

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

**SAA 遺伝子多型と SAA 発現**

分担研究者 馬場 聡 浜松医科大学医学部第二病理

共同研究者 中井秀紀\*、中村 正\*\*、太田策啓\*\*\*

\*勤医協札幌病院、\*\*熊本リウマチセンター、\*\*\*浜松医科大学  
 医学部第三内科

**研究要旨** 血清アミロイドA1 (SAA1) 遺伝子のエクソン3 (SAA1-e3) 多型は AA-アミロイドーシスの発症に関連するが、それと強い連鎖不均衡にある 5'-上流領域 (5'-SAA1) 多型が SAA1 遺伝子の発現に影響するか否かについて検討した。まず、SAA1 のヘテロ接合子における肝臓での2種の SAA1 アロタイプの mRNA 発現比を RT-PCR を使って調べたが、5'-SAA1 多型による明らかな違いは見出せなかった。また、*Flp-In* システムを用いて染色体上の特定部位に1コピーの SAA1 $\gamma$ ミニ遺伝子を挿入した培養 293 細胞株で、IL-6 および IL-1 $\beta$  による SAA1 蛋白の誘導発現量をみたが、5'-SAA1 多型による有意な違いは見出せなかった。したがって、これまでのところでは、5'-SAA1 多型が SAA1 発現に直接影響することで AA-アミロイドーシスに関連しているという仮説を支持するデータを得ることはできなかった。

**A. 研究目的**

AA-アミロイドーシス合併の有無は関節リウマチ(RA) 患者の生命予後を左右する重大な因子である。我々は SAA1 遺伝子エクソン3 (SAA1-e3) の $\alpha$ - $\gamma$ 多型、およびこれと連鎖不均衡にある 5'-上流領域 (5'-SAA1) の A-G 多型が AA-アミロイドーシス発症と関連し、 $\gamma$ および G ハプロタイプがその危険因子であることを報告してきた。しかし、それがいかなる機序によるかは未だ不明である。今回の研究では、昨年とは異なる方法を用いて 5'-SAA1 多型が SAA1 発現に影響するか否かを検討した。

**B. 研究方法**

1. RT-PCR による発現解析

肝癌切除術時に得られた非癌部肝組織から total RNA を抽出し、SAA1 特異的プライマー (片方のプライマーは FITC 標識) を用いて RT-PCR を行った。増幅産物は、一度十分に熱変性を行った後にゆっくり再会合させ、制限酵素 *Ban I* 消化した。その消化物をゲル濾過 HPLC で分離、蛍光検出し、SAA1 ヘテロ接合子における2つのア

ロタイプの相対的発現量を比較した。

2. *Flp-In* システムを用いた発現解析

SAA1 $\gamma$  cDNA に 5'-SAA1 の3多型を各々有する SAA1 プロモーターおよびイントロン3配列を付加したミニ遺伝子を作成し、それを *Flp-In* システム (Invitrogen Corp, USA) の相同組換え用プラスミドベクターに挿入して発現プラスミド (pFRT-A $\gamma$ 、-B $\gamma$ 、-G $\gamma$ ) を作成した。これを FRT リコンビナーゼ発現プラスミドと共に *Flp-In* 293 細胞にコトランスフェクションし、Hygromycin B 選択により安定株 (ポリクローナル) を得た (図 2a)。得られた細胞株集団 (F293-A $\gamma$ 、-B $\gamma$ 、-G $\gamma$  細胞) の細胞数をそれぞれ  $5 \times 10^5$  個に調整、IL-6 (20 U/ml) と IL-1 $\beta$  (20 ng/ml) で刺激し、48 hr 後に培養上清中の SAA 蛋白濃度を ELISA 測定した。

**C. 研究結果**

1. RT-PCR による発現解析

8例の肝組織からの RT-PCR では、SAA1 mRNA に由来する特異的増幅産物 (94 bp) が得られ、その産物を熱変性後にゆっくり再会合させ

てから *Ban I* 消化し、ゲル濾過 HPLC で分析した (図 1a)。各多型の *SAA1* cDNA をクローニングしたプラスミドを種々の比で混合して PCR を行い、同様に *Ban I* 消化、HPLC 分析したものを標準とした (図 1b)。8 例のうち 5 例がヘテロ接合子であったが、各多型の組み合わせにおいて、2 つのピークの面積比から推定される各アロタイプの相対的発現量に明らかな違いはみられなかった (表 1)。

#### 2. *Flp-In* システムを用いた発現解析

*Flp-In* システムを用いて (図 2a) 得られた各細胞株集団は、X-gal 染色陰性かつ Zeosin 感受性であり、相同組換えによって *SAA1* γ ミニ遺伝子が染色体上の特定部位に 1 コピーだけ挿入された 293 細胞株集団と考えられた。各々  $5 \times 10^5$  個の細胞を、IL-6 (20 U/ml) と IL-1β (20 ng/ml) で刺激した 48 hr 後の培養上清中 SAA 蛋白濃度は、挿入遺伝子によって僅かに違い (F293-Aγ < F293-Bγ < F293-Gγ) がみられたが有意な差ではなかった (図 2b)。尚、理由は不明であるが、*Flp-In* 293 細胞の内因性の SAA 発現はほとんど認められなかった。

#### D. 考察

今回我々は、5'-*SAA1* 多型が *SAA1* 発現に影響するか否かをみる目的で 2 つの実験を行った。まず、肝臓における *SAA1* mRNA 発現に 5'-*SAA1* 多型による明らかな違いはなかった。また、相同組換えにより *SAA1* γ 遺伝子を 1 コピー挿入した 293 細胞株集団での *SAA1* 蛋白の発現にも 5'-*SAA1* 多型による有意な差はなかった。昨年は、ヘテロ接合子における血中 *SAA1* アロタイプの相対量比、およびルシフェラーゼ・アッセイによる各 5'-*SAA1* 多型の転写活性に明らかな違いがなかったことを報告した。したがって、これまでのところでは、5'-*SAA1* 多型が *SAA1* 発現へ与える影響は実験誤差によるバラツキよりも小さく、その正確な評価にはより精密な実験が必要と考えられる。また、現時点で 5'-*SAA1* 多型の直接関与を否定するのはまだ危険と思われるが、アミノ酸置換を伴う *SAA1-e3* 多型の方が AA-アミロイドーシス発症に直接関与している可能性を

考えて今後の研究を進めていく必要があると思われる。

#### E. 結論

1. *SAA1* ヘテロ接合子の肝臓で、2 種の *SAA1* アロタイプの mRNA 発現量には、5'-*SAA1* 多型による明らかな違いは見出せなかった。
2. *Flp-In* システムを用いてゲノム上の特定部位に 1 コピーの *SAA1* γ ミニ遺伝子を挿入した 293 細胞株で、*SAA1* 蛋白発現には、5'-*SAA1* 多型による明らかな違いは見出せなかった。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
投稿中および投稿準備中。
2. 学会発表
  - 1) 馬場 聡、中井秀紀、中村 正、太田策啓: AA-アミロイドーシスと遺伝子多型. 第 91 回 日本病理学会総会ワークショップ: 遺伝子多型と疾患、横浜、3月 27 日、2002.
  - 2) 中井秀紀、田村裕昭、松井和生、後藤 眞、志水正敏、馬場 聡: 血清アミロイド A 蛋白 (SAA) への *SAA1* genotype および RA 治療薬剤の影響. 第 46 回 日本リウマチ学会総会ワークショップ: 二次性アミロイドーシス、神戸、4月 23 日、2002.
  - 3) 中村 正、山村雄治、友田邦彦、東野通志、馬場 聡、庄野昌博: 慢性関節リウマチ (RA) に合併するアミロイドーシスの治療に関する臨床的検討. 第 46 回 日本リウマチ学会総会、神戸、4月 24 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。

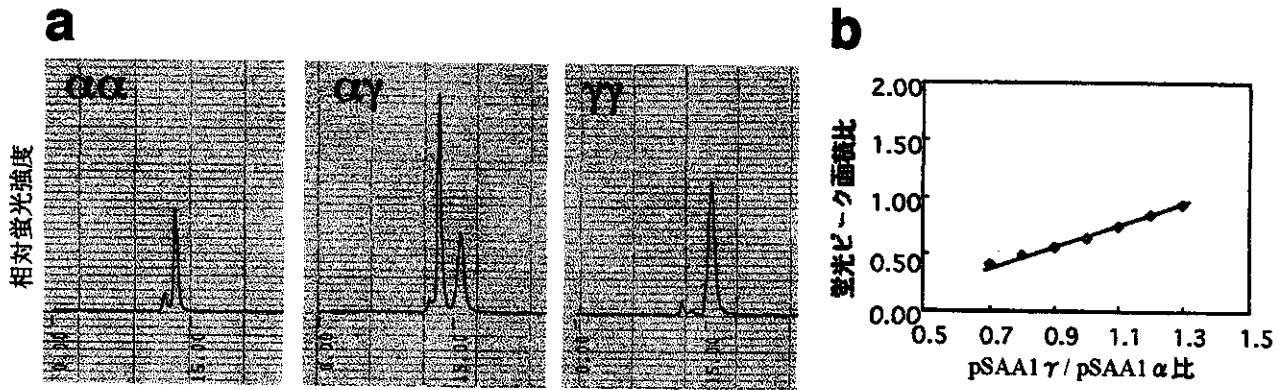


図1 SAA1 特異的 RT-PCR の増幅産物の *Ban*I 消化物をゲル濾過 HPLC で解析. SAA1-ex3 各遺伝子型の解析例 (a) および標準線 (b)

表1 肝組織における SAA1 アロタイプ 発現の相対比

Sample	5'-SAA1 遺伝子型	SAA1-ex.3 遺伝子型	ピーク面積比 (β/α or γ/α)	存在比 (β/α or γ/α)
#1	AA	αα	—	—
#2	BB	ββ	—	—
#3	AG	αγ	0.59	0.93
#4	AG	αβ	0.71	1.06
#5	AG	αγ	0.63	0.98
#6	AA	αα	—	—
#7	AB	αβ	0.57	0.92
#8	AG	αγ	0.72	1.08

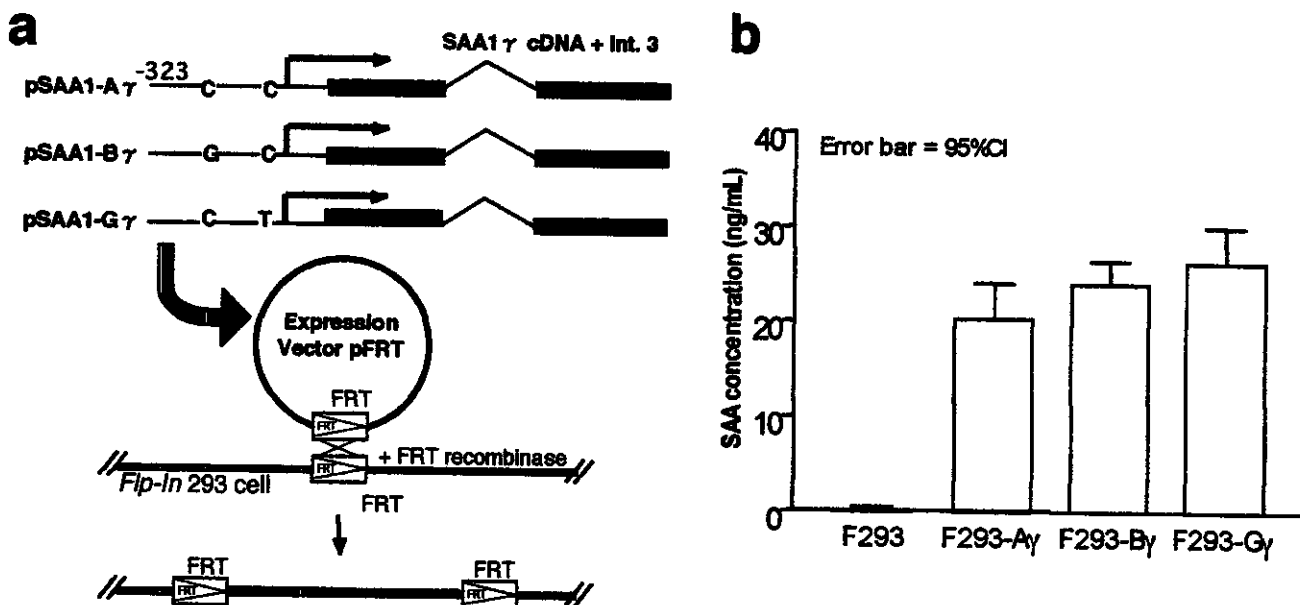


図2 各5'-SAA1 多型 をもつSAA1 γ ミニ遺伝子を相同組換えにより *Flp-In* 293 細胞の染色体上の特定部位に挿入 (a). それぞれ細胞数  $5 \times 10^5$  に調整し、IL-6 と IL-1β で刺激 48 hr 後、培養上清中の SAA 蛋白濃度を ELISA 測定した (b).

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

## 反応性全身性 AA アミロイドーシスの早期診断における 腹壁脂肪吸引生検と SAA genotyping の有用性についての検討

分担研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科

共同研究者 石井 亘\*、松田正之\*、中村昭則\*、中村 直\*\*、鈴木明夫\*\*\*

信州大学医学部、\*第三内科、\*\*同第二内科、\*\*\*丸の内病院リウマチ科

**研究要旨** 5年以上の罹患歴がある関節リウマチ (RA) 患者 217 名について、腹壁脂肪吸引生検を行うとともに、血清アミロイド A 蛋白 (SAA) の遺伝子多型を調べ、AA アミロイドーシスの早期診断における両検査の有用性について検討した。腹壁脂肪吸引生検では、217 例中 17 例 (7.8%) にアミロイド沈着が見られ、その内 9 例についてはアミロイドーシスに起因すると考えられる症状はなかった。SAA の遺伝子多型では SAA1.3 がアミロイドーシス発症と有意に相関を認め、SAA1.3 アリル数の検討では、ホモ接合体で他の二群と比べ、SAA と SAA/CRP が有意に上昇していた。アミロイドーシス合併症例 17 例中 2 例では初回は陰性で、約 1 年間の間隔を開けて施行した 2 度目の生検で初めてアミロイド沈着が確認され、その SAA1 遺伝子多型は 1.3/1.5 と 1.3/1.3 であった。SAA 遺伝子多型の検索と経時的な腹壁脂肪吸引生検は AA アミロイドーシスの早期診断に有用で、特に SAA1.3 を有する RA 長期罹患患者では、重点的かつ注意深い経過観察が必要であると考えられた。

### A. 研究目的

反応性全身性 AA アミロイドーシスは、長期にわたる炎症性疾患、特に RA に続発して発症する予後不良な病態である。進行すると多臓器障害をきたすため、治療にあたっては早期診断が重要である。我々は RA 患者に腹壁脂肪吸引生検を行うとともに、SAA の遺伝子多型を調べ、AA アミロイドーシスの早期診断における両検査の有用性について検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

5年以上の罹患歴がある RA 患者 217 名を対象とした。平均年齢は 64.1±10.6 歳、平均罹病期間は 16.4±9.9 年であった。RA の診断は 1988 年の ARA の分類基準に基づいて行った。

#### 2. 方法

腹壁脂肪吸引生検を約 1 年の間隔で定期的に行いフェノールコンゴレッド染色にてアミロイド沈着の有無を検討するとともに、その前 1 ヶ月以内に血沈、CRP、SAA を測定した。また 127 名の患者

については、山田らの方法を用いて SAA1 と SAA2 の遺伝子多型を検討した。

### C. 研究結果

腹壁脂肪吸引生検では、217 例中 17 例 (7.8%) にアミロイド沈着が見られ、全例が他臓器からの生検組織で免疫染色により AA 型であることが確認された。その内 9 例についてはアミロイドーシスに起因すると考えられる症状はなかった。アミロイドーシス合併症例では CRP ( $p < 0.05$ ) と SAA ( $p < 0.0001$ ) が非合併症例と比較して有意に高値を示した。

SAA の遺伝子多型についての検討では、SAA1.3 が 1.1、1.5 の両者に対してアミロイドーシス発症と有意に相関を認めたが ( $p < 0.005$  vs. 1.1、 $p < 0.05$  vs. 1.5)、SAA2 については有意差を認めなかった (表 1)。SAA1.3 アリルの数と SAA、CRP との相関についての検討では、SAA1.3 アリルのホモ接合体で他の二群と比べ、SAA と SAA/CRP が有意に上昇していた ( $p < 0.05$ ) (表 2)。アミロイドーシス合併症例 17 例中 2 例では約 1 年間の間隔を開けて施行した 2

度目の生検で初めてアミロイド沈着が確認され、そのSAA1遺伝子多型は1.3/1.5と1.3/1.3であった。

#### D. 考察

今回の検討では過去の報告と同様に SAA1.3 が AA アミロイドーシス発症の危険因子であると考えられた。SAA の遺伝子多型が AA アミロイドーシスの発症に関与する機序としては、SAA の産生量とその構造変化の両面から検討がなされている。今までの報告では SAA 産生量とその遺伝子多型との間に有意な相関は認めなかったとするものが多いが、今回の我々の検討では SAA1.3 のホモ接合体で、SAA と SAA/CRP が有意に上昇しており、SAA1.3 アリルの存在により SAA の産生が亢進している可能性が示唆された。今後、さらに症例数を増やして検討していく必要があると思われる。

一方、今回の検討では RA 患者の約 8% に腹壁脂肪吸引生検でアミロイドの沈着を認めたが、そのうちの約半数ではアミロイドーシスに起因すると考えられる症状を認めなかった。本法は消化管内視鏡検査に比べて簡便かつ安全な手技であり、経時的に繰り返し検査を行なうことでアミロイドーシスの合併を早期に見つけだすことができる可能性がある。特に SAA の遺伝子多型として 1.3 を有する者では本法を用いた重点的かつ注意深い経過観察が必要であると考えられた。

#### E. 結論

SAA 遺伝子多型の検索と経時的な腹壁脂肪吸引生検は、RA 患者における AA アミロイドーシ

スの早期診断に有用で、今後臨床の場で積極的に用いられるべきである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Matsuda M, Morita H, Ikeda S. Long-term follow-up of systemic reactive AA amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. Successful treatment with intermediate-dose corticosteroid. Intern Med 41: 403-407, 2002

2) Ishii W, Matsuda M, Nakamura N, Katsumata S, Toriumi H, Suzuki A, Ikeda S. Phenol Congo red staining enhances diagnostic value of abdominal fat aspiration biopsy in reactive AA amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. Intern Med (in press)

##### 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

表1a. SAA allelesとAmyloidosis

SAA allele	Amyloidosis		Chi-square
	Absent	Present	
1.1	98	9	10.83*
1.3	61	19	
1.5	61	6	
2.1	167	24	0.45
2.2	53	10	

\*p&lt;0.005

表1b. SAA1 allelesごとのAmyloidosis発症率の $\chi^2$ 検定による比較

SAA allele	1.1	1.3	1.5
1.1	—		
1.3	8.46*	—	
1.5	0.015	5.65**	—

\*p&lt;0.005, \*\*p&lt;0.05

表2. SAA1.3 alleleとSAA, CRPとの相関

	Number of SAA1.3 allele		
	0	1	2
SAA ( $\mu$ g/ml)	109.0 $\pm$ 150.2	98.1 $\pm$ 164.2	336.1 $\pm$ 377.3*,**
CRP (mg/dl)	3.65 $\pm$ 3.81	3.97 $\pm$ 4.67	3.75 $\pm$ 4.22
SAA/CRP	65.5 $\pm$ 117.6	109.4 $\pm$ 296.3	88.4 $\pm$ 84.5*,**

\*p&lt;0.05 vs. group without SAA1.3

\*\*p&lt;0.05 vs. group with one allele of SAA1.3

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

<分科会報告>  
**AA アミロイドーシスに対する治療指針の確立**

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

共同研究者 池田修一<sup>1)</sup>、今井浩三<sup>2\*)</sup>、下条文武<sup>3)</sup>、原 茂子<sup>4)</sup>、高杉 潔<sup>5)</sup>、  
 馬場 聡<sup>6)</sup>、山田俊幸<sup>7)</sup>、石原得博<sup>8)</sup>

信州大学医学部第三内科<sup>1)</sup>、札幌医科大学医学部第一内科<sup>2)</sup>、  
 新潟大学大学院医歯学総合研究科内科環境医学講座<sup>3)</sup>、虎の門病院腎センター  
 内科<sup>4)</sup>、道後温泉病院リウマチ科<sup>5)</sup>、浜松医科大学医学部病理第二講座<sup>6)</sup>、  
 順天堂大学医学部臨床病理学講座<sup>7)</sup>、山口大学医学部構造制御病態学<sup>8)</sup>

**研究要旨** AA アミロイドーシスは全身性で慢性炎症性疾患に合併する場合が多く、診断後数年で死亡に到る難治性の疾患である。特記すべき治療法がなく新たな治療薬の開発が望まれている。しかし従来薬を用いた場合でも AA アミロイドーシスの進行を遅らせることが出来た症例もある。本年はこれらの有効症例を注意深く検討し、従来薬を用いた治療における治療指針を確立するとともに、今後新たに開発される治療薬を用いた治療方針確立の参考にすることを目的とした。このため1) 治療目標の設定2) 診断及び経過観察項目3) 対象患者4) 治療薬・治療法の実際5) 効果・副作用の判定6) 症例報告作成期間7) 症例検討施設等の内容を含んだプロトコールを検討作成し、それに基づいて各施設毎の症例検討を開始している。

**A. 研究目的**

AA アミロイドーシスは難治性疾患で新たな治療法が開発が望まれている。しかし Gillmoreらによる報告(The Lancet 358,2001)にもあるように、炎症反応を極力抑制することによりアミロイド沈着の増加抑制が得られ、また我々のグループの中でも従来薬を駆使して進行遅延あるいは改善を認めた症例もある。本年はこれら有効な症例を詳細に検討し、従来薬を用いた AA アミロイドーシスの治療指針を確立することを目的とする。

**B. 研究方法**

AA アミロイドーシスの治療指針の確立のためのプロトコールを以下のように作成した。

1.研究デザイン：既存症例の治療経過報告

2.研究対象患者：

・AA アミロイドーシス合併を診断された患者で、  
 診断後一年以上原疾患並びに AA アミロイドー

シスとして治療を受けた患者

・AA アミロイドーシスの診断は消化管生検によりアミロイド線維の沈着が認められた患者。更に他の内臓器における沈着が確認されている患者が望ましい。

・原疾患としては関節リウマチとするが、他の疾患症例も参考とする。

・特記すべき患者選択基準はもうけないが、治療が有効であったと思われる患者。

・対象患者数として有効者数、不応例いずれも出来るだけ多くの患者を対象とする

3.治療対象薬：すべての既存薬を対象とする。

(NSAIDs, DMARDs, MTX, Steroid, Immunosuppressant)

4.治療期間及び投薬内容 (表 1)

5.観察・検査スケジュール (表 2)

6.有効性評価

1) Primary endpoint：侵襲臓器別機能検査値の維

持又は改善

2) 2<sup>nd</sup> endpoint A) 消化管アミロイド繊維沈着

・生検像 (治療後による増加抑制又は減少) 担当  
石原。

・半定量 (治療後による増加抑制又は減少) 担当  
山田

B) SAA 値の上昇抑制または低下

7. 安全性評価

投薬による有害事象：症状

：検査異常

8. 統計解析

(参) 検査項目及び検査担当施設 (表 3)

倫理面への配慮

1) 症例記載並びに報告にあたって、患者には予めそのためのインフォームド・コンセントを得る。

2) SAA-1 genotype 検査施行に対して患者に文章で了解を得る。

C. 研究結果

現在各施設でそれぞれ症例を検討中である。

D. 考察

AA アミロイドーシスは稀少疾患でありしかも治療の成功例が少ない。それゆえに一例一例が貴重であり、これを記録し、何らかの治療指針を出すことが出来れば臨床家にとって極めて有用であると思われる。このため今まで各施設独自で対応し模索しながら治療していたが、このたび当研究班で臨床研究グループを構成し、共通のプロトコールに、基づいて治療成功例の治療記録を集約することとなった。

プロトコール (治療概要) を作成するにあたり、統一見解を得るのに参加者の多大な協力を得られたことは大きい。具体的には対象患者数として有効者数は制限せず、一例でも多く記録すること、また、無効例をコントロールすることで対比をより明確にすることが可能になると思われる。治療対象薬に DMSO を入れるかどうかでも有効例が不定であるので削除された。有効性評価として、当初は Primary endpoint を SAA の上昇抑制または低下としていたが、これは Second endpoint にまわし、侵襲臓器別臨床機能検査値の維持又は改善を

Primary endpoint にした。これは主に従来薬では SAA の減少を得るには困難で、多少でも症状の改善が得られれば有効とした方が良いという見解から決められたものである。

現在サイトカイン抑制作用を有す生物製剤の開発が進められており、TNF $\alpha$ 、IL-6 の阻害剤では SAA の低下又は正常化が示唆されている。これら新しい治療に伴い新しいプロトコールが作成されなければならないがその作成にあたって従来薬を用いた治療指針は大いに参考になると思われる。

E. 結論

既存薬を用いた AA アミロイドーシスの治療指針確立のためのプロトコールを作成し、現在各例毎に症例記載を行っているところである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mihara M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Suzuki T: Influences of anti-mouse IL-6 receptor antibody on immune responses in mice. *Immunol. Lett.* **84**:223-229, 2002.

2) Okazaki M, Yamada Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mihara M: Characterization of anti-mouse IL-6 receptor antibody. *Immunol. Lett.* **84**:231-240, 2002.

3) Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Price R, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T, Panay GS. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum.* **46**:3143-3150, 2002.

4) Iwamoto M, Nara H, Hirata D, Minota S, Nishimoto N, Yoshizaki K: Humanized monoclonal anti-interleukin 6 receptor antibody for treatment of intractable adult-onset Still's disease. *Arthritis Rheum.* **46**:3388-3389, 2002.

5) Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda, K. Kuritani T,



Deguchi H, Sato B, Imai N, Kakehi T, Takagi N, Suemura M, Kishimoto T: Toxicity, pharmacokinetics, and dose finding study of repetitive treatment with humanized anti-interleukin 6 receptor antibody, MRA, in rheumatoid arthritis -a phase I/II clinical study of MRA for rheumatoid arthritis in Japan-. *J. Rheum.* 2003 (in press).

6) Katsume A, Saito H, Yamada Y, Yorozu K, Ueda O, Akamatsu K, Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K, Ohsugi Y: Anti-Interleukin 6 (IL-6) Receptor Antibody Suppresses Castleman's Disease Like Symptoms Emerged in IL-6 Transgenic Mice. *Cytokine* 2003 (in press).

7) Gejima R, Tanaka K, Nakashima T, Hashiguchi S, Ito Y, Yoshizaki K, Sugimura K: Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling. *Human Antibody* 2003 (in press).

8) Goya S, Matsuoka H, Mori M, Morishita H, Kida H, Kobashi Y, Kato T, Taguchi Y, Osaki T, Tachibana I, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kawase I, Hayashi S: Sustained interleukin-6 signaling leads to the development of lymphoid organ-like structures in the lung. *J. Pathol.* 2003 (in press).

9) Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N: Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor (VEGF) production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 (in press).

10) Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T: IL-6 blocking therapy with humanized anti-IL-6 receptor antibody (MRA) in rheumatoid arthritis. *Rheuma21st.com* (web journal) <http://www.rheuma21st.com>. 2002.

11) Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T: Interleukin-6. In: *Smolen J, Lipsky P, eds. Targeted Therapy in Rheumatology.* London: Martin Dunitz; p.231-241,2003.

## 2. 学会発表

1) Nishimoto N, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Kakehi T, Suemura M, Kishimoto T,

Yoshizaki K: Safety and efficacy of repetitive treatment with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody in rheumatoid arthritis. 6th International Symposium on the Immunotherapy. Limassol, Cyprus. 05.15-19,2002.

2) Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T: New therapeutic strategy by the way of interleukin 6 (IL-6) blocking with humanized anti IL-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis, a hyper IL-6 syndrome. 26th International Congress of Internal Medicine. Kyoto, Japan. 05.27,2002.

3) Yoshizaki K: Role of IL-6 on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Kyoto, Japan. 10.20-25, 2002.

4) Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T: A multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of humanized anti-interleukin-6 (IL-6) receptor monoclonal antibody (MRA) in rheumatoid arthritis (RA). 66th National Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology. New Orleans, USA. 10.25-29, 2002.

5) Nishimoto N, Nakahara H, Yoshizaki K: Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy normalized serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with rheumatoid arthritis (RA). 66th National Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology. New Orleans, USA. 10.25-29, 2002.

6) Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakano N, Nakamura M, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Kishimoto T, Yoshizaki K: Improvement of wasting by treatment with a humanized anti-interleukin-6 receptor (IL-6R) monoclonal antibody, MRA in multicentric Castleman's disease, a phase II clinical trial of 28 patients. 44th Annual Meeting of the American Society of Hematologists. Philadelphia, USA. 12.06-10, 2002.

7) Yoshizaki K, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Kodama F, Kumagai S, Asaoku H,

Kishimoto T, Nishimoto N: A dose finding study of a humanized anti-interleukin-6 receptor (IL-6R) monoclonal antibody, MRA in multicentric Castleman's disease. 44th Annual Meeting of the American Society of Hematologists. Philadelphia, USA. 12.06-10, 2002.

8) 吉崎和幸,三原昌彦,椎名雅史,赤松健一,萩原圭祐,西本憲弘:IL-6 阻害による AA アミロイドーシスマウスの発症抑制ならびに病態改善.第 46 回日本リウマチ学会,神戸,4月.22-24日,2002.

9) 萩原圭祐,中原英子,西本憲弘,吉崎和幸:リアルタイム定量的 PCR を用いた SAA アイソフォーム mRNA 発現の解析とヒト型化抗 IL-6レセプター抗体による抑制効果の検討.第 46 回日本リウマチ学会,神戸,4月 22-24 日,2002.

10) 西本憲弘,中原英子,萩原圭祐,吉崎和幸:多剤抵抗性 RA、アミロイドーシス合併 RA に対するヒト型

化抗 IL-6レセプター抗体治療.第 46 回日本リウマチ学会,神戸,4月 22-24 日,2002.

11) 吉崎和幸:IL-6 阻害療法による関節リウマチの病態解析.第 30 回日本臨床免疫学会,東京,12月 03-04 日 2002.

12) 吉崎和幸:炎症性サイトカインとくに IL-6 の病態意義とその作用阻害によるインパクト.第 23 回日本臨床薬理学会,大阪,12月 10-11 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

表1.治療期間及び投薬内容

治療薬 (量)	原疾患 治療中	AAアミロイドー シス治療開始時	6ヶ月後	12ヶ月後	18ヶ月後	24ヶ月後
NSAIDs DMARDs MTX ステロイド 免疫抑制剤						

治療内容に変更がある場合はその都度記入すること（具体的に薬剤名、量を記入して下さい。）

表2.観察・検査スケジュール

観察・検査項目	原疾患 治療中	AAアミロ イドーシ ス治療開 始時	6ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月	
全般	患者背景 消化管生検 侵襲臓器生検 SAA-1 genotype 血沈 CRP SAA アルブミン 免疫グロブリン 尿検査 ACRコアセット(RAの場合) フィブリノーゲン 補体価 一般検血 総コレステロール RF 抗核抗体						
臓器別	観察・検査項目	原疾患 治療中	AAアミロ イドーシ ス治療開 始時	6ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月
腎アミロイド	尿検査 尿比重 一日総尿蛋白量 尿沈査 BUN Creatinine β2m又は α1-microglobulin Creatinine clearance						
消化管アミロイド	下痢回数 下血 麻痺性イレウス						
甲状腺	TSH FT3 FT4						
その他							

表3. 検査項目及び担当施設

サンプル	検査項目	担当施設
生検組織（病理用）	アルカリコンゴレッド染色 アミロイドA免疫染色 治療前後サンプルを同一ブロックに包 消化器組織と可能ならば侵襲臓器 (腹壁アミロイドは参考とする)	山口大学医学部構造制御病態学 石原得博
末梢単核球	SAA-1 genotype	浜松医科大学医学部病理第二講 座 馬場 聡
生検組織	SAA-1の $\beta/\gamma$ 比	
血清	血中ApoE.	順天堂大学医学部臨床病理学講 座 山田俊幸
生検組織	組織中SAA量 組織中ApoE量	

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

メラトニンによる Aβ アミロイドーシス治療

分担研究者 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  
 共同研究者 松原悦朗、瓦林 毅、阿部康二  
 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

**研究要旨** インビトロにおいてアンチアミロイドジェニックな作用と抗酸化作用を併せ持つものの、アルツハイマー病患者脳でその絶対量不足が顕著であるメラトニンに注目し、メラトニン投与治療効果の有無をアルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)において検討した。メラトニン投与により、ELISAにて定量しうる脳内アミロイド原性 Aβ プール量の著明な減少と、脳内酸化ストレスの指標である nitrotyrosine 量の有意な減少が確認された。今回使用したメラトニン量では毒性のないことが脳内 APP 発現量の検討から判明し、メラトニン投与 mice 群では有意な寿命延長効果も見出された。メラトニンはアルツハイマー病治療に有望と考えられる。

**A. 研究目的**

メラトニンの血液や髄液中濃度は加齢により著減するばかりでなく、アルツハイマー病患者においてその減少の著しいことが知られている。脳内メラトニン濃度も同様の加齢変動をきたし、加齢で指数関数的に増加する Aβ とは対照的である。さらにメラトニンは、Aβ の高次構造を修飾し、神経毒性とアミロイド形成を制御するアンチアミロイドジェニック作用とフリーラジカル消去作用、ラジカル消去酵素活性化や神経細胞保護作用といった抗酸化作用を有し、その補充がアルツハイマー病患者治療に有用であろうことが推察される。本年度はアルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)において、メラトニンによる脳 Aβ アミロイドーシス治療効果の検討を行った。

**B. 研究方法**

4 カ月令の Tg2576 mice(4-8 匹)でメラトニン 0.5mg/ml 濃度の水分投与もしくは vehicle 投与を開始した。8, 9.5, 11, 15.5 カ月令で解剖し、脳内 Aβ 蓄積量を 2%SDS で溶出される可溶性画分と 2%SDS に不溶性で 70%蟻酸により抽出されるアミロイド画分とに分取後、BNT77/BA27, BNT77/BC05 ELISAにて Aβ40, Aβ42 を分別定量した。脳内メラ

トニンと nitrotyrosine 濃度の定量は HPLC 法で行った。脳内 APP 発現はイムノブロット法(APP の C 末を認識するポリクローナル抗体,KS7)で検討した。15.5 カ月令 mice の脳内 Aβ 沈着を 4G8 による免疫組織化学的検討にて検出した後、image analyzer を用いて amyloid load の定量を行った。さらに 2mg/ml メラトニン投与群(44 匹)と非投与群(44 匹)4 カ月令 mice において、16 カ月令まで生存率を検討した。

**C. 研究結果**

メラトニン投与群において、脳内 Aβ 蓄積量は可溶性画分とアミロイド画分の両方で Aβ40 と Aβ42 の有意な低下を認めた。アミロイド画分の蟻酸抽出画分では、すでに 8 カ月令から、Aβ42 蓄積量の抑制を認めたこの ELISA における Aβ 量は、免疫組織化学的手法で検出不能な Aβ を含む、脳内アミロイド原性 Aβ プールを反映していると考えられる(図 1)。8 カ月令と 15.5 カ月令で検討した脳内メラトニン濃度は、メラトニン非治療群で加齢による減少が認められ、治療群では 4-6 倍程度増加していた。イムノブトットによる脳内 APP の発現程度はメラトニン治療群と非治療群で差は認められず、今回使用した投与量のメラトニンが毒

性をもち、脳内 APP 発現量を減らし、その結果として脳内 AB 蓄積量が減少している訳ではないことが証明された。次いで、AB-mediated oxidative injury の元凶と考えられている peroxynitrate の関与を脳内 nitrotyrosine の定量を指標として、メラトニン治療群、非治療群で経時的(8, 9.5, 11, 15.5 カ月令)に検討した。メラトニン治療群において、脳内 nitrotyrosine の有意な低下を認め、その低下は若年群において顕著で、加齢とともに減弱傾向にあった。一方、脳内 amyloid load (15.5 カ月令)は、0.5mg/ml 濃度のメラトニン投与群において、その減少傾向は認められたものの、有意差は得るには至らなかった。メラトニン投与群、非投与群における mice の 4 から 16 カ月令までの生存率はそれぞれ 92.7%, 70.4%とメラトニン投与群で有意な寿命の延長が認められた。

#### D. 考察

今回の検討から、メラトニンは免疫組織化学的に検出する老人斑アミロイド量を有意に減少させることはできなかったが、脳全体のアミロイド原性の AB プールを有意に減少させるインビボでのアンチアミロイドジェニック効果が確認された。脳内の酸化ストレスを激減させるインビボでの抗酸化効果も同様に認められた。興味深いことに、メラトニン投与群 mice では有意に生存率の改善がはかられることが明らかとなった。現在、メラトニン 2mg/ml 投与群での老人斑アミロイド減弱効果の検討と、両 dose での水迷路試験における行動異常改善効果を検討中である。メラトニンは、すでに欧米では健康サプリメントとして販売されており、目立った副作用の報告もなく、今後アルツハイマー病患者への臨床応用に有望であると考えられる。

#### E. 結論

メラトニンは、脳内アミロイド原性 AB プール抑制、脳内酸化ストレスの抑制、寿命延長効果を併せ持ち、アルツハイマー病治療薬として有望である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究結果発表

##### 1. 論文発表

1) **Shoji M**, Fukushima K, Wakayama M, Shizuka-Ikeda M, Ikeda Y, Kawakami A, Sakazume Y, Ikeda M, Harigaya Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Murakami T, Nagano I, Manabe Y, Abe K. Intellectual faculties in patients with Alzheimer's disease regress to the level of a 4-5-year old child. *Geriatrics and Gerontology International*. 2002; 02: 143-147.

2) Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang WR, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Temporal and spatial changes of free cholesterol and neutral lipids in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Res*. 2003 Jan;45(1):91-100.

3) Matsubara E, Shoji M, Murakami T, Abe K, Frangione B, Ghiso J. Platelet Microparticles as Carriers of Soluble Alzheimer's Amyloid beta (sAbeta). *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov;977:340-8.

4) Abe K, Murakami T, Matsubara E, Manabe Y, Nagano I, **Shoji M**. Clinical Features of CADASIL. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov;977:266-72.

5) Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang WR, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Spatiotemporal changes of free cholesterol and neutral lipids after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov;977:115-22.

6) Jin G, Omori N, Li F, Sato K, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Activation of cell-survival signal Akt by GDNF in normal rat brain. *Brain Res*. 2002 Dec 27;958(2):429-33.

7) Li F, Omori N, Sato K, Jin G, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Coordinate expression of survival p-ERK and proapoptotic cytochrome c signals in rat brain neurons after transient MCAO. *Brain Res*. 2002 Dec 20;958(1):83-8.

- 8)Omori N, Jin G, Li F, Zhang WR, Wang SJ, Hamakawa Y, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Enhanced phosphorylation of PTEN in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 2002 Nov 8;954(2):317-22.
- 9)Sasaki A, **Shoji M**, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Naito M, Matsubara E, Abe K, Nakazato Y. Amyloid cored plaques in Tg2576 transgenic mice are characterized by giant plaques, slightly activated microglia, and the lack of paired helical filament-typed, dystrophic neurites. *Virchows Arch.* 2002 Oct;441(4):358-67.
- 10)Wang SJ, Omori N, Li F, Zhang WR, Jin G, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Enhanced expression of phospho-Akt by electro-acupuncture in normal rat brain. *Neurol Res.* 2002 Oct;24(7):719-24.
- 11)Ohta Y, Manabe Y, Sasaki C, Shiote M, Hayashi T, **Shoji M**, Abe K. A case of paroxysmal kinesigenic dyskinesia with spastic paraparesis. *Neurol Res.* 2002 Oct;24(7):684-6.
- 12)Sato K, Murakami T, Hamakawa Y, Kamada H, Nagano I, **Shoji M**, Takata H, Nobukuni K, Ihara Y, Namba R, Hayabara T, Hirose S, Abe K. Selective colocalization of transglutaminase-like activity in ubiquitinated intranuclear inclusions of hereditary dentatorubral-pallidoluyian atrophy. *Brain Res.* 2002 Oct 18;952(2):327-30.
- 13)Wang SJ, Omori N, Li F, Jin G, Zhang WR, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci Lett.* 2002 Oct 11;331(2):115-8.
- 14)Sato K, Iwai M, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Temporal and spacial changes of BrdU immunoreactivity in amygdala kindling development. *Neurol Res.* 2002 Sep;24(6):593-6.
- 15)Warita H, Manabe Y, Murakami T, Shiote M, Shiro Y, Hayashi T, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Tardive decrease of astrocytic glutamate transporter protein in transgenic mice with ALS-linked mutant SOD1. *Neurol Res.* 2002 Sep;24(6):577-81.
- 16)Sato K, Iwai M, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Changes of localization of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in rat hippocampus with exposure to repeated kindled seizures. *Brain Res.* 2002 Aug 16;946(2):323-7.
- 17)Ohta Y, Hayashi T, Sasaki C, Shiote M, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Cauda equina syndrome caused by idiopathic sacral epidural lipomatosis. *Intern Med.* 2002 Jul;41(7):593-4.
- 18)Manabe Y, Nagano I, Gazi MS, Murakami T, Shiote M, **Shoji M**, Kitagawa H, Setoguchi Y, Abe K. Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis. *Apoptosis.* 2002 Aug;7(4):329-34.
- 19)Manabe Y, Warita H, Murakami T, Shiote M, Hayashi T, Omori N, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Early decrease of the immunophilin FKBP 52 in the spinal cord of a transgenic model for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 2002 May 10;935(1-2):124-8.
- 20)Prat MI, Adamo AM, Gonzalez SA, Affranchino JL, Ikeda M, Matsubara E, **Shoji M**, Smith MA, Castano EM, Morelli L. Presenilin 1 overexpressions in Chinese hamster ovary (CHO) cells decreases the phosphorylation of retinoblastoma protein: relevance for neurodegeneration. *Neurosci Lett.* 2002 Jun 21;326(1):9-12.
- 21)Manabe Y, Narai H, Warita H, Hayashi T, Shiro Y, Sakai K, Kashihara K, **Shoji M**, Abe K. Benign adult

familial myoclonic epilepsy (BAFME) with night blindness. *Seizure*. 2002 Jun;11(4):266-8.

22)Sato K, Iwai M, Nagano I, **Shoji M**, Abe K. Expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in rat subventricular zone with exposure to repeated kindled seizures. *Neurosci Lett*. 2002 May 3;323(3):244-6.

23)**Shoji M**, Matsubara E, Murakami T, Manabe Y, Abe K, Kanai M, Ikeda M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Watanabe M, Amari M, Ishiguro K, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Nishimura T, Nakamura Y, Takeda M, Urakami K, Adachi Y, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, Kanemaru K, Yamanouchi H, Yoshida Y, Ichise K, Tanaka K, Hamamoto M, Yamamoto H, Matsubayashi T, Yoshida H, Toji H, Nakamura S, Hirai S. Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders: 1. a large scale multicenter study by a Japanese study group. *Neurobiol Aging*. 2002 May-Jun;23(3):363-70.

24)Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K. Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002 Apr;22(4):411-9.

25)Shizuka-Ikeda M, Matsubara E, Ikeda M, Kanai M, Tomidokoro Y, Ikeda Y, Watanabe M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Maruyama K, Castano EM, St George-Hyslop P, **Shoji M**. Generation of amyloid beta protein from a presenilin-1 and betaAPP complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Mar 29;292(2):571-8.

26)**Shoji M**. Cerebrospinal fluid Abeta40 and Abeta42: natural course and clinical usefulness. *Front Biosci*. 2002 Apr 1;7:d997-1006.

27)Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, **Shoji M**, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE. Cholesterol-dependent gamma-secretase

activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis*. 2002 Feb;9(1):11-23.

28)Matsubara E, **Shoji M**, Abe K, Frangione B, Ghiso J. Vascular Amyloidosis in neurodegenerative conditions. *Drug News Prospective* 2002 15: 439-444

29)Matsubara E, Bryant-Thomas T, Pacheco J, Henry TL, Poeggeler B, Manjon M, Herbert D, Cruz-Sanchez F, Chyan Y-J, **Shoji M**, Abe K, Leone A, Grundke-Ikbal I, Wilson G, Ghiso J, Williams C, Refolo LM, Pappolla MA. Melatonin Increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* (in press)

## 2.学会発表 一般演題

1)Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang WR, Ohta K, Omori N, Nagano I, **Shoji M** and Abe K. Spatiotemporal changes of free cholesterol and neuritic lipids after transient middle cerebral artery occlusion in rat. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on "Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia" Okayama 2002, 10, 18

2)Kawarabayashi T, Murakami T, Matsubara E, Nagano I, **Shoji M** and Abe K. Accumulation of amyloid beta protein in lipid rafts. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on "Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia" Okayama 2002, 10, 18

3)Li F, Omori N, Sato K, Jin G, Nagano I, **Shoji M** and Abe K. Coordinate expression of survival p-ERK and proapoptotic cytochrome c signals in rat brain neurons after transient MCAO. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on "Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia" Okayama 2002, 10, 18



- 4)Ohta K, Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, **Shoji M** and Abe K. Dissociative increase of oligodendrocyte progenitor cells between young and aged rats after transient cerebral ischemia. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on “Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia” Okayama 2002, 10, 18
- 5)Shiote M, Nagano I, Ilieva H, Murakami T, Hayashi T, **Shoji M** and Abe K. Early decrease of survival signal protein and DNA repair enzyme in spinal motor neuron of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on “Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia” Okayama 2002, 10, 18
- 6)Zhang WR, Sato K, Omori N, Iwai M, Nagano I, **Shoji M** and Abe K. Time dependent amelioration against ischemic brain damage by glial cell line-derived neurotrophic factor after transient middle cerebral artery occlusion in rat. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on “Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia” Okayama 2002, 10, 18
- 7)Harigaya Y, Tomidokoro Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Kanai M, IKarashi Y, Matsubara E, **Shoji M**. Brain beta-amyloidosis in APPsw mice induces memory impairment with decrease of acetylcholine and focal loss of neurons with accumulation of phosphorylated tau. The 8th International conference on Alzheimer’s disease and related disorders. Stockholm 2002, 7, 20-25
- 8)**Shoji-M**, Kawarabayashi T, Ikeda M, Harigaya Y, Murakami T, Manabe Y, Abe K. The effect of beta-amyloid 42 vaccine on TG2576 Alzheimer model mice. The 8th International conference on Alzheimer’s disease and related disorders. Stockholm 2002, 7, 20-25
- 9)Ikeda M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Okamoto K, Matsubara E, **Shoji M**, Murakami T. Memory loss and Parkinsonism with severe tauopathy in the frontotemporal lobe of transgenic mice overexpressing R406W mutant human tau. The 8th International conference on Alzheimer’s disease and related disorders. Stockholm 2002, 7, 20-25
- 10)Kanai M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Okamoto K, **Shoji M**. Tau and beta-amyloid protein in cerebrospinal fluid as biomarkers of Alzheimer’s disease. The 8th International conference on Alzheimer’s disease and related disorders. Stockholm 2002, 7, 20-25
- 11)Abe K, Murakami T, Manabe Y, Nagano I, **Shoji M**. Clinical feature of CADASIL. Third world congress on vascular factors in Alzheimer’s disease. Kyoto 2002, 4, 7-10
- 12)Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang W, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe k. Temporal and spatial changes of free cholesterol and neutral lipids in rat brain after middle cerebral artery occlusion. Third world congress on vascular factors in Alzheimer’s disease. Kyoto 2002, 4, 7-10
- 13)Matsubara E, **Shoji M**, Mukakami T, Abe K, Frangione B, Ghiso J. Microparticles are carrier of platelets A $\beta$ . Third world congress on vascular factors in Alzheimer’s disease. Kyoto 2002, 4, 7-10
- シンポジウム, 教育講演  
1)**Shoji M**. A $\beta$  vaccine therapy for Alzheimer’s disease. Summer School of the Internal Society of CBF and Metabolism and Joint International Symposium on “Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke and Dementia” Okayama 2002, 10, 18

2)**Shoji M**, Kawarabayashi T, Murakami T, Matsubara E, Nagano I, Yasuo Harigaya Y, Hoshii Y, Kawano H, Ishihara T, Abe K. Amyloid associated proteins in A $\beta$  amyloid in APPsw mice. 5th International symposium on FAP, Matsumoto Sep 24-27, 2002

2002, 5, 10

3)**Shoji M**, Matsubara E, Murakami T, Nagano I, Manabe Y and Abe K. The study of Alzheimer's disease using transgenic mice. Third international symposium "the study on brain function" Fukuoka,

#### H. 知的所有権の取得状況

1.特許取得

なし

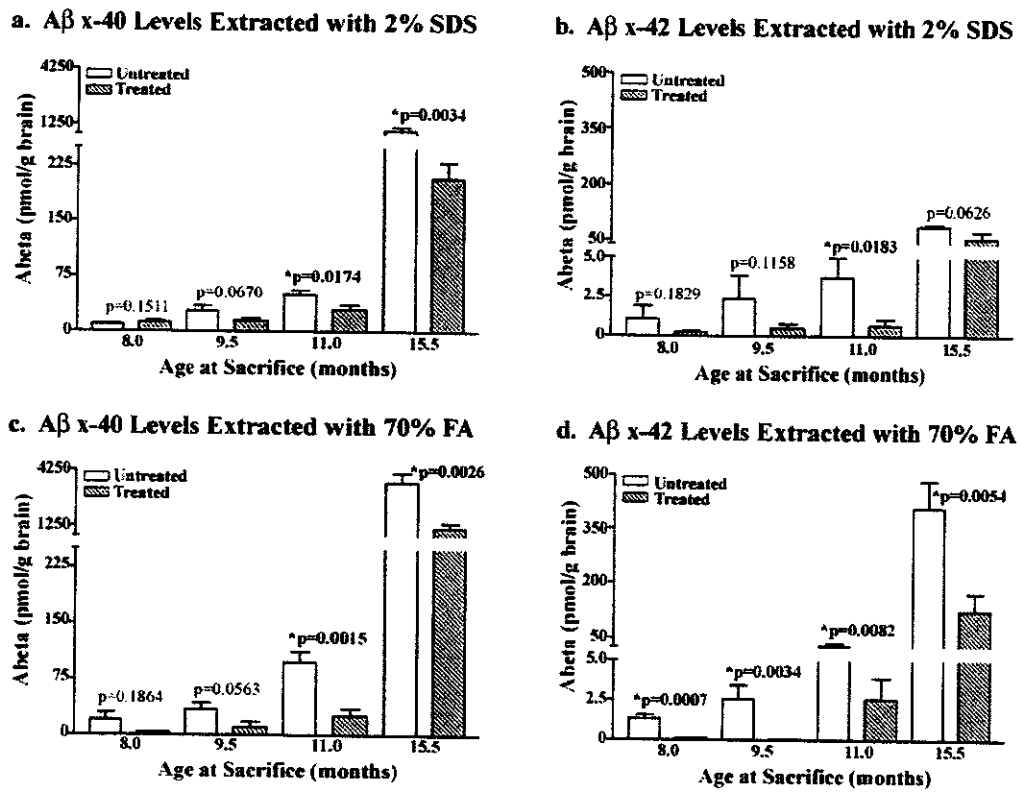
2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

図 1. ELISA による脳内 Aβ プール定量(SDS 可溶性と SDS 不溶性蟻酸可溶性アミロイド画分)



厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

## 脳アミロイドアンギオパチー (CAA) に関連する脳出血の危険因子

分担研究者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)  
 共同研究者 袖山信幸\*、水澤英洋\*、伊藤嘉憲\*\*、高橋 敦\*\*、大友英一\*\*、  
 松下正明\*\*\*  
 \*東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学 (神経内科)、  
 \*\*浴風会病院内科、\*\*\*東京都精神医学総合研究所神経病理

**研究要旨** 脳アミロイドアンギオパチー (CAA) に関連する脳出血の危険因子を明らかにする目的で、高度の CAA を有する 57 例を脳出血を発症した 24 例 (出血群) と脳出血を発症しなかった 33 例 (非出血群) に分け、臨床・病理学的特徴、アポリポ蛋白 (*APOE*) 遺伝子型を比較した。痴呆は非出血群で有意に高率であった。高血圧の頻度には両群間で差がなかった。出血群では軽度の頭部外傷を有する頻度が高い傾向があった。皮質の微小出血および小梗塞、CAA 関連血管変化、フィブリノイド壊死の頻度は出血群で有意に高率であった。*APOE* 各アレル頻度は両群間に有意差を認めなかった。以上より、頭部外傷は CAA 関連脳出血の誘因になる可能性があり、皮質微小出血や小梗塞の画像上の検出は診断や脳出血発症を予測する有用なマーカーとなりうるものと考えられた。

### A. 研究目的

CAA は脳血管のアミロイド沈着症である。高齢者やアルツハイマー病 (AD) では  $A\beta$  型 CAA がしばしばみられ、脳出血を代表とする脳血管障害の原因となる。しかし高度の CAA を有する例が必ずしも脳出血を発症するとは限らない。CAA 関連脳出血のリスクには、(1) 脳血管へのアミロイド沈着を起こす危険因子、(2) アミロイド沈着のある脳血管の破綻を誘発する危険因子の両者が関与している。今回、我々は (2) について検討した。

### B. 研究方法

老人病院における日本人高齢者 1700 連続剖検例を検索し、高度の CAA (後頭葉の髄膜、皮質血管の 70% 以上にアミロイド沈着) を有する 57 例を抽出した (全例  $A\beta$  型 CAA)。脳出血 (脳葉型の大脳出血/小脳出血) を発症した 24 例 (出血群) と脳出血を発症しなかった 33 例 (非出血群) とに分類し、臨床・病理学的特徴、アポリポ蛋白 (*APOE*) 遺伝子型を比較した。

(倫理面への配慮)

研究は患者家族の同意、機関の倫理審査委員会

の承認を得て行われた。

### C. 研究結果

痴呆は非出血群で有意に高率で、AD の頻度も非出血群で高い傾向があった。高血圧の頻度は両者間で差がなかった。出血群では軽度の頭部外傷を有する頻度が高い傾向があった。

皮質の微小出血および皮質の小梗塞は出血群で有意に高率であった。白質病変の頻度には差がなかった。

CAA 関連血管変化 (内膜肥厚/血管壁重複/微小動脈瘤形成/フィブリノイド壊死) についてみると、いずれかの CAA 関連血管変化を有する頻度およびフィブリノイド壊死の頻度は、出血群において有意に高率であった。

*APOE* 各アレル頻度は両群間に有意差を認めなかった。

### D. 考察

非出血群で痴呆の頻度が有意に高かったことは、痴呆患者が多い老人病院の剖検シリーズによる研究であったことと関連している可能性があ