

厚生省 特定疾患対策研究事業

アミロイドーシスに関する研究

平成 11 年度 研究報告書

平成 12 年 3 月

主任研究者 池 田 修 一

目 次

[I] 総括研究報告

主任研究者 池田修一	1
------------------	---

[II] 分担研究報告

1. 慢性関節リウマチ(RA)に合併したAAアミロイドーシスにおける 消化管部位別陽性頻の検討	7
高杉 潔 道後温泉病院リウマチセンター リウマチ科	
2. SAA1 多型と AA-アミロイドーシス	11
馬場 聡 浜松医科大学第二病理	
3. IL-6 シグナル伝達阻害による SAA 発現抑制の細胞内伝達機構の解明	18
吉崎和幸 大阪大学健康体育部健康医学第一部門	
4. アミロイドーシスを合併した慢性関節リウマチ(RA)の長期予後の解析 ー特に免疫抑制薬の有用性に関する検討ー	23
下条文武 新潟大学第二内科	
5. β_2 -Mアミロイド骨関節病変における増殖因子発現細胞	28
下条文武 新潟大学第二内科	
6. 透析アミロイドーシスモデルマウスの作出	31
下条文武 新潟大学第二内科	
7. β_2 -ミクログロブリン関連アミロイド線維(fA β 2M)の中性 pH 反応液における 脱重合反応とアポリポプロテイン E(ApoE)の fA β 2M 安定化作用	33
内木宏延 福井医科大学第二病理	
8. 長期にわたる β_2 ミクログロブリン(β 2MG)吸着療法における骨嚢胞の推移および 吸着療法併用時の Factor D の動態	36
原 茂子 虎の門病院腎センター内科	

9. 透析アミロイドーシスの骨病変に対する etidronate disodium による治療の試み ……	40
–2年後の評価–	
原 茂子	
虎の門病院腎センター内科	
10. 変異導入マウスを用いたアミロイドーシス発症機構の解析 ……	44
–血清アミロイド P 成分の機能解析–	
前田秀一郎	
山梨医科大学第一生化	
11. 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者の心筋アミロイドを構成する トランスサイレチン(TTR)分子種の解析 ……	49
池田修一	
信州大学第三内科	
12. 軽微な末梢神経障害を呈するトランスサイレチン型 FAP ……	53
中里雅光	
宮崎医科大学第三内科	
13. 本邦初の家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の compound heterozygote (FAP ATTR Val30Met/ATTR Arg104His)の一例 ……	56
安東由喜雄	
熊本大学臨床検査医学講座	
14. 遺伝カウンセリングで見いだされた症状の乏しい家族性アミロイドポリ ニューロパチー(FAP)患者に対する肝移植の適応 ……	62
池田修一	
信州大学第三内科	
15. 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP ATTR)患者の肝臓移植後の眼科検診の 必要性について ……	64
安東由喜雄	
熊本大学臨床検査医学講座	
16. AL アミロイドーシス発症に関する骨髄腫細胞の細胞生物学的研究 ……	69
–ヒト骨髄腫細胞の SCID-hIL6 transgenic mice への移植系の確立–	
河野道生	
山口大学寄生体(免疫血液)学講座	
17. AL アミロイドーシスを免疫組織化学的に診断する抗免疫グロブリン L 鎖 抗体の作製および組織切片への適用 ……	72
石原得博	
山口大学第一病理	

18. 多発性骨髄腫に伴うアミロイドーシスの臨床的検討 77 - 血中遊離 L 鎖との関連について - 麻奥英毅 広島赤十字原爆病院第 4 内科	
19. AL アミロイドーシスに対する新しい治療法としての遺伝子治療法の開発 82 今井浩三 札幌医科大学第一内科	
20. AL アミロイドーシスに対する大量デキサメサゾン・ α -インターフェロン療法 ... 86 山田正仁 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学 (現 金沢大学神経内科)	
21. アミロイド蛋白前駆体への変異型プレセニリンの作用に関する研究 92 森 啓 大阪市立大学老年医学研究部門脳神経科学	
22. アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成反応における β ペプチド 1-42 と 1-40 の相互作用 97 内木宏延 福井医科大学第二病理	
23. 脳アミロイド沈着におけるリポ蛋白フリー A β の役割 103 東海林幹夫 群馬大学神経内科	
24. アルツハイマー病(AD)脳におけるアミロイド β 蛋白(A β 42)分子種の 沈着に関する神経病理学的検討 110 玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科	
25. ヒト血小板に含まれるアミロイド β 蛋白(A β)分子種の定量とアポリポ蛋白 E (APOE)-E4 アイソフォームとの相関関係の解析 113 玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科	
26. アミロイドアンギオパチーに起因する多発性脳出血に対する副腎皮質 ステロイド療法の試み 117 池田修一 信州大学第三内科	

27. マウス老化 amyloid 蛋白質 (apoA-II) mRNA の発現 : in situ hybridization 法 による解析	121
樋口京一 信州大学加齢適応研究センター 脈管病態分野	
28. C型 apoA-IIはB型 apoA-IIによるアミロイド線維形成を誘導する	126
樋口京一 信州大学加齢適応研究センター 脈管病態分野	
29. 動脈硬化における Serum Amyloid P Component の役割に関する研究	130
由谷親夫 国立循環器病センター	
30. 精囊アミロイドーシスの免疫組織化学的検討	132
石原得博 山口大学病理学第一講座	
[Ⅲ] アミロイドーシスの全国疫学調査成績	
アミロイドーシスの全国疫学調査成績	137
中川秀昭 ¹⁾ , 森河裕子 ¹⁾ , 三浦克之 ¹⁾ , 石原得博 ²⁾ , 池田修一 ³⁾ , 伊藤祐子 ⁴⁾ , 玉腰暁子 ⁴⁾ , 大野良之 ⁴⁾ , 川村 孝 ⁵⁾ 金沢医科大学公衆衛生 ¹⁾ , 山口大学第一病理 ²⁾ , 信州大学第三内科 ³⁾ , 名古屋大学予防医学 ⁴⁾ , 京都大学保健管理センター ⁵⁾	
[Ⅳ] 業績目録	141
[Ⅴ] ワークショップ, 班会議プログラム	153
[Ⅵ] 班構成員名簿	163

[I] 総括研究報告

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

総括研究報告書

アミロイドーシスに関する研究

主任研究者 池田修 ー 信州大学医学部 教授

分担研究者

今井浩三 (札幌医科大学・教授)
玉岡 晃 (筑波大学臨床医学系・教授)
東海林幹夫 (群馬大学医学部・講師)
下条文武 (新潟大学医学部・教授)
樋口京一 (信州大学医学部加齢適応研究センター・教授)
前田秀一郎 (山梨医科大学・教授)
山田正仁 (金沢大学医学部・教授)
原 茂子 (虎の門病院分院腎センター・部長)
馬場 聡 (浜松医科大学・助教授)
内木宏延 (福井医科大学・教授)
森 啓 (大阪市立大学医学部・教授)
吉崎和幸 (大阪大学健康体育部・教授)
由谷親夫 (国立循環器病センター・部長)
麻奥英毅 (広島赤十字原爆病院・副部長)
石原得博 (山口大学医学部・教授)
河野道生 (山口大学医学部・教授)
高杉 潔 (道後温泉病院リウマチセンター・理事長)
安東由喜雄 (熊本大学医学部・講師)
中里雅光 (宮崎医科大学・講師)

A. 研究目的

アミロイドーシスは臨床症状が多様であり、かつ特徴的な症状に乏しいため一般に早期診断が困難である。また治療の多くは、対症療法のみである。

本研究では種々なアミロイドーシスの発生機序を分子レベルから解明し、有効

な治療法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1) AL アミロイドーシス: アミロイド惹起性の免疫グロブリンを産生する骨髄腫細胞の細胞生物学特性を知るために、免疫不全マウス SCID マウスに遺伝的基盤の異なるヒト骨髄腫細胞株を移植して AL アミロイドーシスの発生の有無を検索する (河野)。日本人患者に対するメルファラン+プレドニン(MP)療法の標準的投与量を設定するために、本年度は研究グループの施設で出来るだけ多くの患者に本治療法を繰り返し試みてその効果、副作用の評価を行う (麻奥、今井、安東、池田、中里、山田)。本疾患の確定診断には生検組織の免疫組織化学的検討が不可欠であるが、AL アミロイドを特異的に認識する抗体は少なく、また入手困難である。精製した AL アミロイドに対する種々な抗体を作成し、特異性の高い抗体を得て一般の施設で容易に入手出来るようにする (石原、由谷)。

2) AA アミロイドーシス: 慢性関節リウマチ患者を対象に内視鏡下の胃十二指腸生検を定期的に行い、早期の本症患者を見出す。これらの患者に対し抗 IL-6 抗体を一定の方式で投与することで、本疾患の進展が阻止可能であるかを検討する (高杉、吉崎)。慢性関節リウマ

チ患者の発病から AA アミロイドーシス発症までの期間と SAA1 遺伝子多型との関連を検索し、日本人における AA アミロイドーシス感受性を分子レベルから明らかにする(馬場)。また実験的 AA アミロイドーシスのマウス系を使用してアミロイドの吸収促進作用のある薬剤を見出す(石原)。

- 3) FAP:国内・国外で肝移植を受けた FAP 患者を一定のプロトコールに沿って定期的に評価する(安東、池田)。変異型のみでなく野性型 transthyretin のアミロイド惹起性を検索する目的で、心障害が顕著な 30Val→Met、30Val→Leu、38 Asp→Ala transthyretin 変異を有する患者の剖検心からアミロイド細線維を抽出可溶化し、これらを mass spectrometry で分析することでアミロイド形成に関与する変異型と野性型 transthyretin の役割を明らかに出来る(池田)。FAP 患者では transthyretin の代謝が低下しており、その意義を明らかにするために本症患者および transgenic mice の肝臓から transthyretin 受容体を精製してその構造を決定する。また本受容体の機能を正常者と比較検討する(中里、前田)。
- 4)透析アミロイドーシス：骨嚢胞の進展抑制を目的に Etidronate disodium を長期投与して、その効果を判定する(原)。分光蛍光定量法により in vitro で $\beta 2$ microglobulin がアミロイド線維伸長反応を引き起こす蛋白濃度を決定する。また $\beta 2$ microglobulin が過剰発現する transgenic mice を作成し、実験的透析アミロイドーシスモデルを作成する(内木、下条)。
- 5)脳アミロイドーシス：ヒトの脳組織、髄液、血液を用いて $A\beta$ の加齢による生理的変動を測定し、 $A\beta$ の生成・代謝過程に対する加齢の影響を明らかにす

る。最終的には弧発性 Alzheimer 病の成因解明を目指す(東海林)。脳実質へ $A\beta$ アミロイドが沈着する transgenic mice 系列を用いて二次的に生じる tau の異常を検索し、髄液中の tau 濃度の測定系を確立する(東海林、森、玉岡)。剖検例、生検例の脳標本を用いて、 $A\beta$ アミロイドの沈着が高度な血管壁への炎症細胞浸潤の程度を細胞病理学的に検索し、脳血管アミロイドーシスの血管破綻機序に対する血管炎の関与を検討する(池田、山田、玉岡)。

- 6)マウス老化アミロイドーシス：本疾患マウスを用いて、アミロイド惹起性の apoA-II の細胞内移動と分泌過程を免疫組織化学的に検索する。また apoA-II の構造変換を招く因子として、apoA-II 結合蛋白、HDL の酸化とそのレセプター、カルバミル化などに注目して検討を続ける(樋口)。

C. 結果 D.考察

a) AL アミロイドーシス

河野らはヒト骨髄腫細胞を SCID-hIL6 transgenic mice へ高率よく移植する条件を明らかにした。麻奥らは多発性骨髄腫患者の血清中に存在する遊離 L 鎖の測定を行い、 λ 型遊離 L 鎖の濃度が高い患者ほど本アミロイドーシスを発症しやすいことを見出した。また今井らはアミロイド原性 L 鎖の DNA の一次構造を決定し、そのアンチセンス鎖を利用することで本疾患の新たな治療法の開発を検討している。山田らは 3 例の AL アミロイドーシス患者に大量デキサメサゾンと α -インターフェロンの併用療法を行い、通常の治療法に抵抗を示す患者では試みる価値があることを報告した。

石原らは本疾患アミロイドを免疫組織化学的に診断しうる抗免疫グロブリン

ン L 鎖抗体の作成を行い、組織切片への適応を検討中である。

b) AA アミロイドーシス

高杉らは RA に合併した AA アミロイドーシスに対する消化管生検の部位別陽性頻度を検討した。その結果、十二指腸第二部 (92.1%)、十二指腸球部 (92.1%)、S 状結腸 (81.6%)、胃前庭部 (78.9%)、直腸 (65.8%) の順でアミロイド沈着を認め、本疾患の早期診断目的では十二指腸の生検が有用であることを報告した。また馬場は SAA1 遺伝子多型と本疾患との関連を検索し、新たな SAA1 遺伝子多型を見出した。吉崎らは IL-6 シグナル伝達阻害による SAA の細胞内伝達機構の解明の一段として、SAA1、SSA2、SSA4 遺伝子に特異的な mRNA の解析法を RT-PCR で確立した。

c) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)

池田らは FAP 患者の剖検心から抽出したアミロイドを化学的に分析して、変異 TTR の種類に係わらず野生型 TTR と変異型 TTR がほぼ等量含まれていることを明らかにした。中里は末梢神経障害が軽微な TTR 型 FAP 患者 2 例を、安東らは本邦初の FAP の compound heterozygote 1 例を報告した。肝移植に関しては池田らが遺伝カウンセリングで発見された FAP 発病早期 2 例の肝移植の適応について、安東らは肝移植を受けた 17 名の本症患者の経過観察の中で 3 名に新たな眼病変が出現したことを報告し、術後の眼科検診の重要性を指摘した。なお今年度は本邦初の脳屍体からの肝移植が FAP 患者に行われ、それに続いて生体肝移植に際し FAP 患者から摘出された肝臓のドミノ移植が 2 例に行われた。本研究班では小委員会を設けて FAP 患者から

摘出された肝臓を利用したドミノ肝移植の指針を作成し、厚生省、日本移植学会を含む関係部署へ報告した。

d) 透析アミロイドーシス

下条らは透析アミロイドーシスのアミロイド沈着病変の周囲に存在する線維芽細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞などが種々のサイトカインを産生していることを見出し、これらが局所の炎症伸展に関与している可能性を指摘した。また本疾患のモデル動物として $\beta 2$ microglobulin を過剰産生するトランスジェニックマウスの作成にも成功したことを報告した。内木らは試験管内アミロイド線維伸長反応系を用いて、酸性領域で重合した $\beta 2$ microglobulin 由来のアミロイド線維が中性領域では脱重合を起すこと、またこの反応はアポリポ蛋白 E の付加で抑制されることを報告した。原らは本症患者に $\beta 2$ microglobulin を選択的に吸着するカラムを長期に使用した結果、骨嚢胞の増大化が防止されることを報告し、また同時に破骨細胞の活性化を押さえる etidronate disodium の投与により本症患者の骨病変の伸展が阻止できることも付け加えた。

e) 脳アミロイドーシス

森らは PC12D 培養細胞を用いて PS1 変異と APP の発現量の関連を検討し、PS1 の発現量が多いものほど APPC 末断片量が増加することを見出し、両者の代謝が相互関連にあるとした。内木らは試験管内アミロイド線維伸長反応系を用いて $A\beta 1-40$ と $A\beta 1-42$ の相互作用を検討した結果、 $A\beta 1-42$ が核の形成を行い、これを基に $A\beta (1-40)$ が重合反応を起していることを確認した。東海林らはアルツハイマー病脳におけるアミロイド沈着に際してリポ蛋白フリーの可溶性 $A\beta$ が重要であるこ

とを指摘した。玉岡らはアルツハイマー病患者脳を検討から $A\beta$ 1-42 が神経細胞内に蓄積していることを示唆する所見を得た。一方、血小板内に含まれる $A\beta$ 1-40 と $A\beta$ 1-42 は健常対照者とアルツハイマー病患者で差がないことを示した。池田らは脳アミロイドアンギオパチーに起因する脳出血の再発予防に副腎皮質ステロイドホルモンが有用である可能性を提唱した。

f) マウス老化アミロイドーシス

樋口らはマウス老化アミロイドーシスのアミロイド前駆蛋白である apoA-II の産生部位を in situ hybridization 法で検索した結果、本蛋白が肝臓に加えて胃、小腸、皮膚の特異細胞でも産生されていることが確認され、これらの組織における早期からのアミロイド沈着と関連があることが示唆された。また non-amyloidogenic B type apoA-II も amyloidogenic C type apoA-II の存在下でアミロイド細線維を形成することを明らかにした。

g) その他のアミロイドーシス

前田らは無 SAP マウスではインターフェロンで誘導される核蛋白質遺伝子の発現が増強しており、血清中の抗核抗体が非常に高値を示すことを報告した。由谷らは SAP が動脈硬化巣内に存在し、本病変の伸展に伴って増加していることを示した。石原らは手術時に得られた 53 例の前立腺材料を検索し、13 例に精囊アミロイドーシスの存在を見出した。これらのアミロイドは免疫組織化学的に精囊で産生される lactoferrin 由来であることが確認された。

中川らは 1998 年度 1 年間のアミロイドーシス疫学像を明らかにするために AL アミロイドーシス、AA アミロイドーシス、透析アミロイドーシスの 3

型を対象に全国疫学調査を行った。その結果全国推計患者数は、AL アミロイドーシスが 510 人、AA アミロイドーシス 1800 人、透析アミロイドーシス 4500 人と推計された。特に透析アミロイドーシスは過去の疫学調査に比べて大幅に増加していた。

h) 今後の問題点としては以下の点が考えられた。

1. アミロイドーシス全体の疫学調査は未だ不完全であり、種々なアミロイドーシスの診断基準を確立して全国の患者動向をより正確に把握すべきである。
2. AL アミロイドーシスでは未だ早期診断が困難であり、相当進行した患者が治療の対象となっているため、その予後が不良である。本疾患の早期診断法の開発が必要である。
3. AA アミロイドーシスの基礎疾患としてはわが国では圧倒的に慢性関節リウマチであるが、SAA 遺伝子多型との関連を含めて AA アミロイドーシスを発症しやすい成因を開明し、可能ならば予防的措置を取れるようにする。
4. FAP では Met30TTR 型以外の病型の病態を検索し、肝移植の適応基準の作成を行う。また心病変が前景に立つ病型では循環器専門医にその存在を十分認識してもらい、早期診断の実施に努める。
5. 透析アミロイドーシスでは現在行われている治療法をさらに確固なものとしていく。
6. 脳アミロイドーシスでは $A\beta$ アミロイドの沈着機序の詳細をさらに開明する。また脳アミロイドアンギオパチーに関連する脳血管障害については脳生検の適応、手技などの検討も行う。

E. 結論

平成 11 年度は AL アミロイドーシス患

者に Dexamethazone 大量投与 + α interferon 療法、AA アミロイドーシス患者に対する cyclosporin 療法の有用性が示された。また FAP では本邦初の脳屍体からの肝移植が本症患者に行われ、それに続いて生体肝移植に際し FAP 患者から摘出された肝臓のドミノ移植が2例に行われた。本研究班では小委員会を設けて FAP 患者から摘出された肝臓を利用したドミノ肝移植の指針を作成し、厚生省、

日本移植学会を含む関係部署へ報告した。さらに脳アミロイドーシスでは患者血中にリポ蛋白から遊離した A β 分子種があり、この前駆蛋白が脳アミロイド形成に重要であること、透析アミロイドーシスでは破骨細胞の活性化を押さえる etidronate disodium の投与により本症患者の骨病変の伸展が阻止できることなどの研究成果があがった。

[Ⅱ] 分担研究報告

厚生省科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

慢性関節リウマチ (RA)に合併した AA アミロイドーシス における消化管部位別陽性頻度の研究

分担研究者 高杉 潔 道後温泉病院理事長
共同研究者 奥田恭章 道後温泉病院内科部長

研究要旨 [目的] RA に合併した AA アミロイドーシスに対する十二指腸生検の有用性を検討。[方法] 1.同時期に GIF と CF を行い、AA アミロイド蛋白の沈着が認められた RA38 例の部位別陽性頻度を調査。2.GIF 生検を行った RA3125 検体のうち AA アミロイド陽性を認めた 498 検体の部位別陽性頻度を調査。[結果及び考察] 1.それぞれの陽性頻度は、十二指腸第二部 92.1%、十二指腸球部 92.1%、S 状結腸 81.6%、胃前庭部 78.9%、直腸 65.8%の順であった。S 状結腸または直腸のいずれかにアミロイド陽性を示したのは 81.6%であるのに対して、十二指腸球部または十二指腸第二部に陽性を認めたのは 100%であった ($p<0.0115$)。2.アミロイド蛋白沈着の程度により高度から中等度沈着例及び軽度沈着例の 2 群に分類した。軽度沈着例の部位別陽性頻度は胃前庭部 48.5%であるのに対して、十二指腸球部 72.5%、十二指腸第二部 72.9%であった ($p<0.0001$)。十二指腸球部または第二部のどちらかにアミロイド蛋白沈着を認めたものに高度から中等度沈着例で 99.5%、軽度沈着例でも 93.9%の高頻度であった。

[結論] RA に合併した AA アミロイドーシスの消化管生検において十二指腸生検がもっとも感度が高く、早期診断に対する有用性も高いと考えられる。

A.研究目的

慢性関節リウマチ(RA)は、AA アミロイドーシスを合併するもっとも代表的な疾患であり、生検診断による検討では約 10%に AA アミロイドーシスを合併する。AA アミロイドーシス合併 RA は、進行例ではその予後はきわめて悪く、早期よりの診断および管理が重要である。消化管は、腎臓とならび AA アミロイドーシスの主な標的器官であり、早期より臨床症状を呈することが多く、AA アミロイドーシスの生検部位としてもっとも適した部位と考えられる。今回、多数例の RA

患者に AA アミロイドーシスに対する消化管生検を行い、陽性例における消化管の生検部位別陽性頻度を調査し、もっとも感度が高い消化管生検部位を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

1.同時期(一週間以内)に上部消化管内視鏡(GIF)と下部消化管内視鏡(CF)を行い、AA アミロイド蛋白の沈着が認められた RA38 例の部位別陽性頻度を調査した。生検は、胃前庭部、十二指腸球部、十二指腸第二部、S 状結腸、直腸の

5カ所を施行した。2.AA アミロイドーシスに対する GIF スクリーニング生検及びフォローアップ生検を行った RA3125 例のうち AA アミロイド陽性を認めた 498 検体の部位別及び沈着程度別陽性頻度を調査した。沈着の程度は、高度から中等度沈着例 N=203、軽度沈着例 N=295 に分け、それぞれの群での部位別陽性頻度を検討した。なお、沈着程度はもっとも沈着が多く認められた部位をもとに分類した。AA アミロイドーシスの診断は生検標本を Congo-red 染色し、偏光顕微鏡下に緑色複屈折性を確認した。さらに陽性例に AA 蛋白に対する免疫組織染色を行い、AA アミロイドーシスであることを確認した。

C. 研究結果

1.それぞれの陽性頻度は、十二指腸第二部 35/38 (92.1%)、十二指腸球部 35/38 (92.1%)、S 状結腸 31/38 (81.6%)、胃前庭部 30/38 (78.9%)、直腸 25/38 (65.8%) の順であった (図 1)。上部消化管生検と下部消化管生検の感度の比較をするために、十二指腸第二部または球部が陽性である頻度と S 状結腸または直腸が陽性である頻度を比較した。S 状結腸または直腸のいずれかにアミロイド陽性を示したのは 31/38 (81.6%)、十二指腸球部または十二指腸第二部に陽性を認めたのは 38/38 (100%) であり、十二指腸において有意に高頻度であった (図 2)。

2.アミロイド蛋白沈着の程度により高度から中等度沈着例 (n=203)及び軽度沈着例 (n=295 例) の 2 群に分類した。高度、中等度沈着例の部位別陽性頻度の結果は、それぞれ、十二指腸球部 94.1%、第二部 93.1%、胃前庭部 75.4%で、十二指腸の 2 カ所は胃前庭部に比べて有為の高頻度であった (図 3)。軽度沈着例の部位別陽性頻度は胃前庭部 143/295

(48.5%)、十二指腸球部 214/295 (72.5%)、十二指腸第二部 215/295 (72.9%) であった。高度、中等度沈着例と同様に、軽度沈着例においても 十二指腸の 2 カ所は胃前庭部に比べて有為の高頻度であった (図 4)。

また、十二指腸球部または第二部のどちらかで陽性を示したものは、高度、中等度沈着例 203 例中 202 例 (99.5%)、軽度沈着例でも 295 例中 277 例 (93.9%) であって、高感度を示すものであった。

D. 考察

アミロイドーシスの消化管部位別の沈着程度の比較は岩下らによる報告がある。彼らの AA のみでなく AL も含めた全身性アミロイドーシスの剖検 22 例での検討では、消化管の粘膜下層において十二指腸、空腸、回腸がもっとも高頻度かつ高度のアミロイドの沈着が認められたと報告している。今回の我々の AA アミロイドーシス合併 RA に対する多数例の生検の結果も同様であり、十二指腸生検の有用性が強く示唆された。今後、RA の日常臨床において、AA アミロイドーシスの早期診断と予後の改善を目標に十二指腸生検が広く行われることが重要と考えられる。

E. 結論

RA に合併する AA アミロイドーシスの生検スクリーニングにおいて十二指腸 2 カ所の生検はもっとも感度が高く、積極的に行うべきと考えられる。

F. 研究発表

1.論文発表

1) 奥田恭章、山田俊幸、高杉潔、武田政寛、難波滋、大西誠、宮本健史、井上靖浩：慢性関節リウマチに合併した二次性アミロイドーシスにおける SAA1,SAA2,

- アポリポ蛋白 E の遺伝多型と疾患感受性の検討 リウマチ 39 : 3-10, 1999
- 2) 奥田恭章、高杉潔 : アミロイドーシス合併 RA の診断と予後 リウマチ科 21 : 460 - 465, 1999
- 3) Takasugi K: Approach to the diagnosis and management of local and systemic complications of rheumatoid arthritis - Special reference to Amyloid A amyloidosis -. Asian Med J 42: 306-313,1999
- 4) Okuda Y, Takasugi K: Diagnostic and prognostic study of secondary amyloidosis complicating rheumatoid arthritis. Amyloid and Amyloidosis. Parthenon Publishing Group, New York : 426 - 428,1998
- 5) 高杉潔 : 慢性関節リウマチにみられる合併症とその対策. 日本医師会雑誌 120 : 1743-1747
- 6) Okuda Y, Takasugi K, Oyama T, Oyama H, Nanba S, Miyamoto T: Intractable diarrhoea associated with secondary amyloidosis in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 56:535-541, 1997
- 2.学会発表
- 1) 奥田恭章、高杉潔、武田政寛、難波滋、大西誠、宮本健史、井上靖浩 : 慢性関節リウマチにおける二次生アミロイドーシスの発症. リウマチ 39:351,1999
- 2) Okuda Y, Takasugi K: Diagnostic and prognostic study of secondary amyloidosis complicating rheumatoid arthritis. International Symposium on Amyloidosis. Mayo Clinic, Rochester Minnesota: 166,1998
- 3) Okuda Y, Takasugi K: Secondary amyloidosis in rheumatoid arthritis - diagnostic and prognostic study of 198 biopsy proven cases. Arthritis Rheum 40: S115, 1997

図1.消化管部位別陽性頻度

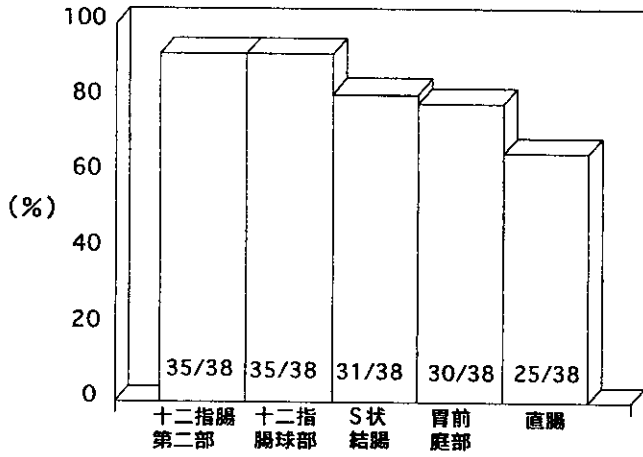


図2.上部消化管生検と下部消化管生検の感度の比較

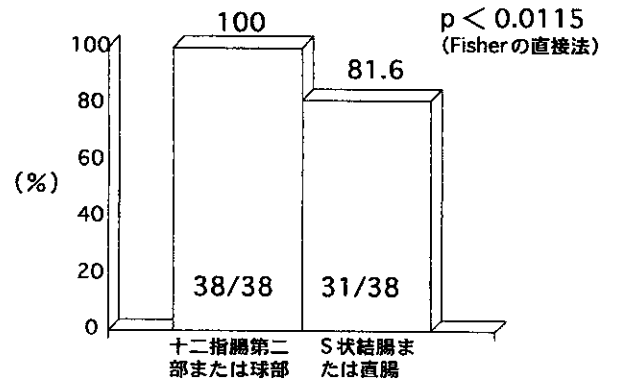


図3.高度から中等度沈着例

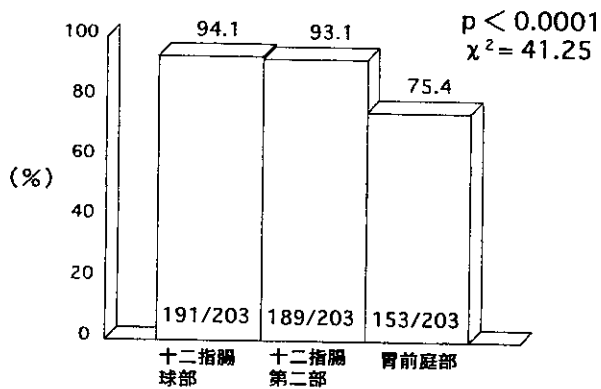
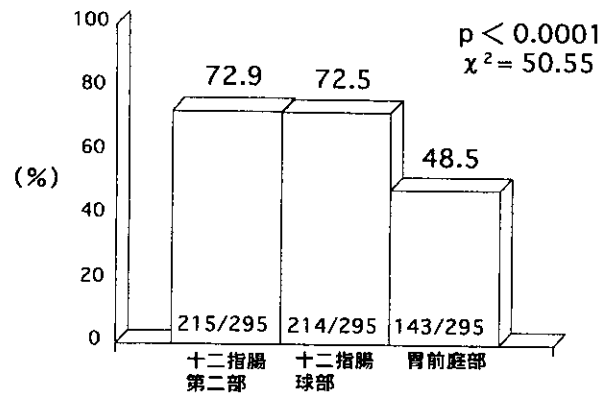


図4.軽度沈着例



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

SAA1 多型と AA-アミロイドーシス

分担研究者 馬場 聡 浜松医科大学医学部病理学第二講座 助教授

研究要旨 血清アミロイド A1 (SAA1) 遺伝子の $\alpha \sim \gamma$ 多型がどのようなメカニズムで AA-アミロイドーシスの発症に関与するのかを解明していくためにいくつかのアプローチを試みた。まず $\alpha \sim \gamma$ 多型にそれぞれ連鎖する新たな多型 (A~G 多型) を SAA1 遺伝子上流領域に見出した。この連鎖は異なる人種集団においても同様にみられた。質量分析計でみる限り A α /G γ ヘテロ患者血中の SAA1 α と SAA1 γ の存在比に差はなく、A~G 多型が SAA1 の発現量/血中レベルに影響している可能性は否定的であった。一方、SAA1 の多型部分に相当する合成デカペプチドは *in vitro* でアミロイド様線維を形成し、蛋白レベルでの多型がアミロイド原性に関する可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) 患者にとって AA-アミロイドーシスを合併するか否かは、その予後を左右する点で重要な問題である。AA-アミロイドーシスの発症に関わる遺伝的要因として我々はこれまでに、SAA1 遺伝子の $\alpha \sim \gamma$ 多型 (図 1 下) が日本人 RA 患者での AA-アミロイドーシス発症と関連し、先に発見した SAA1 γ がその危険因子であること、さらに SAA1 $\alpha \sim \gamma$ の各遺伝子頻度には大きな人種差のあることを報告してきた。しかし、SAA1 多型がどのようなメカニズムで AA-アミロイドーシスの発症と関連するのかについては、現在のところまったく不明である。

このメカニズムとして 2 つの可能性を考えた。1 つは多型と SAA1 の発現量とが関連する場合で、もし SAA1 遺伝子の転写調節領域に $\alpha \sim \gamma$ 多型と連鎖した多型が存在すれば、それが SAA1 発現に影響しているかもしれない。もう 1 つは SAA1 の蛋白レベルでの多型が直

接あるいは間接的にアミロイド原性の程度に関わっている可能性である。そこで今回は、これらの可能性を検討するために SAA 遺伝子上流域の多型解析を行い、また遺伝子型と血中 SAA レベルとの関係を質量分析計で分析した。さらに、SAA1 蛋白の多型部分に潜在的アミロイド原性があるか否かを合成ペプチドで検討した。

B. 研究方法

(1) SAA 遺伝子上流域多型のスクリーニング

SAA の遺伝子型が既知の日本人 DNA について、SAA 遺伝子上流域 (-323 ~ +43) を PCR-SSCP で解析した。PCR プライマーは、forward: 5'-CGGAATTCCTTCACACCTTCCAGCAGC-3', reverse: 5'-CGCGGATCCTCCTCACCTGATCTGTGCTG-3' を用いた。SSCP は 1 本鎖に変性させた増幅 DNA 断片を 5%グリセロールを含むポリアクリルア

ミドゲル (8%T, 2%C) で室温で泳動し、銀染色で検出した。泳動パターンの異なる DNA 断片をクローニングし塩基配列を決定した。

(2) 異なった人種集団での SAA 遺伝子上流域多型の解析

次に、新たに見つかった SAA1 遺伝子上流域の 2 ヶ所の 1 塩基変異の組み合わせによる遺伝子型を、いずれも血縁関係のない日本人 (東京, n = 106), 中国人 (江蘇省, n = 100), スイス人 (n = 160) の DNA サンプルについて, PCR-RFLP 解析で決定した。PCR プライマーは, forward: 5'-

CAGGCACATCTTGTTCCCTC-3',

reverse: 5'-

CTCCTCACCTGATCTGTGCTG-3' を

用い, SAA1 特異的に増幅された DNA 断片を制限酵素 *MnI* と *Bsr* BI でそれぞれ消化し 10% ポリアクリルアミドゲルで泳動後, 銀染色で検出し, 泳動パターンの組み合わせにより遺伝子型を決定した。

(3) 質量分析計による血中 SAA の測定

また, RA 患者血清 (CRP > 5 mg/dl) から抗ヒト SAA 抗体で SAA を免疫沈降し, 質量分析計 (MALDI-TOF/MS) で SAA アイソフォームの存在比を推定した。

(4) SAA 蛋白多型部分の潜在的アミロイド原性の検討

SAA1 蛋白のアミノ酸配列について, コンピューターソフトウェア (DNA Strider™ 1.1) を用いて構造予測を行った。SAA1 蛋白の部分合成ペプチド [SAA12-11: SFFSFLGEAF, 多型なし] および [SAA1 γ 50-59: GGAWAAEAI, 多型部分に相当] を作成し, Westermarckらの方法 (BBRC 182:27, 1992) に準じて, in vitro でアミロイド (様) 線維形成の有無をみた。

C. 研究結果

(1) SAA1 遺伝子上流域には $\alpha \sim \gamma$ 多型と連鎖した多型が存在した。

SAA1 遺伝子型がそれぞれ α , β , γ ホモ接合子 (SAA2 はすべて α ホモ接合子) のゲノム DNA を各 10 サンプルずつ選び, 転写調節領域を PCR-SSCP で解析した。SAA1 の $\alpha \sim \gamma$ 多型に連鎖した 3 種類のバンドパターンが全サンプル共通のバンド (SAA2 α に相当) とともに得られた (not shown)。そこで前者を各々クローニングして塩基配列を調べたところ, (-59C/G) と (-11C/T) の 2 ヶ所の 1 塩基変異の組み合わせによる 3 種のハプロタイプの存在が確認された (図 1 上)。

(2) SAA1 遺伝子上流域の多型には, $\alpha \sim \gamma$ 多型同様に人種差があった。

次に, 日本人, 中国人, およびスイス人の 3 つの人種集団について (-59C/G) は制限酵素 *MnI*, (-11C/T) は *Bsr* BI による PCR-RFLP 解析で遺伝子型を決定した (図 2)。表 1 に各人種集団で観察されたハプロタイプの頻度を示す。スイス人では -59C/-11C (ハプロタイプ A) が最も高頻度で, -59C/-11T (ハプロタイプ G) は極めて稀であった。中国人と日本人ではハプロタイプ G が最も高頻度であった。以上の遺伝子型およびハプロタイプの分布は, 先に報告した各人種集団における $\alpha \sim \gamma$ 多型のそれとよく似ていた。実際に $\alpha \sim \gamma$ 多型と今回の A~G 多型との対応をみると, どの集団においても 90% 以上の SAA1 遺伝子で A は α に, B は β に, そして G は γ に一致したが, 少数の不一致例 (組み換え型) が存在した (表 2)。日本人では G- β ハプロタイプが 16/204 (7.8%) と比較的高頻度であった。

(3) SAA1 多型と血中 SAA レベルとの

間には差がなかった。

SAA アイソフォームの存在比を推定するため、 $A\alpha/G\gamma$ ヘテロ接合体である RA 患者血清から免疫沈降した SAA を MALDI/TOF-MS にかけたところ、SAA1 α と SAA1 γ はほぼ同等のマスピークとして観察された (図 3)。

(4) SAA1 蛋白の多型部分に相当するデカペプチドはアミロイド様線維を形成した。

SAA12-11 と SAA1 γ 50-59 のはともに比較的疎水性が高くかつ β 構造をとりやすいと予想され、実際に 2 つの合成ペプチド はともにアミロイド様線維を形成することが電顕的に観察された (図 4)。また、コンゴ赤結合試験でも吸光スペクトルの長波長側へのシフトがみられた (not shown)。

D. 考察

過去に Betts ら (*Scand J Immunol* 34:471, 1991) が報告した SAA1 β 遺伝子上流の塩基配列は -59C/-11C (ハプロタイプ A) であったが、今回の DNA サンプルでは -59C/-11C (ハプロタイプ A) は SAA1 α に、-59G/-11C (ハプロタイプ B) は SAA1 β に、そして -59C/-11T (ハプロタイプ G) は SAA1 γ にほぼ対応していた。このことは今回調べた 3 つの異なった人種集団において同様であった。

$\alpha\sim\gamma$ 多型と A~G 多型とがよく一致することから、統計学的には A~G 多型も AA-アミロイドーシスと関連し、ハプロタイプ G はその危険因子となる。しかし、今回の変異のうち (-59C/G) は NF- κ B 配列と TATA box との間、(-11C/T) は TATA box と転写開始点との間に位置し、SAA1 遺伝子発現に重要な NF-IL6 配列や NF- κ B 配列には変異はなかった。しかも、 $A\alpha/G\gamma$ ヘテロ

接合体患者血清で SAA1 α と SAA1 γ のマスピークに差がなかったことから、多型が SAA1 の発現量/血中濃度に影響している可能性は低いと考えられたが、今後、より定量性の高い方法で確認する必要があると思われる。

一方、合成デカペプチドを用いた実験では多型部分に相当する SAA1 γ 50-59 がアミロイド様線維を形成しうることがわかった。以前 Westermarck ら (*BBRC* 182:27, 1992) は、SAA12-12、SAA113-23、SAA124-34、SAA135-45 のうち SAA12-12 だけが *in vitro* でアミロイド様線維を作ること示し、それがアミロイド原性を決定しているとしたが、今回の結果からは SAA150-59 もアミロイド原性に直接影響する可能性があると思われる。今後は SAA1 α 50-59、SAA1 β 50-59、SAA1 γ 50-59 の 3 つ、さらに沈着型である AA1 $\alpha\sim\gamma$ や前駆体 SAA1 $\alpha\sim\gamma$ の間でアミロイド原性に違いがあるか否かを検討していく必要がある。

E. 結論

SAA 遺伝子の 5'-上流に新たな多型を見いだしたが、AA-アミロイドーシスとの直接的な関連性は否定的であった。一方、SAA の蛋白レベルでの多型はアミロイド原性に関っている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Baba S, Miyamoto S, Kawashima M, Nakai H, Goto M, Morris BJ, Sawaguchi T, Wang X, Tsugane S, Sugimura H, Shirasawa H, Tsutsui Y: Serum amyloid A gene polymorphism and AA-amyloidosis. In: Kyle RA, Gertz MA (eds). *Amyloid and Amyloidosis 1998*, The Parthenon Publishing