

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18590536

研究課題名（和文） 血清アミロイドA多型の機能的解析

研究課題名（英文） Functional analysis for serum amyloid A polymorphism

研究代表者

山田 俊幸 (YAMADA TOSHIYUKI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50211636

研究成果の概要：血清アミロイドA蛋白（SAA）の代謝機構の解明のため、種々のSAA親和性物質との結合様式を表面プラズモン解析機種、ビアコアを用いて解析した。親和性物質としてまず、SAAが生体内でアポ蛋白として存在するHDLを用いた。rSAAのセンサーチップへの固定法、HDLの添加条件などの検討に1年を要した。2年目に、定められた条件で3種のSAA1アイソタイプとHDLの親和性を検討したところ、親和性の強さはSAA1.5>SAA1.1=SAA1.3という結果になった。SAA1.5保有者において血中SAA濃度が高くなるという観察が、HDL中で安定であるという今回の実験で裏付けられた（論文印刷中）。3年目は、SAAをチップ上に固相化した実験系で分析物にヒト末梢リンパ球、単球、単球様株化細胞であるTHP-1を使用して検討した。程度の差こそあれ、これら細胞間にSAAへの結合性の差異はなかった。用いたSAAについてはマウスリコンビナントintact SAAとヒト組織から抽出したAA蛋白はこれら細胞への結合性を示したが、ヒトリコンビナントintact SAAはどのアイソタイプでも有意な結合性を示さなかった。SAAのアミロイド線維化において細胞の関与が必須であることから、ヒトSAAが線維化するにはC末端の除去が必要であり、このことはヒト臨床材料のアミロイド組織中にintact SAAが存在せず、マウスアミロイド組織では存在するという事実を裏付けるものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	720,000	3,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床化学

1. 研究開始当初の背景

血清アミロイド A (SAA) は 2 次性アミロイドーシス沈着物質の前駆蛋白であり、炎症でその血中濃度が著明に増加する鋭敏な急性期反応物質である。血中においては HDL 中のアポ蛋白として存在する。

この SAA の生物学的機能、アミロイド形成メカニズムを理解する上で、SAA とその親和性物質、例えば先の HDL・細胞・組織外マトリックス、などの同定、結合様式は重要な研究課題である。実際、これまでのところ、SAA 溶液を使って当該物質と反応させたものをフローサイトメトリや免疫沈降法などで解析することで、種々細胞、ウイルス、細菌と SAA との親和性が報告されてきた。しかし、私の長年の SAA 研究の経験から、本物質は極めて疎水性が高く、溶液状態にすること自体が困難であり、かつ溶液状態になったとしても、ほかの物質との混合により非特異吸着を示しやすいことが判明しており、これまでの報告の信頼性を疑問視している。

そこで今回は、より特異的な SAA とほか物質の親和性を検討する系として装置ピアコアを用い、まず HDL を最初のターゲットに方法論の確立から研究を始めた。

2. 研究の目的

SAA とその親和性物質を同定するための信頼性の高い方法としてピアコアを応用した系を確立する。その方法を用い、HDL・細胞・組織外マトリックス、などとの親和性を検討する。その系において、SAA アイソタイプ間での比較を行い、臨床的に観察されている、SAA1 多型の機能であるアミロイドーシス感受性、血中濃度への影響の裏づけとなるメカニズムを探る。

3. 研究の方法

SAA は既に報告している大腸菌の発現系を使用して調整した。今回の研究ではヒト型として、SAA1.1, SAA1.3, SAA1.5 を、マウス型として *saal* と *saal2* を用意した。

機器として、分子間相互作用解析装置、ピアコア 2000 を用いた。概要は以下のとおりである。センサーチップと呼ばれる固相にリガンドを固定化し、親和性物質を流路にアプライされる。リガンドと親和性物質の結合は表面プラズモン解析 (SPR) と呼ばれる独特の光学的手法により解析される。結合と解離がリアルタイムでモニターできる点が最大の特徴である。システムには結合と解離を勘案した親和性定数 (KD) を算出するソフトも組み込まれている。

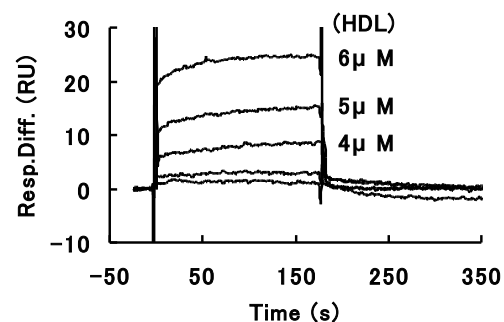
4. 研究成果

ピアコアの条件設定に難渋したが、その経験からいくつかの有意義な知見を得た。

センサーチップに SAA を固定化する際に通常使われる酸性条件で行うと、HDL に十分な結合を示さなかった。このことは酸性で SAA が凝集傾向を示し、アミロイド線維化も同じ環境で起こることから、アミロイド形成傾向の SAA は HDL に結合できないことが想定された。固定化量を増やしていくと、HDL との反応が 2 相性になり、すなわち一旦 SAA に結合して解離した HDL がまた近傍の SAA に結合していると推測された。そこで SAA を少量でアルカリ側で固定する条件を設定した。

流路の HDL については HDL が自家凝集を起こすことから、低濃度でかつ反応緩衝液に界面活性剤を使用する条件を設定した。

以上の定められた条件が、限りなく 1:1 に近い SAA と HDL の反応を見ていると想定して実際の SAA 1 アイソタイプと HDL の親和性実験を行った。反応は解離の非常に速い反応で、結合と解離を同時に解析するいわゆる kinetic analysis のモデルに適合しなかったため、反応がプラトーになった部分を利用する affinity analysis モデルを当てはめた (下図)。各 SAA1 アイソタイプと HDL の結合親和性は SAA1.5>SAA1.1=SAA1.3 となった。



SAA1.5 アレル保有者は血中 SAA 濃度が高めになることを既に見いだしており、今回の知見は、SAA1.5 は HDL と親和性が高いことで血中でより安定である、そのことが血中濃度を高めにするよう影響していると裏付けるものである。

また、アミロイドーシス感受性としては SAA1.3 で正のリスクであることが私たちのこれまでの研究で明らかになっている。今回の知見は SAA1.3 が HDL から解離しやすいことを示していて、そのことが組織への移行

性が高いことになり、アミロイド線維化しやすい性質に関連しているのではないかと想定された。しかし、アミロイドーシス感受性として負のリスクである SAA1.1 との間に特徴的な差異はなく、アミロイドーシス感受性に関してはさらなる因子の考慮が必要と思われた。

HDL との結合実験で確立された条件はほかの SAA 親和性物質の探索に応用可能である。ここでは SAA とアミロイド線維形成に不可欠な細胞成分（マクロファージなど）との親和性実験に応用した。

マウス intact saa とヒト組織から抽出した AA 蛋白 (intact SAA の C 末端が除去されたもの) はヒト末梢血単球への特異的な結合性を示したが、ヒト intact SAA はどのアイソタイプでも有意な結合性を示さなかった。マウスでは intact SAA も実際の沈着中にあり (すなわち線維形成能がある)、ヒトの場合は沈着中に intact SAA が殆どないことから、ヒト SAA のアミロイド線維化においては C 末端の除去が必要であり、線維化そのものに対する影響だけでなく、線維化前段階の細胞との interaction にもこの部分分解が必要であることが示唆された。現在は、人工的に作られた SAA の限定分解産物と細胞の親和性を検討している。

HDL との結合安定性、細胞との結合性がおそらくアミロイド線維化になんらかの役割を果たしていると思われ、その制御の研究がアミロイドーシスの予防や治療につながるものと確信する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Yamada T, Sato J, Okuda Y: Differential affinity of serum amyloid A1 isotypes for high density lipoprotein. Amyloid 査読有 (in press)
2. Yamada T, Someya T, Fujita S: Immunotargeting of apolipoprotein E in the amyloid. An initial trial in mice. Ann Clin Lab Sci 査読有 39:134-137, 2009
3. van der Hilst JC, Yamada T, Op den Camp HJ, van der Meer JW, Drenth JP, Simon A: Increased susceptibility of serum amyloid 1.1 to degradation by MMP-1; potential explanation for higher risk of type AA amyloidosis. Rheumatology 査読有 47:1651-1654, 2008
4. Miida T, Yamada T, Seino U, Ito M, Takahashi A, Kosuge K, Soda S, Hanyu O, Obayashi K, Miyazaki O, Okada M :

Serum amyloid A (SAA)-induced remodeling of CSF-HDL. Biochim Biophys Acta 査読有 1761:424-433, 2006

[学会発表] (計 3 件)

1. 佐藤純司, 山田俊幸: 表面プラズモン共鳴による SAA (血清アミロイド A) と HDL の親和性の検討. 第 48 回日本臨床化学学会年会. 2008 年 8 月 30 日, 浜松
2. 佐藤純司, 山田俊幸: モノクロナル抗体の反応性を利用した SAA (血清アミロイド A) の構造・機能解析. 第 47 回日本臨床化学学会年会. 2007 年 11 月 23 日, 大阪
3. 山田俊幸: SAA と HDL の親和性解析の基礎検討. 第 45 回日本臨床化学学会年会. 2006 年 9 月 9 日, 東京 6

[図書] (計 1 件)

1. 山田俊幸: SAA (血清アミロイド A) . 基準値と異常値の間. pp471-472. 河合忠編. 中外医学社. 東京, 2006

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田俊幸 (YAMADA TOSHIYUKI)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50211636

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし