

アミロイド関連分子 AM34 抗原 エピトープの解析と臨床応用

太田 雅彦 伊東 文生 今井 浩三

札幌医科大学医学部内科学第1講座 (主任 谷内 昭)

Analysis of the Epitope of an Amyloid-related Molecule, AM34 Antigen, and Its Clinical Application

Masahiko OTA, Fumio ITOH, Kohzoh IMAI

Department of Internal Medicine (Section 1), School of Medicine, Sapporo Medical University
(Chief: Prof. A. YACHI)

ABSTRACT Antigen corresponding to monoclonal antibody (MoAb) AM34, which had been generated from the fusion of mouse myeloma cells with splenocytes obtained from a BALB/c mouse that had been immunized with crude amyloid proteins extracted from the amyloid kidney of a patient with rheumatoid arthritis, was investigated for cDNA cloning by immunoscreening. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequences was then compared with the previously reported ones. It was consequently revealed that the amino acid sequence of the antigen reacted with MoAb AM34 corresponded with the C-terminal site of factor H, which is a complementary co-factor.

Western blot analysis followed by immunoprecipitation with MoAb AM34 or anti-factor H polyclonal antibody revealed that each antibody reacted with the same molecule of 150 KD, suggesting that the AM34 antigen is complement factor H or a very closely related molecule.

Immunohistological analysis with MoAb AM34 revealed that the epitope is located in the amyloid deposits resulting from secondary amyloidosis, Alzheimer's disease or Down's syndrome. It is therefore concluded that factor H or factor H-related protein exists in the above-mentioned amyloid tissues.

(Received July 28, 1993 and accepted August 9, 1993)

Key words: Amyloidosis, cDNA cloning, Factor H, Factor H-related molecule, Alzheimer's disease

1 緒 言

アミロイド沈着を来たす疾患は、沈着アミロイドを構成する蛋白の違いにより、幾つかに分類されている。その中でアルツハイマー病、ダウン症などの脳に沈着する主要アミロイド蛋白は、 β 蛋白として同定された^{1,2)}。この β 蛋白は、 β 蛋白前駆体 (amyloid precursor protein; APP) と呼ばれる膜タンパク質の一部であることが判明した³⁾。われわれも、この β 蛋白の合成ペプチドを用いてモノクローナル抗体を作製し、 β 蛋白の組織分布、APPの髄液中、血清中での同定を試み報告してきた^{4,5)}。一方さらにわれわれは、別の観点からアミ

ロイド物質に注目して、研究を進めてきた。すなわち、続発性アミロイドーシス患者の腎組織より抽出した粗アミロイド蛋白を免疫原として、モノクローナル抗体 AM34 を作製した⁶⁾。この抗体は、興味深いことに、続発性アミロイドーシスのアミロイド沈着各臓器ばかりでなく、アルツハイマー病脳のアミロイド部分にも反応することが判明した。すなわち、アルツハイマー病脳のアミロイド沈着部位には、 β 蛋白以外にモノクローナル抗体 AM34 対応抗原 (AM34 抗原) が存在することが強く示唆される。

本研究では、この AM34 抗原分子の cDNA クローニングを施行し、既報の蛋白質のアミノ酸配列と比較し

た. さらに AM34 抗原の免疫化学的解析, 並びに免疫組織学的検索を行なったので報告する.

2 研究方法

2.1 cDNA クローニング

2.1.1 モノクローナル抗体 AM34 及び cDNA ライブラリー

cDNA クローニングのスクリーニングには, AM34 産生ハイブリドーマを BALB/c マウスに腹腔内注射をして得た腹水を, 1/20~1/80 に希釈して用いた. cDNA ライブラリーとしては, ヒト成人肝由来 cDNA ライブラリー(Clontec, USA #HL 1001 b, Lot 2102) を用いた.

2.1.2 免疫学的方法によるスクリーニング

Young *et al* の方法⁷⁾ によりスクリーニングを行なった. すなわち 5×10^4 pfu (plaque forming unit) の λ gt 11 cDNA ライブラリー溶液に, 大腸菌 Y1090 300 μ l を加え 37°C, 20 分間インキュベート後, 6.5 ml の NZ top agarose (NZ アミン 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g, agarose 1.4 g/200 ml) と混合して NZ agarose (NZ アミン 10 g, NaCl 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g, agarose 15 g/L) の 150 mm プレートに加え, 42°C, 3.5 時間インキュベートした. 次いで 10 mM isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) に 5 分間浸したニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell, Germany) を, 上述のプレートに重層し, さらに 37°C, 4 時間インキュベートした. ニトロセルロース膜は TNT 溶液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し, 以下の操作を行なった.

20% 牛胎児血清加 TNT で室温で 30 分間ブロッキングを行ない, AM34 と室温で 3 時間反応させた. 0.1% アルブミン加 TNT で 10 分間, 0.1% アルブミン, 0.1% Nonident P-40 加 TNT で 10 分間, さらに 0.1% アルブミン加 TNT で 10 分間 washing し, アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG (Promega, USA) 1/1,500 希釈と室温で 2 時間反応させた. 上記の washing 操作を繰り返し, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) と nitro blue tetrazolium (NBT) を用いて発色させた.

2.2 cDNA クローンの塩基配列の決定

2.2.1 cDNA の回収

スクリーニングで陽性であった λ ファージクローンからの cDNA 断片は, プレートライセート法により回収した. すなわち大腸菌 Y1090 に 2.1.2 と同様に NZ プレートを用いて, 一枚当たり約 5,000 個のファージプ

ラークを作製した. これに 10 ml の SM 溶液 (0.1 M NaCl/10 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /50 mM Tris-HCl pH 7.5/0.1% gelatin) を加えて 4°C, 12 時間静置後溶液を回収し, 6,000 回転 10 分間遠心して上清を得た. 次いで DNase および RNase を最終濃度 2 μ g/ml に加えて 37°C, 30 分間加温後, 5 M NaCl を 1/5 量, 50% polyethylene glycol を 1/5 量ずつ加え, 水中に 1 時間静置した. この後 10,000 回転 20 分間遠心して得た沈渣に, 10% SDS 12.5 μ l, 0.5 M EDTA 5 μ l, RNase (10 mg/ml) 1 μ l を加え 65°C, 15 分間加温し, フェノール/クロロフォルム抽出を 2 回行ない, エタノール沈澱後, 20 μ l の 10 mM Tris-HCl pH 7.8/1 mM EDTA に溶解した.

2.2.2 サブクローニングおよび制限酵素地図の作成

2.2.1 で得られた λ ファージ中の cDNA 断片を, プラスミド p-Bluescript (Stratagene, USA) 中にサブクローニングした. サブクローニングした cDNA 断片を EcoRI と Hind III で二重消化し, 制限酵素地図を作成した.

2.2.3 塩基配列の決定

サブクローニングした cDNA 断片の部分塩基配列の決定は, Sequenase ver. 2.0 キット (USB, USA) を用いて, dideoxy 法によりプロトコールに従って行なった.

2.2.4 ホモロジー・サーチ

決定された塩基配列と塩基配列より推定されるアミノ酸配列を, GenBank/EMBL に登録されている既報の塩基配列・アミノ酸配列と, FASTA program に従い比較検討した.

2.3 AM34 抗原の免疫化学的解析

2.3.1 免疫沈降法

免疫沈降反応は, 山梨ら⁸⁾ に準じて以下の方法で施行した. 血清 20 μ l (髄液 200 μ l) に, solubilizing buffer (Radio Immuno Protein Assay; RIPA buffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.4/1% NP 40/0.1% sodium deoxycholate/0.1% SDS/0.15 M NaCl/1 mM EDTA/10 μ g/ml aprotinin/0.3 M PMSF) により 50%(v/v) suspension として平衡化させた Protein G Sepharose® (Pharmacia, Sweden) 50 μ l を加え, 4°C で 24 時間混和振盪させた. この溶液を 2,000 \times g, 5 分間遠沈させた後, その各上清にそれぞれモノクローナル抗体 AM34 10 μ g, ポリクローナル抗 H 因子抗体 (sheep anti-human factor H; THE BINDING SITE, England) 1.5 μ l, 抗 β 蛋白モノクローナル抗体 TB-1⁴⁾ 10 μ g, あるいは抗 β 蛋白モノクローナル抗

体 22C11⁹⁾ 5 μ g を加え混和, 4°C, 1 時間放置した。その後 RIPA-buffer にて懸濁させた 50% (v/v) Protein G Sepharose 50 μ l を各免疫複合体溶液に加え, 4°C にて 1 時間混和振盪させた。この溶液を 2,000 \times g, 1 分間遠沈後, 上清を取り除き, 新たな RIPA-buffer にて懸濁, 2,000 \times g, 1 分間遠沈することで 1 回の洗浄とし, これを 5 回繰り返した。

2.3.2 sodium dodecylsulfate polyacryl amide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) 及びウエスタンブロット法による検討

Imai *et al*¹⁰⁾ の報告に準じ, 8~16% SDS-PAGE mini ゲル (岩城硝子) を用い実施した。2.3.1 の免疫沈降物を 2 \times サンプルバッファー (20% glycerol/10% 2-mercaptoethanol/6% SDS/130 mM Tris-HCl, pH 6.8) に懸濁し, 5 分間煮沸することで免疫複合体を分解した後, 2,000 \times g, 1 分間遠沈させ, その上清 35 μ l を SDS-PAGE にて展開後, 渡辺ら¹¹⁾ の方法に従ってゲルよりニトロセルロース膜 (pore size 0.45 μ m, Schleicher & Schull, Germany) へ転写し, 酵素抗体法を用いて抗原を検出した。血清 (髄液) 中の抗原を AM34, 抗 H 因子抗体, TB-1 それぞれで沈降単離させたサンプルを 1 組として, 1 次抗体として AM34 (20 μ g/ml), 抗 H 因子抗体 (1% BSA-PBS にて 1,000 倍希釈), TB-1 (20 μ g/ml) ならびにコントロールとしての 22C11 (10 μ g/ml) をそれぞれ反応させ, その後 2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン (DAKO, Denmark), およびペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヒツジ免疫グロブリン (CHEMICON, USA) を使用した。

2.4 AM34 抗原の免疫組織学的検索

2.4.1 組織材料

1967 年~1993 年までに行われた剖検・手術及び生検材料計 38 症例, 44 組織切片を対象とし, 各組織はすべてホルマリン固定の材料を使用した。内訳は原発性あるいは多発性骨髄腫に伴うアミロイドーシス 12 症例, 21 組織切片, 続発性アミロイドーシス 10 症例, 11 組織切片, 家族性ポリニューロパチーに伴うアミロイドーシス 3 症例, 膵限局性アミロイドーシス 1 症例, 内分泌腫瘍に合併するアミロイドーシス 1 症例, 皮膚アミロイドーシス 1 症例, アルツハイマー病 8 症例, ダウン症 2 症例である。

2.4.2 免疫ペルオキシダーゼ染色

遠藤・今井が記載した方法¹²⁾ に従った。脱パラフィン後, 各組織切片について 0.6% H₂O₂ メタノールで内因性ペルオキシダーゼ活性を除去し, 2 次抗体の非特異

的吸着を阻止するため 10% 正常ウサギ血清を反応させ, その後 1 次抗体としてモノクローナル抗体 AM34, あるいは TB-1 を反応させた。2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン (DAKO, Denmark) を反応させ, 発色には 3-3'-diaminobenzidine (関東化学) を用い, 1% メチルグリーンにより核染色を行なった。

3 研究成績

3.1 AM34 陽性 cDNA のクローニング

モノクローナル抗体 AM34 と反応する抗原蛋白を遺伝子レベルで明らかとする目的で, ヒト成人肝由来 λ gt 11 cDNA ライブラリーと MoAb AM34 を用いて免疫スクリーニングを行なった。4 回のスクリーニング操作で合計 31 の陽性クローンを得た。

陽性クローンをプラスミド p-Bluescript にサブクローニングした後, 制限酵素 EcoRI および Hind III を用いて二重消化を行ない, 制限酵素地図の作成を行った。31 の陽性クローンは, 二重消化断片長が 0.35 kb + 1.25 kb の 5 クローン, 0.35 kb + 0.9 kb の 2 クローン, 0.35 kb + 0.75 kb の 24 クローンの 3 種に分かれた (Fig. 1)。

3.2 AM34 陽性クローンの塩基配列の決定

3.1 で得られた陽性クローン中, 各 EcoRI・Hind III 2 重消化断片長のものを用いて, Fig. 1 の中に示す No. 1~No. 10 の領域について塩基配列の決定を行なっ

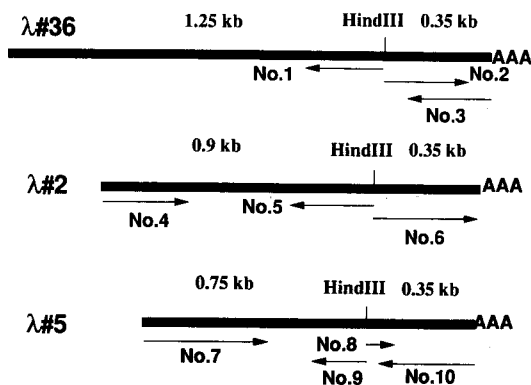


Fig. 1 Restriction enzyme maps of immunoscreening positive clones. Representative clones λ #36, λ #2 and λ #5 are shown in the figure. The sizes of these clones digested with EcoRI and Hind III are 0.35 kb+1.25 kb, 0.35 kb+0.9 kb and 0.35 kb+0.75 kb, respectively. Underlines with arrow heads (from No. 1 to No. 10) indicate the regions where the nucleotide sequences were determined.

```

510      20      30      40      50
CATGGGACTA AATTGAGTTA TACTTGTGAG GGTGGTTCCTA GGATATCTGA
60      70      80      90      100
AGAAATGAA ACAACATGCT ACATGGGAAA ATGGAGTCTT CCACCTCAGT
110     120     130     140     150
GTGAAGGGCT TCCCTGTAAA TCTCCACCTG ATATTTCCTA TGGTGTGTGA
160     170     180     190     200
GCTCACAATG CAGACAGTTA TCAGTATGGA GAAGAGTTA CGTACAATG
210     220     230     240     250
TTTGTAGAGT TTTGGAATG ATGGGCGTGC AATTGCAAAA TGCTTAGGAG
260     270     280     290     300
AAAAATGGTC TCACCCCTCA TCATGATATA AACAGATGT TCTCAGTTTA
310     320     330     340     350
CCTAGTCTTG AAAATGCCAT ACCCATGGGA GAGAAGAAG ATGTGTATAA
360     370     380     390     400
GGCGGTGAG CAAGTGACTT ACATGTGTGC AACATATTAC AAAATGGATG
410     420     430     440     450
GAGCCAGTAA TGTAACATGC ATTAATAGCA GATGGACAGG AAGGCNENNN
460     470     480     490     500
NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN
510     520     530     540     550
NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN
560     570     580     590     600
NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN
610     620     630     640     650
NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNTCAATGC AAAGATCTA CAGGAAAATG
660     670     680     690     700
TGGGCCCTCT CCACCTATTG ACAATGGGGA CATTACTTCA TCCCGTGTGT
710     720     730     740     750
CAGTATATGC TCCAGCTTCA TCAGTGTAGT ACCAATGCCA GAACCTGTAT
760     770     780     790     800
CAACTGTAGG GTAACAAGCG AATAACATGT AGAAATGGAC AATGTGCAGA
810     820     830     840     850
ACCACAAAAA TGCTTACATC CBTGTGTAAT ATCCCGAGAA ATTATGGAAA
860     870     880     890     900
ATTATAACAT AGCATTAAAG TGGACAGCCA AACAGAGCT TTTATCGAGA
910     920     930     940     950
ACAGGTGAAT CAGTTGAAAT TGTGTGTAAA CGGGATATC GTCTTTCATC
960     970     980     990     1000
ACGTTCTCAC ACAATGGGCA CAACATGTGT GGATGGGAAA CTGAGATATC
1010    1020    1030    1040    1050
CAACTGTGTC AAAAAGTAG AATCAATCAT AAGTGACACA CCTTTATCCA
1060    1070    1080    1090    1100
GAACCTTAGT ATTAATCAG TCTCAATTT CATTTTATAT GTATTGTTT
1110    1120    1130    1140    1150
ACTCCTTTT ATTCATAGT AAAATTTTGG ATTAATTTGT GAAAATGTAA
1160    1170    1180    1190    1200
TTATAAGCTG AGACCGTGTG CTCTCTTCTT AAAAGCACCA TATTAAATCC
1210    1220    1230
TGAAACTATA AAAAAAAA AAAAAAAA

```

Fig. 2 The nucleotide sequence of AM34 positive clone λ #2. λ #2 has 1228 base pairs. N indicates the nucleotides which were not sequenced, in this study.

た。代表例として、クローン λ #2 について決定された塩基配列、およびクローン λ #5 の No.7 の領域の塩基配列を加えて Fig. 2 に示す。その結果、クローン λ #2 における 5' 側 445 bp、および 3' 側 606 bp の塩基配列が明らかとなった。

3.3 AM34 陽性クローン塩基配列のホモロジー・サーチ

決定された塩基配列および塩基配列より推定されるアミノ酸配列の両者を、既報の塩基配列およびアミノ酸配列と、2・2・4 に示した方法と比較した。AM34 陽性クローンにおいて決定された塩基配列およびアミノ酸配列は、ヒト補体系の制御因子である H 因子のものと 1 塩基 (1 アミノ酸) を除いて完全に一致した。また、クローン λ #2 で塩基配列未決定であったのは、177 bp であることが明らかになった (Fig. 2)。H 因子と一致していなかったのは、Fig. 2 の Nucleotide No. 132 (H 因子の No. 2881) の 1 塩基 (G→T) であり、アミノ酸

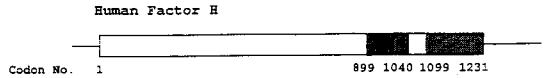


Fig. 3 Schematic representation of human factor H protein and corresponding region of clone λ #2. The regions of factor H identical with clone λ #2 are indicated with shading. Codon No. of factor H are also shown below the scheme. Codon No. 936 of factor H is different from that in clone λ #2 (E→D).

は (E; Glu → D; Asp) への変化であった。AM34 陽性クローンが H 因子と一致していた部分を Fig. 3 に示す。AM34 抗原のエピトープは、補体制御蛋白である H 因子の C 末端部寄りの部分にあることが強く示唆された。

3.4 AM34 抗原の免疫学的検討

AM34 抗原と補体制御蛋白 H 因子との関連性をさらに検討するために、免疫学的検討を試みた。すなわち血清中抗原に、それぞれ MoAb AM34 あるいは抗 H 因子抗体を加え、免疫沈降させた沈降抗原をサンプルとして用い、SDS-PAGE・ウェスタンブロット法を行なった。Fig. 4a に示すように、それぞれ 1 次抗体として MoAb AM34 (lane 1, 2)、あるいは抗 H 因子抗体 (lane 4, 5) を反応させると、いずれの沈降抗原を用いた場合にも、150 KD の位置で反応を示した。一方 lane 3 および lane 6 に示すように、抗 β 蛋白 MoAb TB-1 で免疫沈降させた沈降抗原では、MoAb AM34 および抗 H 因子抗体いずれでも反応を示さなかった。lane 8, 9 に示すように、MoAb AM34 あるいは抗 H 因子抗体にて免疫沈降させた後、TB-1 と反応させてもバンドは得られなかった。他方、MoAb TB-1 で免疫沈降させたウェスタンブロット法にて MoAb TB-1 と反応させた場合 (lane 7)、および MoAb 22C11 にて免疫沈降させた MoAb 22C11 と反応させた場合 (lane 10) は、100 KD 前後に分泌型 APP と思われる抗原が検出された。しかし、いずれの場合でも 150 KD の位置には対応抗原を見いだせなかった。

また髄液でも同じ操作を実施した。Fig. 4b に示す通り、MoAb AM34 で免疫沈降させた抗原 (lane 3 および 6)、あるいは抗 H 因子抗体で免疫沈降させた抗原 (lane 4 および 5)、それぞれをウェスタンブロット法において、MoAb AM34 あるいは抗 H 因子抗体と反応させた場合には、いずれも同じ 150 KD の位置に対応抗原を確認できた。一方、MoAb TB-1 で沈降させた抗原 (lane 1 および 4) に対しては、MoAb AM34、抗 H

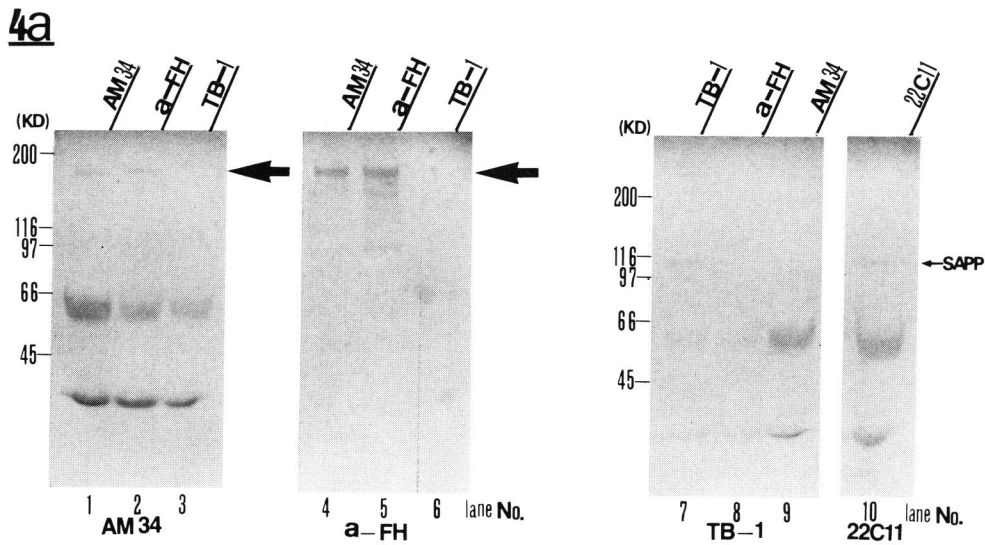


Fig. 4a SDS-PAGE (8-16% gel) and western blot analysis of antigens recognized by MoAb AM34 (lanes 1-3), anti-factor H polyclonal antibody (a-FH) (lanes 4-6), anti- β MoAb TB-1 (lanes 7-9) and anti- β MoAb 22C11 (lane 10). Normal human serum was immunoprecipitated by MoAb AM34 (lanes 1, 4, 9), a-FH (lanes 2, 5, 8), TB-1 (lanes 3, 6, 7) and 22C11 (lane 10), before performing SDS-PAGE and western blotting. The large arrows indicate the 150 kD molecule protein. The small arrow indicates a protein of just under 100 kD which is a secretory amyloid precursor protein (SAPP) of β -protein.

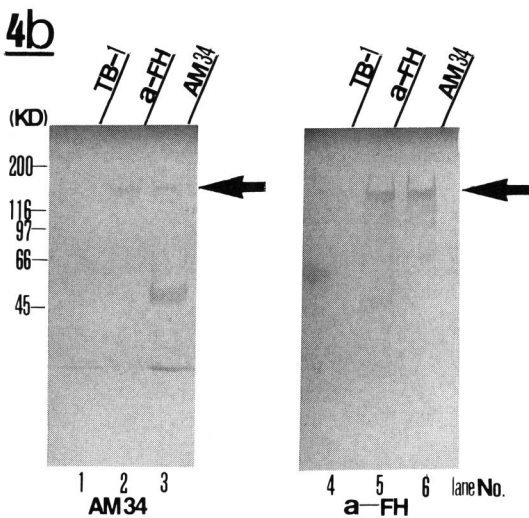


Fig. 4b SDS-PAGE (8-16% gel) and western blot analysis of AM34 (lanes 1-3) and anti-factor H polyclonal antibody (a-FH) (lanes 4-6). Cerebrospinal fluid from a patient with Alzheimer's disease was immunoprecipitated by MoAb AM34 (lanes 3, 6), a-FH (lanes 2, 5) and anti- β MoAb TB-1 (lanes 1, 4). Large arrows indicate the 150 kD molecule protein.

因子抗体ともに反応を示さなかった。

3.5 各種アミロイド沈着組織における AM34 抗原エピトープの分布

2.4.1 に示した各種アミロイドーシス 38 症例のアミロイド沈着組織について、MoAb AM34 の反応性を、免疫ペルオキシダーゼ法を用いて検討し、MoAb TB-1 のそれと比較して Table 1 に一括した。その結果、AM34 抗原は、続発性アミロイドーシス症例に極めて高頻度に存在すること、ならびにアルツハイマー病およびダウン症の脳組織にも検索の限りで全例に存在することが明らかにされた。一方、MoAb TB-1 で検出される β 蛋白は続発性アミロイドーシス症例には認められず (Fig. 5)、アルツハイマー病およびダウン症に限られていた。

AM34 抗原は原発性アミロイドーシスあるいは骨髄腫に伴うアミロイドーシスには殆ど存在せず、さらに家族性アミロイドーシスや限局性アミロイドーシスにも検出されなかった。すなわち、AM34 抗原は AA 蛋白および β 蛋白の存在部位に一致したユニークな分布を示すことが明らかとなった。しかも、興味あることに AM34 抗原の局在は、アルツハイマー病およびダウン症の脳組織の老人斑、アミロイドアンギオパチーに

Table 1 Reactivity of the Monoclonal Antibody AM34 and TB-1 with Tissues of Various Types of Amyloidosis detected by Immunoperoxidase Staining

Clinical Feature	Type of Amyloid Protein	Case No.	Tissue	Reactivity		
				AM34	TB-1	
Secondary Amyloidosis	AA	1	kidney	+	-	
		2	thyroid gland	+	-	
			kidney	±	-	
		3	intestine	+	-	
		4	liver	+	-	
		5	kidney	+	-	
		6	synovium	+	-	
		7	kidney	+	-	
		8	heart	+	-	
		9	rectum	+	-	
	10	kidney	+	-		
Alzheimer's Disease	β -protein	11	brain	+	+	
		12	brain	+	+	
		13	brain	+	+	
		14	brain	+	+	
		15	brain	+	+	
		16	brain	+	+	
		17	brain	+	+	
		18	brain	+	+	
Down's Disease	β -protein	19	brain	+	+	
		20	brain	+	+	
Primary or Myeloma associated Amyloidosis	AL(κ)	21	liver	-	-	
			spleen	-	-	
			heart	-	-	
		22	colon	-	-	
	AL(λ)	23	tongue	-	-	
		24	colon	±	-	
		25	lung	-	-	
		26	tongue	-	-	
	AL(unknown)	AL(unknown)	27	spleen	-	-
			28	kidney	-	-
				spleen	±	-
			29	liver	-	-
			kidney	-	-	
30			liver	-	-	
31	liver	-	-			
	spleen	-	-			
	32	liver	-	-		
Familial Amyloid Polyneuropathy	AF	33	spleen	-	-	
		34	intestine	-	-	
		35	intestine	-	-	
Localized Amyloid	AE	36	pancreas	-	-	
		37	lymph node	-	-	
Skin Amyloid	AD	38	skin	-	-	

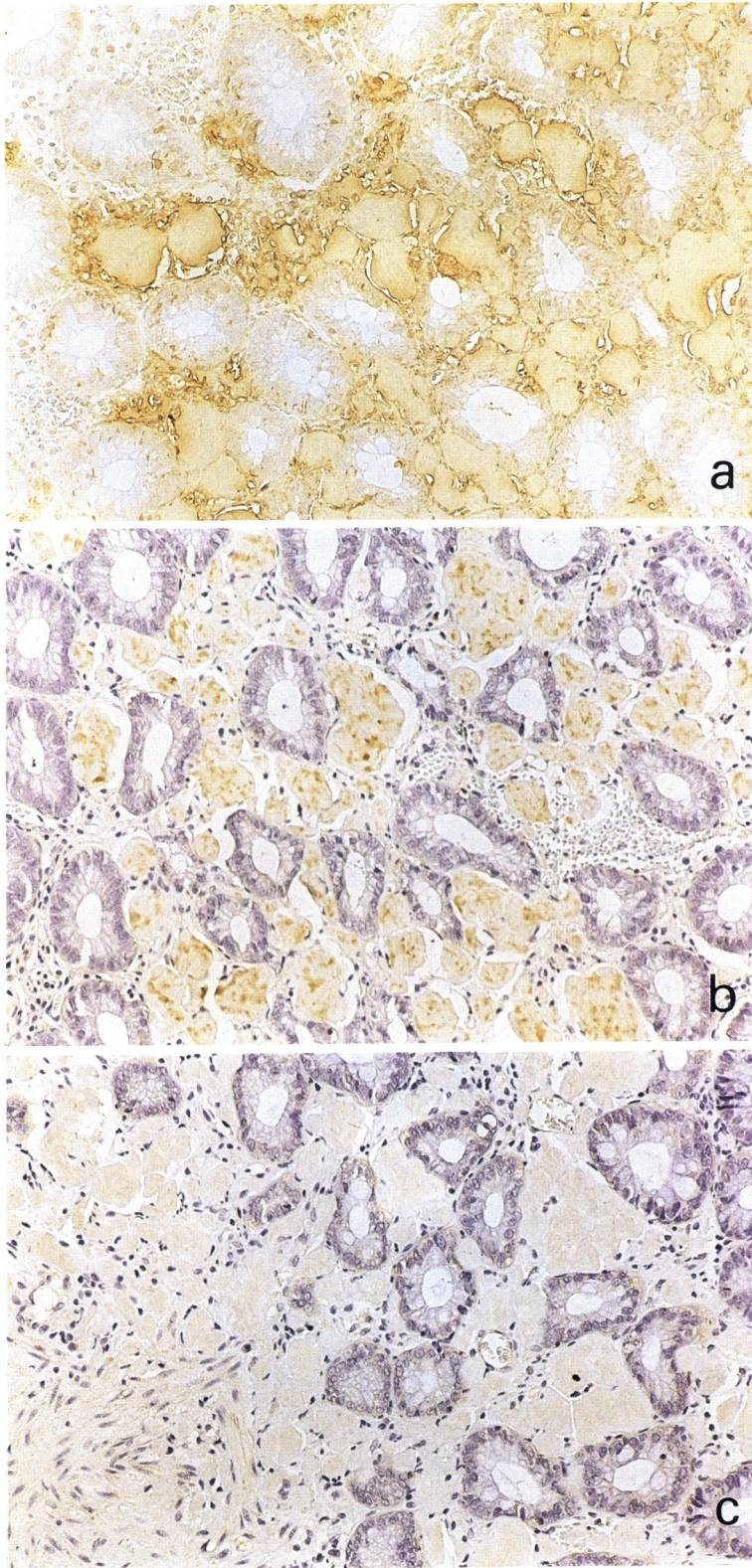


Fig. 5 Staining pattern in the rectal tissues of a patient with secondary amyloidosis with MoAb against AA-protein (anti-AA MoAb), MoAb AM 34 and anti- β MoAb TB-1. Amyloid deposits were stained with anti-AA MoAb (a). They were stained differently with MoAb AM34 (b). They were not stained with anti- β MoAb TB-1. ($\times 100$)

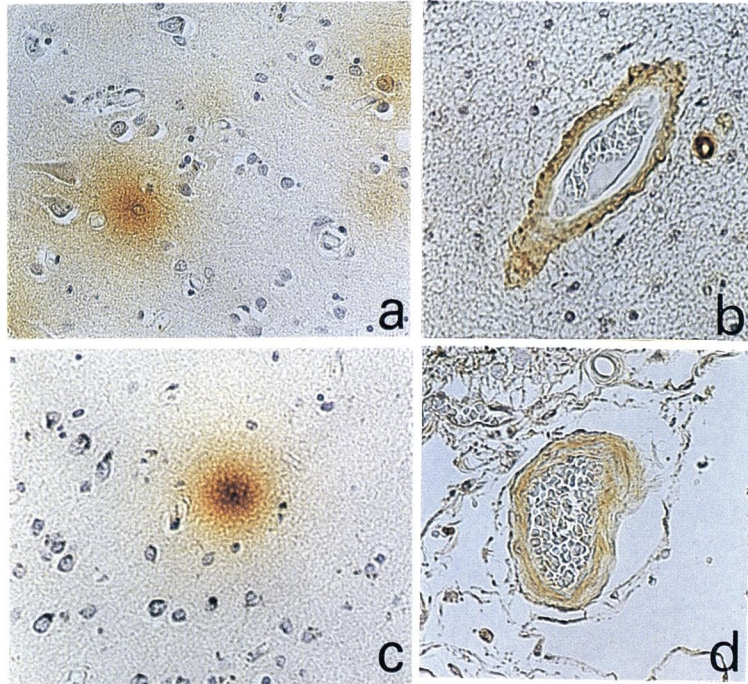


Fig. 6 Staining pattern in the tissues of Alzheimer's disease brain with MoAb AM34 and anti- β MoAb TB-1. Senile plaques (a, c) and amyloid angiopathy (b, d) were stained with MoAb AM34 (c, d) or MoAb TB-1 (a, b). ($\times 100$)

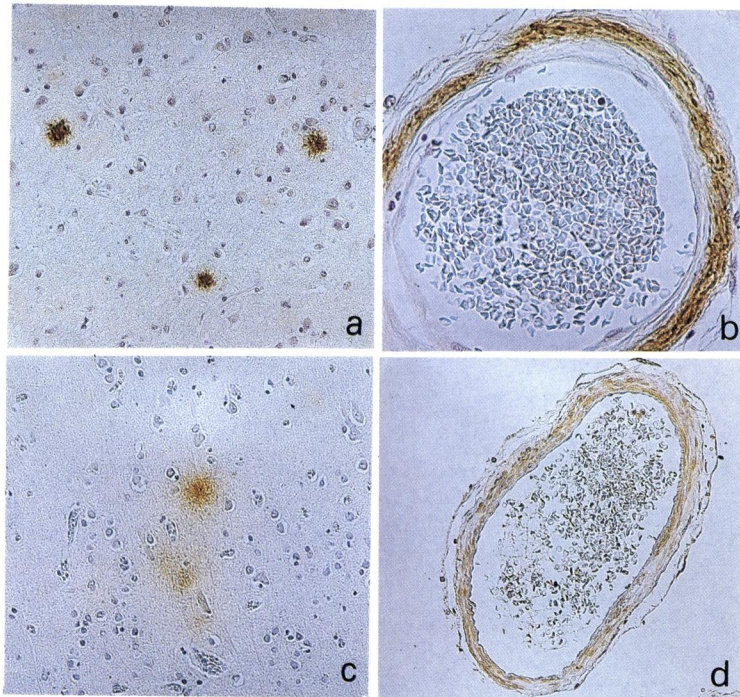


Fig. 7 Staining pattern in the tissues of Down's syndrome brain with MoAb AM34 and anti- β MoAb TB-1. Senile plaques (a, c) and amyloid angiopathy (b, d) were stained with MoAb AM34 (c, d) or MoAb TB-1 (a, b). ($\times 100$)

において β 蛋白の局在と非常に類似していた (Fig. 6, 7).

4 考 察

慢性関節リウマチに続発する全身性アミロイドーシス患者剖検腎より抽出した粗アミロイド蛋白を免疫原として、作製したモノクローナル抗体 AM34 の対応抗原 cDNA を、免疫スクリーニング法によって検討し、そのアミノ酸配列を既報の蛋白質のそれと比較した。その結果、AM34 対応抗原分子は、補体制御蛋白 H 因子の C 末端側のアミノ酸配列と、1 個のアミノ酸を除いて一致した。そこで MoAb AM34 および抗 H 因子抗体を用いて、免疫沈降法により、対応抗原分子の異同をさらに検討した。その結果、MoAb AM34 により免疫沈降した分子は、抗 H 因子抗体と反応し、抗 H 因子抗体により免疫沈降した分子は MoAb AM34 と反応したことから、両抗体が同一の分子に反応している可能性が示された。その分子サイズは 150 KD であり、H 因子のそれと一致した。以上より、AM34 抗原分子は H 因子と同一か、H 因子の一部 (C 末端側) と同一であることが強く示唆された。

アミロイドーシスと補体との関連性については、アルツハイマー病脳のアミロイド沈着部位に C3, C4 が検出される¹³⁾との報告があるのみで、詳細な検討はされていない。H 因子は補体反応の調節機構を担う蛋白であり、C3b に結合して、I 因子とともに、これを不活化するとされている。その活性部分は N 末端側にあることが判明している^{14,15)}が、アミロイド沈着との関連性はこれまでに報告がみられない。

最近、H 因子に関連した分子の cDNA が 3 種類報告されている。第 1 は、H 因子遺伝子の alternative splicing 機構により得られたと考えられている 1.8 kb mRNA に対応すると考えられる cDNA である^{16,17)}。第 2 は、H36-1 といわれている cDNA で、H 因子遺伝子と異なる遺伝子由来であり、1.4 kb mRNA を示す^{18,19)}。この分子のアミノ酸配列は H 因子の C 末端側と homology が高く、抗原的には H 因子と類似している。この分子のサイズは 42 KD および 37 KD とされている。第 3 には、上記の 2 種とは異なる、分子サイズのやや小さい (29 KD および 24 KD) 蛋白をコードする DDESK 59 と呼ばれる cDNA が報告されている²⁰⁾。この分子も上記 2 種と高い homology を有しており、H 因子関連遺伝子ファミリーであることが明らかにされている。

我々はこれ迄に、MoAb AM34 が、アミロイド抽出抗原中で 45 および 42 KD の分子サイズの抗原とも反応

することを報告⁶⁾してきたが、この事実は MoAb AM34 が、H 因子以外に H 因子関連遺伝子ファミリーの一部、特に H36-1 cDNA 産物などと交差反応している可能性を示唆する所見かもしれない。この点は、今後さらに検討すべき課題であろう。

次に AM34 抗原の組織分布を検討したが、注目すべきことに、そのエピトープは続発性アミロイドーシスとアルツハイマー病、ないしダウン症脳のアミロイド沈着部位に限局して発現していた。これは、これ迄の我々の成績⁶⁾を再確認すると同時に、ダウン症脳のアミロイドにも、AM34 抗原の存在を明らかにした点で興味深い。ダウン症脳には、アルツハイマー病脳と同様 β 蛋白の沈着が報告²¹⁾されているからである。

また、続発性アミロイドーシスの場合の主要蛋白は分子量 9~7 KD の AA 蛋白であり、アルツハイマー病およびダウン症の場合の主要成分は β 蛋白であることは周知の事実であるが、今回の成績は、これらの蛋白分子に加えて、H 因子ないしは H 因子関連蛋白が沈着していることを示している。成績には示していないが、抗 H 因子抗体を用いて上記の組織との反応性を検討したところ、反応性は極めて弱いか、ほとんど認められなかった。この抗 H 因子抗体は、Fig. 4 に示したように、抗体活性は十分保たれているので、これらの成績から、1) アミロイド沈着部位に H 因子の全分子は存在せず、MoAb AM34 に対応するエピトープを有する C 末端側の断片分子のみが存在して抗 H 因子抗体には反応し得ない、2) H 因子関連蛋白が沈着しているが、これに抗 H 因子抗体は反応し得ない、3) H 因子は沈着しているが、conformational な変化ないしは他の物質との結合のためにエピトープがマスクされている等の可能性が示唆されよう。これらの組織から直接 MoAb AM34 に反応するアミロイド蛋白を精製して、アミノ酸シーケンスを行ない、この点を明らかにする予定である。いずれにしても、これらの 2 種のアミロイドの沈着に AM34 抗原が密接に関連することは明らかであるが、一方において、原発性や骨髄腫に伴うアミロイド沈着、すなわち L 鎖関連アミロイドの沈着とは関連がないものと考えられる。現時点では、AM34 抗原が、アミロイド沈着機序にどのように関係するかは不明ではあるが、今後検討すべき興味ある課題と考えられる。

5 要 約

1. 続発性アミロイドーシスの剖検腎より抽出した粗アミロイド蛋白を免疫原として作製されたモノクロー

ナル抗体 AM34 の対応抗原について、cDNA クローニングを施行した。その結果を既報の蛋白のアミノ酸配列と比較したところ、補体制御蛋白である H 因子の C 末端領域と 1 アミノ酸を除いて完全に一致した。

2. 血清および髄液を材料に、MoAb AM34, 抗 H 因子抗体あるいは抗 β 蛋白 MoAb を用いて免疫沈降法を施行した。その結果、AM34 抗原分子は、150 KD の分子サイズを示し、H 因子蛋白と考えられた。

3. MoAb AM34 を用いて免疫組織学的検討を加えたところ、その反応性は続発性アミロイドーシスおよびアルツハイマー病、ダウン症脳のアミロイド沈着部位に限局して認められた。

4. 以上より、上記アミロイド沈着部位には、AA 蛋白あるいは β 蛋白以外に、H 因子ないしこれと免疫学的に交差反応を示す H 因子関連蛋白の存在が明らかになった。

謝 辞

御指導・御校閲いただいた谷内 昭教授、技術面での貴重な御教示をいただいたサントリー生物医学研究所(栗原達也先生、中里 紘先生)、並びに貴重な組織標本を御提供下さいました信州大学医学部第 3 内科池田修一先生、慈恵会病院 浦澤喜一先生、笠井美智子先生、またご協力頂いた諸先生に深謝いたします。

本研究は、厚生省特定疾患原発性アミロイドーシス調査研究班(谷内)、文部省科学研究費補助金一般研究 C (No. 03670331) (今井) ならびに北海道老年医学研究振興会研究費 (谷内、今井) の補助による。

文 献

- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984, 120: 885-890.
- Masters CL, Simmus G, Weiman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82: 4245-4249.
- Kang J, Lemaire HC, Unterbek A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller MB. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature* 1987: 733-736.
- 斎藤丹羽子, 今井浩三. β 蛋白に対するモノクローナル抗体を用いたアルツハイマー病の免疫学的検討. *札幌医誌* 1991, 60: 309-320.
- 太田雅彦, 今井浩三, 斎藤丹羽子, 伊東文生, 辻崎正幸, 杉山敏郎, 日野田裕治, 谷内 昭, 笠井美智子, 川原田 信, 佐藤保則, 浦澤喜一, 伊藤公晴, 八代信義, 奥瀬 哲, 大山俊郎, 野又康博, 樋川明久, 笠原洋勇. モノクローナル抗体を用いたアルツハイマー病関連 β 蛋白の検討. *日老医誌* 1993, 30: 23-29.
- Yamashita T, Imai K, Saito N, Yachi A. Detection of novel protein associated with secondary amyloidosis and Alzheimer's disease by monoclonal antibody. *Brain Res* 1988, 474: 309.
- Young RA, Davis RW. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80: 1194.
- 山梨裕司. 免疫沈降法. 東京大学医科学研究所編. 細胞工学実験プロトコール. 東京, 秀潤社, 1991, 237-239.
- Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 1561-1565.
- Imai K, Galloway DR, Ferrone S. Serological and immunological analysis of the specificity of xenoantiserum 8986 elicited with hybrids between human melanoma cells and murine fibroblasts. *Cancer Res* 1981, 41: 1028-1033.
- 渡辺 武, 大原純一, 江田康幸, 松橋幸子. ブロッキング法によるモノクローナル抗体の検出. 免疫実験操作法. 1982, 11: 3485-3489.
- 遠藤高夫, 今井浩三. ヒト肺腺癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製と癌患者血清中抗原の検出. *札幌医誌* 1985, 54: 393-410.
- Ishii T, Haga S. Immunoelectronmicroscopic localization of complements in amyloid fibrils of senile plaques. *Acta Neuropathol (Berl.)* 1984, 63: 296-300.
- Hong K, Kinoshita T, Dohi Y, Inoue K. Effect of trypsinization on the activity of human factor H. *J Immunol* 1982, 129: 647-652.
- Alsens J, Lambris JD, Schulz TF, Dierich MP. Localization of the complement-component-C3b-binding site and the cofactor activity for factor I in the 38 KDa tryptic fragment of factor H. *J Biochem* 1984, 224: 389-398.
- Fontaine M, Demares MJ, Koistinen V, Day AJ, Davrinche C, Sim RB, Ripoche J. Truncated forms of human complement factor H. *J Biochem* 1989, 258: 927.

17. Misasi R, Huemer HP, Schwaeble W, Soelder E, Larcher C, Dierich MP. Human complement factor H: an additional gene product of 43 KDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement. *Eur J Immunol* 1989, 19: 1765-1768.
 18. Skerka C, Horstmann RD, Zipfel PF. Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *J Biol Chem* 1991, 266: 12015.
 19. Estaller C, Koistinen V, Schwaeble W, Dierich MP, Weiss EH. Cloning of the 1.4-Kb mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150-kDa molecule. *J Immunol* 1991, 146: 3190-3196.
 20. Skerka C, Timmann C, Horstmann RD, Zipfel PF. Two additional human serum proteins structurally related to complement factor H; Evidence for a family of factor H-related genes. *J Immunol* 1992, 148: 3313-3318.
 21. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82: 4245-4249.
-
- 別刷請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学医学部内科学第1講座 太田雅彦