

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 アミロイドーシスモデル動物の病態発症における雌雄差と その要因に関する検討

分担研究者 中里雅光 宮崎大学医学部神経呼吸内分泌代謝学講座
 共同研究者 伊達 紫*

*宮崎大学フロンティア科学実験総合センター

研究要旨 カゼイン投与により作製した AA アミロイドーシスモデルマウスの SAA 生合成、脂質代謝関連酵素発現における雌雄差を解析し、病態との関連を検討した。カゼイン投与により肝臓での SAA1 および 2 の遺伝子発現、SAA1 血中濃度は雌雄ともに上昇していたが、その程度は雌に比べ雄で有意に高かった。コントロール群の脂質代謝関連遺伝子発現は、雄に比べ雌で有意に高く、肝リパーゼやアシル CoA 酸化酵素発現は雌雄ともカゼイン投与により減少した。肝臓でのエストロゲン受容体 α の遺伝子発現は、雌雄ともカゼイン投与群で増加していたが、その程度は雌の方が有意に高かった。カゼイン投与による SAA の発現・分泌、それに伴う脂質代謝遺伝子の発現には明らかな雌雄差を認めた。SAA 上昇による血中脂質プロファイルの変化、あるいはエストロゲン受容体を介した抗炎症作用などが AA アミロイドーシスモデル動物での雌雄差の要因として考えられる。

A. 研究目的

これまでに私たちはカゼイン投与による雄性 AA アミロイドーシスマウスの遺伝子を網羅的に解析し、AA アミロイドの原因タンパクである serum amyloid A (SAA) や炎症性サイトカイン；IL6 の細胞内シグナル伝達に関与する STAT3 の肝臓での発現増加、肝リパーゼをはじめとする脂肪酸 β 酸化関連酵素の発現減少を報告してきた。さらに、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α 活性化することで脂肪酸 β 酸化を促進する薬剤；フェノフィブラートをマウスに投与すると SAA の発現および血中濃度の低下とともに AA アミロイドーシスの発症が抑えることを明らかにした。今回は、雌マウスを用いて AA アミロイドーシスモデルマウスを作製し、AA アミロイドーシス発症における雌雄差の有無と関連遺伝子の発現変動を解析することで、病態発症の要因に関する検討を行った。

B. 研究方法

8 週齢、雌雄 C3H/He マウスに、10% ミルクカゼインあるいは生食を 6 週間皮下投与(各 n = 8)

し、投与終了後、血液および肝臓を採取した。全血から血清を分離し、EIA キット (BioSource International, Inc.) にて SAA1 血中濃度を測定した。肝臓(100 mg) から total RNA を抽出し、reverse transcriptase を用いて cDNA を作製した。SAA1、SAA2、エストロゲン受容体 α 、肝リパーゼ、カルニチンアシル転移酵素 1 (CPT1)、アシル CoA 酸化酵素 (ACC) に特異的なプライマーを設計し、intact マウスの肝臓の cDNA を鋳型に各プライマーによる PCR 産物を得た。定量 PCR 系の開発のため、それぞれの PCR 産物をプラスミドベクターに挿入後、大腸菌に transformation し、スタンダードベクターを調整した。このシステムを用いて雌雄 AA アミロイドーシスマウスの肝臓での各遺伝子発現を測定した。

(倫理面への配慮)

実験動物にはその愛護に留意し、投与実験や sacrifice の際の苦痛を最小限にとどめるように配慮した。

C. 研究結果

カゼイン投与6週後のSAA1血中濃度は、雄ではコントロールに比べ約35倍に、雌では約15倍に上昇していた。上昇したSAA1濃度の実測値は、雄では 10.3 ± 2.2 mg/ml、雌では 2.85 ± 0.42 mg/mlであった。SAA1およびSAA2の遺伝子発現は、雄ではコントロールに比べそれぞれ約40倍と100倍に、雌では25倍と63倍に増加していた。肝臓でのエストロゲン受容体 α の遺伝子発現は、雄で1.3倍、雌で1.8倍に増加していた。肝リパーゼ遺伝子発現は、コントロールでも雌雄差があり、雌での発現が雄に比べ有意に増加していた。6週間のカゼイン投与により、雌雄とも肝リパーゼ発現は減少し、雌ではカゼイン群で約1/2に、雄ではカゼイン群で約1/3に減少していた。CPT1の遺伝子発現は雌雄ともカゼイン投与による影響を受けなかった。しかし、CPT1発現は、雌のコントロール群が雄に比べ約2倍増加していた。ACCの遺伝子発現も雌のコントロール群が雄に比べ有意に増加しており、雌雄ともカゼイン投与により減少傾向を示した。

D. 考察

カゼイン投与による AA アミロイドーシスマウスの雌雄差について検討した。雄のカゼイン投与マウスでは、SAA1 血中濃度が雌に比べ約5倍高く、SAA1 および SAA2 の遺伝子発現も雄の方が有意に増加していた。肝臓でのエストロゲン受容体 α は、本来、雄に比べ雌での発現が高い。カゼイン投与により雌雄ともエストロゲン受容体 α の発現は増加した。エストロゲンは雌の生殖機能に重要な役割を果たす性ホルモンであるが、近年、受容体のサブタイプが多くクローニングされ、免疫系をはじめ多くの生体制御機構に関与していることが明らかにされている。エストロゲン受容体 α は、nuclear hormone receptor superfamily の一つとして、さまざまな転写因子のリクルートメントによりターゲット遺伝子を活性化する。肝臓でのエストロゲン受容体 α は、IL6 の細胞内シグナル伝達に関わる NF- κ B とクロストークすることで、SAA の遺伝子発現に抑制的に機能することが報告されており、雌雄マウスにおけるエストロゲン受容体 α の発現レベルの違いが、SAA 遺伝子発現の雌雄差に関与している可能性もある。エストロゲンによる SAA をはじめとする炎

症性タンパクの発現制御機構については、肝細胞を用いた *in vitro* 実験や卵巣摘出マウスを用いた *in vivo* 実験により解明していく必要がある。

私たちは昨年までの研究成果から、雄の AA アミロイドーシスマウスでは、脂肪酸 β 酸化に機能する酵素発現が減少していることを明らかにしている。さらに、PPAR α を活性化し脂肪酸 β 酸化を促進する高脂血症治療薬;フェノフィブラートの投与が、カゼインによる AA アミロイドーシスの発症に予防的に作用することも報告している。本研究では、中性脂肪を脂肪酸とグリセロールに分解する肝リパーゼ、アシル CoA と縮合した脂肪酸が β 酸化を受けるためミトコンドリアに入るときに必要な CPT1、またペルオキシゾームの β 酸化系初発酵素である ACC 発現を検討し、脂質代謝における AA アミロイドーシスマウスの雌雄差を検討した。肝リパーゼと ACC 発現は、雌雄ともカゼイン投与により減少したが、その程度は雄マウスで顕著であった。一方、CPT1 は雌雄ともカゼイン投与による影響を受けなかったが、雌マウスでの発現の方が有意に高かった。肝リパーゼ活性の制御には、HDL のアポリポタンパクが重要な役割を果たすことが知られている。炎症性サイトカインの上昇により、NF- κ B を介する SAA の発現および血中濃度の増加が起こり、SAA は HDL のアポリポタンパクとして存在するようになる。また、炎症性サイトカインは PPAR α を抑制することで、HDL 本来のアポリポタンパクである Apo-AI の発現を抑制する。つまり、AA アミロイドーシスマウスでは、IL6 などの炎症性サイトカインの上昇を引き金に、SAA の増加に加え Apo-AI の減少が起こり、血中の脂質プロファイルが大きく変化している可能性がある。この脂質プロファイルの変化が肝リパーゼ活性の低下、さらにはペルオキシゾームでの β 酸化酵素の活性低下を招き、ロイコトリエンなどの炎症性反応物質の代謝の障害に繋がっていると考えられる。PPAR α の活性化は、脂肪酸 β 酸化の促進による炎症性物質のクリアランスを上げるとともに、Apo-AI の発現を増加させることにより、脂質プロファイルの正常化を促す効果が期待され、AA アミロイドーシスの予防や治療に有効な手段かもしれない。本研究で得られた知見を基盤

に、free の SAA 濃度と病態との関連、また、エストロゲンとその受容体による炎症制御の分子メカニズムの解明し、AA アミロイドーシスの治療標的分子の同定を目指した展開を今後の課題とする。

E. 結論

カゼイン投与による SAA の遺伝子発現や血中濃度には明らかな雌雄差があり、その要因の一つに、エストロゲンおよびエストロゲン受容体を介した抗炎症機構が考えられた。また、SAA の血中濃度の上昇が脂質プロファイルに影響し、脂肪酸 β 酸化関連酵素の発現減少に繋がっている可能性が示唆された。

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。

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

抗ヒト SAA1. 83-95 の作製およびヒト AA アミロイドに対する 免疫組織化学的検討

分担研究者 石原得博 山口大学大学院医学系研究科情報解析医学系学域病理形態分野

共同研究者 星井嘉信*、伊東和恵*、崔 丹*、河野裕夫*

*山口大学大学院医学系研究科情報解析医学系学域病理形態分野

研究要旨 SAA の 77 番目以降の領域の組織学的局在を証明する目的で、今年度新たにヒト SAA1 の N 末端側より 83-95 番目の領域を抗原とする抗ヒト SAA1.83-95 を作製し、ヒト AA アミロイドにおける陽性率および陽性部位について免疫組織化学的検討を行った。SPOTs メンブレンペプチドアレイによるエピトープ分析では抗ヒト SAA1.83-95 は SAA1.85-100、SAA2. 85-100 の部分とよく反応した。免疫組織化学的検討における抗原賦活処理については、賦活効果およびアミロイド以外の部分の染色性から、現状では Microwave による抗原賦活処理が最も有効と考えられた。昨年度報告した抗マウス SAA1.81-93 は 50 例中 23 例(46%)で AA アミロイドの一部に陽性像がみられたが、抗ヒト SAA1.83-95 は Microwave 処理により 51 例中 37 例(72.5%) (昨年度と重複する症例では 43 例中 33 例(76.7%))で AA アミロイドの一部に陽性像がみられ、陽性率が増加した。抗ヒト SAA1.83-95 陽性部位の局在については、血管壁ではアミロイドの辺縁部が主として陽性となり、白脾髄の染色性は様々であり、抗マウス SAA1.81-93 の染色パターンとほぼ同様であった。抗ヒト SAA1.83-95 がアミロイド線維となった SAA と反応しているのか、アミロイド沈着部に集積した線維になっていない SAA と反応しているのかは、今回の検討では不明である。

A. 研究目的

我々は諸種アミロイドーシスの診断および発生病理の解明に有用な新規抗体を開発することを目的として、これまで様々な抗体作製を行ってきた。このなかで昨年度、SAA の 77 番目以降の領域の組織学的局在を証明する目的で作製した抗マウス SAA1.81-93 について報告をした。この抗マウス SAA1.81-93 はマウス AA アミロイドとよく反応し、ヒトとも交叉反応を示したが、反応性がやや弱く、ヒト AA アミロイドの陽性率は 50%以下であった。そこで今年度、ヒト SAA1 のほぼ同一部分を抗原とする抗ヒト SAA1.83-95 を作製し、ヒト AA アミロイドにおける陽性率および陽性部位について免疫組織化学的検討を行った。

B. 研究方法

抗体作製: ヒト SAA1 の 83-95 に相当するアミ

ノ酸配列の N 末端側に Cystein を付加したペプチド(C+NEWGRSGKDPNHF)を KLH を担体としてウサギに免疫し抗血清を作製、アフィニティー精製を行い、抗ヒト SAA1.83-95 として使用した。

SPOTs メンブレンペプチドアレイによるエピトープ分析: 抗ヒト SAA1.83-95 がヒト SAA1 のどの部分と反応するのか、またヒト SAA2 の該当する部分と反応するか否かを確認するため、SPOTs メンブレンペプチドアレイによるエピトープ分析をおこなった。ヒト SAA1 の一部に相当する 12 アミノ酸残基のペプチドをヒト SAA1 の N 末端側から 4 個ずつずらして合成、またヒト SAA2 の 81-100 の部分についても同様に合成を行い、セルロース膜に共有結合させたものについて、抗ヒト SAA1.83-95 による免疫染色を行った。peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1:1000; Dako, Glostrup, Denmark) を用い、tetramethyl benzidine (Kirkegaard and Perry

Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)にて発色を行った。陰性コントロールとして一次抗体なしでの染色も施行した。

免疫組織化学: 山口大学大学院医学系研究科情報解析医学系学域病理形態分野 (病理学第一講座)に保存されている全身性アミロイドーシス剖検例のうち、過マンガン酸処理感受性、抗ヒトAA抗体陽性であったヒトAAアミロイドーシス例の脾臓のホルマリン固定パラフィン切片を材料とした。まず抗原賦活処理法の検討として、抗原賦活処理なし、ギ酸処理、Microwave処理、Proteinase K処理、Actinase E処理について染色性を比較した。続いて全身性AAアミロイドーシス例51例について、target retrieval solution (DAKO, Denmark) 中で95°C20分間Microwave処理を行った後、一次抗体として抗ヒトSAA1.83-95(2.2 µg/mL)、二次抗体としてEnVision+ (1:2 Dako, USA)による免疫染色を施行し、DAB+ (Dako, USA)にて発色を行い陽性率、陽性部位について検討した。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織については承諾を得て実施された病理解剖例を用いており、個人が特定されることのないよう配慮した。

C. 研究結果

SPOTsメンブレンペプチドアレイによるエピトープ分析: 抗ヒトSAA1.83-95はSAA1.85-96、89-100、同様にSAA2.85-96、89-100のペプチドとよく反応した(図1)。SAA1.29-40、33-44、37-48の部分とも弱く反応したが、この部分については一次抗体なしでも反応がみられた。

免疫組織化学的検討: 抗ヒトSAA1.83-95は抗原賦活処理なしでもアミロイドの一部と反応したが、ギ酸処理によりやや染色性が増強し、Microwave処理によりさらに染色性が増強した。Proteinase K処理ではアミロイドの染色性は増強しなかった。Actinase E処理ではMicrowave処理よりもさらにアミロイドがよく染まったが、平滑筋などの細胞成分も陽性となった。Microwave処理ではこのような所見はみられなかった。全身性AAアミロイドーシス例51例の検討では、51例中37例(72.5%)でアミロ

イドの一部に陽性像がみられた。アミロイドは主として血管壁のみあるいは血管壁および白脾髄に沈着しており、抗ヒトAA抗体ではアミロイドがほぼ均一に染まったが、抗ヒトSAA1.83-95では血管壁のアミロイドは辺縁部が血管内腔側、外側ともに陽性となり、アミロイドの中心部はほとんど染まらなかった。白脾髄のアミロイドの染色性は様々であり、症例によっては抗ヒトSAA1.83-95で強く染まった(図2)。

D. 考察

抗ヒトSAA1.83-95はSPOTsメンブレンペプチドアレイによるエピトープ分析ではヒトSAA1の85-100の部分と強く反応し、SAA1とSAA2は84および90番目のアミノ酸が異なるが、SAA2もSAA1と同様に強く反応した。今回の研究において目的にそう部位と反応する抗体がえられたものとする。なお抗ヒトSAA1.29-48の部分でも弱い反応がみられたが、この部分については一次抗体なしでも反応がみられ、二次抗体がペプチドと交叉反応を示している可能性が示唆された。

抗原賦活処理については、賦活効果およびアミロイド以外の部分の染色性から、現状ではMicrowaveによる抗原賦活処理が最も有効と考えた。抗原賦活処理としてActinase E処理を行うと、アミロイドに対しMicrowave処理よりもさらに強い反応がみられたが、平滑筋などの細胞成分も陽性となり、これが細胞内のSAAと反応しているのか、他の物質と交叉反応を示しているのかについては、今後さらに検討が必要である。

昨年度報告した抗マウスSAA1.81-93は50例中23例(46%)でAAアミロイドの一部に陽性像がみられたが、抗ヒトSAA1.83-95はMicrowave処理により51例中37例(72.5%) (昨年度と重複する症例では43例中33例(76.7%))でAAアミロイドの一部に陽性像がみられ、陽性率が増加した。抗ヒトSAA1.83-95陽性部位の局在については、血管壁ではアミロイドの辺縁部が主として陽性となり、白脾髄の染色性は様々であり、抗マウスSAA1.81-93の染色パターンとほぼ同様であった。

抗ヒトSAA1.83-95がアミロイド線維となったSAAと反応しているのか、アミロイド沈着部に集積した線維になっていないSAAと反応してい

るのかは、昨年度報告した抗マウス SAA1.81-93 同様不明であるが、今後、免疫電顕等を行うことにより解明できるかもしれない。

抗ヒト SAA1.83-95 による AA アミロイドの免疫組織化学的検討は、AA アミロイドーシスに対する治療の際に、アミロイドへの新たな SAA の集積あるいは新たなアミロイド沈着の有無をみるという点で、治療効果判定の一助となるかもしれない。

E. 結論

抗ヒト SAA1.83-95 を作製し、免疫組織化学的な陽性率および陽性部位の局在について検討を行った。ヒト AA アミロイドーシス剖検例の 72.5% でアミロイドに部分的な陽性像がみられた。

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. SPOTs メンブレンペプチドアレイによるエピトープ分析

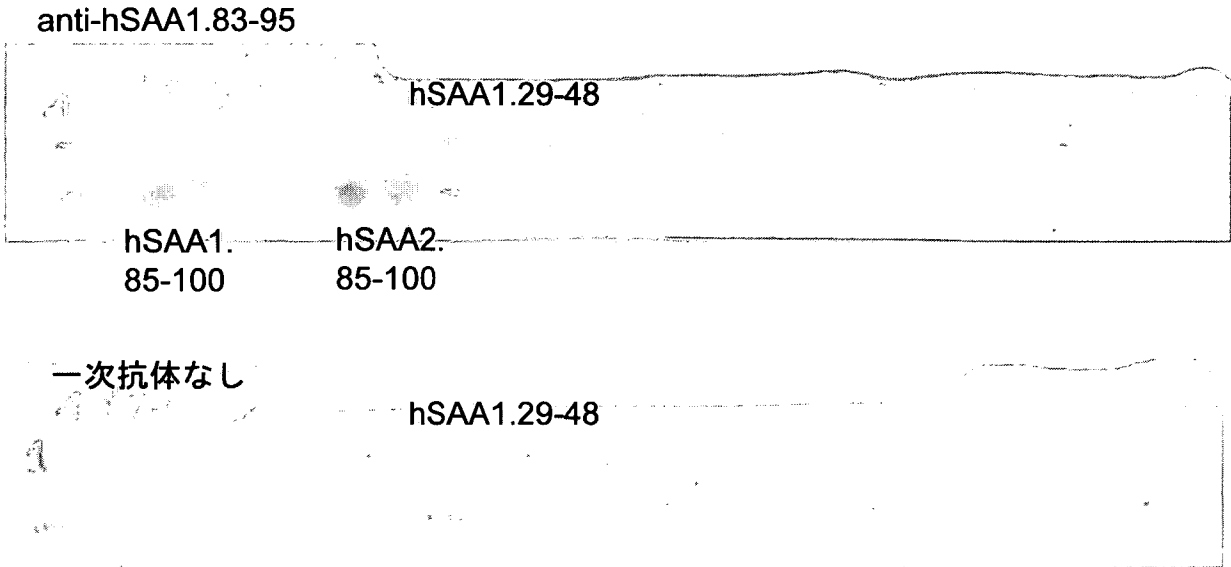
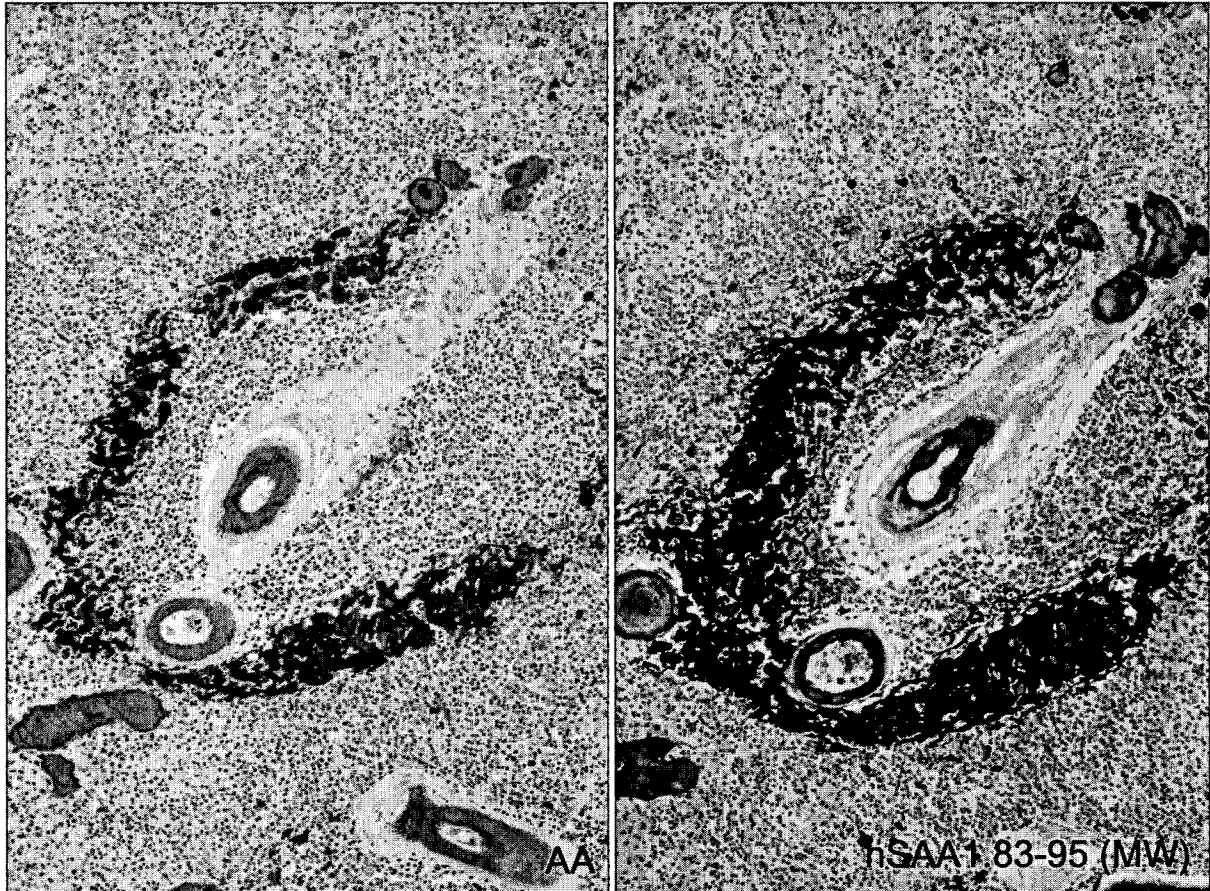


図2. ヒトAAアミロイドーシスにおける染色性の局在



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

生検消化管粘膜の AA 定量

分担研究者 山田俊幸 自治医科大学 臨床検査医学

共同研究者 佐藤純司*、奥田恭章**

*自治医科大学 臨床検査医学、**同道後温泉病院リウマチセンター

研究要旨 AA アミロイドーシスの診断においては胃十二指腸生検による病理診断の有用性が確立されているが、生検部位によって沈着程度に差が見られることをよく経験する。本研究では、少量の生検粘膜組織中のアミロイド沈着を可溶化し、AA 蛋白を免疫化学的に定量する方法を確立、その有用性の評価を検討した。関節リウマチ患者 25 例 (うちアミロイドーシス陽性 13 例) に 3 箇所の内視鏡的胃十二指腸生検を行った。胃前庭部の一部を AA 定量に供した。組織片を 4 M グアニジン塩酸中で可溶化し、SAA 定量のための高感度 ELISA で AA を定量した。アミロイド陽性群の定量値は 125~1,500 ng/g 重量に分布し、陰性群は血中 SAA の持つ込みと考えられた 1 例が 88 (同単位) を示した他は 10 (同単位) 以下と明確に区別された。また、病理診断は 3 部位の沈着程度にバラツキが見られたが、定量値はそのうち同部位である胃前庭部の沈着程度より、3 部位の平均沈着程度に相関した。以上から、本診断法は陽性陰性の判定に極めて有用であることが示され、病理診断を補足する意義があると考えられた。

A. 研究目的

AA アミロイドーシスの診断は障害臓器の生検、もしくは陽性率が高いという理由で胃十二指腸粘膜生検組織の病理診断によってなされる。しかし、生検による病理診断には、採取臓器に必ずしも沈着が含まれているとは限らないという問題、それに起因して定量性に欠けるという問題がある。アミロイド沈着減少を引き起こす治療が有望となってきた昨今、アミロイド量を定量的に評価することも望まれている。

そこで本研究では、通常胃十二指腸粘膜生検材料の一部について免疫化学的な AA 蛋白定量を試み、その診断有用性について評価した。

B. 研究方法

1. 対象

道後温泉病院通院または入院中の関節リウマチ患者 25 例を対象とした。うち 13 例は過去の検索で既に AA アミロイドーシスの診断が決定していた。他 12 例は新規検索例である。生検は通常通り、胃前庭部、十二指腸球部、十二指腸第 2 部を生検し、病理診断に供した。この際、胃前庭

部組織の一部を生食で十分に洗浄後、凍結保存し、AA 定量に供した。

2. 分析方法

組織片を 2 分し、一方の湿重量を測定し、500 μ l の 4M グアニジン塩酸、0.1M Tris、pH 8.2 に浮遊させ、10 秒間長音波処理した後、室温で一晩、振盪した。この溶液につき SAA 定量用の高感度サンドイッチ ELISA で SAA 濃度として測定した。測定時にはグアニジンの影響は無視できるほど高希釈となっている。もう一方の組織片は、AA (SAA より低分子のバンド) の存在を確認するため直接 SDS-PAGE で分離し、抗ヒト SAA 抗体を用いたイムノブロットを行った。

3. 倫理面への配慮

通常の内視鏡生検時の組織片を利用するものであることを患者に説明し、了解を得てから実施された。

C. 研究結果

組織からの AA 抽出液として、グアニジンの他に酸、アルカリ、尿素などを検討したがグアニジンが最も効率がよかった。AA 存在の確認にイムノブ

ロットは有効であった。組織の病理診断（3部位のうち一つでも陽性であれば陽性）を判定基準にした陽性群、陰性群のAA定量値の分布を図1に示した。2群は明確に区別され、大まかには陽性群は100 ng/g重量以上、陰性群は一例を除き、10 ng/g以下であった。その一例につきイムノブロットで確認したところSAAサイズのバンドは見られたが、AAサイズのバンドが見られず、血中SAAの持ち込みであると判断した。陽性例で沈着程度を0～3にスコア化し、定量値との相関を調べたところ、生検部位である胃前庭部とは弱く相関（ $p=0.028$ ）、3部位のスコアの平均と強く相関（ $p=0.0059$ ）した。

D. 考察

切片の病理診断のバラツキは本検討でも経験された。すなわち陽性 13 例で、3 部位とも陽性であったのは 7 例で、2 部位陽性が 1 例、1 部位陽性が 4 例であった。本検討での定量値は胃前庭部のものであったが、3 部位の沈着程度の平均と最もよく相関した。考察すると病理診断によるアミロイド沈着程度は部位によってばらつくだけでなく、切片の厚みに入らなかったことにも起因すると考えられる。このことは同部位である胃前庭部の病理診断で陰性であっても定量で陽性であったことから示唆される。このように定量には組織の厚みを含んだより広い評価が可能という利点がある。また陽性陰性の切れのいい判定などからも病理診断を補足するものとして有用性が期待される。今後、経過を追った検討で、定量値が臨床所見や画像診断など他法で評価された沈着量と関連するかが課題となろう。

注意点は本検討の一例で見られたように血中 SAA の持ち込みにより過大評価されることである。十分な組織片の洗浄やイムノブロットでの確

認などが必要となる。この意味において、イムノブロットは陽性陰性判定の有用な確認法となることを提唱したい。

E. 結論

生検組織中の AA 定量はアミロイドーシス陽性陰性の判定に極めて有用で、病理診断を補足する意義は高い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 山田俊幸：血清アミロイド A (SAA)。臨床検査ガイド：174-175, 2007.

2. 学会発表

- 1) 奥田恭章、山田俊幸：AA アミロイドーシスにおける抗サイトカイン療法の臨床的評価。第 51 回日本リウマチ学会学術集会、横浜、2007.4.26.
- 2) 佐藤純司、山田俊幸：モノクロナル抗体の反応性を利用した SAA (血清アミロイド A) の構造・機能解析。第 47 回日本臨床化学学会年次学術集会、大阪、2007.11.23.

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

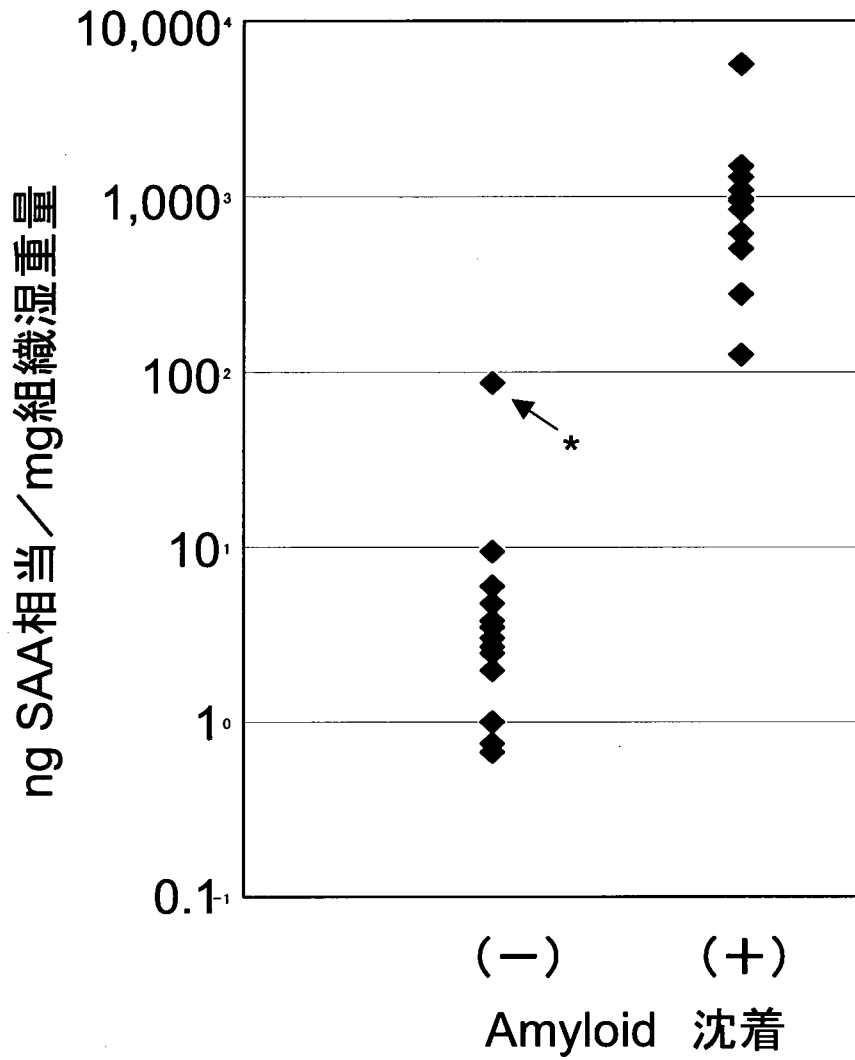


図1 胃前庭部生検組織中のAA定量値

* イムノブロットでSAA(+), AAサイズ(-)であったので
血中SAAの持ち込みと判定した。

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

関節リウマチ続発性アミロイドーシスにおける腎アミロイド沈着の パターン分類と臨床症状の相関について

研究協力者 佐伯 修 大阪府立大学 総合リハビリテーション学部 栄養学専攻

共同研究者 宇田裕史*、横田 章**

大阪府立大学 総合リハビリテーション学部*

大阪府立急性期・総合医療センター リウマチ科**

研究要旨 関節リウマチ(RA)では長期罹患者で急に腎機能が悪くなり死亡する人がいる。この原因として続発性のアミロイドーシス(ア症)があるが診断、治療が手遅れとなる場合が多いが、その病理像と予後については不明な部分が多い。そこで早期にア症を診断し、その後の治療に生かすことが求められている。リウマチ発症後5年以上経過し、腎症状のない人に対してア症の診断を行い、腎生検像の分類と腎機能の予後に関するプロスペクティブな検討を行った。腎生検像では、アミロイドの沈着により血管型、糸球体型、混合型に別れた。臨床像では血管のみに沈着する群では腎機能の悪化がほとんど見られなかった。糸球体が侵される型では進行性に腎機能の悪化が認められ、多数が5年以内に透析導入に至った。リウマチに伴う二次性アミロイドーシス患者では腎臓における沈着の仕方より、血管型・糸球体型に分けられ、臨床像も大きく異なることが示唆され、今後の治療に生かされることが望まれる。

A. 研究目的

関節リウマチでは長期罹患者に腎機能が悪くなり、検査して続発性のアミロイドA沈着によるア症が診断され、治療が手遅れとなり予後不良となる場合が多い。そこで早期にア症を診断し、その後の治療に生かすことが求められている。しかし、現状では本症については、病因、病理や治療についてはほとんど明らかにされていないのが現状である。リウマチに伴う二次性ア症患者では腎臓における沈着の仕方より、血管型・糸球体型等の存在が漠然と示唆されているが、其の病理的分類と機能的な分類との相関は不明である。また今まではレトロスペクティブな研究が殆どであった。

そこでこれらの腎生検像が腎機能の予後と相関するかプロスペクティブな検討を行い、その分類を試み、ア症の病像を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

関節リウマチの罹病期間が5年以上で腎機能低下が見られない(BUN<20・Cr<1.0)患者で、同

意を得られた人に対して、十二指腸生検などを行いア症の診断を行った。ア症診断患者に対して腎生検を行い、アミロイドの沈着部位による以下の3つの病理的分類を試みた。

- a 型・糸球体に選択的に沈着が認められる、
- b 型・血管壁に選択的に沈着が認められる、
- c 型・両方にアミロイドの沈着が認められるに分類しその比率を検討した。

臨床症状の経過追跡 ア症と診断された患者に対して5年間、臨床経過(CRP・SAA・Creatinine・BUNなど)を追跡調査し、病理分類との相関について検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面に関しては研究に入る前に大学内の倫理委員会で許可を得るとともに、患者に対しても、研究の参加、および胃生検、腎生検を実施するに当たりインフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究結果

リウマチ患者に腎生検などを行い53名がア症と診断がされた。このうち更に同意が得られた人に腎生検を行い、a型7人(18%)、b型11人(29%)、c型20人(53%)に分類された。

次に腎機能の評価を5年間の経過を追えた38名に対して検討したが、進行性にBUNとクレアチニンが悪くなる1型と、ほとんどこれらの腎機能が悪くならない2型の2つに大まかに分かれた。病理像との比較では糸球体が侵されているa、c型では腎機能は進行性に悪化する1型を示し、主に血管型のb型ではほとんど腎機能の悪化が見られなかった2型を示した。従って、臨床像は糸球体が侵されるか侵されないかによって予後が判定された。1型と2型の患者背景を比較するとリウマチの診断は1型のほうが若かったが、両者の罹病機関や受けている内服薬は殆んど差が見られなかった(1)。

D. 考察

今まではリウマチによるア症患者ではレトロスペクティブに腎機能が進行性に悪くなるとされていたが、プロスペクティブな研究で腎機能が保たれる血管型が存在することが明らかになり、長期リウマチ患者ではアミロイドの診断を行い、今後の治療に活かされることが期待される。また最近使用されるようになった生物学的製剤(2)により予後が変わるか検討することも肝要である。

E. 結論

関節リウマチに5年以上罹患期間のある患者に対して、アミロイドの診断を行い53名が診断された。そのうち腎生検を行い、a型・糸球体に選択的に沈着が認められる患者、b型・血管壁に選択的に沈着が認められる患者、c型・両方にアミ

ロイドの沈着が認められる患者に分類された。しかし臨床像では糸球体が侵されるa型、c型では、同じ様に腎機能が進行性に悪化する臨床経過(1型)を辿り、b型では殆んど変化しない(2型)2群に分かれた。今後はアミロイドの診断を早期に行い臨床に活かすことが期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1)H Uda, A Yokota, K Kobayashi, T Miyake, H Fushimi, O Saiki: Two distinct clinical courses of renal involvement in rheumatoid amyloidosis. *J Rheumatology* 33:1482-1487, 2006.

2)O Saiki, R Takao, Y Naruse, M Kuhara, S Imai, H Uda: Infliximab but not methotrexate induces extra-high levels of VLDL-TG in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatology* 34:1997-2004, 2007.

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

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

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

メトトレキサートは日本人関節リウマチ続発性アミロイドーシスの 予後を改善した

研究協力者 寺井千尋 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター

共同研究者 小関由美*、金子裕隆*、稲田進一**、森口正人***、鎌谷直之*

*東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター、

**東京都立大塚病院リウマチ膠原病科、

***自治医科大学さいたま医療センターアレルギー・リウマチ科

研究要旨 関節リウマチ (RA) に続発する反応性 AA-アミロイドーシスの生命予後に関与する因子につき検討した。対象は AA-アミロイドーシス合併の RA 患者 75 例で、AA-アミロイドーシス診断年別、MTX 治療の有無、SAA1 遺伝子型で分け生存解析を行い、予後と関連する因子を解析した。2000-2005 年に AA-アミロイドーシスと診断された群 (32 例) は 1990-1994 年 (11 例) や 1995-1999 年 (32 例) に診断された群と比較し有意に生命予後が良好で、この群では治療薬において唯一 MTX が有意に高頻度で使用されていた。MTX 使用群 (26 例) は非使用群 (49 例) に比べアミロイドーシス診断後の平均 CRP は有意に低値で生存率、平均生存期間、Kaplan-Meier 生存解析とも有意に良好であった。MTX 使用群をさらにアミロイドーシス診断前から使用していた群 (12 例) と診断後使用開始した群 (14 例) で分けると診断後使用開始群でより診断後平均 CRP は低く (0.5 ± 0.6 mg/dl)、予後も良好であった。SAA1 遺伝子型別の検討では、SAA1.3 は症状の重症化と関連したが、予後に差はなかった。MTX により RA 関節炎が抑えられた結果 AA-アミロイドーシスの予後も改善したものと考えられた。

A. 研究目的

反応性 AA アミロイドーシスは 2000 年から 2004 年における剖検例関節リウマチ (以下 RA) 患者の約 4 分の 1 に組織学的に合併し、RA 死因の約 11% を占める。このように近年でも、RA 患者の生命予後に AA アミロイドーシスはきわめて重要であるが、有効な治療法に関しての多数例での検討は不十分である。本研究では有効な治療法を見いだすべく、RA に続発した反応性 AA アミロイドーシス患者の生存に関与する因子につき後ろ向きに検討した。

B. 研究方法

対象は当センターと都立大塚病院で 1990 年から 2005 年に診断された 75 名の RA 続発性 AA アミロイドーシス患者である。患者は診断年代により 3 群に分け、さらにメトトレキサート (MTX) の使用の有無により分類し、臨床症状、検査デー

タ、SAA1 遺伝子型、使用薬剤、生存につき解析した。

(倫理面への配慮)

retrospective な検討である。東京女子医科大学および東京都立大塚病院の倫理指針に基づき実施した。

C. 研究結果

Kaplan-Meier 生存解析で 2000-2005 年 (32 例) に診断された患者群では、1990-1994 年 (11 例)、1995-1999 年 (32 例) の患者群より有意に生命予後が改善していた (図 1)。この 3 群間で薬剤の使用頻度に差がみられたのは、MTX のみであった (表 1)。そこで MTX 使用群 26 例と未使用群 49 例、さらに MTX 使用群はアミロイドーシス診断前からの使用群 12 例と診断後に開始した 14 例に分け検討した。MTX 使用群では診断後の CRP が有意に低く、生存期間が長く、より多くが生存

していた (表 2)。Kaplan-Meier 生存解析で、MTX 使用群の生存は有意に改善 ($p=0.0004$) しており、診断後 MTX 開始群ではさらに改善していた ($p=0.0008$) (図 2)。

MTX 未使用群は年齢が高く、腎機能が低下していたため、MTX 未使用群から、年齢、性別、血清クレアチニンを、診断後 MTX 開始群とマッチさせた 24 例を用い検討したが、やはり診断後 MTX 開始群で有意に改善 ($p=0.0072$) していた (図 3)。遺伝子型別による検討では、SAA1.3 をもつ患者では、腎障害、下痢などが高頻度であったが生命予後には有意な差は見られなかった (表 3、図 3)。

D. 考察

MTX は RA に対してはその有効性が確認され、第一選択薬となりつつある。一方、腎機能低下例では禁忌ないし慎重投与が必要で、アミロイドーシス患者に使用されることは少なかった。しかし、本研究では MTX は RA 炎症を抑え AA アミロイドーシスにも有効で生存率を改善することが示された。さらに SAA1.3 allele は重症化に関与するが、生命予後にはむしろ薬剤の影響が大きいことが示された。

E. 結論

本研究の結果は MTX が RA に続発した反応性 AA アミロイドーシス患者の生命予後を改善することを示すもので、現時点では MTX 未使用の AA アミロイドーシスを合併した活動性 RA で禁忌がなければ MTX の使用を試みる価値があることを示唆する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Moriguchi, M, Kaneko, H, Terai, C, Koseki, Y, Kajiyama, H., Inada, S., Kitamura, Y, and Kamatani, N: Relative transcriptional activities of SAA1 promoters polymorphic at position -13(T/C): potential association between increased transcription and amyloidosis. *Amyloid* 12:26-32, 2005.

2) Koseki, Y, Inada, S, Kitahama, M, Sakurai, T, Kamatani, N, and Terai C: Methotrexate Improved Outcome of Japanese AA-amyloidosis Patients Secondary to Rheumatoid Arthritis. *Amyloid* 13:38, 2006.

3) Kitahama, M., Sakurai, T., Itoh, M., Koseki, Y., Kamatani, N., and Terai, C.: Prevalence of AA-amyloidosis in autopsied patients in Japan. *Amyloid* 13:37-38, 2006.

4) Terai C, Kaneko H, Koseki Y, Sakurai T, Kitahama M, and Kamatani N: Study of MEFV Gene Mutations in Japanese Patients with AA-amyloidosis Secondary to Rheumatoid Arthritis. *Amyloid* 13:62-63, 2006.

5) Koseki Y, Inada S, Kitahama M, Sakurai T, Kamatani N, and Terai C: Methotrexate Improved Outcome of Japanese AA-amyloidosis Patients Secondary to Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 54: S373-S374, 2006.

6) Kitahama M, Sakurai T, Itoh M, Koseki Y, Kamatani N, and Terai C: Causes of death and prevalence of AA-amyloidosis among Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54: S186, 2006.

7) Yamanaka H, Inoue E, Tanaka E, Nakajima A, Taniguchi A, Terai C, Hara M, Tomatsu T, and Kamatani N: Influence of methotrexate dose on its efficacy and safety in rheumatoid arthritis patients: evidence based on the variety of prescribing approaches among practicing Japanese rheumatologists in a single institute-based large observational cohort (IORRA). *Mod Rheumatol* 17:98-105, 2007.

8) Kitahama M, Koseki Y, Sakurai T, Kamatani N, and Terai C: Female is a risk factor for developing AA-amyloidosis in patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 56: S410-11, 2007.

2. 学会発表

1) Moriguchi M, Kaneko H, and Terai C: Japanese Familial Mediterranean Fever has certain distinct features compared to continental Familial Mediterranean Fever. EULAR2007, Barcelona,

Spain 2007.

- 2) 小関由美, 北浜真理子, 櫻井正, 鎌谷直之, 寺井千尋: 大量ステロイド投与での SAA と CRP の動態に関する検討. 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 51 回・16 回 Page416、2007.
- 3) 岡本完, 桃原茂樹, 寺井千尋, 谷口敦夫, 山中寿, 鎌谷直之: 血清アミロイド A 蛋白の関節リウマチ病態における意義. 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 51 回・16 回 Page275、2007.
- 4) 北浜真理子, 小関由美, 櫻井正, 伊藤美紀, 鎌谷直之, 寺井千尋: AA-アミロイドーシス臨床像の年代別変化. 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 51 回・16 回 Page282、2007.
- 5) 森口正人, 高鳥志乃, 渡辺恭孝, 金子裕隆, 寺井千尋: 日本人地中海熱の 2 例報告. 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 51 回・16 回 Page339、2007.
- 6) Kitahama M, Koseki Y, Sakurai T, Kamatani N, and Terai,C.: Female is a risk factor for developing

AA-amyloidosis in patients with Rheumatoid Arthritis. ACR 71st Annual Scientific Meeting, Boston, Nov. 9, 2007.

- 7) 小関由美: SAA1 遺伝子多型と関節リウマチ (RA) に合併した反応性 AA-アミロイドーシス (ア症) の臨床的特徴と予後との関連. 日本人類遺伝学会第 52 回大会、東京、9 月 14 日、2007.
- 8) 小関由美、北浜真理子、櫻井正、鎌谷直之、寺井千尋: ステロイド投与での SAA と CRP の動態に関する検討. 第 35 回日本臨床免疫学会、大阪、10 月 16 日、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

表 1. AA-アミロイドーシス診断年別の検討

診断年	1990-1994 年	1995-1999 年	2000-2005 年	p*
症例数	11	32	32	
性別 (男性:女性)	2:9	4:28	2:30	NS
RA 発症時年齢 (歳)	47.1 ± 7.3	46.8 ± 11.8	47.4 ± 12.6	NS
アミロイドーシス診断時年齢 (歳)	59.7 ± 6.4	63.8 ± 8.3	62.3 ± 9.5	NS
アミロイドーシス診断時症状				
下痢	8 (72.7 %)	12 (37.5 %)	6 (18.8 %)	< 0.001 [‡]
持続性蛋白尿	5 (45.5 %)	18 (56.3 %)	18 (56.3 %)	NS
腎機能障害	3 (27.3 %)	15 (46.9 %)	11 (34.4 %)	NS
血清クレアチニン (mg/dl)	1.18 ± 0.84 (0.6~2.9)	1.62 ± 1.35 (0.4~5.3)	1.30 ± 1.29 (0.5~2.4)	NS
症状なし	0	8 (25.0 %)	10 (31.3 %)	< 0.05 [‡]
CRP (mg/dl)				
アミロイドーシス診断時	6.67 ± 6.09	3.47 ± 2.90	3.84 ± 3.17	NS
アミロイドーシス診断後平均 [§]	3.25 ± 3.27	1.30 ± 1.56 [‡]	1.21 ± 1.49 [‡]	< 0.01 [#]
アミロイドーシス診断後の治療				
全 DMARDs	6 (54.5 %)	17 (53.1 %)	19 (59.4 %)	NS
MTX	3 (27.3 %)	7 (21.9 %)	16 (50.0 %)	< 0.03 ^{**}
サラゾスルファピリジン	3 (27.3 %)	5 (15.6 %)	2 (6.3 %)	NS
ブシラミン/d-ペニシラミン	1 (9.1 %)	1 (3.1 %)	0	NS
免疫抑制薬 ^{##}	2 (18.2 %)	4 (12.5%)	3 (9.4 %)	NS
抗 TNF 療法	0	0	2 (6.3 %)	NS
プレドニゾロン使用量 (mg/day)				
アミロイドーシス診断時	6.41 ± 4.04	5.65 ± 3.09	5.03 ± 2.28	NS
アミロイドーシス診断後最高量	11.4 ± 9.44	10.3 ± 8.45	8.81 ± 6.10	NS
最終観察時	7.0 ± 2.2	9.6 ± 8.7	6.7 ± 4.2	NS
使用者数	11 (100 %)	31 (96.8 %)	31 (96.8 %)	NS

NS = 有意差なし、DMARDs = disease modifying anti-rheumatic drugs、TNF = tumor necrosis factor

* 1990-94 年と 1995-99 年、1995-99 年と 2000-05 年、1990-94 年と 2000-05 年、すべてを比較

‡ 1990-94 年と 2000-05 年の比較、1990-94 年と 1995-99 年、1995-99 年と 2000-05 年は NS

§ アミロイドーシス診断後毎 3 ヶ月ごとの CRP の平均

‡ アミロイドーシス診断時 CRP とアミロイドーシス診断後平均 CRP を比較 (p<0.02)

1990-94 年と 2000-05 年の比較、1990-94 年と 1995-99 年では p<0.03、1995-99 年と 2000-05 年は NS

** 1990-94 年と 1995-99 年の合計と 2000-05 年の比較

シクロフォスファミド、アザチオプリン、ミゾリビン

表 2. メトトレキサート (MTX) 使用有無での検討

	MTX 非使用群	MTX 使用群			p*
		全	アミロイドーシス		
			診断前より使用	診断後使用開始	
症例数	49	26	12	14	
性別 (男性 : 女性)	7 : 42	1 : 25	1 : 11	0 : 14	NS
アミロイドーシス診断時年齢 (歳)	63.7 ± 8.1	60.3 ± 9.3	60.4 ± 12.8	60.2 ± 5.2	NS
アミロイドーシス診断時症状					
下痢	20 (40.8 %)	6 (23.1 %)	3 (25.0 %)	3 (21.0 %)	NS
持続性蛋白尿	28 (57.1 %)	13 (50.0 %)	5 (41.7 %)	8 (57.1 %)	NS
腎機能障害	12 (44.9 %)	7 (26.9 %)	2 (16.7 %)	5 (35.7 %)	NS
症状なし	9 (18.4 %)	9 (34.6 %)	6 (50.0 %)	3 (21.4 %)	NS
血清クレアチニン (mg/dl)					
アミロイドーシス診断時	1.70 ± 1.44	0.88 ± 0.50	0.76 ± 0.31	0.98 ± 0.62	< 0.002
最終観察時	3.01 ± 2.43	1.74 ± 1.50	2.01 ± 1.96	1.49 ± 1.45	< 0.02
CRP (mg/dl)					
アミロイドーシス診断時	4.43 ± 4.24	3.48 ± 2.47	3.83 ± 2.18	3.17 ± 2.75	NS
アミロイドーシス診断後平均 [‡]	1.78 ± 2.21 [§]	1.13 ± 1.43 [§]	1.86 ± 1.77	0.50 ± 0.59 [§]	NS (< 0.002 [‡])
プレドニゾロン使用量 (mg/day)					
アミロイドーシス診断時	5.8 ± 3.0	4.9 ± 2.7	5.9 ± 2.0	4.1 ± 3.0	NS
アミロイドーシス診断後最高量	10.2 ± 8.3	9.3 ± 4.3	10.3 ± 7.9	8.4 ± 6.8	NS
最終観察時	9.2 ± 7.4	5.3 ± 3.0	7.0 ± 3.4	4.5 ± 2.8	< 0.002
腎障害改善例	3 (6.1 %)	6 (23.1 %)	2 (16.7 %)	4 (28.6 %)	NS
最終観察時生存者数	12 (24.5 %)	18 (69.2 %)	7 (58.3 %)	11 (78.6 %)	< 0.002
アミロイドーシス診断後生存期間	33.5 ± 31.4	54.8 ± 36.6	36.3 ± 19.0	70.6 ± 41.1	< 0.02
(月)	0 - 137	9 - 141	9 - 71	11 - 141	

NS = 有意差なし

* MTX 非使用群と MTX 使用群との比較

[‡]アミロイドーシス診断後毎3ヶ月ごとの CRP の平均

[§]アミロイドーシス診断時 CRP とアミロイドーシス診断後平均 CRP を比較 (p<0.002)

[‡]MTX 非使用群とアミロイドーシス診断後 MTX 使用開始群を比較

表 3. SAA1 遺伝子による検討

SAA1.3(γ) allele数	0	1	2	p*
症例数	17	25	21	
性別 (男性 : 女性)	1 : 16	1 : 24	2 : 19	NS
アミロイドーシス診断時年齢 (歳)	65.4 ± 7.5	60.2 ± 10.0	61.9 ± 7.2	NS
RA発症→ア症診断 (年)	17.6 ± 9.3	14.9 ± 8.5	15.6 ± 11.9	NS
アミロイドーシス診断時症状				
下痢	2 (11.8 %)	9 (36.0 %)	15 (71.4 %)	p<0.001**
持続性蛋白尿	13 (76.5 %)	21 (84.0 %)	20 (95.2 %)	NS
腎機能障害	10 (58.8 %)	18 (72.0 %)	19 (90.5 %)	p<0.05**
なし	3 (17.6 %)	2 (8.0 %)	0	NS
血清クレアチニン (mg/dl)	1.48 ± 1.2	1.30 ± 1.1	1.76 ± 1.7	
	NS			
CRP (mg/dl)	3.13 ± 4.7	3.99 ± 3.0	4.02 ± 3.5	NS
生存例	7 (41.2 %)	13 (52.0 %)	8 (38.1 %)	
	NS			
腎障害改善例	2 (11.8 %)	3 (12.0 %)	4 (19.0 %)	NS
ア症診断後生存期間	45.6 ± 34.2	41.3 ± 37.9	48.5 ± 36.2	NS

NS = 有意差なし

* SAA1.3(γ) allele数0と1、 allele数1と2、 allele数0と2、すべてで比較

** SAA1.3(γ) allele数0と1の合計とSAA1.3(γ) allele数2の比較、

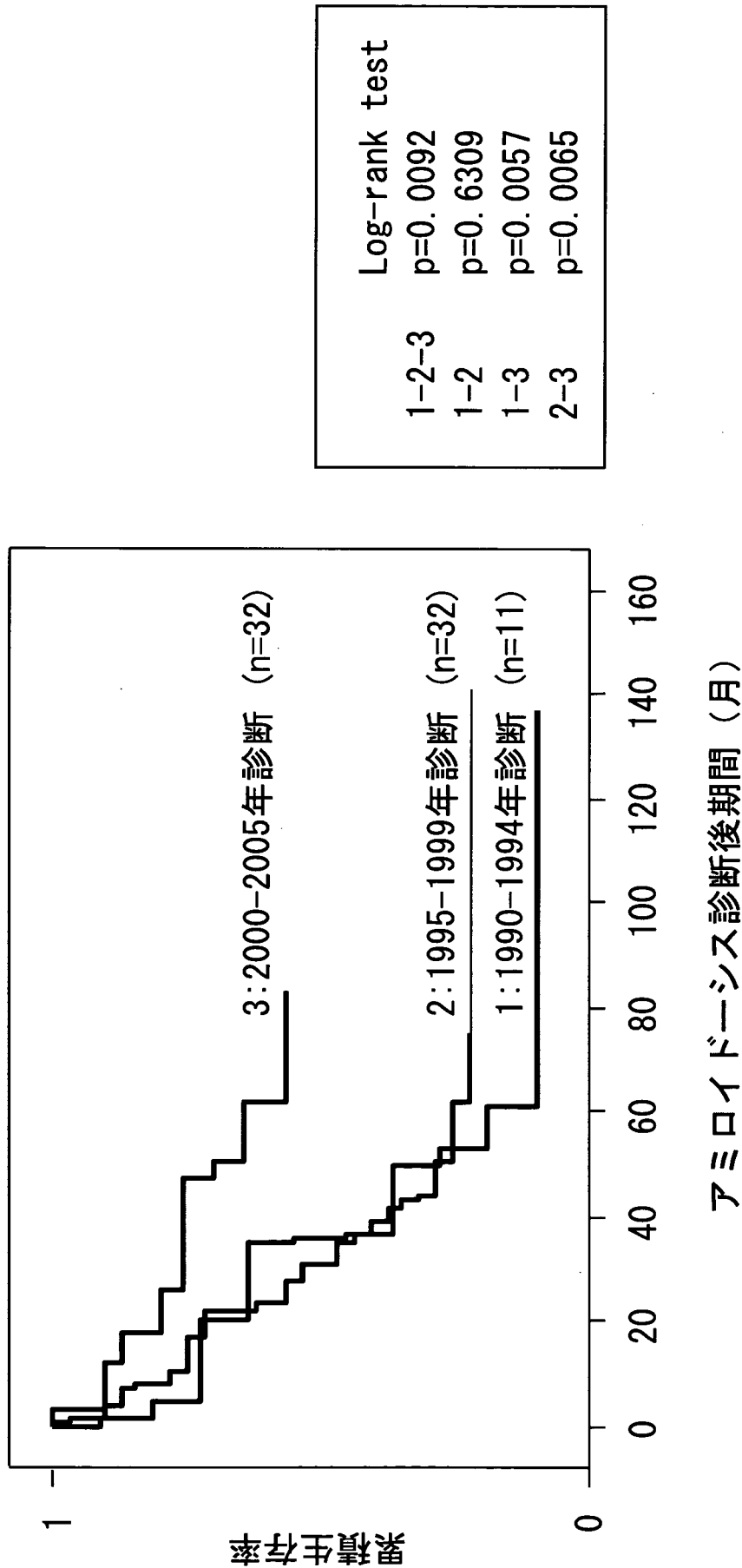
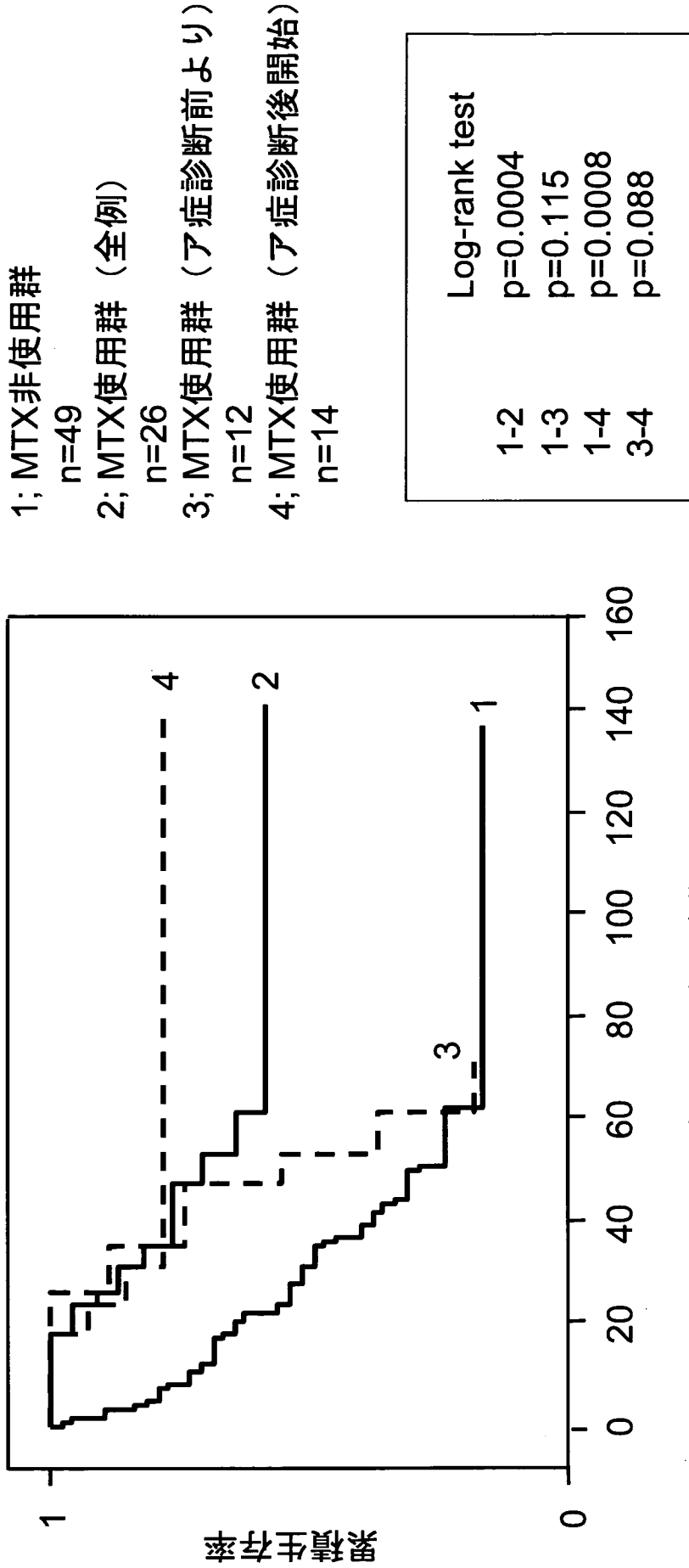


図1. AA-アミロイドーシス診断年別の生存曲線

2000-2005年に診断された群は、1990-1994年や1995-1999年に診断された群に比べ有意に予後良好であった。1990-1994年と1995-1999年の比較では差がみられなかった。



アミロイドーシス診断後期間 (月)

図2. メトトレキセート (MTX) 使用の有無での生存曲線

Kaplan-Meierの生存解析では、MTX使用群は未使用群に比べ有意に生命予後は良好であった。さらにアミロイドーシス診断前よりMTXを使用した群と診断後使用開始した群で分けると、診断前よりMTXを使用していた群では非使用群と差がなく、アミロイドーシス診断後MTX使用開始群の予後は非使用群と比較し有意に良好であった。