

の脱重合反応実施の際に、ヒト精製 apoE およびヒト血清アルブミン (HSA) を各々別々にあるいは同時に添加し、ThT 蛍光減少に対するこれらの効果も観察した。

脱重合 β 2-m の分子量検討：脱重合反応を終了した反応液の総タンパク濃度を測定後、反応液を 18,500 x g で 30 分間遠心し、上清を採取した。この上清を分画分子量 100,000 の遠心式濾過ユニット (Ultrafree-MC Biomax-100, Millipore) にて 5000 x g, 30 分間遠心し、ろ液を採取した。さらに分画分子量 30,000 (Biomax-30) および 10,000 (Biomax-10) で遠心し、ろ液を採取した。採取した各サンプルについてタンパク濃度 (Bradford 法) を測定した。

C. 研究結果

A β 2M 患者関節滑膜より抽出・精製した S0 fA β 2M seed より r- β 2-m を用いて伸長反応を繰り返すことにより、伸長初速度は増加し、平衡に達する時間も短縮された。増幅 fA β 2M ではアミロイド関連共存蛋白である serum amyloid P component (SAP) や apoE も消失していた。

fA β 2M を中性反応液 (50mM Tris-HCl-100mM NaCl, pH 7.5) 中 37°C でインキュベートすると、直ちに ThT 蛍光値の減少がみられ、24 時間後には F0 fA β 2M は初期値の約 70%, F1 は 50%, F11 は 5~7% 程度まで減少した (図 1)。F11 の ThT 蛍光の減少は pH 5 以下の酸性反応液中ではほとんど認められなかったが、pH 6 以上の中性・アルカリ領域では顕著に観察された。fA β 2M を pH 7.5 で 24 時間反応させた反応液中には、オリゴマー以下まで脱重合した β 2-m が認められ、ネガティブ染色による電子顕微鏡観察では、アミロイド線維の数および長さの顕著な減少がみられた。

apoE は、中性反応液中での fA β 2M の脱重合による ThT 蛍光の減少を濃度依存的

に抑制し、アミロイド線維の数・長さの減少の抑制も示した (図 2)。HSA 単独においても fA β 2M の脱重合抑制作用を示したが、apoE は 4% HSA 存在下でも相加的な脱重合の抑制効果を示した。

D. 考察

r- β 2-m を用いて fA β 2M 線維伸長反応を繰り返すことにより、A β 2M 患者より抽出・精製した fA β 2M や腎不全患者尿より精製した β 2-m を用いずとも、再現性のある fA β 2M 線維伸長反応を行う事が可能になるとともに、 β 2-m のみから構成される fA β 2M が入手可能となった。

pH 6 以上では、fA β 2M 伸長反応において ThT 蛍光の増加は観察されず、 β 2-m のみから構成される fA β 2M はむしろオリゴマー以下の β 2-m にまで脱重合することが示された。しかし、アミロイド関連共存物質の一つである apoE はこの fA β 2M の中性域の脱重合反応を抑制した。この作用は HSA 存在下でも確認され、apoE の fA β 2M 脱重合抑制作用は生体内でも起こり得ると考えられた。

アミロイド線維形成における apoE の関わりは未だ完全には明らかとなっておらず、線維形成促進・抑制効果の報告がともに存在する。今回の我々の結果は、apoE が一旦形成されたアミロイド線維に作用して脱重合を抑制し、線維の安定化に作用し、アミロイド線維の沈着・長期安定化に関与していることを示唆しており興味深い。

E. 結論

β 2-m のみより構成される fA β 2M は中性反応液中で脱重合しやすいが、アミロイド関連共存物質の一つである apoE が、形成されたアミロイド線維に作用して線維を安定化する可能性が示された。

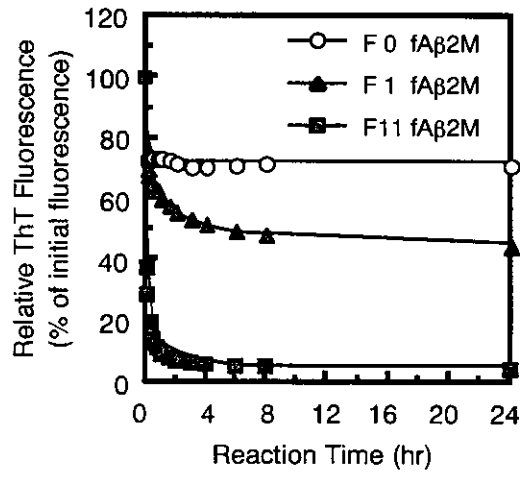


図 1 中性反応液中におけるfAβ2MのThT蛍光の変化

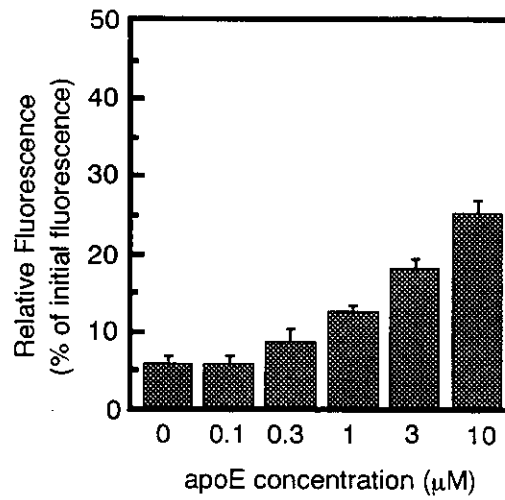


図 2 中性反応液におけるfAβ2M 脱重合に対する apoE の効果

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 –長期にわたる $\beta 2$ -ミクログロブリン ($\beta 2$ MG) 吸着療法における骨嚢胞の推移–

分担研究者 原 茂子 虎の門病院 腎センター血液浄化療法部長、内科医長
 共同研究者 乳原善文 虎の門病院 腎センター内科 医員
 山田 明 虎の門病院 腎センター内科 部長

研究要旨 透析アミロイドーシスへの対策、治療として $\beta 2$ MG ($\beta 2$ microglobulin) の除去、透析液の清浄化、ダイアライザー膜の生体適合性対策などが日常の臨床で行なわれている。しかしながら透析アミロイドーシスによる破壊性脊椎関節症、骨嚢胞は経年的に増加し 15 年以上例では 75% にみられ、長期透症例での QOL の低下、さらには生命予後にも影響をきたしている現状である。そこで 4 年間の長期にわたる $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2$ MG) 吸着療法がその進展を防止しえるか、骨嚢胞の推移より検討した。さらに骨嚢胞化にかかわる破骨細胞侵潤を誘導するサイトカイン、さらに炎症メディエーターに関し、吸着療法併用透析による動態を検討した。吸着カラム併用により骨嚢胞の増大化は抑制された。吸着カラム併用療法では、非併用時に比し、血中における IL-1 β 活性の抑制、炎症メディエーターである factorD の低下がみられた。透析アミロイドーシスは透析療法に伴う炎症による二次性アミロイドーシスであり、今後の治療の主眼は抗炎症療法であると考えられる。

A. 研究目的

透析アミロイドーシスの原因としては、 $\beta 2$ MG の蓄積、膜素材、透析液中のエンドトキシン、アミロイドーシスなど多因子の関与が推察され、その対策が試みられているが、骨嚢胞の進展がみられ、疼痛、可動制限により QOL 低下をきたしている。 $\beta 2$ MG の除去効率をはかるべく、逆ろ過型ダイアライザーを開発し使用してきたが、疼痛の軽減はみられず、また骨嚢胞の進展も認められた。一方 $\beta 2$ MG 吸着療法併用にて、疼痛緩和が認められその機序として透析中のサイトカインと

くに IL-1 β 産生が抑制されることを我々は報告してきた。本報告では組織炎症メディエーター因子であり、また生体反応を促進する補体因子である FactorD の動態を、吸着療法の有無で検討し、さらに吸着カラム併用療法での骨嚢胞サイズの推移を経年的に検討した。

B. 研究方法

1) 維持透析例でカラム併用開始前後の各々 4 年、計 8 年間における骨嚢胞サイズの推移を対比した。骨嚢胞のサイズは大腿骨、上腕骨 X-P から骨嚢胞面積を

画像解析装置を用いて測定し、左右の面積を総和した。

2) 同一症例でβ2MG 吸着カラム併用の有無で、透析療法前後でのサイトカイン (TNF-α、IL1-β、IL-6、IL-8、) と炎症メディエーターの Factor D を測定し、その動態を検索した。

C. 研究結果

1) 吸着カラム併用透析 5 例での骨嚢胞サイズの推移では、左右の上腕骨頭では使用開始 4 年前、使用開始時、使用開始 4 年後では図-1 に示すように各々、 $0.98 \pm 0.99\text{mm}^2$ 、 $3.6 \pm 1.8\text{mm}^2$ 、 $3.7 \pm 1.7\text{mm}^2$ で使用開始時では開始 4 年前に比し有意に高値を示し、サイズの増大化があきらかであった。併用開始時と開始 4 年後では骨嚢胞サイズには差はなく増大化は抑制されていた。一方、大腿骨頭部では、開始前 4 年、開始時および開始 4 年後での骨嚢胞サイズは図-2 に示すごとく、各々 0.82 ± 0.8 、 5.2 ± 9.7 、 $5.8 \pm 9.7\text{mm}^2$ で各群間で有意差はみられなかったが、開始時では開始 4 年前に比し高値を示した。大腿骨骨嚢胞、上腕骨骨嚢胞ともに、カラム吸着療法により骨嚢胞の増大化が抑制された。

2) 吸着療法併用透析に伴うサイトカインの動態では、表-1 に示すように TNF-α、の変化率では、吸着カラム併用時 $-32.1 \pm 15.6\%$ 、非併用時 $-39.8 \pm 14.2\%$ で両群に有意差はみられなかった。IL-6 は吸着療法併用透析では $76.8 \pm 64.7\%$ 、非併用時では $36.8 \pm 23.5\%$ で有意差なし。IL-8 は、吸着カラム併用透析、非併用透析ともに、検出されなかった。IL1-β は、吸着療法併用時には $56.0 \pm 72.9\%$ 、非併用時には $110.7 \pm 64.1\%$ で有意 (paired T, $p < 0.05$) で、併用時には IL1-β の増加が抑制された。

Factor D の動態では、吸着カラム併用

時の透析前値は、 $741 \pm 116\text{ units/ml}$ 透析後では $284 \pm 49\text{ units/ml}$ で有意 ($P < 0.000001$) に吸着併用透析後に低下を認めした。一方吸着カラム非併用時の Factor D の透析前値は $784 \pm 179\text{ units/ml}$ 透析後は $632 \pm 177\text{ units/ml}$ で有意な低下はみられなかった。

D. 考察

透析アミロイドーシスによる骨病変の機序に関しては、骨周囲で椎間板を中心とする関節周囲組織にβ2MG を構成成分とするアミロイドの沈着にはじまる。アミロイドが AGE 化され、その周辺に侵潤したマクロファージや単球から産生された IL-1β、IL-6、TNF-α などのサイトカインにより、破骨細胞が活性化されて、骨膜から骨組織へと骨破壊が進展する。β2MG 除去効率をはかることをこころみ、当院で逆ろ過推進型ダイアライザーを開発したが、臨床使用にてβ2MG 除去は 78% と効率がえられているが、疼痛の軽減がえられてない。アミロイド形成を防ぐことが根本的解決策であるが、現状ではいまだ困難である。対策として骨嚢胞の進展、増大を抑制する対策として、1) サイトカインを抑制する、2) 破骨細胞の活性化を抑制することも治療として意義あるものと推察される。

我々の検索による成績からは、β2MG 吸着療法ではβ2MG 除去のみではなく、サイトカインの活性化が抑制されている。今回の骨嚢胞の進展が防止している成績と考えあわせると、サイトカイン抑制による治療効果ではないかと推察される。さらに今回検索による Factor D の動態からは、Factor D が補体カスケードのなかでも組織炎症のメディエーター産生増加因子であること、透析アミロイド組織には炎症細胞侵潤を認めることなどより、アミロイド進展に Factor D など補体因子

の関与も推察された。これらの末梢でのサイトカイン、Factor D の動態が局所かどうかかわるかは今後検討課題であるとともに、補体因子の関わりに関してはさらに検討を要する。

E. 結論

β 2MG 吸着カラム使用により骨嚢胞の増大化が防止されうる。骨嚢胞の進展、疼痛には、Factor D を含めた補体因子の関与も示唆された。透析アミロイドーシスは透析療法に伴う炎症による二次性アミロイドーシスである。

F. 研究発表

1. 論文発表

1). 下条文武、川口良人、原 茂子 ほか：透析アミロイドーシスに対する直接血液灌流型 β 2 ミクログロブリン吸着器「リクセル R」の臨床効果：前向き多施設コントロールミクログロブリン吸着器スタディ

(β 2MACS). 腎と透析 46 (4) 547-559, 1999

2. 学会発表

1) 柴田 猛、小川浩之、原 茂子 ほか：中空糸高密度充填型 Reverse Flux Dialyser の開発 第 43 回日本透析医学会学術集会. 1998 年 6 月

2) 白矢勝子、原 茂子、田上哲夫ほか：HD、CAPD 療法別にみた透析アミロイドーシスの臨床病理学的検討. 第 44 回日本透析医学会学術集会. 1999 年 6 月

3) 原 茂子、田上哲夫、乳原善文ほか：九州アフエレーシス研究会. シンポジウム「病因物質よりみたアフエレーシス」1999 年 10 月

4) 田上哲夫、原 茂子、乳原善文 ほか：長期透析合併症にみられる破壊性脊椎関節病変 (DSA) 以外の脊椎病変合併例の検討. 第 44 回日本透析医学会学術集会. 1999 年 6 月

図1 β_2 MG吸着カラム併用例,非併用例での骨嚢胞(上腕骨)サイズの推移

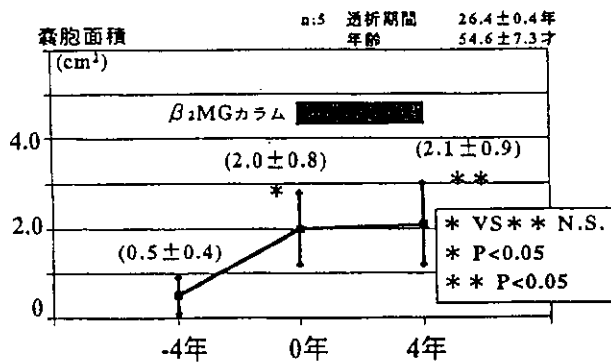


表1 β_2 MG吸着カラム併用透析時,非併用時の治療前後におけるサイトカインの変化率 n:8

	吸着カラム 血液透析	血液透析 単独
TNF- α	-32.1 ± 15.6(%)	-39.8 ± 14.2(%)
IL-1 β	56.0 ± 72.9	110 ± 64.1 *
IL-6	76.8 ± 64.7	36.8 ± 23.5
IL-8	N.D	N.D

N.D: not detectable
*: P < 0.05 (paired T)

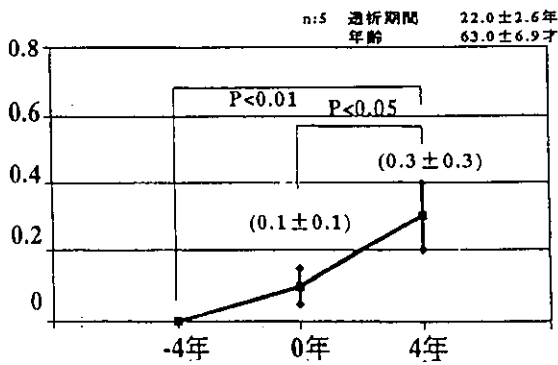
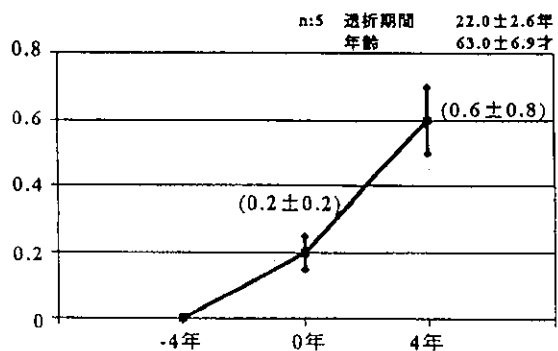
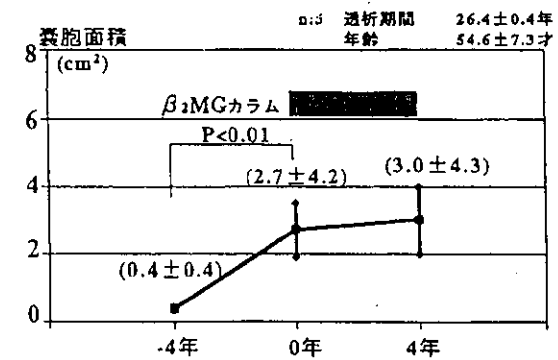


図2 β_2 MG吸着カラム併用例,非併用例での骨嚢胞(大腿骨)サイズの推移



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 —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—

分担研究者 原 茂子 虎の門病院 腎センター血液浄化療法部長 内科医長
 協力研究者 乳原善文 虎の門病院 腎センター内科 医員
 山田 明 虎の門病院 腎センター内科 部長

研究要旨 長期透析患者における問題点として透析アミロイドーシスによる骨病変(破壊性脊椎関節症(DSA)、関節周囲の骨嚢胞)が知られている。しかしこれまでに十分な治療法は確立されていない。今回我々は etidronate disodium を用い、破骨細胞活性を抑えることにより上記骨病変に対する治療を 2 年間試みた。画像上骨病変の改善はみられなかったが、非投与群に比し明らかな進展が乏しいことが判明した。このことから本剤はアミロイド形成を抑えないが、骨病変の進展は抑えられる可能性が示唆された。

A. 研究目的

透析アミロイドーシスによりもたらされる骨病変としては破壊性脊椎関節症(DSA)、関節周囲の骨における骨嚢胞が挙げられ、これが長期透析患者における生命予後と日常生活動作に影響を与えることになる。この骨病変の特徴は骨周囲で椎間板をはじめとする部位に β 2MGによるアミロイドの沈着が生じ、これがAGE化をうけると、それを処理するために出現したマクロファージや単球がIL-1 β , IL6, TNF α 等のサイトカインの産生を介して破骨細胞の活性化を引き起こし、アミロイド周囲の骨梁をまで破壊することが原因とされている。そこで骨の石灰化前線に取り込まれ、それを貪食した破骨細胞にアポトーシスを惹起させ破骨細胞の活性を低下させ etidronatedisodium

(ED)を用いて、破骨細胞活性を抑えることにより骨破壊を予防しうるかいを検討した。

B. 研究方法

ED 200mg/日を2週投与した後10週休薬するといったサイクルで治療を継続する。治療効果の判定となる観察項目として、単純X-Pによる骨嚢胞(上腕骨骨頭、大腿骨骨頭、手根骨)と頸椎DSAの推移をそのサイズを測定することにより比較した。さらに血清学的なマーカーとしては骨吸収マーカーとしてのI-CTP(1型プロコラーゲンC末端プロペプチド)とTRAP(酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ)を測定し、同時にintact-PTH(副甲状腺ホルモン)、BGP(オステオカルシン)をも測定して比較検討した。統計処理は

paired t-test にて行った。

対象は血液透析 10 年以上の症例 20 名 (男 12 名、女 8 名) で開始した。しかし 2 年経た時点で 2 名が死亡脱落したため、残り 18 名が最終的に対象となった。2 年次での平均年齢は 60.4 ± 8.1 (41-71) 歳、平均透析年数 22.0 ± 6.2 (14-32) 年であった。また対照としての ED 剤非投与群として血液透析 10 年以上の症例 18 名 (男 9 名、女 9 名) は平均年齢 59.0 ± 8.8 (48-78) 歳、平均透析年数 20.7 ± 4.6 (14-32) 年であった。

C. 研究結果

本薬剤による治療を開始して 8 クール行い、丁度 2 年経過したところで今回比較検討した。ED 投与群で治療 2 年終了時の成績を示し、一方 ED 非投与群で 2 年経過時点での成績を前者の後に () 内に示す。DSA を認めた症例は 9(7) 例で、経過観察中に悪化 1(2) 例、変化なし 8(4) 例、新たな出現 0(1) 例、改善例 0(0) 例。上腕骨骨頭嚢胞 6(7) 例で、悪化 3(4) 例、変化なし 2(0) 例、新たな出現 0(3) 例、改善例 0(0) 例。大腿骨骨頭嚢胞は 8(6) 例で、悪化 1(3) 例、変化なし 7(2) 例、新たな出現なし 0(1) 例、改善 0(0) 例。手根骨骨嚢胞および手指変形拘縮 5(6) 例で、悪化 1(1) 例、変化なし 4(4) 例、新たな出現 0(1) 例、改善 0(0) 例で、合計するとアミロイド骨病変 28(26) 箇所のうち、悪化 6(10) 箇所、変化なし 22(10) 箇所、新たな出現 0(6) 箇所、改善 0(0) 例であった。ED 投与群に比し ED 非投与群の方が経過中の悪化例、或いは新たな出現例が多く、変化なし例は少なかった。また ED 剤の投与された 2 例において明らかに骨嚢胞のある側の下肢痛の改善がみられた。

血清学的骨マーカーの推移は表-1 に示すごとくである。I-CTP は前値と 2 年後値の間に $P < 0.001$ の有意差にて上昇し、

TRAP は 1 年後値と 2 年後値の間に $P < 0.001$ の有意差にて低下を認めた。iPTH は前値と 2 年後値の間に $P < 0.05$ の有意差にて上昇し、BGP も前値と 2 年後値の間に $P < 0.01$ の有意差に増加を認めた。本剤を投与したことによる合併症は 1 例もみられなかった。また 1 回の血液透析前後での血中 B2MG の除去量は 2 群間に有意差を認めなかった (表-2)。

D. 考察

透析アミロイドーシスは約 10 年以上の長期透析症例に高頻度にみられ、進行を続ける合併症の一つである。現在透析技術の改善、 $\beta 2$ MG 吸着療法といった予防法は試みられているが、積極的な治療法は確立されていない。破骨細胞活性を抑えることによりアミロイド沈着部位近傍の骨破壊抑制を目的に ED 剤を投与したところ、同程度の透析年数をもつ ED 非投与群と対比すると、投与群には進行が乏しい症例が多くみられたのに対し、非投与群では進行例が多くみられた。このことから骨破壊の起りやすい透析歴 20 年前後の時期において ED 剤は骨破壊を抑えていることが推測された。

本剤は破骨細胞活性を抑えことによりアミロイド周囲の骨破壊の抑制を目的に投与されたが、実際に血清学的には破骨細胞活性を十分に抑えられていないという結果がでた。同時に骨形成を反映するマーカーも上昇したことから、PTH の影響が大きく血清学的な I-CTP や TRAP の推移をみかけ上相殺されている可能性も考えられた。本剤の投与量は透析患者に使用する場合の安全量と考えられている量を投与した。しかし本剤は組織結合性が強く容易に代謝されないという特性から、徐々にではあるが破骨細胞活性を低下させることにより、アミロイド骨病変の治療になる可能性が考えられた。

E. 結論

同等の透析年数をもつ本剤非投与群と対比したところ本剤投与群症例において明らかにアミロイド骨病変の進行が抑えられていることが判明した。今後も合併症に留意しながら本治療法を継続させたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1). 下条文武、川口良人、原 茂子 ほか：透析アミロイドーシスに対する直接血液灌流型 $\beta 2$ ミクログロブリン吸着器「リクセル R」の臨床効果：前向き多施設コントロールミクログロブリン吸着器スタディ ($\beta 2$ MACS). 腎と透析 46 (4) 547-559, 1999

2. 学会発表

- 1) 柴田 猛、小川浩之、原 茂子 ほか：中空糸高密度充填型 Reverse Flux Dialyser の開発 第 43 回日本透析医学会学術集会. 1998 年 6 月
- 2) 白矢勝子、原 茂子、田上哲夫ほか：HD、CAPD 療法別にみた透析アミロイドーシスの臨床病理学的検討. 第 44 回日本透析医学会学術集会. 1999 年 6 月
- 3) 原 茂子、田上哲夫、乳原善文ほか：九州アフエレーシス研究会. シンポジウム「病因物質よりみたアフエレーシス」1999 年 10 月
- 4) 田上哲夫、原 茂子、乳原善文 ほか：長期透析合併症にみられる破壊性脊椎関節病変 (DSA) 以外の脊椎病変合併例の検討. 第 44 回日本透析医学会学術集会. 1999 年 6 月

表一 1 Ethidronate disodium 投与による
血清学的骨代謝マーカー

	前	1年後	2年後
I-CTP(ng/ml)	35.6±11.1	43.4±15.0	59.9±24.3
TRAP(U/l)	8.4±1.8	8.3±1.8	7.8±1.8
iPTH(pg/ml)	171.7±179.1	157.3±176.5	239.6±170.9
BGP(ng/ml)	73.3±66.2	115.6±118.6	121.4±108.5

表一 2 Ethidronate disodium 投与の有無
と透析前後の血清β 2 MG の対比

	ED群(n=18)	非ED群(n=18)
透析前(mg/L)	33.8±10.8	33.7±9.4
透析後(mg/L)	13.4±8.6	14.1±6.2

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

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 - 血清アミロイド P 成分の機能解析 -

分担研究者 前田秀一郎 山梨医科大学医学部生化学第一講座 教授
 共同研究者 玉置寿男^{1,2}, 河野裕夫³, 坂本美穂子⁴, 岡田芳家¹, 伊藤禎洋¹,
 神庭重信², 尾崎由基男⁴, 石原得博³
 山梨医科大学医学部生化学第一講座¹
 山梨医科大学医学部精神神経科学講座²
 山口大学医学部病理学第一講座³
 山梨医科大学医学部臨床検査医学講座⁴

研究要旨 種々のアミロイドーシスで沈着する異なるアミロイドの共通成分、血清アミロイド P 成分(SAP)の機能を明らかにするため、標的遺伝子組換え法を用いて作製した無 SAP マウスに異常があるかどうかを解析し、以下の結果を得た。(I) 無 SAP マウスでは、インターフェロンで誘導され、細胞増殖抑制作用を持つ核蛋白質を規定する遺伝子の発現が対照野生型マウスに比べ、増強していた。(II) 英国のグループが作製した無 SAP マウスでは、高い頻度で抗核抗体と全身性紅斑性狼瘡様の重度の糸球体腎炎を認めると報告されている。我々が独自に作製した無 SAP マウスも血清中の抗核抗体価が顕著に上昇していた。しかし、糸球体腎炎の所見は認められず、平均寿命の短縮を認めなかった。

A. 研究目的

常染色体性優性の遺伝性神経難病、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)では、血清蛋白質、トランスサイレチン(TTR)の1アミノ酸が置換した異型 TTR がアミロイドを形成して全身種々の臓器に沈着する。FAP の病因は、*ttr* 遺伝子上の点変異であることが明らかにされているが、発症機構は不明で、発症には主因となる *ttr* 遺伝子変異のほかに、老化、環境因子や他の蛋白質が関与することが予想されている。従って、FAP の治療法や発症を遅らせる手だてを開発するためには、実験操作の容易なマウス

で疾患モデルを作り、発症に関与する因子を明らかにすることが必要と考えられる。先に我々は、FAP の病因である Met30 点変異を持つヒト *ttr* 遺伝子をマウス受精卵に注入する方法で、FAP のトランスジェニックマウスモデルを作製した。これらマウスでは、FAP 患者と同様の種々の臓器に、ヒト異型 TTR から成るアミロイドが沈着する。しかし、この方法ではマウス内在性の *ttr* 遺伝子の機能は正常のまま、FAP 患者に特徴的な末梢神経へのアミロイド沈着がなく、神経障害を認めない。そこで本研究では、FAP により近似したモデルマウスの作製を目指す

とともに、既に標的遺伝子組換え法を用いて作製した遺伝子欠損マウスや上記のトランスジェニックマウスモデル等を用いて、FAP におけるアミロイドの沈着機構を明らかにし、発症に関与する因子を見出して、この遺伝性神経難病の治療法や予防法を確立することを目的とする。

先に我々は標的遺伝子組換え法を用いて、種々のアミロイドーシスで沈着する異なるアミロイドの共通成分、血清アミロイド P 成分(SAP)を欠く無 SAP マウスを作製し、対照野生型マウスに比べ、AA アミロイドーシスが遅れて惹起されることを見出した。この結果は、SAP がマウスにおいて AA アミロイドの沈着を促進することを示唆している。では、SAP はヒトのアミロイドーシスの発症も促進するだろうか。無 SAP マウスと FAP のトランスジェニックマウスモデルとの交配によって得られる、SAP を欠損し FAP の病因となるヒト TTR Met30 を合成するマウス株と SAP とヒト TTR Met30 の双方を合成する従来のトランスジェニックマウスモデル株とにおける TTR アミロイド沈着の開始時期や程度を比較解析すれば、FAP の発症に SAP がどう関与するかを明らかにできると考えられる。一方 SAP は、マウスの代表的な急性期応答蛋白質で、英国のグループが作製した無 SAP マウスでは、高い頻度で抗核抗体と全身性紅斑性狼瘡様の重度の糸球体腎炎を認めると報告されている。しかし我々は、通常の飼育環境下では無 SAP マウスに平均寿命の短縮を認めず、外観上にも何ら異常を認めない。無 SAP マウスに異常がなければ、上記の方法で SAP がヒトのアミロイドーシスの発症を促進するかどうかを調べることができる。そこで、以下の方法で SAP の機能を解析し、無 SAP マウスに自己免疫疾患等の異常があるかどうかを解析した。

B. 研究方法

(I) 細菌 (*Salmonella typhimurium*) のリポ多糖体 (LPS) を腹腔内に体重あたり 15 mg/kg 投与して急性炎症を惹起した無 SAP マウスと対照野生型マウスにおける肝の mRNA の種類や量の差異を、Differential Display (DD)法で検索する。差異のある cDNA クローンは単離し、その塩基配列構造を決定する。DD 法は、Takara のキットを用いて行う。このキットでは、9 種類の下流プライマーと 24 種類の上流プライマーの組み合わせによる 216 通りの PCR 反応を行う。

(II) 無 SAP マウス及び対照野生型マウスの血清中の抗核抗体価を、Hep-2 細胞によるキットを用いて蛍光抗体法で測定し、比較する。

(III) 無 SAP マウス及び対照野生型マウスの尿中の総蛋白質量を測定、比較し、さらに光学顕微鏡を用いて、糸球体腎炎の有無を調べる。

C. 研究結果

(I) 無 SAP マウス及び対照野生型マウス各 2 匹の腹腔内に、体重当たり 15 mg/kg の LPS を投与し、24 時間後に SAP の産生臓器である肝の mRNA を抽出し、DD 法で解析した。上記 4 匹の肝 mRNA 由来の cDNA を合計 216 通りの PCR 反応で増幅後、ゲル電気泳動法で差異を比較解析した結果、無 SAP マウス肝に特異的な 1 本のバンドを見出した。

(II) この cDNA バンドをゲルから抽出してサブクローニングし、これをプローブとしてノーザンブロット法で調べ、無 SAP マウスでは、約 2 kb の mRNA の発現量が、対照野生型マウスに比べ、明らかに増加していることを確認した。次にこの cDNA の塩基配列を決定したところ、インターフェロンで誘導さ

れる細胞増殖抑制作用を持つ既知の核蛋白質を規定していることが判明した。

(III) *sap* 遺伝子の双方のアレルに挿入変異をもつ無 SAP マウス(*sap*^{-/-})、一方のアレルにのみ変異をもつヘテロ接合体マウス(*sap*^{+/-})及び対照野生型マウス(*sap*^{+/+})の血清中の抗核抗体価を蛍光抗体法で定量した。抗核抗体価は、無 SAP マウスにおいて雌雄ともに顕著に上昇していた(図1)。

(IV) 一方、尿中の総蛋白質量は、無 SAP マウス及び対照野生型マウスで顕著な差異を認めなかった。また、何れの遺伝子型のマウスにも糸球体腎炎の所見を認めなかった。

D. 考察

上記の結果は、インターフェロンで誘導され、細胞増殖抑制作用を持つ核蛋白質を規定する遺伝子の発現が、無 SAP マウスにおいて対照野生型マウスに比べ増強していることを示している。また、無 SAP マウスにおいて対照野生型マウスに比べ、血中の抗核抗体価が顕著に上昇していた。一方、尿蛋白質の定量、光学顕微鏡を用いた解析からは、英国のグループが報告した結果と異なり、無 SAP マウスが糸球体腎炎を惹起し易いとは考え難い。

今後、無 SAP マウスで何故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、血清中の抗核抗体価が高いかを解析し、SAP の機能を明らかにしたいと考えている。

また先に、無 SAP マウスと対照野生型マウスとに沈着した AA アミロイドの構成成分を光学顕微鏡を用いて、免疫組織化学的に比較解析し、さらにその超微細構造を電子顕微鏡を用い、急速凍結・デュープエッチング法で比較観察した。この結果 SAP は、AA アミロイドの表面に

結合し、SAP の内側に AA 線維が存在し、そのさらに内側に、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)が結合していることを示唆する結果を得た。そこで現在、この結果を確認するため、免疫電顕法により解析している。

E. 結論

(I) 無 SAP マウスでは、インターフェロンで誘導され、細胞増殖抑制作用を持つ核蛋白質を規定する遺伝子の発現が異常に増強していた。

(II) 無 SAP マウスにおいて、血清中の抗核抗体価が顕著に上昇していた。しかし、糸球体腎炎の所見は認められず、平均寿命の短縮を認めなかった。従って、ヒトのアミロイドーシスでのアミロイド沈着に SAP がどう関与するかを解析するために、この無 SAP マウスを利用可能と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Togashi S, Watanabe H, Nagasaka T, Shindo K, Shiozawa Z, Maeda S, Tawata M, and Onaya T: An aggressive familial amyloidotic polyneuropathy caused by a new variant transthyretin Lys 54.

Neurology 1999;53:637-639.

2) Kato G, and Maeda S: Neuron-specific Cdk5 kinase is responsible for mitosis-independent phosphorylation of c-Src at Ser75 in human Y79 retinoblastoma cells.

J. Biochem. 1999;126:957-961.

3) 前田秀一郎、玉置寿男: 家族性アミロイドポリニューロパチー発症の分子機構の解析。

脳神経 2000;52(1):14-24.

2. 学会発表

1) Maeda S, Yamamura K, Ishihara T, Shimada K: Use of Mice Carrying Targeted

Mutations to Analyse the Molecular Bases of Familial Amyloidotic Polyneuropathy.

"The Fourth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders" and "The Third International Workshop on Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy", 1999, Umea, Sweden.

2) 本田伸一郎, 原田信広, 前田秀一郎: アロマトーゼ欠損雄マウスにおける性行動の解析.

第72回日本内分泌学会学術総会, 1999, 横浜

3) 前田秀一郎: 遺伝子改変マウスを用い

たヒト遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析.

第42回日本神経化学会, 1999, 広島

4) 加藤梧郎, 前田秀一郎: ヒト c-Src セリン75のM期非依存的磷酸化の機能.

第22回日本分子生物学会年会, 1999, 福岡

5) 玉置寿男, 相馬 真, 岡田芳家, 坂本美穂子, 河野裕夫, 伊藤禎洋, 神庭重信, 尾崎由基男, 石原得博, 前田秀一郎: 遺伝子改変マウスを用いた血清アミロイド P 成分の機能解析 (II).

第22回日本分子生物学会年会, 1999, 福岡

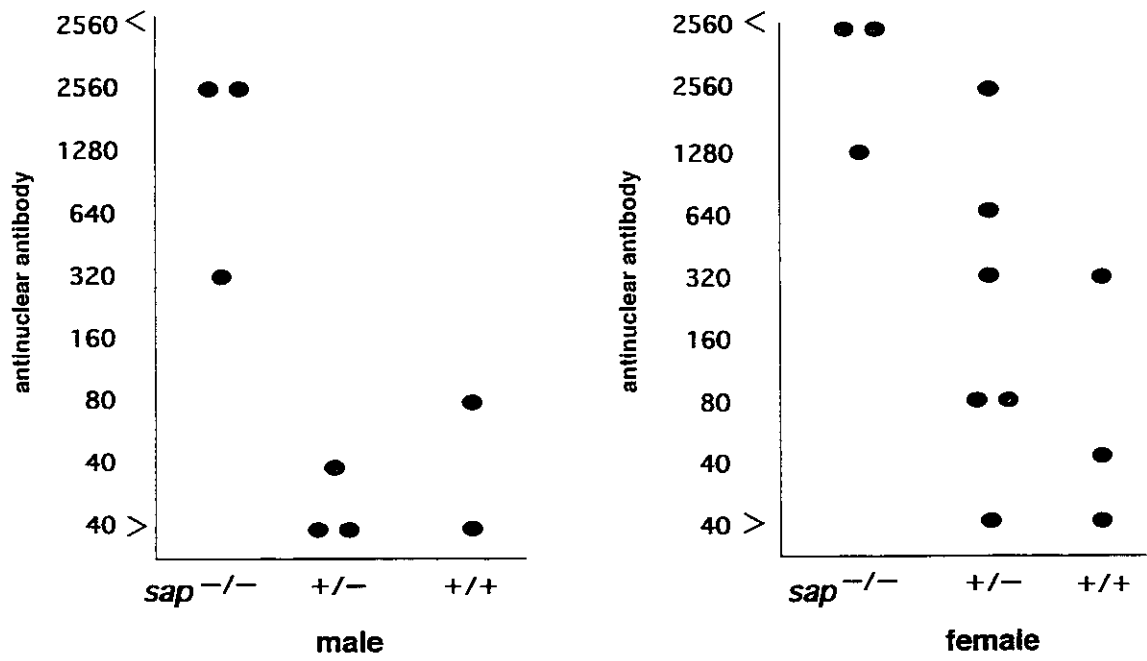


図 1

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

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

分担研究者 池田修一 信州大学第三内科教授
 共同研究者 徳田隆彦、矢崎正英 信州大学第三内科
 樋口京一、中村明宏 信州大学加齢適応研究センター
 脈管病態部門

研究要旨 FAP 患者の心アミロイドーシスの発症・進展機序を解明する目的で、FAP 患者の心筋に沈着するアミロイド線維の構成成分、特に TTR の分子種を生化学的に解析した。臨床的に心不全症状を有して心筋にアミロイド沈着を認めた FAP 患者 6 例 (Met30;2 名, Leu30;2 名, Ala38;2 名)の心筋アミロイド構成蛋白を抽出し二次元電気泳動、N 末端アミノ酸配列分析および質量分析法などにより分析した。心不全症状で死亡した FAP 患者の心筋では正常 TTR と異常 TTR がほぼ 1:1 の割合で沈着し、この比率は変異 TTR の種類によらず一定であった。また肝移植後に心不全が増悪して死亡した症例では沈着アミロイドの約 80%が正常 TTR であった。これらの結果からは、FAP 患者の心筋アミロイドーシスの発症には正常 TTR が大きく関与し、かつこの正常 TTR の心筋への沈着は TTR の変異の種類に関係なくすべての変異 TTR について生じうる病態であると考えられた。今回の結果は、FAP の根治療法としての肝移植術の適応を考慮する際に心アミロイドーシスの術前評価が不可欠であることを示している。

A. 研究目的

心アミロイドーシスはアミロイドーシス患者の生命予後を決定する重大な因子の一つであり、FAP 患者においても心アミロイドーシスが出現することが知られている。さらに、近年、生体あるいは脳死体からの肝移植が FAP の根治療法となることが確立されたが、最近、肝移植後も心筋へのアミロイド沈着が進行する Met30 以外の変異 TTR を有する FAP 症例が存在することが報告されている。今後も肝移植療法を継続していく上で、このような FAP 患者の心筋障害の発症機序は可能な限り早く解明されねばならない。

今回の研究では FAP 患者の心筋に沈着する TTR の分子種を生化学的に解析して、沈着臓器あるいは変異 TTR の種類による相違を検討し、FAP 患者の心アミロイドーシスの発症・進展機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

臨床的に心不全症状を有して死亡し、剖検で心筋にアミロイド沈着を認めた FAP 患者 6 例 (Met30;2 名, Leu30;2 名, Ala38;2 名)を対象とした(表 1)。これらの症例のうち、Leu30 を有する FAP 患者 1

例(表 1、症例 3)は 54 歳時に生体部分肝移植を受けた症例であり、患者は術前には心不全症状を示さなかったが、胸部 x 線検査上軽度の心肥大を認めた。肝移植施行後、この症例の心筋は徐々に肥厚し、術後約 1 年の経過で、心不全症状が急速に増悪し死亡した。

2. 心筋アミロイドの単離

剖検時に採取して凍結保存した心筋を用いて、組織に沈着したアミロイド線維を Pras らの方法に準じた水抽出法により単離した。Congo red 染色および電子顕微鏡によりアミロイド線維が単離されていることを確認した。

3. 心アミロイドから得られた TTR の質量分析

6 例の FAP 患者から単離したアミロイド画分を、塩酸グアニジンと dithiothreitol(DTT)を含むトリス緩衝液中で溶解し、十分に透析した後に抗 TTR 抗体(DAKO)によりアミロイド由来の TTR を免疫沈降させた。得られた沈降物を MALDI/TOF 型質量分析計(Voyager-Elite Biospectrometry Workstation, Perkin Elmer)に導入し、その質量スペクトラムを得た。

4. 二次元電気泳動(2D-PAGE)

FAP 症例 5, 6 (表 1 参照、Ala38TTR を有する症例)から単離したアミロイド画分を二次元電気泳動(Multiphore II system, Amersham Pharmacia)により解析した。アミロイド画分を Phast Gel Dry IEF ゲル(Amersham Pharmacia)を用いた等電点電気泳動で分離した後、このゲルを SDS-PAGE に apply した。ゲル上に分離された蛋白質を PVDF 膜に転写し、抗 TTR 抗体と反応させた後、peroxidase 標識二次抗体と ECL system(Amersham Pharmacia Biotech)により TTR の spot を検出した。

5. N 末端アミノ酸配列分析

2D-PAGE で分離したゲル上の TTR spot を切り出して、臭化シアン処理を行い

tris-tricine SDS-PAGE により分離した。分離した蛋白を PVDF 膜に転写し CBB で染色した後、truncated TTR に相当する ~13 kDa の band を切り出して、N 末端アミノ酸配列分析装置(Applied Biosystems 477A Pulsed Liquid Phase sequencer)にかけた。

C. 研究結果

1. 質量分析による心筋アミロイド内に存在する TTR 分子種の検討

FAP 患者の心筋アミロイドから得られた TTR 分子の質量スペクトラムには、正常 TTR に由来する peak ($m/z = 13,762$)と変異 TTR に由来する peak の両者が認められた(図 1)。これらの peak の振幅から心筋アミロイド内の正常 TTR と変異 TTR の存在比を算出すると、肝移植を行わず心不全症状で死亡した FAP 患者 5 例の心筋では正常 TTR と異常 TTR がほぼ 1:1 の割合で沈着し、この比率は変異 TTR の種類によらず一定であった。また肝移植後に心不全が増悪して死亡した症例(図 1、症例 3)では沈着アミロイドの約 80%が正常 TTR であった。

2. 二次元電気泳動による沈着 TTR の分析

症例 5 および 6 (Ala38TTR を有する)の心筋から得られたアミロイド画分を二次元電気泳動および immuno-blotting で分析すると、17kDa 付近に抗 TTR 抗体陽性の 2 つの major spots が認められた(図 2)。これらの spot は N 末端アミノ酸配列分析により TTR の spot であることが確認され、塩基性側の spot が変異 TTR (Ala38)分子であり、酸性側の spot が正常 TTR (Asp38)分子であった。各 spot の Densitometry からはこれらの変異 TTR と正常 TTR の存在比は約 1:1 であり、質量分析で得られた結果と一致する結果であった。

D. 考察

今回我々は、心筋では他臓器と比較してそのアミロイド沈着に対する正常 TTR の関与が大きいこと、正常 TTR の心筋への沈着は TTR の変異の種類に関係なくすべての変異 TTR について生じうる病態であること、およびこの正常 TTR の沈着は肝移植術施行後も進行しうる病態であることを明らかにした。またこれらの結果からは、他のアミロイドーシスと同様に、FAP 患者の心筋においては、変異 TTR が TTR アミロイド沈着の seed となり一旦ある程度の seed が形成されればそこに正常 TTR の沈着が加わりアミロイドーシスの進行が促進される、という病態進展機序の存在が示唆される。肝移植後の神経症状の経過を検討した報告では、肝移植を行うことにより生命予後にとって重要である自律神経障害を含む神経症状の進行は阻止できることが示されている。これらの報告と今回の結果は、心アミロイドーシスが FAP 患者の生命予後にとって極めて重要であること、さらに、従来 FAP 患者の肝移植では患者の罹病期間および主たる臨床症状すなわち末梢神経障害と自律神経障害の重症度から手術適応が判定されてきたが、FAP の根治療法としての肝移植術の適応を考慮する際には心ア

ミロイドーシスの術前評価が不可欠であることを示している。

E. 結論

1. FAP 患者の心筋アミロイド沈着の進展には正常 TTR の関与が大きく、このことは変異 TTR の種類に関係なく認められる。
2. 心筋への正常 TTR の沈着は、十分な seed となる変異 TTR の沈着が存在すれば、肝移植術施行後も増悪する可能性がある。
3. FAP 患者に肝移植術の適応を考慮する際には心アミロイドーシスの術前評価が不可欠である。

F. 研究発表

学会発表

- 1) T. Higashikata, M. Yazaki, S. Ikeda, A. Nakamura, K. Higuchi. Biochemical analysis of amyloid protein in the heart of patients with Ala38TTR variant. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders & The 3rd International Workshop on Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy, Umeå, Sweden, June 3-5, 1999.

図 1. Mass spectrometry of immunoprecipitated TTR extracted from cardiac amyloid in the 6 patients with FAP.

The amyloid fibrils (1 mg) extracted from cardiac muscles of the 6 patients with FAP were incubated in Tris buffer containing 6M guanidine-HCl and 50 mM DTT. After extensive dialysis, TTR molecules that had constituted amyloid and dissolved in the Tris buffer were precipitated with polyclonal anti-TTR antibody (Dako). Lyophilized precipitates were loaded onto MALDI/TOF mass spectrometry (17). Cardiac amyloid protein is composed of both the variant and wild-type TTR (m/z 13,762, dotted line). Variant TTRs are indicated by arrowheads (m/z 13,794, Met30 TTR), filled arrows (m/z 13,776, Leu30 TTR), and open arrows (m/z 13,718, Ala38 TTR). The mass spectrum of immunoprecipitated TTR from the serum of a normal control was shown in the bottom column.

図 2. 2-D PAGE analysis of cardiac amyloid protein in patient 5 with Ala38 TTR.

Water-extracted amyloid fractions were processed to isoelectric focusing (IEF) under the reduction condition in the presence of 8 M Urea and 0.1 % Triton X 100. After IEF, the gels were processed to SDS-PAGE (15 %). After the electrophoresis, proteins were transferred onto Immun-blot membranes, then reacted with a polyclonal anti-TTR antibody (Dako) and peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibodies (Biolabs). Immunoreactive spots were detected with ECL Western blotting analysis system (Amersham Pharmacia biotech). Amino acid sequencing confirmed that the basic spot and the acidic consisted of variant (Asp38Ala) and wild-type TTR, respectively

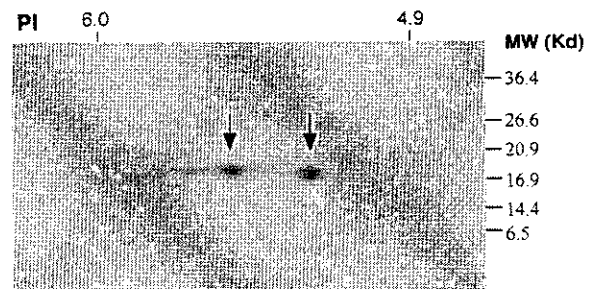
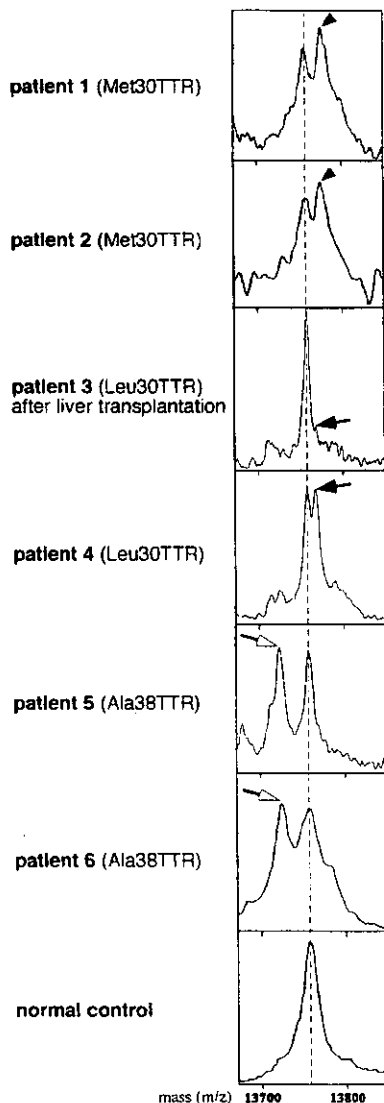


図 2

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

軽微な末梢神経障害を呈するトランスサイレチン型 FAP

分担研究者 中里雅光 宮崎医科大学 第三内科 講師

研究要旨 本邦の心アミロイドーシス症例について血清 TTR の質量解析と TTR の遺伝子解析により、Asp18→Glu と Glu92→Lys の分子異常を同定した。両症例とも、心症状が短期間で増悪しているにも拘わらず、末梢神経障害の進行は、自覚症状ならびに末梢神経伝導速度検査上、ともに軽微であった。

A. 研究目的

緒言

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、トランスサイレチン (transthyretin: TTR) の遺伝子異常 (ミスセンス変異) により、異常 TTR がアミロイドを形成し、全身組織に沈着する常染色体優性遺伝疾患である¹⁾。FAP には発症年齢や臨床経過の異なるいくつかのサブタイプの存在が明らかになっている。われわれはまた、血清異常 TTR を簡便に且つ確実にスクリーニングする手法として、質量分析を用いた血清診断法を確立している²⁾。心障害は患者の予後を決定する極めて重要な因子であり、アミロイドーシスの临床上、重大な問題となる。最近見出した心アミロイドーシスが主体で、末梢神経障害は軽微だったトランスサイレチン型アミロイドーシスについて解析した。

B. 研究方法

方法

症例は日本人の 44 歳男性 (症例 1) と 71 歳男性 (症例 2)。両者ともアミロイドーシスの家族歴がなく、拘束型心筋症や

不整脈、起立性低血圧症を呈した。心症状の発症 5 年と 6 年を経ても、末梢神経障害は軽微で、継年的な末梢神経の電気生理的検査でも軽度の異常しか示さなかった。コンゴー赤染色と TTR 抗体を用いた免疫染色により、TTR 由来のアミロイド沈着を確認した。血清 5μl を飛行時間型質量分析法で分析し、血清変異型 TTR の検査を行った。さらに TTR 遺伝子の全エキソンの塩基配列を決定した。

C. 研究結果

結果

血清 TTR の質量解析により、症例 1 から +14 dalton の質量増加を示す変異 TTR を認めしたが、症例 2 からは質量の異なる変異 TTR を検出できなかった。白血球 DNA を用いた TTR の遺伝子解析により、症例 1 からは Asp18→Glu を、症例 2 からは Glu92→Lys の分子異常を同定した。2 症例とも、変異遺伝子に対し、ヘテロ接合体であった。また心症状が短期間で増悪しているにも拘わらず、末梢神経障害の進行は、自覚症状ならびに末梢神経伝導速度検査上、ともに軽微であった。