

Amyloidogenesis in Transgenic Mouse Model of  
Type I Familial Amyloidotic Polyneuropathy

トランスジェニックマウスを用いた

I型家族性アミロイドーシスにおけるアミロイド沈着の解析

高 岡 裕

Amyloidogenesis in Transgenic Mouse Model of  
Type I Familial Amyloidotic Polyneuropathy

トランスジェニックマウスを用いた  
I型家族性アミロイドーシスにおけるアミロイド沈着の解析

高岡 裕

## 目次

序 章	研究の背景	3
第一節	序論	4
第二節	FAP の疾患モデル動物の作出	8
第三節	Met30 TTR の構造解析	10
第四節	本研究の課題	12
第一章	Met30 TTR 遺伝子導入マウスについて	14
第一節	導入遺伝子発現部位とアミロイド沈着について	15
第二節	考察	19
第二章	アミロイド沈着に及ぼす Cys10 側鎖の影響について	21
第一節	トランスジェニックマウス作出	22
第二節	トランスジェニックマウスの選択	29
第三節	組織病理学的解析	34
第四節	考察	41
第三章	研究のまとめ	47
第四章	実験材料および実験方法	49
謝辞		62
引用文献		63
論文目録		81

## 序章

### 研究の背景

## 第一節 序論

家族性アミロイドーシスとは

家族性アミロイドポリニューロパシー (Familial Amyloidotic Polyneuropathy ; FAP) は 1952 年にポルトガルの Andrade により初めて報告された全身性アミロイドーシスの一種であり、細胞外へのアミロイド沈着を特徴とする常染色体優性遺伝病である (1)。

アミロイドとは、電子顕微鏡下で幅 8-12nm、長さ 50-1000nm の一對のねじれた線維の集積を示し、X 線結晶回析像は逆平行  $\beta$  シート構造 (antiparallel  $\beta$ -pleated configuration) を呈するもので、各種溶剤に難溶であり、各種酵素による分解に対し比較的安定な蛋白質である (2)。アミロイド沈着部位は、アルカリコンゴールレッド染色により赤橙色に染色され、アルカリコンゴールレッド染色後偏光下で複屈折し黄緑色の蛍光を呈することにより同定される (3)。これらのアミロイド線維として沈着している蛋白質の前駆体は、疾患毎に特異的である (2)。例えば、免疫グロブリン性アミロイドーシスでは免疫グロブリンの light chain (AL 蛋白) や heavy chain (AH 蛋白)、反応性 AA アミロイドーシスではアミロイド A 蛋白 (SAA)、アルツハイマー病では  $\beta$  蛋白 (APP)、透析アミロイドーシスでは  $\beta_2$  マイクログロブリンが、それぞれアミロイドの前駆体蛋白質である。つまりアミロイドーシスは種々の疾患の総称であり、その共通の特徴はアミロイドの沈着により正常な組織や器官の機能が損なわれることである。

現在、FAP は臨床症状から I 型 (Andrade type)、II 型 (Rukavina type)、III 型 (van Allen type)、IV 型 (Meretoja type) と 4 型に分類されている (4)。そして、免疫化学的、蛋白質化学的解析により I 型と II 型の FAP のアミロイドの主成分はトランスサイレチン (Transthyretin ; TTR) であり (5)、III 型では apolipoprotein AI (6)、IV 型では gelsolin (7, 8) であることが明らかになっている。このうち、日本 (9) をはじめ世界中の殆どの症例が I 型であり、ポルトガル (10)、スウェーデン (11)、合衆国 (12) などにおいても同様である。



## FAP 原因遺伝子の解析

I 型 FAP の分子レベルでの病態解析は、1978 年に Costa らが免疫化学的に FAP のアミロイドが TTR 抗体と交叉するという知見から開始された (5)。TTR は分子量 54,980 Da (13) で、127 アミノ酸残基の分子量 14,980 Da の同一サブユニットの 4 量体からなる血清蛋白質である (14)。血清中において甲状腺ホルモンとレチノール結合蛋白質-ビタミン A 複合体との結合能を有しており、これらを輸送する機能を持つ (15, 16)。TTR の名称は、この生理作用を表したものである。TTR は主として肝臓で発現しており、肝臓以外では脳脈絡叢や網膜において発現していることが明らかになっている (17, 18)。TTR 遺伝子はヒトでは 18 番染色体に (19)、マウスでは 4 番染色体に存在し (20)、ゲノム上で 4 個のエクソンを含む全長 7kb のセグメントを形成している (21, 22)。ヒトとマウスの間の相同性は cDNA レベルで 70 %、アミノ酸レベルでは 80 % であり、異なる生物間においても非常によく保存されている (18, 23, 24)。

1983 年に Saraiva や Tawara らの蛋白化学的分析により、アミロイド沈着を起こしている TTR は N 末端から 30 番目のバリン (Val) がメチオニン (Met) に置換した異型 TTR (hMet30) であることが明らかになった (9, 10)。さらに 1984 年に Sasaki らによる cDNA クローニングの結果、1 アミノ酸置換に一致する塩基置換 (GTG→ATG) の存在が明らかになった (25, 26)。この塩基置換により患者遺伝子ではこの部位が新たに Nsi I と Bcl I による切断部位となり、この性質を利用して発症前や出生前の遺伝子診断をおこなうことが可能になった (25)。これを契機に、TTR 遺伝子の分析が広範囲に行われ、その結果 I 型 FAP 患者は全員が少なくとも 1 つの変異 TTR 遺伝子を持っていることが示され、変異遺伝子の存在が発症の主たる遺伝的要因と結論された。現在までに TTR では 60 種類の変異が確認されており、そのうちアミロイド沈着の原因となる変異は 50 種類 (Table 1) 存在するが、Met30 によるものが症例の大多数を占めている。

当初から、何故 Met30 による変異が高頻度なのか興味が持たれていた。Met30

変異による FAP の症例が多い理由として、CpG 変異ホットスポット説とポルトガル人創始者効果説の 2 説が考えられている。前者は、CpG ジスクレオチドは DNA メチル化酵素のターゲット配列であり、メチル化された 5 メチルシトシン (5mC) は高頻度に T に変換されるとする報告 (74, 75, 76) を基に、Ala 29 Val30 をコードする GCCGTG の逆鎖である CACGGC が高頻度に C→T 変換を起こし、その結果コーディング鎖側の配列も変化し Val→Met 変異を誘発しているとする説、後者はブラジルやスウェーデンの FAP がポルトガルに起源していることが古文獻により知られていることから、16 世紀以降の大航海時代にポルトガルからこの変異遺伝子が世界中に広まったとする通説である。これらの説に関し Yoshioka らは、世界各地の FAP に関するハプロタイプを解析し、世界中の Met30 型の FAP には複数の起源があることを示した (77)。

以上のように、1980 年代中頃に FAP の原因遺伝子が明らかになり、その結果 FAP の DNA 診断法が確立され、FAP の確定診断はもとより出生前診断や発症前診断も可能になった (25)。しかし、その発症に至るメカニズムは依然不明であり、種々の制約を伴う肝臓移植 (78, 79) を除くと適切な治療方法や治療薬がないのが現状である。適切な治療法や治療薬開発のために、FAP アミロイド形成のプロセスを分子レベルで明らかにすることが強く望まれてきた。

そこでこれまでに発症メカニズムの分子レベルでの解明を目指して様々なアプローチがなされてきた。その中で、顕著な研究成果をあげたものとして、Met30 TTR 遺伝子を導入した疾患モデル動物の作出 (80, 81) と Met30 TTR 蛋白質の X 線構造解析 (82) があげられる。

Table 1 Amyloidogenic transthyretin mutations

Amino acid substitution	Predominant Clinical feature	Geographic kindreds	Ref.
Cys10Arg	Neurop	US (PA)	(27)
Leu12Pro	Leptomenin	UK	(28)
Asp18Glu	Neurop	South America	(28)
Asp18Gly	Leptomeningeal	Hungary	(29)
Val20Ile	Neurop-CTS	Germany, US	(30,31)
Pro24Ser	Neurop-CTS	US	(32)
Val30Met	Neurop	Japan, Portugal, Sweden, US	(9,10,11,12)
Val30Ala	Neurop	US	(33)
Val30Leu	Neurop	Japan	(34)
Val30Gly	Leptomeningeal	US	(35)
Phe33Ile	Neurop	Israel	(36)
Phe33Leu	Neurop	US	(37)
Phe33Val	Neurop	UK	(28)
Arg34Thr	Neurop	Italy	(38)
Lys35Asn	Neurop	France	(39)
Ala36Pro	Neurop-CTS	US	(40)
Glu42Gly	Neurop	Japan	(41)
Ala45Thr	Cardio	US	(42)
Ala45Asp	Cardio	US	(43)
Gly47Arg	Neurop	Japan	(44)
Gly47Ala	Neurop	Italy, Germany	(45,46)
Gly47Val	Neurop-CTS	Sri Lanka	(47)
Thr49Ala	Neurop-CTS	France, Italy	(48)
Ser50Arg	Neurop	Japan	(49)
Ser50Ile	Cardio	Japan, French/Italian	(50,51)
Ser52Pro	Neurop	England	(48)
Glu54Gly	Neurop	England	(39,47)
Leu55Pro	Neurop	US, Taiwan	(52)
Leu58His	Neurop-CTS	US	(53)
Leu58Arg	Neurop-CTS	Japan	(54)
Thr59Lys	Cardio	Italy	(55)
Thr60Ala	Cardio	US	(56,57)
Glu61Lys	Neurop	Japan	(58)
Phe64Leu	Neurop-CTS	US, Italy	(38)
Ile68Leu	Cardio	Germany	(59)
Tyr69His	Vitreous	US	(60)
Lys70Asn	Neurop-CTS	US	(61)
Val71Ala	Neurop	France, Spain	(62)
Ser77Tyr	Neurop	US, France	(63)
Ile84Ser	Neurop-CTS	US, Hungary	(64)
Ile84Asn	Vitreous	US	(65)
Glu89Gln	Cardio	Italy	(48)
Ala97Gly	Neurop	Japan	(66)
Ile107Val	Neurop-CTS	US	(67)
Leu111Met	Cardio	Denmark	(68)
Ser112Ile	Neurop	Italy	(69)
Tyr114Cys	Neurop	Japan	(70)
Tyr114His	Neurop-CTS	Japan	(71)
Val122Ile	Cardio	US	(72)
Val122*	Neurop	US (Ecuador)	(73)

Neurop: amyloid neuropathy; Neurop-CTS: amyloid neuropathy with carpal tunnel syndrome; Cardio: amyloid cardiomyopathy; Vitreous: vitreous amyloid; Leptomenin: leptomeningeal; \*, deficient of DNA



## 第二節 FAP の疾患モデル動物の作出

FAP は常染色体優性の遺伝形式をとることから、マウス個体に FAP の病因となるヒト変異 TTR 遺伝子を導入し発現させることで、FAP の疾患モデルマウス作出の可能性が十分あると考えられた。そこで、1987 年に Wakasugi らはヒト Met30 TTR 遺伝子 (hMet30) を Metallothionein I (MT) プロモーターの支配下に置いたトランスジェニックマウスを作出し (81)、これらのマウスにおいて生後 6 月で最初のアミロイド沈着が小腸の血管壁に局限して生じ、12 月齢には心臓、腎臓、小腸、皮膚の血管壁やその周囲の組織にアミロイド沈着を生じることを報告した (83)。しかし、このマウス (MT-hMet30) では MT プロモーターのため、遺伝子発現のパターンがヒト TTR 遺伝子の場合と異なり、肝臓以外にも腎臓や骨格筋、腸管などの広範な組織において導入遺伝子の発現がなされていた (84)。

そこで、Yamamura らはヒト TTR プロモーターを用いることで、導入遺伝子の発現がヒトの場合と同様に肝臓や脳の脈絡叢で行われるトランスジェニックマウスの作出を試みた。このトランスジェニックマウスの作出に用いられた導入遺伝子は、転写開始点の上流 0.6kb までの領域を含む hMet30 遺伝子 (0.6-hMet30) と、上流 6.0kb までを含む hMet30 遺伝子 (6.0-hMet30) である (85, 86)。

作出されたマウスを解析した結果、0.6kb のヒト TTR 遺伝子プロモーターを用いた 0.6-hMet30 マウスの血清 TTR 濃度  $2.1 \pm 1.8$  mg/dl (mean  $\pm$  S.D.) に比べ 6.0kb のプロモーター用いた 6.0-hMet30 マウスの血清 TTR 濃度は  $15.1 \pm 2.8$  mg/dl と高かったことと、マウスのプロモーター領域に存在しているエンハンサー配列に類似した配列がヒト TTR プロモーター上流 4.5kb に報告されている (87) ことから、0.6kb よりも上流のプロモーター領域にエンハンサーが存在することが示唆された。また、これらのマウスの病理学的解析の結果、0.6-hMet30 マウスと 6.0-hMet30 マウスのいずれにおいてもアミロイド沈着が生じることが確認された (85, 86)。すなわち、0.6-hMet30 マウスでは 18 月齢に心臓や小腸に最初の沈着がみられ、6.0-hMet30 マウスでは 0.6-hMet30 マウスよりも 6 ヶ月早く、12 月齢で

心臓、腎臓、小腸、皮膚等の組織に最初の沈着がみられた。しかし、いずれのマウスにおいても末梢神経へのアミロイド沈着はみられず、FAP は発症しなかった (85, 86)。

このように、末梢神経系にはアミロイド沈着を生じなかったことから、0.6-hMet30 マウスと 6.0-hMet30 マウスは厳密な意味ではFAPの疾患モデルとはいえない。しかし、TTR アミロイド沈着を *in vivo* で解析するための有用な系であるということができる。

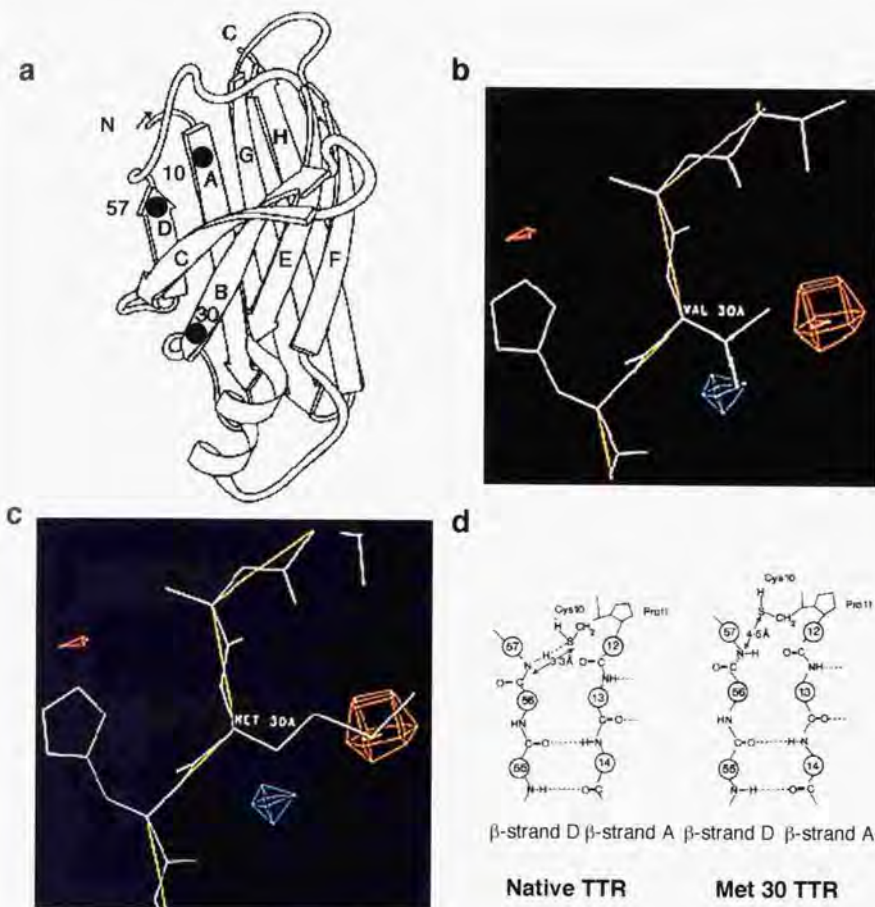
### 第三節 Met30 TTR の構造解析

TTR の N 末端から 30 番目の Val の Met への 1 アミノ酸置換がアミロイド形成に至るかどうかを規定している。実際、正常 TTR と変異 TTR が等量存在しているヘテロ接合体の患者においても、沈着するのは大部分が変異 TTR である (9)。このことから、FAP のアミロイド形成のプロセスを分子レベルで解析する上で、重要なポイントの一つは正常型と変異型 TTR 分子の物理化学的性質の相違である。しかし、大半の FAP 患者は変異 TTR 遺伝子に対してヘテロであり、変異型 TTR のみを患者血液から分離することは困難であった。

このような観点から Sakaki らのグループは、正常 TTR と Met30 TTR を大腸菌を用いて大量に産生させる実験系を開発した (89)。この実験系では、大腸菌のシグナルペプチドに置き換えたヒト TTR cDNA をリボプロテインプロモーター (*lpp*) の支配下で効率良く発現させ、大量の Met30 TTR を入手可能にした。この方法で産生された Met30 TTR の電気的性質は患者 Met30 TTR と同様で、Thyroxine 結合能や Retinol Binding Protein (RBP) 結合能も同様に持ち合わせていた。次に、この産生された Met30 TTR 蛋白質を精製後に結晶化し、Terry らと協力して X 線結晶解析による構造解析を行なった (82)。

その結果、正常 TTR では  $\beta$  鎖 A 上にある 10 番目のシステイン (Cys10) 残基の側鎖 (-SH) が高次構造の内側で  $\beta$  鎖 D 上の 57 番目のグリシン (Gly57) の側鎖との距離が  $3.3 \text{ \AA} \pm 0.2 \text{ \AA}$  で水素結合しているのに対して、hMet30 では Met の側鎖が Val のそれよりも長いために高次構造に変化が生じ、Cys10 側鎖と Gly57 側鎖間の距離が  $4.5 \text{ \AA} \pm 0.4 \text{ \AA}$  へ広がり、蛋白分子内での水素結合が形成不能となることが示唆された (Fig. 1)。

これまでに、FAP のアミロイド蛋白には S-S 結合が存在していることや、TTR には N 末端から 10 番目の Cys 以外には Cys が存在しないことなどとあわせて、Terry らはこのアミロイドーシスでは hMet30 の Cys10 の側鎖がフリーになり、このことがアミロイド蛋白形成の引き金になるとの仮説を提唱した (82)。



**Fig. 1 Schematic drawing of the subunit structure of TTR and the changing in interaction of Cys10 in the hMet30.**

(a) Antiparallel  $\beta$  structure of transthyretin. Eight  $\beta$  strands are arranged in two parallel planes. Closed circle indicates residue 10, 30 and 57.

(b) (c) The main features of the Met30 TTR difference map in the near residue 30.

(d) Schematic drawing of the change in interaction of Cys10 in the Met30 TTR:

**Left**, -SH group of Cys10 interacted with NH group of residue 57 (NH57) by hydrogen bond formation ( $3.3 \text{ \AA} \pm 0.2 \text{ \AA}$ ) in the native TTR;

**Right**, The hydrogen bond breaking between Cys10 and NH57 in the Met30 TTR.

The structural effect of the Met30 substitution causes the hydrogen bond of Cys10 and NH57 to increase to  $4.5 \text{ \AA} \pm 0.4 \text{ \AA}$ .



#### 第四節 本研究の課題

これまでに述べた知見をもとに、本研究はフリーになった反応性の Cys10 のアミロイド形成における役割を、トランスジェニックマウスの手法による *in vivo* のアミロイド沈着系によって検討したものである。

前述したように、すでに Met30 変異を持った TTR 遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスが山村らにより作出されており、変異 TTR のアミロイド沈着が確認されている。

そこで、これまでに沈着の生じたマウスに関してその特質を精査し、目的のトランスジェニックマウス作出時の条件設定に関して検討を加えた（第一章）。

次に、Cys10 のアミロイド形成への関与を検討するために、10 番目のアミノ酸を Cys と分子構造が類似しているセリン (Ser) (Fig.2) になるように人工変異を加えた Met30 TTR 遺伝子を作成した。この遺伝子と、正常ヒト TTR 遺伝子及びアミロイド原性を持つ Met30 TTR 遺伝子をそれぞれ導入したトランスジェニックマウスを作出し、これら 3 系統間のアミロイド沈着を比較することで、アミロイド沈着形成における Cys10 側鎖の役割について検討をおこなった（第二章）。

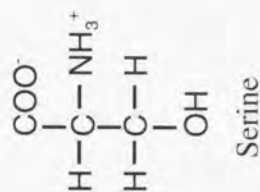
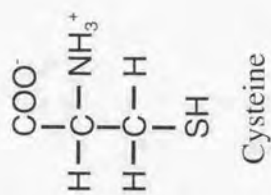


Fig. 2 Schematic drawing of the structure of Cysteine and Serine.

## 第一章

### ヒト Met30 TTR 遺伝子導入マウスについて

## 第一節 導入遺伝子発現部位とアミロイド沈着について

本研究第二章において用いるためのトランスジェニックマウスを新たに作出する時の条件設定について検討することを目的に、これまでにアミロイド沈着を生じた実績があり、TTR プロモーター領域0.6kbを持つ0.6-hMet30マウス(85)と、TTR プロモーター領域約6kbを持つ6.0-hMet30マウス(86)の2種類のトランスジェニックマウスの導入遺伝子発現部位、アミロイドの沈着部位、沈着時期、沈着の程度に関して検討した。

まず、導入遺伝子発現部位について検討した。既に報告(85, 86)されているように、0.6-hMet30マウスと6.0-hMet30マウスのいずれにおいても、肝臓における導入遺伝子発現がなされていた。しかし免疫組織化学法による追試の結果、脳脈絡叢における導入hMet30遺伝子発現は0.6-hMet30マウスにはみられなかったが、6.0-hMet30マウスでは脳脈絡叢において遺伝子発現が行われていることが示された(Fig. 3)。すなわち、抗ヒトTTR抗体を用いた免疫組織化学染色により、脳脈絡叢において非トランスジェニックマウス(Fig. 3A)や0.6-hMet30マウス(Fig. 3B)では抗ヒトTTR抗体に反応しなかったが、6.0-hMet30マウスでは反応がみられた(Fig. 3C)。このことから、上流域6kb程度を含むヒトTTRプロモーター領域を導入遺伝子に使用することで、ヒトの場合と同様に肝臓と脳脈絡叢における遺伝子発現を得ることが可能であることが判明した。更に、血清hMet30濃度をあらためて調べたところ、0.6h-Met30マウスが $2.1 \pm 1.8$  mg/dl ( $n=12$ )、6.0-hMet30マウスが $15.1 \pm 2.8$  mg/dl ( $n=13$ )と、約6kbのプロモーターを使用した場合の方が0.6kbの場合と比べて高濃度であった。

次に、15月齢の6.0-hMet30マウスを用いてアミロイド沈着部位とその時期および程度について検討を加えた。トランスジェニックマウスのアミロイド沈着の同定は、ApoAIIのアミロイド沈着を除外する目的で $\text{KMnO}_4$ による前処理の後コンゴアレッド染色を行うWright法(90)による染色の後、偏光下で緑色の複屈折を確認することで行った。



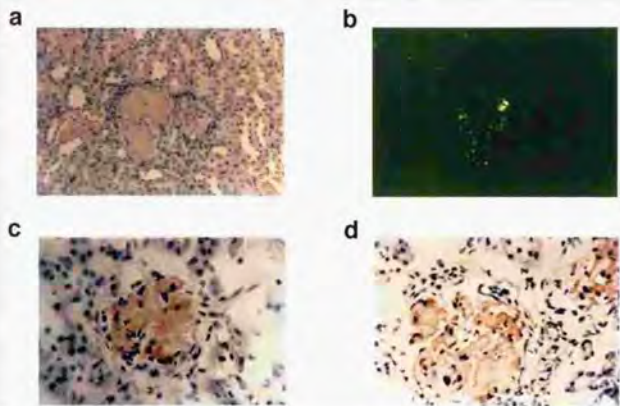
Fig.4 に、腎臓の解析結果を示す。コンゴレッド染色により橙赤色に染色された部位は偏光下で緑色の複屈折を示しており、アミロイド沈着が生じている事が再確認された (Fig. 4a, b)。そして、沈着しているアミロイドが hMet30 由来であるかどうかについて免疫組織化学法により解析した。これまでに、コンゴレッド染色陽性であった全ての組織において、ヒト TTR とのみ反応しマウス TTR とは交叉しない抗ヒト TTR 抗体が反応したことから、沈着アミロイドはヒト Met30 TTR (hMet30) 由来であることが既に示されており (83)、再検討によっても同様の結果が示された (Fig. 4c)。さらに他の蛋白質のアミロイド沈着への関与を検討するために、抗マウス SAP (Serum Amyloid P component) 抗体、抗マウス SAA 抗体による検討がおこなわれているが、抗マウス SAP 抗体のみ反応すると報告されており (83)、これも再検討による結果も同様であった (Fig. 4d)。

以上の結果を、これまでに報告されているデータとともに Table 2 に示す。アミロイド沈着の主要な組織分布は、消化管、腎臓、心臓と甲状腺であり、沈着の程度に性差はみられなかった。また、いずれのマウスにおいても末梢神経への沈着はみられなかった。Table 2 にみられるように、6.0-hMet30 マウスでは 0.6-hMet30 マウスに比べて広範囲なアミロイド沈着がみられ、全ての 21 月齢の 6.0-hMet30 マウスにおいてアミロイド沈着が確認された。しかし 0.6-hMet30 マウスでは、24 月齢においても 3 匹中 1 匹は沈着を生じていなかった。また、6.0-hMet30 マウスでは心臓と血管系には不均一なアミロイド沈着が見られ、心臓では心内膜と心筋表層から心筋深層へと沈着領域が拡大していた。それに対して、0.6-hMet30 マウスでは、心内膜下層にのみ限局して沈着が見られた (Table 2)。このように 0.6-hMet30 マウスに比べて 6.0-hMet30 マウスにおいて沈着が広範囲であったという結果は、血清 hMet30 が 0.6-hMet30 マウスの  $2.1 \pm 1.8$  mg/dl に比べて 6.0-hMet30 マウスでは  $15.1 \pm 2.8$  mg/dl と高濃度であったことに関連すると考えられる。このことから、トランスジェニックマウス作出に際しては、hMet30 が高濃度であった 6.0-hMet30 マウスと同じ TTR のプロモーター領域を用いることが望ましいと結論した。



**Fig. 3 Immunohistochemical staining of human TTR in choroid plexus.**

(a) control mouse (x100); (b) 0.6-hMet30-62 transgenic mouse (x100); (c) 6.0-hMet30-15 transgenic mouse (x100). The epithelial cells of the choroid plexus are immunoreactive only in the 6.0-hMet30 mice.



**Fig. 4 Histochemical and immunohistochemical analysis of the renal glomeruli in 6.0-hMet30 mouse line.**

Congo-red-positive deposits are present in the glomeruli of kidney (a) of 6.0-hMet30 mice at 15 months of age. In the same ones, these sections are seen emitting emerald-green birefringence in polarized light (b). Amyloid deposits in the glomeruli show positive reactions for anti-human TTR antibody (c) and anti-mouse SAP antibody (d) by immunohistochemical analysis.

a, b, x100; c, d, x200

Table 2 Tissue distribution of Amyloid deposits in transgenic mice

Organs		6	9	12	15	18	21	24
		(months)						
0.6-hMet30 mice	Brain	-	-	-	-	-	-	-
	Choroid Plexus	-	-	-	-	-	-	-
	Sciatic Nerve	-	-	-	-	-	-	-
	Heart	-	-	-	-	→+	→+	-
	Lung	-	-	-	-	-	-	-
	Upper alimentary tract	-	-	-	→+	+++	→++	→+
	Lower alimentary tract	-	-	-	-	+++	→+++	→+
	Anal Ring	-	-	-	-	+	→+	-
	Liver	-	-	-	-	-	-	-
	Spleen	-	-	-	-	-	-	-
	Pancreas	-	-	-	-	-	-	-
	Kidney	-	-	-	-	-	→+	-
	Testis	-	-	-	-	-	-	-
	Skin	-	-	-	-	→+	→+	-
	Muscle	-	-	-	-	-	-	-
6.0-hMet30 mice	Brain	-	-	-	-	-	-	-
	Choroid Plexus	-	-	-	-	-	-	-
	Sciatic Nerve	-	-	-	-	-	-	-
	Heart	-	-	→+	→+	-	→+	→+++
	Lung	-	-	-	-	-	-	→+
	Upper alimentary tract	-	→+	→++	→+++	→+	→++	→+
	Lower alimentary tract	-	-	→+++	→+++	→+	→+++	→+++
	Anal Ring	-	-	→+	→+	-	→+	→+++
	Liver	-	-	-	-	-	→+++	→+
	Spleen	-	-	-	-	-	→+	→+++
	Pancreas	-	-	-	-	-	-	-
	Kidney	-	-	→±	→+	-	→+++	→+
	Testis	-	-	-	-	-	→±	→±
	Skin	-	-	→+	→+	-	→+	→+
	Muscle	-	-	-	-	-	-	-

Amyloid deposits are absent, -; limited to the wall of small vessels, ±; observed in the wall of small vessels and their surrounding regions, +; moderate in the interstitium, ++; marked in the interstitium and parenchyma, +++; not tested, NT.

## 第二節 考察

第一章では、第二章の実験系で使用するトランスジェニックマウス作出時の条件設定を検討することを主目的として、これまでにアミロイド沈着を生じた実績のある 6.0-hMet30 マウスと 0.6-hMet30 マウスの 2 種類のトランスジェニックマウスについて検討を加えた。

まず、用いるプロモーターによって導入遺伝子発現分布がどのようになるかについて追試をおこなった。免疫組織化学法により脳における導入遺伝子発現を検討したところ、0.6kb のヒト TTR プロモーターを用いた 0.6-hMet30 マウスでは脳脈絡叢での遺伝子発現が見られず肝臓でのみ導入遺伝子が発現していたのに対して、約 6kb のヒト TTR プロモーターを用いた 6.0-hMet30 マウスでは脳脈絡叢と肝臓のいずれにおいても導入遺伝子発現がみられた (Fig. 3)。この結果は、ヒトの場合と同様に脳脈絡叢と肝臓で導入遺伝子を発現するトランスジェニックマウス作出には、ヒト TTR プロモーター領域約 6kb 支配下で導入遺伝子を発現させる必要があることを示している。

次に、各系統ごとに血清 hMet30 濃度アミロイド沈着の時期と沈着の程度および沈着組織分布について検討した。血清 hMet30 濃度は 0.6h-Met30 マウスが  $2.1 \pm 1.8$  mg/dl であったのに対し、6.0-hMet30 マウスでは  $15.1 \pm 2.8$  mg/dl と 6.0-hMet30 マウスの方が高かった。そして血清 hMet30 濃度の高い 6.0-hMet30 マウスでは 0.6-hMet30 マウスよりも早期に広範囲なアミロイド沈着を生じていた (Table 2)。血清 hMet30 濃度は 0.6h-Met30 マウスの  $2.1 \pm 1.8$  mg/dl に対し、6.0-hMet30 マウスでは  $15.1 \pm 2.8$  mg/dl と高かったことから、hMet30 の血清レベルがアミロイド沈着の程度と関連することが示唆された。

ところで、これまでに確認された 10 人程度の hMet30 遺伝子のホモ接合体例 (91, 92, 93, 94) では、ヘテロ接合体患者の約 2 倍の血清 hMet30 濃度が確認されているにもかかわらず、FAP 発症時期やアミロイド沈着の程度に差は見られていない (95)。また、マウスの実験系においても、マウス TTR 遺伝子を破壊した



マウスを用いてマウス内在性の TTR 遺伝子の影響を排除した Met30-TTR 遺伝子導入マウスとマウス内在性の TTR を有する 6.0-hMet30 マウスにおいて、アミロイド沈着の開始時期と程度に差はみられていない (88)。この結果は、アミロイド沈着は血清 hMet30 のある一定濃度まで比例関係にあるが、それ以上の濃度ではアミロイド沈着は加速されないことを示唆している。

従って、作出するトランスジェニックマウスの血清中の導入遺伝子産物 (hMet30) が高濃度であることがモデル動物としては好ましく、しかも極力血清 TTR 濃度の類似した系統で比較するのが重要であると結論できる。また血清 TTR 濃度は、最低でも 0.6-hMet30 マウスにみられた  $2.1 \pm 1.8$  mg/dl よりも高濃度の系統を選択すべきであると結論した。

前述のように約 6 kb のヒト TTR プロモーターを用いた 6.0-hMet30 マウスでは肝臓と脳脈絡叢のいずれにおいても導入遺伝子発現がみられると共に (Fig. 3)、血清中の hMet30 濃度も 0.6-hMet30 マウスより高かった。従って、血清中のヒト Met30 TTR 濃度が高いトランスジェニックマウス作出には、6.0-hMet30 マウス同様のヒト TTR プロモーター領域支配下で hMet30 遺伝子発現させる導入遺伝子を用いることが必要と結論した。

## 第二章

### アミロイド沈着に及ぼす Cys10 側鎖の影響について

## 第一節 トランスジェニックマウス作出

### 導入遺伝子の構築

第二章では、Met30 TTR の N 末端から 10 番目のシステイン残基 (Cys10) とアミロイド沈着との関連を、トランスジェニックマウスを作出し検討した結果を報告する。すなわち第一章で得た、これまでにアミロイド沈着の実績のある系統のトランスジェニックマウスの結果を参考に新たなトランスジェニックマウスの作出をおこない、Met30 TTR の Cys10 とアミロイド沈着との関連について検討した。

まず、ヒト Met30 TTR (hMet30) のアミロイド原性確認のために hMet30 遺伝子を導入したマウスと正常ヒト TTR (hTTR) 遺伝子を導入したマウスを作出し、アミロイド沈着について検討した。次に、Cys10 のアミロイド沈着への関連を検討するために、Met30 TTR 中の Cys10 を別のアミノ酸に置換した遺伝子を用いたトランスジェニックマウスを作出し実験に供した。その際、アミノ酸置換による TTR 蛋白質の分子構造の変化を最小限にするために、人工変異には Cys と分子構造が類似しているが化学的性質が異なり、側鎖の反応性が低いセリン (Ser) を選択した。Cys と Ser の分子構造の違いはわずかであり、Cys では側鎖が-SH 基であるのに対して Ser では-OH 基である (Fig.2)。

以上をまとめると、導入遺伝子はアミロイド原性のある hMet30 TTR 遺伝子、アミロイド原性の低い正常 hTTR 遺伝子、及び検討対象となる hMet30 TTR 遺伝子の Cys10 を Ser10 へと、人工変異を加えた Ser10Met30 TTR 遺伝子であり、合計 3 種類の cDNA を用いた (Fig. 7)。これら 3 種類の cDNA は、大腸菌において発現させるために作成されたベクター (89) から切り出して使用した。しかし、いずれの cDNA も大腸菌の発現系で用いるために、シグナルペプチド領域が大腸菌の配列に置き換えられていた。そこで、この大腸菌シグナルペプチド配列をヒト TTR のシグナルペプチド配列に組換え後、塩基配列の確認をおこない、ベクターの構築に用いることにした。次に、cDNA 発現ベクターである pLG-1 (96,

97) から *Bam*HI と *Xho*I にてウサギ  $\beta$ -グロブリンのゲノム遺伝子を利用した cDNA 発現領域を切り出した。ウサギ  $\beta$ -グロブリン遺伝子による cDNA 発現配列の利用は、 $\beta$ -グロブリン遺伝子イントロンにはエンハンサー様領域がイントロン B/第3エクソン接合部に存在していること、エクソン・イントロン構造を持つことによるスプライシングの存在が細胞質での mRNA の安定性に寄与すること、などの知見から導入遺伝子中にイントロンを存在させることによって導入遺伝子を効率良く発現させることを目的としている (98, 99)。この cDNA 発現ベクターには、ウサギ  $\beta$ -グロブリン遺伝子の第2エクソン内の *Bam*HI 部位から下流のゲノム遺伝子が含まれている。この第3エクソンの *Eco*RI 部位に TTR cDNA を挿入し、これをヒト TTR プロモーター下流に連結し、プラスミドベクター (pBR 322) にクローニングした。その後、*Kpn*I と *Sac*II にてプラスミド配列を除き、DNA 注入用遺伝子構築を完了した (Fig. 5)。

今回の実験で用いたヒト TTR プロモーター領域は、5'側を *Eco*RI、3'側を *Bam*HI にて切断しアガロースゲル泳動により 6.7 kb のバンド (-7201~-503) と 0.5 kb のバンド (-503~-1) を回収した後に、両者を結合して用いた (Fig. 6)。これらの操作は、Nagata らの報告した 6.0-hMet30 トランスジェニックマウス作成時 (86) と同様に行い、全く同じヒト TTR プロモーター領域のクローンの 5'側を *Eco*RI によって切断して用いた。

TTR 遺伝子のプロモーター領域はヒトでは-24~-30 に TATA ボックス様配列が、-95~-102 に CAAT ボックス様配列が存在し、-50~-190 はヒトとマウスの間で高度に (93%) 保存されている。この領域には、肝細胞での発現の特異性を持つ HNF-1, C/EBP, HNF-3, HNF-4 等の結合領域が存在している。さらにマウスでは-1.85~-1.96 kb 領域に肝細胞特異的エンハンサーが存在しており、類似の配列がヒトの-3.55~-3.66 kb 領域に存在している (87) (Fig. 6)。更に、第一章で示したように約 6.0 kb のプロモーターを用いることで、ヒトと同様に脳脈絡叢と肝臓において導入遺伝子発現が見られた。今回実験に用いた 7.2 kb ヒト TTR プロモーターはこれらの領域を含んでおり、ヒト同様の遺伝子発現が期待される。

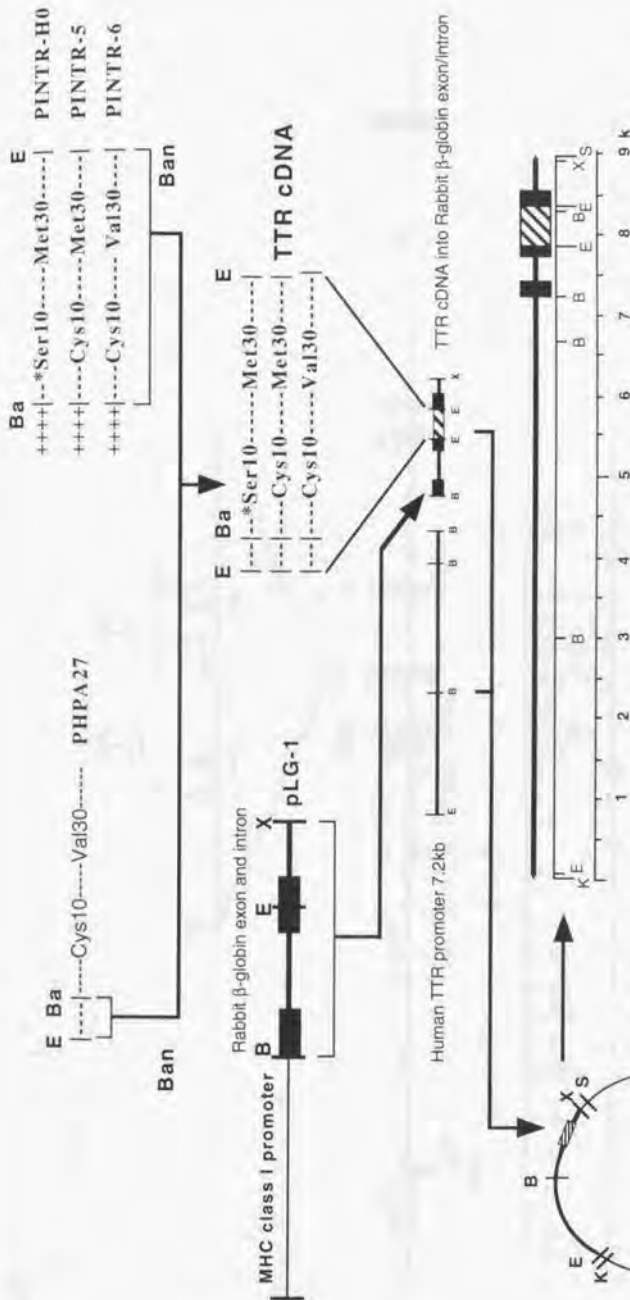


以上のように、導入遺伝子は 7.2kb のヒト TTR プロモーター領域にウサギ  $\beta$ -グロビン 遺伝子を利用した cDNA 発現配列を連結し、前述の 3 種のヒト TTR cDNA を組み込むことにより作成した。

まとめると、マウスに導入するヒト TTR 遺伝子はそれぞれ、

- (1) ヒト異型 TTR である Cys10, Met30 をコードするもの (7.2-hMet30 マウス)、
- (2) ヒト正常 TTR である Cys10, Val30 をコードするもの (7.2-hTTR マウス)
- (3) 10 番目の Cys を分子構造の類似している Ser に置き換えた人工変異導入異型ヒト異型 TTR cDNA である Ser10, Met30 をコードするもの (7.2-hSerMet マウス)、

の、合計 3 種類である。



**Fig. 5. Constructions of the various mutant TTR cDNA transgenes.**

Each transgene contains 7.2kb of the human TTR promoter region and rabbit beta-globin gene with three TTR cDNAs which encode Ser10Met30 as an artificial hTTR without Cys10, Met30 as an amyloidogenic mutant hTTR and normal hTTR, respectively. The striped box indicates TTR cDNA that is inserted into *EcoRI* site of rabbit beta globin gene exon and intron (indicated by closed box) to express the cDNA gene. Then 7.2kb of the human TTR promoter region and TTR cDNA with rabbit beta globin gene were constructed into the pBR vector. After construction, the vector was digested by *Kpn* I and *Sac* II to exclude plasmid sequence as a transgene.

Asterisks show the artificial substitution. The plus line indicates a signal peptide sequence of *E. coli*.

Symbols for restriction endonucleases are as follows: B, *Bam*HI; Ba, *Bam*I; E, *Eco*RI; K, *Kpn*I; S, *Sac* II; X, *Xba*I.

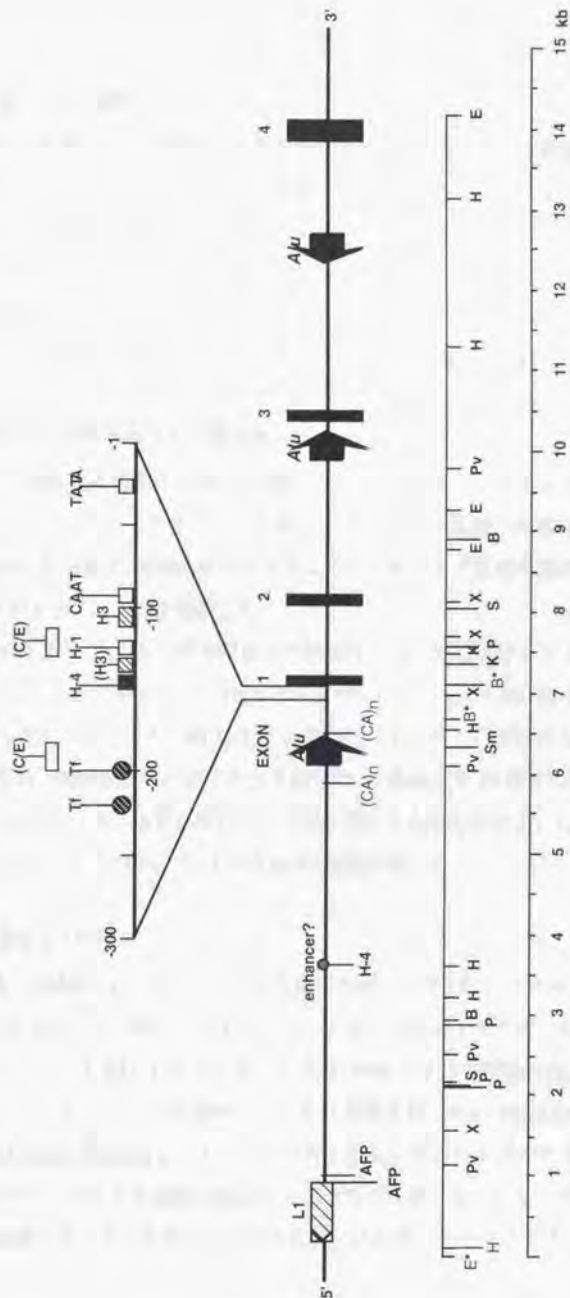


Fig. 6 Schematic presentation of the structure of the human TTR gene.

E\*, B\*, EcoRI and BamHI site for DNA construction; *Alu*, *Alu* repetitive family sequence; L1, L1 repetitive family sequence; TATA, TATA box; CAAT, CAAT box; (CA)<sub>n</sub>, purine-pyrimidine stretches; H1, C/E, H-3, H4, binding site of HNF-1, C/EBP, HNF-3 and HNF-4, respectively; tf, motif of TF-LF-1, TF-LF-2 and LF-A1; enhancer, a region showing high homology to a tissue-specific enhancer of the mouse TTR gene; AFP, AFP-1 site; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; S, *Sal*I; Sm, *Sma*I; X, *Xba*I.

### 注入用 DNA の調製

次に、受精卵に導入遺伝子を導入するために注入用 DNA の調製をおこなった。まず、導入遺伝子はプラスミドに構築後 *KpnI* と *SacII* により切断し、プラスミド配列を除き、0.7% アガロースゲルにて泳動し目的のバンド (8947 bp) を切り出した後、Gene Clean II Kit (Bio101; CA, USA) により精製した (Fig. 5)。プラスミド配列の除去は、導入遺伝子発現の低下を防ぐ目的でおこなった (100)。精製した注入用 DNA は 200 copies/pl 相当の 2.0  $\mu$ g/ml 濃度に調製した。

### 受精卵への遺伝子導入と卵管移植

注入用 DNA を精製した後、受精卵へのマイクロインジェクションをおこなった。トランスジェニックマウス作製にはアミロイド沈着への遺伝的背景の影響を排除する目的で、FAP モデルマウスでのアミロイド沈着の実績のある近交系の、C57BL/6J マウスを選択した。

まず注入用 DNA を、受精卵あたり約 200 コピーの遺伝子をマイクロインジェクションした。1 種類の注入 DNA ベクターについて 200~400 個の受精卵に遺伝子導入をおこない、その後 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晚培養した。遺伝子注入の翌日、偽妊娠させたメスマウス卵管に、1 匹あたり 30 個ずつ胚を移植した。移植 18~19 日後、自然分娩によって仔を得た。出生した仔は、7.2-hMet30 が 36 匹、7.2-hTTR が 32 匹、7.2-hSerMet が 74 匹であった。

### 導入遺伝子の同定

生後 4 週齢に達したマウスを個体識別の後、その尾を 1~1.5 cm 切断しゲノム DNA を抽出した。導入した遺伝子は、サザンハイブリダイゼーションにより検定した。ゲノム遺伝子は *ScaI* または *ScaI*, *MluI* による切断後 (Fig. 7a)、0.7% アガロースゲルを用いた泳動後、アルカリ変性をおこない Hybond N<sup>+</sup>, positively charged nylon membrane にトランスファーした。ブレハイブリダイゼーションの後、<sup>32</sup>P でラベルした標識 DNA でハイブリダイゼーションし、その後フィルターを洗浄した。フィルターのシグナルは、バイオイメージアナライザー Bas 2000



(Fujix; Tokyo, Japan) にて解析した (Fig. 7b)。その結果、それぞれ 14 匹、15 匹、9 匹がヒト TTR 遺伝子を持つトランスジェニックマウスであった。サザンハイブリダイゼーションの結果から推定して、各々 10 から 25 コピー程度の遺伝子導入が確認された (Table 3)。

さらに、個体識別時に耳朶より回収した組織から DNA を抽出し、PCR による導入遺伝子の同定もおこなった (101)。サザンブロット解析の検定結果とマウス耳朶から抽出したゲノム DNA の PCR による検定結果が一致したので、以後のヒト TTR 遺伝子の検定は PCR 法によっておこなった (Fig. 7b, c)。

次に、導入遺伝子が同定されたマウスの眼窩から血液を採取し SDS-PAGE の後、ウエスタンブロット法により血液中の導入遺伝子産物の検定をおこなった (Fig. 8a)。トランスジェニックマウスのうち、ウエスタンブロット法で血液中に導入遺伝子産物を確認したのは、それぞれ 10 匹 (7.2-hMet30)、4 匹 (7.2-hTTR)、6 匹 (7.2-hSerMet) であった。

## 第二節 トランスジェニックマウスの選択

### マウスの SPF 化および飼育条件

トランスジェニックマウスの血液中の導入遺伝子産物をウエスタンブロット法により確認した後、マウス飼育室の全マウスがマウス肝炎ウイルス (Mouse hepatitis virus) によって汚染されていることが判明した。そこで、体外受精により SPF 化 (specific pathogen free: 特定病原体除去) 作業をおこなうことにした。得られたマウスの中から、導入ヒト TTR 蛋白質の血清濃度が高い順に 1 種類の導入遺伝子あたり 2 ないし 3 系統を SPF 化した。体外受精により得られたマウスは 8 ヶ月間隔離し、その間に実験動物中央研究所微生物モニタリングセンター (Kawasaki, Japan) に依頼して 1 ケージ最低 1 匹の血清を検査するとともにマウスを解剖し肝臓の病変の有無について精査した。検査依頼した特定病原体は Sendai virus (HVJ), Mouse hepatitis virus, Ectromelia virus (Mouse pox), Mouse adenovirus, *Mycoplasma pulmonis*, Tyzzer's organism, *Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium kutscheri* である。

その結果、実験動物中央研究所に検査を依頼した体外受精後の全てのマウスが SPF であることが確認された。また、採血時に屠殺したマウスの内臓に肉眼的な異常はみられず、検査した全てのマウスが SPF であることが確認された。山村らは SPF 条件下ではアミロイド沈着を生じないと指摘しているので、順次 conventional な条件下に移し実験に用いた。なお飼育条件を一定にするために、以後の実験に用いたマウスは全て 8 月齢に達するまで SPF 環境下で飼育された後、conventional な条件下に移し飼育された。

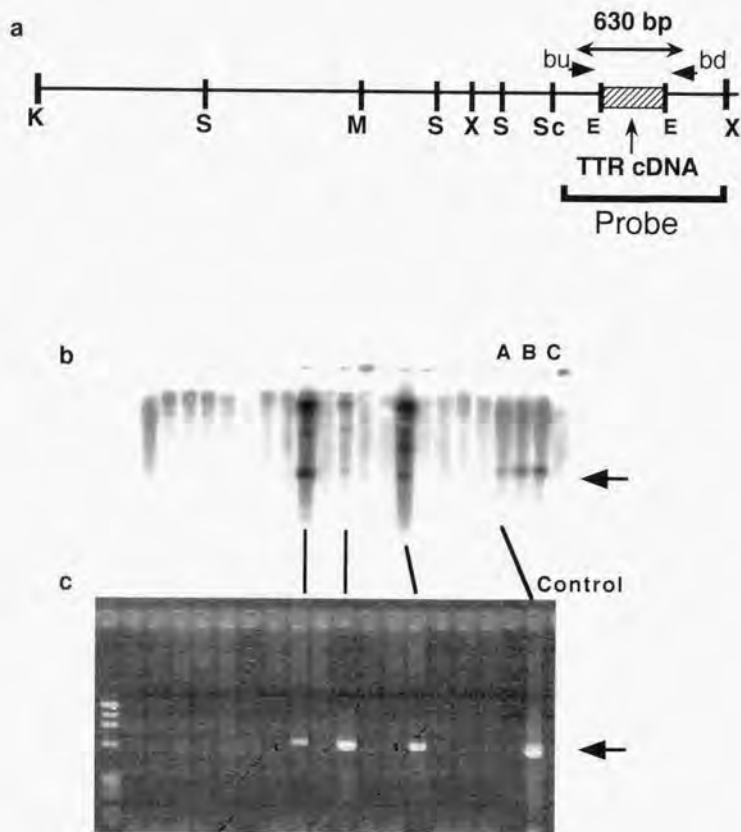
実験には、7.2-hMet30 マウスでは line CM5, CM29, CM34, 7.2-hTTR マウスは line CV5, CV15, 7.2-hSerMet マウスは line SM8, SM25, SM46 の各系統を用いた。

### 血清 hTTR 濃度

次に、実験に用いた系統のマウスの血中 hTTR 濃度を決定した。血清は、ウエスタンブロット後、画像解析ソフトの NIH Image 1.6.1(Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)を用いて光学的に導入遺伝子由来の蛋白質のバンドの積分値を求めることにより算出した。Vectastain ABC キットを用いたウエスタンブロット法ではバックグラウンドが高かったため、実験に用いたマウスの血清 hTTR 濃度測定やこれ以後の解析には ECL Western blotting system (Amersham; Buckinghamshire, UK) を用いた(Fig. 8b)。

その結果、実験に用いたマウスの血清中ヒト TTR 蛋白質濃度は、line CM5, CM29, CM34 では  $4.8 \pm 2.2$  mg/dl (n=8)、 $5.7 \pm 2.4$  mg/dl (n=4)、 $5.5 \pm 2.7$  mg/dl (n=5)、line CV5, CV15 では  $3.8 \pm 1.1$  mg/dl (n=5)、 $5.3 \pm 2.7$  mg/dl (n=9)、line SM8, SM25, SM46 でそれぞれ、 $4.5 \pm 0.8$  mg/dl (mean  $\pm$  S.D., n=6)、 $7.8 \pm 2.0$  mg/dl (n=13)、 $5.5 \pm 3.2$  mg/dl (n=12)であった (Table 3)。このように、今回の実験に用いたマウスの血清中のヒト TTR 蛋白質は  $3.8 \pm 1.1$  mg/dl から  $7.8 \pm 2.0$  mg/dl の間である。第一章において検討した血清変異 TTR 濃度が  $2.1 \pm 1.8$  mg/dl の 0.6-hMet30 マウスと  $15.1 \pm 2.8$  mg/dl の 6.0-hMet30 マウスのアミロイド沈着出現時期・頻度・組織分布には違いが見られたことから、2 mg/dl から 15 mg/dl の間では濃度依存性にアミロイド沈着の程度に差がみられる。つまり、各ライン間の血清 hTTR 濃度に有意な差がないことが、アミロイド沈着比較の前提となる。そこで、各ライン間の血清 hTTR 濃度を Fisher の正確確率検定法 (Fisher's exact probability test) にて比較したところ、各ライン間の血清 hTTR 濃度に有意な差はみられなかった。

さらに、RT-PCR による検討の結果、同じプロモーター領域をもちいた 6.0-hMet30 マウス同様に、導入遺伝子発現は脳と肝臓において認められた (Fig. 8c, Table 3)。



**Fig. 7 PCR and Southern blot analysis of tail DNAs.**

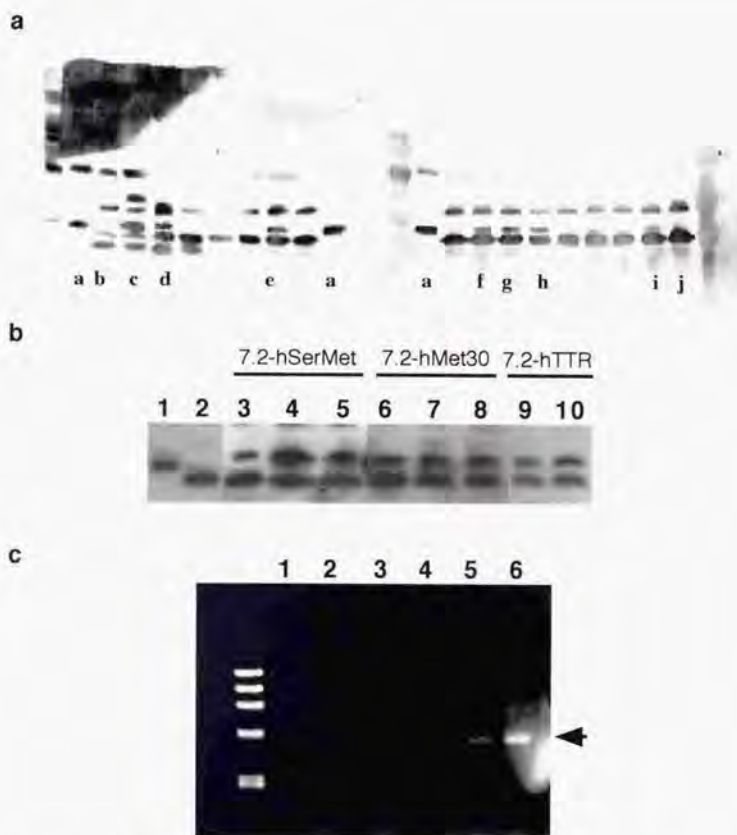
(a) The small arrows indicate the positions and directions of the PCR primers bu and bd. The expected size of PCR products are indicated.

A thick bar below is the map which corresponds to the probe used for southern blot analysis. Symbols for restriction endonucleases are as follows: E, *EcoRI*; K, *KpnI*; M, *MluI*; Sc, *Scal*; S, *SmaI*; X, *XhoI*.

(b) Southern blot analysis of tail DNAs digested by *Scal* and *MluI*. Lane A, B and C are control DNAs of 1, 3 and 5 copies, respectively.

(c) PCR analysis of the same tail DNAs as used in (b).





**Fig. 8 Western blot and RT-PCR analysis of transgenic mice.**

(a) Western blot analysis of the serum derived from transgenic mice by ABC kit.

a, Human serum; b, Control mice; c, 6.0-hMet30; d, 7.2-hTTR (line CV15);

e, 7.2-hSerMet (line SM25); f, 7.2-hMet30 (line CM34); g, 7.2-hMet30 (line CM5);

h, 7.2-hMet30 (line CM29); i, 7.2-hTTR (line CV5); j, 7.2-hSerMet (line SM8).

(b) Western blot analysis of the serum derived from each transgenic mouse by ECL kit.

lane 1, human; lane 2, wild mouse; lane 3, 7.2-hSerMet (line SM8); lane 4, 7.2-hSerMet (line SM25);

lane 5, 7.2-hSerMet (line SM46); lane 6, 7.2-hMet30 (line CM5); lane 7, 7.2-hMet30 (line CM29);

lane 8, 7.2-hMet30 (line CM34); lane 9, 7.2-hTTR (line CV5); lane 10, 7.2-hTTR (line CV15)

(c) RT-PCR analysis of line CM29 of 7.2-hMet30 transgenic mice.

lane 1, negative control; lane 2, lung; lane 3, spleen; lane 4, kidney; lane 5, brain; lane 6, liver.

Table 3 Characterization of transgenic mice

Mice line (genotype)	Strain	Serum level of human TTR (mg/dl) (mean±S.D.)	Gene expression of human TTR	Copy number
7.2-hSerMet (Ser10, Met30)	SM8	4.5 ± 0.8 (n=6)	Brain, Liver	20-25
	SM25	7.8 ± 2.0 (n=13)	Brain, Liver	10-15
	SM46	5.4 ± 3.2 (n=12)	Brain, Liver	20-25
7.2-hMet30 (Cys10, Met30)	CM5	4.8 ± 2.2 (n=8)	Brain, Liver	15-20
	CM29	5.7 ± 2.4 (n=4)	Brain, Liver	20-25
	CM34	5.5 ± 2.7 (n=5)	Brain, Liver	10-15
7.2-hTTR (Cys10, Val30)	CV5	3.8 ± 1.1 (n=5)	Brain, Liver	10-20
	CV15	5.3 ± 2.7 (n=9)	Brain, Liver	20-25

No significant difference in serum level of human TTR between 7.0-hSerMet and 7.0-hMet30, 7.0-hSerMet and 7.0-hTTR, 7.0-hMet30 and 7.0-hTTR, respectively.

### 第三節 組織病理学的解析

実験に用いたマウスは SPF 化確認の後、生後 8 ヶ月目に conventional な条件下に移し飼育を継続した。各系統ごとのアミロイド沈着の有無について、生後 9、16、24 ヶ月に検討した。但し、7.2-hMet30 マウスの 24 月齢群のみは、24 月齢に到達する前に状態の悪化するマウスがあり、体調の悪化したものはすみやかに病理学的な検討に供したため、21 月齢から 24 月齢の間のデーターを積算した。また、7.2-hTTR マウスの CV15 系統は 4 匹を 30 月齢で、7.2-hSerMet マウスの SM25 系統は 1 匹を 27 月齢において、それぞれ検討を加えた。

アミロイド沈着の同定には、 $\text{KMnO}_4$  による前処理の後コンゴレッド染色を行う Wright 法 (90) による染色と、偏光下で緑色の複屈折を確認することで行った。この Wright 法による染色では、2 次性のアミロイド沈着は染色されない。

熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設と井上実験動物の conventional な条件下で飼育したマウスの 24 月齢群において、7.2-hMet30 マウスの 3 系統全てにアミロイド沈着が認められた (Fig. 9)。7.2-hMet30 マウスのアミロイド沈着の出現頻度は、line CM5 と line CM29 で各々 7 匹中 2 匹 (29%)、line CM34 で 5 匹中 2 匹 (40%) であった (Table 4)。また、これらの沈着アミロイドは免疫組織化学染色によりヒト TTR 抗体との交叉が確認されたことから、ヒト TTR 由来であることが確認された (Fig. 10)。アミロイド沈着の生じたマウスは、line CM5 では 22 月齢と 24 月齢、line CM2 では 23 月齢と 24 月齢、line CM34 では 21 月齢と 22 月齢であった (Table 5)。アミロイド沈着組織分布は、line CM5 では心臓、甲状腺、肝臓、腎臓、脾臓、胃上部、小腸であり、このうち甲状腺 (Fig. 9a, b)、腎臓、小腸では間質にかなりの沈着が見られた (Table 5)。line CM29 では心臓、甲状腺、肝臓、腎臓、胃上部、大腸、小腸に沈着が見られ (Table 5)、小腸 (Fig. 9c, d)、大腸 (Fig. 9e, f) 沈着は粘膜下組織に観察された。腎臓には全ての沈着したマウスに共通してアミロイドがみられた (Fig. 10a, b, Table 5)。

一方、正常ヒト TTR を発現している 7.2-hTTR マウスと、7.2-hMet30 マウスの

同腹仔の非トランスジェニックマウス (litter mate: LM) では、アミロイド沈着が全くみられなかった。さらに、4 匹の 7.2-hTTR マウスを生後 30 月齢で検討したが、アミロイド沈着は全く生じていなかった (Table 4)。これまでに変異 TTR と正常 TTR を導入したトランスジェニックマウスの比較はおこなわれていなかった。しかし、今回この実験によってはじめて Met30 TTR 導入トランスジェニックマウスにおけるアミロイド沈着の原因は、ヒトの場合と同様に変異 TTR (hMet30) の存在であるとはじめて証明された。

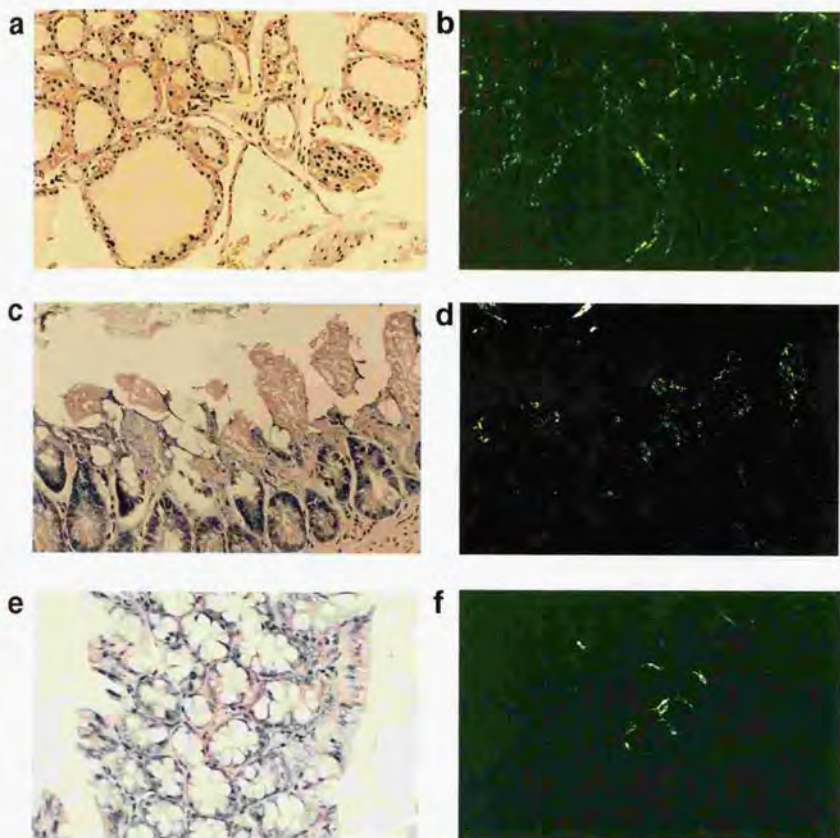
ところで今回実験に用いたマウスは、全て 8 ヶ月間 SPF にて飼育された後、conventional な条件下の熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設と井上実験動物の双方で飼育し、アミロイド沈着が確認された。これまで、全期間 SPF 環境下で飼育したマウスにアミロイド沈着は生じない、つまり SPF 環境はアミロイド沈着を抑制するらしいとの指摘がなされている。実際、この実験系においても 24 月齢までの全期間 SPF 環境下にて飼育した 7.2-hMet30 マウスではアミロイド沈着を生じなかった (Table 4)。しかし、SPF 環境下での飼育期間とアミロイド沈着との関連は明確ではない。今回の実験では、これまでとは異なり 8 ヶ月間 SPF にて飼育した後 conventional な環境に移している。そこで 8 ヶ月間 SPF にて飼育した影響を検討するために、14 ヶ月間 SPF で飼育した後に conventional な環境に移した 7.2-hMet30 マウス (line CM5) のアミロイド沈着について実験をおこなった。その結果、14 ヶ月間 SPF で飼育した後に conventional な環境に移した 24 月齢マウスの 12 匹中 1 匹 (8.3 %) にアミロイド沈着が生じていた (Table 4)。つまり、SPF 環境下での飼育期間が 8、14、24 ヶ月と長期になるのに伴い、24 月齢の 7.2-hMet30 マウスにおけるアミロイド沈着出現頻度は 29%、8%、0% と低くなる傾向がみられた。このように conventional な環境における飼育期間が、アミロイド沈着と密接に関係していることが示された。

次に、TTR における Cys10 の存在がアミロイド沈着発症にどのように関与しているか明らかにするために、Met30 TTR の 10 番目の Cys を Ser に人工的に置き換えた 7.2-hSerMet マウスについて検討を加えた。その結果、7.2-hSerMet マウ



ス3系統中1系統(line SM25)において24月齢群25匹中1匹(4%)に沈着が見られた。この沈着アミロイドは免疫組織化学染色によりヒトTTRであることが確認された。このマウスのアミロイド沈着組織分布は肝臓、腎臓であり、腎臓への沈着は7.2-hMet30マウスと同程度であったが、その他の組織には沈着はみられなかった。

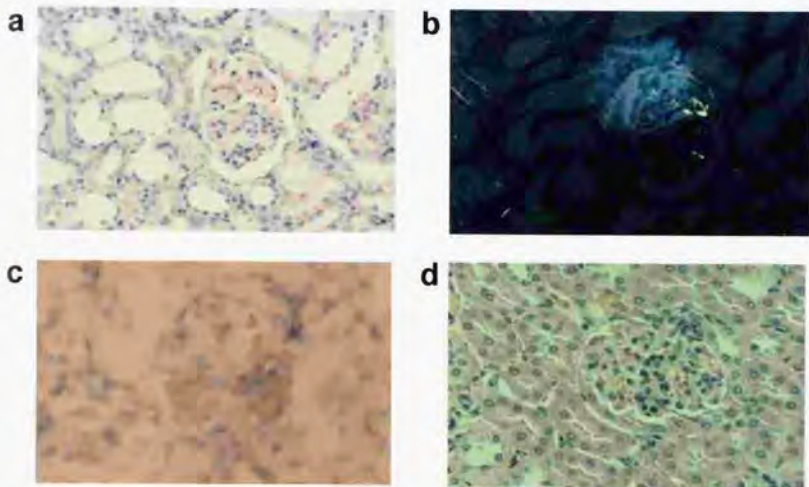
今回の実験に用いた各系統間のマウス血清ヒトTTR濃度には、統計学的に有意な差がみられなかったため、アミロイド沈着の違いに血清ヒトTTR濃度は影響しないと考えられる。そこでCys10のアミロイド沈着への関与について、7.2-hSerMetマウス3系統と7.2-hMet30マウスの3系統の間のアミロイド沈着出現頻度をFisherの正確確率検定法により比較することにより検討した。その結果、7.2-hSerMetマウスと7.2-hMet30マウスのアミロイド沈着出現頻度の間には、危険率0.5%以下で有意な差( $P<0.005$ )がみられた(Table 4)。この結果から、Met30 TTRにおけるCys10の存在はアミロイド沈着に必須ではないが、それを促進させる役割があると結論した。



**Fig. 9 Histochemical analysis of 7.2-hMet30 transgenic mice.**

Congo-red-positive deposits are present in the interstitium of thyroid gland of line CM5 (a), in the submucosal layers of small intestine (c) and large intestine (e) of line CM29.

In the same ones, these sections are seen emitting emerald-green birefringence in polarized light (b, d and f). a-d,  $\times 100$



**Fig. 10 Immunohistochemical analysis of kidney in 7.2-hMet30 transgenic mice.** Congo-red-positive deposits are present in the glomeruli of kidney (a) of 7.2-hMet30 mice. In the same ones, these sections are seen emitting emerald-green birefringence in polarized light (b). Amyloid deposits in the glomeruli show positive reactions for anti-human TTR antibody (c) and anti-mouse SAP antibody (data not shown) by immunohistochemical analysis. Amyloid deposits are absent in the control mice by HE stain(d).  
a, b, d, x100; c, x200

Table 4. Amyloid deposits in TTR transgenic mice

Mice Strain	9	16 (months)	24	The ratio of amyloid deposits in 24 months
7.2-hSerMet(SM8)	-	0/2	0/6	0 %
7.2-hSerMet(SM25)	0/1	0/4	1*/25	4 %
7.2-hSerMet(SM46)	0/3	0/5	0/6	0 %
7.2-hMet30(CM5)	0/3	0/5	2/7	29 %
7.2-hMet30(CM29)	0/1	0/7	2/7	29 %
7.2-hMet30(CM34)	-	0/7	2/5	40 %
7.2-hTTR(CV5)	-	0/2	0/4	0 %
7.2-hTTR(CV15)	0/1	0/6	0/19**	0 %
Control (LM)	0/1	0/6	0/15	0 %
7.2-hMet30(CM29-SPF***)	0/4	0/5	0/17	0 %
7.2-hMet30(CM5-SPF/C****)	-	0/1	1/12	8 %

\*This mouse was killed at 27 months after birth; \*\*The data of four mice at 30 months are included; \*\*\*SPF, all mice were kept under SPF conditions; \*\*\*\*SPF/C, all mice were kept under conventional conditions after 14 months in SPF.  
The data of 24 months of all 7.2-hMet30 mice group include the results of 21 to 24 months.



Table 5 Tissue distribution of Amyloid deposits

Mice Strain	Number of mice	Age of mice (months)	Sciatic		Heart	Thyroid	Liver	Kidney	Spleen	upper Stomach	Large intestine	Small intestine
			Brain	Nerve								
line CM5	2	22, 24	-	-	±	++	±	++	±	+	-	++
line CM29	2	23, 24	-	-	±	+	±	++	-	±	+	++
line CM34	2	21, 22	NT	NT	±	NT	NT	++	NT	NT	NT	NT
line SM25	1	27	-	-	-	-	±	++	-	-	-	-

Amyloid deposits are absent, -; limited to the wall of small vessels, ±; observed in the wall of small vessels and their surrounding regions, +; moderate in the interstitium, ++; marked in the interstitium and parenchyma, +++; NT, Not tested. Line CM5, CM29 and CM 34 are 7.2-hMet30 mice. Line SM25 is 7.2-hSerMet mice.



#### 第四節 考察

正常 hTTR と hMet30 の X 線結晶解析による高次構造の特徴的な差異は、正常型では  $\beta$  鎖 A 上にある 10 番目のシステイン (Cys10) 残基の側鎖 (-SH) が、 $3.3 \text{ \AA} \pm 0.2 \text{ \AA}$  の距離で 57 番目のグリシン (Gly57) の側鎖と水素結合しているのに対し、hMet30 では Cys10 側鎖と Gly57 間の距離が  $4.5 \text{ \AA} \pm 0.4 \text{ \AA}$  へと広がり、蛋白分子内での水素結合が形成不能となること (82) である (Fig. 1)。その結果、Cys10 の側鎖である -SH 基が、TTR 高次構造の外側にフリーな状態で存在している可能性が高いことが示されている。

これまでに、Met30 型 FAP 患者の沈着アミロイドの主成分は変異型 TTR である hMet30 であること (9)、hMet30 由来のアミロイド蛋白内には S-S 結合が存在していること (102, 103) や、hMet30 は *in vitro* でアミロイド様線維を形成すること (104)、TTR には N 末端から 10 番目の Cys 以外には Cys が存在しないこと (19)、TTR 四量体には Cys10 が 4 個存在するが、いずれの Cys10 も立体構造の外側に存在する (82) などの知見が明らかになっている。これらのことから、Cys10 の -SH 側鎖の存在がアミロイド蛋白形成の引き金になる可能性、例えば -SH 側鎖を介したジスルフィド結合により四量体がアグリゲートしやすくなる、また、TTR 高次構造内部の水素結合からフリーになった反応性に富む -SH 側鎖が生体内で何らかの反応をきたしてアミロイド形成を促進する可能性などが考えられた (82)。

そこで、本研究では Cys10 のアミロイド形成への関与を検討するために、TTR の N 末端から 10 番目の Cys が Ser になるように人工変異を導入した Ser10, Met30 のヒト TTR (hSerMet) を発現するマウス (7.2-hSerMet マウス)、Cys10, Met30 の患者型ヒト TTR (hMet30) を発現するマウス (7.2-hMet30 マウス)、Cys10, Val30 の正常ヒト TTR (hTTR) を発現するマウス (7.2-hTTR マウス) の 3 種類のトランスジェニックマウスを新たに作成し、それらのアミロイド沈着能について解析し比較した。

作出されたいずれの系統のマウスもヒト TTR プロモーター領域 7.2kb を用いることで、ヒトの場合と同様に、脳と肝臓で導入遺伝子を発現していた (Fig. 8c, Table 3)。また、血清 hTTR 濃度は第一章の実験でアミロイド沈着を生じていた 6.0-hMet30 マウスの 1/2 から 1/3 程度で、0.6-hMet30 マウスの血清濃度である  $2.1 \pm 1.8$  mg/dl よりも高濃度であり (Table 3)、アミロイド沈着を生じさせるに十分な濃度であることを確認した。

ところで、これまでに正常 TTR と Met30 TTR を発現させたトランスジェニックマウス間でのアミロイド沈着については検討されていない。ヒトとマウスの TTR では、18 箇所のアミノ酸に違いが存在している。このことと、TTR のアミノ酸置換がアミロイド沈着の原因であるということを考えると、正常ヒト TTR もマウスにとっては変異 TTR ということになる。それゆえ、このマウスの系におけるアミロイド沈着の原因が Met30 変異依存性であることを証明するためには、正常ヒト TTR を発現している 7.2-hTTR マウスにおけるアミロイド沈着の有無を検討しなくてはならない。そこで正常ヒト TTR を発現している 7.2-hTTR マウスを、7.2-hMet30 マウスに対するコントロール群として Met30 変異とアミロイド沈着の関連について検討した。

その結果、7.2-hMet30 マウスと 7.2-hTTR マウス共に 16 月齢までは全ての系統に沈着がみられなかったが、24 月齢では 7.2-hMet30 マウスの 3 系統全てにアミロイド沈着が認められた (Table 4)。しかし 7.2-hTTR マウスでは 30 月齢まで全く沈着は見られなかったことから、マウスの系でもヒトの場合と同様にアミロイド沈着の原因は TTR における Met30 変異の存在であることが、今回はじめて示された。

しかし 7.2-hMet30 マウスのアミロイド沈着の組織分布を検討すると、今回の実験に際して新たに作出された 7.2-hMet30 マウスにおいても、これまでと同様に末梢神経系へは全く沈着を生じていなかった (Table 5)。これまで、いずれのケースにおいても末梢神経系におけるアミロイド沈着が見られなかった理由は不明である。しかし最近、FAP 患者では hMet30 のアミロイドが末梢神経のミエ

リンを構成しているミエリン P2 蛋白質と特異的に結合していると報告されている (105)。したがって、ヒト・ミエリン P2 蛋白質の存在が末梢神経系への hMet30 アミロイド沈着に必要な可能性が考えられる。もしそうであれば、ヒト・ミエリン P2 蛋白遺伝子を導入した 7.2-hMet30 マウスを作出することで、末梢神経系への沈着を生じさせることが可能になるかもしれない。

次に、血清ヒト TTR 濃度とアミロイド沈着の程度や出現頻度には相関があることから、各マウス系統間の導入遺伝子由来 hTTR 血中濃度の比較にした。その結果、統計学的に有意な差がみられなかったことから、アミロイド沈着出現頻度の比較が可能であると結論した。その上で、7.2-hMet30 マウスのアミロイド沈着出現頻度と 7.2-hSerMet マウスのそれを比較することで、Cys10 のアミロイド沈着への関与を検討した。

その結果、7.2-hMet30 マウスにおけるアミロイド沈着の出現頻度は精査したマウスの 29-40%であったのに対して、7.2-hSerMet マウスのそれは 3 系統中 1 系統に沈着が生じたのに過ぎず、しかも 25 匹中わずか 1 匹のみ (4%) であった。そして、これら 2 系統間のアミロイド沈着出現頻度には統計学的に有意な ( $P<0.005$ ) 差がみられた (Table 4)。しかも、この沈着を生じた 7.2-hSerMet マウス 1 匹は 27 月齢と、比較した 7.2-hMet30 マウスの 21~24 月齢に比べ老齢であった。さらには沈着を生じている組織分布も、7.2-hSerMet マウスの方が少なく沈着の程度も軽度であった (Table 5)。

以上の結果から、Met30 TTR に起因する FAP においては N 末端から 10 番目のアミノ酸の-SH 側鎖がアミロイド沈着に至る過程において、重要な役割を果たしていると考えられる。

ところで、Cys10 がアルギニン (Arg) に置換された FAP 患者 (Arg10) が報告されている (27)。このことは、Cys10 が必ずしもアミロイド形成に必須ではないことを示している。また、Cys10 が Arg に置換することでアミロイド原性が獲得されたことを示している。既に 50 種類以上の変異型 TTR においてアミロイド原性が報告されており、TTR の何らかの構造変化がアミロイド形成の誘発因子



であり、Arg10 もその一つと考えられる。我々が検討した Met30 による FAP における Cys10 の役割は、Met30 変異により誘発されたアミロイド形成反応の促進因子と考えるのが妥当と思われる。実際、FAP の発症時期が 30 歳前後である hMet30 の場合とは異なり、Arg10 の患者では発症年齢が高齢（59 歳から 68 歳）であることやアミロイド沈着の程度が軽度であること、そして FAP の臨床症状も軽度であるなどのことが報告されている (27)。

ここで問題となるのは、Cys10 を Ser10 に置換したことによる TTR 分子の構造変化とそのアミロイド原性との関係である。Arg は Cys や Ser に比べて側鎖が大きく、また電荷をもつ荷電アミノ酸であり、この Cys10→Arg10 変異により蛋白質の構造や電氣的性質が変わる可能性が高い。一方我々が今回選択した人工変異導入異型 TTR (Ser10Met30 TTR) では Cys10 を Cys と同じ極性アミノ酸である Ser に置換しており、この両者の違いは Cys 側鎖が S と Ser 側鎖が S と同じ 6B 族の O である。また、S の電気陰性度が 2.44 であるのに対して O では 3.5 と高いことから、-SH に比して -OH は反応性が非常に乏しい。しかも、Cys10 は TTR 分子内部における Cys 同士のジスルフィド結合による立体構造形成に関与していない。これらのことから、Cys→Ser の置換による TTR の高次構造への影響は極めて低いと思われる。実際いくつかの蛋白質において、蛋白質内でジスルフィド結合を形成していない Cys の機能を検討するために、Cys を Ser に置き換えてその立体構造を検討しているが、いずれも構造上の変化は報告されていない (106, 107)。これらのことから考えると、厳密には Cys10→Ser10 のみの置換ではアミロイド原性に変化がないことを示すべきであるが、hMet30 の Cys10 の -SH 側鎖のアミロイド沈着への関与に関しては、人工的に Cys10 を Ser10 置換した hMet30 を比較対象として用いた今回の実験結果から、Cys10 がアミロイド形成の促進因子として働いていると考えるのは妥当であると考ええる。

ところで最初のアミロイド沈着が見られた時期だが、第一章で検討した 0.6-hMet30 マウスの 15 月齢や 6.0-hMet30 マウスの 9 月齢に比較して 7.2-hMet30 マウスでは 21 月齢から 24 月齢と遅く、またアミロイド沈着の組織分布も 7.2-



hMet30 マウスの方が数少なかった (Table 2, Table 5)。7.2-hMet30 マウスにおいて 21-24 月齢まで沈着がみられなかった理由として、今回実験に用いたマウスは全てが生後 8 ヶ月間 SPF 環境下で飼育された後、conventional な条件下に移し飼育したことがその理由として考えられる。このことを示唆するデータとして、同じ 7.2-hMet30 マウス (CM5) を生後 14 ヶ月間 SPF 環境下で飼育した場合、24 月齢では 12 匹中 1 匹にのみアミロイド沈着がみられたこと、また 24 月齢までの全期間 SPF 環境下で飼育した 7.2-hMet30 マウス (CM29) 17 匹の全てにアミロイド沈着は生じなかったことがあげられる。すなわち、SPF 環境での飼育期間が 8 ヶ月、14 ヶ月、24 ヶ月となるのにもない 24 月齢でのアミロイド沈着出現頻度は、それぞれ 29%、8%、0%と低下していた (Table 4)。これらのことは、ある一定の期間以上 conventional な条件下で飼育することがアミロイド沈着に必要であることを示している。

conventional な環境下におけるアミロイド沈着に関与する要因として、FAP のアミロイド沈着には必ず含まれる SAP が考えられる (108)。SAP は、急性炎症により発現が上昇することが知られており、conventional な環境下では何らかの感染による炎症が原因で SAP が上昇する可能性があるため、その関与が考えられてきた。しかし、バクテリアの lipopolysaccharide を反復投与することで急性炎症を惹起した MT-hMet30 マウス (109) やヒト SAP 遺伝子を MT-hMet30 マウスに導入したダブルトランスジェニックマウス (110, 111) においてアミロイド沈着開始時期に差はみられなかったことから、SAP がアミロイド沈着を誘発しているとは考えられない。

今回の研究により示された Cys10 の-SH 側鎖のアミロイド沈着への関与は、反応性に富んだ-SH 基における酸化反応の重要性を示唆していると考えられる。興味深いことに FAP 患者では、酸化ストレスの指標の一つである過酸化脂質が健康人に比べて増加していたと報告 (112) されている。さらに、活性酸素を消去する酵素である extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) 遺伝子に変異を有する FAP 患者において、通常よりも重篤なアミロイド沈着を生じていた (113)。

以上と今回の研究結果とを考え合わせると、-SH 基における反応は酸化反応であることから生体内環境を還元状態下におくことや、Cys10 の-SH 基の反応性を奪うことにより、アミロイドーシスの進行を抑制できる可能性が考えられる。例えば、N-アセチル-L-システインや、グルタチオン、アスコルビン酸、 $\alpha$  トコフェロールといった、抗酸化作用のある薬物を投与し生体内環境の酸化を抑制可能な状態にすることにより、アミロイド沈着を低下させることも可能ではないかと考えている。今後、これら薬剤を投与した 7.2-hMet30 マウスにおけるアミロイド沈着抑制の可能性について検討する必要があると考えている。

### 第三章

#### 研究のまとめ

第一章の予備的実験結果は、ある一定の閾値までは血液中の hMet30 濃度が高いほどアミロイド沈着が生じやすいこと、アミロイド沈着が生じていたマウスで血清 hMet30 濃度の最も低いマウスは  $2.1 \pm 1.8$  mg/dl であった。よって可能な限り高濃度であり、互いの血清 hMet30 濃度が類似しているトランスジェニックマウスを用いて実験をおこなう必要があると結論した。

第二章では、患者型である Met30 TTR を発現させた 7.2-hMet30 マウス、正常型ヒト TTR を発現させた 7.2-hTTR マウス、Met30 TTR のアミロイド沈着への Cys10 の関与を検討するために Met30 TTR の Cys10 を Ser に人工的に置き換えた 7.2-hSerMet マウス、の 3 系統のトランスジェニックマウスを新たに作出し実験に供した。

まず、マウスの系におけるアミロイド沈着が Met30 変異依存性であるかどうかについて検討した。その結果、Met30 TTR を発現させた 7.2-hMet30 マウスではアミロイド沈着を生じたが、正常ヒト TTR を発現している 7.2-hTTR マウスではアミロイド沈着が生じなかったことから、このトランスジェニックマウスの実験系における TTR アミロイド形成もヒト FAP の場合と同様に、Met30 変異依存性であることがはじめて示された。さらに、沈着の生じた 7.2-hMet30 マウスを SPF 環境下で飼育したところ、これまでの指摘同様に 24 月齢においてアミロイド沈着を全く生じなかった。しかし、SPF 環境下で飼育した期間を 14 ヶ月、8 ヶ月と短くすることによって 24 月齢でのアミロイド沈着出現頻度が 8% から 29%~40% へと上昇した。このことは、conventional な環境での飼育期間がアミロイド沈着に関連していることを示している。

次に 7.2-hMet30 マウスと 7.2-hSerMet マウスの間の 24 月齢のアミロイド沈着出現頻度を比較したところ、7.2-hMet30 マウスでは 29%、29%、40%、7.2-hSerMet マウスでは 0%、4%、0% とアミロイド沈着出現頻度に明らかな違いが生じた。Cys10 を Ser10 に置き換えることで、Met30 変異によって生じる TTR アミロイド沈着頻度が大きく減少したことから、アミロイド形成の促進に Cys10 が深く関わっていることが *in vivo* 実験系において証明された。



## 第四章

### 実験材料および実験方法

## 1. トランスジェニックマウス

第一章では、既に作出されている 0.6-hMet30 マウス (85) と 6.0-hMet30 マウス (86) の 2 種類のトランスジェニックマウスを用いた。これらのマウスは、0.6kb または 6.0kb のヒト TTR プロモーターと Met30 変異を持った TTR ゲノム遺伝子が導入されており、既にアミロイド沈着が報告されている (86, 88)。

第二章では 7.2-hMet30 マウス、7.2-hTTR マウス、7.2-hSerMet マウスの 3 種類のトランスジェニックマウスを新たに作出しアミロイド沈着に及ぼす Cys10 の影響について検討した。

## 2. トランスジェニックマウスの作出

### 2-1. 導入遺伝子の構築

マウスに導入する TTR cDNA はそれぞれ、10 番目の Cys を分子構造の類似している Ser に置き換えた人工変異導入異型 TTR である Ser10, Met30 をコードするもの、異型 TTR である Cys10, Met30 をコードするもの、正常 TTR である Cys10, Val30 をコードするものとした (Fig. 8)。アミノ酸置換による分子構造の変化を最小限にするために、人工変異には 10 番目の Cys と分子構造の類似している Ser を選択した。Cys と Ser 共に極性アミノ酸に属し、その構造上の違いは側鎖が-SH か-OH かのみである (Fig. 2)。これら 3 種類の cDNA は、古谷らによって大腸菌の発現系用に作られた cDNA (89) の、PINTR-HO (Ser10, Met30)、PINTR-5 (Met30)、PINTR-6 (native TTR) とヒト TTR cDNA である PHPA27 のシグナルペプチド部分を *Ban*I サイトで組換えて作成した (Fig. 7)。組換えの後、ダイレクトシーケンシング (114) により塩基配列の確認をおこない、コンストラクションに用いた。培養細胞ではプロモーター領域下流に cDNA のみを直接連結することで蛋白質へ翻訳されるが、*in vivo* ではエクソン・イントロン構造がないことによる遺伝子発現の低下、またスプライシングを受けられない結果として mRNA が不安定になるなど、効率の良く導入遺伝子由来の蛋白質を得ることが出来ない。そこで今回、エクソン・イントロン構造を含んだ cDNA 発現ベク

ターを用いることで、この問題を回避した。

cDNA 発現ベクターである pLG-1 (97) から *Bam*HI と *Xho*I にてウサギ  $\beta$  グロビン遺伝子のエクソン・イントロン部分のみを取り出し、cDNA クローニングサイトである第3エクソン内の *Eco*RI サイトに各種ヒト TTR cDNA を挿入した後、ヒト TTR プロモーター-7.2kb 下流に挿入した (Fig. 7)。

ヒト TTR プロモーター配列を含むプラスミドは、ヒト TTR プロモーター内に存在する大腸菌 *ori* 類似配列のため目的のプラスミドを獲得することが困難であった。そこで、pUC 系に比して大腸菌あたりの複製コピー数の少ない pBR322 プラスミドに pBlueScript のマルチクローニングサイトを移したプラスミドを新たに作成し、このプラスミド上で導入用遺伝子構築をおこなった。大腸菌へのトランスフォーメーション後は、通常より低い 30 度で大腸菌の培養をおこなうことで問題を回避した。

## 2-2. 注入用 DNA の調製

導入遺伝子はプラスミドベクターに構築後、導入遺伝子発現の低下 (114) を防ぐ目的で *Kpn*I と *Sac*II により切断することでプラスミド配列を除き、0.7% アガロースゲルにて泳動後目的のバンド (8947 bp) を切り出し、Gene Clean II Kit (Bio101; CA, USA) により精製した。精製した注入用 DNA は 200 copies/ $\mu$ l 相当の 2.0  $\mu$ g/ml 濃度に調製するとともに、ダイレクトシーケンシング (114) により TTR cDNA と cDNA 発現ベクターの配列を確認した。

## 2-3. 受精卵への遺伝子導入

トランスジェニックマウス作出には、アミロイド沈着への遺伝的背景の影響を排除する目的と、FAP モデルマウスでのアミロイド沈着の実績があることを考慮した結果、近交系の C57BL/6J マウスを選択した。

トランスジェニックマウス作製において使用可能な細胞は、受精卵を含む初期胚 (115) と ES 細胞であるが、この実験では受精卵を用いたマイクロインジェ

クション法による方法を用いた (116, 117)。6 週齢の採卵用の C57BL/6J メスマウスに妊馬血清性ゴナドトロピン 5 単位、その 48 時間後にヒト胎盤性ゴナドトロピン 5 単位をそれぞれ腹腔内投与し、ヒト胎盤性ゴナドトロピンを投与した翌朝、卵管膨大部を取りだし、10% ヒアルロニダーゼ/受精卵培養用培養液 (102mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 22.6mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5.6mM Glucose, 1.71mM Ca-Lactate- $5\text{H}_2\text{O}$ , 0.23mM Na-Pyruvate, 0.0075% Penicillin G, 0.005% Streptomycin, 3% BSA, 0.0001% Phenol red) 中で未受精卵を採取した。採取した受精卵のまわりの卵丘細胞が遊離したことを確認の後、キャピラリーチューブをバーナーで熱して作成した採卵用ピペットで受精卵を吸い取り、あらかじめ 37℃ の  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で保温しておいた培養液中に移し、3 回洗浄した。その後、形態が正常な受精卵だけをパラフィンオイル (Sigma, Embryo grade) 中の培養液滴に移し、pH 変化や温度の低下を防ぐためにすみやかに  $\text{CO}_2$  インキュベーター内に移した。

DNA 注入用ピペットは、硬質ガラスキャピラリーチューブ (G 1.2, 10 cm, 成茂社) を微小電極作製機 (Microelectrode puller PN-3, 成茂社) によって処理して作成した。実体顕微鏡でキャピラリー先端を確認しながら、マイクロガラスピペット先端研磨機で約 1 分半研磨した。研磨終了後、キャピラリーを注射器に接続し、蒸留水中で空気を押し出すことでキャピラリー先端が研磨できているか確認した。最後に、弱いガス炎でキャピラリー先端から 2 cm 付近を熱し約 25 度の角度で曲げた。

受精卵保持用ピペットは、硬質ガラスキャピラリーチューブ (G 1.2, 10 cm, 成茂社) を微小電極作製機 (Microelectrode puller PN-3, 成茂社) によって処理した後先端を切断した後、マイクロフォージ (De Fron Brun) でキャピラリー先端を丸く加工した。その後、DNA 注入用ピペット同様の角度にした。いずれのピペットも、遺伝子導入をおこなう当日に作成した。

作成したピペットをマニピュレーターに装着し、パラフィンオイル中の培養液滴において受精卵の雄性前核に DNA 注入をおこなった。受精卵は受精卵保持用



ピペットの内圧をわずかに陰圧にして雄性前核に焦点が合うように固定し、DNA 注入用ピペットをこの焦点上に合わせた後、ピペットを雄性前核に刺入した。雄性前核に DNA を注入したことによる膨張を確認した後、すみやかにピペットを受精卵から抜いた。遺伝子注入は、1 導入遺伝子につき 200-400 個の受精卵に対して、1 受精卵あたり約 200 コピーを注入することでおこなった。

その後、精管結紮雄マウス (ICR) によって偽妊娠させたレシピエントマウス (ICR) の卵管に移植した。1 卵管あたり、約 15 個ずつ胚を移植した。

#### 2-4. 精管結紮雄マウス作出

偽妊娠メスマウス作成用に、精管結紮オスマウスを作出した。トランスジェニックマウス作成に C57BL/6J マウスを選択しているの、仮に精管結紮手術が失敗していた場合等にも被毛の色で判別できることと、交配能力を考慮して ICR マウスのオスを選択した。6-7 週齢のオス ICR マウスに 10%ネンブタールを腹腔内に投与し麻酔し、被毛を除去した後生殖器の上部を正中線に沿って約 1 cm 切開した。ピンセットで腹腔内から左右の精巣と精巣上体と精管を取りだし、精管の周りの膜を分離した後縫合糸で 5-10 mm 間隔で 2ヶ所結紮し、その間で精管を切断した。精巣と精巣上体を腹腔に戻した後、縫合し手術を終えた。手術 2-3 週間後から、3 匹のメスマウスと約 1 週間同居させ妊娠能力の無いことを確認した後実験に用いた。

#### 2-5. 偽妊娠メスマウス作出

受精卵移植の前日午後 5 時頃に、マウスの外陰部が赤みを帯びてやや膨らんだ発情前期のメス ICR マウスを選択した。精管結紮オスマウス 1 匹に対して、メスを 1 匹を同居させた。移植当日の午前 8 時半に臍栓を確認し、交配の確認出来た雌マウスを移植に用いた。その際、交配の有無を精管結紮マウスごとに記録し、交配状況の悪いオスマウスを実験に用いないようにした。

臍栓を確認できなかったメスマウスは、2 週間以上経過した後に再び偽妊娠マ

ウス作出に用いた。

## 2-6, 偽妊娠メスマウス卵管への受精卵の移植

乾熱滅菌したパスツールピペットをガス炎で加熱した後左右に伸ばして、卵管移植用のピペットを作製した。細く伸ばした毛細管は、カッターで傷を付け折った後、毛細管の先端から3 cm 位の部分をバーナーで加熱して約45度の角度で折り曲げた。ピペットはシリコンチューブに接続し、マウスピースで口に含んで使用した。

レシビエントマウスに10%ネブタールで麻酔をかけ、背部の被毛を除いた後に70%エタノールで消毒し、脊椎部分の横5 mmから8 mmの背部を脊椎に沿って切開し、卵巣周囲の脂肪組織を目安に筋層を切開した。卵巣、卵管、子宮上部を体外に引き出し、クレンメで脂肪組織をはさんで固定した。次に、血管を傷つけないように注意しながら、尖鋭ピンセットで卵巣囊をつまんで切開し卵管采を確認した。移植用ピペットに少量の培養液とともに気泡を2つ入れた後に受精卵を吸入し、気泡を目安に卵管采に受精卵を移植した。卵管あたり約15個の受精卵を移植した。

移植終了後、クレンメを取り外し、取りだした卵巣、卵管、子宮を腹腔内に戻し筋層を縫合の後、外皮をオートクリップにて縫合し移植を完了した。移植後約20日で出産するので、出産予定日の2~3日前に細かく裁断したティッシュを床敷きに混ぜ最後のケージ交換をおこない、その後はマウスを刺激しないように飼育した。出産5~6日後にケージ交換を再開し、2週間目からは少量の餌をケージの中に入れ、離乳を促進させた。

## 2-4. マウスの選択

### 2-4-1. サザンハイブリダイゼーションと PCR

生後 4 週齢に達したマウスを個体識別の後、導入遺伝子の有無を調べる目的でその尾を 1-1.5 cm 切断しゲノム DNA を抽出した。導入した遺伝子は、サザンハイブリダイゼーションにより検出した。ゲノム遺伝子は *ScaI* のみ、または *ScaI*, *MluI* による切断後、 $\times 1$  TBE (50mM Tris, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 48mM ホウ酸) 溶液中で 0.7% アガロースゲルを用いて泳動した。泳動終了後、30 分間 0.2M NaOH, 0.6M NaCl 溶液中でアルカリ変性をおこない、Hybond N<sup>+</sup>, positively charged nylon membrane (Amersham; Buckinghamshire, UK) にトランスファーした。標識 DNA は Megaprime DNA labelling systems (Amersham; Buckinghamshire, UK) を用いて <sup>32</sup>P でラベルした。次に、サケ精子 DNA を用いて 4 時間プレハイブリダイゼーションをおこなった後、 $5\times$  SSPE, 0.5% SDS,  $5\times$  Denhardt's solution 溶液に標識 DNA を入れ 65 度でハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリ終了後、 $2\times$  SSPE, 0.1% SDS にて室温で 10 分間洗った後、 $1\times$  SSPE, 0.1% SDS にて 65 度 15 分間、その後  $0.1\times$  SSPE, 0.1% SDS にて 65 度で 40 分間洗浄した。フィルターのシグナルは、パイオイメージアナライザー Bas2000 (Fujix; Tokyo, Japan) にて解析した。その際、対照として泳動した導入遺伝子のバンドから、おおよそ導入された遺伝子のコピー数を算出した。

さらに、簡便に短時間でトランスジェニックマウスの同定をおこなうために、個体識別時に耳葉より回収した組織から DNA を抽出し、PCR による導入遺伝子同定もおこなった (101)。耳葉より回収した組織は、350  $\mu$  g/ml proteinase K, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.4), 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45% NP-40, 0.45% Tween 20 溶液 50  $\mu$  l 中で 55 度 1 時間インキュベートされた。次に、96 度で 10 分間インキュベートして proteinase K を失活させた後、30 秒間 15000 回転で遠心し、上清を PCR に用いた。一つの耳葉から、約 9  $\mu$  g の DNA が得られた。

PCR 反応は、TTR cDNA 配列の僅かに外側の rabbit  $\beta$ -globin 遺伝子の配列上に、

$\beta$ u (5'-CCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCT-3'),

$\beta$ d (5'-GGCATTGGCCACACCAGCCACCACCAC-3')

としてプライマーを設定し、94 度 1 分、58 度 1 分、72 度 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル反応をおこなった。これによって、トランスジェニックマウスでは 630bp の PCR 産物が増幅される (Fig. 10c)。

#### 2-4-2. ウェスタンブロッティング

次に、導入遺伝子が同定されたマウスの眼窩から血液を採取しウェスタンブロット法により血液中の導入遺伝子産物の検定をおこなった (86)。マウスの血液は氷中で 30 分間静置の後、700 回転で 2 分間遠心し血清を得た。この血清を 2X SDS buffer (4% SDS, 10% beta-mercaptoethanol, 125mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 1mg/ml Bromo Phenol Blue) と等量混合し、100 度で 10 分間ボイルしサンプルを調製した。このサンプルを 17.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE の後、メタノールに 10 秒間、蒸留水に 2 分間、転写溶液 (0.1M Tris, 0.19M glycine, 20% Methanol) に 5 分間それぞれ浸した Hybond N<sup>+</sup>, positively charged nylon membrane に、定電圧 10V で 30 分間転写した。転写終了後、メンブレンをブロッキング溶液 (3% skim milk, 2% fetal calf serum) で 1 時間震盪させた後、抗ヒト TTR ウサギ抗体 (Behringwerke, Marburg, Germany) をブロッキング溶液にて 1000 倍希釈した 1 次抗体で 1 時間インキュベートした。インキュベーション終了後、メンブレンは洗浄液 (0.02M Tris, 0.01M NaCl, 0.05% Tween20) にて 5 分間の洗浄を 3 回おこない、Vectastain ABC キット (Vector)、または ECL Western blotting system (Amersham; Buckinghamshire, UK) 付属の 2 次抗体 (peroxidase ラベルされた抗ウサギヤギ抗体) によるインキュベーションをおこなった (86)。2 次抗体によるインキュベーションの後、再び洗浄液による洗浄を 3 回おこない、検出に供せられた。



## 2-5, 体外受精によるマウスの SPF 化と飼育環境

得られたトランスジェニックマウスは、マウス肝炎ウイルス (Mouse hepatitis virus, MHV) に汚染されていたので、体外受精により SPF (specific pathogen free: 特定病原体除去) 化作業をおこなった。

6 週齢の採卵用の C57BL/6J メスマウスに妊馬血清性ゴナドトロピン 5 単位、48 時間後にヒト胎盤性ゴナドトロピン 5 単位を、それぞれ腹腔内投与した。ヒト胎盤性ゴナドトロピンを投与した翌朝、C57BL/6J メスマウスの卵管膨大部から未受精卵を採取した。体外受精をおこなうオスのトランスジェニックマウスの精巣上体を摘出し、精子を 0.22  $\mu$  m フィルタでろ過滅菌した HTF 培養液 (101.60mM NaCl, 4.96mM KCl, 0.20mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.37mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.04mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 25mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2.78mM glucose, 0.33mM Na-Pyruvate, 21.40mM Na-Lactate, 75mg/ml Penicillin, 50mg/ml streptomycin, 0.000008% phenol red, 4mg/ml BSA) 内に搾り出し、37 度、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで 1.5 時間インキュベートした後、体外受精に用いた。体外受精後 0.22  $\mu$  m フィルタでろ過滅菌した受精卵培養用培養液 (102mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 22.6mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5.6mM Glucose, 1.71mM Ca-Lactate- $5\text{H}_2\text{O}$ , 0.23mM Na-Pyruvate, 0.0075% Penicillin G, 0.005% Streptomycin, 3% BSA, 0.0001% Phenol red) 中へ受精卵を移し、37 度、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで一晩培養した。翌日、正常に 2 細胞へと分裂した細胞のみを SPF の偽妊娠メスマウス (ICR) 卵管へ移植した。

移植後、誕生したマウスは実験動物中央研究所微生物モニタリングセンター (Kawasaki, Japan) に依頼して 1 ケージ最低 1 匹の血清を検査するとともにマウスを解剖し肝臓の病変の有無について精査した。

実験に用いた全てのトランスジェニックマウスは熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設 (熊本県熊本市九品寺) と井上実験動物 (熊本県益城郡中央町) の conventional な飼育条件下において、プラスチックケージにより維持された。同時に 7.2-hMet30 マウスは、熊本大学医学部附属動物実験施設の SPF 環境下においても維持された。なお、実験に用いた全ての 7.2-hSerMet マウス、7.2-hMet30

マウスと 7.2-hTTR マウスは体外受精による SPF 化作業にともない、生後 8 ヶ月間 SPF 環境下での飼育の後 conventional な飼育条件に移された。

飼育環境はいずれも、気温  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50-70 %、照度 200 ルクス、午前 6 時点灯午後 8 時消灯（照明 14 時間）を維持した。マウスの飲料水は浄水器を通した水道水を使用し、飼料は放射線滅菌した CE-2（日本クレア）を使用した。また、ケージ交換を週 2 回おこなうことで、清潔な飼育環境を維持した。

## 2-6. 導入 hTTR の血中濃度

マウス選択時の指標にすることと血清濃度とアミロイド沈着の関連を検討するために、実験に用いた系統のマウスの導入遺伝子由来ヒト TTR 蛋白質の血清濃度を測定した。濃度測定に用いた血液は眼窩から採取し、すでに述べたように SDS-PAGE の後、抗ヒト TTR 抗体 (Behringwerke; Marburg, Germany)、ECL Western blotting system (Amersham; Buckinghamshire, UK) を用いて解析した。ヒト TTR 抗体はマウス TTR と若干交叉するため、マウス血清中のヒト TTR の濃度測定に ERISA は用いることが出来ない。そこで、ウエスタンブロッティングのデータは高解像度フラットヘッド型スキャナ (ColorOneScanner 1200/30, Apple Computer Inc.) にて取り込んだ後、画像解析ソフトの NIH Image 1.6.1 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) の Gel Plotting Macro を用いてマッキントッシュコンピュータ (PowerMacintosh 9600/350, Apple Computer Inc.) により導入 TTR 蛋白質バンドの積分値を求めた。同時に、濃度が明らかなヒト TTR 蛋白質のバンドの積分値を算出し、その比から濃度を算出した。例えば、7.5mg/dl 時の hTTR バンドの積分値は 19517、3.25mg/dl 時では 9861 であったので、濃度算出の計算式は (積分値) / 2988 となる。

## 2-7, 導入遺伝子の発現部位

導入した hTTR 遺伝子の発現を、RT-PCR によって検討した。屠殺時に、脳、肺、脾臓、肝臓、腎臓を採取し、TRIZOL Reagent (GIBCO BRL)を用いて全 RNA を調製した。全 RNA は Deoxyribonuclease(RT Grade, Wako Nippon gene)処理により混入したゲノム DNA の影響を排除した後、Superscript Preamplification System (Life technologies, Gibco BRL) により 1st. strand cDNA 合成を行った。PCR 反応はこの cDNA に対して、rabbit  $\beta$ -globin 遺伝子と hTTR cDNA 配列の境界から cDNA 上に、

TTR-UEco (5'-GGACGAATTCACAGAAGTCCACTCATTCTT-3')、

TTR-DEco (5'-ATGCGAATTCGCGTTCACGTCGTTGCTCAG-3')

としてプライマーを設定し、AmpliTaq DNA Polymerase(Perkin Elmer)を用いて 94 度 45 秒、58 度 25 秒、72 度 2 分を 1 サイクルとして 25 サイクル反応をおこなった。遺伝子発現がおこなわれている臓器では 510 bp の PCR 産物として増幅される。

### 3. マウスの解析

#### 3-1. 組織病理学的解析

アミロイド沈着の有無について検討するために、コンゴレッド染色をおこなった。まず、フェノール・コンゴレッド溶液を作成した。コンゴレッド 0.2g と NaCl を 19g を蒸留水 100 ml に溶解後、100% Et-OH を 100 ml 加え 10℃で保存した。沈殿が生じたらろ紙で濾過し、これをフェノール・コンゴレッド原液とした。この原液は、約 1 ヶ月間の室温保存が可能である。フェノール・コンゴレッド溶液は、実験開始前にこの原液 100 ml に対して溶解したフェノール 5 ml を加えた後、酢酸 1 ml を加えて実験に用いた。

0.6-hMet30 マウスと 6.0-hMet30 マウスは 3 ヶ月毎に生後 24 ヶ月まで、毎回各ラインについて 2 匹から 6 匹を脱血により屠殺した。7.2-hSerMet マウス、7.2-hMet30 マウス、7.2-hTTR マウスは conventional な飼育条件下のものは生後、9、16、24 ヶ月に、SPF 環境下の 7.2-hMet30 マウスは生後 14 月を SPF 環境下で飼育した後 conventional な環境に移して飼育したものと、24 ヶ月間 SPF にて飼育したものを、24 月齢に屠殺し検討を加えた。

全てのトランスジェニックマウスは屠殺の後すみやかに脳、坐骨神経、眼、肺、胸腺、甲状腺、顎下腺、食道、胃上部、胃下部、小腸、大腸、Peyer 板、腸間膜根リンパ節、肝臓、脾臓、心臓、膀胱、腎臓、副腎、骨格筋、骨髄、皮膚、生殖器（メス：卵巣・子宮、オス：睪丸・精囊）を摘出し、10%中性ホルマリン溶液中で固定した後、パラフィン包埋をおこなった。その際、同数の同腹仔も処理した。アミロイド同定時のパラフィン切片のコンゴレッド染色は、5%過マンガン酸カリウム ( $\text{KMnO}_4$ ) による処理の後に染色を行う Wright 法により行った (3)。

まず、脱パラフィンのために流水で水洗した後、2.5%  $\text{KMnO}_4$ 、0.15%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液で 3 分間処理した。軽く流水水洗した後、0.5%  $\text{HBrO}_3$  にて切片が白色になるまで反応をおこなった後、再び軽く水洗して余分な  $\text{HBrO}_3$  を除きフェノール・コンゴレッド溶液中で約 1 時間染色した。1 時間後水洗し、ハマトキシリ



ン溶液で染色した。10 分後、5 分間水洗し 20% Et-OH, 0.0001%  $\text{NH}_3$  溶液に 20 秒間浸した後、直ちに水洗した。その後 100% アルコールにより脱水、透徹、封入し、パラフィン切片はアミロイド沈着の同定のために顕微鏡下 (OLYMPUS, BH-2) で検討された。アミロイド陽性はコンゴレッド染色により橙赤色に染色され、偏光下で複屈折し緑色の蛍光を呈するものとした。

### 3-2, 免疫組織化学

アミロイド沈着物質の主要構成成分の同定のために、免疫組織化学的な検討をおこなった。マウスの組織は 4℃ で 5 時間、periodite-lysine-paraformaldehyde (PLP 固定液, 0.01M  $\text{NaIO}_4$ , 0.075M Lysine, 0.0375M phosphate, 2% PFA, pH 6.2) により固定した。Sucrose を浸透させる目的で PBS-Sucrose 濃度勾配による処理を、10%、15%、20% と Sucrose を徐々に高濃度に変えて 5 時間ずつおこなった。引き続き、PBS-20% Sucrose, 10% Glycerol に 1 時間浸した後、O.C.T. compound (Sakura Finetek U.S.A., Inc., Torrance, USA) 中で凍結し cryostat (Bright; Hunting-ton, UK) により 6~8  $\mu\text{m}$  の薄切切片を作成した。薄切切片はただちにスライドガラス上にて風乾した後、4℃ PBS で 5 分間 3 回洗浄し、バックグラウンドを消すために 5 mM 過ヨウ素酸水溶液中に 10 分、PBS で洗浄後 3mM 水酸化ホウ酸ナトリウム中で 30 分処理して内因性ペルオキシダーゼを阻害した (118)。再び PBS にて洗浄し、組織切片を羊の血清で 10 分間浸した後、一次抗体で 1~2 時間処理した。一次抗体として用いた抗体はラット抗ヒト TTR (Behringwerke; Marburg, Germany) 抗体、ラット抗マウスアミロイド A 蛋白 (Prof. S. Migata, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Japan) 抗体、ラット抗マウス SAP (Behring Diagnostics; La Jolla, USA) 抗体である。1 時間後 PBS で洗浄し、peroxidase 標識二次抗体 (羊抗ラット抗体, Amersham, Little Chalfont, UK) で 1 時間反応させた。1 時間後に組織切片は PBS で洗浄し、3,3'-diaminobenzidine と過酸化水素を用いて処理し抗体と反応した部位を発色させた。

## 謝辞

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター 榊 佳之教授に謹んで御礼申し上げます。

また、マウス作出に際して御指導を賜りました、熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設 山村研一教授、更に病理組織学的な解析にあたり御指導賜りました、熊本大学医学部第二病理学教室 高橋 潔教授に謹んで御礼申し上げます。

なお本研究遂行にあたり、熊本大学医学部遺伝発生医学研究施設 鈴木操助教授、同大学医学部第二病理学教室 宮川和久博士、井重博博士、山梨医科大学学生化学教室 前田秀一郎教授、大阪大学医学部栄養学教室 田代文博士から御助言を賜りました。これらの諸先生方に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Andrade, C. (1952)  
A peculiar form of peripheral neuropathy: familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves.  
*Brain* 75, 408-427.
- 2) Glenner, G.G. (1980)  
Amyloid deposit and amyloidosis.  
*N. Eng. J Med*, 306, 1283-1342
- 3) Wright, J.R. (1977)  
Potassium permanganate reaction in amyloidosis.  
*Lab. Invest.* 36, 274-281
- 4) Reilly, M.M., King, R.H.M. (1993)  
Familial amyloid polyneuropathy.  
*Brain Pathol.* 3, 165-176
- 5) Costa, P. P., A. S. Figueira, and F.R. Bravo (1978)  
Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4499-4503
- 6) Nichols, W. C., J. J. Liepnieks, E. L. Snyder, and M. D. Benson. (1991)  
Senile cardiac amyloidosis associated with homozygosity for a transthyretin variant (ILE-122).  
*J. Lab. Clin. Med.* 117, 175-80.
- 7) Haltia, M., F. Prelli, J. Ghiso, S. Kiuru, H. Somer, J. Palo, and B. Frangione. (1990)  
Amyloid protein in familial amyloidosis (Finnish type) is homologous to gelsolin, an actin-binding protein.  
*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 167, 927-932.
- 8) Maury, C.P.J., K. Alli, and M. Baumann. (1990)  
Finnish hereditary amyloidosis.  
*Febs Lett.* 260, 85-87

- 9) Tawara, S., M. Nakazato, K. Kangawa, H. Mathuo, and S. Araki. (1983)  
Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type).  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 880-888
- 10) Saraiva, M.J.M, P.P. Costa, and D.S. Goodman. (1983)  
Studies on plasma transthyretin (prealbumin) in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. *J. Lab. Clin. Med.* 102, 590-603
- 11) Westermark, P., P. Pitkanen, L. Benson, A. Vahlquist, B.O. Olofsson, and Gg 3d. Cornwell. (1985)  
Serum prealbumin and retinol-binding protein in the prealbumin-related senile and familial forms of systemic amyloidosis.  
*Lab. Invest.* 52, 314-318
- 12) Benson, M.D. and A.S. Cohen. (1977)  
Generalized amyloid in a family of Swedish origin-a study of 426 family members in seven generations of a new kinship with neuropathy, nephropathy and central nervous system involvement.  
*Ann. Intern. Med.* 86, 419-424.
- 13) Kanda, Y., Goodman D.S., Canfield R.E., and Morgan F.J. (1974)  
The amino acid sequence of human plasma prealbumin.  
*J. Biol. Chem.* 249, 6796-6805.
- 14) Gonzalez, G. and R.E. Offord. (1971)  
The subunit structure of prealbumin.  
*Biochem J* 125, 309-317.
- 15) Ferguson, R.N., H. Edelhoch, H.A. Saroff, J. Robbins, and H.J. Cahnmann. (1975)  
Negative cooperativity in the binding of thyroxine to human serum prealbumin.  
*Biochem* 14, 282-289.
- 16) Van Jaarsveld, P.P., H Edelhoch, D.S. Goodman, and J. Robbins. (1973)  
The interaction of human plasma retinol-binding protein with prealbumin.  
*J. Biol. Chem.* 248, 4698-4705.



- 17) Martone, R.L., J. Herbert, A. Dwork, and E.A. Schon. (1988)  
Transthyretin is synthesized in the mammalian eye.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 905-912
- 18) Tu, G., T. Cole, W. Duan, and G. Schreiber. (1989)  
The nucleotide sequence of transthyretin cDNA isolated from a sheep choroid plexus cDNA. *Nucl. Acids Res.* 17, 6384
- 19) Sparkes, R.S., H. Sasaki, T. Mohandas, K. Yoshioka, I. Klisak, Y. Sakaki, C. Heinzmann, and M. Simon. (1987)  
Assignment of the prealbumin (PALB) gene (familial amyloidotic polyneuropathy) to human chromosome region 18q11.2-q12.1  
*Hum. Gent.* 75, 151-154
- 20) Whitehead, A. S., and M Skinner, G. A. Bruns, W Costello, M. D. Edge, A.S. Cohen, and J.D. Sipe. (1984)  
Cloning of human prealbumin complementary DNA. Localization of the gene to chromosome 18 and detection of a variant prealbumin allele in a family with familial amyloid polyneuropathy.  
*Mol. Biol. Med.* 2, 411-423
- 21) Sasaki, H., N. Yoshioka, Y. Takagi, and Y. Sakaki. (1985)  
Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin.  
*Gene* 37, 191-197.
- 22) Tsuzuki, T., S. Mita, S. Maeda, S. Araki, and K. Shimada. (1985)  
Structure of the human prealbumin gene.  
*J. Biol. Chem.* 260, 12224-12227.
- 23) Wakasugi, S., S. Maeda, K. Shimada, H. Nakashima, and S. Mita. (1985)  
Structural comparisons between mouse and human prealbumin.  
*J. Biochem. (Tokyo)* 98, 1707-1714
- 24) Duan, W, M.G. Achen, S.J. Richardson, M.C. Lawrence, R.E. Wettenhall, A. Jaworowski, and G. Schreiber. (1991)  
Isolation, characterization, cDNA cloning and gene expression of an avian transthyretin. Implications for the evolution of structure and function of transthyretin in vertebrates.  
*Eur. J. Biochem.* 200, 679-687

- 25) Sasaki, H., Y. Sakaki, H. Matsuo, I. Goto, Y. Kuroiwa, I. Sahashi, A. Takahashi, T. Shinoda, T. Isobe, and Y. Takagi. (1984)  
Diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy by recombinant DNA techniques.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 636-642.
- 26) Mita, S., S. Maeda, M. Ide, T. Tsuzuki, K. Shimada, and S. Araki. (1986)  
Familial amyloidotic polyneuropathy diagnosed by cloned human prealbumin cDNA. *Neurology* 36, 298-301.
- 27) Uemichi, T., J.R. Murrell, S. Zeldenrust, and M.D. Benson. (1992)  
A new mutant transthyretin (Arg 10) associated with familial amyloid polyneuropathy.  
*J Med Genet.* 29, 888-891
- 28) Booth, D.R., S.E. Booth, M.R. Persey, S.Y. Tan, S. Madhoo, M.B. Pepys, and P.N. Hawkins. (1995)  
Three new amyloidogenic TTR mutations: Pro12, Glu18, and Val33.  
*In 3rd International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders, O12*
- 29) Vidal, R., F. Garzuly, H. Budka, M. Lalowski, R.P. Linke, F. Brittig, B. Frangione, and T. Wisniewski. (1996)  
Meningocerebrovascular amyloidosis associated with a novel transthyretin mis-sense mutation at codon 18.  
*Am J Pathol.* 148, 361-366.
- 30) Jenne, D.E., K. Denzel, P. Blatzinger, B. Obermaier-Skrobanek, R.P. Linke, and K. Altland. (1996)  
A new isoleucine substitution of Val-20 in transthyretin tetramers selectively impairs.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6302-6307.
- 31) Jacobson, D.R., T. Pan, R.A. Kyle, and J.N. Buxbaum. (1997)  
Transthyretin ILE20, a new variant associated with late-onset cardiac amyloidosis.  
*Hum. Mutat.* 9, 83-85.

- 32) Uemichi, T., M.A. Gertz, and M.D. Benson. (1995)  
A new transthyretin variant (Ser24) associated with familial  
amyloid polyneuropathy.  
*J Med. Genet.* 32, 279-281.
- 33) Jones, L.A., J.C. Skare, A.S. Cohen, J.A. Harding, A. Milunsky,  
and M. Skinner. (1992)  
Familial amyloid polyneuropathy: a new transthyretin position 30  
mutation (alanine for valine) in a family of German descent.  
*Clin. Genet.* 41, 70-73.
- 34) Nakazato, M., S. Ikeda, K. Shiomi, S. Matsukura, K. Yoshida, H. Shimizu,  
T. Atsumi, K. Kangawa, and H. Matsuo. (1992)  
Identification of a novel transthyretin variant (Val30—Leu) associated  
with familial amyloidotic polyneuropathy  
*FEBS Lett.* 306, 206-208.
- 35) Petersen, RB, H. Goren, M. Cohen, S.L. Richardson, N. Tresser, A. Lynn,  
M. Gall, M. Estes, and P. Gambetti (1997)  
Transthyretin amyloidosis: a new mutation associated with dementia.  
*Ann Neurol.* 41, 307-313.
- 36) Nakazato, M., K. Kangawa, N. Minamino, S. Tawara,  
H. Matsuo, and S. Araki. (1984)  
Revised analysis of amino acid replacement in a prealbumin  
variant (SKO-III) associated with familial amyloidotic polyneuropathy  
of Jewish origin.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 921-928.
- 37) Ii, S., S. Minnerath, K. Ii, P.J. Dyck, and S.S. Sommer. (1991)  
Two-tiered DNA-based diagnosis of transthyretin amyloidosis  
reveals two novel point mutations.  
*Neurology* 41, 893-898.

- 38) Patrosso, M.C., P. Vezzoni, F. Salvi, P. Gobbi, P. Winter, K. Altland, and A. Ferlini (1995)  
Two new mutations in the transthyretin gene leading to polyneuropathy and cardiomyopathy in two unrelated Italian families.  
*In 3rd International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders*, P20
- 39) Reilly, M.M., D. Adams, D.R. Booth, M.B. Davis, G. Said, M. Laubriat-Bianchini, M.B. Pepys, P.K. Thomas, and A.E. Harding. (1995)  
Transthyretin gene analysis in European patients with suspected familial amyloid polyneuropathy.  
*Brain*, 118, 849-856.
- 40) Jones, LA, J.C. Skare, J.A. Harding, A.S. Cohen, A. Milunsky, and M. Skinner. (1991)  
Proline at position 36: a new transthyretin mutation associated with familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Am. J. Hum. Genet.* 48, 979-982.
- 41) Ueno, S, T. Uemichi, N. Takahashi, F. Soga, S. Yorifuji, and S. Tarui (1990)  
Two novel variants of transthyretin identified in Japanese cases with familial amyloidotic polyneuropathy: transthyretin (Glu42 to Gly) and transthyretin (Ser50 to Arg).  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 1117-1121.
- 42) Saraiva, M.J., M. do R. Almeida, W. Sherman, M. Gawinowicz, P. Costa, P.P. Costa, and D.S. Goodman. (1992)  
A new transthyretin mutation associated with amyloid cardiomyopathy.  
*Am. J. Hum. Genet.* 50, 1027-1030.
- 43) Jacobson, R., M.A. Gertz, I. Kane, and J.N. Buxbaum. (1993)  
Genetic analysis of 9 unrelated patients with transthyretin (TTR)-cardiac amyloidosis: Correlation of clinical and genetic findings and description of 2 new TTR variants.  
*Amyloid and Amyloidosis 1993*, 474-476.



- 44) Murakami, T., S. Maeda, S. Yi, S. Ikegawa, E. Kawashima, S. Onodera, K. Shimada, S. Araki. (1992)  
A novel transthyretin mutation associated with familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 520-526.
- 45) Ferlini, A., F. Salvi, C. Patrosso, S. Fini, P. Vezzoni, and A. Forabosco. (1993)  
Gly47Ala: A new transthyretin gene mutation in hereditary amyloidosis TTR-related.  
*J. Rheumatol.* 20, 187.
- 46) Altland, K., M.D. Benson, M. Kruger, R.P. Linke, M.P. Manns, T. Uemichi, and P. Winter. (1995)  
Demonstration of mutant TTR(Ala47) in spinal fluid and its absence in plasma after liver transplantation.  
*In 3rd International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders*, P85
- 47) Booth, D.R., A.K. Soutar, P.N. Hawkins, M. Reilly, A. Harding, and M.B. Pepys. (1993)  
Three new amyloidogenic transthyretin gene mutations: Advantages of direct sequencing.  
*Amyloid and Amyloidosis 1993*, 456-458.
- 48) Almeida, M.R., A. Ferlini, A. Forabosco, M. Gawinowicz, P.P. Costa, F. Salvi, R. Plasmati, C.A. Tassinari, K. Altland, and M.J. Saraiva. (1992)  
Two transthyretin variants (TTR Ala-49 and TTR Gln-89) in two Sicilian kindreds with hereditary amyloidosis.  
*Hum. Mutat.* 1, 211-215.
- 49) Saeki, Y., S. Ueno, N. Takahashi, F. Soga, and T. Yanagihara. (1992)  
A novel mutant (transthyretin Ile-50) related to amyloid polyneuropathy. Single-strand conformation polymorphism as a new genetic marker.  
*FEBS Lett.* 308, 35-37.

- 50) Nishi, H., A. Kimura, H. Harada, Y. Hayashi, M. Nakamura, and T. Sasazuki. (1992)  
Novel variant transthyretin gene (Ser50 to Ile) in familial cardiac amyloidosis.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 460-466.
- 51) Jacobson, D.R., D.E. McFarlin, I. Kane, and J.N. Buxbaum. (1992)  
Transthyretin Pro55, a variant associated with early-onset, aggressive, diffuse amyloidosis with cardiac and neurologic involvement.  
*Hum Genet.* 89, 353-356.
- 52) Nichols, WC, J.J. Liepnieks, V.A. McKusick, and M.D. Benson. (1989)  
Direct sequencing of the gene for Maryland/German familial amyloidotic polyneuropathy type II and genotyping by allele-specific enzymatic amplification.  
*Genomics* 5, 535-540.
- 53) Saeki, Y, S. Ueno, S. Yorifuji, Y. Sugiyama, IY. de, and Y. Matsuzawa. (1991)  
New mutant gene (transthyretin Arg 58) in cases with hereditary polyneuropathy detected by non-isotope method of single-strand conformation polymorphism analysis.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 380-385.
- 54) Booth, DR, S.Y. Tan, P.N. Hawkins, M.B. Pepys, and A. Frustaci. (1995)  
A novel variant of transthyretin, 59Thr-->Lys, associated with autosomal dominant cardiac amyloidosis in an Italian family.  
*Circulation* 91, 962-967.
- 55) Wallace, M.R., F.E. Dwulet, P.M. Conneally, and M.D. Benson. (1986)  
Biochemical and molecular genetic characterization of a new variant prealbumin associated with hereditary amyloidosis.  
*J. Clin. Invest.* 78, 6-12.
- 56) Waits, R.P., T. Uemichi, and M.D. Benson. (1995)  
Haplotype analysis of the transthyretin gene: Evidence for multiple recurrence of the Met30 mutation in the Caucasian population.  
*Amyloid; Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2, 114-118.

- 57) Shiomi, K, M. Nakazato, S. Matsukura, A. Ohnishi, H. Hatanaka, S. Tsuji, Y. Murai, M. Kojima, K. Kangawa, and H. Matsuo. (1993)  
A basic transthyretin variant (Glu61-->Lys) causes familial amyloidotic polyneuropathy: protein and DNA sequencing and PCR-induced mutation restriction analysis.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 1090-1096.
- 58) Almeida, M.R., A. Hesse, A. Steinmetz, B. Maisch, K. Altland, R.P. Linke, M.A. Gawinowicz, M.J. Saraiva. (1991)  
Transthyretin Leu 68 in a form of cardiac amyloidosis.  
*Basic. Res. Cardiol.* 86, 567-571.
- 59) Zeldenrust, S., M. Skinner, J. Harding, J. Skare, and M.D. Benson. (1994)  
A new transthyretin variant (His-69) associated with vitreous amyloid in an FAP family.  
*Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 1, 17-22.
- 60) Izumoto, S., D. Younger, A.P. Hays, R.L. Martone, R.T. Smith, and J. Herbert. (1992)  
Familial amyloidotic polyneuropathy presenting with carpal tunnel syndrome and a new transthyretin mutation, asparagine 70.  
*Neurology* 42, 2094-2102.
- 61) Almeida, M.R., F.L. Andreu, M.M. Ques, P.P. Costa, and M.J. Saraiva. (1993)  
A new transthyretin variant in a Spanish family with familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Hum. Mutat.* 2, 420-421.
- 62) Wallace, M.R., F.E. Dwulet, E.C. Williams, P.M. Conneally, and M.D. Benson. (1988)  
Identification of a new hereditary amyloidosis prealbumin variant, Tyr-77, and detection of the gene by DNA analysis.  
*J Clin Invest.* 81, 189-193.

- 63) Zolyomi, Z., M.D. Benson, K. Halasz, T. Uemichi, and G. Fekete. (1998)  
Transthyretin mutation (Serine 84) associated with familial amyloid  
polyneuropathy in a Hungarian family.  
*Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 5, 30-34.
- 64) Skinner, M., J. Harding, I. Skare, L.A. Jones, A.S. Cohen, A. Milunsky,  
and J. Skare. (1992)  
A new transthyretin mutation associated with amyloidotic vitreous  
opacities. Asparagine for isoleucine at position 84.  
*Ophthalmology* 99, 503-508.
- 65) Yasuda, T., G. Sobue, M. Doyu, M. Nakazato, K. Shiomi, T. Yanagi,  
and T. Mitsuma. (1994)  
Familial amyloidotic polyneuropathy with late-onset and well-preserved  
autonomic function: a Japanese kindred with novel mutant transthyretin  
(Ala97 to Gly).  
*J. Neurol. Sci.* 121, 97-102.
- 66) Jacobson, D.R., M.A. Gertz, and J.N. Buxbaum. (1994)  
Transthyretin VAL107, a new variant associated with familial cardiac  
and neuropathic amyloidosis.  
*Hum. Mutat.* 3, 399-401.
- 67) Nordlie, M., K. Sletten, G. Husby, and P.J. Ravn. (1988)  
A new prealbumin variant in familial amyloid cardiomyopathy  
of Danish origin.  
*Scand. J. Immunol.* 27, 119-122.
- 68) De Lucia, R., A. Mauro, A. Di Scapio, A. Buffo, P. Mortara, L. Orsi,  
and D. Schiffer. (1993)  
A new mutation on the transthyretin gene (Ser112→Ile) causes an  
amyloid neuropathy with severe cardiac impairment.  
*Clin. Neuropathol.* 12, S34



- 69) Ueno, S, T. Uemichi, S. Yorifuji, and S. Tarui. (1990)  
A novel variant of transthyretin (Tyr114 to Cys) deduced from the  
nucleotide sequences of gene fragments from familial amyloidotic  
polyneuropathy in Japanese sibling cases.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 143-147.
- 70) Murakami, T., S. Tachibana, Y. Endo, R. Kawai, M. Hara, S. Tanase,  
and M. Ando. (1994)  
Familial carpal tunnel syndrome due to amyloidogenic transthyretin  
His 114 variant.  
*Neurology* 44, 315-318.
- 71) Saraiva, M.J.M., W. Sherman, C. Marboe, A. Figueira, P.P. Costa,  
A.F. Freitas, M.A. Gawinowicz. (1990)  
Cardiac amyloidosis: Report of a patient heterozygous for  
the transthyretin isoleucine 122 variant.  
*Scand. J. Immunol.* 32, 341-346.
- 72) Uemichi, T., J.J. Liepnieks, and M.D. Benson. (1997)  
A trinucleotide deletion in the transthyretin gene (delta V 122)  
in a kindred with familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Neurology* 48, 1667-1670.
- 73) Salser, W. (1977)  
Globin mRNA sequences: analysis of base pairing and evolutionary  
implications.  
*Cold Spr. Harb. Symp. Quant Biol.* 42, 985-1002.
- 74) Coulondre, C., J.H. Miller, P.J. Farabaugh, W. Gilbert. (1978)  
Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*.  
*Nature* 274, 775-780.
- 75) Bird, A.P. (1980)  
DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA.  
*Nucleic Acids Res.* 8, 1499-1504.

- 76) Barker, D., M. Schafer, R. White. (1984)  
Restriction sites containing CpG show a higher frequency of polymorphism in human DNA.  
*Cell* 36, 131-138.
- 77) Yoshioka, K., H. Furuya, H. Sasaki, M.J.M. Saraiva, P.P. Costa, and Y. Sakaki. (1989)  
Haplotype analysis of familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Hum. Genet.* 82, 9-13.
- 78) Holmgren, G., L. Steen, J. Ekstedt, C.G. Groth, B.G. Ericzon, S. Eriksson, O. Andersen, I. Karberg, G. Norden, M. Nakazato, et al. (1991)  
Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-Met30).  
*Clin. Genet.* 40, 242-246.
- 79) Holmgren, G., B.G. Ericzon, C.G. Groth, L. Steen, O. Suhr, O. Andersen, B.G. Wallin, A. Seymour, S. Richardson, P.N. Hawkins, et al (1993)  
Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis.  
*Lancet* 341, 1113-1116.
- 80) Sasaki, H., M. Nakazato, M.J.M. Saraiva, H. Matsuo, and Y. Sakaki. (1986)  
Generation of transgenic mice producing a human transthyretin variant: a possible mouse model for familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 794-799.
- 81) Wakasugi, S., T. Inomoto, S. Yi, M. Naito, M. Uehira, T. Iwanaga, S. Maeda, K. Araki, J. Miyazaki, K. Takahashi, K. Shimada, and K. Yamamura. (1987)  
A transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Proc. Japan. Acad.* 63, 344-347.

- 82) Terry, C. J., A. M. Damas, P. Oliveira, M. J. Saraiva, I. L. Alves, P. P. Costa, P. M. Matias, Y. Sakaki, and C.C. Blake. (1993)  
Structure of Met30 variant of transthyretin and its amyloidogenic implications.  
*EMBO J.* 12, 735-741.
- 83) Yi, S., K. Takahashi, M. Naito, F. Tashiro, S. Wakasugi, S. Maeda, K. Shimada, K. Yamamura, and S. Araki. (1991)  
Systemic amyloidosis in transgenic mice carrying the human mutant transthyretin (Met30) gene.  
*Am. J. Pathol.* 138, 403-412.
- 84) Yamamura, K., S. Wakasugi, S. Maeda, T. Inomoto, T. Iwanaga, M. Uehira, K. Araki, J. Miyazaki, and K. Shimada. (1987)  
Tissue-specific and developmental expression of human transthyretin gene in transgenic mice.  
*Dev. Genet.* 8, 195-205.
- 85) Shimada, K., S. Maeda, T. Murakami, S. Nishiguchi, F. Tashiro, S. Yi, S. Wakasugi, K. Takahashi, and K. Yamamura. (1989)  
Transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Mol. Biol. Med.* 6, 333-343.
- 86) Nagata, Y., F. Tashiro, T. Murakami, S. Maeda, K. Takahashi, K. Shimada, H. Okamura, and K. Yamamura. (1995)  
The 6 kb upstream region of human transthyretin gene can direct developmental, tissue-specific and quantitatively normal expression in transgenic mouse.  
*J. Biochem. (Tokyo)* 117, 169-175.
- 87) Sakaki, Y, K. Yoshioka, H. Tanahashi, H. Furuya, and H. Sasaki. (1989)  
Human transthyretin (prealbumin) gene and molecular genetics of familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Mol. Biol. Med.* 6, 161-168.

- 88) Kohno, K., J.A. Palha, K. Miyakawa, M.J. Saraiva, S. Ito, T. Mabuchi, W.S. Blaner, H. Iijima, S. Tsukahara, V. Episkopou, M.E. Gottesman, K. Shimada, K. Takahashi, K. Yamamura, and S. Maeda. (1997)  
Analysis of amyloid deposition in a transgenic mouse model of homozygous familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Am. J. Pathol.* 150, 1497-1508.
- 89) Furuya, H., M. J. Saraiva, M. A. Gawinowicz, I. L. Alves, P.P. Costa, H. Sasaki, I. Goto, Y. Sakaki, (1991)  
Production of recombinant human transthyretin with biological activities toward the understanding of the molecular basis of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP).  
*Biochem.* 30, 2415-2421.
- 90) Wright, J.R. (1977)  
Potassium permanganate reaction in amyloidosis.  
*Lab. Invest.* 36, 274-281.
- 91) Sandgren, O., G. Holmgren, and E. Lundgren. (1990)  
Vitreous amyloidosis associated with homozygosity for the transthyretin methionine-30 gene.  
*Arch. Ophthalmol.* 108, 1584-6.
- 92) Holmgren, G., S. Bergstrom, U. Drugge, E. Lundgren, C. Nording-Sikstrom, O. Sandgren, and L. Steen. (1992)  
Homozygosity for the transthyretin-Met30-gene in seven individuals with familial amyloidosis with polyneuropathy detected by restriction enzyme analysis of amplified genomic DNA sequences.  
*Clin. Genet.* 41, 39-41.
- 93) Ikeda, S., T. Nakano, N. Yanagisawa, M. Nakazato, and H. Tsukagoshi. (1992)  
Asymptomatic homozygous gene carrier in a family with type I familial amyloid polyneuropathy.  
*Eur. Neurol.* 32, 308-13.



- 94) Yoshinaga, T., M. Nakazato, S. Ikeda, and A. Ohnishi. (1992)  
Homozygosity for the transthyretin-Met30 gene in three Japanese  
siblings with type I familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Neurology* 42, 2045-7.
- 95) HogenEsch, H., T. A. Niewold, K. Higuchi, P. C. J. Tooten, E. Gruys,  
and J. Radl. (1993)  
Gastrointestinal AAPOAII and systemic AA amyloidosis  
in aged C57BL/Ka mice.  
*Virch. Arch. B Cell Pathol.* 64, 37-43.
- 96) Townes T.M., H.Y. Chen, J.B. Lingrel, R.D. Palmiter  
and R.L. Brinster (1983)  
Expression of human beta-globin genes in transgenic mice: effects of a  
flanking metallothionein-human growth hormone fusion gene.  
*Mol. Cell Biol.* 5, 1977-1983.
- 97) Toyonaga, T., O. Hino, S. Sugai, S. Wakasugi, K. Abe,  
M. Shichiri, and K. Yamamura (1994)  
Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-g  
in the liver.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 614-618
- 98) Palmiter R.D., E.P. Sandgren, M.R. Avarbock, D.D. Allen  
and R.L. Brinster (1991)  
Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 478-482
- 99) Brinster, R.L., J.M. Allen, R.R. Behringer, R.E. Gelinas,  
and R.D. Palmiter. (1988)  
Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 836-840
- 100) Brinster, R.L., H.Y. Chen, M.E. Trumbauer, M.K. Yagle,  
and R.D. Palmiter (1985)  
Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice  
by microinjecting eggs.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4438-4442.

- 101) Qi, S.L., K. Akagi, K. Araki, J. Miyazaki, and K. Yamamura. (1991)  
Rapid identification of transgenic mice with PCR amplification  
of DNA from ear punching.  
*Meth. Mol. Cell. Biol.* 2, 119-122
- 102) Felding, P., G. Fex, P. Westermark, B.O. Olofsson, P. Pitkanen,  
and L. Benson. (1985)  
Prealbumin in Swedish patients with senile systemic amyloidosis  
and familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Scand J Immunol.* 21, 133-140.
- 103) Thylen, C., J. Wahlqvist, E. Haettner, O. Sandgren, G. Holmgren,  
and E. Lundgren. (1993)  
Modifications of transthyretin in amyloid fibrils: analysis of amyloid from  
homozygous and heterozygous individuals with the Met30 mutation.  
*EMBO J.* 12, 743-748.
- 104) Gustavsson, A., U. Engstrom, and P. Westermark. (1991)  
Normal transthyretin and synthetic transthyretin fragments form  
amyloid-like fibrils in vitro.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 1159-1164.
- 105) Martone, R. L., M.D. Benson, J. Herbert. (1991)  
Myelin P2 protein in transthyretin (Ser84) vitreous amyloid.  
Amyloid and amyloidosis 1990.  
Amsterdam, kluwer Academic Publishers, 655-658
- 106) Shamila, S. M., D. Parsonage, A. Claiborne, and W. G. J. Hol. (1995)  
Crystallographic analysis of NADH peroxidase Cys42Ala and Cys42Ser  
Mutants: Active site structures, mechanistic implications, and an unusual  
environment of Arg 303.  
*Biochem.* 34, 6985-6992.
- 107) Smith, C. J., and Marnett, L. J. (1996)  
Effects of Cysteine-to-Serine mutations on structural and functional  
properties of prostaglandin endoperoxide synthase.  
*Arch. Biochem. Biophys.* 335, 342-350.

- 108) Emsley, J., H.E. White, B.P. O'Hara, G. Oliva, N. Srinivasan, I.J. Tickle, T.L. Blundell, M.B. Pepys, and S.P. Wood. (1994)  
Structure of pentameric human serum amyloid P component.  
*Nature* 367, 338-345.
- 109) Murakami, T., S. Yi, S. Maeda, F. Tashiro, K. Yamamura, K. Takahashi, K. Shimada, and S. Araki. (1992)  
Effect of serum amyloid P component level on transthyretin-derived amyloid deposition in a transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy.  
*Am. J. Pathol.* 141, 451-456.
- 110) Iwanaga, T., S. Wakasugi, T. Inomoto, M. Uehira, S. Ohnishi, S. Nishiguchi, K. Araki, M. Uno, J. Miyazaki, S. Maeda, K. Shimada, and K. Yamamura. (1989)  
Liver-specific and high-level expression of human serum amyloid P component gene in transgenic mice.  
*Dev. Genet.* 10, 365-371.
- 111) Tashiro, F., S. Yi, S. Wakasugi, S. Maeda, K. Shimada, and K. Yamamura. (1991)  
Role of serum amyloid P component for systemic amyloidosis in transgenic mice carrying human mutant transthyretin gene.  
*Gerontology* 37(Suppl. 1), 56-62.
- 112) Ando, Y., N. Nyhlin, O. Suhr, G. Holmgren, K. Uchida, M. el Sahly, T. Yamashita, H. Terasaki, M. Nakamura, M. Uchino, and M. Ando. (1997)  
Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 497-502.
- 113) Sakashita, N., Y. Ando, T. Yamashita, H. Terazaki, M. Ohbayashi, M. Ando, K. Tajima, M. Uchino, and K. Takahashi. (1998)  
Familial amyloidotic polyneuropathy type I with extracellular superoxide dismutase mutation: a case report.  
*Human Pathol.* 29, 1169-1172.

- 114) Takaoka, Y., H. Ideguchi, M. Matsuda, N. Sakamoto, T. Takeuchi,  
and Y. Fukumaki. (1994)  
A novel mutation in the erythrocyte protein 4.2 gene of Japanese  
patients with hereditary spherocytosis (protein 4.2 Fukuoka).  
*Br. J. Haematol.* 88, 527-533.
- 115) Palmiter, R.D., and R.L. Brinster. (1986)  
Germ-line transformation of mice.  
*Annu. Rev. Genet.* 20, 465-499.
- 116) Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini, and E. Lacy. (1994)  
Manipulating the mouse embryo. (second edition)  
*Cold Spring Harbor Lab.*, 1994.
- 117) 野村達次、勝木元也. (1987)  
発生工学実験マニュアル-トランスジェニックマウスの作り方-  
講談社サイエンティフィック
- 118) Isobe S., Chen S.T., Nakane P.K. & Brown W.R. (1977)  
Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal  
epithelium. 1.Improvements in the peroxidase-labeled antibody method  
for application to study of human intestinal mucosa.  
*Acta. Histochem. Cytochem.* 10, 161-171.



## 論文目録

本論文の研究内容の一部は、以下の論文として発表された。

Takaoka Y., F. Tashiro, S. Yi, S. Maeda, K. Takahashi, Y. Sakaki  
and K. Yamamura: Comparison of amyloid deposition in two lines of  
transgenic mouse that model familial amyloidotic polyneuropathy, type I.  
*Transgenic Research* **6** (4), 261-269, 1997



