

ELISA で測った A β の増加を確認するために免疫沈降と Western blotting で A β を検討した。lipid rafts には A β の monomer と dimer が検出され、8 月齢から lipid rafts 中の A β は増加した。また、lipid rafts 中の A β は dimer が優位であった。これらのことから、A β 凝集の最初の step である A β oligomer 形成がアミロイド沈着の早期から lipid rafts で起こることが示された。

lipid rafts を免疫電顕で検討すると 10 nm gold particles を用いて抗 A β 抗体によってラベルされる A β fibril が観察された。よって少なくとも A β が lipid rafts に存在することが示された。

Lipid rafts のマーカーである flotillin の免疫染色では、flotillin は神経細胞に染色された。また、老人斑、特にその周囲に著明な蓄積を認めた。よって組織学的にも lipid rafts とアミロイド沈着の密接な関係が示された。

AD 脳では A β 42、A β 40 は lipid rafts に蓄積していた。一方、AD の初期病変とされる病的老化脳 (PD) では lipid rafts に A β 42 の増加を認めた。よって AD 脳でも APPsw mice と同様に早期から lipid rafts に A β 42 が蓄積することが示された (図 3)。

APPsw mice でタウおよびリン酸化タウが lipid rafts 中に存在した。AD 脳でも著明なリン酸化タウの蓄積が lipid rafts に認められ、さらに

AD 脳の lipid rafts には APPsw mice には認められなかった PHF に特徴的な smear pattern を認めた。

高コレステロール食投与 APPsw mice ではコントロール食投与 APPsw mice に比べて血中コレステロールが 3 倍に増加し、血漿 A β 40 および A β 42 の増加が認められた。また脳 lipid rafts 分画中の A β oligomer の増加が認められた。

考 察

アミロイド沈着前の APPsw mice では全 A β の約 20% が lipid rafts に存在した。lipid rafts は膜全体のごく一部であることが知られており、MDCK 細胞では細胞膜のわずか 0.4 から 0.8% とされている¹⁰⁾。従って、lipid rafts 中で A β は非常に高濃度に濃縮されて存在することが示された。さらに lipid rafts には A β の前駆体である APP と APP の C 末 fragment、A β 産生酵素の s-secretase である BACE-1、 γ -secretase とされる presenilin-1 の C 末および N 末 fragment、A β の主たる分解酵素である neprilysin、A β 凝集に必要な apolipoprotein E という A β の産生、分解、凝集に関わるすべての因子が含まれていた。一方、培養細胞を用いた実験からは lipid rafts が A β 産生の場合であるという結果を我々は示している³⁾。以上の結果から lipid rafts が A β の産生、分解、凝

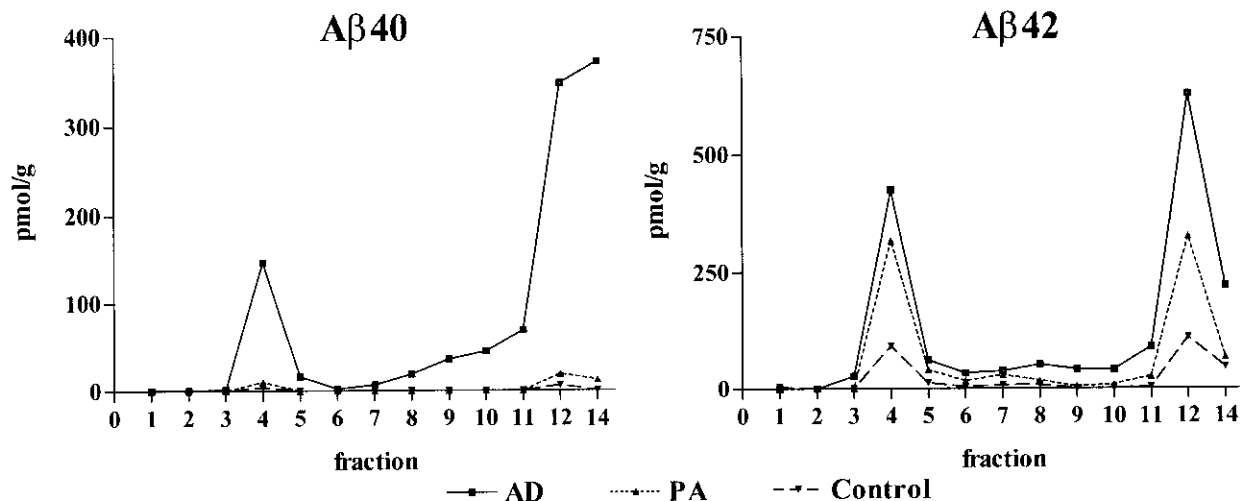


図 3

集に関わる重要な部位であることが示された。

APPsw mice の加齢によって A β はアミロイド沈着の初期から lipid rafts に特異的に蓄積した。しかも A β 凝集の最初の step である dimer と最後の step である fibril の両方が存在した。以上より lipid rafts はアミロイドの初期形成部位と考えられた。AD 脳においても A β は lipid rafts に高濃度に存在し、AD の初期像とされる病的老化脳でもすでに A β 42 が lipid rafts に蓄積していた。よって AD においても lipid rafts がアミロイド初期沈着部位であると考えられた。

A β アミロイド沈着と並ぶ AD のもう一つの病理学的所見はリン酸化タウからなる PHF の沈着である。APPsw mice では PHF 形成は起こさないが、リン酸化タウが蓄積することを我々はすでに報告している¹¹⁾。今回の検討から lipid rafts には A β と共にリン酸化タウも蓄積することが示された。AD 脳でもリン酸化タウが lipid rafts に特異的に認められ、さらに AD 脳では APPsw mice には認められなかった PHF に特徴的な smear pattern を認めた。よって AD 脳では lipid rafts に A β と PHF-tau が共に蓄積することが示された。アミロイドカスケード仮説では A β アミロイドが PHF の形成を引き起こすと考えられているが、両者の作用部位は不明であった。これらの検討から lipid rafts がアミロイドカスケードを成立させる両者の作用部位である可能性が示された。

APPsw mice x PS1 の double transgenic mice で高コレステロール食が脳アミロイド沈着を増加させることが示されている¹²⁾。我々の APPsw mice への高コレステロール食投与実験では、血漿コレステロールの増加と共に血漿 A β 40 および A β 42 の増加が認められ、さらに脳の lipid rafts 中の A β oligomer が増加した。よって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ある。

以上の検討からアミロイド形成過程は以下のように想定される。もともと A β は lipid rafts 上に高濃度に存在し、産生と分解のバランスを保っているが、そのバランスが崩れて A β 量が増加する

と lipid rafts の A β 凝集促進作用のために A β は重合し、それが鑄型となってさらに A β 凝集を促進させてアミロイドを形成すると考えられる。その際にコレステロール組成の変化や老化に伴う膜脂質の酸化などによる膜の障害がさらに A β 凝集を促進するものと考えられる。一方、凝集した A β は細胞毒性を示すが、これは lipid rafts の機能障害を介して起こる可能性がある。今回の検討で APPsw mice の lipid rafts に A β 42 が増加する 7 月齢は、行動異常が出現する時期とほぼ一致した¹³⁾。lipid rafts には signal transduction molecule が集中しており、情報伝達の経路への A β アミロイド蓄積は異常 signal を引き起こす可能性がある。lipid rafts は脂質輸送を担う場所でもあり、A β アミロイドはコレステロールホメオスタシスを変化させ脂質輸送を障害する可能性がある。また、lipid rafts で A β アミロイドがリン酸化タウに作用して PHF 形成を引き起こす可能性がある。これらのことは、lipid rafts における A β の蓄積がさらなる病的カスケードを促進する可能性を示している。よって lipid rafts における A β の産生、代謝、凝集の制御はアルツハイマー病の治療を考える上でも重要な target と考えられた。

結 論

以上の検討から、lipid rafts は A β 代謝の場であり、アミロイド沈着の最初の部位である。lipid rafts には A β とリン酸化タウが蓄積し、アミロイドカスケードを成立させる両者の作用部位の可能性もある。高コレステロール血症は lipid rafts の A β oligomer 形成を促進することでアミロイド沈着を促進する可能性がある以上のことから、lipid rafts における A β の産生、分解、凝集を制御することが AD 治療の標的として重要と考えられた。

健康危険情報

なし。

「引用文献」

1) Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB,

- Selkoe DJ. The oligomerization of amyloid β -protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39 (35):10831-10839, 2000.
- 2) Wolozin B, Kellman W, Russeau P, Celesia GG, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57(10):1439-1443, 2000.
 - 3) Wahrle S, Kawarabayashi T, McLendon C, et al. Cholesterol dependent γ -secretase activity in a lipid raft microdomain. *Neurobiol Dis* (in press).
 - 4) Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C, Yanagisawa K. Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid β -protein in cell culture. *J Biol Chem* 274 (21):15110-15114, 1999.
 - 5) Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 (6633): 569-572, 1997.
 - 6) Lee SJ, Liyanage U, Bickel PE, Xia W, Lansbury PT Jr, Kosik KS. A detergent-insoluble membrane compartment contains A β in vivo. *Nat Med* 4(6): 730-734, 1998.
 - 7) Choo-Smith LP, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Surewicz WK. Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of A β -(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J Biol Chem* 272(37): 22987-22990, 1997.
 - 8) Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274(5284): 99-102, 1996.
 - 9) Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, et al. An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid β protein precursor (sAPP717) mutants. *Science* 264(5163): 1336-1340, 1994.
 - 10) Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti M.P. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 122(4): 789-807, 1993.
 - 11) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, et al. A β amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP (Sw) mice. *Neurosci Lett*. 299(3): 169-172, 2001.
 - 12) Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7(4): 321-331, 2000.
 - 13) Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, et al. The relationship between A β and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*(in press).

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.

知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Analysis of amyloid β protein in lipid rafts

by

Mikio SHOJI*

Takeshi KAWARABAYASHI**, Yasuo HARIGAYA**, Masaki IKEDA**,

Yasushi TOMIDOKORO**, Etsuro MATSUBARA**

From

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

**Gunma University School of Medicine, Department of Neurology

The progressive deposition of amyloid β protein ($A\beta$) is a crucial step of Alzheimer's disease (AD). To detect when and where $A\beta$ begins to deposit, we have fractionated APPsw mouse brain, an animal model of AD, and AD brains by sucrose gradient fractionation. Precursors of $A\beta$, β -secretase (BACE-1), putative γ -secretase (presenilin-1), main $A\beta$ catabolizing enzyme (neprilysin), and apolipoprotein E all colocalized in lipid rafts. About 20% of total $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 localized in lipid rafts from 3 months old APPsw mice. From 7-8 months, early stage of amyloid deposition, $A\beta$ 42 increased in lipid rafts. SDS-stable $A\beta$ dimers and amyloid fibrils were detected in lipid rafts. $A\beta$ 42 also increased in lipid rafts from the early stage of AD. Phosphorylated-tau was increased in lipid rafts from APPsw mice and AD brain. When APPsw mice were fed with high cholesterol diet, dimer of $A\beta$ was increased in lipid rafts. These results suggested that lipid rafts may be the site of early $A\beta$ deposition. They may be crucial site for $A\beta$ production, $A\beta$ degradation and $A\beta$ aggregation. The possible roles of lipid rafts $A\beta$ site of early $A\beta$ amyloid deposits indicate that adjustment of their environment may be an effective therapeutic targets for AD.

高 橋 睦 夫

マウス AA アミロイドモデル動物

分担研究者 高 橋 睦 夫*

共同研究者 石 原 得 博** 河 野 裕 夫** 前 田 秀 一 郎***

森 本 宏 志* 権 藤 俊 一**

研究要旨

AA アミロイドーシスのマウスモデル動物において、アミロイドの伝播と、各種変異マウスにおけるマウス AA アミロイドーシスの発症について検討し、IL-6 knockout mouse ではアミロイドが発症しない事およびアミロイド罹患マウスの尿にも、AEF 活性がある事を示した。

研究目的

アミロイドーシスの病因や治療法の解明には、モデル動物における検討が不可欠である。その中でも AA アミロイドーシスのマウスモデルは、古くから使われており、比較的良く調べられている。しかしながら、一方では、同じプロトコールで発症刺激を与えても、発症頻度や、沈着量に関してのばらつきが大きく、一部施設では、マウス AA アミロイドの発症がほとんど見られない場合もある。これには、マウスの系統による、SAA の一次配列の差によるものもあるが、それ以外にも、飼育環境による差などがあるのではないかとと思われる。これに関して、当施設で行ってきたマウス AA アミロイドーシス発症方法に関する検討と各種の実験、マウス AA アミロイドの発症病理について、3年間のまとめとして報告する。

研究方法

6～8週令、SPFの ICR mouse およびconventional な飼育環境の AKR マウスに、以下の AA アミロイド発症の炎症刺激を加えた。一部実験では、AEF(Amyloid enhancing factor) も併用した。

- 1、M. Butyricum の懸濁液 と complete Freund's adjuvant のエマルジョン (以下 Adj.) の腹腔内あるいは皮下投与→7～10日目にアミロイド沈着開始。
- 2、5～10% milk casein を連日皮下投与→3～4週にアミロイド沈着開始。
- 3、2% AgNO₃ を単回あるいは連日皮下投与→10～20日にアミロイド沈着開始。

AEF はアミロイド発症マウスの脾あるいは肝臓より Axelrad らの方法 (一部改変)¹⁾ で作成したもので、炎症刺激と共に投与すると、Pre-amyloid phase を短縮し、炎症刺激後2日目にはアミロイドの沈着を認める。

マウスは、型のごとく屠殺し、マウスの脾臓の圧搾および肝脾腎等の各臓器の組織切片をHE

* 山口大学医学部構造制御病態学講座

** 山梨医科大学化学第一講座

*** 山口大学附属病院病院病理部

染色あるいは Congo Red 染色で観察し、Congo Red 染色については、偏光顕微鏡下の観察も行った。一部では電顕的観察も行った。

これらのマウス AA アミロイドモデルにおいて、以下の項目について検討した。

1、マウス飼育環境における AA アミロイドーシスの発症の差に関する検討

同系統のマウスにおいても、同じ方法でアミロイド発症刺激を加えても、時にアミロイドの発症にばらつきが生じることが知られているが、これが飼育環境によるものか否かの検討を行った。同時に入荷した SPF マウスを、SPF 環境のままと、conventional なものとに分け、馴化期間の後に、同様のアミロイド発症刺激を加えて検討した。

2、各種変異マウスにおける AA アミロイドーシス

マウス AA アミロイドの発症病理と治療法を検討するために以下の各種変異マウスにおいてアミロイド発症実験を行った。

a. OP/OP mouse における検討。OP/OP mouse は macrophage colony stimulating factor を先天的に欠損した突然変異マウスで、アミロイド線維形成における macrophage の関与について検討する。

b. SAP knockout mouse における検討。SAP (serum amyloid P component) は、すべてのアミロイドに主成分としての各種アミロイド蛋白とともに共沈している蛋白で、そのアミロイド発生病理における役割が検討されている。

c. SCID mouse における検討。アミロイドーシスと免疫系の関係についても十分に解明されていない。

d. Apo E 欠損マウスでの検討。Apolipoprotein E はアルツハイマー病の脳アミロイドにおいてアミロイドとともに認められており、その発症と遺伝子多型との関係が示されている。

e. IL-6 knockout mouse における検討。続発性 AA アミロイドーシスの先行病変としての炎症刺激から肝での SAA (serum amyloid A) 産生亢進の間に IL-6 が関与して

おり、この欠損動物におけるアミロイドの発症について検討する。

3、アミロイドの伝播に関する実験

- アミロイド線維の経口摂取の検討。同種、異種のアミロイド線維を経口摂取させることによるアミロイドの発症について検討した。マウス AA アミロイド、ヒト AL アミロイド、ウシ AA アミロイドの粗性抽出物をマウスに経口投与し、さらに炎症刺激を加え検討した。
- アミロイド発症マウスの尿のアミロイド発症促進効果についての検討。マウス糞中にも、アミロイド伝播の可能性を示すものがあることがわかっているが、マウス AA アミロイドを発症した尿を採集し、これを健常マウスに投与し、さらに炎症刺激を加え検討した。
- アミロイド沈着臓器の移入によるアミロイド発症について。(詳細は本報告書内で別に報告)

研究結果

- 今回の我々の施設の検討では Clean な環境と conventional な環境ではアミロイドの発症頻度に差はなかった(表1)。しかし、これまでも系統によるアミロイド発症の差など、発症傾向に関する不思議な差が示されており、このマウス実験的 AA アミロイド発症頻度の多様性についてはさらに検討が必要であろう。アミロイドーシス発症のしやすさについてのマウス系統による差については、Cohen ら²⁾ が(1972 年カゼインによる)、CBA/J > C57BL/6J > Swiss white > C3H/HeJ > Balb/cJ > SWR/J という傾向を示している。また、CE/J mouse に関しては、そのSAAのアミノ酸一時配列が原因でアミロイ

表1 飼育環境によるアミロイド発症率の比較

	脾臓	肝臓	腎臓
動物実験施設飼育 (SPF)	9 / 10	8 / 10	6 / 10
研究室飼育 (Conventional)	10 / 10	8 / 10	5 / 10

* 入荷後それぞれの飼育室に移し、1週間の馴化期間後 Adj. i.p. その1週間後屠殺

イドが発症しないことがわかっている。我々は、ICR, AKR/Y(37 世代目, closed colony) で安定した実験モデルを得ている。

2、M-CSF 欠損 mouse (OP/OP mouse) (表 2)、SAP 欠損 mouse (図 1)、Scid mouse、Apo E 欠損 mouse (表 3) では程度の差はあったが、いずれもアミロイドの沈着を認めた。IL-6 KO mouse (表 4、図 2) では、SAA の上昇は一過性でアミロイドの沈着は認められなかった。IL-6 を阻害することによる、治療の可能性が考えられた。

表 2 op/op mouse 週令別アミロイド発症頻度(匹数)

	10 週未満	10 ~ 20 週	20 週以上
Amyloid +	0	3	0
Amyloid -	6	1	12

表 3 Apo E 欠損マウスの AA amyloidosis

	炎症刺激	amyloid
C57BL/6J	Adj.	6 / 9
C57BL/6J	AEF + AgNO ₃ , 48 hours	9 / 10
C57BL/6J	AEF + AgNO ₃ , 72 hours	10 / 10
Apo E deficient	Adj.	6 / 8
Apo E deficient	AEF + AgNO ₃ , 48 hours	8 / 10
Apo E deficient	AEF + AgNO ₃ , 72 hours	9 / 9

表 4 IL-6 knockout mouse における AA アミロイドーシス

1 群	IL-6 ko, adjuvant 投与後 10 日	0/29
2 群	Control, adjuvant 投与後 10 日	29/29
3 群	IL-6 ko, adjuvant 投与後 7 日	0/6
4 群	Control, adjuvant 投与後 7 日	10/15
5 群	IL-6 ko, casein 40 回投与後	0/8
6 群	Control, casein 40 回投与後	2/2

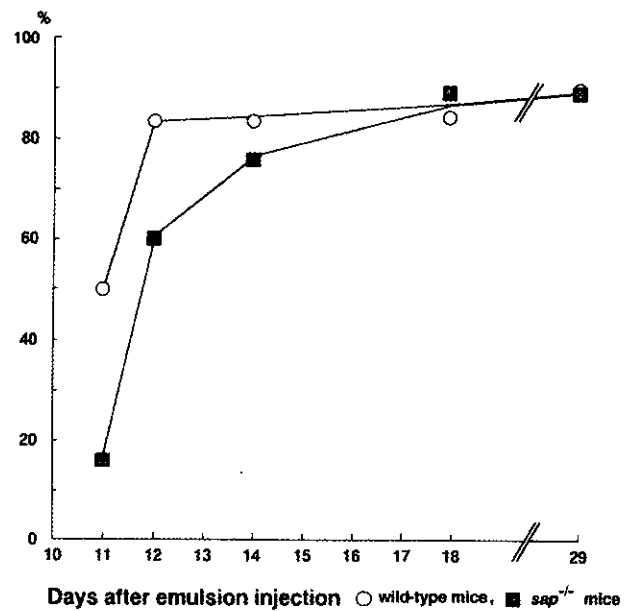


図 1 SAP knockout mouse と control mouse の実験的アミロイド発症の経時変化

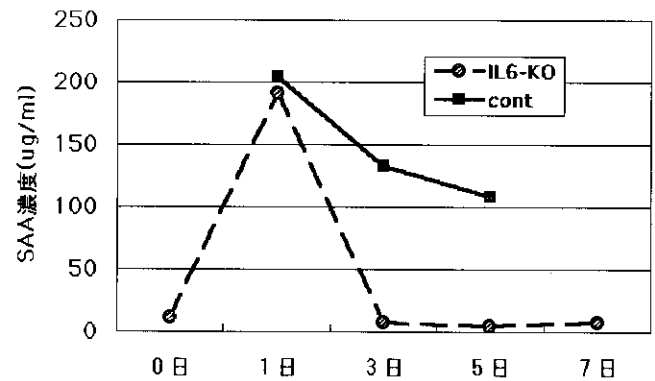


図 2 炎症刺激後の SAA の濃度変化

3、粗性のアミロイド線維を経口摂取したマウスでの AA アミロイドの発症についての検討では、この系でのマウス AA アミロイドの沈着には、炎症刺激が必須であった。マウス AA アミロイド線維のみではなく、牛 AA やヒト A λ アミロイド線維によっても AA アミロイドの沈着を認めた (表 5)。

また、アミロイドを発症したマウスの尿を腹腔内に投与し炎症刺激を加えると早期のアミロイド沈着 (AEF 効果) が認められた (表 6)。

表5 アミロイド線維経口摂取の検討

Amyloid 線維	Lag time	炎症刺激	amyloid
マウス AA	3 weeks	+	14 / 15
マウス AA	none	+	2 / 15
マウス AA	none	-	0 / 15
蒸留水	3 weeks	+	0 / 15
ウシ AA	3 weeks	+	12 / 15
ヒト A λ	3 weeks	+	11 / 15

表6 Mouse 尿の投与実験

尿	Amyloid
正常マウスの尿を投与した群	0 / 12
AA マウスの尿*を投与した群	7 / 18

*尿 0.1 ~ 0.2ml 腹腔投与 + Adj. 3日後屠殺
尿はカゼイン60回投与された複数のマウスから集めたもの

結 論

マウス AA アミロイドの発症機構の中で、肝でのSAA産生分泌の抑制、線維核の形成阻止、重合反応の阻害、アミロイドの吸収亢進のいずれかを行うことが治療の方法として考えられるが、これらのモデル動物においてさらに検討が必要である。また、発症予防という観点から、アミロイド伝播についてはさらに詳細な検討が必要であるが、少なくともAAアミロイドーシスに関しては、炎症刺激を伴わなければアミロイドの伝播は起こらないと考えられる。

健康危険情報

なし

[引用文献]

- 1) Yokota T, Takahashi M, Ishihara T, et al. Amyloid enhancing factor (AEF) -Isolation and Biochemical and pathological characteristics. Acta Pathol Jpn. 1991; 41(11): 798-

805.

- 2) Cohen AS, Shirahama T. Animal model : Spontaneous and induced amyloidosis. Am J Pathol. 1972; 68(2): 441-444.

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. Patho 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. Pathl 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. Pathl 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) 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)
- 2) 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)
- 3) 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）

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

An experimental model mouse of AA amyloidosis

by

Mutsuo TAKAHASHI*

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

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

From

*Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital

**Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine

***First Department of Biochemistry, Yamanashi Medical University

We have studied the pathogenesis of amyloidosis on experimental model mice of AA amyloidosis. We use several inflammatory stimuli; emulsions of Complete Freund's Adjuvant and M. Butyricum, solutions of Casein and AgNO₃. We used several mutant mice for this study. Mice were maintained under different conditions.

Results are as follows. Comparing a conventional and a SPF condition, there was no difference on the amyloid susceptibility. We confirmed amyloid deposition of OP/OP mice, SAP deficient mice, Scid mice and Apo E deficient mice. IL-6 knockout mice showed no amyloid deposition though control mice did. Urine which were collected from amyloidotic mice showed AEF activity when urine was injected i.p. Dietary administration of Crude amyloid fibrils from different species also showed AEF activities.

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

分担研究者 河野道生

共同研究者 石川秀明 津山尚宏

研究要旨

AL アミロイドーシス合併した骨髄腫患者からの骨髄腫細胞を SCID-hIL6 transgenic mice (SCID-hIL6 Tg mice) 腹腔内に移植生存させる系を確立し、AL アミロイドーシス由来の 3 種の骨髄腫細胞株を樹立した。AL アミロイドーシス合併骨髄腫患者から樹立した 3 種の骨髄腫細胞株を SCID-hIL6 mice の腹腔内に移植・生存させ長期に観察したが、いずれもアミロイド沈着は認められなかった。この結果は、単なる M 蛋白の負荷だけではアミロイド沈着を惹起できないことを示唆している。今後は、生体側の反応を修飾し得る条件下での検討が必要である。

目 的

AL アミロイドーシスの多くは骨髄腫に随伴するものである。しかしながら、骨髄腫に随伴する AL アミロイドーシス発症の機序は全く不明であるし、それを実験的に誘発できる動物モデルも確立されていない。本年度は、AL アミロイドーシス合併した骨髄腫患者からの骨髄腫細胞を SCID-hIL6 transgenic mice (SCID-hIL6 Tg mice) に移植生存させる系を確立し、AL アミロイドーシス誘導を起こし得る可能性がある骨髄腫細胞株を樹立する。それらの骨髄腫細胞株を SCID-hIL6 Tg mice に再度移植生存させて、骨髄腫細胞株から産生される M 蛋白 (amyloidogenic と考えられる) の負荷が実際にマウス個体においてアミロイド沈着を起こしうるかを確認する。

研究方法

- 1) 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の SCID-hIL6 Tg mice への移植：AL アミロイドーシス合併の骨髄腫患者からの骨髄穿刺検査に対するインフォームド・コンセントを得た後、骨髄穿刺検査を施行して骨髄液を採取した。既報のごとく骨髄単核球分画を分離して、SCID-hIL6 Tg mice の腹腔内へ 1.5% agarose gel とともに注射した。
- 2) マウス腹腔内骨髄腫細胞の生存増殖の確認：SCID-hIL6 Tg mice の腹腔内へ注射後、6 週、8 週及び 12 週にマウスの腹腔内から細胞を回収した。また、腫瘤を形成している場合は腫瘤を摘出した。回収した細胞を、FITC 標識 CD38 抗体、PE 標識 CD54、MPC-1 抗体および PC5 標識 CD45 抗体で染色し、フローサイトメーター (EPICS ELITE, Coulter 社) で解析した。

- 3) in vitro 培養での細胞株の樹立：マウス腹腔内より回収した細胞を RPMI-1640 培地 + 10% 牛胎仔血清にインターロイキン 6 (IL-6) 添加あるいは非添加で in vitro 培養した。増殖してきた細胞をクローン化した。
- 4) 株化した骨髄腫細胞株の SCID-hIL6 Tg mice での移植生存の確認：株化し得た骨髄腫細胞株を 1.5% agarose gel とともに再度 SCID-hIL6 Tg mice の腹腔内に注射した後、8 週、12 週及び 20 週にマウスの腹腔内から細胞を回収し、生存増殖を確認した。
- 5) 組織学的検討：骨髄腫細胞株を移植したマウスからの腫瘤あるいは腹腔組織を採取して、組織学的検討を行なった。

研究結果

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 mice 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 mice 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、腹腔内の腫瘤、腹膜および筋肉組織のアミロイド沈着の有無を調べた。対照として、既知の骨髄腫細胞株 3 株 (U-266, KMS-5, IL-KM3) においても同様の移植実験を行った (図-1)。しかしながら、AL アミロイドーシス患者からの骨髄腫細胞株 (Y01, Y02, Y03) を移植されたマウスにおいてはいずれにもアミロイド沈着は認められなかった。対照の骨髄腫細胞株においてもアミロイド沈着は認められなかった。

考 察

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 mice 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。また、他の骨髄腫細胞株 U-266 (λ 産生)、IL-KM3 (IgG-κ 産生)、KMS-5 (IgG-λ 産生) でも同様の実験を行ったが、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。M タンパク負荷は必要条件であろうが、それだけでは十分ではないと考えられる。今後、SCID-hIL6 Tg mice の移植系において、マウス生体側のマクロファージの活性

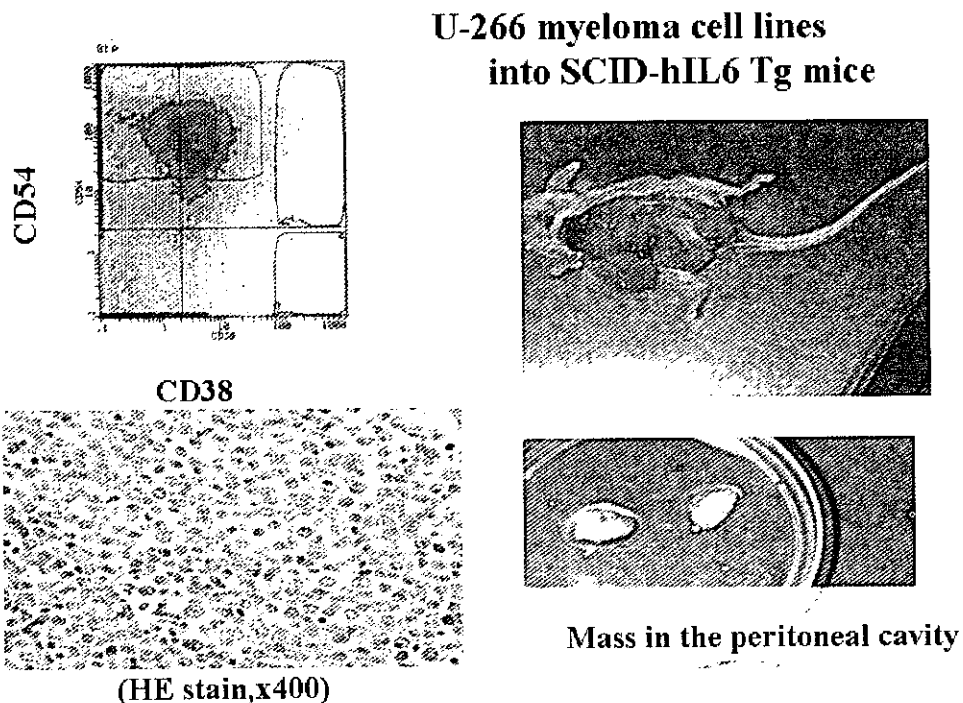


図 1

(HE stain, x400)

刺激あるいはマクロファージから産生されるプロテアーゼ(例えば cathepsin S 等)遺伝子を導入した骨髄ストローマ細胞株 KM-102 との共移植系でのアミロイド沈着誘導実験を考える必要があるであろう。

結 論

1. AL アミロイドーシス合併骨髄腫患者からの骨髄腫細胞を SCID-hIL6 mice の腹腔内に注射して生存・増殖させ得たものから 3 種の細胞株を樹立することができた。
2. AL アミロイドーシス合併骨髄腫患者から樹立した骨髄腫細胞株を SCID-hIL6 mice の腹腔内に移植・生存させ長期に観察したが、いずれもアミロイド沈着は認められなかった。今後は、生体側の反応を修飾し得る条件下での検討が必要である。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表
 - 1) Ishikawa H, Mahmoud MS, Fujii R, Abroun S, Kawano MM. Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 39(1-2): 51-55, 2000.
 - 2) Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Taniguchi O, Kawano MM. Requirement of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. *Blood* 99(in press), 2002.
2. 学会発表
 - 1) 河野道生：形質細胞の分化と腫瘍化－骨髄腫細胞から学ぶもの－. 総説講演. 第63回日本血液学会総会、名古屋、平成13年4月20日、2001.
 - 2) Tsuyama N, Ishikawa H, Abroun S, Liu S, Li F, Kawano MM: The proliferation of

MPC-1-CD49e-CD45+ immature myeloma cells are strictly controlled by IL-6 in the SCID-hIL6 Tg mice. The 43 annual meeting of American Society of Hematology, Orland, U.S.A., December 7-11, 2001.

- 3) Ishikawa H, Abroun S, Tsuyama N, Liu S, Li F, Kawano MM: Implication of an inhibitory role of STAT1 for myeloma cell proliferation. The 43 annual meeting of American Society of Hematology, Orland, U.S.A., December 7-11, 2001.
- 4) Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, Liu S, Li F, Kawano MM: Insulin and IGF-1 are survival factors for myeloma cells in vitro. The 43 annual meeting of American Society of Hematology, Orland, U.S.A., December 7-11, 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

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

by
Michio M. Kawano

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

The purpose of this project is to establish an experimental model inducing AL amyloidosis in SCID-hIL6 transgenic mice(SCID-hIL6 Tg mice) and to clarify the mechanism how human M protein produced from myeloma cell lines degenerate into amyloid deposit in these mice. We established three human myeloma cell lines from myeloma patients with AL amyloidosis, which were established from peritoneal mass in these SCID-hIL6 Tg mice. We implanted these established myeloma cell lines into peritoneal cavity of SCID-hIL6 Tg mice with agarose gel as reported previously, however we could not observe any amyloid deposition in the peritoneal cavity of SCID-hIL6 Tg mice. Thus, these results suggest that only loading of M protein produced from myeloma cell lines is not enough for induction of amyloid deposition. In future, we should try to induce amyloid deposition in these SCID-hIL6 Tg mice after intraperitoneal injection of these myeloma cell lines with various reagents that can modulate function of macrophages.

加 藤 昭 夫

アミロイド型リゾチームの小胞体での品質管理

分担研究者 加 藤 昭 夫

共同研究者 宋 有 涛

研究要旨

アミロイドーシスモデル蛋白質として、ニワトリリゾチームのアミロイド型変異体を作成し、酵母でのこれらの変異体の運命（分泌および品質管理）について検討した。酵母 *S. cerevisiae* のカルネキシンは糖蛋白質に特異的な分子シャペロンであるが、これをノックアウトしても酵母の生育に関係なく、熱ストレスや浸透圧ストレス下でも生育に影響はなかった。他の真核生物では、カルネキシンをノックアウトすると致命的になるため、カルネキシン欠損による研究が出来なかった。したがって、酵母 *S. cerevisiae* を用いることにより、カルネキシンの品質管理機能を直接的に明らかにできる。こうした視点から、本研究ではカルネキシン欠損酵母を用いて、モデル蛋白質として、ニワトリリゾチームを N-グリコシル化した変異体 (G49N) を用い、アミロイド型リゾチーム変異体 (I55T/G49N, D66H/G49N) を作成し、野生型酵母およびカルネキシン欠損酵母で分泌させることにより、品質管理機能を検討した。その結果、アミロイド変異体 (D66H/G49N) は野生型酵母では発現分泌が著しく抑制されるが、カルネキシン欠損酵母では抑制されず、多量に分泌した。一方、もう一つのアミロイド変異体 (I55T/G49N) は野生型、カルネキシン欠損酵母で同様の分泌量を示した。これらの結果は、①分子シャペロンの品質管理機能が低下するとアミロイド変異体 (D66H) を分泌しやすくなること。②アミロイド変異体 (I55T) の種類によって品質管理を受けずに分泌する可能性があることが示された。

目 的

アミロイド型リゾチームを作成し、アミロイドーシスの分子機構ならびにその生体内での分解機構（品質管理）を明らかにすることを目的とした。そのために、二種類のアミロイド型リゾチーム (I55T, D66H) を遺伝子工学的手法で作成し、酵母発現システムを用いて、アミロイド型リゾチームの発現ならびに品質管理に関する情報を得るための実験モデル系を作成した。

方 法

酵母 *S. cerevisiae* のカルネキシンのノックアウトはカルネキシン遺伝子の BamH1 と Pst1 部位に Leu2 遺伝子を挿入し、相同組換えによりカルネキシン欠損株を作成した。アミロイド型リゾチームは部位指定変異により、I55T, D66H 二種類の変異体を作成した。これらの変異体を野生型とカルネキシン欠損型 *S. cerevisiae* に導入し、発現分泌量を調べた。また、この発現系における小胞体シャペロン Bip, PDI の発現量を Competitive RT-PCR 法により、並行して調べ、Unfolded Protein

Response の検討を行った。

結 果

アミロイド型リゾチームの変異部位を図1に示した。ヒトとニワトリともに同じ部位での変異によりアミロイド型リゾチームに変換する。図1に示すように、ニワトリの55位のイソロイシンと66位のアスパラギン酸はともに周辺のアミノ酸との水素結合により、 β 構造を分子内部に固定する重要なアミノ酸である。このアミノ酸が一残基置換をおこす変異 (I55T または D66H) により、周辺のアミノ酸との水素結合が破壊され、 β 構造が分子表面に露出しやすくなり、リゾチーム分子間でのクロス β 構造を形成し、アミロイド形成をもたらす。図2に示すように、このアミロイド型変異体は分泌が極めて少なく、酵母の培養中にアミロイド形成し、不溶化する可能性があり、これを防ぐ発現分泌系の確立が必要とされた。このアミロイド型リゾチームは、49位のグリシンをアスパラギンに置換する (G49N) とこの位置にN型糖鎖が結合し、アミロイドーシス形成を抑制することが期待される。この「グリコシル化」により、安定な状態で可溶化したアミロイド変異体を発現分泌できることが明らかになった。

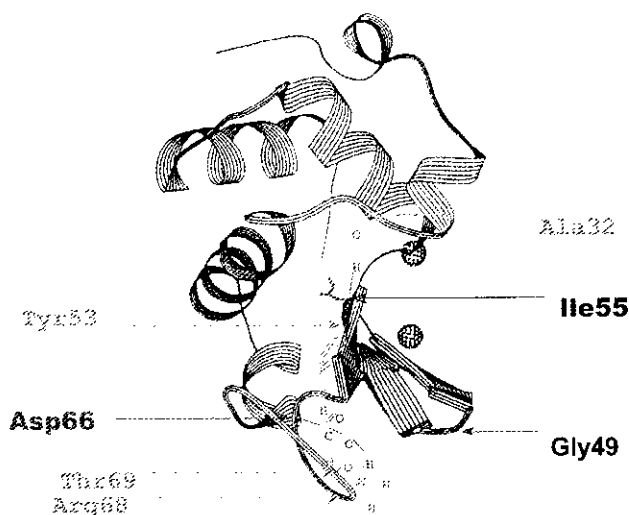


図1 リゾチームのコンピュータグラフィクス

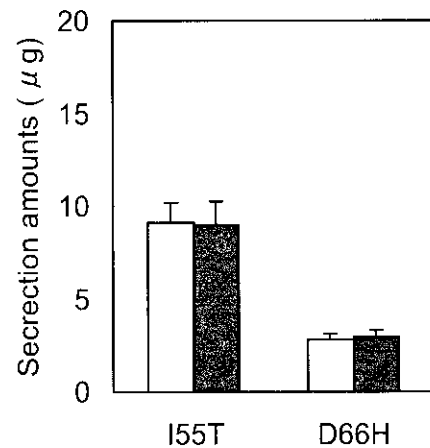


図2 アミロイド型リゾチーム (I55T,D66H) の酵母での発現分泌

白カラム：野生型酵母、黒カラム：カルネキシン欠損酵母

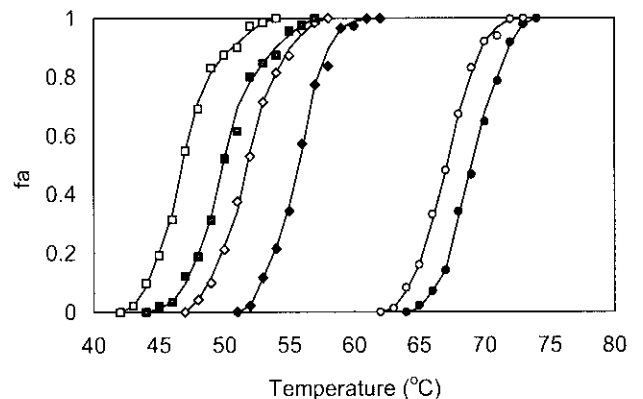


図3 アミロイド型リゾチームの変性曲線

黒丸、野生型リゾチーム；白丸、グリコシル化リゾチーム (G49N)；黒ダイヤモンド、I55T；白ダイヤモンド、I55T/G49N；黒四角、D66H；白四角、D66H/G49N)

図3は種々のタイプのアミロイド型リゾチームの変性カーブを示しており、この結果はアミロイド変異体 I55T、D66H は野生型リゾチームに比べ、変性転移温度が13°C および18°C 低くなっており、アミロイド変異により著しく構造が不安定になることを示す。また、49位でのグリコシル化により、一層不安定になることを示している。しかし、前述のように、グリコシル化により構造が一層不安定になっても、可溶性でアミロイド形成を抑制するので、実験系としては望ましい。図4に示すように、グリコシル化により、比較的少量

の変異体が得られた。興味深いことに、アミロイド変異体 (D66H/G49N) は野生型酵母では発現分泌が著しく抑制されるが、カルネキシン欠損酵母では抑制されず、多量に分泌した。一方、もう一つのアミロイド変異体 (I55T/G49N) は野生型、カルネキシン欠損酵母で同様の分泌量を示した。この現象は二種類のタイプの酵母で同様に観察された。この結果はアミロイド型リゾチーム (D66H/G49N) は小胞体カルネキシンによる品質管理 (不良蛋白質のプロテアソームでの分解) が行われていることを直接証明したものである。こ

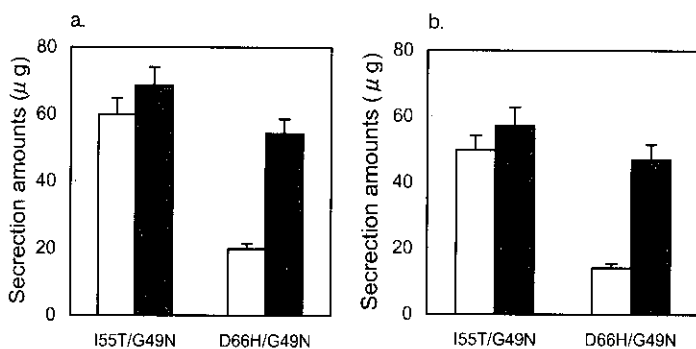


図4 グリコシル化アミロイド型リゾチーム (I55T/G49N, D66H/G49N) の酵母 *S.cerevisiae* AH22 (Panel a) と W303 (Panel b) での発現分泌

白カラム：野生型酵母；黒カラム：カルネキシン欠損酵母

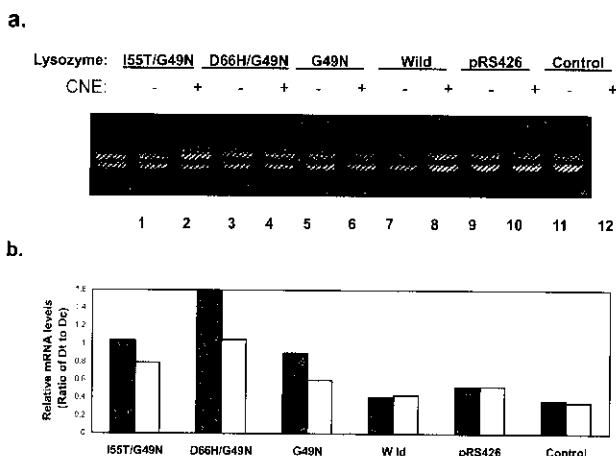


図5 アミロイド型リゾチームを野生型酵母とカルネキシン欠損酵母で発現した場合のPDI mRNA の発現量の比較

a: RT-PCR 後のアガロースゲル電気泳動図 (下のバンドがコンペティター、上のバンドが PDI)
b: 上図のバンドからコンペティターあたりの PDI のバンドの濃さの比率を示す。白カラム：野生型酵母；黒カラム：カルネキシン欠損酵母

れに対して、同じアミロイド型リゾチームでも I55T/G49N はカルネキシンによる品質管理を受けないことが示された。これを証明するために、小胞体の他のシャペロン BiP と PDI の発現量を調べた。すなわちカルネキシン欠損により、不良蛋白質 (アミロイド型リゾチーム) が小胞体内に蓄積し、他のシャペロン BiP と PDI が Unfolded Protein Response により、発現量が増加することが予想される。これを Competitive RT-PCR 法により、各々の mRNA を測定した。その結果は図 5、図 6 に示した。予想したように、アミロイド型リゾチーム (D66H/G49N) をカルネキシン欠損酵母で発現させると分子シャペロン PDI, BiP とともに著しく発現量が増加し、Unfolded Protein Response が生じていることが明らかにされた。一方、もう一種類のアミロイド型リゾチーム (I55T/G49N) は Unfolded Protein Response があまり生じていないことが示された。これらの結果から、アミロイド型リゾチームをモデル蛋白質として、小胞体内での分泌、品質管理機構を解析することが可能になり、分子シャペロンカルネキシンの品質管理機能が明確に示され、また同じアミロイド型リゾチームでも、この品質管理によりトラップされ分解系に持っていかれるものと、これを潜り抜けるものもあることが示された。

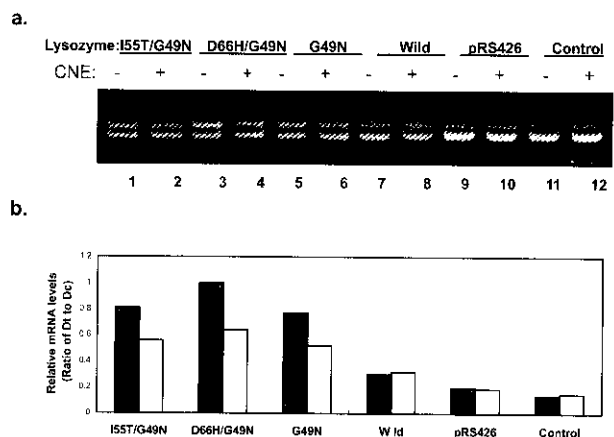


図6 アミロイド型リゾチームを野生型酵母とカルネキシン欠損酵母で発現した場合の BiP mRNA の発現量の比較

a: RT-PCR 後のアガロースゲル電気泳動図 (下のバンドがコンペティター、上のバンドが PDI)
b: 上図のバンドからコンペティターあたりの BiP のバンドの濃さの比率を示す。白カラム：野生型酵母；黒カラム：カルネキシン欠損酵母

考 察

アミロイド型リゾチーム変異体を用いて、アミロイドーシスの分子機構ならびにその品質管理機構を検討した。真核生物の糖蛋白質に特異的な分子シャペロンカルネキシンを欠損させると、致命的となり、カルネキシンの機能を直接検討できなかったが、酵母 *S.cerevisiae* はカルネキシンを欠損しても生育に関係なく生存できるという特性を利用して、カルネキシン欠損酵母と野生型酵母でアミロイド型リゾチームの発現分泌執権を行った。本実験で、分子シャペロンカルネキシン欠損により、アミロイド型リゾチームの分泌が増加したという結果は、分子シャペロンの品質管理機能が低下するとアミロイド変異体が分泌しやすくなる可能性を示している。また、アミロイド変異体のタイプによっては分子シャペロンによる品質管理の監視を潜りぬけて分泌する可能性が示唆されるデータも得られた。今後、このアミロイドーシスモデル蛋白質を用いて、アミロイドーシスの分子機構ならびにその品質管理機構が一層明らかにされることが期待される。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Y Song, H Azakami, M Hamasu, A Kato. In vivo glycosylation suppresses the aggregation of amyloidogenic hen wgg white lysozyme expressed in yeast. FEBS Letters 491; 63-66 (2001).
- 2) Y Song, J Sata, A Saito, M Usui, H Azakami, M Hamasu, A Kato. Effects of calnexin deletion in *Saccharomyces cerevisiae* on the secretion of glycosylated lysozymes. J Biochem. 130; 757-764 (2001).
- 3) Y Song, H Azakami, S Begum, J W He, A Kato. Different effects of calnexin deletion in *Saccharomyces cerevisiae* on the secretion of two glycosylated amyloidogenic lysozymes. FEBS Letters in press (2002).

Quality Control of Amyloidogenic Lysozymes in Endoplasmic Reticulum in Yeast

by
Akio KATO

From
Department of Biological Chemistry, Yamaguchi University

Glycosylated amyloidogenic mutant lysozymes (I55T/G49N and D66H/G49N) having the N-glycosylation signal sequence (Asn-X-Ser) were constructed by genetic engineering and secreted in yeast expression system. The glycosylated chains seem likely can mask the β strand of amyloidogenic lysozymes from the intermolecular cross β sheet association, thus improving the solubility of amyloidogenic lysozymes. Both glycosylated amyloidogenic lysozymes I55T/G49N and D66H/G49N were expressed in wild-type and calnexin-disrupted *Saccharomyces cerevisiae*. The secretion amounts of mutant I55T/G49N were almost similar in both wild-type and calnexin-disrupted *S. cerevisiae*. In contrast, the secretion of mutant D66H/G49N greatly increased in calnexin-disrupted *S. cerevisiae*, while the secretion was very low in wild-type strain. In Parallel, the induction level of the molecular chaperones BiP and PDI located in the ER was investigated when these glycosylated amyloidogenic lysozymes were expressed in wild-type and calnexin-disrupted *S. cerevisiae*. The mRNAs of BiP and PDI were evidently increased when mutant lysozyme D66H/G49N was expressed in calnexin-disrupted *S. cerevisiae*, while they were not so increased when I55T/G49N mutant was expressed. This observation indicates that the conformation of mutant lysozyme D66H/G49N was less stable in the ER, thus leading to the higher-level expression of ER molecular chaperones via the unfolded protein response (UPR) pathway. This suggests that glycosylated amyloidogenic lysozyme I55T/G49N may have relative stable conformation in the ER, thus releasing from the quality control of calnexin compared with mutant lysozyme D66H/G49N.