200400847A

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16年度総括・分担研究報告書

平成17(2005)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

2004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

2005年3月

March 2005

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 16 年度総括研究報告 …… 5
平成 16 年度分担研究報告 …… 17
平成 16 年度事業報告 …… 77
平成 16 年度研究班班員名簿 …… 83
研究成果の刊行に関する一覧表 …… 87

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１６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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）総括研究報告

研究課題：アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究

主任研究者：所属施設 山口大学医学部構造制御病態学講座（旧１病理）
氏　　名 石原得博
分担研究者：所属施設 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学
氏　　名 東海林幹夫
所属施設 山梨大学大学院医学工学総合研究部第一生化学
氏　　名 前田秀一郎
所属施設 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
氏　　名 樋口京一
所属施設 信州大学医学部神経内科
氏　　名 池田修一
所属施設 帯広畜産大学獣医学部家畜病理学
氏　　名 松井高峯
所属施設 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
氏　　名 河野道生
所属施設 山口大学農学部生物機能科学科
氏　　名 加藤昭夫
所属施設 福井大学医学部第二病理
氏　　名 内木宏延
所属施設 つくば動物衛生研究所
氏　　名 山田学
所属施設 国立長寿医療センター研究所
氏　　名 田平武
所属施設 麻布大学獣医学部病理学教室
氏　　名 宇根有美

１．　研究目的

アミロイドーシスとは、さまざまな前駆蛋白がβ構造を多く含んだ共通の線維構造からなるアミロイドを形成し、様々な臓器に沈着し、障害を引き起こし致死的ともなる疾患群である。いわゆる原発性や骨髄腫に伴うＡＬアミロイドーシス、リウマチ(RA)や結核に続発するＡＡアミロイドーシス、家族性アミロイドポリニューロパチー（ＦＡＰ）、アルツハイマー病などの脳アミロイドーシス、老人性アミロイドーシスなど多くの病型がある。アミロイド線維は、

種々の異なる前駆蛋白（現在までに明らかなもので２１種類）からなっている。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、治療法も十分に確立されていない状態である。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。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．石原らはマウス AA アミロイド線維の経口投与、ウシアミロイド線維やアミロイド沈着肝臓のホモジナイズ液の腹腔内投与およびウシアミロイド沈着臓器の移入によるマウス AA アミロイドーシス発症促進効果を示した。樋口らは、マウスのAapoAⅡ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。

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を試み，これらの細胞株の増殖・生存を抑制する薬剤を検討する。

２．　研究方法および結果と考察

１）　動物のアミロイドーシスの発生頻度

動物からの伝播の可能性を検討する基礎に、ウシアミロイドーシスの発症頻度を検索した。松井や山田らの検索では 5702 頭中 20 頭（0.35%）にアミロイドを認め、また６歳以上にみられる傾向にあった。肝臓、脾臓、腎臓、消化管、内分泌器官に加え、生殖器、乳腺、骨格筋においても高率にアミロイド沈着を認めた。池田らは約 326 頭中 16 頭（5%）の高齢食用牛の腎臓にアミロイド沈着を認めた。アミロイド蛋白は全例 AA アミロイドであった。解体時肉眼的に原因となる内臓病変（基礎疾患）を認め田茂のは，全ての内蔵臓器は破棄された。しかしこれらのウシの肉は消費ルートにまわされるので、さらなる十分の検討が必要である。牛 AA アミロイドーシスは高齢牛では一定頻度で発生することが知られてお

り、牛の臓物を種々な食品として摂取するヒトにとっては，常にアミロイド摂取の危険に曝されていると言える。現在、こうした内臓アミロイド病変を有する牛の骨格筋におけるアミロイド沈着の有無についても検索中である。また，今回の牛腎の組織検索により評価した高齢牛における全身性AA アミロイドーシスの頻度は約 5%であり、従来の報告の 0.4-2.7%に比較して高かったことも注目に値する。公的屠殺場で処理されている高齢牛における AA アミロイドーシスの頻度が予想以上に高かったことは，ヒトの食の安全を確保する上でもこうした病態の解明の必要性を示している。

1935 年より 2004 年 6 月までに死亡したチーター346 頭を疫学的に、１９９４年以降に死亡した 72 頭について病理学に検索した。チーター68 頭中 61 頭（89.7%）という極めて高頻度にアミロイド沈着を認めた。分布は腎臓、肝臓、消化管、脾臓、膵臓、副腎、心臓、肺臓、舌など、ほぼ全身性諸臓器に種々の程度であった。多頭飼育由来の若齢で死亡する個体で著しく高い。このように高頻度で，飼育環境に依存した動物のアミロイド沈着症は他になく，AA アミロイドーシスの発症機序の解明に有用な疾患モデル動物になると考えられる。

解放飼育されているハクチョウを主とした水禽類でも，死亡したもので高齢のものではほぼ全例に AA アミロイドの沈着を認めた。

２）　アミロイドーシスの発症機序について

内木らは、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。反応速度論的解析結果のもとに、Aβ蛋白質と fAβからなる生体反応系の部分的なモデル化を試みた。これにより、各種生体分子の反応性の差がアミロイド線維の形成・沈着に及ぼす影響を包括的なシステムとして解析し、重要な影響を及ぼす生体分子を特定すると共に、それらの反応機構を解明できると考える。

東海林らは，アミロイドーシスの一病型でもある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成している。Aβ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。また，Aβオリゴマーがアルツハイマー病の病態惹起分子種であることを示唆し，変性Aβダイマーに特異的な抗体を得て，現在予測診断法および抗体療法について検討中である。

田平らは，Aβ分泌リコンビナントアデノウイルス随伴ウイルスベクターを作製し，経口投与腸管免疫によるアルツハイマー病のワクチン療法について検討し，APP トランスジェニックマウスでは，６ヶ月にわたり，強い副作用もなく抗体価を維持し，組織学的にも，アミロイド沈着・老人斑形成の軽減を認めた。

加藤らは，酵母をモデル生物として、アミロイド型蛋白質を分泌するシステムを用いて、アミロイドーシスの分子機構を調べた。この結果、分子シャペロンの機能低下により、アミロイド型タンパク質の品質管理が抑制され、細胞外に分泌しやすくなることが証明された。また、酵母発現系を用

いて、アミロイド凝集体形成を経時的に調査できることが示され、アミロイド抑制成分の検索に有効な手段となるであろう。

透析アミロイドーシスの発症因子の解明や、治療・予防法の開発のためにはモデル動物が必要であるが、まだ存在していない。そこで樋口らは，透析アミロイドーシスのモデルマウスとしてヒトβ2-microglobulin (β2M)トランスジェニックマウスを作成し、β2M ノックアウトマウスとの交雑を行い、$h\beta2M^{+/+}/m\beta2m^{-/-}$ マウスを作成した。この$h\beta2M^{+/+}/m\beta2m^{-/-}$マウスは透析患者の数倍の血清β2M 濃度を示し、アミロイド沈着機構の解析、透析アミロイドーシスの治療・予防法の検証に貴重なモデル動物と考える。

前田らは，アミロイド共存蛋白の一つである SAP ノックアウトマウスを作製し，他のアミロイドモデルマウスとの交雑を行い，種々のアミロイドーシス症例で沈着する異なるアミロイドに共通の微量成分、SAP がアミロイドの沈着を促進することを示唆した。また，APP トランスジェニックマウスと無 TTR マウスの交雑により，TTR が Aβの沈着を促進することを in vivo で示した。

3） アミロイドーシスの発症促進（伝播）について

松井らは，ウサギの伝達・誘発実験で、ウシアミロイドを腹腔あるいは静脈内投与後 FCA, AgNO3, LPS およびカゼインなどで炎症刺激を行ったウサギで約 20%（14/64 匹）にアミロイドが発生した。LPS を連続投与後、アミロイドを腹腔内投与し、さらに LPS を連続投与した群では 100%（12/12）のウサギにアミロイドーシスの発症がみられた。アミロイドを静脈内投与後、FCA とカゼインを連続接種したヤギで 50%（2/4 匹）にアミロイドを認めた。ウシのアミロイドがマウス以外の動物にも伝達可能であることが示唆された。

チーター由来のアミロイドを炎症刺激下のマウスに腹腔内に投与することにより 75%にアミロイド沈着を認めた。

マウスアミロイド沈着臓器を健常マウスに移入することにより、アミロイドーシス発症促進効果がみられた。ウシアミロイド線維またはウシアミロイド肝臓ホモジネートを投与すことで、マウスでのアミロイドーシス発症促進効果がみられ、アミロイド線維の含有量からみれば、肝臓ホモジネートはアミロイドーシス発症促進効果が強くみられた。オートクレーブまたは高濃度の NaOH でのアミロイド線維前処理でアミロイドーシス発症促進効果が消失した。アミロイド線維で免疫したマウスではアミロイドーシス発症促進効果はみられなかった。十分量の抗 IL-6 抗体を持続的に投与すると、実験的 AA アミロイドーシスの発症抑制効果がみられた。Triptolide は実験的 AA アミロイドーシスの発症を濃度依存性に抑制することができた。

マウスを用いた実験的 AA アミロイドーシスでは本疾患が個体間で伝播する可能性が指摘され、その原因として罹患マウスの糞便中に排泄された AA アミロイド細線維を他の健常マウスが経口的に摂取することが重視されている。

マウス老化アミロイドーシスではアミロイド線維による伝播が観察される。(Xing Y, Higuchi K. J Biol Chem. 2002). 伝播の実態

とメカニズムをより詳細に理解するために、母子間の伝播について解析した。アミロイドーシスを発症している母マウスが出産し、保育した仔マウスにはアミロイドーシスの促進が認められる。正常母から産まれてアミロイドーシス発症母マウスに育てられたマウスでのみアミロイド沈着が促進した事実やアミロイドーシス発症母マウスのミルクの腹腔内投与がアミロイド沈着を促進した結果は、母子間のアミロイドーシスの伝播にはミルクが関与する可能性を強く示唆している。

これらの結果は国際学会等で発表し、現在論文投稿中である。(Korenaga 他)

各種アミロイドーシスの病的要素の検索、特にアミロイド線維による伝播の可能性の解析には適切なモデル動物の開発が必須である。我々は既に家族性アミロイドポリニューロパチ(FAP)のモデルマウスを用いて伝播性の検討を始めている (Wei L, Higuchi K, Maeda S. Amyloid 2004)。

(倫理面への配慮)

本研究結果を公表する際には世間における無用な不安を惹起しないよう、関係機関と十分協議して行う。動物実験は各動物実験施設の動物実験倫理委員会の承認を得て行っている。

3. 結論

1) 食物からのアミロイドの伝播という観点から，動物のアミロイドについても検討し，高齢牛では約５％，チーターでは約９０％，水禽類でも高頻度にアミロイドを認め，いずれも AA アミロイドーシスであった。

2) アミロイドの線維伸長機序が一次反応速度論に一致することを示し，共存蛋白等としてアミロイド沈着に関する各種生体分子の検討システムを開発した。

3) アルツハイマー病における病因としての Aβオリゴマー，ダイマーの関与を示し，Aβのワクチン療法についても検討を加え，実用性を示した。

4) TTR, APP, SAP, Aβ2M, 等の各種トランスジェニックモデルマウスを開発し，それらを利用した発症機序の検討を行い，共存物質としての TTR や SAP の重要性を示した。

5) 治療法として，Aβのワクチン療法，メラトニン，Triptolide 等が有力であることを示した。

6) アミロイドの発症促進効果の伝播については，各種異種アミロイドを炎症刺激下の動物に，経静脈，腹腔内および経口投与することで，発症が促進されることが確認され，これは用量依存性であることが示唆された。また母子間では，母乳からの移行も示唆された。

7) 発症促進効果は，線維自体でなく，それを含む臓器の導入によっても認め，その効果の消失には，線維のオートクレーブや強アルカリによる処理よって得られた。

8) アミロイドーシスの治療法・病態の解明とともに，線維の摂取による発症促進作用についてのさらなる詳細な検討が必要と考えられた。

4. 健康危険情報

ただちに健康危険情報となるものではないが、マウス AApoAII アミロイドー

シスや AA アミロイドーシスでは異種のアミロイド線維投与でアミロイドーシスの発症促進効果が観察され、ヒトアミロイドーシスでも同様なことが起りうるのか？慎重な検討が必要と考える。

５．研究発表

１）国内

口答発表　　１２５件

原著論文による発表　　８件

それ以外（レビュー等）の発表　６９件

そのうち主なもの

論文発表

Ueno T, Hoshii Y, Cui D, Kawano H, Gondo T, Takahashi M, Ishihara T. Immunohistochemical study of cytokeratins in amyloid deposits associated with squamous cell carcinoma and dysplasia in the oral cavity, pharynx, and larynx. Pathol Int 53(5):265-269,2003

Cui D, Kawano H, Takahashi M, Hoshii Y, Setoguchi M, Gondo T, Ishihara T.Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. Pathol Int 2002;52:40-45.樋口京一、付笑影・老化アミロイドーシス・基礎老化研究・28(4): 7-13・2004

樋口京一・アミロイドーシスの伝播機構。『細胞における蛋白質の一生』（小椋　光、遠藤斗志也、森　正敬、吉田賢右編）　pp1101-1104, 蛋白質核酸酵素増刊　共立出版、2004

樋口京一・アミロイドーシスと伝播。『アミロイドーシスの基礎と臨床』（池田修一編）金原出版（東京）　印刷中　・2005

佐藤勝哉，安田純子，片桐誠二，中村菊保，山田学，旭節夫，加藤満年，山中進吾．採卵鶏群に発生したアミロイド症の病理．鶏病研究会報．39(1), 38－42．2003.

Kato, G., Maeda, S.: Production of mouse ES cells homozygous for Cdk5-phosphorylated site mutation in c-*src* alleles. J Biochem, 133 (5), 563-569, 2003.

学会発表

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)

樋口京一・ 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)

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)

加藤昭夫・日本農芸化学会 2004 年度大会シンポジウム“小胞体膜結合シャペロンの機能低下はアミロイド型タンパク質の分泌を促進する”

中村菊保，早稲田万大，山本佑，山田学，中澤宗生，秦英司，寺崎敏明．採卵用成鶏におけるアミロイド症を伴う鶏痘による増殖性壊死性皮膚炎の病理．第139回日本獣医学会学術集会（平成17年春）．

小谷百合、古賀真昭、堀内雅之、古林与志安、松井高峯・第138回日本獣医学会(2004年9月10-12日於札幌)・ウシ由来アミロイド投与によるウサギにおける実験的アミロイドーシス

Maeda, S., Kanba, S., Ishihara, T., Shoji, M., Sakashita, N., Ando, Y., Yamamura, K.: Study on the Molecular Bases of Familial Amyloidotic Polyneuropathy by the Use of Genetically Altered Mice. The 5th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders & The 4th International Workshop on

Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy, Matsumoto, Japan, September 24-27, 2002.

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

Tojo K, Tokuda T, Hoshii Y, Fu X, Higuchi K, Matsui T, Ikeda S: Unexpected high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. In International Symposium Prion Diseases, Sendai, Japan. October 31-November 2, 2004.

東海林幹夫，Alzheimer 病の疾患マーカー及び画像診断，第 45 回　日本神経学会総会シンポジウム，2004

2) 海外

口答発表　３６件

原著論文による発表　１０５件

それ以外（レビュー等）の発表　１４件

そのうち主なもの

論文発表

Naohiro Sakata,Yoshinobu Hoshii, Tomomi Nakamura, Makiko Kiyama, Hirofumi Arai, Masatoshi Omoto, Mitsunori Morimatsu, Tokuhiro Ishihara : Colocalization of Apolipoprotein AII in various kinds of systemic amyloidosis. J Hischem Cytochem 53:1-6, 2005

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. J Lipid Res. 44: 762-769, 2003

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.

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 563: 179-184. 2004

Korenaga T, Fu X, Xing Y, Matsusita 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. 164: 1597-1606. 2004.

Y. Song, H. Azakami, B. Shamima , J. He, A. Kato: Differnet effects of calnexin deletion in Saccharomyces cerevisiae on the secretion of two types glycosylated amyloidogenic lysozymes. FEBS Letters, 512, 213-217 (2002)

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.

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 Ther, 11 (10), 838-846, 2004.

Wei, L., Kawano, H., Fu, X., Cui, D., Ito, S., Yamamura, K., Ishihara, T., Tokuda, T., Higuchi, K., Maeda, S.: Deposition of transthyretin amyloid is not accelerated by the same amyloid in vivo. Amyloid: J.

Protein Folding Disord, 11 (2), 113-120, 2004.

Tamaoki, T., Tezuka, H., Okada, Y., Ito, S., Shimura, H., Sakamoto, M., Endo, T., Ozaki, Y., Kanba, S., Maeda, S.: Avoiding the effect of linked genes is crucial to elucidate the role of Apcs in autoimmunity. Nat Med, in press.

Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin L, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH and Younkin SG, Dimeric Aβ Rapidly Accumulates in Lipid Rafts Followed by ApoE and Phosphorylated Tau as Memory is Impaired in the Tg2576 Mouse Model of *Alzheimer's* Disease. Journal of Neuroscience 24(15): 3801-9, 2004

Matsubara 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. Journal of Neurochemistry 85: 1101~1108, 2003

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 55: 439-42, 2004

Matsubara E, Sekijima Y, Tokuda T, Urakami K, Amari M, Shizuka-Ikeda M, Tomidokoro Y, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Ikeda S, Murakami T, Abe K, Otomo E, Hirai S, Frangione B, Ghiso J, Shoji M, Soluble Aβ homeostasis in AD and DS: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins. Neurobiology of Aging 25(7):833-41, 2004

学会発表

Sawashita J, Zhang H, Korenaga T, Higuchi K. The inhibitive effects of extrasomatic treatments and medical reagents to the transmission of amyloid fibril on mouse senile amyloidosis. . Xth International Symposium on Amyloidosis. April 18-22, 2004 Tours, France

Korenaga T, Fu X, Mori M, Sawashita J, Naiki H, Matsushita T, Higuchi K. Transmission of mouse AApoAII amyloidosis from mother to pups. Xth International Symposium on Amyloidosis. April 18-22, 2004 Tours, France

Higuchi K. Transmission of mouse senile amyloidosis. 1st Italian-Japanese workshop, Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies. December 9-13, 2004 Pavia. Italy

Kawano MM: Growth mechanism of human myeloma cells by interleukin-6. Scientific Sessions. S17. Multiple Myeloma. The 29th Wolrd Congress of the International Society of Hematology, Seoul, 2002.

Maeda, S., Kanba, S., Arita, J., Ando, Y., Gottesman, M.E., Tohyama, C.: What lessons to learn from the rodent models carrying targeted mutations at the TTR locus? First International Symposium on Transthyretin in Health and Disease, Strasbourg, France, April 22-25, 2002

Shoji M, Soluble Aβ homeostasis in Alzheimer's disease and Down syndrome: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins, IANA International Symposium Octorber 1, 2004, Tokyo

6．知的所有権の出願・取得状況

1) 特許取得

平成１４年　３月　Lewy 小体を再現する変異 α -synuclein トランスジェニックマウス

（特許出願中：特願 2002-001229）

平成１５年　９月　抗 Aβ特異抗体による脳アミロイドーシスの治療と診断（特許出願中：特願 2003-317443）

2)　実用新案登録

なし

3)　その他

なし

平成１６年度

分担研究報告

目　　次

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 …… 21
ーバイカレインの骨髄腫細胞に及ぼす作用についてー
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、大津山賢一郎
劉　尚勤、馬　梓

酵母をモデル生物としたアミロイド型タンパク質の品質管理機構の解析
ー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— …… 27
山口大学農学部生物機能科学科　加藤昭夫、阿座上弘行、何剣為、植山宣博

腸管免疫によるアルツハイマー病のワクチン療法の開発 …… 34
国立長寿医療センター研究所　田平　武
同 血管性痴呆研究部　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に関する研究：
遺伝性アルツハイマー病モデルマウスを用いた解析 …… 40
山梨大学・大学院・医学工学総合研究部・生化学　前田秀一郎、Henny Wati、河西あゆみ
伊藤禎洋
信州大学大学院・医学研究科加齢生物学　Xiaoying Fu、樋口京一
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

アルツハイマー病態惹起分子Aβ オリゴマーの検証 …… 44
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

本邦高齢牛における全身性AA-アミロイドーシスと骨格筋病変に関する研究 …… 48
信州大学医学部第三内科　池田修一、東城加奈、吉田拓弘
徳田隆彦、松田正之
信州大学医学部加齢適応脈管病態　樋口京一
山口大学医学部構造制御病態学講座　星井嘉信
帯広畜産大学獣医学部家畜病理　松井高峯

牛アミロイドのウサギとヤギへの伝達実験 …… 51
帯広畜産大学病態獣医学講座　小谷百合、堀内雅之、古林与志安
古賀真昭、松井高峯

家畜におけるアミロイド症の発生頻度の調査及び病理学的検討 …… 52
（独）動物衛生研究所病態病理研究室　山田学、中村菊保、山本佑
帯広畜産大学家畜病理学教室　古林与志安、松井高峯

チーター(*Acinonyx jubatus*)由来アミロイドの伝達性に関する研究 …… 54
麻布大学獣医学部病理学研究室　宇根有美、勝山悠子、奥田裕也、山本諭
小座間裕紀、伊藤亜紀子
アドベンチャーワールド　伊藤修
群馬サファリパーク　川上茂久

アルツハイマー病βアミロイド線維およびAβ蛋白に対する各種生体分子の親和性の定量的解析（その２）
—伝播機構解析の為の基礎的検討— …… 57
福井大学医学部医学科病因病態医学講座分子病理学領域　内木宏延、長谷川一浩

トリアミロイド-シスの発症頻度とトリアミロイド線維投与による
AAアミロイドーシス発症促進効果に関する調査およびAAアミロイド-シス治療法の検討 …… 61
山口大学医学部病理学第一講座　石原得博、河野裕夫、崔　丹、星井嘉信
小野咲弥子
同 脳神経病態学講座　尾本雅俊

モデル動物を用いたFAPおよび透析アミロイドーシス発症機構の解析 …… 68
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、Zhang Huanyu、厳景民
是永龍巳、葛鳳華、Zhang Beiru、森政之
澤下仁子

厚生科学研究費補助金　（特定疾患対策克服研究事業）
アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究　分担研究報告書

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
ーバイカレインの骨髄腫細胞に及ぼす作用についてー

分担研究者　河野 道生
山口大学・大学院医学研究科・生体シグナル解析医学講座
共同研究者　石川 秀明、大津山　賢一郎、劉　尚勤、馬　梓
山口大学・大学院医学研究科・生体シグナル解析医学講座

研究要旨　ALアミロイドーシスの背景には形質細胞の単クローン性増殖がある。その増殖を抑制し得る因子を明らかにするべく、本年度は抗炎症作用を示す漢方薬の中から黄芩を選別した。更に、その成分であるバイカレインのin vitro作用に加えてin vivo系での有効性を検討した。バイカレインは確かに骨髄腫細胞株に加えてALアミロイドーシスを含む骨髄腫患者の骨髄腫細胞のin vitro増殖・生存を抑制することを確認した。その抑制作用はNF-kB活性の抑制によるものと考えられた。バイカレインは、SCID-hIL6 Tg miceを使用したin vivo系においても骨髄腫細胞株の移植・生存を著明に抑制した。従って、バイカレインおよびバイカレインを含む黄芩は、ALアミロイドーシスにおける形質細胞の増殖を抑制し得る有効な因子と考えられる。

A. 研究目的

ALアミロイド-シスを惹起する骨髄腫細胞のin vivo増殖を調節し得る因子を明らかにして，アミロイド沈着の惹起を予防しようとするものである。本年度は抗炎症作用の強い漢方薬の中から骨髄腫細胞のin vitro増殖を強く抑制する黄芩に注目した。特に，その成分であるバイカレインのin vitro作用とともにin vivo頸での骨髄腫細胞の生存抑制作用を検討した。

B. 研究方法

1．バイカレインのin vitro作用

1）骨髄腫細胞株U266, NOP-2, ILKM3等をバイカレイン、バイカリンあるいはウオゴニンの種々の濃度で添加培養して、生存細胞数をフローサイトメーターで測定した。2）ALアミロイドーシス患者を含む骨髄腫患者9症例からの骨髄腫細胞に対する増殖・生存に及ぼす作用を同様に検討した。3）骨髄腫細胞株において、バイカレイン添加によるNF-kB活性への作用を検討した。PPARβ発現、IkBαのリン酸化、NF-kB標的遺伝子IL-6,XIAP mRNA発現およびNF-kB(p65)の核内移行

を解析した。

2．バイカレインの in vivo 系での作用：SCID-hIL6 Tg mice の腹腔内へ骨髄腫細胞株 U266 を移植生存させる系において、移植時、その後週 1 回で 3 週間、バイカレイン(10 μg)をマウス皮下注射して、その効果を約 6～8 週後に移植の可否、増殖・腫瘍塊の程度を観察した。

C. 研究結果

漢方薬黄芩の成分であるバイカレインは、in vitro 系で強く骨髄腫患者の骨髄腫細胞の増殖・生存を抑制した。特に、未熟型(MPC-1-)骨髄腫細胞の増殖・生存を抑制した。骨髄腫細胞株の検討では、バイカレインは PPARβ 発現を亢進させ、IkBα のリン酸化を抑制し、その結果として NF-kB(p65)の核移行を抑制し、NF-kB 活性は抑制された。NF-kB の標的遺伝子である IL-6, XIAP の発現は抑制された。ミトコンドリアからのサイトクローム C の遊離の亢進、Caspase9 および 3 の活性化を確認した。

SCID-hIL6 Tg mice を使用した骨髄腫細胞株の腹腔内移植系において、バイカレイン注射はその移植生着、腫瘍塊形成を著明に抑制し得た。

D. 考察

骨髄腫細胞の増殖・生存を抑制し得るものとして、抗炎症作用のある漢方薬の中から黄芩が選別された。黄芩
レインにその作用が強く、AL アミロイドーシスを含む骨髄腫患者からの骨髄腫細胞で強く増殖・生存を抑制することが確認された。その作用としては、結果として NF-kB 活性を抑制することが明らかとなった。しかし、バイカレインのような低分子は多岐にわたる生物活性を示す可能性があり、今後詳細な作用機序の解明が必要である。

バイカレインは in vivo 系でも著明な増殖・生存の抑制効果を示した。このことは、AL アミロイドーシスにおける形質細胞の増殖を抑制する上でも極めて有効な治療となり得る基盤的な研究成果と考えられる。

E. 結論

1．バイカレインは、in vitro 系で骨髄腫細胞株に加えて AL アミロイドーシスを含む骨髄腫患者からの骨髄腫細胞の増殖・生存を著明に抑制した。
2．バイカレインの増殖・生存の抑制効果は、一つには NF-kB 活性の抑制によると考えられた。
3．バイカレインは、in vivo 系においても骨髄腫細胞株の移植・生存を著明に抑制した。
4．バイカレインおよびバイカレインを含む黄芩は、AL アミロイドーシスの治療薬として有効である可能性を示唆した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, Liu S,

Li F, Otsuyama K, Zheng X, Obata N, Kawano MM: Receptor synergy of interleukin-6(IL-6) and insulin-like growth factor-I in Myeloma cells that highly express IL-6 receptor α.
Blood 103:2291-2298,2004.

2)Li F, Tsuyama N, Ishikawa H, Obata M, Abroun S, Liu S, Otsuyama K, Zheng X, Ma Z, Maki Y, Kawano MM : A rapid translocation of CD45RO but not CD45RA to lipid rafts in IL-6-induced proliferation in Myeloma. Blood (in press)

3) Ma Z, Otsuyama K, Liu S, Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, Obata M, Li F, Zheng X, Maki Y, Miyamoto K, Kawano MM: Baicalein, a component of Scutellaria Radix, identified from Huang-Ling-Jie-Du-Tang (HLJDT), leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human Myeloma cells. Blood (in press)

4) Liu S, Ishikawa H, Li F, Ma Z, Otsuyama K, Asaoku H, Abroun S, Zheng X, Tsuyama N, Obata M, Kawano MM: Dehydroepiandrosterone can inhibit the proliferation of myeloma cells and the interleukin-6 production of bone marrow mononuclear cells from patients with Myeloma. Cancer Research (in press)

2. 学会発表

1) Kawano MM: Heterogenous expression of CD45 on myeloma cells and its biological significance. (invited speaker) Multiple Myeloma 2004, Torino, Italy, April 22-24, 2004.

2) 大津山賢一郎、劉 尚勤、馬 梓、李 富君、Saeid Abroun, 鄭 旭、槇 泰子、津山尚宏、小幡雅則、石川秀明、河野道生: DHEA ホルモンの骨髄腫細胞増殖および IL-6 産生に及ぼす作用について 第 66 回日本血液学会総会、京都、2004 年 9 月 18 日

3) 李 富君、津山尚宏、石川秀明、小幡雅則、Saeid Abroun、劉 尚勤、大津山賢一郎、鄭 旭、馬 梓、槇 泰子、河野道生: 骨髄腫細胞株では CD45 分子は IL-6 刺激により脂質ラフトに移行する。第 66 回日本血液学会総会、京都、2004 年 9 月 18 日

4) 劉 尚勤、石川秀明、津山尚宏、李 富君、Saeid Abroun、大津山賢一郎、鄭 旭、馬 梓、槇 泰子、小幡雅則、河野道生: 骨髄腫細胞のアポトーシス感受性を制御する CD45 と VDAC-1 の発現亢進 第 66 回日本血液学会総会、京都、2004 年 9 月 18 日

5) 馬 梓、劉 尚勤、大津山賢一郎、Saeid Abroun、李 富君、鄭 旭、槇 泰子、津山尚宏、小幡雅則、石川秀明、河野道生: 黄連解毒湯及びその構成物質バイカレインによる骨髄腫細胞増殖に及ぼす作用について 第66回日本血液学会総会、京都、2004年9月 18 日

6) Li F, Tsuyama N, Ishikawa H, Obata M, Abroun S, Liu S, Otsuyama K, Zheng X, Ma Z, Maki Y, Kawano MM: IL-6–induced CD45RO, RB translocation to lipid rafts in Myeloma cells. 46th Annual meeting of American Society of Hematology, San Diego, IU.S.A., Dec.4-7, 2004.

7) Liu S, Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Ma Z, Maki Y,

Obata M, Kawano MM: CD45 defines signaling thresholds critical for proliferation and apoptosis in Myeloma cells. 46th Annual meeting of American Society of Hematology, San Diego, IU.S.A., Dec.4-7, 2004.

8) Otsuyama K, Ma Z, Liu S, Li F, Abroun S, Zheng X, Maki Y, Tsuyama N, Obata M, Ishikawa H, Kawano MM: DHEA can inhibit the proliferation of myeloma cells and the IL-6 production of mone marrow mononuclear cells from the myeloma patients. 46th Annual meeting of American Society of Hematology, San Diego, IU.S.A., Dec.4-7, 2004.

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