

図3. メトトレキセート (MTX) 使用の有無での生存曲線 (性別、年齢、血清クレアチニンをマッチさせた群との比較)

MTX非使用群は、アミロイドーシス診断時の血清クレアチニンが有意に高く年齢も高い傾向のため、MTX非使用群の年齢、性別、血清クレアチニンをマッチさせて生存解析を行った。アミロイドーシス診断後MTX使用開始したMTX使用群の予後は、血清クレアチニンなどをマッチさせたMTX非使用群と比較し有意に良好であった。

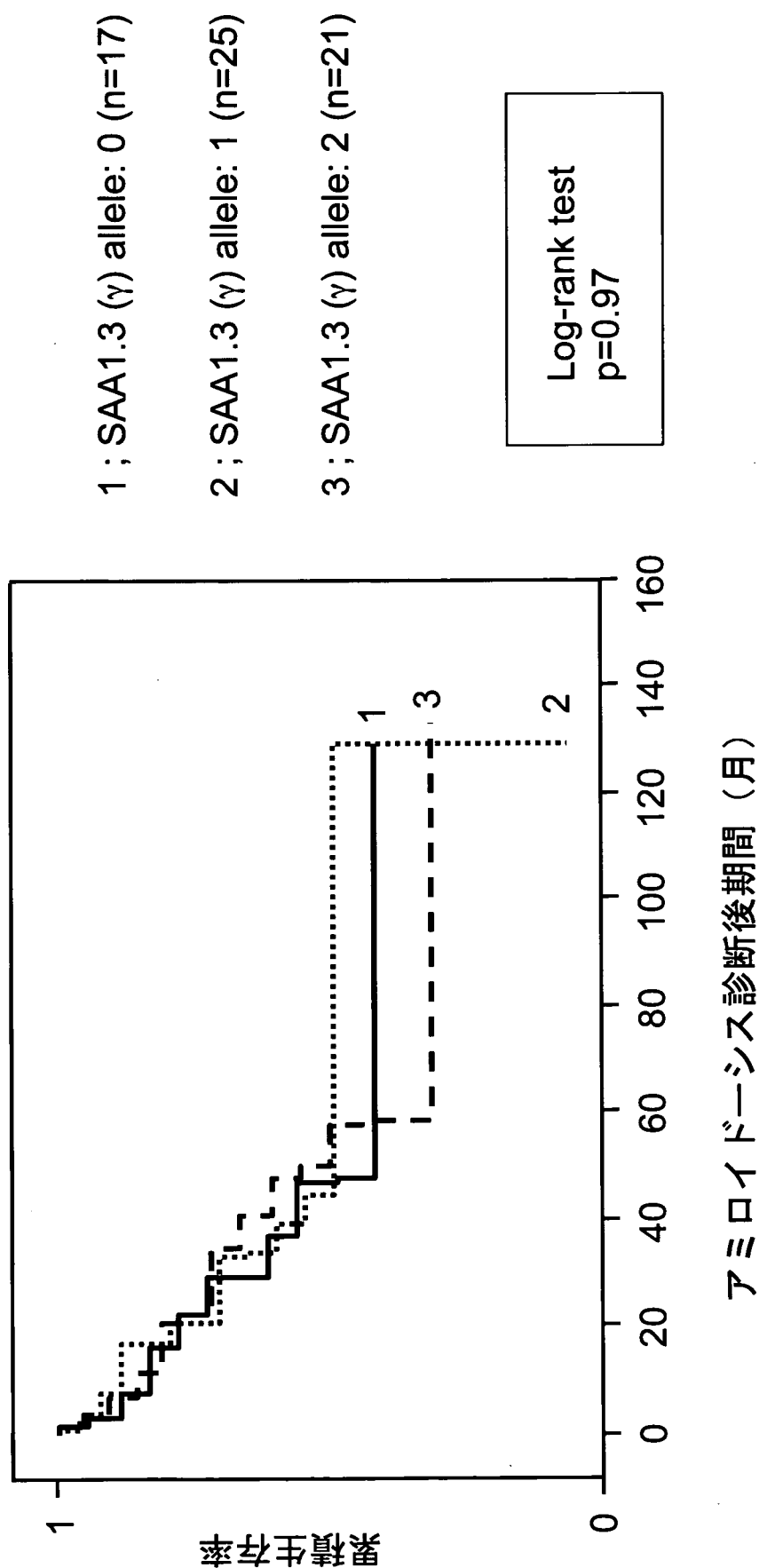


図4. SAA1.3(γ)allele数別による生存曲線
SAA1.3(γ)alleleの数別での生存曲線に有意差はみられなかった。

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

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

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 (AA) に対する抗サイトカイン療法は前駆物質 SAA に対する強い産生抑制効果からその臨床的有用性が報告されている。TNF 阻害及び IL-6 阻害を行った AA 合併関節リウマチ (RA) におけるその臨床効果を検討した。対象は AA 合併 RA に対して治療を行った、インフリキシマブ (IFX) : 5 例 (有症候 1 例、無症候 4 例)、エタネルセプト (ETN) : 4 例 (有症候 1 例、無症候 3 例)、トシリズマブ (TOS) : 4 例 (1 例は JIA carry over) (有症候 4 例) である。それぞれの群における SAA 値の推移、アミロイド症状の推移、上部消化管の組織沈着の変化について調査を行った。1. それぞれの生物学的製剤の使用期間は ETN: 11 ± 11 ヶ月、IFX: 27 ± 14 ヶ月、TOS: 49 ± 18 ヶ月であった。2. 開始時と最終観察時及び全経過平均の SAA ($\mu\text{g/ml}$) は、ETN: 294.96 → 24.79 : 21.28、INF: 259.9 → 17.51 : 67.78、TOS: 514.6 → 4.63 : 7.24 と良好に低下を示した。3. 経過中、すべての症例で重症消化管症状の発症は認めなかった。腎機能の推移も安定しており、TOS の 2 例では腎機能の改善を認めた。4. 組織沈着では、ETN は期間が短く、評価は未、INF は、少量沈着の 1 例で陰性化、他の 4 例はほぼ同程度、TOS は、大量沈着の 3 例のうち 2 例が著減、大量沈着と中等量沈着の各 1 例も減少した。[結論] すべての抗サイトカイン療法は、SAA 抑制効果が優れており、臓器障害の進行もほぼ認めず、AA アミロイドーシスの進行阻止に基本的に有用であると思われる。特に TOS は長期観察結果から、重症例かつ重症病型においても SAA 低下能、臨床症状安定化あるいは改善能、組織学的改善能が優れており、もっとも有用である可能性が高い。

A. 研究目的

AA アミロイドーシス (AA) に対する抗サイトカイン療法は前駆物質 SAA に対する強い産生抑制効果からその臨床的有用性が報告されている。今回、TNF 阻害及び IL-6 阻害を行った AA 合併関節リウマチ (RA) におけるその臨床効果を検討した。

B. 研究方法

対象は AA 合併 RA に対して治療を行った、インフリキシマブ (IFX) : 5 例 (有症候—消化管 1 例、無症候 4 例)、エタネルセプト (ETN) : 4 例 (有症候—腎+消化管 1 例、無症候 3 例)、トシリズマブ (TOS) : 4 例 (1 例は JIA carry over) (有症候—腎+消化管 2 例、腎 2 例) である。平均使用期間は、INF : 27 ± 14 カ月、ETN : 11 ± 11 カ月、

TOS : 49 ± 18 カ月であった。IFX の 1 例 (理由 : 食道癌) は 9 カ月で中止、TOS の 1 例 (理由 : 本人希望—不安神経症) は 36 カ月でそれぞれ使用中止した。AA 診断から、生物学的製剤使用までの平均期間は、IFX : 40 ± 48 カ月、ETN : 70 ± 59 カ月、TOS : 44 ± 34 カ月であった。それぞれの群における SAA、CRP 値の推移、アミロイド症状の推移、上部消化管の組織沈着の変化について調査を行った。

(倫理面への配慮)

SAA lexon3 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. 開始時と最終評価時と全経過の平均SAA(μ g/ml) (図1)

IFX: 開始時 259.9 ± 226.0 から、最終評価時 17.51 ± 16.46 と低下した。全経過平均は 67.78 ± 80.3 であった。

ETN: 開始時 294.96 ± 321.46 から、最終評価時 24.79 ± 21.87 と低下した。全経過平均は 21.28 ± 11.08 であった。

TOS: 開始時 514.60 ± 421.53 から、最終評価時 4.63 ± 2.04 と低下した。全経過平均は 7.24 ± 1.85 であった。

2. アミロイド症状の推移

① 重篤な消化管アミロイドの発症

難治性下痢、麻痺性イレウス、虚血性腸炎などの重篤な消化管アミロイド症状は経過中、全症例で認めなかった。

② 開始時と最終評価時の平均Creatinine(mg/dl) (図2)

INF: 開始時 0.47 ± 0.05 、最終評価時 0.59 ± 0.05 とほとんど変化を認めなかった。

ETN: 開始時 0.65 ± 0.21 、最終評価時 0.74 ± 0.22 とほとんど変化を認めなかった。

TOS: 開始時 1.20 ± 0.59 、最終評価時 1.13 ± 0.59 と軽度の低下を認めた。

3. 消化管組織沈着の改善の評価

IFX: 少量沈着の1例は陰性化した。他の4例はほぼ同程度で推移した。

ETN: 観察期間短く、評価未である。

TOS: 大量沈着の2例は著減し(図3、図4)、他の大量沈着の1例と中等量沈着の1例も減少した。

D. 考察

抗TNF阻害療法は、SAA抑制効果が優れており臓器障害の進行もほぼ認めず、AAの進行阻止に基本的に有用であると思われる。今回、比較的軽症例での検討であり、重症例での評価は今後の課題である。一方、IL-6阻害を行うTOSは長期観察結果から、重症例においてもSAA低下能、臨床症状安定化及び改善能が優れており、さらに有用である可能性が高い。

組織学的にアミロイド沈着の著減を示した2例はSAA1 exon 3多型がともに予後不良病型の1.3/1.3であり、これら重症病型の症例にすぐれ

た臨床的効果が示されたことはAAに対する高い有用性が示唆される。

E. 結論

すべての抗サイトカイン療法は、SAA抑制効果が優れており、臓器障害の進行もほぼ認めず、AAアミロイドーシスの進行阻止に基本的に有用であると思われる。特にTOSは長期観察結果から、重症例及び重症病型においてもSAA低下能、臨床症状安定化あるいは改善能、組織学的改善能が優れており、もっとも有用である可能性が高い。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 奥田恭章: AAアミロイドーシスの病態と診断 腎と透析 62: 194-198, 2007.

2) 奥田恭章: 関節リウマチの重要な合併症—AAアミロイドーシス *Medical Technology* 36:54-57, 2008.

3) Yasuaki Okuda: Review of Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis. *Biologics: Targets & Therapy* 2, in press.

2. 学会発表

1) 奥田恭章、大西誠、的場謙一郎、城山一男、山田明弘、孫瑛洙、高杉潔、山田俊幸: 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—, 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会、横浜、4/26-4/29, 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. 開始時と最終評価時と全経過の平均SAA
($\mu\text{g} / \text{ml}$)**

○ **Infliximab : 259.9 ± 226.0 → 17.51 ± 16.46**

全経過平均 : 67.78 ± 80.3

○ **Etanercept : 294.96 ± 321.47 → 24.79 ± 21.87**

全経過平均 : 21.28 ± 11.08

○ **Tocilizumab : 514.60 ± 421.53 → 4.63 ± 2.04**

全経過平均 : 7.24 ± 1.85

**図2. 開始時と最終評価時のCreatinine
(mg / dl)**

○ **Infliximab: 0.47 ± 0.05 → 0.59 ± 0.05**

○ **Etanercept: 0.65 ± 0.21 → 0.74 ± 0.22**

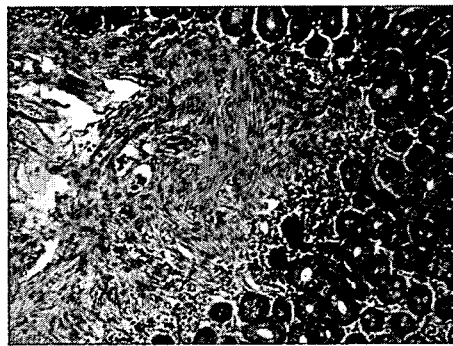
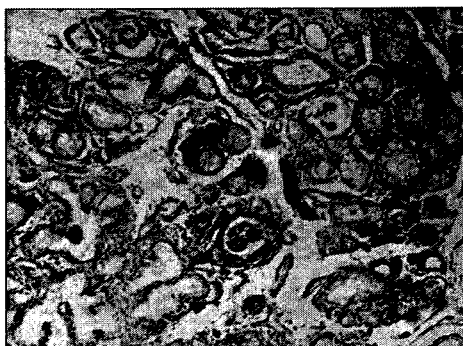
○ **Tocilizumab: 1.20 ± 0.59 → 1.13 ± 0.59**

図3. 大量沈着例1 - Tocilizumab

SAA1 exon3多型 : 1.3 / 1.3

Tocilizumab治療前

Tocilizumab治療後
(6年)



Marked regression of amyloid A protein deposits was observed after the tocilizumab treatment. (Congo red)

図4. 大量沈着例2 - Tocilizumab

SAA1 exon3多型 : 1.3 / 1.3

Tocilizumab治療前

Tocilizumab治療後
(4年)



Marked regression of amyloid A protein deposits was seen after the treatment. (Congo red)

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 2. AA アミロイドーシスの臨床研究会の発足

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⁵⁾、工藤幸司⁶⁾、
 下条文武⁷⁾、高市憲明⁸⁾、中里雅光⁹⁾、山田俊幸¹⁰⁾
 研究協力者 稲田進一¹¹⁾、江口勝美¹²⁾、公文義雄¹³⁾、佐伯修¹⁴⁾、田中敏郎¹⁵⁾、田村裕昭¹⁶⁾、
 寺井千尋¹⁷⁾、中野正明⁷⁾、中村正¹⁸⁾、松原司¹⁹⁾、養田清次¹⁰⁾、山名征三²⁰⁾
 金沢大学¹⁾、信州大学²⁾、山口大学³⁾、愛知医科大学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¹⁰⁾、
 東京都立大塚病院¹¹⁾、長崎大学¹²⁾、高知大学¹³⁾、大阪府立大学¹⁴⁾、
 大阪大学¹⁵⁾、勤医協中央病院¹⁶⁾、東京女子医科大学¹⁷⁾、
 熊本リウマチセンター¹⁸⁾、松原メイフラワー病院¹⁹⁾、東広島記念病院²⁰⁾

研究要旨 AA アミロイドーシスの新たな治療法の開発を目標とし、班研究として AA 分科会が設立された。しかし班研究としてではなく、班とは切り離して新たに「AA アミロイドーシス臨床研究会」の設立をめざした。研究会として規約を作成し、規約に則り会長、理事、監査、幹事を決定した。今後は理事会決定を中心として会の運営をおこなう。その結果、臨床研究計画が検討されている。臨床研究は 2 段階に大別され、第 1 段階の観察期間における方針がほぼ完成し、今後第 2 段階での検討薬投与期間における臨床研究計画を作成し、諸書類を確立して研究を推進する。

A. 研究目的

AA アミロイドーシスに対するヒト化抗 IL-6 受容体抗体 (トシリズマブ) を用いた SAA 抑制による臨床研究のために、AA アミロイドーシス専門医師による臨床研究会を発足する。

(倫理面への配慮)

本段階での倫理面への配慮は全く不要である。しかし、実施段階では臨床研究を行うにあたり、今後患者の了解を得るためインフォームドコンセントを要する。

B. 研究方法

アミロイドーシス班、山田班長を中心として AA アミロイドーシス治療臨床試験のために AA 分科会を立ち上げ、2006 年 9 月及び 12 月、2007 年 8 月の計 3 回で臨床研究のためにプロトコル作成、組織作成、実施方法等を検討した。その結果、本臨床試験は班研究として行うのではなく、状況に即したより広い視野に立って、医師主導型の臨床研究として行うこととなった。このため、AA アミロイドーシスの臨床研究会を発足し、本研究会で臨床研究を行う。

C. 研究結果

1. 第 3 回 AA 分科会 (2007 年 8 月 30 日、山口大学)

1) 経過報告: 2006 年 12 月開催の第 2 回 AA 分科会後、実質的に臨床試験が実施できるように諸問題に取り組んだ。その結果、研究班臨床試験ではなく、アミロイドーシス班とは別個の研究組織で臨床研究を行うこととなった。

2) 今後の研究組織について

- (1) AA アミロイドーシス臨床研究会の発足：経過説明の結果、班研究 AA 分科会から医師主導型 AA アミロイドーシス臨床研究会とすることが了解された。
- (2) AA アミロイドーシス臨床研究会の規約作成：原案が説明された。ただし役員については研究会員が決定してから検討する。
- (3) AA アミロイドーシス臨床研究会、会員について：現会員数では不十分であるので、新たに参加者を募ることとなった。
- (4) 臨床研究とすることより、実施体制、患者補償等、再検討を要することが討議された。
- (5) 臨床研究とすることから、資金について再検討を要することが討議された。
- (6) 研究結果の論文発表に際して必要承認を得るプロセスが示された。i) 臨床研究計画の倫理審査を受け承認を得ること。ii) FDA、WHO または U-MIN に臨床研究登録を申請すること。

2. AAアミロイドーシス臨床研究会について

(1) 会員（表 1）

会長 吉崎和幸
 理事 江口勝美、奥田恭章、寺井千尋、
 中村正、簗田清次、山田俊幸
 監事 石原得博、高市憲明
 幹事 田中敏郎

(2) 研究基本原則

- ・ AA アミロイドーシス臨床研究会が行う医師主導型の自主臨床研究で、いわゆる治療試験ではない。従って、検討薬の対象疾患拡大を目的としない。
- ・ 患者福祉のための治療研究である。
- ・ 国際レベルの臨床研究とし、一流誌掲載を目標とする。
- ・ 患者に対する倫理原則を遵守する。

(3) 臨床研究方法

- ・ 臨床研究施設：研究会員所属または関連施設で行う多施設共同による臨床観察・治療研究

- ・ 対象患者：RA 患者でアミロイド沈着が確認されている患者

- ・ 目標症例数：100 例

- ・ 研究デザイン

第 1 段階 観察期間(約 6 ヶ月)

第 2 段階 検討薬投与期間(1-1.5 年)

- ・ 実施期間：2008 年 1 月～2010 年 12 月

- ・ 倫理：ヘルシンキ宣言に基づく倫理の原則を遵守し、臨床研究に関する倫理指針に準用して実施する。

(4) 研究実施タイムコース（図 1）

D. 考察

生物製剤の登場により、AA アミロイドーシスに対する治療効果も期待できるようになったことにより、客観的評価を行い、新たな治療法を開発する必要が生じた。このため当班として積極的に取り組むこととなったが、諸事情により班とは切り離して自主的に研究を行うことから、班員を中心に AA アミロイドーシス臨床研究会を発足させた。このため多少紆余曲折があり、予定より活動が遅れたことを反省する。

E. 結論

AA アミロイドーシスの治療研究を AA アミロイドーシス臨床研究会として実施することが決定され、そのための準備を進めることとなった。

F. 健康危険情報

臨床研究会に入る前段階の検討を行っているため、特記すべき危険情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nishikawa T, Hagihara K, Isobe T, Matsumura A, Song J, Tanaka T, Kawase I, Naka T, Yoshizaki K: Transcriptional complex formation of c-Fos, STAT3, and HNF-1 α is essential for cytokine-driven CRP gene expression. *J. Immunol.* 2008, in press.

2) 吉崎和幸, 萩原圭祐, 西川哲平, 宋健: AA アミロイドーシスの治療と展望. *腎と透析* 62: 199-207, 2007.

3) 吉崎和幸: 関節リウマチにおける抗体医薬治

療の今後の展望. *Pharma Medica* 25:51-55, 2007.

4)吉崎和幸: キャッスルマン病. *IL-6 Bench to Bedside*. 大阪:メディカルレビュー p.25-37, 2007.

2. 学会発表

1)Yoshizaki K, Hagihara K, Nishikawa T, Song J: Efficacy and pathogenic analysis of chronic inflammatory diseases by the IL-6 blocking therapy. 8th World Congress on Inflammation. Copenhagen, Denmark, June 17, 2007.

2)吉崎和幸: 慢性炎症性疾患におけるヒト化抗IL-6 受容体抗体による炎症関連分子の産生抑制機序. 第 28 回日本炎症・再生医学会シンポジウム. 東京、8月 2-3 日、2007.

3)吉崎和幸: 生物製剤をどのように使い分けていけば良いのか. 第 17 回日本リウマチ学会近畿

支部学術集会. 大阪、9月 8 日、2007.

4)吉崎和幸: IL-6 阻害療法が教えてくれた病態解析と新たな治療への展開. 第 35 回日本臨床免疫学会シンポジウム. 大阪、10月 19 日、2007.

5)吉崎和幸: 臨床 IL-6 物語. 第 35 回日本臨床免疫学会会長講演. 大阪、10月 19 日、2007.

6)吉崎和幸: リウマチ疾患の病態解析と治療展望—炎症病態におけるサイトカインと炎症マーカーについて—. 横浜、1月 24 日、2008.

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

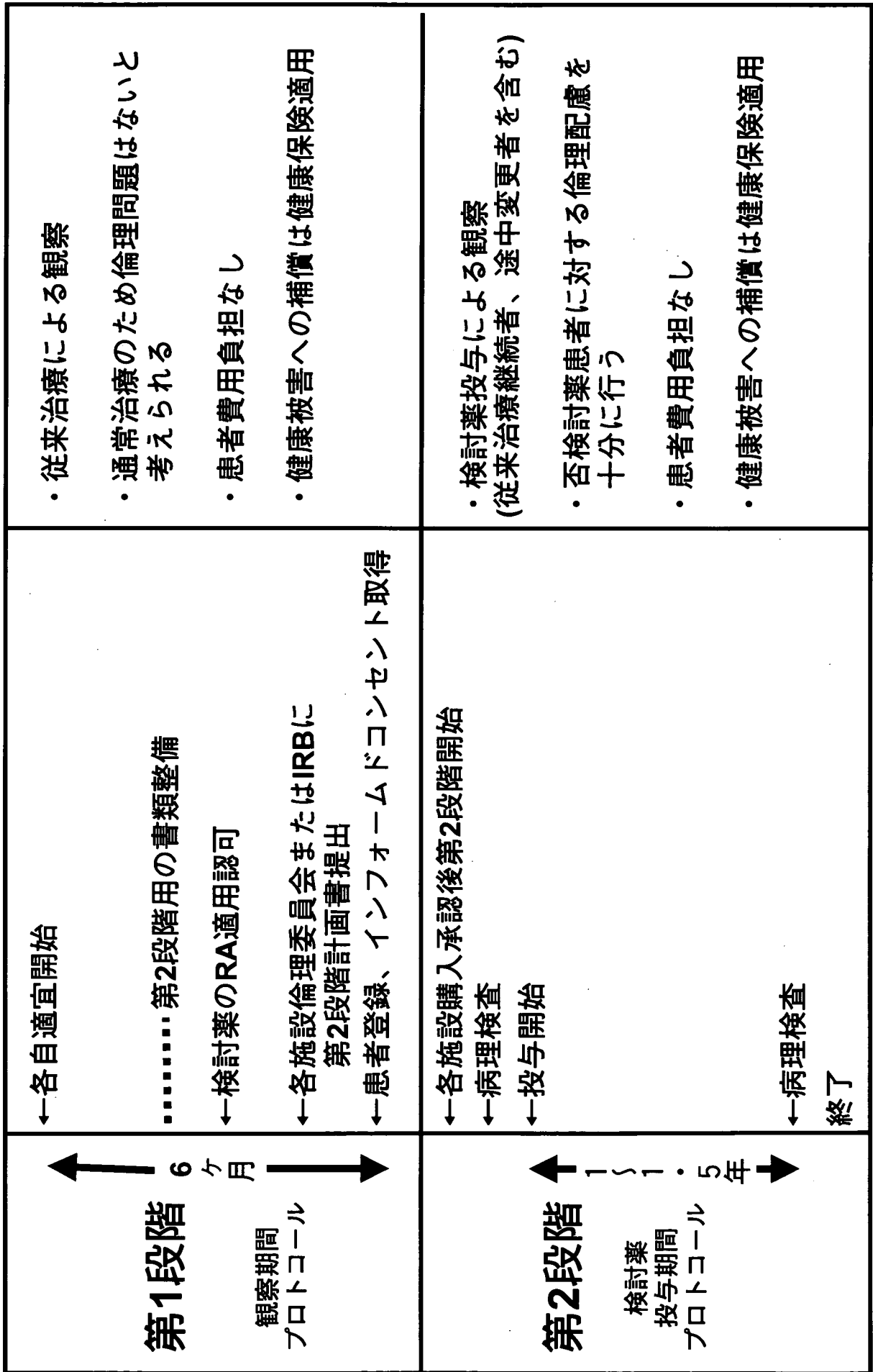
3. その他

なし

表1. AAアミロイドーシス臨床研究会 会員

施設名	担当者	施設名	担当者
勤医協中央病院	田村 裕昭	松原メイフラワー病院	松原 司
自治医科大学附属病院	簗田 清次	東広島記念病院	山名 征三
新潟大学医学部附属病院	下条 文武	道後温泉病院	奥田 恭章
新潟大学医学部附属病院	中野 正明	高知大学医学部附属病院	公文 義雄
信州大学医学部附属病院	池田 修一	長崎大学医学部・歯学部附属病院	江口 勝美
金沢大学医学部附属病院	山田 正仁	宮崎大学医学部附属病院	中里 雅光
虎の門病院	高市 憲明	熊本リウマチセンター	中村 正
東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	寺井 千尋		
都立大塚病院	稲田 進一	臨床検査測定施設	担当者
愛知医科大学病院	今井 裕一	東北大学	工藤 幸司
大阪大学医学部附属病院	田中 敏郎	自治医科大学	山田 俊幸
大阪大学保健センター	吉崎 和幸	山口大学	石原 得博
堺温心会病院	佐伯 修		

図1. 研究実施タイムコース (模式図)



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

AL アミロイドーシスに対する治療法の基礎的研究 -AL アミロイドーシスを含む MGUS における単クローン性形質細胞の NF-kB 活性について-

分担研究者 河野道生 山口大学・大学院医学系研究科・細胞シグナル解析学

共同研究者 大津山賢一郎、Jakia AMIN

山口大学・大学院医学系研究科・細胞シグナル解析学

研究要旨 ALアミロイドーシスを含む MGUS における単クローン性形質細胞の NF-kB 活性につき検討を加えた。NF-kB 活性の評価として、その標的遺伝子の一つである CD54 遺伝子に注目した。NF-kB 活性 (DNA 結合能)は細胞膜表面の CD54 蛋白発現と正の相関を示すことを確認した。MGUS の単クローン性形質細胞は、CD54 発現が極めて高く、正常骨髄形質細胞と同等あるいはそれ以上であった。逆に、骨髄腫細胞では CD54 発現は有意に低かった。NF-kB 活性を上昇しうるものの一つに SDF-1 α があるが、単クローン性形質細胞の CD54 発現と骨髄液中の SDF-1 α 活性とは正に相関した。In vitro 培養系での SDF-1 α 添加によっても、CD54 発現は有意に亢進した。更に、MGUS の単クローン性形質細胞における極めて高い NF-kB 活性の生存・増殖に及ぼす作用について、予備的実験を行った。一つには、NF-kB 標的遺伝子の一つである p53 遺伝子につき検討した。NF-kB 活性の高い骨髄腫細胞株では、p53 遺伝子発現は強く誘導されていたが、p53 遺伝子に点突然変異を認め p53 蛋白の機能異常が間出された。NF-kB 活性の低い細胞株では、p53 遺伝子変異は認められなかった。今後、MGUS の単クローン性形質細胞において、その極めて高い NF-kB 活性とその生存に及ぼす影響、p53 遺伝子変異の有無等を含めた関係を明らかにして行かなければならない。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスに対する有効な治療法を確立するための基礎的研究を行う。特に、単クローン性形質細胞の生存に深く関る恒常的 NF-kB 活性の細胞生物学的意義を明らかにする。本年度は NF-kB 標的遺伝子の一つである CD54 遺伝子のタンパク発現を表面抗原解析することで、恒常的 NF-kB 活性の高低を推し量るとともに、その活性化機構にも解析を加える。

B. 研究方法

1. 対象及び方法

1)AL アミロイドーシス症例を含む MGUS(monoclonal gammopathy of undetermined significance、前骨髄腫状態)および骨髄腫患者からの骨髄穿刺液から常法のごとく骨髄単核球を分離した。2)骨髄単核球

を FITC-CD38, PE-CD19, PE-MPC-1, PE-CD49e, PE-CD54, PC5-CD56, PC5-CD45 等で多重染色し、フローサイトメーター(Epics Elite ESP, Coulter)で解析した。3)骨髄穿刺液から血漿を分離し、ELISA 法で SDF-1 α 活性を測定した。4)in vitro 培養系にて、SDF-1 α 存在下で培養後、CD54 発現の変化をフローサイトメーターで解析した。5)一部の細胞にて、RT-PCR およびマイクロアレイ法(Human Genome U133Plus2.0 array (54,675 genes, Affymetrix))による遺伝子発現プロファイリング(GEP)を行った。6)p53 遺伝子の exon5~exon8(DNA 結合領域)での点突然変異の有無を PCR による直接シーケンス決定で解析した。

(倫理面への配慮)

C. 研究結果

1) ALアミロイドーシスを含む MGUS の単クローン性形質細胞では、CD54 発現は有意に正常骨髄形質細胞に同等あるいはよりも高かった (図-1)。逆に、骨髄腫細胞では CD54 発現は低下していた。NF- κ B 標的遺伝子の発現をマイクロアレイ法による GEP および RT-PCR で解析すると、確かに CD54 遺伝子発現は NF- κ B 活性と正に相関していた (図-2、図-3)。2) 骨髄穿刺液中の SDF-1 α 活性と単クローン性形質細胞の CD54 発現は正に相関していた ($P < 0.05$)。in vitro 培養系で骨髄腫細胞を SDF-1 α 添加で培養すると、1 週間後には CD54 発現は有意に上昇していた。3) p53 遺伝子変異について、NF- κ B 活性の高い骨髄腫細胞株では認めたが、NF- κ B 活性の極めて低い MOLT-4 細胞株では認めなかった。患者骨髄腫細胞株では検出された。

D. 考察

骨髄腫細胞株の恒常的 NF- κ B 活性は主に RelB/p50 による alternative pathway の活性化であることを明らかにしてきた。ALアミロイドーシスを含む MGUS の単クローン性形質細胞では、CD54 発現が正常骨髄形質細胞のそれと同等あるいはそれ以上に極めて高いことから、NF- κ B 活性も極めて高いことが考えられる。NF- κ B 活性を上昇させるものの一つに SDF-1 α がある。今回の検討では細胞の CD54 発現の強度と骨髄液中の SDF-1 α 活性とが正の相関を示したことから、NF- κ B 活性の上昇に SDF-1 α 活性の上昇が関係している可能性を示した。In vitro 培養系での SDF-1 α 刺激実験の結果もそれを支持するものであった。

一方で、NF- κ B 標的遺伝子の中に p53 遺伝子がある。NF- κ B 活性が極めて高いと、その標的遺伝子である p53 遺伝子発現も高まる。NF- κ B 活性が高い骨髄腫細胞株では、p53 遺伝子発現が予想通り上昇していたが、p53 遺伝子の DNA 結合領域(exon5~exon8)に点突然変異を検出し、骨髄腫細胞でも検出された。MGUS 症例での検討は未だ十分になされていないが、p53 遺伝子発現も高く遺伝子変異がなければ、MGUS の単クローン性形質細胞の生存・増殖動態を考える上で

極めて重要な点となるであろう。

今後、極めて高い恒常的 NF- κ B 活性と in vitro 培養系における生存能の強弱との関係、p53 遺伝子変異の有無 (p53 蛋白機能の正常、異常) を明らかにする必要がある。原発性 ALアミロイドーシスの治療戦略は、骨髄腫のそれとは異なる視点 (異なる薬剤、異なる薬剤感受性) が必要と思われる。

E. 結論

1. 原発性 ALアミロイドーシスを含む MGUS からの単クローン性形質細胞は、正常骨髄形質細胞と同等あるいはそれ以上の強い CD54 発現が認められた。
2. NF- κ B の DNA 結合能は CD54 発現の強弱と正に相関活性していた。
3. 単クローン性形質細胞の CD54 発現は、骨髄液中の SDF-1 α 活性と正に相関していた。
4. 単クローン性形質細胞を in vitro で SDF-1 α 添加で培養すると、CD54 発現が上昇した。SDF-1 α 活性の上昇は、NF- κ B 活性上昇の一つに機序と考えられた。
5. NF- κ B 活性の高い骨髄腫細胞株では、p53 遺伝子発現は高く誘導されていたが、p53 遺伝子の点突然変異 (DNA 結合領域) が検出され p53 蛋白機能は障害されていた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Liu S, Otsuyama K, Ma Z, Abroun S, Shamsasenjan K, Amin J, Asaoku H, Kawano MM: Induction of multilineage markers in human myeloma cells and their down-regulation by interleukin-6. *Int J Hematol* 85:49-58, 2007.
- 2) Otsuyama K, Ma Z, Abroun S, Amin J, Shamsasenjan K, Asaoku H, Kawano MM: PPARbeta-mediated growth suppression of baicalein and dexamethasone in human myeloma cells. *Leukemia* 21:187-190, 2007.

2. 学会発表

- 1) Kawano MM, Otsuyama K, Liu S: Induction of multi-lineage markers and their down-regulation by interleukin-6 in human myeloma cells. XIth International Myeloma Workshop, Kos Island, Greece, June 25-30, 2007.
- 2) Islam A, Otsuyama K, Amin J, Abroun S, Shamsasenjan K, Iqbal MS, Kawano MM: SDF-1 is responsible for the constitutive high NF- κ B activity in human Myeloma cells. 49th Annual Meeting of American Society of Hematology, Atlanta, Georgia, U.S.A., Dec.8-11, 2007.
- 3) 大津山賢一郎、Amin J, Islam A, Shamsasenjan K, Iqbal MS, Abroun S, 河野道生: ヒト骨髄腫細胞における恒常的 NF- κ B 活性とそれを制御する PPAR β 活性化機構. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会、横浜、10 月 11 日, 2007.
- 4) Amin J, 大津山賢一郎, Islam A, Shamsasenjan K, Iqbal MS, Abroun S, 河野道生: ヒト骨髄腫細胞における CD54 発現と恒常的 NF- κ B 活性の相関. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会、横浜、10 月 11 日, 2007.
- 5) 河野道生、大津山賢一郎: 骨髄腫最近の知見—骨髄腫細胞は幹細胞様であり、その NF- κ B 活性は正常形質細胞より低い— (会長要望講演) 第 32 回日本骨髄腫研究会総会、東京、11 月 10 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

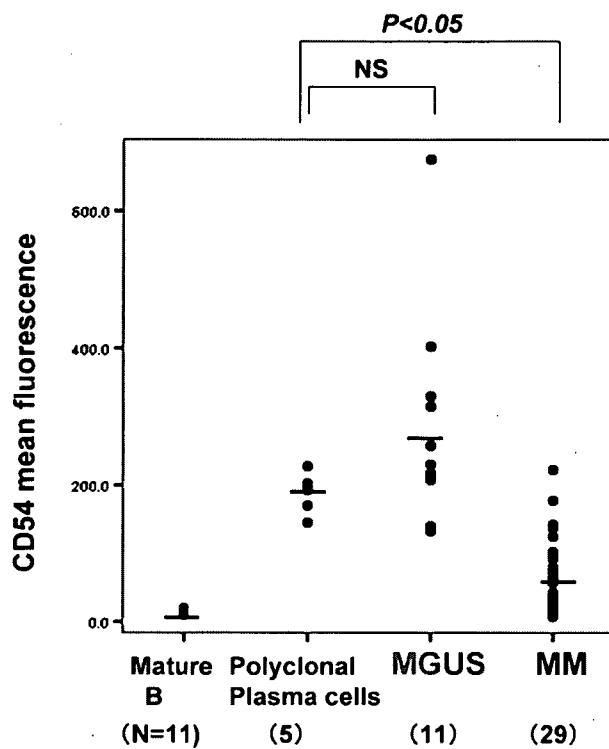


図-1 各種単クローン性形質細胞における CD54 発現

AL アミロイドーシスを含む MGUS の単クローン性形質細胞は、正常骨髄形質細胞(polyclonal plasma cells)と同等あるいはそれ以上に高い CD54 発現であった。

逆に、骨髄腫細胞(MM)では、正常骨髄形質細胞よりも有意に低い発現であった。

Function	Gene	U266	AMO1	NOP2	ILKM8
Regulator of apoptosis	IAP-1	+	+	+	+
	IAP-2	+	+	+	+
	XIAP	+	+	+	+
	IEX-1L	+	+	+	+
Cell Adhesion	CD54	+	+	+	+
	Fibronectin	+	+	+	+
Cytokine/Chemokine	TNF α	+	+	+	+
Immuno-receptor	CD38	+	+	+	+
Stress response gene	SOD1	+	+	+	+
	SELS	+	+	+	+
Cell-surface receptor	A2A	+	+	+	+
	Ly49	+	+	+	+
Transcription factor	NF- κ B 1	+	+	+	+
	NF- κ B 2	+	+	+	+
	BCL3	+	+	+	+
	p53	+	+	+	+

	Gene	U266	AMO1	NOP2	ILKM8
Cytokine/Chemokine	CCL19	-	-	-	-
	CCL22	-	-	-	-
	CCL23	-	-	-	-
	CCL28	-	-	-	-
	IL-2	-	-	-	-
	IL-11	-	-	-	-
	IL-8	-	-	-	-
Immuno-receptors	CD40	-	-	-	-
	CD86	-	-	-	-
Growth factors/ligands	BMP4	-	-	-	-
Transcription factors	NR4A2	-	-	-	-
	HGF	-	-	-	-
Miscellaneous	CCND3	-	-	-	-

図-2 NF- κ B 標的遺伝子発現プロファイリング(GEP)

骨髄腫細胞で発現している標的遺伝子(左側)、発現していない標的遺伝子(右側)を示す。中でも、CD54 遺伝子の発現は、NF- κ B に厳格に調節されている。

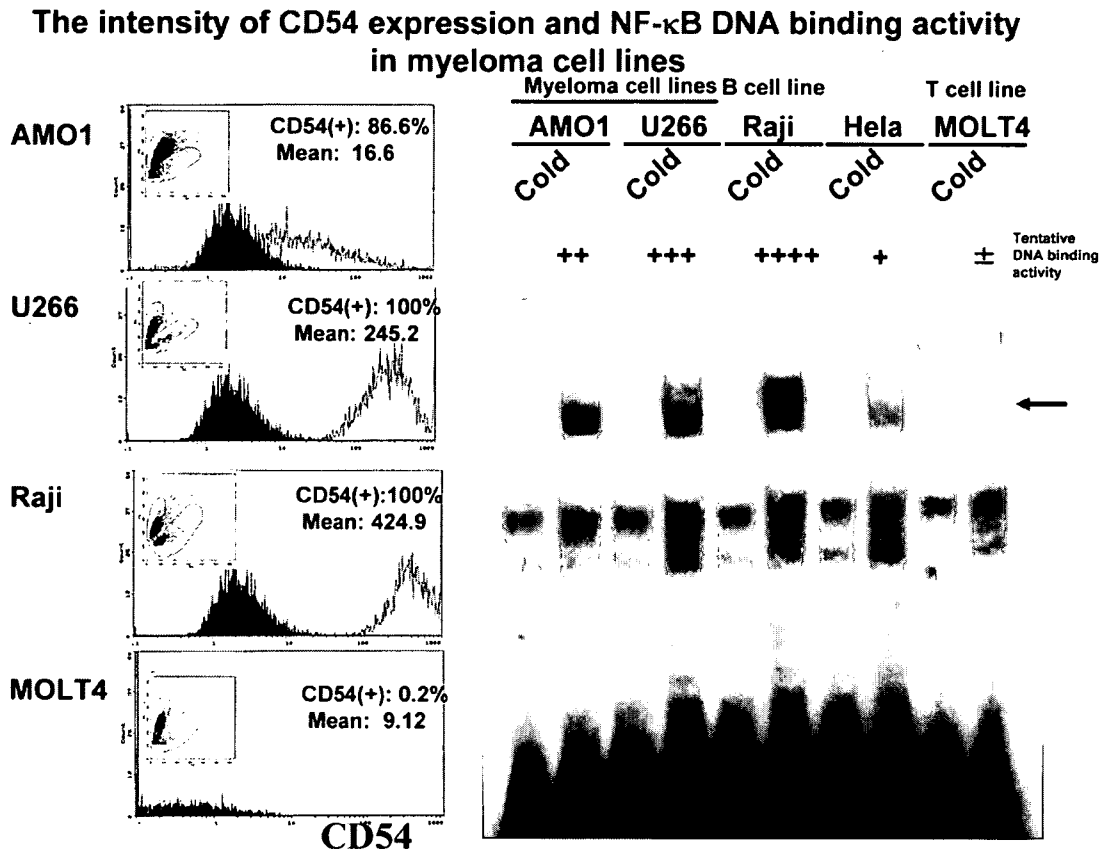


図-3 NF- κ B 活性(DNA 結合能)と CD54 発現強度の正の相関
 骨髄腫細胞株(U266,AMO1), B 細胞株(Raji)およびT細胞株(MOLT4)での、NF- κ B 活性 (DNA 結合能、ゲル・シフト アッセイ) と CD54 発現 (CD54 蛋白発現、表面抗原解析) を示す。

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

monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) 患者での 尿中 Bence Jones 蛋白 (λ 型) と腎障害について

分担研究者 今井裕一 愛知医科大学 腎臓・膠原病内科

共同研究者 山田晴生、菅 憲弘、三浦直人、山口 諭、渡邊一司、北川 渡、西川和裕
 愛知医科大学 腎臓・膠原病内科

研究要旨 MGUS は、M-蛋白は存在するが多発性骨髄腫が否定された疾患であり、人口の 1% 程度で見られる。腎病変を伴った MGUS 5 例および全身性アミロイドーシス 7 例で尿中の軽鎖の存在を Western Blotting で検討した。MGUS 5 例は光顕・蛍光抗体所見から 2 例は膜性増殖性糸球体腎炎、2 例は巣状糸球体硬化症であった。全例で電顕を施行したが、アミロイド線維構造物の沈着は認めなかった。その 5 例中 3 例で血清・尿の免疫電気泳動で IgG-κ の M 蛋白を認めた。尿の Western Blotting では 5 例全例に λ 型軽鎖 2 量体を認めた。しかし κ 型遊離軽鎖は認めなかった。本研究ではモノクロナールな免疫グロブリン増多症の 1 つである MGUS で BJP の存在を伴う腎障害を認めた。組織学的にアミロイド線維様構造物が証明されない場合でも、尿中に λ 型軽鎖 2 量体が増加しているという特徴があった。一方、腎病変が存在しない全身性アミロイド症では尿中の軽鎖 2 量体は検出できなかった。このことは腎障害の発症に免疫グロブリンの遊離軽鎖(λ 鎖)が重要であることを示唆している。

A. 研究目的

MGUS は免疫電気泳動で M-蛋白の存在を認めるが多発性骨髄腫が否定された疾患であり、人口の 1% 程度で見られる。人口の高齢化に伴い増加していると考えられている。これは多発性骨髄腫とは異なり化学療法を必要としないが、形質細胞が自律的増殖状態にあることから、前癌病態とされている。本研究では MGUS における腎病変と尿中軽鎖 2 量体の関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1:対象および方法

12 例(腎病変を伴わない全身性 AL 型アミロイドーシス 3 例, 腎病変を合併した異常蛋白血症 9 例, そのうち典型的な腎アミロイドーシス 4 例, MGUS 5 例) で尿中の軽鎖の存在を Western Blotting で検出した。コントロールとして健常者尿・IgA 腎症患者尿を検討した。

2:倫理面への配慮

本研究は臨床検体を使用して、臨床検査の延長

上で応用して施行するものであり、倫理的問題は生じなかった。

C. 研究結果

1: 腎病変を伴わない全身性アミロイドーシス
 表の Case1-3 に腎病変を伴わない全身性アミロイドーシスを示す。血清の免疫電気泳動では λ 鎖が 2 例、κ 鎖が 1 例であった。いずれの症例も尿には免疫電気泳動・Western Blotting にて尿中に BJP を認めなかった。

2: 腎病変を伴った異常蛋白血症

表の Case4-12 に腎病変を伴った異常蛋白血症 9 例を一覧に示す。典型的な腎アミロイドーシス 4 例 (Case4-7)、MGUS 5 例 (Case8-12) であった。腎アミロイドーシスでは λ 型 3 例、κ 型 1 例を認めた。血清・尿の免疫電気泳動および Western Blotting では血清と同型の BJP を検出した。

一方、MGUS の症例では血清で λ 型を 3 例、κ 型を 2 例に認めた。尿中には免疫電気泳動で BJP を認めなかった。しかし、Western Blotting ではいず

れもλ型の BJP を検出した。

3 : MPGN 症例(Case 10)の病理所見

20個の糸球体で3個の硬化糸球体を認めた。図1に示すように、残り個の糸球体ではPAS染色で糸球体係蹄の一部の二重化とメサングウム細胞の増殖とメサングウム基質の増加を認めた。組織学的には膜性増殖性糸球体腎炎と診断した。

図2に示すように蛍光抗体所見で、糸球体でκ鎖が有意に染色されたが、興味深いことに、一部の尿細管でλ鎖の染色を認めた。

図3に示すように電子顕微鏡像では、係蹄の内皮下に免疫複合体を認め、膜性増殖性糸球体腎炎の像に符合した所見を示したが、アミロイドを思わせる線維状の構造物は認めなかった。

4 : FGS 症例(Case 11)の病理所見

16個の糸球体で2個の硬化糸球体を認めた。残り14個の糸球体のうちで7個の糸球体に図4に示すようなPAS染色・マッソントリクローム染色でsegmentalな糸球体硬化を認めた。図5に示す様に蛍光抗体所見では糸球体・尿細管にλ鎖が有意に染色された。また、図6に示すように電子顕微鏡では繊維状構造物の沈着を認めなかった。

5 : 尿の BJP 検出

MGUS で腎病変を認めた5例について、尿の BJP を Western Blotting で確認した。図7・8に示す様に、いずれも尿中にλ型軽鎖の2量体を認めた。興味深いことに血清中に増加した軽鎖の種類にかかわらず、尿中にはλ鎖の2量体を有意に認めた。IgA 腎症患者・健常者の尿にはκ・λいずれもBJPを認めなかった。

D. 考察

モノクロナールな免疫グロブリン増多症の1つであるMGUSで腎病変を合併した症例を経験した。組織学的に電子顕微鏡レベルでアミロイド類似の線維様構造物が証明されない場合でも、尿中にλ型軽鎖2量体の増加を認めた。また、複数臓器にアミロイド沈着が観察される場合でも腎病

変が存在しない場合には尿中の軽鎖2量体を検出できなかった。このことは腎障害の発症に免疫グロブリンの遊離軽鎖の存在が重要であることを示す所見と考えた。

近年、免疫グロブリン軽鎖がフリーラジカル産生を介して直接に培養糸球体上皮細胞に障害性を示すことが示されている。この結果によれば、κ鎖よりもλ鎖の方がより細胞障害性が強いことが示されている。

臨床的にも腎アミロイドーシスではアミロイドの沈着の程度と腎機能・ネフローゼ症候群の程度とは一定の関係を認めないことが知られている。このことも遊離軽鎖の存在が病態に重要な影響を及ぼしていることを示唆する知見であると思われた。

E. 結論

MGUS で尿中に遊離λ型軽鎖2量体を認め、組織学的にMPGNまたはFGSの所見を示した。尿中λ型軽鎖の組織障害性の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

表1

Case	免疫電気泳動 Type		Blotting	アミロイド沈着組織	腎生検	血液学的所見
	血清	尿				
1	λ	ND	ND	心・腸	NA	
2	λ	ND	ND	肝・腸	NA	
3	κ	ND	ND	腸	NA	
4	λ	λ	λ	腎・心	腎アミロイド	
5	λ	λ	λ	腎	腎アミロイド	
6	κ	κ	κ	腎・心・腸	腎アミロイド	
7	λ	λ	λ	腎・心	腎アミロイド	
8	λ	ND	λ	ND	NA(腎不全)	
9	λ	ND	λ	ND	MPGN	MGUS
10	λ	ND	λ	ND	MPGN	MGUS
11	κ	ND	λ	ND	FGS	MGUS
12	κ	ND	λ	ND	FGS	MGUS

ND:検出せず NA:施行せず