

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))] など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、わが国の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実施し有用性を評価し、他の治療オプション (同種ミニ移植など) の有用性を報告した。AA では抗サイトカイン療法の有用性を示し、特に IL-6 受容体抗体トシリズマブが優れていたことから、本剤による AA アミロイドーシスに対する世界初の全国多施設臨床試験体制を確立した。FAP では新規集積地であることが判明した石川県の TTR Val30Met 型 FAP の特徴を明らかにし、Val30Met 型 FAP では加齢に伴い野生型 TTR 沈着が増加することを示し、更に治療薬開発に有用な *in vitro* の TTR アミロイド形成系を報告した。透析アミロイドーシスでは腎移植が症状の改善や進行の抑制に有用であることを明らかにし、遊離脂肪酸によるアミロイド形成促進を発見した。脳アミロイドーシスでは Aph-1 を介した γ セクレターゼ活性の調節機構、エストロゲンの抗アミロイド作用、抗 A β 40 抗体の治療的有用性、皮質微小出欠の CAA 診断上の意義等を明らかにし、有用な A β オリゴマー特異抗体およびモデル動物を作成した。老化アミロイドーシスマウスの ApoA-II アミロイド線維形成機構解明が進展した。アミロイドイメージング開発では、micro PET によるアミロイドーシスモデル動物におけるアミロイド画像化に成功し、臨床応用の段階に至った。

分担研究者

分担研究者	病院長
下条文武 新潟大学大学院医歯学総合研究科 内部環境医学講座 教授	島崎千尋 京都府立医科大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科 講師
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	吉崎和幸 大阪大学保健センター 教授 東海林幹夫 弘前大学大学院医学研究科附属脳神 経血管病態研究施設 脳神経内科学 講座 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・原爆病院検査部 部長 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
玉岡 晃 筑波大学人間総合科学研究科病態制 医学専攻 教授	河野道生 山口大学大学院医学系研究科細胞シ グナル解析学分野 教授 奥田恭章 道後温泉病院リウマチセンター内科 部長
高市憲明 虎の門病院腎センター内科 部長	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
山田俊幸 自治医科大学臨床検査医学 准教授	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
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	
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	
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	
葛原茂樹 国立精神・神経センター武蔵病院	

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
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分野 教授

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、本症の発症動向の把握と共に、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、その他の治療オプションの、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、予後規定因子の解明、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。本症の病態解明、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・治療法開発およびその他のアミロイドーシス**：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を開発し臨床診断への応用を行う。

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 (2003-2005 年度) を用い、本症の疫学、特に FAP 患者の全国分布を検討した (山田正仁)。
- 2) **AL アミロイドーシス**：
 - ① **自家末梢血幹細胞移植併用新規プロトコルによる臨床試験及び他の治療法の検討**：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プロトコルによる全国多施設臨床試験を実施した。さらに各施設における本療法による AL 治療経験例を検討した (島崎、高市、池田、石田ほか)。さらに、メルファラン大量療法後のサルベージ療法としてサリドマイドを投与した例、同種ミニ移植 (RIST) 実施例を検討した (麻奥)。
 - ② **BJP 蛋白の解析**：AL を含む monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) 患者について尿中 Bence Jones 蛋白 (BJP) と腎障害の関連を検討した (今井)。
 - ③ **抗 NF- κ B 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 活性について検討した (河野)。
- 3) **AA アミロイドーシス**：
 - ① **臨床的研究**：RA に合併する AA アミロイドーシスについて、腎臓のアミロイド沈着パターンと腎機能の予後との関係 (佐伯)、メトトレキサート治療導入の有無と治療予後との関係を検討した (寺井)。AA アミロイドーシスに対する抗サイトカイン療法 (インフリキシマブ、エタネルセブ

ト、トシリズマブ)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)による全国多施設共同臨床試験を遂行するために、AA アミロイドーシス臨床研究会を発足させ、臨床試験プロトコールを作成した(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(SAA1.83-95)を抗原とする抗 SAA 抗体の作製を試みた(石原)。本症の生検消化管粘膜から AA を定量する方法を確立し、病理所見との相関を検討した(山田俊幸)。AA アミロイドーシスマウスにおける SAA 生合成及び脂質代謝関連酵素発現の雌雄差を検討した(中里)。

4) FAP :

① **FAP の病態及び肝移植治療に関する研究**: 疫学研究により石川県が FAP の新規集積地として同定されたため、石川県の FAP を調査した(山田正仁)。Val30Met 型 FAP 患者 44 名の腹壁脂肪吸引生検と 13 名の胃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)により野生型 TTR(V30)と変異型 TTR(M30)の構成比を検索、さらに野生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)。

② **FAP の発症機構解明および新規治療法開発に関する研究**: 生体内に豊富に存在するヒト血清アルブミン(HSA)が TTR のアミロイド形成に与える影響を検討した(安東)。生理的 pH 下で ultrasonication を用いることにより TTR のアミロイド形成促進を試みた(安東)。

5) 透析アミロイドーシス :

① **臨床的研究**: 献腎移植を行った維持透析患者 32 名について臨床経過を調査し移植の効果を検討した(下条)。骨盤内に形成された透析アミロイド腫瘍の画像的特徴を検討した(高市)。

② **基礎的研究**: *In vitro* β 2-m アミロイド線維形成系を用い、遊離脂肪酸の 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)。

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**: γ セクレターゼ構成因子の 1 つである Aph-1 の量的変化がもたらす γ セクレターゼ活性

の変化を検討するために、HEK293 細胞に APP 遺伝子導入した stable 細胞に Aph-1aL を遺伝子導入した場合、siRNA でノックダウンした場合等に、培養液中に産生される A β 40 及び A β 42 の量的変化を ELISA 法にて測定した(水澤)。慢性脳虚血が A β 産生に与える影響を明らかにするために両側総頸動脈結紮モデルラット脳を検討した(玉岡)。疫学研究でホルモン補充療法を受けている女性では AD 発症率が低いことから、エストロゲンが A β 凝集過程および既成凝集体の不安定化過程に及ぼす効果を、生体条件試験管内モデルを用いて解析した(山田正仁)。AD 病態惹起分子と考えられている A β オリゴマーに対する抗体を作成し、本抗体が認識するオリゴマーが AD 脳に存在するかどうか、A β オリゴマーの神経毒性や線維形成能を中和するかどうかを検討した(東海林)。Tg2576 マウスと presenilin-1 L286V マウスとの double transgenic (Tg) mouse、TgTau^{P301L} マウス、TgTau^{P301L} と Tg2576 の double Tg マウス、変異 α シヌクレイン発現モデルマウス(Tg α SYN)を用いて A β 、リン酸化タウ、リン酸化 α シヌクレインの蓄積を検討し、更に抗 A β 40 抗体投与による治療法開発を行った(東海林)。

② **CAA に関する研究**: MRI gradient-echo 法(T2*)を用いて高齢者(60 歳以上の連続 548 例)の cerebral microbleeds(CMBs)を検討した(葛原)。高度の CAA を呈し典型的老人斑を欠くアイオワ型 APP 変異(Asp23Asn)を有する家系の患者脳に沈着する A β 分子を解析した(玉岡)。

③ **BRI2 関連蛋白に関する研究**: 家族性英国型あるいはデンマーク型認知症は BRI2 遺伝子変異による常染色体優性早期発症認知症であるが、BRI 関連蛋白の AD への関与を明らかにするために、BRI 関連蛋白(BRI2 および 3 の分泌部位)に対する抗体を作製し AD 脳を免疫染色した(中里)。

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・治療法開発およびその他のアミロイドーシス**: 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に関与するアミノ酸組成について検討した(樋口)。アミロイドイメージング開発の目的で、アミロイドーシス動物モデルにアミロイド標識プローブとして [¹¹C]BF-227 を投与し、in vivo micro PET 画像及び

ex vivo オートラジオグラフィを観察した(工藤)。老化アミロイドーシスモデル及びADモデルマウスにブドウ種子由来ポリフェノール (GSE) を投与し発症抑制効果を検討した (前田)。大腿の陳旧性血腫性病変に伴うアミロイドーシス7例について検討した (石原)。

(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。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、3 年とも長野(11.0-15.5)、熊本 (10.1-10.3)、石川 (3.5-4.2) の順であり、その他の都道府県は 2.0 以下であった。

2) **AL アミロイドーシス** :

① **自家末梢血幹細胞移植併用新規プロトコールによる臨床試験及び他の治療法の検討** : 本研究班 AL 分科会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原発性 AL アミロイドーシス治療プロトコールを作成、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、6 名の患者を登録した。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 $0.08 \sim 2.27 \times 10^6/\text{kg}$ であり、6 例中 2 例でのみ目標 CD34+細胞数 ($2 \times 10^6/\text{kg}$) 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、6 例全例で自家末梢血幹細胞移植が行われた。移植後の血球回復は速やかで、全例が生存中である。移植後の血液学的効果は PR5 例、SD1 例で、臓器効果は 2 例にみられ、血清 free light chain の判定は効果判定に有用であった。

AL アミロイドーシス患者 4 例に対し自家末梢

血幹細胞移植療法併用メルファラン大量療法、経時的な腎組織評価を行い、3 例で臨床的改善、うち 1 例では組織学改善も認めた。末梢神経障害を主徴とする AL アミロイドーシス患者 2 例に対し自家末梢血幹細胞移植療法併用メルファラン大量療法を行い、血液学的寛解と共に末梢神経障害の改善を認めた。

メルファラン大量療法の非寛解例 4 例にサルベージ療法として、RIST を実施し寛解 (1 例)、サリドマイド投与にて寛解あるいは臨床効果 (3 例) を認めた。

② **BJP 蛋白の解析** : MGUS あるいは AL アミロイドーシス 12 例において腎障害と尿中軽鎖との関連を検討したところ、 λ 型軽鎖 2 量体 BJP 検出例はアミロイド沈着の有無に関わらず腎障害を認めた。

③ **抗 NF- κ B 治療法の開発** : NF- κ B 活性、SDF-1 α 活性は細胞表面の CD54 蛋白発現と正の相関を示した。CD54 発現は AL を含む MGUS では極めて高く、一方、骨髄腫細胞株において有意に低かった。SDF-1 α 添加で単クローン性形質細胞を培養すると CD54 発現が上昇した。

3) **AA アミロイドーシス** :

① **臨床的研究** : AA 合併 RA について、アミロイド沈着が血管に限局する場合に較べて糸球体にある例では腎機能の予後が悪かった。AA 合併 RA に対するメソトレキセート導入後、AA アミロイドーシスの予後は改善しており、RA が抑えられた結果と考えられた。AA 合併 RA に対する抗サイトカイン療法の有用性の検討では、すべての抗サイトカイン療法は SAA を抑制し、臓器障害の進行もほぼ認められず、基本的に有用と考えられたが、特にトシリズマブは SAA 低下能、臨床症状改善能、組織学的改善能が優れていた。トシリズマブによる全国多施設臨床試験を円滑に遂行するための体制 (AA アミロイドーシス臨床研究会) を発足させ、第一段階の治療前観察期間のプロトコールを確立した。

② **基礎的研究** : 作製した抗 SAA1.83-95 抗体は本症 51 例中 37 例 (73%) のアミロイドを免疫染色した。本症の生検消化管粘膜から 4M グアニジン塩酸でアミロイドを可溶化し高感度 ELISA で AA を定量化する方法を確立した。本定量結果は病理

学的評価とよく相関し、本診断法はアミロイドの陽性、陰性の判定に有用であることが示された。本症モデルマウスの SAA1 血中濃度、エストロゲン受容体発現、肝リパーゼ遺伝子発現等は、雄に較べて雌に有意に高かった。

3) FAP :

①FAP の病態及び肝移植治療に関する研究 : 石川県の FAP11 家系 28 例は全て TTR 型であり、うち 10 家系 26 例は Val30Met 変異、他の 1 家系 2 例は Leu58Arg 変異であった。石川県の Val30Met 型 FAP は高齢発症で家族歴を高率に認めることが特徴であった。Val30Met 型 FAP のアミロイドの野生型 TTR(V30)と変異型 TTR(M30)の構成比をみると、腹壁脂肪では生検時年齢が高くなると野生型の比率が高くなったが、胃では一定の傾向は得られなかった。

②FAP の発症機構解明および新規治療法開発に関する研究 : HSA の共存により、TTR のアミロイド形成が有意に抑制され、TTR 四量体の安定性が上昇した。また、HSA は変性 TTR に対し高い結合性を示した。Ultrasonication により生理的 pH 下における TTR アミロイド形成が促進され、CD スペクトル分析で ultrasonication は TTR の四量体の減少及び二次構造の変化をもたらすことが示唆された。

4) 透析アミロイドーシス :

①臨床的研究 : 献腎移植を受けた維持透析患者 32 例中 9 例はアミロイド関節症を合併しており、非合併例と較べ透析期間が長かった。移植は症状の改善、進行の抑制に有効であったが、1 例は移植後、腎機能が保たれている中で頸椎の破壊性関節症の手術を受けていた。透析アミロイドーシスのアミロイド腫瘍の MRI は T1 強調画像で筋肉と同程度の低信号、T2 強調画像で筋肉やよりも低信号を示した。

②基礎的研究 : *In vitro* β 2-m アミロイド線維形成系を用い、遊離脂肪酸(ラウリル酸、ミリスチン酸、御レイン酸、リノール酸)が強い線維伸長効果を有することを明らかにした。血清アルブミン共存下でも線維伸長効果が認められた。

5) 脳アミロイドーシス :

①A β アミロイド沈着分子病態解明と AD 診断治療法開発 : Aph-1aL の発現により Aph-1 の増加と

共に A β 40 および 42 産生量を増加がみられたが、プレセニン、ニカストリン、Pen-2 などの因子に量的変化はなかった。一方、siRNA による Aph-1aL ノックダウンでは A β 40 および 42 産生量は減少した。慢性低灌流モデルラットでは A β 40/42、APP、BACE1 の沈着、高発現を認めた。エストロゲンは濃度依存性に A β 40 および 42 の重合・伸長反応を抑制し、既成凝集体を不安定化させたが、アンドロゲンには抗アミロイド効果はなかった。A β オリゴマー特異抗体は AD 脳内のオリゴマーと結合し、*in vitro* の系で A β 凝集を抑制し A β オリゴマーの神経細胞毒性を中和した。複数の transgenic AD モデルを駆使することにより、A β アミロイドーシスに伴いタウオパチを二次的に誘発し、A β 沈着のみならず、神経原線維変化、神経細胞死を再現することに成功した。また、Tg α SYN モデルで α シンクレインの脳内蓄積を再現し得た。A β 40C 末特異抗体による免疫療法で脳アミロイド斑及び CAA の減少を認めた。

②CAAに関する研究 : MRI gradient-echo 法(T2*)上、皮質・皮質直下のみに CMBs が認められる表在型 CMB パターンは皮質下出血例と AD 症例で有意に多かった。表在型 CMB の分布は後頭葉に多く、特に皮質分水嶺領域に多かった。高度な CAA を有するアイオワ型 APP 変異患者脳では、A β 23-Asp と A β 23-Asn の双方が沈着し、N-、C-両末端で切断され全ての Asp 残基が部分的な翻訳後修飾を受けていた。

③BRI 関連蛋白に関する研究 : BRI 関連蛋白 (BRI2 および 3 の分泌部位) に対する抗体は AD 脳の老人斑などの A β 沈着部位に染色性を示した。

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・治療法開発およびその他のアミロイドーシス : 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に関与するアミノ酸組成の検討では、線維形成には 16 番目の Gln が最重要であり、次いで 5 番目の Gln が重要であることが示唆されたが、アミロイド好発性と抵抗性の違いをまだ十分説明できなかった。アミロイドーシス動物モデルにアミロイド標識プローブとして [¹¹C]BF-227 を投与し、*in vivo* micro PET 画像及び *ex vivo* オートラジオグラフィを観察し、両試験に

において脾臓への高い集積を確認し得た。老化アミロイドーシスモデル及びADモデルマウスにブドウ種子由来ポリフェノール (GSE) を投与した所、小胞体ストレス抑制効果を認めたが、アミロイド沈着に変化を認めなかった。大腿の陳旧性血腫性病変に伴う限局性アミロイドーシスのアミロイド蛋白は既知のアミロイド蛋白に対する抗体とは反応しなかった。

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いる。都道府県によるデータの電子入力が遅れており、調査票の利用上制約があることが大きな問題になっている。本年度は昨年よりも入力が増加した 2003-2005 年度のデータ解析を行ったが、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）は、常に長野、熊本、石川の順で一定しており、石川は長野、熊本に次ぐ FAP の集積地であることが明らかになった。

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行った。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、幹細胞採取効率や寛解導入効果の面では不十分であること、また血液学治療効果と臨床的効果（臓器反応性）がみられることが明らかになった。今後、より効率のよい幹細胞採取方法の確立、移植前処理の効果が期待される。また、最近、プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブの有用性が報告されており、次期プロトコルとしてボルテゾミブを組み込んだ寛解導入と自家末梢血幹細胞移植の併用を検討している。

また、自家造血幹細胞移植併用メルファラン大量療法により臨床的寛解ばかりでなく組織学的改善（アミロイド沈着の減少）がみられることが示され、積極的治療の有用性が明確にされた。末梢神経障害を主徴とする AL アミロイドーシスにおいても、本療法は末梢神経障害の進行を停止させ、症状を改善させることが期待されることが示

された。

さらに、メルファラン大量療法の非寛解例に対するサルベージ療法として、サリドマイド療法、RIST（ミニ移植）が有力な治療選択肢になりうることを示したことは意義が大きい。

また、AL アミロイド沈着の有無に関わらず尿中軽鎖 2 量体（特に λ 鎖）が存在していることが腎障害に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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、p53 遺伝子変異の有無等の関係を解明していく必要がある。

2) AA アミロイドーシス：メソトレキセート導入後本症の予後が改善したこと、3 種の抗サイトカイン療法はいずれも本症の進行阻止に有用であること、その中で特にトシリズマブによる IL-6 阻害療法が他と較べてより有効性が高いことが示唆された。そこで、トシリズマブによる AA 合併 RA に対する全国多施設共同臨床試験を円滑に実施するために AA アミロイドーシス臨床研究会を設立した。治療開始前の観察期間のプロトコルに加え、今後、第 2 段階の投与期間におけるプロトコルを確立する。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、新しい抗 SAA1.83-95 抗体を作製したが、この抗体は昨年報告した抗 SAA1.81-93 抗体よりも免疫組織化学的診断能が優れていた。また、生検消化管粘膜から微量の AA を抽出し定量する方法を確立した。病理学的評価法を補足する有用な AA アミロイドの評価法と考えられる。また、AA アミロイドーシスのモデルで雌雄差の影響が明らかになり、エストロゲン及びエストロゲン受容体を介した炎症機構が本症の発症に寄与していることが考えられた。

3) FAP：わが国第 3 の集積地であることが判明した石川県の FAP は Val30Met 型が大多数であるが、その臨床的特徴（高齢発症で家族性発症）は二大集積地である長野、熊本（若年発症で家族性発症）あるいは全国に散在する非集積地の Val30Met 型

FAP 例の特徴（高齢発症で孤発性で男性が多い）とは異なっていた。わが国の TTR Val30Met 型 FAP には (i) early-onset and endemic type（長野、熊本）、(ii) late-onset and endemic type（石川）、(iii) late-onset and non-endemic type（全国に散在）の 3 臨床病型が存在することが明らかになった。沈着アミロイドの解析により、Val30Met 型 FAP では加齢に伴い野生型 TTR の沈着が増加するが、それは臓器によって異なる可能性があることが示された。老人性 TTR アミロイドーシスでは野生型 TTR が沈着する。今後、FAP で野生型 TTR の沈着に関わる因子や臨床症状との関連などを明らかにしていく必要がある。

血中アルブミンが TTR のアミロイド形成に抑制的に働くことが示された。腎障害や疾患の進行に伴うアルブミンレベルの低下が病態をさらに進行させている可能性が示ある。また、ultrasonication を用いれば、生理的 pH 条件下で TTR アミロイド形成が促進されることを示した。この *in vitro* の系は TTR 凝集抑制による治療薬開発に有用と考えられる。

4) 透析アミロイドーシス：献腎移植を受ける透析患者は長期透析例で透析アミロイドーシスを合併し、腎移植が症状の改善や進行の抑制に有効であることが示された。腎移植後に投与される免疫抑制薬の抗炎症作用によって透析アミロイドーシスの症状が改善している可能性もある。移植時進行例もあると考えられ、更なる治療法の確立が望まれる。また、透析アミロイドーシスではアミロイド腫瘍を形成しやすく、MRI がアミロイド腫瘍検出に有用であることが示された。

In vitro β 2-m アミロイド線維形成系を用いた実験で、昨年度リゾリン脂質が β 2-m 線維形成を促進する作用を有することを示したが、本年度、リゾリン脂質に加えて、遊離脂肪酸も透析患者の生体環境下で β 2-m 線維形成を誘起する可能性があることが明らかになった。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。

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 Aph-1 と結合し γ セクレターゼ活性を調節する因子の候補となる蛋白を発見したが（平

成 17 年度報告）、その結合の際の γ セクレターゼ活性を測定するシステムを構築することができた。Aph-1 が独自の A β 産生調整能を有している可能性が示唆され、今後、そのメカニズムを明らかにすることは AD の治療法開発の手がかりとなる可能性がある。

慢性低灌流ラットモデルで A β 産生が促進される結果が得られた。これは、脳血管障害が AD 発症に促進的に作用する修飾因子として作用する可能性を示唆する結果と考えられる。

女性ホルモンが A β 凝集抑制作用および不安定化作用を有することが明らかになり、女性ホルモンが生体内で AD 発症に抑制的に働いており、更年期以後の、そのバランス変化が AD 発症に促進的に作用する可能性が考えられた。

AD の病態に大きな役割を果たすと考えられている A β オリゴマーに対する特異抗体を作成し、本抗体がオリゴマーの神経細胞毒性中和作用を有すること、AD 患者脳に本抗体に結合する A β オリゴマーが存在することを示した。今後、本オリゴマー抗体は AD 治療抗体として有望と考えられた。

AD モデルマウスでの研究でリン酸化タウの沈着を伴う AD モデル、 α シヌクレイン蓄積モデルマウスの作成に成功した。これらは A β アミロイドーシス、タウオパチー、 α シヌクレイノパチーの治療法開発上有用なモデルとなる可能性がある。また、抗 A β 40 特異抗体の投与により脳内 A β 40 を選択的に可溶化しアミロイド斑コアと CAA を減少させることが示された。抗 A β 40 抗体は CAA に対する有力な治療法になる可能性がある。

MRI T2*画像の表在型の CMBs は CAA の診断に有用であることが確認され、感度は低いものの、比較的感度の高い診断マーカーと考えられた。後頭葉、特に皮質分水嶺領域に CMBs が多いことから CMBs の出現には虚血性機序が関与している可能性が考えられた。

アイオワ型 APP 変異例の脳にみられた A β 分子の生化学的多様性は、重合・沈着過程に関与し高度な CAA を示す病理像を形成するものと推測された。AD 脳のアミロイドが抗 BRI 抗体に反応したことから、AD の A β アミロイド沈着に BRI

が関与している可能性を今後検討する必要がある。

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・治療法開発およびその他のアミロイドーシス: 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アミノ酸組成が判明されたが、まだ未解明の部分も残った。本モデルはアミロイド蛋白の1次構造、アミロイド線維形成、アミロイドーシス発症・伝播の関連を解明するにあたり優れたシステムである。

アミロイドーシス動物モデルにおいて、アミロイド標識プローブ^{[11C]BF-227}によるアミロイドイメージングに成功した。現在、探索的臨床研究の倫理審査で承認を得た段階であり、来年度以降、患者への臨床応用を開始することが可能となった。

アミロイドーシスモデル動物においてブドウ種子由来ポリフェノール (GSE) のアミロイド沈着抑制効果は明らかではなく、さらに長期間に渡る詳細な検討が必要と考えられた。

大腿の陳旧性血腫性病変に伴うアミロイド沈着は dysphoric な限局性アミロイドーシスであり、未知のアミロイド蛋白による新しいアミロイドーシスの病型である可能性が考えられた。

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実施し有用性を評価し、他の治療選択肢 (同種ミニ移植など) を検討し、さらに有用性の高い次期臨床試験プロトコルを提案した。AA では抗サイトカイン療法の有用性を示し、特に IL-6 受容体抗体トシリズマブが優れていたことから、本剤による AA アミロイドーシスに対する世界初の全国多施設臨床試験のための体制を確立した。FAP では新規集

積地であることが判明した石川県の TTR Val30Met 型 FAP の特徴を解明、Val30Met 型 FAP では加齢に伴い野生型 TTR 沈着が増加することを示し、さらに治療薬開発に有用な in vitro の TTR アミロイド形成系を報告した。透析アミロイドーシスでは腎移植が症状の改善や進行の抑制に有用であることを明らかにし、遊離脂肪酸によるアミロイド形成促進を発見した。脳アミロイドーシスでは Aph-1 を介した γセクレターゼ活性の調節機構、エストロゲンの抗アミロイド作用、抗 Aβ40 抗体の治療的意義、皮質 CMBs の CAA 診断上の意義等を明らかにし、有用な Aβオリゴマー特異抗体およびモデル動物を作成した。老化アミロイドーシスマウスの ApoA-II アミロイド線維形成機構解明が進展した。アミロイドイメージング開発では、micro PET によるアミロイドーシスモデル動物におけるアミロイドの画像化に成功し、臨床応用の段階に至った。

F. 健康危険情報

なし。

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) Nagai Y, Inui T, Popiel HA, Fujikake N, Hasegawa K, Urade Y, Goto Y, Naiki H, Toda T: A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol* 14:332-340, 2007.
- 2) Sato T, Susuki S, Suico MA, Miyata M, Ando Y, Mizuguchi M, Takeuchi M, Dobashi M, Shuto T, Kai H: Endoplasmic reticulum quality control regulates the fate of transthyretin variants in the cell. *EMBO J* 26:2501-2512, 2007.
- 3) Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Matsubara E, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R: The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease, Consortium Information: Genetic association of CTNNA3 with late-onset Alzheimer's disease in females. *Hum Mol Genet* 16: 2854-2869, 2007.
- 4) Yazaki M, Mitsuhashi S, Tokuda T, Kametani F,

- Takei Y, Koyama J, Kawamorita A, Kanno H, Ikeda S: Progressive wild-type transthyretin deposition after liver transplantation preferentially occurs onto myocardium in FAP patients. *Am J Transplant* 7:235-242, 2007.
- 5) Inomata Y, Zeledon ME, Asonuma K, Okajima H, Takeichi T, Ishiko T, Ando Y: Whole-liver graft without the retrohepatic inferior vena cava for sequential (domino) living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 7:1629-1632, 2007.
- 6) Yamamoto S, Wilczek H. E, Nowak G, Larsson M, Oksanen A, Iwata T, Gjertsen H, Söderdahl G, Wikström L, Ando Y, Suhr OB, and Ericzon B-G: Liver Transplantation for Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP): A single center experience during 16 years. *Am J Transplant* 7:2597-604, 2007.
- 7) Nishikawa T, Hagihara K, Isobe T, Matsumura A, Song J, Tanaka T, Kawase I, Naka T, Yoshizaki K: Transcriptional complex formation of c-Fos, STAT3, and HNF-1 α is essential for cytokine-driven CRP gene expression. *J Immunol* 2008, in press.
- 8) Otsuyama K, Ma Z, Abroun S, Amin J, Shamsasenjan K, Asaoku H, Kawano MM: PPAR β -mediated growth suppression of baicalein and dexamethasone in human myeloma cells. *Leukemia* 21:187-190, 2007.
- 9) Yan J, Fu X, Ge F, Zhang B, Yao J, Zhang H, Qian J, Tomozawa H, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils (AApoAII) and protein A amyloid fibrils (AA). *Am J Pathol* 171: 172-180, 2007.
- 10) Aoyagi H, Hasegawa M, Tamaoka A: Fibrillogenic nuclei composed of P301L mutant tau induce elongation of P301L tau, but not wild-type tau. *J Biol Chem* 282:20309-20318, 2007.
- 11) Okamoto H, Kaneko, H, Terai C, Kamatani N: Protective effect of A at position - 168 in the type III promoter of the MHCIIA gene in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 66:1263-1264, 2007.
- 12) Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Zeledon ME, Hirahara T, Hirai T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Inomata H, Uchino M: Effect of liver transplantation on transthyretin Tyr114Cys-related cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 70:123-128, 2008.
- 13) Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda S: Transthyretin accelerates vascular A β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Pathology* 2008, in press.
- 14) Matsunari I, Samuraki M, Chen W-P, Yanase D, Takeda N, Ono K, Yoshita M, Matsuda H, Yamada M, Kinuya S: Comparison of ¹⁸F-FDG PET and optimized voxel-based morphometry for detection of Alzheimer's disease: aging effect on diagnostic performance. *J Nucl Med* 48:1961-1970, 2007.
- 15) Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Maruyama M, Itoh M, Iwata R, Yanai K, Arai H: 2-(2-[2-Dimethylamino- thiazol -5-yl] ethenyl) -6-(2- [fluoro]ethoxy) benzoxazole: A novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J Nucl Med* 48:553-561, 2007.
- 16) Sasahara K, Yagi H, Naiki H, Goto Y: Heat-induced conversion of β_2 -microglobulin and hen egg-white lysozyme into amyloid fibrils. *J Mol Biol* 372:981-991, 2007.
- 17) Yamamoto K, Yagi H, Ozawa D, Sasahara K, Naiki H, Goto Y: Thiol compounds inhibit the formation of amyloid fibrils by β_2 -microglobulin at neutral pH. *J Mol Biol* 376:258-268, 2008.
- 18) Takei Y, Gono T, Yazaki M, Ikeda S, Ikegami T, Hashikura Y, Miyagawa S, Hoshii Y: Transthyretin-derived amyloid deposition on the gastric mucosa in domino recipients of familial amyloid polyneuropathy liver. *Liver Transpl* 13:185-187, 2007.
- 19) Tsuchiya A, Yazaki M, Kametani F, Takei Y, Ikeda S: Marked regression of abdominal fat amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy during long-term follow-up after liver transplantation. *Liver Transpl*, in press.
- 20) Ge F, Yao J, Fu X, Guo Z, Yan J, Zhang B, Zhang H, Tomozawa H, Miyazaki J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Amyloidosis in transgenic mice

expressing murine amyloidogenic apolipoprotein A-II (Apoa2C). *Lab Invest* 87: 633-643, 2007.

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)ベンゾキサゾール誘導体 (PCT/JP2007/063350、平成 19 年 7 月 4 日出願)

2)フッ素およびヒドロキシ基で置換されたアルコキシ基を有する PET プローブ（特願 2007-176366、平成 19 年 7 月 4 日出願）

安東由喜雄

1)HMGB1 のアミロイドーシスへの保護作用（特願 2007-034325、平成 19 年 4 月 1 日出願）

2)HMGB1 のアミロイドーシスへの保護作用
（C1-A0620、平成 19 年 6 月 1 日出願）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし