

イドの主として辺縁部が陽性となり、この部分はアミロイド沈着後あまり時間の経過していない部かもしれない。

ヒト SAA1.33-38 およびマウス SAA1.85-92 の領域はウサギ SAA 中にも含まれており、この領域を認識するウサギポリクローナル抗体の作製が可能であったことから動物種によってはその種の SAA1 の一部を含む合成ペプチドの免疫により抗体価が上昇することが判明した。マウスにおいても抗マウス SAA1.18-35 抗原ペプチド免疫により抗体価の上昇がみられた。今後ヒト SAA1.27-36、ヒト SAA1.33-38 を含めて、これらのペプチド免疫によりマウス AA アミロイド吸収促進効果があるか否かについて検討を行う予定である。

E. 結論

諸種 AA アミロイドーシスの診断および発生病理の解明に有用と考えられる 4 種類の抗 SAA 抗体を作製しえた。抗原ペプチドの免疫による AA アミロイドーシス治療への応用については、アミロイドの吸収促進効果があるか否か今後さらに検討を要する。

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

なし

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

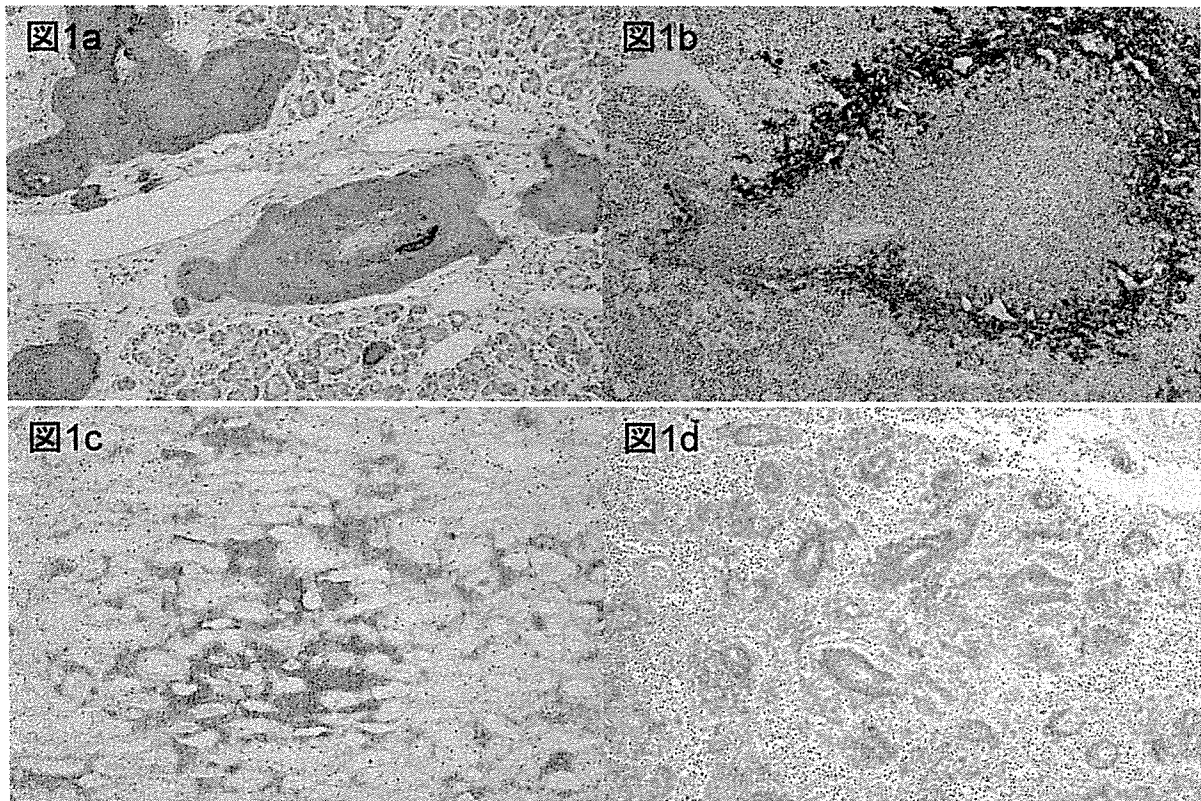


図1: 抗ヒトSAA1.33-38による免疫染色. a:ヒト, b:マウス, c:ウシ, d:白鳥

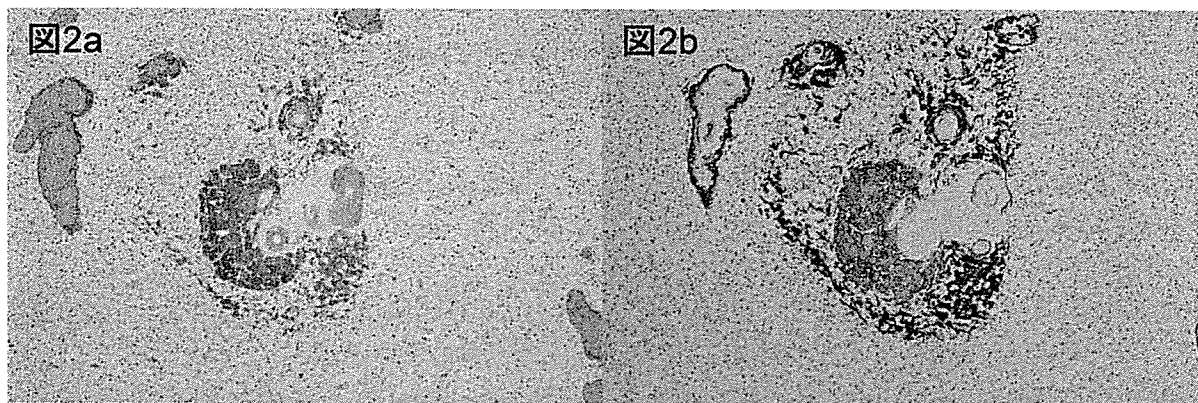


図2: ヒトAAアミロイドーシス例の免疫染色. a:抗ヒトSAA1.27-36, b:抗マウスSAA1.81-93

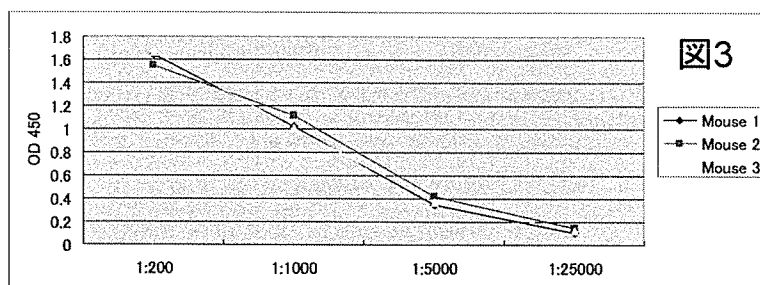


図3: マウスSAA1.18-35ペプチドを免疫したマウスの抗体価測定(ELISA)

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

SPR 法による SAA 結合様式研究の基礎検討

分担研究者 山田俊幸 自治医科大学医学部臨床検査医学
共同研究者 佐藤純司 自治医科大学医学部臨床検査医学

研究要旨 AA アミロイド前駆体である SAA の安定性を研究するために、SPR 法 (Biacore 社機器) を用いた SAA と HDL の結合親和性の解析を行った。今回はその基礎条件をまず検討した。SAA をチップに固定化、HDL をアナライトとする系で、SAA 固定化はアルカリ性条件下、少量固定が有効であること、HDL の溶媒に界面活性剤が必要なことが見出された。今回の実験条件で、ヒト SAA1 各アイソタイプでは SAA1.5 が HDL に対し親和性が高く、SAA1.3 が低い傾向であった。前者で血中濃度が高めになること、後者がアミロイドーシスにより関連していることに符号する成績であった。しかし、マウス SAA ではアミロイド原性であるアイソタイプと他方の間にヒト HDL に対する親和性に差はなかった。今後、実験条件をさらに改善し、HDL だけではなく種々の SAA 親和性物質との結合様式を解析したい。

A. 研究目的

アミロイド線維化のプロセスにおいて前駆蛋白の安定性が重要視されている。SAA は循環血中では HDL に会合していることから、その親和性を検討する SPR (表面プラズモン共鳴) による解析系を構築し、種々の SAA 表現型で比較することを目的とした。今回はリコンビナント (r) SAA の応用の基礎検討を行った。

B. 研究方法

ヒト rSAA、マウス rsaa 各表現型は大腸菌に発現させ、最終的に 6M 尿素添加のクロマトフォーカシングで精製し、凍結乾燥されたものを用いた。SPR 解析は Biacore2000 を使い、固定化チップにアミンカップリング用の CM5 または CM3、基本的なランニングバッファーに HBS-EP (生理的 HEPES バッファー) を用いた。HDL は健常者血清から KBr 超遠心法で調整した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト、動物を直接の対象としていないため倫理問題は発生しない。

C. 研究結果

SAA をアナライト (流路) とする系は、SAA

のコントロールチップ (未固定) への非特異吸着を認める、また SAA の難溶性のため十分な SAA 濃度が得られない、などの問題のため、SAA を固定化し、HDL をアナライトとする系を採用した。

実験条件の検討、ならびに preliminary ではあるが以下のことが示唆された。①固定化を通常酸性条件で行うと、アルカリ (pH8.5) 固定化に比べ、N 末端近傍を認識する抗体の結合量が著明に低下した (図 1)。酸性条件で SAA が folding していると考えられた。②固定化量を 200RU 程度以上にすると、HDL の結合がプラトーに達せず、条件としては固定化量を少なくすることが必要であった (図 2)。③通常ランニングバッファーでは解離領域でも反応が上昇し、HDL の自己凝集が疑われた。これを阻止するために、界面活性剤の添加 (Tween-20 0.05%) を要した。④結合、解離のいわゆる同時解析モデルには fit しない場合があり、現時点では平衡結合量を用いる affinity 解析を併用せざるを得なかった。⑤以上のような条件という限定であるが、rSAA と HDL の KD は e^{-5} 程度となり、ヒト rSAA1 アイソタイプ間の比較では rSAA1.5 が HDL に親和性が高く、rSAA1.3 が低い傾向であった。⑥マウス SAA では、ヒト HDL に対してではあるが、rsaa1 と rsaa2 に優位

な差異を認めなかった。

D. 考察

SPR 法の基礎検討を行う過程で SAA のいくつかの性質が新たに見出された。

酸性条件で固定化すると N 末端近傍抗体の結合が低下することから、チップ結合に関与してその部位がマスクされる、もしくは酸性条件下で fold される可能性が考えられるが、後者であるならアミロイド原性蛋白としての性質に見合ったこととして興味深い。エピトープのわかっている各種抗体を利用してアミロイド線維化に関連した構造変化を解析できる可能性も示されたことになる。

SAA の固定化条件が固まったことで、HDL 以外の各種親和性物質との結合様式解析が可能となった。しかし、理想的には SAA をアナライズとして用いる系も望まれ、SAA 溶解条件の改善が必要である。

今回の HDL との親和性解析では、アミロイドーシスのリスク因子である SAA1 アリルの表現型 SAA1.3 で親和性が低い傾向にあり、アミロイド易線維化を示唆している可能性がある。また血中濃度が高くなり、おそらくクリアランスの遅いタイプ、SAA1.5 で親和性が高い傾向であることは、血中での安定性を示唆しているようでこれも興味深い。ただし、アミロイド線維化能が明確に違い、HDL との結合に関与する N 末端構造の違い、マウス SAA アイソタイプ間で差異が得られなかったことは期待はずれであった。マウス HDL を用いるなどの工夫が必要なのかもしれない。

精製 SAA を使用した実験は、SAA の取り扱い、精製法から保存法までも含む、にかなりの慎重さが求められることも強調したい。その取り扱いの改善を含め、SPR 法解析の質をさらに高め、SAA の機能研究、線維化機序の研究に役立てたい。

E. 結論

SPR 法で、固定化 SAA と HDL との親和性を

解析する条件を設定した。血中濃度が高めになる SAA1.5 で親和性が高く、アミロイドーシスにより関連した SAA1.3 で低い傾向であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Xu Y, Yamada T, Satoh T, Okuda Y: Measurement of serum amyloid A1 (SAA1), a major isotype of acute phase SAA. *Clin Chem Lab Med* 44:59-63, 2006.

2) Miida T, Yamada T, Seino U, Ito M, Takahashi A, Kosuge K, Soda S, Hanyu O, Obayashi K, Miyazaki O, Okada M: Serum amyloid A (SAA)-induced remodeling of CSF-HDL. *Biochim Biophys Acta* 1761:424-433, 2006.

3) 岩本雅弘、釜田康行、奈良浩之、上村健、吉尾卓、岡崎仁昭、蓑田清次、山田俊幸、田中亨. メトトレキサートが腎機能悪化を 7 年間抑制したと考えられる関節リウマチ誘発腎アミロイドーシス. *臨床リウマチ* 18:332-336, 2006.

2. 学会発表

1) Yamada T, Okuda Y. Measurement of amyloidogenic SAA isotype, SAA1. XI International Symposium on Amyloidosis. Woods Hole, USA, 11 月 6 日、2006 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

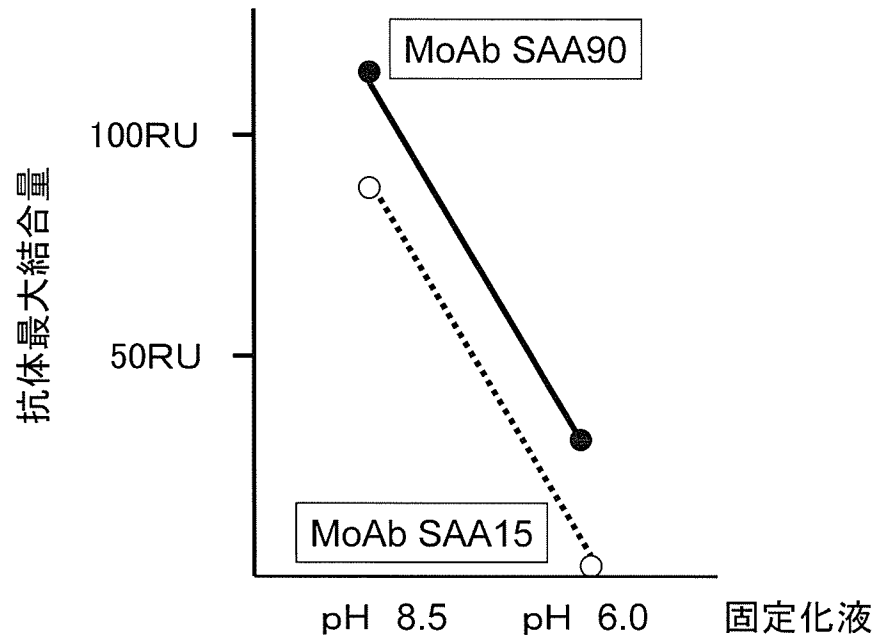


図1 固定化pHの影響。ヒトrSAA1.1を50RU固定化したチップへの各抗体の結合量。MoAb15: SAA15位を認識。MoAb90: 同90位を認識。

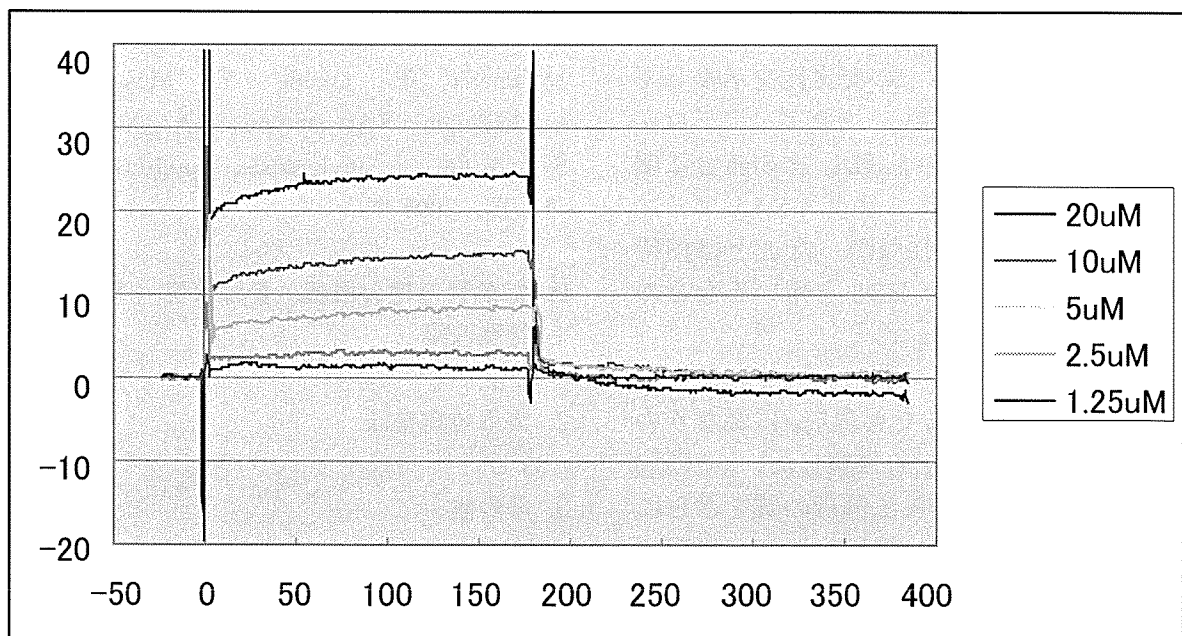


図2 ヒトrSAA1.1を20RU固定化したチップへのHDLの結合解離曲線 (縦軸: 結合量RU、横軸: 時間(s))

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

AA アミロイドーシス合併関節リウマチに対する抗サイトカイン療法の有用性の評価— SAA 抑制効果を中心に—

分担研究者 奥田恭章 道後温泉病院リウマチセンター内科
 共同研究者 山田俊幸 自治医科大学臨床検査医学

研究要旨 AA アミロイドーシスに対するヒト化抗 IL-6 レセプター抗体、トシリズマブの著明な SAA 抑制効果及び臨床的有用性を報告した (Arthritis Rheum 2006)。今回、AA アミロイドーシスに対する抗 TNF α 抗体療法の有用性を SAA の抑制効果を中心に検討した。AA アミロイドーシス合併関節リウマチ (RA) 4 例 (平均観察期間 20 カ月、11—36 カ月) におけるインフリキシマブ投与前後の SAA の推移、臨床効果を調査した。RA 活動性指標の DAS28-CRP (4) は、投与前平均 5.96 から最終観察時平均 2.69 へ低下し、4 例中 3 例が good response であった。治療前 SAA の平均は 344.45 μ g/ml であった。治療中における計 50 回のインフリキシマブ投与前の SAA は平均 88.61 μ g/ml であり、このうち投与前平均値の正常化例は 1 例のみであった。AA アミロイドーシスによる臓器障害の進行は観察期間中認めなかった。[結論] 抗 TNF α 抗体療法は AA アミロイドーシスに有用と思われるが、SAA の抑制効果はトシリズマブのほうが優れており、IL-6 阻害療法がより重要な AA アミロイドーシスに対する治療戦略になると考えられた。

A. 研究目的

AA アミロイドーシスに対する抗サイトカイン療法の有用性がその優れた抗炎症効果から報告されている。ヒト化抗インターロイキン 6 (IL-6) レセプター抗体、トシリズマブの著明な SAA 値改善効果、臨床症状及び病理組織学的改善を経験し、その有用性について報告を行った (表 1、図 1、図 2)。今回、AA アミロイドーシスに対する抗 TNF- α 抗体、インフリキシマブについて SAA に対する抑制効果を中心に評価を行った。

B. 研究方法

対象は上部消化管生検スクリーニングにて AA アミロイドーシスと診断され、インフリキシマブが投与された関節リウマチ (RA) 4 症例である。観察期間は 11 カ月から 36 カ月 (平均 20 カ月)、投与回数は 8 回から 23 回 (計 50 回)、SAAlexon3 多型は、それぞれ 1.1/1.3、1.5/1.5、1.3/1.3、1.1/1.5 であった。これら 4 症例について 1.RA 活動性の推移—DAS28-CRP(4)を用い評価、

2.SAA 値の推移、3.アミロイドーシス症状の有無の経過、4.上部消化管での組織沈着の推移について検討を行った。

(倫理面への配慮)

SAAlexon3 多型の解析は、当院倫理委員会で承認された同意書を用い、インフォームドコンセントを得た後に採血、解析を行った。

C. 研究結果

1.RA活動性の推移

RA活動性指標のDAS28-CRP (4) は、投与前平均 5.96(5.05 – 6.97)から最終観察時2.69(2.01 – 3.31)へ低下し、EULAR改善基準において4例中3例がgood response、1例がmoderate responseであった。

2.SAA値の推移 (表2)

治療前SAAの平均は344.45 μ g/ml (52.58 – 840.24) であった。治療開始後計50回のインフリキシマブ投与前のSAAは平均88.61 (5.9 – 327.38) μ g/mlであり、このうち投与前平均値の正常化例は1例のみであった。

3. アミロイドーシス症状の有無の経過 (表3)

4症例とも診断時無症候例であり、経過中に難治性下痢などの消化器症状、腎機能の悪化、蛋白尿等のアミロイド症状の発症を認めなかった。

4. 上部消化管での組織沈着の推移 (表4)

4例とも投与前のアミロイド沈着量は少量であった。このうち投与前の平均SAAが正常化した症例3は、投与前に前庭部の粘膜及び粘膜下層に少量の沈着を認めたが、投与15カ月後の生検では陰性であった。他の3例はフォローアップの生検で沈着の部位はやや拡大したが、沈着量は少量のままだった。

D. 考察

抗サイトカイン療法はその優れた抗炎症作用にからリウマチ性疾患に合併する AA アミロイドーシスに対する有用性が症例報告、症例集積研究として報告され始めている。抗 TNF α 療法のもっとも多数例の症例集積研究として Gottenberg らの報告があり、炎症性関節炎に合併した AA アミロイドーシス 15 例の腎障害に対する抗 TNF α 療法 (インフリキシマブ 10 例、エタネルセプト 4 例、両方使用 1 例) の評価を行い、それぞれ、蛋白尿減少または GFR 上昇 ; 3 例、腎障害進行なし ; 5 例、腎機能悪化または進行 ; 7 例に認めたとしており、腎障害を認める進行例に約半数で有効であったと報告している。しかしながら、この研究では進行例は CRP の低下は不十分であり、より強力に炎症マーカーの低下を達成できる薬剤が必要であると思われる。我々は高度活動性、難治性 JIA に進行性 AA アミロイドーシスを合併した症例に対してトシリズマブの投与を行い、SAA の持続的正常化、アミロイド臨床症状の消失、組織での AA 蛋白の著減を経験し報告を行った。また我々は、AA アミロイドーシスを合併したトシリズマブ治験中 RA 症例でも全例 SAA の正常化を達成することができており、萩原、吉崎らの基礎的研究結果とも合わせて今後もっとも期待できる抗サイトカイン療法であると思われる。今回は、インフリキシマブの 4 例の効果を検討し、1 例に SAA の正常化、組織での陰性化を確認できたが、他の 3 症例は、SAA の正常化は達成できず、組織学的にも改善は認めら

れなかった。全例が無症候例であり、アミロイド症状の新たな発症は認めず有用性が示唆されるが、SAA 抑制効果はトシリズマブのほうが優れており、AA アミロイドーシスの治療にはトシリズマブがより適していると思われる。今後、トシリズマブによる臨床的改善、組織学的改善を示す多くの臨床データの報告が期待される。

E. 結論

抗 TNF α 抗体の AA アミロイドーシスの進行阻止への有用性が示唆された。しかし、SAA の抑制効果はトシリズマブのほうが優れており、IL-6 阻害療法がより重要な AA アミロイドーシスに対する治療戦略になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuda Y, Takasugi K: Successful use of a humanized anti-interleulin-6 receptor antibody, Tocilizumab, to treat amyloid A amyloidosis. *Arthritis Rheum* 54: 2997-3000, 2006.
- 2) Xu Y, Yamada T, Satoh T, Okuda Y: Measurement of serum amyloid A1(SAA1), a major isotype of acute phase SAA. *Clin Chem Lab Med* 44:59-63, 2006
- 3) 奥田恭章 : 関節リウマチに合併した AA アミロイドーシスの診断と治療 *臨床リウマチ* 18 : 291-297, 2006
- 4) 奥田恭章 : AA アミロイドーシスと新しい治療法 *リウマチ病セミナーXV II* 2006 永井書店 217-222, 2006

2. 学会発表

- 1) 奥田恭章 : 関節リウマチと AA アミロイドーシス. 第 2 回愛媛 SAA 研究会、松山、1/28, 2006
- 2) 奥田恭章 : 関節リウマチと AA アミロイドーシス. 信州自己免疫疾患研究会、松本、3/18, 2006
- 3) 奥田恭章 : AA アミロイドーシス合併関節リウマチにおける診断時無症候例の臨床経過と長期予後. 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会、

長崎、4/24、2006

4)奥田恭章：関節リウマチ合併 AA アミロイドーシスの臨床像の変遷. 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会、長崎、4/24、2006

5)奥田恭章：SAA と二次性アミロイドーシス. 第 3 回 SAA フォーラム 21、東京、7/21、2006

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. トシリズマブによる臓器障害の改善

	治療開始前		6か月後
<u>消化器症状</u>	難治性下痢、 嘔気、腹痛 PCI	→	なし
<u>尿蛋白</u> (g/日)	0.7	→	0
<u>クレアチニン</u> <u>クリアランス</u> (ml/min)	66	→	124

図2. トシリズマブによる内視鏡、組織所見の改善

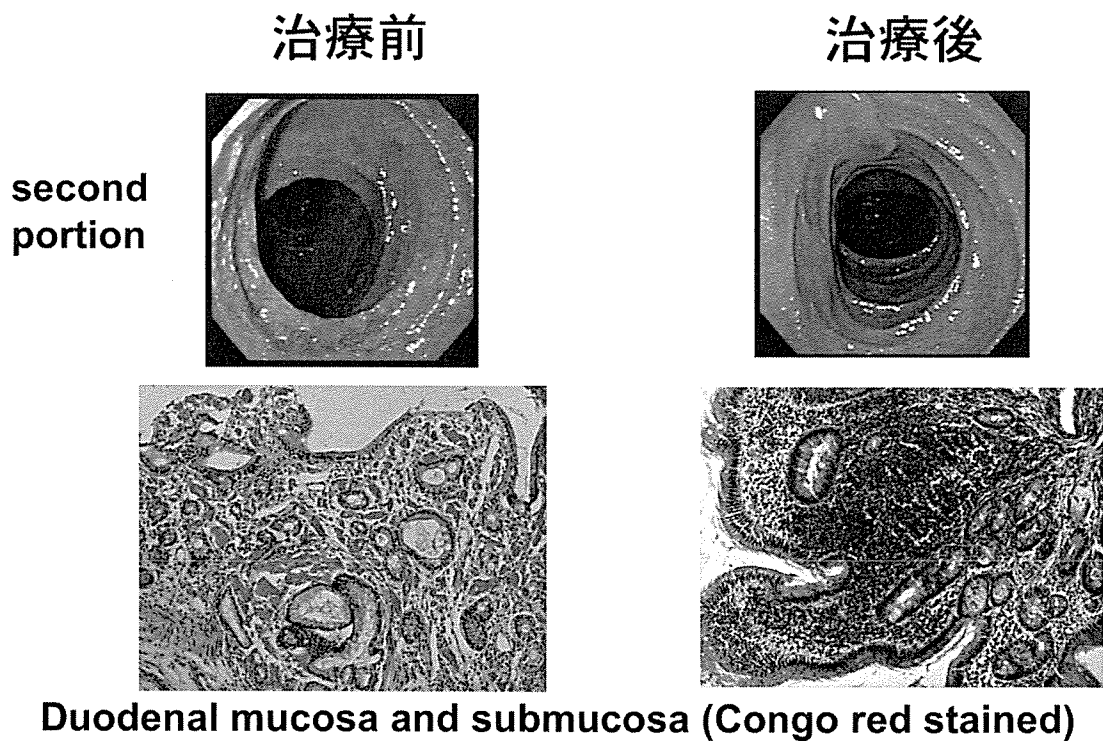


表1. トシリズマブ投与中のSAA, CRP値
(計42回)

	SAA (μ g/ml)	CRP (mg/dl)
平均値	3.15	0.03
最小値	0.79	0.01
最大値	10.2	0.23

治療開始前: SAA 242.7 μ g/ml (MTX15mg/週, PSL 10mg/日)
MTX:methotrexate, PSL:prednisolone

表2. インフリキシマブ治療とSAAの推移

	投与前	治療後平均 (計50回)	最小 - 最大
Case 1	226.0	65.16	4.91 - 240.32
Case 2	259.0	44.29	10.6 - 209.59
Case 3	52.58	5.90	1.01 - 17.63
Case 4	840.24	327.38	129.56 - 461.64

(μ g/ml)

表3.インフリキシマブ治療中の
アミロイド症状の経過(平均20カ月)

	GI symptoms		CRN(mg/dl)	
	投与前	治療後	投与前	治療後
Case 1	—	—	0.41	0.42
Case 2	—	—	0.42	0.45
Case 3	—	—	0.48	0.46
Case 4	—	—	0.43	0.47

表4. インフリキシマブ治療と組織沈着の推移

	投与前	最 新
Case 1	bulb+ : 少量 (SM : ST)	2-p,bulb+ : 少量 (SM : ST,PERI)
Case 2	bulb+ : 少量 (SM : ST)	bulb+ : 少量 (SM : ST,PERI)
Case 3	Ant+ : 少量 (SM,M : ST)	—
Case 4	2-p+ : 少量 (SM : ST)	2-p+ : 少量 (SM : ST,PERI)

SM:submucosa, M:mucosa, ST:stromal, PERI:perivasucular
bulb:bulbus, 2-p:second portion, ant:antrum

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

AA アミロイドーシスのトシリズマブによる治療研究
1. AA 分科会の発足と治療プロトコール作成

分担研究者 吉崎和幸 大阪大学保健センター

共同研究者 山田正仁¹⁾、池田修一²⁾、石原得博³⁾、今井裕一⁴⁾、奥田恭章⁴⁾、工藤幸司⁵⁾、
下条文武⁶⁾、高市憲明⁷⁾、中里雅光⁸⁾、山田俊幸⁹⁾

1) 金沢大学、2) 信州大学、3) 山口大学、4) 道後温泉病院、5) 東北大学、

6) 新潟大学、7) 虎ノ門病院、8) 宮崎大学、9) 自治医科大学

研究要旨 キャッスルマン病、関節リウマチに対するヒト化抗 IL-6 受容体抗体 (トシリズマブ) による治療研究において、AA アミロイド前駆蛋白質の Serum amyloid A (SAA) の正常値化が認められ、一部の患者で AA アミロイド沈着減少による腎機能の改善、消化器症状の改善が認められた。一方昨年我々は肝細胞からの SAA 発現にサイトカインの中でも IL-6 刺激が重要で、IL-6 阻害により SAA 発現がほぼ完全に抑制され、その転写機序において STAT3 の活性化が最も重要であることを示した。以上のことから、難治性で有効な治療法が確立されていない AA アミロイドーシスに対してトシリズマブを用いた臨床試験の開発を提案した。本試験を行うにあたり山田班長の発案でアミロイドーシス班に AA 分科会を発足し、実施基本原則が検討された。AA 分科会が中心となり実施体制を組織化し、プロトコールを作成、データの管理・評価を行うこととなった。班員のみでは患者数不足のため、全国から研究協力者を要請した。その結果 50 名以上の対象候補者が予想され、実施可能であることが裏付けられた。プロトコール作成はプロトコール検討委員で更に検討されることとなった。可能なら 3 月中に準備を終了し、4 月頃から観察を開始する予定となった。

A. 研究目的

AA アミロイドーシスのトシリズマブによる臨床試験研究発足のための準備。

検査・治療の意義ならびに有害事象の説明を行い、プロトコールを理解してもらい、その了解を得るためインフォームドコンセントを取る予定である。

B. 研究方法

AA 分科会で検討し、班会議で概要説明をして承認を得てから開始する。

トシリズマブは既にキャッスルマン病に対しては医薬品機構から承認を受けており、関節リウマチに対しては申請中であり、その他の疾患に対しては承認される見通しはない。従って AA アミロイドーシス合併基礎疾患によって責任体制、実施体制、プロトコール内容、評価方法、安全性が異なる。このためそれぞれの対応を考慮しなければならない。

(倫理面への配慮) 準備段階による倫理面への配慮は全く不要であるが、実施にあたっては患者に

C. D. 研究結果および考察

1. AA分科会の発足と提案 (2006年8月)

2. 第1回AA分科会 (2006年9月16日: 於大阪大学) 議事

1) 大阪大学岸本忠三教授の顧問就任決定

2) 基本概念: あくまで患者のために行う (図 1)

3) 研究協力者の要請:

患者数の拡大と専門知識賛助

[研究協力者]

勤医協札幌病院 : 田村裕昭

東京女子医科大学 : 寺井千尋

都立大塚病院 : 稲田進一
 自治医科大学 : 箕田清次
 大阪大学 : 田中敏郎
 大阪府立大学 : 佐伯 修
 高知大学 : 公文義雄
 熊本リウマチセンター : 中村 正

(敬称略)

4) プロトコール作成 (継続)

3. 第2回AA分科会

(2006年12月23日 : 於大阪市内)

議事

1) 基本体制について :

研究班主導の医師主導の臨床研究として行う。

2) 臨床試験 :

オープン試験とする。但し客観性を高めるプロトコールとする。

3) 保険適応の有無により基礎疾患によって2本立て臨床試験とする。(図2)

4) 試験の開始及び終了 :

半年程の観察期間を設置する。終了は投与開始1年後とするが、病理所見により2年以内もありうる。観察期間も入れると2007年4月から2010年3月を試験期間と予定する (図3)。

5) トシリズマブ投与方法 :

8mg/kgを月1回投与を原則とする。但し疾患によっては8mg/kgを月2回又は4mg/kgを月2回投与することも考慮する。

6) 腎症の有無による試験 :

消化管生検によるAAアミロイド沈着陽性者を対象患者とするが、腎症の有無によって図4の試験方法を考慮する。(これについてはコアメンバーによる検討を要する。)

7) 評価 :

主要評価は1年後の消化管生検によるAAアミロイド沈着の程度により評価する。副次的評価としては①腎障害、消化器症状の程度、頻度と②SAA値とするがACR、DAS28等のRA症状評価も考慮することを検討する。評価は若干名の評価委員によってなされる。

8) 対象患者数 : 予測として50名程度。2月の班会議までに人数確認する。

9) プロトコール作成 : 若干名のプロトコール検

討委員によって作成される。

10) AA分科会での決定(案)は2月の班会議で承認されることとなった。但し、可能ならば3月中に準備を完了し、4月頃から観察を開始する予定となった。

E. 結論

AA分科会が発足し、AAアミロイドーシスに対するトシリズマブによる臨床試験の実質的検討が開始された。試験は班主導の自主研究として行うことを原則とする。メンバーとして班員以外の先生の協力を得ることができ、患者数が確保された。基礎疾患によってプロトコールが異なり、今後若干名によるプロトコール検討委員により完成させることとなった。可能ならば4月開始を目標とする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hagihara K, Nishikawa T, Matsumura A, Song J, Tanaka T, Yoshizaki K: Analysis of cytokine-driven serum amyloid A expression based on the clinical results of IL-6 blocking therapy: a new cis-acting mechanisms of STAT3. *Inflammation Regeneration* 26:453-459,2006.

2) 吉崎和幸, 萩原圭祐, 西川哲平, 宋健 : 関節リウマチの血清アミロイド A 発現機序- IL-6 阻害に基づくシグナル伝達、転写機序の解明. *遺伝子医学MOOK* 6号 : p.230-237、2006.

3) 宋健, 吉崎和幸: HHV-8 とキャッスルマン病. *化学療法の領域*.22:43-48、2006.

2. 学会発表

1) 萩原圭祐、吉崎和幸 : Induction mechanism of serum amyloid A, an acute phase protein and a marker of atherosclerotic risk, by proinflammatory cytokine. *Keystone Symposia, Keystone*, 04.02-07、2006.

2) 吉崎和幸 : Immunopathogenic roles of IL-6 on the synergistic induction of an acute phase protein,

ser amyloid A (SAA), via interaction between STAT3 and NF- κ B in rheumatoid arthritis. Immunology 2006, Boston, 05.12-16. 2006.

3) 吉崎和幸：IL-6 阻害治療の有効性と作用機序. 第 71 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、兵庫、07.08. 2006.

4) 吉崎和幸：サイトカイン阻害療法から学ぶ病態解析及び治療への展開. 第 16 回日本リウマチ学会近畿支部学術集会、大阪、09.02. 2006.

5) 吉崎和幸：抗サイトカイン療法における IL-6 阻害療法第 18 回中部リウマチ学会、三重、09.02. 2006.

6) 吉崎和幸：早期 RA の多様性. 第 21 回日本臨

床リウマチ学会、東京、11.21-22. 2006.

7) 吉崎和幸：Immunological intervention in rheumatoid arthritis by the blocking of Interleukin 6 a single cytokine. Keystone Symposia, Montana, 01.06-11. 2007.

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. 臨床試験の原則

1. 早期の開始
2. 患者負担の軽減
3. 症状・所見の改善
4. 国際レベルでの試験研究
5. 班主体で医師主導の自主臨床研究ではあるが、場合によりそれに
こだわらない組織体制も可
6. 可能ならTNF- α 阻害薬との比較化

図2. 2本立臨床試験

1. RA・キャッスルマン病を基礎疾患とする
AAアミロイドーシス（保険適応内）の臨床試験
 - 薬剤の提供：有償
 - 副作用、有害事象に対する責任：要調査
 - データ管理、データ解析：AA分科会
(一部製薬会社のデータを借用するか要検討)
2. 1以外の疾患を基礎疾患とするAAアミロイドーシス
(保険適応外の医師主導型臨床試験)
 - 薬剤の提供：無償（但し、医薬品機構の了承を要す）
 - 副作用、有害事象に対する責任：医師
 - データ管理、データ解析：AA分科会、特に担当者

図3. 試験の開始及び終了（2007年4月～2010年3月予定）

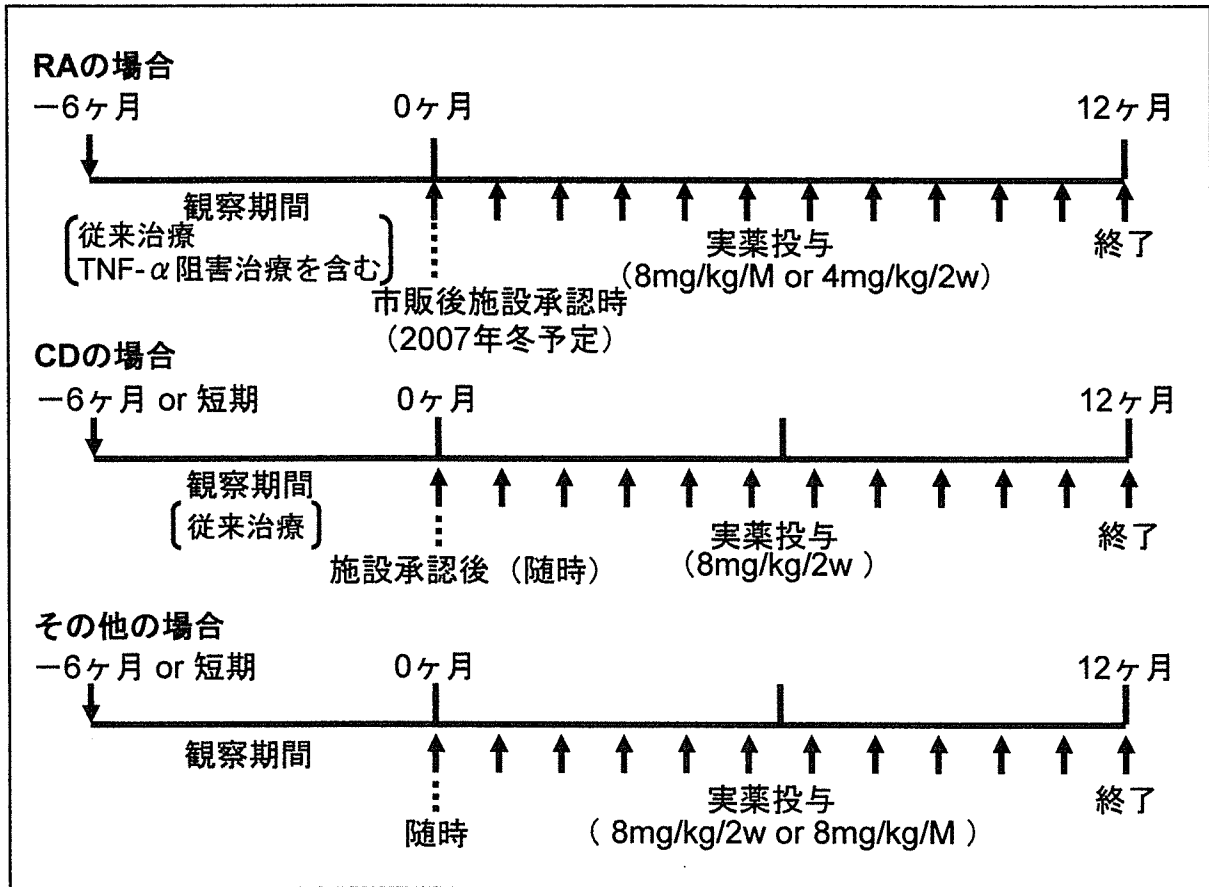
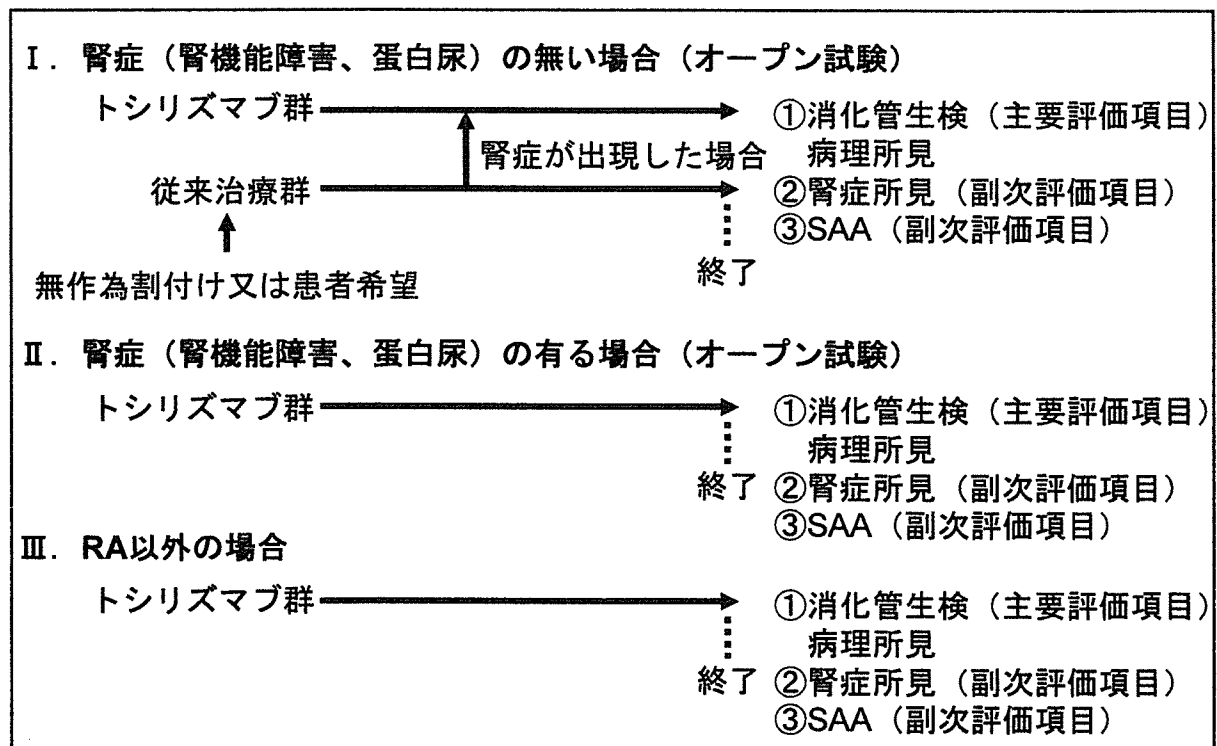


図4. 臨床試験と評価



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

リゾリン脂質の $\beta 2$ -ミクログロブリンアミロイド線維形成促進効果と 透析患者における血清リゾリン脂質濃度の解析

分担研究者 内木宏延 福井大学医学部医学科 病因病態医学講座・分子病理学領域

共同研究者 大越忠和*、長谷川一浩*、大橋祐美子*、木村秀樹**、高橋直生**、吉田治義**

*福井大学医学部医学科 病因病態医学講座・分子病理学領域、

**同 病態制御医学講座・腎臓病態内科学領域

研究要旨 透析アミロイドーシスの患者組織に沈着する $\beta 2$ -ミクログロブリン($\beta 2$ -m)アミロイド線維を中性 pH 域で伸長させる生体内分子を探索する目的で、種々のリゾリン脂質の $\beta 2$ -mアミロイド線維伸長促進効果を、チオフラビン T 法及び電子顕微鏡観察により解析した。中性 pH 域で親水基に陰性荷電を持つ、リゾフォスファチジン酸、リゾフォスファチジルグリセロールが線維伸長促進効果を持つことを明らかにした。また、リゾフォスファチジン酸は、 $\beta 2$ -m モノマーからのアミロイド線維形成を促進した。これらの効果はリゾフォスファチジン酸が $\beta 2$ -m モノマーに結合し、その立体構造を部分的に崩すこと、及び線維表面に結合し脱重合を抑制することによると考えられた。さらに、血液透析患者の血漿リゾフォスファチジン酸濃度は、正常対照群と比べて有意に増加しており、透析患者における脂質代謝異常が、透析アミロイドーシスの発症に関与してい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は長期血液透析患者に見られる合併症で、前駆蛋白質である $\beta 2$ -ミクログロブリン($\beta 2$ -m)が、天然の立体構造を変化させながら次々に重合してアミロイド線維を形成し、骨・関節組織に沈着する。一般に、アミロイド線維形成は、重合核形成過程と線維伸長過程の二段階からなる。種々の生体分子がこの過程に影響を及ぼし、線維形成を促進、あるいは抑制すると考えられているが、その詳細については未だ明らかにされていない。 $\beta 2$ -mアミロイド線維の伸長反応は、酸性 pH 域では速やかに起こるが、中性 pH 域では線維伸長は全く起こらず、むしろ線維は脱重合してしまう。昨年われわれは、生体分子であるリゾリン脂質が、中性 pH 域で $\beta 2$ -mアミロイド線維伸長を引き起こすことを報告した。今回さらにいくつかの解析・検討を加え、合わせて臨床的解析を行った。

B. 研究方法

親水基の異なる 5 種類のリゾリン脂質について、それぞれ疎水基である脂肪酸の炭素数が異なるものを数種類ずつスクリーニングした(リゾフォスファチジルコリン: 5 種類、リゾフォスファチジルグリセロール: 4 種類、リゾフォスファチジルセリン: 2 種類、リゾフォスファチジン酸: 5 種類、リゾフォスファチジエタノールアミン: 4 種類)。リゾリン脂質を種々の濃度(0~1.0 mM)で添加した中性緩衝液中で、シードとなる断片化線維を $\beta 2$ -m モノマーとともにインキュベートし、チオフラビン T を用いた分光蛍光定量法、並びに電顕観察にてアミロイド線維伸長の有無を確認した。また、リゾリン脂質分子の構造(親水基の種類、電荷、疎水基である脂肪酸鎖の長さや二重結合の有無など)と線維伸長促進効果の有無、及び線維伸長促進効果の強さとの相関を解析した。線維伸長促進効果が認められたリゾフォスファチジン酸のうち、疎水基の脂肪酸の長さが 16 のもの(MPPA)に関しさらに以下の実験を行った。① $\beta 2$ -m モノマーの立体構造に及ぼす

影響を CD スペクトル測定により調べた。② MPPA を含む中性緩衝液中で β 2-m アミロイド線維をインキュベートし、脱重合抑制効果を調べた。③ MPPA による線維伸長反応系において、線維伸長初速度のシード線維濃度ならびに β 2-m モノマー濃度に対する依存性を解析した。④ シードを含まない中性緩衝液中で、 β 2-m モノマーを MPPA 存在下に長期間インキュベートし、モノマーからのアミロイド線維形成の有無を調べた。最後に透析患者の血漿リゾフォスファチジルコリン、及びリゾフォスファチジン酸濃度を測定し正常対照群と比較することで、リゾリン脂質の透析アミロイドーシス発症との関連性を検討した。

(倫理面への配慮)

試験管内実験に必要な β 2-m 線維を精製するためのアミロイド沈着組織は、患者より実験に使用する旨の同意書を得た後、手術時に採取した。血液透析患者の血漿リゾリン脂質測定に際しては、研究用に使用する旨の同意書を得た後、血液透析時に採取した。

C. 研究結果

疎水基である脂肪酸の炭素数が14~18で、中性pHで親水基に陰性荷電を持つ、リゾフォスファチジン酸、及びリゾフォスファチジルグリセロールが、100 μ M以上の濃度で β 2-mアミロイド線維の伸長促進効果を示した。これらのリゾリン脂質のうちMPPAに関してさらにいくつかの実験を行い、MPPAが β 2-mモノマーに結合し、その立体構造を部分的に崩すこと、 β 2-mアミロイド線維に結合し中性pH域における脱重合を抑制することを明らかにした。また、MPPAによる線維伸長反応の初速度が、シード線維濃度、及び β 2-mモノマー濃度に比例して増加することを示した。さらに、MPPAが中性pH域における β 2-mモノマーからのアミロイド線維形成を促進することを確認した。最後に血液透析患者の血漿リゾリン脂質濃度が、正常対照群と比べて有意に増加していることを明らかにした。

D. 考察

中性pH域で陰性荷電を持つリゾフォスファチジン酸などのリゾリン脂質が β 2-mモノマーの

立体構造を変化させ、さらに β 2-mアミロイド線維を安定化することで、重合核形成、及び線維伸長を促進することを明らかにした。また、透析患者では、血漿リゾフォスファチジン酸濃度が正常対照群と比べて有意に増加しており、透析患者における脂質代謝異常が、透析アミロイドーシスの発症に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

中性pH域で陰性荷電を持つリゾリン脂質が β 2-mモノマーの立体構造を変化させ、 β 2-mアミロイド線維を安定化することで、モノマーからのアミロイド線維形成、及び線維伸長反応を促進することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M: Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Neurochem Int* 48(4):275-285, 2006.
- 2) Korenaga T, Yan J, Sawashita J, Matsushita T, Naiki H, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Fu X: Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am J Pathol* 168(3):898-906, 2006.
- 3) Ono K, Hamaguchi T, Naiki H, Yamada M: Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1762(6):575-586, 2006.
- 4) Chatani E, Naiki H, Goto Y: Seeding-dependent propagation and maturation of β ₂-microglobulin amyloid fibrils under high pressure. *J Mol Biol* 359(4):1086-1096, 2006.
- 5) Sasahara K, Naiki H, Goto Y: Exothermic effects observed upon heating of β ₂-microglobulin monomers in the presence of amyloid seeds. *Biochemistry* 45(29):8760-8769, 2006.
- 6) Kihara M, Chatani E, Iwata K, Yamamoto K,

- Matsuura T, Nakagawa A, Naiki H, Goto Y: Conformation of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin probed by tryptophan mutagenesis. *J Biol Chem* 281(41):31061-31069, 2006.
- 7) Yamaguchi KI, Naiki H, Goto Y: Mechanism by which the amyloid-like fibrils of a β_2 -microglobulin fragment are induced by fluorine-substituted alcohols. *J Mol Biol* 363(1):279-288, 2006.
- 8) Ono K, Noguchi-Shinohara M, Samuraki M, Matsumoto Y, Yanase D, Iwasa K, Naiki H, Yamada M: Blood-borne factors inhibit Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro. *Exp Neurol* 202(1):125-132, 2006.
- 9) Ban T, Morigaki K, Yagi H, Kawasaki T, Kobayashi A, Yuba S, Naiki H, Goto Y: Real-time and single fibril observation of the formation of amyloid β spherulitic structures. *J Biol Chem* 281(44):33677-33683, 2006.
- 10) Iwata K, Fujiwara T, Matsuki Y, Akutsu H, Takahashi S, Naiki H, Goto Y: 3D structure of amyloid protofilaments of β_2 -microglobulin fragment probed by solid-state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(48):18119-18124, 2006.
- 11) Ono K, Naiki H, Yamada M: The development of preventives and therapeutics for Alzheimer's disease that inhibit the formation of β -amyloid fibrils (fA β), as well as destabilize preformed fA β . *Curr Pharm Des* 12(33):4357-4375, 2006.
- 12) Matsuzaki K, Noguch T, Wakabayashi M, Ikeda K, Okada T, Ohashi Y, Hoshino M, Naiki H: Inhibitors of amyloid β -protein aggregation mediated by GM1-containing raft-like membranes. *Biochim Biophys Acta* 1768(1):122-130, 2007.
- 13) Ono K, Noguchi-Shinohara M, Yoshita M, Naiki H, Yamada M: Cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies patients enhances α -synuclein fibril formation in vitro. *Exp Neurol* in press.
- 14) Hirohata M, Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Ohhashi Y, Ookoshi T, Ono K, Yamada M, Naiki H: The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure. *Biochemistry* in press.
- 15) Adachi R, Yamaguchi KI, Yagi H, Sakurai K, Naiki H, Goto Y: Flow-induced alignment of amyloid protofilaments revealed by linear dichroism. *J Biol Chem* in press.
- 16) 長谷川一浩, 大越忠和, 内木宏延: 透析アミロイドーシスと β_2 ミクログロブリン. *細胞工学* 26(2):156-161, 2007.
- 17) 大越忠和, 長谷川一浩, 内木宏延: アミロイド線維生成沈着機構. *腎と透析* 62(2) 印刷中.

2. 学会発表

- 1) 大越忠和, 長谷川一浩, 大橋祐美子, 内木宏延: β_2 -ミクログロブリンアミロイド線維を伸長させるリゾリン脂質の探索. 第95回日本病理学会総会、東京、4.30-5.2, 2006.
- 2) 長谷川一浩, 廣畑美枝, 大橋祐美子, 大越忠和, 小野賢二郎, 山田正仁, 内木宏延: フラボノイドによるアルツハイマー病 β アミロイド線維形成阻害機構. 日本分子イメージング学会設立総会、京都、5.23-24, 2006.
- 3) Naiki, H: Molecular pathogenesis of β_2 -microglobulin related amyloidosis. 24th Annual Meeting of the International Society of Blood Purification, Nara, 9.8-10, 2006.
- 4) 内木宏延: アミロイドーシスへのいざない. 第23回日本臨床細胞学会北陸支部連合会学術集会、福井、9.23, 2006.

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

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

β₂-microglobulin の transgenic マウスの作製とアミロイド沈着の解析

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 付 笑影*、葛 鳳霞*、張 倍茹*、錢 金澤*、澤下 仁子*、森 政之*、
 内木 宏延**

*信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野、

**福井大学医学部病因病態医学講座分子病理学領域

研究要旨 透析アミロイドーシスの発症機構の解明と、予防・治療法の開発の為に、ヒトβ₂-microglobulin (β₂M) を高発現する 2 系統の transgenic (Tg)マウスを作製した。さらにこれらの Tg マウスとβ₂M knockout マウスとの交配によって、ヒトβ₂M のみを高発現するモデルマウスを作製した。これらのマウスは透析患者の数倍の血清β₂M 濃度を示し、透析アミロイドーシスのモデルマウスとしての可能性を示したが、まだ自然発症のアミロイド沈着は観察されていない。アミロイド線維投与による発症促進効果を調べるために、試験管内で作製した Aβ₂M アミロイド線維、及びマウス AApoAII アミロイド線維を静脈に投与した。AApoAII 投与マウスでは投与後 6 ヶ月以降に、AApoAII の沈着が皮膚に認められ、近接した部位に non-fibrillar なβ₂M 沈着が観察された。

A. 研究目的

長期人工透析患者では、血中ミクログロブリン (β₂M) 濃度の持続の上昇のため、靭帯や関節滑膜などへアミロイド線維が沈着する「透析アミロイドーシス」が重大な問題となっている。しかしながら、これまで適当な透析アミロイドーシスのモデル動物はなかった。我々は、透析アミロイドーシスの発症機構の解明と、予防・治療法の開発の為に欠く事のできないモデルマウスの作製を目指して、ヒトβ₂-microglobulin (β₂M) を高発現する 2 系統の transgenic (Tg)マウスを作製した。特に、アミロイド線維による発症促進 (伝播) が透析アミロイドーシスの進行に果たしている役割を明らかにする為に、試験管内で作製した Aβ₂M アミロイド線維やマウス AApoAII アミロイド線維を Tg マウスへ投与して、アミロイド沈着の促進効果を検討した。

B. 研究方法

2 種類のヒトβ₂M Tg マウスの作製 : 1) CAG (cytomegalovirus immediate early gene enhancer/Chicken β -actin promoter and rabbit β -globin

polyA signal) プロモーターの下流にヒトβ₂M cDNA を持つベクターを構築し、必要部分を精製して C57BL/6 マウス受精卵にマイクロインジェクションした。2) 肝臓特異的に発現する AAT (alpha-1-antitripsin) プロモーターの下流にヒトβ₂M cDNA を持つベクターを構築し、精製した必要部分を、C57BL/6 マウス受精卵にマイクロインジェクションした。以上の 2 種類の Tg マウスとβ₂M knockout マウスを交配し、ヒトβ₂M のみを発現するマウス系統を作製した。

RT-PCR と Western blotting 法で各臓器におけるヒトβ₂M mRNA とβ₂M タンパク質の発現を検討し、血清中ヒトβ₂M の濃度を測定した。

アミロイド線維の投与実験 : 1) 試験管内、中性反応条件下で Aβ₂M アミロイド線維を核として、リコンビナントヒトβ₂M タンパク質 (大阪大学蛋白質研究所、後藤祐児教授から提供) からアミロイド線維を作製した (tAβ₂M)。50 μg を 2 ヶ月齢のβ₂M Tg マウスに尾静脈投与した。2) マウスの肝臓に沈着した AApoAII アミロイド線維を抽出し、100 μg を尾静脈投与した。3) 対照群には DW を投与した。投与開始後、マウスを