

図2. Case 7の臨床経過

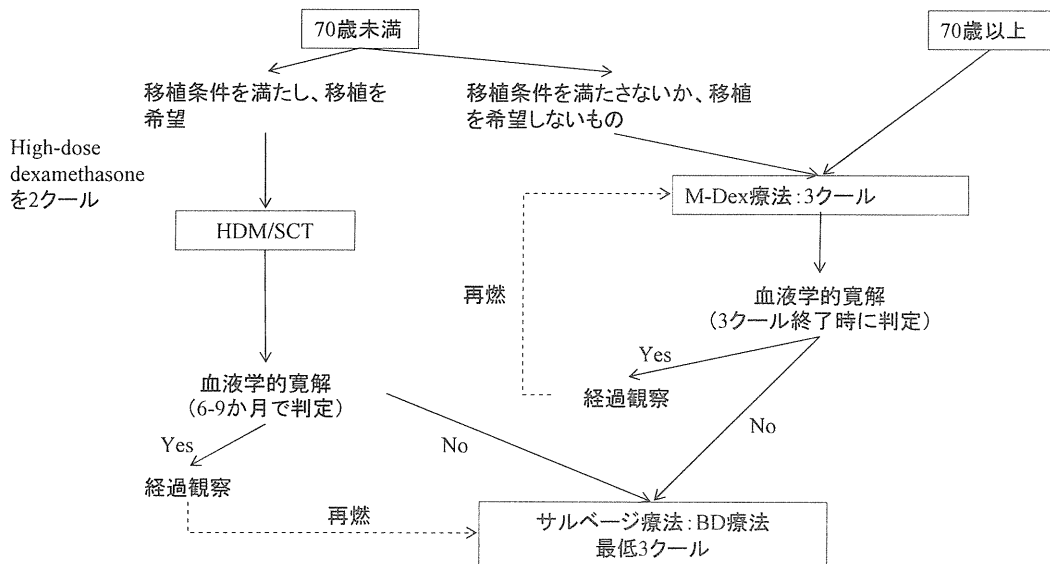


図3. 当科におけるALアミロイドーシスの新治療方針

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

マウスアポリポタンパク質 A-I の欠損はアポリポタンパク質 A-II の再分配と AApoAII アミロイドーシスの悪化を伴う

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 王 耀勇、澤下仁子、錢 金澤、張 蓓茹、田 耕、陳 磊、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 血清高密度リポタンパク質 (HDL) のアポリポタンパク質の多くは、アミロイド線維を形成するなど、アミロイドーシスの発症に重要な役割を果たすことが知られている。特に ApoA-I は HDL の主要なアポリポタンパク質として心血管疾患に対する防御効果が報告されてきたが、最近、A β アミロイド線維の形成及び沈着を抑制することが報告されている。ApoA-I のノックアウトマウス (*Apoa1*^{-/-}) を用いて、HDL の代謝や、ApoA-II が沈着するマウス老化アミロイドーシス (AApoAII) への効果を解析した。2 ヶ月齢の C57BL6/J (WT) と *Apoa1*^{-/-}マウスの尾静脈に AApoAII アミロイド線維を投与し、アミロイドーシスを誘発した。*Apoa1*^{-/-}マウスでは、2 ヶ月齢で HDL コレステロールが著しく減少し、ApoE が増加したが、その後、加齢に伴い、apoA-II と HDL コレステロールが有意に増加した。また、加齢に伴い、apoA-II、コレステロールが HDL3 から分子量の大きい HDL1 に再分配した。全身の AApoAII アミロイド沈着量は WT マウスに比較して有意に増加したが、特に心臓での沈着増加が顕著であった。アミロイドーシスの促進の原因のひとつとして、ApoA-II mRNA 発現量が *Apoa1*^{-/-}マウス肝臓で加齢に伴い増加し、心臓で約 5 倍の増加が観察された。また、重篤なアミロイドーシスは、血漿 apoA-II やコレステロール濃度の減少を引き起こした。これらの結果より、ApoA-I は血漿 ApoA-II やコレステロールの各リポタンパク質分画への再分配の調節作用を持ち、AApoAII アミロイドーシスの発症に重要な役割を果たすことが示唆された。

A. 研究目的

血清高密度リポタンパク質 (HDL) の主なアポリポタンパク質は、apoA-I (約 70%) と apoA-II (約 20%) である。ApoA-I はすべての脊椎動物に存在し、コレステロール逆輸送の促進や、酸化ストレスの抑制による心血管疾患に対する防御効果が報告されてきた。ApoA-II は、ヒト、齧歯類、魚類にのみ HDL3 分画に A-I/A-II HDL として存在し、HDL の維持、高脂血症の誘導、炎症やインスリン抵抗性の促進等の機能を持つことが報告されている。また、ApoA-II はマウス老化アミロイドーシス (AApoAII) のアミロイドタンパク質である。最近、ApoA-I の新たな機能としてアルツハイマー病での A β 線維の形成、沈着を抑制することが報告されているが、ApoA-I と ApoA-II の相互作用については不明な点が多く残されて

いる。本研究では、apoA-I 欠損 (*Apoa1*^{-/-}) マウスを用いて、apoA-II やその他のアポリポタンパク質の加齢に伴う変化や、HDL などへの再分配 (redistribution) を検討し、AApoAII アミロイドーシスへの影響を解析した。

B. 研究方法

マウス: *Apoa1*^{-/-}マウスは Jackson Laboratory より購入し、信州大学で繁殖/飼育した。雌マウスに 5.6 % 脂肪含有飼料を自由摂取させた。アミロイドーシスの誘発: 2 ヶ月齢の C57BL6/J (WT)、*Apoa1*^{-/-}マウスの尾静脈に AApoAII アミロイド線維を投与後、2 ヶ月と 4 ヶ月後に屠殺し、アミロイド沈着程度を解析した。HDL、リポタンパク質分析: AApoAII 投与後 0、2、4 ヶ月のマウス (2、4、6 ヶ月齢に相当) から絶食後に血漿を採

取した。① 血漿及び HPLC で分離した各リポタンパク質分画の総及び HDL コレステロール、トリグリセリドを定量した。② Sudan Black B で染色した血漿を native-PAGE で分離して HDL の分布を調べ、Western blot 法によって ApoA-I、A-II、E、A-IV、C-II の分布を調べた。③ SDS-PAGE / western blot 法によって ApoA-I、A-II、E 濃度を定量した。④ 2、6 ヶ月齢の WT、*Apoa1*^{-/-}マウスの肝臓と心臓から総 mRNA を分取し、RT-PCR と real-time-PCR により *Apoa2* mRNA 発現量を調べた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換えマウスを用いた動物実験に関しては、研究計画書を信州大学遺伝子組換え等安全委員会へ提出し、学長の承認を受けた後に、決められた実験施設で組換え遺伝子の拡散防止に注意しながら研究を実施した。(承認番号 08-024, 09-019 等)。また、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て実施した(承認実験計画 No. 190007, 210029, 220003, 230040, 実施動物実験室 No. 192011)。

C. 研究結果

① *Apoa1*^{-/-}マウスでは、2ヶ月齢で総及び HDL コレステロール、トリグリセリドが WT マウスより著しく減少したが、ApoA-II は軽度減少し、ApoE は約 2 倍に増加した。その後、加齢に伴い、ApoA-II、総及び HDL コレステロール、トリグリセリドが有意に増加した。ApoE は変化しなかった。② 加齢に伴い、ApoA-II 及びコレステロールが HDL3 から分子量の大きい HDL1 に再分配した(図 1)。③ アミロイド線維投与後、全身のアミロイド沈着量が有意に増加したが、特に心臓での沈着増加が顕著であった(図 2)。④ 肝臓の *Apoa2* mRNA の発現量が加齢に伴い増加した。心臓での *Apoa2* mRNA の発現量は肝臓に比較すると軽微であるが、WT マウスに比較して約 5 倍に増加した。⑤ 重篤な AApoAII アミロイドーシスは血漿 ApoA-II やコレステロール濃度の減少を引き起こした。

D. 考察

コレステロールやトリグリセリド等の脂質と

HDL を形成する ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoC-II、ApoE、SAA などのアポリポタンパク質は、脂質代謝調節などの生理的機能とともに、多くのアミロイドーシスにおいて、アミロイド線維としての沈着や、発症の抑制効果が報告されている。これらのアポリポタンパク質が HDL 粒子の中でどのように相互作用し、アミロイドーシスの発症に関与するかを明らかにすることは、アミロイドーシスの治療や予防法の開発に有意義である。特に、ApoA-I と ApoA-II は主要な HDL アポリポタンパク質としての多様な機能とアミロイド線維としての沈着が報告されているが、その相互作用に関しては解析されてこなかった。本研究では、ApoA-I の欠損により、一旦 HDL が減少し、その後、加齢に伴い増加すること、さらに HDL の粒子径が増大することが明らかになった。このような加齢に伴う濃度と大きさの増大は、ApoA-II の発現量の増加や、HDL の取り込みの減退が考えられる。このような ApoA-II の濃度増大、HDL 中の脂質含量の増大、HDL の代謝遅延等が原因となって AApoAII アミロイドーシスの発症が促進したと考えられるが、ApoA-I の直接的な線維形成抑制効果の消失も考えられる。アミロイドーシス発症の機構の解明には、より詳細な解析が必要である。また、特に心臓へのアミロイド沈着の増大は興味深い。また、*Apoa1*^{-/-}マウス心臓での ApoA-II の発現量の増大(約 5 倍)が原因なのかは今後の検討課題である。

E. 結論

ApoA-I は、血漿 ApoA-II やコレステロール濃度や、各リポタンパク質分画への再分配の調節作用を持つことが示された。また、ApoA-I の欠損に対して ApoA-II は代償作用を持つことも明らかになった。リポタンパク質や apoA-II の分布の変動は AApoAII アミロイドーシスの発症に重要な役割を果たすことが示唆されたが、そのメカニズムに関しては検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chen L, Une Y, Higuchi K, Mori M: Cheetahs have 4 Serum Amyloid A genes evolved through repeated duplication events. *J Hered* 103: 115-129, 2012.
- 2) Higuchi K, Qian J, Yan J, Ge F, Zhang B, Fu X, Tomozawa H, Sawashita J, Mori M: Mouse apoA-II amyloid fibrils deposit in skeletal muscle and exhibit amyloidosis-enhancing activity. *Amyloid* 18 Suppl 1: 42-44, 2011.
- 3) Sawashita J, Kametani F, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Higuchi K: Amyloid fibrils formed by selective N- and C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II. *Amyloid* 18 Suppl 1:19-21, 2011.
- 4) Wall JS, Richey T, Stuckey A, Donnell R, Macy S, Martin EB, Williams A, Higuchi K, Kennel SJ: In vivo molecular imaging of peripheral amyloidosis using heparin-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E586-594, 2011.
- 5) Wang Y, Sawashita J, Qian J, Zhang B, Fu X, Tian G, Chen L, Mori M, Higuchi K: ApoA-I deficiency in mice is associated with redistribution of apoA-II and aggravated AApoAII amyloidosis. *J Lipid Res* 52: 1461-1470, 2011.
- 6) Higuchi K, Fu X, Zhang P, Sawashita J, Zhang Z, Qian J, Wang Y, Mori M: Mouse Models to Study Systemic Amyloidoses: Is Prion-Like transmission a common pathogenic mechanism? in “*Amyloidosis-Mechanism and Prospects for Therapy*”. Saranstseva S ed, pp 163-180. INTEC Rijeka Croatia, 2011.
- 7) Higuchi K, Mori M, Sawashita J: Mouse senile systemic AApoAII amyloidosis: pathology, genetics and transmission. in “*SAM Research*”. Takeda T ed, pp 293-302. Elsevier B.V. Amsterdam, The Netherlands, 2012, in press.

2. 学会発表

- 1) 王耀勇、亀谷富由樹、銭金澤、張蓓茹、付笑影、澤下仁子、森政之、樋口京一：老化アミロイドーシスにおける伝播性の強い糞中 AApoAII アミロイド線維の解析。第 100 回日本病理学会総会、横浜、4.28、2011.

- 2) 樋口京一、銭金澤、弘瀬雅教、張蓓茹、王耀勇、付笑影、澤下仁子、森政之、中井彰：心臓への老化アミロイド沈着と熱ストレス反応：HSF1 ノックアウトマウスを用いた解析。第 100 回日本病理学会総会、横浜、4.28、2011.
- 3) 樋口京一：アミロイドーシスの伝播：タンパク質の異常構造は自己増殖するか？。（ワークショップ）第 11 回日本蛋白質科学会年会、大阪、6.9、2011.
- 4) 澤下仁子、王耀勇、田耕、羅宏敏、陳磊、森政之、樋口京一：マウス老化アミロイドタンパク質 (apolipoprotein A-II) トランスジェニックマウスは促進老化を示す？。日本基礎老化学会第 34 回大会、東京、6.15、2011.
- 5) 樋口京一：全身性アミロイドーシスの伝播：異常構造アミロイドタンパク質はプリオンのように自己増殖するか？。第 12 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、6.18、2011.
- 6) 樋口京一：モデル動物から学ぶ老化と予防医療：老化促進モデルマウス(SAM)の特性と抗老化研究。（特別講演）第 5 回日本聴覚医学会聴覚アンチエイジング研究会、東京、7.4、2011.
- 7) 樋口京一、張蓓茹、銭金澤、王耀勇、田耕、澤下仁子、森政之、池田修一、宇根有美、内木宏延、安東由喜雄：アミロイドーシスの伝播に対する提言—どこまでわかっているのか？ どう対処すべきか？。アミロイドーシス夏のワークショップ 2011、熊本、7.29、2011.
- 8) 樋口京一：全身性アミロイドーシス（チーター・マウス）。（シンポジウム）第 30 回日本認知症学会、東京、11.11、2011.
- 9) Higuchi K : Plasma apolipoprotein A-II deposits as amyloid fibril in mouse transmissible systemic amyloidosis. (Invited speaker). The 27th International Kumamoto Medical Bioscience Symposium. “Plasma Proteins: Its Function and Toxicity”, Kumamoto, 11. 23, 2011.
- 10) Higuchi K: Transmission of amyloidoses in mouse and cheetah: Implications in human systemic amyloidoses. (Invited speaker) “Transmissible Amyloidoses”, Cold Spring Harbor, 12. 2, 2011.
- 11) Hirose M, Qian J, Shimojo H, Kashihara T, Hongo M, Yamada M, Higuchi K: Roles of heat shock

transcription factor 1 gene (Hsf1) expressions in cardiac remodeling in a mouse model of senile cardiac amyloidosis. European Society of Cardiology Congress 2011, Paris, 8.27-31, 2011.

12) 樋口京一：全身性アミロイドーシスを伝播という視点から考える；—マウスやチーターのアミロイドーシス—。(招待講演)。第10回日本腎病理協会研究会、東京、1.7、2012

13) Hirose M, Qian J, Shimojo H, Kashihara T, Hongo M, Yamada M, Higuchi K: Heat shock transcription factor 1 improves amyloid deposition-induced cardiac remodeling in a mouse model of senile cardiac amyloidosis. 第89回日本生理学会大会、3.29-31、2012.

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

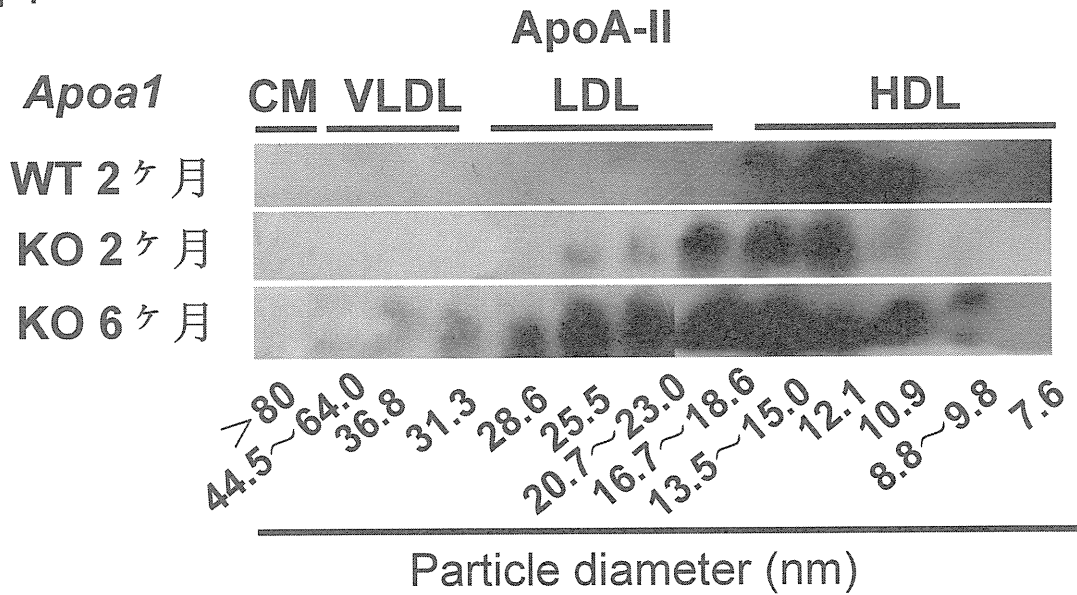
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1



HPLC (ゲル濾過法)+SDS-PAGE+western blot

図 1 ApoA-I 欠損(KO)マウスでは加齢に伴いApoA-IIの粒子径の大きなりポタンパク質への再分配が起こる。血清をゲル濾過カラムで分画し(HPLC)、各フラクションのApoA-II量をSDS-PAGE及びwestern blot法で解析した。

図2

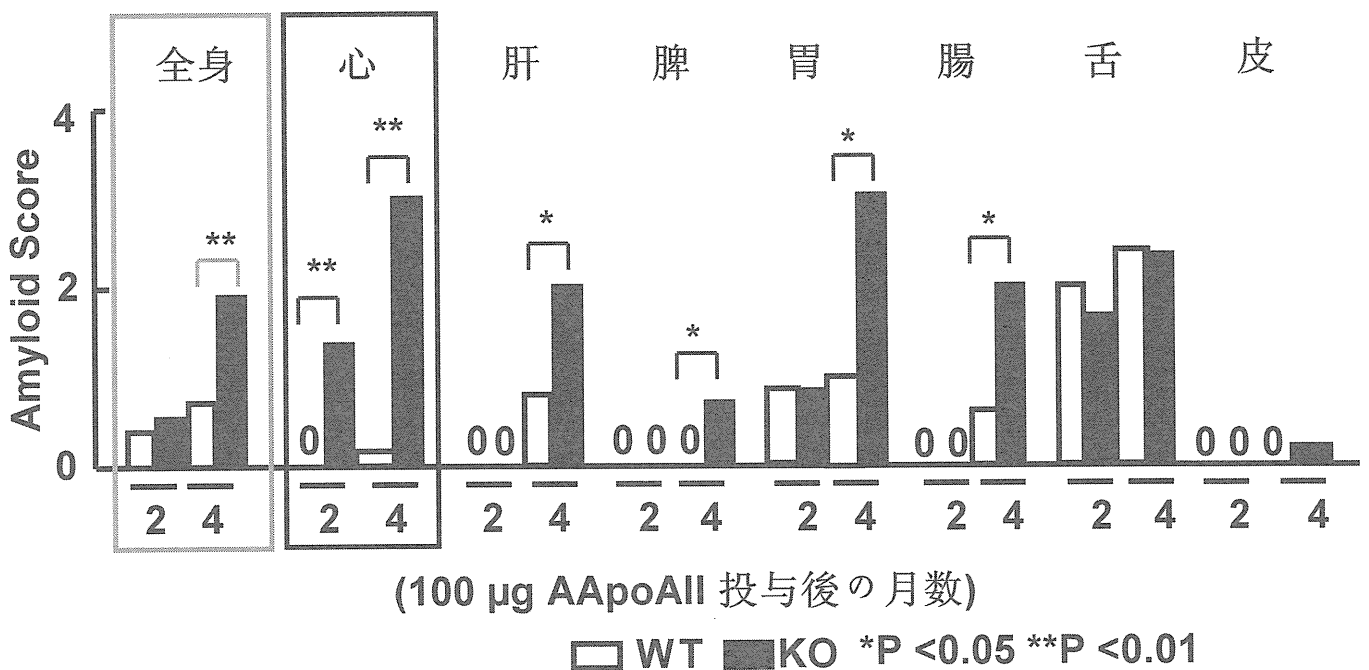


図 2 ApoA-I 欠損(KO)マウスではAapoAIIアミロイドーシスが促進された。ApoA-I KOと野生型(WT)マウスにAapoAIIアミロイド線維を投与してアミロイドーシスを誘発し、2,4ヶ月後に屠殺してアミロイド沈着を解析した。全身でのアミロイド沈着が有意に増加したが、特に心臓での沈着増加が顕著であった。

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

マウス AApoAII アミロイドーシスの発症は マウス F 型 apoA-II の C 末ペプチドで軽減できる

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*、長谷川一浩**、森 政之*、内木宏延**、
 亀谷富由樹***

信州大学大学院医学系研究科加齢生物学分野*、福井大学医学部医学科病因病態
 医学講座**、(財)東京都医学総合研究所認知症・高次脳機能研究分野***

研究要旨 AApoAII アミロイドーシス関連タンパク質である apolipoprotein A-II (apoA-II) の合成部分ペプチドを用いた *in vitro* 線維形成解析システムと、老化アミロイドーシス高発症モデルマウス (*Apoa2^c* トランスジェニックマウス:*Apoa2^c* Tg) を用いた *in vivo* 伝播解析システムを駆使し、マウス F 型 apoA-II の線維形成不能性と、マウスに対する合成ペプチドの線維沈着抑制作用を解析した。まず、*in vitro* 解析により、F 型 apoA-II は線維を形成しないこと、C 末 48-65 番アミノ酸配列部分に強力な線維形成阻止能があることを見いだした。次に、*Apoa2^c* Tg に、AApoAII 線維を投与してアミロイドーシスを誘発すると同時に F 型 apoA-II の C 末合成ペプチドを継続投与した結果、アミロイド線維の沈着程度が明らかに低くなることを示した。線維沈着抑制作用の詳細な分子機構の解析が必要であるが、マウス AApoAII アミロイドーシスを疾患モデルとした *in vitro* / *in vivo* 解析は、線維形成・伝播機構の本質を捉え、生体内物質との相互作用や線維形成阻害物質の探索、分子設計へと応用が期待される。

A. 研究目的

これまでの *in vitro* 研究から、AApoAII 線維形成タンパク質 apolipoprotein A-II (apoA-II) の N 末 6-16 番と C 末 48-65 番領域 (線維形成コア領域) が相互作用してアミロイド線維を形成することを明らかにしてきた¹⁾。また、AApoAII アミロイドーシス高発症マウスの C 型 apoA-II とは線維形成コア領域で 4ヶ所のアミノ酸組成が異なる F 型 apoA-II マウスは、アミロイドーシスの誘発に抵抗することを明らかにしている²⁾。本研究では、C 型と F 型 apoA-II のアミノ酸組成の違いに着目し、F 型 apoA-II の線維形成能と、高発症マウスに対する F 型 apoA-II 組成の合成ペプチドの線維沈着に対する効果を解析した。

B. 研究方法

***In vitro* 研究** : マウス apoA-II の線維形成コア領域 (図 1) の合成ペプチド (Sigma Genosys、5% DMSO 溶液) を pH 2.5、37°C で振とうし、重合反

応をチオフラビン T 法で解析した。また、形成線維を電子顕微鏡下で観察し、コンゴレッドとの反応性も観察した。また、形成線維の成分を LC-MS/MS で、反応開始直後の 2 次構造を CD スペクトル法で解析した。

***In vivo* 研究** : C 型 apoA-II の 62 番目を F 型 apoA-II のアミノ酸組成に置換した C 末ペプチド (c48/65(N62K)、あるいは C 型 apoA-II の C 末ペプチド (c48/65) の 5%DMSO 溶液を浸透圧ポンプ (ALZET、#1004) に封入し、AApoAII アミロイドーシス高発症マウス (*Apoa2^c* Tg、信州大学にて開発/維持)³⁾ の腹腔内に留置した。翌日、AApoAII 線維 5 µg を尾静脈内投与し、27 日後の組織切片をコンゴレッド染色し、線維沈着程度を評価した。
 (倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、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、上記規定に沿って実施した。ペプチド由来線維及び AApoAII 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、残渣や器具等は焼却または2 N NaOH に2時間以上浸漬処理した。

C. 研究結果

In vitro 解析 : F型 apoA-II のN末とC末ペプチドの組み合わせでは、線維が全く形成されなかった (図 2A)。F型N末ペプチドはC型C末ペプチドと線維を形成せず、また、C型N末とC末ペプチドの重合反応にも影響せず、形成線維の構成成分でもなかった (図 2B)。一方、F型C末ペプチドは、C型N末ペプチドと線維を形成しないだけでなく、1/10 のモル比でもC型N末とC末ペプチドの重合反応を完全に阻害した (図 3A)。また、C型 apoA-II の62番目のAsnをF型のLysに置換したC末合成ペプチド c48/65(N62K)は、C型のN末ペプチドと線維を形成しなかった。これらの線維形成しなかったペプチドの組み合わせでは、線維形成反応初期にみられる2次構造変化が起きなかった (図 3B)。

In vivo 解析 : F型 apoA-II のアミノ酸組成を持つC末ペプチド c48/65(N62K)を投与したマウスでは、Vehicle 投与マウスよりも AApoAII の沈着程度が有意に低レベルだった (図 4)。

D. 考察

マウス F型 apoA-II について、線維形成コア領域の配列部分の合成ペプチドを用いた解析により、N末には線維形成能も形成阻害能も持たないこと、C末には線維形成能がないだけでなく、強力な阻害作用を有することを明らかにした。また、C型 apoA-II の62番目のAsnをF型のLysに置換した合成ペプチドでは線維を全く形成しないことから、62番アミノ酸の組成が apoA-II の線維形成を決定づける最重要因子であると考えられた。次に、重合反応開始直後の CD スペクトルを解析した結果、本来、線維形成初期に起こり得るペプチドの2次構造変化をF型C末が阻害し、その結果として線維形成が抑制される作用機序が考えられた。アミロイド線維を形成しやすいペプチドの2次構造変化を、F型C末ペプチドがどのような機序で阻害しているのか、詳細な分子メカニ

ムの解明が必要ではあるが、本研究で示したように、線維形成不能な低分子ペプチドを利用し、本来、線維形成しやすい性質を持つタンパク質の2次構造変化を阻止する作用機序は、アミロイドーシスの発症予防・治療策の構築に有用な知見を与えるものと考えられる。

我々は、これまでに、AApoAII アミロイド線維によるアミロイドーシスの誘発に対して非常に高い感受性を示す *Apoa2^c* Tg を開発し³⁾、合成ペプチド由来線維による線維沈着促進効果も示してきた⁴⁾。本研究では、この *in vivo* 解析システムを用い、F型 apoA-II のC末ペプチドによるアミロイド線維形成抑制効果を解析した。その結果、F型 apoA-II の組成を持つ c48/65(N62K)は、アミロイド線維の沈着を完全阻止するには至らないものの、Vehicle (5%DMSO) 投与群やC型 apoA-II のC末ペプチド投与群よりも線維沈着を低減する効果を示した。この結果は、*in vitro* 解析で見いだされたF型C末配列の線維形成阻害作用を *in vivo* 解析系でも再現できることを示し、我々の *in vitro* / *in vivo* 解析系がアミロイド線維の形成や伝播機序の解明に有用であることが考えられる。また、マウスの腹腔内から c48/65(N62K)を投与したが、腹腔内だけでなく、胸腔内や皮膚等、遠隔臓器・組織でもアミロイド線維の沈着を抑制していた。すなわち、F型 apoA-II が血液を介して各臓器に到達し、アミロイド線維の沈着を抑制したと考えられる。

今後は、マウス老化アミロイドーシス以外のアミロイドーシスについてもアミロイドーシス関連タンパク質の線維形成機序、伝播機序や他因子との相互作用、さらに、今回見いだされた、F型 apoA-II のC末ペプチドのような線維形成阻害物質の探索を行うことが必要である。

E. 結論

マウス F型 apoA-II の線維形成コア領域は線維を形成しないこと、F型 apoA-II のC末配列部分がマウス AApoAII アミロイドーシスの発症を軽減できることを示した。本モデルのさらに詳細な解析により、老化関連アミロイドーシスの発症機序の解明や予防/治療戦略の構築に役立てられることが期待される。

[参考文献]

- 1) Sawashita J, Kametani F, Hasegawa K, Tsutsumi-Y S, Zhang B, Yan J, Mori M, Naiki H, Higuchi K: Amyloid fibrils formed by selective N-, C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II. *Biochim Biophys Acta -Proteins & Proteomics* 794: 1517-1529, 2009.
- 2) Sawashita J, Zhang B, Wang Y, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Kametani F, Higuchi K: C-terminal sequence of type F apolipoprotein A-II inhibits polymerization of apolipoprotein A-II into amyloid fibrils in mice. *Submitted* 2012.
- 3) 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.
- 4) 樋口京一：マウス apoA-II 部分ペプチドによるアミロイド線維形成機構と伝播の解析 (第 2 報)。アミロイドーシスに関する調査研究班 平成 22 年度分担研究報告書 50-55, 2010.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chen L, Une Y, Higuchi K, Mori M: Cheetahs have 4 Serum Amyloid A genes evolved through repeated duplication events. *J Hered* 103: 115-129, 2012.
- 2) Higuchi K, Qian J, Yan J, Ge F, Zhang B, Fu X, Tomozawa H, Sawashita J, Mori M: Mouse apoA-II amyloid fibrils deposit in skeletal muscle and exhibit amyloidosis-enhancing activity. *Amyloid* 18 Suppl 1: 42-44, 2011.
- 3) Sawashita J, Kametani F, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Higuchi K: Amyloid fibrils formed by selective N- and C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II. *Amyloid* 18 Suppl 1:19-21, 2011.
- 4) Wall JS, Richey T, Stuckey A, Donnell R, Macy S, Martin EB, Williams A, Higuchi K, Kennel SJ: In vivo molecular imaging of peripheral amyloidosis

using heparin-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E586-594, 2011.

- 5) Wang Y, Sawashita J, Qian J, Zhang B, Fu X, Tian G, Chen L, Mori M, Higuchi K: ApoA-I deficiency in mice is associated with redistribution of apoA-II and aggravated AApoAII amyloidosis. *J Lipid Res* 52: 1461-1470, 2011.
- 6) Higuchi K, Fu X, Zhang P, Sawashita J, Zhang Z, Qian J, Wang Y, Mori M: Mouse Models to Study Systemic Amyloidosis: Is Prion-Like transmission a common pathogenic mechanism? in “*Amyloidosis-Mechanism and Prospects for Therapy*”. Saranitseva S ed, pp 163-180. INTEC Rijeka Croatia, 2011.
- 7) Higuchi K, Mori M, Sawashita J: Mouse senile systemic AApoAII amyloidosis: pathology, genetics and transmission. in “*SAM Research*”. Takeda T ed, pp 293-302. Elsevier B.V. Amsterdam, The Netherlands, 2012, in press.

2. 学会発表

- 1) 王耀勇、亀谷富由樹、銭金澤、張蓓茹、付笑影、澤下仁子、森政之、樋口京一：老化アミロイドーシスにおける伝播性の強い糞中 AApoAII アミロイド線維の解析。第 100 回日本病理学会総会、横浜、4.28、2011.
- 2) 樋口京一、銭金澤、弘瀬雅教、張蓓茹、王耀勇、付笑影、澤下仁子、森政之、中井彰：心臓への老化アミロイド沈着と熱ストレス反応：HSF1 ノックアウトマウスを用いた解析。第 100 回日本病理学会総会、横浜、4.28、2011.
- 3) 樋口京一：アミロイドーシスの伝播：タンパク質の異常構造は自己増殖するか？。(ワークショップ) 第 11 回日本蛋白質科学会年会、大阪、6.9、2011.
- 4) 澤下仁子、王耀勇、田耕、羅宏敏、陳磊、森政之、樋口京一：マウス老化アミロイドタンパク質 (apolipoprotein A-II) トランスジェニックマウスは促進老化を示す？. 日本基礎老化学会第 34 回大会、東京、6.15、2011.
- 5) 樋口京一：全身性アミロイドーシスの伝播：異常構造アミロイドタンパク質はプリオンのように自己増殖するか？. 第 12 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、6.18、2011.

- 6) 樋口京一：モデル動物から学ぶ老化と予防医療：老化促進モデルマウス(SAM)の特性と抗老化研究。(特別講演) 第5回日本聴覚医学会聴覚アンチエイジング研究会、東京、7.4、2011.
- 7) 樋口京一、張蓓茹、銭金澤、王耀勇、田耕、澤下仁子、森政之、池田修一、宇根有美、内木宏延、安東由喜雄：アミロイドーシスの伝播に対する提言—どこまでわかっているのか？ どう対処すべきか？. アミロイドーシス夏のワークショップ 2011、熊本、7.29、2011.
- 8) 樋口京一：全身性アミロイドーシス (チーター・マウス). (シンポジウム) 第30回日本認知症学会、東京、11.11、2011.
- 9) Higuchi K: Plasma apolipoprotein A-II deposits as amyloid fibril in mouse transmissible systemic amyloidosis. (Invited speaker). The 27th International Kumamoto Medical Bioscience Symposium. "Plasma Proteins: Its Function and Toxicity", Kumamoto, 11.23, 2011.
- 10) Higuchi K: Transmission of amyloidoses in mouse and cheetah: Implications in human systemic amyloidoses. (Invited speaker) "Transmissible Amyloidoses", Cold Spring Harbor, 12.2, 2011.
- 11) Hirose M, Qian J, Shimojo H, Kashihara T, Hongo M, Yamada M, Higuchi K: Roles of heat shock

transcription factor 1 gene (Hsf1) expressions in cardiac remodeling in a mouse model of senile cardiac amyloidosis. European Society of Cardiology Congress 2011, Paris, 8.27-31, 2011.

12) 樋口京一：全身性アミロイドーシスを伝播という視点から考える；—マウスやチーターのアミロイドーシス—. (招待講演). 第10回日本腎病理協会研究会、東京、1.7、2012.

13) Hirose M, Qian J, Shimojo H, Kashihara T, Hongo M, Yamada M, Higuchi K: Heat shock transcription factor 1 improves amyloid deposition-induced cardiac remodeling in a mouse model of senile cardiac amyloidosis. 第89回日本生理学会大会、3.29-31、2012.

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

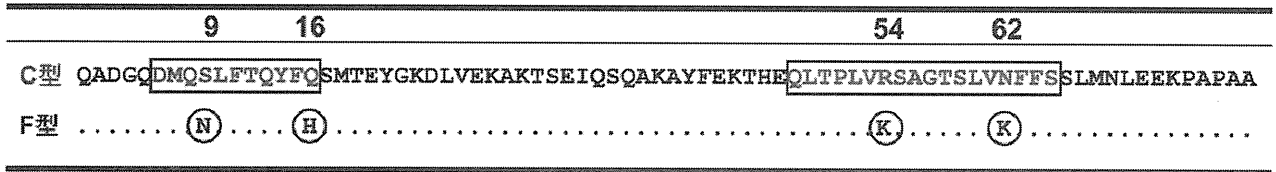
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

A



B

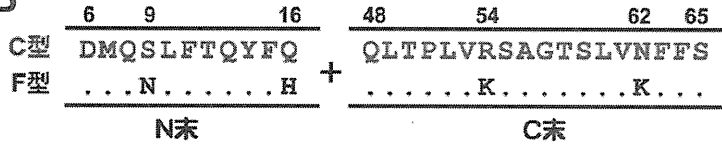
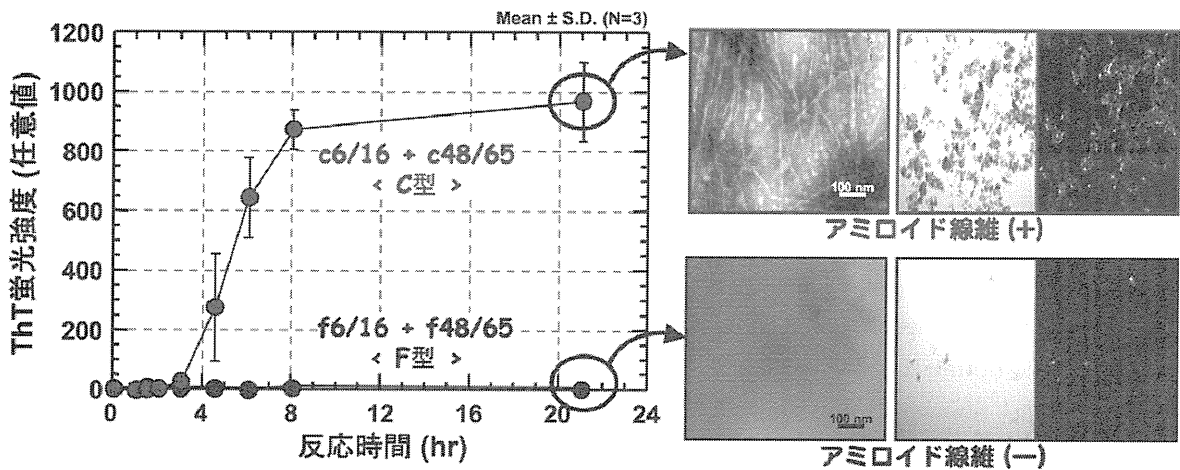


図1 マウスapoA-IIのアミノ酸組成 (A) と線維形成コア領域の合成ペプチド (B)

A



B

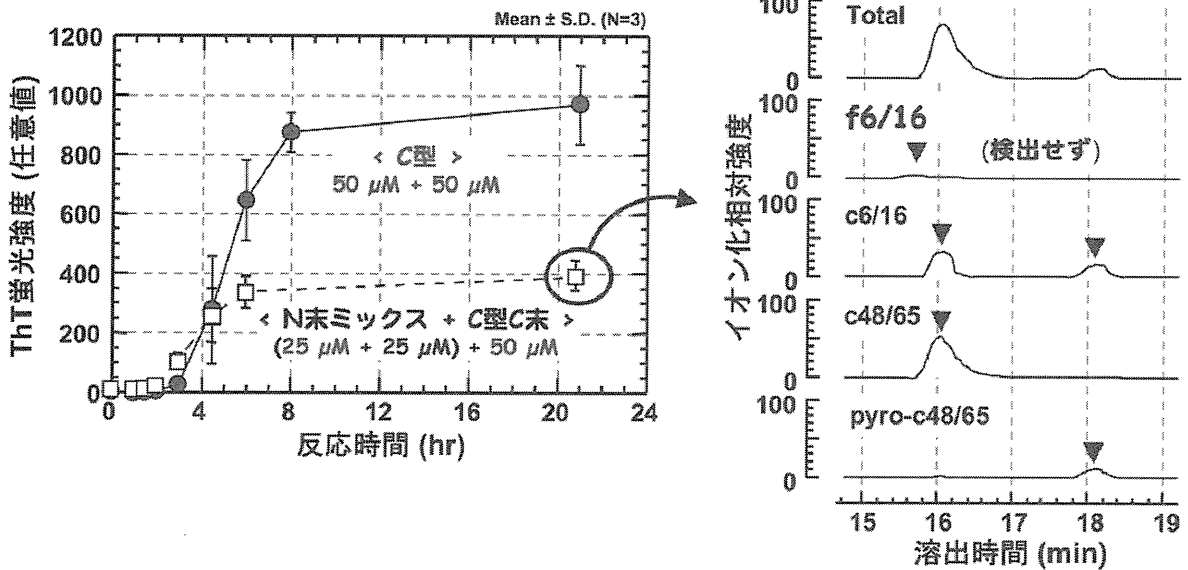


図2 マウスF型apoA-IIの線維形成コア領域の合成ペプチドはアミロイド線維を形成せず (A)、F型N末ペプチドはC型の線維形成を阻害しなかった (B)。

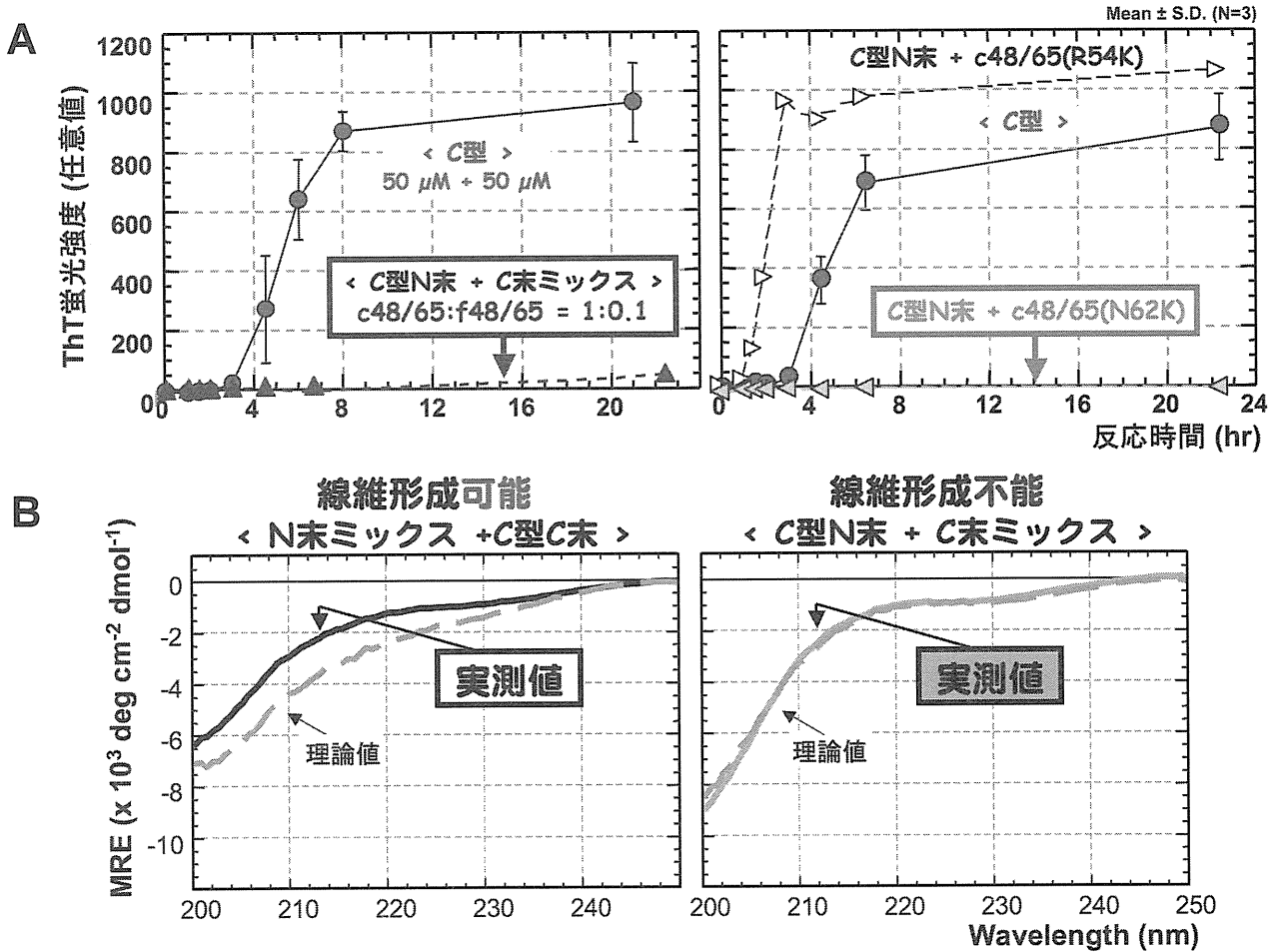


図3 F型apoA-IIのC末ペプチドは線維形成を阻害し、62番置換体c48/65(N62K)は線維を形成しなかった(A)。F型C末ペプチドは、線維形成初期に起こるC型ペプチドの2次構造変化を阻害することが示唆された(B)。

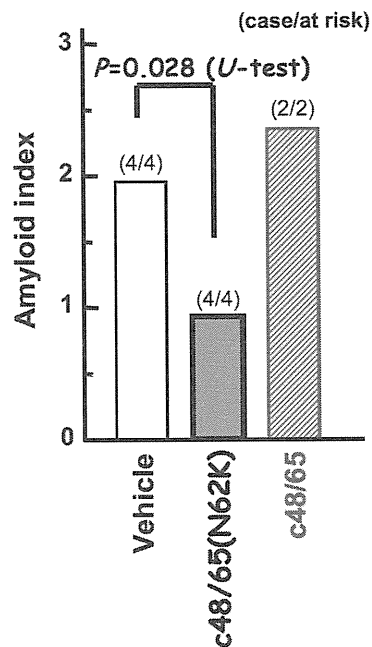


図4 C型apoA-IIの62番目のAsnをLysに置換したC末ペプチドc48/65(N62K)はアミロイドーシス高発症マウスのアミロイド線維沈着を軽減した。

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

霊長類トランスサイレチンに関する基礎的研究

研究分担者 水口峰之 富山大学大学院医学薬学研究部

共同研究者 植田光晴¹、安東由喜雄¹

¹熊本大学大学院生命科学研究部病態情報解析学分野

研究要旨 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、トランスサイレチン (TTR) の遺伝子変異により生じる全身性アミロイドーシスである。近年、全身性 TTR アミロイドーシスが高齢ベルベットモンキー (アフリカミドリザル) で生じることが明らかにされた。本研究の目的は、ベルベットモンキーにおける TTR アミロイドーシスの発症メカニズムを解明し、サルをモデル動物とした病態解析や治療法開発に向けた基礎的データを集積することである。我々は霊長類 TTR の大腸菌による大量発現系を構築した。ベルベットモンキー、カニクイザル、ニホンザル TTR は、N 末端に Met が付加された状態で発現・精製した。コモンマーモセットとクロヒゲサキザル TTR は、His タグ融合タンパク質として発現させ、精製後に Factor Xa で His タグを切断・除去した。さらに、霊長類 TTR の結晶化条件を検討し、5 種類すべての霊長類 TTR の結晶を得ることに成功した。

A. 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、トランスサイレチン (TTR) の遺伝子変異によって生じる。これまでヒト以外の動物種で TTR アミロイドーシスを自然発症した報告はなかったが、近年になって高齢のベルベットモンキーが全身性 TTR アミロイドーシスを生じた例が報告された (Nakamura et al., *Vet Pathol*, 2008, 45, 67-72; Ueda et al., *Lab Invest*, in press)。本研究の目的は、ベルベットモンキーにおける TTR アミロイドーシスの発症メカニズムを解明し、サルをモデル動物とした病態解析や治療法開発に向けた基礎的データを集積することである。そのために、ベルベットモンキーを含む5種類の霊長類 TTR の立体構造と構造安定性を調べる。

B. 研究方法

霊長類 TTR の発現ベクターは、ベルベットモンキー、ニホンザル、コモンマーモセット、クロヒゲサキザル由来の cDNA を pQE30 (QIAGEN 社) に導入することで得た。カニクイザル TTR の発現ベクターは、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 社) を用いて、ベルベットモ

ンキー TTR に Ile122Val 変異を導入することで得た。得られた発現ベクターを用いて大腸菌 M15 を形質転換し、数リットルスケールで培養した。TTR を発現した大腸菌を超音波破碎し、イオン交換クロマトグラフィーと逆相高速液体クロマトグラフィーで精製した。

X 線結晶構造解析に用いる TTR は、発現ベクターを pOP ベクター、大腸菌を C43(DE3)RIPL に変えて準備した。また、TTR の N 末端領域はフレキシブルで X 線構造解析では観測できないため、結晶化を行う際にはフレキシブルな N 末端領域 (N 末端の 7 または 10 アミノ酸) を欠損させた。

(倫理面への配慮)

問題なし。本研究では、患者と対象とする臨床研究、疫学研究、動物実験を行っていない。

C. 研究結果

5種類の霊長類 TTR について大腸菌による大量発現系を構築した。ベルベットモンキー、カニクイザル、ニホンザル TTR は、N 末端に Met が付加された状態で発現・精製した。コモンマーモセットとクロヒゲサキザル TTR は、His タグ融合タンパク

質として発現させ、精製後にFactor XaでHisタグを切断・除去した。

霊長類 TTR の結晶化は、Crystal Screen 1 (HAMPTON RESEARCH社) で結晶化条件の初期スクリーニングを行い、シッティングドロップ法を用いて20°Cで行った。その結果、5種類すべての霊長類TTRについて結晶を得ることに成功した。

D. 考察

霊長類 TTR は、今後予定している安定性評価やアミロイド形成実験に用いる。また、結晶化条件の最適化が必要であるが、次年度は X 線回折実験に進むことが可能と予想される。

E. 結論

バルベットモンキーを含む霊長類 TTR の結晶化に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jono H, Anno T, Motoyama K, Misumi Y, Tasaki M, Oshima T, Mori Y, Mizuguchi M, Ueda M, Shono M, Obayashi K, Arima H, Ando Y: Cyclodextrin, a novel therapeutic tool for suppressing amyloidogenic transthyretin misfolding in transthyretin-related amyloidosis. *Biochem J* 437:35-42, 2011.
- 2) Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers JK, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y: Aged vervet monkeys developing transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: a valid pathological model of the human disease. *Lab Invest*, in press.
- 3) Yokoyama T, Mizuguchi M, Nabeshima Y, Kusaka K, Yamada T, Hosoya T, Ohhara T, Kurihara K, Tomoyori K, Tanaka I, Niimura N: Hydrogen-bond network and pH sensitivity in transthyretin: Neutron

crystal structure of human transthyretin. *J Struct Biol*, in press.

2. 学会発表

- 1) 横山武司、鍋島裕子、細谷孝明、大原高志、栗下和男、日下勝弘、水口峰之、田中伊知郎、新村信雄：トランスサイレチンの中性子結晶構造解析. 第12回Pharmaco-Hematology シンポジウム、富山、6.17-18、2011.
- 2) 水口峰之：トランスサイレチンの構造変化とアミロイドーシス. 第12回Pharmaco-Hematology シンポジウム、富山、6.17-18、2011.
- 3) Yokoyama T, Nabeshima Y, Hosoya T, Ohhara T, Kurihara K, Kusaka K, Mizuguchi M, Tanaka I, Niimura N: Preliminary neutron crystallographic study of mutant transthyretin. XXII Congress and General Assembly. International Union of Crystallography, Madrid, Spain, 8.22-29, 2011.
- 4) 水口峰之：天然変性蛋白質 PQBP-1 の動的な構造変化. 日本物理学会 2011 年秋季大会・シンポジウム・生命現象に関する構造変化を俯瞰する、富山、9.21-24、2011.
- 5) Mizuguchi M: Dimeric transthyretin variant assembles into cytotoxic aggregates. VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Kumamoto, 11.20-22, 2011.
- 6) Mizuguchi M: Dynamic structural changes of the intrinsically disordered protein PQBP-1. 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences, Experiments and Simulations. Nara, 1.9-11, 2012.

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

大型ネコ科動物におけるアルツハイマー病関連病変

研究分担者 宇根 有美 麻布大学獣医学部病理学研究室

共同研究者 芹沢省吾*、栗林大幸*、高橋映里佳*、鈴木拓也*、チェンバーズ・ケン**

*麻布大学獣医学部病理学研究室、

**東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室

研究要旨 ヒトのアルツハイマー病の病理学的特徴を示す完全な動物モデルは、未だ報告されていない。本研究では、チーターを含めた大型ネコ科動物 7 種 32 頭を用いて、自然発生性アルツハイマー病関連病変の検討を行った。検索に用いた動物の 69% に瀰漫性に A β が沈着し、チーターでは、10 歳以上のすべての動物において認められた。また、AT8 免疫染色により高率に高リン酸化タウの蓄積を伴うことが判明し、そのうち 60% の個体では、AT8 陽性部位に一致して神経原線維変化の形成も認められた。併せて臨床的に認知障害と判断された 2 頭には、高度の大脳皮質萎縮も観察された。

今回の結果から、大型ネコ科動物には瀰漫性 A β 沈着しか観察されないにも関わらず、チーターは 11 歳という比較的 low 年齢（最高年齢は 19 歳）であっても、高率に A β 沈着と高リン酸化タウの蓄積があり、NFT 形成に至ることが明らかとなった。加えて、2 頭に大脳萎縮と認知障害が認められ、AD の特徴的病変を全て具える動物と考えられる。作出モデル動物を含めて、このような動物は、未だかつて報告されていない。

A. 研究目的

ヒトのアルツハイマー病(以下 AD)の病理学的特徴は、大脳における A β 沈着 (老人斑)、神経原線維変化(NFT)、神経細胞脱落、大脳萎縮とされているが、今まで、動物において、これらの病変をすべて具える症例、動物種はみつかっていない。今回、我々は、大型ネコ科動物、特にチーターに自然発生の AD 関連病変を見出したので、その病理学的特徴を明らかにすることを目的として、研究を行った。

B. 研究方法

1. 動物

2006 年から 2010 年の 5 年間に、本研究室で病性鑑定したチーター 22 頭 (平均年齢 9.9 歳)、ライオン 3 頭 (平均年齢 18.7 歳)、ユキヒョウ 3 頭 (平均年齢 13.7 歳)、トラ 1 頭 (16 歳前後)、シベリアオオヤマネコ 1 頭 (5 歳)、サーバルキャット 1 頭 (17 歳)、ピューマ 1 頭 (13 歳) 合計 7 種、32 頭の大型ネコ科動物の脳を材料とした。また、

対照として老齢のイエネコ (以下老齢ネコ) 3 頭 (平均年齢 19 歳) を用いた。対象とした大型ネコ科動物の個体情報を **Table 1** に示した。

2. 病理組織学的検索

AD 罹患脳では、海馬を中心とする神経細胞死が特徴的であることから、10% 中性緩衝ホルマリン固定材料から大脳半球の乳頭体を通る前額断面を作成し、常法に従い、パラフィンブロックを作成し、4 μ m で薄切後、HE 染色を施した。併せて以下の検索を行った。

3. 免疫組織化学的検索

切片は脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ阻止のための 1% H₂O₂ 加メタノールに 20 分間浸漬し、PBS (pH7.4) で洗浄した。賦活化処理として、A β 40、A β 42 は 100% 蟻酸処理 (室温 10 分間浸漬)、AT8 はマイクロウェーブによる熱処理 (クエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸漬、90°C、9 分加温) を用いた。PBS 洗浄後、非特異反応阻止は、5% スキムミルク (室温、20 分間反応) を用いて行った。一次抗体のプロフィールと反応条件は

Table 2 に示すとおりである。抗体の希釈には1% BSA 加 PBS を用いた。一次抗体を適量マウントした後、4°Cで一晩静置した。反応後、PBS で洗浄し、可視化には、高分子ポリマー法（シンプルステイン MAX-PO, MULTI ; Nichirei, Japan）を用いた（室温、60 分間反応）。DAB により発色、ヘマトキシリンで対比染色した後、光学顕微鏡により観察した。

4. 大型ネコ科動物の AD 関連病変の評価

老人斑、A β 沈着の評価：老人斑は嗜銀性、コンゴレッド染色性、A β 免疫染色性から形態学的に3型（典型斑／原始斑、瀰漫斑、瀰漫性 A β 沈着）に分類される。大型ネコ科動物の脳における老人斑の形成、種類を評価するため、PAM 染色、コンゴレッド染色、抗 A β 40 抗体（A β 40）および抗 A β 42 抗体（A β 42）を用いた免疫染色を実施した。

A β 沈着分布：脳実質や脳血管における A β 沈着の頻度や分布を評価するため、大脳前額断面の連続薄切標本に、前述の2つの A β 抗体を用いて、免疫染色を行った。そして、大脳前額断面を①頭頂部、②側頭部部、③海馬およびその周囲領域の3部位に分け、また、血管の染色性は別途評価した。

高リン酸化タウ蓄積部位：大脳における高リン酸化タウ蓄積部位を評価するため、抗 PHF-Tau 抗体（AT8）を用いて免疫染色を実施した。AT8 陽性部位は、A β 沈着分布と同様、大脳前額断面を①頭頂部、②側頭部部、③海馬およびその周囲領域の3部位に分けて評価した。

高リン酸化タウの蓄積と NFT／ニューロピルスレッド形成の関連性を評価するため、AT8 免疫染色標本の連続切片を用いて、改良 Gallyas-Braak 法を行った。

（倫理面への配慮）

対象とした動物はすべて展示動物あるいは愛玩用動物で、死後、献体として提供されたもので、特段の倫理面の配慮はない。

C. 研究結果

老人斑の組織的評価：今回の研究で使用した大型ネコ科動物 7種 32頭の脳において、PAM染色陽

性あるいはコンゴ赤陽性のいわゆる老人斑は観察されず、免疫染色にのみ反応する瀰漫性A β 沈着が認められた。瀰漫性A β 沈着は対象とした動物の69%（22/32頭；チーター 13頭；ライオン 3頭；ユキヒョウ 2頭；トラ 1頭；サーバルキャット 1頭；シベリアオオヤマネコ 1頭；ピューマ 1頭）にみられた。また、対象とした老齢ネコでは、3頭すべてに瀰漫性A β 沈着があり、うち1頭に瀰漫斑（コンゴレッド陰性、PAM染色陽性）が数ヶ所みられた（図1）。

瀰漫性A β 沈着がみられた動物は、シベリアオオヤマネコ 1頭を除き、いずれも10歳以上であった。特に、チーターでは10歳以上のすべての個体で沈着があった。また、明らかな認知障害が2頭のチーターで観察され、肉眼的に高度の大脳萎縮があり、組織学的に大脳皮質神経細胞が脱落・消失していた（図2）。なお、これらの個体は、抗プリオンタンパク抗体を用いた免疫染色に陰性で、猫海綿状脳症は否定された。

A β 沈着分布：A β 沈着がみられたすべての動物種および動物ではほぼ同様の沈着パターンを示した。沈着軽度な例では、頭頂・側頭部に、重度な例では、さらに海馬にまで沈着部位が広がっていた。また、皮質深層の神経網に、大小様々な瀰漫性沈着として観察された（図1）。髄膜血管や脳実質毛細血管におけるA β 沈着はほとんど認められなかった。大脳前額断面のA β サブタイプ沈着を比較すると、A β 40、A β 42共にほぼ同部位に認められたが、A β 42はA β 40に比べ広範囲に沈着していた。

高リン酸化タウ（AT8）蓄積部位：免疫染色による検索の結果、すべての動物の34%（11/32頭；チーター 10頭；ピューマ 1頭）に高リン酸化タウが蓄積していた。大型ネコ科動物のうち、A β 沈着のあった動物の50%（11/22頭）、チーターでは77%（10/13頭）にAT8陽性部位がみられた。高リン酸化タウは、軽度の例では海馬傍回およびCA1の神経細胞に認められ、高度な例では、海馬に加えて頭頂・側頭部にもみられ、重篤な例では大脳全域に観察された（図3）。

改良Gallyas-Braak法によりNFT／ニューロピルスレッドの有無を検索したところ、高リン酸化タウの蓄積がみられた動物11頭のうち6頭においてAT8陽性部位と一致して、神経突起を含めた神経細胞の

細胞質内に嗜銀性糸屑状構造物が多数観察された(図3)。特に認知障害のあった2頭では、NFTが広範に認められた。ピューマにおいても、高リン酸化タウ沈着がみられたが、NFTの形成はみられなかった。なお、他の動物には、高リン酸化タウの蓄積およびNFT形成は認められなかった。

D. 考察

ヒトのアルツハイマー病(AD)は「認知機能障害と記憶力の低下を主徴とした進行性の神経細胞の機能障害を伴う認知症」と定義されている。ADの脳の特徴的な病理学的所見として β アミロイドを主成分とする老人斑、タウが異常にリン酸化されることで形成される神経原線維変化(NFT)、神経細胞死を伴う大脳萎縮の3つが挙げられる。これに加え、脳血管にアミロイドが沈着する脳血管アミロイドアンギオパチー(CAA)といわれる病態も増悪因子として考えられている。

獣医医療の発達により、伴侶動物として犬や猫の寿命が延長し、15歳以上(ヒトの年齢に換算すると80歳以上)の動物も稀ではない。そして、動物においては、ヒトのように厳密に認知障害を判定する基準がないものの、犬では、10歳を過ぎる頃から、徐々に痴呆と表現される症状が観察され始め、加齢に伴い進行する。また、動物園で飼育されている野生動物において、野生下では考えられない年齢で、天寿を全うする動物も少なからずいる。しかしながら、現在までにADの特徴的な脳病変を自然発生性にすべて具える動物は見つかっていなかった。

今回の研究では、大型ネコ科動物に $A\beta$ が沈着し、10歳以上のチーターでは、100%と高い沈着率を示した。高リン酸化タウの蓄積は、チーターとピューマで観察され、10歳以上のチーターの77%で認められ、さらに、これらの60%でNFT形成がみられた。加えて、チーター2頭に大脳萎縮と認知障害が認められ、ADの特徴的な病変を全てそなえていることが確認された。

これまで動物にADがみられない理由として、動物の寿命の短さ、成熟型老人斑の形成が少ないことなどが考えられていたが、今回の結果から、大型ネコ科動物には瀰漫性 $A\beta$ 沈着しか観察されないにも関わらず、チーターは11歳という比較的低

年齢(最高年齢は19歳)であっても、高率に $A\beta$ 沈着と高リン酸化タウの蓄積を認め、NFT形成に至ることが明らかとなった。

ADの発生機序として、 $A\beta$ が沈着することで神経細胞の微小管関連タンパクであるタウが過剰にリン酸化され、高リン酸化タウが蓄積することでNFTが形成され、神経細胞死に至らせるという”アミロイドカスケード仮説”が広く受け入れられている。そして、 $A\beta$ の凝集が重要であるとされている。しかし、チーターでの成績は、凝集の有無ではなく、 $A\beta$ 沈着そのものが高リン酸化タウ蓄積に関係してことを示唆している。

従来から、チーターの遺伝的多様性は極めて低いとされているが、今回、ネコ科動物の進化系統樹上、同一のクラスターに入るピューマにも $A\beta$ およびAT8沈着がみられたことは、病理発生を検討する上で、大変興味深い現象であると考えられる。

E. 結論

動物において、初めて自然発生性に $A\beta$ 沈着、神経原線維変化(NFT)、神経細胞脱落・大脳萎縮および精神障害を生じる動物種を見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chen L, Une Y, Higuchi K, Mori M: Cheetahs have 4 serum amyloid A genes evolved through repeated duplication events. *J. Heredity* 103:115-129, 2012.
- 2) Serizawa S, Chambers JK, Une Y: Beta amyloid deposition and neurofibrillary tangles spontaneously occur in the brains of captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet. Pathol*, in press.
- 3) Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers JK, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y: Aged vervet monkeys developing transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: A valid pathological model of the human disease. *Lab. Invest*, in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1 本研究において使用した大型ネコ科動物における A β 沈着と AT8 蓄積

個体 No.	年齢 (Y*)	性別 (M/F)**	A β スコア	AT8 蓄積	備考
チーター					
1	0.8	M	0	—	肺炎
2	1	F	0	—	神経症状
3	2	F	0	—	神経症状
4	3	M	0	—	腎不全
5	4	F	0	—	腎不全
6	6	M	0	—	てんかん様発作
7	6	M	0	—	
8	7	M	0	—	感染症
9	8	M	0	—	肝機能低下
10	10	F	2	—	腎不全
11	11	M	3	+	
12	11	F	3	—	
13	11	F	2	+	尿毒症
14	11	M	6	+	
15	12	F	5	+	認知障害、白内障
16	14	M	9	+	認知障害
17	14<	F	8	+	腎不全
18	15	M	8	+	老衰
19	16<	F	9	+	
20	17	F	8	+	腎不全
21	18	F	4	+	腎不全
22	19	F	7	—	腎不全
ライオン					
23	17	F	3	—	リンパ腫
24	17	M	3	—	老衰
25	22	M	2	—	多発性肝嚢胞
ユキヒョウ					
26	7	F	0	—	全身性石灰沈着症
27	16	M	1	—	化膿性髄膜炎
28	18	M	3	—	尿閉塞
トラ					
29	16	M	2	—	老衰
サーバルキャット					
30	17	F	1	—	子宮腺癌
シベリアオオヤマネコ					
31	5	M	1	—	肛門部の扁平上皮癌
ピューマ					
32	13	M	2	+	

Table 2 使用抗体と免疫染色条件

評価対象	抗体名	クロー ン (M/P) *	動物種 (M/R) *	賦活 化 処理	抗体 濃度
<i>Aβ</i> 沈着					
Aβ40	Anti-Human Amyloid beta (1-40) Rabbit IgG Affinity Purify (JP18580; IBL)	P	R	蟻酸	1:100
Aβ42	Anti-Human Amyloid-beta (1-42) Rabbit IgG (JP18582; IBL)	P	R	蟻酸	1:100
高リン酸化タウの蓄積					
高リン酸化タウ	anti-human PHF tau phospholyated Ser202 (AT8; Innogenetics)	M	M	MW†	1:500

* M/P: Monoclonal/Polyclonal.

** M/R: Mouse/Rabbit.

† MW: Microwave.

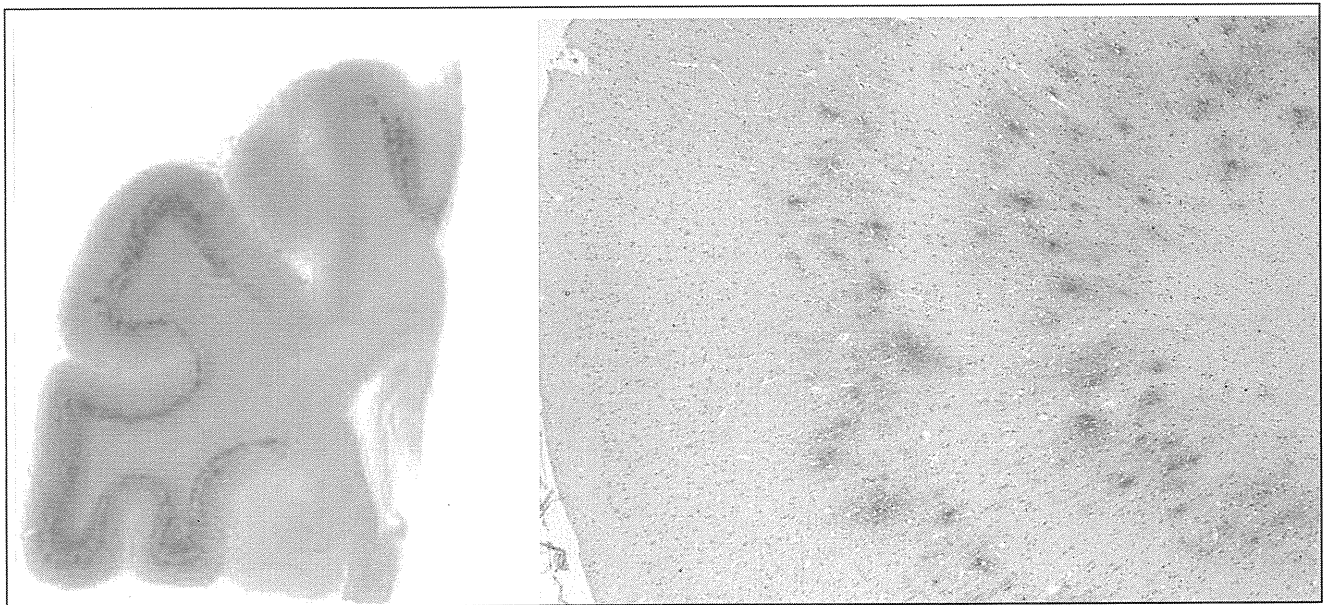


図 1. 大脳頭頂部から側頭部。Aβ 沈着部位は、頭頂・側頭部に主座し、皮質深層（第Ⅲ層～Ⅴ層）に多くみられる。左 ルーペ拡大；右 弱拡大。抗 Aβ 42 抗体染色。