

氏 名	ちば たくや 千 葉 卓 哉
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2310 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	Mouse senile amyloid deposition is suppressed by adenovirus-mediated overexpression of amyloid-resistant apolipoprotein A-II (アデノウイルスベクターによるアミロイド抵抗性アポリポ蛋白質 A-II の過剰発現はマウス老化アミロイドの沈着を抑制する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 北 徹 教 授 笹 井 芳 樹

論 文 内 容 の 要 旨

血清高密度リポ蛋白質 (HDL) の主要なアポ蛋白質であるアポリポ蛋白質 A-II (apoA-II) は、マウスにおいては加齢に伴い、アミロイド線維 (AApoA-II) として全身に沈着してくる。マウス apoA-II には 3 種の Variant (A, B, C 型) が知られており、このうち C 型の apoA-II をホモに持つマウスが最も重篤な若齢からアミロイドーシスを発症し、B 型をホモに持つマウスではほとんど発症しない。また B 型と C 型の apoA-II をヘテロに持つマウスにおいては、発症が顕著に抑制されていることがわがっている。このことは、B 型 apoA-II が AA, poAII 線維の伸長において阻害的に働く可能性を示唆している。本研究では B 型 apoA-II を発現するアデノウイルスベクターを作製し、その肝臓における過剰発現が、アミロイド線維の伸長に及ぼす影響について解析した。

ウイルスゲノムのほぼ全長を含み、かつ肝臓特異的な CAG プロモーターを組み込んだコスミドベクターに *Apoa2^b* cDNA を挿入し、ウイルス DNA との間の相同組み換えにより、B 型 apoA-II を発現する非増殖型組み換えアデノウイルスベクター (Adex1 CAT *Apoa2^b*) を作製した。精製し、価測定後、C 型 apoA-II をホモにもつコンジュニクマウス、R1. P1-*Apoa2^c* に尾静脈よりウイルスを接種した。その 3 日後にアミロイド線維の重合核である AApoA-II を尾静脈より投与しアミロイドーシスを誘導させた。AApoA-II 投与 1 カ月後に屠殺し、アミロイド沈着をコンゴレッド染色により調べた。また、B 型 apoA-II の過剰発現が血清中の apoA-II と apoA-I 濃度、および脂質濃度に与える影響について調べた。

Adex1 CAT *Apoa2^b* を接種したマウスでは 1 日後から肝臓での *Apoa2^b* mRNA の発現がみられ、7 日後まで発現力増続していた。ApoA-II 蛋白質の発現は 3 日後にピークが見られ、7 日後までコントロールウイルス (Adex1wl) を接種した対照群と比べて有意差が見られた。血清中の HDL 及び総コレステロール濃度もまた、対照群と比較して 7 日後まで有意に高かった。Adex1 CAT *Apoa2^b* 投与群では HDL 粒子のサイズが対照群と比較して大きいことが、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で示された。これらの結果は、HDL 粒子中に存在するアポ蛋白質のうち、B 型 apoA-II が占める割合が増加していることを示唆している。対照群においては、舌、小腸、胃の粘膜下に中程度の沈着が見られたのに対し、Adex1 CAT *Apoa2^b* 接種群においては、舌、小腸にこおいてのみ、わずかに沈着が認められるだけであった。沈着の度合いを数値化した Amyloid Index から顕著なアミロイド沈着抑制効果が確認され、その効果は接種したウイルスベクターの用量に依存していた。これらの結果は、AApoA-II 線維核と C 型 apoA-II とが接触し、線維の末端に結合する際に B 型 apoA-II が存在すると、線維伸長が阻害されることを示唆している。*In vitro* の系においても、同様な B 型 apoA-II による線維伸長抑制作用が確認された。

本研究において、B 型 apoA-II 発現アデノウイルスベクターをもちいてアミロイド沈着を顕著に抑制可能であることを示した。今後は線維伸長を抑制する分子機構を明らかにするとともに、より高い抑制効果を発揮するために必要なアミノ酸配列を決定するなどの検討を行うことが考えられる。

論文審査の結果の要旨

アミロイドーシスは前駆蛋白質がアミロイド線維を形成することにより発症する。アミロイド線維の形成は重合核形成と線維伸長の二段階で起こることが提唱されており、伸長反応の阻害が治療法の標的であると考えられる。本研究ではマウス老化アミロイドーシスをモデルとしてアミロイド抵抗性のB型 apoA-II による遺伝子治療が検討された。

肝臓特異的にB型 apoA-II を発現するアデノウイルスベクター (Adexl CAT *Apoa2^b*) を作製し、C型 apoA-II をホモにもつマウスに接種した。その3日後にアミロイド線維の重合核 (AApoA-II) を投与しアミロイドーシスを誘導させ、アミロイド沈着の度合いを調べた。Adexl CAT *Apoa2^b* を接種したマウスでは(1)肝臓での *Apoa2^b* mRNA の高発現(2)それに伴う apoA-II 蛋白質の発現(3)血清中の HDL 及び総コレステロール濃度の上昇(4)HDL 粒子のサイズの増加が示された。アミロイド沈着は対照群においては、舌、小腸、胃の粘膜下に中程度の沈着が見られたのに対し、Adexl CAT *Apoa2^b* 接種群においては、舌、小腸においてのみ、わずかに沈着が認められるだけであった。これらの結果から、AApoA-II と C 型 apoA-II との間の伸長反応をB型 apoA-II が阻害することが考察された。

以上の研究はアミロイド線維伸長の阻害機構の解明に貢献し、今後のアミロイドーシスに対する治療法の開発に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成12年12月8日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。