

図1:CT所見

CT



骨盤腔内に石灰化を伴った腫瘤状病変がみられた。

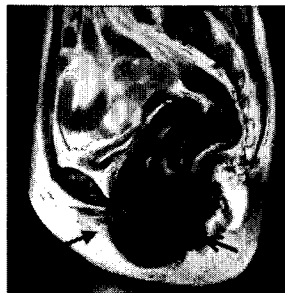
図2: MRI所見

入院時MRI

T2強調画像

T1強調画像

T1強調画像
(造影後)



筋肉と比較すると
低吸収像



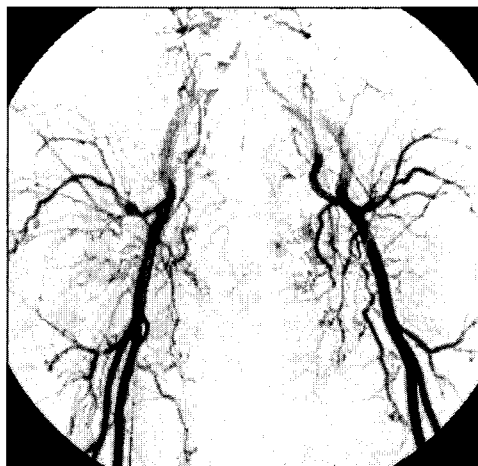
筋肉と比較すると
等一低吸収像



造影効果は乏しい

腔と直腸の間に位置する9.0×6.0×5.0 cmの巨大腫瘍が発見

図3; 血管造影所見
血管造影



腫瘍に対する造影効果は乏しい

図4 : 経膈的腫瘍生検、HE染色

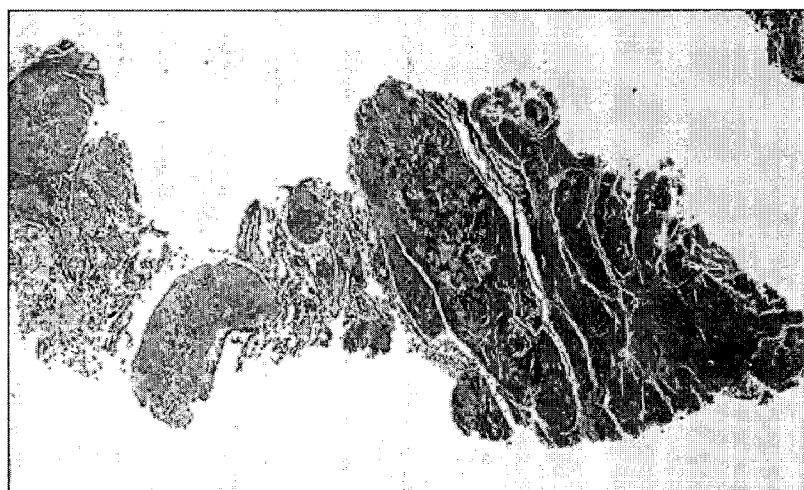
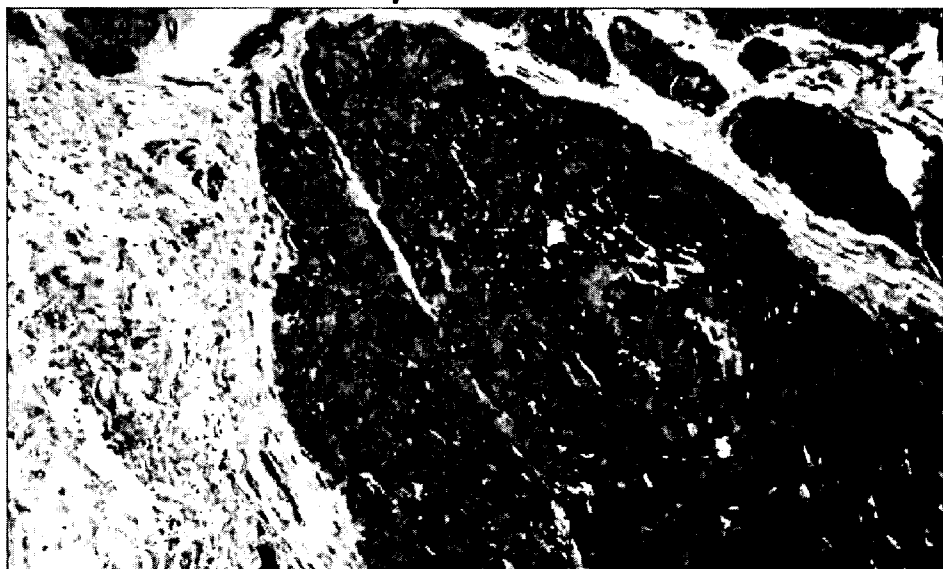


図5: Congo Red染色



図6: β 2-MG染色



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

献腎移植を行った透析患者における透析アミロイドーシスの臨床経過

分担研究者 下条文武 新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座 (第2内科)

共同研究者 山本卓*、西慎一**、風間順一郎***、丸山弘樹****、成田一衛*、
諏訪通博*****、中川由紀*****、齋藤和英*****、高橋公太*****

*新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座 (第2内科)

**新潟大学医歯学総合病院血液浄化療法部

***新潟大学医歯学総合病院集中治療部

****新潟大学大学院医歯学総合研究科腎医学医療センター寄附講座

*****新潟大学大学院医歯学総合研究科腎泌尿器病態学 (泌尿器科)

研究要旨 透析アミロイドーシスは長期透析患者に高頻度に発症する透析合併症の1つであり、手根管症候群 (CTS) をはじめ様々な骨関節病変を呈する。本症の最も効果的な治療は腎移植であるが、その効果については一定の見解がない。今回我々は最近10年間、当院で献腎移植を施行された維持透析患者32名についての透析アミロイドーシスの臨床経過について調査した。CTS、破壊性脊椎関節症 (DSA) あるいはアミロイド関節症発症の既往は9例 (28.1%) であり、非発症例と比較して透析期間の長期化 (21.3 ± 3.2 vs. 15.5 ± 7.3 年) が特徴的であった。移植後多くは関節症状の改善を認めたが、腎機能が保たれているなか DSA の手術を施行された症例もあった。献腎移植を受ける透析患者は長期透析例で、透析アミロイドーシスの合併を認めた。腎移植は症状の改善、進行の抑制に有効であったが、進行例もあると思われる、更なる治療法の確立が望まれる。

A. 研究目的

平成18年末の我が国の透析歴20年以上の透析患者は17527名となり、長期透析患者が増加する傾向にある。10-20年以上の長期透析は透析アミロイドーシス発症のリスクファクターである。平成18年度に我々は、当院における治療目的で紹介された慢性透析症例366名について透析アミロイドーシスの病態を検討した。手根管症候群 (CTS)、破壊性脊椎関節症 (DSA)、アミロイド関節症の手術歴のある患者は15-19、20-24年、25年以上の透析期間別でそれぞれ13.1、25.0、67.5%であり、透析期間の長期化に伴い増加し多彩な病態を呈した。現在、本症の唯一の根治的治療は腎移植である。今回、我々は献腎移植を受ける機会を得た長期透析患者の透析アミロイドーシスの臨床病態について調査した。

B. 研究方法

最近10年間、献腎移植をうけた維持透析患者について透析アミロイドーシスの合併について臨床的に検討した。

(倫理面への配慮)

匿名性を確保した。

C. 研究結果

症例は32名 (男20名、女12名) であり、移植時年齢は 48.3 ± 8.6 歳、透析期間は 17.1 ± 6.9 年であった。全例で移植後、シクロスポリンまたはタクロリムス、メチルプレドニゾロン、ミコフェノール酸モフェチルまたはその他で免疫抑制薬を併用した。腎移植後は調査時に腎機能が保たれている例が23例、移植腎不全のため透析に再導入された例が6例、移植後生着しなかった例が3例であった。CTS、DSA あるいはアミロイド関節症発症の既往は9例 (28.1%) であり、非発症例と比較して透析期間の長

期化 (21.3±3.2 vs. 15.5±7.3年)が特徴的であった。関節症のある例では移植後間もなく関節症状の改善を認めた。1例は移植腎機能が保たれているなか頸椎DSAの手術を施行された。また1例は移植後生着せず、術1年後移植腎摘出、免疫抑制薬を中止し、血液透析を継続したところ、術3、6年後にCTSに対して手術を施行された。

D. 考察

献腎移植を受けた透析患者は長期透析例で透析アミロイドーシスの合併を認めた。腎移植は症状の改善、進行の抑制に有効であったが、1例移植腎機能が保たれているなかDSAに対し手術を施行された例もあった。腎移植の透析アミロイドーシスに対する効果に関して1つは、腎機能の獲得により、アミロイドの前駆蛋白質であるβ₂-ミクログロブリンが減少することでアミロイド形成が抑制されると考えられる。これまで試験管内アミロイド線維形成反応における重合核依存性重合モデルにあてはめると、いずれアミロイドが消失することが期待されるが、過去の報告では進行が抑制されたにとどまるものが多い。また免疫抑制薬の使用による抗炎症作用が透析アミロイドーシスの症状を改善している可能性がある。過去に本症に対する少量ステロイドの効果について報告があるが、同様に腎移植でも免疫抑制薬使用の効果が大きいと思われる。

E. 結論

献腎移植を受ける透析患者は長期透析例で、透析アミロイドーシスの合併を認めた。腎移植は症状の改善、進行の抑制に有効であったが、進行も

あると思われ、更なる治療法の確立が望まれる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1)山本卓、長谷川一浩、山口格、風間順一郎、丸山弘樹、成田一衛、後藤裕児、内木宏延、下条文武：β₂-ミクログロブリンアミロイド線維形成・沈着の分子機構。透析会誌 40: 1028 - 1030, 2007.

2. 学会発表

1) Yamamoto S, Kazama JJ, Maruyama H, Nishi S, Narita I, Gejyo F: Dialysis-related Amyloidosis; A Serious Complication in CKD stage5D Patients Undergoing Dialysis Therapy for More Than 30 Years, World Congress of Nephrology, Rio de Janeiro, Brazil, April 21-25, 2007.

2) 山本 卓、内木宏延、下条文武: 透析アミロイド症 病態解明へのアプローチ update. 第52回日本透析医学会学術集会・総会, 大阪, 平成19年6月15-17日。

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

遊離脂肪酸による $\beta 2$ -ミクログロブリンアミロイド線維の 伸長反応促進効果の検討

分担研究者 内木宏延 福井大学医学部医学科 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*、大越忠和*、後藤祐児**

*福井大学医学部医学科 病因病態医学講座・分子病理学領域、

**大阪大学 蛋白質研究所

研究要旨 $\beta 2$ -ミクログロブリン($\beta 2$ -m)アミロイド線維の試験管内形成反応において、前駆体蛋白質 $\beta 2$ -m は立体構造が部分変成し、アミロイド原性の構造に変化する必要がある。昨年度までに、この部分変成作用を示す生体成分として、陰性荷電を有するリゾリン質群を報告した。今回、遊離脂肪酸の効果について検討した。ラウリル酸、ミリスチン酸、オレイン酸、リノール酸に強い線維伸長効果が認められた。パルミチン酸、ステアリン酸は単独では伸長効果を示さないが、血中の組成に類似したオレイン酸、リノール酸との混合物としては効果を示した。血中での脂肪酸輸送蛋白質である血清アルブミン共存下でも、血清アルブミンの最大結合容量を超える遊離脂肪酸を添加した場合には線維伸長が認められた。リゾリン質に加えて、遊離脂肪酸も透析患者に特有の生体環境下で、 $\beta 2$ -m アミロイド線維形成を誘起する可能性がある。

A. 研究目的

透析アミロイドーシスの $\beta 2$ -ミクログロブリン($\beta 2$ -m)アミロイド線維の試験管内形成反応系を開発し、この線維形成反応が重合核形成過程と線維伸長過程の二段階からなる重合核依存性重合モデルに適合することを示してきた。また、種々の生体分子がこれらの過程に影響を及ぼし、線維形成を促進あるいは抑制することを示してきたが、その全体像については未だ明らかにされていない。 $\beta 2$ -m アミロイド線維の試験管内伸長反応において、前駆体蛋白質である $\beta 2$ -m は、天然の立体構造のままでは線維として伸長せず、アミロイド原性の立体構造に変化する必要があることが判明している。既に pH 2.5 程度の酸性溶液条件あるいは、中性溶液中では陰性荷電をもつ界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムなどがこの構造変化を引き起こすことを示してきた。最近、生体内に存在する界面活性物質であるリゾリン脂質のうちリゾフォスファチジン酸およびリゾフォスファチジルグリセロール等の陰性荷電を有する群が $\beta 2$ -m に作用し線維伸長を誘起さ

せることを示した。今回、生体内に豊富に存在する陰性荷電を有する界面活性物質であり、また重要なエネルギー源でもある遊離脂肪酸について、 $\beta 2$ -m アミロイド線維伸長効果を解析した。

B. 研究方法

遊離脂肪酸を種々の濃度で添加した中性緩衝液(50 mM リン酸ナトリウム(pH7.5) 100 mM NaCl) に、超音波破碎した $\beta 2$ -m アミロイド線維(シード)と $\beta 2$ -m モノマーを添加して 37°C で線維伸長反応を行い、チオフラビン T を用いた分光蛍光定量法、並びに電子顕微鏡観察にてアミロイド線維伸長の有無を確認した。遊離脂肪酸としては飽和脂肪酸であるラウリル酸(C12)ミリスチン酸(C14)、パルミチン酸(C16)、ステアリン酸(C18)、不飽和脂肪酸であるオレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)の各ナトリウム塩、ならびに、血中の組成を模倣するパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸の混合物(混合比(3:1:3:1.5)と(3:1:3)の2種類)を用いた。

(倫理面への配慮)

試験管内実験に必要な β 2-m 線維を精製するためのアミロイド沈着組織は、患者より実験に使用する旨の同意書を得た後、手術時に採取した。

C. 研究結果

試験管内でのアミロイド線維伸長実験では、ラウリル酸、ミリスチン酸、オレイン酸、リノール酸にそれぞれ単独で強い線維伸長効果が認められた。ラウリル酸、オレイン酸、リノール酸は界面活性剤ミセルを形成する為の最低濃度である臨界ミセル濃度以上の濃度で顕著な伸長能を示した。パルミチン酸、ステアリン酸は単独では伸長効果を示さないが、生体での組成を模倣した脂肪酸混合物としては効果を示した。パルミチン酸、ステアリン酸は、ミセルを形成して界面活性剤の効果を示す最低温度がそれぞれ、55-60°C、65°C以上と高い為、37°Cではオレイン酸やリノール酸と混合ミセルを形成することではじめて機能すると考えられる。上記脂肪酸混合物の伸長反応に対する至適濃度は0.5-1 mM前後であり、ほぼ血中の遊離脂肪酸濃度と同等であった。

円偏光二色性分光法を用いて、 β 2-mに0.1-5 mMのオレイン酸を添加した際の立体構造変化を測定した。その結果、ドデシル硫酸ナトリウムの場合と同様に β シート構造が減少し、 α ヘリックスおよびランダムコイル構造が増加する立体構造変化が引き起こされることを確認し、アミロイド原性の立体構造に変化しうることが示された。

遊離脂肪酸は血中では血清アルブミンに結合して輸送される。上記の試験管内線維伸長反応系に低濃度血清アルブミン(0.5g/dl)を共存させ、遊離脂肪酸(オレイン酸、および脂肪酸混合物)を添加した。血清アルブミンは一分子当たり脂肪酸を最大7分子結合するが、最大結合容量(この場合約0.5 mM)を超える脂肪酸を添加した場合には線維伸長が認められた。従って、生体中では血清アルブミン非結合型の遊離脂肪酸が線維伸長を誘起しうるものと考えられる。

D. 考察

血清アルブミン非結合型の遊離脂肪酸が β 2-mと結合し、その立体構造がアミロイド原性のもの

に変化し、その結果アミロイド線維が伸長する可能性が示された。血中の非結合型遊離脂肪酸濃度は測定法により異なった値が報告されているが、健常人では10 nM以下であるとの推定もなされている。ただ、透析患者の体内では、 β 2-mは代謝が遅いため血中を循環し続けるものの、遊離脂肪酸は速い速度(半減期数分)で供給・消費され続ける開放型反応系を構成している。従って、非結合型遊離脂肪酸によりアミロイド原性に変化した β 2-mは微量ながらも持続的に生成され、沈着し続ける可能性がある。今後、このような系で年単位の経過で反応を行った場合に、どの程度の濃度の非結合型脂肪酸が線維伸長を誘起しうるのかを検討する。一方、透析患者では透析時のheparin投与により血中遊離脂肪酸濃度が増加することが報告されている。また、透析前に蓄積した尿毒性物質が血清アルブミンに干渉し、非結合型脂肪酸濃度を増加させる可能性も考えられる。今後、このような透析患者に特有の生体環境下で、遊離脂肪酸がどの様にして β 2-mアミロイド線維形成を誘起し得るのか解析を進める。また、リン脂質と遊離脂肪酸がそれぞれどの様な機序で線維形成に影響を及ぼすのかを比較検討する必要がある。

E. 結論

中性pH域で陰性荷電を持つ各種遊離脂肪酸およびその混合物が、 β 2-mモノマーの立体構造を変化させることで、アミロイド線維伸長反応を誘起することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasahara K, Yagi H, Naiki H, Goto Y: Heat-triggered conversion of protofibrils into mature amyloid fibrils of β 2-microglobulin. *Biochemistry* 46:3286-3293, 2007.
- 2) Nagai Y, Inui T, Popiel HA, Fujikake N, Hasegawa K, Urade Y, Goto Y, Naiki H, Toda T: A toxic monomeric conformer of the polyglutamine

protein. *Nat Struct Mol Biol* 14:332-340, 2007.

3) Yan J, Fu X, Ge F, Zhang B, Yao J, Zhang H, Qian J, Tomozawa H, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils and protein A amyloid fibrils. *Am J Pathol* 171:172-180, 2007.

4) Sasahara K, Yagi H, Naiki H, Goto Y: Heat-induced conversion of β_2 -microglobulin and hen egg-white lysozyme into amyloid fibrils. *J Mol Biol* 372:981-991, 2007.

5) Yagi H, Ban T, Morigaki K, Naiki H Goto Y: Visualization and classification of amyloid β supramolecular assemblies. *Biochemistry* 46:15009-15017, 2007.

6) Yamamoto K, Yagi H, Ozawa D, Sasahara K, Naiki H, Goto Y: Thiol compounds inhibit the formation of amyloid fibrils by β_2 -microglobulin at neutral pH. *J Mol Biol* 376:258-268, 2008.

7) Morimoto H, Wada J, Font B, Mott JD, Hulmes DJ, Ookoshi T, Naiki H, Yasuhara A, Nakatsuka A, Fukuoka K, Takatori Y, Ichikawa H, Akagi S, Nakao K, Makino H: Procollagen C-proteinase enhancer-1 (PCPE-1) interacts with β_2 -microglobulin (β_2 -m) and may help initiate β_2 -m amyloid fibril formation in connective tissues. *Matrix Biol*, in press.

8) 廣畑美枝, 長谷川一浩, 安原しのぶ(堤), 小野賢二郎, 山田正仁, 内木宏延: ポリフェノールが β アミロイド蛋白凝集に及ぼす抗アミロイド効果の分子機構解明. 未病と抗老化 16(1):115-127, 2007.

2. 学会発表

1) 山本卓、内木宏延、下条文武: 透析アミロイド症病態解明へのアプローチ update. 第52回日本透析医学会学術集会・総会、大阪、6、15-17, 2007.

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

Apolipoprotein A-II (apoA-II) の部分ペプチドを用いた アミロイド線維形成機構

分担研究者 樋口京一 信州大学大学院医学系研究科加齢生物学分野

共同研究者 澤下仁子、張 倍茹、錢 金澤、森 政之

信州大学大学院医学系研究科加齢生物学分野

研究要旨 マウス老化アミロイドーシスのアミロイド線維形成機構の解明を目的とし、老化アミロイドーシス関連タンパク質 apolipoprotein A-II (apoA-II) の合成部分ペプチドを用い、*in vitro* における重合反応を解析した。アミロイド線維形成最小単位 6-16 番目の N 末ペプチドと 48-65 番目の C 末ペプチドを用いた結果、線維形成には構成アミノ酸だけでなく、その配列順が重要であり、N 末配列は形成量を決定する可能性、C 末配列は線維形成の初期過程に必須であることを明らかにした。また、発症頻度が異なる B 型と C 型 apoA-II の 1-16 番目の N 末ペプチドを用いた結果により、線維形成には 16 番目の Gln が最重要アミノ酸であること、次いで 5 番目の Gln が重要となる可能性を示唆した。さらに、F 型 apoA-II を有するマウスは、高発症マウスの C 型とは異なるアミノ酸組成の apoA-II を有することにより難線維形成性を示し、その結果、アミロイドーシス抵抗性となることが考えられた。

A. 研究目的

これまで、A 型、B 型、C 型 apoA-II マウスの老化アミロイドーシス研究により、アミロイドーシスの発症には apoA-II の 5 番目のアミノ酸が Gln であることが重要と考えられてきた。しかし、*in vitro* 実験により、線維形成には 5 番目のアミノ酸は必須ではなく、A、B、C 型 apoA-II の共通配列である 6-16 番目と 48-65 番目が強酸性条件下にて線維を形成すること、16 番目の Gln が反応の鍵となる可能性を示唆してきた(平成 17 年度の班会議にて既報。図 1)。

本研究では、アミロイドーシス高発症マウスが有する C 型 apoA-II (5Gln, 9Ser, 16Gln, 38Ala, 54Arg, 62Asn)、低発症マウスの B 型 (C 型との相違; 5Pro, 38Val) の線維形成機構の相違解明を試みると共に、発症頻度不明の F 型 apoA-II (C 型との相違; 9Asn, 16His, 54Lys, 65Lys。発症頻度は本班会議にて報告) の重合反応を解析し、アミノ酸組成・配列順の相違と線維形成量との関連性を検討した。

B. 研究方法

酸性条件下における apoA-II 部分ペプチドの重

合反応: 1) 16 番アミノ酸の相違に着目した重合反応 線維形成可能な apoA-II ペプチドの最小単位 6-16 番 (N 末配列) と 48-65 番 (C 末配列) について、C 型 (=A, B 型) と F 型の合成部分ペプチドを用い、氷冷下、50 μ M ペプチド溶液 (DMSO 5%)、50 mM バッファ (pH 2.5)、100 mM NaCl の混合液を調製し、37 $^{\circ}$ C で振とう (300 rpm) した。反応液を経時的に分取し、室温下、250 nM チオフラビン T (ThT) 溶液 (50 mM Glycine-NaOH 溶液、pH 9.0) と反応させ、直ちに、励起波長 450 nm、測定波長 482 nm にて蛍光強度を測定した。蛍光強度の変化パターンから、線維形成の有無と形成量を推定した。また、反応 10 日後の反応液を用い、コンゴレッド染色による光学顕微鏡観察を行い、さらに、リンタングステン酸染色後の電子顕微鏡観察によりアミロイド線維様構造体の存在を確認し、形態を比較した。2) アミノ酸配列順に着目した重合反応 C 型 apoA-II の 6-16 番目 (N 末配列) と 48-65 番目 (C 末配列) の順配列と逆配列ペプチドを用い、1) と同様の解析を反応 24 時間後まで行った。

各種 pH における重合反応: B、C 型 apoA-II

の 1-16 番目、C 型 1-16 の 16 番目を F 型の His に置換した N 末配列ペプチド (C(Q16H)) を用い、B、C 型共通の 48-65 番目の C 末配列と pH 2.5-7.4 における重合反応を行い、前項 1)と同様の解析を反応 24 時間後まで行った。

(倫理面への配慮)

本研究は合成ペプチドを用いた *in vitro* 研究であるため、倫理的配慮は不要である。

生成アミロイド線維に関しては、ヒトへの伝播・発症の危険は無いと考えられるが、取り扱い際には手袋・マスクを着用し、使用後の器具等は焼却、または 2 N NaOH に 2 時間以上浸透処理することとしている。

C. 研究結果

酸性条件下における apoA-II 部分ペプチドの重合反応：1) 16 番アミノ酸の相違に着目した重合反応 <C型同士の N 末 + C 末>では、反応 3 時間後から ThT 蛍光強度が増加し始め、10 日後も高値であった (図 2)。また、反応液中には多量の長線維が存在していた。一方、<F 型同士の N 末 + C 末>では、C 型同士よりも蛍光強度の増加開始が非常に遅く、反応 2 日後から増加し始め、その最大値は C 型同士の 1/10 以下で、形成線維も短い形態であった。また、<C 型 N 末 + F 型 C 末>では、反応 10 日後まで蛍光強度が全く増加せず、線維を形成しなかった。さらに、<F 型 N 末 + C 型 C 末>では、C 型同士とほぼ同期に蛍光強度が増加し始めたが、その最大値は C 型同士の約 1/10 で、短線維だった。2) アミノ酸配列順に着目した重合反応 <順配列同士の N 末 + C 末>と比較して、<逆配列同士の N 末 + C 末>、<順配列 N 末 + 逆配列 C 末>や<逆配列 N 末 + 順配列 C 末>では蛍光強度の増加は非常に少なかった (図 3)。電子顕微鏡観察により、<逆配列同士>や<順配列 N 末 + 逆配列 C 末>は線維を全く検出できず、<逆配列 N 末 + 順配列 C 末>も極微量の短線維だった。

各種 pH における重合反応：B 型、C 型のいずれの重合反応においても、pH 2.5 と 3.0 で ThT 蛍光強度は最高値を示し、その他の pH では低値で、両者に相違はなかった (図 4)。しかし、pH 3.8 における反応では、C 型は B 型の 2 倍以上の蛍光強度だった。一方、C(Q16H)では全ての pH 条件下で蛍光強度が

低値だった。

D. 考察

apoA-II のアミロイド線維形成には、6-16 番目の N 末配列と 48-65 番目の C 末配列が重要で、その構成アミノ酸だけでなく、配列順が非常に重要であることが示唆された。特に、C 末配列が F 型 apoA-II 由来、あるいは C 型由来であっても逆配列の時には、線維を全く形成しないか、形成しても極微量の短線維であったことから、C 末配列は重合反応初期に必須であると示唆された。また、N 末配列についても、F 型由来、あるいは C 型由来であっても逆配列の時には、微量短線維の形成であったことから、N 末配列は線維形成量を決定する重要な配列であると考えられた。

広範囲の pH 条件下による重合反応により、A 型、B 型、C 型 apoA-II に共通の【16 番目の Gln】が重合反応を進行させる最重要アミノ酸であることを明らかにした。また、B 型と C 型 apoA-II では異なる【5 番目の Gln】は pH 3.8 付近の反応に重要な役割を持つ可能性を示し、B 型、C 型それぞれの apoA-II を持つマウスのアミロイドーシス発症頻度の相違を解明する「てがかり」になると考えられた。

F 型 apoA-II を有するマウスのアミロイドーシス発症に関しては、F 型 apoA-II の 16 番目が Gln ではないこと、48-65 番目にも C 型 apoA-II とは異なるアミノ酸置換があることから難線維形成性であり、その結果、アミロイドーシス抵抗性を示すと考えられた。(F 型 apoA-II マウスの老化アミロイドーシス研究：本学会分担報告書 分担研究者；樋口京一、共同研究者；張 倍茹 参照)。

E. 結論

マウス apoA-II の 16 番目のアミノ酸が線維形成に最重要アミノ酸であること、次いで 5 番目のアミノ酸が反応に寄与する可能性を示した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ge F, Yao J, Fu X, Guo Z, Yan J, Zhang B, Zhang H, Tomozawa H, Miyazaki J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Amyloidosis in transgenic mice expressing murine amyloidogenic apolipoprotein A-II (Apoa2C). *Lab Invest* 87: 633-643, 2007.
- 2) Yan J, Fu X, Ge F, Zhang B, Yao J, Zhang H, Qian J, Tomozawa H, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils (AApoAII) and protein A amyloid fibrils (AA). *Am J Pathol* 171: 172-180, 2007.
- 3) Fu X, Korenaga T, Yan J, Ge F, Zhan B, Qian J, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloidosis: possible horizontal transmission in the mouse room. in XI th International Symposium on Amyloidosis. (Skinner M, Berk JL, Connors LH, Seldin DC eds) pp10-12. *CRC Press Boca Raton, FL USA*, 2007.
- 4) Higuchi K, Ge F, Fu X, Yao J, Zhan B, Zhan H, Qian J, Sawashita J, Mori M: Amyloidosis in the transgenic mice of mouse amyloidogenic apolipoprotein A-II (Apoa2C). in XI th International Symposium on Amyloidosis. (Skinner M, Berk JL, Connors LH, Seldin DC eds) pp143-145. *CRC Press Boca Raton, FL USA*, 2007.
- 5) Zhang B, Une Y, Ge F, Fu X, Qian J, Zhang P, Sawashita J, Higuchi K, Mori M. Characterization of the cheetah serum amyloid A1 (SAA1) gene: critical role and functional polymorphism of a cis-acting element. *J Heredity* 2008, *in press*.
- 6) Higuchi K, Fu X, Korenaga T, Sawashita J, Mori M. Genetics and transmission of mouse systemic amyloidosis. in *Biophysical Inquiry into Protein Aggregation and Amyloid Diseases*. (P.L. San Biagio and D. Bulone eds) *Research SignPost Kerala, India*. 2008, *in press*.
- 7) 樋口京一、池田修一：全身性アミロイドーシスの伝播。『プリオン病と遅発性ウイルス感染症』（水沢英洋編）金原出版（東京）2008年（印刷中）。
- 8) 樋口京一：アミロイドモデル動物実験ガイド。

『老化・老年病研究のための動物実験ガイド』（日本基礎老化学会編）アドスリー（東京）2008年（印刷中）。

2. 学会発表

- 1) 樋口京一：アミロイドーシス発症要因としての伝播。厚生労働省科学研究費補助金・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、アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 夏のワークショップ 2007 平成19年8月30日、宇部市。
- 2) Higuchi K: Reduced Coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in senescence accelerated SAMP1 mice. (Topics Invited speaker) 5th Conference of International Coenzyme Q10 Association. Nov. 09-12, 2007, Kobe, Japan.
- 3) 樋口京一、張倍茹、付笑影、巖景民、葛鳳霞、澤下仁子、森政之、亀谷富由樹、宇根有美：チーターのAAアミロイドーシス。第51回日本実験動物学会総会 平成19年5月23日、東京。
- 4) 銭金澤、巖景民、張倍茹、葛鳳霞、澤下仁子、友沢寛、内木宏延、森政之、付笑影、樋口京一：マウス老化アミロイドーシスでの骨格筋へのアミロイド沈着。第22回老化促進モデルマウス研究協議会 平成19年7月26日、酒田市。
- 5) 張倍茹、付笑影、張鵬堯、銭金澤、友沢寛、森政之、樋口京一：Apolipoprotein A-IIの多型とマウス老化アミロイドーシス：Apoa2^f congenicマウスを用いた解析。第22回老化促進モデルマウス研究協議会 平成19年7月26日、酒田市。
- 6) 銭金澤、巖景民、張倍茹、葛鳳霞、澤下仁子、友沢寛、内木宏延、森政之、付笑影、樋口京一：マウス老化アミロイドーシスでの骨格筋へのアミロイド沈着。第2回臨床ストレス応答学会大会 平成19年11月30日、福岡市。
- 7) 川上佳紀、竹本恵子、久本雅嗣、奥田徹、樋口京一、前田秀一郎：ブドウ種子由来ポリフェノールのアミロイドーシス発症抑制効果の解析。第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会合同大会 平成19年12月11日、横浜市。

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

ApoA-II	1	5	6	9	16	20	26	38																																						
A型	Q	A	D	G	P	D	M	Q	S	L	F	T	Q	Y	F	Q	S	M	T	D	Y	G	K	D	L	M	E	K	A	K	T	S	E	I	Q	S	Q	A	K							
B型					P			S									Q				E																		V							
C型					Q			S									Q				E																					A				
D型					P			S									Q				E							M														A				
E型					Q			N									Q				E																						A			
F型					Q			N									H				E																					A				
			48						65						78																															
A~C・D型	Y	F	Q	K	T	H	E	Q	L	T	P	L	V	R	S	A	G	T	S	L	V	N	F	F	S	S	L	M	N	L	E	E	K	P	A	P	A	A	A							
E・F型																																														

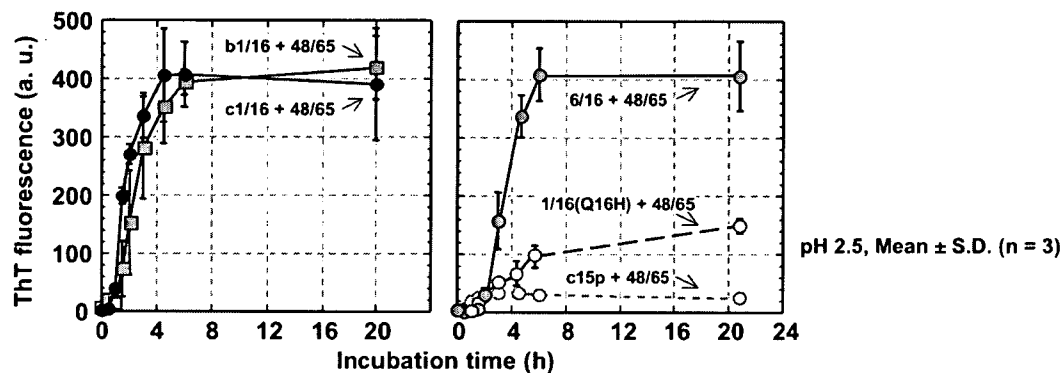


図1 アミロイド線維の形成には5番目のアミノ酸は必須ではなく、6-16番目と48-65番目が重要で、特に16番目が最重要アミノ酸であると考えられた

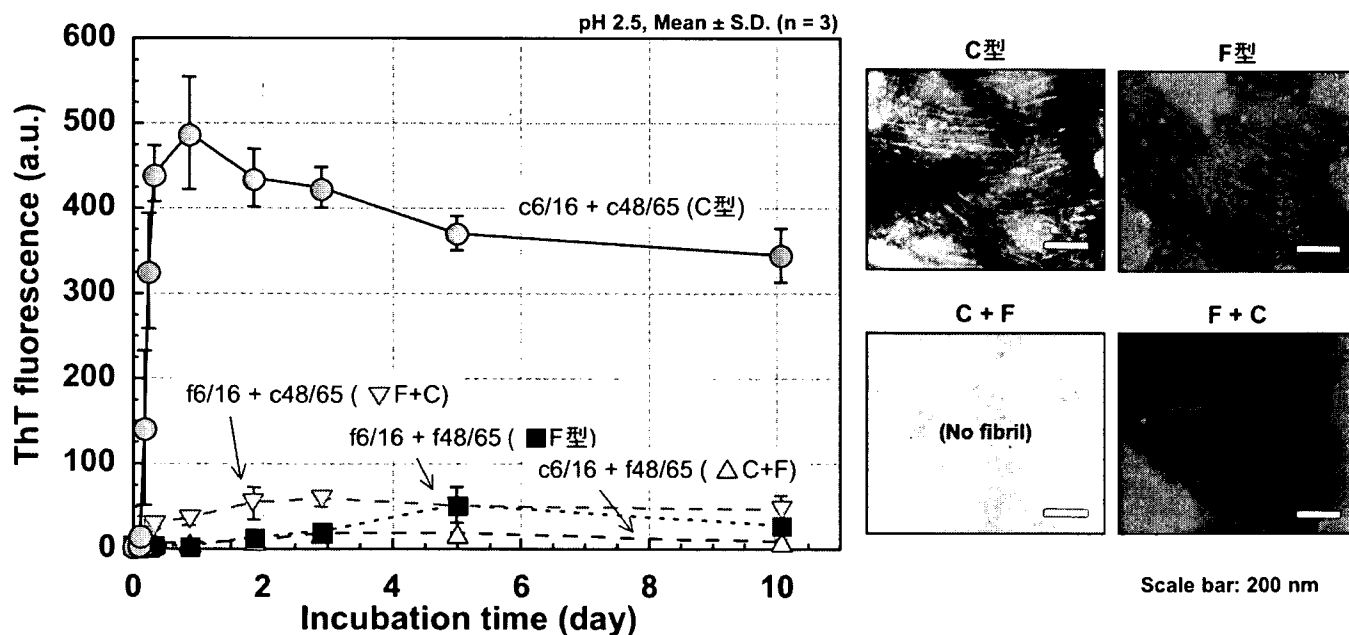


図2 F型ペプチドのアミロイド線維形成は極微量であり、C末配列がC型であることが重合反応初期には重要と考えられた

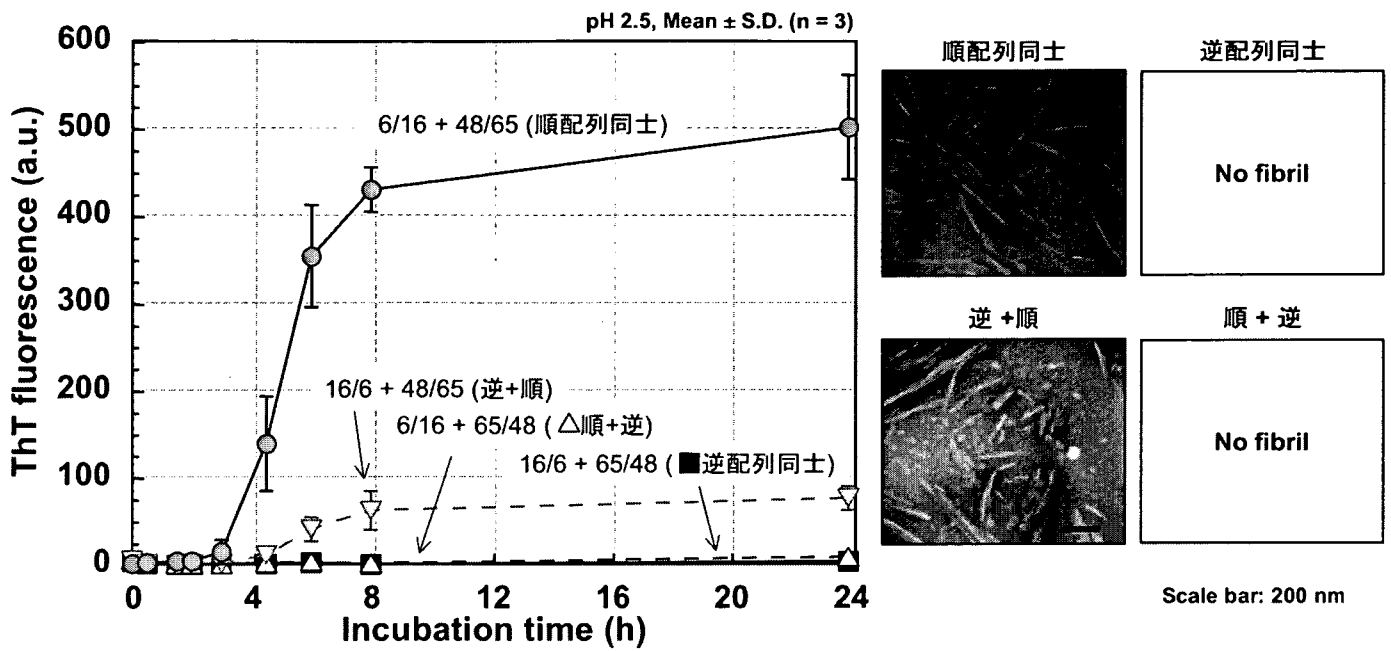


図3 アミロイド線維の形成初期には順配列のC末配列が必須であり、N末配列は線維形成量を決定する可能性が示唆された

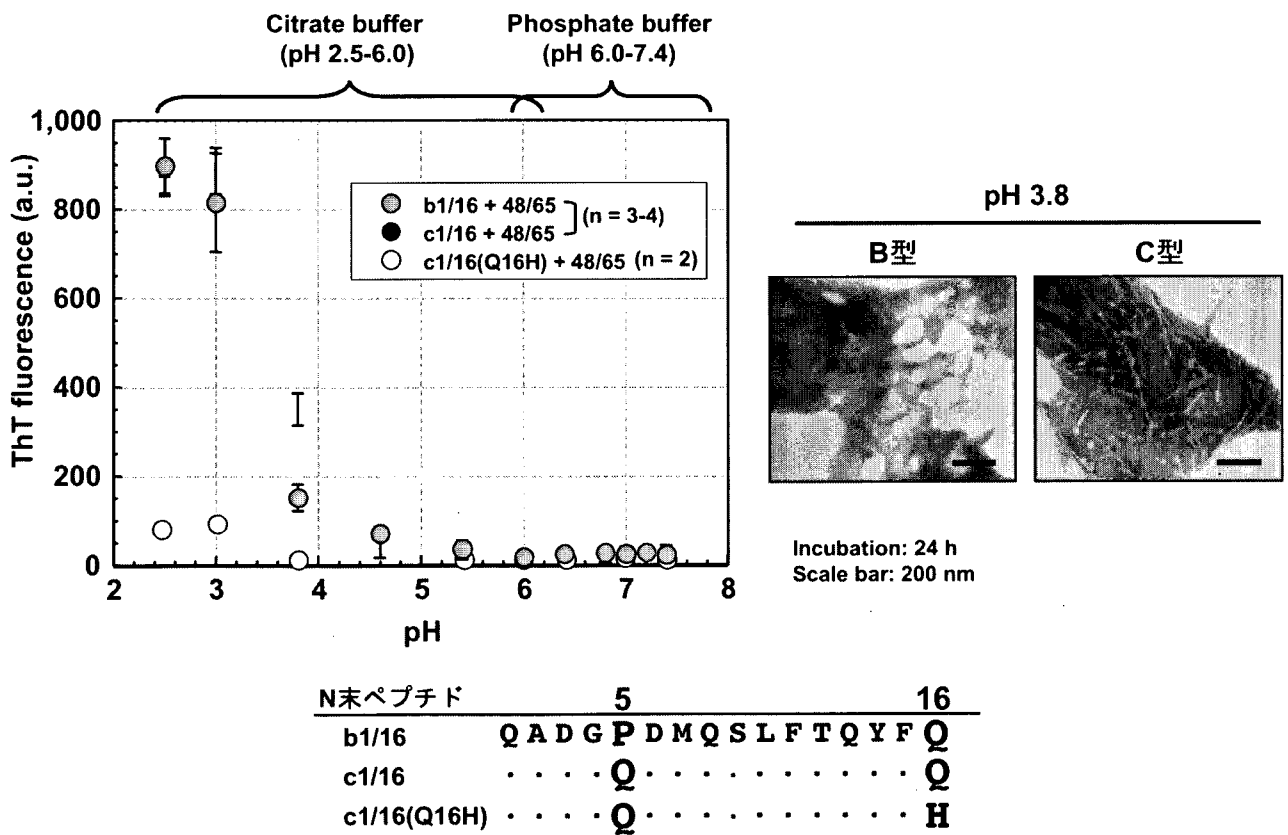


図4 線維形成には16番目のアミノ酸が最重要アミノ酸で、次いで5番目が重要と考えられた

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

Apolipoprotein A-II の多型とマウス老化アミロイドーシス： *Apoa2^f* congenic マウスを用いた解析

分担研究者 樋口京一 信州大学医学系研究科加齢生物学分野

共同研究者 張 倍茹*、付 笑影*、張 鵬堯*、錢 金澤*、友澤 寛**、森 政之*

* 信州大学医学系研究科加齢生物学分野、

** 信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験部門

研究要旨 マウス老化アミロイドーシスでは、HDL のアポタンパク質である apoA-II がアミロイド線維 (AApoAII) を形成し、全身に沈着する。これまでに、7種類の apoA-II variants が発見されているが、アミロイドーシスの発症程度は variants 間で非常に異なっている。そのメカニズムは不明であるが、apoA-II の 5 番目アミノ酸が重要であると推測されてきた。本研究では、アミロイド線維を形成しやすい C 型 apoA-II と同様の 5 番目アミノ酸としてグルタミンである F 型 apoA-II (*Apoa2^f*) を持つマウスのアミロイドーシス発症と HDL 代謝特性を解析し、マウス老化アミロイドーシスの発症の分子的メカニズムを検討した。*Apoa2^f* をホモに持つマウス (*Apoa2^{ff}*) では、アミロイド線維投与によるアミロイドーシス誘発 9 ヶ月後であってもアミロイドの沈着は観察されなかった。また、アミロイドーシス抵抗性の B 型 apoA-II マウスに関する研究で報告されていた HDL 濃度と粒子サイズの増加は、F 型 apoA-II マウスでは認められなかった。以上の結果より、5 番目アミノ酸がグルタミンであることや、HDL 濃度や粒子サイズがマウス老化アミロイドーシスの発症に関与するとされてきた従来の仮説には再検討が必要である。本研究の解析対象であるマウス老化アミロイドーシスは、アミロイドタンパク質の 1 次構造とアミロイドーシス発症の関連性を解析し、発症メカニズム解明に優れたシステムである。

A. 研究目的

マウス老化アミロイドーシスは、HDL のアポタンパク質である apoA-II がアミロイド線維 (AApoAII) を形成して細胞外に沈着する病態である。舌や小腸の粘膜下から沈着が始まり、加齢と共に脳を除く全身臓器に沈着が拡大する。AApoAII は系統にかかわらず高齢マウスで広く沈着が観察されるが、系統間には沈着開始時期と沈着程度に非常に大きな差が存在することが明らかにされている。これまでに、我々は 7 種類の apoA-II の多型を報告し、この中で C 型 apoA-II (*Apoa2^c*) は重度なアミロイドーシスを引き起こすが、B 型 apoA-II (*Apoa2^b*) はアミロイド線維の沈着に抵抗性を示すことを明らかにしてきた。1 次構造の比較から、5 番目アミノ酸 (C 型はグルタミン、B 型はプロリン) が重要であると推測さ

れてきた。本研究では、C 型 apoA-II と同様に、5 番目アミノ酸としてグルタミンを持つ *Mus spretus* (マウスの亜種) の F 型 apoA-II (*Apoa2^f*) を C57BL/6 マウス (*Apoa2^a*) や SAMR1C (*Apoa2^c*) に導入したコンジェニックマウスを作製し、アミロイド線維によるアミロイドーシス発症誘発を試みた。また血中 HDL の粒子サイズやコレステロール濃度を解析し、マウス老化アミロイドーシス発症の分子的メカニズムを検討した。

B. 研究方法

1、**実験動物** : 1) B6.SPRET-*Apoa2^f* コンジェニックマウスの作製 : マウスの亜種である *Mus spretus* (*Apoa2^f*) を C57BL/6 (*Apoa2^a*) マウスとの 6 世代戻し交配を行い、*Mus spretus* (SPRET) マウス由来の *Apoa2^f* 遺伝子を C57BL/6 (B6) マ

ウスの遺伝的背景に導入した B6.SPRET-*Apoa2^f* コンジェニックマウスを作製した。*Apoa2* 遺伝子に関して、*Apoa2^{fff}* ホモ、*Apoa2^{a/a}* ホモ、*Apoa2^{a/f}* ヘテロの 3 種類のマウスを実験で使用した。2) R1.SPRET-*Apoa2^f* コンジェニックマウスの作製：1)と同様の方法で、SAMR1C (*Apoa2^c*) と SPRET マウスから R1.SPRET-*Apoa2^f* コンジェニックマウスを作製し、*Apoa2^{fff}* ホモ、*Apoa2^{c/c}* ホモ、*Apoa2^{c/f}* ヘテロの 3 種類のマウスを実験に使用した。

2、アミロイドーシスの誘発及び検出：AApoAII 投与によりアミロイドーシスを発症した SAMR1C コンジェニックマウスの肝臓より、AApoAII アミロイド線維 (AApoAIIc) を分取し、100 µg を 2 ヶ月齢の B6.SPRET-*Apoa2^f* と R1.SPRET-*Apoa2^f* コンジェニックマウス各 3 種の尾静脈に投与した。3、6、9 ヶ月後にマウスを屠殺し、組織切片の Congo red 染色像からアミロイド沈着程度 (Amyloid Index) を評価した。(R1.SPRET-*Apoa2^f* コンジェニックマウスは、投与 2 ヶ月後に屠殺し、アミロイド沈着程度を評価した。)

3、血漿総コレステロールと HDL-コレステロール濃度の測定：over night の絶食後、血漿を採取し、測定キットのプロトコールに基づいて血漿総、HDL コレステロール濃度を測定した。

4、HDL 粒子サイズの測定：over night の絶食後に採取した血漿 3 µL を Sudan Black B で染色し、5-15%グラディエントゲルを用いた Native PAGE で粒子サイズを測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いた研究である。実験に供したマウスの飼育状態が良好な環境になるように、また屠殺に際しては苦痛が最小限になるように配慮した。実験計画書を信州大学動物実験委員会に提出し、学長の承認を得て、信州大学動物実験等に関する規定に沿って行った。

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

B6.SPRET-*Apoa2^f* コンジェニックマウスに AApoAIIc アミロイド線維を投与し、アミロイドーシス発症を試みた。*Apoa2^{a/a}* ホモマウスでは、投与後 3 ヶ月でアミロイド沈着が観察され、投与後期間が長くなるに従って、沈着程度が増大した (図 1)。また、各月齢において、*Apoa2^{a/f}* ヘテロマウスでは *Apoa2^{a/a}* ホモマウスよりは軽度であるがアミロイドの沈着が誘発された。しかし、*Apoa2^{fff}* ホモマウスでは、アミロイド線維投与 9 ヶ月後までアミロイドの沈着は全く観察されなかった。一方、R1.SPRET-*Apoa2^f* コンジェニックマウスでも同様に、アミロイド線維投与 2 ヶ月後、*Apoa2^{c/c}* ホモマウスでは重度のアミロイド沈着、*Apoa2^{c/f}* ヘテロマウスでは軽度の沈着が誘発されたが、*Apoa2^{fff}* ホモマウスではアミロイド沈着は観察されなかった。

B6.SPRET-*Apoa2^f* コンジェニックマウスでは、apoA-II の対立遺伝子 (*Apoa2^{a/a}*、*Apoa2^{a/f}*、*Apoa2^{fff}*) によって血漿総コレステロールと HDL コレステロール濃度には有意差が認められなかった (図 2A)。また、3 種類の apoA-II を持つマウス間には、HDL 粒子サイズに有意差は認められなかった (図 2B)。B 型 apoA-II を持つマウス (SAMR1) と比較すると、コレステロール濃度、粒子サイズとも有意に低いことが明らかになった。

D. 考察

これまでに apoA-II の型 (variants) によって、アミロイドーシスの発症に大きな差が生じるメカニズムは不明であった。プロリン残基がβ-シートの形成を抑制するのに対し、グルタミン残基はβ-シート構造を安定化することが知られているため、apoA-II の 5 番目アミノ酸が *Apoa2^c* ではグルタミン、*Apoa2^b* ではプロリンである事がアミロイドーシスの発症程度の相違の原因であると推測されてきた (図 3)。しかし、*Apoa2^f* のコンジェニックマウスを用いた本研究の結果により、5 番目アミノ酸がグルタミンである F 型 apoA-II

は、マウスの遺伝的背景 (C57BL/6J と SAMR1 C) にかかわらずアミロイドーシスの発症に抵抗することが証明され、5 番目アミノ酸がグルタミンであることはアミロイドーシスの発症には一義的原因ではないことが示唆された。F 型と C 型 apoA-II 間には、5 番目アミノ酸以外に 4 カ所でアミノ酸置換が存在し(図 3)、発症への抵抗性のメカニズム解明には、今後の検討が必要である。

B 型 apoA-II を持つマウスでは、apoA-II が HDL とより安定した構造を形成する為、HDL 粒子サイズやコレステロール濃度の増加を招き、apoA-II が HDL から遊離してアミロイド線維を形成し難くなることがアミロイドーシスへの抵抗性を示す原因であると推測されていた。しかし、*Apoa2^{ff}* ホモマウスでは、アミロイドーシスに抵抗性を示すにもかかわらず、HDL 粒子サイズもコレステロール濃度も増加しなかった。F 型 apoA-II のアミロイドーシス発症への抵抗性のメカニズムは、HDL 粒子中での安定性ではなく、アミロイド線維形成への分子的障害が関与する可能性が示唆された(アミロイドーシスに関する調査研究班・平成 19 年度分担報告書、分担研究者；樋口京一、共同研究者；澤下仁子 参照)。

本研究により作製した F 型 apoA-II を持つコンジェニックマウスは、マウス老化アミロイドーシスのみならず、他種のアミロイドーシスの発症メカニズムを解析するための有用なモデルマウスであると考えられる。例えば、プリオン病、ATTR アミロイドーシスやアルツハイマー病などでは、原因タンパク質の変異が重要であることが証明されているが、そのメカニズムは不明である。従って、apoA-II の多型を用いた本研究システムは、これらアミロイドーシスの発症機構を解明し、治療・予防法の開発にも有用なモデルであると考えられる。

E. 結論

F 型 apoA-II を持つマウスはアミロイドーシス抵抗性を示すことを明らかにし、5 番目アミノ酸がグルタミンであることがマウス老化アミロイドーシスの発症に重要であるとする従来の仮説には再検討が必要と考えられた。また、アミロイドーシス抵抗性の B 型 apoA-II で報告された

HDL 粒子サイズの増加は F 型 apoA-II マウスには認められず、発症抵抗性のメカニズムとしては HDL 濃度や粒子サイズで表される HDL 中での apoA-II の安定性ではなく、F 型 apoA-II のアミロイド線維形成への分子的障害を検討する必要があることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ge F, Yao J, Fu X, Guo Z, Yan J, Zhang B, Zhang H, Tomozawa H, Miyazaki J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Amyloidosis in transgenic mice expressing murine amyloidogenic apolipoprotein A-II (Apoa2C). *Lab Invest* 87: 633-643, 2007.
- 2) Yan J, Fu X, Ge F, Zhang B, Yao J, Zhang H, Qian J, Tomozawa H, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils (AApoAII) and protein A amyloid fibrils (AA). *Am J Pathol* 171: 172-180, 2007.
- 3) Fu X, Korenaga T, Yan J, Ge F, Zhan B, Qian J, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloidosis: possible horizontal transmission in the mouse room. in XI th International Symposium on Amyloidosis. (Skinner M, Berk JL, Connors LH, Seldin DC eds) pp10-12. *CRC Press Boca Raton, FL USA*, 2007.
- 4) Higuchi K, Ge F, Fu X, Yao J, Zhan B, Zhan H, Qian J, Sawashita J, Mori M: Amyloidosis in the transgenic mice of mouse amyloidogenic apolipoprotein A-II (Apoa2C). in XI th International Symposium on Amyloidosis. (Skinner M, Berk JL, Connors LH, Seldin DC eds) pp143-145. *CRC Press Boca Raton, FL USA*, 2007.
- 5) Zhang B, Une Y, Ge F, Fu X, Qian J, Zhang P, Sawashita J, Higuchi K, Mori M: Characterization of the cheetah serum amyloid A1 (SAA1) gene: critical role and functional polymorphism of a cis-acting element. *J Heredity* 2008, *in press*.
- 6) Higuchi K, Fu X, Korenaga T, Sawashita J, Mori

M: Genetics and transmission of mouse systemic amyloidosis. in *Biophysical Inquiry into Protein Aggregation and Amyloid Diseases*. (P.L. San Biagio and D. Bulone eds) *Research SignPost Kerala, India* 2008, *in press*.

7) 樋口京一、池田修一：全身性アミロイドーシスの伝播。『プリオン病と遅発性ウイルス感染症』（水沢英洋編）金原出版（東京）2008年（印刷中）

8) 樋口京一：アミロイドモデル動物実験ガイド。『老化・老年病研究のための動物実験ガイド』（日本基礎老化学会編）アドスリー（東京）2008年（印刷中）

2. 学会発表

1) 樋口京一：アミロイドーシス発症要因としての伝播。厚生労働省科学研究費補助金・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、アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 夏のワークショップ 2007 平成19年8月30日、宇部市。

2) Higuchi K: Reduced Coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in senescence accelerated SAMP1 mice. (Topics Invited speaker) 5th Conference of International Coenzyme Q10 Association. Nov. 09-12, 2007, Kobe, Japan.

3) 樋口京一、張 倍茹、付 笑影、巖 景民、葛 鳳霞、澤下仁子、森 政之、亀谷富由樹、宇根有美：チーターのAAアミロイドーシス。第51回日本実験動物学会総会 平成19年5月23日、東京。

4) 錢 金澤、巖 景民、張 倍茹、葛 鳳霞、澤下仁子、友沢 寛、内木宏延、森 政之、付 笑影、樋口京一：マウス老化アミロイドーシスでの骨格筋へのアミロイド沈着。第22回老化促進モデルマウス研究協議会 平成19年7月26日、酒田市。

5) 張 倍茹、付 笑影、張 鵬堯、錢 金澤、友沢 寛、森 政之、樋口京一：Apolipoprotein A-IIの多型とマウス老化アミロイドーシス：Apoa2 congenicマウスを用いた解析。第22回老化促進モデルマウス研究協議会 平成19年7月26日、酒田市。

6) 錢 金澤、巖 景民、張 倍茹、葛 鳳霞、澤下仁子、友沢 寛、内木宏延、森 政之、付 笑影、樋口京一：マウス老化アミロイドーシスでの骨格筋へのアミロイド沈着。第2回臨床ストレス応答学会大会 平成19年11月30日、福岡市。

7) 川上佳紀、竹本恵子、久本雅嗣、奥田 徹、樋口京一、前田秀一郎：ブドウ種子由来ポリフェノールのアミロイドーシス発症抑制効果の解析。第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会合同大会 平成19年12月11日、横浜市。

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

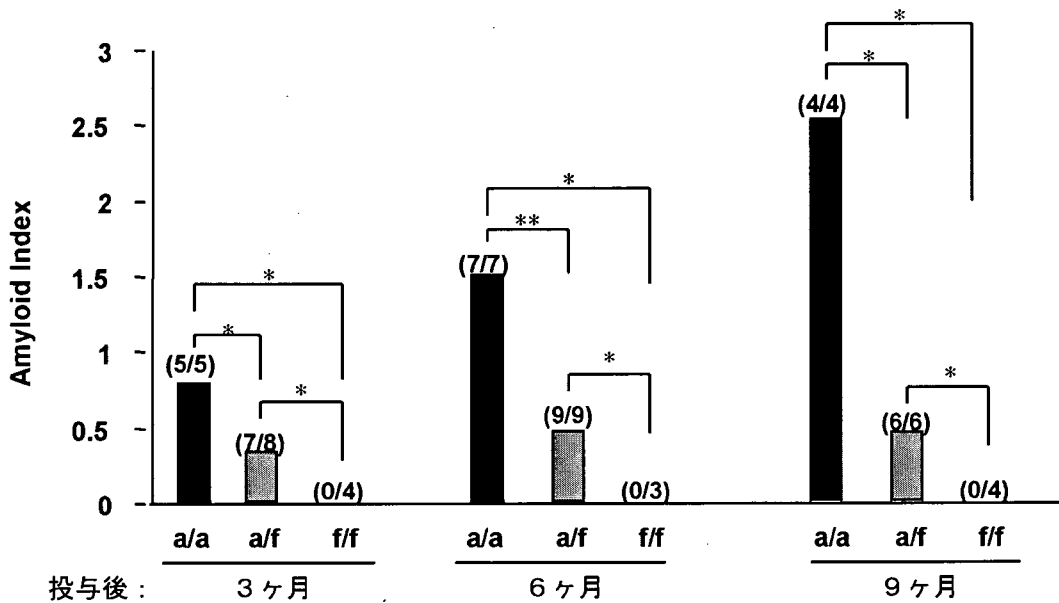


図1 AApoAIIcアミロイド線維を3種の2ヶ月齢B6.SPRET-Apoa2^fコンジェニックマウスの尾静脈に投与し、3、6、9ヶ月後のAmyloid Indexを調べた。アミロイド線維投与によって、Apoa2^{a/a}ホモマウスでは、投与後の期間が長くなるに従って沈着程度は増加したが、Apoa2^{a/f}ヘテロマウスでは沈着は軽度であり、Apoa2^{f/f}ホモマウスでは、9ヶ月後でもアミロイド沈着は全く観察されなかった。

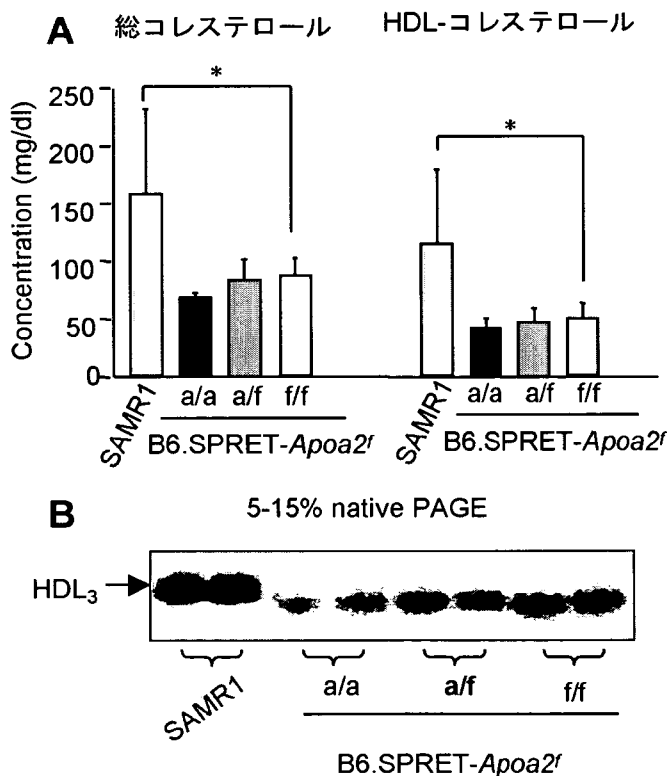


図2 A. B6.SPRET-Apoa2^fコンジェニックマウスでは、apoA-IIの型 (Apoa2^{a/a}、Apoa2^{a/f}、Apoa2^{f/f}) によって、血漿総及びHDLコレステロール濃度には有意差がなく、SAMR1 (Apoa2^{b/b}) マウスより低値であった。B. HDL粒子サイズにも差は認められず、SAMR1マウスより小さかった。

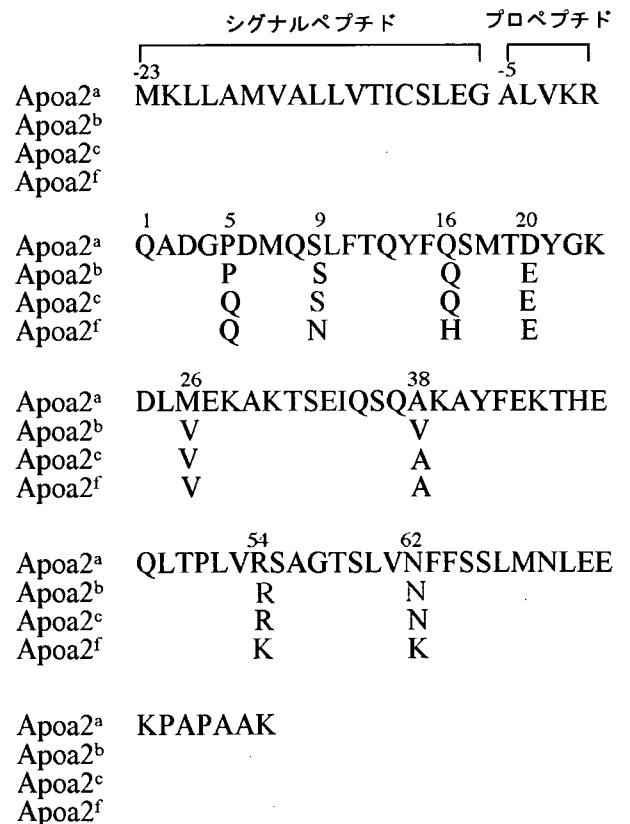


図3 マウスapoA-IIのアミノ酸配列

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

アミロイドーシスモデルマウスを用いたブドウ種子由来ポリフェノールの アミロイドーシス発症抑制効果の解析

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 川上佳紀*、竹本恵子*、久本雅嗣**、奥田徹**、
 付笑影***、張鵬堯***、樋口京一***

*山梨大学大学院医学工学総合研究部生化学、

**山梨大学ワイン科学研究センター、

***信州大学大学院医学系研究科加齢生物学

研究要旨 抗酸化作用をもつブドウポリフェノールが *in vitro* でアミロイド線維形成を阻害する事が見出され、また、酸化ストレスはアミロイド沈着を促進すると考えられている。そこで本研究では、ブドウ種子由来のポリフェノール (GSE) のアルツハイマー病 (AD) や老化アミロイドーシスの発症抑制効果を、これらの疾患モデルマウスを用いて検証した。このため、GSE 40 mg/kg-体重を、AD のモデルマウス (Tg2576) や老化アミロイドーシスのモデルマウス (R1. P1-*Apoa2*^o) に投与した。GSE を 6 ヶ月間投与した 14 カ月齢の Tg2576 の脳内アミロイド沈着程度は未だ低く、対照非投与群と有意な差異を認めなかった。そこで現在、より高齢となったマウスに GSE 投与を継続している。また、R1. P1-*Apoa2*^o では、GSE 5 ヶ月間投与により、酸化、小胞体ストレス抑制効果を認め、一方、ダイオキシン (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TCDD) 投与により、酸化、小胞体ストレスが惹起されたが、両投与群ともに対照非投与マウス群に比べ、アミロイド沈着程度に有意な差異を認めなかった。

A. 研究目的

高齢化社会を迎え、人々の老化、及び老化によって引き起こされる疾患に対する関心が高まっている。老化に伴って引き起こされる疾患の 1 種にアミロイドーシスがある。80 歳以上の高齢者の 1/4 例には、血清蛋白質、トランスサイレチン (TTR) が、全身種々の臓器にアミロイドを形成して沈着し、老化アミロイドーシスと呼ばれている。さらにアルツハイマー病 (AD) も脳内アミロイド β タンパク ($A\beta$) 沈着を特徴とし、これらアミロイドは高齢者における種々の臓器の機能障害の原因となっている。今後高齢化社会に於いて、アミロイドーシス患者数は益々増加すると予想されるが、未だその発症機構の詳細は不明で、安全で確実な治療法は無い。一方、近年、ブドウ由来のポリフェノールの医学的効能が強い関心を集めている。ブドウ由来のポリフェノールが酸化ストレスを抑制すること (抗酸化作用) は広く知られ

ているが、その他にも、ワイン・ブドウ由来のミリセチン、ケルセチン、カテキンやクルクミン、リスベラトロール、タンニン酸などの多くのポリフェノールが、AD の原因物質である $A\beta$ の凝集・線維化を抑制する事、線維化した $A\beta$ 構造の不安定化、及び構造的伸長の抑制などといったアミロイド形成抑制作用を持つ事が報告されている。さらに、ワインにはブドウ由来のポリフェノールが豊富に含まれているが、ワインを適度に摂取する人では AD 発症率が低下するという疫学的な報告や、AD モデルマウスへの適度な赤ワイン投与により、学習能力の改善、及び $A\beta$ 産生量が減少するという報告がある。また、ポリフェノール (リスベラトロール) が健康状態の改善や寿命の延長に効果があるという報告もある。

しかし、これらの実験は、既に単離されていて容易に手に入る純品のポリフェノールを用いて行われている。一方、ブドウ中には、数百～数千