

3. その他

なし

図 1 :

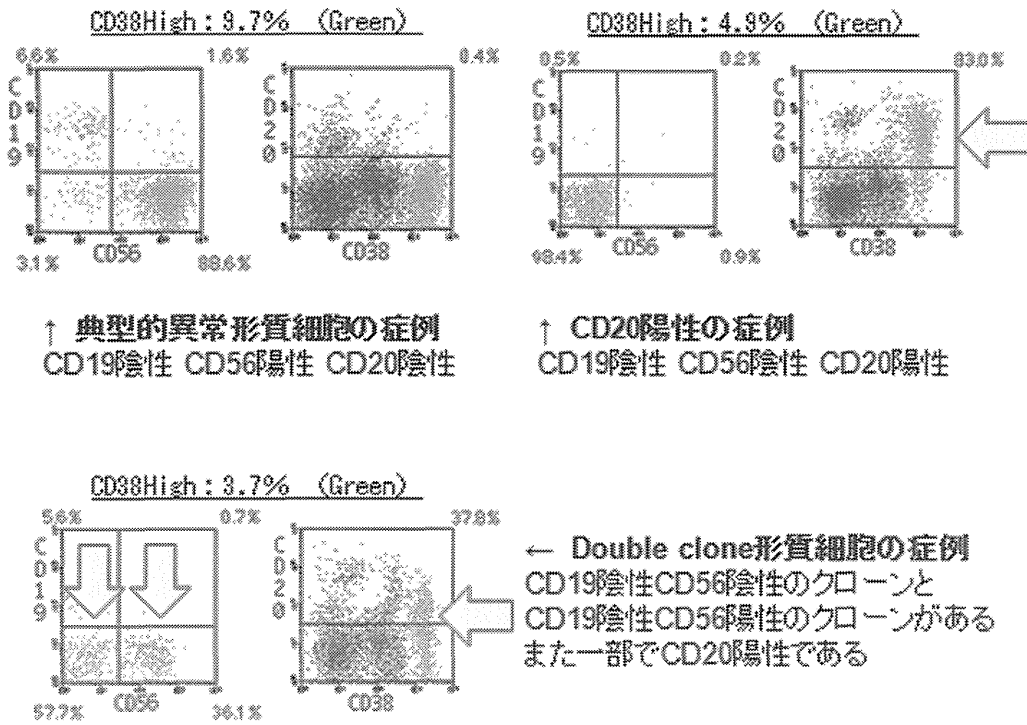


図 2 :

主要沈着臓器	CD20+ AL amyloidosis (n=26) (25%)	CD20- AL amyloidosis (n=78) (75%)
心臓	8 (30.8%)	36 (46.2%)
腎臓	8 (30.8%)	27 (34.6%)
消化管	6 (23.1%)	10 (12.8%)
その他	3 (11.5%)	5 (6.5%)

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

特殊な免疫グロブリン軽鎖による AL アミロイドーシス

研究分担者 畑裕之 熊本大学大学院生命科学研究部生体情報解析学  
 共同研究者 田崎雅義<sup>1,2</sup>、大林光念<sup>3</sup>、安東由喜雄<sup>3</sup>、遠藤慎也<sup>4</sup>、西村直<sup>4</sup>、奥野豊<sup>4</sup>、  
 満屋裕明<sup>4</sup>、園田美子<sup>5</sup>、猪山賢一<sup>5</sup>

<sup>1</sup>熊本大学大学院生命科学研究部病態情報解析学、<sup>2</sup>熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学、  
<sup>3</sup>熊本大学医学部附属病院アミロイドーシス診療体制構築事業、<sup>4</sup>熊本大学医学部附属病院血液  
 内科、<sup>5</sup>熊本大学医学部附属病院病理部

**研究要旨** AL アミロイドーシスの診断には、免疫グロブリン軽鎖の沈着を証明することが重要であるが、免疫染色による診断は、時に困難である。今回、免疫染色が陰性であった4例に、特定のλ鎖定常領域が沈着していることを見出した。

**A. 研究目的**

免疫染色で免疫グロブリン軽鎖を特定できない症例において、染色不能である理由を解明する。

**B. 研究方法**

M タンパクが存在するかまたはフリーライトチェーン異常を呈し、Congo Rec 陽性病変を持つ症例のCongo Red 陽性部位をLC-MS/MS解析した。一方、当該症例の骨髄よりCD138 磁気ビーズで形質細胞を純化し、免疫グロブリン軽鎖をPCRにて増幅、塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

臓器生検、骨髄穿刺については同意を得て試行している。体細胞の遺伝子情報は得ていないため、倫理上の問題はない。

**C. 研究結果**

4例の免疫染色陰性例を解析し、全例からIGLC2を検出した。形質細胞が2例から入手でき、いずれからもIGLC2のmRNA発現を検出できた。IGLC2を認識する抗体は入手できなかったため、抗IGLL5抗体を用いてアミロイド沈着臓器由来標本を免疫染色したところ、IGLL5の沈着が証明された。一方、DAKO社の抗体で染色できた症例で

は、抗IGLL5抗体では染色不能であった。下表に症例のprofileをまとめた。

症例	沈着臓器	年齢	免疫 陰性	KMnO4 阻害	FLC	LC/MS 結果	Mタンパク	治療	臓器改善 効果
1	腎、唾液腺、消化管	52	不可	あり	正常	IGLC2	G-L	移植 VCD	MR*
2	心、消化管、形質細胞腫	52	不可	なし	異常	IGLC2	BJP-L	MD	無効
3	腎⇒心へ	60	不可	なし	異常	IGLC2	IgG-L、 BJP-L	移植	MR**
4	心、腎、筋、神経	54	不可	なし	異常	IGLC2	G-L	移植	無効*

**D. 考察**

これまで免疫染色に用いられてきた DAKO 社の抗体では IGLC2 は染色できなかったと思われる。DAKO 社の抗体では約3分の1が染まらないといわれており、これらの症例にはIGLC2が沈着している可能性がある。4例のうち2例は定常領域のみ、残り2例には可変領域も沈着が見られ、これら2例の可変領域も高い相同性を示した。

これら4例は、いずれも化学療法にて血液学的な奏功が得られるものの、臓器改善効果は得られていないことから、沈着したIGLC2がアミロイド編成後に不可逆的な臓器沈着を呈していると考えられる。

**E. 結論**

AL アミロイドーシスのなかにIGLC2が沈着する一群を見出した。これらは免疫染色で検出され

ないため、特殊な抗体を用いる必要がある。一方、IGLC2のアミロイド変性機序や、臓器親和性なども今後明らかにされるべき課題である。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1: Fujiwara S, Kawano Y, Yuki H, Okuno Y, Nosaka K, Mitsuya H, Hata H. PDK1 inhibition is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Cancer*. 15; 108(1):170-8, 2013.
- 2: Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Nihiro H, Iino T, Endo S, Kawano Y, Komohara Y, Takeya M, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, Okuno Y. PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. *Blood* 121: 962-970, 2013. 畑裕之
- 3: 骨硬化型骨髄腫。多発性骨髄腫updating 第2巻 117-118, 2013, 医薬ジャーナル社
- 4: 畑裕之、高アミラーゼ血症。多発性骨髄腫 updating 第2巻 282-285, 2013, 医薬ジャーナル社
- 5: 畑裕之、骨髄腫に伴うアミロイドーシス。血液症候群 第2版 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No23. 613-614, 2013
- 6: 畑裕之、多発性骨髄腫ガイドライン 臨床血液 第54巻304-310, 2013
- 7: Kawano Y, Kikukawa Y, Fujiwara S, Wada N, Okuno Y, Mitsuya H, Hata H. Hypoxia reduces CD138 expression and induces an immature and stem cell-like transcriptional program in myeloma cells. *Int J Oncol*. 2013 Dec;43(6):1809-16.

### 2. 学会発表

- 1: Kawano Y, Fujiwara S, Wada N, Yuki H, Mitsuya H, Hata H. Hypoxia Reduces CD138 Expression and Induces Immature Phenotype in Myeloma Cells. 14<sup>th</sup> International Myeloma Workshop, Kyoto, Japan. Apr 2013.
- 2: 畑裕之、多発性骨髄腫ガイドライン。第75回日本血液学会総会、2013年10月、札幌

- 3: 上野 二菜、上野 志貴子、立津 央、幸 宏道、畑 裕之、飯野 忠史、新納 宏昭、赤司 浩一、満屋 裕明、奥野 豊 . IRF4 down-regulation may be involved in PU.1-induced growth arrest / apoptosis in myeloma cells. 第75回日本血液学会総会、2013年10月、札幌
- 4: 藤原 志保、和田 奈緒子、河野 和、奥野 豊、満屋 裕明、畑 裕之 . Lactate is actively transported through MCT in MM cells and serves as an energy source 第75回日本血液学会総会、2013年10月、札幌
- 5: 和田 奈緒子、田崎 雅義、安藤 由喜雄、河野 和、藤原 志保、幸 宏道、奥野 豊、満屋 裕明、畑 裕之 . Induction of apoptosis and necroptosis in myeloma cells by shikonin. 第75回日本血液学会総会、2013年10月、札幌
- 6: 奥野 豊、宮川 英子、古田 梨愛、平田 真哉、畑 裕之 . Successful treatment by VRCD therapy of multiple myeloma (MM) patients refractory to RCD or VCD. 第75回日本血液学会総会、2013年10月、札幌
- 7: 河野 和、藤原 志保、和田 奈緒子、満屋 裕明、畑 裕之 . Hypoxia induces immature phenotype and stem cell like transcriptional program in myeloma cells. 第75回日本血液学会総会、2013年10月、札幌
- 8: Naoko Wada, Yawara Kawano, Shiho Fujiwara, Yoshitaka Kikukawa, Yutaka Okuno, Hiroaki Mitsuya, Hiroyuki Hata. A Small Molecule, Shikonin, Dually Functions As a Proteasome Inhibitor and a Necroptosis Inducer In Multiple Myeloma Cells The 55<sup>th</sup> annual meeting of American Society of Hematology, Dec. 2013, New Orleans, USA.
- 9: Shiho Fujiwara, Naoko Wada, Yawara Kawano, Yoshitaka Kikukawa, Hiroaki Mitsuya, Hiroyuki Hata. Lactate Is a Crucial Energy Source For Multiple Myeloma (MM) Cells In Bone Marrow Microenvironment. The 55<sup>th</sup> annual meeting of American Society of Hematology, Dec. 2013, New Orleans, USA.

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 の脂質への結合によるアミロイド線維形成の阻害

研究分担者 山田俊幸 自治医科大学臨床検査医学講座

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、前駆タンパク質である SAA（104 残基）の N 末端フラグメント（主に 76 残基程度）がアミロイド線維を形成し、臓器に沈着し機能障害をもたらす。AA アミロイドーシスの主要な原因となる SAA1 は感染症や自己免疫疾患などの炎症状態で血中濃度が上昇する、いわゆる急性相反応タンパク質であるが、その大部分は血中で高密度リポタンパク質 (HDL) と結合した状態、すなわち脂質と結合した状態で存在する。本研究では、SAA の脂質への結合がアミロイド線維形成に及ぼす影響について検討した。SAA 分子が脂質に結合するのに伴って安定な  $\alpha$ ヘリックス構造が形成されると、ヘパリンによるアミロイド線維形成が阻害されることが示された。しかしながら、SAA は HDL 結合状態で  $\alpha$ ヘリックス構造をもつにもかかわらず、線維形成が引き起こされた。この結果は、ヘパリンが HDL から SAA の解離を促したためであると推察された。

### A. 研究目的

アミロイドーシスの原因となるタンパク質には脂質との関連性を有するものが多く存在する。通常は脂質と結合することによって安定に存在しているタンパク質が、何らかの要因によって脂質から一部または全部が解離する、あるいは、本来は脂質結合活性をもたないタンパク質が、脂質環境を足場とすることでアミロイド線維の形成が促進される可能性が考えられる。したがって、脂質結合とアミロイド線維形成の関連性を評価することは、アミロイドーシス発症の分子基盤を解明する上でも重要である。本研究では、炎症状態で HDL の構成タンパク質として存在する SAA のアミロイド線維形成における脂質結合の影響について調査した。

### B. 研究方法

SAA の N 末端 (SAA 1-27 残基)、中間 (SAA 43-63 残基) 及び C 末端 (SAA 77-104 残基) の各領域からなるフラグメントペプチドを作製した。また、全長 SAA タンパク質を大腸菌発現により作製した。なお、SAA にはいくつかのアイソフォームが存在するが、今回は SAA1.1 を用いた。これらを用いて、主に蛍光や円二色性 (CD) といった分光

学的測定によってアミロイド線維形成や脂質結合性を評価した。

(倫理面への配慮)  
特に必要なし

### C. 研究結果

SAA の N 末端領域ペプチドにリゾホスファチジルコリン (lysoPC) ミセルを添加すると、トリプトファン蛍光のブルーシフトと  $\alpha$ ヘリックス構造の形成が認められ、lysoPC ミセルに対する結合が示唆された。脂質非存在下において、このペプチドにヘパリンを添加すると、アミロイド線維形成の指標となるチオフラビン T (ThT) 蛍光の増加と  $\beta$ シート構造の形成が観察されるが、lysoPC ミセルを共存させると ThT 蛍光の増加は抑制され、 $\alpha$ ヘリックス構造の形成が観察された。すなわち、N 末端領域ペプチドの lysoPC ミセルへの結合がアミロイド線維形成を阻害することが示唆された。一方、中間領域ペプチドは lysoPC ミセルに結合性を示さず、その共存下においてもヘパリンによる線維形成は阻害されなかった。なお、C 末端領域ペプチドは脂質非存在下における線維形成も脂質結合性も示さなかった。

全長SAAタンパク質は、N末端領域ペプチドと同様にlysoPCミセルに対する結合を示し、ヘパリンによるアミロイド線維形成はlysoPCミセルを共存させると阻害された。しかしながら、全長SAAタンパク質とホスファチジルコリンからなる再構成HDL粒子にヘパリンを添加すると、ThT蛍光は僅かな減少を示したのみで、 $\beta$ シート構造の形成も抑制されず、lysoPCミセル結合時とは異なる結果となった。

#### D. 考察

SAAのような両親媒性タンパク質は、脂質への結合に伴い $\alpha$ ヘリックス構造が形成される。それにより、ヘパリンを添加した際に観察されたアミロイド線維に特有の $\beta$ シート構造の形成が抑制されたと推察される。しかしながら、SAAはHDL結合状態で $\alpha$ ヘリックス構造をもつにもかかわらず、線維形成が引き起こされた。この結果は、ヘパリンがHDLからSAAの解離を促したためであると考えられる。

HDLは非常に不均一な粒子であり、その構成脂質組成は多様である。そのうえ、炎症状態においてはSAAがHDLの構成タンパク質になることに伴って、脂質組成も変化する可能性が考えられる。HDLを構成する脂質組成の違いによって解離のしやすさ、ひいては線維形成のしやすさも異なることが考えられ、今後さらなる検討が必要である。

#### E. 結論

SAA分子が脂質に結合することでヘパリンによるアミロイド線維形成が阻害されることが示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1)

Takase H., Tanaka M., Miyagawa S., Yamada T., Mukai T.: Effect of amino acid variations in the central region of human serum amyloid A on the amyloidogenic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444: 92-97, 2014.

#### 2. 学会発表

1)

高瀬ひろか、田中将史、山田俊幸、向高弘：血清アミロイドAの線維形成に生体分子が与える影響. 第1回日本アミロイドーシス研究会学術集会, 東京, 8月30日, 2013年

2)

高瀬ひろか、田中将史、山田俊幸、向高弘：生体分子との相互作用を介したヒト血清アミロイドAの構造変化. 第86回日本生化学会大会, 横浜, 9月11-13日, 2013年

3)

古地大輝、高瀬ひろか、田中将史、山田俊幸、向高弘：血清アミロイドAを用いた再構成HDLの作製と特性評価. 日本薬学会第134年会, 熊本, 3月27-30日, 2014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

## CE/J 系マウスにおける AA アミロイドーシス抵抗性の 分子遺伝学的基盤の解明

研究分担者 樋口 京一 信州大学大学院医学系研究科加齢生物学講座  
共同研究者 森 政之、田 耕  
信州大学大学院医学系研究科加齢生物学講座

**研究要旨** CE/J 系マウスは AA アミロイドーシスに対する強力な抵抗性を示す。この抵抗性は CE/J 系マウスの SAA2.2 タンパク質が Q30L (シグナルペプチドを除くと 11 番)アミノ酸置換をもつためにアミロイドへの構造変換が妨げられることに起因すると考えられていた。さらに CE/J 系マウスにおいては、炎症条件下において SAA1 と SAA2 が発現される他のマウス系統とは異なり、SAA2.2 のみが発現されるというユニークな特性もその一因と考えられている。しかしながら、SAA1 が発現されない原因は不明であった。そこで、CE/J 系マウスに関して *Saa1* および *Saa2* 遺伝子の PCR クローニング、RT-PCR による発現解析、およびプロモーター/エンハンサーアッセイを行ない、AA アミロイドーシスに対する抵抗性の分子遺伝学的基盤の解明を試みた。CE/J 系マウスの *Saa1* および *Saa2* 遺伝子はともに Q30L アミノ酸置換を含む同一の SAA2.2 をコードする塩基配列を有していた。また、炎症を誘起した CE/J 系マウス肝臓では *Saa1* および *Saa2* 遺伝子がほぼ等しく転写発現されていた。さらに、CE/J 系マウスの *Saa1*、および *Saa2* 遺伝子にはほぼ等しいプロモーター/エンハンサー活性が検出された。以上の結果は、CE/J 系マウスにおいても実際には *Saa1*、および *Saa2* 遺伝子が発現されるが、それらが同一のアミノ酸配列をコードするために、あたかも SAA2.2 のみが発現されているように見えることを示す。それらはともに Q30L アミノ酸等の置換を含むためにアミロイドへの構造変換が生じず、このことが CE/J 系マウスの AA アミロイドーシスに対する強力な抵抗性の一因であることが示された。AA アミロイドーシス抵抗性の分子遺伝学的基盤が明確にされたことにより、CE/J 系マウスの他のアミロイドーシス研究モデルとしての有用性はさらに高まったと考えられる。

### A. 研究目的

AA アミロイドーシスに抵抗性を示す CE/J 系マウスは他のアミロイドーシス研究に有用なモデルである。この抵抗性は CE/J 系マウスの SAA2.2 タンパク質が Q30L (シグナルペプチドを除くと 11 番)アミノ酸置換をもつためにアミロイドへの構造変換が妨げられることに起因すると考えられてきた。さらに CE/J 系マウスは、炎症条件下において SAA1 と SAA2 が発現される他のマウス系統とは異なり、SAA2.2 のみが発現されるというユニークな特性を有することが知られていた。この原因は CE/J 系マウスが *Saa1* 遺伝子をもたないためであるとする報告もあったが、この真偽は不明であった。CE/J 系マウスのアミロイドーシス

研究モデルとしての有用性を高めるためには、これらの分子遺伝学的基盤を明確にすることが必須である。そこでこの目的のために、CE/J 系マウスに関して *Saa1* および *Saa2* 遺伝子のクローニング、転写発現解析、およびプロモーター/エンハンサーアッセイを試みた。

### B. 研究方法

CE/J 系マウスは米国 Jackson Laboratory から購入し、信州大学ヒト環境科学研究支援センター附属動物実験施設の SPF 条件下で飼育・繁殖した。常法により肝臓からゲノム DNA を抽出した。*Saa1* (3618 bp)、および *Saa2* 遺伝子 (4109 bp) の全長を特異的に PCR 増幅可能なプライマーを転写

開始部位の約 600 塩基上流、およびポリ A 添加シグナルの約 500 塩基下流 (*Saa1*)、または約 1000 塩基下流 (*Saa2*) に設計した。ゲノム DNA をテンプレートとして両遺伝子を PCR 増幅した。PCR 産物の塩基配列を BigDye Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Life Technologies 社製)、および ABI 310 automated sequencer (Life Technologies 社製) を用いて決定した。

2ヶ月齢の CE/J 系マウス (n=6) に 2% 硝酸銀溶液 0.5mL を皮下に投与すると同時に 100  $\mu$ g のマウス AA アミロイド線維を静脈内投与した。翌日に 3 匹のマウスを安楽死させ、肝臓から mRNA を抽出し、cDNA を作製した。これをテンプレートとし、*Saa1* および *Saa2* 遺伝子に共通する塩基配列部分に設定したプライマーを用いて PCR 増幅を行なった。得られた PCR 産物をダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定するとともに、pCR21.プラスミドベクター (Life Technologies 社製) 中に連結し、大腸菌に導入してクローニングした。48 個のクローンの塩基配列を BigDye Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Life Technologies 社製)、および ABI 310 automated sequencer (Life Technologies 社製) を用いて決定した。残りの 3 匹のマウスは 10 日後に安楽死させ、主要臓器を摘出してホルマリン固定後に組織切片を作製し、コンゴレッド染色、および免疫組織化学染色により AA アミロイドの沈着の有無を調査した。

CE/J 系、および BALB/c 系マウスの *Saa1*、および *Saa2* 遺伝子のプロモーター/エンハンサーを含む上流約 640 bp を PCR で増幅し、pGL4.10 プラスミドベクター (Promega 社製) の *KpnI/BglII* サイトにクローニングしてレポータープラスミドを作製した。HepG2 細胞 (理研 BRC より入手) をレポータープラスミド、およびコントロールレポーター-pRL-TK (Promega 社製) によりトランスフェクションした。その 24 時間後にヒトの IL-1 $\beta$  (Peprotech 社製) および IL-6 (HumanZyme 社製) をそれぞれ最終濃度 10 ng/mL となるように添加し、その 4 時間後に Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社製) を用いルシフェラーゼレポーター活性を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては動物実験計画書を提出し、信州大学動物実験委員会による承認を得た。

### C. 研究結果

CE/J系マウスのゲノムDNAをテンプレートとしたPCR解析では、*Saa1* および *Saa2* 遺伝子の両産物が得られたことから、CE/J系マウスは両遺伝子を保有していることが明らかとなった。両PCR産物の塩基配列は高い相同性を示した。特にコード配列には59番目のコドンでの1カ所のサイレント塩基置換 (*Saa2*ではAAC、*Saa1*ではAAT) が存在するのみであり、両者がコードするアミノ酸配列は全く同一であった。注目すべきことに、CE/J系マウスの*Saa1* および *Saa2* 遺伝子はともにQ30Lアミノ酸置換を含むSAA2.2をコードする塩基配列を有していた。一方、両遺伝子の停止コドンとポリA添加シグナル間には15カ所の塩基置換が存在した (図1、2)。

この塩基置換の存在を利用して、両遺伝子の発現の有無をRT-PCR法により解析した結果、両遺伝子がほぼ等しいレベルで転写発現されていることが判明した。すなわち、RT-PCR産物の塩基配列解読クロマトグラムでは15カ所においてほぼ等しい高さの二つのピークの重なりが観察され、さらにRT-PCR産物の48クローンを解析した結果、27クローン、および21クローンが*Saa1* および *Saa2* 遺伝子に由来するものであった (図3)。一方、過去の報告と一致して、硝酸銀投与とAAアミロイド線維投与によるアミロイドーシ誘発実験ではCE/J系マウスにはAAアミロイドの沈着は全く観察されなかった。

レポーター解析の結果、CE/J系マウスの*Saa1*、および*Saa2* 遺伝子には、BALB/c系マウスの*Saa1* 遺伝子のプロモーター/エンハンサーに認められるIL-1 $\beta$  と IL-6による相乗効果は認められないものの、IL-6による中程度のエンハンサー効果が認められた。また、両者にはほぼ等しいプロモーター/エンハンサー活性が検出された。このデータは、炎症時のCE/J系マウスのRT-PCR解析から得られた*Saa1*と*Saa2*遺伝子がほぼ等しいレベルで転写発現されるとの結果と一致した。



## D. 考察

以上の結果を総合すると、CE/J 系マウスにおいては炎症時に *Saa1*、および *Saa2* 遺伝子がともに発現されるが、それらが同一のアミノ酸配列をコードするために、タンパク質レベルの解析ではあたかも SAA2.2 のみが発現されているように見えることが推察される。

マウスには SAA2.1 タンパク質のみが沈着し、SAA1.1 タンパク質は沈着しない。(マウスの SAA1, SAA2 タンパク質の命名には、歴史的に混乱があり、本報告では SAA2 がヒトの SAA1 に、SAA 1 が SAA2 に相当する命名法を用いた。) CE/J の SAA2.2 タンパク質の 1 次構造は、アミロイド線維として沈着しない SAA1.1 の配列に類似しており、特に線維形成能が高いとされる N 末端部分は SAA1.1 に類似している (図 1)。CE/J マウスでは *Saa1*、*Saa2* 遺伝子の産物はともに Q30L アミノ酸置換を含む、SAA1.1 と類似した 1 次構造 (SAA2.2) を有するために、アミロイド線維への構造変換が生じず、このことが CE/J 系マウスの AA アミロイドーシスに対する強力な抵抗性の一因であると考えられる。

## E. 結論

CE/J 系マウスの AA アミロイドーシス抵抗性の一因は *Saa1* と *Saa2* 遺伝子のどちらもが Q30L アミノ酸置換を含む SAA2.2 をコードし、アミロイド線維形成能が高い SAA2.1 タンパク質を産生できないためであることが明らかになった。AA アミロイドーシス抵抗性の分子遺伝学的基盤が明確にされた CE/J 系マウスは、他のアミロイドーシス発症機序解明の研究に有用である。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mori M, Tian G, Ishikawa A, Higuchi K: Diversity and complexity of the mouse *Saa1* and *Saa2* genes. *Exp. Anim.* 63: 99-106, 2014.
- 2) Mori M, Tian G, Higuchi K: AA amyloidosis-resistant CE/J mice have *Saa1* and *Saa2* genes that

encode an identical SAA isoform. *Amyloid* in press, 2014.

- 3) Higuchi K: Transmission of AA amyloidosis may cause outbreaks of amyloid A amyloidosis in chickens. *Amyloid.* 20: 59-60, 2013.
- 4) Murakami T, Ishiguro N, Higuchi K: Transmission of Systemic AA Amyloidosis in Animals. *Vet Pathol.* 2013 [Epub ahead of print]
- 5) Higuchi K, Mori M, Sawashita J: Mouse senile systemic AApoAII amyloidosis: pathology, genetics and transmission. Takeda T et al, eds. *The Senescence- Accelerated Mouse (SAM): Achievements and Future Directions.* Elsevier B.V. Amsterdam, Netherlands, pp 301-310, 2013.
- 6) 森 政之、樋口 京一: 老化のモデル生物が果たす役割。石井直明、丸山直記 編。老化の生物学 化学同人 京都 2014 (印刷中)
- 7) 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. Hazenberg B. P.C & Bijzet J eds XIIIth International Symposium on Amyloidosis From Molecular Mechanisms Towards the Cure of Systemic Amyloidosis", Zalsman Groningen B. V, Netherlands. pp 122-125. 2013
- 8) 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 apolipo- protein A-II into amyloid fibrils in mice. Hazenberg B. P.C & Bijzet J eds XIIIth International Symposium on Amyloidosis From Molecular Mechanisms Towards the Cure of Systemic Amyloidosis" Zalsman Groningen B. V., Netherlands. pp126-129, 2013.

### 2. 学会発表

- 1) 劉 穎業、田 耕、羅 宏敏、李 琳、澤下 仁子、森 政之、樋口 京一: マウス老化アミロイド線維(AApoAII)の構造と伝播性の解析。第 28 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、名古屋

- 市、2013年7月6日。
- 2) 羅 宏敏、澤下 仁子、田 耕、劉 穎業、森 政之、樋口 京一：R1.P1-Apoa2c マウスにおける老化アミロイド(AApoAII)の沈着は小胞体ストレスを誘導する。第28回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、名古屋市、2013年7月6日。
- 3) 羅 宏敏、錢 金澤、王 耀勇、田 耕、澤下 仁子、森 政之、樋口 京一：マウス老化アミロイド(AApoAII)の沈着は小胞体ストレスを誘導する。日本基礎老化学会第36回大会、大阪市、2013年6月4-6日。
- 4) 澤下 仁子、李 琳、田 耕、森 政之、樋口 京一：マウスF型 ApoA-II のC末ペプチドによるアミロイド線維形成阻害機序とアミロイドーシス発症軽減効果。日本基礎老化学会第36回大会、大阪市、2013年6月4-6日。
- 5) 樋口 京一：Seeding 反応による伝播現象から見たアミロイドーシスの病態。(シンポジウム) 第1回日本アミロイドーシス研究会学術集会、東京、2013年8月30日。
- 6) 樋口 京一：アミロイドーシスの分子機構と治療法開発に向けた戦略。厚生労働省アミロイドーシス研究班 夏のワークショップ、2013年7月25-26日。
- 7) Higuchi K : Prion-like transmission of systemic amyloidoses. (Invited Speaker) Asian Pacific Prion Symposium (APPS) Nagasaki, 2013.7.21-22.
- 8) 劉 穎業、田 耕、羅 宏敏、李 琳、澤下 仁子、森 政之、樋口 京一：マウス老化アミロイド線維(AApoAII)の構造と伝播性の解析。第1回日本アミロイドーシス研究会学術集会、東京、2013年8月30日。
- 9) 澤下 仁子、張 蓓茹、李 琳、田 耕、亀谷 富由樹、樋口 京一：マウスF型 ApoA-II のC末ペプチドはAApoAII アミロイドーシスを軽減する。第1回日本アミロイドーシス研究会学術集会、東京、2013年8月30日。
- 10) 樋口 京一、田 耕、澤下 仁子、森 政之、細川 昌則、竹田俊男：老化促進モデルマウス(SAM)を用いた老化および抗老化研究。(招待講演)第22回腸内フローラシンポジウム、東京、2013年11月1日。
- 11) 羅 宏敏、錢 金澤、王 耀勇、田 耕、澤下 仁子、森 政之、樋口 京一：マウス老化アミロイド(AApoAII)の沈着は小胞体ストレスを誘導する。第8回臨床ストレス応答学会大会、松本市、2013年11月15-16日。
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得  
無し
  2. 実用新案登録  
無し
  3. その他  
無し

C57BL/6J	SAA1.1	MKLLTSLVFCSLLLGVCHGGFFSFVHEAFQGGAGDMWRAYTDMKEANWIKNSDKYFHARGNY	Non-Amyloidogenic
	SAA2.1	.....IG.....G..DG.....	Amyloidogenic
CE/J	SAA2.2	.....L.....G..DG.....	Non-Amyloidogenic
C57BL/6J	SAA1.1	DAAQRGPGGVWAAEKISDGREAFQEFFFRGHEDTIADQEANRHGRSGKDPNYYRPPGLPDKY	Non-Amyloidogenic
	SAA2.1	.....A..S.....M.....A..	Amyloidogenic
CE/J	SAA2.2	.....M.....	Non-Amyloidogenic

図1. CE/JマウスSAAタンパク質1次構造の比較。CE/JマウスのSAAタンパク質はSAA2.2の1種類だけであり、アミロイド線維として組織に沈着するSAA2.1とは5カ所のアミノ酸が異なる。特にアミロイド形成能が高いと考えられているN末端アミノ酸配列はアミロイド線維としての沈着しないSAA1.1と類似する。

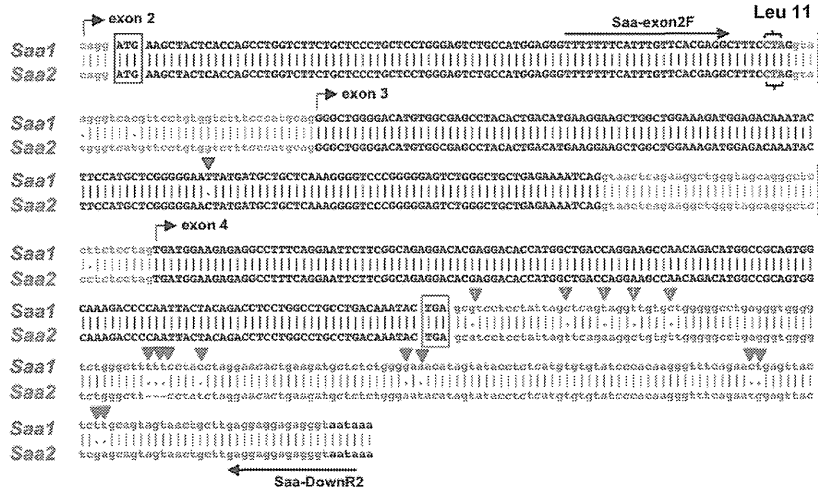


図2 CE/JマウスSAA遺伝子構造。CE/JマウスではSAA1, SAA2遺伝子が全く同一の1次構造を持つタンパク質(SAA2.2)をコードする。

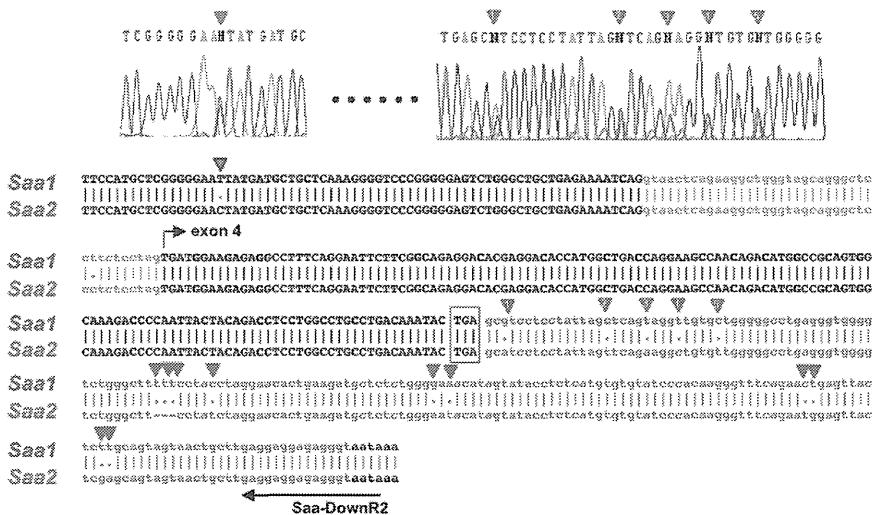


図3. CE/JマウスではSAA1とSAA2は同程度に発現されている。CE/Jマウスではアミロイドとして沈着するSAAとは構造が異なるSAA2.2のみが発現していることが抵抗性の原因と考えられる。

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

## JAK 阻害剤による関節リウマチ患者の血清アミロイド A 蛋白（SAA） 産生の抑制

研究協力者 右田清志 独立行政法人国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター

共同研究者 和泉泰衛<sup>1</sup>、中村 正<sup>2</sup>

<sup>1</sup>独立行政法人国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター

<sup>2</sup>くまもと森都総合病院リウマチ膠原病内科

**研究要旨** JAK 阻害剤トファシチニブの、RA 患者の血清アミロイド A（SAA）濃度に及ぼす影響について検討した。活動性 RA 患者（n=15）にトファシチニブ（5mg/day～20mg/day）を経口投与すると、SAA 濃度は 110.5±118.5µg/ml から 15.5±13.3µg/ml へ低下した。SAA が正常化（<8µg/ml）した患者では、RA の活動性も有意に改善した。トファシチニブは RA 患者の血清 IL-6 濃度を、39.2±38.6pg/ml から 7.9±8.9pg/ml へと有意に低下させた。トファシチニブは RA 患者の血中の IL-6 を低下させることで SAA の濃度を正常化させる作用があることが示唆された。

### A. 研究目的

経口投与可能な低分子化合物であるトファシチニブは JAK キナーゼを阻害する新規抗リウマチ剤で、TNF 阻害剤などの生物学的製剤治療抵抗例などに対する治療薬として位置づけられている。トシリズマブを中心とする生物学的製剤は、サイトカインを中和することで、サイトカインで誘導される血清アミロイド A（SAA）の産生を抑制するだけでなく、すでに発症した AA アミロイドーシスに対しても治療効果を示すことが明らかになっている。今回、トファシチニブが、RA 患者の SAA、炎症性サイトカインにどのように影響するか検討した。

### B. 研究方法

トファシチニブの第三相臨床試験にエントリーした関節リウマチ患者 16 名のなかで、トファシチニブ（実薬）が投与された 15 名を対象とした。平均年齢は、男女比は 2 : 13、平均年齢は 47.8±9.5 歳、Stage 分類は、II 3 名、III 5 名、IV 6 名、平均 DAS28（CRP）は 5.66±0.77 であった。15 名の症例のうち、MTX 併用症例は 10 名（平均投与量 7.8±1.8mg/week）、非併用症例は 5 名であ

った。全例でプレドニゾロンが投与されており平均投与量は 6.2±2.5mg/day であった。

トファシチニブ投与前、投与後 4 週後の血清を用い、SAA を EIA 法、血清 IL-6、血清可溶性 IL-6 レセプターを ELISA 法で測定した。

### C. 研究結果

トファシチニブ投与により、SAA 濃度は、110.5±118.5µg/ml から 15.5±13.3µg/ml へ有意に低下した。SAA が基準値以下（8<µg/ml）に低下した症例（n=11）と SAA が基準値まで低下しなかった症例（n=4）でトファシチニブ投与後の DAS28（CRP）を比較した所、SAA が正常化した群で有意に DAS28（CRP）が低下していた。血清 IL-6 は、トファシチニブ投与前が 39.2±38.6pg/ml から投与後 4 週で 7.9±8.9pg/ml と有意に低下した。血清可溶性 IL-6 レセプターはトファシチニブの投与前後で変化がみられなかった。

### D. 考察

我々はこれまでに、トファシチニブが、IL-6 刺激で誘導される RA 滑膜細胞 JAK2、STAT3 のリン酸化を阻害することで、SAA 誘導を強力に抑制

することを報告してきた。この検証のため RA 患者で、トファシチニブ投与前後での SAA の変化を検討した所、トファシチニブは、SAA の濃度を強力に低下させることを確認した。さらにトファシチニブは血清 IL-6 濃度も低下させることも判り、IL-6 のシグナル阻害だけでなく、IL-6 自体の産生を阻害することで、RA 患者の SAA 産生を抑制していることが示唆された。トファシチニブの IL-6 産生阻害のメカニズムに関しては、IL-6 誘導の上位に位置すると考えられているサイトカインである TNF- $\alpha$  のシグナル伝達に JAK/STAT 経路は、関与しておらず、トファシチニブによる TNF- $\alpha$  シグナルをブロックしているとは考えにくい。トファシチニブが、活性化リンパ球に作用し、サイトカインシグナル、活性化シグナルを阻害することで、IL-6 誘導に関与するサイトカイン、あるいは IL-6 の産生そのものを抑制することが示唆された。

#### E. 結論

トファシチニブは、RA 患者の血中 IL-6、SAA 濃度低下させることで、RA 滑膜炎、AA アミロイドシスの発症に抑制的に働くことが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujikawa K, Migita K, Tsukada T, Umeda M, Nonaka F, Kawakami A, Eguchi K: Interleukin-6 targeting therapy in familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol* 31:150-1, 2013.
- 2) Migita K, Agematsu K, Masumoto J, Ida H, Honda S, Jiuchi Y, Izumi Y, Maeda Y, Uehara R, Nakamura Y, Koga T, Kawakami A, Nakashima M, Fujieda Y, Nonaka F, Eguchi K, Furukawa H, Nakamura T, Nakamura M, Yasunami M: The Contribution of SAA1 Polymorphisms to Familial Mediterranean Fever Susceptibility in the Japanese Population. *PLoS One* 8:e55227, 2013.
- 3) Mori S, Yonemura K, Migita K: Familial Mediterranean Fever Occurring in an Elderly Japanese Woman with Recent-onset Rheumatoid Arthritis. *Intern Med* 52:385-388, 2013.
- 4) Ishiguro T, Takayanagi N, Kobayashi K, Migita K, Yanagisawa T, Hoshi T, Sugita Y: Magnetic resonance imaging can detect thoracic inflammation due to familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol* 23:604-7, 2013.
- 5) Eguchi M, Miyashita T, Shirouzu H, Sato S, Izumi Y, Takeoka A, Ohno T, Sumiyoshi R, Nishino A, Jiuchi Y, Nonaka F, Eguchi K, Kawakami A, Migita K: Coexistence of polymyositis and familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol* 23:374-8, 2013.
- 6) Satomura K, Torigoshi T, Koga T, Maeda Y, Izumi Y, Jiuchi Y, Miyashita T, Yamasaki S, Kawakami A, Aiba Y, Nakamura M, Komori A, Sato J, Ishibashi H, Motokawa S, Migita K: Serum amyloid A (SAA) induces pentraxin 3 (PTX3) production in rheumatoid synoviocytes. *Mod Rheumatol* 23:28-35, 2013.
- 7) Migita K, Izumi Y, Torigoshi T, Satomura K, Izumi M, Nishino Y, Jiuchi Y, Nakamura M, Kozuru H, Nonaka F, Eguchi K, Kawakami A, Motokawa S: Inhibition of JAK/STAT signaling pathway in rheumatoid synovial fibroblasts using small molecule compounds. *Clin Exp Immunol* 174:356-63, 2013.
- 8) Migita K, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Izumi M, Sakai T, Nakamura M, Motokawa S, Nakamura T, Kawakami A: Effects of Janus kinase inhibitor tofacitinib on circulating serum amyloid A and interleukin-6 during treatment for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2013 in press.
- 9) Nonaka F, Migita K, Haramura T, Sumiyoshi R, Kawakami A, Eguchi K: Colchicine-responsive protracted gouty arthritis with systemic inflammatory reactions. *Mod Rheumatol* 2013 Jan 10. [Epub ahead of print]
- 10) Nakamura T, Migita K, Ando Y, Takaoka H, Suzushima H, Shiraishi N: Amyloid A

- amyloidosis in a Japanese patient with familial Mediterranean fever associated with homozygosity for the pyrin variant M694I/M694I. *Mod Rheumatol* 2012 Sep 29. [Epub ahead of print]
- 11) Migita K, Agematsu K, Yazaki M, Nonaka F, Nakamura A, Toma T, Kishida D, Uehara R, Nakamura Y, Jiuchi Y, Masumoto J, Furukawa H, Ida H, Terai C, Nakashima Y, Kawakami A, Nakamura T, Eguchi K, Yasunami M, Yachie A: Genotype-Phenotype Correlations in Japanese Patients with Familial Mediterranean Fever. *Medicine* 2014 in press.
  - 12) 右田清志, 野中文陽, 和泉泰衛, 江口勝美, 中村 正, 井田弘明, 上松一永: 家族性地中海熱の臨床. 特集 *Clinical Science* 自己炎症症候群の新しい知見. *炎症と免疫* 21:40-46, 2013.
  - 13) 川上 純, 右田清志, 井田弘明: 自己炎症疾患. 特集 免疫反応と疾患. 自己炎症疾患・炎症性疾患の免疫異常. *medicina* 50:458-462, 2013.
  - 14) 右田清志, 和泉泰衛, 野中文陽, 江口勝美: 日本人における自己炎症疾患関連遺伝子の異常. 特集<Basic Science> リウマチ・膠原病のゲノム解析 update. *炎症と免疫* 21:401-409, 2013.
  - 15) 右田清志, 和泉泰衛, 野中文陽, 江口勝美: 遺伝性自己炎症疾患—家族性地中海熱—. I. 炎症の諸相. *別冊 BIO Clinica* 2:52-57, 2013.
  - 16) 右田清志, 和泉泰衛, 野中文陽, 江口勝美: 痛風. *Clinical Science* 自然免疫が関与する炎症性疾患. *炎症と免疫* 21:517-524, 2013.
  - 17) 右田清志: リウマチ性疾患と IL-1 阻害療法. 臨床リウマチ医のための基礎講座. *臨床リウマチ* 25:299-301, 2013.
  - 18) 江口勝美, 野中文陽, 右田清志: 自己炎症疾患の新たな展開—内科医でも知っておく必要があります—. *アレルギー* 62:942-949, 2013.
- 1) 右田清志, 和泉泰衛, 井田弘明, 増本純也, 谷内江昭宏, 上松一永: 家族性地中海熱の臨床像 (全国調査集計結果). シンポジウム. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 広島. 2013.4-19-21.
  - 2) 右田清志, 井田弘明, 和泉泰衛, 宮下賜一郎, 野中文陽, 江口勝美, 寺井千尋, 古川 宏, 川上 純, 増本純也, 矢崎正英, 中村昭則, 谷内江昭宏, 上松一永: 家族性地中海熱の臨床像. シンポジウム. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 22 回国際リウマチシンポジウム. 京都. 2013.4.18-20.
  - 3) 藤川敬太, 塚田敏昭, 岩本直樹, 一瀬邦弘, 山崎聡士, 中村英樹, 川上 純, 岩永 希, 植木幸孝, 右田清志, 井田弘明: 原発性肥大型骨関節症患者の疾患遺伝子解析と MEFV 変異の検討. ワークショップ. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 22 回国際リウマチシンポジウム. 京都. 2013.4.18-20.
  - 4) 野中文陽, 住吉玲美, 右田清志, 川上 純, 江口勝美: 中高年で発症した家族性地中海熱 (Familial Mediterranean fever: FMF) 11 例の臨床的特徴. ワークショップ. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 22 回国際リウマチシンポジウム. 京都. 2013.4.18-20.
  - 5) 志村紀彰, 神菌淳司, 小野佳代, 天本正乃, 市川光太郎, 右田清志: 非典型家族性地中海熱の臨床症状と MEFV 遺伝子 exon 1/2 変異の意義. 口演発表. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 広島. 2013.4.19- 21.
  - 6) 小松成綱, 本間大, 林圭, 井川哲子, 辻ひとみ, 高橋英俊, 山本明美, 右田清志, 井田弘明, 飯塚一: 家族性地中海熱に伴う壊死性血管炎の 1 例. ポスタ. 第 112 回日本皮膚科学会総会. 横浜. 2013.6.14-16.
  - 7) 森 俊輔, 米村憲輔, 右田清志: 早期関節リウマチの高齢女性に発症した家族性地中海熱の 1 症例. 一般演題. 第 302 回日本内科学会九州地方会. 別府. 2013.8.24.
  - 8) 清水俊匡, 右田清志, 野中文陽, 川上 純, 江口勝美: コルヒチン抵抗家族性地中海熱にトシリズマブが奏功した一例. 一般演題. 第 46 回九州リウマチ学会. 佐賀. 2013.9.7-8.

## 2. 学会発表

- 9) 松岡直樹, 坪井雅彦, 一瀬恭史, 岩永淳子, 川上 純, 右田清志: 家族性地中海熱 (FMF) を併発した関節リウマチの2症例. 一般演題. 第46回九州リウマチ学会. 佐賀. 2013.9.7-8.
- 10) 野中文陽, 右田清志, 清水俊匡, 川上 純, 江口勝美: MEFV および TNFRSF1A 遺伝子のヘテロ変異を有し, 興味深い臨床経過を認めた SLE の1例. 一般演題. 第46回九州リウマチ学会. 佐賀. 2013.9.7-8.
- 11) 久永紗知, 鎌田理嗣, 大野直義, 荒木利卓, 右田清志: 診断に苦慮した家族性地中海熱の1例. 一般演題. 第303回日本内科学会九州

地方会例会. 沖縄. 2013.11.16.

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（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

## イムノブロットでの AA76 サイズ検出による AA アミロイドーシスの診断

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<sup>1</sup>、奥田恭章<sup>2</sup>、黒田毅<sup>3</sup>

<sup>1</sup>自治医科大学医学部臨床検査医学、<sup>2</sup>道後温泉病院リウマチセンター

<sup>3</sup>新潟大学保健管理センター

**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)の 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、本研究ではイムノブロットによる当該サイズの AA 検出の診断性能を検討した。胃粘膜生検試料では、陰性例で検出されることはなく（特異度 100%）、1115 試料中 106、92%で陽性であった。コンゴレッド法の 67%、免疫染色法の 72%という感度を上回った。また、6 例の腹壁脂肪でも検出された。この高感度、高特異性の診断法は特に腹壁脂肪などの未固定試料で有用性が発揮され则认为る。

### A. 研究目的

AA アミロイドーシスでは前駆物質である SAA の C 末端部分が蛋白分解により除去された N 末端部分 (AA) が沈着する。AA は切断部位による多様性を示すが、最も普遍的にみられるのは SAA の 76-77 残基間の切断により生ずる AA76 であるため、組織中での AA76 の検出は AA アミロイド沈着の間接的な証明となる可能性がある。今回は胃十二指腸由来の未固定の生検組織または腹壁脂肪生検試料において、イムノブロットで AA76 を検索し、診断における有用性を検討した。

### B. 研究方法

関節リウマチ患者で、AA アミロイドーシスのスクリーニングのため胃十二指腸生検を受け、結果的に Congo red 染色陰性であった 14 症例 14 試料（スクリーニング陰性群）と過去に診断されていて経過観察のために生検された 47 症例 115 試料（経過観察群）を対象とした。生検は十二指腸第 2 部、同球部、胃前庭部で行い、各部位あたり隣接した 2 か所から粘膜小片を採取した。小片のうち、一方は固定して切片を作製し、Congo red 染色と抗 SAA 抗体による免疫染色を行った。他

方は 6M 尿素中でホモジナイズし、イムノブロットで分析した。イムノブロットは、低分子用の SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、抗 SAA 抗体を反応させ、酵素化学発光系で検出した。AA76 の確認はリコンビナント AA76 との易動度の一致によった。腹壁脂肪は既診断例 6 例と疑い例 1 例から採取し、同様にイムノブロットで分析した。

（倫理面への配慮）

患者組織切の利用に関しては、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

胃十二指腸粘膜試料でスクリーニング陰性群においては全例が免疫染色、イムノブロットの AA76 とも陰性であった。AA76 が非アミロイドーシスで検出されないことを示唆している。経過観察群では、Congo red 陰性であった 38 例において、免疫染色では 6 例が陽性、32 例が陰性であった。免疫染色陰性の 32 例において、イムノブロットの AA76 検出では、23 例が陽性、9 例が陰性であった。Congo red 陽性試料において免疫染色陰性はな



く、免疫染色陽性試料でイムノブロット陰性はなかった。以上のようにイムノブロット法の高感度が示された。腹壁脂肪での AA76 検出は、既診断 6 例全例で陽性、疑い例で結果的には否定された 1 例で陰性であった。

#### D. 考察

本診断法の高い感度、特異性が確認された。実際は、胃粘膜試料においては固定標本を使った現行の組織学的診断が問題なく行われているため本診断法を用いる必要性が低い、今回の検討で示されたように腹壁脂肪などの未固定試料には有用性の高い方法と考えられる。今後腹壁脂肪以外の試料への応用を模索していきたい。

#### E. 結論

本診断法は感度、特異度に優れ、特に腹壁脂肪などの未固定試料での有用性は高いと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tsuchiya H, Sato J, Tsuda H, Yamada T, Fujimura A, Koshimizu TA. Serum amyloid A upsurge precedes standard biomarkers of hepatotoxicity in ritodrine-injected mice. *Toxicology* 305:79-88, 2013.
- 2) Ishii W, Liepnieks J, Yamada T, Benson MD, Kluge-Beckerman B. Human SAA1-derived amyloid deposition in cell culture: a consistent model utilizing human PBMC and serum-free medium. *Amyloid* 20: 61-71, 2013.
- 3) Miyamoto M, Kotani K, Okada K, Ando A, Hasegawa H, Kanai H, Ishibashi S, Yamada T, Taniguchi N. Arterial wall elasticity measured using the phased tracking method and atherosclerotic risk factors in patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb* 2013; 20: 678-687.

4) Sato J, Kotani K, Yamada T. Accumulation and absorption of serum amyloid A and apolipoprotein E fragments in the course of AA amyloidosis: A study in a mouse model. *Ann Clin Lab Sci*, in press

5) Takase H, Tanaka M, Miyagawa S, Yamada T, Mukai T. Effect of amino acid variations in the central region of human serum amyloid A on the amyloidogenic properties. *Biochem Biophys Res Commun*, in press

#### 2. 学会発表

- 1) 山田俊幸、佐藤純司、奥田恭章：最も普遍的な AA アミロイド成分である AA76 の特異的検出. 第 57 回日本リウマチ学会学術集会、京都、4 月 20 日、2013 年
- 2) 石井亘、松田正之、池田修一、山田俊幸、Juris Liepnieks, Barbara Kluge-Beckerman, Merrill D.Benson. ヒト末梢血単核球培養を用いた AA アミロイド形成機序の解析. 第 57 回日本リウマチ学会学術集会、京都、4 月 20 日、2013 年
- 3) 山田俊幸、生田目久美子、奥田恭章：AA アミロイド沈着の検出におけるイムノブロットの有用性. 第 1 回日本アミロイドーシス研究会、東京、8 月 30 日、2013 年.
- 4) Minakata D, Ohmine K, Fujikawa S, Nagai T, Muroi K, Yamada T, Hoshii Y, Ozawa K. Nodular cutaneous AL amyloidosis with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. 第 75 回日本血液学会学術集会、札幌、10 月 11 日、2013 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

## 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<sup>1</sup>、伊藤由美<sup>2</sup>、今井直史<sup>2</sup>、中枝武司<sup>2</sup>、和田庸子<sup>2</sup>、村上修一<sup>2</sup>、  
 中野正明<sup>3</sup>、山田俊幸<sup>4</sup>

<sup>1</sup>新潟大学保健管理センター、

<sup>2</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科腎・膠原病内科学分野、

<sup>3</sup>新潟大学医学部保健学科、<sup>4</sup>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13症例とアミロイドーシスを合併しない5症例の尿を検討した。アミロイドーシスを合併した5症例で尿中にAA76を検出したが、アミロイドーシスを合併しない5症例ではAA76は検出されなかった。尿沈渣のサイトスポットの解析では、アミロイドーシス合併例の一部でアミロイドの粒子を認め、二重染色でSAA陽性の粒子が腎組織の細胞のマーカーと同じ部位に出現していた。尿沈渣の抗SAA抗体と糸球体、尿細管のマーカーによる二重染色によりアミロイドの局在診断が可能であった。

### 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- $\alpha$ 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、腎に沈着したア

ミロイドの動態を検討し局在診断を行うことを目的とした。

### B. 研究方法

反応性AAアミロイドーシスを合併したRA13症例の尿と合併していないRA5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。可溶化した沈渣と約200倍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。更に分離した沈渣の一部を用いサイトスポットを作成した。ホルマリン固定、未固定でそれぞれCongo-red染色、各種免疫染色を行い、腎の糸球体、尿細管のマーカーとアミロイド蛋白の関係を検討した。

(倫理面への配慮)

問題なし。

### C. 研究結果

結果1: AAアミロイドーシスを合併した13症例中5症例において、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 症例で濃縮上清にも同様のバンドを検出した。生物学的製剤で治療されている 2 症例ではバンドは検出されなかった。また、AA アミロイドーシスを合併していない 5 症例ではバンドは検出されなかった。

結果 2：可溶化した沈渣の Blot でバンドを検出された一部の症例の尿沈渣をホルマリン固定後 Congo-red 染色を行った結果、Congo-red 陽性で偏光でアップル・グリーンの複屈折を呈する粒子を尿沈渣中に検出しアミロイド蛋白と確認できた。さらに未固定標本での抗 SAA 抗体と糸球体上皮細胞のマーカーであるポドカリキシン、近位尿細管のマーカーであるメガリン、アクアポリン 1、遠位尿細管のマーカーであるアクアポリン 2 との二重染色において、抗 SAA 抗体が単独で陽性の粒子、ポドカリキシン、メガリン、アクアポリン 1、アクアポリン 2 が単独で陽性の粒子、抗 SAA 抗体とこれらの腎臓を構成する細胞マーカーと同部位に染色される粒子が各々観察された。

#### 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。これらの機序を踏まえ、糸球体、近位尿細管、遠位尿細管へのアミロイドの沈着が尿沈渣により検出できることが今回明らかになった。今後は、治療効果などの判定に使用できる可能性も示唆された。

#### 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。尿沈渣のサイトスロットによる解析では、沈渣中にコンゴレッド染色陽性、偏光顕微鏡で緑色偏光を呈する沈渣が認められた。抗 SAA 抗体と腎組織のマーカーによる二重染色により糸球体、尿細管のアミロイドの局在診断が可能であった。

#### 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 AA アミロイドーシスに対する十二指腸 AA 蛋白定量生検による薬剤別治療効果の検討

研究分担者 奥田恭章 道後温泉病院リウマチセンター

共同研究者 山田俊幸<sup>1</sup>

<sup>1</sup>自治医科大学臨床検査医学

**研究要旨** リウマチ性疾患に合併する AA アミロイドーシスに対して消化管で最も検出感度の高い十二指腸生検を経時的に行い、薬剤別に組織沈着量の推移を検討した。

対象は、経時的に AA 蛋白定量生検を行った 21 例で、治療薬群別に、1. 経口 DMARDs 群 (non-Bio) 7 例、2. 抗 TNF 製剤群(TNF)6 例、3. トシリズマブ群(TCZ)8 例の 3 群に分け、ELISA 法にて AA 蛋白組織沈着量 (ng/mg of tissue、正常値 10 以下) の推移を検討した。なお検体は、SDS-PAGE 抗 SAA 抗体によるイムノプロットにて AA 蛋白であることを確認した。初回評価時の各群の定量値 (中央値) は、non-Bio : 1997、TNF 群 : 2057、TCZ 群 : 1722 で有意差を認めなかった ( $p=0.9546$ )。最終評価時に AA 蛋白減少例は、non-Bio 群 : 1/7(14.3%)、TNF 群 : 4/6(66.7%)、TCZ 群 : 8/8(100%) であった。沈着量推移は、初回沈着量を 100 % として最終評価沈着量 (中央値) は、non-Bio 群 : 194.3%、TNF 群 : 84.6%、TCZ 群 : 14.0% であった。non-Bio 群は有意の増加 ( $p = 0.0469$ )、TNF 群は有意差を認めず ( $p=0.6875$ )、TCZ 群は有意の減少を示した ( $p = 0.0078$ )。各製剤投与中の SAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) (中央値) は、non-Bio 群 : 58.1、TNF 群 : 20.3、TCZ 群 3.0 であった ( $p = 0.001$ )。

3 群で TCZ 群はもっとも SAA 抑制効果が高く、AA 蛋白の優れた turnover 効果を認めた。

### 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して消化管で最も検出感度の高い十二指腸に対する生検 (図 1) を経時的に行い、薬剤別に組織沈着量の推移を検討した。

(倫理面への配慮)

アミロイド定量生検は、道後温泉病院倫理委員会にて承認を得て、患者へ研究内容を説明し、同意書を取得後に行った。

### B. 研究方法

対象は、2008 年から 2013 年に経時的に AA 蛋白定量生検を行った 21 例で (平均観察期間  $39.8 \pm 14.0$  ヶ月、生検回数中央値 3 (2 - 6 回)、治療薬群別に、1. 経口 DMARDs 群 (non-Bio) 7 例、2. 抗 TNF 製剤群(TNF)6 例、3. トシリズマブ群(TCZ)8 例の 3 群に分け、ELISA 法にて AA 蛋白組織沈着量 (ng/mg of tissue、正常値 10 以下) の推移を検討した。なお検体は、SDS-PAGE 抗 SAA 抗体によるイムノプロットにて AA 蛋白であることを確認した (図 2)。

### C. 研究結果

1. 観察期間平均 (月) は、それぞれ、non-Bio 群 :  $38.3 \pm 14.3$  (18 - 58)、TNF 群 :  $45.2 \pm 15.3$  (24 - 61)、TCZ 群 :  $37.0 \pm 13.6$  (18 - 58) であった。

1. 初回評価時の各群の定量値 (中央値) は、non-Bio 群 : 1997、TNF 群 : 2057、TCZ 群 : 1722 で有意差を認めなかった (図 3) ( $p = 0.9546$ )。

2. 最終評価時に AA 蛋白減少例は、non-Bio 群 : 1/7(14.3%)、TNF 群 : 4/6(66.7%)、TCZ 群 : 8/8(100%) であった (図 4,5,6)。

3. 沈着量推移は、初回沈着量を 100 % として最終評価沈着量 (中央値、最小-最大) は、non-Bio