

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

チーターは複数回の遺伝子重複により形成された4個の serum amyloid A 遺伝子をもつ

研究分担者 樋口 京一 信州大学医学系研究科疾患予防医科学系加齢生物学講座

共同研究者 陳 磊*、劉 穎業*、丁 欣*、澤下 仁子*、森 政之*、宇根 有美**、

*信州大学医学系研究科疾患予防医科学系加齢生物学講座、

**麻布大学獣医学部病理学研究室

研究要旨 飼育下チーターではAA アミロイドーシスの罹患率が非常に高く、主要な死因となっている。チーターにおけるSAA 遺伝子の特性を解析し、AA アミロイドーシスの病態解明と治療法及び予防法開発への手がかりを得ようとした。Genome Walking とPCR法を用いて、チーターゲノム中には4種類のSAA 遺伝子(SAA1A、SAA1B、SAA3A、SAA3B)が存在することを明らかにした。SAA1A とSAA1B 遺伝子間、SAA3A とSAA3B 遺伝子間では、それぞれ高度な塩基配列の相同性が認められた。特にタンパク質レベルではSAA1A とSAA1B は全く同一であることが判明した。マウス、ヒトなど他の哺乳動物のSAA 遺伝子との比較から、チーターの4種のSAA 遺伝子は、複数回の遺伝子重複、および遺伝子変換により形成されたことが示唆された。炎症やAA アミロイドーシスを発症したチーターの肝臓ではSAA1A、SAA3A、SAA3B 遺伝子の高い転写活性が認められたが、胃では炎症やアミロイドーシス発症と関係なくSAA3A、SAA3B のmRNA が検出された。しかしSAA1B はどの臓器でも発現していなかった。4種類のSAA 遺伝子の遺伝子型を、51個体を用いて家系追跡した結果、SAA1 タンパク質の多形は見つからず、SAA1 タンパク質の単一性がAA アミロイドーシスへの高い感受性の一因である可能性が考えられた。SAA1A 遺伝子上流のNF κ B 反応領域での多型(-97; GGG vs GG)とAA アミロイドーシスの重篤度との相関が示唆されたが、より詳細な解析が必要である。

A. 研究目的

ある種の疾患への感受性に特定の遺伝子の特性が関与することがある。AA アミロイドーシスは慢性の炎症性疾患に続発し、急性期蛋白であるserum amyloid A (SAA)由来のアミロイド(AA)が全身に沈着する疾患である。AA アミロイドーシス発症の重要な要因の一つは高い血中SAA レベルが継続されることである。ヒトにおいてはSAA 蛋白をコードするSAA 遺伝子の多型を含む特性が血中SAA レベル、さらにはAA アミロイドーシス発症に対する感受性を決定する一因であることが想定されている。AA アミロイドーシスはネコ科の哺乳動物であるチーターにおいても罹患率が急速に高まりつつあり、その主要な死因の一つとなっている。ヒトと同様、チーターのSAA 遺伝子の特性が、この動物種がAA アミロイドー

シスに高い感受性を示す一因である可能性がある。この仮説を検証するために、チーターのSAA 遺伝子のクローニング、およびその塩基配列、多型性、転写発現プロファイルなどの特性を解析し、AA アミロイドーシスの病態解明と治療法及び予防法開発への手がかりを得ようとした。

B. 研究方法

日本国内の動物園で死亡した51個体のチーターの臓器(肝臓、胃、腸)を入手し、ゲノムDNA、およびmRNAを調整した。このうち32個体は一つの大家系に、3個体は小家系に属した。また、28個体には軽～重度のAAアミロイド沈着が認められた。ゲノム歩行法により、未知であったSAA 遺伝子の5'上流域、および3'下流域の塩基配列を取得した。この塩基配列情報に基づき、SAA 遺伝

子のコード領域全長を PCR 増幅可能なプライマーを設計し、SAA 遺伝子を PCR クローニングした。この PCR 産物の塩基配列を決定し、チーター個体間で比較することにより、多型部位を同定した。また mRNA より cDNA を逆転写調整し、RT-PCR 法により SAA 遺伝子の転写発現プロファイルを調査した。

(倫理面への配慮)

信州大学では動物を用いた実験は行っていない。またチーター遺伝子に関しては、PCR による遺伝子増幅と塩基配列の決定を行ったので、遺伝子組換え実験は行っていない。

C. 研究結果

Genome Walking 法、および PCR クローニングの結果、チーターゲノム中には 4 種類の SAA 遺伝子 (SAA1A、SAA1B、SAA3A、SAA3B) が存在することが明らかになった (図 1)。51 個体のチーターから得られた 4 種類の SAA 遺伝子の PCR 産物の塩基配列を比較した結果、多数の塩基多型を同定することができた。すなわち、SAA1A 遺伝子に関しては 8 カ所の塩基多型と、その組み合わせによる 4 種類の対立遺伝子を同定した。同じく SAA1B 遺伝子に関しては 6 カ所の塩基多型と 6 種類の対立遺伝子を、SAA3A 遺伝子に関しては 14 カ所と 7 種類の対立遺伝子を、SAA3B 遺伝子に関しては 3 カ所の塩基多型と 4 種類の対立遺伝子を同定した。SAA1A と SAA1B 遺伝子の間、および SAA3A と SAA3B 遺伝子の間では、それぞれ高度な塩基配列の相同性が認められた。また、これらの塩基多型は全てコード領域外にあり、したがってタンパク質レベルではチーターの SAA1A、SAA1B、および SAA3A、SAA3B はそれぞれ単一であることが判明した。この SAA1 蛋白の単一性が、チーターが AA アミロイドーシスに高い感受性を示す一因である可能性が考えられた。4 種類の SAA 遺伝子の遺伝子型を家系追跡した結果、これらの SAA 遺伝子は全て同一の染色体上に存在し、4 種類の SAA 遺伝子上の遺伝子型の組み合わせにより、51 個体のチーター集団中には 9 種類のハプロタイプが存在する事を明らかとした。しかしながら、これらの SAA ハプロタイプと AA アミ

ロイドーシスの重篤度との間には有意な相関は認められなかった。しかし、SAA1A 遺伝子上流の NF κ B 反応領域での多型(-97; GGG vs GG)と AA アミロイドーシスの重篤度との相関が示唆された (図 2)。この多形に関してはより詳細な解析が必要である。

51 個体のチーターにおける SAA 遺伝子の RT-PCR 解析の結果、SAA1A 遺伝子は肝臓において発現しており、特に炎症、または AA アミロイドーシスを発症したチーターの肝臓では高い転写活性が認められた。SAA1B 遺伝子は調査したいずれの臓器でも転写発現が認められなかった。SAA3A、および SAA3B 遺伝子の転写発現は肝臓、および胃において検出された。胃での転写発現レベルは炎症、または AA アミロイドーシスの重篤度とは相関していなかった。一方、肝臓での転写発現レベルは炎症、または AA アミロイドーシス発症と相関していた。これらの結果は、個々の SAA 遺伝子が独自の転写発現制御を受けていることを示唆した。さらに、上記のデータ、およびマウス、ヒトなど他の哺乳動物の SAA 遺伝子の塩基配列との比較から、チーターの 4 種の SAA 遺伝子は、複数回の遺伝子重複、および遺伝子変換により形成されたことが示唆された。

D. 考察

この研究では 1) チーターの SAA 遺伝子の構造を明らかにする。2) SAA タンパク質の特質を明らかにし、チーターでのアミロイドーシス高発症率のメカニズムを探る。3) SAA 遺伝子の多形と家系解析を行う。を主な目的とした。

ヒトやマウスでは SAA 遺伝子の重複が報告されている。チーターでも少なくとも 4 つの遺伝子 (SAA1A、SAA1B、SAA3A、SAA3B) が同一染色体上に存在することが明らかになった。SAA1A と SAA1B 間には全くアミノ酸配列の相違が見つからず、またメカニズムは不明であるが SAA1B はどの臓器でも発現していなかった。また、51 匹のチーターを用いた多形解析の結果、どの SAA 遺伝子にも、アミノ酸置換を招く多形は発見できなかった。従ってすべてのチーターでは、我々が同定した SAA1A タンパク質のみが、AA アミロイド線維として沈着していることが明らかになっ

た。このようなアミロイドタンパク質の均一性がチーターでの高発症率の原因の一つと考えられる。チーターの SAA タンパク質の特性に関しては、他のネコ類や動物との比較等、今後の検討が必要である。

ヒトでは SAA1 遺伝子の多形 (-13T/C, 2295 C/T, 3010 C/T 等) とアミロイドーシスの発症率との関連が報告されてきた。我々はチーター-SAA1 遺伝子上流の非転写領域に存在する NF κ B 反応領域の多型 (-97 ; GGG/GG) によって、肝臓細胞での IL-1, IL-6 による発現誘導量が有意に異なる (GGG>GG) 事を報告している。今回の 51 匹のチーターを用いた多形解析では、GGG を持つチーターではアミロイド沈着個体の割合が高い傾向が認められた。今後さらに詳細な解析が必要であるが、GG の多形を持つ個体を増やす事によって、チーターでのアミロイドーシス発症を抑制できる可能性が示唆された。

E. 結論

本研究において得られたデータは、チーター及びヒトにおける AA アミロイドーシスの発症機序を解明し、さらに予防法を確立する上で有用である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉田 邦広、樋口 京一、池田 修一：神経変性疾患は個体伝播するか -アミロイドーシスモデルからの推論- *BRAIN and NERVE* 64: 665 - 674, 2012.
- 2) 樋口 京一：全身性アミロイドーシスは伝播するか？ (チーター及びマウス)。 *Dementia Japan*, 27: 54 - 61, 2013.
- 3) 森 政之、樋口 京一：老化のモデル生物が果たす役割。「老化の生物学」石井直明、丸山直記編集、京都市、化学同人、(印刷中)
- 4) Higuchi K, Mori M, Sawashita J : Mouse senile systemic AApoAII amyloidosis: pathology, genetics and transmission. *The Senescence-*

Accelerated Mouse (SAM): Achievements and Future Directions. Takeda T ed. pp 293-302. Elsevier B.V. Amsterdam, The Netherlands, 2013 (in press)

2. 学会発表

- 1) 樋口 京一、王 耀勇、銭 金澤、田 耕、陳 磊、森 政之、澤下 仁子：マウスアポリポ蛋白質 A-I の欠損はアポリポ蛋白質 A-II の再分配と AApoAII アミロイドーシスの悪化を伴う。第 101 回日本病理学会総会、東京、4 月 26 日、2012 年。
- 2) Sawashita J, Zhang B, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Kametani F, Higuchi K: The C-terminal sequence of type F apolipoprotein A-II inhibits the polymerization of apolipoprotein A-II into amyloid fibrils in mice. XIIIth International Symposium on Amyloidosis. Groningen, The Netherlands, May 6 - 10, 2012
- 3) Qian J, Hirose M, Zhang B, Wang Y, Tian G, Luo H, Liu Y, Fu X, Ge F, Sawashita J, Mori M, Fujimoto M, Nakai A, Higuchi K: Heat shock factor 1 (Hsf1) plays a key role in AApoAII cardiac amyloidosis in mice. The Netherlands, May 6 - 10, 2012.
- 4) 王 耀勇、銭 金澤、田 耕、羅 宏敏、劉 穎業、森 政之、澤下 仁子、樋口京一：マウスアポリポ蛋白質 A-I の欠損はアポリポ蛋白質 A-II の再分配と AApoAII アミロイドーシスの悪化を伴う。第 27 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、東京都、7 月 6 日、2012 年。
- 5) 澤下 仁子、張 蓓茹、亀谷 富由樹、長谷川 一浩、森 政之、内木宏延、樋口 京一：マウス F 型 apoA-II の C 末ペプチドは老化アミロイドーシス高発症マウスのアミロイド沈着を軽減する。第 27 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、東京都、7 月 6 日、2012 年。
- 6) 王 耀勇、銭 金澤、田 耕、羅 宏敏、劉 穎業、森 政之、澤下 仁子、樋口 京一：アポリポ蛋白質 A-I の欠損はアポリポ蛋白質 A-II の加齢に伴う再分配と老化 AApoAII アミロイドーシスの悪化を伴う。日本基礎老化学会第 35 回大会、船橋市、7 月 16 日、2012 年。

- 7) 樋口 京一：全身性アミロイドーシスの伝播。
第3回神経科学と構造生物学の融合研究会、大阪、10月4日，2012年
- 8) Higuchi K：Animal Models to Study Aging and Age-Related Diseases. Pathogenesis of Amyloidosis; Findings from animal models of systemic amyloidosis. 老年医学研究進捗国際研究会，湖北宜昌（武漢）、中国、October 26-28, 2012.
- 9) 樋口 京一：アミロイドーシスは伝播するか？—タンパク質フォールディング病の共通メカニズムとしての伝播現象—、京都大学再生医科学研究所セミナー、京都市、11月2日，2012年.
- 10) 樋口 京一：伝播性（感染性）アミロイドーシス。お茶の水 Brain Science Seminar，東京、12月7日，2012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

SAA3 のアミノ酸モチーフ

Cheetah SAA1A MKLFTGLIFCSLVLVGSSE-WY SFLG EAAQGAWDMWRAYS DMREANYIGADKYFHARGNYDAAQRG
 Cheetah SAA3A MKL FVGILL CSLVLGVSSQRWL TFLK EACQGT KDMWRAYS DMREANYIGADKYFHARGN DAAQRG
 Cheetah SAA3B MKL FVGILL CSLVLGVSSQRWL TFLK EACQGT KDMWRAYS DMREANYIGADKYFHARGNYDAAQRG
 Mouse SAA3 MKP SIATIL CILILGVDSQRWV QFMK EACQGS RDMWRAYS DM KEAN WIKNSDKYFHARGNYDAAQRG
 Mouse SAA1 MKLL TSLVFCSLLLGVCHGGFF SFVH EAFQGA CDMWRAYTDM KEAN WIKNSDKYFHARGNYDAAQRG

ヒトやマウスに見られない8アミノ酸の挿入

Cheetah SAA1A PGGAWAAKVISDARENSQRVTDFFRHGSSGHGAEDSKADQAANEWGRSGKDPNHFRPAGLPDKY
 Cheetah SAA3A PGGAWAAKVISNARENSQRVTDFFSHRSSGHGAEDSKADQAANEWGRSGKDPNHFRPAGLPKRY
 Cheetah SAA3B PGGAWAAKVISNARENSQRLTDFFRHGSSGHGAEDSKADQAANEWGRSGKDPNHFRPAGLP SKY
 Mouse SAA3 PGGAWAAKVISDAREAVQKFT-----GHGAEDSRADQFANEWGRSGKDPNHFRPAGLPKRY
 Mouse SAA1 PGGWAAEKISDGREAFQEFF-----GRGHEDTIADQEANRHGRSGKDPNYRPPGLPDKY

図1. チーター-SAA1A, SAA3A, SAA3タンパク質のアミノ酸配列の比較。

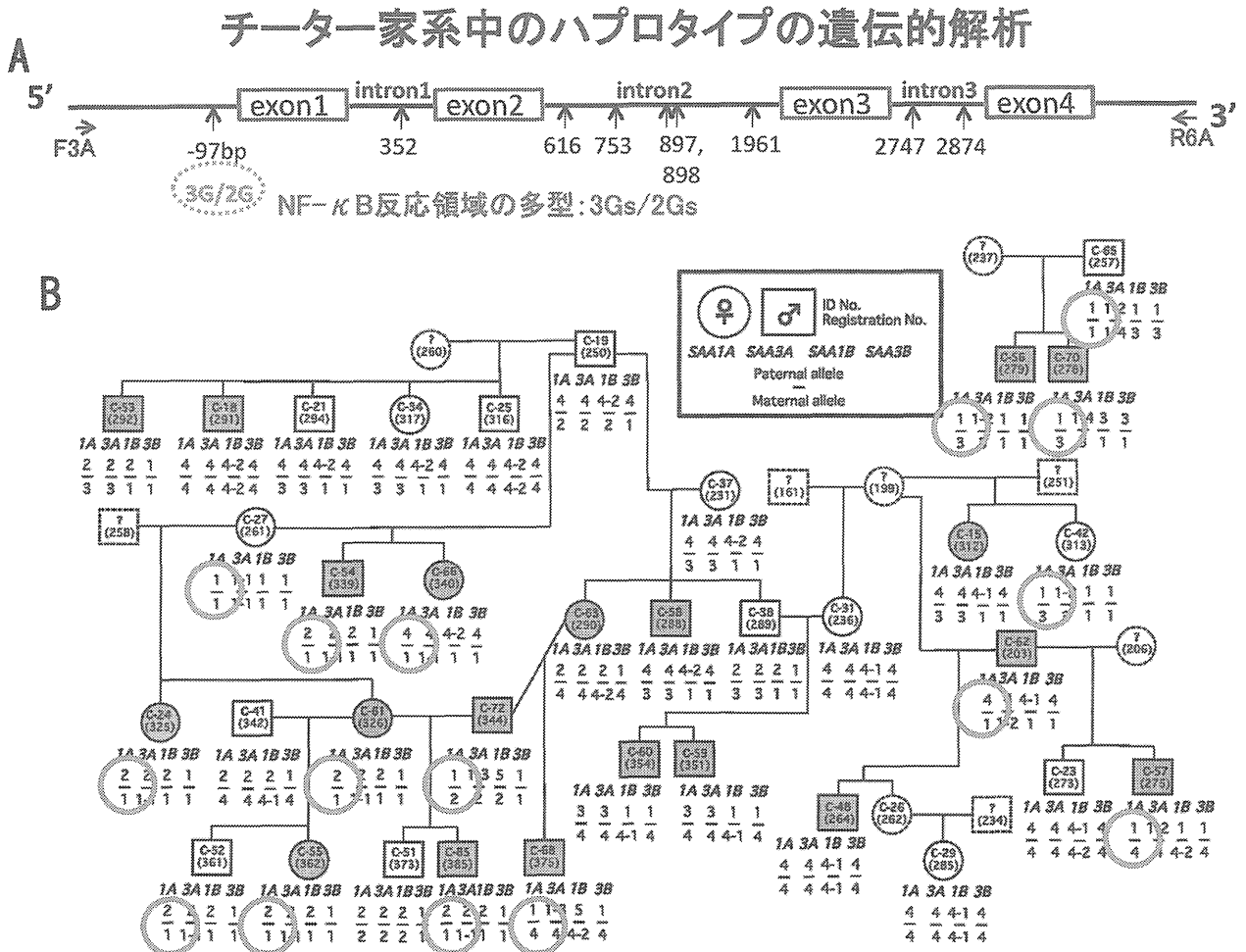


図2. チーター-SAA遺伝子の家系解析: A. SAA1Aタンパク質のアミノ酸をコードする領域には多形は見つからない。B. SAA1A遺伝子上流の非翻訳領域(-97bp)のNF-κB反応領域に発見された多形はNF-κBへの反応性が高い”GGG”を持つチーター(サークル)でアミロイドーシス発症の割合が高い傾向があった。灰色で示された個体にはアミロイド沈着が認められた。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

アミロイド特異成分 AA76 の検出

研究分担者 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*、奥田恭章**

*自治医科大学医学部臨床検査医学、**同道後温泉病院リウマチセンター内科

研究要旨 AA アミロイドーシスにおいては血清アミロイド A(SAA)が限定分解を受けた N 末端部分 (AA) が線維化して沈着する。最も普遍的な AA は SAA の 76,77 残基間切断により生じた AA76 であるため、その特異的検出は AA アミロイドーシスの診断に直結する。本研究ではまず、AA76 の検出のためのモノクロナル抗体を確立し、得られた抗体の反応性お検討を行った。SAA76 残基を C 末端とするペプチドを合成し、ラットに免疫して型どおりにモノクロナル抗体の作製を行った。抗体のスクリーニングではその反応性評価において AA76 に反応し、AA78 に反応しないものを選択した。2 種のクローン、CF1 と CF6 が得られた。前者は AA76 に対して高親和性であり、後者は低親和性であった。両者とも、患者組織より水抽出した不溶性 AA アミロイド線維に高反応を示したが、線維を SDS、グアニジン、尿素などで変性させると反応性は著しく低下した。AA アミロイドーシス患者消化管粘膜の免疫組織化学では、従来の抗体がアミロイド沈着以外に前駆体 SAA と想定される血管組織に陽性反応を示すのに対し、新規抗体はアミロイド沈着に特異的であった。新規抗体は AA アミロイドーシス診断の優れたツールになりうる。

A. 研究目的

AA アミロイドーシスにおける沈着アミロイド物質の主成分は血清アミロイド A(SAA)が限定分解を受けた N 末端部分 (AA) であり、最も普遍的な AA 種は SAA の 76,77 残基間切断により生じた AA76 である。したがって AA76 の特異的検出は AA アミロイドーシスの診断に直結する。本研究では、AA76 の検出のためのモノクロナル抗体を作製し、得られた抗体の反応性を検討した。

B. 研究方法

SAA76 残基を C 末端とするペプチドを合成し、ラットに免疫して得られたリンパ球をマウスミエローマ細胞と融合することによりモノクロナル抗体の作製を行った。抗体のスクリーニングではその反応性評価において AA76 ペプチドに反応し、AA78 ペプチド (2 アミノ酸 C 末端延長) に反応しないものを選択した。既製の抗体、クローン SAA30(SAA の 30 位付近に反応するモノクロナル抗体)を対照に用いた。AA アミロイドーシス患

者 (疑いを含む) 30 例の胃十二指腸粘膜生検材料について免疫組織化学を施行した。

(倫理面への配慮)

動物への免疫に関しては研究分担者の施設において動物実験審査委員会の承認を得た。患者組織切片の利用に関しては、研究分担者の施設ならびに共同研究者施設の研究倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

2 種の新規クローン、CF1 と CF6 が得られた。前者は AA76 に対して高親和性であり、後者は低親和性であった。両者とも、患者組織より水抽出した不溶性 AA アミロイド線維に反応を示したが、線維を SDS、グアニジン、尿素などで変性させると反応性は著しく低下した。患者消化管粘膜の免疫組織化学では、コンゴレッド陽性を示したものは全例、新規抗体で陽性であった。コンゴレッド陰性であったがクローン SAA30 が陽性で付帯情

報からアミロイド陽性が疑われた3例においても新規抗体は陽性であった。クローンSAA30は、 Congo Red陰性でアミロイド沈着とは考え難い、おそらく毛細血管内のSAAに陽性となったが、新規抗体は陰性であった。

D. 考察

AA76に特異性の高いモノクロナル抗体が得られた。この抗体はAA線維には明確に反応したが、線維を変性させると反応性は著しく低下した。このことは抗体が native な線維構造内のAA76 C末端に反応する可能性を示唆している。免疫組織化学において新規抗体は Congo Red陽性沈着を見逃すことなく検出した。既製抗体は Congo Red陰性のアミロイドと思われる部位に陽性反応を示すが、アミロイドとは考え難いおそらく血管または組織中のSAA/AAに反応する欠点があった。新規抗体は既製抗体が反応するアミロイドを見逃すことなく検出し、かつアミロイド以外のSAA/AAには反応しなかった。つまり、新規抗体は Congo Redを上回る検出能を有し、アミロイド以外のSAA/AAに反応しない感度、特異性を備えていることを意味し、免疫組織化学的診断お有用なツールと言える。今後、本抗体をアミロイド線維化機構や治療の基礎研究に活用していきたい。

E. 結論

新規抗体はAAアミロイドーシス診断の優れたツールになりうる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada T, Okuda Y: AA amyloid quantification in biopsy samples from stomach. *Ann Clin Lab Sci.* 42: 3-6, 2012.
- 2) Kotani K, Yamada T, Uurtuya S, Taniguchi N: The correlation between serum amyloid A and reactive oxygen metabolites in a young Mongolian population. *Ethn Dis* 22:329-334, 2012

3) Kotani K, Yamada T, Miyamoto M, Ishibashi S, Taniguchi N, Gugliucci A: Influence of atorvastatin on serum amyloid A-low density lipoprotein complex in hypercholesterolemic patients. *Pharmacol Rep* 64: 212-216, 2012.

4) 山田俊幸: AAアミロイドーシスの病態とSAA. *臨床化学* 41:16-21, 2012

5) 山田俊幸, 奥田恭章: 若年性関節リウマチの経過中、蛋白尿、下痢を呈した28歳の女性. *検査と技術* 40(増):1071-1075, 2012

2. 学会発表

1) Toshiyuki Yamada, Jyunji Sato: Antibodies specific to AA76, the common species of AAs. XIIIth International Symposium on Amyloidosis, Groningen, 5. 7, 2012.

2) 田村裕昭, 山田俊幸, 中井秀紀: AAアミロイドーシス合併関節リウマチに対する生物学的製剤の使用成績. 第56回日本リウマチ学会学術集会、東京、4. 28, 2012.

3) 山田俊幸, 松山泰, 寺井千尋, 星井嘉信: アミロイドーシスの病型診断に未固定生検試料のイムノブロットが有用である. 第52回日本臨床化学会年次学術集会、盛岡、9. 7, 2012.

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 (難治性疾患等克服研究事業 (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

SAA のアミロイド線維形成におけるアイソフォームの影響

研究分担者 山田俊幸 自治医科大学臨床検査医学

共同研究者 田中将史、高瀬ひろか、向高弘 神戸薬科大学薬品物理化学研究室

研究要旨 AA アミロイドーシスでは、SAA を前駆タンパク質とする AA (104 残基の SAA の C 末端側 30 残基程度が切断されている) が線維形成し、臓器に沈着し機能障害をきたす。AA アミロイドーシスの主要な原因タンパク質である SAA1 には 3 種のアイソフォーム (SAA1.1, 1.3, 1.5) が存在するが、それらの間で AA アミロイドーシスへの罹患率が異なることが疫学的調査により知られている。本研究では、AA アミロイドーシス発症に及ぼす SAA アイソフォームの影響を分子レベルで解明することを目的に実験を行った。アミノ酸置換を含む中間領域ペプチドでは、アイソフォームにより線維形成能が異なることが明らかとなったが、全長タンパク質ではアイソフォームによる線維形成能の違いは認められなかった。すなわち、切断される C 末端領域の存在がアミロイド線維の形成に影響を及ぼす可能性があることが推察された。

A. 研究目的

ヒト SAA タンパク質には SAA1, 2, 4 のアイソタイプが存在し、このうち SAA1 と 2 が炎症性サイトカインの刺激により合成される急性相反応タンパク質である。アミロイド沈着臓器から主に単離されるのは SAA1 由来であり、そのため SAA1 が病因的意義の高いアイソタイプと考えられている。さらに SAA1 には 52 および 57 残基目のアミノ酸が異なるアイソフォーム (SAA1.1, 1.3, 1.5) が存在し、AA アミロイドーシスへの罹患率に影響を及ぼすと考えられている。本研究では、その分子基盤を解明することを目的として、SAA のアミロイド線維形成におけるアイソフォームの影響について調査した。

B. 研究方法

SAA1 の各アイソフォームで共通の N 末端領域 (SAA 1-27 残基) のほか、各アイソフォームに相当する中間領域 (SAA 43-63 残基) からなるフラグメントペプチドを作製した。また、各アイソフォームの全長 SAA1 タンパク質 (N 末端メチオン+104 残基) を大腸菌発現により作製した。アミロイド線維形成の指標となるチオフラビン T (ThT) の蛍光測定、円二色性 (CD) 測定による

二次構造の評価、及び透過型電子顕微鏡を用いた形態観察を行った。

(倫理面への配慮)

特に必要なし

C. 研究結果

我々の測定条件 (pH4.0、SAA 濃度 50 µg/mL) では、線維形成能を有するペプチドにヘパリンを添加することで ThT 蛍光の増大が観察され、ヘパリンが線維形成の促進因子として働くことが示唆された。また、これまでに報告されていた SAA の N 末端領域以外に、新たに SAA1.1 分子の中間領域にも線維形成能があることを明らかにした。しかしながら、この中間領域ペプチドが形成する線維の二次構造や形態は、典型的なアミロイド線維のそれとは異なるものであった。一方、SAA1.3 分子の中間領域ペプチドではヘパリンの添加による ThT 蛍光の増大や二次構造の変化は見られず、アイソフォームにより線維形成能が異なることが分かった。そこで、N 末端と中間領域を共に含む各アイソフォームの全長タンパク質で同様の評価を行ったところ、アイソフォームによる線維形成能の違いは認められなかった。

D. 考察

AA アミロイドーシスにおける臓器沈着物は SAA 分子の C 末端 30 残基程度が切断された N 末端から 76 残基程度である。C 末端領域の切断がアミロイド線維の形成に必須であるかはいまだ明らかではないが、全長タンパク質ではアイソフォーム間で線維形成能に差異は認められず、中間領域では差異が認められるという今回の結果より、C 末端領域の存在がアミロイド線維の形成に影響を及ぼす可能性があることが推察された。

また、SAA は生体内で HDL に結合して存在しており、脂質への結合が SAA の線維形成に影響することが示唆されている。つまり、脂質との相互作用の違いがアイソフォーム間でのアミロイド線維の形成に影響を及ぼす可能性も考えられ、今後詳細に調べることで、AA アミロイドーシスの罹患率に及ぼすアイソフォームの影響を分子レベルで解明することを目指す。

E. 結論

異なる SAA1 アイソフォームにおける中間領域での線維形成能に違いがあることが分かり、このことが AA アミロイドーシスへの罹患率に影響を及ぼす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

1)

高瀬ひろか、山田俊幸、田中将史、向高弘：血清アミロイドAの構造安定性と線維形成能の検討. 第10回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム, 京都, 8月6-7日, 2012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

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

Caplan 症候群に合併した AA アミロイドーシス

研究分担者 中村正 くまもと森都総合病院

共同研究者 太良史郎 1) 高岡 宏和 2) 貞松智貴 1) 大林光念 3) 安東由喜雄 3)

1)くまもと森都総合病院血液内科、2)同リウマチ膠原病内科

3)熊本大学アミロイドーシス診療体制構築事業

研究要旨 症例は 72 歳男性で 16 年前に塵肺と診断され、その際関節リウマチを指摘されるも無治療であった。今回労作時呼吸困難及び両側下腿浮腫を主訴として近医を受診し、心不全・腎不全のために当科入院となった。上部消化管内視鏡検査を施行し、胃幽門部・十二指腸球部前壁より生検を行い、Cong-Red 染色陽性で、酸化処理で染色性が消失する AA アミロイド線維の沈着を認めた。合併症検索では、経胸壁心臓超音波検査にて駆出率 23%(diffuse hypokinesis)と低下し、granular sparkling 様の心筋性状を認め心アミロイドーシスが疑われた。また腎機能は尿蛋白 2+/尿潜血 2+、血清 Cre 3.75mg/dL(eGFR 13.2)で CKD G5(末期腎不全)であった。AA アミロイドーシスに関する遺伝子素因についての検索では、MEFV 遺伝子解析で E148Q ヘテロ変異を、血清アミロイド A1 遺伝子の解析で SAA1 1.3/1.5、C13T C/T を認めた。トシリズマブ(TCZ)400mg(=8mg/kg)による加療を開始したところ、心機能・腎機能は投与前の状態を維持し、TCZ は有効であると思われた。本症例は Caplan 症候群に合併した AA アミロイドーシスの 1 例である。Caplan 症候群は塵肺に合併した関節リウマチであるが、その機序としてシリカの慢性吸入による自己免疫性の獲得が疑われている。また本症例では環境曝露に加えて AA アミロイドーシスを発症しやすい遺伝子素因も持ち合わせており、両者が相まって AA アミロイドーシスを発症したものと思われた。重篤な合併症である AA アミロイドーシスに対して、SAA1 アリルの遺伝子多型及び MEFV(Mediterranean fever)遺伝子解析による発症リスクの評価と、TCZ による早期治療介入が重要である。

A. 研究目的

心不全、腎不全を契機に診断に至った Caplan 症候群に合併した AA アミロイドーシスの 1 例について症例を提示し、病態形成における臨床的な考察を行った。

B. 研究方法

(1)心不全、腎不全の評価及び原因検索のために血液・尿検査、超音波検査を行った。またアミロイドーシスの病理診断確定のために上部消化管内視鏡検査を行い、胃幽門部・十二指腸球部前壁より生検による病理組織学的検索を行った。(2) 遺伝子多型の観点から、MEFV、SAA1、SAA1-13T/C に関して遺伝学的検索を行った。(3)TCZ 投与による臨床経過を理学所見や血液・尿

検査、超音波検査などで観察した。

(倫理面への配慮)

本症例の解析においては、事前に患者・家族に十分なインフォームドコンセントを行い、同意を得た上で行った。

C. 研究結果

症例は 72 歳男性。38 年間トンネル工事に従事し 56 歳時に塵肺と診断された。その際関節リウマチ(RA)も指摘されたが無治療であった。労作時呼吸困難及び両下腿浮腫が出現し、近医で心不全・腎不全を指摘され当科入院となった。

上部消化管内視鏡検査を施行し、胃幽門部・十二指腸球部前壁より生検を行い、その結果 Congo-Red 染色陽性で、酸化処理で染色性が消失

する AA アミロイド線維の沈着を認めた(図 1)。合併症の評価では、心機能は駆出率 23%(diffuse hypokinesis)と低下し、granular sparkling 様の心筋性状を認め心アミロイドーシスが疑われた。腎機能は尿蛋白 2+/尿潜血 2+、血清 Cre 3.75mg/dL(eGFR 13.2)で CKD G5(末期腎不全)であった。MEFV 遺伝子解析で E148Q ヘテロ変異を、血清アミロイド A1 遺伝子の解析で SAA1 1.3/1.5、C13T C/T を認めた。

TCZ 400mg(=8mg/kg/4weeks)で加療を開始し、血清 SAA は前値 56.8 □g/mL から 2.50□g/mL へと低下した。心機能は駆出率 46.6%と改善。血清 Cre 3.76mg/dL(eGFR 13)で腎機能は不変。臓器不全の進行なく心機能は著明な改善が得られており、TCZ は有効であると思われた(表 1)。

D. 考察

Caplan 症候群は塵肺患者に生じた関節リウマチで、胸部画像上比較的境界明瞭な結節影を認める疾患である。関節リウマチを合併する機序については、吸入された粉塵により惹起される慢性活動性炎症が全身性の自己免疫を形成する可能性が指摘されている。一方 SAA1 遺伝子多型及びそのプロモーター領域の多型である-13T は AA アミロイドーシス発症の高リスクとされる。本症例は SAA1 1.3 ヘテロ陽性・-13T 陽性で、元々 AA アミロイドーシスを合併しやすい素因があった。更に本症では遺伝性自己炎症症候群のひとつである家族性地中海熱の責任遺伝子である MEFV の遺伝子変異である E148Q ヘテロ変異陽性であることから、炎症病態が惹起されやすい素因もあったことが推測された。

AA アミロイドーシスは関節リウマチにおける最も重篤な合併症の一つである。これまでは対症療法が主体であったが、TCZ が登場し治療介入可能となった。しかし進行した臓器不全に対しては依然として改善を得ることは困難であり、病歴及び遺伝学的検索による早期診断・早期治療介入が更に重要になると思われた。

E. 結論

未治療の関節リウマチに塵肺を合併した Caplan 症候群で、多臓器障害の原因として AA アミロイドーシスを合併した 1 例を経験した。トシリズマブ(TCZ)による加療を行い、有効であると思われた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1)高岡宏和、下村泰三、鈴島仁、飯干明、伊勢紘平、中村正：MTX 治療に伴う RA のリンパ増殖性疾患：2 症例の検討. 九州リウマチ 2013(印刷中)

2. 学会発表

1)太良史郎、高岡宏和、藤本哲広、下村泰三、鈴島仁、中村正：血管炎を伴い悪性リンパ腫との鑑別が困難であったシェーグレン症候群の 1 例. 第 45 回九州リウマチ学会. 那覇. 3 月 10 日、2013

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

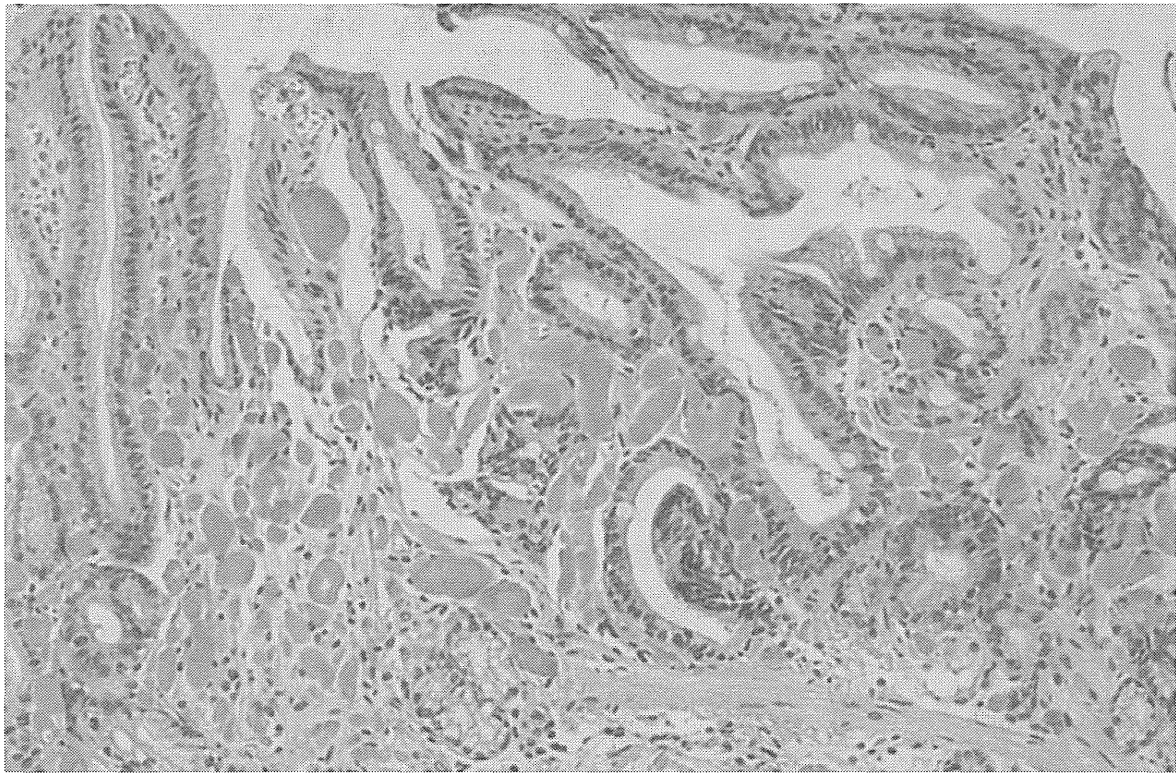
2. 実用新案登録

なし

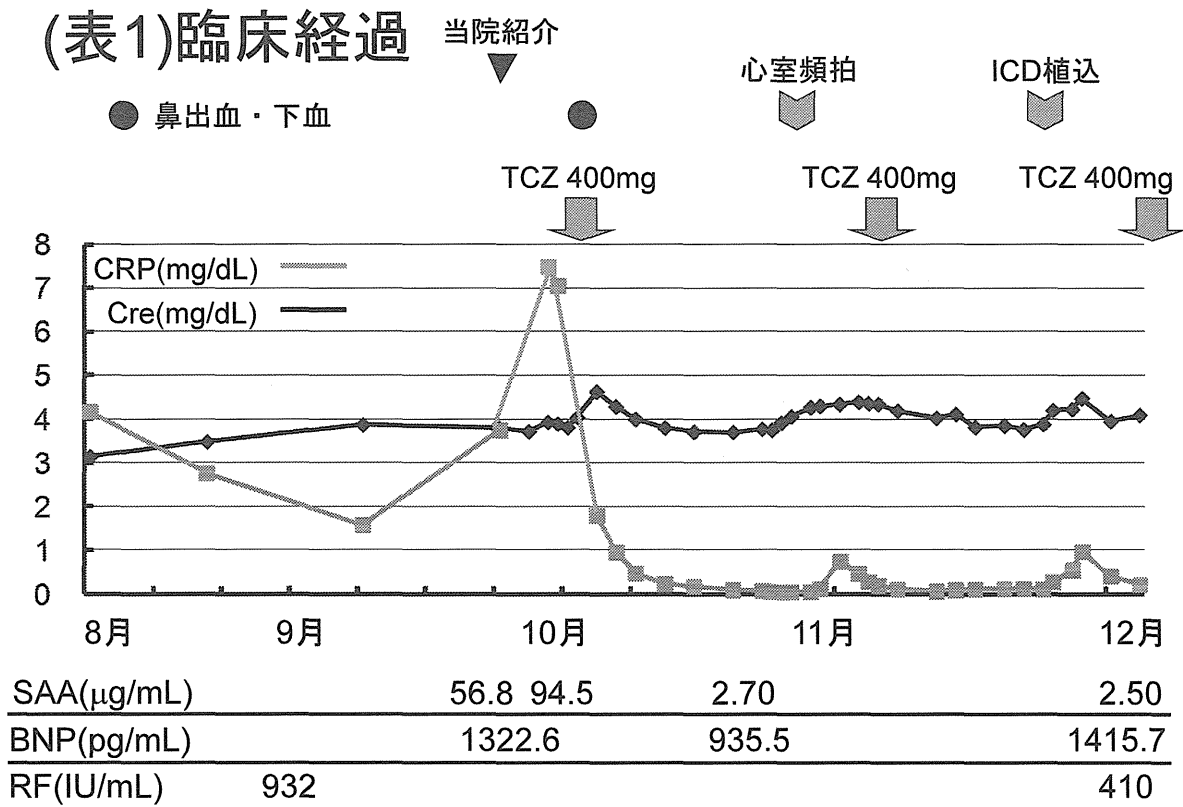
3. その他

なし

(図1)胃幽門部生検病理像(Congo-Red染色)



(表1)臨床経過



厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

尿検査による腎アミロイドーシスの診断法および腎臓内のアミロイドの動態について

研究分担者 西 慎一 神戸大学大学院医学研究科腎臓内科 腎・血液浄化センター

共同研究者 黒田 毅*、伊藤由美**、今井直史**、中枝武司**、和田庸子**、村上修一**、中野正明***、山田俊幸****

*新潟大学保健管理センター、** 新潟大学大学院医歯学総合研究科腎・膠原病内科学分野、***新潟大学医学部保健学科、****自治医科大学臨床検査医学講座

研究要旨 関節リウマチに合併した反応性 AA アミロイドーシス 9 症例の尿を検討した。4 症例で尿中に AA76 を検出した。腎生検標本の詳細な検討から、原尿中に排泄されたアミロイド蛋白が尿細管で再吸収され尿細管上皮細胞内で再び重合することにより沈着して腎障害を進展させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA)は、関節のみならず多彩な関節外症状を来す疾患である。反応性 AA アミロイドーシスは進行期の RA の重要な合併症の一つで、予後は不良である。アミロイドの生成機序は、関節炎の局所で産生される Interleukin-6, Tumor necrosis factor- α 等の炎症性サイトカインが血液を介して肝臓に運ばれ Serum amyloid A 蛋白(SAA)が生成される。SAA は 104 個のアミノ酸よりなり、2 つに分解され N 末端側が重合性を帯び、アミロイド蛋白として沈着する。沈着したアミロイド蛋白が、腎障害をはじめとする機能障害を起こすと考えられている。我々は、これらの炎症性サイトカインを阻害する生物学的製剤を使用し、RA の関節症状の改善のみならず肝臓での SAA の産生の低下、組織に沈着したアミロイドの除去を報告した。さらに我々は、反応性 AA アミロイドーシスでは生物学的製剤等の治療により生命予後が改善することも明らかにした。しかしこれらの治療によっても一部の症例では腎不全への進行は阻止できず、透析導入例に対する治療の効果は十分ではなかった。これらを踏まえて、本研究は反応性 AA アミロイドーシス患者の尿、腎組織を検討することにより腎臓内に沈着したアミロイドタンパクの動態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

反応性 AA アミロイドーシスを合併した RA9 症例の尿を 1500 回転で 5 分間遠心し、上清と沈渣に分離した。可溶化した沈渣と濃縮した上清に対して抗 SAA モノクロナル抗体(N 末端側に反応)によるイムノブロットを行い、SAA 分解産物の有無と分子サイズを検討した。更に腎生検標本を光顕、免疫染色、電顕等で詳細に検討することにより腎臓内のアミロイド蛋白の動態も検討した。

(倫理面への配慮)
問題なし。

C. 研究結果

結果 1: 9 例中 4 例において、可溶化した沈渣から重合してアミロイドタンパクになり得る AA76 のバンドを検出した。分子量より N 末端側の SAA 部分と考えられた。また 1 例で濃縮上清にも同様のバンドを検出した。

結果 2: 腎生検標本において、糸球体の基底膜を破壊してボウマン腔内にアミロイド線維が進展している所見を認めた(spicula formation)。結果 1 を踏まえ、尿細管でのアミロイドの沈着を検討した。その結果、細動脈壁と周囲の尿細管の一部に

PAS および Congo-Red 陽性の無構造物質の沈着を認め、これらは抗 SAA 抗体が陽性であり AA アミロイド蛋白と考えられた。AA アミロイド蛋白は尿細管基底膜と peritubular capillary (PTC) との間、および尿細管上皮細胞の基底膜側に沈着していた。PTC の周囲にもアミロイド線維が存在し、PTC の基底膜の構造の一部が破壊されている像が観察された。

D. 考察

白浜らはマウス Casein アミロイドモデルにおいてアミロイドは再分布すると報告した(Shirahama T, *et al. Am J Pathol* 1980;99: 539)。これはモデルマウスにおいて、脾臓、肝臓、腎臓と時間のズレを持ってアミロイドが沈着していき、急性反応が収束し脾臓、肝臓からアミロイドが消失した後も腎臓からはアミロイドが消退しないというものである。我々もアミロイドーシス合併症例において生物学的製剤の使用は胃・十二指腸粘膜のアミロイド沈着を減少させるが、腎機能はクレアチニンクリアランス 40ml/min 以下の進行例では進展を止められないと報告した (Kuroda T, *et al. J Rheumatol* 2009;36:2409)。さらに、反応性 AA アミロイドーシス症例で生物学的製剤の使用により、生命予後は改善するが腎不全の進行は阻止できず透析導入率は改善しないと報告した (Kuroda T, *et al. J Rheumatol* 2012;39:1348)。これらの報告は尿細管での再吸収というメカニズムを考慮することにより合理的な説明がつくと考えられた。また我々は、尿細管への沈着を含めて腎組織すべてのアミロイド沈着量を評価すると、AA (Kuroda T, *et al. Rheumatol Int* 2012;32:3155)、AL アミロイドーシス (Kuroda T, *et al. BMC Nephrol* 2012, 13:118) 共に腎生検組織で腎組織に占めるアミロイドの面積と腎

機能は相関すると報告した。尿細管障害が進展することにより腎障害が他の臓器障害より改善しにくい可能性もある。以上より、糸球体を通過し原尿中に濾過された AA76 サイズの SAA が尿細管上皮細胞内で再重合しアミロイド蛋白となり尿細管障害を引き起こすと考えられた。

E. 結論

反応性 AA アミロイドーシスを合併した RA 症例の尿中に Common AA (AA76) サイズの SAA と intact SAA を検出した。アミロイドが沈着した腎臓内ではアミロイド蛋白は turn over しており腎機能障害の進展に関与し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 (難治性疾患等克服研究事業 (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

リウマチ性疾患に合併する反応性 AA アミロイドーシスに対する抗 IL-6 レセプター抗体療法と抗 TNF 療法の臨床的有用性の比較・検討 - 第二報

研究分担者 奥田恭章 道後温泉病院リウマチセンター

研究要旨 昨年度、当院における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トシリズマブ治療(TCZ)と抗 TNF 治療(TNF)の有効性及び安全性についての比較・検討を報告した。今年度、症例数を増加、観察期間を延長し、さらに詳細な検討を行った。

抗サイトカイン製剤使用症例は、1 剤使用：35 例、2 剤使用：11 例、3 剤使用：1 例の 47 症例であった。TCZ 治療期間群 (25 例)、TNF 治療期間群(34 例)の 2 群に分け、 Kaplan-Meier 法による治療継続率と Cox 比例ハザード分析による抗サイトカイン療法の継続/中止の因子解析、SAA 値の推移、eGFR の推移と改善率、蛋白尿の推移、原疾患の活動性の経過をそれぞれの群で比較・検討した。TCZ は、TNF に較べ有意に高い継続率を示した ($p=0.0024$)。抗サイトカイン療法投与中止の低下因子として TCZ が抽出された。SAA 値の推移は、TCZ:207.8 から 4.8 (正常化)、TNF:122.3 から 31.8 であった ($p=0.0143$)。eGFR の上昇は、TCZ において有意な改善を認めた($p=0.0127$)。TCZ 群は治療開始時に 13 例に蛋白尿を認め、最終観察時 10 例が陰性化した。TNF 群は、治療開始時に 3 例に蛋白尿を認め、1 例が陰性化した。最終観察時、CDAI における寛解または低疾患活動性の達成率は、TCZ が TNF に較べ有意に高値だった($p=0.003$)。リウマチ性疾患に合併する反応性 AA アミロイドーシス治療において、TCZ は TNF より高い臨床的有用性を認めた。

A. 研究目的

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抗サイトカイン療法の有用性に関する報告は近年多く見られるが、TNF 阻害と IL-6 阻害の有用性を直接比較した報告はほとんどない。当院における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トシリズマブ治療 (TCZ)と抗 TNF 治療(TNF)の有効性及び安全性を retrospective に今年度、症例数を増加、観察期間を延長し、さらに詳細な検討を行った。

B. 研究方法

対象は、関節リウマチ 44 例、若年性特発性関節炎 carry over 2 例、成人発症 Still 病 1 例。抗サ

イトカイン製剤使用症例は、1 剤使用：35 例、2 剤使用：11 例、3 剤使用：1 例の 47 症例であった。TCZ 治療期間群 (25 例- 観察期間中央値:29.0 months)、TNF 治療期間群(34 例- 観察期間中央値：21.0 months)：エタネルセプト 21 例、インフリキシマブ 10 例、アダリムマブ 2 例))の 2 群に分け、

1. Kaplan-Meier 法による治療継続率と Cox 比例ハザード分析による抗サイトカイン療法の継続/中止の因子解析
- 2.SAA の推移 ($\mu\text{g/ml}$ 、中央値)
- 3.eGFR (ml/min/1.73m^2) の推移と改善率
- 4.蛋白尿の推移
- 5.原疾患の活動性：Clinical disease activity

index(CDAI)の推移

をそれぞれの群で比較・検討した。

(倫理面への配慮)

SAA1exon3 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.TCZの1年継続率は92%、10年継続率は92%であった。2例が早期に脱落し、副作用中止(下部消化管穿孔と下腿蜂巣炎)であった。TNFの1年継続率は72.7%、9年継続率は20.0%であった(ログランク検定: $p=0.0024$) (図1)。TNFの脱落17例は、一次無効2例、二次無効10例、副作用5例(癌2例、血管炎1例、下部消化管穿孔1例、間質性肺炎1例)であった。抗サイトカイン療法投与中止に関わる因子として治療前SAA値(ハザード比1.003(95%CI;1.001-1.005, $p=0.006$)とTCZ治療(ハザード比:0.172(95%CI; 0.026-0.646, $p=0.007$)が抽出された。AAアミロイドーシス合併リウマチ性疾患において、投与開始時のSAA値が低い程、またTCZ群で薬剤投与中止リスクが低くなることが示された(図2)。

2.SAA値の推移は、TCZ:207.8から4.8、TNF:122.3から31.8であった($p=0.0143$) (図3)。

3.eGFRの上昇は、TCZ:72.0%、TNF:38.2%でTCZにおいて有意な改善を認めた($p=0.0127$) (図4)。

4.TCZ群は治療開始時に13例に蛋白尿を認め、最終観察時10例が陰性化した。TNF群は、治療開始時に3例に蛋白尿を認め、1例が陰性化した。

5.最終観察時、CDAIにおける寛解または低疾患活動性の達成率は、TCZ 80.0%、TNF 32.4%だった($p=0.003$)。

D. 考察

この研究においてリウマチ性疾患におけるAAアミロイドーシスに対する臨床的有用性をTCZとTNFで比較した。AAアミロイドーシスに対するもっとも合理的な治療法は前駆物質SAAの抑制である。GillmoreらはSAPシンチグラフィを用いてアミロイド蛋白の消退と生命予後に関し

て報告しているが、SAA値を中央値 $10\mu\text{g/ml}$ 未満にコントロールした群の10年生存率が約90%であるのに対して、 $10\mu\text{g/ml}$ 未満を達成できなかった群は約40%であったと報告している(Lancet, 2001)。また、同グループのLachmannら(NEJM,2007)は、アミロイド蛋白の消退の有無及び腎機能の変化、長期生命予後について観察期間中央値86ヶ月のAAアミロイドーシス症例374例について詳細な検討を報告している。SAPシンチグラフィを用いた全身アミロイド量の消退の有無の検討では、SAA値が、中央値 $7\mu\text{g/ml}$ を達成した症例群において消退が認められたと報告している。また、腎機能についてはfollow-up期間におけるSAA値が、 $28\mu\text{g/ml}$ のものは悪化し、 $6\mu\text{g/ml}$ 以下のものは改善したとしている。当施設での今回の検討では、TNF群のSAA値は $122.3\mu\text{g/ml}$ から $31.8\mu\text{g/ml}$ までの改善にとどまったのに対して、TCZ群は、 $207.8\mu\text{g/ml}$ から $4.8\mu\text{g/ml}$ までの改善を示し、eGFRの変化においては有意にTCZ群の改善が示され、Lachmannらの報告とほぼ一致する結果が得られた。一方、有効性と安全性の総和を示すと考えられる継続率も、10年継続率はTCZ群92.0%、TNF群9年継続率20.0%で、明らかにTCZの有意性が示される結果となった。Cox比例ハザード分析による抗サイトカイン療法の継続/中止の因子解析では、TCZ群で薬剤投与中止リスクが低くなることが示された。本研究は当施設のみのretrospectiveな研究結果であるが、これまでIL-6阻害剤とTNF阻害剤の有用性を直接比較した多数例の報告はなく、重要な臨床経験報告であると考えられる。

E. 結論

リウマチ性疾患に合併する反応性AAアミロイドーシス治療において、TCZはTNFより高い臨床的有用性を認めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okuda Y, Ohnishi M, Matoba K, Jouyama K, Yamada A, Sawada N, Mokuda S, Murata Y, Takasugi K: Comparison of the clinical utility of tocilizumab and anti-TNF therapy in AA amyloidosis complicating rheumatic diseases. *Mod Rheumatol.* (In press)

2) Yamada T and Okuda Y: AA amyloid quantification in biopsy samples from the stomach. *Annals of Clinical & Laboratory Science.*42: 3-6,2012

3) 奥田恭章. リウマチ性疾患の腎病変- 診断と治療の最前線 二次性アミロイドーシスの診断と治療. *リウマチ科.* 47(5): 508-515, 2012

4) 奥田恭章: 第5章: 代謝系疾患の医療ニーズ 第2節 AA アミロイドーシス. *稀少疾患/難病の診断・治療と製品開発: (株)技術情報協会*, 878-886, 2012

2. 学会発表

1) Okuda Y, Ohnishi M, Matoba K, Jouyama K, Yamada A, Sawada N, Mokuda S, Murata Y, Takasugi K: Comparison of the clinical utility of tocilizumab and anti-TNF therapy in AA amyloidosis complicating rheumatic diseases. Annual European Congress of Rheumatology, Berlin 6.7. 2012

2) 奥田恭章: 特別講演 1. RA と AA アミロイドーシス～当院症例を中心に～. リウマチ性疾患検討会, 愛媛, 3月10日, 2012

3) 奥田恭章、大西誠、的場謙一郎、城山一男、山田明弘、澤田直哉、茂久田翔、高杉潔: 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抗 IL-6 レセプター抗体療法と抗 TNF 療法の臨

床的有用性の比較・検討. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 4月26日, 2012

4) 奥田恭章: AA アミロイドーシス治験症例の臨床経過. AA アミロイドーシス臨床研究会, 東京, 5月26日, 2012

5) 奥田恭章: 関節リウマチに合併した反応性 AA アミロイドーシスの病態と診断・治療. 第3回三重リウマチ合併症フォーラム, 三重, 9月9日, 2012

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

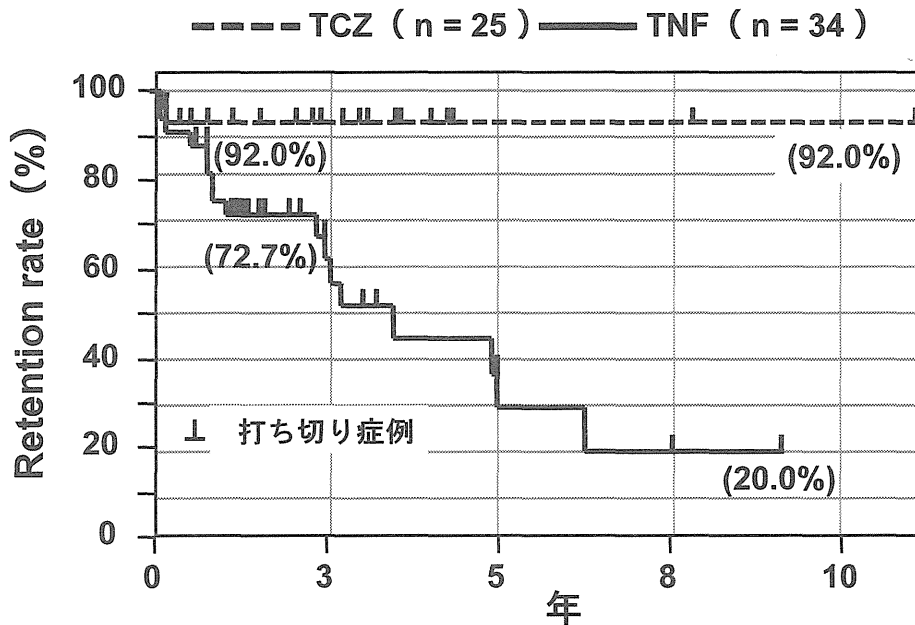
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. 継続率の比較(Kaplan-Meier 法)

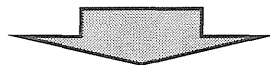


TCZ群はTNF群に較べて、有意に高い治療継続率を示した。
Log-rank test, p=0.0027

図2. 抗サイトカイン治療中止に関わる多変量
Cox比例ハザード分析

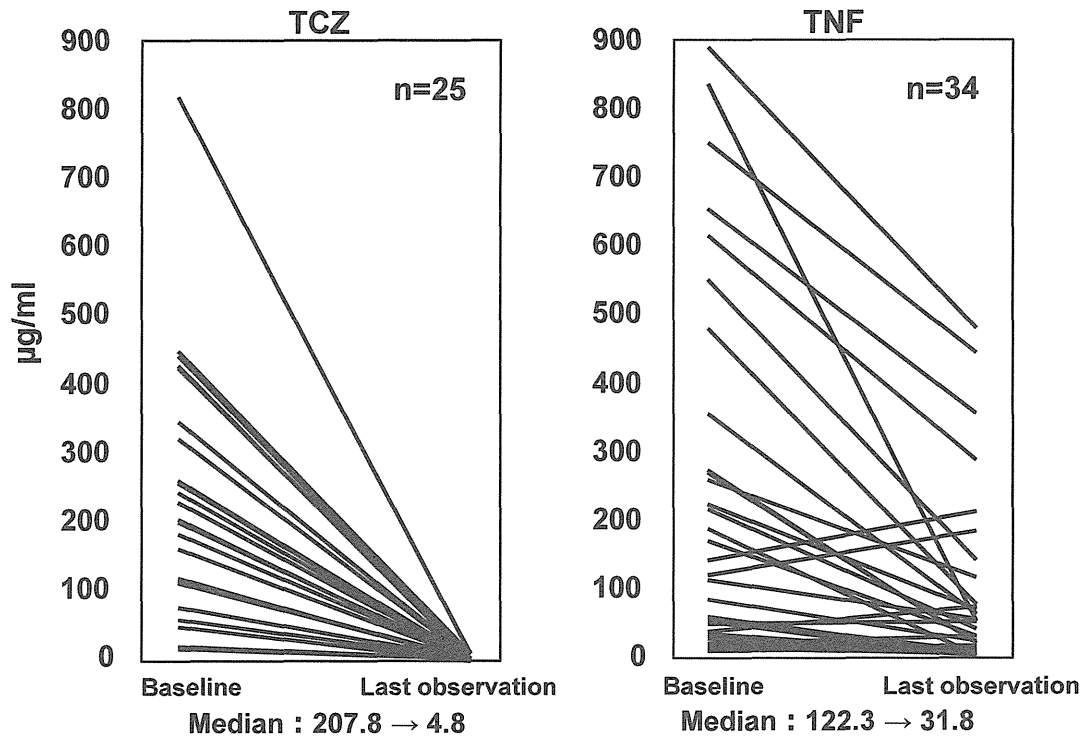
Clinical parameters	ハザード比	95%CI	p
Age (1 year)	1.040	0.994 - 1.099	0.094
SAA (1µg/dl)	1.003	1.001 - 1.005	0.006*
CDAI (1単位)	0.978	0.893 - 1.063	0.609
TCZ treatment (vs TNF i)	0.172	0.026 - 0.646	0.007*

*Biologicsの投与中止に関わる因子として、投与前SAA値とTCZ治療が抽出された。



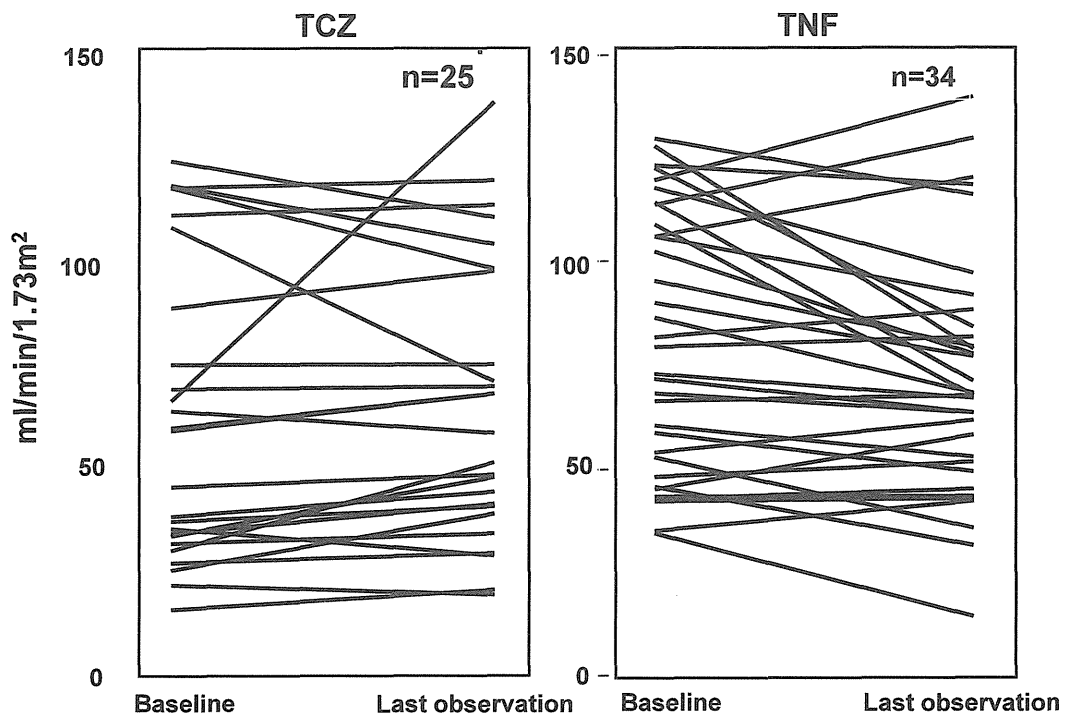
AAアミロイドーシス合併リウマチ性疾患において、投与開始時のSAA値が低い程、またTCZ治療群で薬剤投与中止リスクが低くなることが示された。

図3. SAA値推移の比較



TCZ治療群はTNF治療群と比較して有意にSAA値の改善を認めた。p=0.0143

図4. eGFRの推移



TCZ治療の18例(72.0%)、抗TNF治療の13例(38.2%)においてeGFRの改善を認めた。

TCZ versus TNF p=0.0127

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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アミロイドーシスにおけるエタネルセプトのアミロイド 沈着に与える影響 — 腎と消化管との相違について —

研究協力者 佐伯 修 東大阪市立総合病院 内科
 共同研究者 宇田裕史、三上有子、水本綾、原田環、高間俊郎
 東大阪市立総合病院 内科

研究要旨 AAアミロイドーシスを合併するリウマチ患者において、生物学的製剤を用いて治療すると、消化管のアミロイドが除去ないし減弱する事が定説になっている。しかし、エタネルセプト7年経過した患者において、消化管ではアミロイドの沈着が除去されていたが、腎臓組織でのアミロイドの沈着についてはほとんど変化なく、消化管との違いが示唆される。

A. 研究目的

AAアミロイドーシスにおいて、トシリズマブなどの生物学的製剤で治療することにより、アミロイドの沈着が除去されることが相次いで報告され、コンセンサスになりつつある。

しかし、今までの報告は、ほとんどが消化管の検索によるものであり、腎臓について検索された報告はほとんどない。そこで生物学的製剤使用前後で、消化管と腎臓でのアミロイド沈着に与える影響の相違について検討する機会が得られたので、その結果を報告する。

B. 方法

我々は、腎臓のアミロイド沈着に、血管型と瀰漫性にくるものの2つ以上の型があること、また血管型は腎機能が比較的保たれることを以前報告した (J.Rheumatology

2006)。女性のリウマチ患者で発症後20年経つ、Stage IV, Class II の人が居り、主にエタネルセプトの治療を受けていた。この患者は血管型のア症と診断され7年を経過した後も比較的腎機能が保たれていた。治療経過は図1に示しています。そこで当患者に検査についての意義を説明し、同意が得られたので、消化管及び腎生検を行った。エタネル前後で、消化管と腎臓でのアミロイド沈着に与える影響の相違について検討した。消化管は胃カメラにて、腎標本は腎生検にて組織標本を採取し、コンゴレッド染色とアミロイドA染色を行い同定した。

C. 結果

エタネルセプトの投与により、臨床症状及び、血液検査、CRPなどの改善が認められ、7年以上経つ今日にてもQOLの改善が認められている (図1)。特に血管型のア