

Fig. 1 治療前後での上部消化管内視鏡検査

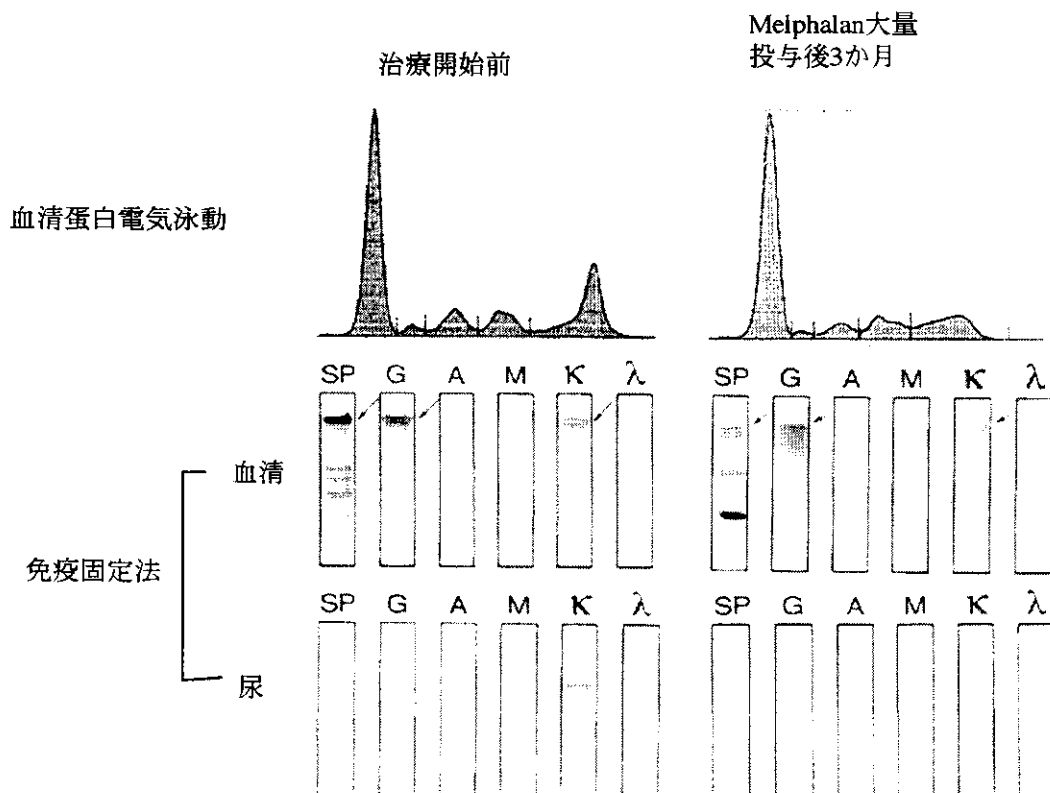


Fig. 2 治療前後でのM蛋白

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

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 -

分担研究者 高杉 潔 道後温泉病院

共同研究者 奥田恭章 道後温泉病院

研究要旨 [目的] AA アミロイドーシス(AMY)合併慢性関節リウマチ (RA) の死因を調査し、その変遷より診断の進歩と治療の問題点を検討。[方法]①当院 RA 死亡例を AMY 合併 RA と非診断 RA に層別化し、臨床背景と死因を比較検討した。②当院 AMY 合併 RA 死亡症例のうち死因調査が可能であった 84 例を 94 年死亡までの 40 例と上部消化管アミロイドーシススクリーニングが確立しその影響を受けると考えられる 95 年以降死亡の 44 例の 2 群に分け、それぞれの臨床背景と死因を比較調査した。[結果および考察] 1.RA 死亡例 338 例中 108 例 (32.0%) において AMY の合併が認められた。AMY 非診断 RA の死因順位は、1.感染症 (24.2%)、2.悪性腫瘍 (19.4%)、3.間質性肺炎等の呼吸器疾患 (15.3%)、4.心疾患 (13.7%) であるのに対して、AMY 合併 RA の死因順位は、1.感染症 (33.3%)、2.腎不全 (30.0%)、3.脳血管障害 (11.9%) であった。感染症は、AMY 合併の有無を問わず、重要な死因と考えられるが、AMY 群でより多い傾向が認められた。このことは、AMY による低蛋白血症や腎不全による易感染性と RA に対する治療の強化が背景因子として考えられる。2.AMY 合併 RA において RA 罹病期間は前期の平均 15.8 年に対して後期は平均 22.0 年と有意に延長し、死亡年齢も前期が平均 66.9 歳なのに対して後期は平均 69.9 歳と有意に延長が認められた。上部消化管アミロイドスクリーニングによる早期診断と早期よりの強力な治療が予後の改善に寄与していることが示唆される。3.AMY 合併 RA の死因において、前期群、後期群とも死因の 60-70% は腎不全または感染症であり、この点は AMY 合併 RA の重要な特徴であると考えられた。死因の変遷の点からは前期 1 位であった腎不全は 35%から 27%へと減少し、一方、感染症は 28%から 39%へと上昇し後期の死因の 1 位となり、死因における感染症の増加が特徴的であった。[結論] 当院 AMY 合併 RA は、後期群において有意に予後の改善を示した。上部消化管アミロイドスクリーニングによる早期診断を行い、免疫抑制剤やステロイド剤などによる RA 活動性の抑制 (アミロイド進行阻止) が予後の改善のために重要であると考えられるが、易感染性への十分な配慮が必要である。

A. 研究目的

AA アミロイドーシスは、腎、消化管などを中心とするその多臓器障害性から慢性関節リウマチ (RA) の死因に大きく影響を及ぼしている。今回、アミロイドーシス合併

RA 死亡例の臨床背景と死因の変遷を調査し、その診断の進歩と治療の問題点を検討した。

B. 研究方法

1.当院 RA 死亡例 338 例を AA アミロイドーシス合併 RA と非診断 RA に層別化し、そ

の死因を比較検討した。

2. 当院 AA アミロイドーシス合併 RA 死亡症例のうち死因調査が可能であった 84 例を 94 年死亡までの 40 例と上部消化管アミロイドスクリーニングが確立しその影響を受けると考えられる 95 年以降死亡の 44 例の 2 群に分け、それぞれの臨床背景と死因を比較調査した。

C. 研究結果

1. RA 死亡例 338 例中 108 例 (32.0%) において AA アミロイドーシスの合併が認められた (図 1)。AA アミロイドーシス非診断 RA の死因順位は、1. 感染症 (24.2%)、2. 悪性腫瘍 (19.4%)、3. 間質性肺炎等の呼吸器疾患 (15.3%)、4. 心疾患 (13.7%) であるのに対して、AA アミロイドーシス合併 RA の死因順位は、1. 感染症 (33.3%)、2. 腎不全 (30.0%)、3. 脳血管障害 (11.9%) であった (図 2)。感染症は、アミロイドーシス合併の有無を問わず、重要な死因と考えられるが、アミロイドーシス群でより多い傾向が認められた。このことは、アミロイドーシスによる低蛋白血症や腎不全による易感染性と RA に対する治療の強化が背景因子として考えられる。

2. アミロイドーシス合併 RA の予後の変遷を表に示す。RA 発症年齢は後期群で若くなっていたが、有意差は認めなかった。RA 罹病期間は 15.8 年から 22 年と約 6 年間の有意の延長を認めた。また、死亡年齢も前期群は 66.9 歳であるのに対して、後期群は 69.9 歳と約 3 年間の有意の延長が認められた。

3. 図 3 にアミロイドーシス合併 RA の死因の変遷を示す。前期群、後期群とも死因の約 3 分の 2 は腎不全または感染症であり、この点はアミロイドーシス合併 RA の重要な特徴であると考えられた。死因の変遷の点から、前期 1 位であった腎不全は 35% から 27% に減少し、一方、感染症は 28% から 39% に大きく増加し、後期の死因の 1 位となった。感染症の上昇は死因の変遷の点から大きな特徴

であると考えられる。

D. 考察

我々は、アミロイドーシスをできるかぎり早期より診断し、治療を行うことを目指して、1989 年より AA アミロイドーシスの主な標的臓器である消化管の生検スクリーニングを行ってきた。今回の調査から、アミロイドーシス合併 RA の予後は有意に改善しており、アミロイドーシス生検スクリーニングの有用性が示唆された。

一方、今回の調査から死因における感染症の増加が特徴的であった。アミロイドーシス合併の有無を問わず、RA の特徴的死因は感染症であるが、特に肺炎死がもっとも多く、その要因として図 4 に示すような risk factor が考えられる。まず、RA の関節外症状/合併症として慢性気管支炎や気管支拡張症などの慢性気道感染症の頻度が高く、易感染性であること、また、肺線維症の進行例では肺機能の予備能が低く、肺炎合併時に重篤になりやすいと考えられる。薬物療法では MTX などの免疫抑制剤や DMARDs の併用療法、ステロイド療法により易感染状態であると考えられる。また、種々の関節障害、すなわち、上肢 ADL の低下、頸椎障害による可動域制限、顎関節障害による開口障害と下顎の後退、喉頭の輪状披裂関節炎による声帯開大不全などにより喀痰排出困難となり肺炎が難治性となる傾向がある。これらが、RA における感染症死、肺炎死の比率の上昇に関与していると考えられる。また、アミロイドーシス合併症例における感染症死の増加に関しては 1. 多臓器不全、2. ネフローゼや消化管の吸収不良、蛋白漏出による低蛋白血症、3. アミロイドーシスの進行を阻止するための強力な免疫抑制療法がさらに感染のリスクを上昇させていると考えられ、注意深い観察、治療が必要である。

E. 結論

AA アミロイドーシス合併 RA の診療において、上部消化管アミロイドスクリーニングによる早期診断を行い、免疫抑制剤やステロイド剤による RA 活動性の抑制（アミロイド進行の阻止）が予後の改善のために重要であると考えられるが、易感染性への十分な配慮が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

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 回臨床リウマチ学会総会、2000

- 2) 奥田恭章、山田俊幸、高杉潔、武田政寛、難波滋、大西誠：AA アミロイドーシスを合併した慢性関節リウマチにおける SAAI 遺伝子多型と生命予後。第 45 回日本リウマチ学会総会、2001

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. RA死亡症例におけるアミロイドの合併

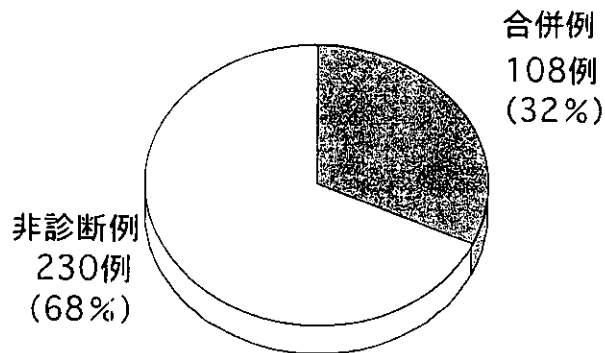


図3. アミロイド合併RAの死因の変遷

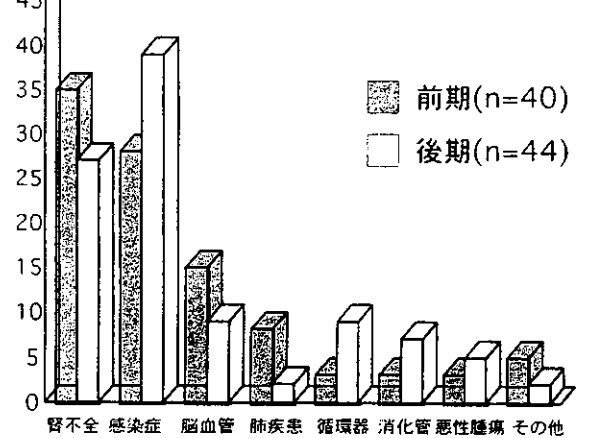


図2. RAの死因

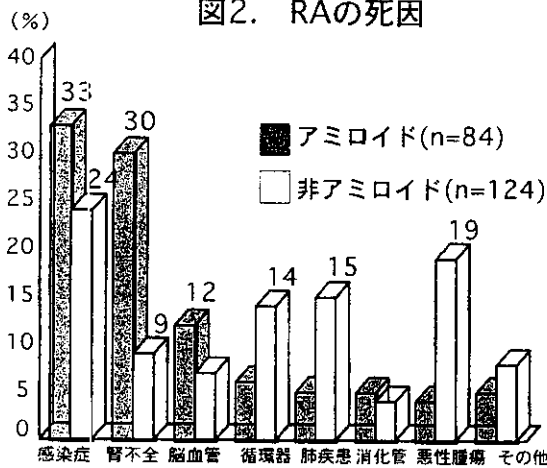


図4. RAにおける呼吸器感染症増加の要因

関節外症状/合併症 (易感染性と肺予備能低下)

- 慢性気道感染症 (慢性気管支炎、気管支拡張症)
 - RAで高頻度
- 肺線維症
 - 進行例では肺予備能が低い

薬物療法 (易感染性)

- MTXやDMARDS併用療法
- ステロイド療法

関節障害 (喀痰排出困難)

- 上肢ADLの低下
- 頸椎障害による可動域制限
- 顎関節障害
 - 開口障害・下顎後退
- 喉頭輪状披裂関節炎
 - 声帯開大不全

表. アミロイド合併RA死亡症例の臨床背景の比較

	前期 (n=48)	後期 (n=60)	p
RA発症年齢	51.1±13.0	47.9±11.2	0.1618
RA罹病期間	15.8±8.8	22.0±9.5	0.0007
死亡年齢	66.9±8.2	69.9±7.4	0.0496

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

フィブレートによるマウス AA アミロイドーシスの抑制

分担研究者 高杉潔 道後温泉病院リウマチセンター

共同研究者 山田俊幸*、村井丈寛**、羽生忠正**、三井田孝***、奥田恭章****

*順天堂大学臨床病理、**新潟大学整形外科、***新潟大学検査部

****道後温泉病院リウマチセンター

研究要旨 抗炎症効果を併せもつとされる高脂血症治療薬のフィブレート系製剤がマウス AA アミロイドーシス発症を抑制するか否か検討した。マウスにフェノフィブレート 0.05, 0.1, 0.2%含有餌を与え、AEF と Freund アジュバントによりアミロイドーシス惹起した。未治療群の脾臓アミロイド沈着度、SAA 濃度を 100%とすると、0.05%治療群でそれぞれ、69%、65%に、0.1%群で 49%、45%に、0.2%群で 16%、21%に抑制された。すなわち薬剤濃度依存性にアミロイド沈着、SAA 濃度上昇が抑制された。本薬剤は SAA 濃度上昇抑制を主とした抗炎症作用によりアミロイドーシス発症を抑制したと考えられ、新しいアミロイドーシス治療薬としての可能性が示された。

A. 研究目的

近年、血清脂質降下剤が抗炎症作用を併せもち、抗動脈硬化作用の一端を担うことが議論されている。高トリグリセライド血症タイプの治療薬である、フィブレート誘導体は、細胞の peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) に結合し、炎症反応の主経路である NF- κ B pathway を抑制することで、炎症性サイトカインとその産物である急性期蛋白の発現を抑制することが知られている。本研究ではこの薬剤が血清アミロイド A(SAA)の濃度を抑制し、AA アミロイド発症を予防するか否か、マウスモデルを用い検討した。

B. 研究方法

雌 8 週齢の CBA/Jn マウスを各実験群 10 匹づつ用いた。固形餌に、フェノフィブレートを 0.05%、0.1%、0.2% (w/w) になるよう混合し、アミロイド惹起 1 週前より、実験

を通して与えた。アミロイドはアミロイド沈着のあるマウス脾臓の抽出物である amyloid enhancing factor (AEF) の腹腔内投与と Freund complete adjuvant 投与により惹起した。4、7、14 日目に血清を採血し、SAA 濃度を ELISA により定量した。14 日目に脾のアミロイド沈着程度を grading (0-4) した。

C. 研究結果

フィブレート非投与群の結果を 100%とすると、アミロイド沈着量は 0.05%投与群で 69%、0.1%群で 49%、0.2%群で 16%であった (表 1)。7 日目の SAA 濃度は 0.05%群で 65%、0.1%群で 45%、0.2%群で 21%であった (図 1)。すなわち薬剤濃度依存性にアミロイド沈着、SAA 濃度上昇が抑制された。

D. 考察

AA アミロイドーシスの発症機序には不明の点が多いが、線維前駆物質である SAA の

高発現持続が主で、炎症に伴う様々な細胞、組織反応が関与していると思われる。本検討で見られたフィブレートの効果は、PPAR活性化によりこの炎症の経路に抑制的に働き、SAAの濃度上昇を抑えたと考えられる。SAA発現抑制以外に、アミロイド沈着のどの要素に関与したかは今後検討を要する。本剤は副作用も少なく、これまでの抗炎症療法とは異なったタイプの治療薬として、ヒトAAアミロイドーシスにおける応用を今後検討していきたい。

E. 結論

マウスモデルにおいて、フィブレート誘導体はSAA濃度上昇を抑制し、AAアミロイドーシス発症を予防した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Yamada T, Miyake N, Itoh K, Igari J. Further characterization of serum amyloid A4 as a minor acute phase reactant and a possible nutritional indicator. *Clin Chem*

Lab Med 39 : 7-10, 2001

2. 学会発表

- 1) Yamada T, Murai T, Miida T, Hanyu T. Reactive AA-amyloidosis in mice is inhibited by a PPAR ligand fenofibrate. IXth International Symposium on Amyloidosis. Budapest, Hungary, July 17, 2001
- 2) 山田俊幸：単球の血清アミロイド A (SAA)産生様式は肝細胞と異なる。第51回日本電気泳動学会春季大会。東京。2001年6月9日
- 3) 山田俊幸。単球SAA産生様式。第45回日本リウマチ学会総会。東京。2001年5月15日
- 4) 村井丈寛、山田俊幸、羽生忠正、三井田孝、荒井勝光。フィブレートによる2次性アミロイドーシスの抑制。第45回日本リウマチ学会総会。東京。2001年5月15日
- 5) 山田俊幸、猪狩淳：SAA1遺伝子型を考慮したリウマチ患者におけるSAA/CRP比の検討。第48回日本臨床検査医学会総会。横浜。2001年8月26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

表1 脾アミロイド沈着へのフェノフィブレードの効果

フェノフィブレード量 (例数)	脾アミロイド グレード					平均±SE
	0	1	2	3	4	
無 (n=10)				8	2	3.2±0.2
0.05% (n=9)		1	5	3		2.2±0.2-
0.1% (n=10)		2	4	2	2	1.4±0.3*-
0.2% (n=10)	5	5				0.5±0.2**

* $p < 0.005$, ** $p < 0.0001$ vs 無治療群

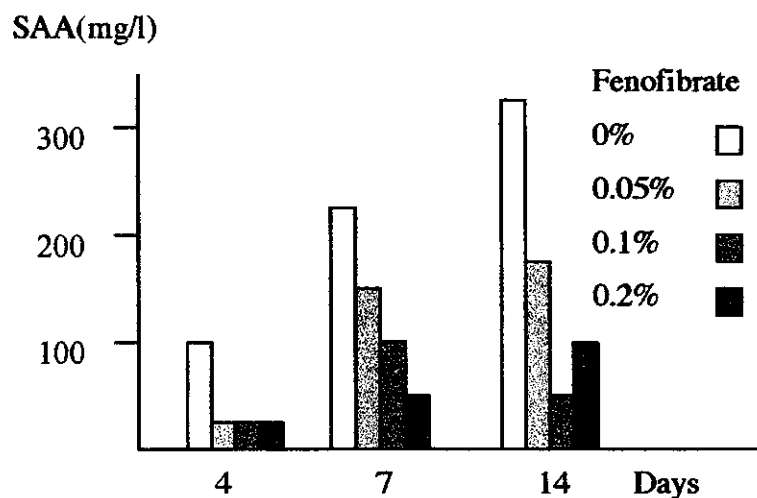


図1. アミロイドーシス惹起マウスにおけるフェノフィブレードの血清 SAA 濃度への影響 (図は各群 10 例の平均)

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 大阪大学健康体育部健康医学第一部門
 大阪大学医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学
 共同研究者 萩原圭祐*、中原英子*、杉本正道、菅又泰博、西本憲弘
 大阪大学健康体育部健康医学第一部門
 *大阪大学医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学

研究要旨 我々は慢性関節リウマチ、キャッスルマン病に対しヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体 (MRA)療法を行い、血中SAAレベルの正常化とAAアミロイドの沈着減少を示唆する臨床所見を得ている。AAアミロイドーシスにはSAA1が主に関与するといわれているが、そのシグナル伝達機構は未だ明らかでない。昨年我々は、HepG2細胞においてリアルタイム定量的PCRにより、SAA各アイソフォーム mRNAの発現誘導が解析可能であることを示し、IL-6+IL-1 β による相乗効果がMRAによりほぼ完全に抑制されることを報告した。今回我々は、より発現の安定したインターナルコントロールを検討し、SAA発現誘導を再検討した。さらにSAA発現誘導での相乗効果においてIL-6が中心となるサイトカインであるかどうかを、MRA、IL-1レセプターアンタゴニスト (IL-1ra)、抗TNF α 抗体を用いた誘導阻害により比較検討した。GAPDH、 β -actin、 β 2mの発現のばらつきを比較検討したところ、 β 2mのばらつきが最も小さく、有意差を認めたことから、 β 2mを用いて補正を行い、SAA発現誘導を再検討した。その結果、SAA1,2の発現はIL-6刺激後6時間、IL-1 β 刺激後6~12時間で最大値に達した。TNF α では有意な増加を示さなかった。SAA4の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。用量依存性の検討ではSAA1,2の発現においてIL-6 100 ng/ml、IL-1 β 1.0 ng/mlで最大の増加を示した。IL-1 β 、TNF α 刺激によりSAA1,2の発現に違いを認めたことから、それぞれの刺激によるNF κ Bの活性化を検討した。Western blottingでIL-1 β 、TNF α 刺激ともにI κ B α の分解が確認され、NF κ Bが同様に活性化されていることが示唆された。相乗効果の検討では、SAA1の発現においてIL-6+IL-1 β 、IL-6+TNF α の組み合わせで相乗効果を認めた。しかし、IL-1 β +TNF α では明らかな相乗効果を認めなかった。それを裏付けるようにIL-6,IL-1 β 、TNF α 全てを加えた刺激の場合、MRAはその相乗効果を完全に抑制できたが、IL-1raでは不完全にしか抑制せず、抗TNF α 抗体では抑制できなかった。従ってSAA1発現誘導での相乗効果において、IL-6は中心的な働きをするピボータルサイトカインであることが示され、MRAを用いたIL-6阻害治療はAAアミロイドーシスに対して最も合目的であり、有効であると考えられた。

A. 研究目的

我々は慢性関節リウマチ、キャッスルマン病患者に対してヒト型抗IL-6レセプター抗体(MRA)療法を行い、血中SAAレベルの正常化とAAアミロイドの沈着減少を示唆する臨床所見を得ている。AAアミロイドーシスの発症にはSAA1が主に関与するといわれているが、そのシグナル伝達機構は未だ明らかでない。昨年我々はHepG2細胞においてリアルタイム定量的PCRにより、SAA各アイソフォームmRNAの発現誘導の定量的解析が可能であることを示し、IL-6+IL-1 β による相乗効果がヒト型抗IL-6受容体抗体によりほぼ完全に抑制されることを報告した。今回我々は、より発現の安定したインターナルコントロールの検討を行い、SAAの各アイソフォーム発現誘導を再検討した。さらにSAA発現誘導の相乗効果においてIL-6が中心となるサイトカインであるかどうかを、MRA、IL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)、抗TNF α 抗体を用いた誘導阻害により比較検討した。また、IL-1 β 、TNF α 刺激によりSAA1,2の発現の違いを認めたことから、それぞれの刺激によるNF κ Bの活性化を検討した。

B. 研究方法

1. 培養細胞・条件: Hep G2細胞を、10% heat inactivated FCS, 50units/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin, 2 Mm L-glutamin 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用い、6 well plate に 5×10^5 /5 ml/well でまき、72時間培養後サブコンフルエントの状態ですイトカイン刺激を行った。

2. mRNAの回収および逆転写反応: RNA抽出機Mag Extractor-RNA- (TOYOBO, OSAKA) を用いてRNAを抽出した。total RNA 2 μ g を使って逆転写反応を行いcDNAを得た。逆転写酵素にはMMLV、プライマーにはoligo DTを用いた。

3. リアルタイム定量的 PCR: Gene Amp 5700 Sequence Detection System を用い、蛍光

色素には SYBR Green Dye を使ってリアルタイム定量的 PCR を行った。測定に用いた SAA1,2,4 の特異的プライマー、反応条件は平成 12 年度の報告書に示したとおりである。それぞれの PCR 産物をプラスミドに組み込みこんだものをスタンダードとし、その希釈系列を使って、スタンダードカーブを作製した。

4. インターナルコントロールの検討: Gene Amp 5700 Sequence Detection Systemを用い GAPDH, β -actin, β 2m Pre-Developed Assay Kit (Applied Biosystems) を使って、total RNA 2 μ g を逆転写反応して得られたcDNAのばらつきを比較検討した。95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分間、40 サイクルのPCR条件で反応を行い、無刺激コントロールを1とした希釈系列を用いスタンダードカーブを作製し、サンプルのばらつきを検討した。

5. IL-1 β ・TNF α 刺激でのI κ B α の時間経過の検討: 同様の培養条件のHep G2細胞をIL-1 β 0.1 ng/ml、TNF α 10 ng/mlで刺激し、sample bufferを用いて溶解した。蛋白定量にて等量のサンプルをアプライし10%ゲルにてSDS-PAGEを行い、rabbit 抗 I κ B α polyclonal 抗体 (Promega) を用い Western blottingを行った。

C. 研究結果

1. インターナルコントロールの検討: 無刺激コントロールを1とし、同一サンプル(n=12)のばらつきを比較したところ、GAPDH 1.60 \pm 0.82、 β -actin 1.50 \pm 0.45、 β 2m 1.21 \pm 0.39 と明らかに β 2mのばらつきが小さく、P<0.05の有意差を認めた。以上の結果からSAA発現誘導の評価は、無刺激コントロールを基準に相対比較を行った後に、 β 2m発現量で補正を行うこととなった。

2. 発現誘導の経時的変化、用量依存性の再検討: SAA1, 2の発現の経時的変化はIL-6刺激後6時間、IL-1 β 刺激後6~12時間で最大値に達した。TNF α では有意な増加を示さな

かった。SAA4 の発現はいずれのサイトカイン刺激でもほぼ一定であった (図 1, 2)。この結果から、以下の実験では、サイトカイン刺激後 6 時間で RNA を採取した。容量依存性の検討では SAA1,2 の発現において IL-6 100 ng/ml、IL-1 β 1.0 ng/ml で最大の増加を示した。(図 3,4)。

3. IL-1 β ・TNF α 刺激での I κ B α の時間経過の検討: IL-1 β , TNF α 刺激により、I κ B α はリン酸化・ユビキチン化を受けた後に分解され、NF κ B が核内移行することが知られている。IL-1 β , TNF α 刺激ともに、I κ B α は 15 分、30 分で分解され 60 分で再び出現するというパターンを示し、NF κ B のシグナルが同様に活性化されていることが示唆された (図 5)。

4. 相乗効果ならびに抑制効果の検討: IL-6 10 ng/ml、IL-1 β 0.1 ng/ml、TNF α 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 の発現において IL-6+IL-1 β 、IL-6+TNF α の組み合わせで相乗効果を認めた。しかし、IL-1 β +TNF α では明らかな相乗効果を認めなかった(図 6)。MRA、IL-1ra、抗 TNF α 抗体を用い SAA1 産生の抑制効果を検討したところ、上記の結果を裏付けるように IL-6、IL-1 β 、TNF α 全てを加えた刺激の場合、MRA はその相乗効果を完全に抑制できたが、IL-1ra では約 50%程度しか抑制せず、抗 TNF α 抗体では抑制できなかった(図 7)。

D. 考察

今回十分な検討により安定したアッセイ系を確立できたことから、IL-6+TNF α による相乗効果を認めることができた。従来の SAA2 における解析では IL-6+IL-1 β による相乗効果は、NF IL-6 と NF κ B の働きによると報告されている。IL-1 β 、TNF α ともに NF κ B を、ほぼ同様に活性化したことより、矛盾のない結果であると思われる。さらに、MRA、IL-1ra、抗 TNF α 抗体による抑制効果の検討から SAA1 発現誘導の相乗効果において、IL-6 は中心的な働きをするピボータルサイ

トカインであることが示された。IL-1 β や TNF α が高いレベルで存在していても、IL-6 を阻害するだけで、その相乗効果が失われ、血中 SAA レベルが正常化されると考えられる。これは我々の臨床での経験を裏付けるものであり、慢性関節リウマチの治療において、抗 TNF α 抗体療法、IL-1ra 療法などで CRP、SAA の完全な陰性化がみられないことと一致した結果である。前駆蛋白である SAA の産生を抑えるには IL-6 阻害治療が最も合目的であり、有効であると考えられる。

E. 結論

MRA を用いた IL-6 阻害治療は AA アミロイドーシスに対して最も合目的であり、有効であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mihara M, Kotoh M, Nishimoto N, Oda Y, Kumagai E, Takagi N, Tsunemi K, Ohsugi Y, Kishimoto T, Yoshizaki K, Takeda Y: Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in monkeys. *Clin.Immunol.* 98:319-326, 2001.
- 2) 杉本正道, 西本憲弘, 吉崎和幸: IL-6 を標的とした分子治療. *Molecular Medicine* 38:410-417, 2001.
- 3) 萩原圭祐, 西本憲弘, 吉崎和幸: IL-6 シグナルを阻害するヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体 MRA. *Molecular Medicine* 38:692-697, 2001.
- 4) 菅又泰博, 西本憲弘, 伊藤裕章, 吉崎和幸: サイトカイン療法. 先端医療シリーズ II 「消化器疾患の最新医療」(幕内雅敏, 川野淳, 千葉勉, 中村仁信, 森正樹編) 東京: 先端医療技術研究所; p. 20-26,

2001.

2.学会発表

- 1) Yoshizaki K, Nishimoto N: A new therapy for rheumatic arthritis with a humanized anti IL-6 receptor antibody. MRA. 10th International Rheumatology Symposium. Tokyo, Japan. May 14-16, 2001.
- 2) Hagihara K, Nakahara H, Sugimoto M, Sugamata Y, Nishimoto N, Yoshizaki K: Cytokine regulation of SAA isoform expression and inhibition by humanized anti-IL-6 receptor antibody. IXth International Symposium on Amiloidosis. Budapest, Hungary. July 15-21, 2001.
- 3) Nishimoto N, Maeda K, Deguchi H, Imai N, Kuritani T, Kakehi T, Sato B, Suemura M, Kishimoto T, Yoshizaki K: Safety and efficacy of repetitive treatment with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (MRA) in reumatoid arthritis (RA). 65th National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. San Francisco, USA. November 11-15, 2001.
- 4) Iwamoto M, Nara H, Hirata D, Okazaki H, Kano S, Minota S, Nishimoto N, Yoshizaki K: Dramatic improvement of intractable adult-onset Still's disease by intravenous humanized anti-interleukin 6 receptor antibody (MRA). 65th National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. San Francisco, USA. Novemver 11-15, 2001.
- 5) Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mori M: Therapeutic efficacy of humanized anti-IL-6-receptor antibody in systemic juvenile idiopathic arthritis. 65th National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. San Francisco, USA. November 11-15, 2001.
- 6) 吉崎和幸: 抗 IL-6 レセプター抗体による RA の治療. 第 45 回日本リウマチ学会. 東京 5 月 14-16 日, 2001.
- 7) 吉崎和幸: IL-6 阻害療法における抗体阻害薬から低分子阻害薬への展開. 第 17 回日本 DDS 学会. 大阪. 7 月 12 日, 2001.
- 8) 西本憲弘: RA の抗サイトカイン療法 (IL-6 抗体など). 第 11 回日本リウマチ学会近畿支部学術集会. 大阪. 9 月 1 日, 2001.
- 9) 西本憲弘: キャッスルマン病の病態と治療. 第 6 回近畿リンパ腫研究会. 京都. 9 月 7 日, 2001.
- 10) 吉崎和幸, 西本憲弘: 慢性関節リウマチに対する IL-6 阻害治療. 第 16 回日本臨床リウマチ学会. 名古屋. 11 月 26-27 日, 2001.
- 11) 吉崎和幸: IL-6 と免疫疾患. 第 29 回日本臨床免疫学会. 大阪. 12 月 10 日, 2001.
- 12) 吉崎和幸, 三原昌彦, 椎名雅史, 赤松健一, 萩原圭祐, 西本憲弘: 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. 厚生労働省・アミロイドーシスに関する研究班班会議. 東京. 12 月 13-14 日, 2001.
- 13) 吉崎和幸, 萩原圭祐, 中原英子, 杉本正道, 菅又泰博, 西本憲弘: 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. 厚生労働省・アミロイドーシスに関する研究班班会議. 東京. 12 月 13-14 日, 2001.
- 14) 西本憲弘: 抗 IL-6 レセプター抗体による血液・免疫病の治療. 第 39 回日本臨床分子医学会. 大阪. 3 月 1-2 日, 2002.
- 15) 吉崎和幸: 臨床免疫研究とは—IL-6 をモデルとして—. 第 5 回京都免疫ワークショップ. 京都. 3 月 2 日, 2002.
- 16) 吉崎和幸: キャッスルマン病における IL-6 の意義と IL-6 阻害療法. 第 20 回埼玉臨床血液カンファレンス. 埼玉. 3 月 9 日, 2002.

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

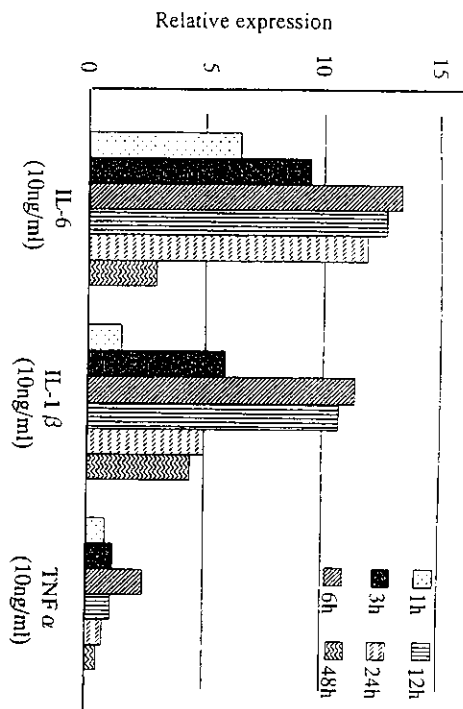


図1 IL-6, IL-1, TNFαによるSAA1発現誘導の経時的変化

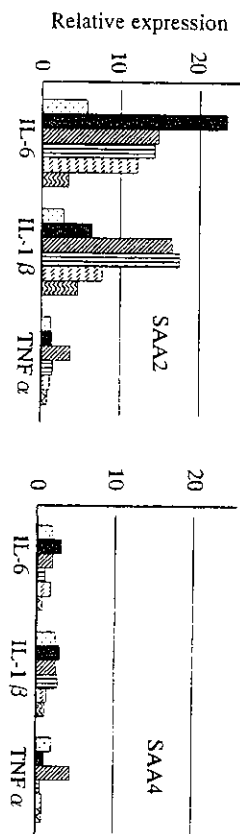
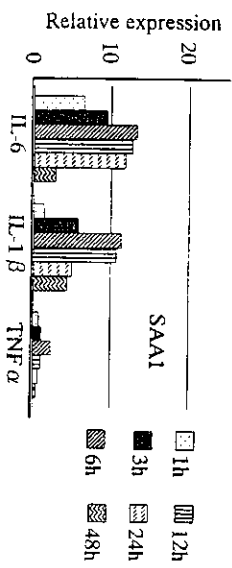


図2 SAAアイソフォーム発現誘導の経時的変化

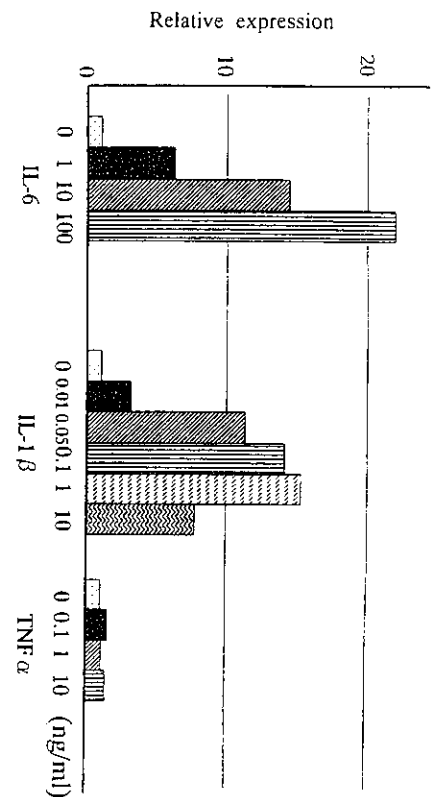


図3 IL-6, IL-1, TNFαによるSAA1発現誘導の用量依存性

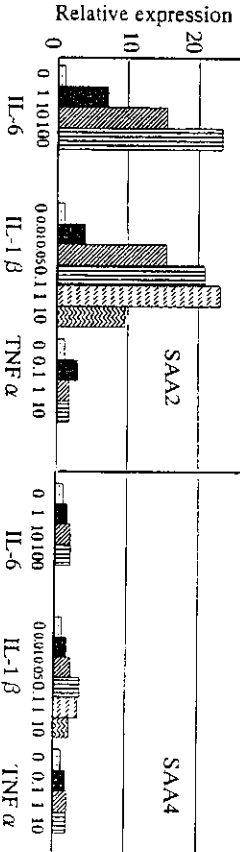
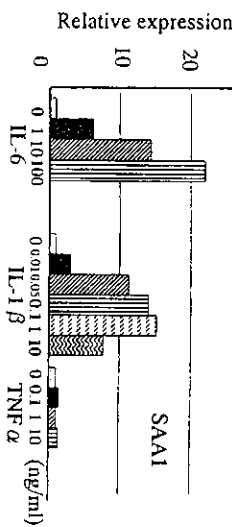


図4 IL-6, IL-1, TNFαによるSAAアイソフォーム発現誘導の用量依存性

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

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

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
 大阪大学医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学

共同研究者 三原昌彦***, 椎名雅史***, 赤松健一***, 萩原圭祐**,
 西本憲弘***

*大阪大学健康体育部健康医学第一部門,

**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,

***中外製薬株式会社

研究要旨 IL-6 阻害による AA アミロイドーシス治療の開発を目的とした。まず急性アミロイドーシスモデルマウスにラット抗 IL-6 レセプター抗体 (MR16-1) を投与したところ、アミロイド沈着を予防することを見出した。次に、IL-6 遺伝子導入マウスに AEF を投与することによって安定して慢性アミロイドーシスモデルマウスが作成された。本マウスを用い MR16-1 を投与することによってアミロイド沈着の遅延、減少が見られた。最後に AA アミロイドーシス患者にヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体を投与したところ、SAA の速やかな正常化とともにアミロイド沈着の減少および下痢等の症状の改善が見られた。以上の結果、抗 IL-6 レセプター抗体は AA アミロイドーシス治療薬となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

石原らにより開発されたカゼイン、アジュバント誘導急性炎症性 AA アミロイドーシスモデルマウスはヒト AA アミロイドーシスの病態解析に有用である。しかし、ヒト AA アミロイドーシスは慢性炎症に合併する場合が多く、慢性炎症に伴うアミロイド沈着モデル動物の作成が望まれていた。また、前述のモデルの唯一の欠点は、同じ操作をしたとしても施設毎に発症にばらつきが生じ、モデルマウス作成において安定性に問題があった。

ところで、*in vitro* の肝種由来細胞を用いた系において、IL-6 を中心とする炎症性サイトカインによる SAA-1, SAA-2mRNA の発現

誘導、およびヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体によるほぼ完全な SAAmRNA 発現抑制を認めた。また、我々は慢性関節リウマチ (RA) およびキャッスルマン病のヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体を用いた IL-6 阻害治療にて、ほぼ全例に SAA の速やかな正常化と AA アミロイドーシス改善を示唆する所見を得た。

以上のため、今回は主として IL-6 トランスジェニック (IL-6Tg) マウスを用いて安定した慢性炎症に伴うアミロイド沈着の改善を目的とした IL-6 阻害治療研究を行う。

B. 研究方法

1. Amyloid enhancer factor (AEF) の作成: 石原らの方法に準じ、AEF を作成した、すな

わち、7週目の C57BL/6 マウスに以前作成した AEF(0.5ml)を腹腔内に注入するとともに完全フロイントアジュバント(CFA,0.2ml)を皮下に注射した。2週間後アミロイド沈着の認められたマウスの肝臓、脾臓を 4mol/L グリセロール、0.01mol/L Tris-Hcl(pH7.6)の下破砕し、20,000g 1時間遠心し、その上清を回収し分子量 3,500 カットで透析して AEF を作成した。

2. アジュバント誘導急性 AA アミロイドーシスモデルマウスの作成及びラット抗マウス IL-6 レセプター抗体(MR16-1)による予防実験：石原らによる作成法に準じ、7週目の C57BL/6 みに腹腔内に AEF(0.5ml)を、CFA(0.2ml)を皮下に投与し2週間後及び5週後のアミロイド沈着を病理学的に検討した。また、AEF+CFA とほぼ同時に MR16-1(100mg/kg)を腹腔内投与しアミロイド沈着予防の有無を検討した (図1)。

3. IL-6 遺伝子導入(IL-6Tg)マウスを用いた慢性炎症に伴う AA アミロイドーシスモデルマウスの作成及び MR16-1 投与による治療実験：8週後の IL-6Tg マウス(C57BL/6)に AEF(0.5ml)を腹腔内投与し、3週及び6週にアミロイド沈着を病理学的に検索した。つづいて AEF 投与後アミロイド沈着を確認し、1週より MR16-1 100mg/kg を静注し、以後 5mg/kg の腹腔内 12週 2回投与し、3週及び6週におけるアミロイド沈着の改善の有無を検討した (図2)。

4. AA アミロイドーシス患者に対するヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体(MRA)によるアミロイドーシス改善の予備研究：RA(20名)及びキャッスルマン病(12名)患者に対し、MRA を 2mg/kg～8mg/kg、2週又は4週間隔投与を行った。アミロイド合併は腸管等組織バイオプシーにて病理学的に確認した。

C. 研究結果

1. アジュバント誘導急性アミロイドーシス

マウスにおける MR16-1 の予防実験：AEF + CFA と同時に MR16-1 を投与することにより表1に示すように組織へのアミロイド沈着は全匹において完全に阻害された。このことから、IL-6 機能阻害がアミロイド発症を予防することが示唆された。図3に肝・腎・脾の組織像を示すが MR16-1 投与例での沈着は確認されなかった。

2. IL-6 Tg 慢性炎症アミロイドーシスマウスにおける MR16-1 による治療実験：AEF 感作後3週および6週で病理学的に検索したところ、肝・腎・脾臓のみならず多臓器にアミロイド沈着が認められ、安定したモデルマウスを作成することができた。そこで MR16-1 をスケジュール通り投与し、血中 SAA 濃度を測定したところ、MR16-1 投与群で有意に低下を認めた (図4)。次に、3週および6週での組織へのアミロイド沈着を病理学的に検討したところ、表2および表3に示すように各臓器においていずれも沈着の遅延、減少、時には消失が見られた。特に、肝組織への沈着低下と沈着頻度の少ない組織への沈着度の低下が著しく認められた。しかし、腎臓、十二指腸、副腎、甲状腺等の沈着減少は顕著ではなかった。図5に病理像を示すが、MR16-1により肝臓、脾臓への沈着抑制が認められた。全身状態としては非投与群では3週頃より体重の減少がみられたが、MR16-1投与群では体重減少はみられなかった (図6)。また、尿蛋白も図7のように投与群で4、5週で1例みられたのみで腎傷害の改善が示唆された。

3. AA アミロイドーシスに対する MRA による予備治療研究：RA、キャッスルマン病に対する MRA 治療が現在進められている。キャッスルマン病で消化管アミロイドーシス合併患者で MRA 治療を受けたところ、SAA の正常化に続いて下痢回数の減少のみならず、従来 IVH を受けていた治療を中止することができた。治療開始後6ヶ月におけ

る大腸組織のアミロイド沈着の減少も確認された。このことから、SAA 産生抑制にて組織アミロイド沈着の減少が認められ、MRA による AA アミロイドーシスの改善が示唆された。

D. 考察

生体内における SAA の発現にはサイトカインをはじめ多数の刺激によって誘導されていると考えられる。今回、MRA を用いた RA、キャッスルマン病の予備治療研究ではほぼ全例に血中 SAA の正常化が認められたことは予想を超え、IL-6 が SAA 産生の重要な因子であることを示唆した。それを裏付けるように *in vitro* で肝腫瘍由来細胞 HepG2 を用いたサイトカインによる SAA-1,2 の mRNA 発現で IL-6 刺激が中心であり、IL-6 阻害によりほぼ完全に発現抑制が認められた。

しかしながら、SAA 発現抑制が認められたからといって AA アミロイドの組織沈着が低下または減少するかは不明である。この機序を明らかにするために慢性炎症による AA アミロイドーシスモデル動物の開発が望まれた。前述のごとく、IL-6 遺伝子導入マウスを用いて AEF を投与したところ、安定した AA アミロイドーシスモデル動物の作成に成功した。そこで、IL-6 阻害を行うためラット抗マウス IL-6 レセプター抗体を投与したところ、各種臓器の AA アミロイド沈着の遅延、減少、時に消失を観察した。以上のことから、SAA 発現を完全に抑制することによって沈着していたアミロイド線維の組織からの離脱が生じ AA アミロイドーシス治療への可能性が示唆された。しかし、アミロイド沈着離脱の機序については今後の解析によるが、石原らによるとマクロファージによるスカベンジャー活性の亢進による報告がある。あるいは内木による反応速度論的な考え方もある。いずれにしても IL-6Tg AA アミロイドーシスマウスは本問題の解析にも

有用である。

E. 結論

慢性炎症による AA アミロイドーシスモデルマウスを IL-6Tg マウスを用いて安定して作成することが可能になった。本マウスを用いて抗 IL-6 レセプター抗体投与により SAA の産生抑制と AA アミロイドーシス予防ならびに治療の可能性を示唆することができた。

F. 健康危険情報

ヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体 (MRA) の RA、キャッスルマン病に対する臨床試験は厚生労働省ガイドラインに基づいて行われている。したがって本治験参加者には MRA について安全性も含めて十分説明した上、インフォームドコンセントを得て行っている。さらに MRA との関連有無にかかわらず、治験中に発生した有害事象については担当医師を通じて患者に報知し、同時に治験継続の同意を得ている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mihara M, Kotoh M, Nishimoto N, Oda Y, Kumagai E, Takagi N, Tsunemi K, Ohsugi Y, Kishimoto T, Yoshizaki K, Takeda Y: Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in monkeys. *Clin.Immunol.* 98:319-326, 2001.
- 2) 杉本正道, 西本憲弘, 吉崎和幸: IL-6 を標的とした分子治療. *Molecular Medicine* 38:410-417, 2001.
- 3) 萩原圭祐, 西本憲弘, 吉崎和幸: IL-6 シグナルを阻害するヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体 MRA. *Molecular Medicine* 38:692-697, 2001.
- 4) 菅又泰博, 西本憲弘, 伊藤裕章, 吉崎和

幸: サイトカイン療法. 先端医療シリーズ 11「消化器疾患の最新医療」(幕内雅敏, 川野淳, 千葉勉, 中村仁信, 森正樹編) 東京: 先端医療技術研究所; p. 20-26, 2001.

2. 学会発表

- 1) Yoshizaki K, Nishimoto N: A new therapy for rheumatic arthritis with a humanized anti IL-6 receptor antibody, MRA. 10th International Rheumatology Symposium. Tokyo, Japan. May 14-16, 2001.
- 2) Hagihara K, Nakahara H, Sugimoto M, Sugamata Y, Nishimoto N, Yoshizaki K: Cytokine regulation of SAA isoform expression and inhibition by humanized anti-IL-6 receptor antibody. IXth International Symposium on Amiloidosis. Budapest, Hungary. July 15-21, 2001.
- 3) Nishimoto N, Maeda K, Deguchi H, Imai N, Kuritani T, Kakehi T, Sato B, Suemura M, Kishimoto T, Yoshizaki K: Safety and efficacy of repetitive treatment with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (MRA) in reumatoid arthritis (RA). 65th National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. San Francisco, USA. November 11-15, 2001.
- 4) Iwamoto M, Nara H, Hirata D, Okazaki H, Kano S, Minota S, Nishimoto N, Yoshizaki K: Dramatic improvement of intractable adult-onset Still's disease by intravenous humanized anti-interleukin 6 receptor antibody (MRA). 65th National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. San Francisco, USA. Novemver 11-15, 2001.
- 5) Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mori M: Therapeutic efficacy of humanized anti-IL-6-receptor antibody in systemic juvenile idiopathic arthritis. 65th National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. San Francisco, USA. November 11-15, 2001.
- 6) 吉崎和幸: 抗IL-6レセプター抗体によるRAの治療. 第45回日本リウマチ学会. 東京 5月14-16日, 2001.
- 7) 吉崎和幸: IL-6阻害療法における抗体阻害薬から低分子阻害薬への展開. 第17回日本DDS学会. 大阪. 7月12日, 2001.
- 8) 西本憲弘: RAの抗サイトカイン療法(IL-6抗体など). 第11回日本リウマチ学会近畿支部学術集会. 大阪. 9月1日, 2001.
- 9) 西本憲弘: キャスルマン病の病態と治療. 第6回近畿リンパ腫研究会. 京都. 9月7日, 2001.
- 10) 吉崎和幸, 西本憲弘: 慢性関節リウマチに対するIL-6阻害治療. 第16回日本臨床リウマチ学会. 名古屋. 11月26-27日, 2001.
- 11) 吉崎和幸: IL-6と免疫疾患. 第29回日本臨床免疫学会. 大阪. 12月10日, 2001.
- 12) 吉崎和幸, 三原昌彦, 椎名雅史, 赤松健一, 萩原圭祐, 西本憲弘: 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. 厚生労働省・アミロイドーシスに関する研究班班会議. 東京. 12月13-14日, 2001.
- 13) 吉崎和幸, 萩原圭祐, 中原英子, 杉本正道, 菅又泰博, 西本憲弘: 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. 厚生労働省・アミロイドーシスに関する研究班班会議. 東京. 12月13-14日, 2001.
- 14) 西本憲弘: 抗IL-6レセプター抗体による血液・免疫病の治療. 第39回日本臨床分子医学会. 大阪. 3月1-2日, 2002.
- 15) 吉崎和幸: 臨床免疫研究とは—IL-6をモ

デルとしてー. 第 5 回京都免疫ワークショップ. 京都. 3 月 2 日, 2002.

- 16) 吉崎和幸: キャッスルマン病における IL-6 の意義と IL-6 阻害療法. 第 20 回埼玉臨床血液カンファレンス. 埼玉. 3 月 9 日, 2002.

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