

氏名 (本 (国) 籍)	NAEEM MUHAMMAD (パキスタン)		
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 石黒直隆		
学位の種類	博士 (獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第471号		
学位授与年月日	平成28年9月26日		
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	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)		
審査委員	主査	岐阜大学 教授	柳井徳磨
	副査	帯広畜産大学 教授	古岡秀文
	副査	岩手大学 教授	御領政信
	副査	東京農工大学 准教授	鈴木和彦
	副査	岐阜大学 教授	石黒直隆

学位論文の内容の要旨

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 β 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。ヒトはこうした臓器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 J 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。

審 査 結 果 の 要 旨

アミロイド症は、蛋白質の折りたたみ異常により形成されるアミロイド線維が組織に蓄

積する疾患である。アミロイド A (AA) 蛋白質を前駆蛋白質とする AA アミロイド症は、ヒトおよび動物などに広く認められ、慢性的な炎症刺激により誘発される。動物ではニワトリやウシの AA アミロイド症がよく知られている。また、AA アミロイド症は、アミロイド線維の接種により他動物にも伝播が可能である。しかし、アミロイド症の異種動物への伝播性や宿主でのアミロイド線維の蓄積性については、詳しく解析されていない。そこで申請者は、マウスとウシ由来のアミロイド線維をマウスに投与して、アミロイド線維の伝播性と蓄積性、宿主でのサイトカインの動態やマクロファージの役割について解析した。

第1章では、マウスのアミロイド線維をマウスに実験的に投与して、AA アミロイド症の発症とアミロイド線維の蓄積について長期間解析した。アミロイド線維の蓄積は、接種後20日でピークに達し、その後減少し始めた。組織でのアミロイド線維の消失を確認後、330日と430日に再度アミロイド線維を投与した。2回目の投与で、重篤なアミロイド症を誘発し、脾臓や肝臓での蓄積は顕著であった。AA アミロイド症の誘発時にはサイトカイン IL-6 の上昇が、アミロイド消失時には IL-10 の上昇が顕著であった。これにより、アミロイドの蓄積と消失には、サイトカインが重要な役割を果たしていると考えられた。

第2章では、マウスあるいはウシ由来のアミロイド線維をマウスに投与して AA アミロイド症の誘発を長期間解析した。その結果、マウスおよびウシ由来のアミロイド線維は、AA アミロイド症を誘発したが、ウシ由来のアミロイド線維を投与したマウスは、マウス由来のアミロイド線維を投与したマウスに比べてアミロイド線維の蓄積は少なかった。アミロイド線維を再度投与した場合、重篤な AA アミロイド症が観察された。AA アミロイド症でのマクロファージの役割については、投与したアミロイド線維の由来による差は見られなかった。

上記のごとく、申請者は、AA アミロイド症は種を越えて伝播することを示した。また、アミロイド線維の2回目の接種により、AA アミロイド症は重篤化すること、さらにアミロイド線維の蓄積と消失には、サイトカインとマクロファージが深く関わっていることを示した。こうした研究成果は、AA アミロイド症の病態と発症機構を知る上で重要な知見を提供したものと認める。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論部として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Long-term kinetics of AA amyloidosis and effects of inflammatory restimulation after disappearance of amyloid depositions in mice
著 者 名 : Muhammad, N., Murakami, T., Inoshima, Y. and Ishiguro, N.
学術雑誌名 : Clinical & Experimental Immunology
巻・号・頁・発行年 : 181(2) : 133-141, 2015
- 2) 題 目 : Longitudinal study of experimental induction of AA amyloidosis in mice seeded with homologous and heterologous AA fibrils
著 者 名 : Muhammad, N., Murakami, T., Inoshima, Y. and Ishiguro, N.
学術雑誌名 : Inflammatory Research
巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Experimental induction and oral transmission of avian AA amyloidosis

in vaccinated white hens

著者名：Murakami, T., Muhammad, N., Inoshima, Y., Yanai, T., Goryo M. and
Ishiguro, N.

学術雑誌名：Amyloid

卷・号・頁・発行年：20 (2) : 80-85, 2013