

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292171

研究課題名(和文)蛋白質のミスフォールディングに起因するアミロイド症の異種動物への伝播性とそのリスク

研究課題名(英文)Transmission and risk of Amyloid A amyloidosis as a protein misfolding disease in intra- and cross-species animals

研究代表者

石黒 直隆 (ISHIGURO, NAOTAKA)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00109521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドA(AA)アミロイド症は、血清アミロイドAが構造変換して形成されるAAアミロイドの臓器沈着により発症する疾患であり、同種動物および異種動物に伝播する。本研究では、ウシおよびニワトリ由来のAAアミロイドをマウスに接種することにより、その病態や熱に対する抵抗性について解析した。ニワトリおよびウシのAAアミロイドのマウスへの伝播は、マウスに比べて低率であった。マウスでのAAアミロイドの沈着は、時間の経過と共に消失し、再接種により増加した。AAアミロイド症の初期ではIL-6の発現が増加し、その後IL-10が増加した。また、動物由来AAアミロイドは、熱に極めて抵抗性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Amyloid A (AA) amyloidosis is induced with protein misfolding of serum amyloid protein A, and characterized by extracellular deposition of AA fibrils in several organs. The AA amyloidosis is also transmitted to intra- and cross-species animals. In this study, heterologous (bovine and poultry) as well as homologous (murine) AA fibrils were injected intraperitoneally to mice, and the transmission mechanism and heat stability of the AA fibrils were histologically examined. Severity of AA amyloidosis was low in mice inoculated with heterologous AA fibrils than homologous AA fibrils. Clearance of AA fibrils in spleen was gradually observed after first inoculation, but the deposition of AA fibrils was rapidly increased after the second stimulus. The level of IL-6 was increased after first inoculation, while the level of IL-10 was increased after second inoculation of AA fibrils. The AA fibrils isolated from animal amyloidosis appear to be relatively resistant to several heat treatments.

研究分野：獣医学

キーワード：アミロイド 伝播 マウス ウシ ニワトリ ミスフォールディング

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質が構造変換して不可逆的構造となる現象をミスフォールディング(構造変換)と言う。その原因は、蛋白質のヘリックス構造がシートに変換することに起因するが、原因は不明である。ミスフォールディングした蛋白質はアミロイドを形成して蓄積し、組織の機能障害をもたらす。人では、構造変換する蛋白質として20種類以上が知られている。動物では急性期炎症蛋白質である血清アミロイドA蛋白質(Serum Amyloid A: SAA)が構造変換して致死的なAAアミロイドを形成しアミロイド症を誘発する。また、動物由来のAAアミロイドは、同種および異種動物に伝播してアミロイド症を引き起こすことから、新たな公衆衛生上の問題として注目されていた。

### 2. 研究の目的

蛋白質のミスフォールディングに起因する動物の疾患として、プリオン病やアミロイド症が知られているが、AAアミロイドによる同種および異種動物への伝播性については、不明な点が多い。特に、ウシおよびニワトリに多く発症するアミロイド症のAAアミロイドは、食肉を解してヒトに影響することが危惧される。本研究では、こうした背景に基づき、ウシおよびニワトリ由来のAAアミロイドの異種動物(マウス)への伝播性、長期間における宿主組織でのAAアミロイドの蓄積性と分解性、動物由来AAアミロイドの熱に対する抵抗性などを検討した。主な検討項目は以下の通りである。

- (1) ウシおよびニワトリのSAA-1に対するモノクローナル抗体(mAb)の作製
- (2) ウシ、ニワトリ、マウス由来の動物由来AAアミロイドのマウスへの伝播実験と免疫組織化学検査
- (3) 疾患モデル動物を用いたAAアミロイド症の伝播実験
- (4) 培養細胞を用いたAAアミロイドの形成と蓄積性の解析
- (5) AAアミロイド症の病態に伴う宿主側の応答機構の解析
- (6) ウシ、ニワトリ、マウス由来のAAアミロイドの熱抵抗性試験

### 3. 研究の方法

(1) ウシおよびニワトリSAA-1に特異的なmAb抗体の作成: ウシおよびニワトリのSAA-1のアミノ酸配列でエピトープと予測されるアミノ酸領域についてペプチドを合成し、マウスに免疫して常法に従ってmAbを作成した。

(2) マウス、ウシ、ニワトリ由来AAアミロイドの精製: アミロイド症に罹患しているマウス、ウシ、ニワトリの肝臓からAAアミロイドをPrasら(J. Clin. Invest. 47:924-933, 1968)の方法に従って精製した。

(3) 同種動物および異種動物へのAAアミロイド症の伝播実験: 同種動物間でのAAアミロイド症の伝播実験として、マウスからマウスへ、また、ニワトリからニワトリへの伝播実験を行った。マウスにおいては硝酸銀を、ニワトリにおいてはLPSを、AAアミロイド接種前に炎症起爆剤として投与した。

(4) 疾患モデル動物へのAAアミロイド症の伝播実験: 自己免疫疾患マウスとしてC57BL/lpr/lprマウスを、2型糖尿病疾患マウスとしてC57BLHamob/obマウスを用いた。

(5) AAアミロイド分子の検査と組織中での蓄積度の解析: 精製したAAアミロイドの確認は、クマシーブルー染色とウエスタンブロット解析により行った。また、組織中のAAアミロイドの蓄積動態は、免疫組織化学検査とコンゴレッド染色により検査した。

(6) 培養細胞を用いたAAアミロイドの反応性検査: 免疫系細胞Raw株と、腸管系細胞CMT-93にAAアミロイドを添加して、細胞周辺でのAAアミロイドの蓄積やその反応性について検査した。

(7) 宿主側の反応性の解析: AAアミロイドの蓄積に対する宿主側の反応性を、各種サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF-, IFN-)の発現動態で解析した。

### 4. 研究成果

(1) ウシおよびニワトリのSAA-1に特異的なmAbの作成と有用性: これまでに、ウシSAA-1に特異的なmAbとして25BF12を分離した。また、ウシSAA-3に特異的な231G7およびSAA-4に特異的な30FD3を分離したが、ニワトリのSAA-1に対するmAbは得られなかった。AAアミロイドの蓄積を評価する免疫組織化学検査では、ウシの場合は、25BF12を、ニワトリの場合は、免疫マウス血清を用いた。

(2) ニワトリの個体間でのAAアミロイドの伝播性について: ニワトリの胸筋内にサルモネラワクチンを接種するとアミロイド症を誘発する恐れのあることがわかった。さらに、AAアミロイドを経口投与するとアミロイド症の発症が増加することが明らかとなった。このことは、同種動物間でアミロイド症が伝播することを強く示唆している(発表論文番号)。また、採卵系197サンプルおよびブロイラー100サンプルの肝臓についてAAアミロイドの蓄積を検査したが、僅かに採卵系の1サンプルからしかAAアミロイドの沈着は検出できなかった(発表論文番号)。一般的に、ワクチン接種により誘発されるニワトリのAAアミロイドの沈着は、時間の経過に伴い消退することが明らかとなった(発表論文番号)。

(3) 同種動物および異種動物への AA アミロイド症の伝播実験

マウスの AA アミロイド症の誘発と経時的な AA アミロイド沈着の動態：C57BL/6j マウスに炎症刺激剤として硝酸銀を投与した後に、AA アミロイドを腹腔内投与して経時的に AA アミロイドの蓄積を観察した。その結果、投与後 20 日で脾臓での AA アミロイドの蓄積は最大となり、その後、消滅した。初回投与後、330 日と 440 日に再度、硝酸銀と AA アミロイドを投与したところ、脾臓での AA アミロイドの蓄積は、初回時より増大した。特に、硝酸銀のみの投与より、硝酸銀と AA アミロイドを投与したグループでは AA アミロイドの蓄積が増大した。また、AA アミロイドの蓄積は、腎臓にも観察されるなど全身的な蓄積が免疫組織化学検査とコンゴレット染色により明らかとなった。440 日に 2 回目を投与したマウスの各グループでの AA アミロイドの蓄積スコアを図 1 に示した。

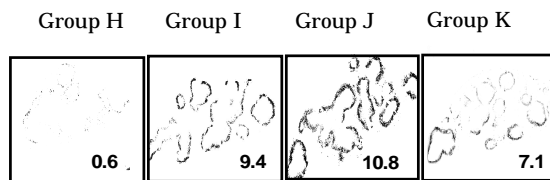


図 1 .2 回目の AA アミロイド投与後のマウス脾臓での AA アミロイドの蓄積スコア

|         | 1 回目投与                    | 2 回目投与                    |
|---------|---------------------------|---------------------------|
| GroupH: | Amyloid/AgNO <sub>3</sub> | None                      |
| GroupI: | Amyloid/AgNO <sub>3</sub> | AgNO <sub>3</sub>         |
| GroupJ: | Amyloid/AgNO <sub>3</sub> | Amyloid/AgNO <sub>3</sub> |
| GroupK: | AgNO <sub>3</sub>         | Amyloid/AgNO <sub>3</sub> |

硝酸銀や AA アミロイドを投与したマウスでは、SAA と IL-6 の上昇が顕著であった。しかし、2 回目の投与後では IL-6 より IL-10 の発現が有意に増加していた。これらの結果より、AA アミロイドの投与により形成されたアミロイド沈着は、徐々に減少するが、再度、炎症刺激が加わることにより急速に増大することが明らかとなった（発表論文番号）。

異種動物（マウス）へのウシ AA アミロイドの投与実験と経時的な動態解析：ウシおよびマウスの AA アミロイドを用いて、同種および異種動物への伝播実験を実施した。その結果、マウス AA アミロイドをマウスに投与した場合に比べて、ウシ AA アミロイドをマウスに接種した方が、脾臓での AA アミロイドの沈着は少なかった。さらに、2 回目の投与に際して、投与する AA アミロイドをさまざまに組み合わせ投与した結果、初回時にマウス AA アミロイドをマウスに投与したグループが最も脾臓での AA アミロイドの蓄積が多く、ウシ由来の AA アミロイドを投与したグループでは、僅かであった。また、同種の AA アミロイドを投与されたグループでの

AA アミロイドの蓄積は、全身的であり、脾臓以外に、肝臓、腎臓、小腸で AA アミロイドの沈着が免疫組織化学検査およびコンゴレット染色で確認された。初回時の投与では IL-6 の発現は顕著であったが、2 回目の投与では、IL10 の発現が有意に高かった。以上の結果より、異種の AA アミロイドより同種の AA アミロイドの方が、AA アミロイド症を誘発しやすいことが明らかとなった（発表論文番号）。

リスザルへのウシおよびニワトリ由来 AA アミロイドの投与実験：8 匹のリスザルにウシおよびニワトリ由来の AA アミロイドを静脈内投与して AA アミロイドの蓄積を検査したが、どの臓器にも AA アミロイドの蓄積は見られなかった。このことは、動物由来の AA アミロイド症は霊長類には伝播しづらいことを示している（発表論文番号）。

(4) 疾患モデルマウスを用いた AA アミロイドの伝播実験：C57BL マウス系の自己免疫モデルマウス C57BL *lpr/lpr* と 2 型糖尿病モデルマウス C57BL *Hamob/ob* を用いて基礎疾患を有する動物での AA アミロイド症の伝播について解析した。両疾患モデルマウスともマウス AA アミロイドを投与した場合、正常なマウスに比べて、AA アミロイド症の伝播は低率であった。また、ウシおよびニワトリ由来の AA アミロイドの伝播は、マウス AA アミロイドに比べて低かった。C57BL *lpr/lpr* と C57BL *Hamob/ob* マウス間での AA アミロイドの蓄積に差は、見られなかった。特に C57BL *lpr/lpr* マウスでは、IL-10 の発現が顕著であった。これにより、自己免疫状態にある動物では、AA アミロイドの伝播と蓄積は抑制されることが明らかとなった（発表論文番号）。

(5) 培養細胞を用いた AA アミロイドの蓄積性と分解性の解析：AA アミロイドは宿主の SAA-1 が過剰に産生される時、脾臓、肝臓、腎臓で SAA-1 が構造変換して形成される。本研究では、AA アミロイドの形成を *in vitro* で解析すべく、免疫系の培養細胞 Raw 株を用いて解析した。その結果、SAA-1 のみや AA アミロイド単独では AA アミロイドを形成しなかったが、SAA-1 と AA アミロイドの共存により、Raw 細胞の周辺に AA アミロイドがコンゴレット染色で確認された。これにより、AA アミロイド形成には、免疫系細胞が重要な役割を果たすことが示された。

(6) AA アミロイド症の病態に伴う宿主側の反応要因の解析：

AA アミロイドの形成に伴い、IL-6 や TNF- $\alpha$  の発現の上昇が確認された。一方、アミロイド症の病態が長期化するにつれて、IL-6 の発現が減少し、IL-10 の発現が顕著に上昇した（発表論文番号）。

腸管系細胞 CMT-93 細胞を用いて、腸管での細菌の LPS に対する宿主側の反応性を SAA の動態で解析した。その結果、LPS の添加に伴い SAA-1 に比べて SAA-3 の発現上昇が観察された。また、SAA-3 の発現上昇は MUC2 の発現を誘発した。このことは、SAA-3 は、宿主の自然免疫に関与することが明らかとなった ( 発表論文番号 )

( 7 ) ウシ、ニワトリ、マウス由来 AA アミロイドの熱抵抗性試験 : 各種動物由来の AA アミロイドの熱抵抗性について、加熱処理後のマウスへの伝播性を指標に評価した。その結果、121 処理では、マウスへの伝播性を減少させ、135 処理では、伝播が見られなかったのに比べて、60 と 100 では伝播性が増加した。AA アミロイドの伝播性を完全に消失させるには、135 処理が必要であった。ウシやニワトリ由来の AA アミロイドではマウスへの伝播性が低いが、60 や 100 にて処理することにより、マウスへの伝播性が増加した。この結果は、各種動物由来の AA アミロイドは、熱処理に比較的抵抗性を有していることを示している。熱処理したウシ由来の AA アミロイド分子の形状を図 2 に示した ( 発表論文番号 )

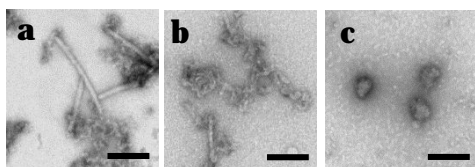


図 2 . ウシ由来 AA アミロイドを熱処理した時の AA アミロイド分子の形状

- a: 非加熱 (線維分子)
- b: 100 5 分処理 (線維分子の小型化)
- c: 135 30 分処理 (線維分子の消失)

( 8 ) 総説の執筆 : これまでの動物由来の AA アミロイド症に関する研究成果を 2 報の総説として公表した。特に、動物由来の AA アミロイド症は、動物プリオン病と同様な病態を示すことから prion-like disorder として認知されており、公衆衛生上の課題も多く含んでいる ( 発表論文番号 )

#### 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 11 件 )

Mayuko Maeda, Tomoaki Murakami, Naeem Muhammad, Yasuo Inoshima and Naotaka Ishiguro: Experimental transmission of systemic AA amyloidosis in autoimmune disease and type 2 diabetes mellitus model mice. *Exp. Anim.* 査読有 65:427-436, 2016. Doi:10.1538/expanim.16-0037

Naeem Muhammad, Tomoaki Murakami,

Yasuo Inoshima and Naotaka Ishiguro: Longitudinal study of experimental induction of AA amyloidosis in mice seeded with homologous and heterologous AA fibrils. *Inflamm. Res.* 査読有 65:689-699, 2016. DOI:10.1007/s00011-016-0950-1

Tomoaki Murakami, Yasuo Inoshima and Naotaka Ishiguro: Systemic AA amyloidosis as a prion-like disorder. *Virus Res.* 査読有 207:76-81, 2015. DOI:10.1016/j.virusres.2014.12.019. 2014.12.019

Saki Ogawa, Tomoaki Murakami, Yasuo Inoshima and Naotaka Ishiguro: Effect of heating on the stability of amyloid A(AA) fibrils and intra- and cross-species transmission of AA amyloidosis. *Amyloid*, 査読有 20:1-8, 2015. DOI:10.3109/13506129.2015.1095735

Kamata Ibi, Tomoaki Murakami, Wael Mohamed Goda, Naoki Kobayashi, Naotaka Ishiguro and Tokuma Yanai: Prevalence of amyloid deposition in mature healthy chickens in the flock that previously had outbreaks of vaccine-associated amyloidosis. *J.Vet.Med.Sci.* 査読有 77:1214-1245, 2015. DOI:10.1292/jvms.15-0029.

Naeem Muhammad, Tomoaki Murakami, Yasuo Inoshima and Naotaka Ishiguro: Long-term kinetics of AA amyloidosis and effects of inflammatory restimulation after disappearance of amyloid depositions in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 査読有 181:133-141, 2015. DOI:10.1111/cei.12615

Tomoaki Murakami, Naotaka Ishiguro and Kyouichi Higuchi: Transmission of systemic AA amyloidosis in animals. *Vet. Pthol.* 査読有 51:363-371, 2014. DOI:10.1177/0300985813511128

Hiroaki Shigemura, Naotaka Ishiguro and Yasuo Inoshima: Up-regulation of MUC2 mucin expression by serum amyloid A3 protein in mouse colonic epithelial cells. *J.Vet.Med.Sci.* 査読有, 76:985-991, 2014. DOI:10.1292/jvms.14-0007

Naotaka Ishiguro, Tomoaki Murakami, Abdelazim E. Elhelaly and Yasuo Inoshima: Surveillance of amyloid deposition and bacterial contamination

in chicken liver from meat market. J. Poult. Sci. 査読有,51:104-107, 2014. DOI:10.2141/jpsa.0130028

Tomoaki Murakami, Kanata Ibi, Takeshi Kuraishi, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Naotaka Ishiguro and Tokuma Yanai: Failure of heterogeneous amyloid-enhancing factor in geriatric squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). J. Med. Primatol. 査読有 43:488-491, 2014. DOI:10.1111/jmp.12136

Tomoaki Murakami, Naeem Muhammad, Yasuo Inoshima, Tokuma Yanai, Masanobu Goryo and Naotaka Ishiguro: Experimental induction and oral transmission of avian AA amyloidosis in vaccinated white hens. Amyloid, 査読有 20:80-85, 2013. DOI:10.3109/13506129.2013.783474

[学会発表](計 10 件)

村田依璃子、猪島康雄、石黒直隆 : ウシの粘膜上皮における血清アミロイド A3 の発現、日本獣医学会、2016 年 9 月 6 日、日本大学

村田依璃子、猪島康雄、石黒直隆 : ウシの粘膜上皮における血清アミロイド A3 の発現、第 4 回日本アミロイドーシス研究会、2016 年 8 月 19 日、KKR ホテル東京

Yasuo Inoshima, Manami Tashiro and Naotaka Ishiguro: N-terminal region of serum amyloid A3 is responsible for up-regulation of MUC2 mRNA expression in mouse epithelial cells. The XVth International Symposium of Amyloidosis, 2016 年 7 月 4 日、スエーデン・ウプサラ大学

前田麻友子、猪島康雄、石黒直隆 : 疾患モデルマウスにおける AA アミロイド症の伝播性。日本獣医学会、2015 年 9 月 9 日、北里大学

田代真奈美、猪島康雄、石黒直隆 : 腸管上皮での粘液ムチン発現に關与する血清アミロイド A3 のアミノ酸領域の同定。日本獣医学会、2015 年 9 月 9 日、北里大学

Naeem Muhammad, 村上智亮、小川紗季、猪島康雄、石黒直隆 : Long-term study of amyloid transmission within and across the animal species in murine AA amyloidosis. 日本獣医学会、2014 年 9 月 10 日、北海道大学

小川紗季、村上智亮、猪島康雄、石黒直隆 :

加熱処理が AA アミロイドの伝播性に与える影響。日本獣医学会、2014 年 9 月 10 日、北海道大学

衣斐彼方、村上智亮、柳井徳磨、酒井洋樹、石黒直隆、小林直樹 : AA アミロイド症を耐過した成熟鶏群におけるアミロイド蓄積量の変化。日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、北海道大学

Naeem Muhammd, 村上智亮、川尻百香、小川紗季、重村洋明、猪島康雄、石黒直隆 : Histological study of experimental induction and resorption of murine AA amyloidosis. 日本獣医学会、2013 年 9 月 21 日、岐阜大学

川尻百香、猪島康雄、石黒直隆 : マクロファージにおけるマウスアミロイドの取り込みと分解。日本獣医学会、2013 年 9 月 21 日、岐阜大学

[その他]

ホームページ等  
<http://www1.gifu-u.ac.jp/~naishigu/naiyou.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石黒 直隆 (ISHIGURO Naotaka)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号 : 00109521

(2)研究分担者

猪島 康雄 (INOSHIMA Yasuo)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号 : 20355184

(3)連携研究者

柳井 徳磨 (YANAI Tokuma)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号 : 1024744

(4)研究協力者

村上 智亮 (MURAKAMI Tomoaki)

ナイム ムハマド (NAEEM Muhammad)

重村 洋明 (SHIGEMURA Hiroaki)

川尻 百香 (KAWASHIRI Momoka)