

生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

遺伝性アルツハイマー病における脳内 A β アミロイド沈着への トランスサイレチン及び血清アミロイド P 成分の関与に関する研究

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**、平澤孝枝***、久保田健夫***

瓦林 毅****、松原悦朗*****、東海林幹夫****、針谷康夫*****

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、**同分子情報伝達学、

同環境遺伝医学、*弘前大学医学部神経内科、

*****国立長寿医療センター研アルツハイマー病研究部、

*****前橋赤十字病院、*****山口大学医学部構造制御病態学

研究要旨 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 (Tg2576) と我々が作製した無トランスサイレチン (TTR) マウスまたは無血清アミロイド P 成分 (APCS; SAP) マウスを交配させて得た、TTR または SAP 欠損 Tg2576 (Tg2576/TTR^{-/-}または Tg2576/SAP^{-/-}) と対照ヘテロ接合体 Tg2576 (Tg2576/TTR^{+/+}または Tg2576/SAP^{+/+}) を用いて、昨年度に引き続き、遺伝性アルツハイマー病での脳内 A β アミロイドの沈着に TTR や SAP がどう関与するかを解析し、以下の結果を得た。

1) 7~20 カ月齢の Tg2576/TTR^{-/-}42 匹と対照 Tg2576/TTR^{+/+}42 匹における脳内 A β アミロイド沈着開始時期や程度を、抗 A β 抗体を用いて比較解析した。この結果、TTR は、Tg2576 の脳内 A β アミロイドの沈着を抑制しないことを見出した。

2) 8~25 ヶ月齢の Tg2576/SAP^{-/-}39 匹と対照 Tg2576/SAP^{+/+} 39 匹の脳内 A β 沈着開始時期や程度を、抗 SAP 抗体を用いて比較解析した。この結果、両者に差異を認めず、SAP は、Tg2576 の脳内 A β アミロイドの沈着を促進しないと結論した。

A. 研究目的

トランスサイレチン (TTR) は、アルツハイマー病 (AD) の病因となる A β アミロイド線維の形成を、*in vitro* で抑制することが見出されている。また、アメリカ合衆国の Hsiao 博士が作製した、スウェーデンの早期発症型遺伝性 AD の原因となるヒト変異アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 遺伝子を運ぶトランスジェニックマウス (Tg2576) では、非トランスジェニックマウスに比べて、脳の海馬における TTR 量の増加が認められ、加齢とともに AD の特徴である、A β 沈着量の増加を認めるが、タウのリン酸化やアポトーシスを認めない。しかし、抗 TTR 抗体を、Tg2576 の海馬に注入すると、A β 沈着量が増加し、

タウのリン酸化やアポトーシスが惹起されることが報告されている。以上の実験結果から、TTR は AD における A β アミロイド線維の形成を阻害し、発症を抑制すると考えられるが、*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、A β 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、Hsiao 博士から供与された Tg2576 マウスと我々が作製した無 TTR マウス及び無 SAP マウスを用いて、遺伝性アルツハイマー病での A β アミロイドの沈着に TTR や SAP が、*in vivo* でどう影響するかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

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) 遺伝子を高発現するトランスジェニックマウス (Tg2576) と我々が確立した無 TTR マウス株、あるいは無 SAP マウス株とを交配させて得た、TTR または SAP 欠損 Tg2576 (Tg2576/TTR^{-/-}または Tg2576/SAP^{-/-}) と対照ヘテロ接合体 Tg2576 (Tg2576/TTR^{+/+}または Tg2576/SAP^{+/+}) とにおける脳内 Aβ アミロイド沈着の開始時期、程度や Aβ 量を、月齢を追って比較解析し、Aβ アミロイドの沈着に TTR や SAP 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、ポリクローナル抗 Aβ 抗体 (Ab9204) を用いて免疫組織化学的に検出した。Ab9204 で染色されたマウス脳切片は AxioCam (Carl Zeiss) でデジタル化し、Image-Pro Plus Ver4.5 (Plantron) 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。また、脳内 AB42 および AB40 量を、抗 Aβ 抗体 (BNT77、BA-27 と BC-05) と ELISA 法を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

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) 先ず、16~20 カ月齢の Tg2576/TTR^{+/+} と Tg2576/TTR^{-/-} における脳内 APP 量を、APP の C 末端を認識する抗体、Saeko を用いた western blot 法で比較解析した。この結果、両者に有意な差異を認めなかった。そこで次に、7~20 カ月齢の Tg2576/TTR^{-/-}42 匹と対照 Tg2576/TTR^{+/+}42 匹における脳内全 Aβ アミロイド沈着程度を、抗 Aβ 抗体を用いて免疫組織化学的に解析した (表 1)。この結果、Tg2576/TTR^{+/+} マウス、対照 Tg2576/TTR^{+/+} マウスともに 12 ヶ月齢から Aβ 沈着を認め、全 Aβ 沈着量は、月齢とともに増加したが、17 ヶ月齢までは、その程度に両者で差異

を認めなかった。しかし、18~20 ヶ月齢の高齢 Tg2576/TTR^{+/+} マウスでは、同月齢の Tg2576/TTR^{-/-} マウスに比べて、より多量の Aβ 沈着を認めた。また、アミロイドアンギオパチーの程度も 18~20 ヶ月齢の Tg2576/TTR^{+/+} マウスでは、同月齢の Tg2576/TTR^{-/-} マウスに比べて、より高かった。さらに抗 Aβ 抗体 (BNT77、BA-27 と BC-05) と ELISA 法を用いて、13~20 カ月齢の Tg2576/TTR^{-/-}19 匹と Tg2576/TTR^{+/+}19 匹の脳における AB42 および AB40 量を比較解析した。この結果、13~17 ヶ月齢までは、両者に差異を認めなかった。しかし、18~20 ヶ月齢の高齢 Tg2576/TTR^{+/+} マウスでは、同月齢の Tg2576/TTR^{-/-} マウスに比べて、より多量の AB40 を認めた。AB40 量は、アミロイドアンギオパチー量と相関することが認められている。従って、この結果は、上記の免疫組織化学的解析結果と良く一致している。また、Tg2576/TTR^{-/-} と Tg2576/TTR^{+/+} ともに海馬におけるタウのリン酸化やアポトーシスを認めなかった。

2) 8~25 ヶ月齢の Tg2576/SAP^{-/-}39 匹と Tg2576/SAP^{+/+}39 匹における脳内 Aβ アミロイド沈着開始時期や程度を比較解析した (表 2)。この結果、両者の Aβ アミロイド沈着程度に差異を認めなかった。また、ELISA 法を用いて、18~25 ヶ月齢の Tg2576/SAP^{-/-}9 匹と Tg2576/SAP^{+/+}9 匹の脳内 AB40 および AB42 量を比較解析したが、両者に有意な差異を認めなかった。

D. 考察

1) 上記のように、TTR が、*in vitro* で Aβ アミロイド線維の形成を阻害することが見出されている。また、抗 TTR 抗体を、Tg2576 の海馬に注入すると、Aβ 沈着量が増加し、タウのリン酸化やアポトーシスが惹起されることが報告されている。これらの実験結果から、TTR は AD における Aβ アミロイドの形成を阻害し、発症を抑制すると思われる。しかし、TTR が、海馬を含む脳実質で合成されていることを示す実験的裏付けは無い。むしろ最近、laser microdissection 法を用いた詳細な解析によって、TTR は、脳内では脈絡叢でのみ合成されることが見出されている。従って、上記の Tg2576 を用

いた *in vivo* の解析結果は、なお検討を必要とすると考えられる。本実験結果は、TTR が、*in vivo* では、脳内 Aβ 沈着に何ら関与しないことを、明確に示すものと考えられる。

2) SAP 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。また、免疫組織化学な解析では、Tg2576/SAP^{+/+}脳内に沈着した Aβ アミロイドは、抗マウス SAP 抗体と反応しなかった。本結果は、Tg2576 では、血液脳関門により SAP の脳実質への移行が阻害されていることを示唆する。

E. 結論

これ迄の予想に反し、TTR や SAP は、遺伝性アルツハイマー病のモデルマウスにおける脳内 Aβ アミロイドの沈着に関与しないことを見出した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Terazaki h, Ando y, Fernandes r, Yamamura k, Maeda s, Saraiva m: Immunization in familial amyloidotic polyneuropathy: counteracting deposition by immunization with a Y78F TTR mutant. *Lab Invest* 86:23-31, 2006.

2. 学会発表

なし

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. 免疫組織化学的手法で A β 沈着度を解析したマウスの月齢と匹数

月齢	Tg2576/TTR ^{+/+} (n)	Tg2576/TTR ^{-/-} (n)
7	2	2
8	2	2
11	2	2
12	2	2
13	5	5
14	6	6
15	6	6
16	6	6
17	3	3
18	6	6
20	2	2
Total	42	42

n, 匹数

表 2. ELISA 法で A β 沈着量を解析したマウスの月齢と匹数

月齢	Tg2576/TTR ^{+/+} (n)	Tg2576/TTR ^{-/-} (n)
13	2	2
14	3	3
15	2	2
16	3	3
17	2	2
18	5	5
20	2	2
Total	19	19

n, 匹数

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

スタチン服用群における髄液 A β 分子種の検討

分担研究者 玉岡 晃 筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻
神経病態医学分野 (臨床医学系神経内科)

共同研究者 原田祐嗣*、石井一弘*

*筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻
神経病態医学分野 (臨床医学系神経内科)

研究要旨 動物実験や疫学調査の結果より、スタチンにアルツハイマー病 (AD) の発症抑制作用が示唆されてきたが、スタチンのアミロイド β 蛋白 (A β) に対する作用に関しては未だ確立した知見はない。本研究では、スタチン服用群における髄液 A β 分子種を定量し解析することによって、スタチンの脳内 A β に対する影響を検討したが、スタチン服用群と非服用群との間で有意差は認められなかった。また、ステロイド服用の有無による効果も求められなかった。

A. 研究目的

スタチンは、コレステロール低下作用の他にも様々な多面的効果を有することが知られている。動物実験や疫学調査の結果より、スタチンにアルツハイマー病 (AD) の発症抑制作用が示唆されてきたが、これまでの我々の研究結果では、スタチン服用群と非服用群との間に血漿アミロイド β 蛋白 (A β) の有意差はなく、プラバスタチンの投与前後で血漿 A β の変動は認められなかった。本研究では、スタチン服用群における髄液 A β 分子種を定量し解析することによって、スタチンの脳内 A β に対する影響を検討した。

り、A β 40 と A β 42 を識別定量した。具体的には BNT77 (A β 25-35 に対するモノクローナル抗体) を固相化し、BA27 (A β 1-40 に対するモノクローナル抗体)、BC05 (A β 35-43 に対するモノクローナル抗体) を標識抗体として用い、それぞれにより N 末端の修飾されたものも含めて A β 40、A β 42 を測定した。

(倫理面への配慮)

髄液採取に際しては、本人にその目的を十分説明した後了承を得ており、倫理的には何ら問題がない。

B. 研究方法

対象は高脂血症を有しスタチンを服用している各種神経疾患患者 25 名と高脂血症が無くスタチン非服用の神経疾患患者 26 名の 2 群間での髄液中 A β 分子種を比較検討した。またスタチン服用群・非服用群それぞれにおいてステロイド非服用 (スタチン服用群 13 名・非服用群 20 名) と服用 (スタチン服用群 12 名・非服用群 6 名) とで比較検討した。用いたスタチンはプラバスタチン 5~10 mg/日 14 名、シンバスタチン 10 mg/日 3 名、アトルバスタチン 10 mg/日 8 名であった。髄液中 A β 分子種はサンドイッチ ELISA 法によ

C. 研究結果

ステロイドを服用していない対象における髄液 A β 分子種の平均値 (標準誤差) は、A β 40 も A β 42 もスタチン服用群 13 名 [A β 40:1400pM(173), A β 42:328pM(53.6)] と非服用群 20 名 [A β 40:1480pM(124), A β 42:322pM(26.1)] との間で有意差は認められなかった。また、スタチン服用群・非服用群それぞれにおいて、ステロイドの服用の有無でも比較検討したが、髄液中 A β 分子種の有意差は認められなかった。

D. 考察

スタチンに認知症や A β の発症抑制効果が報告されてきたが、その作用機序は明らかではない。一方、高コレステロール食の摂取が AD のモデルマウスにおいて A β の蓄積を促進するという知見も報告されてきた。従って、コレステロールの合成抑制剤であるスタチンと A β との関連に興味をもたれるところであるが、我々は既に、脳のコレステロールに特異的な代謝産物スタチン (10 mg/日のプラバスタチンや 5 mg/日のシンバスタチン) を服用している痴呆のない高コレステロール血症の患者群とスタチンを服用していない対照群において血漿の A β 40、A β 42 を測定し、両者に有意差が認められないことを報告した。また、10 mg/日のプラバスタチン投与の前後で血漿 A β 40、A β 42 を測定し、血漿コレステロールは有意に低下させたものの、血漿 A β 分子種に変化がないことを確認した。これらの知見より、常用量のスタチンでは A β の産生に影響しない可能性が示唆されたが、Friedhoff らは高 LDL コレステロール血症の患者にロバスタチンを投与し、血清 A β が容量依存的に低下し、特に 40 mg/日と 60 mg/日の投与群で対照群よりも有意な低下を示したことを報告している。これらの結果の違いが、スタチンの容量によるものか、種類によるものか、など今後検討すべき課題は多い。

一方、髄液中 A β 分子種に関しては、Simons らは正常コレステロール血症の AD 患者にシンバスタチンを二重盲検法で投与し、全 AD 群や高度の AD 群では有意な変化は観察できなかったが、軽度の AD 群では髄液中 A β 40 が有意に低下することを見いだした。従って、スタチンが血液脳関門を透過して脳のコレステロール代謝に影響し、脳の A β の産生を減少させる可能性は否定できないものと思われる。しかしながら、今回の我々の検討ではスタチンの服用の有無による髄液中 A β 分子種は両群間で有意差は認められなかった。非認知症の高齢者にスタチンを投与し、投与群では髄液中のコレステロールや 24S-hydroxycholesterol の有意な低下がみられたものの、髄液 A β 42 に変化が認められなかったという報告もあり、非認知症対象例における通常治療量のスタチンが脳内の A β に影響を与える

可能性は低いものとか考えられた。

E. 結論

スタチン服用群、非服用群の間で、髄液中 A β 40、A β 42 ともに有意差は認められなかった。用いたスタチンの種類による有意差やステロイド服用の有無による有意差もみられなかった。無作為化対照比較試験において、スタチンの AD 進行抑制が示された報告もあるが、未だ対象数が少なく、スタチンが AD のリスクを減少させるか否かについては今後疫学的にも生物学的にも更なる検討が必要である。スタチンによる髄液中 A β 分子種の変化が認められなかったとこより、もしスタチンが AD のリスクを減少させる場合、その機序としては、A β に直接作用するよりは、コレステロール代謝を介した作用やその他の多面的効果によるものである可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Momo K, Homma M, Kohda Y, Ohkoshi N, Yoshizawa T and Tamaoka A: Drug interaction of tizanidine and ciprofloxacin: Case report. *Clin Pharmacology & Therapeutics* 80(6):715-720, 2006.
- 2) Oyama F, Miyazaki H, Sakamoto N, Becquet C, Machida Y, Kaneko K, Uchikawa C, Suzuki T, Kurosawa M, Ikeda T, Tamaoka A, Sakurai T, Nukina N. Sodium channel beta4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurochem*. 98(2):518-29, 2006.
- 3) Nakamagoe K, Ishii K, Tamaoka A, Shoji S: Upward gaze-evoked nystagmus with organoarsenic poisoning. *Neurology* 66(1):131-132, 2006.
- 4) Harada H, Tamaoka A, Ishii K, Shoji S, Kametaka S, Kametani F, Saito Y, Murayama S: Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is increased in remaining neurons in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Res*. 54(1): 24-29, 2006.
- 5) 玉岡 晃: スタチンはアルツハイマー病のり

- スクを減少させるか. *老年精神医学雑誌* 17 : 105-112, 2006.
- 6) 玉岡 晃 : 認知症の分子病態の多様性. *最新医学* 61 : 2379-2385, 2006.
- 7) 玉岡 晃 : アミロイド・カスケード仮説に基づくアルツハイマー病の治療戦略. *DDL magazine 2006 Summer* : 20-21. 2006.
- 8) 玉岡 晃 : 内科疾患からみた認知症の予防—高脂血症・スタチン. *Prog Med* 26(2):401-406, 2006.
- 9) 玉岡 晃 : 認知症の神経徴候の診方. *D&N Trends* 8 : 3, 2006.
- 10) 玉岡 晃 : 認知症に対する治療はどうすべきか. *EBM 神経疾患の治療 2007-2008* (水澤英洋、棚橋紀夫、岡本幸市 編)、中外医学社、2007年、pp228-235.
- 11) Reiko Koide and Akira Tamaoka: Body Image Deviation in Chronic Schizophrenia: New Research. In: *Body Image: New Research*, ed. By Marlene V. Kines, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, 2006, pp145-197.
- 12) 玉岡 晃 : アルツハイマー病、臨床病態学(北村 聖編)、ヌーヴェルヒロカワ、2006年、pp 112-118.
2. 学会発表
- 1) A Ishii, N Ohkoshi, H Tsuji, A Oda, A Hayashi, A Mochizuki, K Ishii, A Tamaoka: Autoantibodies in stiff-person syndrome and other paraneoplastic neurologic disorders. The 8 th International Congress of Neuroimmunology, Nagoya, Oct 18, 2006
- 2) Akira Tamaoka: Alzheimer's disease; from amyloid beta protein to potential therapy with NSAIDs, The 8 th International Congress of Neuroimmunology, Nagoya, Oct 17, 2006
- 3) 玉岡 晃 : アルツハイマー型痴呆の臨床と早期診断. 第1回取手認知症研究会、取手、10月17日、2006.
- 4) Akira Tamaoka, Hirotsugu Harada, Kazuhiro Ishii, Yuko Saito, and Shigeo Murayama: Increased temporal cortex cyclooxygenase-2 in Alzheimer disease, International College of Geriatric Psychoneuropharmacology 6 th Annual Scientific Meeting, Hiroshima, Oct 5, 2006.
- 5) 玉岡 晃 : アルツハイマー病の分子病態と治療. 第24回 Clinical Neurology Club、東京、9月8日、2006.
- 6) 玉岡 晃 : アルツハイマー病の分子病態と治療—アミロイドβ蛋白を中心に—. 第44回北陸神経内科懇話会、金沢、6月24日、2006.
- 7) 廣畑 美枝、吉田 光宏、池田 修一、玉岡 晃、葛原 茂樹、東海林 幹夫、安東 由喜夫、徳田 隆彦、山田 正仁 : 脳アミロイドアンギオパチーに関する全国疫学調査. 第47回日本神経学会総会、東京、5月11日、2006.
- 8) 玉岡 晃、原田 祐嗣、石井 一弘、斉藤 祐子、村山 繁雄 : アルツハイマー病脳における cyclooxygenase(COX)-2 の生化学的検討. 第47回日本神経学会総会、東京、5月12日、2006.
- 9) 伊藤 伸朗、小久保 康昌、石黒 幸一、玉岡 晃、葛原 茂樹 : 前頭側頭葉変性症の脳脊髄液診断マーカー. 第47回日本神経学会総会、東京、5月12日、2006.
- 10) 原田 祐嗣、玉岡 晃、石井 一弘、荒木 亘 : Beta-site APP cleaving enzyme 1(BACE1)の発現に関する解析. 第47回日本神経学会総会、東京、5月12日、2006.
- 11) 玉岡 晃 : スタチンはアルツハイマー病のリスクを減少できるか? アルツハイマー病研究会第7回学術シンポジウム、東京、4月8日、2006.
- 12) 玉岡 晃 : 神経疾患の病態と治療. 平成17年度茨城県病院薬剤師会合同研修会、つくば、1月14日、2006.
- 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 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

Familial Danish Dementia(家族性デンマーク型認知症) : 典型的老人斑を欠いた ADan 及び A β の共沈着

分担研究者 玉岡 晃 筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻神経病態医学
 分野 (臨床医学系神経内科)

共同研究者 富所康志*、Blas Frangione**、Jorge Ghiso**

*筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻神経病態医学分野
 (臨床医学系神経内科)

**Department of Pathology, New York University School of Medicine

研究要旨 家族性デンマーク型認知症(FDD)は *BRI2* 遺伝子変異による常染色体優性早期発症認知症である。その神経病理学的特徴は、ADan と A β から成る大・小脳皮質プレアミロイドと血管アミロイドの沈着、神経原線維変化並びに典型的老人斑の欠如である。本症における ADan と A β の沈着機序を明らかにするため、凍結剖検脳から ADan と A β を連続抽出し生化学的に解析した。非線維性沈着物は全長 ADan 分子から成り、その N 末端は約 60%がピログルタミン酸化(ピロ化)され、主要 A β 分子種は A β 1-42/4-42 であった。A β 1-34/4-34 が可溶性分画特異的に見出された。アミロイドの分画では、ADan は高度に重合し、N/C 両末端側で切断され、切断を免れた N 末端の殆どがピロ化されていた。皮質・血管共に主要 A β は A β 4-42 で A β x-40 はわずかであった。ADan-A β 結合の特異性が合成ペプチドによるリガンドプロットにより示された。ADan・A β 両分子の翻訳後修飾・切断はその不溶性と重合性に関与し、それら分子の特異的相互作用が共沈着の機序の 1 つとして考えられた。

A. 研究目的

家族性デンマーク型認知症(Familial Danish Dementia; FDD)は *BRI2* 遺伝子異常による常染色体優性遺伝で早期発症型の認知症と小脳失調を呈する。主要な神経病理学的特徴は ADan 及び A β からなるアミロイドやプレアミロイドの大脳・小脳皮質と脳血管への沈着、並びにアルツハイマー病(AD)と同様の神経原線維変化である。中心にアミロイド芯があり、辺縁に変性神経突起を有する典型的老人斑は殆ど見られない。以上の知見は、認知症の発現には A β から成る大脳皮質の典型的老人斑は必須でないことを意味し、アミロイドよりはむしろプレアミロイドの重要性を示唆している。本研究ではプレアミロイド・アミロイド物質の沈着過程における ADan と A β 両分子の翻訳後修飾と切断の意義を、その可溶性の違いに基づき生化学的に解析した。又、ADan と A β の共沈着の機序についても検討した。

B. 研究方法

FDD 患者の凍結剖検脳から、2 種のアミロイド分子、ADan と A β 、をその可溶性に応じてリン酸緩衝液、SDS、ギ酸にて連続的に抽出し、免疫沈降、ウェスタンプロット、質量分析及びアミノ酸シーケンスを組み合わせ生化学的に解析した。更に、ADan と A β が特異的に結合するか否かを、合成ペプチドを用いたリガンドプロットで評価した。

(倫理面への配慮)

剖検例の凍結脳の解析及び生存例の血漿の解析共に、デンマーク アルフス大学、米国ニューヨーク大学及び米国 NIH のプロトコールに沿い、それらの承認のもと行われた。

C. 研究結果

沈着物質の不溶性亢進に伴って、アミロイド分

子は多様性を増し、重合性も増大していた。主な翻訳後修飾と切断部位を図に示す。可溶性分画と SDS 分画に回収された非線維性物質は主に 34 アミノ酸からなる全長 ADan1-34 から成り、その N 末端のグルタミン酸はピログルタミン酸化されていた。一方、循環血液中では、可溶性 ADan の N 末端のピログルタミン酸化は認められず、ADan の重合も生じていなかった。A β は可溶性分画では A β 4-34 のみが認められ、SDS 分画では A β 1-42 と A β 4-42 が約 1:1 の比で認められた。アミロイド分画では ADan は高度に重合し、N/C 両末端側での切断による多様性に富み、ADan1-34 の他、ADan1-33、ADan1-28、ADan3-34、ADan3-33、ADan3-28 等様々な分子種から構成されていた。N 末端が切断を受けていない場合、その殆どはピログルタミン酸化を受けていた。一方 A β は主に A β 4-42 から構成されていた。A β X-40 は皮質でも血管でも無視できる量であった。ADan と A β との間の特異的相互作用が合成ペプチドを用いたリガンドプロットで認められた。

D. 考察

剖検脳から見出された ADan 分子の N 末端のピログルタミン酸化は血漿中 ADan 分子では存在しなかった。ADan 分子の N 末端のピログルタミン酸化は非可逆的反応であることから、血漿中の ADan 分子は脳からのクリアランスは反映せず、ADan 分子の N 末端翻訳後修飾はその分子重合が起こる部位で生じるものと考えられた。更に、ADan 分子の N/C 両末端側すなわち Ala3-Ser4、Asn28-Ser29、His33-Tyr34 各ペプチド結合での切断はアミロイドの分画でのみ見出され、アミロイド分子の翻訳後修飾と切断が、その可溶性や重合性等に強く関与すると考えられた。

同様に A β 分子においても、その可溶性に応じて Glu3-Phe4 や Leu34-Met35 ペプチド結合における翻訳後切断が異なった比率で認められた。特に A β 4-34 は可溶性分画特異的に見出され、その意義について、他の疾患において更に検討が必要と考えられた。現在、FDD 同様典型老人斑を欠く Iowa 家系の変異型 AD 例を解析中である。

ADan と A β との間の特異的相互作用が合成ペ

プチドを用いたリガンドプロットで認められた。A β の共沈着は、同じく BRI2 遺伝子変異による家族性英国型認知症 (Familial British dementia; FBD) では認められておらず、又、FBD に沈着するアミロイド分子 ABri と A β 分子の相互作用は、同時に行った検討では見いだされなかった。ADan と A β の特異的相互作用が 2 種のアミロイド分子が共沈着を起こす機序の 1 つとなっている可能性が示された。

E. 結論

非 A β 脳アミロイドーシスである FDD においては、アミロイド分子の翻訳後修飾と切断が、その可溶性や重合性等に強く関与すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tomidokoro Y, Lashley T, Rostagno A, Neubert T, Bojsen-Moller M, Braendgaard H, Plant G, Holton J, Frangione B, Revesz T, Ghiso J: Familial Danish dementia: co-existence of Danish and Alzheimer amyloid subunits (ADan and A β) in the absence of compact plaques. *J Biol Chem* 280:36883-36894, 2005.

2. 学会発表

1) Tomidokoro Y, Frangione B, Lashley T, Fleire S, Rostagno A, Holton J, Houlden H, Bojsen-Moller M, Braendgaard H, Plant G, Revesz T, Ghiso J: Familial Danish Dementia: The Relationship of Two Different Amyloids (ADan/A β) Deposited in the Brain, 32nd Annual Meeting of American society for Neuroscience, Orlando, FL, U.S.A. Nov. 2-7, 2002.

2) Tomidokoro Y, Lashley T, Fleire S, Holton J, Houlden H, Bojsen-Moller M, Braendgaard H, Plant G, Rostagno A, Revesz T, Frangione B, Ghiso J: Co-existence of amyloid ADan and amyloid- β in familial Danish dementia, 8th international conference on Alzheimer's disease and related

disorders, Stockholm, Sweden, Jul. 20-25, 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

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

高齢者の cerebral microbleeds : cerebral amyloid angiopathy の MRI 画像診断に関する検討

分担研究者 葛原茂樹 三重大大学院神経病態内科学分野 (神経内科)

共同研究者 伊藤伸朗*、前田正幸**

*三重大学医学部附属病院神経内科、

**三重大大学院非侵襲的診断治療分野 (放射線科)

研究要旨 MRI gradient-echo法(T2*)を用いて高齢者の cerebral microbleeds(CMBs)を検討し、cerebral amyloid angiopathy(CAA)の生前診断、病的意義に関して考察した。当院神経内科依頼でMRIを撮像した60歳以上の連続症例398例と、definite CAAの4症例を検討。CMBs陽性例は81/398例(20.4%)で、うち、皮質・皮質直下のみにCMBsが認められる症例は23.5%で、その基礎疾患においてはアルツハイマー病(AD)が31.5%と高率だった。また、ADにおけるCMBs出現率は12%でコントロールと差はないが、皮質・皮質直下型が66.7%を占め、特に白質変性の強い症例に多かった。一方、Definite CAAでは3/4例(75%)が皮質・皮質直下型であり、皮質・皮質直下のみに出現するCMBsはCAAによる可能性が考えられた。CAAの生前診断は脳葉型出血以外には困難だが、MRI T2*画像の脳表層のCMBsに注目することにより無症候例の診断率が向上すると考えられ、CAAの病的意義の解明に寄与すると思われる。

A. 研究目的

孤発性脳アミロイド血管症(CAA)は、高齢者の脳血管障害の原因、また、認知症と関連があり、高齢者脳では病理学的に高頻度に認められる。しかし、生前の臨床診断は困難で、病的意義も十分に解明されていない。今回我々は、非侵襲的かつ汎用されているMRIを用いて、とくにAD、definite CAAを主とした脳葉型出血に注目し、CAAに関する知見を得る。

B. 研究方法

2005年7月-2006年11月に三重大神経内科依頼でMRI検査を施行した60歳以上の連続症例(全398例)でT2*画像を撮像し、脳内の cerebral microbleeds:CMBs を検討した。病理学的にCAAが確認された4例の脳葉型出血も、連続症例と別に検討した。症例の内訳は脳梗塞93例、TIA18例、脳出血18例(深部型13例、脳葉型5例)、AD43例、軽症認知障害10例、パーキンソン病およびその他の変性型パーキンソニズム、脊髄小脳変性症、非AD変性型認知症などの神経変性疾患77

例、頭痛、めまい、しびれ精査などの非脳(器質性)疾患(コントロール)74例、その他(NPH、脳腫瘍、中枢神経感染症など)65例で平均年齢は71.0±6.9歳。さらに、血腫除去手術時の標本からCAAが原因と診断された脳葉型出血の4症例(definite CAA)を連続症例とは別に検討した。

CMBsは脳内のdot状(径<10mm)の信号消失とし、CT、MRI T1WI、T2WIで確認される血腫は除外した。CMBsの出現部位、数、CMBsの背景因子として、白質変性の程度(無:0、散在性に少数:1、散在性に多発:2、融合性:3)と、高血圧、高脂血症、糖尿病、抗血小板療法、抗凝固療法の有無、そして、CMBs陽性例(25例)でApoE多型を調べた。

倫理面への配慮：遺伝子検査は文書による説明の上、同意書を得て行った。画像、血液生化学データは匿名化して解析した。

C. 研究結果

CMBs出現症例は計81例(全症例の20.4%)であった。CMBsの出現部位によって以下の3

型に分けられた。1)皮質・皮質直下のみに出現する皮質・皮質直下型：計 19 例で全 CMB 例中の 23.5%、CMB 数は平均 1.8 個 (1-5 個)。基底核・深部白質のみに出現する基底核・深部白質型：計 37 例 (45.7%)、平均 2.8 個 (1-10 個)。その両方に出現する混合型：計 25 例 (30.9%)、平均 9.2 個 (3-30 個) (図 1)。なお、テント下のみに CMBs が出現していた 3 症例は、脳幹のみと小脳深部のみであったため基底核・深部白質型に含めた。

基礎疾患は、すべての型で、最多は脳梗塞(皮質・皮質直下型で 42.1%、基底核・深部白質型で 37.8%、混合型で 44.0%)であったが、皮質・皮質直下型では AD が 31.5%を占める点特徴的であった。脳出血は混合型において 28%と多く、基底核・深部白質型で 8.5%、皮質・皮質直下型では脳葉型の 1 例のみであった。

背景因子で、CMB の有無と有意な相関がみられたものは、白質変性の程度と高血圧であった。年齢との相関は認めなかった。抗血小板療法では統計的には有意差がない ($p=0.051$) が、抗血小板療法で多い傾向があった。なお、この観察期間中に、抗血小板療法中の CMBs 陽性例の新規脳出血発症が 1 例あった。ApoE は例数が少ないため統計学的検討は行えなかった。

AD に関する検討 (図 2) では、症候性の脳血管障害合併例を除いた AD(平均年齢 74.5 ± 8.1 歳)、神経変性疾患 (70.0 ± 6.4 歳)、非脳 (器質性) 疾患をコントロール (71.4 ± 6.5 歳) にしたところ、各群とも CMB 陽性はおおよそ 12%であった。しかし、AD では皮質・皮質直下型が 66.7% (変性疾患では 0%、コントロール 33.3%) で多かった。AD において、MMSE でみた進行例に CMB 陽性例の頻度が高くみられた (陽性例の平均 MMSE score 15.8 ± 5.8 、陰性例 20.0 ± 4.6 、 $p=0.031$)。また、AD においての白質変性の程度は他の群よりも強く、白質変性と CMB 陽性例の頻度は相関していたが、それらにおいても皮質・皮質直下型が多かった。

脳血管障害に関しては、CMBs 陽性例は脳梗塞では 35.5%、脳出血では 66.7%と高頻度だった。脳葉型出血では皮質・皮質直下型は 5 例中の 1 例と少なく、混合型が 1 例だった。

脳葉型出血例をまとめると(表 1)、definite CAA では 3/4 例が皮質・皮質直下型の症例だった。一方、Boston criteria に照らして、CMBs も脳出血と捉えると probable 3 例、possible 2 例となり、これらの中では 1 例のみが皮質・皮質直下型の症例で、1 例が混合型だった。

皮質・皮質直下に現れた CMB の分布 (図 3) は、CMB の総数は、後頭葉、側頭葉に多く、容積の大きさも考慮すれば明らかに前頭葉には少なかった。皮質・皮質直下型では前頭葉にも多いが、2型の CMBs は、ほぼ同様に分布していた。

D. 考察

Gradient-echo MRI —T2*画像による CMBs は、無症候性微小脳内出血が変性して、脳内に点状ヘモジデリン沈着を示すことによって出現する。報告により差があるが、正常高齢者の 3-6%に確認されるとされる。また、small vessel disease に関連した白質変性の程度と相関し、脳血管障害患者で高頻度とされている。また、抗血小板療法、抗凝固療法で二次性脳出血の危険性を示す指標となる。現時点では、血栓溶解療法 (経静脈 tPA 療法) の禁忌項目にあげられていない。CAA との関連では、①AD において CMBs の頻度が高い、②皮質・皮質直下の CMBs は CAA と関連する、また、③ApoE 4 多型と関連する、などの報告が少数あり、今回、本邦の患者で再検討した。

今回の検討で、CMBs は、60 歳以上の非脳血管障害対照例と神経変性疾患の約 12%に認められた。この結果は、これまでの報告よりも高頻度であったが、対象年齢が高いためと考えられた。脳血管障害 (脳梗塞 < 脳出血) で高頻度であること、CMBs 出現が白質変性の程度と相関していたことなどは、これまでの報告と同様であった。

AD では CMBs 出現率は他の神経変性疾患やコントロールとの差はないが、皮質・皮質直下型の症例が多く、また、definite CAA でも皮質・皮質直下 CMBs が高率に認められたことから、皮質・皮質直下のみに出現する CMBs は CAA による可能性が高いと考えられた。AD の CMBs 陽性例は、白質変性例、重症例に多く、CAA は AD

の白質変性、認知症に関与するという説を支持するものであったが、その他の臨床的意義一症候性脳出血の危険性を示すものか、などは不明であった。AD において脳葉型出血の頻度が高いという証拠はこれまでにないが、CMBs 陽性例の経過観察が必要と思われた。

病理学的検索をしていない脳葉型出血では皮質・皮質直下型の症例は少なかった。一方、混合型として、皮質・皮質直下の CMBs は、高血圧性の深部出血でも 43.8%と多く認められた。高血圧性の深部脳出血の原因とされる lipohyalinosis は、皮質血管にも生じるとされており、混合型における皮質・皮質直下の CMBs は、CAA が疑われる皮質・皮質直下のみに出現する CMBs とは病理所見が異なる可能性がある。この 2 者では脳葉の分布には明らかな差はなかったが、CMBs 出現数が大きく異なっていた。

E. 結論

MRI T2*画像による検討で、皮質・皮質直下のみに出現する CMBs は CAA による可能性が高いことを確認した。MRI T2*画像の脳表層の CMBs に注目することにより無症候性の CAA の診断率が向上すると考えられ、高齢者の CAA の病的意義の解明に寄与すると思われる。今後さらに、剖検例での病理学的検討、また、アミロイドイメージングの検討も今後の課題である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mimuro M, Kokubo Y, Kuzuhara S: Similar topographical distribution of neurofibrillary tangles in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex in people living in the Kii peninsula of Japan suggests a single tauopathy. *Acta Neuropathol.* in press.

2. 学会発表

1) 伊藤伸朗、小久保康昌、石黒幸一、玉岡晃、葛原茂樹：前頭側頭葉変性症の脳脊髄液診断マーカー、日本神経学会総会、東京、2006.5.12

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

図1 CMBs 出現の型

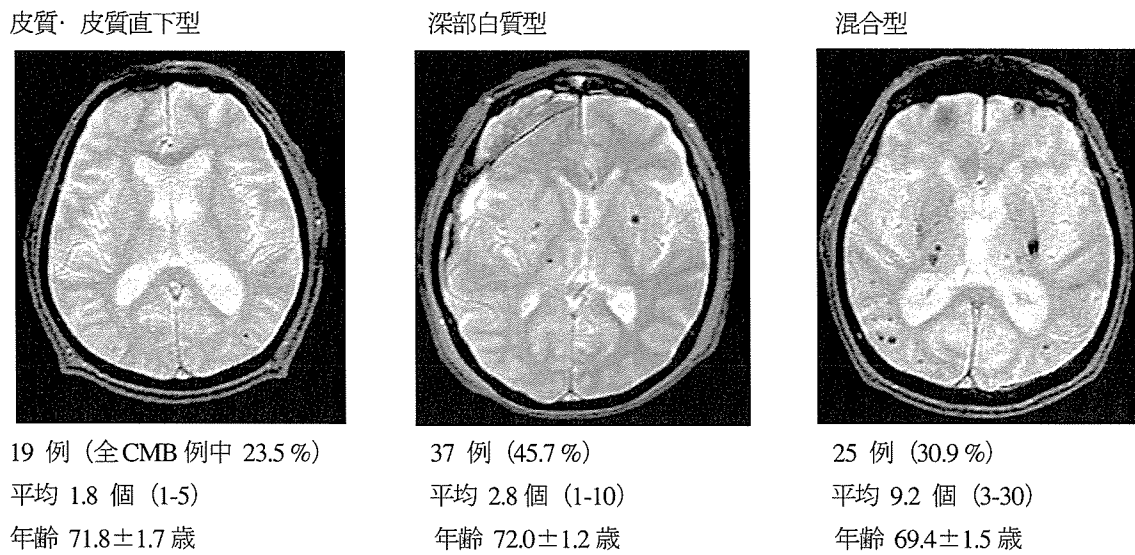


図2 AD における CMBs 陽性例の頻度と型

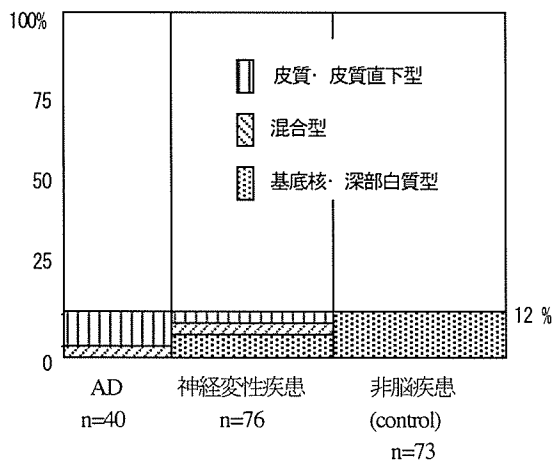


表1 脳葉型脳出血症例の T2*所見 (CMB 数と型)

CAA 分類	年齢・性別	脳出血部位	CMB 数	CMB 型
CAA definite	74 M	症候性: 右後頭葉 無症候性: 左前頭葉	3	皮質・皮質直下型
CAA definite	75 M	症候性: 右後頭葉	4	皮質・皮質直下型
CAA definite	72 M	症候性: 右前頭・頭頂葉	2	皮質・皮質直下型
CAA definite	71 F	症候性: 左後頭葉	0	
CAA probable	78 M	症候性: 右頭頂・後頭葉 無症候性: 左後頭葉	0	
CAA probable(?)	68 F	症候性: 右前頭葉	2	皮質・皮質直下型
CAA probable(?)	65 M	症候性: 左後頭葉	4	混合型(皮質 3, 基底核 1)
CAA possible	77 F	症候性: 右後頭葉	0	
CAA possible	79 M	症候性: 右前頭・側頭葉	0	

図3 皮質・皮質直下に出現するCMBsの分布



CMBs 数	●	●	計
前頭葉	15	11	26
側頭葉	31	6	37
頭頂葉	28	5	33
後頭葉	30	11	41
小脳皮質	10	1	11

- 混合型におけるCMBs
- 皮質・皮質直下型におけるCMBs

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

AA アミロイドーシスモデル動物におけるフェノフィブラートの治療効果

分担研究者 中里雅光 宮崎大学医学部神経呼吸内分泌代謝学講座
共同研究者 伊達 紫 宮崎大学フロンティア科学実験総合センター

研究要旨 AA アミロイドーシスマウスにおけるフェノフィブラートの効果を検討した。カゼイン投与により血中 serum amyloid A (SAA)I および IL-6 濃度は上昇し、肝臓での SAA1, SAA2 および SAA4 の発現が増加した。フェノフィブラートを摂取させたマウスにおいてはカゼイン群で上昇していた SAA1, 2, 4 の遺伝子発現が有意に低下し、脾臓でのアミロイド沈着も認められなかった。また、カゼイン群で低下していた飽和脂肪酸の β 酸化関連酵素の遺伝子発現は、フェノフィブラートによりすべて正常化した。フェノフィブラートは核内受容体 PPAR α を活性化することで、SAA の生合成を抑制しアミロイド沈着の予防に効果的に作用する可能性が示唆された。

A. 研究目的

二次性アミロイドーシス (AA アミロイドーシス) は、多くの慢性炎症性疾患に合併することが知られており、これまでも AA アミロイド実験モデルを用いて病態解明に向けての幅広い研究が施行されている。これまで私たちは AA アミロイドーシスモデルマウスの遺伝子発現解析を通して、AA アミロイドの原因蛋白である serum amyloid A (SAA) や IL-6 の細胞内シグナル伝達に関与する STAT3 の肝臓での遺伝子発現が増加していることを明らかにした。さらに興味深いことに、飽和脂肪酸の β 酸化に関連する一連の酵素の遺伝子発現が有意に減少していることも示した。今回の研究では、脂肪酸 β 酸化を促進する高脂血症治療薬; フェノフィブラートが AA アミロイドの発症に影響を与えるかどうかを明らかにするために、フェノフィブラートを摂取させたマウスにミルクカゼインを皮下投与し、組織でのアミロイド沈着、SAA 血中濃度、IL-6 血中濃度、肝臓での遺伝子発現を検討した。

B. 研究方法

普通食を摂取させている 8 週齢雄性マウス (ICR) に、AEF (amyloid enhancing factor; 初日のみ) と 10% ミルクカゼインを 1 週間皮下投与し、AA アミロイドーシスマウス (カゼイン投与群、

n = 6) を作製した。フェノフィブラート 100 mg/kg/day を 7 日前から摂取させ、AEF と 10% ミルクカゼインを投与したマウス (カゼイン + フェノフィブラート投与群、n = 6) を作製した。普通食を摂取させ、生食を投与したマウスをコントロール群 (n = 6) とした。

これら 3 群のマウスの肝臓および内蔵脂肪から RNA を抽出し、real time PCR 法を用いて SAA1 mRNA および SAA2 mRNA 発現量を定量した。DNA マイクロアレイ解析のため、肝臓から抽出した RNA を reverse transcriptase により逆転写し cDNA を作製後、in vitro transcription により cRNA を合成した。合成した cRNA を DNA マイクロアレイ; GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 Array に hybridization させ、解析ソフト GeneSpring[®] 7.2 を用いて、3 群間で変動した遺伝子をアノテーション解析した。血中 SAA および IL-6 を EIA にて測定し、脾臓でのアミロイド沈着を組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物にはその愛護に留意し、投与実験や屠殺の際の苦痛を最小限にとどめるように配慮した。

C. 研究結果

カゼイン投与群の血中SAA濃度は、コントロール群に比べ約120倍に上昇しており、同群マウスの脾臓においてアミロイド沈着を確認した。カゼイン+フェノフィブラート投与群の血中SAA濃度もコントロール群に比べ約100倍に上昇しており、カゼイン投与群とカゼイン+フェノフィブラート投与群間で血中SAA濃度には有意な差を認めなかった。血中IL-6濃度はコントロール群に比べカゼイン投与群およびカゼイン+フェノフィブラート投与群で上昇しており、カゼイン+フェノフィブラート投与群では統計学的有意差はないものの、カゼイン投与群に比べ減少傾向を示した。real time PCRの結果、カゼイン投与群の肝臓でのSAA1およびSAA2の遺伝子発現は、コントロール群に比べそれぞれ約85倍と約500倍に増加していた。カゼイン+フェノフィブラート投与群のSAA1およびSAA2の遺伝子発現も、コントロール群に比べそれぞれ約50倍と約300倍に増加していたが、カゼイン投与群に比べ有意な減少を示した。内臓脂肪でのSAA1およびSAA2の発現は、個体差が大きく、カゼイン群、カゼイン+フェノフィブラート投与群ともにコントロール群に比べ有意な差を示さなかった。DNAマイクロアレイの結果から、カゼイン群でのSAA1およびSAA2の発現増加に加え、SAA4の遺伝子発現の増加も明らかとなり、このSAA4の発現は、フェノフィブラート投与により完全にコントロールレベルに復した。また、カゼイン群で見られたケモカインの発現増加もフェノフィブラート投与により完全にコントロールレベルに復した。カゼイン群では飽和脂肪酸の β 酸化に関連する4種類の酵素をコードする遺伝子発現がすべて減少しており、これらの酵素の遺伝子発現は、フェノフィブラート投与によりすべてコントロールレベルかコントロール群を超える発現を示した。

D. 考察

フェノフィブラートは肝細胞内の核内受容体のひとつである perioxisome proliferator-activated receptor(PPAR) α を活性化することで脂質代謝を改善させる薬剤である。PPAR α は核内でレチノイド X 受容体とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子つまりペルオキシソーム β 酸化酵素の発

現を調節し、脂質代謝を促進する。さらに、PPAR α は、IL-6 receptor components (gp80, gp130)を負に制御し、STAT3のリン酸化やc-Junの活性化を阻害したり、IL-6 induced acute phase response (APR) gene (fibrinogen, SAA, hepatoglobulin)やNF κ Bを抑制したりすることで、抗炎症にも作用する。今回の研究で明らかとなったカゼイン+フェノフィブラート投与群でのSAA発現の減少は、IL-6カスケードがPPAR α の活性化により抑制されたことで引き起こされた結果であると考えられる。また、肝臓での β 酸化は、細胞膜リン脂質に由来する炎症性物質；ロイコトリエンB4の血中からのクリアランスに関与するシステムであることが知られている。PPAR α の活性化による脂肪酸 β 酸化の促進は、炎症を収束に向かわせるために重要な要素かもしれない。DNAマイクロアレイの結果、カゼイン投与で増加したSAA4の遺伝子発現がフェノフィブラート投与により完全にコントロールレベルに復することが明らかになった。SAA4は非炎症下においてもconstitutiveに存在するが、リウマチ性関節炎の滑液中で増加していることや脂質プロファイルに関与することなどが報告されており、AAアミロイドーシスにおけるSAA4の病態生理学的意義の検討は今後の課題である。

E. 結論

AAアミロイドーシスモデル動物におけるフェノフィブラートの治療的意義を遺伝子発現の変動、SAAやIL-6の血中レベルの変動から検討した。フェノフィブラート投与によりIL-6で誘導されるSAA遺伝子発現は減少し、脾臓でのアミロイド沈着も見られなかった。また、フェノフィブラートによるPPAR α の活性化は炎症性物質の血中からのクリアランスを増大させ、炎症反応のdurationの短縮に貢献する可能性もある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

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 (難治性疾患克服研究事業)
アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

合成ペプチドを利用した新規抗 SAA 抗体の開発、 諸種 AA アミロイドーシスの検討および免疫療法に関する研究

分担研究者 石原得博 山口大学大学院医学系研究科、情報解析医学系学域

共同研究者 星井嘉信、崔丹、河野裕夫

山口大学大学院医学系研究科、情報解析医学系学域

研究要旨 諸種 AA アミロイドーシスの診断および発生病理の解明に有用な新規抗 SAA 抗体の開発を目的として、合成ペプチドを抗原とする抗 SAA 抗体の作製を試みるとともに、抗体を作製する際に抗原として用いた合成ペプチドの免疫による AA アミロイドーシス治療の可能性についての検討に着手した。ヒト SAA1.27-36、ヒト SAA1.33-38(各種共通部分)、マウス SAA1.18-35、マウス SAA1.81-93 に相当する合成ペプチドに対するウサギポリクローナル抗体を作製し、ヒト、マウス、ウシ、白鳥の AA アミロイドーシス例について免疫組織化学的検討を行った。抗ヒト SAA1.27-36 はヒト AA アミロイドと、抗マウス SAA1.18-35、抗マウス SAA1.81-93 はマウス AA アミロイドと良好に反応するとともに、抗体によっては他種 AA アミロイドとも交叉反応を示した。抗ヒト SAA1.33-38 (各種共通部分) は未処理ではマウス AA アミロイドのみ陽性となり、Proteinase K 処理によりヒト、マウス、ウシ、白鳥の AA アミロイドいずれも陽性となった。抗ヒト SAA1.27-36 および抗マウス SAA1.81-93 のヒト AA アミロイドーシス剖検例 50 例の免疫組織化学的検討では抗ヒト SAA1.27-36 は全例陽性であったが、抗マウス SAA1.81-93 は 23 例陽性で、アミロイド辺縁部が陽性となる傾向にあった。抗マウス SAA1.18-35 抗原ペプチドをマウスに免疫し、抗血清の作製を試みたところ、抗体価上昇がみられた。今回の研究で諸種 AA アミロイドーシスの診断および発生病理の解明に有用と考えられる 4 種類の抗 SAA 抗体を作製しえた。抗原ペプチドの免疫による AA アミロイドーシス治療の可能性については、アミロイドの吸収促進効果があるか今後さらに検討を要する。

A. 研究目的

全身性 AA アミロイドーシスは様々な動物種に発症しうる。これら諸種 AA アミロイドーシスの診断および発生病理の解明に有用な新規抗 SAA 抗体の開発を目的として、合成ペプチドを抗原とする抗 SAA 抗体の作製を試みた。また現在 AA アミロイドーシスに限らず全身性アミロイドーシスの治療に関して、沈着したアミロイドを積極的に吸収する治療法は実用化されていない。そこで今回、抗体を作製する際に抗原として用いた合成ペプチドの免疫による AA アミロイドーシス治療の可能性についての検討に着手した。

B. 研究方法

抗体作製：ヒト SAA1.27-36(ANYIGSDKYF)、ヒト SAA1.33-38(DKYFHA:各種共通部分)、マウス SAA1.18-35(RAYTDMKEAGWKDGDKYF)、マウス SAA1.81-93(ANRHGRSGKDPNY)のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドの N 末端側にシステインを付加したものを KLH を担体としてウサギに免疫し抗血清を作製、アフィニティー精製を行った。抗マウス SAA1.81-93 については ELISA によりヒト SAA1.83-95、マウス SAA1.85-92 (多くの種に共通の部分)、ヒト SAA との反応性を確認した

免疫組織化学的検討：抗ヒト SAA1.27-36 (3.32 μ g/ml)、抗ヒト SAA1.33-38 (0.868 μ g/ml)、抗マウス SAA1.18-35 (5 μ g/ml)、抗マウス SAA1.81-93

(10.8 μ g/ml)を一次抗体としてヒト、マウス、牛、白鳥の AA アミロイドーシス例のホルマリン固定パラフィン切片について免疫組織化学的検討を行った。切片を脱パラフィン、水洗後、内因性ペルオキシダーゼの阻害、非特異反応の阻害を行い、一次抗体を室温 30 分、二次抗体として EnVision+ (DAKO, 2 倍希釈)を室温 30 分反応させた後、DAB+ (DAKO)にて発色を行った。抗原賦活処理としてギ酸処理および Proteinase K 処理を行い染色性を検討した。

さらに抗ヒト SAA1.27-36 および抗マウス SAA1.81-93 についてはヒト AA アミロイドーシス剖検例 50 例の脾臓のホルマリン固定パラフィン切片について上記と同様の方法で免疫組織化学的検討を行い、陽性率、陽性部位の局在について検討した。

抗原ペプチドのマウスへの免疫：KLH 標識した抗マウス SAA1.18-35 の抗原ペプチド (C+RAYTDMKEAGWKDGDKYF) (約 2.0mg/ml) を Titer MAX Gold と当量混合し、Water in Oil の状態までホモジネートしエマルジョンを作製した。C57BL/6J マウス 3 匹に上記エマルジョン 0.2ml/匹を腹腔内投与し、4 週間後に屠殺、血清を採取した。この血清について抗原ペプチドに対する抗体価上昇がみられるか ELISA により検討を行うとともに MOM Kit(Vector)を用いてホルマリン固定パラフィン包埋マウス組織の免疫組織化学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織については承諾を得て実施された病理解剖例を用いており、個人が特定されることのないよう配慮した。マウスを用いた動物実験は山口大学医学部動物実験指針に基づいて行った。ウシおよび白鳥の組織については自然死した個体あるいは研究以外の目的で屠殺された個体から摘出し使用した。

C. 研究結果

免疫組織化学的検討：抗ヒトSAA1.27-36はヒトAA、マウスAA(Proteinase K処理)、白鳥AAと反応した。抗ヒトSAA1.33-38 (各種共通部分に対する抗体) は未処理ではマウスAAとのみ反応し、

Proteinase K処理によりすべての種のAAと反応した(図1)。抗マウスSAA1.18-35はマウスAAとのみ反応し、他種AAとの交叉反応はみられなかった。抗マウスSAA1.81-93はヒトAA (一部の症例)、マウスSAA、白鳥AAと反応し、ギ酸処理でウシAAがわずかに陽性となった。抗ヒトSAA1.27-36および抗マウスSAA1.81-93によるヒトAAアミロイドーシス剖検例50例の検討では、抗ヒトSAA1.27-36は全例陽性であり、アミロイドほぼ全域が陽性となった。抗マウスSAA1.81-93は23例(46%)でアミロイドに陽性像がみられ、アミロイドの辺縁部が染色される傾向にあった(図2)。

抗原ペプチドのマウスへの免疫：KLH標識したマウスSAA1.18-35をC57BL/6Jマウス3匹に免疫したところ、3匹とも抗原ペプチドに対する抗体価上昇がみられた(図3)。免疫を行ったマウスの血清によるホルマリン固定パラフィン包埋マウス組織の免疫組織化学的検討では、現在のところマウスAAアミロイドとの確定的な反応性はえられていない。

D. 考察

今回検討を行った 4 種類の抗体ともホルマリン固定パラフィン包埋切片にて利用可能であり、それぞれの種の AA アミロイドーシスの検出に有用であることが示唆された。特に各種 SAA 共通部分に対する抗体である抗ヒト SAA1.33-38 は Proteinase K 処理でヒト、マウス、ウシおよび白鳥 AA と反応し、各種 AA アミロイドの免疫組織化学的検出に利用可能であり、今回検討を行っていない動物種の AA アミロイドの検出も期待できる。一方でこの抗ヒト SAA1.33-38 は抗原賦活処理なしではマウス AA とのみ反応し、マウス以外の AA とは反応しなかった。動物種によって AA アミロイドには β シートの折りたたみの違いなど立体構造上なんらかの差があるのかもしれない。抗ヒト SAA1.27-36 および抗マウス SAA1.81-93 によるヒト AA アミロイドーシス例の免疫組織化学的検討では、SAA1.27-36 の領域は全例のアミロイド沈着物中にほぼ均一に含まれていること、およびヒト AA アミロイドーシス例の一部では SAA の 77 番目以降の領域がアミロイド沈着物に含まれていることが示唆された。抗マウス SAA1.81-93 陽性例ではヒト AA アミロ