

6, 7, 8, 9の各種バッファーで血清を50倍希釈、髄液を10倍希釈し、SELDI-TOF MSで分析を行った。また、プロテインチップ上でDTTを用い還元処理を行うことで、システイン残基を介したTTRの修飾を解除した。遺伝子検査で同定されたアミノ酸変異から推測される質量変化とSELDI-TOF MSで得られた解析上の質量変化が一致するか、各種変異型(ATTR C10R, V30M, F33V, G47V, S50I, V30M/R104H, Y114C)のFAP患者血清を用いて検討した。

また、健康人とFAP ATTR V30Mホモ患者血清から分離・精製したWT TTRとATTR V30Mを様々な割合で混ぜSELDI-TOF MSで解析した、得られたピーク比からWTとATTRの存在比が算出可能であるか検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は血清蛋白質の解析であるが、変異体蛋白質を検出することにより遺伝情報を推測できるため、遺伝子検査と同様のインフォームドコンセントを得て解析を行った。

C. 研究結果

Q10とCM10を用いpH 3~9の各種バッファーでFAP ATTR V30M患者血清を50倍希釈しSELDI-TOF MSで測定したところ、pH7のバッファーで希釈しQ10を用いて解析した場合が最もコントラスト良く正常と異型TTRを分離して検出できた。本方法では、抗TTR抗体を用いた免疫沈降物の作成を行う必要なく、1ステップ約3時間で簡便に異型TTRを解析できることが判明した。またチップ上でDTTを用い還元処理(約3分)を行うことで、システイン残基を介したTTRの修飾型は消失し、より明瞭な正常と異型TTRのピークが検出された(図2)。

各種変異型(ATTR C10R, V30M, F33V, G47V, S50I, V30M/R104H, Y114C)のFAP患者血清を用いて上記の条件で解析し、異型TTRの質量変化が遺伝子検査で同定されたアミノ酸変異とほぼ一致することが確認できた。しかし、FAP ATTR Y114C患者血清からは、異型TTRは検出されなかった。従来のTTR免疫沈降物を用いたMALDI-TOF MS解析でも同様にFAP ATTR Y114C患者血清からは、異型TTRは検出されなかった。FAP ATTR Y114C患者

血清をpH 3~9の各種バッファーで50倍希釈し、Q10とCM10を用いSELDI-TOF MSで測定したところ、pH3のバッファーで希釈しCM10を用いて解析した場合に小さなATTR Y114C由来のピークが検出できた。解析条件による検出の違いを検討するため、WT TTR, ATTR V30M, ATTR Y114Cの3種のリコンビナント蛋白質を用いて、等電点電気泳動をおこなったところ、WT TTRとATTR V30Mは等電点が4.61とほぼ同じであったのに対し、ATTR Y114Cは等電点が5.69と1以上高いことが判明した。また、同時期に採取した血清と髄液を用いて解析し、ATTR Y114CとWT TTRのピーク比を算出したところ、血清と比較して髄液でより高いATTR Y114Cのピークが得られた。

WT TTRとATTR V30Mを様々な割合で混ぜSELDI-TOF MSで解析したところ、得られたピーク比とWTとATTRの存在比の間に良好な検量線が算出可能であった。

D. 考察

ATTR V30Mは50 mMリン酸バッファー(pH 7)で50倍希釈しQ10(陰イオン交換体コーティングチップ)を用いて、解析することで異型TTRの検出を明確に行うことが出来た。従来用いていたTTR免疫沈降物を使用したMALDI-TOF MS解析と比較してほぼ同等の結果と考えられる。免疫沈降物の作成と精製のステップを省略することが出来たため、データ取得まで1ステップ3時間と迅速に行うことが可能となった。また同時に免疫沈降物の作成と精製の技術も不要であるため、より簡便な手法といえる。

本条件で、各種変異型(ATTR C10R, V30M, F33V, G47V, S50I, V30M/R104H)のFAP患者血清から異型TTRが検出できることと、質量変化がアミノ酸変化の理論値とほぼ一致することが確認でき、以前の方法とほぼ同精度の解析が可能であった。

Q10, pH7の条件や免疫沈降物を用いたMALDI-TOF MSで検出できなかったATTR Y114Cもバッファーとプロテインチップを変えること(CM10, pH 3)で検出が出来た。ATTR Y114CはWT TTRと比較して等電点が1以上高いことが等電点電気泳動で明らかになった。pH 3

のバッファー内では WT TTR に比べて ATTR Y114C がより強力にプラスにチャージし、その結果として陽イオン交換体がコーティングされている CM10 に WT TTR より強く結合することが、検出可能となった理由と考えられる。

FAP ATTR Y114C 患者の血清より髄液の方が異型 TTR 由来のピークが大きかったことから、血清に比較して髄液の方が ATTR Y114C が多く存在していると考えられる。

また、WT TTR と ATTR V30M を様々な割合で混ぜ SELDI-TOF MS で解析したところ、得られたピーク比と WT と ATTR の存在比の間に良好な検量線が算出可能であったことから、溶液中の WT TTR と ATTR V30M の存在比率解析が、本検出方法でハイスループットに行うことが可能となり、FAP 患者の治療前後などのフォローアップにも有用な検査方法になると考えられる。

E. 結論

SELDI-TOF MS を用いた血清異型蛋白質の解析は、迅速かつ簡便な異型 TTR 分析法であり、病院の検査室で実施可能な解析法であると考えられる。

従来の方法で検出できなかった ATTR Y114C がプロテインチップを用いることで迅速に検出できることが判明した。

WT TTR と ATTR V30M の比率を SELDI TOF MS で解析できることが判明した。ハイスループットな異型 TTR の存在比率解析が可能となったため、治療前後の経過観察などに有用である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ando Y, Ueda M. Novel methods for detecting amyloidogenic proteins in transthyretin related amyloidosis. *Front Biosci*, 2008 (in press).

2. 学会発表

1) 植田光晴、安東由喜雄. 遺伝子疾患の画期的診断法の確立と新たな病態解析. 第26回日本臨床化学会夏季セミナー、志摩、Jul 5-7、2007.

2) 植田光晴、孟薇、三隅洋平、齋藤史織、大林光念、堀端洋子、中熊るみ、中川邦子、永田四郎、安東由喜雄. SELDI-TOF MS を用いた異型トランスサイレチンの簡便かつ迅速な検出法. 第54回日本臨床検査医学会学術集会、大阪、Nov 22-25、2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特記事項なし。

2. 実用新案登録

特記事項なし。

3. その他

特記事項なし。

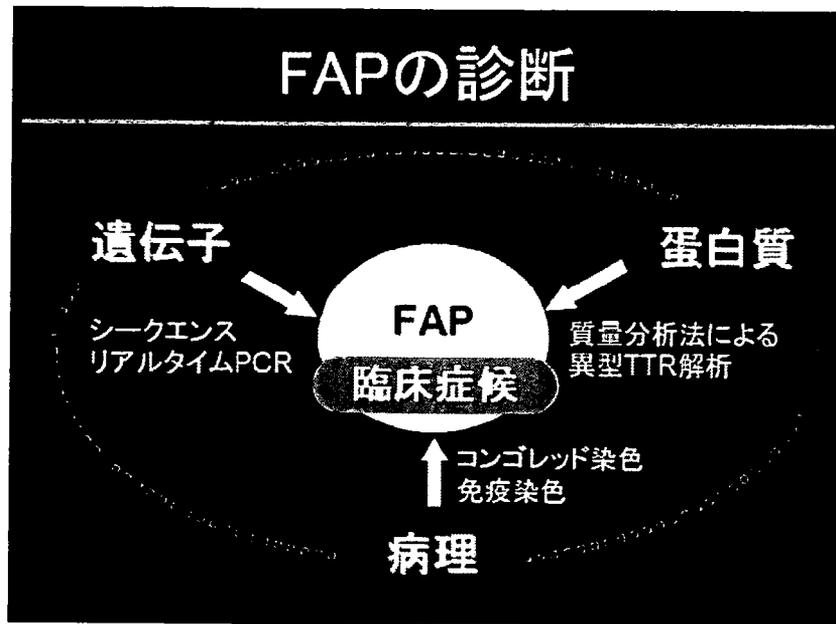


図1. FAP 診断システム

確実な FAP 診断を実現するため、遺伝子、蛋白質、病理と多面的な解析結果を総合的に判断し最終的な診断を行っている。

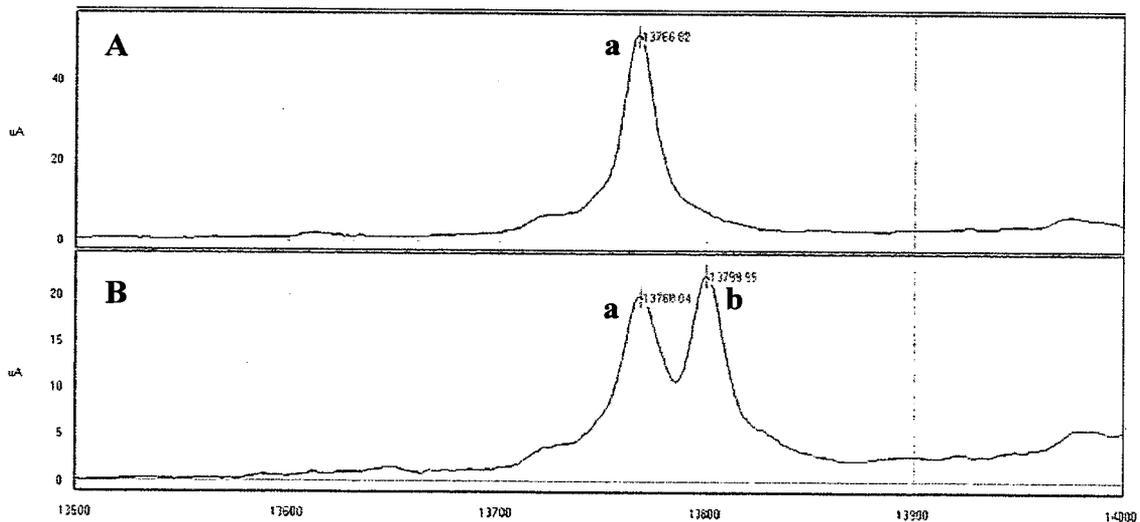


図2. SELDI-TOF MS による異型 TTR の検出

健常人の血清 (A) と FAP ATTR V30M 患者の血清 (B) 2 μ l を 50 mM リン酸バッファー (pH 7) で 50 倍希釈し、Q10 のプロテインチップで解析後、チップ上で DTT を用い還元処理を行った。健常人の血清では TTR は単一のピーク (a) として検出される (A) が、FAP ATTR V30M 患者血清では +32 Da シフトした異型 TTR 由来のピーク (b) が検出された。

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

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の病態解析と肝移植によらない新しい治療法の開発（3年間のまとめ）

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学大学院医学薬学研究部 病態情報解析学
 共同研究者 植田光晴*、中村政明*、三隅洋平**、山下太郎**、齋藤史織*、大林光念*、城野博史*
 熊本大学大学院医学薬学研究部 病態情報解析学*、神経内科**

研究要旨 1. TTR の四量体構造の安定化を図り、アミロイド形成を阻止する治療：Cr³⁺投与によるアミロイド形成抑制治療、2. アミロイドの伸張反応を抑制し、アミロイド形成を阻害する治療：新たなアミロイド結合物質 FSB を用いた治療、3. アミロイド沈着の予防、進展を抑制するため、TTR Y78F および TTR のフラグメンに対するワクチン・抗体治療、4. 異型 TTR の産生を完全にシャット・アウトする治療として single stranded oligonucleotides (SSOs)、およびヒト ATTR V30M を選択的に抑制する配列を持つ siRNA 用いた遺伝子治療、の4つの研究を行った。

A. 研究目的

FAP に対する、肝移植に代わる非侵襲的な新たな治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

1. TTR の四量体構造の安定化を図り、アミロイド形成を阻止する治療：Cr³⁺投与によるアミロイド形成抑制治療、2. アミロイドの伸張反応を抑制し、アミロイド形成を阻害する治療：新たなアミロイド結合物質 FSB を用いた治療、3. アミロイド沈着の予防、進展を抑制するため、TTR Y78F および TTR のフラグメンに対するワクチン・抗体治療、4. 異型 TTR の産生を完全にシャット・アウトする治療として single stranded oligonucleotides (SSOs)、およびヒト ATTR V30M を選択的に抑制する配列を持つ siRNA 用いた遺伝子治療、の4つの研究を行った（図1）。

（倫理面への配慮）

すべての研究は、遺伝子実験施設、医学部倫理委員会、動物実験センターの承認を得て行っている。

C. 研究結果

1. Cr³⁺投与によるアミロイド形成抑制治療研究は、in vitro による TTR および ATTR V30M を用いた実験では、dose dependent に四量体を

安定化させたが、1年に渡るトランスジェニックラット ATTR V30M に対する投与実験では優位な抑制効果は確認できなかった。

- FSB は FAP の組織沈着アミロイドのみならず、他の全身性アミロイドーシスのアミロイドも Congo red 染色よりもより鋭敏にアミロイドを描出した。また結合実験では、本色素は TTR 蛋白にはアフィニティーは示さないが、アミロイドとは強い結合性を示した。MRI で老人班を描出できることも判明した。
- 四量体を形成せず、自動的に misfolding を起こす TTR Y78F でトランスジェニックマウス ATTR V30M を免疫したところ、TTR 沈着を起こす前に免疫したマウス、すでに TTR 沈着を来たしたマウスともに有意に TTR 沈着を抑制できることが判明した。さらにアミロイドとのみ反応する TTR115-124 フラグメント抗体を作成したところ、本抗体は血清には反応せず、FAP ATTR V30M のアミロイドに特異性が高いため（図2）、トランスジェニックラット ATTR V30M の腹腔に投与したところ、TTR 沈着が抑制されることが判明した。
- 74 mer の single stranded oligonucleotides (SSOs) をアテロコラーゲンに包埋したものを HepG2 の培養系、およびトランスジェニックマウス ATTR V30M の肝臓に直接打ち込む形

で遺伝子変換率を検討したが、それぞれ27%、および8%の変換率が得られた。

また、上記以外のプロジェクトとして、移植後患者の眼アミロイドーシス抑制治療として網膜細胞の光凝固治療を行ったところ、有用性が認められた。

D. 考察

肝移植によらない4種の新規治療法を考案し、その可能性を追求した。Cr³⁺は *in vitro* では四量体の安定化作用を示し、アミロイド形成能を抑制したが、*in vivo* の実験では有意なアミロイド抑制効果は認められていない。四量体の安定化作用は認められているため、NSAIDs 誘導体との併用なども含め、治療薬としての可能性をさらに検討していきたい。

BSB/FSB は *in vitro* でのアミロイド形成抑制効果が認められているため、さらに毒性試験などを行って生きたい。またアミロイドーシスの *real time* の診断に向けて、現在 PET の開発に向けて取り組んでいる。

遺伝子治療では、アテロコラーゲン包埋 SSOs が有用性を示したため、さらにアテロコラーゲンを用い、異型 TTR 遺伝子の発現のみを抑制する siRNA や、異型 TTR 遺伝子のみを抑制する DNA エンザイムを細胞内で発現させるベクターを開発し、現在 *in vitro*、*in vivo* の系で高い異型 TTR 遺伝子の発現抑制をあげるための検討を行って生きたい。

抗体治療は、現在最も実用化の可能性の高いプロジェクトであると考えられる。さらに TTR フラグメントによる免疫、およびその抗体による有効性を確認中である。

E. 結論

FAP の肝移植によらない治療法は、抗体治療を中心に確実に成果を上げてきている。次年度のプロジェクトにおいては、考察に記載した観点に焦点を絞り、それぞれのプロジェクトの実用化に向け、研究を行う予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

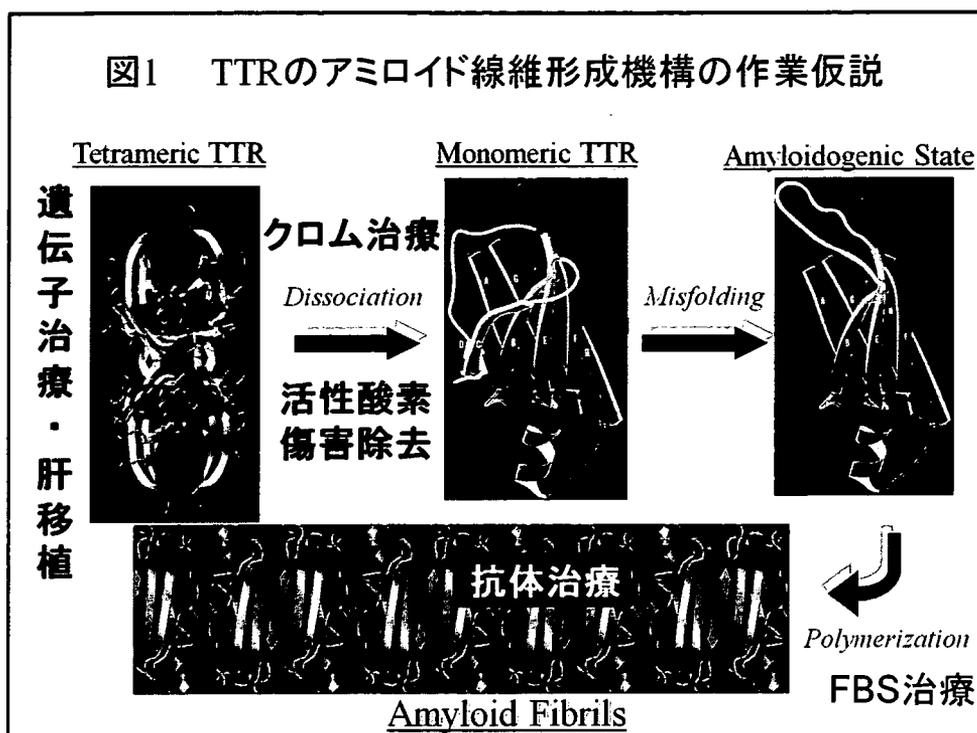
G. 研究発表

1. 論文発表

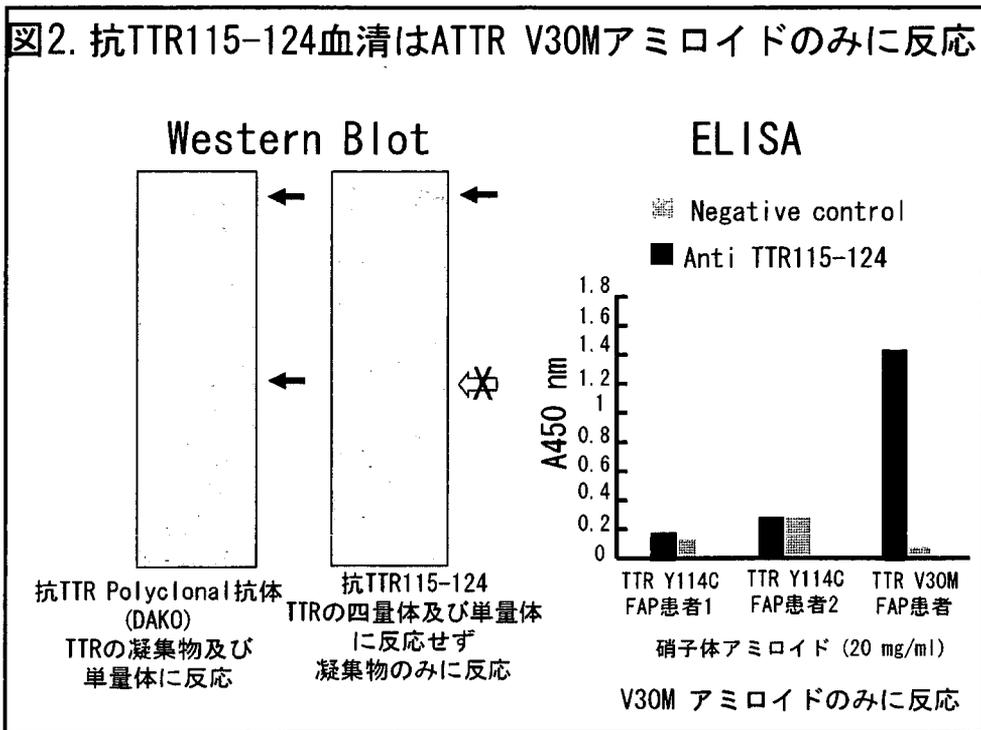
- 1) Ueda M, Ando Y, Hakamata Y, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Himeno S, Inoue S, Sato Y, Kaneko T, Takamune N, Misumi S, Shoji S, Uchino M, Kobayashi E. A novel transgenic rat with human amyloidogenic transthyretin V30M. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 299-304, 2007
- 2) Sato T, Susuki S, Suico MA, Miyata M, Ando Y, Mizuguchi M, Takeuchi M, Dobashi M, Shuto T, Kai H. ER quality control regulates the fate of transthyretin variants in the cell. *EMBO J* 26: 2501-2512, 2007
- 3) Koide-Yoshida S, Niki T, Ueda M, Himeno S, Taira T, Iguchi-Arigo SM, Ando Y, Ariga H. DJ-1 degrades transthyretin and an inactive form of DJ-1 is secreted in familial amyloidotic polyneuropathy. *Int J Mol Med* 19:885-893, 2007.
- 4) Bergström J, Patrosso MC, Colussi G, Salvatore M, Penco S, Lando G, Marocchi A, Ueda A, Nakamura M, Ando Y. A novel type of familial transthyretin amyloidosis, ATTR Asn124Ser, with co-localization of kappa light chains. *Amyloid* 14:141-145, 2007.
- 5) Inomata Y, Zeledon ME, Asonuma K, Okajima H, Takeichi T, Ishiko T, Ando Y. Whole-liver graft without the retrohepatic inferior vena cava for sequential (domino) living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 7:1629-1632, 2007.
- 6) Yamamoto S, Wilczek H. E, Nowak G, Larsson M, Oksanen A, Iwata T, Gjertsen H, Söderdahl G, Wikström L, Ando Y, Suhr OB, and Ericzon B-G. Liver Transplantation for Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP): A single center experience during 16 years. *Am J Transplant* 7:2597-604, 2007
- 7) Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Zeledon ME, Hirahara T, Hirai T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Inomata H, Uchino M. Effect of liver transplantation on transthyretin Tyr114Cys-related cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 70:123-128, 2008.

- 8) Berk JL, Bisbee AB, Kelly JW, Dyck PJ, Falk RH, Ando Y, Coelho T, Ikeda S, Merlini G, Suhr OB, Skinner M, the Diflunisal Investigators Consortium. Clinical trial for TTR amyloidosis using diflunisal. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p387-389, 2007
- 9) Himeno S, Ueda M, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Sun X, Misumi Y, Shinriki S, Ueda A, Uji Y, Saito S, Kim J, Meng W, Ando Y. Urinary transthyretin: a possible biochemical marker in the early stage of renal dysfunction. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p146-148, 2007
- 10) Kakizoe N, Ando Y, Kawaji T, Ando E, Sandgren O, Suhr OB, Tanihara H. Unique phenotype of vitreous amyloidosis in different endemic areas. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p149-151, 2007
- 11) Kim J, Motomiya Y, Nakamura M, Ueda M, Saito S, Misumi Y, Himeno S, Obayashi K, Shinriki S, Meng W, Semba U, Kai H, Ando Y. Role of the C-terminal amino acids in β 2-microglobulin amyloid formation. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p16-18, 2007
- 12) Misumi Y, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Himeno S, Ueda M, Obayashi K, Sun X, Saito S, Kim J, Shinriki S, Meng W, Ueda A, Uchino M. An autopsy case of familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Val30Met 10 years after liver transplantation: changes in the amount of amyloid deposits in the pancreas. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p169-171, 2007
- 13) Obayashi K, Yamashita T, Ueda M, Nakamura M, Asonuma K, Inomata Y, Uchino M, Tanaka K, Ando Y. Amyloid neuropathy in a Japanese domino liver-transplanted recipient. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p172-174, 2007
- 14) Okamoto S, Yamashita T, Ando Y, Nakamura M, Ueda M, Uchino M. Comparison of cardiomyopathy in FAP after orthotopic liver transplantation with those of non-transplanted FAP patients. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p180-181, 2007
- 15) Saito S, Ando Y, Ueda M, Kim J, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Misumi Y, Shinriki S, Himeno S, Meng W, Ishima Y, Akaike T, Otagiri M. Effect of nitric oxide in transthyretin-related amyloidosis. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p185-187, 2007
- 16) Sato T, Sasaki S, Miyata M, Ando Y, Shuto T, Suico MA, Kai H. Inhibition of intracellular tetramerization induces the proteasomal degradation of amyloidogenic transthyretin variants. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p188-190, 2007
- 17) Shinriki S, Ueda M, Yamashita T, Obayashi K, Sun X, Himeno S, Ueda A, Misumi Y, Saito S, Kim J, Meng W, Shinohara M, Ando Y. Amyloid deposition in the tongue of patients with familial amyloidotic polyneuropathy. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p196-198, 2007
- 18) Ueda A, Ueda M, Yamashita T, Hirano T, Nakamura M, Misumi Y, Meng W, Ito T, Uchino M, Ando Y. Proliferation of smooth muscle cells in the tunica intima of cerebral vessels in familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Y114C. In "XIth International Symposium on Amyloidosis",

- Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p202-204, 2007
- 19) Ueda M, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Misumi Y, Shinriki S, Ueda A, Zeledon R ME, Himeno S, Saito S, Kim J, Meng W, Uchino M. FK506 inhibits murine AA amyloidosis without modulating serum SAA levels. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p99-101, 2007
- 20) Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Hirahara T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Uchino M. Effects of liver transplantation on hereditary cerebral amyloid angiopathy associated with ATTR Y114C. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p211-213, 2007
- 21) Zeledon R, Ando Y, Asonuma K, Nakamura M, Ueda M, Sun X, Fujii J, Inomata Y. Effect of tacrolimus and cyclosporine on transthyretin (TTR) metabolism in rats: a long term analysis. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p214-216, 2007
2. 学会発表
- 1) Ando Y : Liver transplantation in hereditary amyloidosis. Symposium on pathology. The 24th World Congress of Pathology and Clinical Medicine, Kuala Lumpur, Malaysia, Aug 20-24, 2007.
- 2) Kim J, Motomiya Y, Nakamura M, Ueda M, Saito S, Misumi Y, Himeno S, Obayashi K, Shinriki S, Meng W, Semba U, Kai H, and Ando Y. Role of the C-terminal amino acids in beta2-microglobulin amyloid formation. 19th FAOBMB Seoul Conference, Seoul, Korea, May 27-30, 2007.
- 3) 植田光晴、安東由喜雄：遺伝子疾患の画期的診断法の確立と新たな病態解析. 第 26 回日本臨床化学会夏季セミナー、志摩、Jul 5-7、2007.
- 4) 大林光念、植田光晴、三隅洋平、山下太郎、内野誠、安東由喜雄. 本邦初のドミノ肝移植患者が術後 7 年目にアミロイドポリニューロパチーを発症した. 第 25 回日本神経治療学会総会、仙台、June 21-22、2007.
- 5) 植田光晴、安東由喜雄、中村政明、山下太郎、大林光念、植田明彦、三隅洋平、内野 誠：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 投与の遺伝子発現に及ぼす影響. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、May 16-18、2007.
- 6) 植田光晴、安東由喜雄：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 投与の遺伝子発現に及ぼす影響. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会、横浜、April 26-29、2007.
- 7) 植田光晴、孟薇、大林 光念、堀端 洋子、安東 由喜雄：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 のアミロイド抑制効果と T 細胞の関与. 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、Oct 19-20、2007.
- 8) 安東由喜雄、植田光晴、山下太郎、三隅洋平、大林光念、川路隆博、安東えい子、谷原秀信. 網膜光凝固術による家族性アミロイドポリニューロパチーの眼症状進行抑制の可能性. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、May 16-18、2007.
- 9) 安東由喜雄. トランスサイレチン型アミロイドーシスの病態解析と治療. 第 54 回日本臨床検査医学会学術集会、大阪、Nov 22-25、2007.
- 10) 植田光晴、孟薇、三隅洋平、齋藤史織、大林光念、堀端洋子、中熊るみ、中川邦子、永田四郎、安東由喜雄. SELDI-TOF MS を用いた異型トランスサイレチンの簡便かつ迅速な検出法. 第 54 回日本臨床検査医学会学術集会、大阪、Nov 22-25、2007.
- 11) 孟薇、植田光晴、大林光念、堀端洋子、安東由喜雄. AA アミロイドーシス惹起マウスの血中に AEF 類似因子が存在する. 第 54 回日本臨床検査医学会学術集会、大阪、Nov 22-25、2007.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
2. 実用新案登録
- HMGB1 のアミロイドーシスへの保護作用（特許出願中）
3. その他



この蛋白は、TTRアミロイド形成を考える上でも重要なモデルといわれる劇症型FAPでありますPro55という異型TTRの立体構造の解析から人工的に考え出された蛋白ですが、アミロイド沈着過程で重要と考えられている立体構造の変化、すなわちmisfoldしている異型TTRの立体構造に近似していると考えられ手いる蛋白です。



他のペプチドに対する抗血清が、アミロイドにも、TTRにも反応するのに対し、このTTR115-124に対する抗血清はアミロイドのみに反応し、血清TTRには反応しませんでした。さらに、他の抗体がATTR Cys114のアミロイドにも反応するのに対し、本抗抗体は、ATTR Cys114には反応せず、Met30のみに反応する、特異性の高いものでした。

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期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

**Transthyretin-related FAP :
 若年発症例と高齢発症例の比較からみたアミロイド沈着の病態解析**

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学神経内科

共同研究者 小池春樹¹、両角佐織¹、川頭祐一¹、飯島正博¹、服部直樹¹、山本正彦²、
 安田武司³、向井栄一郎⁴、伊達 紫⁵、塩見一剛⁶、中里雅光⁶、斉藤史織⁷、
 安藤由喜雄⁷

名古屋大学神経内科¹、愛知学院大学健康科学科²、トヨタ記念病院神経内科³、
 国立病院機構名古屋医療センター神経内科⁴、宮崎大学フロンティア科学実験総合センター⁵、
 宮崎大学医学部第三内科⁶、熊本大学医学部病態情報解析分野⁷

研究要旨 FAP TTR Val30Met は従来、集積地（長野県小川村および熊本県荒尾市）との関連で報告され、20-40 歳で発症し、浸透率が高く、著明な自律神経症状を認め、解離性感覚障害を呈し、房室伝導ブロックをきたしやすいなどの特徴があるといわれてきた。これに対して近年、50 歳以上の高齢で発症する FAP TTR Val30Met が全国で散在性に報告され、従来の集積地の若年例に比べ、病初期の自律神経症状が軽度で、著明な解離性感覚障害を呈さず、心伝導障害よりも心肥大をきたしやすいなどの特徴を有することが明らかになっている。同じトランスサイレチン遺伝子の Val30Met 変異を有するにもかかわらず異なる臨床像を呈する原因は明らかになっていない。FAP TTR Val30Met における若年発症例と高齢発症例の地理的分布、臨床症状の相違はポルトガルでも報告されており、現在、両者の遺伝的背景の違い等について調査が進行中である。今回、TTR-related FAP の若年群 (Val30Met) と高齢群 (Ala97Gly、Val94Gly および Val30Met) の臨床病理像を比較検討したところ、高齢発症の TTR-related FAP は変異ごとにある程度の臨床病理像の多様性があるものの、加齢に伴い、ある程度の類似性が生じ、従来からの若年群とは異なった病態の関与が示唆された。

A. 研究目的

FAP TTR Val30Met は本邦においては最も一般的な FAP であり、若年発症例と高齢発症例は同じ遺伝子異常を有するにもかかわらず、異なる臨床病理学的所見を呈する。臓器ごとの間質における基質の違いや、その加齢に伴う変化、さらにはハプロタイプの違いなどが関連していると考えられ、これらの検索をすることは、FAP の病態の解明、新規治療法の開発に役立つと考えられる。今回、集積地の若年発症例 (Val30Met) と集積地と関連のない高齢発症例 (Ala97Gly、Val94Gly および Val30Met) の臨床病理像を比較検討し、異なる変異を有する高齢発症例の共通点および若年発症例との相違点について明らかにすることにより、FAP の病態を解明し、ひいては新規治療

の開発に結びつける。

B. 研究方法

1. 対象

遺伝子診断で確定した FAP TTR Met30 の若年発症例 (若年群) 21 例、高齢発症例 (高齢群) 44 例、および剖検例として若年発症 Val30Met 3 例と高齢発症 Val30Met 3 例、および Ala97Gly 1 例 (56 歳発症) と Val94Gly 1 例 (54 歳発症)

2. 方法

臨床像、末梢神経伝導検査所見、および剖検病理所見を比較検討した。また、心臓に沈着したアミロイド組成の解析を SELDI-TOF MS で施行した。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断と剖検に関しては名古屋大学および当該施設倫理委員会の承認のもと、十分な説明を行い、同意を得て行った。

C. 研究結果

臨床的には高齢群は運動感覚性ニューロパチーを呈したが、自律神経症状が軽度であった点が共通していた。神経伝導検査の指標は若年群では罹病期間と相関を認める傾向があったのに対し、高齢群では相関を認めなかった。アミロイドは若年群では、ほとんどの臓器においてコンゴレッドでの染色性と偏光顕微鏡下での緑色複屈折性が良好で、形態的にも長い線維が同一方向に並ぶ傾向を認めたのに対し、高齢群では若年群に比べて、コンゴレッドでの染色性と複屈折性は不良であり、形態的にも方向性を持たない短い線維を認めた。SELDI-TOF MS を用いた心アミロイドの解析では若年群は全例で変異 TTR の比率が 80%以上であったのに対し、高齢群では変異 TTR の比率は 41.2%であった。

D. 考察

FAP TTR Met30 においては高齢群では若年群とは異なった病態が発症以前から進行していると考えられた。また、高齢発症 TTR-related FAP は加齢に伴って生じた共通の臨床病理像を呈し、正常 TTR の沈着する senile systemic amyloidosis に類似した病態も関与していると推測された。

E. 結論

高齢発症の TTR-related FAP は変異ごとにある程度の臨床病理像の多様性があるものの、加齢に伴い、ある程度の類似性が生ずることが明らかになり、FAP の表現型に与える加齢の重要性が示唆された。また、若年群においては何らかの因子がアミロイドの沈着開始の時期を早めていると考えられ、今後、このような観点からアミロイド沈着のメカニズムを解明し、病態解明から新規治療法の開発へとつなげていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Koike H, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Katsuno M, Tanaka F, Watanabe H, Doyu M, Yoshikawa H, Sobue G. Nonmyelinating Schwann cell involvement with well-preserved unmyelinated axons in CMT1A. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 1027-1036.

2) Koike H, Sobue G. Small neurons may be preferentially affected in ganglionopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 113.

3) Oki Y, Koike H, Iijima M, Mori K, Hattori N, Katsuno M, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Shiraishi M, Yazaki S, Nokura K, Yamamoto H, Sobue G. Ataxic vs painful form of paraneoplastic neuropathy. *Neurology* 2007; 69: 564-572.

4) Iijima M, Koike H, Hattori N, Tamakoshi A, Katsuno M, Tanaka F, Yamamoto M, Arimura K, Sobue G. Prevalence and incidence rates of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in the Japanese population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008, in press.

5) Kawagashira Y, Watanabe H, Oki Y, Iijima M, Koike H, Hattori N, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Intravenous immunoglobulin therapy markedly ameliorates muscle weakness and severe pain in proximal diabetic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 899-901.

6) Iguchi Y, Mori K, Koike H, Mano K, Goto Y, Kato T, Nakano T, Furukawa D, Sobue G. Hypophosphataemic neuropathy in a patient who received intravenous hyperalimentation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 1159-1160.

7) Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain* 2008; 131: 229-239.

2. 学会発表

Haruki Koike, Yumiko Oki, Yuichi Kawagashira, Masahiro Iijima, Masahiko Yamamoto, Naoki Hattori, Hiroo Yoshikawa, and Gen Sobue. Nonmyelinating

Schwann cell involvement with well preserved unmyelinated axons in CMT1A. Peripheral Nerve Society 2007 Biennial Meeting; Salt Lake City, USA: 2007, July 14-18.

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)

アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

老人性全身性アミロイドーシスの臨床像の多様性について

分担研究者 池田修一 信州大学医部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

共同研究者 東城加奈*、土屋彩子*、小平農*、矢崎正英*、関島良樹**、武井洋一*
星井嘉信***

信州大学医学部、*脳神経内科、リウマチ・膠原病内科、**同遺伝子診療部、

***山口大学大学院医学系研究科情報解析医学系学域病理形態分野 (病理学第一講座)

研究要旨 老人性全身性アミロイドーシス (SSA) は高齢者の剖検例に多く見られる疾患であるが、その詳細は不明な点が多い。今回我々は当科で診断した SSA 患者 10 例の臨床像をまとめ、その多様性について検討した。性別は男性 8 名、女性 2 名であった。初発年齢は 44 歳から 97 歳 (68.3±12.9 歳) で従来考えられていたよりも発症年齢に幅のある疾患である可能性が示唆された。臨床症状としては、心不全、心房細動といった心障害の他、手根管症候群や心原性脳塞栓で診断に至った症例も複数認められた。今回の検討から、中高齢者の心障害や手根管症候群、心原性脳梗塞の原因として、SSA も考慮すべきと考えられた。また SSA の確定診断には組織学的検討が不可欠であるが、患者の多くが高齢者であることから非侵襲的で感度の高い生検部位の確立が望まれている。皮膚組織は比較的安全に生検が施行できるため、今後症例を蓄積し、診断感度を検討する必要がある。

A. 研究目的

老人性全身性アミロイドーシス (SSA) は、高齢者の剖検例に多くみられる (80 歳以上 20-30%) 野生型トランスサイレチン (TTR) 由来のアミロイドーシスである。しかし、現時点では SSA の根本的治療法が存在しないこともあり、積極的に生前診断されることは少なく、臨床像の詳細は不明な点が多い疾患である。今回我々は、当科で診断した SSA 患者の臨床像をまとめ、その多様性と早期診断の手がかりを検討した。

B. 研究方法

2008 年 1 月までに当科で組織学的診断 (TTR アミロイド沈着あり) や血清 TTR 蛋白の質量解析 (一峰性ピーク)、TTR 遺伝子解析 (変異なし) を行い、SSA と診断した患者 10 名の臨床像をまとめた。

(倫理面への配慮)

各患者には十分な説明を行い、同意を得て検査を施行した。

C. 研究結果

症例1: 75歳男性

主訴; 両手指しびれ 既往歴; 60歳~高血圧 現病歴; 65歳から両側手指のしびれ、両側母指球筋の筋萎縮が出現。66歳時の集団検診で発作性心房細動を指摘。74歳時うっ血性心不全で入院加療を受けた。75歳時両側手根管開放術目的に入院。検査所見; 現症、末梢神経伝導速度検査とも両側手根管症候群に合致した所見を認めた。胸部単純レントゲンでは心胸郭比は58.3%と拡大し、^{99m}Tc-PYP心筋シンチでは心筋壁へのびまん性集積を認め、心アミロイドーシスの合併が示唆された。組織学的検討; 手根管開放術時に摘出された屈筋支帯内にはアミロイド沈着を認め、免疫染色では抗TTR抗体のみに陽性であった。その他胃粘膜生検と腹壁脂肪吸引生検でもアミロイドの沈着を認めた。

症例2: 97歳女性

主訴; 意識障害、右半身麻痺 既往歴; 特記事項なし現病歴; 起床後突然会話不能となった。意識障害 (E4V1M3) と右半身麻痺を認め、左中大脳

動脈領域の心原性脳塞栓と診断され入院。検査所見；頭部MRIでは拡散強調画像で左中大脳動脈領域に高信号域あり。胸部単純レントゲン上心胸郭比は66%で、心電図上心房細動を認めた。心臓超音波検査では心室中隔壁の肥厚と心筋壁のエコー輝度上昇を認めた。また^{99m}Tc-PYP心筋シンチでも心筋壁へのびまん性集積を認めた。組織学的検討；心アミロイドーシスの合併を強く疑ったが、本例は超高齢であり、また全身性アミロイドーシスでは腹壁脂肪吸引生検の有用性が報告されていることから、腹壁脂肪吸引生検をまず行った。その結果、アミロイド沈着陽性であったことから腹部皮膚生検を行った。皮膚生検では皮下脂肪織のごく一部にアミロイド沈着を認め、免疫染色では抗TTR抗体のみに陽性であった。

症例3：67歳男性

主訴；右半身麻痺 既往歴；40歳～高血圧 現病歴；仕事中に突然右半身不全麻痺が出現。左中大脳動脈領域の脳塞栓と診断され入院。検査所見；頭部MRI拡散強調画像で左中大脳動脈領域に高信号域あり。心電図は洞調律であったが、肢誘導は低電位でV1-V3はQSパターンであった。胸部単純レントゲンで心胸郭比は49%であったが、心臓超音波検査では心室中隔厚は19.8mmと肥厚し、心筋壁のエコー輝度は上昇していた。また^{99m}Tc-PYP心筋シンチでも心筋壁へのびまん性集積を認めた。組織学的検討；心筋生検を施行し、心筋間質にアミロイド沈着を認めた。免疫染色では抗TTR抗体のみに陽性であった。

その他の症例も併せて検討した結果（表1）、症例総数は10名（男性8名、女性2名）で、初発年齢は44歳～97歳（68.3±12.9歳）であった。診断の契機となった症状は、手根管症候群4名、心不全3名、脳梗塞2名で、残り1名は胃癌摘出術時に偶発的にTTR陽性のアミロイド沈着が胃粘膜組織に認められた。この症例は全身のアミロイド検索は不十分な状態である。臨床症状全体としては心不全等何らかの心障害を9名、手根管症候群を6名、脳梗塞を3名に認めた。アミロイド沈着は手根管組織や消化管、心筋、皮膚の生検組織で確認された。心アミロイドーシスについては、心筋生検施行症例は3名で他は心臓超音波検査や^{99m}Tc-PYP心筋シンチの結果から疑われた。

D. 考察

今回の検討には、従来考えられていたよりも早期に発症する症例も含まれており、SSA は発症年齢に幅のある疾患である可能性が考えられた。診断の契機となった症状にはこれまでに報告のある心不全等の心障害や手根管症候群の他、心原性脳塞栓も含まれていた。心原性脳塞栓は、心筋へのアミロイド沈着の結果、心房細動や心拡張障害が見られやすくなるとともに形態的には心内腔の狭小化や心内膜面の不整がみられることから、心内血栓が形成され易くなり、脳塞栓の発症率が高まるものと考えられた。組織学的検討については、皮膚組織は比較的安全に生検が施行できるため、当科では本症が疑われた場合皮膚生検を積極的に行っているが、診断感度については今後の検討課題である。

E. 結論

中高齢者の心不全や心拡張障害、心筋壁肥厚等の心障害や心房細動等の不整脈、手根管症候群、心原性脳梗塞の原因として SSA も考慮すべきである。各疾患群中の SSA 頻度も今後検討していく必要がある。また組織生検は患者の年齢層から可能な限り非侵襲的部位から行うべきであり、皮膚生検も検討の余地がある。

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

1) 小平農、東城加奈、関島良樹ら：野生型トランスサイレチン由来アミロイドによる両側手根管症候群を呈した 48 歳男性例。第 182 回日本神経学会関東地方会、東京、9 月 1 日、2007 年

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 当科で診断したSSA患者一覧

性別	初発年齢	診断年齢	診断の契機となった症状	その他の症状	アミロイド沈着確認部位
男	44	48	手根管症候群	I度房室ブロック	手根管, 胃
男	65	75	手根管症候群	心不全, 発作性心房細動	手根管, 心, 胃
男	68	78	手根管症候群	心拡張障害	手根管, 心
女	70	74	手根管症候群	心筋肥厚, 発作性心房細動, 脳梗塞	手根管, 胃, 心
男	60	76	心不全	手根管症候群	胃, 心
男	69	70	心不全	なし	心筋
男	71	73	心不全	手根管症候群	心筋, 胃
男	67	67	脳梗塞	心筋肥厚, 心拡大	心筋
女	97	97	脳梗塞	心拡大, 心筋肥大, 心房細動	皮膚, 心
男	72	72	なし	胃癌	胃

心: 心臓超音波, 99mTc-PYP 心筋シンチで心アミロイドーシスに合致する所見あり.

心筋: 心筋生検施行.

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

高齢牛に沈着した AA アミロイド線維のアミロイドーシス誘発活性

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 吉田拓弘*、池田修一*、

張 鵬堯**、張 蓓茹**、澤下仁子**、森 政之**、付 笑影**、

信州大学、*医学部第三内科、**同医学系研究科加齢生物学分野

研究要旨 反応性(AA)アミロイドーシスでは既存のアミロイド線維の摂取がアミロイドーシスの発症を促進/誘発する可能性が示唆されている。以前の調査で、長野県で屠殺された高齢牛では、予想外に高率(5%)での腎臓へのAAアミロイド沈着が明らかになった(東條、Amyloid 2005)。今回、高齢牛でのAAアミロイド沈着頻度の再調査を行い、沈着臓器から分取したアミロイド線維のマウスAAアミロイドーシスの発症促進・誘発効果を検討した。腎臓にアミロイドの沈着が認められた高齢牛(4才以上)は9匹(9/293)で沈着頻度は3.1%であった。また1匹の大腿筋にも微小なアミロイド沈着を認めた。これらのアミロイド沈着は抗ウシAA抗体で染色された。すべての腎臓のアミロイド線維画分にはAA蛋白質が確認されたが、筋肉の線維画分では検出できなかった。代表的な2匹の腎臓のアミロイド線維画分の投与はマウスAAアミロイドーシスを誘発した。これらの結果は、AAアミロイドーシスに関連する基礎疾患を持つ患者が、AAアミロイドが沈着したウシの腎臓などを摂取した際にアミロイドーシス発症が促進される可能性を否定できず、より詳細な解析が必要であることを示している。

A. 研究目的

関節リウマチなど、慢性炎症によって血液中SAA濃度が上昇した患者のうちで、アミロイドーシスを発症する割合は多くない。マウスを用いた実験的AAアミロイドーシスでは、既存のアミロイド線維(AA)の摂取がアミロイドーシスの発症を促進/誘発する可能性が示唆され(アミロイドーシスの伝播)、ヒトでも食品中のアミロイド線維の摂取がアミロイドーシス発症を促進する可能性が危惧されている。以前の調査で、長野県で屠殺された高齢牛(4才以上、ホルスタインと黒毛和牛、外見上は病歴無し)では、予想外に高率(5%)での腎臓へのAAアミロイド沈着が明らかになった¹⁾。今回は再度、高齢牛でのAAアミロイド沈着頻度の調査を行い、沈着臓器からアミロイド線維を分取して、マウスAAアミロイドーシスでの伝播性を検討した。

1. Tojo K, Tokuda T, Hoshii Y, Fu X, Higuchi K, Matsui T, Kametani F, Ikeda S. Unexpectedly high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered

cattle in Japan. Amyloid 12: 103-108, 2005.

B. 研究方法

長野県で屠殺された高齢牛(4才以上、ホルスタイン)293匹の腎臓及び大腿筋へのアミロイド沈着を病理学的に調べた。アミロイド沈着が確認された牛の腎臓及び筋肉からPrasらの方法でアミロイド線維を抽出し、Western blot法でAAアミロイド線維の存在を確認した。この線維画分を1%硝酸銀溶液の皮下投与で急性炎症を惹起したC57BL/6Jマウスの尾静脈に投与し(100 µg/100 µl)、10日後に屠殺してアミロイドの沈着を解析した。

(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研究を行った。

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した。

C. 研究結果

コンゴレッド染色後の緑色偏光で腎臓にアミロイドの沈着が認められた高齢牛は9匹であった。これらのアミロイド沈着は抗ウシAA抗体で染色されるので、AAアミロイドの沈着と考えられる。沈着頻度は $9/293 = 3.1\%$ であった。(表1) また1匹の大腿筋にも微小なアミロイド沈着を認めた(図1)。

病理学的に沈着が確認された組織より水抽出分画としてアミロイド線維画分を分取し、SDS電気泳動法で分離した後、Western blot法で解析した。解析したすべての腎臓からの線維画分にはAA蛋白質が確認されたが、筋肉の線維画分には検出できなかった(図2)。

代表的な2匹の腎臓及び筋肉線維画分のアミロイドーシス誘発活性をマウスの実験的AAアミロイドーシスのシステムで検討した結果、腎臓画分では誘発性(アミロイド沈着マウス; 6/7)を示したが、筋肉画分では1匹のみに(1/7)ごく弱い誘発が認められた(表2)。

D. 考察

AAアミロイドーシスやマウスAApoAIIアミロイドーシスではプリオン様の「アミロイド線維による伝播」が発症に関与する可能性が強く示唆されている。Solomonらはフォアグラ中に含有されたAAアミロイド線維がマウスAAアミロイドーシスを誘発することを示し、食品に含まれるアミロイド線維がアミロイドーシス発症促進要因になる危険性を示した。Tojoらは長野県で屠殺された4才以上の病歴の無い高齢牛の5.0%(15/302)の腎臓にアミロイド沈着を認めた。今回の調査では高齢牛(4才以上)でのAAアミロイドの腎臓への比較的高率(~3%)の沈着が再確認された。さらに1例で筋肉への微小なアミロイド沈着が認められた。

これらの臓器から分取したアミロイド線維画分には、ウシとマウスとの動物種のバリアーを超えて、マウスでのAAアミロイドーシスの誘発性が認められた。

これらの結果は、関節リウマチなどAAアミロイドーシス発症に関連する基礎疾患を持つ患者が、AAアミロイドが沈着したウシの腎臓などを摂取した際にアミロイドーシス発症を促進する危険性を否定することはできない事を示している。今後は以下のような点に関してより詳細な検討が必要であると考ええる。すなわち、今回は比較的大量の線維画分をマウスに投与し、誘発が観察された。一方、摂取したアミロイド線維は微量でも体内に蓄積していくと報告されている。実際に摂取する可能性のある線維量、及び頻度で、どの程度の確率でアミロイドーシスの誘発が起こるのか?を推測する必要がある。この問題を解決するためには、ヒト型SAAを発現するマウスの系統の作製による、よりヒトに近い実験系の開発と、疫学的解析による実証が必要と考えられる。

E. 結論

高齢牛でのAAアミロイドの腎臓への比較的高率のAAアミロイド沈着が確認された。このアミロイド線維はマウスでのAAアミロイドーシスの誘発性が認められた。骨格筋へのアミロイド沈着はより詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報

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(7): 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(1): 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 SAMPI 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^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) 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

表 1. 高齢牛の腎臓および大腿筋へのAAアミロイド沈着

番号	年齢	腎臓	筋肉
514	9才7ヶ月	尿細管周囲(2+)、糸球体(1+)	(-)
575	12才6ヶ月	尿細管周囲(2+)、糸球体(1+)	(-)
586	9才8ヶ月	尿細管周囲(1+)、糸球体(-)	(-)
669	8才9ヶ月	髄質、皮質血管壁(1+)、糸球体(1+)	(1+)
682	7才4ヶ月	尿細管周囲(-)、糸球体(3+)	(-)
722	11才5ヶ月	尿細管周囲(1+)、皮質血管壁(1+)	(-)
730	10才4ヶ月	皮質血管壁(1+)、糸球体(2+)	(-)
751	13才0ヶ月	尿細管周囲(-)、糸球体(2+)	(-)
793	13才7ヶ月	尿細管周囲(1+)、糸球体(-)	(-)

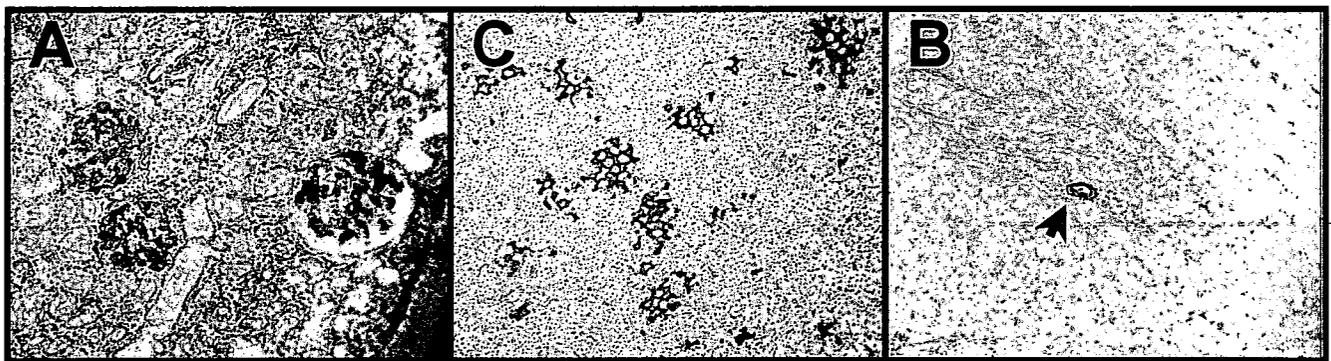


図 1. 高齢牛へのAAアミロイド線維の沈着 (抗ウシAA抗体による免疫組織染色)。A, 糸球体への沈着 (ウシ682)。B, 尿細管周囲への沈着(ウシ514)。 C, 筋肉への沈着(ウシ669)

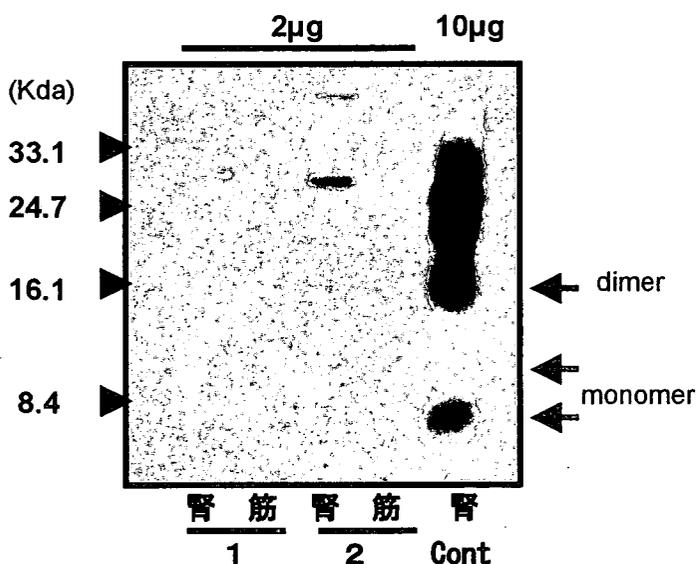


図 2. アミロイド線維が沈着した腎臓及び筋肉のアミロイド線維分画のWestern blot 解析

表 2. ウシアミロイド分画のAAアミロイドーシス誘発効果。AgNO3を投与したマウスに100 µgの分画を投与し10日後にアミロイド沈着を調べた。

AA fibrils		Positive mice	Amyloid Grade (Spleen)
牛1	腎	4/4	3
	筋	1/4	0,1
牛2	腎	4/4	3
	筋	0/3	0
牛C (control)	腎	Ex1 3/5	0,3
	Ex2	1/5	0,1

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AAアミロイド症に関する研究

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*、石原得博**、河野裕夫**、崔 丹**、
 伊藤亜紀子***、深野百合子***、藤野みゆき***、小林亮介***
 *信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野、
 **山口大学医学部構造制御病態学講座、
 ***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、以下の項目を検討した。

1.チーターの病性鑑定

2005～2007年の3年間に20頭のチーターが死亡した。これらを病理学的に検索したところ、アミロイドは80%(16/20)にみられ、過去の成績と同様にチーターの死因としてアミロイド症は重要であった。さらに、施設間でのアミロイド沈着程度に差があり、この差の解明が望まれた。

2.チーター由来アミロイド症の伝達性とモデル動物開発

チーター由来アミロイドの伝達性の検討と、誘発モデル動物の開発を行った。アミロイド症により死亡したチーター由来アミロイド線維を10%カゼインで炎症刺激を行ったモルモット6匹に50mg/匹を腹腔内接種し、4週、8週、12週目に検査した。また、1%硝酸銀1mlまたはAdjuvant complete Freundと10%カゼインを等量混合した溶液2mlで炎症刺激を行った猫18匹に、チーター由来アミロイド線維を湿重量10、100、1000mg/匹、アミロイド罹患チーター肝臓乳剤3、5g/匹を腹腔内または静脈内に接種し、1～2週間観察後、検査した。実験に供したモルモットおよび猫のいずれにも、アミロイドの沈着はみられなかった。このため、少なくとも従来の方法では、この2種類の動物にアミロイドは誘発できないものと考えられた。対照としたマウスでは、チーター由来アミロイド接種によりアミロイドが誘発できた。

3.非侵襲性アミロイド症生前診断法の確立とその精度

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22検体と、死亡時に採材した糞4検体(C-67、68、84、90)中のアミロイド線維の有無を検索した。その結果、生前採取した糞22検体のうち20検体(91%)からアミロイド線維が検出された。死亡時に採材した糞4検体のうち、アミロイドはC-67以外の3検体から検出され(75%)、これらのチーターの各臓器におけるアミロイド沈着指数は、C-68:腸1、腎3、肝3、C-67:腸0、腎2、肝0、C-84:腸1、腎3、肝3、C-90:腸3、腎3、肝0で、腸のアミロイド沈着状況を反映しており、アミロイド症の生前診断法として有効であると判断した。今後は、症例数を増やし、糞を用いたアミロイド症診断法の検出限界やアミロイド線維の排泄推移などを検討する予定である。

A. 研究目的

本研究は、チーターのアミロイド症の病理発生を解明することにより、ヒトのAAアミロイド症の病理発生解明とチーターの種の保存に貢献す

ることを目的としている。

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