

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

総合研究報告書

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

総合研究報告書

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

平成 17(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

総合研究報告	5
総合分担報告	17
研究班班員名簿	97
研究成果の刊行に関する一覧表	101

アミロイド沈着による
病的要素の検索に関する研究

総合研究報告

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）総合総括研究報告

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命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A β 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。

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 β 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し得る。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られた。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、A β 蛋白質とfA β 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。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。また、A β 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A β 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、A β 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 $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2M$)トランスジェニックマウスを作成し、 $\beta 2M$ ノックアウトマウスとの交雑を行い、 $h\beta 2M^{+/+}/m\beta 2m^{-/-}$ マウスを作成した。この $h\beta 2M^{+/+}/m\beta 2m^{-/-}$ マウスは透析患者の数倍の血清 $\beta 2M$ 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 A β 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ることで、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A β オリゴマー、ダイマーの関与を示し、A β 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, A β 2M, 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、A β 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によって得られた。

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, Tokuhiko Ishihara : Colocalization of Apolipoprotein AII in various kinds of systemic amyloidosis. *J Histochem Cytochem* 53:1-6, 2005

Umezawa M, Tatematsu K, Korenaga T, Fu X, Matsushita 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, Matsushita T, Kuramoto K, Syumiyama 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: Different 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 Apc 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 A β 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 A β homeostasis in AD and DS: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins. Neurobiology of Aging 25(7):833-41, 2004

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 World 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 A β homeostasis in Alzheimer's disease and Down syndrome: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins, IANA International Symposium October 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 A β 特異抗体による脳
アミロイドシスの治療と診断 (特許出願
中：特願 2003-317443)

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

総合分担研究報告

目 次

外来性アミロイド線維によるアミロイド発症促進効果についての検討 およびAA アミロイド-シス治療法の検討	21
山口大学医学部構造制御病態学講座	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
AB の脳アミロイドーシス形成における病的要素の検討	31
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
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	36
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
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
信州大学大学院医学研究科加齢生物学	Xiaoying Fu、樋口京一
山梨大学大学院医学工学総合研究部精神神経科学	玉置寿男
信州大学医学部第三内科学	徳田隆彦
山口大学医学部構造制御病態学	河野裕夫、石原得博
モデル動物を用いたアミロイドーシス伝播機構の解析	43
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、Zhang Huanyu 葛鳳華、Zhang Beiru、澤下仁子、森政之
信州大学医学部第3内科	徳田隆彦、池田修一
福井大学医学部病理学	内木宏延
山梨大学大学院医学工学総合研究部	前田秀一郎
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	51
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

牛アミロイドーシスの発生状況、病変分布と伝達実験	54
帯広畜産大学畜産学部獣医学科	松井高峯、古林与志安
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	55
-NF-kB 活性を抑制し、PPAR 活性を上昇させる薬剤の有用性-	
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	62
-酵母発現系でのアミロイド型リゾチーム、シスタチンの発現分泌-	
山口大学農学部生物機能科学科	加藤昭夫、阿座上弘行
アルツハイマー病 β アミロイド線維およびA β 蛋白に対する各種生体分子の親和性の定量的解析	69
-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、小野賢二郎
金沢大学神経内科	山田正仁
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	75
(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、山本佑
帯広畜産大学畜産学部獣医学科	古林与志安、松井高峯
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	78
国立長寿医療センター研究所	田平武
同 研究所血管性痴呆研究部	原英夫
飼育下チーター(<i>Acinonyx jubatus</i>)のAAアミロイド症に関する研究	86
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

外来性アミロイド線維による
アミロイド発症促進効果についての検討
および
AA アミロイドーシス治療法の検討

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 河野裕夫¹、崔丹¹、星井嘉信¹、小野咲弥子¹、尾本雅俊²

1. 山口大学医学部 構造制御病態学講座（旧病理学第一講座）
2. 山口大学医学部 脳神経病態学講座（旧神経内科学講座）

研究要旨

ウシ AA アミロイド線維によるマウス反応性 AA アミロイドーシスの発症促進効果「構造の伝播」が容量依存性であることを確認し、アミロイド沈着臓器自体の移入でも発症促進効果があることを示した。アミロイド線維の発症促進効果は、線維のオートクレーブや強アルカリによる処理等の過酷な条件で消失した。アミロイド線維の免疫による前処理の効果を示した。反応性 AA アミロイドーシスの治療法として抗 IL-6 抗体療法および Triptolide (C₂₀H₄₀O₆、雷公藤) の可能性を示した。鳥のアミロイドーシスの頻度が決して低くない可能性を示し、鳥のアミロイド線維でも、アミロイドーシス発症促進効果がある事を示した。

研究目的

1、最近、アミロイドーシスの発症機序において、prion 病に見られる様な外来アミロイド線維によるアミロイドーシス発症促進効果「構造の伝播」が示されている。アミロイドーシス罹患動物が食材として使われたり、臓器移植においてアミロイド

が外来性に供給される等の可能性があり、これら発症促進効果の詳細な検討が必要である。さらに、アミロイド線維の発症促進効果 (AEF 効果) を失活させる条件の検討を行う。2、また、反応性 AA アミロイドーシスは慢性炎症疾患患者の合併症として発症することが知られているが現段

階では AA アミロイドーシスに対して、原疾患の治療以外に確立した治療法がなく、その開発が望まれている。そこで、AA アミロイド蛋白の前駆体である SAA の肝細胞での合成を高めるサイトカインの内、interleukin 6 (IL-6) の阻害による治療法の可能性を検討する。また、漢方薬 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. は中国、台湾に広く分布し、中国では慢性関節リウマチの治療薬や全身性エリテマトーデス (SLE) などの免疫疾患の治療薬として繁用されている。その精製品の Triptolide の抗アミロイド効果を検討する。

3. 我々が、外来性にアミロイド線維を接種する可能性として、アミロイドーシスに罹患した動物の食肉の摂取の可能性があり、ウシについては検討されつつあるが、ニワトリをはじめとする鳥類のアミロイドーシスについては詳細な報告がなく、今回われわれはハクチョウを中心に水鳥のアミロイドーシス発症頻度、アミロイド線維の性質などを調べる目的で、調査を行う。

研究方法及び結果

1. ウシ AA アミロイド沈着肝臓の homogenate と粗抽出ウシアミロイド線維によるアミロイドーシス発症促進効果の比較検討: ウシ AA アミロイド沈着肝臓の homogenate または粗抽出アミロイド線維を、濃度を変えてマウスの腹腔内または経

口投与を行い、同時に炎症刺激を与えた。容量依存性に発症効果が高まり、経口投与の場合、いずれもアミロイド線維量 5mg 以下でアミロイドーシス発症促進効果が消失した。腹腔内投与の場合: 0.312mg のアミロイド線維ではわずかにアミロイドーシス促進効果が残り、同量の肝臓 homogenate では発症促進効果は認めなかった。(図1)

2. アミロイド沈着臓器の移入(移植)による発症促進効果: a) AA アミロイド沈着組織片を健常マウス肝臓に移入し、炎症刺激を与えると、一週間で脾臓に AA アミロイドの沈着が見られた。b) AApoA II アミロイド沈着組織片を肝臓に移入すると、炎症刺激なしに、12週で AApoA II アミロイドの沈着がみられた。さらに、この時点で炎症刺激をすると、AA と AApoA II の両タイプのアミロイドが同一個体で沈着した。

3. ヒトアミロイド線維による Amyloid enhancing factor 効果の抑制方法の検討: ヒト甲状腺髄様癌組織より水抽出した AA アミロイド線維に対して、等の処理を行い、オートクレーブ処理 (132℃ 60分 1.2気圧 (プリオン不活性化条件))、NaOH で 1時間処理、塩酸グアニジンで処理、これを ICR マウス (♀) の腹腔内注射した後に、皮下にカゼインアジュバントを注射して脾のアミロイド沈着を調べた。AA アミロイド線維を 2回マウスの皮下組織に免疫

前処理し、アミロイド発症刺激を加えアミロイドーシス発症を調べた。

結果として、アミロイド線維へのオートクレープ処理により F-AEF (Fibril - Amyloid enhancing factor) 活性は抑制された。低濃度 NaOH 処理では、F-AEF 抑制は認められなかった。塩酸グアニジン処理をしたアミロイド線維の皮下投与による免疫は、強い F-AEF 抑制が認められた。

4. AA アミロイドーシス発症における IL-6 の関与について： a) IL-6 ノックアウトマウスに反応性 AA アミロイドーシスの発症炎症刺激を加えて、IL-6 ノックアウトマウスでは、実験的 AA アミロイドーシスは発症しないことを確認した。(表 1) b) アミロイドーシス発症刺激下のマウスに抗 IL-6 抗体を投与するとアミロイドーシス発症抑制効果がみられた。(表 2) これらの個体では、血清 SAA 濃度は低下していたが、血清 IL-6 濃度は逆に上昇していた。

5. Triptolide による、実験的マウス AA アミロイドーシスにおける発症抑制効果：マウスに体重あたり 480、360、240、120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の Triptolide を腹腔内に投与し、アミロイド発症炎症刺激を加え、アミロイド沈着の有無を確認した。240、120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の Triptolide を投与した群のマウスではごく少数の個体にごく微量のアミロイドの沈着がみられ、480、360 $\mu\text{g}/\text{kg}$

の Triptolide を投与した群ではマウスにアミロイドの発症がみられなかった。屠殺の時点で Triptolide を投与した群では血清 SAA の上昇が明らかに抑制され、血清 IL-6 の上昇は認めなかった。

6. トリアミロイドーシスの発症頻度およびアミロイド蛋白の検討：公園で死亡した白鳥を中心に鳥類を解剖した。鳥のアミロイドーシスの発症頻度が表 3 にまとめられている。ハクチョウのアミロイド線維を SDS-PAGE で分離すると、14.4 kDa の明瞭なバンドがみられ、抗ヒト AA 抗体とよく反応した。ハクチョウアミロイド線維から粗抽出したアミロイド線維によるマウス AA アミロイドーシスの発症促進効果についての検討すると、粗抽出した鳥アミロイド線維をマウスに投与し、同時に炎症刺激を与えた。5 匹中 3 匹のマウスの脾臓にアミロイドの沈着がみられた。鳥アミロイド線維もマウスアミロイドーシス発症促進効果を持つ事が示された。

(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。

考察

近年、アミロイドーシスの発症に、prion 病に類似した、いわゆるタンパク質の「構造の伝播」が基本メカニズムとして関与していると提唱され、多くの研究成果が集積されつつある。しかしながら、現実的に、その発症機序において、この「構造の伝播」の重要性や、治療のターゲットとしての重要性はまだ十分に解明されておらず、さらなる詳細な検討が必要である。

実際に、ヒトが食する食肉中にアミロイド線維が存在する可能性としては、ウシ、ブタ、ニワトリ等が問題となってくる。今回の検討では、AA アミロイドーシス発症の炎症刺激が不可欠ではあるが、ウシアミロイドの摂取でマウス AA アミロイドーシスが容量依存性に発症促進されることがわかり、また、FAP の臓器移植と関連し、アミロイド沈着臓器の移入においても、アミロイドーシスが発症促進されることがわかった。

また、鳥類のアミロイドーシスについて調べたが、17羽のコブハクチョウ中16羽と高頻度にアミロイドの沈着がみられ、抗ヒト AA 抗体と反応した。これまでも、水禽類では、アミロイドの発症頻度が高いことが報告されており、今後さらに検討する必要があると思われる。また、さまざまな種類のアミロイド線維がアミロイドーシスの発症促進効果を有することが報告されているが、今回、トリアミロイド線維につ

いてもマウスアミロイドーシス発症促進効果を持つ事が示された。これら、異種アミロイド蛋白あるいは異動物種のアミロイド蛋白による「構造の伝播」は重要な検討課題である。食肉の調理という観点を考慮し、どのような処理で、AEF (Amyloid enhancing factor) 即ち「構造の伝播」が阻害されるかという検討では、強アルカリあるいはオートクレープ処理などの過酷な条件が必要であることがわかった。また、アミロイド線維による免疫療法の可能性を示した。

IL-6 ノックアウトマウスでは、実験的な反応性 AA アミロイドーシスが発症しないことを示し、アミロイドーシスの抑制には、抗 IL-6 抗体療法が有効である可能性がわかった。Triptolide の投与により実験的 AA アミロイドーシスの発症を抑制することができた。血中の SAA 上昇を抑制することにより AA アミロイドーシスの発症を抑制したと考えられる。これらの治療法については、さらに検討が必要である。

結論

- 1、異種アミロイド線維による反応性 AA アミロイドーシスの発症促進効果を確認し、アミロイド沈着臓器自体の移入でも同様の効果を認めた。
- 2、アミロイド線維の発症促進効果は、線維のオートクレープや強アルカリによる