

学位論文
Doctor's Thesis

トランスサイレチン遺伝子によって引き起こされる優性遺伝病の解析

Analysis of the chronic hereditary diseases induced by transthyretin gene

野口博光

Hiromitsu Noguchi

指導教官名：皮膚科学講座教授

小野友道

病態遺伝分野教授

浦野 徹

臓器形成分野教授

山村研一

審査委員名：形態形成分野教授

相澤慎一

分子遺伝学講座教授

森 正敬

細胞識別分野教授

栗原裕基

神経発生分野教授

大久保博晶

2002年3月

目次

要旨	1
Abstract	4
発表論文リスト	7
謝辞	8
略語一覧	9
序論	
1) 優性遺伝病の発症機構	10
2) TTR の構造と機能	12
3) FAP と変異 TTR	14
4) TTR の構造とアミロイド線維の形成機序	17
5) FAP の発症と環境要因	18
6) FAP の疾患モデルマウスの作製	19
7) hTTR 遺伝子の導入による鼻上顎奇形マウス	22
8) TTR と顔面奇形	22
9) hTTR 遺伝子の発現によるヒトの顔奇形	24
第1章 腸内フローラとアミロイド沈着との関係	
材料と実験方法	
1) 6.0-hMet30 マウスの作製と飼育環境	26
2) ゲノム DNA の抽出	28
3) Tg マウスの同定	28
4) ウェスタンブロット法	29
5) 病原微生物学的検査	30
6) 病理組織検査	30
7) 腸内フローラの検査	30
結果	
1) 導入遺伝子の発現とアミロイド沈着	33
2) 好中球浸潤とアミロイド沈着	35
3) 腸内フローラ	40

4) 病原微生物学的検査	42
考察	42
第2章 hTTR 発現による鼻上顎奇形マウス	
対象と実験方法	
1) マウスの作製	46
2) ゲノム DNA の抽出と PCR 法による Tg マウスの同定	46
3) サザンブロット法	47
4) ウエスタンブロット法	48
5) 病理組織学的検査	48
6) アポトーシスの検出	49
7) RNA プローブの作成	49
8) In situ ハイブリゼーション法	50
9) 鼻プラコード組織培養	51
結果	
1) hTTR 遺伝子量に依存した Nax の表現型	51
2) 復帰型 Tg ライン、Nax-normal の分析	57
3) hTTR 遺伝子の発現が顔奇形を生じる	61
4) 異なるプロモーターを用いた hTTR 過剰発現マウス	62
5) 鼻プラコードの組織培養への hTTR の作用	65
6) 鼻プラコードでのアポトーシス	65
7) レチノイン酸の作用に関する遺伝子の発現	67
考察	
1) 顔での hTTR の発現による Nax の表現型	69
2) hTTR 遺伝子とヒトの疾患との関係	71
3) 発生時期特異的な hTTR 発現の効果	73
4) hTTR のアポトーシス誘導について考えられる機序	74
結語	75
参考文献	77

要旨

優性遺伝病の発症において、考えうる遺伝的機構には、半数不全、機能獲得型変異、ドミナントネガティブ型変異、ヘテロ接合性の喪失、遺伝子重複型変異、トリプレットリピートの増幅がある。このうち、遺伝子産物の量が少ないため病気になる半数不全と出生後の遺伝子の欠失がかかわるヘテロ接合性の喪失をのぞくと、多くの場合は変異遺伝子産物と疾患が密接に関連している。これら優性遺伝病の発症機序解明のためには疾患モデル動物の樹立と解析が有効であるが、疾患の原因となる遺伝子を導入し発現させるトランスジェニックマウス(Tg)の作製は最も優れた手段の1つである。

家族性アミロイドポリニューロパシー (FAP) はアミロイド線維が全身に蓄積し、末梢神経障害と自律神経障害を主徴とする常染色体優性遺伝病であり、機能獲得型変異の代表例である。アミロイド蛋白の主成分は変異トランスサイレチン ($hTTR^{Met30}$) であり、症例の大部分は 30 番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに置換している。われわれは FAP 患者のもつ変異ヒト TTR ($hTTR^{Met30}$) 遺伝子を用い、マイクロインジェクション法によりヒト疾患モデルに近いトランスジェニックマウス(Tg)を作製した。これらのマウスはコンベンショナルな (CV) 環境で 18 ヶ月程飼育すると、様々な臓器にアミロイドが沈着すが、特定の病原微生物や寄生虫が感染しないような清浄な飼育条件下 (SPF) では全く沈着しない。FAP は発症年齢が遅く浸透率が低いことから、環境要因が発症に影響する可能性が指摘されてきた。ヒトの腸内には糞便 1 g あたり 10^{10} 個以上の細菌が常在しており、腸内フローラ (腸内細菌叢) は主要な環境要因の 1 つである。そこで、FAP の疾患モデル Tg マウスを用いてアミロイド沈着への腸内フローラの影響を調べた。2つの

異なった施設の CV 環境 (CV1, CV2) で飼育したマウスの腸内フローラを疾患モデルマウスに移入後、同時にコントロールとして作製した SPF の腸内フローラをもつ SPF 群とともに温度、湿度、微生物学的な環境がコントロールされたアイソレーター内で飼育した。ところが、CV1 群は 28 ヶ月間飼育した後も、アミロイド沈着はなかった。一方、CV2 群では 18 ヶ月齢の 3 匹中 2 匹の食道および小腸にアミロイドが沈着し、病変部には多くの好中球が浸潤していた。CV2 群の腸内フローラは嫌気性グラム陽性球菌が減少し、酵母、ブドウ球菌および大腸菌科の細菌の数が有意に多かった。これらの結果から腸内フローラの違いという環境因子によって、FAP の発症が影響を受けることが示唆された。

樹立した FAP の疾患モデル Tg マウスラインの中で目から鼻にかけての距離が短く、不正咬合を呈し、その奇形が常染色体優性遺伝するラインが得られた。このことから、このマウスを *Nax* (Naso-maxillary deformity) と名付け、その奇形の原因を解析した。*Nax* では導入した *hTTR^{Met30}* 遺伝子は 1 箇所にも 5 コピー挿入されていたが、*Nax* の継代中に偶然得られた表現型が正常にもどった Tg マウスでは 1 コピーに減少しており、発現も消失していた。また、*Nax* のホモ接合体はヘミ接合体に比べて、奇形の程度も血中 *hTTR^{Met30}* の発現も強かった。このことから、*hTTR^{Met30}* の発現が顔奇形の原因となっている可能性を考え、顔が形成される時期の *hTTR^{Met30}* 遺伝子の発現を調べた。その結果、胎生 10.5 日の *Nax* の鼻プラコードで *hTTR^{Met30}* 遺伝子の発現と過剰な細胞死が観察され、他の Tg ラインでは同様の現象はこの時期、この場所で認められなかった。*hTTR^{Met30}* の発現が顔奇形を引き起こすことを確かめるために、*hTTR^{Met30}* 過剰発現 Tg マウスを作製したところ、このマウスは有意に鼻が短縮した。*hTTR* は血中でレチノール (ビタミン A) を輸送

する蛋白である。これらの結果から頭部神経堤細胞が鼻プラコードに定着した時期、 $hTTR^{Met30}$ の過剰発現が局所のレチノールの濃度を変化させ、これらの細胞にアポトーシスが生じて顔面奇形の原因となる可能性が考えられた。

これら $hTTR^{Met30}$ 遺伝子を導入した Tg マウスの発現解析から $hTTR^{Met30}$ 遺伝子は 12.5 日以降、他のラインでも鼻で発現していることがわかった。これはヒトではもともと $hTTR$ 遺伝子が鼻で発現していることを示し、その発現時期がずれるとヒトにおける顔奇形の原因になることも考えられる。エドワード症候群は $hTTR$ 遺伝子が存在する第 18 染色体のトリソミーによる 2 番目に頻度が高い染色体異常疾患で、ほぼ全例に小顎症などの顔奇形がみられる。この病態に Nax マウスで観察されたような $hTTR^{Met30}$ 遺伝子の早期発現増加が関与している可能性がある。

$hTTR^{Met30}$ 遺伝子を導入した Tg マウスによって、機能獲得型変異の優性遺伝病である FAP の発症に環境因子である腸内フローラが影響することがわかった。さらに、 $hTTR^{Met30}$ 遺伝子は、プロモーター領域の変異などで発現時期がずれることによって優性遺伝する顔奇形の原因となる可能性が示唆された。

Abstract

Autosomal dominant diseases are caused by many genetic aberrations such as haploinsufficiency, gain of function, dominant negative effect, loss of heterozygosity, gene duplication and trinucleotide repeat expansions. Many of those disorders are closely related to mutant gene product except haploinsufficiency resulted from shortage of normal gene product and loss of heterozygosity caused by gene deletion after birth. Therefore, the transgenic mouse models that introduced and expressed the mutant gene are the best tools to understand the mechanism of these genetic diseases.

Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) is an autosomal dominant disease characterized by the systemic accumulation of amyloid fibrils and is a typical model for gain of toxic function. The mutant transthyretin (*hTTR^{Met30}*) gene is mainly responsible for the disease and produces amyloidogenic protein, atypical TTR. Most FAP patients have the atypical TTR (*hTTR^{Met30}*) substituted methionine for valine at amino acid position 30. We previously produced transgenic mouse models for FAP by microinjecting the *hTTR^{Met30}* gene. In these transgenic mice housed under conventional (CV) conditions, amyloid deposition occurred in various organs at 18 months of age. However, amyloid was never deposited under specific pathogen-free (SPF) conditions. Onset of FAP has been affected by environmental factors because of its late onset and low penetrance. There are 10 billions of bacteria per 1 g of human feces and one of major environmental factors is intestinal flora. Thus, we examined the effect of intestinal flora in a transgenic (Tg) mouse model of FAP. Two types of intestinal flora were introduced into a Tg mouse FAP model, 6.0-hMet30. The transgenic mice were transferred with the intestinal flora (CV1, CV2) from two

different mouse facilities housed under conventional conditions and were maintained together with the control (SPF group) under controlled temperature, humidity and bacterial conditions. However, amyloid was not deposited over a period of 28 months in the CV1 groups. Whereas, amyloid was deposited in the esophagus and small intestine of two of the three CV2 mice at 18 months. Many neutrophils infiltrated into the lesions. The numbers of tissue neutrophils were higher in the CV2 group than in the SPF and CV1 groups at 18 months. The CV2 flora included fewer gram-positive anaerobic cocci as well as higher proportions of yeasts, staphylococci and enterobacteriaceae compared with the SPF and CV1 flora. These findings suggest that amyloid deposition of FAP is affected by intestinal flora.

One of the established transgenic mice lines showed an autosomal dominant mutation of facial development. This facial malformation was characterized by a short snout and a twisted upper jaw and named the line *Nax* (Naso-maxillary deformity). We examined the cause of *Nax* malformations. During propagation of *Nax* mice, a normal appearing Tg mouse, *Nax-normal* mice were incidentally obtained. Although *Nax* had integrated five copies of the transgene, *Nax-normal* had only one and a complete normal phenotype. The homozygotes of *Nax* mice showed a more severe phenotype and a higher serum hTTR^{Met30} than hemizygotes. These facts suggest that an inappropriate expression of the transgene causes the malformation and we examined the *hTTR^{Met30}* gene expression in the developmental face. In result, the *hTTR^{Met30}* gene expression and the excessive cell death were observed in the nasal placode at 10.5 embryonic day (E10.5). Although another transgenic line expressed the gene in the nose after E12.5, these mice were not detected at

E10.5. In order to confirm that expression of $hTTR^{Met30}$ gene affects facial development, we produced the $hTTR^{Met30}$ -overexpressing mice with the CAG promoter expressed strongly and ubiquitously and the mice significantly decreased the nose length. TTR is a carrier protein of retinol (vitamin A). These results supported the expression of $hTTR^{Met30}$ might change the local retinol concentration at the stage that cranial neural crest cells have placed on the nasal placode and induce the human craniofacial malformation.

We also found the nasal expression after E12.5 in another Tg mice introduced $hTTR^{Met30}$ gene such as line 62 and 6.0-hMet30. This suggests that the $hTTR$ gene naturally express in the human nose and out of timing may cause the facial malformations. Edwards' syndrome (trisomy 18) is the second most common autosomal trisomy in man and the facial malformation such as micrognathia is found in almost all the cases. The early expression like *Nax* mice might be related with the pathogenesis of Edwards' syndrome.

Although FAP is an autosomal dominant disease caused by the $hTTR^{Met30}$, we found the onset of the disease is affected by intestinal flora. Moreover, the $hTTR^{Met30}$ gene expression mistimed by a mutant promoter may cause the autosomal dominant facial malformations.

発表論文リスト

1. Noguchi, H., Ohta, M., Wakasugi, S., Noguchi, K., Nakamura, N., Nakamura, O., Miyakawa, K., Takeya, M., Suzuki, M., Nakagata, N., Urano, T., Ono, T., Yamamura, K. (2002) Effect of the intestinal flora on amyloid deposition in a transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy. *Experimental Animal* 51,
2. 野口博光、萱島研一、小野友道：毛包と連続した石灰化上皮腫. (1999) 臨床皮膚科 53, 878-879.
3. Noguchi, H., Kayashima, K., Ono, T. (1999) Pilomatricoma associated with several hair follicles. *American Journal of Dermatopathology* 21, 458-461.
4. Noguchi, H., Kayashima, K., Nishiyama, S., Ono, T. (1999) Two cases of pilomatrixoma in Turner's syndrome. *Dermatology* 199, 338-340.

謝辞

熊本大学発生医学研究センター器官形成部門・臓器形成分野において、熊本大学大学院医学研究科、臓器形成学、山村研一教授、同病態遺伝学、浦野 徹教授、熊本大学医学部皮膚科学、小野友道教授のご指導の下、本研究を行いました。多くのご指導を頂き、深く感謝いたします。

また、熊本大学動物資源開発研究センター、資源開発学、中潟直己教授には本実験のマウス作製技術のご指導を頂きました。臓器形成学、荒木喜美助教授、大田美香研究員、熊本大学遺伝子実験施設、荒木正健助教授には日々の実験手法から論文の指導まで幅広いご指導を頂きました。深く感謝致します。

病理学第2講座、竹屋元裕教授、宮川和久助手、中村 治先生には病理組織の標本作成と診断についてご指導頂きました。技術開発学、鈴木 操助教授にはマウスの作整計画についてご指導頂きました。病態遺伝学、野口和浩先生には腸内フローラ検査とビニールアイソレーターの飼育管理の技術指導を、中村直子先生にはマウスのモニタリング検査についてご指導頂きました。

大阪大学歯学部口腔解剖学第1講座、阿部真土先生には Nax マウスの歯牙の組織学的検討をお願いしました。京都大学大学院医学研究科、口腔機能病態分野、高橋 克先生には下顎組織培養法をご教授頂きました。臓器形成学、実験補助員の河崎幾予さんには病理組織検査の技術的な指導を頂きました。

臓器形成学教室、熊本大学医学部、皮膚科学教室の皆さまには有形無形の多くのご協力とご支援を頂きました。

心から感謝致します。

略語一覽

BMP: bone morphogenic protein

CRBP: cellular retinol binding protein

CRABP: cellular retinoic acid binding protein

CV: conventional

FAP: familial amyloidotic polyneuropathy

FGF: fibroblast growth factor

hCG: human chorionic gonadotropin

hTTR: human transthyretin

Nax: naso-maxillary deformity

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>)

PMS: pregnant mare's serum

RA: retinoic acid

RAR: retinoic acid receptor

RBP: retinol binding protein

RXR: retinoid X receptor

SHH: sonic hedgehog

SPF: specific pathogen free

Tg: transgenic mouse

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling

TTR: transthyretin

序論

1) 優性遺伝病の発症機構

優性遺伝病の発症において、考えうる遺伝的機構には、ヘテロ接合性の喪失、機能獲得型変異、トリプレットリピートの増幅、ドミナントネガティブ型変異、半数不全、遺伝子重複型変異がある (山村 1997)。

ヘテロ接合性の喪失 (loss of heterozygosity) は、網膜芽細胞腫などの優性遺伝性癌にみられるように、1つ残っていた正常な対立遺伝子が体細胞分裂の過程で失われることによるものであり、結局劣性遺伝病と同一の機構で病気がおこる。

機能獲得型変異 (gain of function) は遺伝子の変異により、その遺伝子産物が正常と異なった作用を有し、病気の原因となる。家族性アミロイドポリニューロパチーは機能獲得型変異の代表例である。変異遺伝子によってつくられる変異トランスサイレチンが、新たな機能を獲得して、病気の原因のアミロイドになる。また、最近注目されているトリプレットリピート病は正常人でも存在する3塩基反復配列がある長さ以上に異常伸長することによって発症する (表1) (中村, 2001)。

トリプレットリピート病の中でハンチントン病や脊髄小脳失調症などはポリグルタミンをコードしている CAG リピートの数の過剰が病気の原因となる。ハンチントン病のモデルマウスの研究では異常に伸長したポリグルタミン蛋白が神経核内凝集体をつくり、新たな機能を獲得して神経細胞を障害すると報告されている (Davies *et al.* 1997; DiFiglia *et al.* 1997; Scherzinger *et al.* 1997)。

ドミナントネガティブ型変異は変異遺伝子産物がそれ単独で悪作用を及ぼすのではなく、正常な遺伝子産物を巻き込んで病気をおこす。もともと2つ以上の分子が結合して1つの機能単位をつくっている場合、その1つの分子の異常がある

表1. トリプレットリピートによる優性遺伝病

疾患名	遺伝子	座位	重複配列	存在部位
Huntington病	IT15	4p16.3	CAG	翻訳領域
歯状核赤核淡蒼球ルイ核萎縮症	CTG-B27	12p12	CAG	翻訳領域
脊髄小脳失調症 1 型	SCA1	6q21.3	CAG	翻訳領域
脊髄小脳失調症 2 型	SCA2	12q23-24	CAG	翻訳領域
脊髄小脳失調症 3 型 ／ Machado-Joseph病	MJD1	14q32.1	CAG	翻訳領域
脊髄小脳失調症 6 型	CACNL1A4	19p13.1	CAG	翻訳領域
脊髄小脳失調症 7 型	SCA7	3p12-13.5	CAG	翻訳領域
脊髄小脳失調症 17 型	TBP	6q27	CAG	翻訳領域
脊髄小脳失調症 12 型	PPP2R2B	5q31-33	CAG	5'-UTR
脊髄小脳失調症 8 型	SCA8	13q21	CTG	3'-UTR
筋緊張性ジストロフィー 1	DM1	19q13.2-13.3	CTG	3'-UTR
鎖骨頭蓋異形成症	CBFA1	6p21	GAC	翻訳領域
多合指症	HOXD13	2q31-32	GCN	翻訳領域
仮性軟骨形成不全症	COMP	19p13.1	GAC	翻訳領域
眼咽頭型筋ジストロフィー	PABP2	14q11.2-13	GCN	翻訳領域

と、機能が果たせなくなる場合、ドミナントネガティブ型変異になる。これも機能獲得型変異と同様に正常遺伝子産物の有無に関わらず変異蛋白の存在が病気と直結するので優性遺伝病になる。

半数不全 (haploinsufficiency) は、2つある対立遺伝子のうち1つに突然変異が起こり、結果的に正常な遺伝子産物の量が半分になることにより機能を果たせなくなることである (表2)。また、遺伝子重複型変異は正常な遺伝子が重複することで疾患が引き起こされる場合である。片方の染色体上の正常な遺伝子が重複して、遺伝子の数が正常の2コピーから3コピーになり、理論上、遺伝子産物の量が1.5倍になる。優性遺伝性ニューロパチーの Charcot-Marie-Tooth 病1A型では、PMP22 遺伝子が重複した結果、末梢神経内で PMP22 蛋白が増加して、シュワン細胞を障害するために脱髄が生じる (Murakami *et al.* 1996)。このように半数不全や遺伝子重複型変異では遺伝子産物の量の増減で病気が生じる。このことは、正常な機能を維持するためには比較的厳密に遺伝子産物の量がコントロールされていることが必要であることを示唆する。

2) TTR の構造と機能

トランスサイレチンは、以前はプレアルブミンと称し、血清蛋白の電気泳動時にアルブミンより早く泳動されることから、名前がつけられたものである。しかし、遺伝子構造が次々と明らかになる中、「プレ」という名前が前駆体を意味するようになり、プレアルブミンという名称もトランスサイレチン (TTR) と変更されるに至った。TTR は分子量 13761Da の蛋白で同一の単量体が重合して4量体を形成する (Kanda *et al.* 1974)。これが甲状腺ホルモン (T_4) とレチノール結合蛋白 (RBP) に親和性の高い、独立した2つの結合部位をもち、血中および髄液中で甲状腺ホ

表2. 半数不全によると考えられている優性遺伝病

疾患名	遺伝子	参考文献
Alagille syn.	JAG1	Pilia G: <i>Hum. Mut.</i> 14 , 394, 1999.
Anidria with other anomalies	PAX6	Singh S: <i>J. Biol. Chem.</i> 273 , 21531, 1998.
Autosomal dominant hereditary spastic paraplegia	SPG4	Burger J: <i>Eur. J. Hum. Genet.</i> 8, 771, 2000.
Autosomal dominant optic atrophy	OPA1	Alexander C: <i>Nature Genet.</i> 26 , 211, 2000.
Bethlem myopathy	COL6A1	Lamande SR: <i>J. Biol. Chem.</i> 274 , 1999.
Cleidocranial dysplasia	CBFA1	Lee B: <i>Nature Genet.</i> 16 , 307, 1997.
Familial thrombocytopenia	CBFA2	Song WJ: <i>Nature Genet.</i> 23 , 166, 1999.
GLUT-1 deficiency	GLUT1	Klepper J: <i>Hum. Mol. Genet.</i> 10 , 63, 2001.
Greig cephalopolysyndactyly	GLI-3	Wild A: <i>Hum. Mol. Genet.</i> 6, 1979, 1997.
Hereditary hemorrhagic teleangiectasia, type 1	Endoglin	Pece-Barbara N: <i>Hum. Mol. Genet.</i> 8, 2171, 1999.
Hirschsprung disease	RET	Luo Y: <i>Hum. Mol. Genet.</i> 2, 1803, 1993
Holoprosencephaly	SHH	Nanni L: <i>Hum. Mol. Genet.</i> 8, 2479, 1999.
Lymphedema-distichiasis	FOXC2	Fang J: <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 67 , 1382, 2000.
Miller-Dieker syn.	LIS-1	Reiner O: <i>Nature</i> 364 : 717, 1993.
Nail patella syn.	LMX1B	Silahtaroglu A: <i>Eur. J. Hum. Genet.</i> 7 , 68, 1999.
Nevoid basal cell carcinoma syn.	PTC	Wicking C: <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 60 , 21, 1997.
Obesity	MCR4	Sina M: <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 65 , 1501, 1999.
Oculodigitoesophageoduodenal syn.		Celli J: <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 66 , 436, 2000.
Parietal foramina	MSX2	Wilkie AO: <i>Nature Genet.</i> 24 , 387, 2000.
Rieger syndrome	RIEG	Flomen RH: <i>Genomics</i> 47 , 409, 1998.
Saethre-Chotzen syn.	TWIST	Gripp KW: <i>Hum. Mut.</i> 15 , 150, 2000.
Selective tooth agenesis	MSX1	Hu G: <i>Mol. Cell. Biol.</i> 18 , 6044, 1998.
Spherocytosis, type 1	Ankyrin	Eber SW: <i>Nature Genet.</i> 13 , 214, 1996.
Striae palmoplantar keratoderma	Desmoplakin	Whitlock NV: <i>J. Invest. Dermatol.</i> 113 , 940, 1999.
Townes-Brocks syn.	SALL1	Marlin S: <i>Hum. Mut.</i> 14 , 377, 1999
Treacher Collins syn.	TCOF1	Dixon J: <i>Hum. Mol. Genet.</i> 9, 1473, 2000.
Tricho-rhino-phalangeal syn., type 1	TRPS1	Momeni P: <i>Nature Genet.</i> 24 , 71, 2000.
Waardenburg syn., type 2A	MITF	Nobukuni Y: <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 59 , 76, 1996.
Williams syn.	Elastin	Baumer A: <i>Hum. Mol. Genet.</i> 7, 887, 1998.
Wolf-Hirschhorn syn.	ZNF141	Wright T: <i>Hum. Mol. Genet.</i> 6, 317, 1997.

ルモンやレチノール（ビタミン A）を運搬する(Blake *et al.* 1978)。トランスサイレチンという名称はこの機能に由来する。サイはサイロイド、レチンはレチノールを意味する。ヒトでは主に肝臓、脳室脈絡叢で合成、分泌され (Soprano *et al.* 1985; Herbert *et al.* 1986)、血中の hTTR 濃度は約 30mg/dl である。ヒトとマウスの TTR の 1 次構造を比較すると、127 アミノ酸残基のうち 25 アミノ酸残基が置換しており、相同性は約 80% である。このアミノ酸置換が立体構造上のどこに位置するか調べると、TTR の機能にかかわる内部の基本構造を形成する 50 残基のうち 49 残基は同一で、残る 1 残基もヒトでイソロイシンの所がマウスでは性質の似たロイシンに置換していた。一方、置換しているアミノ酸残基のほとんどが 4 量体分子の外側に向いた面に存在する。このことから、ヒトとマウスの TTR は同じ機能をもつが、抗原性は異なることが示唆される(Wakasugi *et al.* 1985)。ヒトの TTR (*hTTR*) 遺伝子は第 18 染色体上に位置し (Sparker *et al.* 1987)、マウスは第 4 染色体にある。ヒトとマウスの *TTR* 遺伝子は全長約 7.6Kb で 4 つのエクソンがあり、cDNA の塩基配列の相同性は約 70% である。

3) FAP と変異 hTTR

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) I 型は末梢神経をはじめ全身の種々の臓器や組織の細胞外にアミロイドが沈着し、これにより機能障害を生じる常染色体優性遺伝病で、1952 年にポルトガルの地方病として初めて報告された (Andrade *et al.* 1952)。FAP I 型は日本、ポルトガル、スウェーデンに患者が集積しているが、特に我が国では熊本県と長野県に多くの患者が集積している (Nakazato *et al.* 1991)。発症年齢は 18~69 歳、平均 34.8 歳で、初発症状は足先のしびれ感、交代性の下痢と便秘、陰萎が多い。臨床症状は、温痛覚優位の解離性知覚神経障

表3. TTR の点変異と臨床症状

変異	表現型	変異	表現型	変異	表現型
Gly6Ser	非アミ	Gly47Val	自、手根、心、多神	Ile84Thr	心、多神
Cys10Arg	眼、心、多神	Gly47Glu		Ile84Ser	手根、眼、心、髄
Leu12Pro	肝、髄	Gly47Arg	自、多神	Ile84Asn	手根、眼、心
Asp18Glu	多神	Thr49Ala	手根、心	Glu89Lys	心、多神
Asp18Gly	髄	Thr49Ile	心、多神	Glu89Gln	手根、心、多神
Val20Ile	手根、心	Ser50Arg	自、多神	His90Asn	非アミ
Ser23Asn	眼、心、多神	Ser50Ile	自、心、多神	Ala91Ser	手根、心、多神
Pro24 Ser	手根、心、多神	Glu51Gly	心	Gln92Lys	心
Ala25 Ser	心、多神	Ser52Pro	自、心、腎、多神	Ala97Gly	心、多神
Val28Met	多神	Gly53Glu	髄、神	Ala97Ser	
Val30Gly	眼、髄	Glu54Gln		Gly101Ser	非アミ
Val30Ala	自、心	Glu54Gly	自、眼、多神	Pro102Arg	非アミ
Val30Leu	心、多神	Glu54Lys	多神	Arg104His	非アミ
Val30Met	自、眼、髄、多神	Leu55Pro	自、眼、心	Arg104Cys	非アミ、神
Phe33Cys	手根、眼、心、腎	Leu55Arg		Ile107Val	手根、心、多神
Phe33Val	多神	Leu58His	手根、心	Ala109Ser	
Phe33Ile	眼、多神	Leu58Arg	自、手根、眼、心	Ala109Thr	非アミ
Phe33Leu	多神	Thr59Lys	自、心、多神	Ala109Val	非アミ
Arg34Thr	心、多神	Thr60Ala	手根、心	Leu111Met	心
Lys35Asn	自、心、多神	Glu61Lys	多神	Ser112Ile	心、多神
Ala36Pro	手根、眼	Phe64Leu	手根、心、多神	Tyr114His	手根
Asp38Ala	心	Phe64Ser	眼、髄、多神	Tyr114Cys	自、眼、髄、多神
Trp41Leu	眼	Ile68Leu	心	Tyr116Ser	多神、自
Glu42Gly	自、心、多神	Tyr69His	眼	Thr119Met	非アミ
Glu42Asp	心	Lys70Asn	手根、眼、多神	Thr118Met	
Phe44Ser	自、心、多神	Val71Ala	手根、眼、多神	Ala120Ser	心
Ala45Thr	心	Ile73Val	自、多神	Val122Ala	眼、心、多神
Ala45Asp	心、多神	Asp74His	非アミ	Val122Ile	心
Ala45Ser	心	Ser77Phe	多神	Val122欠失	心、多神
Gly47Ala	自、心	Ser77Tyr	心、腎	Pro125Ser	非アミ

心：心筋症、眼：眼症状、手根：手根管症候群、腎：腎障害、多神：多発神経症、自：自律神経障害
 神：末梢神経障害、髄：髄膜症状、非アミ：非アミロイド

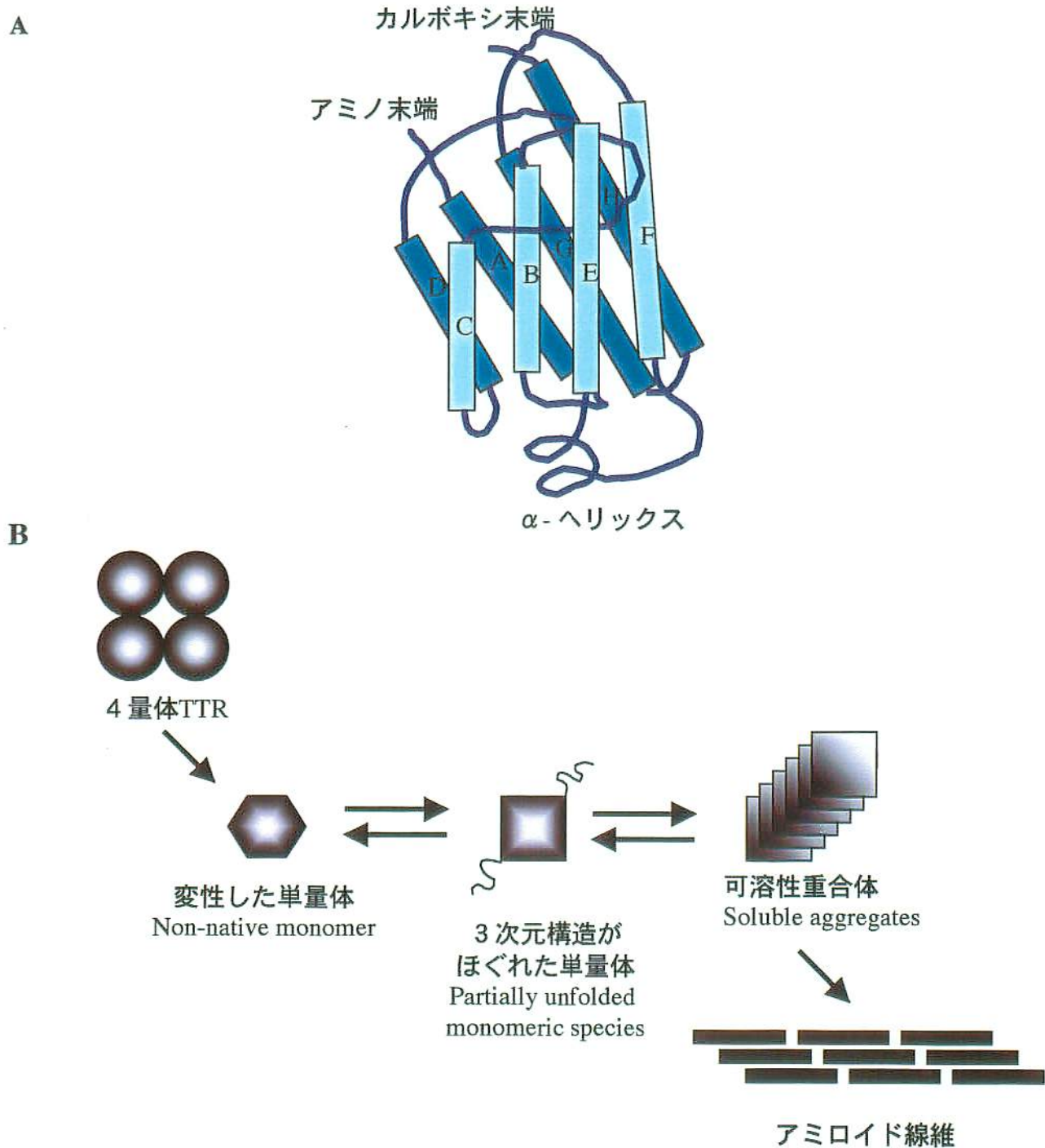


図1. A: TTRの単量体の立体構造。2層の β シート (A-H)をもち、それぞれの1層は4本の逆方向の β -strandからなる。B: アミロイド線維の形成過程。変異TTRは不安定なので、4量体が単量体に解離しやすい。単量体の3次元構造が一部ほぐれて、可溶性の蛋白質重合体となり不溶性のアミロイド線維が形成される。

害、筋萎縮や筋力低下、下肢の自発痛、瞳孔の異常などの神経症状、排尿障害、下痢、便秘、起立性低血圧、陰萎、発汗異常などの自律神経障害、貧血、体重減少、不整脈、浮腫などの全身症状であり (Ando *et al.* 1993)、これらは徐々に進行する。予後を推測する因子は消化管の機能異常による栄養障害であり、体重 (kg) /身長² (BMI)を補正して数値化する (Suhr *et al.* 1994)。発症すると数年から 10 数年を経て、心不全、尿毒症、肺炎などで死亡する (Andersson 1976)。

1978 年、FAP のアミロイドは免疫学的に hTTR であることがわかり (Costa *et al.* 1978)、Tawara らは、熊本県の FAP 患者の hTTR は 30 番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに変異している異型 hTTR Val30Met (hTTR^{Met30}) であることを明らかにした (Tawara *et al.* 1983)。その後、スウェーデンおよびポルトガルの FAP I 型の患者においても同一の変異が証明され、これらが同一疾患であることが証明された。

hTTR の変異は FAP I 型を生じる変異 hTTR Val30Met が最も多いが、現在までに hTTR の他の変異が 90 例報告されている (Connors *et al.* 2000; <http://med-bioph-L5.bu.edu>)。これらの中には両側手根管症候群、硝子体混濁による視力障害を主症状とする FAP II 型や家族性アミロイド心筋症などを呈する変異もあるが、アミロイドを沈着することなく高サイロキシン血症のみを呈するものや全くの無症状のものもある (表 3)。

4) hTTR の構造とアミロイド線維の形成機序

hTTR の高次構造は β 構造に富んでいて単量体当たり 2 層の β シートがあり、それぞれの 1 層は 4 本の逆方向の β -strand からなる (図 1 A)。一般にこの β 構造をもとに凝集して、幅約 10nm の枝わかれの無い不溶性のアミロイド線維を形成する。ア

ミロイド線維はコンゴレッド染色陽性で、その標本が偏光顕微鏡下に緑色の複屈折を示す。hTTR からアミロイド線維が形成される際、4量体のhTTRが解離して単量体になる過程が重要である。Quintas らによれば、解離した単量体は、分子量が変わることなく、つまり分解されたりしないで、一部の立体構造がほどけ、これが重合して可溶性の高分子蛋白を生じ、さらに不溶性のアミロイド線維が形成されると報告している (Quintas *et al.* 2001) (図 1 B)。

FAP 患者のほとんどはヘテロ接合体で、変異 hTTRVal30Met (hTTR^{Met30}) と正常 hTTR が種々の割合で結合したヘテロ 4 量体 hTTR をもつ。ところが、ホモ接合体の患者は、hTTR^{Met30} のみからなるホモ 4 量体をもつが、発症はむしろ遅く (Holmgren *et al.* 1992)、また、hTTR^{Met30} と変異 hTTR Thr119Met (Coelho *et al.* 1993) または hTTR^{Met30} と変異 hTTR Arg104His (Tarazaki *et al.* 1999) をそれぞれもつ複合型ヘテロ接合体の患者はほとんど臨床症状を示さない。さらに、変異したアミノ酸の部位によっても予後が異なると考えられ、変異 hTTR Leu55Pro をもつ患者は若年で発症し、急速に死の転帰をとる (Jacobson *et al.* 1992)。in vitro の実験によると、これらのアミロイドが沈着する変異をもった hTTR と正常の hTTR とがヘテロ結合した 4 量体はサブユニット相互の結合が弱く、4 量体として不安定であり、解離して単量体になりやすいと考えられている (Alves *et al.* 1997; Quintas *et al.* 1997, 1999, 2001; Almeida *et al.* 2000)。さらに、不安定な 4 量体は in vivo ではライソゾームのような pH が低い環境下で解離して単量体になると考えられていたが (Colon *et al.* 1992, 1996; Kelly *et al.* 1997)、pH 7 の環境でも単量体になり重合してアミロイド線維を形成することが報告された (Quintas *et al.* 1999, 2001)。

5) FAP の発症と環境要因

80 歳以上の年齢層の 25%には正常の hTTR による心・血管のアミロイドが認められる。このことは、正常な hTTR であっても、もともとアミロイド形成を起こしやすい立体構造をもっていること、アミロイド沈着に加齢などの外的因子も関与することを示唆している (Westermarck *et al.* 1990)。FAP I 型 (Vao30Met) は日本、ポルトガル、スウェーデンに患者が集積しており、日本とポルトガルの発症年齢はそれぞれ 40.1 歳、33.5 歳であるが、北スウェーデンでは同じ変異をもつ患者が平均 56 歳で発症する。ポルトガルの FAP の浸透率 (penetrance) は 48.4%であるが、北スウェーデンではわずか 2%で、多くのキャリアは無症状である (Nakazato *et al.* 1992; Sousa *et al.* 1995; Holmgren *et al.* 1994)。また、55 歳の一卵性双生児の一方は 7 年前に FAP を発症したが、もう一方は全く健康であるという報告がある (Holmgren *et al.* 1997)。このように、北スウェーデンでは発症年齢が遅く、浸透率が低いこと、同一の遺伝子背景の一卵性双生児でも発症時期に違いがあることは、環境要因の発症への影響が示唆される。環境要因の本態は不明であるが、前述のように大部分が無症状キャリアである北スウェーデンの FAP 患者のアンケート調査によれば、有機溶剤を扱う職業と麻酔薬の使用が発症の危険因子だという報告もある (Hardell *et al.* 1995)。

6) FAP の疾患モデルマウスの作製

環境因子の解明はキャリアの人々にとって最も重要なことである。そのためには FAP のモデル動物を作製することが必要である。FAP は機能獲得型の優性遺伝病であるから、この変異 hTTR 遺伝子を導入することでモデル動物を作製できると考えられた。そこで、臓器形成分野の研究室では FAP の発症機序を解析するために変異 hTTR 遺伝子 ($hTTR^{Met30}$) を用いて家族性アミロイド多発神経症のモデルの

トランスジェニック (Tg) マウスを作製してきた。プロモーターとしては3種類を用いた。即ち、約 0.6kb のプロモーター領域を含む *hTTR^{Met30}* 遺伝子を導入した 0.6-hMet30 マウス(Yamamura et al. 1987)、上流約 6.0kb の領域を含む *hTTR^{Met30}* 遺伝子を導入した 6.0-hMet30 マウス (Nagata et al. 1995)、メタロチオネイン遺伝子プロモーターをもつ *hTTR^{Met30}* 遺伝子を導入した MT-hMet30 マウス(Wakasugi et al. 1987)である。0.6-hMet30 マウスと MT-hMet30 マウスの *hTTR^{Met30}* の血中濃度は3~5 mg/dl であったが、6.0-hMet30 マウスはヒトの血中濃度に匹敵する約 10mg/dl であった。また、MT-hMet30 マウスの *hTTR^{Met30}* mRNA の発現は肝臓、脳、精巣、心臓に認められたが、0.6-hMet30 マウスと 6.0-hMet30 マウスは内在性のマウス *ttr* 遺伝子と同様に肝臓、脳脈絡叢に認められた。表4に示すようにこれらの Tg マウスには消化管、腎臓、心臓、皮膚などにアミロイドが沈着するが、FAP の患者のように末梢神経への沈着はなかった(Shimada et al. 1989; Takaoka et al. 1997)。一般的に生後1年以上になるとアミロイド沈着が始まり、18 ヶ月以降になるとほぼ全例にアミロイド沈着を認める。この中でも 6.0-hMet30 マウスは発現の量、時期および組織特異性がヒトの遺伝子発現に類似しており、様々な臓器にアミロイドが沈着するため FAP の疾患モデルに近いと考えられた(Takaoka et al. 1997)。

興味深いことに、これらのマウスはコンベンショナル (CV) な環境で飼育するとアミロイドが沈着するが、特定の病原微生物や寄生虫が感染しないような清浄な飼育条件下 (SPF) では全く沈着しない (論文準備中)。SPF 群のマウスは微生物学的にコントロールされているばかりでなく、温度、湿度などの物理的環境も一定に維持されている。一方、CV 群はこれらの環境要因のすべてがコントロールされていない。CV と SPF との環境要因の違いの1つは腸内フローラである。した

表4. FAPモデルTgマウスと患者のアミロイドが沈着した組織

組織	0.6-hMet30 (21ヶ月齢)	6.0-hMet30 (21ヶ月齢)	MT-hMet30 (15ヶ月齢)	FAP剖検例
脳	—	—	—	—
脳脈絡叢	—	—	—	++
座骨神経	—	—	—	+++
顎下腺	—	—	—	±
心臓	+	+	+	+++
肺臓	—	+	—	±
上部消化管	++	++	++	±
下部消化管	+++	+++	+++	+
肝臓	—	+++	—	—
脾臓	—	++	—	+
腎臓	+	+++	++	+++
リンパ節	+	—	+	±
皮膚	+	+	++	nd
骨格筋	—	—	—	±
精巣	—	±	—	±
精囊	—	—	+++	nd

—：沈着なし、±：血管壁に限局、+：血管壁とその周囲、++：間質に中程度、+++：間質と実質に多量
nd：検査せず

がって、腸内フローラがアミロイド沈着に関係する可能性があると考えられた。そこで、6.0-hMet30 マウスを腸内フローラ以外の温度、湿度などの環境要因を一定にして飼育し、3つの異なる施設からの腸内フローラを移入し、そのアミロイド沈着を比較し、腸内フローラのアミロイド形成への影響を調べた。

7) $hTTR^{Met30}$ 遺伝子の導入による鼻上顎奇形マウス

FAP の疾患モデルとして 0.6kb のプロモーター領域を含む $hTTR^{Met30}$ 遺伝子を C57BL/6 マウスの受精卵に導入し、9 ラインの 0.6-hMet30 マウスを樹立した (Yamamura *et al.* 1987)。その中の Founder No.14 に由来するラインが、常染色体優性遺伝の鼻骨、前上顎骨の低形成を特徴とする顔奇形を生じた。このことから、このマウスを *Nax* (Naso-maxillary deformity) と名付けた。*Nax* の $hTTR^{Met30}$ 遺伝子はマウス内在性 *ttr* と同様に肝臓や脳室脈絡叢で発現し、肝臓の mRNA のレベルはヒトの 1/10 であった。 $hTTR^{Met30}$ の血中濃度は 3.0mg/dl で、樹立したライン中では発現が強いものの1つであった。導入した $hTTR^{Met30}$ 遺伝子は第 13 染色体に 5 コピータンデムに挿入されていた。奇形は胎生 15.5 日から明らかになった (Wakasugi *et al.* 1988)。

8) TTR と顔面奇形

TTR は血中でレチノール (ビタミン A) を運搬する機能をもつ。肝臓に貯蔵されているレチノールエステルは末梢臓器の需要に応じてレチノールに変換され、血中に分泌される。このレチノールはレチノール結合蛋白 (RBP) と血中で 1 : 1 のレチノール-RBP 複合体をつくり、さらに TTR と蛋白-蛋白複合体 (レチノール-RBP-TTR) を形成して、標的臓器まで運ばれる (Monaco 2000)。ここで、RBP、TTR から遊離したレチノールが細胞内に取り込まれる機構はよくわかっていないが、

TTR や RBP に対する細胞表面受容体を介して膜を透過すると考えられている (Ward *et al.* 1997; Kuchler-Bopp *et al.* 2000; van Bennekum *et al.* 2001; Sousa & Saraiva 2001)。

レチノールは細胞質内で細胞内レチノール結合蛋白 (CRBP) と結合する。これが代謝酵素の作用によって、all-trans レチノイン酸や 9-cis レチノイン酸などの核受容体に結合しうる形に転換され、all-trans レチノイン酸はレチノイン酸受容体 (RAR)、9-cis レチノイン酸はレチノイド X 受容体 (RXR) を介して、遺伝子の発現を制御する。また、細胞内レチノイン酸結合蛋白 (CRABP) はレチノイン酸を核受容体から隔離する働きがあるとされ、これがレチノイン酸の濃度勾配を増幅していると考えられている。このようにレチノイン酸はレチノールの生物学的活性型であり、視覚、生殖、成長、分化誘導、免疫など多くの生理作用とともに形態形成への関与も知られている (西脇 1997)。実際にレチノイン酸や大量のレチノール (ビタミン A) の投与はヒトに顔面奇形を生じる (Lammer *et al.* 1985; Rothman *et al.* 1995)。

顔の基本的な形態はヒトでは第 4 週、マウスでは胎生 9.5 日以降の 5 つの顔面隆起の発生と、その癒合によって形成される。5 つの顔面隆起とは前頭鼻隆起と 2 つの上顎突起、2 つの下顎突起である。前頭鼻隆起の外胚葉は肥厚して鼻プラコードになり、やがて鼻プラコードの中心は陥凹しその周囲はもりあがって、鼻窩と外側、内側鼻突起ができる。この両側の鼻突起が *Nax* で顕著な奇形がみられる鼻郭の原基になる。この部位の骨、軟骨および結合組織は主に頭部神経堤細胞に由来する。マウスでは胎生 10.5 日には頭部神経堤細胞は菱脳の神経外胚葉から腹側の鼻プラコードへの遊走を完了し、そこで外胚葉間葉として増殖し、前索軟骨 (梁柱軟骨) をつくる。この前索軟骨が鼻骨や鼻甲介などの原基になる (Larsen

2001)。この過程で上皮間葉相互作用、あるいは周囲の細胞とのやりとりが必要で、その障害によって顔面奇形を生じる。トリの胎児で神経堤細胞の遊走が完了した時期、前頭鼻隆起のレチノイン酸のシグナルを拮抗物質で阻害すると、上のくちばしなどの前頭鼻隆起に由来する組織が形成されず、この部位での sonic hedgehog *SHH* と fibroblast growth factor *FGF8* の発現が欠如していた(Schneider *et al.* 2001)。また、上顎突起の形成される部位の BMP を拮抗物質で抑制して、レチノイン酸の濃度を上げると、この部位に上顎突起ではなく前頭鼻隆起に由来する器官ができる(Lee *et al.* 2001)。このことからレチノイン酸は他の遺伝子を制御することにより、顔の形態形成を調節しており、そのときレチノイン酸の適切な濃度が必要であることが示唆される。

TTR と RBP の mRNA の発現はラットでは胎生 7.5 日の臓側内胚葉に始まる(Makover *et al.* 1989)。これは、マウス胚で始めてレチノイン酸が認められる時期に一致する(Ang *et al.* 1997)。また、顔の形態形成に重要な胎生 10 日、マウス TTR mRNA は臓側卵黄囊の内胚葉細胞、脈絡組織、肝細胞に発現している (Murakami *et al.* 1987)。TTR 欠損マウスは ()、明らかな表現型の異常を示さなかった(Episkopou. *et al.* 1993; Wei. *et al.* 1995; van Bennekum *et al.* 2001)が、発生時期に TTR が顔の形態形成に何らかの役割がある可能性がある。

9) *hTTR* 遺伝子の発現によるヒトの顔奇形

hTTR 遺伝子は第 18 染色体に位置するので (Sparker *et al.* 1987)、トリソミー18 (エドワード症候群) では *hTTR* 遺伝子の発現量は理論上 1.5 倍になる。トリソミー18 は第 18 染色体の過剰による 2 番目に頻度が高い染色体異常疾患で、発症率は新生児 100 に 0.3 である。50%が出生第 1 週に死亡し、残りの多くも 12 ヶ月以内で死

亡する。わずか5～10%が高度の精神発達障害児として生き残る。奇形は泌尿生殖器、心臓、頭部顔面、中枢神経系に生じ、50%以上の症例で耳介低位、眼裂狭小、小口症、高口蓋、小顎症などの顔奇形がみられる(Jones 1997)。これらの奇形の中には第18染色体上の発生時期に重要な遺伝子の発現異常によるものもあると考えられるが、*hTTR* 遺伝子もその候補の1つと考えられる。

21番染色体のトリソミーはダウン症候群を生じる。ダウン症候群は最も頻度が高い染色体異常疾患で、頭蓋顔面奇形、骨格異常、短躯、精神発達異常、心内膜クッション欠損、高頻度の白血病の発症などの異常がある(Jones 1997)。ヒトの21番染色体はマウスの16番染色体と相同である。そこで、ヒトの21番染色体上でダウン症候群の発症に重要な21q21-22.3に対応するマウスの部分的トリソミー-16が相互転座によって作製された(Reeves *et al.* 1995)。このマウスはダウン症候群の疾患モデルとして有望で、学習障害や顔奇形を生じる(Richtsmeier *et al.* 2000)。一方、*Ets2* (e twenty six 2) は発生時期のマウスで頭蓋や脊椎の軟骨形成部位に発現する遺伝子であるが、ヒトでは21番染色体に位置する。*Ets2* を過剰発現するTgマウスはダウン症にみられるような脳頭蓋、顔面頭蓋、頸部の骨格異常を生じた(Sumarsono *et al.* 1996)。この他にも第21染色体上の多くの遺伝子について、Tgマウスやノックアウトマウスの研究がなされ、ダウン症(トリソミー-21)の病態への関連が報告されている(Kola & Hertzog, 1997)。しかし、トリソミー-18については調べられていない。*Nax* の奇形を調べることによって、*hTTR* が顔の形態形成に何らかの役割をもち、*hTTR* 遺伝子の発現がトリソミー-18の奇形にみられるようなヒトの顔面奇形の病態へ関与することが明らかになる可能性がある。

第1章 腸内フローラとアミロイド沈着との関係

対象と実験方法

図1AのようにFAPのモデルマウス6.0-hMet30に、CV1、CV2、SPFの異なった施設からの腸内フローラ（腸内細菌叢）を移入して、経時的に病理組織検査、腸内フローラ検査、微生物検査を行った。

1) 6.0-hMet30マウスの作製と飼育環境

本実験には定期的にアミロイド沈着の有無と腸内フローラを解析するために多数の6.0-hMet30マウスが必要である。その6.0-hMet30マウスを準備するために体外受精を行った。即ち6.0-hMet30マウスの精巣上体尾部から精子を採取し、妊馬血清性腺刺激ホルモン（PMS）とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）で過排卵処理したC57BL/6J（CLEA, Tokyo, Japan）から採卵した未受精卵と体外受精を行った。1晩培養し、2細胞期胚となったものを不妊手術をした雄マウスと交尾させ、偽妊娠した仮親のICRマウス（CLEA）の卵管に移植した（Nakagata 1992）。一部の2細胞胚は簡易ガラス化法により凍結保存し、必要に応じて融解、移植手術を行い、効率的にマウスを準備した（Nakagata 1995, 1996, 1998）。

ある環境の腸内フローラのマウスへの移入はその環境下で飼育しているマウスと最低3週間同居させることで可能である（Hirayama *et al.* 1995）。CV1群は井上実験動物（下益城郡中央町）のコンベンショナル（CV）な飼育室での腸内フローラを移入した群である。これはこの条件下で準備した仮親の卵管に、体外受精を行って得た2細胞期胚を移植し、その結果生まれたマウスを引き続きその仮親と生後2ヶ月間、同居させることにより腸内フローラを移入した。一方、CV2群は発生医学研究センターF棟のCV環境下の腸内フローラを移入した群である。これは

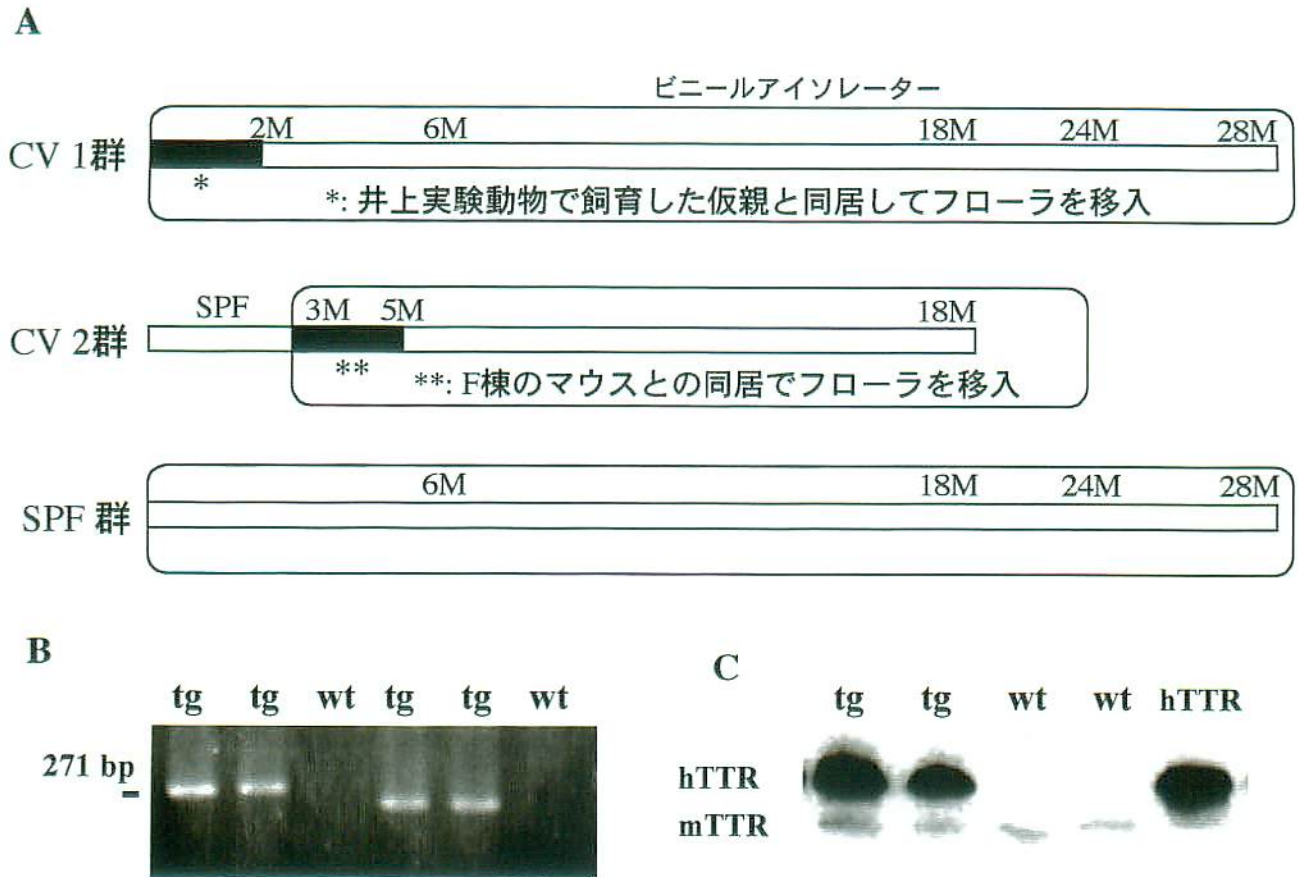


図 1 .A: 実験計画。FAPのモデルマウス6.0-hMet30に、CV1、CV2、SPFの異なった施設からの腸内フローラを移入して、ビニールアイソレーターで飼育し、経時的に病理組織検査、腸内フローラ検査、微生物検査を行った。B: PCRを用いたgenotyping。2組のプライマーを作成して、274bpと231bpのバンドを検出した。C: ウェスタンブロット法を用いて、hTTR^{Met30}を検出した。第5レーンは精製 hTTR 10mg/dlをアプライした。

動物資源開発研究センター本館の SPF 条件下で3ヶ月飼育したマウスをF棟マウスと同じケージで8週間同居させることにより腸内フローラを移入した。上記のマウスは腸内フローラの移植後、ビニールアイソレーター (ICM Co Ltd., Ibaraki, Japan) に搬入し新たな腸内フローラの混入がおこらないようにした。各群の温度、湿度、および微生物的な飼育環境は同一に設定した。即ちビニールアイソレーターは0.3 μ mの粒子を濾過することができるエアフィルターを装着し、温度が22 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度が50-70%、昼夜12時間の照明にコントロールされた。TPX製のケージ (CLEA) にオートクレーブした木製の床敷を入れ、マウスは50kGyの ^{60}Co γ 線照射した固形エサ (FR-1: Funabashi Farm Co., Chiba, Japan) とオートクレーブした水を随時与えて、飼育した。マウスは識別のために耳標 (#1005 size1 monel, CLEA) を装着した。

2) ゲノム DNA の抽出

細切したマウスの尾を700 μ lの細胞溶解液に加え、55 $^{\circ}$ Cで溶解。これに等量のフェノール・クロロホルムを加えDNAを抽出し、イソプロパノールで析出させ、70%エタノールでリンス、乾燥後、TE 100 μ lに溶解し、4 $^{\circ}$ Cで保存した。

細胞溶解液の組成は、1xSSC 42ml、10% SDS (pH 7.2) 4.2ml、1 μ g/ml Proteinase K 0.3 ml である。

3) Tg マウスの同定

Tg マウスは、*hTTR* 遺伝子の第2エクソンと第4エクソンを検出する2組のプライマー、即ちhTTR-1 (5'-tct cac gtg tct tct cta ca)、hTTR-2 (5'-agc ctc tct cta cca agt ga) とhTTR-3 (5'-ttg tct ctg cct gga ctt ct)、hTTR-4 (5'-cgg gct ctg gtg gaa atg ga)を設定し、ゲノムDNAを用いたPCR法により同定した。このプライマーのセット

ではマウスの *TTR* 遺伝子は検出されないはずであり、そのことを確認するために non-Tg マウスを対照群とした (図 1 B)。ゲノム DNA 1 μ g を反応液 19 μ l に加え、反応条件は 94°C 45 秒、55°C 25 秒、72°C 2 分、28 サイクルとし、hTTR-1, 2 および hTTR-3, 4 に対して、それぞれ 274bp、231bp の PCR 産物を得た。

反応液の組成は、プライマー (50pM) 各 0.1 μ l、100mM dNTP 0.2 μ l、25mM MgCl₂ 1.1 μ l、AmpliTaq DNA polymerase (Roche, Basel, Switzerland) 0.1 μ l、10xPCR buffer (Roche) 2 μ l、mQ 16.2 μ l である。

4) ウェスタンブロット法

血液は解剖時に腹部大静脈から採取した。血清に 等量の SDS gel-loading buffer を加え、100°C 10 分加温して冷却し、0.1% SDS/17.5% ポリアクリルアミドゲルにアプライした。定電流 20mA で泳動し、PVDF メンブレイン (Immobilon; Millipore) にセミドライ法で転写した。メンブレインはブロッキングを行い、1000 倍希釈抗ヒトプレアルブミン抗体 (MBL Co. Ltd., Nagoya, Japan) に室温 1 時間、2000 倍希釈抗ウサギ IgG ペルオキシダーゼ抗体 (Amersham) に 30 分反応させ、TTBS で洗浄し、ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いて検出した。泳動画像はデンストグラフ (AE6929-MF) で処理し、精製 hTTR (Calbiochem Japan Ltd., Tokyo, Japan) を用いて補正、定量化した (図 1 C)。

用いた試薬類は以下のとおりである。

2 x SDS gel-loading buffer : 0.5M Tris HCl (pH 6.8) 2ml、 β メルカプトエタノール

1.2 ml、10% SDS 4ml、glycerol 2ml、bromophenol blue 20 μ l、mQ 水 0.8 ml

泳動用バッファー : グリシン 28.8g、Tris 6g、SDS 2g、mQ で 2L

分離ゲル : 1.5M Tris (pH 8.8) 5ml、70% グリセロール 3 ml、44% AB 8 ml、

10% SDS 200 ul、APS 200 ul、TEMED 20 ul、mQ 3.8ml

濃縮ゲル：0.5MTris (pH6.8) 3.8ml、44% AB 1.7 ml、10% SDS 150 ul、APS 150 ul、
TEMED 15 ul、mQ 10.2ml

転写用バッファー：Tris 5.8g、10%SDS 3.75ml、グリシン 2.9g、メタノール 200ml、
mQ で 1L、

ブロッキング液：スキムミルク 3g、FBS 2ml、1xPBS 98ml

5) 病原微生物学的検査

微生物学的検査は動物資源開発研究センターの微生物モニタリングの対象生物と検査方法 (Urano 1999) に基づいて行った (表 1)。

6) 病理組織検査

ネンブタール(5mg/ml; Abbott lab., North Chicago, U.S.A.) 0.5ml を腹腔内に投与して麻酔した後、4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液を用いて灌流固定を行い、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、肺、膵臓、食道、胃、小腸、大腸、腸間膜リンパ節、膀胱、甲状腺、筋肉、皮膚、骨髄、座骨神経、眼球、脳などの臓器を採取した。

各臓器は4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液で固定しパラフィン包埋を行った。パラフィン標本は HE 染色を作成し、特に食道、小腸、大腸の切片は 400 倍 5 視野 (25mm²) を観察して、1 mm²あたりの好中球の数を調べた。さらに、コンゴレッド染色を行い、偏光顕微鏡下に複屈折の所見を調べ、アミロイド沈着の有無を検討した。

7) 腸内フローラの検査

腸内フローラの検査は嫌気性グローブボックス法により嫌気性チェンバー (図 2 A: 85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂; ICM Co. Ltd., Osaka, Japan) を用いて行った (Mitsuoka et

表1. 微生物モニタリングの対象生物と検査方法

検査項目	検査方法（検査部位）
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	ELISA, IFA, 培養（気管・咽喉頭）
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	凝集反応, 培養（気管・咽喉頭・盲腸内容）
<i>Salmonella</i> spp.	凝集反応, 培養（盲腸内容）
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	培養（気管・咽喉頭・膣洗浄液）
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	培養（気管・咽喉頭）
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	培養（気管・咽喉頭）
<i>Citrobacter rodentium</i>	培養（盲腸内容）
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	培養（盲腸内容）
<i>Staphylococcus aureus</i>	培養（盲腸内容）
<i>Clostridium piliforme</i>	ELISA, IFA
Mouse hepatitis virus・SDAV	ELISA, IFA
Sendai virus	ELISA, IFA
Ectomelia virus	ELISA, IFA
Mouse adenovirus	ELISA, IFA
<i>Syphacia</i> spp.	顕微鏡検査（肛門周囲）
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	顕微鏡検査（結腸内容）
<i>Giardia muris</i>	顕微鏡検査（十二指腸内容）
<i>Spiroplasma muris</i>	顕微鏡検査（十二指腸内容）
<i>Trichomonas</i> ect.	顕微鏡検査（盲腸内容）
<i>Chilomastix</i> spp., <i>Octomitus</i> spp.	顕微鏡検査（盲腸内容）
ectoparasite	顕微鏡検査（盲腸内容）

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, IFA: Immuno-fluorescence assay

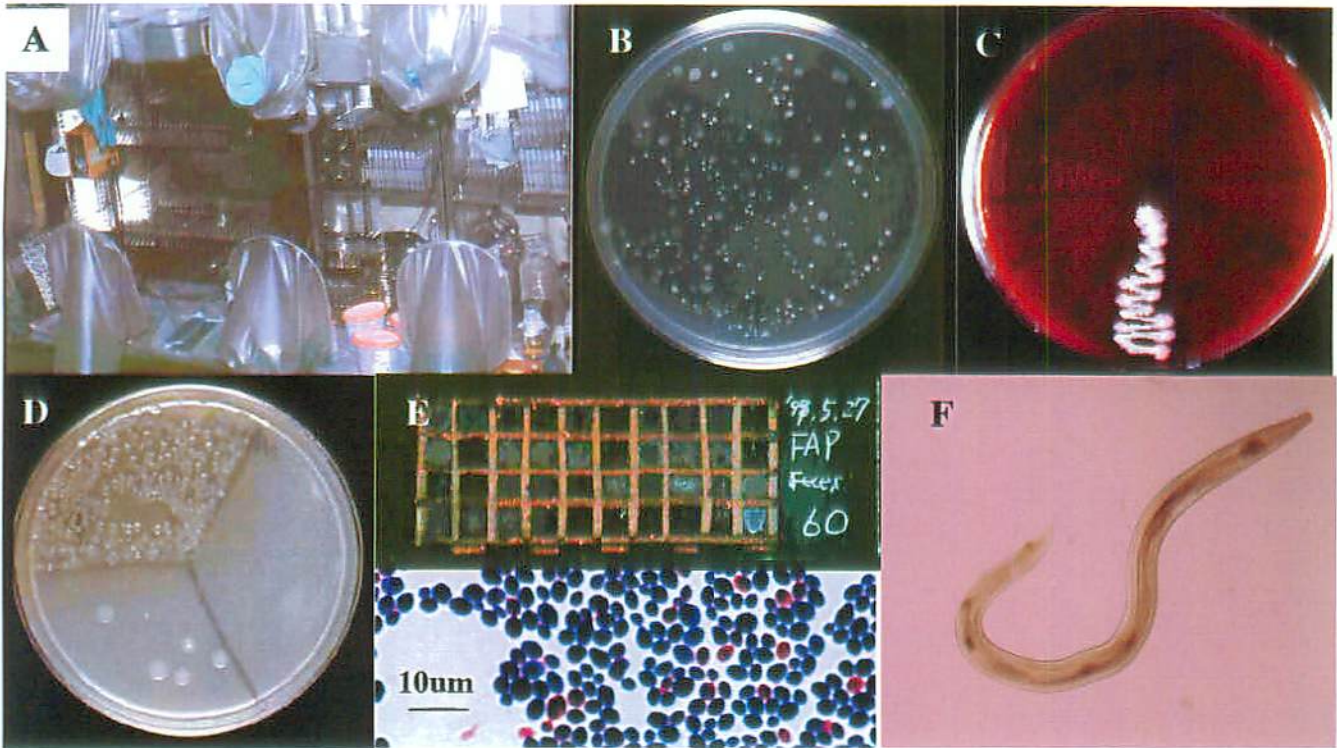


図 2. A: 嫌気チェンバーの中で、マウスの糞便の希釈系列をつくり、培地に塗り分けた。B: 非選択培地 (M10) の嫌気性菌の集落はすべてピックアップして、塗抹標本をつくり、血液培地に植え継いだ。C: 植え継いだ血液培地で溶血性と通性好気性菌かどうかを調べた。D: 好気性菌は糞便の濃度毎に塗りわけて、集落形態を観察した。緑膿菌の色素産生のため培地が緑変した。E: 塗抹標本のグラム染色で、菌の形態を観察、酵母様真菌が観察された。F: CV1群のモニタリング検査で、*Aspiculuris tetraptera* (ネズミ蛔虫) が観察された。

al. 1965, 1976; Itoh *et al.* 1983)。マウスの糞便を採取し重さを計測した後、試験管内を二酸化炭素で置換し、嫌気性チェンバーに搬入した。検体は嫌気性希釈液 [Trypticase soy broth without dextrose 27.5g (BBL, Cockeysville, USA)、Bact-agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) 0.5g、L-cystein · HCl · H₂O (Wako Pure Chemical Ind. Ltd., Osaka, Japan) 0.5g、Na₂CO₃ 0.84g (Wako) /l] を用いて 50 倍に希釈混合して、順次 10 倍の希釈系列 (10⁻¹~10⁻⁸) を作成し、16 種の非選択培地と選択培地に塗布した。非選択培地の M10 と EG は嫌気性チェンバーで 4 日間、8 種の培地 (EG, BL, NBGT, BS, ES, VS, NN, LBS) は嫌気性培養ジャー (Hirayama Manuf. Co., Tokyo, Japan) で 3 日間、6 種の培地 (TS, DHL, TATAC, PEES, PD, NAC) は好気性条件で 24-48 時間、それぞれ培養した (表 2)。嫌気性菌の非選択培地に形成された菌集落は集落形態を観察し (図 2 B)、すべてをピックアップして塗沫標本を作成するとともに血液培地への植継ぎを行った。血液培地は好気性条件下で 37℃ 48 時間培養し、溶血性を観察し、通性嫌気性菌か偏性嫌気性かどうかの好気性テストを行った (図 2 C)。好気性菌の非選択培地とすべての選択培地は菌数と集落形態を調べ、塗沫標本をつくった (図 2 D)。これらの塗沫標本はグラム染色を行い顕微鏡下に観察した (図 2 E)。これらの所見を記載したデータシートにもとに菌種を同定した。菌数は糞便 1 g あたりの生菌数を対数変換して表現し、統計処理は対応のない t 検定を用いた。

結果

1) 導入遺伝子の発現とアミロイド沈着

体外受精およびいったん凍結したものを融解して得られた 2 細胞期胚を卵管に移

表2. 培地と培養方法

培地	検出菌種	培養方法
EG	偏性嫌気性菌	嫌気グローブボックス法 37℃、96時間
M10	偏性嫌気性菌	
EG	嫌気性菌	スチールウール嫌気培養法 37℃、72時間
BL (Eiken)	嫌気性菌	
NBGT	バクテロイデス	
BS	ビフィズス菌	
ES	ユーバクテリウム	
VS	ベイヨネラ	
NN	クロストリジウム	
LBS (BBL)	乳酸桿菌	
TS (BBL)	好気性菌	
DHL(Eiken)	腸内細菌科の菌	
TATAC	連鎖球菌	
PEES (Eiken)	ブドウ球菌	
PD (Difco)	真菌	
NAC (Eiken)	緑膿菌	

植することにより多数の Tg マウスを準備した。出産したマウスは 362 匹（雄 198 匹、雌 164 匹）で、tail DNA の PCR 法で Tg マウスと同定されたマウスは 179 匹（雄 96 匹、雌 83 匹）、nonTg マウスは 183 匹（雄 102 匹、雌 81 匹）であった。これらのマウスにおいてはウエスタンブロット法を用いて hTTR^{Met30} の発現を確認した。マウスの血中 hTTR^{Met30} 濃度は SPF 群と CV1 群がそれぞれ、6 ヶ月齢が 8.92 ± 3.90 mg/dl (n=16)、 10.12 ± 4.24 mg/dl (n=10)、18 ヶ月齢が 7.88 ± 3.98 mg/dl (n=14)、 11.73 ± 7.72 mg/dl (n=10)、24 ヶ月齢が 11.91 ± 4.61 mg/dl (n=11)、 9.83 ± 5.28 mg/dl (n=10)、28 ヶ月齢が 12.68 ± 2.17 mg/dl (n=5)、 9.14 ± 3.64 mg/dl (n=21) で、SPF 群と CV1 群との間に有意差はなかった ($p < 0.05$) (表 3)。hTTR^{Met30} の発現は観察期間中一定であったが、28 ヶ月の観察期間中、SPF 群と CV1 群の Tg マウスのアミロイド沈着はなかった (表 4 A)。一方、CV2 群の Tg マウスは、18 ヶ月齢の 3 匹中 2 匹に食道 (扁平上皮)、胃、小腸のアミロイド沈着が観察された (図 3 A-D)。消化管以外のアミロイド沈着はなかった (表 4 B)。

2) 好中球浸潤とアミロイド沈着

アミロイド沈着を認めた 18 ヶ月齢の Tg マウスの胃と小腸の粘膜固有層に好中球浸潤に気づいた (図 4 A, B)。そこで、アミロイド沈着と好中球浸潤が相関するかどうかを解析するため、18 ヶ月齢のマウスの消化管粘膜固有層の好中球の数を調べた。食道、小腸、大腸の好中球の数は、それぞれ SPF 群 (n=28) が 0.36 ± 0.41 、 3.10 ± 2.10 、 1.86 ± 1.83 細胞/mm²、CV1 群 (n=20) が 0.91 ± 1.26 、 5.11 ± 2.68 、 7.91 ± 5.07 細胞/mm²、CV2 群 (n=6) は 1.63 ± 0.91 、 8.50 ± 3.42 and 13.26 ± 9.22 細胞/mm² であった。一般的にコンベンショナルな環境の方が好中球増加の傾向にあった。CV2 群の食道、小腸、大腸の好中球の数を SPF 群と比較した p 値はそれぞれ 0.0025、0.0017、

表 3. TgマウスのhTTR^{Met30}の血中濃度

実験群	マウス月齢			
	6	18	24	28
SPF	8.92±3.90	7.88±3.98	11.91±4.61	12.68±2.17
CV1	10.12±4.24	11.73 ±7.72	9.83±5.28	9.14±3.64
p値	0.4830	0.1738	0.2872	0.1469

表 4 A. マウスのアミロイド沈着

実験群	マウス	マウス月齢			
		6	18	24	28
SPF	Tg	0/16*	0/14	0/11	0/5
	nonTg	0/19	0/14	0/9	0/5
CV1	Tg	0/10	0/10	0/10	0/21
	nonTg	0/10	0/10	0/10	0/4
CV2	Tg	0/2	2/3		
	nonTg	0/1	0/3		

*陽性例／検査例

表 4 B. FAPモデルTgマウスのアミロイドが沈着した組織

マウス月齢 検体数	SPF群				CV1群				CV2群	
	6	18	24	28	6	18	24	28	6	18
脳	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
眼球	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
座骨神経	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
心臓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺臓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
食道	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
小腸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
大腸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肝臓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脾臓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
腎臓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
リンパ節	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
皮膚	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
骨格筋	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : 沈着なし、+ : 血管壁とその周囲、++ : 間質に中程度

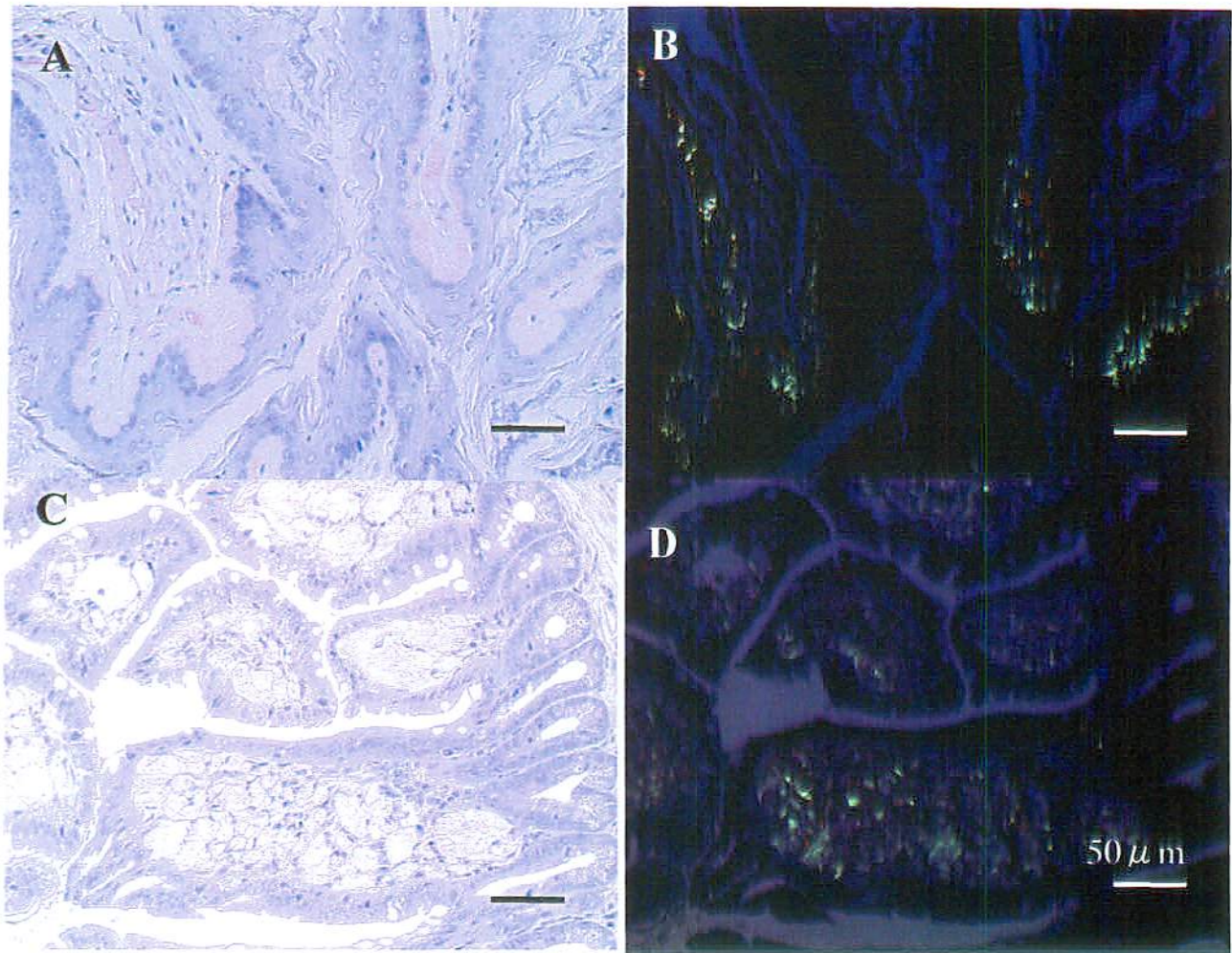


図3. AB: コンゴレッド染色。食道(A)と小腸(B)の粘膜固有層にアミロイド沈着を認める。
CD: 偏光顕微鏡で食道(C)と小腸(D)のアミロイド沈着部位が緑色に蛍光する。

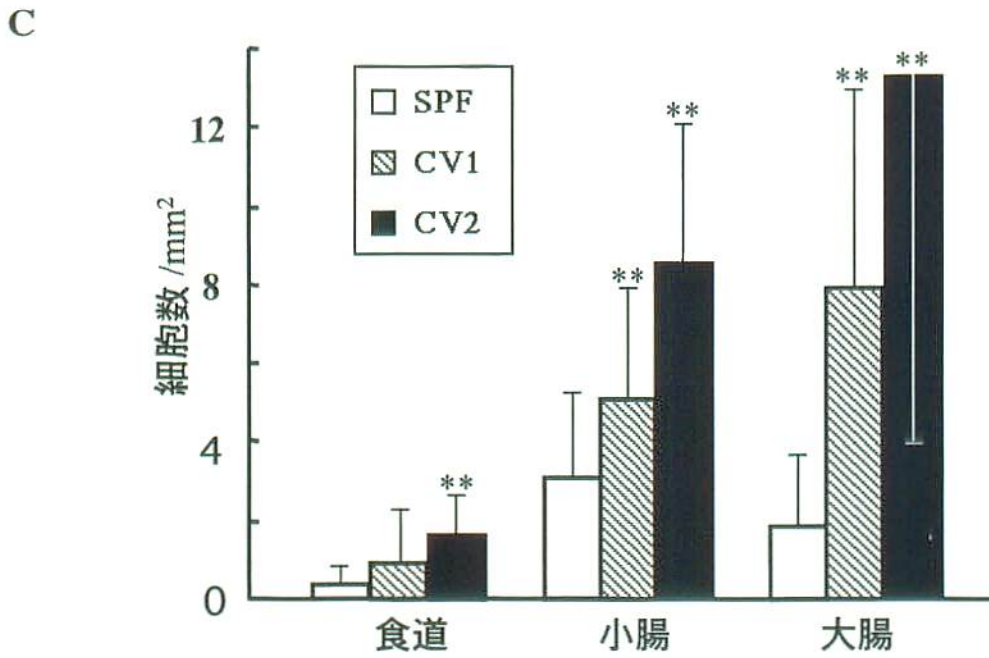
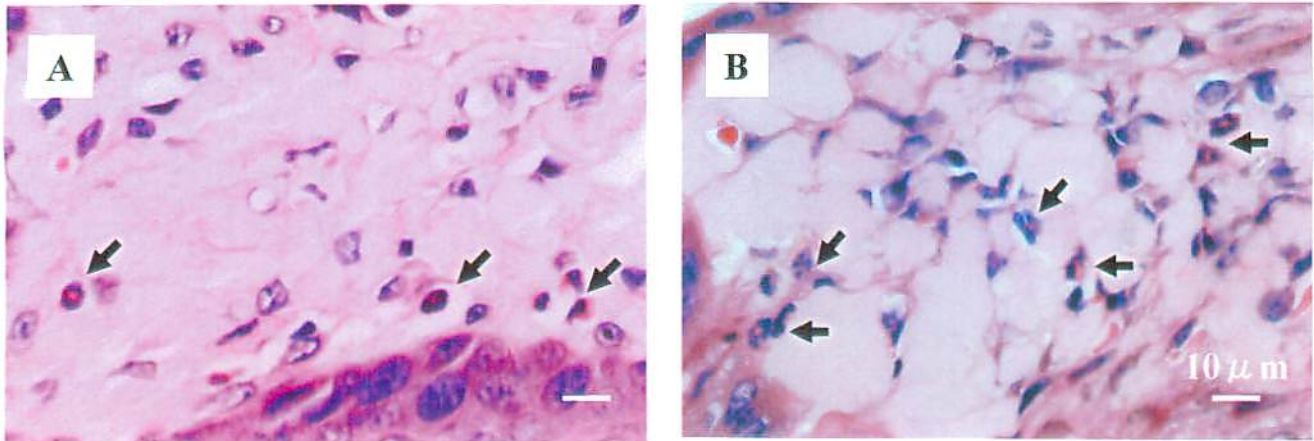


図4. 18ヶ月齢Tgマウスのアミロイド沈着部位、食道(A)、小腸(B)の粘膜固有層の好中球浸潤(矢印)がみられる。C: と18ヶ月齢マウスの消化管粘膜固有層の好中球数は、SPF群と比較して多い。**: $P < 0.01$ で有意差がある。

0.0049、CV1 群と比較した場合は、0.0509、0.0079、 < 0.0001 であり、CV2 群と CV1 群とは、0.2881、0.0843、0.2467 であった。CV2 群のマウスの食道、小腸、大腸の粘膜固有層の好中球数は SPF 群に比べて有意に多かった(< 0.01)。また、CV1 群の小腸と大腸の好中球数も SPF 群に比べて有意に多かった(< 0.01)。CV1 群と CV2 群の好中球数の間には有意差はなかった(図 4 C)。

3) 腸内フローラ

腸内フローラと Tg マウスのアミロイド沈着等との相関を評価するために、CV1 群と CV2 群の腸内フローラを構成するそれぞれの菌種を SPF 群と比較した(表 5)。腸内細菌科の菌について、6 ヶ月、18 ヶ月の CV2 群は SPF 群と比較して多かった($p < 0.05$)。緑膿菌は SPF 群では検出されず、6 ヶ月では CV1 群が CV2 群よりも多く($p < 0.05$)、18 ヶ月では CV2 群が CV1 群よりも多かった($p < 0.05$)。連鎖球菌は 18 ヶ月の CV1 群は SPF 群($p < 0.01$)および CV2 群($p < 0.05$)に比べて少なかったが、24 ヶ月と 28 ヶ月の CV1 群は SPF 群に比べて多かった($p < 0.01$)。ブドウ球菌は 6 ヶ月では各群に差はなかったが、18 ヶ月では CV2 群は SPF 群に比較して多く($p < 0.01$)、CV1 群は SPF 群に比べて少なかった($p < 0.05$)。酵母様真菌は 10^7 レベルの高い菌数で CV2 群のみに検出された。乳酸桿菌は 18 ヶ月の CV2 群($p < 0.05$)、24 ヶ月の CV1 群($p < 0.05$)は SPF 群より少なかった。バクテロイデスは 6 ヶ月の CV2 群が SPF 群よりも多かったが($p < 0.05$)、他の月齢に有意差はなかった。嫌気性グラム陽性球菌は 6 ヶ月では 3 群間に有意差はなかったが、18 ヶ月の CV1 群が SPF 群よりも多く($p < 0.05$)、CV2 群は 1 例を除いて検出されなかった。嫌気性グラム陽性桿菌は 24 ヶ月の CV1 群が SPF 群よりも少なかったが($p < 0.01$)、他の月齢の 3 群間に差はなかった。コリネバクテリウム、ベイヨネラ、クロストリジウムはほとんど検出で

表 5. 腸内フローラ検査

菌種	6			18		
	SPF(n=11)	CV1(n=8)	CV2 (n=3)	SPF(n=17)	CV1(n=10)	CV2 (n=6)
腸内細菌科	6.5±0.6	6.4±0.6	7.6±0.5*	6.5±0.8	6.0±0.7	7.5±0.5**
緑膿菌	n.d.	6.6±0.6	4.1±1.0	n.d.	4.9±0.5	6.3±1.2(4)
グラム陰性桿菌	7.3(1)	5.9(1)	n.d.	n.d.	6.0±0.8(7)	n.d.
連鎖球菌	7.5±0.5	7.3±0.5	7.6±0.3	8.4±0.7(12)	7.4±0.6**	8.3±0.9(5)
ブドウ球菌	4.6±1.4	4.3±1.0	5.9±0.5	4.8±0.9	4.0±0.6*	7.1±0.9**
コリネバクテリウム	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
酵母様真菌	n.d.	n.d.	7.2±0.2	n.d.	n.d.	7.2±0.7
乳酸桿菌	9.4±0.2	9.6±0.3	9.2±0.3	9.4±0.3	9.3±0.2	9.1±0.3*
バクテロイデス	9.6±0.6	9.2±0.5	10.4±0.2*	10.1±0.4	9.9±0.2	10.3±0.2
ベイヨネラ	n.d.	n.d.	n.d.	8.3(1)	n.d.	n.d.
嫌気性グラム陽性球菌	9.6±0.6(10)	9.9±0.4	9.2±0.2	9.4±0.8(15)	10.1±0.1*	9.0(1)
嫌気性グラム陽性桿菌	8.4±1.3	8.7±0.7	9.1±0.3	8.7±1.2	8.8±0.4	8.0±0.9(5)
クロストリジウム	n.d.	n.d.	n.d.	9.0±0.1(2)	n.d.	n.d.
総菌数	10.3±0.2	10.2±0.2	10.5±0.0	10.4±0.2	10.2±0.2	10.5±0.0

菌種	24		28	
	SPF(n=10)	CV1(n=10)	SPF(n=5)	CV1(n=5)
腸内細菌科	6.3±0.4	6.1±0.7	5.5±0.5	6.4±0.8
緑膿菌	n.d.	5.7±0.6	n.d.	5.6±1.0
グラム陰性桿菌	6.4(1)	6.2±1.1(5)	n.d.	n.d.
連鎖球菌	7.3±0.6	8.2±0.4**	6.3±0.7	8.0±0.3**
ブドウ球菌	4.9±0.7	5.1±1.0	5.3±0.4	5.0±2.0(4)
コリネバクテリウム	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
酵母様真菌	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
乳酸桿菌	9.6±0.2	9.3±0.2*	9.4±0.3	9.4±0.3
バクテロイデス	9.8±0.2	9.8±0.1	9.7±0.2	9.4±0.4
ベイヨネラ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
嫌気性グラム陽性球菌	9.6±0.5	9.7±0.7	9.8±0.3	9.3±0.9
嫌気性グラム陽性桿菌	9.6±0.3	8.7±0.5 **	9.1±0.5	9.1±0.4
クロストリジウム	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
総菌数	10.3±0.2	10.4±0.1	10.3±0.2	10.1±0.4

n.d.: 検出せず、SPF群と比較して* p<0.05 または **p<0.01で有意差がある。

きなかった。hTTR^{Met30} の発現に性差の影響はないことを確認しているので、腸内フローラ検査には加齢による損耗が少ない雌を用いたが、28 ヶ月齢の SPF 群は雌が不足したので雄を用いた。各群の Tg マウスと nonTg マウスの腸内フローラに差はなかった。アミロイドが沈着した CV2 群に特徴的な腸内フローラの検査所見は、以下のとおりである。酵母の数が 10^7 レベルで高く維持されたが、SPF 群、CV1 群では検出されなかった。CV2 群は腸内細菌科とブドウ球菌の数が CV1 群、SPF 群より多かった。CV2 群は最優勢菌の嫌気性グラム陽性球菌が 18 ヶ月齢で検出されなかったが、CV1 群と SPF 群では 10^9 以上のレベルで 28 ヶ月齢まで維持された。CV1 群、CV2 群では緑膿菌が検出されたが、SPF 群では検出されなかった。

4) 病原微生物学的検査

SPF 群では表 1 に記載した微生物はすべて検出されなかった。CV1 群は *Pseudomonas aeruginosa* と *Aspicularis tetraptera* (ネズミ蛔虫)、CV2 群は *Mycopetes musculus* (ネズミ毛喰いダニ) が検出された。

考察

家族性アミロイド多発神経症 (FAP) のアミロイド沈着の主な原因は hTTR^{Met3} 遺伝子が存在し、hTTR^{Met30} が産生されることである。hTTR は甲状腺ホルモンやレチノール(ビタミン A)を運搬する機能を有し、127 アミノ酸残基からなる分子量 5.5 KDa の 4 量体蛋白で、4 つのポリペプチドはそれぞれ 127 アミノ酸からなる(Kanda et al. 1974; Blake et al. 1978)。FAP 患者の多くは hTTR^{Met30} 遺伝子のヘテロ接合体である。アミロイドの原因となる hTTR^{Met30} からなる 4 量体は野生型 hTTR よりも不安定であるので (Colon et al. 1996)、例えば酸性下では一部が解離して、単量体のアミロ

イドになり (Colon *et al.* 1992)、この異型単量体どうしが凝集して、最終的にアミロイド線維を形成すると考えられる(Kelly *et al.* 1997)。6.0-hMet 30 マウスの血清 hTTR^{Met30} 濃度は1ヶ月齢でヒトと同じ 10mg/dl のレベルに達する。しかし、アミロイド沈着は9ヶ月齢で上部消化管に始まり、24ヶ月齢までに、消化管、唾液腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、皮膚などで観察された (Takaoka *et al.* 1997)。血中には生後4週より変異蛋白が十分存在するにもかかわらず、アミロイド沈着は生後9ヶ月以降であることは hTTR^{Met30} の存在だけでなく内因性または外因性の要因がアミロイド沈着に影響することを強く示唆する。

井上実験動物の CV フローラを移植された CV1 群にアミロイド沈着はなかったが、発生医学研究センターの CV フローラを移植された CV2 群は消化管にアミロイドが沈着した。このことは CV2 フローラがアミロイド沈着に影響したことを示唆する。しかし、この実験でアミロイドが沈着したマウスはわずか2匹であり、アミロイド沈着の結果、フローラの変化が生じた可能性も否定できない。

もし腸内フローラがアミロイド沈着に影響するなら、SPF、CV1、CV2 の腸内フローラの違いを調べることは重要である。実際、結果で記述したように SPF、CV1、CV2 の腸内フローラには違いがある。

ヒトの腸内フローラを構成する微生物は日齢に伴う推移のパターンと宿主との関係により、I 群：宿主の防御機構に排除されることがない共生的な菌で、一生にわたって最優勢な菌（菌数 10^9 - 10^{11} ）、II 群：宿主の健康状態が悪くなったときに増加する菌で I 群の次に優勢な菌（菌数 10^5 - 10^8 ）、III 群：易感染宿主に日和見感染をおこす病原菌で、ふつう少数派になる菌群（菌数 0 - 10^4 ）に分類される(光岡, 1997)。CV2 群の腸内フローラに便宜上この分類を適応すると、I 群は、バクテロイデス、

乳酸桿菌、ペプトストレプトコッカスなどの嫌気性グラム陽性球菌、ピフィズス菌などの嫌気性グラム陽性桿菌、II 群は腸内細菌科の細菌、連鎖球菌、コリネバクテリウム、クロストリジウム、ペイヨネラ、III 群は緑膿菌、ブドウ球菌、酵母様真菌に該当する。I 群の嫌気性菌は腸内細菌科の細菌、緑膿菌、ブドウ球菌、連鎖球菌などの II 群、III 群の好気性菌の発育を抑制して腸内フローラを制御している(Itoh *et al.* 1983, 1989, 1990)。アミロイドが沈着した CV2 群の特徴的な所見は、嫌気性菌の 1 つである嫌気性グラム陽性球菌の数が低下し、好気性微生物である酵母、ブドウ球菌、腸内細菌科の菌数が多かったことである。これは嫌気性菌がそのような好気性微生物の発育を抑制して腸内フローラを制御しているという考え方に一致している。即ち CV2 群の腸内フローラは嫌気性菌の減少により弱毒菌の好気性菌の増殖を抑制できないという菌群の不均衡が生じていると考えられる。なお病原性好気性菌の緑膿菌は CV1 群、CV2 群共に検出されたので、アミロイド沈着に影響する可能性は低い。

18 ヶ月齢の CV2 群の食道と小腸のアミロイド沈着部位には多数の好中球浸潤が観察され、CV2 群の食道と小腸の粘膜固有層の好中球数は SPF 群と CV1 群よりも多かった。他の組織の好中球浸潤は顕著でない。CV2 群では、Tg マウスも nonTg マウスも共に好中球数が増加しており、Tg マウスと nonTg マウスとに差はなかった。nonTg マウスは $hTTR^{Met30}$ を発現せず、アミロイドは沈着しないので、好中球浸潤の原因はアミロイド沈着ではなく CV2 フローラである可能性がある。

CV2 フローラの影響により好中球浸潤が起こったと仮定した場合、さらにその好中球浸潤がアミロイド沈着に関係するかどうかの問題がある。この実験では 3 匹中 2 匹にアミロイド沈着が認められたが、検討したマウスの数があまりにも少

なく現時点で結論づけることは困難である。したがって、この問題の回答にはさらなる解析が必要である。

CV2 群では酵母様真菌やブドウ球菌のような好気性菌の数が増加していた。好中球はそのような好気性菌に対する防御に重要な機能をもつ。マウスの腸内に常在する酵母様真菌は主にカンジダである(Savage 1983)。カンジダは日和見感染菌で宿主の好中球の酸素依存性殺菌作用で処理される (Diamond 1995)。また、好中球はブドウ球菌感染に対する防御の中心的な役割をもつ(Gresham *et al.* 2000)。CV2 群の腸内フローラはカンジダやブドウ球菌の定着に刺激されて、好中球の走化活性が促進されていた可能性がある。このことは好中球や単球の走化活性は無菌マウスよりも SPF マウスの方が高いというデータと一致する (Yamazaki *et al.* 1981)。Stone らは FAP を含む5種の全身性アミロイドーシスの患者から分離されたアミロイド線維に好中球の蛋白分解酵素のエラスターゼとカテプシン G を検出し (Stone *et al.* 1993)、これらのアズール顆粒内の蛋白分解酵素が細胞外の炎症性微小環境やファゴライソゾーム内でアミロイド前駆蛋白に添加され、アミロイド形成に関与すると考えた。FAP は *hTTR*^{Met30} 遺伝子が原因である典型的な遺伝病であるが、今回の結果から腸内フローラがアミロイド形成に重要な役割をもち、微生物環境を制御すると腸管でのアミロイド沈着を抑制する可能性があることが示唆された。

第2章 $hTTR^{Met30}$ 発現による鼻上顎奇形マウス

対象と実験方法

1) マウスの作製

Tg マウスは、緩慢凍結法によって凍結保存されていた受精卵を融解し、仮親 (MCH: CLEA Japan inc., Tokyo, Japan) の卵管に移植して子孫を得、これを C57BL/6J に交配してラインを維持した。Nax と BALB/c の交配のためには、Nax の精巣上体から採取した精子と BALB/c メス (CLEA) を過排卵処理し採取した卵を体外受精して、2細胞期胚を仮親に移植した (Nakagata 1992)。

$hTTR^{Met30}$ 遺伝子過剰発現マウスを作るために、 $hTTR^{Met30}$ cDNA (Mita et al. 1984) を pCAGGS ベクター (Niwa et al. 1991) の EcoRI 部位に挿入し、pCAGGS- $hTTR^{Met30}$ を構成した。このプラスミドを SpeI と BamHI で切断、ベクター部分を除去し、精製、DNA 溶液を $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ に調整した。Tg マウスはこれを BDF₁♂ と BDF₁♀ の交配によって得た受精卵の前核にマイクロインジェクションすることによって作製した。

2) ゲノム DNA の抽出と PCR 法による Tg マウスの同定

ゲノム DNA はマウスの尾または胎児の卵黄囊から精製した。細切した組織を Proteinase K を含む細胞溶解液に加え、55°C で溶解し、フェノール・クロロホルムで抽出、イソプロパノールを加え DNA を析出させ、TE (10mM Tris 1mM EDTA) に溶解した。PCR には約 100ng の DNA を用いた。

$hTTR^{Met30}$ 遺伝子の検出は、2組のプライマー、エクソン 2 に設定した hTTR-1 (5'-tct cac gtg tct tct cta ca)、hTTR-2 (5'-agc ctc tct cta cca agt ga) とエクソン 4 に設定した hTTR-3 (5'-ttg tct ctg cct gga ctt ct)、hTTR-4 (5'-cgg gct ctg gtg gaa atg ga) を用

いた PCR で行った。反応条件は 94℃45 秒、55℃25 秒、72℃2 分、28 サイクルとし、hTTR-1, 2 のときには 274bp hTTR-3, 4 のときには 231bp の PCR 産物が得られる。

hTTR^{Met30} 遺伝子過剰発現マウスでの導入遺伝子の検出には、mTTR-3 (5'-gga cac caa atc gta ctg gaa g) と AG4 (5'-acc ttc tga tag gcc a) をプライマーとして 94℃30 秒、50℃1 分、72℃1 分、30 サイクルの反応条件で PCR を行った。

3) サザンブロット法

Nax の野生型アレルと変異体アレルの識別と導入遺伝子のコピー数の同定にはサザンブロット法を用いた。6 μ g のゲノム DNA を適当な制限酵素で消化し、1% アガロースゲルで電気泳動し、変性液を用いてナイロンメンブレイン (Roche, Basel, Switzerland) に転写した。プローブは DNA フラグメントを digoxigenin (DIG) DNA labeling and detection kit (Roche) を用いて DIG ラベルした。転写が完了したメンブレインは 2xSSC で洗浄し、80℃で baking をした後、HB 液中で 65℃1 時間プレハイブリダイゼーションを行い、次にプローブを加えた HB 液で 65℃ O/N ハイブリダイゼーションさせた。65℃で Wash1 液 10 分 2 回、Wash2 液 10 分 6 回、室温で HB1 液 10 分 2 回洗浄し、HB2 液でブロッキングした後、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche) を用いて室温で 30 分抗体反応を行った。次に HB1/0.3% tween20 で 10 分 4 回、HB3 液で 5 分洗浄し、アルカリフォスファターゼの発光基質である CSPD (Roche) と 5 分反応させ、x 線フィルム (Fuji photo film, Kanagawa, Japan) を感光してシグナルを検出した。

試薬類の組成を以下に示す。

変性液：10N NaOH 40ml、5N NaCl 120ml、水で 1 L

HB 液 : 20xSSC 100ml、10%SDS 0.8ml、N-lauroylsarcosine 0.4g、

blocking reagent 2g、水 300ml

Wash1 液 : 20xSSC 50ml、10%SDS 5ml、水 445ml

Wash2 液 : 20xSSC 5ml、10%SDS 5ml、水 490ml

HB1 液 : 1M Tris HCl (pH 7.3) 50ml、5M NaCl 15ml、水 435ml

HB2 液 : blocking reagent 5g、HB1 液 500ml

HB3 液 : 1M Tris HCl (pH 9.5) 5ml、5M NaCl 1ml、1M MgCl₂ 2.5ml、水 41.5ml

4) ウェスタンブロット法

血清 hTTR の検出にはウェスタンブロット法を用いた。成獣の8週齢以降のマウスは眼静脈から採血し、新生仔は断頭して滴下する血液を採取、遠心して血清を得た。ウェスタンブロット法は p.23 に記載した方法で行った。

5) 病理組織学的検査

組織は4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液で固定し、パラフィンで包埋し、切片を作製、ヘマトキシリンエオジン染色をして、顕微鏡で観察した。骨標本は付着している筋肉等軟組織を除去し、形態を観察した。新生仔は皮膚を剥離し、内臓を除去し、エタノールで固定、アルシャンブルー8GX (Wako, Osaka, Japan) とアリザリンレッド S (Wako) で染色した(McLeod, 1980)。

免疫組織染色に用いた抗体および至適希釈濃度、条件を以下に示す。

抗 hTTR (human prealbumin) 抗体 (MBL) : 200 倍、トリプシン処理

抗 hTTR 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark) : 200 倍、トリプシン処理

抗 mouse Pax6 抗体 (Ericson *et al.* 1997) : 1000 倍

抗 mouse FGF-2 抗体(Chemecon International Inc., Temecula, CA) : 1000 倍

抗 mouse Islet-1 抗体 (Ericson *et al.* 1992; Yamauch *et al.* 1999) : 10 倍

抗 mouse CD31(PECAM-1) 抗体 (PharMingen, San Diego, CA) : 400 倍、トリプシン処理

6) アポトーシスの検出

TUNEL 法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling) によるアポトーシスの検出には ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kit (Intergen Co., NY, USA) を用いて、パラフィン包埋組織切片を染色した。標本の顕微鏡像は Mac SCOPE Ver. 2.6 (Mitani Co., Fukui, Japan) で画像処理し、単位面積あたりのアポトーシス陽性細胞を算出した。また、ホールマウントでアポトーシスの分布の異常を調べるために 10 日胚を Nile Blue sulfate (Wako) の 2 万倍 PBS 希釈溶液で 15 分間生体染色を行い、直ぐに実体顕微鏡で写真を撮った (Grindley *et al.* 1995)。

7) RNA プローブの作製

cDNA 配列を含むプラスミドを適当な制限酵素で線状化して、これを鋳型にし DIG RNA Labeling Kit (Roche) を用いて、DIG 標識 RNA プローブを合成し、スピンカラムを用いて精製した (Bio-Rad, Hercules, CA)。RAR α , β , γ と CRABP I の配列を含んだプラスミドは東北大・大隅典子先生から供与を受けた (Zelent *et al.* 1989; Stoner & Gudas 1989; Osumi-Yamashita *et al.* 1990)。RAR γ のプラスミドはセンスプローブ作製のために cDNA 部分を pBluescript II SK+ (Stratagene, California, USA) にクローニングし直した。これらのプラスミドは BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA) を用いてシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer) で塩基配列を確認した。それぞれのプローブ作製に用いた制限酵素、プライマー (アンチセンス; センスの順)

を示す。

hTTR (Mita et al. 1984) : HindIII, T3 ; BamHI, T7

mouseTTR (Wakasugi et al. 1985) : PstI, T3 ; XhoI, T7

RAR α : BalI, T3 ; BamHI, T7

RAR β : HindIII, T7

RAR γ (pSG5) : BamHI, T3

RAR γ (pBLsk+) : HindIII, T3 ; BamHI, T7

CRABP I : BamHI, T7

8) *In situ* ハイブリゼーション法

ホールマウントと組織切片の *in situ* ハイブリゼーション法は過去の報告に準じて行った(Wilkinson 1992, 1993; Sekimoto et al. 1998)。サンプルは4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液で固定し、ホールマウントハイブリゼーションを行う9.5日、10.5日胚はPBSで洗浄し、100%メタノールに順次置換して、-20℃で保存した。一方、凍結切片にする10.5日、12.5日、14.5日胚は固定後、PBSで洗浄、30%スクロース PBS 溶液に順次置換して、50%OCTで4℃2時間処理した後、OTCに包埋した。矢状断および正中断の凍結切片は厚さ8 μ mで薄切し、MASコート付スライド(Matsunami Glass Ind., Tokyo, Japan)にマウントし、-20℃で保存した。ハイブリゼーションの前に、PBS/0.1% Tween 20で洗浄し、1 μ g/ml proteinase K (Wako)で37℃10分間処理し、4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液で20分再固定した。ホールマウント標本は6%過酸化水素で漂白も行った。ハイブリダイゼーションはhTTRとmouseTTRのプロープを用いる時には65℃、RAR α 、 β 、 γ とCRBPIのプロープには58℃ O/Nで行った。その後、洗浄とブロッキングを行い、1000倍希釈 anti-DIG

AP Fab fragments (Roche)と4℃ O/Nで反応させた。最後に100倍希釈NBT/BCIP Stock Solution (Roche)で30分から3時間染色した。

9) 鼻プラコード組織培養

鼻プラコードの培養は第1鰓弓の器官培養法を応用した (Slavkin *et al.* 1998)。器官培養ディッシュ (Falcon 3037; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)の外側の溝に3 mlのmQ水を入れ、内側の円に0.1 μg/mlのアスコルビン酸 (Sigma Chemical Co., St. Luis, USA)、アンピシリン 75 μg/ml (Wako)、カナマイシン 1 μg/ml (Wako)を含むBGJb medium (Gibco BRL, Rockville, MD) 1.5 mlを入れ、支持グリッド (stainless steel grid: Cambridge Wirecloth Co., Cambridge, MD)、0.4 μm HTPP type 支持フィルター (Millipore, Bedford, MA) を載せ、器官培養セットを組み立てる。10.5日胚からHanks' balanced salt solutions (HBSS) without phenol red (Gibco BRL)の入った解剖ディッシュで実体顕微鏡下に鼻プラコードを切り出し、葉さじですくい、フィルター上に鼻を上にして液面に沈まないように載せる。37℃ 5%CO₂のインキュベータで6日間培養し、4%パラホルムアルデヒドPBS溶液で固定した。

結果

1) *hTTR^{Met30}* 遺伝子量に依存した *Nax* の表現型

Nax マウスラインでは、短鼻に代表される顔面奇形が常染色体優性遺伝し、その表現型は導入遺伝子である *hTTR^{Met30}* 遺伝子の有無と100%相関している。*Nax* と野生型のマウスの頭蓋骨の標本からわかるように鼻の短縮は鼻骨および前上顎骨の低形成による (図1A, B)。*Nax* では咬合不全 (62.9%; n=35) という表現型もみられ (図1C)、また、x線写真による観察では野生型に比べて、上顎切歯の前突

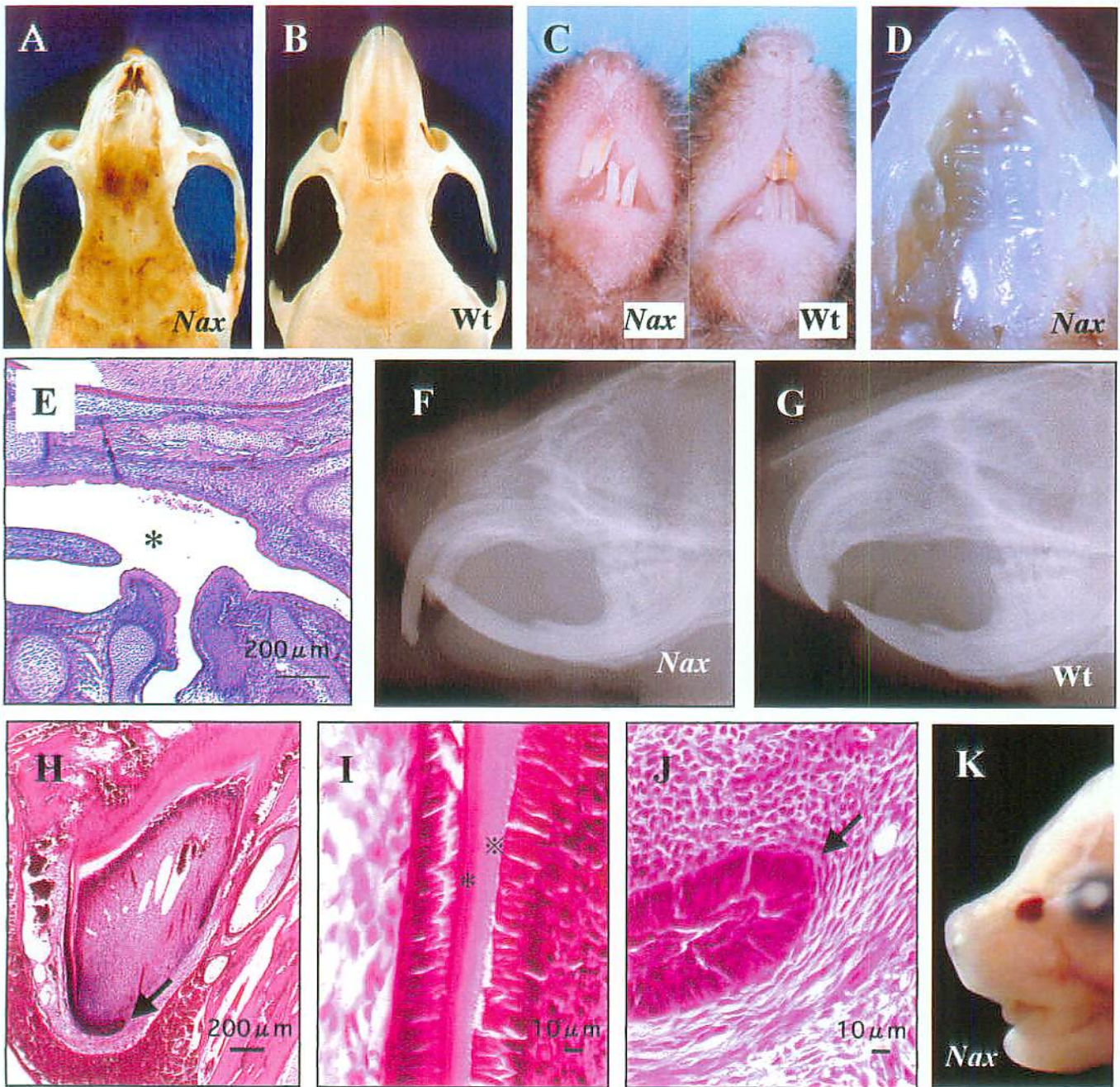


図1. *Nax*の表現型。A, B: 成体頭部の骨格標本。*Nax* (A)は野生型(B)に比べ鼻骨、前上顎骨の低形成が明らかである。C: 8週齢の*Nax*(左)と野生型(右)の咬合。*Nax*は咬合不全がある。D: *Nax*の新生仔の口蓋。口蓋裂はない。E: *Nax*の新生仔の咽喉頭のHE染色。後鼻孔閉鎖(*)はない。F, G: 成体のX線像。*Nax* (F)は野生型(G)に比べて上顎切歯の前突が明らかである。H-J: 成体の*Nax*の歯根部のHE染色 (H)。エナメル質(*), 象牙質(*)への分化(I)やApical loop構造 (Hの矢印, J)に異常はなかった。K: 胎生15.5日の*Nax*。約半数に眼角部の片側性の血腫が観察された。

が顕著であったので (図 1 F, G)、歯牙の形成過程で異常が生じている可能性を考え、胎生 12.5 日、14.5 日、16.5 日、新生仔、8 週齢のマウスの矢状断の HE 標本を作製し観察したが、歯根部のエナメル質や象牙質への分化や apical loop 構造の異常はなかった (図 1 H-J)。したがって、咬合不全は前上顎骨の低形成が原因の二次的な表現型と考えられる。新生仔の *Nax* を解剖して調べたが口蓋裂はなかった (図 1 D)。また、鼻部の奇形としては先天性後鼻孔閉鎖症が知られており、これは後鼻孔が両側性または片側性に骨性あるいは膜性に閉鎖された奇形であるが、*Nax* にはそのような後鼻孔閉鎖はなかった (図 1 E)。

Nax の顔の奇形は胎生 15 日から外見的に明らかになり (Wakasugi *et al.* 1988)、ヘミ接合体の約半数には片側性の血腫が眼角部に観察される (45.8%; n=24) (図 1 K)。新生仔の段階ではこの血腫は吸収されて残っていないが、このような胎生期における片側性の血腫が頭蓋顔面奇形の原因になるという報告もあり、注目される (Poswillo 1988)。

胎生 16.5 日の *Nax* での形態異常を組織学的に詳しく観察したところ、鼻郭とそれに伴う皮膚、毛包、漿液腺が低形成で、鼻骨と鼻軟骨の成長が野生型と比較して明らかに遅延していることがわかった (図 2 A-H)。このように低形成の異常が鼻とその周辺組織に強くみられることから、*Nax* における奇形の根本的な原因は鼻プラコードに由来する組織の発生異常によると考えられる。また、*Nax* の遺伝的背景は C57BL/6 であるが、この系統は頭蓋顔面奇形を自然発症することが多く、さらに頭蓋顔面奇形を生じる催奇形物質への感受性が強いことが報告されている (Juriloff *et al.* 1985; Hovland *et al.* 1999; Weston *et al.* 1994)。そこで、*Nax* でみられる表現型が C57BL/6 の遺伝的背景の影響を受けているのかどうかを調べるために、

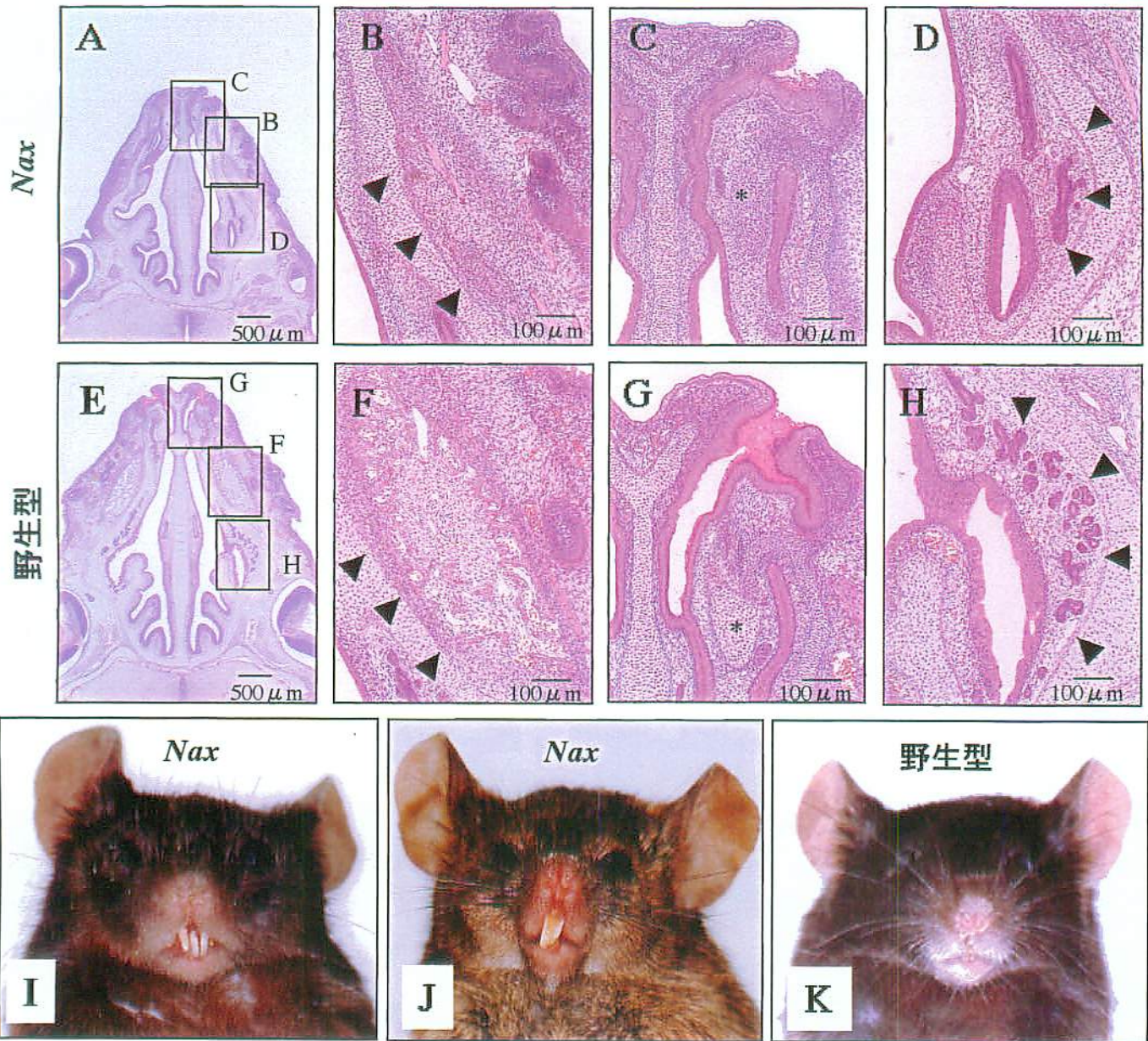


図2. A-H: 胎生16.5日の顔の組織学的検討。 *Nax*(A-D)は野生型(E-H)に比べて鼻郭の低形成がある。 *Nax*は鼻骨の骨化が遅延しており (B)、鼻軟骨が形成されていない (C)。また、鼻粘膜の漿液腺の発達が遅延している (D)。
 I-K: C57BL/6の系統は頭蓋顔面奇形を自然発症することが多いので、遺伝的背景が顔奇形の原因であることを除外するために、BALB/cの遺伝的背景を混ぜた *Nax* を作製した (J)。野生型 (K) と比較して明らかなように C57BL/6 の遺伝的背景の *Nax* (I) と同じ表現型であった。

BALB/c のメスを用いて体外受精を行い、遺伝的背景を混ぜた *Nax* を作製した。

図 2 I-K に示すように、興味深いことに表現型の浸透率は 100%で、奇形の程度も変化はなく、遺伝的背景の影響はあまり受けていないことがわかった。

導入遺伝子である *hTTR^{Met30}* 遺伝子はどのようなしくみでこの奇形を引き起こしているのであろうか。原因は 2 つ考えられる。1 つは導入遺伝子の挿入による内在性遺伝子の破壊であり、もう 1 つは導入遺伝子の過剰または異常発現である。*hTTR^{Met30}* を産生する他のすべての Tg マウスは、外見的に正常であり *Nax* の表現型を示さないので (Wakasugi *et al.* 1987; Nagata *et al.* 1995; Takaoka *et al.* 1997)、まず挿入変異を考え、ライブラリーを用いて導入遺伝子の上流約 12kb のゲノム配列をクローニングした (Wakasugi *et al.* 1988)。さらに広い周囲の配列を調べるために、このクローニングした領域の DNA をプローブにして、正常マウスのゲノム DNA のコスミドライブラリーのスクリーニングを行い、計 39kb のゲノム DNA のクローニングに成功した。図 3 A に示すように塩基配列と制限酵素部位の解析により、導入遺伝子の挿入の際、ゲノム DNA に約 1 kb の欠失が生じている他は大きなリアレンジは起こっていないことがわかった。しかし、挿入部位の周囲に遺伝子が存在しないかどうか塩基配列決定やノザンプロットなどを行ったが、調べ得たかぎりでは遺伝子の同定はできなかった。

導入遺伝子の周囲の DNA 断片が得られたので、この部分をプローブに用いたザンプロットを行うことにより野生型アレルと導入遺伝子を挿入したアレルの識別が可能になった (図 3 A, B)。ホモ接合体の表現型を調べるためにヘミ接合体同士を交配し得られた新生仔 105 匹の genotype を行ったところ、野生型、ヘミ接合体、ホモ接合体がそれぞれ 26 匹、49 匹、30 匹得られた。したがって、ホモ接合

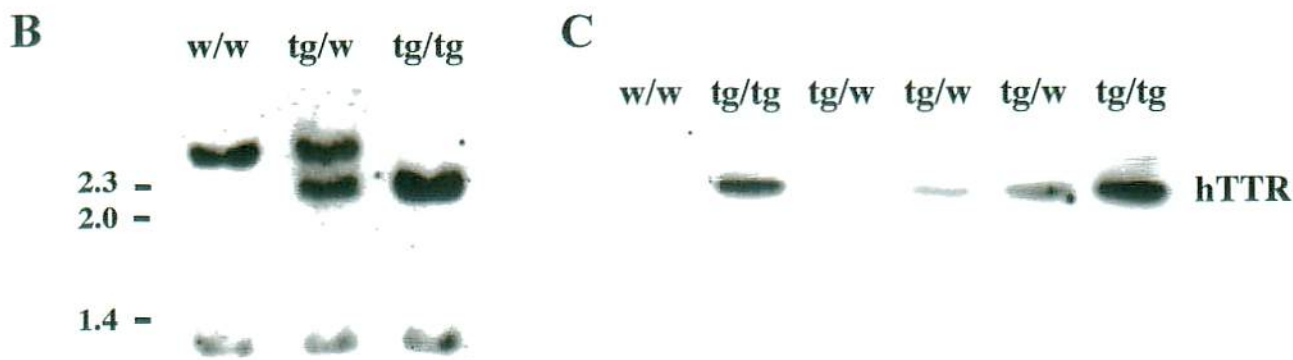
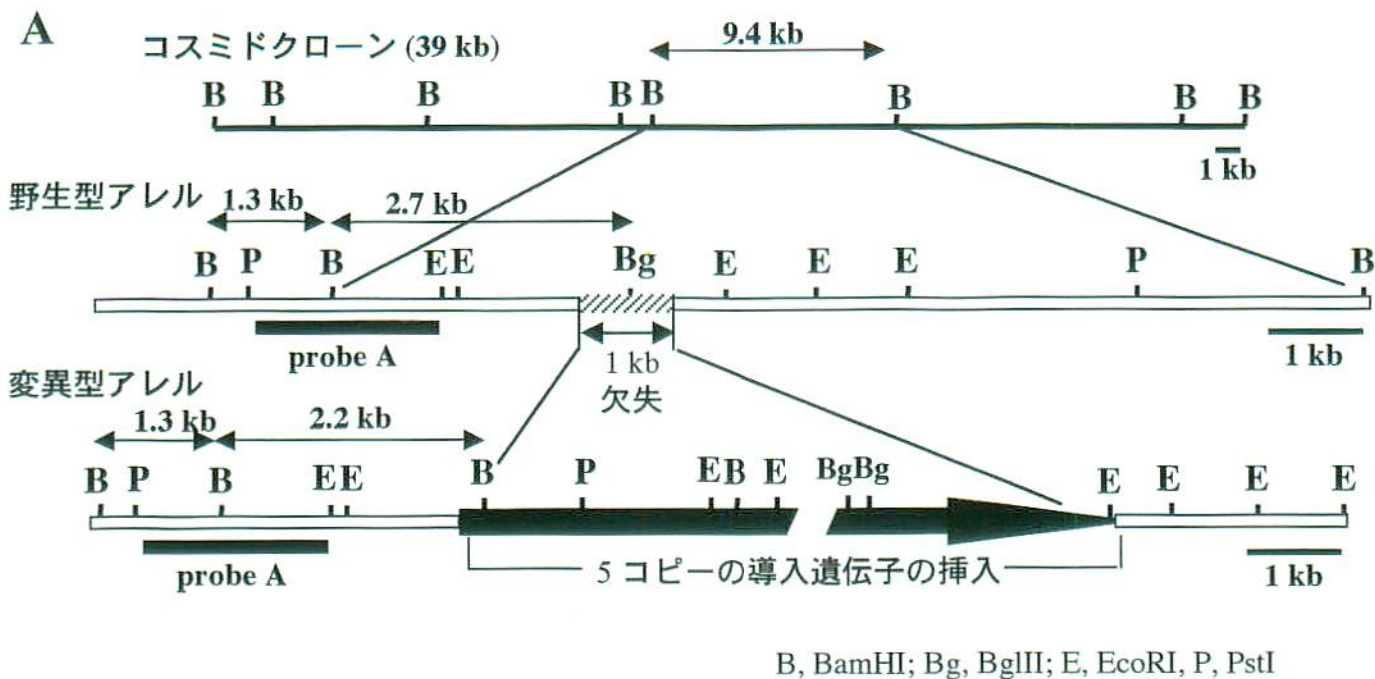


図3. A. *Nax*の導入遺伝子の挿入された部位周辺の制限酵素地図。正常マウスのゲノムDNAのコスミドライブラリーのスクリーニングを行い、計39kbのゲノムDNAをクローニングした。導入遺伝子の挿入部位には約1 kbの欠失があったが(斜線)、大きなリアレンジは起こっていなかった。また、調べたかぎり挿入部位の周囲に遺伝子の同定はできなかった。B: probeAを用いたサザンブロット。BamHIとBglIIの切断で、野生型アレルは2.7kb、変異型アレルは2.2kbのバンドを検出し、ホモ接合体(tg/tg)とヘミ接合体(tg/w)の識別ができた。C: 新生仔の血清hTTRのウエスタンブロット。ホモ接合体(tg/tg)はヘミ接合体(tg/w)よりも濃いバンドが得られ、hTTR^{Met30}の発現が強いことがわかった。

体はメンデルの法則から期待される割合、1 : 2 : 1 で存在し胚生致死ではなかった。しかし、ホモ接合体では鼻上顎奇形がヘミ接合体よりも強くあらわれた (図 4 A-C)。新生仔の鼻の先端から両眼窩を結ぶ線までの鼻の長さの平均は、野生型 $4.22 \pm 0.16 \text{mm}$ (n=10)、ヘミ接合体 $3.52 \pm 0.28 \text{mm}$ (n=20)、ホモ接合体 $3.21 \pm 0.24 \text{mm}$ (n=10) で、各群間の差は有意だった ($p < 0.01$)。また、アルシアンブルー・アリザリンレッド染色では *Nax* の新生仔の鼻骨の骨化が不完全で、特にホモ接合体は骨化が認められなかった (図 4 D-F)。これら、ヘミ、ホモ接合体における *hTTR^{Met30}* 遺伝子の発現レベルを調べるためウェスタンブロット法で血清 *hTTR^{Met30}* を調べたところ、ホモ接合体の血清 *hTTR^{Met30}* はヘミ接合体よりも明らかに高値であった (図 3 C)。これらの所見から表現型は *hTTR^{Met30}* 遺伝子発現量に依存することが示唆された。

2) 復帰型 Tg ライン、*Nax-normal* の分析

Nax の継代中、表現型が正常な Tg マウスが偶然得られ、その子孫も正常であった (図 5 A, B)。前述したように *Nax* の浸透率は 100%なので、この復帰型マウスライン、*Nax-normal* では導入遺伝子に何らかの変化が生じたと考え、導入遺伝子の挿入パターンを調べた。導入遺伝子のコピー数を調べるために *hTTR^{Met30}* 導入遺伝子の内部にあるプロンプ B を用いたサザンブロットを行った (図 6 A)。図 6 B に示すように *Nax-normal* では BamH I で消化した場合、*Nax* の約 1/5 の強さのバンドが得られ、Pst I ではゲノム DNA との連結部を含む 9.4-kb のバンドに変化はなかったが、タンデムコピーに由来する導入遺伝子全長の 7.6-kb のバンドが消失した。このことから *Nax-normal* では導入遺伝子が 1 コピーに減少したことがわかった。さらに *Nax-normal* の導入遺伝子の挿入部位には変化が生じていないことの確認を

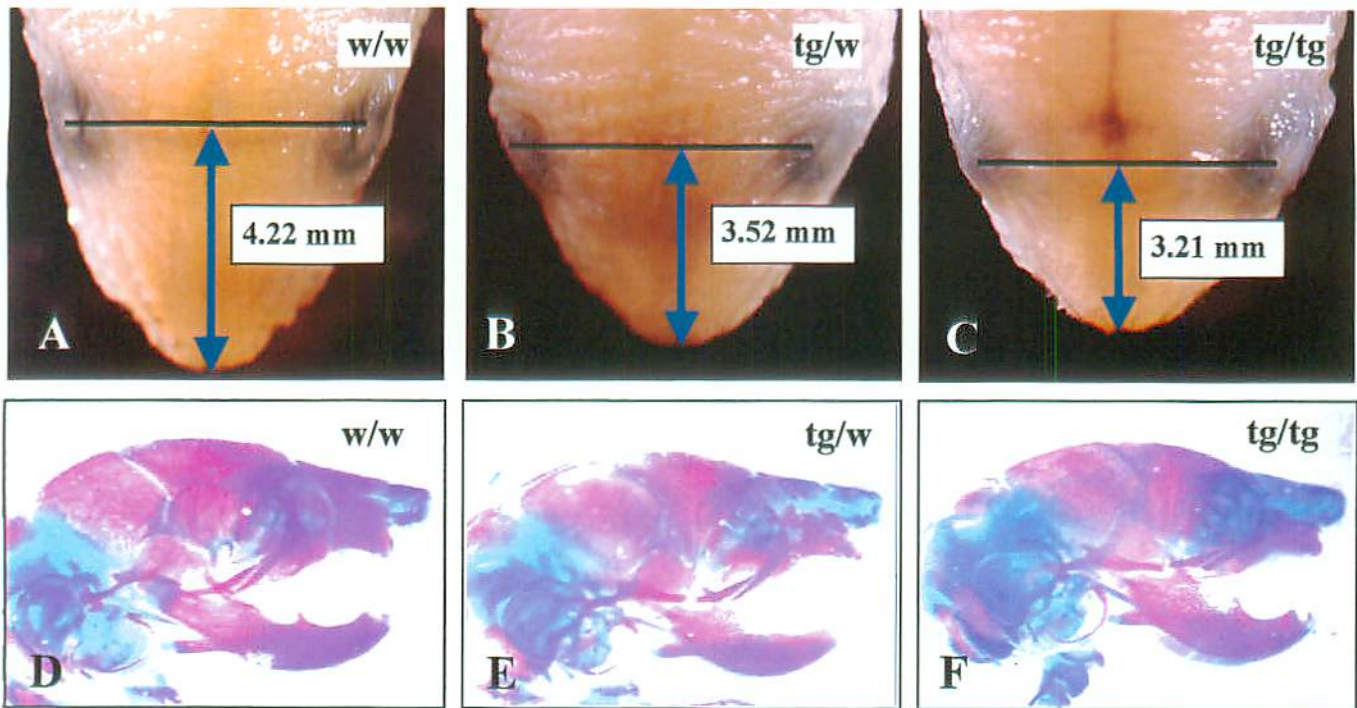


図4. A-C: 新生仔の鼻の長さの比較。野生型(A)、ヘミ接合体より(B)、ホモ接合体(C)の順に鼻が短く、各2群間には有意差があった($p < 0.01$)。D-F: 新生仔のアルシアンブルー(軟骨)・アリザリンレッド染色(骨)。ヘミ接合体(E)は野生型(D)に比べて鼻骨の骨化が不完全であった。また、ホモ接合体(F)は鼻骨の骨化が認められなかった。

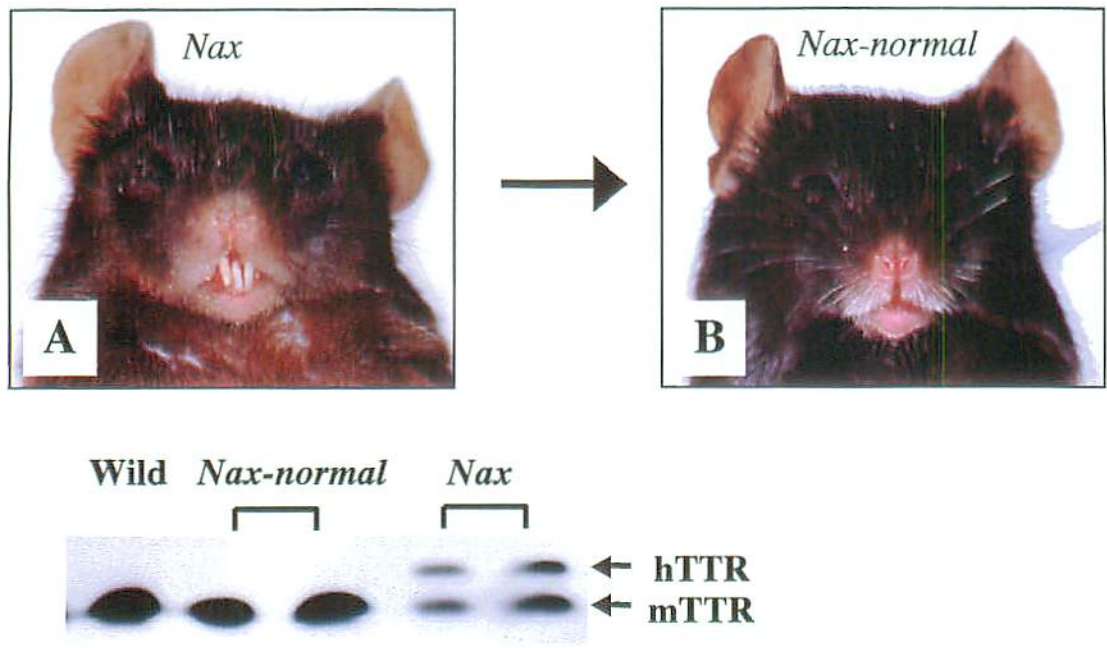


図5. A, B: *Nax-normal*の出現。*Nax*(A)の継代中に表現型が正常にもどった*Nax-normal* (B)が出現した。C: 成体の血清hTTRのウエスタンブロット。*Nax-normal*では血中TTR^{Met30}が検出されなかった。

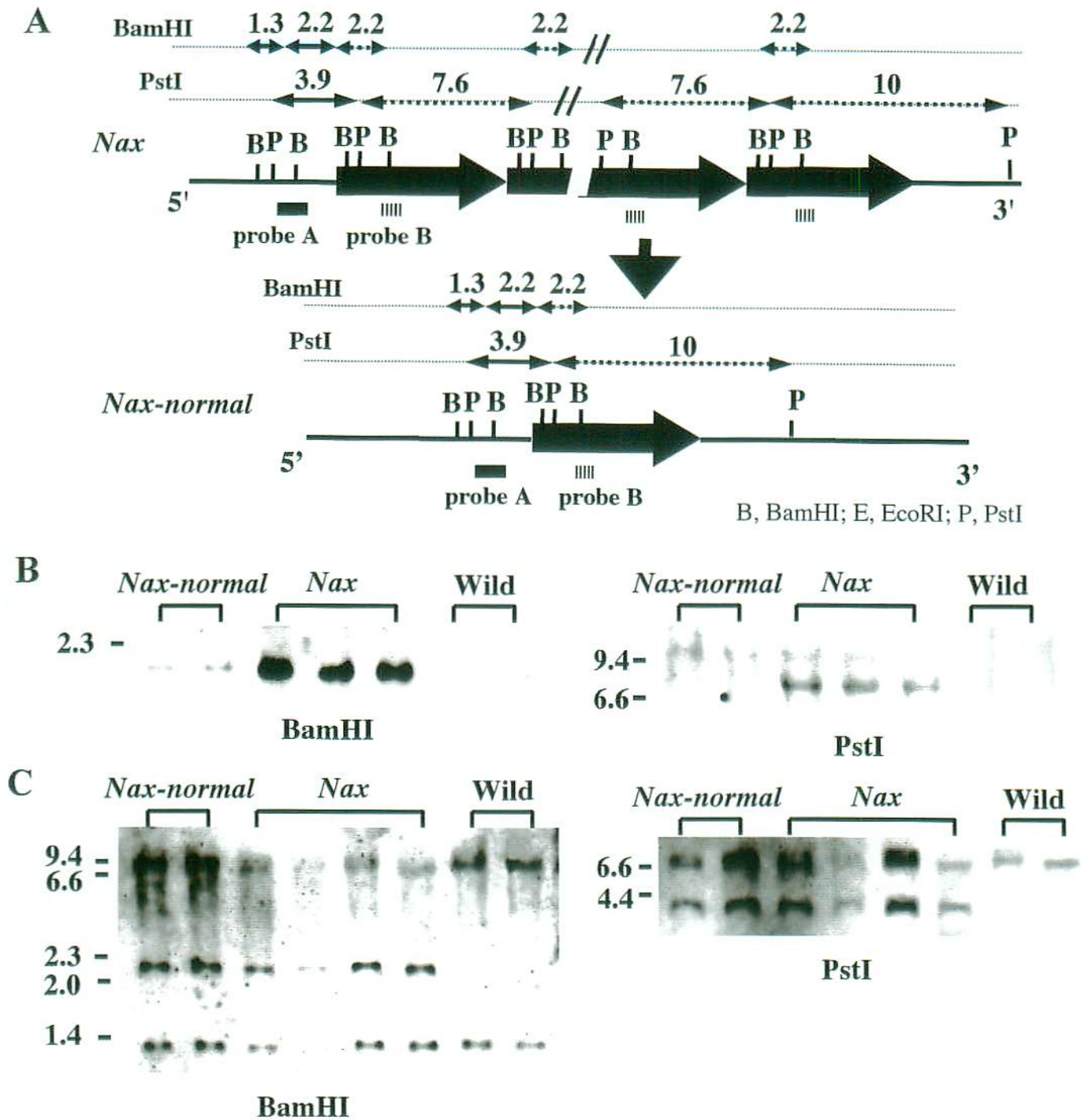


図6. *Nax-normal*の分析。A: *Nax*と*Nax-normal*の導入遺伝子の周辺の制限酵素地図。*Nax*の導入遺伝子の挿入部位は1箇所であり、5コピーのタンデムに連なった導入遺伝子は*Nax-normal*では1コピーになっていた。B: 導入遺伝子内部のprobeB (点線)を用いたサザンプロット。*Nax-normal*ではBamHIによる2.2kbのバンドは*Nax*の1/5の濃さで、PstIによる導入遺伝子全長の7.6kbのバンドはなかった。C: 導入遺伝子の外側のprobeA (実線)を用いたサザンプロット。*Nax*と*Nax-normal*はBamHIでもPstIでも同じバンドが得られ、導入遺伝子の挿入部位に変化がないことを確認できた。

導入遺伝子の外側のプローブ A を用いて行った。その結果、BamHI でも PstI でも *Nax* と *Nax-normal* で同一のシグナルパターンが得られた (図 6 C)。したがって *Nax* では 1 ケ所にタンデムに連なっていた導入遺伝子が脱落して、*Nax-normal* ではシングルコピーになったことがわかった。導入遺伝子の発現に変化があったかどうかを血清のウエスタンブロット法で調べたところ、*Nax-normal* では血清 hTTR^{Met30} は検出されず (図 5 C)、コピー数の減少により導入遺伝子の発現は消失または低下していることがわかった。

3) hTTR^{Met30} 遺伝子の発現が顔奇形を生じる

Nax-normal の解析から *Nax* の奇形の原因は導入遺伝子が内在性の遺伝子の中に挿入したことにより、これを破壊した単純で直接的な挿入変異であるという可能性は否定された。かわりに 2 つの可能性が考えられる。1 つは挿入変異ではあるが、エンハンサーのようなシス作用性調節エレメントと転写開始点との距離を導入遺伝子が隔てることにより、その効果を阻害するという転写調節異常を引き起こす挿入変異である。この場合、*Nax-normal* ではコピー数の減少によりシス作用性調節エレメントと原因遺伝子との間隔が短縮し、正常に作動するようになったと考えられる。2 つめは hTTR^{Met30} 導入遺伝子の発現が奇形を引き起こしたという可能性である。*Nax-normal* では導入遺伝子の発現の減少によって奇形が消失したと考えられる。これまでの解析で *Nax* の表現型は常染色体優性で 100% の浸透率であり、奇形の程度は hTTR^{Met30} の発現の強さによって変化することがわかっており、これは後者の可能性をより支持する結果である。さらに、TTR の機能の 1 つは発生時期の形態形成に重要な役割が知られているレチノールの輸送であり、その発現が奇形の原因となる可能性は十分に考えうる。そこで 2 つめの仮説を確かめるため

に $hTTR^{Met30}$ 遺伝子の発生時期の顔での発現を *Nax*、*Nax-normal*、同じ導入遺伝子を持ち $hTTR^{Met30}$ を発現するが奇形が認められない Tg マウス *line 62* をホールマウントと組織切片の *in situ* RNA ハイブリダイゼーション法で調べた。9.5 日胚では、どのラインも顔での導入遺伝子の発現はなかった。10.5 日胚では *Nax* のみに鼻プラコードでの $hTTR^{Met30}$ の発現が認められたが(図 7 A, D)、*Nax-normal* と *line 62* にはこの時期導入遺伝子の発現はなかった (図 7 B, C, E, F)。12.5 日と 14.5 日胚では *Nax* および *line 62* とともに鼻部での発現が認められたが (図 7 G, I, J, L)、*Nax-normal* では認められなかった(図 7 H, K)。マウスの *TTR* mRNA はこの部位では検出されなかった。これらの結果から 10.5 日の $hTTR^{Met30}$ 遺伝子の鼻部での発現が顔奇形の原因であることが強く示唆された。

4) 異なるプロモーターを用いた $hTTR^{Met30}$ 過剰発現マウス

$hTTR^{Met30}$ 遺伝子の過剰発現が顔奇形を生じるかどうかを証明するために $hTTR^{Met30}$ を過剰発現する新たな Tg マウスを作製した。胎生 10.5 日の鼻プラコードに特異的に発現するプロモーターを用いるのが最適ではあるが、そのようなプロモーターの選定が困難であったため、胎生初期から全身で強く発現する chicken β -actin を用いた CAG プロモーター (Niwa *et al.* 1991) を使用した。CAGGS ベクターに $hTTR^{Met30}$ cDNA を挿入したコンストラクトを構築し (図 8 A)、 $hTTR^{Met30}$ 過剰発現 Tg マウスを作製した。受精卵へのマイクロインジェクション、仮親の卵管への移植後、胎生 14.5 日および胎生 16.5 日の胚を解剖、PCR と *in situ* ハイブリダイゼーションによって、導入遺伝子の有無と頭部での発現を調べた (図 8 B, C)。14.5 日胚では 47 匹中 7 匹が導入遺伝子を持ち、4 匹が $hTTR^{Met30}$ を発現していたが、明らかな形態異常はみられなかった。16.5 日胚は 64 匹中 10 匹の胚が導入遺伝子を

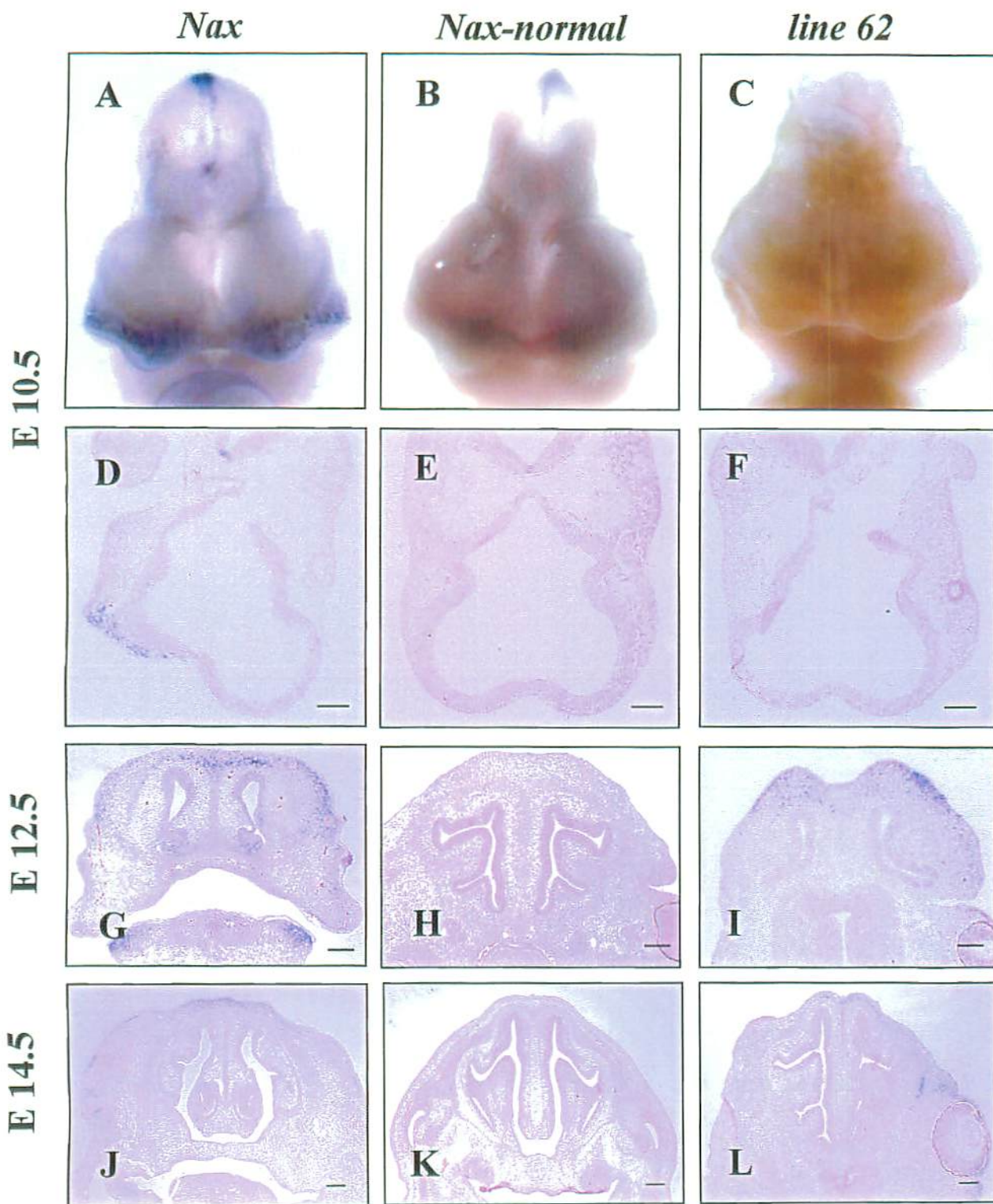


図7. $hTTR^{Met30}$ 遺伝子の顔での発現。A-C: 10.5日胚のホールマウント *in situ* hybridization。D-F: 頭部正中断のsection *in situ* hybridization。胎生10.5日では*Nax*のみ鼻プラコードで $hTTR^{Met30}$ 遺伝子の発現が認められたが (AD)、*Nax-normal*と*line 62*には認められなかった。胎生12.5日(G-I)、14.5日(J-L)のsection *in situ* hybridization。*Nax*および*line62*で $hTTR^{Met30}$ 遺伝子の鼻での発現がみられた。Scle:20 μ m

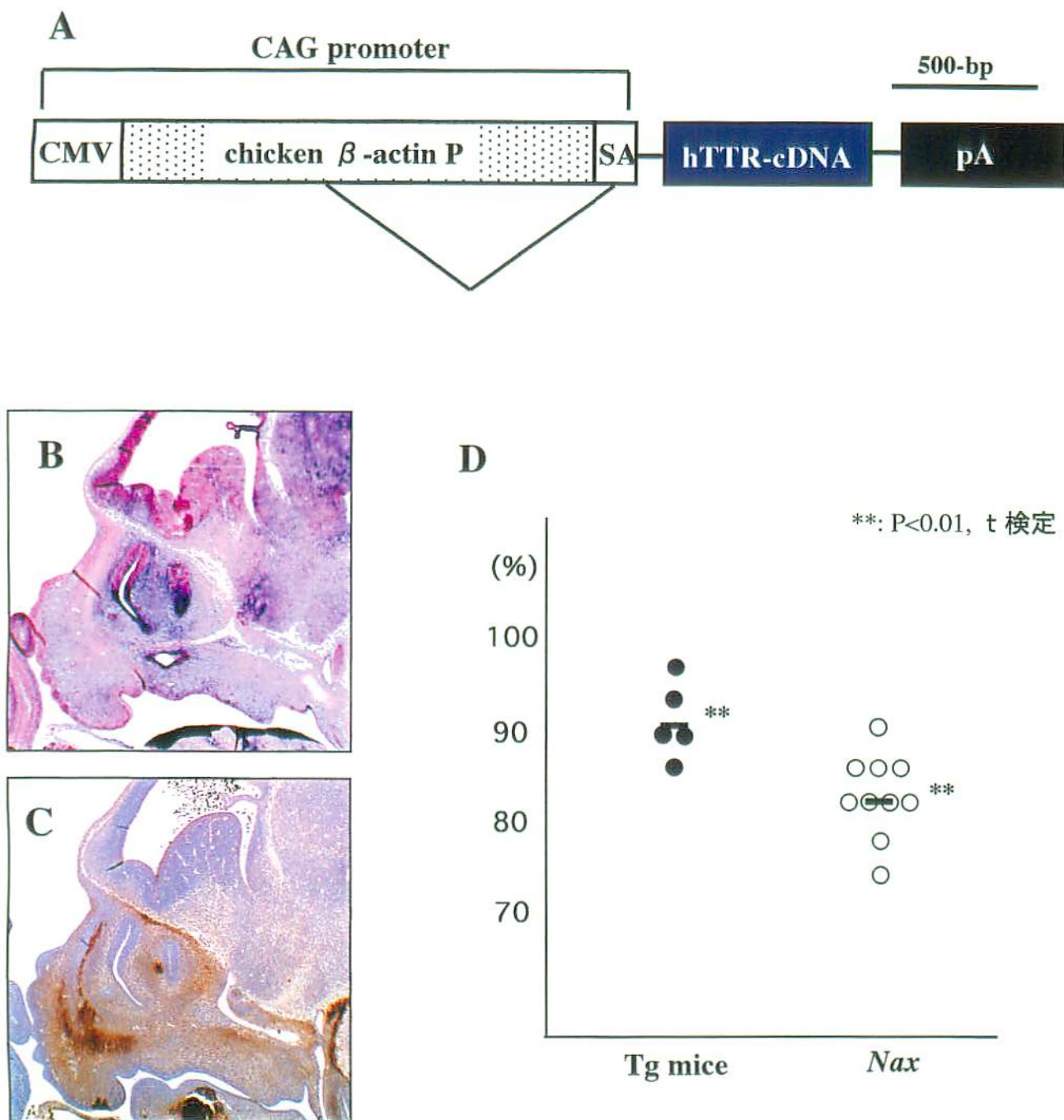


図8. A: $hTTR^{Met30}$ 過剰発現Tgマウスのコンストラクト。 $hTTR^{Met30}$ cDNA をCAGGSベクターに挿入して構築した。 SAとPAはラビット β -グロビン遺伝子のものを使用している。 CMV: CMV enhancer, SA: splice acceptor, pA: poly A。
 B, C: 胎生14.5日の $hTTR^{Met30}$ Tgマウス。 鼻で $hTTR^{Met30}$ mRNA (B)と $hTTR^{Met30}$ 蛋白 (C) の発現が認められたが、明らかな奇形はなかった。
 D: 胎生16.5日のTgマウス鼻の短縮率。 それぞれ同腹のnonTg胚の鼻の長さの平均を100としたときの割合で示した。 Tgマウスは同腹のnonTg胚に比べて有意に鼻が短かった ($p < 0.01$)。

もち、その半数が $hTTR^{Met30}$ を発現していた。胚の鼻の長さを計測したところ、図 8 D に示すように $hTTR^{Met30}$ 発現胚では $3.18 \pm 0.15 \text{mm}$ ($n=5$)、同腹の導入遺伝子を持っていない (nonTg) 胚 [$2.93 \pm 0.14 \text{mm}$ ($n=10$)] よりも有意に短かった ($P=0.0043$)。同腹の nonTg 胚に対する鼻の長さの比率は 92.3% で、胎生 16.5 日の Nax での同腹野生型胚に対する割合 82.9% に比べて短縮率は小さかったが、この結果は $hTTR^{Met30}$ 遺伝子の発現により顔奇形が生じることを強く示唆している。

5) 鼻プラコードの組織培養への hTTR の作用

外部より与えられた過剰な hTTR 蛋白が鼻プラコードの成長に影響を与えるかどうかを組織培養システムを用いて検討した。鼻プラコードの組織培養は第 1 鰓弓の器官培養法を応用し (Slavkin *et al.* 1998)、無血清培地の BGJb medium (Gibco BRL, Rockville, MD) を用いて行った。10.5 日胚から採取した鼻プラコードを 37°C 5% CO_2 の条件で 6 日間の培養したところ鼻郭の組織構造に対応した軟骨とその内側の上皮構造が発育し、アルシアンブルー染色による形態観察が可能になった (図 9 A)。しかし、 Nax を用いて同様の培養を行ったところ、 $hTTR^{Met30}$ 蛋白の発現が観察されたが、軟骨の形態も発育も野生型の胚と違いはみられなかった (図 9 B)。成人のヒトの血中濃度に匹敵する 10mg/dl の hTTR を培養液に加えた組織培養も行ったが異常はみられなかった (図 9 D)。これは予想外の結果であったが、組織培養の系では、*in vivo* の状態よりある程度成長が低下するのは当然と考えられ、その結果、野生型も Nax も同程度しか成長できなかったものと推測している。

6) 鼻プラコードでのアポトーシス

Nax 胚での *in situ* ハイブリダイゼーションの結果は、 $hTTR^{Met30}$ 遺伝子の胎生 10.5 日における鼻プラコードでの発現が Nax の顔奇形の原因であることを示唆してい

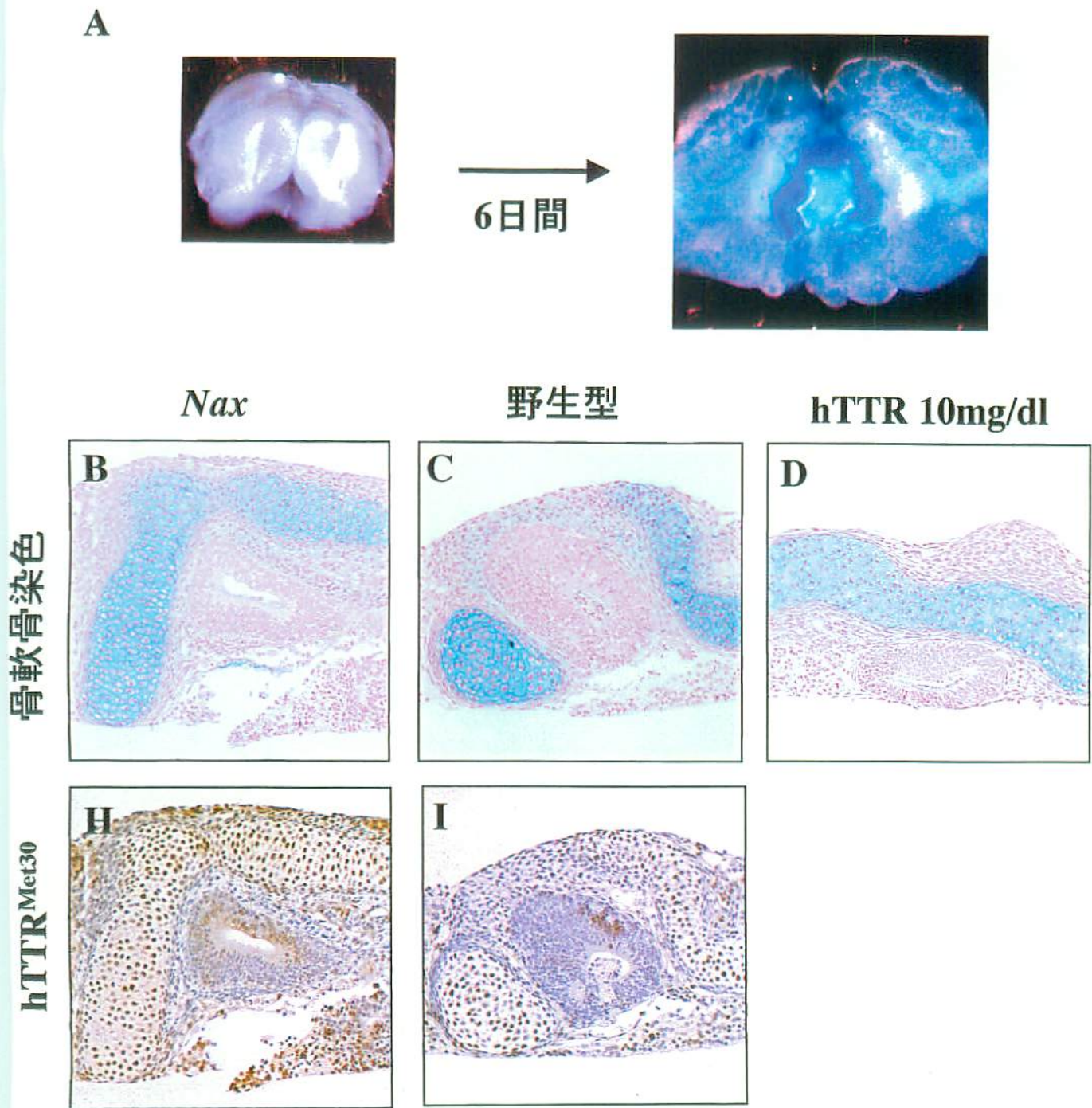


図9. A: 鼻プラコードの組織培養系の確立。10.5日胚から鼻プラコードを切り出して（左）、無血清培地で6日間培養すると、軟骨が形成され、アルシアンブルーで青く染色された（右）。B-D: 培養した鼻プラコードのアルシアンブルー染色。Nax (B)と野生型(C)と形態と発育に差はなく、同じように鼻軟骨と鼻腔上皮に類似した構造がみられた。hTTRを培養液中に加えても(D)、野生型との形態に差はなかった。H, I: hTTR蛋白の免疫組織染色。Nax (H)の鼻プラコードでのhTTR^{Met30}産生が確認できた。

る。TTR は血漿中でレチノールを輸送する重要な機能をもち、レチノールや他のレチノール誘導体への暴露 (Sulik *et al.* 1988; Dixon *et al.* 2000) または欠損 (Schneider *et al.* 2001; Dickman *et al.* 1997) は、過剰な細胞死による頭蓋顔面奇形を生じることが報告されている。したがって、*Nax* でもアポトーシスの亢進がみられないかどうか、胎生 10.5 日の鼻プラコードで TUNEL 法によってアポトーシス細胞を免疫組織学的に検出した。図 10A-D に示すように鼻プラコードでは野生型よりも多くのアポトーシス細胞を認めた。統計学的な差を評価するために、標本切片 0.1mm^2 当りのアポトーシス細胞を数え、*Nax* と野生型で比較したところ、上皮ではそれぞれ、 22.76 ± 14.02 、 2.19 ± 3.71 、間葉では 10.32 ± 9.15 、 0.95 ± 0.94 で、*Nax* の鼻プラコードの上皮および間葉のアポトーシス細胞の数は野生型の 10 倍以上であった (上皮: $p=0.0069$ 、間葉: $P=0.0326$) (図 10E)。この鼻部での過剰なアポトーシス細胞は胎生 11.5 日、12.5 日、14.5 日の *Nax* ではみられなかった。これらの結果から、外奇形は胎生 15.5 日まで明らかにならないが、*Nax* の鼻郭の低形成の原因は胎生 10.5 日の鼻プラコードでの一過性の過剰な細胞死であることが示唆された。ナイルブルー染色でアポトーシス細胞の分布を胎生 10.5 日のホールマウント胚で調べたが、*Nax* と野生型との差はなく、検出法の感度の問題と考えられた (図 10F, G)

7) レチノイン酸の作用に関係する遺伝子の発現

妊娠 10 日でのレチノイン酸の投与はマウスに頭蓋顔面奇形を生じることが報告されており (Grant *et al.* 1997)、また、レチノールの結合や応答に関与する遺伝子である細胞内レチノイン酸結合蛋白 1 (CRABP I) 遺伝子とレチノイン酸受容体 (RAR) 遺伝子 (サブタイプ α 、 γ) は、胎生 10.5 日の鼻プラコードでの発現パタ

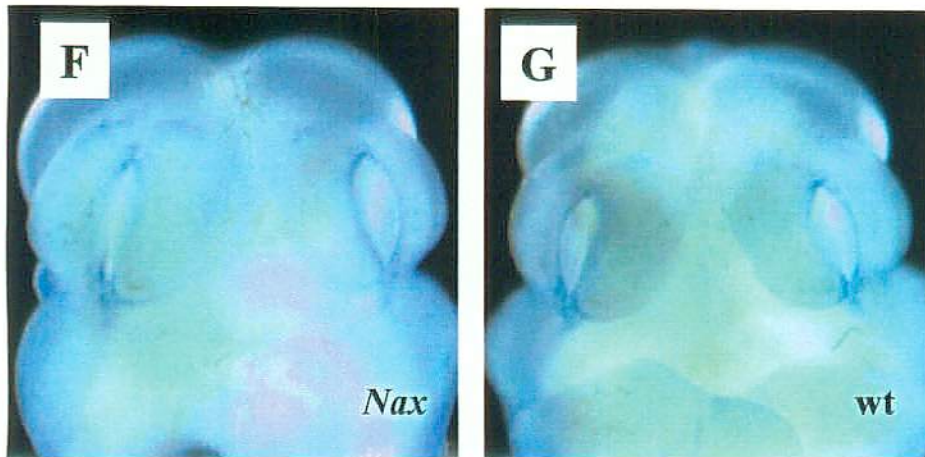
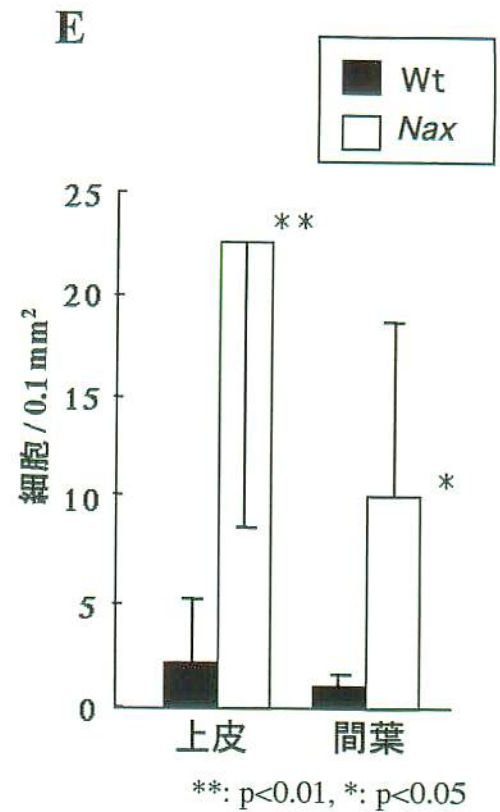
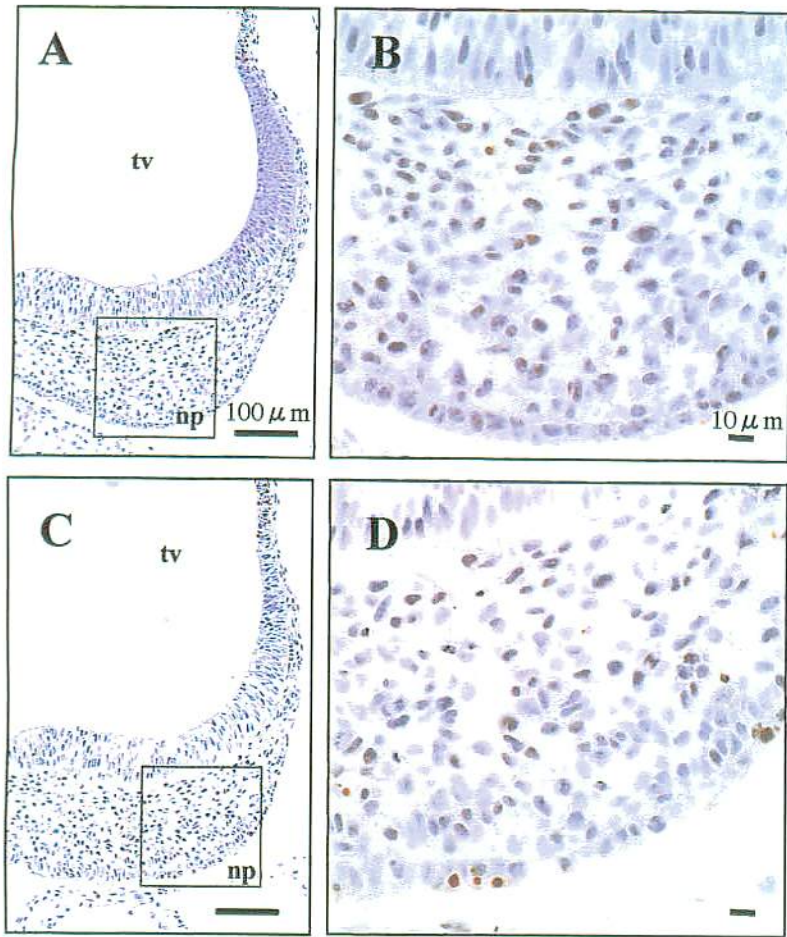


図10. A-D: 胎生10.5日のNaxの鼻プラコードのTUNEL法によるアポトーシスの検出。Nax(C, D)では野生型(A, B)よりも多くのアポトーシス陽性細胞が観察された。E: 単位面積当りのアポトーシス陽性細胞数。鼻プラコードの上皮および間葉のアポトーシス細胞の数は野生型の10倍以上であった。FG:10.5日胚のナイルブルー染色。Nax (F)と野生型(G)のアポトーシス細胞の分布の違いは検出できなかった。

ーンをしている (Osumi-Yamashita *et al.* 1990; Kleijian *et al.* 1997)。 $hTTR^{Mei30}$ 遺伝子のこの部位での発現がこれらの遺伝子に影響しているかどうかを *in situ* ハイブリダイゼーションにより観察した。しかし、*Nax* でのこれらの遺伝子の発現は野生型と同じパターンであった (図 11A-F)。

考察

1) 顔での $hTTR^{Mei30}$ 発現による *Nax* の表現型

$hTTR^{Mei30}$ を発現する Tg マウスラインの鼻上顎奇形の解析により、胎生 10.5 日の鼻プラコードでの $hTTR^{Mei30}$ の発現によるアポトーシスが鼻部の低形成の原因であることがわかった。このような形態形成初期のアポトーシスなので、非特異的に神経堤細胞に由来する骨、軟骨とそれに伴う結合組織全般の低形成を生じると考えられる。もちろん、挿入変異も完全には除外できない。したがって、さらに研究を進めるためには鼻プラコードで特異的に発現するプロモーターの下に $hTTR^{Mei30}$ を発現する Tg マウスの作製や $hTTR^{Mei30}$ の発現によって影響を受ける遺伝子の同定などが必要である。

実験に用いた $hTTR^{Mei30}$ 遺伝子は 30 番目のコドンがバリンからメチオニンに置換した変異遺伝子であり、 $hTTR^{Mei30}$ によるアミロイド線維の沈着を生じる。実際、*line62* は 15 ヶ月齢以降、主に消化管にアミロイド沈着を認めた (Takaoka *et al.* 1997)。しかし、 $hTTR^{Mei30}$ はレチノールや甲状腺ホルモンを輸送する機能は完全に正常である (Kohno *et al.* 1997)。したがって、 $hTTR$ の変異は *Nax* の奇形に関係しないと考えられる。

Nax と *line62* は 0.6-kb のプロモーター領域を含む $hTTR^{Mei30}$ 遺伝子をもっている

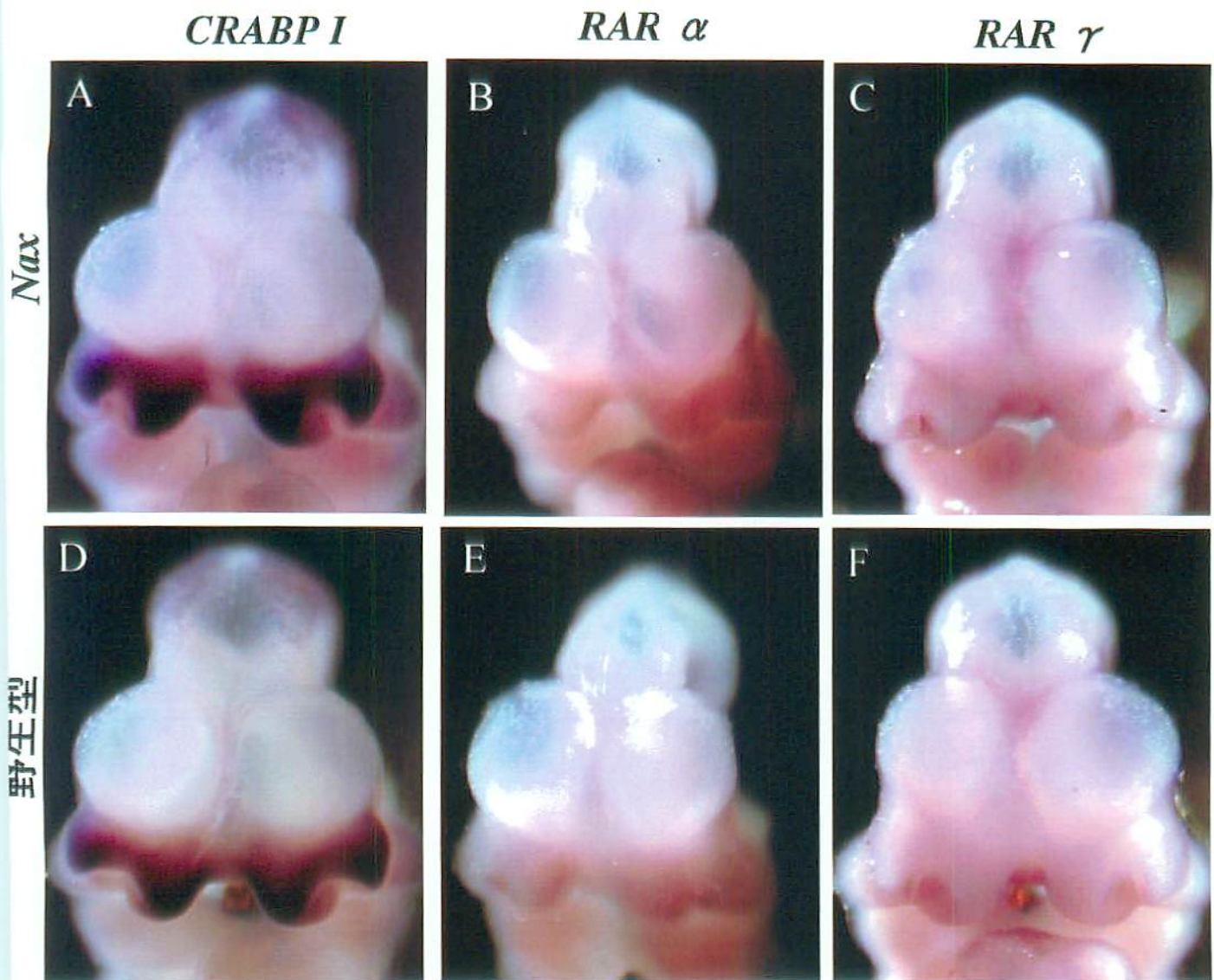


図11. レチノイン酸の作用に関連する遺伝子の発現。 *CRABP I* (A, D)、*RAR α* (B, E)、*RAR γ* (C, F) の発現を10.5日の*Nax*胚 (A-C) と野生型胚 (D-F) を用いて調べたが、鼻プラコードでの*Nax*と野生型との発現パターンに違いはなかった。

が、時期は異なるものの、 $hTTR^{Mei30}$ 遺伝子が両ライン共に鼻プラコードで発現する。われわれは 6-kb 上流までのプロモーター領域を含み、*Nax* よりも $hTTR^{Mei30}$ の発現が高い別の Tg ライン、6.0-hMet30 も調べた。興味深いことに、このラインでも *line62* と同様に胎生 12.5 日から鼻で $hTTR^{Mei30}$ 遺伝子が発現していた (図 12D, G)。このことより、 $hTTR^{Mei30}$ 遺伝子はもともとこの部位で発現することがわかる。マウスの内在性の *ttr* 遺伝子のこの部位での発現は検出できなかった (図 12C, F, I)、ヒト特異的な発現パターンである可能性がある。したがって *Nax* でみられた発現異常は位置効果によって引き起こされた、部位ではなく時期を誤った発現であるということができる。

2) $hTTR$ 遺伝子とヒトの疾患との関係

Nax では $hTTR^{Mei30}$ の発現がわずか 2 日早かったために顔奇形が生じた。また、ヒトでは $hTTR$ 遺伝子が発生時期の顔で発現している可能性が高い。このことから $hTTR$ 遺伝子の発現制御の微妙な異常がヒトの顔奇形の原因になる可能性がある。 $hTTR$ 遺伝子は 18 染色体上に位置し (18q11.2-q12.1) (Sparker *et al.* 1987)、ヒト 18 トリソミー (エドワード症候群) は 2 番目に多い染色体異常症候群で泌尿生殖器、心臓、頭蓋顔面、中枢神経の奇形を生じる。50%以上の患者に小顎症などの顔奇形がある (Jones 1997)。実際に TTR 遺伝子の過剰発現が 20~23 週のヒト 18 トリソミーの胎児の肝臓と小腸で観察されている (Loughna *et al.* 1995)。もしこの症候群において $hTTR$ 遺伝子が正常の胎児よりも早く発現していたら、顔奇形の原因である可能性がある。

Binder 症候群も *Nax* と同様の鼻骨、前上顎骨の低形成によって鼻の形態の奇形を生じるので注目に値する。この先天性奇形は上顎と鼻棘の低形成によって極端

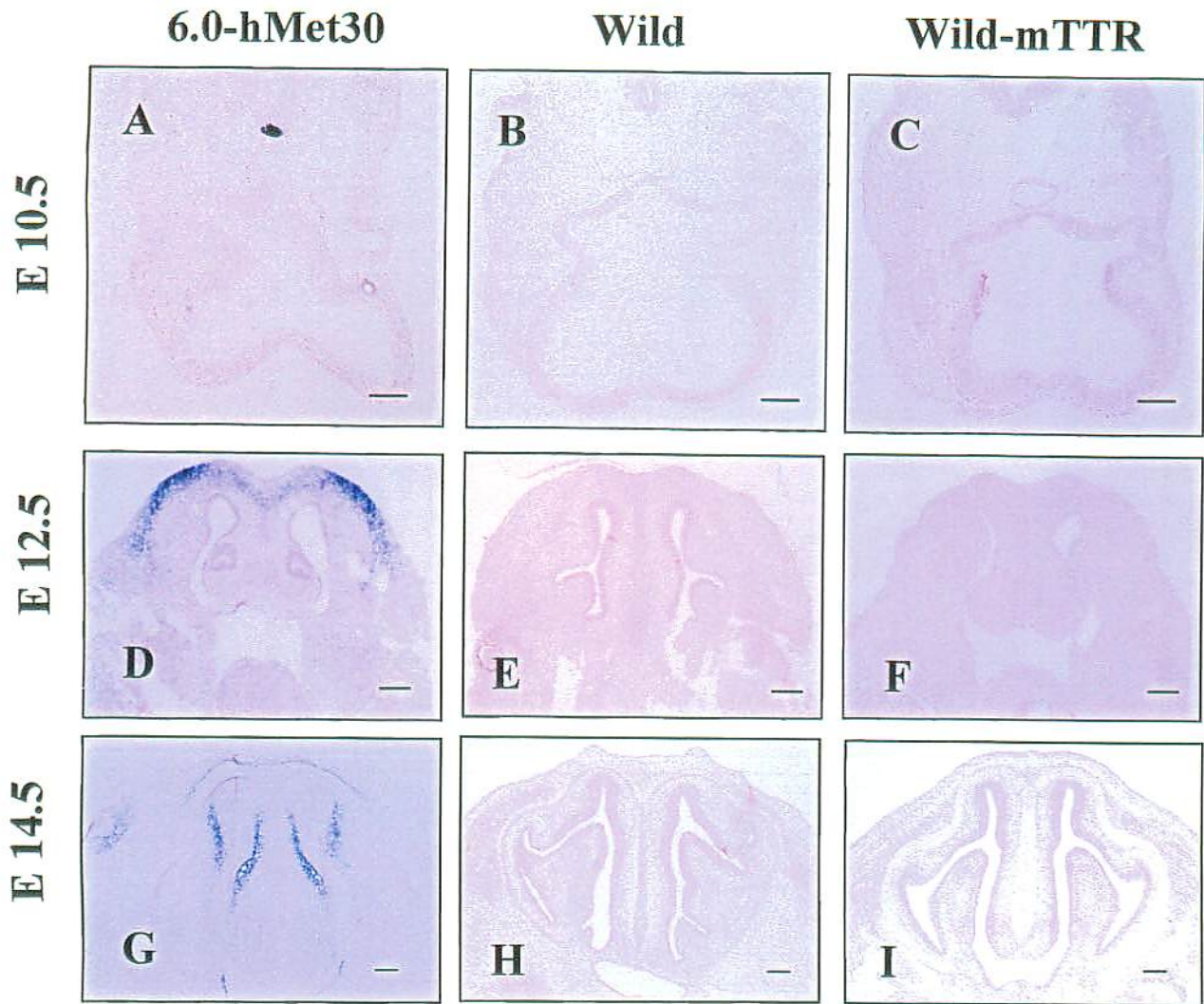


図12. 6.0-hMet30マウスラインにおける $hTTR^{Met30}$ 遺伝子の発現とマウス ttr 遺伝子の発現。6.0-hMet30 の10.5日胚(A)、12.5日胚(D)、14.5日胚(G)での $hTTR^{Met30}$ プローブを用いたsection *in situ* hybridization。12.5日胚以降で、 $hTTR^{Met30}$ が発現している。野生型の10.5日胚(B)、12.5日胚(E)、14.5日胚(H)では $hTTR^{Met30}$ のシグナルは検出されない。また、野生型マウスにおいてマウス内在性の ttr 遺伝子は10.5日(C)、12.5日(F)、14.5日(I)のいずれの時期でもこの部位での発現は検出できなかった。Scale:200 μ m

に扁平で後退した鼻が特徴である。咬合不全が 54%にみられる。上顎鼻異形成の患者の多くは顔の奇形は軽度で機能的には正常で、白人以外の人種では問題にされない(Holmström 1988)。Binder 症候群の多くは散発例であるが、常染色体優性遺伝の家族例の報告がある Roy-Doray et al. 1997)。そのような家族例における *hTTR* 遺伝子の変異や発現異常を調べることは大変興味深いと思われる。

また、ヒトにおける *hTTR* 遺伝子の顔面での発現は顔面奇形との関連以外に、種特異的顔面形態形成にも *hTTR* 遺伝子が働いている可能性も考えられ興味深い。ヒトや霊長類は他のほ乳類に比べて頭蓋骨が前後に短く、扁平な顔で、鼻が短い。もしかしたら *TTR* はこのようなヒトや霊長類の顔の形態形成に重要な遺伝子かもしれない。

3) 発生時期特異的な *hTTR^{Mei30}* 発現の効果

Nax と奇形を生じない他の *hTTR^{Mei30}* を産生する Tg マウスとの差異は *hTTR^{Mei30}* の発現のタイミングが2日早いことである。これは胎生 10.5 日という時期が極めて重要であることを示唆する。胎生 10.5 日、菱脳から遊走してきた頭部神経堤細胞は鼻プラコードに定着する。これらの細胞は外胚葉間葉として鼻プラコードで増殖し、鼻の大部分の組織構造に分化する。実際に妊娠 10 日の C57BL/6J マウスにレチノイン酸を投与すると神経堤細胞に由来する頭部顔面奇形を生じる (Grant et al. 1997)。また、胎生 9 日の胎児へのレチノイン酸の投与は Treacher Collins 症候群に似た上顎、下顎の奇形を生じ、第 1、第 2 鰓弓に過剰なアポトーシスが観察されている (Webster et al. 1986)。このように感受性が高い時期なので、*hTTR^{Mei30}* の発現が神経堤細胞由来の外胚葉間葉細胞のアポトーシスに寄与した可能性がある。

4) hTTR のアポトーシス誘導について考えられる機序

TTR は血漿蛋白であり、2つの甲状腺ホルモン結合部位と、これとは別にレチノールを特異的に運搬するレチノール結合蛋白(RBP)に対する4つの結合部位をもつ。甲状腺ホルモンやレチノールは正常の発生に必須であり、内因性の *ttr* 遺伝子は発生初期から発現しているので、TTR は発生時期の胚に何らかの機能をもつと考えられた。しかし、TTR 欠損マウスは正常で生殖可能であった (Episkopou *et al.* 1993; Palha *et al.* 1994; Wei *et al.* 1995)。

hTTR^{Mei30} の前頭鼻部での発現は、血液中に内在性の TTR が存在するにもかかわらず、どのようにしてアポトーシスを誘導するのか？ *hTTR^{Mei30}* を全身に過剰に発現する Tg マウスに、なぜ微妙な効果しか観察されなかったのだろうか？この極めて限局した効果はレチノールの局所的な濃度が影響している可能性が考えられる。*hTTR^{Mei30}* の発現によりレチノールの効果が増強することも考えられるが、逆に減弱することも考えられる。鼻部で産生された hTTR は RBP にすでに結合している内在性の TTR に競合することにより、抑制する可能性があるからである。トリの顔の形態形成においてはレチノイン酸の適切な濃度が前頭鼻隆起の分化に必要である (Lee *et al.* 2001)。

われわれはレチノイン酸の作用に介在する遺伝子、核受容体である *RAR α* 、*RAR β* 、*RAR γ* と細胞質結合蛋白の *CRABP I* の発現を調べた。*RAR α* 、*RAR γ* と *CRABP I* は胎生 10.5 日マウス胚の鼻プラコードで発現しており (Osumi-Yamashita *et al.* 1990; Kleinjan *et al.* 1997)、*CRABP I* と *CRABP II* の欠損マウスは表現型に異常がないが (Gorry *et al.* 1994; Fawcett *et al.* 1995; Lampron *et al.* 1995)、*RAR α* と γ のダブル欠損マウスは顔奇形を生じる (Lohnes *et al.* 1994)。しかし、これらのレチノイン酸の作

用に介在する遺伝子の発現パターンには *Nax* と野生型の差はなかった。*Nax* において奇形が生じる過程に関与する分子を明らかにするためには、さらに詳細な解析が必要である。

結語

「腸内フローラとアミロイド沈着との関係」の結果から腸内フローラがアミロイド形成に重要な役割をもち、微生物環境を制御すると腸管でのアミロイド沈着を抑制する可能性があることが示唆された。今回の実験で、アミロイド沈着に影響している特定の菌種の存在は考えられなかったが、嫌気性菌が多く好気性菌の増殖を抑制している腸内フローラではアミロイド沈着が予防できる可能性が考えられた。また、もしも好中球浸潤がアミロイド沈着に関係するのならば、好中球のサイトカインや受容体に関連する遺伝子のノックアウトマウスや Tg マウスを FAP の Tg マウスと交配させて、それらの遺伝子のアミロイド沈着への影響を調べると、アミロイド沈着を抑制する因子を調べることができる。FAP は末梢神経障害、自律神経障害を呈して 30 歳前後で発症し、約 10 年の経過で、心不全、尿毒症、尿路感染症などから死亡する難病である。近年、TTR の主要な産生臓器は肝臓であることから肝移植が行われているが (Holmgren *et al.*, 1993)、根本的な治療はなく、このような発症機序の解明が重要だと思われる。

「*hTTR^{Mei30}* の異所性発現による鼻上顎奇形マウス」の実験では、神経堤細胞が鼻プラコードに定着する胎生 10.5 日の *hTTR^{Mei30}* のこの部位での発現が、鼻郭の低形成を生じることがわかった。この時期のレチノイン酸の作用に関係する遺伝子の発現は調べたが、さらに広範に神経堤細胞の働きに関係する遺伝子の発現を調

べると、*TTR* の上流や下流の遺伝子を同定できる可能性がある。今まで *TTR* 蛋白質はレチノール運搬分子として形態形成に重要と考えられていたものの、直接形態に関与した例はまだ報告されていなかった。今回、われわれの解析により、*TTR* 遺伝子がヒトの優性遺伝性顔面奇形疾患の原因となりうることが示唆された。今後、ヒト胎児や他のほ乳動物での鼻プラコードでの *TTR* の発現を調べれば、鼻の形態形成への *TTR* の役割が明らかになると考えられる。

参考文献

1. Almeida, M.R., Alves, I.L., Terazaki, H., Ando, Y., Saraiva, M.J. (2000) Comparative studies of two transthyretin variants with proctive effects on familial amyloidotic polyneuropathy: TTR R104H and TTR T119M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 1024-1028.
2. Alves, I.L., Hays, M.T., Saraiva, M.J.M. (1997) Comparative stability and clearance of (Met 30) transthyretin and (Met 119) transthyretin. *Eur. J. Biochem.* **249**, 662-668.
3. Andersson, R. (1976) Familial amyloidosis with polyneuropathy: a clinical study based on patients living in northern Sweden. *Acta. Med. Scand.* **198** (Suppl. 590), 1-64.
4. Ando, Y., Araki, S., Ando, M. (1993) Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. *Internal Med.* **32**, 920-922.
5. Andrade, C. (1952) A peculiar form of peripheral neuropathy: familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* **75**, 408-427.
6. Ang, H. L., Duyster, G. (1997) Initiation of retinoid signaling in primitive streak mouse embryos: spatiotemporal expression patterns of receptors and metabolic enzymes for ligand synthesis. *Dev. Dyn.* **208**, 536-543.
7. van Bennekum, A.M., Wei, S., Gamble, M.V., Vogel, S., Piantedosi, R., Gottesman, M., Episkopou, V., Blaner, W.S. (2001) Biochemical basis for depressed serum level in transthyretin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 1107-1113.
8. Blake, C.C.F., Geisow, M.J., Oatley, S.J., Rerat, B., Rerat, C. (1978) Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement. *J. Mol. Biol.* **121**, 339-356.
9. Coelho, T., Carvalho, M., Saraiva, M.J., Alves, I., Almeida, M.R., Costa, P.P. (1993) A strikingly benign evolution of FAP in an individual compound heterozygote for two TTR mutation: TTR Met30 and TTR Met119. *J. Rheumatol.* **20**, 179.
10. Colon, W., Kelly, J.W. (1992) Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochem.* **31**, 8654-8660.
11. Colon, W., Lai, Z., McCutchen, S.L., Miroy, G.J., Strang, C., Kelly, J.W. (1996) FAP mutations destabilize transthyretin facilitating conformational changes required for amyloid formation. *Ciba. Found. Symp.* **199**, 228-238.
12. Connors, L.H., Richardson, A.M., Thébrege, R., Costello, C.E. (2000) Sequence

- communication; tabulation of transthyretin (TTR) variants as of 1/1/2000. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* **7**, 54-69.
13. Costa, P.P., Figueira, A.S., Bravo, F.R. (1978) Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 4499-4503.
 14. Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., Bates, G.P. (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-548.
 15. Diamond, R.D. (1995) Mechanisms involved in neutrophil-mediated killing of *Candida albicans* hyphae. *Jpn. J. Med. Mycol.* **36**, 1-6.
 16. Dickman, E.D., Thaller, C., Smith, S.M. (1997) Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects. *Development* **124**, 3111-3121.
 17. DiFiglia, M., Saap, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., Aronin, N. (1997) Aggregation of Huntington in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**, 1990-1993.
 18. Dixon, J., Brakebusch, C., Fassler, R., Dixon, M.J. (2000) Increased levels of apoptosis in the prefusion neural folds underlie the craniofacial disorder, Treacher Collins syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1473-1480.
 19. Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T.M., Yamada, T. (1992) Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of Homeobox gene *Islet-1* *Science* **256**, 1555-1560.
 20. Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., Briscoe, J. (1997) Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* **90**, 169-180.
 21. Episkopou, V., Maeda, S., Nishiguchi, S., Shimada, K., Gaitanaris, G.A., Gottesman, M.E., Robertson, E.J. (1993) Disruption of transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2375-2379.
 22. Fawcett, D., Pasceri, P., Fraser, R., Colbert, M., Rossant, J., Giguère, V. (1995) Postaxial polydactyly in forelimbs of CRABP-II mutant mice. *Development* **121**, 671-679.

23. Gorry, P., Lufkin, T., Dierich, A., Rochette-Egly, C., Décimo, D., Dollé, P., Mark, M., Durand, B., Chambon, P. (1994) The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9032-9036.
24. Grant, J.H., Maggio-Price, L., Reutebuth, J., Cunningham, M.L. (1997) Retinoic acid exposure of the mouse on embrionic day 9 selectively spares derivatives of the frontnasal neural crest. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* **17**, 1-8.
25. Gresham, H.D., Lowrance, J.H., Caver, T.E., Wilson, B.S., Cheung, A.L., Lindberg, F.P. (2000) Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.* **164**, 3713-22.
26. Grindley, J.C., Davidson, D.R., Hill, R.E. (1995) The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* **121**, 1433-1442.
27. Hardell, L., Holmgren, G., Steen, L., Fredrikson, M., Axelson, O. (1995) *Epidemiol.* **6**, 598-601.
28. Herbert, J., Wilcox, J., Pham, K.T., Freneau, R.T., Zeviani, M., Dwork, A., Soprano, D.A., Makover, A., Goodman, D.S., Zimmerman, E.A., Boberts, J.L., Schon, E.A. (1986) Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. *Neurology* **36**, 900-911.
29. Hirayama, K., Miyaji, K., Kawamura, S., Itoh, K., Takahashi, E., Mitsuoka, T. (1995) Development of intestinal flora of human-flora-associated (HFA) mice in the intestine of their offspring. *Exp. Anim.* **44**, 219-222.
30. Holmgren, G., Bergstöm, S., Drugge, U., Lundgren, E., Nording-Sikstöm, C., Sandgren, O., Steen, L. (1992) Homozygosity for transthyretin-Met30-gene in seven individuals with familisl amyloidosis with polyneuropathy detected by restriction enzyme analysis of amplified genomic DNA sequences. *Clin. Genet.* **41**, 39-41.
31. Holmgren, G., Ericzon, B.G., Groth, C.G., Steen, L., Suhr, O., Andersen, O., Wallin, B.G., Seymour, A., Richardson, S., Hawkins, P.N. (1993) Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* **341**, 1113-1116.
32. Holmgren, G., Costa, P.M.P., Andersson, C., Asplund, K., Steen, L., Beckman, L., Nylander, P.O., Teixeira, A., Saraiva, M.J.M. (1994) Geographical distribution of TTR met30 carriers in northern Sweden: discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. *J. Med. Genet.* **31**, 351-354.
33. Holmgren, G., Ando, Y., Wikstöm, L., Rydh, A., Suhr, O. (1997) Discordant

- symptoms in monozygotic twins with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) (TTR Met30). *Amyloid* 4, 178-180.
34. Holmström H. (1986) Clinical and pathologic features of maxillonasal dysplasia (Binder's syndrome): significance of the prenasal fossa on etiology. *Plast. Reconstr. Surg.* 78, 559-567.
 35. Hovland, D.N.Jr., Machado, A.f., Scott, W.J.Jr., Collins, M.d. (1999) Differential sensitivity of the SWV and C57BL/6 mouse strains to the teratogenic action of single administrations of cadmium given throughout the period of anterior neuropore closure. *Teratology* 60, 13-21.
 36. Itoh, K., Mitsuoka, T., Sudo, K., Suzuki, K. (1983) Comparison of fecal flora of mice based upon different strains and different housing. *Z. Versuchstierk* 25, 135-146.
 37. Itoh, K., and Freter, R. (1989) Control of *Escherichia coli* populations by a combination of indigenous clostridia and lactobacilli in gnotobiotic mice and continuous-flow cultures. *Infect. Immun.* 57, 559-565.
 38. Itoh, K. (1990) Production of standard intestinal flora for experimental animals raised under barrier sustained conditions. *Exp. Anim.* 39, 1-8.
 39. Jacobson, D.R., McFarlin, D.E., Kane, I., Buxbaum, J.N. (1992) Transthyretin Pro55, a variant associated with early-onset, aggressive diffuse amyloidosis with cardiac and neurologic involvement. *Hum. Genet.* 89, 353-356.
 40. Jones, K.L. (1997) Chromosomal abnormality syndromes. In: Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation, 5th ed. W.B.Saunders, Philadelphia, pp. 8-17.
 41. Juriloff, D.M., Sulik, K.K., Roderick, T.H., Hogan, B.K. (1985) Genetic and developmental studies of a new mouse mutation that produces otocephaly. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 5, 121-145.
 42. Kanda, Y., Goodman, D.S., Canfield, R.E., Morgan, F.J. (1974) The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J. Biol. Chem.* 249, 6796-6805.
 43. Kelly, J.W., Colon, W., Lai, Z., Lashuel, H.A., McCulloch, J., McCutchen, S.L., Miroy, G.J., Peterson, S.A. (1997) Transthyretin quaternary and tertiary structural changes facilitate misassembly into amyloid. *Adv. Protein. Chem.* 50, 161-181.
 44. Kleinjan, D.A., Dekker, S., Vaessen, M-J., Grosveld, F. (1997) Regulation of the CRABP-I gene during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 67, 157-169.
 45. Kohno, K., Palha, J.A., Miyakawa, K., Saraiva, M.J.M., Ito, S., Mabuchi, T., Blaner, W.S., Iijima, H., Tsukahara, S., Episkopou, V., Gottesman, M.E., Shimada, K.,

- Takahashi, K., Yamamura, K., Maeda, S. (1997) Analysis of amyloid deposition in a transgenic mouse model of homozygous familial amyloidotic polyneuropathy. *Am. J. Pathol.* 150, 1497-1508.
46. Kola, I., Hertzog, P.J. (1997) Animal models in the study of the biological function of genes on human chromosome 21 and their role in the pathophysiology of Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1713-1727.
 47. Kuchler-Bopp, S., Dietrich, J-B., Zaepfel, M., Delaunoy, J-P. (2000) Receptor-mediated endocytosis of transthyretin by ependymoma cells. *Brain Res.* 870, 185-194.
 48. Larsen, W.J.. (2001) Development of the head and neck. In: Sherman, L.S., Potter, S.S., Scott, W.J., Eds. Human embryology 3rd ed. Pp351-378, Philadelphia, Pennsylvania, Churchill Livingstone.
 49. Lammer, E.J., Chen, D.T., Hoar, R.M., Agnish, N.D., Benke, P.J., Braun, J.T., Curry C.J., Fernhoff, P.M., Grix, A.W., Lott, I.T., Retinoic acid embryopathy. (1985) *N. Engl. J. Med.* 313, 837-841.
 50. Lampron, C., Rochette-Egly, C., Gorry, P., Dollé, P., Mark, M., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P. (1995) Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 121, 539-548.
 51. Lee, S.-H., Fu, K.K., Hui, J.N., Richman, J.M. (2001) Noggin and retinoic acid transform the identity of avian facial prominences. *Nature* 414, 909-912.
 52. Lohnes, D., Mark, M., Mendelshon, C., Dollé, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A., Chambon, P. (1994) Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (I) Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120, 2723-2748.
 53. Loughna, S., Bennett, P., Moore, G. (1995) Molecular analysis of the expression of transthyretin in intestine and liver from trisomy 18 fetuses. *Hum. Genet.* 95, 89-95.
 54. Makover, A., Soprano, D.R., Wyatt, M.L., Goodman, DeW. S. (1989) An in situ hybridization study of the localization of retinol-binding protein and transthyretin messenger RNAs during fetal development in the rat. *Differentiation* 40, 17-25.
 55. McLeod, M.J., Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alucian blue and alizarin red S. *Teratology.* 22, 299-301.
 56. Mita, S., Maeda, S., Shimada, K., Araki, S. (1984) Cloning and sequence analysis of cDNA for human prealbumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 558-564.

57. Mitsuoka, T., Segal, T., Yamamoto, S. (1965) Eine verbesserte Methodik der quantitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. *Zbl Bacteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg I Orig A* 195, 455-469.
58. Mitsuoka, T., Ohno, K., Benno, Y., Suzuki, K., Namba, K. (1976) Die Faecal-flora bei Menschen IV. Mitteilung: Vergleich des neu entwickelten verfahrens mit dem bisherigen üblichen Verfahren zur Darmfloraanalyse. *Zeutralbl Bacterial Parasitenkd Infektionskr Hyg I Orig A* 234, 219-233.
59. Monaco, H.L. (2000) The transthyretin-retinol-binding protein complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482, 65-72.
60. Murakami, T., Yasuda, Y., Mita, S., Maeda, S., Shimada, K., Fujimoto, T., Araki, S. (1987) Prealbumin gene expression during mouse development studied by in situ hybridization. *Cell. Diff.* 22, 1-10.
61. Murakami, T., Garcia, C.A., Reiter, L.T., Lupski, J.R. (1996) Charcot-Marie-Tooth disease and related inherited neuropathies. *Medicine* 75, 233-250.
62. Nagata, Y., Tashiro, F., Yi, S., Murakami, T., Maeda, S., Takahashi, K., Shimada, K., Okamura, H., Yamamura, K. (1995) A 6-Kb upstream region of the human transthyretin gene can direct developmental, tissue-specific, and quantitatively normal expression in transgenic mouse. *J. Biochem.* 117, 169-175.
63. Nakagata, N. (1992) Embryo transfer through the wall of the Fallopian tube in mice. *Exp. Anim.* 41, 387-388.
64. Nakagata, N. (1995) Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. *Exp. Anim.* 44, 1-8.
65. Nakagata, N. (1996) Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab. Anim. Sci.* 46, 236-238.
66. Nakagata, N. (1998) Cryopreservation of mouse embryos and gametes. *J. Kumamoto Med. Soc.* 72, 1-8. (In Japanese)
67. Nakazato, M., Shiomi, K., Miyazato, M., Matsukura, S. (1992) Type I familial amyloidotic polyneuropathy in Japan. *Internal. Med.* 31, 1335-1338.
68. Niwa, H., Yamamura, K., Miyazaki, J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-200.
69. Osumi-Yamashita, N., Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Doi, H., Eto, K., Taniguchi, S. (1990) Expression of retinoic acid receptor genes in neural crest-derived cells during

- mouse facial development. *FEBS* 264, 71-74.
70. Palha, J., Episkopou, V., Maeda, S., Shimada, K., Gottesman, M.E., Saraiva, J.M. (1994) Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null mouse strain. *J. Biol. Chem.* 269, 33135-33139.
 71. Poswillo, D. (1988) The aetiology and pathogenesis of craniofacial deformity. *Development* 103 Suppl., 207-212.
 72. Quintas, A., Saraiva, M.J.M., Brito, R.M.M. (1997) The amyloidogenic potential of transthyretin variants correlates with their tendency to aggregate in solution. *FEBS Lett.* 418, 297-300.
 73. Quintas, A., Saraiva, M.J.M., Brito, R.M.M. (1999) The tetrameric protein transthyretin dissociates to a non-native monomer in solution. *J. Biol. Chem.* 274, 32943-32949.
 74. Quintas, A., Vaz, D.C., Cardoso, I., Saraiva, M.J.M., Brito, R.M.M. (2001) Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *J. Biol. Chem.* 276, 27207-27213.
 75. Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., Davisson, M.T. (1995) A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nature Genet.* 11, 177-184.
 76. Richtsmeier, J.T., Baxter, L.L., Reeves, R.H. (2000) Parallels of craniofacial maldevelopment in Down syndrome and Ts65Dn mice. *Dev. Dyn.* 217, 137-145.
 77. Rothman, K.J., Moore, L.L., Singer, M.R., Nguyen, U.D.T., Mannino, S. & Milunsky, A. (1995) Teratogenicity of high vitamin A intake. *N. Engl. J. Med.* 333, 1369-1373.
 78. Roy-Doray, B., Geraudel, A., Alembik, Y., Stoll, C. (1997) Binder syndrome in a mother and her son. *Genet. Counsel.* 8, 227-233.
 79. Savage, D. (1983) Morphological diversity among members of the gastrointestinal microflora. *Int. Rev. Cytol.* 82, 305-334.
 80. Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H., Wanker, E.E. (1997) Huntington-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90, 549-558.
 81. Schneider, R.A., Hu, D., Rubenstein, J.L.R., Maden, M., Helms, J.A. (2001) Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining FGF8 and SHH. *Development.* 128, 2755-2767.

82. Sekimoto, T., Yoshinobu, K., Yoshida, M., Kuratani, S., Fujimoto, S., Araki, M., Tajima, N., Araki, K., Yamamura, K. (1998) Region-specific expression of murine Hox-genes implies the Hox code-mediated patterning of the digestive tract. *Genes. Cells* **3**, 51-64.
83. Shimada, K., Maeda, S., Murakami, T., Nishiguchi, S., Tashiro, F., Yi, S., Wakasugi, S., Takahashi, K., Yamamura, K. (1989) Transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy. *Mol. Biol. Med.* **6**, 333-343.
84. Slavkin, H.C., Nuckolls, G.H., Shum, L. (1998) Craniofacial development and patterning. In: Tuan, R.S., Lo, C., Eds *Developmental Biology Protocols, Methods in Molecular Biology Series*. Totowa, NJ, Humana Press.
85. Sousa, A., Coelho, T., Barros, J., Sequeiros, J. (1995) Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) –type I in Povoia do Varzim and Vila do Conde (North of Portugal). *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 512-521.
86. Sousa, M.M., Saraiva, M.J. (2001) Internalization of transthyretin. *J. Biol. Chem.* **276**, 14420-14425.
87. Sparkers, R.S., Sasaki, H., Mohandas, T., Yoshioka, K., Klisak, I., Sakaki, Y., Heinzmann, C., Simon, M.I. (1987) Assignment of the prealbumin (PALB) gene (familial amyloidotic polyneuropathy) to human chromosome region 18q11.2-q12.1. *Hum. Genet.* **75**, 151-154.
88. Stone, P.J., Campistol, J.M., Abraham, C.R., Rodgers, O., Shirahama, T., Skinner, M. (1993) Neutrophil proteases associated with amyloid fibrils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 130-136.
89. Stoner, C.M., Gudas, L.J. (1989) Mouse cellular retinoic acid binding protein: cloning, complementary DNA sequence, and messenger RNA expression during the retinoic acid-induced differentiation of F9 wild type and RA-3-10 mutant teratocarcinoma cells. *Can. Res.* **49**, 1497-504.
90. Suhr, O., Danielsson, A., Holmgren, G., Steen, L. (1994) Malnutrition and gastrointestinal dysfunction as prognostic factor for survival in familial amyloidotic polyneuropathy. *J. Internal Med.* **235**, 479-485.
91. Sulik, K.K., Cook, C.S., Webster, W.S. (1988) Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death. *Development* **103** Suppl., 213-232.
92. Sumarsono, S.H., Wilson, T.J., Tymms, M.J., Venter, D.J., Corrick, C.M., Kola, R., Lahoud, M.H., Papas, T.S., Seth, A., Kola, I. (1996) Down's syndrome-like skeletal

- abnormalities in Est2 transgenic mice. *Nature* 379, 534-537.
93. Takaoka, Y., Tashiro, F., Yi, S., Maeda, S., Takahashi, K., Sasaki, Y., Yamamura, K. (1997) Comparison of amyloid deposition in two lines of transgenic mouse that model familial amyloidotic polyneuropathy, type I. *Transgenic Res.* 6, 261-269.
 94. Tawara, S., Nakazato, M., Kangawa, K., Matsuo, H., Araki, S. (1983) Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 880-888.
 95. Terazaki, H., Ando, Y., Suhr, O., Ohlsson, P.I., Obayashi, K., Yamashita, T., Yoshimatsu, S., Suga, M., Uchino, M., Ando, M. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 26-30, 1998.
 96. Urano, T. (1999) Bacterial infectious disease in laboratory animals. *J. Kumamoto Med. Soc.* 73, 1-8. (In Japanese)
 97. Wakasugi, S., Maeda, S., Shimada, K., Nakashima, H., Migita, S. (1985) Structural comparisons between mouse and human prealbumin. *J. Biochem.* 98, 1707-1714.
 98. Wakasugi, S., Inomoto, T., Yi, S., Naito, M., Uehira, M., Iwanaga, T., Maeda, S., Araki, K., Miyazaki, J., Takahashi, K., Shimada, K., Yamamura, K. (1987) A transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc. Japan Acad.* 63, 344-347.
 99. Wakasugi, S., Iwanaga, T., Inomoto, T., Tengan, T., Maeda, S., Uehira, M., Araki, K., Miyazaki, J., Eto, K., Shimada, K., Yamamura, K. (1988) An autosomal dominant mutation of facial development in a transgenic mouse. *Dev. Genet.* 9, 203-212.
 100. Ward, S.J., Chambon, P., Ong, D.E., Bavik, C. (1997) A retinol-binding protein receptor-mediated mechanism for uptake of vitamin A to postimplantation rat embryos. *Biol. Reprod.* 4, 751-755.
 101. Webster, W.S., Johnston, M.C., Lammer, E.J., Sulik, K.K. (1986) Isotretinoin embryopathy and the cranial neural crest: An in vivo and in vitro study. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 6, 211-222.
 102. Wei, S., Episkopou, V., Piantedosi, R., Maeda, S., Shimada, K., Gottesman, M.E., Blaner, W.S. (1995) Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *Biol. Chem.* 270, 866-870.
 103. Westermark, P., Sletten, K., Johansson, B., Cornwell, G.C.3rd. (1990) Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

87, 2843-2845.

104. Weston, W.M., Greene, R.M., Uberti, M., Pisano, M.M. (1994) Ethanol effects on embryonic craniofacial growth and development: implications for study of the fetal alcohol syndrome. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **18**, 177-182.
105. Wilkinson, D.G. (1992) *In situ hybridization: a practical approach*. pp.75-83. Oxford, UK: IRL Press at Oxford university Press.
106. Wilkinson, D.G. (1993) *In situ hybridization*. In: *essential developmental biology: a practical approach*, pp. 257-274. Oxford UK: IRL Press at Oxford university Press.
107. Yamamura, K., Wakasugi, S., Maeda, S., Inomoto, T., Iwanaga, T., Uehira, M., Araki, K., Miyazaki, J., Shimada, K. (1987) Tissue-specific and developmental expression of human transthyretin gene in transgenic mice. *Dev. Genet.* **8**, 195-205.
108. Yamauchi, Y., Abe, K., Mantani, A., Hitoshi, Y., Suzuki, M., Osuzu, F., Kuratani, S., Yamamura, K. (1999) A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice. *Dev. Biol.* **212**, 191-203.
109. Yamazaki, S., Ueda, K., Someya, S. (1981) Non-immunological resistance of mice to infection with a virulent strain of *Mycobacterium bovis*. S. Sasaki (ed.), *Advances in germfree research*. Tokai Univ. Press, Tokyo, pp. 419-423.
110. Zelant, A., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P., Chambon, P. (1989) Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature* **339**, 714-717.
111. 中村浩一郎. (2001) トリプレットリピート病. *最新医学* **56**, 171-179.
112. 西脇伸二. (1997) レチノイドの分子生物学. 武藤泰敏編、*レチノイド・カロテノイド—体内代謝と発癌予防—*. pp95-118、南山堂、東京
113. 光岡知足 (1997) 腸内細菌の形成、推移、分布. 光岡知足編、*腸内細菌学*. pp87-107、朝倉書店、東京.
114. 山村研一 (1993) 遺伝子領域における応用. *マウスからみた分子医学—遺伝子導入と標的組換え—*. pp53-69、南江堂、東京.
115. 山村研一 (1997) 遺伝病の謎への挑戦. *考える遺伝学*. pp151-180、南山堂、東京.