

厚生科学研究研究費補助金
特定疾患対策研究事業

アミロイドーシスモデル動物における 発症機序の解明に関する研究

平成13年度総括・分担研究報告書

ANNUAL REPORT OF THE RESEARCH ON THE
PATHOGENESIS OF THE AMYLOIDOSIS ON THE EXPERIMENTAL
ANIMAL MODELS, SURVEYS AND RESEARCH ON SPECIFIC
DISEASE, THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE OF JAPAN

平成14(2002)年3月

March 2002

主任研究者 石原得博

山口大学医学部構造制御病態学講座

Chairman: Tokuhiko ISHIHARA

Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine

目 次

平成13年度総括研究報告	5
平成13年度分担研究報告	15
平成13年度事業報告	87
平成13年度研究班班員名簿	91
研究成果の刊行に関する一覧表	95

アミロイドーシスモデル動物における
発症機序の解明に関する研究
平成 13 年度
総括研究報告

石 原 得 博

山口大学医学部構造制御病態学講座

総括研究報告

アミロイドーシスモデル動物における発症機序の解明に関する研究

主任研究者 石原 得博*

分担研究者 前田 秀一郎** 樋口 京一*** 東海林 幹夫****

河野 道生***** 加藤 昭夫***** 高橋 睦夫*****

横田 忠明*****

研究要旨

アミロイドーシス発症機序の解明の為に、モデル動物の開発と応用研究を行なった。ヒト疾患により近いアルツハイマー病やFAPモデルマウスの作製を行った。モデル動物を用いての治療法の開発では、脳アミロイドーシスのワクチン療法の有用性を示唆した。モデルマウスを用いたアミロイドーシス伝播機構については、マウス AApoAII アミロイドーシスでは、母乳経由のアミロイド伝播、マウス AA アミロイドーシスでは、異種アミロイドの経口摂取による伝播の可能性が示された。

研究目的

1) モデルマウスを用いたアミロイドーシス伝播機構の解析

外来性の線維蛋白による発症促進効果（核依存性重合反応）がアミロイドーシスの発症病理において注目されている。これまでに、マウス老化およびAAアミロイドモデルにおいて、アミロイド線維の経口および静注によるアミロイドーシスの促進効果を示した。また、異種アミロイド蛋白や異動物種のアミロイドの静注ある

いは腹腔内投与、経口摂取でもアミロイドーシス伝播の可能性が示され、このことは、プリオン病に見られる伝播機構の解明とともに、家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）患者のドミノ肝移植の問題とも関連して緊急性の高い問題であり、多様な疾患群としてのアミロイドーシスの発症機序の解明の重要な糸口になると考えられる。

2) アミロイドーシスモデル動物の作製と応用

アミロイドーシスとは、さまざまな前駆蛋白が β 構造を多く含んだ共通の線維構造からなるアミロイドを形成し、いろいろな臓器に沈着し、障害を引き起こし致命的ともなる疾患群である。いわゆる原発性や骨髄腫に伴うALアミロイドーシス、慢性関節リウマチ（RA）や結核に続発するAAアミロイドーシス、FAP、アルツハイマー病などの脳アミロイドーシス、老人性アミロイドーシスなど多くの病型がある。しかし、その有効な直接的な治療法はなく、多くは

* 山口大学医学部構造制御病態学講座教授

** 山梨医科大学第一生化学教授

*** 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教授

**** 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学助教授

***** 山口大学医学部大学院医学研究科応用医工学系生体シグナル解析医学教授

***** 山口大学農学部生物機能科学科教授

***** 山口大学医学部附属病院病理部副部長

***** 小倉記念病院病理部部長

原疾患の治療によるが、唯一注目されているのはFAPで行われている肝移植である。これはドミノ移植でも注目を集めている。また、疾患の希少性と難治性ゆえに、モデル動物の必要性が高いが、AAアミロイドーシス以外のモデル動物はいまだ十分ではなくその開発が急務である。アミロイドモデルマウスとしての各種トランスジェニックマウスの作製を行いこれらのマウスの交雑による、各因子の発症機序における役割についても検討する。また、ALアミロイドーシスについては、Ig産生ヒト骨髓腫細胞株をSCID-hIL6トランスジェニックマウスに移植し、ALアミロイドーシス発症動物モデルを作製を試みる。

3) モデル動物を用いた治療法の開発

- (1) ヒトの疾患により近い動物モデルを用いて治療法（コルヒチン、メラトニンなど）についての基礎的研究を行う。
- (2) IL-6ノックアウトマウスでアミロイドーシスが発症しないことより、AAアミロイドーシスモデルマウスにおいて抗IL-6抗体を用いた免疫療法、またA β アミロイドーシスマウスにおいての免疫療法の可能性を検討する。

研究方法

1) モデルマウスを用いたアミロイドーシス伝播について

- (1) 種を越えたアミロイドーシスの伝播機構の解析
 - a) ヒトアミロイド線維の種類増加 (α -synuclein, lysozyme, GroES, polyglutamate などから作製したアミロイド線維) や環境から侵襲すると考えられるアミロイド線維様物質 (ウシAAや絹線維、細菌、飼料など) のアミロイド誘発能の解析を行い、ヒトアミロイドーシスの発症の危険因子の同定を試みる。
 - b) 外部から侵入したアミロイド線維の代謝経路の解析、現在静注したAA線維はまず肺へ集積、舌、小腸へと移行し、その順

番でマウスAApoAIIの沈着が開始することが明らかになりつつある。これらの臓器でのアミロイド線維の代謝やRAGE、HRB1レセプターなどを中心とした細胞学的解析を行う。

- c) アミロイド (AA, AapoA II) 沈着臓器を肝臓に移入し、レシピエントマウスのアミロイドーシス発症の有無を検討する。
 - d) ヒト脳アミロイド注入実験を種々の方法で長期間行い、脳A β アミロイドの伝播性について最終的な結果を明らかにする。
- ### (2) 母子間伝播機構の解析
- a) マウスモデルを用いて母子間伝播の可能性と伝播経路を明らかにする。
 - b) 伝播経路を明らかにするために出産後の母雌マウスの交換やミルクの解析などを行う。
- ### (3) Amyloid enhancing factor (AEF) の本態の解析

種々のアミロイドーシスにおいて、amyloid enhancing factor (AEF) あるいはアミロイド線維自体にアルカリ処理や過熱、焼灼などの種々の操作を行うことによって、そのAEF効果の消退を検討し、さらにアミロイド線維の凝集阻害剤としての数種類の化合物を、実際にアミロイドモデル動物に投与し効果を検討し、AEFの本態を調べる。

2) モデル動物の作製と応用

- (1) 脳アミロイド沈着における病態発現の分子機構と治療法の解明
 - a) APPswマウスにtauR406Wトランスジェニックマウスを掛け合わせて、脳アミロイドーシスと神経原線維変化、神経細胞死を再現する最終的なアルツハイマー病の動物モデルを確立する。
 - b) このマウスで実際に脳アミロイドーシスによってtauopathyが誘発される機序を明らかにする。
 - c) このマウスを用いてA β ワクチン療法を詳細に検討し、有用性、副作用、適応などヒトへ応用する基礎的な検討を行う。

- d) その他の新たな治療法をこのシステムで検証する。
- (2) 変異導入マウスを用いた遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析
- a) SAP や TTR の遺伝性アミロイドーシス発症に及ぼす効果の解析
- SAP 欠損マウスと FAP のトランスジェニックマウスやスウェーデン早期発症型アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデルとを交配させ、脳内 A β アミロイド沈着や FAP の病因となるヒト TTR Met30 のアミロイド沈着の開始時期や程度について月齢を追って調べる。SAP のリガンドの一種であるガラクトースの誘導体でアミロイド沈着を抑制する方法を検討する。
- b) FAP の新たなモデルマウス作製の試み
- ttr* Pro55 遺伝子や最近我々が見出した *ttr* Lys54 遺伝子は、20 ~ 30 歳台で死亡する若年発症の劇症型 FAP を惹起する。ヒト *ttr* Met30 遺伝子を運ぶ劇症型 FAP のトランスジェニックマウスを作製する。
- c) TTR 欠損マウスを用いた脳神経系における TTR の機能解析
- TTR 欠損マウスと対照野生型マウス脳における遺伝子発現の違いを、ディファレンシャルディスプレイ法で比較する。
- d) SAP 欠損マウスを用いた SAP の機能解析
- SAP 欠損マウスでは対照野生型マウスに比べ、血中の抗核抗体価が顕著に上昇しており、リポ多糖体で惹起したエンドトキシンショックに抵抗性を示した。何故このような差異が生じたかを解析し、SAP の機能を明らかにする。
- (3) IL-6 ノックアウトマウスにアミロイドーシスが発症しないことを証明し、さらに外来性の recombinant IL-6 や SAA を投与しアミロイド発症の可能性を検討し、組織学的にあるいは電顕的にその作用部位および機序を調べる。
- (4) 新しく樹立した IgA を恒常的に分泌するヒ

ト骨髓腫細胞株 MSG-Y01 を用いて、SCID-hIL6 Tg マウスで、種々の網内系賦活化を行うことにより AL アミロイド発症モデルを作製する。

- (5) 新しいリゾチーム変異体によるアミロイドの発症機構の解析

致死性アミロイドーシスを発症させる 2 つのリゾチーム変異体を、ニワトリのアミロイド型変異体を酵母で発現させ、糖付加操作によって可溶化し、in vitro で発症機構を解析する。

- 3) モデル動物を用いた治療法の開発

- (1) アミロイドーシス惹起物質と併用して各種薬剤（コルヒチン、メラトニンなど）をマウスに投与し、アミロイドーシス発症抑制および吸収促進について解析する。

- (2) AA アミロイドーシスモデルマウスにおいて抗 IL-6 抗体を用いて、また A β アミロイドーシスマウスにおいての抗 A β 抗体を用いての免疫療法およびワクチン療法について検討する。

(倫理面への配慮)

実験動物の取扱および遺伝子操作に関しては各研究施設の動物実験に関する規則等にしたがって審査を受けて行う。また、アミロイドーシス患者の組織等を使う場合には、検査等のために採取されたものの残りを使用することを主とし、また必要な場合は、研究の主旨、方法、予想される成果等をあらかじめ十分に説明し、承諾を得たのちに材料の提供をお願いするものとする。

研究結果

- 1) モデルマウスでのアミロイドーシス伝播機構の解析

- (1) アミロイド線維によるアミロイドーシス誘発・促進

AApoAII や AA アミロイドーシスでは、アミロイド線維の血管内投与、消化管内投与、飲水中への添加および肝臓内へのアミロイド沈着臓器（肝、腎）の移入によりアミロドー

シスが誘発された。マウス飼育室内でのアミロイドーシス発症頻度・沈着程度が時期を追い増大することが確認され、アミロイドーシスの拡散が観察された。アミロイドーシス発症マウスから生まれた仔マウスではアミロイドーシス発症の促進が認められ、母乳による伝播の可能性が示された。

(2) 誘発におけるアミロイド線維構造の共通性と特異性

ヒトAA, ATTR, AL, A β 1-40, α -synuclein, lysozyme, GroES 及びマウス AA, C型 AApoAII, A型 AApoAII のアミロイド線維をマウスに投与（静注）したところすべてのアミロイド線維が AApoAII アミロイドーシスを誘発した。実験的 AA アミロイドーシスについても同様な結果が得られ、共通のアミロイドーシス誘発構造が存在することが明らかになった。一方アミロイド線維により、アミロイドーシスの誘発力には大きな差が存在し、最も誘発・促進力が強いのはアミロイド線維とアミロイドタンパク質の一次構造が一致した場合である事が明らかになり、それぞれのアミロイド線維に特異的な構造が存在することが明らかになった。

(3) 脳アミロイドの伝播性の検討

a) 蛍光ラベルした合成A β 40, 42をTgマウスの凍結脳切片に反応させ in situ amyloidogenesis が起こることを明らかにした。

b) アルツハイマー病患者脳から抽出した A β oligomerをAPPsw miceと対照マウスの脳に投与し、一度脳内に投与された A β oligomer は5ヶ月以上経っても分解されずに脳内に存在すること、脳アミロイド蓄積を増強すること、対象マウスで、注入部位以外にも A β の蓄積が観察されマウス内因性 A β も蓄積していた。したがって、ヒトの amyloidogenic な構造変化を起こした A β oligomer が伝播する可能性が示唆された。

2) アミロイドーシス発症モデル動物の開発

(1) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) モデルマウス

a) 変異導入マウスを用いた遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析

FAPにより近似した疾患モデル動物の確立を目指し、標的遺伝子組換え法を用いて、マウス内在性のトランスサイレチン (*ttr*) 遺伝子に FAP の病因となる Met30 変異を持つマウス株を作製した。このマウスは今後、正常 *ttr* 遺伝子を組み込んだ RNA/DNA キメラヌクレオチドを用いた遺伝子治療等の試行に有用な FAP のモデル動物と考えられる。

(2) 血清アミロイド P 成分 (SAP) について

a) 無 SAP マウスでは、インターフェロンで誘導され、細胞増殖抑制作用を持つ核蛋白質を規定する遺伝子の発現が対照野生型マウスに比べ、増強していることを見出した。今後、無 SAP マウスで何故インターフェロンで誘導される核蛋白質遺伝子の発現が増強するかを解析し、SAP の機能を明らかにしたいと考えている。

b) SAP 欠損 APP Tg マウスは、対照野生型 APP Tg マウスに比べ、学習能力が高い傾向を認めた。このことは、SAP が A β アミロイドの沈着を促進することを示唆する。さらに、両トランスジェニックマウスにおける脳内 A β アミロイド沈着の程度を詳細に比較解析している。

3) 脳アミロイドを再現する各種モデル動物の確立

a) 脳に A β アミロイドを再現する Tg マウス (APPsw) で、脳アミロイドの沈着機序と経時的变化、それによって引き起こされる神経細胞死、グリオーシス、神経活性物質の変化、リン酸化タウの蓄積、記憶障害を明らかにした。A β アミロイドの早期蓄積部位としての lipid raft の重要性を明らかにした。

b) 家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である変異 presenilin-1 を発現する Tg と APPsw を掛け合わせて double Tg マウスを作製して、著しい A β アミロイドの蓄積促進

を明らかにして、変異 presenilin-1 の病的意義が A β アミロイド蓄積促進であることを明らかにした。

c) 変異タウ Tg マウスを確立し、このマウスでは A β アミロイドは誘発されず、逆にタウ R406W x APPsw double Tg マウスでは Gallyas 染色陽性の神経原線維変化が出現することから、アルツハイマー病では A β アミロイドーシスが最も重要な原因であり、もっとも根本的な治療の対象であることを明らかにした。

4) AL アミロイドーシス発症モデルの研究

AL アミロイドーシス合併したヒト骨髄腫患者 25 症例の骨髄液を SCID-hIL6 Tg マウス (SCID-hIL6 Tg マウス) の腹腔内に移植した結果、9 症例にて 8~12 週後に生存し得る骨髄腫細胞株を得た。この中で 3 症例において骨髄腫細胞株を得ることができた (Y01, Y02, Y03)。細胞株化した骨髄腫細胞 3 株を、SCID-hIL6 Tg マウスの腹腔内にアガロースゲルとともに注射して、移植後 8 週、12 週、さらに 20 週に腹腔内から細胞を回収して骨髄腫細胞株の生着を確認するとともに、腹腔内の腫瘍、腹膜および筋肉組織のアミロイド沈着の有無を調べたが、これまでの所アミロイド沈着は認めていない。AL アミロイドーシス合併の骨髄腫患者からの骨髄腫細胞 3 株を SCID-hIL6 Tg マウスの腹腔内で移植生存させ、長期に観察したがアミロイド沈着は認められなかった。以上の結果から、たとえ AL アミロイドーシス合併の骨髄腫患者からの骨髄腫細胞株をマウスに移植し単に M タンパクの負荷をかけても、アミロイド沈着を誘導できないことを示している。

3) モデル動物を用いての治療法の開発

脳アミロイドの治療法の確立

a) APPsw に A β 42 ワクチン療法を行い、アミロイド蓄積の 43% を抑制した。

b) APPsw にメラトニン療法を行い、アミロイド沈着を 3 ヶ月間抑制した。ヒトに換算すると約 15~30 年間に対応する抑制作用であるため、今後の臨床応用が望まれた。

考 察

モデル動物におけるアミロイドーシスの伝播に関してはヒトでアミロイドーシスが伝播するか否かについては不明な点も多く、出来るだけ早急にさらなる研究が必要である。

モデル動物の作製は、AA アミロイドーシス、FAP (TTR アミロイドーシス)、脳 (A β) アミロイドーシスや老化モデルマウスとしては、ほぼ達成したが、AL アミロイドーシスにおいてはこれからである。

治療法に関しては、ヒトの疾患により近いモデル動物が作製出来たので、今後大きな期待がもてる。

アミロイドーシスの伝播あるいは感染については Dr. Prusiner が protein only 仮説を提唱し、これを支持する多くの研究が蓄積されているが、プリオンの構造が必ずしもアミロイド線維構造とは同一ではなく、他のアミロイドーシスでは伝播は報告されていなかったという二点からアミロイドーシス発症とアミロイド線維核による伝播には疑問が持たれてきた。しかし樋口 (分担研究者) らがマウス老化アミロイドーシスで経口伝播の可能性を強く示唆する研究結果 (Lab Invest. 78: 1535, 1998) を世界で初めて示した事はアミロイドーシスの発症機構を考える上で画期的な出来事である。今後、移植医療におけるアミロイド線維核の残留、あるいは経口的なアミロイド線維核の摂取によるアミロイド発症の可能性は、社会的に重要な検討課題である。

動物実験モデルについては、前田 (分担研究者) らの FAP の Tg マウスの研究 (Am J Pathol: 150, 1497, 1997) は世界レベルのものである。また、アルツハイマー病のモデルとしての A β 関連蛋白の Tg マウスは、ここ数年でいくつかの報告があるが、我が国でも東海林 (分担研究者) らが作製している (Neurobiol aging. 19: S59, 1998)。前田らはこのほかにも、アミロイド共存蛋白 SAP のノックアウトマウスを作製しており (Lab Invest: 77, 525, 1997)、これら複数のマウスを同時に使用した研究に今後期待される。

免疫グロブリン L 鎖由来の AL アミロイドーシスについては、汎用性のある実験モデルがはまだ

確立されておらず、発生病理や治療法の解明が進んでいない状況である。多様性に富んだ免疫グロブリンからなるALアミロイドーシスのモデル動物の開発は、アミロイドーシスの発症機構を考える上で重要な示唆を与えると考えられる。

これまでの結果はモデルマウスを用いて得られたものである。ヒトへの外挿を考え、1) よりヒトアミロイドーシスに近いモデルを用いた検討、2) 伝播源となりうるアミロイド線維用物質の高感度検出系の開発が重要と考える。そのため1) FAPとRA、アルツハイマー病のモデルマウスを用いて、伝播の可能性を検討する。2) 食餌、腸内細菌等の生活環境やアミロイドーシス患者内のアミロイド原性物質を検出するためのモデル動物(AAやAApoAII高発現マウス等)や新たな検出方法の開発が急務である。

結 論

1) モデルマウスを用いたアミロイドーシス伝播機構

マウスアミロイドーシス(AApoAIIとAA)では伝播が起こりうる事が明らかになった。アミロイド線維にはアミロイド誘発に関して共通構造が存在し、動物種やアミロイドタンパク質の違いを超えた伝播の可能性が示唆された。

2) アミロイドーシス発症モデル動物の開発と応用

1) ヒト疾患により近いアルツハイマー病やFAPモデルマウスを開発した。

2) モデル動物を用いての治療法の開発

(1) 脳アミロイドーシスのワクチン療法の有用性を示唆した。

(2) メラトニンがアミロイド沈着を抑制することを明らかにし、今後の臨床応用の必要性を示唆した。

研究発表

1. 論文発表

1) Cui D, Ishihara T, et al: Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. *Pathol Int* 52:40-45, 2002.

2) Xing Y, Higuchi K, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest* 81: 493-499 2001.

3) Fu L, Matsuyama I, Higuchi K, et al. Extra-hepatic Expression of Apolipoprotein A-II in Mouse Tissues: Possible Contribution to Mouse Senile Amyloidosis. *J Histochem Cytochem* 49: 739-748 2001.

4) Setoguchi M, Ishihara T, et al: Analysis of plasma cell clonality in localized AL amyloidosis. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 7:41-45, 2000.

5) Shoji M, Kawarabayashi T, et al. Age-related amyloid β protein accumulation induces cellular death and macrophage activation in transgenic mice. *J Pathol*. 2000 May; 191(1): 93-101.

6) Tomidokoro Y, Shoji M, et al. Brain Abeta amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau. *J Pathol*. 2001 Aug;194(4):500-6.

7) Kawarabayashi T, Shoji M, et al. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001 Jan 15;21(2):372-81.

8) Mahmoud MS, Fujii R, Ishikawa H, Kawano MM: Enforced CD19 expression leads to growth inhibition and reduced tumorigenicity. *Blood* 94:3551-8, 1999.

9) Ishikawa H, Kawano MM, et al: Requirement of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. *Blood* (in press).

10) Y Song, H Azakami, M Hamasu, A Kato. In vivo glycosylation suppress the aggregation of Amyloidogenic hen egg white lysozymes expressed in yeast. *FEBS Letters*, in press (2001).

11) A Kato, S Nakamura, et al. Enthalpic

destabilization of glycosylated lysozymes constructed by genetic modification. *Biochim Biophys Acta*. 2000,1481; 88-96.

- 12) Usui I, Ishihara T, Maeda S, et al. Homozygous serum amyloid P component-deficiency does not enhance regression of AA amyloid deposits. *Amyloid: Int J Prot Folding Dis*, 2001, 8,101-104.

2. 学会発表

- 1) 樋口京一、石原得博他：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
- 2) 是永龍巳、樋口京一他：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
- 3) 前田秀一郎、石原得博：遺伝子改変マウスを用いた家族性アミロイドーシスの発症機構の解析。第74回日本生化学会大会（2001.10）
- 4) 前田秀一郎他：遺伝子改変マウスを用いたトランスサイレチンの脳神経系における機能解析。第45回日本人類遺伝学会（2000.10）
- 5) 東海林幹夫：脳アミロイドーシス、脳A β アミロイドの形成機序と感染性について。アミロイドーシスシンポジウム、宇部、2000.2.11
- 6) 東海林幹夫、村上哲郎他：行動異常を示すtauR406Wトランスジェニックマウスの検討。1st Parkinson's disease forum, 東京, 2001
- 7) Xing, Y, Higuchi K, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. IX th International Symposium on Amyloidosis (2001. 7) Budapest.
- 8) Xing, Y, Higuchi, K, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. CGGH Symposium (2001. 8) Sapporo.
- 9) Shoji M, Matsubara E, et al. The effect of A β 42 vaccine on Tg2576 Alzheimer model mice. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 10) Kawarabayashi T, Shoji M, et al. Amyloid

β protein accumulates in lipid rafts. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.

- 11) Harigaya Y, Shoji M, et al. Brain A β Amyloidosis in APPsw mice induces memory impairment with decrease of Acetylcholine, focal loss of neurons with accumulation of phosphorylated Tau. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 12) Shoji M. The study of Alzheimer's disease using transgenic mouse models. 2001 Collegium Internationale Neuro-Phychopharmacologium regional meeting, Hirosima, 2001.

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

平成 13 年度分担研究報告

目 次

母子間伝播によるマウス老化アミロイドーシス発症の可能性	22
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	樋口京一, 是永龍巳, 付笑影 森 政之
京都大学再生医化学研究所再生統御	松下隆壽, 細川昌則
アミロイドーシスにおける異常構造タンパク質の伝播	27
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	樋口京一, 是永龍巳, 付笑影 Xing Yanming, 郭占軍
京都大学再生医科学研究所再生統御	松下隆壽, 細川昌則
アミロイド組織片の移入によるマウスアミロイドーシス発症促進の可能性について	34
山口大学医学部構造制御病態学講座	石原得博, 崔 丹, 星井嘉信 河野裕夫, 権藤俊一
山口大学医学部附属病院病理部	高橋睦夫, 森本宏志
脳アミロイドーシスの治療法の検討	38
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学	東海林幹夫, 松原悦朗 阿部康二
群馬大学医学部神経内科	針谷康夫, 瓦林毅, 池田将樹
都立神経病院	平井俊策
Monensin によるマウス AA アミロイドーシスの抑制	44
山口大学医学部構造制御病態学講座	石原得博
山口大学医学部病理学第一講座	権藤俊一
山口大学医学部学生	小林成紀
山口大学医学部附属病院病理部	森本宏志
種々の動物のアミロイド線維の Amyloid enhancing factor 効果とその抑制法	49
社会保険小倉記念病院病理科	横田忠明
山口大学医学部構造制御病態学講座	河野裕夫, 星井嘉信, 権藤俊一 石原得博
山口大学医学部附属病院病理部	高橋睦夫

変異導入マウスを用いた遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析	54
山梨医科大学学生化第一講座	前田秀一郎, 伊藤禎洋
山梨医科大学精神神経科学講座	杉山仁視, 久保田正春 神庭重信
山口大学医学部構造制御病態学講座	河野裕夫, 石原得博
群馬大学医学部神経内科学講座	針谷康夫
熊本大学医学部病理学第二講座	坂下直実
熊本大学医学部臨床検査学講座	安東由喜雄
脳アミロイドを再現する種々の動物モデルの確立	59
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学	東海林幹夫, 松原悦朗 村上哲郎
群馬大学医学部神経内科	針谷康夫, 瓦林毅, 池田将樹 富所康志
lipid rafts におけるA β アミロイドの検討	64
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学	東海林幹夫, 松原悦朗
群馬大学医学部神経内科	瓦林毅, 針谷康夫, 池田将樹 富所康志
マウス AA アミロイドモデル動物	71
山口大学附属病院病院病理部	高橋睦夫, 森本宏志
山口大学医学部構造制御病態学	石原得博, 河野裕夫, 権藤俊一
山梨医科大学学生科学第一講座	前田秀一郎
SCID-hIL6 transgenic mice でのヒト AL アミロイドーシス発症モデルの研究	77
山口大学大学院医学研究科応用医工学系生体シグナル解析医学講座	河野道生, 石川秀明, 津山尚宏
アミロイド型リゾチームの小胞体での品質管理	81
山口大学農学部生物機能科学科	加藤昭夫, 宋有涛

CONTENTS

The possibility of vertical transmission of mouse senile amyloidosis	26
Keiichi HIGUCHI*	
Tatsumi KORENAGA*, Xiaoying FU*, Masayuki MORI*, Takatoshi MATSUSITA**, Masanori HOSOKAWA**	
*Department of Aging Angiology, Research Center on Aging and Adaptation, Shinshu University School of medicine	
**Field of Regeneration Control, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University	
Transmission of the pathological structure of protein in amyloidosis	33
Keiichi HIGUCHI*	
Tatsumi KORENAGA*, Yanming XING*, Xiaoying FU*, Zhanjun GUO*, Takatoshi MATSUSHITA**, Masanori HOSOKAWA**	
*Department of Aging Angiology, Research Center on Aging and Adaptation, Shinshu University School of Medicine	
**Field of Regeneration Control, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University	
Acceleration of murine amyloid by transferred amyloid-laden graft	37
Tokuhiro ISHIHARA*	
Dan CUI*, Yoshinobu HOSHII*, Hiroo KAWANO*, Mutsuo TAKAHASHI**, Toshikazu GONDO*, Hiroshi MORIMOTO**	
*Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine	
**Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital	
The study of therapy of brain A β amyloidosis	43
Mikio SHOJI*	
Etsuro MATSUBARA*, Yasuo HARIGAYA**, Takeshi KAWARABAYASHI**, Masaki IKEDA**, Shunsaku HIRAI***, Koji ABE*	
*Department of Neurology, Graduate School of Medicine and dentistry, Okayama University	
**Department of Neurology, Gunma University School of Medicine	
***Tokyo metropolitan Neurological Hospital	
The inhibitory effect of monensin on murine AA amyloidosis	48
Tokuhiro ISHIHARA*	
Toshikazu GONDO*, Seiki KOBAYASHI**, Hiroshi MORIMOTO***	
*Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine	
**Yamaguchi University School of Medicine	
***Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital	

Amyloid enhancing factor (AEF) activity of several amyloid fibrils and inhibition of AEF activity	53
---	----

Tadaaki YOKOTA*

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

*Department of Pathology, Kokura Memorial Hospital

**Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine

***Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital

Analysis of molecular basis of familial amyloidosis by using the mice carrying targeted mutations	58
---	----

Shuichiro MAEDA*

Sadahiro ITO*, Hiroo KAWANO**, Tokuhiko ISHIHARA**,
Hitoshi SUGIYAMA***, Masaharu KUBOTA***, Yasuo HARIGAYA****,
Naomi SAKASHITA*****, Yukio ANDO*****

*Department of Biochemistry, Yamanashi Medical University

**Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine

***Department of Neuropsychiatry, Yamanashi Medical University

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

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

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

Development of several animal models demonstrating brain A β amyloidosis for Alzheimer's disease	63
--	----

Mikio SHOJI*

Yasuo HARIGAYA**, Takeshi KAWARABAYASHI**, Masaki IKEDA**,
Yasushi Tomidokoro**, Etsuro MATSUBARA*, Tetsuro MURAKAMI*

*Department of Neurology, Neuroscience, Biophysiological Science,
Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry

**Department of Neurology, Gunma University School of Medicine

Analysis of amyloid β protein in lipid rafts	70
--	----

Mikio SHOJI*

Takeshi KAWARABAYASHI**, Yasuo HARIGAYA**, Masaki IKEDA**,
Yasushi TOMIDOKORO**, Etsuro MATSUBARA**

*Department of Neurology, Neuroscience, Biophysiological Science,
Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry

**Department of Neurology, Gunma University School of Medicine

An experimental model mouse of AA amyloidosis 76

Mutsuo TAKAHASHI*

Hiroo KAWANO**, Tokuhiko ISHIIHARA **, Shuichiro MAEDA ***, Dan CUI**

Yoshinobu HOSHII**, Hiroshi MORIMOTO*, Toshikazu GONDO**

*Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital

**Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine

***First Department of Biochemistry, Yamanashi Medical University

Establishment of an experimental model inducing human AL amyloidosis in SCID-hIL6 transgenic mice 80

Michio M. KAWANO

Department of Bio-Signal Analysis, Applied Medical Engineering Science, Graduate School of Medicine, Yamaguchi University

Quality Control of Amyloidogenic Lysozymes in Endoplasmic Reticulum in Yeast 85

Akio KATO

Department of Biological Chemistry, Yamaguchi University

母子間伝播によるマウス老化アミロイドーシス発症の可能性

分担研究者 樋口京一*

共同研究者 是永龍巳* 付笑影* 森政之*

松下隆壽** 細川昌則**

研究要旨

スクレイパーでは母子間感染（垂直感染）が報告されている。また家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) で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おり、親子間でのアミロイドーシス垂直伝播の可能性が考えられる。本研究では、そのアミロイドーシスの垂直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。アミロイドーシス発症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垂直伝播の可能性が示唆された。この現象は、anticipation を説明する上でも重要な知見と考えられる。

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 (AApoAII) 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出ししている¹⁾。

一方、家族性アミロイドポリニューロパチー (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²⁾、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³⁾。

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垂直伝播により発症年齢の若齢化が認められることが考えられる。

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垂直伝播の可能性を検証し、マウスモデルの有用性について検討する目的で研究を行った。

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

* 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

** 京都大学再生医化学研究所再生統御

抽出し⁴⁾、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R1P1-*Apoa2^c* 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、出産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が哺育、及びその逆)を行った。

仔マウスを生後一定期間経過後に屠殺し、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による変化を調べた。

(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、信州大学医学部動物実験委員会の承認の下に、信州大学医学部の動物実験に関する指針に沿って行った。

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(図1)、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

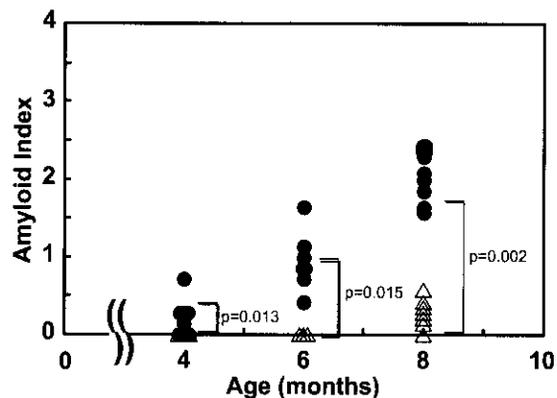


図1 アミロイドーシス発症マウスの仔マウスと非発症マウスの仔マウスの全身のアミロイド沈着レベルの加齢変化

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て哺育した結果、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(表1)、両者の間には有意な差が認められた($p = 0.04$, Fisher直接法)。

表1 雌親交換哺育における仔マウスのアミロイドーシス発症頻度(4ヶ月)

Exchange	Number	Amyloidosis	
		positive	negative
Amyloid deposited → Control	11	0	11
Control → Amyloid deposited	10	4	6

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、母親から子供

ヘアミロイドーシスが伝播する可能性があることをも意味すると考えられる。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おり⁵⁾、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。

結 論

AApoAII好発系であるR1. P1-*Apoa2^c* 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、マウスモデルの有用性が示された。また、予備的であるが母乳経由の母子間伝播の可能性が考えられる。

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) 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).
- 3) Yamamoto K, Ikeda S, Hanyu N, et al. A pedigree analysis with minimised ascertainment bias shows anticipation in Met30-transthyretin related familial amyloid polyneuropathy. *J Med Genet.* 35, 23-30 (1998).
- 4) 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).

- 5) Xing Y, Nakamura A, Chiba T, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest*, 81, 493-499 (2001).

研究発表

1. 論文発表

- 1) Xing Y, Nakamura A, Higuchi K, et al. 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, Higuchi K, et al. Extrahepatic 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.* 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 Clinica* 16: 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, Higuchi K, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. IXth International Symposium on Amyloidosis. Budapest

(2001. 7)

- 2) Xing Y, Fu X, Higuchi K, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. CGGH Symposium. Sapporo (2001. 8)
- 3) 付笑影、是永龍巳、樋口京一、他：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 東京 (2001. 4)
- 4) 是永龍巳、森政之、付麗、松下隆壽、細川昌則、樋口京一：*Apoa2^a* 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 東京 (2001. 4)
- 5) 樋口京一、付笑影、石原得博、他：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 大阪 (2001. 6)
- 6) 是永龍巳、森政之、樋口京一、他：*Apoa2^a* 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 大阪 (2001. 6)
- 7) 郭占軍、森政之、樋口京一、他：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 (2001. 6)
- 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 京都 (2001. 7)
- 9) 郭占軍、森政之、樋口京一、他：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 京都 (2001. 7)
- 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 小樽 (2001. 11)
- 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」名古屋 (2001. 11)

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