

論文の内容の要旨

獣医学 専攻
平成 24 年度博士課程 入学
氏 名 鄭 明奈
指導教員名 中山 裕之

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

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。ヒトでは現在までに 31 種類のアミロイド蛋白質が生化学的に同定されており、またその前駆体蛋白質についても明らかになっている。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）が原因で生じ、コンフォメーション病とも呼ばれる。異なる前駆体蛋白質に由来するにも関わらず、フォールディング過程で起こる様々な生体内の現象により線維化し、組織に沈着する。いずれのアミロイドもヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で薄桃色の均質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示す。また、アミロイドは電子顕微鏡で観察すると幅 7~13 nm の細長い線維として認められる。

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、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。特に猫では全身性のアミロイド A (AA) アミロイド症および限局性の膝島アミロイド (AIAPP) 症の発生が多く、犬では全身性 AA アミロイド症、限局性免疫グロブリン軽鎖 (AL) アミロイド症および少数ながら限局性の乳腺アミロイド (Acas) 沈着が報告されている。アミロイド蛋白質の最大の特徴は、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。また、犬と猫においてもヒトのアミロイド症のカウンターパートとなるアミロイド症が発生することから、これらの動物のアミロイド症の病理発生を検索することにより、ヒトのアミロイド症の病態解明に寄与できると考えられる。

本研究の第1章では、すでにアミロイド β ($A\beta$) の線維伸長を抑制すること、およびその経口摂取頻度と認知機能レベルに正の相関があることが報告されているクルクミンについて、 $A\beta$ 以外のアミロイドとの結合性を検証し、アミロイド線維形成阻害の可能性を検討した。また、各種アミロイドを酸化還元処理したのちのコンゴレッドとクルクミンのアミロイドに対する結合性の相違から、各種アミロイドのアミノ酸組成が立体構造に与える影響について考察し、両色素とアミロイドの結合部位を検討した。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。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るが、古くから食品として用いられており、コンゴレッドと比較して生体に対する毒性が低いことが知られている。犬と猫の AA、AL、犬の Acas、猫の AIAPP が沈着した組織とクルクミン水溶液をそれぞれ反応させた結果、全てのアミロイドとクルクミンが結合した。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施したところ、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。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。以上のことから、コンゴレッドとクルクミンはアミロイドのクロス 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。両色素のアミロイドに対する染色性の相違から、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。

第2章では、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、各種アミロイドの病態に共通して関与することが予想される ApoE、および ApoE 受容体である LRP1 の局在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、 $A\beta$ 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ると考えられた。ApoE は $A\beta$ のシャペロン蛋白としてその線維化の促進あるいは線維構造の安定化に働くことが報告されており、また、LRP1 はミクログリアにおける $A\beta$ の分解と中枢から末梢への $A\beta$ の排泄に関わると考えられている。以上のことから、中枢神経系以外の組織においてもアミロイドと共沈着する ApoE が、樹状細胞に発現する 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。

第3章では、日本猫の SAA 遺伝子多型に関する検討と沈着 AA の免疫組織化学的検索を行った。AA アミロイド症の病理発生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、慢性炎症による高 SAA 状態が持続しても必ずしも発症するわけではない。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。日本人では3種の SAA1 アレルのうち SAA1.3 を有することが AA アミロイド症のリスク因子であることが明らかとなっており、SAA 遺伝子多型は AA アミロイド症の病態に関与することが知られている。また、猫でもアビシニアン種とシャム種において家族性 AA アミロイド症が知られており、それぞれの種はアミロイド原性の高い SAA 遺伝子型を有すると考えられている。加えて、それらの遺伝子型と組織沈着パターンとが関連するという報告もある。そこで、散発的に AA アミロイド症の発生がみられる日本猫において、AA アミロイド症の4例と対照群5例の SAA 遺伝子を検索し、翻訳した SAA のアミノ酸配列を比較して、遺伝子型とアミロイドの組織沈着パターンとの関連について検討した。その結果、日本猫の SAA 遺伝子には2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。またその多型のうち、45番目がアルギニン、51番目がアラニンの SAA 蛋白質は哺乳類で現在までに報告がなく、新たな配列であった。この新たな遺伝子型は、症例群で4例中1例、対照群で5例中全例で認められたが、アミロイド症の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、遺伝子型と組織沈着パターンとの関連性も見出すことはできなかった。そこで、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) の相違について検索した。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。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。そこで、日本猫の SAA 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種類のウサギ抗血清を用いて、免疫組織化学的に組織に沈着した AA を検索した。その結果、検索した全てのネコ AA が上記3種類の抗血清と反応し、いずれの SAA 部分配列も沈着 AA に含まれることが明らかとなった。このことから、ヒトの症例と異なり猫の AA は、SAA の C 末端を含むことから、猫では SAA の切断は AA 線維形成の必要条件ではないことが示唆された。

本研究では、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。とくに日本猫における AA アミロイド症について、前駆体蛋白質 SAA の一次アミノ酸配列を決定しその病態への関与を検証したが、明確な関連性は見いだせなかった。しかし、ネコ SAA の部分においてヒトでミスフォールディングのきっかけと考えられている C 末端側の切断が、日本猫では生じていない可能性が示された。以上のことから、アミロイド線維形成には第2章で論じた ApoE を含むシャペロン蛋白の関与が重要であると考えられた。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ものである。