

図1 非アルツハイマー病脳よりの抽出蛋白を用い、抗H因子抗体によりwestern blot法で解析。150kDに相当するバンドを認める。
a-FH: 抗H因子ポリクローナル抗体

及び関連蛋白の遺伝子配列と比較した。

(2) ヒト非アルツハイマー病脳組織の抽出蛋白を抗原として、ヒツジ抗ヒトH因子ポリクローナル抗体を用いてwestern blot法により、H因子及び関連蛋白の発現を解析した。

(3) アルツハイマー病患者から得られた脳脊髄液より、AM34及び抗H因子抗体を用いて免疫沈降させた沈降物を、それぞれ抗H因子抗体とAM34によりwestern blot法で解析した。

結 果

(1) 脳組織よりtotal RNAを抽出してRT-PCRを行い、167bpのバンドを得た。これをゲルより回収後、subcloningして得られた26個のクローンについて、塩基配列を決定してH因子及び関連蛋白の遺伝子配列と比較した。その結果、7クローンがH因子の塩

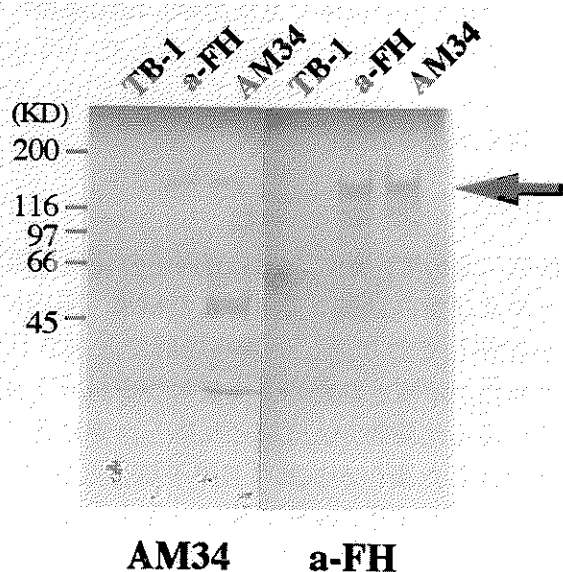


図2 アルツハイマー病患者の脳脊髄液を各種抗体TB-1, a-FH, AM34 (上段) で免疫沈降し、沈降物をAM34或いは抗H因子抗体 (下段) でwestern blotting。コントロール (TB-1) を除いて、150kDのバンドを認める。
TB-1: 抗Aβモノクローナル抗体; a-FH: 抗H因子ポリクローナル抗体

基配列と一致していた。残りのクローンは、8クローンがFHR-2、7クローンがFHR-3と一致していた。また、FHR-3及びFHR-4と良く似た配列であるが、多少異なる配列を示すクローンは2個みられた。以上の結果より、H因子及び関連蛋白のmRNAが脳組織において発現していることが確認された。

(2) 非アルツハイマー病脳からの抽出蛋白について、抗H因子抗体を用いてwestern blot法による解析を行うと、H因子の分子量と一致する150kDのバンドが検出された (図1)。関連蛋白に相当する、より低分子量のバンドはみられなかった。以上のことから、正常脳組織において、H因子が産生されていることが確認された。関連蛋白についてはmRNAの存在が示された。

(3) AD患者の脳脊髄液を用いて、AM34の対応抗原とH因子の関連を検討した。脳脊髄液よりAM34で免疫沈降した沈降物を、抗H因子抗体を用いてwestern blot法で解析すると、150kDのバンドを示

した。また抗H因子抗体で免疫沈降した沈降物についても、AM34と150kDで反応を示した(図2)。以上のことから、AM34がH因子と反応していることが、強く示唆された。

考 察

本研究において、脳におけるH因子の発現を遺伝子レベル及び蛋白レベルで検討した結果、脳内にH因子が存在しており、しかも脳局所で産生されている可能性が示唆された。さらにヒツジ抗ヒトH因子抗体による沈降物がAM34と反応し、逆にAM34で免疫沈降した蛋白が抗ヒトH因子抗体と反応し、しかも両者ともH因子の分子量に一致する150kDの位置に泳動された。このことから、老人斑においてAM34と反応している物質がH因子である可能性が強く示唆された。

従来から老人斑では、補体成分のC1qやC3、C4が検出されると報告されており、アルツハイマー病における神経組織障害に補体のclassical pathwayが関与することが指摘されていた。この機序としては、A β がC1qに直接結合し、以後のclassical pathway活性化に働くことが、*in vitro*の系で示されている⁹⁾。最近、A β がC3に結合してalternative pathwayをも活性化することが示されているが⁷⁾、H因子の存在は、老人斑形成におけるalternative pathwayの関与をさらに支持するものと思われる。

また、H因子が生体内で何らかの修飾を受けることによって、単球遊走因子としての活性を示すことが近年報告されている⁸⁹⁾。これは、H因子が補体を制御して組織に対し保護的に作用するという本来の概念とは逆に、単球を局所に動員活性化して炎症反応や腫瘍免疫を惹起し得る可能性を示唆している。アルツハイマー病においては、ミクログリアの動員活性化を招くことによって、H因子が老人斑形成に深く関与している可能性を想定させ、興味深い。この点については、実際にアルツハイマー病脳組織よりH因子を精製し、活性の検討などを行う必要がある。

以上のように、老人斑におけるH因子の検出は、A β による神経障害機序や老人斑の形成過程などに対して様々な問題を投げかけており、極めて興味深い現象と思われる。今後は *in situ*

hybridization法によってH因子産生細胞を特定し、さらにアルツハイマー病におけるH因子の意義について検討して行く予定である。

結 論

(1) ヒトの脳組織において、補体制御蛋白であるH因子のmRNAが発現しており、蛋白レベルでの存在も確認された。したがって脳組織においてH因子が産生されており、生理的意義を有していると思われる。

(2) 免疫沈降法を用いて検討した結果、AM34が認識している抗原はH因子であると思われる。AM34は老人斑と反応することから、ADの脳組織において、H因子は老人斑と密接に関連して存在しており、その形成機序に何らかの形で関わっている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Yamashita T, Imai K, et al. Detection of novel protein associated with secondary amyloidosis and Alzheimer's disease by monoclonal antibody. *Brain Res* 1988;474: 309-315.
- 2) 太田雅彦、伊東文生、今井浩三. 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. *札幌医誌* 1993;62:175-186.
- 3) Riposhe J, et al. The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem J* 1988;249: 593-602.
- 4) Zipfel PF, et al. Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today* 1994;15: 121-126.
- 5) Skerka C, et al. The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins. *J Biol Chem* 1997;272: 5627-5634.
- 6) Jiang H, et al. β -Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1qA chain. *J Immunol* 1994; 152: 5050-5059.
- 7) Watson MD, et al. Complement interaction with amyloid β 1-42: a nidus for inflammation in AD brains. *Amyloid* 1997; 4 :147-156.
- 8) Ohtsuka H, et al. Thrombin generates monocyte chemotactic activity from complement factor H. *Immunology* 1993; 80: 140-145.

- 9) Nabil K, et al. Identification of human complement factor H as a chemotactic protein for monocytes. *Biochem J* 1997; 326: 377-383.

Relation of Factor H and AM34 antibody which react with amyloid deposits

by

Kohzoh IMAI

Fumio ITOH, Mitsuru YOSHIMOTO, Saho HONDA

from

The First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

We have previously shown that monoclonal antibody AM34, which is reactive with the senile plaques, may recognize the C-terminus of complement factor H. In this study, we investigated the expression of factor H in tissue from human brain and the relation of AM34 antigen and factor H.

RT-PCR was employed for detecting mRNAs coding for factor H and related proteins in normal human brain. Primers were designed to amplify the sequence that is relatively conserved among factor H and related proteins. Amplified DNA fragments were subcloned and analyzed by sequencing. Thus 26 clones were obtained, among which 7 clones were identical to factor H, and others were related proteins and unreported sequences. Western blot analysis of protein extracts from the normal brain tissue with anti-human factor H polyclonal antibody exhibited the 150 kD band, indicating the presence of factor H. The cerebrospinal fluid from an Alzheimer disease (AD) patient was immunoprecipitated with AM34 and anti-factor H antibodies, then analyzed by western blotting with AM34 and anti-factor H antibodies. AM34 was immunoreactive with 150 kD molecule contained in the immunoprecipitates with anti-factor H antibodies, and vice versa. These results suggest that AM34 antigen could be identical to complement factor H.

These experiments demonstrate that factor H is produced and transcribed in the human brain, and that AM34 could recognize factor H. The fact that AM34 was capable of staining senile plaques positively makes it evident that factor H may be associated with senile plaques in Alzheimer disease.

多発性骨髄腫に伴うアミロイドーシスの臨床的検討 - アミロイドーシス合併の危険因子 -

研究者 麻 奥 英 毅* 田 利 晶** 栗 原 寛 治***
藤 原 恵***

はじめに

多発性骨髄腫におけるアミロイドーシス合併の危険因子について臨床的に検討したので報告する。骨髄腫においてアミロイド原性蛋白となりうるM蛋白のtypeによってアミロイドーシス合併の頻度が異なる。つまりBJPtype, λ typeに多いことは良く知られている。しかしM蛋白のtypeのみがアミロイド沈着の要因でないことも又明らかである。最近アミロイドーシスにアポリポ蛋白が関わっていることを示唆する報告が多い。そこで今回脂質代謝異常も含め危険因子を検討した。

対象と方法

対象は多発性骨髄腫患者79例である。アミロイドーシスの確認は胃生検におけるCongo Red陽性物質沈着の有無にて行った。死亡例4例は剖検材料も併せて検討した。アミロイドーシス合併例と非合併例について初診時における年齢, M蛋白のtype, 尿BJPの有無, 臨床病期, 腎障害の有無, 総コレステロール値, トリグリセライド値について比較検討した。

結 果

骨髄腫患者79例中28例 (35%) にアミロイドの沈着を認めた。内アミロイド症 (臨床症状) を有

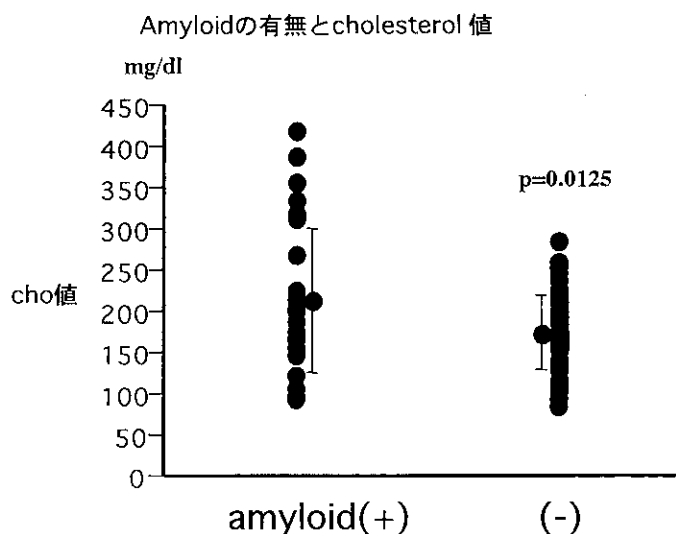
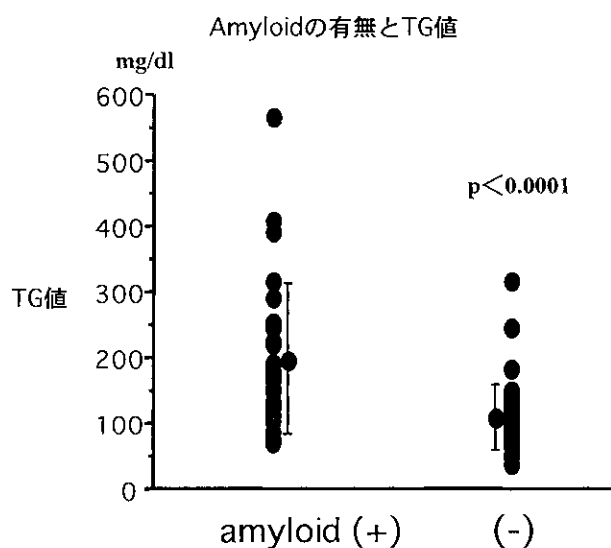


図1

* 広島赤十字・原爆病院第四内科
** 同 第七内科
*** 同 病理部

表1 多発性骨髄腫患者における各因子とアミロイドの有無

	All Pt.	amyloid Pt.	%	p値
	79	28	35.4	
M	42	17	40.5	
F	37	11	29.7	
age	66(46-82)	64(48-82) (amyloid(-)Pt 65)		
IgG	55	16	29.1	} 24/72(33.3) } 0.2087
IgA	14	5	35.7	
IgM	2	2	100	
IgD	1	1	100	
BJP	7	4	57.2	4/7(57.2)
κ	44	12	27.3	} 0.887
λ	35	16	45.7	
stage1	29	6	20.7	} 0.914
stage2	21	9	42.9	
stage3	26	10	38.5	
A	69	20	30	} 0.0092
B	8	6	75	
BJP+	32	13	40.6	} 0.4314
BJP-	38	12	31.6	
TG>149	24	18	75	} 0.0001
TG<150	55	10	18.2	
T.cho>219	18	9	50	} 0.1417
T.cho<220	61	19	31.1	

するものは6例(7.5%)であった。

危険因子の検討(表1)では、高齢者にアミロイド沈着例が多いとはいえなかった。M蛋白のtypeで見ると、従来いわれているようにBJPtype, λtypeに多い傾向を認めたものの有意差はなかった。又尿中BJ蛋白の有無及び臨床病期においても差を認めなかった。有意差を認めたのは腎障害(臨床病期B)の有無及びトリグリセライド値であった。アミロイド沈着例においてトリグリセライド値、総コレステロール値は高い値を取る傾向が認められ、特にトリグリセライド値は有意差を持って高値であった。(図1)

考 案

多発性骨髄腫に合併するアミロイドーシスの頻

度は従来約10%とされているがこれは剖検例を中心に検討されたものである⁹⁾。今回我々は主に胃生検にて検討した結果35%にアミロイドの沈着を認めた。欧米の最近の報告でも皮下脂肪及び骨髄の生検で骨髄腫の38%にアミロイドの沈着をみとめている²⁾。このように骨髄腫患者には従来考えられていた以上にアミロイド沈着例が存在すると考えられる。

骨髄腫患者におけるアミロイドーシス発症の危険因子については、従来よりBJPtype, λtypeにアミロイドーシスが多いとされているが今回の検討では多い傾向を認めたが有意では無かった。有意差を認めたのはトリグリセライド値と腎障害の有無の2つであった。特にトリグリセライド値との関係については今まで報告がなく今回の検討で

明らかになった。多発性骨髄腫に伴う脂質代謝異常は良く知られており、一般的には低脂質血症を来すが高脂血症を来した症例も多く報告されている。高脂血症を来す機序としてM蛋白がリポ蛋白やアポリポ蛋白に対し抗体活性を持つためだと考えられている⁹⁾。今回アミロイド沈着例に高トリグリセライド血症を認めたことからアミロイド原性を有するM蛋白が一方でトリグリセライドを上昇させる原因となっている可能性も考えられた。そこでアミロイド沈着例におけるM蛋白量とトリグリセライド値との相関を検討したが残念ながら相関を認めなかった。しかしこれは骨髄腫においてアミロイド原性を有するのはM蛋白のごく一部であるためとも考えられた。

トリグリセライドは食事やアルコール、又ステロイド投与により大きく影響されるがその点を考慮に入れて尚トリグリセライド高値を認めた場合アミロイドーシスの合併を疑い検査を進めるべきである。

結 論

1. 多発性骨髄腫患者には従来考えられていた以上に多くアミロイドーシスが合併する。
2. トリグリセライド高値、腎障害の存在がアミロイドーシス合併の危険因子と考えられた。

文 献

- 1) 戸川敦、大澤源吾、高久史磨. 我が国の多発性骨髄腫とアミロイドーシス合併多発性骨髄腫 - 最近の動向 -. 日本医事新報 1997;3839:23-26.
- 2) Desikan KR, Dhodapkar MV, Hough A, et al. Incidence and impact of light chain associated (AL) amyloidosis on the prognosis of patients with multiple myeloma treated with autologous transplantation. Leuk Lymph1997;27:315-319.
- 3) Nozaki S, Ito Y, Nakagawa T, et al. Autoimmune hyperlipidemia with Inhibitory monoclonal antibodies against low density lipoprotein binding to fibroblasts in a case multiple myeloma. Intern Med 1997;36(12):920-925.

Clinical investigation on amyloidosis associated with multiple myeloma -Risk factor-

by

Hideki ASAOKU*

Akira TARI**, Kanji KURIHARA***, Megumu FUJIWARA***

From

*Fourth Department of Internal Medicine, Hiroshima Red Cross Hospital & Atomic-bomb Survivors Hospital

**Seventh Department of Internal Medicine, Hiroshima Red Cross Hospital & Atomic-bomb Survivors Hospital

***Division of Pathology, Hiroshima Red Cross Hospital & Atomic-bomb Survivors Hospital

To identify risk factors for amyloidosis, amyloid deposition was investigated using gastric biopsy and autopsy in 79 patients with multiple myeloma and the clinical characteristics were evaluated. Of the 79 patients, 28(35%) were found to be positive for amyloid deposition. Patients with B₂ or λ type myeloma tended to show a high incidence of amyloid deposition, but it was not significant. On the other hand, the incidence of amyloid deposition was significantly high in patients with nephropathy or hypertriglyceridemia ($p < 0.0001$). In conclusion, amyloidosis occurs more often in our series of patients with multiple myeloma than previously reported. Nephropathy and hypertriglyceridemia can be considered risk factors for amyloidosis in multiple myeloma.

ALアミロイドーシス発症に関する骨髓腫細胞の細胞生物学的研究 2. SCID-hIL6 transgenic mouseへの骨髓腫細胞株の移植系の確立

研究者 河野道生 石川秀明 藤井龍一
Maged S. Mahmoud

目 的

ALアミロイドーシスの多くは骨髓腫に随伴するものである。しかしながら、いかなる骨髓腫がアミロイドーシスを惹起するかは明らかでない。昨年度我々は骨髓腫に合併するALアミロイドーシスの発症に、Ig高産生型の成熟骨髓腫細胞^{1,2)}の関与が考えられるか否かを骨髓腫細胞の表面抗原の解析から検討したが、その関与は認められなかった。そこで、ヒト骨髓腫細胞株および骨髓腫患者からの骨髓腫細胞をSCID-hIL6 transgenic mouse^{4,5)}へ移植し増殖できる系を確立し、アミロイド誘発因子等を注射してALアミロイドーシスを惹起するマウスモデルを確立する。これにより、いかなる骨髓腫細胞によりALアミロイドーシスが惹起されるかを明らかにすることができる。本年度はヒト骨髓腫細胞株をSCID-hIL6 transgenic mouseの腹腔内に注射して、*in vivo*で増殖できる系を確立した。

方 法

ヒトIL-6遺伝子を恒常的に発現したSCID mouse, SCID-hIL6 transgenic mouse (中外製薬(株), 創薬研究所より供与) にヒト骨髓腫細胞株KMS-5, U-266, IL-KM3を移植した。骨髓腫細胞株KMS-5はIL-6非依存性増殖細胞株であり、U-266およびIL-KM3はIL-6⁶⁾依存性増殖株である。細胞株の移植経路として、皮下注、静脈内注射あるいは腹腔内注射を行った。注射後経時的に、各臓器(脾臓, 肝臓, 腹

腔内および大腿骨骨髓)から細胞を回収してフローサイトメーター(Epics Elite, Coulter)にて解析した。ヒト骨髓腫細胞株の同定には、抗ヒトCD54, CD56抗体の反応性で行った。更に、腹腔内注射にあたっては、骨髓腫細胞株をMatrigel(CR社)あるいはagarose gelとともに、あるいは予め骨髓ストローマ細胞株KM-102を1週間前に腹腔内注射した後に、マウス腹腔内に注射した。また、マウス体内でのヒト骨髓腫細胞株の生着および増殖を確認する上で、マウス血清中のヒトIgをELISA法で測定した。

結 果

IL-6非依存性で造腫瘍性のKMS-5細胞株は、SCID-hIL6 transgenic mouseの皮下に腫瘍形成可能であり、骨髓にも浸潤が認められた。腹腔内注射にても、腹水内に増殖可能であり骨髓にも浸潤した。しかし、静脈内注射では移植はできなかった。IL-6依存性増殖細胞株U-266, IL-KM3は、皮下注射では腫瘍形成は困難であり、静脈注射にては移植できなかった。腹腔内注射単独では移植は困難であったが、Matrigelあるいはagarose gelとともに腹腔内注射すると移植可能であった。また、KM-102ストローマ細胞株を1週間前に予め腹腔内注射したものでも、移植が可能であった。このように腹腔内注射にて移植可能であったものでは、8週後骨髓への浸潤も観察された(図1)。特に、agarose gelとともに注射した群では、骨髓への浸

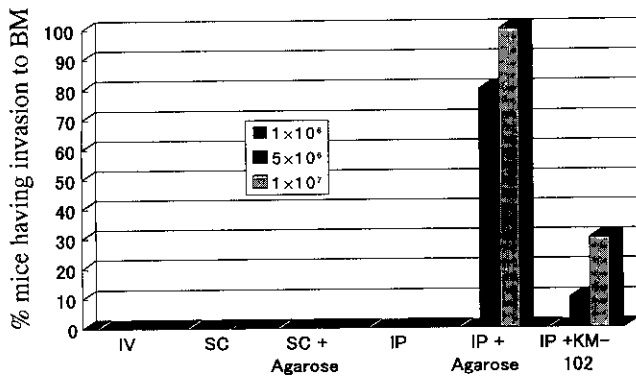


図1 Homing of the myeloma cell line(U-266) to bone marrow
 骨髄腫細胞株U-266(1×10^6 , 5×10^6 あるいは 1×10^7 細胞数)を静脈内(IV), 皮下(SC)あるいは腹腔内(IP)で注射した。場合によっては, agarose gel(Agarose)とともにあるいは予め1週前に骨髄ストローマ細胞株KM-102を注射しておいた。U-266注射後8週に, 大腿骨骨髄から細胞を回収しフローサイトメーターでU-266細胞株の浸潤の有無を解析した。

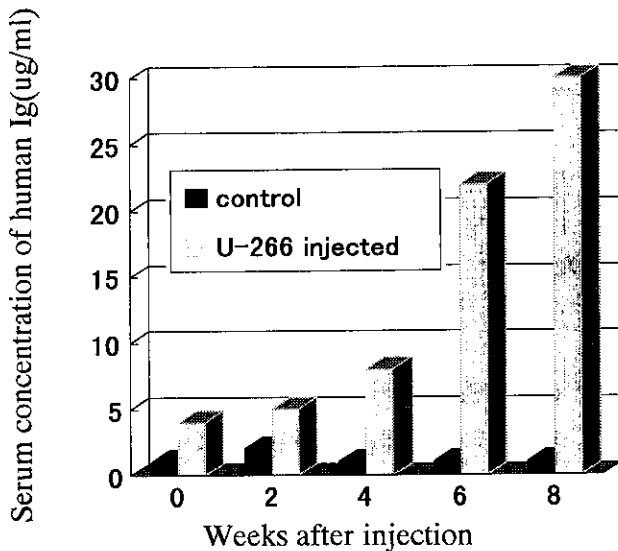


図2 マウス血清中のヒトIg値
 骨髄腫細胞株U-266あるいはPBS(control)を腹腔内注射した後, 経時的にマウスの血清を採取し常法のごとくELISA法にてヒトIgを測定した。

潤が強く認められた。一方, 骨髄腫細胞株U-266の *in vivo*増殖の指標となるマウス血清中のヒトIg値は, 注射後4週目から有意に上昇し8週では顕著であった(図2)。

考 察

ヒト骨髄腫細胞株をSCID-hIL6 transgenic

mouseの腹腔内にagarose gelあるいはMatrigelとともに注射することにより, 腹水内さらにマウス骨髄へ浸潤増殖する系が確立された。注射後約8週で, マウス血清中のヒトIg値も顕著となった。現在, 骨髄腫患者よりの骨髄腫細胞をマウス腹腔内へagarose gelあるいはMatrigelとともに注射して, それらの生存増殖および骨髄への浸潤の程度を検討している。この *in vivo*系の確立により, 今後アミロイド誘発因子等の投与によりアミロイド沈着誘導が起こるか否かを実際の骨髄腫患者の骨髄腫細胞で解析できる。これまで骨髄腫におけるALアミロイドーシス発症には, 大きく3つの機構が考えられてきた。1) 骨髄腫細胞が多量のIgを産生し, それによるIg過負荷による。Igを多く産生する成熟型骨髄腫細胞の関与が考えられる。2) Igの量的な問題ではなく, 質的にアミロイド好性Igを産生する骨髄腫細胞が存在する。3) 骨髄腫発症による免疫学的機能の変異してIg処理がうまくいかない。前年度の研究成果により, 1)の機構は必ずしも必要ではないことが明らかになった。今年度の *in vivo*系の確立により, 2)あるいは3)の可能性を検討できるものと思われる。

文 献

- 1) Harada H, Kawano MM, Huang N, et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993; 81:2658-2663.
- 2) Kawano MM, Huang N, Harada H, et al. Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. *Blood* 1993; 82:564-570.
- 3) Huang N, Kawano MM, Harada H, et al. Heterogeneous expression of a novel MPC-1 antigen on myeloma cells. *Blood* 1993; 82:3721-3729.
- 4) Suematsu S, Masuda T, Aozasa K, et al. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:7547-7551.
- 5) Katsume A, Miyai T, Moriguchi Y, et al. Interleukin-6 overexpression cannot generate serious disorders in severe combined immunodeficiency mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 82: 117-124.
- 6) Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988; 332: 83-85.

Biological Study of Myeloma cells in AL amyloidosis

2. Establishment of *in vivo* system of transplantation of human myeloma cell lines into SCID-hIL6 transgenic mice.

by

Michio M. KAWANO

Hideaki ISHIKAWA, Ryuichi FUJII, Maged S.MAHMOUD

from

Department of Immunohematology, Yamaguchi University School of Medicine

We established *in vivo* system of transplantation of human myeloma cell lines into SCID-hIL6 transgenic mice. Both IL-6-dependent cell line(U-266 and IL-KM3) and IL-6-independent cell line(KMS-5) were implanted intraperitoneally into these mice. Efficiency of transplantation was improved by simultaneous injection of agarose gel or Matrigel. Furthermore, invasion to bone marrow was observed in these mice injected intraperitoneally with agarose gel or Matrigel. Also, these mice injected with myeloma cell lines and agarose gel showed an increase in serum human Ig measured by ELISA method after 4 weeks of injection. Therefore, this *in vivo* system of transplantation of human myeloma cells into SCID-hIL6 transgenic mice will contribute to investigating which myeloma cells could induce the deposition of amyloid *in vivo*.

ALアミロイドーシスにおけるBence-Jones蛋白の解析 および*in vitro* fibrillogenesis

研究者 山田正仁* 窪田哲朗** 袖山信幸*
坂本昌巳* 入岡隆* 原健*
塩尻俊明* 横田隆徳* 大橋健一***
水澤英洋*

目 的

ALアミロイドーシスにおけるアミロイド沈着機構の解明を目的に、ALアミロイドーシス患者の尿中Bence-Jones蛋白(BJP)の解析、精製したBJPを用いた*in vitro*でのアミロイド細線維形成実験を行った。

方 法

全身性ALアミロイドーシス4例(47~68歳, 男性2例/女性2例, A κ 2例/A λ 2例)を対象とした。

患者尿中BJPを抗ヒト κ あるいは λ 鎖抗体-セファロースカラムを用いて精製した。1例では甲状腺に沈着したアミロイドをPrasらの方法¹⁾により水抽出した。

患者尿, 精製BJP, アミロイド抽出液, 患者血清, 正常対照血清を用い, β -メルカプトエタノール付加下の還元状態でSDS-PAGEを行い, さらに抗ヒト κ あるいは λ 鎖特異抗体を用いたWestern blotを行った。また, 患者BJPのglycosylationを検討するために, N-glycosidase Fによる処理後, 同様の検討を行い, さらに各種レクチン(ConA, PNA, DSA, SSA)を用い糖鎖構造を検討した。

精製BJPとアミロイド抽出液の凍結乾燥物をPBSに溶解させ37°Cでインキュベートすることにより, アミロイド細線維の*in vitro*での形成実験を行った。アミロイド細線維の形成は, Congo red反応後の沈渣の偏光顕微鏡下観察, ネガティブ染色による電顕的観察, チオフラビンT反応後の分光蛍光度計による定量(excitation 435 nm, emission 485 nm)によって評価した。

結果及び考察

SDS-PAGE/Western blotによる検討では, 正常血清由来のL鎖と比較して, AL患者のBJPのメインバンドはサイズがより大きい例があった(図1 a)。1例では, 尿中BJPは還元条件のSDS-PAGEでの分子量が約30.5kDaのメインバンドと, さらに抗 κ 特異抗体に反応する多数の約2.5kDa間隔で並ぶラダー状のバンドを伴っており, ラダー状のバンドはカラム精製尿において, より明瞭になった(図1 b)。ラダー状のバンドは尿を長時間放置しても時間経過に関わりなく認められ, 二次的な人工産物ではないと考えられた。

糖鎖構造について検討するためN-glycosidase F処理を行うと, メインバンドは小さくなる傾向があり, BJPがN結合型の糖鎖による修飾を受けていることが示唆された。一方, ラダー状のバンドは影響を受けなかった。しかし, 各種レクチンをプローブとして反応性をみると, ラダー状のバンド

*東京医科歯科大学医学部神経内科

**東京医科歯科大学医学部保健衛生学科

***東京医科歯科大学医学部病理

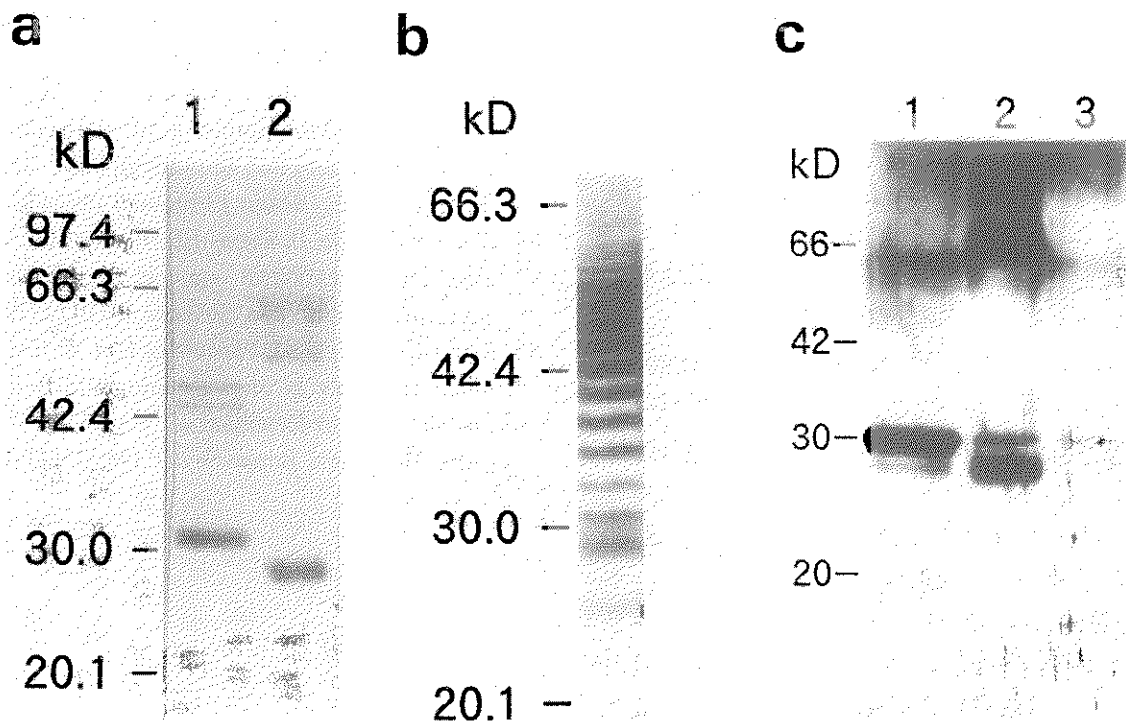


図1. 1a: 患者尿(レーン1)および正常対照血清(レーン2)の抗ヒト κ 鎖抗体によるWestern blot。
 1b: 同患者のカラム精製尿の抗ヒト κ 鎖抗体によるWestern blot。
 1c: 同患者の尿(レーン1), 患者血清(レーン2), 甲状腺アミロイド抽出液(レーン3)の抗ヒト κ 鎖抗体によるWestern blot。

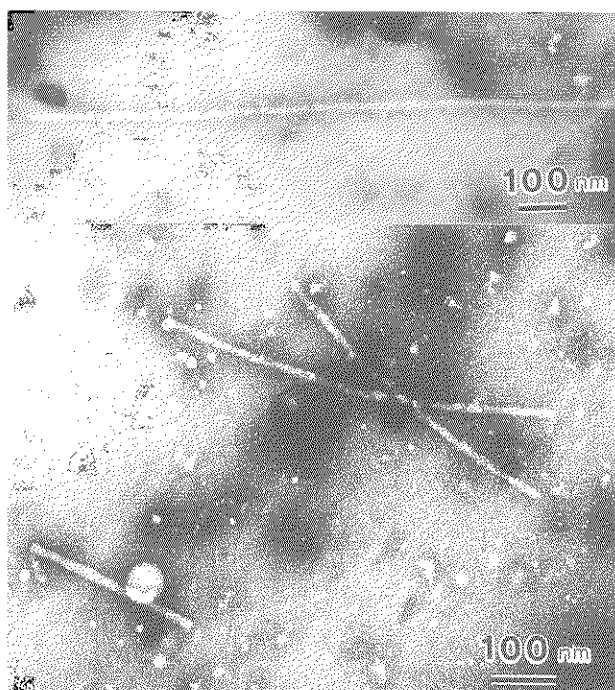


図2. カラム精製BJPによる細線維形成。twisted doublet filamentsを認める。

もDSAおよびSSAと結合し、やはりある種の糖鎖構造を有することが推測された。正常の免疫グロブリンL鎖と比較して、多発性骨髄腫やALアミロイドーシスのBJPが数種類のglycosylationを受けていることがあり²⁾, 更にALアミロイドーシス症例で沈着しているL鎖あるいはその断片もglycosylationを受けている場合があることが報告されている^{3,4)}。骨髄腫にみられる腎障害とBJPのglycosylationの間に関連があることが報告されている²⁾。ある種のglycosylationはBJPの組織へのaffinityに関与し, amyloidogenesisや組織沈着パターンと関連している可能性がある。

BJPのサイズが正常L鎖よりみかけ上大きくなる原因として, SDS-PAGEの条件下でBJPが正常L鎖とは異なる立体構造をとる可能性や, 上述したようなglycosylationが関与している可能性が考えられる。

甲状腺アミロイド抽出液からは尿中BJPのメインバンドと一致するサイズの蛋白が検出され(図1c),

BJPそのものもアミロイドとして沈着している可能性が考えられた。

アミロイド細線維形成実験をBJP精製尿, アミロイド抽出液について行ったところ, アミロイド抽出液のみならず, 精製BJPも, Congo red陽性で緑色偏光を呈し電顕的に細線維構造を有するアミロイドを形成することを観察し(図2), その線維形成過程をチオフラビンTテストで測定し得た。

GlennerらによりBJPのproteolytic cleavageにより, V_L断片を生じ, *in vitro*で細線維形成がおこることが報告されてきた^{3,5)}。一方, Klafkiら⁶⁾はBJPにproteolytic enzymeを付加することなく, βメルカプトエタノール付加の還元状態下におくと, 容易に細線維形成がみられることを報告している。本研究ではBJPをproteolysisにより断片化したり, βメルカプトエタノールによる変性処理などを加えることなしに, BJP自体に細線維形成能があることが示唆された。今後, この細線維形成を加速ないし抑制する因子を詳細に検討することがALアミロイドーシスに対する治療法開発につながるものと考えられる。

結 論

ALアミロイドーシス患者のBJPのWestern blotによる解析では, BJPは正常対照のL鎖と比較して, みかけ上大きな分子量を示しており, その原因としてL鎖分子構造の変化やglycosylationによる修飾の可能性が考えられた。1例の精製尿はBJPのメインバンドに加え, 多数のラダー状のL鎖フラグメントを有していた。

アミロイド抽出物ばかりでなく, 患者BJPは蛋白分解酵素を付加することなくアミロイド細線維を形成した。この*in vitro*の実験系はALアミロイド沈着に関わる因子の解明に有用と考えられる。

文 献

- 1) Pras M, Schubert M, Zucker-Franklin D, et al. The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J Clin Invest* 1968;47:924-933.
- 2) Kagimoto T, Nakakuma H, Hata H, et al. Differential glycosylation of Bence Jones protein and kidney impairment in patients with plasma cell dyscrasia. *J Lab Clin Med* 1997;129:217-223.

- 3) Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. *N Engl J Med* 1980;302:1283-1292.
- 4) Omtvedt LA, Husby G, Cornwell III GG, Kyle RA, Sletten K. The amino acid sequence of the glycosylated amyloid immunoglobulin light chain protein AL MS. *Scand J Immunol* 1997;45:551-556.
- 5) Glenner GG, Ein D, Eanes ED, Bladen HA, Terry W, Page DL. Creation of "amyloid fibrils" from Bence Jones proteins *in vitro*. *Science* 1971;174:712-714.
- 6) Klafki H-W, Pick AI, Pardowitz I, et al. Reduction of disulfide bonds in an amyloidogenic Bence Jones protein leads to formation of "amyloid-like" fibrils *in vitro*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1993;374:1117-1122.

Analysis of Bence Jones protein and *in vitro* fibrillogenesis in AL amyloidosis

by

Masahito YAMADA*

Tetsuro KUBOTA**, Nobuyuki SODEYAMA*, Masami SAKAMOTO*,
Takashi IRIOKA*, Ken HARA*, Toshiaki SHIOJIRI*, Takanori YOKOTA*,
Ken-ichi OHASHI***, Hidehiro MIZUSAWA*

from

*Departments of Neurology, Tokyo Medical and Dental University

**Departments of Allied Health Sciences, Tokyo Medical and Dental University

***Departments of Pathology, Tokyo Medical and Dental University

To elucidate pathomechanisms underlying AL amyloidogenesis, we analyzed Bence-Jones proteins (BJPs) from 4 patients with systemic amyloidosis and observed *in vitro* fibril formation of BJPs. In the Western blot analysis of the urine with anti- κ or λ antibodies, BJPs in the patients appeared larger than those of light chains from normal control sera. The decrease of the molecular size after deglycosylation suggested glycosylation of the BJPs. Furthermore, the urinary BJP from an AL patient showed multiple ladder-like bands in addition to the major band of the BJP- κ at 30.5 kDa. In the experiment of *in vitro* fibrillogenesis, BJPs as well as AL protein purified from the thyroid gland of an AL patient formed the amyloid as demonstrated by Congo red staining, electron microscopy, and thioflavin-T test. The *in vitro* system would be useful for analysis of the factors influencing AL fibrillogenesis.

アミロイド原性L鎖可変領域遺伝子の構築と大腸菌での発現

研究者 篠田 友孝 小池 守 芹川 久美子
K.マウエニエガ 梶 裕之

目 的

アミロイド線維形成の機構はいずれのアミロイド前駆体タンパク質についても未知である。今回、免疫グロブリンL鎖をモデルタンパク質として、その*in vitro*でのアミロイド線維形成の機構を解明するため、まず組換え体L鎖の大量調製系の構築を計画した。モデルL鎖としては、これまでに本研究室で一次構造解析され、天然のタンパク質が入手可能な二つの標品（NIG93とNIG26、共にV κ 3、相同性は75%）を選択した。前者はアミロイド原性で、後者は非アミロイド原性のベンスジョーンズタンパク質（BJP）である。cDNAのクローニングは既に不可能なため、アミロイド原性に深く関与すると考えられる可変領域部分について、化学合成DNAオリゴマーより人工的に遺伝子を構築することにした。この遺伝子を大腸菌で発現させ、大量の組換え体L鎖が精製された後、この線維形成能を*in vitro*で追跡する方法の検討が課題となる。最終的に、NIG93（アミロイド原性）の一部の領域を非アミロイド原性L鎖（NIG26）のアミノ酸配列を参考に、アミノ酸置換変異を導入し、アミロイド原性に深く関わる領域や残基を同定する。

方 法

L鎖可変領域の遺伝子は、NIG93およびNIG26のアミノ酸配列を基に、大腸菌のコドンを使用してデザインした。可能な領域には、相補性決定領域

(CDR)を容易に交換（変異）できるよう便宜的に制限酵素部位を配置した。制限部位を基準にして、可変領域を三つの部分に分け、それぞれを構成するDNA鎖をデザインし、化学合成した。構成オリゴマーはリン酸化した後、アニーリングして二本鎖を形成させ、DNAリガーゼで連結した。これをクローニングベクターに挿入し、塩基配列を確認した。得られた遺伝子断片を連結して、発現ベクターpET22-bの*pelB*シグナル配列下に挿入し、これを大腸菌BL21(DE3)に導入し、LB培地中、37°Cで培養した。増殖の対数中期にIPTGで発現を誘導した。さらに一晚培養した後、菌体および培地を回収し、SDS-ゲル電気泳動で目的タンパク質の発現を確認した。分泌の際、切断された部位を決定する目的で、培養液培地中のタンパク質をTCA沈殿により回収し、同様にSDS-ゲル電気泳動後、PDGFメンブレンフィルターに転写した。CBB染色後、目的のL鎖の分子量に相当するバンドを切り出し、直接アミノ末端配列を決定した。また、逆相HPLCを用いて、培地より組換え体L鎖を精製し、飛行時間型分析計で質量を測定した。

結果及び考察

NIG93可変領域に相当する人工遺伝子は前述の方法で構築した。この遺伝子をベクターpET-22bに挿入し、発現ベクターpET-NIG93Vを作成した。これを用いて大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、LB培地で培養した。対数増殖期中期に0.1mM IPTGで発現誘導後、さらに一晚培養し、菌体内および培地タンパク質をSDS-ゲル電気泳動した。菌体内で

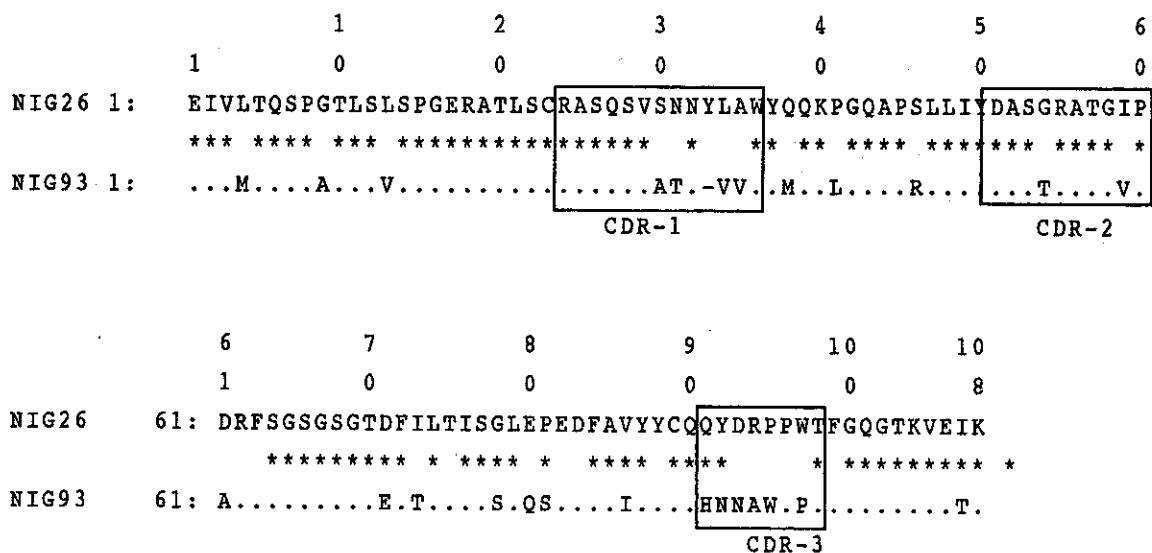


図1 アミロイド原性L鎖NIG93と非アミロイド原性NIG26の可変領域のアミノ酸配列の比較同位アミノ酸を*で示した。また、CDRを四角で囲った。

は14kDaのバンドが誘導に伴って増加し、培地には12kDaのタンパク質が検出された。培地に分泌されたタンパク質を逆相HPLCで精製し、アミノ酸配列分析を行った結果、アミノ末端4残基の配列は目的のアミノ酸配列と一致した。従って、菌体内に蓄積された14kDaのタンパク質はシグナル配列が切除されていない前駆体であると考えられる。次いで、培地画分を逆相HPLCで分離・精製し、12kDaのタンパク質の分子量をMALDI-TOF/MSにより決定したところ、アミノ酸配列から予測される質量と完全に一致し、発現されたNIG93Vはデザインと同じ一次構造を持つと予測される。分泌された発現タンパク質量は1リットル培養あたり30mgであり、可溶性であった。

NIG26の遺伝子は同様の手順で構築し、現在までにN末端部分の前半半分、およびC末端部分(合計で全体の約2/3)の二つの断片の構築が完了し、残りの部分についての構築を継続している。

結 論

アミロイド原性L鎖可変領域(NIG93V)の遺伝子が構築され、組換え体NIG93Vの大量調製が可能となった。発現された組換え体NIG93Vを精製し、まずは*in vitro*での線維形成能の分析法の確

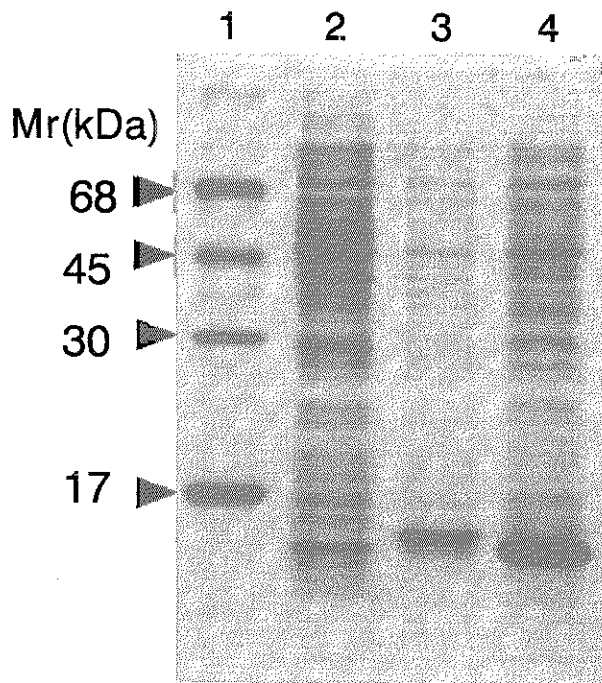


図2 pET-NIG93Vの大腸菌での発現
lane 1: 分子量マーカー
lane 2: 菌体タンパク質 (大腸菌BL21(DE3), 誘導前)
lane 3: 菌体タンパク質 (誘導後)
lane 4: 培地タンパク質 (誘導後)

立が課題となるが、線維形成の機構を追跡する基盤が完成したと考えられる。

非アミロイド原性L鎖NIG26可変領域の遺伝子の構築が部分的に完了しているので、全遺伝子の構築に加え、既に存在する断片をNIG93V遺伝子に置換・導入し、NIG93Vの線維化に関わる領域を狭め、さらに任意の1アミノ酸置換変異を導入することによって、L鎖アミロイド原性に関わる領域や残基の同定が可能となるであろう。

Construction of a Synthetic Gene for Variable- Region of Amyloidogenic Light-chain (AL)
and its Expression in *E.coli*

by

Tomotaka SHINODA

Mamoru KOIKE, Kumiko SERIKAWA, Kuwasi MAWENYEGA, Hiroyuki KAJI

from

Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, Graduate School of Science,
Tokyo Metropolitan University

To obtain a large amount of immunoglobulin light-chain (L-chain) to reveal mechanism on its fibril formation *in vitro*, we constructed an artificial gene for the variable-region of an amyloidogenic L-chain (AL), NIG93V, from chemically synthesized DNA oligomers. The gene was designed according to the amino acid sequence of NIG93 with *E.coli* codon usage. Several restriction sites were disposed for fragment displacement to substitute amino acid residue(s). At first, constituent oligomers were phosphorylated, annealed, and ligated to construct partial gene fragments. Second, the fragments were assembled into the complete gene and then the gene was inserted to downstream of pelB signal sequence of an expression vector pET-22b. *E.coli* BL21(DE3) was transformed with the resultant vector, pET-NIG93V. The gene was expressed in *E.coli* and the expressed protein was secreted to the culture medium. The yeild was about 30 mg / liter cultivation. The recombinant NIG93V showed the same N-terminal amino acid sequence and the identical mass on matrix assisted laser desorption ionization / time of flight - mass spectrometry as respected from the sequence. Introducing mutation(s) to the protein, residue or region responsible for amyloidogenesis might be evident.

In vitro 透析アミロイド (β_2 -m) 線維形成モデルの解析

研究者 下 条 文 武* 山 口 格** 長谷川 一 浩**
橋 本 儀 一*** 内 木 宏 延****

目 的

ヒトアミロイドーシスの病態解明および治療法開発にとって、試験管内アミロイド線維形成の実験系は有用と考えられる。我々は、試験管内で β_2 -ミクログロブリン (β_2 -m) より形成される透析アミロイドーシスのアミロイド線維 (fA β_2 -m) 伸長機構を反応速度論的に解析し、これが一次反応速度論モデルに従うことを示した¹⁾。さらに、2種類の修飾物質 (D-glucoseや3-deoxyglucosone ; 3-DG)²⁾による advanced glycation end products (AGEs) 修飾 β_2 -m のfA β_2 -m 伸長反応への効果も検討した。本試験管内fA β_2 -m 伸長反応系は透析アミロイドーシス患者から抽出したfA β_2 -mおよび腎不全患者尿から精製したネイティブ β_2 -m (n- β_2 -m) を用いており、試験実施には多くの制約が存在する。近年、リコンビナントヒト β_2 -m (r- β_2 -m) が入手可能となった。r- β_2 -m のfA β_2 -m 伸長反応モデルへの利用は試験系の精度および利便性の向上が期待されることから、n- β_2 -mおよびr- β_2 -mを用いたfA β_2 -m 伸長反応の比較検討を実施した。

方 法

fA β_2 -m : 透析アミロイドーシス患者の関節囊胞壁より、Prasらの方法³⁾にて粗抽出後、 $10^5 \times g$ 超遠心、および 50~60% 不連続シヨ糖密度勾配超遠沈により精製した。

β_2 -m : n- β_2 -mは腎不全患者尿からHPLCで精製後⁴⁾、脱塩、凍結乾燥したものを用いた。r- β_2 -mは市販のものを購入し、脱塩、凍結乾燥したものを用いた。

AGEs修飾 β_2 -m : n- β_2 -mを2種類の修飾物質 (D-glucose, 3-DG) とともに37°Cでインキュベートした²⁻⁴⁾。AGEs化は褐色化現象、特異的蛍光 (励起光 370 nm, 蛍光 440 nm) の出現、架橋構造形成の確認により判断した²⁾。

fA β_2 -m定量法^{1,6)} : fA β_2 -mを含み反応溶液を蛍光色素 thioflavine T (ThT)溶液と混合し、励起波長 (455 nm)・蛍光波長 (485 nm), pH 8.5 の条件で分光蛍光光度計にて測定した。

fA β_2 -m伸長反応¹⁾ : 一定量の fA β_2 -m と β_2 -m 単体あるいはAGEs- fA β_2 -mを37°Cでインキュベートし、ThT法による分光蛍光定量法と電子顕微鏡による線維の形態観察によりモニターした。

結果及び考察

1. n- β_2 -m を用いた伸長反応

n- β_2 -mを用いてfA β_2 -mを伸長させた試験系においては、ThT蛍光を指標にした線維伸長はpH 2~3で極大を示し、線維の伸長は酸性領域でみられた。pH 2.5におけるfA β_2 -m伸長反応の経時変化では、反応開始後蛍光はラグタイムなく増加し、やがて平衡に達した。さらに、蛍光極限值から各時間の蛍光量の差の片対数上のプロットは良好な直線性を示した。したがって、fA β_2 -m伸長反応は、一次反応速度論モデルに適合する、つまり既に存在する線維端に単体 β_2 -mが次々に結合することに

*新潟大学医学部第二内科

**福井医科大学医学部臨床検査医学講座

***福井医科大学医学部附属病院検査部

****福井医科大学医学部病理学第二講座