

博士論文

論文題目

犬と猫のアミロイド症の病理発生に関する基盤的研究

氏名 鄭 明奈

緒論.....	3
第1章 犬と猫の各種アミロイドとクルクミンの結合性に関する研究.....	11
序.....	12
材料と方法.....	14
結果.....	16
考察.....	18
要約.....	21
図表.....	22
第2章 犬と猫の各種アミロイド沈着における ApoE および LRP1 の関与.....	32
序.....	33
材料と方法.....	35
結果.....	37
考察.....	38
要約.....	41
図表.....	42
第3章 日本猫の SAA 遺伝子および沈着 AA アミロイドを構成する SAA 分子種 の検索.....	47
序.....	48
材料と方法.....	50
結果.....	53
考察.....	55
要約.....	59
図表.....	60
総括.....	71
謝辞.....	76
引用文献.....	77

緒論

アミロイドは、クロス β シート構造を有する不溶性線維状蛋白質の総称であり、全身諸臓器の細胞外にアミロイドが沈着してその機能障害を引き起こす疾患群をアミロイド症と呼ぶ。アミロイドおよびアミロイド症という疾患概念は 1853 年に Virchow によってなされた。それから 150 年以上経た今もアミロイド症の根本的な治療方法は確立しておらず、それどころか、異なる病態における、異なる臓器に、異なるアミロイドが新たに見つかり、現在では 31 種類のアミロイド蛋白質が生化学的に同定され、またその前駆体蛋白質についても明らかになっている[73]。日本では、全身性アミロイド症のうち AL アミロイド症、家族性アミロイドポリニューロパチー、老人性全身性アミロイド症が指定難病として医療費助成の対象疾患となっている。また、限局性アミロイドーシスである AD の患者数は 2015 年の時点で 250 万人を超え、更なる高齢化社会を迎えるにあたり増加の一途をたどると考えられている。アミロイド症は古くて新しい病態であり、今なお盛んにその病態や治療法が研究されている。本研究は、犬と猫のアミロイド症の病理発生を研究することで、ヒトのアミロイド症の病態解明の一助をなることを目的として行った。

アミロイドは、それぞれ異なる前駆体蛋白質に由来するにも関わらず、いずれもヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で薄桃色の無構造物として観察され、コンゴレッド色素により赤桃色に染色され、これを偏光顕微鏡で観察すると黄緑色の複屈折光を呈する領域として同定される。また、アミロイドは電子顕微鏡では幅 7~13 nm の細長い線維が錯綜状に認められる。コンゴレッド色素はフェノール環を 6 つ有するポリフェノール化合物で、化学構造的にアミロイドのクロス β シート構造に親和性を有すると考えられている[35]。一方クルクミンはコンゴレッドと類似のポリフェノール構造を有する天然化合物であり、アルツ

ハイマー病 (AD)の原因とされているアミロイド β (A β)と結合することが報告されている[40, 50]。疫学的調査では、カレーの消費頻度と認知機能レベルに有意な正の相関があることが報告されており[53]、*in vitro* では A β の線維伸長を抑制するという実験結果も得られている[97]。ヒトのアミロイド症は、アミロイド蛋白質が全身諸臓器に沈着する全身性アミロイド症と、特定の臓器に限局して沈着する限局性アミロイド症に大別されるが、動物においても全身性と限局性のいずれも発生が報告されており (Table 0)、いくつかの自然発症例がヒトアミロイド症の病態モデルとして用いられている [24, 57]。アミロイドの最大の特徴は、異なるアミノ酸配列を有する様々な前駆体蛋白質が、同様のクロス β シート構造に変化して不溶化し、各組織に沈着する点にある。コンゴレッドはアミロイドに共通するクロス β シート構造を特異的に認識し結合することから、アミロイド染色として汎用されている。以上のことから、コンゴレッドと類似の構造を有するフェノール化合物であるクルクミンも、A β に加えて他の各種アミロイドとも特異的に結合すると考えた。そこで第 1 章では、犬および猫の様々なアミロイド蛋白質とクルクミンの結合性を検証し、クルクミンのアミロイド線維形成阻害の可能性を検討した。また、酸化還元処理を加えた各種アミロイドとコンゴレッドまたはクルクミンの結合性の相違について検討し、アミロイドのアミノ酸組成の相違が立体構造に与える影響について考察した。

1991 年、Namba ら[52]は AD 患者の脳においてアミロイド沈着部位に Apolipoprotein E (ApoE)が共沈着していることを明らかにした。ApoE は中枢神経のコレステロール代謝に必須の因子である。ApoE 遺伝子には $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ の 3 つの対立遺伝子 (アレル) があり、ApoE $\epsilon 4$ アレルが AD の人種を超えた最大の遺伝的リスク因子であることが明らかとなっている[16]。近年では全ゲノム関連解析

(GWAS)により、ApoE 遺伝子以外の AD リスク遺伝子も明らかになっているが [25, 56]、これらのうちのいくつかは ApoE と同様に脂質代謝と密接に関連する。ApoE は Very low density lipoprotein (VLDL)、Low density lipoprotein (LDL)、High density lipoprotein (HDL)などのリポ蛋白と結合して脂質を輸送することで脳機能を正常に維持すると考えられており [9]、ApoE のアイソフォームの違いが脳における脂質代謝能に反映される。ApoEε4 アリルを有する個体では、ApoE レセプターである Low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1)を介した血管平滑筋による Aβ の取り込みと中枢神経系からの排泄が妨げられると推測されている [88]。また、神経細胞およびアストロサイトは LRP1 を介した Aβ の取り込みと分解の役割を担っているが、ApoEε4 のアリルを有する個体ではこれらの細胞のライソゾームに Aβ 断片が蓄積しやすく、これにより細胞が傷害されると報告されている [30]。このように、Aβ と ApoE に関する研究はこれまで数多くあり、その二つの蛋白質をつなぐ分子として現在 LRP1 が注目されている [9]。

これまで Aβ 沈着以外のアミロイド症に対する ApoE や LRP1 分子の働きはあまり調べられていない。AA アミロイド (AA)や AL アミロイド (AL)の沈着好発部位である腎臓、肝臓においても ApoE および LRP1 の発現が認められていることから、各臓器に沈着するアミロイド症の病理発生にも関与すると考えられる。動物では、犬と猫の AA および AL アミロイド症、脳 Aβ アミロイド沈着 [78, 84]、犬の乳腺アミロイド (Acas) [82]、猫の髌島アミロイド (AIAPP) [46]などが知られているが、いずれにおいてもその病態への ApoE および LRP1 の関与は調べられていない。そこで、第 2 章では、様々なアミロイド症の病理発生における ApoE と LRP1 の関与を明らかにする目的で、AA, AL, Aβ, Acas および AIAPP が沈着した犬と猫の組織における ApoE と LRP1 の局在を免疫組織学的に検索した。

前述したように動物においても多種のアミロイド症が知られているが、中でも AA アミロイド症は様々な動物で発生し[22]、ヒトにおける AA アミロイド症のカウンターパートに位置づけられている。AA の前駆体蛋白質は急性期炎症蛋白質である Serum amyloid A (SAA)である。AA アミロイド症は、炎症状態が長き血清 SAA の濃度が持続的に高い病態において発症する[39, 62]。日本におけるヒトの AA アミロイド症の基礎疾患は、ほとんどが関節リウマチ (RA)であり[67]、そのほかPyrin をコードする *MEFV* 遺伝子の変異によって生じる家族性地中海熱 (FMF) [58]や、結核 [91]、炎症性腸疾患[68]にも続発することが知られている。これに対し、動物では結核[5, 71]、慢性化膿性炎症[94]、水禽類の趾瘤症[80]に続発するものが大半を占める。いずれにおいても、消化管粘膜や腎糸球体に AA が重度に沈着し予後不良となることから、臨床的に大きな問題となっている[67]。AA アミロイド症の治療法としては、①SAA の産生抑制、②AA 沈着阻害、③沈着 AA の溶出、が考えられるが、今のところ③の沈着 AA を溶出する薬剤はなく、メトトレキサート、タクロリムスなどによる強力な免疫抑制療法[85]、TNF 阻害療法[51]、IL-6 阻害療法[38]など SAA 産生抑制作用を有する薬剤が第一選択肢となっている。しかし、上記の治療を行っても十分な臨床効果が得られない症例が存在し、かつ感染症を併発しやすいという問題があるため、SAA 産生抑制以外の治療法の開発が急務である。

前述したように、AA アミロイド症の発症には前駆体蛋白質である SAA の持続的高値が必須と考えられているが、慢性炎症状態が持続しても必ずしも発症するわけではなく[47]、生体内におけるアミロイド線維形成のメカニズムは依然として不明である。このことから、SAA のアミロイド原性に個体差があるのではないかと考えた。日本人の SAA1 遺伝子型には exon 3 の多型により、3 種の

SAA1 アレル (SAA1.1: ⁵²Val/⁵⁷Ala, SAA1.5: ⁵²Ala/⁵⁷Val, SAA1.3: ⁵²Ala/⁵⁷Ala) が存在し、そのうち SAA1.3 を有することが AA アミロイド症の発症を促進することが明らかとなっている[2]。獣医学領域では、アビシニアン種、シャム種の猫において家族性 AA アミロイド症の発症が知られている [8, 86]。アビシニアンでは腎臓がアミロイド沈着の主な標的臓器であるのに対し、シャムでは主に肝臓と消化管に AA が沈着し、この相違は SAA 遺伝子の多型によるものとされている [54]。2014 年現在日本で飼育されている猫は日本猫 (雑種) が約 8 割を占めている (日本ペットフード協会調査 <http://www.petfood.or.jp/data/chart2014/01.html>)。日本猫でも AA アミロイド症が散発的に発生しているが、本猫種の SAA 遺伝子について未だ詳細な検討はなされておらず、その遺伝子多型についてもわかっていない。そこで第 3 章では、AA アミロイド症を発症した日本猫と未発症の日本猫の SAA 遺伝子からアミノ酸配列を決定し、アミロイド症発症との関連および組織沈着パターンとの関連について検討した。

また、SAA のアミロイド原性を規定する遺伝的素因以外の因子として AA アミロイドを構成する SAA 分子の部分 (moiety) の相違が挙げられる。ヒトの AA は、104 個のアミノ酸から成る SAA が 76 番目のアミノ酸残基と 77 番目のアミノ酸残基の間で切断された N 末端部分の SAA で主に構成されていることがわかっている[95]。各種動物においても C 末端側に近い様々な部分で切断された N 末側の部分が AA の主な構成分子であることが報告されている[7, 36]。第 3 章では、さらに加えて、散発的に発生している日本猫の AA アミロイド症についてネコ SAA の N 末端側、中央部分、C 末端側のそれぞれと反応する 3 種類の抗血清を用いて、ネコ AA を構成する SAA 分子の部分についても検索した。

本研究は上述したように、3章より構成される。まず第1章では、クルクミンと犬と猫の各種アミロイドとの結合性を検討することにより、その結合部位と各種アミロイドの立体構造について考察し、アミロイド形成阻害剤としての可能性を検討した。第2章では、アミロイド線維の形成には「その構造変化および凝集・線維化を促進する分子機序」が作用するという観点から、ApoEとLRP1についてアミロイド形成との関連を検索した。そして第3章では、アミロイド線維形成能は「原因蛋白質自体の構造的性質（アミロイド原性）」が規定するという観点から、日本猫のSAA遺伝子の配列を決定し、AAを構成するSAAの分子種部分を検索することによりSAAのアミロイド原性を考察した。本研究は、犬および猫の多種のアミロイドについて分子病理学的に比較することで、その形成に共通する因子あるいは各アミロイドに特有の因子を明らかにし、アミロイド線維形成の分子機構解明の一端となることを目的とする。

Table 0. 動物で報告されているアミロイド症

報告された動物種	疾患名／略称	前駆蛋白	全身性／限局性	主な沈着臓器	ヒトでの疾患名
各種	続発性AAアミロイドーシス／AA	血清アミロイドA (SAA)	S, L	CNSを除く全臓器	続発性AAアミロイド症・ 家族性地中海熱
犬、猫、牛等	形質細胞腫／AL	免疫グロブリン軽鎖	S	CNSを除く全臓器	骨髄腫性ALアミロイド症
犬	加齢性変化／AApoAI	アポリポ蛋白AI	S	心臓、腎臓、肝臓等	家族性アミロイドポリニュー ロパチーIII
マウス	加齢性変化／AApoAII	アポリポ蛋白AII	S	腎臓	(遺伝子改変マウスのみ)
ベルベットモンキー	加齢性変化／ATTR	変異型トランスサイレチン	S	心臓、眼、髄膜等	家族性アミロイドポリニュー ロパチーI・ 老人性全身性アミロイド症
ムナジロテン	特発性／AFib	フィブリノーゲン	S	腎臓	家族性腎アミロイド症
多種	加齢性変化／A β	A β 前駆蛋白	L	CNS	アルツハイマー病・ 脳血管アミロイド症
猫、アライグマ	インスリノーマあるいは 加齢性変化／AIAPP	アミリン	L	膵島	膵島アミロイド症
デグー	加齢性変化／AI _{ns}	インスリン	L	膵島	医原性皮膚アミロイド症
牛、山羊、鹿等	BSE、スクレイパー／APrP	変異型プリオン	L	CNS	クロイツフェルトヤコブ病 (CJD)
牛	乳腺アミロイドーシス／Acas	カゼイン	L	乳腺	該当なし

出典: Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. (Sipe, J.D. *et al.* *Amyloid* 2014)

S: Systemic(全身性)、L: Localized(限局性)、CNS: 中枢神経系

第1章

犬と猫の各種アミロイドとクルクミンの結合性
に関する研究

序

クルクミンはウコン（ターメリック）から抽出されるフェノール化合物で、古くから香辛料や伝統薬としてインドなどで用いられてきた[64]。近年、クルクミンの生体に対する様々な作用が科学的に明らかとなっており、盛んに研究がなされている。主な作用として、フリーラジカル除去による抗酸化作用、NF- κ B の活性化を抑制することによる抗炎症作用などが知られている[37]。また、*in vivo* および *in vitro* でアルツハイマー病 (AD)の原因物質であるアミロイド β (A β)のオリゴマーや線維の形成を阻害し、それらの凝集までも阻害することが報告されている[97]。ヒトでは AL アミロイド症患者にクルクミンを投与したところ、その病態の進行が抑制されたという報告[21]や、老齢性全身性アミロイド症におけるトランスサイレチンアミロイドや家族性アミロイドポリニューロパチーにおけるゲルソリンアミロイドと結合し、線維化を阻害するとの報告もある[17, 75]。このようなアミロイド線維の形成阻害作用が、クルクミンの抗炎症作用、抗酸化作用[23]、コレステロール低下作用[92]、または、これらが組み合わさった結果なのか、あるいはアミロイド線維との直接的な結合によるものなのかは明らかではない。アミロイド症は現在でも根本的な治療法が確立していない難治性疾患であり、治療薬の開発が望まれている。クルクミンを主成分とするウコンは古くから食用・薬用に用いられてきた経緯から安全性は高いと考えられ、科学的根拠に基づいた実用化が期待されている。

AD 患者と AD モデルマウスである Tg2576 マウスの脳には多量の A β が沈着するが、これらの脳切片とクルクミン水溶液を反応させる（クルクミン染色）と、クルクミンが β アミロイド斑に特異的に結合することが知られている[40, 50]。また、AD モデルマウスではクルクミンの摂取により β アミロイド斑の形成が減

少することも報告されている[89]。このように、クルクミンと A β との結合に関する研究は数多くあるが、AA、AL など A β 以外のアミロイドとの結合に関する研究はあまり行われていない。クルクミンはアミロイド染色に汎用されているコンゴレッド色素と同様のフェノール環を含む化学構造を有する (Fig. 1-1)ことから、A β 以外の様々な種類のアミロイド蛋白質とも結合するのではないかと考えた。

そこで本章では、犬および猫の AA、AL、犬の乳腺アミロイド (Acas)、猫の胼島アミロイド (AIAPP) が沈着している組織標本についてクルクミン染色 (0.009%) を行い、クルクミンの自家蛍光 (蛍光極大 550 nm) [29] を共焦点レーザー顕微鏡により検出し、アミロイドとクルクミンとの結合性を調べた。また、各アミロイド蛋白質に過マンガン酸カリウムとシュウ酸による酸化還元処理を加えてその構造を変化させたのちにアルカリ・コンゴレッド (ACR) 染色およびクルクミン染色を行って染色性の変化を比較し、両色素のアミロイドに対する結合部位を検討し、各種アミロイドのアミノ酸組成による立体構造の相違について考察した。

材料と方法

症例・材料、病理組織

犬と猫の AA、AL、犬の Acas、猫の AIAPP が沈着した組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従い 4 μm 厚のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、ACR 染色[61]およびクルクミン染色を行った。また、過マンガン酸カリウムおよびシュウ酸による酸化還元処理（以下酸化還元処理と記す）をした後に ACR 染色およびクルクミン染色を行った。各症例の概要は Table 1-1 に示した。

クルクミン染色

脱パラフィンした切片を 80% エタノールに浸漬した後、0.3% トリトン X100、3% bovine serum albumin (BSA) および 0.5% Tween20 を含む 0.1 M tris- buffered saline (TBS) にそれぞれ 10 分ずつ漬けた。次いで、3% BSA および 0.5 % Tween20 を含む 0.1 M TBS に 0.0245 μM のクルクミン (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を溶かしたクルクミン溶液（クルクミン濃度 0.009%）を作製し、このクルクミン溶液に切片を 37°C で 1 時間浸漬した。TBS で洗浄し、蒸留水 (DW) に浸し蛍光染色用封入剤で封入した後、Carl Zeiss LSM700 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss Micro Imaging, Tokyo, Japan) を用いて観察し、波長 505 から 550 nm の蛍光を緑色、650nm 以上の蛍光を赤色で描出した。

免疫組織化学

用いた一次抗体を Table 1-2 に示した。脱パラフィンした切片について、3% 過酸化水素・メタノール溶液で室温 5 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不

活化し、ブロッキング溶液（8%スキムミルク・TBS）で 37°C、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、TBS で希釈した一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。TBS で洗浄した後、EnVision polymer (Dako, Kyoto, Japan)法により EnVision horseradish peroxidase-labeled polymer anti-mouse IgG あるいは anti-rabbit IgG (Dako)と 37°Cで 40 分間反応させた。発色には 0.5% DAB (Dojindo Laboratories, Kumamoto)に 0.1%になるように H₂O₂ (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を添加して使用した。核染色にはヘマトキシリンを用いた。

結果

病理組織・免疫組織化学

各アミロイドについて、Table 1-2 に示した抗体を用いた免疫組織化学法（免疫染色）によりアミロイド種を同定した。代表的な症例の染色像を Figs. 1-2 に示した。

犬の腎系球体に巣状に沈着したアミロイド (AA)は、抗 AA 抗体を用いた免疫染色で陽性を示した (Fig. 1-2a)。ACR 染色を行うと赤桃色に染色され (Fig. 1-3-1a)、同部を偏光観察すると黄緑色の複屈折光が認められた (Fig. 1-3-1b)。しかし、酸化還元処理により複屈折光は失われた (Fig. 1-3-1c)。クルクミン染色では 650 nm 以上の波長の蛍光を示した (Fig. 1-3-1d)が、酸化還元処理によりその蛍光は失われた (Fig. 1-3-1e)。猫の肝臓に沈着したアミロイドはディッセ腔にびまん性に沈着し、抗 AA 抗体を用いた免疫染色で陽性を示した (Fig. 1-2b)。同部は ACR 染色により赤桃色に染色され (Fig. 1-3-2a)、偏光観察すると黄緑色の複屈折光が認められた (Fig. 1-3-2b)。複屈折光は酸化還元処理により失われた (Fig. 1-3-2c)。クルクミン染色では 650 nm 以上の波長の蛍光を示した (Fig. 1-3-2d)が、酸化還元処理により蛍光は失われた (Fig. 1-3-2e)。

犬、猫の形質細胞腫に随伴して沈着したアミロイド (AL)は、ともに抗 lambda-light chain 抗体を用いた免疫染色で陽性を示した (Figs. 1-2c, 2d)。アミロイドは ACR 染色で赤桃色に染色され (Figs. 1-3-3a, 4a)、偏光観察により黄緑色の複屈折光を認めた (Figs. 1-3-3b, 4b)。犬、猫いずれの症例も、酸化還元処理を行っても複屈折光は失われなかった (Figs. 1-3-3c, 4c)。クルクミン染色では、アミロイドはともに 650 nm 以上の波長の蛍光を示した (Figs. 1-3-3d, 4d)が、酸化還元処理によりその蛍光は失われた (Figs. 1-3-3e, 4e)。

犬の多脂肪乳腺癌において、間質に認められたアミロイド (Acas)は抗 β -casein 抗体を用いた免疫染色で陽性を示した(Fig. 1-2e)。同部は ACR 染色により赤桃色に染色され (Fig. 1-3-5a)、偏光観察により黄緑色の複屈折光を認めた (Fig. 1-3-5b)。同アミロイドに酸化還元処理をした後に ACR 染色を行っても複屈折光は失われなかった (Fig. 1-3-5c)。クルクミン染色では、アミロイドは 650 nm 以上の波長の蛍光を示した (Fig. 1-3-5d)が、酸化還元処理によりその蛍光は観察されなくなった (Fig. 1-3-5e)。

猫の腓島に観察されたアミロイド (AIAPP)は、抗 IAPP 抗体を用いた免疫染色で陽性を示した (Fig. 1-2f)。同部は ACR 染色により赤桃色に染色され (Fig. 1-3-6a)、偏光観察により黄緑色の複屈折光を認めた (Fig. 1-3-6b)。また、酸化還元処理をしたのちに ACR 染色を行っても、複屈折光は失われなかった (Fig. 1-3-6c)。クルクミン染色を行うと、アミロイドは 650 nm 以上の波長の蛍光を示し (Fig. 1-3-6d)、酸化還元処理をした後にクルクミン染色を行っても、蛍光は観察された (Fig. 1-3-6e)。

以上の結果は Table 1-3 にまとめた。

考察

アミロイド蛋白質は現在までにヒトで31種類あることが知られているが[73]、動物で主にみられるのはAAである。ALは、犬および猫で皮膚形質細胞腫に随伴して沈着することが知られている[60]。ヒトの乳腺組織に沈着するアミロイドは大半がALであるとされているが[66]、牛および犬では乳蛋白質であるカゼインに由来するアミロイドAcasが沈着することが知られている[15, 81, 82]。また、猫の膵島アミロイドAIAPPはヒトと同様にIslet amyloid polypeptide (IAPP)に由来する[46]。猫では基礎疾患の有無に関わらずAIAPPの沈着が認められ、高齢でより重度に沈着すると報告されている[45]。

本章の結果から、クルクミンはコンゴレッドと同様にAA、AL、犬のAcasおよび猫のAIAPPと特異的に結合することが示された。異なるアミノ酸配列を有する前駆体蛋白質から構成されるアミロイド蛋白質と結合したことから、クルクミンはこれらのアミロイド蛋白質に共通する特徴的な立体構造である、クロスβシート構造を特異的に認識することが推察された。

アミロイド蛋白質ではβストランド同士が水素結合により逆並行に並びβシートを形成し、これが線維軸と直行する方向に積み重なることで、クロスβシート構造をとる (Fig. 1-4)。芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン、トリプトファンに富む配列を多く含む蛋白質はアミロイド原性が高く、これらのアミノ酸の芳香環同士がπ-stackingにより積み重なって線維軸が形成されると考えられている[18] (Fig. 1-4)。アミロイドとコンゴレッドは、アミロイドの芳香族アミノ酸とコンゴレッドのフェノール環の相互作用により結合すると考えられており、分子動力的 (MD)シミュレーションにより、アミロイド線維軸に垂直方向および水平方向の二種類の様式で結合することが予測されている[35, 63]。このうち、

アミロイド線維軸に水平方向の結合が線維の伸長を妨げると考えられている[63]。プリオンに由来するペプチドとコンゴレッドとの結合性に関する MD シミュレーション研究から、コンゴレッドはアミロイド線維軸に水平方向に約 78%、垂直方向に約 11%が結合しており、水平方向に結合しやすいことが示されている[93]。

過マンガン酸カリウム・シュウ酸酸化還元処理によりアミロイドを構成するアミノ酸は様々な酸化修飾を受けるため、規則正しいクロス β シート構造が失われた結果、コンゴレッドやクルクミンの結合部位の構造が変化すると考えられる。酸化によりクロス β シート構造を変化させる原因となるアミノ酸として、疎水性相互作用を有する中性アミノ酸が考えられるが、中でも芳香族アミノ酸であるトリプトファン、 $A\beta$ と α シヌクレインにおいてその酸化によりアミロイド形成が抑制されると報告されているメチオニン[13]、およびジスルフィド結合を形成するシステインが重要と考えられる。トリプトファンは酸化されるとその芳香環が切断され[11]、蛋白質の立体構造の変化を招く。メチオニンは酸化されてメチオニルスルホンに変化するが、これにより $A\beta$ が β シート構造を形成しにくくなることが報告されている[28]。また、システインは容易に酸化されてジスルフィド結合を形成するが、これは還元剤により切断され元の構造に戻る可逆的な反応である。AA はトリプトファンに富むことから、酸化されると芳香環が切断され、モノマーの構造さえ維持されず、コンゴレッド、クルクミンともに結合できなくなると考えられる (Fig. 1-5)。Acas はメチオニンに富み、またメチオニンは疎水性アミノ酸であることから線維の内部に存在すると考えられる。メチオニンは酸化されると疎水性が低下するために、線維軸方向の β シート同士のスタッキングが崩壊した結果、クルクミンとの結合性がなくなったと推測

される (Fig. 1-6)。AIAPP はトリプトファン、メチオニンを含まずシステインに富むことから、システインの酸化還元により構造が維持されたために、コンゴレッド、クルクミンともに染色性が変化しなかったと考えられる (Fig. 1-7)。このように、今回検索した AA、AL、犬の Acas、猫の AIAPP は、それぞれ異なる一次アミノ酸配列を持つために、過マンガン酸カリウム・シュウ酸酸化還元処理によりコンゴレッドとクルクミンの各種アミロイドに対する結合性が異なつたと考えられた。コンゴレッドはアミロイドの線維軸と水平方向に、クルクミンは垂直方向により結合しやすいと推察された (Figs. 1-5, 6, 7, 8)。

コンゴレッドによるアミロイドの染色性は、アミロイドの種類や沈着量によって異なる。また、コンゴレッドは膠原線維や弾性線維とも結合しやすいため、膠原線維が豊富に存在する皮膚組織等を染色した際には慎重な判断が必要である。一方、本章の結果から、クルクミンはコンゴレッドよりも共染が少なく、より特異的にアミロイドと結合したため、アミロイドをより鋭敏に検出することが可能であると考えられた。また、生体内で成熟線維が形成される前のアミロイド蛋白質にクルクミンが結合した場合、線維の伸長を阻害する可能性が高い。コンゴレッドと異なり生体に対しての毒性が低いクルクミン[19]は、アミロイドの線維化抑制剤の有力な候補となると考えられた。

要約

共通するクロス β シート構造を有する各種アミロイドに酸化還元処理を加えてその構造を変化させた場合のコンゴレッドとクルクミンの結合性の相違から、各種アミロイドのアミノ酸組成の相違が立体構造に与える影響について考察した。

クルクミンは、コンゴレッドと同様、犬と猫の AA、AL、犬の Acas、猫の AIAPP と結合した。これらのアミロイドにその化学構造を変化させる過マンガン酸カリウム・シュウ酸による酸化還元処理をしたところ、コンゴレッドでは AA の染色性のみが失われたのに対し、クルクミンでは AA、AL、犬の Acas の染色性が失われた。すなわち、コンゴレッドとクルクミンはクロス β シート構造を特異的に認識して結合するが、それぞれアミロイド蛋白質の異なる部位に結合することが示唆された。この結合性の相違は、各種アミロイドの一次アミノ酸配列の相違を反映していると考えられた。また、両色素の染色性の相違から、クルクミンはアミロイド線維伸長方向に結合すると考えられ、アミロイド線維の伸長阻害に有用であると考えられた。

Table 1-1. Animals examined in the present study.

Case No.	Animals	Breeds	Sex	Age	Deposited amyloid	Histopathological diagnosis
1	Dog	Dalmatian	M	4y	AA	Peripheral polyneuropathy and systemic AA amyloidosis
2	Cat	Japanese domestic cat	SF	13y	AA	Mandibular abscess and systemic AA amyloidosis
3	Cat	Japanese domestic cat	CM	6y	AA	Bacterial dermatitis and systemic AA amyloidosis
4	Cat	Japanese domestic cat	CM	5y 2m	AA	B cell lymphoma in cerebellum and systemic AA amyloidosis
5	Cat	Japanese domestic cat	SF	12y 5m	AA	Chronic renal failure with systemic AA amyloidosis
6	Cat	Japanese domestic cat	CM	2y 2m	AA	Osteochondromatosis and systemic AA amyloidosis
7	Cat	Japanese domestic cat	SF	9y 8m	AA	Intestinal lymphoma (small cell type) and systemic AA amyloidosis
8	Cat	Japanese domestic cat	SF	15y	AA	Pyogenic bronchitis, interstitial pneumonia, acute myocarditis and systemic AA amyloidosis
9	Dog	Mongrel	M	12y	AL	Multiple cutaneous anaplastic plasmacytoma with amyloid deposition
10	Cat	Maine Coon	SF	8y 6m	AL	Anaplastic plasmacytoma with amyloid deposition in nasal cavity
11	Cat	Japanese domestic cat	SF	11y	AL	Anaplastic plasmacytoma with amyloid deposition
12	Dog	Labrador retriever	F	6y	Acas	Mammary lipid rich carcinoma with extensive amyloid deposition
13	Cat	American shorthair	M	16y 6m	AIAPP	Portal vein thrombosis and pulmonary adenocarcinoma
14	Cat	Japanese domestic cat	SF	13y 3m	AIAPP	Systemic metastasis of mammary gland carcinoma
15	Cat	Chinchilla Persian	CM	16y	AIAPP	Adenocarcinoma of nasal cavity
16	Cat	American shorthair	SF	17y 1m	AIAPP	Squamous cell carcinoma and pulmonary adenocarcinoma
17	Cat	Chinchilla Persian	F	17y	AIAPP	Adenocarcinoma of nasal cavity and its infiltration into olfactory bulb

Abbreviations: SF, Spayed female; CM, Castrated male; F, Female; M, Male

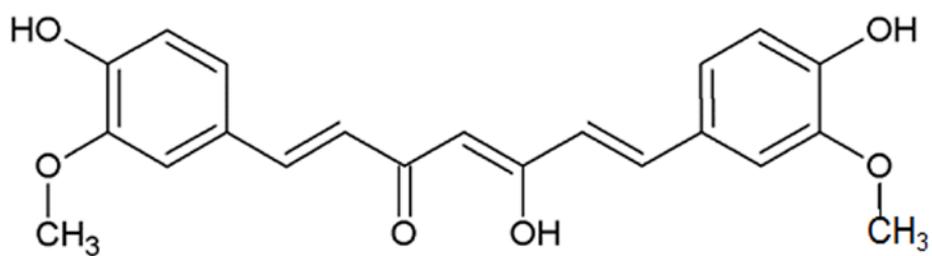
Table 1-2. Antibodies used for the immunohistochemistry.

Antibodies	Immunized animals (clone)	Antigen retrieval	Dilution	Supplier, Product number
Amyloid A	Mouse (KM268)	0.1% Actinase E	1:100	Kyowa Medics, HM01
lambda light chain	Rabbit	Immunosavor	1:10000	Dako, A0191
amyloid β x42	Mouse (12F4)	Formic acid	1:500	Millipore, 05-831
β casein	Mouse (FL-226)	Citrate Buffer, autoclaving	1:50	Santa cruz, sc-30041
Amylin/IAPP	Mouse (R10/99)	None	1:100	Acris, SM1341

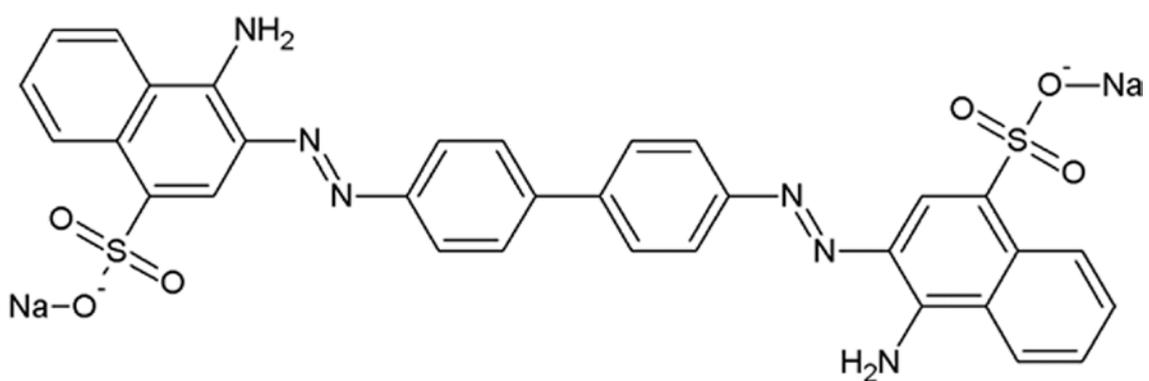
Table 1-3. Results of ACR staining and Curcumin staining.

Staining	Type of Amyloid					
	Dog AA	Cat AA	Dog AL	Cat AL	Dog Acas	Cat AIAPP
ACR						
W/O KMnO ₄	+	+	+	+	+	+
W/ KMnO ₄	-	-	+	+	+	+
Curcumin						
W/O KMnO ₄	+	+	+	+	+	+
W/ KMnO ₄	-	-	-	-	-	+

(+) Stained, (-) Unstained. W/: with, W/O: without.



Curcumin



Congo red

Figure 1-1: Chemical structures of Curcumin and Congo red.

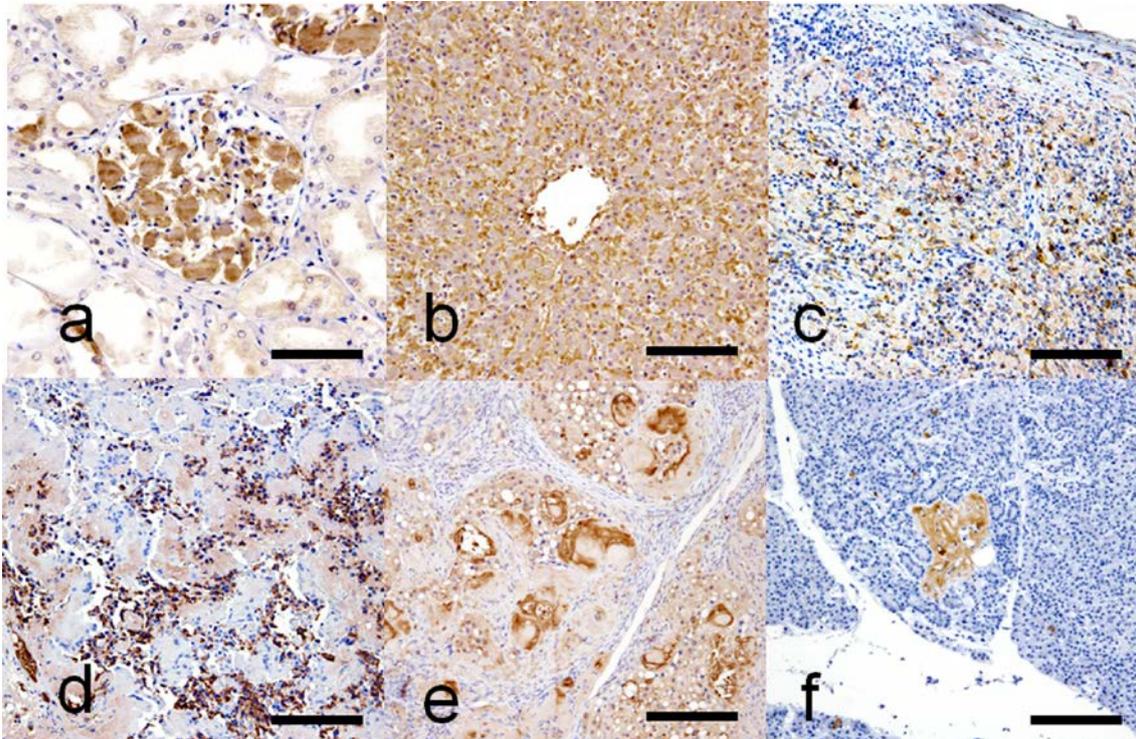


Figure 1-2: Immunohistochemistry of amyloid of dogs and cats examined.

- a. Dog, No. 1, Renal glomeruli, AA deposited severely in mesangial region. Bar, 40 μ m.
- b. Cat, No. 2, Liver, AA, AA deposited mainly in the space of Disse. Bar, 40 μ m.
- c. Dog, No. 9, Dermis, Lambda-light chain, AL deposited between neoplastic plasma cells. Bar, 40 μ m.
- d. Cat, No. 11, Dermis, Lambda- light chain, AL deposited between neoplastic plasma cells. Bar, 40 μ m.
- e. Dog, No. 12, Mammary gland, β -casein, Acas deposited focally between neoplastic mammary epithelial cells. Bar, 80 μ m.
- f. Cat, No. 13, Pancreatic islet, AIAPP deposited in pancreatic islet and normal islet cells are disappeared. Bar, 80 μ m.

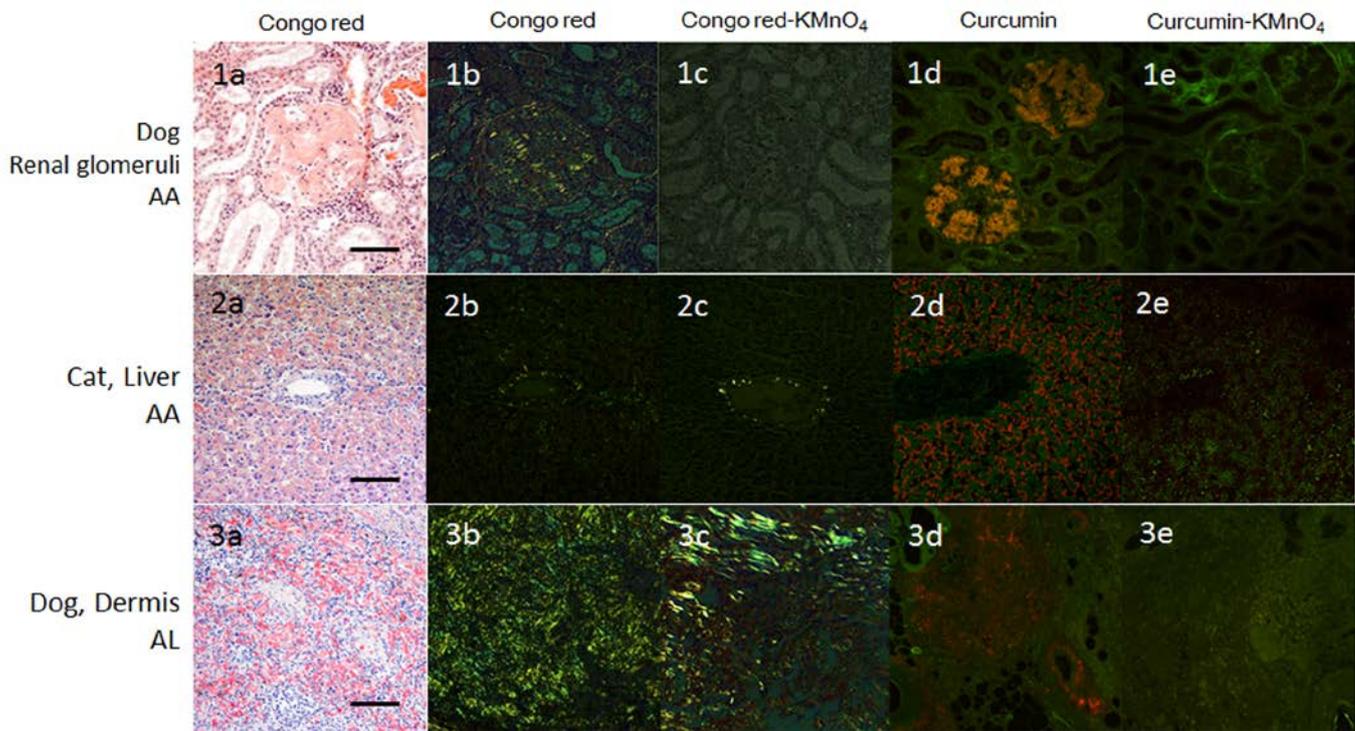


Figure 1-3: CR staining and Curcumin staining.

1. Dog, No. 1, Renal glomerulus, AA deposition. bar, 40 μ m. 2. Cat, No. 2, Liver, AA deposition. Bar, 80 μ m. 3. Dog, No. 9, Dermis, AL deposition. Bar, 80 μ m. (a)ACR staining, (b)ACR staining examined by polarized light microscopy, (c)ACR staining with redox treatment examined by polarized light microscopy, (d)Curcumin staining examined by confocal laser microscopy, (e)Curcumin staining with redox treatment examined by confocal laser microscopy.

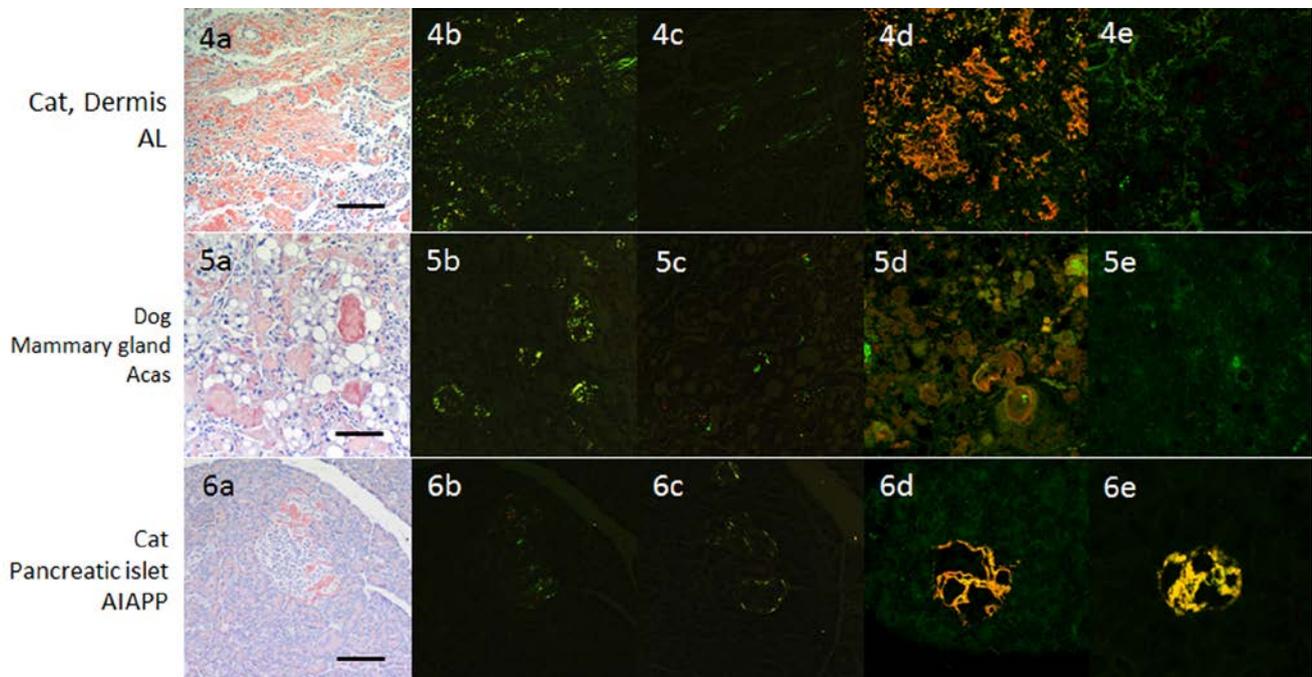


Figure 1-3 (cont.): CR staining and Curcumin staining.

4. Cat, No. 11, Dermis, AL deposition. Bar, 80 μm . 5. Dog, No. 12, Mammary gland, Acas deposition. Bar, 40 μm . 6. Cat, No. 13, Pancreatic islet, AIAPP deposition. Bar, 40 μm . (a)ACR staining, (b)ACR staining examined by polarized light microscopy, (c)ACR staining with redox treatment examined by polarized light microscopy, (d)Curcumin staining examined by confocal laser microscopy, (e)Curcumin staining with redox treatment examined by confocal laser microscopy. Although ACR and curcumin bind to every amyloid examined, AA lost the characteristic polarization of ACR and AL and Acas lost the fluorescence of Curcumin with redox treatment. AIAPP kept its polarization of ACR and fluorescence of Curcumin even after redox treatment.

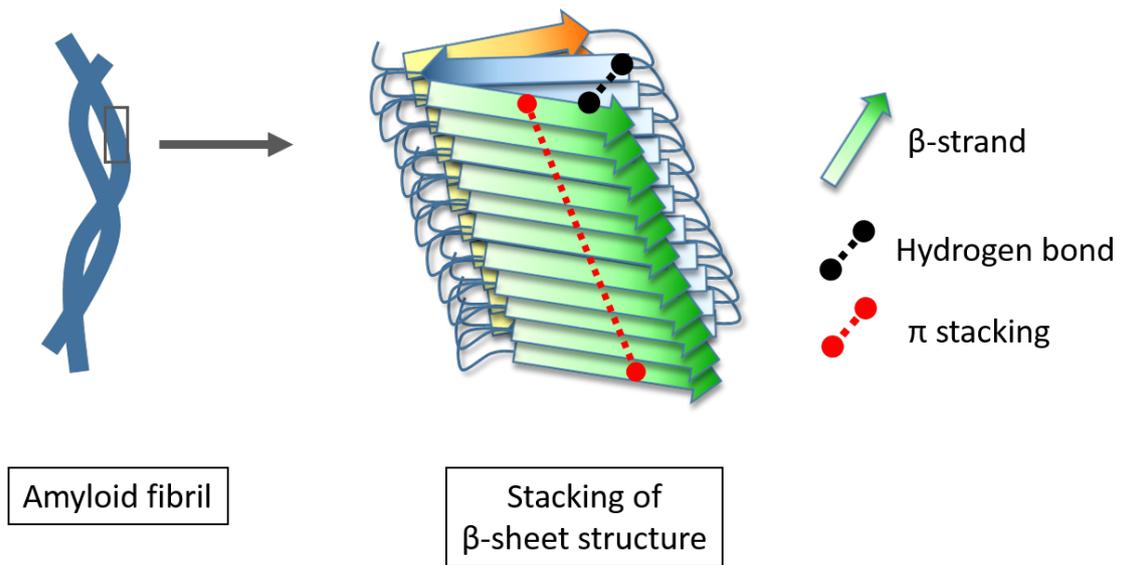


Figure 1-4: A model for possible arrangement of amyloid fibril. The fibril is made of a stack of β -strands. β -sheets are held together by hydrogen-bonding.

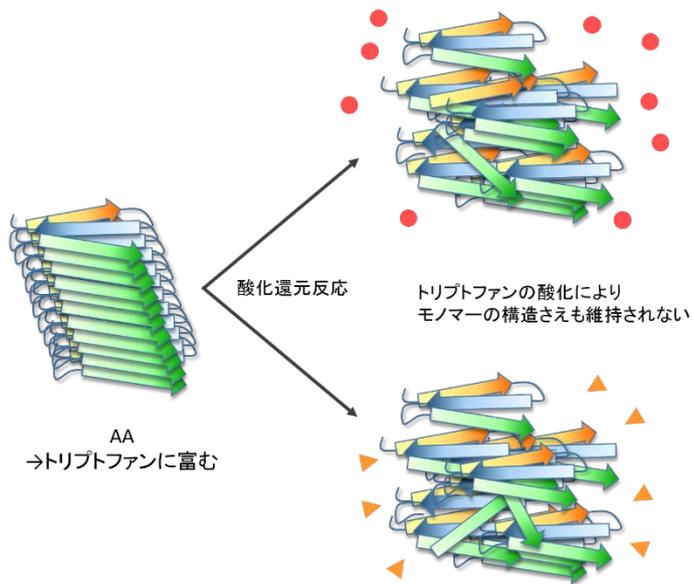


Figure 1-5: Predicted conformational change of AA by redox reaction.

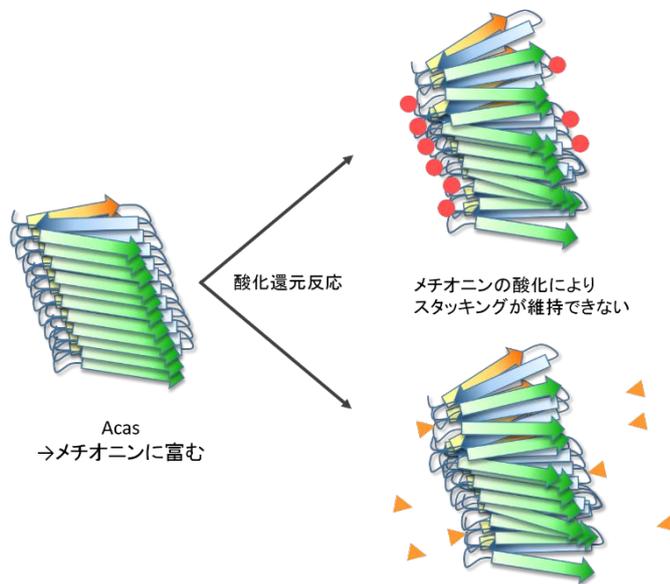


Figure 1-6: Predicted conformational change of Acas by redox reaction.

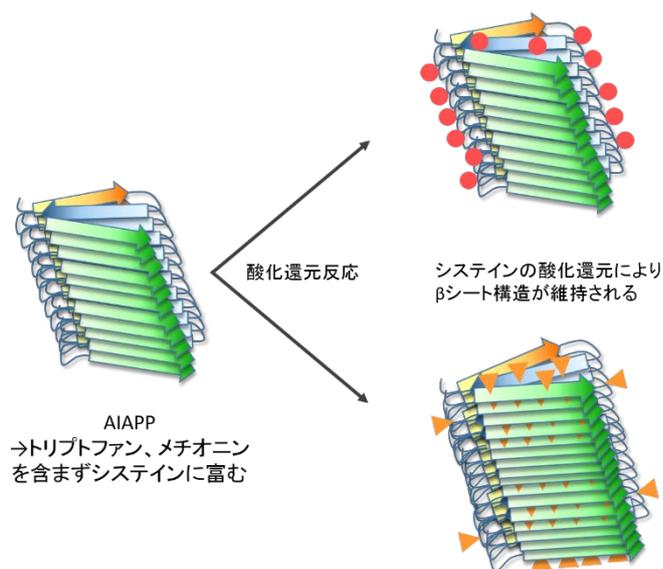


Figure 1-7: Predicted conformational change of AIAPP by redox reaction.

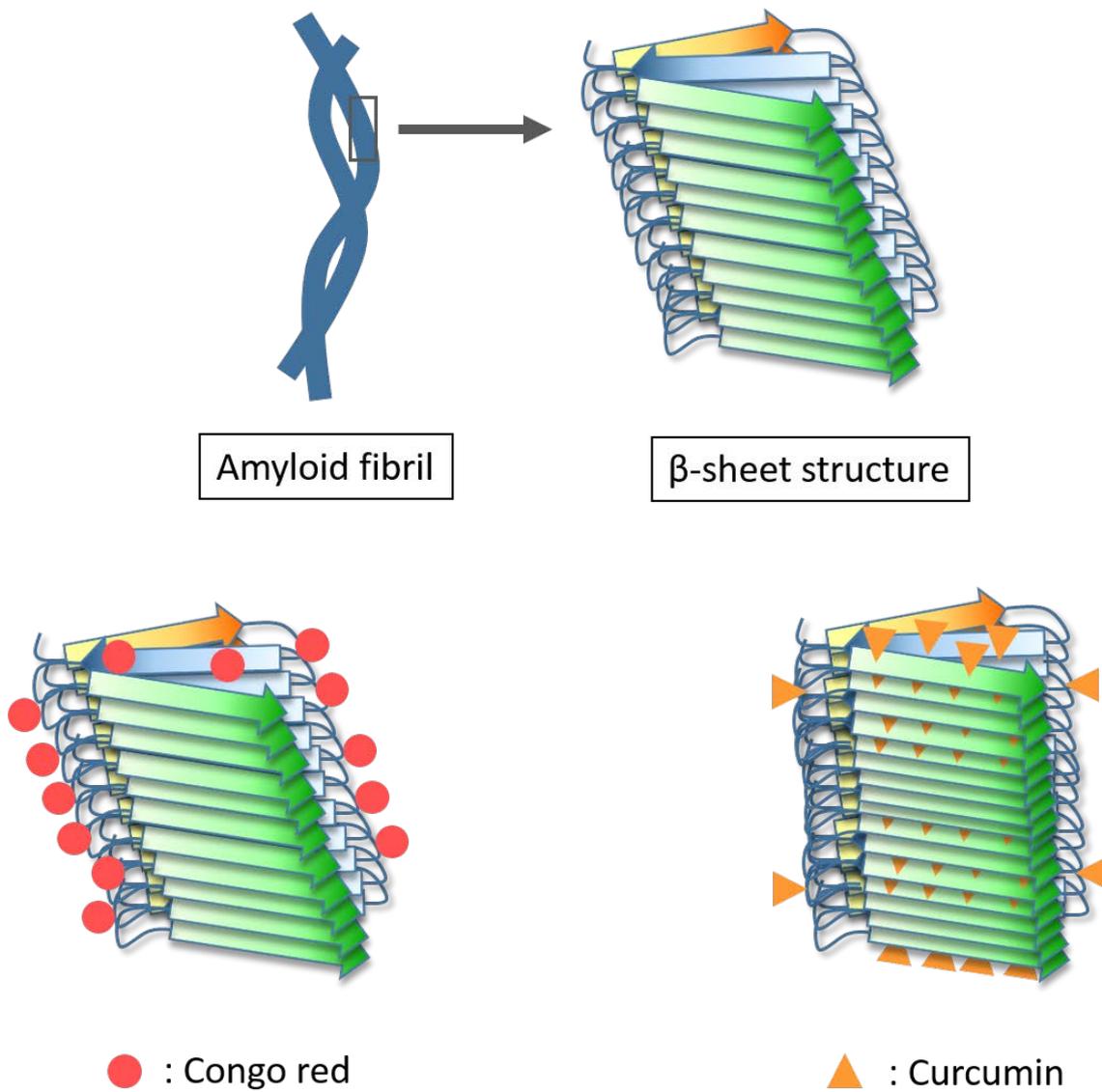


Figure 1-8: Predicted binding of Congo red and curcumin to the β -sheet structure.

第2章

犬と猫の各種アミロイド沈着における ApoE および LRP1 の関与

序

ApoE は、リポ蛋白質を構成する主要なアポリポ蛋白質の一つであり、細胞表面の ApoE 受容体である LRP1 との相互作用を介してリポ蛋白質の細胞内取り込みおよび代謝に関与する。1991 年、Namba ら[52]により AD 患者の脳の A β 沈着部位に ApoE が共局在していることが報告された。また、家族性および孤発性 AD 患者では、ApoE の対立遺伝子のうち ApoE ϵ 4 の割合が健常者と比較して有意に高いことが明らかとなった[69]。ヒトの ApoE 遺伝子には ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 の 3 つの対立遺伝子（アリル）があり、ApoE ϵ 4 が AD の最大の遺伝的リスク因子であることが明らかとなっている[16]。ApoE は中枢神経のコレステロール代謝に必須の因子である。近年では全ゲノム関連解析 (GWAS)により、ApoE 遺伝子以外の AD リスク遺伝子も明らかとなっており[25, 56]、これらのうちのいくつかは脂質代謝と密接に関連することから、脳における脂質代謝異常と AD の病理発生との関連が疑われている。ApoE は脳では主にアストロサイトで産生され、コレステロールを神経細胞へ輸送することで脳機能を正常に維持する[9]。ApoE はそのアイソフォームの違いにより脂質結合能が異なるため、脳におけるコレステロールの輸送および代謝能に違いが生じると考えられている。また、ApoE が可溶性 A β と直接結合し LRP1 を介して A β の細胞内への取り込みを調節している可能性[77]や、ApoE と LRP1 が結合し、LRP1 を介した A β のクリアランスが調節される可能性[88]が示されている。

ApoE および LRP1 は、脳だけでなく全身の脂質代謝を調節する分子であり、AA や AL の沈着好発部位である腎臓や肝臓においても発現が認められる。しかし、末梢組織におけるアミロイド沈着とこれらの分子との関連についてはほとんど調べられていない。AA の前駆体蛋白質である SAA は、血中では HDL およ

び LDL と結合して存在していることから、AA アミロイド線維形成のシャペロン蛋白質として ApoE が関与するのではないかと考えた[55]。ApoE アイソフォームの立体構造の相違がアミロイド蛋白質との結合能に影響することから、ApoE は A β 、AA のみならず、共通の立体構造を有する様々なアミロイド線維の形成にシャペロン分子として関与することが疑われる。

動物では、犬と猫の AA、AL アミロイド症[32]、脳アミロイド症[78, 84]、犬の乳腺アミロイド Acas [82]、猫の睥島アミロイド AIAPP [46]等の発生が知られているが、いずれにおいてもその病態への ApoE および LRP1 の関与は調べられていない。そこで、本章では様々なアミロイド症の病理発生における ApoE と LRP1 の影響を明らかにする目的で、AA, AL, A β , Acas, AIAPP が沈着した犬と猫の組織における ApoE, LRP1 の局在を免疫組織学的に検索した。

材料と方法

症例・材料、病理組織

犬と猫の AA、AL、A β 、犬の Acas および猫の AIAPP が沈着した組織およびアミロイド沈着がない対照組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従い 4 μ m 厚のパラフィン切片を作製、HE 染色、ACR 染色[61]を行った。AA, AL, 犬の Acas、猫の AIAPP の症例は第一章で用いたものと同じであり、これに A β が沈着した犬および猫の脳組織を一例ずつと、それぞれのアミロイドの対照組織を加えた (Table 2-1)。

免疫組織化学、蛍光免疫コンゴレット二重染色

用いた抗体を Table 2-2 に示した。脱パラフィンした切片について、3% 過酸化水素・メタノール溶液で室温 5 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、ブロッキング溶液 (8% スキムミルク・TBS) で 37°C、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、TBS で希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。TBS で洗浄した後、EnVision polymer (Dako) 法により EnVision horseradish peroxidase-labeled polymer anti-mouse IgG あるいは anti-rabbit IgG (Dako) と 37°C で 40 分間反応させた。発色には 0.5% DAB (Dojindo Laboratories) に 0.1% になるように H₂O₂ (Wako Pure Chemical Industries) を添加して使用した。核染色にはヘマトキシリンを用いた。

次いで、抗 ApoE 抗体を用いた蛍光免疫染色と ACR 染色の二重染色を行った。Table 2-2 に示した条件で抗原賦活化を行い組織切片を一次抗体と反応させた後、TBST を用いて洗浄し、TBST で希釈した Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体

(1:200 希釈、Life Technologies, Carlsbad, CA)と室温で 37°C、1 時間反応させた。その後切片を 1% CR 水溶液と 10 分間反応させ後、飽和炭酸リチウム溶液で洗浄した。非特異的な結合を切断するため 80%エタノールに 5 分間浸漬した後、流水水洗を行った。封入後、Carl Zeiss LSM700 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss Micro Imaging)を用いて観察した。ACR の蛍光観察には 596 nm の励起波長を用い、発光極大 620 nm の波長を赤色で検出した[12]。

結果

犬と猫の AA、AL、犬の Acas、猫の AIAPP (Figs. 2-1-a)、犬の A β 42 血管アミロイド (Fig. 2-2-1a)、猫の A β 42 血管アミロイド (Fig. 2-2-2a)および A β 42 びまん斑 (Fig. 2-2-2e)が免疫染色で ApoE に陽性を示した。犬と猫の AA、AL、犬の Acas および猫の AIAPP については蛍光免疫染色と蛍光 CR の二重染色を行ったところ、ApoE 陽性部と CR 陽性部が共局在した (Figs. 2-1-b, c, d)。犬の A β 沈着脳では、ApoE は主に皮質の小血管壁および髄膜血管壁において A β 42 と共局在していたが (Figs. 2-2-1b, 1c, 1d)、CR 陰性の A β 42 びまん斑に局在しなかった (Figs. 2-2-1f, 1g, 1h)。一方、猫の A β 沈着脳では、血管壁および皮質びまん斑のいずれにおいても A β 42 と ApoE の共局在が認められた (Figs. 2-2-2)。

LRP1 は、犬の腎系球体では沈着 AA およびメサンギウム細胞に発現が認められた (Fig. 2-3a)が、AA が沈着していない腎系球体ではメサンギウム細胞にわずかに発現が認められるのみであった (Fig. 2-3e)。退形成性形質細胞腫に伴う AL 沈着が認められた犬の皮膚組織では、アミロイド周囲の樹状細胞が LRP1 陽性であった (Fig. 2-3b)が、正常の犬皮膚組織では LRP1 陽性細胞は観察されなかった (Fig. 2-3f)。Acas が沈着した犬の多脂肪乳腺癌組織では、アミロイド周囲の樹状細胞に LRP1 陽性像が観察された (Fig. 2-3c)が、Acas 沈着を伴わない犬の乳腺癌組織には LRP1 陽性細胞は観察されなかった (Fig. 2-3g)。また、A β が沈着した犬の脳では、ミクログリア、アストログリアおよび血管周皮細胞が LRP1 陽性であった (Fig. 2-3d)が、A β が沈着していない若齢犬の脳では LRP1 陽性細胞は認められなかった。これに対し、猫では正常組織とアミロイド沈着組織のいずれにおいても LRP1 陽性所見は認められなかった (結果は示していない)。

考察

ヒトにおいて、ApoEは種々のアミロイド沈着部位に共局在することが知られているが、今回犬および猫の種々のアミロイドも同様に ApoE が共局在することが確認された。ApoE は VLDL や LDL、HDL などの血漿リポ蛋白質の構成成分で、リポ蛋白質受容体のリガンドとして働き、脂質の輸送および再分布に関与する。さらに、そもそも AD 患者では ApoE 対立遺伝子のうち ApoE ϵ 4 の頻度が非 AD の者の約 3 倍であることが報告され、AD における遺伝的リスク因子として、注目されている。また、ApoE ノックアウトマウスに変異 APP とヒト型 ApoE ϵ 4 の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、若齢では ApoE は A β の除去に働き[27]、加齢により A β 除去作用が弱まるとともに、A β の線維化を促進したと報告されている[26]。このことから、アミロイド蛋白質に対する ApoE の作用を考える場合、加齢に伴う ApoE 分子の脂質代謝の変化を加味する必要があると考えられる。

ApoE はその受容体である LRP1 を介して A β を除去すると考えられるが、三者が相互にどのように作用し合っているか未だ明らかではない。近年、ApoE と A β が LRP1 のリガンドとして競合することにより、脳内の A β 濃度が調節される可能性が報告されている。このことから、LRP1 のリガンドとして機能するアミロイド蛋白質は、ApoE を介した同様の機構により沈着が調節される可能性がある。

今回の検索では、犬の AA 沈着腎臓組織、AL 沈着皮膚組織、Acas 沈着乳腺組織および A β 沈着脳組織において ApoE の共沈着と LRP1 の発現が認められた一方、アミロイド沈着がない犬の腎臓、皮膚、乳腺および脳組織で ApoE および LRP1 は認められなかった。このことから、AA、AL アミロイド症においても、

脳における A β 沈着と同様に、ApoE が LRP1 を介してアミロイドの取り込み・分解に影響を与える可能性が示唆された。今回、犬の脳組織において A β 42 びまん斑と ApoE が共局在しなかったこと、および猫の脳組織において皮質の小血管壁と髄膜血管壁の A β 42 陽性部位と ApoE が共局在しなかった理由として、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫染色における抗 ApoE 抗体の安定性が担保されなかった可能性が考えられる[84]。また、猫では A β びまん斑にも ApoE が共沈着していたことから、ApoE はアミロイド線維のクロス β シート構造と結合するのではなく、アミロイドの前駆体蛋白質がアミロイド化する過程に関連することが示唆された。

LRP1 は末梢組織において ApoE だけでなく 40 以上の異なるリガンドと結合することが知られており、脂質代謝、蛋白分解酵素の恒常性維持や細胞分化等様々な生理反応に関与する[42]。また、ディフェンシンにより活性化されることで、様々な疾病、感染症においてスカベンジャー受容体として働くことも知られており[10]、不溶性沈着物であるアミロイドに対しても樹状細胞における発現を介して免疫応答を惹起する可能性が考えられる。今回、犬ではアミロイド沈着組織で LRP1 陽性細胞が観察されたのに対し、猫では正常組織およびアミロイド沈着組織のいずれにおいても LRP1 陽性所見は認められなかった。用いた抗体は、ヒト LRP1 の細胞外ドメインを標識する抗体であったが、この抗原ドメインはヒトと犬で 97.7%、ヒトと猫で 97.5%と、高い相同性を有することから、犬と猫での結果の違いを抗体の交叉性に求めることはできない。今回検索した犬の脳では、A β 42 陽性びまん斑と一致した ApoE 陽性像が認められなかったのに対し、猫ではほぼすべてのびまん斑に一致して ApoE 陽性像が認められたことから、猫では犬と比較して脳内 ApoE 濃度が高い可能性がある。これは、LRP1 の発現が

犬よりも低いために ApoE がより多く脳内に蓄積するためと考えられる

本章の結果から、各種アミロイドに共沈着した ApoE がリガンドとして LRP1 と結合し、アミロイド除去に働く免疫反応を誘導する可能性が示唆された。

要約

犬と猫の各種アミロイド沈着組織およびアミロイド非沈着対照組織について、 $A\beta$ のシャペロン蛋白質と考えられている ApoE の沈着および ApoE 受容体である LRP1 の発現を免疫組織学的に検索した。その結果、検索した全てのアミロイドと ApoE の共局在が認められた。また、犬の AA、AL、Acas 沈着組織では、アミロイド周囲の樹状細胞に LRP1 の陽性像が確認された。また、 $A\beta$ が沈着した脳組織では沈着部位周囲のミクログリア、アストロサイトおよび血管周皮細胞に LRP1 の陽性像が認められた。アミロイド沈着のない対照組織ではいずれも LRP1 は発現しておらず、アミロイドの沈着が LRP1 の発現レベルを上昇させたと考えられた。ApoE は $A\beta$ の線維化促進あるいは安定化に働くこと、および LRP1 はミクログリアによる $A\beta$ の分解と排泄に関わると考えられていることから、アミロイドと共局在した ApoE が、樹状細胞に発現した LRP1 にリガンドとして結合し、アミロイドの分解に関与すると推察された。

Table 2-1. Animals examined in the present study.

Case No.	Animal	Breed	Sex	Age	Deposited amyloid	Histopathological diagnosis
1	Dog	Dalmatian	M	4y	AA	Peripheral polyneuropathy and systemic AA amyloidosis
2	Cat	Japanese domestic cat	SF	13y	AA	Mandibular abscess and systemic AA amyloidosis
3	Cat	Japanese domestic cat	CM	6y	AA	Bacterial dermatitis and systemic AA amyloidosis
4	Cat	Japanese domestic cat	CM	5y 2m	AA	B cell lymphoma in cerebellum and systemic AA amyloidosis
5	Cat	Japanese domestic cat	SF	12y 5m	AA	Chronic renal failure with systemic AA amyloidosis
6	Cat	Japanese domestic cat	CM	2y 2m	AA	Osteochondromatosis and systemic AA amyloidosis
7	Cat	Japanese domestic cat	SF	9y 8m	AA	Intestinal lymphoma (small cell type) and systemic AA amyloidosis
8	Cat	Japanese domestic cat	SF	15y	AA	Pyogenic bronchitis, interstitial pneumonia, acute myocarditis and systemic AA amyloidosis
9	Dog	Mongrel	M	12y	AL	Multiple cutaneous anaplastic plasmacytoma with amyloid deposition
10	Cat	Maine Coon	SF	8y 6m	AL	Anaplastic plasmacytoma with amyloid deposition in nasal cavity
11	Cat	Japanese domestic cat	SF	11 y	AL	Anaplastic plasmacytoma with amyloid deposition
12	Dog	Labrador retriever	F	6y	Acas	Mammary lipid rich carcinoma with extensive amyloid deposition
13	Cat	American shorthair	M	16y 6m	AIAPP	Portal vein thrombosis and pulmonary adenocarcinoma
14	Cat	Japanese domestic cat	SF	13y 3m	AIAPP	Systemic metastasis of mammary gland carcinoma
15	Cat	Chinchilla Persian	CM	16y	AIAPP	Adenocarcinoma of nasal cavity
16	Cat	American shorthair	SF	17y 1m	AIAPP	Squamous cell carcinoma and pulmonary adenocarcinoma
17	Cat	Chinchilla Persian	F	17y	AIAPP	Adenocarcinoma of nasal cavity and its infiltration into olfactory bulb
18	Dog	Pembroke Welsh Corgi	NA	14y	A β	Degenerative Myelopathy in Welsh Corgi
19	Cat	Himalayan	SF	17y 1m	A β	Chronic pancreatitis
20	Dog	Mix	SF	16y	ND	Pulmonary adenocarcinoma and transitional cell carcinoma
21	Dog	Miniature Schnauzer	SF	14y 2m	ND	Normal skin tissue of the case No. 22
22	Dog	Miniature Schnauzer	SF	14y 2m	ND	Adenocarcinoma of the mammary gland
23	Dog	Cavalier King Charles Spaniel	CM	11y	ND	Systemic metastasis of T cell lymphoma

Abbreviations: SF, Spayed female; CM, Castrated male; F, Female; M, Male; NA, Not Available.; ND; Not Detected.

Table 2-2. Antibodies used in the present study.

Antibody	Immunized animal (clone)	Antigen retrieval	Dilution	Supplier, product number
Human ApoE	Rabbit	Target retrieval solution, pH9 (Dako), autoclaving	1:100	IBL, 18171
LRP1	Mouse (5A6)	Citrate buffer, steam	1:100	LifeSpan BioScience, LS-B2675

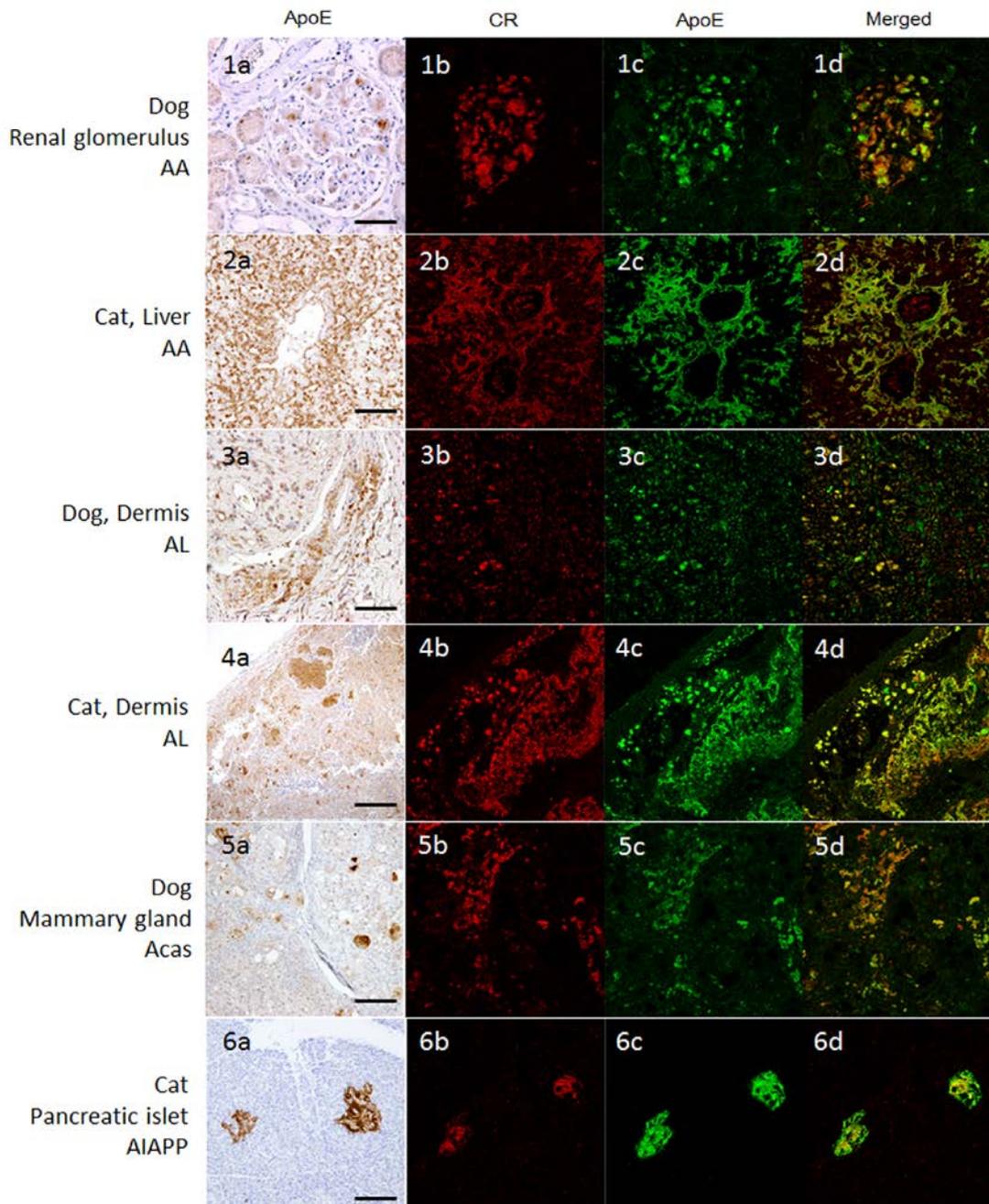


Figure 2-1: Immunohistochemistry and immunofluorescence for ApoE and CR stain. 1. Dog, No. 1, Renal glomerulus, AA deposition. Bar, 40 μ m. 2. Cat, No. 6, liver, AA deposition. Bar, 80 μ m. 3. Dog, No. 9, Dermis, AL deposition. Bar, 80 μ m. 4. Cat, No. 11, Dermis, AL deposition. Bar, 80 μ m. 5. Dog, No. 12, Acas deposition. Bar, 80 μ m. 6. Cat, No. 17, Pancreatic islet, AIAPP deposition. Bar, 40 μ m. (a)Immunohistochemistry for ApoE. (b)CR stain (red). (c)Immunofluorescence for ApoE (green). (d)Merged (yellow). All amyloids examined colocalized with ApoE.

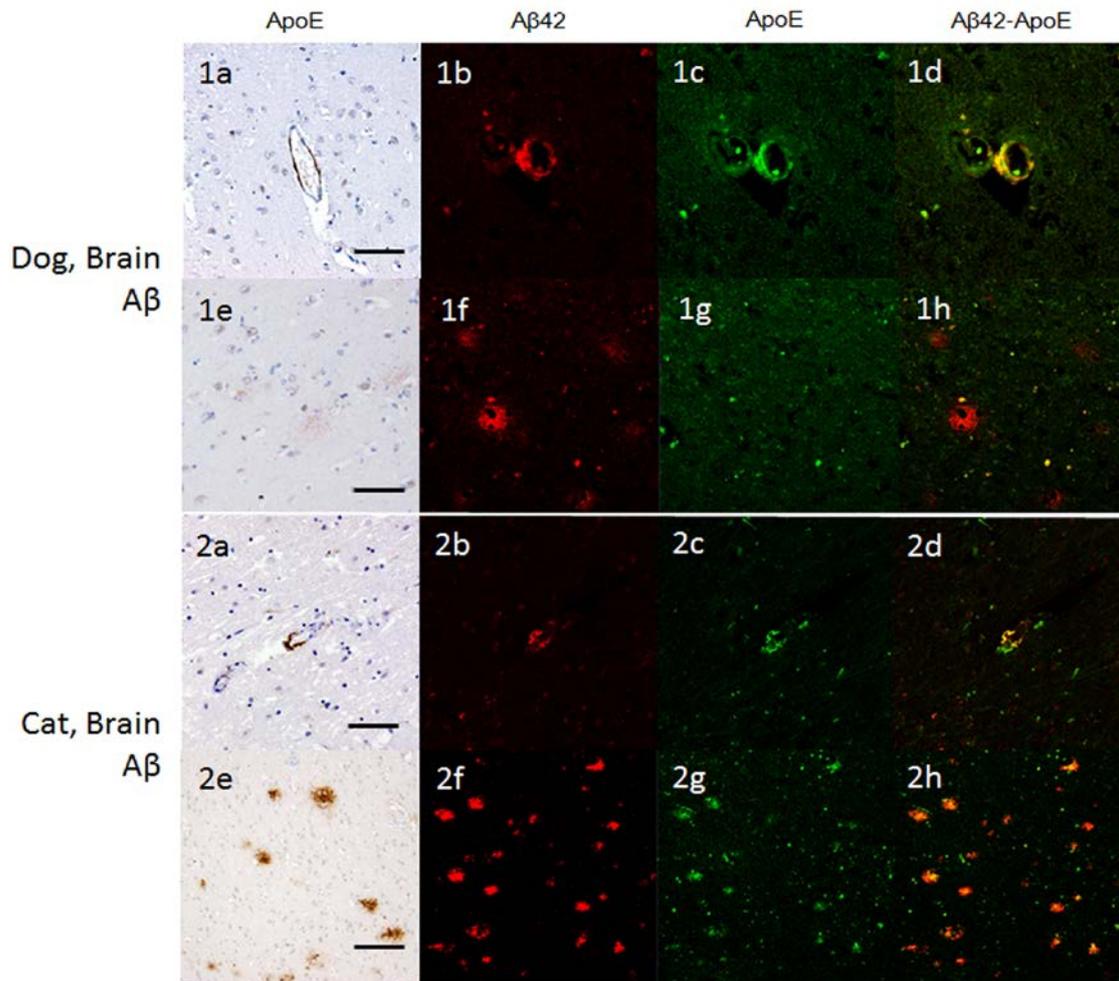


Figure 2-2: Immunohistochemistry and immunofluorescence for ApoE and A β 42.

1. Dog, No. 18, Brain, ApoE was detected around the meningeal vessel and the vessel walls of the brain parenchyma (a, b, c and d). Bar, 40 μ m. ApoE was not detected in A β 42-positive diffuse senile plaque (e, f, g and h). Bar, 80 μ m. 2. Cat, No. 19, Brain, ApoE was positive around the vessel walls (a, b, c and d). Bar, 80 μ m. ApoE also detected in A β 42-positive diffuse senile plaques (e, f, g and h). Bar, 40 μ m. (a) Immunohistochemistry for ApoE, (b) Immunofluorescence for A β 42 (red), (c) Immunofluorescence for ApoE (green), (d) merged (yellow).

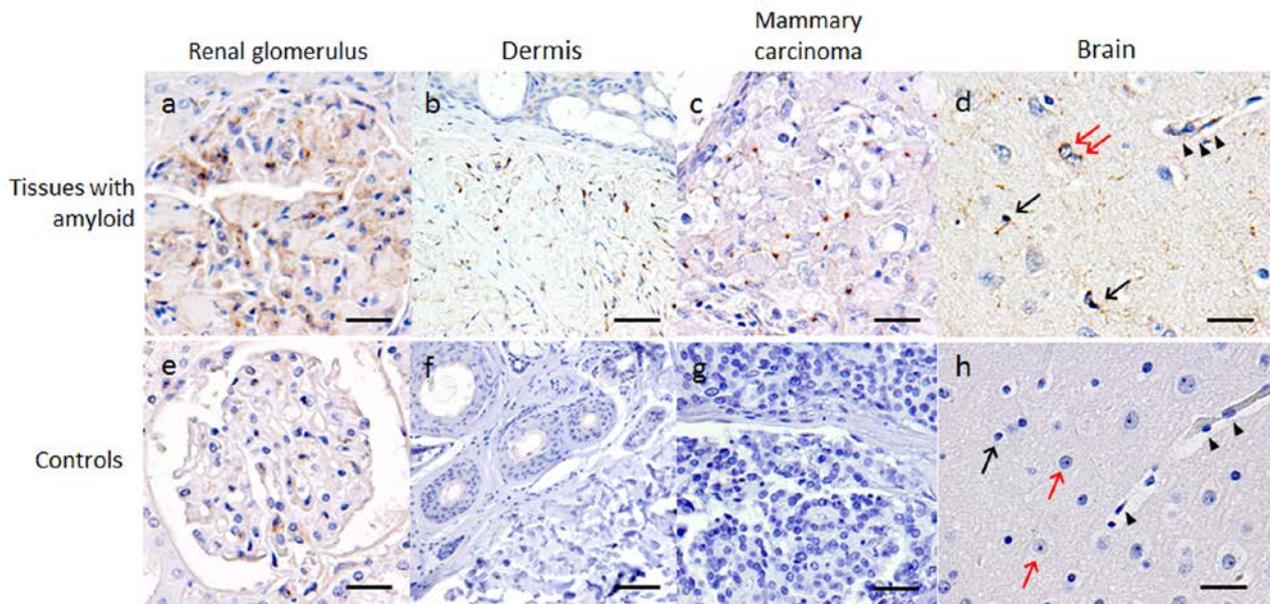


Figure 2-3: Immunohistochemistry for LRP1 in (a)AA-, (b)AL-, (c)Acas- and (d)A β -deposited tissues and control tissues of dogs (e, f, g and h, respectively).

(a)No. 1, Renal glomerulus. AA deposited in the mesangial region and mesangial cells are immunopositive for LRP1. Bar, 20 μ m. (b)No. 9, Dermis. AL deposited severely in the dermis and dendritic cells around amyloid are positive for LRP1. Bar, 40 μ m. (c)No. 12, Mammary lipid rich carcinoma, Acas deposited among neoplastic cells and dendritic cells in the amyloid region are positive for LRP1. Bar, 20 μ m. (d)No. 18, Brain. Cerebral cortex with diffuse senile plaques and vascular amyloid deposition. Microglia (black arrows), astrocytes (red arrows) and vascular pericytes (arrow heads) are positive for LRP1. Bar, 20 μ m. (e)No. 20, Renal glomerulus. No amyloid deposition. Few mesangial cells were positive for LRP1. Bar, 20 μ m. (f)No. 21, Dermis. No amyloid deposition. No LRP1-positive for LRP1. Bar, 40 μ m. (g)No. 22, Mammary gland adenocarcinoma. No amyloid deposition. No LRP1-positive cells. Bar, 20 μ m. (h)No. 23, Brain. No amyloid deposition. No expression of LRP1 on microglia (black arrows), astrocytes (red arrows) and vascular pericytes (arrow heads). Bar, 20 μ m.

第3章

日本猫の SAA 遺伝子および

沈着 AA アミロイドを構成する SAA 分子種の検索

序

AA アミロイド症は慢性炎症性疾患に併発し、致死的経過をたどることもある難病である。AA の前駆蛋白質は急性期炎症蛋白質の SAA であり、SAA の持続的高値が AA アミロイド症の発症の必要条件であることは、SAA 抑制療法が有効であることから明らかとなっている[20]。しかし AA アミロイド症は SAA 高値の患者の一部にしか発症しないことから、SAA 以外の因子の関与が想定されている。ヒトの SAA 遺伝子は少なくとも 4 種類 (SAA1, SAA2, SAA3, SAA4) があり、そのうち SAA1 遺伝子が AA アミロイド症の原因遺伝子である[41]。日本人の SAA1 遺伝子には exon 3 の多型により、3 種のアレルが存在し (SAA1.1: ⁵²Val/⁵⁷Ala, SAA1.5: ⁵²Ala/⁵⁷Val, SAA1.3: ⁵²Ala/⁵⁷Ala)、アミロイド症患者で SAA1.3 の頻度が高く正のリスクファクターである一方、SAA1.1 はアミロイド症に防御的であることが疫学的に明らかとなっている[3, 49, 96]。しかし、これらの遺伝子多型がアミロイド症の発症に影響するメカニズムはまだ不明である。

獣医学領域では、豚、犬、猫、マウス等で SAA 遺伝子の検索が行われているが[48, 72, 74, 87]、その遺伝子多型とアミロイド症の関連についてはほとんど調べられていない。猫ではアビシニアン種、シャム種において家族性の AA アミロイド症の発生が知られており、これらの種にそれぞれ特異的な SAA 遺伝子配列が明らかとなっている[87]。また、アビシニアンでは主に腎臓に、シャムでは主に肝臓と消化管に AA が沈着することから、SAA のアミノ酸配列が組織沈着パターンと関連すると考えられている[54]。日本ではこれらの種の飼育頭数は少なく日本猫（雑種）が圧倒的多数を占めるが、日本猫においても AA アミロイド症は散発的に発生している。その原因として、長期にわたる感染あるいは腫瘍による慢性炎症の存在が考えられているが、ヒトと同様、慢性炎症を患う日

本猫のすべてが AA アミロイド症を発症するわけではないと考えられる。そこで本章では、猫における AA アミロイド症の発症要因の一つとして SAA 遺伝子の変異を想定し、症例および対照例の日本猫について SAA 遺伝子を検索し、AA アミロイド症の発症および組織沈着パターンとの関連について検討した。

また、ヒトで組織に沈着した AA は SAA の 76 と 77 番目のアミノ酸残基の間で切断された N 末端側で構成されることが明らかとなっている[65]。このことから過剰に産生された SAA は血中あるいは組織局所で切断されることにより安定性を失い、クロス β シート構造へと変化しアミロイド線維が形成されることが考えられている。しかし、この切断はアミロイド線維が形成された後に起こるという報告[34]もあり、切断がアミロイド線維形成に必須かどうかは依然として不明である。マウスでは全長 SAA がアミロイド線維を形成することがわかっているが、それ以外の動物では切断部位について様々な報告があり、切断部位とアミロイド形成の関連については十分に調べられていない。そこで、本章では SAA の N 末端ペプチド、中央部分ペプチド、C 末端ペプチドに対する抗血清を作製し、これらを用いた免疫組織化学法により、猫の組織沈着 AA を構成する SAA 分子種について検索した。

材料と方法

症例・材料および病理組織学

病理組織学的に AA アミロイド症と診断された日本猫 4 例と、アミロイドの沈着が認められなかった日本猫 5 例を用いた。各症例の概要は Table 3-1 に示した。採材組織は 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、常法に従い 4 μm 厚のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、アルカリ・コンゴレッド (ACR) 染色[61]、各種抗体を用いた免疫染色に使用した。ACR 染色を行った切片は偏光顕微鏡で観察し黄緑色の複屈折光を確認することで、アミロイド沈着の有無を判定した。

DNA 抽出とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅

ゲノム DNA は、新鮮凍結肝臓組織から DNeasy[®] Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Limburg, Netherlands) を用いて、メーカーのプロトコルに従い抽出した。SAA 遺伝子配列は PrimeSTAR[®] Max DNA polymerase (TaKaRa Bio, Otsu, Shiga, Japan) を用いて、メーカーのプロトコルに従い PCR 法により増幅した。ネコ SAA 遺伝子の exon 2, 3 および 4 に特異的なプライマー配列は以下の通りである。

Exon 2 forward: 5'-CAA CTG CCC TCT TCC TCC AT-3', reverse: 5'-GAC GGA CAC AAA TCC TCT GGT-3'

Exon 3 forward: 5'-CTG GAG TCG GTG GCA GAT TT-3', reverse: 5'-CCT TGC TCT GAC CCC ATC AG-3'

Exon 4 forward: 5'-ACC CAG TAA GGG ATC AGC CT-3', reverse: 5'-CAC CCC TGG GAA CGA ACA AA-3'

PCR 条件は、変性を 98°C, 10 秒、アニーリングを 57°C, 5 秒、伸長を 72°C, 3

秒で、35 サイクル行った。次に、PCR 産物のアガロースゲル電気泳動を行い切り出したバンドゲルからメーカーのプロトコルに従って QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)を用いて目的増幅産物の抽出を行った。抽出物は BigDye Terminator 3.1 mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) および ABI Prism 3030 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて、その遺伝子配列を解析した。

抗ネコ SAA ポリクローナル抗体の作製

ネコ SAA の N 末端領域 (MREANYIGAD)、中央領域 (QRGPGGAWAAKV)、C 末端領域 (EWGRSGKDPNHFRP)の合成ペプチド (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan)をウサギ 3 羽にそれぞれに注射し、各ペプチドに対する抗血清 AS-No.1, AS-No. 2, AS-No. 3 を得た (Fig. 3-1)。各抗血清の特異性については、リコンビナントネコ SAA 蛋白質およびそれぞれの合成ペプチドに対するウエスタンブロット法により確認した (Fig. 3-2)。リコンビナントネコ SAA 蛋白質は、東京大学大学院獣医内科学研究室の大野耕一准教授、玉本隆司博士により供与を受けた[79]。

免疫組織化学法

用いた抗体を Table 3-2 に示した。脱パラフィンした切片について、3%過酸化水素・メタノール溶液で室温 5 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、ブロッキング溶液 (8%スキムミルク・TBS) で 37°C、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、TBS で希釈した一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。TBS で洗浄した後、EnVision polymer (Dako) 法により Envision horseradish

peroxidase-labeled polymer anti-mouse IgG あるいは anti-rabbit IgG (Dako)と 37°Cで 40 分間反応させた。発色には 0.5% DAB (Dojindo Laboratories)に 0.1%になるように H₂O₂ (Wako Pure Chemical Industries)を添加して使用した。核染色にはヘマトキシリンを用いた。

蛍光免疫-コンゴレット二重染色

上述した免疫組織化学法と同様に抗原賦活化を行った後、切片を一次抗体と反応させ、TBST で洗浄し、TBST で希釈した Alexa Fluor 488 抗ウサギ IgG 抗体 (1:200 希釈、Life Technologies)と室温で 37°C、1 時間反応させた。蛍光免疫染色を行った切片を 1% CR 水溶液と 10 分間反応させ後、飽和炭酸リチウム溶液で洗浄した。非特異的な結合を切断するため 80%エタノールと 5 分間反応させた後、流水水洗を行った。蛍光染色用封入剤で封入後、Carl Zeiss LSM700 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss Micro Imaging)を用いて観察した。ACR 染色切片の蛍光観察には 596 nm の励起波長を用い、発光極大 620 nm の波長を赤色で検出した[12]。

結果

病理組織学

各症例における AA の組織分布およびその程度を Table 3-3 に示した。沈着アミロイドは、検索したすべての猫において抗 AA 抗体および作製した SAA 部分ペプチドに対する抗血清を用いた免疫組織化学法の結果、陽性であった。全身性 AA アミロイド症の日本猫、7 頭中 4 頭で重度の、2 頭で中程度の AA 沈着が肝臓に認められた。AA はグリソン鞘では血管壁に、また中心静脈周囲およびデイス腔において肝細胞索に沿って沈着が認められた (Fig. 3-3)。AA が重度に沈着する箇所では、肝細胞の萎縮が観察された。AA が主に腎臓の糸球体に認められた症例では髄質間質への沈着は軽度であり (Case No. 1 と Case No. 3)、逆に糸球体への沈着が軽度の症例では髄質間質への沈着が重度であった (Case No. 4 と Case No. 6)。糸球体ではメサングウム領域において巣状のアミロイド沈着が認められた (Fig. 3-4)。Case No. 4 では肝臓への沈着は認められず、腎髄質間質に重度の沈着が認められた (Fig. 3-5)。肝臓および腎臓以外では、甲状腺、消化管粘膜固有層、副腎および舌に AA の沈着が観察された。甲状腺では間質へのアミロイド沈着による濾胞の萎縮が認められた (Fig. 3-6)。

日本猫の SAA 遺伝子およびアミノ酸配列解析

Case No. 1 から Case No. 4、Case No. 8 から Case No. 12 の 9 例の肝臓から抽出した DNA について直接シーケンス法により塩基配列を決定し、SAA 蛋白質のアミノ酸配列へ変換し比較したところ、1 残基目、45 残基目、51 残基目に多型が認められた (Table 3-4)。全ての非 AA アミロイド症例 (Case No. 8 から Case No. 12) と 2 頭の AA 症例 (Case No. 1 と 4) は、45R (アルギニン)、51A (アラニ

ン) のアミノ酸を有していた。Case No. 2 では、主に腎臓に AA が沈着していたアビシニアン症例と同様の 45Q (グルタミン)、51A (アラニン) の組み合わせを有していたが、AA の沈着は肝臓で重度に認められ腎臓ではわずかであった。また、Case No. 1, Case No. 2 および Case No. 3 では肝臓に重度のアミロイド沈着がみられたが、主に肝臓および消化管にアミロイドが沈着していたシャムと同一の配列 (45R-51V (バリン)) を有する症例は存在しなかった。1 残基目については、AA の沈着の有無および組織沈着パターンとの間に関連性はなかった。

抗ネコ SAA 部分配列血清を用いた免疫組織化学法

ネコ SAA 蛋白質のアミノ酸残基 23-32, 45-56, 91-104 の各ペプチド配列に対する抗血清、AS-No. 1, AS-No. 2, AS-No. 3 を作製した (Fig. 3-1)。また、ウェスタンブロット法により各抗血清とリコンビナントネコ SAA 蛋白質およびそれぞれの抗原ペプチドに対する特異性を確認した (Fig. 3-2)。各症例の肝臓、腎臓に沈着した AA はいずれの抗血清とも免疫組織化学的に反応した (Figs. 3-7, 3-8)。

また、ACR 染色と各抗血清を用いた蛍光免疫染色の重染色の結果、ACR 陽性アミロイドはいずれの抗血清とも共局在した (Fig. 3-9)。このことから、ヒトと異なり猫の沈着 AA には SAA の 23 から 104 番目までのアミノ酸残基が含まれ、AA 形成に SAA の C 末端が必ずしも切断・代謝される必要がないことが示唆された。

考察

本研究では日本猫 9 頭の SAA 遺伝子を解析し、1, 45, 51 番目のアミノ酸残基に多型を認めた。解析された配列のうち、45R と 51A の組み合わせは哺乳類で他にみつかっておらず、鶏と同一の組み合わせであった (Table 3-5)。鶏における AA アミロイド症は *Enterococcus faecalis* の感染に伴って発生し、主にアミロイド関節症を呈する[76]。ネコ SAA に関するいくつかの先行研究では、SAA 遺伝子変異とアミロイド症発症について明らかな関連性はみつかっていない[31, 54]。本研究においてネコ SAA の新たな多型としてみつかった 45R-51A がアミロイド原性を有するかどうかは残念ながら不明のままである。

近年、ヒト SAA1.1 の立体構造が明らかとなり、45 番目と 51 番目のアミノ酸残基はそれぞれ隣り合った異なる α ヘリックス部分に含まれることがわかった[44]。また、ヒト SAA1.1 の N 末端側はアミロイド原性が高いこともすでに報告されていた[43, 90]。また、SAA1.1 の立体構造に関する先行研究においても 1-7 番目と 51-58 番目のペプチドがアミロイド原性とされている。このことから、今回猫で確認された 51A-V というアミノ酸一つの変化がネコ SAA の立体構造を変化させた結果、AA アミロイドを形成した可能性が考えられた。51A あるいは 51V のアミノ酸残基を含むネコ SAA ペプチドのアミロイド原性に関するさらなる研究が必要不可欠である。

アビシニアン¹の家族性 AA アミロイド症は、臨床的、病理組織学的にヒトの家族性地中海熱 (FMF) と類似する[14]。FMF およびアビシニアン¹の家族性 AA アミロイド症では AA が主に腎髄質に沈着する。FMF の原因遺伝子は SAA ではなく Pyrin 蛋白質をコードする *MEFV* 遺伝子である[58]が、猫の *MEFV* 遺伝子についての詳細な検討はなされていない。Pyrin は、炎症において中心的な役割を

果たしているシグナル伝達複合体 (インフラマソーム) を構成する分子である。そのため FMF では、*MEFV* 遺伝子の変異により Pyrin 蛋白質の機能に異常が生じ、自己炎症が惹起される。アビシニアンとシャムの家族性 AA アミロイド症に関する先行研究において、これらの品種の SAA アミノ酸配列と AA の沈着パターンに関連があると報告されている[54]。しかし本研究において日本猫で見出した各 SAA アミノ酸配列と、AA の組織沈着パターンとの間に関連はなかった。今回免疫組織化学的に検索した日本猫の AA アミロイド症では、7 例中 6 例で肝臓に重度の沈着が認められ、肝臓が沈着好発組織であった。その他の組織については、慢性炎症性疾患あるいは腫瘍などの基礎疾患の罹患期間が長引くにつれ腎糸球体、消化管に順次沈着していくと考えられた。しかし、Cat No. 4 では肝臓に AA が沈着せず、腎髄質に重度の沈着が認められた (Table 3-3)。先行文献において、血縁関係にあるアムールトラ 4 頭の腎髄質 AA アミロイド症が報告されており [70]、沈着好発組織には遺伝的要因が関係すると考えられる。今回の検索では SAA 遺伝子多型と組織沈着パターンに関連性は見いだせなかったが、AA が主に腎髄質に沈着する症例については SAA 遺伝子以外の遺伝的要因 (例えば上述の *MEFV* 遺伝子など) の関与が疑われる。

ヒトでは血清 SAA の持続的高値が AA アミロイド症発症の必要条件であり、さらに *SAA1.3* のアレルを有することがリスク因子と考えられている[6]。猫でもヒトと同様に血清 SAA の持続的高値がアミロイド症の発症に必要なかどうかは明らかではないが、今回の結果から SAA の遺伝子変異は重要なリスク因子ではないと考えられた。そのため、リスク要因と考えられる *MEFV* 遺伝子、あるいはアポリポ蛋白 E、血清アミロイド P コンポーネント、グリコサミノグリカンなど

のシャペロン蛋白質の病態への関与についてさらなる検索が必要である[1, 33, 83]。

AA アミロイド症の病理発生に影響する因子として、SAA 蛋白質の切断部位が挙げられる。質量分析法による解析で、ヒトでは SAA の N 末端から 76 番目と 77 番目のアミノ酸残基の間で切断された N 末端断片が主な AA アミロイド構成分子であることがわかっている[65]。このことから、SAA の切断によりその N 末端断片の立体構造が変化し、アミロイド線維形成が開始されると考えられている。一方、ネコの AA に関する先行研究においても、AA は SAA の N 末端側の配列で構成されていることが報告されている[54]。本研究では、ネコ SAA の部分ペプチド (N 末端側 23-32 残基、中央部分 45-56 残基、C 末端側 91-104 残基) に対して作製された抗血清を用いた免疫組織化学的検索により、いずれの部分ペプチドも AA アミロイド内にと存在することを示した。このことから、ヒトやそのほかの哺乳類と異なり、ネコ AA は SAA の C 末端断片を広く含むことが示唆された。先行研究[54]で、猫の AA アミロイドの解析に用いたエドマン分解法では、アミノ酸は N 末端側から 1 残基ずつ同定されるが、何らかの修飾を受けている場合は、反応が先に進まず解析不能となる[4]。そのため、ネコ AA の解析においても、C 末端側が解読不能であった可能性が考えられる。Patke ら[59]は、マウス SAA において C 末端側が失われると線維化効率が有意に下がることから、C 末端側が SAA の線維化になんらかの働きをすると報告している。今回の検索によりネコ AA は C 末端断片を含むことが明らかとなったが、このことは Patke らの報告と矛盾しない。

以上、日本猫の SAA 遺伝子を同定した結果、3 カ所のアミノ酸多型箇所と、4 種類のアミノ酸配列の組み合わせを見出した。そのうち 45R-51A の組み合わせ

は哺乳類で新規にみつかったものであった。しかし、その配列がアミロイド線維形成に促進的に働くのかどうかはまだ不明である。ヒトとは異なり、ネコ AA は SAA の C 末端を含むことから、猫では SAA の切断と C 末端断片の代謝が AA 線維形成の必要条件ではないことが示唆された。

要約

AA アミロイド症に罹患した4頭の日本猫と、罹患していない5頭の日本猫のSAA 遺伝子をダイレクトシーケンス法により検索した結果、3箇所の多型が同定され、これらの塩基配列をアミノ酸配列に翻訳すると、3つのアミノ酸多型箇所が示された。これらアミノ酸多型のうち、アミロイド症の日本猫1頭と非アミロイド症の日本猫5頭が有していた45R-51Aの組み合わせは、哺乳類で初めて報告されたものであった。しかし、これらのアミノ酸多型とAA アミロイドの組織沈着パターンとの間に関連は認められなかった。したがって、SAA のアミノ酸配列の相違はAA アミロイド症の病態発生に寄与しないと考えられた。

次いで行ったSAA 蛋白質のN末端側(23-32)、中央部分(45-56)、C末端側(91-104)を抗原として作製した抗血清を用いた免疫染色の結果から、ヒトと異なりネコAAにはC末端側が含まれることが示された。したがって、SAA 蛋白質のC末端側の切断はアミロイド線維形成に必須のイベントではないと考えられた。

Table 3-1. JDC cats examined in the present study

Cat No.	Sex	Age	Major pathologic diagnosis at necropsy
1*	SF	13 y	Mandibular abscess and systemic AA amyloidosis
2*	CM	6 y	Bacterial dermatitis and systemic AA amyloidosis
3*	CM	5 y 2 m	B cell lymphoma in cerebellum and systemic AA amyloidosis
4*	SF	12 y 5 m	Chronic renal failure with systemic AA amyloidosis
5	CM	2 y 2 m	Osteochondromatosis and systemic AA amyloidosis
6	SF	9 y 8 m	Intestinal lymphoma (small cell type) and systemic AA amyloidosis
7	SF	15y	Pyogenic bronchitis, interstitial pneumonia, acute myocarditis and systemic AA amyloidosis
8*	SF	13 y 3 m	Systemic metastasis of mammary gland carcinoma
9*	SF	16 y	Systemic metastasis of anaplastic plasmacytoma
10*	CM	12 y 2 m	Systemic histiocytosis
11*	F	15 y	Systemic metastasis of mammary gland carcinoma
12*	M	10 y	Systemic metastasis of T cell lymphoma

* Cats examined for DNA sequence analysis.

Abbreviations: SF, Spayed female; CM, Castrated male; F, Female; M, Male; AA, amyloid A.

Table 3-2. Antisera used for Immunofluorescence and Western blot.

Antibody	Antigen	Species	Dilution	Supplier
AA (clone KM268) Antiserum	Human SAA 37-47	Mouse	1:50 (IF)	Kyowa Medics
AS-No.1	Cat SAA 23-32	Rabbit	1:150 (IF) 1:1000 (WB)	Eurofins Genomics
AS-No.2	Cat SAA 45-56	Rabbit	1:150 (IF) 1:1000 (WB)	Eurofins Genomics
AS-No.3	Cat SAA 91-104	Rabbit	1:150 (IF) 1:1000 (WB)	Eurofins Genomics

Table 3-3. Tissue distribution and severity of AA deposition in JDCs examined in the present study

Cat No.	Liver	Renal glomerulus	Renal medulla	Thyroid gland	Intestinal lamina propria	Other tissues
1	+++	+++	+	++	-	Adrenal gland++
2	+++	-	+	-	+	Tongue +
3	+++	++	+	++	-	ND
4	-	-	+++	-	++	Tongue +
5	+++	-	-	+	++	Adrenal gland+
6	++	+	+++	+++	++	Adrenal gland+
7	++	-	-	-	+	Adrenal gland+

Amyloid deposition: Renal glomerulus, - = no amyloid detected, + = mild segmental deposition < 25%, ++ = moderate segmental to global deposition affecting 25-50% and +++ = severe segmental to global deposition affecting > 50%; Renal medulla, - = no amyloid detected, + = minimal to mild deposition affecting < 25%, ++ = moderate multifocal deposition affecting between 25 and 50% and +++ = severe multifocal to diffuse deposition affecting >50%; Other tissues, - = no amyloid detected, + = minimal to mild deposition, ++ = moderate multifocal deposition and +++ = severe multifocal to diffuse deposition. ND: not detected.

Table 3-5. Amino acid sequence of SAA protein from various species.

	Amino acid sequence																								
	45						51																		
Human	R	G	N	Y	D	A	A	K	R	G	P	G	G	V	W	A	A	E	A	I	S	D	A	R	E
Mouse	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	V	W	A	A	E	K	I	S	D	A	R	E
Cat (Aby)	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E
Cat (Siam)	R	G	N	Y	D	A	A	R	R	G	P	G	G	V	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E
Cat (JDC)	R	G	N	Y	D	A	A	R	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E
Chicken	R	G	N	Y	D	A	A	R	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E
Cow	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E
Dog	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E
Mink	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E
Pig	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E
Rabbit	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	V	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E

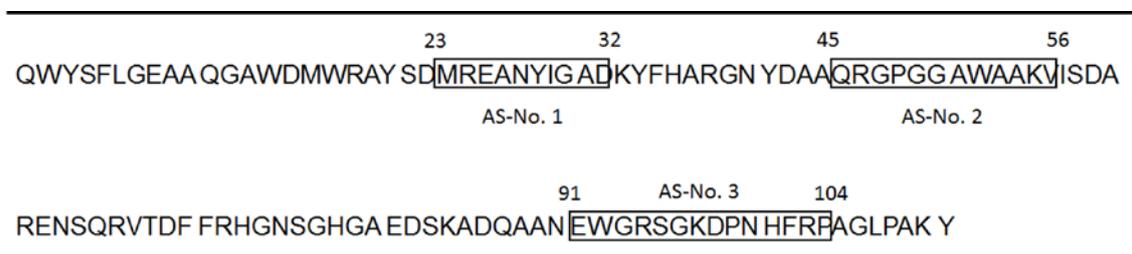


Figure 3-1: Amino acid sequence of feline SAA. AS-No. 1 to No. 3 are oligopeptide used as immunogens.

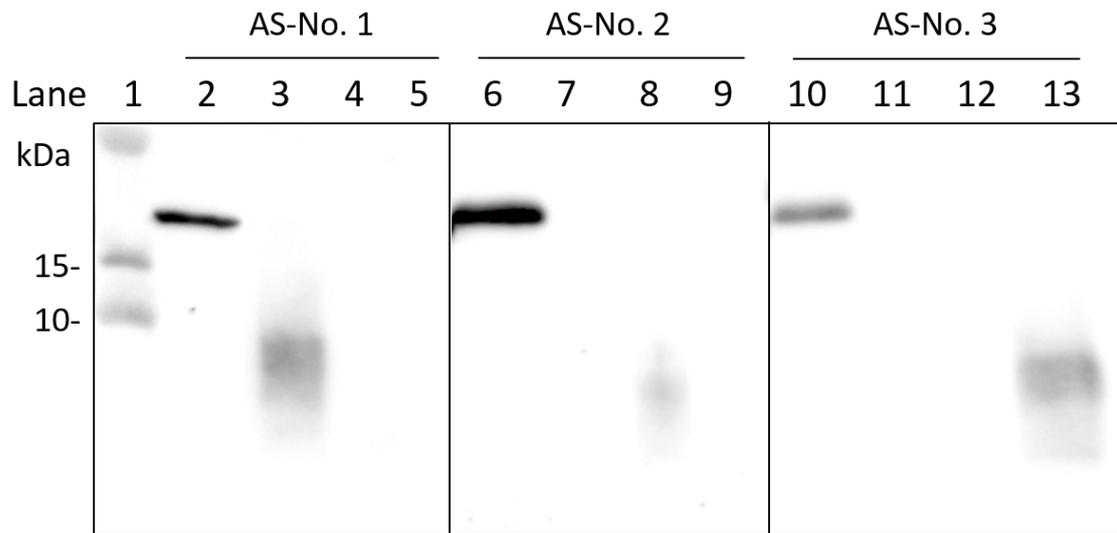
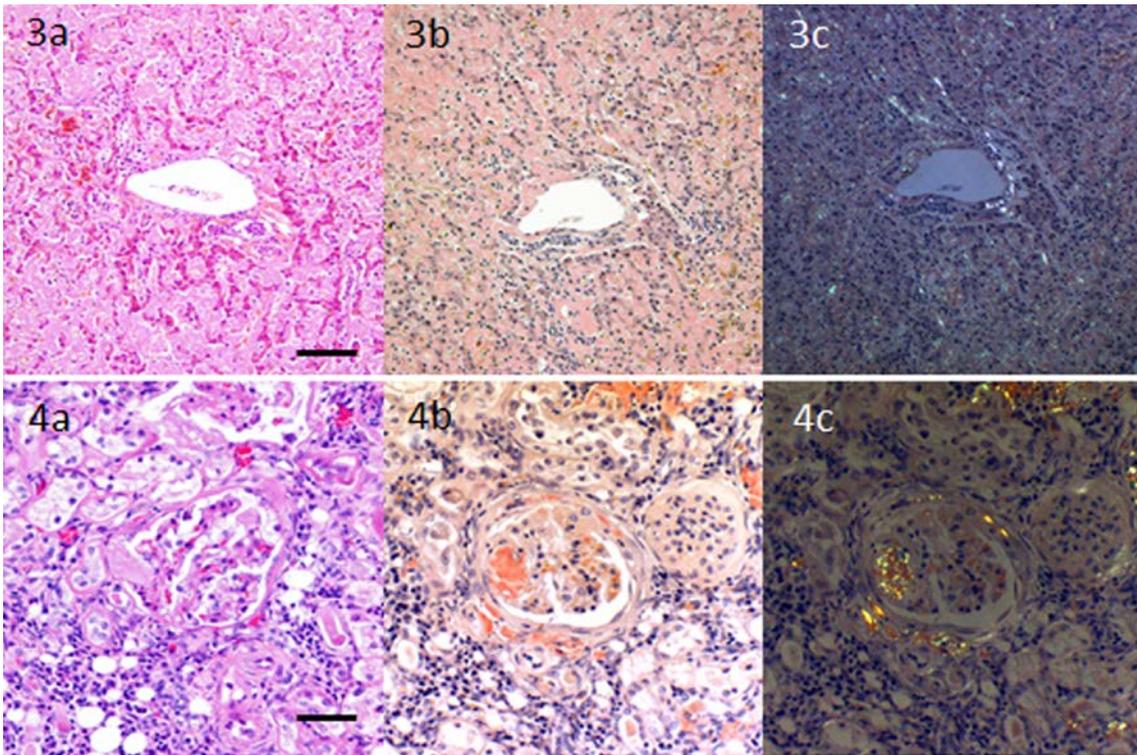
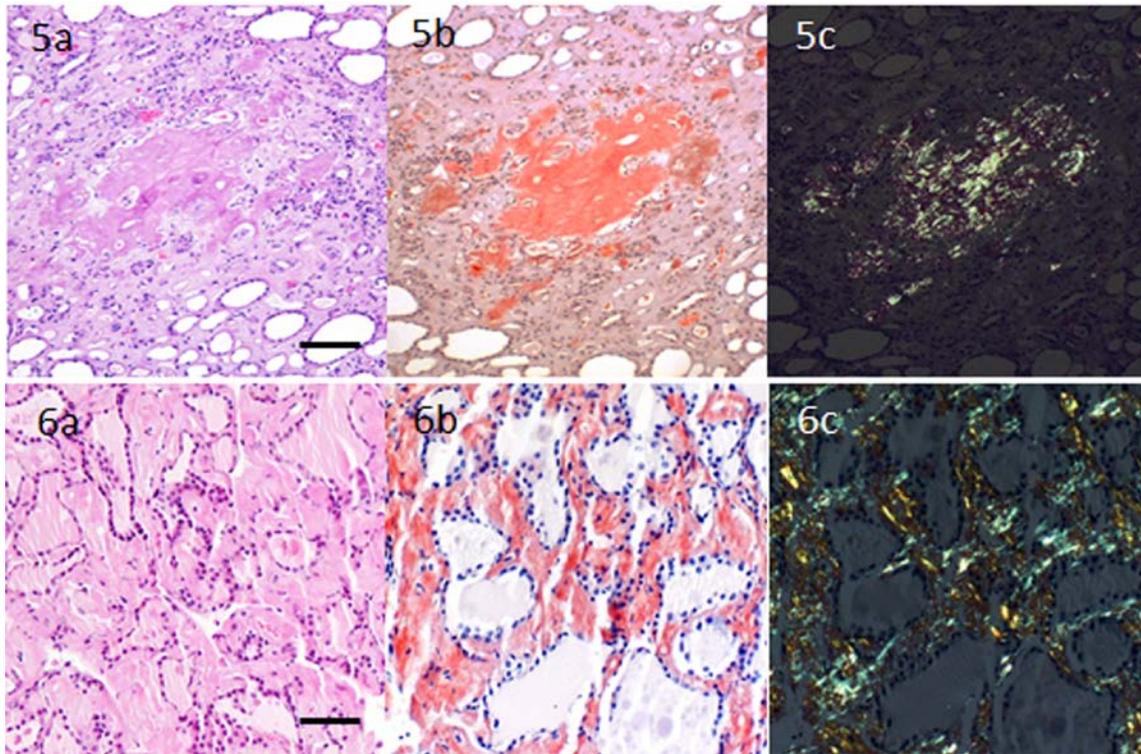


Figure 3-2: Western blot analysis. Antisera used were AS-No. 1 (lanes 2 to 5), AS-No. 2 (lanes 6 to 9) and AS-No. 3 (lanes 10 to 13). Electrophoresed antigens were rb feline SAA (lanes 2, 6 and 10), SAA 23-32 (lanes 3, 7 and 11) SAA 45-56 (lanes 4, 8 and 12) and SAA 91-194 (lanes 5, 9 and 13). Lane 1 represents a size marker. AS-No. 1, No. 2 and No. 3 immunoreacted with rb feline SAA protein (Lanes 2, 6 and 10). Each antisera immunoreacted only with their own antigen peptides (lane 3, lane 8, lane 13).



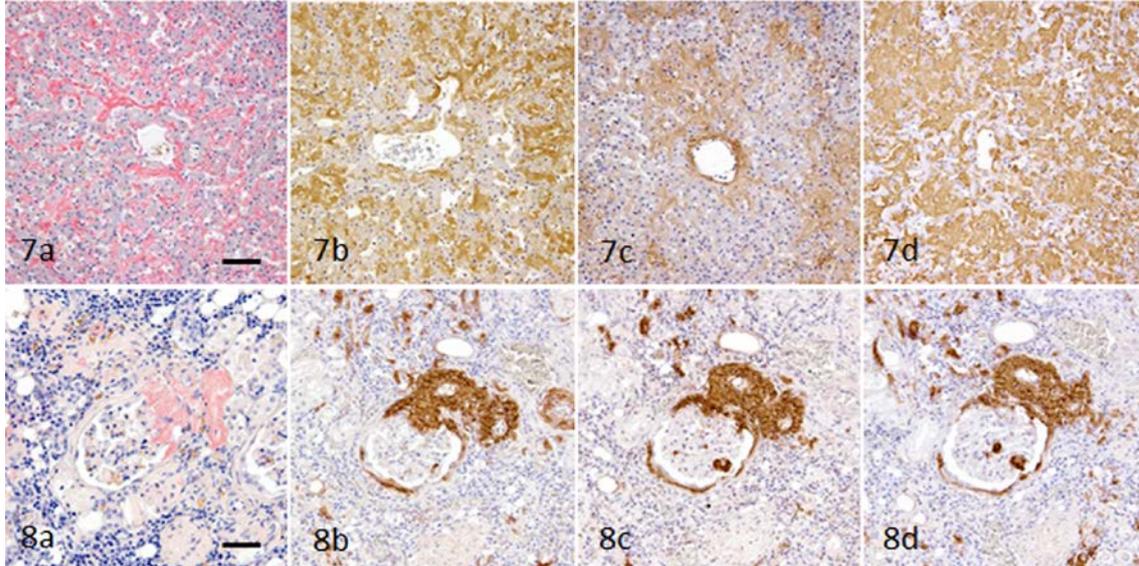
Figures 3-3: Liver, Cat No. 1, AA deposited around the central vein and in the space of Disse. HE (a), CR (b) and CR with a polarized light (c). Bar, 50 μ m.

Figures 3-4: Kidney, Cat No. 6, AA deposited segmentally in the renal glomerulus. HE (a), CR (b), CR with a polarized light (c). Bar, 25 μ m.



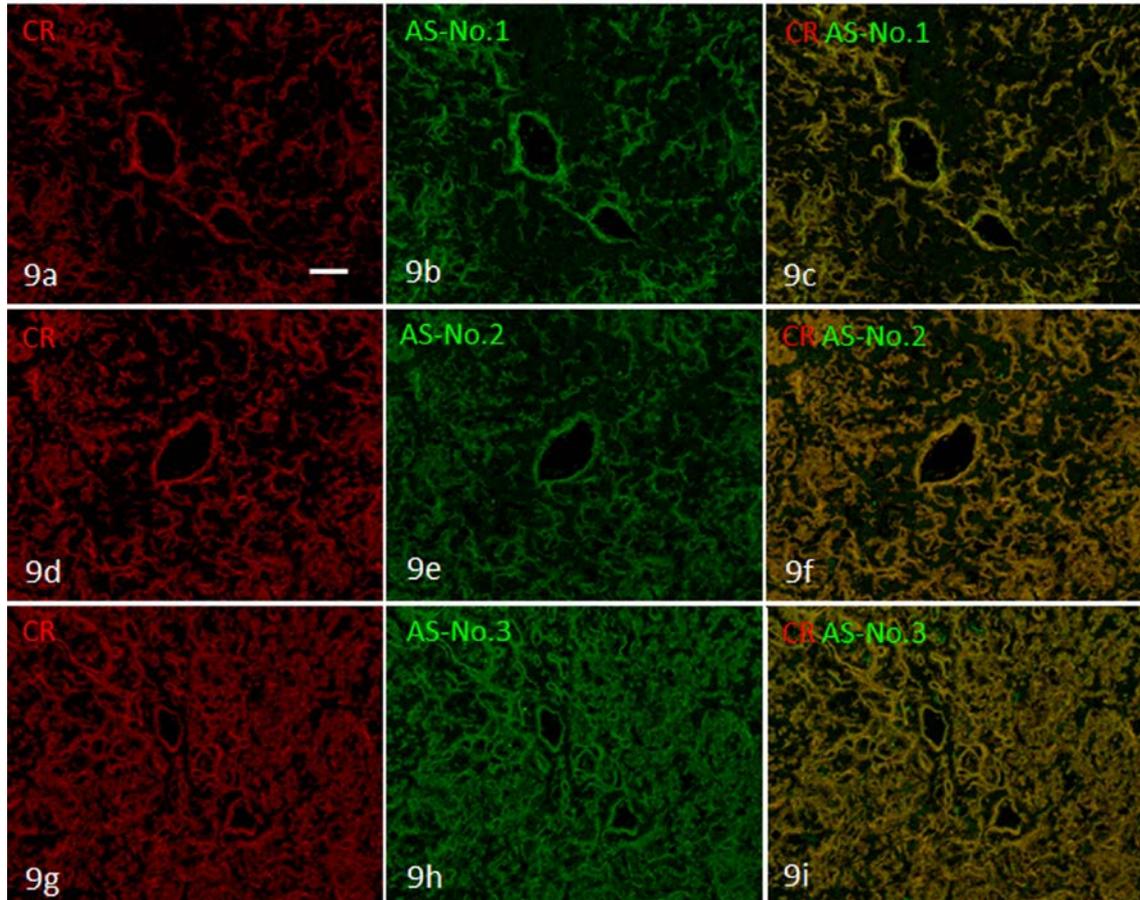
Figures 3-5: Kidney, Cat No. 4, AA deposited in the interstitium of the medulla. HE (a), CR (b), CR with a polarized light (c). Bar, 50 μ m.

Figures 3-6: Thyroid gland, Cat, No. 6, AA deposited in the interfollicular interstitium. HE (a), CR (b), CR with a polarized light (c). Bar, 25 μ m.



Figures 3-7: Liver, No. 5, AA deposited mainly in the space of Disse. CR (a) and immunostained with AS-No.1 (b), AS-No. 2 (c) and AS-No. 3 (d), respectively. Bar, 50 μ m.

Figures 3-8: Kidney, No. 6, AA deposited in the glomerulus and in the wall of the arterioles. CR (a) and immunostained with AS-No.1 (b), AS-No. 2 (c) and AS-No. 3 (d), respectively. Bar, 25 μ m.



Figures 3-9: ACR-stained liver sections observed with a confocal laser microscope (a, d and g), and those immunostained with AS-No. 1 (b), No. 2 (e) and No. 3 (h), respectively. ACR-positive AA deposits immunoreacted also with AS-No. 1 (c), AS-No. 2 (f) and AS-No. 3 (i). Bar, 50 μ m.

総括

アミロイド症は、それぞれの前駆体蛋白質の三次立体構造（コンフォメーション）への折りたたみ異常（ミスフォールディング）が原因であり、コンフォメーション病あるいは蛋白ミスフォールディング病とも呼ばれる。細胞内で翻訳された蛋白質は、そのアミノ酸配列に応じて固有の立体構造に折りたたまれて機能を有するようになる。すなわち、蛋白質は自発的に、熱力学的に最も安定な立体構造をとる。しかし、そのフォールディング過程で起こる様々な生体内現象により異常なフォールディングが生じ、不溶性の凝集物としてアミロイドが沈着し、臓器に機能障害を引き起こす。

第1章では、各種アミロイドのアミノ酸組成と生化学的特性の関連を考察する目的で、犬と猫のAA、AL、犬のAcas、猫のAIAPPにACR染色とクルクミン染色を行い、さらに過マンガン酸カリウムによる酸化還元処理を加えてその染色性の変化を検討することで、クルクミンとアミロイドとの結合性を検証した。クルクミンは検索した全てのアミロイドと結合し、アミロイド沈着部位と一致してクルクミンの自家蛍光が検出された。ACR染色はアミロイドの染色法として確立されているが、アミロイドの種類によって染色性に差があり、また、膠原線維を共染しやすいなどの問題点がある。本章においてクルクミン染色は簡便に行うことが可能で、かつクルクミンはコンゴレッドよりも鋭敏に各種アミロイドと結合したことから、アミロイドの染色として有用であると考えられた。また、各種アミロイドに過マンガン酸カリウムおよびシュウ酸による酸化還元処理を施して、その立体構造を変化させることにより、ACRとクルクミンによる染色性の変化を検討した。その結果、ACR染色ではAAのみ染色性が失われ、クルクミン染色ではAA、AL、Acasの染色性が失われた。この現象は、各種アミロイドのアミノ酸配列の相違により生じると考えられ、コンゴレッド

はアミロイド線維と水平方向に、クルクミンはアミロイド線維軸に垂直方向により結合しやすいと推察された。また、クルクミンのアミロイド線維形成阻害剤としての可能性が示唆された。

第2章では、犬と猫の各種アミロイド沈着組織における ApoE およびそのレセプターである LRP1 の局在を免疫組織化学的に検索した。その結果、ApoE は犬と猫の AA、AL、A β 、犬の Acas および猫の AIAPP と共局在すること、および ApoE のレセプターであり、脳で A β の分解および排出に関わると考えられている LRP1 は、犬と猫の AA、AL、犬の Acas、猫の AIAPP 沈着組織周囲の樹状細胞に発現することが明らかになった。犬の A β 沈着脳組織では、ミクログリア、アストロサイトおよび血管周皮細胞に LRP1 の発現が認められた。また、アミロイド沈着のない対照組織では、いずれも LRP1 陽性細胞は観察されなかった。以上のことから、A β のみならず AA、AL、Acas および AIAPP の沈着においても、ApoE および LRP1 がその病態に関与することが示唆された。

第3章では、AA アミロイド症に罹患した4頭の日本猫と罹患していない5頭の日本猫の SAA 遺伝子の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定し、それから翻訳されるアミノ酸配列について、他の品種の配列と比較した。その結果、猫の SAA には1残基目、45残基目、51残基目の3カ所に多型が存在することが明らかとなった。45残基目がアルギニン、51残基目がアラニンの SAA 蛋白質は哺乳類で現在まで報告がなく、新たな配列であった。しかし、この配列は AA アミロイド症に罹患していない対照例5例中全例と、アミロイド症4例中1例で認められたことから、アミロイド症の遺伝的リスク因子あるいは防御的因子としての意義は不明であった。さらに、SAA のアミノ酸多型とアミロイドの組織沈着パターンとの関連性も見出すことができなかった。また、日本

猫の SAA アミノ酸配列の N 末端側、中央部分、C 末端側のそれぞれを抗原として作製した 3 種類の抗血清を用いて、組織に沈着した AA を免疫組織学的に検索したところ、いずれの SAA 部分配列も沈着 AA に含まれていた。したがって、猫の AA アミロイド症では、SAA の切断が AA 線維形成の必要条件ではないことが示唆された。

本研究の結果から、ApoE が内因性因子としてアミロイド線維形成促進的に、またクルクミンは外因性因子として、LRP1 は内因性因子としてアミロイド線維形成防御的に働くことが推測された。また、とくに AA アミロイド症については、ミスフォールディングの要因と考えられる前駆体蛋白質 SAA の遺伝子多型を決定し、SAA の一次アミノ酸配列の相違の病態への関与を検証したが、関連は見いだせなかった。しかし、ヒトでミスフォールディングのきっかけになると考えられている SAA の C 末端側の切断が日本猫では生じておらず、猫の AA アミロイド症では SAA の C 末端側の切断がアミロイド症の病理発生の本質ではないと考えられた。今回の一連の研究結果から、アミロイド症の病態には、一次アミノ酸配列の多型ではなく、そのフォールディングの過程における ApoE をはじめとするシャペロン蛋白による立体構造の変化と安定化が重要であることが示唆された (Fig. 4-1)。

アミロイドには、動物種や前駆体蛋白質の特性を超えた共通の性質が存在し、その多くは難治性疾患の原因となりうる。本研究の一連の結果は動物のみならず、ヒトのアミロイド症の病態解明および治療法の開発の一助となると考えられる。

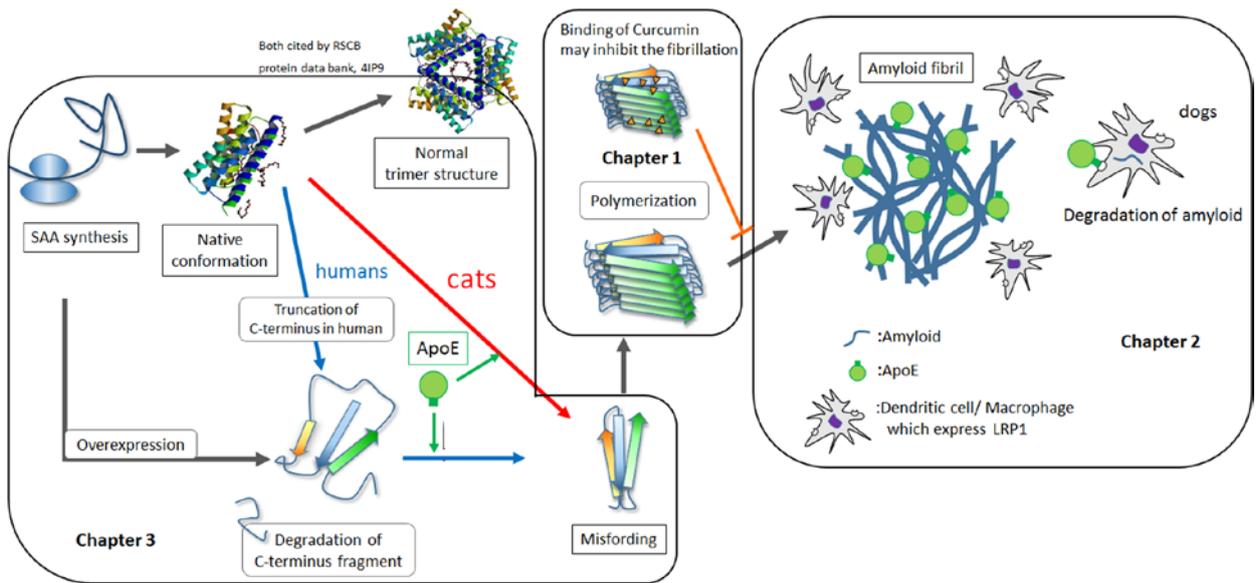


Figure 4-1: Schema of the study. Pathological cascade of AA amyloidosis. In cat, truncation of C-terminus of the SAA protein does not occur.

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導・御鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室の中山裕之教授、病理組織学の基礎から厳しく、ときにユーモアを交えて丁寧に御指導・御鞭撻を頂き、その楽しさを教えてくださいくださった同研究室の内田和幸准教授、また、研究を遂行するにあたり要所々々で有益な御助言を賜りましたジェームズ・チェンバーズ助教に敬意を表するとともに深く感謝いたします。また、同期として、かつ教員として御指導を頂き、支えてくださった東京大学附属動物医療センター病理診断部の坪井誠也特任助教、滞りなく研究を遂行できるよう常に環境を整えてくださった土居千代さんに感謝いたします。

合成組換えネコ SAA 蛋白を快く提供してくださった東京大学農学生命科学研究科獣医内科学研究室の大野耕一准教授、玉本隆司博士、遺伝子解析に関して一から御指導を賜りました東京大学農学生命科学研究科獣医臨床病理学研究室の前田真吾特任助教に深謝いたします。

また、研究活動のみならず、日々の学生生活を共に楽しみ、あらゆる場面で支えてくださった、同期の小澤真希子さん、Thongtharb Atigan さんをはじめ、獣医病理学研究室の皆様にご厚くお礼申し上げます。

最後に、博士課程に進学する機会を与え、温かく見守ってくれた両親、家族に深く感謝いたします。

引用文献

1. Aguilera, J. J., Zhang, F., Beaudet, J. M., Linhardt, R. J. and Colon, W. 2014. Divergent effect of glycosaminoglycans on the in vitro aggregation of serum amyloid A. *Biochimie*. **104**: 70-80.
2. Ajiro, J., Narita, I., Sato, F., Saga, D., Hasegawa, H., Kuroda, T., Nakano, M. and Gejyo, F. 2006. SAA1 gene polymorphisms and the risk of AA amyloidosis in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. **16**: 294-9.
3. Baba, S., Masago, S. A., Takahashi, T., Kasama, T., Sugimura, H., Tsugane, S., Tsutsui, Y. and Shirasawa, H. 1995. A novel allelic variant of serum amyloid A, SAA1 gamma: genomic evidence, evolution, frequency, and implication as a risk factor for reactive systemic AA-amyloidosis. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 1083-7.
4. Bailey, J. M. 1995. Chemical methods of protein sequence analysis. *J. Chromatogr. A*. **705**: 47-65.
5. Benavides, J., Garcia-Pariente, C., Garrido, J. M., Sevilla, I. A., Garcia-Marin, J. F., Perez, V. and Ferreras, M. C. 2013. Coexistence of granulomatous enteric inflammation and neoplasia in an adult sheep. *Vet. Pathol.* **50**: 1158-62.
6. Benson, M. D. and Cohen, A. S. 1979. Serum amyloid A protein in amyloidosis, rheumatic, and neoplastic diseases. *Arthritis Rheum.* **22**: 36-42.
7. Benson, M. D., DiBartola, S. P. and Dwulet, F. E. 1989. A unique insertion in the primary structure of bovine amyloid AA protein. *J. Lab. Clin. Med.* **113**: 67-72.
8. Boyce, J. T., DiBartola, S. P., Chew, D. J. and Gasper, P. W. 1984. Familial renal amyloidosis in Abyssinian cats. *Vet. Pathol.* **21**: 33-8.

9. Bu, G. 2009. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**: 333-44.
10. Cappelletti, M., Presicce, P., Calcaterra, F., Mavilio, D. and Della Bella, S. 2015. Bright expression of CD91 identifies highly activated human dendritic cells that can be expanded by defensins. *Immunology.* **144**: 661-7.
11. Chaudhury, S., Ghosh, I., Saha, G. and Dasgupta, S. 2015. EGCG prevents tryptophan oxidation of cataractous ocular lens human gamma-crystallin in presence of H₂O₂. *Int. J. Biol. Macromol.* **77**: 287-92.
12. Clement, C. G. and Truong, L. D. 2014. An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. *Hum. Pathol.* **45**: 1766-72.
13. Cui, Z. J., Han, Z. Q. and Li, Z. Y. 2012. Modulating protein activity and cellular function by methionine residue oxidation. *Amino Acids.* **43**: 505-17.
14. DiBartola, S. P., Benson, M. D., Dwulet, F. E. and Cornacoff, J. B. 1985. Isolation and characterization of amyloid protein AA in the Abyssinian cat. *Lab. Invest.* **52**: 485-9.
15. Farrell, H. M., Jr., Cooke, P. H., Wickham, E. D., Piotrowski, E. G. and Hoagland, P. D. 2003. Environmental influences on bovine kappa-casein: reduction and conversion to fibrillar (amyloid) structures. *J. Protein Chem.* **22**: 259-73.
16. Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N. and van Duijn, C. M. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* **278**: 1349-56.

17. Ferreira, N., Saraiva, M. J. and Almeida, M. R. 2011. Natural polyphenols inhibit different steps of the process of transthyretin (TTR) amyloid fibril formation. *FEBS Lett.* **585**: 2424-30.
18. Gazit, E. 2002. A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J.* **16**: 77-83.
19. Giger, M., Baumgartner, H. R. and Zbinden, G. 1974. Toxicological effects of Evans blue and Congo red on blood platelets. *Agents Actions.* **4**: 173-80.
20. Gillmore, J. D., Lovat, L. B., Persey, M. R., Pepys, M. B. and Hawkins, P. N. 2001. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet.* **358**: 24-9.
21. Golombick, T., Diamond, T. H., Manoharan, A. and Ramakrishna, R. 2015. Stabilisation of Laryngeal AL Amyloidosis with Long Term Curcumin Therapy. *Case reports in hematology.* **2015**: 910528.
22. Gruys, E. 2004. Protein folding pathology in domestic animals. *Journal of Zhejiang University. Science.* **5**: 1226-38.
23. He, Y., Yue, Y., Zheng, X., Zhang, K., Chen, S. and Du, Z. 2015. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Molecules.* **20**: 9183-213.
24. Hoenig, M., Hall, G., Ferguson, D., Jordan, K., Henson, M., Johnson, K. and O'Brien, T. 2000. A feline model of experimentally induced islet amyloidosis. *Am. J. Pathol.* **157**: 2143-50.
25. Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J. C., Carrasquillo, M. M., Abraham, R., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvina, V., Dowzell, K., Jones, N., Stretton, A., Thomas, C., Richards, A., Ivanov, D., Widdowson, C., Chapman, J.,

Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Brayne, C., Rubinsztein, D. C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Brown, K. S., Passmore, P. A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Holmes, C., Mann, D., Smith, A. D., Beaumont, H., Warden, D., Wilcock, G., Love, S., Kehoe, P. G., Hooper, N. M., Vardy, E. R., Hardy, J., Mead, S., Fox, N. C., Riosor, M., Collinge, J., Maier, W., Jessen, F., Ruther, E., Schurmann, B., Heun, R., Kolsch, H., van den Bussche, H., Heuser, I., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frolich, L., Hampel, H., Gallacher, J., Hull, M., Rujescu, D., Giegling, I., Goate, A. M., Kauwe, J. S., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J. C., Mayo, K., Sleegers, K., Bettens, K., Engelborghs, S., De Deyn, P. P., Van Broeckhoven, C., Livingston, G., Bass, N. J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Al-Chalabi, A., Shaw, C. E., Tsolaki, M., Singleton, A. B., Guerreiro, R., Muhleisen, T. W., Nothen, M. M., Moebus, S., Jockel, K. H., Klopp, N., Wichmann, H. E., Pankratz, V. S., Sando, S. B., Aasly, J. O., Barcikowska, M., Wszolek, Z. K., Dickson, D. W., Graff-Radford, N. R., Petersen, R. C., Alzheimer's Disease Neuroimaging, I., van Duijn, C. M., Breteler, M. M., Ikram, M. A., DeStefano, A. L., Fitzpatrick, A. L., Lopez, O., Launer, L. J., Seshadri, S., consortium, C., Berr, C., Champion, D., Epelbaum, J., Dartigues, J. F., Tzourio, C., Alperovitch, A., Lathrop, M., consortium, E., Feulner, T. M., Friedrich, P., Riehle, C., Krawczak, M., Schreiber, S., Mayhaus, M., Nicolhaus, S., Wagenpfeil, S., Steinberg, S., Stefansson, H., Stefansson, K., Snaedal, J., Bjornsson, S., Jonsson, P. V., Chouraki, V., Genier-Boley, B., Hiltunen, M., Soininen, H., Combarros, O., Zelenika, D., Delepine, M., Bullido, M. J., Pasquier, F., Mateo, I., Frank-Garcia, A., Porcellini, E., Hanon, O., Coto, E., Alvarez, V., Bosco, P., Siciliano, G., Mancuso, M., Panza, F., Solfrizzi, V., Nacmias, B., Sorbi, S., Bossu, P., Piccardi, P., Arosio, B.,

- Annoni, G., Seripa, D., Pilotto, A., Scarpini, E., Galimberti, D., Brice, A., Hannequin, D., Licastro, F., Jones, L., Holmans, P. A., Jonsson, T., Riemenschneider, M., Morgan, K., Younkin, S. G., Owen, M. J., O'Donovan, M., Amouyel, P. and Williams, J. 2011. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **43**: 429-35.
26. Holtzman, D. M., Bales, K. R., Tenkova, T., Fagan, A. M., Parsadanian, M., Sartorius, L. J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D. and Paul, S. M. 2000. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 2892-7.
27. Holtzman, D. M., Bales, K. R., Wu, S., Bhat, P., Parsadanian, M., Fagan, A. M., Chang, L. K., Sun, Y. and Paul, S. M. 1999. Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* **103**: R15-R21.
28. Hou, L., Kang, I., Marchant, R. E. and Zagorski, M. G. 2002. Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid abeta-(1-42) peptide of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **277**: 40173-6.
29. Jagannathan, R., Abraham, P. M. and Poddar, P. 2012. Temperature-dependent spectroscopic evidences of curcumin in aqueous medium: a mechanistic study of its solubility and stability. *J. Phys. Chem. B.* **116**: 14533-40.
30. Ji, Z. S., Miranda, R. D., Newhouse, Y. M., Weisgraber, K. H., Huang, Y. and Mahley, R. W. 2002. Apolipoprotein E4 potentiates amyloid beta peptide-induced lysosomal leakage and apoptosis in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 21821-8.
31. Johnson, K. H., Sletten, K., Werdin, R. E., Westermarck, G. T., O'Brien, T. D. and

- Westermarck, P. 1989. Amino acid sequence variations in protein AA of cats with high and low incidences of AA amyloidosis. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **94**: 765-8.
32. Johnson, K. H., Westermarck, P., Sletten, K. and Obien, T. D. 1996. Amyloid proteins and amyloidosis in domestic animals. *Amyloid.* **3**: 19.
33. Kindy, M. S., King, A. R., Perry, G., de Beer, M. C. and de Beer, F. C. 1995. Association of apolipoprotein E with murine amyloid A protein amyloid. *Lab. Invest.* **73**: 469-75.
34. Kisilevsky, R., Narindrasorasak, S., Tape, C., Tan, R. and Boudreau, L. 1994. During AA amyloidogenesis is proteolytic attack on serum amyloid A a pre- or post-fibrillogenic event? *Amyloid.* **1**: 174-183.
35. Klunk, W. E., Pettegrew, J. W. and Abraham, D. J. 1989. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J. Histochem. Cytochem.* **37**: 1273-81
36. Kluve-Beckerman, B., Dwulet, F. E., DiBartola, S. P. and Benson, M. D. 1989. Primary structures of dog and cat amyloid A proteins: comparison to human AA. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **94**: 175-83.
37. Kocaadam, B. and Sanlier, N. 2015. Curcumin, an Active Component of Turmeric (*Curcuma longa*), and Its Effects on Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*: 0.
38. Kuroda, T., Tanabe, N., Kobayashi, D., Sato, H., Wada, Y., Murakami, S., Saeki, T., Nakano, M. and Narita, I. 2012. Treatment with biologic agents improves the prognosis of patients with rheumatoid arthritis and amyloidosis. *J. Rheumatol.* **39**: 1348-54.
39. Lachmann, H. J., Goodman, H. J., Gilbertson, J. A., Gallimore, J. R., Sabin, C. A.,

- Gillmore, J. D. and Hawkins, P. N. 2007. Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **356**: 2361-71.
40. Lazar, A. N., Mourtas, S., Youssef, I., Parizot, C., Dauphin, A., Delatour, B., Antimisiaris, S. G. and Duyckaerts, C. 2013. Curcumin-conjugated nanoliposomes with high affinity for Abeta deposits: possible applications to Alzheimer disease. *Nanomedicine.* **9**: 712-21.
41. Liepnieks, J. J., Kluge-Beckerman, B. and Benson, M. D. 1995. Characterization of amyloid A protein in human secondary amyloidosis: the predominant deposition of serum amyloid A1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1270**: 81-6.
42. Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E. and Strickland, D. K. 2008. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol. Rev.* **88**: 887-918.
43. Liu, Y., Cui, D., Hoshii, Y., Kawano, H., Une, Y., Gondo, T. and Ishihara, T. 2007. Induction of murine AA amyloidosis by various homogeneous amyloid fibrils and amyloid-like synthetic peptides. *Scand. J. Immunol.* **66**: 495-500.
44. Lu, J., Yu, Y., Zhu, I., Cheng, Y. and Sun, P. D. 2014. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 5189-94.
45. Lutz, T. A., Ainscow, J. and Rand, J. S. 1994. Frequency of pancreatic amyloid deposition in cats from south-eastern Queensland. *Aust. Vet. J.* **71**: 254-6.
46. Lutz, T. A. and Rand, J. S. 1993. A review of new developments in type 2 diabetes in human beings and cats. *Br. Vet. J.* **149**: 527-36.
47. Migita, K., Eguchi, K., Tsukada, T., Kawabe, Y., Takashima, H., Mine, M., Aoyagi, T.,

- Ichinose, Y. and Nagataki, S. 1996. Increased circulating serum amyloid A protein derivatives in rheumatoid arthritis patients with secondary amyloidosis. *Lab. Invest.* **75**: 371-5.
48. Mori, M., Tian, G., Ishikawa, A. and Higuchi, K. 2014. Diversity and complexity of the mouse Saa1 and Saa2 genes. *Exp. Anim.* **63**: 99-106.
49. Moriguchi, M., Terai, C., Koseki, Y., Uesato, M., Nakajima, A., Inada, S., Nishinarita, M., Uchida, S., Nakajima, A., Kim, S. Y., Chen, C. L. and Kamatani, N. 1999. Influence of genotypes at SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of secondary AA-amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis. *Hum. Genet.* **105**: 360-6.
50. Mutsuga, M., Chambers, J. K., Uchida, K., Tei, M., Makibuchi, T., Mizorogi, T., Takashima, A. and Nakayama, H. 2012. Binding of curcumin to senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in the aged brain of various animals and to neurofibrillary tangles in Alzheimer's brain. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 51-7.
51. Nakamura, T., Higashi, S., Tomoda, K., Tsukano, M. and Baba, S. 2007. Efficacy of etanercept in patients with AA amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **25**: 518-22.
52. Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E. and Ikeda, K. 1991. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* **541**: 163-6.
53. Ng, T. P., Chiam, P. C., Lee, T., Chua, H. C., Lim, L. and Kua, E. H. 2006. Curry consumption and cognitive function in the elderly. *Am. J. Epidemiol.* **164**: 898-906.

54. Niewold, T. A., van der Linde-Sipman, J. S., Murphy, C., Tooten, P. C. and Gruys, E. 1999. Familial amyloidosis in cats: Siamese and Abyssinian AA proteins differ in primary sequence and pattern of deposition. *Amyloid*. **6**: 205-9.
55. Ogasawara, K., Mashiba, S., Wada, Y., Sahara, M., Uchida, K., Aizawa, T. and Kodama, T. 2004. A serum amyloid A and LDL complex as a new prognostic marker in stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. **174**: 349-56.
56. Olgiati, P., Politis, A. M., Papadimitriou, G. N., De Ronchi, D. and Serretti, A. 2011. Genetics of late-onset Alzheimer's disease: update from the alzgene database and analysis of shared pathways. *Int. J. Alzheimers Dis*. **2011**: 832379.
57. Olsson, M., Meadows, J. R., Truve, K., Rosengren Pielberg, G., Puppo, F., Mauceli, E., Quilez, J., Tonomura, N., Zanna, G., Docampo, M. J., Bassols, A., Avery, A. C., Karlsson, E. K., Thomas, A., Kastner, D. L., Bongcam-Rudloff, E., Webster, M. T., Sanchez, A., Hedhammar, A., Remmers, E. F., Andersson, L., Ferrer, L., Tintle, L. and Lindblad-Toh, K. 2011. A novel unstable duplication upstream of HAS2 predisposes to a breed-defining skin phenotype and a periodic fever syndrome in Chinese Shar-Pei dogs. *PLoS genetics*. **7**: e1001332.
58. Onen, F. 2006. Familial Mediterranean fever. *Rheumatol. Int*. **26**: 489-96.
59. Patke, S., Maheshwari, R., Litt, J., Srinivasan, S., Aguilera, J. J., Colon, W. and Kane, R. S. 2012. Influence of the carboxy terminus of serum amyloid A on protein oligomerization, misfolding, and fibril formation. *Biochemistry*. **51**: 3092-9.
60. Platz, S. J., Breuer, W., Geisel, O., Linke, R. P. and Hermanns, W. 1997. Identification of lambda light chain amyloid in eight canine and two feline extramedullary plasmacytomas. *J. Comp. Pathol*. **116**: 45-54.

61. Puchtler, E., Sweat, F. and Levine, M. 1962. On the binding of Congo red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.* **10**: 9.
62. Real de Asua, D., Costa, R., Contreras, M. M., Gutierrez, A., Filigghedu, M. T. and Armas, M. 2013. Clinical characteristics of the patients with systemic amyloidosis in 2000-2010. *Rev Clin Esp (Barc).* **213**: 186-93.
63. Reinke, A. A. and Gestwicki, J. E. 2011. Insight into amyloid structure using chemical probes. *Chem. Biol. Drug Des.* **77**: 399-411.
64. Ringman, J. M., Frautschy, S. A., Cole, G. M., Masterman, D. L. and Cummings, J. L. 2005. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research.* **2**: 131-6.
65. Rocken, C., Menard, R., Buhling, F., Vockler, S., Raynes, J., Stix, B., Kruger, S., Roessner, A. and Kahne, T. 2005. Proteolysis of serum amyloid A and AA amyloid proteins by cysteine proteases: cathepsin B generates AA amyloid proteins and cathepsin L may prevent their formation. *Ann. Rheum. Dis.* **64**: 808-15.
66. Said, S. M., Reynolds, C., Jimenez, R. E., Chen, B., Vrana, J. A., Theis, J. D., Dogan, A. and Shah, S. S. 2013. Amyloidosis of the breast: predominantly AL type and over half have concurrent breast hematologic disorders. *Mod. Pathol.* **26**: 232-8.
67. Sasatomi, Y., Sato, H., Chiba, Y., Abe, Y., Takeda, S., Ogahara, S., Murata, T., Kaneoka, H., Takebayashi, S., Iwasaki, H. and Saito, T. 2007. Prognostic factors for renal amyloidosis: a clinicopathological study using cluster analysis. *Intern. Med.* **46**: 213-9.
68. Sattianayagam, P. T., Gillmore, J. D., Pinney, J. H., Gibbs, S. D., Wechalekar, A. D., Gilbertson, J. A., Rowczenio, D., Hawkins, P. N. and Lachmann, H. J. 2013.

- Inflammatory bowel disease and systemic AA amyloidosis. *Dig. Dis. Sci.* **58**: 1689-97.
69. Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Rosi, B. L., Gusella, J. F., Crapper-MacLachlan, D. R., Alberts, M. J. and et al. 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. **43**: 1467-72.
70. Schulze, C., Brugmann, M., Boer, M., Brandt, H. P., Pohlenz, J. and Linke, R. P. 1998. Generalized AA-amyloidosis in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*) with predominant renal medullary amyloid deposition. *Vet. Pathol.* **35**: 70-4.
71. Segales, J., Vicente, J., Lujan, L., Toussaint, M. J., Gruys, E. and Gortazar, C. 2005. Systemic AA-amyloidosis in a European wild boar (*Sus scrofa*) suffering from generalized tuberculosis. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **52**: 135-7.
72. Sellar, G. C., DeBeer, M. C., Lelias, J. M., Snyder, P. W., Glickman, L. T., Felsburg, P. J. and Whitehead, A. S. 1991. Dog serum amyloid A protein. Identification of multiple isoforms defined by cDNA and protein analyses. *J. Biol. Chem.* **266**: 3505-10.
73. Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M. J. and Westermark, P. 2014. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid*. **21**: 221-4.
74. Soler, L., Luyten, T., Stinckens, A., Buys, N., Ceron, J. J. and Niewold, T. A. 2011. Serum amyloid A3 (SAA3), not SAA1 appears to be the major acute phase SAA isoform in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **141**: 109-15.
75. Srivastava, A., Arya, P., Goel, S., Kundu, B., Mishra, P. and Fnu, A. 2015. Gelsolin Amyloidogenesis Is Effectively Modulated by Curcumin and Emetine Conjugated

- PLGA Nanoparticles. *PLoS One*. **10**: e0127011.
76. Steentjes, A., Veldman, K. T., Mevius, D. J. and Landman, W. J. 2002. Molecular epidemiology of unilateral amyloid arthropathy in broiler breeders associated with *Enterococcus faecalis*. *Avian Pathol.* **31**: 31-9.
77. Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D. and Roses, A. D. 1993. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 8098-102.
78. Takeuchi, Y., Uetsuka, K., Murayama, M., Kikuta, F., Takashima, A., Doi, K. and Nakayama, H. 2008. Complementary distributions of amyloid-beta and neprilysin in the brains of dogs and cats. *Vet. Pathol.* **45**: 455-66.
79. Tamamoto, T., Ohno, K., Ohmi, A., Goto-Koshino, Y. and Tsujimoto, H. 2008. Verification of measurement of the feline serum amyloid A (SAA) concentration by human SAA turbidimetric immunoassay and its clinical application. *J. Vet. Med. Sci.* **70**: 1247-52.
80. Tanaka, S., Dan, C., Kawano, H., Omoto, M. and Ishihara, T. 2008. Pathological study on amyloidosis in *Cygnus olor* (mute swan) and other waterfowl. *Med. Mol. Morphol.* **41**: 99-108.
81. Taniyama, H., Kitamura, A., Kagawa, Y., Hirayama, K., Yoshino, T. and Kamiya, S. 2000. Localized amyloidosis in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* **37**: 104-7.
82. Tei, M., Uchida, K., Chambers, J. K., Harada, H., Takahashi, M., Nishimura, R., Watanabe, M. and Nakayama, H. 2012. Mammary lipid-rich carcinoma with

- extensive amyloid deposition in a dog. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 809-11.
83. Togashi, S., Lim, S. K., Kawano, H., Ito, S., Ishihara, T., Okada, Y., Nakano, S., Kinoshita, T., Horie, K., Episkopou, V., Gottesman, M. E., Costantini, F., Shimada, K. and Maeda, S. 1997. Serum amyloid P component enhances induction of murine amyloidosis. *Lab. Invest.* **77**: 525-31.
84. Uchida, K., Kuroki, K., Yoshino, T., Yamaguchi, R. and Tateyama, S. 1997. Immunohistochemical study of constituents other than beta-protein in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* **93**: 277-84.
85. Ueno, T., Takeda, K. and Nagata, M. 2012. Remission of proteinuria and preservation of renal function in patients with renal AA amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**: 633-9.
86. van der Linde-Sipman, J. S., Niewold, T. A., Tooten, P. C., de Neijts-Backer, M. and Gruys, E. 1997. Generalized AA-amyloidosis in Siamese and Oriental cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **56**: 1-10.
87. van Rossum, M., van Asten, F. J., Rofina, J., Lenstra, J. A., Benson, M. D. and Gruys, E. 2004. Analysis of cDNA sequences of feline SAAs. *Amyloid.* **11**: 38-43.
88. Verghese, P. B., Castellano, J. M., Garai, K., Wang, Y., Jiang, H., Shah, A., Bu, G., Frieden, C. and Holtzman, D. M. 2013. ApoE influences amyloid-beta (Abeta) clearance despite minimal apoE/Abeta association in physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: E1807-16.
89. Wang, P., Su, C., Li, R., Wang, H., Ren, Y., Sun, H., Yang, J., Sun, J., Shi, J., Tian, J. and Jiang, S. 2014. Mechanisms and effects of curcumin on spatial learning and memory improvement in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *J. Neurosci. Res.* **92**: 218-31.

90. Westermark, G. T., Engstrom, U. and Westermark, P. 1992. The N-terminal segment of protein AA determines its fibrillogenic property. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 27-33.
91. Westermark, P. and Nilsson, G. T. 1984. Demonstration of amyloid protein AA in old museum specimens. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **108**: 217-9.
92. Wongcharoen, W. and Phrommintikul, A. 2009. The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. *Int. J. Cardiol.* **133**: 145-51.
93. Wu, C., Wang, Z., Lei, H., Zhang, W. and Duan, Y. 2007. Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 1225-32.
94. Yamada, M., Kotani, Y., Nakamura, K., Kobayashi, Y., Horiuchi, N., Doi, T., Suzuki, S., Sato, N., Kanno, T. and Matsui, T. 2006. Immunohistochemical distribution of amyloid deposits in 25 cows diagnosed with systemic AA amyloidosis. *J. Vet. Med. Sci.* **68**: 725-9.
95. Yamada, T., Liepnieks, J. J., Kluge-Beckerman, B. and Benson, M. D. 1995. Cathepsin B generates the most common form of amyloid A (76 residues) as a degradation product from serum amyloid A. *Scand. J. Immunol.* **41**: 94-7.
96. Yamada, T., Okuda, Y., Takasugi, K., Itoh, K. and Igari, J. 2001. Relative serum amyloid A (SAA) values: the influence of SAA1 genotypes and corticosteroid treatment in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **60**: 124-7.
97. Yang, F., Lim, G. P., Begum, A. N., Ubeda, O. J., Simmons, M. R., Ambegaokar, S. S., Chen, P. P., Kaye, R., Glabe, C. G., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. 2005. Curcumin

inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**: 5892-901.