

Group, New York, 1999, pp. 417-419.

2) 馬場 聡, 筒井祥博, 澤口聡子, 王 秀玲, 澤口彰子, Tibor Varga: 血清アミロイド A 遺伝子多型: 人種差および AA-アミロイドーシスとの関連. DNA 多型, Vol. 7: 278-281, 1999.

3) 馬場 聡: 反応性全身性アミロイドーシス. 生体の科学, 50 (5): 457-458, 1999.

4) 馬場 聡, 筒井祥博, 澤口聡子, Patrice D. Mangin: 血清アミロイド A (SAA) 遺伝子転写調節領域の多型. DNA 多型, Vol. 8 (印刷中).

2. 学会発表

1) 馬場 聡: RA アミロイドーシスと

SAA 多型. 第 9 回日本リウマチ学会近畿支部学術集会

2) 馬場 聡, 筒井祥博: AA-アミロイドーシスにおける血清アミロイド A 遺伝子型 (第三報)—剖検例のパラフィン切片からの SAA 遺伝子型解析—. 第 88 回日本病理学会総会 1999 .

3) 馬場 聡, 筒井祥博, 澤口聡子, Patrice D. Mangin: 血清アミロイド A (SAA) 遺伝子転写調節領域の多型. 日本 DNA 多型学会第 8 回学術集会 1999 .

G. 知的所有権の取得状況

なし。

- 表 1 スイス人(n = 160),中国人(Jiangsu,n=100),および日本人(Tokyo,n=102)における SAA1 遺伝子上流域の遺伝子型およびハプロタイプ頻度.
- 表 2 3つの人種集団における SAA1 遺伝子の 5'-上流域多型 (ハプロタイプ A~G)とエクソン 3 多型(ハプロタイプ $\alpha \sim \gamma$)との関係. matched:A- α ,B- β ,G- γ の合計;mismatched:それ以外の組合わせの合計.

表 1

	Swiss		Jiangsu		Tokyo	
	n	f	n	f	n	f
genotype						
AA	69	0.43	15	0.15	8	0.08
AB	62	0.39	10	0.10	12	0.12
AG	5	0.03	29	0.29	38	0.37
BB	23	0.14	1	0.01	4	0.04
BG	1	0.01	21	0.21	24	0.24
GG	0	0.00	24	0.24	16	0.16
haplotype						
A	205	0.64	69	0.35	66	0.32
B	109	0.34	33	0.17	44	0.22
G	6	0.02	98	0.49	94	0.46

表 2

Haplotypes	Swiss		Jiangsu		Tokyo	
	n	%	n	%	n	%
A- α	200	62.5	69	34.5	66	32.4
A- β	5	1.6	0	0.0	0	0.0
A- γ	1	0.3	0	0.0	0	0.0
B- α	15	4.7	0	0.0	0	0.0
B- β	94	15.2	32	16.0	44	21.6
B- γ	0	0.0	1	0.5	0	0.0
G- α	1	0.3	0	0.0	0	0.0
G- β	0	0.0	1	0.5	16	7.8
G- γ	4	1.3	97	48.5	78	39.0
total	320		200		204	
matched	298	93.1	198	99.0	188	92.2
mismatched	22	6.9	2	1.0	16	7.8

- 図 1 SAA1 遺伝子の多型部分の塩基配列.
- 図 2 PCR-RFLP による SAA1 遺伝子の 5'-上流域の遺伝子型タイピング.
- 図 3 MALDI-TOF/MS による血中 SAA1 分析. A α /G γ ヘテロ接合子患者では SAA1 α と SAA1 γ がほぼ同等のマスピークとして検出される (右, SAA1 γ の分子量は SAA1 α よりも 28 小さい). 血中 SAA1 には全長型 (104 a.a.) のほかに N-末端アミノ酸を 1つまたは2つ欠くものも存在し, 各々3つの分子種が検出される.
- 図 4 試験管内で形成されたアミロイド様線維のネガティブ染色による電子顕微鏡像

5'-upstream polymorphism

haplotype A : ... TCTTCCCTCCC⁻⁵⁹ ... CACCGCTCCCT⁻¹¹ ...
 haplotype B : ... TCTTCGCTCCC ... CACCGCTCCCT ...
 haplotype G : ... TCTTCCCTCCC ... CACCGTTCCT ...

exon 3 polymorphism

haplotype α : ... GGGTGTCTGGGCTGCAGAAGCGATCA ...
 haplotype β : ... GGGTGCCTGGGCTGCAGAAGTGATCA ...
 haplotype γ : ... GGGTGCCTGGGCTGCAGAAGCGATCA ...

Val⁵² Ala⁵⁷
 Ala⁵² Val⁵⁷
 Ala⁵² Ala⁵⁷

図 1

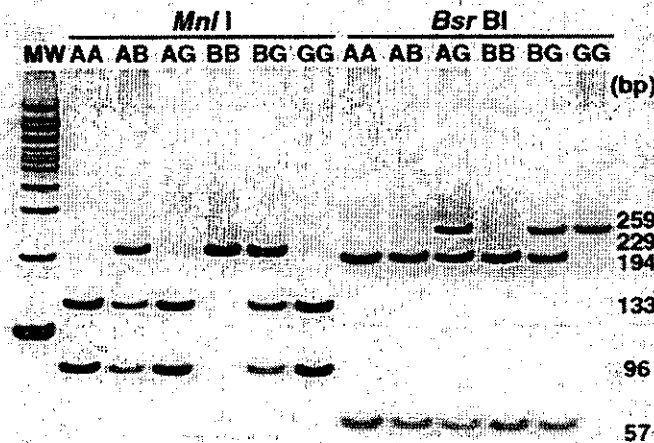


図 2

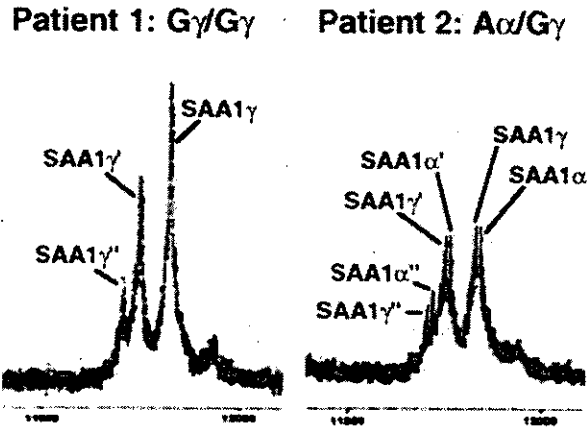


図 3

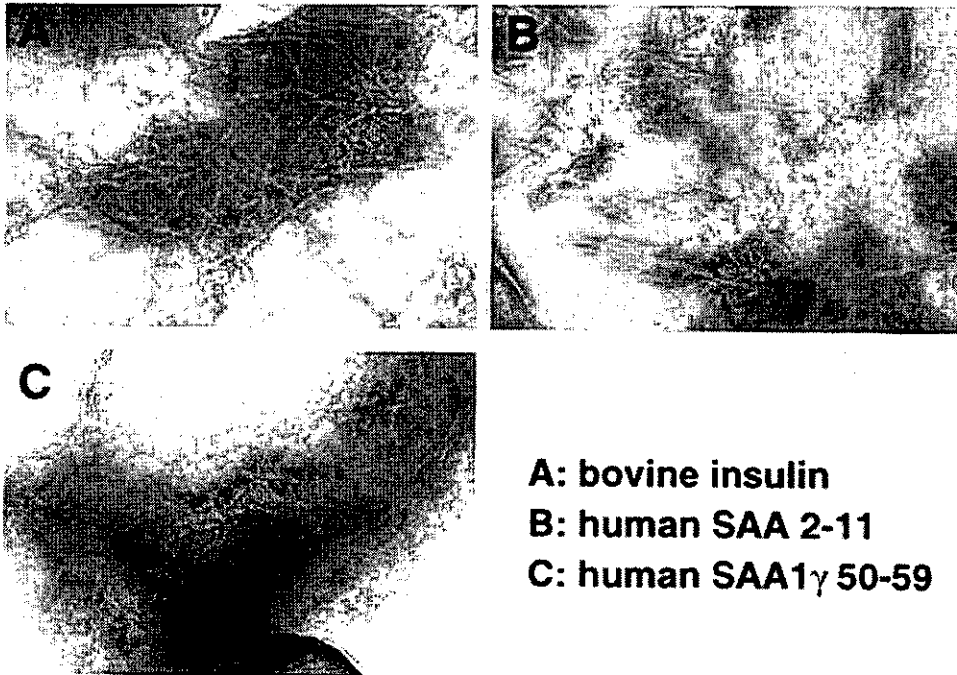


図 4

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

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

分担研究者 吉崎和幸 大阪大学健康体育部健康医学第一部門 教授
共同研究者 西本憲弘、松本智成、中原英子、奥畑聡子
大阪大学健康体育部健康医学第一部門

研究要旨 我々は二次性アミロイドーシスを合併した RA、キャッスルマン病に対してヒト型化抗 IL-6 受容体抗体療法を行なった。その結果、SAA の正常化に加えアミロイドーシスによる消化管症状や腎機能障害などの改善を認めた。これは一度組織に沈着したアミロイドが SAA の正常化に伴い減少または消失する可能性を示唆する。IL-6 シグナル伝達阻害による SAA 産生抑制の機序については、既知の結果から推測されるものの、*in vitro* のみならず *in vivo* においても証明されていない。このため SAA 発現における IL-6 の意義を示し、また AA アミロイドーシスに主に関与する SAA-1 についての発現機序を明らかにすることによって AA アミロイドーシスの発症機序の手がかりを得ると考えられる。

本年は上記目的の第一段階としてプロモーター領域に NF-IL6 RE、NF-kB RE をいずれも有す SAA-1、SAA-2 及び NF-IL6 RE のみを有す SAA-4 の mRNA 発現解析システムの確立と急性期蛋白を産生するヒト肝芽腫細胞由来の HepG2 細胞を用いて IL-6、IL-1 及び TNF- α 刺激におけるこれら SAA の発現を RT-PCR にて検討した。

HepG2 に対するサイトカイン刺激の結果、SAA-1、SAA-2 は無刺激ではほとんど発現が見られなかったが、IL-6、さらに IL-6 に加えて、IL-1 β 添加において発現増強が見られた。一方 SAA-4 は刺激の有無にかかわらず発現されており、刺激を加えても発現の増強は見られなかった。今回 RT-PCR 法を用いて IL-6 刺激による SAA-1 及び SAA-2 のそれぞれに特異的な発現の解析が可能であることを示した。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)に発症する二次性アミロイドーシスは最も重要な合併症の一つであり、腎障害、心機能障害や消化管機能障害を来すことにより生命予後に大きく影響する。RA に合併しやすいアミロイドーシスはアミロイド A (AA)タイプであり、その前駆物質である血清アミロイド A (SAA)の持続性の上昇が発症において重要である。SAA には、SAA1 から SAA4 まで 4 種類の遺伝子が報告されているが、二次性アミロイドーシスの原因蛋

白として SAA1 と SAA2 が報告されており、その中でも SAA1 が特に重要である。SAA2 蛋白産生のメカニズムに関しては、種々の報告があるが、臨床的により重要な SAA1 産生機序については、ラットで報告されているものの、ヒトにおける報告はない。

一方、RA の病態には種々のサイトカインが関与しているといわれている。特に炎症性サイトカインと呼ばれる TNF- α 、IL-1、IL-6 が病態形成に大きく関わる。そして SAA の産生には、IL-6 が関与して

いるが、TNF- α 、IL-1 が IL-6 による SAA 産生効果を相乗的に増強することが報告されている。

我々は二次性アミロイドーシスを合併した RA、キャッスルマン病に対してヒト型化抗 IL-6 受容体抗体療法を行なった。その結果、SAA の正常化に加えアミロイドーシスによる消化管症状や腎機能障害などの改善を認めた。これは一度組織に沈着したアミロイドが SAA の正常化に伴い減少または消失する可能性を示唆する。このことから、我々は RA を含む慢性炎症性疾患に対して抗 IL-6 受容体抗体を投与し SAA の産生を持続的に抑制することによりアミロイドーシスの予防および治療が可能であると考えた。一方、TNF- α 、IL-1 をターゲットにした RA に対する治療法として抗 TNF- α 抗体療法、IL-1ra 療法等があるが、これらの治療法は、CRP、SAA の陰性化は認められない。

IL-6 シグナル伝達阻害による SAA 産生抑制の機序については、既知の結果から推測されるものの、*in vitro* のみならず *in vivo* においても証明されていない。特に IL-6 シグナルが遮断されているだけで IL-1 や TNF- α が依然として高いレベルで存在している時期ですら著明な SAA 産生抑制が生じる機序については不明である。これを解明することによって SAA 発現における IL-6 の意義を示す、また AA アミロイドーシスに主に関与する SAA-1 についての発現機序を明らかにすることによって AA アミロイドーシスの発症機序の手がかりを得ると考えられる。

本年は上記目的の第一段階としてプロモーター領域に NF-IL6 RE、NF- κ B RE をいずれも有す SAA-1、SAA-2 及び NF-IL6 RE のみを有す SAA-4 の mRNA 発現解析システムの確立と急性期蛋白を産生するヒト肝芽腫細胞由来の HepG2 細胞を用いて IL-6、IL-1 及び TNF- α 刺激

におけるこれら SAA の発現を検討した。

B. 研究方法

HepG2 細胞を 10% heat inactivated FCS, 50 units/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin, 2 mM L-glutamin 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)にて培養し、10 cm dish に 80% コンフルエントになった状態の細胞を実験に使用した。サイトカインによる細胞刺激条件は 1) 無刺激 4 時間培養、2) IL-6 (10 ng/ml) 刺激 4 時間培養、3) IL-1 β (10 ng/ml) 刺激 2 時間後 IL-6 (10 ng/ml) を追加刺激し更に 2 時間培養、である。

次に、Trizol をもちいて total mRNA を抽出し、Dnase 処理を行なった後、Random hexamer を用いて逆転写反応を行なった。酵素は Superscript II を用い添付文章の反応条件に従った。作成されたそれぞれの cDNA 1 μ g を template とし SAA-1、SAA-2、そして SAA-4 に対する特異的プライマー(図 1)を用いて下記条件にて SAA 特異的な半定量 RT-PCR を行った。コントロールとして β -actin プライマーを使用した。

PCR 反応条件は、Perkin Elmer Thermal Cycler 2400 を用いて 95 $^{\circ}$ C 10 分間の Denature 後 denature 95 $^{\circ}$ C 1 分間、annealing 61 $^{\circ}$ C 1 分間、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分間、での 40 サイクルの反応を行った。PCR 産物は 2%アガロース電気泳動にて展開し解析を行った。

C. 研究結果

HepG2 に対するサイトカイン刺激の結果、SAA-1、SAA-2 は無刺激ではほとんど発現が見られなかったが、IL-6、さらに IL-6 に加えて、IL-1 β 添加において発現増強が見られた。一方 SAA-4 は刺激の有無にかかわらず発現されており、刺激を

加えても発現の増強は見られなかった(図2)。

D. 考察

今回 RT-PCR 法を用いて IL-6 刺激による SAA-1 及び SAA-2 のそれぞれに特異的な発現の解析が可能であることを示した。SAA-4 の発現については SAA-4 は急性期蛋白ではないが、アミノ酸配列上 SAA-1 や SAA-2 と相同性があり解析対象として検索に加えた。今後本系を用いて IL-6 と IL-1、TNF α 刺激における SAA-1 及び SAA-2 発現機構、続いて抗 IL-6 レセプター抗体を用いた IL-6 阻害による SAA-1、SAA-2 の発現抑制機構を解析する。なお SAA-1、SAA-2 の蛋白レベルでの発現も解析すべきであるが、アミノ酸配列の高相同性より、それぞれに対する特異抗体の作成が困難である。そこで SAA-1 と SAA-2 との混合として SAA 蛋白発現を検討したい。

E. 結論

SAA-1、SAA-2、SAA-4 遺伝子特異的な mRNA 発現の解析法を RT-PCR 法で確立した。HepG2 細胞に IL-6 刺激することによって SAA-1 と SAA-2 の発現増強が認められた。また SAA-4 は恒常的に発現し、IL-6 刺激による発現増強は見られなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasai, M., Y. Saeki, S. Ohshima, K. Nishioka, T. Mima, T. Tanaka, Y. Katada, K. Yoshizaki, M. Suemura, and Kishimoto, T. 1999. Delayed onset and reduced severity of Collagen-Induced Arthritis in Interleukin 6 deficient mice. *Arthritis Rheum.* 42: 1635-1643.
2. Nishimoto, N., Yoshizaki, K., and

Kishimoto, T. 1999. Anticytokine therapy in autoimmune diseases. *Internal Medicine* 38: 178-182.

3. Nishimoto, N., A. Ito, M. Ono, H. Tagoh, T. Matsumoto, T. Tomita, T. Ochi, and Yoshizaki, K. 2000. IL-6 inhibits the proliferation of fibroblastic synovial cells from rheumatoid arthritis patients in the presence of soluble IL-6 receptor. *International Immunology* 12: 187-193.
4. Nishimoto, N., M. Sasai, Y. Shima, M. Nakagawa, T. Matsumoto, T. Shirai, T. Kishimoto, and Yoshizaki, K. 2000. Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood* 95: 56-61.
5. Yamamoto, M., K. Yoshizaki, T. Kishimoto, and Ito, H. 2000(in press). Anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody prevents T-helper 1 cell-mediated murine colitis. *J. Immunol.*
6. Mori, Y., N. Nishimoto, M. Ohno, R. Inagi, P. Dhepakson, K. Amou, T. Hirano, K. Yoshizaki, and Yamanishi, K. 2000(in press). Human Herpesvirus 8-encoded Interleukin-6 homologue (viral IL-6) induces endogenous human IL-6 secretion. *J. Med. Virol.*

2. 学会発表

1. K. Yoshizaki, N. Nishimoto, T. Matsumoto, and T. Kishimoto. RA therapy by the blocking of IL-6 signaling with humanized anti IL-6 receptor antibody. At: Fourth International Synovitis Workshop 1999.05 (USA, Dallas)
2. N. Nishimoto, M. Sasai, Y. Shima, K. Yoshizaki, and T. Kishimoto. Improvement Rheumatoid Arthritis by humanized anti IL-6 receptor antibody.

At: Fifth International Symposium on the Immunotherapy of the Rheumatic Disease. 2000.05.29. (Cyprus)

3. 吉崎和幸、松本智成、橋本 淳、松野博明、富田哲也、超智隆弘、西本憲弘. ヒト型化抗インターロイキン6抗体によるインターロイキン6のシグナル阻害による骨粗鬆症の発症予防と治療法の開発. 日本総合健診医学会大28回大会. 2000.1.27. 埼玉.
4. 合屋将、木田博、森下裕、新井徹、森雅秀、松岡洋人、林清二、吉崎和幸. IL-6/IL-6 receptor double transgenic mouse の肺病変の検討. 日本呼吸器学会総会. 2000.3.22-24. 広島
5. 吉崎和幸、西本憲弘、松本智成. IL-6

シグナル阻害による慢性関節リウマチの治療. 第27回日本臨床免疫学会総会. 1999.10.7 (日本、栃木)

6. K. Yoshizaki, N. Nishimoto, T. Matsumoto. Chronic inflammation in RA and RA therapy blocking cytokine function. 第27回日本リウマチ学会総会. 1999.06.04. (北海道札幌市)

G.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得
なし。
- 2.実用新案登録
なし。
- 3.その他

図 1. SAA mRNA 半定量 RT-PCR 解析用プライマー配列

SAA1 forward: 5'- CAGACAAATACTTCCATGCT -3'

Reverse: 5'- ATTGTGTACCCTCTCCCC -3'

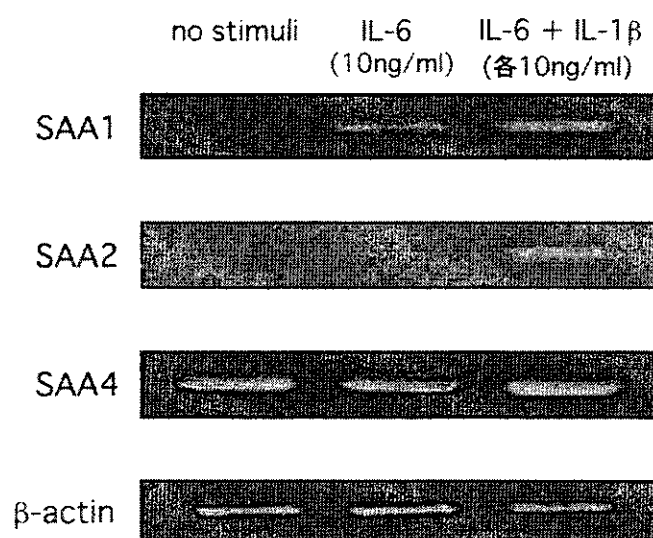
SAA2 forward: 5'- CAGACAAATACTTCCATGCT -3'

Reverse: 5'- ATTATATGCCATATCTCAGC -3'

SAA4 forward: 5'- CCAGTGAAAGCTGGCGTTCG -3'

Reverse: 5'- GAGAAGTGTGTGGCTCACAGCC-3'

図2. HepG2細胞におけるSAA1、SAA2及びSAA4 mRNAの発現



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

アミロイドーシスを合併した慢性関節リウマチの長期予後の解析 -特に免疫抑制薬の有用性に関する検討-

分担研究者 下条文武 新潟大学第二内科 教授
共同研究者 中野正明、長谷川尚、伊藤 聡 新潟大学第二内科

研究要旨 アミロイドーシス(AM)関連の症状を呈した入院症例の 5 年生存率は約 50%、10 年生存率は約 10%と予後不良の結果であった。特に予後不良な急速に進行する症例は、AM 診断時血清クレアチニン(Cr)が既にかなり高値であり、急速進行例の防止には AM の早期診断が重要と思われた。免疫抑制薬の使用などによる治療の強化が腎障害の進行を抑制し、予後の改善にもつながる可能性が示唆された。しかし、治療強化例は AM 診断時の年齢が若く、腎機能障害も軽度であり、これらの治療法の有用性を明確にするには、prospective な検討が必要と思われた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)は反応性 AA アミロイドーシスの基礎疾患として、近年、重要性が高まっている。今回、アミロイドーシス(AM)を合併した RA の長期予後における免疫抑制薬の有用性を中心に検討したので報告する。

B. 対象・方法

対象は、1981 年以後 AM 関連の症状・所見を呈し、組織学的に AM が確認された当科入院の 49 例であり、性別は男性 8 例、女性 41 例であった。AM 合併診断時の平均年齢は 61 歳、平均罹病期間は 15.6 年、平均血清クレアチニン(Cr)は 1.5mg/dl であった。1998 年 10 月までの臨床経過と予後の解析を行った。

対象症例は、臨床経過や AM 診断後の治療により、急速進行群、治療強化群、治療不変群の三群に分けて比較した。急速進行群とは AM 診断から 6 ヶ月以内に透析

導入あるいは死に至った 13 例である。治療強化群とは、AM 診断後 6 カ月以上観察可能で、免疫抑制薬の併用などで治療が強化された 19 例である。治療不変群は、それら以外の 16 例である。なお、1 例はこれらのどの群にも該当しなかった。

治療強化群の基本となる治療内容は、cyclophosphamide(CY)は 50mg/日を基本とした。ステロイドは prednisolone (PSL)換算で経口 5~20mg/day、静注では 20~30mg/day を上限に開始や増量を行った。下痢に対しては、中心静脈栄養を考慮した。CY は抗リウマチ薬としての効果やステロイドの節約効果、amyloidogenesis に対する抑制作用などを期待して使用した。ステロイドは速効性で確実な抗炎症効果を期待し、CRP や SAA の陰性化を目標に適宜増減した。

C. 結果

対象 49 例の全体像は、28 例が AM 診

断後平均 26.2 ヲ月で透析に導入され、この内 23 例は既に死亡し、死亡群の透析期間は最長 64 ヲ月であった。5 例が生存し維持透析中であったが、その平均透析期間は 32.8 ヲ月であった。一方、残る 21 例は透析に至らずに平均 38.1 ヲ月後死亡した 11 例と、最終時点で生存していた 10 例である。透析導入 28 例の導入時血清 Cr は平均 5.4mg/dl で、5.0 未満の低値例が半数を占め、3mg/dl 未満も 6 例認めた。血清 Cr が低値ながら、心不全などで透析導入となる症例が多い結果であった。AM 診断から透析導入までの期間と、維持透析期間の関係をみると、AM 診断後比較的急速に末期腎不全に至った症例は、長期の維持透析例は少なく、合併診断後比較的ゆっくりと末期腎不全に至った症例では、長期の維持透析例が多い結果であった。従って、腎障害の進行速度が透析導入後の経過とも密接に関連すると思われた。

Kaplan-Meier 法により AM 診断から透析導入を end point とした予後をみると、50% 生存率が約 40 ヲ月、25% 生存率が約 110 ヲ月であり、腎機能障害が進行性であった。生命予後についても、50% 生存率が約 54 ヲ月、10 年生存率が約 10% ときわめて不良であった。透析導入 28 例を対象に生命予後をみると、50% 生存率が 6 ヲ月程度、25% 生存率が約 49 ヲ月で、きわめて予後不良であった。透析導入後早期の死亡例が多いが、これらの多くは腎障害が進行した段階で AM 合併が判明しており、その後短期間で透析に導入され、透析維持も困難な症例であった。一方、透析導入例を導入時の年齢で 66 歳未満と 66 歳以上に分けて比較した結果、高齢群の生命予後はきわめて不良であった。66 歳未満群は導入直後の死亡は多いものの、その後は比較的良好的な経過であり、二群間に有意差を認めた。

対象を三群に分けて臨床所見や転帰を

比較した結果では、急速進行群は AM 診断時の Cr が最も高い値であった。治療強化群には 1990 年代の症例が多い傾向であった。また、治療強化群は他の二群に比べて透析導入例や死亡例の割合が少ない傾向であった。なお、AM 診断時の年齢は治療強化群で他の群に比べて若く、血清 Cr も他の群に比べて低い値であった(表 1)。

図 1 は治療強化群の一例の臨床経過である。1980 年に RA が発症し、他院で注射金剤やメトトレキサートなどで治療された。91 年頃に頑固な下痢が出現し、大腸生検で AM の合併が確認され、関連施設で PSL10mg や CY50mg などで治療された。その後、尿蛋白が出現し腎機能障害も加わったが、96 年頃より CRP の陰性化が得られてからは、腎機能障害の進行が抑制され、尿蛋白量も減少傾向で経過している。図 2 も治療強化例の臨床経過である。1975 年の RA 発症で、約 7 年後に腎生検で AM 合併が判明した。当初、ネフローゼ症候群に近い多量の尿蛋白を認めたが、CY の開始や PSL の増量により、尿蛋白はほぼ消失するまでに減少し、腎機能も良好に維持された。なお、この症例はこのあと 6 年程経過した 92 年に透析に導入された。

AM 診断から透析導入あるいは最終観察まで 6 ヲ月以上観察できた 35 症例の腎機能の悪化速度を血清 Cr の年間上昇速度でみると、治療不変群では血清 Cr が年間で平均 1.6mg/dl 上昇したのに対して、有意差はないものの、治療強化群では年間 1.0mg/dl の上昇に押さえられていた。AM の診断が 1980 年代の 13 例と 90 年代の 22 例に分けて比較した結果では、最近の症例で治療強化例が多いこともあり、1980 年代(年間平均 2.2mg/dl 上昇)に比べて 90 年代の症例(年間平均 0.8mg/dl 上昇)で有意に腎機能の悪化速度が緩やかであった($p < 0.05$)。

図 3 は、消化器症状に対して治療を強化

した前後で、胃粘膜生検を 4~11 ヶ月の間隔で経時的に行い、アミロイド沈着の程度を、半定量的に評価した 4 症例の結果である。全例でアミロイド沈着が減少しており、沈着消失例も 2 例認めた。これらの治療の有効性が組織学的にも裏付けられた。治療不変群と治療強化群の、AM 診断から透析導入を end point とした比較では、治療強化群で透析導入までの期間が延長する傾向にあり、比較的良好な経過が得られた。同様に、生命予後に関しても治療強化群で生存期間の延長傾向を認めた。

D. 考案

続発性 AM の予後に関しては、5 年生存率が 25%、3 年生存率が 40%など、予後不良の成績が報告されている。透析導入後の予後に関しては、Ylinen らが 3 年生存率が 37%と導入後の予後も不良であることを報告しており、AM が全身性疾患であり心不全などを高頻度にきたすためと考えられる。奥田らは AM 診断時期で 1980 年代と 90 年代の症例に分け、最近生存率が向上していると報告しているが、両群で AM 関連の症状を認める頻度に差があり、単純には比較できないと思われる。また、Kobayashi らは、上部消化管生検での沈着アミロイドを半定量的に評価し、沈着が高度の群では軽度の群に比べて有意に予後不良との成績を報告している。従って、沈着アミロイドの定量的評価も予後を推測するうえで重要と思われる。

治療薬物との関連では、Berglund らは、免疫抑制薬使用群での良好な生命予後を報告しており、Ahlman らも、AM 合併 RA の 5 年生存率が、免疫抑制薬併用群で 89%、非併用群で 27%と併用の有無で有意に異なると報告している。今回の我々の成績も、これに類似した結果と思われる。従って、免疫抑制薬を含めた薬物療法の強化が AM 合併 RA の予後の改善に重要と思われ

る。

E. 結論

AM 関連の症状を呈した入院 RA 症例では、5 年生存率が約 50%、10 年生存率が約 10%ときわめて予後不良であった。特に予後不良な急速進行例は AM 診断時血清 Cr が既にかなり高値であり、急速進行例の防止には AM の早期診断が重要と思われる。免疫抑制薬の使用などによる治療の強化が腎障害の進行を抑制し予後を改善する可能性が示唆された。上部消化管の経時的組織評価の結果は、これらの治療法が沈着アミロイド量の減少にもつながる可能性を示した。しかし、治療強化例は AM 診断時の年齢が若く、腎機能障害も軽度であり、これらの治療法の有用性を明確にするには、prospective な検討が必要と思われた。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Nakano M. et al. Analysis of renal pathology and drug history in 158 Japanese patients with rheumatoid arthritis. Clin Nephrol 50: 154, 1998
- 2) Nakano M. et al. Determination of IgA- and IgM-rheumatoid factors in patients with rheumatoid arthritis with and without nephropathy. Ann Rheum Dis 55: 520, 1996
- 3) 中野正明、他. 生検診断によるアミロイドーシス合併慢性関節リウマチの臨床的検討. リウマチ 29: 251, 1989
- 4) 中野正明、他. 慢性関節リウマチにおける続発性アミロイドーシス. 臨床リウマチ 9: 218, 1997
- 5) 中野正明、他. RA に合併した疾患の把握と治療. リウマチ科 12: 239, 1994
- 6) 中野正明、他. RA アミロイドーシスの腎障害. リウマチ科 21: 451, 1999

表1. 三群の臨床所見・転帰の比較
(観察6カ月未満の1例を除く)

	1)急速進行群 (n=13)	2)治療不変群 (n=16)	3)治療強化群 (n=19)
AM診断時平均年齢(歳)	64.8	64.6	54.7
平均罹病期間(年)	19.5	13.5	13.7
AM診断時平均Cr値(mg/dl)	2.2	1.5	1.0
AM診断時期			
1980年代/90年代	5/8	7/9	6/13
HD導入例(%)	10(77)	10(63)	8(42)
死亡例(%)	11(85)	12(75)	11(58)

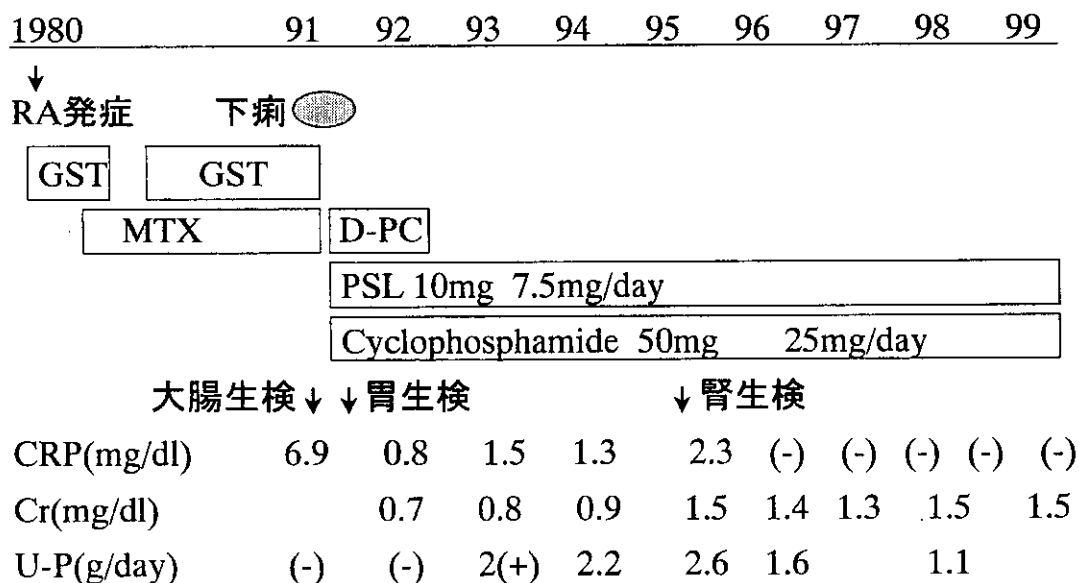


図1. 症例:伊○政○殿、1940年生、男性

	1982	83	84	85	86
	2.5mg		PSL 10mg		5mg
	Cyclophosphamide 50~100mg				
腎生検	↑				
CRP	2(+)	1(+)		1(+)	(-)
ESR	100 mm/h		19		10
血清Cr	0.8 mg/dl	0.7		0.9	0.8
Ccr	89.2 ml/min		73.1		72.0
尿蛋白	3.4 g/day	1.3		0.3	0.2

図2. 症例: 中○俊○殿、1941年生、女性

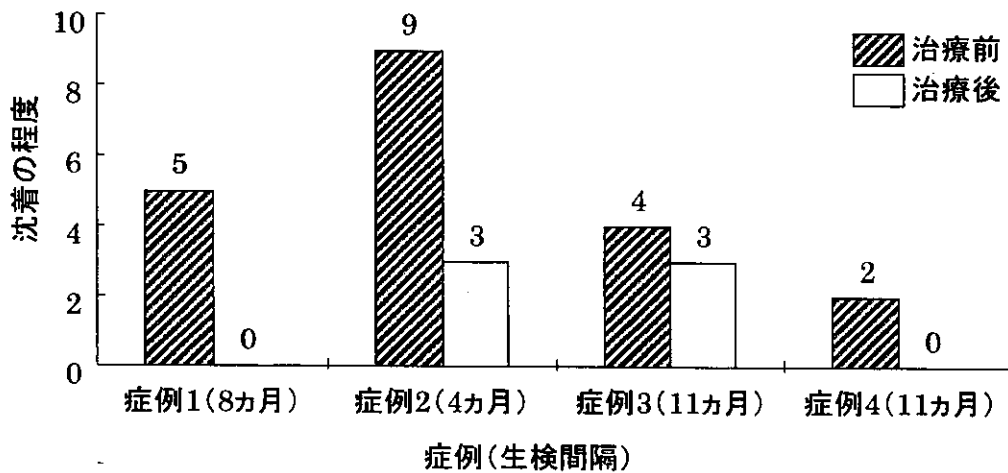


図3. PSL-CY療法前後の胃粘膜沈着アミロイドの半定量的評価
(生検部位3カ所の合計)

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

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

分担研究者 下条文武 新潟大学第二内科 教授
共同研究者 齋藤徳子^{1,2)}、宮崎 滋²⁾、鈴木正司²⁾、
森田 俊³⁾、平澤由平²⁾
新潟大学第二内科¹⁾、信楽園病院腎センター²⁾、
同病理部³⁾

研究要旨 透析アミロイドーシス骨関節病変病において matrix metalloproteinase (MMP) 産生を誘導し、血管新生に関与することが知られている増殖因子 (VEGF, bFGF, PDGF) の発現について検討した。VEGF, bFGF, PDGF はアミロイド周囲や肉芽組織に浸潤している M ϕ 、異物型多核巨細胞, fibroblast, myofibroblast, 血管内皮細胞、破骨細胞に陽性であり、一部に血管の増生を認めた。多くの細胞が増殖因子を発現し、血管の増生を含めた局所での炎症に関与している。

A. 研究目的

透析アミロイドーシスでは、アミロイド沈着周囲に浸潤したマクロファージ(M ϕ)の産生するサイトカインが病変の進展に影響を与えていると考えられている。今回、炎症のメディエーターとして、matrix metalloproteinase(MMP)産生を誘導し、血管新生に関与することが知られている増殖因子に着目し、透析アミロイドーシス病変局所における発現について検討した。

B. 研究方法

対象は透析アミロイド骨関節病変（頸椎）4 症例、滑膜病変（手根管）7 症例の計 11 例である。

上記病変の連続切片を作成し、M ϕ と破骨細胞のマーカーである CD68、血管内皮細胞のマーカーである vWF、平滑筋細胞のマーカーである α -smooth muscle actin(α SMA)、血管内皮増殖因子(VEGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、線維芽細胞

増殖因子(bFGF)を発現している細胞について免疫組織化学的に検討した。

C. 研究結果（図 1）

1. 骨関節病変では VEGF, bFGF, PDGF はアミロイド周囲や肉芽組織に浸潤している M ϕ 、異物型多核巨細胞, fibroblast, myofibroblast, 血管内皮細胞、破骨細胞に陽性であった。（陽性細胞数 PDGF>VEGF>bFGF）

浸潤細胞数の多い部位では血管の増生を認めた。

2. 肉芽組織近くの変性軟骨細胞の一部も VEGF, bFGF, PDGF 陽性であった。（PDGF>VEGF>bFGF）

3. 滑膜病変ではアミロイド周囲浸潤細胞（非 M ϕ 系細胞も多い）、血管内皮細胞の一部に VEGF, bFGF, PDGF が陽性であった。（VEGF>bFGF >PDGF）

D. 考察

一般に、各種増殖因子は MMP や、MMP

阻害蛋白の産生、細胞の分化、増殖、細胞外基質の合成などを制御することにより、組織の破壊、修復に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、透析アミロイドーシスにおいて、増殖因子に着目した報告はほとんどない。今回私たちは、MMP 産生を誘導し、血管新生に関与することが知られている、VEGF, bFGF, PDGF の発現について検討した。

アミロイド沈着周囲に浸潤している Mφ は VEGF, bFGF, PDGF を発現していたが、Mφ 以外にも各増殖因子陽性細胞は多数存在し、一部に血管の増生を認めた。透析アミロイドーシスにおいても、増殖因子は、血管の増生を含めた局所での炎症に関与していると考えられる。

E. 結論

透析アミロイドーシスでは、これまで注目されてきた Mφ のみでなく、fibroblast、myofibroblast、変性軟骨細胞、破骨細胞、血管内皮細胞など、多くの細胞が増殖因子を発現し、炎症の進展、血管の増生、組織の修復に関与していることが示唆された。

F. 研究発表

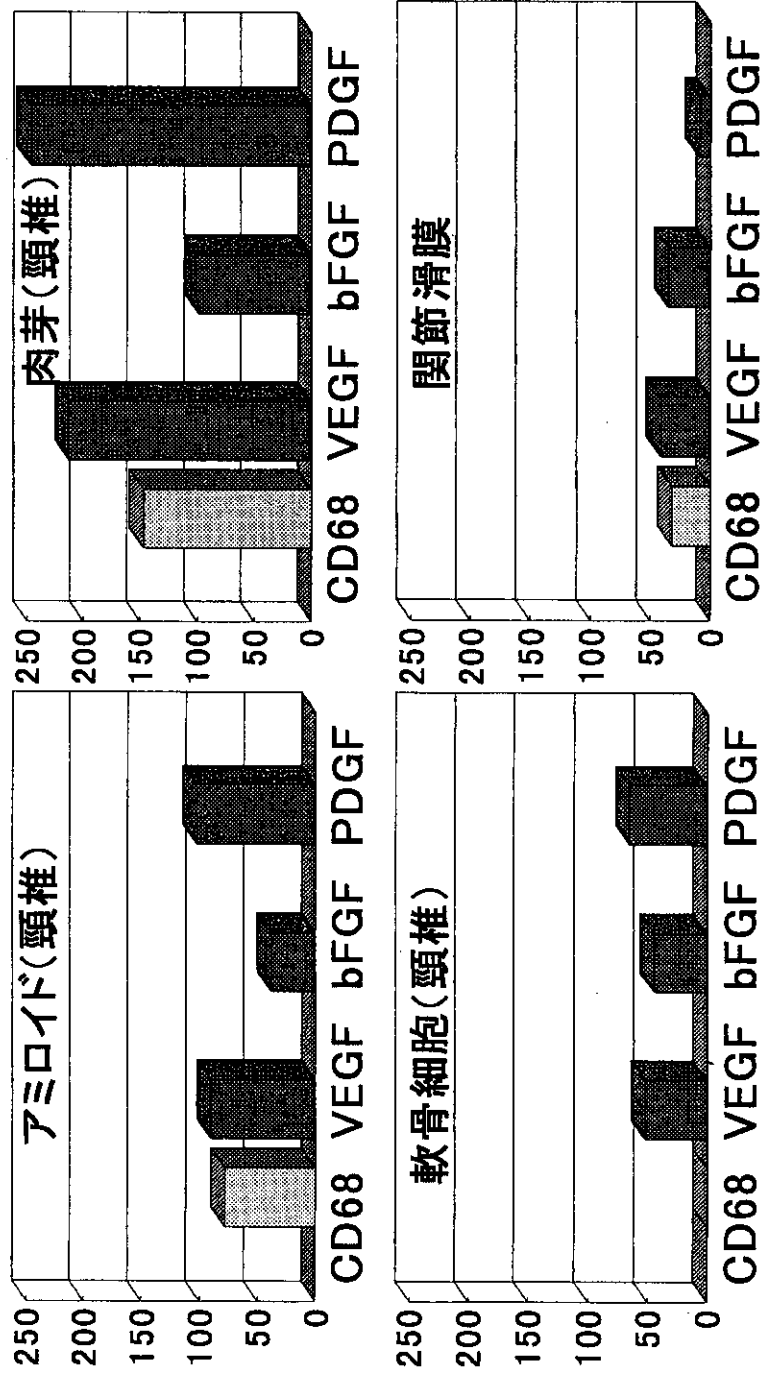
1. 学会発表

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

齋藤徳子、宮崎滋、鈴木正司、森田俊、平澤由平、荒川正昭、下条文武

第 44 回日本透析医学会総会 1999 年 6 月 横浜市

図 1 増殖因子発現細胞数



細胞浸潤の認められるアミロイド沈着部位を各標本2~4視野ずつ選び、66倍に倍率を一定にして各種増殖因子発現細胞数をカウントした。
(縦軸：1視野あたりの平均陽性細胞数)

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

透析アミロイドーシスモデルマウスの作出

分担研究者 下条文武 新潟大学医学部第二内科 教授

共同研究者 丸山弘樹¹⁾、長谷川進²⁾、多田昇弘³⁾、谷澤龍彦⁴⁾、宮崎純一⁵⁾

新潟大学医学部第二内科¹⁾、同血液浄化部²⁾、

大正製薬創薬研究所標的分子研究室³⁾、信楽園病院整形外科⁴⁾、

大阪大学大学院医学系研究科 G6 分子防御医学講座⁵⁾

研究要旨 透析アミロイドーシスの前駆蛋白であるヒト β_2 -ミクログロブリンを過剰発現するトランスジェニックマウスを作出し、本症の治療薬の開発に役立つモデルマウスの確立に努めている。

A. 研究目的

透析技術の進歩と合併症の治療薬の開発により、10 年を超える長期透析患者が増加してきた。これらの患者には、透析アミロイドーシスによる骨・関節障害が発症し、QOL を規定する重大な要因になっている。透析アミロイドーシスの前駆蛋白である β_2 -ミクログロブリン (β_2 -M) を効率よく除去できる血液透析用ダイアライザーが開発されてきたが、透析アミロイドーシスを完全には防止できない。さらに、腎移植が成功しても、組織に沈着したアミロイドを取り除くことができないという報告もある。発症した透析アミロイドーシスは、腎機能を改善しても治癒しがたいので、透析導入時から、積極的な予防治療が望まれる。そこで、透析アミロイドーシスのモデル動物を作出し、治療薬の検討、開発についての研究を試みた。

B. 研究方法

RT-PCR でクローニングしたヒト β_2 -M の cDNA を CAG プロモーターに接続してトランスジーンを構築して、ヒト β_2 -M 過剰発現トランスジェニックマウスの作

出を試みた。

C. 研究結果

サザンブロットでヒト β_2 -M のトランスジーンを導入が 5 系統のトランスジェニックマウス (F0) で認められた。各系統の F1 について、脳、肺、心、肝、脾、腎、骨格筋でのヒト β_2 -M の mRNA の発現を RT-PCR とノーザンブロットで確認した。さらに、血液と尿におけるヒト β_2 -M の発現をウエスタンブロットで確認した。高発現の系統の血中ヒト β_2 -M 濃度は 20 から 30mg/l と血液透析患者の透析前濃度と同程度である。各系統ごとに、ホモ (F2) の確立とその交配によるホモ (F3) の作出を行っている。

D. 考察

これまで、アミロイドの沈着は認められていないこと、臨床においても慢性腎不全患者に限定して透析アミロイドーシスが認められることから、本症の発症には、高ヒト β_2 -M 血症だけでなく腎不全状態であることも重要であると考えられる。現在、5/6 腎摘を行って、慢性腎不全の要因を組み込んで、透析アミロイドーシ

スの発症を図っている。

E. 結論

ヒト β_2 -M 過剰発現トランスジェニックマウスの作出に成功した。今後、透析アミロイドーシスのモデルマウスの確立についての検討を要する。

G. 知的所有権の取得状況

3. その他

本研究は、透析アミロイドーシスモデルマウスの作出と病態の解析（平成 10～12 年度基盤研究 C 一般研究代表者丸山弘樹）によるものであり、この研究の credit は丸山弘樹にある。

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

β2-ミクログロブリン関連アミロイド線維 (fAβ2M) 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 fAβ2M 安定化作用

分担研究者 内木宏延 福井医科大学病理学第二講座 教授

研究要旨 我々は、酸性領域で線維伸長が観察される試験管内β2-ミクログロブリン (β2-m) 関連アミロイド線維 (fAβ2M) 伸長反応系を用い、リコンビナントβ2-mにより線維伸長反応を繰り返し、β2-mのみからなる fAβ2M を得た。fAβ2M は中性反応液中(pH 7.5)で直ちに脱重合し、アミロイド線維の数および長さの顕著な減少を示し、24 時間後にはオリゴマー以下のβ2-m にまで脱重合した。

この fAβ2M 脱重合反応は apolipoprotein E (apoE) の添加により濃度依存的に抑制された。この apoE による fAβ2M 脱重合の抑制効果はアルブミン存在下でも確認され、apoE が fAβ2M の安定化因子として生体内で作用し、fAβ2M の沈着・長期安定化に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

我々は Aβ2M の形成メカニズムを解明することを目的として、患者から抽出した線維とβ2-m モノマーを用いて、酸性領域でβ2-m アミロイド線維 (fAβ2M) の伸長が観察される試験管内アミロイド線維伸長反応系を確立してきた。今回はリコンビナントβ2-m (r-β2-m) を用い、pH 2.5 で線維伸長反応を繰り返して fAβ2M を増幅し、β2-m のみで構成された fAβ2M を得た。加えて、この fAβ2M が中性 pH 反応液中で脱重合を起こすとともに、アミロイド関連共存タンパク質であるアポリポプロテイン E (apoE) がその脱重合反応を抑制することを見いだしたので報告する。

B. 研究方法

fAβ2M の抽出と増幅 : fAβ2M は、Aβ2M 患者関節滑膜より、Pras らの方法にて粗抽

出後、10⁵ x g 超遠沈、および 50-60% 不連続ショ糖密度勾配超遠沈により精製した。精製 fAβ2M (F0) を超音波破碎した線維断端を精製 fAβ2M seed (S0) とした。S0 seed (10 μg/ml) と r-β2-m (25 μM) を 50mM citrate - 100 mM NaCl (pH 2.5)中で 37°C、24 時間の伸長反応と超音波破碎を 11 回繰り返し、最終的に調製されたアミロイド線維を F11 fAβ2M とした。

fAβ2M 脱重合反応 : F11 fAβ2M を遠心・回収し、線維を終濃度 150 ng protein/ml になるように 50mM 緩衝液-100 mM NaCl 中に懸濁し、直ちに ThT 蛍光を測定した後 (初期値)、37°C で反応させ、ThT 蛍光量の変化と電子顕微鏡による線維形態の変化を観察した。脱重合反応には以下の緩衝液を用いた。citrate-HCl (pH 1.0 & 1.5), citrate (pH 2.0~6.0), phosphate (pH 6.5 & 7.0), Tris-HCl (pH 7.5~8.5)。また、fAβ2M