

The possibility of vertical transmission of mouse senile amyloidosis

by

Keiichi HIGUCHI*

Tatsumi KORENAGA*, Xiaoying FU*, Masayuki MORI*,

Takatoshi MATSUSITA**, Masanori HOSOKAWA**

From

*Department of Aging Angiology, Research Center on Aging and Adaptation, Shinshu University School of Medicine

**Field of Regeneration Control, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University

In mouse senile amyloidosis, apoA-II polymerized to amyloid fibrils (AApoAII) and deposited systemically. Using mouse senile amyloidosis, we studied the vertical transmission of amyloidosis. AApoAII isolated from aged R1.P1-*Apoa2^c* mice were injected intravenously into 2 months old female R1.P1-*Apoa2^c* mice. 3 months after injection, the female mice in which amyloidosis was induced were mated with male mouse that has no amyloid deposition. Senile amyloidosis in the mice born from amyloid-deposited mother mice was accelerated significantly. At 4 months of age, AApoAII fibrils were detected in the intestine. The mice born from control mice and lactated by the mother mice in which amyloidosis was induced also had AApoAII fibrils in the intestine at 4 months age. On the other hand, the mice born from amyloid-deposited mice and lactated by the control mother mice had no amyloid deposition at 4 months age.

These results indicate possibility of vertical transmission of AApoAII amyloidosis by way of milk.

アミロイドーシスにおける異常構造タンパク質の伝播

分担研究者 樋 口 京 一*

共同研究者 是 永 龍 巳*

郭 占 軍*

Xing Yanming*

付 笑 影*

松 下 隆 壽**

細 川 昌 則**

研究要旨

病的なタンパク質の構造(アミロイド線維)によるアミロイドーシスの伝播について、マウスアミロイドーシスモデルを用いて以下の3点の検討を行った。①マウス飼育室内の年度ごとのアミロイドーシスの発症程度の変化を調べ、アミロイドーシスの水平伝播の可能性を明らかにした。②ヒト及びマウスの各種アミロイド線維投与によるAApoAIIアミロイドーシスの誘発を行い、動物種やアミロイドタンパク質の相違によるbarrierを越えたアミロイドーシスの伝播の可能性を明らかにした。③C57BL/6マウスに1.0%硝酸銀水溶液の皮下投与によって炎症を惹起すると同時に各種アミロイド線維を投与した結果、10日後にAAアミロイド沈着を認めた。AApoAIIアミロイドーシスと同様にAAアミロイドーシスでも動物種やアミロイドタンパク質の相違のbarrierを越えたアミロイドーシスの伝播が明らかになった。

以上の結果より、アミロイドーシスの水平伝播の危険性が指摘された。また様々なアミロイド線維構造によるアミロイドーシスの誘発は、食物中や環境中のアミロイド線維様構造を持つ物質が体内に入り、アミロイドーシスを発症する危険性を示唆しており¹⁾、他のアミロイドーシスでの同様な危険性の有無の確認²⁾、アミロイド物質の同定のために高感度の検出系の開発が急務であると考えられる。

研究目的

アミロイドーシスは本来生理的機能を持つタンパク質が突然変異、炎症、加齢等に伴って、微細なアミロイド線維を形成し組織に障害を与える疾患の総称であり、現在20種以上のアミロイドタンパク質が報告されている。マウスではHDLのアポタンパク質であるapoA-IIがアミロイド線維(AApoAII)を形成し全身に沈着する。本研究班で我々はアミロイドーシスの発症機構と予防・治療

方法をマウスAApoAIIアミロイドーシスを用いて解析してきた。特に、既存のアミロイド線維が外部から侵入し、生体内のアミロイドタンパク質の構造を自らと同一の構造へ変換させながら線維を伸長させることによって、アミロイドーシスの誘発・促進を引き起こす「病的タンパク質構造の伝播」説を提唱し、検証してきた。すなわちアミロイドーシスの一つであるプリオン病に見られる異常構造タンパク質による伝播が他のアミロイドーシスでも起こるのかを動物モデルを用いて検討する事が主要な目的であった。昨年度までの研究でアミロイド線維の経口伝播、食糞によると思

* 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

** 京都大学再生医科学研究所再生統御

われる個体間の伝播を明らかにしたが^{1,2)}、本年度は①マウス飼育室内でのアミロイドーシスの水平伝播はあるのか？ ②ヒトとマウス組織より精製、あるいはリコンビナントタンパク質より作成した各種のアミロイド線維にAApoAII沈着の誘発力はあるのか？ ③AAアミロイドーシスでも同様な伝播が起こるのか？ を検討した。これらの研究から、実際のアミロイドーシスの伝播の危険性や、アミロイド線維による動物種、あるいはアミロイドタンパク質の種類を越えた伝播を検証し、各アミロイド線維間の相互作用を解析しようとした。

研究方法

マウス：アミロイドーシスを好発する apoA-II の C allele (*Apoa2^c*) を持つ congenic マウス R1.P1-*Apoa2^c* を用いた。1998年に京都大学再生医科学研究所で飼育されていた R1.P1-*Apoa2^c* に帝王切開によるクリーニングを行い、信州大学医学部附属動物実験施設へ導入した。C57BL/6 マウスは日本 SLC より購入した。

アミロイドーシスの伝播の検証：現在までに信州大学で飼育した R1.P1-*Apoa2^c* マウスでの発症程度を調べ、マウスの誕生時期とアミロイドーシス発症程度との関係を調べた。

ヒト AA (甲状腺)、ATTR (Met30Val, 心臓)、AL (脾臓)、A β 2M (手根管靭帯) 及びマウス AA (肝臓)、C 型 AApoAII (肝臓)、A 型 AApoAII (小腸) の各種アミロイド線維を Pras らの方法で、水抽出分画として分離・精製した。合成 A β 1-40 (ヒト) ペプチドからアミロイド線維を作成した。またリコンビナントヒト α -synuclein, lysozyme, GroES からアミロイド線維を試験管内で作成した。2ヶ月齢 R1.P1-*Apoa2^c* マウスにこれらのアミロイド線維を静注 (0.1mg) し、3ヶ月及び6ヶ月経過後に屠殺し、全身の AApoAII 沈着をコンゴレッド及び免疫染色によって確認し、アミロイド沈着レベルの指標である Amyloid Index (肝、脾、心、胃、皮膚、舌、小腸のアミロイド沈着の評点の平均値) を求めた。また、2ヶ月齢 C57BL/6 マウスに 1.0% 硝酸銀水溶液 (500 μ l) を皮下投

与し、同時に各アミロイド線維を尾静脈に投与した。10日後に屠殺し、全身の AA アミロイド沈着を調べた。

(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

飼育室内水平伝播の検討：1998年後期 (7~12月) に生まれたマウスでは 24ヶ月齢でもほとんどアミロイド沈着が認められないが、1999年前期 (1~6月)、後期、2000年前期と誕生時期が進むに従い、アミロイドーシスの沈着開始月齢の若齢化と、沈着程度の重篤化が観察された。信州大学では 1999年よりアミロイドーシス誘発実験を開始し、アミロイドーシス発症マウスを作成している。現在では同一飼育室内での無誘発・自然発症アミロイドーシスの沈着時期・程度は京都大学の conventional 条件下での飼育マウスと同程度にまで促進された。この結果は飼育室内でのアミロイドーシスの拡散・促進を示唆している。

アミロイドーシスの伝播の検証：AApoAII アミロイドーシスを最も強く誘発したのは、R1.P1-*Apoa2^c* マウスに沈着したアミロイドである C 型 AApoAII を投与した場合であった (表 1)。Amyloid Index は 3ヶ月で 2.2、6ヶ月で 3.2 に達する。沈着レベルは C 型 AApoAII 投与より軽度であるが、投与後 6ヶ月では全てのアミロイド線維でアミロイドーシス誘発能が認められた。Amyloid Index はヒト AA、ATTR、A β 2M 投与でそれぞれ、2.2、1.5、0.8 であった。リコンビナント α -synuclein, lysozyme, GroES から形成された線維の投与でも 6ヶ月後には 3種ともアミロイド沈着を誘発した (Amyloid Index はそれぞれ 1.5、0.5、1.2)。これらの結果に対し非投与群ではアミロイド沈着が認められなかった。また、線維構造を持たないヒトアルブミン及びヒトトランスサイ

表1 各種アミロイド線維投与による AApoAII アミロイドーシスの誘発

Strain	Amyloid fibrils	Origin*	Month	Mice** (positive)	Amyloid index (average)
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human AA	T	3	6 (6)	1.1
			6	9 (9)	2.1
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human A β 1-40	SP	3	3 (2)	0.7
			12	3 (3)	1.7
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human ATTR (Met30Val)	T	3	5 (3)	0.4
			6	3 (3)	1.6
			12	4 (4)	3.3
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human AL-1	T	3	5 (5)	0.6
			6	6 (6)	1.4
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human AL-2	T	3	3 (0)	0
			6	3 (3)	0.8
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human A β 2 M	T	3	7 (2)	0.1
			6	8 (8)	1.5
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Mouse AApoAII(C)	T	3	14(14)	2.4
			6	9 (9)	3.3
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Mouse AApoAII(A)	T	3	7 (7)	1.3
			6	7 (7)	2.5
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Mouse AA	T	3	4 (4)	0.3
			6	5 (5)	2.1
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human α -synuclein	R	3	4 (2)	0.1
			6	4 (4)	1.0
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human lysozyme	R	3	3 (0)	0
			6	5 (4)	0.5
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human GroEs	R	3	3 (3)	0.1
			6	5 (5)	1.3
SAMR1	Human TTR	T	3	3 (0)	0
			12	3 (0)	0
SAMR1	Human A β 1-40	T	3	5 (0)	0
			6	3 (0)	0
			12	2 (0)	0
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human albumin	S	3	5 (0)	0
			6	6 (0)	0
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	Human TTR	S	3	5 (0)	0
			6	5 (0)	0

* T: 組織から抽出, SP: 合成ペプチドから作成したアミロイド線維, R: リコンビナントタンパク質から作成したアミロイド線維, S: 市販のタンパク質

** 使用した雌マウスの匹数。() の数字はアミロイド沈着が確認された匹数

レチン投与群についても、投与後3、6ヶ月のどちらでもアミロイド沈着が認められなかった。沈着組織の免疫組織化学検査や各組織から抽出したアミロイド線維画分の Western blotting の結果、AApoAII の沈着が確認された。

実験的 AA アミロイドーシスの場合でもアミロイド線維投与によるアミロイドーシスの誘発が確認された。マウス AA アミロイド線維投与によるアミロイド沈着が最も強く、アミロイド沈着は脾

臓、小腸、肝臓、心臓で観察された (Amyloid Index は 1.5)。アミロイドーシス誘発の程度はヒト AA、マウス C 型 AApoAII、リコンビナント α -synuclein, GroES の順であった(表2)。いずれの場合でもアミロイド沈着は脾臓から開始した。唯一 Lysozyme アミロイド線維の投与では、アミロイドの誘発は認められなかった。いずれの場合も AA タンパク質の沈着が確認されたが、AApoAII の沈着はなかった。

表2 各種アミロイド線維投与によるAAアミロイドーシスの誘発

Strain	Amyloid fibrils	Mice** (positive)	Amyloid index (average)
C57BL/6	mouse AA	9 (9)	1.6
C57BL/6	AApoAII(C)	9 (9)	1.0
C57BL/6	AApoAII(A)	10(3)	0.2
C57BL/6	human AA	10(9)	1.5
C57BL/6	human AL	4 (4)	0.8
C57BL/6	human ATTR	5 (3)	0.1
C57BL/6	α -synuclein	10(4)	0.6
C57BL/6	GroEs	5 (1)	0.2
C57BL/6	lysozyme	10(0)**	0
SAMR1	mouse AA	7 (7)	1.4
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	mouse AA	8 (8)	1.0
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	human AA	4 (1)	0.2
R1.P1- <i>Apoa2^c</i>	human AL	5 (0)	0

* 使用した雄マウスの匹数。() の数字はアミロイド沈着が確認された匹数

** 雌マウスを使用した

考 察

従来アミロイドーシスはプリオン病に代表される伝播性 (transmissible) アミロイドーシスとその他の非伝播性 (nontransmissible) アミロイドーシスに分類されてきた。我々は昨年度までに、AApoAII アミロイド線維の消化管投与で経口伝播が起こること、アミロイド発症マウスと同居したマウスでのアミロイドーシスの発症促進を明らかにするなど、アミロイドーシスの伝播性を実証してきた。本年度はマウス飼育室で、アミロイドーシス発症の若齢化と重篤化が進行していることを示し、アミロイドーシスの拡散・促進、すなわち水平伝播の可能性を示唆した。発症促進の原因として、微生物の感染等も考えられるが、我々はアミロイド線維の個体間の伝播の可能性を考えている。その伝播経路の解明が重要である。本年度の班会議では是永らがAApoAII アミロイドーシスの母マウスから仔への垂直伝播の可能性を示唆した。今後このような水平・垂直伝播が他のアミロイドーシスでも成立するのか早急に検討する

必要がある。

また昨年度には予備的にはあったが種々のヒト及びマウスアミロイド線維の投与がマウスAApoAII沈着の促進を示すこと、すなわちアミロイド線維の種類を越えた、アミロイド線維の共通構造によるアミロイドーシスの誘発 (伝播) が起こる事を示した。本年度の研究ではリコンビナントタンパク質 (α -synuclein, lysozyme, GroES) から作製したアミロイド線維を用いて、他の夾雑物の混入 (他のタンパク質、核酸、微生物等) の可能性を除去した。さらにAApoAIIアミロイドーシスに加えてAAアミロイドーシスでも同様な伝播が成り立つ可能性を示した。これらの結果から、AApoAIIのみならずAAアミロイドーシスにおいても、アミロイド線維による伝播が起こりうる事が確認された。このような伝播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ときに最も強い発症促進効果が認められ、異なるときには促進効果が弱くなる。これらの結果はプリオンの感染で指摘されている動物種のbarrier

がアミロイドーシスの伝播でも存在するが、この barrier を越えて伝播する可能性を示唆している。特にマウスとヒト AA 線維には誘発程度に有意な差が存在しなかった。

全てのアミロイド線維には共通した形態学的 (アミロイド線維の電顕像、コンゴ赤染色後の緑色偏光など)、生化学的 (Thioflavin T との蛍光や β 構造、線維核投与による試験管線維形成促進など) 性質が存在する。我々が示した結果はアミロイドーシス伝播について、全てのアミロイド線維に共通する構造によるアミロイドーシスの誘発 (共通性) と、各線維毎に構造の特異性が存在し、互いに相互作用しながら線維形成の調節を行う可能性があると考えられる。最近酵母でのプリオンタンパク質や大腸菌でもアミロイド線維の産生が報告されている^{3,4)}。また、牛ではかなりの頭数において AA アミロイドーシスの発症が報告されているし他の食用動物におけるアミロイド沈着も報告されている⁵⁾。したがってアミロイドーシスにおける発症を調節する重要な要因として、アミロイド線維の侵襲を考える必要があり、これらの同定と排除が必要と考える。

結 論

アミロイド線維形成においては、アミロイド線維に共通する線維構造が線維形成を促進する可能性が示唆される。アミロイドーシス促進の程度はアミロイド線維とアミロイドタンパク質間の組み合わせによって変わる。

健康危険情報

AApoAII アミロイドーシスにおける水平伝播の可能性が示された。また各種アミロイドーシス発症にアミロイド線維様物質の外部からの侵襲が関与する可能性が考えられる。食事や生活環境内にアミロイド線維が存在するかなど今後の検討が必要である。

[引用文献]

1) Higuchi K, Kogishi K, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fi-

bril conformation-dependent. Lab Invest 78: 1535-1542, 1998.

- 2) Xing Y, Nakamura A, Chiba T, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. Lab Invest 81: 493-499, 2001.
- 3) Santoso A, Chien P, Osherovich LZ, and Weissman JS. Molecular basis of a yeast prion species barrier. Cell 100: 277-288 2000.
- 4) Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, et al. Role of Escherichia coli Curli operons in directing amyloid fiber formation. Science 259: 851-855, 2002.
- 5) Landman WJ, Sletten K, Koch CA, Tooten PC, Gruys E. Chicken joint amyloid protein is of the AA-type I Characterization of the amyloid protein. Scand J Immunol 43: 210-218. 1996.

研究発表

1. 論文発表 (原書)

- 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. IX th International Symposium on Amyloidosis (2001. 7) Budapest.
- 2) Xing Y, Fu X, Higuchi K, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. CGGH Symposium (2001. 8) Sapporo.
- 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、姚俊潔、付笑影、Xing Yan-ming、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 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

Transmission of the Pathological Structure of Protein in Amyloidosis

by

Keiichi HIGUCHI*

Tatsumi KORENAGA*, Yanming XING*, Xiaoying FU*, Zhanjun GUO*,
Takatoshi MATSUSHITA**, Masanori HOSOKAWA**

From

*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

We had studied the transmission of the pathological structure (amyloid fibrils) of proteins using mouse models of amyloidosis. In mouse senile amyloidosis, apoA-II polymerizes to amyloid fibrils (AApoAII) and deposits systemically. Here, we found that the incidence and the degree of spontaneous AApoAII amyloidosis increased year after year in our mouse-room in Shinshu University. This result suggested the possibility of horizontal transmission of amyloidosis. We studied the induction of AApoAII amyloidosis by various human and mouse amyloid fibrils that were isolated from human and mouse tissues and formed in vitro from synthetic peptides and recombinant proteins. Induction by human amyloid fibrils indicated the cross-species transmission of amyloidosis. C57BL/6 mice were injected subcutaneously with 1.0 % AgNO₃ and intravenously with various human and mouse amyloid fibrils. We observed the induction of AA amyloidosis by injection of various amyloid fibrils and indicated the transmission of AA amyloidosis.

These results suggested that the invasion of exogenous substances with amyloid fibrils like structures in foods and environment may act as seeds and trigger the conformational change of endogenous amyloid proteins to polymerize into amyloid fibril. It is urgently necessary to verify the horizontal transmission in another amyloidosis and examine amyloid fibril like-substance in our environment.

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

分担研究者 石原得博*

共同研究者 崔丹* 星井嘉信* 河野裕夫*

高橋睦夫** 権藤俊一* 森本宏志**

研究要旨

アミロイドーシス沈着臓器からの抽出物には実験的アミロイドーシスの前アミロイド期を著しく短縮させる作用がある物質が存在し、そのような性質がある物質を amyloid enhancing factor (AEF) と呼ぶ。今まで AEF またはアミロイド線維をアミロイド沈着臓器から抽出し、静脈、腹腔内注射または経口投与によりその作用が検討されてきた。今回、アミロイドの沈着した組織片を健常マウスに移入することによるアミロイドの発症促進効果について検討した。AA アミロイド線維または AApoA II アミロイド線維の沈着した組織片の移入でもアミロイド発症促進効果が認められた。

研究目的

Amyloid enhancing factor (AEF) はアミロイドーシスの発症までの期間を著しく短縮させる能力を持つ特異的な生理活性物質である。最近、樋口ら¹⁾や我々²⁾により、アミロイド線維にプリオン病と同様の機序でアミロイドーシスを伝播する可能性が示唆された。今回、アミロイドの沈着した組織片を健常マウスに移入することによるアミロイドの発症促進効果について検討した。

研究方法

実験は二つのグループに分けて行なった。実験 I : 健常の 6 週令 AKR マウスの肝臓内に AA アミロイドの沈着した肝臓組織片 (約 1.5mm × 4mm

の大きさ) を移入し、次の日から 10% カゼインを 6 日間連続皮下注射し、8 日目に屠殺後、脾臓、肝臓、腎臓、消化管を摘出した。実験 II : 凍結保存された AApoA II アミロイドの沈着したマウスの腎臓組織片 (約 1.5mm × 4mm の大きさ) を 6 週令 AKR マウスの肝臓内に移入し、無処置で 12 週間飼育後、10% カゼインを 6 日間連続皮下注射し、8 日目に屠殺後、脾臓、肝臓、腎臓、消化管、舌、皮膚を摘出した。対照としてはアミロイド組織片のかわりに正常の肝臓または腎臓組織片を移入した。

摘出した臓器のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、HE、CR 染色を行なった。CR 染色標本は偏光顕微鏡で観察し、アミロイド沈着の有無を調べた。また、抗マウス AA 抗体と抗マウス AApoA II 抗体を一次抗体として免疫染色も行なった。

* 山口大学医学部構造制御病態学講座

** 山口大学医学部附属病院病理部

(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、また実験、屠殺に際しては苦痛が最小限になるように配慮し、山口大学医学部動物実験委員会の承認の下に、山口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

実験Ⅰのグループでは5匹中5匹のマウスの脾臓にAAアミロイドの沈着が認められた。実験Ⅱでは4匹中3匹のマウスの脾臓にAAアミロイドの沈着が、4匹中4匹のマウスの舌、皮膚または消化管にAApoAⅡアミロイド沈着がみられた。対照マウスではアミロイドの沈着が認められなかった。

考 察

ヒトまたはマウスのアミロイドが沈着していた臓器をホモジネートし、腹腔内または経口投与に炎症刺激を加えれば、実験的アミロイドーシスの発症を促進するという“transfer amyloid”仮説³⁾を裏付けた。今回、われわれはタイプの異なるアミロイド組織片を健常マウスに移入することにより実験的アミロイドーシスの発症を促進することを確認した。移入した組織片の生着は見られなかったが、アミロイド沈着は12週間(実験Ⅱ)を経ても吸収されなかった。近年、臓器移植が盛んに行われているが、臓器移植の安全性、特にドナーの臓器のアミロイド沈着の有無について慎重に確認する必要があるかもしれない。

結 論

AAアミロイド線維やAApoAⅡアミロイド線維の沈着した組織片の移入でもアミロイド発症促進効果が認められ、臓器移植を踏まえて、その機序の解明のためにさらなる検討が必要である。

健康危険情報

なし

[引用文献]

- 1) Xing YM, Nakamura A, Higuchi K, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest* 81, 493-499 (2001).
- 2) Cui D, Kawano H, Takahashi M, Hoshii Y, Setoguchi M, Gondo T, Ishihara T. Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. *Pathol Int* 52, 40-45 (2002).
- 3) Varga J, Flinn MSM, Shirahama T, et al. The induction of accelerated murine amyloid with human splenic extract. *Virchows Arch B*. 51, 177-185 (1986).

研究発表

1. 論文発表
- 1) Cui D, Takahashi M, Ishihara T, et al. Acceleration of AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. *Pathol Int* 2002;52:40-45.
- 2) Matsutani H, Takahashi M, Ishihara T, Yokota T, et al. Vascular amyloid of unknown origin and senile TTR amyloid in the lung and gastrointestinal tract of old age: histological and immunohistochemical studies. *Pathol Int* 2001;51:257-263.
- 3) Hoshii Y, Takahashi M, Ishihara T, et al. Useful polyclonal antibodies against synthetic peptides corresponding of immunoglobulin light chain amyloidosis. *Pathol Int* 2001;51:264-70.
- 4) 内野文彌、石原得博、高橋睦夫、横田忠明。網内系とアミロイドーシスー研究の過去と現在ー日本網内系学会雑誌 2001;40:185-194.
- 5) 高橋睦夫、石原得博。アミロイドーシスとマクロファージ 代謝異常症とマクロファージ 353-358.

2. 学会発表

- 1) 河野裕夫、崔 丹、瀬戸口美保子、石原得博、内野文彌：マウス実験的 AA アミロイドーシスには IL-6 が不可欠である。第 90 回日本病理学会総会 東京 (2001. 4)
- 2) 星井嘉信、瀬戸口美保子、岩田隆子、石原得博：AL アミロイドーシスを免疫組織化学的に診断しうる抗体の作製および組織切片への適用。第 90 回日本病理学会総会 東京 (2001. 4)
- 3) 石原得博：代謝性疾患、特にアミロイドーシスの診断への応用。第 91 回日本病理学会総会 神奈川 (2002. 3)
- 4) 横田忠明、河野裕夫、星井嘉信、権藤俊一、高橋睦夫、石原得博：Fibril-amyloid enhancing factor(F-AEF) の抑制について。第 91 回日本病理学会総会 神奈川 (2002. 3)
- 5) 崔 丹、高橋睦夫、石原得博、他。：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効果について。第 91 回日本病理学会総会 神奈川 (2002. 3)
- 6) 上野徹、高橋睦夫、石原得博、他：口腔、咽頭、喉頭の扁平上皮癌に伴うアミロイドの免疫組織化学的検討。第 91 回日本病理学会総会 神奈川 (2002. 3)
- 7) 山崎里恵、大原信哉、星井嘉信、石原得博、赤木忠厚：後天性第 V 因子欠乏症を合併した全身性アミロイドーシスの 1 剖検例。第 91 回日本病理学会総会 神奈川 (2002. 3)
- 8) 付笑影、是永龍巳、松下隆寿、細川昌則、馬場聡、内木宏延、徳田隆彦、池田修一、河田康志、石原得博、森政之、樋口京一：種を超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 II。第 91 回日本病理学会総会 神奈川 (2002. 3)
- 9) 権藤俊一、小林成紀、森本宏志、星井嘉信、河野裕夫、石原得博：Monensin によるマウス AA アミロイドーシスの抑制。第 91 回日本病理学会総会 神奈川 (2002. 3)

Acceleration of murine amyloid by transferred amyloid-laden graft

by

Tokuhiro ISHIHARA*

Dan CUI*, Yoshinobu HOSHII*, Hiroo KAWANO*, Mutsuo TAKAHASHI**,

Toshikazu GONDO*, Hiroshi MORIMOTO**

From

*Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine

**Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital

We now report that experimental murine AA amyloid deposition is accelerated by transferred murine amyloid-laden graft. The recipient mice were divided into two groups. Group 1: Murine amyloid (AA type)-laden liver grafts were transferred to health recipient mice. From the next day, the recipient mice received daily 0.5ml of 10% casein injection, and on the 7th day, they were sacrificed. Amyloid deposits were detected in 5 out of 5 recipient mice, and was AA type. Group 2: Murine amyloid (AApoA II type)-laden renal grafts were transferred to health recipient mice. The recipient mice were kept without any further treatment. After 12 weeks, the recipient mice received daily 0.5ml of 10% casein injection, and on the 7th day, they were sacrificed. In the spleen amyloid depositions were found in 3 out of 4 recipient mice, the amyloid deposits were classified as AA type. In the tongue, the skin or in the intestine, amyloid depositions were found in 4 out of 4 recipient mice, the amyloid deposits were classified as AApoA II type. No amyloid deposits were detected in control mice.

These results indicate that experimental murine AA amyloid deposition is accelerated by transferred murine amyloid-laden graft.

東海林 幹 夫

脳アミロイドーシスの治療法の検討

分担研究者 東海林 幹 夫*

共同研究者 松 原 悦 朗* 針 谷 康 夫** 瓦 林 毅**

池 田 将 樹** 平 井 俊 策*** 阿 部 康 二*

研究要旨

脳アミロイドーシスを再現する動物モデルの開発を行い、脳アミロイドーシスの治療法を検討した。脳アミロイドーシスを再現する APPsw マウスを用いて¹⁾、A β 42ワクチン療法の効果²⁾、ワクチン療法における最も危険な副作用と考えられる構造変化を来した A β の混入によるアミロイド沈着促進効果³⁾、メラトニンによる A β 凝集抑制による脳アミロイド抑制作用を検討した。A β 42ワクチン療法では脳アミロイドとして沈着している不溶性 A β 42 の 43% を抑制していた。投与されたマウスに死亡例がみられ副作用の詳細な検討が必要と思われた。ヒト脳アミロイドから抽出した A β oligomer は一旦脳内に注入されると代謝に抵抗性で 5 ヶ月以上存在し、A β アミロイドの形成を促進していた。メラトニンは 8 ヶ月齢から 11 ヶ月齢まで動物モデルにおける脳アミロイド沈着を抑制した。メラトニンは現実に使用されている薬剤であり、現実の臨床応用に向けたさらなる詳細な検討が必要と考えられた。

研究目的

脳アミロイドーシスはアルツハイマー病と脳血管アミロイドアンギオパチーにともなう脳血管障害患者にみられる特徴的变化である。この 2 つの疾患は社会の高齢化とともに近年、急増しており、両疾患の原因である脳アミロイドーシスの早急な治療法の確立が求められている。さらに、アルツハイマー病患者脳では脳アミロイドとともに神経原線維変化も出現するため、この 2 つの病理的变化の発現機序や関連と治療法の開発も求められている。我々はこの目的のために脳アミロイドーシ

スや神経原線維変化を再現する動物モデルの開発を行い、脳アミロイドの形成機序を解明してきた。この結果、脳アミロイドーシスがより本質的な治療の対象であることが明らかとなったため、本年度は脳アミロイドーシスを再現する APPsw マウスを用いて¹⁾、A β 42ワクチン療法の効果のさらなる検討²⁾、ワクチン療法における最も危険な副作用と考えられる構造変化を来した A β の混入によるアミロイド沈着促進効果の検討³⁾、A β 凝集抑制作用を有するメラトニンが現実に動物モデルレベルでも脳アミロイドを抑制可能であるかどうかを検討した。

* 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

*** 都立神経病院

研究方法

1. 22 匹の APPsw マウスに 6 ヶ月齢 (16 匹)、

9ヶ月齢(6匹)から50 μ gのA β 42をアジュバントともに皮下注射し、A β 免疫を行った。免疫は1回/月で行い、12ヶ月齢で脳を検索した。対照として20匹の無処理 age-matched APPsw miceを用いた。半脳は4%パラフォルム固定パラフィン切片を作成し、Ab9201 および各種A β に対する抗体で免疫染色を行った。A β 沈着の評価は海馬がみえる前額断大切片をNIH imageを用いて免疫染色陽性面積の総計を計算するとともに、顕微鏡で同定された直径50~150 μ mの大型の老人斑とそれ以下の老人斑、アミロイドアンギオパチーに分けて出現数を定量した。APPsw miceの半脳をTBSと70%ギ酸で連続抽出し、鈴木らによって確立されたSandwich ELISA系を用いて経時的にA β 40、A β 42量を測定した。また、脳検索時に同時に血液を採取し、A β 42に対する抗体価の上昇を検討した。

2. アルツハイマー病患者脳約1gに1mlの2%SDSを加え、テフロンホモジェナイザーでホモジェナイズし、100,000xgで遠心した。沈査を70%蟻酸で再度抽出して得られた脳A β アミロイド凝集粗分画をさらにSuperose 12カラムを用いて、monomer(15分画)とoligomer(13,14分画)に分離して、それぞれの分画5 μ gを3.5~5ヶ月齢APPswマウス計32匹の脳内に注入し、~3ヶ月後に脳を組織学的に検索した。対照として同年齢のnon-transgenic mice 11匹を検索した。12ヶ月齢のAPPswマウス10匹と4匹のNon-transgenicマウス脳に同様の分画を打ち込んで、対照としてそれぞれ4匹のAPPswマウスとNon-transgenicマウスを用い15、17ヶ月齢で比較した。

3. メラトニンのモデル動物レベルでの脳アミロイドの蓄積抑制作用を検討するため、24匹のAPPswマウス(melatonin group)に4ヶ月齢から0.5mg/mlのmelatoninを投与した。対照として20匹の無処理APPswマウスを用いて、それぞれ8、9.5、11、15.5ヶ月齢で脳のA β 40とA β 42の蓄積量をELISAで測定して比較した。

研究結果

A β 42免疫APPsw miceは16匹の内11匹が経過中に死亡した。生存した6ヶ月開始群と9ヶ月開始群で検討した。直径50~150 μ mの大型の老人斑(Large plaque: LP)とそれ以下の老人斑(Small plaque: SP)、アミロイドアンギオパチー(Amyloid angiopathy: AA)に分けて免疫群(Im)と対照群(C)で出現数は 3.6 ± 1.7 (LPIm)、 8.8 ± 5.4 (LPC)、 7.7 ± 9.5 (SPIIm)、 47.9 ± 31.7 (SPC)、 6.6 ± 4.9 (AAIm)、 7.9 ± 6.4 (AAC)であり、免疫群で有意に大型($P=0.0058$)と小型の老人斑の抑制($P=0.0008$)が認められた。同じ切片でNIH imageを用いてA β 免疫染色陽性部位を定量すると、免疫群(Area Im)で 592 ± 184 pixelで対照群では 1028 ± 162 pixelで有意が認められた($p=0.0467$)。

次に、ELISAでA β 40およびA β 42を測定した。TBSで抽出した可溶性A β 分画では免疫群A β 40は 289 ± 355 fmol/ml(Im)、A β 42は 122.3 ± 66.6 fmol/ml(Im)であった。対照群A β 40は 1357 ± 1447 fmol/ml(Cont)、A β 42は 120.5 ± 147.1 fmol/ml(Cont)であった。蓄積したアミロイドを定量する蟻酸抽出分画では免疫群A β 40は 690.9 ± 618.6 pmol/ml(Im)、A β 42は 140 ± 78.7 pmol/ml(Im)であった。対照群A β 40は 1076 ± 990.1 pmol/ml(Im)、A β 42は 246.3 ± 165.5 pmol/ml(Im)であった。この蟻酸分画の免疫群でA β 42は43%減少しており、有意な蓄積の減少が認められた($P<0.05$)。したがって、このA β 免疫療法は脳アミロイドとして沈着したA β 42を改善すると考えられた。

ヒトA β アミロイド注入実験では32匹のAPPswマウスの内、2ヶ月後に生存したマウスでは5匹であった。死亡は注入一週間後に多く、広範な炎症壊死像と注入した脳アミロイド沈着の代謝像が観察された。注入部位以外にもA β が染色された。経時的な検討では注入したヒト脳アミロイドは塊状となって、transgenic mice群、対照群ともに認められ、3ヶ月後でも代謝されずに沈着していた。対照の生食群ではこのような変化はみられなかった。ヒトA β アミロイドを投与した

transgenic mice で3ヶ月後に注入部位の対側に新たな老人斑の出現がみられた。12ヶ月齢の5匹の APPsw マウスと2匹の non-Tg マウスに A β oligomer を打ち込んだ群では、対照の2匹の APPsw マウスと2匹の non-Tg マウスに比較して、急性期死亡例では、マクロファージ A β 、A β 沈着同様に観察された。15ヶ月齢と17ヶ月齢 Tg では注入部にマクロファージ A β と A β 沈着が残存しており、両年齢とも5例のうち3例で老人斑 A β の出現が亢進していた。non-Tg では注入部マクロファージ A β 、A β 沈着がみられ、2例で老人斑様構造物が観察された。Tg および non-Tg の両者でマウス 3pyro A β が蓄積していた。以上のことは AD 患者 A β oligomer は一度脳内に入ると分解されずに5ヶ月以上、長期間脳内に存在して、マウス A β を巻き込んで成長することを示している。したがって、ヒト A β アミロイドは一旦脳内に進入すると代謝に抵抗性で長期間存在し、A β アミロイドの形成を促進する可能性があることが示唆された。A β ワクチンの臨床応用には、以上のことより A β oligomer の危険性についてのさらに厳密な検討が必要であると考えられた。

つぎに、メラトニンのアミロイド抑制効果を APPsw mice で検討した結果では、対照 APPsw マウスに比べて8ヶ月から15.5ヶ月まで有意に脳アミロイド蓄積を抑制した。SDS 抽出 soluble A β 40 (P=0.0068)、soluble A β 42 (P=0.0366) 分画とギ酸抽出 A β 40 (P=0.0026)、soluble A β 42 (P=0.0108) 分画共に有意に抑制されていた。これを、便宜的にヒト脳 A β アミロイド蓄積抑制期間に換算するとほぼ15年間に匹敵すると考えられた。

考 察

以上のことから、A β 42 による免疫療法は明らかに脳アミロイド沈着を阻止することが可能であると思われた。ことから脳アミロイドーシスの根本的な治療は可能であると思われる。しかし、現実にはヒトに臨床応用するためには、我々の検討では途中死亡例があること、抑制効果は訳43%とそれほど大きいものではないことから、これらの動物モデルを用いて、さらに大規模な副作用や投与

方法の改善などが迅速に検討されるべきと考えられる。さらに、脳アミロイドーシスの程度と治療法の効果をヒトで評価可能な臨床マーカーの確立も急がれる。さらに、ヒト A β アミロイド注入実験では予想されたごとくアミロイド沈着促進傾向がみられたことから、アルツハイマー病の素因のあるものに、もし、構造変異した A β が投与された時には逆に脳アミロイド形成を促進する可能性が考えられた。したがって、ヒトにヒト A β 42 を投与するワクチン療法で、もし、A β 42 が構造変化を起こした A β 42 が投与された場合、逆に A β アミロイド蓄積を促進する可能性があり、A β ワクチン療法で解決すべき重要な課題と考えられた。また、A β が構造変化を起こして正常 A β を巻き込んでアミロイドとして成長するプリオンと同様な構造変化病としての基本的性格を有しているとすると、さらに問題は重要であり、今後、副作用の検討と厳密なヒト伝播に対する検討が必要とされる。メラトニンは松果体で産生されるホルモンでヒトの体内時間を調節すると考えられている。加齢とともに減少することが知られており、アルツハイマー病では著明に減少することが明らかにされている。1999年にメラトニンの A β 凝集抑制作用が明らかとなり、モデル動物レベルでの検討が期待されていた。私たちの検討は明らかにメラトニンがモデル動物レベルでも有効であることを示している。メラトニンは時差呆けや不眠の治療薬として欧米では広く使用されており、重篤な副作用も現在まで報告されていない。また、A β の凝集阻止がその主要な作用であることから、A β ワクチンに比べて脳アミロイドを促進する可能性はない、したがって、今後一刻も早い、臨床応用に向けた検討の開始が期待される。

結 論

A β 42 による免疫療法は明らかに脳アミロイド沈着を阻止する。構造変化を来してヒト脳に沈着した A β アミロイドには A β アミロイド形成促進作用がある。メラトニンが、脳アミロイド蓄積を動物レベルで抑制した。

健康危険情報

一度脳内に進入した脳アミロイド A β は長期間代謝されずに存在し、アミロイド形成を促進する可能性がある。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Shoji M, Matsubara E, Hirai H, et al. Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders: A large scale multicenter study by a Japanese study group. *Neurobiol Aging* (in press).
- 2) Shoji M and Kanai M. Cerebrospinal fluid A β 40 and A β 42: natural course and clinical usefulness. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2001;3: 313-321.
- 3) Shoji M, Kanai M, Hirai S, et al. The levels of cerebrospinal fluid A β 40 and A β 42 (43) are regulated age-dependently. *Neurobiol Aging*. 2001 Mar-Apr; 22(2): 209-15.
- 4) Wahrle S, Shoji M, Golde TE, et al. Cholesterol Dependent γ -Secretase Activity in a Lipid Raft Microdomain. *Neurobiol disease* (in Press).
- 5) Murakami T, Shoji M, Koji Abe, et al. Two Japanese CADASIL Families With a R141C Mutation in the Notch3 Gene. *Internal Medicine* (in press).
- 6) Manabe Y, Shoji M, Abe K, et al. Nocturnal blood pressure dip in CADASIL. *J Neurol Sci* 2001 Dec ; 15;193(1) : 13-6.
- 7) Takeda M, Shoji M, Yoshida H, et al. Basic and clinical studies on the measurement of β -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: multi center study in Japan. *Psychogeriatrics* 2001; 1: 56-63.
- 8) Dobrogowska DH, Shoji M, Wisniewski HM, et al. Cytochemical study of the involvement of cell organelles in formation and accumulation of fibrillar amyloid in the pancreas of NORbeta transgenic mice. *Histol Histopathol*. 2001 Oct; 16(4): 1047-56.
- 9) Manabe Y, Shoji M, Abe K, et al. Early decrease of redox factor-1 in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene. *Brain Res*. 2001 Oct 5; 915(1): 104-7.
- 10) Manabe Y, Wang JM, Murakami T, Warita H, Hayashi T, Shoji M, Abe K. Expressions of nitrotyrosine and TUNEL immunoreactivities in cultured rat spinal cord neurons after exposure to glutamate, nitric oxide, or peroxynitrite. *J Neurosci Res*. 2001 Sep 1;65(5):371-7.
- 11) Paganelli AR, Shoji M, Carrasco AE, et al. The Alzheimer-related gene presenilin-1 facilitates sonic hedgehog expression in *Xenopus* primary neurogenesis. *Mech Develop*. 2001 Sep;107(1-2):119-31.
- 12) Tomidokoro Y, Harigaya 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.
- 13) Murakami T, Nagano I, Hayashi T, Manabe Y, Shoji M, Setoguchi Y, Abe K. Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated E. coli LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene. *Neurosci Lett* 2001 Aug 10;308(3):149-52.
- 14) Urakami K, Shoji M, Nakashima K, et al. Diagnostic significance of tau protein in cerebrospinal fluid from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci* 2001 Jan ; 15 : 183(1):95-8.
- 15) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Shoji M, et al. A beta amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP (Sw) mice. *Neurosci Lett* 2001 Feb 23;299(3):169-72.
- 16) 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 2001 Jan 15;21(2):372-81.

- 17) Takenoshita H, Shoji M, Okamoto K, et al. Presynaptic inhibition of cerebellar GABAergic transmission by glutamate decarboxylase autoantibodies in progressive cerebellar ataxia. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2001 Mar;70 (3) : 386-9.

2. 学会発表

- 1) Shoji M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Ikeda M, Harigaya Y, Okamoto K, Abe K. The effect of A β 42 vaccine on Tg2576 Alzheimer model mice. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 2) Matsubara E, Sasaki A, Shoji M, et al. Platelets A β as a potential source of amyloid deposits in the wall. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 3) Kanai M, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M. A study of cerebrospinal fluid as biomarkers of Alzheimer's disease. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 4) Ikeda M, Kawarai T, Shoji M, et al. Memory loss and parkinsonism with severe Tauopathy in the fronto-temporal lobe of transgenic mice expressing R406W mutant human Tau. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 5) Kawarabayashi T, Shoji M, Wahrle S, Younkin LH, Younkin SG. Amyloid β protein accumulates in lipid rafts. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 6) Harigaya Y, Tomidokoro 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. (一般演題)

知的所有権の取得状況

1. 特許取得
Transgenic animal for Alzheimer's disease; European Patent No: 94117512.7 (94.11.07)
Transgenic mouse β -amyloid transgene; US patent No: 6,037,521 (March 14, 2000)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

The study of therapy of brain A β amyloidosis

by

Mikio SHOJI*

Etsuro MATSUBARA *, Yasuo HARIGAYA **, Takeshi KAWARABAYASHI **,
Masaki IKEDA **, Shunsaku HIRAI ***, Koji ABE *

From

*Department of Neurology, Graduate School of Medicine and dentistry, Okayama University

**Department of Neurology, Gunma University School of Medicine

***Tokyo metropolitan Neurological Hospital

We developed transgenic mice models showing human brain A β amyloidosis and evaluated candidates for curative therapy using these mice models. This examination consisted of 3 experiments: 1) A β 42 vaccine; 2) brain injection to of human A β amyloids with abnormal conformation; 3) melatonin treatment. Treatment with A β 42 vaccine decreased 43% of accumulation of brain amyloid fraction of A β 42. About a half of mice treated with A β 42 peptides died. Further evaluation of side effects of A β 42 vaccine is necessary. Purified oligomer of A β from Alzheimer's brain was injected into Tg2576 and control mice brains. Injected A β amyloids are protease resistant for 5 months. About 60% of A β amyloid injected mice showed increased amyloid burden suggesting that once A β amyloids with abnormal conformation enter into the brain, amyloids persisted long time and induce acceleration of the brain amyloidosis. Melatonin significantly inhibited the brain amyloidosis indicating rapid clinical application for treatment.

石 原 得 博

Monensin によるマウス AA アミロイドーシスの抑制

分担研究者 石 原 得 博*

共同研究者 権 藤 俊 一* 小 林 成 紀** 森 本 宏 志***

研究要旨

マウス AA アミロイドーシス (マウス AA) では、IL-1 や IL-6、TNF α などの炎症性サイトカインが、肝細胞での SAA の産生・分泌を亢進させる。monensin は Na⁺-イオノフォアの 1 つで、単球の炎症性サイトカインの分泌を抑制する。そこで、monensin がマウス AA の発症を抑制し得るかについて検討した。

ICR マウス (♀) を使用し、A 群 : monensin(2.4mg, ip, n=10)、B 群 : monensin(0.48mg, ip, n=10)、C 群 (対照群 : n=10) および D 群 : monensin(0.2mg, po, n=10)、E 群 (対照群 : n=10) とした。アミロイドーシスは Ram らの方法に準じて惹起した。アミロイド沈着は、脾臓で判定し、さらに沈着程度を共焦点レーザー走査型顕微鏡と画像解析ソフトにより定量した。

【結果】アミロイド沈着は A 群 1/2、B 群 7/8、C 群 10/10 に認め、脾臓の 1 割面あたりのアミロイドの平均面積は B 群 $0.522 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 、C 群 $1.33 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ であった ($p=0.0041$)。D 群 10/10、E 群 9/9 で、平均面積は D 群 $0.729 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 、E 群 $1.06 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ であった ($p=0.044$)。

【考察】monensin 腹腔内および経口投与によりマウス AA が抑制されることが証明された。その機序として、monensin によりマクロファージのサイトカイン分泌が抑制され、肝細胞での SAA 産生が亢進しなかったため、または肝細胞からの SAA 分泌が抑制されたためと考える。

研究目的

反応性 AA アミロイド、colchicine が有効な場合もあるが¹⁾、反応性 AA に対して著効を示す薬剤はまだ開発されてない。マウス AA アミロイドーシス (マウス AA) モデルを用いた研究から、炎症刺激によりマクロファージなどから分泌された interleukin (IL)-1 や IL-6、TNF α などの炎症性サイトカインが、肝細胞での serum amyloid

A (SAA) の産生・分泌を亢進させることが明らかにされている。

monensin は Na⁺-ionophore の 1 つで、in vitro でヒト単球の炎症性サイトカインの分泌を抑制することが知られている²⁾。我々は、in vivo の予備実験で、monensin が肝細胞の SAA 分泌を抑制することを確認した。monensin が炎症性サイトカインの分泌または SAA の産生・分泌を抑えることにより、反応性 AA の発症を抑制する可能性を、マウス AA モデルを用いて検討した。

* 山口大学医学部構造制御病態学講座

** 山口大学医学部学生

*** 山口大学医学部附属病院病理部

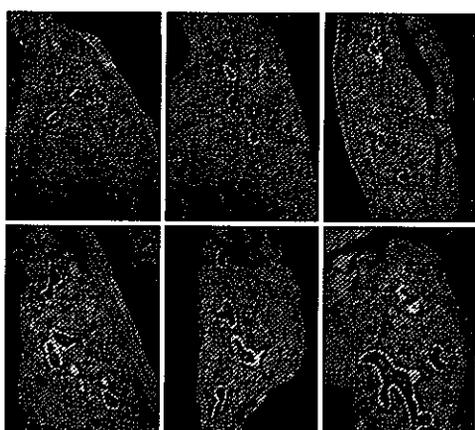


図1 脾臓の共焦点レーザー走査型顕微鏡像
脾濾胞周辺帯にアミロイドの沈着を認める
(灰色の部)。
上段：B群、下段：C群（1匹のマウスの脾
臓から作製した3割面を示す。）

研究方法

動物はICRマウス(♀)を使用し、アミロイドーシスを *Mycobacterium butyricum* の菌体粉末と complete Freund's adjuvant のエマルジョン (Adjuvant) の腹腔内投与により惹起した。アミロイド沈着の有無は、脾臓のコング赤染色標本を偏光顕微鏡で観察し判定した。さらに、アミロイドの沈着程度を共焦点レーザー走査型顕微鏡(オリンパス GB-200)と画像解析ソフト (Image-Pro Plus) により定量して比較した³⁾。

実験Ⅰ. A群: monensin sodium salt(2.4mg) 腹腔内1回投与(n=10)、B群: monensin sodium salt (0.48mg) 腹腔内7日間投与(n=10)、C群(対照群): 生理食塩水 0.5ml 腹腔内投与(n=10)とし、Adjuvant 惹起の2週間後に屠殺した。

実験Ⅱ. D群: monensin sodium salt (0.2mg) 経口投与(n=10)、E群(対照群): 生理食塩水 0.2ml 経口投与(n=10)とし、惹起の7日前から monensin sodium salt を毎日投与し、屠殺の前日まで合計21回投与した。

研究結果

実験Ⅰ: A群では8匹、B群では2匹のマウスが実験途中で死亡した。アミロイド沈着はA群

1/2、B群7/8、C群10/10に認められた。B群とC群とでは、アミロイドの沈着程度に差がみられ(図2)、脾臓の1割面あたりのアミロイドの平均面積はB群 $0.522 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 、C群 $1.33 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ であった ($p=0.0041$)。

実験Ⅱ: アミロイド沈着はD群10/10、E群9/9に認められ、脾臓の1割面あたりのアミロイドの平均面積はD群 $0.729 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 、E群 $1.06 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ であった ($p=0.044$)。図1・2に画像解析の結果を示す。

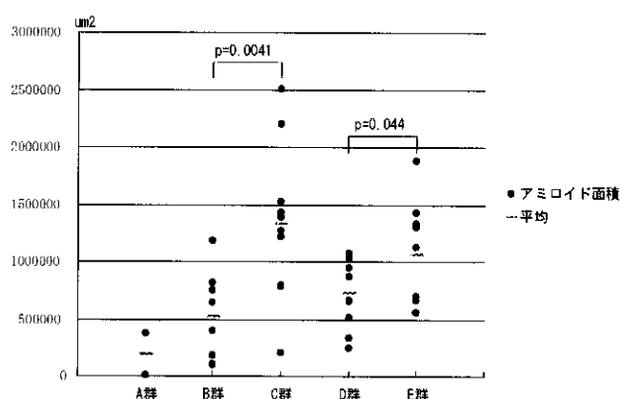


図2 画像解析結果

考察

アミロイドの沈着量を画像解析により定量した結果、monensin の腹腔内および経口投与によりアミロイド沈着が低減されることが証明された。その抑制機序として、次の機序が想定される。

1. monensin sodium salt によりマクロファージのサイトカイン (IL1 と IL 6、TNF α など) 分泌が抑制され、肝細胞での SAA 産生が亢進しなかった。
2. monensin sodium salt により肝細胞からの SAA 分泌が抑制された。
3. これらの2つの機序の相乗作用。

monensin sodium salt によるマウス AA の抑制機序を明らかにするため、今後、組織中と血中のサイトカインや SAA を定量し、さらにこれらの mRNA の発現について検討したい。