

Toshiyuki YAMADA

Department of Clinical Pathology,
Juntendo University School of Medicine

要 旨

2次性アミロイドーシスは関節リウマチを始めとした慢性炎症疾患に続発し、予後を左右する重要な合併症の一つである。一方、高脂血症治療薬として広く使われているフィブラート系薬剤は、近年その抗炎症作用が注目されている。今回、我々は、フェノフィブラートの2次性(炎症性)のアミロイド沈着及びその前駆物質である血清アミロイドA(SAA)に対する影響をマウスモデルを用い検討した。その結果、フェノフィブラートは容量依存性に臓器アミロイド沈着及び血中SAA濃度を抑制し、さらに、*in vitro*において、単球からの炎症サイトカインの産生及び肝細胞からのSAA産生のいずれをも抑制した。フェノフィブラートは2次性アミロイドーシスの予防だけでなく、広く炎症制御に関わる可能性が示唆された。

キーワード：2次性アミロイドーシス、血清アミロイドA、フェノフィブラート、炎症性サイトカイン

背景と目的

2次性アミロイドーシスは関節リウマチを始めとした慢性炎症性疾患に続発し、患者の予後を左右する重要な合併症の一つである。これはAA蛋白からなる不溶性線維の臓器・組織への沈着であり、AA蛋白の前駆物質は血清アミロイドA(SAA)である。SAAは急性期蛋白の一つで、主にインターロイキン1(IL-1)、IL-6、TNF- α などの向炎症性サイトカインの刺激で産生される。AAアミロイドの沈着には遺伝的背景の関与も重要であることが明らかになりつつあるが、本質的には炎症に伴うSAAの持続的産生の亢進が原因とされる。一方、フェノフィブラートは高脂血症治療として広く使われており、特に中性脂質を強力に低下させることで知られている。近年、フィブラート系薬剤が脂質代謝だけでなく、炎症制御に関わることが明らかになり、*in vivo*、*in vitro*においてサイトカインをはじめとした炎症関連物質を抑制することが報告された^{1)–3)}。

そこで今回我々は、フェノフィブラートが炎症状態下での血中SAA増加を抑制できれば、その結果2次性アミロイド沈着を抑制できるのではないかと仮説を立て、これをマウスモデルを用いて

検討した。さらに、培養細胞でのフェノフィブラートの炎症性サイトカイン産生及びSAA産生に対する影響を検討した。

方法と結果

1. マウス・アミロイドーシスモデルに対するフィブラート投与実験

9週令雌CBAマウスを群分けし、それぞれの群に対し異なる濃度(0%, 0.05%, 0.1%, 0.2%)でフェノフィブラート粉末を含有した固形飼料の投与を開始した(−7日目)。1週間の前投与期間ののち(10週令時; 0日目)にアミロイド感作を行った。アミロイドの感作はアミロイド担体臓器よりグリセロール抽出したアミロイドエンハンシングファクター(AEF)とフロイントコンプライートアジュバント(CFA)の単回腹腔内投与法を用いた。アミロイド感作後も各群決められた濃度での薬の投与を実験終了時まで継続した。感作して2週後(14日目)脾臓を採取し、組織切片を作成した。脾臓におけるアミロイド沈着の程度を0–4点でスコア化し評価した。また、−7, 0, 2, 7, 14日目(屠殺時)に採血を行い、血漿を分離後、SAAをELISA法で測定した。さらに14日

表1 脾臓組織アミロイド沈着スコア

| Group | Number of mice | | | | | Average (mean±SEM) |
|----------------|----------------|---|---|---|---|-----------------------|
| | Score | | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 0 %ff (n=10) | | | | 8 | 2 | 3.2±0.1 |
| 0.05%ff (n=9) | | 1 | 5 | 3 | | 2.2±0.2* |
| 0.1 %ff (n=10) | 2 | 4 | 2 | 2 | | 1.4±0.3* |
| 0.2 %ff (n=10) | 5 | 5 | | | | 0.5±0.2** |

* $p < 0.005$, ** $p < 0.0001$ vs. ff (0%) mice in the same group.

AEF, amyloid enhancing factor; FCA, Freund's complete adjuvant; ff, fenofibrate

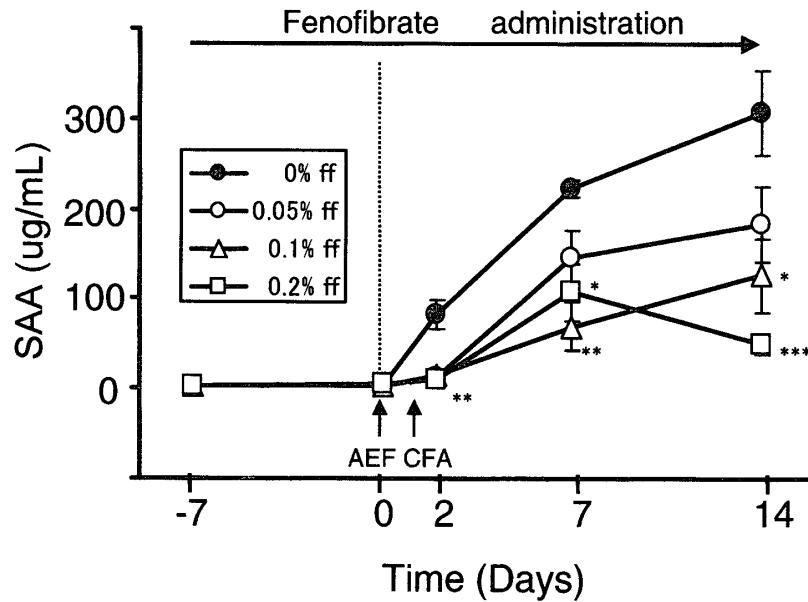


図1

アミロイド感作後の血清アミロイド A (SAA) 上昇はフェノフィブラート投与群でほぼ容量依存性に抑制されていた。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0005$ vs. 0 % ff mice.

目の血漿を用い、血中フェノフィブリン酸（フェノフィブラートの活性代謝物）濃度を高速液体クロマトグラフィー法で測定した。以下の結果が得られた。脾臓組織評価では、フィブラート投与により容量依存性にアミロイド沈着が抑制された（表1）。また、血中 SAA 濃度もフィブラート投与によりほぼ容量依存性に抑制されていた（図1）。さらにフィブラート投与群では腹水や腹腔内癒着などの肉眼的炎症所見が軽減されていた。14日目

の血中フェノフィブリン酸濃度は経口投与したフェノフィブラート濃度と相関していた（データは示さない）。

2. 培養細胞に対するフェノフィブリン酸の添加実験

①RAW264 細胞からの IL-1 β , IL-6 産生に対する影響

マウスの単球系細胞として樹立された RAW264 に対し、lipopolysaccharide (LPS) 100ng/ml, 同

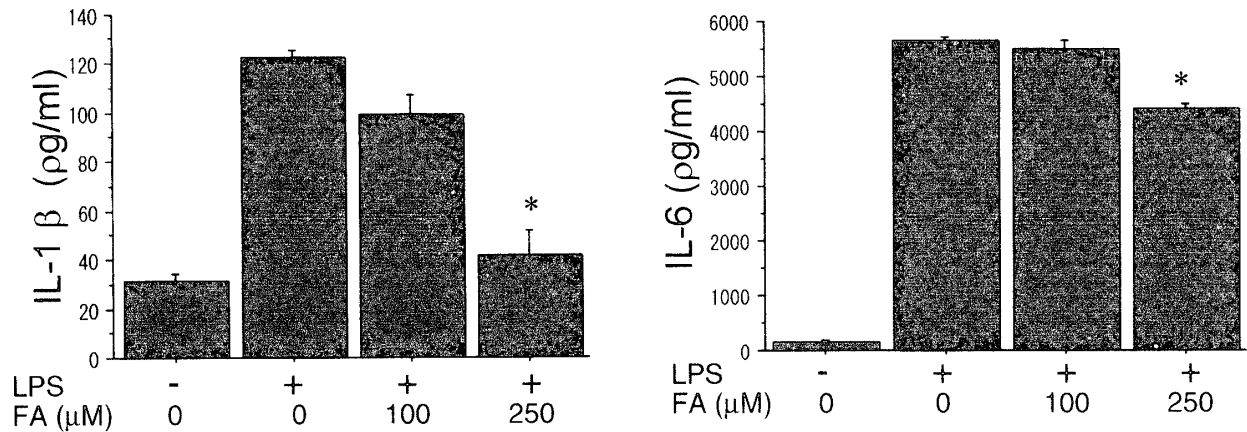


図2

Lipopolysaccharide (LPS) 刺激 24 時間後の RAW264 細胞培養上清中 IL-1 β 及び IL-6 (B) 濃度はいずれもフェノフィブリン酸 (FA) 添加により抑制された。

* $p < 0.05$ vs. FA 0 μ M

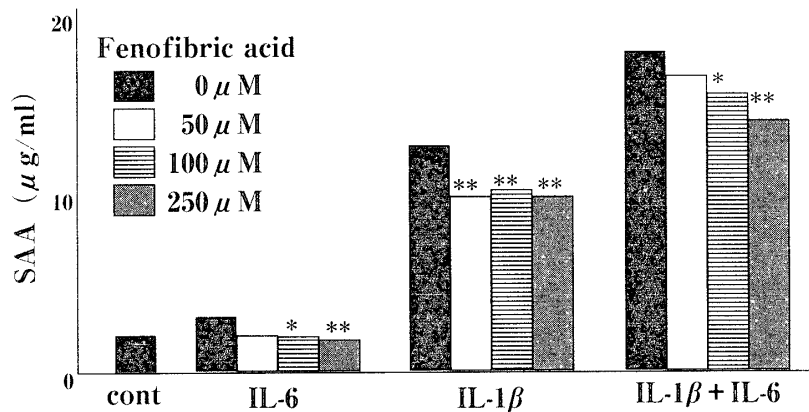


図3

IL-1 β , IL-6 刺激 48 時間後の HepG2 細胞培養上清中の SAA 濃度はフェノフィブリン酸添加により抑制された。

* $p < 0.001$, ** $p < 0.0005$ vs. FA 0mM

時にフェノフィブリン酸を 0, 100, 250 μ M の濃度で加えた。24 時間培養後の培養上清中の IL-1 β 及び IL-6 を ELISA 法で測定した。LPS 刺激による IL-1 β , IL-6 の産生は 250 μ M のフェノフィブリン酸で有意に抑制された (図 2-A, B)。

② HepG2 細胞からの SAA 産生に対する影響

ヒト hepatoma 由来の樹立細胞である HepG2 に対しヒトリコンビナント IL-1 β : 25ng/mL, IL-6 25ng/mL をそれぞれ単独あるいは同時に添

加し、同時にフェノフィブリン酸を 0, 50, 100, 250 μ M の濃度で添加した。48 時間培養後に上清を回収し、SAA を ELISA 法で測定した。その結果 SAA 産生はフェノフィブリン酸の添加により有意に抑制された (図 3)。

考察とまとめ

実験 1 の結果より、フェノフィブリン酸はマウ

ス炎症モデルにおける血中 SAA の増加を抑制することにより、臓器アミロイド沈着を予防したと考えられる。またその効果は容量依存性であった。さらに、フェノフィブラートは腹水や腹腔内癒着などの肉眼的炎症所見をも抑制していた。実験 2 では、フェノフィブリン酸は炎症刺激による単球系細胞からの向炎症性サイトカインの産生及び向炎症性サイトカイン刺激による肝細胞からの SAA 産生いずれをも抑制していた。これは実験 1 の結果を支持するものであった。また、SAA だけでなく、IL-1 β や IL-6 などのサイトカインを抑制することからアミロイドーシスのみでなく、広く炎症制御に関わる可能性もあった。フェノフィブラートは核内転写因子 PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor α) の activator として知られており、PPAR α の活性化を介して脂質代謝、あるいは炎症制御に関わることが報告されている²⁾⁴⁾。今回の結果に対する PPAR α の関与について更なる研究が望まれる。

本文の要旨は、第 584 回 新潟医学会 シンポジウム 関節リウマチの診療 — 最近の進歩 (2002 年 10 月 19 日) で発表した。また、結果の一部は *Arthritis & Rheumatism* 2002; 46, 1683-1688. で報告している。

文 献

- 1) Madej A, Okopien B, Kowalski J, Zielinski M, Wysocki J, Szygula B, Kalina Z and Herman ZS: Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia II b. *Int J Clin Pharmacol* 36: 345-349 1998.
- 2) Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Pineda Torra I, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC and Najib J: Activation of human aortic smooth muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* 393: 790-793 1998.
- 3) Kockx M, Gervois PP, Poulain P, Derudas B, Peters JM, Gonzalez FJ, Princen HM, Kooistra T and Staels B: Fibrates suppress fibrinogen gene expression in rodents via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Blood* 93: 2991-2998 1999.
- 4) Staels B, Schnoojans K, Fruchart JC and Auwerx J: The effects of fenofibrates and thiazolidiones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). *Biochimie* 79: 95-99 1997.