

Specific Deposition of Serum Amyloid A Protein 2 in the Mouse

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7928

血清アミロイド A 成分のマウス脾臓内での特異的沈着

金沢大学がん研究所分子免疫部 (主任: 右田俊介教授)

城 尾 昌 宏

(昭和62年1月20日受付)

アゾカゼインで誘導したマウスの続発性アミロイドーシスにおいて、脾臓に沈着したアミロイドに含まれ、抗 SAA/AA 抗体と反応する SAA 関連タンパクを調べた。アミロイドが沈着した CBA マウスの脾臓のホモジネートについて SDS-PAGE を行った後、ラット抗マウス SAA/AA モノクローナル抗体 (MSA 4-26) を用いた Western blotting で解析したところ、アミロイドには分子量が 12,000 の SAA2 と分子量が 9,000 と 10,000 の SAA 部分分解産物、および分子量が 8,000 の AA タンパクが含まれていた。AA タンパクの前駆体である SAA2 がアミロイドに含まれていることから、SAA2 は組織に沈着してから分解されるものと考えられる。ホルマリン固定した脾臓の組織切片に、SAA を含む急性期の CBA の血清を加えインキュベートする実験から、SAA は濾胞周辺帯の細胞間質ならびに若干の細胞に吸着することが明らかになった。この吸着部位は *in vivo* でのアミロイド沈着部位とよく一致し、また、炎症時の脾臓切片を用いると SAA の吸着が増加することから、濾胞周辺帯の細胞間質に存在する SAA 結合物質は、生体内でのアミロイド線維形成過程で重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。アミロイドタンパクが線維を形成してからの SAA のアミロイド線維への吸着に関しては、AA-セファローズへ SAA が吸着することが明らかになったことから、SAA 結合物質の存在の有無に関係なく SAA はアミロイド線維へ吸着すると考えられる。脾臓内での SAA2 の特異的な沈着に関しては、脾細胞画分の共存下で SAA を含む血清をインキュベートすることで再現することができた。そして、この SAA2 の特異的な沈着にも SAA 結合物質が関わっている可能性が示唆された。

Key words experimental amyloidosis, murine spleen, Western blotting, immunohistochemistry

続発性アミロイドーシスではアミロイド A (AA) タンパクが種々の臓器に沈着し、線維を形成する。血清アミロイド A (SAA) タンパクはアミロイド線維の前駆物質と考えられ、血漿中や単球の細胞表面上にあるいくつかのタンパク分解酵素によって分解されると考えられている¹⁾。マウスでは、3つの SAA isotype, SAA1, SAA2 と SAA3 が肝臓の実質細胞で産生され²⁾、血清中では高密度リポタンパクと会合している。Hoffman らは SAA2 と AA タンパクのアミノ酸配列を比較して、AA タンパクの前駆体は SAA1 と SAA3 ではなく、SAA2 であることを報告した³⁾。Meek らの報告によれば、マウスにアミロイドーシスを誘導した際に、血清中の SAA1 濃度はほぼ一定であるのに SAA2 濃度は減少し、その一方で肝臓から産生される

SAA1 と SAA2 の量比は、アミロイド誘導の期間を通じて一定である⁴⁾。しかしながら、なぜ SAA2 だけが脾臓に沈着するのか、SAA2 が沈着するのは SAA2 の代謝の前なのか後なのかについてはまったく分っていない。そこで、マウスの SAA と AA タンパクとに反応するモノクローナル抗体と SDS-PAGE, Western blotting とを用いて、アゾカゼイン注射によって組織に沈着した SAA 関連タンパクの分子量を調べた。その結果、これらのタンパクの沈着はアゾカゼインの注射を始めてから6日目に始まり、その後はアゾカゼインの注射を連日繰り返す毎に増加した。アミロイドの沈着が起こり始める初期の段階では、分子量 12,000 の SAA2 と分子量が 9,000 と 10,000 の SAA 部分分解産物とが沈着したが、アミロイドーシスが進行した段

Abbreviations: AA, amyloid A; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; SAA, serum amyloid A; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

階では、これらのタンパクに加えて分子量が8,000のAAタンパクが沈着した。以上の結果から、血液中を流れるSAA2はある組織に特異的に結合し、アミロイド線維を形成した後に分子量が8,000のペプチド鎖へと分解されるものと考えられる。

材料および方法

I. 動物

1. CBA/KIJms マウスは東京大学医科学研究所より分与していただいた。実験には、conventionalの条件下で飼育した3~6ヶ月齢の雌雄のマウスを用いた。正常マウスは感染や炎症を起こしておらず、血清中には急性期タンパクであるSAAは認められなかった。アミロイドーシスの誘導には、生理食塩水に溶解した0.5 mlの10%カゼインまたは10%アゾカゼイン⁹⁾を用い、マウスの背部皮下に90日まで連日注射した。マウスはアミロイドーシス誘導の各時点で屠殺し実験に用いた。

2. マウスのSAAを免疫するための雄のLewisラットは日本チャールズリバーより購入した。免疫を開始する時のラットは2ヶ月齢で、conventionalの条件下で飼育した。

II. AAタンパクの精製

アミロイド線維は、1回50 mgのカゼインを3ヶ月間連日皮下注射したCBA/KIJmsの肝臓から、Prasらの方法⁶⁾に従い水で抽出した。続いて、アミロイド線維を0.2 M NaClを含み酢酸でpHを3に合わせた6 M尿素溶液に溶解し、Eriksenらの方法⁷⁾に従いセファデックス G-100 カラムクロマトグラフィーを行った。分子量が8,000付近の画分に含まれるタンパクをAAタンパクとし、0.2%酢酸に対して透析した後、-20°Cで保存した。

III. 高密度リポタンパク中のSAAの精製

高密度リポタンパク画分は、CBA/KIJmsにアゾカゼインを皮下注射してから2日後のブールした血清に臭化ナトリウムを溶解後、連続密度勾配超遠心を行い、密度が1.063より大きく1.21より小さい画分として得られた。高密度リポタンパク画分をエタノールとエーテルの混合液（混合比3:2）で脱脂した後、AAタンパクの精製に用いたのと同じ条件でセファデックス G-100 カラムクロマトグラフィーを行い、分子量が12,000のSAAタンパクを精製した。このSAAタンパク画分はSAA1とSAA2を含んでいた。

IV. ラット抗マウスSAA/AAモノクローナル抗体の調製

セファデックス G-100 カラムで画分したSAA画分を抗原として、Lewisラットに免疫した。等容量の

Freund' 完全アジュバントと混合した1 mgのSAA抗原を、2週間毎に5回皮下注射した。さらに細胞融合の3日前に1 mgのSAA抗原を静脈内注射した。細胞融合はKennettの方法⁸⁾を基に行った。3×10⁸個のLewisラットの脾臓細胞と6×10⁷個のNSIマウス骨髓腫細胞とを、45%ポリエチレングリコールで融合した。細胞融合後、HAT選択培養液中で培養したところ、300個のコロニーが得られた。このうち、48個のコロニーがマウスSAAに対するIgGを産生していることを、ELISA法によって確かめた。MSA 4-26 クローンは、なかでも最も強くSAAと反応した。また、MSA 4-26はSAAばかりではなくAAタンパクとも反応した。MSA 4-26 クローンは、10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培養液中、5%二酸化炭素存在下、37°Cで培養した。組織切片の酵素抗体染色やWestern blottingには、MSA 4-26 クローンの培養上清をMSA 4-26抗体溶液として用いた。

V. SDS-PAGEとWestern blotting

SAAおよびAAタンパクの分離には、6 M尿素を含む13%ポリアクリルアミドゲルを用いた⁹⁾。Western blottingはSDS-PAGEの後、タンパクをゲルからニトロセルロース膜へ転写し、抗マウスSAA/AAモノクローナル抗体MSA 4-26、ビオチン標識したヤギ抗ラットIgG抗体、peroxidase標識したアビジンD (Vector Laboratories Inc.)を順次結合させ、発色には、0.04%ジアミノベンチジンをを用いた¹⁰⁾。

VI. 脾細胞画分へのSAAの吸着と分離

正常またはアゾカゼインを5日間注射したマウスから脾臓細胞画分を調製した。マウスの脾臓を脱カプセルした後、RPMI 1640培養液中に懸濁した。この細胞群の中から0.16 M塩化アンモニウム処理で赤血球を除いた後、再びRPMI 1640に懸濁し、細胞濃度を測定した。正常およびアゾカゼインを5日間注射したマウス脾臓細胞10⁷個のそれぞれに、アゾカゼインを注射してから2日後のCBAマウスから採取した血清0.5 mlを無菌条件下で加え、30秒間超音波処理を行ない細胞を破壊した。この懸濁液の一部を4°Cで5時間インキュベートし、SAAの細胞画分への吸着を調べた。低温では血清中のタンパク分解酵素活性が低下すると考えられるので、吸着を調べるためにこの条件を選んだ。インキュベーションを終えてから、遠心により上清と沈澱に分離し、沈澱を生理食塩水で洗った。この沈澱に吸着しているSAAと上清に残ったSAAとを、SDS-PAGEとWestern blottingにより検出した。SAAの分解を調べるには、血清を含む細胞懸濁液を37°Cで2日および4日間インキュベートした後、SDS-PAGEとWestern blottingによりSAAと分解

産物とを検出した。

VII. 脾臓の組織化学的検索

アゾカゼインの連日注射の各時点で、マウスの脾臓を10%ホルマリンで固定した。脱水後、パラフィンに包埋し、3 μ mの厚さの切片を調製した。脱パラフィンのあと、Western blottingに用いたのと同様な免疫染色法でアミロイドタンパクを染色した。細胞の核はMethyl Greenで染色した。

VIII. AA-セファロースの調製

Pharmaciaから購入した臭化シアン活性化セファロース4Bに、カゼインを90日間注射したCBAマウスの肝臓より抽出したAAタンパクを結合させた。セファロース1gあたりのAAタンパクの結合量は5mgであった。

成 績

I. アゾカゼイン注射に伴うCBAマウス血清中のSAA2濃度の減少

アゾカゼインを連日注射した際に起こる血清中のSAA2濃度の減少を図1に示す。急性炎症時には、等量のSAA1とSAA2が血清中に誘導されたが、アゾカゼイン注射を続けるにつれて、SAA2の血中濃度が次第に減少していった。アゾカゼインの注射を開始してから40ないし90日後の炎症が慢性化した頃には、SAA2は血清中にはほとんど認められなかった。

II. アゾカゼイン注射に伴うCBA脾臓内でのSAA2およびAAタンパクの沈着

アゾカゼイン注射を始めてから、どの時点でAAタンパクがマウスの脾臓内に沈着し始めるのか。また、脾臓に沈着するSAA関連タンパクの分子量はどのくらいであるかを、SDS-PAGEとWestern blottingとで調べた。脾臓内でのアミロイド沈着の経時変化を図

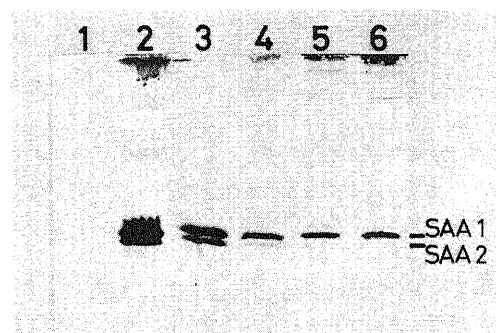


Fig.1. Disappearance of SAA2 in the serum of CBA mice during azocasein injections. Sera were prepared from CBA mice bled after receiving none (lane 1), 2 (lane 2), 5 (lane 3), 10 (lane 4), 40 (lane 5), and 90 (lane 6) daily injections of 50 mg azocasein. Two μ l of each serum was placed on 13% SDS-PAGE gels to nitrocellulose membranes, SAA related proteins from SDS-PAGE gels to nitrocellulose membranes, SAA related proteins were detected by immunoblotting method using rat anti-murine SAA/AA monoclonal antibody.

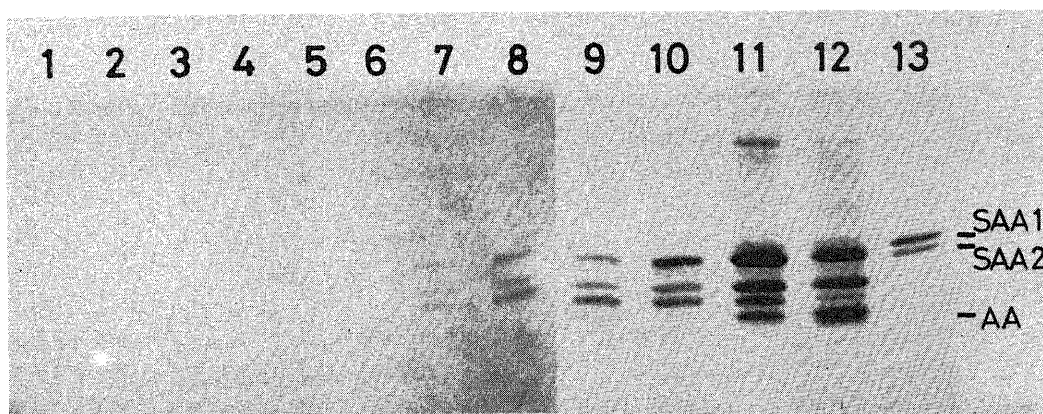


Fig.2. SAA2 and AA depositions in the CBA spleen during azocasein injections. Spleens were prepared from CBA mice sacrificed after receiving up to 90 daily injections of azocasein. These spleens were homogenized and washed several times with saline. The pellets were dissolved in the saline supplemented with 1% SDS. Each of these specimens was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting method. The homogenate applied in lane 1 was prepared from the spleen of a normal CBA mouse. Lanes 2 to 8 were the homogenates of the spleens obtained from 1 to 7 times azocasein daily injected CBA mice. Lanes 9, 10, 11 and 12 were the spleen homogenates of 10, 15, 40 and 90 times injected CBA mice, respectively.

2に示す。アミロイドーシスを誘導し始めてから5日目までは、抗マウス SAA/AA 抗体 MSA 4-26 と反応する SAA 関連タンパクの沈着は認められなかった。6日目から SAA2 と分子量が 9,000 と 10,000 の MSA 4-26 と反応するタンパクの沈着が始まった。これらのタンパクの量比は、アゾカゼイン注射を開始してから2週間くらいまではほぼ一定していたが、2週目以後は SAA2 の比率が増加した。分子量が 8,000 の AA タンパクは、アゾカゼインを注射してから2週間まではほとんど認められなかった。SAA 関連タンパクの総量は、アゾカゼイン注射に伴い増加していた。

III. CBA 脾臓内での SAA と AA タンパクの沈着の組織化学的検索

SAA2 と AA タンパクの沈着部位を決めるため MSA 4-26 抗体を用いて脾臓切片を染色した。正常とアゾカゼインを注射してから5日目までの CBA マウスの脾臓組織切片は、MSA 4-26 では染まらなかった。しかし、アゾカゼインを注射し始めてから6日目以降の脾臓組織切片は MSA 4-26 で染色された。この結果は、図2で示した結果と一致していた。図3にアゾカゼインを6回連日注射した CBA マウスおよび対照マウスの脾臓切片を MSA 4-26 抗体で染色した結果を示す。SAA 関連タンパクは、白脾髄周辺帯にある食細胞の細胞間質に認められ、細胞膜表面に限局されていなかった。濾胞の外側には Langhans 巨細胞があったが、MSA 4-26 抗体で染色されなかった。脾臓切片を Congo Red で染色すると、抗体で染色された部分と同じ所が染色され、偏光顕微鏡下で緑色に複屈折を示した。

IV. *in vitro*での脾臓組織切片への SAA の吸着

in vitro で、正常およびアゾカゼインを5日間注射した CBA マウスの脾臓切片に、アゾカゼインを注射してから2日後の CBA マウスから調製した SAA を含む血清をマウントした後、4°C で16時間インキュベートし、SAA が脾臓切片に吸着するかどうかを調べた。インキュベーション後、組織切片を pH 7.4 のリン酸緩衝液で洗い、続いて MSA 4-26 抗体で染色した。図4に示す様に、正常およびアゾカゼインを5日間注射した CBA マウスの脾臓切片の両方とも、濾胞周辺部の細胞間質が MSA 4-26 抗体で染色された。これは図3に示したように、SAA が沈着し始める部分であるが、この部分以外に、正常マウスとアゾカゼインを5日間注射したマウスの脾臓の濾胞周辺部にあるマクロファージやリンパ球に SAA は吸着した (図4B, D)。

V. AA-セファロースへの SAA の吸着

AA タンパクをリガンドとした AA-セファロース

に、SAA が吸着するかどうかを調べた。AA-セファロースにアゾカゼインを注射してから2日後の血清、またはこの血清から調製した高密度リボタンパク画分、あるいは高密度リボタンパク画分を脱リボ化して得られる SAA を含むタンパク質画分を加えてから、4°C で16時間攪拌した。このインキュベーション後、3 ml のカラムにそれぞれの AA-セファロースゲルを詰め、0.15 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) でゲルを十分に洗い、続いて 6 M 尿素を含む

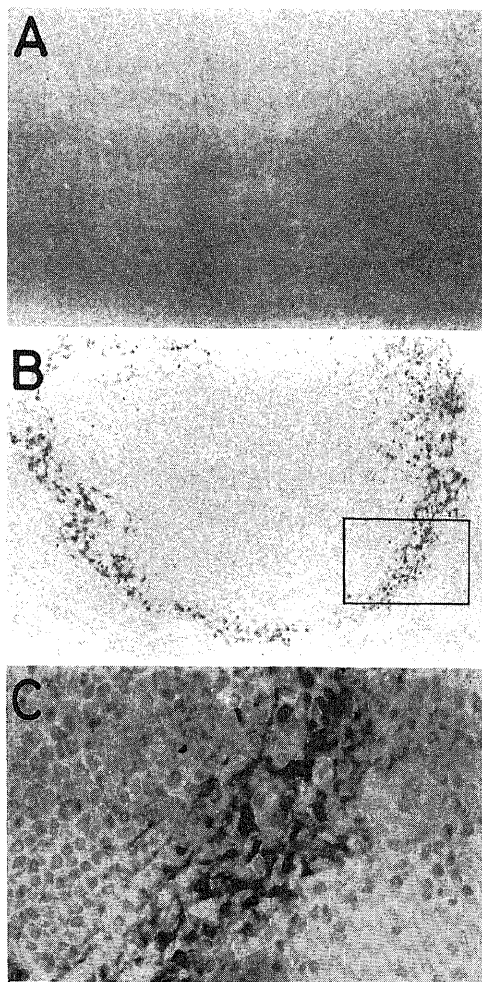


Fig. 3. The depositions of SAA2 and AA proteins. Each spleen was fixed with a 10% formalin solution. Sectioned spleens were stained by immunostaining using MSA 4-26. Spleens were prepared from normal (A), and azocasein 6 times daily injected (B) CBA mice. The squared area in B was enlarged (C). The dark spots around secondary follicles in B show the deposition of SAA related proteins.

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で AA-セファロースに吸着した SAA を溶出した。溶出した SAA は、SDS-PAGE と Western blotting により分子量を測定した。図 5 に示す様に、SAA を含む血清または高密度リポタンパク画分を AA-セファロースに加えた場合は、SAA1 と SAA2 とが AA-セファロースに吸着したが、高密度リポタンパク画分を脱リポ化した場合は、SAA1 のみが AA-セファロースに吸着して SAA2 の吸着はほとんど認められなかった。

VI. 脾臓細胞画分への SAA の吸着と *in vitro* での SAA の分解

図 4 で SAA がマウス脾臓の組織切片に *in vitro* で吸着することを示したが、吸着した SAA の分子量を調べるため、組織切片の代わりに脾細胞画分を用いて同様の実験を行った。正常またはアゾカゼインを 5 回注射した CBA マウスの脾臓から調製した細胞画分に、アゾカゼインを注射してから 2 日後の CBA マウスの血清を加え超音波処理した後、4°C で 5 時間インキュベートした。この懸濁液を遠心して上清と沈澱とに分けて、SDS-PAGE と Western blotting によりそ

れぞれの画分に含まれる SAA を調べた。その結果、SAA1 と SAA2 の両方が正常およびアゾカゼインを 5 回注射したマウスの脾細胞画分に吸着した (図 6, lane 1)。しかしながら、アゾカゼインを注射したマウスの脾細胞画分には、SAA の部分分解産物も多く吸着し、正常マウスでの SAA 吸着とは異なっていた。

次に *in vitro* での SAA の分解を調べた。SAA の吸着を調べるために用いた血清と脾細胞画分との混合物とを、37°C で 2 日および 4 日間インキュベートし、脾細胞画分に吸着して残る SAA 関連タンパクを SDS-PAGE と Western blotting とにより調べた。図 6, lane 2, 3 に示す様に、脾細胞画分に吸着した SAA 関連タンパクは、タンパク分解酵素によって分解された。正常マウスとアゾカゼインを 5 回注射したマウスとで SAA2 の代謝に関して大きく異なり、正常マウスでは速かに分解されたのに対し、アゾカゼインを注射したマウスでは SAA2 の分解速度は低下した。しかし、細胞画分を加えず血清だけを 37°C でインキュベートした場合には、SAA1 と SAA2 は同じ速度で分解された。

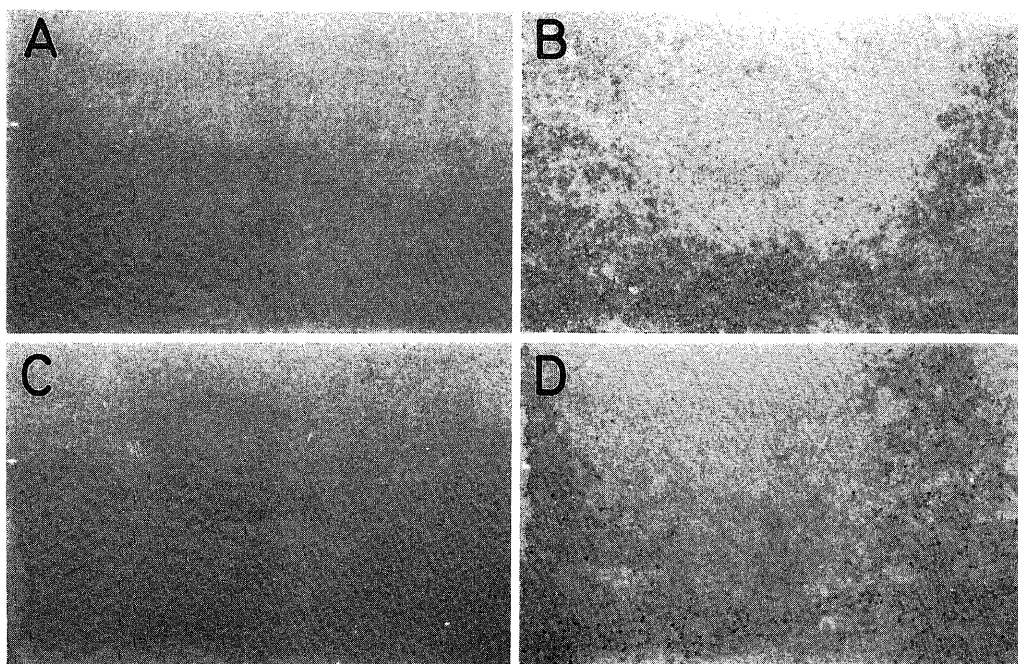


Fig. 4. The absorption of SAA to the sectioned spleens. The spleens from normal and 5 times azocasein injected CBA mice were fixed with a 10% formalin solution and sectioned. The sectioned spleens on slide glasses were incubated with the serum prepared from CBA mice 2 days after the azocasein injections for 16 hours at 4°C. After the incubation, spleen sections were stained by immunostaining. In normal (B) and azocasein 5 times injected (D) CBA spleen sections, the deposits of SAA were determined as black spots. (A) and (C) were controls for (B) and (D) respectively, using normal rabbit serum instead of the acute murine serum.

考 察

これまで *in vitro* において, SAA は種々の serine protease^{11)~14)}, 単球細胞表面上の elastase¹⁵⁾ や肝臓内の Kupffer 細胞¹⁶⁾ によって完全あるいは部分的に分解されることが報告されてきた。また, SAA が部分分解されてできた AA タンパクが線維を形成し, アミロイドとして種々の臓器に沈着するものと考えられてきた。そして, AA タンパクの分子量と SAA の cDNA 配列との比較から, ヒトでは 76 番, マウスでは 75 番アミノ酸のカルボキシル末端部分で SAA が切断していると考えられている¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし, SAA が肝実質細胞から分泌されて脾臓などに沈着するまでの機序は明らかになっていない。一方, ヒトの続発性アミロイドーシスでは, 患者の脾臓中に分子量が 8,000 よりも大きいタンパクが含まれている¹⁸⁾ことが分っている。そこで, まずマウスの脾臓内に誘導したアミロイドに含まれる SAA 関連タンパクの分子量を測定した。マウスの SAA1, SAA2 それと AA タンパクとに反応するモノクローナル抗体 MSA 4-26 を用いた Western blotting より, 炎症時にマウスの脾臓に沈着するアミロイドには, これまでに報告されてきた分子量が 8,000 の



Fig. 5. Absorption of SAA to AA-Sepharose gel. One ml of SAA containing solution was incubated with 0.3 g of AA-Sepharose gel for 16 hours at 4°C. After incubation, AA-Sepharose gel was packed in a column and washed with saline thoroughly. Absorbed SAA on the gel was eluted with 6M urea/0.1M Tris-HCl (pH 7.0). Twenty-five μ l of the eluate (lane 1 to 4) and 5 μ l of the column passing solution (lanes 5 to 8) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. High density lipoprotein fraction (lanes 1 and 5), acute phase CBA serum (lanes 2 and 6) and delipidated high density lipoprotein fraction (lanes 3 and 7) were used as the SAA containing solution. Saline (lanes 4 and 8) was used as a control.

AA タンパク¹⁹⁾²⁰⁾ばかりでなく, AA タンパクの前駆体である SAA2 と SAA の部分分解産物である分子量が 9,000 と 10,000 のタンパクも含まれていることが明らかになった。分子量が 8,000 の AA タンパクは SAA2 に由来することが Hoffman ら³⁾により報告されているが, 分子量 9,000 と 10,000 の SAA 部分分解産物については, 今回初めて沈着することが分ったので, これらのタンパクの前駆体に関する報告は未だなく, SAA1 に由来するのか SAA2 に由来するのかは明らかでない。これらの SAA 関連タンパクのマウス脾臓内での沈着を経時的に調べたところ, 図 2 に示した様にアミロイドーシス誘導の初期段階では, AA タンパクの沈着はほとんど認められなかったのに対して, アミロイドーシス誘導のあとの段階では, 脾臓内に沈着したアミロイド線維の中に高い比率で含まれていることが分った。また, アゾカゼインの注射を開始してから 6 日目に, SAA2 と分子量が 9,000 と 10,000 の SAA 部分分解産物が沈着し始めることが分った。この時期の脾臓組織切片は Congo Red で染まり, 偏光顕微鏡下で緑色偏光を示したことから, AA タンパクがなくても SAA2 および SAA 部分分解産物は, アミロイド線維を形成することができると考えられる。脾臓以外の組織, 例えば肝臓や腎臓では, アミロイド沈着の開始時期が遅れたけれども, 脾臓と同様に SAA2 と SAA 部分分解産物の沈着が, アミロイド沈着初期から認められた。

図 4 に示した脾臓組織切片への *in vitro* での SAA の吸着は濾胞周辺帯に認められたが, これは図 3 に示した *in vivo* でのアミロイド沈着部位とほぼ同じ場所であった。この結果から, SAA が結合するなんらかの物質が正常マウスとアゾカゼインを 5 回注射したマウスの脾臓の濾胞周辺帯にあるのではないかと考えられる。そして SAA の吸着の量は正常マウスよりもアゾカゼインを注射したマウスの方が多かったことから, 炎症を起こすと SAA 結合物質の量が増加するのではないかと考えられる。さらに *in vitro* での SAA 吸着実験では, 細胞間質ばかりでなく, 濾胞周辺帯のマクロファージおよびリンパ球に SAA が吸着したので, SAA 結合物質がこれらの細胞から産生されている可能性もある。組織切片の代わりに超音波処理をした脾細胞画分を用いて SDS-PAGE と Western blotting により吸着した SAA 関連タンパクの分子量を調べたところ (図 6), SAA1 と SAA2 が正常マウスとアゾカゼイン注射マウスの脾臓に吸着していることが分った。さらに, アゾカゼイン注射マウスでは SAA 部分分解産物も相当量吸着していたので, SAA 吸着物質は正常マウスとアゾカゼイン注射マウスでは質的にも異

なると考えられた。いずれの場合でも、生細胞がなくても脾臓の濾胞周辺帯に SAA は吸着した。これより、マウスでのアミロイド沈着の初期には、SAA がマクロファージに貪食、分解されてアミロイド線維を形成するのではなく、細胞外で形成されたアミロイド線維がマクロファージに貪食されるのではないかと考えられる。

AA-セファローズへの SAA の吸着実験から、一旦 AA タンパクが線維を形成してしまえば、SAA 結合物質がなくても SAA はアミロイド線維に結合することが示唆された。AA-セファローズに血清あるいは高密度リポタンパク画分を加えてインキュベートすると、SAA1 と SAA2 とが結合したのに対して、高密度リポタンパク画分から脂質を除くと、SAA2 の結合がみられず SAA1 のみが結合した。すなわち、SAA2 の AA タンパクへの結合には脂質が関与しているのではない

かと考えられる。この SAA の AA タンパクへの結合は、アミロイドーシスが進行してからの SAA の沈着に重要であると考えられるが、この結果だけでは *in vivo* での SAA2 の特異的な沈着を説明することができず、脂質を含む SAA1 と SAA2 が AA タンパクに結合した後に、SAA2 の特異的な沈着が起こるのではないかと考えられる。

図 6 に示した脾臓細胞画分共存下での SAA の分解を調べる実験では、以下のように脾細胞画分への SAA2 の特異的な吸着を *in vitro* で初めて再現することができた。正常あるいはアゾカゼインを 5 回注射した CBA マウスの脾臓細胞画分に、アゾカゼインを注射してから 2 日後の血清を加えてから超音波処理し、37°C で 2 日ないし 4 日間インキュベートすると、正常マウスでは SAA2 が速かに分解されたのに対してアゾカゼインを注射したマウスでは分解速度が遅

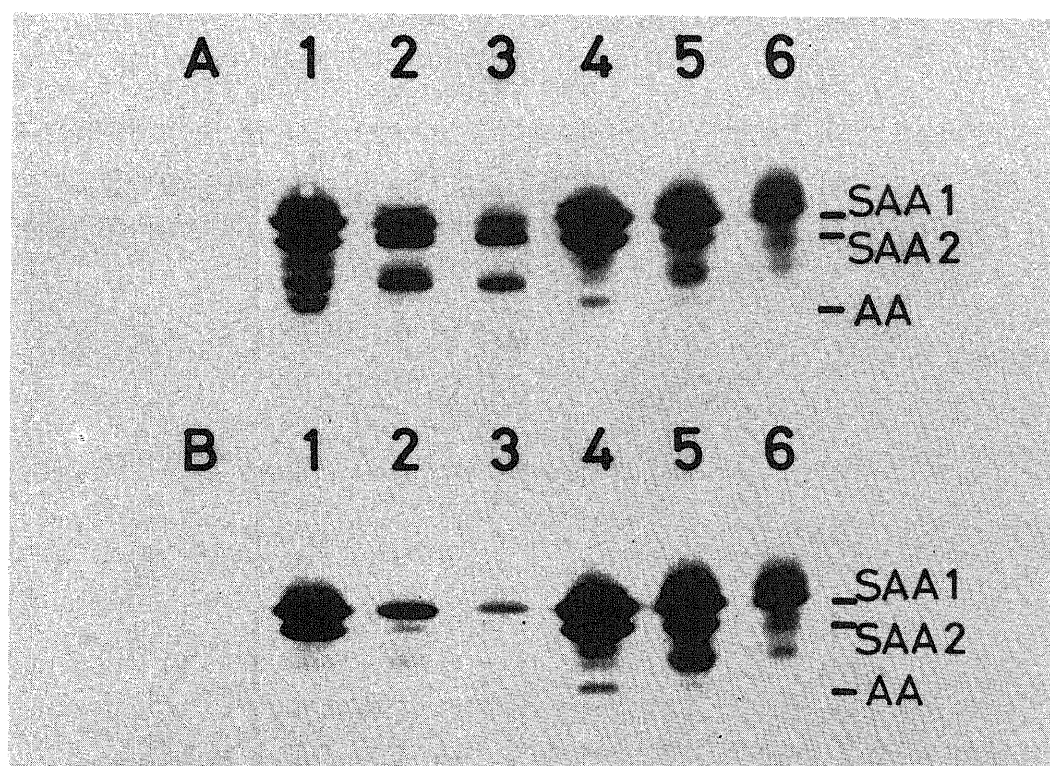


Fig. 6. Absorption and degradation of SAA1 and 2 in the mixture of the sonicated CBA spleen cells and the acute phase CBA serum. Spleen cells were prepared from the CBA mice with daily injections of azocasein for 5 days (A) and from normal mice (B). These cells were sonicated and incubated with the serum prepared from CBA mice 2 days after the azocasein injections for 5 hours at 4°C (lanes 1, 4) to examine the absorption of SAA to cell pellets, and then incubated for 2 (lanes 2, 5) or 4 days (lanes 3, 6) at 37°C to examine the degradation of SAA. At the end of the incubation, these cell mixtures were centrifuged and separated to precipitates and supernatants. SAA related proteins in precipitates (lanes 1, 2, 3) and supernatants (lanes 4, 5, 6) were detected by SDS-PAGE and immunoblotting method.

く、脾細胞成分に吸着していることが分った。血清に含まれるタンパク分解酵素は、非特異的にSAA1とSAA2を分解した。SAA1の分解速度は、アゾカゼインの注射の有無に関わらず同じであったことより、アゾカゼイン注射マウスではSAA2の分解が特異的に阻害されていると考えられた。先に、濾胞周辺帯にあるSAAの結合物質が、正常マウスとアゾカゼイン注射マウスでは性質が異なることを述べたが、アゾカゼイン注射により誘導されたSAA結合物質にSAA2が結合して、タンパク分解酵素による分解が阻害された可能性が最も強い。しかし、この結果だけでは、図1に示した血清中からのSAA2の特異的な消失を十分に説明することができず、*in vivo*での脾臓へのSAA2の特異的な沈着を直接証明できないが、この実験で示したSAA2の分解の特異的な阻害と、脾臓へのSAAとその部分分解産物の結合は、アミロイド線維形成の初期段階で重要な役割を果たしているものと考えられる。

結 論

1. CBAマウスにアゾカゼインを注射すると、血清中のSAA濃度は2日後に最大となるが、その後SAA2のみが徐々に減少し、アゾカゼイン注射を始めてから40日後の血清中では、SAA2は検出されなくなった。

2. アゾカゼイン注射マウスでは、血清中のSAA2濃度の減少に伴い、脾臓中でのSAA2およびSAAの部分分解産物の沈着量が増加した。SAA2の沈着はアゾカゼイン注射を始めてから6日目に始まり、この時点では分子量が8,000のAAタンパクは脾臓内に沈着していなかった。AAタンパクが脾臓内に沈着を始めるのは更にアミロイドーシスが進行してからで、アゾカゼイン注射を始めてから2週間以降であった。このことから、炎症初期に脾臓に沈着したSAA2と分子量が9,000と10,000のSAA部分分解産物が、炎症の慢性化と共に分子量が8,000のAAタンパクへと徐々に分解されるという機序でアミロイドの沈着が起きていることが示唆された。

3. SAA2が沈着し始めるアゾカゼイン注射から6日目のCBAマウスの脾臓の免疫組織化学的検索から、SAA2は濾胞周辺帯の主に細胞間質に沈着していることが分った。これまでにマクロファージがSAAを貪食し、細胞内でSAAが部分分解され、生じたAAタンパクが線維を形成し細胞外へ放出されるという可能性が論じられてきたが、SAAが分解されなくてもアミロイドとして沈着するという結果より、少なくともマウスではこの考え方は否定的で、細胞間質に沈着、

線維を形成したアミロイドタンパクをマクロファージが貪食するものと考えられた。

4. マウスの脾臓切片の濾胞周辺帯にSAAが特異的に吸着した。この吸着部位は*in vivo*でのSAA2の沈着部位とほぼ一致した。その結果、脾臓の濾胞周辺帯にはSAAと結合する物質があることが示唆された。

5. セファローズゲルにAAタンパクを共有結合させて作製したAA-セファローズにSAAが吸着することが分った。SAA画分から脂質を徐くと、AA-セファローズへの結合性が低下したので、SAAのAA-セファローズへの結合には脂質が必要であると考えられた。またSAAがAA-セファローズへ結合することは、生体内で一旦アミロイド線維が作られると、アミロイド線維にその構成成分であるSAAが特異的に吸着することを示唆している。

6. アゾカゼインを5回注射したマウスの脾臓から調製した細胞画分の共存下で、SAAを含む血清を37°Cでインキュベートすると、SAA2が細胞画分に吸着してその分解が阻害され、*in vivo*での脾臓内のSAA2の特異的な沈着を*in vitro*で再現することができた。このSAA2分解の特異的な阻害は、炎症時に脾臓内の濾胞周辺帯に誘導されるSAA結合物質が関与している可能性が強く、アミロイドーシスの初期段階での濾胞周辺帯の細胞間質へのSAA2の沈着にこのSAA結合物質が大きく関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った右田俊介教授に深謝いたします。また終始有益な御助言、御協力を頂きました本学病理学第一講座の河原栄助手と中西功夫教授に深謝いたします。

本研究の要旨は、第6回国際免疫学会(1986年、トロント)で発表した。

文 献

- 1) Lavie, G., Zucker-Frankin, D. & Franklin, E. C.: Degradation of serum amyloid A protein by surface-associated enzymes of human blood monocytes. *J. Exp. Med.*, 148, 1020-1031 (1978).
- 2) Yamamoto, K., Shiroo, M. & Migita, S.: Diverse gene expression for isotypes of murine serum amyloid A protein during acute phase reaction. *Science*, 232, 227-229 (1986).
- 3) Hoffman, J. S., Ericsson, L. H., Eriksen, N., Walsh, K. A. & Benditt, E. P.: Murine tissue amyloid protein A, NH₂-terminal sequence identity

with only one of two serum amyloid protein (apo SAA) gene products. *J. Exp. Med.*, **159**, 641-646 (1984).

4) **Meek, R. L., Hoffman, J. S. & Benditt, E. P.**: Amyloidogenesis: One serum amyloid A isotype is selectively removed from the circulation. *J. Exp. Med.*, **163**, 499-510 (1986).

5) **Scheinberg, M. A. & Cathcart, E. S.**: Casein induced experimental amyloidosis. III. Response to mitogens, allogeneic cells and graft-versus-host reactions in the murine model. *Immunology*, **27**, 953-963 (1974).

6) **Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimón, A. & Franklin, E. C.**: The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J. Clin. Invest.*, **47**, 924-933 (1968).

7) **Eriksen, N., Ericsson, L. H., Pearsall, N., Lagunoff, D. & Benditt, E. P.**: Mouse amyloid protein AA: Homology with non-immunoglobulin protein of human and monkey amyloid substance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 964-967 (1976).

8) **Kennett, R.**: Cell fusion. *Methods in Enzymology*, **58**, 345-359 (1979).

9) **Hoffman, J. S. & Benditt, E. P.**: Changes in high density lipoprotein content following endotoxin administration in the mouse: Formation of serum amyloid protein rich subfractions. *J. Biol. Chem.*, **257**, 10510-10517 (1982).

10) **Erickson, P. F., Minier, L. M. & Lasher, R. S.**: The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. Immunol. Methods*, **55**, 297-307 (1982).

11) **Skogen, B. & Natvig, J. B.**: Degradation of amyloid proteins by different serine proteases. *Scand. J. Immunol.*, **14**, 389-396 (1981).

12) **Teppo, A. M. & Maury, C. P. J.**: Do serine

proteases degrade amyloid A fibrils? *Scand. J. Immunol.*, **18**, 363-366 (1983).

13) **Hoffman, J. S. & Benditt, E. P.**: Plasma clearance kinetics of the amyloid-related high density lipoprotein apoprotein, in the mouse. Evidence for rapid apo SAA clearance, *J. Clin. Invest.*, **71**, 926-934 (1983).

14) **Bausserman, L. L. & Herbert, P. N.**: Degradation of serum amyloid A and apolipoproteins by serum proteases. *Biochemistry*, **23**, 2241-2245 (1984).

15) **Fuks, A. & Zucker-Franklin, D.**: Impaired Kupffer cell function precedes development of secondary amyloidosis. *J. Exp. Med.*, **161**, 1013-1028 (1985).

16) **Yamamoto, K. & Migita, S.**: Complete primary structures of two major murine serum amyloid A proteins deduced from cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 2915-2919 (1985).

17) **Sletten, K. & Husby, G.**: The complete amino acid sequence of non-immunoglobulin amyloid fibril protein AS in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Biochem.*, **41**, 117-125 (1974).

18) **Møyner, K., Sletten, K., Husby, G. & Natvig, J. B.**: An unusually large (83 amino acid residues) amyloid fibril protein AA from a patient with Waldenström's macroglobulinaemia and amyloidosis. *Scand. J. Immunol.*, **11**, 549-554 (1980).

19) **Ein, D., Kimura, S. & Glenner, G. G.**: An amyloid fibril protein of unknown origin: Partial amino acid sequence analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 498-500 (1972).

20) **Levin, M., Franklin, E. C., Frangione, B. & Pras, M.**: The amino acid sequence of a major non-immunoglobulin component of some amyloid fibrils. *J. Clin. Invest.*, **51**, 2773-2776 (1972).

To determine the sizes of the serum amyloid A protein (SAA) degraded proteins contained in amyloid deposited tissues, secondary amyloidosis was induced in CBA mice with azocasein. The homogenates of amyloid deposited spleens were analyzed by SDS-PAGE and the immunoblotting method using rat anti-murine SAA/amyloid A (AA) monoclonal antibody, MSA 4-26. In result, amyloid deposited tissues contained SAA2 and SAA intermediates with molecular weights of 8,000, 9,000 and 10,000. It was found that the precursor of AA protein, SAA2 itself deposited in tissues. Considering this result, it is thought that some SAA2 are degraded after tissue deposition. Using fixed sections of spleens and the sera of acute phase CBA mice, it was proved in vitro that SAA bind to the intercellular space in the marginal zone of secondary follicles. This result corresponds to that of in vivo amyloidogenesis. SAA binding to the inflamed murine spleen was more extensive than to the normal murine spleen. The absorption of SAA to AA binding Sepharose suggested that SAA could bind to amyloid proteins after the amyloid formation in vivo. Moreover, a delay of the degradation rate of SAA2 was shown using sonicated spleen cells and acute phase murine sera in vitro. The reason why only SAA2 deposits in the inflamed murine spleen was partially explained in this experiment.