

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
 アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

## ApoA-II トランスジェニックマウス (*Apoa2<sup>c</sup> Tg*) の 開発と老化アミロイドーシス

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 葛 鳳霞、姚 俊潔、付 笑影、郭 占軍、張 倍茹、嚴 景民、  
 澤下仁子、森 政之

\*信州大学医学研究科加齢生物学分野

**研究要旨** アミロイドーシスの発症機構の解明と治療法の開発の為に、マウス AApoAII アミロイドーシスの線維タンパク質をコードする *Apoa2<sup>c</sup>* 遺伝子を過剰発現する transgenic (Tg)マウスを作製した。さらにこの Tg マウスと R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* マウス (*Apoa2<sup>c/c</sup>*) の戻し交配 (6 世代) によって、3 種類のモデルマウスを作製した (*Apoa2<sup>c</sup>Tg+/+ Apoa2<sup>c/c</sup>*, *Apoa2<sup>c</sup>Tg+/- Apoa2<sup>c/c</sup>*, *Apoa2<sup>c</sup>Tg-/- Apoa2<sup>c/c</sup>*)。ホモ (Tg+/+), および、ヘテロ (Tg+/-) マウスは全身臓器で *Apoa2<sup>c</sup>*mRNA の発現が認められ、Western blot 解析では apoA-II タンパク質が検出された。Tg+/+マウス血漿中 apoA-II 濃度、apoA-II/apoA-I 比は Tg-/-に比較して、有意に上昇した。Tg+/+マウスでは極く微量( $10^{-8}$   $\mu$ g)のアミロイド線維投与後アミロイド沈着が認められたが、Tg-/-マウスでは  $10^{-5}$   $\mu$ g でも沈着が確認できず、アミロイド線維による伝播に関して感受性が増大している事が明らかになった。

### A. 研究目的

マウス老化(AApoAII) アミロイドーシスでは血清高密度リポタンパク質(HDL) のアポタンパク質である apoA-II が、加齢に伴ってアミロイド線維を形成し全身に沈着する。apoA-II には3つの主要な allele (*Apoa2<sup>a</sup>*, *Apoa2<sup>b</sup>*, *Apoa2<sup>c</sup>*)が存在し、*Apoa2<sup>c</sup>* を持つ SAMP1 や congenic 系統である R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* では重篤なアミロイドーシスが発症する。我々はこれまでにマウス AApoAII アミロイドーシスを用いて、アミロイド線維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来た (アミロイドーシスの伝播)。アミロイドーシスのより詳細で迅速な研究のためのモデルマウスの開発を目指して、APOA2C タンパク質を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウス系統を作成した。

### B. 研究方法

1. *Apoa2<sup>c</sup> Tg* マウスの作成 : CAG (cytomegalovirus immediate early gene enhancer

+chicken  $\beta$ -actinpromoter+rabbit  $\beta$  globin poly A)プロモーターの下流にマウス *Apoa2<sup>c</sup>* cDNA を持つベクターを BDF2 マウス受精卵にマイクロインジュクションした。

2. Tg マウスの検出: PCR 法で trans gene を有するマウス (Tg+) を検出した。この Tg+マウスを用いて R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* マウスとの戻し交配を繰り返し (6 世代)、*Apoa2<sup>c</sup> Tg* マウス 3 系統 (*Apoa2<sup>c</sup> Tg+/+*, *Apoa2<sup>c</sup> Tg+/-* および *Apoa2<sup>c</sup> Tg-/-*) を作成した。

3. アミロイドーシスの誘発および検出 : AApoAII アミロイドーシスを発症した R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* マウス肝臓より、AApoAII アミロイド線維を分取し、sonication 後に、Tg+/+, Tg+/- および Tg-/-の3系統マウスの尾静脈に投与した。1、2、3ヶ月後にマウスを屠殺し、各臓器のアミロイド沈着程度を検討した。

(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、承認を得て、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アミロイドーシス誘導に関しては、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、使用した器具やアミロイド線維は焼却するか、1 N NaOH 中でオートクレーブ処理することになっている。

### C. 研究結果

作製された Tg マウスには、第 13 染色体に 2 コピーの transgene がタンデムに挿入されていた。transgene に関してホモのマウス (Tg+/+) は、内在性の apoA-II 遺伝子を加えて、6 コピーの apoA-II 遺伝子を持つことが明らかになった。Tg+/+マウスでは全身の臓器で apoA-II mRNA の発現が認められ、Western blot 解析では各臓器で apoA-II タンパク質の発現が検出された。Tg+/+マウスでは、Tg-/-マウスと比較して、血漿 apoA-II 濃度、apoA-II/apoA-I 比が、有意に上昇した。Tg+/+マウスでは、 $10^{-8}$   $\mu\text{g}$  の AApoAII アミロイド線維投与後 (尾静脈) 2 ヶ月で、アミロイド沈着が認められた。また  $1\mu\text{g}$  の AApoAII 投与では全身に重篤なアミロイド沈着が認められた。Tg+/+マウスでは、全ての線維投与量で Tg-/-に比較して有意に重度な沈着が観察された。さらに  $1\mu\text{g}$  の AApoAII 投与後 1 ヶ月で、全身にアミロイド沈着が認められた。

### D. 考察

これまで我々はマウス AApoAII アミロイドーシスを用いてアミロイド線維による伝播機構に関する解析を進めてきた。主に用いて来たマウス系統は R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* マウスで、このマウスでは静脈内に投与した、最小  $10^{-7}\mu\text{g}$  の AApoAII アミロイド線維を 2 ヶ月後に検出 (アミロイド沈着) することができた。しかし食品等の環境中に含まれるアミロイド線維はさらに微量であると考えられる。またアミロイド線維とアミロイドタンパク質が同一の場合 (Self-seeding) と比較して、異なる場合 (Cross-seeding) は伝播の効率が、大きく

低下することが知られている。これらの事実より、環境中のアミロイド線維の検出を行い、アミロイド線維の伝播がアミロイドーシス発症で果たす役割を明らかにするためには、より高感度なモデルマウスが必要であった。我々が開発した *Apoa2<sup>c</sup>* Tg+/+マウスは R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* マウスの約 1,000 倍の感度を持つことが示され、アミロイドーシスの画期的診断開発のための有用なモデルマウスである。

現在までにマウス apoA-II 遺伝子の Tg マウスが作製され、動脈の脂質沈着への感受性が增大することが報告されている。しかしこれらの報告では 3 種の *Apoa2* 対立遺伝子のどれが使われたかは不明であった。今回我々は *Apoa2<sup>c</sup>* Tg マウスを作製して、血中 apoA-II やコレステロールが上昇するとともに、アミロイド線維による伝播への感受性が上がる事を明らかにした。今後はアミロイドーシスの発症機構の解明のみならず、コレステロールなどの脂質代謝において、apoA-II が果たす役割についても、詳細かつ迅速な解析が可能になると考える。

### E. 結論

新たに作製した *Apoa2<sup>c</sup>* Tg マウスでは、血清 apoA-II 濃度が増加し、アミロイド線維による誘発に対する感受性が上昇した。食品や環境中のアミロイドーシス誘発物質の、迅速かつ高感度の検出などの、アミロイドーシスの伝播機構解明のための有用なモデル動物と考える。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Zhang H, Sawashita J, Fu X, Korenaga T, Yan J, Mori M, Higuchi K. Transmissibility of mouse AApoAII amyloid fibrils: inactivation by physical and chemical methods. *FASEB J* 20 (7): 1012-1014, 2006
- 2) Korenaga T, Yan J, Sawashita J, Matsusita T, Naiki H, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Fu X. Transmission of amyloidosis in offspring of mice

- with AApoAII amyloidosis. *Am J Pathol* 168 (3): 898-906, 2006
- 3) Yan J, Fujii K, Yao J, Kishida H, Hosoe K, Sawashita J, Takeda T, Mori M, Higuchi K. Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice. *Exp Gerontol* 41 (2) : 130-140, 2006
- 4) 樋口京一 アミロイドーシスの伝播 細胞工学 26 (2), 177-180, 2007
2. 学会発表
- 1) 張蓓茹、付笑影、葛鳳霞、嚴景民、姚俊潔、張桓宇、澤下仁子、森政之、中井彰、樋口京一：活性型 hHSF1 トランスジェニックマウスにおける AApoAII アミロイドーシスの抑制。第 29 回日本基礎老化学会、長崎、6 月 16 日、2006 年
- 2) Fu X, Korenaga T, Zhang H, Yan J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. Mouse senile amyloidosis: Possible transmission in the mouse room. 2006 Conference of Korean Society for Gerontology and The 6th Korean-Japan Gerontologist joint Meeting, Chuncheon, Korea, June 22, 2006
- 3) 葛鳳霞、姚俊潔、付笑影、郭占軍、嚴景民、張蓓茹、張桓宇、澤下仁子、森政之、樋口京一：ApoA-II transgenic マウス (*Apoa2<sup>c</sup>* Tg) の開発と老化アミロイドーシス。第 21 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、名古屋、7 月 27 日、2006 年
- 4) 張蓓茹、宇根有美、亀谷富由樹、嚴景民、葛鳳霞、姚俊潔、張桓宇、澤下仁子、森政之、樋口京一、付笑影：チーターの AA アミロイドーシス。第 1 回臨床ストレス応答学会、京都、11 月 23 日、2006 年
- 5) Fu X, Korenaga T, Yan J, Ge F, Zhang B, Qian J, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. Mouse senile amyloidosis : Possible horizontal transmission in the mouse room. XIth International Symposium on Amyloidosis. Woods Hole, USA, November 7, 2006
- 6) Higuchi K, Ge F, Fu X, Yao J, Guo Z, Yan J, Zhang B, Zhang H, Qian J, Sawashita J, Mori M. Amyloidosis in the transgenic mice of mouse amyloidogenic apolipoprotein A-II (*Apoa2<sup>c</sup>*). XIth International Symposium on Amyloidosis. Woods Hole, USA, November 7, 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

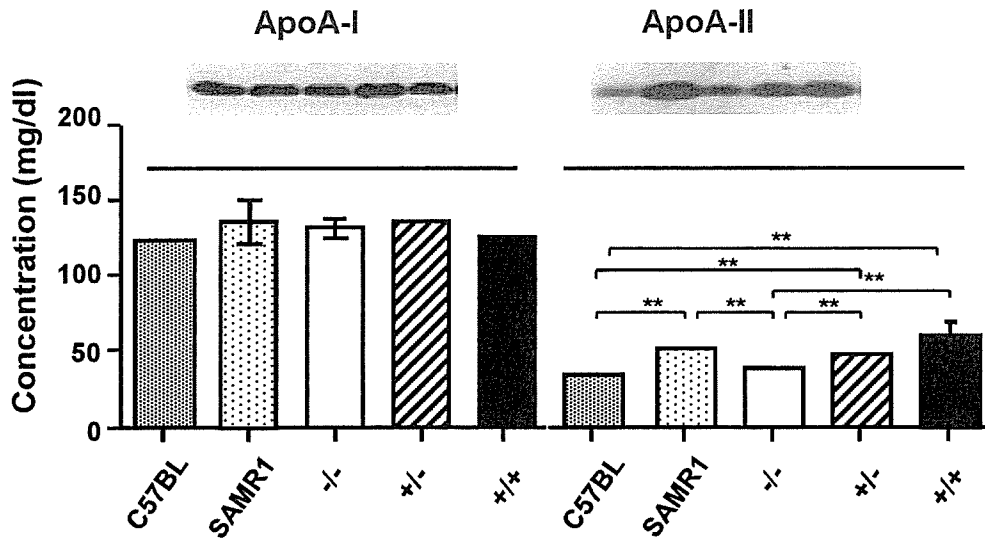


図1 *Apoa2*<sup>o</sup>トランスジェニックホモ (Tg<sup>+/+</sup>)およびヘテロ(Tg<sup>+/-</sup>)マウスの血漿中 ApoAII濃度は有意に増加した ( $P < 0.01$ )。ApoAI濃度の変化は認められなかった。

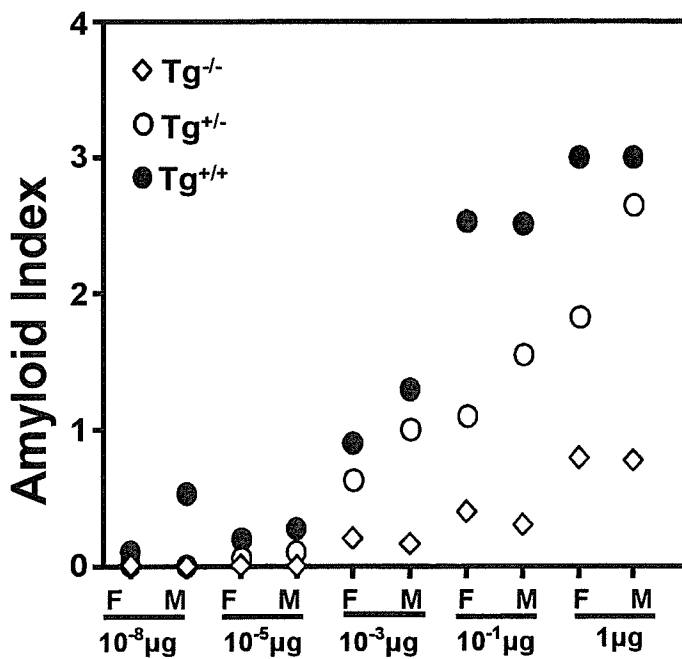


図2 アミロイド誘発実験。10<sup>-8</sup> μg - 1 μgの AApoAIIアミロイド線維を3系統の*Apoa2*<sup>o</sup> Tgマウスの尾静脈に投与し、2ヶ月後に屠殺してアミロイド沈着を調べた。Tg<sup>+/+</sup>及び Tg<sup>+/-</sup>マウスでTg<sup>-/-</sup>マウスに比較して、重篤な沈着を認めた。

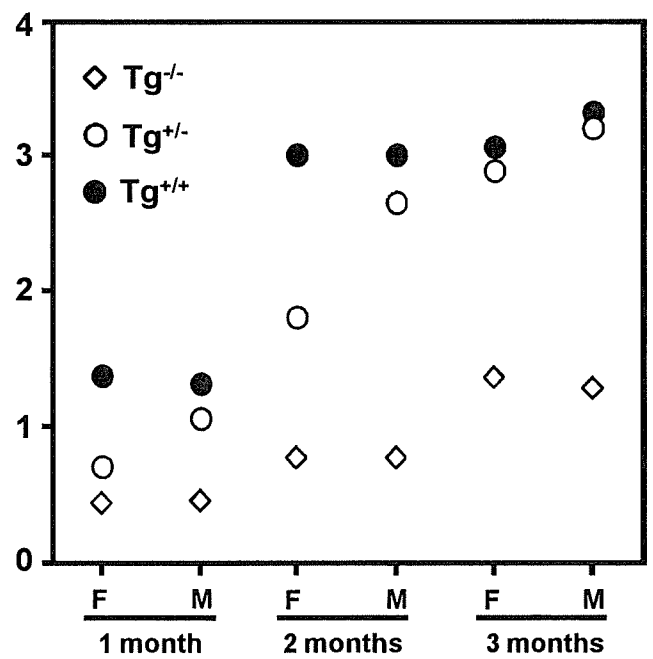


図3 AApoAIIアミロイド線維を1 μg尾静脈に投与後1, 2, 3ヶ月に屠殺しアミロイド沈着を調べた。*Apoa2*<sup>o</sup> Tgマウスはアミロイド線維に対する高感受性を示した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
アミロイドーシスの画的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

## アミロイドタンパク質オリゴマーに関する研究

分担研究者 亀谷富由樹 財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所

**研究要旨** 種々のアミロイドタンパク質は共通のアミロイド線維形成機序を持ち、アミロイドタンパク質が変性し、オリゴマーを形成した後、それらがシードとなり、さらにアミロイド線維形成にいたると考えられている。したがって、アミロイドタンパク質オリゴマーを解析することで、アミロイド症の早期診断および治療についての情報が得られると考えられる。そこで本研究では種々のアミロイドタンパク質のオリゴマーの化学的特性等を解析し、その検出法の開発について検討した。

### A. 研究目的

種々のアミロイドタンパク質は共通のアミロイド線維形成機序を持ち、アミロイドタンパク質が変性し、オリゴマーを形成した後、それらがシードとなり、さらにアミロイド線維形成にいたると考えられている。最近、アミロイド症のモデル動物等を用いた解析から、アミロイドタンパク質の供給が止まると、アミロイド線維沈着の進行が止まり、あるいは減少も見られ、症状が改善することが判明した。このことは、アミロイド症において早期診断が非常に重要であることを示している。そこで本研究ではアミロイド線維形成にいたる過程のアミロイドタンパク質のオリゴマーの化学的特性等を解析し、その検出法を開発し、アミロイド症の早期診断、治療につながる知見を得ることを目的とした。

### B. 研究方法

A $\beta$  ペプチド、TTR 等のアミロイドタンパク質を可溶化した直後と可溶化後 37°C でインキュベーターとした溶液中に存在するアミロイドタンパク質を、Native-PAGE、Native-2DPAGE、SDS-PAGE、イムノブロットング、質量分析器等を用いて解析した。

本研究では、市販の合成ペプチドおよびタンパク質を用いて種々の実験を行っており、動物およびヒト由来のサンプルは用いていない。したがって倫理面での問題はないと判断した。

### C. 研究結果

A $\beta$  ペプチド可溶化直後は、Native-電気泳動ではモノマー（あるいはダイマー）に由来するバンドが見られ、質量分析器では明らかにモノマーに由来する3価のイオンスペクトルが得られるが、37°C で3時間インキュベートすると、モノマー（あるいはダイマー）のバンドは消失し、質量分析においてはモノマー以外に可溶性オリゴマーに由来すると思われる複数のイオンスペクトルが得られた。これらの溶液をSDS-電気泳動にて分析すると共にモノマーのバンドが観察され、生じているオリゴマーはSDSには不安定なオリゴマーで、溶液中ではアクリルアミドゲルに入らないような巨大なオリゴマーを形成していることが判明した。TTRでも同様の解析を行なったところ、TTRは、pH3で変性させると可溶性オリゴマーを形成した。このオリゴマーもSDS存在下では容易にモノマーに解離した。Native-PAGEではスメア状の泳動像を示した。

### D. 考察

A $\beta$  ペプチド、TTR が形成する可溶性のオリゴマーを質量分析器、および Native-PAGE を用いることで検出することが出来た。今後、イムノブロット等の方法を組み合わせることで検出感度を上げることができ、アミロイド症患者の血清中のアミロイドタンパク質のオリゴマーの検出も可能になると思われた。さらに種々のアミロイドタンパク質についても分析方法を検討し、アミロ

イド症の早期診断・治療に結びつく情報を得たいと考えている。

#### E. 結論

アミロイドタンパク質溶液を長時間 37°Cで放置すると、オリゴマーの形成が見られ、Native-電気泳動および質量分析において顕著な変化が観察された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kume H, Kametani F: Abeta11-40/42 production without gamma-secretase epsilon- site cleavage. *Bioche Biophys Res Commun* 349: 1356-1360, 2006.
- 2) Murayama KS, Kametani F, Tabira T, Araki W: A

novel monoclonal antibody specific for the amino-truncated beta-amyloid Abeta 5-40/42 produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein. *J Neurosci Methods*: (in press)

- 3) Progressive wild-type transthyretin deposition after liver transplantation preferentially occurs onto myocardium in FAP patients. *Am J Transplant* 7: 235-242, 2007.

##### 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



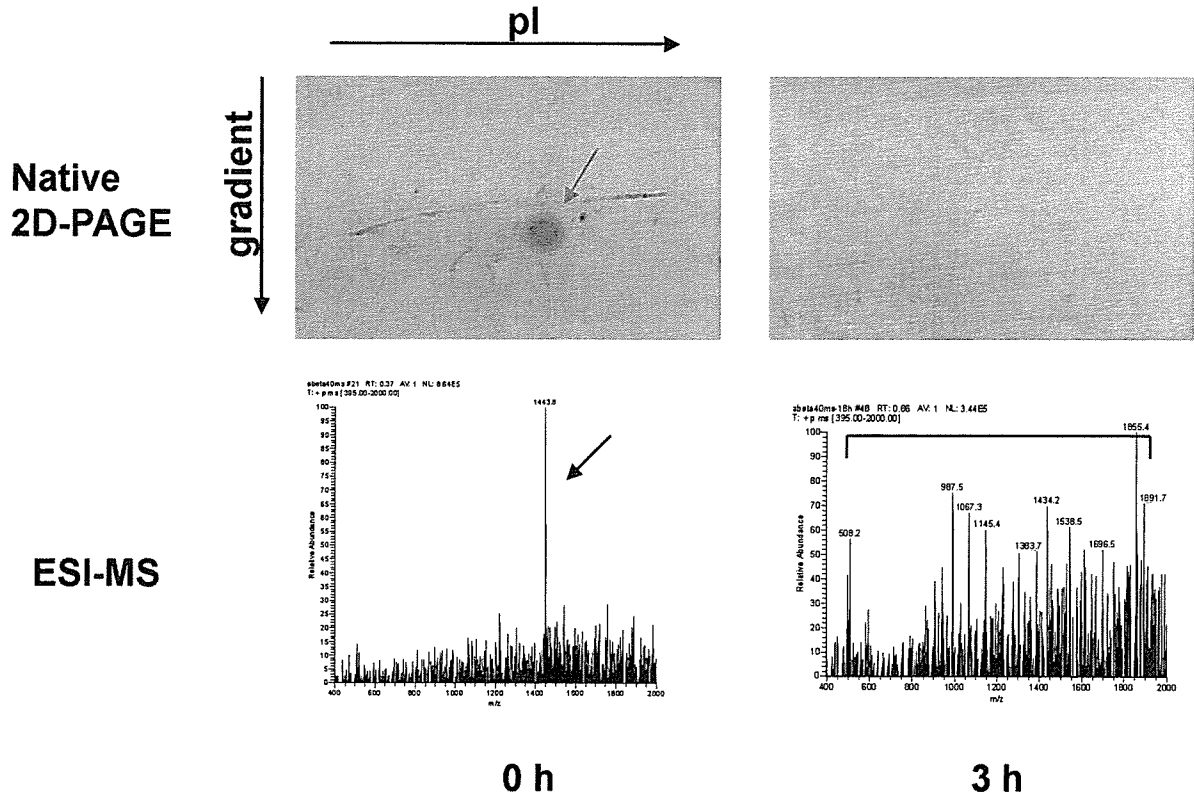


図1 Aβペプチドオリゴマーの解析。37°Cで3時間インキュベートするとNative-2D-PAGEでゲルに入らないようなAβオリゴマーが形成された。ESI-MS分析ではオリゴマーに由来する多価の複数のピークが観察された。

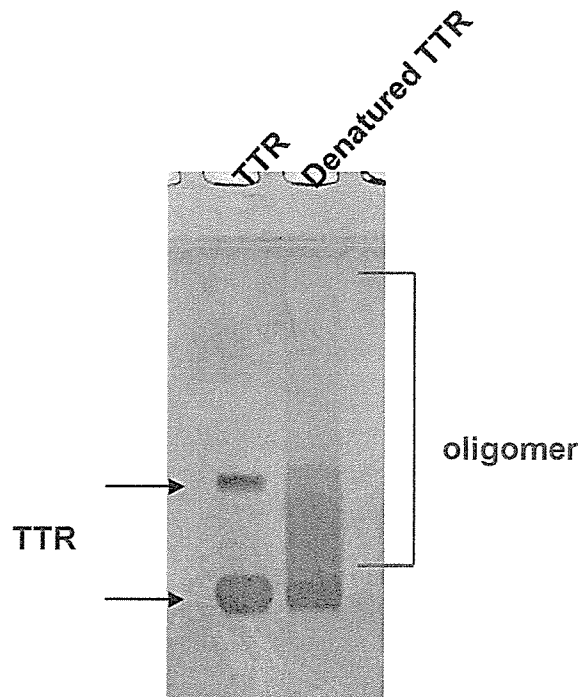


図2 TTRオリゴマーの解析。pH3溶液で編成したTTRは37°Cで24時間インキュベートすると、オリゴマーを形成した。このオリゴマーはNative-PAGEでスメア状のバンドとなった。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
 アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

チーターの AA アミロイドーシスの解析

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 張 倍茹\*、宇根 由美\*\*、付 笑影\*、巖 景民\*、葛 鳳霞\*、姚 俊潔\*、  
 張 桓宇\*、澤下 仁子\*、森 政之\*、亀谷 富由樹\*\*\*

\*信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野、

\*\*麻布大学獣医学部獣医学科 \*\*\*東京都精神医学総合研究所

研究要旨 チーターは、絶滅危惧種として世界的に保護されているが、個体数は現在も減少し続けている。飼育下チーターでは反応性 AA アミロイドーシスによる死亡が問題となっている。我々は、チーター AA アミロイドーシスの発症メカニズムを明らかにするために、AA タンパク質の構造、遺伝的要因、アミロイドーシスの伝播などの基本的情報について解析した。チーター AA タンパク質の 1 次構造は、アミロイドーシスを発症しやすい品種のネコの AA タンパク質と非常に類似し、SAA の N-末端部分が沈着することが明らかになった。また、アミロイドーシスを発症したチーターの糞中にアミロイド線維が存在し、伝播性を持つことを明らかにした。糞中線維は肝臓線維と比較して伝播性が強いが、塩酸グアニジン処理では、より敏感に失活した。さらに、SAA1 プロモーター領域に SAA1 の炎症に伴う発現に重要な C/EBP $\beta$  と NF- $\kappa$ B 応答配列が存在することを証明した。NF- $\kappa$ B 領域に存在した 1 塩基欠失多型は、プロモーター活性に多大な影響を与えることが明らかになった。以上の結果より、飼育チーターの主要死因である AA アミロイドーシスの発症機構解明のための基本的情報とツールを得た。これらのデータはチーターの保全戦略のための基盤となるばかりでなく、AA アミロイドーシスの病態を解析するためにも貴重である。

A. 研究目的

地球上で最も速く走る哺乳動物であるチーターは、絶滅危惧種として世界的に保護されているが、残念ながら個体数は現在も減少し続けている。近年、動物園で飼育されているチーターではアミロイドーシスを発症し、死亡する個体数が、年々上昇しており、病態の解明と治療法の提示が求められている。飼育チーターの集団に AA アミロイドーシスが高率に発症する原因は不明だが、多頭飼育条件下では、少数飼育条件よりもアミロイド指数が上昇すること、ヘリコバクターの慢性感染による胃炎、腸炎がアミロイドーシス発症の促進要素であることなどが報告されている。我々はチーターの AA タンパク質の構造、遺伝的要因、多頭飼育によるストレス、アミロイド線維の伝播などが、発症に重要であると考えている。我々は、チーター AA アミロイドーシスの発症メカニズ

ムを明らかにするために、AA タンパク質の構造、遺伝的要因、伝播性などに関する基本的情報について解析した。

B. 研究方法

1、アミノ酸配列の決定：Pras<sup>7</sup>らの方法により、抽出された肝臓と糞のアミロイド線維を SDS 電気泳動（PAGE）で分離し、アミノ酸配列を決定した。

2、チーター SAA1 遺伝子全長のクローニング：チーターの AA タンパク質のアミノ酸配列と非常に類似している事が明らかになったネコの SAA 遺伝子の cDNA 配列に基づいて、PCR 用のプライマーを設計した。これらを用いてチーターの肝臓 DNA と mRNA を用いて、SAA1 遺伝子と cDNA の全長をクローニングし、塩基配列を決定した。

3、チーターSAA1 遺伝子プロモーター領域の塩基配列の決定: 決定されたチーターSAA1 遺伝子の塩基配列に基づいてゲノムウォーキング法によってプロモーター・エンハンサー領域の塩基配列を決定した。

4、プロモーター活性の解析: 作製されたレポーターコンストラクト (ルシファラーゼ) をヒトの肝癌に由来する HepG2 細胞に導入後、炎症性サイトカインである IL-1 と IL-6 を培養液に添加し、ルシファラーゼアッセイ法によりプロモーター活性を測定した。

5、AA アミロイドーシスの伝播機構の解析: 糞と肝臓から抽出された線維は、未処理、或は塩酸グアニジンやギ酸処理などの変性処理後に、C57BL/6J 雄マウスに尾静脈に投与し、同時に皮下に硝酸銀溶液を投与し、急性炎症を惹起した。投与後、10日で屠殺し、脾臓アミロイドの沈着を評価した。

#### (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、承認を得て、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アミロイドーシス誘導に関しては、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、使用した器具やアミロイド線維は焼却するか、1N NaOH 中でオートクレーブ処理することになっている。

#### C. 研究結果

チーターAA タンパク質の1次構造は、アミロイドーシスを発症しやすい品種のネコ (ABY 等) のAA タンパク質1次構造と非常に類似していた。この結果はAA タンパク質の1次構造がチーターのAA アミロイド沈着に関連することを示唆している。チーターSAA1 遺伝子は4つのエクソンを含み、第2-4エクソンがコードエクソンである。またAA タンパク質はSAA1 のN-末端部分であることが明らかになった。

プロモーター・エンハンサー領域にSAA1 の炎症に伴う発現に重要な C/EBP $\beta$  と NF- $\kappa$ B 反応領域が存在することを証明した (図1)。両方を含む場合は、非常に高いプロモーター活性を示したが、C/EBP $\beta$  を欠失した場合は、活性が約50%に低下した。一方、両方ともに欠失した場合は、活性がほぼ完全に喪失した。さらに注目すべきはNF- $\kappa$ B 領域にGが3回繰り返しているものと、2回繰り返しているものの2種類の対立遺伝子が存在することを発見した。Gが3回繰り返している配列はIL-1 と IL-6 刺激時のプロモーター活性が有意に高いことが分かった (図2)。

アミロイドーシスを発症したチーターの糞中にアミロイド線維が存在することを証明した。このアミロイド線維をマウスに投与し、急性炎症を誘導するとAAアミロイドーシスの発症が認められ、糞中線維が伝播性を持つことを明らかにした (図3)。糞中線維は肝臓のアミロイド線維より分子量が小さく、電子顕微鏡での形態も異なっていた。糞中線維は肝臓線維と比較して伝播性が強いが、塩酸グアニジンとギ酸処理では、より敏感に失活した (図3)。

#### D. 考察

近年、動物園で飼育されたチーター集団中でAAアミロイドーシスが高率に発症し、飼育下チーターの主要な死因になっている。特に多頭飼育条件下では、アミロイドーシス発症率が高く、アミロイド指数が上昇し、平均寿命が短くなることが報告されている。これらの事実より、何らかの経路を介したアミロイドーシスの伝播が重要な役割をもつと考えられている。我々はこれまでにマウスのアミロイドーシスにおいて、唾液や糞などを介してアミロイドーシスが個体間で伝播していくことを実証してきた。チーターでも同様の機構でAAアミロイドーシスが個体間で伝播する可能性を考え、今回は特に糞を介する可能性に関して検討した。その結果、アミロイドーシス発症したチーターの糞中にAAアミロイド線維を発見し、マウスによる実験的AAアミロイドーシスモデルを用いて、この線維が伝播力を持つことを示した。すなわち糞中のアミロイド線維を介したAAアミロイドーシスの個体間伝播が起こ

っている可能性を明らかにした。糞 AA アミロイド線維の伝播力を喪失させる方法も検討した。これまでに我々は 6M 塩酸グアニジンとギ酸処理がマウス AApoAII アミロイド線維の伝播力を完全に喪失させる事を報告している。糞 AA 線維は肝臓に沈着した AA 線維とは形状が異なり、重量当たりの伝播力は肝臓線維より強い事が示された。一方、変性処理には脆弱であることが分かった。以上の結果より、糞が AA アミロイドーシス伝播経路の一部であることが示唆されたが、6M 塩酸グアニジンやギ酸による処置はこの伝播力を喪失させる方法である事が判明した。

アミロイドーシスの沈着前駆タンパク質である SAA1 の発現機構を検討した。SAA1 は主に肝臓細胞で産生され、ヒトでは急性感染などを受けた場合、その発現が約 1,000 倍にも急上昇する。そのためには SAA1 遺伝子のプロモーター領域に存在する C/EBP $\beta$  と NF- $\kappa$ B 応答配列が重要であることが報告されている。チーターの SAA 発現も同様に C/EBP $\beta$  と NF- $\kappa$ B 応答配列により制御されていることが示唆された。また、NF- $\kappa$ B 応答配列中にプロモーター活性が大きく異なる対立遺伝子が存在することを発見した。この結果は、チーター集団中には、炎症により SAA1 の発現が誘導され易い個体と、比較的誘導が低い個体が混在している可能性を示唆する。今後は、遺伝子診断によるこのような個体の識別を行ない、この仮説を立証したいと考えている。

## E. 結論

飼育チーターの主要死因である AA アミロイドーシスの発症機構解明のための基本的情報とツールを得た。チーターが AA アミロイドーシスを発症しやすい原因として、AA タンパク質のアミノ酸配列、および発現調節配列の多型が重要であることを明らかにした。また、糞中のアミロイド線維を介した AA アミロイドーシスの個体間伝播の可能性を示した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Zhang H, Sawashita J, Fu X, Korenaga T, Yan J, Mori M, Higuchi K. Transmissibility of mouse AApoAII amyloid fibrils: inactivation by physical and chemical methods. *FASEB J* 20 (7) : 1012-1014, 2006
- 2) Korenaga T, Yan J, Sawashita J, Matsusita T, Naiki H, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Fu X. Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am J Pathol* 168 (3): 898-906, 2006
- 3) Yan J, Fujii K, Yao J, Kishida H, Hosoe K, Sawashita J, Takeda T, Mori M, Higuchi K. Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice. *Exp Gerontol* 41 (2) : 130-140, 2006
- 4) 樋口京一 アミロイドーシスの伝播 細胞工学 26 (2), 177-180, 2007

### 2. 学会発表

- 1) 張蓓茹、付笑影、葛鳳霞、嚴景民、姚俊潔、張桓宇、澤下仁子、森政之、中井彰、樋口京一：活性型 hHSF1 トランスジェニックマウスにおける AApoAII アミロイドーシスの抑制。第 29 回日本基礎老化学会、長崎、6 月 16 日、2006 年
- 2) 葛鳳霞、姚俊潔、付笑影、郭占軍、嚴景民、張蓓茹、張桓宇、澤下仁子、森政之、樋口京一：ApoA-II transgenic マウス (*Apoa2<sup>c</sup>* Tg) の開発と老化アミロイドーシス。第 21 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、名古屋、7 月 27 日、2006 年
- 3) 張蓓茹、宇根有美、亀谷富由樹、嚴景民、葛鳳霞、姚俊潔、張桓宇、澤下仁子、森政之、樋口京一、付笑影：チーターの AA アミロイドーシス。第 1 回臨床ストレス応答学会、京都、11 月 23 日、2006 年
- 4) Fu X, Korenaga T, Yan J, Ge F, Zhang B, Qian J, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. Mouse senile amyloidosis : Possible horizontal transmission in the mouse room. XIth International Symposium on Amyloidosis. Woods Hole, USA, November 7, 2006

5) Higuchi K, Ge F, Fu X, Yao J, Guo Z, Yan J, Zhang B, Zhang H, Qian J, Sawashita J, Mori M. Amyloidosis in the transgenic mice of mouse amyloidogenic apolipoprotein A-II (*Apoa2<sup>c</sup>*). XIth International Symposium on Amyloidosis. Woods Hole, USA, November 7, 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

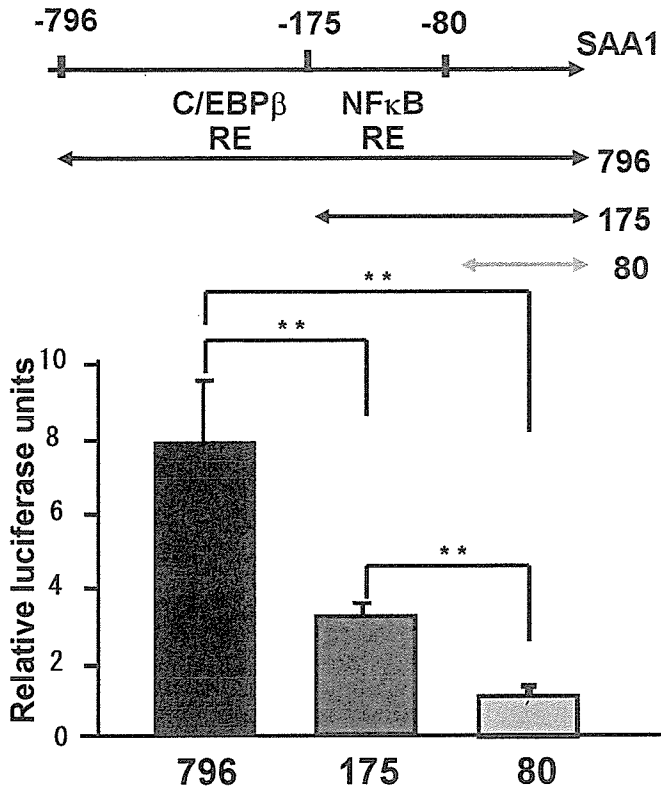


図1 チーター-SAA1遺伝子の5'上流域にSAA1の発現に重要であるC/EBPβとNF-κB応答配列が存在する ( $P < 0.01$ )。

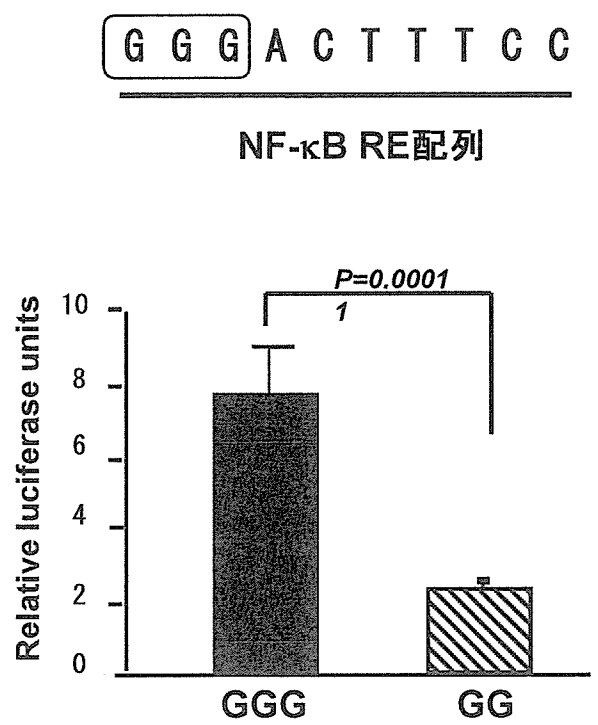


図2 チーター集団中にはプロモーター活性の強弱を規定するNF-κB応答配列中で遺伝的多型があることを発見した。

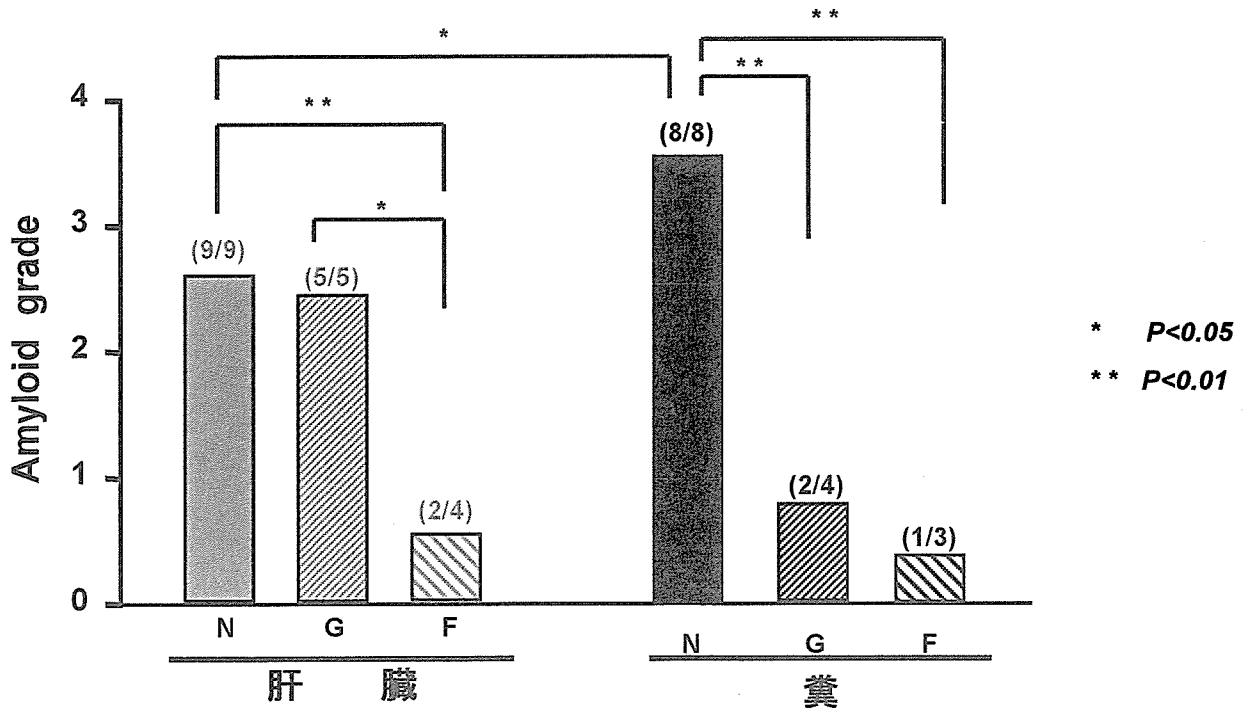


図3 糞と肝臓からAAアミロイド線維を抽出し、マウスの実験的アミロイドーシスモデルを用いて、伝播力を評価した。糞中線維の方が伝播能力が強いことが示唆された。一方、6M塩酸 Guanidine やギ酸のようなアミロイド線維を変性させる処置を加えると容易に伝播能力を失うことから、糞中線維は変性処理には非常に弱いことが分かった。

N:未処理、 G: 6M塩酸 Guanidine 処理 F: ギ酸処理

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)  
 アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

チーター(*Acinonyx jubatus*)のアミロイド症の生前診断法に関する研究

分担研究者 宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

研究協力者 樋口京一\*、付笑影\*、藤野みゆき\*\*

\*信州大学医学研究科加齢生物学分野、\*\*麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

研究要旨 チーターの重要な死因である AA アミロイド症の発生メカニズムを解明するために、チーターについて非侵襲性的アミロイド症生前診断法の確立とその精度について検討した。抗チーターアミロイド線維抗体を用いたウエスタンブロット法により、生前に採取した糞 18 検体 (TT 施設 6 検体、HC 施設 5 検体、WS 施設 7 検体) と死亡時に採材した糞 2 検体 (C-67,68) 中のアミロイド線維の有無を検索した結果、生前採取された糞 18 検体のうち 15 検体よりアミロイド線維が検出された (83.3%)。施設別検出率の割合は TT 施設 100%、HC 施設 80.0%、WS 施設 71.4%であった。死亡時に採材した糞のうち C-68(腸アミロイド沈着あり)からアミロイド線維は検出されたが、C-67(腸へのアミロイド沈着なし)からは検出されなかった。しかし、死の 4ヶ月前に採材した糞からアミロイド線維は検出されなかったが、死亡時小腸～大腸にかけて高度のアミロイド沈着が見られた例もあったことから、今後、症例数を増やして、糞を用いたアミロイド症診断法の検出限界、アミロイド線維の排泄推移など検討する必要がある。

A. 研究目的

チーターは絶滅危惧種に指定され、世界的規模で保護が行われている。しかしながら、目立った個体数の増加はなく、国内ではむしろ減少しており、1994年90頭を越えていた飼育数が、2003年には50頭を切った。2006年1月から2007年1月の間に死亡した10頭のチーターのうち、8頭にアミロイド沈着があり(80%)、そのうち7頭が全身性であった。また、全身性アミロイド症は1歳のチーターにも観察され、死因として重要である(表1)。チーターを絶滅の危機から救うためには、チーターの死因として重要なアミロイド症の病理発生を解明する必要がある、今日まで日本動物園水族館協会種の保存委員会の協力を得て、死亡したチーターについて疫学のおよび病理学的に解析してきた。その結果、多頭飼育をしている飼育施設由来チーターの平均寿命は短く、アミロイドの沈着も高度で、何らかの環境因子が関与していることが明らかとなった。また、炎症刺激下のICRマウスに、

チーター由来アミロイドを腹腔内接種すると、伝達することが証明された。しかし、経口投与ではチーター由来アミロイドの伝達性は証明されず、対照として行ったウシやマウスのアミロイドを用いたマウスアミロイド伝達実験結果と比較すると、チーターのアミロイドはAEF効果を持っているものの、他の動物に比較してその効果は低いと推察された。

本研究の目的は、チーターのアミロイド症の病理発生を解明して、ヒトのAAアミロイド症の研究とチーターの種の保存に貢献することで、特に本研究では、チーターについて、非侵襲性的アミロイド症生前診断法の確立とその精度について検討する。本診断法の確立により、アミロイド症罹患動物の確認、治療実験などが可能となる。

B. 研究方法

チーターの腸におけるアミロイド沈着状況と、糞中へのアミロイド排出と腸組織におけるアミ

ロイド沈着との関連をみるために、以下の材料と方法を用いた。

- 1) チーター由来アミロイド線維の精製  
C-68 のチーターの肝臓（アミロイド沈着スコア 2）より抽出、精製（図 1）
- 2) チーター由来アミロイド線維抗体の作製  
ウサギに抗原を接種し作製
- 3) 抗チーター由来アミロイド線維抗体を用いたウェスタンブロット法の確立（図 2）  
各種動物の AA アミロイドとの反応性を検討
- 4) 糞を用いたチーター由来アミロイド線維検出法（ウェスタンブロット法）の確立  
以上の項目は、共同研究者の信州大学樋口京一先生が検討した。
- 5) 病理組織学的検索：死亡したチーター 7 頭（2 頭は死亡時に糞と腸を採材し、残りの 5 頭は糞採取時と死亡日が最長で 1 年期間が離れているものがあつた）の臓器を病理組織学的に検索して、アミロイド沈着の程度を評価して、糞中アミロイドとの関係のみた。

（倫理面への配慮）

動物の排泄物を収集して、それを材料とした研究のため、倫理面では特に問題がない。

#### C,D. 研究結果および考察

調査期間中死亡したチーターは 10 頭で、その内訳は表 1 のとおりであつた。うち 5 頭で、生前に糞が回収されていた。

糞中のアミロイド線維の検出として、信州大学樋口京一先生が作製した抗チーターアミロイド線維抗体を用いたウェスタンブロット法（図 3）により、生前に採取した糞 18 検体（TT 施設 6 検体、HC 施設 5 検体、WS 施設 7 検体）と死亡時に採材した糞 2 検体（C-67,68）中のアミロイド線維の有無を検索した。

その結果、生前採取された糞 18 検体のうち 15 検体よりアミロイド線維が検出された（83.3%）（表 2）。施設別検出率の割合は TT 施設 100%、HC 施設 80.0%、WS 施設 71.4%で、多頭飼育施設である WA で検出率が低かつた（表 2）。しかし、検体数も少ないことから、今

回の検査結果のみで、多頭飼育施設でアミロイド罹患率が低下していると判断できなかつた。実際、2004 年から 2006 年までに 13 頭のチーターが死亡してアミロイド罹患率は 61.5%であつたが、WS 由来の 7 頭すべてにアミロイドの沈着があり、今回の生前診断法による罹患率とかなりの差があつた。

死亡時に採材した糞のうち C-68 からアミロイド線維は検出されたが、C-67 からは検出されなかつた。それぞれのチーターの各臓器におけるアミロイド沈着状況は、C-68:腸 1、腎 4、肝臓 3（図 4,5）、C-67:腸 0、腎 2、肝 0 であつたことから、糞中のアミロイド排泄の状況は、腸のアミロイド沈着状況を反映していた。しかし、No.13 のように死の 4 ヶ月前に採材した糞からアミロイド線維は検出されなかつたが、死亡時、小腸から大腸にかけて高度のアミロイド沈着が見られた例もあつたことから、今後、症例数を増やして、糞を用いたアミロイド症診断法の検出限界、アミロイド線維の排泄状況など検討する必要がある。

#### E. 結論

今後、さらに検討する必要があるがあつたが、猛獣であるチーターに関して、本検査法はアミロイド症の非侵襲的なアミロイド症生前診断法として有用であると考えた。

#### 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

#### 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



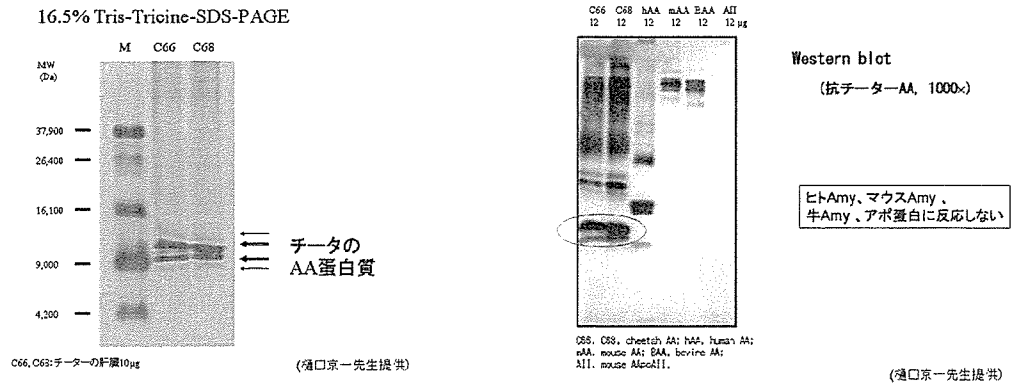
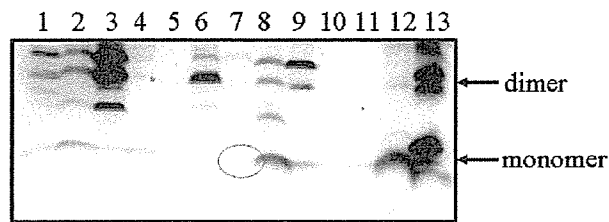


図1. チーター由来アミロイドの精製

図2. チーター由来アミロイド抗体の作成



Western blotting (抗チーターAA, 3000x)  
 1~12, feces 約2 μgずつ; 13, C68のliver 40 μg  
 1 エンジュ 2 ジーナ 3 スミレ  
 4 ソテツ 5 マンサワ 6 ユリ  
 7 **ポニー** 8 クライド 9 カーリス  
 10 ナンシー 11 シド 12 C68

12 13 14 15 18 26 29  
 (糞のアミロイド fraction 20μgずつ)

No. 7、13、15の糞からAAを検出できなかった。  
 ほかの糞からは、AAが検出された。

12 フェール 13 アクセル 14 アルト  
 15 アン 18 シルニー 26 ムー  
 29 レイ

図3. 診断への応用

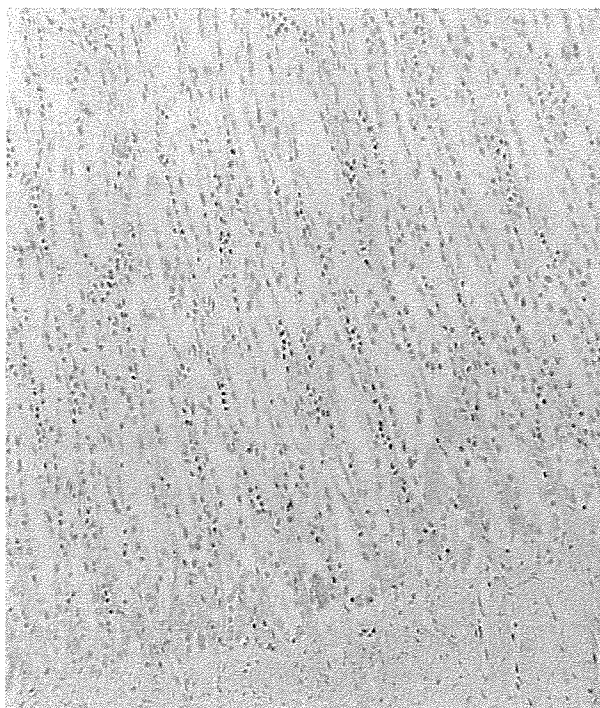


図4 C-68 小腸 コンゴ赤染色

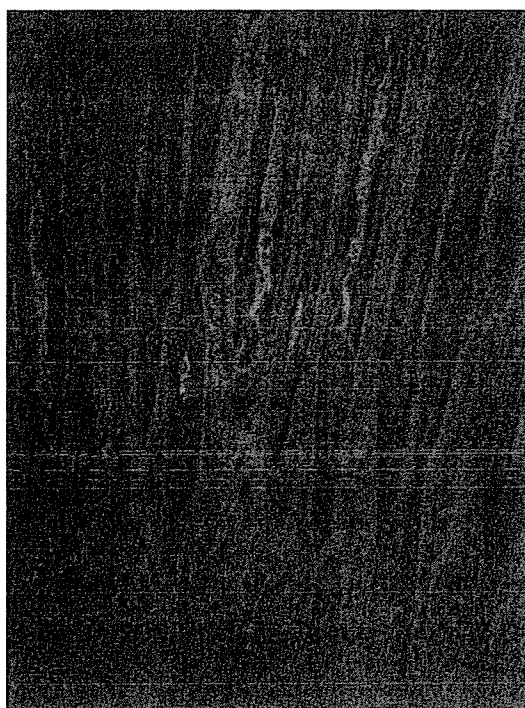


図5 C-68 小腸 蛍光顕微鏡観察

表1 2006年1月～2007年1月までに死亡した10頭のチーターの内訳

No	由来	(愛称)	性別	年齢	臨床診断	腎病変		腎以外のアミロイド沈着	その他
						アミロイド	その他		
C-78 (409)	B/WS	フォーール	♂	1	神経症状	(-)	溶血	胃、腸、心、甲状腺、脾、副腎	間質性肺炎、肺水腫、大脳の水腫変性
C-79 (408)	B/WS	ネフティ	♂	1	神経症状(痙攣、硬直)	(+)1	腎梗塞	肝、小腸、大腸、胃、脾臓	軽度出血を伴う肺水腫、全身性循環障害、脳脊髄神経細胞の高度変性、心内膜症
C-80 (365)	B/WS	カナタ	♂	8	不明※	(-)	間質性腎炎	肝臓、脾臓、小腸	肺水腫、脂質性肺炎、カタル性肺炎、胃幽門部上皮細胞の変性壊死、結腸潰瘍、慢性結腸炎、大脳水腫性変性
C-81 (355)	I/YA	ホダリー	♂	18	腎不全、消瘦、歩行困難	(+)1～2	間質性腎炎、尿細管変性	(-)	慢性腸炎
C-82 (381)	B/YA	ラルク	♂	6	てんかん	(-)	(-)	(-)	肺水腫(高度)、誤嚥、慢性小腸炎、大腸炎
C-83 (372)	B/WS	アクセル	♂	6	不明※	(+)1	間質性腎炎、腎盂炎、腎乳頭壊死(軽度)	胃、腸、肝、副腎、心、脾、膵	食道潰瘍、リンパ・プラズマ細胞性小腸炎、大腸炎
C-84 (401)	B/WS	シュクラ	♀	3	腎機能低下	(-)	間質性腎炎、尿細管変性	肝、副腎、脾、心、胃、腸	肺血栓症、脂質性肺炎、膠様萎縮(脾脂肪組織)、ヘモジデロシス(脾、肺)
C-85 (385)	B/WS	ムー	♂	5	不明※	(+)	間質性腎炎、糸球体硬化	胃、腸、肝、脾、心、副腎	肺水腫、心臓線維化、慢性腸炎(軽度)、ヘモジデロシス(脾、腸間膜リンパ、髄外造血(脾))
C-86 (343)	I/WS	アン	♀	11	不明※	(+)	ボウマン嚢尿管拡張	肝	肺水腫、肝変性、脳水腫
C-87 (253)	B/TT	ジーナ	♀	15	老衰	(-)	腎線維化	(-)	全身性うっ血、心筋線維化、肝変性

B：国内繁殖個体、I：輸入個体 アルファベットは飼育施設の略号

表2 糞中へのアミロイド排出状況

No.	愛称	AA(糞)	死亡時Am	死亡日
1	エンジュ	+		
2	ジーナ	+	—	2007.1
3	スミレ	+		
4	ソテツ	+		
5	マンサク	+		
6	ユリ	+		
7	ボニー	—		
8	クライド	+		
9	カーリス	+		
10	ナンシー	+		
11	シド	+		
12	フォール	+	+	2006.3
13	アクセル	—	+	2006.4
14	アルト	+		
15	アン	—	—	2006.12
18	シルニー	+		
26	ムー	+	+	2006.10
29	レイ	+		

No.1-6 : TT 施設、7-11 : HC 施設、12-29 : WS 施設

糞の採取時期 : 2005 年 12 月—翌 1 月

死亡時 Am : 組織検査(死亡時) のアミロイド沈着有無