



TRANSFORMATION FROM SAA2-FIBRILS TO AA-FIBRILS IN AMYLOID FIBRILLOGENESIS: IN VIVO OBSERVATIONS IN MURINE SPLEEN USING ANTI-SAA AND ANTI-AA ANTIBODIES

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 新井, 一守 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1458

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 181号	学位授与年月日	平成 6年 7月 8日
氏名	新井 一守		
論文題目	<p>TRANSFORMATION FROM SAA2-FIBRILS TO AA-FIBRILS IN AMYLOID FIBRILLOGENESIS : IN VIVO OBSERVATIONS IN MURINE SPLEEN USING ANTI-SAA AND ANTI-AA ANTIBODIES (アミロイド線維形成における血清アミロイドA 2 蛋白線維からアミロイドA 蛋白線維への転換: 抗血清アミロイドA 蛋白抗体及び抗アミロイドA 蛋白抗体を用いたマウス脾の in vivo 観察)</p>		

博士(医学) 新井 一守

論文題目

TRANSFORMATION FROM SAA 2-FIBRILS TO AA-FIBRILS IN AMYLOID FIBRILLOGENESIS : IN VIVO OBSERVATIONS IN MURINE SPLEEN USING ANTI-SAA AND ANTI-AA ANTIBODIES

(アミロイド繊維形成における血清アミロイド A 2 蛋白線維からアミロイド A 蛋白線維への転換 : 抗血清アミロイド A 蛋白抗体及び抗アミロイド A 蛋白抗体を用いたマウス脾の *in vivo* 観察)

論文の内容の要旨

二次性アミロイド前駆物質である血清アミロイド A 蛋白 (serum amyloid A:SAA) からアミロイド線維が形成される過程を、アミロイド症モデルマウスを使い抗 SAA 抗体及び抗アミロイド A 蛋白 (amyloid A:AA) 抗体を用いて、形態学的、生化学的に経時観察した。

[方法]

アミロイド症惹起期間を著しく短縮するとされる amyloid enhancing factor (0.5ml 静注) と casein-Freund's complete adjuvant (1 ml 皮下注) を投与して、ICR マウスにアミロイド症を誘発し、8 日間経時観察した。

ウサギで作ったマウス SAA isotype 2 (SAA 2) の C 末端 20 ペプチドに対する抗体で、AA とは反応しないとされる抗 SAA 抗体と、従来から使用されている抗 AA 抗体を用いて、アミロイド形成過程におけるマウス脾の免疫染色を行い、光顕、電顕で観察した。なお組織切片の作成は 8% periodate-lysine-paraformaldehyde 固定の前包埋法を用い、免疫染色の二次抗体には抗ウサギ IgG (Fab')₂ を、発色には diaminobenzidine を各々使用した。

またマウス脾抽出物と血清を、8 M urea を含む 12.5% polyacrylamide gel で電気泳動後、上記抗体を用いて immunoblot し、SAA の脾への沈着を観察した。

[結果]

炎症惹起により血中濃度を増した SAA は、惹起後 48 時間から減少しはじめた。一方、脾抽出物では SAA の isotype のうち SAA 2 のみが immunoblotting 上、惹起後 48 時間から認められるようになり、8 日目まで漸増した。また脾の免疫光顕上でも惹起後 48 時間から濾胞周辺帯が陽性に染まりはじめたが、この時期はアミロイド形成開始時期とほぼ一致した。脾アミロイド出現早期 (惹起後 48 時間) の抗 SAA 抗体を用いた免疫電顕では、濾胞周辺帯の単核細胞細胞膜に沿って顆粒状陽性物が認められ、さらに細胞によっては陽性物が膜表面で融合顆粒状をなし、その中に細胞膜から伸長した直鎖線維状陽性物を有するものもみられた。この線維状物については、抗 SAA 抗体で陽性に染まるものは細胞膜近傍に限られ、細胞遠隔の線維は染まらなかった。これに対し、抗 AA 抗体では膜近傍の線維も遠隔の線維も共に陽性を示した。同様の所見は免疫光顕上のアミロイド結節においても認められた。

[考察]

マウス二次性アミロイド症では従来、28 個のアミノ酸からなる SAA 2 の C 末端部分がはずされてきた AA が重合して、アミロイド線維が形成されると考えられてきたが、炎症惹起により血中濃度を増した SAA 2 が濾胞周辺帯の単核細胞細胞膜表面に吸着し、重合して、線維構造 (SAA amyloid fibril) を形成し、伸長と共にその C 末端が線維からはずされ、主として AA からなるアミロイド線維 (AA amyloid fibril) が形成されることが推察された。

論文審査の結果の要旨

二次性アミロイド症は主として肝細胞で産出される serum amyloid A 蛋白 (以下 SAA) に由来するアミロイド A 蛋白 (以下 AA) 線維が網内系臓器等に沈着する疾患であるとされている。

本症では従来、SAA の C 末端側のポリペプチドが一部切断されてできた AA が重合して、アミロイド線維が形成されると考えられてきた。

申請者らは、次のような実験を行い、二次性アミロイド症では SAA のまま重合が行なわれてアミロイド線維が形成され、次いでその C 末端側ポリペプチドが切り離されることを示唆する結果を得た。

7 週間の雌 ICR マウスに casein-Freund's complete adjuvant 1 ml を皮下注射して炎症を惹起するとともに、アミロイド誘発期間を著しく短縮させる amyloid enhancing factor 0.5 ml を静注し、8 日間経時観察した。その間、血清中及び脾臓における SAA の代謝とアミロイド線維について、Western blot、光顕、免疫電顕などの手法を使って検索した。なお免疫化学には、本症の研究に従来から用いられている抗 AA 抗体に加えて、AA 前駆物質である SAA と反応し、AA とは反応しないとされる抗 SAA 抗体を作製し使用した。

その結果次のようなことが判明した。

casein による炎症惹起により血中濃度を増した SAA は 48 時間以後減少した。一方脾では惹起後 48 時間から、マウス SAA の 2 つの isotype のうち本症に関与するとされている SAA 2 のみが、immunoblotting によって、認められるようになり、8 日目までに漸増した。また免疫組織化学的にも、惹起後 48 時間から脾の濾胞周辺帯が抗 SAA 抗体で陽性に染まる線維状構造が認められた。これは細胞近傍に限られ、細胞遠隔の線維は陰性であった。なお、抗 AA 抗体では細胞遠隔の線維も陽性であった。さらに免疫光顕上のアミロイド結節においても、抗 AA 抗体は全体が陽性であるのに対し、抗 SAA 抗体は結節の辺縁部にのみ陽性であった。

これらの結果から二次性アミロイド症においては、炎症等で血中濃度を増した SAA (マウスでは SAA 2) が単核細胞 (脾では濾胞周辺帯) の細胞膜表面に吸着し、重合して線維状構造 (申請者らは論文中で SAA 2 amyloid fibril と呼称) をなし、伸長と共にその C 末端側がポリペプチドが SAA 2 アミロイド線維から切断されて、AA アミロイド線維が形成されることが示唆された。

以上の発表に対して次のような質疑ないし討論がなされた。

1. 表面にアミロイド線維が形成される単球はいかなる種類の単球か
2. 白脾臓と赤脾臓の境界部に何故最初にアミロイドが沈着するか
3. 何故、SAA 1 はアミロイド線維の形成に関与しないか
4. SAA の遺伝子解析はどのように進められているか
5. SAA の生物学的活性乃至意義は何か
6. Congo-red 染色後に始めてアミロイドが複屈折性を生じる理由は何か
7. SAA はどこでまたいかなる過程で分解されるのか
8. 今回の実験で、AA が重合してアミロイドになるという過程を否定したのか、それとも SAA の重合が主流であるということを主張しているのか

以上の質問に対する申請者の解答はおおむね適切であり、研究内容も博士 (医学) 学位論文としての水準に達しているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	喜納	勇			
	副査	教授	金子	榮藏	副査	教授	寺川 進
	副査	教授	藤田	道也	副査	助教授	星野 知之