

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

研究代表者 山田正仁 金沢大学医薬保健研究域医学系 脳老化・神経病態学（神経内科学） 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、脳アミロイドアンギオパチー）]ごとの戦略、及び全病型に共通する課題の研究により、疫学病態調査、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。AL では新規 BMD 療法全国多施設臨床試験を進め、自家末梢血幹細胞移植療法及び他の治療オプションの有用性を検討した。AA では IL-6 受容体抗体トシリズマブによる世界初の AA 全国多施設臨床試験が進行した。FAP では多数の肝移植例の解析において発症早期の移植がより有効であることを示し、さらに非移植治療として siRNA 療法開発研究において画期的な成果を得た。透析アミロイドーシスでは世界初の本症診断基準を作成し、その妥当性を検証した。脳アミロイドーシスではアポリポ蛋白 E がアイソフォーム特異的にアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) 凝集に影響すること、フェノール化合物が *in vitro* 及び *in vivo* で $A\beta$ 凝集沈着を抑制することを示した。アミロイドイメージング開発では AA 患者における探索的臨床研究が進行した。アミロイドーシスの”伝播”に関する研究では、AA アミロイドーシスのウシの舌内唾液腺のアミロイド沈着とウシ AA アミロイドによるウサギにおける本症誘発を報告し、”伝播”の分子機構及びその抑制法を解明するためのマウス老化アミロイドーシスモデルを確立した。

研究分担者

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	奥田恭章	道後温泉病院リウマチセンター 副院長
樋口京一	信州大学大学院医学研究科加齢生 物学分野 教授	安東由喜雄	熊本大学大学院生命科学研究部病態 情報解析学分野 教授
玉岡 晃	筑波大学大学院人間総合科学研究 科疾患制御医学専攻 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
高市憲明	虎の門病院腎センター内科 部長	工藤幸司	東北大学未来医工学治療開発センタ ー前臨床応用部門 教授
山田俊幸	自治医科大学臨床検査医学 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
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 教授	星井嘉信	山口大学大学院医学系研究科情報解 析医学系病理形態学分野 講師
今井裕一	愛知医科大学内科学講座腎臓・リウ マチ膠原病内科 教授	西 慎一	新潟大学医歯学総合病院血液浄化療 法部 准教授
島崎千尋	社会保険京都病院 副院長	畑 裕之	熊本大学医学部附属病院血液内科 講師
吉崎和幸	大阪大学先端科学イノベーションセ ンター 特任教授	松井高峯	帯広畜産大学畜産学部基礎獣医学 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	岩坪 威	東京大学大学院医学系研究科神経病 理学分野 教授
麻奥英毅	広島赤十字・原爆病院検査部 部長	小池春樹	名古屋大学医学部附属病院神経内科 助教
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		

小野賢二郎 金沢大学附属病院神経内科 助教

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・治療法の開発・確立を目的とし、病型ごとの戦略並びに全病型共通の発症機構研究により、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。

1) **AL アミロイドーシス**: 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の有効性が報告されているが、適応になる患者は限られる。そこで、新規治療プロトコールによる全国多施設臨床試験、その他の治療オプションの検討を行い、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**: 本症は関節リウマチ (RA) 患者の 5-10% に合併し、その場合の予後は不良である。RA における本症発症及び予後規定因子の解明、診断・治療指針の作成、分子病態解明に基づく新規治療法の開発、全国多施設共同臨床試験によるその有用性確立をめざす。

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、長期的にみた移植の有効性や問題点を明らかにする。さらに、移植非適応例にも可能な新規治療法の開発が必要であり、トランスサイレチン (TTR) 沈着機構解明に基づく TTR 分子標的治療開発をめざす。

4) **透析アミロイドーシス**: 腎移植が少ないわが国では長期透析患者が多く、20 年以上の長期透析例では本症は必発である。本症合併の危険因子同定と発症予防、診断基準策定を含む早期発見法確立、 β_2 -ミクログロブリン (β_2 -m) 凝集過程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)、脳アミロイドアンギオパチー (CAA) 等で脳に蓄積するアミロイドを標的とした新しい早期診断マーカー、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・伝播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**: 全病型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、アミロイドイメージングの臨床診断への応用を行う。また、アミロイドによるアミロイドーシス発症促進 (“伝播”) 現象の意義、分子機構を解明する。

B. 研究方法

1) **AL アミロイドーシス**:

① **AL アミロイドーシスの発症要因、病態解明、診断に関する研究**: 本症の発症機序解明のため、

102 例の monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) 患者における無症候性のアミロイド沈着を検討し (麻奥)、本症を含む MGUS 由来の単クローン性形質細胞の NF- κ B 活性、p53 遺伝子等につき検討を加えた (河野)。本症では線溶異常が合併しやすいことが知られている。その実態や機序を明らかにするため全国調査を行った (畑)。消化管は本症の好発部位である。消化管限局性 AL アミロイドーシスについて臨床病理学的に検討し、全身性と比較した (松田)。本症の免疫組織化学的診断を標準化するために、抗ヒト κ 鎖ウサギモノクローナル抗体 (clone H-16E) の有用性を検討した (星井)。

② **治療法の検討 (新規プロトコールによる臨床試験を含む)**: 大量メルファラン (HDM) + 自家末梢血幹細胞移植療法 (ASCT) の有用性を腎組織所見を含め検討した (高市)。一方、HDM + ASCT 療法は治療リスクのため、その適応例が限られるので、本研究班の AL 分科会は新規治療法としてボルテゾミブ (BOR)、メルファラン (MEL)、デキサメタゾン (DEX) の 3 剤併用 (BMD 療法) による安全性と有用性を検証する臨床試験を推進し、BOR/DEX 治療経験を報告した (島崎ほか)。また、それ以外の治療として、血液透析 (HD) による遊離軽鎖 (FLC) 除去療法の有用性について検討した (今井)。

2) **AA アミロイドーシス**:

① **臨床的研究**: 昨年度までに確立した生検材料の AA 定量法を用い、AA 合併 RA 22 例の胃、十二指腸生検を評価し、部位別の比較、継時的変化の評価を行った (奥田)。AA 合併 RA 58 例について腎におけるアミロイド沈着と腎障害の関連を検討した (西)。AA 合併 RA に対する生物学的製剤 (エタネルセプト・トシリズマブ) による治

療に伴う腎機能の変化について検討した(中村)。AAアミロイドーシスに対するヒト化抗IL-6受容体抗体(トシリズマブ)を用いたSAA産生抑制による治療法確立のために、本研究班AA分科会メンバー他からなるAAアミロイドーシス臨床研究会による臨床試験を推進した(吉崎ほか)。

② 基礎的研究: AAモデルマウスによる研究を推進するため、マウスSAAに対する新しいモノクローナル抗体を作成し、この抗体を用いて高感度SAA測定系を確立しマウスAAアミロイドーシスの解析を行った(山田俊幸)。

3) FAP:

① FAPの病態及び肝移植治療の効果に関する研究: FAP剖検心組織の病理学的解析、培養平滑筋細胞への患者血清由来TTRアミロイド線維投与、患者血清中のIV型コラーゲン測定により、FAPにおけるアミロイドと基底膜との関連を検討した(安東)。長野県の集積地出身のFAP患者の末梢神経障害の自然経過を電気生理学的に検討した(池田)。肝移植を受けたFAP45例の術後経過を検討した(池田)。FAP患者(ATTR Tyr114Cys)からの生体ドミノ肝移植を受けた患者の剖検所見を検討した(小池)。

② FAPの新規治療法開発に関する研究: FAPにおける難治性眼アミロイドーシスに対する治療法開発のため、TTR発現を選択的にノックダウンするsiRNAをヒト網膜色素上皮細胞株(ARPE-19)、V30M TTRトランスジェニックラットの眼硝子体へ投与し、TTR発現抑制効果を検討した(安東)。抗TTR siRNA発現アデノウイルス随伴ウイルスベクター(AAV8)を作成し、V30M TTRトランスジェニックマウスへ経静脈的に投与しTTR抑制効果を検討した(水澤)。

4) 透析アミロイドーシス:

腹膜透析(CAPD)患者における透析アミロイドーシス発症要因を明らかにする目的で、血液透析(HD)あるいはCAPDを導入し10年以上経過観察できた患者(HD18例、CAPD6例)における破壊性脊椎関節症(DSA)発症、血清 β_2 -m等のデータを検討した(高市)。透析アミロイドーシスの診断基準(案)を作成し、その有用性を実証するために、60名の透析患者を対象とした横断的調査を実施した(西)。

5) 脳アミロイドーシス:

① アミロイド β 蛋白(A β)沈着分子病態解明とAD診断治療法開発: ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞及び変異型APP過剰発現SH-SY5Y細胞に酸化ストレス物質 ethacrynic acid (EA)を負荷し酸化ストレスがA β 産生に与える影響を検討した(玉岡)。アンギオテンシン受容体拮抗薬(ARB)がA β 産生に与える影響を野生型及び変異型APP発現HEK293細胞を用いて検討した(水澤)。In vitroのA β 凝集における気液界面等の効果(内木)、アポリポ蛋白E(apoE)アイソフォーム特異的な効果を検討した(岩坪)。ワイン関連ポリフェノール等のフェノール化合物のin vitroにおけるA β 凝集抑制効果(小野)、ADモデルマウス(Tg2576)におけるAD病理予防効果を検討した(山田正仁)。ADモデルマウス(Tg2576)においてメラトニン経口負荷試験が脳内A β 蓄積を反映するかどうかを検討した(東海林)。タウオパチーモデル動物の脳脊髄液(CSF)タウを測定し脳内におけるタウ蓄積との関連を検討した(東海林)。AD診断における頭部MRI、脳血流SPECT、FDG-PET、CSFマーカー[A β 42/タウ(total)/リン酸化タウ]の有用性をAD207例において比較検討した(山田正仁)。

② BRI2関連蛋白に関する研究: 家族性英国/デンマーク型認知症(FBD/FDD)はBRI2遺伝子変異に起因する。BRI2の分泌部位に対する抗体を作成し測定系を構築、ADその他の神経変性疾患のCSF中のBRI2を測定した(中里)。FBDで沈着するアミロイド蛋白ABriのN末端にはピログルタミン酸残基を有するが、それが中枢神経に限らず末梢にも存在するかどうかを検討した(玉岡)。

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:

① アミロイドイメーシングに関する研究: プローブBF-227によるアミロイドイメーシング研究において、本年度はヒトにおける ^{11}C BF-227探索的臨床研究として、正常健康人2名、AAアミロイドーシス患者1名のPET画像を撮影した(工藤)。

② マウス老化アミロイドーシス及びウシアミロイドーシス伝播に関する研究: apoA-IIが沈着するマ

ウス老化アミロイドーシスモデルと HSF1 (heat shock factor 1) ノックアウトマウスを用いて、マウス老化アミロイドーシスに対する HSF1 の抑制機構を検討した (樋口)。独自に開発した apoA-II の合成部分ペプチドを用いた *in vitro* 線維形成システムとマウス apoA-II アミロイドーシス (AApoAII) 高発症モデルマウス (*Apoa2^c* トランスジェニックマウス : *Apoa2^cTg*) を用い、アミロイド線維の形成及び伝播機構を解析した (樋口)。

食品としてビーフを摂取する時にウシに沈着しているアミロイドが人体に入った場合、個体のアミロイドーシス発症を促進する可能性がある。ウシの舌は食用となる。そのため、ウシの AA アミロイドーシスについて舌を含め詳細に検討し、ウシ由来の AA アミロイドをウサギに投与することによる伝播モデル作成を試みた (松井)。

(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) AL アミロイドーシス :

① AL アミロイドーシスの発症要因、病態解明、診断に関する研究 : 102 例の MGUS 患者の 8.8% (9 例) に無症候性のアミロイド沈着を認め、一方、多発性骨髄腫では 23.3% に無症候性アミロイド沈着を認めた。M 蛋白のタイプでは無症候性アミロイドーシス例は MGUS と同様に完全型 M 蛋白が多く、 κ 型 $>$ λ 型であり、BJP を有する例は少なかった。一方原発性 AL アミロイドーシス患者では BJP - λ 型が多くを占めていた。

AL アミロイドーシス合併例を含む MGUS 由来の単クローン性形質細胞は正常形質細胞と同程度に CD54 を強く発現し、p53 変異を認めなかった。これは、CD54 発現が弱く 1/3 に点変異を求める骨髄腫細胞と対照的であった。

本症に合併する線溶異常の全国調査において、

AL アミロイドーシス 35 例、アミロイドーシス非合併骨髄腫 31 例を検討したところ、plasmin/plasmin inhibitor complex (PIC) がアミロイドーシス例で有意に増加していた。骨髄標本の検討ではアミロイドーシス例の形質細胞はウロキナーゼ型プラスイミノゲンアクチベータ (uPA) を発現していたが、骨髄腫例では 1 例を除き発現していなかった。

消化管限局性 AL アミロイドーシス 9 例の検討では、沈着アミロイドは λ 型が多く、消化管内沈着部位は上部のみが 4 名 (44%)、下部のみが 3 名 (33%)、両者が 2 名 (22%) であり、診断の契機は検診が 5 名 (56%)、消化管出血が 3 名 (33%) 等であった。長期観察例は自覚症状なく経過しており、全身性への移行は見られなかった。

抗ヒト κ 鎖ウサギモノクローナル抗体 (clone H-16E) の免疫組織化学的有用性の検討では、A κ 型アミロイドーシス症例の消化管及び肝臓のほとんどが陽性に染色された。

② 治療法の検討 : HDM+ASCT 療法を施行した 5 例の検討では、臨床的寛解例では、4 年後に糸球体アミロイド沈着の改善が示唆された。一方、治療効果に関わらず、硬化糸球体の率は全例で増加した。

AL 分科会は、HDM+ASCT 以外の有効な新規治療法として、BOR、MEL、DEX の 3 剤併用 (BMD) 療法の有用性を検証する臨床試験を立案し、現在進行中である。心不全で発症した AL アミロイドーシスの 76 歳女性例に対して BOR/DEX を実施したところ、FLC は速やかに低下し、心機能も改善した (EF 36% \rightarrow 68%)。副作用として末梢神経障害を認めた。

AL アミロイドーシスにおける HD による FLC 除去の有効性を検討した。透析前後の FLC 除去率をみると、血液濾過透析療法 (HDF) の方が HD よりも除去率が高く、また PS 膜が PEPA 膜よりも除去率が優れていた。PS 膜による HDF で血中 FLC は低値で長期に安定し、臓器障害の進行を認めなかった。

2) AA アミロイドーシス :

① 臨床的研究 : AA 合併 RA 患者の消化管生検の AA 定量法による評価では、アミロイド沈着は胃

と較べて十二指腸で明らかに優位であった。また、治療で SAA を十分抑制し得た例では沈着は継時的に減少した。一方、SAA が比較的高値の例でも AA 定量値が改善する例もあった。

AA 合併 RA 例の腎アミロイド沈着と腎障害の関連を検討したところ、クレアチニンと沈着量は正の相関、クレアチニンクリアランスと沈着量は負の相関を示した。また、AA 合併 RA に対する生物学的製剤（エタネルセプト・トシリズマブ）による治療に伴う腎機能の変化についてみると、血清アルブミン、推算糸球体濾過量は治療で有意に改善した。

AA アミロイドーシスに対するヒト化抗 IL-6 受容体抗体（トシリズマブ）を用いた全国多施設臨床試験において、現在までに 30 例をエントリーし、研究が進行した。

②基礎的研究：マウス SAA の N 末端側と C 末端側にエピトープを有する 2 つのモノクローナル抗体を得た。この抗体を用いて高感度 SAA 測定系を確立し、AA アミロイドーシス惹起後 2 ヶ月を放置したマウスの血清 SAA を測定したところ軽度の異常を認め、アミロイド担マウスは軽度の炎症状態を持続していることが判明した。

3) FAP :

①FAP の病態及び肝移植治療の効果に関する研究：FAP 剖検心組織の病理学的解析、培養平滑筋細胞への患者血清由来 TTR アミロイド線維投与実験により、FAP 患者の心筋及び血管平滑筋においては、基底膜にアミロイド線維形成、沈着がおり、基底膜は肥厚し、IV 型コラーゲン、ラミニンなどの基底膜成分が増加した。FAP 患者血清の IV 型コラーゲン濃度は未発症キャリア、健常人と較べ増加していた。

長野県の集積地の FAP の末梢神経障害の自然経過の検討では、全経過を通じ下肢を中心とした軸索障害が進行し、発症 5 年以内に stage II まで進行し、約半数において約 7 年で下肢末梢神経機能が全廃した。

肝移植を受けた FAP 45 例の術後経過をみると、移植後 3 年以内に 7 名が死亡し、3 年以上生存した 32 名中 24 名は社会復帰可能となり、7 割の患者で何らかの症状改善がみられた。予後良好の症例の方が、移植前の全身状態が良い傾向にあった。

FAP 患者（ATTR Tyr114Cys）からの生体ドミノ肝移植を受けた、潰瘍性大腸炎＋原発性胆汁性胆管炎患者がバーキットリンパ腫により 8 年後に死亡し、剖検所見を検討したところ、アミロイド沈着が、ドナー由来と考えられる肝臓以外にも、交感神経節、心臓、消化管粘膜下血管、末梢神経などに認められた。中枢神経系には沈着はなかった

②FAP の新規治療法開発に関する研究：TTR 発現を選択的にノックダウンする siRNA をヒト網膜色素上皮細胞株（ARPE-19）、V30M TTR トランスジェニックラットの眼硝子体へ投与したところ、*in vitro* 及び *in vivo* の両者において、TTR 発現を選択的に抑制した。

siRNA 発現 AAV8 を V30M TTR トランスジェニックマウスへ経静脈的に投与したところ、変異 TTR の発現のみを特異的に抑制し、肝毒性を回避し副作用はみられなかった。

4) 透析アミロイドーシス :

CAPD 患者における透析アミロイドーシス発症要因の検討では、透析導入後 10 年の経過で DSA と診断された患者は HD が 0% に対し CAPD は 50% と高率であった。血清 β_2 -m は CAPD 群が HD 群よりも有意に高値であり、一方、血清尿素窒素、クレアチニン、アルブミンは両群間に有意差を認めなかった。CAPD 患者で DSA 発症群と非発症群を比較すると発症群で β_2 -m は高値であった。

透析アミロイドーシス診断基準は臨床的所見（主要症状 5 項目／副症状 3 項目）と病理学的所見からなり、臨床診断例は主要症状 2 項目以上、臨床的疑い例は主要症状 1 項目＋副症状 1 項目以上、病理学的診断例ではそれに加えて病理学的所見が必要となる。臨床診断例および臨床的疑い例は透析年数とともに増加した。病理診断を実施していた例は少なかった。

5) 脳アミロイドーシス :

①A β 沈着分子病態解明と AD 診断治療法開発：SH-SY5Y 細胞及び変異型 APP 過剰発現 SH-SY5Y 細胞は酸化ストレス物質 EA 負荷によりプレセニリン 1（PS1）mRNA、脂質ラフトの PS1 蛋白、A β 分泌が増加した。ARB6 種は、高濃度で、活性体への変換型不活体が A β 産生を抑制する傾向を示した。*In vitro* の A β 凝集は、気液界面なしで

は 5 μ M 以下の濃度では凝集しなかったが、気液界面ありの条件、あるいはポリプロピレンのディスクを入れて攪拌すると A β 重合反応が促進された。In vitro の A β 凝集系に apoE E2、E3、E4 を添加したところ、E4 を添加した場合は他のアイソフォームと比べてプロトフィブリル維持効果が弱く、線維形成が早期に進行した。ブドウ種由来のポリフェノールのメガナチュラルは A β の β シートへの 2 次構造変換、オリゴマー形成、プロトフィブリル形成、線維形成のすべての過程を in vitro で抑制し、A β の細胞毒性を軽減させた。AD モデルマウス (Tg2576) に各種フェノール化合物を投与したところ、ロスマリン酸等の化合物は A β 沈着、不溶性 A β 、A β オリゴマー濃度を有意に低下させ、可溶性 A β 濃度を有意に増加させた。AD モデルマウス (Tg2576) において、認知機能が正常な段階でもメラトニン経口負荷によって脳内 A β 蓄積を反映して血液中に A β 排泄がみられた。タウオパチーモデル動物の神経原線維変化 (NFT) 蓄積、脳不溶性 tau 増加を反映して、CSF タウは上昇した。AD 診断における頭部 MRI、脳血流 SPECT、FDG-PET、CSF マーカーの陽性率を比較検討したところ、CDR0.5 (ほぼ軽度認知障害レベル) では CSF マーカーが、CDR1 (軽症) では CSF に加え FDG-PET が、CDR2 以上では全ての検査の陽性率が高かった。

② BRI2 関連蛋白に関する研究 : FBD/FDD の原因遺伝子 BRI 関連蛋白の測定系を確立した。CSF 中の BRI2 は AD において他の神経変性疾患に比べて高い傾向を示した。FBD で沈着するアミロイド蛋白 ABri の N 末端にはピログルタミン酸残基を有するが、それが中枢神経系に限らず末梢にも存在していた。

6) アミロイドーシスに共通する発症・伝播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 :

① アミロイドイメーシングに関する研究 : [¹¹C]BF-227 探索的臨床研究として、健常人 2 名、AA アミロイドーシス患者 (非常に早期) 1 名の PET 画像を撮影したところ、健常者と患者の間に特記すべき違いはみられなかった。42 例の AA 患者の消化管生検標本の BF-227 染色では、標本ごとに染色像にかなりの違いがみられた。

② マウス老化アミロイドーシス及びウシアミロイドーシス伝播に関する研究 : HSF1 ノックアウトマウスを用いてマウス老化アミロイドーシスに対する HSF1 の抑制機構を検討したところ、Hsf1^{-/-} マウスでは、重度な apoA-II アミロイド沈着とそれに伴う心機能の低下が認められた。apoA-II in vitro 線維形成システムを用いた研究では、F 型 apoA-II の 48-65 番アミノ酸配列領域に強力な線維形成阻止能があること、B 型 apoA-II 合成ペプチド由来線維には in vivo で沈着促進能を有することが判明した。

AA アミロイドーシスのウシの検索では、腎、肝などの通常の沈着部位に加え、舌内唾液腺にアミロイド沈着を認めた。ウシ由来の AA アミロイドを炎症刺激 (飛節潰瘍+ブトウ球菌死菌等) 後のウサギに投与することによって、7 羽中 3 羽に AA アミロイドーシスが誘発された。

D. 考察

1) ALアミロイドーシス :

MGUSとALアミロイドーシスとの関連について検討したところ、MGUSの8.8%に無症候性アミロイドーシスを認め、その頻度は骨髄腫と比較すると少なかった。M蛋白のタイプは原発性ALアミロイドーシスではBJP- λ 型が多いのに対して、無症候沈着例は完全型M蛋白 ($\kappa > \lambda$) が多く、アミロイド原性が低いものと考えられた。アミロイド原性が高いとアミロイドーシスを早期に合併し、一方、アミロイド原性が低いものでも長期に量的負荷がかかると遅発性に症候性になる可能性がある。

ALアミロイドーシス合併例を含むMGUSの形質細胞は正常骨髄形質細胞と同様の細胞生物学的性質を示しており、恒常的NF- κ B活性が高くp53遺伝子変異もなく、増殖活性は強くないが、長期生存には有利な状態にあると考えられる。

ALアミロイドーシスにおける線溶異常の多施設共同研究では、本症における過剰線溶と、その基盤になると考えられる形質細胞のuPA発現が確認された。プラスミンによるBJP修飾がアミロイドーシス発症や進展に関与している可能性があり、詳細な病態解明は治療法開発につながる可能性もある。

本症は消化管に好発するが、消化管限局性アミロイドーシスの場合、進行はある時点から停止性で、制御不能な出血や通過障害などをきたさずに、全身性に移行することなく長期間経過することが明らかになった。限局性の場合、基本的に予後良好であることから、ALアミロイドーシスの診断では全身性との鑑別に十分留意する必要がある。

抗ヒトκ鎖抗体 (clone H-16E) はAκアミロイドの大部分を染色したことから、Aκの免疫組織化学的同定に有用な抗体と考えられた。従来、ALではN末端から定常領域までが主にアミロイドとして沈着するとされてきたが、このκ鎖抗体はC末端部分を抗原としており、多くの例のAκアミロイドはC末端部分を含んでいることが新たに示された。

本症に対する治療では、HDM+ASCT療法の有効性が注目され、適応例では治療の第一選択となっている。本療法を施行し臨床的寛解が得られた場合、長期的には腎臓におけるアミロイド沈着を改善する可能性が示された。本療法により完全寛解に至ればアミロイド沈着を抑制するだけでなく、一旦沈着したアミロイドを除去できることが示唆される。

一方、HDM+ASCT療法は、重篤な臓器障害がある場合、適応外となってしまうことが問題となる。そのため、AL分科会では、BMD療法の全国多施設臨床試験を実施中である。本報告のようにBORの有用性を示す症例が報告されてきており、BMD療法の有用性が期待される。しかし、時には心毒性により心不全がおこる場合もあるなど、重篤な副作用の可能性を考慮し慎重な投与が必要である。

また、血液透析療法では、PS膜によるHDFによって最も効率的にFLCが除去され、血清FLCは低値を維持し臓器障害の進行抑制に効果がある可能性が示唆された。HDM+ASCTの施行できない例において、有用な治療オプションになる可能性がある。

2) AA アミロイドーシス：

RAにおけるAA発症の感度の高い検出は重要な課題である。今回、消化管生検のAA定量法による評価では、沈着量において十二指腸が最も多く、診断及び進行評価のための生検部位として十二指腸が最も優れていることを確認した。さらに、治療でSAAを十分抑制し得た例では沈着は継時

的に減少する一方で、SAAが完全に抑制できなくても沈着が改善する例などもあり、SAA値以外のファクターもアミロイド沈着に関与している可能性が示唆された。

AA合併RAの腎障害の検討では、クレアチニンは腎組織におけるアミロイド沈着量を反映すること、血清アルブミン、推算糸球体濾過量が生物学的製剤 (エタネルセプト・トシリズマブ) による治療効果判定の指標となりうることが示唆された。AAアミロイドーシスにおいて腎障害は予後決定因子であり、アミロイド沈着と腎機能障害の関係の解明や適切な治療効果の判定基準の確立に向けた研究が必要である。

AAアミロイドーシスに対するヒト化抗IL-6受容体抗体 (トシリズマブ) を用いた全国多施設臨床試験については、現在までに30例が登録されたが、生物学的製剤による治療の普及に伴い、新たな臨床試験参加者の確保が困難になりつつある傾向にあり、今後、登録者増加のための方策をとる必要がある。

マウスモデルを用いたAAアミロイドーシスの解明のため、マウスSAAに対するモノクローナル抗体を作成し、それを用いた高感度SAA測定系を確立した。これらはAA研究のための有用なツールとなるものである。

3) FAP：

FAPにおけるアミロイド沈着と基底膜との関連の検討結果から、基底膜におけるアミロイド線維形成と基底膜成分の増加が連鎖的におこっていることが示唆された。基底膜はすべてのアミロイド沈着の好発部位であり、アミロイド蛋白と基底膜構成成分の相互作用に関する分子レベルでの解明が必要である。また、血清中のIV型コラーゲンはアミロイド沈着の指標になる可能性がある。

また、長野県の集積地のFAPの末梢神経障害の自然経過が明らかになった意義は大きい。これらのデータは、今後行われる種々の治療介入において貴重な対照データとなるものと思われる。また、肝移植などの治療介入はできるだけ早期に、少なくとも発症5年以内に行うべきことが示された。

肝移植を受けたFAP45例の術後経過の検討で

は、死亡症例は術後早期にはグラフト不全や門脈や肝動脈の血栓症が死因となり、その後は合併症が死因となっていた。3年以上の経過例では7割が何らかの症状改善がみられたが、術後の問題として、心アミロイドーシス、排尿障害、眼アミロイドーシス、精神症状、胆管吻合部狭窄などがあつた。肝移植においては、これらの点に十分留意する必要がある。

FAP患者(ATTR Tyr114Cys)からの生体ドミノ肝移植を受けた例の8年後の剖検で、無症候性に、アミロイド沈着が広範囲に認められた。これまでの同様の報告と併せ、ドミノ肝移植では長期間を経ればレシーピエントにアミロイド沈着をきたすことを十分考慮する必要がある。

FAPの新規治療法開発に関する研究では、siRNA療法について画期的な成果を得た。TTR発現を選択的にノックダウンするsiRNAの硝子体投与がTTR発現を選択的に抑制したことから、難治性眼アミロイドーシスの治療法の1つとなる可能性が示唆された。さらに、siRNA発現AAV8をV30M TTRトランスジェニックマウスへ経静脈投与によって副作用なく変異TTRの発現のみを特異的に強く抑制したことから、本治療はFAPの根本的治療法となる可能性がある。今後、ヒトでの臨床応用をめざし、霊長類を用いた長期的な安全性確認などの研究を行っていく必要がある。

4) 透析アミロイドーシス：

昨年度、HDよりもCAPDよりも透析アミロイドーシスを発症しやすいことを報告したが、今年度はその要因を検討した。血清 β_2 -mはCAPD群がHD群よりも有意に高値であり、CAPD患者でDSA発症群と非発症群を比較すると発症群で β_2 -mは高値であったことから、CAPDにおける β_2 -m高値がDSA発症に関与していることが推測される。

透析アミロイドーシス診断基準はこれまでになく、本研究班の診断基準が世界初のものである。この診断基準を使うと透析経過年数と共に臨床診断例が増え、特に15年以上となると発症件数は急増し、この診断基準は実施臨床上妥当なものと思われる。しかし、手根管症候群や弾撥指を呈した例の約1/3が手術を受けているにも関わらず病理学的診断例が少ないことが問題であり、今後、

病理学的確定診断例を増やして本診断基準の診断精度を高めるためには、透析治療に携わる医師に対する啓発活動が必要と思われる。

5) 脳アミロイドーシス：

A β 産生の制御メカニズムを解明し抑制することは脳アミロイドーシス治療開発に直結する。酸化ストレスはPS1mRNA発現を増加させ脂質ラフトPS1蛋白を増加させ、A β 分泌を促進させたことから、抗酸化物質によるAD治療の可能性が示唆された。また、ARBの不活体がA β 産生を抑制した。使用した濃度が高いため日常臨床で用いられている薬剤量では効果がある可能性はほとんどないが、その作用機序の解明はAD創薬につながる可能性がある。

A β 凝集の抑制は脳アミロイドーシス治療法開発の重要なターゲットである。*In vitro*のA β 凝集系の解析で、気液界面や疎水性プラスチック表面が重要な役割を果たすことが明らかになった。脳内では細胞膜リン脂質表面、基底膜などの細胞外マトリックス成分等の生体界面が、それらに対応する重合核形成の場である可能性が示唆される。また、A β 凝集系にapoE E4を添加すると、他のアイソフォームと較べてプロトフィブリル維持効果が弱く、線維形成が早期に進行したことから、E4はA β の不溶化が進行しやすくAD発症を促進する可能性が考えられる。抗A β 凝集療法開発については、ポリフェノールを中心とするフェノール化合物がオリゴマー形成を含むA β 凝集、沈着過程を阻害することが*in vitro*及び*in vivo*の研究で明らかになった。今後、これらの化合物のAD予防、治療への臨床応用が期待される。

治療法開発と共に、脳アミロイドーシスの早期診断法の確立が急務となっている。モデルマウスにおいてメラトニン経口負荷によって脳内A β 蓄積を反映して血液中にA β 排泄がみられたことから、この負荷試験は脳内A β 沈着のマーカーとして有用である可能性がある。また、タウオパチーモデルマウスの検討から、CSFタウは脳内のNFT及び不溶性タウ蓄積を反映するマーカーであることが確認された。AD診断における頭部MRI、脳血流SPECT、FDG-PET、CSFマーカーの比較では、CDR0.5ではCSFマーカーが最も陽性率が高かった。今後、各種検査の方法及び評価法の標

準化、それに基づく比較検討が必要である。

FBD/FDDの原因遺伝子 *BRI* 関連蛋白が AD において他の神経変性疾患に較べて高い傾向を示したことは興味深い。老人斑に *BRI2* 免疫活性が認められていることから、*BRI2* が FBD/FDD ばかりでなく、 $A\beta$ 凝集、AD 発症にも関与している可能性がある。また、FBD で沈着する ABri の N 末端のピログルタミン酸生成が中枢神経系に限らず末梢にもみられることから、ピログルタミン酸を標的とした治療法開発上、末梢組織の ABri 沈着は有用な指標となりうることが示唆される。

6) アミロイドーシスに共通する発症・伝播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：

$[^{11}C]BF-227$ を用いたアミロイドイメージングの探索的臨床研究が進行した。AA アミロイドーシス患者 1 例と健常者間に特記すべき違いがみられなかったのは、当該患者が非常に早期のステージにあり、アミロイド沈着が乏しかったためと推測される。実際、AA アミロイドーシスと診断された消化管生検標本の BF-227 染色をみると、標本ごとに陽性所見（沈着量）にかなりの違いがみられている。今後、患者数を増やし、イメージング所見と生検所見を対比させることにより、イメージングの精度を検証していく必要がある。

マウス老化 (apoA-II) アミロイドーシスの *in vitro* 及び *in vivo* モデルを用いたアミロイド線維形成・伝播機構の解析研究が一段と進展した。HSF1 ノックアウトマウスを用いた研究で、*Hsf1*^{-/-}マウスでは apoA-II アミロイド沈着が促進されることから、アミロイド沈着には HSF1 が重要な役割を果たし、Hsps の発現促進による治療の可能性が示唆された。apoA-II *in vitro* 及び *in vivo* 線維形成システムを用いた研究では、F 型 apoA-II ペプチド（48-65 番アミノ酸配列領域）の重合阻害効果、B 型 apoA-II 合成ペプチド由来線維の沈着促進効果が明らかとなった。今後、マウス老化アミロイドーシス以外のアミロイドーシスについても、アミロイドーシス関連蛋白の線維形成機構、伝播機構、抑制物質探索を行うにあたり、本研究手法は非常に有用な試験系と考えられる。

ウシの検索では、通常の沈着部位に加え、舌内

唾腺に AA アミロイド沈着を認めること、ウシ由来の AA アミロイドの投与によりウサギに AA アミロイドーシスが誘発されることが明らかになった。舌組織は牛タンとして食用に供される部位である。RA などの慢性炎症を有するヒトがウシ由来アミロイドを摂取した場合、AA アミロイドーシスを誘発する可能性がある。ウシ由来食品の安全性という観点から、ウシ AA アミロイド投与によるアミロイドーシス動物モデルの作製は重要な課題である。食品等に含まれるアミロイドによるアミロイドーシス伝播あるいは促進現象が、実際にヒトで起こりうるかという点を検証するために、今後、基礎研究から疫学的研究まで幅広い研究を推進する必要がある。

E. 結論

病型ごとの戦略及び全病型に共通する課題の研究により、疫学病態調査、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。AL では HDM+ASCT 療法の有用性の検討に加え、新規 BMD 療法による全国多施設臨床試験を推進し、その他の治療オプションとして HDF の有用性を示した。AA では IL-6 受容体抗体トシリズマブによる世界初の AA 全国多施設臨床試験が進行した。FAP では肝移植例の長期予後の解析等により移植の適応条件を明確にし、非移植治療として siRNA 治療開発研究を行いモデル動物で画期的な成果を得た。透析アミロイドーシスでは世界初の本症診断基準を作成し、実地臨床における妥当性を検証した。脳アミロイドーシスでは ApoE E4 がアイソフォーム特異的に $A\beta$ 線維形成を促進すること、フェノール化合物が *in vitro* 及び *in vivo* でオリゴマー形成を含む $A\beta$ 凝集・沈着を抑制することを示した。アミロイドイメージング開発はアミロイドーシス患者における探索的臨床研究に進んだ。アミロイドーシスの“伝播”については、伝播機構に関する分子レベルでの基礎的研究、ウシの舌等の食用部位におけるアミロイド沈着の検出やウシ由来アミロイドによる伝播実験が進行した。

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) Ono K, Condron MM, Teplow DB: Structure-neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14745-14750, 2009.
- 2) Chatani E, Lee YH, Yagi H, Yoshimura Y, Naiki H, Goto Y: Ultrasonication-dependent production and breakdown lead to minimum-sized amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11119-11124, 2009.
- 3) Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T: A β immunotherapy: intracerebral sequestration of A β by an anti-A β monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble A β . *J Neurosci* 29:11393-11398, 2009.
- 4) Ashihara E, Kawata E, Nakagawa Y, Shimazaki C, Kuroda J, Taniguchi K, Uchiyama H, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Kamitsuji Y, Inaba T, Taniwaki M, Kimura S, Maekawa T: β -catenin small interfering RNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model. *Clin Cancer Res* 15:2731-2738, 2009.
- 5) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M: Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid β aggregation pathway. *Am J Pathol* 175:2557-2565, 2009.
- 6) Ueda M, Misumi Y, Mizuguchi M, Nakamura M, Yamashita T, Sekijima Y, Ota K, Shinriki S, Jono H, Ikeda SI, Suhr OB, Ando Y: SELDI-TOF Mass Spectrometry Evaluation of Variant Transthyretins for Diagnosis and Pathogenesis of Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Clin Chem* 55:1223-1227, 2009.
- 7) 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 Pathol* 19:48-57, 2009.

8) Susuki S, Sato T, Miyata M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, Ando Y, Kai H: The endoplasmic reticulum-associated degradation of transthyretin variants is negatively regulated by BiP in mammalian cells. *J Biol Chem* 284:8312-8321, 2009.

9) Kawaji T, Ando Y, Hara R, Tanihara H: Novel Therapy for Transthyretin-related Ocular Amyloidosis A Pilot Study of Retinal Laser Photocoagulation. *Ophthalmology*, in press.

10) Misumi Y, Ando Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Uchino M: Chain reaction of amyloid fibril formation with induction of basement membrane in familial amyloidotic polyneuropathy. *J Pathol* 219:481-490, 2009.

11) Zhao W, Wang J, Ho L, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM: Identification of antihypertensive drugs which inhibit amyloid- β protein oligomerization. *J Alzheimers Dis* 16:49-57, 2009.

12) Ho L, Chen LH, Wang J, Zhao W, Talcott ST, Ono K, Teplow D, Humala N, Cheng A, Percival SS, Ferruzzi M, Janle E, Dickstein DL, Pasinetti GM: Heterogeneity in red wine polyphenolic contents differentially influences Alzheimer's disease-type neuropathology and cognitive deterioration. *J Alzheimers Dis* 16:59-72, 2009.

13) Jin H, Sanjo N, Uchihara T, Watabe K, St. George-Hyslop P, Fraser PE, Mizusawa H: Presenilin-1 holoprotein is an interacting partner of sarco endoplasmic reticulum calcium-ATPase and confers resistance to endoplasmic reticulum stress. *Journal of Alzheimer's Disease*, in press.

14) Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [^{11}C]BF-227 PET. *Eur J Nuc Med*, in press.

15) Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Yaegashi N, Kase Y, Arai H: A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects

on Alzheimer's amyloid β proteins in vitro and in vivo. *J Neurochem* 1009:1648-1657, 2009.

16) Okamoto S, Wixner J, Obayashi K, Ando Y, Ericzon BG, Friman S, Uchino M, Suhr OB: Liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: impact on Swedish patients' survival. *Liver Transp* 15:1229-1235, 2009.

17) Hamaguchi T, Ono K, Yamada M: Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther*, in Press.

18) Sasahara K, Yagi H, Naiki H, Goto Y: Thermal response with exothermic effects of β_2 -microglobulin amyloid fibrils and fibrillation. *J Mol Biol* 389:584-594, 2009.

19) Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda S, Tamaoka A, Kuzuhara S, Shoji M, Ando Y, Tokuda T, Yamada M: Clinical features of non-hypertensive lobar intracerebral hemorrhage related to cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Neurol*, in Press.

20) Arif M, Chikuma T, Ahmed MM, Nakazato M, Smith MA, Kato T: Effects of memantine on soluble $A\beta_{25-35}$ -induced changes in peptidergic and glial cells in Alzheimer's disease model rat brain regions. *Neuroscience* 164:1199-1209, 2009.

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

安東由喜雄

1) 発明の名称：アミロイド線維形成抑制剤およびその作用

出願番号：特願 2009-042102

出願日：2009年2月25日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし