

BF-227染色像を示した。

図4にトシリズマブ治療前および治療1年後のBF-227染色領域比 (%) の推移を示した。トシリズマブ治療1年後には治療前と比較して、BF-227染色領域の有意な減少が観察された (n=17, Wilcoxon signed rank test, p=0.0138)。

図5にトシリズマブ治療1年後および治療2年後のBF-227染色領域比 (%) の推移を示した。トシリズマブ治療1年後と2年後間にはBF-227染色領域の有意な変化は観察されなかった (n=16, Wilcoxon signed rank test, p=0.1550)。

図6にトシリズマブ治療前および治療2年後のBF-227染色領域比 (%) の推移を示した。トシリズマブ治療2年後には治療前と比較して、BF-227染色領域の有意な減少が観察された (n=20, Wilcoxon signed rank test, p=0.0076)。

一方、TNF- α 阻害治療群、MTX(またはプログラフ)治療群においては、TNF- α 阻害治療前-2年後間で治療前に比較してBF-227染色領域の有意な減少が観察された (n=6, BF-227染色領域 (%) 治療前: 5.65 ± 5.35 , 治療2年後: 0.96 ± 0.92 , Wilcoxon signed rank test, p=0.0313) 以外、有意な変化は見られなかった。

II. APPT g マウスマウスにおける A β の近赤外線蛍光プローブによる描出

図7 (上段および下段) に19ヶ月および32か月齢APPTgマウスにTHK-265 1mg/kgを静脈内投与して118分間にわたって頭部を観察した画像を示した。APPTgマウスでは月齢依存的に脳内A β 蓄積が増加することが知られているが、図7ではこれを確認することができた。また投与3分後にはすでにTg-Wtマウス間で蛍光強度に明らかな差がみられた。

III. アミロイドーシスモデルマウスにおけるアミロイドの近赤外線蛍光プローブによる描出

図8にアミロイドーシスモデルおよびコントロールマウスにTHK-5XY 0.3mg/kgを静脈内投与後30分後の画像を示したが、THK-5XYはアミロイドーシスモデルマウスの脾臓 (アミロイド集積

部位) に一致して著明に集積したが、一方、コントロールマウスではアミロイドーシスモデルマウスと同様の所見は得られなかった。

次にTHK-5XYと同様に長波長蛍光物質であるが、アミロイド蛋白に親和性を有しないインドシアニングリーン 0.3mg/kgをアミロイドーシスモデルマウスに静脈内投与30分後の画像および同用量のTHK-5XYを静脈内投与した際のそれと比較した (図9)。THK-5XYはアミロイドーシスモデルマウスの脾臓 (アミロイド集積部位) に一致して著明な集積を示したが、一方、インドシアニングリーンでは同マウスにおいてTHK-5XYと同様の所見は得られなかった。

コントロールおよびアミロイドーシスモデルマウスにTHK-5XYを投与後に脾臓を摘出し、同臓器を普通のカラー写真および近赤外蛍光イメージング装置 (IVIS) にて撮影した画像を図10上段に、また同臓器を薄切し、コンゴ レッド染色、Direct fast scarlet染色、抗マウスAA抗体免疫染色した結果を図10下段に示した (THK-5XYは投与のみで染色せず)。アミロイドーシスモデルから摘出された脾臓をIVISで撮影した際には強い近赤外線蛍光がみられたが、コントロールマウスから摘出されたそれにはモデルマウス様の所見は観察されなかった (図10上段)。

THK-5XYを投与後、摘出された脾臓を薄切して蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i, Nikon)、フィルターCy5(励起590-650nm、蛍光: 662.5-737.5nm) で観察した所見と、近接切片をコンゴレッド染色、Direct fast scarlet染色および抗マウスAA抗体免疫染色した所見とはほぼ一致することが確認された (図10下段)。

D. 考察

アミロイドーシスにおける病理像としてのアミロイドに高い親和性を示す BF-227 を用いて、アミロイドーシス治療薬として注目を浴びているトシリズマブの有用性を検証した。胃幽門輪標本における BF-227 染色の結果、特にトシリズマブにおいて治療前に比較して治療1年後および2年後に有意なBF-227染色領域の減少がみられ、アミロイドーシスに対してトシリズマブが治療

効果を有することが示唆される結果が得られた。

A β に親和性を有し、血液-脳関門を容易に通過するとともに生体を透過する領域（光の分光学的窓領域）に励起および蛍光波長を有する THK-265 を脳内にA β が蓄積する APPTg マウスに投与した結果、同 Tg マウスにおける月齢依存的な A β の蓄積を確認することができた。

また投与 3 分後には Tg マウス脳と Wt マウスのそれとの間で明らかな蛍光強度の差がみられた。その理由としては THK-265 の濃色効果 (hyperchromic effect) が考えられた(図 11)。図 11 に示したように THK-265 は A β 1-140 および A β 1-42 と結合することにより、それぞれ 3.6 倍および 6.0 倍蛍光強度が増強された。THK-265 のこの特性が投与 3 分後というタイミングで Tg と Wt マウス間で明らかな差をもたらした原因であろうと考えられる。

アミロイドに親和性を有するとともに生体を透過する領域（光の分光学的窓領域）に励起および蛍光波長を有する THK-5XY を脾臓にアミロイドが蓄積するモデルマウスに投与した結果、アミロイド蓄積部位に THK-5XY の高集積を確かめることができた。一方、THK-5XY と同様に長波長蛍光物質であるが、アミロイド蛋白に親和性を有しないインドシアニングリーン同マウスにおいて THK-5XY と同様の所見は得られなかった。

以上、A β and/or アミロイドに親和性を有し、生体を透過する領域（光の分光学的窓領域）に励起および蛍光波長を有する近赤外線蛍光プローブは、簡便・廉価・迅速なアルツハイマー病およびアミロイドーシス診断を可能とする可能性が高いことが示唆される（但し、アルツハイマー病診断用には前述の 2 つの特性にプラスして血液-脳関門通過性が高いというそれも必要である）。

表 1 に一応の定量性が得られる各種アルツハイマー病診断の特徴とそれらの比較表を、また表 2 にアルツハイマー病診断に求められる達成目標と各診断法の比較表を示した。

近赤外線蛍光プローブを用いたアルツハイマー病診断法は、近い将来、同病診断のファーストチョイスとなり、特にプレクリニカル アルツハイマー病の診断に最も適したそれになる可能性が高いと、分担研究者らは考えている。

E. 結論

1) アミロイドーシス患者の胃幽門輪標本を BF-227 で染色することにより、治療前に比較してトシリズムの治療効果が示唆される結果を得ることができた。

2) 近赤外線蛍光プローブ THK-265 を A β Tg マウスに投与することにより、同マウスの月齢依存的な A β の蓄積が確認され、また Wt マウスとの比較では投与 3 分後に明らかな差がみられた。

3) 近赤外線蛍光プローブ THK-5XY をアミロイドーシスマウスに投与することにより、アミロイド蓄積部位（脾臓）に一致して、THK-5XY の高集積像が観察された。

なお、THK-265 のデータは引用文献 3) に発表されている。

引用文献

- 1) Furukawa K, Ikeda S, Okamura N, Tashiro M, Tomita N, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Cardiac positron-emission tomography images with an amyloid-specific tracer in familial transthyretin-related systemic amyloidosis. *Circulation* 125:556-557.2012
- 2) Antoni G, Lubberink M, Estrada S, Axelsson J, Carlson K, Lindsjö L, Kero T, Långström B, Granstam SO, Rosengren S, Vedin O, Wassberg C, Wikström G, Westermarck P, Sörensen J.: In vivo visualization of amyloid deposits in the heart with 11C-PIB and PET. *J Nucl Med.* 2013 Feb;54(2):213-20.
- 3) Okamura N, Mori M, Furumoto S, Yoshikawa T, Harada R, Ito S, Fujikawa Y, Arai H, Yanai K, Kudo Y: In vivo detection of amyloid plaques in the mouse brain using the near-infrared fluorescence probe THK-265. *J Alzheimers Dis.*(2011)23.37-48

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furukawa K, Ikeda S, Okamura N, Tashiro M, Tomita N, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Cardiac positron-emission tomography images with an amyloid-specific tracer in familial transthyretin-related systemic amyloidosis. *Circulation* 125:556-557.2012
 - 2) Villemagne V L, Furumoto S, Fodero-Tavoletti M, Harada R, Mulligan R S, Kudo Y, Masters C L, Yanai K, Rowe C C, Okamura N.: The challenges of tau imaging. *Future Neurology*. 7.409-421.2012
 - 3) Tomita N, Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Une K, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H.: Brain accumulation of amyloid β protein visualized by positron emission tomography and BF-227 in Alzheimer's disease patients with or without diabetes mellitus. *Geriatr Gerontol Int*. 13.215-21.2013
 - 4) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Maruyama M, Higuchi M, Yosikawa T, Arai H, Iwata R, Kudo Y, Yanai K.: Comparison of the binding characteristics of [(18F)]THK-523 and other amyloid imaging tracers to Alzheimer's disease pathology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 40.125-132.2013
 - 5) Furumoto S, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Ishikawa Y, Sugi K, Tomita N, Waragai M, Harada R, Tago T, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y.: A (18)F-Labeled BF-227 Derivative as a Potential Radioligand for Imaging Dense Amyloid Plaques by Positron Emission Tomography. *Mol Imaging Biol*. 2013 Jan 30.(Accepted)
2. 学会発表
- 海外
- 1) Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Harada R, Arai H, Kudo Y, Yanai K: [11C]BF-227 PET study in patients with dementia with Lewy bodies. 第 59 回米国核医学会議 (SNM 2012). 米国・マイアミ. 2012 年 6 月 12 日
 - 2) Okamura N, Furumoto S, Harada R, Fodero - Tavoletti M, Villemagne V, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: Novel 18F-Labeled Quinoline Derivatives for In Vivo Detection of Tau Pathology in Alzheimer's Disease. 国際アルツハイマー病学会 2012. バンクーバーコンベンションセンター (カナダ) 2012 年 7 月 14 日～19 日
 - 3) Villemagne V L, Furumoto S, Fodero- Tavoletti M T, Mulligan R S, Hodges J, Piguet O, Pejoska S, Kudo Y, Masters C L, Yanai K, Rowe C C, Okamura N: In vivo tau imaging in Alzheimer's disease and other dementias. 国際アルツハイマー病学会 2012. バンクーバーコンベンションセンター (カナダ) 2012 年 7 月 14 日～19 日
 - 4) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Yoshikawa T, Arai H, Kudo Y, Yanai K: Wavelength-dependent selective detection of Tau pathology in Alzheimer's disease using a novel fluorescent probe THK-1188. 国際アルツハイマー病学会 2012. バンクーバーコンベンションセンター (カナダ) 2012 年 7 月 14 日～19 日
 - 5) Suzuki M, Tomita N, Okamura N, Furukawa K, Kudo Y, Arai H: The Relationships between memory impairment and dense beta-amyloid deposition reflected by BF-227. 国際アルツハイマー病学会 2012. バンクーバーコンベンションセンター (カナダ) 2012 年 7 月 14 日～19 日
 - 6) Furumoto S, Kawauchi T, Okamura N, Tago T, Harada R, Zhang M.R, Higuchi M, Yanai K, Iwata R, Kudo Y.: Novel Fluorine-18 Labeled Benzothiazole Derivatives for Amyloid Imaging by PET. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine 2012. MiCo-Milano Congressi (イタリア・ミラノ) . 2012 年 10 月 26 日～10 月 31 日
 - 7) Okamura N, Furumoto S, Harada R, Tago T, Fodero-Tavoletti M, Villemagne VL, Iwata R, Arai H, Yanai K, Kudo Y.: [18F]THK-5105 and [18F]THK-5117 as possible PET probes for in vivo detection of tau pathology in Alzheimer's disease. *Human Amyloid Imaging* 2013. 米国・マイアミ. 2013 年 1 月 16 日～18 日
- 国内
- 1) 原田龍一、岡村信行、古本祥三、吉川雄朗、谷内一彦、工藤幸司：アルツハイマー病病理像

- を生体画像化するための光イメージングプローブの開発. 第7回日本分子イメージング学会総会・学術集会、浜松市アクトシティ、2012年5月24-25日
- 2) 岡村信行、古本祥三、原田龍一、多胡哲郎、岩田錬、谷内一彦、工藤幸司：新規 18F 標識プローブ THK-5105 によるタウ蛋白の生体イメージング. 第7回日本分子イメージング学会総会・学術集会、浜松市アクトシティ、2012年5月24-25日
- 3) 原田龍一、岡村信行、古本祥三、吉川雄朗、谷内一彦、工藤幸司：波長依存性蛍光プローブによるアミロイド・タウの選択的検出. 第7回日本分子イメージング学会総会・学術集会、浜松市アクトシティ、2012年5月24-25日
- 4) 工藤幸司、丸山将浩：特異的プローブによるタウ及びA β 蓄積メカニズムの解明. 分子イメージング研究戦略推進プログラム 成果発表シンポジウム2012. 神戸国際会議場メインホール. 2012年8月1日
- 5) 岡村信行、古本祥三、工藤幸司：特異的プローブによるタウ及びA β 蓄積メカニズムの解明（タウイメージング）. 分子イメージング研究戦略推進プログラム 成果発表シンポジウム2012. 神戸国際会議場メインホール. 2012年8月1日
- 6) 古本祥三、岡村信行、工藤幸司：特異的プローブによるタウ及びA β 蓄積メカニズムの解明（アミロイド イメージング）. 分子イメージング研究戦略推進プログラム 成果発表シンポジウム2012. 神戸国際会議場メインホール. 2012年8月1日
- 7) 原田龍一、岡村信行、古本祥三、吉川朗、工藤幸司、谷内一彦：アルツハイマー病病理像検出のための光イメージング. 分子イメージング研究戦略推進プログラム 成果発表シンポジウム2012. 神戸国際会議場メインホール. 2012年8月1日
- 8) 岡村信行、古本祥三、原田龍一、谷内一彦、多胡哲郎、岩田錬、荒井啓行、工藤幸司：¹⁸F 標識キノリン誘導体を用いた脳内蓄積タウ蛋白画像化の試み. 東北脳循環カンファレンス、仙台市 江陽グランドホテル5F鳳凰の間. 2012年9月22日
- 9) 古本祥三、岡村信行、多胡哲郎、原田龍一、石川洋一、岩田錬、谷内一彦、工藤幸司：2-アリアルキノリンを母核とするフッ素 18 標識タウ画像化プローブ. 第52回日本核医学会学術総会. ロイトン札幌・さっぽろ芸術文化の館. 2012年10月11日～13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

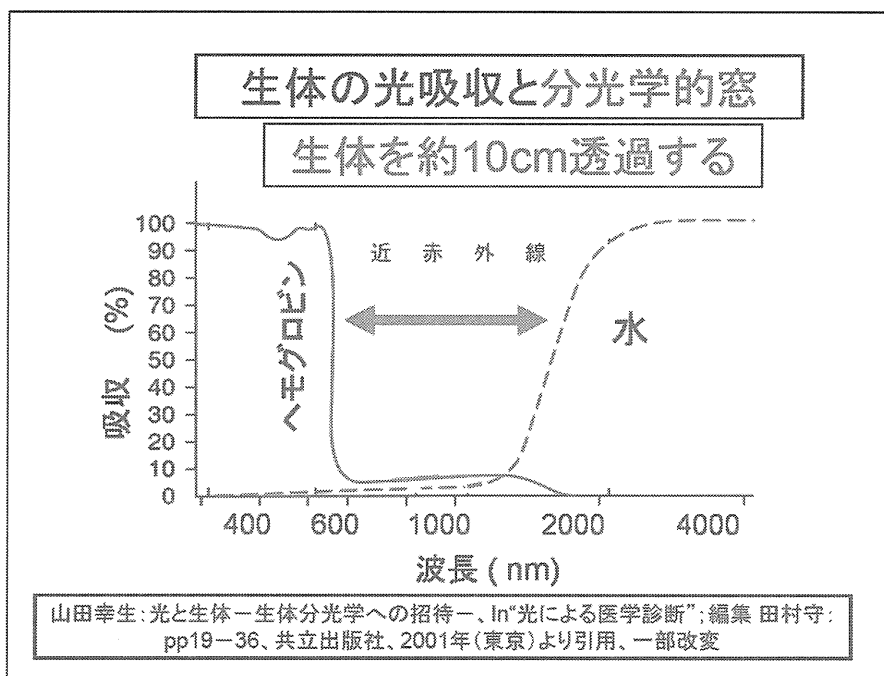


図 1. 生体における光の透過性
生体を透過しやすい光の領域は「生体における分光学的窓」と呼ばれている。

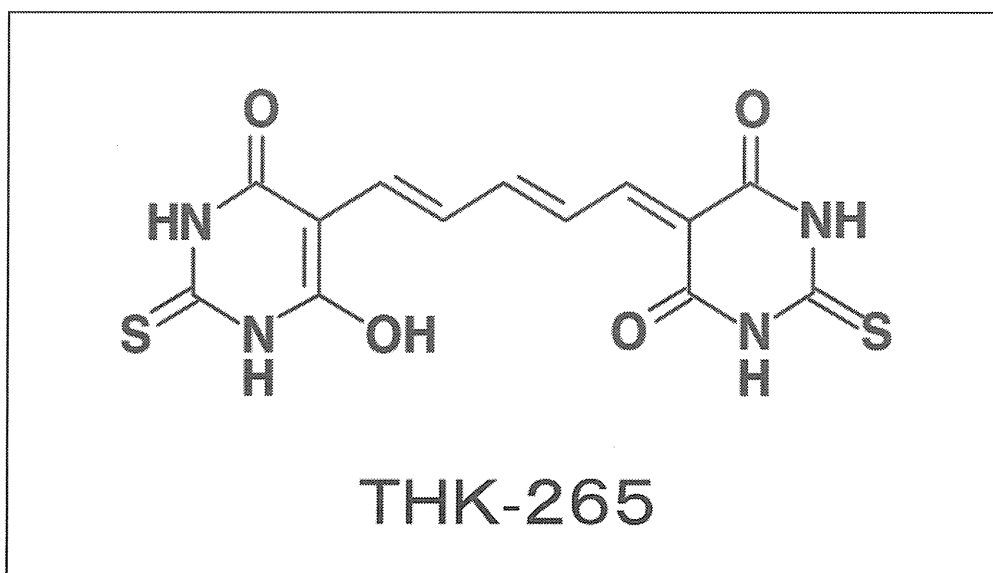


図 2. THK-265 の化学構造

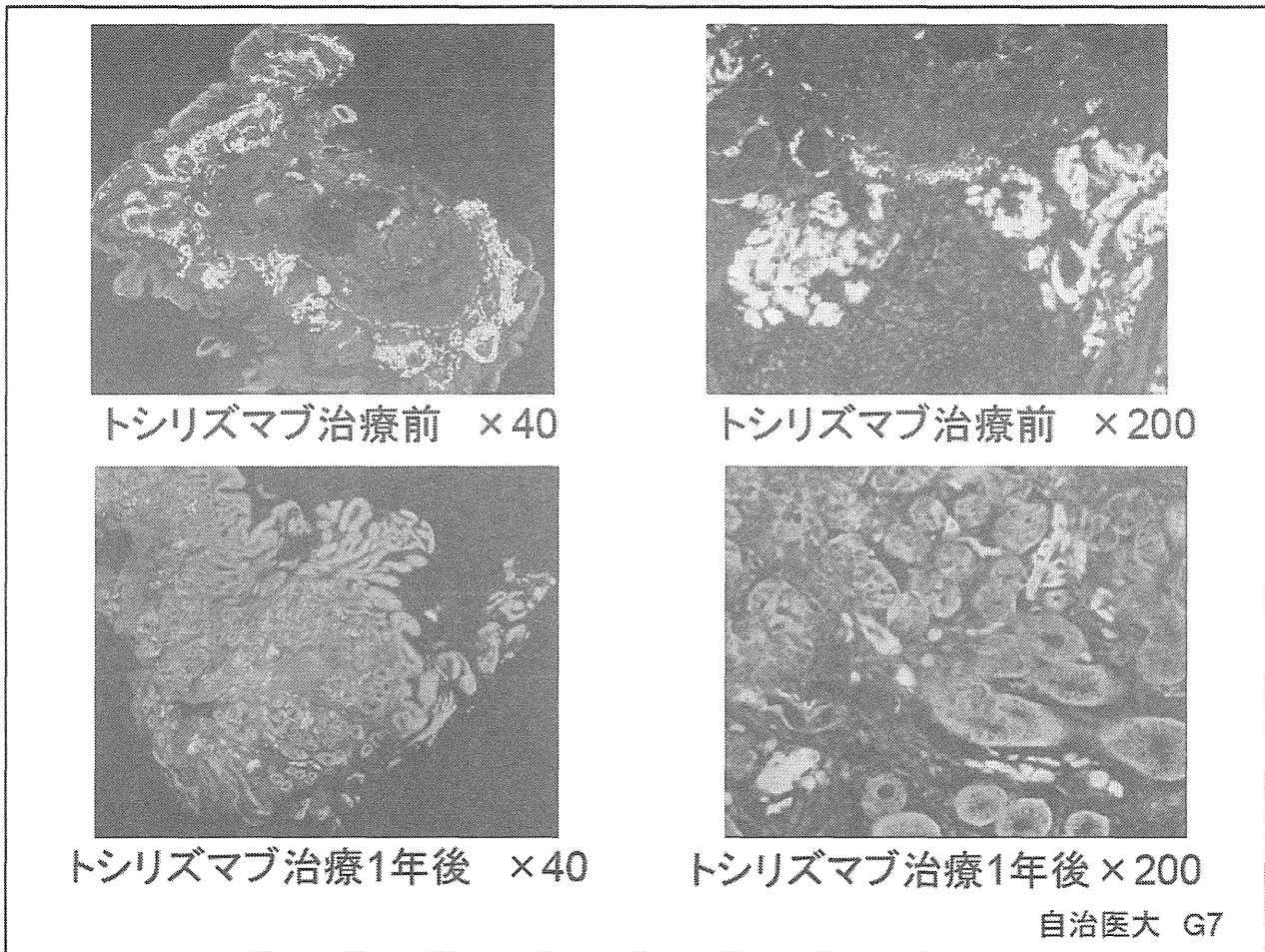
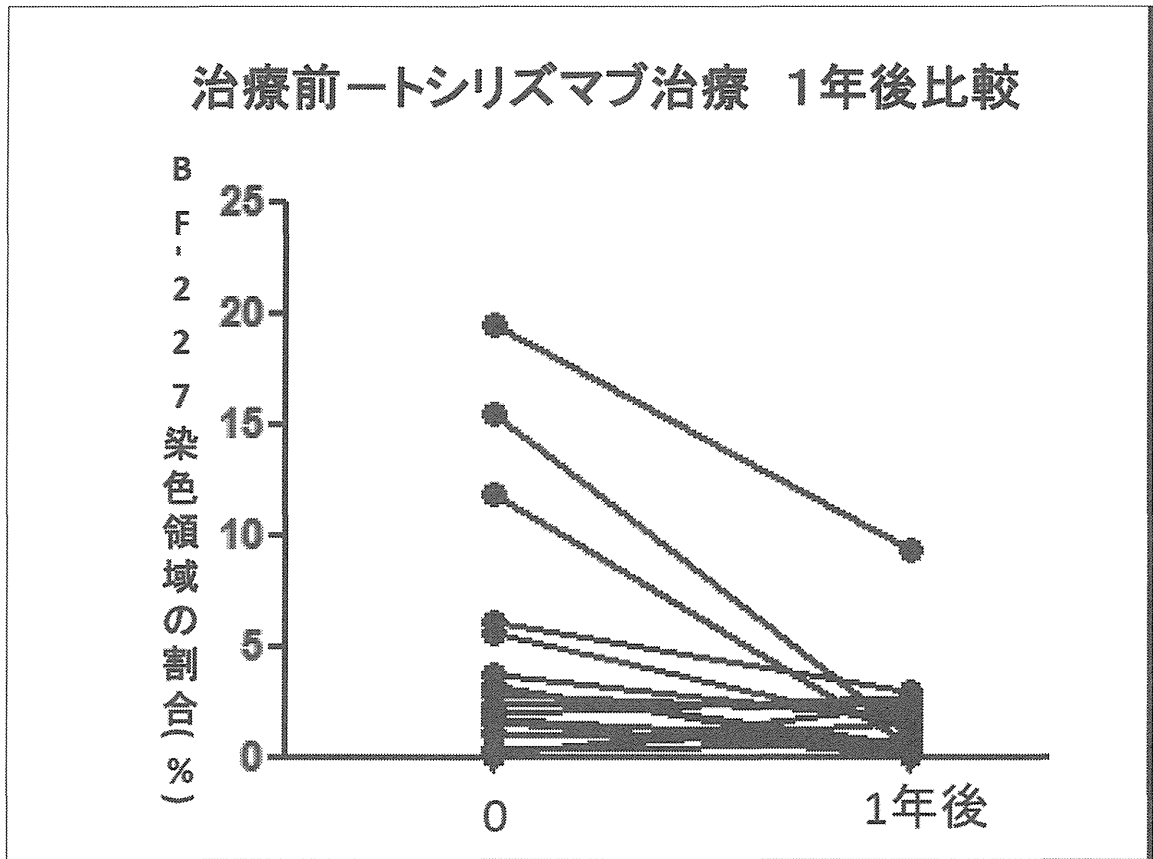


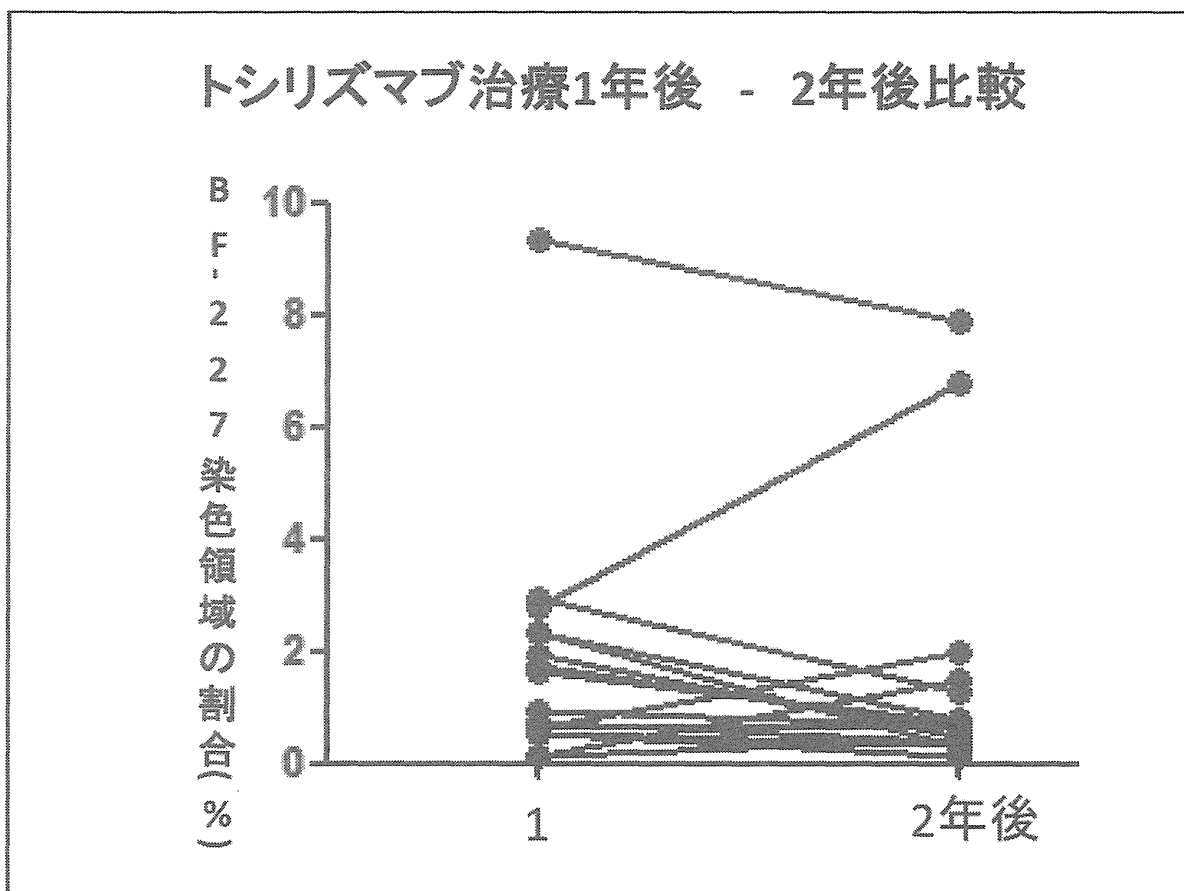
図3.アミロイドーシス患者におけるトシリズマブ治療前と治療1年後のBF-227染色像
(胃幽門輪部、自治医大の症例G7、正立蛍光顕微鏡画像)



Wilcoxon signed rank test			
	Mean of differences	S.D.	P value
トシリズマブ群 n=17	2.95	4.72	0.0138*

BF-227染色領域 (%)		
	治療前	1年後
平均±S.D.	4.74±5.61	1.79±2.13

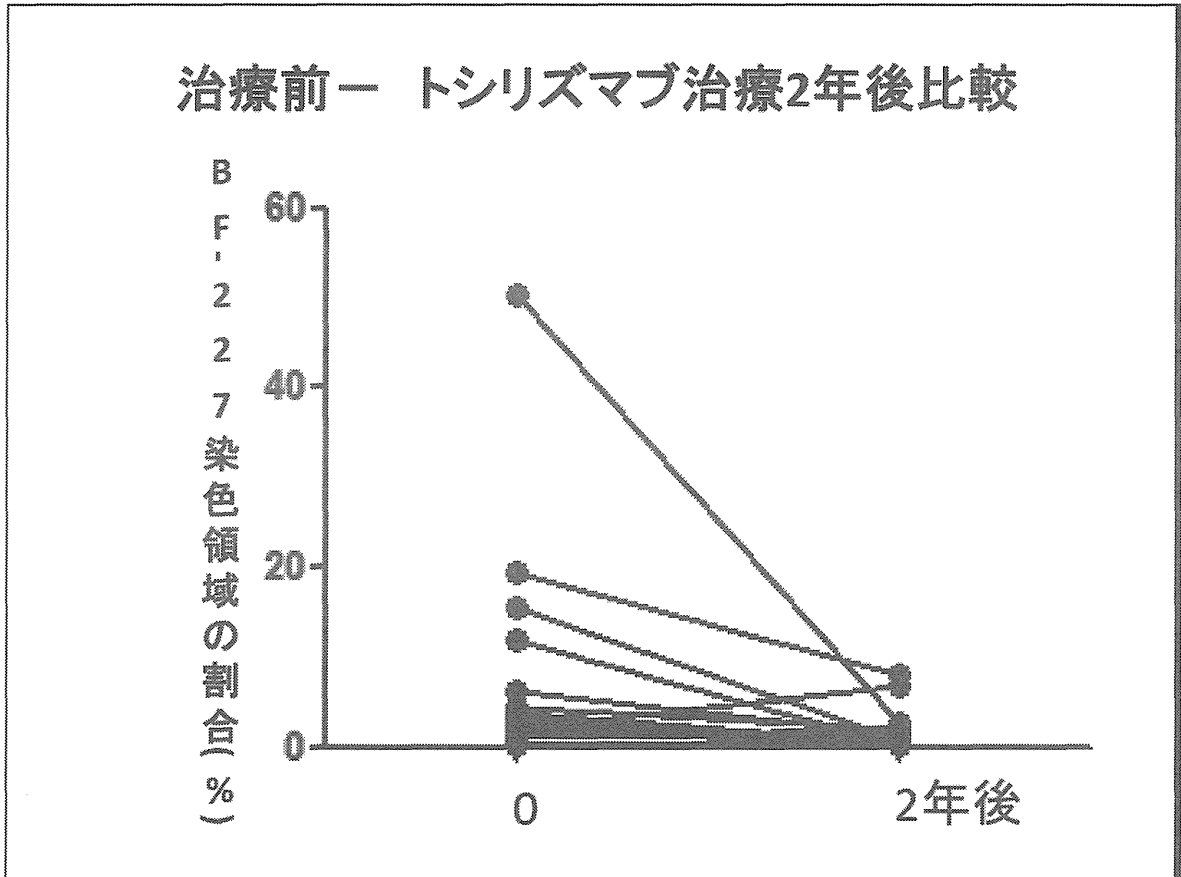
図 4. アミロイドーシス患者におけるトシリズマブ治療前と治療 1 年後の胃幽門輪部 BF-227 染色領域



Wilcoxon signed rank test			
	Mean of differences	S.D.	P value
トシリズマブ群 N=16	0.27	1.52	0.1550

BF-227染色領域(%)		
	1年後	2年後
平均±S.D.	1.83±2.20	1.55±2.31

図 5. アミロイドーシス患者におけるトシリズマブ治療1年後と同2年後の胃幽門輪部 BF-227 染色領域



Wilcoxon signed rank test			
	Mean of differences	S.D.	P value
トシリズマブ群 N=20	5.09	11.09	0.0076 ^{**}
BF-227染色領域(%)			
	治療前	2年後	
平均±S.D.	6.59±11.58	1.50±2.11	

図 6. アミロイドーシス患者におけるトシリズマブ治療前と治療 2 年後の胃幽門輪部 BF-227 染色領域

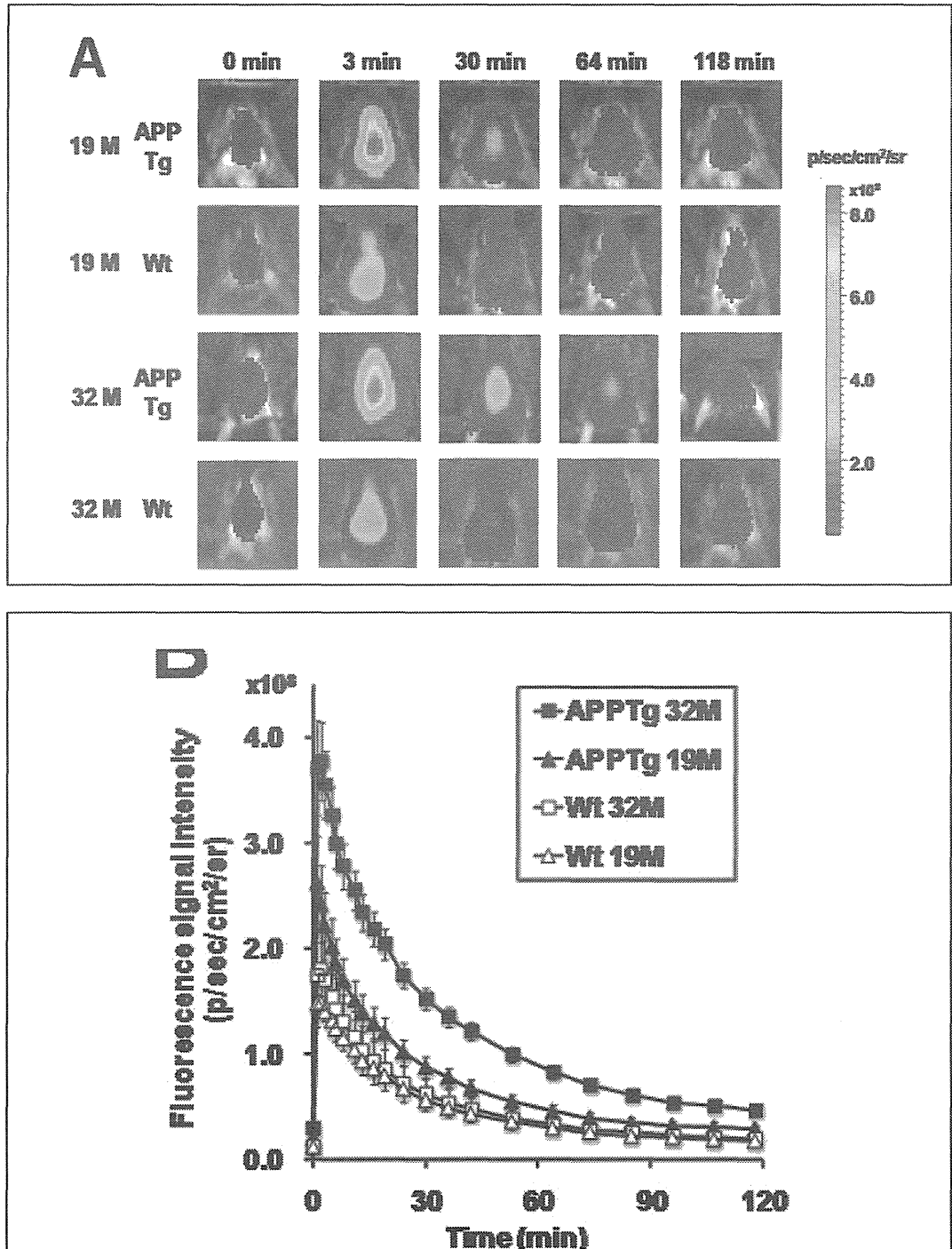


図 7.19 7ヶ月および 32 か月齢 APPTg マウスならびに同月齢 Wt マウスに THK-265 1mg/kg を静脈内投与した際のマウス頭部における蛍光イメージング画像（上段）および蛍光強度タイムコース（下段）

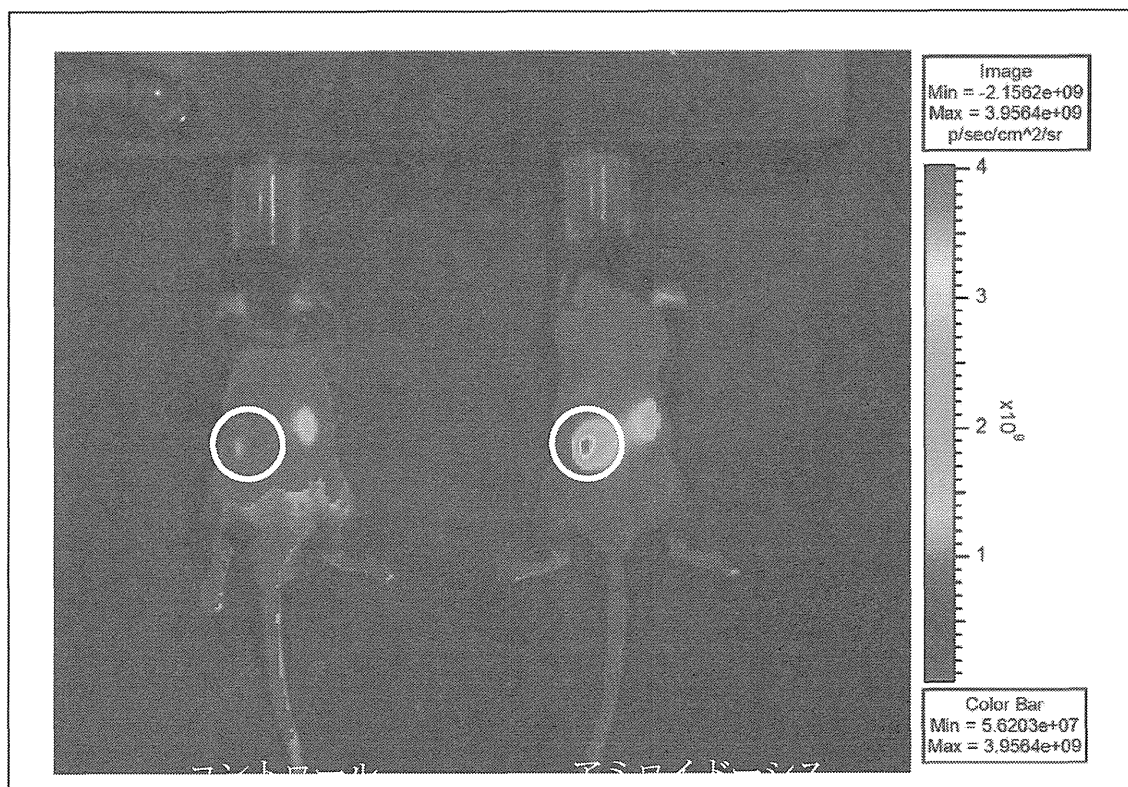


図 8. アミロイドーシスモデル (右) およびコントロール (左) マウスに THK-5XY 0.3mg/kg を静脈内投与した際の蛍光イメージング画像 (投与 30 分後の画像)

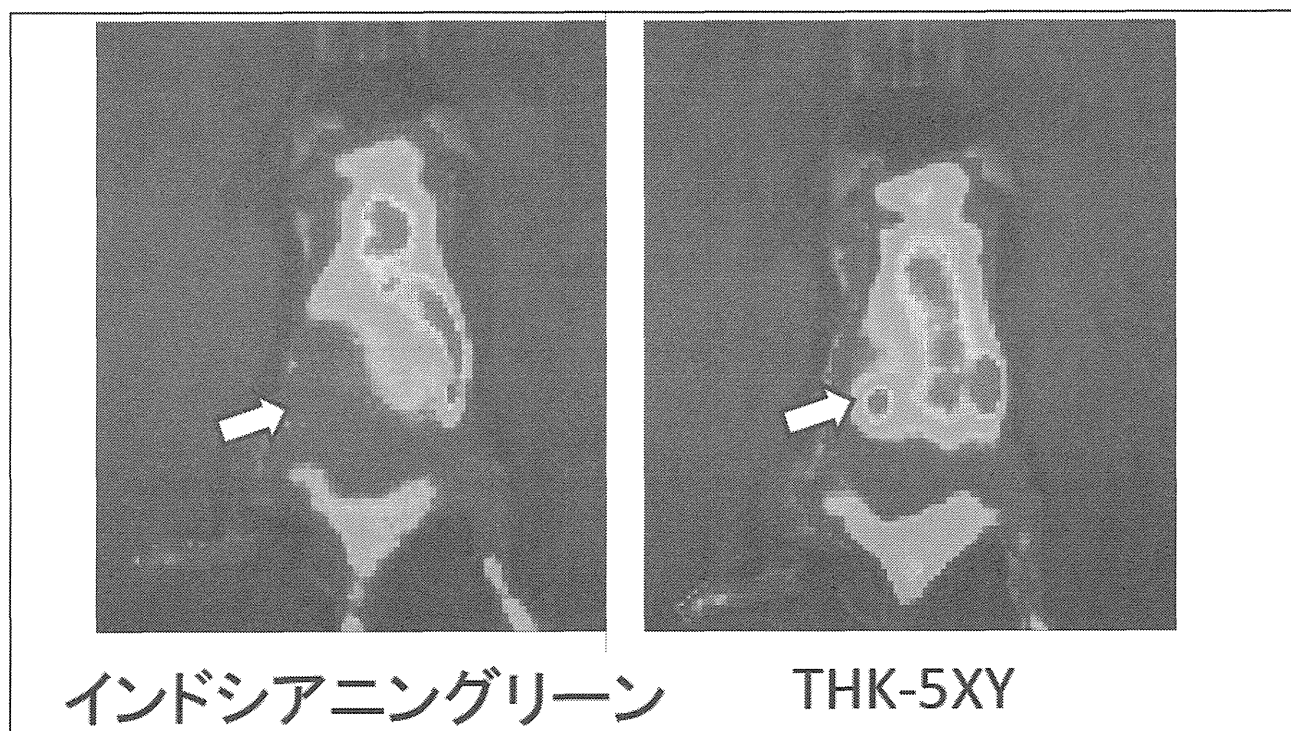


図 9. アミロイドーシスモデルマウスにそれぞれ THK-5XY およびインドシアニンググリーン 0.3mg/kg を静脈内投与した際の蛍光イメージング画像 (投与 30 分後の画像)

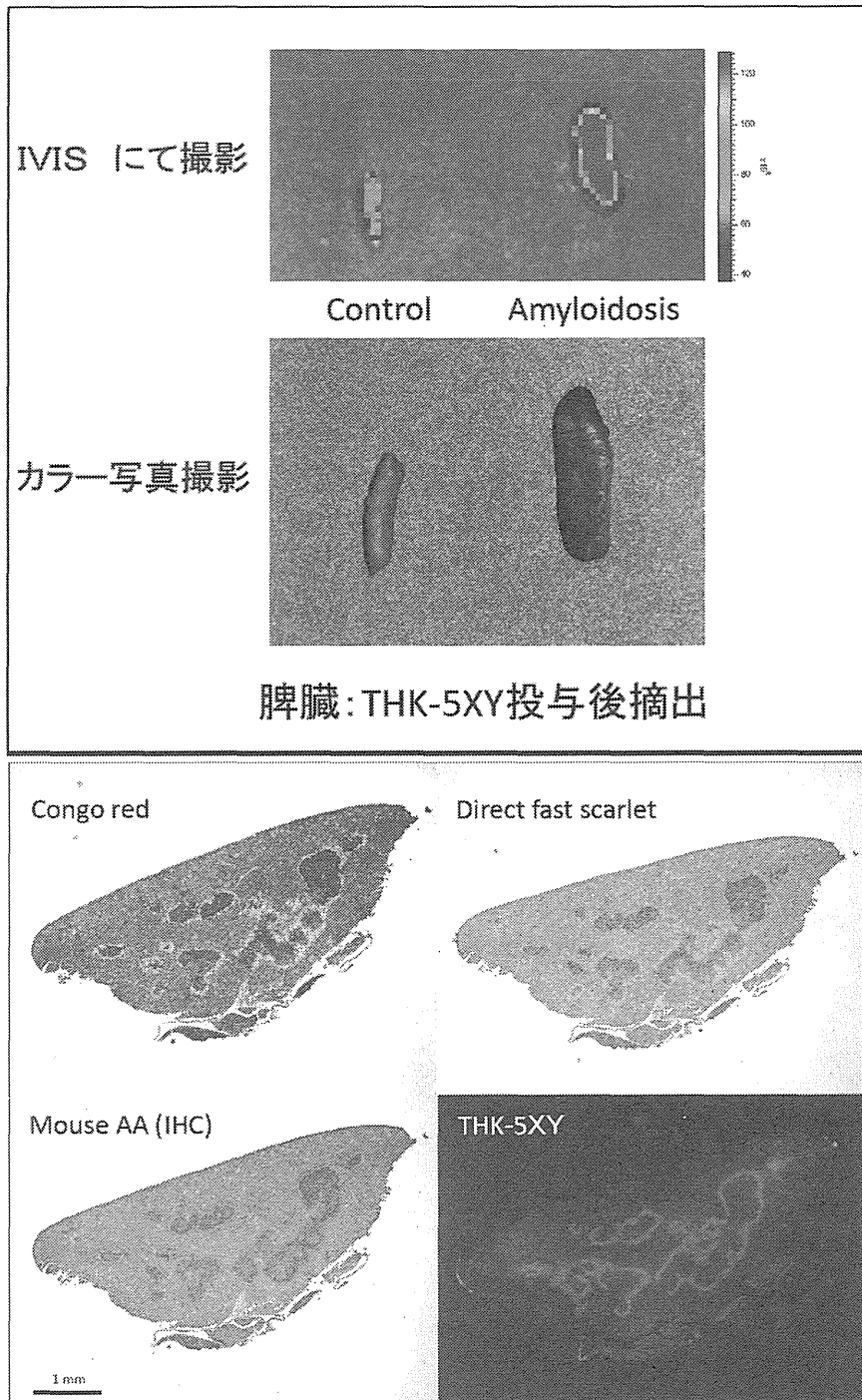


図 10. コントロールおよびアミロイドーシスモデルマウスに THK-5XY を投与後に脾臓を摘出し、同臓器を普通のカラー写真および近赤外蛍光イメージング装置 (IVIS) にて撮影した画像 (上段) 脾臓を薄切し、コンゴ レッド染色、Direct fast scarlet 染色、抗マウス AA 抗体免疫染色した結果 (下段、THK-5XY は投与のみで染色せず、正立蛍光顕微鏡画像)。

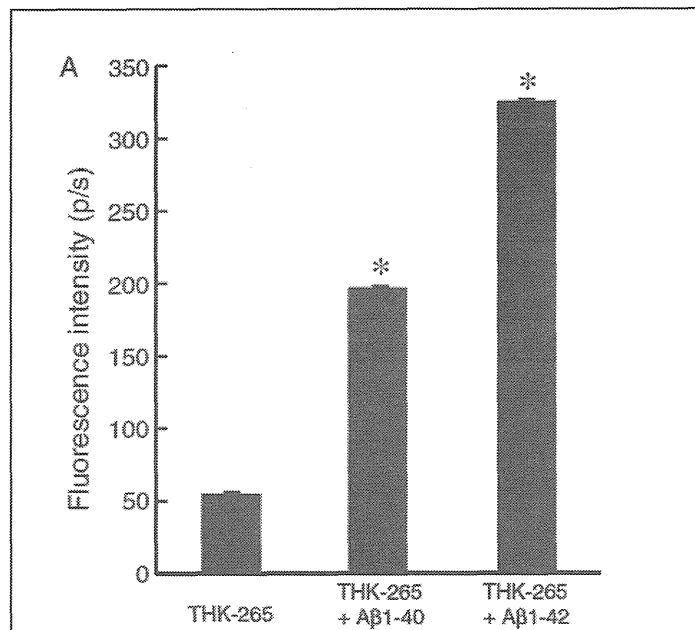


図 11. THK-265 と Aβ 1-40 および Aβ 1-42 とが結合した際の濃色効果

表 1. 各種アルツハイマー病診断法の特徴とそれらの比較

診断法 比較項目	近赤外線蛍光プローブ- 蛍光イメージング診断装置	MRI	PETプローブ-PET
消費エネルギー	極めて少ない	極めて多大	極めて多大
診断機器の価格	比較的安価 (500万円から 1000万円と推測される)	極めて高価 (数億円)	極めて高価 (数億円)
付帯施設・機器の 必要性	必要なし	必要有り (磁場-電波シールド施設・機器冷却装置・ 建屋等・装置が大がかり)	必要有り (サイクロトロン・放射 性物質隔離施設・建屋等・装置 が大がかり)
放射線を	使用しない	使用しない	使用する
診断原理	近赤外線蛍光プローブとA βとの結合	脳の体積の減少 (脳萎縮)	標識プローブとAβとの結合
感度	10 ⁻¹² M		10 ⁻¹² M
発症前および鑑別診断	可能	不可能~可能	可能
診断場所 装置の可搬性	ベッドサイド、外来 等 持ち運び自由	MRI施設(建屋) 可搬性なし(設置)	PET施設(建屋) 可搬性なし(設置)
患者1人当り	数分~30分 ≤1万円	数万円	1時間から数時間 数万円
集団検診に 人間ドックに	最適	不適	不適

表 2 アルツハイマー病診断に求められる達成目標と各診断法の比較

達成目標	タウ and/or アミロイド・蛍 光イメージング	タウ イメージング ・PET	アミロイド イメージング ・PET	MRI
感度・特異度 80%以上	○(タウ)	○	×~△	△
認知機能テストとの相関	○(タウ)	○	×	△~○
客観的・定量的に評価	○	○	○	○
非侵襲的であること	○	○	○	○
Preclinical AD 検出可能	○(Aβ)	△~○	○	×
簡便・廉価・迅速に診断	○	×	×	×
一般医院・病院に容易に 導入できること	○	×	×	×

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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 アミロイド線維の形成・伸長は ApoA-II タンパク質の 62 番アミノ酸に影響される

研究分担者 樋口 京一 信州大学医学系研究科疾患予防医科学系加齢生物学講座

共同研究者 澤下 仁子*、田 耕*、羅 宏敏*、李 琳*、森 政之*、亀谷 富由樹**

*信州大学医学系研究科疾患予防医科学系加齢生物学講座、

** (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 マウス AApoAII アミロイドーシスのアミロイド線維形成阻害ペプチドの阻害機構を、*in vitro* 線維形成解析システムで解析した。まず、AApoAII アミロイドーシス高発症マウスの C 型 ApoA-II の 62 番アミノ酸を F 型 ApoA-II の組成に置換した合成ペプチド N62K でアミロイド線維を前処理すると、線維伸長反応が抑制された。次に、N62K の線維形成阻害効果を検討した結果、重合反応初期の阻害効果が最も強く、次いで、1 次反応速度論に従って線維が形成している時期に効果を有した。また、他の 62 番 1 アミノ酸置換ペプチドを解析した結果、ApoA-II の 62 番アミノ酸が C 型のアスパラギン以外では線維を形成せず、同時に、線維形成阻害作用を併せ持つことを見いだした。以上の結果から、マウス ApoA-II の線維形成阻害ペプチドはアミロイド線維形成初期の線維核と相互作用し、線維のさらなる形成・伸長を抑制すると考えられ、62 番アミノ酸がマウス AApoAII アミロイドーシスの発症を左右する最重要分子であることが示唆された。線維形成阻害ペプチドとモノマーとの相互作用については詳細な解析が必要だが、線維形成阻害作用の詳細な分子機構が解明されれば、アミロイドーシスの伝播及び発症の抑制や治療に有効な物質の探索、分子設計への応用が期待できると考えられる。

A. 研究目的

マウス AApoAII アミロイドーシスをモデルとして、*in vitro* および *in vivo* 解析システムにより、アミロイド線維の形成・伸長と伝播機構を解析してきた。これまでに、このアミロイドーシスのアミロイド関連タンパク質 Apolipoprotein A-II (ApoA-II) については、高頻度発症マウスが持つ C 型 ApoA-II の線維形成コア領域 (N 末 6-16 番目と C 末 48-65 番目) を発見している¹⁾。また、線維形成コア領域内に C 型 ApoA-II とは 4 カ所のアミノ酸組成が異なる新変異体 (F 型) を持つマウスは AApoAII アミロイドーシスを全く発症せず (伝播もしない)、さらに、この F 型 ApoA-II の C 末ペプチド、特に、C 型 48-65 番ペプチド (c48/65) の 62 番をアスパラギン (N) からリジン (K) に置換した合成ペプチド N62K には線維形成を強力に阻害する作用があり、このペプチドをアミロイドー

シス誘発マウスに継続投与することでアミロイド線維の沈着を有意に軽減できることも明らかにしている²⁻⁴⁾。本研究では、C 型 ApoA-II 合成ペプチドの線維形成・伸長反応に対する N62K の阻害効果を *in vitro* 解析システムで検討し、このペプチドの線維形成阻害機構の解明を試みた。

B. 研究方法

C 末ペプチド N62K とアミロイド線維との相互作用：マウス C 型 ApoA-II 線維形成コア領域 (図 1) の合成ペプチド (Sigma Genosys, c6/16 と c48/65) を pH 2.5、37°C で振とうしてアミロイド線維を形成した。遠心操作で未反応ペプチドを除去した沈殿画分 (アミロイド線維) に、C 型 ApoA-II の C 末ペプチド c48/65、あるいは C 型 ApoA-II の 62 番アミノ酸を F 型 ApoA-II の K に置換した C 末ペプチド N62K を添加し、37°C で 30

分間振とうした。遠心後のアミロイド線維を用い、線維形成可能な C 型 ApoA-II の c6/16 と c48/65 による伸長反応をおこなった。チオフラビン T 法で伸長反応を経時観察し、形成物のコンゴレッド反応性と電子顕微鏡像を解析した。また、合成ペプチド由来アミロイド線維に c48/65 あるいは N62K を添加し、C 末ペプチドによる線維分解作用の有無を検討した。

C 末ペプチド N62K の線維形成阻害タイミング: C 型 ApoA-II ペプチドの c6/16 と c48/65 を pH 2.5、37°C で振とうして重合させる時に、N62K を 1) 反応開始期、2) 線維増加期、あるいは 3) 線維形成平衡期に添加し、N62K の線維形成阻害作用の強度を比較した。

62 番 1 アミノ酸置換 C 末ペプチドの線維形成阻害作用: C 型 ApoA-II の 62 番アミノ酸をアルギニン (R) あるいはアラニン (A) に置換した C 末ペプチド (N62R あるいは N62A) を用い、N 末 c6/16 との線維形成能、c6/16 と c48/65 の線維形成に対する阻害能、および線維分解能を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究で形成させたペプチド由来アミロイド線維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 時間以上浸漬して処理した。

C. 研究結果

C 末ペプチド N62K とアミロイド線維との相互作用: C 型 ApoA-II の C 末ペプチド c48/65 で前処理した線維を用いると、溶媒で処理した線維と同等の線維伸長を示したのに対し、C 末ペプチド N62K で前処理した線維では伸長反応が減少した (図 2C)。伸長反応後の反応溶液はいずれもコンゴレッドに陽性で、電子顕微鏡によって線維状の構造体を確認できたが、N62K 前処理線維による形成体では線維長が短く、極少量だった。また、c48/65 と N62K には線維分解作用はなかった (図 3)。

C 末ペプチド N62K の線維形成阻害タイミング: C 末ペプチド N62K の線維形成阻害作用は、1) 反応開始期に添加した場合が最も強く、次いで

2) 線維増加期に添加した場合であり、3) 線維形成平衡期にはほとんど作用しなかった (図 4)。

62 番 1 アミノ酸置換 C 末ペプチドの線維形成阻害作用: N62K と同様、アルギニン置換体 N62R は c6/16 とは線維を形成せず (図 2A)、c6/16 と c48/65 の線維形成を阻害し (図 2B)、また、線維分解作用はなかった (図 3)。一方、アラニン置換体 N62A は、N62K よりは作用が弱いものの、c6/16 との線維形成は極めて微量で、c6/16 と c48/65 の線維形成阻害作用も有したが、線維の分解については、むしろ抑制していた。

D. 考察

これまでの研究により、マウス ApoA-II の 62 番アミノ酸が C 型 ApoA-II の N から F 型の K に置換した合成ペプチドは C 型 N 末ペプチド c6/16 との線維形成能が無いだけでなく、C 型の N 末と C 末 (c6/16 と c48/65) の重合反応を阻害することが明らかになっている。今回の研究により、ApoA-II の 62 番アミノ酸を他の組成 (R、A) に置換した合成ペプチドも C 型 N 末ペプチド c6/16 との線維形成能が無いだけでなく、C 型の N 末と C 末 (c6/16 と c48/65) の重合反応を阻害することから、AApoAII アミロイド線維の形成には ApoA-II の 62 番目が N であることが最重要で、その部分の側鎖のチャージ変化や極性を持たない他のアミノ酸への置換によって劇的に線維形成能を失い、また同時に、線維形成阻害作用を併せ持つことが示唆された。一方で、これら置換体には線維分解作用は無く、c6/16 と c48/65 の反応初期あるいは線維増加期で反応を停止させること、N62K で前処理した線維では伸長反応が減少したことから、線維形成阻害ペプチドはアミロイド線維形成初期の線維核と相互作用し、線維のさらなる形成・伸長を阻害する可能性が考えられた (図 5)。阻害ペプチドとモノマーとの相互作用の有無のほか、この阻害ペプチドが他のアミロイドーシスに対しても線維形成阻害作用を有するか、今後の検討課題である。

E. 結論

マウス AApoAII アミロイドーシスについて、ApoA-II の 62 番アミノ酸が線維形成に関わる最重要アミノ酸であることを明らかにし、さらに、線

維形成阻害ペプチドの作用機構も仮定した。

[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) 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 21 年度分担研究報告書 50-55, 2010.
- 3) 樋口京一：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。アミロイドーシスに関する調査研究班 平成 23 年度分担研究報告書, 2012.
- 4) 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. *In revision*.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉田 邦広、樋口 京一、池田 修一。神経変性疾患は個体伝播するか -アミロイドーシスモデルからの推論- *BRAIN and NERVE* 64: 665 - 674, 2012.
- 2) 樋口 京一：全身性アミロイドーシスは伝播するか？ (チーター及びマウス)。 *Dementia Japan*, 27: 54 - 61, 2013.
- 3) 森 政之、樋口 京一：老化のモデル生物が果たす役割。「老化の生物学」石井直明、丸山直記編集、京都市、化学同人、(印刷中)
- 4) Higuchi K, Mori M, Sawashita J : Mouse senile systemic AApoAII amyloidosis: pathology, genetics and transmission. The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): Achievements and

Future Directions. Takeda T ed. pp 293-302.

Elsevier B.V. Amsterdam, The Netherlands, 2013 (in press)

2. 学会発表

- 1) 樋口 京一、王 耀勇、銭 金澤、田 耕、陳 磊、森 政之、澤下 仁子：マウスアポリポ蛋白質 A-I の欠損はアポリポ蛋白質 A-II の再分配と AApoAII アミロイドーシスの悪化を伴う。第 101 回日本病理学会総会、東京、4 月 26 日、2012 年。
- 2) Sawashita J, Zhang B, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Kametani F, Higuchi K : The C-terminal sequence of type F apolipoprotein A-II inhibits the polymerization of apolipoprotein A-II into amyloid fibrils in mice. XIIIth International Symposium on Amyloidosis. Groningen, The Netherlands, May 6 - 10, 2012
- 3) Qian J, Hirose M, Zhang B, Wang Y, Tian G, Luo H, Liu Y, Fu X, Ge F, Sawashita J, Mori M, Fujimoto M, Nakai A, Higuchi K: Heat shock factor 1 (Hsf1) plays a key role in AApoAII cardiac amyloidosis in mice. The Netherlands, May 6 - 10, 2012.
- 4) 王 耀勇、銭 金澤、田 耕、羅 宏敏、劉 穎業、森 政之、澤下 仁子、樋口京一：マウスアポリポ蛋白質 A-I の欠損はアポリポ蛋白質 A-II の再分配と AApoAII アミロイドーシスの悪化を伴う。第 27 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、東京都、7 月 6 日、2012 年。
- 5) 澤下 仁子、張 蓓茹、亀谷 富由樹、長谷川 一浩、森 政之、内木宏延、樋口 京一：マウス F 型 apoA-II の C 末ペプチドは老化アミロイドーシス高発症マウスのアミロイド沈着を軽減する。第 27 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、東京都、7 月 6 日、2012 年。
- 6) 王 耀勇、銭 金澤、田 耕、羅 宏敏、劉 穎業、森 政之、澤下 仁子、樋口 京一：アポリポ蛋白質 A-I の欠損はアポリポ蛋白質 A-II の加齢に伴う再分配と老化 AApoAII アミロイドーシスの悪化を伴う。日本基礎老化学会第 35 回大会、船橋市、7 月 16 日、2012 年。
- 7) 樋口 京一：全身性アミロイドーシスの伝播。

第3回神経科学と構造生物学の融合研究会、大阪、10月4日、2012年

- 8) Higuchi K : Animal Models to Study Aging and Age-Related Diseases. Pathogenesis of Amyloidosis; Findings from animal models of systemic amyloidosis. 老年医学研究進捗国際研究会, 湖北宜昌 (武漢)、中国、October 26-28, 2012.
- 9) 樋口 京一 : アミロイドーシスは伝播するか?—タンパク質フォールディング病の共通メカニズムとしての伝播現象—、京都大学再生医科学研究所セミナー、京都市、11月2日、2012年.
- 10) 樋口 京一 : 伝播性 (感染性) アミロイドーシス。お茶の水 Brain Science Seminar, 東京、12月7日、2012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

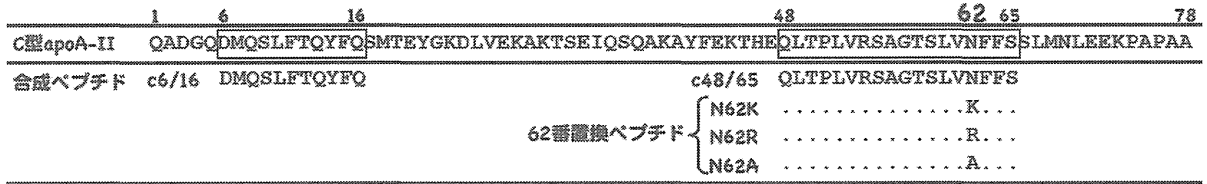


図1. AApoAIIアミロイドーシス好発マウスのC型apoA-IIと合成ペプチドのアミノ酸組成
グレーの囲みは線維形成コア領域を示す

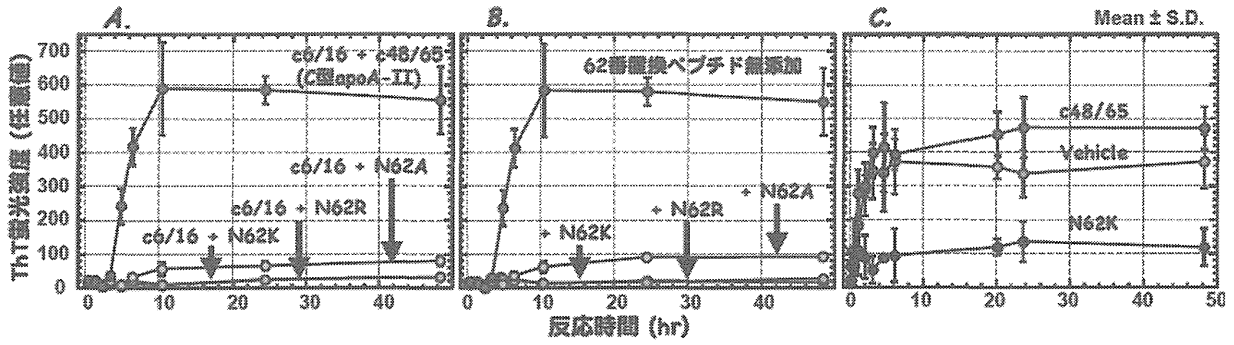


図2. 1アミノ酸置換C末ペプチドによる重合反応(A)、線維形成阻害反応(B)と線維伸長阻害反応(C)

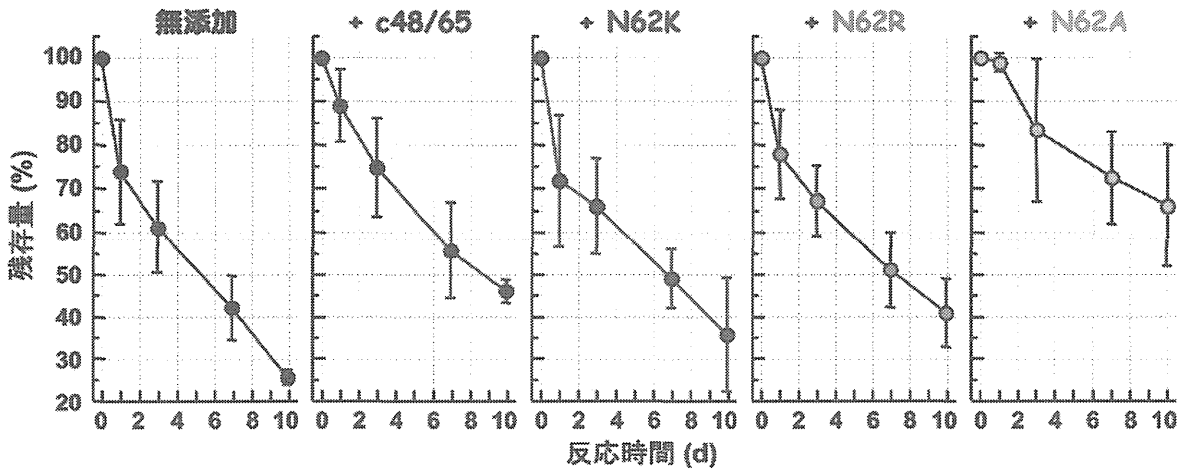


図3. 1アミノ酸置換C末ペプチドによるアミロイド線維の分解反応

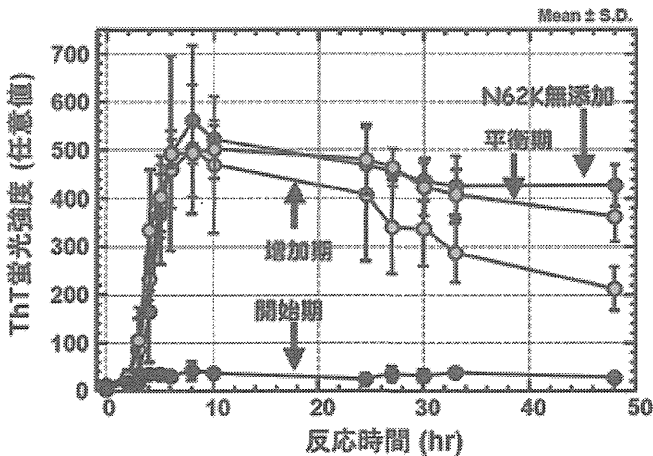


図4. 1アミノ酸置換C末ペプチドN62Kの線維阻害タイミング

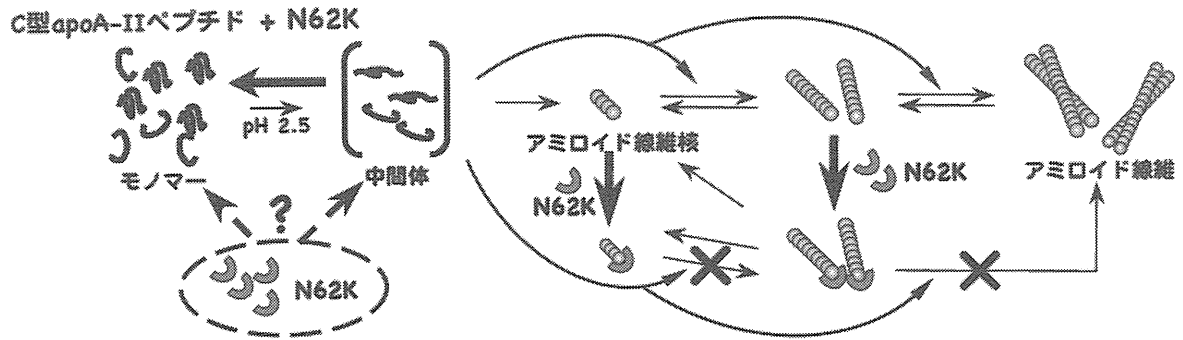


図5. 1アミノ酸置換ペプチドのアミロイド線維形成阻害機序 (仮説)
 核依存性重合モデルに従ってモノマーから線維が形成される過程で、線維末端にN62Kが作用して線維の伸長を阻害すると考えられる。N62Kとモノマーとの相互作用は今後の検討課題。