

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

平成 12 年度 研究報告書

平成 13 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. AA アミロイドーシス(AMY)を合併した慢性関節リウマチ(RA)における SAA1 遺伝子多型と生命予後	7
高杉 潔 道後温泉病院リウマチセンター リウマチ科	
2. 血清アミロイド A(SAA)遺伝型とアミロイド原生、血中濃度、代謝の関連	12
高杉 潔 道後温泉病院リウマチセンター リウマチ科	
3. アミロイドーシスと異物型多核巨細胞反応について	15
由谷親夫 国立循環器病センター臨床検査部病理	
4. リアルタイム PCR を用いた SAA アイソフォーム mRNA 発現の解析と IL-6 シグナル伝達阻害による抑制効果の検討	18
吉崎和幸 大阪大学健康体育部健康医学第一部門	
5. 腎アミロイドーシスに関する病理学的検討 —AL 型アミロイドーシスと AA 型アミロイドーシスの比較—	24
下条文武 新潟大学第二内科	
6. β 2-ミクログロブリン関連アミロイドーシスにおけるグリコサミノグリカン 及びプロテオグリカンの影響	30
内木宏延 福井医科大学第二病理	
7. 長期透析例における透析アミロイドーシス発症、進展因子の検討	35
原 茂子 虎の門病院腎センター内科	
8. β 2 Microglobulin 吸着器および小型化吸着器使用の臨床的検討	39
原 茂子 虎の門病院腎センター内科	

9. 骨格筋内にアミロイド沈着を認めた長期透析の一例	43
原 茂子 虎の門病院腎センター内科	
10. A β アミロイドの APPsw mice における沈着機序	47
東海林幹夫 群馬大学神経内科	
11. 脳 A β アミロイドーシスは痴呆を引き起こす	54
東海林幹夫 群馬大学神経内科	
12. 神経細胞内のタウ蛋白蓄積と記憶運動機能障害の低下を認めた変異タウ(R406W)トランスジェニックマウスの検討	59
東海林幹夫 群馬大学神経内科	
13. A β アミロイドーシスは anti-amyloidogenic environment の再構築障害か?	63
東海林幹夫 群馬大学神経内科	
14. 脳アミロイドーシスの治療法の検討	68
東海林幹夫 群馬大学神経内科	
15. ダウン症候群における血漿アミロイド β 蛋白の再検討 —精神遅滞を有する疾患対照群との対比も含めて—	72
玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科	
16. Chrysamine G (CG)は線維性 A β の神経毒性を抑制する	77
森 啓 大阪市立大学老年医学研究部門脳神経科学	
17. PC12D 細胞中に安定的に導入したヒトプレセニリン 1 の作用	82
森 啓 大阪市立大学老年医学研究部門脳神経科学	
18. 脳アミロイドアンギオパチー : paraoxonase 遺伝子多型、血清脂質、動脈硬化との 関連	87
山田正仁 金沢大学神経内科	

19.	開放反応系を用いたアルツハイマー病 β アミロイド線維形成及び分解機構の解明	91
	内木宏延 福井医科大学第二病理	
20.	中枢神経系血管炎を伴う脳アミロイドアンギオパチーの臨床病理学的検討	95
	池田修一 信州大学第三内科	
21.	中枢神経症状を呈した家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP ATTR Try114Cys)の病態解析	100
	安東由喜雄 熊本大学臨床検査医学講座	
22.	家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) のトランスサイレチン (TTR) 代謝におけるリポ蛋白の重要性について	106
	安東由喜雄 熊本大学臨床検査医学講座	
23.	手根管症候群を特徴とする家族性アミロイドポリニューロパチー	112
	中里雅光 宮崎医科大学第三内科	
24.	FAP 患者に対する補助的同所性部分肝移植 (APOLT) 治療の有効性	114
	池田修一 信州大学第三内科	
25.	本邦における FAP 家系の地理的分布状況とその遺伝子変異の多様性	117
	池田修一 信州大学第三内科	
26.	変異導入マウスを用いた遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析	120
	前田秀一郎 山梨医科大学第一生化	
27.	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	124
	今井浩三 札幌医科大学第一内科	
28.	AL アミロイドーシスに伴うニューロパチーの病態と診断：家族性アミロイドポリニューロパチーとの比較	128
	山田正仁 金沢大学神経内科	

29. AL アミロイドーシスを免疫組織化学的に診断しう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 (第二報).....	132
石原得博 山口大学第一病理	
30. SCID-hIL6 transgenic mice への患者骨髄腫細胞の移植	136
河野道生 山口大学寄生体 (免疫血液) 学	
31. 多発性骨髄腫に対する多剤併用大量化学療法による末梢血幹細胞移植.....	140
麻奥英毅 広島赤十字原爆病院第 4 内科	
32. 血液透析導入後に生体肝移植を行った原発性アミロイドーシスの一例.....	144
下条文武 新潟大学第二内科	
33. β_2 M アミロイド骨関節病変における matrix metalloproteinase(MMP)と vascular endothelial growth factor(VEGF)の発現に関する検討.....	150
下条文武 新潟大学第二内科	
34. ApoA2 ^a allele を持つマウスにおけるアミロイド沈着.....	153
樋口京一 信州大学加齢適応研究センター 脈管病態分野	
35. 種を超えたアミロイドーシス誘導の可能性: マウスモデルを用いた解析 樋口京一 信州大学加齢適応研究センター 脈管病態分野	158
36. 食事脂肪による老化アミロイドーシスの制御 ー老化促進モデルマウス (SAM) を用いてー.....	163
樋口京一 信州大学加齢適応研究センター 脈管病態分野	
37. 角膜ラクトフェリンアミロイドーシスの同定	166
安東由喜雄 熊本大学臨床検査医学講座	
38. <i>In vitro</i> selection 法によるアミロイド結合性核酸の探索	172
馬場 聡 浜松医科大学病理学第二	

[Ⅲ] 研究成果の刊行に関する一覧表	175
[Ⅳ] 班構成員名簿	195

[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)

アミロイドーシスに関する研究 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 修一 信州大学医学部 教授

要旨 臨床病理学的に多様性を有するアミロイドーシスに対して、個々の病態に即した適切な診断法と治療法を確立することが望まれる。本年度はAL、AA、脳アミロイドーシスの各分野で治療法の進歩があった。またALアミロイドーシス診断時の組織反応性が特異的に出る血清抗体の作成、わが国におけるFAP患者の実態把握、病態解析面ではAlzheimer病のモデルとしてA β 過剰産生マウスに加えて、tauopathyの病理像を呈するtransgenic miceも作成され、今後の研究への応用が期待される。

分担研究者名

今井浩三 (札幌医科大学・教授)
 玉岡 晃 (筑波大学臨床医学系・助教授)
 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 (山梨医科大学医学部・教授)
 石原得博 (山口大学医学部・教授)
 中里雅光 (宮崎医科大学医学部・講師)
 馬場 聡 (浜松医科大学医学部・助教授)
 森 啓 (大阪市立大学医学部・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)
 麻奥秀毅 (広島赤十字原爆病院・副部長)
 河野道生 (山口大学医学部・教授)
 安東由喜雄 (熊本大学医学部・講師)
 内木宏延 (福井医科大学医学部・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)
 高杉 潔 (道後温泉病院リウマチセンター・理事長)

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て、有効な治療法を確立することを目的とする。

その中で今年度は各分野で以下の目標を立てた。1)ALアミロイドーシス：ヒト骨髓腫細胞をSCID-hIL6 transgenic miceへ移植することで本疾患のモデル動物を作成すること、末梢血幹細胞移植を併用した有効な化学療法確立、2)AAアミロイドーシス：慢性関節リウマチ患者における本疾患の発生予防のための具体的対策、既に本疾患を併発した患者にはその治療指針の作成、3)FAP：肝移植以外の治療法の開発、4)透析アミロイドーシス：本疾患の発生予防を目的とした透析装置の改良、薬物療法の開発、5)脳アミロイドーシス：早期診断法の確立、特に脳生検を実施するに当り倫理的側面の検討、transgenic miceを用いて有効な薬物療法の開発、6)マウス老化促進アミロイドーシス：変異立体構造を有するapoA-IIが糞便を介して他の個

体マウスにアミロイドーシスを伝播するかどうかのさらなる検討とヒトアミロイドーシスにおける類似性の有無の検討。

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）。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。同時に血液、生検組織を用いた本疾患の早期診断法を確立する（石原、由谷、麻奥）。AL アミロイドーシスの化学療法を確立する（麻奥、今井、山田）。
- 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）。平成 12 年度は患者血清中の IL-6、SAA 濃度を指標として、AA アミロイドーシス患者に対する副腎皮質ステロイドホルモン、シクロスポリンの治療効果を複数施設で検討する（高杉、吉崎、下条、原、池田、山田）。
- 3) 家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）：国内における本症患者の実態

- 調査、遺伝子変異の多様性を調査する（池田、中里、安東）。過去に国内・国外で肝移植を受けた FAP 患者、平成 11 年度にドミノ移植として FAP 患者の肝臓を移植された second donor 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）。また異なる transthyretin 遺伝子変異を導入した transgenic mice を作成し、アミロイド沈着機序の差異を検討する（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、その治療効果を引き続き判定する（原）。分光蛍光定量法により in vitro で $\beta 2$ microglobulin がアミロイド細に変換される病態を詳細に観察できるシステムは既に確立されている。平成 12 年度はこの実験系を用いて、患者から抽出した $\beta 2$ microglobulin アミロイド細線維そのものが可溶性 $\beta 2$ microglobulin のアミロイドへの変換、その伸長反応へどのような影響を与えるのかを検索する。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 β の加齢による生理的変動を測定し、A β 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、森）。平成 12 年度は脳実質へ A β アミロイドが沈着する transgenic mice 系列へ抗 A β 42 抗体を投与することで、A β アミロイドの沈着阻止が可能かどうかを検討する（東海林、森、玉岡）。また脳血管アミロイドーシスに起因する脳出血の再発予防に対し副腎皮質ステロイドホルモンが有効である可能性を昨年度提唱したが、本年度はステロイドホルモンが A β 代謝に及ぼす影響を臨床的ならびに動物実験で検討する（池田、山田、

玉岡)。

- 6) 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。また平成 12 年度はヒト臓器から抽出した種々なアミロイド細線維を本疾患マウスへ注射し、このアミロイド細線維を核としてマウス本来のアミロイド沈着が起こるかどうかを検討する(異種動物間におけるアミロイドーシス伝播の研究)(樋口)。

(倫理面への配慮)

本研究の対象となる患者に対しては研究の主旨を十分説明し(インフォームドコンセントを行う)、その後同意が得られた患者のみに適応外の薬剤投与を行う。知的障害を伴う Alzheimer 病患者の人権に配慮して、患者とともに配偶者、家族にも十分説明し、種々な検査時には書面で確認をとる。さらに特殊な療法を行う際にはそれぞれの属する施設の倫理委員会の承認を前提とする。動物実験の場合はそれぞれの施設の動物実験委員会の許可を得て行う。

C. 研究結果

- 1) AL アミロイドーシス：アミロイド惹起性のヒト骨髄腫細胞を SCID-hIL6 transgenic mice へ移植することで本疾患のモデル動物を作成しようとする試みは、本年度ヒト骨髄腫細胞がこのマウス腹腔内で 2 週間以上生着することが確認できた(河野)。また昨年度から行って来た AL アミロイドに対する特異抗体の作成については、本年度 κ 鎖、 λ 鎖の両方に対する特異抗体が精製され、臨床診断に使用可能な段階に到った(石原)。臨床面では本疾患の原因となる多発性骨髄腫の治療として本年度新たに末梢血幹細胞移植を併用した多剤併用の強力化学療法が 10 数名に行われ、その有効性が実証された(麻奥)。免疫グロブリン L 鎖の可変領域に対するアンチセンス治療法の試みも報告された(今井)。

さらに著しい肝腫大を伴う AL アミロイドーシス患者に対して血液透析導入後生体肝移植を行い、成功したことが本邦で初めて報告された(下条)。病態比較では AL アミロイドーシスに伴うポリニューロパチーと FAP とでは末梢神経障害が非常に類似しており、特に高齢者では M 蛋白血症があっても FAP の可能性を疑って遺伝子解析をする必要があることが強調された(山田)。AL 型と AA 型における腎病変の比較では、アミロイド沈着が AL 型では糸球体糸球壁に強く、AA 型では髄質内直細動脈をはじめとする血管壁に優位であることが示された(下条)。

- 2) AA アミロイドーシス：慢性関節リウマチ患者を対象に AA アミロイドーシスを合併し易い遺伝的背景を検索し、SAA1-genotype が γ/γ である患者はリスクが高いことが示された。また SAA1.5 アリルの保有者は血中 SAA 濃度が高値になるが、本蛋白のクリアランスが遅いことが影響している可能性があり、血中濃度とアミロイドーシスの発症に直接因果関係があるわけでないことが示された(高杉)。In vitro で抗 IL-6 受容体抗体を投与すると SAA1 mRNA の発現が 90%以上抑えられることが証明され、抗 IL-6 受容体抗体の投与は慢性関節リウマチ患者が本アミロイドーシスを発生することを予防できる可能性が示された(吉崎)。
- 3) FAP：わが国における FAP 家系の実態が明らかにされた。すなわち Met30TTR 型は熊本県荒尾市と長野県上水内郡小川村の二大集積地以外に約 40 家系が存在すること、弧発家系では高齢発症の傾向があること、non-Met30TTR 家系は遺伝子変異が 14 種類、家系は 22 家系以上あること、Met30TTR 型に比して心病変の程度が

強いこと、また non-Met30TTR 家系では手根管症候群で発症する例が少なくないことが示された（池田、中里、安東）。硝子体混濁、髄液の循環障害などの中枢神経病変を伴う Cys114TTR 型 FAP の剖検所見が報告された（安東）。TTR の体内における代謝状態の検索では、TTR は血中のリポ蛋白、特にカイロミクロンと結合した状態にあることが示された（安東）。生体肝移植でドナーから得られるグラフトが小さい場合には、まず一期手術としてグラフトを FAP 患者の肝左葉部分に移植して本来の右葉を残し、移植した左葉がある程度大きくなったところで二期手術として残存する右葉を摘出する方法（補助肝移植：APOLT）が報告された（池田）。トランスジェニックマウスを用いた FAP 発症機序の解析として、マウス Met30TTR 遺伝子とヒト Met30TTR 遺伝子を導入した場合の比較では、前者の方ではアミロイド沈着が起こらないことが示された（前田）。

- 4) 透析アミロイドーシス：本病変の発生機序として局所の matrix metalloproteinase、vascular endothelial growth factor が重要であること（下条）、遺伝的には細胞外 superoxide dismutase の遺伝子多型が関与していることが示された（原）。またアミロイド前駆蛋白である $\beta 2$ ミクログロブリンを選択的に吸着する小型カラムの臨床応用性についても検討がなされた（原）。26 年間の長期透析を受けた患者では全身の諸臓器、特に従来注目されていなかった骨格筋に多量のアミロイド沈着が生じることが報告された（原）。グリコサミノグリカン、プロテオグリカンを用いた *in vitro* $\beta 2$ アミロイドーシスの生成機序の研究では、両物質がアミロイド伸長機構に影響を与えていることが示された（内

木）。

- 5) 脳アミロイドーシス：A β を過剰産生する transgenic mice を用いて脳内でもアミロイド沈着機序の詳細が解明され、また Alzheimer 病の発生に際して脳アミロイド沈着がキーポイントであることが改めて確認された。また本モデルマウスを用いて A β のワクチン療法の基礎的実験が開始された。同様に変異 tau 遺伝子を導入した transgenic mice では運動機能の低下と脳の広範な領域の神経細胞内に tau の蓄積が起こることが示された。また血漿中のリポ蛋白フリーの A β 濃度が年齢依存性に変化しており、これが脳への A β アミロイド沈着の critical determinant になる可能性が示された（東海林）。一方、ダウン症候群を含む精神遅滞と血漿中 A β 分画濃度との間には一定の関連がないことが示された（玉岡）。また A β と結合性が高い chrysamine G は A β の神経毒性を抑制すること、PC12D 細胞に導入したヒトプレセニン1の作用機序も報告された（森）。臨床的研究として脳アミロイドーシスの診断に対する脳生検の有用性と安全性、血管炎を合併した本疾患例が報告された（池田ら）。
- 6) マウス老化促進アミロイドーシス：このマウス系列に本疾患のアミロイド前駆体である ApoAII 由来アミロイド線維、さらに種々なアミロイド蛋白から成るアミロイド線維を注射したところ、全ての例で非投与群よりアミロイド沈着が促進された。投与されたアミロイド線維を核にアミロイド沈着の伸展が起こることが証明され、アミロイド惹起性の線維構造の伝播で病気が伝播される可能性を今後もさらに追求する必要があることが示された（樋口ら）。
- 7) その他：全身性アミロイドーシスの中で心病変が目立つ AA アミロイドーシ

スと FAP の 2 例について、全身のアミロイド沈着が目立つ臓器において異物型多核巨細胞が存在することが報告された（由谷）。また繰り返す睫毛内反に伴う角膜アミロイドーシスの原因蛋白としてラクトフェリンが同定され（安東）、*in vitro selection* 法を適応してアミロイド結合性核酸検索の予備実験結果の報告がなされた（馬場）。

D. 考察

従来、アミロイドーシスは不治の病との概念が定着していたが、本研究班ではこの固定概念を打破することを最大の目標としている。本年度は AL アミロイドーシスの治療戦略の第一歩として、多発性骨髄腫に対する末梢血幹細胞移植を併用した大量の化学療法の有効性、本疾患が原因で肝腫大が著しい患者への生体肝移植などが報告された。また AA アミロイドーシスに対する抗サイトカイン療法（抗 IL-6 受容体抗体療法）も着実に臨床応用への道を歩んでいる。

同様に、透析アミロイドーシスでは新たな薬物療法、改良され小型化された透析カラムの長期使用成績が明らかにされ、この領域でも治療法の進歩が伺える。さらにアミロイドーシスの中でも治療へのアプローチが最も困難と考えられていた Alzheimer 病を代表とする脳アミロイドーシスに対しても、モデル動物を使ってワクチン療法が開始されたことは特筆に値する。

一方、診断面でも貴重な進歩があった。AL アミロイドーシスの確定診断は組織に沈着したアミロイドを免疫組織化学的に A κ または A λ 抗体で染め分けることである。従来市販されている抗体はいずれも非特異的反応性が強く、正確な診断に用いることは出来ず、唯一 1980 年に Fujihara、Glenner らが作成して石原らが保有している抗体が利用可能であった。その最大の理由はアミロイドとなる免疫グロブリンの

L-chain のアミノ酸配列の多様性に起因すると考えられる。今回石原らがこれらの問題点を克服して臨床診断に有用な抗体を精製で来たことは今後わが国で、本疾患の診断・治療を行う上で非常に有用である。FAP は遺伝子解析を中心とする診断法の著しい進歩により、最近のその患者数は増加傾向を示し、また同時に本疾患の臨床像の多様性が注目されている。しかしわが国における FAP 患者の実態は未だ不明な点が多かった。今回 FAP に関与している班員の共同研究により本邦の FAP 家系の地理的分布状況、臨床像ならびに遺伝子変異の多様性が明らかにされた。FAP は熊本県荒尾市または長野県上水内郡小川村に存在する本疾患の集積地を中心に発生する地域病との概念が長らく定着していたが、今回の調査結果で本疾患はわが国のどの地域にも存在する疾患であることが明らかとなった。おそらく本疾患はわが国における遺伝性ニューロパチーの中で一、二位の頻度で多い疾患と位置付けられると考えられる。

病態解析の面でも昨年度に引き続いて *in vitro* でのアミロイド生成実験、FAP・Alzheimer 病の動物モデルとなる *transgenic mice* を用いた研究、老化促進マウスでのアミロイド細線維を播種することでの個体間におけるアミロイド沈着促進などの研究成果が発表された。この分野は今後アミロイドーシスに対する薬物療法の開発などで非常に重要になると考えられる。さらに遺伝子治療などの新たな治療戦略への取り組みも本班として必要であろうし、またアミロイドーシスに対する一貫した診断・治療が行える拠点作りも合わせて考えていかななくては課題である。

E. 結論

種々なアミロイドーシスの病態解析、診断法、治療法の開発の各分野で進歩があった一年であった。来年度は三年目の評価を受ける年であり、一層の発展を期待した

い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

分担研究報告参照。

H. 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

なし

[Ⅱ] 分担研究報告

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

AA アミロイドーシス(AMY)を合併した慢性関節リウマチ(RA) における SAA1 遺伝子多型と生命予後

分担研究者 高杉 潔 道後温泉病院リウマチセンター、リウマチ科

共同研究者 奥田恭章*、山田俊幸**

*道後温泉病院リウマチセンター、リウマチ科、**順天堂大学医学部、臨床病理学

研究要旨 【目的】 RA における AA アミロイドーシスの発症において SAA1.1 (α) は防御的に、SAA1.3 (γ) は促進的に働くと考えられる。さらに、SAA1 遺伝子型の相違が AMY 合併 RA の臨床経過及び生命予後に影響を及ぼすかを検討した。【対象及び方法】 SAA1 遺伝子型を PCR-RFLP 法にて解析した AMY 合併 RA の 80 例のうち、genotype が、1.1/1.1 の 4 例 (AMY 診断後平均観察期間 55.2 カ月)、1.5/1.5 の 8 例 (同 50.7 カ月)、1.3/1.3 の 17 例 (同 55.3 カ月) を対象とし、それぞれの群の臨床背景及び生命予後を比較検討した。【結果】 (1) 1.1/1.1 群、(2) 1.5/1.5 群、(3) 1.3/1.3 群のそれぞれの群における重症消化管病変イベントの頻度は、(1) なし、(2) 1 例、12.5%、(3) 7 例、41.2%、また、腎不全の進行は、(1) なし、(2) 1 例、12.5%、(3) 5 例、29.4%であった。死亡例におけるアミロイドーシスの関与は、(1) 死亡例なし、(2) 3 例中 1 例、(3) 5 例中 4 例であった。【結語】 SAA1 遺伝子型の相違は AMY 合併 RA の臨床経過及び生命予後に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

RA における AA アミロイドーシスの発症において SAA1.1 (α) は防御的に、SAA1.3 (γ) は促進的に働くと考えられる。今回さらに、SAA1 遺伝子型の相違がアミロイドーシス合併 RA の臨床経過及び生命予後に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1. 対象

対象は、SAA1 遺伝子型を PCR-RFLP 法にて解析したアミロイドーシス合併 RA の 80 例のうち、genotype が、1.1/1.1、1.5/1.5、

1.3/1.3 のホモ症例を対象とした。それぞれ、1.1/1.1 は 4 例、1.5/1.5 は 8 例、1.3/1.3 は 17 例であり、これらの計 29 例を検討した。

2. 対象の臨床背景

それぞれの群におけるアミロイドーシス診断からの平均観察期間は、1.1/1.1、55.2 \pm 42.7 カ月、1.5/1.5、50.7 \pm 21.9 カ月、1.3/1.3、55.3 \pm 39.0 カ月であった。

また、死亡例を含めた最終観察時年齢の平均は、それぞれ、1.1/1.1、71.8 \pm 11.3 歳、1.5/1.5、71.0 \pm 8.5 歳、1.3/1.3、67.3 \pm 11.0 歳であった。

これらアミロイドーシス合併 RA 29 例

に対する治療は以下のとおりである。アミロイド蛋白の凝集阻止を目標に Dimethylsulphoxide(DMSO)は、皮膚外用塗布にて全例に投与を行った。また、SAAの産生抑制及び関節炎の抑制を目的に疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs) 及びステロイド剤の投与または、ステロイド剤単独の投与を行った。DMARDs 及びステロイド剤の投与は 22 例で、このうち、DMARDs 併用療法を 9 例に、免疫抑制剤投与を 12 例に行い、強力な SAA 及び関節炎の抑制を目指した。併用例を含む投与 DMARDs の種類及び症例数は、メソトレキサート、9 例、アザチオプリン、3 例、チオプロニン、8 例、サラゾスルファピリジン、7 例、ブシラミン、3 例、D-ペニシラミン、2 例、金チオリンゴ酸ナトリウム、1 例であった。一方、ステロイド剤単独例は 7 例で、アミロイドーシスによる臓器障害などから DMARDs の使用が困難な症例が主な対象であり、プレドニゾロンで平均 8.9mg/day (5 - 15mg/day) が使用されていた。なお、genotype の相違による治療方針の差は特にもうけなかった。

3. 検討事項

- (1) 重症消化管病変イベント
- (2) 腎機能の推移及び腎不全
- (3) 生存率 (Kaplan-Meier 法)
- (4) 死亡症例の死因とアミロイドーシスの関与についてそれぞれの群での比較、調査を行った。

(倫理面への配慮)

サンプルの採取においては個々に承諾を得た。

C. 研究結果

(1) 重症消化管病変イベント

重症消化管病変は、麻痺性イレウス、虚血性腸炎による下血、難治性下痢のいずれかとした。診断時から現在までの重症消化管病変イベントは、それぞれ、1.1/1.1 は、

なし、1.5/1.5 は 1 例、12.5%、であるのに対して、1.3/1.3 は 7 例、41.2% と高頻度に重症消化管病変イベントを生じた (表 1)。

(2) 腎機能の推移及び腎不全

1.1/1.1 は、平均観察期間 55.2 カ月の間にクレアチニンの上昇を認めた症例はなかった (図 1)。1.5/1.5 は 1 例が、腎機能の急速な悪化から、透析にいたった (図 2)。1.3/1.3 は、平均観察期間 55.3 カ月で、5 例においてクレアチニンの上昇が認められ、3 例は透析にいたっている (図 3)。以上をまとめると、腎不全進行例は、1.1/1.1 は、なし、1.5/1.5 は、1 例、12.5% に、1.3/1.3 は 5 例、29.4% に認められた (表 2)。

(3) 生存率 (Kaplan-Meier 法)

それぞれの群のアミロイドーシス診断時からの 7 年生存率は、それぞれ、1.1/1.1、100%、1.3/1.3、66.4%、1.5/1.5、54.7% であった。

(4) 死亡症例の死因とアミロイドーシスの関与

死亡症例と死因を表 3 に示す。1.1/1.1 は全例生存、1.5/1.5 は 8 例中 3 例が死亡した。死因は、腎不全、1 例、敗血症、2 例であった。死亡にアミロイドーシスの関与が考えられるたのは 3 例のうち 1 例であった。1.3/1.3 は、17 例中 5 例が死亡した。死因は、腎不全、3 例、肺炎、2 例であった。5 例のうち 4 例は死亡にアミロイドーシスが関与していたと考えられた。

D. 考察

今回我々は、SAA1 genotype 調査後、長期間の観察により SAA1 genotype の相違がアミロイドーシスの臓器障害の進行や予後に影響を及ぼすかを検討した。SAA1.1/1.1 の 4 例は平均観察期間 55.2 カ月の時点で全員生存し、また、重症消化管病変イベントの出現、腎機能の悪化はいずれの症例においても認めず、AA アミロイドーシスの発症だけでなく、進行において

も防御的に関与していることが示唆された。一方、SAA1.3/1.3 では重症消化管病変イベントを 7 例 (41.2%) に、腎不全の進行を 5 例 (29.4%) に認め、死亡例の 5 例のうち 4 例はアミロイドーシスの関与が認められ、AA アミロイドーシスの臓器病変の進行及び予後の悪化に関与していることが示唆された。なお、7 年生存率では SAA1.5/1.5 が 54.7% ともっとも低かったが、アミロイドーシスが死因に関与していると考えられたのは 3 例中 1 例のみであり、臓器障害の進行や予後の悪化への関与は SAA1.3/1.3 より低いと考えられる。

E. 結論

SAA1.1/1.1 は臓器障害の進行を認めず、AA アミロイドーシスの進行において防御的に働いていることが示唆された。一方、SAA1.3/1.3 は、重篤な消化管障害や腎機能障害の進行例を多く認め、AA アミロイドーシスの進行に促進的に働いていることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 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

2. 学会発表

1) 奥田恭章、武田政寛、難波滋、大西誠、高杉潔：慢性関節リウマチにおける死因としての AA アミロイドーシス：第 15 回日本臨床リウマチ学会総会、別府、12/8 -12/9、2000

2) 奥田恭章、山田俊幸、高杉潔、武田政寛、難波滋、大西誠：慢性関節リウマチにおける SAA1 遺伝子型と SAA/CRP 比：第 44 回リウマチ学会総会、横浜、5/13 - 5/15、2000

H. 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

なし

図1.腎機能の推移：1.1/1.1

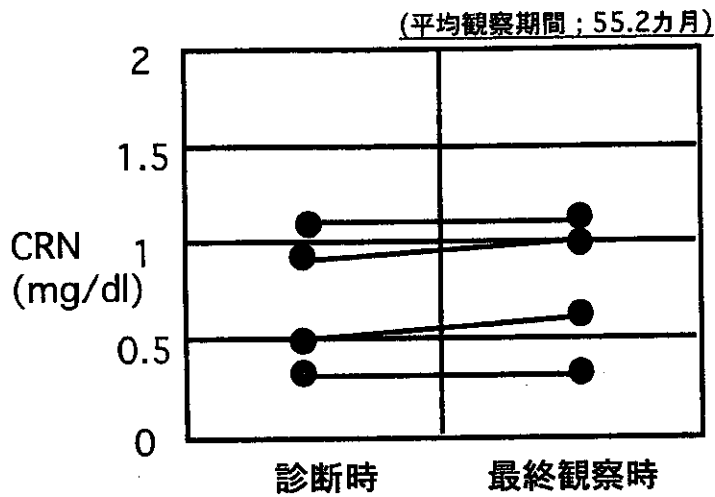


図2.腎機能の推移：1.5/1.5

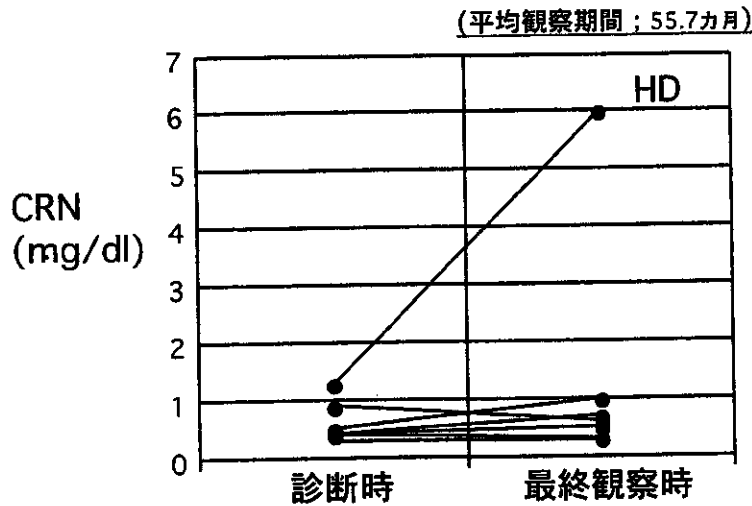


図3.腎機能の推移：1.3/1.3

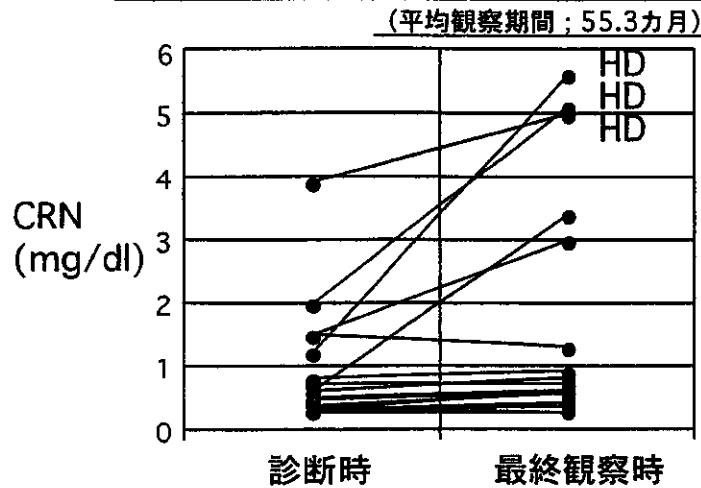


表1.重症消化管病変のイベント

genotype	症例数
<u>1.1/1.1 (α/α)</u>	0 / 4
<u>1.5/1.5 (β/β)</u>	1 / 8 (12.5%)
<u>1.3/1.3 (γ/γ)</u>	7 / 17 (41.2%)

表2.腎不全の進行症例

genotype	症例数
<u>1.1/1.1 (α/α)</u>	0 / 4
<u>1.5/1.5 (β/β)</u>	1 / 8 (12.5%)
<u>1.3/1.3 (γ/γ)</u>	5 / 17 (29.4%)

表3.死亡症例と死因

genotype	死亡数	死因	アミロイドーシスの関与
<u>1.1/1.1 (α/α)</u>	0 / 4		
<u>1.5/1.5 (β/β)</u>	3 / 8	腎不全 1例 敗血症 2例	<u>1/3</u>
<u>1.3/1.3 (γ/γ)</u>	5 / 17	腎不全 3例 肺炎 2例	<u>4/5</u>

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

血清アミロイド A(SAA)の遺伝型とアミロイド原性、 血中濃度、代謝の関連

分担研究者 高杉 潔 道後温泉病院リウマチセンター内科

共同研究者 山田俊幸*、奥田恭章**

*順天堂大学医学部臨床病理学

**道後温泉病院リウマチセンター内科

研究要旨 AAアミロイド前駆体である血清アミロイド A 蛋白アイソタイプ 1 (SAA1) exon 3 の主たる 3 種の多型が血中 SAA 濃度へ与える影響を検討した。また対応する SAA 表現型の遺伝子組み換え体を作製し、アミロイド原性についての生化学的比較検討を行った。280 例の健常者の SAA 濃度、316 例の慢性関節リウマチ (RA) 患者の SAA/CRP 比とも、SAA1.5 アリルのホモ接合体で最も高く、ヘテロ接合体がこれに続いた。遺伝子組み換え技術を用いリコンビナント SAA1.1, SAA1.3, SAA1.5 蛋白を大腸菌で発現させ、実験に用いた。10%酢酸条件下でのアミロイド線維様構造の電顕所見、高比重リポ蛋白 (HDL) 親和性において各アイソタイプ間に差異はなかった。マウスへ静注後のクリアランスでは rSAA1.5 が他より消失が遅いという結果が得られ、対応アリル保因者での血中濃度高値を説明するものと思われた。しかし、血中濃度、血中クリアランスとも本邦におけるアミロイドーシス感受性正の因子である SAA1.3 アリル、負の因子である SAA1.1 アリルならびにそれらの表現型間に差異はなく、アミロイド原性にはこれらの遺伝子多型に関連するような他の因子の関与も想定された。

A. 研究目的

AAアミロイド線維の前駆体である血清アミロイド A 蛋白 (SAA) には種々の遺伝子多型が存在し、アミロイド前駆体アイソタイプ 1 (SAA1) の exon 3 遺伝子多型は慢性関節リウマチ(RA)におけるアミロイドーシス感受性に関連している。すなわち、本邦では主たる 3 つのアリル、SAA1.1, 1.3, 1.5 がほぼ均等に出現するが、アミロイドーシス合併 RA 患者では、1.1 の頻度が少なく、1.3 の頻度が高い。その遺伝子効果の説明は未だなされていない。

本研究では①当該多型が血中 SAA 濃度に影響するか否か、②対応する SAA 表現型の遺伝子組み換え体を作製し、アミロイド原性に関連する種々の性質の検討を行った。

B. 研究方法

①SAA1 exon 3 多型の判明している 280 例の健常者、316 例の RA 患者につき、SAA、C-反応性蛋白 (CRP) 濃度を調べた。② SAA1.1 cDNA を鋳型に、変異導入 PCR で SAA1.3, SAA1.5 cDNA を調整し、既報に