

論文の内容の要旨

獣医学 専攻
平成23年度博士課程 入学
氏名 渡邊 謙一
指導教員名 中山 裕之

論文題目 実験的 AA アミロイドーシスの病理発生と伝達性に関する研究

AA アミロイドーシスは急性期炎症蛋白である serum amyloid A (SAA)が細線維状に凝集し、AA アミロイドとして全身に蓄積する難治性疾患である。AA アミロイドーシスは血中 SAA 値の持続的高値によって起こることから、ヒトでは結核や関節リウマチなどの慢性炎症性疾患に続発する。AA アミロイドーシスの病理発生に関しては不明な点が多く、基礎疾患のコントロールにより病状の進行を遅らせることは可能であるものの、根本的な治療法は確立されていない。AA アミロイドーシスは硝酸銀やアゾカゼイン等をマウスに皮下投与することで実験的に作出可能である。しかしながら、実験的に作出した AA アミロイドーシスではアミロイド沈着が主に脾臓や肝臓に限局すること、炎症刺激の中止により一過性に沈着したアミロイドが消失することなど、自然例の病態を忠実に再現できない。そのため、この実験モデルは主に生物アッセイのツールとして利用されており、剖検時における AA アミロイド沈着の有無以外、病態に関する考察が殆どなされていない。

実験的 AA アミロイドーシスでは、AA アミロイド沈着臓器の乳剤を投与することで、発症までの期間を劇的に短縮することが可能である。この乳剤や臓器か

ら抽出した AA アミロイドを amyloid-enhancing factor (AEF) と称し、微量の AEF によって AA アミロイドーシスを誘発出来ること、AEF は熱処理や酵素処理などによっても活性を失わないことなどが明らかとなり、病原性プリオンと同様に動物からヒトへの AA アミロイドーシスの伝達が懸念されるようになった。AEF を用いた本実験系はアミロイドーシスの発症メカニズムを解明する上でも極めて重要である。そこで本研究では AEF を用いた実験的アミロイドーシスモデルの病態を解析することにより、AA アミロイドーシスの詳細な病理発生と伝達機構を解明することを目的とした。

第 1 章では、実験的アミロイドーシスモデルにおける Interleukin-1 receptor antagonist knock out マウス(IL-1raKO)の有用性を検討した。BALB/c を遺伝的背景に持つ IL-1raKO はヒトの関節リウマチ様の慢性関節炎を自然発症し、平常時の SAA 値が BALB/c の約 10 倍と高値を示す。この IL-1raKO に硝酸銀水溶液と AEF を投与し、AA アミロイドーシスを誘発したところ、重度の AA アミロイド沈着がみとめられた。そこで、同様の手技により AA アミロイドーシスを誘発し、誘発処置から 60 日間の AA アミロイド沈着量およびその分布、SAA 値の経時変化を BALB/c と比較した。IL-1raKO、BALB/c ともに処置後 2 日目より脾臓、肝臓、小腸回盲部に AA アミロイド沈着を認めた。アミロイド沈着量は 20 日目に最大となり、IL-1raKO では 20 日以降も沈着量は高値を維持したが、BALB/c では 20 日目以降、沈着量は著しく低下した。IL-1raKO では 35 日目以降、脾臓や肝臓における沈着量の低下を認めたが、同時期から腎臓、甲状腺、副腎等多数の臓器における沈着量が増加した。BALB/c の半数では 60 日以内にアミロイドがほぼ消失した。SAA 値は両群ともに 1 日目が正常値の約 1000 倍と最も高く、20 日目にはほぼ平常値まで低下した。実験開始から 5 日目以降、IL-1raKO の SAA 値は BALB/c よりも有意に高値を示した。IL-1raKO は SAA の基礎値が高いことに加え、SAA 値の低下が緩徐であることから、BALB/c では再現困難であった全身性の AA アミロイドーシスの病態を再現できることがわかった。

実験的 AA アミロイドーシスモデルでは、AA アミロイドの分解過程における再刺激によってさらに多量の AA アミロイドが再沈着することが報告されている。第 2 章では AA アミロイドの分解過程における各臓器の組織学的変化および血清中の SAA オリゴマー量をもとに AA アミロイドの分解機序について考察した。肝臓、脾臓に沈着した AA アミロイドは血液流路の上流側では沈着量が減少し、下流側では沈着量が増加した。最終的にアミロイドは血管周囲に限局した。また、血中の SAA オリゴマーは AA アミロイドの沈着が始まる誘発処置後 2 日目に増加し、60 日目まで高値を維持した。アミロイドの消失が進行する 45 日目

降の血清中では SAA ダイマーが検出された。また、誘発処置後 5,10,35 および 50 日に硝酸銀水溶液投与による再刺激を行ったところ、再刺激の翌日にはすべての個体において沈着量の顕著な増加を認めた。沈着量の増加率は 35 日目に再刺激を行ったマウスで最も高かった。これらの知見から、再刺激によるアミロイド沈着では既に広域に分布している SAA オリゴマーを核としてアミロイドが沈着したものと考えられた。本章の結果から、AA アミロイドーシスの進行過程において血液中の SAA モノマー、オリゴマー、および組織に沈着した AA アミロイドの 3 者が常に平衡状態にあり、これらの平衡が傾くことでアミロイドの沈着と分解が生じると考えられた。

実験的アミロイドーシスにおける AA アミロイド沈着は脾臓濾胞辺縁帯 (marginal zone: MZ) に始まる。マウスの MZ には脾動脈の分枝が開口し、血中抗原を捕捉する MZ macrophage (MZMs), MZ metallophilic macrophage (MZMMs) および MZ B cell が分布するが、AA アミロイドーシスを誘発したマウスではアミロイド沈着と同時期に MZMs が消失することが知られている。また、静脈内に投与された AEF は一旦 MZ に集積し、アミロイド沈着前に代謝されることから、MZMs の消失と AA アミロイドーシス発症との関連が疑われている。第 3 章では AA アミロイド沈着に伴う MZ の組織学的変化を経時観察した。MZMs および MZMMs については、それぞれに特異的な細胞マーカーを用いて蛍光免疫染色を行い、陽性面積による定量を行った。MZMs および MZ B cell はアミロイド沈着が始まる誘発処置 2 日目以降、沈着量の増加とともに減少し、処置後 10 日にはほぼ消失した。アミロイド沈着量が減少し、沈着巣が粗鬆化する 35 日目には MZMs および MZ B cell が再び MZ に出現した。MMMs はアミロイド沈着の影響を受けなかった。これらの結果より、MZMs および MZ B cell の挙動はアミロイド沈着および消失に付随する二次的な変化であり、疾患の発症機序との関連性は乏しいものと推察された。

第 4 章ではウシおよびネコ由来の AA アミロイドのマウスへの伝達性について検討した。AA アミロイドが沈着したウシおよびネコの肝臓乳剤を作製し、これらと硝酸銀とを IL-1raKO および BALB/c に投与し、AA アミロイドーシスを誘発した。誘発処置から 20 日目のウシアミロイド投与群 (cow 群) およびネコアミロイド投与群 (cat 群) におけるアミロイド沈着率および沈着量はマウス AA アミロイドを投与した場合よりも低値を示した。免疫染色の結果から、沈着したアミロイドはマウス SAA 由来であり、ウシおよびネコ AA アミロイドは検出できなかった。IL-1raKO は BALB/c と比較し、高率に異種間における AA アミロイドーシス伝達を再現可能であった。IL-1raKO について、誘発から 60 日目までのアミロイ

ド沈着の過程を経時観察したところ、cat 群では、5 日目と 10 日目、45 日目以降では全ての個体で AA アミロイド沈着が認められ、特に 45 日目以降では重度のアミロイド沈着を認めた。cow 群ではいずれのタイミングにおいてもアミロイド沈着は軽度であった。さらに第 2 章同様、誘発後 50 日目において再刺激を行った結果、cow 群、cat 群ともに AA アミロイドの重度の再沈着が認められた。これらの結果から、異種由来の AA アミロイドの投与によって誘発される AA アミロイド沈着は軽度であるが、このアミロイドが分解されることで同種間伝達と同様に AA アミロイドーシスが進行することが示された。

IL-1raKO を用いた実験モデルでは、血中 SAA 値の低下が緩やかであることに加え、単回の炎症刺激により十分な量のアミロイドが沈着することから、病態の進行過程を追跡することが可能であった。本研究で得られた新しい知見からも、IL-1raKO が AA アミロイドーシスの病態解析において有効なツールであることが示された。これまで、実験的アミロイドーシスにおける AA アミロイドの分解はマクロファージによる貪食によると考えられてきたが、本研究の結果からは、沈着した AA アミロイドの大部分は SAA オリゴマーに分解されて血中へと溶出するものと推察された。脾臓 MZ や肝臓ディッセ腔に沈着した AA アミロイドに比べ、毛細血管壁や細網線維に微量に沈着したアミロイドは分解除去されにくかったことから、長期の経過をたどる自然例の AA アミロイドーシスではアミロイドの沈着と分解とを繰り返すことで沈着パターンが変化し、病状末期には糸球体毛細血管や消化管粘膜下織などへ重度にアミロイドが沈着するものと推察される。今回 AA アミロイドの伝達機序を完全に解明するには至らなかったが、異種動物間における伝達と同種動物間における伝達との間で、病態の進行過程に違いはみられなかった。このことから両者の違いは AEF の投与から AA アミロイド沈着が始まるまでのごく短い間に生じると考えられた。