

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 NAEEM MUHAMMAD

題 目 Studies on the Experimental Transmission of AA Amyloidosis Induced by Amyloid Fibrils from Different Animal Species

(異なる動物種由来のアミロイド線維により誘発される AA アミロイド症の実験的伝播に関する研究)

アミロイド症は、アミロイド線維の蓄積により特徴づけられる蛋白質の折りたたみ異常に起因する病気の総称である。アミロイド A (AA) 蛋白質を前駆蛋白とする AA アミロイド症は、動物に広く認められる疾病であり、慢性的な炎症疾患により引き起こされる。持続的な炎症状態は、炎症性サイトカインを誘発し、血清アミロイド A 蛋白質 (SAA) の血清濃度を 1000 倍以上にまで上昇させる。過剰発現した SAA は、アミロイドと呼ばれる  $\beta$  シート構造を有する AA アミロイド線維を形成する。アミロイド線維は、ニワトリやウシの脾臓、肝臓、小腸といったさまざまな臓器に蓄積することが報告されている。ヒトはこうした組織を消費することから、結果として臓器内に沈着した AA アミロイド線維を摂取するリスクを有する。AA アミロイド症は、絶え間ない炎症刺激により誘発される。一般に、実験的な AA アミロイド症を誘発するには、数週間から数ヶ月を要する。アミロイド症の誘発期間は、アミロイド症を発症した動物の組織抽出物を接種することにより短縮することができる。このような臓器抽出物には、それ自身、アミロイド線維を保有していることから、新たなアミロイド線維形成の鋳型となりうる。AA アミロイド線維の鋳型形成は、動物種を越えてアミロイド症を誘発する。マウスおよびウシ由来のアミロイド線維をマウスに投与した場合のアミロイド形成の病態や、アミロイドの沈着時のサイトカインやマクロファージの役割については、詳しく検討されていない。それゆえ、本研究では、AA アミロイド症の発症機構とその病態について研究した。

第 1 章では、マウスのアミロイドの蓄積に関して、実験的にアミロイドを投与後、440 日まで追跡調査した。マウスの AA アミロイド症は、マウスのアミロイド線維 300 マイクログラムと炎症刺激として 2% 硝酸銀 0.5ml を皮下に投与して誘発した。マウスの剖検は、接種後、異なった日に行いアミロイドの蓄積と減弱を検査した。アミロイド線維の蓄積は、免疫組織化学検査とコンゴレッド染色により行い、NIH イメージ J によりアミロイドの蓄積具合を評価した。アミロイドの蓄積は、接種後 20 日にピークに達し、40 日以降からアミロイドの蓄積が減少し始めた。一旦、蓄積したアミロイドは、240 日まで検出された。組織でのアミロイドの消失を確認後、初回投与後 330 日と 430 日に、再度、アミロイド線維と硝酸銀を投与した。2 回目の投与は、重篤なアミロイド症を誘発し、脾臓の濾胞の周辺や肝臓および腎臓組織にアミロイドの蓄積が観察された。血清中の SAA 濃度は、SAA 検出用の ELISA キットを用いて測定したところ、炎症刺激後に急速に上昇し、その後、減少することが明らかとなった。また、血清中のサイトカイン濃度は、サイトカイン CBA キットを用いてフローサイトメーターにより測定した。炎症刺激により炎症性サイトカインで

ある IL-6 の濃度が上昇した一方、アミロイド消失時では、炎症抑制サイトカイン IL-10 が高いことが明らかとなった。これらの結果は、アミロイドの蓄積と消失の機構には、炎症性サイトカインと炎症抑制サイトカインが重要な役目を果たしていることを示している。

第2章では、マウスおよびウシ由来のアミロイド線維を投与して発症した AA アミロイド症の長期動態について解析した。マウスおよびウシから抽出したアミロイド線維の定性および定量的な性状については、ウエスタンブロットで解析した。マウスのアミロイド症の誘発試験については、マウスおよびウシ由来のアミロイド線維をさまざまに組み合わせてマウスに投与して発症させた。マウスに蓄積したアミロイドの免疫組織化学的解析には、山羊抗マウス SAA1 抗体やマウス抗ウシ SAA1 抗体を用いた。免疫組織化学検査後のイメージ解析の結果は、ウシ由来アミロイド線維で誘発されたアミロイド症は、マウス由来のアミロイド線維で誘発された場合に比べて軽症であり、アミロイド線維の蓄積量も少なかった。ウシ由来アミロイド線維で誘発したアミロイドの消失は、マウス由来の時に比べて早かった。アミロイドの2回目の接種により、重篤なアミロイド症と全身性のアミロイドの蓄積が観察された。アミロイドの重度の沈着が、脾臓、肝臓および腎臓に観察された。アミロイド症でのマクロファージの役割を明らかにする目的で、F4/80 と CD68 発現について解析した。F4/80 および CD68 陽性マクロファージの発現は、アミロイド症を誘発させたマウスおよびウシ由来のアミロイド線維間で差は見られなかった。アミロイド線維の2回接種時において、血清中 IL-10 サイトカイン濃度が高値を示すと共に、重篤なアミロイド症を引き起こすことが明らかとなった。

本研究の結果は、マウスでの同種のアミロイド線維および異種動物のアミロイド線維により誘発されるアミロイド症の動態解析の理解に大きく貢献した。マウスでは、脾臓でのアミロイドの蓄積は最も多く、その次に肝臓と腎臓であった。マウス由来のアミロイド線維によるアミロイド症は、異種動物のウシ由来アミロイド線維に比べて顕著であり、2回の接種実験により、重篤な全身性アミロイド症を誘発した。一方、アミロイドの蓄積の消失も、時間の経過と共に進行した。サイトカイン濃度やマクロファージは、アミロイドの蓄積や消失と免疫学的に深く関わっている可能性が示唆された。今回の研究は、AA アミロイド症の病態と発症機構を知る上で、重要な所見を提供するものと思われる。

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 NAEEM MUHAMMAD

題 目 Studies on the Experimental Transmission of AA Amyloidosis  
Induced by Amyloid Fibrils from Different Animal Species

(異なる動物種由来のアミロイド線維により誘発されるAAアミロイド症の実験的伝播に関する研究)

Amyloidosis refers to a group of protein misfolding diseases characterized by amyloid deposition. Amyloid A (AA) amyloidosis is the most common form of amyloidosis in domestic animals, and is associated with chronic inflammatory diseases. Persistent inflammatory conditions cause pro-inflammatory cytokines to trigger a thousand-fold increase in the levels of serum amyloid A (SAA). The excess SAA is processed into AA fibrils with a cross  $\beta$ -pleated structure that is known as amyloid. Amyloid deposition has been reported in different organs such as spleen, liver, intestine, and muscle tissue of chicken and cattle. As humans consume animal organs as food, there is a risk of acquiring AA fibrils from dietary sources. In laboratory animals, AA amyloidosis can be induced after repeated inflammatory stimulation. Generally, the induction of experimental AA amyloidosis takes from weeks to months. The induction period can be shortened to days by administration of tissue extracts from animals with AA amyloidosis. The contents of such extracts have been ascribed to AA fibrils itself. The preformed AA fibrils act as a template for the formation of new AA fibrils. The template action of AA fibrils can span animal species, leading to cross seeding of amyloidosis. The exact kinetics of amyloidosis in mice after seeding with murine or bovine AA fibrils, and the role of cytokines and macrophages in the amyloid deposition has not been fully explored. Therefore, a study was required to investigate the kinetics and mechanism of AA amyloidosis.

In chapter 1, the kinetics of amyloid deposition in mice was investigated for a period exceeding 440 days. In experimental mice, AA amyloidosis was induced by intraperitoneal injection of 300  $\mu$ g of murine AA fibrils, and subcutaneous injection of 0.5ml of 2% silver nitrate solution. Autopsy of the mice was performed at different time points to examine the induction and disappearance of amyloid deposits. Amyloid deposits were evaluated using immunohistochemistry and Congo red staining methodologies. NIH image J was used to estimate the intensity of amyloid deposits in stained tissue sections. Peak levels of amyloid deposits were observed 20 days post inoculation (dpi) and disappearance of amyloid deposits was observed from 40 dpi onward. Only traces of amyloid deposits were detected at 240 days. A second injection with murine AA fibrils and silver nitrate was performed at 330 or 430 days, after disappearance of the initial amyloid deposits. The second inoculation caused severe amyloid deposition around the periphery of spleen follicles and in hepatic and renal tissues. A mouse SAA enzyme-linked immunosorbent assay test kit was used to measure SAA concentrations in sera samples. Assessment of cytokine levels in sera was performed using a mouse Th1/Th2/Th17 cytokine CBA kit. Injection of inflammatory stimuli caused higher serum levels of the proinflammatory cytokine interleukin (IL)-6, while higher levels

of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were observed upon disappearance of the amyloid deposits. These observations suggest that the proinflammatory and anti-inflammatory status might play an important role in the kinetics of the amyloid deposition and disappearance mechanisms.

In chapter 2, the long-term kinetics of murine AA amyloidosis seeded with murine or bovine AA fibrils was investigated. The quality and quantity of extracted murine or bovine AA fibrils were confirmed by Western blot analysis. For induction of AA amyloidosis, various combinations of bovine and murine AA fibrils were injected into mice. For immunohistochemical analysis of amyloid deposits, goat anti-mouse SAA1 or monoclonal mouse anti-bovine SAA1 antibodies were used. Image J scoring after immunohistochemical staining revealed that the incidence and severity of AA amyloidosis was quite low in mice inoculated with bovine AA fibrils compared to murine AA fibril administration. Clearance of amyloid deposits was faster in mice inoculated with bovine AA fibrils than with murine AA fibrils. Severe and systemic amyloid deposits were observed after the second inoculation. Organs with particularly massive amyloid deposits were spleen, liver and kidneys. To investigate the role of macrophages in amyloidosis, the expression of the F4/80 and CD 68 markers in macrophages was performed. Alterations in the expression of CD 68 and F4/80 macrophages were not observed following inoculation with either murine or bovine AA fibrils. A further increase in the already elevated serum level of IL-10 cytokine after the second inoculation was observed.

The results of this study provide a better understanding of the kinetics of experimental AA amyloidosis induced with homologous murine or heterologous bovine AA fibrils in mice. In mice, amyloid deposition starts in the spleen followed by the liver and kidneys. The efficiency in inducing amyloidosis with homologous murine AA fibrils is higher than heterologous bovine fibrils. A second inoculation results in a severe and systemic form of AA amyloidosis. Clearance of amyloid deposits occurs with the passage of time, as the pathogenesis of AA amyloidosis undergoes turnover. Cytokines and macrophages might be immunologically associated with amyloid deposition and disappearance. This study provides valuable information for further understanding the kinetics and mechanism of AA amyloidosis.