

特別講演

アミロイド線維の伝播とアミロイドーシスの発症

樋口 京一*

[Key Words] アミロイドーシス、伝播、マウス、全身性、限局性、神経変性疾患

はじめに

アミロイドという言葉は初めて用いたのは、ドイツの病理学者 Virchow で、1854 年に臓器に沈着する奇妙な物質がデンプンに似た反応を示すことから、アミロイド (amyloid: 類澱粉質) と命名した。その後アミロイドやアミロイドが沈着する疾患であるアミロイドーシスの実態は長らく不明であった。しかし、コンゴレッド染色後の特徴的な緑色偏光や、電子顕微鏡での微細な線維という形態学的特性が明らかになり、アミロイドの本態はクロスβ構造を持つ蛋白質が線維状に重合したアミロイド線維であることが解明された。すなわちアミロイドーシスとは、アミロイド線維と呼ばれる微細線維に重合した異常構造蛋白質の沈着が、臓器に障害を引き起こす一群の疾患群である (図 1)。アミロイドーシスは線維を形成するアミロイド蛋白質 (前駆蛋白質) の種類に基づいて、現在までに 30 種類以上が報告されており¹⁾、その数は今後さらに増大すると考えられている (表 1)。アミロイドーシスはアミロイド線維が全身の臓器に沈着する全身性アミロイドーシスと、ある臓器に限って沈着する限局性アミロイドーシスに分けることができる。全身性アミロイドーシスの代表的なものとしては、AL, AA, 透析アミロイドーシス、家

族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) などがある。限局性アミロイドーシスとしてはアルツハイマー病 (AD) や感染性を持つプリオン病が代表例である。アミロイドーシスにおける伝播現象 (アミロイド線維が鋳型: seed となって、アミロイド蛋白質の構造変化と線維への重合を促進する) が、全身性アミロイドーシスや脳アミロイドーシス (AD、パーキンソン病などの神経変性疾患) の発症や進展に共通したメカニズムである可能性が注目を集めている (図 1)。

I. マウス AApoAII アミロイドーシスの伝播

アミロイドーシスはヒト以外の動物でも報告されている (表 2)。マウスでは、加齢にともない血清高密度リポ蛋白質 (HDL) のアポ蛋白質であるアポ A-II (ApoA-II) がアミロイド線維 (AApoAII) に重合し、脳実質以外の全身組織の細胞外に沈着する。特に肝臓、脾臓、心臓等での沈着が特徴的で、これらの臓器の肥大や、腎臓では萎縮を引き起こす²⁾。

ApoA-II は主として肝臓で合成されるコレステロール運搬等の生理的な機能を持つ血中蛋白質であり、アポ A-I、アポ E、アポ C-II 等と HDL を形成している。マウスでは最低 7 つの主要な対立遺伝子 (A, B, C, ..., F) の各アリルでアミノ酸配列が

*信州大学医学系研究科疾患予防医科学系加齢生物学 keiichih@shinshu-u.ac.jp

アミロイド

1. コンゴレッド染色でピンク色に染まり、偏光顕微鏡下で緑色偏光を呈する
2. 電子顕微鏡で微細線維構造(アミロイド線維)を観察する

アミロイド線維

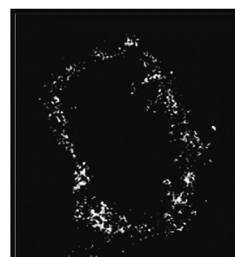
1. 幅~10 nmの原則として直線上の枝分かれのない線維構造
2. β -sheet 構造に富む
3. Thioflavine T と結合し特異的蛍光を発する
4. Seeding反応による線維伸長

アミロイドーシス

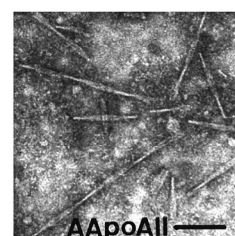
1. アミロイドが沈着することによって発症する疾患
2. 主に加齢に伴い沈着する代表的な変性疾患
3. 一部のアミロイドーシスでは伝播(プリオン類似)が示唆される

アミロイドーシスの歴史

1. 1854年 Virchow: 類デンプン様無構造物質 (Amyloid)
2. 1980年 Glenner: 線維構造蛋白質 (β -fibrilloses)
3. 1976年 Gajdusek, 1997年 Prusiner: ノーベル賞 (伝播性蛋白質)



マウス脾臓に沈着したAAアミロイドのコンゴレッド染色/偏光顕微鏡像(緑色偏光)



高齢マウス肝臓から採取したAApoAIIアミロイド線維の電子顕微鏡像
(Scale bar は 100 nm)

図1 アミロイドとアミロイドーシス

異なる)が存在し、それぞれのアミロイドを持つ系統ではアミロイドーシスの発症程度や沈着臓器が異なり、C型ApoA-IIを持つ系統では重度のアミロイド沈着が観察されるが、B、F型のApoA-IIを持つ系統ではほとんど発症しない³⁾。しかしアミロイド沈着は飼育環境や飼料等の影響も大きいことも報告されている。

多くの種類のアミロイド蛋白質を試験管内で37℃で反応させると、アミロイド線維が検出されるまでのラグタイムと、その後の急速な線維形成からなるシグモイド型の曲線を示す(図2-A)。このようなアミロイド線維形成動態を説明するモデルとして、重合核形成過程と線維伸長反応よりなる「重合核依存性重合モデル」が提唱されている⁴⁾。重合核形成は非常に起こり難い反応であるが、重合核が鋳型(Seeds)として働き、アミロイド蛋白質をその線維末端に追加しながら伸張していく、線維伸張反応は重合核形成よりもはるかに早い反応である。すなわち、最初のラグタイムが重合核形成反応、急速な線維形成が伸張反応にそれぞれ対

応する。注目すべきは、反応液に既存のアミロイド線維(重合核)を添加すると、ラグタイムが消失して速やかに線維形成が起こる(Seeding反応)ことである。Seeding反応は、プリオンで提唱され、プリオンによる感染の基本メカニズムと考えられている。

試験管内でApoA-II蛋白質溶液にAApoAIIアミロイド線維を添加すると、急速な伸張反応(Seeding反応)が観察される。我々は同様な現象が生体でも観察されること(伝播現象)を明らかにした⁵⁾。微量のAApoAIIアミロイド線維を静脈内($>10^{-12}$ g/マウス)、腹腔内($>10^{-8}$ g/マウス)、胃内($>10^{-6}$ g/マウス)へ投与すると、アミロイドーシスの発症を著しく促進し、その効果はDNAase、RNAaseなどの処理では変化しないが、6M塩酸グアニジンや蟻酸処理で線維構造を壊すと消失するなど、プリオンの伝播に類似している。さらに、アミロイドーシスを発症したマウスと同一ケージで飼育したマウスでは糞中のアミロイド線維を介して⁶⁾、アミロイドーシスを発症している母から生まれたマ

表 1 アミロイド蛋白質とアミロイドーシス

アミロイド線維	前駆蛋白質	全身性(S) 限局性(L)	後天的(A) 家族性(H)	アミロイドーシス
AL	免疫グロブリン L 鎖	S, L	A, H	AL アミロイドーシス
AH	免疫グロブリン H 鎖	S, L	A, H	AH アミロイドーシス
AA	血清アミロイド A(SAA)	S	A	反応性 AA アミロイドーシス
ATTR	トランスサイレチン (変異型)	S, L	H	家族性 TTR アミロイドーシス(I, II 型 家族性アミロイドーシスポリニューロ パチー : FAP)
ATTR	トランスサイレチン (正常型)	S, L	A	正常型 TTR アミロイドーシス(老人性 全身性アミロイドーシス : SSA)
A β 2M	β 2 ミクログロブリン	S, L	A, H	透析アミロイドーシス
AApoAI	アポリポ蛋白質 A-I(変異型)	S	H	家族性 ApoA-I アミロイドーシス(III 型 FAP)
AApoAII	アポリポ蛋白質 A-II(変異型)	S	H	家族性 ApoA-II アミロイドーシス
AApoAIV	アポリポ蛋白質 A-IV	S	A	加齢関連アミロイドーシス
AGel	ゲルソリン(変異型)	S	H	フィンランド型 FAP(VI 型 FAP)
ALys	リゾチーム(変異型)	S	H	家族性腎アミロイドーシス
ALECT2	Leukocyte Chemotactic Factor-2	S	A	腎アミロイドーシス
AFib	フィブリノーゲン α 鎖 (変異型)	S	H	家族性腎アミロイドーシス
ACys	シスタチン C	S	H	遺伝性アミロイド脳血管アミロイドー シス(アイスランド型)
ABri	ABri 前駆蛋白質	L	H	家族性英国型認知症
ADan	ADan 前駆蛋白質	L	H	家族性デンマーク型認知症
A β	A β 前駆蛋白質(A β PP)	L	A, H	アルツハイマー病、脳血管アミロイ ドーシス
APrP(PrPSc)	プリオン蛋白質(PrPc)	L	A, H	プリオン病
ACal	プロカルシトニン	L	A	甲状腺髄様癌
AIAPP	Islet amyloid polypeptide (アミリン)	L	A	II 型糖尿病・インスリノーマに関連
AANF	心房ナトリウム利尿因子	L	A	限局性心房性アミロイドーシス
APro	プロラクチン	L	A	加齢性、下垂体腺腫アミロイドーシス
AIns	インスリン	L	A	医原性アミロイドーシス(注射)
ASPC	Lung Surface Protein	L	A	肺アミロイドーシス
AGal7	ガレクチン 7	L	A	皮膚アミロイドーシス
ACor	コルネオデスモシン	L	A, H	皮膚アミロイドーシス、毛嚢
AMed	ラクタドヘリン(Medin)	L	A	大動脈(中膜)アミロイドーシス
AKer	ケラトエピセリン	L	A, H	角膜アミロイドーシス
ALac	ラクトヘリン	L	A	角膜アミロイドーシス
ASemI	セメノゲリン I	L	A	高齢者精嚢アミロイドーシス
AOAAP	歯原性エナメル芽細胞 関連蛋白質	L	A	歯原性腫瘍随伴アミロイドーシス
AEnf	エンフルピチド (抗 HIV ペプチド)	L	A	医原性アミロイドーシス(注射)

表 2 動物のアミロイドーシス

アミロイド線維	前駆蛋白質	全身性(S) 限局性(L)	アミロイドーシス	動物種
AL	免疫グロブリン L 鎖	S, L	AL アミロイドーシス (形質細胞腫)	猫、馬
AA	血清アミロイド A(SAA)	S	反応性 AA アミロイドーシス	マウス、猫、牛、犬、 家禽、チータ、モル モット、その他
ATTR	トランスサイレチン	S	加齢性全身性アミロイドーシス	猿 (Vervet monkey)
AApoAI	アポリポ蛋白質 A-I	S	加齢性全身性アミロイドーシス	犬
AApoAII	アポリポ蛋白質 A-II	S	加齢性全身性アミロイドーシス	マウス
AFib	フィブリノーゲン A α 鎖	S	脾、肝アミロイドーシス	ムナジロテン
A β	A β 前駆蛋白質 (A β PP)	L	加齢性脳アミロイドーシス	犬、羊、クズリ、猫
APrP (PrPSc)	プリオン蛋白質 (PrPc)	L	プリオン病	牛、鹿、羊
AIAPP	Islet amyloid polypeptide (アミリン)	L	II 型糖尿病・インスリノーマ に関連	猿、猫、アライグマ
AIns	インスリン	L	膵臓アミロイドーシス	デグー (<i>Octodon degus</i>)
ACas	A-S2C カゼイン	L	乳腺	乳牛

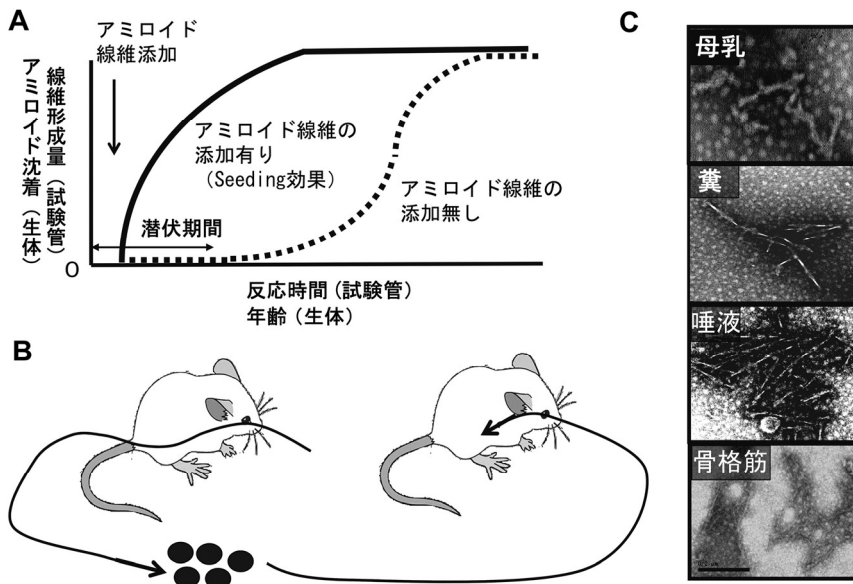


図 2 重合核依存性重合モデル (Seeding 反応) によるアミロイドーシスの伝播

ウスでは母乳中のアミロイド線維を介して⁷⁾、アミロイドーシスが促進されることが明らかになった。すなわちプリオン以外のアミロイドーシスで、初めて個体レベルでの伝播が確認された。さらに唾液中や骨格筋中にもアミロイド線維が含まれて

いることが明らかになり⁸⁾、これらのアミロイド線維を投与するとアミロイドーシスが誘発された。これらの結果は、様々な経路によるアミロイド線維の摂取によってアミロイドーシスが伝播する可能性を強く示唆している(図 2-B, C)。さらに

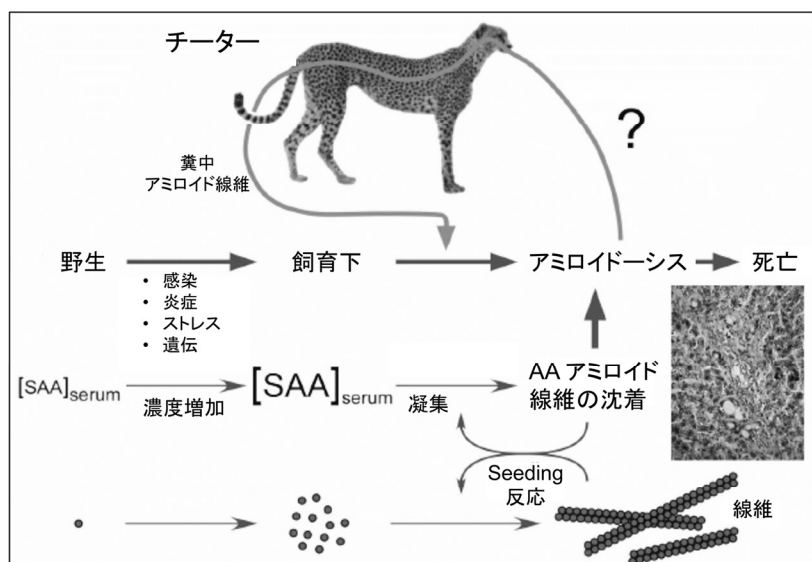
AApoAII アミロイドーシスでは動物種や種類の異なるアミロイド線維の投与によってもアミロイドーシスが誘発される、いわゆる「cross-seeding 効果」が認められる⁹⁾。

II. AA アミロイドーシスの伝播

プリオン病以外のアミロイドーシスにおける伝播現象の重要性を最初に指摘したのは、我々 (AApoAII アミロイドーシス) と Westermarck らによる AA アミロイドーシスのモデル動物を用いた研究である。急性期蛋白質である血清アミロイド A (SAA) は炎症に伴い血中濃度が急激に上昇し、高濃度が維持されるとアミロイド線維 (AA) を形成し全身に沈着する。ほとんどの SAA は HDL 中に存在するが、HDL から解離した SAA が AA 線維に重合して沈着すると考えられている。SAA の機能の詳細はまだ不明であるが、進化的に良く保存された蛋白質で、ヒトを含む多くの動物種で AA アミロイドーシスが観察される (表 2)。関節リウマチ患者のアミロイドーシス発症頻度は低い (10-25%) が、一旦沈着が始まると急速に進行することから、沈着を誘発する物質 (アミロイド促進因

子; amyloid enhancing factor、略して AEF) の存在が長らく議論されてきた。マウスを用いた実験的 AA アミロイドーシスでも AEF の存在が古くから報告されていたが、Westermarck らは AEF の主要な成分は AA アミロイド線維であることを示し、AA アミロイドーシスでもプリオン類似の伝播が起こることを報告した¹⁰⁾。

動物園などで飼育されているチーター (*Acinonyx jubatus*) では、慢性胃腸炎に伴う AA アミロイドーシスの罹患率が急上昇し、飼育集団内での AA アミロイドーシスの伝播の可能性が考えられた。アミロイドーシスを発症したチーターの糞中には、肝臓に沈着したアミロイド線維より細く、脆弱な構造を持つアミロイド線維が観察され、この線維は肝臓沈着線維よりも短い SAA 蛋白質断片からなることが報告された¹¹⁾。マウスの実験的 AA アミロイドーシスを用いてこの糞中 AA 線維は、肝臓線維と比較して伝播性が有意に強いことが示された。これらの結果より、体外に排出された伝播性の強い糞中アミロイド線維を、別の個体が摂取することで、AA アミロイドーシスが伝播する可能性が示された (図 3)。公営屠殺場で処理された



Byron Caughey and Gerald S. Baron: Proc Natl Acad Sci USA (2008) 105: 7113-7114 を改変

図 3 飼育下チーターでの糞を介した AA アミロイドーシスの伝播仮説

外見上健康に見える4歳以上の高齢牛の腎臓を検索した結果、約5%の頻度でAAアミロイドの沈着が発見された¹²⁾。ウシの腎臓から精製したAAアミロイド線維は、炎症を惹起したウサギやマウスに投与すると、AAアミロイドーシスを誘発することから、ウシAAアミロイドーシスが種の壁を越えて伝播可能であることが示唆された¹³⁾。さらに家禽類での自然発症やワクチン接種によるAAアミロイドーシスの発症が報告され、AAアミロイド線維の経口投与による伝播が報告されている¹⁴⁾。

限られた条件の中では、動物の個体間でAAアミロイドーシスの伝播が起こる可能性が示されているが、ヒトでの伝播の可能性に関しては、明らかになっていない。

III. 脳アミロイドーシスの伝播

A β が試験管内で核形成依存性重合モデルに従ってアミロイド線維を形成することは良く知られていたが、アルツハイマー病で伝播が起こるといふ報告は、少数の霊長類での研究以外にはなかった¹⁵⁾。しかし最近アルツハイマー病のモデルマウスを用いて、その可能性が示唆されるようになった。ヒトのAPPを発現する各種のトランスジェニック(Tg)マウスでは脳実質や血管壁へのA β アミロイド沈着が観察される。このようなTgマウスの脳内にAD患者脳やA β が沈着したTgマウス脳のホモジネートを投与すると、A β アミロイド沈着が促進された。この場合、A β 沈着の無いコントロール患者やマウスの脳のホモジネートや、A β を免疫沈降で除いたホモジネートを投与しても沈着の促進は起こらなかった。これらの実験結果より、A β 蛋白質でも伝播(Seeding)現象が成り立つ可能性が示唆された¹⁶⁾。さらに、脳抽出物を末梢である腹腔内に投与しても、また不溶性のアミロイド線維だけでなく、可溶性で、低分子のA β 断片でも伝播が起こること、脳内へ投与した部位から他の領域へとA β の沈着が拡散して行くことが報告されている。

最近になって、多くの研究報告が、アミロイド様の蛋白質凝集体が細胞内に沈着する複数の神経

変性疾患においても、伝播(Seeding)が病態の進展に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。タウ(tau)、 α シヌクレイン(α -synuclein)、SOD1 (superoxide dismutase 1)、TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43)、Fus (fused in sarcoma)、ポリグルタミン鎖異常伸長蛋白質(polyglutamin expansion proteins)等の蛋白質がプリオン様性質(伝播性)を示すことが報告され、多くの総説も書かれている^{17, 18)}。

おわりに

マウスApoA-IIのN末端(6-16)とC末端(48-65)のペプチドが相互に作用して、重合核依存性重合モデルに従い、アミロイド線維を形成することが明らかになった¹⁹⁾。これらのペプチドはアミノ酸一次構造からアミロイド線維形成特性を予測するアルゴリズムで計算された線維形成コア領域とほぼ一致する。また、この試験管での線維形成解析システムを用いて得られた線維抑制ペプチドは、生体でのAApoAIIアミロイドーシスの進展を抑制した²⁰⁾。これらの報告から、マウスAApoAIIアミロイドーシスは、アミロイドーシスの伝播の基本メカニズムや伝播経路、抑制方法解明のための、優れた生体および分子レベルでの、解析システムであることが判る。

最近の病態学、蛋白質化学など様々な分野の研究によってアミロイドーシスの伝播現象の基礎的理解が進んでいるが、伝播現象が各種のアミロイドーシスや神経変性疾患患者での発症や進行に及ぼす影響については、まだはっきりとした疫学的な証拠はなく、不明な点が多い。動物モデルから得られた知見を中心として全身性アミロイドーシスにおける伝播やそのメカニズム、さらにはその治療法に関する研究の発展が望まれる。

文 献

- 1) Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJ, Westermarck P. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid* 2014; 21: 221-4.
- 2) Higuchi K, Yonezu T, Kogishi K, Matsumura A,

- Takeshita S, Higuchi K, et al. Purification and characterization of a senile amyloid-related antigenic substance (apoSASSAM) from mouse serum. apoSASSAM is an apoA-II apolipoprotein of mouse high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1986; 261: 12834-40.
- 3) Kitagawa K, Wang J, Mastushita T, Kogishi K, Hosokawa M, Fu X, et al. Polymorphisms of mouse apolipoprotein A-II: seven alleles found among 41 inbred strains of mice. *Amyloid* 2003; 10: 207-14.
 - 4) Naiki H, Nagai Y. Molecular pathogenesis of protein misfolding diseases: pathological molecular environments versus quality control systems against misfolded proteins. *J Biochem* 2009; 14: 751-6.
 - 5) Naiki H, Higuchi K, Nakakuki K, Takeda T. Kinetic analysis of amyloid fibril polymerization in vitro. *Lab Invest* 1991; 65: 104-10.
 - 6) Xing Y, Nakamura A, Chiba T, Kogishi K, Matsushita T, Li F, et al. Transmission of mouse senile amyloidosis. *Lab Invest* 2001; 81: 493-9.
 - 7) Korenaga T, Yan J, Sawashita J, Matsushita T, Naiki H, Hosokawa M, et al. Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am J Pathol* 2006; 168: 898-906.
 - 8) Qian J, Yan J, Ge F, Zhang B, Fu X, Tomozawa H, et al. Mouse senile amyloid fibrils deposited in skeletal muscle exhibit amyloidosis-enhancing activity. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000914.
 - 9) Fu X, Korenaga T, Fu L, Xing Y, Guo Z, Matsushita T, et al. Induction of AApoAII amyloidosis by various heterogeneous amyloid fibrils. *FEBS Lett* 2004; 563: 179-84.
 - 10) Lundmark K, Westermark GT, Nyström S, Murphy CL, Solomon A, Westermark P. Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6979-84.
 - 11) Zhang B, Une Y, Fu X, Yan J, Ge F, Yao J, et al. Fecal transmission of AA amyloidosis in the cheetah contributes to high incidence of disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 7263-8.
 - 12) Tojo K, Tokuda T, Hoshii Y, Fu X, Higuchi K, Matsui T, et al. Unexpectedly high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. *Amyloid* 2005; 12: 103-8.
 - 13) Murakami T, Inoshima Y, Watanabe K, Kobayashi Y, Matsui T, Kurazono H, Ishiguro N. Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore hocks-affected rabbits. *Amyloid* 2011; 18: 112-8.
 - 14) Murakami T, Ishiguro N, Higuchi K. Transmission of systemic AA amyloidosis in animals. *Vet Pathol* 2014; 51: 363-71.
 - 15) Baker HF, Ridley RM, Duchon LW, Crow TJ, Bruton CJ. Evidence for the experimental transmission of cerebral beta-amyloidosis to primates. *Int J Exp Pathol* 1993; 74: 441-54.
 - 16) Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, et al. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 2006; 313: 1781-4.
 - 17) Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 2013; 501: 45-51.
 - 18) Prusiner SB. Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu Rev Genet* 2013; 47: 601-23.
 - 19) Sawashita J, Kametani F, Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Zhang B, Yan J, et al. Amyloid fibrils formed by selective N-, C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794: 1517-29.
 - 20) Sawashita J, Zhang B, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Kametani F, Higuchi K. C-terminal sequence of amyloid-resistant type F apolipoprotein A-II inhibits amyloid fibril formation of apolipoprotein A-II in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: E836-45.