

37(77%)/48(83%)、14-3-3 蛋白: 23(74%)/31(53%)、NSE: 15(50%)/30(52%)、probable 群(363 例) 脳波: 363(100%)/363(100%)、脳 MRI: 213(77%)/276(76%)、14-3-3 蛋白: 112(92%)/122(34%)、NSE: 108(71%)/153(42%)、possible 群(36 例) 脳波: 0(0%)/32(89%)、脳 MRI: 14(61%)/23(64%)、14-3-3 蛋白: 9(64%)/14(39%)、NSE: 5(28%)/18(50%)、全例群(457 例) 脳波: 405(89%)/453(99%)、脳 MRI: 264(76%)/347(76%)、14-3-3 蛋白: 144(86%)/167(37%)、NSE: 128(64%)/201(44%)であった(表 2)。全例群の検査の施行率には $p < 0.01$ で有意差が認められた。Definite 群における感度は脳波、脳 MRI、14-3-3 蛋白が 70%台前半と類似しているのに比べ、NSE の低値が目立った。全例群における検査の施行率は脳波の 99%から 14-3-3 蛋白の 37%まで大きく異なっていた。

脳波、脳 MRI、14-3-3 蛋白、NSE で CJD の発症から異常が認められるまでの期間は全例群においてはそれぞれ 3.6、4.4、4.8、3.6 ヶ月であり(表 3)、孤発例群では 3.6、4.2、4.7、3.3 ヶ月であった。各群間に有意差はなかった。発症後 1 ヶ月ごとに見た検査陽性数は全例群において共に脳 MRI、14-3-3 蛋白、NSE では 1 ヶ月後に最大となったが、脳波では 2 ヶ月後に最大となった(図 5)。なお、異常が認められるまでの期間は CJD サーベイランス調査票の記載に基づいている。調査票に記載されている検査で異常を認めた日は必ずしも最も初めに異常が検出された日ではない。しかし、典型的な CJD は経過が短いため多くの症例では最も初めに異常が検出された日が記載されていると推定され、本研究での検査で異常が認められるまでの期間と最も初めに異常が検出されるまでの期間の間に大きな相違はないものと思われる。

脳波は施行率や感度が高く、本研究における検査で陽性所見が認められるまでの期間も短い。他の検査より検査陽性数が最大となるのが遅かった。脳 MRI に関しては感度や施行率は高く、検査陽性数が最大となるまでの期間も短い。検査で異常が認められるまでの平均の期間は比較的長かった。14-3-3 蛋白はその感度が高く、検査陽性数が最大となるまでの期間も短い。本邦における施行率は低く、検査陽性までの期間の平均

は脳波や NSE に比べると長い。NSE は感度が同じ脳脊髄液を検体とする 14-3-3 蛋白よりも低いが、検査陽性数が最大となるのは脳波よりも早く、検査陽性までの期間の平均も比較的短い。以上より各検査にはそれぞれの利点があり CJD の信頼の置ける早期診断にはこの 4 検査を共に施行することが重要である。

E. 結論

日本のプリオン病の現状について CJD サーベイランス調査の結果を中心に報告した。これらの情報を臨床に反映させ、CJD の診断をさらに正確・迅速なものにすることが重要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamaguchi T, Okino S, Sodeyama N, Itoh Y, Takahashi A, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H, Yamada M. Association of a polymorphism of the transforming growth factor- β 1 gene with cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (in press)
- 2) Nishida Y, Sodeyama N, Toru Y, Toru S, Kitamoto T, Mizusawa H. Creutzfeldt-Jakob disease with a novel insertion and codon 219 Lys/Lys polymorphism in PRNP. *Neurology* 63:1978-1979, 2004.

2. 学会発表

- 1) Sodeyama N, Nakamura Y, Yamada M, Satoh T, Kitamoto T, Mizusawa H. Duration between initial manifestation of CJD and detection of PSD, specific findings on MRI, 14-3-3 protein, or high NSE. 2004 International Symposium of Prion Diseases for Food and Drug Safety. (Sendai, Japan) 1 November, 2004.
- 2) 袖山信幸、水澤英洋、山田正仁、佐藤猛、北本哲之、中村好一。日本のクロイツフェルト・ヤコブ病における脳波、脳 MRI、14-3-3 蛋白。第 45 回日本神経学会総会(東京)。5 月、2004 年。

- 3) 袖山信幸、水澤英洋、山田正仁、佐藤猛、北本哲之、中村好一、黒岩義之、森若文雄、志賀裕正、武田雅俊、西澤正豊、葛原茂樹、黒田重利、村井弘之、村山繁雄、立石潤、堂浦克美。プリオン病の診断と問題例 臨床検査 (MRI, 14-3-3, NSE, tau, 尿)。クロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランスに関する全国担当者会議 (東京)。2 月 27 日、2004 年
- 4) 袖山信幸、水澤英洋、山田正仁、佐藤猛、北本哲之、中村好一、黒岩義之、森若文雄、志賀裕正、武田雅俊、西澤正豊、葛原茂樹、黒田重利、村井弘之、村山繁雄、立石潤、堂浦克美。日本のクロイツフェルト・ヤコブ病の診断における脳波、脳 MRI、14-3-3 蛋白の意義。平成 15 年度プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班 研究報告会 (東京) 1 月 26 日、2004 年
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

表1 対象の内訳

	男	女	計
孤発性CJD	167 (41.2%)	238 (58.8%)	405 (78.2%)
家族性CJD	25 (41.0%)	36 (59.0%)	61 (11.8%)
感染性CJD	17 (32.7%)	35 (67.3%)	52 (10.0%)
計	209 (40.3%)	309 (59.7%)	518 (100%)

表2 全例群における脳波、脳MRI、14-3-3蛋白、NSEの感度と施行率

	総数	脳波	MRI	14-3-3蛋白	NSE
Definite CJD					
陽性数/施行数	58	42/58	37/48	23/31	15/30
感度/施行率		72/100%	77/83%	74/53%	50/52%
Probable CJD					
陽性数/施行数	363	363/363	213/276	112/122	108/153
感度/施行率		100/100%	77/76%	92/34%	71/42%
Possible CJD					
陽性数/施行数	36	0/32	14/23	9/14	5/18
感度/施行率		0/89%	61/64%	64/39%	28/50%
Total					
陽性数/施行数	457	405/453	264/347	144/167	128/201
感度/施行率		89/99%*	76/76%*	86/37%*	64/44%*

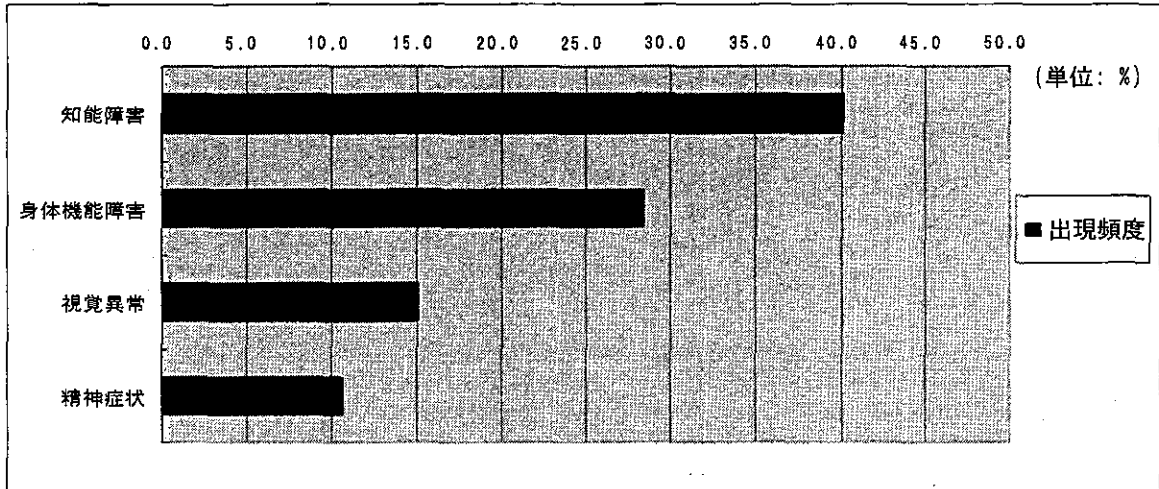
*p<0.01

表3 全例群におけるCJDの発症から脳波、脳MRI、14-3-3蛋白NSEで異常が認められるまでの期間(月)

	脳波	MRI	14-3-3蛋白	NSE
Definite CJD	3.5±3.4	6.3±5.2	6.4±5.2	3.4±3.0
Probable CJD	3.6±5.9	3.8±4.2	4.2±10.4	3.4±3.7
Possible CJD	-	9.8±6.9	8.0±7.6	8.7±2.3
Total	3.6±5.7	4.4±4.7	4.8±9.6	3.6±3.7

(単位は月、mean±SD)

図1 孤発性プリオン病の初発症状



知能障害: 記憶障害、計算ができない、失語、痴呆
 身体機能障害: 歩行障害、ふらつき歩行、めまい、手足の麻、parkinsonism
 視覚異常: 物がゆがんで見える、大きいものが小さく見える
 精神症状: ぼんやりしている、意欲の低下、不安、人格の変化、疲労感

図2 孤発性プリオン病の経過中に出現する症状

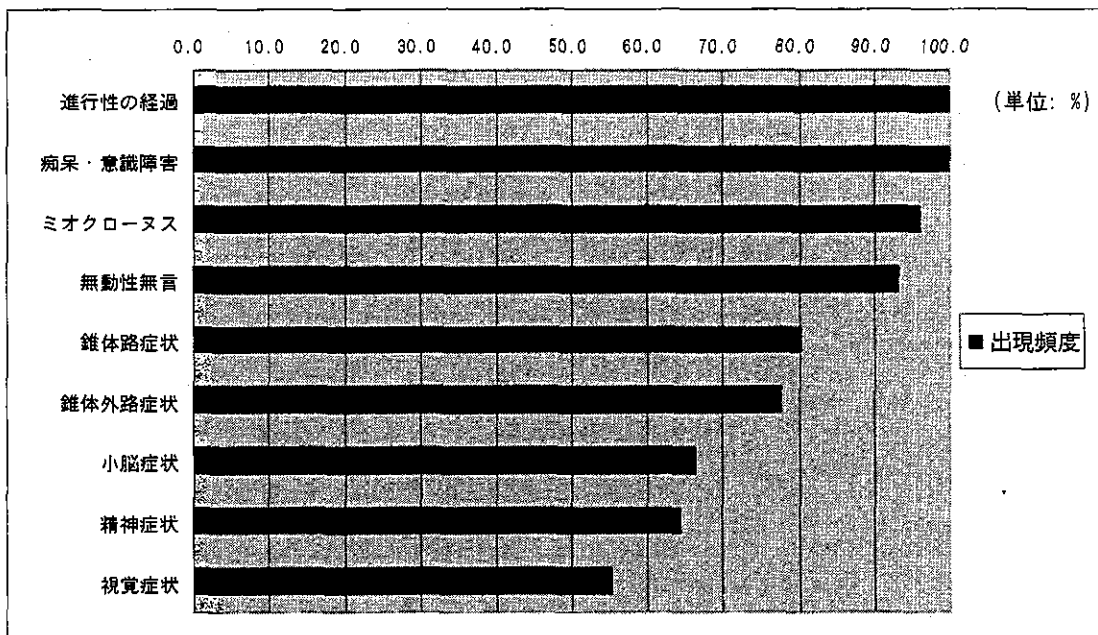


図3 硬膜移植からCJD発症までの期間

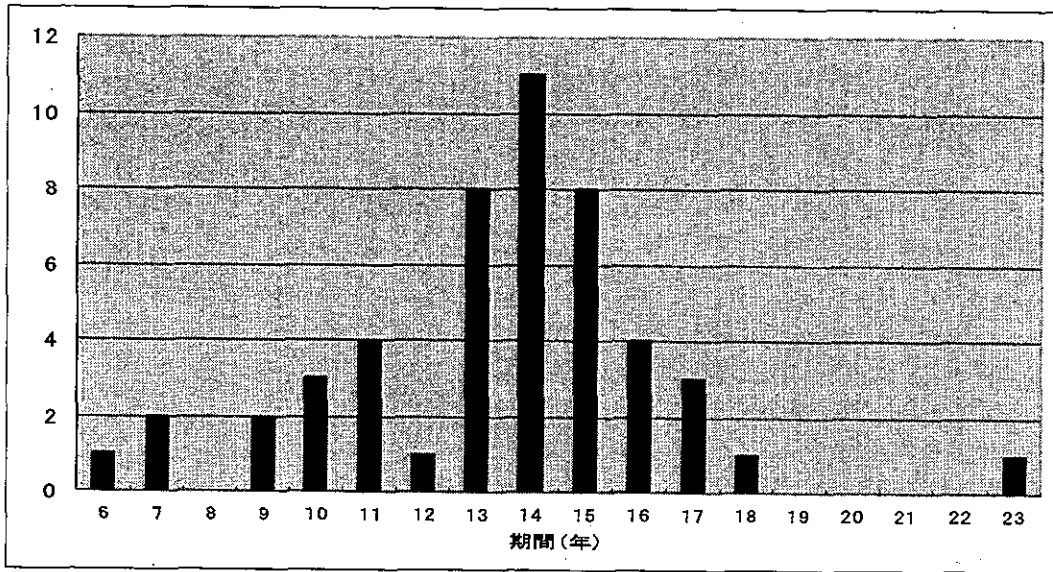


図4 年別の原因となった硬膜移植手術数とCJDの発症数

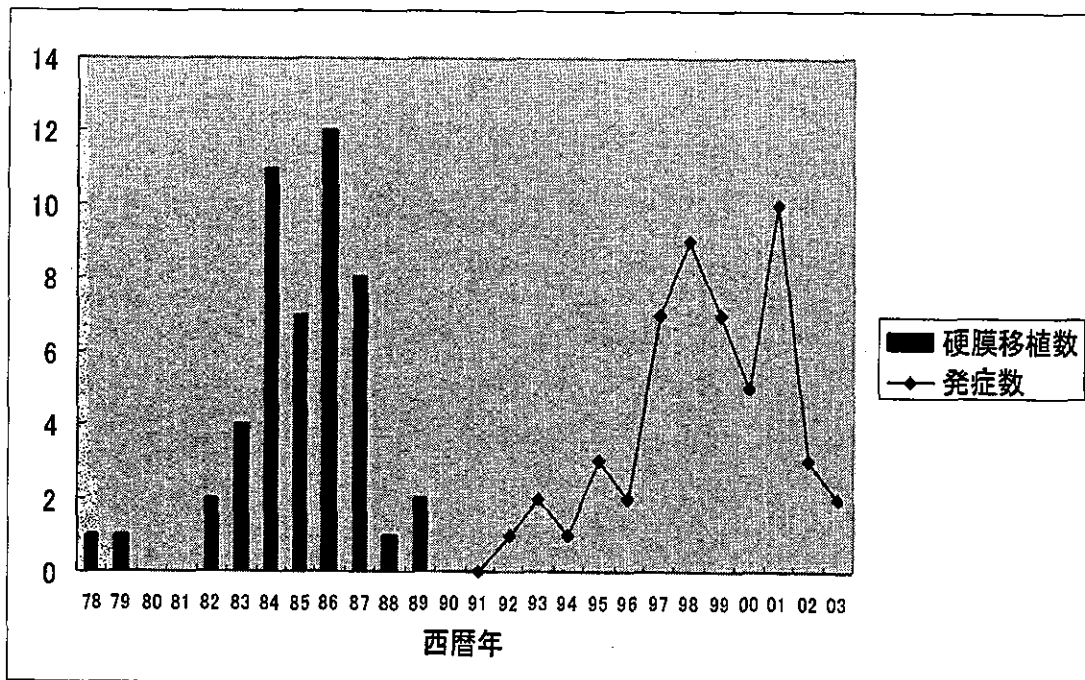
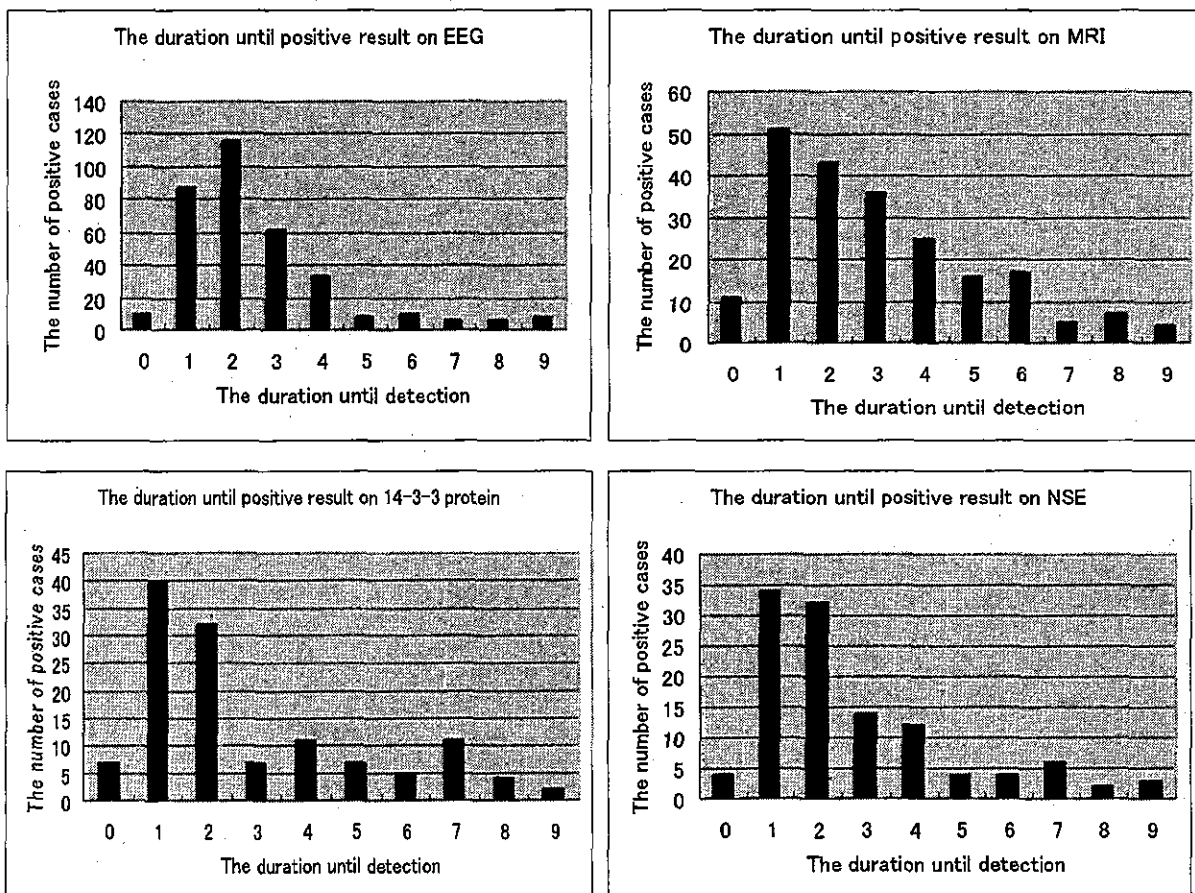


図5 全例群における発症後1ヶ月ごとの脳波、脳MRI、14-3-3蛋白、NSEでの検査陽性数



厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

慢性炎症における SAA 発現機構—肝腫瘍細胞株を用いた IL-6, IL-1, TNF α 刺激による SAA1 プロモーター発現機構の解析

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 萩原圭祐**, 西川哲平*, 宋健*

*大阪大学健康体育部健康医学第一部門、**大阪大学微生物病研究所

研究要旨 IL-6 阻害治療により関節リウマチ患者の血清 SAA が正常化される機構を、転写調節レベルで解明することを、この三年間の目的とした。SAA1 リアルタイム定量的 RT-PCR の系で、IL-6 が SAA1 の相乗発現に必須であり、JAK-STAT 系が重要であることを示した。ヒト SAA1 のプロモーター領域には、STAT3 の結合領域は報告されていないが、ルシフェラーゼアッセイによる解析により、STAT3 が SAA1 の相乗発現に必須であることを明らかにした。ゲルシフトアッセイにより、転写複合体に STAT3 が存在することを確認し、pGL3-SAA1(-796/+24)の C/EBP β 、NF- κ B 結合領域の変異体を用いた検討により、STAT3 が NF- κ B 結合領域を介し、SAA1 の相乗発現を誘導することを明らかにした。STAT3 と NF- κ B の相互作用を免疫沈降、SAA1 (-196/-73)オリゴプローブを用いた DNA affinity chromatography により検討し、STAT3 が NF- κ B p65 と複合体を形成し、NF- κ B 結合領域近傍に結合することを確認した。さらに、STAT3 が転写共役因子である P300 を誘導し SAA の相乗発現に寄与することを明らかにし、サイトカインによる SAA の相乗効果発現の仕組みをほぼ解明することができた。IL-6 阻害治療により血清 SAA が正常化される分子機序が明らかとなり、IL-6 阻害治療が AA アミロイドーシスの治療に有効であることが裏付けられた。

A. 研究目的

IL-6 阻害治療により、関節リウマチ患者の血清 SAA の正常化がみられ、AA アミロイドーシス合併患者においては、その症状が改善することが認められる。IL-6 阻害治療により血清 SAA が正常化される機構を、SAA の転写調節レベルで解明し、IL-6 阻害の臨床意義を分子レベルで明らかにすることを、この三年間の目的とした。

B. 研究方法

1) 培養細胞・サイトカイン

不活化した 10% FCS、50 units/ml Penicillin-Streptomycin、2mM L-glutamine を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)で培養した肝腫瘍細胞株 HepG2 細胞を用いた。サイトカイン刺激は、IL-6 10 ng/ml、IL-1 β 0.1 ng/ml でそれぞれ行った。

2) リアルタイム定量的 RT-PCR

測定に用いた SAA1、2 の特異的プライマー、反

応条件などは平成 12 年度の報告書に示したとおりである。

3) SAA1 ルシフェラーゼベクターの作製

Gene Bank 上の *Homo sapiens* SAA1 beta gene DNA 配列をもとに PCR クローニングにて pGL3-SAA1(-796/+24)を作製した。5'-欠失体も同様の方法で作成した。各種変異体、欠失体は Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて作製した。

4) ルシフェラーゼアッセイ

HepG2 細胞を、 2×10^5 /3ml/well で 6 穴プレートに培養し、24 時間後に Fugen 6 を使い、トランスフェクションを行った。72 時間後にサイトカイン刺激を行い、刺激後 3 時間のサンプルを回収し、Dual-luciferase アッセイを行った。すべてのアッセイは triplicate で行った。

5)ゲルシフトアッセイ

C/EBP β および NF- κ B 結合領域を含む SAA1 (-196/-73)オリゴプローブ 5 fmol と核蛋白 10 μ g

を反応液中で 25°C 30 分間インキュベーションを行った。核蛋白-DNA 複合体は Light Shift™ Chemiluminescent EMSA kit を用いて検出した。スーパーシフトアッセイは、転写因子各特異抗体を、オリゴと反応させる前の核蛋白に加え、37°C 60 分間インキュベーションさせた。

6) 免疫沈降

サイトカイン刺激後 30 分の核蛋白 (200-300µg) を、抗体と 4°C で一晩反応させ、プロテイン A セファロースで免疫複合体を落とした後、6-7.5% のゲルで SDS-PAGE 行い、ウエスタンブロットにて検出した。

7) DNA affinity chromatograph

核蛋白 (200µg) をビオチン化した SAA1 (-196/-73)オリゴプローブ (1µg) と 25°C、30 分間反応させ、その後 50 µl のストレプトアビジン Dynabeads と 30 分間反応させた。Dynabeads をマグネットで回収し、結合した蛋白を、ウエスタンブロットで検出した。

C. 研究結果

リアルタイム定量的 RT-PCR の系で、Jak2 阻害薬 AG490 により、SAA1 の相乗発現が阻害され、JAK-STAT 系の関与が重要であることが示された (図 1)。SAA の相乗発現は、NF-κB と C/EBPβ によると報告されており、ヒト SAA1 のプロモーター領域には、STAT3 の結合領域は報告されていない。そこで、STAT3 の関与を確認するために、SAA1, SAA2 のプロモーター解析を、ルシフェラーゼアッセイにより行ったところ、dominant negative STAT3 を共発現させると、SAA1, SAA2 ともに相乗発現が消失し、wild type STAT3 を共発現させると、約 3 倍の増強効果がみられた (図 2)。

STAT3 は SAA1, SAA2 相乗発現に cis 反応的に必須であることが示された為、新たな STAT3 の結合領域の可能性を 5'-deletion mutants を用いて、検討した。C/EBPβ の結合領域を削ると約 1/3、NF-κB の結合領域を削るとほぼ活性が消失した。C/EBPβ の結合領域から NF-κB の結合領域にかけて、STAT3 が相乗発現に関与する可能性を考え、ゲルシフトアッセイの実験を行ったところ、IL-6 + IL-1 刺激後に、DNA-核蛋白複合体の形成を認め、特異抗体を用いたスーパーシフトアッセイに

より、NF-κB p65 と C/EBPβ が複合体を形成していることを確認した。様々な検討を行った結果、STAT3 の 727 番目のセリンのリン酸化抗体により、この複合体の形成が阻害され、STAT3 が複合体に存在することが確認された (図 3)。

次に、それぞれの結合領域を除いた変異体を作製し、STAT3 を共発現させたところ、C/EBPβ の結合領域を除いたものでは、野生型と比較し減弱は認められたが、明らかに STAT3 による増強効果を認めた。しかし、NF-κB の結合領域を欠失または変異させたものでは、STAT3 の増強効果は、完全に消失した (図 4)。つまり、STAT3 は NF-κB の結合領域を介して、相乗発現を誘導していることが示された。免疫沈降により、STAT3 と NF-κB の相互作用を検討したところ、IL-6 + IL-1 刺激後に STAT3 は NF-κB p65 と複合体を形成することが示された (図 5)。

この結果だけでは、C/EBPβ を含めた転写複合体の形成を説明できないことから、転写共役因子である p300 に注目し、検討を行った。p300 は STAT3 共発現化に、STAT3 の用量依存性に SAA の相乗発現を増強した (図 6)。免疫沈降でも、STAT3 と p300 の複合体形成を確認しており、その結果 STAT3 は、NF-κB p65 と複合体を形成し、p300 を誘導することにより、相乗効果に関与することが考えられた。

最後に、STAT3 のコンセンサス配列が存在しない状態での、STAT3 の結合形態を検討した。方法としては、DNA affinity chromatography を用いた。NF-κB 結合領域及び、その 3' 側の近傍の配列を変異させたオリゴプローブを用い検討を行ったところ、STAT3 は、NF-κB p65 と複合体を形成することにより、下流の 3' 領域に結合することを示した (図 7)。事実、NF-κB シグナルをブロックする IκBαM を共発現させたところ、STAT3 の増強効果がブロックされた。

D. 考察

今回の実験結果をもとに、我々が提唱するサイトカインによる SAA の相乗発現のワーキングモデルを示す (図 8)。STAT3 は、NF-κB p65 と複合体を形成し、NF-κB 結合領域の 3' 側と反応する。さらに、STAT3 は p300 を誘導し、SAA1 のプロ

モーター上に転写複合体を形成して、SAA の相乗発現を引き起こすと考えられる。

E. 結論

サイトカイン誘導による SAA の発現には、NF- κ B p65 と STAT3 のクロストークが必須であることが明らかとなった。IL-6 阻害治療により血清 SAA が正常化される分子機序が明らかとなり、IL-6 阻害治療は、AA アミロイドーシスの治療に有効であることが裏付けられた。今後は、NF- κ B p65 と STAT3 のクロストークの阻害が新たな分子標的である可能性を示唆する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hagihara K, Nishikawa T, Isobe T, Song J, Sugamata Y, Yoshizaki K. IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314:363-369, 2004.
- 2) Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, Iwamoto Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Okano H. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.* 76:265-276, 2004.
- 3) Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, Matsumoto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N, Yoshizaki K, Shimoyama T, Kishimoto T. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 126:989-996, 2004.
- 4) Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T. Treatment of rheumatoid arthritis

with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 50:1761-1769, 2004.

- 5) Mihara M, Shiina M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Akamatsu K. Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits murine AA-amyloidosis. *J. Rheum* 31:1132-1138, 2004
- 6) Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T. Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-IL 6-receptor antibody for children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* In press, 2004

2. 学会発表

- 1) 吉崎和幸. 炎症性疾患のIL-6阻害療法に基づく分子レベルでの病態解析. 第41回日本臨床分子医学会. 福岡. 2004. 7.16.
- 2) 吉崎和幸. 関節リウマチに対するインターロイキン6阻害による治療. 和歌山臨床RAフォーラム. 和歌山. 2004. 7.31.
- 3) Yoshizaki K. Pathogenic roles of IL-6 and the IL-6 blocking therapy on RA. *APLAR 2004 (11th Asian Pacific League of Associations for Rheumatology Congress)*. Jeju, Korea. 2004. 9.11-15.
- 4) 吉崎和幸. 各種疾患におけるサイトカイン: IL-6を中心として. 京都炎症・免疫研究会. 京都. 2004.10.12
- 5) 吉崎和幸. IL-6の炎症における基礎と臨床. 第32回日本救急医学会ランチョンセミナー. 千葉. 2004. 10.27.
- 6) 吉崎和幸. モノクロナル抗体の治療への応用. 第20回ジャパン・イムノロジー・セミナー. 東京. 2004. 11.27.
- 7) 吉崎和幸. ヒト型化抗IL-6受容体抗体をもちいた関節リウマチの新しい治療. 播磨リウマチ膠原病研究会. 姫路. 2004. 12.11.
- 8) Yoshizaki K. IL-6 blocking therapy for secondary amyloidosis by inhibition of SAA production. *International Symposium on Amyloidosis*. Kumamoto, Japan. 2005.2.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

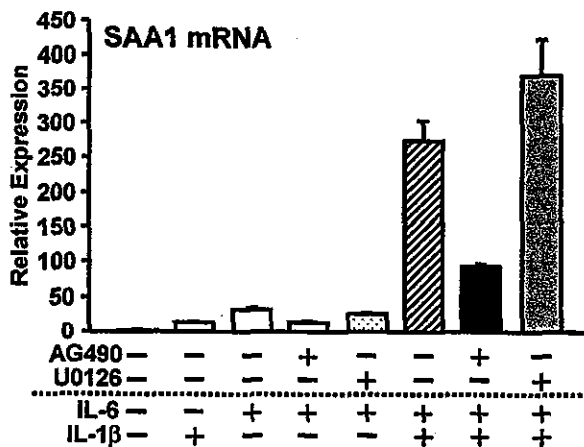


図1. SAA1 発現におけるAG490、U0126の阻害効果

100μM AG490, 10μM U0126をサイトカイン刺激30分前に加えている。

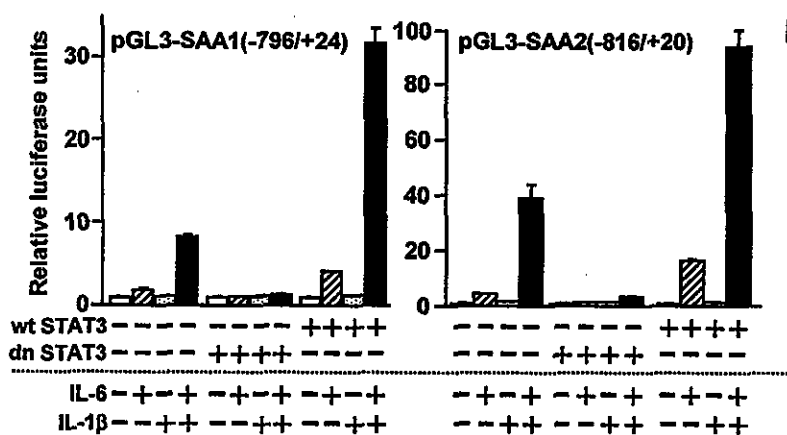


図2. SAA1, SAA2発現におけるSTAT3の役割

wt STAT3:野生型STAT3
dn STAT3:ドミナントネガティブSTAT3

STAT3がSAAの発現に必須であることが示されている。

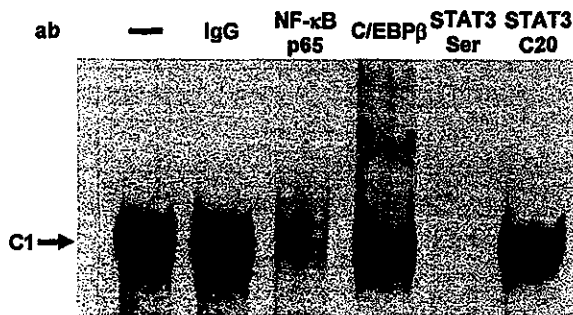


図3. スーパーシフトアッセイの結果

プローブ:SAA1(-196/-73)オリゴプローブ
核蛋白:サイトカイン刺激後1時間のHepG2由来の核蛋白を使用

抗STAT3セリンリン酸化抗体により複合体形成が阻害されている。

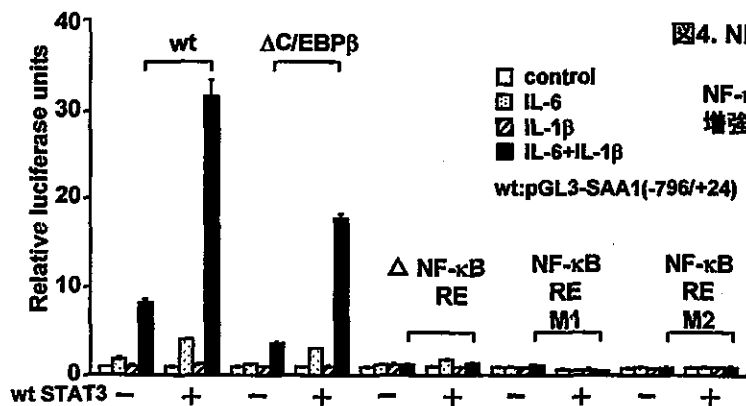


図4. NF-κB, C/EBPβ結合領域変異体を用いた検討

NF-κB結合領域の変異体ではSTAT3の増強作用が消失している。

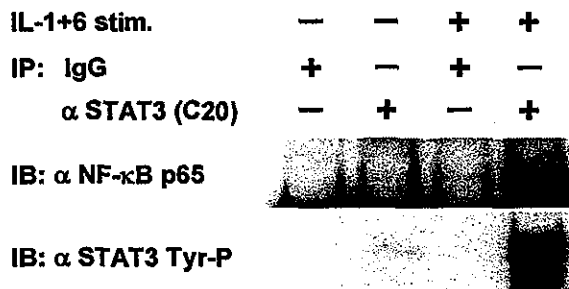


図5. IL-6 + IL-1刺激後の核蛋白を用いた免疫沈降の結果

NF-κB p65とSTAT3が明らかに共沈していることが認められる。

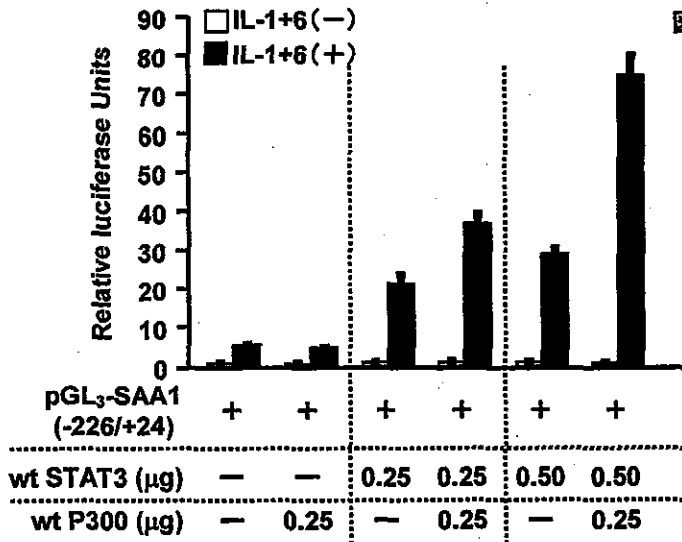


図6. p300を共発現させたルシフェラーゼアッセイの検討

STAT3を共発現させるとp300はSAAの相乗発現を増強する。

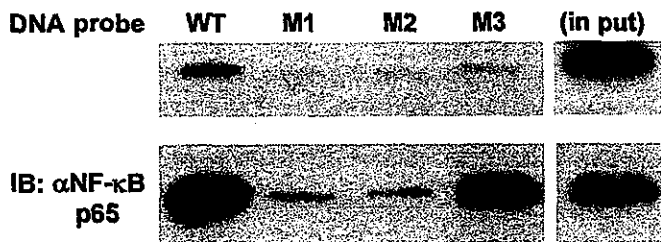


図7. DNA affinity chromatographyによる検討

SAA1 (-196/-73) オリゴプローブ
 WT: CAGGGACTTTCCCCAGGGAC
 M1 : AGATCTATTTCCCCAGGGAC
 M2 : CAGGGACTTGTACCAGGGAC
 M3 : CAGGGACTTTCCCAGATCTA

M3において、NF-κB p65のバンドは変化しないが、STAT3のバンドは明らかに減弱している。

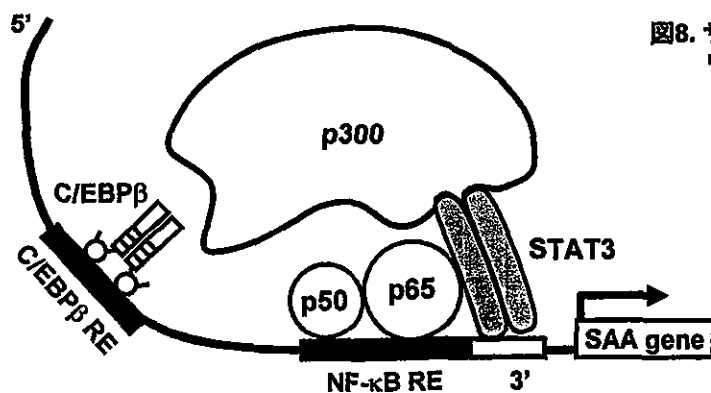


図8. サイトカイン誘導によるSAA相乗発現のワーキングモデル

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

マウス AA アミロイドーシスモデルにおける抗体の in vivo 応用： 発症抑制、吸収促進効果の検討

分担研究者 山田俊幸 順天堂大学医学部臨床病理学
共同研究者 染谷朋之介 順天堂大学医学部小児科学

研究要旨 マウスモデルを用い、AA アミロイド沈着内の成分である SAA/AA、アポリポ蛋白 E (アポ E) に対するモノクロナル抗体の in vivo 投与による AA アミロイドーシス (ア症) の治療の可能性を検討した。抗 SAA 抗体を用いた系で AEF、硝酸銀誘発ア症は抑制されたが、AEF、Freund アジュバント誘発ア症は抑制されなかった。抗アポ E 抗体系では、発症の抑制、長期の吸収促進効果いずれも観察されなかった。以上より、発症予防の可能性は示されたものの、抗体投与方法などさらなる工夫が必要と考えられた。

A. 研究目的

アミロイドーシスの治療の一つとしてアミロイド成分に対する抗体の応用が、アルツハイマー病などで試行されている。我々は、マウス AA ア症において、アミロイド線維前駆体である SAA と、全ての型のアミロイド沈着内に存在するとされるアポリポ蛋白 E (アポ E) に対する抗体の応用を検討し、昨年までの研究で、これら抗体が in vivo でアミロイド沈着に到達することを示してきた。今回はこれら抗体によるア症発症予防、吸収効果促進の可能性を検討した。

B. 研究方法

ICR マウス (メス、10 週齢) に AEF 腹腔投与、硝酸銀皮下投与によりア症を惹起する系で、day 4 から毎週 1 回計 5 週にわたり抗マウス SAA モノクロナル抗体 (クローン M10)、1 mg 相当を腹腔投与し、脾アミロイド沈着を評価した。また AEF、CFA (Freund 完全アジュバント) 腹腔投与によりア症を惹起し、抗体を皮下投与する条件でも検討した。

ヒトアポ E2 ノックインマウス (三菱生命研、藤田博士より供与) についても断片化ヒトアポ E モノクロナル抗体 (クローン YK-2) を用い AEF、CFA 惹起法により同様の発症抑制実験を行った。また同様の惹起後、脾生検によりアミ

ロイド沈着量を確認し、毎週 1 回計 6 週にわたり抗体を皮下投与してアミロイド吸収効果を検討した。

以上の実験は学内動物実験審査委員会の承認を受け、可能な限り動物に苦痛を与えない配慮で行われた。

C. 研究結果

AEF、硝酸銀惹起マウスに抗 SAA 抗体を腹腔内投与した系では発症が 5 匹中 1 匹と抑制された (対象は発症 5/5)。しかし、AEF、CFA 惹起マウスに皮下投与する系では発症抑制はみられなかった。

抗アポ E 抗体を投与する系では発症抑制、吸収亢進のいずれも観察されなかった。

D. 考察

抗 SAA 抗体を投与した系で、発症抑制が観察されたのは将来の応用に期待がもてる成績と考えたい。おそらくアミロイド沈着の初期には相当量の SAA の参画が必要で、抗体がこれを抑制したものと考えられる。しかし、CFA 惹起、抗体皮下投与での発症抑制失敗はこの系がより重度の惹起系である、または皮下投与による抗体の移行などの問題が考えられ、今後の検討課題としたい。

抗アポ E 系での陰性成績は前述の実験条件に加え、抗体の結合性の問題、あるいはアポ E そのもののアミロイド形成における寄与の程度にも関連していることを考慮する必要がある。しかし、アポ E は型を問わないアミロイド沈着の共存成分であり、抗体の工夫などもあわせ、このモデルの活用意義を高めていきたい。

E. 結論

抗 SAA 抗体投与によりマウス AA アミロイド一シズ発症予防の可能性は示された。しかし抗体投与方法などさらなる工夫が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada T: Genetic effects on serym concentrations of serum amyloid A protein (SAA). *Clin Chem* 50: 978-979, 2004.
- 2) Kurusu A, Yamada T, Yamaji K, Nishitani M, Tashiro K, Maeda K, Horikoshi S, Shirato I, Rinno H, Tomino Y. A case of primary

immunoglobulin light chain amyloidosis with a delayed appearance of Bence Jones protein in urine. *Nephrology* 9 :122-125, 2004.

2. 学会発表

- 1) 染谷朋之介、山田俊幸. アミロイドーシズにおける抗断片化アポ E 抗体の in vivo 応用. 第 48 回日本リウマチ学会総会. 岡山. 2004 年 4 月 15 日, 2004
- 2) Tomonosuke Someya, Toshiyuki Yamada, Mariko Kobayashi, Shinobu C. Fujita. Targeting apolipoprotein E fragments in amyloid deposits; a study on a mouse model. Xth International Symposium on Amyloidosis. Tours, France, April 19, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

関節リウマチ (RA) 合併 AA アミロイドーシスの臨床像の変遷 - 消化管生検スクリーニングによる評価を中心に -

分担研究者 高杉潔 道後温泉病院リウマチセンター内科

共同研究者 奥田恭章 道後温泉病院リウマチセンター内科

研究要旨 RA 治療の変化に伴って合併症である AA アミロイドーシスの臨床像に変化が起きているかを検討した。1990 年から 2003 年に行った上部消化管生検によるスクリーニングにて診断された AA アミロイドーシスを 1990 年から 1996 年までの 7 年間に診断された症例 (前期群) と 1997 年から 2003 年までの 7 年間に診断された症例 (後期群) の 2 群に分け、それぞれの期間における RA における AA アミロイドーシスの合併頻度、また、2 群における RA 発症から AA アミロイドーシスの診断までの罹病期間、RA 発症年齢と AA アミロイドーシス診断年齢、生存率、死因についてそれぞれ比較、調査を行った。1.後期群において新規アミロイドーシスの合併頻度は有意に低下が認められた ($p=0.0155$)。2.アミロイド診断までの平均 RA 罹病期間は後期群において有意の期間の延長が認められた ($p=0.036$)。3.RA 発症年齢は前期群と後期群の間で差は認められなかった。4.アミロイド診断年齢は、後期群において有意に高齢であった ($p=0.0164$)。5.アミロイド診断時からの 5 年生存率は、後期群で若干の改善が認められたが有意差はなかった ($p=0.7609$, Logrank)。6.死亡症例の主な死因は、腎不全と感染症であったが、腎不全は前期に対して後期で減少し、感染症は後期で増加した。以上より、RA 治療の変化、進歩に伴い、AA アミロイドーシスの発症率の低下、アミロイド発症までの期間の延長、死因の変化が認められた。

A. 研究目的

当院では AA アミロイドーシスの早期診断及び管理を行うために 1989 年 8 月より約 15 年にわたり上部消化管生検によるスクリーニングを行ってきた。この間、RA の治療においてメトトレキサート (MTX) の使用法の進歩、抗リウマチ剤併用の頻度の増加、ステロイド使用の工夫などが行われてきた。RA 治療の変化に伴って合併症である AA アミロイドーシスの臨床像に変化が起きているかを検討した。

B. 研究方法

1990 年から 2003 年に行った上部消化管生検によるスクリーニングにて診断された AA アミロイドーシスを 1990 年から 1996 年までの 7 年間に診断された症例 (前期群) と 1997 年から 2003 年までの 7 年間に診断された症例 (後期群) の 2 群に分けた。それぞれの期間における RA における

AA アミロイドーシスの合併頻度、また、2 群における RA 発症から AA アミロイドーシスの診断までの罹病期間、RA 発症年齢と AA アミロイドーシス診断年齢、生存率、死因についてそれぞれ比較、調査を行った。

(倫理面への配慮)

上部消化管内視鏡及び生検は、患者への説明と同意のもとに行った。

C. 研究結果

1.前期群の新規アミロイド合併頻度は未診断症例 1893 例中 144 例 (7.83%)、後期群は同 2282 例中 131 例 (5.74%) であり有意に合併頻度の低下が認められた ($p=0.0155$) (図)。

2.アミロイド診断までの平均 RA 罹病期間は前期群平均 16.8 ± 9.4 年であるのに対して後期群は平均 19.5 ± 11.7 年と有意の期間の延長が認められた ($p=0.036$) (表)。

3. RA 発症年齢は前期群において 46.69 ± 13.7 歳、後期群は 46.68 ± 14.46 歳 ($p=0.9974$) で差は認められなかった。アミロイド診断年齢は前期群 63.44 ± 10.44 歳に対して、後期群は 66.43 ± 10.12 歳と有意に高齢であった ($p=0.0164$) (表)。

4. アミロイド診断時からの 5 年生存率は前期群 63.0%、後期群 67.7% であり、後期群で若干の改善が認められたが、有意差はなかった ($p=0.7609$, Logrank)。

5. 死亡症例は前期 77 例、後期 40 例であった。主な死因は、腎不全と感染症であったが、腎不全は前期 19 例 (24.5%) に対して後期 7 例 (17.5%) に減少し、感染症は前期 20 例 (26%) から後期 16 例 (40%) に増加した。

D. 考察

当院における過去 15 年の RA 治療の変化は主なものとして以下の 3 点をあげることができる。まず、抗リウマチ剤 (DMARDS) の併用療法の増加である。1992 年の当院における併用療法の頻度は、約 6% にすぎなかったが、2000 年以降は約 40% で推移しており、MTX を中心とする step-up 併用によってより強力な RA 治療を行っている。次に MTX の使用法の変化あるいは進歩である。1990 年代前半と 2000 年以降とでは使用頻度の上では約 40% で大きな差は認めないが、前者では多くの DMARDS が無効の進行期の症例に主に用いていたのに対して、後者では活動性の高い症例にはより早期より積極的に使用するようになった。最大使用量も週 7.5mg/週までであったのが、2000 年以降は葉酸を併用するなどして 15mg/週くらいまで使用するようになった。さらに、3 つ目の変化としてステロイド使用量の増加が考えられる。難治性の病態に対しては bridge therapy として 10mg/日以上ステロイドも積極的に使用するようになった。これらの治療

戦略の変化が、今回の調査でのアミロイドーシス発症頻度の減少、発症までの期間の延長に結びついていると考えられる。一方、死因としての感染症の増加は、今後さらに生物製剤の導入などで治療が強力になってゆくであろう AA アミロイドーシス合併 RA の治療において、抗菌剤の予防投与などのより積極的な感染症対策を検討してゆく必要があると思われる。

E. 結論

RA 治療の変化、進歩に伴い、AA アミロイドーシスの発症率の低下、アミロイドーシス発症までの RA 罹病期間の延長が認められた。一方、アミロイドーシス合併 RA における感染症死の増加はより積極的な感染症対策の検討を要すると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 奥田恭章、高杉潔：AA アミロイドーシスの治療、第 15 回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会、岡山、11.13、2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

図. RAにおけるAAアミロイドーシス合併の頻度

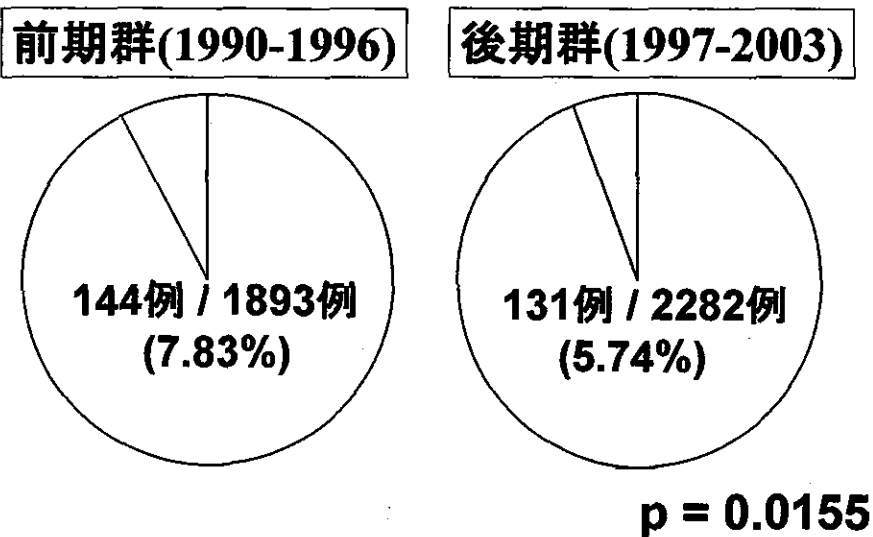


表. 臨床背景の比較

	前期群	後期群	p
Amyloid 診断時年齢	63.4 ± 10.4	66.4 ± 10.1	0.0164
RA発症年齢	46.7 ± 13.7	46.7 ± 14.5	0.9974
Amyloid 診断までの RA罹病期間	16.8 ± 9.4	19.5 ± 11.7	0.036

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

中性 pH での $\beta 2$ -ミクログロブリン関連アミロイド線維伸長に 及ぼす界面活性剤の影響

分担研究者 内木 宏延 福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域

共同研究者 山本 卓****、山口 格*、長谷川 一浩*、大越 忠和*、木原 美穂**、
 後藤 祐児**、下条 文武***

福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域 (第二病理)*、

大阪大学蛋白質研究所・蛋白質溶液学部門**、

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 $\beta 2$ -ミクログロブリン ($\beta 2$ -m) 関連アミロイドーシスは、長期透析患者の全身組織、特に骨関節組織に高率に発症する。われわれはこれまで、 $\beta 2$ -m アミロイド線維 (fA $\beta 2$ M) の試験管内伸長反応系を開発し、反応機構を検討してきた。従来は酸性条件下で伸長反応を行ってきたが、近年、トリフルオロエタノール、あるいは、生体内界面活性物質のアナログであるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を臨界ミセル濃度付近で用いて $\beta 2$ -m を部分変性することで、中性 pH で線維を伸長する反応系を開発し報告した。今年度は $\beta 2$ -m に対する SDS の効果を更に詳細に解析した結果、臨界ミセル濃度付近の SDS は $\beta 2$ -m に対し β -sheet から α -helix/random 構造型へのゆっくりとした構造変化を生じさせることを解明した。また、中性・SDS 存在下で伸長させた線維を seed として再び伸長させることを繰り返すこと (継代) により伸長効率の良い線維を選択的に取得することが可能となった。上記のような検討により、中性 pH 緩衝液中での界面活性剤による fA $\beta 2$ M 線維伸長に必要な諸条件が解明されてきた。これらの結果を利用して線維伸長効果を示す生体界面活性物質の探索を進めている。

A. 研究目的

$\beta 2$ -ミクログロブリン ($\beta 2$ -m) 関連アミロイドーシスは、長期透析患者の全身組織、特に骨関節組織に高率に発症する。我々は、 $\beta 2$ -m 関連アミロイド線維 (fA $\beta 2$ M) をはじめとする各種の試験管内アミロイド線維の形成反応は、重合核依存性重合モデルに従うことを明らかにした。このモデルは重合核形成相と線維伸长相から構成される。重合核あるいは既に形成された線維が存在すると、それらをシードとして一次反応速度論形式に従い線維が速やかに伸長する。

我々はこれまで fA $\beta 2$ M 線維の試験管内アミロイド線維の伸長反応について、下記の諸点を解明してきた。(1) 線維は酸性 pH で速やかに伸長するが、中性 pH では伸長せずむしろ脱重合する。(2) fA $\beta 2$ M 線維の最初期沈着部位である軟骨組織に豊富に存在するグリコサミノグリカン、プロテオ

グリカン、およびヘパリンは酸性 pH でアミロイド線維形成反応を促進し、中性 pH での脱重合反応を抑制する。(3) トリフルオロエタノールを用いて $\beta 2$ -m を部分変性することで、中性 pH で線維が伸長する。またこの際、陰性荷電を有するグリコサミノグリカン (ヘパリン等) が線維を安定化し、伸長反応を促進する。(4) 生体界面活性物質アナログと考えられるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) が中性 pH での fA $\beta 2$ M 伸長・安定化効果を有する。また、この効果を示すためには、SDS の陰性極性基が必要である。以上の結果は透析患者の生体内における $\beta 2$ -m 関連アミロイド線維形成・沈着において多様な生体分子が線維を安定化させたり、 $\beta 2$ -m をアミロイド原性の立体構造に変化させることにより、線維を伸長させていることを示唆している。本年度は生体内で SDS と同様の効果を有する生体界面活性物質、特にリン脂

質などの探索の試みとその為の準備を行った。また、 β 2-m に対する SDS の効果を更に詳細に解析した。

B. 研究方法

1. 中性 pH での fA β 2M 伸長過程に及ぼす SDS の効果の解析; 30 μ g/ml fA β 2M (seed) - 25 μ M recombinant β 2-m (r- β 2-m) を含む 50 mM phosphate-100 mM NaCl (pH 7.5) (PBS) 溶液に 0-10 mM の SDS・界面活性剤を添加し、37°C で 0-120 時間インキュベートし、線維伸長をチオフラビン T (ThT) 蛍光法により測定した。

2. β 2-m の立体構造変化に対する SDS の効果解析; 25 μ M r- β 2-m を含む PBS に 0-10 mM SDS を添加し、円二色性偏光 (CD) スペクトルを測定し、CDPro software Package (Sreerama N and Woody RW, Anal Biochem, 287, 252-260, 2000) により 2 次構造解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は試薬を用いての試験管内実験であり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. β 2-m の立体構造変化に及ぼす SDS の効果の解析; β 2-m に臨界ミセル濃度(0.7 mM)付近の SDS (0.2-1.0 mM) を添加すると、中性 pH で線維が伸長する。一方、臨界ミセル濃度を大きく超える SDS (1.5 mM 以上) には促進効果はなく、反対にシードの線維も脱重合させた。CD スペクトルを詳細に解析することにより、臨界ミセル濃度を境にして、 β -sheet 構造含量が約 50% から 20% にまで急に低下し、反対に α -helix と random 構造の含量が増加することが判明した。また、この構造変化は、数時間の遅い経過をとって平衡に達する。さらに、0.5 mM SDS 存在下では β 2-m の一部が可逆的な oligomer を形成していることが、高速液体クロマトグラフィー分析ならびに分析用超遠心法により判明した。

2. 継代による線維の成熟効果; 酸性で伸長した線維を中性の SDS 存在下で伸長する場合、seed としての効率が良くない場合がある。中性・SDS 存在下で伸長させた線維を seed として再び伸長

させることを数回繰り返すこと(継代)で、伸長速度、最終生成量が共に増加するようになる。

3. 生体内において SDS と同様の効果を有する界面活性物質の探索を行うため、極性基と脂肪酸鎖長の異なるリン脂質を系統的に蒐集し、これらを用いて溶解・分散法の検討、臨界ミセル濃度測定などを進めている。

D. 考察

臨界ミセル濃度付近の SDS は β 2-m monomer に対しゆっくりとした、しかし特異的な構造変化を生じさせる。この部分的に不安定化した状態の β 2-m が既に存在する線維を鋳型にして、立体構造を変化させ、結果的に線維が伸長すると考えられる。継代による線維の成熟現象は、複数の型の線維が存在し、継代により効率の良い型の線維が選択的に増幅され、結果的にその型の線維の含有率が増加する為である可能性が考えられる。上記のような検討により、中性 pH 緩衝液中での界面活性剤による fA β 2M 線維伸長に必要な諸条件が解明されてきた。これらを利用して線維伸長効果を示す生体界面活性物質を探索し、患者組織における線維形成・沈着機構を解析することを検討している。

E. 結論

臨界ミセル濃度付近の SDS による中性 pH における β 2-m アミロイド線維の伸長機構について、monomer に対する効果の解析を進めると共に、伸長効率の良い seed の調製法を見出した。これらにより中性 pH 緩衝液中での界面活性剤による fA β 2M 線維伸長に必要な諸条件が明らかになってきており、SDS と類似した効果を示す生体内物質の探索を進めている。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto S, Hasegawa K, Yamaguchi I, Tsutsumi S, Kardos J, Goto Y, Gejyo F, Naiki H. Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce

the extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry*. 43(34): 11075-11082, 2004

- 2) Kihara M, Chatani E, Sakai M, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. Seeding-dependent maturation of beta 2-microglobulin amyloid fibrils at neutral pH. *J Biol Chem* (in press)

2. 学会発表

- 1) Naiki, H.: Molecular interactions in the formation and destabilization of Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. Joint Meeting of the 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and

the 47th Annual Meeting of the Japanese Society for neurochemistry ISN Symposium . Neurochemical aspects and approaches for neurological diseases. 2004,9,21-23, Osaka.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。