

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

アミロイドーシス発症への血清アミロイド P 成分の関与に関する研究

研究分担者 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 竹本恵子*、盧山*、張鵬堯**、HENNY WATI*、川上佳紀*、瓦林毅***、
松原悦朗***、東海林幹夫***、樋口京一**

*山梨大学大学院医学工学総合研究部生化学、**信州大学大学院医学系研究科加齢生物学、***弘前大学脳神経内科

研究要旨 我々が作製した無血清アミロイド P 成分 (SAP) マウスを用いて、遺伝性アルツハイマー病 (AD) のトランスジェニックマウスモデル (Tg2576) における Aβアミロイド沈着、及び全身諸臓器へのアポリポ蛋白質 AII アミロイド (AApoAII) 沈着に Sap が *in vivo* でどう関与するかを解析し、以下の結果を得た。

1) 8~25 ヶ月齢の Tg2576/Sap⁺ と Tg2576/Sap^{-/-}、各々38 匹を解剖し Aβアミロイド沈着程度を抗 Aβ抗体を用いて比較解析した。この結果、Sap の有無によって、Aβアミロイドの沈着時期や程度に差異を認めなかった。しかし、Tg2576/Sap⁺ 脳内に沈着した Aβアミロイドは、ヒト AD 脳内のものと異なり、抗 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。

2) 2~3 ヶ月齢の Sap⁺ マウス 28 匹と同月齢の対照 Sap^{-/-} マウス 22 匹に 50μg の AApoAII 線維を尾静脈に注入し、11 ヶ月齢時または 16~17 ヶ月齢時に解剖して、アミロイド沈着程度を比較解析した。この結果、両群マウスの種々の臓器における AApoAII 沈着時期や程度には、差異を認めなかった。本実験では、あらかじめ AApoAII 線維核を投与している。従って、Sap は、AApoAII アミロイド線維形成過程における伸張反応を促進しないことが示された。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) をはじめとするアミロイドーシス患者数は、社会の高齢化に伴い、今後増加すると予想されるが、未だその多くは、発症機構の詳細が不明で、安全で確実な治療法は無い。一方、血清アミロイド P 成分 (Serum Amyloid P Component; SAP) は、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して結合し、アミロイド形成を促進することが示唆されている。そこで、本研究では、標的遺伝子組換え法を用いて独自に作成した無 Sap (Sap^{-/-}) マウスを用い、AD のモデルマウス (Tg2576) における脳内に限局した Aβアミロイド沈着、及び全身諸臓器へのアポリポ蛋白質 AII アミロイド (AApoAII) 沈着に Sap が *in vivo* でどう関与するかを解析する。

SAP がアミロイド沈着を促進すれば、リガンドであるガラクトース誘導體等を用い、SAP とアミロイドの結合を阻害することで、種々のアミロイドーシスの発症を抑制できると考えられる。

B. 研究方法

1) Tg2576 と Sap^{-/-} マウスとを交配させて得た、8~25 ヶ月齢の Sap^{+/+}/Tg2576 と対照 Sap^{+/+}/Tg2576、各々38 匹における脳内 Aβ沈着の程度を、月齢を追って比較解析した。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 (Planetron) 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 Aβ42 および Aβ40 量を、抗 Aβ 抗体 (BNT77, BA-27 と BC-05) と ELISA 法を用いて測定した。

2) 上記 *Sap*^{+/+}マウスは、129/Sv/Ev マウス由来の ES 細胞から作製したもので、変異 *Sap* 遺伝子の近傍に 129/Sv/Ev 由来の *Apoa2*^b 遺伝子をもつ。*Apoa2* 遺伝子には、主に 3 つ (A, B, C) のアレルがあり、異なるアレル間で AApoAII 沈着の程度に差異が認められる。そこで、同じ *Apoa2*^b をもつ C3H/He と *Sap*^{+/+}マウスとを交配させて得た、F1 *Sap*^{+/+}マウスに *Sap*^{+/+}マウスを交配させ、*Sap*^{+/+}/*Apoa2*^bマウスと対照 *Sap*^{+/+}/*Apoa2*^bマウスを得て、実験に使用した。2~3 ヶ月齢のこれらマウスに 1μg の AApoAII を尾静脈から注入した後、11 ヶ月齢時または 16~17 ヶ月齢時に解剖し、諸臓器の AApoAII の沈着程度を比較解析した。AApoAII 沈着程度は、組織をコンゴレッド染色後、偏光顕微鏡で観察し、全臓器のアミロイド沈着程度の平均を、0~4 段階の Amyloid Index で表して比較した。同時に抗 ApoAII 抗体による免疫組織化学的検査を行い、ImagePro^R PLUS を用いて比較した。

(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、*Sap*^{+/+}/Tg2576 と対照 *Sap*^{+/+}/Tg2576 における脳内ヒト変異アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 量を Western Blot 法を用いて比較したところ違いを認めなかった。そこで、8~25 ヶ月齢の Tg2576/*SAP*^{+/+}38 匹と Tg2576/*SAP*^{+/+}38 匹における脳内全 Aβ アミロイド、老人斑、及びアミロイドアンギオパチーの沈着開始時期や程度を比較解析した。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 Aβ40 および Aβ42 量を比較解析したが、両者に有意な差異を認めなかった。一方、Tg2576/

Sap^{+/+}脳内に沈着した Aβ アミロイドは、ヒト AD 脳内のものと異なり、抗 *Sap* 抗体と反応しなかった。

2) *Sap*^{+/+}/*Apoa2*^b マウスと対照 *Sap*^{+/+}/*Apoa2*^b マウスにおける、AApoAII 前駆体である血清アポリポ蛋白質 AII (ApoAII) 量を Western Blot 法を用いて比較したところ違いを認めなかった。そこで、2~3 ヶ月齢のこれらマウスの尾静脈に 50μg の AApoA II 線維を注入し、11 ヶ月齢の *Sap*^{+/+}/*Apoa2*^b マウス 11 匹と対照 *Sap*^{+/+}/*Apoa2*^b マウス 9 匹、及び、16~17 ヶ月齢の *Sap*^{+/+}/*Apoa2*^b マウス 17 匹と対照 *Sap*^{+/+}/*Apoa2*^b マウス 13 匹の種々の臓器 (脾、心、肝、舌、胃、腸、皮膚) 中の AApoAII 沈着程度を、コンゴレッド染色及び抗 ApoAII 抗体による免疫組織化学的検査により比較解析した。この結果、両マウス群で差異を認めなかった。

D. 考察

1) *Sap* の有無によって、Aβ アミロイドの沈着時期や程度に差異を認めなかったが、抗 *Sap* 抗体を用いた免疫染色の結果は、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。従って今後、ヒト AD と同様に *Sap* が脳内 Aβ アミロイドに結合するモデル動物を用いて、Aβ アミロイド沈着に *Sap* がどう関与するかを解析する必要がある。

2) 11 ヶ月齢時及び 16~17 ヶ月齢時の *Sap*^{+/+}/*Apoa2*^{b/b} マウスと対照 *Sap*^{+/+}/*Apoa2*^{b/b} マウスにおける AApoA II アミロイド沈着時期や程度には、ともに両群で差異を認めなかった。本実験では、あらかじめ AApoA II アミロイド線維核を投与している。従って、*Sap* は、AApoA II アミロイド線維形成過程における伸張反応を促進しないことが示された。線維核形成への *Sap* の関与を検討するため、今後、線維核を投与しない実験系での解析が必要である。

E. 結論

1) 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結果を得た。

2) *Sap* は、AApoA II アミロイド線維形成過程における伸張反応を促進しない。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda S: Transthyretin Accelerates Vascular A β Deposition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Brain Pathol* 19: 48-57, 2009.

2. 学会発表

1) 竹本恵子, 盧 山, HENNY WATI, 瓦林 毅, 松原悦朗, 東海林幹夫, 樋口京一, 前田秀一郎: アミロイドーシス発症への血清アミロイド P 成分の関与に関する研究. 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会合同年会, 神戸, 12.9-12, 2008.

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

マウス apoA-II の部分ペプチドを用いたアミロイド線維形成機構と伝播の解析

研究分担者 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 蓓茹、王 耀勇、銭 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 我々が開発した Apolipoprotein A-II (apoA-II) の合成部分ペプチドを用いた *in vitro* 線維形成システムとマウス apoA-II アミロイドーシス (AApoAII) 高発症モデルマウス (*Apoa2^c* トランスジェニックマウス: *Apoa2^cTg*) を用い、アミロイド線維の形成及び伝播機構の解明を試みた。まず、AApoAII アミロイドーシスを極めて発症し難い F 型 apoA-II (*Apoa2^f*) の合成部分ペプチドを用いた *in vitro* 線維形成解析から、apoA-II の 9、16、62 番のアミノ酸配列が線維形成に重要であることを見いだした。次に、合成ペプチドから 4°C で作製した線維を *Apoa2^cTg* に投与することにより、37°C 生成線維に比較して有意に高頻度のアミロイド線維沈着を誘発し、4°C 生成線維の高い沈着促進力 (伝播能力) を示唆した。4°C 生成線維は 37°C 生成線維とは超微形態が若干異なり、各種タンパク質変性操作に高い感受性 (脆弱性) を示した。以上の結果より、我々の AApoAII アミロイドーシスを基本モデルとした *in vitro* 線維形成システムと *Apoa2^cTg* による *in vivo* 解析システムの併用・活用は、1) 分子レベルからのアミロイドーシス発症・伝播機構の解明や、2) 生体内物質や各種薬剤の線維形成促進・抑制効果の解析に非常に有用であり、アミロイドーシスの予防・治療策の提案への貢献が期待される。

A. 研究目的

アミロイドーシスの発症機序を解明し、治療戦略を立案するには、アミロイド線維の形成機構、種々の生体内物質や薬剤との相互作用や伝播機構の解明が必須である。これまで、疾患臓器や培養細胞系からのアミロイド線維画分を用いた研究が実施されてきたが、夾雑物の影響を完全には無視できないため、リコンビナントタンパク質や合成ペプチドを用いて作製したアミロイド線維を解析対象とした研究も進められている。我々は、マウス老化アミロイドーシスをモデル疾患とし、アミロイド線維形成機構のより詳細な研究手法を確立するため、apoA-II の合成部分ペプチドを用いた *in vitro* 線維形成システムを開発してきた。本研究では、1) *in vitro* で線維形成反応を行い、アミロイド線維形成にかかわる主要アミノ酸を決定した。次に、2) 線維形成条件を変えて作製したペプチド由来線維をマウスに投与し、線維沈着促進効果を解析した。

B. 研究方法

apoA-II のアミロイド線維形成における主要アミノ酸の決定 これまでに apoA-II のユニークな 2 種のペプチド (N 末、C 末ペプチド) の線維形成反応により明らかとした線維形成最小配列 6-16 番 (N 末) と 48-65 番 (C 末) について、アミロイドーシス高発症マウスの C 型 apoA-II の 9、16、54 及び 62 番を、発症抵抗性マウスの F 型の配列 (C 型: 9Ser, 16Gln, 54Arg, 62Asn, F 型: 9Asn, 16His, 54Lys, 62Lys) (図 1) に置換した各種ペプチドを用い、酸性条件下、37°C で重合反応を行った。チオフラビン T (ThT) による蛍光強度の経時変化を測定し、電子顕微鏡 (TEM) で形態観察を行った。

ペプチド由来線維の線維沈着促進効果と性状の解析 C 型 apoA-II の 1-16 番目と 48-65 番目の合成ペプチドを用い、酸性条件下、4°C あるいは 37°C でアミロイド線維を作製した。1) ペプチド由来線維 5 µg を *Apoa2^cTg^{+/+}* (♀、2 ヶ月齢) に尾静脈内投与し、投与 3 ヶ月後の主要組織切片をコ

ンゴレッド染色してアミロイド沈着程度を評価した。2) 生成線維の形態を TEM で観察した。また、加温、振とう、塩酸グアニジンあるいは Tween20 の添加等の各条件下、72 時間後における線維残存量を ThT による蛍光強度で測定した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験に関しては、信州大学動物実験等実施規定により、信州大学動物実験委員会の審査を経て学長の承認を得た。上記規定に沿って実験を実施している。

生成アミロイド線維に関しては、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、取り扱う際には手袋・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 時間以上浸透処理している。

C. 研究結果

apoA-II のアミロイド線維形成に関与する主要アミノ酸の決定 1) N 末配列の解析: C 型 apoA-II の 9 番アミノ酸を F 型の Asn に置換した N 末ペプチド (S9N) と C 型の C 末ペプチドによる重合反応は、反応 3 日後まで ThT 蛍光強度が増加せず、線維をほとんど形成しなかった (図 1 N 末配列の解析)。16 番のアミノ酸置換ペプチド (Q16H) では、C 型同士の重合反応 (c1/16) の約 1/3 の蛍光強度にまで反応が減少し、形成線維量も減少していた。2) C 末配列の解析: C 型 apoA-II の 54 番を F 型に置換した C 末ペプチド (R54K) と C 型の N 末ペプチドとの反応は、C 型同士の反応よりも早期に ThT 蛍光強度が上昇し始め、その最大値も大きかった (図 1 C 末配列の解析)。R54K の反応生成物中には線維が存在していたが、球状・不定形の構造体も多く見いだされた。62 番のアミノ酸置換ペプチド (N62K) や 54 番と 62 番のいずれも F 型に置換した C 末ペプチド (R54K/N62K) では、いずれも反応 3 日後まで ThT 蛍光強度が全く増加せず、線維を形成しなかった。

線維形成温度を変えたペプチド由来線維の線維沈着促進効果と性状の解析

1) アミロイド線維沈着促進効果: C 型 apoA-II のペプチドから線維を作製し、 $Apoa2^{C}Tg^{+/+}$ に投与して 3 ヶ月後の線維沈着程度を解析した結果、37°C

で作製した線維よりも 4°C 生成線維の沈着促進効果の方が有意に高かった (図 2 左図)。しかし、その効果は AApoAII の沈着促進効果よりも弱かった。主な沈着臓器は舌、小腸、肺や胃で、自然発症マウスや肝臓から抽出した AApoAII を投与してアミロイドーシスを誘発したマウスの沈着臓器・組織と同一だった (図 2 右図)。2) ペプチド由来線維の性状: ペプチド由来線維を TEM で観察した結果、4°C 生成線維は AApoAII と形態が類似し、短径も同サイズだったが、37°C 生成線維は 1.5-2 倍太かった (図 3 左図)。また、線維を室温、酸性溶液中で振とうし、72 時間後の残存量を測定した結果、4°C 生成線維は約 55%、37°C 生成線維は約 73% が残存していた。3 M 塩酸グアニジン処理 72 時間後は、いずれの線維も 15% 以下の残存量だった (図 3 右図)。2.5% Tween20 を添加した結果、72 時間後の 37°C 生成線維は 70% 以上が残存していたが、4°C 生成線維は約 32% の残存量だった。また、室温で静置、あるいは 37°C で振とうした場合のいずれの結果も、室温で振とうした場合とほぼ同様の結果だった。

D. 考察

F 型 apoA-II を有するマウスはアミロイドーシス発症抵抗性で、apoA-II の線維形成最小配列 6-16 番と 48-65 番目のアミノ酸組成が高発症系マウスの C 型 apoA-II と異なることによって線維が形成せず、発症抵抗性になると示唆してきた^{1,2)}。本研究でさらに詳細に検討した結果、C 型 apoA-II とアミノ酸組成が異なる 9、16 と 62 番目が 1 カ所でも F 型 apoA-II のアミノ酸に置換されると、線維形成量が激減することが明らかとなった。つまり、F 型 apoA-II は、これら 3 カ所の線維形成抑制型アミノ酸置換体であるため、極めて線維を形成しにくい性質であり、その結果、F 型 apoA-II マウスが発症抵抗性を示すと考えられた。また、apoA-II の 54 番目の F 型アミノ酸置換体では線維形成を抑制しなかったが、これは C 型 apoA-II とは塩基性アミノ酸同士の置換であり、分子特性に大きな変化を与えなかったことに因ると推察される。以上の結果より、apoA-II は、少なくとも 9、16 と 62 番目のアミノ酸側鎖が線維形成に重要な意味を持つと考えられる。

線維形成最小配列を含むペプチドから 4°C で作

製したアミロイド線維を用い、アミロイド線維投与に高い感受性を示す *Apoa2^cTg³* にアミロイドーシスを誘発することに成功した。4°C 生成線維は、AApoAII に類似の形態を持ち、各種タンパク質変性操作に対して線維構造を失いやすい性質を示した。このような脆弱な構造を持つ線維がより強い線維沈着促進 (伝播) 力を持つ現象は、チーターの糞中 AA タンパク質や酵母プリオンでも報告されている^{4,5)}。しかし、ペプチド由来線維の伝播力は天然アミロイド線維に比較すると弱く、線維形成コア領域以外の配列 (全長タンパク質) や未知の生体内物質との相互作用が伝播力の増大に必要と考えられる。

今後は、アミロイドーシス関連タンパク質の線維形成コア領域におけるアミノ酸分子の結合様式や他因子との相互作用の解析、線維形成阻害物質の探索等が必要で、本研究手法は *in vitro*、*in vivo* の両面から解析可能な、非常に有用な試験系と考えられる。

参考文献

- 樋口京一。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。アミロイドーシスに関する調査研究班 平成 19 年度分担研究報告書 22-27 : 2008.
- 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。アミロイドーシスに関する調査研究班 平成 19 年度分担研究報告書 28-32 : 2008.
- 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 (*Apoa2^c*). *Lab Invest* 87:633-643, 2007.
- Zhang B, Une Y, Fu X, Yan J, Ge F, Yao J, Sawashita J, Tomozawa H, Kametani F, Higuchi K: Fecal translation of AA amyloidosis in the cheetah contributions to high incidence of disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 105:7263-7268, 2008.
- Tanaka M, Collins SR, Toyama BH, Weissman JS: The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 442:585-589, 2006.

E. 結論

マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)をモデル疾患とし、アミロイドーシス関連タンパク質 apoA-II の線維形成機序ならびに伝播に関する研究を、我々が開発した *in vitro*、ならびに *in vivo* の解析システムを用いて行った。その結果、1) apoA-II の 9、16、62 番アミノ酸が線維形成に特に重要であること、2) 合成ペプチドから伝播能が異なる 2 種の線維の作製に成功した。本システムでアミロイドーシス関連タンパク質の線維形成機序や伝播機序を解析することにより、予防・治療策構築の基盤データ収集が可能になると期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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 gene: critical role and functional polymorphism of a cis-acting element. *J Heredity* 99:355-363, 2008.
- Zhang B, Une Y, Fu X, Yan J, Ge F, Yao J, Sawashita J, Tomozawa H, Mori M, Kametani F, Higuchi K: Fecal transmission of AA amyloidosis in the cheetah contributions to high incidence of disease. *Proc Nat Acad Sci* 105:7263-7268, 2008.
- Yoshida T, Zhang P, Fu X, Higuchi K, Ikeda S: Slaughtered aged cattle might become one dietary source exhibiting amyloid enhancing factor activity. *Amyloid*, in press.
- Higuchi K, Fu X, B Zhang, 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. pp253 - 267. Research SignPost, India, 2008.
- 樋口京一: アミロイドモデル動物。『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) p.95-100, アドスリー(丸善), 2008.
- 樋口京一: 分子シャペロンとアミロイドーシ

ス。分子細胞治療 7:318-323, 2008.

7) 樋口京一: アミロイドーシス. 蛋白質 核酸 酵素 53: 907, 2008.

8) 樋口京一, 張 蓓茹, 宇根有美, 亀谷富由樹, 澤下仁子, 森 政之: チーターのアミロイドーシスはプリオンのように伝播するか? *Dementia Japan* 22: 207-214, 2008.

9) 樋口京一: チーターのアミロイドーシス: アミロイドーシスはプリオンのように伝播するか? *信州医誌*, (印刷中).

2. 学会発表

1) 銭金澤, 巖景民, 張蓓茹, 葛鳳霞, 澤下仁子, 友澤寛, 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. 松本, 6.13, 2008.

2) 長谷川寛, 竹内正義, 付笑影, 葛鳳霞, 張蓓茹, 友澤寛, 森政之, 澤下仁子, 樋口京一: AApoAII と AA アミロイドタンパク質の糖化最終産物 AGEs による修飾. SAM 研究協議会第 23 回研究発表会, 京, 7.17, 2008.

3) アミロイドーシスの発症要因としての“伝播” 日本プロテオーム機構第 6 回大会, 大阪, 7.26, 2008.

4) 張鵬堯, 張蓓茹, 付笑影, 吉田拓弘, 池田修一, 樋口京一: 屠殺された高齢牛はアミロイド促進因子活性を持つ食品となる可能性がある. 第 3 回臨床ストレス応答学会, 秋田, 11.14, 2008.

5) Keiichi Higuchi: Molecular mechanism or transmission of amyloidosis. “Life science against intractable diseases”. The Joint Symposium of the 4th International Symposium of Institutes Network and Osaka University Global COE Symposium. Osaka, 2.1, 2008.

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

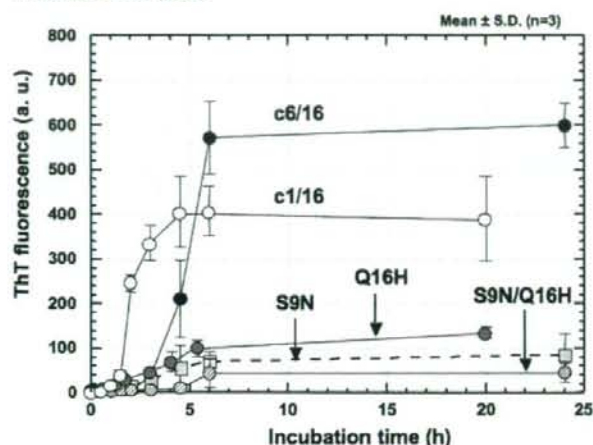
2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

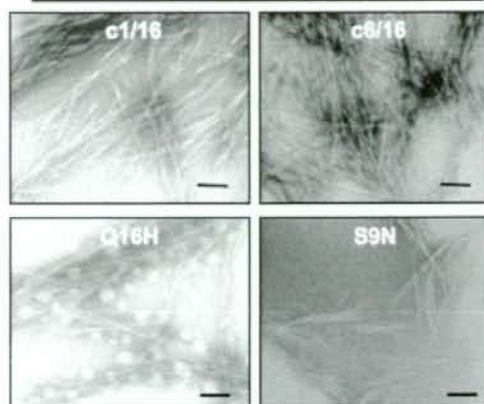
マウスapoA-IIの線維形成配列におけるアミノ酸の相違

	1	6	9	16	...	48	54	62	65	...																													
C型	Q	A	D	G	Q	D	M	Q	S	L	F	T	Q	Y	F	Q	...	Q	L	T	P	L	V	R	S	A	G	T	S	L	V	N	F	F	S	...			
F型	N	H

N末配列の検討

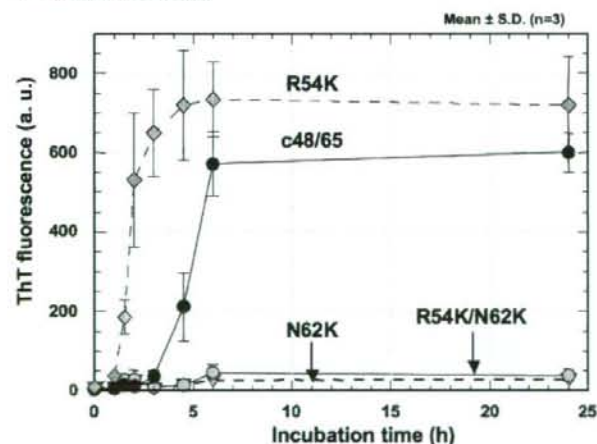


c48/65 +

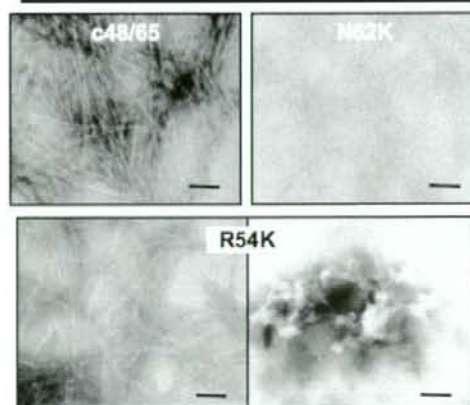


Scale bar; 100 nm

C末配列の検討



c6/16 +



Scale bar; 100 nm

図1 apoA-IIのアミロイド線維形成における主要アミノ酸の決定

C型apoA-IIの線維形成配列のうち、9、16、62番をF型apoA-IIのアミノ酸に置換したペプチド(S9N、Q16H、N62K)の重合反応はC型同士の反応(c1/16、c6/16、c48/65)よりも抑制され、線維形成量も減少した(N62Kは全く形成されない)。54番目のアミノ酸置換体(R54K)は重合反応が進行して線維が形成されたが、不定形な構造体も形成していた。

F型apoA-IIのN末ペプチド(S9N/Q16H)とC型apoA-IIのC末ペプチドを反応させても線維は形成せず、逆も同様だった。

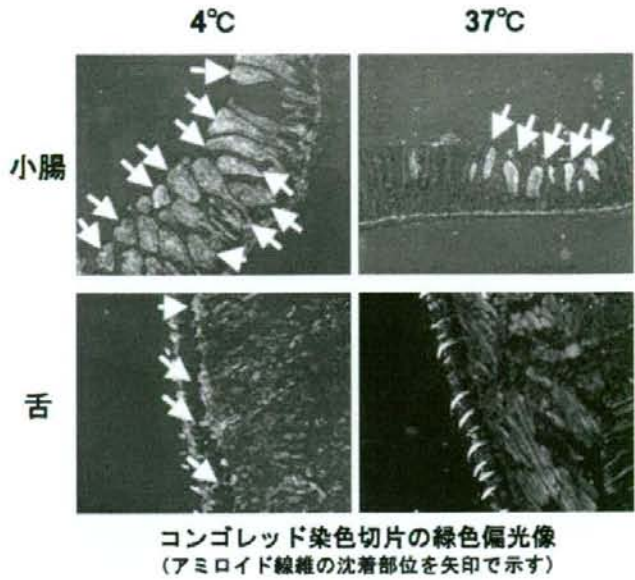
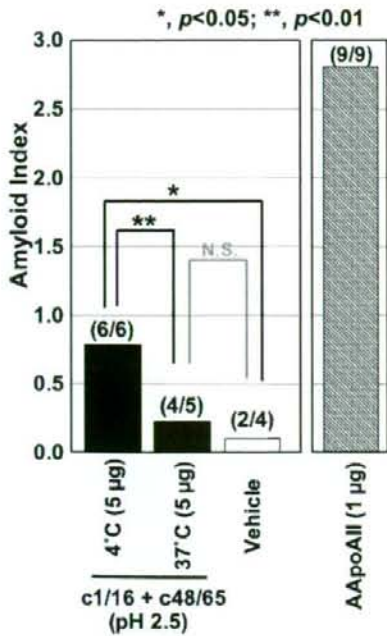


図2 合成ペプチド由来アミロイド線維の線維沈着促進効果

4°C生成線維投与3ヶ月後のApoa2^{Tg}マウスの線維沈着程度は37°C生成線維よりも有意に高く(左図)、小腸や舌に多量に沈着していた(右図)。

AApoAIIによる誘発実験: F Ge et al. Lab Invest '07: 87(7):pp. 633-643.

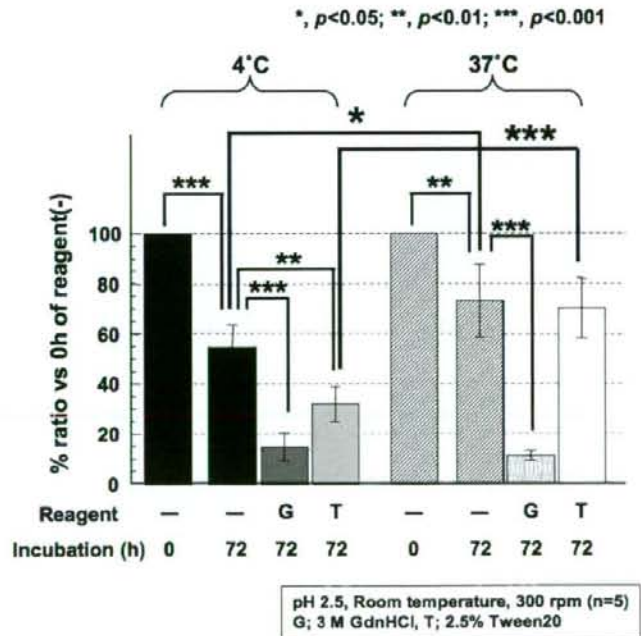
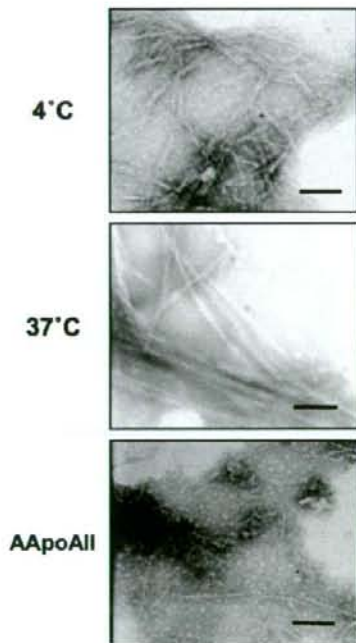


図3 合成ペプチド由来アミロイド線維の性状

線維沈着促進効果を有する4°C生成線維はAApoAIIと形態が類似し(左図)、37°C生成線維よりもタンパク変性操作に対して感受性を示した(右図)。

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

牛アミロイド投与によるウサギ AA アミロイドーシスモデルの開発

研究分担者 松井高峯 帯広畜産大学基礎獣医学部 (家畜病理学)

共同研究者 古林与志安、村上智亮、渡邊謙一*、堀内雅之**

*帯広畜産大学基礎獣医学部 (家畜病理学)、**動物医薬品検査所、

研究要旨 飛節潰瘍罹患ウサギにアジュバント等による炎症刺激と伴に牛アミロイドを投与するとアミロイドーシスを誘発することが報告されている。ウサギに飛節潰瘍を人為的に作成し、ウサギにおけるアミロイドーシス発症モデル動物開発の可能性を試みた。足底部の剃毛等により飛節潰瘍に類似した病態を作成することはできたが、アミロイドーシスの誘発までには至らなかった。アミロイドーシス誘発に対しては飛節潰瘍 (自然発生) 病変部よりの菌分離を含め更なる検討が必要と思われた。

A. 研究目的

アミロイドーシスの発症機構解明のためには均一で質の高いモデル動物の開発が求められる。飛節潰瘍罹患ウサギに炎症刺激を加えた後、牛のアミロイドを投与すると高率にアミロイドーシスを作成できる。しかしながら、飛節潰瘍罹患ウサギの入手は容易でないことより、自然発生の飛節潰瘍罹患ウサギと同様な条件を人工的に作出することを試みた。

B. 研究方法

ウサギの足底部の被毛を剃毛あるいは除毛し、飛節潰瘍形成を促進する。経過観察の後、飛節潰瘍形成ウサギにフロイントコンプリートアジュバント等による炎症刺激を行う。炎症刺激後、牛アミロイドを投与し2日後に病変形成を病理学的に検索する。

飛節潰瘍 (自然発生) 病変部から菌分離を行い菌の同定を行う。分離同定菌をアジュバントに混合し、正常 (飛節潰瘍非罹患) ウサギに接種し、炎症刺激を行う。その後、牛アミロイドを投与し病理学的に検索する。

(倫理面への配慮)

以上の実験は帯広畜産大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

足底部の剃毛等により飛節潰瘍に類似する病態を作成することができた (図1) が、飛節潰瘍誘発健全ウサギにアミロイドーシスを誘発するまでには至らなかった (0/8)。しかしながら実験開始時に飛節潰瘍病変を有しており、より重度の飛節潰瘍誘発ウサギの2匹 (2/9) で脾臓におけるアミロイドーシスの誘発が認められた (図2)。アミロイドーシス誘発2例の飛節潰瘍病変部より *staphylococcus* spp. と *streptococcus* spp. が分離された。

D. 考察

飛節潰瘍を人為的に作成する技術的問題は解決された様に思われるが、自然発生の飛節潰瘍病変との比較検討が必要と思われた。又、人為的な飛節潰瘍形成とコンプリートアジュバントの組み合わせのみではアミロイドーシスの誘発は難しいと思われ、今後病巣よりの分離菌との混合接種による実験が必要と思われる。

E. 結論

健全ウサギに飛節潰瘍を人為的に作成し、牛アミロイドを投与したがアミロイドーシスを誘発することはできなかった。分離菌を用いてアジュバントの作成は学内規則の関係より今回はできなかった。今後、分離菌をアジュバントとして用

い検討する必要があると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Horiuchi N, Kotani Y, Koga M, Yamada M, Kobayashi Y, Matsui T: Experimental induction of amyloidosis by bovine amyloid fibrils in Sore Hock rabbits. *Amyloid* 15:84-88, 2008.

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 足底部除毛により作成した飛節潰瘍

飛節潰瘍の判定

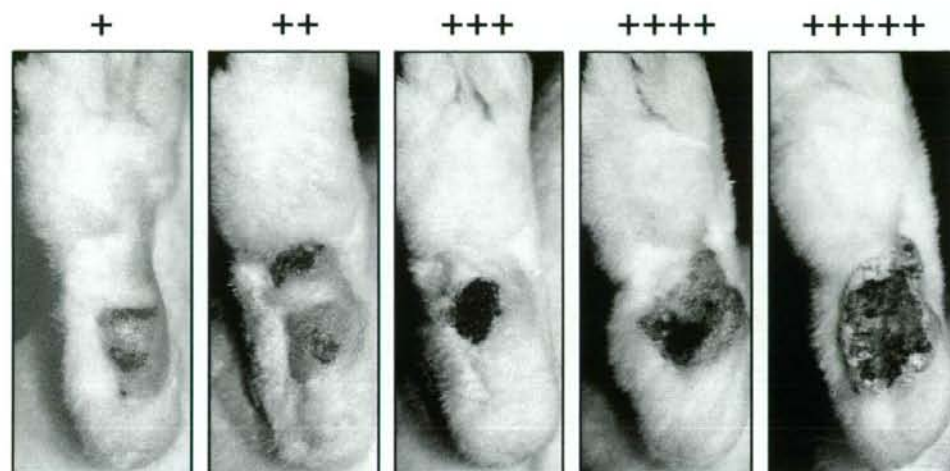


図2 実験の結果

結果：SHの程度およびアミロイド沈着の記録

アミロイド投与後	搬入時のSH	解剖時のSH	脾臓	腎臓
2	+	++	-	-
2	+	++	-	-
2	++	+++++	-	-
2	+	+++	-	-
2	+	+++	-	-
2	-	+	-	-
2	-	+++	-	-
2	-	+++++	-	-
2	-	+++++	-	-
3	+	+	-	-
3	+	+++	-	-
3	+	+++++	++	-
3	++++	+++++	+++	-
3	-	+++	-	-
3	-	++++	-	-
3	-	++++	-	-
3	-	++++	-	-

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 アミロイドーシスの病因・診断に関する研究

研究分担者 山田俊幸 自治医科大学 臨床検査医学

共同研究者 佐藤純司*、奥田恭章**

*自治医科大学 臨床検査医学、**同道後温泉病院リウマチセンター

研究要旨 AA アミロイドーシス診断に胃十二指腸生検による組織診断の有用性が確立されているが、生検部位によって沈着程度に差が見られることをよく経験する。そこで生検試料中のAA蛋白を定量することが組織診を補完しうることを提唱したが、今回はアミロイドーシス既診断例を対象に、生検部位による差異について検討した。AA 定量値は十二指腸球部>同第2部>胃前庭部となり、十二指腸部の優位性が確認された。また組織診で陰性でもAA測定では定量される、つまり陽性となる例が多く、アミロイドーシス経過観察においても本定量法の有用性が示唆された。

アミロイドーシスの病因として前駆蛋白の安定性が重要であることをうけ、SAAとその会合体であるHDLとの親和性をSAA1アイソタイプ別に調べた。分析には表面プラズモン解析を利用した装置BIAcoreを使い、固相化されたリコンビナントSAA1アイソタイプと正常HDLとの親和性を解析した。親和性の高い順に、SAA1.5>SAA1.1=SAA1.3となり、SAA1.5で血中濃度が高くなる臨床的観察に符号したが、アミロイドーシス促進的であるSAA1.3と、防御的であるSAA1.1との間にHDL親和性に差異はなく、amyloidogenesisには他の因子の関与も重要であると考えられた。

A. 研究目的

①胃十二指腸生検試料中のAA定量によるAAアミロイドーシス診断：昨年度、胃十二指腸生検試料のAA定量によりAAアミロイドーシスを診断できる可能性を示した。今回は生検の至適部位の選択、アミロイド沈着の分布をみる目的で生検の部位3箇所におけるAA定量値を比較した。②分子間相互作用解析による各rSAAアイソタイプとHDLの親和性解析：AA amyloidogenesisにおいて前駆体SAAの血中安定性は重要な因子である。SAAは血中ではHDLに会合している。一昨年度、表面プラズモン共鳴解析装置BIAcoreにおけるrSAAとヒトHDLとの結合親和性解析の条件につき報告した。今回は各rSAAアイソタイプとHDLの親和性を定量比較した。

B. 研究方法

①胃十二指腸生検試料中のAA定量

1. 対象

道後温泉病院通院または入院中の関節リウマ

チ患者で既にアミロイドーシスと診断されている15例を対象とした。

2. 分析方法

胃前庭部(GA)、十二指腸球部(DB)、十二指腸第2部(D2)の生検試料を昨年の報告通りに4Mグアニジン塩酸、0.1M Tris、pH 8.2に浮遊させ、10秒間超音波処理した後、室温で一晩、振盪した。この溶液につきSAA定量用の高感度サンドイッチELISAでSAA濃度として測定した。別にcongo red染色標本でアミロイド沈着量のスコア化(0~3)を行った。

3. 倫理面への配慮

通常の内視鏡生検時の組織片を利用するものであることを患者に説明し、了解を得てから実施された。本研究は自治医科大学、臨床研究倫理審査委員会の承認が得られている。

②SAAアイソタイプとHDLの親和性解析

1. 分析方法

実験はBIAcore 2000を用いて行われた。大腸菌で発現、精製された各ヒトrSAA(SAA1.1、SAA1.3、

SAA1.5) をセンサーチップ CM5 に固定化し、正常 HDL を流路に添加した。非特異凝集を抑制するため Tween20 の存在下で結合実験を行ったが、解離が速い反応であったため、kd の算出には親和性解析を用いた。

2. 倫理面への配慮

使用した HDL は研究者本人のものであったため、倫理面の配慮は特に必要としない研究と判断した。

C. 研究結果

①胃十二指腸生検試料中の AA 定量

部位の平均では AA 値 (ng/mg protein) で DB(1,030)>D2(605)>GA(302)、スコアで D2(1.87)>DB(1.73)>GA(1.33)、と十二指腸部の優位性が確認された (図1)。

②SAA アイソタイプと HDL の親和性解析

算出された kd の平均は、 $rSAA1.5 ; 4E^{-06} > rSAA2.1 ; 6E^{-06} > rSAA1.1 ; 1E^{-05} > rSAA1.3 ; 2E^{-05}$ となった (図2)。

D. 考察

①上部内視鏡生検による AA アミロイドーシス診断には十二指腸部の陽性率が高いことが組織学的検索で示されていたが、今回の AA 定量による検討でも同じことが再確認された。スコアと同様に AA 値も同一患者内でバラツキを示したが、スコア 0 でも陽性に定量される例が多く、組織診が過小評価している印象ももたれた。昨年度からの検討も併せると、本定量法はアミロイドーシス有無のスクリーニングだけでなく、経過観察例におけるアミロイド沈着量の推移の判定にも有用と考えられた。

②HDL との親和性では SAA1.5 が高く、このタイプでは SAA の血中濃度が高くなりやすいので、それを裏付ける所見と考えられた。アミロイドーシス促進の SAA1.3 と防御的である SAA1.1 との間に HDL 親和性に差異はなく、amyloidogenesis には他の因子の関与も重要であると考えられた。本解析法は SAA の生体内代謝を説明可能と思われ、引き続き SAA と他因子の結

合親和性を検討していきたい。

E. 結論

①上部消化管内視鏡生検試料中の AA 定量は AA アミロイドーシスの経過観察に有用で、部位は十二指腸が望ましい。②SAA と HDL の親和性は血中 SAA 濃度に影響しているが、amyloidogenesis には更なる因子の関与が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) van der Hilst JC, Yamada T, Op den Camp HJ, van der Meer JW, Drenth JP, Simon A: Increased susceptibility of serum amyloid 1.1 to degradation by MMP-1: potential explanation for higher risk of type AA amyloidosis. *Rheumatology* 47:1651-1654, 2008.

2. 学会発表

- 1) 山田俊幸, 奥田恭章: 生検消化管粘膜でのアミロイド A 定量の試みと診断的意義. 第 52 回日本リウマチ学会学術集会, 札幌, 4.23, 2008.
- 2) 佐藤純司, 山田俊幸: 表面プラズモン共鳴による SAA (血清アミロイド A) と HDL の親和性の検討. 第 48 回日本臨床化学学会年次学術集会, 浜松, 8.30, 2007.
- 3) 山田俊幸, 奥田恭章: AA アミロイドーシスにおける消化管生検試料中のアミロイド A 定量の評価. 第 55 回日本臨床検査医学会総会, 名古屋, 11.28, 2008.

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

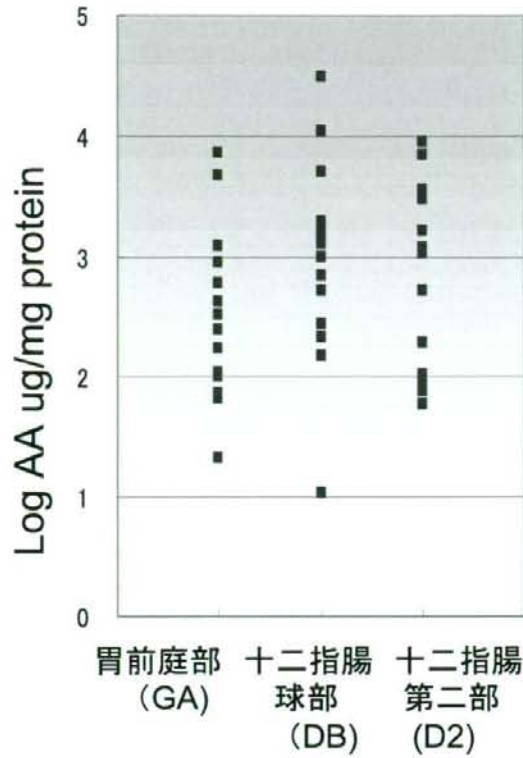


図1 生検試料中のAA定量値

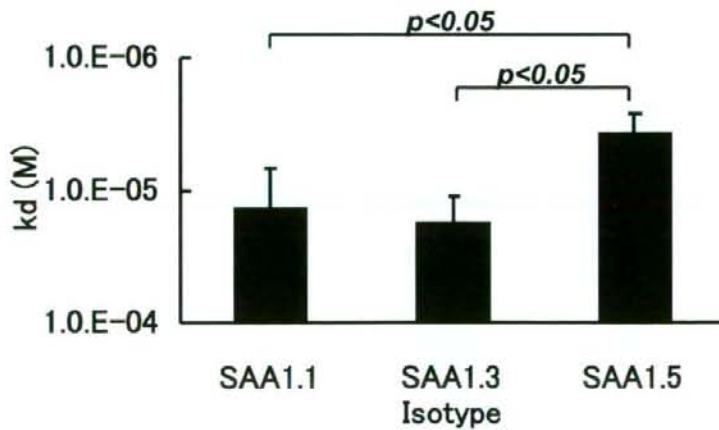


図2 SAAとHDLの親和性、SAA1アイソタイプ間の比較

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 アミロイドーシスにおける疾患感受性の検討—ageing を中心に—

研究分担者 奥田恭章 道後温泉病院リウマチセンター内科

共同研究者 山田俊幸 自治医科大学臨床検査医学

研究要旨 高齢の急性期蛋白 (SAA など) は若年より高く反応することが動物実験より知られている。本院の AA アミロイドーシス合併関節リウマチ (RA) 症例における ageing の AA アミロイドーシス発症に及ぼす影響を検討した。2008 年 10 月末までに当院で生検診断した AA アミロイドーシス合併 RA のうち 20 歳以降に RA を発症した 388 例を調査対象とし、1. RA 発症年齢、2. アミロイドーシス診断までの罹病期間、3. 性差、4. SAA1 exon3 多型 (144 症例) を検討した。RA 発症年齢とアミロイドーシス診断までの罹病期間の平均年数は、10 歳毎に区切った検討において年代を増すにしたがって短くなっていった。RA 発症年齢と診断までの罹病期間との相関は -0.675 ($p < 0.0001$) であった。性比は RA 全体では男性 785 例、女性 3157 例 (1 : 4.02) であるのに対して、アミロイドーシス群は男性 43 例、女性 346 例 (1 : 8.05) と女性が有意に高頻度であった ($p < 0.0001$)。しかし、アミロイドーシス合併 RA の発症年齢の平均は、男性 50.7 歳、女性 47.3 歳と男性で高齢の傾向を認めた ($p = 0.096$)。アミロイドーシス発症までの期間の平均は男性 14.9 年、女性 18.0 年と男性がより早期に発症していた ($p = 0.06$)。SAA1 exon3 多型の検討では、SAA1.3+群 (105 例) のアミロイドーシス発症までの罹病期間は平均 17.9 年、SAA1.3-群 (39 例) の同期間は平均 24.6 年で有意に+群で短かった ($p = 0.0011$)。SAA1.3+群 (105)、SAA1.3/1.3 群 (31) について RA 発症年齢と診断までの罹病期間について検討したところ、ともに全体の AA アミロイドーシス症例と同様に診断までの罹病期間は年代を増す毎に短くなっていった。以上より、Ageing は、成人発症 RA において AA アミロイドーシス発症の独立した重要な risk factor であると考えられた。

A. 研究目的

高齢の急性期蛋白 (SAA など) は若年より高く反応することが動物実験より知られている。また、高齢化に伴う SAA 分解、処理能力の低下も証明はされていないものの、可能性として想定される。本院の AA アミロイドーシス合併 RA 症例において、ageing の AA アミロイドーシス発症に及ぼす影響を他の risk factor と共に検討した。

B. 研究方法

対象：2008 年 10 月末までに当院において生検により診断された AA アミロイドーシス 396 例について、20 歳以降に RA を発症した 388 例を調査対象とした (200 例生存、188 例死亡)。

方法：1. RA 発症年齢、2. AA アミロイドーシス診断までの罹病期間、3. 性差、4. SAA1 exon3 多型 (144 症例) を調査し、ageing と他の risk factor

を層別化し、検討を行った。

(倫理面への配慮)

SAA1 exon3 多型の解析は、当院倫理委員会で承認された同意書を用い、インフォームドコンセントを得た後に採血、解析を行った。

C. 研究結果

① RA 発症年齢と AA アミロイドーシス診断までの罹病期間の平均年数：20 歳代 (47 例) ; 30.6 年、30 歳代 (65 例) ; 23.0 年、40 歳代 (91 例) ; 19.0 年、50 歳代 (115 例) ; 13.5 年、60 歳代 (47 例) ; 10.2 年、70 歳代 (23 例) ; 6.2 年と年代を増すにしたがって診断までの罹病期間は短くなった (図 1)。また、RA 発症年齢と罹病期間 10 年以内の AA アミロイドーシス発症率は、年齢を増すと共に増加した (図 2)。RA 発症年齢と診断までの罹病期間との相関は

-0.675 ($p < 0.0001$) であった (図3)。

②性差の検討：性比はRA全体では男性785例、女性3157例 (1 : 4.02) であるのに対して、アミロイド群は男性43例、女性346例 (1 : 8.05) と女性が有意に高頻度であった ($p < 0.0001$)。しかし、アミロイド合併RAの発症年齢の平均は、男性50.7歳、女性47.3歳と男性で高齢の傾向を認めた ($p = 0.096$)。アミロイド発症までの期間の平均は男性14.9年、女性18.0年と男性がより早期に発症していた ($p = 0.06$)。SAA1.3アリの頻度は、男性72.7%、女性71.2%と同等であった。

③SAA1 exon3多型の検討：SAA1.3+群 (105例) のアミロイド発症までの罹病期間は、平均17.9年、SAA1.3-群 (39例) の同期間は平均24.6年で有意に+群で短かった ($p = 0.0011$)。SAA1.3+群 (105)、SAA1.3/1.3群 (31) についてRA発症年齢と診断までの罹病期間について検討したところ、ともに全体のアミロイド症例と同様に20歳以降発症のRAは診断までの罹病期間は年代を増す毎に短くなっていった (図4、図5)。

D. 考察

今回の我々の多数例のAAアミロイドーシス合併RA症例での検討では、ageingは、他のrisk factorに影響されない強い独立したアミロイド発症のrisk factorであることが示された。動物実験では、ageingにより急性期反応が増強され、結果的にアミロイドーシスになりやすいことを示したHusらの報告や、人においてもインフルエンザに罹った場合に老人のほうがCRPやSAAの反応がより高いという報告がある。また、Yokotaらは、正常高齢マウスの臓器抽出物がAmyloid enhancing factor(AEF)の効果を示し、若年マウスのアミロイドーシスを誘導しやすくし、ageingでの臓器環境がアミロイドーシス発症に促進的に働くことを間接的に示唆させることを報告している。今回の我々のrisk factorの検討では、性差、すなわち女性がアミロイドーシス群で有意に高頻度であることを報告したが、男性がよりRAに関して高齢発症であり、アミロイド発症までのRA罹病期間が逆に短いことから、ageingが性差の有意差を生じさせた大きな要因である可能性も示唆させる結果が得られた。したがって、純粋にAAアミロ

イドーシスのrisk factorとして抽出されるのは、ageingとSAA1 exon3多型と考えるのが妥当であると思われる。一方、治療的側面から考えるとAAアミロイドーシス発症予防の観点からは、高齢発症のRAに対しては強力な免疫抑制、炎症コントロールが必要であるということになるが、臓器機能低下を来していることが多い高齢症例には感染症などの合併症に対して細心の注意を払いながら治療を行うことが非常に重要であると思われる。

E. 結論

Ageingは、20歳以降発症のRAにおいてAAアミロイドーシス発症における独立した重要なrisk factorであると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuaki Okuda: Review of Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis. *Biologics: Targets & Therapy* 2:75-82, 2008.
- 2) 奥田恭章：関節リウマチ検査・診療の新展開 6. 関節リウマチ患者の重要な合併症—AAアミロイドーシス. *Medical Technology* 36:54-57, 2008.
- 3) 竹林匡史, 奥田恭章：抗IL-6自己抗体と再発性皮膚感染症. *リウマチ科* 40:655-658, 2008.

2. 学会発表

- 1) 奥田恭章, 大西誠, 的場謙一郎, 城山一男, 山田明弘, 竹林匡史, 澤田直哉, 高杉潔, 山田俊幸: AAアミロイドーシス合併関節リウマチに対する抗サイトカイン療法の有用性. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会, 札幌, 4.20-23, 2008.

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. AAアミロイドーシス診断までの罹病期間

(n = 388)

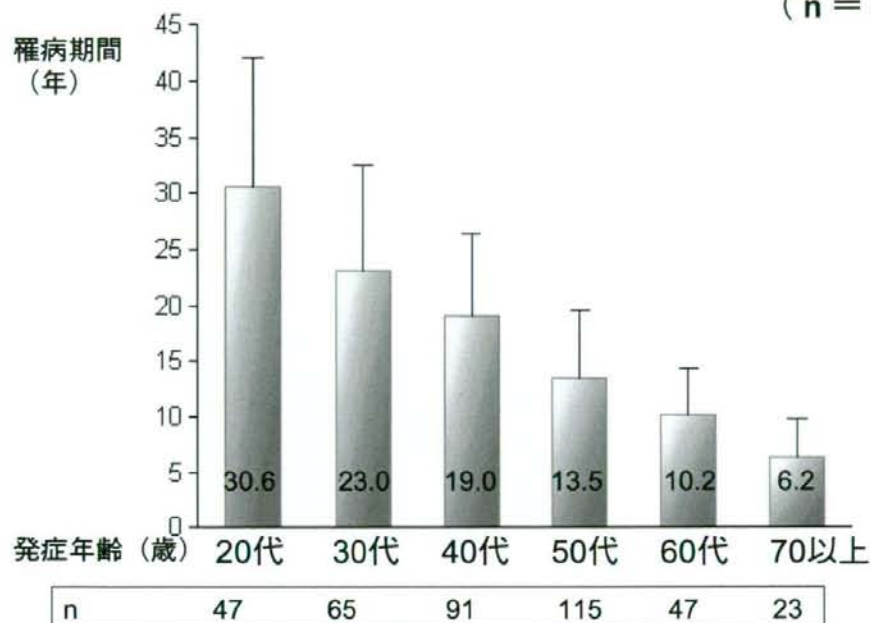


図2. RA発症年齢と罹病期間10年以内のAAアミロイドーシス発症率 (n = 388)

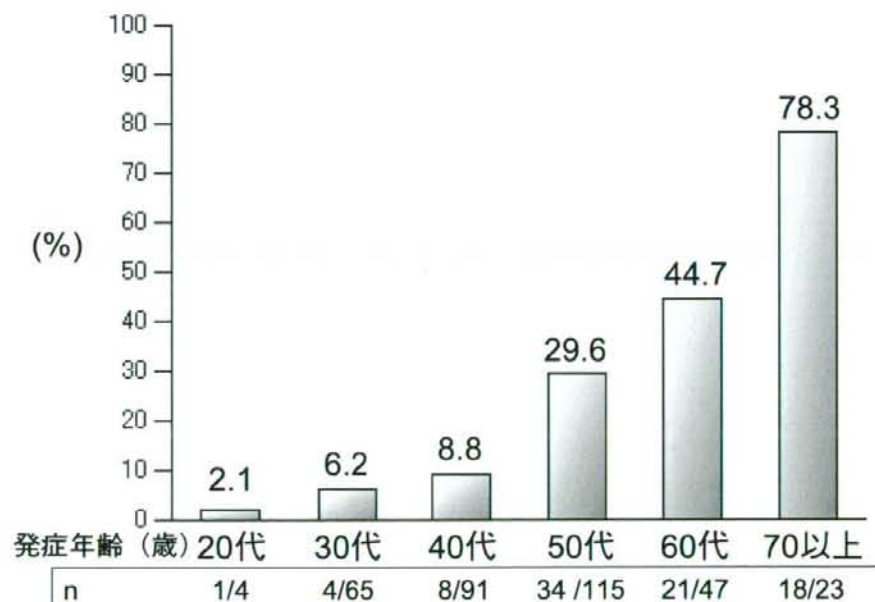


図3. RA発症年齢とAAアミロイドーシス診断期間の相関

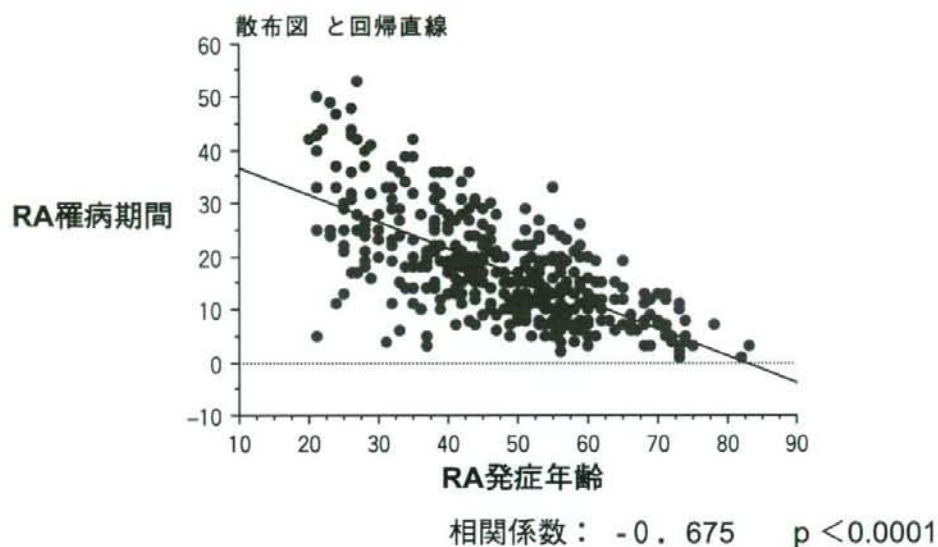


図4. SAA1 1.3 +症例におけるRA発症年齢とAAアミロイドーシス診断までの期間 (n = 105)

