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。

3、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（C20H4006、雷公籐）の可能性を示した。

4、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。

健康危険情報

なし

研究発表

1）国内

口答発表

10件

原著論文による発表

5件

それ以外（レビュー等）の発表

9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: Accsleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extradcted from different apecies. Pathol Int, 2002, 52: 40-45.

Hoshii Y, Setoguchi M, Ishihara T, et al.:Useful polyclonal antibodies against syntetic peptides corresponding to immunoglobulin ligjt chain constant region for immunohistochemical detection of immunoglobulin light chain amyloidosis. Pathol Int, 2001, 51: 264-270

Matsutani H, Takahashi M, Ishihara T, Hoshii Y, Yokota T, et al : Vascular amyloid of unknown origin and senile TTR amyloid in the lung and gastrointestinal tract of old age: histological and immunohistochemical studeies. Pathol Int, 2001, 51: 257-263.

2) 海外

口答発表

1件

原著論文による発表

12 件

それ以外（レビュー等）の発表

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 A □ in various kinds of systemic amyloidosis. J Hischem Cytochem 53:1-6, 2005

Usui I, Ishihara T, Maeda S, et al. Homozygous serum amyloid P component-deficiency does not enhance regression of AA amyloid deposits. Amyloid: Int J Prot Folding Dis , 2001;8:101-104

Soma M, Ishihara T, Maeda S, et al. Mice lacking serum amyloid P component do not necessarily develop severe autoimmune disease. Biochem Biophys Res Commun , 2001;286:200-205

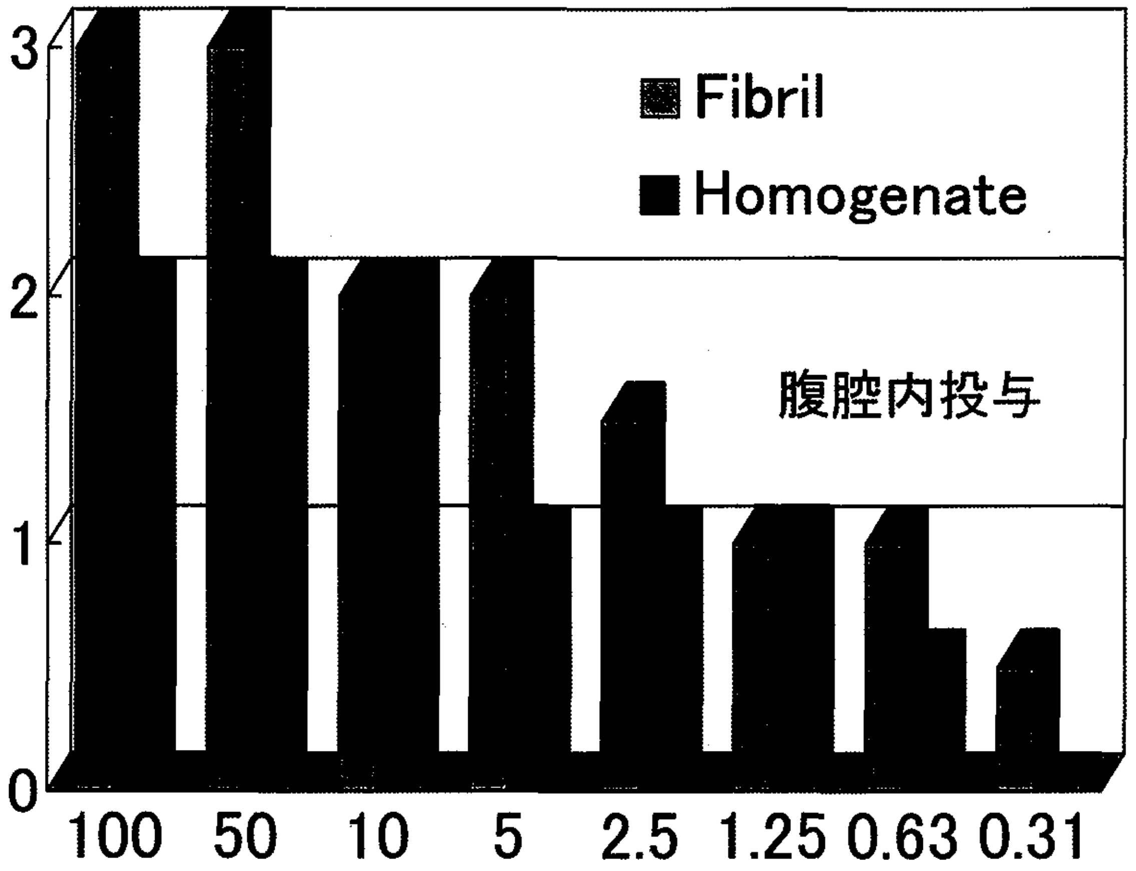
知的所有権の出願・取得状況

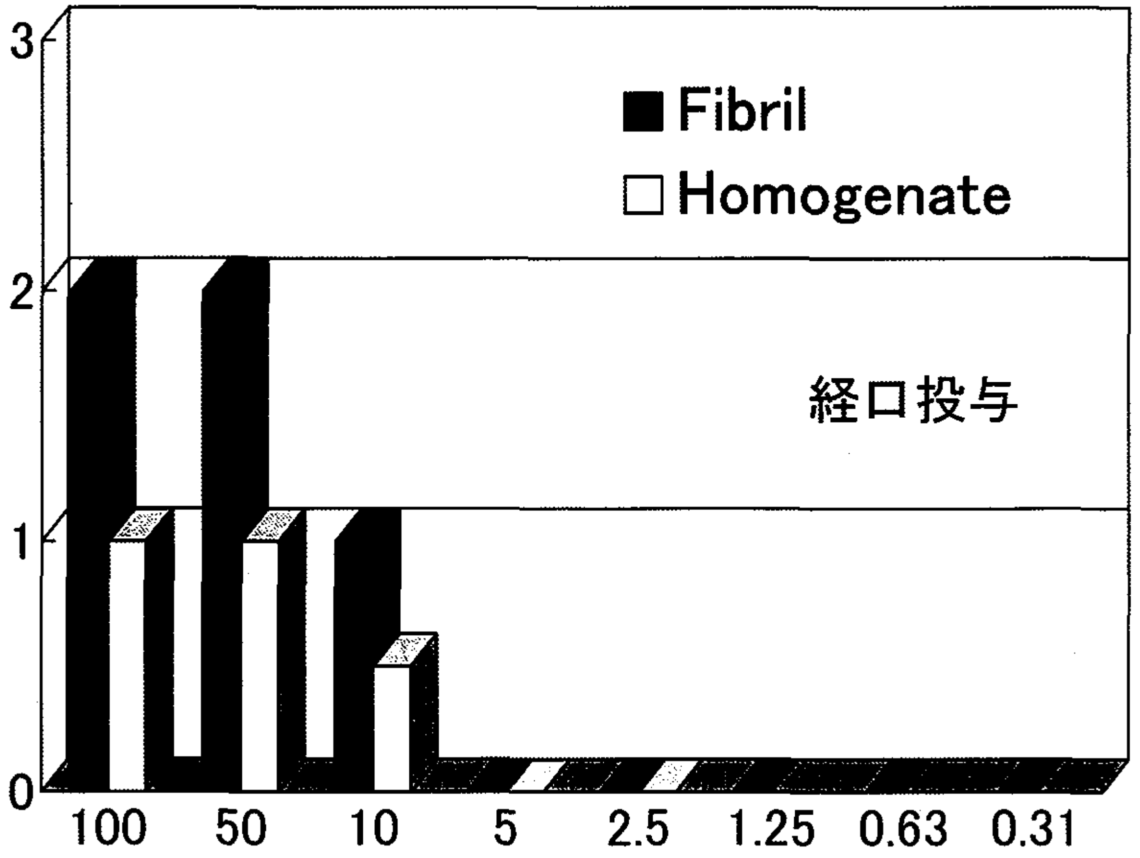
特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

（図1）


3
2
1
0
Fibril
Homogenate
腹腔内投与
100
50
10
5
2.5
1.25
0.63
0.31


3
2
1
0
Fibril
Homogenate
経口投与
100
50
10
5
2.5
1.25
0.63
0.31

（表１）

アミロイド陽性数 / 総数

1群	TG, adjuvant 投与後 10 日	0/29
2群	Control, adjuvant 投与後 10 日	29/29
3群	TG, adjuvant 投与後 7 日	0/6
4群	Control, adjuvant 投与後 7 日	10/15
5群	TG, casein 40 回投与後	0/8
6群	Control, casein 40 回投与後	2/2

TG: IL-6 knockout mouse

（表２）

40ug/ml, 1ml 連日腹腔投

	cont	Ab
0日目	0/3	
1日目	0/3	0/6
3日目	0/3	0/7
5日目	2/3	0/7
7日目	5/5	1/7*

*少量

表3：Triptolide による、実験的マウス AA アミロイドーシスに対する発症抑制効果：

投与した試薬および量	アミロイド沈着頻度および量	
Triptolide 480μg/ kg	0/10	0
Triptolide 360μg/ kg	0/10	0
Triptolide 240μg/ kg	2/10	微量
Triptolide 120μg/ kg	3/10	微量
MTX 1 3. 5μg/ kg	10/10	中等量
生食	10/10	中等量

表4.　トリのアミロイド-シス

	総数	ア数	♂	♀	性別不明	年齢
コブハクチョウ	17 羽	16/17	10/10	4/5	2/2	3 才の 2 羽、他 9 才以上
コクチョウ	1 羽	1/1	1/1			推定 20 歳
クロエリハクチョウ	1 羽	1/1		1/1		不明
コシベニペリカン	1 羽	0/1	0/1			26 歳
アカリュウキュウガモ	1 羽	1/1	1/1			推定 7 歳以上
エジプトガン	1 羽	1/1		1/1		7 歳
アオバト	1 羽	0/1			0/1	幼鳥 (7M)
トビ	1 羽	0/1			0/1	成鳥？
ツグミ	1 羽	0/1		0/1		8 ヶ月 (?)
ツミ	1 羽	0/1	0/1			幼鳥
ノスリ	1 羽	0/1		0/1		成鳥

表５：粗抽出トリアミロイド線維のマウスアミロイド-シスの発症促進効果：

実験群	投与した物質	アミロイド沈着頻度
1 群	トリ肝臓アミロイド線維	3/5
2 群	トリ脾臓アミロイド線維	3/5
3 群	マウスアミロイド線維	5/5
4 群	生食	0/5

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

Aßの脳アミロイドーシス形成における病的要素の検討

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学
共同研究者　松原悦朗、瓦林毅、阿部康二
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

研究要旨　アルツハイマー病(AD)患者脳において脳内リポ蛋白非結合型 amyloid ß(Aß)はダイマー形成能に富み，血液中に存在する同分子種とは質的相違を持った脳内アミロイドーシス惹起分子である．我々は AD 患者脳から抽出した Aß オリゴマーがいったん脳に入ると長期間分解されずに存在し，アミロイド原性に乏しいマウス Aß ペプチドを巻き込みアミロイド形成を促進すること，２）末梢血管投与された Aß ペプチドが脳アミロイド形成に直接関与すること，３）脳アミロイド沈着の超早期蓄積が lipid raft の Aß オリゴマーであり，行動異常や二次的病理変化の誘因となりうること，４）脳アミロイドに対するメラトニン療法の作用点が Aß ダイマーをモノマーに解除して血液中に Aß モノマーを除去すること，５）Aß オリゴマーを特異的に認識する抗体を確立して，モノマー，オリゴマーの分別定量 ELISA の開発を行い，Aß オリゴマーの病的要素と診断・治療法を検討した．

A. 研究目的

AD 患者脳に存在する脳内リポ蛋白非結合型 Aß はダイマー形成能に富み，血液中に存在する Aß モノマーとは質的相違を持ったアミロイドーシス惹起分子であると考えられる．またアルツハイマー病患者脳 Aß オリゴマーはいったんマウス脳に入ると長期間分解されずに存在し，アミロイド原性に乏しいマウス Aß ペプチドを巻き込みアミロイド形成を促進することから，Aß ワクチン療法が逆に老人斑形成を促進する可能性が示唆されている．また，血液中からマウス脳内，特に経静脈的な Aß ペプチドの老人斑への移行が示されている．

Tg2576 脳アミロイドモデルマウスでは行動異常が出現するが脳アミロイドが未だ組織学的に確認されない超早期には Aß オロゴマーが蓄積して，病的カスケードを引き起こすものと考えられている．このように，Aß は脳アミロイドの直接的な誘発因子として注目されているが，最も早期の Aß 凝集と想定される Aß オリゴマーの存在とその病的役割は不明である．本研究では，この３年間に Aß オリゴマーを同定し，その病的役割を明らかにして，診断と治療法を開発した．

B. 研究方法

AD 脳，正常加齢脳より,TBS でホモジェネートを作製し，10 万 g で回収される TBS

可溶性画分を調整し，ゲルろ過法，イムノブロット法，及び ELISA 法を用いて脳内 Aß 分子種を解析した．抽出された AD 脳のギ酸抽出不溶性 Aß を HPLC で分画し，Aß オリゴマー分画を同定した．さらに，この分画を Tg2576 マウスおよび non-TG マウス脳に注入し，脳アミロイドの促進効果を検討した．

12 月齢の Tg2576 の頚静脈より Fluorescein/Biotin 2 重標識 Aß 1-42 (400_g /400_l)を投与した．経静脈投与された Aß 1-42 による老人斑標識の有無を蛍光顕微鏡にて観察した．同切片を biotin 標識化抗体でも標識Aßペプチドの有無を観察した．Tg2576 マウス脳と AD 6 例, 病的老化 2 例, コントロール 2 例を 1% Triton-X-100 を含む MBS buffer で homogenize した． 40%, 38%, 5%の不連続ショ糖勾配を作製して，100,000 g で 19 時間遠心し，1ml ずつ 11 分画を採取し，4 番目の lipid raft 分画を ELISA と Western blotting で検討した．

メラトニンの Tg2576 マウスにおける脳アミロイドの蓄積抑制作用機序を検討するため，24 匹の Tg2576 マウス (メラトニン group)に 4 ヶ月齢から 0.5mg/ml のメラトニンを投与した．対照として 20 匹の無処理 Tg2576 マウスを用いて，それぞれ 8, 9.5, 11, 15.5 ヶ月齢で脳および血液の Aβ40 と Aβ42 を ELISA で測定して比較した．SDS 可溶性不溶性分画に蓄積する Aß オリゴマー量を Western blot で検討した．

オリゴマー化させた Aß 1-42 ペプチドから SDS-PAGE にて分離した Aß 1-42 テトラマーをマウスに免疫し、Aß オリゴマー特異的モノクローナル抗体を作製した。抗体のオリゴマー特異性の検討は、AD 患者脳より抽出した脳アミロイドの免疫沈降法と Tg2576 マウス脳の免疫組織化学的検討により行った。

C. 研究結果

AD 脳の不溶性分画から，HPLC14~15 分画に Aß オリゴマーを抽出した．この分画を Tg2576 マウスおよび nonTG マウス脳に注入し，脳アミロイドの促進効果が認められた．頚静脈より投与された Fluorescein /Biotin 2 重標識 Aß 1-42(400_g/400_l)は BBB を越えて，Tg2576 マウス脳の老人斑 Aß と結合した．

6 か月齢 Tg2576 マウスでは lipid rafts に Aß40, Aß42 ダイマーが出現していた．lipid rafts における Aß ダイマーは AD 脳，pathological aging の段階から同定された．Aß ダイマーは，Apo E や過剰リン酸化 tau の蓄積などの二次的病理変化を引き起していた．

メラトニンは 8 ヶ月から 15.5 ヶ月まで有意に脳アミロイド蓄積を抑制した．SDS 抽出 Aß40, Aß42 分画とギ酸抽出 Aβ40, Aβ42 分画共に有意に抑制されていた．SDS 可溶性，不溶性分画では対照群に較べて，メラトニン投与群で Aß ダイマー，モノマーの減少が認められた．一方，マウス血液中にはメラトニン投与群で Aß40 と Aß42 の増加がみとめられた．メラトニンは脳における Aß オリゴマーの形成を抑制し，血液中に Aß モノマーを除去することによって，脳アミロイド蓄積を抑制するものと考えられた．

Aß オリゴマー特異的モノクローナル抗体は脳アミロイドコアを認識し，蟻酸抽出 Aß ダイマーを選択的に検出していた．一

方，可溶性 Aß モノマーや Aß 前駆体，Aß 前駆体 C 末フラグメントとは全く反応せず，Aß アミロイドダイマー特異的抗体であった．

D. 考察

以上の検討から，Aß ダイマーが脳アミロイドを誘発し，超早期脳アミロイド蓄積形態であり，ひき続く AD 脳の二次的病変を引き起こすことが明らかとなった．これらの Aß ダイマーの超早期蓄積はモデルマウスの行動異常とも密接に関連しており，組織学的に同定される脳アミロイドよりも，直接の病原性分子と想定される．AD 患者脳から抽出した Aß オリゴマーの脳アミロイド促進作用や末梢血管から投与した Aß ペプチドの脳アミロイド結合能と考え合わせると，Aß オリゴマーは脳アミロイドーシスにおける病態の最も重要な病因分子と考えられる．

この脳 Aß オリゴマーの蓄積はメラトニン投与で確実に解除可能であった．この機序は脳から末梢血管への生理的な Aß のクリアランスを維持することによるものであり，今後の臨床応用が期待される．さらに，今回，より直接的に Aß オリゴマーを認識する抗体の作成に成功した．Aß ワクチン療法が重篤な副作用によって頓挫しており，今後この抗体を用いた受動免疫療法の臨床応用が期待される．

E. 結論

Aß オリゴマーの蓄積が脳アミロイドーシスにおける最も重要な病態であることを明らかにした．この，Aß オリゴマーの蓄積はメラトニンの経口投与によって解除される．さらに，Aß オリゴマー特異抗体の作成に成功した．

F. 健康危険情報

なし

G. 研究結果発表

1.論文発表

1) Ikeda M, **Shoji M**, Kawarai T, Kawarabayashi T, Matsubara E, Murakami T, Sasaki A, Tomidokoro Y, Ikarashi Y, Kuribara H, Ishiguro K, Hasegawa M, Yen SH, Davies P, Chishti M A, Harigaya Y, Okamoto K, Abe K, Carlson GA, St.George-Hyslop P, Westaway D. Accumulation of Filamentous Tau in the Cerebral Cortex of Human Tau R406W Transgenic Mice. **The American Journal of Pathology** 166(2):521-531, 2005

2) 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, Bouslam 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** 69: 225-227, 2004

3) Ohyagi Y, Asahara H, Chui DH, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, Yamada T, Kikuchi H, Taniwaki T, Murai H, Ikezoe K, Furuya H, Kawarabayashi T, **Shoji M**, Checler F,

Iwaki T, Makifuchi T, Takeda K, Kira J, Tabira T. Intracellular Aß42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer' s disease. **The FASEB Journal** 19(2):255-257, 2005

4) Kawarabayashi T, **Shoji M**, Younkin L, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH and Younkin SG, Dimeric Aß 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

5) 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 Aß homeostasis in AD and DS: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins. **Neurobiology of Aging** 25(7):833-41, 2004

6) Ikarashi Y, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Kanai M, Ikeda M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Kuribara H, Younkin SG, **Shoji M,**. Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APPsw mice. **Neurobiology of Aging** 25: 483-90, 2004

7) 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

8) **Shoji M**, Matsubara E, Murakami T, Manabe Y, Abe K, Kanai M, Ikeda M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Watanabe W, Amari M, Ishiguro K, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Nishimura T, Nakamura Y, Takeda M, Urakami K, Adachi Y, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, Kanemaru K, Yamanouchi H, Yoshida Y, Ich K, Yoshida H, Toji, H Nakamura S, Hirai H, Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders: A large scale multicenter study by a Japanese study group. **Neurobiology of Aging** 23:363~370, 2002

9) **Shoji M**, Fukushima K, Wakayama M, Shizuka-Ikeda M, Ikeda Y, Kawakami A, Sakazume Y, Ikeda M, Harigaya Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Murakami T, Nagano I, Manabe Y, Abe K, Intellectual faculities in patients with Alzheimer's disease regress to the level of a 4-5-year old child. **Geriatrics and Gerontology International** 2:143~147, 2002

10) Sasaki A, **Shoji M**, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Naito M, Matsubara E, Abe K, Nakazato Y, Amyloid cored plaques in Tg2576 transgenic mice are characterized by giant plaques, slightly activated microglia, and the lack of paired helical filament-typed,

dystrophic neuritis. **Virchows Archiv** 441: 358~367, 2002

11) Prat MI, Adamo AM, Gonzalez SA, Affranchino JL, Ikeda M, Matsubara E, **Shoji M**, Smith MA, Castano EM, Morelli L, Presenilin 1 overexpressions in Chinese hamster ovary (CHO) cells decreases the phosphorylation of retinoblastoma protein: relevance for neurodegeneration. **Neuroscience Letters** 326: 9~12, 2002

12) Shizuka-Ikeda M, Matsubara E, Ikeda M, Kanai M, Tomidokoro Y, Ikeda Y, Watanabe M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Maruyama K, Castano EM, St George-Hyslop P, **Shoji M**, Generation of amyloid beta protein from a presenilin-1 and ßAPP complex. **Biochemial and Biophysical Research Communications** 292: 571~578, 2002

13) Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, **Shoji M**, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE, Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. **Neurobiology of Disease** 9: 11~23, 2002

14) Matsubara E, **Shoji M**, Abe K, Frangione B, Ghiso J, Vascular Amyloidosis in neurodegerative conditions. **Drug News & Perspectives** 15: 439~444, 2002

2.学会発表

1. 一般演題

1) Kawarabayashi T, **Shoji M**, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Nagano I, Abe K, Ashe KH, Younkin SG. Dimeric Aß rapidly accumulates in lipid rafts followed by ApoE and phosphorylated tau as memory is impaired in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience 2004, the Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, 2004, 10, 23-27

2.シンポジウム，教育講演

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

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

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

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・生化学
共同研究者　Henny Wati*、河西あゆみ*、伊藤禎洋*、東海林幹夫**、瓦林　毅**、Xiaoying Fu***、樋口京一***、玉置寿男*,****、徳田隆彦*****、河野裕夫******、石原得博******
*山梨大学・大学院・医学工学総合研究部・生化学、
**岡山大学・大学院・医歯学総合研究科・神経病態内科、
***信州大学大学院・医学研究科加齢生物学
****山梨大学・大学院・医学工学総合研究部・精神神経科学
*****信州大学・医・第三内科学
******山口大学・医・構造制御病態学

研究要旨

1) 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（Apcs; Sap）マウスを用いて、遺伝性アルツハイマー病での脳内Aβアミロイドの沈着にTtrやApcsがどう関与するかを解析し、15～18カ月齢のマウスにおいて、TtrがAβアミロイドの沈着を促進する傾向を認めた。一方、Apcsについては、Aβアミロイドの沈着に影響することを示す結果は得られなかった。

2) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者由来のヒトのTTRから成るアミロイド線維（ATTR）画分が、ATTRの沈着を*in vivo*で促進するかどうかを調べるため、FAPのトランスジェニックマウスモデルにFAP患者の心由来のATTR画分を投与して、ATTRによるATTR沈着促進効果を調べた。この結果、外来ATTRの摂取によりFAPの発症が促進される可能性は、極めて低いと考えられた。

3) 血清アミロイドP成分（Apcs; Sap）の欠損が、英国の研究グループが報告したように、全身性紅斑性狼瘡様の重度の自己免疫疾患を惹起するかどうかを明確にすることを目的に、我々が独自に作製した無Apcsマウスを用いて研究を進めた。この結果、C57BL/6マウスと交配させて得た無Apcsマウスは、重篤な自己免疫疾患に罹患せず、その抗核抗体価が高いのは、Apcsの欠損によるものではなく、129/Sv//Evマウス由来の*Ifi202*遺伝子などの自己免疫疾患の原因遺伝子が、C57BL/6マウスの遺伝的背景の中で高発現していることに由来することを示唆する結果を得た。またApcsは、*Ifi202*遺伝子の異常な発現に何ら関与しないことを見出した。

A. 研究目的

アミロイドーシスは、高齢者における種々の臓器の機能障害を惹起しており、患者数は今後益々増加すると予想される。しかし、未だその発症機構の詳細は不明で、安全で確実な治療法は無い。一方、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の病因は、トランスサイレチン (*TTR*) 遺伝子の変異である。しかし、発症には、主因となる*TTR*遺伝子変異のほかに、老化、環境因子や他の蛋白質が関与すると考えられる。これら因子を同定できれば、発症時期を遅

らせることができるであろう。そこで本研究は、FAP や家族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)、遺伝子欠損マウス等、種々の遺伝子改変マウスを用いて、これら遺伝性アミロイドーシスにおけるアミロイドの沈着機構を明らかにし、発症に関与する因子を見出して、その治療法や予防法の開発を促進することを目的に、以下のように遂行した。

1) TTR は、アルツハイマー病の Aβ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、血清アミロイドP成分（APCS; SAP）が、Aβ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、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次のように遂行する。

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 Apcs マウスを用いて、遺伝性アルツハイマー病での Aβアミロイドの沈着に Ttr や Apcs がどう関与するかを明らかにする。

2) 狂牛病やクロイツフェルトヤコブ病の感染源の病的プリオンもアミロイドに分類され、_ 構造を多く含んだアミロイド線維様の異常プリオン蛋白による発症促進効果に基づく感染機構が注目されている。同様に、アポリポ蛋白、ApoA-II がアミロイドを形成して沈着するマウス老化アミロイドーシスモデルにおいても ApoA-II アミロイド線維（AApoAII）やヒトのアミロイド線維によるアミロイドーシスの経口感染の可能性が報告されている。そこで本研究では、FAP 患者由来のヒト TTR から成るアミロイド線維（ATTR）画分が、ATTR の沈着を *in vivo* で促進するかどうかを明らかにすることを目的に遂行する。このため、FAP の病因となるヒト変異 *TTR* 遺伝子を運び、高齢になるとヒト ATTR を種々の臓器に沈着する FAP のトランスジェニックマウスモデルに FAP 患者の心臓由来の ATTR 画分を投与して、ATTR による ATTR 沈着促進効果を調べる。

3) 先に我々は、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、血清アミロイド P 成分 (APCS; SAP) が、アミロイドーシスの発症にどう関与するかを明らかにするために、標的遺伝子組換え法を用いて、無 Apcs マウス株を作製した。一方その後、英国のグループが作製した無 Apcs マウスでは、高い頻度で抗核抗体と全身性紅斑性狼瘡様の重度の糸球体腎炎を認めると報告された。重篤な自己免疫疾患に罹患するのであれば、アミロイドーシス研究に無 Apcs マウスを用いることができない。しかし、マウス第 1 番染色体上の *Apcs* 遺伝子を含む領域には、マウス系統特異的に全身性紅斑性狼瘡を惹起する原因遺伝子群が存在する。一方、我々が作製した無 Apcs マウスも対照野生型マウスに比べ、血清中の抗核抗体価が顕著に上昇していた。しかし、糸球体腎炎の所見は認められず、平均寿命の短縮等の異常を認めなかった。そこで本研究は、Apcs 欠損が、全身性紅斑性狼瘡様の重度の自己免疫疾患を惹起するかどうかを明確にすることを目的に遂行する。

B. 研究方法

1) 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 Apcs マウス株とを交配させて得た Ttr 又は Apcs 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 Aβ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、Aβアミロイドの沈着に Ttr や Apcs がどう関与するかを解析した。

脳内 Aβアミロイドの沈着は、コンゴー赤染色法、および抗 Aβ抗体 (Aβ9204 ; AβのN末端を認識するポリクローナル抗体) を用いて検出した。抗 Aβ抗体 Aβ9204 で染色したマウス脳切片は、AxioCam (Carl Zeiss) にて digitalize し、Image-Pro Plus Ver4.5 (Planetron)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。

2) 本来の 5'上流領域 6kb を含むヒト変

異 *TTR* 遺伝子を運ぶ FAP のトランスジェニックマウスモデルと無 Ttr マウスの交配により、FAP のモデルマウス株を作製した。

マウス血中のヒト TTR 量は抗ヒト TTR 抗体によるウェスタンブロット法で決定した。8〜13 カ月齢のこれらマウス 9 匹に、FAP 患者由来の ATTR 画分を 1mg/ml の濃度で含む蒸留水 0.1ml を尾静脈から注入した。対照群として、同月齢のマウス 9 匹に蒸留水のみを注入した。注入 4 カ月後あるいは 12 カ月後にこれらマウスを解剖し、種々の臓器のアミロイド沈着を、コンゴー赤染色組織標本を偏光顕微鏡下で観察する方法で検索した。沈着アミロイドの主成分は、抗ヒト TTR 抗体、抗マウス AA 抗体、抗マウス ApoA-II 抗体を用いて免疫組織化学的な手法で同定した。

3) C3H/He マウスと無 Apcs マウス（C57BL/6 X 129/Sv//Ev）を交配させて得た 12〜13 カ月齢の無 Apcs マウスと同月齢の対照野生型マウスの血中抗核抗体価を、Hep-2 細胞によるキットを用いて蛍光抗体法で、比較解析した。*Ifi202* 遺伝子の脾での発現量は、ノーザンブロット法や Real-time RT-PCR 法で解析した。アデノウィルス発現ベクターにマウス *Apcs* cDNA を組み込み、Apcs 欠損マウスの尾静脈に注入し、Apcs を肝で高発現させて *Ifi202* 遺伝子の発現量の変化を調べた。

マウスの飼育およびマウスを用いた実験は、山梨大学の動物実験専門委員会の承認を得て行った。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) 6〜18 ヵ月齢の Ttr 欠損 APPsw 30 匹と同月齢の対照ヘテロ接合体 APPsw 29 匹とにおける脳内 Aβアミロイド沈着程度（アミロイド斑＋血管アミロイド）を解析した。この結果、14 ヶ月齢以下の月齢では差異を認めなかったが、15〜18 ヵ月齢では、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 Aβアミロイドが沈着する傾向を認めた（図 1）。

さらに、アミロイド斑と血管アミロイドの沈着程度を解析し、前者には、有意な差異を認めるが、後者には差異を認めないことを見出した。一方、8〜16 ヶ月齢の Apcs 欠損 APPsw 22 匹と同月齢の対照野生型またはヘテロ接合体 APPsw 23 匹とにおける脳内 Aβアミロイド沈着程度を解析したが、両者の Aβアミロイド沈着程度に差異を認めなかった。

2) 13 カ月齢でヒト ATTR 画分を投与したマウス 4 匹と蒸留水のみを投与した同月齢の 4 匹の対照マウスを、投与後 4 カ月で解剖し、種々の臓器のアミロイド沈着を調べた。この結果、8 匹の何れにも沈着を見出せなかった。そこで残りの 10 匹を、ヒト ATTR 画分あるいは蒸留水のみを投与後 12 カ月で解剖してアミロイドの沈着を調べた。この結果、ヒト ATTR 画分を投与した 5 匹全てで種々の臓器にアミロイドの沈着を認めたが、蒸留水のみを投与した 5 匹の対照マウスには認めなかった。沈着したアミロイドは、抗マウス AApoAII 抗体とのみ結合し、抗ヒト TTR 抗体も抗マウス AA 抗体も結合しなかった。

3) C3H/He マウスと無 Apcs マウス（C57BL/6 X 129/Sv//Ev）を交配させて得た 12〜13 カ月齢の無 Apcs マウス 50 匹と同月齢の対照野生型マウス 41 匹の血中抗核抗体価を、比較解析したところ、両者に差異を認めなかった。

マウス第 1 番染色体上の *Apcs* 遺伝子を含む領域には、*Ifi202* 遺伝子が存在し、脾での高発現により、マウスの系統特異的に血中抗核抗体価を上昇させるが、腎炎は惹起しないと報告されている。また、C57BL/6 マウスでは、この遺伝子は、ほとんど発現していないが、C3H/He や 129/Sv//Ev では、高発現していることが知られている。そこで、C57BL/6 マウスに戻し交配させて得た、抗核抗体価の高い無 Apcs マウスと C3H/He マウスと交配させて得た、対照野生型マウスと抗核抗体価に差異を認めない無 Apcs マウスについて、脾における *Ifi202* 遺伝子の発現量を、それぞれの対照野生型マウスと比較した。この結果、C57BL/6 マウス系統の無 Apcs マウスでは、対照野生型マウスに比べ、*Ifi202* 遺伝子の発現量が顕著に増加していたが、C3H/He マウス系統の無 Apcs マウスでは、対照野生型マウスとほぼ同量が発現していた。上記のように、C57BL/6 マウスと交配させて得た無 Apcs マウス血清中の抗核抗体価は、対照野生型マウスに比べて顕著に高いが、C3H/He マ

ウスと交配させて得た無 Apcs マウス血清中の抗核抗体価は、対照野生型マウスと同程度である。従ってこれらの結果は、*Apcs* 遺伝子ではなく *Ifi202* 遺伝子の発現量の差異が抗核抗体価の差異と良く相関することを示している（表1）。

さらに Apcs が、C57BL/6 マウスの遺伝的背景の中では、*Ifi202* 遺伝子の発現を抑制することによって、抗核抗体価を調節している可能性を考え、組換えアデノウィルスによる発現系を用いて、抗核抗体価の高い無 Apcs マウスの肝で、マウス *Apcs* cDNA を高発現させたが、*Ifi202* 遺伝子の発現は抑制されなかった。また先に、C57BL/6 マウスと交配させて得た、抗核抗体価の高い無 Apcs マウスにヒト *APCS* 遺伝子を高発現させても、血中抗核抗体価は、低下しないことを見出している。

D. 考察

1) 15～18 カ月齢のマウスにおいて、Ttr が脳内 Aβアミロイド斑の沈着を促進するが、血管アミロイドの沈着には、影響を与えないことを見出した。今後、より多くのマウスを解析し、結果を検証する。

一方、Apcs については、Aβ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。

2) ATTR は、四量体の異型 TTR が単量体に解離して生じた立体構造の変化した単量体が重合して形成されると考えられている。従って ATTR 沈着においては、TTR 四量体の単量体への解離に長時間を要するために、ATTR を投与しただけでは、ATTR の沈着を促進できなかったと考えられる。

3) C3H/He マウスと無 Apcs マウス（C57BL/6 X 129/Sv//Ev）を交配させて得た 12～13 カ月齢の無 Apcs マウスと同月齢の対照野生型マウスの血中抗核抗体価を比較解析し、Apcs の欠損のみでは、血中抗核抗体価は上昇しないことを見出した。また、*Apcs* 遺伝子ではなく *Ifi202* 遺伝子の発現量の差異が抗核抗体価の差異と良く相関することを見出した（表1）。さらに先に、9～12 カ月齢の内在性 Apcs 欠損ヒト *APCS* 遺伝子高発現トランスジェニックマウスと対照無 Apcs マウスについて、血清抗核抗体価を測定し、何れも同様に高いことを見出した。

以上の結果は、C57BL/6 マウスと交配させて得た無 Apcs マウスの抗核抗体価が高いのは、Apcs の欠損によるものではなく、129/Sv//Ev マウス由来の *Ifi202* 遺伝子などの自己免疫疾患の原因遺伝子が、C57BL/6 マウスの遺伝的背景の中で発現しているためではないかと考えられた。また、組換えアデノウィルスによる発現系を用いて、Apcs は、*Ifi202* 遺伝子の発現を抑制しないことを明らかにした。

E. 結論

1) Ttr が遺伝性アルツハイマー病のモデルマウスにおける脳内アミロイド斑の沈着を促進することを示唆する結果を得た。

2) 外来 ATTR の摂取により FAP の発症が促進される可能性は、極めて低いと考えられる。

3) Apcs の欠損は、重篤な自己免疫疾患を惹起しない。従って無 Apcs マウスを用いて、ヒトのアミロイドーシスの発症に Apcs がどう関与するかを解析できると結論できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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. Nature Medicine 11(1): 11-12, 2005.

2) 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 11(2): 113-120, 2004.

3) 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 11(10): 838-846, 2004.

4) 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 pp. 60-64, 2004.

5) 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.

6) 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.

2. 学会発表

1) 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

2) 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.

3) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

表 1. マウス血中抗核抗体価と*Ifi202*遺伝子発現量の比較

遺伝的背景	マウス血中抗核抗体価		*Ifi202* 遺伝子発現量	
	無Apcsマウス	対照野生型マウス	無Apcsマウス	対照野生型マウス
C57BL/6	▲	▼	▲	▼
C3H/He	―	―	―	―

▲ 高い　▼ 低い　― 差異が無い

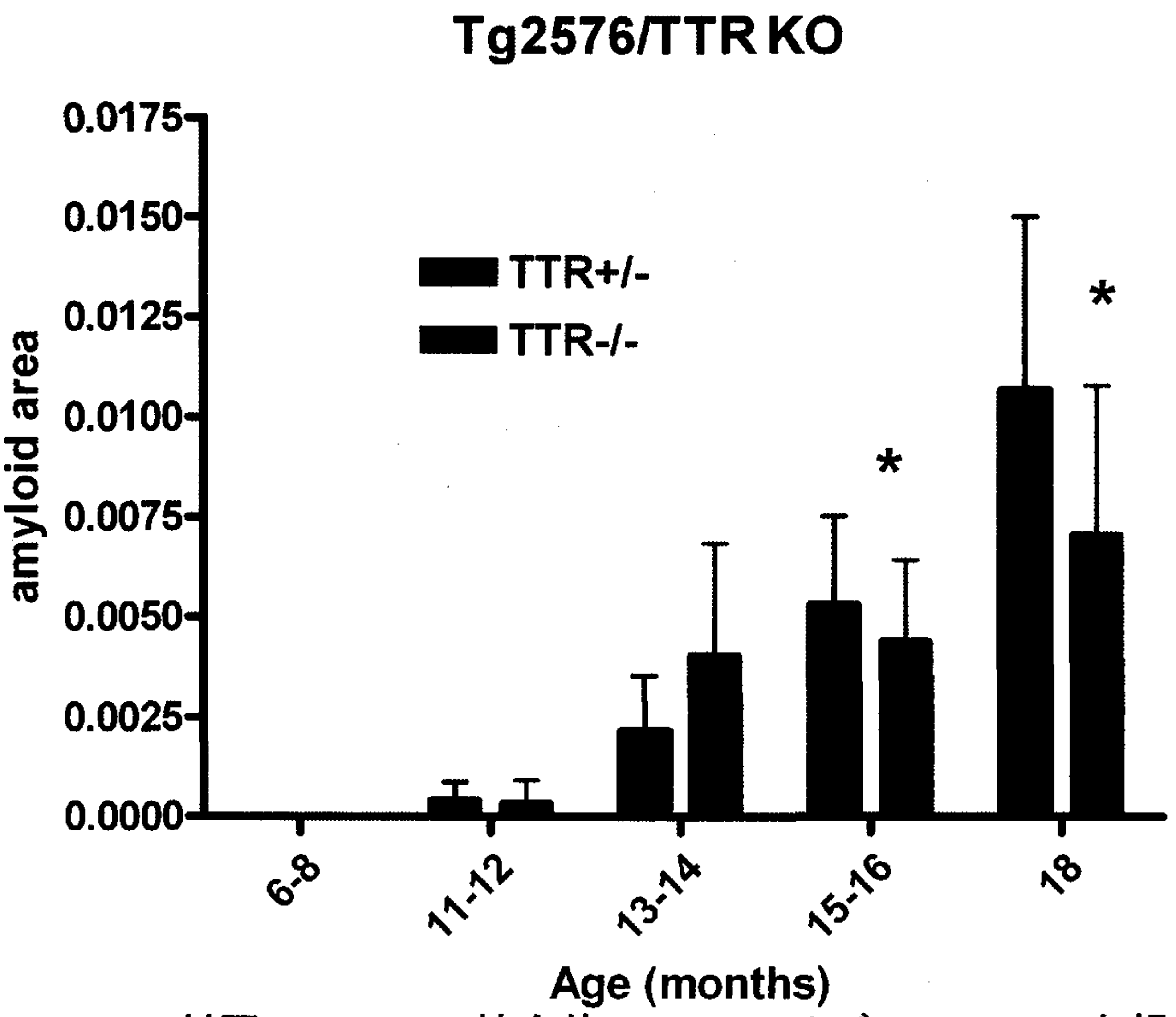


図１：TTR+/-; 対照 Ttr ヘテロ接合体 APPsw、及びTTR-/-; Ttr欠損 APPswにおけるアミロイド沈着

アミロイド沈着程度は、抗Aβ抗体による染色陽性部位（アミロイド斑及び血管アミロイド）の面積と大脳皮質全体の面積の比で表記した。

モデル動物を用いたアミロイドーシス伝播機構の解析

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*，Zhang Huanyu*、葛鳳華*、Zhang Beiru*，徳田隆彦**，澤下仁子*，森政之*，池田修一**，内木宏延***、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，
***福井大学医学部病理学
****山梨大学大学院医学工学総合研究部

研究要旨　アミロイド沈着による病的要素を効率良く検索し、治療や予防に応用するためには、適切なモデルマウスを用いることが必要不可欠である。我々はこれまでマウス AApoAII や AA アミロイドーシスのモデルマウスを用いて，アミロイド線維(Seed)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伝播に関して以下のような研究成果を得た。1)AApoAII アミロイドーシスの母子間の伝播には、出生後の母親からの因子、特にミルクの関与が重要である。2)マウス飼育室内での AApoAII アミロイドーシスの発症程度が年度毎に上昇する、すなわちマウス飼育室内での伝播の可能性が示唆された。3)家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)モデルマウスに($hMet30TTRTg^{+}, mTtr^{KO/KO}$)アミロイド線維を経口投与すると AApoAII の沈着と同時に ATTR の沈着も観察された。4)透析アミロイドーシスのモデル動物としてヒトβ2ミクログロブリントランスジェニックマウス($hB2MTg^{+}$,m$B2m^{KO/KO}$)を作成し、血清ミクログロブリン濃度が患者血清の数倍にまで達することが確認された。

A. 研究目的

我々はこれまでマウス AApoAII アミロイドーシスを用いて、「微量のアミロイド線維投与によるアミロイドーシス発症の促進（伝播）」を明らかにしてきた。　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アミロイド沈着促進というプリオン類似の伝播を報告した。このような体外からのアミロイド線維の侵襲による発症促進が、他のアミロイドーシスでも起るのかを明らかにすること、さらに伝播の経路や、線維形成促進のメカニズム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し、治療・予防法を開発するために重要である。既存の AApoAII アミロイドーシスや家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）のモデルマウスや新たに作成した透析アミロイドーシスのモデルマウスを利用して、アミロイド沈着を促進する要因を解析する事が本研究の目的である。

B. 研究方法

1)AApoAII アミロイドーシスのモデルマウスとして R1.P1-*Apoa2*^{C} (SAMRC と略す）を用いた。SAMR1C は

amyloidogenic な *Apoa2*^{C} アリルを持つ congenic マウスである。アミロイド誘発用の AApoAII アミロイド線維はアミロイド線維投与後 6 ヶ月の SAMR1C マウス肝臓より精製した。

2) 前田らが作成した FAP トランスジェニック(Tg)マウス；6.0-h *Met30TTR*Tg^{+}, *mTtr*$^{KO/KO}$)を、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。Met30 ATTR アミロイド線維を FAP type I 患者の心臓より抽出し、2カ月齢のマウスに胃ゾンデで 2 週間毎日投与した。投与開始後、マウスを 3, 6, 9, 12, 18, 24 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) CAG (CMV-IE enhancer + Chicken β-actin promoter + rabbit β globin polyA) プロモーターと AAT (alpha-1-antitripsin)プロモーターを持つ 3 種のヒト *ß2M* Tg を作成し、*ß2M* ノックアウトマウスと交雑し、モデルマウス (h*B2MTg*$^{+}$, *mB2m*$^{KO/KO}$)を作成した。

4) 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。各臓器切片をヒト TTR 特異的抗体とマウス apoA-II 抗体で染色した。ヒト ß2M 特異的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，その承認を得た後，信州大学医学部動物実験に関する指針に沿って行った。

アミロイド線維による伝播に関しては、ヒトや正常マウスへの伝播／発症の危険は無いと考えられるが、アミロイド線維を扱う際は、手袋とマスクを着用し、使用した器具は焼却するか、2N NaOH に 2 時間以上浸して処理することにしている。

C. 研究結果

1)AApoAII アミロイドーシス：出生直後の線維無投与母親マウスの仔マウスを、線維を投与した（アミロイドーシスを発症している）母親マウスが哺育した場合に、有意なアミロイド沈着促進が確認された。これに対し、アミロイドーシスを誘発した母マウスをから出生し、線維無投与マウスに保育された仔マウスでは、沈着の促進は観察されなかった。さらにアミロイドーシス誘発母マウスのミルクを採取し、腹腔内に投与した SAMR1C マウスではアミロイドーシス発症の促進が認められた。これらの結果より母乳を介してのアミロイド線維の伝播が考えられた（**図１**）。

クリーニングを経て、普通飼育条件から信州大学の SPF の動物飼育室（A 室）に導入した当初は SAMR1C マウスのアミロイド沈着は極軽度であった。しかしアミロイド線維による誘発を開始して以来、出生時期が後になるにつれて、線維投与を受けないマウスでの、アミロイド沈着の早期化と重篤化が認められた。再クリーニング後に別の SPF 室(B 室)に戻すと発症は亡くなり、B 室からもう一度 A 室に戻すと発症が観察された。

2)FAP(ATTR)アミロイドーシス: Met30 ATTR 及び Ala38 ATTR を経口投与したマウスでは投与後 18 ヶ月で初めてアミロイド沈着が観察された。DW 投与マウスでは 24 ヶ月後まで沈着は全く観察されなかった。各臓器から、水抽出分画として分離したアミロイド線維を、Western Blotting で解析すると、AApoAII と ATTR が同時に検出された。

3) 透析 (Aß2M) アミロイドーシス：3 種のヒト *ß2M* Tg と *B2m* ノックアウトマウスとの交雑による h*B2M*Tg^{+},