

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390120
 研究課題名（和文）透析アミロイドーシス発症の分子機構解明
 -試験管内モデルと動物モデルの融合-
 研究課題名（英文）Molecular pathogenesis of dialysis-related amyloidosis
 -A fusion of the in vitro model and the animal model-
 研究代表者
 内木 宏延（NAIKI HIRONOBU）
 福井大学・医学部・教授
 研究者番号：10227704

研究成果の概要：本研究でわれわれは、長期血液透析患者に発症する $\beta 2$ -ミクログロブリン（ $\beta 2$ -m）アミロイドーシス発症の分子機構解明を目指し、リゾフォスファチジン酸など一部のリゾリン脂質、各種遊離脂肪酸等、陰性荷電を有する生体界面活性分子が、生理的条件下における $\beta 2$ -m アミロイド線維の試験管内伸長反応を促進することを明らかにした。また、モデル動物の確立を目指し、ヒト $\beta 2$ -m トランスジェニックマウスを作成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2007 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：透析アミロイドーシス、 $\beta 2$ -ミクログロブリン、アミロイド線維、試験管内分子間相互作用、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

わが国では現在 20 万人以上の患者が透析治療を受け、透析患者の多くが透析導入の十数年後、手根管症候群、破壊性脊椎関節症などの全身関節症状を主症状とする透析アミロイドーシスを発症する。下条らにより上記患者に沈着したアミロイド線維の前駆蛋白質が $\beta 2$ -ミクログロブリン（ $\beta 2$ -m）であることが明らかにされて以来、透析アミロイドーシス発症の分子機構が、世界中の多くの研究者により研究されてきた。研究代表者の内木は、独自に開発した分光蛍光定量法、及び反応速度論的実験系を駆使し、 $\beta 2$ -m アミロイド線維、アルツハイマー病 β アミロイド線維、及び AL アミロイド線維の形成を説明する重合核依存性重合モデル、及び線維伸長の一次

反応速度論モデルを構築、アポリポ蛋白質 E などの生体分子、及び NDGA など種々の有機化合物が線維形成に及ぼす影響を解析して来た。一方研究分担者の樋口らは、独自にマウスアミロイドーシスモデルを開発、上記モデルが動物レベルでも当てはまることを明らかにした。一般にアミロイドの組織沈着は、前駆蛋白質が天然の立体構造を変化させながら重合してアミロイド線維を形成する過程に加え、アミロイド線維の脱重合過程、さらには種々の生体分子が両過程に及ぼす促進・抑制効果の総和として起こると考えられる。透析アミロイドの初期沈着部位が関節軟骨、あるいは腱組織であることは、 $\beta 2$ -m がこれらを構成する II 型コラーゲン、プロテオグリカンなど種々の細胞外マトリクス分子

と特異的相互作用を起し、線維形成に至ることを示唆している。この作業仮説に基づき、既におかれは、(1) アポリポ蛋白質 E、ヘパリン、及び様々なプロテオグリカンが β 2-m アミロイド線維に特異的に結合、線維を安定化させ脱重合を阻害すること、(2) トリフルオロエタノール (TFE) を用いた中性 pH での β 2-m アミロイド線維伸長反応系を構築し、ヘパリンが濃度依存性に線維伸長を促進すること、及び (3) 生体脂質アナログのドデシル硫酸ナトリウム (SDS) が、臨界ミセル濃度以下で TFE と同様の効果を発揮し、中性 pH で線維伸長を引き起こすことを明らかにしていた。

2. 研究の目的

われわれは、試験管レベルでの分子機構解明に止まらず、透析アミロイドーシスのトランスジェニックマウスモデルを新たに開発し、(1) β 2-m からのアミロイド線維形成過程、及びアミロイド線維の β 2-m への脱重合過程を反応速度論的ならびに熱力学的に解析すると共に個体レベルでも検証し、線維形成・脱重合の統一的モデルを構築すること、(2) これら試験管モデルとマウスモデルの両方を駆使して種々の生体分子の線維形成・脱重合過程への影響を解析し、透析アミロイドーシス発症の分子基盤、特に関節組織への特異的沈着機構を明らかにすること、及び (3) 線維形成・脱重合過程を修飾する有機化合物を試験管レベルで探索すると共にモデルマウスを用いて検証し、治療薬開発への糸口をつかむこと、の三点を目指し本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) β 2-m アミロイド線維形成を促進する生体分子群の探索：

①リゾリン脂質：親水基の異なる5種類のリゾリン脂質について、それぞれ疎水基である脂肪酸の炭素数が異なるものを数種類ずつスクリーニングした。リゾリン脂質を種々の濃度 (0~1.0 mM) で添加した中性緩衝液中で、シードとなる断片化線維を β 2-m モノマーとともにインキュベートし、チオフラビン T を用いた分光蛍光定量法、並びに電顕観察にてアミロイド線維伸長の有無を確認した。また、リゾリン脂質分子の構造と線維伸長促進効果の強さとの相関を解析した。線維伸長促進効果が認められたリゾフォスファチジン酸のうち、疎水基の脂肪酸の長さが 16 のもの (MPPA) に関しさらに以下の実験を行った。(a) β 2-m モノマーの立体構造に及ぼす影響を CD スペクトル測定により調べた。(b) MPPA を含む中性緩衝液中で β 2-m アミロイド線維をインキュベートし、脱重合抑制効果を調べた。(c) MPPA による線維伸長反応系

において、線維伸長初速度のシード線維濃度ならびに β 2-m モノマー濃度に対する依存性を解析した。(d) シードを含まない中性緩衝液中で、 β 2-m モノマーを MPPA 存在下に長期間インキュベートし、モノマーからのアミロイド線維形成の有無を調べた。最後に透析患者の血漿リゾフォスファチジルコリン、及びリゾフォスファチジン酸濃度を測定し正常対照群と比較することで、リゾリン脂質の透析アミロイドーシス発症との関連性を検討した。試験管内実験に必要な β 2-m 線維を精製するためのアミロイド沈着組織は、患者より実験に使用する旨の同意書を得た後、手術時に採取した。血液透析患者の血漿リゾリン脂質測定に際しては、研究用に使用する旨の同意書を得た後、血液透析時に採取した。②遊離脂肪酸：遊離脂肪酸を種々の濃度で添加した中性緩衝液に、超音波破碎した β 2-m アミロイド線維 (シード) と β 2-m モノマーを添加して 37 °C で線維伸長反応を行い、チオフラビン T を用いた分光蛍光定量法、並びに電顕観察にてアミロイド線維伸長の有無を確認した。遊離脂肪酸として、飽和脂肪酸のラウリル酸 (C12)、ミリスチン酸 (C14)、パルミチン酸 (C16)、ステアリン酸 (C18)、不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2) の各ナトリウム塩、及び血中の組成を模倣するパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸の混合物を用いた。

(2) ヒト β 2-m トランスジェニック (Tg) マウスの作成とアミロイド沈着評価：

①ヒト β 2-m Tg マウスの作製：CAG (cytomegalovirus immediate early gene enhancer/chicken β -actin promoter and rabbit β -globin poly(A) signal) プロモーターの下流にヒト β 2-m cDNA を持つベクターを C57BL/6 マウス受精卵に投与し、Tg マウスを作製した。さらに β 2-m ノックアウトマウスと交配し、ヒト β 2-m のみを発現する交雑マウスを作製した ($hB2MTg^{+/+}\beta 2m^{-/-}$)。

②アミロイド沈着の観察：Tg マウスのアミロイド沈着を調べた。また、試験管内でリコンビナントヒト β 2-m から作成した β 2-m アミロイド線維、透析アミロイドーシス患者組織から抽出した β 2-m アミロイド線維、及びマウス肝臓から抽出した AApoAII アミロイド線維を Tg マウスに投与し、アミロイド沈着を調べた。動物を用いた実験に関しては、信州大学動物実験等実施規定により信州大学動物実験委員会の審査を経て学長の承認を得た。また、信州大学遺伝子組換え実験等安全委員会での審査を経て学長の承認を受けた。

(3) β 2-m アミロイド線維形成を阻害する有

機化合物の探索：

0.5 mM ドデシル硫酸ナトリウムを含む β 2-m アミロイド線維の中性伸長反応系に 100 μ M の NDGA、あるいはミリセチンを添加した。線維伸長の時間変化は、伸長線維を電気泳動後、 β 2-m のバンドを定量することにより求めた。

4. 研究成果

(1) β 2-m アミロイド線維形成を促進する生体分子群の探索：

①リゾリン脂質：(a) 疎水基である脂肪酸の炭素数が 14~18 で、中性 pH で親水基に陰性荷電を持つ、リゾフォスファチジン酸、及びリゾフォスファチジルグリセロールが、100 μ M 以上の濃度で β 2-m アミロイド線維の伸長促進効果を示した。(b) これらのリゾリン脂質のうち MPPA に関してさらにいくつかの実験を行い、MPPA が β 2-m モノマーに結合し、その立体構造を部分的に崩すこと、 β 2-m アミロイド線維に結合し中性 pH 域における脱重合を抑制することを明らかにした。(c) MPPA による線維伸長反応の初速度が、シード線維濃度、及び β 2-m モノマー濃度に比例して増加することを示した。(d) MPPA が中性 pH 域における β 2-m モノマーからのアミロイド線維形成を促進することを確認した。(e) 血液透析患者の血漿リゾフォスファチジン酸濃度が、正常対照群と比べて有意に増加していることを明らかにした。

②遊離脂肪酸：(a) 臨界ミセル濃度以上のラウリル酸、ミリスチン酸、オレイン酸、及びリノール酸は、それぞれ単独で強い線維伸長促進効果を示した(図 1)。(b) パルミチン酸、

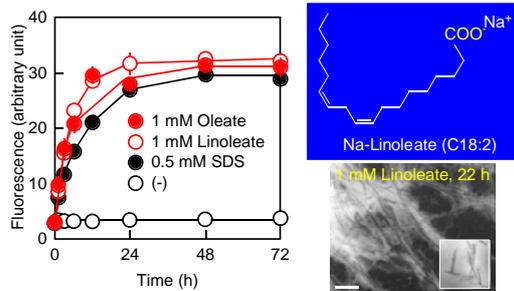


図1 遊離脂肪酸による中性pHでの β 2-mアミロイド線維の伸長反応誘導

ステアリン酸単独では伸長促進効果を示さなかったが、血中組成・濃度を模倣した脂肪酸混合物は、混合ミセルを形成することにより線維伸長促進効果を示した。(c) β 2-m に 0.1~5 mM のオレイン酸を添加した際の立体構造変化を CD スペクトルにより測定すると、 β シート構造が減少し、 α -ヘリックスおよびランダムコイル構造が増加した。このデータは、オレイン酸により β 2-m の天然構造がアミロイド原性の立体構造に変化したことを示している。(d) 遊離脂肪酸は血中では血清

アルブミンに結合して輸送される。上記試験管内線維伸長反応系に 0.5 g/dl の血清アルブミンを共存させ、遊離脂肪酸を添加した。血清アルブミンは一分子当たり脂肪酸を最大 7 分子結合するが、最大結合容量を超える脂肪酸を添加した場合にはじめて線維伸長促進効果を認めた。このデータは、血清アルブミン非結合型の遊離脂肪酸が、生体中で線維伸長を誘起しうることを示唆している(図 2)。

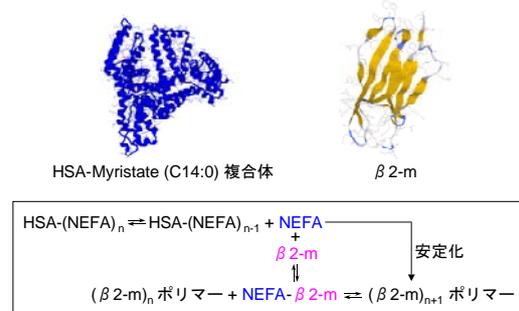


図2 血中におけるアルブミン(HSA)、遊離脂肪酸(NEFA)、 β 2-m モノマーの平衡と β 2-mアミロイド線維形成

(2) ヒト β 2-m トランスジェニックマウスの作成とアミロイド沈着評価：

①モデルマウスの作製：Tg/KO マウス ($hB2MTg^{+/+}m\beta 2m^{-/-}$) は、全身臓器でヒト β 2-m を発現し、血漿 β 2-m 濃度 (193 mg/L) は、健常人の約百倍、透析患者の 4 倍以上であった。

②アミロイド沈着：アミロイド線維を投与しなかった Tg マウスでは、24 ヶ月齢の Tg マウスでアミロイド沈着を認めたが、 β 2-m アミロイド沈着は観察されず、AApoAII アミロイドの沈着であった。患者組織から抽出した β 2-m 線維を投与したマウスでは、アミロイド線維を投与しなかったマウスや試験管内で合成した β 2-m 線維を投与したマウスに比べアミロイド沈着程度は重篤であったが、やはり β 2-m アミロイド沈着は観察されず、AApoAII アミロイド沈着のみが認められた。特に、椎間板及び膝関節にもアミロイド沈着を観察したが、AApoAII アミロイドの沈着であった。

(3) β 2-m アミロイド線維形成を阻害する有機化合物の探索：

100 μ M の NDGA、あるいはミリセチンは中性 pH での β 2-m アミロイド線維伸長を有意に抑制した。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望：

透析アミロイドーシスの病態解明に向け、生理的条件下で β 2-m アミロイド線維形成を促進する生体分子群の解明は最重要課題と言える。本研究は、生理的条件下で β 2-m アミロイド線維の試験管内形成を促進する生体脂質

分子（リゾリン脂質、遊離脂肪酸）を世界ではじめて同定し、 $\beta 2$ -mアミロイド線維形成・沈着の分子機構解明に大きく貢献することが出来た。今後の展望として、①本研究では確立できなかった透析アミロイドーシスモデルマウスを確立すること、②試験管内実験で探索した生体分子群の機能をモデルマウスで検証すること、③培養細胞系およびモデルマウスを用いた実験によりアミロイド線維による細胞・組織傷害機構を明らかにすること、及び④線維形成を阻害する有機化合物を試験管レベルでさらに探索すると共にモデルマウスを用いて検証し、治療薬開発への端緒をつかむこと、が挙げられる。

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 34 件）

下記は全て査読論文

1. A comprehensive model for packing and hydration for amyloid fibrils of $\beta 2$ -microglobulin. Lee, Y-H., Chatani, E., Sasahara, K., Naiki, H., Goto, Y. **J. Biol. Chem.** 284(4):2169-2175, 2009
2. Destruction of amyloid fibrils of a $\beta 2$ -microglobulin fragment by laser beam irradiation. Ozawa, D., Yagi, H., Ban, T., Kameda, A., Kawakami, T., Naiki, H., Goto, Y. **J. Biol. Chem.** 284(2):1009-1017, 2009
3. Growth of $\beta 2$ -microglobulin-related amyloid fibrils by non-esterified fatty acids at a neutral pH. Hasegawa, K., Tsutsumi-Yasuhara, S., Ookoshi, T., Ohhashi, Y., Kimura, H., Takahashi, N., Yoshida, H., Miyazaki, R., Goto, Y., Naiki, H. **Biochem. J.** 416(2):307-315, 2008
4. Lysophospholipids induce the nucleation and extension of $\beta 2$ -microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. Ookoshi, T., Hasegawa, K., Ohhashi, Y., Kimura, H., Takahashi, N., Yoshida, H., Miyazaki, R., Goto, Y., Naiki, H. **Nephrol. Dial. Transplant.** 23(10):3247-3255, 2008
5. Procollagen C-proteinase enhancer-1 (PCPE-1) interacts with $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2$ -m) and may help initiate $\beta 2$ -m amyloid fibril formation in connective tissues. Morimoto, H., Wada, J., Font, B., Mott, J. D., Hulmes, D. J., Ookoshi, T., Naiki, H., Yasuhara, A., Nakatsuka, A., Fukuoka, K., Takatori, Y., Ichikawa, H., Akagi, S., Nakao, K., Makino, H. **Matrix Biol.** 27(3):211-219, 2008
6. Visualization and classification of amyloid β supramolecular assemblies. Yagi, H., Ban, T., Morigaki, K., Naiki, H., Goto, Y. **Biochemistry** 46(51):15009-15017, 2007
7. Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils and protein A amyloid fibrils. Yan, J., Fu, X., Ge, F., Zhang, B., Yao, J., Zhang, H., Qian, J., Tomozawa, H., Naiki, H., Sawashita, J., Mori, M., Higuchi, K. **Am. J. Pathol.** 171(1):172-180, 2007
8. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H. A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H., Toda, T. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 14(4):332-340, 2007
9. The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure. Hirohata, M., Hasegawa, K., Tsutsumi-Yasuhara, S., Ohhashi, Y., Ookoshi, T., Ono, K., Yamada, M., Naiki, H. **Biochemistry** 46(7):1888-1899, 2007
10. 3D structure of amyloid protofilaments of $\beta 2$ -microglobulin fragment probed by solid-state NMR. Iwata, K., Fujiwara, T., Matsuki, Y., Akutsu, H., Takahashi, S., Naiki, H., Goto, Y. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 103(48):18119-18124, 2006
11. Inhibitors of amyloid β -protein aggregation mediated by GM1-containing raft-like membranes. Matsuzaki, K., Noguch, T., Wakabayashi, M., Ikeda, K., Okada, T., Ohashi, Y., Hoshino, M., Naiki, H. **Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes** 1768(1):122-130, 2007
12. Real-time and single fibril observation of the formation of amyloid β spherulitic structures. Ban, T., Morigaki, K., Yagi, H., Kawasaki, T., Kobayashi, A., Yuba, S., Naiki, H., Goto, Y. **J. Biol. Chem.** 281(44):33677-33683, 2006
13. Conformation of amyloid fibrils of $\beta 2$ -microglobulin probed by tryptophan mutagenesis. Kihara, M., Chatani, E., Iwata, K., Yamamoto, K., Matsuura, T., Nakagawa, A., Naiki, H., Goto, Y. **J. Biol. Chem.** 281(41):31061-31069, 2006
14. Seeding-dependent propagation and maturation of $\beta 2$ -microglobulin amyloid fibrils under high pressure. Chatani, E., Naiki, H., Goto, Y. **J. Mol. Biol.** 359(4):1086-1096, 2006

〔学会発表〕（計 26 件）

1. 【シンポジスト】内木宏延, 長谷川一浩, 小野賢二郎, 山田正仁, “アミロイド線維形成の重合核依存性重合モデルと線維形成阻害薬の探索”, 日本薬学会第 129 年会 シンポジウム (S-22) 「アミロイド β ペプ

チドの凝集・毒性発現の分子メカニズムの解明と低分子化合物による阻害：アルツハイマー病の克服に向けて」,

2009.03.27-28, 京都

2. 【シンポジスト】 内木宏延, “ヒトアミロイドーシスの分子病態解明に向けて”, 日本ヒトプロテオーム機構第6回大会シンポジウム「蛋白質のフォールディング病」, 2008.07.29-30, 大阪
3. 【シンポジスト】 内木宏延, “ヒトアミロイドーシスの分子病態解明に向けて：現状と展望”, 第8回日本蛋白質科学会年会シンポジウム「アミロイド構造生物学の新たな地平」, 2008.06.10-12, 東京
4. 【招待講演】 Naiki, H., Molecular pathogenesis of β 2-microglobulin-related amyloidosis. 24th Annual Meeting of the International Society of Blood Purification, 2006.09.8-10, Nara, Japan

[図書] (計2件)

1. タンパク質の事典(編:猪飼 篤, 伏見 譲, 卜部 格, 上野川修一, 中村春木, 浜窪隆雄), “アミロイドタンパク質”, 内木宏延 (分担執筆), pp. 109-112, 朝倉書店, 2008.07

6. 研究組織

(1)研究代表者

内木 宏延 (NAIKI HIRONOBU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10227704

(2)研究分担者

長谷川 一浩 (HASEGAWA KAZUHIRO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：60324159

大越 忠和 (OOKOSHI TADAKAZU)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：90362037

樋口 京一 (HIGUCHI KEIICHI)

信州大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20173156

後藤 祐児 (GOTO YUJI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：40153770