

200/0821

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13年度 総括研究報告書

主任研究者 池田修一

平成14(2002)年3月

# 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. 透析患者の手根管症候群の発症における MCP-1 および MIP-1 $\alpha$ 遺伝子多型の関与	7
下条文武 新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座 (第二内科)	
2. ヒトアミロイド線維形成・分解の試験管内分子機構	14
内木宏延 福井医科大学第二病理	
3. 長期透析患者にみられる破壊性脊椎関節症(DSA)以外の脊椎病変合併症の臨床的 検討	17
原茂子 虎の門病院腎センター内科	
4. 透析アミロイドーシスの指標 —MMP-3 (マトリックスメタプロテアーゼ-3) 測定の意義—	22
原茂子 虎の門病院腎センター内科	
5. RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチドによる家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の遺伝子治療の基礎的研究	28
安東由喜雄 熊本大学臨床検査医学講座	
6. 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者の摘出肝を移植されたドミノ移植 患者の血中に異型トランスサイレチン (ATTR) に対する自己抗体が出現する!	31
安東由喜雄 熊本大学臨床検査医学講座	
7. 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者の眼症状に関する病理学的、 生化学的解析	34
安東由喜雄 熊本大学臨床検査医学講座	
8. Ser50→Arg 型 FAP の臨床像に関する研究	37
中里雅光 宮崎医科大学第三内科	

9. 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 .....	39
前田秀一郎 山梨医科大学第一生化	
10. FAP 患者に対する補助的同所性部分肝移植 (APOLT) およびドミノ移植の経験 .....	43
池田修一 信州大学第三内科	
11. AL アミロイドーシスに対するアンチセンス治療法の開発 .....	47
今井浩三 札幌医科大学第一内科	
12. 筋無力症状を呈した AL アミロイドーシス .....	52
山田正仁 金沢大学神経内科	
13. 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 (第三報) .....	55
石原得博 山口大学第一病理	
14. AL アミロイドーシス発症に関する骨髓腫細胞の細胞生物学的研究 — SCID-hIL6 transgenic mice への患者骨髓腫細胞の移植生存系の確立 — .....	59
河野道生 山口大学大学院医学研究科生体シグナル解析医学	
15. 多発性骨髓腫に伴うアミロイドーシスの臨床的検討 — アミロイド沈着の危険因子: アポリポ蛋白の検討 — .....	63
麻奥英毅 広島赤十字原爆病院第 4 内科	
16. 心アミロイドーシスにおける洞房および房室結節へのアミロイド沈着について .....	67
由谷親夫 国立循環器病センター臨床検査部病理	
17. 原発性 AL アミロイドーシスにおける自己末梢血幹細胞移植を併用した melphalan 大量化学療法の一経験 .....	71
池田修一 信州大学第三内科	
18. AA アミロイドーシス合併慢性関節リウマチの死因の変遷 — 診断の進歩と治療の問題点 — .....	76
高杉 潔 道後温泉病院リウマチセンター リウマチ科	

19. フィブレートによるマウス AA アミロイドーシスの抑制……………80  
 高杉 潔  
 道後温泉病院リウマチセンター リウマチ科
20. 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……………83  
 吉崎和幸  
 大阪大学健康体育部健康医学第一部門
21. 慢性炎症に伴う AA アミロイドーシスモデルマウスの作成と IL-6 阻害治療の開発……………90  
 吉崎和幸  
 大阪大学健康体育部健康医学第一部門
22. AA アミロイドーシスと SAA1 遺伝子多型……………98  
 馬場 聡  
 浜松医科大学病理学第二
23. 急速凍結 ーレプリカ免疫電顕法による SAP 欠損マウス AA および  
 ヒト AL アミロイド線維の超微形態学的解析……………103  
 池田修一  
 信州大学第三内科
24. 脳 A $\beta$  アミロイドーシスはアルツハイマー病治療のターゲットである……………110  
 東海林幹夫  
 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学
25. リポ蛋白非結合型 A $\beta$  は脳内アミロイドーシス惹起分子である……………114  
 東海林幹夫  
 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学
26. 脳アミロイドーシスの治療法の検討……………118  
 東海林幹夫  
 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学
27. アルツハイマー病脳におけるミクログリア活性化経路と活性化阻害物質の検索……………124  
 玉岡 晃  
 筑波大学臨床医学系神経内科
28. アルツハイマー病(AD)脳におけるアミロイド $\beta$  蛋白(A $\beta$ )と酸化ストレスの相関  
 ー血漿 A $\beta$  に対するスタチン作用の解析も含めてー……………128  
 玉岡 晃  
 筑波大学臨床医学系神経内科

29. 変異型プレセニリン1を発現する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	133
森 啓 大阪市立大学老年医学研究部門脳神経科学	
30. ネプリライシン遺伝子多型とアルツハイマー病、脳アミロイドアンギオパチーとの関連	138
山田正仁 金沢大学大学院脳老化神経病態学（神経内科）	
31. 中等量以上のprednisolone治療は髄液中A $\beta$ 濃度を減少させる	141
池田修一 信州大学第三内科	
32. マウス老化アミロイドーシスの母子間伝播の可能性の検討	147
樋口京一 信州大学加齢適応研究センター 脈管病態分野	
33. マウス老化アミロイドーシス抑制遺伝子の解析	151
樋口京一 信州大学加齢適応研究センター 脈管病態分野	
34. アミロイドーシス沈着機構の解明；マウスモデルを用いた解析	155
樋口京一 信州大学加齢適応研究センター 脈管病態分野	
[Ⅲ] 研究成果の刊行に関する一覧表	161
[Ⅳ] 班構成員名簿	177

## [ 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

研究要旨 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の確立を目指して研究を遂行している。本年度はALアミロイドーシス患者に対して、その基礎にある形質細胞異常症を完全に抑える目的で末梢血幹細胞移植を併用したメルファランの大量静注療法が開始された。またAAアミロイドーシスのモデル動物としてIL-6遺伝子導入マウスが作製され、本動物に抗IL-6受容体抗体を投与すると血清中のSAAが正常化してアミロイドーシスを発症しないことも証明された。その他のアミロイドーシスの分野でも発生機序、新たな治療法の試みなどで進歩が見られた。

### 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 (岡山大学医学部・助教授)  
 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単一の疾患ではなく、臨床像ならびにアミロイド蛋白の化学性状により複数の亜型に分類されている。代表的な疾患としては1)ALアミロイドーシス、2)AAアミロイドーシス、3)家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)、4)透析アミロイドーシス、5)脳アミロイドーシス、6)マウス老化アミロイドーシス、がある。本研究組織では以下の課題に取り組み、3年間で研究成果をまとめる。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形質細胞異常症ならびに骨髄腫細胞の細胞生物学的特性を分子レベルから解明し(今井、河野、麻奥)、また有効な治療法を確立する(池田、今井、麻奥、山田)。2)AAアミロイドーシス：本症を引き起こす基礎疾患の病態を検索し(石原、馬場、高杉)、抗サイトカイン療法などの新たな治療法を検討する(高杉、吉崎)。3)FAP：原因となる80種類以上のtransthyretin(TTR)遺伝子の異常によ

り FAP は幾つかに亜型分類され、一部の疾患群は肝移植の治療効果が不明瞭である。従って個々の病態に応じた肝移植の適応基準を作成する（池田、安東）。また肝移植以外の治療法の開発も行う（前田、中里、安東）。4)透析アミロイドーシス：in vitro でのアミロイド線維形成モデルを用いて本疾患の病態解明を行い（内木、下条）、同時に薬物療法の有用性を検討する（原、下条）。5)脳アミロイドーシス：本症のモデル動物を作成して、細胞外への A $\beta$  アミロイドの沈着から神経細胞内へ tau の異常蓄積が起り、最終的に神経細胞死に至る過程の詳細を明らかにする。またこの動物モデル系で薬物療法を試みる（森、東海林、玉岡）。6)マウス老化アミロイドーシス：アミロイド前駆蛋白である apoA-II の構造変換を招く因子を解析し、また変異構造を持つ apoA-II 蛋白を介して老化アミロイドーシスが個体間で伝播する機序を明らかにする（樋口）。以上の研究を総括的に行うことにより種々なアミロイドーシスに共通した発症機構が解明され、また個々の病態に応じた適切な診断・治療法が確立できると考えられる。平成 13 年度は 3 年間の研究成果をまとめることを重視した。

## 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。（石原、由谷、麻奥）。欧米で行われている末梢血幹細胞移植を併用した強力な化学療法をわが国の患者に施行する（池田、麻奥、山田）。2)AA アミロイドーシス：RA 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）。RA 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）。（高杉、吉崎、下条、原、池田）。3)家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）：過去に国内・国外で肝移植を受けた FAP 患者、平成 11、12 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。この実験系を用いて、可溶性  $\beta 2$  microglobulin のアミロイドへの変換とその伸長反応へ影響を与える因子を検索する。（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 $\beta$  の生成・代謝過程に対する加齢の影響を明らかにする（東海林）。平成 13 度はステロイドホルモン、NSAID に代表される薬剤が A $\beta$  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（東海林、



森、池田、山田、玉岡)。6)マウス老化アミロイドーシス：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。動物実験の場合は各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：河野はアミロイドーシスを合併したヒト骨髄腫細胞を SCID-hIL6 transgenic mice の腹腔内へ移植して、同環境下で骨髄腫細胞が M 蛋白を持続的に分泌する系を確立した。しかしマウスではアミロイドーシスは誘発されなかった。麻奥は多発性骨髄腫に合併する AL アミロイドーシスの危険因子を明らかにする目的で120名の患者を対象に各種血液検査を施行した。その結果、BUN 値( $\geq 19\text{mg/dl}$ )とアポリポ蛋白 E 値( $\geq 4.5\text{mg/dl}$ )を本疾患発症の危険因子と看做した。今井は本症患者の骨髄または末梢血から V $\lambda$  mRNA を増幅して単クローン性 L 鎖の塩基配列を決定し、本領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを作成した。そして骨髄腫細胞の培養液中へこのアンチセ

ンスオリゴヌクレオチドを投与することで、L 鎖濃度の低下を確認した。由谷は心アミロイドーシスの剖検心 17 名の刺激伝導系を検索して、同部位へのアミロイド沈着の程度と不整脈・伝導障害の程度が相関することを明らかにした。石原は $\lambda$ 鎖、 $\kappa$ 鎖に対する特異抗体を作成して、臨床現場での使用を可能とした。池田は本症患者 2 名に VAD 療法 2 クール、それに続く造血幹細胞移植を併用したメルファラン大量静注療法を行い、血中ならびに尿中の M 蛋白消失を確認した。

2) AA アミロイドーシス：馬場は多施設の慢性関節リウマチ(RA)患者を数多く検索し、SAA1 遺伝子の $\gamma$ 型と 5'-上流の G 型、ならびにそれぞれのホモ接合体はアミロイドーシスの強い危険因子であることを見出した。同様に高杉は SAA1-genotype が $\gamma/\gamma$ である RA 患者において、アミロイドーシスによる重篤な消化管または腎機能障害が発生し易いことを報告した。吉崎は AEF 投与 IL-6 遺伝子導入マウスにおいて慢性炎症に基づくアミロイドーシスを発生させ、本動物に抗 IL-6 受容体抗体を投与すると血清中の SAA が正常化すると共に、アミロイド沈着の軽減または消失が起ることを確認した。

3) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)：前田は内在性 TTR 遺伝子の双方に Met30 変異を組み込んだマウスを作成し、本動物は FAP 患者の遺伝子治療のモデルとなることを報告した。安東は FAP 患者の肝臓をドミノ移植された患者血清中において変異 Met30TTR に対する自己抗体を見出し、また FAP 患者では肝移植後新たに網膜から産生された変異 TTR が眼病変を起すことを証明した。中里は心病変が前景に出る Ser50ArgTTR 型 FAP 3 家

系の臨床像を報告し、また剖検された心アミロイドーシス 2000 例の中から 5 例の変異 TTR 由来の遺伝性アミロイドーシスを見出した。池田は FAP 患者に対する補助的同所性部分肝移植(APOLT)とドミノ移植の経験をそれぞれ 3 名報告した。

- 4) 透析アミロイドーシス：内木は *in vitro* の系で  $\beta 2$  microglobulin 由来のアミロイド線維は中性 pH 反応液中で速やかに脱重合を起こすことを見出した。下条はアミロイド沈着病変の発生に関与するマクロファージの指標として monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) と macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$ ) の遺伝子多型を検討し、本病変による手根管症候群を有する患者では MCP-1 遺伝子型が有意に高いことを報告した。原は長期透析患者において黄色靭帯、後縦靭帯に多量のアミロイドが沈着して神経障害を呈した患者 6 名を報告し、また透析アミロイドーシスの指標として血中のマトリックスメタプロテアーゼ-3(MMP-3)濃度が有用であることも加えた。
- 5) 脳アミロイドーシス：内木は表面プラズモン共鳴法を駆使して、 $\beta$ アミロイド線維伸長過程と共に脱重合過程も一次反応速度論モデルで説明できることを証明した。山田はアミロイド分解酵素であるネプリライシンの遺伝子多型が脳アミロイド沈着の危険因子になっていることを報告した。玉岡は  $A\beta$  分子種と酸化ストレスとの関連を検討し、不溶性分画  $A\beta 42$  は過酸化脂質と正の相関があることを見出した。森は変異型 presenilin1 を発現する PC12D 細胞を用いてその細胞代謝を検討し、本遺伝子の導入により細胞運動の異常亢進がみられることを報告した。東海林は脳アミロイド沈着を発生する複数のマウスモデルを

作成して、メラトニンによるアミロイド沈着抑制効果を含めて、臨床応用可能な薬物療法の検討を開始した。池田はある一定量以上の副腎皮質ステロイドホルモン投与によりヒト脳脊髄液中の  $A\beta$  濃度が有意に低下することを報告した。

- 6) マウス老化促進アミロイドーシス：本モデルマウスにはアミロイドーシス修飾遺伝子領域があること、世代を経るごとに発症促進現象がみられること、異なる蛋白から成るアミロイド線維を投与することでアミロイドーシスの発症促進が見られることの三点を明らかにした。

#### D. 考察

今年度はアミロイドーシスの発生機序と治療の面で進歩が見られた。前者については AL アミロイドーシスにおいてマウスの腹腔内に骨髄腫細胞を移植して、M 蛋白が持続的に分泌される状態が作製され、こうしたマウスでは AL アミロイドの沈着が起ることが期待された。しかし実際にはアミロイド沈着が起ってこないことより、アミロイドーシスの発生にはアミロイド惹起性蛋白の負荷に加えて、何らかの生体側の要因が必要であろうと推測された。また PBST を併用した AL アミロイドーシスに対する化学療法は本邦では開始されたばかりで、その適応と効果については今後症例を蓄積する必要がある。AA アミロイドーシスに関しては RA 患者を対象とした発病素因の研究により SAA 遺伝子のある表現型と本アミロイドーシスの発症頻度に関連があることが判明した。FAP については肝移植以外の治療法が模索され出したが、まだその具体的方法は定まっていない。透析アミロイドーシスでは発病に関連した分子遺伝学的背景が検索され始めた。また脳アミロイドーシスでは既知の薬物の中から、

メラトニン、副腎皮質ステロイドホルモンが本病変の発病抑制に有用性がある可能性が指摘され、今後の展開が待たれる。

#### E. 結論

1. アミロイドーシスの発生機序については脳アミロイドーシス、マウス老化アミロイドーシスを中心に進歩が見られた。
2. AL, AA-アミロイドーシス、FAP を代表とする全身性アミロイドーシスに新たな治療法が班員の所属する施設で行われた。

#### 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

## 透析患者の手根管症候群の発症における MCP-1およびMIP-1 $\alpha$ 遺伝子多型の関与

分担研究者 下条文武 新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座  
(第二内科)

共同研究者 大森健太郎、宋 進、斉藤徳子、後藤 眞、坂爪 実、成田一衛  
新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座 (第二内科)

**研究要旨** [目的] 透析アミロイドーシスでは、沈着アミロイド周囲の単球/マクロファージ浸潤が認められ、同時に monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) および macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )などのケモカインの発現も亢進している。私たちは透析アミロイドーシスの発症に関与する遺伝的な背景を解明することを目的として、MCP-1 および MIP-1 $\alpha$  の遺伝子多型について検討した。[方法] 透析患者 366名 (うち手根管開放術の既往者 95名)、健常者 142名を対象に、PCR-RFLP法などでMCP-1 およびMIP-1 $\alpha$  の遺伝子型を同定し、臨床データとの関連を統計学的に解析した。[結果および考察] 手根管開放術既往者では、MCP-1GG型が有意に高頻度 ( $P=0.0326$ ) に認められた。さらに、Cox比例ハザードモデルによる解析で、MCP-1GG型が手根管症候群の発症に影響を与える因子であることが証明された ( $P=0.0398$ 、ハザード比 1.976、95%信頼区間 1.032-3.781)。一方、MIP-1 $\alpha$  では、それぞれの対象群間の遺伝子頻度に有意差を認めなかった。[結論] MCP-1 (-2518位) GG遺伝子型が手根管症候群の発症に関与している可能性が示唆された

### A. 研究目的

長期透析患者に発症する透析アミロイドーシスは、骨・関節障害を主病変とするため、QOLの低下を招く深刻な合併症である。本症の発症要因として、透析導入年齢が高いこと、透析期間が長いこと、生体適合性の低い透析膜あるいは純度の低い透析液の使用などが知られている。また、遺伝的な背景としてアポリポ蛋白遺伝子 E4 が報告されている。しかし、発症までの透析期間は5年未満-30年以上と個体差が大きいことなど、その病態の詳細は未だ不明である。

病理学的に透析アミロイドーシスは、アミロイド沈着部にマクロファージの浸潤を伴

うことが特徴的である。また、アミロイド沈着部およびその周囲での monocyte chemotactic protein 1(MCP-1)、macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )などのケモカインの発現亢進が報告されている (図1)。MCP-1 および MIP-1 $\alpha$ は、主に活性化されたマクロファージ、T細胞、B細胞、線維芽細胞などから産生され、その基本的機能は単球・マクロファージに対する遊走活性作用や、炎症性サイトカインの産生誘導を惹起することである。このような炎症性ケモカインやマクロファージが透析アミロイドーシスの進展に関与している可能性が示唆されている。

一方、最近 MCP-1 (-2518 位) 遺伝子転写制御領域、および MIP-1 $\alpha$  (-906 位) 遺伝子転写制御領域に遺伝子多型が見いだされ、これら多型が遺伝子の発現を変化させている可能性が示されている。

今回私たちは、MCP-1 および MIP-1 $\alpha$  の遺伝子多型が、透析アミロイドーシスの主要症状のひとつである手根管症候群の発症に関与しているかを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

対象は、詳細な臨床情報が得られた維持血液透析患者 366 名(男性 231 名、女性 135 名、平均年齢 61.5 $\pm$ 12.2 才、平均透析期間 140 $\pm$ 104 ヶ月)とした。基礎疾患は慢性糸球体腎炎 237 名、糖尿病性腎症 63 名、多発性嚢胞腎 19 名、その他の疾患(腎硬化症、腎盂腎炎など) 47 名であった。さらに、日本人での遺伝子頻度をみるために、コントロール群として健常人 142 名(男性 69 名、女性 73 名、平均年齢 48.8 $\pm$ 13.3 才)を抽出した。

### 2. MCP-1(-2518 位)遺伝子多型のタイピング

患者および健常者の末梢白血球からゲノム DNA を抽出した後、特異的プライマー(5'-CCG AGA TGT TCC CAG CAC AG-3'、5'-CTG CTT TGC TTG TGC CTC TT-3')を用いて PCR 反応(94 $^{\circ}$ C5 分; 94 $^{\circ}$ C30 秒、60 $^{\circ}$ C30 秒、72 $^{\circ}$ C30 秒のサイクルを 35 回、72 $^{\circ}$ C7 分)を行った。特異的に増幅された DNA を制限酵素 PvuII を用いて消化し、エチジウムブロマイドを添加した 1%アガロースゲル電気泳動の後、紫外線下で観察した。その泳動パターンの組み合わせから GG、AA、GA に分類した。

### 3. MIP-1 $\alpha$ (-906 位)遺伝子多型タイピング

同様な方法で抽出したゲノム DNA 用いて、特異的プライマー(5'-AAG GCA TGT ATT TCC AAG C-3'、5'-CCC ACA ACG AAA CTC

AGA-3')で PCR 反応(94 $^{\circ}$ C5 分; 94 $^{\circ}$ C30 秒、53 $^{\circ}$ C30 秒、72 $^{\circ}$ C30 秒のサイクルを 35 回、72 $^{\circ}$ C7 分)を行った後、12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、紫外線下で観察した。TA のリピート数による塩基長差から TA4/TA4、TA6/TA6、TA4/TA6 に分類した。

## 4. 統計解析

各測定値は平均 $\pm$ 標準偏差で表した。統計的処理は 2 群間の数値の比較には Mann whitney の U 検定、各遺伝子型と手根管開放術既往の有無の比較にはカイ 2 乗検定あるいは Fisher の直接確率法を用いた。各臨床データおよび遺伝子多型が手根管症候群の発症にどの程度影響しているかを検討するために Cox 比例ハザードモデルを用いた。この解析では統計学的に有意に影響する因子を漸減法によるステップワイズ解析で選択し、共変量とした。P<0.05 を有意差ありと判定した。

## C. 研究結果

透析患者 366 名中、95 名で手根管開放術の既往を認めた(表 1)。手術既往群は非既往群に比べ、有意に透析導入年齢が若く、長期間透析、高効率透析であった。

手根管開放術の有無と MCP-1/MIP-1 $\alpha$  遺伝子型、およびアレル頻度の間には関連を認めなかった。(表 2)

次に、MCP-1 A アレル頻度が日本人では欧米人に比べて低い(A アレル頻度 日本人:欧米人、0.37:0.71)ことに注目し、MCP-1 遺伝子型を GG 群と GA+AA 群に分けて比較したところ、GG 群で有意に手根管開放術が高頻度であった(表 3)。さらに、Cox 比例ハザードモデルを用いて、手根管症候群の発症に与える影響を検討した結果、MCP-1GG 型と透析導入年齢が手根管症候群の発症に関与していることを認めた(表 4)。

MCP-1GG 型はその他の遺伝子型の 1.976 倍の発症危険率を有し、透析導入年齢が 1 才増加すると発症の危険性は 1.036 倍であった。

#### D. 考察

今回の検討で、MCP-1 (-2518 位) GG 遺伝子型が手根管症候群の発症に関与している可能性が示唆された。MCP-1 (-2518 位) 遺伝子多型に関しては、Rovin らの報告より、ルシフェラーゼ発現ベクターを用いた *in vitro* の発現系で、G アレルを持つものは、IL- $\beta$  刺激下での転写活性がより高いことが報告されている。さらに個体由来の末梢血単核球は、IL- $\beta$  存在培地中で AA,GA,GG の順に高濃度の MCP-1 を産生している。つまり、MCP-1GG 遺伝子型を有する患者では、血中 MCP-1 が他の遺伝子型を有する患者に比べてより高濃度で存在し、単球/マクロファージの遊走活性作用が亢進されていると推測される。その結果、アミロイド沈着部へのマクロファージの浸潤など局所病変がより進行し、手根管症候群の発症へと進展しやすいことが考えられた。

風間らは RI 標識された  $\beta 2$  ミクログロブリンでのシンチグラフィを検討した結果、RI 標識された  $\beta 2$  ミクログロブリンがアミロイド周囲のマクロファージに貪食されていることを報告している。このことは、マクロファージが単に炎症反応の結果として観察されるのではなく、マクロファージによる  $\beta 2$  ミクログロブリンへの修飾が局所でのアミロイド形成そのものに関与している可能性を示唆しており、今回の結果はそれを支持するものと考えられた。

一方、MIP-1 $\alpha$  (-906 位) 多型については、MIP-1 $\alpha$  のプロモーター領域に存在するマイクロサテライトリピート多型が、炎症性疾患の発症に関与している可能性が示唆されているが、私たちの検討では関連性を認めなかった。今後、この部位での多型が直接的に

MIP-1 $\alpha$  蛋白の発現に関与しているかを解明し、再検討する必要があると思われた。

#### E. 結論

MCP-1(-2518 位)GG 型および、透析導入年齢は、手根管症候群の発症に関与している可能性が示唆された。

一方、MIP-1 $\alpha$  多型と手根管症候群の発症には関連性を認めなかった。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Gejyo F:  $\beta 2$ -microglobulin amyloid. *Amyloid* 7:17-18, 2000
- 2) Kazama J, Maruyama H, Gejyo F: Osteoclastogenesis and osteoclast activation in dialysis-related amyloid osteopathy. *American Journal of Kidney Diseases* 38(Suppl 1): 156-160, 2001
- 3) Yamaguchi I, Hasegawa K, Takahashi N, Gejyo F, Naiki H: Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of  $\beta 2$ -microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry* 40:5499-8507, 2001
- 4) Kazama J, Maruyama H, Gejyo F: Reduction of circulating  $\beta 2$ -microglobulin level for the treatment of dialysis-related amyloidosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 16(Suppl 4):31-35, 2001
- 5) Yamaguchi I, Hasegawa K, Naiki H, Mitsu T, Matuo Y, Gejyo F: Extension of A  $\beta 2$ M amyloid fibrils with recombinant human  $\beta 2$ -microglobulin. *Amyloid* 8:30-40, 2001
- 6) 下条 文武、丸山弘樹、風間順一郎：アミロイド骨関節障害の病態と対策－第 44 回日本透析医学会・第 42 回日本腎臓学会

- 合同シンポジウムよりー 日本透析医学会雑誌 33 : 329-330, 2000
- 7) 下条 文武、高橋直生：透析アミロイドーシス 日本内科学会雑誌 89 : 96-102, 2000
- 8) 下条 文武：血液透析治療に伴うアミロイド症の病態解明と治療対策 新潟医学会雑誌114 : 264-269, 2000
- 9) 恵 以盛、下条 文武：アミロイド骨症の予防と治療（黒川 清 監修、深川 雅史編）透析骨病変- 新しい考え方（日本メディカルセンター）：255-263, 2000
- 10) 丸山 弘樹、下条 文武：アミロイド骨症の予防と治療（黒川 清 監修、深川 雅史編）透析骨病変- 新しい考え方（日本メディカルセンター）：326-333, 2000
- 11) 齋藤 徳子、下条 文武：透析アミロイドーシスの概念と成因（酒井紀 監修、秋澤 忠男、五十嵐 隆、北岡 健樹、佐中 孜、高橋 公太 編）腎と透析 vol.49 増刊号 慢性腎不全のすべて-2000（東京医学社）：717-721,2000
- 12) 風間 順一郎、丸山 弘樹、下条 文武：AGEs とアミロイド線維：（酒井 紀 監修、秋澤 忠男、五十嵐 隆、北岡 健樹、佐中 孜、高橋 公太 編）腎と透析 vol.49 増刊号 慢性腎不全のすべて-2000（東京医学社）：722-724,2000
- 13) 下条 文武：アミロイドーシスの対策（酒井紀 監修、秋澤忠男、五十嵐隆、北岡健樹、佐中孜、高橋公太 編）腎と透析 vol.49 増刊号 慢性腎不全のすべて-2000（東京医学社）：738-740,2000
- 14) 橋本 義一、内木 宏延、吉田 治義、下条 文武：実験的アミロイド線維伸長とAGE 化 $\beta$ 2-m 腎と骨代謝 14 : 31-36, 2001
- 15) 下条 文武：透析アミロイドーシス(1)ー手根管症候群ー 透析ケア 7 : 48-51,2001
- 16) 下条 文武： $\beta$ 2-microglobulin と透析アミロイドーシス 臨床病理 49 : 244-248,2001
- 17) 大林 弘明、丸山 弘樹、下条 文武：透析アミロイドーシスへの対策 腎と透析 50 : 685-689,2001
- 18) 齋藤 徳子、下条 文武：透析アミロイドーシス 内科87 : 1242-1247, 2001
- 19) 下条 文武：透析アミロイドーシス Medical Technology 29 : 1161, 2001
- 20) 丸山 弘樹、樋口 昇、下条 文武：透析アミロイドーシスによる関節症の治療（伊藤 克己、浅野 泰、遠藤 仁、御手 洗哲也、東原 英二 編）Annual Review 腎臓（中外医学社）：240-246,2001
- 21) 下条 文武：アミロイドーシス(透析療法合同専門委員会 編) 血液浄化療法ハンドブック(共同医書出版社):388-394,2001
- 22) 下条 文武：透析アミロイドーシス(荒川 正昭、小磯 謙吉、浅野 泰 監修) 腎臓病の最新医療(先端医療技術研究所) ( in press )
2. 学会発表
- 1) Kazama JJ, Gejyo F: Dialysis-related Amyloidosis 2000 - Perspective of clarification of the pathogenesis and the treatments Beta 2-microglobulin absorption therapy; a new device for the treatment of dialysis related amyloirois. 国際シンポジウム dialysis-related amyloidosis 2000, Tokyo, Japan, 2000
- 2) Yamaguchi I,Hasegawa K, Takahashi N, Gejyo F, Naiki H: Apolipoproteine E inhibits the depolymerization of  $\beta$  2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. 9th International Symposium on Amyloidosis. Budapest,Hungary, 2001
- 3) Takahashi N, Hasegawa K, Yamaguchi I, Gejyo F, Naiki H: Establishment of a first-order kinetic model of AL Amyloid fibril extension in vitro. 9th International Symposium on Amyloidosis.



Budapest, Hungary, 2001

- 4) Gejyo F:  $\beta$  2- m icroglobulin and dialysis-related amyloidosis: pathogenic and therapeutic consideration. 19th Annual Meeting on the International Society of Blood Purification, Tokyo, japan, 2001
- 5) 齋藤 徳子、宮崎 滋、鈴木 正司、森田 俊、平沢 由平、下条 文武:  $\beta$  2M アミロイド骨 関 節 病 変 に お け る matrix metalloproteinase (MMP) と vasucular endothelial growth factor (VEGF) の発現に関する検討、第 45 回日本透析医学会学術集会・総会、福岡、2000.6.16～6.18
- 6) 井口 清太郎、安城 淳哉、西 慎一、長谷川 進、長谷川 和宏、山本 智章、惠 京仔、小田 瑞枝、惠 以盛、惠 らん、丸山 弘樹、下条 文武: 透析アミロイドーシスによる脊柱管狭窄症の一例、第 45 回日本透析医学会学術集会・総会、福岡、2000.6.16～6.18
- 7) 村上 修一、本田 茂、大淵 雄子、伊藤 聡、中野 正明、下条 文武: RA に対する外科手術のタイミングー 内科・整形外科の立場ー から アミロイド腎症を合併した慢性関節リウマチに股関節置換術を行った 3 例、第 1 2 回中部リウマチ学会、岐阜、2000.9.2
- 8) 齋藤 徳子、下条 文武、宮崎 滋、鈴木 正司、森田 俊、平沢 由平:  $\beta$  2M アミロイド骨関節病変におけるオステオポンチン(OPN)の発現に関する検討、日本透析医学会、大阪、2001.6.21～6.24
- 9) 下条 文武: 透析とアミロイド骨・関節病変、第 31 回日本腎臓学会東部学術大会、山梨、2001.10.26～10.27
- 10) 白崎 有正、風間 順一郎、大林 弘明、上野 光博、成田 一衛、鈴木 栄一、下条 文武: 急性腎不全を呈した Bence-Jones(BJ) 型多発性骨髄腫に続発するアミロイドーシスの一例、第 31 回日本腎臓学会東部学術大会、山梨、2001.10.26～10.2

#### 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

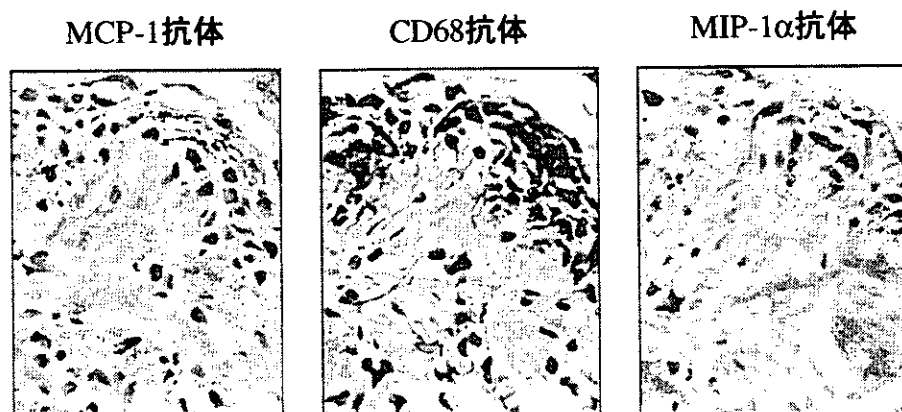


図1 血液透析患者の滑膜組織像  
 手根管症候群の患者の滑膜組織を、MCP-1およびMIP-1αに対する特異抗体、  
 および、単球/マクロファージに対するCD68抗体で染色したもの。  
 CD68陽性細胞およびその周囲で、MCP-1、MIP-1αが陽性である。

	手根管開放術		P 値
	あり n=95	なし n=271	
性別 (女/男)	36/59	99/172	NS
年齢 (才)			
平均±標準偏差	60.7±9.1	61.8±13.1	NS
分布域	(43-83)	(21-89)	
透析導入年齢 (才)	37.6±11.7	54.1±15.0	<0.001
透析期間 (月)	277.3±63.4	91.9±66.0	<0.001
Kt/V <sub>urea</sub> (L/kg)	1.60±0.31	1.45±0.37	0.041
β <sub>2</sub> -microglobulin (mg/l)	27.1±6.8	28.2±8.7	NS
Kt/V for β <sub>2</sub> -microglobulin (L/kg)	1.27±0.75	1.13±0.53	NS

表1 臨床検査値と手根管開放術既往の有無

	手根管開放術		健常者 n=142 (%)	P 値
	あり n=95(%)	なし n=271(%)		
MCP-1 遺伝子型				
AA	9 (9.5)	29(10.7)	16 (11.3)	NS
GA	40(42.1)	142(52.4)	74 (52.1)	
GG	46(48.4)	100(36.9)	52 (36.6)	
アレル				
A	58 (30.5)	200(37.0)	106 (37.3)	NS
G	132 (69.5)	342(63.0)	178 (62.7)	
MIP-1α 遺伝子型				
(TA) <sub>4</sub> /(TA) <sub>4</sub>	9 (9.5)	25 (9.2)	11 (7.7)	NS
(TA) <sub>4</sub> /(TA) <sub>6</sub>	42 (44.2)	125(46.1)	70 (49.3)	
(TA) <sub>6</sub> /(TA) <sub>6</sub>	44 (46.3)	121(44.7)	61 (43.0)	
アレル				
(TA) <sub>4</sub>	60(31.6)	175(32.3)	92 (32.4)	NS
(TA) <sub>6</sub>	130(68.4)	367(67.7)	192 (67.6)	

表2 透析患者、健常者における遺伝子型およびアレル頻度

	手根管開放術	
	あり n=95 (%)	なし n=271 (%)
MCP-1 GG	46 (48.4)	100 (36.9)
MCP-1 GA+AA	49 (51.6)	171 (63.1)

$P = 0.0326, \chi^2 = 3.894, \text{odds ratio} = 1.605$

表3 MCP-1遺伝子型頻度と手根管開放術既往の有無

	ハザード比	95% 信頼区間	P値
MCP-1 GG型 (対GA+AA)	1.976	[ 1.032 - 3.781 ]	0.0398
透析導入年齢	1.036	[ 1.006 - 1.067 ]	0.0175

表4 手根管症候群の発症に影響した因子 (Cox比例ハザードモデル)

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

## ヒトアミロイド線維形成・分解の試験管内分子機構

分担研究者 内木宏延 福井医科大学医学部第2病理

共同研究者 長谷川一浩\*、山口 格\*、高橋直生\*\*、小野賢二郎\*\*\*\*、  
 山本 卓\*\*\*、下条文武\*\*、山田正仁\*\*\*、上田孝典\*\*\*\*

\*福井医科大学医学部第2病理、\*\*新潟大学医学部第2内科、  
 \*\*\*金沢大学医学部神経内科、\*\*\*\*福井医科大学医学部第1内科

**研究要旨** アルツハイマー病、全身性ALアミロイドーシス、及び透析アミロイドーシスにおけるアミロイド線維形成の反応速度論的解析を並行して遂行し、個々のアミロイドーシスの特殊性と共に、ヒトアミロイドーシス全般に共通する発症機構・因子を明らかにすることを旨とした。(1) アルツハイマー病では、系外からA $\beta$ 蛋白が供給され続ける開放反応系を表面プラズモン共鳴法を用いて構築し、 $\beta$ アミロイド線維(fA $\beta$ )伸長過程と共に脱重合過程も一次反応速度論モデルで説明できることを証明した。また、種々の有機化合物のfA $\beta$ 分解作用をチオフラビンT法を用いて比較解析し、抗酸化剤NDGA、次いでリファンピシン、テトラサイクリンが強力な線維分解能を有すること明らかにした。(2) ALアミロイドーシスでは、中性pH域における線維伸長反応を重点的に解析し、線維伸長過程が種々の生体分子により抑制的あるいは促進的に修飾を受けていることを明らかにした。(3) 透析アミロイドーシスでは、アミロイド線維が中性pH反応液中でオリゴマー以下まで脱重合を起こすと同時に、種々のアミロイド共存分子がその脱重合反応を抑制することを明らかにした。

### A. 研究目的

われわれは、アルツハイマー病 $\beta$ アミロイドーシス、ALアミロイドーシス、及び透析アミロイドーシスにおける試験管内アミロイド線維形成の反応速度論的解析を並行して遂行した。そして、各々の成果を他のアミロイドーシス研究にフィードバックすることにより、個々のアミロイドーシスの特殊性と共に、ヒトアミロイドーシス全般に共通する発症機構・因子を明らかにすることをグループの主要な研究目標とした。3年間の主要成果を報告する。

### B. 研究方法

(i) いずれのアミロイドーシスも、蛍光色

素チオフラビンTを用いたアミロイド線維分光蛍光定量法、及びネガティブ染色後の電顕観察を基本的分析手段とした。

(ii) アルツハイマー病 $\beta$ アミロイドーシスでは、ピアコアを用いた開放反応系を構築した。測定には表面プラズモン共鳴法(SPR, BIACORE 1000, 3000)を用いた。最初にA $\beta_{1-40}$ 蛋白よりpH7.5で $\beta$ アミロイド線維(fA $\beta$ )を形成させ、これを重合核としてセンサーチップ上に固定化した。次いで、リン酸緩衝液(pH7.5)に溶解した各種濃度(0-30 $\mu$ M)のA $\beta_{1-40}$ 蛋白溶液を連続的に添加し、37°CにおけるfA $\beta$ の伸長及び脱重合過程をリアルタイムで測定した。