

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

チーターのアミロイド症の疫学的検討

分担研究者 宇根有美 麻布大学獣医学部病理学研究室

研究協力者 川上茂久 群馬サファリパーク
伊藤修 アドベンチャーワールド

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。

A. 研究の目的

チーターは絶滅危惧種に指定され、世界的規模で保護が行われている。しかしながら、自立した個体数の増加はなく、国内ではむしろ減少しており、1994 年頃 80 頭を越えていた飼育数が、2003 年には 50 頭を切った（輸入個体を除く）。チーターを絶滅の危機から救うためには、チーターの死因として重要なアミロイド沈着のメカニズムを解明する必要がある。

本研究では、アミロイド症の発生メカニズムを解明することを目的として、チーターの由来（国内繁殖あるいは輸入）、飼育施設、飼育面積および死亡時平均年齢（以下平均年齢）とアミロイド症の発生状況との関連を解析した。

B. 研究方法

1) 調査の対象

1931 年に国内でチーターの飼育が開始されてから 2003 年までに 398 頭のチーターが登録され、うち 346 頭が死亡した。本研究では、国内のチーター飼育技術が確立された 1985 年以降に死亡した 247 頭の動物から幼若齢（2 歳未満）の動物を除いた 179 頭を対象とした。なお、チーターの寿命はおよそ 15～16 歳とされており、調査期間を 1985 年～2003 年とすることによって、多くのチーターについて、その終生を追跡することが可能となった。

2) 病性鑑定

日本動物園水族館協会種の保存委員会の協力を得て、国内で死亡したチーターの病性鑑定を行うことになっている。チーターが死亡

するとその死体あるいは死体の一部（ホルマリン固定材料および冷凍材料）が送付され、これを病理学的に検索した。2003年までに70頭のチーターの

病性鑑定を行った。アミロイド沈着の有無は、ホルマリン固定材料、パラフィン切片にH.E染色、コンゴ赤染色、ダイレクトファーストスカーレット染色などを施して判定した。

3) 統計処理

チーターの由来：国内で生まれた個体（繁殖個体）とアフリカ（南アフリカ又はナミビア）から幼獣あるいは成獣で輸入された個体（輸入個体）

飼育施設：飼育頭数、飼育面積と施設の構造

以上の3つの項目と死亡時平均年齢（平均年齢）との関連を統計学的に検討した。

4) その他

対象施設数は、9施設、TS（東北エリア）、GS、ST、TT（関東エリア）、SH（中部エリア）WA（近畿エリア）、YA、HC（中国エリア）、AT（四国エリア）で、チーターが熱帯地方に生息していることもあって、1施設を除いて関東以西に位置している。

チーターの餌は、どの施設もほぼ同様で、輸入馬肉を主体として、施設によって鶏頭、ニワトリ、ウサギなどを与えている。

C. 結果

対象とした179頭のうち輸入個体は79頭、繁殖個体は100頭で、平均年齢は7.82歳で、その内訳は輸入個体9.81歳、繁殖個体6.25歳であった。飼育施設別平均年齢は、最低で3.9歳、最高11.8歳と、施設によって差があった（表1）。また、各施設の飼育頭数は最低で延べ4頭、最高で110頭であった（表2）。各飼育施設別に飼育頭数と平均年齢の関係を解析したところ、飼育頭数が増加すると、繁殖個体群で優位

に平均年齢が低下した（表3）。飼育施設の面積（総面積、1頭あたりの専有面積および寝室、放飼場など各部の面積と平均年齢との関連をみたところ、明らかな関連は見出せなかった。

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。アミロイドの沈着は、若齢で死亡する個体で、すなわち多頭飼育由来の個体で、より広汎かつ高度で、死に直接関係する病変であったが、平均寿命あるいはそれ以上の年齢に達して死亡する個体では、死因のほとんどが老衰などで、アミロイドの沈着はないかあるいは、限局性でごく軽度であった。

D. 結論

チーターのアミロイドの沈着とその程度と広がり、チーターの飼育環境、特に多頭飼育形態に関連することが明らかになった。このことから、今後、多頭飼育形態のどのような点がチーターのアミロイド沈着に深く関わっているか解析する予定である。

学会発表

1 EPIDEMIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL SURVEY OF CAPTIVE CHEETAHS (*Acinonyx jubatus*) IN JAPAN, 1935-2002. Une, Y.1), Kawakami, S.2), Ito, S.3) and Nomura, Y.1).

1) Lab. of Vet. Pathol., Azabu Univ., 2) Gunma Safari Park, 3) Shirahama Adventure World, Japan.

21st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology. (Sep. 2003) Dublin, Ireland

2 EPIDEMIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL SURVEY OF CAPTIVE CHEETAHS (*Acinonyx jubatus*) IN JAPAN. Une, Y.1), Kawakami, S.2), Ito, S.3) and

Nomura, Y.1).

1) Lab. of Vet. Pathol., Azabu Univ.,
2)Gunma Safari Park, 3)Shirahama
Adventure World, Japan.

54th Annual Meeting of the American
College of Veterinary
Pathologists. (Nov. 2003) Banff, Alberta,
Canada.

3. HELICOBACTER SPECIES AND
HELICOBACTER INFECTIOUS DISEASES
IN ANIMALS. Yumi Une, Department of
Veterinary Pathology, School of Veterinary
Medicine, Azabu University, Japan
28th World Small Animals Veterinary
Association Congress, (Oct. 2003) Bangkok,
Thailand.

表1 施設別死亡時平均年齢

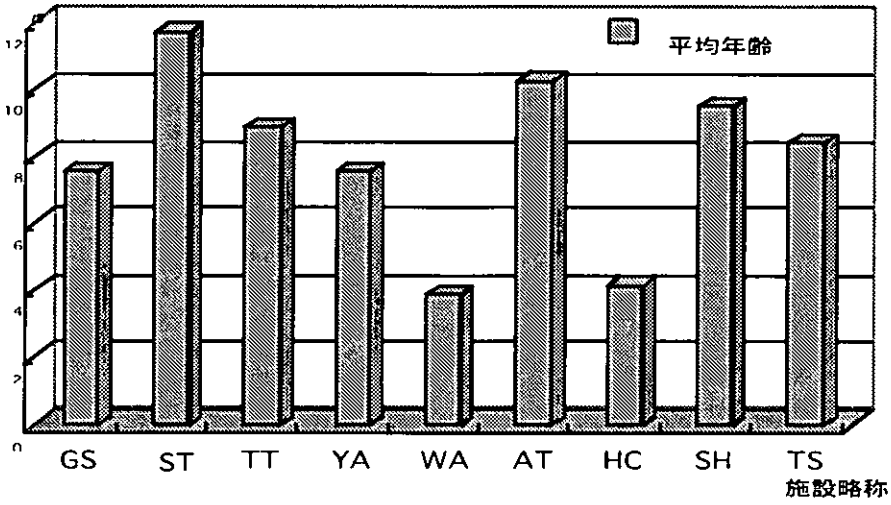


表2 各施設別の死亡頭数

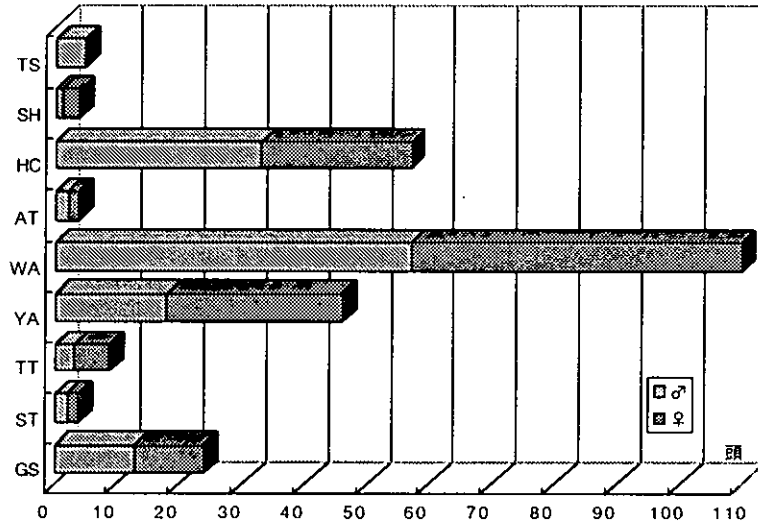
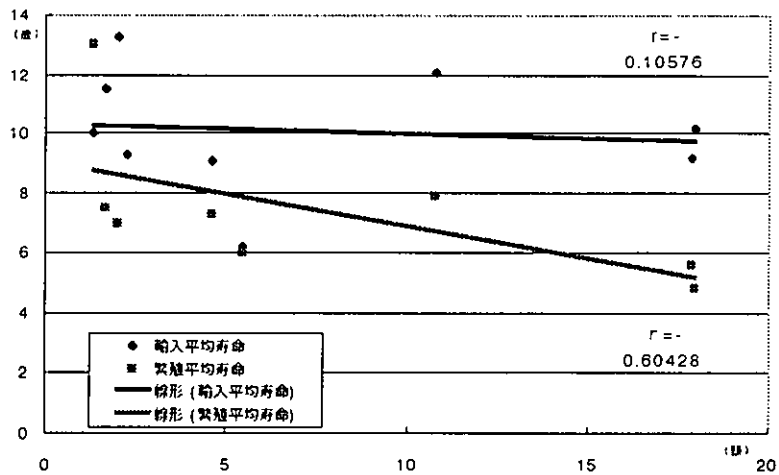


表3 平均飼育頭数と死亡時平均年齢の関係 (1985~2002)



透析アミロイドーシスモデルとしてのヒト β 2ミクログロブリン トランスジェニックマウス作製の試み

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 山田雪**, 神吉昭子**, 付笑影*, 郭占軍***,
森政之*, 田川陽一**
*信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野,
**信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験部門,
*** CREST

研究要旨 我々はこれまでマウス AApoAII 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他のアミロイドーシスにでも起こりうるのかを明らかに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。長期の人工透析患者では、血中ミクログロブリン(β 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 β 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・治療法は不明である。我々は、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 β 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。

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

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^{1,2}。(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。(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。(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。また石原や Westermark らは、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伝播が起ることを報告している^{3,4}。

長期の人工透析患者では、血中ミクログロブリン(β 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し、組織破壊を引き起す「透析アミロイドーシス」が重大な問題となっている。我々は、アミロイド線維による発症促進が透析アミロイドーシスの進

行に重要な役割を果たしているかを明らかにするためにヒト β 2Mを高発現するトランスジェニックマウス(Tg)の作成を試みた。このマウスを用いて血中の可溶性 β 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を解明し、さらにその予防・治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

1) ES細胞を用いたヒト β 2M Tgマウス作成 : CAGプロモーター(CMV-IE enhancer + Chicken β -actin promoter + rabbit β globin polyA) にヒト β 2M cDNA (ヒト肝臓 mRNA より RT-PCR で作成) を挿入し、さらに TK promoter を持つ Neo 遺伝子を挿入した plasmid DNA を構築した (図1)。上記の plasmid の不要部分を除いた DNA を精製し、エレクトロポレーションで 129 マウス由来の ES 細胞 E.14.1 に導入し、G418 に耐性のクローンについて RT-PCR, ウェスタンブロッティングを行って、mRNA, 蛋白質ともに導入遺伝子が高発現している2クローンを選定し、キメラマウスを作製した。

2) マイクロインジェクションによるヒト β 2M Tgマウス作成 : CAGプロモーターの下流にヒト β 2M cDNA を持つ DNA を構築し、C57BL/6 マウス受精卵に、マイクロインジェクションした。状態の良好な卵を仮親(ICR)の卵管に移植し、生まれた産子について、Tg の存在を PCR 法で検出した。

3) 肝臓特異的プロモーターを用いたヒト β 2M Tgマウス作成 : 肝臓特異的に発現する AAT (alpha-1-antitrypsin) プロモーター (熊本大学遺伝子実験施設・荒木先生より供与) の下流にヒト β 2M cDNA を持つ plasmid DNA を構築し、必要部分を精製し C57BL/6 マウス受精卵にマイクロインジェクションした。(熊本大学との共同研究)

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物のみ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、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) ES細胞を用いたヒト β 2M Tgマウス作成 : G418 に耐性の ES クローンについて、mRNA, 蛋白質ともに導入遺伝子が高発現している2クローン (No. 36, 40) を選定し、キメラマウスを作製した。得られたキメラマウスと C57BL/6 との F1 マウスよりの解析より、どちらのクローンも ES 細胞由来の生殖細胞を作ることが確認できた。その F1 マウスを用いて RT-PCR を行ったところ、肝臓、脳、精巣などに導入遺伝子の高い発現が認められた。また血清中にヒト β 2M の発現を確認した (図2)。これらの Tg マウス系統は現在継代中である。

2) マイクロインジェクションによるヒト β 2M Tgマウス作成 : DNA をマイクロインジェクションした C57BL/6 の受精卵より産まれた 45 匹の F1 マウスのうち 9 匹にヒト β 2M 遺伝子導入が確認された F1(Tg+/-)。コピー数が多いと見られる系統について現在系統の樹立と解析を行っている。

3) 肝臓特異的プロモーターを用いたヒト β 2M Tgマウス作成 : AAT プロモーター+h β 2M DNA をマイクロインジェクションした C57BL/6 マウス受精卵から、67 匹の仔マウスを得て、そのうち 7 匹が導入遺伝子を有していた。コピー数が多いと見られる系統について現在系統の樹立と解析を行っている。

D. 考察

長期の人工透析患者では「透析アミロイドーシス」が問題となっている。ところが、血中の $\beta 2M$ 濃度と透析アミロイドーシスの発症が必ずしも相関しないこと、透析アミロイドーシスの発症までに長期間要すること、試験管内で $\beta 2M$ 蛋白質モノマーからのアミロイド線維生成が困難であり、アミロイド線維添加により生成が促進されることなどを根拠に、アミロイド線維の形成には複雑なメカニズムが存在することが示唆されている。そこで、ヒト $\beta 2M$ トランスジェニックマウスを作製し、可溶性 $\beta 2M$ からアミロイド線維が生成する機構、特に既存のアミロイド線維が「種」となってアミロイド線維形成を促進する可能性について明らかにしようとした。

ES細胞より作製したヒト $\beta 2M$ Tgマウスにおいて、肝臓、脳など様々な臓器で発現させることに成功した。また $\beta 2M$ Tgマウスの血清中には、ヒト $\beta 2M$ 蛋白質が確認された。さらにC57BL/6へのマイクロインジェクションで作成した $\beta 2M$ Tgマウスも現在継代中である。今後、透析アミロイドーシスモデルマウスとして使用するためには十分なヒト $\beta 2M$ の発現（血清濃度）が必要であると考えられるため、各Tgマウス系統の選抜と交配により、モデルマウスとして適当な系統の樹立を目指す。さらに内在性（マウス） $\beta 2M$ 遺伝子のノックアウトマウスと交配し、ヒト型モデルの作成を進める。透析アミロイドーシスの病態に近づけるために、腎機能障害を目指した処置を計画している。

今後、アミロイド線維投与やその他の環境要因の変化による発症促進を試み、アミロイドーシス病的要素の検索を進めたい。

E. 結論

「アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究班」に於いて既存の

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重要と考える。患者数が膨大である透析アミロイドーシスに関してこの問題を検証するため、3種のヒト $\beta 2M$ Tgマウスを作成した。今後はこれらのマウスを用いて、透析アミロイドーシスにおける病的要素の検索を行い、発症の機序解明と治療法の開発を目指す。

[引用論文]

- 1) Xing Y, Nakamura A, Chiba T, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest* 81: 493-499, 2001.
- 2) Xing Y, Nakamura A, Korenaga T, et al. Induction of protein conformational change in mouse senile amyloidosis. *J Biol Chem* 277: 33164-33169, 2002.
- 3) 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
- 4) 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

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Umezawa M, Tatematsu K, Korenaga T, Fu X, Matushita 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, Mastushita 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) 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 (AApoAll)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

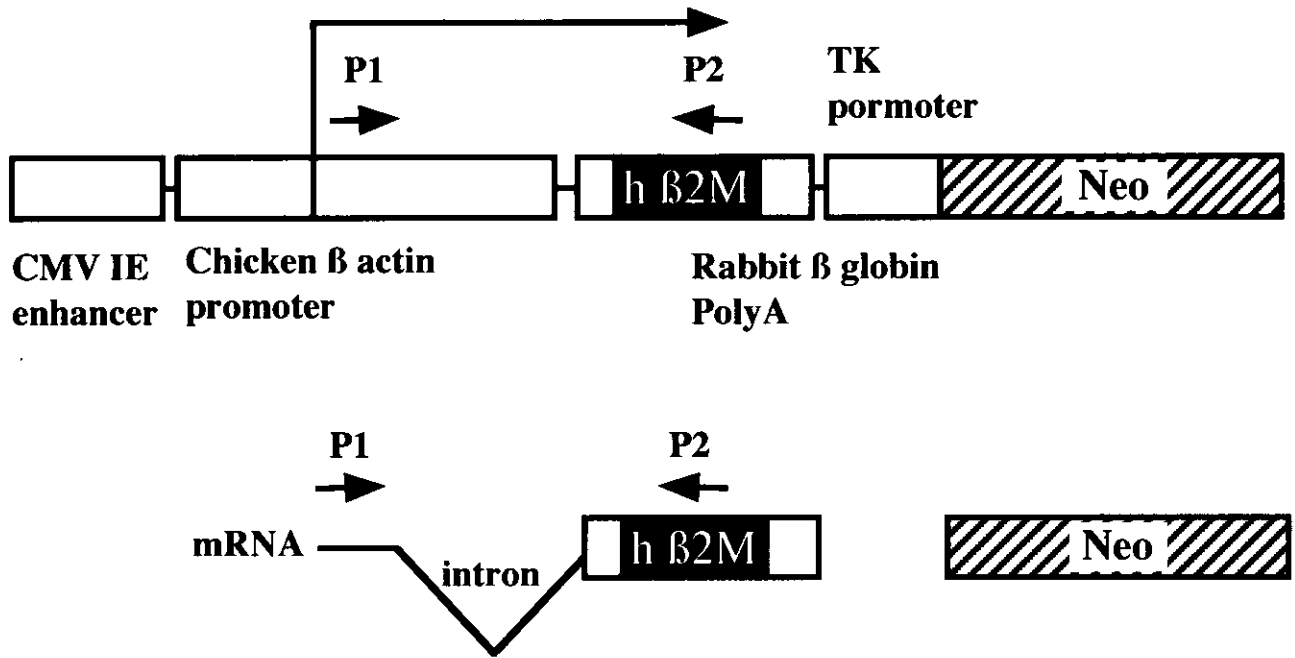


図 1. 透析アミロイドーシス (A β 2M)モデルマウスの作成。導入遺伝子 β 2M-Neoの構造を示す。P1, P2はES細胞クローンの選択に用いたPCR用プライマー。導入されたDNAからはイントロンが取り除かれたhuman β 2MとNeoのmRNAが産生される。

ヒトβ2M-特異抗体
(抗ヒトC末端-peptide)



ヒト, マウスβ2M-抗体
(抗ヒトβ2M)



Control
mouse

β2M Tg
mouse

Human β2M
standard

図2. F1トランスジェニックマウス(clone 36)血清におけるβ2Mの発現。
control;Tg (-/-), β2M Tg; Tg (+/-) マウスの血清(1.0 μl)をSDS-ポリアクリル
アミド (15%)電気泳動で分離し, Western blot解析を行った。ヒトβ2M-C末
端peptideに対する抗体 (サンタクルズ社) はヒトβ2Mのみと反応し,
DAKO社抗体は, マウス, ヒト両方のβ2Mと反応する。

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
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

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 効率よく A β 蛋白を分泌できるようなりコンピナントアデノ随伴ウイルスベクターを作成した。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。

A. 研究目的

作年度はリコンピ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。今年度は、APP トランスジェニックマウスに A β 発現アデノ随伴ウイルスベクター(rAAV/A β)を経口投与し、脳におけるアミロイド沈着の変化について検索した。

B. 研究方法

効率よく A β が細胞外に分泌されるようなアデノ随伴ウイルスベクターを開発し、アルツハイマー病の動物モ

デルである APP transgenic mouse (Tg2576)に rAAV/A β を経口投与し（15週齢、30週齢、45週齢時）、腸管組織での A β 抗原の発現や抗体産生、脳におけるアミロイド沈着の変化を病理組織学的に検索した。

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、rAAV/A β 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 DNA 精製：

rAAV/ $A\beta$ 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、Tris 溶液の中で組織を homogenate した後、DNA を精製した。次に、APP signal sequence の 5'塩基配列と $A\beta$ 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。

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

APP-Tg マウスに経口投与後、血清中の $A\beta$ に対する抗体は、4週後をピークとして、6ヶ月間持続した。またこの抗体は、in vitro での $A\beta$ の凝集を抑制した。rAAV/ $A\beta$ を投与したマウスの脾細胞は、 $A\beta$ 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。APP transgenic mouse (Tg2576)は、加齢と共にアミロイド沈着が進み、10ヶ月齢になると、アミロイド沈着は著明になり、老人斑の形成も認められるようになる。rAAV/ $A\beta$ を投与したマウス（12～13ヶ月齢）の脳を解析すると、コントロールに比べ明らかにアミロイド沈着が減少し、老人斑も激減していた。

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、どの臓器にも炎症所見は認められなかった。脳組織を T 細胞マーカー (CD4)、T 細胞活性化分子 (CD86) で染色したが、陰性であった。前頭葉、側頭葉には活性化したミクログリア (Iba-1 陽性) の増加を認めた。

D. 考察

今回、加齢と共にアミロイド沈着が増加する APP トランスジェニックマウスの腸管細胞に $A\beta$ 抗原を強制発現させた場合に、脳アミロイド沈着に変化が起こるか解析した。腸管に多くの抗原を発現させた場合、抗原に対する抗体産生が誘導され、逆に沈着したアミロイドを除去する現象が認められ、アミロイドーシスに対するワクチン療法など抗体やアミロイドを可溶化する分子等を用いた治療の可能性が示唆された。

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、どの様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

1. 田平 武、原英夫：アルツハイマー病と免疫 神経免疫学 11：193-196, 2003.
2. 原英夫：アルツハイマー病のワクチン療法。基礎老化研究 27:122-127, 2003.
3. 原英夫：Alzheimer 病に対する経口ワクチン療法の開発。医学のあゆみ 206：990, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

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

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

分担研究者 前田秀一郎 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・生化 1

共同研究者 河西あゆみ*、大森弘子*、伊藤禎洋**、針谷康夫***、

東海林幹夫****、瓦林 毅****

*山梨大学大学院医学工学総合研究部・生化 1、

**山梨大学・総合分析実験センター、

***前橋日赤病院・神経内科、

****岡山大学・大学院・医歯学総合研究科・神経病態内科

研究要旨 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 (APPsw) と我々が作製した無トランスサイレチン (TTR) マウス及び無血清アミロイド P 成分 (SAP) マウスを用いて、遺伝性アルツハイマー病での脳内 A β アミロイドの沈着に TTR や SAP がどう関与するかを昨年度に引き続き解析し、以下の結果を得た。

1) 今年度は、より高齢 (12~24 カ月齢) の TTR 欠損 APPsw 10 匹と対照ヘテロ接合体 APPsw 11 匹における脳内 A β アミロイド沈着を、抗 A β 抗体を用いて解析した。この結果、予想に反し、13 カ月齢以上の高齢マウスにおいて、TTR が A β アミロイドの沈着を促進する傾向を認めた。

2) 一方、8~18 カ月齢の SAP 欠損 APPsw 12 匹につき、脳内 A β アミロイド沈着程度を、同月齢の野生型 APPsw またはヘテロ接合体 APPsw 合計 12 匹と比較解析した。この結果、両者に差異を認めなかった。

今後、TTR 欠損 APPsw の系統については、13 カ月齢より高齢のマウスを用いて、一方、SAP 欠損 APPsw の系統については、より若い (9~12 カ月齢) 多数のマウスを用いて月齢を追って、脳内 A β アミロイドの沈着程度を解析する。

前田 秀一郎・山梨大学大学院医学工学総合研究部・教授

A. 研究目的

TTR は、アルツハイマー病の A β アミロイドの形成を、*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。そこで本研究は、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（APPsw）と我々が作製した無TTRマウス及び無SAPマウスを用いて、遺伝性アルツハイマー病でのA β アミロイドの沈着にTTRやSAPがどう関与するかを明らかにし、この遺伝性神経難病の治療法や予防法を確立することを目的に遂行する。

B. 研究方法

Hsiao博士から供与された、スウェーデンの早期発症型遺伝性アルツハイマー病の原因となるヒトの変異アミロイド前駆体蛋白（*app*）遺伝子を運ぶトランスジェニックマウス（APPsw）と我々が確立した無TTRマウス株あるいは無SAPマウス株とを交配させて得たTTR又はSAP欠損APPswと対照野生型APPswまたは対照ヘテロ接合体APPswとにおける脳内A β アミロイド沈着の開始時期や程度を、月齢を追って比較解析し、A β アミロイドの沈着にTTRやSAPがどう関与するかを解析する。

脳内A β アミロイドの沈着は、コンゴ赤染色法、および以下の3種類の抗A β 抗体を用いた免疫組織化学的手法により調べた。

1) A β 9204; A β のN末端を認識するポリクローナル抗体 2) BA27; A β のC

末端40を認識するモノクローナル抗体

3) BC05; A β のC末端42を認識するモノクローナル抗体

脳内A β アミロイドの沈着程度は、次のように計測した。1) 抗A β 抗体A β 9204で染色されたマウス脳切片はAxioCam (Carl Zeiss)にてdigitalizeされた。2) Image-Pro Plus Ver4.5 (Plantron)を用いて染色陽性部位（アミロイド斑+血管アミロイド）の面積と大脳皮質全体の面積の比を計測した。計測はマウスあたり4切片で行った。

本研究での動物実験は、山梨大学総合分析実験センターの実験指針に基づき、実験計画ごとに事前に委員会による審査を受け、承認されており、動物愛護の観点から倫理的に問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

1) 昨年度、6~11ヶ月齢のTTR欠損APPsw 6匹と同月齢の対照野生型APPsw 4匹とにおける脳内A β アミロイド沈着程度を解析し、11ヶ月齢のマウスの大脳皮質にのみ極軽度のヒトA β 沈着を認めたが、その程度に差異はなかった。そこで今年度は、より高齢(12~24ヶ月齢)のTTR欠損APPsw 10匹と同月齢の対照ヘテロ接合体APPsw 11匹とにおける脳内A β アミロイド沈着程度を解析した。この結果、12ヶ月齢(TTR欠損1匹、ヘテロ接合体1匹)では差異を認めなかったが、13ヶ月齢(TTR欠損1匹、ヘテロ接合体1匹)、14ヶ月齢(TTR欠損1匹、ヘテロ接合体1匹)、15ヶ月齢(TTR欠損3匹、ヘテロ接合体3匹)、16ヶ月齢

(TTR 欠損3匹、ヘテロ接合体3匹)では、TTR 欠損マウスに比べ、ヘテロ接合体マウスにおいて、より高度の A β アミロイドが沈着する傾向を認めた。18ヶ月齢以上 (TTR 欠損マウス 1匹、ヘテロ接合体マウス2匹)では、TTR 欠損マウスおよびヘテロ接合体マウス共に A β アミロイドの沈着が進み、差異を認めなかった (図1)。

2) 昨年度、8~18ヶ月齢の SAP 欠損 APPsw 9匹と同月齢の対照野生型 APPsw 9匹とにおける脳内 A β アミロイド沈着程度を解析し、SAP が A β アミロイド沈着の初期段階を促進することが示唆された。そこで今年度は、8~18ヶ月齢の SAP 欠損 APPsw 12匹と同月齢の対照野生型 APPsw またはヘテロ接合体 APPsw 合計 12匹とにおける脳内 A β アミロイド沈着程度を比較解析した。この結果、両者の A β アミロイド沈着程度に差異を認めなかった。

D. 考察

予想に反し、13~16ヶ月齢のマウスにおいて、TTR が脳内 A β アミロイドの沈着を促進する傾向を認めた。今後、さらに多数の 13~18ヶ月齢のマウスを解析し、結果を検証する。

一方、SAPについては、A β アミロイドの沈着を促進することを示す結果は得られなかった。昨年度の実験では、13ヶ月齢では、SAP 欠損 APPsw において、対照野生型 APPsw に比較して A β 沈着が減少していたが、18ヶ月齢では、差異を認めなかった。これらの結果は、SAP の欠損が脳内 A β アミロイドの初期の沈着を遅らせることを示

唆する。そこで今後、より若い9~12ヶ月齢の多数のマウスを解析する。

E. 結論

TTR 欠損 APPsw と対照ヘテロ接合体 APPsw 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、上記結果を確認する。

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 前田 秀一郎：家族性アミロイドポリニューロパチー。別冊・医学のあゆみ 疾患モデル動物—病因解析での役割と限界60-64, 2004.

2) Maeda S: Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. *Amyloid: J. Protein Folding Disord*, 10 (Suppl 1): 17-20, 2003.

3) Kato G, Maeda S: Production of mouse ES cells homozygous for Cdk5-phosphorylated site mutation in *c-sirt* alleles. *J Biochem*, 133: 563-9, 2003.

4) Nakamura M, Ando Y, Nagahara S, Sano A, Ochiya T, Maeda S, Kawaji T, Ogawa M, Hirata

A, Terazaki H, Haraoka K, Tanihara H, Ueda M, Uchino M, Yamamura K: Targeted conversion of the transthyretin gene in vitro and in vivo. *Gene Therapy, in press.*

2. 学会発表

伊藤禎洋, 手塚英夫, 岡田芳家, 玉置寿男, 大森弘子, 坂本美穂子, 尾崎由基男, 神庭重信, 山村研一, 前田秀一郎: 血清アミロイド P 成分 (SAP) の欠損は、自己免疫疾患を惹起しない

第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月

10 日～13 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

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

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
共同研究者 瓦林毅、松原悦朗、阿部康二 岡山大学大学院神経病態内科

研究要旨 Alzheimer病の発症機序としてamyloid cascadeが提唱され、アミロイドβ蛋白(Aβ)の沈着がtau からなるNeurofibrillary tangle (NFT)の蓄積を引き起こして細胞死を誘発すると考えられている。しかしAβとtauとの関係は未だに明らかになっていない。我々はADモデル動物APPswマウスに変異presenilin-1 (PS1) (PS1L286Vtg)発現Tg、および変異tau (R406WまたはP301L)発現Tgを掛け合わせてdouble Tgを作製し、Aβの沈着がNFTを誘発するかどうかを検討した。変異PS1TgとAPPswのdouble Tgは脳アミロイド沈着を著明に促進すると共にアミロイド周囲の変性神経突起内にリン酸化tauを、電顕でstraight tubulesの蓄積を認めた。変異tau TgとAPPswのdouble Tgではtauの出現時期、分布に変化を認めず、NFTの促進作用は認めなかった。変異PS1はAβ蓄積を介してtauの蓄積を増加させるが、tau Tgの検討ではAβ蓄積によるtauopathy促進効果は明らかでなかった。

A. 研究目的

Alzheimer 病脳の特徴はアミロイド β 蛋白 (Aβ)からなる Aβ amyloid と tau からなる Neurofibrillary tangle (NFT)である。近年、amyloid 沈着が NFT の蓄積を引き起こして細胞死を誘発するという amyloid cascade theory が広く信じられている。しかし Aβ と tau との関係は未だに明らかになっていない。我々の amyloid モデルマウス (APPsw) の検討でも NFT の誘発は認められていない。今回我々は NFT を再現する transgenic mouse と APPsw の double transgenic mouse を確立して Aβ による NFT の誘発可能性について検討した。

B. 研究方法

Alzheimer 病モデル動物である変異 APP transgenic mouse APPsw に変異 presenilin-1 (PS1) transgenic mouse (PS1L286Vtg)、変異 tau transgenic mouse (TauTg R406W または TauTg P301L)を掛け合わせて double transgenic mouse (double Tg) を作製した。double Tg および single Tg の脳でアミロイド β 蛋白、tau 抗体による免疫染色を経時的に 16 月齢まで行った。さらに Western blotting により tau の蓄積量を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いには The US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals (PHS policy) と the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (the Guide) に準じて行われた。

C. 研究結果

1) PS1L286Vtg と APPsw との double Tg の検討
APPsw では 8 月齢から Aβ 蓄積が見られるのに対し、double Tg では 2 月齢から Aβ 蓄積が出現し、以後、加速度的に脳アミロイドが沈着した。よって double Tg では APPsw に比べ Aβ の沈着が約 4 倍の速度で進行していた。抗リン酸化 tau 抗体 AT8、PHF-1 および抗 PHF-tau 抗体 Alz50 を用いた免疫染色で、double Tg では APPsw に比べて老人斑周囲の変性神経突起内に著明な染色所見が認められた。これらの突起は NFT に特異的とされる Gallyas 染色で陽性に染色された。Double Tg の電顕による検討では老人斑周囲の変性神経突起内に線維性の構造物の充満を認め、直径は約 14 nm で NFT の straight tubule に相当した。以上の検討より、変異 PS1 は Aβ amyloid 蓄積を促進させ、tau の蓄積や NFT の形成も促進させることが示唆された。

2) TauTg R406W と APPsw の double Tg の検

討

抗ヒト Tau 抗体を用いた免疫染色では、tau の蓄積は double Tg、TauTg R406W のどちらも 6 月齢より認められ、その分布にも違いを認めなかった。NFT の出現も認めなかった。Double Tg と APPsw の間で脳アミロイド沈着に差はみられなかった。Western blotting では脳 TS 可溶性分画で double Tg において TauTg R406W に比べて tau の増加が認められた。また、Sarkosyl 不溶性分画においては double Tg で TauTg R406W に比べてリン酸化 tau の増加が認められた。

3) TauTg P301L と APPsw の double Tg の検討

今回新たな変異 tauP301L を導入した TauTg P301L Tg を確立した。このマウスは hamster prion promotor のもとに 4 repeat のヒト longest tau を発現する。脳への Tau の蓄積は 3 月齢より認められた。16 月齢以上で海馬や側頭葉に Gallyas 染色強陽性の NFT が再現された。電顕では、神経細胞内に twisted ribbon が再現された。その径は約 15 nm で、P301L 変異を持つ FTDP-17 で出現する twisted ribbon と同じ大きさであった。また、16 月齢以上で海馬の錐体細胞の神経細胞死が確認できた。

抗ヒト Tau 抗体を用いた免疫染色では、tau の蓄積は double Tg と TauTg P301L の間でその出現と分布に違いを認めなかった。一方、double Tg と APPsw との間で A β の蓄積に差を認めなかった。リン酸化 tau 抗体を用いた免疫染色では Double Tg で老人斑周囲の変性神経突起内にリン酸化 tau の蓄積がみられた。しかし、NFT 出現の促進は認められなかった。

D. 考察

PS1L286Vtg と APPsw の double Tg の検討から、変異 PS-1 は脳アミロイド沈着を増加させ、tau の二次的な増加と straight tubules、twisted tubules の形成を来した。一方、変異 tau との double Tg の検討では A β はリン酸化 tau の蓄積を促進することは示されたが、その効果は著明なものではなく、NFT の形成促進効果は認めなかった。A β 蓄積による tauopathy 誘発は単純な tau 発現増加以外の要因が想定された

E. 結論

変異 PS1 は A β 蓄積を介して tau の蓄積を増加させる。A β 蓄積は tau 蓄積効果は認めるものの NFT 促進効果は明らかでなかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Nemeth AH, Ber IL, Moniz JC, Tranchant C, Aubourg P, Tazir M, Schols L, Pandolfo M, Schulz JB, Pouget J, Calvas P, Shizuka-Ikeda M, Shoji M, Tanaka M, Izatt L, Shaw CE, M'Zahem A, Dunne E, Bomont P, Benhassine T, Bousslam N, Stevanin G, Brice A, Guimaraes J, Mendonca P, Barbot C, Coutinho P, Sequeiros J, Durr A, Warter JM, Koenig M. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. Nature Genetics 2004 Feb 8 [Epub ahead of print]
2. Murakami T, Shoji-M, Imai Y, Inoue H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Harigaya Y, Sasaki A, Takahashi R and Abe K, Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. Annals of Neurology (in Press)
3. Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin L, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH and Younkin SG, Dimeric A β Rapidly Accumulates in Lipid Rafts Followed by ApoE