

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790393  
 研究課題名（和文） 透析アミロイドーシスにおける骨・関節破壊機構の解明  
 研究課題名（英文） analysis of the mechanism of bone and articular destruction in dialysis related amyloidosis  
 研究代表者  
 大越 忠和（OOKOSHI TADAKAZU）  
 福井大学・医学部・助教  
 研究者番号：90362037

研究成果の概要（和文）：透析アミロイドーシスにおいて、 $\beta$ 2-ミクログロブリン（ $\beta$ 2-m）アミロイド線維の沈着が骨・関節破壊を引き起こすメカニズムを明らかにするため、 $\beta$ 2-m アミロイド線維のウサギ滑膜線維芽細胞に対する細胞毒性を検討した。 $\beta$ 2-m アミロイド線維を培養液に添加すると、ウサギ滑膜線維芽細胞は、壊死及びアポトーシスを起こした。 $\beta$ 2-m アミロイド沈着による骨・関節破壊の病態に、アミロイド線維による直接の細胞傷害効果が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To reveal the way that deposition of  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2-m) amyloid fibrils in dialysis related amyloidosis induce bone and articular destruction, we investigated the cytotoxicity of  $\beta$ 2-m amyloid fibrils to rabbit synovial fibroblasts. Necrosis and apoptosis of rabbit synovial fibroblasts were induced when  $\beta$ 2-m amyloid fibrils were added to the culture medium. This result suggests that direct cytotoxicity of  $\beta$ 2-m amyloid fibrils to synovial cells may involve the pathogenesis in bone and articular destruction by deposition of  $\beta$ 2-m amyloid.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：アミロイドーシス、細胞毒性、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、血液透析

## 1. 研究開始当初の背景

申請者の所属するグループでは、アミロイドーシスの病態を解明し、予防、治療法の開発に貢献すべく、主にアミロイド線維形成機構、及び線維形成阻害機構を中心に研究してきた。しかし、現在でもアミロイド線維の沈着による臓器障害の機構は完全には明らかになっていない。

透析アミロイドーシスでは、 $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイドが主に関節、腱組織に沈着し、手根管症候群、破壊性脊椎関節症などの全身関節症状を引き起こす。骨・関節破壊を伴う進行した透析アミロイドーシスの病

変を病理組織学的に観察すると、アミロイド沈着と共に単球、マクロファージの浸潤が認められる。また、沈着した $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維は AGE（Advanced glycation end product）化などの修飾を受けていることも明らかになっている。しかしながら、 $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維の沈着が骨・関節破壊を引き起こすメカニズムは未だ明らかになっていない。

仮説としては、①関節組織に存在する滑膜細胞や軟骨細胞に対し、 $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維が細胞傷害作用を持つ、②これらの細胞を刺激して炎症性サイトカイ

ンの産生を誘導する、③蛋白分解酵素などの組織傷害因子の産生を誘導する、④ $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維そのものが単球・マクrophageの走化性因子として働く、などがありこれらを支持する研究報告も散見されるが、いずれも $\beta$ 2-ミクログロブリンモノマーを用いた研究であり、これまでに $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維を用いて検討されたものはない。また、アミロイド $\beta$ 蛋白 (A $\beta$ ) や Islet amyloid polypeptide / アミリン (IAPP) など、他のアミロイドではアミロイド線維やオリゴマーによる細胞毒性が報告されているが、 $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイドではほとんど報告がない。

本研究では、試験管内で形成したアミロイド線維と培養細胞を用い、透析アミロイドシスにおいて $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維の沈着が破壊性脊椎関節症などの骨・関節破壊を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、 $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維の沈着が破壊性脊椎関節症などの骨・関節破壊を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目的とし、以下の項目について検討した。

(1)  $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維の滑膜細胞、及び軟骨細胞の増殖速度に対する影響を検討する。

(2)  $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維の滑膜細胞、及び軟骨細胞に対する細胞傷害作用の有無と程度を明らかにする。

(3)  $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維が滑膜細胞、及び軟骨細胞を刺激し、炎症性サイトカインや組織傷害因子の産生を誘導するのか否かを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ウサギ滑膜線維芽細胞由来の株細胞 (HIG-82) を 24 穴プレートに培養し、 $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維、あるいは $\beta$ 2-ミクログロブリンモノマーを種々の濃度で培養液に添加した。一定時間のインキュベーションの後、LDH release assay 及び MTT reduction assay を行い、アミロイド線維の培養細胞に対する毒性の有無と程度を評価した。

(2) さらに、培養細胞染色キットによる染色を行い形態学的な評価を行った。

(3) アミロイド線維によるアポトーシス誘導の有無、程度を評価するために、DAPI 染色、

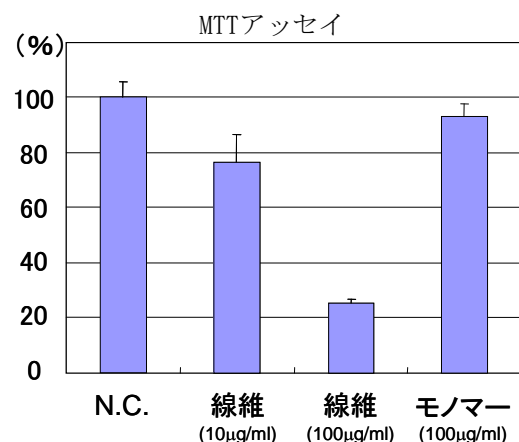
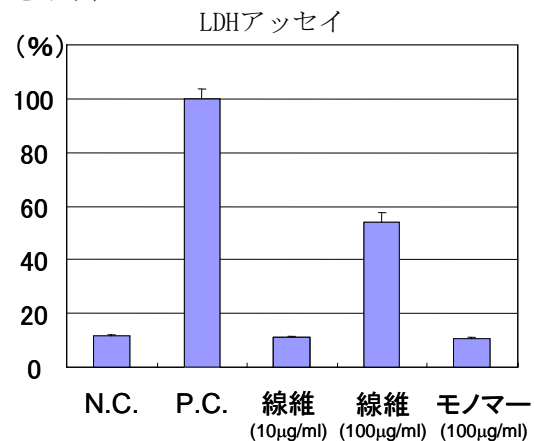
TUNEL 染色の二重染色を行い、アポトーシス率を測定した。

(4) Congo-red 染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、添加したアミロイド線維が細胞に付着しているのか、細胞内に取り込まれているのかを検討した。

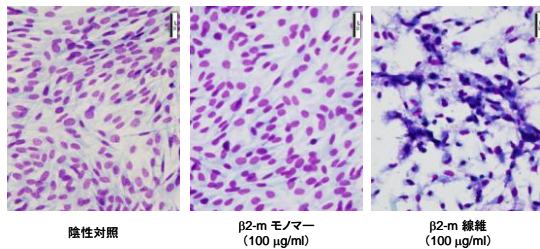
(5) アミロイド線維投与による細胞の形態変化、及びアミロイド線維と培養細胞との相互作用を電子顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

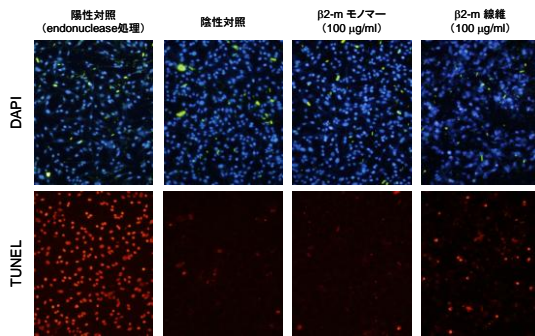
(1)  $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維を 100 $\mu$ g/ml 含む培養液でインキュベーションした群は、モノマー (100 $\mu$ g/ml) 添加群、及びコントロール群と比較して、LDH release assay、MTT reduction assay のいずれの方法でも有意に viability が低下していた。(下グラフ: LDH アッセイは細胞膜崩壊により上清中に放出された LDH 量を反映しており、値が高いほど viability が低下していることを示す。また、MTT アッセイは、ミトコンドリアの酸化還元能を示しており、値の低下が viability の低下を示す)



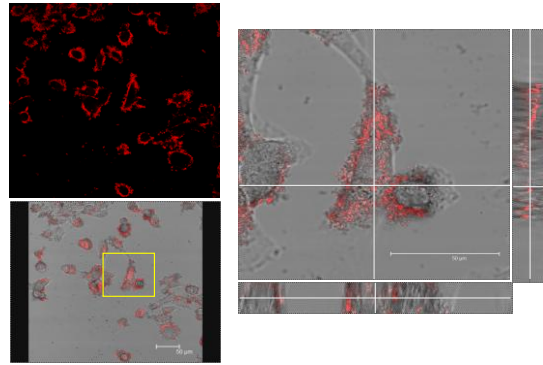
(2) 光学顕微鏡で観察すると、陰性対照群、モノマー投与群では、細胞は比較的均一な類円形核と紡錘形の細胞質を有しており、整然と分布していた。一方、アミロイド線維投与群では、細胞数は少なく、疎に分布しており、染色性も不均一であった。また、アミロイド線維投与群では、核濃縮や細胞質の膨化、空胞化などの壊死性の変化がみられると共に、アポトーシス小体と考えられる核の断片化も認められた。(下写真)



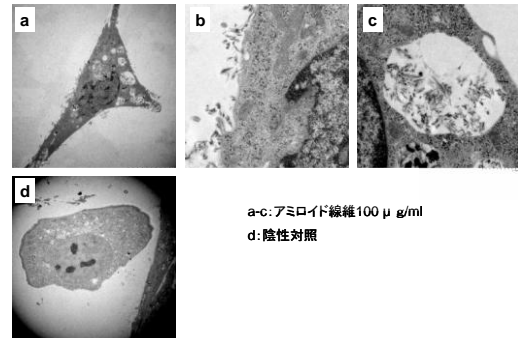
(3) DAPI/TUNEL二重染色による検討では、アミロイド線維投与群では陰性対照、及びモノマー投与群に比して多くのTUNEL陽性像が認められた。これらの細胞数を数え、アポトーシス率を計算すると、陰性対照群では、0.48%、モノマー添加群で0.55%と低値だが、アミロイド線維添加群で5.1%と高値を示した。(下写真)



(4) Congo-red 染色では、陽性像が細胞表面に線状に認められ、アミロイド線維が細胞表面に付着していると考えられた。(右上写真：左上がCongo-redの蛍光像で、左下が明視野像と重ね合わせた像。黄色で示された領域を拡大したのが右側の写真で、十字に示された直線上でのZ軸方向の像を再構成したものが、右側と下側に示されている)



(5) 電子顕微鏡による観察では、アミロイド線維添加群でアミロイド線維が細胞表面に付着し、一部で細胞膜に刺入しているような像が認められ、アミロイド線維が細胞内に取り込まれていることも確認できた。また、核形の不整や核縁にクロマチンが分布するなど核の異常も目立った。



以上の結果より、β2-ミクログロブリンアミロイド線維は細胞表面に付着、及び細胞内に取り込まれ、壊死及びアポトーシスの両者を引き起こすことで毒性を発揮すると考えられた。本研究の結果は、β2-ミクログロブリンアミロイド沈着による骨・関節破壊の病態に、β2-ミクログロブリンアミロイド線維による直接の細胞傷害効果が関与している可能性を示唆している。

今後、壊死やアポトーシスを誘導するメカニズムをさらに検討していくとともに、炎症性サイトカインや組織傷害因子の産生の誘導に関して、及びアミロイド線維の軟骨細胞に対する毒性の検討など、今回の研究期間内に行えなかった項目についても研究を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① 大越忠和、 $\beta$ 2-ミクログロブリン線維の滑膜線維芽細胞に対する細胞毒性の検討、第102回日本病理学会総会、2013年6月8日、ロイトン札幌

② 大越忠和、 $\beta$ 2-ミクログロブリン線維の細胞毒性に関する検討、アミロイドーシスに関する調査研究班・研究報告会、2013年1月24日、KKRホテル東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大越 忠和 (OOKOSHI TADAKAZU)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：90362037

### (2) 研究協力者

内木 宏延 (NAIKI HIRONOBU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10227704

長谷川 一浩 (HASEGAWA KAZUHIRO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：60324195

小澤 大作 (OZAWA DAISAKU)

福井大学・テニユアトラック推進本部・助教

研究者番号：60554524