

審査の結果の要旨

氏名 鄭明奈

アミロイドとは、正常では可溶性の生理的蛋白質が遺伝子多型による構造異常、過剰産生あるいは異常な分解などにより異常に折りたたまれた（ミスフォールディング）、不溶化性線維状蛋白質の総称である。全身諸臓器の細胞外にアミロイドが沈着して機能障害を引き起こした病的状態をアミロイド症と呼ぶ。各種アミロイドは異なる前駆体蛋白質に由来するにも関わらず、共通の生化学的特徴を有する。すなわち、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（CR）色素により赤桃色に染色される。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。電子顕微鏡観察では幅約 10 nm の細線維として認められる。

動物においても複数のアミロイド症が報告されており、猫ではアミロイド A (AA) アミロイド症および脾臓アミロイド (AIAPP) 症の発生が多く、犬では AA アミロイド症、免疫グロブリン軽鎖 (AL) アミロイド症、老化にともなう脳アミロイド β ($A\beta$) 沈着および乳腺のアミロイド (Acas) 沈着が報告されている。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前駆体蛋白質が、いずれもクロス β シート構造に変化して不溶化し組織に沈着する点にある。また、犬と猫においてもヒト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、動物の各種アミロイド症の病理発生を検索することにより、アミロイド化を規定する因子を同定できると考えた。

第 1 章では、 $A\beta$ の線維化を阻害することが *in vivo* および *in vitro* で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討した。また、酸化還元処理によりアミロイドの立体構造を変化させた場合の結合性の相違から、クルクミンとアミロイドの結合部位を検討した。その結果、クルクミンは犬と猫の AA と AL、犬の Acas および猫の AIAPP と結合した。過マンガン酸カリウムを用いた酸化還元処理を施すと、CR 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。この結合性変化の相違は、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、CR とクルクミンはいずれも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の異なる部位に結合することが示唆された。両色素の染色性の相違から、クルクミンはアミロ

イド線維の伸長方向に結合すると考えられた。

第 2 章では、各種アミロイドの病態に共通して関与すると考えられているアポリポ蛋白 E (ApoE) とその受容体である 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、犬の各種アミロイド沈着組織ではアミロイド周囲のマクロファージ／樹状細胞に LRP1 の陽性像が確認され、 $A\beta$ 沈着脳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が、非沈着対照組織ではいずれも陽性像は観察されなかった。このことから、各種アミロイドと共沈着する ApoE がマクロファージ／樹状細胞に発現する LRP1 と結合し、アミロイドの分解に関与すると推察された。

第 3 章では、動物で発生の多い AA アミロイド症の発症を規定する因子を探ることを目的として、日本猫の *SAA* 遺伝子多型と沈着 AA を構成する *SAA* 分子の部分を検索した。その結果、日本猫では *SAA* 蛋白質の 1、45、51 残基目のアミノ酸に変化をもたらす *SAA* 遺伝子の多型が存在することが明らかとなった。しかし、検索した日本猫の症例と、家族性 AA アミロイド症が報告されているアビシニアンとシャムの症例でアミロイド原性と関連する多型を確認することはできなかった。また、遺伝子型と組織沈着パターンとの関連性も見出せなかった。次いで、ネコ *SAA* の N 末端部、中央部、C 末端部に対する抗血清を作製し、これらを用いて沈着 AA を免疫組織学的に検索したところ、日本猫では全ての *SAA* 部分が沈着 AA に存在していた。このことから、ネコではヒトと異なり、*SAA* の C 末端断片の切断はアミロイド化に必須ではないことが明らかとなった。

本研究の結果から、クルクミンは犬と猫の各種アミロイドと結合すること、ApoE および LRP1 が各種アミロイドの病態に共通して関与することが分かり、アミロイド症に共通する線維形成分子機構の一端が明らかになった。また、猫の AA アミロイド症においては遺伝子多型が発症を一意に規定する因子ではないことが示唆された。また、ヒトではミスフォールディングのきっかけと考えられている *SAA* の C 末端側の切断が、日本猫では生じていない可能性も示された。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。