyas 染色陽性の神経細胞が認められたことから、A $\beta$ AM が AD のより本質的な病理学的変化と考えられた。

#### E. 結論

A $\beta$ AM は AD の他の病理変化をも引き起こす重要な早期の病理変化であり、AD の根本的な治療のターゲットであると考えられた。今後は、約 4 倍の速さで A $\beta$ アミロイド沈着を示す APPsw x PS-1 L286V double TG を用いて、抗 A $\beta$ モノクローナル抗体による治療を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Urakami K, Wada K, Arai H, Sasaki H, Kanai M, Shoji M, Ishizu H, Kashihara K, Yamamoto M, Tsuchiya-Ikemoto K, Morimatsu M, Takashima H, Nakagawa M, Kurokawa K, Maruyama H, Kaseda Y, Nakamura S, Hasegawa K, Oono H, Hikasa C, Ikeda K, Yamagata K, Wakutani Y,

Takeshima T, Nakashima K. Diagnostic significance of tau protein in cerebrospinal fluid from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci.* 183(1): 95-98,2001.

- 2) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Kawarabayashi T, Shirao T, Ishiguro K, Okamoto K, Younkin SG, Shoji M. Brain A $\beta$  amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau. *J pathol* 194(4):500-506,2001
- 3) Shoji M, Kanai M. Cerebrospinal fluid A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42: Natural course and clinical usefulness. *J Alzheimer's disease* (in press)
- 4) Shoji M, Kanai M, Matsubara E, Tomidokoro Y, Shizuka M, Ikeda Y, Ikeda M, Harigaya Y, Okamoto K, Hirai S: The levels of cerebrospinal fluid A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42(43) are regulated age-dependently. *Neurobiol Aging* 22: 209-215, 2001.
- 5) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park J, Yasutake K, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M: A $\beta$  amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice. *Neurosci Lett* 299: 169-172, 2001.
- 6) Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG: Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid  $\beta$  protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21: 372-381, 2001.
- 7) Takenoshita H, Shizuka-Ikeda M, Mitoma H, Song S, Harigaya Y, Igeta Y, Yaguchi M, Ishida K, Shoji M, Tanaka M, Mizusawa H, Okamoto K. Presynaptic inhibition of cerebellar GABAergic transmission by glutamate decarboxylase autoantibodies in progressive cerebellar ataxia. *J Neurol Neuro surg Psychiatry* 70(3):386-9,2001

2. 学会発表

- 1) Shoji M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Ikeda M, Kanai M, Tomidokoro Y, Harigaya Y, Okamoto K, Murakami T, Abe K. The effect of A $\beta$ 42 vaccine on Tg2576 Alzheimer model mice. 31<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, November 10-15, 2001.
- 2) Kanai M, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M. A study of cerebrospinal fluid as biomarkers of Alzheimer's disease. 31<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, November 10-15, 2001.
- 3) Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Matsubara E, Okamoto K, Sasaki A, Davies P, Chishti A, Westaway D, St. George-Hyslop P, Shoji M. Memory loss and parkinsonism with severe Tauopathy in the fronto-temporal lobe of transgenic mice expressing R406W mutant human Tau. 31<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, November 10-15, 2001.
- 4) Kawarabayashi T, Shoji M, Wahrle S, Younkin LH, Younkin SG. Amyloid  $\beta$  protein accumulates in lipid rafts. 31<sup>th</sup>

Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, November 10-15, 2001.

- 5) Harigaya Y, Tomidokoro Y, Ikeda M, Kawarabayashi T, Kanai M, Okamoto K, Matsubara E, Shoji M. Brain A $\beta$  Amyloidosis in APPsw mice induces memory impairment with decrease of Acetylcholine, focal loss of neurons with accumulation of phosphorylated Tau. 31<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, November 10-15, 2001.
- 6) Matsubara E, Sasaki A, Kawarabayashi T, Ikeda M, Harigaya Y, Kanai M, Abe K, Frangione B, Ghiso J, Shoji M. Platelets A $\beta$  as a potential source of amyloid deposits in the vessel wall. 31<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, November 10-15, 2000.

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

## リポ蛋白非結合型 Aβは脳内アミロイドーシス惹起分子である

分担研究者 東海林幹夫 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

共同研究者 松原悦朗\*、村上哲郎\*、阿部康二\*

池田将樹\*\*、瓦林毅\*\*、針谷康夫\*\*

\*岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

\*\*群馬大学医学部神経内科

研究要旨 孤発性アルツハイマー病においては、血液中で Aβ アミロイド沈着を予防する防衛的代謝系の活性化機能不全が認められ、Aβ のアミロイド形成に直接貢献しうる病的分子種、リポ蛋白非結合型 Aβ が病初期より増加している。本研究では脳内においても共通の分子病態基盤が存在するかどうかを検討し、リポ蛋白非結合型 Aβ がアミロイド形成の真の病態惹起分子であるかどうかを検討した。孤発性アルツハイマー病脳と健常脳を比較検討した結果、アルツハイマー病脳においてのみ、Aβ ダイマー形成能を持つきわめてアミロイド原性に富むリポ蛋白非結合型 Aβ が同定された。リポ蛋白非結合型 Aβ はアルツハイマー病脳で増加しており、脳内アミロイドーシス惹起分子と考えられた。

### A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)では Aβ アミロイド沈着を予防する防衛的代謝系の活性化機能不全が認められ、Aβ のアミロイド形成に直接貢献しうる病的分子種、リポ蛋白非結合型 Aβ が病初期より増加している。ダウン症候群での検討から、この変化は、痴呆発症前段階から存在する超早期病態であることを確認し昨年度報告した。本研究では、脳内における同分子種の同定を行い、脳内アミロイドーシス惹起分子となりうるかの検討を行った。

### B. 研究方法

アルツハイマー病脳(AD, 6 例)、正常加齢脳 (NC, 4 例) より、4 倍量の TBS 緩衝液でホモジェネートを作製し、10 万 g にて回

収される上清 (TBS 可溶性画分) を調整した後、10 万 g ペレットから 70% 蟻酸可溶性アミロイド画分を抽出した。両画分をゲルろ過法、イムノブロット法、及び ELISA 法を用いて解析した。

### C. 研究結果

TBS 緩衝液可溶性画分をゲルろ過にて分離し、各フラクションをイムノブロット法と ELISA 法により解析すると、正常加齢脳と AD 脳の両者で、リポ蛋白非結合型とリポ蛋白結合型 Aβ モノマーの存在が確認された。正常加齢脳に比し、AD 脳においては両分子種の絶対量の増加が認められ、脳内ではリポ蛋白非結合型 Aβ の占める割合が著増していた。リポ蛋白非結合型 Aβ<sub>40・42</sub> 分子種の組成では AD 脳において Aβ<sub>42</sub> の占める割合の