

## アミロイドーシスの発症機構に関する研究

### Studies on the pathological process of amyloidosis

代表研究者	熊本大学医学部教授 Prof., Kumamoto Univ., School of Med. Ken-ichi YAMAMURA	山 村 研 一
協同研究者	熊本大学医学部助教授 Assoc. Prof., Kumamoto Univ., School of Med. Jun-ichi MIYAZAKI	宮 崎 純 一
	熊本大学医学部助手 Assist. Prof., Kumamoto Univ., School of Med. Fumi TASHIRO	田 代 文

Amyloidosis comprises of heterogenous group of disorder characterized by extracellular or intracellular deposition of amyloid fibrils which may be distinguished biochemically or immunohistochemically. Main component of amyloid fibrils have been identified and are different in each type of amyloidosis. Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) is an autosomal dominant disease and is characterized by systemic amyloidosis leading to prominent peripheral and autonomic nerve involvement. The age at onset is at around 20 to 45 years, and the disease is progressive and fatal within 10 to 20 years. The main component of amyloid fibrils has been shown to be the mutant transthyretin (TTR) molecule which is deposited together with a minor component, amyloid P component (AP). In most cases of Japanese type the valine at position 30 was replaced with methionine. Several other mutations have been found in other countries. This amino acid substitution is thought to lead to amyloid deposition. The genes encoding for both normal and mutant molecules have been isolated and the sequence analysis revealed the nucleotide change corresponding to the amino acid substitution. As the new restriction site for NsiI is created by this point mutation, it is now possible to carry out DNA diagnosis. So far examined in Japan, most FAP patients are heterozygotes, that is, they carry one normal and one mutant allele suggesting that the main cause of this disease is the presence of the mutant TTR gene. However, many questions remain to be elucidated. For example, there is more than 40 years difference at the age of onset suggesting that factor(s) other than the mutant gene is involved in the development of this disease. In order to dissect the pathological process of this disease development and to devise a new way of treatment, we have attempted to establish a transgenic mouse model by introducing the human genes related to amyloidosis.

The conclusions obtained from these studies are as follows. First, the amyloid deposition can occur as early as 6 months of age in transgenic mice carrying human mutant TTR genes. Second, the whole molecules are first excreted into the serum and then deposited in many extracellular tissues including kidney, heart, thyroid gland and skin, areas where amyloid deposition is usually found in human FAP patient at the time of autopsy. Third, the amyloid deposition itself start to occur after puberty. Fourth, the concentration of tetramers composed of mostly human mutant molecules is critical for the amyloid deposition. Fifth, the serum amyloid P component is not involved in the initiation, distribution and progression of amyloid deposition. Sixth, microenvironment such as rich blood flow or loose tissue structure can affect the amyloid deposition. The difference of this microenvironment surrounding the peripheral nervous tissue between human and mouse may be the reason for the absence of amyloid deposition in this tissue of transgenic mice. Seventh, the amyloid deposition is clearly influenced by environmental factors such as the living condition. Because there is also a big variation at the age of onset of amyloid

deposition in these transgenic mice inspite of the fact that we used an inbred strain of mouse, C57BL/6. All these studies clearly suggest that the pathological process of amyloid deposition is not simple, that is, is affected by both environmental factor and genetic factor, but that the elucidation and control of environmental factor will make it possible to devise a new way of treatment in the near future.

## 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパシー (Familial amyloidotic polyneuropathy: FAP) は常染色体優性遺伝病であり、全身の細胞外にアミロイドが沈着し末梢神経および自律神経障害を主徴とする疾患である。全身に沈着しているアミロイド蛋白の主成分が変異トランスサイレチン (transthyretin: TTR) であること、日本人型やポルトガル人型の場合第 30 番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに置換したものである (hTTR: Met30) こと、発症後は 10~20 年の経過後心不全、腎不全、感染症などで死亡に至ることが明らかとなっている。遺伝子もすでに単離され、アミノ酸置換に一致する変異、すなわち第 30 番目のアミノ酸をコードする GTG が ATG となっていることが分かった。この一塩基置換によりこの部位に NsiI という制限酵素部位が生じるので、これを利用して DNA 診断が可能となった。現在までの解析では日本では FAP 患者はほぼ全員ヘテロ接合体であり、一つの正常と異常遺伝子を持つ。しかしながら、例えば同一家系内において発症年齢が 40 才以上ずれることもあり、アミロイド沈着などに関する病態は全く不明である。この病態解析や新しい治療法の開発を目的として、ヒトと同一の分子機構で発症するトランスジェニックマウスモデルの作製を試みた。

## 研究経過

ヒトにおいては同一家系でも発症年齢が大きくずれることは、他の遺伝的背景が発症に影響を与えている可能性がある。そこでマウスの実験ではこの遺伝的背景の影響を考えなくて良いようにする必要があり、そのために遺伝的背景が同一と考えられる近交系マウスでありトランスジェニックマウス作製に適している C56BL/6 マウスを用い

て実験を行った。

ヒトでの発症は少なくとも 20 年近くかかるが、マウスの寿命は 3 年程度である。従って遺伝子の発現量を高くするため、強力なプロモーターでありその有効性が実証されているメタロチオネインプロモーターをまず用いた。このプロモーターを接続したヒト変異 TTR 遺伝子 (MT-hTTR: Met30) を導入したトランスジェニックマウスを 5 系統作製した。それらのトランスジェニックマウスにおける血中のヒト TTR 量は 1.0~5.0 mg/dl であった。ヒト FAP 患者における hTTR: Met30 の量が 10 mg/dl であることを考えるとそれほど低い発現量ではなかった。これらのマウスではアミロイド沈着がみられ、以後年齢とともに種々の組織に沈着が広がり、沈着量も増大することが分かった。ついで抗ヒト TTR 抗体を用いた免疫組織学的解析を行うことにより、hTTR: Met30 がアミロイドとして沈着していることが実証された。また、アミロイド沈着の組織分布が大部分においてヒトと極めて類似していることが明らかとなったが、ヒトでの特徴である末梢および自律神経へのアミロイド沈着がマウスでは全く見られないことが分かった。これらの事実を基本として、以下の病態の解析を始めた。

## 研究成果

### 1) アミロイド沈着の経路

TTR 遺伝子の発現部位は肝臓や脳脈絡叢であるが、肝臓そのものにはアミロイドが沈着しない。したがって、これらの組織で産生された TTR はいったん血中に分泌され各組織に沈着すると推定されていた。このことはトランスジェニックマウスの解析からも明らかで、主たる産生部位である肝臓には沈着がみられず、産生のほとんどない腎臓や心臓に多かった。

## 2) アミロイド沈着の開始時期

病気の発症は思春期以降であるが、アミロイドの沈着はいつ頃から起こるのか不明であった。DNA 診断が可能となり、発症前にアミロイド沈着の有無を調べることが可能となり、思春期以前には、例えば 15~16 才ではアミロイド沈着は認められていない。この点に関し理論的に二つの仮説が成立する。第一は出生前後から沈着が始まり、徐々に沈着量が増大していき思春期に到りある域値をこえ発症に至るという説である。第二はアミロイド沈着そのものも、思春期に突然始まり急速に沈着量が増大し発症に至るという説である。このどちらの説が正しいのかをこれらのトランスジェニックマウスを用いて解析した。前述のように MT-hTTR:Met30 の系統では生後 6 か月から沈着が開始している。マウスの生後 6 か月はヒトの 30~40 才台に匹敵する。このことはアミロイド沈着が思春期以降に始まることを示唆している。さらに解析を進め、1 歳齢の時点でアミロイド沈着が多量にみられるものと全くみられないマウスが存在すること、しかもこれらのマウスにおける血中 hTTR:Met30 量には差がないことが明らかとなった。このことはアミロイド沈着が思春期以降に始まること、そしてこの沈着の開始には他の要因が関与することを示している。

## 3) hTTR:Met30 の発現時期

アミロイド沈着そのものも思春期以降である原因として、hTTR:Met30 遺伝子そのものの発現が思春期以降となっていることも考えられる。この解析のため、二つの遺伝子を準備した。第一は上流域約 600 塩基対を含むもの (0.6-hTTR:Met30) であり、これを選んだ理由はこの領域内にマウスとヒトの遺伝子で相同性に富む塩基配列が存在しこの領域に遺伝子発現の組織特異性や時期特異性に関与する調節領域が含まれていると考えられたからである。第二は約 6 kb 上流域を含むもの (6.0-hTTR:Met30) で、これは Costa らがマウス遺伝子の場合約 2 kb 上流にエンハンサーが存在すると報告したので、ヒトの遺伝子でも同様の領域にエンハンサーが存在すると予測されたからである。これらの遺伝子を導入したトランス

ジェニックマウスを解析することにより次のことが明らかになった。すなわち、0.6-hTTR:Met30 遺伝子でも本来の組織である肝臓や卵黄のうで発現し、かつマウス内因性遺伝子と同様の発現時期特異的発現を示した。つまり、肝臓では、胎生期 13 日目頃より発現し徐々に上昇していくことが明らかとなった。しかし、発現量は約 1/10 であった。一方、6.0-hTTR:Met30 はやはり同様の組織特異的かつ時期特異的発現を示したが、また発現量は明らかに増大し正常とほぼ同じレベルであった。このことは、組織特異性と時期特異性に関与するシスエレメントは上流 600 塩基対までに存在すること、しかし発現レベルの上昇に関与するエンハンサーは上流 6 kb までの間に存在することを示唆している。また、TTR:Met30 遺伝子自体は胎生期より発現し、したがってその産物そのものは出生前より存在していること、したがって血中に存在する TTR:Met30 が各組織に沈着する過程に何らかの要因が作用していることが示唆された。

## 4) アミロイド沈着に影響を与える諸要因の解析

アミロイドの沈着経路から、その沈着に及ぼす諸要因を三つの段階に分けることができる。すなわち、血中の要因、血管周囲の微小環境、そしてマウス個体のいる飼育環境である。これらの解析はヒトでは不可能であり、マウスではじめて可能となる。

血中要因として二つ考えられ、第一は hTTR:Met30 そのものの量であり、第二はアミロイド蛋白の 10~20% を占めるアミロイド P 成分 (AP) である。この AP は血中に由来し血中の血清アミロイド P 成分 (serum amyloid P component: SAP) と同一のものである。

(a) hTTR:Met30 の血中量とアミロイド沈着  
TTR 分子は四量体である。したがってヘテロ接合体の FAP 患者では、正常分子と異常分子とからなる雑種四量体が存在している。一方、実際に沈着しているアミロイド蛋白の大部分は TTR:Met30 分子であると考られている。これに基づけばアミロイド沈着機構には二つの仮説が成立す

ることになる。第一は、雑種四量体も含めすべての分子がまず沈着する。しかし、正常分子は容易に分解され結局変異分子のみがアミロイド成分として残るといふ説である。第二は、大部分変異分子からなる四量体のみが何らかの物理化学的性質を有するためアミロイドとして沈着するという説である。このいずれの説が正しいのかを検討するため二つの系統のマウスを作製することを試みた。すなわち、血中の総 TTR:Met30 量は等しいが、hTTR:Met30 のみよりなる四量体 (M4) の量が両者でかなり異なる二つの系統である。このため二つの遺伝子を準備した。第一は自身のプロモーターを含むものであり、この場合肝臓特異的に発現することが期待される。そうならば hTTR:Met30 はマウスの TTR 分子 (mTTR) と雑種四量体を形成し、その結果 M4 の量は低くなると予測される。第二は、メタロチオネイン遺伝子のプロモーターで、これではマウスの内因性 TTR 遺伝子が発現していない組織での発現が期待され、そこでは M4 のみが産生されるはずで、したがって M4 の濃度は高くなるはずである。このような遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、経時的にアミロイド沈着を比較した。その結果、0.6-hTTR30 の場合は生後 15 か月頃からアミロイド沈着が開始したが、MT-hTTR:Met30 では生後 6 か月からであった。また同一年齢で比較すると明らかに MT-hTTR:Met30 の方がアミロイド沈着は多かった。両系統のマウスでは血中の総 hTTR:Met30 の量はほとんど同じであるが、発現の組織特異性の違いから、M4 の量は MT-hTTR:Met30 の方が約 30 倍多いことが分かり、これがアミロイド沈着の開始時期および沈着量の差につながったと考えられた。この結果は前記の第二の仮説が正しいことを示唆している。

#### (b) 血中ヒト SAP の役割

日本の FAP 患者の発症年齢をみると男性のピークが 25~30 才であるのに対し、女性では 30~35 才であり男性の方がやや早い。これと一致して、血中の濃度は男性が 1.4~4.3 mg/dl で女性が 1.0~3.3 mg/dl とやはり男性が高い。この

ことは SAP がアミロイド沈着において何らかの役割を果たしていることを示している。そこで、ヒト SAP 遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを作製し、前述の MT-hTTR:Met30 と交配し両方の遺伝子を有するマウスを得た。しかしながら、ヒト SAP がヒト血清中と同じレベルかむしろ高い濃度であるにもかかわらず、アミロイド沈着の開始時期、その沈着速度、および組織分布には全く影響がなかった。SAP 自体は急性炎症蛋白である C 反応性蛋白 (CRP) と 60% の相同性を有し、カルシウム存在下である種のライガントに結合する性質を有してはいるが、アミロイド沈着に関し特に積極的な関与はなく附属物と考えて良いと思われる。

#### (c) 血管周囲の微小環境の影響

ほとんどの組織におけるアミロイド沈着のパターンはヒト FAP 患者もマウスも同じであるが不思議なことに、ヒトでの特徴である末梢神経への沈着がマウスでは全く認められなかった。この可能性の一つとして、マウスの組織の特異性が考えられる。実際、例えば胃におけるアミロイド沈着を解析してみると、常に左側の扁平上皮側のみにもみられ、右側の腺上皮側には全くみられない (ヒトでは食道において扁平上皮から腺上皮に移行するが、この食道にはアミロイド沈着は認められていない)。これは肛門部でも同様で常に扁平上皮側で多量にアミロイド沈着が認められる。このことは各組織における微小環境、すなわち血流量の豊富さまたは組織が粗であるか密であるかなどによってアミロイド沈着が影響されることを示唆している。

#### (d) アミロイド沈着に及ぼす環境要因

前述したように、この実験では全て近交系マウスを用いた。それにもかかわらず生後 1 年の時点で血中の hTTR:Met30 の量が等しいのにアミロイド沈着が多量にみられるマウスと、全くないマウスが存在する。このことは、遺伝要因ではなく明らかに飼育などの環境要因がアミロイド沈着に影響を及ぼすことを示唆している。

#### 今後の課題と発展

ヒト FAP においては、例えば TTR 遺伝子に

同じ変異を持ちながら日本とポルトガルでは平均発症年齢が30才台、スウェーデンでは50才台であることが知られていた。このことは発症における環境要因の関与を示唆するが、他の遺伝要因の関与を否定することはできない。しかし、以上の研究から環境要因がその発症に強く関与することが明らかとなった。このことはたとえ典型的な優性遺伝病であっても、環境要因のコントロールにより疾患の発症を予防しうることを示唆している。今後の課題はこの環境要因が何であるのかを解析することであろう。

#### 発表論文

- 1) Iwanaga, T., Wakasugi, S., Inomoto, T., Uehira, M., Ohnishi, S., Nishiguchi, S., Araki, K., Uno, M., Miyazaki, J., Maeda, S., Shimada, K. and Yamamura, K.: Liver-specific and high-level expression of human serum amyloid P component gene in transgenic mice, *Dev. Genet.*, **10**, 365~371 (1989).
- 2) Shimada, K., Maeda, S., Murakami, T., Nishiguchi, S., Tashiro, F., Yi, S., Wakasugi, S., Takahashi, K. and Yamamura, K.: Transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy, *Mol. Biol. Med.*, **6**, 333~343 (1989).
- 3) Yamamura, K., Wakasugi, S., Inomoto, T., Iwanaga, T., Yi, S., Maeda, S., Naito, M., Takahashi, K. and Shimada, K.: Production of a Transgenic Mouse Model for a Human Dominantly Inherited Disease. in *Automation and New Technology in the Clinical Laboratory*, ed. by K. Okuda, Blackwell Scientific Publications, London, 1990, pp. 129~130.
- 4) Yamamura, K., Tashiro, F., Wakasugi, S., Yi, S., Maeda, S. and Shimada, K.: Transgenic Mouse Model of an Autosomal Dominant Disease: Familial Amyloidotic Polyneuropathy. in *Molecular Mechanisms of Aging*, ed. by K. Beyreuther and G. Schettler, Springer-Verlag, Heidelberg, 1990, pp. 146~154.
- 5) Yi, S., Araki, S., Naito, M., Takahashi, K., Wakasugi, S., Inomoto, T., Tashiro, F. and Yamamura, K.: Pathological Studies on Transgenic Mice Model for Type I Familial Amyloidotic Polyneuropathy (TTR MET 30). in *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders*, ed. by P. P. Costa, A. Falcao de Freitas and M. J. M. Saraiva, Arquivos de Medicina, Porto, 1990, pp. 255~259.
- 6) Yi, S., Takahashi, K., Naito, M., Tashiro, F., Wakasugi, S., Maeda, S., Shimada, K., Yamamura, K. and Araki, S.: Systemic amyloidosis in transgenic mice carrying the human mutant transthyretin (Met30) gene: Pathological similarity to human familial amyloidotic polyneuropathy, type I, *Am. J. Pathol.*, **138**, 403~412 (1991).
- 7) Tashiro, F., Yi, S., Wakasugi, S., Maeda, S., Shimada, K. and Yamamura, K.: Role of serum amyloid P component for systemic amyloidosis in transgenic mice carrying human mutant transthyretin gene, *Gerontology*, **37** (Suppl 1); 56~62 (1991).