

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	劉 穎業
論文審査担当者	主 査 谷口 俊一郎 副 査 鈴木 龍雄 ・ 竹下 敏一
論文題目 <p style="text-align: center;">Distribution of Transmissible Amyloid Proteins in the Liver with Apolipoprotein A-II Amyloidosis                  (マウス ApoA-II アミロイドーシス肝臓における伝播力を持ったアミロイド蛋白質の分布)</p>	
(論文の内容の要旨) <p><b>【背景と目的】</b> アミロイドーシスとは本来可溶性で生理的機能を持つ蛋白質が様々な原因で変性して線維状 (アミロイド線維) に集合、沈着し、細胞、組織障害を引き起こす疾患群である。現在では 30 種類以上のアミロイド蛋白質が報告されており、アルツハイマー病、プリオン病、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)などが代表例である。マウス老化アミロイドーシスでは、血清高密度リポ蛋白質(HDL)のアポリポ蛋白質 A-II (ApoA-II)が加齢に伴って、アミロイド線維 (AApoAII) を形成し、全身臓器に沈着する。本学医学系研究科加齢生物学教室では AApoAII アミロイド線維が鋳型 (Seed)として作用し、生理的 ApoA-II 蛋白質を線維状蛋白質に変換することによって、アミロイドーシスが急速に進行し、さらに個体間で伝播することを世界に先駆けて明らかにしてきた (プリオン様伝播現象)。最近では伝播 (Seeding) 現象が、アルツハイマー病、パーキンソン病、炎症性 AA アミロイドーシスなどの病態進展の基本的メカニズムであることを多くの研究報告が明らかにしている。この様な状況の中で本研究では、マウス AApoAII アミロイドーシスを解析システムとして用いて、伝播現象に関与するアミロイド蛋白質の分布、性質と伝播性について解析した。</p> <p><b>【材料および方法】</b> 1) R1.P1-<i>Apoa2<sup>c</sup></i> マウスに 100 µg の AApoAII 線維を投与しアミロイドーシスを誘発した。投与後 2、4、7、10、13 ヶ月の異なった病態進展時期の R1.P1- <i>Apoa2<sup>c</sup></i> マウスを屠殺し、肝臓ホモジナートを超音波処理した後、遠心分離で不溶性 (3,000 g 沈殿、100,000 g 沈殿) と可溶性の 3 分画 (超音波処理の有無で全 6 分画) に分離した。各分画の ApoA-II 量、線維構造を示すチオフラビン T (ThT) 蛍光量、電子顕微鏡(EM)像 (ネガティブ染色) を解析し、さらに 2 ヶ月齢の R1.P1- <i>Apoa2<sup>c</sup></i> マウスへ投与して伝播力を解析した。2) アミロイド沈着が認められた投与 4、7、10 ヶ月後のマウスの肝臓よりアミロイド線維を分離した。非変性ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) によって分離した、I (モノマー&amp;ダイマー)、II (トリマー ~ ペンタマー)、III (ヘキサマー~デカマー)、IV (オリゴマー)、V (凝集体) の 5 分画をゲルから切り出し、蛋白質を抽出した。各分画の ApoA-II 量、ThT 蛍光量を測定した。さらに R1.P1-<i>Apoa2<sup>c</sup></i> マウスに 10 µg を投与し、2 ヶ月後に屠殺して伝播力を解析した。</p> <p><b>【結果】</b> 1) 組織学的には投与 2 ヶ月後から肝臓でのアミロイド沈着が観察されたが、Western blot 法では投与 4、7、10 及び 13 ヶ月後で ApoA-II の検出が可能であった。アミロイドーシスの病態進展度に拘わらず、ApoA-II のほとんどが 3,000 g 沈殿の不溶性分画に分布した。この分画では、強い ThT 蛍光と EM で多くの線維構造が観察されることから、ApoA-II は沈着の初期から、大部分が線維構造を取ることが示唆された。100,000 g 沈殿分画は強い ThT 蛍光を示したが、EM ではほとんど線維構造は観察されなかった。超音波処理によって 3,000 g 沈殿分画から 100,000 g 沈殿分画に ApoA-II の移動が認められ、EM では細断された線維状構造が観察された。3,000 g 及び 100,000 g 沈殿分画は強い伝播性を示した。可溶性分画には ApoA-II は検出されず、ThT 蛍光や EM での線維構造も観察されなかったが、弱い伝播力が認められた。可溶性分画を抗 ApoA-II 抗血清を用いて吸収 (immuno-depletion) を行うと、~25kDa の抗体特異的な蛋白質バンドが減少し、伝播力の低下が認められた。この蛋白質についてはさらなる検討が必要である。2) 非変性 PAGE によって分離した 5 分画 (モノマー~凝集体) の ThT 蛍光は低く、それぞれの分画の伝播力も低いことが明らかになった。これらの結果から、アミロイド B (AB) やプリオンで報告されている伝播力が強い可溶性のオリゴマーを検出することはできなかった。</p> <p><b>【結論】</b> 以上の結果から、AApoAII アミロイドーシスでは、伝播力を持つアミロイド蛋白質は、沈着の初期からほとんどが不溶性 (沈殿) 分画のアミロイド線維に存在すること、またモノマー~オリゴマーまではほとんど伝播力がないことが明らかになったと結論された。</p>	