

総 説

アミロイドーシスの発症機序について

高橋睦夫

山口大学医学部保健学科・基礎検査学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8554)

Key words : アミロイドーシス, マクロファージ, serum amyloid A protein, amyloid enhancing factor, 発症機序

はじめに

アミロイドーシスは全身性アミロイドーシスと限局性アミロイドーシスに分類されるが、何れのアミロイドーシスもアミロイド線維という形態学的に特徴のある細線維が細胞・組織間隙に沈着し、種々の機能異常を引き起こす疾患と定義されている。アミロイド線維に変わりうる蛋白は“前駆体蛋白”とよばれ、現在、約20種類のものが見出されている。アミロイドーシスの発症機序に関しては、アミロイドの前駆体蛋白そのものにアミノ酸配列などの異常があり、アミロイド線維に変わりやすいことが知られているが、構造異常を有さない前駆体蛋白もアミロイド線維に変わりうる。例えば、慢性関節リウマチ患者の1割程度が、経過中、続発性アミロイドーシス(AAアミロイドーシス)を合併するが、そのような患者においても、前駆体蛋白(serum amyloid A protein, SAA)に構造異常は見出されていない。このように、アミロイドーシスの発症には、前駆体蛋白の増加が必要条件であるが、それ以外に、何らかの因子が加わっていることが推測されている。従来より、全身性アミロイドーシス、特に続発性アミロイドーシス(AAアミロイドーシス)においては、前駆体蛋白がアミロイド線維に変わる際に網内系細胞(マクロファージ)が重要な役割を果たしていると考えられてきた。本稿では、アミロイドと網内系細胞の歴史的背景を概説し、アミロイドーシスの発

症におけるマクロファージの関与について述べる。

I. アミロイドと網内系細胞の歴史的背景

1924年Domagkが始めてアミロイド形成に網内系の関与を示唆し、Smetana¹⁾はアミロイドの形成に網内系細胞が密接に関わっていることを報告した。Grayzelら²⁾は実験的アミロイドーシスで、アミロイドが最初に出現するのは、網内系細胞の胞体内であり、アミロイドーシスは網内系が関係した蛋白代謝異常であると述べている。1952年から1964年にかけて、Teilum³⁾は実験的アミロイドーシスの発症過程を光顕レベルで詳細に検討し、“two-phase cellular theory”を提唱して、網内系細胞によるアミロイドの産生説を発表した。

1950年代からアミロイドーシスの研究に電子顕微鏡が取り入れられるようになり、1959年CohenとCalkins⁴⁾は、電子顕微鏡を用いてアミロイドが細線維よりなることを初めて報告した。その後、多くの研究者が網内系細胞の胞体の陥凹部からアミロイド線維の束が細胞外に向かって放射状に配列する像を、網内系細胞のアミロイド産生像と報告した^{5, 6)}。

1970年代には、アミロイドーシスの研究に生化学的手法が用いられるようになり、1971年Bendittら⁷⁾は、続発性アミロイドーシスの症例から従来の免疫グロブリンのlight chainとは異なったアミロイド蛋白を抽出することに成功し、この蛋白はamyloid A protein(AA)と命名された。その後、このAA蛋白の前駆体蛋白は血中に存在することがわかり、serum amyloid A protein(SAA)と名付けられた。

平成14年8月30日受理

SAAはアミノ酸分析により、104残基のアミノ酸から構成され、そのN末端から76番目までの配列がアミロイド蛋白AAと一致する。SAAは急性期蛋白の一種で、正常でも血清中にhigh density lipoproteinと結合した状態で微量存在しているが、炎症刺激などにより正常の500~1000倍にも上昇すると報告されている。

Glennerら⁸⁾は、Bence-Jones蛋白を37°Cでペプシン処理を行って、アミロイドと同じ特性を持った細線維を作り出すことに成功した。このことからGlennerは、アミロイドは血中の免疫グロブリンのlight chainがマクロファージのlysosome酵素で分解され、フラグメントになって凝集・重合し、細線維となって細胞外に沈着したものと考えた。その後、Bence-Jones蛋白にヒトのlysosome分画を添加して、アミロイドと同じ線維が得られたこと⁹⁾や、網内系細胞とアミロイド線維の関係を示す電顕所見などにより、Glennerの説は多くの研究者に支持された。

II. 実験的アミロイドーシスとマクロファージ

実験的に惹起されたアミロイドーシスの肝臓を光学顕微鏡で観察すると、結節状のアミロイド沈着の周囲にKupffer細胞が取り囲む像がしばしば認められる。このような部を電子顕微鏡でみると、Kupffer細胞の胞体からアミロイド線維が束状、いわゆるアミロイド束amyloid bundleとなって細胞外へ放射状に放出されている像が観察される。そのような像をみて、多くの研究者はKupffer細胞がアミロイド線維を産生している像と考えたが¹⁰⁾、一方では、Kupffer細胞は旺盛な貪食能を有する細胞であるので、Kupffer細胞は細胞外に沈着したアミロイド線維を貪食している像と考える研究者もいた。現在も、この2つの相反する説は完全には解決されていないが、恐らく両者が並行して起こっているであろうと推測される。

以下、われわれの実験結果を中心に諸家の報告と併せて実験的マウスアミロイドーシスにおけるマクロファージの役割について述べる。

1) アミロイド沈着期とマクロファージ

動物にカゼイン、硝酸銀、細菌の菌体成分(lipopolysaccharide)などの投与による炎症性刺激

を加えることで、比較的容易に実験的アミロイドーシス担体を作ることができる。炎症性刺激によって惹起された動物のアミロイドーシスのアミロイド蛋白は、ヒトの続発性アミロイドーシスと同じくAA蛋白で、その前駆体蛋白はSAAである。マウスのSAAにはSAA1, SAA2, SAA3と3種類のもものが報告されている。この中のSAA2のみがアミロイド線維形成に関与し、SAA2は肝細胞が主な産生細胞である¹¹⁾。マウスにカゼイン注射などのアミロイドーシス惹起刺激を加えると、マクロファージからinterleukin-1, tumor necrosis factor, interleukin-6などのサイトカインが産生され、それによって肝細胞のSAAの産生が亢進すると考えられている¹²⁾。肝細胞で産生されるSAAはアミロイドーシス惹起注射(炎症刺激)後1日目が最も多く、経過と共に減少するが、アミロイド沈着期(惹起後10日目頃)にも肝細胞でのSAAの産生が認められている。

Kupffer細胞では、まだアミロイド沈着がみられない時期(前アミロイド期)には、細胞膜表面あるいはphagosomeの中にSAAが認められている¹³⁾。特に細胞膜の複雑に入り組んだ陥凹部にはSAAが多く捕捉されていた。しかし、Kupffer細胞では実験の全経過を通じて蛋白合成に関与する小器官にSAAの存在が認められなかったことより、Kupffer細胞は肝細胞で産生されたSAAをpinocytotic mechanismで胞体内に取り込むことが考えられた¹³⁾。アミロイドが出現するごく初期、すなわちアミロイド線維がごく微量存在する時期に、稀にKupffer細胞の胞体内にアミロイド線維がみられ、lysosomal dense bodyの融合が同部に認められることがある。このような部を酸性ホスファターゼ反応の標本で検索すると、このKupffer細胞内のアミロイド線維を入れた構造物には酸性ホスファターゼの活性がみられ、アミロイド線維の形成にlysosome酵素が関与するであろうことが推測された¹⁴⁾。しかし、アミロイド沈着の初期において、このようなKupffer細胞の胞体内にアミロイド線維がみられることは稀で、アミロイド線維のほとんどはKupffer細胞の細胞膜に接した細胞外に認められている。一見、細胞内とみられるアミロイド線維の多くも細胞膜の深い陥凹部で細胞外に存在する¹⁴⁾。これらの所見からアミロイド線維が形成される場合は、大部分がKupffer細胞の細胞膜に接した細胞外で、一部が細

胞内と考えられた。

このアミロイド沈着期とマクロファージの関係をさらに詳細に検索するため、脾臓のアミロイドーシスについて検討した¹⁵⁾。実験的アミロイドーシスにおいて、アミロイドは全身諸臓器の最初に脾臓に沈着することがよく知られている。そこで、アミロイドーシスを短期間で発症させうる amyloid enhancing factor (AEF) とカゼイン投与によるアミロイドーシス惹起を行った。投与後2日目に、微量のアミロイド沈着がマウス脾の濾胞周辺帯と白脾髄の細胞間隙に認められた。この時期を免疫電顕法で観察すると、濾胞周辺帯と白脾髄境界部に存在している一部のマクロファージの胞体内で lysosome と考えられる類円形～菱状の dense body 内にアミロイド線維と考えられる細線維構造がみられた。また、マクロファージによっては、線維構造を有さない dense body 内にも SAA が認められた¹⁵⁾。この結果より、アミロイド線維は脾臓のマクロファージの lysosome 内で形成されることが推測された。この仮説を実証するために、アミロイドの吸収実験を行って、マクロファージによるアミロイド線維の貪食像を解析し、アミロイド沈着期の像と比較検討した^{15, 16)}。

2) アミロイド吸収期とマクロファージ

方法としては、カゼイン連続皮下投与によりマウスの脾臓にアミロイドーシスを惹起させ、脾臓を部分的に切除して多量のアミロイド沈着があることを確認した後、カゼイン投与を中止してそのまま放置し、脾臓のアミロイド沈着量を約1/2に吸収させた。

アミロイドの結節内にマクロファージの侵入がみられ、それらのマクロファージの胞体内には多数の不整形の dense body あるいは vacuole がみられた。これらの構造物内には種々の消化過程にあるアミロイド線維と他の不定形の貪食された物質が混在し、この小器官は heterophagosome と考えられた。また、一部には、吸収されて間がないと考えられる比較的 intact なアミロイド線維も認められた。一方、アミロイド沈着期のものは、dense body の形態が円形～紡錘形と比較的揃っていて、他の貪食された物質の混入がみられていない。これらの実験結果より、アミロイド沈着期のマクロファージの胞体内にみられたアミロイド線維は、細胞外のものを貪食したも

のではなく、肝細胞で産生され、血中に分泌された SAA がマクロファージに貪食された後、胞体内でアミロイド線維に変化したものと考えられた¹⁵⁾。

III. マクロファージの機能異常とアミロイドーシス

全身性あるいは限局性の如何を問わず全てのアミロイドーシスにおいて、その発症には前駆体蛋白の量的な増加(過剰産生)が必要である。家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)では、沈着するアミロイドはトランスサイレチン由来であるが、FAPの患者の大部分はトランスサイレチンのN末端から30番目のバリンがメチオニンに置換した異型トランスサイレチンが肝細胞で作られ、アミロイドとして沈着する。このように、アミロイドーシスの発症にはその前駆体蛋白自体の質的な異常も存在することは事実である。しかしながら、前駆体蛋白が増加したからといって、すべての個体にアミロイドーシスが発症するわけではない。例えば、多発性骨髄腫では、ベンス・ジョーンズ蛋白のλ型(特にλVIサブクラス)のものがκ型よりアミロイドーシスを発症しやすいが、λ型だからといって全ての患者にアミロイドーシスを合併するわけではない。この前駆体蛋白の質的・量的異常の他にアミロイドーシスの発症に関わるものとして、マクロファージの機能異常が考えられている。

Lavieら¹⁷⁾はアミロイドーシスの患者の monocyte を培養して、その培養液中にSAAを加えると、AA蛋白と同じ分子量の蛋白にまでしか分解されず、健康人では、さらに小さな分子量の蛋白にまで分解されたと報告し、アミロイドーシス患者の monocyte の機能異常を指摘している。また、彼らは、このSAAの分解に関与する酵素は monocyte の細胞膜面で働く serine esterase で elastase の一種であろうと報告している。FuksとZucker-Franklin¹⁸⁾も実験的アミロイドーシスにおいて、アミロイドが沈着する以前にKupffer細胞の機能異常が存在することを明らかにしている。

アミロイドーシス発症に関与する因子として、実験的アミロイドーシスの項で簡単に記載したが、アミロイドーシスを短期間で発症させうる amyloid enhancing factor (AEF) が重要である。通常の実験的アミロイドーシスでは、カゼインをマウスの皮下に4週間程度連続投与しないとアミロイドーシス

が発症しないが、AEFとカゼインの1回投与のみで、1日～2日後の短期間で脾臓にアミロイド沈着が起こる。このようにAEFは非常に強い生理的活性を有する物質であり、多くの研究者がその分離・精製に精力を注いできた¹⁹⁾。その結果、AEFはアミロイド惹起刺激をした動物の脾臓の細胞や好中球などの細胞成分²⁰⁾や沈着したアミロイド自体あるいはそれらをホモジネイトした上清に存在することが確認されている。AEF活性は腹腔マクロファージにも存在し、マウスの尾静脈からマクロファージを静注すると、donorの肺の毛細血管内で投与されたマクロファージの細胞膜面にアミロイド線維の形成が認められている²¹⁾。また、分子工学的にin vitroで合成した種々のアミロイド線維にもAEF活性が存在することが明らかとなっている。

最近では、AEFに含まれている断片化したアミロイド線維が核 (seed) となって、アミロイド沈着が促進されるとの報告もある²²⁾。このAEFは動物に経静脈的や腹腔内投与のみならず、経口投与にてもアミロイドーシスの発症が促進され、ヒトの続発性アミロイドーシス (AAアミロイドーシス) の発症に重要な役割を果たしていることが推測される²³⁾。

おわりに

アミロイドーシスの領域においても、分子病理学あるいは遺伝子工学の技法が取り入れられ、前駆体蛋白の遺伝子やアミノ酸異常などが次第に明らかにされつつある。しかしながら、現在もなお、組織に多量に沈着したアミロイドを選択的に吸収・除去させる方法は見出されてなく、全身性アミロイドーシス、特に続発性アミロイドーシス (AAアミロイドーシス) の決定的な治療法はない。アミロイドーシスの発症機序の解明と並行して、治療薬を含めたアミロイドーシスの治療法の開発が急務である。

謝 辞

この総説の脱稿後、内野文彌名誉教授がご他界されました。私の実験は、故内野文彌先生のご指導のもと、第一病理学教室で行った成果をまとめたもので、先生の生前のご指導に深く感謝申し上げますとともに、心より哀悼の意を表します。また、本学医学

科石原得博教授、保健学科岩田隆子教授をはじめとして、本研究にご協力いただいた第一病理学教室の諸先生方に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Smetana H. The relation of the reticuloendothelial system to the formation of amyloid. *J Exp Med* 1927 ; 45 : 619-632.
- 2) Grayzel HG, Jacobi M, Warshall HB, Bogin M, Bolker H. Amyloidosis. Experimental studies. *Arch Pathol* 1934 ; 17 : 50-75.
- 3) Teilum G. Pathogenesis of amyloidosis. The two-phase cellular theory of local secretion. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1964 ; 61 : 21-45.
- 4) Cohen AS, Calkins EA. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 1959 ; 183 : 1202-1203.
- 5) Gueft B, Ghidoni JJ. The site of formation and ultrastructure of amyloid. *Am J Pathol* 1963 ; 43 : 837-854.
- 6) Uchino F. Pathological study on amyloidosis. Role of reticuloendothelial cells in inducing amyloidosis. *Acta Pathol Jpn* 1967 ; 17 : 49-82.
- 7) Benditt EP, Eriksen N, Hermodson MA, Ericsson LH. The major proteins of human and monkey amyloid substance: Common properties including unusual N-terminal amino acid sequences. *FEBS Lett* 1971 ; 19 : 169-173.
- 8) Glenner GG, Ein D, Eanes ED, Bladen HA, Terry W, Page DL. Creation of "amyloid" fibrils from Bence-Jones proteins in vitro. *Science* 1971 ; 174 : 712-714.
- 9) Epstein WV, Tan M, Wood IS. Formation of "amyloid" fibrils in vitro by action of human kidney lysosomal enzymes on Bence-Jones proteins. *J Lab Clin Med* 1974 ; 84 : 107-110.
- 10) Shirahama T, Cohen AS. Intralysosomal formation of amyloid fibrils. *Am J Pathol* 1975 ; 81 : 101-116.
- 11) Hoffman JS, Ericsson LH, Eriksen N, Walsh KA, Benditt EP. Murine tissue amyloid protein AA: NH₂-terminal sequence identity with only

- one of two serum amyloid protein (Apo SAA) gene products. *J Exp Med* 1984 ; **159** : 641-646.
- 12) Sipe JD, Vogel SN, Sztejn MB, Skinner M, Cohen AS. The role of interleukin 1 in acute phase serum amyloid A (SAA) and serum amyloid P (SAP) biosynthesis. *Ann NY Acad Sci* 1982 ; **389** : 137-150.
- 13) Takahashi M, Yokota T, Yamashita Y, Ishihara T, Uchino F. Ultrastructural evidence for the synthesis of serum amyloid A protein by murine hepatocytes. *Lab Invest* 1985 ; **52** : 220-223.
- 14) Uchino F, Takahashi M, Yokota T, Ishihara T. Experimental amyloidosis. Role of the hepatocytes and Kupffer cells in amyloid formation. *Appl Pathol* 1985 ; **3** : 78-87.
- 15) Takahashi M, Yokota T, Kawano H, Gondo T, Ishihara T, Uchino F. Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. *Virchows Arch A* 1989 ; **415** : 411-419.
- 16) Ishihara T, Uchino F. Pathological study on amyloidosis. Amyloid formation and resorption in Kupffer cell. *Recent Adv in RES Res* 1975 ; **15** : 145-171.
- 17) Lavie G, Zucker-Franklin D, Franklin EC. Elastase-type protease on the surface of human blood monocytes: Possible role in amyloid formation. *J Immunol* 1980 ; **125** : 175-180.
- 18) Fuks A, Zucker-Franklin D. Impaired Kupffer cell function precedes development of secondary amyloidosis. *J Exp Med* 1985 ; **161** : 1013-1028.
- 19) Axelrad MA, Kisilevsky R, Willmer J, Chen SJ, Skinner M. Further characterization of amyloid enhancing factor. *Lab Invest* 1982 ; **47** : 139-146.
- 20) Yokota T, Ishihara T, Kawano H, Takahashi M, Yamashita Y, Gondo T, Fujinaga Y, Uchino F. Immunocytochemical evidence of amyloid-enhancing factor (AEF) in polymorphonuclear leukocytes. *Acta Pathol Jpn* 1989 ; **39** : 349-355.
- 21) Shirahama T, Miura K, Ju ST, Kisilevsky R, Gruys E, Cohen AS. Amyloid enhancing factor-loaded macrophages in amyloid fibril formation. *Lab Invest* 1990 ; **62** : 61-68.
- 22) Lundmark K, Westermark GT, Nyström S, Murphy SL, Solomon A, Westermark P. Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Pro Natl Acad Sci* 2002 ; **99** : 6979-6984.
- 23) Cui D, Kawano H, Takahashi M, Hoshii Y, Setoguchi M, Gondo T, Ishihara T. Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. *Pathol Int* 2002 ; **52** : 40-45.

Amyloid and Amyloidogenesis

Mutsuo TAKAHASHI

*Division of Basic Laboratory Sciences, Faculty of Health Sciences,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1, Minamikogushi, Ube, Yamaguchi 755-8554, Japan*

SUMMARY

From early twentieth, it has been considered that reticuloendothelial cells play an important role in the pathogenesis of amyloidosis. In the present review I discussed the role of macrophages in the formation of amyloid fibrils. In addition I described the role of amyloid enhancing factor in amyloidosis, which exceedingly shortened a lag period of amyloid deposition during amyloid induction.