

---

# SAA1遺伝子プロモーター領域による SAA産生調節の解明と治療への応用

---

課題番号 13670479

平成13～14年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）  
研究成果報告書



平成16年3月

研究代表者 寺井千尋

(東京女子医科大学・医学部・助教授)





## は し が き

関節リウマチに続発するAAアミロイドーシスは、臨床症状出現から2, 3年の間に大半の患者が死亡するきわめて重篤な病態であり、関節リウマチ患者の死亡原因の上位を占める。まだ確立した治療法がなく、放置すれば致命的なことからALアミロイドーシスに準じた強力な免疫抑制治療が行われたり、中等量ステロイドの投与がおこなわれかえって骨髄抑制や易感染性に斃れることも少なくなかった。

慢性関節炎にともなう持続的な血清アミロイドAの上昇が、本症発症の必要条件ではあるが、そのような患者のすべてに本症が現れるのではなく、また人種により発病率に大きな差が存在するので、何らかの遺伝的な要因の存在が考えられていた。その後、血清アミロイドA (SAA) をコードする遺伝子の研究より本症の病態解明の糸口がえられた。急性炎症蛋白であるSAAにはSAA1とSAA2があるが、アミロイド沈着蛋白の解析からヒトではSAA1蛋白に由来するアミロイドAが主要な構成成分であり、本症の原因蛋白と考えられていた。日本におけるAAアミロイドーシスの多数例の遺伝的検討から、日本人にみられる3種類のSAA1遺伝子のコード領域多型のうちSAA1.3 (SAA1  $\gamma$ ) がAAアミロイドーシス発症の危険因子であり、さらにはCaucasianではSAA1.3の頻度が低いことが判明した。しかしSAA1.3遺伝子をもつ患者がなぜAAアミロイドーシスを発症しやすいかに関しては、いまだ結論は得られていない。本研究ではSAA1のプロモーター領域についてさらなる検討を行った。

本研究の結果、SAA1.3と連鎖するプロモーター領域を有する患者ではSAA1 mRNA産生の亢進が示されたが、血中蛋白レベルの測定ではSAA1.3患者でSAA1蛋白量は必ずしも高くなく、さらにSAA蛋白の代謝、他の因子との相互作用などの検討が必要である。それ以前にSAA蛋白自体の生体における役割もまだ十分に明らかになっておらず、この方面からのさらなる研究の発展が切望される。

最後にAAアミロイドーシスの症例を収集するにあたって多くの先生方のご協力をいただいたことに感謝いたします。

(平成13～14年 科学研究費、基盤研究(C)(2))

SAA1遺伝子プロモーター領域による  
SAA産生調節の解明と治療への応用

(課題番号 13670479)

目次

	はしがき	
I	研究組織、経費	1
II	研究発表リスト	2
III	研究の背景	7
IV	研究成果	9
V	論文別冊	22

## I 研究組織、経費

### 1. 研究組織

研究代表者 : 寺井千尋 (東京女子医科大学医学部助教授)  
研究分担者 : 小関由美 (東京女子医科大学医学部助手)  
研究分担者 : 梶山 浩 (東京女子医科大学医学部助手)  
研究協力者 : 金子裕隆 (東京女子医科大学医学部研究生)

### 2. 研究経費

平成13年度	1,900千円
平成14年度	1,200千円
計	3,100千円

## II 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Masato Moriguchi, Chihiro Terai, Hirotaka Kaneko, Yumi Koseki, Hiroshi Kajiyama, Masashi Uesato, Shinichi Inada, and Naoyuki Kamatani. A novel single-nucleotide polymorphism at the 5'-flanking region of *SAA1* associated with risk of type AA amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44, 2001, p1266-1272.
2. Masato Moriguchi, Chihiro Terai, Yumi Koseki, Masashi Uesato, Toshio Nishikawa, and Naoyuki Kamatani. Genotypes at *SAA1* locus correlate with the clinical severity of AA-amyloidosis. *Amyloid* 8, 2001, p115-120.
3. Yumi Koseki, Chihiro Terai, Hirotaka Kaneko, Hiroshi Kajiyama, and Naoyuki Kamatani. Effect of corticosteroid and immunosuppressant on serum level and hepatic synthesis of serum amyloid A. *Arthritis Rheum* 44, 2001, pS218.
4. Hirotaka Kaneko, Chihiro Terai, Masato Moriguchi, Yumi Koseki, Hiroshi Kajiyama, and Naoyuki Kamatani. Up-regulation of transcriptional activity by a single nucleotide polymorphism at the 5' flanking region of *SAA1* gene that was associated with risk for AA-amyloidosis secondary to RA. *Arthritis & Rheum* 44, 2001, pS358.
5. Hiroshi Kajiyama, Chihiro Terai, Yumi Koseki, Hirotaka Kaneko, Jun Maeda, Katsuko Yamashita, and Naoyuki Kamatani. Ten years follow up of renal function of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum* 44, 2001, pS279.
6. Yumi Koseki, Chihiro Terai, Masato Moriguchi, Masashi Uesato, and Naoyuki Kamatani. A prospective study on renal involvement in patients with early rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases* 60, 2001, P327-331.
7. Chihiro Terai, Hirotaka Kaneko, Masato Moriguchi, Yumi Koseki, Hiroshi Kajiyama, CPJ Maury, S Tiitinen, K Kaarela, M Hurme, H Direskeneli, P

- Atagunduz, E Akoglu, Serhan Tuglular, and Naoyuki Kamatani. *SAA1* gene analysis in the patients with AA-amyloidosis from three different populations. *Arthritis & Rheum* 46, 2002, pS549.
8. Yumi Koseki, Chihiro Terai, Hiroshi Kajiyama, Miki Itou, Ayako Nakajima, Hisashi Yamanaka, Masako Hara, Tomatsu Taisuke, and Naoyuki Kamatani. Study of effect of inflammation on lipid metabolism in patients with rheumatoid arthritis using a large cohort. *Arthritis & Rheum* 48, 2003, pS320.
  9. Miki Ito, Chihiro Terai, Hiroshi Kajiyama, Yumi Koseki, Masashi Uesato, Eiichi Tanaka, Hisashi Yamanaka, Masako Hara, Tomatsu Taisuke, and Naoyuki Kamatani. Increased frequency of renal tubulo-interstitial (TI) damage in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum* 48, 2003, pS106.
  10. 寺井千尋、アミロイドーシス、診断と治療、91 (5)、2003、p851-855
  11. 寺井千尋、遺伝子多型と疾患感受性、炎症と免疫、11(2)、2003、P211-215

## (2) 口頭発表

1. 小関由美、寺井千尋、金子裕隆、森口正人、梶山浩、上里雅史、鎌谷直之。ステロイド投与が血清アミロイドA (SAA) レベルに与える影響。第45回日本リウマチ学会総会、2001年5月15日。
2. 金子裕隆、寺井千尋、小関由美、森口正人、梶山浩、上里雅史、鎌谷直之。Serum Amyloid A1 (SAA1) gene promoter領域SNPsの転写活性への影響に関する検討。第45回日本リウマチ学会総会、2001年5月15日。
3. Yumi Koseki, Chihiro Terai, Hirotaka Kaneko, Hiroshi Kajiyama, and Naoyuki Kamatani. Effect of corticosteroid and immunosuppressant on serum level and hepatic synthesis of serum amyloid A. 65th Annual meeting of American College of Rheumatology, November, 2001.
4. Hirotaka Kaneko, Chihiro Terai, Masato Moriguchi, Yumi Koseki, Hiroshi Kajiyama, and Naoyuki Kamatani. Up-regulation of transcriptional activity by a single nucleotide polymorphism at the 5' flanking region of

SAA1 gene that was associated with risk for AA-amyloidosis secondary to RA. 65th Annual meeting of American College of Rheumatology, November, 2001.

5. Hiroshi Kajiyama, Chihiro Terai, Yumi Koseki, Hirotaka Kaneko, Jun Maeda, Katsuko Yamashita, and Naoyuki Kamatani. Ten years follow up of renal function of patients with rheumatoid arthritis. 65th Annual meeting of American College of Rheumatology, November, 2001.
6. 金子裕隆、寺井千尋、小関由美、梶山浩、森口正人、鎌谷直之。SAA1遺伝子 promoter領域SNPsの転写因子結合への影響。第46回日本リウマチ学会総会、2002年4月24日。
7. 小関由美、寺井千尋、梶山浩、中川美紀、松田祐子、山中寿、原まさ子、齋藤輝信、戸松泰介、鎌谷直之。大規模患者調査（J-ARAMIS）を用いた慢性関節リウマチ（RA）患者における腎障害の検討。第46回日本リウマチ学会総会、2002年4月22日。
8. 梶山浩、寺井千尋、小関由美、中川美紀、前田淳、山下克子、鎌谷直之。慢性関節リウマチ患者における10年間の腎機能変化。第46回日本リウマチ学会総会、2002年4月22日。
9. 寺井千尋、金子裕隆、小関由美、梶山浩、CP Maury、森口正人、鎌谷直之。フィンランド人アミロイドーシス患者におけるSAA遺伝子多型の解析。第46回日本リウマチ学会総会、2002年4月23日。
10. 小関由美、寺井千尋、梶山浩、中川美紀、鎌谷直之。RA続発AA-アミロイドーシス（ア症）患者の臨床経過。第46回日本リウマチ学会総会、2002年4月23日。
11. 寺井千尋、小関由美、梶山浩、中川美紀。慢性関節リウマチ患者における炎症と脂質代謝異常および動脈硬化に関する研究。公益信託日本動脈硬化予防研究基金研究報告会、2002年5月11日。
12. Chihiro Terai, Hirotaka Kaneko, Masato Moriguchi, Yumi Koseki, Hiroshi Kajiyama, CPJ Maury, S Tiitinen, K Kaarela, M Hurme, H Direskeneli, P Atagunduz, E Akoglu, Serhan Tuglular, and Naoyuki Kamatani. SAA1 gene analysis in the patients with AA-amyloidosis from three different populations. 66th Annual meeting of American College of

Rheumatology, October, 2002.

13. 梶山浩、寺井千尋、金子裕隆、中川美紀、小関由美、鎌谷直之. 関節リウマチ(RA)続発AA-amyloidosis(ア症)におけるRAGE geneのSNPs解析. 第47回日本リウマチ学会総会、2003年4月24日.
14. 中川美紀、寺井千尋、梶山浩、小関由美、田中栄一、山中寿、原まさ子、齋藤輝信、戸松泰介、鎌谷直之. 関節リウマチ(RA)患者における間質性腎障害の検討. 第47回日本リウマチ学会総会、2003年4月26日.
15. 小関由美、寺井千尋、梶山浩、中川美紀、中島亜矢子、山中寿、原まさ子、齋藤輝信、戸松泰介、鎌谷直之. 大規模患者調査 (J-ARAMIS) を用いたRA患者における炎症と脂質代謝に関する検討. 第47回日本リウマチ学会総会、2003年4月25日.
16. 中川美紀、寺井千尋、梶山浩、小関由美、上里雅史、森口正人、田中栄一、山中寿、原まさ子、齋藤輝信、戸松泰介、鎌谷直之. 大規模患者調査を用いた関節リウマチ(RA)患者腎障害の検討. 第46回日本腎臓学会、2003年5月24日.
17. Yumi Koseki, Chihiro Terai, Hiroshi Kajiyama, Miki Itou, Ayako Nakajima, Hisashi Yamanaka, Masako Hara, Tomatsu Taisuke, and Naoyuki Kamatani. Study of effect of inflammation on lipid metabolism in patients with rheumatoid arthritis using a large cohort. 67th Annual meeting of American College of Rheumatology, October, 2003.
18. Miki Ito, Chihiro Terai, Hiroshi Kajiyama, Yumi Koseki, Masashi Uesato, Eiichi Tanaka, Hisashi Yamanaka, Masako Hara, Tomatsu Taisuke, and Naoyuki Kamatani. Increased frequency of renal tubulo-interstitial (TI) damage in patients with rheumatoid arthritis. 67th Annual meeting of American College of Rheumatology, October, 2003.

### (3) 出版物

1. 寺井千尋. アミロイドーシス. リウマチナビゲーター. メディカルビュー社. 2001年、p58-59.
2. 寺井千尋. 関節リウマチに伴うアミロイドーシス. 今日の治療指針. 医学書院.



2002年、p531-532.

3. 寺井千尋. アミロイドーシス対策. 関節リウマチ診療-生物学的製剤の導入による新展開. メジカルビュー社、2003年、p157-159.
4. 寺井千尋. 腎障害対策. 関節リウマチ診療-生物学的製剤の導入による新展開. メジカルビュー社、2003年、p151-153.

### III 研究の背景

#### 1) 関節リウマチおよび続発性AAアミロイドーシス

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis:RA) は患者数が多いこと、患者のうけるQOL上の不利益の大きいこと、社会的な負担が大きいことなどにより、リウマチ性疾患のなかで最も重要な疾患といえる。本症は慢性の関節炎により関節破壊、変形をきたし、かつては患者の半数は身体障害により寝たきりになった。以前には身体障害はあるものの生命予後の低下は大きくないと考えられていたが、実際は患者の寿命は平均より約10年短く、悪性リンパ腫と同程度の生命予後をもつ疾患と位置づけられる。関節リウマチ (RA) 患者死因中で腎死は第3位を占める。腎死の大部分は続発性AA-アミロイドーシスによるものである。日本におけるRAの推定患者数50-70万人 (有病率 0.5%) を考慮すると、続発性アミロイドーシスの病態解明、有効な治療法の開発は重要な課題といえる。

本症で腎や消化管などの臓器に沈着するアミロイドA蛋白 (AA) は、血清アミロイドA (SAA) に由来する。SAAにはSAA1とSAA2の2種類の急性炎症SAA (A-SAA) と構成的に発現しているSAA4がある。A-SAAはCRPと同様にIL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン刺激により肝で産生される。結核、RA、炎症性リウマチ性疾患、炎症性腸疾患、慢性骨髓炎などの慢性炎症性疾患では長期にわたりA-SAAの産生が持続し、このような患者の一部に続発性アミロイドーシスが発症する。

#### 2) SAA1遺伝子

AA-アミロイドーシスの発症に関連するのは主にはSAA1蛋白とされる。

当初はSAA1 geneの蛋白コード領域の多型 (SAA1  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) とアミロイドーシス発症の関連が検討され、SAA1  $\gamma$ 遺伝子が危険因子であることが示された。当グループもSAA1遺伝子の解析、臨床症状との関連を検討してきたが、さらにSAA1 geneのプロモーター領域の解析を行い、SAA1  $\gamma$ よりも密接にアミロイドーシス発症に関連するSNP (single nucleotide polymorphism) をプロモーター領域に見だし、これが本研究の一部ともなっている。またこのSNPにより従来説明が困難であった日本人とCaucasianにおける続発性アミロイドーシス発症頻度の差や、CaucasianではSAA1  $\alpha$ がアミロイドーシスを発症しやすいhaplotypeであることも説明が可能であ

る。

SAA gene promoterにはC/EBP-binding elementsとNF- $\kappa$ B-binding elementsが存在し、これらのelementsのdeletionやmutationによってpromoter活性が劇的に減少することが報告されている。この領域にはTATA box (-31 to -26)、NF- $\kappa$ B binding element (-97 to -88)、NF-IL6 binding element (-187 to -177)などのcis-acting regulatory elementsが存在することから、この領域での変異がSAA promoter活性に対して影響を与え、直接病因と関連する可能性が十分に考えられる。

本研究ではさらにSAA1 gene promoter領域の-13 T変異のアミロイドーシス発症への関与を解明することを目的とした。

## IV 研究成果

### A. SAA1遺伝子プロモーター領域の検討

日本人RA患者ではSAA1.3 (SAA1  $\gamma$ ) がAAアミロイドーシス発症の危険因子であり、逆にSAA1.1 (SAA1  $\alpha$ ) は発症の危険率を低下させること、SAA1.5 (SAA1  $\beta$ ) は発症に関しては中立的であることが我々を含む複数の研究グループより報告されている。一方、Caucasianの報告ではAAアミロイドーシスの危険因子であるSAA1.3 (SAA1  $\gamma$ ) はまれでありAAアミロイドーシスの頻度自体が少ないと考えられるが、発症したものは日本人とは逆にSAA1.1 (SAA1  $\alpha$ ) がAAアミロイドーシス発症の危険因子であると報告されている。SAA1.1 (SAA1  $\alpha$ ) がアミロイドーシス発症危険因子なのか防御因子であるかが、人種間において逆転する現象は、従来のSAA1遺伝子の多型のみで説明することは困難であった。

この点を解明するために、SAA1 遺伝子のプロモーター領域の解析を行った。

#### 1) 対象およびDNAサンプル

44例のRA続発性AAアミロイドーシス患者、55例の早期RA患者、58例のコントロールの末梢血よりDNAを抽出した。全例日本人で全員より同意を取得したのち採血をおこなった。またCoriell Cell Repositoryより購入した50例のCaucasian DNAサンプルも解析の対象とした。

#### 2) 方法

GenBankデータベースより得たSAA1遺伝子近傍の遺伝子配列より、表1のprimerのセットを作成し、プロモーター領域約上流約700bpまでdirect sequencingにより配列を決定した。また、SAA1.1 (SAA1  $\alpha$ )、SAA1.3 (SAA1  $\gamma$ )、SAA1.5 (SAA1  $\beta$ ) はエクソン3領域のprimerセットにより増幅し、*Ban I*、*Bcl I*の切断により区別した。

また得られたSNPsのセットをhaplotypeとしてその頻度の推定を試みた。haplotype頻度の評価には当教室で開発されたEH (the estimating haplotype frequencies) ソフトウェアを用いた。

#### 3) 結果

SAA1プロモーター領域上流700bpのdirect sequencingにより、3カ所のSNPsが発見された。-61C/G、-13T/C、-2G/Aでそれぞれ*MnII*、*AciI*、*Cac8 I*の制限酵

素により区別された。

表 1. Polymerase chain reaction primer sets designed to amplify the 5-flanking region of the SAA1 gene, exon 3 of SAA1, and exon 4 of the SAA2 gene

Region, primer set	Primer sequence	Location in gDNA* (bp)	Length (bp)	Polymorphic sites	Restriction enzyme
5-flanking sequence of SAA1					
Primer set 1					
Forward	5-GTGCAGTGGCGTGATTATAG-3	-712/-693	528	None	
Reverse	5-CAACCTGAGGGAACAAGATG-3	-204/-185			
Primer set 2					
Forward	5-CTCAACTCCGCAGCCTCAGC-3	-277/-258	303	-61C/G	Mnl I
Reverse	5-GTGCTGTAGCTGAGCTGCGG-3	7/26		-13T/C -2G/A	Aci I Cac8 I
Exon 3 of SAA1					
Primer set 3					
Forward	5-GCCAATTACATCGGCTCAG-3	2919/2937	518	2995C/T	Ban I
Reverse	5-TGGCCAAAGAATCTCTGGAT-3	3417/3436		3010C/T	Bcl I
Exon 4 of SAA2					
Primer set 4					
Forward	5-AGAGAATATCCAGAGACTCACAGGC-3	3130/3154	115	3156A/G	Nco I
Reverse	5-TGGCCAAAGAATCTCTGGAT-3	3225/3244			

この新たに発見されたプロモーター領域の3 SNPsと、従来のエクソン3の多型を規定するSNPsである2995T/C、3010C/Tの位置関係を図1に示す。ちなみにSAA1とSAA2遺伝子は第11染色体のp15.1領域に約15kbの間隔でそれぞれの5'末端を向かい合わせる形で位置する(図1)。この5つのSNPsにさらにSAA2のエクソン4にみられるSAA2 3156A/Gを加えた6 SNPsにつき、日本人アミロイドーシス合併RA

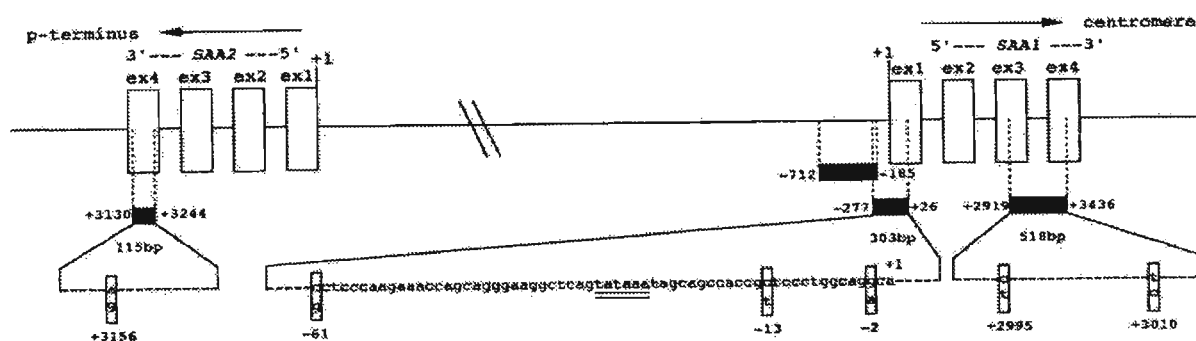


図1 SAA1とSAA2遺伝子と本検討で用いたPCR産物、SNPsの位置を示す



患者、早期RA患者、日本人コントロールとCaucasianで遺伝子頻度（表2）とallele頻度（文献1のTable 3参照）を検討した。

表2. 各グループ別の6 SNPsにおけるgenotype頻度

SNPs	Amyloid group (n = 44)	RA group (n = 55)	Non-RA group (n = 58)	Caucasoid group (n = 50)
<b>-61 at the SAA1</b>				
CC	0.59	0.49	0.55	0.42
CG	0.39	0.36	0.38	0.48
GG	0.02	0.15	0.07	0.10
<b>-13 at the SAA1</b>				
TT	0.36	0.09	0.17	0.00
TC	0.61	0.47	0.53	0.16
CC	0.02	0.44	0.29	0.84
-13T positivity	0.98	0.56	0.71	-
<b>-2 at the SAA1</b>				
GG	0.95	0.87	0.95	0.86
GA	0.05	0.09	0.03	0.14
AA	0.00	0.04	0.02	0.00
<b>2995 at the SAA1</b>				
CC	0.80	0.38	0.48	0.16
CT	0.18	0.53	0.41	0.52
TT	0.02	0.09	0.10	0.32
2995C positivity	0.98	0.91	0.90	-
<b>3010 at the SAA1</b>				
CC	0.48	0.42	0.47	0.42
CT	0.43	0.42	0.47	0.48
TT	0.09	0.16	0.07	0.10
<b>3156 at the SAA2</b>				
AA	0.77	0.80	0.74	-
AG	0.23	0.20	0.26	-
GG	0.00	0.00	0.00	-

エクソン3のhaplotypeであるAA1.1 (SAA1 $\alpha$ )、SAA1.3 (SAA1 $\gamma$ )、SAA1.5 (SAA1 $\beta$ )はそれぞれ2995C/Tと3010C/TのSNPsの組み合わせのT-C、C-C、

C-Tに相当する。解析の結果、-13T/Cと2995C/Tがアミロイドーシス群と早期RA群あるいはコントロール群とで有意な差を示し、-13Tと2995Cがアミロイドーシス群と強い相関を示した。先の検討では2995C/Tと3010C/Tで形成されるhaplotypeがアミロイドーシス発症と相関を示したが、この検討では実際に疾患に関連するのは2995C/Tのみであることが示された。つぎにアミロイドーシスと有意な相関を示した-13Tと2995Cの陽性率を各群で比較したところ（表2）、-13Tの陽性率はアミロイドーシス群98%であり、RA群56%に対し $\chi^2=22.2$ 、 $P=2.5 \times 10^{-6}$ 、コントロール群71%に対し $\chi^2=12.6$ 、 $P=3.9 \times 10^{-4}$ と極めて強い相関を示したが、2995Cはアミロイドーシス群98%に対し、RA群91%（ $\chi^2=2.0$ 、 $P=0.16$ ）、コントロール群90%（ $\chi^2=2.6$ 、 $P=0.11$ ）で有意差は見られなかった。これより2995Cではなく-13Tがアミロイドーシス発症のより直接的な危険因子であることが示された。

表3. アミロイドーシス群vs早期RA群およびコントロール群のChi-square valueとOdds比

SNPs	SAA1					SAA2
	-61	-13	-2	2995	3010	3156
Amyloid versus RA						
Chi-square						
Allele number (1 df)	3.02	23.07	3.25	15.24	0.94	0.10
Genotype (2 df)	4.54	26.04	2.49	17.07	1.19	-
Odds ratio	1.77	4.18	3.83	4.28	1.34	1.15
Amyloid versus non-RA						
Chi-square						
Allele number (1 df)	0.50	10.73	0.24	11.09	0.01	0.11
Genotype (2 df)	1.16	14.23	0.84	10.63	0.22	-
Odds ratio	1.27	2.59	1.54	3.51	1.02	1.16

CaucassianのDNAサンプルでは、-13Tのallele頻度は8%と低かった。この-13Tの頻度の低さがCaucasianでAAアミロイドーシス発症が少ないことに関係すると考えられた。つぎにEHソフトウェアにより、-13C/T、2995T/C、3010C/Tの3SNPsの組み合わせよりなるhaplotypeの出現頻度を予測した（表4）。

haplotypeの予測では、日本人では-13T・2995C・3010C（-13C・ $\gamma$ ）、-13C・2995C・3010T（-13C・ $\beta$ ）、-13C・2995T・3010C（-13C・ $\alpha$ ）の3つが主な

haplotype であるが、Caucasian では -13C・2995T・3010C (-13C・ $\alpha$ ) と -13C・2995C・3010T (-13C・ $\beta$ ) の 2 つが大半を占め、-13T・2995C・3010C (-13C・ $\gamma$ ) は少数しか見られなかった。-13Tを含むhaplotypeについて2人種間で検討すると、日本人では-13Tはよりエクソン3の $\beta$  haplotypeと連鎖するが、Caucasianでは-13Tはよりエクソン3の $\alpha$  haplotypeと連鎖していた。CaucasianではSAA1.1 (SAA1  $\alpha$ ) がアミロイドーシスの危険因子であるが、人種間での-13Tのエクソン3との連鎖の差がこの点をよく説明する。

表4. 日本人とCaucasoidにおける3 SNPsのhaplotype頻度

5'-flanking	SNP sites in the SAA1 gene			Haplotype frequency	
	Exon 3			Japanese	Caucasian
-13T	2995	3010	(Haplotype)	(n=58)	(n=50)
T	T	C	( $\alpha$ )	0.000	0.020
T	C	T	( $\beta$ )	0.061	0.000
T	C	C	( $\gamma$ )	0.379	0.060
C	T	C	( $\alpha$ )	0.310	0.560
C	C	T	( $\beta$ )	0.241	0.340
C	C	C	( $\gamma$ )	0.009	0.020

以上より-13Tがアミロイドーシス発症にきわめて重要な意味をもつSNPであることが考えられた。

-13T/Cはこれまで報告されているプロモーター部分の外に位置するが、その近傍にはにはTATA box (-31 to -26)、NF-kB binding element (-97 to -88)、NF-IL6 binding element (-187 to -177)などのcis-acting regulatory elementsが存在することから、これらのpoint mutationがSAA promoter活性に対して影響を与えている可能性が十分に考えられる。

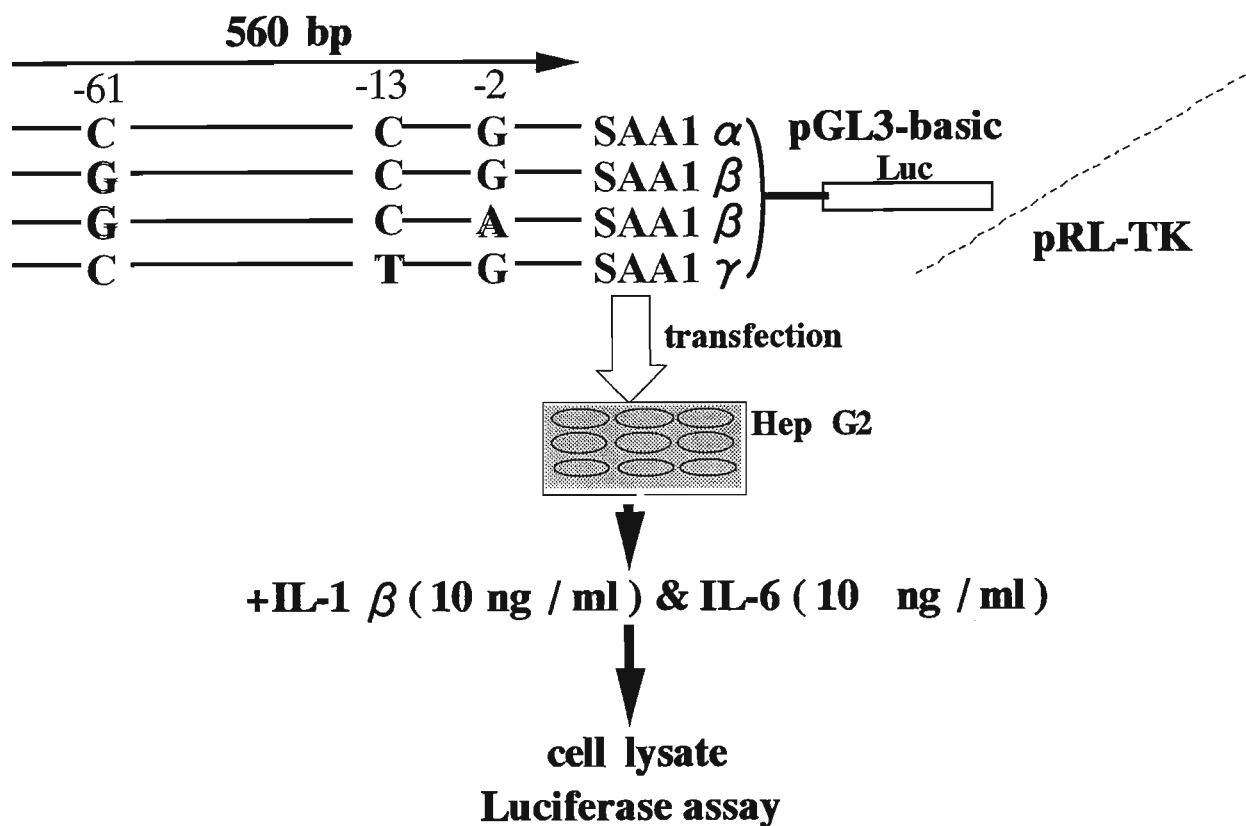
#### B. SAA1遺伝子プロモーター領域SNPsの転写活性に与える影響の検討

先の検討により、SAA1遺伝子5'-flanking領域に存在する-13Tがアミロイドーシス発症に強く相関することから、次にこの領域のSNPsの存在が転写活性に与える影響を検討した。

##### 1) 方法

SAA1プロモータをルシフェラーゼベクター (pGL3-basic) に組み込み、内部標準となるpRL-TKベクターとともに、FuGENETM6 (Roche社) を用いてヒト肝細胞由来のHep G2細胞にトランスフェクションを行った。SAA1プロモーター部には、日本人144例の検討より4種類のハプロタイプが存在したので、その全てを作成しPCR法により増幅した。4種類のプロモーターhaplotypeは先の検討で発見された-61C/G、-13C/T、-2G/Aの3SNPsの組み合わせによるもので、それぞれエクソン3多型であるSAA1.1 (SAA1  $\alpha$ )、SAA1.3 (SAA1  $\gamma$ )、SAA1.5 (SAA1  $\beta$ ) と図2にみられるような連鎖を示す。-13Tを含むhaplotypeはSAA1.3 (SAA1  $\gamma$ ) と連鎖する。

図2. SAA1 promotorのルシフェラーゼ・アッセイ



各ベクターのトランスフェクションの後に、炎症性サイトカイン刺激 (IL-1  $\beta$  ; 10ng/ml、IL-6 ; 10ng/ml) をHepG2細胞に加え、一定時間後に細胞を溶解し、細胞溶解液を用いてルシフェラーゼ・アッセイを行った。

## 2) 結果

炎症性サイトカイン刺激により急激にルシフェラーゼ活性が誘導され、4-6時間をピークとしてその後はやや活性は減弱したが24時間後にも活性が認められた(図3)。プロモーター活性にはhaplotypeの間で活性の差がみられ、SAA1.3 (SAA1  $\gamma$ ) に連

図3. 各haplotypeのプロモーター活性の時間経過

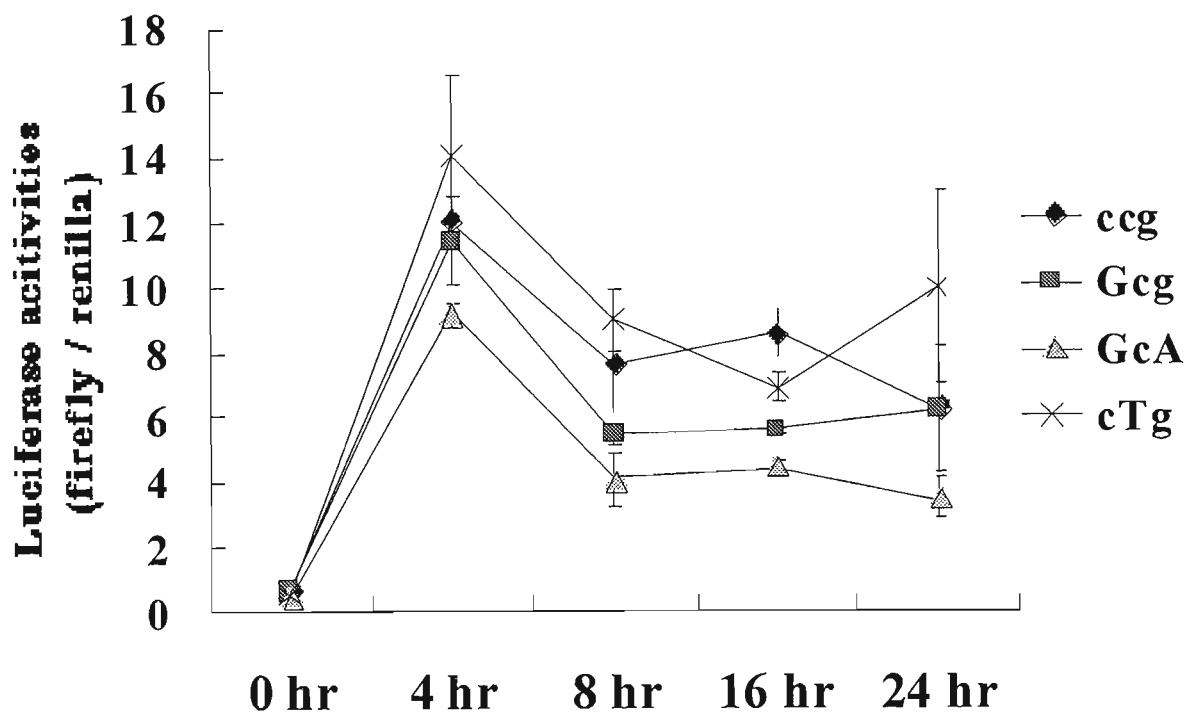
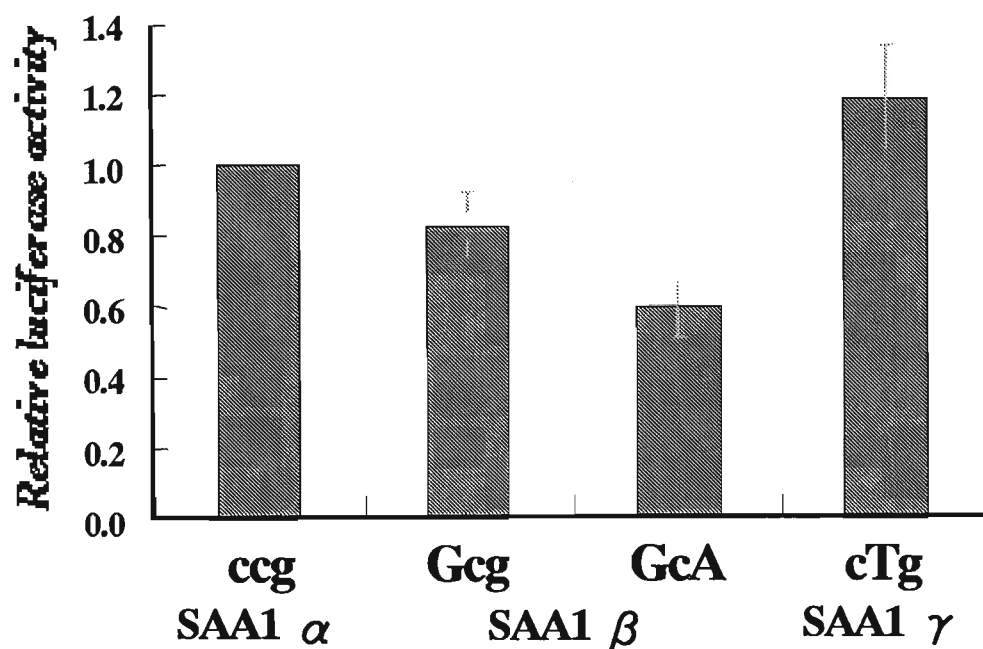


図4. SAA1プロモーターhaplotypeによるルシフェラーゼ活性の差





鎖を示す-13Tをもつhaplotypeが、*SAA1.1* (*SAA1*  $\alpha$ ) や*SAA1.5* (*SAA1*  $\beta$ ) と連鎖する他のプロモーターhaplotype よりも全経過を通じて活性が高い傾向があった。

ルシフェラーゼ活性がピークとなる6時間で、繰り返し測定し、*SAA1.1* (*SAA1*  $\alpha$ ) に連鎖するccg (-61C·-13C·-2G) haplotypeの活性を1として、他のhaplotypeの活性を表示すると図4のようになり、*SAA1.3* (*SAA1*  $\gamma$ ) に連鎖するcTg (-61C·-13T·-2G) がccgより15%、Gcgよりも30%高い活性を示し、統計学的に有意な差であった。以上のように-13Tを持つことにより*SAA1.3* (*SAA1*  $\gamma$ ) 遺伝子を有する患者では*SAA1* mRNAの産生が、他のエクソン3多型をもつ患者より亢進することが示された。

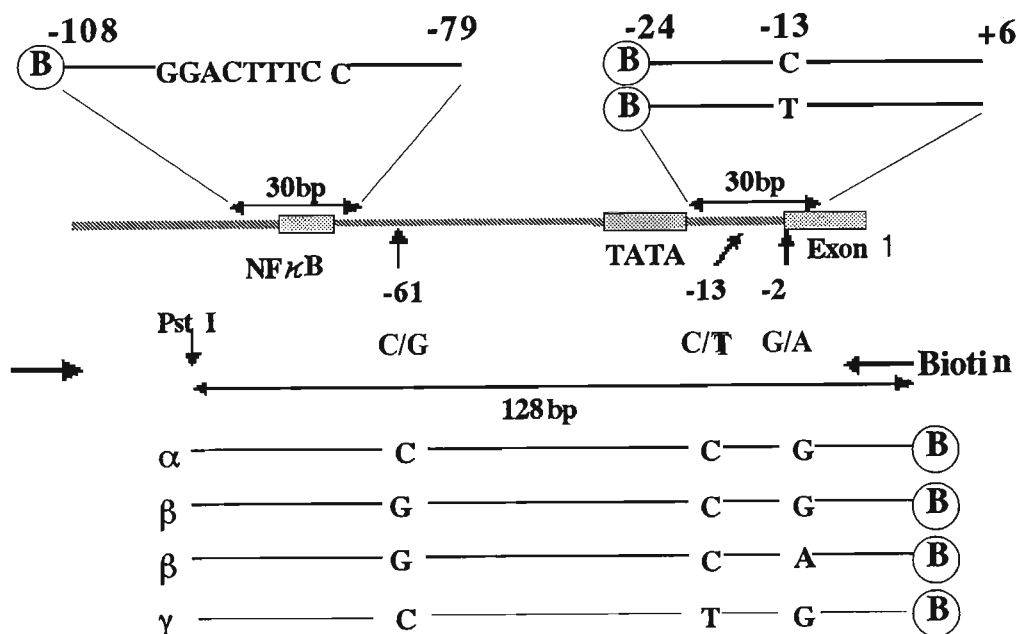
### C. *SAA1* 遺伝子プロモーター領域SNPsへの転写因子結合に関する検討

先の検討で-13Tをもつプロモーターhaplotypeでは転写活性の亢進が生じることがルシフェラーゼ・アッセイにて確認された。つぎに、多型による転写活性の変化を解明するため、SNPsが転写因子との結合にどのような影響を与えるかの検討を試みた。

#### 1) 方法

プロモーター多型を含んだDNAプローブと転写因子との相互作用をゲルシフトアッセイによって検討した。図5に実験に用いたビオチン標識プローブと転写因子の推定結合部位、SNPsの位置を示す。

図5. ビオチン標識プローブ



SAA1プロモーターには3カ所のSNPによってそれぞれ4種類のhaplotype配列が存在し、SAA1の転写活性化に重要であると考えられるNFκBの認識配列も存在する。そこで、ビオチン化プライマーを用いたPCRプロダクトを制限酵素Pst Iで断片化し、3カ所のSNPsとNFκB認識配列を含んだ128bpのプローブをハプロタイプごとに4種類調製した。

さらに、合成プローブとして、NFκB認識配列を含む30bp、および発症と関連が強いSNP -13C/Tを含む配列30bpを合成した。

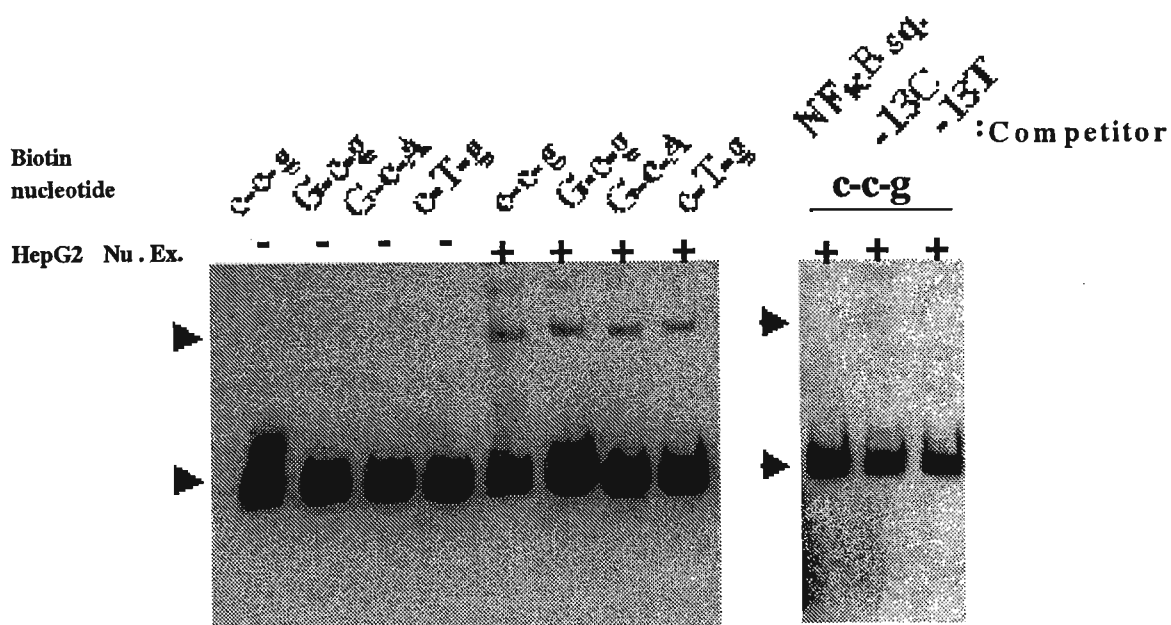
HepG2細胞を培養し、IL-1βおよびIL-6で刺激後、Dignamらの方法に従って核抽出液を得た。核抽出液とビオチン標識したオリゴヌクレオチドを反応し、ポリアクリルアミドゲルで泳動後、ナイロン膜に転写し、反応後、化学発光シグナルをluminomaging analyzer FAS-1000を用いて解析した。

## 2) 結果

### (1) 転写因子のプロモーター配列への結合

ビオチンプローブにNFκB認識配列と3ヶ所のSNPs含んだ128bpの4種類のハプロタイプ配列と、IL-1βとIL-6で刺激後のHepG2核抽出液の反応により、シフトバンドが確認され、転写因子の結合が示された(図6左部分)。しかし、ハプロタイプ配列ごとのシフトバンドの強度に大きな差は認められない。このシフトバンドが、何に由来するかを検索するため、NFκB認識配列、および-13C/Tを含む未標識オリゴ

図6. ビオチン標識ハプロタイプ配列とHepG2各抽出液のゲルシフト・アッセイ



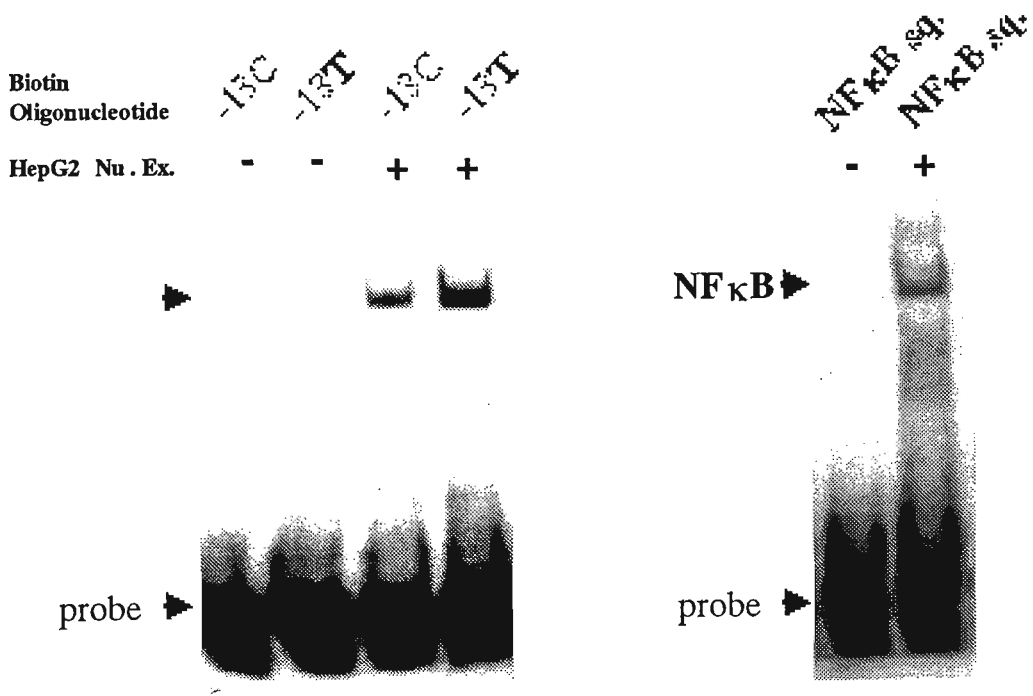
ヌクレオチドを競合させた結果を図6右部分に示す。

未標識NFκB配列との競合の結果シフトバンドが消失し、このシフトバンドはNFκBの結合に由来していることが考えられた。また、-13Cや-13T配列の競合にてシフトバンドが消失し、このNFκBの結合に-11C/TのSNPサイトが何らかの影響を与えることが示唆された。

**(2) -13C/TによるNFκB結合への影響**

つぎに標識NFκB認識サイトとサイトカイン刺激後HepG2核抽出液を反応により、シフトバンドが観察され、刺激によるNFκBの核内への移行が確認された(図7右)。

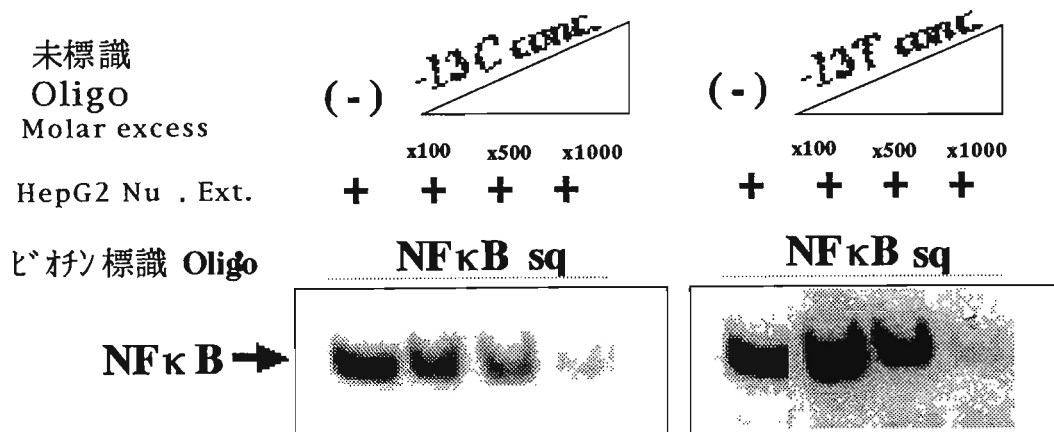
図7. 標識NFκB認識配列および標識-13C/T配列とHepG2核抽出液によるゲルシフト・アッセイ



標識-13C/T配列をHepG2核抽出液と反応させた場合もシフトバンドが認められ、このサイトに何らかの転写因子の結合が確認された。シフトバンドを-13T配列で強く、-13Tを持つことで多くの転写因子の結合することが示唆された。

さらに-13C/T配列と、NFκBとの関係を調べるために、標識NFκB認識配列と刺激後のHepG2核抽出液の反応に対して、未標識-13C又は-13Tのオリゴヌクレオチドを添加した(図8)。

図8. NFκB認識配列とHepG2核抽出液のゲルシフトの-13C/T配列による変化



未標識-11C配列の濃度を増加させるとNFκB認識配列のシフトバンドは濃度依存性に消失したが、-11Tを用いた場合100倍では逆にシフトバンドが増強し、-11TがNFκBの結合を安定化させることが示唆された。

以上より、SAA1プロモーターSNP(-13C/T)の領域に転写因子の結合を認め、AAアミロイドーシス発症の危険因子である-13Tの存在でより多くの転写因子の結合が認められた。そのメカニズムとして-13Tの存在でNFκBの認識サイトへの結合が安定化する事が示唆された。

#### D. 関節リウマチ続発AAアミロイドーシス患者におけるRAGE遺伝子のSNPs解析

グルコース等が蛋白質のアミノ酸残基と反応し形成される不可逆的な構造物であるAGE (advanced glycation endproducts) は糖尿病や腎不全でその形成が亢進し、炎症局所での増加も報告されている。RAGE (receptor for AGEs)はAGE受容体のひとつで、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージ、腎メサンギウム細胞などに発現し、動脈硬化、アミロイドーシス、糖尿病、関節炎などの各種モデルで病態に促進的に関与することが報告されており、最近、ヒトAAアミロイドーシスにおけるアミロイド腎や脾などでのRAGE発現や、関節リウマチ滑膜における発現の報告がある。RAGEはmultiligand receptorであり、AGEの他、SAAにも結合する事も明らかになり、AAアミロイドーシス病態への関与が考えられる。また、RAGEのSNPsの検討により、糖尿病や乾癬、関節リウマチへの関与が報告されている。

そこで関節リウマチとAAアミロイドーシスにおけるRAGEの関与を検討する為、既知の RAGE SNPs のうち、RAGE発現の亢進に関与が示唆される5' flanking region の-374T/A、 -429 T/C、またRAGEの機能を亢進させると報告されるexon3の G82Sの変異につき検討した。

### 1) 方法

対象は健常人control 64人、RA患者37人、AAアミロイドーシス患者72人。

PCR primerはすべて報告にある方法に準じ、PCR-RFLP法で解析した。統計処理は $\chi^2$ 乗検定を用いた。

### 2) 結果

各SNPの3群におけるGenotype頻度を表5に、allele頻度を表6示す。

表5. RAGE SNPsのGenotype頻度

SNP site (genotype)	control	RA	amyloidosis
<b>-374T/A</b>			
TT	40	14	39
TA	20	18	24
AA	3	2	6
Tdel	1	3	3
<b>-429T/C</b>			
TT	50	29	48
TC	13	8	21
CC	1	0	2
<b>G82S</b>			
GG	36	30	53
GS	20	4	19
SS	2	2	0

表6. RAGE SNPsのAllele頻度

SNP site (allele)	control	RA	amyloidosis
<b>-374T/A</b>			
T	101	49	105
A	26	22	36
<b>-429T/C</b>			
T	113	66	117
C	15	8	25
<b>G82S</b>			
G	92	64	125
S	26	8	19

genotype頻度では-374 T/A、-429 T/Cでは3群間で有意な差を認めず、G82SはRAで、controlに対し有意に多くのG allele陽性例を認めた。

allele頻度をしめします。-374T/A、-429T/Cは3群間で大きな違いは見られず、G82Sにおいて、RA群Amyroidosis群でGalleleが多い傾向が見られたが有意差ははなかった。以上のように、今回検討した範囲ではRAGE遺伝子とアミロイドーシスとの関連はみられなかった。



## E. 今後の研究の展開

-13 T 変異がアミロイドーシス発症に関与する場合、*SAA1* mRNA 転写の活性化から SAA1 蛋白の産生を亢進させ、アミロイド沈着が増加する過程が考えられた。この点で SAA/CRP 比の血中レベルでの検討で SAA1.5 (SAA1 $\beta$ ) がもっとも高値という結果と矛盾するが、血中濃度は産生と代謝（クリアランスあるいは沈着）のバランスから決定されるので、その場合は SAA1 蛋白の  $\alpha, \beta, \gamma$  の違いによる代謝の違いを検討する必要がある。

当初、予定していた薬剤の *SAA1* mRNA 転写への影響、SAA1 蛋白産生への影響は、理論的な治療法の確立のためにも今後ぜひ必要な検討であると考ええる。