

厚生労働科学研究研究費補助金

特定疾患対策研究事業

アミロイド沈着による病的要素の 検索に関する研究

平成14年度総括・分担研究報告書

平成15(2003)年3月

主任研究者 石原得博

厚生労働科学研究研究費補助金
特定疾患対策研究事業

アミロイド沈着による
病的要素の検索に関する研究

2002 年度研究報告書

ANNUAL REPORT OF THE RESEARCH ON THE
PATHOLOGICAL FACTOR OF THE AMYLOID DEPOSITION,
SURVEYS AND RESEARCH ON SPECIFIC DISEASE,
THE MINISTRY OF HEALTH LABOUR AND WELFARE OF JAPAN

2003年 3 月

March 2003

主任研究者 石 原 得 博

山口大学医学部構造制御病態学講座

Chairman: Tokuhiko ISHIHARA

Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine

目 次

平成 14 年度総括研究報告	5
平成 14 年度分担研究報告	13
平成 14 年度事業報告	81
平成 14 年度研究班班員名簿	87
研究成果の刊行に関する一覧表	91

アミロイド沈着による
病的要素の検索に関する研究
平成14年度
総括研究報告

石原得博

山口大学医学部構造制御病態学講座

アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究

主任研究者 石原得博 山口大学医学部構造制御病態学教授

分担研究者

東海林幹夫（岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学助教授）

前田秀一郎（山梨医科大学第一生化学教授）

樋口京一（信州大学医学部加齢適応研究センター脈管病態分野教授）

池田修一（信州大学医学部神経内科教授）

松井高峯（帯広畜産大学獣医学部家畜病理学教授）

河野道生（山口大学大学院医学研究科独立専攻応用医工学系生体シグナル解析医学講座細胞シグナル解析学教授）

横田忠明（社会保険小倉記念病院病理科部長）

加藤昭夫（山口大学農学部生物機能科学科教授）

内木宏延（福井医科大学第二病理教授）

久保正法（つくば動物衛生研究所疫学研究部病性鑑定室室長）

田平武（国立療養所中部病院長寿医療研究センター所長）

A. 研究目標

アミロイドーシスとは、さまざまな前駆蛋白が β 構造を多く含んだ共通の線維構造からなるアミロイドを形成し、色々な臓器

に沈着し、障害を引き起こし致命的ともなる疾患群である。いわゆる原発性や骨髄腫に伴うALアミロイドーシス、RAや結核に続発するAAアミロイドーシス、家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）、アルツハイマー病などの脳アミロイドーシス、老人性アミロイドーシスなど多くの病型がある。しかし、その有効な治療法はなく、唯一注目されているのは、ドミノ移植でも知られているFAPで行われている肝移植である。さらに近年、その発症病理において注目されているのは、プリオン病に見られるような、外来性の異常蛋白（線維）の発症促進効果である。分担研究者の樋口は、マウス老化アミロイドモデルにおいて、アミロイドーシスの経口感染の可能性を示した。

これまで我々は、アミロイドーシスは異種アミロイド蛋白や異動物種のアミロイドの静注あるいは腹腔内投与、経口摂取でもアミロイドーシス発症促進の可能性を示し、続発性のAAアミロイドーシスにおいてもアミロイドの経口摂取による同様の可能性を示した。アミロイドモデルマウスとしての各種トランスジェニックマウスの作製を行いこれらのマウスの交雑による、各因子の発症機序における役割についても検討して

きた。また、一部では実際の治療法についても基礎的研究を行っている。

本研究班では、新しい動物モデルの開発、核依存性重合反応によるアミロイド線維形成機序の解明の為に、共通の因子の検討、核依存性重合反応における阻害反応の誘導（治療）の可能性をモデル動物あるいは各種変異動物において検討する。また脳アミロイドでは、 $A\beta$ による免疫療法を検討する。ALアミロイドーシスについては、アミロイド産生ヒト骨髄腫細胞株を使って、ALアミロイドーシス発症モデル動物を作製する。

さらに、プリオン病でアミロイド線維核がもととなりアミロイドーシスを引き起こすという伝播発症機構が示され、我々の研究班においても、マウス老化アミロイドーシスモデルや実験的AAアミロイドーシスでも、アミロイド線維の摂取による発症促進効果の可能性が示された。アミロイド線維形成を促進する因子（危険因子）としての、①アミロイド線維やプリオンの様にアミロイド線維の鋳型(seed)になる物質、②AEF(Amyloid Enhancing Factor)、③遺伝的要因、の解明が重要である。これには、アミロイド線維核による発症機構の解析と各種アミロイドに共通の構成成分やAEFに関する研究を各アミロイド病型について検討し、それらの結果を統合し解析することによってアミロイドーシス共通の発症機序の解明と治療法の開発ができると考えられる。アミロイド線維核の移行に関する研究は、家族性アミロイドポリニューロパチー患者肝臓のドミノ肝移植の可否にも関係し、その重要性は高く、アミロイドーシス

と狂牛病等のプリオン病との共通性を指摘し、発症の予防法や危険因子の解析法を開発する点で、厚生行政上の意義は大きく、国内外の研究に先んずる研究課題である。

B. 研究成果及び考察

1. ALアミロイドーシス

ALアミロイドーシスを惹起する骨髄腫細胞の増殖をいかにして抑制するかは、ALアミロイドーシスの治療として極めて重要である。骨髄腫の発症が高齢者に多いことから、高齢者の背景となる生物学的状況と形質細胞の分化・増殖との関連が研究されなければならぬ。河野らは高齢とともに低下する副腎皮質ホルモンDHEA (dehydro-epiandrosterone)に注目して、その骨髄腫細胞の増殖に及ぼす作用について検討し、ALアミロイドーシスの発症・進展を抑制するものとして、上昇しているInterleukin-6 (IL-6)活性を抑制するものが治療戦略の一つとして有力である可能性を示唆した。

2. AAアミロイドーシス

IL-6ノックアウトマウスでは、実験的AAアミロイドーシスが発症しない事を示してきたが、Wildマウスにおいて、抗IL-6抗体を投与する事によって、血中IL-6を中和し、アミロイドーシスの発症抑制効果を得る事ができるか否かを検討した。IL-6抗体療法が、実験的AAアミロイドーシス発症において抑制効果がある事がわかった。今後、血清IL-6濃度の変化や、アミロイドの吸収期における、IL-6抗体療法の効果についてのさらなる検討が必要である。

3. $A\beta$ アミロイドーシス

内木らは $A\beta$ 蛋白からの β アミロイド線

維 (fA β) 形成過程を、チオフラビン T を用いた分光蛍光定量法および閉鎖反応系を駆使して速度論的に解析してきた。その結果、同過程が重合核依存性重合モデルで説明できることを明らかにした。このモデルは、A β 蛋白からの重合核形成過程及び線維伸長過程より成るが、後者の過程は一次反応速度論形式に従う。今回、生体により近いモデルとして、系外から A β 蛋白が供給され続ける開放反応系を構築し、fA β の伸長ならびに脱重合機構を解析した。また、apoE などの生体分子の A β 蛋白、fA β それぞれに対する親和性、ならびに線維形成に及ぼす影響を、新たに構築した開放反応系を用いて解析した。内木らが構築した開放反応系は、種々の生体分子および有機化合物が線維形成に及ぼす影響を定量的に解析し、そのメカニズムを解明する上で極めて有用である。現在上記と同様の方法で、種々の生体分子および有機化合物の A β 蛋白、fA β それぞれに対する親和性、ならびに線維形成に及ぼす影響を解析している。これらの結果を統合し、生体内環境において複数の分子種がどのように相互作用し線維の伸長・分解に影響を及ぼすのかを、より忠実に再現するモデルの構築を試みている。

東海林らは AD 患者脳において脳内リポ蛋白非結合型 A β はダイマー形成能に富み、血液中に存在する同分子種とは質的相違を持った脳内アミロイドーシス惹起分子であると考えた。また AD 患者脳 A β オリゴマーは一旦マウス脳に入ると長期間分解されずに存在し、アミロイド原性に乏しいマウス A β ペプチドをも巻き込みアミロイド

形成を促進することを昨年度報告した。今後の本研究においては可溶性 A β オリゴマーや AD 患者脳 A β オリゴマーの病原性検討を主眼とし、血液中からのマウス脳内、特に老人斑への移行を MRI 画像にて検証する。A β オリゴマーの病原性の検討は、今後の AD 治療診断の中核をなす重要なもので、より AD 病態惹起分子選択的な治療診断法開発に有用と考えられる。

アデノウイルスベクターに A β cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノウイルスを B6 マウスに経口投与し、腸管上皮細胞に感染させた。そして A β 抗原を腸管細胞に発現させ、免疫系に抗原提示し、どのような免疫反応が惹起されるか検索した。腸管細胞に A β 抗原を強制発現させた場合、抗体産生は誘導されたが、細胞性免疫は惹起されなかった。脳・腎臓を含め各臓器において炎症所見は認められなかった。

4. アミロイドーシスにおける共存蛋白関連

Amyloid P component (AP) および apolipoprotein E (Apo E) はアミロイド線維蛋白と共存し、アミロイド線維形成において何らかの役割を果たしている。今回、マウス AA アミロイドの吸収期における AP 及び Apo E とアミロイドの関連を検討する目的で免疫組織化学的検索を行った。実験的 AA アミロイドーシスにおいては、原因を除くことによって、一旦沈着したアミロイドが吸収され、特に肝臓のアミロイドはより早く吸収された。アミロイド吸収の時期において AP と Apo E との染色態度が違ふ事は、AP と Apo E がアミロイド線維の形成、アミロイド線維の吸収において、

異なる役割を果たしている可能性を示唆した。

トランスサイレチン(TTR)は、アルツハイマー病のA β アミロイドの沈着を、*in vitro*で抑制することが見出されているが、*in vivo*での証明はされていない。また、種々のアミロイドーシスで沈着する異なるアミロイドに共通の微量成分、SAPが、A β アミロイドの沈着にどう関与するかも明らかでない。Hsiao博士が作製した遺伝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と分担研究者の前田らが作製した無TTRマウス及び無SAPマウスを用い、遺伝性アルツハイマー病でのA β アミロイドの沈着におけるTTRやSAPの関与について検討し、SAPは脳内A β アミロイド沈着の初期の段階を遅らせることを示唆する結果を得た。

加藤らはアミロイド型リゾチームを酵母*S. cerevisiae*で発現分泌させる系を用いて、分子シャペロン欠損により、アミロイド変異体の分泌が促進されることを明らかにした。今回はアミロイド型シスタチンを作成し、その特性を調べ、分子シャペロン(PDIホモログ)欠損がアミロイド変異体の分泌を促進するかどうかを検討した。ヒトシスタチンCは遺伝性アミロイド性脳出血を引き起こすことが知られており、本研究ではこのモデルタンパク質として、酵母発現系でヒト型ホモログであるニワトリシスタチンを用いて、アミロイド型変異体を作成することができた。今後はこの系を用いて、分子シャペロンとアミロイドーシスの関係を明らかにしていく予定である。

5. 自然発症動物アミロイドーシス

松井らは牛のアミロイドーシスについて、最近10年間における北海道での発生状況、年令分布等を調査し、また過去の症例の組織切片を用いてアミロイドの沈着部位を検索した。さらに最近得られた牛アミロイド症例の腎臓よりアミロイドの抽出を試みた。牛のアミロイドーシスは比較的めずらしい病気で、末期での発見は比較的容易であるが、病期途中の状態では発見されづらいと思われた。新たな症例によりより詳細な病変分布を検索する必要があると思われた。

久保らはアミロイド症の発生頻度と病理像を明らかにするために、茨城県、千葉県でBSEの検査を行った牛のホルマリン固定した腎臓の組織標本を作製し、アミロイドーシスの有無を検索した。アミロイドーシスは、2/150例の腎臓で見つかり、9歳と13歳の高齢であった。更に症例数を増やして検討すること、また、アミロイドーシスを合併した8歳のホルスタイン牛の凍結保存した腎臓よりアミロイドを抽出し、マウス等に投与試験を計画している。

研究協力者の宇根は飼育チーター(*Acinonyx jubatus*)に多発するアミロイドーシスの病理発生を解明し、絶滅危惧種であるチーターの種の保存に貢献し、またヒトのAAアミロイド症のモデル動物としての可能性を検討した。

飼育下チーターには、AAアミロイドが高率に沈着し、これが死因として最も重要であることが明らかになった。しかし、その病理発生については今後さらに検討する必要がある。

6. アミロイド促進(Amyloid enhancing factor, AEF)効果について

アミロイド沈着臓器からの抽出物質には、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のある物質が存在し、その物質は Amyloid enhancing factor (AEF) と呼ばれているが詳細は未だ不明である。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。また、アミロイド線維を介してアミロイドーシスの発症が促進される可能性を示唆する報告もある。そこで、ヒトアミロイド線維にいくつかの処理を行うことによって、マウスに対するヒトアミロイド線維の F-AEF 活性の抑制方法について検討した。

ヒト甲状腺髄様癌組織より水抽出した AA アミロイド線維に対してそれぞれ以下の処理を行い、ICR マウス (♀) の腹腔内注射した後に、皮下にカゼインアジュバントを注射して脾のアミロイド沈着について検索した。

アミロイド線維へのオートクレーブ処理により F-AEF 活性は抑制された。低濃度 NaOH 処理では、F-AEF 抑制は認められなかった。塩酸グアニジン処理をしたアミロイド線維の皮下投与による免疫により、強い F-AEF 抑制が認められた。

7. マウス AApoAII アミロイドーシス発症促進物質の伝播機構の解析

樋口らは既にマウス AApoAII アミロイドーシスにおいて発症促進物質としてのアミロイド線維の伝播がアミロイドーシス発症に重要な役割を担っている可能性を 1) アミロイド線維投与による発症促進 (実験的伝播)、2) アミロイドーシス発症個体

と同居したマウスでの発症促進 (水平伝播)、3) アミロイドーシス発症母親からの仔マウスでの発症促進 (垂直伝播) 等の事実より示唆してきた。今回、アミロイドーシスにおける伝播機構を明らかにするために、1) 飼育室内水平伝播、2) 母子間垂直伝播をより詳細に検討し、さらに3) 伝播に必要な AApoAII アミロイド線維量について検討した。

AApoAII 好発系である SAMR1C, SAMP1 マウスにおいて、マウス AApoAII アミロイドーシスの同一飼育室内での水平伝播が示唆されたが、嫌発系である SAMR1 では観察されなかった。出生後の母子間垂直伝播が示唆されたが、伝播経路についてはまだ不明である。また AApoAII アミロイド線維は極微量 ($<10^{-7} \mu\text{g}$) でも伝播が可能であることが判明した。

8. FAP 家系における表現促進現象の発現機序の検討

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者家系では、同一家系内で下の世代ほどその発症年齢が若年化するという表現促進現象が認められ、またこの表現促進現象は母から子への母系遺伝の際に顕著に認められることが知られている。近年、実験動物レベルでは個体間でのアミロイドーシスの発症促進現象が存在することが報告されている。このような現象の発現機序としては、個体間でアミロイド線維形成の重合核 (seed) となりうる分子 (アミロイド原性蛋白の変性単量体、) が個体間で伝達される可能性が示唆されている。今回は、FAP の表現促進現象がヒトにおける母子間でのアミロイドーシス発症促進因子の伝播に相

当する可能性があるのかどうかを検討した。

FAP 患者家系では、アミロイド線維あるいはアミロイド原性蛋白質が臍帯血あるいは母乳を介して母子間で伝播する可能性があり、そのことは FAP 家系で認められる表現促進現象の原因となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究結果発表

別掲

H. 知的所有権の取得状況

1 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 14 年度分担研究報告

目 次

FAP 家系における表現促進現象の発現機序の検討	17
信州大学医学部第三内科 池田修一, 矢崎正英, 竹井洋一 信州大学医学部附属加齢適応研究センター神経可塑性分野 徳田隆彦	
腸管細胞に発現させた A β ペプチドに対する免疫応答に関する研究	26
国立療養所中部病院長寿医療研究センター 田平武, 原英夫	
ヒト・アミロイド線維の amyloid enhancing factor 効果の抑制方法の検討	29
社会保険小倉記念病院病理科 横田忠明 山口大学医学部脳神経病態学講座 尾本雅俊 山口大学医学部構造制御病態学講座 河野裕夫, 崔 丹, 星井嘉信 権藤俊一, 石原得博	
酵母発現系でのアミロイド型シスタチンの分泌とその特性	33
山口大学農学部生物機能科学科 加藤昭夫, 阿座上弘行	
AL アミロイドーシス発症骨髄腫細胞の in vivo 増殖を調整し得る因子の検討 —副腎皮質ホルモン DHEA の骨髄腫細胞におよぼす作用について—	38
山口大学大学院医学研究科生体シグナル解析医学講座 河野道生, 石川秀明, 津山尚宏	
家畜におけるアミロイド症の発生頻度の調査および病理学的検討	42
つくば動物衛生研究所疫学研究部病性鑑定室 久保正法	
牛のアミロイドーシスに関する研究	43
帯広畜産大学獣医学部家畜病理学 松井高峯, 古林与志安	
IL-6 抗体を用いた実験的 AA アミロイドーシスの抑制	44
山口大学医学部構造制御病態学講座 石原得博, 河野裕夫, 石井文彩 崔 丹, 星井嘉信	
吸収期の実験的マウス AA アミロイドにおける amyloid P component, apolipoprotein E の免疫組織化学的検討	47
山口大学医学部構造制御病態学講座 石原得博, 崔 丹, 星井嘉信 河野裕夫, 権藤俊一 山口大学医学部保健学科基礎検査学講座 高橋睦夫	

飼育下チーター (Acinonyx jubatus) のアミロイド症	51
山口大学医学部構造制御病態学講座	石原得博
麻布大学獣医学部病理学研究室	宇根有美
遺伝子改変マウスを用いた遺伝性アミロイドーシスの発症予防法の開発： 遺伝性アルツハイマー病におけるアミロイド沈着へのトランスサイレチン (TTR) ならびに血清アミロ イド P 成分 (SAP) の関与の解析	56
山梨医科大学学生化第一講座	前田秀一郎, 大森弘子, 魏 嵐
山梨医科大学総合分析実験センター	伊藤禎洋
山梨医科大学精神神経科	杉山仁視, 久保田正春 神庭重信
群馬大学医学部神経内科	針谷康夫
岡山大学大学院医歯学総合研究所神経病態内科	東海林幹夫, 瓦林毅
A β オリゴマーの病原性の検討	62
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学	東海林幹夫, 松原悦朗 瓦林毅, 阿部康二
開放反応系を用いたアルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成・ 分解機構解明および生体分子との相互作用解析	69
福井医科大学第二病理	内木宏延, 長谷川一浩
金沢大学神経内科	小野賢二郎, 山田正仁
マウス AApoA II アミロイドーシス伝播機構の解析	73
信州大学医学部附属加齢適応研究センター脈管病態分野	樋口京一 是永龍巳 付笑影 張 Huan _{yu} 澤下仁子 森政之
京都大学再生医科学研究所再生統御	松下隆壽
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所形態学部	細川昌則

FAP 家系における表現促進現象の発現機序の検討

分担研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科

共同研究者 徳田隆彦*、矢崎正英**、武井洋一**

*信州大学医学部附属加齢適応研究センター神経可塑性分野

**信州大学医学部第三内科

研究要旨 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者家系では、同一家系内で下の世代ほどその発症年齢が若年化するという表現促進現象が認められ、またこの表現促進現象は母から子への母系遺伝の際に顕著に認められることが知られている。今回は、FAP の表現促進現象を母子間でのアミロイドーシス発症促進因子の伝播という観点から検討した。FAP 患者の乳腺組織を採取し、乳腺へのアミロイド沈着の有無および組織における沈着の分布を病理学的および免疫組織化学的に検討した。また妊娠・出産した FAP 患者から臍帯血および母乳を採取し、それらに含まれる transthyretin(TTR)分子について蛋白化学的に検討した。FAP 患者の乳腺組織には Congo red 染色陽性の TTR amyloid の沈着が認められ、その沈着量は患者の臨床症状の重症度と相関していた。剥離した腺上皮の直下に存在する amyloid は腺腔に接して存在していた。また FAP 患者由来の臍帯血中には、対照者由来の臍帯血中よりも TTR 単量体が有意に多く存在していた。FAP 家系で認められる表現促進現象は母子間での発症促進因子の伝播に起因する可能性が考えられた。

A 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者の家系では、同一家系内で下の世代ほどその発症年齢が若年化するという表現促進現象が認められることが知られている。我々は以前に、この表現促進現象は母から子への母系遺伝の際に最も顕著に認められることを報告してい

る。

近年、実験動物レベルでは個体間でのアミロイドーシスの伝播現象が存在することが報告されている。このような伝播現象の発現機序としては、個体間でアミロイド線維形成の重合核(seed)となりうる分子(アミロイド原性蛋白の変性単量体、オリゴマー、アミロイド線維自体など)が

個体間で伝達される可能性が示唆されている。またヒトにおいても、移植硬膜による Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)の感染や牛海綿状脳症からの変異型 CJD の発症など、アミロイドーシスのヒトからヒトへの、あるいは家畜からヒトへの伝播が医学的および社会的に大きな問題になっている。

FAP の原因遺伝子である transthyretin (TTR)遺伝子には表現促進現象の原因として有名な伸長した trinucleotide repeat などは存在せず、また FAP の表現促進現象が母系遺伝の際に顕著であることから、FAP 患者家系に認められる表現促進現象も、上記のようなアミロイドーシスの伝播現象が母子間において生じているという可能性が考えられる。今回は、FAP の表現促進現象がヒトにおける母子間でのアミロイドーシス発症促進因子の伝播に起因する可能性があるのかどうかを検討した。

B. 研究方法

1. FAP 患者由来の臍帯血の検討

FAP患者3例(24歳、26歳、35歳)の分娩時に採取した臍帯血および正常対照として Wild-type TTR の homozygote である同年齢の正常産婦4名(23歳~36歳、平均年齢: 29.0 ± 5.5 歳)の分娩時に採取した臍帯血を対象とした。

臍帯血から分離した血清0.5 mlを、HiPrep 26/60 Sephacryl S-200HRカラム (Pharmacia)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより、移動相のbufferを Tris-HCl, pH7.4/ 0.15M NaCl(TBS)にして、生理的

な条件に近い条件で分画した。Elution volume 90-240 mlをfraction 1-60として回収した。溶出される分子量が13kDa付近となる10 fractionをmonomer fractionとした。回収したfraction 1-60をPVDF膜に転写し、抗TTR抗体(DAKO)を一次抗体として dot blotting を行いECLにより可視化した。発色させたECL filmから densitometry (NIH image)により各fractionが含有するTTRの相対濃度を測定した。

2. FAP 患者の乳腺組織の検討

FAP 患者2例 (1例は34歳女性で末梢神経障害を発症して約4年が経過した患者、もう1例は35歳女性で自覚症状はないが腹壁脂肪吸引生検でアミロイド沈着が確認された患者)を対象とした。患者の乳腺組織を超音波ガイド下マンモトーム生検により採取し、乳腺へのTTRアミロイド沈着の有無とその程度および分布を Congo red 染色により検討した。また、乳腺組織から total RNA を抽出して、TTR cDNA の exon2 および exon3 に結合する primer を用いた RT-PCR 法により、乳腺組織における TTR mRNA の発現の有無を検討した。

C. 研究結果

1. FAP患者由来の臍帯血の検討

FAP患者由来の臍帯血をゲル濾過クロマトグラフィーにより分画して得られた fraction 1-60には、濃度に違いはあるが TTR分子が存在した(図1)。今回の溶出条件が生理的な条件に近いものであることから、fraction毎の溶出時間により臍帯血

血清中に存在するTTR monomerをTTR oligomerから分離できると考えた。FAP患者由来の臍帯血中では、全TTR分子中にしめるTTR monomerの割合が5.8-8.6%(平均6.8%)に達していて、対照者由来の臍帯血 (0.3-1.9%; 平均1.2%)と比較して、有意に増加していた(図1, 2)。

2 FAP患者の乳腺組織の検討

今回検討したFAP患者2例の乳腺組織にはCongo red染色陽性のTTRアミロイドの沈着が認められた(図3)。アミロイド沈着は主として血管周囲、腺上皮周囲および脂肪組織周囲に認められ、その沈着量は患者の臨床症状の重症度と相関している傾向があった。剥離した腺上皮の直下に存在するアミロイドは腺腔に接して存在していた。

またRT-PCR法による検討では、乳腺組織には、肝臓と比較すると発現量は少ないが、TTR mRNAの発現が認められた(図4)。

D. 考察

母子間で垂直的にアミロイドーシス発症促進因子が伝播している可能性があるとするれば、その経路として、血液を介した経胎盤的な伝播および母乳を介した経口的な伝播の両者の可能性が考えられる。そのような考えのもとに今回の検討ではFAP患者由来の臍帯血とFAP患者の乳腺組織を検討した。

1. FAP患者由来の臍帯血の検討

今回の検討では、FAP患者由来の臍帯血中では、対照者由来の臍帯血と比較し

て、全TTR分子中にしめるTTR monomerの割合が有意に増加していた。臍帯血は基本的には胎児側の循環血であり今回の検討では倫理的な観点から胎児の遺伝子診断は行っていないが、正常人の年齢別血中TTR濃度曲線によれば小児期のTTR産生量は極めて少ないことから、臍帯血中のTTRは母体由来の胎盤を通過したTTRである可能性が高い。従って、今回の結果を換言すれば、正常妊婦から生まれた胎児の循環血中TTRと比較して、FAP妊婦から生まれた胎児の循環血中TTRはより全分子中でのmonomeric TTRの存在比が大きい、と言える。FAP患者ではvariant TTRとwild-type-TTRが1:1の割合で産生されるにもかかわらず全身組織に沈着するアミロイドは主としてvariant TTRから構成されること、またTTRは血液中では安定なtetramerとして存在しているがFAPを発症する遺伝子変異を有する患者ではこのTTR tetramerが不安定になりmonomerに解離することがその発症に重要であるとされている。従って、FAP妊婦から生まれた胎児血中でmonomeric TTRの比率が増大していることは、FAP妊婦から生まれた胎児では、そのようなmonomeric TTRの一部がamyloidogenic TTRとなる確率が、正常妊婦から生まれた胎児よりも高い可能性があると考えられた。

2. FAP患者の乳腺組織の検討

従来TTRの産生部位としては肝、脈絡叢、網膜などが知られていたが、乳腺で

TTRが産生されるか否かは知られていなかった。今回RT-PCR法による検討で乳腺組織にTTR mRNAの発現が認められたことから、量的には少量であると考えられるが乳腺でもTTRが局所的に産生されていることを示している。

また、FAP患者の乳腺組織にはCongo red染色陽性のTTRアミロイドの沈着が認められ、その沈着量は患者の臨床症状の重症度と関連していた。とくにアミロイド沈着量の多かった一例では乳腺の腺上皮直下にもアミロイドの沈着が大量に認められた。乳腺は乳汁分泌の際に腺上皮が剥離脱落する分泌形態をとることから、そのような上皮直下のアミロイドの一部は腺腔内に露出して存在しており、乳汁中へのTTRアミロイド線維、TTR oligomerあるいはTTR monomerの供給源となりうる可能性が考えられた。

3. 今後の課題

今後の課題として、母乳および臍帯血中にTTRのどのような分子種(monomer, oligomer, or protofibril)が存在するのか、さらにそのようなTTR分子種の中でアミロイド線維形成およびアミロイド沈着を促進するものはどのような分子であるのかを、in vitroあるいはin vivoの実験系で明らかにする必要がある。

E. 結論

FAP患者家系では、アミロイド線維あるいはアミロイド原性蛋白質が臍帯血あるいは母乳を介して母子間で伝播する可

能性があり、そのことはFAP家系で認められる表現促進現象の原因となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kotani N, Hattori T, Yamagata S, Tokuda T, Shirasawa A, Yamaguchi S, Kobayashi S, Ikeda S: Transthyretin Thr60Ala Appalachian-type mutation in a Japanese family with familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 9: 31-34, 2002
- 2) Tokuda T, Oide T, Tamaoka A, Ishii K, Matsuno S, Ikeda S: Prednisolone (30–60 mg/day) for diseases other than AD decreases amyloid β peptides in CSF. *Neurology* 58 1415-1418, 2002
- 3) Ikegami T, Kawasaki S, Ohno Y, Chisuwa H, Urata K, Nakazawa Y, Hashikura Y, Terada M, Miyagawa S, Takei Yi Y, Tokuda T, Ikeda S: Temporary auxiliary liver transplantation from a living donor to an adult recipient with familial amyloid polyneuropathy. *Transplantation* 73: 628-630, 2002
- 4) Takei Y, Hattori T, Gono T, Tokuda T, Saitoh S, Hoshii Y, Ikeda S. Semile systemic amyloidosis presenting as bilateral carpal tunnel syndrome. *Amyloid:*

J Protein Folding Disord 9: 252-255, 2002
5) Oide T, Tokuda T, Takei Y, Takahashi H,
Ito K, Ikeda S: Serial CT and MRI in a
patient with isolated angitis of the central
nervous system associated with cerebral
amyloid angiopathy. Amyloid. J Protein
Folding Disord 9: 256-262, 2002.

2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

TTR in umbilicord serum/ FAP vs NI control

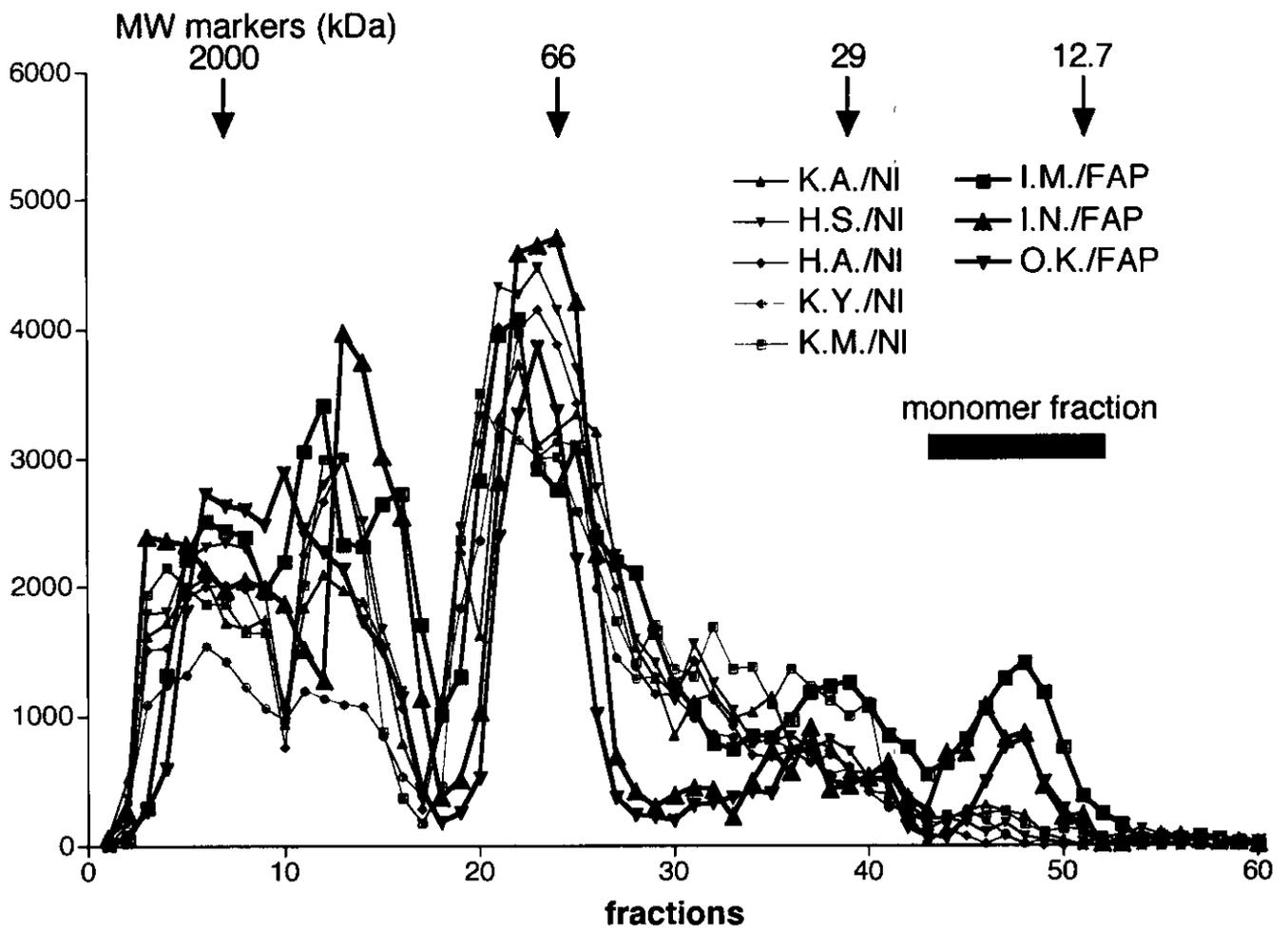


図1 臍帯血をゲルろ過クロマトグラフィーで分画した各fractionに含まれるTTRの相対濃度

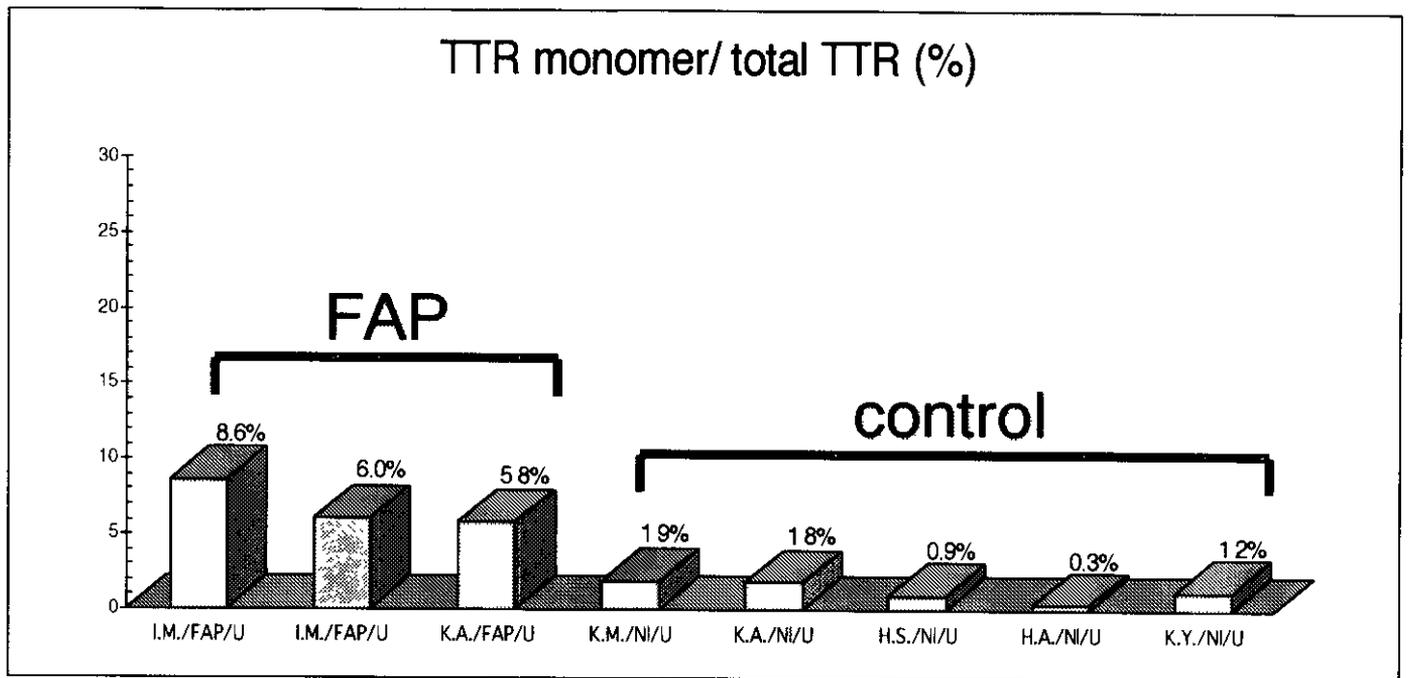


図2 臍帯血中の全TTRに対するTTR monomerの存在比