

transmissibility を検証しうる有力なツールとなり得るからである。

E. 結論

リボ蛋白非結合型 A β オリゴマーは、脳内アミロイドーシス惹起分子であると同時に A β の transmissibility にも関与する可能性があり、今後その病原性の検討は最重要課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究結果発表

1. 論文発表

- 1) **Shoji M**, Fukushima K, Wakayama M, Shizuka-Ikeda M, Ikeda Y, Kawakami A, Sakazume Y, Ikeda M, Harigaya Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Murakami T, Nagano I, Manabe Y, Abe K. Intellectual faculties in patients with Alzheimer's disease regress to the level of a 4-5-year old child. *Geriatrics and Gerontology International*. 2002; 02: 143-147.
- 2) Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang WR, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Temporal and spatial changes of free cholesterol and neutral lipids in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Res*. 2003 Jan;45(1):91-100.
- 3) Matsubara E, Shoji M, Murakami T, Abe K, Frangione B, Ghiso J. Platelet Microparticles as Carriers of Soluble Alzheimer's Amyloid beta (sA β). *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov;977:340-8.
- 4) Abe K, Murakami T, Matsubara E, Manabe Y, Nagano I, **Shoji M**. Clinical Features of CADASIL. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov;977:266-72.
- 5) Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang WR, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Spatiotemporal changes of free cholesterol and neutral lipids after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov;977:115-22.
- 6) Jin G, Omori N, Li F, Sato K, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Activation of cell-survival signal Akt by GDNF in normal rat brain. *Brain Res*. 2002 Dec 27;958(2):429-33.
- 7) Li F, Omori N, Sato K, Jin G, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Coordinate expression of survival p-ERK and proapoptotic cytochrome c signals in rat brain neurons after transient MCAO. *Brain Res*. 2002 Dec 20;958(1):83-8.
- 8) Omori N, Jin G, Li F, Zhang WR, Wang SJ, Hamakawa Y, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Enhanced phosphorylation of PTEN in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*. 2002 Nov 8;954(2):317-22.
- 9) Sasaki A, **Shoji M**, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Naito M, Matsubara E, Abe K, Nakazato Y. Amyloid cored plaques in Tg2576 transgenic mice are characterized by giant plaques, slightly activated microglia, and the lack of paired helical filament-typed, dystrophic neurites. *Virchows Arch*. 2002 Oct;441(4):358-67.

10)Wang SJ, Omori N, Li F, Zhang WR, Jin G, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Enhanced expression of phospho-Akt by electro-acupuncture in normal rat brain. *Neurol Res* 2002 Oct;24(7):719-24

11)Ohta Y, Manabe Y, Sasaki C, Shiote M, Hayashi T, **Shoji M**, Abe K. A case of paroxysmal kinesigenic dyskinesia with spastic paraparesis. *Neurol Res* 2002 Oct;24(7):684-6.

12)Sato K, Murakami T, Hamakawa Y, Kamada H, Nagano I, **Shoji M**, Takata H, Nobukuni K, Ihara Y, Namba R, Hayabara T, Hirose S, Abe K. Selective colocalization of transglutaminase-like activity in ubiquitinated intranuclear inclusions of hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Brain Res*. 2002 Oct 18;952(2):327-30

13)Wang SJ, Omori N, Li F, Jin G, Zhang WR, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci Lett* 2002 Oct 11;331(2):115-8.

14)Sato K, Iwai M, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Temporal and spacial changes of BrdU immunoreactivity in amygdala kindling development. *Neurol Res*. 2002 Sep;24(6):593-6.

15)Warita H, Manabe Y, Murakami T, Shiote M, Shiro Y, Hayashi T, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Tardive decrease of astrocytic glutamate transporter protein in transgenic mice with

ALS-linked mutant SOD1. *Neurol Res*. 2002 Sep;24(6):577-81.

16)Sato K, Iwai M, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Changes of localization of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in rat hippocampus with exposure to repeated kindled seizures. *Brain Res*. 2002 Aug 16;946(2):323-7.

17)Ohta Y, Hayashi T, Sasaki C, Shiote M, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Cauda equina syndrome caused by idiopathic sacral epidural lipomatosis. *Intern Med*. 2002 Jul;41(7):593-4.

18)Manabe Y, Nagano I, Gazi MS, Murakami T, Shiote M, **Shoji M**, Kitagawa H, Setoguchi Y, Abe K. Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis. *Apoptosis*. 2002 Aug;7(4):329-34.

19)Manabe Y, Warita H, Murakami T, Shiote M, Hayashi T, Omori N, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Early decrease of the immunophilin FKBP 52 in the spinal cord of a transgenic model for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 2002 May 10;935(1-2):124-8.

20)Prat MI, Adamo AM, Gonzalez SA, Affranchino JL, Ikeda M, Matsubara E, **Shoji M**, Smith MA, Castano EM, Morelli L. Presenilin 1 overexpressions in Chinese hamster ovary (CHO) cells decreases the phosphorylation of retinoblastoma protein. relevance for

neurodegeneration. *Neurosci Lett*. 2002 Jun 21;326(1):9-12

21)Manabe Y, Narai H, Warita H, Hayashi T, Shiro Y, Sakai K, Kashihara K, **Shoji M**, Abe K. Benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME) with night blindness *Seizure*. 2002 Jun;11(4):266-8.

22)Sato K, Iwai M, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in rat subventricular zone with exposure to repeated kindled seizures. *Neurosci Lett* 2002 May 3;323(3):244-6.

23)**Shoji M**, Matsubara E, Murakami T, Manabe Y, Abe K, Kanai M, Ikeda M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Watanabe M, Aman M, Ishiguro K, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Nishimura T, Nakamura Y, Takeda M, Urakami K, Adachi Y, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, Kanemaru K, Yamanouchi H, Yoshida Y, Ichise K, Tanaka K, Hamamoto M, Yamamoto H, Matsubayashi T, Yoshida H, Toji H, Nakamura S, Hirai S. Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders a large scale multicenter study by a Japanese study group. *Neurobiol Aging*. 2002 May-Jun;23(3):363-70

24)Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002 Apr;22(4):411-9.

25)Shizuka-Ikeda M, Matsubara E, Ikeda M, Kanai M, Tomidokoro Y, Ikeda Y, Watanabe M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Maruyama K, Castano EM, St George-Hyslop P, **Shoji M**. Generation of amyloid beta protein from a presenilin-1 and betaAPP complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Mar 29;292(2):571-8.

26)**Shoji M**. Cerebrospinal fluid Abeta40 and Abeta42: natural course and clinical usefulness. *Front Biosci*. 2002 Apr 1;7:d997-1006

27)Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, **Shoji M**, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE. Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis*. 2002 Feb;9(1):11-23.

28)Matsubara E, **Shoji M**, Abe K, Frangione B, Ghiso J. Vascular Amyloidosis in neurodegenerative conditions. *Drug News Prospective* 2002 15: 439-444Matsubara E, Bryant-Thomas T, Pacheco J, Henry TL, Poeggeler B, Manjon M, Herbert D, Cruz-Sanchez F, Chyan Y-J, **Shoji M**, Abe K, Leone A, Grundke-Ikbal I, Wilson G, Ghiso J, Williams C, Refolo LM, Pappolla MA. Melatonin Increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* (in press)

2.学会発表

1. 一般演題

1)Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang WR, Ohta K, Omori N, Nagano I, **Shoji M** and Abe K.

Spatiotemporal changes of free cholesterol and neuritic lipids after transient middle cerebral artery occlusion in rat. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on "Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia" Okayama 2002, 10, 18

2)Kawarabayashi T, Murakami T, Matsubara E, Nagano I, **Shoji M** and Abe K. Accumulation of amyloid beta protein in lipid rafts Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on "Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia" Okayama 2002, 10, 18

3)Li F, Omori N, Sato K, Jin G, Nagano I, **Shoji M** and Abe K. Coordinate expression of survival p-ERK and proapoptotic cytochrome c signals in rat brain neurons after transient MCAO. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on "Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia" Okayama 2002, 10, 18

4)Ohta K, Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, **Shoji M** and Abe K. Dissociative increase of oligodendrocyte progenitor cells between young and aged rats after transient cerebral ischemia. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on "Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia" Okayama 2002,

10, 18

5)Shiote M, Nagano I, Ilieva H, Murakami T, Hayashi T, **Shoji M** and Abe K. Early decrease of survival signal protein and DNA repair enzyme in spinal motor neuron of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on "Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia" Okayama 2002, 10, 18

6)Zhang WR, Sato K, Omori N, Iwai M, Nagano I, **Shoji M** and Abe K. Time dependent amelioration against ischemic brain damage by glial cell line-derived neurotrophic factor after transient middle cerebral artery occlusion in rat Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on "Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia" Okayama 2002, 10, 18

7)Harigaya Y, Tomidokoro Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Kanai M, IKarashi Y, Matsubara E, **Shoji M**. Brain beta-amyloidosis in APPsw mice induces memory impairment with decrease of acetylcholine and focal loss of neurons with accumulation of phosphorylated tau. The 8th International conference on Alzheimer's disease and related disorders. Stockholm 2002, 7, 20-25

8)**Shoji-M**, Kawarabayashi T, Ikeda M, Harigaya Y, Murakami T, Manabe Y, Abe K. The effect of beta-amyloid 42 vaccine on TG2576 Alzheimer

model mice The 8th International conference on Alzheimer's disease and related disorders. Stockholm 2002, 7, 20-25

9) Ikeda M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Okamoto K, Matsubara E, **Shoji M**, Murakami T. Memory loss and Parkinsonism with severe tauopathy in the frontotemporal lobe of transgenic mice overexpressing R406W mutant human tau The 8th International conference on Alzheimer's disease and related disorders. Stockholm 2002, 7, 20-25

10) Kanai M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Okamoto K, **Shoji M**. Tau and beta-amyloid protein in cerebrospinal fluid as biomarkers of Alzheimer's disease. The 8th International conference on Alzheimer's disease and related disorders. Stockholm 2002, 7, 20-25

11) Abe K, Murakami T, Manabe Y, Nagano I, **Shoji M**. Clinical feature of CADASIL Third world congress on vascular factors in Alzheimer's disease. Kyoto 2002, 4, 7-10

12) Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang W, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe k. Temporal and spatial changes of free cholesterol and neutral lipids in rat brain after middle cerebral artery occlusion. Third world congress on vascular factors in Alzheimer's disease Kyoto 2002, 4, 7-10

13) Matsubara E, **Shoji M**, Murakami T, Abe K, Frangione B, Ghiso J. Microparticles are carrier of platelets A β . Third world congress on vascular factors in Alzheimer's disease. Kyoto 2002, 4,

7-10

2. シンポジウム, 教育講演

1) **Shoji M** A β vaccine therapy for Alzheimer's disease. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on "Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia" Okayama 2002, 10, 18

2) **Shoji M**, Kawarabayashi T, Murakami T, Matsubara E, Nagano I, Yasuo Harigaya Y, Hoshii Y, Kawano H, Ishihara T, Abe K. Amyloid associated proteins in A β amyloid in APPsw mice. 5th International symposium on FAP, Matsumoto Sep 24-27, 2002

3) **Shoji M**, Matsubara E, Murakami T, Nagano I, Manabe Y and Abe K. The study of Alzheimer's disease using transgenic mice. Third international symposium "the study on brain function" Fukuoka, 2002, 5, 10

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

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

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
・分解機構の解明および生体成分との相互作用の解析に関する研究

分担研究者 内木宏延 福井医科大学第2病理

共同研究者 長谷川一浩⁽¹⁾、小野賢二郎⁽²⁾、山田正仁⁽²⁾

⁽¹⁾福井医科大学第2病理、⁽²⁾金沢大学神経内科

研究要旨 アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内での伸長・脱重合機構を詳細に解析した。さらに、種々の生体内成分が、 $A\beta$ 蛋白あるいは β アミロイド線維と相互作用して線維伸長に及ぼす影響を、定量的に解析する方法を検討した。測定には表面プラズモン共鳴法を原理とするピアコアを用いた。また、より生体に近いモデルとして、系外から $A\beta$ 蛋白を連続的に供給する開放反応系を構築し β アミロイド線維の伸長及び脱重合反応を解析した。この結果、 β アミロイド線維伸長反応、脱重合反応共に一次反応形式に従うことを示した。また、重合速度と脱重合速度が均衡する $A\beta$ 蛋白濃度(臨界モノマー濃度)を実験的に求めることができた。更に apoE、HSA を例として、 β アミロイド線維伸長反応に対する作用を比較解析したところ、apoEの方が強い抑制効果を示すと考えられる。本方法により、線維形成に重要な影響を及ぼす生体成分を検出し、その反応機構を詳細に解析できると考えられる。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名：内木宏延・福井医科大学 第2病理・教授

A. 研究目的

われわれはこれまでに、 $A\beta$ 蛋白から

の β アミロイド線維形成過程を、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、 $A\beta$ 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、 β アミロイド線維の伸長ならびに脱重合機構を解析した。また、アポリポ蛋白質 E (apoE) などの各種生体分子が A β 蛋白、 β アミロイド線維それぞれに対し、どの様に相互作用をし、線維形成に影響を及ぼしているのか解析を試みた。今回は、モデルケースとして、apoE、ヒト血清アルブミン (HSA) と A β 蛋白、 β アミロイド線維間の相互作用について検討した。この様に、本研究は、アミロイド線維沈着に重要な促進・抑制効果を及ぼす生体成分を探索し、それらが β アミロイド線維形成・沈着に、どのような機構で作用するかを解明することが目的であり、最終的にはこれらの成分を制御することで、 β アミロイド線維形成・沈着を抑制することを目標としている。

B. 研究方法

測定には表面プラズモン共鳴法 (SPR) を測定原理とする BIAcore 3000 (ピアコア) を用いた。最初に、重合核となる β アミロイド線維を超音波破碎後、センサーチップ上にアミノ基カップリング法を用いて共有結合により固定化した。固定化量は 4 つのフローセル毎に変化させ、0~4000 レスポンスユニット (RU) とし

た。尚、1000 RU はセンサーチップの面積 1 平方 mm 当たり 10 ng の蛋白量に相当する。次いで、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.5) に溶解した 0~30 μ M の A β 蛋白溶液を流速 30 μ l/min で連続的に添加し、37 $^{\circ}$ C における β アミロイド線維の伸長過程及び脱重合過程をリアルタイムで測定した。また、A β 蛋白も同様に固定化した。HSA、apoE 溶液についても、A β 蛋白と同様にしてピアコアセンサーチップに添加し、 β アミロイド線維並びに A β 蛋白に対する親和性を定量した。

C. 研究結果

1. 開放反応系における β アミロイド線維の伸長と脱重合機構の基礎検討 (速度論解析)。線維の固定化量が異なる複数のフローセル (0~4000 RU) に 0~30 μ M の A β 蛋白溶液を添加したところ、反応シグナルは直線的に増加した。この傾き (伸長速度) は、線維の固定化量および A β 蛋白濃度に比例した。次いで、A β 蛋白の供給を停止し、緩衝液のみを流すと、SPR シグナルは経時的に減少する。この減少は早い成分と、定常的な遅い成分から構成されているが、この内、遅い減少反応成分はアミロイド線維の固定化量だけに比例し、脱重合の速度に相当する。この結果は、伸長反応、脱重合反応共に、一次反応速度論形式に従うことを示している。更に、この反応モデル

を用いて、線維の伸長反応と脱重合反応がつり合い、見かけ伸長も脱重合もしない A β 蛋白の濃度、つまり、臨界モノマー濃度を実験的に求めたところ、約 20 nM であった。A β 蛋白の濃度がこれ以上では線維が伸長し、これ以下では脱重合すると考えられる。さらに、センサーチップ表面を原子間力顕微鏡で観察し、固定された β アミロイド線維が伸長反応後、実際に伸びていることを確認した。

2. 脳における β アミロイド線維の形成・沈着に関わる生体分子と、A β 蛋白・ β アミロイド線維との相互作用解析のモデルケースとして、A β 蛋白、 β アミロイド線維、apoE 及び HSA の相互作用について検討した。A β 蛋白および β アミロイド線維をそれぞれ固相化したフローセルに apoE3 を添加し、それぞれに対する結合定数を求めたところ、apoE3 は β アミロイド線維に対しより強い親和性を示した。次いで、脳脊髄液レベルの約 3 倍 (5 μ M) の HSA を添加しても殆ど結合が認められず、更に、100 nM の apoE3 に 5 μ M の HSA を混合して添加したところ、100 nM の apoE3 単独と同程度の結合が認められた。また、HSA の β アミロイド線維並びに A β 蛋白に対する親和性は apoE のそれに比べて、1/1000 程度であった。従って、HSA は、apoE と β アミロイド線維の反応に殆ど影響を及ぼしていない可能性がある。次に、固相化した β アミロイド線維に

apoE を添加し結合させた後、A β 蛋白を添加し、線維伸長速度を測定すると、apoE の添加量に依存して伸長速度が低下した。従って、apoE は β アミロイド線維伸長反応に対し、抑制的に作用する可能性が示された。

D. 考察

今回我々が開発した SPR を用いた測定法は、マイクロモラ以下の濃度の A β 蛋白の反応を測定することが可能な高感度測定法であり、また、リアルタイム測定を行うため、反応速度を直接求めることができる。また、閉鎖系では観測不可能であった解離反応に相当する SPR シグナルの減少を、リアルタイムで観測できた。さらに、線維伸長過程は重合と脱重合の平衡過程であることを示し、臨界モノマー濃度を直接求めることが初めて可能となった。同時に、平衡定数など各種反応速度論的パラメータを求めることができ、線維の安定性等を定量的に評価することができる。

脳脊髄液中に比較的少量に存在する HSA より、比較的少量しかない apoE の方がアミロイド線維形成により影響を及ぼす可能性が示された。生体内においては、多様な成分が、促進的あるいは抑制的に相互作用した結果、線維形成が進行していると考えられる。この総体を一旦構成成分に分解して、各要素間の相互作用を検討し、再構成することで、アミ

ロイド線維形成に重要な役割を果たしている成分を見出し、これを制御することで、アミロイド線維形成・沈着を抑制することが可能であると考え。また、種々の有機化合物が上記過程に及ぼす効果の解析にも使用可能と考え、現在検討を進めている。

E. 結論

SPR 法を用いた開放反応系によって β アミロイド線維の伸長、および脱重合機構を解析し、臨界モノマー濃度を直接測定した。また、apoE、HSA を例として、生体成分がどの様に相互作用して、アミロイド線維の形成に影響を及ぼすかを解析する方法を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hasegawa, K., Ono, K., Yamada, M., Naiki,

H. Kinetic modeling and determination of reaction constants of Alzheimer's β -amyloid fibril extension and dissociation using surface plasmon resonance. *Biochemistry* 41(46): 13489-13498, 2002

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・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

マウス AApoAII アミロイドーシス伝播機構の解析

分担研究者 樋口京一 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
共同研究者 是永龍巳*、付笑影*、張 Huanyu*、澤下仁子*、森政之*、
松下隆壽**、細川昌則***
*信州大学医学部附属加齢適応研究センター脈管病態分野、
**京都大学再生医科学研究所再生統御、
***愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所形態学部

研究要旨 我々はこれまでマウス AApoAII アミロイドーシスを用いて、アミロイド線維によるアミロイド線維伸長反応促進がアミロイドーシス発症に重要な役割を担っていることを示してきた。今回、このようなアミロイド線維による伝播の機構を明らかにするために、1) 飼育室内でのマウス AApoAII アミロイドーシス発症程度の経年変化、2) 母子間での垂直伝播の機構、3) アミロイドーシス発症促進に必要な AApoAII アミロイド線維量について検討した。

1998年に京都大学より R1.P1-Apoa2^c (SAMR1C と略す) マウスをクリーン化後、信州大学医学部附属動物実験施設に導入した。SAMR1C マウスでは導入当初、アミロイドーシスの発症が激減したが、出生時期が遅くなるに連れて、アミロイド沈着時期が早まり、沈着程度が増大した。アミロイドーシスが発症した母マウスに哺育された仔マウスではアミロイドーシス発症が有意に促進した。AApoAII アミロイド線維を段階的に希釈し、SAMR1C マウスの尾静脈に投与した結果、 $10^{-7} \mu\text{g}$ の極微量でも2ヶ月後に AApoAII アミロイドの沈着が認められた。これらの結果より、AApoAII アミロイドーシスの発症には微量のアミロイド線維の伝播が関与する可能性が示唆された。

分担研究者：

樋口京一・信州大学医学部附属加齢適応
研究センター・教授

A. 研究目的

我々はマウス AApoAII アミロイドーシスにおいて、アミロイド線維による伝播

(発症促進) がアミロイドーシス発症に重要な役割を担っていることを以下のような研究結果より明らかにしてきた。(1) AApoAII アミロイド線維投与によって、アミロイドーシスの発症が促進される：実験的伝播 1)、 (2) AApoAII アミロイドーシスが発症している老齢マウスと同一ケージ内で飼育した若齢の SAMR1C マウスではアミロイドーシスの発症が促進された：アミロイド線維を含んだ糞の摂食による水平伝播の可能性 2)、 (3) アミロイドーシスを発症している母親から生まれ、哺育された仔マウスではアミロイドーシスの発症が促進された：母子間の垂直伝播の可能性。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) 飼育室内での AApoAII アミロイドーシス発症程度の経年的変化の検討、2) 母子間垂直伝播の機構の検討、3) アミロイドーシス発症促進に必要な AApoAII アミロイド線維量の検討、を行った。

B. 研究方法

1) 信州大学医学部附属動物実験施設でのアミロイドーシス発症程度の経年変化：C型 apoA-II (対立遺伝子; *Apoa2^c*) を持ち、AApoAII アミロイドーシスを若齢より発症する R1.P1-*Apoa2^c* (SAMR1C) と SAMP1 系統マウス、正常型 (B 型) apoA-II (対立遺伝子; *Apoa2^b*) を持ち、AApoAII アミロイドーシスをほとんど発症しない SAMR1 系統マウスを用いた。

1998 年に京都大学再生医科学研究所の conventional 環境下で飼育されていた SAMR1C マウスを帝王切開によるクリーニングし、信州大学医学部附属動物実験施設に導入した。自然死、あるいは安楽死させた各系統マウスのアミロイド沈着を調べ、生まれた時期によるアミロイド沈着の程度の違いを比較した。

2) 母子間伝播の可能性の検討：2 ヶ月齢の SAMR1C マウス (雌、雄) に AApoAII アミロイド線維を尾静脈投与し、アミロイド沈着を誘発した。アミロイド沈着のないマウスと交配し、出産した仔マウスは離乳までアミロイド沈着親マウスと同居させ、その後のアミロイド沈着を調べた。また、出産直後に母親マウスの交換 (アミロイド線維投与と非投与) を行い離乳まで哺育させた。またアミロイドーシス発症マウスからミルクや尿を採取しアミロイド線維の存在を検討した。

3) アミロイドーシス発症促進に必要なアミロイド線維量の検討：AApoAII アミロイド線維は高齢 SAMR1C マウスの肝臓より Pras らの方法で抽出した。2 ヶ月齢の SAMR1C マウスの尾静脈に段階的に希釈した AApoAII 線維を投与した、2 ヶ月後に屠殺し、アミロイド沈着誘発効果を検討した。

(倫理面への配慮)

実験に供したマウスの飼育状態が良好な環境になるように、また屠殺に際しては苦痛が最小限になるように配慮し、

信州大学医学部動物実験委員会の承認の下に、信州大学医学部の動物実験に関する指針に沿って行った。

C. 研究結果

1) 飼育室内でのアミロイドーシス発症程度の経年変化；クリーニングを経て、信州大学に導入した当初は SAMR1C と SAMP1 系統マウスともにアミロイド沈着は極軽度であった。出生時期が後になるにつれて、アミロイド沈着の早期化と重篤化が認められ、現在では京都大学の conventional 環境下と変わらない沈着程度を示している。アミロイド沈着初期では肺あるいは消化管から沈着が見られた。しかしながら正常型 apoA-II を持つ SAMR1 ではアミロイド沈着は現在まで全く観察されていない。

2) 母子間伝播の可能性の検討；アミロイド線維投与母マウスから出生した仔マウスでは、生後4ヵ月齢において、腸管及び舌に軽度な AApoAII アミロイド沈着が確認された。アミロイド沈着レベルは加齢とともに重度化し、対照群との間には有意差が認められた。また、線維無投与母親マウスの仔を、出生直後に線維を投与した（アミロイドーシスが発症している）母親マウスが哺育した場合には、有意なアミロイド沈着促進が確認された（図1）。これに対し、アミロイド線維を投与し、アミロイドーシスを誘発した雄マウスを父として出生し、離乳まで同居した仔マウスでは、沈着の促進は観察さ

れなかった（表1）。これらの結果より母乳を介してのアミロイド線維の伝播が考えられたが、Westernblot による解析では母乳中に apoA-II アミロイドタンパク質等は検出できなかった。また尿中にも apoA-II は検出されなかった。

3) 伝播に必要なアミロイド線維量の検討；SAMR1C マウスの肝臓より調整した AApoAII アミロイド線維 $1\sim 10^{-7}\mu\text{g}$ を尾静脈に投与したが、いずれの投与量でも、微量ながら、主に舌にアミロイド沈着が観察されるマウスが存在した。

D. 考察

アミロイド線維自体が鋳型となって、アミロイドタンパク質モノマーの構造変換を加速し、線維の末端に結合させることによってアミロイド線維の伸長が起る。すなわちアミロイド線維が、生体内で種 (seeds) として作用し、アミロイド沈着を促進する。我々はこのようなアミロイド線維の伝播による線維伸長促進が、アミロイドーシスの発症に重要な要因であることを AApoAII アミロイドーシスで検証してきた (1-3)。今回は同一飼育室内でのアミロイドーシス発症の経年的変化を詳細に解析し、1) アミロイドーシスを発症しやすい遺伝的素因を持つマウス (SAMR1C や SAMP1) では、信州大学医学部附属動物実験施設での出生時期が遅くなるに連れてアミロイド沈着の亢進が認められた。2) アミロイドーシスにかかりにくい遺伝的素因を持つマウス (SAMR1)

ではアミロイド沈着は全く観察されななかった。ことが明らかになった。アミロイド沈着の早期化については、アミロイド線維の何らかの経路による伝播が考えられるが、現在のところ確実な証拠はない。今後、微生物学的環境や腸内細菌等の変化も考慮に入れて検討する必要がある。

アミロイドーシスを発症した母マウスに哺育された仔マウスではアミロイドーシスの発症の促進が観察された。しかし母乳中や尿中にはアミロイド線維が現在の検出感度では確認できなかった。この母子間での発症促進機構について、より詳細に検討する必要がある。

伝播によるアミロイドーシス発症促進に必要なアミロイド線維の数量を知るとは、伝播機構の解明に重要である。今回の報告では 10^{-7} μg でも、軽度であるがアミロイド線維が沈着したマウスが観察された (4/5 匹)。したがって生体では極微量のアミロイド線維の伝播でも、アミロイドーシスを誘発する可能性を示唆した。今後さらに広範囲な投与量を検討し、必要最低限の線維量を決定する必要がある。

E. 結論

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の可能性が示唆された。また出生後の母子間垂直伝播が示唆された。しかしながら、その機構についてはまだ不明であり、ア

ミロイド線維の伝播が関与するのか、今後の検討が必要である。また AApoAII アミロイド線維は極微量 ($<10^{-7}$ μg) でも生体でのアミロイドーシスの発症促進が可能であることが判明した。

[引用論文]

- 1) Higuchi K, Kogishi K, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation-dependent. *Lab Invest* 78: 1535-1542, 1998.
- 2) Xing Y, Nakamura A, Chiba T, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest* 81: 493-499, 2001.
- 3) Xing Y, Nakamura A, Korenaga T, et al. Induction of protein conformational change in mouse senile amyloidosis. *J. Biol. Chem.* 277: 33164-33169, 2002.

F. 健康危険情報

マウスの AApoAII アミロイドーシスの場合、アミロイドーシスを発症し易い遺伝的素因を持つ場合に、母親から子どもへのアミロイドーシスの伝播 (発症促進) が起る可能性が示唆された。ヒトアミロイドーシスについては、AA について否定的報告がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Xing Y, Nakamura A, Korenaga T, Guo Z, Yao J, Fu X, Matsushita T, Kogishi K,

- Hosokawa M, Kametani F, Mori M, Higuchi K. Induction of protein conformational change in mouse senile amyloidosis. *J. Biol. Chem.* 277: 33164-33169, 2002.
- 2) Xing Y, Higuchi K. Amyloid Fibril Proteins. *Mech Ageing Dev.* 123: 1625-1636, 2002
- 3) Suzuki T, Tozuka M, Kazuyoshi Y, Sugano M, Nakabayashi T, Okumura N, Hidaka H, Katsuyama T, Higuchi K. Predominant apolipoprotein J exists as lipid-poor mixtures in cerebrospinal fluid. *Ann Clin Lab Sci.* 32: 369-376. 2002
- 4) Umezawa M, Tatematsu. K, Korenaga T, Fu X, Matushita T, Okuyama H, Hosokawa M, Takeda T, Higuchi K. Dietary fat modulation of ApoA-II metabolism and prevention of senile amyloidosis in the senescence accelerated mouse (SAMP1). *J Lipid Res.* 2003 (in press)
- 5) 森 政之、樋口京一。 老化疾患モデル - マウス。 現代医療 Vol. 34 pp. 37-42. 2002
- 6) 森 政之、樋口京一。 老化疾患モデル マウス *Molecular Medicine* 39. pp. 528-533, 2002
2. 学会発表
- 1) 樋口京一。 基礎老化と疾患 (アミロイドーシス) との狭間で。 教育講演 1『老化研究の方向を説く』 日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)
- 2) 樋口京一。 アミロイド蛋白質 apoA-II の線維構造への変換と伝播。 ワークショップ「蛋白質の品質管理とその破綻」 第 55 回日本細胞生物学会大会。(2002.5.21 横浜)
- 3) Higuchi K. Mouse apoA-II amyloidosis: genetics, epigenetics and transmission. (Keynote Lecture) The 5th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. (2002.9.26 Matsumoto)
- 4) 付笑影、是永龍巳、松下隆壽、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。 種を越えたアミロイドーシス誘発の可能性；マウスモデルを用いた解析 II。 第 91 回日本病理学会総会 (2002.3.27 横浜)
- 5) 付笑影、森政之、是永龍巳、松下隆壽、細川昌則、馬場聡、内木宏延、石原得博、河田康志、池田修一、樋口京一。 種を越えたアミロイドーシス誘発の可能性 2；AA アミロイドーシスモデルを用いた解析。 日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)
- 6) 是永龍巳、付笑影、森政之、松下隆壽、細川昌則、樋口京一。 母子間垂直伝播によるマウス老化アミロイドーシス発症の可能性。 日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)
- 7) 姚俊潔、森政之、酒井潤、広瀬国孝、羽田亮介、千葉卓哉、樋口京一。 SAGE

法によるマウス精巢での遺伝子発現プロファイルの加齢変化の解析。日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)

H. 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

表1 SAMR1C マウスにおける AApoAII アミロイドーシスの親子間伝播の可能性の検討 (仔マウス4ヶ月齢)

Amyloidosis-induced parent	Cases / at risk*	AI**
Female	7 / 10	0.22 ^a
Male	2 / 10	0.04 ^b

* amyloid positive mouse/total mouse.

** Amyloid Index.

^a vs ^b significantly different. $p = 0.0233$ (Mann-Whitney-U test)

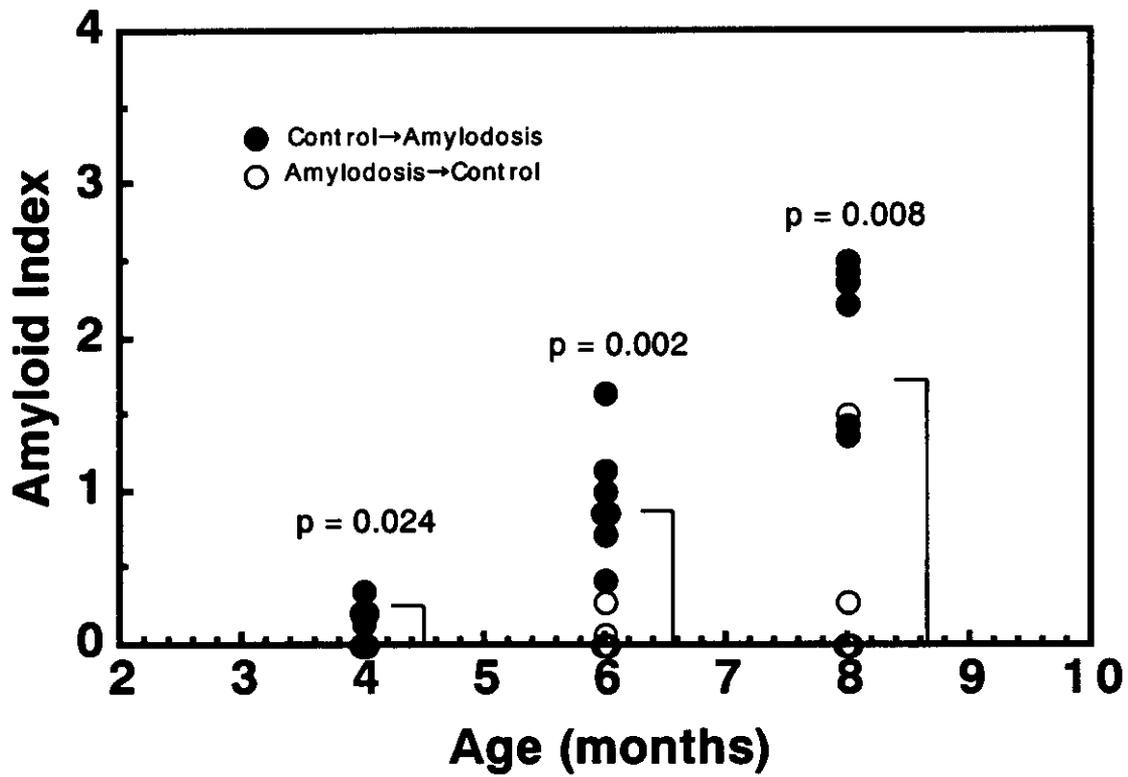


図1 SAMR1C マウスにおけるAApoAII アミロイドーシスの母子間伝播の可能性
 ○アミロイドーシス発症母親マウスから出生し、アミロイドーシスを発症していないマウスが哺育した仔マウス。●アミロイドーシスを発症しない母親マウスから出生し、アミロイドーシス発症マウスが哺育した仔マウス

平成14年度
研究事業報告

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 年度合同ワークショップ

日 時：平成 14 年 8 月 30 日、10 時～17 時

場 所：KKR ホテル東京 11F 孔雀の間

参加者：主任研究者、分担研究者他、計 38 名

内 容：1、挨拶

厚生労働省保健疾病対策課担当官

主任研究者 石原得博

2、研究発表（プログラムは次頁）－主任研究者、分担研究者

3、その他

平成 14 年度合同研究報告会

日 時：平成 15 年 1 月 30 日、10 時～17 時

平成 15 年 1 月 31 日、9 時～17 時

場 所：KKR ホテル東京 11F 孔雀の間

参加者：主任研究者、分担研究者他、計 136 名

内 容：1、挨拶

厚生労働省保健疾病対策課担当官

主任研究者 石原得博

2、研究発表（内容は前掲）－主任研究者、分担研究者

3、その他

アミロイドーシスに関する研究班ならびに
アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究班
合同ワークショップ プログラム

日時：平成 14 年 8 月 30 日（金） 10:00-16:10

場所：KKR ホテル東京

東京都千代田区大手町1-4-1 TEL 03-3287-2921（代表）

10:00-10:10 厚生労働省健康局疾病対策課 担当官 御挨拶

I. アミロイドーシス調査研究

座長：今井浩三（札幌医大第一内科）

1. 主任研究者の今後の方針と目標 10:10-10:30

（評価委員会における過去 3 年間の実績論評を踏まえて）

信州大学医学部第三内科 池田修一

2. AL-アミロイドーシス 10:30-11:00

末梢血幹細胞移植(PBSCT)を併用したメルファラン大量静注療法の適応とその実施要項

信州大学医学部第三内科 松田正之

座長：高杉 潔（道後温泉病院）

3. AA-アミロイドーシス 11:00-11:30

SAA 産生機序の解析ならびに治療指針の確立

大坂大学健康体育部健康医学第一部門 吉崎和幸

指定発言：AA-アミロイドーシスを合併した RA 患者に対する治療 11:30-11:40

血清 SAA 濃度を指標とした免疫抑制剤の投与方法

信州大学医学部第三内科 池田修一

4. F A P 11:40-12:10

肝移植以外の治療法について

熊本大学医学部附属病院臨床検査医学 安東由喜雄

12:10-13:00（昼食・班員会議）