

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461471

研究課題名(和文)尿中SAAフラグメント測定による反応性アミロイドーシスの診断と治療効果の判定

研究課題名(英文)A diagnosis method of the reactive amyloidosis by urinary SAA fragment measurement and determination of the effect of treatment

研究代表者

黒田 毅 (Kuroda, Takeshi)

新潟大学・保健管理・環境安全本部・准教授

研究者番号：00372475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)に合併するAAアミロイドーシスは腎臓に沈着し進行すると腎不全、血液透析にいたる。腎のアミロイドの沈着は通常腎生検で証明されるが、RA症例においては生検が困難な場合が多い。非侵襲的な診断法として尿を用いたアミロイドーシスの診断法を開発した。アミロイドーシス症例の尿沈渣を可溶化しイムノブロットで重合能を持つアミロイド前駆蛋白(AA76)を60%の症例で検出した。アミロイドのない症例では検出されなかった。さらに尿沈渣のCongo-red染色と腎組織の表面マーカーの二重染色によって糸球体、尿細管、集合管などの腎組織とアミロイド蛋白の共存が確認され、沈着領域の質的診断も可能であった。

研究成果の概要(英文)：Diagnosis of amyloidosis is made by evaluation of biopsy specimens. Biopsy collection is an invasive procedure and, poses risk to the patient. We have developed a new diagnostic method of AA amyloidosis. We developed diagnostic procedure of the amyloidosis using the urine as noninvasive diagnostic procedure. We solubilized the urinary sediment of the amyloidosis case and detected AA76 in 60% of cases in immunoblot. It was not detected in the case without amyloidosis. Furthermore, some of the renal tissues, such as glomerulus, renal tubules, and collecting duct were coexisted with amyloid deposits confirmed in the urinary sediment. Coexistence of the amyloid protein were confirmed by Congo-red staining and the double stain with the surface marker of the renal tissue, and the qualitative diagnosis of the deposition region was possible. We have developed a non-invasive method for diagnosing AA amyloidosis. This method represents as an alternative approach to evaluation of tissue biopsies.

研究分野：腎・膠原病

キーワード：Amyloidosis Rheumatoid arthritis SAA

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)の合併症である AA アミロイドーシスは予後不良である。本邦の RA 患者数は約 70 万人と推定されアミロイドの合併はこのうち約 10%である。これらの症例では腎不全が死因の上位を占めている。前駆蛋白である SAA が高濃度で長期間存在することによりアミロイド蛋白が生成する。生成機序は、SAA はタンパク分解酵素により切断され、AA 蛋白となりはじめて組織に沈着する性質を帯びるが、一次構造は 76 番目の Ser と 77 番目の Leu の間で切断された SAA ポリペプチド鎖の N 末端側と同一である。申請者は、かねてより RA における AA アミロイドーシスの、基礎的、臨床的病態検討を行ってきた。診断に関して現在、胃・十二指腸粘膜生検、腎生検が行われているが、胃・十二指腸粘膜生検と腎生検の極めて高い相関を報告し (Clin Rheumatol 2002; 21: 123-128) このスクリーニング法は広く用いられている。予後の改善を図るため頻度、RA 発症からの期間、年間死亡率、死因、年間透析導入率につき疫学的調査を行った (Clin Rheumatol 2006; 25: 498-505)。診断からの年間透析導入率は約 15%であり血液透析導入時の早期死亡が予後を悪化させていた。血液透析に関する問題点を提起し (Rheumatol Int. 2006; 26: 1147-53) 透析導入時のトラブルを回避するために、安全な血液透析導入法を提唱し確立した (Rheumatol Int. 2011; 31: 1177-1182)。一方、腎アミロイドーシスの組織学的評価法は、臨床的な重症度と良い相関を示すものがなかったが申請者はアミロイドの沈着量を画像解析技術を用い検討し、生検組織の沈着面積と臨床的なパラメーターの相関を示した (Rheumatol Int. 2012; 32: 3155-3162, BMC Nephrol. 2012; 13: 118)。生物学的製剤による治療が RA ではスタンダードな治療になり、強力な抗炎症作用、骨破壊抑制、破壊された骨の再生等の作用が報告されている。申請者は抗 TNF 療法により胃・十二指腸粘膜生検での血管周囲のアミロイドが除去され、腎機能の改善や、蛋白尿の減少を報告した (Rheumatol Int 2008; 28: 1155-1159)。更に抗 TNF 療法により胃・十二指腸粘膜生検のアミロイドは減少するが胃粘膜生検の組織上の減衰率により治療効果を判定可能となった (J Rheumatol. 36; 2409-2415: 2009)。生物学的製剤の治療でアミロイドが消化管組織より消失することより、生命予後への影響が注目されているが、生物学的製剤の治療による生命予後の延長効果に関して明らかなにした (J Rheumatol. 2012; 39: 1517-1523)。腎アミロイドーシスは腎生検により診断されるが RA では関節拘縮や変形により腎生検が困難な場合も多く非侵襲的な腎アミロイドーシスの診断法が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では尿検査による新たなスクリーニング法を開発し低侵襲、迅速で特異度の高い診断法を開発し、この方法を用い腎組織への治療効果を直接検討する方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画ではアミロイドーシス症例の尿サンプルを用いて

- 1) 尿上清および沈渣を可溶化したサンプルのアミロイド蛋白を構成する SAA ポリペプチド鎖の N 末端側の検出。
- 2) 尿沈渣に付着した SAA ポリペプチド鎖の N 末端側の検出と沈渣の成分の同定。
- 3) 腎障害のマーカーを探る。

4. 研究成果

(1) 尿によるアミロイドの検出

尿中におけるアミロイドの検出の可能性を検討した。AA アミロイドーシスの尿を上清と沈渣に遠心分離し、沈渣を可溶化したサンプルを、重合能を持ちアミロイド蛋白となる AA76 の N-terminal に反応する抗体でイムノプロットを行った。尿サンプルは、RA で胃十二指腸粘膜生検によりアミロイドの沈着が認められた 16 例と認められなかった 5 例で検討した。アミロイドの沈着が認められた 16 例中、イムノプロットで Common AA サイズの SAA と AA76 が陽性であったのは 9 例であり、うち 1 例は上清でも AA76 が陽性であった。陰性であった 7 例中 2 例は RA の治療として生物学的製剤が使用されていた。一方、胃十二指腸粘膜生検でアミロイドの沈着が認められなかった 5 例は、全例で AA76 の陽性者は認められず上清でも検出されなかった。

(2) 尿沈渣による腎アミロイドーシスの質的診断

尿沈渣の可溶化によるイムノプロットでアミロイドが検出されたことより、沈渣中にアミロイドが直接検出できる可能性が示唆された。尿沈渣のサイトスポットを作成し Congo-red 染色を行ない、抗 SAA 抗体と腎組織の表面マーカーとの二重染色を行った。イムノプロットで AA76 が陽性であった症例の尿沈渣中に Congo-red 染色が陽性である粒子が認められ、偏光顕微鏡で緑色偏光を呈した事によりアミロイドと確認された(図 1)。

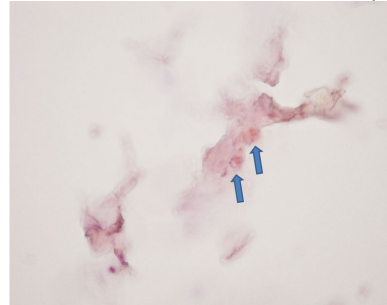


図 1: 尿沈渣中のアミロイド粒子
イムノプロットで AA76 が陽性であった尿沈

渣を用いサイトスポットを作成し Congo-red 染色を行った。沈渣中に Congo-red 染色陽性の粒子を認め(矢印)、偏光顕微鏡で緑色偏光を呈した。

また抗 SAA 抗体による免疫染色でもアミロイド陽性の症例では沈渣が染色され、症例によっては抗メガリン抗体(近位尿細管と反応)、抗アクアポリン 1 抗体(近位尿細管と反応)、抗 TAL 抗体(遠位尿細管と反応)、抗アクアポリン 2 抗体(集合管と反応)、抗ポドカリキシン抗体(糸球体と反応)などとの二重染色でも抗 SAA 抗体と各種の腎組織のマーカーと同じ位置に確認される症例を認めた。以上より抗体認識部位へのアミロイドの沈着が示唆された(図 2)。

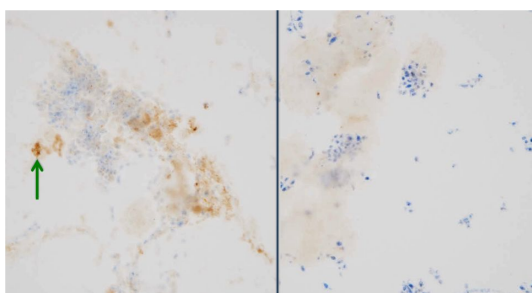


図 2:尿沈渣の二重染色(抗 AA 抗体:茶, 抗メガリン抗体:青)

アミロイドーシス症例(左)では尿沈渣中に抗 AA 抗体が陽性の粒子(矢印)が存在し、抗メガリン抗体がほぼ同じ部位に発現している。アミロイドーシスのないコントロール症例(右)では、メガリンは発現しているが抗 AA 抗体が陽性の粒子は認められない。

以上の結果より、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 が検出可能であった。また、尿沈渣のサイトスポ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アミロイドの粒子が認められた。抗 SAA 抗体と尿細管のマーカーによる二重染色により尿細管のアミロイドの局在診断が可能であると考えられた。

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)

[雑誌論文](計 9 件)

Takeshi Kuroda, Yumi Ito, Naofumi Imai, Yukiko Nozawa, Hiroe Sato, Takeshi Nakatsue, Yoko Wada, Mitsuhiro Ueno, Masaaki Nakano, Ichiei Narita. Significant association between renal function and area of amyloid deposition evident in kidney biopsy specimens in both AA and AL amyloidosis. Amyloid (supplement) Amyloid, 査読有, 2017 Mar;24(sup1):151-152.
黒田毅 AA アミロイドーシス合併関節リ

ウマチ患者では血液透析と腹膜透析のどちらを選択すべきか? 最新アミロイドーシスのすべて-診療ガイドライン 2017 と Q&A、査読無、P184, 2017 医歯薬出版

黒田毅 AA アミロイドーシスの腎移植は推奨されるか? 最新アミロイドーシスのすべて-診療ガイドライン 2017 と Q&A、査読無、P183, 2017 医歯薬出版

Junji Sato, Yasuaki Okuda, Takeshi Kuroda, and Toshiyuki Yamada: Detection of AA76, a common form of amyloid A protein, as a way of diagnosing AA amyloidosis. Ann Clin Lab Sci, 査読有, 2016 Mar;46(2):147-53.

Takeshi Kuroda, Naohito Tanabe, Yukiko Nozawa, Hiroe Sato, Takeshi Nakatsue, Daisuke Kobayashi, Yoko Wada, Takako Saeki, Masaaki Nakano, Ichiei Narita. Effects of biologic agents in patients with rheumatoid arthritis and amyloidosis treated with hemodialysis. Intern Med, 査読有, 2016;55(19):2777-2783

尿中 SAA フラグメント測定による反応性アミロイドーシスの診断。 黒田毅。新潟医学会雑誌、査読無、130(2):85-91, 2016

AA アミロイドーシスの治療。 黒田毅。臨床透析、査読無、2016 32(4)429-430
Takeshi Kuroda, Naohito Tanabe, Hiroe Sato, Takeshi Nakatsue, Yoko Wada, Shuichi Murakami, Masaaki Nakano, Ichiei Narita. Distribution of amyloid deposits in the kidney of a patient with reactive amyloidosis associated with rheumatoid arthritis. BMC Research Notes, 査読有, 2013;6:231-235

関節リウマチにより反応性アミロイドーシスを合併した 1 剖検例における腎組織へのアミロイド沈着の検討。 黒田毅、中枝武司、和田庸子、村上修一、中野正明、成田一衛 中部リウマチ、査読有、43(1)56-58, 2013

[学会発表](計 7 件)

黒田毅、長谷川 絵里子、若松 彩子、野澤 由貴子、佐藤 弘恵、中枝 武司、和田 庸子、中野 正明、成田 一衛、関節リウマチに合併する AA アミロイドーシスと AL アミロイドーシスの腎生検組織におけるアミロイド沈着量、臨床所見、腎組織所見の検討。第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会。2017 年 4 月 21 日、福岡。

Takeshi Kuroda, Yumi Ito, Naofumi Imai, Yukiko Nozawa, Hiroe Sato, Takeshi Nakatsue, Yoko Wada, Mitsuhiro Ueno,

Masaaki Nakano, Ichiei Narita. Significant association between renal function and area of amyloid deposition evident in kidney biopsy specimens in both AA amyloidosis associated with rheumatoid arthritis and AL amyloidosis. The XVth International Symposium on Amyloidosis. 2016年7月6日,スウェーデン。

黒田 毅、長谷川 絵理子、野澤 由貴子、佐藤 弘恵、中枝 武司、和田 庸子、中野 正明、成田 一衛。AA アミロイドーシスと生物学的製剤。第59回日本腎臓学会学術総会。2016年6月19日、横浜。

黒田 毅、小林 大介、若松 彩子、高井 千夏、佐藤 弘恵、中枝 武司、和田 庸子、中野 正明、成田 一衛、山田 俊幸。尿沈渣におけ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。第60回日本リウマチ学会総会・学術集会。2016年4月23日、横浜。

黒田 毅。関節リウマチに合併するAAアミロイドーシスとALアミロイドーシスの腎生検組織におけるアミロイド沈着量、臨床所見、腎組織所見の検討。第4回日本アミロイドーシス研究会学術集会。2016年8月19日、東京。

黒田 毅、佐藤 弘恵、中枝 武司、和田 庸子、村上 修一、中野 正明、山田 俊幸、成田 一衛。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 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会。2014年4月24日、東京。

黒田 毅、山崎 美穂子、佐藤 弘恵、中枝 武司、和田 庸子、村上 修一、中野 正明、成田 一衛。関節リウマチ合併アミロイドーシスの血液透析導入後の生命予後に対する生物学的製剤の影響。第57回日本リウマチ学会総会・学術集会。2013年4月18日、京都。

〔図書〕(計 1 件)

Takeshi Kuroda, Yoko Wada, Masaaki Nakano. Diagnosis and Treatment of AA Amyloidosis with Rheumatoid Arthritis: State of the Art. In Dali Feng (ed), Amyloidosis, InTech. Croatia, 2013, p187-212.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 毅 (KURODA Takeshi)
新潟大学・保健管理センター・准教授
研究者番号：00372475

(2) 研究分担者

中枝 武司 (NAKATSUE Takeshi)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：20464000

和田 庸子 (WADA Yoko)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：30608534

山田 俊幸 (YAMADA Toshiyuki)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：50211636