

monensin sodium salt は原虫や細菌、真菌に対する抗菌作用があり、Coban や Romensin、Rumensin として家畜などに使用されている⁴⁾。さらに、最近では、癌治療の基礎研究から monensin が抗癌剤の cytotoxicity を増強することが明らかになり、臨床応用が可能と期待されている⁵⁾。したがって、反応性 AA の患者に、アミロイドーシスの進行を抑制する目的で monensin を投与することが可能となり得ると考える。

結 論

monensin 投与によりマウス AA アミロイドーシスでのアミロイド沈着が軽減された。

健康危険情報

なし

[引用文献]

1. Zemer D, Revach M, Pras M, Modan B, Sohar E, Gafni J. A controlled trial of colchicin in preventing attacks of familial Mediterranean fever. *New Engl J Med* 291: 932-43, 1974.
2. Mori M, Yamaguchi J, Oyamada M, Enomoto K, Kaneko A. Cytochemical examination of the compartments involved in the transcellular transport of horseradish peroxidase T. Confocal observation of senile plaques in Alzheimer's disease: senile plaque morphology and relationship between senile plaques and astrocytes. *Pathol Int* 48: 332-40, 1998.
3. Phipps RH, Wilkinson JJ, Jonker LJ, Tarrant M, Jones AK, Hodge A. Effect of monensin on milk production of Holstein-Friesian dairy cows. *J Dairy Science* 83:2 789-94, 2000.
4. Lorenzetti I, Meneguzzi A, Fracasso G et al. Genetic grafting of membrane-acting peptides to the cytotoxin dianthin augments its ability to de-stabilize lipid bilay-

ers and enhances its cytotoxic potential as the component of transferrin-toxin conjugates. *Int J Cancer* 86: 582-9, 2000.

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 - 研究の過去と現在 - 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す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、星井嘉信、河野裕夫、高橋睦夫、権藤俊一、森本宏志、石原得博：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、星井嘉信、崔 丹、河野裕夫、権藤俊一、高橋睦夫、石原得博：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)

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

The inhibitory effect of monensin on murine AA amyloidosis

by

Tokuhiro ISHIHARA*

Toshikazu GONDO*, Seiki KOBAYASHI**, Hiroshi MORIMOTO***

From

*Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine

**Yamaguchi University School of Medicine

***Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital

We examined the effect of monensin on experimental murine AA amyloidosis. ICR mice given amyloidogenic stimuli according to Ram's method were divided into 5 groups. Group A: monensin(2.4mg), ip, n=10, group B: monensin(0.48mg), ip, n=10, group C: control, n =10, group D : monensin(0.2mg), po, n=10, group E: control, n=10. Amyloid deposits in the spleen were observed 1/2 in group A, 7/8 in group B and 10/10 in group C. Amyloid deposits in the sections of the spleen were analyzed with confocal laser scanning microscopy and image morphometry soft. The average amyloid area of one slice of the spleen(AAA) were $0.522 \times 10^6 \text{um}^2$ in group B and $1.33 \times 10^6 \text{um}^2$ in group C($p=0.0041$). Amyloid deposits in the spleen were observed 10/10 in group D and 9/9 in group E. AAA were $0.729 \times 10^6 \text{um}^2$ in group D and $1.06 \times 10^6 \text{um}^2$ in group E($p=0.044$). The present data showed that monensin decreased amyloid deposits in murine AA amyloidosis. The mechanism for inhibitory effect of monensin should be investigated.

横 田 忠 明

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

分担研究者 横 田 忠 明*

共同研究者 河 野 裕 夫** 星 井 嘉 信** 権 藤 俊 一**

高 橋 睦 夫*** 石 原 得 博**

研究要旨

種族、種類の異なるアミロイド線維の Fibril-amyloid enhancing factor (F-AEF) 活性の有無とその抑制方法を検討した。

白鳥、牛、マウスの AA、ヒトでは甲状腺髄様癌患者でカルシトニン由来のアミロイド (ACal)、AA、A λ に F-AEF 活性を認めた。ヒト・カルシトニン (hCal) の免疫は ACal の F-AEF 活性の抑制に効果があった。ヒト AA および ACal を抗ヒト AA 抗体および抗 hCal 抗体と混和後、各々の F-AEF 活性を調べた。F-AEF 活性の抑制効果は認めなかった。ヒト AA を NaOH、トリプシン、プロナーゼ、ペプシンおよび proteinase K 濃縮液、焼灼および煮沸処理し、F-AEF 活性を調べた。F-AEF 活性は NaOH 処理で完全に失活した。焼灼処理は F-AEF 活性の抑制にかなりの効果があった。酵素処理および煮沸処理では F-AEF 活性は抑制できなかった。

目 的

アミロイド沈着臓器からの抽出物中には実験的マウス・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) と呼び、本態の追求が行われてきたが、その詳細は未だ不明である。AEF はアミロイド線維とは異なる物質と考えられているが、アミロイド線維自体にも AEF 活性が存在することが報告され、Fibril-amyloid enhancing factor (F-AEF) と呼ばれている¹⁾。アミロイド線維の経口投与でアミロイドーシスが促進されることが

報告され²⁾、さらにアミロイド線維を介してアミロイドーシスが伝播する可能性を示唆する報告がある³⁾。そこで種族および種類の異なるアミロイド線維を抽出し、これらアミロイド線維の F-AEF 活性の有無とその抑制方法について検討した結果を報告する。

方 法

動物および各種アミロイド線維の抽出：AA アミロイドが沈着した白鳥、牛およびマウスの臓器から Pras らの方法⁴⁾により粗製アミロイドを抽出した。ヒトでは甲状腺髄様癌患者でカルシトニン由来のアミロイド (ACal)、AA、A κ 、および A λ アミロイドが沈着した臓器からアミロイドを抽出した。

* 社会保険小倉記念病院病理科

** 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

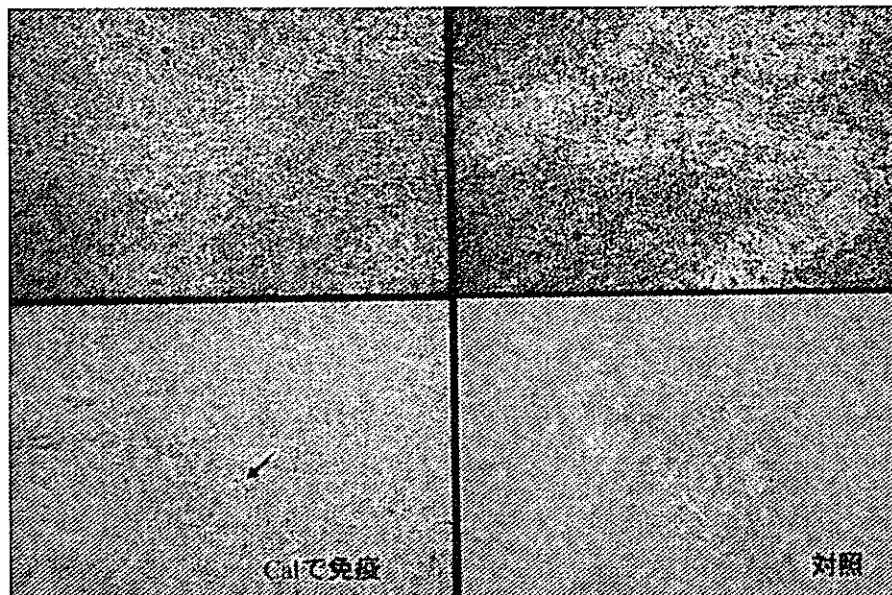


図 1

上段左：ヒト・カルシトニンで免疫したマウス脾臓の HE 染色。周辺帯にはアミロイド沈着は確認できない。

下段左：ヒト・カルシトニンで免疫したマウス脾臓をスライドガラスですり潰した後、コンゴウ・レッド染色、偏光レンズ下に観察したもの。矢印部にコンゴウ・レッド陽性、緑色の複屈折を示す極微量のアミロイドが観察される。

上段右：対照マウスの脾臓の HE 染色。周辺帯に帯状のアミロイド沈着が認められる。

下段右：対照マウスの脾臓をスライドガラスですり潰した後、コンゴウ・レッド染色、偏光レンズ下に観察したもの。コンゴウ・レッド陽性、緑色の複屈折を示す大量のアミロイドが観察される。

F-AEF 活性の検討：マウス 1 匹あたり 1 mg のアミロイド線維を腹腔内に注射し、0.5ml のカゼイン・アジュバント（10%カゼインと complete Freund's adjuvant の等量懸濁液）を皮下に注射後、7 日目に屠殺、脾臓を摘出しアミロイド沈着の有無を調べた。

F-AEF 活性の抑制法：

免疫学的処理

マウス 1 匹あたり $10\mu\text{g}$ のヒト・カルシトニン (hCal と略、Sigma) と incomplete Freund's adjuvant との懸濁液を皮下に 2 回注射した。hCal を免疫した 5 匹のマウスの腹腔内に $20\mu\text{g}$ の ACal を注射し、カゼイン・アジュバントを皮下に注射した。7 日目に屠殺して脾臓のアミロイド沈着を調べた。

$100\mu\text{g}$ のヒト AA および $100\mu\text{g}$ の ACal を 2ml の抗ヒト AA 抗体 (DAKO) および 2 ml の抗 hCal 抗体 (DAKO) とそれぞれ混和後、1 匹当たり $20\mu\text{g}$ のアミロイド線維を各々 5 匹のマウスの腹腔内に注射し、さらにカゼイン・アジュバントを皮

下に注射した。7 日目に屠殺して脾臓を摘出しアミロイド沈着の有無を調べた。

酵素処理

ヒト AA を 100mg トリプシン (CaCl₂ 加 0.05M Tris buffer, pH7.6)、 100mg プロナーゼ (0.05M Tris buffer, pH7.6)、 100mg ペプシン (0.01N HCl 溶液) および 2ml proteinase K 濃縮液 (DAKO) で 37°C 、24 時間処理後、15 分間煮沸処理し、マウス 1 匹あたり $20\mu\text{g}$ ヒト AA を腹腔内に投与し、さらにカゼイン・アジュバントを皮下に注射し 4 ~ 7 日目に屠殺して脾臓を摘出しアミロイド沈着の有無を調べた。ペプシン処理では 0.01N NaOH 溶液で中和後、注射した。

化学的処理

ヒト AA を 1N NaOH で 24 時間および 1 時間、0.01N NaOH で 1 時間処理後、HCl で中和後、マウス 1 匹あたり $20\mu\text{g}$ ヒト AA を腹腔内に投与し、さらにカゼイン・アジュバントを皮下に注射し 4 ~ 7 日目に屠殺して脾臓を摘出しアミロイド沈着の有無を調べた。

物理的処理

ヒト AA を試験管に入れガスバーナーで 15 分間焼灼後、マウス 1 匹あたり 20 μ g ヒト AA を腹腔内に投与し、さらにカゼイン・アジュバントを皮下に注射し 7 日目に屠殺して脾臓を摘出しアミロイド沈着の有無を調べた。

結果および考察

白鳥 AA を注射したマウスでは 3 匹中 2 匹、牛 AA では 3 匹中 3 匹、マウス AA では 3 匹中 2 匹、ヒト AA では 2 匹中 1 匹、A λ では 2 匹中 1 匹および ACal では 3 匹中 2 匹のマウスにアミロイド沈着が見られ、これらのアミロイドには F-AEF 活性を認めた。A κ を注射したマウスにはアミロイド沈着は認められなかった。

hCal で免疫し ACal を注射したマウスでは 5 匹中 2 匹のマウスにアミロイド沈着が見られたが、その沈着量はごく微量であった。Cal の免疫は F-AEF 活性の抑制にかなりの効果があったと思われる。(図 1)

ヒト AA および ACal を各々の抗体で処理後、注射したマウスでは各々 5 匹中 5 匹のマウスにアミロイドの沈着が見られ、F-AEF 活性の抑制効果は認めなかった。

ヒト AA のトリプシン、プロナーゼ、ペプシンおよび proteinase K 濃縮液での処理では各々 5 匹中 5 匹のマウスにアミロイド沈着がみられ、これらの酵素処理では F-AEF 活性は抑制できなかった。

ヒト AA の NaOH 処理では各々 5 匹中いずれのマウスにもアミロイドの沈着は認められなかった。NaOH 処理により F-AEF 活性は完全に失活したと思われた。

ヒト AA の焼灼処理では 5 匹中 2 匹に微量のアミロイド沈着を認めた。焼灼処理は F-AEF 活性の抑制にかなりの効果があったと思われた。

結 論

アミロイド前駆蛋白による免疫は F-AEF 活性の抑制にかなりの効果を認めた。焼灼処理は F-AEF 活性の抑制にかなりの効果があった。水酸化

ナトリウム処理は F-AEF 活性を完全に抑制した。

健康危険情報

なし

「引用文献」

1. Niewold TA, Hol PR, van Andel ACJ, et al. Enhancement of amyloid induction by amyloid fibril fragments in hamster. Lab Invest 1987; 56:544-549.
2. 石原得博、崔 丹、河野裕夫。AA アミロイド線維の経口投与による AA アミロイドーシス発症促進効果についての検討。厚生省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 1999 年度研究報告書 2000 ; pp20-22.
3. 樋口京一、Xing Yanming、是永龍巳、他。厚生省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 1999 年度研究報告書 2000 ; pp29-31.

研究発表

1. 論文発表
 - 1) 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—研究の過去と現在—日本網内系学会雑誌 40 巻 185 頁平成 13 年
 - 2) Matsutani H, Hoshii M, Yokota T et al. Vascular amyloid of unknown origin and senile transthyretin amyloid in the lung and gastrointestinal tract of old age; Histological and immunohistochemical studies. Pathol International 51: 326,2001.
2. 学会発表
 - 1) 横田忠明、河野裕夫、石原得博、他：各種の粗製アミロイド線維の Amyloid enhancing factor (AEF) についての病理学的検討、第 89 回日本病理学会、大阪国際会議場 (大阪)、平成 12 年 4 月
 - 2) 瀬戸口美保子、河野裕夫、横田忠明、他：好中球由来の Amyloid enhancing factor (AEF)

についての検討、第 89 回日本病理学会、大阪国際会議場（大阪）、平成 12 年 4 月

- 3) 松谷博之、星井嘉信、横田忠明、他：高齢者肺アミロイドーシスの組織学および免疫組織化学的検討、第 89 回日本病理学会、大阪国際会議場（大阪）、平成 12 年 4 月
- 4) 横田忠明、河野裕夫、石原得博、他：Fibril-amyloid enhancing factor (F-AEF) の抑制について、第 90 回日本病理学会、パシフィコ横浜（神奈川）、平成 14 年 3 月

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

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

by

Tadaaki YOKOTA*

Hiroo KAWANO**, Yoshinobu HOSHII**, Tosikazu GONDO**,

Mutsuo TAKAHASHI***, Tokuhiko ISHIHARA**

From

*Department of Pathology, Kokura Memorial Hospital

**Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine

***Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital

Amyloid enhancing factor (AEF) activity of several crude amyloid fibrils including AA from swan, mouse, cow and human, human A κ , human A λ , and calcitonin related-amyloid fibrils from a patient with medullary carcinoma of thyroid gland, were tested in mice. AA from cow, swan, mouse and human, human A λ , and calcitonin related-amyloid fibrils had an ability of acceleration of experimental murine amyloidosis. All amyloid deposits reacted positively to anti-AA antibody, when examined immunohistochemically. No AEF activity was observed in mice receiving human A κ .

The accelerating activity was partially inhibited in mice immunized with human calcitonin. Human AA amyloid fibril was treated with either 1N NaOH for 24 hours, 1N NaOH and 0.1N NaOH for 1 hour, pepsin, trypsin, pronase and proteinase K for 24 hours, boiling or burning for 15 minutes. The accelerating activity completely disappeared following treatments with 1N NaOH and 0.1N NaOH, and partially by immunization and burning. Pepsin, trypsin, pronase, proteinase K and boiling treatment had no effect.

Conclusion: Amyloid fibrils from different species and different types of amyloid accelerated the activity of murine AA formation. Treatment with 1N NaOH and 0.1N NaOH completely inhibited, but immunization and burning treatment partially inhibited the fibril-amyloid enhancing factor.

前 田 秀一郎

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

分担研究者 前 田 秀一郎*

共同研究者 伊 藤 禎 洋* 河 野 裕 夫** 石 原 得 博**

杉 山 仁 視*** 久保田 正 春*** 神 庭 重 信***

針 谷 康 夫**** 坂 下 直 実***** 安 東 由 喜 雄*****

研究要旨

- (I) 先に我々が開発した新規ジーンターゲティング法を用いて作製した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 変異を持つマウス血中の異型 TTR タンパクの量と分子量を質量分析装置を用いて正常 TTR のものと比較した。この結果、内在性の *ttr* 遺伝子の双方に Met30 変異を持つマウスの血中には正常 TTR より分子量が 32 ダルトン大きい異型 TTR が存在していた。また、変異マウス血中の TTR 量は、野生型マウスのものとほぼ等量であった。従って、この変異マウスは、正常 *ttr* 遺伝子を組込んだ RNA/DNA キメラヌクレオチドを用いた遺伝子置換による遺伝子治療等の試行に有用な FAP のモデルマウスと考えられる。
- (II) 家族性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル (APP トランスジェニックマウス) と我々が確立した無血清アミロイド P 成分 (SAP) マウスとを交配させて得た 12 ヶ月齢の SAP 欠損 APP トランスジェニックマウス 8 匹と対照野生型 APP トランスジェニックマウス 6 匹の学習能力を、shuttle avoidance test とモリス式水迷路により比較検討し、SAP 欠損 APP トランスジェニックマウスは、対照野生型 APP トランスジェニックマウスに比べ、学習能力が優れている傾向を認めた。このことは、SAP が脳内 A β アミロイド沈着を促進することを示唆する。しかし、これら SAP 欠損 APP トランスジェニックマウスと対照野生型 APP トランスジェニックマウスの脳内 A β アミロイド沈着の程度に明らかな差異を認めなかった。今後、より月齢の若い APP トランスジェニックマウスを用いて比較解析を行う必要がある。

* 山梨医科大学第一生化

** 山口大学医学部構造制御病態学講座

*** 山梨医科大学精神神経科

**** 群馬医科大学神経内科

***** 熊本大学医学部第二病理

***** 熊本大学医学部臨床検査

研究目的

本研究では、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) に近似した優れたモデルマウスの作製を目指すとともに、既に作製している遺伝子欠損マウス、FAPや家族性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル等、種々の遺伝子改変マウスを用いて、FAPや家族性アルツハイマー病におけるアミロイドの沈着機構を明らかにし、発症に関与する因子を見出して、この遺伝性神経難病の治療法や予防法を確立することを目的とする。今回は、

- (I) 先に作製した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 変異を持つマウス血中の異型 TTR タンパクの量と分子量を正常 TTR のものと比較する。また、変異マウスに沈着したアミロイドの主成分を明らかにする。
- (II) 家族性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル (APP トランスジェニックマウス) と我々が確立した無血清アミロイド P 成分 (SAP) マウスとを用いて、家族性アルツハイマー病での A β アミロイドの沈着に SAP がどう関与するかを解析する。

研究方法

- (I) 内在性の *ttr* 遺伝子の双方のアレルに Met30 変異を持つマウスと対照野生型マウスの血中の TTR を質量分析装置を用いて解析する。また、24 ヶ月齢の Met30 変異を持つマウス 2 匹の種々の臓器に沈着したアミロイドの主成分を免疫組織化学的方法で調べる。
- (II) APP トランスジェニックマウスと我々が確立した無 SAP マウスとを交配させて得た 12 ヶ月齢の SAP 欠損 APP トランスジェニックマウス 8 匹と対照野生型 APP トランスジェニックマウス 6 匹の学習能力を、shuttle avoidance test と Morris 水迷路により比較検討し、同時に脳内 A β アミロイドの沈着程度を免疫組織化学的に比較解析する。

本研究での動物実験は、山梨医科大学医学部附属動物実験施設の実験指針に基づき、実験計

画ごとに事前に委員会による審査を受け、承認されており、動物愛護の観点から倫理的に問題は無いと考えられる。

研究結果

- (I) 内在性の *ttr* 遺伝子の双方に Met30 変異を持つマウスの血中には正常 TTR より分子量が 32 ダルトン大きい異型 TTR が存在していた。また、変異マウス血中の TTR 量は、野生型マウスのもとのほぼ等量であった (図 1)。一方、内在性の *ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つ 24 ヶ月齢のマウス 2 匹の種々の臓器に沈着したアミロイドの主成分を、抗 AA 抗体、抗 IgG 抗体、抗 TTR 抗体を用いて免疫組織化学的に調べたが、反応性を認めなかった。

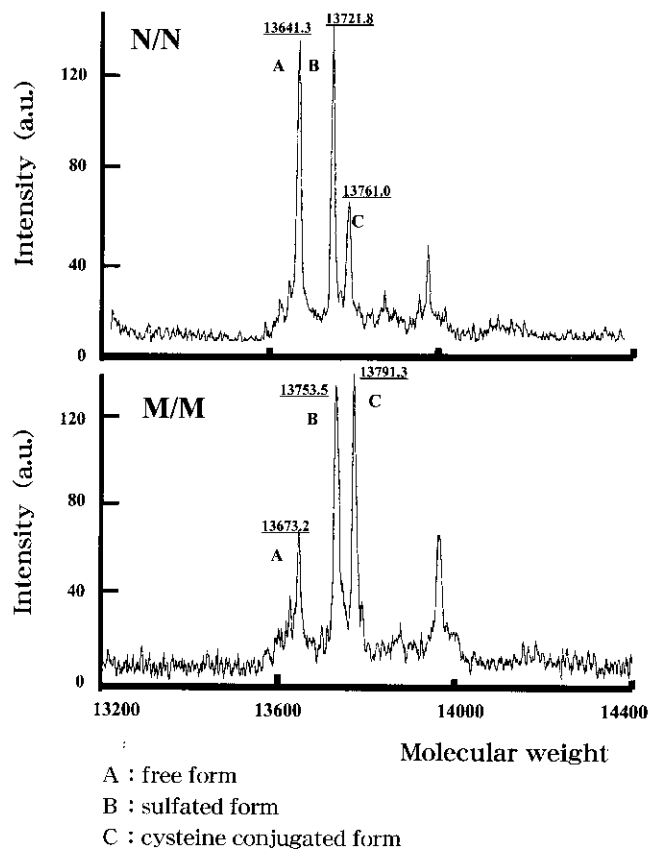


図 1 : 質量分析装置によるマウス TTR の解析

N/N; 対照野生型マウス血清

M/M; 内在性の *ttr* 遺伝子の双方に Met30 変異を持つマウス血清

(II) shuttle avoidance test では、SAP 欠損 APP トランスジェニックマウスは、対照野生型 APP トランスジェニックマウスに比べ、学習能力が優れている傾向を認めた。また、モリス式水迷路では、SAP 欠損 APP トランスジェニック雌マウス 5 匹と対照野生型 APP トランスジェニック雌マウス 3 匹との比較で、前者は後者に比べ、有意に空間認知能力が優れているという結果を得た。しかし、雄では差異を認めなかった。そこでこれら、計 14 匹のマウス脳内 A β アミロイド沈着の程度を比較解析したが、SAP 欠損 APP トランスジェニックマウスと対照野生型 APP トランスジェニックマウスの脳内 A β アミロイド沈着の程度に明らかな差異を認めなかった。

考 察

- (I) Met30 点変異を導入した *ttr* 遺伝子と正常 *ttr* 遺伝子との発現量に差異は無いと考えられる。なお、ウェスタンブロット解析の結果、マウスの異型 TTR は、抗マウス TTR 抗体と結合しにくいことを認めている。アミロイドの主成分を明らかにするためには、今後アミロイド線維を抽出して解析を進める必要があると考えられる。
- (II) 行動実験では、SAP が脳内 A β アミロイド沈着を促進することを示唆する結果を得た。しかし、これら 12 ヶ月齢の SAP 欠損 APP トランスジェニックマウスと対照野生型 APP トランスジェニックマウスの脳内 A β アミロイド沈着の程度に明らかな差異を認めなかった。先に、SAP 欠損マウスでは、AA アミロイドの沈着開始時期が遅れることを見出している。そこで今後、より月齢の若い APP トランスジェニックマウスを用いて比較解析を行う必要があると考えられる。

結 論

- (I) 内在性の *ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つマウスに沈着したアミロイドが TTR 由来であることを未だ証明できていない

が、この変異マウスは、従来のトランスジェニックマウスモデルと異なり、変異遺伝子を 1 コピーしか持たないため、正常 *ttr* 遺伝子を組込んだ RNA/DNA キメラヌクレオチドを用いた遺伝子置換による遺伝子治療等の試行に有用な FAP の優れたモデル動物と考えられる。

- (II) SAP 欠損 APP トランスジェニックマウスと対照野生型 APP トランスジェニックマウスを用いた解析により、SAP が脳内 A β アミロイド沈着を促進することを示唆する結果を得たが、これら 2 種の APP トランスジェニックマウスの脳内 A β アミロイド沈着の程度に明らかな差異を認めなかった。先に、無 SAP マウスでも対照野生型マウスと同程度に AA アミロイドが沈着するが、前者は後者に比べ、AA アミロイドーシスの惹起が有意に遅れることを見出している。そこで今後、より月齢の若い APP トランスジェニックマウスを用いて比較解析を行う必要があると考えられる。

健康危険情報

なし

研究発表

- 論文発表
- 1) Soma M, Tamaoki T, Maeda S, et al. Mice lacking serum amyloid P component do not necessarily develop severe autoimmune disease. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 200-205, 2001.
- 2) Usui I, Kawano H, Ito S, Hamada Y, Ishihara T, Maeda S. Homozygous serum amyloid P component-deficiency does not enhance regression of AA amyloid deposits. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 8: 101-104, 2001.
- 3) Amagasaki K, Sasaki A, Kato G, Maeda S, Nukui H, Naganuma H. Antisense-mediated reduction in thrombospondin-1 expression reduces cell motility in malignant glioma

cells. Int J Cancer 94: 508-512, 2001.

2. 学会発表

口頭発表

1) 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 京都 2001/10/27

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

Analysis of molecular basis of familial amyloidoses by using the mice carrying targeted mutations

by

Shuichiro MAEDA *

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

From

*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

A mass spectrometric analysis indicated that the serum level of variant TTR in mice carrying a targeted point mutation (Val 30 Met) in both of the endogenous *ttr* alleles was much the same with that of normal TTR in control wild-type mice. The transgenic mouse model of FAP generated through microinjection of human mutant *ttr* gene, responsible for FAP, into fertilized eggs carries about 30 copies of the mutant gene. On the other hand, the above mutant mouse, generated through a novel gene targeting procedure, carries only a pair of *ttr* alleles. Thus the mice carrying the targeted point mutation in the endogenous *ttr* gene will be useful for evaluating the efficacy of therapy such as targeted gene correction by a chimeric RNA · DNA oligonucleotide.

To elucidate the role of SAP in the pathogenesis of human amyloidosis, we generated mouse lines carrying a null mutation at the endogenous *sap* locus and human mutant amyloid precursor protein (*app*) gene, responsible for familial Alzheimer's disease, as a transgene. We examined whether there were any significant differences in the onset and progression of brain A β amyloid deposition between the *sap*^{-/-} and control wild-type transgenic mice expressing the human mutant *app* gene. There was, however, no difference in the degree of A β amyloid deposition between 12-month-old wild-type and *sap*^{-/-} transgenic mice.

東海林 幹 夫

脳アミロイドを再現する種々の動物モデルの確立

分担研究者 東海林 幹 夫*

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*

研究要旨

アルツハイマー病(AD)における脳A β アミロイドーシス(A β 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 β AMとTauopathyを再現するTransgenic mice(TG)を確立しA β 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 β 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 β AMの促進が認められ、変異Presenilin-1の病的役割はA β 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 β 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 β 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。

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 β 蛋白(A β)が沈着して脳A β アミロイドーシス(A β 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 β 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 β 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 β 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 β 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。

研究方法

1. APPsw miceの解析

脳A β AMを再現するAPPsw miceにおけるA β 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

* 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

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 xPS-1 L286V double TG)、変異 PS-1 の脳 A β 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 β AM との関係を示すために Prion promoter を用いて変異 Tau R406W を過剰発現する TG を作製した。主に病理学的・生化学的に解析を行った。

4. APPsw x Tau R406W double TG

APPsw mice と Tau R406W mice を掛け合わせ、病理学的に検索を行い A β 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。

研究結果および考察

1. APPsw mice

ELISA で得られた結果と相関して 8 ヶ月齢から A β AM、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 β 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に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ったが、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)。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 β 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 β 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 β 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。

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 β 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。以上の結果は、変異 PS-1 は A β 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。

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 蛋白が蓄積していた。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が明らかに減少していた。A β アミロイドの沈着は認められなかった。

4. APPsw xTauR 406W double TG

10ヶ月齢 TG でみられた A β 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 β や Tau の蓄積の著明な促進はみられなかった。A β 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 β AM が AD のより本質的な病理学的変化と考えられた。

結 論

A β 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 β アミロイド沈着を示す APPsw xPS-1 L286V double TG を用いて、抗 A β モノクローナル抗体による治療を行う予定である。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 183(1): 95-98,2001.
- 2) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Shoji M, et al. Brain A β 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 β 40 and A β 42: Natural course and clinical usefulness. *J Alzheimer's disease* (in press).
- 4) 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* 22: 209-215, 2001.

- 5) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Shoji M, et al. A β 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 β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21: 372-381, 2001.
- 7) Takenoshita H, Shoji M, Okamoto K, et al. 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, Abe K, et al. The effect of A β 42 vaccine on Tg2576 Alzheimer model mice. 31th 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. 31th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, November 10-15, 2001.
- 3) 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 Society for Neuroscience, San Diego, November 10-15, 2001.
- 4) Kawarabayashi T, Shoji M, Wahrle S, Younkin LH, Younkin SG. Amyloid β protein accumulates in lipid rafts. 31th Annual

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

- 5) 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 Society for Neuroscience, San Diego, November 10-15, 2001.
- 6) Matsubara E, Sasaki A, Shoji M, et al. Platelets A β as a potential source of amyloid deposits in the vessel wall. 31th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, November 10-15, 2000.

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

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

by

Mikio SHOJI*

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

From

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

**Department of Neurology, Gunma University School of Medicine

To clarify the role of brain amyloid β protein (A β) amyloidosis in Alzheimer's disease (AD) and to develop treatments, we examined 3 transgenic mice (TG) demonstrating A β amyloidosis.

1) In brains of APPsw mice (Hsiao, 1996 Science), cored, diffuse plaques, and amyloid angiopathy were recognized. Neuronal and synapse loss were found in cored plaques. In dystrophic neurites around the cored plaques, phosphorylated-tau was accumulated. These mice demonstrated memory impairment and decrease of acetylcholine in cortex and hippocampus.

2) We generated APPsw x Presenilin-1 L286V double TG. These double TG developed A β amyloidosis 4 times earlier than APPsw mice. The pathological role of mutant Presenilin-1 is acceleration of deposition of A β .

3) We have developed TauR406W mutant mice demonstrating tau accumulation in cortex and hippocampus accompanied by gliosis. We generated APPsw x TauR406W double TG. The pathology of A β amyloidosis was similar in both these double TG and APPsw mice. Gallyas silver-staining showed enhanced tau pathology in the hippocampus of these double TG relative to TauR406W mice.

These findings suggest that A β amyloidosis causes subsequent pathology such as accumulation of phosphorylated tau, neuronal loss and memory disturbance, and that it is most important to treat A β amyloidosis for cure of AD.

東海林 幹 夫

lipid rafts における A β アミロイドの検討

分担研究者 東海林 幹 夫*

共同研究者 瓦 林 毅** 針 谷 康 夫** 池 田 将 樹**

富 所 康 志** 松 原 悦 朗*

研究要旨

Sweden 型の突然変異をもつアミロイド前駆体タンパク (APP) を過剰産生する Alzheimer 病 (AD) モデルマウス APPsw mice とヒト脳を用いて lipid rafts におけるアミロイド β 蛋白 (A β) 沈着を検討した。アミロイド沈着前の若年マウスでは lipid rafts に全 A β 40 と A β 42 の約 20% が局在し、また A β の産生、分解および凝集に関わるすべての因子が局在した。加齢と共にアミロイド沈着の早期から lipid rafts に A β 40 および A β 42 が特異的に蓄積し、A β 凝集の最初の step である dimer が出現した。AD 脳でも早期から lipid rafts に A β が蓄積し、リン酸化タウも蓄積した。高コレステロール食を APPsw mice に投与すると血漿 A β 40 および A β 42 が増加し、lipid rafts の A β oligomer が増加した。以上のことから、lipid rafts は脳 A β 代謝に重要な部位であり、A β アミロイドの超早期形成部位と考えられた。また高コレステロール血症は lipid rafts の A β oligomer 形成を増加することにより A β アミロイド沈着を促進する可能性が考えられた。

研究目的

アミロイド β 蛋白 (A β) が沈着して脳 A β アミロイドーシスが起これ、続いて神経原線維変化 (PHF) と神経細胞死が出現するというアミロイド・カスケード説がアルツハイマー病 (AD) の発症機序として考えられている。従来 A β 凝集は細胞外で起こると考えられていたが、細胞外液の A β 濃度は nanomolar の範囲であり、in vitro で A β fibril を形成するのに必要な濃度よりはるかに低いことより、細胞内 compartment で A β 凝集が起こるとい説が有力になりつつある¹⁾。一

方、高コレステロール血症が Alzheimer 病 (AD) の危険因子であること、HMG CoA reductase 阻害薬による治療を受けた患者で AD の発症率が低いことなどから最近 AD とコレステロールとの関係が注目されている²⁾。細胞系を使った検討からコレステロールが A β の産生および凝集を制御することが示されている^{3,4)}。lipid rafts はコレステロールと glycosphingolipid の凝集によって形成される membrane microdomain である⁵⁾。lipid rafts には A β が高濃度で存在すること⁶⁾。A β 産生活性が示されていること³⁾。lipid rafts の構成成分である GM1 ganglioside と cholesterol には A β の凝集促進作用があること^{4,7)} などから、A β 産生および蓄積の重要な候補部位と考えられ

* 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

ている。我々はA β アミロイドの代謝および沈着機序を明らかにするために脳アミロイドを再現する transgenic mice (APPsw)⁸⁾ およびAD脳で lipid rafts におけるA β の蓄積を検討した。次にAPPsw mice に高コレステロール食の投与を行い、高コレステロール血症がA β に与える影響を検討した。

研究方法

APPsw mice 脳(3~28月齢)とヒト脳(AD 6例、病的老化2例、コントロール2例)を1% Triton-X-100を含むMBS bufferでhomogenizeした。2,000g 10分の低速遠心の後に上清を用いて40%、38%、5%の不連続ショ糖勾配を作製した、100,000gで19時間遠心し、上から1mlずつ11分画を採取した。各分画にて鈴木らによって確立された Sandwich ELISA系⁹⁾を用いて経時的にA β 40、A β 42量を測定した。また、A β およびAPPをimmunoblottingで検討した。

8.5月齢のAPPsw miceに5%コレステロール、10%脂肪を含む高コレステロール食またはコレステロールを欠くコントロール食を6週間投与し、脳の分画を行った。

研究結果

アミロイド沈着前の3月齢APPsw miceの各分画のA β をELISAで測定すると、A β 42およびA β 40とも、全A β の約20%がlipid raftsに検出された(図1)。

3月齢APPsw miceの全分画をWestern blottingで検討した。脳のlipid raftsのマーカであるflotillinとGM1 gangliosideが第4分画に特異的に検出されることから、ここがlipid raftsと同定された。lipid raftsにはAPP、APPのC末fragment、BACE-1、PS1、neprilysin、Apolipoprotein EなどA β の産生、分解および凝集に関わるすべての因子が存在した。

経時的にAPPsw mice脳を抽出し、その各分画のA β をELISAで測定すると、lipid rafts分画である第4分画でA β はアミロイド沈着の始まる7~8月齢から上昇し、加齢と共に急速に上昇した。

7~8月齢からA β 42は統計上有意に増加した。この増加は他の分画には認められなかった(図2)。

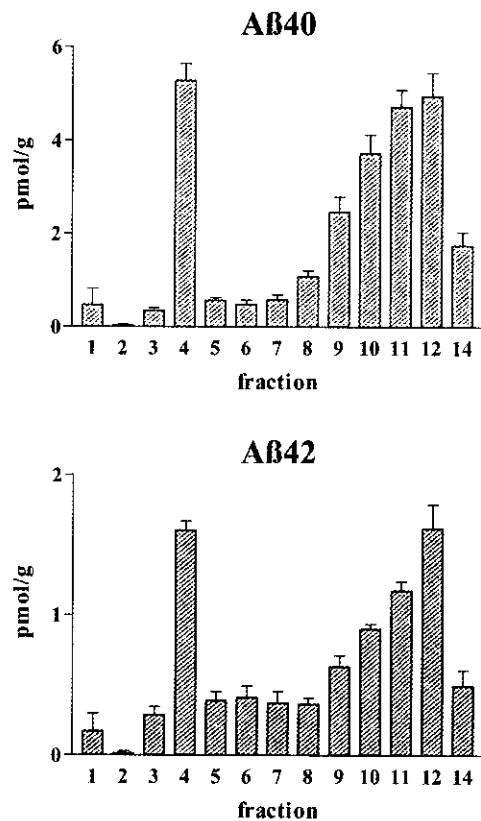


図 1

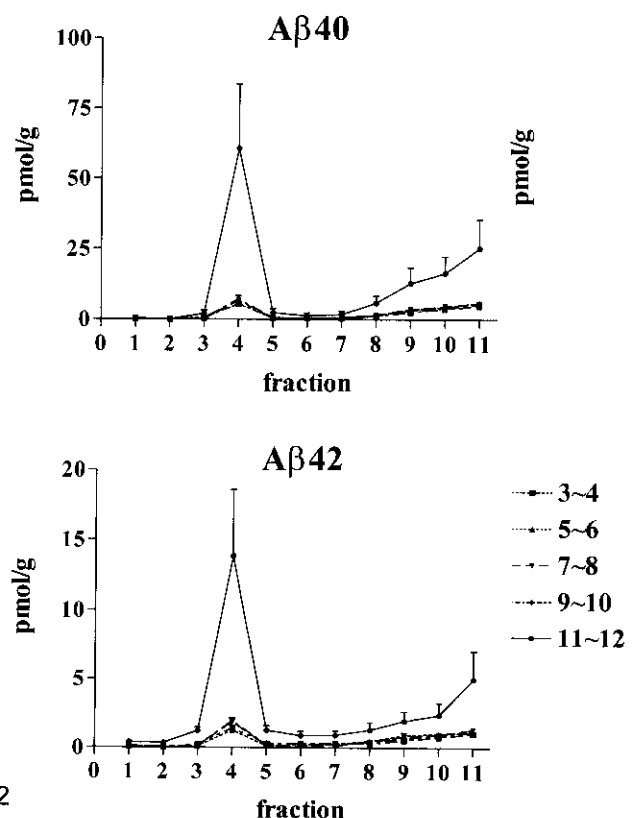


図 2