

2. 培養細胞系における AS-ODN の効果

RPMI8226 の V λ cDNA 塩基配列に基づいて、CDR-1, 2, 3 それぞれに対する AS-ODN を作製して RPMI8226 に導入し、導入後の培養上清中の λ 鎖濃度を測定した(図1)。72 時間後には、センス配列の ODN およびランダム配列の ODN に比べて、AS-ODN 導入群では、有意に λ 鎖産生量の低下を認めた。しかし、120 時間、144 時間後には他のオリゴ同様有意差はなくなった。

3. 培養細胞系における siRNA の効果

AS-ODN と同様に RPMI8226 の V λ cDNA 塩基配列に基づいて、CDR-2,3 それぞれに対する siRNA を作製して RPMI8226 に導入し、導入後の培養上清中の λ 鎖濃度を測定した(図2)。

48 時間後ではほとんど抑制効果は見られなかった。しかし、72 時間後では Control siRNA は細胞のみの培養とほとんど変わらなかったが、siRNA CDR-2, siRNA CDR-3 では、control siRNA に比較して、強い抑制効果を受けた。

4. 培養細胞系における AS-ODN と siRNA の効果の比較

CDR-2 領域において、AS-ODN, siRNA について同時に抑制効果を検討した(図3)。AS-ODN は 4.8 μ M 用い、siRNA は 0.12 μ M 用いた。

48 時間後では AS-ODN, siRNA においては軽度抑制効果が見られた。72 時間後には AS-ODN は強い抑制効果が見られたが、siRNA においてはさらに強い抑制効果をも認めた。

D. 考察

昨年までの研究で我々は、PCR 法によって簡便に、臨床材料から単クローン性 L 鎖を同定することが可能であることを示してきた。これによって、個々の患者毎に単クローン性 L 鎖を同定し、アンチセンス DNA を作製、導入するなどの応用が考えられる。そこで我々は、骨髓腫細胞株の V λ 領域塩基配列を基にして AS-ODN および siRNA を作製し、L 鎖産生の抑制を試みた。今回の検討では AS-ODN, siRNA とともに抑制効果をも認めたが、siRNA は AS-ODN の 40 分の 1 という少量にもかかわらず、より強い抑制効果が現れた。

我々は昨年、骨髓腫マウスモデルを作製し、移植された腫瘍内に AS-ODN を投与することにより、 λ 鎖の

血中濃度を著明に抑制することが可能であったことを示した。L 鎖の血中濃度を低下させることは、アミロイドーシスの進行抑制や退縮に繋がる可能性がある。今回 AS-ODN 以上の抑制効果をも認めた siRNA ではさらに強い抑制効果が期待できるかもしれない。ただし、siRNA は AS-ODN と比較して生体内で非常に不安定なため、投与方法に対しても工夫が必要であり、安定化剤を併用した合成 siRNA, あるいは siRNA 発現ベクターの作成などの工夫が必要と考える。

E. 結論

RT-PCR 法によって腫瘍細胞株の λ 鎖 V 領域の塩基配列を決定し、これに基づいて CDR 領域に対応する AS-ODN および siRNA を作製した。AS-ODN および siRNA を培養細胞に導入することにより、 λ 鎖の産生が抑制された。さらに、siRNA は AS-ODN に比較して少量にもかかわらず、より強い抑制効果が現れた。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
高橋 文彦、石田 禎夫、豊田 実、村井 政史、佐藤亜由美、池田 幸穂、酒井 基、今井 浩三 多発性骨髓腫における DNA メチレーションプロファイル。第 65 回日本血液学会-第 45 回日本臨床血液学会。2003、大阪

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
申請中 2002-240083 原発性アミロイドーシスの治療方法
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

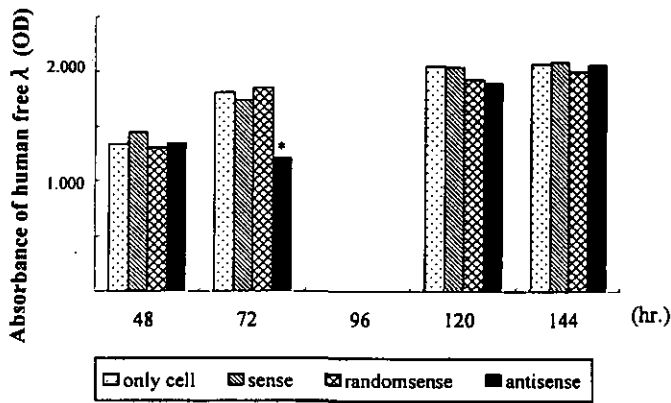


図1 RPMI8226 への AS-ODN 導入による、 λ 鎖産生の抑制。CDR-2 に対する AS-ODN を導入。細胞のみ (only cell)、センス配列 (sense) およびランダム配列 (randomsense) の ODN に比べて、RPMI8226 に対する AS-ODN (antisense) 導入後は、有意に λ 鎖産生が低下。しかし時間の経過とともに抑制効果は減弱する。

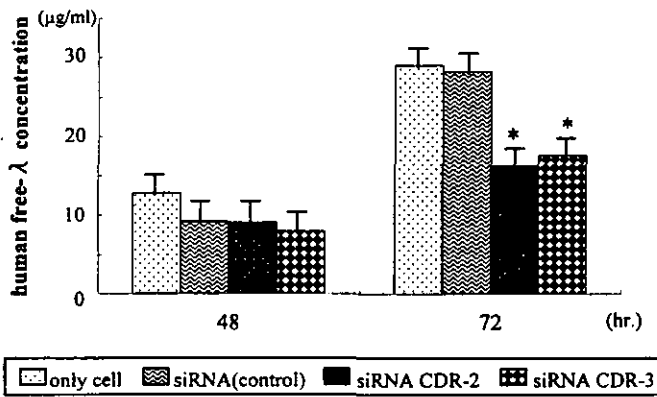


図2 RPMI8226 への siRNA 導入による、 λ 鎖産生の抑制。CDR-2, 3 に対する siRNA を導入。細胞のみ (only cell)、コントロール (control siRNA) に比べて、RPMI8226 に対する siRNA 導入後は、有意に λ 鎖産生が低下。

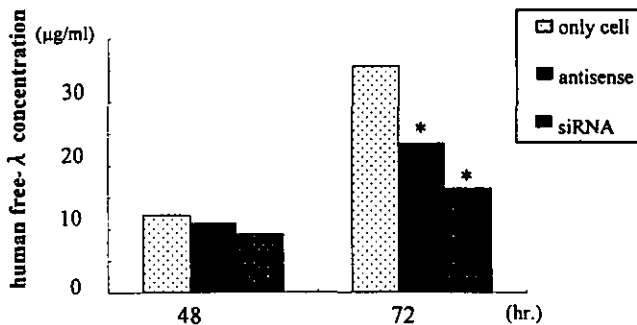


図3 RPMI8226 への CDR-2 における AS-ODN および siRNA 導入による λ 鎖産生の抑制。RPMI8226 に対する AS-ODN、siRNA ともに導入後は、有意に λ 鎖産生が低下。しかし siRNA のほうが抑制効果は強い。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

リスクを有する AL アミロイドーシス患者に対する自家造血
 幹細胞移植併用メルファラン大量療法

分担研究者 麻奥英毅 広島赤十字・原爆病院検査部輸血部

共同研究者 藤原 恵*、吉田知巳**、有田健一***、許 泰一****

広島赤十字・原爆病院、*病理部、**同循環器科、***同呼吸器科、

****同第4内科

研究要旨 Comenzo と Gerz らが提唱した risk-adapted approach の基準 (Blood 2002;99:4277) でそれぞれ good risk、poor risk に相当する高齢及び強い臓器障害を有する 2 例に対し、アミロイドーシス調査研究班治療プロトコルに準じ自家造血幹細胞移植を施行した。Good risk 例は問題なく完遂できたが、poor risk 例は前治療の途中で全身状態の悪化を来した。しかしその後の治療を省略し幹細胞採取を G-CSF 単独で行うことで自家造血幹細胞移植を施行し得た。2 例とも移植後の経過は良好である。原発性 AL アミロイドーシスのモデルとして前治療で good PR の多発性骨髄腫患者を対象に自家造血幹細胞移植の効果を検討した結果、腫瘍量の少ない AL アミロイドーシスでは前治療を行わず自家造血幹細胞移植併用メルファラン大量療法だけでも十分な効果を得ることが予想された。臓器障害を有するリスクの高い症例に対しては新たな治療戦略として、初回は減量した大量化学療法による自家移植を行い、臓器障害の改善を待って通常的大量化学療法による自家移植を行う double transplant を検討すべきと考えた。

A. 研究目的

全身性 AL アミロイドーシスに対し自家造血幹細胞移植併用メルファラン大量療法は現在唯一有効な治療法であるが治療関連死が多く、その適応は限られる。現在アミロイドーシスに関する調査研究班では 65 才以下で臓器障害の強くない例を適応基準とし自家造血幹細胞移植症例の集積を行いその安全性と有効性の検討を行っているが、臨床の場においてはこの適応基準外の症例も多い。これらの症例に対し自家造血幹細胞移植を組み込んだ安全かつ有効な治療指針の確立を目的とする。

B. 研究方法

1. 対象

アミロイドーシス調査研究班の適応基準外の患者 2 例。なお対象患者に対しては自家造血幹細胞移植までに複数回の説明を行い毎回理解の確認と同意を得た。

2. 方法

- 1) アミロイドーシス調査研究班の治療プロトコルに準じて治療を行い本プロトコルの適応拡大の可能性について検討する。しかし必要に応じ適宜 modification を行う。同時に治療法選択の基準として Comenzo と Gerz らが提唱した Risk-adapted approach の有用性について検討する。
- 2) 原発性 AL アミロイドーシスと同程度の腫瘍量と考えられる多発性骨髄腫患者をモデルに自家造血幹細胞移植の効果を検討し、臓器障害を有する AL アミロイドーシス患者に適した自家造血幹細胞移植併用大量化学療法の治療戦略を検討する。

C. 研究結果

1. 2 症例に対する自家造血幹細胞移植併用大量化学療法 (表 1)

症例 1. 67 才女性

症状：労作時息切れ

診断：IgG-κ、(BJP-κ) MGUS、全身性 AL アミ

ロイドーシス

病変部位：肺、肝、胃アミロイドーシス

検査値：骨髄中形質細胞 6.0%、肝腎機能正常、24hrsCcr116.9 l/day、肺機能検査；%VC 74.4、%FVC 72.1、FEV1.0 67.2%、DLCO73.5、SAT 96%、5分歩行後 SAT 92%

治療：アミロイドーシス調査研究班の治療プロトコールに従って行った。VAD 2 コース後 VP16+G-CSF により動員を行い末梢血幹細胞を採取（採取量 9.07×10^6 CD34cell/kg）。メルファラン $140\text{mg}/\text{m}^2$ 投与後自家造血幹細胞移植を行った。治療経過は大きな併発症もなく順調に経過し移植後 3 週間で退院した。1 ヶ月後の検査で骨髄中形質細胞 0.6%、蛋白分画で明らかな M 蛋白は消失していた。

症例 2. 56 才女性

症状：心不全、ネフローゼ、下痢

診断：BJP- λ MGUS、全身性 AL アミロイドーシス

病変部位：心、腎、大腸、胃、皮下脂肪アミロイドーシス

検査値：骨髄中形質細胞 6.5%、肝機能異常なし、TP 3.8 g/dl、Alb 1.9 g/dl、BUN 8.7 mg/dl、Cr 0.56 mg/dl、24hrsCcr 45.5 l/day、血圧 83 / 62 mmHg、EF 55%、HANP 57 pg/ml、BNP 250 pg/ml、SAT 95%

治療：アミロイドーシス調査研究班の治療プロトコールに従って治療を開始したがカテコラミンを使用しても血圧のコントロールが困難であったため VAD1 コースで終了。G-CSF 単独動員で末梢血幹細胞採取を行い（採取量 7.11×10^6 CD34cell/kg）、 $140\text{mg}/\text{m}^2$ のメルファラン大量化学療法後自家造血幹細胞移植を行った。移植後の経過は順調で移植後 6 日目には顆粒球の回復を認め 2 週間目にはカテコラミンから離脱した。1 ヶ月後には骨髄中形質細胞 0.5%、心不全症状は改善傾向となり 2 ヶ月後 EF62%と改善した。（図 1）

なお 2 症例とも十分な幹細胞が採取できたため採取量の半分を移植したがいずれも造血能の回復は良好で約 10 日間で正常値に回復した。

2. 腫瘍量の少ない骨髄腫に対する自家造血幹細胞移植併用大量化学療法の効果（図 2）

原発性 AL アミロイドーシスを腫瘍の観点からみると MGUS に相当し、腫瘍量は少ないと考え

られる。そこで前治療で good partial response（骨髄中形質細胞 $\leq 5\%$ 、かつ M 蛋白 IgG $\leq 2000\text{mg}/\text{dl}$ 、または IgA $\leq 1000\text{mg}/\text{dl}$ ）となった多発性骨髄腫患者 23 例をモデル対象とし自家造血幹細胞移植の効果を検討した。その結果は complete response が 56.5%であり、3 年無再発無増悪生存率は 75.3%であった。

D. 考察

症例 1 は 67 才と高齢でありアミロイドーシス調査研究班の適応基準外であるが、Comenzo らの Risk-adapted approach の基準に照らし合わせると good risk group に属し、本研究班治療プロトコールをそのまま適応できると考えられた。実際治療経過は順調で大きな併発症もなく経過した。

症例 2 はアミロイドーシスによる心、腎障害が強く、Risk-adapted approach の基準では poor risk に相当する。本症例は VAD 療法の途中で血圧維持が困難となり研究班プロトコールを完遂できなかった。この 2 例の経験においては臓器障害を有する全身性 AL アミロイドーシスの治療法選択の基準として Risk-adapted approach は有用であると思われた。

腫瘍量の少ない good partial response 多発性骨髄腫患者をモデルとした検討では CR 率、3 年無再発無増悪生存率とも無治療骨髄腫患者を対象とした従来の報告に比べ良好な結果であった。腫瘍量の観点からみれば原発性 AL アミロイドーシスにおいても臓器障害がなければほぼ同程度の治療効果が期待できるはずである。しかし実際にはアミロイドーシスの臓器障害による治療関連死など多くの問題が存在する。今までの報告でも臓器障害の強い例では前治療や造血幹細胞採取の段階で全身状態の悪化を来し、自家造血幹細胞移植まで到達できない例が多く報告されている。症例 2 においても 1 コース目の VAD 療法の途中で全身状態の悪化を来したためその後の化学療法は行わず、幹細胞採取は G-CSF 単独で動員を行うことで自家造血幹細胞移植を施行し得た。Good partial response 多発性骨髄腫患者をモデルとした検討からも前治療がなくても十分な治療効果が得られることが予想される。また造血幹細胞採取法については症例 2 で示したように

G-CSF 単独でも十分な幹細胞が採取できる可能性が高い。よって臓器障害の強い例に対しては前治療や幹細胞動員のための化学療法は行わず、速やかに G-CSF 単独による動員で幹細胞を採取し、臓器障害の程度を考慮に入れ dose down を行った大量化学療法+自家造血幹細胞移植を施行するのがよいと思われる。2例だけの経験ではあるが dose down にあたっては Comenzo らの Risk-adapted approach の基準が参考になると思われる。

自家造血幹細胞移植後アミロイドーシスによる臓器障害の改善が認められるという報告が多くある。今回の2症例においても移植後3ヶ月で臓器障害の改善が認められている。以上のことから新たな治療戦略として double transplant も検討に値する。つまり臓器障害の強い症例は初めから G-CSF 単独動員で幹細胞採取を行い、臓器障害の程度に応じ dose down した大量化学療法により1回目の自家造血幹細胞移植を施行する。その後臓器障害、全身状態の改善を待って full dose で2回目の幹細胞移植を行うというものである。実際にこの治療戦略が有用であるか今後さらに検討する予定である。

E. 結論

1. 高齢者に対しても本研究班治療プロトコールは施行可能であり、その適応を決めるに当たっては Risk-adapted approach の基準が有用であると思われる。
2. 骨髄腫患者をモデルとした検討から腫瘍量が

少ない原発性 AL アミロイドーシスでは自家造血幹細胞移植だけで十分な効果が得られると考えられた。

3. 幹細胞採取において G-CSF 単独動員で十分採取可能である。
4. よって臓器障害の強い例に対しては前治療や幹細胞動員目的の化学療法を行わず速やかに G-CSF 単独での動員採取、自家造血幹細胞移植を考慮しても良い。
5. 臓器障害を有する患者に対しより安全かつ有効な治療戦略として double transplant を検討すべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
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

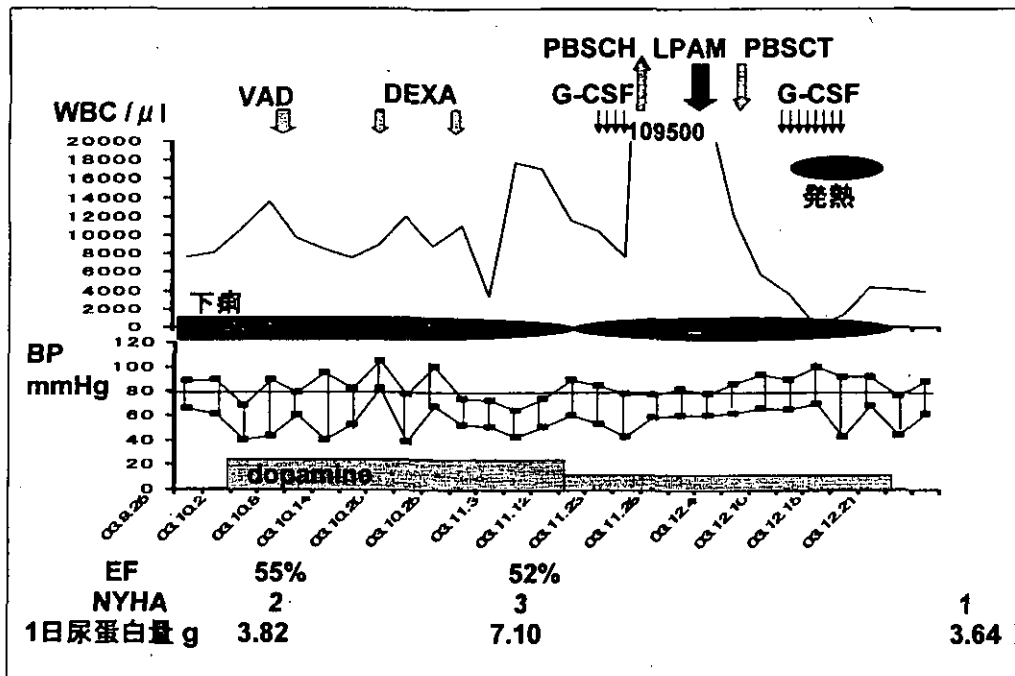


図1. 症例2の経過を示す
56 y F BJP-λ

症例	67才女性	56才女性
前治療	VAD 2コース	VAD 1コース
幹細胞動員方法	VP16+G-CSF	G-CSF
採取幹細胞数	9.07×10^6 /kg	7.11×10^6 /kg
移植前大量化学療法	LPAM $140\text{mg}/\text{m}^2$	LPAM $140\text{mg}/\text{m}^2$
移植幹細胞数	5.7×10^6 /kg	3.6×10^6 /kg
WBC<1000/ μ lの期間	5日	6日
M蛋白に対する効果	消失*	消失*

*免疫電気泳動

表1. 2症例の自家造血幹細胞移植まとめ

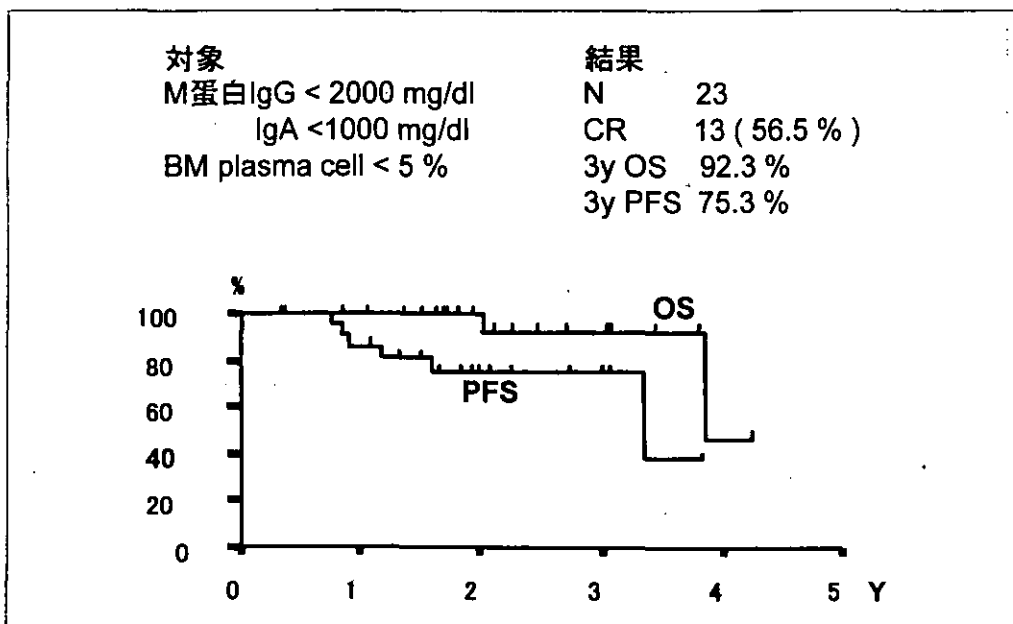


図2. Multiple myeloma good PR例をモデルにした
PBSCT効果予測

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

腎尿路系を侵す稀な免疫細胞性 (AL) アミロイドーシス

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 伏見智久*、矢崎正英*、武井洋一*、徳田隆彦**、星井嘉信***

*信州大学医学部第三内科、**信州大学加齢適応医科学系専攻、

***山口大学医学部構造制御病態学

研究要旨 腎尿路系を侵す稀な免疫細胞性アミロイドーシスの臨床像について検討した。症例 1 は 71 歳女性。69 歳頃より腎機能障害が徐々に進行し腎生検を施行、メサングウム領域にびまん性のアミロイド沈着が認められたが、免疫染色ではアミロイド A、 β 2-MG、TTR、A λ 、A κ のいずれも陰性。再度腎生検を施行し、腎生検組織からアミロイド細線維を分離し、そのアミノ酸配列を分析した。その結果 IgG H 鎖の可変領域成分が検出され AH-アミロイドーシスと診断した。腎アミロイドーシスの原因蛋白の解析に腎生検検体を用いたアミロイド蛋白のアミノ酸配列解析が有用である。症例 2、3 は尿管限局性アミロイドーシスの 73 歳男性と 80 歳女性。両症例とも左尿管狭窄により左水腎症をきたし左腎尿管全摘術を施行された。症例 2 では 7 ヶ月後に対側尿管に再発し腎機能が進行性に低下、右腎瘻を造設され以後腎機能は安定している。症例 3 は 5 ヶ月後に対側尿管に再発、プレドニゾン 30mg/日の内服を開始、漸減して 10mg/日の内服を継続したところ尿管狭窄部に改善がみられた。尿管限局性アミロイドーシスに対し、副腎皮質ステロイド薬の少量持続投与が有効である可能性がある。

A. 研究目的

1. 特異なアミロイド沈着様式を呈し、原因蛋白が不明であった腎アミロイドーシスの 1 例について、アミロイド蛋白を解析した。
2. 尿管限局性アミロイドーシスの 2 例について、対側尿管に再発した際の治療法について検討した。

B. 研究方法

1. 症例 1 は 71 歳女性。IgG λ 型 M 蛋白陽性を指摘されていた。69 歳頃より腎機能障害が徐々に進行したため腎生検を施行、メサングウム領域を中心に diffuse/global なアミロイド沈着が認められたが、基底膜は良く保たれていた。免疫染色ではアミロイド A、 β 2-MG、TTR、A λ 、A κ のいずれも陰性。再度腎生検を施行し、腎生検組織からアミロイド細線維を分離して、そのアミノ酸配列を解析した。
2. 症例 2、3 は尿管限局性アミロイドーシスの 73 歳男性と 80 歳女性。両症例とも左尿管狭窄よ

り左水腎症をきたし尿管癌を疑われ、左腎尿管全摘術を施行された。症例 2 では 7 ヶ月後に対側尿管に再発し腎機能が進行性に低下した。症例 3 は 5 ヶ月後に対側尿管に再発した。

C. 研究結果

1. アミロイド蛋白のアミノ酸配列を解析した結果、IgG H 鎖の可変領域成分が検出され AH アミロイドーシスと診断した。
2. 症例 2 には右腎瘻が造設され、以後腎機能は安定している。症例 3 には尿管狭窄の進行抑制目的にプレドニゾン 30mg/日の内服を開始、漸減して 10mg/日の内服を継続したところ、尿管狭窄部に明らかな改善が認められた。

D. 考察

1. 腎アミロイドーシスの診療にあたっては、アミロイドの原因蛋白を正確に把握することが非常に重要である。アミロイドの原因蛋白は多種多様であるが、ほとんどの症例では病歴、身体所見、

血液検査所見、生検組織アミロイドの免疫染色の結果より比較的容易に判定することができる。しかし、AHアミロイドーシス、近年その存在が注目されている遺伝性腎アミロイドーシスの診断には、アミロイド蛋白のアミノ酸配列の解析が必要であり、アミロイドが特異な沈着パターンを示す場合や、免疫染色で有意な結果が出ない場合には実施を検討する必要がある。今回検討した症例1ではM-蛋白が陽性であったが、通常のAL-アミロイドーシスとは生検腎組織的に異なったアミロイド沈着パターンを示し、1日尿蛋白量は正常範囲内であった。免疫染色でも陽性所見なく、アミロイド蛋白からはIgG H鎖の断片が検出されAH-アミロイドーシスと診断した。AH-アミロイドーシスの既報告例は4例しかなく、うち2例では高度のネフローゼ症候群を呈し、アミロイドは主にメサンギウム領域に沈着していた。アミロイドの原因蛋白は本例と同様にいずれも22kDa以下のheavy chainの断片であった。今後、症例を蓄積してさらなる検討がのぞまれる。

2. 尿管限局性アミロイドーシスは1937年に第1例目が報告され、それ以降多数例の報告がある。最年少は12歳、最高齢は82歳で、発症の平均年齢は55.7歳である。突然の側腹部痛、肉眼的血尿で発症することが多く、尿管はアミロイド沈着により進行性に狭窄して水腎症をきたす。悪性腫瘍との鑑別が困難であることから一般に外科的治療が行われており、内科的治療の報告はほとんどない。本疾患の病態については尿管壁に浸潤している形質細胞により局所で産生されたL鎖がアミロイドの原因蛋白になると考えられている。報告の大部分が一側性であり両側性の報告は少ないが、対側尿管へ再発した場合、既に片腎になっていることが多く、治療方針の決定には注意を要する。これまでの報告では再発時、尿管切除+尿管再建が3例、1例で腎瘻造設、1例で血液透

析がなされた。症例2では腎瘻造設により腎機能は安定し、症例3ではPSLの内服加療により狭窄部に改善がみられた。PSLの少量持続投与が本症に有効である可能性が考えられた。

E. 結論

1. 腎アミロイドーシスの原因蛋白の解析に、腎生検検体を用いたアミロイド蛋白のアミノ酸解析が有用である。
2. 尿管限局性アミロイドーシスに対し、副腎皮質ステロイド薬の少量持続投与が有効である可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 伏見智久、矢崎正英、池田修一：AH-アミロイドーシスの1例。第33回日本腎臓学会東部学術大会、旭川、9月25日、2003年
- 2) 伏見智久、山本寛二、松田正之、橋本隆男、池田修一：両側性尿管限局性アミロイドーシスの2例。第113回日本内科学会信越地方会、新潟、10月11日、2003年

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 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

マウス老化アミロイドーシスの伝播防止処理効果に関する検討

分担研究者 樋口京一 信州大学大学院医学研究科加齢生物学
 共同研究者 張 桓宇、是永龍巳、澤下仁子
 信州大学大学院医学研究科加齢生物学

研究要旨 これまで、老化アミロイドーシス好発系マウスを用いた研究によって原因アミロイド線維の AApoAII が個体間伝播する可能性を示唆してきたが、本研究では、この伝播防止策を構築することを目的とし、タンパクの変性処理法や各種薬剤による AApoAII の変性 / 分解を試み、マウスを用いて伝播防止効果を検討した。その結果、蟻酸や塩酸グアニジン処理が AApoAII の強力な伝播防止効果を有すること、また、テトラサイクリン等一部の抗生物質にもその効果が期待できることが示唆された。

A. 研究目的

我々は、マウス老化アミロイドーシスの研究を通じて、1) マウスに AApoAII を投与するとアミロイドーシスの発症が促進されること¹⁾、2) アミロイドーシスを発症した老齢マウスと未発症幼若マウスを同一ケージ内で飼育すると幼若マウスのアミロイドーシス発症が促進されること²⁾を見いだし、さらに、3) アミロイドーシスが母子間伝播する可能性を示唆してきた³⁾。アミロイド線維の伝播機序を解明することは勿論であるが、また、同時に、伝播防止策を構築することも非常に重要であると考えられたため、本研究では、マウスを用いて AApoAII の個体間伝播防止策を構築することをめざし、病原性プリオンタンパクの不活性化に検討されてきた各種のタンパク変性方法やβアミロイドの線維伸長反応を阻止する可能性が示唆されている抗生物質や抗酸化剤による AApoAII の変性 / 分解を試み、これら処理方法による伝播防止効果の有無を検討した。

B. 研究方法

1. マウス

信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験部門において系統維持されている老化アミロイドーシス好発モデルの R1.P1-*Apoa2*^o コンジェニックマウスを用いた。マウスには通常飼料と UV 滅菌済み水道水を自由摂取させ、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、信州大学医学部の動物実験に関する指針に沿って実験に供した。

2. AApoAII の精製と保存

R1.P1-*Apoa2*^o の肝臓から AApoAII を抽出し⁴⁾、超遠心分離法にて分離精製後、大塚注射用水に均一懸濁 (1mg / mL) して凍結保存した。

3. AApoAII の個体間伝播確認試験

AApoAII 懸濁液を超音波処理後、 10^{10} ~ $100 \mu\text{g}$ をマウス (雌、2ヶ月齢) に尾静脈内、腹腔内あるいは経口投与し、2ヶ月後の各臓器における AApoAII の沈着レベルを Amyloid Index (AI) を用いて評価した。

4. 物理的手法・タンパク変性剤による AApoAII の変性 / 分解

AApoAII 懸濁液をオートクレーブ (AC) (121°C 、1気圧加圧、1~3時間)、脱脂⁵⁾あるいは凍結融解処理 ((-70°C 1時間+室温1時間) × 5回) した。また、塩酸グアニジン (Gdn-HCl) (6M、24時間)、蟻酸 (88%、8時間)、尿素 (6M、72時間) あるいは中性ホルマリン (10%、24時間) を AApoAII 懸濁液と室温にて反応させ、Gdn-HCl およびホルマリン処理試料は超遠心分離後に水洗し、その他の試料は透析法にて残存試薬を除去し、超音波処理後、6. に使用した。

5. 抗生物質・抗酸化剤による AApoAII の変性 / 分解

テトラサイクリン (TC) (AApoAII の 1-8 倍量)、ベンジルペニシリン (ペニシリン G、PCG)、セファレキシム (CEX)、リンコマイシン、リファンピシム (RFP)、ストレプトマイシン (SM)、ノルジヒドログアイアレチン酸 (NDGA)、クエルセチンあるいはレスベラトロール (以上、0-1mM) を AApoAII 懸濁液と 37°C にて 0-8 日間反応させた。薬剤処理後の試料を超音波処理し、一部をチオフラビン T (ThT) (250nM, 50mM グリシン- NaOH バッファ (pH9.0)) と反応させて蛍光量を測定した (Ex450nm, Em482nm)。処理前 (超音波処理済) と比較して蛍光量が最も減少した薬剤濃度・反応時間で処理した AApoAII 溶液を 6. に使用した。

6. AApoAII の伝播防止処理効果の検討

マウス (雌、2 ヶ月齢) に各処理後の 1、10 あるいは 100 μ g 相当分の AApoAII 溶液を尾静脈内投与し、2 ヶ月後の各臓器における AApoAII の沈着レベルを AI にて評価した。

C. 研究結果

1. AApoAII の個体間伝播確認試験

尾静脈内投与では、 10^{-8} μ g 以下の投与量ではアミロイド線維の促進効果が全く認められなかったが、0.1 μ g 以上で投与量に依存してアミロイド線維の沈着レベルが増加した。一方、腹腔内や経口投与では、尾静脈内投与の場合よりも沈着レベルは低いものの、それぞれ 0.01 μ g 以上、1 μ g 以上でアミロイド線維の沈着促進が観察された。

2. AApoAII の伝播防止処理効果の検討

AC 1 時間処理では、投与量が 1 μ g まではアミロイド線維の沈着促進を完全に阻止できたが、10、100 μ g では完全阻止には至らず、約 70% の抑制効果にとどまった。この傾向はさらに長時間の AC 処理でも同様で、AC 2 または 3 時間処理後、10 あるいは 100 μ g 相当の AApoAII 溶液を投与したマウスでは、アミロイド線維の沈着レベルは無処理 AApoAII 投与群よりは有意に低下したものの、完全阻止には至らなかった (70-90% 抑制)。一方、投与量が 1 μ g であっても、尿素処理では完全阻止には至らず、また、ホルマリン処理は有意な抑制効果を持たなかった (それぞれ約 65%、約 17% 抑制)。しかし、Gdn-HCl や蟻酸で処理することにより、AApoAII の投与量が 100 μ g であってもアミロ

イド線維の沈着促進を完全に阻止できることが明らかになった。

次に、各種薬剤を用いて AApoAII の変性 / 分解を試みた結果、TC、PCG、CEX、RFP、SM および NDGA が ThT によるアミロイド線維の蛍光量を時間の経過と共に減少させることが明らかになった。そこで、最も蛍光量の減少効果が高かった薬剤濃度、反応時間で、TC (8 μ g、6 日間)、PCG、RFP (1mM (それぞれ約 74 μ g、150 μ g)、3 日間)、CEX (1mM (約 75 μ g)、2 日間) あるいは NDGA (0.5mM (約 30 μ g) 以上、24 時間) を 1 μ g の AApoAII と反応させ、マウスに尾静脈内投与してアミロイド線維の沈着レベルを比較検討した。その結果、TC の沈着抑制効果が最も高く、無処理 AApoAII 投与群と比較して 85% も沈着レベルを低下させた。また、PCG も TC と同レベルまで沈着レベルを低下させたが (約 88% 抑制)、RFP の沈着抑制効果は弱く、NDGA は有意な抑制効果をもたなかった (それぞれ約 50%、15-30% 抑制)。CEX および SM 処理群に関しては、現在、データ解析中である。

D. 考察

本研究結果により、物理的手法およびタンパク変性剤による AApoAII の伝播防止効果に関してはプリオンタンパクと類似した性質を有し、Gdn-HCl や蟻酸処理後に 100 μ g 相当の AApoAII を投与しても伝播を完全に阻止できること、また、AC や尿素処理も一部有効であることが示唆された。さらに、TC や RFP は β アミロイドの線維構造を破壊してその毒性軽減に寄与する薬剤として有望視されているが⁶⁾、それらの効力に違いはあるものの、AApoAII に対しても有効な薬剤である可能性が示唆された。しかし、一方では、同じく β アミロイド不活性化剤である NDGA⁶⁾ やポリフェノール類⁷⁾ が AApoAII には無効と考えられる結果であったことから、個体間伝播の可能性のあるアミロイドーシスにおいて、その伝播防止策を講じるには、個々の原因アミロイド線維に対する薬剤感受性を詳細に検討することが必要であると共に、アミロイド線維の種類とは無関係に普遍的に伝播防止効果を有する薬剤を探索する必要があると思われる。また、これら薬剤が既に発病してい

る個体に対しても有効であるか、即ち、治療効果についても詳細に検討する必要があると思われる。

E. 結論

アミロイドーシスの伝播の可能性という観点から、動物モデルを用いて伝播防止策を検討した結果、有効と考えられる数種の処理方法が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

[引用文献]

- 1) Higuchi K, Kogishi K, Wang J, Chen X, Chiba T, Matsushita T, Hoshii Y, Kawano H, Ishihara T, Yokota T, Hosokawa M. Fibrilization in mouse senile amyloidosis in fibril conformation dependent. *Lab Invest*, 78, 1535-1542 (1998).
- 2) Xing Y, Nakamura A, Chiba T, Kogishi K, Matsushima T, Li F, Guo Z, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest*, 81, 493-499 (2001).
- 3) 樋口京一、是永龍巳、森政之、松下隆壽、細川昌則。マウス老化アミロイドーシスの母子間伝播の可能性の検討。厚生労働省科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)アミロイドーシスに関する研究 平成 13 年度総括研究報告書、147-150 (2002).
- 4) Pras M, Schubert M, Zucker-Franklin D, Rimon A, Franklin C. The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J Clin Invest*, 47, 924-933 (1968).
- 5) Converse CA and Skinner ER (Eds.). *The Practical Approach Series - Lipoprotein Analysis*-, Oxford University Press (1992) New York.
- 6) Ono K, Hasegawa K, Yoshiike Y, Takashima A, Yamada M, Naiki H. Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. *J Neurochem*, 81, 434-440 (2002).
- 7) Savaskan E, Oliviere G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Muller-Spahn F. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. *Gerontology*, 49, 380-383 (2003).

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Umezawa M, Tatematsu K, Korenaga T, Fu X, Matsushita T, Okuyama H, Hosokawa M, Takeda T, Higuchi K, Hosokawa M, Kametani F, Mori M, Higuchi K. Dietary fat modulation of apoA-II metabolism and prevention of senile amyloidosis in the senescence- accelerated mouse. *J Lipid Res*, 44, 762-769 (2003).
 - 2) Kitagawa K, Wang J, Matsushita T, Kogishi K, Hosokawa M, Fu X, Guo Z, Mori M, Higuchi K. Polymorphisms of mouse apolipoprotein A-II: seven alleles found among 41 inbred strains of mice. *Amyloid*, 10, 207-214 (2003).
 - 3) Guo Z, Mori M, Fu X, Yao J, Xing Y, Korenaga T, Li G, Matsushita T, Hosokawa M, Higuchi K. Amyloidosis modifier genes in less amyloidogenic A / J mouse strain. *Lab Invest*, 83, 1605-1613 (2003).
 - 4) Fu X, Korenaga T, Xing Y, Fu L, Guo Z, Matsushita T, Hosokawa M, Naiki H, Baba S, Kawata Y, Ikeda S, Ishihara T, Mori M, Higuchi K. Induction of AApoAII amyloidosis by various heterogeneous amyloid fibrils. *FEBS Letter*, *in press* (2004).
 - 5) Korenaga T, Fu X, Xing Y, Matsushita T, Kuramoto K, Syumiya S, Hasegawa Z, Naiki H, Ueno M, Ishihara T, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K. Tissue distribution, biochemical properties and transmission of mouse type A AApoAII amyloid fibrils. *Am J Pathol*, *in press* (2004).
 - 6) 樋口京一。アミロイドと老化。日本アフェレシス学会雑誌、23、印刷中(2004)。
 - 7) 樋口京一、森 政之。「アミロイド」その他、『分子生物学・免疫学キーワード辞典(第2版)』医学書院(2003)。
- ### 2. 学会発表
- 1) 是永龍巳、付 笑影、森 政之、松下隆壽、内木宏延、細川昌則、樋口京一。垂直伝播によるマウス老化アミロイドーシス発症促進。第92回日本病理学会総会(2003.4.23 福岡)
 - 2) 樋口京一、森 政之。老化促進モデルマウス(SAM)の開発と老化関連疾患研究への応用。第

- 16 回老年泌尿器学会総会 特別講演 (2003.5.17 松本)
- 3) 樋口京一。アミロイド線維によるアミロイドーシスの伝播機構。大阪大学蛋白質研究所セミナー「タンパク質の構造・機能発現の品質管理 - 凝集と再生-」 (2003.6.5 大阪)。
- 4) Fu X, Korenaga T, Xing Y, Fu L, Guo Z, Matsushita T, Hosokawa M, Naiki H, Mori M, Higuchi K. Induction of AApoAII and AA amyloidosis by the injection of various amyloid fibrils. 2nd International Conference on Senescence: The SAM Model. (2003.7.21 Sapporo)
- 5) Higuchi K. Transmission of AApoAII amyloidosis. シンポジウム「アミロイドーシス研究の新展開」第76回日本生化学会大会 (2003.10.16 横浜)
- 6) 澤下仁子、張 桓宇、是永龍巳、付 笑影、森 政之、樋口京一。アミロイドタンパク質の変性・分解によるマウス AApoAII アミロイドーシスの伝播防止効果。文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究 (A)「タンパクの一生：細胞における成熟、移動、品質管理」平成 15 年度研究班会議 (2004.1.15 大津)
- 7) 樋口京一。短寿命変異マウスからのメッセージ。第8回 Wako つくばフォーラム (2004.1.22 つくば)
- 8) 樋口京一。マウスアミロイドーシス (AApoAII) を用いたアプローチ。シンポジウム「タンパク質のコンフォメーション異常とフォールディング病」日本農芸化学学会 2004 年度大会 (2004.3.31 広島)
- 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

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

抗免疫グロブリン κ 鎖可変領域抗体およびアミロイド特異的抗トランスサイレチン抗体作製の試み

分担研究者 石原得博 山口大学医学部構造制御病態学講座

共同研究者 星井嘉信*、崔丹*、河野裕夫*、木山真紀子*

*山口大学医学部構造制御病態学講座

研究要旨 これまでの研究の一環として免疫グロブリン κ 鎖可変領域に対する抗体および抗 ATTR アミロイド特異的抗体の作製を試み、免疫組織化学的検討を行った。免疫グロブリン κ 鎖 V κ I サブグループ(BAN など)の 37-45 番目に相当する合成ペプチドに対する抗体(抗 BAN37-45)、および Gustavsson らの報告に準じてトランスサイレチンの 115-124 番目に相当する合成ペプチドに対する抗体(抗 TTR115-124)を作製し、これまでに免疫組織化学的にタイプの決定がなされている全身性アミロイドーシス剖検例などのホルマリン固定パラフィン切片を用いて免疫組織化学的検討を行った。抗 BAN37-45 は A κ 型 8 例中 2 例陽性、2 例弱陽性であり、陽性率は 50%であった。1 例尿管上皮が顆粒状に強く陽性となったが、切片中の血清や扁桃組織の形質細胞はほとんど染色されなかった。抗 TTR115-124 は ATTR 型 6 例が全て陽性であり、市販の抗体と比較して抗原賦活処理なしでもアミロイドと反応し、ギ酸処理で染色性がさらに増強し良好に染色された。血清はほとんど染まらなかったが、ラ氏島の内分泌細胞が陽性であり、完全にアミロイド特異的とまではいえなかった。抗 BAN37-45 および抗 TTR115-124 はホルマリン固定パラフィン切片上でアミロイドと良好に反応し、Native な前駆体蛋白との反応性が弱く、アミロイドの免疫組織化学的タイプ決定に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまでアミロイドーシスの免疫組織化学的診断に用いることを主な目的として、免疫グロブリン L 鎖定常領域あるいは λ 鎖可変領域に対するいくつかの抗体を作製し、検討を行ってきた。今年度はこれまでの研究の一環として免疫グロブリン κ 鎖可変領域に対する抗体および抗 ATTR アミロイド特異的抗体の作製を試みた。

これまで A κ 型アミロイドーシスの中では V κ I サブグループの頻度が高い(61.5%あるいは 77%)ことが報告されているので、今回は V κ I に対する抗体を作製することとした。AL アミロイドーシスは L 鎖のサブグループによって沈着しやすい場所が異なることが示唆されており、もし免疫組織化学的に沈着している AL アミロイドの L 鎖サブグループが確認できれば、予後の推定の点からも有用性が高いと考えられる。

また ATTR アミロイドーシスに関してはすでに Gustavsson らによって抗 ATTR アミロイド特異的抗体が報告されており、一方、市販の抗 TTR 抗体は Native な TTR の検出を主な目的としているため血清とよく反応してしまい、アミロイドの検出には蟻酸処理など何らかの賦活処理を必要とする場合が多く、ときにアミロイドの免疫組織化学的タイプ決定が困難なことがある。アミロイドの免疫染色に適した抗体は、理想的にはアミロイド特異的抗体であり、このような抗体は沈着したアミロイドの吸収促進の点で、治療応用への可能性も考えられる。そこで今回 Gustavsson らの報告に基づいて、抗 ATTR アミロイド特異的抗体が作製可能であるか否か検討を行うこととした。

B. 研究方法

1. 抗 BAN37-45

免疫グロブリン κ 鎖 V κ I サブグループとして報告されている配列 BAN、MEV、ROY などの 37-45 番目(フレームワーク 2 領域の一部)に相当するアミノ酸配列の N 末端側にシステインを付加した直鎖ペプチド(CQQKPGKAPK)を合成し、MBS 法により KLH に結合させたものをウサギに免疫し、抗血清を作製、さらにアフィニティー精製を行い、抗 BAN37-45 とした。

材料として、これまでに抗 κ 鎖および λ 鎖定常領域抗血清、抗 AA 抗体、抗トランスサイレチン抗体(DAKO)、抗 β 2 ミクログロブリン抗体(Nordic immunology)、Dr. Glenner より供与された抗 A κ および抗 A λ 抗体を用いた免疫組織化学的検討により、A κ 型と診断された全身性アミロイドーシス剖検例 8 例の腎臓、同様に A λ 型 2 例、AA 型 2 例の腎臓、ATTR 型 2 例の心臓、外科的に切除された慢性扁桃炎症例のホルマリン固定パラフィン切片を用いた。

免疫組織化学的検討は切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼおよび非特異反応のブロッキングを行い、一次抗体として抗 BAN37-45(14.5 μ g/ml)を室温 30 分間反応させ、二次抗体として、DAKO EnVision+ポリマー試薬を室温 30 分間反応させた後 DAB を用いて発色反応を行った。抗原賦活処理として脱パラフィン後水洗中に蟻酸処理 1 分を行った。

2. 抗 TTR115-124

Gustavsson らの報告に準じて、トランスサイレチンの 115-124 番目に相当する直鎖ペプチド SYSTTAVVTN (10mer)を合成し、カルボジイミド法により KLH に結合させたものをウサギに免疫し、抗 TTR115-124 を作製した。

材料としてこれまでの免疫組織化学的検討により ATTR 型と診断された全身性アミロイドーシス剖検例の心臓 6 例(年齢 82~95 歳、老人性全身性アミロイドーシス疑い)、A λ 型 2 例、A κ 型 2 例、AA 型 2 例の腎臓、全身性アミロイドーシスのない剖検例 2 例の膵臓のホルマリン固定パラフィン切片を用いた。

免疫組織化学的検討は抗 BAN37-45 と同様で、一次抗体として抗 TTR115-124(1:800)およびこれまで免疫組織化学的検討に用いてきた市販の抗 TTR 抗体(DAKO、1:300)を室温で 30 分間反応さ

せた。

C. 研究結果

1. 抗 BAN37-45

A κ 型アミロイド例は抗原賦活処理なしでも陽性となる例(8 例中 2 例)があったが、やや染色性が弱く、ギ酸処理により染色性が増強した。ギ酸処理により A κ 型 8 例中 2 例陽性、2 例弱陽性であり、陽性率は 50%であった。1 例尿細管上皮が顆粒状に強く陽性となったが、切片中の血清や扁桃組織の形質細胞はほとんど染色されなかった。A κ 型以外の症例は、A λ 型で 1 例ギ酸処理によりアミロイドが部分的に弱く染色された(抗原賦活処理なしでは陰性)が、他の症例はギ酸処理後も陰性であった。

2. 抗 TTR115-124

ATTR 型アミロイド例は 6 例全例陽性であった。抗原賦活処理なしでもアミロイドと反応し、ギ酸処理で染色性がさらに増強した。血清はほとんど染まらなかったが、ラ氏島の内分泌細胞が陽性であった。市販の抗体ではギ酸処理を行わないとアミロイドはほとんど染色されず、ギ酸処理でアミロイド辺縁が濃く染色される傾向が見られたが、抗 TTR115-124 では、アミロイドの中心部まで比較的均一に良好に染色された。ATTR 型以外のアミロイドはすべて陰性であった。

D. 考察

今年度作製した抗 BAN37-45 および抗 TTR115-124 はホルマリン固定パラフィン切片上で、アミロイドと良好に反応した。

抗 BAN37-45 は、これまでに作製した抗 κ 鎖定常領域抗血清では検出できない可変領域主体の AL アミロイドーシス例も検出できる可能性がある。また今回の検討で Native な免疫グロブリンとはほとんど反応しない可能性が示唆された。しかしながらこれまでに報告されている A κ アミロイドーシス中の V κ I の頻度と比較すると陽性率がやや低かった。同じ V κ I サブグループでも多少アミノ酸配列が異なっている症例を検出できなかった可能性がある。また A λ 型 1 例がギ酸処理後弱陽性となったが、これは minor component として κ 鎖 V 領域が沈着している可

能性や、抗 BAN37-45 が一部のλ鎖 V 領域と交叉反応する可能性が考えられる。今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。

抗 TTR115-124 も、Native な TTR よりもアミロイド線維となった TTR と反応しやすい抗体であることが示唆された。しかしながらラ氏島の内分泌細胞とは反応し、今回の検討では完全にアミロイド特異的であるとまではいえなかった。

E. 結論

今年度作製した抗 BAN37-45 および抗 TTR115-124 はホルマリン固定パラフィン切片上でアミロイドと良好に反応し、Native な前駆体蛋白との反応性が弱く、アミロイドの免疫組織化学的タイプ決定に有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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

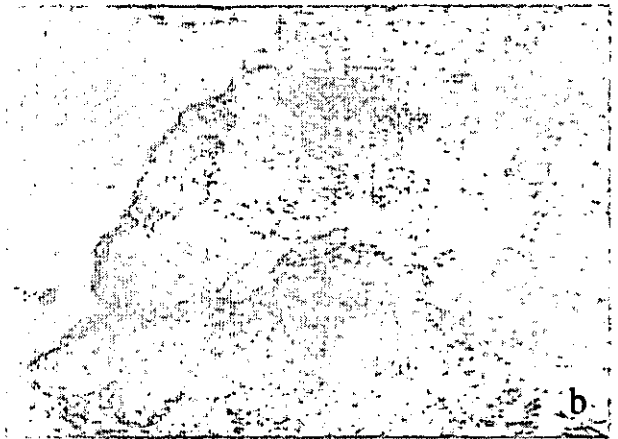


図1. A κ アミロイドーシス例の腎臓。(a)コンゴレッド染色。(b) κ 鎖定常領域抗体。(c)抗BAN37-45蟻酸処理。

アミロイドは主として血管壁に沈着している。抗BAN37-45はやや染色性が不均一であるが、アミロイドと良好に反応している。

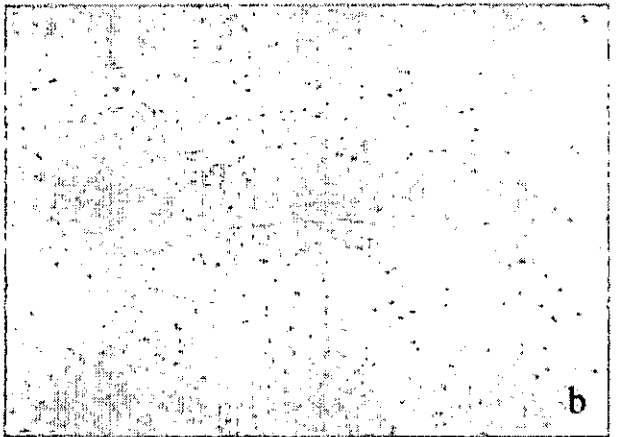
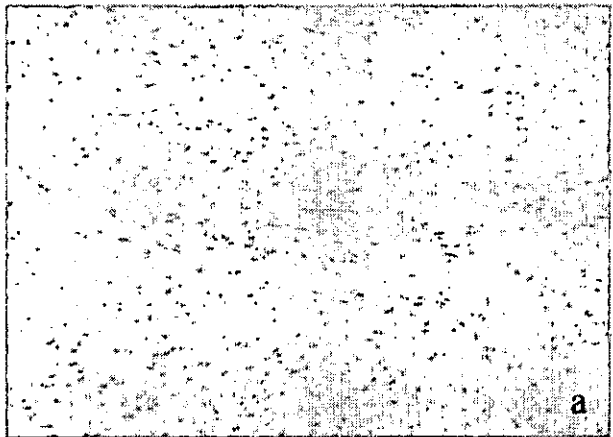
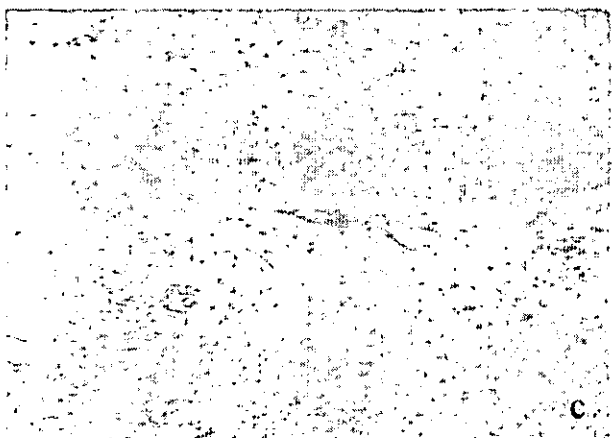


図2. ATTRアミロイドーシス例の心臓。(a)コンゴレッド染色。(b)抗TTR115-124未処理。(c)抗TTR115-124蟻酸処理。

アミロイドは血管壁や心筋線維周囲に沈着している。抗TTR115-124は未処理でもアミロイドと良好に反応し、蟻酸処理により染色性がさらに増強した。



厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

**γセクレターゼによるアミロイド前駆体タンパクの
 プロセシング部位の検討**

協力研究者 亀谷富由樹 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究部門
 分担研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科

研究要旨 γセクレターゼによる APP の切断部位にはγ切断部位およびε切断部位があることが知られている。本研究では培養細胞に APP およびその断片等を発現させ、γおよびε切断がどのように制御されているのか解析した。その結果、γ切断はAβ産生とε切断はAICD産生と密接に関連し、それぞれの切断は別々に制御されていることが明らかとなった。

A. 研究目的

βアミロイド前駆体タンパク質 (APP) は、αセクレターゼまたはβセクレターゼ切断部位において切断され、C 端側断片 (CTFαまたは、CTFβ) を産生する。この C 端側断片からは、さらにγセクレターゼによる切断によって、アミロイドβタンパク質 (Aβ) または p3 と細胞内断 (AICD) が産生される。最近、γセクレターゼによって生じた AICD の N 末端のアミノ酸配列が解析され、本来考えられていた切断分位より7から9残基C末側で切断されていることが明らかにされた(ε切断部位)。これまでのところ、γおよびε切断部位の関係については不明である。そこで培養細胞を用いて、γおよびε切断部位がどのような関係にあるのか解析した。

B. 研究方法

APP およびその C 端側断片、CTFα (C83) およびCTFβ (C99) を発現させた培養細胞の膜面分を調製し、in vitro での AICD の産生を APPC 末抗体 R37 を用いて分析した。また、BACE1 を共発現させた細胞およびPMA 処理した細胞における AICD についても分析した。

本研究は、培養細胞中でのタンパク質代謝を研究対象にしているため、倫理面への配慮等の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

AICDはAPPおよびそのC端断片を発現した細胞において産生された。反応開始時点でのCTFαの量に応じて、AICDが産生され、AICDの産生増加に伴って、CTFαが減少している傾向がみられた。一方、βセクレターゼであるBACE1との共発現をおこなった細胞では、CTFβは増加し、Aβも増加したが、CTFαは減少し、AICDの産生も減少した。また、PMA処理によってαセクレターゼを活性を増加させ多細胞では、CTFαが増加し、AICDも増加した (図1)。さらに、C83およびC99を発現した細胞において、AICD産生の割合を比べると、C99発現細胞においてAICD産生が低下していた (図2)。

D. 考察

これらの結果から、AICD 産生はCTFαに依存し、BACE1 等によるCTFβの増加はAICDの減少を引き起こした。γセクレターゼによるγ切断部位とε切断部位は別々に制御されていることが示唆され、特に、ε切断は主としてCTFαに起こると推定された。

最近、AD においてBACE1 あるいはその活性が増加しているという報告がある。本研究の結果から、BACE1 の増加はAβの増加だけでなく、CTFαの減少、さらにはAICDの減少を引き起こすことが推定される。したがって、AD において、Aβの増加とともに、AICDの減少が生じていることが示唆され、AICD が関わる情報伝達系において障害が起きている可能性がある。

E. 結論

γ 切断による A β 産生と ϵ 切断による AICD 産生は別々に制御されている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kume H, Sekijima Y, Maruyama K, Kametani F: gamma-Secretase can cleave amyloid precursor protein fragments independent of alpha- and beta-secretase pre-cutting. *Int J Mol Med* 12: 57-60, 2003.
- 2) Kametani F, Usami M, Tanaka K, Kume H, Mori H: Mutant presenilin (A260V) affects Rab8 in PC12D cell. *Neurochem Int* 44: 313-320, 2004.
- 3) Kume H, Maruyama K, Kametani F (2003) Intracellular domain generation of amyloid precursor protein by epsilon-cleavage depends on C-terminal fragment by alpha-secretase cleavage.

Int J Mol Med 13: 121-125, 2004.

2. 学会発表

- 1) Kametani F, Kume H, Maruyama K: Elevated BACE1 levels affected the generation of APP intracellular domain. 第 46 回日本神経化学会大会、新潟、9 月 24-26 日、2004.
- 2) 亀谷富由樹, 久米秀明, 丸山敬: アルツハイマーアミロイド前駆体タンパク細胞内ドメインの産生は α セクレターゼ切断による C 末断片に依存. 第 22 回日本痴呆学会、東京、10 月 3-4 日、2003.

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

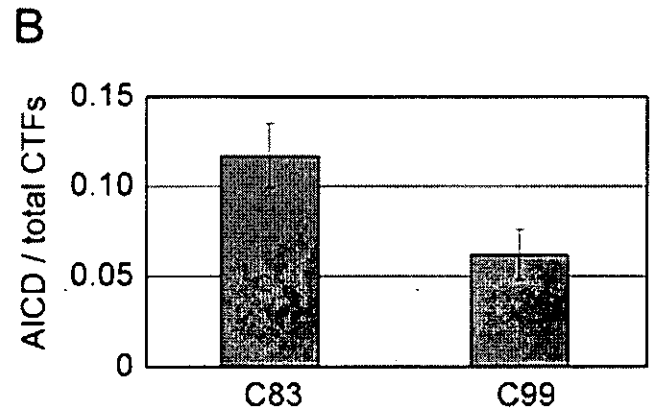
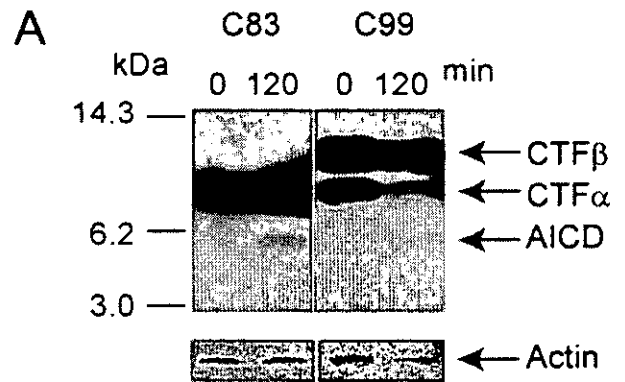
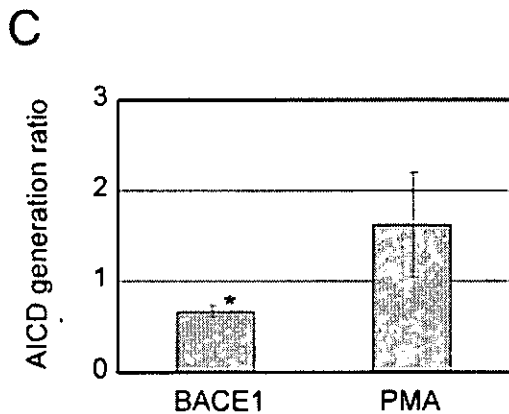
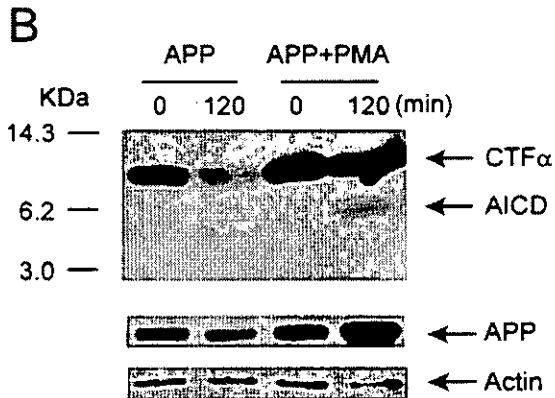
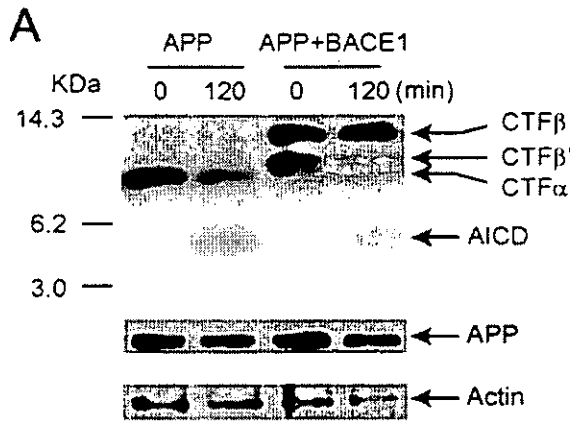


図 2. (A) C83およびC99を発現させたCOS-1細胞での In vitro AICD産生。CTF α , CTF β およびAICDは抗APP(末抗体R37)で検出した。(B) CTFs総量(CTF α + CTF β + AICD)に対するAICDの割合。平均値と標準誤差を示した。C99におけるAICD産生の割合は低下していた。

図 1. (A) APPのみを発現およびAPPとBACE1共発現したCOS-1細胞でのIn vitro AICD産生。AICDは抗APP(末抗体R37)で検出。これらの細胞でのAPPおよびActinの発現量には変化が見られなかった。(B)APPのみを発現およびPMA処理したAPP発現COS-1細胞でのIn vitro AICD産生。AICDは抗APP(末抗体R37)で検出。(C) AICD産生量の比較。抗APP(末抗体 R37)の反応性を計算し比較した。APPのみを発現したCOS-1細胞におけるAICD産生を1.0として、APPとBACE1共発現したCOS-1細胞およびPMA処理したCOS-1細胞でのAICD産生の割合を示した。独立した3回の実験を行い、平均値と標準誤差を示した。APPのみを発現およびAPPとBACE1共発現したCOS-1細胞では有意な差 ($p < 0.05$, t-test) が見られた。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

赤ワイン関連ポリフェノールのアルツハイマー病βアミロイド線維分解作用

分担研究者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)
 共同研究者 小野賢二郎*、吉池裕二**、高島明彦**、長谷川一浩***、内木宏延***
 *金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)、
 **理化学研究所脳科学総合研究センター、
 ***福井大学医学部第2病理学

研究要旨 赤ワインに含まれるポリフェノール類のβアミロイド線維 (fAβ) 形成及び線維伸長の抑制作用、既存の fAβ に対する分解作用を、蛍光色素チオフラビン T (ThT) 法および電顕を用いて調べた。また、ポリフェノールによって分解された fAβ の細胞毒性についても検討した。今回調べたポリフェノール類は全て fAβ の形成・伸長を抑制するばかりでなく、既存の fAβ に対する分解作用も認めた。また、ポリフェノールによって分解されることにより fAβ の細胞毒性も軽減した。赤ワイン関連ポリフェノール類は、アルツハイマー病における Aβ 蓄積の防御に向け、有力な基本分子となる可能性がある。

A. 研究目的

近年、デンマークをはじめとするヨーロッパの疫学的研究は、適度の赤ワイン飲用者にはアルツハイマー病 (AD) の発病抑制効果が見られることを示唆しているが、その機序は不明である。我々は赤ワインに含まれるポリフェノール類に注目し、それらがβアミロイド蛋白 (Aβ) の線維形成や伸長を抑制し、既存の Aβ 線維 (fAβ) を分解する作用があるかどうかを検討した。

B. 研究方法

pH 7.5、37°Cにおいて、赤ワイン関連ポリフェノール類が示す fAβ (1-40) および fAβ (1-42) の形成・伸長抑制作用、並びに分解作用を、チオフラビン T (ThT) を用いた分光蛍光定量法、及びネガティブ染色後の電顕観察を用いて経時的に観測した。また、ポリフェノールによって分解された fAβ の細胞毒性についても検討した。

C. 研究結果

赤ワイン関連ポリフェノール類は、濃度依存性に Aβ からの fAβ 形成、伸長を抑制し、さらに既存の fAβ に対しても分解作用を認めた。電顕観察

においても、反応時間に依存した fAβ の線維形成・伸長抑制や線維分解を確認した。また、ポリフェノールによって分解されることにより fAβ の細胞毒性が軽減することも確認した。

D. 考察

多くの天然産ポリフェノール類が *in vivo* あるいは *in vitro* で神経保護作用を示し、その作用が主に抗酸化作用に由来するものであること、緑茶ポリフェノールであるエピガロカテキン・ガレートが Aβ の神経毒性を軽減することが最近報告されている。

今回の実験で、我々は赤ワイン関連ポリフェノールの fAβ の線維形成・伸長抑制作用、及び分解作用を見だし、さらにポリフェノールによって分解された fAβ の細胞毒性が軽減することも確認した。

正確な機序は不明であるが、ポリフェノールは Aβ あるいは fAβ と特異的に結合し線維形成の阻害作用、あるいは線維分解作用を発揮しているものと推定される。

E. 結論