

厚生労働科学研究研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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 15 年度総括・分担研究報告書

平成16(2004)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
難治性疾患克服研究事業

アミロイド沈着による
病的要素の検索に関する研究

2003 年度研究報告書

ANNUAL REPORT OF THE RESEARCH ON THE
PATHOLOGICAL FACTOR OF THE AMYLOID DEPOSITION,
RESEARCH ON MEASURES FOR INTRACTABLE DISEASE,
THE MINISTRY OF HEALTH LABOUR AND WELFARE OF JAPAN

2004年3月

March 2004

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: Tokuhiro ISHIHARA

Radiopathological and Science, Yamaguchi University School of Medicine

目 次

平成 15 年度総括研究報告	5
平成 15 年度分担研究報告	13
平成 15 年度事業報告	89
平成 15 年度研究班班員名簿	93
研究成果の刊行に関する一覧表	97

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15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

厚生労働省難治性疾患克服研究事業
アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究 総括研究報告書

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 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	山梨大学医学部第一生化学教授
	樋口 京一	信州大学大学院医学研究科加齢適応医科学系 加齢生物学分野教授
	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
	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
	山田 学	つくば動物衛生研究所生産病研究部病態病理研究室 研究員
	田平 武	国立療養所中部病院長寿医療研究センター所長
	宇根 由美	麻布大学獣医学部病理学研究室助教授

研究要旨

本研究班では、ヒトからヒト、動物からヒトへのアミロイド線維の移入による発症促進の可能性の検討を中心に、さらに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、 $A\beta$ による免疫療法等の治療法を検討する。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。関連する病態として、チーターやウシのアミロイドについても検討を行う。

A. 研究目標

アミロイドーシスは、種々の異なる前駆蛋白がアミロイド線維となって沈着する疾患で、現在までに明らかなもので21種類のアミロイドーシス病型からなる疾患群である。いずれのアミロイドも生化学的には

β 構造に富んだ線維状蛋白からなり、その発症機構については、いくつかの共通因子があることなどが知られているが、その疾患の希少性とまた研究のための動物モデルの不十分さの為に、まだその病態の詳細は不明であり、治療法も確立されていない状

態である。脳アミロイドーシスはアルツハイマー病や脳血管アミロイドアンギオパチーの原因であり、本来生理的に存在するβ蛋白(Aβ)がアミロイドを形成して沈着し、高齢化社会での大きな問題となっている。アミロイドにはプリオンと共通に生理的な蛋白が特殊な構造変化を来して凝集・成長する性質があり、脳アミロイドでも同様な機序が想定される。全身性アミロイドーシスには、骨髄腫や慢性関節リウマチなどの疾患や長期透析に続発して起こるものも多く、原疾患以上に患者の予後を左右する場合が多い。これら多彩なアミロイドーシスの発症機構の解明、そして治療法の開発は極めて重要な課題である。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伝播の可能性を示し、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による発症促進の可能性を示した。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、ヒトからヒト、動物からヒトへのアミロイド線維の移入による発症促進の可能性の検討を中心に、さらに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、Aβ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。

B~D. 研究方法、成果、考察および結論

1. アミロイドーシスの伝播

石原らはヒトまたはマウスのアミロイドが沈着した臓器をホモジネートし、腹腔内または経口投与後に炎症刺激を加えれば、実験的アミロイドーシスの発症を促進するという“transfer amyloid”仮説を裏付けた。ウシアミロイド線維投与量とアミロイドーシス発症程度の相関、アミロイドが沈着したウシ肝臓のホモジナイズ液量とアミロイドーシス発症程度の相関および市販の食用ウシ、老齡鶏肝臓、フォアグラの安全性について検討した。さらに、アミロイド沈着臓器を移入したマウスに炎症刺激を加えることによりAAアミロイドーシス発症促進効果を示したが、今回さらにマウスのAAアミロイドが沈着した肝組織片、AApoA II沈着腎組織片を用い、健常マウスの肝臓または皮下にアミロイド組織片を埋め込む移入実験を行った。アミロイド組織片を局所生体内に移入することにより、レシピエントにおいてアミロイドーシスの発症・促進効果があることを示した。さらに移入により発症したアミロイドが短時間内に重篤な程度まで進行することを示唆した。

松井らはウシの臓器より精製抽出したアミロイドを約100羽の兎に接種し6羽にアミロイドーシスの発生を確認したので、さらに追加実験を行った。4頭のアミロイドーシスを合併した牛の腎臓よりアミロイドを抽出し、沈着量を比較するとともに3群92羽のウサギ等を用い伝達実験を行ったアミロイドの伝達性は、抽出アミロイドの凍結保存により低下することが示唆された。抽出アミロイドの保存方法を改善し、再度伝達実験を行うことが必要である。

樋口らは、マウスのAapoA IIやAAアミロイドーシスにおいて、アミロイド線維によるプリオン様の伝播が起ることを明らかにし、外部からのアミロイド線維の侵襲がアミロイドーシスの発症に重要な役割を果たす可能性を提起した。この可能性を検討し、さらにアミロイドーシスの予防や治療方法

を開発するために、FAP のモデルマウスを用いてアミロイド線維投与による発症促進について検討した。前田らが作製した FAP のモデルマウス (Met30 TTR トランスジェニックマウス) に FAP 患者の心臓より抽出したアミロイド線維を経口投与してアミロイド沈着の促進を検討した。投与後 12 ヶ月を経過した時点でアミロイド沈着は観察されなかった。また、アミロイド沈着に先行するとされている非線維状の TTR 蛋白の沈着も観察されていない。今後飼育を継続し、さらに高齢でのアミロイド線維沈着が観察されるか検討する。

樋口らは、外部より侵襲したアミロイド線維が透析アミロイドーシスの発症を促進するかを明らかにする目的で、ヒト $\beta 2M$ を全身に高発現するトランスジェニックマウス (Tg) を作製した。長期の人工透析患者では、血中マイクログロブリン ($\beta 2M$) 濃度の持続的上昇のため、靭帯や関節滑膜などへアミロイド線維が沈着する。しかしながら血中の可溶性 $\beta 2M$ から、アミロイド線維が生成する機構や、アミロイド線維沈着が炎症を引き起す過程、さらにその予防・治療法は不明であり、この Tg マウスの作製は非常に有意義である。

2. 自然発生動物アミロイドーシス

1) ウシアミロイドーシス

動物からの伝播の可能性を検討する為に、まず、食用としてヒトの体内に入る可能性のあるウシアミロイドーシスの発症頻度を検索した。松井や山田らの平成 14 年 9 月から平成 15 年 8 月までの 1 年間に病性鑑定を実施した牛 3324 頭のアミロイドーシスの発症頻度を検討した。アミロイドーシスは 13 頭にみられ、その発生率は 0.39% だった。10 症例における組織学的、免疫組織化学的な検索ではアミロイド沈着は肝臓、脾臓、腎臓、消化管、内分泌器官、生殖器、乳腺、骨格筋にみられた。池田らは食用として解体された一見正常に見えるウシの腎臓におけるアミロイドーシスの発症頻度を検討し

た。検討した 113 例では、1 例 (9 歳雌、ホルスタイン種) で病理学的にアミロイド沈着を認め、その発症頻度は 0.88% であった。ウシのアミロイドーシスに関する過去の報告では、1990 年に藤永が高齢ウシを対象とした検討を行い、その頻度を 0.8% と報告しているが、今回の検討でも 1% 前後の食用牛にアミロイドーシスが発症しているものと推測された。今後対象数を増やした検討、発症を規定する因子の解明および食用牛のアミロイドーシスに対する医学的な対応の指針を確立することが必要と考えられた。

宇根らはウシの弁膜に沈着するアミロイドを病理学的に検索し、64 頭中 4 頭 (6.3%) に認めた。4 頭全てがホルスタイン種の高齢廃用牛 (平均年齢 72.8 ヶ月) で、3 頭に炎症性病変がみられた。アミロイドは房室弁、特に僧帽弁に沈着し、半月弁には認められなかった。

2) チーターアミロイドーシス

宇根らはチーターの重要な死因であるアミロイド症の発生メカニズムを解明するために、チーターにおけるアミロイドの沈着率、由来 (国内繁殖あるいは輸入)、飼育施設および飼育面積と死亡時平均年齢 (以下平均年齢) との関連を解析した。その結果、死亡チーター 64 頭中 55 頭、85.9% にアミロイドの沈着がみられた。繁殖個体より輸入個体の平均年齢が高く、また施設によって平均年齢に大差があり、多頭飼育をしている施設で、特に繁殖個体で平均年齢が優位に低かった。なお、飼育施設の構造、面積と平均年齢の長短とは関連がなかった。

3) アミロイドーシスにおける共存蛋白関連

前田らは TTR 欠損 APP^{sw} と対照ヘテロ接合体 APP^{sw} を用いた解析により、TTR が脳内 A β アミロイドの沈着を促進することを示唆する結果を得た。今後、より多数のマウスについて追試した。一方、SAP が、脳内 A β アミロイド沈着にどう関与す

るかは、今後、より多くの 9~12 ヶ月齢のマウスを用いて解析する必要がある。

加藤らは酵母でアミロイド型シスタチンを発現分泌させ、アミロイド形成の機構ならびにその抑制に関する研究を行った。アミロイド型シスタチン変異体 (I66Q) を酵母 *Pichia pastoris* で発現分泌させると培養中に凝集型シスタチンが増加し、培地に低濃度のアルギニンの存在下では凝集が抑制された。酵母をモデル生物としてアミロイドーシスの形成機構を解明することができることを示した。また、分子シャペロンである PDI ホモログ (Eps1) を欠損した酵母で野生型シスタチンを分泌させると分泌量が著しく増加し、オリゴメリックな凝集体を形成することが示された。この結果は分子シャペロンの機能低下がアミロイドーシスを引き起こす要因の一つであることを暗示している。

4) A β アミロイドーシス

内木らは脳内においてアルツハイマー病 β アミロイド線維 (fA β) 形成・沈着・伝播を引き起こす複雑な分子間相互作用を解明するため、表面プラズモン共鳴法測定装置 (ピアコア) を用いて網羅的解析を試みた。A β 蛋白および fA β をセンサーに固定し、各種生体成分を添加して親和性を解析した。その結果、fA β 及び A β 蛋白に対する各種生体分子 (血漿蛋白質、細胞外基質成分等) の親和性は広い範囲に分布した。さらに、既に求めたアミロイド線維形成の反応パラメータを組み合わせたうえで数値シミュレーションを行い、各成分の効果を比較解析する手法を開発した。本方法により、A β 蛋白質動態と fA β 形成に重要な影響を及ぼす生体成分を特定し、それらの反応機構を解析できると考える。また、本解析法を各種アミロイド線維に応用し、沈着・伝播に係わる生体成分を同定することも可能と考えられる。NDGA、ポリフェノール等の抗酸化剤が β アミロイド線維形成を阻害するのみならず、既に存在する線維を分解すること

を明らかにした。

東海林らはアルツハイマー病に関連して APP 等の複数の価値あるトランスジェニックマウスを作製している。A β の病原性を検討するために、血液中からマウス脳内、特に経静脈的に老人斑への移行を検証した。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随伴ウイルスベクターを作製した。アルツハイマー病の動物モデルである APP-Tg マウスにウイルス粒子を 1 回のみ経口投与した。12~13 ヶ月齢の APP-Tg マウス脳組織を免疫染色で詳細に検索した結果、治療したマウス脳において明らかにアミロイド沈着・老人斑形成がコントロールに比べ減少していた。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、最も炎症が起こりやすいと考えられる脳および腎臓を含め、諸臓器に T 細胞の浸潤や炎症所見は認められなかった。この方法ではアジュバントを必要としないため強い免疫反応を起こさず、髄膜脳炎などの副作用も軽減できると考えられる。

5) ALアミロイドーシス

河野らは 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、アミロイドーシス発症を試み、長期経過観察したが、アミロイド沈着はみられなかった。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。

E. 結語

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伝播の可能性を示し、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による発症促進の可能性を示した。高齢牛の自然発生アミロイドーシスの頻度は 0.39～0.88%であった。飼育下チータのアミロイドーシスの発症頻度は 64 頭中 55 頭 (85.9%) で、死因として最も重要である。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た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

別掲

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

アルツハイマー病の治療のための組換えアデノ随伴ウイルスベクター

出願番号 2003-169714、平成 15 年 6

月 13 日出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成15年度分担研究報告

目 次

FAP モデル動物を用いたアミロイド線維による経口伝播の可能性の検討	17
信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野	樋口京一, 付 笑影, 是永龍巳
	澤下仁子, 森 政之
信州大学医学部第三内科	徳田隆彦
山梨大学大学院医学工学総合研究部	伊藤禎洋, 前田秀一郎
ウシアミロイド線維によるマウス AA アミロイドーシス促進効果に関する検討	22
山口大学医学部構造制御病態学構造	石原得博, 崔 丹, 河野裕夫
	星井嘉信, 小野咲弥子
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可能性について	26
- 移入部位別検討、アミロイド沈着進行状態の検討を加えて -	
山口大学医学部構造制御病態学講座	石原得博, 小野咲弥子, 崔 丹
	星井嘉信, 河野裕夫
牛アミロイドの抽出とその伝達実験	30
帯広畜産大学畜産学部獣医学科	松井高峯, 古林与志安
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	31
(独) 動物衛生研究所生産病研究部病態病理研究室	山田 学, 中村菊保
帯広畜産大学畜産学部獣医学科	古林与志安, 松井高峯
高齢ウシの腎臓におけるアミロイド沈着の組織学的検討	33
信州大学医学部第三内科	池田修一, 東城加奈, 松田正之
信州大学大学院加齢適応医科学系専攻	徳田隆彦
牛の弁膜アミロイド症の病理学的検索	41
麻布大学獣医学部病理学研究室	宇根有美, 田中美穂
神奈川県食肉衛生検査所	大平正剛
チーターのアミロイド症の疫学的検討	45
麻布大学獣医学部病理学研究室	宇根有美
群馬サファリパーク	川上茂久
アドベンチャーワールド	伊藤 修

透析アミロイドーシスモデルとしてのヒト β 2マイクログロブリントランスジェニックマウス作製の試み	…	49
信州大学大学院医学研究科加齢生物	樋口京一, 山田 雪, 付 笑影	
	森 政之, 郭 占軍	
信州大学ヒト環境科学研究支援センター	神吉昭子, 田川陽一, CREST	
	郭 占軍	
腸管細胞に発現させたA β 蛋白のAPPトランスジェニックマウス脳組織に及ぼす影響	……………	56
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	
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)の関与に関する研究	……………	59
山梨大学大学院医学工学総合研究部・生化1	前田秀一郎, 河西あゆみ, 大森弘子	
山梨大学・総合分析実験センター	伊藤禎洋	
前橋日赤病院・神経内科	針谷康夫	
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, 瓦林 毅	
脳アミロイドによるtauの沈着促進機構の解析 Double Transgenic mouseによる検討	……………	63
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科	東海林幹夫, 瓦林 毅, 松原悦朗	
	阿部康二	
A β ペプチドの病原性検討と病原性A β オリゴマー除去療法開発	……………	68
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	
各種生体分子のアルツハイマー病 β アミロイド線維およびA β 蛋白に対する親和性の定量的解析	…	73
—伝播機構解析の為の基礎的検討—		
福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域	内木宏延, 長谷川一浩	
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	……………	78
—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—		
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	
	小幡雅則	
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	……………	83
—分子シャペロン欠損酵母でのアミロイド型タンパク質の分泌—		
山口大学農学部生物機能科学科	加藤昭夫, 阿座上弘行	

FAP モデル動物を用いたアミロイド線維による経口伝播の可能性の検討

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分野
共同研究者 付笑影*, 是永龍巳*, 徳田隆彦**, 澤下仁子*, 森政之*
伊藤禎洋***, 前田秀一郎***
*信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野,
**信州大学医学部第3内科,
***山梨大学大学院医学工学総合研究部

研究要旨 我々はこれまでマウス AApoAll や AA 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（アミロイドーシスの伝播）。このようなアミロイド線維による発症促進が家族性アミロイドポリニューロパチ(FAP)でも起こりうるのかを明らかにすることは FAP の発症機序を解明し、予防、治療法を開発するために重要である。前田らが作成した FAP のモデルマウス(Met30 TTR トランスジェニックマウス)に FAP 患者の心臓より抽出したアミロイド線維を経口投与してアミロイド沈着の促進を検討した。投与後 12 ヶ月を経過した時点でアミロイド沈着は観察されなかった。また、アミロイド沈着に先行するとされている非線維状の TTR 蛋白の沈着も観察されていない。今後飼育を継続し、さらに高齢でのアミロイド線維沈着が観察されるか検討する。

分担研究者：

樋口京一・信州大学大学院医学研究科・
加齢生物学分野・教授

A. 研究目的

樋口らはマウス AApoAll アミロイドーシスでアミロイド線維によるアミロイドーシス発症促進（伝播）を明らかにした¹⁾。また石原²⁾や Westermarck³⁾はマウス AA アミロイドーシスでも AA アミロイド線維によるアミロイド沈着促進を報告した。これらの報告よりアミロイド線維核によるアミロイドーシスの発症促進がどのアミロイドーシスで成立するかを解明することが重

要であると考えられる。

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)では、トランスサイレチン(TTR)の1アミノ酸が置換した異型 TTR がアミロイド線維を形成して組織に沈着する。しかし TTR 遺伝子の同一変異 (Met30) が主要な発症原因であっても、発症年齢には、ポルトガル人と日本人の多くは 30~40 歳代、スウェーデン人は平均 56 歳と地域による差が認められている。また、同一家系内でも、個人によって発症年齢に 20~30 年にわたる違いがある例がしばしば見出されている。さらに、スウェーデンの FAP 家系の人々がアメリカ合衆国に移住して、数世代を経ると早く発症する傾向が認められている。さらに FAP 患者の家系では、同

一家系内で世代が進むほどその発症年齢が若年化するという表現促進現象 (anticipation) が認められることが知られており、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と報告されている。これらのことから FAP の発症には、主因となる TTR 遺伝子変異のほかに、環境因子や他の蛋白質が関与することが予想されている。

アミロイド線維による伝播が、FAP でも病的要因となるのかを明らかにすることは、FAP の発症機構や予防法を解明するために重要である。我々は前田らが作成した TTRMet30 点変異をもつトランスジェニックマウスモデル⁴⁾を用いて、ATTR アミロイド線維がアミロイド沈着に及ぼす効果を検討した。

B. 研究方法

1) FAP モデルマウス：前田らが作成したヒト型 FAP モデルマウスを用いた⁴⁾。6.0 kb 上流領域を含んだ Val30Met human TTR 遺伝子 (Met30TTR) のトランスジェニックマウス (6.0-hMet30 Tg) を Ttr 遺伝子ノックアウトマウス (Ttr^{-/-}) と交配して 3 種の 6.0-hMet30 Tg (Ttr^{-/-}, Ttr^{+/-} and Ttr^{+/+}) を作成し、対照としての C57BL/6 マウスとともに、信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験施設の SPF 環境で飼育した。

2) ATTR アミロイド線維の投与：Met30 ATTR アミロイド線維は FAP type I 患者の心臓より、Ala38 ATTR アミロイド線維も FAP type I 患者の心臓より Pras らの方法で抽出した。2 カ月齢のマウス (Ttr^{-/-}, Ttr^{+/-} and Ttr^{+/+}) に 20 μ g の Met30 ATTR と Ala38 ATTR をソニケーション後に胃ゾンデで 2 週間毎日投与した (全 6 群)。対照群には DW を投与した。投与開始後、マウスを 3, 6, 9, 12 ヶ月で屠殺し、全身の臓器を採取しアミロイドの沈着を検討した。

3) アミロイド沈着の検出：各臓器のアミロイド沈着はコンゴ赤染色後の緑色偏光で確認した。各臓器切片を human TTR 特異的抗体とマウス apoA-II 抗体で染色した。同様の抗体を用いて血清中の濃度を Western Blot 法で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いた研究である。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た。実験計画書を信州大学医学部動物実験委員会に提出し、その承認の下に、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

現在では Met30 ATTR を投与したマウス (3 群)、Ala38 ATTR を投与したマウス (3 群) とともに、投与後 12 ヶ月に到達した。これまでの検索では血清中には前田らの報告とほぼ同等のヒト TTR の発現が確認されているが、どの群でもアミロイドの沈着は観察されていない (表 1)。また FAP の各種モデルマウスで報告されているようなアミロイド線維沈着に先立つ Congo red で染色されない非線維性 TTR 蛋白質の沈着もまだ観察されていない。現在のところ、血清中 TTR や apoA-II 濃度にも明確な加齢に伴う変化は観察されていない。

D. 考察

マウス AApoAII や AA アミロイドーシスで示された線維核によるアミロイドーシスの発症促進がどのアミロイドーシスで成立するかを解明することはアミロイドーシスの発症機序を解明するために重要である。特に患者数が多く、肝臓移植以外に有効な治療法が存在しない FAP では、いくつかの事実が、発症を修飾する要因として「外部からの既存のアミロ

イド線維の侵襲」が何らかの役割を果たす可能性を示唆している。したがってモデル動物を使った解析が必須であると思われる。現在のところ経口投与したATTR アミロイド線維が TTR のアミロイド線維への変換と沈着を促進した事実は確認できなかった。今後さらに高齢のマウスでの沈着を検討する。

E. 結論

FAP において既存のアミロイド線維がアミロイドーシス発症に関与するのかを明らかにすることが発症機構の解明と発症調節のために重要と考える。Met30TTR-Tg マウスへ ATTR アミロイド線維を経口投与したが、投与後 12 ヶ月の時点ではアミロイドーシスの誘発は観察されなかった。

[引用論文]

- 1) Xing Y, Nakamura A, Korenaga T, et al. Induction of protein conformational change in mouse senile amyloidosis. *J Biol Chem* 277: 33164-33169, 2002.
- 2) Cui D, Kawano H, Takahashi M, et al. Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. *Pathol Int*, 52: 40-45, 2002
- 3) Lundmark K, Westermark GT, Nystrom S, Murphy CL, Solomon A, Westermark P. Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 6979-6984, 2002
- 4) Kohno K, Palha JA, Miyakawa K, et al. Analysis of amyloid deposition in a transgenic mouse model of homozygous familial amyloidotic polyneuropathy. *Am J Pathol*. 150: 1497-1508, 1997

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Umezawa M, Tatsumatsu 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 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) 郭占軍, 森政之, 付笑影, 李桂馨, 是永龍巳, 松下隆壽, 小岸久美子, 細川昌則, 樋口京一。マウスアミロイドーシス抑制遺伝子の解析。第92回日本病理学会総会 (2003.4.23 福岡)

2) 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)

3) 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)

4) 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)。

5) Yao J, Chiba T, Sakai J, Hirose K, Hada A, Kuramoto K, Higuchi K, Mori M. Gene expression of the mouse testis revealed with serial analysis of gene expression technique. 第26回日本基礎老化学会大会 (2003.6.19 名古屋)

6) Higuchi K, Xing Y, Fu X, Korenaga T, Guo Z, Nakamura A, Mori M. Mouse senile amyloidosis in SAM model. (Symposium) 2nd International Conference on Senescence: The SAM Model. (2003.7.21 Sapporo)

7) 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)

8) 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)

9) 山田雪, 神吉昭子, 付笑影, 郭占軍, 森政之, 田川陽一, 樋口京一。透析アミロイドーシスモデルとしてのヒト β 2マイクログロブリン(β 2M) トランスジェニックマウス作製の試み。第26回日本分子生物学会年会 (2003.12.12 神戸)

10) 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)

11) 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 ATTR アミロイド線維の経口投与によるアミロイド線維沈着の誘発

Genotypes of transgenic mice	Injected amyloid fibrils	Amyloid deposits					
		3*	6	9	12	18	24
Ttr ^{-/-} / hTTR-V30M ^{+/?}	hATTRMct30	0	0	0	0	**	
Ttr ^{+/-} / hTTR-V30M ^{+/?}		0	0	0	0		
Ttr ^{+/+} / hTTR-V30M ^{+/?}		0	0	0	0		
Ttr ^{-/-} / hTTR-V30M ^{+/?}	hATTRAla38	0	0	0	0		
Ttr ^{+/-} / hTTR-V30M ^{+/?}		0	0	0	0		
Ttr ^{+/+} / hTTR-V30M ^{+/?}		0	0	0	0		
Ttr ^{-/-} / hTTR-V30M ^{+/?}	DW					0	
Ttr ^{+/-} / hTTR-V30M ^{+/?}					0		
Ttr ^{+/+} / hTTR-V30M ^{+/?}							

Ttr^{-/-} / hTTR-V30M^{+/?}, Ttr^{+/-} / hTTR-V30M^{+/?}, Ttr^{+/+} / hTTR-V30M^{+/?}は内在性 Ttr 遺伝子が 0 (ノックアウト・ホモ)、1(ノックアウト・ヘテロ)、2 (野生型) のトランスジェニックマウスを表す。

* アミロイド線維投与後 3 ヶ月

** 数値未記入のセルは未調査

ウシアミロイド線維によるマウス AA アミロイドーシス 発症促進効果に関する検討

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 崔丹、河野裕夫、星井嘉信、小野咲弥子

山口大学医学部 構造制御病態学講座(旧病理学第一講座)

研究要旨 ヒトまたはマウスのアミロイドが沈着した臓器をホモジネートし、腹腔内または経口投与後に炎症刺激を加えれば、実験的アミロイドーシスの発症を促進するという“transfer amyloid”仮説を裏付けた。今回、我々は1) ウシアミロイド線維投与量とアミロイドーシス発症程度の相関；2) アミロイドが沈着したウシ肝臓のホモジナイズ液量とアミロイドーシス発症程度の相関；3) 市販の食用ウシ、老齢鶏肝臓、フォアグラの安全性について検討した。

A. 研究目的

実験的マウス AA アミロイドーシスモデルを用いて、ウシアミロイド線維およびウシ肝臓ホモジナイズ液によるアミロイドーシス発症促進効果について、1) 投与経路の差、2) 投与量の差による、また、3) 市販の食用の肝臓についてアミロイドーシス発症促進効果の検討を行う。

B. 研究材料及び方法

材料：1. マウス：生後7週令の C3H/HeN メスマウス、72（実験 I 群 13 グループ、実験

II 群 59 グループ）グループに分けて、1つのグループを3匹とした。

2. アミロイドが沈着したウシ肝臓（山口大学病理学第一講座で保存された肝臓、老齢）、市販のウシ肝臓 10 匹分（日、売り場を換えて購入、年齢などの詳細不明）、市販の老齢鶏肝臓 35 羽分（約 18 ヶ月齢）、フォアグラ 1 羽分（国産）。

方法：1. アミロイド沈着の確認：使用したウシ肝臓、老齢鶏肝臓、フォアグラをホルマリン固定、パラフィン切片を作製し、HE、Congo red 染色を行い、アミロイドの有無

を検索した。アミロイドが沈着したウシの肝臓については抗ヒト AA 抗体を一次抗体として免疫染色を行った。

2. アミロイドの抽出：Pras 等の方法に従って、ウシ肝臓からアミロイドの粗抽出を行った。抽出したアミロイド線維を湿重 100mg、50mg、10mg、5mg、2.5mg、1.25mg、0.625mg、0.312mg の量になるように蒸留水で懸濁液を作製した (A 液)。

3. 肝臓のホモジナイズ液：アミロイドの沈着した肝臓、または市販の食用の肝を湿重 100mg、50mg、10mg、5mg、2.5mg、1.25mg、0.625mg、0.312mg の量になるように 0.15MNaCl でホモジナイズ液を作製した (H 液)。

市販の食用肝臓を湿重 50mg になるようにホモジナイズ液を作製した。

4. In vivo でのアミロイドーシスの伝播についての検討：

実験を二つ群に分けて行った。

I 群：アミロイド線維の伝播性について (13 グループ)

アミロイド線維懸濁液 (A 液) を 100mg、50mg、10mg、5mg、2.5mg、1.25mg、0.625mg、0.312mg の量で腹腔内または経口投与した。

II 群：アミロイド肝臓 (13 グループ) または市販の食用肝臓のホモジナイズ液 (46 グループ) 伝播性についての検討：

アミロイド肝臓ホモジナイズ液を上記の

量で腹腔内または経口投与した。

I 群、II 群とも腹腔内投与の場合：A 液または H 液を一回腹腔内注射した同時に 10%カゼインを皮下投与し、以後 6 回連日投与を行って、屠殺した。経口投与の場合：A 液または H 液を一日おきに投与し、三週間連続予備投与した。四週目から 10%カゼインを 7 日連日投与し、屠殺した。

市販の食用肝臓ホモジナイズ液を湿重 50mg 一回腹腔内注射し、10%カゼインを 7 日連日投与し、屠殺した。

各グループマウスについて屠殺時に脾臓、肝臓および腎臓を摘出し、組織標本を作製した。HE、Congo red 染色し、偏光顕微鏡で観察、アミロイド沈着の有無を確認した。アミロイド沈着例についてはウサギ抗マウス AA 抗体またはウサギ抗マウス AApoA II 抗体を一次抗体として免疫染色を行い、沈着したアミロイドのタイプを確認した。脾臓のアミロイド沈着量を 4 段階 (0~Ⅲ) に分けた。

(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、山口大学医学部動物実験委員会の承認の下に、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。

C. 研究結果

1. 使用した肝臓の状態：一病理で保存しているアミロイドが沈着したウシの肝臓は抗ヒト AA 抗体と反応した。アミロイド肝臓の三ヶ所から組織を採集し、三回に分けて、抽出を行い、得られたアミロイド線維の量（湿重）三回とも肝臓の約8~8.5%だった。市販の食用ウシ肝臓および老齡鶏肝臓、フオアグラにはアミロイド沈着を認めなかった。

2. In vivo でのアミロイドーシスの伝播効果：I群の結果は表 1. に纏めている。ウシアミロイド線維とアミロイドウシ肝臓ホモジナイズ液の投与により、アミロイド沈着量の比較は Fig. 1 に示された。

3. 市販の食用肝臓のホモジナイズ液をマウスの腹腔内投与例ではマウスアミロイドーシス発症促進効果がみられなかった。

D. 考察

アミロイドの沈着したウシの肝臓からアミロイドを抽出し、得られたアミロイド線維の量（湿重）は三回とも肝臓約の8~8.5%であった。このアミロイド線維の懸濁液（A液）をマウスの腹腔内に投与すると、湿重の0.312mg までに、経口投与すると10mgの量でアミロイドーシスの促進効果がみられた。アミロイド沈着肝臓のホモジナイズ液（H液）を腹腔内に投与すると0.625mg（含まれたアミロイド線維の量約：0.053mg）ま

でアミロイドの沈着効果がみられ、経口投与すると10mg（含まれたアミロイド線維の量約：0.85mg）までアミロイドーシスの促進効果がみられた。投与経路から考えてみれば、腹腔内に投与する場合、よりアミロイドーシス発症促進効果がみられた。アミロイド肝臓からアミロイド線維を抽出する時、アミロイド線維回収率は100%とは言えませんが、H液に含まれるアミロイド線維の量から考慮すると、ウシ肝臓のホモジナイズ液のほうがアミロイドの発症促進効果が強かった。

今回、われわれは市販の食用肝臓について検討したが、サンプルの数が少ないかもしれないが、ウシの肝臓、老齡鶏の肝臓、フオアグラの組織検索の結果：アミロイドの沈着がみられなかった。これらの肝臓のホモジナイズ液をマウスの腹腔内に投与するとマウスアミロイドーシス発症促進効果がみられなかった。

E. 結論

1). ウシアミロイド線維またはアミロイド沈着肝臓のホモジナイズ液を投与することによりマウス AA アミロイドーシスの発症促進効果が見られた。腹腔内投与する場合、効果がもっとも強かった。

2). アミロイドの沈着している肝臓のホモジナイズ液はウシアミロイド線維よりア