

丸山 敬, 森 啓: プレセニリン 1 を安定的に導入した PC12D 細胞中の A β について. 日本痴呆学会, 9月 27-28日, 2001.

- 2) 亀谷富由樹, 宇佐美美穂子, 久米秀明, 丸山 敬, 森 啓: ヒトプレセニリン 1 を安定的に導入した PC12D 細胞における神経突起成長とアルツハイマー突然変異の影響. 日本神経化学会, 10月 18-20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。

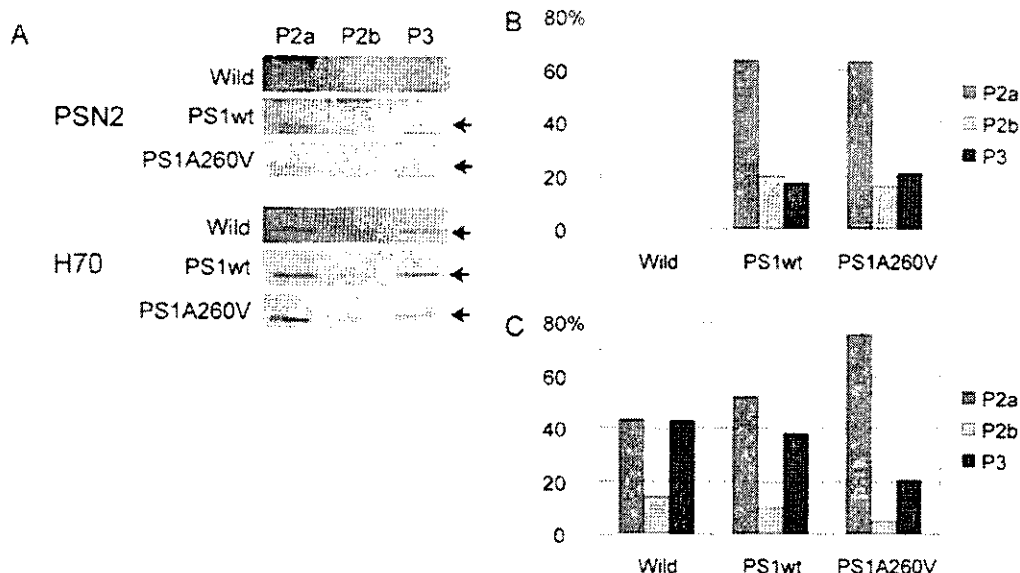


図1 PC12D細胞に導入したPS1wtおよびPS1A260Vの細胞内の分布。(A)培養細胞の膜画分をシヨ糖溶液を用いて、5,000 x g 沈殿 (P2a画分)、8,000 x g 沈殿 (P2b画分)、100,000 x g 沈殿 (P3画分) に分画した。それぞれの画分からヒトおよびラットPS1を免疫沈降し、ヒトPS1N端特異的抗体 (PSN2) およびヒト・ラットPS1N端抗体 (H70) でイムノブロッティングした。(B)ヒトPS1N端断片の細胞内の分布の割合。(C)全PS1N端断片の細胞内の分布の割合。

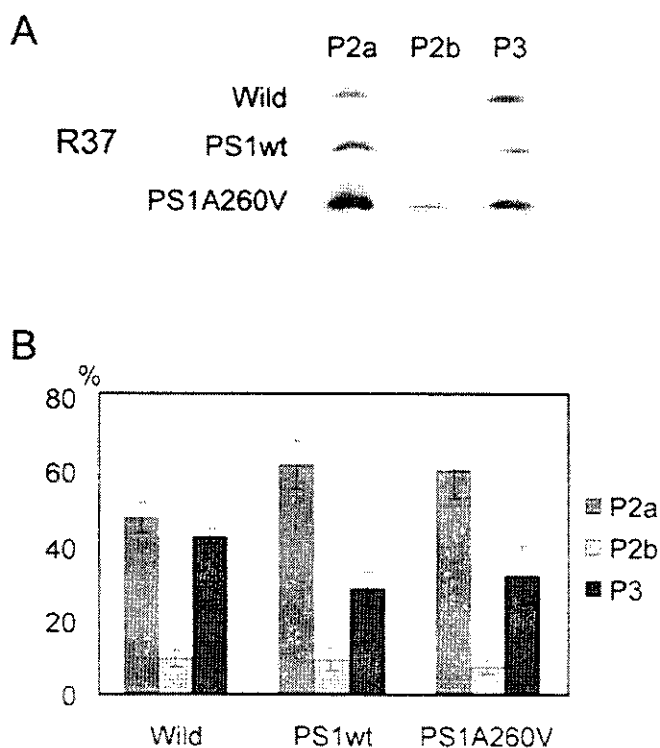


図2 ヒトPS1wtおよびPS1A260Vを導入したPC12D細胞におけるAPPC末断片の細胞内の分布。(A)画膜画分を電気泳動後APPC端抗体 (R37) を用いてイムノブロッティングを行なった。(B)APPC端断片の分布の割合。

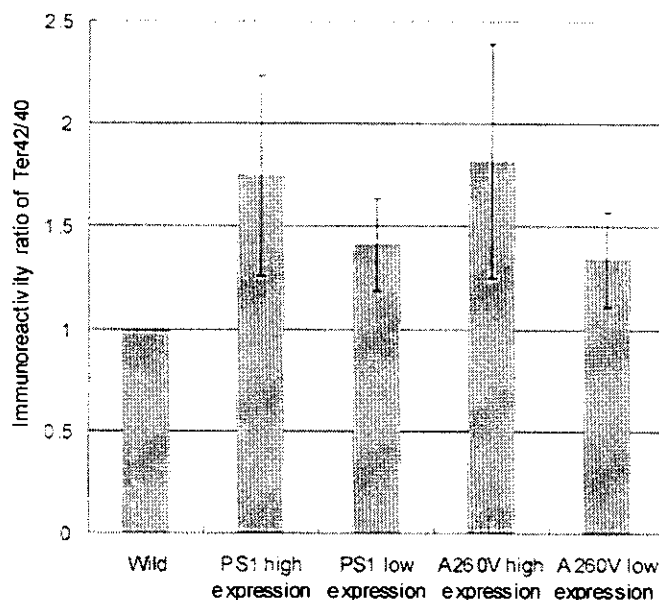


図3 ヒトPS1wtおよびPS1A260Vを導入したPC12D細胞におけるTer42免疫反応の上昇。Aβ40および42のC末に対する抗体Ter40およびTer42の反応性を測定し、野生型細胞(Wild)のTer42/Ter40を1とし、それぞれの細胞におけるTer42/Ter40の総対比を表した。

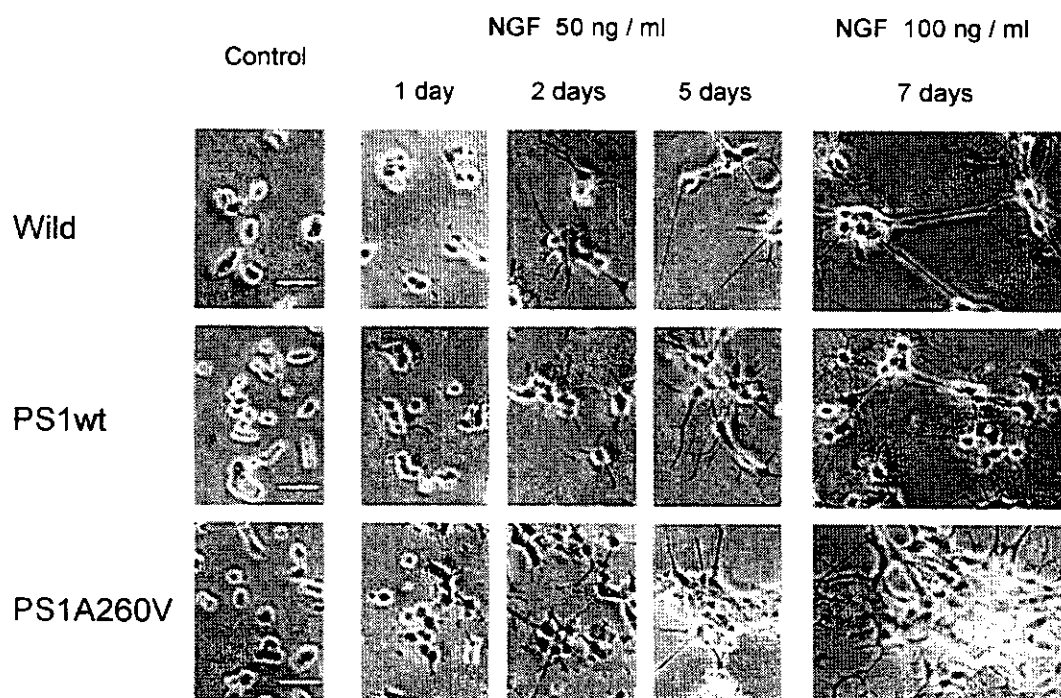


図4 ヒトPS1wtおよびPS1A260Vを導入したPC12D細胞のNGF処理した後の神経突起の伸展

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

ネプリライシン遺伝子多型とアルツハイマー病、 脳アミロイドアンギオパチーとの関連

分担研究者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)

共同研究者 袖山信幸*、水澤英洋*、伊藤嘉憲**、大友英一**、松下正明***
*東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学 (神経内科)、
浴風会病院内科、*東京都精神医学総合研究所神経病理

研究要旨 アミロイド分解酵素ネプリライシン遺伝子 (*NEP*) 多型とアルツハイマー病 (AD)、脳アミロイドアンギオパチー (CAA) との関連を高齢者 168 例について検討した。*NEP* 5' 領域の GT リpeat 多型は AD の発症や AD 型神経病理変化 (老人斑、神経原線維変化) とは関連しなかった。しかし、*NEP* 多型と CAA の程度との間には関連が認められ、*NEP* 多型が CAA の危険因子になっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

孤発性アルツハイマー病 (AD) や孤発性アミロイド β 蛋白 ($A\beta$) 型脳アミロイドアンギオパチー (CAA) における脳実質や脳血管への $A\beta$ 沈着の原因は不明であり、 $A\beta$ の分解能の低下が $A\beta$ 沈着の原因である可能性がある。

ネプリライシン (*NEP*) は $A\beta$ の分解酵素であり、AD 脳では *NEP* が減少していること、実験動物で *NEP* 活性低下が $A\beta$ 蓄積を促進することが報告されている。*NEP* 遺伝子 (*NEP*) には多型があり、血清の *NEP* 濃度や精神疾患との関連が指摘されている。本研究では *NEP* 多型が $A\beta$ の沈着に影響し、AD や CAA と関連している可能性を検討した。

B. 研究方法

孤発性アルツハイマー病 (AD) 75 例を含む日本人高齢者 164 剖検例について、*NEP* の 5' region の dinucleotide repeat 多型の GT repeat 数、アポリポ蛋白 E (*APOE*) 遺伝子型、海馬および上側頭回の老人斑 (NP) 密度、変

性神経突起を伴う老人斑 (NP) 密度、神経原線維変化 (NFT) 密度、後頭葉の CAA の程度 (髄膜・皮質血管の CAA があるパーセント) を評価し、これらの関連を統計的に解析した。

(倫理面への配慮)

研究は患者家族の同意、機関の倫理審査委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

NEP 多型の GT repeat 数は 19 から 23 に分布し、9 つの遺伝子型があった。repeat 数は、AD の発症、SP、NP、NFT のいずれとも有意な関連を示さなかった。*APOE* ϵ 4 の有無を考慮しても同様であった。*NEP* 各遺伝子型と CAA との関連は有意ではなかったが ($p=0.077$)、2 つのアリルのリpeat数の合計が 40 以下の例は、41 以上の例と比較して CAA が有意に高度であり ($p=0.005$)、リpeat数 19 あるいは 20 の短いリpeatのアリル数と CAA の程度は相関した ($p=0.024$)。

D. 考察

NEP 多型は AD、脳内の AD 型神経病理変化とは関連しなかったが、CAA との関連が認められ、NEP 多型が CAA の危険因子である可能性が示唆された。この多型は NEP exon 1 の上流の調節領域に位置し、ニューロンにおける type 1 RNA への転写に影響している可能性がある。この多型の NEP 発現や A β 分解活性における意義について更に検討を加える必要がある。

また、より多数のサンプルを用いた検討や、他の人種における検討も必要である。

E. 結論

NEP 多型と CAA の程度は関連する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada M, Itoh Y, Sodeyama N, Suematsu N, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. Senile dementia of the neurofibrillary tangle type: a comparison with Alzheimer's disease. *Dementia Geriat Cog Disord* 12:117-125, 2001.
- 2) Kimura K, Nonaka A, Tashiro H, Yaginuma M, Shimokawa R, Okeda R, Yamada M. Atypical form of dural graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: report of a postmortem case with review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:696-699, 2001.
- 3) Sodeyama N, Iwata T, Yamada M, Ishikawa K, Itoh Y, Matsushita M, Otomo E, Mizusawa H. Very early onset AD with spastic paraparesis associated with a novel presenilin 1 mutation (Phe237Ile). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 556-557,

2001.

- 4) Yoshita M, Taki J, Yamada M. A clinical role for [123I]MIBG myocardial scintigraphy in the distinction between dementia of the Alzheimer's-type and dementia with Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 583-588, 2001.
 - 5) Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Matsushita M, Otomo E, Mizusawa H. Lack of association of neprilysin polymorphism with AD and AD type neuropathological changes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:817-818, 2001.
 - 6) Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, Suematsu N, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. No association of paraoxonase genotype or atherosclerosis with cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* (In Press).
 - 7) Nishida Y, Yamada M, Hara K, Tsunemi T, Yamawaki M, Shimokawa R, Okeda R, Tsutsumi T, Mizusawa H. Creutzfeldt-Jakob disease after Janneta's operation with cadaveric dura mater graft: initial manifestations related to the grafted site. *J Neurol* (In Press).
 - 8) 山田正仁：脳アミロイドアンギオパチーの発症要因に関する研究。 *日老医誌* 38:487-488, 2001.
 - 9) Yamada M, Itoh Y, Sodeyama N, Suematsu N, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. Senile dementia of the neurofibrillary tangle type (SD-NFT): a clinical, neuropathological, and molecular genetic study. In: Tanaka C, Ihara Y, McGeer PL ed. *Neuroscientific Basis of Dementia*, Basel, Birkhauser Verlag AG, pp.,95-99 2001.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Sodeyama N, Iwata T, Yamada M, Ishikawa K, Itoh Y, Matsushita M, Otomo E, Mizusawa H. Very early onset AD with spastic paraparesis associated with a novel

presenilin 1 mutation (Phe237Ile). The 5th International Conference on Progress in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Kyoto, April 1-5, 2001.

- 2) 山田正仁、袖山信幸、伊藤嘉憲、大友英一、松下正明、水澤英洋：脳アミロイドアンギオパチー：paraoxonase 遺伝子多型、血清脂質、動脈硬化との関連。第 42 回日本神経学会総会。東京。2001 年 5 月 11-13 日。
- 3) 袖山信幸、水澤英洋、伊藤嘉憲、大友英一、松下正明、山田正仁：Paraoxonase 遺伝子多型と Alzheimer 病、Alzheimer 型神経病理変化、動脈硬化との関連。第 42 回日本神経学会総会。東京。2001 年 5

月 11-13 日。

- 4) 石田千穂、柿島章宏、古川 裕、沖野惣一、狩野 操、小田恵夫、中西功夫、巻淵隆夫、北本哲之、山田正仁：プリオン蛋白質を伴う孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病非典型例。第 42 回日本神経病理学会総会。東京。2001 年 5 月 24-26 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。

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

中等量以上の prednisolone 治療は髄液中 A β 濃度を減少させる

分担研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科

共同研究者 徳田隆彦*、大出貴士*、玉岡晃**、石井一弘**、松野佐好子**

信州大学医学部、*第三内科、**筑波大学臨床医学系、神経内科

研究要旨 アルツハイマー病患者の脳内に沈着するアミロイド β 蛋白(A β)の代謝過程に対する副腎皮質ステロイドの効果を検討する目的で、prednisolone を内服している免疫性神経疾患患者において prednisolone 投与前後の髄液中 A β 蛋白濃度を検討した。臨床的に痴呆症状および脳病変がなく、中等量(30mg/日)以上の prednisolone を4週間以上服用した免疫性神経疾患患者16例において、prednisolone 投与前後で経時的に髄液中 A β 蛋白濃度および炎症に関連する諸因子を測定した。対象患者16例中15例で、髄液中 A β x-40、A β x-42 濃度は両者ともに prednisolone 投与後に減少し、この変化は統計学的に有意な変化であった。また prednisolone 投与量を20 mg/日までに減量した7例全例で髄液中 A β x-40 濃度および A β x-42 濃度の再上昇を認めた。今回の結果は、副腎皮質ステロイドがヒト脳における A β 蛋白代謝のバランスを負の方向すなわち A β 蛋白濃度を減少させる方向に傾けることを示している。副腎皮質ステロイドの脳における A β 蛋白代謝に対する作用を解析することは、アルツハイマー病の発症機構の解明及び治療法の開発の上で有用であると考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病の病的過程が A β 蛋白の脳への沈着から始まることは広く受け入れられており、その意味からアルツハイマー病は中枢神経に局限したアミロイドーシスと考えられる。したがってアルツハイマー病に対する治療を開発する場合、脳へのアミロイド沈着を抑制できるか否かが、その効果判定に重要である。

以前から、慢性関節リウマチなどの炎症性疾患で長期に抗炎症療法を受けている患者ではアルツハイマー病の発症が少ないことが知られている。また、非ステロイド性消炎鎮痛剤(NSAID)の長期投与によってアルツハイマー病患者の認知機能に改善を認めたとの報告もある。老人斑には補体の結合やマ

イクログリアの集簇などの炎症像が見られることより、抗炎症剤が老人斑形成に伴う免疫反応を抑制することで、脳組織の破壊が抑制される機序が推定されている。

一方、長期に抗炎症療法を受けた患者の脳組織では老人斑の形成が少ないことも報告されており、抗炎症療法によって A β 蛋白の産生そのものが抑制される可能性も考えられる。

今回の研究では、髄液中 A β 濃度に対する副腎皮質ステロイドの影響について検討した。アルツハイマー病患者に対し少量の副腎皮質ステロイド剤投与を行ったこれまでの臨床研究では、認知機能障害の改善および進行抑制効果は認められていない。本研究では、臨床的に痴呆あるいは大脳病変を有さない

免疫性神経疾患患者で、中等量から大量の副腎皮質ステロイド剤投与を受けた患者を対象とした。

B. 研究方法

1. 対象

痴呆および大脳病変を認めない免疫性神経疾患患者 16 例で、以前に恒常的な副腎皮質ステロイド剤および NSAID の投与を受けていない患者を対象とした。16 例の平均年齢(mean ± SD)は 55.1 ± 18.9 歳であった。全例で個々の免疫性神経疾患に対し initial daily dose として 30mg/日以上 Prednisolone が 30 日以上投与された。対象患者のプロフィールを表 1 に示す。

2. 髄液中 Aβ 蛋白濃度の測定

対象とした 16 例について、副腎皮質ステロイド剤投与前後で経時的に髄液を採取し、-80°C で保存した。Aβ 蛋白の C 末端を識別可能なサンドイッチ ELISA 法により (Suzuki et al. Science 1994 ; Tamaoka et al. JBC 1994) で髄液中の Aβ_{x-40}、Aβ_{x-42} を分別定量した。また、髄液中総蛋白および IgG 濃度を測定し、Aβ 蛋白濃度との関連を検討した。対象とした患者では個々の免疫性疾患の活動性に応じて、prednisolone の投与量が漸減されたが、16 例中 7 例では 1 日投与量が 20 mg またはそれ以下にまで減量された。

3. 統計学的解析

16 例の対象患者における髄液中 Aβ_{x-40} および Aβ_{x-42} 濃度に prednisolone 投与前後で差があるか否かを、Wilcoxon の符号付順位検定により検討した。

C. 研究結果

今回の我々の検討では、中等量以上(30mg/日以上)のprednisolone投与を行った免疫性神経疾患患者16例中15例において、髄液中のAβ_{x-40}、Aβ_{x-42}濃度は両者ともprednisoloneの投与後に低下し、この変化は統計学的に有意な変化であった (p < 0.002)。全症例の髄液

中Aβ_{x-40}およびAβ_{x-42}濃度の経時的な変化とprednisolone投与量との関係を図1に示す。また統計学的な解析結果を図2に示す。この髄液中のAβ_{x-40}およびAβ_{x-42}濃度は、複数回の測定を行った症例では、一方が減少(増加)すると他方も減少(増加)し、髄液中の両者の濃度は常に並行的に推移した(図1参照)。また、prednisolone投与前後で認められた髄液中Aβ_{x-40}、およびAβ_{x-42}の変化と、髄液中総蛋白およびIgGなどの炎症反応の指標となる項目の変化の間には関連性を認めなかった。

さらに、個々の患者ではそれぞれの原疾患の活動性に応じて、経過中にprednisoloneの投与量が漸減されたが、prednisoloneを20mg/日以下にまで減量した7例全例で、髄液中Aβ_{x-40}およびAβ_{x-42}の再上昇が認められた(図1参照)。

D. 考察

今回我々は、痴呆及び大脳病変を有さない免疫性神経疾患患者を対象として、中等量以上のprednisoloneの内服により髄液中のAβ_{x-40}およびAβ_{x-42}濃度が有意に減少することを示した。今回の結果は、アルツハイマー病に対する副腎皮質ステロイドの効果には、従来考えられていた抗炎症作用以外の作用が存在することを示唆している。

今回対象とした患者は全て痴呆および大脳病変を認めない比較的若年者であり、それぞれの患者の脳内のAβ沈着量は殆ど無視できると考えられる。したがって、患者の髄液中Aβ蛋白濃度は脳内の細胞外腔に存在するAβ蛋白の量、すなわちその個体脳におけるAβ蛋白産生量とAβ蛋白分解量の差を反映していると考えられる。以上のような仮定からは、今回の結果は、中等量以上の副腎皮質ステロイド剤は脳におけるAβ蛋白代謝のバランスを負の方向(Aβを減少させる方向)に傾ける作用を有する可能性が考えられた。

さらに、今回の検討では、経過中にprednisoloneの投与量を20mg/日以下にまで減

量した7例全例で、髄液中Aβx-40およびAβx-42の再上昇が認められた。このことは、ヒト脳において、prednisoloneにより髄液中のAβ蛋白濃度を減少させるのには、少なくとも中等量(30mg/日)以上の投与量が必要であることを示していると考えられる。このことは、アルツハイマー病患者に対し少量(20mg/日以下)の副腎皮質ステロイド剤投与を行ったこれまでの臨床研究で認知機能障害の改善および症状の進行抑制効果が認められなかったこととも合致する結果である。

アルツハイマー病を発症するような高齢者に中等量あるいは高用量のprednisoloneを投与することは臨床的には難しいと考えられるが、今回我々が示したように、副腎皮質ステロイドは抗炎症作用のみならず、脳内でのAβ蛋白代謝に対する作用を介しても、アルツハイマー病の病態を修飾する可能性が考えられた。したがって、ヒト脳あるいはアルツハイマー病モデルマウス脳におけるAβ蛋白の代謝に対する副腎皮質ステロイドの作用を解析することは、アルツハイマー病の発症機構の解明や治療法の開発の上で有用であると考えられた。

E. 結論

1. 中等量(30mg/日)以上のprednisolone投与により、対象患者の髄液中Aβx-40およびAβx-42濃度は両者ともprednisoloneの投与後に有意に減少した。
2. 複数回の測定を行った症例では、髄液中のAβx-40濃度とAβx-42濃度は常に並行的に推移した。
3. prednisolone投与量を20mg/日以下にまで減量した7例全例で髄液中Aβx-40およびAβx-42の再上昇を認め、髄液中Aβ濃度を低下させるためには、30mg/日以上の

prednisolone投与量が必要であると考えられた。

4. ヒト脳におけるAβ蛋白の代謝に対する副腎皮質ステロイドの作用の解析は、アルツハイマー病の発症機構の解明および治療法の開発に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tokuda T, Tamaoka A, Matsuno S, Sakurai S, Shimada H, Morita H, Ikeda S: Plasma levels of amyloid β proteins did not differ between subjects with and without taking statins. *Ann Neurol* 49(4): 546-547, 2001.
- 2) Sekijima Y, Tokuda T, Kametani F, Tanaka K, Maruyama K, Ikeda S: Serum transthyretin monomer in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 8: 257-262, 2001.
- 3) Tokuda T, Oide T, Tamaoka A, Ishii K, Matsuno S, Ikeda S: Prednisolone (30–60 mg/day) for diseases other than AD decreases amyloid β peptides in CSF. *Neurology* 2002 (In press).

2. 学会発表

なし

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。

表 1 Patient characteristics

Patients	Age/Sex	Diseases	Starting daily dose / Duration of treatment*
1	25/F	multiple sclerosis	40 mg / 64 days
2	36/F	multiple sclerosis	40 mg / 42 days
3	23/M	multiple sclerosis	40 mg / 30 days
4	68/M	dysthyroid ophthalmopathy	50 mg / 30 days
5	79/F	dysthyroid ophthalmopathy	30 mg / 32 days
6	59/F	cranial polyneuropathy	30 mg / 30 days
7	78/M	polymyositis	60 mg / 68 days
8	65/F	polymyositis	50 mg / 38 days
9	54/M	CIDP	50 mg / 68 days
10	33/M	CIDP	40 mg / 62 days
11	65/M	CIDP	40 mg / 63 days
12	43/F	CIDP	50 mg / 30 days
13	46/M	CIDP	30 mg / 54 days
14	61/F	polymyalgia rheumatica	30 mg / 30 days
15	82/F	trigeminal neuropathy	50 mg / 35 days
16	65/F	polymyalgia rheumatica	30 mg / 30 days

None of the patients with multiple sclerosis had cerebral lesions, only spinal cord involvement, optic neuritis or both. *Duration of treatment (days): the period during which a 30 mg or greater daily dose of prednisolone was administered. CIDP: chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

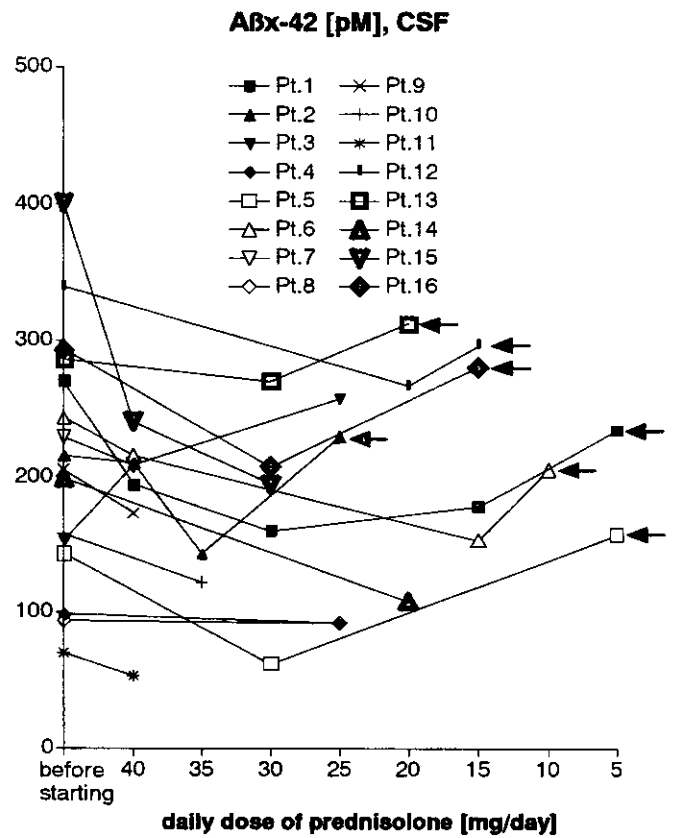
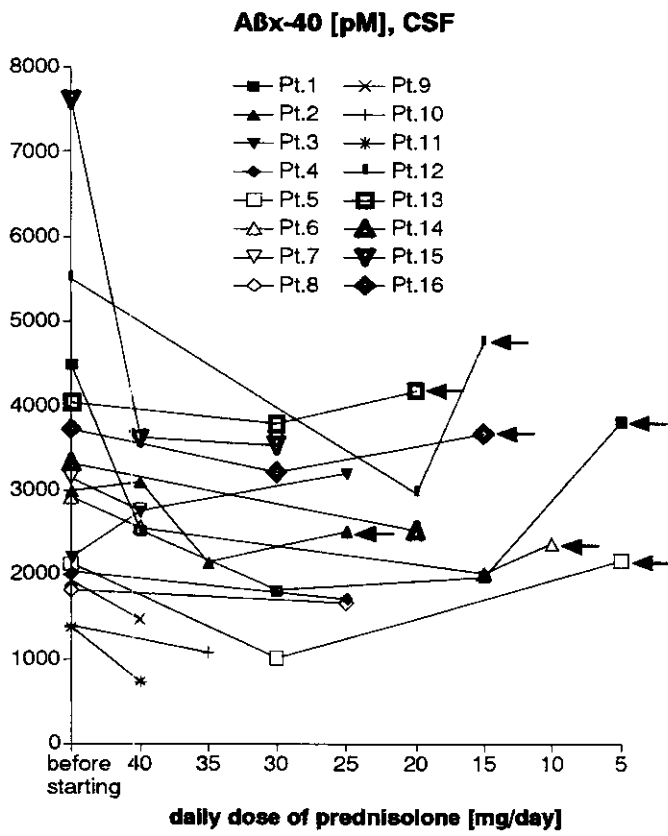


図 1

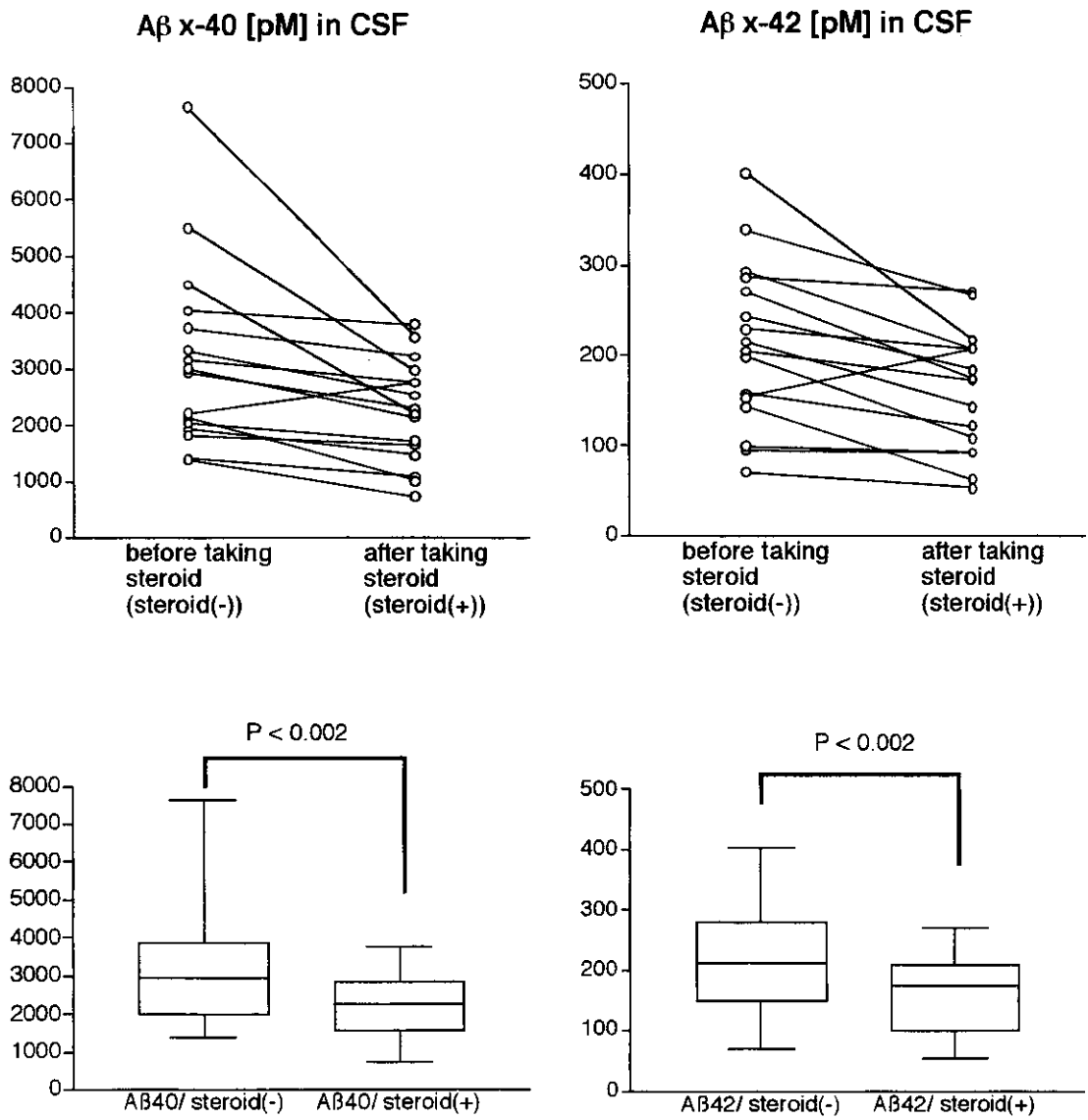


図2

厚生労働科学研究費補助金（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

マウス老化アミロイドーシスの母子間伝播の可能性の検討

分担研究者 樋口京一 信州大学医学部附属加齢適応研究センター

共同研究者 是永龍巳*、森政之*、松下隆壽**、細川昌則**

*信州大学医学部附属加齢適応研究センター

**京都大学再生医化学研究所

研究要旨 老化アミロイドーシス発症老齢マウスと同居した若齢マウスでアミロイドーシス促進効果が見い出されており、マウス個体間においてアミロイド線維の伝播（水平伝播）が示唆される。個体間伝播には親子間の垂直伝播の可能性も考えられ、母子間におけるアミロイドーシス伝播の可能性についてマウス老化アミロイドーシスをモデルに用いて検証した。アミロイド線維投与によりアミロイドーシスを発症したマウスから出生した仔マウスでは、対照群と比較して有意なアミロイドーシス促進現象が認められ、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。

A. 研究目的

これまでに、我々はマウス老化アミロイドーシスをモデルとしてアミロイドーシス伝播の可能性を探り、アミロイドーシス好発系マウスを用いた実験系において、アミロイド線維投与によるアミロイドーシス促進効果を見い出している¹⁾。

また、若齢マウスをアミロイドーシスを発症した老齢マウスと同一ケージ内で飼育した場合、若齢マウスにアミロイドーシス促進現象が見い出され、個体間でのアミロイドーシス伝播が示されている²⁾。

一方、家族性アミロイドポリニューロパシー(FAP)はトランスサイレチン(TTR)の点変異によって生じた変異 TTR がアミロイド線維化し、全身に沈着する疾患であるが³⁾、FAP 発症家系のうち、集積地の家系においては、世代の進行に伴い発症年齢が若齢化する傾向(anticipation)が見られることが報告されている⁴⁾。

anticipation の原因は遺伝的要因や環境的

要因等、さまざまな理由が考えられるが、我々の実験結果から考えると、その理由の一つとして、FAP 発症家系では親から子へのアミロイドーシスの伝播があり、その結果として発症年齢の若齢化が認められる可能性が考えられる。

今回、マウス老化アミロイドーシスをモデルを用いて、母子間におけるアミロイドーシス伝播の可能性について検討する目的で研究を行った。

B. 研究方法

C 型 apoA-II を有し AApoAII 好発系である R1.P1-*Apoa2*^c マウスをモデルとして用いた。このマウスは信州大学医学部附属動物実験施設において兄妹交配によって系統維持されており、重度な老化アミロイドーシスを発症するマウスである。

老齢 R1.P1-*Apoa2*^c マウス肝臓に沈着した C 型 AApoAII アミロイド線維を Pras の方法に従って抽出し⁵⁾、超遠心分離法によって精

製した。このアミロイド線維水分散液を 1 mg/ml の濃度に希釈し、超音波処理を行って線維を切断し可溶化した。

2 ヶ月齢の R1.P1-*Apoa2*^o マウス (雌) に C 型 AApoAII アミロイド線維を静脈注射によって投与 (0.1 ml) し、3 ヶ月間飼育してアミロイド沈着を誘導した後に雄マウス (アミロイド線維非投与) と交配した。出産した仔マウスを所定の哺育期間である 21 日間哺育させた後に離乳した。一方、対照群としてアミロイド線維非投与雌マウス (5 ヶ月齢) を同様に交配し、出産・哺育させた。

また、伝播経路を検討するために、出生後に雌親マウスの交換 (アミロイド線維投与マウスの仔を非投与マウスへ、及びその逆) を行い、哺育させた。

仔マウスを生後一定期間飼育後に屠殺し、全身臓器を中性緩衝ホルマリンで固定した。組織切片はコンゴレッド染色及び抗 apoA-II 抗体による免疫染色を行い、アミロイド沈着の指標となる Amyloid Index を求め、アミロイド沈着レベルの加齢変化を調べた。

マウスを用いた実験は信州大学医学部の動物実験に関する指針に基づいて行われた。

(倫理面への配慮)

実験に供したマウスの飼育状態が良好な環境になるように、また屠殺に際しては苦痛が最小限になるように配慮し、それぞれ信州大学医学部附属動物実験施設の動物実験に関する指針に沿って行った。

C. 研究結果

アミロイドーシス発症マウスから出生した仔マウスでは、生後 4 ヶ月齢において、腸管及び舌に軽度なアミロイド沈着がコンゴレッド染色により確認された。免疫染色の結果、沈着しているアミロイド線維は AApoAII であることが確認された。6 ヶ月齢及び 8 ヶ月齢マウスについて同様に調べた結果、アミロイド沈着レベルは加齢とともに重度化し、沈着組織についても肝臓、脾臓、

胃、心臓へと拡大した。対照群については、4 ヶ月齢及び 6 ヶ月齢ではアミロイド沈着は認められず、8 ヶ月齢では軽度な沈着が見られたが、投与群との間にはノンパラメトリック検定 (Mann Whitney の U 検定) により有意差が認められた。

出生後に雌親を交換した結果、アミロイド線維非投与マウスの仔をアミロイド線維投与マウスが哺育した場合に、生後 4 ヶ月齢において 10 匹中 4 匹について小腸に軽度な AApoAII 沈着を認めたが、逆の場合は 11 匹全てに沈着が認められず、両者の間には有意な差が認められた ($p = 0.04$, Fisher 直接法)。

D. 考察

我々は既に AApoAII 線維投与によるマウス老化アミロイドーシス促進効果を明らかにしている。ゆえに、アミロイドーシス発症マウスから出生した仔マウスにおいて、対照群と比較して有意なアミロイドーシス促進現象が認められたことは、アミロイド線維あるいはそれに準ずる物質 (protofibril 等のアミロイド線維前駆物質) が母子間で伝播したことを示唆するものである。この現象は、FAP 発症家系においては、母親から子供へアミロイドーシスが伝播する可能性があることを示唆すると考えられる。なお、比較的早期から腸管に沈着が認められたことは、アミロイド線維の経口投与によって得られるアミロイドーシス促進効果と類似している。また、アミロイドーシス非発症マウスの仔をアミロイドーシス発症マウスが哺育した場合にアミロイドーシス促進効果が見られていることを合わせて考えると、母乳経由のアミロイドーシス伝播が考えられるが、伝播の経路については、今後さらに詳細に検討する必要がある。

E. 結論

AApoAII 好発系である R1.P1-*Apoa2*^o マウスにおいて、マウス老化アミロイドーシスの

母子間での伝播の可能性が示唆された。また、予備的であるが母乳経由の母子間伝播が疑われる。

F. 健康危険情報

アミロイドーシス促進因子(アミロイド線維あるいはそれに準ずる物質)の母子間垂直伝播の可能性が考えられる。

引用文献

- 1) Higuchi K, Kogishi K, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation dependent. *Lab Invest* 78, 1535-1542 (1998)
- 2) Xing Y, Nakamura A, Chiba T, Kogishi K, Matsushita T, Li F, Guo Z, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest*, 81, 493-499 (2001).
- 3) Ikeda S, Hanyu N, Hongo M, et al. Hereditary generalized amyloidosis with polyneuropathy. A clinicopathological study of 65 Japanese patients. *Brain* 110, 315-317 (1987)
- 4) Yamamoto K, Ikeda S., Hanyu N, et al. Apedigree analysis with minimized ascertainment bias shows anticipation in Met30-transthyretin related familial amyloid polyneuropathy. *J Med Genet.* 35, 23-30 (1998)
- 5) Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T. *Anal Biochem.* 177, 244-249 (1989)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Xing Y, Nakamura A, Chiba T, Kogishi K, Matsushita T, Li F, Guo Z, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K. Transmission of mouse

senile amyloidosis. *Lab Invest* 81: 493-499, 2001.

- 2) Mori M, Toyokuni S, Kondoh S, Naiki H, Toichi E, Hosokawa M, Higuchi K. Spontaneous loss-of-function mutations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase gene in mice and exploration of the possible implication of the gene in senescence. *Free Rad Biol Med* 30: 1130-1136, 2001.
- 3) Fu L, Matsuyama I, Chiba T, Xing Y, Korenaga T, Guo Z, Nakayama J, Mori M, Higuchi K. Extra-hepatic Expression of Apolipoprotein A-II in Mouse Tissues: Possible Contribution to Mouse Senile Amyloidosis. *J Histochem Cytochem* 49: 739-748, 2001.
- 4) Mizutani J, Chiba T, Tanaka M, Higuchi K, Mori M, Unique mutation in mitochondrial DNA of Senescence-Accelerated Mouse (SAM) strains. *J Heredity. J Hered* 92: 352-355, 2001
- 5) Xing Y, Higuchi K. Amyloid fibril proteins *Mech Ageing Dev* 2002 (In press)
- 6) 樋口京一、森政之。老化促進マウス(SAM)の解析。 *BIO Clinical* 6: 57-61, 2001
- 7) 樋口京一、梅澤眞樹子。SAMP とリポ蛋白質。 *Geriatric Medicine* 39: 1399-1404; 2001
- 8) 森 政之、樋口京一。マウスを用いた老化・寿命の分子遺伝学的研究。 *基礎老化研究* 25; 77-82. 2001
- 9) 森 政之、樋口京一。老化疾患モデルマウス。 *現代医療* 34; 349-353. 2002
2. 学会発表
 - 1) Xing, Y, Fu X, Korenaga T, Nakamura A, Chiba T, Kogishi K, Matsushita T, Fu L, Guo Z, Hosokawa M, Masayuki Mori M, Higuchi K. Transmission of mouse senile amyloidosis. IX th International Symposium on Amyloidosis (2001, 7) Budapest

- 2) Xing Y, Fu X, Korenaga T, Nakamura A, Nakamura A, Kogishi K, Matsushita T, Guo Z, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K. Transmission of mouse senile amyloidosis. CGGH Symposium (2001, 8) Sapporo
 - 3) 付笑影、是永龍巳、付麗、松下隆壽、細川昌則、馬場聡、内木宏延、森政之、樋口京一：種を越えたアミロイドーシス誘発の可能性；マウスモデルを用いた解析。第 90 回日本病理学会総会（2001.4）東京
 - 4) 是永龍巳、森政之、付麗、松下隆壽、細川昌則、樋口京一：Apoa2a allele を持つマウスにおける老化アミロイド沈着とその誘導。第 90 回日本病理学会総会（2001.4）東京。
 - 5) 樋口京一、付笑影、是永龍巳、XingYanming、森政之、松下隆壽、細川昌則、馬場聡、内木宏延、石原得博：種を越えたアミロイドーシス誘発の可能性に関するマウスモデルを用いた解析。第 24 回日本基礎老化学会総会（2001.6）大阪
 - 6) 是永龍巳、森政之、付笑影、松下隆壽、細川昌則、倉本数直、朱宮正剛、田中慎、後藤佐多良、樋口京一：Apoa2c allele を持つマウスにおける老化アミロイド沈着-2。第 24 回日本基礎老化学会総会（2001.6）大阪
 - 7) 郭占軍、森政之、姚俊潔、付笑影、XingYanming、是永龍巳、松下隆壽、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス修飾遺伝子の解析。第 24 回日本基礎老化学会総会（2001.6）大阪
 - 8) 是永龍巳、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス。第 17 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会総会（2001.7）京都
 - 9) 郭占軍、森政之、姚俊潔、付笑影、XingYanming、是永龍巳、松下隆壽、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス修飾遺伝子の解析。第 17 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会総会（2001.7）京都
 - 10) 是永龍巳、付笑影、森政之、松下隆壽、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシスの伝播機構の解析；個体間、母子間の伝播第 6 回臨床ストレス蛋白質研究会(2001,11) 小樽
 - 11) 森政之、郭占軍、清水基行、樋口京一。SAMP 系マウスにおける多因子疾患の QTL 解析 第 18 回日本疾患モデル学会ワークショップ「多因子疾患モデルの解析」（2001.11）名古屋
- 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

マウス老化アミロイドーシス抑制遺伝子の解析

分担研究者 樋口京一 信州大学医学部附属加齢適応研究センター
脈管病態分野

共同研究者 郭 占軍、森 政之
信州大学医学部附属加齢適応研究センター脈管病態分野

研究要旨 アミロイドーシスの抑制に関与する遺伝子を解明する目的で、マウスで自然発症する AApoAII アミロイドーシスをモデルとして遺伝学的解析を行なった。同じアミロイドーシス好発型の *Apoa2^o* 遺伝子を持ちながらアミロイド沈着が軽微な A/J 系マウスと重篤な SAMP1 系マウスより作出した F2 および戻し交雑マウス群において、マイクロサテライトマーカー遺伝子を用いた全ゲノムスキニングにより、アミロイド沈着程度と相関する染色体領域として第 4 番と第 19 番染色体上の計 3 領域を特定した。これらの領域に存在する遺伝子群のうち、アミロイドーシス抑制の重要な候補遺伝子と考えられた分泌型ホスホリパーゼ A2 (*Pla2g2a*) 遺伝子の cDNA の解析の結果、アミロイド沈着が軽微な A/J 系マウスだけに 1 塩基挿入による機能喪失型フレームシフト変異が認められた。このことから、A/J 系マウスでは PLA2 活性を喪失しているために、HDL からの apoA-II の放出が抑制される、あるいは炎症反応が軽減され、これが AApoAII アミロイドーシスの軽減化に寄与しているとの機序が推察された。

A. 研究目的

アミロイドーシスの原因は一義的にはアミロイドとして蓄積する蛋白をコードする遺伝子に起因する。しかしながら、その発症には個人差が存在することより、一義的な原因となる遺伝子以外の、発症を抑制あるいは促進する遺伝子の関与が示唆される。この抑制(促進)遺伝子が同定できれば、アミロイドーシスの予防や治療に大きく貢献することが期待される。しかしながら、ヒトは遺伝的にも生活環境においても雑多な集団であり、このような複雑な形質の解析は困難である。このような解析には適切なモデル動物を用いた研究が必須である。

マウスでは SAMP1 系マウスを含め、C 型の apolipoprotein A-II (*Apoa2^o*) 遺伝子を持つ

系統が重篤なアミロイドーシス (AApoAII アミロイドーシス) を発症する。しかしながら A/J 系マウスはアミロイド好発型の *Apoa2^o* 遺伝子を持つにもかかわらず、アミロイド沈着は SAMP1 系マウスと比較して軽度であることが報告されている。このことは、A/J 系マウスが SAMP1 系マウスには無いアミロイドーシス抑制遺伝子を持つことを示唆する。

そこで SAMP1 と A/J 系マウスとの交雑マウス群を用いてアミロイドーシス抑制遺伝子の染色体マッピングと、positional candidate approach によるその同定を試みた。

B. 研究方法

1. 交雑マウスの作出と飼育条件

A/J と SAMP1 系マウスより F2 交雑マウス (A/JxSAMP1)F2 を 54 匹、戻し交雑マウス (A/JxSAMP1)xA/J を 76 匹作成した。マウスはコンベンショナル飼育条件下で、4%の脂質を含有する餌と水道水を自由摂取させた。動物の飼育、および実験は信州大学医学部動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、委員会による審査に合格した後に実施した。また、信州大学医学部で定められた動物実験の指針に則り、動物へのストレス・苦痛が最小限になるよう配慮した。

2. AApoAII アミロイド沈着程度の評価

マウスは 12 ヶ月齢でエーテル麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させた。直ちに肝臓、脾臓、心臓、胃、皮膚をホルマリン固定した。これら 5 臓器の切片をコンゴレッド染色し、偏光顕微鏡下での緑色偏光によりアミロイド沈着を確認した。同時に抗 apoA-II 抗体と ABC 法による免疫組織化学染色により AApoAII アミロイド沈着を調査した。各臓器でのアミロイド沈着を、0 (沈着無し)、1 (極く軽度の沈着)、2 (軽度の沈着)、3 (中程度の沈着)、4 (重度な沈着) までの 5 段階評価し、5 臓器の平均値をその個体のアミロイド Index とした。

3. 全ゲノムスキニングと QTL 解析

交雑仔マウスの肝臓からゲノミック DNA を抽出した。マイクロサテライトマーカー用プライマーは Research Genetics 社から購入した計 87 個を使用した。これらのマーカーはマウスの全ゲノムをカバーするように選択した。各マイクロサテライトマーカーの PCR 増幅とアガロースゲル電気泳動により遺伝子型を判定した。コンピュータープログラム MapManager QT を用いてアミロイド Index の Quantitative Trait Loci (QTL) 解析を行なった。

4. 分泌型ホスホリパーゼ A2 (*Pla2q2a*) 遺伝子の変異解析

アミロイドーシス抑制 QTL 染色体領域に存在し、かつ apolipoprotein A2 を含む HDL

の代謝、あるいはアミロイド線維核の形成、アミロイド線維の伸長などの抑制やアミロイド分解の促進等への関与が疑われる遺伝子を positional candidate gene の選択基準とした。分泌型ホスホリパーゼ A2 (*Pla2q2a*) 遺伝子、perlecan 遺伝子などが該当した。これらのうち *Pla2q2a* 遺伝子の解析を進めた。A/J, SAMP1, さらに *Apoa2*^g 遺伝子を持つ SAMP2, SAMP7, SAMP10, SJL/J 系マウスの肝臓より mRNA を抽出し、1st strand cDNA を合成した。*Pla2q2a* 遺伝子の特異的に増幅できるオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、1st strand cDNA を鋳型とした PCR 法により *Pla2q2a* 遺伝子の cDNA を得た。DNA 塩基配列を決定し、比較した。

C. 研究結果

2. F2 交雑マウス群のアミロイド沈着に関するプロファイル

12 ヶ月齢でのアミロイド Index の平均値は A/J 系マウスで 0.58 (N=12) であり、SAMP1 系マウスの 2.56 (N=12) と比較して有意に低下していた。(A/JxSAMP1)F1 マウスは SAMP1 系マウスと同程度のアミロイド Index (2.27; N=13) を示した。(A/JxSAMP1)F2 交雑群と (A/JxSAMP1)xA/J 戻し交雑群においては、アミロイド Index の平均値はそれぞれ 1.83 と 1.45 と A/J と SAMP1 のほぼ中間の値であったが、0-3.25 と広い分布を示した。

2. アミロイドーシス抑制遺伝子の染色体マッピング

(A/JxSAMP1)F2 マウス群を用いた解析により第 4 番染色体上の 2 個所と第 19 番染色体上の 1 個所にアミロイド Index との有意な遺伝相関を示すマーカー群が検出された。第 4 番染色体上では遺伝相関の程度を示す指標である LRS 値は遠位端付近で最高 31.3 に達し、統計的に有意な強い相関を示した。また、近位端付近にも弱い相関を認めた。第 19 番染色体上では遠位端付近に弱い相関を認めた。これらの弱い相関は (A/JxSAMP1)xA/J 戻

し交雑マウス群においても確認された。これらの染色体領域においては、A/J系マウス由来の対立遺伝子をホモで持つマウス群ではSAMP1系マウス由来の対立遺伝子をホモで持つ群と比較して有意にアミロイド Index が低かった。

3. *Pla2q2a* 遺伝子の変異解析

第4番染色体の遠位端領域には分泌型ホスホリパーゼ A2 (*Pla2q2a*) 遺伝子が存在する。*Apoa2^o* 遺伝子を持つマウス系統の *Pla2q2a* 遺伝子の cDNA を解析した結果、A/J系マウスにおいて 166 番目へのチミジン塩基の挿入による機能喪失型フレームシフト変異を確認した。SAMP1 を含むその他のマウス系統にはこの挿入変異は認められなかった。

D. 考察

F2 交雑マウス群でのアミロイド沈着に関するプロファイルから、A/J系マウスにおけるアミロイドーシス抑制は単一遺伝子によるものではなく、複数の遺伝子が関与するものであることが示唆された。

遺伝相関解析の結果、A/J系マウスでのアミロイドーシス抑制を規定する遺伝的に劣性の遺伝子座が第4番、および第19番染色体上にあることを示唆する結果を得た。

第4番染色体上でアミロイド Index と遺伝相関が最も高い領域に存在する遺伝子の中から、分泌型ホスホリパーゼ A2 (*Pla2q2a*) 遺伝子を以下の理由からアミロイドーシス抑制遺伝子の候補として解析した。PLA2 酵素は血清中の HDL 内のリン脂質を加水分解して apoA-II を放出させる活性を持つ。また、serum amyloid A protein (SAA) による PLA2 活性の亢進が報告されている。さらに SPLA2 はプロスタグランジン D2 合成の基質となるアラキドン酸の合成にも関与することから、炎症への関与も疑われている。*Pla2q2a* 遺伝子の cDNA の解析の結果、A/J系マウスのみならず 1 塩基挿入による機能喪失型フレームシ

フト変異が認められた。このことから、A/J系マウスでは PLA2 活性を喪失しているために、HDL からの apoA-II の放出が抑制される、あるいは炎症反応が軽減され、これが AApoAII アミロイドーシスの軽減化に寄与しているとの機序が推察される。今後、この仮説の検証が必要である。また、第4番染色体の近位端領域、および第19番染色体上の遠位端領域を含め、他の候補遺伝子の解析も必要である。同時に得られたデータをヒトのアミロイドーシスの抑制・予防法の確立などの研究に還元する必要がある。

E. 結論

1. マウス AApoAII アミロイドーシスの発症を抑制する複数の遺伝子が存在する。
2. 分泌型ホスホリパーゼ A2 (*Pla2q2a*) 遺伝子はアミロイドーシス抑制遺伝子としての重要な候補遺伝子である。
3. マウスモデルを用いたアミロイドーシス抑制遺伝子同定研究から、ヒトのアミロイドーシスの抑制・予防戦略への発展の可能性が示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Guo Z, Toichi E, Hosono M, Hosokawa T, Hosokawa M, Higuchi K, Mori M: Genetic analysis of lifespan in hybrid progeny derived from the SAMP1 mouse strain with accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 118: 35-44, 2000.
 - 2) Fu L, Matsuyama I, Chiba T, Xing Y, Korenaga T, Guo Z, Nakayama J, Mori M, Higuchi K: Extra-hepatic expression of apolipoprotein A-II in mouse tissues: Possible contribution to mouse senile amyloidosis. *J Histochem Cytochem* 49:

739-748, 2001.

2. 学会発表

- 1) 郭占軍、森政之、姚俊潔、付笑影、Xing Yaming、是永龍巳、松下隆寿、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス修飾遺伝子の解析. 第 24 回 日本基礎老化学会総会、大阪、6 月 15 日、2001 年.
- 1) 2) 森政之、郭占軍、清水基行、樋口京一：SAMP 系マウスにおける多因子疾患の QTL 解析. 第 18 回 日本疾患モデル学会総会ワークショップ「多因子疾患モデルの解析」、名古屋、11 月 10 日、2001 年.
- 2) 森政之、清水基行、郭占軍、樋口京一：

SAMP 系マウスを用いた老化関連病態の遺伝解析. 第 91 回日本病理学会総会ワークショップ「多因子疾患モデルの解析」、横浜、3 月 27 日、2002 年.

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。