

動物アミロイドーシスの病態解明

村上 智亮 (東京農工大学 大学院農学研究院)

mrkmt@cc.tuat.ac.jp

アミロイドーシスは難治性疾患として古くから研究が進められてきたものの、動物における病態多様性や発症機序については大部分が未解明である。受賞者は獣医病理学を基盤に、質量分析やハイパースペクトル解析など、独創的で新しい視点から研究分野を開拓し、古典的な稀少疾患とされていた動物アミロイドーシスが実は分子と病態の多様性に富む身近な疾患群であることを示し、アミロイドが招く数々の病態を解明してきた。

動物 AA アミロイドーシスの病理・伝播性の解明

アミロイド A (AA) アミロイドーシスは AA の全身諸臓器への沈着を特徴とする人や動物の致死性疾患であり、国内に数万人の患者が存在すると推定されている。アミロイドーシスは原因となる蛋白質によって分類され、現在までにヒトで 42 病型、動物で 21 病型が報告されているが、AA アミロイドーシスは人で 3 番目に、動物において最もよくみられる全身性アミロイドーシスである。しかしながら、特に動物において、その発生状況や発症機序は今なお不明な部分が多い。応募者は本研究において、家畜 AA アミロイドーシスの実態を把握することを目的とし、家畜の AA アミロイドーシスの病態を解析し、病理学的特徴を検証した。さらに、実験動物を用いて家畜由来の AA アミロイドの実験的伝播性について解析した。

牛においては、腎系球体へのアミロイド沈着を伴わない非定型 AA アミロイドーシスの存在を明らかにした(1)。採卵鶏においては若齢期の特定のワクチン刺激が発症要因として重要であり、潜在的な AA アミロイド沈着を生じることが解明した(2)。採卵鶏の潜在的なアミロイド沈着は 2 年後も胸筋に残存していた。これにより、アミロイドが沈着した牛レバーや鶏肉が食肉として流通している可能性を示した。さらにウズラ(3)や豚(4)では加齢性に AA アミロイドーシスの有病率が上昇することを明らかにした。

アミロイドを含む食肉の摂取による健康リスクを評価するため、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウズラを用いて AA アミロイドーシスモデルを開発し、これらを用いて病態の伝播性を明らかにしてきた。マウスやウサギにおいては、牛アミロイドの接種による異種間伝播モデルを開発し(5)、リンパ組織を介した経口吸収機序を明らかにした(6)。また、鳥類アミロイドーシスが伝播することを証明し(7)、AA アミロイドーシスが用量依存性に経口伝播すること(8)、ウズラ-ニワトリ間で異種間伝播することを実験的に証明した(3)。

動物アミロイドーシスの新規同定と病態解明

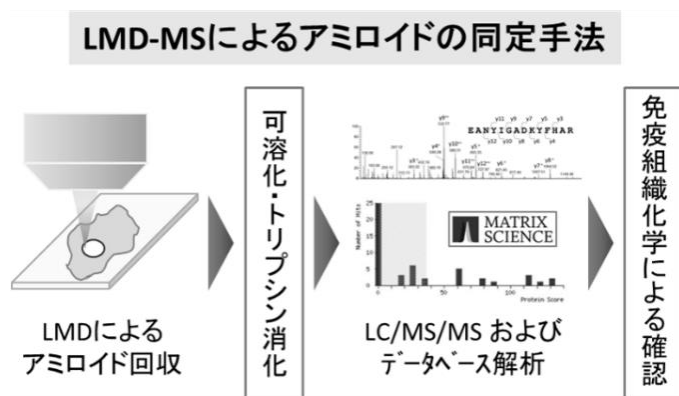
動物モデルを用いた比較病理学的アプローチはアミロイドジェネシスの理解に有効であり、これまで実験動物や自然発生症例を用いた基礎研究が一定の成果を上げてきた。しかしながら、2020 年までに動物で同定されていたアミロイドーシス病型はたった 10 種のみであり、

病態解明研究に資する自然発生モデルは不十分であった。そこで我々は近年、動物アミロイドーシスの新規病型探索および病態解明に注力してきた。

我々はまず、新規動物アミロイドを同定するための手法の開発に取り組んだ。アミロイドーシスの前駆蛋白質の同定には、人でも動物でも免疫組織化学が主流である。しかしながら、免疫組織化学が抱える以下の問題が、新たな動物アミロイドーシスの発見を妨げていた。

- 動物種により抗体の交差性が異なり、特に稀少動物では抗体の選択が困難。
- アミロイドタンパクに可変領域や変異がある場合、抗体が反応しない。
- 候補を予測した上での評価系であるため、未知のアミロイドには対応不可能。

本研究では、免疫組織化学が抱える問題を克服するため、新たな動物アミロイドーシス同定手法としてレーザーマイクロダイセクション-質量分析(LMD-MS)法を確立した。LMD-MS法は、切片上の少数のタンパク種を検出する免疫組織化学と異なり、LMDで回収された組織中の構成タンパクを網羅的に解析できる。また、膨大な生物デー



タベースを引用することで多様な動物種に対応可能である。さらにパラフィン包埋試料を利用できるため、サンプルの確保が容易という利点を有する。なお、現在では本法をより汎用化するため、LMDを使うことなく、実体顕微鏡観察下で通常のスライドガラスから関心領域のアミロイド沈着を回収し、分析する方法を確立済みである。

我々は質量分析法を駆使し、従来のアミロイド同定手法である免疫組織化学では同定出来なかった以下の10種類のアミロイド前駆蛋白質を動物で新たに同定・報告し、それぞれの病態解明研究に取り組んできた。現在までに動物で報告されているアミロイドーシス21病型の約半数は、我々が同定したものである。

表1. 受賞者らが新たに発見した動物アミロイドーシス病型

動物種	アミロイド前駆蛋白質	沈着組織	主たる病態形成要因
ラット	LPS-binding protein	乳腺	加齢に伴う沈着の足場形成(9)
ツマヤマネコ	EFEMP1	動脈	加齢を疑う(10)
イヌ	Keratin5	皮膚	加齢を疑う(11)
イヌ	α -S1-casein	乳腺	腫瘍における前駆蛋白質の発現上昇(12)
ワボウシタマリン	Apolipoprotein A-IV	全身	病因不明(13)
ニホンリス	Fibrinogen α -chain	全身	加齢(14)
イヌ、ネコ	Ameloblastin	歯肉	腫瘍における前駆蛋白質の発現上昇(15)
ホワイトライオン	Apolipoprotein C-III	全身	加齢(16)
ネコ	CRSP1	甲状腺	腫瘍における前駆蛋白質の発現上昇(17)
トガモトギ	Apolipoprotein E	肝臓	脂質代謝異常(18)

おわりに

提案者が新たに発見した病型で着目すべきは、多くの病型において明確な基礎疾患や遺伝子変異が観察されず、加齢が主たる病因であった点である。例えば、ニホンリスの AFib アミロイドーシスは加齢と明確な相関があり、6 歳以上の高齢個体 17 匹では全例に発症がみられた。同様に、Apolipoprotein C-III アミロイドーシスは人では Apolipoprotein C-III の 1 アミノ酸置換によって生じる極めて稀な遺伝性疾患だが、18 歳以上の高齢ライオン 4 頭で認められた同疾患に Apolipoprotein C-III の変異は認められず、加齢に伴う蛋白質の不安定化が原因と考察された。動物において、飼育下の動物は野生動物よりも長寿化する傾向がある。例えば、ニホンリスやライオンの野生下の寿命はそれぞれ 3-5 年および 10-15 年程度であるため、野生個体でアミロイドーシスが発生する可能性は低い。これらの病態は紛れもなく、長寿化がもたらした飼育動物の新興老年病である。

これまでのアミロイドーシス関連研究は主に個々における「どのように発症するのか (How)」という至近原因の解明を主目的とし、「なぜアミロイドーシスになるのか (Why)」という究極原因の追究には至っていなかった。しかしながら現在、人を含め様々な動物種で身近に観察されるようになったアミロイドーシスに適切に対処していくには、「ある種に系統的に備わっているどのような性質が、アミロイドーシスに対する脆弱性を高めているのか」という進化論的な問いへと思考を転換していく必要がある。今後はこれまでに発見した多様な脊椎動物における病態解析を通じて、アミロイドーシスの病態理解に進化医学的アプローチを採用し、新たな学術領域を展開したい。

謝辞

研究の楽しさ・研究者の在り方を御指導賜りました帯広畜産大学名誉教授 松井高峯先生、岐阜大学名誉教授 石黒直隆先生に厚く御礼申し上げます。また、様々な面から御支援賜りました東京農工大学獣医毒性学研究室の卒業生及び在学生の皆さま、共同研究者の先生方に深く感謝いたします。最後に、日本農学進歩賞の受賞にあたり、推薦を賜りました東京農工大学 船田良農学府長をはじめ、関係の先生方に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Murakami T, Inoshima Y, Kobayashi Y, Matsui T, Inokuma H, Ishiguro N. Atypical AA amyloid deposits in bovine AA amyloidosis. *Amyloid*. 2012;19(1):15–20.
2. Murakami T, Inoshima Y, Sakamoto E, Fukushi H, Sakai H, Yanai T, et al. AA amyloidosis in vaccinated growing chickens. *J Comp Pathol*. 2013;149(2–3):291–7.
3. Nakayama Y, Kamiie J, Watanabe G, Suzuki K, Murakami T. Spontaneous, Experimentally Induced, and Transmissible AA Amyloidosis in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). *Vet Pathol*. 2017;54:912–21.
4. Inoue M, Miyazaki S, Kobayashi N, Kangawa A, Murakami T. Pathological Characterization of Spontaneous AA Amyloidosis in Microminipigs. *Toxicol Pathol*. 2023;51(5):257–63.
5. Murakami T, Inoshima Y, Watanabe K, Kobayashi Y, Matsui T, Kurazono H, et al. Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore hocks-affected rabbits. *Amyloid Int J Exp Clin*

- Investig Off J Int Soc Amyloidosis. 2011;18(3):112–8.
6. Iwaide S, Oba R, Kobayashi N, Murakami T. Local administration of amyloid enhancing factor initiates in situ amyloid A deposition followed by systemic lesions in mice. *Exp Anim*. 2023;72(2):218–23.
 7. Murakami T, Muhammad N, Inoshima Y, Yanai T, Goryo M, Ishiguro N. Experimental induction and oral transmission of avian AA amyloidosis in vaccinated white hens. *Amyloid*. 2013;20(2):80–5.
 8. Miyoshi T, Ono A, Shimada K, Murakami T. Experimental model of oral transmissible AA amyloidosis in quails. *Avian Pathol*. 2019;48(6).
 9. Murakami T, Noguchi K, Hachiya N, Kametani F, Tasaki M, Nakaba S, et al. Needle-shaped amyloid deposition in rat mammary gland: evidence of a novel amyloid fibril protein. *Amyloid*. 2020;27(1):25–35.
 10. Miyazaki S, Kobayashi Y, Kametani F, Kobayashi K, Iwaide S, Yanai T, Murakami T. Systemic amyloidosis derived from EFEMP1 in a captive Tsushima leopard cat. *Vet Pathol*. 2022;59(1):152–6.
 11. Kobayashi K, Iwaide S, Sakai H, Kametani F, Murakami T. Keratinic amyloid deposition in canine hair follicle tumors. *Vet Pathol*. 2023;60(1):60–8.
 12. Murakami T, Kaku T, Tsukakoshi K, Iwaide S, Itoh Y, Hisada M, et al. Identification of novel amyloidosis in dogs: α -S1-casein acquires amyloidogenicity in mammary tumor by overexpression and N-terminal truncation. *Vet Pathol*. 2023;60(2):203–13.
 13. Sedghi Masoud N, Iwaide S, Itoh Y, Hisada M, Une Y, Murakami T. Apolipoprotein A-IV amyloidosis in a cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Amyloid*. 2023;30(3):348–50.
 14. Iwaide S, Ito N, Ogino S, Kobayashi N, Koyama S, Hisamoto S, Kondo H, Itoh Y, Hisada M, Hoshino Y, Nakagawa D, Matsubara Y, Nakamura S, Satoh H, Shibuya H, Murakami T. Fibrinogen A α -chain amyloidosis outbreaks in Japanese squirrels (*Sciurus lis*): a potential disease model. *J Pathol*. 2023;261(1):96–104.
 15. Sedghi Masoud N, Iwaide S, Itoh Y, Hisada M, Harada T, Murakami T. Identification of Ameloblastin as an Amyloid Precursor Protein of Amyloid-Producing Ameloblastoma in Dogs and Cats. *Vet Sci*. 2023;10(2):166.
 16. Kobayashi N, Iwaide S, Fukui H, Une Y, Itoh Y, Hisada M, Murakami T. Apolipoprotein C-III amyloidosis in white lions (*Panthera leo*). *Vet Pathol*. 2024;61(4):574-581.
 17. Murakami T, Kobayashi N, Iwaide S, Itoh Y, Hisada M, Izawa T, et al. Identification of calcitonin receptor-stimulating peptide 1-derived amyloid in a feline C-cell carcinoma. *Amyloid*. 2023;1–3.
 18. Ikeda M, Kondo H, Murakami T, Iwaide S, Itoh Y, Shibuya H. Identification of apolipoprotein E-derived amyloid within cholesterol granulomas of leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Sci Rep*. 2024;14(1):13746.