

従い pET21 ベクター、*E. coli* BL21 システムで発現、それぞれのアイソタイプ rSAA を精製した。それぞれの rSAA1 を 10% 酢酸中で放置し、陰性染色後、電子顕微鏡でアミロイド線維様構造を観察した。各 rSAA1 とヒト正常 HDL を混和し、HDL への取り込みの経時変化、量比を変化させた場合の取り込み様式を検討した。各 rSAA1 を正常マウス HDL と再構成し、ICR マウスの尾静脈に投与、経時的に採血し、血中 SAA 濃度を酵素免疫法で測定し、その変化を調べた。

健常者サンプルは健康診断使用後のものを性別、年齢以外の情報を破棄して用いた。患者サンプルの採取においては個々に承諾を得た。動物実験は当該動物実験施設の実験承認を得た。

### C. 研究結果

健常者 SAA 濃度は、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。SAA1.5 保因者の平均は 4.5 mg/l、非保因者の平均は 2.2 mg/l ( $p < 0.001$ ) であった。SAA1.1 アリル、SAA1.3 アリル間に差異はなかった。患者群での SAA/CRP 比の平均も同様の傾向で、SAA1.5 保因者の平均は 9.1、非保因者の平均は 5.1 ( $p < 0.0001$ ) であった。ここでも SAA1.1 アリル、SAA1.3 アリル間に差異はなかった。

rSAA1 アイソタイプ間で、*in vitro* アミロイド様構造に差異はなかった。各アイソタイプとも混和後、80-90% が速やかに HDL 中に回収され、その経時変化、HDL の取り込み能に差異はみられなかった。マウス血中クリアランス実験は 2 回にわけて行われたが、1 回目は rSAA1.1、rSAA1.3 の半減期の平均が 20 分、rSAA1.5 のそれは 28 分であった。2 回目は rSAA1.1、rSAA1.3 の半減期の平均が 40 分、rSAA1.5 のそれは 70 分であった。rSAA1.5 のクリ

アランスが遅く、ここでも SAA1.1、SAA1.3 間に差異はなかった。

### D. 考察

本研究は本邦における AA アミロイドーシスの正の危険因子である SAA1.3 アリルと負の危険因子である SAA1.1 アリル間になんらかの差異を見出すことを目的としたが、期待に反し、この両者には検討した全てにおいて差異はなく、SAA1.5 が血中濃度に正の影響をするという予想外の結果が得られた。

アミロイド原性を考えるうえで、その蛋白の立体構造がもつ線維形成への直接影響が最も重要だが、今回の検討ではアイソタイプ間に差異はなかった。酢酸液中に放置するという実験系の妥当性 (SAA 蛋白は不溶性で適当な試験管内実験法がない) に問題は残るが、元来 SAA の線維形成能は N 末端にあるとされており、今回の多型部位は SAA 蛋白の中ほどであるため影響は少ないとも考えられる。次に問題となるのは前駆体の代謝と考え、SAA は HDL のアポ蛋白であることから、HDL との会合性を検討したが有意な所見はなかった。最後に血中クリアランスを検討した。これはマウス AA アミロイドーシスにおけるアミロイド原性 SAA アイソタイプは血中クリアランスが速いという所見を参考にしている。結果は SAA1.5 のクリアランスが遅く、このことがこのアリル保因者の SAA 高値を説明していることがわかったが、SAA1.1 と SAA1.3 間には差異がなかった。欧米では SAA1.5 はアミロイド非原性とされており、本邦でも SAA1.3 に比べればアミロイド非原性であることから、クリアランス実験の結果はアミロイド原性における SAA1.5 の性質を部分的に説明しているかもしれない。SAA1.1 と SAA1.3 の差異を説明するにはこの多型と連関するような他の因子の関与も考慮すべきと

考えられた。

#### E. 結論

SAA1.5 アリル保有者では血中 SAA 濃度が高く、表現型の血中クリアランスが遅いためと考えられた。rSAA1 アイソタイプの応用実験からは、SAA1.3 の好アミロイド原性を直接示唆する所見は得られず、本アリルのアミロイド原性は、この多型に関連した他因子の寄与が示想定された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamada T: Analysis of serum amyloid A1 exon 4 polymorphism in Japanese population. *Amyloid: Int J Clin Exp Invest* 7:118-120, 2000.
- 2) Yamada T, Okuda Y, Takasugi K, Itoh K, Igari J: Relative serum amyloid A (SAA) values: the influence of SAA1 genotypes and

corticosteroid treatment in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 60: 124-127, 2001

##### 2. 学会発表

- 1) Yamada T, Igari J, Kluve-Beckerman B, Benson MD: Preparation and characterization of human recombinant serum amyloid A1 isotypes. American College of Rheumatology 64th Annual Scientific Meeting. Philadelphia, PA, USA, October 30, 2000.
- 2) 山田俊幸：リコンビナント SAA1 アイソタイプの作製と応用. 第44回日本リウマチ学会総会. 東京. 2000年5月14日
- 3) 山田俊幸：血清アミロイド A (SAA) 遺伝子型と血中 SAA 濃度. 第47回日本臨床病理学会総会. 郡山. 2000年11月4日.

#### 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

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

## アミロイドーシスと異物型多核巨細胞反応について

分担研究者 由谷親夫 国立循環器病センター臨床検査部・病理

共同研究者 福原慎也\*、小西 登\*\*、中村陽一\*\*\*、中里雅光\*\*\*\*

\*奈良医科大学第1内科、\*\*同第2病理、\*\*\*岡山大学医学部循環器内科、\*\*\*\*宮崎医科大学第3内科

**研究要旨** アミロイド蛋白に対して異物型多核巨細胞反応をしめすことは、脳のアミロイドアンギオパチーでは、有名であるが、全身性アミロイドーシスでは文献的には知られているが、その頻度はきわめて低い。その上、なぜ異物型反応をしめすかはまだ明確な理由は分かっていない。

今回、われわれはアミロイド蛋白に対して異物型多核巨細胞反応をしめした2剖検例を経験したので、その病理組織学的所見について報告した。

### A. 研究目的

昭和52年に国立循環器病センターが開設されて以来23年間、病理部門において剖検された症例は2750例におよぶ。この中で全身性アミロイドーシスの症例は45例に達する。41例がALアミロイドーシス、2例がAAアミロイドーシス、他の2例がATTRであった。これらの全身性アミロイドーシスの中で異物型多核巨細胞反応を示した症例が2例みられた。その内訳は、ATTRとAAアミロイドーシスの2例である。

アミロイド蛋白に対して異物型多核巨細胞反応をしめすことは、脳のアミロイドアンギオパチーでは、有名であるが、全身性アミロイドーシスでは文献的には知られているが、その頻度はきわめて低い。その上、なぜ異物型反応をしめすかはまだ明確な理由は分かっていない。

今回、われわれはアミロイド蛋白に対して異物型多核巨細胞反応をしめした

2剖検例を経験したので、その病理組織学的所見について報告する。

### B. 研究方法

異物型多核巨細胞反応をしめした2剖検例は、以下のごとくである。

**ATTR例:** 患者は73歳、女性。8年前検診にて心臓が悪いと言われ、近医で治療を受けていた。約3年前、労作性狭心症の診断のもとに、心カテ検査を受けたが異常はなかった。死亡8ヶ月前、うっ血性心不全と心室性頻脈の診断を受け、当センターに入院したが、心エコー検査にて左心求心性肥大の所見があり、高血圧性心肥大と診断された。その3ヶ月後、呼吸困難が増強し、再度入院した。入院時諸検査にて、異常ガンマグロブリン血症、結核などの慢性炎症性疾患や明らかな末梢神経障害はなかった。しかし、今回入院時の心エコー検査にて、左室肥大心筋にキラキラエコー像、拡張障害、軽

度の肺高血圧がみられ、心アミロイド-シスが強く疑われたが、明らかな所見はえられないままに、高度の心不全とそれに伴う心室性頻脈から死亡した。

**AAアミロイド-シス例:**患者は63歳、男性。53歳ごろから慢性関節リウマチで近医にて加療中であった。1999年5月、労作時前胸部圧迫感を自覚し、近医受診し心電図で急性心筋梗塞と診断され、某大学病院に入院した。その後心筋梗塞は軽快したが、6月突然、右季肋部に腹痛が出現した。内視鏡検査にて、十二指腸炎を認めた。治療の結果、軽快したが、7月5日ごろから発熱を認め、胸写にて肺炎があり、抗生剤の投与を強力に施行したが改善せず、7月25日死亡した。

### C. 研究結果

免疫酵素抗体法により、第1例目はATTR、第2例目はAAアミロイド-シスと病理組織学的診断がなされた。とくに第1例目はホルマリン固定後の肝臓と脾臓を使ってDNAゲノムを調べたところ、Met30変異のATTRであることも判明した。

一方、異物型多核巨細胞の出現は、第1例目は主に腸管の小動脈の中膜から外膜にかけてみられ、多核巨細胞の中には抗ATTR抗体陽性のアミロイド蛋白が確認された。しかし、ほとんど炎症反応は認められず、僅かにリンパ球とマクロファージが浸潤していた。異物型多核巨細胞の出現は腸管以外では心筋、膀胱、脾臓などの小動脈に著明であった。

第2例目では、異物型多核巨細胞に加えて著しいリンパ球とマクロファージの浸潤が心臓の小動脈にみられ、血管壁の破壊を伴っていた。巨細胞性血管炎の像を呈していた。この所見は心臓以外では、やはり腸管、前立腺、そして副腎などに認められた。

### D. 考察

2例ともアミロイド蛋白になんらかの作用が加わり、異物反応を示す抗原性を獲得し、炎症を惹起したと考えられる。

第1例目において、異物型巨細胞反応を示すぐらい強い抗原性をもつには、いくつかの点変異があるといわれていたので、われわれも検討してみたが、唯一つだけしかみつからなかった。

第2例目では、炎症細胞からIL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ などのサイトカインが分泌され、血管壁破壊が生じた可能性が示唆された。しかも、典型的な顕微鏡的多発性動脈炎の像を示していたことは今後の問題点として重要と考えられた。

### E. 結論

2例ともアミロイド蛋白になんらかの作用が加わり、異物反応を示す抗原性を獲得し、炎症を惹起したと考えられる。しかし、これらの抗原性に関しては現時点で不明といわざるをえない。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Nakamura Y, Yutani C, Nakazato M, Date Y, Baba T, Goto Y: A case of hereditary amyloidosis transthyretin variant Met 30 with amyloid cardiomyopathy, less polyneuropathy, and the presence of giant cells. *Pathology International* 49: 898-902, 1999.

### 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

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

## 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

分担研究者 吉崎和幸<sup>\*,\*\*</sup> 教授

共同研究者 萩原圭祐<sup>\*\*</sup>、中原英子<sup>\*\*</sup>、杉本正道<sup>\*</sup>、菅又泰博<sup>\*</sup>、西本憲弘<sup>\*,\*\*</sup>

<sup>\*</sup>大阪大学健康体育部健康医学第一部門

<sup>\*\*</sup>大阪大学大学院医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学

**研究要旨** 我々は高 IL-6 血症を病態とする慢性関節リウマチ、キャッスルマン病に対してヒト型化抗 IL-6 受容体抗体を用いた治療を行った。その結果、全例で血中 SAA レベルの速やかな正常化を認め、二次性アミロイドーシス（AA アミロイドーシス）合併例においては尿蛋白の減少や血中クレアチニンの低下など、アミロイドーシスの改善を示唆する臨床所見を得た。すなわち、IL-6 のシグナルを阻害することにより、SAA 産生を抑制する AA アミロイドーシスの治療法及び予防法の開発が可能であると考えられる。SAA には SAA1, SAA2, SAA4 などのアイソフォームが存在し、SAA2 の発現に IL-6 をはじめ IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  が関わっていることが報告されている。しかし、AA アミロイドーシスの発症に主に関与するといわれる SAA1 の発現機序については未だ明らかでない。平成 11 年度の研究で、ヒト肝芽腫細胞由来の HepG2 細胞において、RT-PCR 法により SAA1, SAA2, SAA4 mRNA 発現の特異的な検出が可能であることを報告した。今回リアルタイム定量的 PCR を用いて、炎症性サイトカインによる SAA1 をはじめとする SAA の各アイソフォーム発現誘導能、サイトカインの相乗効果、およびヒト型化抗 IL-6 受容体抗体による SAA 産生の抑制について検討をおこなった。SAA1, SAA2 の mRNA の発現は IL-6 による刺激後 3 時間において最大値に達し、IL-1 $\beta$  による刺激では 24 時間で最大値に達した。発現誘導の容量依存性の検討では、SAA1 の発現は、IL-6 100 ng/ml の刺激で約 10 倍に増加し、IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml の刺激では約 5 倍に増加した。SAA2 の発現も、ほぼ同様のパターンを示した。相乗効果の検討では、SAA1 の発現において IL-6 と IL-1 $\beta$  の組み合わせにより約 100 倍以上の増加を示す相乗効果を認めた。ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体は、その相乗効果を 90%以上抑制した。しかし、IL-6 と TNF $\alpha$  の組み合わせでは SAA1 の産生に相乗効果はみられなかった。以上の結果より、SAA1 産生に関しては IL-1 $\beta$  との相乗効果が認められ、しかも IL-6 の阻害のみでその殆どを抑制できることが明らかになった。このことは *in vivo* の現象を裏付けるものである。したがって、ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体を使った IL-6 の阻害治療は、SAA1 産生抑制を介して AA アミロイドーシス治療において有効である可能性が示された。

### A. 研究目的

慢性関節リウマチ、キャッスルマン病

は高 IL-6 血症を伴う慢性炎症性疾患で、しばしば二次性アミロイドーシス (AA アミロイドーシス) を合併する。これらの疾患を有する患者に対してヒト型化抗 IL-6 受容体抗体を用いた治療を行ったところ、血中 SAA レベルの速やかな正常化を認め、AA アミロイドーシス合併例においては尿蛋白の減少や血中クレアチニンなど、アミロイドーシスの改善を示唆する臨床所見を得ている。このことは IL-6 のシグナルを阻害するだけで SAA の産生が抑制され、結果的に AA アミロイドーシスの治療あるいは予防が可能であると考えられる。しかし、SAA には SAA1, SAA2, SAA4 などのアイソフォームが存在し、SAA2 の発現に関しては IL-6 をはじめ IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  が関わっていることが報告されている。しかし、AA アミロイドーシスの発症に主に関与するといわれる SAA1 の発現機序については報告はない。昨年、ヒト肝芽腫細胞由来の HepG2 細胞において、RT-PCR 法により SAA1, SAA2, SAA4 mRNA 発現の特異的な検出が可能であることを報告した。今回リアルタイム定量的 PCR を用いて、炎症性サイトカインによる SAA1 をはじめとする SAA の各アイソフォーム発現誘導能、同じくサイトカインによる相乗効果の有無、さらにヒト型化抗 IL-6 受容体抗体による SAA 産生の抑制について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 培養細胞・条件

Hep G2 細胞を、10% heat inactivated FCS, 50 units/ml Penicillin, 50  $\mu$ g/ml Streptomycin, 2 mM L-glutamin 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)にて、10 cm dish を用いて培養し、さらに 80%コンフルエントになった状態で 6 well plate に  $5 \times 10^5$ /5ml/well で移し培養した。6 well plate で培養開始後 60 時間

にて培養液を交換し、72 時間後に 80%コンフルエントになった状態で各種サイトカインを添加し刺激を行った。

### 2. mRNA の回収および逆転写反応

自動 RNA 抽出機 Mag Extractor-RNA- (TOYOBO, OSAKA) を用いて RNA を抽出した。本キット添付の溶解液を用いて、Hep G2 細胞を溶解し、マニュアルに従い total RNA を回収した。oligo dT、酵素に MMLV (Promega, USA) を用い、RNA 2  $\mu$ g を使って逆転写反応を行い cDNA を得た。

### 3. リアルタイム定量的 PCR

mRNA の測定には、リアルタイム定量的 PCR を用いた。測定に用いた SAA1, SAA2, SAA4 それぞれに対する特異的プライマーを表 1 に示す。SAA1, SAA2 は非常に相同性が高いため、exon3 から exon4 をはさむプライマーを用いた。

SAA1, SAA2 の PCR は、Gene Amp 5700 Sequence Detection System を用い、95 $^{\circ}$ C 10 分間の denature 後、denature 95 $^{\circ}$ C 1 分間、annealing 54 $^{\circ}$ C 1 分間、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分間を 1 サイクルとして計 40 サイクルの反応を行い、蛍光色素には SYBR Green を使って検出した。SAA4 では前述の annealing 温度を 51 $^{\circ}$ C に下げて PCR を行った。スタンダードカーブ作製には、それぞれの PCR 産物をプラスミドに組み込んだものを使用した。プラスミドを 100, 10, 1, 0.1 ng/ml の濃度に段階希釈を行い使用した。プラスミド濃度を横軸に取り、蛍光が関知された PCR のサイクル数を縦軸に取りスタンダードカーブを作製し (図 1)、mRNA 量を比較定量化した。サイトカイン刺激による SAA mRNA 発現誘導の評価は、無刺激の細胞の mRNA 量との相対的な比較で行った。

## C. 研究結果

IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  による SAA1, SAA2,

SAA4 mRNA 発現誘導の経時的変化、容量依存性、相乗効果、ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体による抑制効果を検討した。

### 1. 発現誘導の経時的変化の検討

HepG2 細胞にそれぞれ IL-6 10 ng/ml、IL-1 $\beta$  10 ng/ml、TNF $\alpha$  10 ng/ml で刺激を行い、1, 3, 6, 12, 24, 48 時間での mRNA 発現の推移を検討した。HepG2 では無刺激でもわずかに SAA1 を発現していた。SAA1 の発現は IL-6 による刺激後 3 時間において最大値に達し、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  による刺激では刺激後 24 時間で最大値に達した。SAA2 でもほぼ同様のパターンであったが、TNF $\alpha$  による刺激では有意な増加を示さなかった。SAA4 発現はいずれのサイトカイン刺激においてもほぼ一定であった (図 2, 3)。当初 GAPDH を用い、RNA 量の補正を行っていたが、補正值に基づいた IL-6 刺激による SAA1、SAA2 発現のピークは 6 時間であった。そのため、以下の実験では、刺激後 6 時間で RNA を採取した。しかし、その後の検討にて IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  による刺激により GAPDH の mRNA 発現が増加することが判明した。したがって今回の報告では GAPDH による補正を行わない結果を示す。

### 2. 発現誘導の容量依存性の検討

IL-6 1, 10, 100 ng/ml、IL-1 $\beta$  0.1, 1, 10 ng/ml、TNF $\alpha$  0.1, 1, 10 ng/ml の濃度で検討した。SAA1 の発現は、IL-6 10 ng/ml の刺激でほぼプラトーに達し、約 10 倍増加を示した。IL-1 $\beta$  では 0.1 ng/ml の刺激で約 5 倍の増加を示した。TNF $\alpha$  による刺激では有意な増加を示さなかった。SAA2 でも、ほぼ同様のパターンを示した。SAA4 は有意な増加を示さなかった (図 4, 5)。

### 3. 相乗効果ならびにヒト型化抗 IL-6 受容体抗体による抑制効果の検討

IL-6 10 ng/ml、IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml、TNF $\alpha$  10

ng/ml の濃度の組み合わせで相乗効果の有無を検討した。SAA1 mRNA の発現において IL-6、IL-1 $\beta$  単独ではそれぞれ 10 倍、5 倍であったが、IL-6 と IL-1 $\beta$  の組み合わせにより約 100 倍以上の増加を示す相乗効果を認めた。ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体は 25  $\mu$ g/ml の濃度で、IL-6 と IL-1 $\beta$  の組み合わせによる SAA1 発現を 90% 以上抑制した。しかし、IL-6 と TNF $\alpha$  の組み合わせでは SAA1 の産生の増強はみられなかった (図 6)。

### D. 考察

今回のリアルタイム定量的 PCR を使った解析では、IL-6 と IL-1 $\beta$  の組み合わせが SAA1 発現の相乗効果を引き起こし、ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体が、その相乗効果を 90% 以上抑制するという結果が得られた。慢性関節リウマチの治療では、抗 TNF $\alpha$  抗体療法、IL-1 受容体アンタゴニスト療法なども行われているが、CRP、SAA の完全な陰性化は報告されていない。IL-6 阻害治療のみが、IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  が高いレベルで存在している状態でも、血中 SAA レベルを正常化した。用いたヒト型化抗 IL-6 受容体抗体の濃度は、ほぼ我々が治療で得られる血中濃度であり、今回の結果は、まさに *in vivo* の現象を裏付けるものであった。ただ、本来 SAA の産生には、複数のサイトカインが関与していると考えられる。では、何故 IL-6 を単独で阻害するだけで、このような結果が得られるのだろうか。従来の SAA2 についての解析では、IL-6 と IL-1 $\beta$  による相乗効果は、NF-IL6 と NF- $\kappa$ B を介すると報告されている。TNF $\alpha$  も NF- $\kappa$ B を活性化することから、IL-6 と TNF $\alpha$  の組み合わせで相乗効果が得られると予測されるが、今回の我々の結果では否定的であった。そのメカニズムを明らかにするには、転写因子レベルでのさらなる解析が



必要である。また、HepG2 以外の細胞での検討も要する。今後、IL-6 と IL-1 $\beta$  による相乗効果のシグナル伝達経路に焦点を当て、さらなる解析をすすめたい。一方、リアルタイム定量的 PCR による評価は、従来のアッセイ系と比べ非常に有効な方法であることがわかった。

#### E. 結論

ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体を使った IL-6 シグナルの阻害は、SAA1 の産生抑制を介し、AA アミロイドーシス治療に有効である可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mülberg J, Jostock T, Wirtz S, Schüz M, Holtmann M, Schlaak JF, Lehr HA, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of IL-6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature Medicine* 6:583-588, 2000.
2. Nishimoto N, Sasai M, Shima Y, Nakagawa M, Matsumoto T, Shirai T, Kishimoto T, Yoshizaki K. Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood* 95:56-61, 2000.
3. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J. Immunol* 164:4878-4882, 2000.
4. Nishimoto N, Ito A, Ono M, Tagoh H, Matsumoto T, Tomita T, Ochi T, Yoshizaki K. IL-6 inhibits the proliferation of fibroblastic synovial cells from rheumatoid arthritis patients in the presence of soluble IL-6 receptor. *Int. Immunol* 12:187-193, 2000.
5. Nishioka K, Ohshima S, Umeshita-Sasai M, Yamaguchi N, Mima T, Nomura S, Murata N, Shimizu M, Miyake T, Yoshizaki K, Suemura M, Kishimoto T, Saeki Y. Enhanced expression and DNA binding activity of two CCAAT/enhancer-binding protein isoforms, C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$ , in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 43:1591-1596, 2000.
6. Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K. Anti-IL-6 receptor antibody therapy in rheumatic disease. *Ann. Rheum. Dis* 59:121-127, 2000.
7. Mihara M, Kotoh M, Oda Y, Kumagai E, Takagi N, Tsunemi K, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ohsugi Y, Takeda Y. Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in monkeys. *Clin.Immunol*, 2001 (in press).
8. 西本憲弘, 吉崎和幸. Castleman 病と MCD- IL-6 シグナル阻害による治療 - 悪性リンパ腫- 疾患単位の確立と層別化治療- (平井久丸編). 東京: 医歯薬出版. p74-80, 2000.
9. 松本智成, 西本憲弘, 吉崎和幸. 慢性関節リウマチにおける抗 IL-6 レセプター療法. 炎症と免疫 8:195-198, 2000.
10. 吉崎和幸, 松本智成, 宋健, 中原英子, 奥畑聡子, 萩原圭祐, 松永奈緒, 西本憲弘. IL-6 受容体抗体の作用機序と臨床効果. 別冊最新医学・リウマチ 2000 - 慢性関節リウマチ病因・病態解明と

- 治療の最前線. p167-182, 2000.
11. 西本憲弘, 吉崎和幸. 抗 IL-6 レセプター抗体. リウマチ科 23:558-562, 2000.
  12. 松本智成, 西本憲弘, 吉崎和幸. SSI-1/SOCS-1/JAB. Surgery Frontier 7:59-61, 2000.
  13. 西本憲弘, 中原英子, 吉崎和幸. ヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体による Castleman 病の治療. Annual Review 血液 2001 (高久史麿, 溝口秀昭, 小宮山淳, 坂田洋一, 金倉讓編). 東京: 中外医学社. p158-164, 2001.
  14. 菅又泰博, 西本憲弘, 吉崎和幸. ヒト型化 IL-6 レセプター抗体による Castleman 病治療. 血液・腫瘍科 42:166-175, 2001.
  15. 吉崎和幸, 松本智成, 西本憲弘. モノクローナル抗体. 膠原病・リウマチ学 (宮坂信之編). 東京: 朝倉書店, 2001 (in press).
  16. 杉本正道, 西本憲弘, 吉崎和幸. IL-6 と分子治療 (自己免疫疾患). Molecular Medicine 38, 2001 (in press).
  17. 吉崎和幸. 第 3 章: 増殖因子/サイトカイン: インターロイキン-6. Vascular Biology ナビゲーター (用語集)(丸山征郎, 安藤讓二, 佐藤靖史編). 東京: メディカル・レビュー, 2001 (in press).
2. 学会発表
    1. 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸. 抗 IL-6R 抗体療法. 第 21 回日本炎症学会. 2000 年 7 月 (東京).
    2. 中原英子, 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸. 慢性炎症病態におけるサイトカイン依存性血管新生- IL-6 は VEGF を介し Castleman 病の血管新生を引き起こす-. 第 21 回日本炎症学会. 2000 年 7 月 (東京).
    3. 吉崎和幸, 松本智成, 西本憲弘. ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体の生物学的製剤としての意義. 第 28 回日本臨床免疫学会. 2000 年 9 月 (東京).
    4. 松本智成, 西本憲弘, 吉崎和幸. IL-6/soluble IL-6 receptor induce SOCS-1 and SOCS-3 messenger RNA expression in synovial cell. 第 64 回米国リウマチ学会. 2000 年 10 月 (フィラデルフィア).
    5. 西本憲弘, 岡田保典, 小幡賢一, 松本智成, 中原英子, 岸本忠三, 吉崎和幸. Reduction of serum matrix metalloproteinase-3 in rheumatoid arthritis patients following anti-IL-6 receptor antibody therapy. 第 64 回米国リウマチ学会. 2000 年 10 月 (フィラデルフィア).
    6. 吉崎和幸. Pathogenic Role of IL-6 and Therapy by Blocking IL-6 Signal. 第 13 回内藤コンファレンス. 2000 年 11 月 (神奈川).
    7. 中原英子, 吉崎和幸, 松本智成, 西本憲弘. Interleukin-6 may cause angiogenesis through VEGF induction in Castleman's disease. 第 42 回米国血液学会. 2000 年 12 月 (サンフランシスコ).
- 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

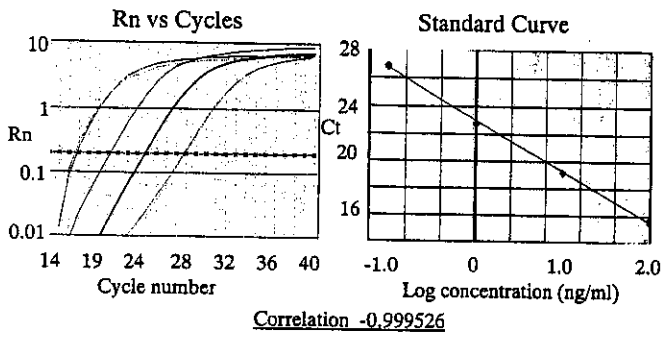


図1. SAA1 Standard Curve

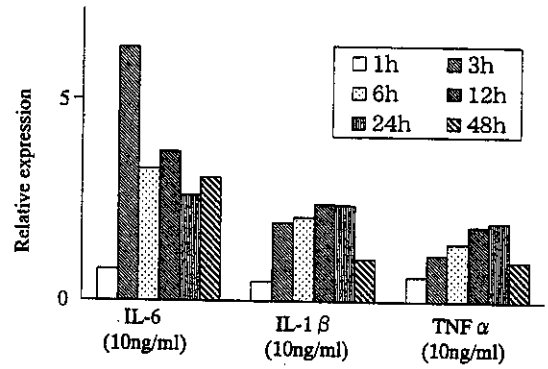


図2. IL-6,IL-1,TNFαによるSAA1発現誘導の経時的変化

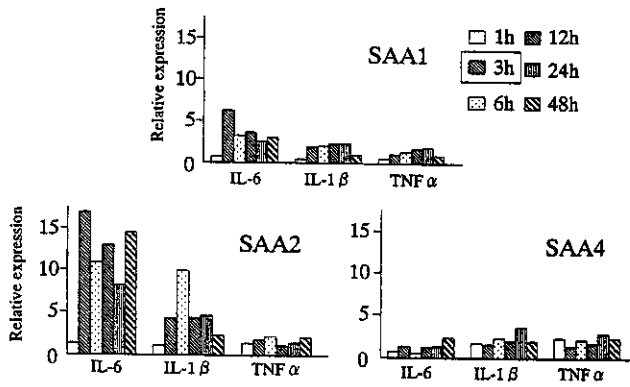


図3.SAAアイソフォーム発現誘導の経時的変化

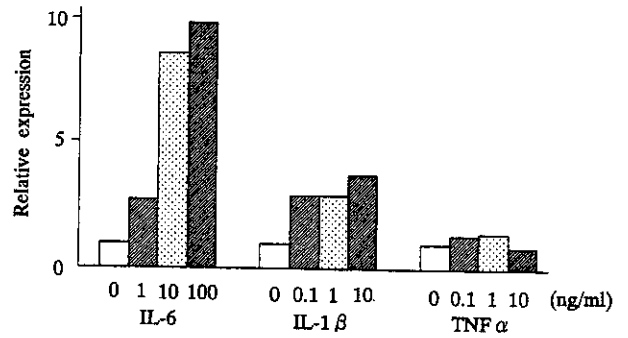


図4. SAA1発現誘導のIL-6,IL-1,TNFαに対する容量依存性

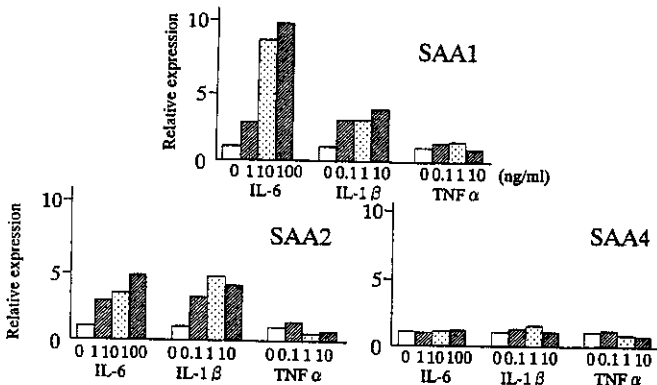


図5.SAAアイソフォーム発現誘導のIL-6,IL-1,TNFαに対する容量依存性

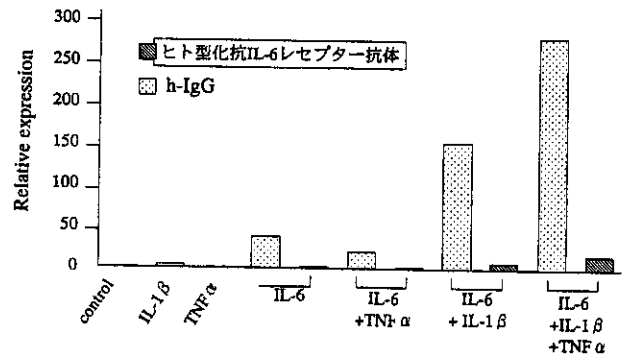


図6.IL-6,IL-1,TNFαのSAA1発現誘導における相乗効果とヒト型化抗IL-6レセプター抗体による抑制効果

SAA1 forward primer 5' -CTGCAGAAGTGATCAGCG-3'  
 reverse primer 5' -ATTGTGTACCCTCTCCCC-3'  
 SAA2 forward primer 5' -CTGCAGAAGTGATCAGCA-3'  
 reverse primer 5' -ATTATATGCATTATCTCAGC-3'  
 SAA4 forward primer 5' -CCAGTGAAAGCTGGCGTTCG-3'  
 reverse primer 5' -GAGAAGTGTGTGGCTCACAGCC-3'

表1.SAA各アイソフォームのプライマー

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

## 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—

分担研究者 下条文武 新潟大学医学部第二内科

共同研究者 上野光博\*、今井直史\*、飯野則昭\*、井口清太郎\*、小山裕子\*、  
西 慎一\*、中野正明\*、島田久基\*\*

新潟大学医学部、\*第二内科、\*\*新潟県立中央病院内科

**研究要旨** AL 型と AA 型の腎アミロイドーシス(AM)の組織学的な相違点を明らかにするために、腎生検により腎 AM と診断された 69 例 (AL 型 27 例、AA 型 42 例) を対象として腎組織所見を解析した。光顕標本で腎内の組織部位ごとにアミロイドの沈着頻度を調べ、また種々の腎組織変化を半定量的に測定した。蛍光抗体法では糸球体への免疫グロブリン、補体、fibrinogen の沈着頻度を調べた。その結果光顕では、1)AL 型は、糸球体、特に係蹄壁へ沈着する傾向が高く、AA 型は、血管壁へ強く沈着する傾向が見られた。2)いわゆる perimembranous type は AL 型のみに見られ、nodular type は有意に AA 型に多くみられた。3)間質への泡沫細胞浸潤は AL 型のみに見られた。蛍光抗体法では、AL 型、AA 型ともに IgG、IgA、IgM、Clq、C3c、C4、fibrinogen のいずれも沈着しうるが、その沈着頻度に有意差は見られず、特異的沈着様式も認めなかった。以上より、光顕的に AL 型と AA 型で、腎内へのアミロイド沈着の頻度や様式に差がみられることが示され、また間質への泡沫細胞浸潤が AL 型の特徴的な組織所見である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

腎アミロイドーシス(AM)は、AM 患者の生命予後を決定する重大な因子の一つである。これまで腎 AM の病理組織像に関しては、生検または剖検の組織を用いて、その主たる沈着部位や形態像から種々の沈着様式が提唱され、報告されている<sup>1-3)</sup>。特に AL 型と AA 型の腎内の沈着様式については、およそ 4 型に分けられ、その沈着様式ごとの頻度や、臨床所見との相関が報告されている<sup>1-3)</sup>。しかし実際に両型で、腎内の各部位別にどの程度沈着するか、ま

た両型の特徴的所見はないか、十分に解析されていない。

そこで今回の研究では、AL 型と AA 型腎 AM の組織学的な相違点や特徴を明らかにすることを目的に、腎生検組織を用いて検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

対象は、1981 年から 2000 年まで当科ならびに関連病院で、インフォームドコンセントを得た腎生検により腎 AM と診断

された症例は 108 例であった。このうち、十分組織がとれなかったもの、AL 型と AA 型の判定が困難であったもの、尿所見や腎機能が不明のものを除いた 69 症例を対象とした (図 1)。AL 型が 27 例、AA 型が 42 例であった。AA 型が AL 型に比べ、有意に女性が多く、低年齢であった。原疾患の内訳は、AA 型のほとんどが慢性関節リウマチであった。

なお、統計学的な検討には、Student の t 検定、Mann-Whitney 検定、Fisher の直接確率計算法、 $\chi^2$  検定を用い、危険率 5% 未満を有意とした。

## 2. 臨床所見の比較 (図 2)

AL 型と AA 型の臨床所見の比較では、血圧は AA 型が有意に高く、尿蛋白は有意に AL 型が有意に高度であった。その内訳では、AL 型が全例有意の蛋白尿を認めていたのに対し、AA 型には尿蛋白陰性の 7 例が含まれていた。ネフローゼ症候群が AL 型に 15 例、AA 型に 10 例含まれていた。クレアチニン・クリアランスは、AA 型が有意に低く、血清総蛋白は AL 型が有意に低値であった。

## 3. アミロイド沈着とその他の光顕組織所見の評価方法 (図 3)

アミロイド沈着に関しては、Congo red 染色または PAM-Masson 染色標本を用いて、糸球体 (メサンギウム領域、係蹄壁、血管極)、ボーマン嚢、尿細管基底膜、間質、血管 (皮質細動脈、皮質小動脈、皮質動脈、髓質内直細動脈) への沈着と、PAM 染色標本による spicule 形成範囲を 0~3 の 4 段階か、有る無し の 2 段階に評価した。さらに糸球体では、完全硬化、分節性硬化、癒着、半月体形成を、尿細管間質では、泡沫細胞の浸潤、間質の線維化や炎症性細胞浸潤の拡がりを 0~4 の 5 段階に、血管の動脈硬化については各サイズ毎に 0~3 の 4 段階に半定量的に評価した。

## 4. 糸球体の蛍光抗体法

糸球体への IgG、IgA、IgM、C1q、C3、C4、fibrinogen の沈着の有無を蛍光抗体法で評価した。

## C. 研究結果 (図 4)

### 1. 糸球体、ボーマン嚢、血管極へのアミロイド沈着 (図 4a)

糸球体への沈着は AL 型の 100%、AA 型の 78.6% に認め、有意に AL 型に高頻度であった。ボーマン嚢への沈着は、各々 33.3%、26.8% で有意差はなかった。血管極への沈着については、AA 型の方が AL 型に比べ有意に強く認められた。

### 2. 糸球体へのアミロイド沈着 (図 4b)

メサンギウム領域への沈着度では有意差は見られなかった。一方係蹄壁への沈着は、AL 型では全例にみられ、星印の grade 3 のびまん性沈着を示す、いわゆる perimembranous type が 29.6% にみられた。これに対し、AA 型は半分以上が係蹄壁への沈着がみられず、perimembranous type は 1 例もなく、明らかに両型に有意差がみられた。Nodular type は AL 型の 14.8%、AA 型の 54.8% にみられ、spicule 形成は AL 型の全例、AA 型の 47.6% にみられ、両型の間で有意差が認められた。

### 3. 尿細管、間質へのアミロイド沈着と間質内泡沫細胞浸潤 (図 4c)

尿細管、間質へのアミロイド沈着は、AA 型、AL 型とも 31% から 44.4% にみられ、両型の間で有意差はなかった。一方、間質内泡沫細胞浸潤は、AL 型の 10 例、37% に見られたのに対し、AA 型では 1 例もみられなかった。この AL 型 10 例中 6 例は perimembranous type で、7 例がネフローゼであったが、3 例は非ネフローゼであった。

### 4. 血管へのアミロイド沈着 (図 4d)

各サイズの動脈レベルで、有意に AA 型が AL 型に比べ、アミロイド沈着が有意

に強く認められた。

#### 5. 沈着部位の組み合わせ (図 4e)

AL 型は全例糸球体に沈着し、糸球体のみの沈着症例は AL 型の 7.4%にみられたが、AA 型にはなかった。一方、AA 型は全例血管に沈着し、血管のみに沈着する症例は AA 型のみにもみられ、AL 型にはなかった。両型とも尿細管間質のみへの沈着例はなかった。

#### 6. その他の光顕所見の比較

間質の線維化や炎症性細胞浸潤は AA 型が AL 型に比べ有意に高度であったが、糸球体の完全硬化、分節性硬化、癒着、半月体形成、動脈硬化については、両型で有意差はなかった。

#### 7. 糸球体の蛍光抗体法所見 (図 4f)

IgG、IgA、IgM、C1q、C3、C4、fibrinogen のすべてが糸球体へ沈着しえたが、両型の間で沈着頻度に有意差はなく、また特異的沈着様式も認めなかった。

#### D. 考察

AL 型と AA 型の腎内の沈着様式については、Dikman ら<sup>1)</sup>は、AA 型が nodular type または mixed nodular-diffuse type を、Nakamoto ら<sup>2)</sup>は AL 型は diffuse type を示しやすいことを報告している。Shiiki ら<sup>3)</sup>は、彼らの考えた沈着様式が AL 型と AA 型の判別と相関することと、perimembranous type の存在を強調し、この type は全て AL 型であったことを報告している。今回の検討も、これらとほぼ同様の結果を統計的有意差をもって示し、さらに腎内の各部位別の沈着頻度や程度も明らかにした。Nakamoto ら<sup>2)</sup>は、小血管のみの沈着例が AL 型にもあると報告しているが、本研究対象症例にはなかった。AA 型は全例血管への沈着がみられたことから、血管が初期沈着部位である可能性が考えられた。AL 型のみにもみられた間質の泡沫細胞浸潤は、本研究で最も注目されたが、

これまでは Hill<sup>4)</sup>などが教科書で単に言及しているのみであった。間質の泡沫細胞浸潤は AL 型の非ネフローゼ 3 例にも見られたが、AA 型ではネフローゼの 10 例でも見られなかったことから、AL 型の特徴的な組織所見である可能性が考えられた。蛍光抗体法所見は、1983 年に Orfila ら<sup>5)</sup>と同様に免疫グロブリンや補体が全て沈着しうることを示した。C1q や C4 などの補体の沈着の有無と臨床所見との関連は今後の課題と考えられた。

#### E. 結論

1. AL 型は、糸球体、特に係蹄壁へ沈着する傾向が高く、AA 型は血管壁へ強く沈着する傾向が見られた。

2. いわゆる perimembranous type は、AL 型のみにもみられ、nodular type は、有意に AA 型に多くみられた。

3. 間質への泡沫細胞浸潤は、AL 型のみにもみられ、AL 型の特徴的な組織所見である可能性が示唆された。

4. 蛍光抗体法では、IgG、IgA、IgM、C1q、C3c、C4、fibrinogen のいずれも沈着する可能性があり、その頻度は、AL 型と AA 型で有意差は見られず、特異的沈着様式も認めなかった。

#### (参考文献)

- 1) Dikman SH, Churg J, Kahn T: Morphologic and clinical correlations in renal amyloidosis. *Hum Pathol* 12: 160-169, 1981.
- 2) Nakamoto Y, Hamanaka S, Akihama T, Miura AB, Uesaka Y: Renal involvement patterns of amyloid nephropathy: a comparison with diabetic nephropathy. *Clin Nephrol* 22: 188-194, 1984.
- 3) Shiiki H, Shimohama T, Yoshikawa Y, Toyoshima H, Kitamoto T, Watanabe T: Renal amyloidosis. Correlations between

morphology, chemical types of amyloid protein and clinical features. *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol* 412: 197-204, 1988.

4) Hill GS: Multiple myeloma, amyloidosis, Waldenstrom's macroglobulinemia, cryoglobulinemias, and benign monoclonal gammopathies. In Heptinstall RH(Eds), *Pathology of the Kidney*, Boston: Little Brown, 1983. P.993.

5) Orfila C, Rakotoarivony J, Segonds A, Suc JM: Immunofluorescence study of "non-idiopathic" renal amyloidosis. *Hum Pathol* 14: 362-367, 1983.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

#### 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.対象

1981~2000年当科ならびに関連施設で、腎生検で  
腎アミロイドーシスと診断された69例  
(28~82歳、男21人、女48人)

	AL型	AA型	
	N = 27	N = 42	
男 : 女	14 : 13	7 : 35	<i>p</i> < 0.01
年齢 (歳)	45~82 (63.6±9.4)	28~76 (57.8±11.6)	<i>p</i> < 0.05
疾患	骨髄腫 5例 原発性 9例 不明 13例	RA 39例 MRA 1例 ベーチェット病 1例 不明 1例	

図2.臨床所見の比較

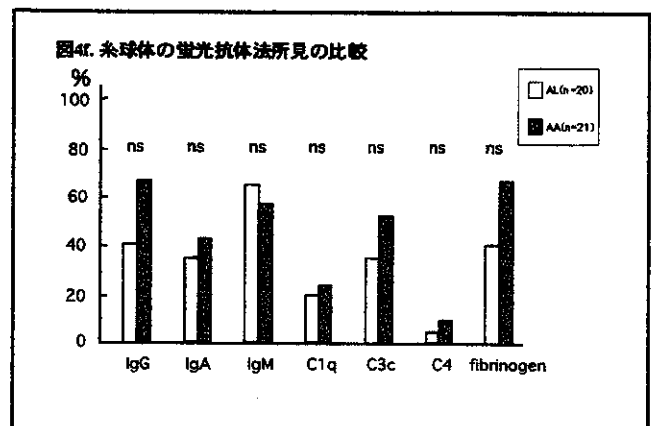
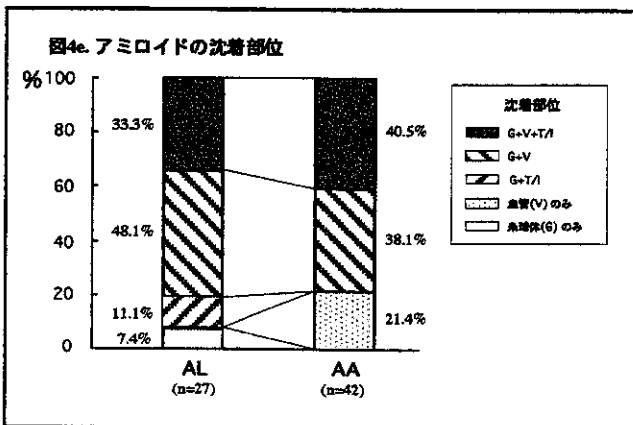
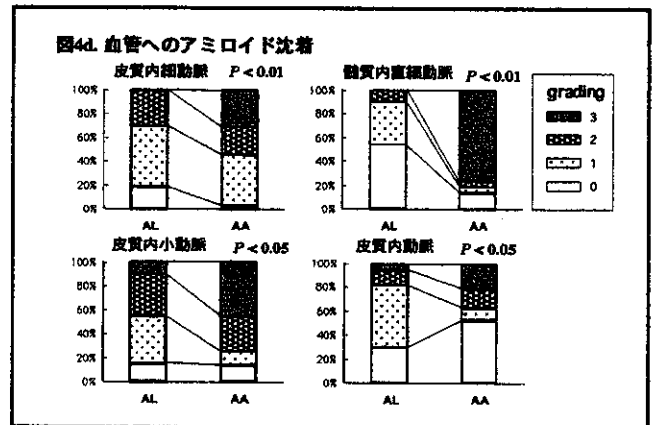
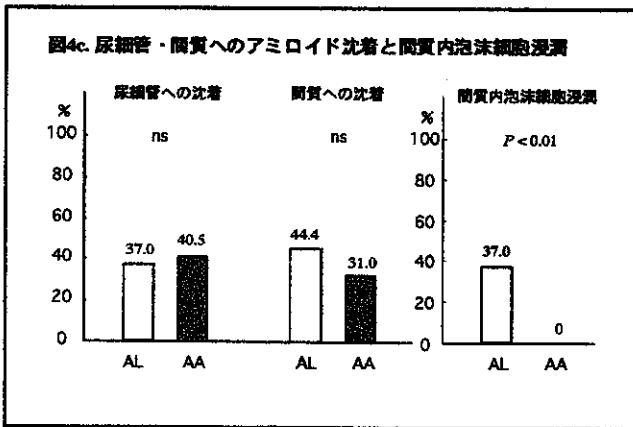
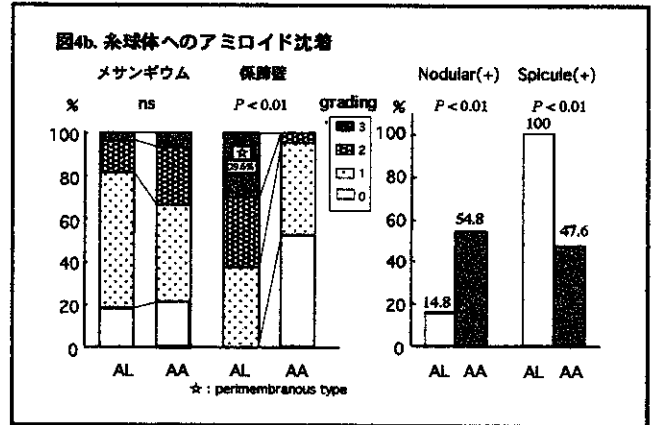
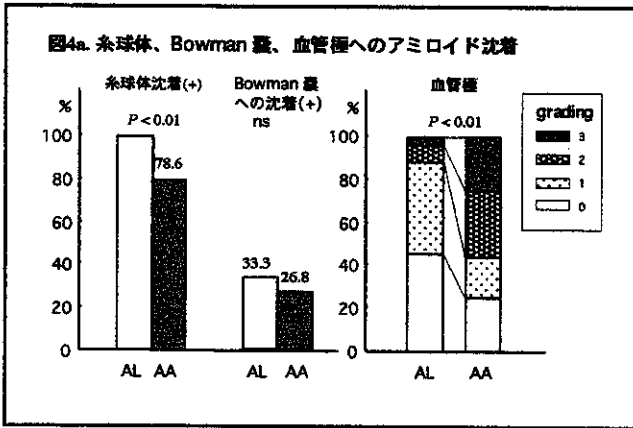
	AL型 (n=27)	AA型 (n=42)	
Systolic BP (mmHg)	119.0±22.3	133.8±18.3	<i>p</i> < 0.01
Diastolic BP (mmHg)	70.6±12.3	77.6±12.1	<i>p</i> < 0.05
Urine Protein (g/day)	3.8±2.2 (0.4~10.0)	2.4±2.2 (0~7.9)	<i>p</i> < 0.05
proteinuria(-)	<0.2	0 cases	7 cases
nephrotic	≥3.5	15 cases	10 cases
Creatinine clearance (ml/min)	74.3±37.7 (13.7~156.1)	58.5±25.3 (12.7~110.4)	<i>p</i> < 0.05
Creatinine (mg/dl)	1.0±0.9 (0.4~4.8)	1.0±0.5 (0.5~2.3)	ns
TP (g/dl)	4.9±0.7 (3.6~6.5)	6.2±1.0 (4.3~8.2)	<i>p</i> < 0.01

Mean±SD

図3.比較した光顕組織所見とgrading

	アミロイド沈着	grading	その他	grading
糸球体	・メサンギウム領域	0/1/2/3	・完全硬化	0/1/2/3/4
	・係蹄壁	0/1/2/3	・分節性硬化	0/1/2/3/4
	・血管極	0/1/2/3	・癒着	0/1/2/3/4
	・spicule	0/1	・半月体形成	0/1/2/3/4
	・ポーマン囊	0/1		
尿細管・間質	・尿細管基底膜	0/1	・泡沫細胞	0/1/2/3/4
	・間質	0/1	・間質の線維化 /細胞浸潤	0/1/2/3/4
血管	・皮質内細動脈	0/1/2/3	・細動脈硝子化	0/1/2/3
	・皮質内小動脈	0/1/2/3	・小動脈硬化	0/1/2/3
	・皮質内動脈	0/1/2/3	・動脈硬化	0/1/2/3
	・髓質内直細動脈	0/1/2/3		





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

## β2-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

分担研究者 内木宏延 福井医科大学第2 病理

共同研究者 山口 格\*、長谷川一浩\*、高橋直生\*\*、下条文武\*\*、

\*福井医科大学第2 病理、\*\*新潟大学医学部第2 内科

**研究要旨** β2-ミクログロブリン関連アミロイドーシス(透析アミロイドーシス)の好発部位である、関節軟骨あるいは滑膜組織の重要な成分であるプロテオグリカンおよびグリコサミノグリカンが、β2-ミクログロブリンアミロイド線維形成・分解に及ぼす効果を検討した。重合核依存性重合モデルに基づいた試験管内線維伸長反応系、線維形成反応系および、線維の脱重合反応系を用いて評価した。その結果、これらは線維伸長過程では抑制的に作用するが、線維形成の律速段階である核形成過程では促進的に作用し、また線維の脱重合を抑制するという、多面的な効果が認められた。プロテオグリカンおよびグリコサミノグリカンは全体としてはβ2-ミクログロブリンアミロイド線維形成・沈着に対し促進的に作用していることが示唆された。

### A. 研究目的

長期血液透析患者に高率に発症するβ2-ミクログロブリン(β2m) 関連アミロイドーシス(Aβ2M アミロイドーシス)の好発部位である関節軟骨マトリクスには、主成分のタイプ2コラーゲンの他、各種のプロテオグリカン(PG)や、ヒアルロン酸および、プロテオグリカンの成分である各種のグリコサミノグリカン(GAG)が多量に存在している。PGやGAGがβ2mアミロイド線維(Aβ2M線維)形成に関与し、Aβ2Mアミロイドーシスの病態の進展に影響を及ぼしていることが考えられる。

我々は、Aβ2Mアミロイドーシスの発症および進展に関与する分子機構を、試験管内アミロイド線維形成反応系を駆使し

て明らかにすることを目指している。そして、アルツハイマー病Aβアミロイド、ALアミロイド等各種の試験管内アミロイド線維の形成反応を説明するモデルとして、重合核形成過程と線維伸長過程から構成される重合核依存性重合モデルを構築しており、Aβ2M線維に関してもこのモデルに一致することを確認してきた。重合核形成過程はアミロイド線維形成全体の律速段階であるが、Aβ2M線維の場合、非常に起こりにくく、試験管内実験系ではこれまで確認されていなかった。これに対し、Aβ2M線維の伸長過程は一次反応形式に従い速やかに進行する。伸長反応の速度は酸性環境下で最も早い。一方、pH7.5では、伸長反応が進まないばかりか、Aβ2M線維が脱重合し、消失する。さらに、

アミロイド共存物質である apoE により pH7.5 での脱重合反応が抑制されることを昨年度報告した。

今回は以上の結果を基に、A $\beta$ 2M 線維形成あるいは蓄積の場に多量に存在する GAG、PG が、A $\beta$ 2M 線維の生成過程にどのように影響を及ぼしているのかを検討するため、伸長過程、核形成過程及び脱重合過程の3過程の各々に対する、各種 GAG 及び PG の効果を解析した。

## B. 研究方法

### 1. 試験管内アミロイド線維伸長過程に及ぼす GAG、PG の効果の解析

反応溶液は、A $\beta$ 2M 線維 (10  $\mu$ g/ml)、ヒトリコンビナント  $\beta$ 2m (r- $\beta$ 2m) (25  $\mu$ M)、50mM citrate-100mM NaCl (pH 2.5) を含み、さらに各種の GAG (1-1000  $\mu$ g/ml) あるいは PG (1-100  $\mu$ g/ml) を添加した。尚、GAG としてはコンドロイチン硫酸 A、B 及び C、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリンの7種類を、PG としてはアグレカン、バイグリカン、デコリン、ヘパラン硫酸 PG、デルマタン硫酸 PG、ケラタン硫酸 PG の6種類を用いた。37 $^{\circ}$ C、2時間および24時間インキュベート後の線維伸長量を、チオフラビン T (ThT) 法により定量し比較した。

### 2. 試験管内アミロイド線維形成反応に及ぼす GAG、PG の効果の解析

反応溶液は、r- $\beta$ 2m (50  $\mu$ M)、50mM citrate-100mM NaCl (pH2.5) を含み、さらにアグレカン、バイグリカン、デコリン、あるいはヘパリンをそれぞれ 1-100  $\mu$ g/ml 添加した。37 $^{\circ}$ C でインキュベート後の A $\beta$ 2M 線維形成を、ThT 法による定量及び電子顕微鏡観察により評価した。この反応では  $\beta$ 2m から、自発的に核を形成させ、その核に  $\beta$ 2m が結合し伸長することで線維を形成させる。

### 3. 試験管内アミロイド線維脱重合過程に

### 及ぼす GAG、PG の効果の解析

反応溶液は、A $\beta$ 2M 線維 (150  $\mu$ g/ml)、50mM phosphate-100mM NaCl (pH 7.5) を含み、さらに上記の GAG あるいは PG を 1. と同様にそれぞれ添加した。37 $^{\circ}$ C、24時間インキュベート後の A $\beta$ 2M 線維の残存率を、ThT 法により定量し比較した。尚、A $\beta$ 2M 線維は次の方法により調製した。最初に A $\beta$ 2M アミロイドーシス患者関節滑膜より抽出精製した A $\beta$ 2M 線維を最初の seed として、r- $\beta$ 2m を用いて線維伸長反応を行った。得られた A $\beta$ 2M 線維を seed として再び線維伸長反応を行った。この操作を 11 回繰り返すことにより調製した A $\beta$ 2M 線維は、事実上 r- $\beta$ 2m のみから構成されており、これを用いた。

## C. 研究結果

### 1. 伸長過程に及ぼす GAG、PG の効果の解析

7種類の GAG および6種類の PG はいずれも、10 または 30  $\mu$ g/ml 以上添加すると、線維伸長を濃度依存的に抑制した。

### 2. 核形成過程に及ぼす GAG、PG の効果の解析 (線維形成反応) (図 1)

r- $\beta$ 2m 単独では 21 日間インキュベートしても、チオフラビン T 蛍光値が増加せず、電子顕微鏡でも線維が観察されなかった。従って核形成が起きなかったことを示している。これに対し、PG やヘパリンを添加した場合は、いずれも数日以内にチオフラビン T の蛍光が増加した。また、線維の増加速度は添加した濃度に依存して増加した。さらに、電子顕微鏡により典型的なアミロイド線維像が観察された。従って、PG やヘパリンにより核形成が促進されたことを示している。

### 3. 脱重合過程に及ぼす GAG、PG の効果の解析 (図 2)

r- $\beta$ 2m だけから構成される A $\beta$ 2M 線

維は、pH7.5 の緩衝液中では脱重合するが、これに GAG、PG を添加した時の保護効果を検討した。ヘパリンは比較的強い脱重合抑制を、コンドロイチン硫酸 B、ヘパラン硫酸は、弱い脱重合抑制をいずれも濃度依存的に示した。また、6種の PG は、いずれも脱重合抑制を示すが、バイグリカン、デコリン、ケラタン硫酸 PG が特に強い抑制効果を示した。

#### D. 考察

GAG、PG は A $\beta$ 2M 線維形成の各過程において、核形成過程では促進的、線維伸長過程では抑制的に作用し、また線維の脱重合を抑制するという、多面的な効果が認められた。A $\beta$ 2M 線維が蓄積する部位は関節軟骨あるいは滑膜組織など、GAG および PG が豊富に含まれている場所である。これらの部位に存在するある種の PG が  $\beta$ 2m からの重合核形成を促進させることは、蓄積との因果関係の上で重要と考えられる。これに対して、線維伸長過程においては GAG、PG は、 $\beta$ 2m 分子に作用して伸長を抑制する。しかし、生体内では試験管内の閉鎖反応系と異なり、常に  $\beta$ 2m は供給され続ける。従って、これらの GAG、PG が共存した場合、伸長速度は抑制されるものの、完全に止まってしまわないと考えられる。線維が形成される反応は、重合核形成が律速段階であると推定される為、速度は遅いものの全体としては線維が伸びる方向に反応が進むと考えられる。さらに GAG、PG は一旦形成された A $\beta$ 2M 線維を安定化させ分解・脱重合を抑制する。以上の様に、GAG、PG は全体としては A $\beta$ 2M 線維形成・沈着に対し促進的に作用していると考えられる。

我々は現在、ここに示した様に多様な分子との相互作用をアミロイド線維形成の各過程において、別々に評価する手法を用い、A $\beta$ 2M アミロイド線維沈着の分子機

構を総合的に解明することを目指して研究を継続している。

#### E. 結論

GAG、PG は A $\beta$ 2M 線維形成の各過程において、線維伸長過程では抑制的に作用するが、線維形成の律速段階である核形成過程では促進的に作用し、また線維脱重合を抑制するという、多面的な効果が認められた。GAG、PG は全体として、A $\beta$ 2M 線維形成・沈着に対し促進的に作用していると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yamaguchi I, Hasegawa K, Naiki H, Mitsu T, Matuo Y and Gejyo F.

Extension of A $\beta$ 2M amyloid fibrils with recombinant human  $\beta$ 2-microglobulin. Amyloid (in press)

2) 内木 宏延、山口 格、長谷川 一浩 (2001) アミロイドーシス発症の分子機構、腎と骨代謝 14 (1)、7-13

3) 橋本 儀一、内木 宏延、吉田 治義、下条 文武 (2001) 実験的アミロイド線維伸長と AGE 化  $\beta$ 2-m、腎と骨代謝 14 (1)、31-36

##### 2. 学会発表

1) 山口 格、長谷川一浩、高橋直生、内木宏延

$\beta$ 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維 (fA $\beta$ 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 $\beta$ 2M 安定化作用

第 89 回日本病理学会総会 2000 年 4 月 11-13 日 大阪、日病会誌 89(1)、276、平成 12 年 3 月

2) 内木宏延