

図3 FAP患者(34歳, 女性)の乳腺組織(Congo red染色)

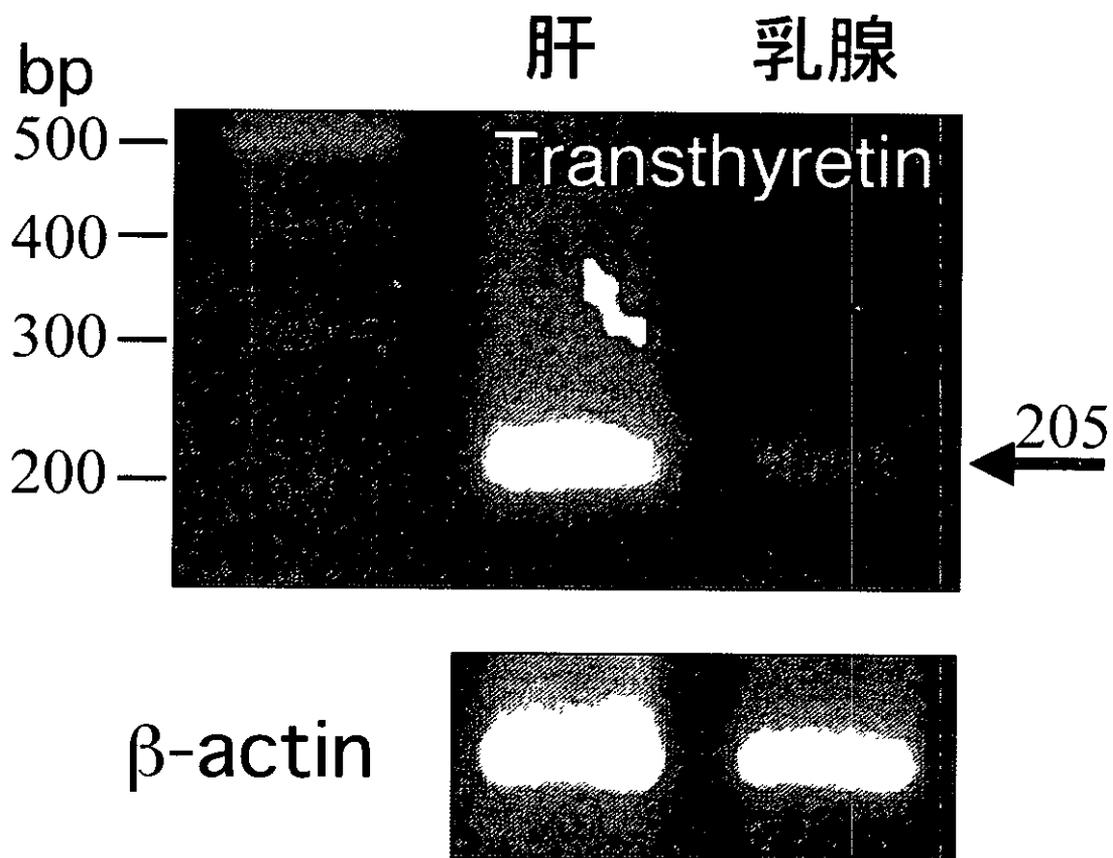


図4 FAP患者(35歳, 女性)の乳腺組織に存在するTTR mRNA (RT-PCR法による解析)

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

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

分担研究者 田平 武 国療中部病院長寿医療研究センター センター長

共同研究者 原 英夫 国療中部病院長寿医療研究センター 室長

研究要旨 腸管細胞から効率よく A β 蛋白を分泌できるようなりコンビナントアデノウイルスベクターを作成した。アデノウイルス粒子を C57BL/6J マウスに1回のみ経口投与し、血清中に A β に対する抗体が産生されることを確認した。抗体産生は、5ヶ月後まで持続した。さらにこの抗体は、A β 蛋白の凝集も阻害する作用が認められた。アデノウイルスが他の臓器に感染していないことを各臓器から精製した RNA を用いて RT-PCR で解析した。アデノウイルスは、上部消化管組織のみ検出された。アデノウイルスを投与したマウスの脾細胞は、A β 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。これにより、抗体産生のみ誘導でき、細胞性免疫は惹起しないことが確認された。

A. 研究目的

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、どの様な免疫反応が惹起されるか検索した。

B. 研究方法

効率よく A β が細胞外に分泌されるようなベクター (pAdeno-X-signal seq-A β 1-43) を開発し、C57BL/6J マウスにウイルス粒子を経口投与した。マウス血清中の抗 A β 抗体の検出は、A β 42 ペプチド (5 μ g/ml) を 96 well plate (Nunc, MaxiSorp) の各

well に付着させ、5% non-fat milk/TBS-T buffer でブロック後、アデノウイルスを投与したマウスより採取した血清を加え (500 倍希釈)、peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体で検出した。測定は、ELISA リーダーで吸光度を測定した。

組織からの RNA 精製及び RT-PCR : アデノウイルスを投与したマウスより心、肺、脾臓、肝臓、上部消化管、腎臓を摘出し、ISOGEN 溶液の中で組織を homogenate した後、RNA を精製した。Total RNA 5 μ g に random primer を結合させ、逆転写酵素により 1st strand cDNA を作成した。次に、APP signal sequence

の 5'塩基配列と A β 43 の 3'塩基配列から PCR 用 primer を作成し、PCR を行った。PCR 産物は、2% agarose gel に泳動し、目的とする 200bp のバンドを確認した。

マウス脾細胞の A β 42 ペプチドに対する細胞増殖反応：アデノウイルスを投与したマウスより脾細胞を分離し、96 well plate の 1 well に 5×10^4 細胞を加え、A β 42 ペプチドを各濃度で加えた培養液中で 48 時間培養した。細胞培養終了後、テトラゾリウム塩(WST-1)を加えた。テトラゾリウム塩は、生細胞にのみ活性のあるミトコンドリアのコハク酸テトラゾリウム還元酵素によりホルマゼン色素に変換されるので、ELISA リーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより、細胞増殖能反応を判定した。

倫理面への配慮

動物、特にマウスに対する実験は、当国立長寿医療研究センター動物実験施設の倫理規定に基づき、動物に対して苦痛を軽減する投与方法、および安楽死後の処置を行った。遺伝子の構築および遺伝子導入した培養細胞の樹立に関する実験は、国立中部病院長寿医療研究センターの組み換え DNA 安全委員会の承認 (P2 規制レベル) を得た。

C. 研究結果

アデノウイルスが他の臓器、脾臓、肝臓、腎臓などには感染していないことを確認するため、アデノウイルスを投与したマウスの各組織より、RT-PCR を行った。陽性のバンドが上部消化管にのみ認められた。

A β 発現アデノウイルス粒子を経口投与したマウスにおいて、1ヶ月後の上部消化管上皮細胞に A β 蛋白の発現を認めた。経口投与5ヶ月後にも A β 蛋白の発現を認めた。さらに同組織切片を congo red 染色し、A β の沈着を認めた。

血清中の抗体価は、主として経口投与後4週間でピークを示し、調べ得た範囲では、5ヶ月後まで抗体の産生持続を認めた。

腸管に免疫した場合には、細胞性免疫を惹起しにくい現象が報告されている。そこでアデノウイルスを投与したマウス脾細胞を分離し *in vitro* において A β 42 ペプチドに対する細胞増殖反応を解析した。アデノウイルスを投与したマウスの脾細胞は、A β 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。

他の臓器に炎症反応が起こっていないか、各臓器の組織を検索したが、どの臓器にも炎症所見は認められなかった。

D. 考察

腸管細胞から効率よく A β 蛋白を分泌できるようなリコンビナントアデノウイルスベクターを作成した。アデノウイルス粒子を C57BL/6J マウスに1回のみ経口投与し、血清中に A β に対する抗体が産生されることを確認した。抗体産生は、5ヶ月後まで持続した。さらにこの抗体は、A β 蛋白の凝集も阻害する作用が認められた。アデノウイルスが他の臓器に感染していないことを各臓器から精製した RNA を用いて RT-PCR で解析した。アデノウイルスは、上部消化管組織のみ検出された。アデノウイルスを投与したマウスの脾細胞は、A β 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。これにより、抗体産生のみ誘導でき、細胞性免疫は惹起しないことが確認された。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。

E. 結論

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。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。また、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。血清中の A β 抗原は、増加していなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

ヒト・アミロイド線維の amyloid enhancing factor 効果の抑制方法の検討

分担研究者	横田 忠明	社会保険小倉記念病院病理科
共同研究者	尾本 雅俊	山口大学医学部脳神経病態学
	河野 裕夫	山口大学医学部構造制御病態学
	崔 丹	山口大学医学部構造制御病態学
	星井 嘉信	山口大学医学部構造制御病態学
	権藤 俊一	山口大学医学部付属病院病理部
	石原 得博	山口大学医学部構造制御病態学

研究要旨

ヒト・アミロイド線維の fibril-amyloid enhancing factor (F-AEF)活性の抑制方法について検討した。132℃、60分、1.2気圧下でオートクレーブ処理（プリオン不活性化条件）により F-AEF 活性は抑制された。1N および 0.1N 水酸化ナトリウム処理では F-AEF は抑制されるが、0.01N および 0.001N 水酸化ナトリウム処理では F-AEF は抑制されなかった。6M 塩酸グアニジンで処理したアミロイド線維を免疫したマウスでは F-AEF 活性が抑制された。

横田忠明 社会保険小倉記念病院
病理科主任部長

詳細は未だ不明である。アミロイド線維自体にも AEF 活性があることが報告され、fibril-amyloid enhancing factor (F-AEF)と呼ばれている¹⁾。

研究目的

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のある物質が存在する。その様な性質がある物質を amyloid enhancing factor (AEF) と呼び、その本態の追求が行われてきたが、その

われわれは、種族および種類が異なるアミロイド線維に実験的マウス・アミロイドーシスを促進させる作用があることを報告している²⁾。また、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もある³⁾。

そこでヒト・アミロイド線維に幾つかの処理を行い、F-AEF 活性の抑制方法について検討したので報告する。

研究方法

材料：慢性関節リュウマチ患者で、AA アミロイドが沈着した甲状腺組織から Pras らの方法によりアミロイド線維を水抽出後、凍結、乾燥したものをを用いた。

マウスは6週令の ICR (♀)を使用した。

実験方法：各群あたり約5匹のマウスを使用した。それぞれの処理を行ったアミロイド線維をマウス1匹あたり $100\mu\text{g}$ を腹腔内に注射し、更に皮下に 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）を皮下に注射した。注射後4日目に屠殺して脾臓を摘出した。脾臓の圧挫標本およびホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、コンゴレッド染色を行い、アミロイド沈着の有無を調べた。

実験1（物理的および化学的処理）

I 群：132°C、60分、1.2気圧下でオートクレーブ処理（プリオン不活性化条件）したアミロイド線維。

II 群：0.01N 水酸化ナトリウムで1時間処理後、中和処理したアミロイド線維。

III 群：0.001N 水酸化ナトリウムで1時間処理後、中和処理したアミロイド線維。

IV 群：未処理のアミロイド線維。

V 群：対照として、蒸留水のみ。

実験2（免疫学的処理）

A 群：未処理のアミロイド線維を2回マウスの皮下に注射して免疫後、未処理のアミロイド線維を腹腔内注射。

B 群：6M 塩酸グアニジンで処理後、蒸留水で透析したアミロイド線維を2回マウスの皮下に注射して免疫後、6M 塩酸グアニジンで処理したアミロイド線維を腹腔内注射。

C 群：6M 塩酸グアニジンで処理後、蒸留水で透析したアミロイド線維を2回マウスの皮下に注射して免疫しただけのマウス。

D 群：6M 塩酸グアニジンで処理後、蒸留水で透析したアミロイド線維。

E 群：6M 塩酸グアニジンで処理後、蒸留水で透析したアミロイド線維とウサギポリクローナル抗 AA アミロイド抗体を混合したものを腹腔内注射。

（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、山口大学医学部の「動物実験に関する指針」に沿って行っ

た。

研究結果

実験1の結果を表1に示した。

I群のオートクレーブ処理では、全てのマウスにアミロイド沈着は認められなかった。

II群およびIII群の低濃度水酸化ナトリウム処理では、全てのマウスにアミロイド沈着を認めた。

陽性対照として用いたIV群のマウスには全例にアミロイド沈着を認めた。

陰性対照のV群にはアミロイド沈着は認めなかった。

表1 物理的および化学的処理

I群	0 / 5
II群	5 / 5
III群	5 / 5
IV群	5 / 5
V群	0 / 5

アミロイド陽性匹数 / 全匹数

実験2の結果を表2に示した。

A群の無処理のアミロイド線維で免疫した群では、全てのマウスにアミロイドを認めた。

B群の塩酸グアニジン処理したアミロイド線維で免疫した群では、6匹中1匹にのみアミロイド沈着を認めた。

C群の塩酸グアニジン処理したアミロイド線維で免疫しただけのマウスでは全例にアミロイド沈着は認められなかった。

D群の塩酸グアニジン処理したアミロイド線維を腹腔内注射した群では、全てのマウスにアミロイド沈着を認めた。

E群の塩酸グアニジン処理したF-AEFに、ポリクローナル抗体を混合したものとアジュバントを腹腔内注射した群では、全てのマウスにアミロイド沈着を認めた。

表2 免疫学的処理

A群	5 / 5
B群	1 / 6
C群	0 / 4
D群	5 / 5
E群	5 / 5

陽性数 / 全匹数

考察

アミロイド線維に AEF 活性が存在するのみならず、アミロイド線維を介してのアミロイドーシス伝播の可能性が報告されている。アミロイド線維は難溶性の非常に安定した線維蛋白質で、アミロイド線維の F-AEF 活性は煮沸処理や種々の酵素処理では失活しない⁴⁾。しかし、今回検討したプリオン不活性化条件下でのオートクレーブ処理では F-AEF 活性は完全に失活した。昨年度行った 1N および 0.1N 水酸化ナトリウムの1時間処理では AEF 活性は完全に失活したが、今回検討した 0.01N および 0.001N 水酸化ナトリウムの処理では AEF 活性は抑制されなかった。F-

AEF 活性の失活、抑制には、かなり高濃度の水酸化ナトリウムが必要であると考えられた。

グアニジン処理アミロイド線維で免疫したマウスでは F - AEF 活性が抑制されたが、非処理のアミロイド線維の免疫では抑制されなかった。非処理のアミロイド線維は抗原性が乏しく、抗体が産生されにくいことが知られている。グアニジン処理の免疫では F - AEF 活性が抑制されたので、グアニジン処理アミロイド線維による免疫は F - AEF 活性の抑制に効果があると考えられた。

しかし、抗体が直接アミロイド線維に作用した為の抑制効果なのか、前駆蛋白の SAA に作用した為なのかは、今回の実験では明らかではない。今後、さらに検討する必要がある。

結語

- 1.アミロイド線維へのオートクレープ処理（フロン不活化条件）により F-AEF 活性は抑制された。
- 2.低濃度水酸化ナトリウム処理では、F-AEF 活性の抑制は認められなかった。
- 3.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は、F-AEF 活性の抑制が認められた。

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

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

分担研究者 加藤 昭夫 山口大学農学部教授

共同研究者 阿座上 弘行 山口大学農学部助手

研究要旨

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した。アミロイド型変異体 I66Q を酵母培養液から硫酸分画により調製し、0.1 飽和で生じる沈殿を精製したものは多量体のシスタチンとして得られ、0.6 飽和で生じる沈殿を精製したものは二量体のシスタチンとして得られた。これらのアミロイド型変異体にチオフラビンTを加え、その蛍光を調べたところ、多量体シスタチンの蛍光は二量体に比べ、2.5 倍の蛍光を示し、アミロイドシスの形成が確認できた。また、アミロイド型シスタチンの分泌量は野生型シスタチンの分泌量に比べ、著しく低下しており、細胞内での分子シャペロンによる異常タンパク質の品質管理が行われていることが示唆された。今後はこの酵母発現系を用いて、分子シャペロンとアミロイドシスの関係を明らかにしていく予定である。

A. 研究目的

本研究者はこれまでに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、小胞体分子シャペロンであるカルネキシンを欠損するとアミロイド型変異体の分泌が著しく促進されることを明らかにしている^{1),2)}。このことはアミロイドシスの要因の一つとして、分子シャペロンによる品質管理機能の低下の可能性を示唆するものである。この仮説をさらに証明するために、異なるアミロイド型タンパク質と異なる分子シャペロンを用いて研究することが望まれる。こうして、本研究では酵母の分子シャペロンPDI ホモログを欠損した発現系で、シスタチンの発現分泌が促進されるかどうか明らかにすることを目的とした。この目的を達成するために、今回はヒトシスタチンCのホモログであるニワトリシスタチンcDNAを用いて、アミロイド型変異体を作成し、その性質を調べた。

B. 研究方法

シスタチンcDNAはヒトシスタチンCとホモログのニワトリシスタチンを用いた。ニワトリ輸卵管組織からmRNAを抽出し、RT-PCRにより作成した。ヒトアミロイド型シスタチン変異体 L68Q に相当するニワトリアミロイド型変異体 I66Q を部位指定変異により作成した。アミロイド型シスタチン変異体cDNAを酵母 *Pichia pastoris* 発現ベクターに導入し、相同組換えにより形質転換酵母を作成した。酵母で発現分泌した培養液の硫酸分画(0.1~0.6 飽和)により、アミロイド型シスタチンを調製し、その性質を検討した。得られたアミロイド型シスタチンはSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動とチオフラビンTの蛍光測定により、特性が調べられた。また、酵母分子シャペロンであるPDIホモログ(Eps1)のノックアウトはEps1遺伝子にLeu2遺伝子を挿入し、欠損株を作成した。

C. 研究結果

図1にヒト型シスタチンのホモログであるcCシスタチンのリボンモデル構造を示した。図からも明らかなようにシスタチンはβ構造に富む構造を採っている。66位のイソロイシンがβ構造の分子内での疎水性パッキングに重要な役割を果たしており、このイソロイシンをグルタミンなどの親水性のアミノ酸に置換するとループ1が伸び二本のβストランドが一本に伸びた長いβストランドを形成しやすくなる。この構造変化がアミロイドシスの引き金になることが予測されている。こうして、本研究では、野生型とアミロイド型変異体 I66Q を作成した。

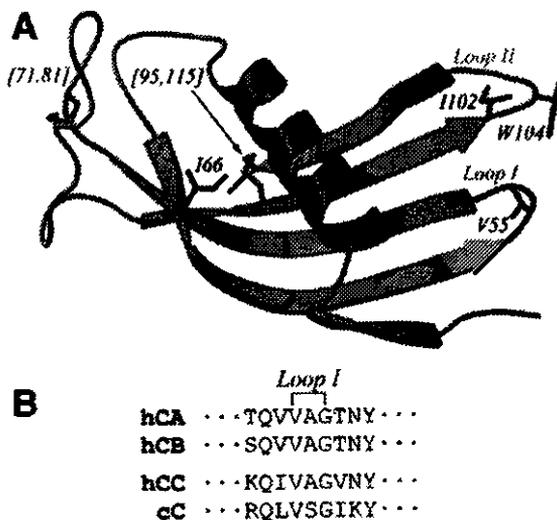


図1. シスタチンのリボンモデル構造とループ1のヒトとニワトリの相同性³⁾

酵母 *Pichia pastoris* で野生型シスタチンの分泌を調べたところ4日間の培養で最高値に達し、以後の培養では減少することが示され、4日培養液の SDS-PAGE パターンを図2に示した。培養液中にシスタチンのバンドが 15kDa に認められた(図2、lane 1)。この培養液を DEAE イオン交換クロマトにより分離精製し(図2、lane 2)、さらにセファデックス G-75 でゲル濾過することにより、精製できる(図2、lane 3)ことが示された。

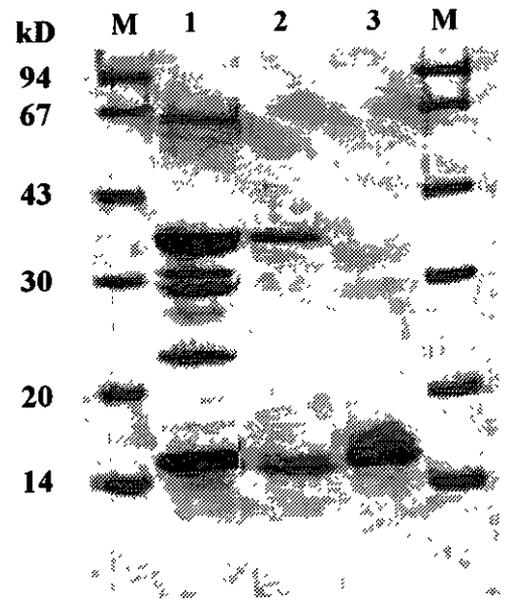


図2. 野生型シスタチンの酵母 *Pichia pastoris* での発現分泌の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動図。M, 分子量マーカー；1, 酵母培養液；2, DEAE イオン交換クロマトでの分離精製；3, セファデックス G75 ゲル濾過ピーク

同様に、アミロイド型変異体 I66Q を作成し、酵母で発現分泌を野生型と同じ条件で行った。アミロイド型変異体は調製中に不溶性の凝集体を形成しやすい。図3にアミロイド型変異体の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図を示した。

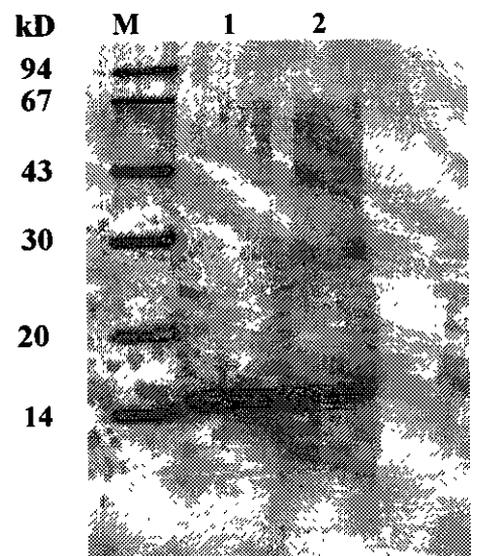


図3. アミロイド型シスタチンの酵母 *Pichia pastoris* での発現分泌の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動図。1, 野生型シスタチン；2, アミロイド型シスタチン(硫安分画:0.6飽和)

図3から明らかなように、アミロイド型シスタチンは単量体（モノマー）以外に二量体も存在することが示され、さらに、詳細に硫安分画を試みた。SDS を入れないネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、0.1 飽和硫安では多量体のみが沈殿し、0.6 飽和では二量体のみが沈殿することが明らかになった(図4)。

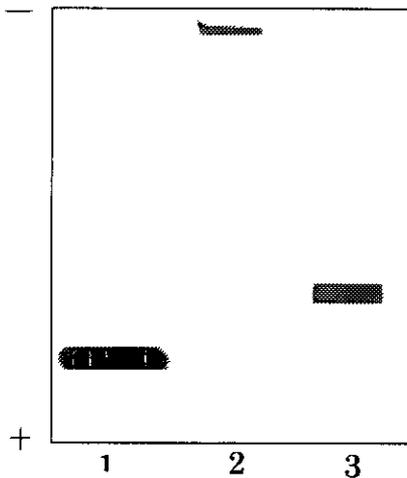


図4. アミロイド型シスタチンのポリアクリルアミドゲル電気泳動図。

1. 野生型シスタチン； 2. アミロイド型シスタチン (0.1 飽和硫安沈殿)； 3. アミロイド型シスタチン (0.6 飽和硫安沈殿)

SDS-PAGE では二量体やオリゴマーの存在は正確に評価できないが、Native PAGE ではこれらの存在が正確に評価できる。こうして、アミロイド型シスタチンは容易に硫安カットで二量体とオリゴマーを分離できるため、これらの性質を個々に検討できる。こうして得られた二量体と多量体のチオフラビンTでの蛍光測定を行った。その結果を表1に示した。

表1. アミロイド型シスタチンのチオフラビンTによる蛍光測定

	蛍光強度 (Ex:440nm, Em:482nm)	
	0 hr	2 hr
多量体	42	48
二量体	17	21

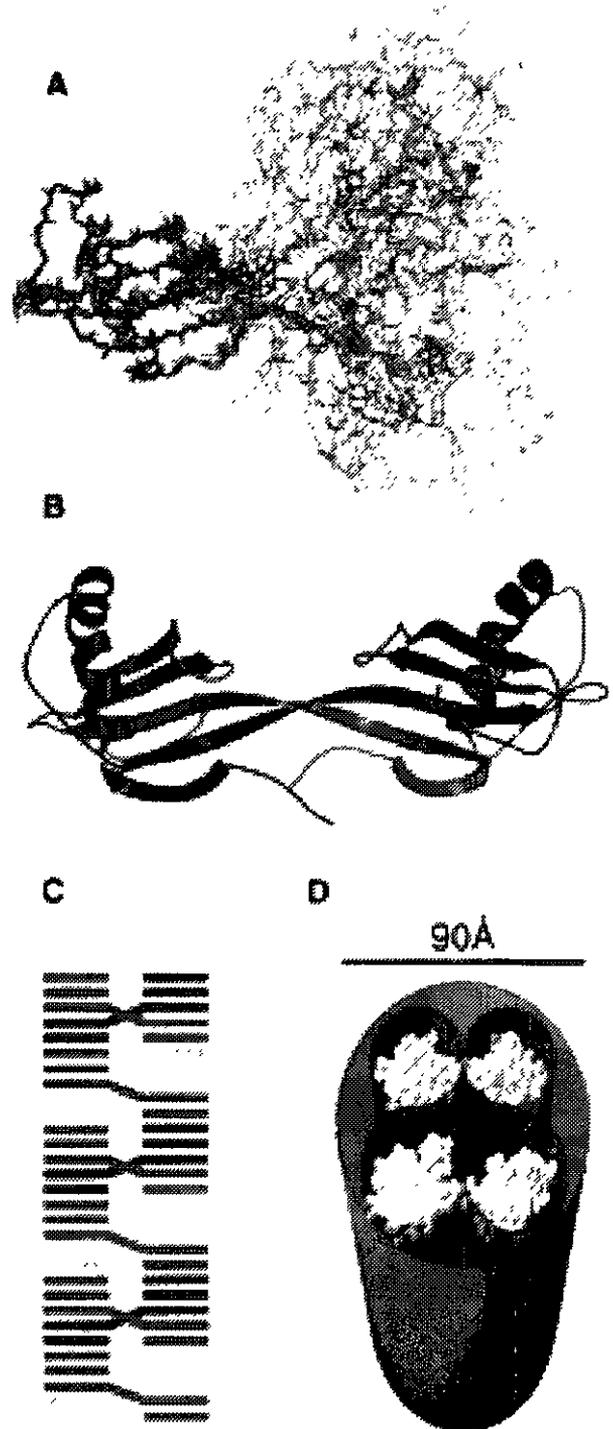


図5. アミロイド型ヒトシスタチンのアミロイド形成機構。A, 二量体結晶解析像； B, 二量体のリボンモデル； C, 二量体の集合モデル； D, プロフィラメントのスペースフィーリングモデル³⁾。

この結果はアミロイド型シスタチンの二量体、多量体の形成はチオフラビンTの

蛍光に対応するクロスβ構造の増加、すなわちアミロイド形成を反映したものであり、本研究者らが作成したシスタチンが確かにアミロイドモデルとして利用できることを示すものである。この結果をStaniforthらによって提案されたシスタチンのアミロイド形成モデル(図5)に基き、うまく説明できる。すなわち、シスタチンは、野生型ではループ1が折れ曲がり(図1)、分子内でβストランドを堅くパックしていたが、アミロイド型変異体ではこのループが直線化しやすくなり、クロスβ構造により、二量体が容易に形成される(図5-B)。形成された二量体はさらに残りのβストランド1と5の二つのβストランドを介して多量体を形成する(図5-C)。こうした多量体はプロフィラメントとしてアミロイド形成の核となる(図5-D)。

以上の結果より、アミロイド型シスタチンが酵母で比較的容易に分離精製できることが明らかになった。加えて、表2に示すように、アミロイド型シスタチンの発現分泌量は比較的多く、1リットル培養液中に約10mg得られるために、その性質を検討することが容易である。

表2. アミロイド型リゾチームの分泌量

シスタチン	分泌量 (mg/liter)
野生型	33.5
アミロイド型	9.4
高分泌型変異体	136.0

それでも、アミロイド型シスタチンは野生型シスタチンに比べ、3~4倍発現は抑制される。アミロイド型は細胞内での品質管理を受けるためであると予想される。培養液中にアミロイド形成したシスタチンの存在は認められないので、細胞内での品質管理による分解と考えて間違いない。

D. 考察

本報告では述べなかったが、酵母 *S. cerevisiae* の小胞体シャペロンEps1をノックアウトすることにも成功しているので、この分子シャペロンによるアミロイド型シスタチンの品質管理がどのように行われているか検討中である。前報告で述べたように、アミロイド型リゾチームが分子シャペロンカルネキシン欠損により、著しく分泌が増加するという観察がアミロイド型シスタチンでも同様に得られれば、分子病アミロイドシス発症の原因の一つとして、分子シャペロンの品質管理機能の低下が証明できると思われる。

E. 結論

ヒトシスタチンCのホモログであるニワトリシスタチンのアミロイド型変異体I66Qの酵母での発現分泌に成功した。このアミロイド型変異体は硫安分画により二量体と多量体として得ることができた。チオフラビンTの蛍光は二量体に比べ多量体で2.5倍に増加し、アミロイド形成に特有のクロスβ構造の増加が観察された。

「文献」

1. Y. Song, J. Sata, A. Saito, M. Usui, H. Azakami, M. Hamasu, A. Kato. Effects of calnexin deletion in *S. cerevisiae* on the secretion of glycosylated lysozymes. *J. Biochem.*, 130, 757-764 (2001)
2. Y. Song, H. Azakami, S. Begum, J. W. He, A. Kato. Different effects of calnexin deletion in *S. cerevisiae* on the secretion of twoglycosylated amyloidogenic lysozymes. *FEBS Letters* 512, 213-217 (2002)
3. R.A. Staniforth et al., Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *EMBO J.* 20(17), 4774-4781 (2001)

G. 研究発表

1. 論文発表

Y. Song, H. Azakami, S. Begum, J. W. He, A. Kato. Different effects of calnexin deletion in *S. cerevisiae* on the secretion of two glycosylated amyloidogenic lysozymes. *FEBS Letters* 512, 213-217 (2002)

A. Kato. Lysozyme In "Handbook of Food Enzymology" ed. by J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, D.W.S. Wong Marcel Dekker Inc. pp. 971-978 (2003)

2. 学会発表

何剣為, 植山宣博, 阿座上弘行, 加藤昭夫
酵母 *Pichia pastoris* によるアミロイド型システチンの発現とその分子特性：日本農芸化学会 2003 年度大会 (2003 年 4 月, 横浜)

AL アミロイドーシス発症骨髄腫細胞の *in vivo* 増殖を調節し得る因子の検討

— 副腎皮質ホルモン DHEA の骨髄腫細胞に及ぼす作用について —

分担研究者 河野 道生

山口大学・大学院医学研究科・生体シグナル解析医学講座

共同研究者 石川 秀明、津山 尚宏

山口大学・大学院医学研究科・生体シグナル解析医学講座

研究要旨 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に極めて重要である。AL アミロイドーシスを含む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・増殖との関連からの視点が必要とされる。本研究では、高齢において極端に低下する副腎皮質ホルモン DHEA(dehydroepiandrosterone)に注目して、アミロイドーシス及び骨髄腫の発症にどのように関係があるかを、骨髄腫患者での骨髄 DHEA-S 濃度及びその骨髄腫細胞の増殖に及ぼす作用について検討した。骨髄腫患者の骨髄 DHEA-S 濃度は同年齢のそれに比して明らかに低値であった。また、*in vitro* にて DHEA は骨髄ストローマ細胞株からの IL-6 産生を抑制し、骨髄腫細胞株 U-266 の増殖も直接に抑制した。更に、骨髄腫細胞株 U-266 を SCID-hIL6 Tg mice へ移植する系において、DHEA 皮下注射は骨髄腫細胞株の *in vivo* 増殖を著明に抑制した。以上より、骨髄 DHEA の低下は骨髄腫細胞の増殖を促進する可能性があり、骨髄腫による AL アミロイドーシス発症にも影響している可能性が示唆された。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスを惹起する骨髄腫細胞の *in vivo* 増殖を調節し得る因子を明らかにして、アミロイド沈着の惹起を予防しようとするものである。特に、骨髄腫が高齢者に多く発症することから、加齢とともに大きく変化するものに注目して、骨髄腫細胞の増殖あるいは増殖因子インターロイキン 6 (IL-6) 産生に及ぼす

観点から検討する。本研究では、高齢者で極めて低下する副腎皮質ホルモン DHEA(S)に注目する。

B. 研究方法

1. 対象

1) AL アミロイドーシス合併を含む骨髄腫患者からの骨髄穿刺液から骨髄単核球分画を分離した。骨髄腫細胞株とし

て、U-266 を使用した。2) 骨髄液中の DHEA-S 値は、大塚アッセイ(RIA 法)に依頼した。IL-6 活性は高感度 ELISA(Immunotech)で測定した。細胞表面抗原解析は、既報のごとく抗 CD38, CD19, MPC-1, CD49e, CD126(IL-6R α)あるいは CD45 抗体で多重染色後、フローサイトメーター(Epics Elite, Coulter)にて行った。3) 患者からの骨髄腫細胞あるいは骨髄腫細胞株 U-266 を *in vitro* 培養し、DHEA 添加の増殖および IL-6 産生に及ぼす効果を検討した。骨髄ストローマ細胞株 KM-102 においても同様の実験を行った。4) SCID-hIL6 Tg mice の腹腔内に骨髄腫細胞株 U-266 をアガロースとともに注射移植する系で、DHEA を皮下注射(100 ug/mice) の効果を検討した。

C. 研究結果

アミロイドーシス合併を含む骨髄腫患者の骨髄中の DHEA-S 値は同年齢のそれに比して男女とも有意に低下していた($P<0.01$)。骨髄腫の前癌病変と考えられている良性M蛋白血症(BMG, MGUS)の患者においても、骨髄中の DHEA-S 値は低下していた。逆に、骨髄中の IL-6 値は有意に上昇していた($P<0.01$)。IL-6 値の上昇は骨髄中の未熟型骨髄腫細胞、特に CD45+ 未熟型骨髄腫細胞の比率とよく相関していた($P<0.05$)。DHEA は、*in vitro* では骨髄ストローマ細胞株 KM-102 からの IL-6 産生を抑制し、骨髄腫細胞株 U-266 の増殖を抑制した。更に、*in vivo* 系において、DHEA 投与は骨髄腫細胞株 U-266 の増殖

生存を著明に抑制した。

D. 考察

AL アミロイドーシスを含む骨髄腫が高齢者に発症する点は、その発症の機構を考える上で極めて重要である。特に、本研究で注目した副腎皮質ホルモン DHEA(S) は、BMG を含め骨髄腫患者の骨髄中で有意に低下していた。症例の中には、極端に低値のものも見られた。DHEA の作用を検討すると、骨髄ストローマ細胞および骨髄腫細胞からの IL-6 産生を抑制することがわかった。このことは、高齢化すると DHEA(S)活性が低下して、逆に IL-6 活性が上昇する可能性を示している。実際に患者の骨髄中の IL-6 活性を測定すると、有意に上昇していた。更に、*in vivo* 系においても DHEA 投与は骨髄腫細胞株 U-266 の増殖を著明に抑制した。つまり、骨髄腫しかも AL アミロイドーシス発症する骨髄腫において、DHEA 活性の低下は骨髄腫細胞の増殖には促進的に働く可能性が示された。今後、症例ごとの詳細な骨髄中及び血清の DHEA-S 値の動態を検討するとともに、*in vivo* での骨髄腫細胞移植系および *in vitro* 系において、DHEA の増殖抑制の機構の詳細な検討が必要とされる。将来的に、DHEA の補充療法の検討も検討されるべきであろう。

E. 結論

1. アミロイドーシス合併骨髄腫患者からの骨髄中の DHEA-S 活性を測定した。BMG を含め骨髄腫では、同年齢のそれに比して男女とも有意に低下していた。

2. DHEA は、in vitro にて骨髄ストローマ細胞および骨髄腫細胞からの IL-6 産生を抑制し、骨髄腫細胞株の増殖も抑制した。
3. 骨髄腫細胞株 U-266 を SCID-hIL6 Tg mice へ移植生存させる系でも、DHEA はその増殖・生存を著明に抑制した。
4. 副腎皮質ホルモン DHEA(S)は、アミロイドーシス合併骨髄腫細胞の増殖を抑制する因子として極めて重要となり得る可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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: 2172-2178, 2002.
 - 2) Ishikawa H, Tsuyama N, Mahmoud MS, Fujii R, Abroun S, Liu S, Li F, Kawano MM: CD19 expression and growth inhibition of tumours in human multiple myeloma. *Leuk Lymphom* 43:613-616, 2002.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Kawano MM, Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X.: Growth mechanism of human myeloma cells by interleukin-6. Scientific Session, The

29th World Congress of the International Society of Hematology, Seoul, Aug. 24~28, 2002.

2) 李 富君、津山尚宏、大津山賢一郎、石川秀明、劉 尚勤、Abroun S, 河野道生: GFP-tag によるIL-6 シグナル伝達分子の可視化 ワークショップ、第 64 回日本血液学会総会、東京、2002 年 9 月 13~15 日。

3) Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Kawano MM: Consequence of IL-6 receptor α overexpression on IL-6-induced signals in myeloma cells. The 44th annual meeting of American Society of Hematology, Philadelphia, U.S.A., December 6-10, 2002.

3) Ishikawa H, Tsuyama N, Liu S, Abroun S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Kawano MM: Proliferation of myeloma cells by interleukin-6 co-operated with fibroblast growth factor receptor 3-mediated signals. The 44th annual meeting of American Society of Hematology, Philadelphia, U.S.A., December 6-10, 2002.

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

Decreased DHEA-S in the BM of Myeloma (male)

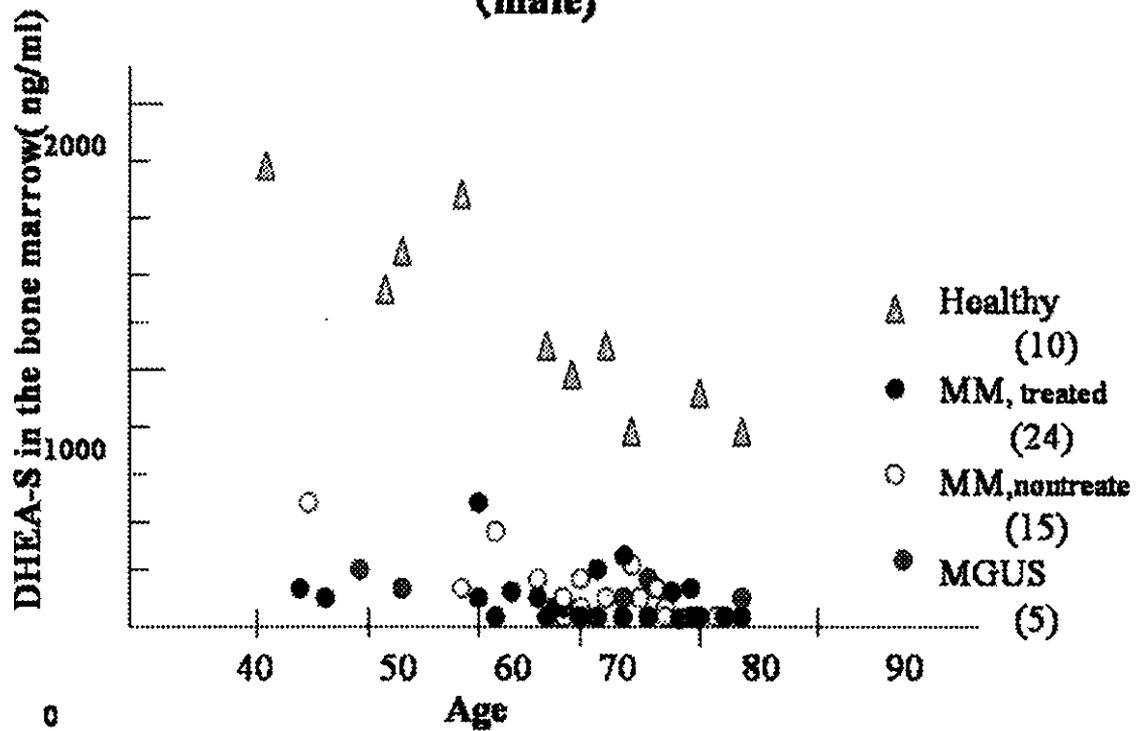


図-1 MGUS を含む骨髄腫患者における骨髄中の DHEA-S 活性 (男性)

健常人 10 例、MGUS 5 例、骨髄腫未治療 15 例、および骨髄腫既治療 24 例の骨髄穿刺液中の DHEA-S 活性を RIA 法で測定した。すべて男性症例である。MGUS を含め骨髄腫では同年齢の健常人のそれに比して明らかに低値である。

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

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
分担研究者 久保正法 動物衛生研究所疫学研究部病性鑑定室

牛のアミロイド症は 5 歳から 14 歳の高齢牛に多く、主として腎臓で観察された。
また、2002 年度の BSE 検査牛における発生頻度は、5/277 (1.8 %) であった。

久保正法・動物衛生研究所疫学研究
部病性鑑定室長

A. 研究目的

家畜におけるアミロイド症の発生頻度と病理像を明らかにする。牛アミロイド症の発生報告はあるが、どの程度の頻度で発生しているのか、明確なデータがないので、本研究で明らかにする。

B. 研究方法

1977 年から毎年動物衛生研究所で実施されている病理研修会提出事例約 1,000 例、当研究所で実施した病性鑑定のうち、1980 年以降に実施された約 13,000 例の中から、アミロイド症例を検索した。また、2002 年度の関東地方における BSE 検査牛のうち 277 頭について、腎臓を中心に検査を実施した。

C. 研究結果

研修会提出事例約 1,000 例中 8 例、病性鑑定事例約 13,000 例中 3 例がアミロイド症と診断されていた。これら 11 例中 7 例がアミロイドネフローシス、2 例が全身性ア

ミロイドーシス、1 例が糸球体アミロイドーシスと診断されていたが、一例は牧草中毒が疑われた全身性肉芽腫と診断されていた。また、BSE 検査牛 277 頭中 5 頭がアミロイド症と診断された。そのうち、1 頭については凍結保存された腎臓を入手した。

D. 考察

BSE 検査牛 277 頭中 5 頭がアミロイド症と診断されたが、BSE 検査牛は運動失調、起立不能等の臨床症状を示した個体であることから、発生頻度に関してはさらに広範な調査が必要である。

E. 結論

牛のアミロイド症は 5 歳から 14 歳の高齢牛に多く、主として腎臓で観察された。また、2002 年度の BSE 検査牛における発生頻度は、5/277 (1.8 %) であった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

牛のアミロイドーシスに関する研究

分担研究者 松井 高峯 帯広畜産大学畜産学部獣医学科
共同研究者 古林与志安 帯広畜産大学畜産学部獣医学科

研究要旨 最近 10 年間の北海道における牛アミロイドーシスの発生状況と、教室剖検例より発症年齢分布および病変分布を調査検討した。

松井 高峯・帯広畜産大学畜産学部
獣医学科家畜病理学教室教授

E. 結論

今後更に新たなる症例を収集し、全身諸臓器・組織を病理組織学的に検索し詳細な病変分布を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

牛アミロイドーシスの発生頻度とアミロイド沈着部位を明らかにする。

F. 危険情報

特になし

B. 研究方法

家畜共済事業統計表より、北海道でアミロイド症として廃用となった乳牛の数を調査した。家畜病理学教室の剖検記録台帳より牛のアミロイド症と診断された症例数、年齢分布および病変分布を調査した。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

C. 研究結果

2001 年迄の過去 10 年間に北海道でアミロイドーシスとして廃用になった乳牛は 619/394166 頭であった。2002 年迄の 10 年間に当教室でアミロイドーシスと診断された牛は 31/1118 頭であり、5 才以上が 25/29、3 才が 4/29、不明が 2/31 であった。

組織学的にアミロイドの沈着は腎臓で最も顕著であり、検索した肝臓、副腎、脾臓、甲状腺、前胃等に観察された。

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

D. 考察

牛のアミロイドーシスは比較的珍しい病気であることが判明した。しかしながら、今迄特に注意深く採材されておらず詳細な病変分布が明らかにされていないことも判明した。今後積極的に収集することにより相当数の確保が可能と思われた。

3. その他

特になし