

2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図 1 分化誘導前後での U937 細胞

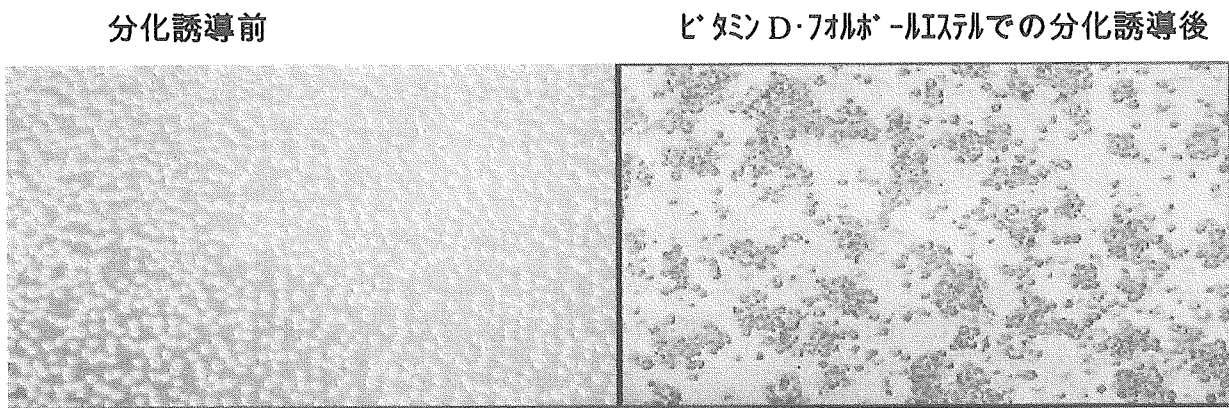


図 2 破骨様細胞へ蛋白の添加による活性酸素種・酒石酸耐性酸フォスファターゼ産生

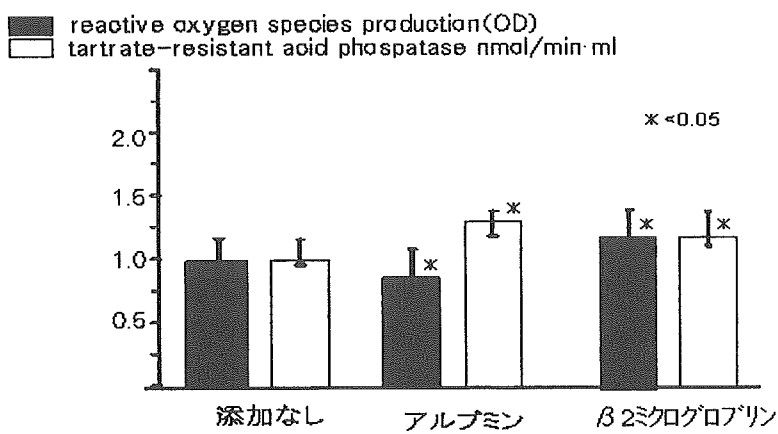
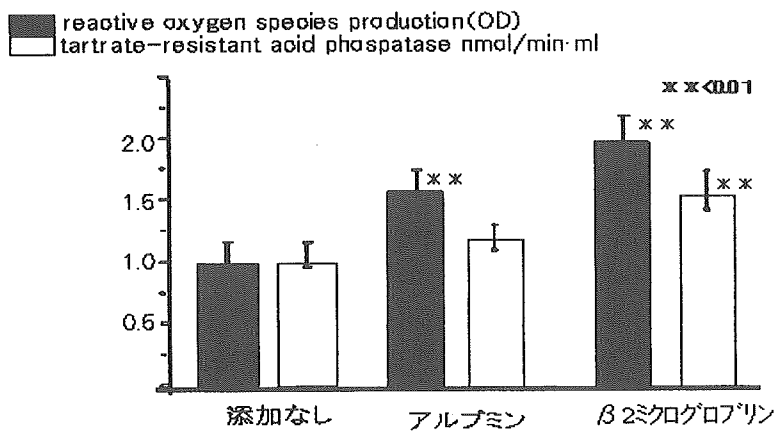


図 3 破骨様細胞へ AGE 化蛋白の添加による活性酸素種・酒石酸耐性酸フォスファターゼ産生



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

## 透析アミロイドーシス滑膜病変における macrophage migration inhibitory factor (MIF)に関する検討

分担研究者 下条文武 新潟大学大学院 腎膠原病内科学分野

共同研究者 齋藤徳子\*、宮崎 滋\*\*、鈴木正司\*\*、森田 俊\*\*、平沢由平\*\*

\*新潟大学大学院 腎膠原病内科学分野、\*\*信楽園病院腎センター

**研究要旨** MIF は炎症の局所において、主に活性化 T リンパ球、マクロファージ (Mφ) から産生され、IL1、TNF- $\alpha$ などの産生を亢進させる重要なサイトカインである。慢性関節リウマチ (RA) では、MIF は、血清、関節液中に高濃度に存在し、滑膜病変の進行に関与していると報告されているが、透析アミロイドーシスについての報告はまだない。そこで、今回我々は、透析アミロイドーシス滑膜病変における MIF の発現とその役割について検討した。 $\beta_2$ M アミロイド滑膜病変における免疫組織化学的検討では、MIF は滑膜表層細胞、滑膜表層下細胞、アミロイド周囲浸潤 Mφ、異物型多核巨細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に陽性であった。一方、透析患者 84 名、健常者 34 名の血清中 MIF、 $\beta_2$ M、SAA、CRP 濃度の測定では、透析患者は健常者に比し、MIF、 $\beta_2$ M、SAA、CRP 値はすべて有意に高値であった。透析 20 年以上では症状の有無は別として、 $\beta_2$ M アミロイドの沈着は避けられない。透析歴 20 年以上の患者は 20 年未満の患者に比して、MIF 値は有意に高値であった。以上より、MIF は透析アミロイドーシス滑膜病変の進展に関与している可能性がある。

### A. 研究目的

MIF (Macrophage migration inhibitory factor) は、エンドトシンや視床下部-下垂体-副腎系が作動するストレスなどにて、下垂体前葉から分泌され、コルチコステロイドに拮抗作用を有するホルモンの一つである。また、炎症の局所においては、主に活性化 T リンパ球、マクロファージ (Mφ) などから産生され、Mφ のランダムな遊走を阻止し、IL-1、TNF- $\alpha$ などの産生を亢進させる pro-inflammatory cytokine として働く。一方、LPS や TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  は Mφ における MIF の分泌や合成を誘導する。

X-ray crystallography にて、MIF は 114 アミノ酸からなる分子量 12343Da のサブユニットの三量体 homotrimer であると報告されている。エンドトキシン血症時には大量に分泌され、他の炎症性サイトカインと共にショックに至る生体の反応を引き起こす。動物実験では、致死的なエンドトキシン血症であっても、抗 MIF 抗体投与により 100% 生存が可能であった。MIF は

一連のサイトカインカスケードの上流に位置していると考えられる。さらに遅延型過敏反応、細胞の分化増殖、血管新生、神経細胞の再生、組織損傷修復などにも関与する多機能なサイトカインである。

また、慢性関節リウマチ (RA) 患者の血清、関節液中には高濃度に存在し、浸潤 T リンパ球、Mφ、滑膜細胞、血管内皮細胞などで産生され、滑膜病変の進行に関与していることが報告されている。

透析アミロイドーシスにおいても、アミロイド沈着部位への Mφ の浸潤と IL-1、TNF- $\alpha$ などのサイトカインの産生が病変の進行に重要である。また、エンドトキシンの混入を防いで、透析液の清浄化を図ること、生体適合性のよいダイアライザーを使用することは透析アミロイドーシスの発症を遅延させる効果があることが知られている。局所の炎症と全身的なストレスに関わる MIF は、長期透析合併症の一つである透析アミロイドーシスにおいてもその発症、進展

に何らかの影響を与えている可能性が考えられるが、まだ報告はない。透析アミロイドーシスの炎症進展のメカニズムを解明する一手段として、透析アミロイドーシス滑膜病変における MIF の発現とその役割について検討した。

## B. 研究方法

### (1) 免疫組織学的検討

透析歴 10 年以上の患者の手根管症候群の手術で得られた  $\beta_2$ M アミロイドアミロイド滑膜病変 (n=6) における、CD68、MIF、 $\alpha$ SMA の発現について、凍結切片を用いて免疫組織学的に検討した。

一次抗体として、Murine monoclonal anti-human CD68、Murine monoclonal anti-human MIF、Murine monoclonal anti-human  $\alpha$ SMA を用いた。

### (2) MIF 血中濃度に関する検討

慢性腎不全で血液透析療法を受けている患者 84 名 (男性 56 名、女性 28 名)、健常者 34 名 (男性 19 名、女性 15 名) を対象とし、インフォームドコンセントの上、採血を行い、MIF、 $\beta_2$ M、SAA、CRP の血清中濃度を測定した。透析患者の場合、透析開始直前に採血した。なお、患者はすべて、ハイパフォーマンス膜ダイアライザーを使用していた。慢性腎不全の原疾患は、慢性腎炎 61 名、腎硬化症 9 名、糖尿病性腎症 4 名、慢性腎盂腎炎 2 名、紫斑病性腎炎 2 名、膜性腎症 1 名、多発性嚢胞腎 1 名、腎結核 1 名、急性腎不全 1 名、その他 2 名。透析期間は  $164 \pm 126$  ヶ月で、透析歴 1 年以上 4 年未満が 26 名、透析歴 8 年以上 13 年未満が 29 名、透析歴 20 年以上が 29 名であった。

MIF の測定は human MIF ELISA development system ( Duo Set ) ( R&D systems ) を用いた sandwich ELISA 法で行った。 $\beta_2$ M は比ろう法、SAA は Latex 凝集免疫法、CRP は Latex 凝集比濁法にて測定した。

## C. 研究結果

### (1) 組織学的所見

手根管滑膜病変では、滑膜表層細胞の増殖、多層化、滑膜表層下細胞の増加、 $\beta_2$ M アミロイドの沈着、アミロイド周囲への CD68 陽性細胞

の浸潤、血管の増生を認めた。

連続切片による検討では、MIF は、滑膜表層細胞、滑膜表層下細胞に陽性で、CD68 陽性滑膜表層細胞の大部分が MIF 陽性であり、CD68 陰性滑膜表層下細胞の一部も MIF 陽性であった。滑膜表層下組織に沈着したアミロイド周囲 CD68 陽性 M $\phi$  の多くは MIF 陽性であり、MIF 陽性の多核巨細胞も認めた。しかし、CD68 陽性でも MIF 陰性の細胞もあり、CD68 陽性細胞が必ずしも MIF 陽性ではなかった。

MIF がまったく陰性の血管もあったが、内皮細胞または、平滑筋細胞が MIF 陽性の血管も認められた。血管内皮細胞のみ MIF 陽性の場合や、血管平滑筋細胞のみ陽性の場合、両者とも MIF 陽性の場合があった。

### (2) 血中濃度に関する検討

透析患者は健常者に比し、血清中 MIF、 $\beta_2$ M、SAA、CRP 値が有意に高値であった。透析歴 20 年以上の患者は 20 年未満の患者に比して、血清中  $\beta_2$ M 値に有意差はなかったが、MIF 値は有意に高値であった。透析条件による除去の程度の違いを少しでも是正するため、MIF/ $\beta_2$ M 値も検討したが、MIF 値と同様の結果であった。

なお、HD 4 年未満の患者群においてのみ、 $\beta_2$ M と MIF に有意な正の相関を認めた。

( Spearman の順位相関  $P=0.0038$  )

## D. 考察

MIF は内因性ステロイドにより誘導され、ステロイドの抗炎症作用に拮抗し、平常状態ではバランスがとれている。炎症の場では MIF は M $\phi$  などから産生され、内因性ステロイドの抗炎症作用を上回り、M $\phi$  などによる TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 などの産生を誘導する。

RA では血清中や関節液中の MIF 濃度は高く、滑膜の MIF 免疫染色陽性面積は臨床症状を反映する血清 CRP 濃度と相関するという報告がある。また、RA 患者から採取した Fibroblast 様培養滑膜細胞において、MIF は MMP-1、MMP-3 の mRNA の発現を誘導することが報告され、MIF による MMP-1、MMP-3 の産生亢進が関節破壊を進行させている可能性がある。

今回の検討では透析歴 20 年以上群は 20 年未満群に比し、血中 MIF 値は有意に高値であったが、SAA、CRP 値に有意差はなかった。透析アミロイドーシスの病変の広がりや一部の沈着局所における限局した炎症反応は、RA ほどには SAA や CRP 値に反映されにくいと考えられる。しかし、MIF はアミロイド周囲に浸潤した Mφ に陽性であり、炎症が起こっている局所においては、RA と同様に TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-1、MMP-3 などの誘導を介して炎症の進展に関与していると考えられる。

MIF は receptor が同定されておらず、代謝経路も不明である。分子量が  $\beta_2$ M より大きいこと、透析歴 1 年以上 4 年未満の患者において、MIF と  $\beta_2$ M の間に有意な正の相関を認めたこと、透析患者で有意に高値であることから、MIF の代謝に腎が関与し、腎不全では MIF が蓄積している可能性がある。透析歴 20 年以上になると、たとえ症状はなくても、 $\beta_2$ M アミロイドの沈着は必発である。透析歴 20 年以上の群ではアミロイド沈着局所での Mφ による MIF 分泌が亢進し、血清 MIF 値がさらに上昇すると考えられる。

## E. 結論

MIF は透析アミロイドーシス滑膜病変の進展に局所で関与している可能性がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamamoto S, Gejyo F: Historical background and clinical treatment of dialysis-related amyloidosis. *Biochemica et Biophysica Acta* 1753: 4-10, 2005
- 2) 山本 卓、下条 文武：透析アミロイドーシスはどんな症状？ どうして手根管症候群になるの？ *透析ケア* 11: 54-55, 2005
- 3) 山本 卓、下条 文武：透析アミロイドーシス（飯野 靖彦、榎野 博史 監）腎疾患・透析最新の治療 2005-2007（南江堂・東京）：303-305, 2005
- 4) 齋藤 亮彦、竹田 徹朗、下条 文武：腎外性  $\beta_2$ -ミクログロブリン代謝の可能性（伊藤 克己、遠藤 仁、御手洗哲也、東原 英二、秋澤 忠男 監）腎疾患・透析最新の治療 2005-2007（中

外医学社・東京）：121-125, 2005

- 5) 下条 文武：透析アミロイドーシス—発症機序解明と治療戦略—。日本内科学会雑誌 94(臨時増刊号): 56-60, 2005
- 6) 齋藤 亮彦、竹田 徹朗、下条 文武：腎外性  $\beta_2$ -ミクログロブリン代謝の可能性（伊藤 克己、遠藤 仁、御手洗哲也、東原 英二、秋澤 忠男 編）Annual Review 腎臓 2005（中外医学社・東京）121-125, 2005
- 7) 山本 卓、下条 文武：透析関連アミロイドーシス（石原 得博 監修、池田 修一 編）アミロイドーシスの基礎と臨床（金原出版・東京）179-185, 2005
- 8) 山本 卓、下条 文武：A-85 透析アミロイドーシスの原因、予防と治療。（飯田 喜俊、椿原美治 編）専門医に聞きたいコメディカルのための腎不全・透析療法 Q&A101（医歯薬出版・東京）172-173, 2005
- 9) 下条 文武：宿題報告 透析アミロイドーシス—発症機序解明と治療戦略—。日本内科学会雑誌 94: 34-43, 2005
- 10) 山本 卓、下条 文武：6. 透析アミロイドーシス *医薬ジャーナル* 41: 103-106, 2005
- 11) 下条 文武：New uremic toxins と血液浄化療法— $\beta_2$ -m アミロイド症を中心に— *HDF 療法'05*（腎と透析 別冊）59: 8-11, 2005

### 2. 学会発表

- 1) 下条 文武：宿題報告 透析アミロイドーシス—発症機序解明と治療対策—（第 102 回日本内科学会講演会 2005.4.7~2005.4.9 大阪）
- 2) 山本 卓、風間 順一郎、丸山 弘樹、成田 一衛、下条 文武：30 年以上の長期透析患者における透析アミロイドーシスの合併に関する調査（第 50 回日本透析医学会学術集会・総会 2005.6.23~2005.6.26 横浜）
- 3) 齋藤 徳子、宮崎 滋、成田 一衛、齋藤 和英、鈴木 正司、森田 俊、平澤 由平、下條文： $\beta_2$ -M アミロイド骨関節病変における vascular endothelial growth factor (VEGF) と matrix metalloproteinase (MMP)-1 に関する検討（第 50 回日本透析医学会学術集会・総会 2005.6.23~2005.6.26 横浜）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生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

## 透析アミロイドーシスに関する患者要因の分析

分担研究者 高市憲明 虎の門病院腎センター

共同研究者 竹本文美、乳原善文 虎の門病院腎センター

**研究要旨** 透析アミロイドーシスは長期間透析を継続している患者に発症し、患者血清中に高濃度に存在する $\beta 2$  ミクログロブリン( $\beta 2$ MG)が様々な組織に沈着して発症すると考えられている。発症には透析様式や透析膜などの透析条件や患者固有の条件が関連していると考えられている。できる限り共通の透析条件を有する患者を対象とすることによって、透析アミロイドーシスの発症に関する患者要因を明確にすることを目的とした。虎の門病院分院で 15 年以上 25 年未満継続して血液透析を実施している患者を対象として、アミロイドスコアおよび手根管症候群に対する手術歴の有無に及ぼす患者要因の影響を検討した。患者要因として、透析導入時年齢、透析期間、血清 $\beta 2$ MG 濃度等の検査成績など検討した。長期間の患者状態を反映させる目的で、患者の検査成績は個々の患者の 5 年間の平均値を用いた。アミロイドスコアには加齢がリスクファクターと考えられた。手根管症候群の発症に関しては、高カリウム血症がリスクファクターである可能性が示唆された。

### A. 研究目的

透析アミロイドーシスの発症は、透析継続年数が長期化するに従って増加する。透析アミロイドーシスのひとつである手根管症候群の発症は血液透析が 10 年以上継続すると次第に発症頻度が増加し、30 年以上継続するとほぼ全例に発症することが下条らにより示されている。透析患者血清中に高濃度に存在する $\beta 2$  ミクログロブリン( $\beta 2$ MG)が様々な組織に沈着して発症すると考えられている。その発症には透析様式や透析膜などの透析条件や透析導入時年齢や透析継続期間などの患者固有の条件が関連していると考えられている。透析条件は長期間透析を継続する間に变化する。そこで、できる限り共通の透析条件を有する患者を対象とすることによって、透析アミロイドーシスの発症に関する患者要因を明確にすることを目的とした。

### B. 研究方法

現在虎の門病院分院で血液透析を継続し、透析継続期間が 15 年以上 25 年未満の患者を対象とした。対象となる患者は 22 名存在した。透析アミロイドーシスの程度は下条らの方法に従っ

て手根管手術、骨のう胞、関節痛の有無によって 0 点から 7 点にスコア化した。

患者要因として、透析導入時年齢、透析継続期間、血清 $\beta 2$ MG 濃度等の各種検査成績、透析効率等を検討した。患者の検査成績等は長期間の透析を継続する間に無視できない変動を認めるので、長期間の患者状態を反映させる目的で、個々の患者において 5 年間の検査成績の平均値を用いた。

アミロイドスコアと各種患者要因の単純相関、全ての因子を対象としたステップワイズ回帰分析を実施した。手根管手術歴の有無で患者を 2 群に分け、両群間の患者要因に何らかの差異があるかどうかを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究自体は、後方視的観察研究であり、用いる成績も日常の診療目的で実施した成績のみである。また、また公表に際しては一切の個人情報には含まれず倫理的に問題ない。

### C. 研究結果

対象とした患者のアミロイドスコアのヒストグ

ラム（図1）では極端な偏りは認めなかった。各種患者要因との相関係数、P値を表1に示した。なお、 $\beta$ 2MG除去率は、 $\beta$ 2MGが細胞外液に分布し、細胞外液の体重に対する比率の変動が透析前後で無視しうる程度と仮定し、透析前後の血清中 $\beta$ 2MG濃度、体重変化より推定した。

アミロイドスコアとの相関関係において0.05以下のP値を示したものは、現在の年齢、透析導入時年齢、総蛋白濃度（TP）、アルブミン濃度（Alb）のみであり、 $\beta$ 2MG濃度、 $\beta$ 2MG除去率、透析年数には有意な要因とはならなかった。なお、TP、Albは年齢との相関が強いため、独立した要因ではない可能性が高かった。

表1に示した全要因を用いてステップワイズ回帰分析を実施すると、透析導入時年齢(F:7.3)と現在の年齢(F:7.2)が有意な要因として抽出された。

手根管症候群の手術歴の有無により患者を2群にわけ患者要因を分析した。各群の平均値および標準偏差、P値を表2に示した。年齢に加えて、血清K値が比較的低いP値を示した。血清K値の関連をさらに検討する目的で、手根管症候群発症の発症のリスクファクターとして広く認識されている透析導入時年齢、透析期間に加えて今回示唆された血清K値を独立変数とし、手根管症候群手術歴の有無を従属変数としてロジスティック回帰分析を実施したところ、血清K値（P:0.04）は導入時年齢(P: 0.06)以上に有意な要因となった。透析期間(P: 0.26)は有意な要因とはならなかった。

#### D. 考察

今回の観察からアミロイドーシス発症の患者要因をしては、加齢が重要な要因であることが明らかとなった。手根管症候群の発症に関しては加齢に加えて、高 K 血症がリスクファクターである可能性が示唆された。但し、血清 K 値は

酸塩基平衡状態による影響をうけ得るので、血清 K 値酸塩基平衡異常を反映している可能性に関してさらに検討する必要がある。

#### E. 結論

透析アミロイドーシスの発症には加齢がリスクファクターである。手根管症候群の発症には高カリウム血症もリスクファクターとなる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
該当するものなし。

2. 学会発表

1) 高市憲明：透析アミロイドーシス発症に関する患者要因の分析，厚生労働省 アミロイドーシスに関する調査研究班、アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 平成 17 年度 合同研究報告会、東京、2 月 9 日-2 月 10 日、平成 18 年。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
該当せず。

2. 実用新案登録  
該当せず。

3. その他  
特記すべきことなし。



図1 アミロイドスコアのヒストグラム

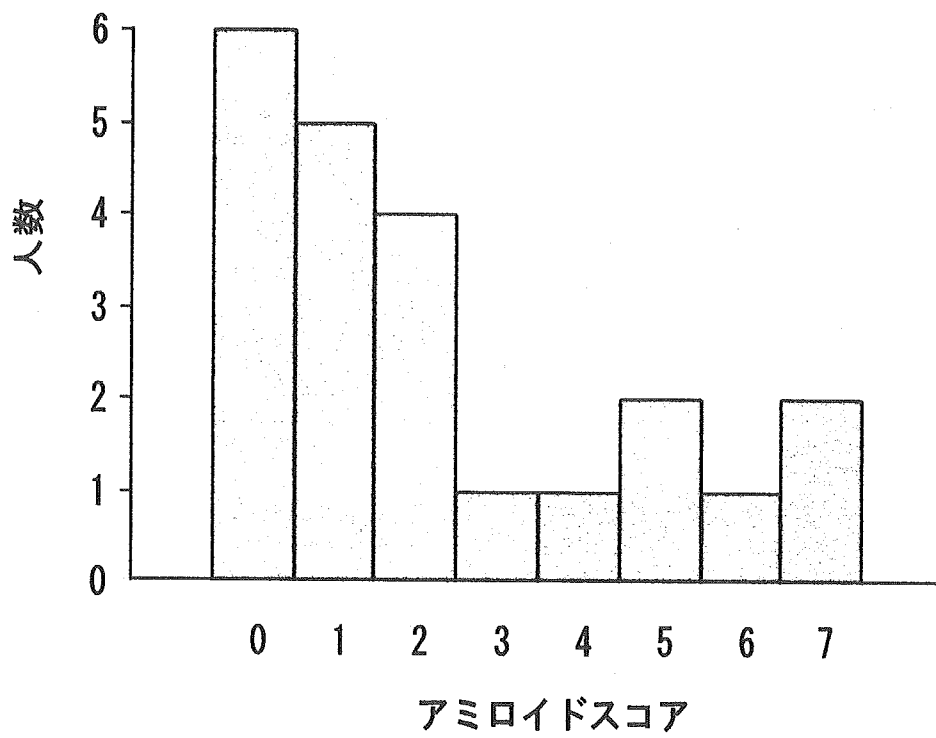


表1 各種患者要因とアミロイドスコアとの相関係数及びP 値

	相関係数	p 値
年齢	0.515	0.013
透析導入時年齢	0.517	0.013
透析年数	-0.059	0.798
$\beta$ 2MG値	-0.285	0.202
$\beta$ 2MG除去量	0.006	0.978
$\beta$ 2MG除去率	-0.081	0.725
TP	-0.422	0.049
Alb	-0.462	0.029
BUN	-0.255	0.257
Cr	-0.209	0.356
CRP	0.093	0.685
K	0.259	0.248
Hb	-0.146	0.522
補正Ca	0.263	0.241
P	0.171	0.451
補正Ca x P	0.247	0.272
徐水率	0.047	0.837
透析回数	0.16	0.944
一回透析時間	-0.1	0.966
Kt/V	-0.126	0.581
TPと年齢	-0.243	0.281
Albと年齢	-0.554	0.007

表 2 手根管手術歴の有無による患者要因の差異(mean ± SD)

	手根管手術歴あり		手根管手術歴無し		P値
年齢	63.6 ±	4.6	54.4 ±	10.9	0.046
透析導入時年齢	43.8 ±	6.1	34.8 ±	11.1	0.061
透析年数	19.9 ±	4.0	19.6 ±	3.0	0.880
β 2MG	32.4 ±	4.3	32.2 ±	2.9	0.586
β 2MG除去量	259.7 ±	56.6	250.8 ±	48.4	0.708
β 2MG除去率	0.719 ±	0.041	0.721 ±	0.058	0.959
TP	6.47 ±	0.145	6.69 ±	0.318	0.103
Alb	3.16 ±	0.184	3.36 ±	0.244	0.066
BUN	71.8 ±	14	73.6 ±	11.3	0.758
Cr	11.8 ±	2.4	12.5 ±	2.0	0.491
CRP	0.369 ±	0.39	0.25 ±	0.335	0.470
K	5.4 ±	0.5	5.1 ±	0.3	0.077
Hb	9.9 ±	0.5	10.2 ±	0.7	0.447
補正Ca	10.2 ±	0.5	10 ±	0.5	0.347
P	5.6 ±	0.7	5.3 ±	0.6	0.424
補正Ca x P	56.8 ±	7.5	53.3 ±	7.1	0.305
徐水率	4.7 ±	1.5	4.3 ±	0.9	0.396
透析回数	678 ±	104	707 ±	109	0.564
一回透析時間	4.8 ±	0.7	4.6 ±	0.7	0.505
Kt/V	1.7 ±	0.3	1.7 ±	0.4	0.973

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

## マウス老化アミロイドーシス関連 apoA-II のアミロイド線維形成機構

分担研究者 樋口京一 信州大学大学院 医学研究科 加齢生物学分野

共同研究者 澤下仁子\*、亀谷富由樹\*\*、森 政之\*

\*信州大学大学院 医学研究科 加齢生物学分野

\*\*東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究部門

**研究要旨** マウス老化アミロイドーシスにおけるアミロイド線維形成機構の解明を目的とし、原因タンパク質であるアポリポタンパク質 A-II (apoA-II) の合成部分ペプチドを用い、*in vitro* における線維重合反応を解析した。N 末ペプチド (1~16 番あるいは 6~16 番) と C 末ペプチド (48~65 番) が共存する時のみ、これらペプチドを 1 : 1 の構成比とした線維が形成し、pH 2.5 の強酸性条件下で最も多量に線維を形成した。一方、16 番目を欠失した N 末ペプチドは線維を形成せず、16 番目の Gln を His に置換した N 末ペプチドも線維形成は極微量であった。さらに、老化アミロイドーシス低発症マウスの B 型 apoA-II の重合反応を解析した結果、高発症マウスの C 型 apoA-II と異なるアミノ酸部位 (5 番と 38 番) は線維形成とは無関係であった。以上の結果から、マウス apoA-II のアミロイド線維の形成は B 型 apoA-II と C 型 apoA-II のアミノ酸組成の相違とは無関係で、両型に共通の 16 番目のアミノ酸 (Gln) を鍵として N 末と C 末配列の相互作用により線維を形成することが示唆された。

### A. 研究目的

マウス老化アミロイドーシスに関連したアミロイドタンパク質であるアポリポタンパク質 A-II (apoA-II) のアミロイド線維形成機構の解明を目的とし、1) 線維形成に関わる apoA-II のアミノ酸配列の解析、ならびに、2) アミロイドーシスの発症頻度と apoA-II の多型との相関性に着目した線維形成頻度・形態変化の相違に関して解析した。

### B. 研究方法

#### 1. 合成ペプチド溶液

マウス apoA-II (78 アミノ酸残基) を N 末側、C 末側、および中間部分の 3 領域に大別し、8~25 アミノ酸残基の合成ペプチド (純度 95.0 % 以上) 21 種類 (プロペプチドを持つ N 末ペプチド含む) を用意した。これら合成ペプチドを DMSO で溶解し、使用直前に精製水で希釈した。

#### 2. 重合反応

水冷下、50~300  $\mu$ M apoA-II 合成ペプチド溶液 (DMSO 濃度 5 %)、50 mM バッファ (pH 2.5

~7.0)、100 mM NaCl の混合液を調製し、37  $^{\circ}$ C で振とう (300 rpm) した。

#### 3. チオフラビン T (ThT) 法

上記 2. の反応液を経時的に分取し、室温下、250 nM ThT 溶液 (50 mM Gly-NaOH 溶液、pH 9.0) と反応させ、直ちに、励起波長 450 nm、測定波長 482 nm にて蛍光強度を測定した。蛍光強度の変化パターンを解析し、線維形成の有無と形成量を推定した。

#### 4. 形態観察

2. の反応液を 1) コンゴレッド染色し、ポジティブであり、かつ、偏光顕微鏡下において緑色を呈すること、また、2) リンタングステン酸染色し、電子顕微鏡にてアミロイド線維様の構造体の存在を確認することにより、線維形成の有無を確定するとともに、その形態を解析した。

#### 5. LC/MS/MS

2. の反応液を 4 $^{\circ}$ C、1.61 x 10<sup>4</sup> g で 3 時間遠心分離し、LC/MS/MS を用いて沈殿 (線維画分) のペプチド組成を解析した。

## C. 研究結果

### 1. 線維形成に関わる apoA-II のアミノ酸配列

老化アミロイドーシス高発症マウスが有する C 型 apoA-II のアミノ酸配列を 3 領域に大別し、それぞれの合成部分ペプチドを用いて、pH 2.5 あるいは 7.0 にて重合反応を行った。反応 13 日後まで ThT 法にて解析したが、ペプチド 1 種類では蛍光強度の増加は無く、また、形態観察からも線維は形成していなかった (図 1A)。そこで、2 種類のペプチドを用いて重合反応を行った結果、N 末ペプチド (プロペプチド + 1~16 番 (c16p)) と C 末ペプチド (48~65 番 (48/65)) の組み合わせでのみ、ThT の蛍光強度が増加した。その変化パターンは、反応開始約 1 時間後までは全く増加せず、その後、一次反応速度論的に増加し、約 6 時間後にプラトーに達する、いわゆる「核形成依存性重合反応モデル」に従っていた (図 1A 右小図)。この反応生成物はコンゴレッドにより赤染し、偏光顕微鏡下で緑色を呈したことから、また、電子顕微鏡によりアミロイド線維様の構造物が多量に存在していたことから、c16p と 48/65 によって線維を形成したことが確認できた。さらに、LC/MS/MS により、両ペプチドが 1:1 の構成比で線維を形成することが明らかになった。c16p と 48/65 は pH 4.5 や 7.0 の反応条件でも線維を形成したが、pH 2.5 の反応条件が最も多量に線維を形成し、いずれの pH で反応させた線維も形態に差異は無かった。

次に、c16p と 48/65 から形成した線維をアミロイド核 (seed) とし、seed 共存時の反応 (線維伸長反応) を行った。その結果、c16p と 48/65 両ペプチドを用いた伸長反応では、ThT の蛍光強度が反応開始直後から一次反応速度論的に増加して約 2 時間後にプラトーに達すること、また、電子顕微鏡観察によって強固な線維が多量に形成していることを確認した。さらに、c16p のみで伸長反応を行った結果、蛍光強度は反応開始直後から増加し、約 72 時間後にプラトーに達した。この反応液を電子顕微鏡で観察した結果、c16p と 48/65 から形成した線維よりも細かい線維が存在していた。一方、48/65 のみでは伸長反応は全く起こらなかった。

c16p および 48/65 の線維形成に重要な領域を

明らかにするため、これらペプチドのアミノ酸を 1~数個ずつ欠失した短ペプチドを用いて重合反応を行った。まず、N 末ペプチドを解析した結果、1) プロペプチドがない N 末ペプチド (c1/16) の重合反応はプロペプチドありの N 末ペプチド (c16p) の反応と全く同等で、同一形態の線維を形成し、2) N 末ペプチドの 16 番目 (Gln) を欠失したペプチド (c15p) の重合反応では線維は形成せず、3) 16 番目を His に置換した N 末ペプチドも線維形成が極微量であった (図 1B, C)。

一方、C 末ペプチドを解析した結果、1) 48/65 より短いペプチド (48/57, 52/61 あるいは 56/65) では線維は形成せず、2) 48/65 のアミノ酸成分が揃う 48/57 + 56/65 の組み合わせであっても線維は形成しなかった。

### 2. アミロイドーシスの発症頻度と apoA-II の多型との相関性に着目した線維形成頻度・形態変化の相違

老化アミロイドーシス低発症マウスが有する B 型 apoA-II (Pro5, Val38) と高発症マウスが有する C 型 apoA-II (Gln5, Ala38) それぞれの合成ペプチドを用い、重合反応の相違を解析した。まず、5 番目のアミノ酸部分を検討した結果、B 型の N 末ペプチド (b16p) では、ThT による蛍光強度の変化パターンと最大強度、コンゴレッド染色像、電子顕微鏡像のいずれも C 型 (c16p) と差異が無かった。そこで、N 末から 5 番目までを欠失したペプチド (両型共通、6/16) を重合反応に用いた結果、b16p、c16p、あるいは c1/16 の反応と同等に ThT による蛍光強度が増大し、電子顕微鏡観察からも多量の線維が存在することが明らかになった (図 1C)。一方、38 番目のアミノ酸部分を検討した結果、1) 38 番を含むペプチド (b32/43 あるいは c32/43) は N 末ペプチド (b16p あるいは c16p) と 48/65 の重合反応に全く影響を与えず、線維の形態変化も起こしておらず、2) c32/43 と N 末ペプチド (c16p)、あるいは c32/43 と 48/65 との重合反応でも蛍光強度の変化が全く起こらなかった。

次に、B 型および C 型それぞれから形成した線維を seed とし、線維伸長反応を行った。その結果、seed もペプチドも、B 型 C 型のいずれも同等に、反応開始直後から ThT の蛍光強度が増加し始

め、約2時間後にはプラトーに達した。これらの反応液を電子顕微鏡で観察した結果、B型もC型も全く同一の形態の線維が形成していた。

#### D. 考察

マウス apoA-II の合成ペプチドを用いてアミロイド線維の重合反応を行った結果、1) 16 番目を含む N 末ペプチドと 48~65 番目までの C 末ペプチドの両者により、「核形成依存性重合反応モデル」に従って線維を形成すること、2) pH 2.5 の反応条件が最も効率良く線維を形成すること、3) N 末と C 末ペプチドが 1 : 1 の構成比で線維を形成することを明らかにした。また、線維伸長過程においては、N 末ペプチドのみであっても反応が進行し、一方で、C 末ペプチドのみでは全く進行しなかったことから、apoA-II の線維形成・伸長過程における N 末配列と C 末配列の役割が異なる可能性が示唆された。

次に、アミロイドーシスの発症頻度が異なるマウスそれぞれが有するB型apoA-IIとC型apoA-IIのアミノ酸組成の相違に着目した解析を行った結果、両型のアミノ酸組成の相違と線維の形成・伸長反応は無関係であることが示唆された。この結果から、アミロイドーシスの発症を制御する因子の探索が必要と考えられる。

我々は、apoA-IIの線維形成機構として、生体内で脂質と相互作用しているapoA-IIが、何らかの因子によって脂質から離れてフリーの状態になり、N末とC末の配列が相互作用してseedを形成し、以後、線維を伸長していく機構を推定している。しかし、本研究において線維形成が容易に進行したpH2.5の環境が生体内でも起こり得る条件であるのかは不確実であり、タンパク質の立体構造を変換させる因子・環境因子の探索が必要である。

#### E. 結論

マウス老化アミロイドーシスに関連したアミロイド線維の形成は B 型 apoA-II と C 型 apoA-II のアミノ酸組成の相違とは関連性が無く、両型に共通の 16 番目のアミノ酸 (Gln) が重要な鍵となり、N 末配列と 48~65 番目までの配列の相互作用によって線維を形成することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1)Tojo K, Tokuda T, Hoshii Y, Fu X, Higuchi K, Matsui T, Kametani F, Ikeda S. Unexpectedly high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. *Amyloid* 12: 103-108, 2005

2)Yan J, Fujii K, Yao J, Kishida H, Hosoe K, Sawashita J, Takeda T, Mori M, Higuchi K. Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice. *Exp Gerontol.* 41: 130-140, 2006

3)Zhang H, Sawashita J, Fu X, Korenaga T, Yan J, Mori M, Higuchi K. Transmissibility of mouse AApoAII amyloid fibrils: inactivation by physical and chemical methods. *FASEB J.* 2006 (*in press*)

4)Korenaga T, Yan J, Sawashita J, Matsusita T, Naiki H, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Fu X. Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am J Pathol*, 2006 (*in press*)

##### 2. 学会発表

1) 付 笑影、是永龍巳、Zhang Huanyu, 巖 景民、澤下仁子、森 政之、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス；飼育室における伝播。日本基礎老化学会第 28 回大会、東京、6 月 16 日、2005 年

2) 巖 景民、藤井健志、岸田秀之、細江和典、姚 俊潔、澤下仁子、森 政之、樋口京一：SAMP1 マウスを用いた還元型 Coenzyme Q10 の抗老化作用の解析。日本基礎老化学会第 28 回大会、東京、6 月 16 日、2005 年

3) 付 笑影、是永龍巳、Zhang Huanyu, 巖 景民、内木宏延、澤下仁子、森 政之、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス；飼育室における伝播の可能性。第 20 回老化促進モデル (SAM) 研究協議会、東京、7 月 29 日、2005 年

4) 澤下仁子、亀谷富由樹、森 政之、樋口京一：

マウス老化アミロイドーシスにおけるアミロイド線維形成関連 apoA-II アミノ酸配列の解析. 第 20 回老化促進モデル (SAM) 研究協議会、東京、7 月 29 日、2005 年

5) 巖 景民、藤井健志、岸田秀之、細江和典、姚 俊潔、森 政之、樋口京一：SAMP1 マウスを用いた還元型 Coenzyme Q10 の抗老化作用の解析. 第 20 回老化促進モデル(SAM)研究協議会、東京、7 月 29 日、2005 年

6) Ge F, Yao J, Fu X, Guo Z, Zhang B, Yan J, Zhang H, Li G, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloidosis in the transgenic mice of apolipoprotein A-II (*Apoa2<sup>c</sup>*). The 4th Asia-Pacific IAP Congress (IAP2005). Beijing China, August 24, 2005

7) Higuchi K. Transmission of mouse systemic amyloidosis. The 4th Asia-Pacific IAP Congress (IAP2005). Beijing China, August 26, 2005

8) Yan J, Nakamura A, Guo Z, Fu X, Mori M, Higuchi K. Initiation and fibrillization of AA amyloidosis by MRP-14 amyloid fibrils. International symposium on "Life of Proteins" – Maturation, transmission and quality control in the cell –. Hyogo Japan, October 31, 2005

9) Fu X, Korenaga T, Zhang H, Yan J, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. Mouse senile amyloidosis: The possible transmission in the mouse room. International symposium on "Life of Proteins" – Maturation, transmission and quality control in the

cell –. Hyogo Japan, October 31, 2005

10) Yao J, Ge F, Fu X, Guo Z, Zhang B, Yan J, Zhang H, Li G, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. Mouse senile amyloidosis in the transgenic mice of apolipoprotein A-II (*Apoa2<sup>c</sup>*). International symposium on "Life of Proteins" – Maturation, transmission and quality control in the cell –. Hyogo Japan, October 31, 2005

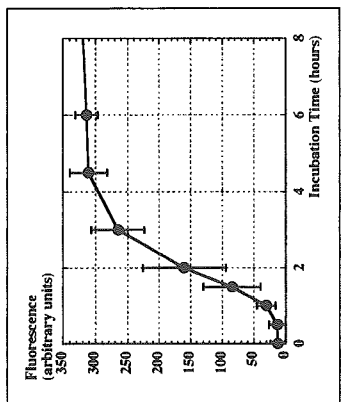
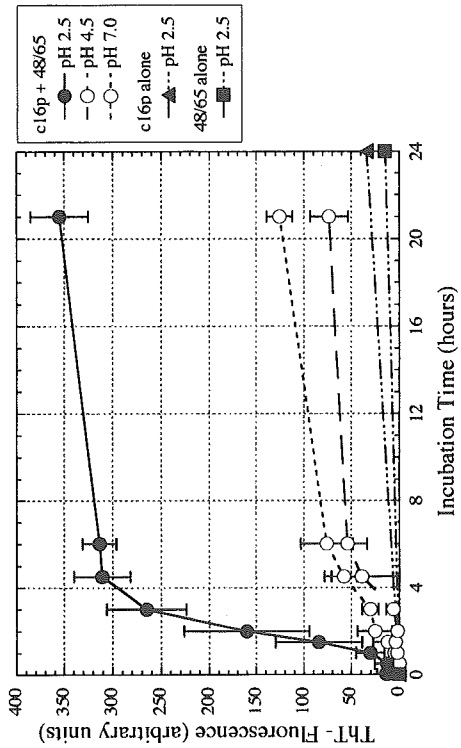
11) Sawashita J, Mori M, Kametani F, Higuchi K. Amyloid fibril formation by the two distinctive sequences of apolipoprotein A-II associated with the mouse senile amyloidosis. International symposium on "Life of Proteins" – Maturation, transmission and quality control in the cell –. Hyogo Japan, November 2, 2005

12) 張 倍茹、付 笑影、葛 鳳霞、巖 景民、張 桓宇、澤下仁子、森 政之、樋口京一：活性化 hHSF1 トランスジェニックマウスにおける AApoAII アミロイドーシスの抑制. 第 10 回臨床ストレス蛋白質研究会、熊本、11 月 26 日、2005 年

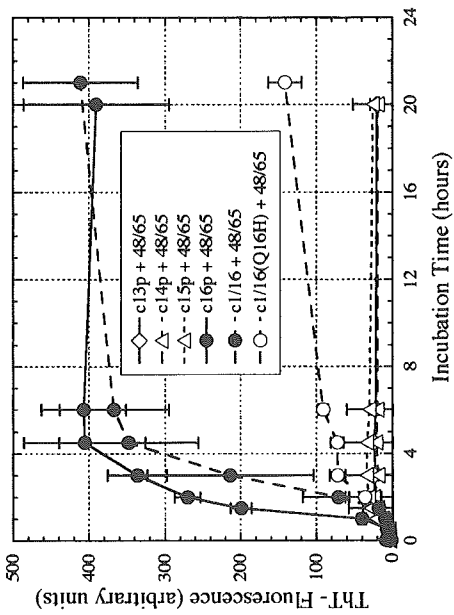
#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

A



B



C

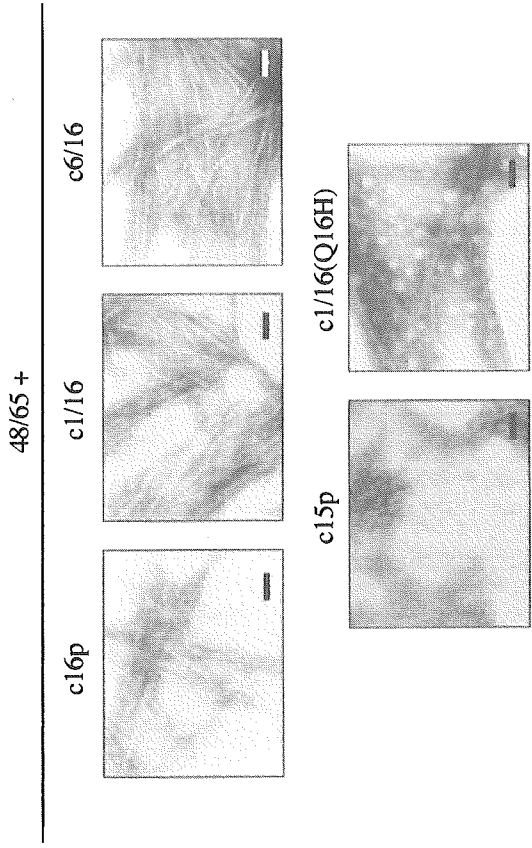


図1 マウス apoA-IIは16番目のアミノ酸を含むN未配列と48~65番目のC未配列によりアミロイド線維を形成する。

A, ThTの蛍光強度変化を示す。平均値 ± 標準偏差 (n = 3) をプロットした。蛍光強度はN未ペプチド (c16p) とC未ペプチド (48/65) 共存時にのみ増加し、pH 2.5の反応条件下で最大であった。pH 2.5でc16pと48/65を重合反応させた時の8時間後までの蛍光強度変化を右小図に示した。  
 B, 16番目のアミノ酸を欠失したN未ペプチド (c15p) では蛍光強度は増加せず、16番目をHisに置換したN未ペプチド (c1/16(Q16H)) も蛍光強度は減弱した。  
 C, pH 2.5の反応条件下、各種N未ペプチドとC未ペプチド (48/65) を重合反応させた時の電子顕微鏡写真を示した。スケールバーは100 nm幅を示す。



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

## アミロイドーシス特有の病理像を認識するプローブの探索

分担研究者 工藤幸司 東北大学先進医工学研究機構高度通信分野

共同研究者 藤川陽介\* 伊藤啓\* 岡村信行\*、谷内一彦\*、古本祥三\*\*、星井嘉信\*\*\*、  
石原得博\*\*\*、山田正仁\*\*\*\*

\*東北大学医学系研究科機能薬理学分野、\*\*東北大学先進医工学研究機構、\*\*\*山口大学  
医学部構造制御病態学講座、\*\*\*\*金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学

研究要旨 ヒトアミロイドーシスおよび動物モデルにおけるアミロイド蛋白と BF-227 との結合を検討し、いずれも高い結合性を示すことを確認した。

### A. 研究目的

アミロイドーシス患者における病理像としてのアミロイドの蓄積量およびその空間的分布をインビボで評価することが可能となれば、アミロイドーシスの新たな客観的診断法となる可能性が高い。分担研究者（工藤）らによって開発されたβシートの構造を認識するプローブ BF-227 のアミロイドーシス診断への応用を最終目的として、本年度は主としてヒトアミロイドーシス標本および動物モデルにおけるアミロイド蛋白と BF-227 との結合性を検討した。

### B. 研究方法

山口大 星井、石原先生より提供いただいたヒトアミロイドーシス(AA、Aλ、Aκ、ATTR)標本におけるアミロイド蛋白と BF-227 との結合性を蛍光顕微鏡で評価した。次に FCA (Freund's Complete Adjuvant) または AEF (amyloid-enhancing-factor) と硝酸銀溶液を投与することにより作製した2種類のアミロイドーシスモデルマウスを用い、脾臓に蓄積したアミロイド A 蛋白と BF-227 との結合性をインビトロおよびインビボ(BF-227 の静脈内投与)で検討した。

### (倫理面への配慮)

アミロイドーシス患者様標本を使用する場合、ヘルシンキ宣言を基準として倫理面に配慮し、標本提供許である山口大学医学部倫理委員会の承認を得た上で使用する。動物実験においては、東北大学における動物実験に関する指針(S63.3.24)に従い、十

分なる愛護精神をもってできるだけ動物に苦痛を与えぬように配慮する。

### C. 研究結果

BF-227 はヒトアミロイドーシス(AA、Aλ、Aκ、ATTR)標本において、コンゴレッドによって染色されるアミロイド蛋白に選択的に結合した(代表例として図1および2を示した)。また BF-227 はアミロイドーシスモデルマウス脾臓標本においてインビトロにおいてはコンゴレッドによって染色されるアミロイド A 蛋白に選択的に結合した。更に同モデルにおいて静脈内投与された BF-227 と脾臓アミロイド A 蛋白との結合が確認された(図3)。

### D. 考察

BF-227 は各種ヒトアミロイドーシス患者および動物モデルにおけるアミロイド蛋白特有のβシート構造を認識することを確認した。

### E. 結論

ヒトアミロイドーシスおよび動物モデルにおけるアミロイド蛋白と BF-227 との結合を検討し、いずれも高い結合性を示すことを確認した。将来像としてポジロン標識 BF-227 を用いたアミロイドーシスの PET 画像診断まで発展させたいと考えている。

### F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

1) Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y: Quinoline and Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes for In Vivo Imaging of Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 25: 10857-10862, 2005.

2) Maruyama M, Ishizawa K, Tomita N, Nemoto M, Ysuda H, Ebihara S, Ohnishi T, Seki T, Iwasaki K, Okamura N, Higuchi M, Yoshida H, Kudo Y, Arai H, Sasaki H: Lithium therapy and cerebrospinal fluid biomarker levels in Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int*. 5:298-300, 2005

3) 福田寛、工藤幸司、篠遠仁、須原哲也: 脳機能の分子イメージング  
臨床放射線 50:375-382, 2005

4) 工藤幸司: アルツハイマー病診断用プローブ. 日本薬理学雑誌. 126:199-206, 2005

5) 工藤幸司: アルツハイマー病の画像診断の進歩. “老年医学update2005-06”, 45-55 (編集日本老年医学会雑誌編集委員会) メジカルビュー社、東京、2005

6) 工藤幸司: アミロイドイメージング. 臨床眼科. 59.(No.11)245 “眼科における最新医工学(編者玉井信)” 医学書院、東京、2005

7) 工藤幸司: PET によるアミロイド イメージングーアルツハイマー病の新しい診断法ー. 77-87. “脳の形態と機能ー画像医学の進歩ー(編者 福田寛)”. 新興医学出版社. 東京、2005 年

8) 岡村信行、工藤幸司: 痴呆の画像診断 -脳アミロイド画像化の試み- “よくわかって役に立つ 痴呆症のすべて”, 134-145 (編者 平井俊策) 永井書店(大阪) 2005

## 2. 学会発表

1) Okamura N., S. Furumoto, M. Maruyama, M. Tashiro, Y. Funaki, M. Kato, M. Nemoto, H. Akatsu, T. Yamamoto, T. Sawada, M. Itoh, R. Iwata, H. Arai, K. Yanai, Y. Kudo. Development of novel PET tracer for in vivo detection of amyloid plaques. The 7th International Conference on Alzheimer's and

Parkinson's Disease, 2005 年 3 月 9 日-13 日 (Sorrento, Italy)

2) S. Furumoto, N. Okamura, Y. Ishikawa, M. Tashiro, M. Kato, Y. Funaki, M. Maruyama, H. Akatsu, T. Suemoto, T. Yamamoto, H. Arai, T. Sawada, R. Iwata, K. Yanai, Y. Kudo; “[<sup>11</sup>C]BF227: A New <sup>11</sup>C-Labeled 2-Ethenylbenzoxazole Derivative for Amyloid-β Plaques Imaging” Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Istanbul (Turkey), October 15-19, 2005.

3) Okamura N., S. Furumoto, M. Maruyama, M. Tashiro, Y. Funaki, M. Kato, M. Nemoto, H. Akatsu, T. Yamamoto, T. Sawada, M. Itoh, R. Iwata, H. Arai, K. Yanai, Y. Kudo, “In vivo imaging amyloid plaques in the brain using BF-227”, Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting, Washington, DC, November 12-16, 2005

4) 岡村信行、古本祥三、加藤元久、丸山将浩、荒井啓行、赤津裕康、山本孝之、澤田徹、谷内一彦、工藤幸司. 脳アミロイドを画像化する新しい PET プローブの開発第 78 回日本薬理学会年会. 2005 年 3 月 23 日 (パシフィコ横浜)

5) 岡村信行、古本祥三、加藤元久、丸山将浩、荒井啓行、赤津裕康、山本孝之、澤田徹、谷内一彦、工藤幸司、“アミロイドイメージング用 PET プローブ BF-227 の開発”、第 24 回日本痴呆学会、大阪、2005 年 9 月.

6) 古本 祥三、岡村 信行、岩田 錬、石川 洋一、丸山 将浩、赤津 裕康、澤田 徹、伊藤 正敏、谷内 一彦、荒井 啓行、工藤 幸司、“新規アミロイドイメージング剤 [<sup>11</sup>C]BF227 の合成と評価”、第 45 回日本核医学会総会、東京、2005 年 11 月 11-13 日.

7) 古本祥三、岡村信行、石川洋一、船木善仁、伊藤正敏、谷内一彦、岩田錬、澤田徹、荒井啓行、工藤幸司、“Aβリガンド [<sup>11</sup>C]BF227 の実用的標識合成と生物学的評価”、第 5 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、京都、2004 年 12 月 10 日.

8) 伊藤啓、岡村信行、加藤元久、谷内一彦、古本祥三、工藤幸司、赤津裕康、山本孝之、澤田徹: アルツハイマー病脳内のタウ蛋白を検出する新規 PET プローブ、第 56 回日本薬理学会北部会、10 月 3 日 (新潟、朱鷺メッセ)

9) 岡村信行、工藤幸司、谷内一彦: アルツハイマ

一病の分子イメージングのためのプローブの開発と臨床応用、第 33 回薬物活性シンポジウム、10 月 4 日 (新潟、朱鷺メッセ)

10) 工藤幸司: アルツハイマー病診断用プローブ開発におけるトランスレーショナルリサーチ・第 78 回日本薬理学会年会シンポジウム (トランスレーショナルリサーチにおける薬理学の役割)・日本薬理学会・2005 年 3 月 22 日・パシフィコ横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

下記参照

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

特許出願状況

	出願番号	発明の名称	出願日	出願人	発明者
1	特 願 2005-322230	アミロイド蓄積性疾患の新規診断用装置およびその操作方法	平成 17 年 11 月 7 日	東北大学	工藤幸司 ら
2	特 願 2005-347818	コンフォメーション病診断および治療用の長波長蛍光物質を含む組成物	平成 17 年 12 月 1 日	東北大学	工藤幸司 ら
3	特 願 2005-371821	コンフォメーション病の診断用プローブ	平成 17 年 12 月 26 日	東北大学	工藤幸司 ら

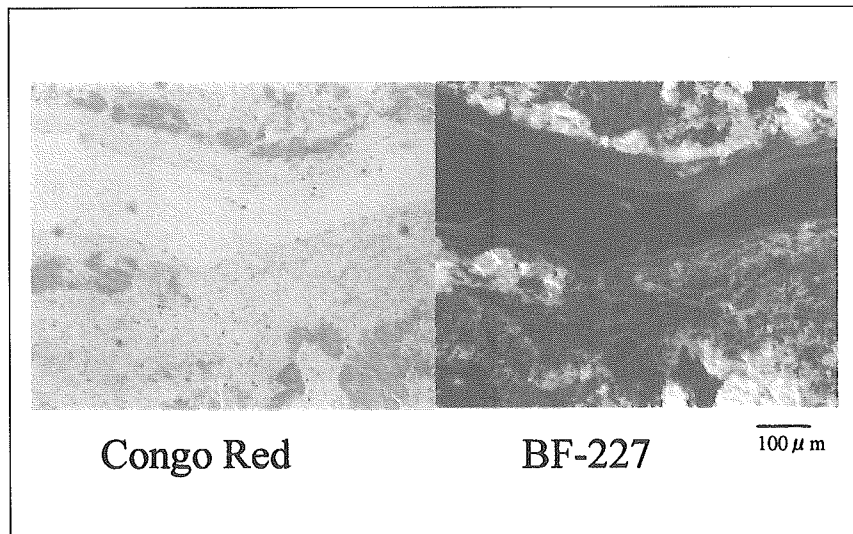


図 1. ヒトアミロイドーシス (A $\kappa$ 、心臓) における Congo Red (左-透過型顕微鏡) および BF-227(右-蛍光顕微鏡)染色の比較

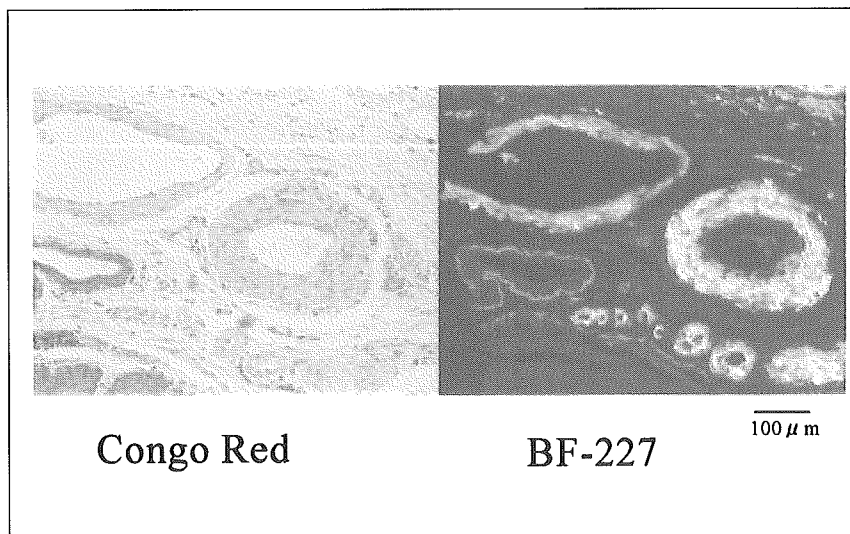


図 2. ヒトアミロイドーシス (A $\lambda$ 、食道) における Congo Red (左-透過型顕微鏡) および BF-227(右-蛍光顕微鏡)染色の比較