

$mB2m^{KO/KO}$ が完成した。これらのうち 2 系統では血清中のヒト $\beta 2M$ 濃度が透析患者の数倍に達しており、アミロイド線維の投与による沈着促進が起るか検討している (図 2)。

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し、治療・予防に応用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 や、さらに患者数が膨大な透析アミロイドーシスでは、医学的、社会的に重要である。いくつかの事実が、これらのアミロイドーシスでは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している可能性を示唆している。したがってモデル動物を使った詳細な解析は必須であると思われる。

ここで示した結果より、経口投与した ATTR アミロイド線維が内因性の apoA-II の沈着を促進し、その後に TTR のアミロイド線維への変換と沈着が促進されたと考えられる。しかし TTR が線維構造を取っているのかなど、さらに詳細な検討が必要である。経口投与した異種のアミロイド線維が正常な apoA-II (Tg マウスの apoA-II は *Apoa2^a*) の沈着を促進した (cross-seeding) 事実が初めて確認された。

血清中に透析患者の数倍の濃度の $\beta 2M$ の発現を持つトランスジェニックマウスを作成した。このマウスはアミロイド線維形成を阻害するとされている内在性のマウス $\beta 2M$ は発現しない。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アミロイド線維の沈着を観察する必要があり、アミロイド線維の投与や月齢の効果を検

討する必要がある。

E. 結論

各種アミロイドーシスの病的要素の検索、特に線維による伝播の可能性の解析には適切なモデル動物が必須である。今後、AApoAII のモデルマウスである SAMR1C や FAP や透析アミロイドーシスのモデルマウスなどの新規のモデルマウスを活用して、アミロイド沈着の迅速な評価システム開発が必須である。

F. 健康危険情報

マウス AApoAII 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が観察された。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。

G. 研究発表 (3 年間)

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Xing Y, Higuchi K. Amyloid Fibril Proteins. *Mech Ageing Dev.* 123: 1625-1636, 2002
- 3) Suzuki T, Tozuka M, Kazuyoshi Y, Sugano M, Nakabayashi T, Okumura N, Hidaka H, Katsuyama T, Higuchi K. Predominant apolipoprotein J exists as lipid-poor mixtures in cerebrospinal fluid. *Ann Clin Lab Sci.* 32: 369-376. 2002
- 4) 森 政之、樋口京一。老化疾患モデルマウス。現代医療 Vol. 34 pp. 37-42. 2002
- 5) 森 政之、樋口京一。老化疾患モデルマウス *Molecular Medicine* 39. pp. 528-533, 2002

- 6) Umezawa M, Tatematsu 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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.* 164: 1597-1606, 2004
- 12) Yazaki M, Fushimi T, Tokuda T, Kametani F, Yamamoto K, Matsuda M, Shimojo H, Hoshii Y, Higuchi K, Ikeda S.: A patient with severe renal amyloidosis associated with an immunoglobulin gamma-heavy chain fragment. *Am J Kidney Dis.* 43: e23-28. 2004
- 13) 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: 113-120. 2004
- 14) 樋口京一、森 政之：SAM(老化促進モデルマウス)。『モデル動物の作成と維持』（森脇和郎、山村研一、米川博通編）pp929-937, エル・アイ・シー（東京）2004
- 15) 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
- 16) Higuchi K, Xing Y, Fu X, Korenaga T, Guo Z, Nakamura A, Mori M.: Mouse senile amyloidosis in the SAM model. In *The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal model of senescence* (Nomura Y, Takeda T, Okuma Y eds). pp35-40. Elsevier BV Amsterdam, The Netherlands. 2004
- 17) 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 injections of various amyloid fibrils. In *The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal model of senescence* (Nomura Y, Takeda T, Okuma Y eds). pp383-386. Elsevier BV Amsterdam, The Netherlands. 2004
- 18) Umezawa M, Okumura H, Hosokawa M, Takeda T, Higuchi K. Effects of dietary fats on senile amyloidosis in SAMP1 mice. In *The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal*

model of senescence (Nomura Y, Takeda T, Okuma Y eds). pp427-431. Elsevier BV Amsterdam, The Netherlands. 2004

- 19) 樋口京一: アミロイドーシスと老化、日本アフェレシス学会雑誌 23(2): 143-150. 2004
 - 20) 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
 - 21) 樋口京一: マウス老化アミロイドーシス。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
 - 22) 樋口京一、付笑影: 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
- ## 2. 学会発表
- 1) 樋口京一。基礎老化と疾患(アミロイドーシス)との狭間で。教育講演 I 『老化研究の方向を説く』日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)
 - 2) 樋口京一。アミロイド蛋白質 apoA-II の線維構造への変換と伝播。ワークショップ「蛋白質の品質管理とその破綻」第 55 回日本細胞生物学会大会。(2002.5.21 横浜)
 - 3) Higuchi K. Mouse apoA-II amyloidosis: genetics, epigenetics and transmission. (Keynote Lecture) The 5th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. (2002.9.26 Matsumoto)
 - 4) 付笑影、是永龍巳、松下隆壽、細川昌則、馬場聡、内木宏延、徳田隆彦、池田修一、河田康志、石原得博、森政之、樋口京一。種を越えたアミロイドーシス誘発の可能性; マウスモデルを用いた解析 II。第 91 回日本病理学会総会 (2002.3.27 横浜)
 - 5) 付笑影、森政之、是永龍巳、松下隆壽、細川昌則、馬場聡、内木宏延、石原得博、河田康志、池田修一、樋口京一。種を越えたアミロイドーシス誘発の可能性 2; AA アミロイドーシスモデルを用いた解析。日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)
 - 6) 是永龍巳、付笑影、森政之、松下隆壽、細川昌則、樋口京一。母子間垂直伝播によるマウス老化アミロイドーシス発症の可能性。日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)
 - 7) 姚俊潔、森政之、酒井潤、広瀬国孝、羽田亮介、千葉卓哉、樋口京一。SAGE 法によるマウス精巣での遺伝子発現プロファイルの加齢変化の解析。日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)。
 - 12) 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)
 - 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 樋口京一: 老化アミロイドーシスモデルマウスの開発と応用。ワークショップ「老化病態研究のための実験モデル」第93回日本病理学会総会 (2004.6.11 札幌)
- 23) 樋口京一: アミロイドーシスの伝播機構。熊本大学大学院特別セミナー 2004.11.17
- 24) 澤下仁子, Zhang Huanyu, 是永龍巳, Fu Xiaying, Yan Jingmin, 森政之, 樋口京一: 外来性アミロイド線維によるマウス老化アミロイドーシス発症促進に対する各種薬剤の効果。第93回日本病理学会総会 (2004.6.9 札幌)
- 25) 張桓宇, 是永龍巳, 付笑影, 森政之, 樋口京一, 澤下仁子。マウス老化アミロイド線維の伝播防止処理効果に関する検討。第9回臨床ストレス蛋白質研究会。 (2004.11.3 秋田)
- 26) Higuchi K, Fu X, Korenaga T, Sawashita J, Mori M.: Genetics and transmission of mouse systemic amyloidosis. International Symposium on Amyloidosis; Genetics, Biochemistry, Pathology and Clinical Studies/ February, 10-11, 2005, Kumamoto, Japan
- 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

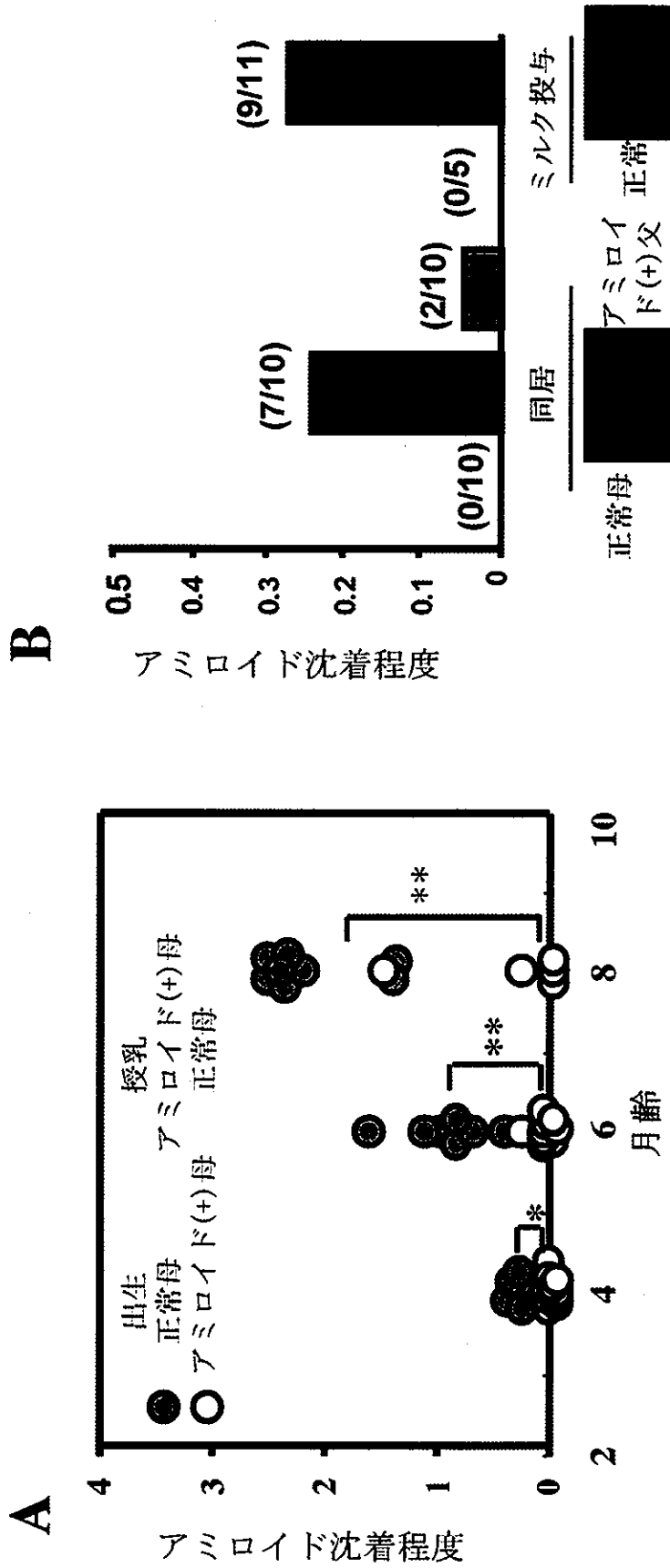
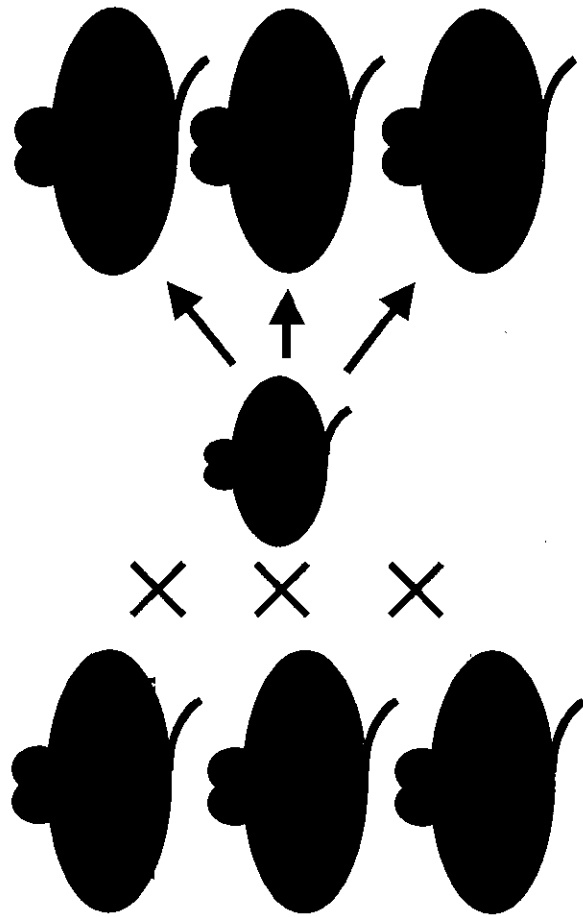


図1 マウス老化アミロイドーシスにおける母子間伝播

A. 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はアミロイド沈着が促進した。(* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$)

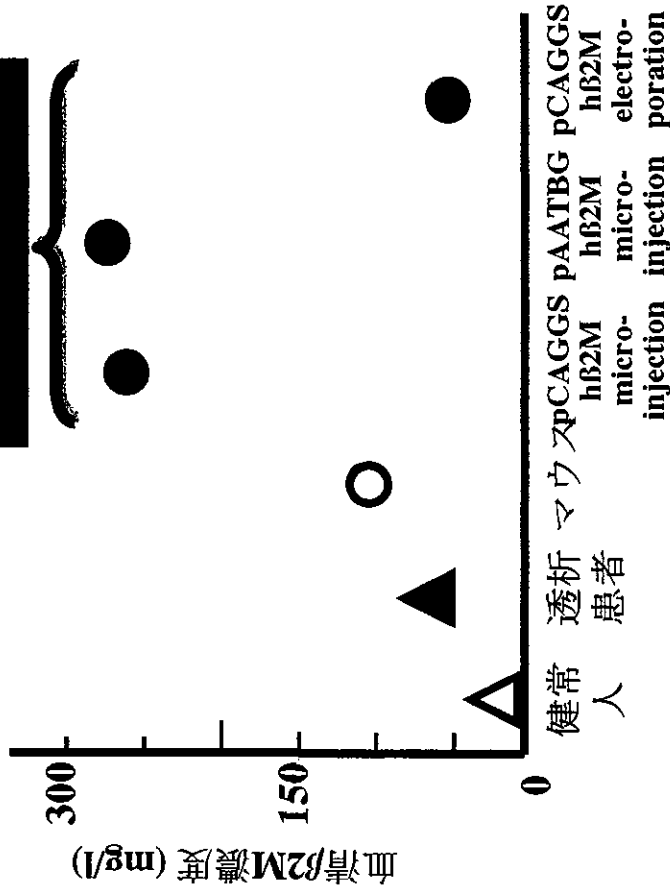
B. アミロイドーシス発症母マウスのミルクの腹腔内投与はアミロイド沈着を促進した。

A



ヒトβ2-microglobulin Tgマウス(*hB2MTg^{+/+} / mB2m^{KO/KO}*)
の作成

B



β2-microglobulin 血中濃度の比較

図2 透析アミロイドシスモデルマウスの作成

A.透析アミロイド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/β2Mノックアウトマウス(*hB2MTg^{+/+} / mB2m^{KO/KO}*)を作成した。

B.トランスジェニックマウスは透析患者の数倍の血清β2M濃度を示した。

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

分担研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科
共同研究者 東城加奈 吉田拓弘 徳田隆彦 信州大学医学部第三内科
付 笑影 樋口京一 信州大学加齢研脈管病態
星井嘉信 石原得博 山口大学医学部第一病理
松井高峯 帯広畜産大学獣医学部家畜病理
山田 学 動物衛生研病態病理

研究要旨

マウスを用いた実験的アミロイドーシスは個体間で伝播することが証明されており、その機序はプリオン病に類似していると想定されている。ヒトの食品に関連したアミロイドーシスとして高齢牛に発生する全身性 AA アミロイドーシスがある。本研究では第一段階として公的屠殺場で外見上は正常として屠殺された高齢牛 (4~19 歳、平均 8 歳) 302 頭の腎組織を採取して、Congo red 染色標本を偏光顕微鏡で観察して、アミロイド沈着の有無を検索した。15 頭にアミロイド沈着を認め、その頻度は 5% であった。アミロイド蛋白は生化学的ならびに免疫組織化学的検索により全例 AA と同定した。罹患牛 15 頭は解体時に内臓の肉眼的異常所見が見られ、基礎疾患として慢性炎症性疾患の存在が疑われた。第二段階としてヒトの食の安全を検討する目的で、さらなる 26 頭では腎臓と骨格筋を同時に採取して Congo red 染色標本を作成して、両組織におけるアミロイド沈着の有無を検索した。26 頭中 1 頭において腎組織へのアミロイド沈着が見られたが、骨格筋にはアミロイドは見られなかった。

A. 研究目的

マウスの老化アミロイドーシス (senescence-accelerated mouse : SAM) は個体間で本アミロイドーシスが伝播することが証明されている。具体的には SAM 発症マウスと同居している若年マウスが本疾患を高率に発症し、その機序として若年未発症マウスが罹患高齢マウスの糞を舐めることにより、その中に含まれるアミロイド細線維が経口的に未発症マウスの体内へ入ることで発症を促進すると考えられている。この仮説を裏付ける事実として、SAM 発症マウスから分離・

精製した ApoAII 由来のアミロイド細線維を若年マウスに経静脈的または経口的に投与するとこれらマウスは 100% の確率で SAM を発症する。同様にマウスを用いた実験的 AA アミロイドーシスにおいても、AA アミロイド細線維の経口投与により本疾患が容易に誘発されることが明らかにされ、その機序としてプリオン病と共通する病因論が推測されている。AA アミロイドーシスは高齢牛において発生することが知られているため、牛の臓物を食するヒトは AA アミロイド細線維を経口的に摂取する危険性がある。特

に関節リウマチの長期罹患者、長期透析患者などの全身性アミロイドーシスを発症する危険性の高い個体がこうしたアミロイド細線維を摂取することは好ましくないと考えられる。本研究では公的屠殺場で外見上健全として処理された高齢牛における AA アミロイドーシスの正確な頻度とその病態を明らかにし、さらにこうした罹患牛における骨格筋へのアミロイド沈着についても検索する。

B. 研究方法

第一シリーズとして公的屠殺場で外見上は正常として屠殺された高齢牛 302 頭の腎組織を採取した。Congo red 染色標本を偏光顕微鏡で観察し、アミロイド沈着のあった例はアミロイド蛋白を免疫組織化学的に同定した。また一部の例では腎組織からアミロイド細線維を精製して蛋白化学的分析した。第二シリーズとして同様な高齢牛 26 頭から腎組織と骨格筋組織を同時に採取して検索した。

(倫理面への配慮)

本研究は信州大学医学部における動物実験の倫理指針に沿う形で行われた。

C. 研究結果

第一シリーズとして検索した牛 302 頭はホルスタイン 235 頭、和牛 67 頭、年齢 4~19 歳、平均年齢はホルスタインが 92.5 ヶ月、和牛が 146.8 ヶ月 8 であった。15 頭 (ホルスタイン 13 頭、年齢 55~150 ヶ月；和牛 2 頭、年齢 95、157 ヶ月) にアミロイド沈着が見られ、病変の主体は腎乳頭部を中心とする髄質であった。8 頭には皮質にもアミロイド沈着が見られたが、2 頭を除くといずれも軽度であった。アミロイド蛋白は免疫組織化学的検索にて全例 AA であり、2 頭で

行ったアミロイド細線維の蛋白化学的分析でも AA のアミノ酸配列を確認した。これら 15 頭には肉眼的に内臓病変 (肝出血、胆道感染、慢性胃腸炎など) が見られ、全ての臓物は破棄された。しかし骨格肉その他の利用物は市場に出荷された。

第二シリーズとして検索した 26 頭では 1 頭に腎髄質への中等度のアミロイド沈着がみられたが、骨格筋にはアミロイド沈着はなかった。

D. 考察

本研究では公的屠殺場で処理されている高齢牛の 5% に内臓器官を障害する全身性反応性 AA アミロイドーシスが見出された。この頻度は過去に藤永らがわが国から報告⁵⁾した 1.2%、諸外国の 0.4~2.7% という報告結果^{4,6)}に比較して非常に高い。藤永らは牛腎臓の断面をヨード・スルフィン酸反応でスクリーニングして、陽性例のみを病理組織学的に検索していた。本研究では全例を顕微鏡的に検索しており、微量なアミロイド沈着例も含まれていることが高頻度の数値として現れたと考えられる。高齢牛の全身性反応性 AA アミロイドーシスはヒトと同様に難治性の下痢、蛋白尿を主体とするネフローゼ症候群を呈するが、本研究で見出された腎臓へのアミロイド沈着例が臨床的には無症状として取り扱われていたのは、障害部位の主体が髄質であり、皮質の障害が軽かったために臨床症状が目立たなかったと想定される。本研究の最終目標はヒトの食の安全性を確保することであるが、こうした内臓に AA アミロイドーシスがある牛の骨格筋は市場に出回っている。そこで本研究でも少数例であるが、高齢牛の腎臓と骨格筋を同時に採取して両組織におけるアミロイド沈着の検索を開始した。今後はこうした点を重点的

に検討する予定である。

E. 結論

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は予想以上に高い。ヒトの食の安全を確保する上でもこうした病態のさらなる解明が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fu X, Korenaga T, Fu Li, Xing Y, 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 heterogenous amyloid fibrils. FEBS Lett 563: 179-184, 2004.
- 2) Tojo K, Tokuda T, Hoshii Y, Fu X, Higuchi K,

Matsui T, Kametani F, Ikeda S: Unexpectedly high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. Amyloid: J Protein Folding Disord in press.

2. 学会発表

- 1) 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.

H. 知的財産権の出願・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

牛アミロイドーシスの発生状況、病変分布と伝達実験

分担研究者 松井 高峯 帯広畜産大学畜産学部獣医学科
共同研究者 古林与志安 帯広畜産大学畜産学部獣医学科

研究要旨

牛アミロイドーシスの発生状況、病変分布、牛アミロイドのマウス以外の動物への伝達性を検討した。その結果未発症アミロイドーシス牛が存在する可能性が示唆された。またアミロイドは筋肉、舌、乳腺等にも沈着することが明らかとなった。牛アミロイドはマウス以外の動物（ウサギ、ヤギ）にも伝達可能であることが示唆された。

A. 研究目的

牛のアミロイドーシスの発生状況、病変分布を調査する。またアミロイドーシス牛より抽出したアミロイドの伝達試験をマウス以外の動物で行う。

B. 研究方法

北海道農業共済組合連合会発行の家畜共済事業統計表より最近 10 年間（1992～2002）にアミロイドーシスとして廃用となった牛の頭数を調査する。帯広畜産大学家畜病理学教室で過去 15 年間に病理解剖したアミロイドーシス牛の病変分布を再調査する。アミロイドーシス牛の腎臓よりアミロイドを抽出し、ウサギおよびヤギ等を用い伝達実験を行うと伴に、アミロイドーシスモデル動物の作成を試みる。

C. 研究結果

10 年間に北海道でアミロイドーシスとして廃用となった牛（全て乳牛）619/394,166 頭（0.16%）であった。過去 15 年間で 43 例のアミロイドーシス牛を病理学的に検索した。そのうち 4 例は臨床的にも病理解剖時においてもアミロイドーシスとは疑われず、組織学的検査により始めてアミロイドーシスと診断された。最近 3 年間で 14 例のアミロイドーシス牛を収集し、沈着部位を詳細に検索した。その結果、従来より報告されている臓器（肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、胃等の消化管等）に加え、乳腺、筋肉、舌等にもアミロイドの沈着が認められた。

ウサギへの伝達実験で牛アミロイドの静脈内、腹腔内、経口投与群でそれぞれ 28/46（61%）、8/60（13%）、0/28（0%）羽でアミロイドが脾臓と腎臓に認められた。

ヤギでは腹腔内投与群 0/3（0%）、静脈

内投与群 2/4（50%）でアミロイド沈着が脾臓のみで認められた。

D. 考察

牛のアミロイドーシスの発生頻度は廃用牛 1,000 頭につき 1～2 頭程であるが、今後年齢分布と併せて調査する必要があると思われた。未発症牛の存在が明らかとなり、早期診断法の確立の必要性が示唆された。

牛のアミロイドがマウス以外の動物へも伝達可能であることが示唆されたが、その発生様式は投与経路により大きく異なっていた。今後実験条件を変更するなどして、経口投与での伝達性の有無を確認する必要があるものと思われた。

E. 結論

牛のアミロイドはマウス以外の動物にも伝達する可能性が示唆された。未発症アミロイドーシス牛の存在が明らかとなり、この様な牛が食肉として流通しない様な監視システムを構築する必要性が示唆された。

F. 危険情報

特になし

G. 研究発表

2. 学会発表

ウシ由来アミロイド投与によるウサギウサギにおける実験的アミロイドーシス
第 138 回日本獣医学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

—NF- κ B 活性を抑制し、PPAR 活性を上昇させる薬剤の有用性—

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、加齢とともに低下する副腎ホルモン DHEA と抗炎症作用がある漢方薬黄芩からの成分であるバイカレインに注目した。DHEA およびバイカレインとも、*in vitro* で骨髄腫細胞株および患者骨髄腫細胞の増殖・生存を強く抑制した。その抑制機序は、PPAR β 発現を亢進させ、I κ B α のリン酸化を抑制して、NF- κ B(p65)の核内移行を抑制して NF- κ B 活性を低下させていると考えられた。SCID-hIL6 Tg mice を使用した *in vivo* 系においても、DHEA およびバイカレインは増殖・生存を強く抑制し得た。従って、DHEA およびバイカレインは、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 アミロイドーシスの背景には形質細胞の単クローン性増殖がある。アミロイド沈着を予防する意味で、その基となる形質細胞の増殖、特に *in vivo* 増殖・生存を抑制し得る因子・物質を明らかにしようとするものである。本研究班においては、加齢とともに減少する副腎ホルモン DHEA(dehydroepiandrosterone)と抗炎症作用のある漢方薬の中から選別された黄芩の成分であるバイカレインに注目した。

B. 研究方法

1. 副腎ホルモン DHEA の作用

1) 骨髄腫および AL アミロイドーシスが高齢者に発症することから、加齢とともに低下する DHEA (S) の血中濃度を検討した。2) DHEA の *in vitro* 系での作用： 骨髄腫細胞株 U266,NOP-2, ILKM-3 等に DHEA を添加培養して、その増殖抑制作用があるか否かを検討した。骨髄ストローマ細胞株 KM-102 あるいは患者骨髄単核球分画を DHEA 添加培養後、培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法で測定した。

同様の添加培養で、PPAR β 発現、IkB α のリン酸化、NF-kB(p65)の核移行および NF-kB 標的遺伝子 IL-6, XIAP の発現を検討した。3) DHEA の in vivo 系での効果： SCID-hIL6 Tg mice の腹腔内へ骨髓腫細胞株 U266 をアガロースゲルとともに移植した。DHEA(100 μ g)を移植時、週1回(3週)皮下注射し、移植後8~12週後に腹腔内の細胞数、腫瘍形成等を観察した。

2. バイカレインの作用

1) 骨髓腫細胞株 U266, NOP-2, ILKM3 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髓腫患者9症例からの骨髓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) 骨髓腫細胞株において、バイカレイン添加による NF-kB 活性への作用を検討した。PPAR β 発現、IkB α 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。4) バイカレインの in vivo 系での作用： SCID-hIL6 Tg mice の腹腔内へ骨髓腫細胞株 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 μ g)をマウス皮下注射して、その効果を約8~12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

副腎ホルモン DHEA (S) は、骨髓腫患者で有意にその血中濃度は低下していた。DHEA は、in vitro 系で骨髓腫細胞株および患者骨髓腫細胞の増殖・生存を抑制し、

骨髓ストローマ細胞株および患者骨髓単核球からの IL-6 産生を濃度依存性に抑制した。漢方薬黄芩に含まれるバイカレインも同様に骨髓腫細胞株および患者骨髓腫細胞の増殖・生存を著明に抑制した。それらの抑制に機序を検討すると、DHEA およびバイカレインとも PPAR β 発現を亢進させ、IkB α のリン酸化を上昇させて、結果的に NF-kB(p65)の核内移行を抑制して NF-kB 活性を低下させた。このことは、NF-kB 標的遺伝子である IL-6, XIAP の発現を抑制していたことで確認された。SCID-hIL6 Tg mice を使用した骨髓腫細胞株 U266 の in vivo 移植・生存系でも、DHEA およびバイカレインは著明な増殖・生存の抑制効果を示した。

D. 考察

加齢とともに低下するホルモン DHEA (S) は、骨髓腫患者の血清で有意に低下しており、骨髓腫細胞に対して in vitro および in vivo とも増殖抑制作用があった。漢方薬の黄芩の成分であるバイカレインにも同様な増殖・生存の抑制作用が認められた。両者とも、NF-kB 活性を抑制してその作用を発揮していると考えられた。特に、抗 NF-kB に働く PPAR を活性化させる可能性が示唆されたことは、今後の詳細な作用機序を考える上で極めて重要な視点と考えられる。これらの研究結果は、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. DHEA およびバイカレインは、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. DHEA およびバイカレインの増殖・生存の抑制効果は、一つには NF- κ B 活性の抑制によると考えられた。
3. DHEA およびバイカレインは、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. DHEA およびバイカレインは、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) Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Taniguchi O, Kawano MM: Requirements of src family kinase activity associated with CD45 for Myeloma cell proliferation by interleukin-6. *Blood* 99:2172-2178, 2002.
- 2) 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.
- 3) 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)

4) 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)

5) 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, Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X: Growth mechanism of human myeloma cells by interleukin-6. (invited speaker) The 29th World cCongress of the International Society of Hematology, Seoul, Korea, Aug. 24-28, 2002.

2) 河野道生: 多発性骨髄腫の臨床: MGUS から myeloma まで 教育講演 第 65 回日本血液学会総会(第 45 回日本臨床血液学会総会)、大阪、8 月 29 日、2003 年

- 3) Kawano MM, Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Obata M: Phenotypic heterogeneity of myeloma cells and its biological significance. (invited speaker) 9th International Workshop of Multiple Myeloma, Salamanca, Spain, May 23-27, 2003.
- 4) Kawano MM: Heterogenous expression of CD45 on myeloma cells and its biological significance. (invited speaker) Multiple Myeloma 2004, Torino, Italy, April 22-24, 2004.
- 5) 大津山賢一郎、劉尚勤、馬梓、李富君、Saeid Abroun、鄭旭、榎泰子、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
- 6) 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、榎泰子、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
- 7) 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、榎泰子、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
- 8) 馬梓、劉尚勤、大津山賢一郎、Saeid Abroun、李富君、鄭旭、榎泰子、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icalein 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
- 9) 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, I.U.S.A., Dec.4-7, 2004.
- 10) 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, I.U.S.A., Dec.4-7, 2004.
- 11) 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 bone marrow mononuclear cells from the myeloma patients. 46th Annual meeting of American Society of Hematology, San Diego, I.U.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

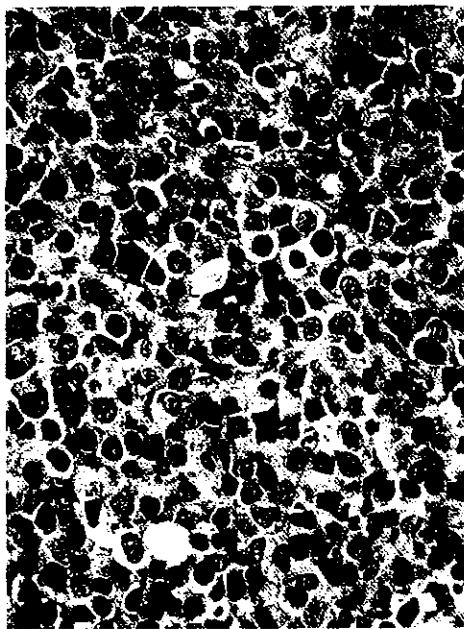
DHEA(-)



DHEA(+)



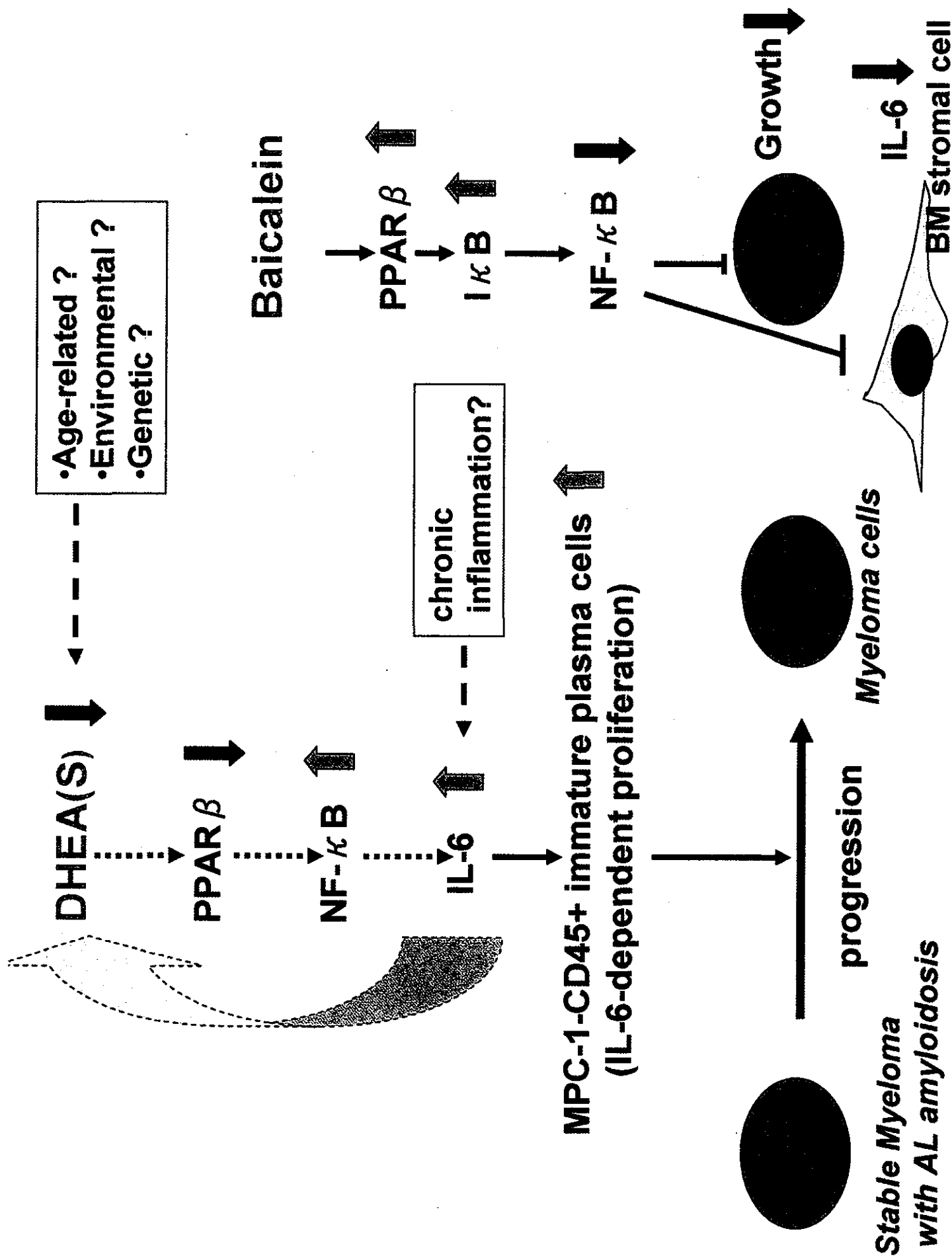
mass from DHEA(-) (HE, x100)



Mass formation 12 W after injection

	DHEA(-)	DHEA(+)	Baicalein(+)
Exp.1	4/5mice	1/5	0/5
Exp.2	5/5	0/5	0/5
Exp.3	5/5	2/5	0/5
		(100 ug)	(10 ug)

Fig. 1 DHEAおよびバイカレインによるin vivo増殖抑制



アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究

[演題名] 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
—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—

[分担研究者] 氏名：加藤昭夫
所属：山口大学農学部生物機能科学科
[共同研究者] 氏名：阿座上弘行
所属：山口大学農学部生物機能科学科

研究要旨 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でアミロイド型リゾチーム及びシスタチンを発現分泌させ、アミロイド型タンパク質の分泌機構ならびにその抑制に関する研究を行った。小胞体膜結合型分子シャペロンカルネキシン及び PDI ホモログ Eps1 を欠損した酵母では不安定変異リゾチームやアミロイド型リゾチームやシスタチンの分泌量が著しく増大することが示された。この結果は、これらの分子シャペロンが不安定タンパク質の品質管理に関与しており、その機能低下がアミロイド型タンパク質などの不安定型タンパク質を細胞外へ分泌しやすくなることを暗示するものである。また、酵母でアミロイド型タンパク質を発現分泌する系を用いて、アミロイド形成ならびにその抑制機構を検討した。モデルタンパク質として、酵母での分泌量が多いアミロイド型シスタチン変異体 (I66Q) を用いた。酵母 *Pichia pastoris* で発現分泌させると培養中にアミロイド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。今後、この系を用いてアミロイドシス抑制成分の検索することができる。

A. 研究目的 近年、真核生物は共通して小胞体でのタンパク質の品質管理により、正しく折りたたまれたタンパク質だけを細胞外に分泌し、不安定でアンフォールドしやすいタンパク質は ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) システムにより、分解される分子機構が明らかにされてきた^{1,2)}。この ERAD システムは老齢化とともに機能低下することが予想され、アミロイドシスを起しやすいタンパク質が細胞外へ分泌しやすくなると考えられる。我々はこの仮説を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として用いて証明しようとした。本研究ではアミロイド型変異リゾチーム、シスタチンを酵母で発現分泌するシステムを用いて、これらのアミロイ

ド型タンパク質の発現分泌が細胞内の品質管理機能の低下によってどのように変化するのかを明らかにすることを試みた。また、酵母発現系を用いて、*in vivo* でのアミロイド凝集体形成の可視化とその抑止成分の検索システムを作成することを目的とした。

B. 研究方法 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の分子シャペロン (カルネキシンホモログ Cnelp 及び PDI ホモログ Eps1p) を欠損した変異株と野生株を用いて、アミロイド型リゾチーム、シスタチンの発現分泌を調べた。酵母 *Pichia pastoris* は高分泌性の異種蛋白質発現系であり、このシステムを用いてアミロイド型タンパク質を分泌させ、培養中におけるアミロイド凝集体形成の評価を行っ

た。ヒトリゾチームとニワトリリゾチームのアミロイド型変異体は部位指定変異により作成した。ニワトリリゾチームの方が酵母での発現分泌量が多いので、ニワトリリゾチームのアミロイド変異体 (I55T, D66H) を用いた。シスタチンの場合も同様に、ヒトシスタチンに比べニワトリシスタチンは酵母での発現分泌量が多く、またヒト型とのホモロジーが高く、アミロイド型が容易に得られるため、ニワトリシスタチンを用いた。アミロイド型シスタチンは 66 位の Ileu を Gln に置換した I66Q 変異体を部位指定変異により作成した。

C. 研究結果 動物細胞では小胞体膜結合型の糖タンパク質特異的分子シャペロンであるカルネキシンを欠損すると致死的であるが、酵母 *S. cerevisiae* はカルネキシンを欠損しても生育に影響しないため、カルネキシンの役割を正確に調べることが可能である。図 1 に示すように、野生型酵母及びカルネキシン欠損酵母を用いて、グリコシル型リゾチームのアミロイド型 (D66H) を含む種々の変異体を発現分泌させると、安定な野生型リゾチームなどは野生型およびカルネキシン欠損酵母で分泌量は変化なく多量分泌する。一方、野生型リゾチームに比べ、変性転移転が 15~19℃ 低下するアミロイド型リゾチーム (D66H) など不安定型リゾチームは野生型酵母では分泌が著しく抑制されるが、カルネキシン欠損酵母では 3~5 倍量多く分泌した。この現象はカルネキシン欠損により、品質管理されずに小胞体に蓄積した不安定変異体が蓄積し、小胞体内で Unfold Protein Response が生じ、他の分子シャペロンの著しい増加をもたらし、フォールディングが促進されるためと考えられる⁴⁾。

また、図 2 に示すように PDI ホモログ

のシャペロンである Eps1p を欠損した酵母を用いて、SS 欠損型不安定変異リゾチーム (C94A) を分泌させると著しく分泌量が増大した。現在、アミロイド型リゾチームやシスタチンの分泌を検討中である。表 1 に示すように、野生型酵母で分泌したリゾチームは SS 欠損リゾチームの活性は野生型リゾチームと同じ活性を示し、フォールディングしたものが分泌していることが示されるが、一方、Eps1 欠損酵母で分泌した SS 欠損変異リゾチームの活性は 34% に低下しており、正しくフォールディングしていないものの分泌が確認できた。これは Eps1 欠損により、前述のカルネキシン欠損の場合と同様に、Unfold Protein Response により、不安定なタンパク質のフォールディングが促進されたためと考えられる。これらの結果は分子シャペロンの機能低下がアミロイド型タンパク質の品質管理機能を低下させ、アミロイド型タンパク質を細胞外に分泌することを示している。

本研究のもうひとつの目的である酵母発現系で多量に分泌するアミロイド型タンパク質の作成について検討した。そのモデルとして、ヒトの脳出血の原因となるアミロイド型シスタチンを用いた。図 3 に示すように、ヒトシスタチンとニワトリシスタチンはホモロジーが高く、ヒトのアミロイド変異体 L68Q に相当する I66Q ニワトリ変異体を作成した。この部位は β 構造を分子内でパックするのに重要な疎水残基であり、親水性アミノ酸に置換すると分子内にパックされていた β シート構造が分子の外側に露出しやすくなり、この β シートを介して二量体を形成し、引き続き多量体を形成し、アミロイド線維形成を考えると考えられる。酵母発現系で I66Q を分泌させると *Saccharomyces cerevisiae* に比べ、*Pichia pastoris* で

発現させると著しく分泌することが明らかになった(図4)。また、ヒトのアミロイド型シスタチンに比べ著しく多量に得ることができた。この酵母でのアミロイド型シスタチンの発現系を用いて、アミロイド型シスタチンを分泌させると培養液にアミロイド型凝集体オリゴマーが経時的に増加し、モノマーは増加しないことが示され、*in vivo* システムでアミロイドシスを追跡できることが示された(図5)。モノマー、オリゴマー、ポリマー凝集体は培養液の硫酸分画により調製し、電気泳動で確認したものである。このアミロイド型変異体 I66Q は二量体形成に引き続き多量体を形成することは SH プロテアーゼの阻害活性が著しく低下することからも確認された。図6に示したように、このアミロイド型変異体のアミロイド形成時間(1ヶ月)を要するが、典型的なアミロイドシスを観察できた。酵母の培養中に得られる凝集体は条件を選べば規則的なアミロイド線維を形成すると考えられる。一般的に、生体内でのアミロイド形成機構として、シードの必要性や長時間を要するなどいろいろな因子が議論されており、今後の一層の研究が必要であろう。本研究者はこのアミロイドシス形成機構にヒントを与える高分泌型 I108T アミロイド変異体についても検討を加えており、N-型糖鎖導入がアミロイド形成を抑制することを観察しており、今後のアミロイドシス治療につながる情報を提供していくための研究を推進している。

D. 考察 酵母をモデル生物としてアミロイド型リゾチーム、シスタチンの分泌系を用いて小胞体内での品質管理に関与する分子シャペロンカルネキシンと PDI ホモログ Eps1 の役割を調べた。真核生物の中で、動物細胞ではこれらのシャペロン

を欠損すると致死的であり、酵母はこれらのシャペロンを欠損しても生育は影響を受けないためにモデル生物として最適である。本研究で明らかにしたように、カルネキシンや PDI ホモログ欠損により、アミロイド型変異体などアンフォールドしやすい不安定なタンパク質が数倍分泌しやすくなる。この結果は分子シャペロンなど新生タンパク質の品質管理に関与している成分の機能低下がアミロイド病の一つの要因となっていると予測される。実際にヒトの場合でも老齢化に伴い、カルネキシンなどのシャペロンの発現量が低下することが報告されている³⁾。本研究で作成したニワトリシスタチンのアミロイド型変異体は酵母で効率よく発現分泌するため、アミロイド形成機構を調べるのに都合のよい系である。

すなわち、アミロイド型シスタチンが分泌するとともに、そのアミロイド凝集過程が追跡できる。現在 A β ペプチドを用いて、アミロイド形成機構を研究できるが、タンパク質を用いたアミロイドシスを調べる系の確立が望まれている。この目的に、酵母でのアミロイド型シスタチンの発現分泌系は適した系であり、今後、アミロイド凝集阻害成分の評価システムに利用できると考えられる。

E. 結論 酵母をモデル生物として、アミロイド型タンパク質を分泌するシステムを用いて、アミロイドシスの分子機構を検討した。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。