
続発性アミロイドーシスと
SAA1、SAA2遺伝子多型との関連についての研究

課題番号10670431

平成10～11年度科学研究費補助金(基盤研究C)研究成果報告書

平成12年3月



研究代表者 寺井千尋

(東京女子医科大学医学部膠原病リウマチ痛風センター助教授)



続発性アミロイドーシスと
SAA1、SAA2遺伝子多型との関連についての研究

課題番号10670431

平成10～11年度科学研究費補助金(基盤研究C)研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 寺井千尋

(東京女子医科大学医学部膠原病リウマチ痛風センター助教授)

は し が き

慢性関節リウマチに続発するAAアミロイドーシスは、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、慢性関節リウマチ患者の死亡原因の第3位を占める。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、それ以上の病態はほとんど解明されてはおらず、一定の治療方針さえないのが現状である。血清アミロイドAをコードする遺伝子の研究が進んだことにより、続発性アミロイドーシスの病態解明の糸口がえられた。本研究では血清アミロイドAをコードする遺伝子であるSAA1とSAA2についてさらなる検討を行った。SAA1 γ alleleがAAアミロイドーシス発症の危険因子であり、AAアミロイドーシスの早期発症に関連することを確認し、地域によるAAアミロイドーシス発症頻度の差がSAA 1 遺伝子alleleの分布の違いによる可能性が示唆された。

研究協力者の努力が大いに本研究の進行に貢献したことをここに記す。また続発性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の意を表したい。現在もさらにSAA遺伝子プロモーター領域の解析、SAA蛋白産生調節の解析を進めており、本症の病態解明、治療法開発に応用できるような成果をめざして、本研究の成果をさらに発展させたい。

(平成10～11年 科学研究費、基盤研究C)

続発性アミロイドーシスと
SAA1、SAA2遺伝子多型との関連についての研究

(課題番号10670431)

目次

	はしがき	
I	研究組織、経費	1
II	研究の背景	2
III	研究成果	6
IV	研究発表リスト	14
V	論文別冊	17

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 : 上里雅史 (東京女子医科大学医学部助手)
 小関由美 (東京女子医科大学医学部助手)
研究協力者 : 森口正人 (東京女子医科大学医学部研究生)
 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10年度	1,400千円
平成11年度	600千円
計	2,000千円

II 研究の背景

アミロイドーシスは β シート構造を有する難溶性の繊維蛋白（アミロイド）が諸臓器に沈着して、臓器機能障害を惹起する疾患である。いくつものアミロイド蛋白が知られ沈着するアミロイドの種類により罹患臓器、症状が異なる。ALアミロイドーシスとAAアミロイドーシスが代表的かつ重篤な疾患である。ALアミロイドーシスで沈着するAL蛋白は抗体軽鎖のアミノ末端側の一部であり、原発性や多発性骨髄腫合併アミロイドーシスで見られる。AAアミロイドーシスは続発性アミロイドーシスとも呼ばれ、急性炎症蛋白である血清アミロイドA蛋白（SAA）に由来するAAアミロイドが沈着する。慢性関節リウマチ（RA：Rheumatoid Arthritis）やその類縁疾患、炎症性腸疾患（クローン病など）、結核、気管支拡張症、慢性骨髄炎などの慢性炎症性疾患ではSAAの高値が長期間持続するために続発する。日本では報告がないが家族性地中海熱では、発熱発作、腹痛、急性関節炎を繰り返し、AAアミロイドーシスを発症する。すなわち、AAアミロイドーシスでは長期間にわたり高度の炎症が持続するかあるいは繰り返した場合に、（炎症の強さ）X（期間）に比例して、SAAが次第に沈着して臓器障害を起こすと考えられる。

A. AAアミロイドーシスの頻度および原疾患

アメリカ合衆国の報告ではアミロイドーシス例のうち、ALアミロイドーシスが多く、AAアミロイドーシスの割合は5%以下であり、家族性アミロイドーシスなどと同様、まれな疾患と考えられている。しかし、日本ではAAアミロイドーシスの頻度は高く、ALアミロイドーシスと同程度の症例数が剖検輯報にて報告されている。一方、ヨーロッパの一部の国〔フィンランド、スペインなど〕では、AAアミロイドーシス発症が比較的高頻度であることが報告されている。日米間におけるAAアミロイドーシス発症頻度の差が、遺伝的な要因によるものか、慢性炎症性疾患、特にRAに対する治療の差によるものかは不明である。

トルコ、イスラエルを始めとする地中海沿岸の東部諸国では、家族性地中海熱がAAアミロイドーシスの最大の原因疾患であったが、コルヒチンによる熱発作の抑制によりAAアミロイドーシス発症は著減した。このよ

うに少なくとも治療により原病の炎症を抑えることにより、AAアミロイドーシスの頻度が減少する。日本においては、AAアミロイドーシスの原因疾患の変遷がみられ、かつては結核が最大の原因疾患であったが、抗結核療法により重症結核患者が減少し、近年ではRAが第一の原因疾患となった。最近ではAAアミロイドーシスの60%以上がRA患者に発症している（1985-89年の剖検輯報による）。

B. 慢性関節リウマチにおけるAAアミロイドーシス

RA患者に発症したAAアミロイドーシスは進行性の腎機能低下、難治性下痢などの消化管吸収障害、心不全などを惹起しRA患者の予後に大きく関わる。RA患者の平均生存期間は悪性リンパ腫と同程度との報告があるが、日常生活動作の障害のみならず生命予後も予想以上に不良であることが明らかになっている。その中で腎死は感染症、呼吸器疾患に次いで、死因の第3位を占める。腎死の大部分は続発性アミロイドーシスによるものでRA患者の生命予後を考えるうえで大きな問題であり、RAの有病率を考慮すると有効な治療法のない続発性アミロイドーシスの病態解明は社会的にも重要な課題である。

C. SAA蛋白と遺伝子

SAA蛋白にはSAA1、SAA2、SAA4がある（SAA3 geneはpseudogeneであり蛋白を産生しない）。SAA4はconstitutionalに発現し、SAA1とSAA2が急性炎症蛋白（A-SAA）として炎症性疾患で増加し、続発性アミロイドーシスの発症に関与する。SAAはCRPと同様に、炎症性サイトカイン（IL-1、TNF- α 、IL-6など）刺激により肝で産生される。しかし長期間、炎症が持続し、A-SAAの高値が持続したと考えられるRAの全例にアミロイドーシスを発症するのではないので、発症には他の要因の関与が想定されてきた。その候補として、(1) SAAのisoformの違い、(2) 単球、顆粒球などによるSAAの処理能の差、血中SAA分解産物の違い、(3) SAP蛋白、apoE表現型やamyloid enhancing factorなどSAA以外の要因が検討されてきたが、十分にアミロイド沈着における個体差やメカニズムを説明するものではなかった。

SAA蛋白は104個のアミノ酸からなり、そのN末端のアミノ酸76個がアミロイド繊維として組織に沈着する。SAAはアポリポ蛋白であり血清中ではそのほとんどがHDL分画中に存在し、アミノ酸の1から11番がHDLとの結合部位と推定されている。SAA1蛋白には3つのisoformがあり、SAA2には2つのisoformが存在する。そのアミノ酸配列を図1に示す。

SAA1の3種類の蛋白をコードする遺伝子 α 、 β 、 γ の3つのgenotypeのうち、Babaら (Hum Molecular Genetics,4:1083,1995) は、AAアミロイドーシス患者においては γ/γ をホモでもつものが有意に多いと報告した。これはAAアミロイドーシスで従来報告されてきたさまざまな危険要因のうち最も確実な危険因子と考えられた。

一方、この報告でSAA1- γ 遺伝子を全くもたない α/α と β/β の遺伝子型の患者も20%にみられた。またLiepnieksら (BBA, 1270:81,1995) は6例の続発性アミロイドーシス患者の脾臓などからえたアミロイドを分析しSAA1とSAA2の比率を検討した。1例はSAA1のみの沈着で、4例ではSAA2の沈着は11%以下で、残る1例では30%程度のSAA2の沈着をみたと報告している。

マウスではSAA1とSAA2のうち、SAA2のみがアミロイドとして沈着し、SAA1の沈着はみられない。ヒトでもSAA2の沈着が全くない症例があることから、SAAのisoformのうち組織にアミロイドとして沈着しうるものと沈着しないものは、そのアミノ酸配列により規定される可能性が強い。その場合はSAA2にも、 α 、 β で組織沈着性に差があるか、さらに別のamyloidogenicなgenotypeが存在することが想定された。

以上より、

(1) RA合併AAアミロイドーシス症例とRA症例および健常人におけるSAA1 α 、 β 、 γ allele頻度の検討

(2) SAA2遺伝子のgenotypeをPCR-SSCP法にて解析し、 α 、 β あるいは新たなalleleの有無を検討

(3) 臨床症状、臨床検査データとSAA1 γ alleleあるいはSAA2の特定のallele保有の関連の検討を行う

の3点を目的として本研究を開始した。

III 研究成果

A. DNAサンプルの収集・抽出

1) 対象

蛋白尿、腎機能低下などの症状を呈し、当センターで腎生検を実施し診断された14例を含めて、43例の慢性関節リウマチに続発したAAアミロイドーシス症例を集めることができた。全例、アミロイドーシスの臨床症状を有し、さらに腎生検、胃粘膜ないし直腸生検、剖検のいずれかの方法により組織学的にアミロイド沈着が証明され、過マンガン酸カリによるコンゴ赤染色性の消褪か抗AA抗体を用いた免疫染色により、沈着アミロイドがAAアミロイドであることが確認された症例である。

コントロールとして健常人103例と、発症5年未満の比較的早期の慢性関節リウマチ患者77例を用いた。図2に示すように、アミロイドーシスはRA発症から10年から20年を経過した長期例に生じることが多くRA発症5年未満の比較的早期にはほとんどみられない。もし疾患のコントロールとしてランダムにRA症例を選んだ場合、長期RA例ではアミロイドーシスを発症しにくい素因をもったRA患者が多く含まれる可能性が高いため、早期RAをRA患者全体のコントロールとした。

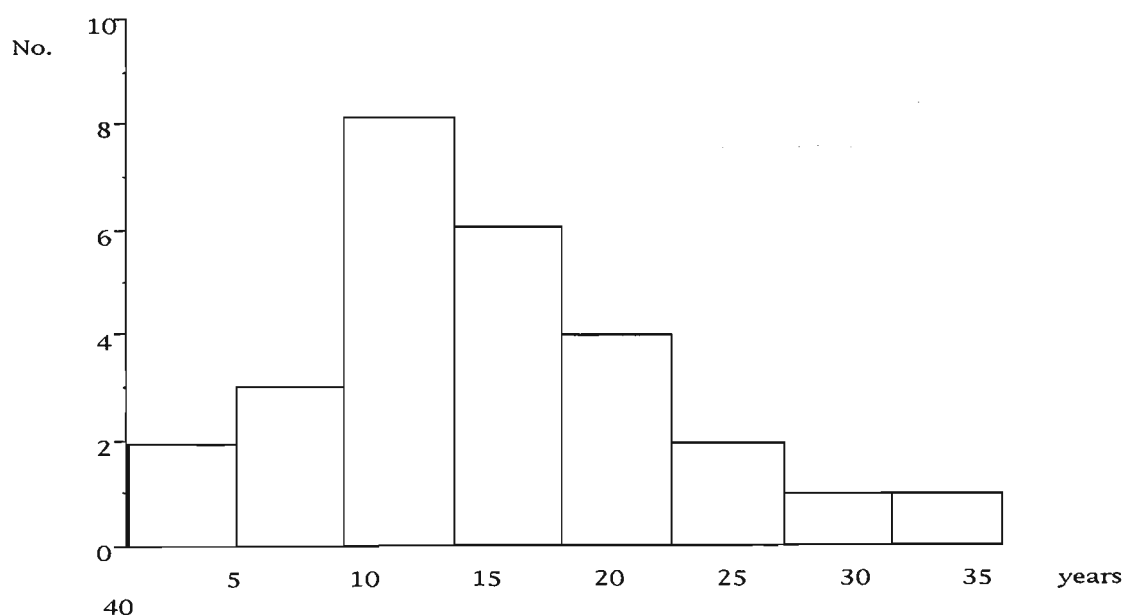


図2 RA発症からAAアミロイドーシス発症までの期間5年ごとの発症人数のヒストグラムを示す。

2) 方法

DNAは市販のキットを用いて末梢血有核球より抽出した。死亡例やすでに通院を中止したアミロイドーシス症例では腎生検か剖検でえられた腎組織切片より抽出した。

SAA1の増幅に用いたプライマーのセットは、図3に示すようにSAA1 geneのエクソン3とエクソン4にまたがり、アミノ酸配列N末端から27番目から70番目のアミノ酸をカバーする。SAA1 α 、 β 、 γ で変異のみられる52と57番目を含む。

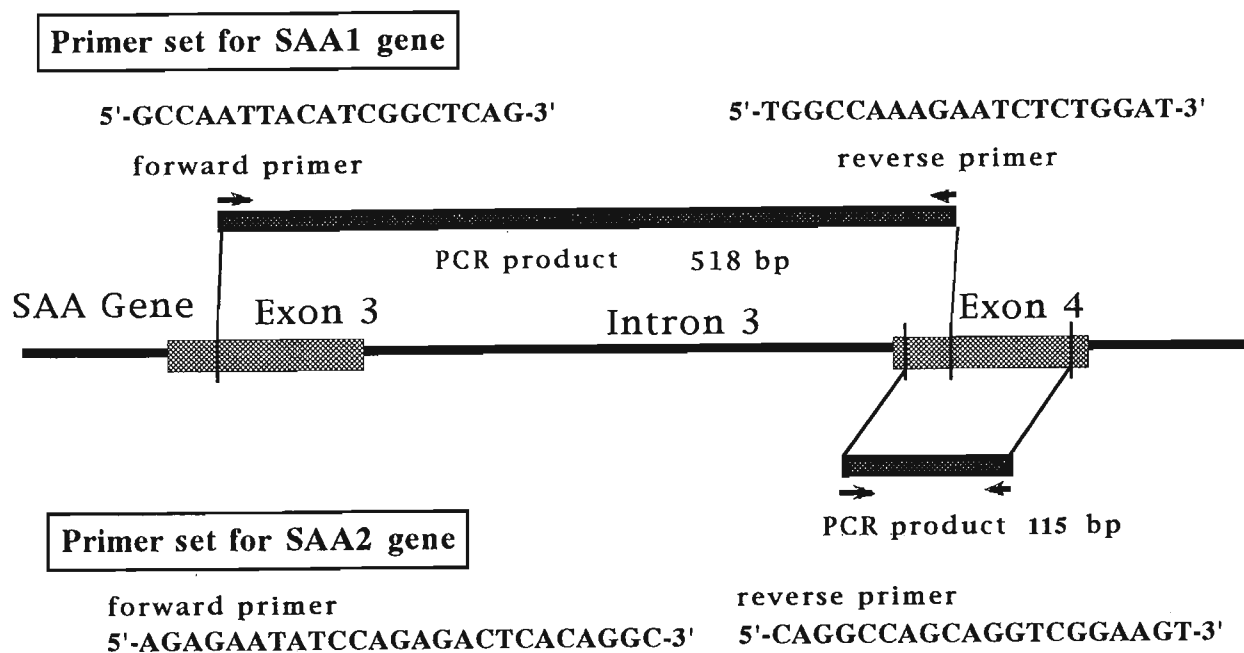


図3 SAA1とSAA2遺伝子のPCRに用いたプライマー

一方、SAA2遺伝子に対するプライマーにより、71番目のアミノ酸に相当するSAA2の多型部分を含む。

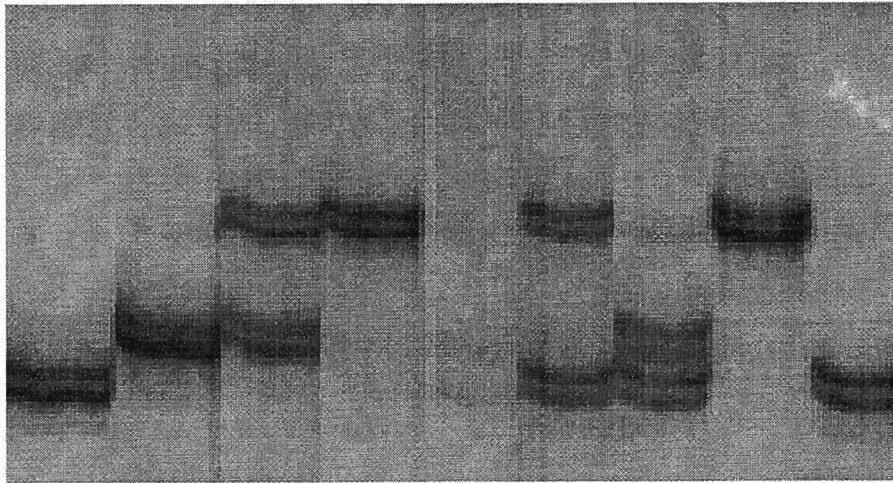
PCR産物は、PCR-SSCP法かPCR-RFLP法により検討した。

3) 結果

①SAA1とSAA2遺伝子のPCRによる増幅

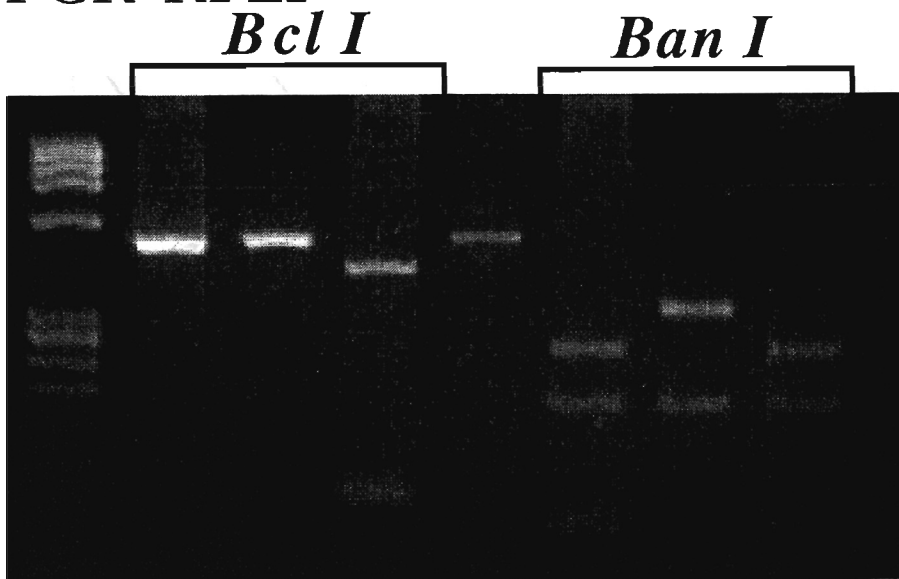
PCR-SSCP法とPCR-RFLP法によりSAA1遺伝子は、 α 、 β 、 γ に明瞭に区別された。図4にPCR-SSCP法とPCR-RFLP法の結果を示す。

PCR-SSCP



1 2 3

PCR-RFLP



1 2 3 cont. 1 2 3

1: SAA1 γ/γ , 2: SAA1 α/α , 3: SAA1 β/β

図4 PCR-SSCP法とPCR-RFLP法によるSAA1遺伝子の解析

同様にSAA2遺伝子も、PCR-RFLP法により α と β に区別された〔図5〕。

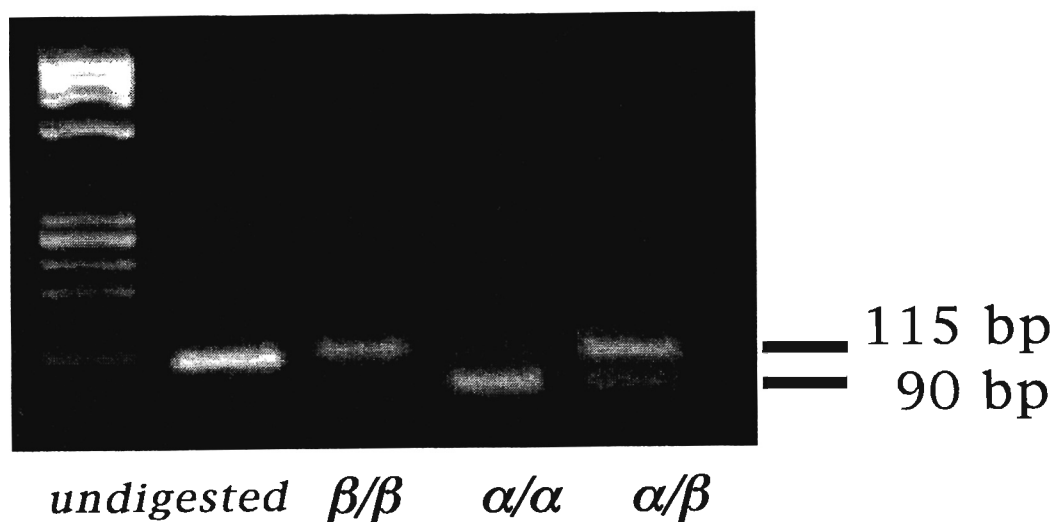


図5 PCR-RFLP法によるSAA2の解析

②SAA1遺伝子の各alleleの頻度の比較

次にSAA1遺伝子の α 、 β 、 γ 各alleleのアミロイドーシス患者群、早期RA群、正常人における頻度を表1に示す。アミロイドーシス患者群におけるSAA1 γ/γ の頻度は、早期RAやコントロールに比べて有意に高く（早期RA群に対し、 $p=0.0001$ ）、一方早期RAとコントロールでは頻度に差はみられなかった。逆にSAA1 α/α はコントロールに比べてアミロイドーシス患者群では有意に低い頻度が観察された。計算上、SAA1 α/α をもつものではアミロイドーシスの相対危険率は0であり、SAA1 γ/γ のものでは相対危険率は4.48倍である。それぞれのallele数で見るとアミロイドーシス患者では α alleleの頻度は有意に低く、 γ alleleの頻度が有意に高い。興味深いのは、 α/γ のgenotypeを示すものでは相対危険率が0.34倍であり、アミロイドーシスのrisk factorとしての γ alleleの影響より、protective factorとしての α alleleの影響の方が強いことを示唆している。

先の馬場らの報告では、RA患者における γ 遺伝子の頻度が明らかでなかったが、本研究により早期RA群では γ alleleの増加がないことより、 γ alleleはRAの危険因子ではなく、アミロイドーシスの危険因子であることが明らかとなった。

表1 SAA1遺伝子のgenotypeと各alleleの頻度の比較

	アミロイドーシス群	早期RA群	正常コントロール
人数〔男：女〕	43 (3 : 40)	77 (21 : 56)	103
年齢	60.2±9.4	53.8±14.9	
RA罹病期間	17.7±10.3	2.9±14.9	
Genotype			
α/α	0 (0.0)	6 (7.8)	12 (11.7)
α/β	5 (11.6)	13 (16.9)	18 (17.5)
α/γ	5 (11.6)	26 (33.8)	25 (24.3)
β/β	3 (7.0)	12 (15.6)	9 (8.7)
β/γ	15 (34.9)	14 (18.2)	26 (25.2)
γ/γ	15 (34.9)	6 (7.8)	13 (12.6)
Allele			
α	10 (11.6)	51 (33.1)	67 (32.5)
β	26 (30.2)	51 (33.1)	62 (30.1)
γ	50 (58.1)	52 (33.8)	77 (37.4)

③アミロイドーシス発症前のRA罹病期間の比較

RAの発病からアミロイドーシスの出現までの期間を、各SAA1 alleleのallele数別に比較したものが図6である。

βalleleの数では、アミロイドーシス発症までの罹病期間に差はないが、γalleleを2コ有するものでは、有意にアミロイドーシス発病までの罹病期間が短く、逆にαalleleがあれば有意にアミロイドーシスの発症が遅くなる。

ここには示さないが、アミロイドーシス発症前のCRPのデータが確認できた症例で、発症前2年間のCRPの平均をSAA1 geneとの関連を比較したところ、SAA1 γ alleleの数が多いほど、平均CRPが高値を示した。CRP以外の、リウマトイド因子やSteinbrockerのレントゲンによるリウマチの

病期分類などの指標とは、SAA1 geneとの有意な関連はみられなかった。

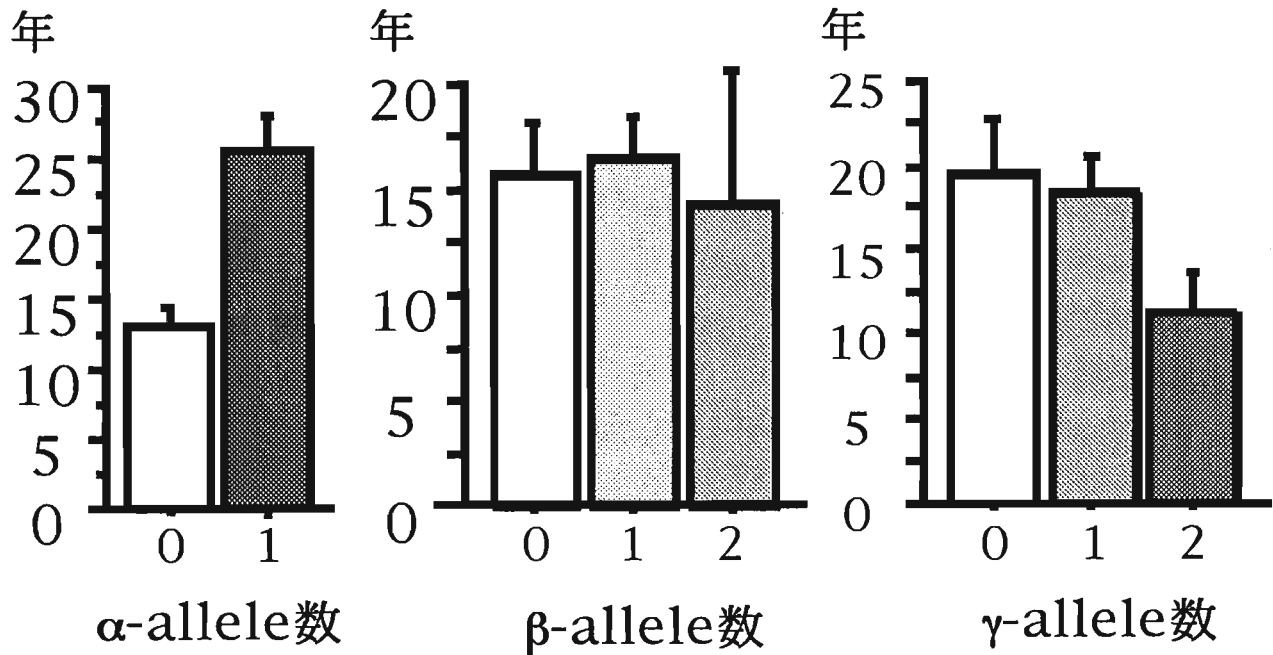


図6 SAA1 alleleの数によるアミロイドーシス発病までのRA罹病期間

④SAA2遺伝子の各alleleの頻度の比較

表2 SAA2遺伝子のgenotypeと各alleleの頻度の比較

	アミロイドーシス群	早期RA群	正常コントロール
Genotype			
α/α	33 (76.7)	60 (77.9)	75 (72.8)
α/β	10 (23.3)	16 (20.8)	28 (27.2)
β/β	0 (0)	1 (1.3)	0 (0)
Allele			
α	76 (88.4)	136 (88.3)	178 (86.4)
β	10 (11.6)	18 (11.7)	28 (13.6)

次に、SAA2 geneがアミロイドーシス発症に関与するかを調べるため、SAA2 α 、 β に関して、アミロイドーシス群、早期RA群、正常コントロール群で頻度を測定した結果が表2である。SAA2 alleleの分布はこの3群間で差はみられなかった。

⑤韓国、台湾人におけるSAA1 各alleleの分布

AAアミロイドーシスの発症頻度の地域差が想定されているが、SAA1 alleleの分布にも地域差がある可能性が考えられる。Faulkesらによれば、21例のコーカシアンの分析では、 α が61.9%で β が38.1%であり、 γ は報告されていない。そこで、韓国、台湾の正常人でのSAA1 alleleの頻度を分析したものが表3である。この2国ともほぼ日本と同様の分布を示し、SAA1 γ alleleの頻度は、韓国人で41.6%、台湾人で35.6%であった。

表3 韓国人、台湾人、日本人における
SAA1遺伝子のgenotypeと各alleleの頻度の比較

	韓国人	台湾人	日本人
人数	90	95	103
Genotype			
α/α	7 (7.8)	10 (10.5)	12 (11.7)
α/β	19 (21.1)	17 (17.9)	18 (17.5)
α/γ	21 (23.3)	13 (13.7)	25 (24.3)
β/β	7 (7.8)	15 (15.8)	9 (8.7)
β/γ	17 (18.9)	24 (25.3)	26 (25.2)
γ/γ	18 (20)	15 (15.8)	13 (12.6)
未知のパターン	1 (1.1)	1 (1.1)	0
Allele			
α	54 (30.3)	50 (26.6)	67 (32.5)
β	50 (28.1)	71 (37.8)	62 (30.1)
γ	74 (41.6)	67 (35.6)	77 (37.4)

⑥今後の研究の展開

SAA1 γ alleleをもつことが、AAアミロイドーシス発症の危険因子であり、さらにRAからアミロイドーシス発症までの期間を短縮することが判明した。SAA1 γ alleleを持つことでアミロイドーシスが発症しやすくなる機序として、〔1〕アミノ酸配列の違いによりSAAの代謝が異なる、〔2〕SAA1 γ alleleが、RA炎症の増強に関連する、〔3〕SAA1 γ を有する個体では、SAA1の産生が他のalleleを持つ個体より高い、の3通りの可能性がある。〔1〕に関しては、血中や組織でのSAA1の分解が異なる可能性、HDLへの親和性が異なる可能性、組織での沈着しやすさが異なる可能性が含まれる。

それぞれの可能性について、解析するための研究を現在進行させている。

〔1〕については、まず血中レベルを測定しているが、現在のSAAの測定ではSAA1とSAA2の両蛋白の合計量しか測定できない。そこで、等電点電気泳動法によりSAA1とSAA2を分離し、蛋白量の測定を試みている。

〔2〕については、臨床データで、各alleleタイプの患者で、血中CRPとSAA、およびSAA/CRP比を検討している。

〔3〕については、SAA1各alleleのプロモーター部分の解析をおこない、興味深いデータを得ている。今後は、ルシフェラーゼ法などによりそれぞれのプロモーター活性の測定を行う予定である。

IV 研究発表

(1) 学会誌等

1. Masato Moriguchi, Chihiro Terai, Yumi Koseki, Masashi Uesato, and Naoyuki Kamatani. Increased risk of AA-amyloidosis in the presence of SAA1g allele in Japanese patients with rheumatoid arthritis (RA). 1998 National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. *Arthritis & Rheumatism* 41, 1998, pS64.
2. 黒堀ゆう子、赤真秀人、高木香恵、中島洋、上里雅史、樋上謙士、針谷正祥、寺井千尋、山中寿、原まさ子、柏崎禎夫。消化管アミロイドーシスによる蛋白漏出性胃腸症を呈した早期 RA の 1 例。日本内科学会雑誌87、1998、p2088-2090。
3. Masato Moriguchi, Chihiro Terai, Yumi Koseki, Masashi Uesato, Ayako Nakajima, Shinichi Inada, Makoto Nishinarita, Shoji Uchida, Atsuo Nakajima, Seong Yoon Kim, Ching-Lang Chen, and Naoyuki Kamatani. Influence of genotypes at SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of secondary AA-amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis. *Human Genetics* 105, 1999, p360-366.
4. Masato Moriguchi, Chihiro Terai, Yumi Koseki, Masashi Uesato, and Naoyuki Kamatani. Influence of genotypes at SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of reactive AA-amyloidosis in patients with Japanese rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 42, 1999, pS87.

(2) 口頭発表

1. 森口正人、寺井千尋、小関由美、上里雅史、柏崎禎夫。慢性関節リウマチに続発したAAアミロイドーシス患者におけるSAA遺伝子多型性解析。第42回日本リウマチ学会総会。1998年5月9日
2. 上里雅史、寺井千尋、森口正人、小関由美、柏崎禎夫。慢性関節リウマチ (RA) における腎障害の組織学的検討。第42回日本リウマチ学会総会。1998年5月9日

3. 寺井千尋．慢性関節リウマチの腎障害について．日本腎臓学会と日本リウマチ学会による合同シンポジウム．1998年5月9日
4. 森口正人、寺井千尋、上里雅史、小関由美、鎌谷直之．慢性関節リウマチ続発AAアミロイドーシスにおけるSAA1およびSAA2遺伝子多型解析．日本人類遺伝学会第43回大会．1998年10月15日
5. Masato Moriguchi, Chihiro Terai, Yumi Koseki, Masashi Uesato, and Naoyuki Kamatani. Increased risk of AA-amyloidosis in the presence of SAA1g allele in Japanese patients with rheumatoid arthritis (RA).1998 National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. 1998年11月9日
6. 上里雅史、寺井千尋、森口正人、小関由美、鎌谷直之．腎アミロイドーシスに伴い、低レニン低アルドステロン性高カリウム血症を来たした慢性関節リウマチの一例．第28回日本腎臓学会東部学術大会．1998年11月20日
7. 小関由美、寺井千尋、上里雅史、森口正人、針谷正祥、原まさ子、鎌谷直之．発症早期にAA-アミロイドーシスを続発し、二重膜濾過法が著効したRAの一例．第9回日本リウマチ学会関東地方会．1998年12月12日
8. 森口正人、寺井千尋、小関由美、上里雅史、鎌谷直之．慢性関節リウマチ合併AA-amyloidosisにおけるSAA遺伝子解析および臨床病理学的検討．第43回日本リウマチ学会総会．1999年6月3-5日
9. 小関由美、寺井千尋、森口正人、上里雅史、鎌谷直之．RA患者におけるSAA1 alleleの違いによる血清アミロイドA (SAA) / CRP 比の検討．第43回日本リウマチ学会総会．1999年6月3-5日
10. Masato Moriguchi, Chihiro Terai, Yumi Koseki, Masashi Uesato, and Naoyuki Kamatani. Influence of genotypes at SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of reactive AA-amyloidosis in patients with Japanese rheumatoid arthritis.1999 National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. 1999年11月14日
11. 森口正人、寺井千尋、金子裕隆、小関由美、上里雅史、鎌谷直之．慢性関節リウマチ (RA) 続発AA-amyloidosisにおけるSAA1 gene

promotor領域の多型解析．第44回日本リウマチ学会総会発表予定〔2000年6月〕

12. 小関由美、寺井千尋、金子裕隆、森口正人、上里雅史、鎌谷直之．RA患者における血清アミロイドA(SAA)1、SAA2の検出．第44回日本リウマチ学会総会発表予定〔2000年6月〕
13. 小関由美、寺井千尋、森口正人、上里雅史、鎌谷直之．血清アミロイドA(SAA)がRA患者の脂質代謝に与える影響．第44回日本リウマチ学会総会発表予定〔2000年6月〕

(3) 出版物

1. 寺井千尋．アミロイドーシス．新内科治療ガイド．文光堂．1999年、p1312-1315．