

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
総括研究報告書

アミロイドーシスに関する調査研究

主任研究者 山田 正 仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科) 教授

研究要旨 アミロイドーシス各病型 [①AL、②AA、③家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)、④透析、⑤脳 (アルツハイマー病 (AD)、脳アミロイドアンギオパチー (CAA))] ごとの戦略および全病型に共通する基盤的研究により、疫学調査、治療プロトコル確立、新規診断・予防・治療法開発を行った。臨床個人調査票に基づきアミロイドーシスの疫学を明らかにした。AL では中等量メルファランによる寛解導入療法と自家末梢血幹細胞移植療法からなる新規治療プロトコルによる全国多施設臨床試験を開始し、安全性を確認した。AA では世界初の抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブによる AA アミロイドーシスに対する臨床試験のプロトコルを作成、全国多施設参加体制を構築した。FAP では、TTR Y114C 変異に伴う遺伝性 CAA で肝移植が有効であったが、一方、ドミノ肝移植で FAP 肝を移植された患者が医原性アミロイドニューロパチーを発症した。透析アミロイドーシスではアミロイド形成促進にリゾリン脂質が関与することを明らかにし、 β 2M 高発現モデルマウスを作製した。脳アミロイドーシスでは γ セクレターゼ活性に関与する presenilin 複合体の新たな構成因子 TMP21 を同定、NSAIDs の新たな抗アミロイド作用を発見、モデルマウスにおける末梢 A β クリアランスの低下を明らかにした。アミロイドイメージング開発研究を行い、アミロイドーシス全病型のイメージングに利用しうるプローブ化合物 BF-227 の有用性を示した。

分担研究者

下条文武	新潟大学医歯学総合病院第二内科 教授	血液病態制御学 講師 吉崎和幸 大阪大学保健センター 教授
池田修一	信州大学医学部内科学脳神経内科、 リウマチ・膠原病内科 教授	東海林幹夫 弘前大学医学部附属脳神経血管病態 研究施設神経統御学部門 教授
樋口京一	信州大学医学部大学院医学研究科 加齢生物学分野 教授	麻奥英毅 広島赤十字病院・原爆病院検査部 部長
玉岡 晃	筑波大学人間総合科学研究科病態制 医学 教授	石原得博 山口大学大学院医学系研究科情報解 析医学系学域病理形態分野 教授
高市憲明	虎の門病院腎センター内科 部長	河野道生 山口大学大学院医学系研究科細胞シ グナル解析学 教授
山田俊幸	自治医科大学臨床検査医学 助教授	奥田恭章 道後温泉病院リウマチセンター内科 部長
前田秀一朗	山梨大学大学院医学工学総合研究部 生化学講座第一教室 教授	安東由喜雄 熊本大学医学部大学院医学薬学研究 部病態情報解析学 教授
内木宏延	福井大学医学部医学科病因病態学講 座分子病理学領域病理学 教授	中里雅光 宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸 内分泌代謝学分野 教授
今井裕一	愛知医科大学医学部内科学講座腎臓 ・膠原病内科 教授	工藤幸司 東北大学先進医工学研究機構高度情 報通信分野 教授
葛原茂樹	三重大学大学院医学系研究科生命医 科学専攻神経感覚医学講座神経病態 内科学 教授	水澤英洋 東京医科歯科大学大学院医歯学総合 研究科脳神経病態学 教授
島崎千尋	京都府立医科大学大学院医学研究科	

A. 研究目的

アミロイドーシスの分子病態に基づく早期診断・治療法の確立を目的とする。そのために、アミロイドーシス病型ごとの戦略並びに全病型共通の発症機構の基盤的研究により、本症の発症状況の把握と共に、早期診断、治療成績の向上、新規診断、予防・治療法の開発を行う。研究成果は、本症に悩む多数の患者、さらには多数の発症リスク保有者に対する医療、保健に貢献する。

1) **AL アミロイドーシス**：従来報告されてきた本症診断後の 50 % 生存は約 1 年である。本症に対する治療法として自家末梢血幹細胞移植併用療法が注目されている。本研究では、自己末梢血幹細胞移植併用療法の有用性を高める新規プロトコルを確立するために、新規プロトコルによる全国多施設臨床試験を実施する。さらに、AL の分子病態解明に基づく新規診断・治療法開発研究を行う。

2) **AA アミロイドーシス**：関節リウマチ (RA) 患者の 5-10% は本症を発症し、本症合併した場合の予後は不良である。リウマチ性疾患における本症発症の危険因子の解明、早期診断・治療指針の作成、分子病態解明に基づく抗サイトカイン療法の確立をめざす。

3) **家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)**：本症の根本治療には肝移植があるが、その有効性や問題点を明らかにすること、肝移植が適用できない患者にも応用可能な治療法の開発が必要である。肝移植の最適化、トランスサイレチン (TTR) 沈着機構の解明とその制御により、新規予防・治療法開発をめざす。

4) **透析アミロイドーシス**：長期透析患者数と共に本症は増加している。本症合併の危険因子同定、早期発見法確立、治療成績の向上、 β_2 -ミクログロブリン (β_2 -m) 線維形成過程の解明による新規治療法開発をめざす。

5) **脳アミロイドーシス**：アルツハイマー病 (AD) は認知症の過半数を占め、脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は高齢者の脳葉型出血の主要な原因である。本研究では AD、CAA 脳に蓄積するアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) の沈着過程の分子病態解明を通じ、アミロイドを標的とした新しい早期診断マーカー、新規予防・治療法の開発を行う。

6) **アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発**：各種アミロイドーシスに共通するアミロイド沈着機構を統合的に研究し、診断、予防・治療法への応用を行う。特に、特異的プローブを用いたアミロイドイメージングは診断への応用が期待される。また、アミロイドーシスの一種であるプリオン病では疾患の伝播が大きな問題となっている。プリオン病に限らず、アミロイドーシス全体に渡って、アミロイドによるアミロイドーシス発症促進 (“伝播”) 現象が見出されており、その機序の解明は、食品や環境の安全確保上重要である。

B. 研究方法

1) **アミロイドーシスの疫学**：特定疾患治療研究事業の臨床調査個人票に基づき、本症の疫学調査を行った (山田正仁)。

2) **AL アミロイドーシス**：

① **新規プロトコルによる臨床試験**：中等量メルファランによる寛解導入療法と自家末梢血幹細胞移植療法による新しい臨床試験を実施した (島崎、高市ほか)。心不全を有する高リスク例に対する risk adapted approach による自家造血幹細胞移植併用メルファラン大量療法の中期的効果を検討した (麻奥)。

② **BJP 蛋白の解析**：アミロイド原性を解明するため、AL 患者の尿中 BJP を解析した (今井)。

③ **抗 NF- κ B 治療法の開発**：アミロイド原性の免疫グロブリン L 鎖を産生する単クローン性形質細胞の抗 NF- κ B 活性化機構と活性の定量化を検討した (河野)。

④ **限局性 AL アミロイドーシス**：呼吸器系を侵すアミロイドーシス症例を検討した (池田)。

3) **AA アミロイドーシス**：

① **臨床的研究**：AA アミロイドーシスに対する抗 TNF α 抗体療法の有用性を検討した (奥田)。抗 IL-6 受容体抗体 (トシリズマブ) による治療成功例を報告した (奥田)。トシリズマブによる臨床試験プロトコルの作成、全国多施設共同臨床試験体制の構築を行った (吉崎ほか)。

② **基礎的研究**：本症の診断および発生病理の解明に有用な新規抗 SAA 抗体の開発を目的として、合成ペプチドを抗原とする抗 SAA 抗体の作製を

試みた(石原)。AA アミロイド前駆体である SAA の安定性を研究するために、SPR 法 (Biacore 社機器) を用いた SAA と HDL の結合親和性の解析を行った(山田俊幸)。AA アミロイドーシスマウスにおけるフェノフィブラートの効果を検討した(中里)。

4) FAP :

① FAP の病態及び肝移植に関する研究 : 未治療の Val30Met 型 FAP 患者 35 名の腹壁脂肪吸引生検の沈着アミロイドについて、Congo red 染色後のスライド標本より、アミロイド線維蛋白を抽出し、質量分析計(LC-MS/MS)により正常型 TTR(V30) と変異型 TTR(M30)の構成比を検索、さらに正常型と変異型の比について、発症年齢、生検時の年齢、罹病期間などの患者背景と比較検討した(池田)。また、Val30Met 以外の変異を有し、臨床的にも古典的な末梢神経障害や自律神経以外に、多彩な症状を呈する 2 症例を解析した(中里)。TTR Y114C 変異を有する FAP 患者は遺伝性 CAA を呈するが、本変異を有する患者に対する肝臓移植の効果について検討した(安東)。ドミノ移植で FAP 肝を移植されたレシーピエントをフォローした(安東)。

② FAP の発症機構解明および新規治療法開発に関する基礎的研究 : アミロイド原性トランスサイレチン (ATTR) の代謝動態を生体で解析するため ATTR V30M 遺伝子を導入したトランスジェニック (TG) ラットを開発・解析した(安東)。

5) 透析アミロイドーシス :

① 臨床的研究 : 透析アミロイドーシスの発症に関係する因子を明確にするために、透析患者で手根管開放術を受けた患者要因を解析し(高市)、長期透析患者の臨床病態を調査した(下条)。

② 基礎的研究 : *In vitro* β 2-m アミロイド線維形成系を用い、種々のリゾリン脂質の β 2-m アミロイド線維伸長促進効果、機序を解析した(内木)。ヒト β 2M を高発現する 2 系統の transgenic (Tg) マウスを作製し、さらにこれらの Tg マウスと β 2M knockout マウスとの交配によって、ヒト β 2M のみを高発現するモデルマウスを作製した(樋口)。

6) 脳アミロイドーシス :

① A β アミロイド沈着分子病態解明と AD 診断治療法開発 : 複数の培養細胞に対し複数の ER スト

レスを付加し、 γ セクレターゼ構成因子 (presenilin、Aph-1) の量的変化を測定した(水澤)。動物実験や疫学調査の結果より、スタチンにアルツハイマー病 (AD) の発症抑制作用が示唆されており、スタチンの脳内 A β に対する影響を検討するために、スタチン服用群における髄液 A β 分子種を解析した(玉岡)。疫学研究で抗 AD 効果が注目されている非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) の抗アミロイド効果の有無を明らかにするため、生体条件試験管内モデルを用いて、NSAIDs (ibuprofen、aspirin、flurbiprofen、diclofenac sodium salt、ketoprofen、indomethacin、sulindac sulfide、naproxen、meclofenamic acid sodium salt) が、A β 線維 (fA β) 形成過程および既成 fA β 不安定化過程に及ぼす作用を解析した(山田正仁)。さらに、抗アミロイド効果の分子機構を明らかにするため、蛍光光度計、分光光度計、原子間力顕微鏡、SDS-PAGE、表面プラスモン共鳴 (surface plasmon resonance (SPR)) 解析を用いて、polyphenols が A β や fA β 形成・不安定化過程に及ぼす分子間相互作用を *in vitro* で検討した(山田正仁)。血液中の A β 42 はリポ蛋白結合型・非結合型が約 9:1 の割合で存在しているが、両分子種とも肝臓を主要代謝臓器としている。血液中の A β クリアランス (末梢性) は、受動免疫療法の治療効果発現を左右しうる重要な因子と考えられるため、血液から肝臓を介し胆汁へと排泄された A β を指標に、末梢性 A β クリアランスを AD モデルマウス (Tg2576) で検討した(東海林)。Tg2576 と無 TTR マウスまたは無血清アミロイド P 成分 (APCS; SAP) マウスを交配させて得た TTR または SAP 欠損 Tg2576 (Tg2576/TTR^{-/-} または Tg2576/SAP^{-/-}) と対照ヘテロ接合体 Tg2576 (Tg2576/TTR^{+/-} または Tg2576/SAP^{+/-}) を用いて、AD の脳 A β 沈着に TTR や SAP がどう関与するかを解析した(前田)。

② CAA に関する研究 : MRI gradient-echo 法 (T2*) を用いて高齢者の cerebral microbleeds (CMBs) を検討し、CAA の意義に関して考察した(葛原)。

③ BRI2 遺伝子変異による脳アミロイドーシス : 家族性デンマーク型認知症 (FDD) は BRI2 遺伝子変異による常染色体優性早期発症認知症であり、ADan と A β から成るプレアミロイドと血管アミ

ロイドの沈着、神経原線維変化並びに典型的老人斑の欠如を特色とする。本症における ADan と A β の沈着機序を明らかにするため、凍結剖検脳から ADan と A β を抽出し生化学的に解析した（玉岡）。

7) **アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発**：マウス老化アミロイドーシスにおけるアミロイド線維形成機構、グリコサミノグリカン (GAG) 等の生体内高分子の影響を解析した（樋口）。アミロイドイメーキング開発の目的で、アミロイドーシス動物モデルのアミロイドとプローブ候補化合物との結合性を検討した（工藤）。

（倫理面への配慮）

患者を対象とする臨床研究（診断、治療、遺伝子解析等）、疫学研究等については各施設の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。遺伝子組み換え動物を含む動物実験に関しては、各施設の指針に基づき動物実験委員会等の承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

1) **アミロイドーシスの疫学**：2003-2005 年度には受給者数は約 1000 名／年であった。2004 年度で個人票データが利用可能であった 657 例をみると、免疫グロブリン性および老人性 TTR 性が 76.9%、家族性 11.3%、分類不能 11.8%であった。家族性は 72%が TTR 型と記載され、その中では Val30Met 変異が最も多かった。家族性アミロイドーシスの都道府県別有病率（人口 100 万対）の推計では、長野(11.9)、熊本 (10.3)、石川 (3.6) の順であった。

2) **AL アミロイドーシス**：

① **新規プロトコールによる臨床試験**：中等量メルファランによる寛解導入療法と自家末梢血幹細胞移植療法からなる原発性 AL アミロイドーシス治療プロトコールを作成し、全国 11 施設からなる臨床試験体制（班員 5 名及び研究協力者 9 名が参加）を構築し、これまでに 6 名の患者登録を終了した。臓器病変は腎（5 例）、消化管（3 例）、神経（2 例）、心臓（1 例）であった。寛解導入療法において grade3 以上の重篤な非血液毒性はみ

られなかった。採取 CD34+細胞数は 2~5 回のアフレーシスで計 0.08~2.27 x 10⁶/kg であり、6 例中 2 例でのみ目標 CD34+細胞数 (2 x 10⁶/kg) を採取し得た。採取不良例では他の幹細胞動員療法が行われ、現時点で 3 例に自家末梢血幹細胞移植が行われた。

心不全を有する AL アミロイドーシス患者 3 例に対し risk adapted approach による自家末梢血幹細胞移植療法併用メルファラン大量療法 (HDM/SCT) を試みた。2 例では double HDM/SCT を行い、2 例は CR、1 例は near CR を得た。それぞれ HDM/SCT 後 2 年 10 ヶ月、2 年 8 ヶ月、1 年 6 ヶ月経過しており、全例緩解を維持し、3 例とも臓器障害の改善、著明な QOL の改善をみとめた。また沈着アミロイドの消失の可能性も確認した。

② **BJP 蛋白の解析**：FIVMTQSP の配列を確認した。

③ **抗 NF-k B 治療法の開発**：骨髓腫細胞株における恒常的 NF-k B 活性は主に RelB/p50 によると考えられた。NF-k B 活性の定量的マーカーとして CD54 に注目した。AL アミロイドーシスを含む MGUS では CD54 発現の強度は、正常骨髓形質細胞と同程度あるいはそれ以上であり、骨髓腫細胞では CD54 発現は減弱していた。

④ **限局性 AL アミロイドーシス**：呼吸器系を侵すアミロイドーシス 12 例は FAP1 例を除き全例 AL であった。AL は全身性 1 例を除き限局性であった。限局性 AL の 2 例では肺外にもアミロイド結節がみられた。

3) **AA アミロイドーシス**：

① **臨床的研究**：AA 合併 RA に対する抗 TNF α 抗体（インフリキシマブ）療法の有用性の検討では、RA 活動性指標の DAS28-CRP は、投与前平均 5.96 から最終観察時平均 2.69 へ低下し、4 例中 3 例が good response であった。治療前 SAA の平均は 344.45 μ g/ml であった。治療中における計 50 回のインフリキシマブ投与前の SAA は平均 88.61 μ g/ml であり、このうち投与前平均値の正常化例は 1 例のみであった。AA アミロイドーシスによる臓器障害の進行は観察期間中認めなかった。一方、抗 IL-6 受容体抗体（トシリズマブ）により著明な SAA 抑制効果及び臨床効果を認めた臨床例を報告した。トシリズマブによる AA 合併 RA

及びキャスルマン病に対する臨床試験プロトコルの作成、班員 11 名及び研究協力者 8 名が参加する全国多施設共同臨床試験体制を構築した。

②基礎的研究：本症の診断および発生病理の解明に有用な 4 種の抗 SAA 抗体を作製した。SAA と HDL の結合親和性の解析を行い、ヒト SAA1 各アイソタイプ間でヒト HDL との親和性に差を認めた。本症モデルマウスにフェノフィブラートを投与すると、SAA1, 2, 4 の遺伝子発現が有意に低下し、脾臓でのアミロイド沈着も認められなかった。また、飽和脂肪酸の β 酸化関連酵素の遺伝子発現が正常化した。

3) FAP :

① FAP の病態及び肝移植に関する研究：Val30Met 型 FAP のアミロイドの正常型 TTR(V30) と変異型 TTR(M30) の構成比をみると、発症年齢、生検時年齢が高くなると正常型の比率が高くなった。Val30Met 以外の変異として、Val71Ala (国内初)、Val94Gly (世界初) を同定した。TTR Y114C 変異を有する遺伝性 CAA で、肝移植群は非移植群より生存率が高く、脳出血の発症が抑制されていた。ドミノ移植で FAP 肝を移植されたレシピエントが移植 7 年後にニューロパチーを発症した (Am J Transplant 6:2512, 2006)。

② FAP の発症機構解明および新規治療法開発に関する基礎的研究：アルブミンをプロモーターとしてヒト ATTR V30M をラットに遺伝子導入し、肝臓、脳、眼を含めた諸臓器でヒト ATTR の発現が確認された。質量分析装置を用いた解析から、TG ラットの血中ヒト ATTR はラット TTR と四量体を形成していると考えられた。高齢 TG ラットの消化管にヒト ATTR の沈着が確認されたが、現在までのところアミロイド沈着は認められていない。正常肝を TG ラットに移植すると、血清ヒト ATTR 濃度が検出感度以下に低下した。

4) 透析アミロイドーシス :

①臨床的研究：維持透析入院患者は年々増加傾向にあり、特に透析歴 20 年以上の長期透析患者の割合が増加した。透析歴が長期化するにしたがって破壊性脊椎関節症 (DSA) の手術目的に入院する割合が増加した。更に透析期間が長期化すると、手根管症候群 (CTS)、DSA、アミロイド関節症の

いずれかの手術の既往のある患者の割合が増加した。透析患者で手根管開放術症例の患者背景を検討すると、透析導入時の年齢が高齢 ($p < 0.001$)、および原疾患が糖尿病性腎症 ($p < 0.01$) であることが初回手根管開放術までの透析期間と有意に相関した。

②基礎的研究：In vitro β 2-m アミロイド線維形成系を用い、リゾフォスファチジン酸、リゾフォスファチジルグリセロールが線維伸長促進効果を明らかにした。その効果はリゾフォスファチジン酸が β 2-m モノマーに結合し、その立体構造を部分的に崩すこと、及び線維表面に結合し脱重合を抑制することによると考えられた。さらに、血液透析患者の血漿リゾフォスファチジン酸濃度は、正常対照群と比べて有意に増加していた。ヒト β 2M を高発現する Tg マウス、ヒト β 2M のみを高発現するモデルマウスを作製に成功した。これらのマウスは透析患者の数倍の血清 β 2M 濃度を示した。試験管内で作製した A β 2M アミロイド線維及びマウス AApoAII アミロイド線維を静脈に投与すると、AApoAII アミロイドの沈着および non-fibrillar な β 2M 沈着が皮膚に認められた。

5) 脳アミロイドーシス :

① A β アミロイド沈着分子病態解明と AD 診断治療法開発： γ セクレターゼ活性を modulate する presenilin 複合体の構成因子として TMP21 を同定した。複数の培養細胞に対し複数の ER ストレスを付加し、 γ セクレターゼ構成因子の量的変化を測定したところ、全長型 presenilin の有意な増加と全長型 Aph-1 の有意な減少を認めた。スタチン服用群における髄液 A β 分子種を解析したところ、スタチン服用群と非服用群との間で有意差は認められず、また、ステロイド服用の有無による効果も求められなかった。NSAIDs が fA β 形成過程および既成 fA β 不安定化過程に及ぼす作用を解析したところ、NSAIDs は濃度依存性に fA β 形成反応を抑制し、かつ既成 fA β を不安定化した。polyphenols が A β や fA β 形成・不安定化過程に及ぼす分子間相互作用を in vitro で検討したところ、polyphenols は (1) 酸化型は非酸化型よりも強力に fA β 形成を阻害し、(2) 三次元蛍光光度解析では fA β 存在下で新しい蛍光ピークを示し、(3) SPR 解析では fA β に対して強力な結合・解離反応を示し

た。末梢性 A β クリアランスを AD モデルマウス (Tg2576) で検討したところ、高齢群 Tg2576 において、コントロールマウス(non-Tg)に比し、A β 胆汁排泄低下を認めた。一方、著しい高 A β 血症を呈す膵臓アミロイド沈着マウス(Tg0304)においては、non-Tg を凌ぐ A β 胆汁排泄が高齢群でも保たれていた。Tg2576/TTR^{+/+}または Tg2576/SAP^{+/+}を用いて、AD の脳 A β 沈着に TTR や SAP がどう関与するかを解析したところ、TTR は Tg2576 の脳内 A β アミロイドの沈着を抑制せず、SAP は Tg2576 の脳内 A β アミロイドの沈着を促進しなかった。

②CAA に関する研究： MRI gradient-echo 法(T2*) 上、CMBs 陽性例は 81/398 例(20.4%)で、うち、皮質・皮質直下のみに CMBs が認められる症例は 23.5%で、その基礎疾患においてはアルツハイマー病(AD)が 31.5%と高率だった。また、AD における CMBs 出現率は 12%でコントロールと差はないが、皮質・皮質直下型が 66.7%を占め、特に白質変性の強い症例に多かった。一方、definite CAA では 3/4 例(75%)が皮質・皮質直下型であり、皮質・皮質直下のみに出現する CMBs は CAA による可能性が考えられた。

③BRI2 遺伝子変異による脳アミロイドーシス： FDD 脳の非線維性沈着物は全長 ADan 分子から成り、その N 末端は約 60%がピログルタミン酸化(ピロ化)され、主要 A β 分子種は A β 1-42/4-42 であった。アミロイドの分画では、ADan は高度に重合し、N/C 両末端側で切断され、切断を免れた N 末端の殆どがピロ化されていた。皮質・血管共に主要 A β は A β 4-42 で A β x-40 はわずかであった。ADan-A β 結合の特異性が合成ペプチドによるリガンドブロットにより示された。

6) アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発： マウス apoA-II のアミロイド線維の形成は N 末と C 末配列の相互作用によって 2 次構造が変化し、アミロイド線維が形成することが示唆された。また、線維形成が困難な中性条件下であっても、グリコサミノグリカン (GAG) 等の生体内高分子が線維形成を促進すること、GAG は線維の安定化には寄与しないことも明らかにした。

アミロイドイメージング用プローブの探索研究では、BF-227はモデルマウス腎臓の糸球体に蓄積

したアミロイド蛋白を特異的に染色し、また同モデルマウス脾臓におけるオートラジオグラフィにおいては¹¹C]BF-227はアミロイド蛋白に特異的に結合した。

D. 考察

1) アミロイドーシスの疫学：近年の本症による特定疾患受給者数は約 1000 名/年であり、過去 20 年以上に渡り増加を続けており、本症に対する認識が高まり診断が増加していることが示唆される。臨床調査個人票によるデータは、受給対象が免疫グロブリン性および老人性 TTR アミロイドーシス、家族性アミロイドーシスに限られていることからこれらの病型に限定されていること、特定疾患を申請しない患者は含まれないこと、都道府県によるデータの電子入力率が 6 割程度に留まっていることなどの制約を受けている。興味深いことには、家族性アミロイドーシスの都道府県別有病率(人口 100 万対)をみると、長野、熊本、石川の順に高く、石川は長野、熊本に次ぐ集積地である可能性が示唆される。

2) AL アミロイドーシス：中等量メルファランによる寛解導入療法と自家末梢血幹細胞移植療法からなる原発性 AL アミロイドーシスの新規治療プロトコルを作成し、全国 11 施設が参加する臨床試験を開始した。中等量メルファランによる寛解導入療法は、安全性には問題ないことが明らかになった。しかし、幹細胞採取効率に問題が残り、より効率のよい幹細胞採取方法を確立することが重要と考えられた。幹細胞移植の有用性については今後の経過観察による評価が必要である。また、心不全を有する高リスク例に対する risk adapted approach による自家造血幹細胞移植併用メルファラン大量療法の有用性を示唆する結果を得た。

AL アミロイドーシスの新規治療戦略として、抗 NF- κ B 療法の開発をめざして研究が進行しているが、今後、形質細胞の生存能と NF- κ B 活性との関連等を解明していく必要がある。

呼吸器系に生じる限局性 AL アミロイドーシスの中には、多臓器に多発する結節性アミロイド沈着を来す例がある。こうした、多発性限局性 AL アミロイドーシスは全身性 AL アミロイドーシス

とは区別されなければならない注意すべき病態と考えられる。

2) AA アミロイドーシス : 抗 TNF α 抗体療法は本症治療に有用と思われるが、SAA の抑制効果はトシリズマブのほうが優れており、IL-6 阻害療法がより重要な治療戦略になると考えられた。そこで、トシリズマブによる AA 合併 RA 及びキャスルマン病に対する臨床試験プロトコールの作成、全国多施設共同臨床試験体制の構築を行った。これは世界初の臨床試験であり、本治療により難治性の本症が完全に制御されるようになることが期待される。

また、本症の基礎的研究として、4 種の抗 SAA 抗体を作製し、SAA と HDL の結合親和性の解析系を樹立、さらにフェノフィブラートの AA 予防効果を示した。これらは、本症の診断法開発、発生病理解明、予防治療法開発の足がかりとなる成果である。

3) FAP : Val30Met 型 FAP では加齢に伴い正常型 TTR(V30)の沈着が増加することが明らかになった。このことは老人性 TTR アミロイドーシスでは正常型 TTR が沈着することを考えると興味深い。国内初の Val71Ala 変異、世界初の Val94Gly 変異の FAP 患者を報告し、FAP の多様性や FAP 非典型例が見逃されている可能性があらためて示された。TTR Y114C 変異を有する遺伝性 CAA における肝移植の有効性が示されたことは重要である。TTR は脳脈絡叢からも産生されるため、中枢神経系へのアミロイド沈着には肝移植が有効ではない可能性も考えられていたが、肝移植の有効性を示す本研究成果は、この変異に伴う CAA では肝由来の血中の TTR が血液脳関門を越えて脳内に入り沈着している可能性を示している。ドミノ移植で FAP 肝を移植されたレシーピエントが移植 7 年後にニューロパチーを発症したことにより、FAP 肝のレシーピエントは、従来考えられていたより早くアミロイド沈着をおこすばかりでなく（昨年度報告）、医原性というべきアミロイドニューロパチーを発症することが明らかになった。

FAP の TTR Val30Met 変異を導入した TG ラットの作製に成功した。本モデルでは肝移植実験が容易であり、本 TG ラットは肝移植前後などの異

型 TTR 代謝動態の解析に有用と考えられる。

4) 透析アミロイドーシス : 透析の長期化、高齢であることが、CTS、DSA などを呈する本症合併の危険要因であることが確認された。透析の長期化、患者の高齢化の傾向は今後もますます強まるものと予想され、本症の予防、治療法の進歩、確立のニーズが高まるものと考えられる。

In vitro β 2-m アミロイド線維形成系を用いた実験で、リゾフォスファチジン酸、リゾフォスファチジルグリセロールが β 2-m 線維形成を促進する因子であることが示された。透析患者では血漿リゾフォスファチジン酸濃度が増加していることから、これらはアミロイド沈着の危険因子として作用しており、それらの制御は本症の治療、予防につながる可能性がある。

本症のモデルとなるヒト β 2M 高発現 Tg マウス作製に成功した。本マウスモデルは本症の病態解明、治療法開発上の有用なツールになることが期待される。

5) 脳アミロイドーシス : A β 産生酵素である γ セクレターゼ活性を修飾する presenilin 複合体の構成因子として新たに TMP21 を同定した (*Nature* 440:1208, 2006)。ER ストレスは全長型 presenilin の有意な増加と全長型 Aph-1 の有意な減少をもたらした。ER ストレス下では γ セクレターゼ活性が停止することが知られており、 γ セクレターゼ構成因子の量的変化は各 γ セクレターゼ構成因子が γ セクレターゼ以外の独自の機能を有しており、特定の ER ストレス状態で作用することを示唆している。

NSAIDs が濃度依存性に fA β 形成反応を抑制し既成 fA β を不安定化することを示し、NSAIDs の抗 AD 作用には、従来報告されていた抗炎症作用、抗 γ セクレターゼ作用の外に、抗アミロイド凝集作用があることが明らかになった。また、昨年度までに報告した polyphenols の抗 A β 凝集、や fA β 不安定化作用の機序を解析し、polyphenols は、A β monomer よりも fA β 線維構造に優先的かつ可逆的に結合することにより、抗アミロイド効果を及ぼすことが推定された。

AD モデルマウス (Tg2576) において末梢性 AB クリアランスは低下しており、それが脳からの中枢性 AB クリアランスを悪化させ、その病態を増

悪する可能性が考えられた。また、AD モデルマウスでの研究で、TTR は Tg2576 の脳内 AB 沈着を抑制せず、SAP は脳内 AB 沈着を促進しなかった。この結果はこれまで TTR 及び SAP のアミロイド沈着に対する作用として報告されてきたことに基づく予想とは異なる結果であり、これらの因子の *in vivo* における役割についてはさらなる検討を要する。

一般に CAA の生前診断は脳葉型出血以外には困難だが、MRI T2*画像の脳表層の CMBs に注目することにより無症候例の診断率が向上すると考えられ、CAA の診断に寄与するものと思われる。ADan・A β の両者が沈着している FDD 脳の解析により、ADan・A β 両分子の翻訳後修飾・切断が不溶性と重合性に関与し、それら分子の特異的相互作用が共沈着の機序の 1 つとして考えられた。

6) アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発：マウス老化アミロイドーシスにおける ApoA-II アミロイド線維形成機構のキーとなる構造が解明され、GAG 等の生体高分子の寄与が明らかになった。これらの生体高分子の修飾はアミロイドーシス全病型に共通する治療戦略となりうる。

アミロイドイメージング開発研究では、昨年度の成果と併せると、プローブ [¹¹C]BF-227 はアミロイドーシス診断用ツールとして高い有用性を有することが示唆された。今後、アミロイドーシス全病型の検出に有用なイメージングプローブとして臨床応用を進めていく予定である。

E. 結論

アミロイドーシス病型ごとの戦略および全病型に共通する基盤的研究により、疫学調査、治療プロトコル確立、新規診断・予防・治療法開発等を行った。臨床個人調査票に基づき AL、老人性 TTR、および家族性アミロイドーシスの疫学を明らかにした。AL では中等量メルファランによる寛解導入療法と自家末梢血幹細胞移植療法からなる新規治療プロトコルによる全国多施設臨床試験を開始し、安全性を確認した。AA では抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブによる AA アミ

ロイドーシスに対する世界初の臨床試験プロトコルを作成、全国多施設参加体制を構築した。FAP では、TTR Y114C 変異に伴う遺伝性 CAA で肝移植が有効であったが、一方、ドミノ肝移植で FAP 肝を移植された患者が医原性アミロイドニューロパチーを発症した。透析アミロイドーシスではリゾリン脂質によるアミロイド形成促進を発見し、 β 2M 高発現モデルマウスを作製した。脳アミロイドーシスでは γ セクレターゼ活性に関与する presenilin 複合体の新たな構成因子 TMP21 を同定、NSAIDs の新たな抗アミロイド作用を発見、モデルマウスにおける末梢 A β クリアランスの低下を明らかにした。アミロイドイメージング開発研究を行い、アミロイドーシス全病型のイメージングに利用しうるプローブ化合物 BF-227 の有用性を示した。

F. 健康危険情報

ドミノ肝移植で FAP 肝を移植されたレシーブエントが、移植 7 年後にニューロパチーを発症した（医原性アミロイドニューロパチー）（*Am J Transplant* 6:2512, 2006）。

G. 研究発表

（主要原著論文のみを下に示す。発表の詳細は分担研究報告を参照のこと）

- 1) Yamada M, Variant CJD Working Group, Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Committee, Japan: The first Japanese case of variant Creutzfeldt-Jakob disease showing periodic electroencephalogram. *Lancet* 367:874, 2006.
- 2) Iwata K, Fujiwara T, Matsuki Y, Akutsu H, Takahashi S, Naiki H, Goto Y: 3D structure of amyloid protofilaments of beta2-microglobulin fragment probed by solid-state NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18119-18124, 2006.
- 3) Zhang H, Sawashita J, Fu X, Korenaga T, Yan J, Mori M, Higuchi K: Transmissibility of mouse AApoAII amyloid fibrils: inactivation by physical and chemical methods. *FASEB J* 20:1012-1014, 2006.
- 4) Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K,

- Kanazawa I, Ihara Y: Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease: Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 15:2170-2182, 2006.
- 5) Korenaga T, Yan J, Sawashita J, Matsushita T, Naiki H, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Fu X: Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am J Pathol* 168:898-906, 2006.
- 6) Murakami T, Paitel E, Kawarabayashi T, Ikeda M, Chishti MA, Janus C, Matsubara E, Sasaki A, Kawarai T, Phinney AL, Harigaya Y, Horne P, Egashira N, Mishima K, Hanna A, Yang J, Iwasaki K, Takahashi M, Fujiwara M, Ishiguro K, Bergeron C, Carlson GA, Abe K, Westaway D, St George-Hyslop P, Shoji M: Cortical neuronal and glial pathology in TgTauP301L transgenic mice: neuronal degeneration, memory disturbance, and phenotypic variation. *Am J Pathol* 169:1365-1375, 2006.
- 7) Kihara M, Chatani E, Iwata K, Yamamoto K, Matsuura T, Nakagawa A, Naiki H, Goto Y: Conformation of amyloid fibrils of beta2-microglobulin probed by tryptophan mutagenesis. *J Biol Chem* 281:31061-31069, 2006.
- 8) Ban T, Morigaki K, Yagi H, Kawasaki T, Kobayashi A, Yuba S, Naiki H, Goto Y: Real-time and single fibril observation of the formation of amyloid beta spherulitic structures. *J Biol Chem* 281:33677-33683, 2006.
- 9) Adachi R, Yamaguchi KI, Yagi H, Sakurai K, Naiki H, Goto Y: Flow-induced alignment of amyloid protofilaments revealed by linear dichroism. *J Biol Chem*, 2007 (in press).
- 10) Liu S, Ishikawa H, Tsuyama N, Li FJ, Abroun S, Otsuyama KI, Zheng X, Ma Z, Maki Y, Iqbal MS, Obata M, Kawano MM: Increased susceptibility to apoptosis in CD45(+) myeloma cells accompanied by the increased expression of VDAC1. *Oncogene* 25:419-429, 2006.
- 11) Nozaki I, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Ono K, Shirasaki H, Komai K, Kitamoto T, Yamada M: The MM2-cortical form of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with visual disturbance. *Neurology* 67:531-533, 2006.
- 12) Okamoto M, Okano A, Akamatsu S, Ashihara E, Inaba T, Takenaka H, Katoh N, Kishimoto S, Shimazaki C: Rituximab is effective for steroid-refractory sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Leukemia* 20:172-173, 2006.
- 13) Otsuyama KI, Ma Z, Abroun S, Amin J, Shamsasenjan K, Asaoku H, Kawano MM: PPARbeta-mediated growth suppression of baicalein and dexamethasone in human myeloma cells. *Leukemia*, 2007 (in press).
- 14) Deguchi K, Tsuru K, Hayashi T, Takaishi M, Nagahara M, Nagotani S, Sehara Y, Jin G, Zhang H, Hayakawa S, Shoji M, Miyazaki M, Osaka A, Huh NH, Abe K: Implantation of a new porous gelatin-siloxane hybrid into a brain lesion as a potential scaffold for tissue regeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 1263-1273, 2006.
- 15) Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Han K, Song SY, St George-Hyslop P, Fraser PE: Transient abundance of presenilin 1 fragments/nicastrin complex associated with synaptogenesis during development in rat cerebellum. *Neurobiol Aging* 27:88-97, 2006.
- 16) Chatani E, Naiki H, Goto Y: Seeding-dependent propagation and maturation of beta2-microglobulin amyloid fibrils under high pressure. *J Mol Biol* 359:1086-1096, 2006.
- 17) Yamaguchi K, Naiki H, Goto Y: Mechanism by which the amyloid-like fibrils of a beta 2-microglobulin fragment are induced by fluorine-substituted alcohols. *J Mol Biol* 363:279-288, 2006.
- 18) Goto T, Yamashita T, Ueda M, Ohshima S, Yoneyama K, Nakamura M, Nanjo H, Asonuma K, Inomata Y, Watanabe S, Uchino M, Tanaka K, Ando Y: Iatrogenic amyloid neuropathy in a Japanese patient after sequential liver transplantation. *Am J Transplant* 6:2512-2515, 2006.
- 19) Ono K, Naiki H, Yamada M: The development of preventives and therapeutics for Alzheimer's disease

that inhibit the formation of beta-amyloid fibrils (fA β), as well as destabilize preformed fA β . *Curr Pharm Des* 12:4357-4375, 2006.

20) Hamaguchi T, Ono K, Yamada M: Anti-amyloidogenic therapies: strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 63:1538-1552, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願・取得

工藤幸司

1)コンフォメーション病診断および治療用の長

波長蛍光物質を含む組成。PCT/JP2006/323962。

2)コンフォメーション病の診断用プローブ。PCT/JP2006/325804。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし