

## [引用文献]

1. R. Sitia & I. Braakman. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*, 426, 891-894 (2003).

2. Y. Oda, N. Hosokawa, I. Wada and K. Nagata. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science*, 299, 1394-1397 (2003).

3. B.H. Choi and J.S. Kim. Age-related decline in expression of calnexin. *Exp. Mol. Med.* 36, 499-503 (2004).

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

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) 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)

(2) Y. Song, J. Sakai, A. Saito, M. Usui, H. Azakami, and A. Kato: Relationship between the stability of lysozymes mutated at the inside hydrophobic core and secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nahrung*, 46, 209-213 (2002)

(3) A. Saito, M. Usui, Y. Song, H. Azakami and A. Kato: Secretion of glycosylated  $\alpha$ -Lactalbumin in yeast *Pichia pastoris*. *J. Biochem.* 132, 77-82 (2002)

(4) S.T. Liu, A. Saito, H. Azakami and A. Kato: Expression, purification, and characterization of an unstable lysozyme mutant in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 27 304-312 (2003)

(5) S. Begum, A. Saito, A. Kato, J. He and H. Azakami: Expression and characterization of chicken ovomucin in *Pichia pastoris*. *Nahrung*, 47, 359-363 (2003)

(6) A. Saito, Y. Sako, M. Usui, H. Azakami and A. Kato: Functional properties of glycosylated lysozyme secreted in *Pichia Pastoris*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 67, 2334-2343 (2003).

(7) M. Usui, A. Saito, N. Taniguchi, N. Nishijima, H. Azakami and A. Kato: Reduction of antigenicity of Cryj1, major allergen of Japanese cedar pollen, by the attachment of polysaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.* 67, 2425-2430 (2003).

(8) M. Usui, H. Tamura, K. Nakamura, T. Ogawa, M. Muroshita, H. Azakami, S. Kanuma and A. Kato: Enhanced bactericidal action and masking of allergen structure of soy protein by attachment of chitosan through Maillard-type protein-polysaccharide conjugation. *Nahrung*, 48, (2004).

(9) M. Usui, T. Shimizu, Y. Goto, A. Saito and A. Kato: Effective reduction of antigenicity of hen lysozyme by site-specific glycosylation. *FEBS Letters* 557, 169-173 (2004)

(10) X.H. Xu, O. Kashima, A. Saito, H. Azakami and A. Kato: Structural and functional properties of chicken lysozyme fused serine-rich heptapeptides at C-terminus. *Biosci. Biotech. Biochem.* 68, 1273-1278 (2004)

(11) X.H. Xu, K. Kanbara, H. Azakami and A. Kato: Expression and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Cne1p, a calnexin homologue. *J. Biochem.*, 135, 615-618 (2004)

(12) X.H. Xu, H. Azakami and A. Kato: P-domain and lectin site are involved in the chaperone function of *Saccharomyces cerevisiae* calnexin homologue (Cne1p). *FEBS Letters* 570, 155-160 (2004)

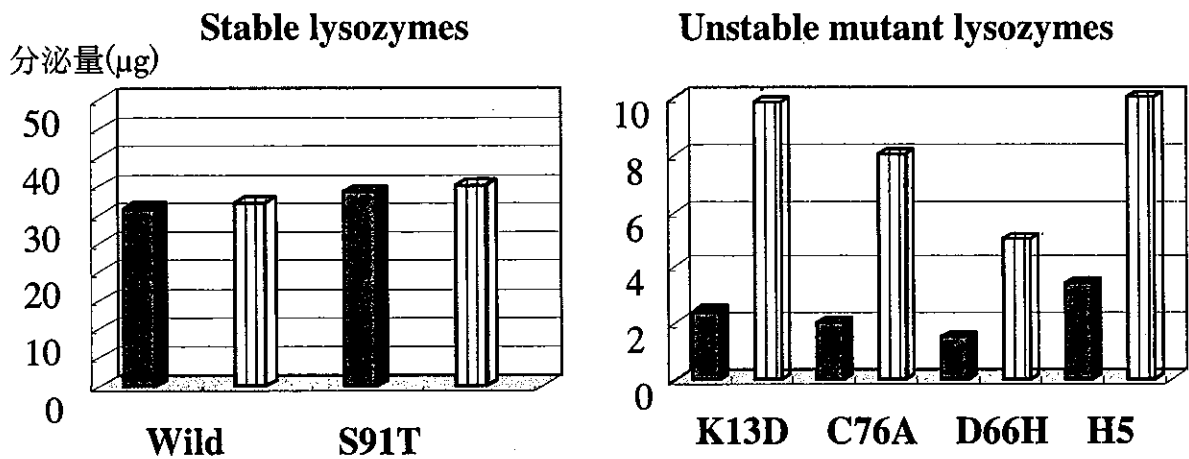


図1. 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* での安定型リゾチーム(wild, S91T)および不安定型リゾチーム (K13D, C76A, D66H, S91T) の分泌。■, 野生型酵母; ▨, カルネキシン欠損酵母

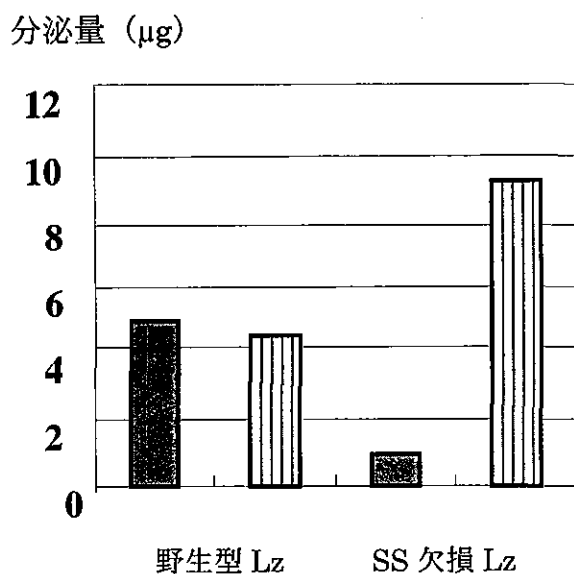
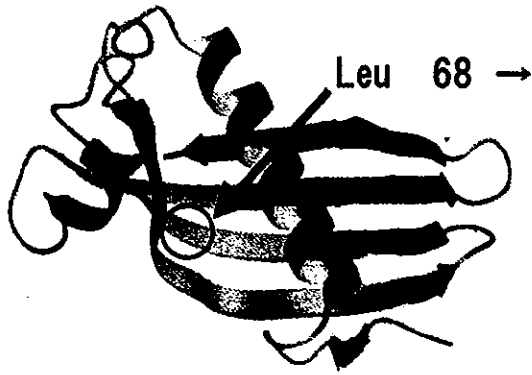


図2. PDI ホモログ Eps1 欠損酵母での野生型リゾチーム及び SS 欠損型リゾチーム変異体 (C94A) の分泌。■, 野生型酵母; ▨, Eps1 欠損酵母

表 1. PDI ホモログ Eps1 欠損酵母で分泌したリゾチームの溶菌活性

	野生酵母	Eps1 欠損酵母
野生型リゾチーム	100	100
SS 欠損型リゾチーム	100	34

Human cystatin C



Chicken cystatin

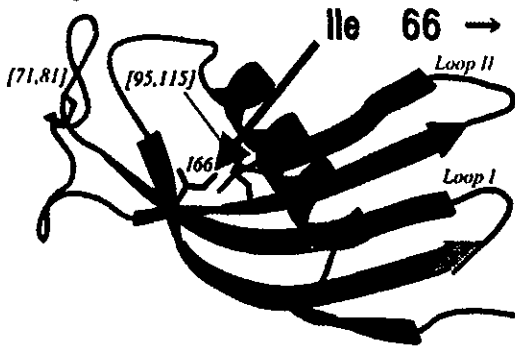


図3. ヒトシスタチンとニワトリシスタチンのアミロイド型変異部位

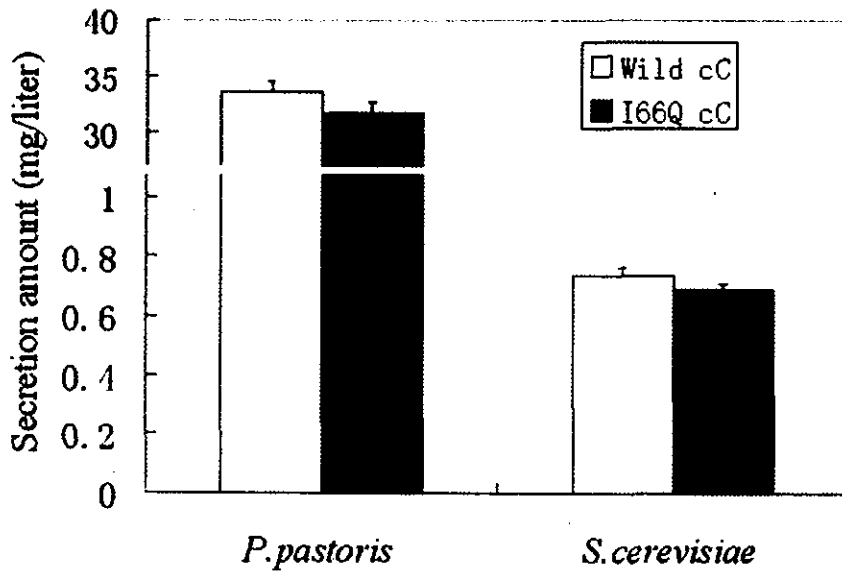


図4. アミロイド型シスタチンの酵母 *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* での発現分泌の比較

分泌量(mg/L)

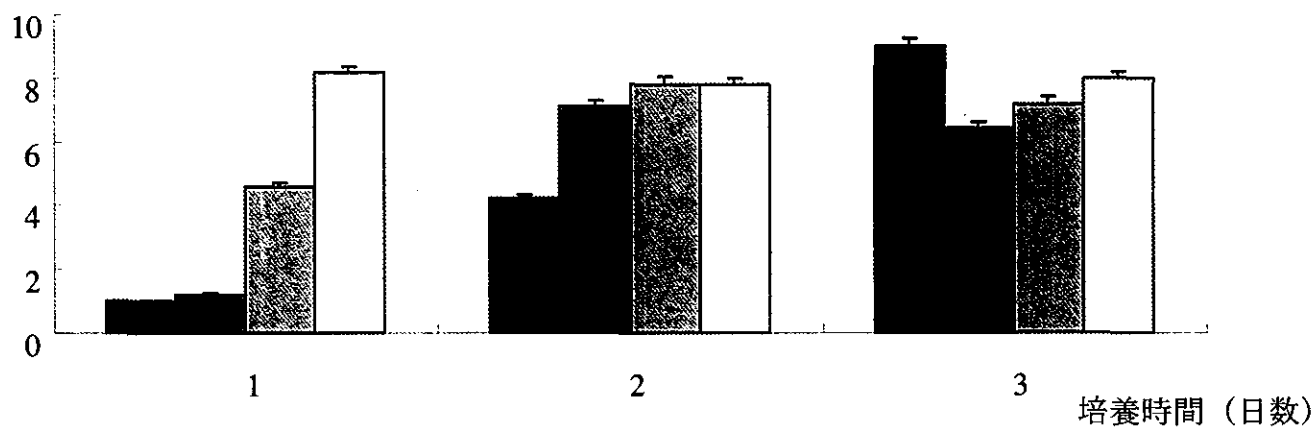


図5. アミロイド型シスタチンの酵母での分泌中における単量体、二量体、多量体、凝集体の経時的形成。■，凝集体；■，多量体；▨，二量体；□，単量体

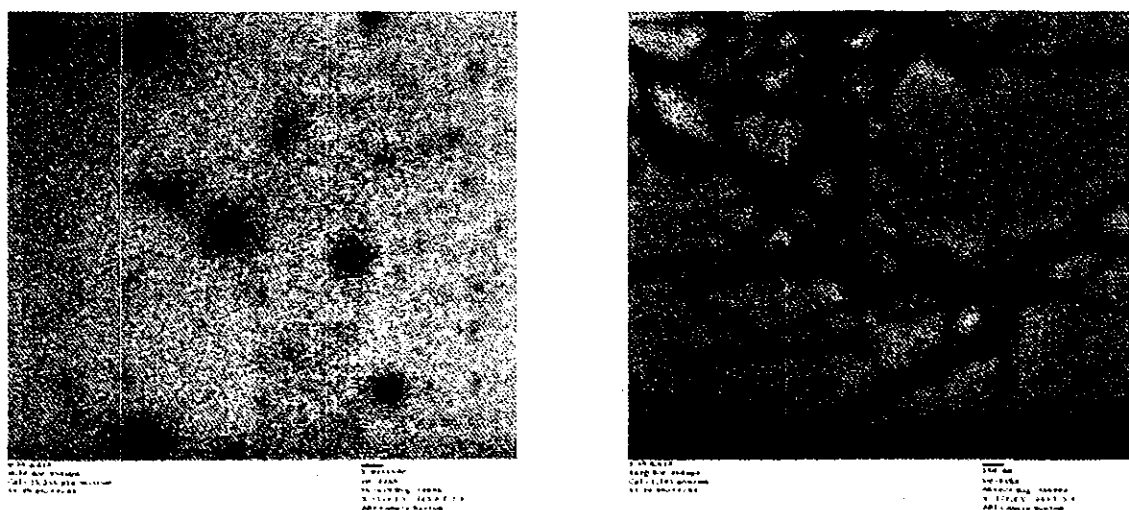


図6. アミロイド型シスタチンのアミロイド線維形成の電顕図。左図，野生型シスタチン；右図，アミロイド型シスタチン (I66Q)

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

アルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維およびA $\beta$ 蛋白に対する各種  
生体分子の親和性の定量的解析-伝播機構解析の為の基礎的検討-

分担研究者 内木 宏延 福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域  
共同研究者 長谷川一浩 福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域  
小野賢二郎、山田正仁 金沢大学神経内科

研究要旨 脳内においてアルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維(fA $\beta$ )形成・沈着・伝播を引き起こす複雑な分子間相互作用を解明するため、表面プラズモン共鳴法測定装置（ピアコア）を用いて網羅的解析を試みた。最初に fA $\beta$ の試験管内での伸長・脱重合機構を詳細に解析し、伸長反応、脱重合反応共に一次反応形式に従うことを示した。また、重合速度と脱重合速度が均衡するA $\beta$ 蛋白濃度(臨界モノマー濃度)を実験的に求めることができた。次いで、ピアコアのセンサーに A $\beta$ 蛋白および fA $\beta$ を固定し、各種生体成分を添加して親和性を解析した。その結果、fA $\beta$ 及びA $\beta$ 蛋白に対する各種生体分子（血漿蛋白質、細胞外基質成分等）の親和性は広い範囲に分布した。さらに、アミロイド線維伸長反応速度などを組み合わせて数値シミュレーションを行い、各成分の効果を比較解析する手法を開発した。本方法により、A $\beta$ 蛋白質の動態と fA $\beta$ 形成に重要な影響を及ぼす生体成分を特定し、それらの反応機構を解析できると考える。また、本解析法を各種アミロイド線維に応用し、沈着・伝播に係わる生体成分を同定することも可能と考えられる。

#### A. 研究目的

われわれはこれまでに、各種前駆体蛋白質からのアミロイド線維形成過程を、チオフラビン T を用いた閉鎖反応系を駆使して速度論的に解析してきた。その結果、同過程が重合核依存性重合モデルで説明できることを明らかにした。このモデルは、A $\beta$ 蛋白からの重合核形成過程及び線維伸長過程より構成される。核形

成過程は熱力学的に起こりにくく、全体の律速過程になっている。アミロイドの伝搬は、核としてのアミロイド線維の伝搬により線維形成が誘発される現象と考えられる。一方、伸長過程は一次反応速度論形式に従い速やかに進行するが、重合と脱重合の平衡反応である。本研究では、表面プラズモン共鳴法による開放反応系測定装置（ピアコア）を用いて、脱

重合反応を高感度に検出することで、伸長反応過程を詳細に解析した。

一方、生体内における、アミロイド線維形成あるいは、前駆体蛋白質の産生、代謝過程を検討する上で、生体分子との相互作用を考慮することは不可欠である。例えば、アミロイド前駆体蛋白質が各種の生体成分と複合体を形成したり、アミロイド線維が好発部位に存在する特定の生体成分と強く相互作用して沈着することなどが考えられる。生体内におけるこの様な前駆体蛋白質の代謝・分解、アミロイド形成さらにアミロイドの伝搬の機構を解析する為、アミロイド前駆体蛋白質とアミロイド線維に対する各種生体成分の親和性を網羅的かつ定量的に解析し比較した。

## B. 研究方法

測定には表面プラズモン共鳴法 (SPR) を測定原理とする Biacore 3000 (ピアコア)を用いた。反応のモデルケースとして、A $\beta$ 40 蛋白、および、 $\beta$ アミロイド線維 (fA $\beta$ 40) の系を用いた。

1.伸長反応過程の解析：最初に、重合核となる $\beta$ アミロイド線維を超音波破碎後、センサーチップ上に共有結合固定した。固定化量は4つのフローセル毎に変化させ、0~4000 レスポンスユニット(RU)とした。次いで、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.5) に溶解した 0~30  $\mu$ M の A $\beta$  蛋白溶液を添加し、37  $^{\circ}$ Cにおける $\beta$ アミロイド線維の伸長過程及び脱重合過程をリアルタイムで測定した。

2.分子間相互作用の測定；センサーチップ上の別々のフローセルに、A $\beta$ 蛋白モ

ノマー、及び fA $\beta$ を固定化し、これに各種生体分子 (精製蛋白質) を含む緩衝液を添加し、A $\beta$ 蛋白、fA $\beta$ それぞれに対する結合並びに解離速度定数、更に解離平衡定数 ( $K_D$ )を求めた。この方法により、平衡状態での親和性のみならず、動的な反応性を定量化した。

## 倫理面への配慮

本研究は試薬を用いての試験管内実験であり、倫理面での問題はない。

## C. 研究結果

1. 開放反応系における $\beta$ アミロイド線維の伸長と脱重合機構の基礎検討(速度論解析)。線維を固定化したフローセルに A $\beta$ 蛋白溶液を添加したところ、反応シグナルはいずれも直線的に増加した。この傾き (伸長速度) は、線維の固定化量および A $\beta$ 蛋白濃度に比例した。次いで、A $\beta$ 蛋白の供給を停止し、緩衝液のみを流すと、SPR シグナルは経時的に減少する。この減少は早い成分と、定常的な遅い成分から構成されているが、この内、遅い減少反応成分はアミロイド線維の固定化量だけに比例し、脱重合の速度に相当する。この結果は、伸長反応、脱重合反応共に、一次反応速度論形式に従うことを示している。更に、線維の伸長反応と脱重合反応が釣り合い、見かけ上伸長も脱重合もしない A $\beta$ 蛋白の濃度、つまり、臨界モノマー濃度を実験的に求めたところ、約 20 nMであった。

### 2.分子間相互作用の測定と解析

血漿蛋白質 (血清アルブミン(HSA)、フィブリノーゲン、IgG、IgM、 $\beta$ 2ミク

ログロブリン、apoE、トランスフェリン等)、および、細胞外マトリックス成分 (collagen 類、フィブロネクチン、ラミニン等) について、反応を測定した。その結果、検討した生体成分中では、A $\beta$  蛋白・fA $\beta$  共に apoE が最も強く反応した。その他の成分の殆どは弱～中程度の親和性を示したが、A $\beta$  蛋白と fA $\beta$  に対する親和性はそれぞれ特徴的な値を示している。例えば、血清アルブミンは A $\beta$  蛋白に対する親和性は弱い、fA $\beta$  に対しては多少強く反応する。コラーゲン type4 も同様に、fA $\beta$  に対しては比較的強く反応するが、A $\beta$  蛋白には殆ど反応しない。この様な親和性の違いが線維の沈着の程度の差を生みだし、好発部位の差などに影響を及ぼす可能性がある。

### 3. 脳内における A $\beta$ 蛋白動態及び fA $\beta$ 線維形成の数値モデル作成の試み

脳実質を一つのコンパートメントと見なし、A $\beta$  蛋白は輸送・産生により流入し、輸送・異化により除去されるという開放反応モデルを構築した。さらに A $\beta$  蛋白はコンパートメント内で他の生体分子と結合し、一方で $\beta$  アミロイド線維形成に消費されるように設定した。生体分子の例として、apoE と HSA を選び、脳脊髄液中の濃度を基に設定した初期濃度 (apoE 250nM, HSA 5 microM) と実測した反応定数を用いてシミュレーションを行った。その結果、遊離の A $\beta$  蛋白は速やかに apoE と高親和性複合体を形成した。また、線維形成は apoE に影響を受け、進行が遅れた。一方、親和性が弱い HSA では A $\beta$  蛋白との複合体形成量はわずかであった。この様に、apoE の

様な強い親和性を有する分子が共存すると A $\beta$  蛋白動態及び fA $\beta$  線維形成に影響を及ぼし得ることが示唆された。

### D. 考察

本研究では、前駆体蛋白の代謝・分解・アミロイド形成の各経路、および線維への各種生体成分の結合とその伝播への影響を解析するために、A $\beta$  蛋白および fA $\beta$  に対する各種生体分子の親和性を網羅的かつ定量的に解析し、モデルを構築することを最終目標とする。A $\beta$  蛋白・fA $\beta$  と各種生体分子の分子間相互作用には、高親和性から低親和性のものが広く分布していると考えられる。親和性の高い分子同士の反応の検出には酵素免疫測定法などが一般的に用いられており、有効である。一方、親和性の弱い分子同士の反応の場合であっても、高濃度に存在する成分は総体として影響を与えている可能性がある。しかし、上記の方法では複合体を分離している間に解離するため測定が困難であるが、ピアコアによるリアルタイム測定ではある程度弱い反応でも検出可能である。

A $\beta$  蛋白の生体内濃度は nM オーダーであるため、この濃度で直接相互作用を測定することは困難である。さらに、脳内を始めとする生体内の反応は、産生と排出・分解が常時進行する動的な開放反応系である。そこでの動態を解明するためには、物質の産生・代謝と共に、動的な分子間相互作用を把握する必要がある。この為、物質の量 (濃度) およびその産生・代謝速度を理解することは勿論、分子間相互作用の平衡結合定数さらには、

結合速度・解離速度までを理解する必要がある。以上の問題点に対しては、表面プラズモン共鳴法を用いた開放反応測定系によりA $\beta$ 蛋白と $\beta$ アミロイド線維(fA $\beta$ )に対する各種生体成分の結合・解離速度定数を網羅的に測定し、複数の反応を統合し生体を模倣する開放反応系数値モデルを用いた定量的シミュレーションを行うことが一つの解決法であると考える。

今後は今回示したような数値モデルをさらに精緻にし、脳内のA $\beta$ 蛋白の動態およびfA $\beta$ 形成過程の全体を一つのシステムとして再構成する試みを行う。また、各種のアミロイド線維と細胞外マトリックス成分などとの親和性を比較したり、生体成分による線維の安定化を解析することで、重合核としての線維の沈着・伝播に関する基礎的解析を展開することを計画している。

#### E. 結論

SPR法を用いた開放反応系によって $\beta$ アミロイド線維の伸長、および脱重合機構を解析し、臨界モノマー濃度を直接測定した。次いでA $\beta$ 蛋白およびfA $\beta$ に対する各種生体分子の親和性を比較し、線維の沈着機序に及ぼす生体分子の効果を解析する方法を開発した。また、A $\beta$ 蛋白およびfA $\beta$ に対する各種生体分子の反応速度定数を測定し、生体を模倣する開放反応系数値モデルを用いたシミュレーションを行った。この方法により、これらの共存分子がA $\beta$ 蛋白の動態にどの様に影響を及ぼすのかを推定することが可能と思われる。

また、複数の反応を統合し定量的に評価することで、A $\beta$ 蛋白の動態およびfA $\beta$ 形成過程の全体、並びに重合核としての線維の沈着・伝播をシステムとして解析できる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Kinetic modeling and determination of reaction constants of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibril extension and dissociation using surface plasmon resonance. Hasegawa K, Ono K, Yamada M, Naiki H, *Biochemistry* 41(46): 13489-13498, 2002

(2) Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. Ban T, Hamada D, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y, *J. Biol. Chem.* 278(19): 16462-16465, 2003

(3) Amyloidogenic synthetic peptides of  $\beta$ 2-microglobulin: a role of the disulfide bond. Hasegawa K, Ohhashi Y, Yamaguchi I, Takahashi N, Tsutsumi S, Goto Y, Gejyo F, Naiki H, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304(1): 101-106, 2003

(4) Glycosaminoglycan and proteoglycan inhibit the depolymerization of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibrils in vitro. Yamaguchi I, Suda H, Tsuzuike N, Seto K, Seki M, Yamaguchi Y, Hasegawa K, Takahashi N, Yamamoto S, Gejyo F, Naiki H, *Kidney Int.* 64(3): 1080-1088, 2003

(5) Potent anti-amyloidogenic and fibril-



- destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M, J. Neurochem. 87(1): 172-181, 2003
- (6) Glycosaminoglycans enhance the trifluoroethanol-induced extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. Yamamoto S, Yamaguchi I, Hasegawa K, Tsutsumi S, Goto Y, Gejyo F, Naiki H. J Am Soc Nephrol. 15(1): 126-133, 2004
- (7) Optimum amyloid fibril formation of a peptide fragment suggests the amyloidogenic preference of beta 2-microglobulin under physiological conditions. Ohhashi Y, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. J Biol Chem. 279(11):10814-10821, 2004
- (8) Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro*. Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. J Neurosci Res. 75(6): 742-750, 2004
- (9) A seed for Alzheimer amyloid in the brain. Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lemere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K. J Neurosci. 24(20): 4894-4902, 2004.
- (10) Environment- and mutation-dependent aggregation behavior of Alzheimer amyloid beta-protein. Yamamoto N, Hasegawa K, Matsuzaki K, Naiki H, Yanagisawa K. J Neurochem. 90(1): 62-69, 2004
- (11) Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. Yamamoto S, Hasegawa K, Yamaguchi I, Tsutsumi S, Kardos J, Goto Y, Gejyo F, Naiki H. Biochemistry. 43(34): 11075-11082, 2004
- (12) Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects *in vitro*. Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Exp Neurol. 189(2): 380-392, 2004
- (13) Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro*. Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Biochim Biophys Acta. 1690(3): 193-202, 2004

## 2. 学会発表

- (1) 内木宏延：アミロイド線維形成・沈着の分子機構—アルツハイマー病、透析アミロイドーシスを中心に。第3回日本蛋白質科学会年回，2003,6,23-25，札幌。プログラム・要旨集。32，2003,5。
- (2) Hironobu Naiki: Molecular mechanism of amyloid fibril formation and destabilization: Implication in the therapeutics of Alzheimer disease and  $\beta$ 2-microglobulin-related amyloidosis, 第76回 生化学会大会, 2003, 10, 15-18, 横浜. 生化学 75(8), 712, 2003, 8.
- (3) Naiki, H. : Molecular interactions in the formation and destabilization of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils *in vitro*. Joint Meeting of

the 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and the 47th Annual Meeting of the Japanese Society for neurochemistry ISN Symposium . Neurochemical aspects and approaches for neurological diseases. 2004,9,21-23, Osaka.

#### 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

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

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

分担研究者 山田 学 (独) 動物衛生研究所生産病研究部病態病理研究室  
共同研究者 中村 菊保 (独) 動物衛生研究所生産病研究部病態病理研究室  
山本 佑 (独) 動物衛生研究所生産病研究部病態病理研究室  
古林 与志安 帯広畜産大学畜産学部獣医学科  
松井 高峯 帯広畜産大学畜産学部獣医学科

研究要旨 平成 14 年 9 月から平成 16 年 8 月までの二年間に病性鑑定を実施した牛 5702 頭のうちアミロイド症は 20 例で、その発生率は 0.35% だった。牛アミロイド症 10 症例におけるアミロイド沈着の病変分布を、組織学的、免疫組織化学的に検索したところ、既知の肝臓、脾臓、腎臓、消化管、内分泌器官に加え、生殖器、乳腺、骨格筋においてもアミロイド沈着が観察された。今回、抽出牛アミロイドを接種した豚においてアミロイドの沈着は認められなかった。

A. 研究目的

家畜におけるアミロイド症の発生頻度と病理像、病変分布を明らかにする。

また、牛腎由来 AA アミロイドの豚への接種試験を実施し、牛アミロイドの豚への伝播の可能性を検討する。

B. 研究方法

各都道府県の家畜保健衛生所において、平成 14 年 9 月から平成 16 年 8 月までの二年間に病性鑑定を実施した牛について、アミロイド症例を検索し、二年間での牛アミロイド症の発生頻度を明らかにする。

牛アミロイド症と診断した 10 症例の全身諸臓器のパラフィン包埋材料について、抗アミロイド AA 抗体を用いた免疫染色を実施して、牛生

体内におけるアミロイドの沈着部位の分布傾向を明らかにする。

アミロイド症の牛腎臓より抽出した牛アミロイドを豚 12 頭（1 群）に腹腔内接種し、18 頭（2～4 群）に静脈内接種した。フロイントの完全アジュバントと硝酸銀を併用（1,2 群）、カゼイン（3 群：6 頭）、カゼインと硝酸銀を併用（4 群：6 頭）による炎症刺激を頻回実施し、経時的に剖検して（接種 2～6 週間後）病理組織学的に検索した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、（独）動物衛生研究所動物実験倫理委員会の規定に基づき実施した。

C. 研究結果

平成 14 年 9 月から平成 16 年 8 月までの二年間に病性鑑定を実施した牛 5702 頭のうちアミロイド症は 20 例であった。今回アミロイド症と診断された牛のうち、7 歳未満のものは 1 例（6 歳）で、残りはすべて 7 歳から 12 歳の間であった。

アミロイドの沈着は、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、副腎、膵臓、甲状腺、下垂体、リンパ節、前胃、腺胃、小腸、大腸、卵巣、子宮、乳腺、筋肉等において認められた。このうち、肺、卵巣、子宮では血管壁のみの沈着にとどまり、実質臓器への沈着は認められなかった。下垂体、小腸、大腸、乳腺、筋肉では、ほとんどのものは血管壁への沈着のみであったが、一部、実質臓器への沈着も観察された。

今回、抽出牛アミロイドを接種した豚においてアミロイドの沈着は認められなかった。

#### D. 考察

平成 14 年 9 月から平成 16 年 8 月までの二年間に病性鑑定を実施した牛 5702 頭のうちアミロイド症の発生率は 0.35% だった。症例は 6 歳以上にみられる傾向にあった。

牛アミロイド症 10 症例におけるアミロイドの沈着部位の分布傾向を組織学的、免疫組織化学的に検索したところ、これまで言われてきた肝臓、脾臓、腎臓、消化管、内分泌器官等に加え、生殖器、乳腺、骨格筋においてもアミロイド沈着が観察された。

食肉屠場において、牛アミロイド症は当該病変の部分廃棄として扱われることが多い。牛アミロイド症が疑われた場合、検査保留として、場合によっては全廃棄処分を下すことが出来るような検査体制を整える必要があると思われる。また、牛のアミロイド症の監視を充実させるためには、生体検査や屠畜検査の際に活用できるような、簡便で迅速な簡易診断技術の確立が求められる。

今回、乳腺へのアミロイドの沈着が認められたことによって、牛乳へのアミロイドの移行が危惧されたが、乳腺に沈着が認められたものはすべて 7 歳以上の高齢牛だった。市販されている牛乳は、通常 2、3 産まで、多くても 4 産までの牛からしぼられており、最近では、黄色ブドウ球菌等の汚染防止のためにも高齢牛から

は搾乳しないよう指導されている。7 歳以上牛からは搾乳しないよう、指導が続けることが重要と思われる。

近年、続発性の AA アミロイド症において、アミロイドの接種とその後の炎症刺激によるマウスへの発症促進の報告がある。牛の AA アミロイドにおいてもマウスへの投与とその後の炎症刺激によって発症促進が認められ、家畜のアミロイド症の病理発生においても、アミロイドの摂取の関与の可能性も疑われている。しかし、牛の AA アミロイド症に関してその病理発生は詳細にされておらず、その他動物へのアミロイド接種によるアミロイド症発症促進を家畜で検索した報告はない。今回、牛腎由来 AA アミロイドの豚への接種試験を実施し、豚におけるアミロイド症発症促進の可能性を検討した。対象動物として豚を選択した理由は、豚の SAA の検査キットが市販されており、既存の SAA のデータがあり、SAA の検索が可能なためであること、アミロイド症の自然発生例の報告があることである。今回、家畜を使うという目的で、扱いやすいことと、異種動物を用いる目的から牛ではない家畜として豚をまず選択した。今回、炎症刺激の方法をいろいろ変えてみたが、牛アミロイドを接種した豚においてアミロイドの沈着は認められず、今回の条件では、牛 AA アミロイド接種による豚のアミロイド症の発現は認められなかった。今回はアミロイド接種や炎症刺激の条件検討が不十分で詳細に検討することができなかったが、今後、アミロイド接種によるアミロイド症発症促進の可能性を、家畜のアミロイド症についても詳細に検討する必要があると思われる。

#### E. 結論

今回、全国の病性鑑定材料における牛アミロイド症の発生頻度の基礎的データを集積した。また牛生体内におけるアミロイドの沈着器官・組織の分布傾向を明らかにした。一方で、牛腎臓由来 AA アミロイドの豚への接種試験を実施したが、豚におけるアミロイド症の発現は認められなかった。

牛アミロイド症について、今後、更に症例を重ね、経過に従ったアミロイド沈着部位の推移や、発症年齢と病変の程度や病変分布との関連

性、発症初期の病態の解明も必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 採卵鶏群に発生したアミロイド症の病理。  
鶏病研究会報. 2003, 39(1), 38-42.

2. 学会発表

1) 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 3 月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

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

分担研究者 田平 武 国立長寿医療センター研究所 所長

共同研究者 原 英夫 国立長寿医療センター研究所血管性痴呆研究部室長

研究要旨 アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法として効率よく A $\beta$  蛋白を分泌できるようリコンビ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 トランスジェニック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 トランスジェニックマウス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

アルツハイマー病の病態仮説として、現在ではアミロイドカスケード仮説が有力で、細胞外に分泌された A $\beta$  ペプチドが不溶化し、凝集・蓄積することがアルツハイマー病の病態の本質であると考えられている。アルツハイマー病の新しい治療法として免疫療法が注目されている。A $\beta$  ペプチドをワクチンとして投与し、抗体を体内で産生させ、抗体が老人斑を除去し、さらに分泌された A $\beta$  の凝集・沈着を抑制することにより神経細胞の脱落を防止しようとするのが目的である。我々は、アルツハイマー病

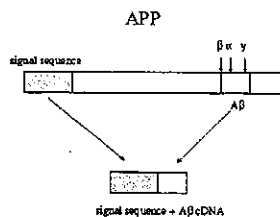
に対する新しい安全なタイプのワクチン療法を開発するために抗原性が低いアデノ随伴ウイルスベクターに分泌型 A $\beta$  cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノ随伴ウイルス (recombinant AAV, rAAV) を作製した。アルツハイマー病のモデルマウスの APP transgenic mouse (Tg2576, Taconic 社、Mayo Clinic) に経口投与し、腸管上皮細胞に感染させた。そして A $\beta$  抗原を腸管細胞に発現させ、免疫系に抗原提示し、A $\beta$  に対する抗体産生を誘導し、アミロイド沈着を抑制するかどうか、その治療としての有効性及び副作用を検

証した。

## B. 研究方法

APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence adaptor(18 アミノ酸)を A $\beta$ 1-43 cDNA の 5'側に結合させた fusion gene ; APP signal sequence+A $\beta$ 1-43 cDNA を作成し、アデノ随伴ウイルスベクター (pXXUF1)に組み込み、効率よく A $\beta$  が細胞外に分泌されるようにした。

Construct of secretion form of A $\beta$ 1-43, A $\beta$ 1-21 cDNA



アルツハイマー病の動物モデルである APP transgenic mouse (Tg2576) は、Taconic 社(Mayo Clinic)から購入した。Group A(15 週齢時投与)、Group B(30 週齢時投与)、Group C(45 週齢時投与)の APP transgenic mouse に A $\beta$ 1-43rAAV を各々  $5 \times 10^{11}$  genome、1 回のみ経口投与した。腸管組織での A $\beta$ 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 $\beta$ 抗体の検出は、A $\beta$ 42 ペプチド(5 $\mu$ g/ml)を 96 well plate (Nunc, MaxiSorp)の各 well に附着させ、5% non-fat milk/TBS-T buffer でブロック後、rAAV/ A $\beta$ 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。

マウスの血清が *in vitro* で A $\beta$ 凝集反応を阻害するか検討した。A $\beta$ 1-40 ペプチドを 120 $\mu$ M の濃度に調整し、37 $^{\circ}$ C でインキュベーションした。24 時間後に A $\beta$ の凝集が開始するのが見られた。この A $\beta$ の凝集にマウスの血清を 1:10, 1:20(vol: vol)の濃度で加え、37 $^{\circ}$ C で1週間インキュベーションした。A $\beta$ 1-40 の結合・凝集をマウスの血清が阻害するかどうか、2 $\mu$ MThioflavin-T を加え Spectrofluorimeter (445nm, excitation; 490nm, emission)を用いて測定した。

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、当国立長寿医療センター研究所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、国立長寿医療センター研究所の組み換え 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 (図 1)。またこの抗体は、in vitro での A $\beta$  の凝集を抑制した (図 2)。rAAV/腸管に免疫した場合には、細胞性免疫を惹起しにくい現象が報告されている。そこで rAAV を投与したマウス脾細胞を分離し in vitro において A $\beta$ 42 ペプチドに対する細胞増殖反応を解析した。rAAV 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 (図 3)。

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。APP transgenic mouse に対して、投与時期を Group A (15 週齢時投与)、Group B (30 週齢時投与)、Group C (45 週齢時投与) の 3 つのグループに分け、A $\beta$ 1-43rAAV をそれぞれ 1 回のみ経口投与した。

A $\beta$ 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウスにおいて、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

我々は、副作用の少ないワクチン療法として、アデノ随伴ウイルスベクターを用いたアルツハイマー病に対する経口内服治療法の開発を行った。腸管粘膜免疫系は、Th2 type T 細胞が誘導されやすい点に着目した。アデノ随伴ウイルスベクターに A $\beta$  cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノ随伴ウイルスを経口投与



し、腸管上皮細胞に感染させる。そして A $\beta$  抗原を腸管細胞に発現させ、腸管粘膜免疫系に抗原提示し、A $\beta$  に対する抗体産生を誘導するのが目的である。アルツハイマー病の動物モデルである APP-Tg マウス(Tg2576)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。

成人の約 80% は、アデノ随伴ウイルスの既感染があり、ウイルスそのものはヒトに対して病原性は無いとされている。アデノ随伴ウイルスベクターの経口投与の利点としては、1 回の投与により、比較的長期（約 6 ヶ月間）に腸管において抗原提示

ができ、しかも胃液などにより分解されにくく、腸管上皮細胞に感染後は大部分が episomal として核内にとどまり、細胞内でウイルスは自己増殖せず、他の臓器への拡散・感染も無い。Th1 type の T 細胞性免疫は惹起されず抗体産生のみ誘導するなどが挙げられる。また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、Th1 CD4<sup>+</sup>T 細胞による髄膜脳炎などの副作用も軽減できると考えられる。

#### E. 結論

アルツハイマー病の病因として amyloid cascade 仮説に基づき、経口ワクチン療法を開発した。rAAV を用いたワクチン療法は、1 回の投与により、比較的長期（約 6 ヶ月間）に腸管において抗原提示ができ、細胞性（障害）性免疫を惹起せず液性免疫（抗体）のみを誘導する利点がある。さらに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脳炎などの副作用も軽減できると考えられる。

Serum IgG antibody against A $\beta$ 42 in the treated APP-Tg mouse

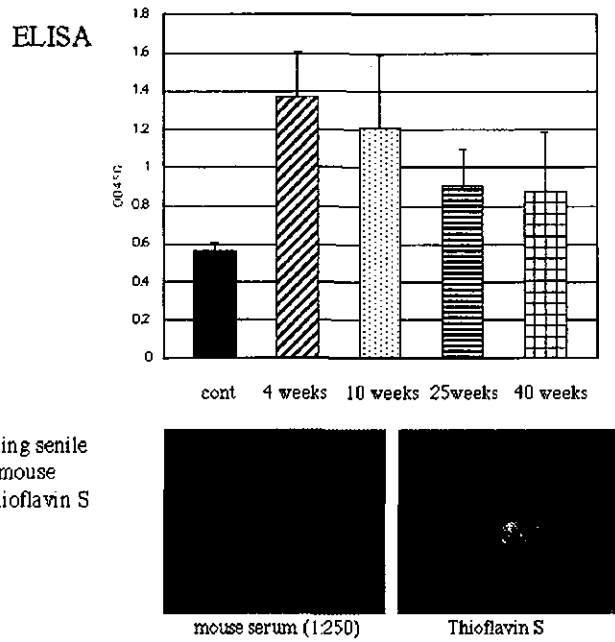


図1 マウス血清中の抗 A $\beta$ 抗体の産生。ヒトの老人斑をマウス血清と thioflavin S と共に二重染色した。

Inhibition of A $\beta$  aggregation *in vitro*.  
Thioflavin T Binding Assay

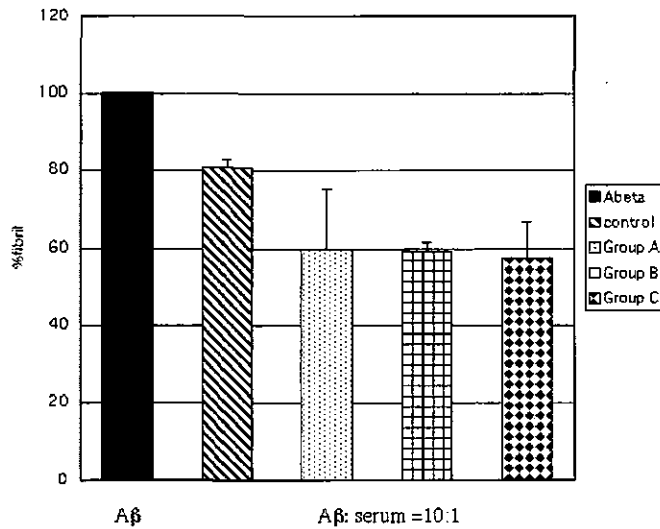


図2 マウス血清中の抗体による *in vitro* での A $\beta$ 凝集抑制。治療したマウス(Tx)の血清は、A $\beta$ 凝集を抑制した。

Low lymphocytes proliferation against A $\beta$ 42 peptide

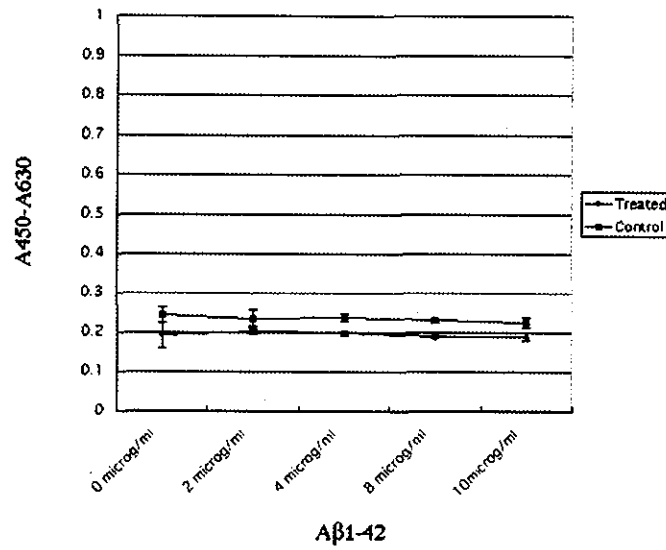


図3 治療したマウスの脾細胞の A $\beta$ 42 ペプチドに対する細胞増殖反応。A $\beta$ 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。

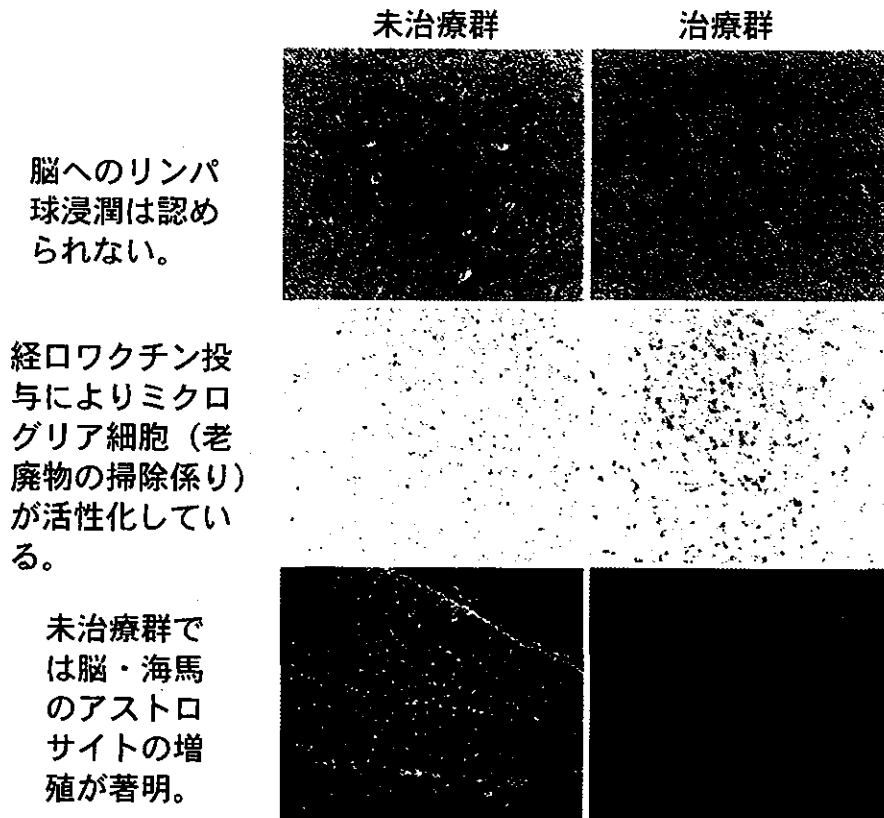
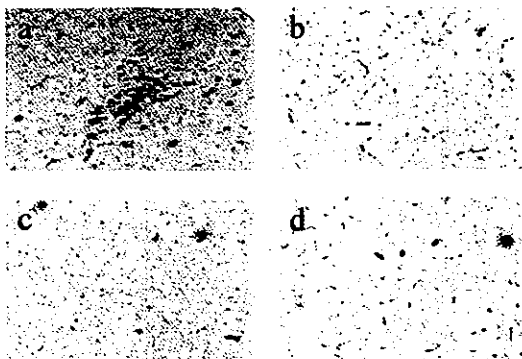


図4 APP-Tg マウス（13ヶ月齢）のコントロール群と治療群の脳の HE 染色。

rAAV/A $\beta$ 43

Frontal cortex



Parietal cortex

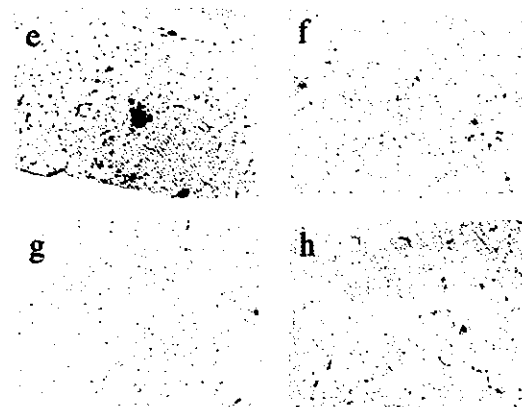


図5 A $\beta$ 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウス (13 ヶ月齢) の脳 (前頭葉、頭頂葉) におけるアミロイド沈着。コントロールと比べ、治療群ではアミロイド沈着が著明に減少している。a,e; コントロール、b,f; 15 週齢時投与、c,g; 30 週齢時投与、d,h; 45 週齢時投与。

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表

1. Hideo Hara, Alon Monsonego, Katsutoshi Yuasa, Kayo Adachi, Shinichi Takeda, Xiao Xiao, Keikichi Takahashi, Howard L. Weiner and Takeshi Tabira. : Development of a safe oral A $\beta$

vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. J. Alz. Dis. 5:483-488, 2004.

2. 原 英夫 : 多発性硬化症—免疫機能検査 最新医学 47: 527-533, 2003.
3. 原 英夫 : Alzheimer 病に対する