

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業))

## アミロイドーシスに関する調査研究

研究代表者 安東 由喜雄 熊本大学 大学院生命科学研究部 神経内科学分野 教授

### 研究要旨

アミロイドーシスは、アミロイド線維の沈着という共通した病態や病理学的な特徴を有する疾患群である。多様な基礎疾患や病態を持つことから、各診療科が連携して横断的な研究に取り組み、本疾患群に対する診療をより良いものへと改善する必要がある。本研究は、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)、AL アミロイドーシス、AA アミロイドーシス、脳アミロイドーシス、透析アミロイドーシスの分子病態に基づいた早期診断・治療法の開発・改善を行い、本疾患群に共通した臨床的な課題に取り組むと共に、本症の発症動向を調査・把握し、各医療機関と病診連携を構築・改善することを目的に実施した。具体的には、本研究により以下の成果および知見を得た。1) FAP: 肝移植後の病態変化は臓器によって異なることが判明した。高齢 FAP 患者では移植後も末梢神経障害が進行する傾向があり移植適応を慎重に判断する必要がある。FAP 肝を用いたドミノ肝移植後に無症候性にアミロイド沈着が生じており定期的な組織学的精査が必要である。TTR 安定化剤であるジフルニサルは、肝移植の効果が乏しい高齢 FAP 患者の末梢神経障害の進行を抑制する可能性がある。2) AL アミロイドーシス: 各種の薬剤や自家末梢血幹細胞移植療法は、適格症例を厳密に選択し、慎重な全身管理を行うことで、有効性の高い治療法となる。また、完全寛解が得られなくとも追加の化学療法が効果を示す可能性がある。新規治療法としてメルファランとデキサメタゾン併用療法に、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブを併用した BMD 療法を考案し臨床試験を継続している。3) AA アミロイドーシス: IL-6 を標的としたトシリズマブは AA アミロイドーシスに対して優れた治療効果を示すことが、多施設共同研究で明らかになった。腎アミロイドは治療後も除去されにくく、臓器により治療反応性が異なっていた。JAK 阻害剤であるトファシニブはアミロイド前駆蛋白質である血清アミロイド A の産生を抑制し新規治療法の候補として考えられた。新規の抗 AA76 抗体は、AA アミロイドーシス診断の優れたツールになりうる。4) 脳アミロイドーシス: A $\beta$ 凝集に対する、Sortilin、ApoE、フェノール化合物、スタチンの影響、及び可溶性 A $\beta$ における毒性 A $\beta$ コンフォマーの存在を報告した。また、家族性アルツハイマー病、老齢ネコ科動物における A $\beta$ 沈着機構及を明らかにし、さらに、アルツハイマー病における微小脳出血の影響、脳アミロイド血管症に対する副腎皮質ステロイドによるアミロイド退縮メカニズムを明らかにした。5) 透析アミロイドーシス: 日本透析医学医会の統計資料を用いて代表的症状である手根管症候群の発症頻度を精査した。透析アミロイド症診断基準の各臨床項目が患者 QOL に与える影響が明らかになった。本疾患のアミロイド線維は細胞表面に付着し、壊死及びアポトーシスの両者を引き起こすことで毒性を発揮すると考えられた。6) アミロイドーシスに共通する発症・伝搬機構の解析および診断・治療法の開発など: 新たなアミロイドイメージング技術や質量分析による原因蛋白質の同定は、本症の早期診断に役立つと考えられた。マウス ApoAII アミロイドーシス伝搬機構の詳細な解析結果から、線維阻害作用を持つ合成ペプチドによるアミロイドーシスの新たな治療法の開発が期待できる。

**研究分担者**

**研究分担者**

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

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

樋口京一 信州大学大学院医学系研究科加齢生物学分野 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

高市憲明 虎の門病院腎センター内科 部長

山田俊幸 自治医科大学臨床検査医学 教授

内木宏延 福井大学医学部医学科病因病態医学講座分子病理学領域 教授

本宮善恢 医療法人翠悠会 理事長

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

吉崎和幸 大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻先端材料化学領域免疫医科学特任教授

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

麻奥英毅 広島赤十字・原爆病院検査部 部長

奥田恭章 道後温泉病院リウマチセンター 副院長

水口峰之 富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）構造生物学研究室 教授

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

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

西 慎一 神戸大学大学院医学研究科腎臓内科腎・血液浄化センター 特命教授

畑 裕之 熊本大学医学部附属病院血液内科 講師

宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室 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

小池春樹 名古屋大学医学部附属病院神経内科

病院講師

島崎千尋 社会保険京都病院 副院長

山下太郎 熊本大学医学部附属病院神経内科 講師

**A. 研究目的**

アミロイドーシスとは、通常は可溶性である種々の蛋白質が、基礎疾患を原因とした蛋白質濃度の上昇や、遺伝子変異による蛋白質の質的变化などによって、不溶性の線維状構造物であるアミロイドへと変性し、諸臓器の細胞外に沈着することで様々な機能障害を生じる疾患群である。

本疾患群は、アミロイド線維の沈着という共通した病態や病理学的な特徴を有するが、多様な基礎疾患や病態を持つことから、各診療科が連携して横断的な研究に取り組み、本疾患群に対する診療をより良いものへと改善する必要がある。

本研究の目的は、各アミロイドーシスの分子病態に基づいた早期診断・治療法の開発・改善を行うと共に、本症の発症動向を調査・把握し、各医療機関と病診連携を行うことで、本症の病型を早期診断し、最善の治療を迅速に行えるシステムを構築・改善することである。

**1) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)**

肝移植後の末梢神経障害の推移に患者年齢が関与するか検証するとともに、肝移植療法の長期効果を詳細に検証した。また、FAP 肝のドミノ肝移植が及ぼす影響を病理学的に検証した。加えて、トランスサイレチン (TTR) の安定化剤であるジフルニサルが肝移植を受けることが困難である高齢発症 FAP 患者に対して有効であるか検証した。

また、本症の動物モデルとして有用と考えられるベルベットモンキーの持つ TTR 分子の立体構造を解析した。

**2) AL アミロイドーシス**

国内の多施設共同で、各種の薬剤や自家末梢血幹細胞移植療法 (ASCT) を併用した治療法の有効性に関する研究を行うと共に、AL アミロイドーシスの神経症候や併発疾患に関する検討を行った。

**3) AA アミロイドーシス**

ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体であるトシリズマブ (TCZ) の AA アミロイドーシスに対する治療効果を全国の多施設が共同で検証した。

また、JAK 阻害を介してサイトカインシグナル伝達を阻止する新規低分子化合物のトファシチニブが本症に効果を示すか基礎検討を行った。

さらに、新規の抗 AA 抗体による病理診断法の開発と、アミロイド抑制ペプチドの開発を目指して、アイソフォーム別 SAA 由来のペプチドのアミロイド形成性を検討した。

#### 4) 脳アミロイドーシス

アルツハイマー病 (AD)、脳アミロイド血管症 (CAA) の病因、病態に迫るとともに、各種薬剤を用いた治療法開発に向けた研究を行った。また、本症のモデル動物としてネコ科動物の脳病理を解析した。

#### 5) 透析アミロイドーシス (DRA)

これまで詳細が不明であった DRA に関する大規模な疫学調査を行うと共に、透析アミロイド症の沈着部位・程度が患者 QOL にどの程度影響しているかを検討した。また、 $\beta 2$  ミクログロブリン ( $\beta 2m$ ) の C 末端特異的抗体を用いた診断法の検証および本アミロイドーシスで骨・関節破壊が生じる機構の解析を行った。

#### 6) アミロイドーシスに共通する発症・伝搬機構の解析および診断・治療法の開発など

近年、各アミロイドーシスに対する効果的な治療法が開発されてきたが、病初期に特に効果を示す。また、各病型により適切な治療法が異なっている。そのため、早期にアミロイド沈着を検出し、迅速にアミロイドの原因蛋白質を同定する必要がある。本研究では、新規の画像診断法と質量分析による病型診断法の開発を行った。

また、プリオンに類似したアミロイド原因蛋白質の伝搬機構を解析した。

## B. 研究方法

### 1) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)

#### ①肝移植後の病態に関する検討

肝移植を施行し、10 年以上経過後に死亡した FAP ATTR Val30Met 4 例と、肝移植を施行せずに自然経過で死亡した FAP Val30Met 7 例の剖検組織を用いて、アミロイド沈着様式の違いを検証した。また、各組織に沈着したアミロイドを構成している TTR を抽出し、変異型と野生型 TTR の比率を分析した (安東ら)。

#### ②若年発症と高齢発症 FAP の症候に関する研究

高齢発症と若年発症 FAP で肝移植前後の末梢神経障害を経時的に検討した (小池ら)。

#### ③ドミノ肝移植患者の病態に関する研究

FAP 患者からの摘出肝を用いて行なわれたドミノ肝移植患者の剖検 2 例における、アミロイドの沈着様式について検討した (山下ら)。

#### ④TTR 安定化剤の効果に関する研究

肝移植の適応のない 18 名の高齢発症 FAP ATTR Val30Met 患者に対し、ジフルニサル 500mg/日を投与し、尺骨神経および脛骨神経の複合筋活動電位 (CMAP) を経時的に評価した (池田ら)。

#### ⑤新規の動物モデルに関する研究

ベルベットモンキーを含む 5 種類の霊長類 TTR を作成し、その立体構造と構造安定性を解析した (水口ら)。

## 2) AL アミロイドーシス

#### ①治療法に関する検討

ASCT の安全性および有効性を高めるために、治療を行った 35 例の生存率に関連する予後因子を単変量解析および多変量解析により後方視的に解析した (鈴木ら)。

ASCT を受けた患者のうち完全寛解 (CR) に至らなかった症例および CR 後に再発した症例に対する治療法を検討した (松田ら)。

現在、原発性 AL アミロイドーシスに対する化学療法の中で最も優れているとされるメルファラン (MEL) /デキサメタゾン (DEX) 併用療法に、骨髓腫細胞に対し直接的にアポトーシスを誘導することが報告されているプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ (BOR) を併用した BMD 療法を考案し、全国 9 施設で、臨床第 I/II 相試験を実施した (島崎ら)。

前治療で CR とならなかった 11 症例中 7 症例に対して biweekly BOR + DEX 療法を維持療法として施行し、効果を検討した (麻奥ら)。

#### ②症候や併発疾患に関する検討

神経症候を主体とした AL アミロイドーシスの症例を解析した (今井ら)。

結節性 AL アミロイド症を合併したシェーグレン症候群 (SjS) について、アミロイド病変の分布を中心に検討した (池田ら)。

## 3) AA アミロイドーシス

### ①治療法に関する検討

RAに伴うAAアミロイドーシスに対するTCZを用いた本症の治療効果を検証した。37名を対象に、TCZ治療群とその他のRAに対する通常の治療群に分け、組織のアミロイド沈着量と腎機能の変化を解析した(吉崎ら)。

25例のTCZ治療群と、34例のTNF治療群を対象に、基礎疾患の病態、SAA、eGFR、蛋白尿の推移を解析し両群間で比較した(奥田ら)。

抗サイトカイン療法後の腎アミロイドーシスおよび腎機能の推移を解析した(西ら、佐伯ら)。

T細胞活性化調整剤であるアバタセプト(ABT)の本症に対する治療効果を解析した(中村ら)。

Caplan症候群に併発した症例の解析を行った(中村ら)。

### ②JAK阻害剤の抗炎症効果およびSAA抑制効果の検討

RA患者の関節滑膜細胞を、炎症性サイトカインで刺激し、JAK阻害剤であるトファシチニブが炎症性シグナルを抑制するか検討した(右田ら)。

### ③新規抗AA抗体による病理診断法の開発

AA76のペプチドを合成し、ラットに免疫してモノクローナル抗体の作製を行い、AAアミロイドーシス患者30例の胃十二指腸粘膜生検材料について免疫組織化学を施行した(山田ら)。

### ④アイソフォーム別SAA由来ペプチドのアミロイド形成性

SAAアイソフォームで共通配列を持つ領域のペプチド(1-27)およびアイソフォーム間で異なる配列を含有するペプチド(43-63)を作成し、アミロイド形成性等を検証した(山田ら)。

## 4) 脳アミロイドーシス

### ①治療法の開発に関する研究

フェノール化合物(山田ら)、スタチン(玉岡ら)の治療効果の検討および、造血幹細胞を用いた治療法に関する基礎検討(芦原ら)を行った。

### ②毒性を示すAβ分子種の解析

ApoEのAβオリゴマー形成に対する作用を明らかにするため、まずapoEε2/εx、ε3/ε3、ε4/ε4各アレルを持つAD患者脳を用い、脳内のTBS可溶性Aβオリゴマー量を検討した(岩坪ら)。

可溶性の毒性コンフォマーの同定を行うため、毒性コンフォマー特異抗体(11A1)を用いて免疫

組織学的に検討し、エピトープが第18位~第22位アミノ酸残基である抗体(4G8)と比較検討した(玉岡ら)。

Aβ重合体の神経毒性発現機序を、sortilinに対するsiRNA法や新規Aβ重合体特異的モノクローナル抗体(72D9)を用いて培養細胞系で解析した(東海林ら)。

プレセニリン(PSEN)1およびPSEN2のノックアウト(PSDKO)マウスの線維芽細胞(PSDKO-MEF)を用いてAβ40、Aβ42、Aβ43の発現量に関して、複数のPSEN1遺伝子変異間で比較した(水澤ら)。

### ③CAAの病態解析

ADにおける脳微小出血(BMB)と灰白質容量、脳糖代謝との関連を解析した(山田ら)。

副腎皮質ステロイドを投与し、脳血管アミロイドが退縮したCAA患者の髄膜血管からAβアミロイド粗画分を分離し、その中に含まれるAβアミロイドおよび関連タンパク質をLC/MSMSを用いて網羅的に解析した。(池田ら)。

### ④α-シヌクレイン(α-Syn)分解機構の解析

オートファジーおよびneurosinによるα-Syn封入体の分解機構を解析した(徳田ら)。

### ⑤動物モデルとしてのネコ科動物の脳病理解析

ネコ科動物の脳におけるβアミロイドの沈着と神経原線維変化について病理学的に解析し、ヒトのアルツハイマー病における脳病変と比較検討した(宇根ら)。

## 5) 透析アミロイドーシス

### ①透析アミロイドーシスの実態調査

日本透析医学会と協力し、手根管症候群(CTS)の手術既往歴の頻度の推移、血中β2m濃度との関係など比較した(西ら)。外来維持透析患者を対象とし、QOL評価のアンケート調査を施行し、X線検査やMRI所見との比較を行った(高市ら)。

### ②β2mのC末端特異的抗体を用いた診断法の開発

キャピラリー電気泳動法でmAb92-99の特性を確認し、C末端unfoldedβ2mに対する抗体(anti-β2m92-99)を用いたELISAでC末端unfoldedβ2mの血中濃度を測定した(本宮ら)。

### ③骨・関節破壊が生じる機構の解析

滑膜線維芽細胞由来の株細胞を用いて、アミロイド線維の及ぼす細胞毒性や形態変化を検討した(内木ら)。

## 6) アミロイドーシスに共通する発症・伝搬機構の解析および診断・治療法の開発など

### ①アミロイドイメーシングに関する研究

本研究では、アミロイド線維に特異的に結合する化合物として作成された BF-227 と新規の近赤外線蛍光アミロイドプローブである THK-5XY を用いたアミロイドイメーシング法の有用性を検証した（工藤ら）。

### ②質量分析法を用いたアミロイドーシスの病型診断

従来の方法では診断が困難であった症例に対して質量分析法による病型診断法の有用性を検証した（安東、畑ら）。

### ③アミロイド原因蛋白質の伝搬機構の解析

伝搬機構が存在することが特に想定されるチーターの AA アミロイドーシスの原因である SAA 分子を解析した（樋口ら）。

アミロイドーシスが伝搬することが判明しているマウス AApoAII アミロイドーシスで、アミロイド線維形成阻害ペプチドの阻害機構を、*in vitro* 線維形成解析システムで解析した（樋口ら）。

（倫理面への配慮）

患者を対象とする臨床研究（診断、治療、遺伝子解析など）、疫学研究等は各施設の倫理委員会の承認後に、インフォームドコンセントを得て実施した。動物実験、遺伝子組み換え実験に関しても、各施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

## C. 研究結果

### 1) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)

#### ①肝移植後の病態に関する検討

肝移植後に長期経過した症例では、心臓など一部の臓器に重度のアミロイド沈着を認めたが、消化管、腎臓などの大部分の臓器におけるアミロイド沈着は軽度であった。肝移植後に長期経過した症例では各臓器のアミロイドは野生型TTRが主体となり構成されていた。また、アミロイドを構成しているTTRの断片化は、肝移植の有無によって差が認められなかった。

#### ②若年発症と高齢発症FAPの症候に関する研究

高齢FAP患者は、肝移植後に症状の改善を認めたものの、症例によっては数年後から末梢神経障

害が徐々に増悪した。

#### ③ドミノ肝移植患者の病態に関する研究

ドミノ肝移植患者の剖検組織において、TTRによるアミロイドの沈着が、諸臓器で認められた。

#### ④TTR安定化剤の効果に関する研究

ジフルニサルの内服により、血清中TTR四量体は安定化され、高齢発症FAP患者のCMAP振幅の低下率を有意に抑制した。

#### ⑤新規の動物モデルに関する研究

ベルベットモンキーTTRは122番目がIle、カニクイザルTTRはValであるが、両者の立体構造はほぼ同一であったが、原子の揺らぎを反映する温度因子がわずかに異なっていた。

## 2) ALアミロイドーシス

### ①治療法に関する検討

ASCTを行った35症例の予後には、主病変が心臓、血漿BNP値600pg/mL以上、左室駆出率が有意な因子として抽出された。多変量解析では有意な因子は抽出されなかった。血清遊離軽鎖（FLC）のフォローが可能であった例でASCT後に速やかなFLCの低下が認められた。

ASCTを受けた症例のうち43%でCRが得られた。CR後の再発は33%で再発までの期間は平均43.8か月であった。Non-CRの患者は16名(57%)で、5名はいずれも治療後12ヶ月未満で死亡、評価可能な患者9名のうち1名はnon-CRながらvery good partial response (VGPR)でORを認めた。残り8名はORを認めず追加治療を要した。その結果2名でCRとORが得られた。

BMD療法の臨床第I/II相試験には、これまで3例が登録され解析を継続している。

前治療でCRとならなかった7症例に対してbiweekly BOR + DEX療法を維持療法として施行したが、2症例は増悪傾向を認め、1例は患者事由により他の治療に変更した。

### ②症候や併発疾患に関する検討

神経症候を呈したALアミロイドーシスの神経組織を質量分析法で解析したところ、L鎖のλが優位に検出され、加えてapolipoprotein E、Serum amyloid P-componentも検出された。

ALアミロイドーシスを併発したSJS 3例中2例で結節性ALアミロイド病変が先行していた。アミロイド沈着病変の出現部位は頭皮、眼瞼、頬粘

膜、乳房、肺、胃粘膜であり、同病変の周りにはリンパ・形質細胞の高度な浸潤がみられた。3例全員で血清中のM蛋白は陰性、骨髄のflow cytometryでも形質細胞異常症は見出せなかった。

### 3) AA アミロイドーシス

#### ①治療法に関する検討

TCZ治療群の方が、非TCZ群に比べてアミロイド沈着量が減少傾向を示す症例が多かった。TCZの1年継続率は92%、10年継続率は92%であった。SAA濃度の抑制、腎機能の改善、基礎疾患の活動性のすべての面で、TCZ群は、TNF群より良好な成績であった。

本症に対して治療を行った後に、消化管のアミロイド沈着は除去されていたが、腎臓に沈着したアミロイドには明らかな変化がなかった。また、尿中からAA76蛋白が検出された。

T細胞活性化調節剤であるABT投与を行ったところ、炎症性サイトカインや制御性T細胞の動態に影響が観察された。

Caplan症候群に合併した本症に対してTCZ治療を行い心機能の改善が得られた。

#### ②JAK 阻害剤の抗炎症効果および SAA 抑制効果の検討

RA患者の滑膜細胞にトファシチニブを投与すると、OSMによるJAK1, 2, 3およびSTAT1, 3, 5のリン酸化は阻害された。また、IL-6刺激によるJAK2/STAT3のSAA1, 2のmRNA発現をトファシチニブは抑制した。

#### ③新規抗AA抗体による病理診断法の開発

AA76に対して高親和性のクローンが得られた。患者消化管粘膜の免疫組織化学では、コンゴレッド陽性を示したものは全例、新規抗体で陽性であった。

#### ④アイソフォーム別 SAA 由来ペプチドのアミロイド形成性

SAAのN末端領域および中間領域のペプチドは、試験管内で線維形成能を有することを明らかにした。また、異なるSAAアイソフォームの全長蛋白質では線維形成能に差異は認められなかったが、中間領域で線維形成能に違いが確認された。

### 4) 脳アミロイドーシス

#### ①治療法の開発に関する研究

ミリセチン (Myr)、ロズマリン酸 (RA)、クル

クミンなどのAβオリゴマー形成における影響をphoto-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP)、原子間力顕微鏡を用いて検討し、15NでラベルしたAβを用いてNuclear Magnetic Resonance (NMR)でAβの結合部位を調べたところ、Myr及びRAが強力にAβオリゴマー形成を抑制し、細胞およびシナプス毒性を軽減し、MyrはNMRにて有意なケミカルシフトを示すことが明らかとなった。

スタチンのAβ産生に対する効果について、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いて検討したところ、pitavastatin (PV)、atorvastatin (AV)でAβ40、Aβ42の分泌量が用量依存性に低下し、PV、AV処理した細胞では、成熟型アミロイド前駆体蛋白 (APP)、Thr668位のリン酸化APP (P-APP)の発現レベルの有意な低下を認め、細胞表面のP-APPレベルの低下を認めた。

Aβに対する食食機能について、マウス骨髄由来細胞およびヒト骨髄由来CD34陽性造血幹細胞を用いて解析した。その結果、付着細胞の一部がAβを食食し、さらにM-CSFを処置することで食食細胞数が有意に増加することが明らかとなった。

#### ②毒性を示すAβ分子種の解析

ApoE4はapoE2、apoE3に比べ有意にAβオリゴマー量を増加させることが判明した。また、AβコンフォマーのAD脳における生化学的同定を試みたところ、毒性AβコンフォマーはSDSの存在下でその特異的構造が失われやすいこと、免疫沈降とWestern blot法の組み合わせにより可溶性の毒性コンフォマーの同定が可能であった。

神経栄養因子受容体として知られるsortilinのノックダウンによりAβ重合体の神経毒性が抑制され、Aβ重合体特異的モノクローナル抗体(72D9)による細胞外Aβ重合体の特異的制御により、sortilinとp75NTRのdeathシグナリング複合体形成が阻害され、細胞外Aβ重合体の神経毒性も中和されることが明らかとなった。

若年発症を生じる病原性変異ほどAβ42/40比が高値を示す傾向にあり、Aβ43の発現量や比率よりもAβ42の影響がより強かった

#### ③CAAの病態解析

ADにおいてBMBは23例(16%)に認められた。

BMB を認める群 (BMB+AD) において頭部 MRI では両側前頭葉、側頭葉、島皮質などで灰白質容積が低下し、FDG-PET では両側島皮質、基底核、帯状回などで代謝低下を認めた。また、CAA+AD 11 例と、BMB を認めない群 (BMB-AD) 117 例で群間比較した結果、頭部 MRI では両側側頭葉、右島皮質などの灰白質容積が低下し、FDG PET では、両側島皮質、帯状回、右基底核などで代謝低下を認めた。BMB+AD、CAA+AD では、BMB-AD と比較し灰白質容積、糖代謝共に低下していた。

脳アミロイド血管症 (CAA) における副腎皮質ステロイド投与によるアミロイドの退縮メカニズムについて LC/MS を用いて網羅的に検討したところ、副腎皮質ステロイド治療 CAA 髄膜血管からは全分子型 A $\beta$  のみが抽出され、apoE、A-I、A-IV、clusterin 等のアミロイド線維結合タンパク質および炎症関連タンパク質 S100A9 等が減少していることが明らかとなった。

#### ④ $\alpha$ -Syn 分解機構の解析

$\alpha$ -Syn 凝集体の分解について、オートファジー関連蛋白質の RNAi による阻害や、protease activity assay により解析したところ、 $\alpha$ -Syn はオートファジーアダプター蛋白質 p62 の関与により分解され、neurosin により細胞外で分解されることが明らかとなった。

#### ⑤ 動物モデルとしてのネコ科動物の脳病理解析

ネコ科動物の脳における  $\beta$ アミロイドの沈着と神経原線維変化について病理学的に解析したところ、 $\beta$ アミロイドの沈着と神経原線維変化が観察され、 $\beta$ アミロイドは嗜銀性のプラークを形成することなく、神経網に微細顆粒状に沈着するパターンをとり、同蛋白質の N 末端側エピトープがヒトとは異なることが判明した。さらに、神経細胞内 A $\beta$  沈着は頭頂部から側頭部上部までほぼ同一で、側頭葉下部から海馬ではより高度であり、一部の例では瀰漫性～小顆粒状タイプの沈着に加えて、海馬錐体細胞を中心として大顆粒状タイプの沈着も観察された。

### 5) 透析アミロイドーシス

#### ① 透析アミロイドーシスの実態調査

CTS手術既往歴は、透析年数とともに増加していた。特に透析歴25年以上の長期透析患者では、手術既往歴がどちらの年度も約半数以上の症例に

認められた。CTS手術既往歴は、患者全体においては4.9%から3.4%に減少していた。臨床項目ごとに患者のQOLを評価すると、身体機能に強く影響を与える因子は破壊性脊椎関節症 (DSA) と多関節痛であり、体の痛みに強く影響を与える因子はDSAとばね指であった。透析アミロイド症の存在が、透析患者の身体機能・疼痛両者に他の要因より影響を及ぼしていた。

#### ② $\beta$ 2m の C 末端特異的抗体を用いた診断法の開発

キャピラリー電気泳動図で $\Delta$ N6 $\beta$ 2m の C 末端 unfoldingを確認し、アミロイド中間構造体 $\beta$ 2m 92-99のELISA法による測定系を確立した。

#### ③ 骨・関節破壊が生じる機構の解析

アミロイド線維により滑膜細胞の viability が低下した。また、核濃縮や細胞質の膨化、空胞化などの壊死性の変化がみられると共に、アポトーシス小体と考えられる核の断片化も認められた。

### 6) アミロイドーシスに共通する発症・伝搬機構の解析および診断・治療法の開発など

#### ① アミロイドイメージングに関する研究

BF-227はAAアミロイドーシス患者の組織に沈着したアミロイドと結合することが確認された。THK-265を、AAアミロイドーシスモデルマウスおよびアルツハイマー病モデルマウスに投与すると、アミロイド沈着部位に集積することが確認できた。

#### ② 質量分析法を用いたアミロイドーシスの病型診断

免疫染色で判定できなかったALアミロイドーシス4例のアミロイドを質量分析で解析したところ、何れも $\lambda$ 型軽鎖の定常領域2型が検出され、本結果よりALアミロイドーシスの診断に至った。

#### ③ アミロイド原因蛋白質の伝搬機構の解析

飼育下チーターの主要な死因となっているAAアミロイドーシスの原因分子であるチーターのSAA分子を詳細に解析したところ、4種類のSAA遺伝子 (SAA1A、SAA1B、SAA3A、SAA3B) が存在することが判明した。また、SAA1A遺伝子上流のNF $\kappa$ B反応領域での多型 (-97 ; GGG vs GG) とAAアミロイドーシスの重篤度との相関が示唆された。

マウスApoAIIアミロイドーシスを高頻度に発症し、個体間でアミロイドーシスが伝搬するマウスの持つApoAII分子 (C型) と、アミロイドーシスを発症しないマウスの持つApoAII分子 (F型) はアミ

ノ酸配列が4か所で異なるが、このF型ApoA-IIのC末ペプチド、特に、C型48-65番ペプチド (c48/65) の62番をアスパラギン (N) からリジン (K) に置換した合成ペプチドN62Kが、C型ApoA-II合成ペプチドの線維形成・伸長反応に対する阻害効果を*in vitro*解析システムで検討したところ、特に重合反応初期の阻害効果を強く認めた。

## D. 考察

### 1) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)

#### ①肝移植後の病態に関する検討

肝移植後に、心臓、舌など一部の臓器では、野生型 TTR によるアミロイド沈着が進行しやすいが、腎臓、甲状腺など大部分の臓器では、アミロイド沈着が進みにくいものと考えられた。

#### ②若年発症と高齢発症 FAP の症候に関する研究

加齢は FAP における肝移植後の末梢神経障害の増悪因子である可能性がある。

#### ③ドミノ肝移植患者の病態に関する研究

FAP 肝を用いたドミノ移植患者で、臨床症状が出現する以前に諸臓器でアミロイド沈着が生じている可能性がある。

#### ④TTR 安定化剤の効果に関する研究

ジフルニサルは高齢発症 ATTR Val30Met FAP 患者における CMAP の悪化を抑制することが明らかになった。

#### ⑤新規の動物モデルに関する研究

アミロイドーシスを生じるベルベットモンキーの TTR は、立体構造が揺らいでいると思われる。

### 2) AL アミロイドーシス

#### ①治療法に関する検討

心臓を主病変とする症例は有意に生存率が低く、ASCT 適応の詳細な検討および Melphalan の投与量の調節を含む全身管理が重要と考えられた。また、血清 FLC は治療効果の判定に有効であると考えられた。

ASCT を含めた初期治療で完全寛解が得られなくとも追加治療が有効である症例が多かった。

BMD 療法は海外でも同様の検討が開始されているが、BOR の至適投与量の明らかにする必要がある。

#### ②症候や併発疾患に関する検討

M 蛋白血症を有する患者の診断に、神経組織で

の LC-MS/MS が有用である。

SJS 患者の皮膚、肺、胃粘膜等の部位に同時期に多源性かつ同一組織内において多発性のアミロイド結節が観察されたことから、多源性に散布された異常形質細胞から局所でアミロイド惹起性の免疫グロブリン軽鎖が分泌されアミロイド細線維形成に至ったと考えられる。

### 3) AA アミロイドーシス

#### ①治療法に関する検討

IL-6 の作用を阻害する TCZ は、現在使用頻度の高い TNF  $\alpha$  を標的とした薬剤や他の標準的な RA 治療群より、良好な治療成績を示した。TCZ は、本症に対する効果的な治療法であると考えられる。

消化管と腎臓のアミロイドは沈着様式や治療反応が異なっており、沈着機構が異なっている可能性がある。

T 細胞活性化調整剤である ABT が本症に対して有効である可能性があり、今後の症例の蓄積が必要である。

#### ②JAK 阻害剤の抗炎症効果および SAA 抑制効果の検討

JAK 阻害剤であるトファシチニブは、IL-6 で誘導される JAK2/STAT3 の活性化を阻害することで、アミロイド前駆蛋白質である SAA の mRNA 発現を抑制することが明らかになった。

#### ③新規抗 AA 抗体による病理診断法の開発

AA76 に特異性の高いモノクローナル抗体が得られた。新規抗体はコンゴレッドを上回る検出能を有し、アミロイド以外の SAA/AA に反応しない感度、特異性を備えていることから、本症の診断に有用である。

#### ④アイソフォーム別 SAA 由来ペプチドのアミロイド形成性

全長蛋白質ではアイソフォーム間で線維形成能に差異は認められず、中間領域では差異が認められるという今回の結果より、C 末端領域の存在がアミロイド線維の形成に影響を及ぼす可能性があることが推察された。

### 4) 脳アミロイドーシス

#### ①治療法の開発に関する研究

Myr や RA をはじめとするフェノール化合物が A  $\beta$  凝集過程における早期の段階であるオリゴマー形成を濃度依存性に抑制し、細胞およびシナプ



ス毒性を軽減することを明らかにした。RA は NMR で detect できない低分子オリゴマー、あるいは構造変換したモノマーに結合することによって A $\beta$ オリゴマー形成を抑制すると考えられた。

スタチンはコレステロールの低下、プレニル化の変化とは別の機序を介して、APP の成熟化、リン酸化に影響し、A $\beta$  産生を低下させることが示唆された。

骨髄から採取した造血幹細胞由来の付着細胞は A $\beta$  の貪食機能を有しており、その貪食細胞の増殖は M-CSF 刺激により有意に促進されることがわかった。

## ②毒性を示す A $\beta$ 分子種の解析

ApoE4 が他のアイソフォームに比べ、A $\beta$  のオリゴマー化を促進することにより AD 発症リスクを高めている可能性がある。

免疫組織学検討と WB の結果の比較検討や、合成ペプチドを用いた検討の結果などから、毒性 A $\beta$  コンフォーマーは SDS の存在下でその特異的構造が失われやすいと考えられた。

Sortilin は細胞外 A $\beta$  重合体の神経毒性発現を直接制御するばかりでなく、細胞内 A $\beta$  重合体やタウの分解・クリアランスも制御する重要な分子と考えられた。

A $\beta$ 43 の沈着と遺伝子変異による A $\beta$ 43 産生における関連性よりも、A $\beta$ 42 の影響が強いと考えられた。

## ③CAA の病態解析

AD における CAA の合併は灰白質容積、脳糖代謝に影響を与えることが示唆される。

副腎皮質ステロイド治療による S100A9 の激減、炎症の抑制が A $\beta$  アミロイド線維化抑制を導き、アミロイドはミクログリア、マクロファージによる貪食作用等の本来の除去システムによって除去されたと推定された。

## ④ $\alpha$ -Syn 分解機構の解析

Neurosin の  $\alpha$ -Syn 分解活性は細胞外に分泌された場合に認められ、neurosin は主に細胞外プロテアーゼとして機能している可能性が考えられた。

## ⑤動物モデルとしてのネコ科動物の脳病理解析

ネコ科動物では、 $\beta$  アミロイドが嗜銀性プラークを形成せずに、アルツハイマー病型の神経原線

維変化を形成すると考えられた。また、細胞内 A $\beta$ 、細胞外 A $\beta$  と高リン酸化タウの蓄積との関連とその機構の解明にネコ科動物の解析は有用であると考えられる。

## 5) 透析アミロイドーシス

### ①透析アミロイドーシスの実態調査

HDA の代表的症状である CTS の手術既往歴は、日本透析医学会の統計調査資料から判断すると、長期透析患者においても低下していることが分かった。この抑制傾向の背景には、透析効率の改善、透析液の清浄化が関与していると推測された。

### ② $\beta$ 2m の C 末端特異的抗体を用いた診断法の開発

多関節痛・DSA は患者の身体機能に、ばね指と DSA は患者疼痛に強く影響を与えていた。

### ③骨・関節破壊が生じる機構の解析

$\beta$ 2m アミロイド線維は細胞表面に付着し、壊死及びアポトーシスの両者を引き起こすことで毒性を発揮すると考えられた。

## 6) アミロイドーシスに共通する発症・伝搬機構の解析および診断・治療法の開発など

### ①アミロイドイメージングに関する研究

BF-227 および近赤外線蛍光プローブはアミロイドと良好に結合し、その局在を同定できることから、本症に対するイメージング剤として早期診断に役立つ可能性がある。

### ②質量分析法を用いたアミロイドーシスの病型診断

従来手法では、本症の病型診断（原因蛋白質の特定）が困難であった症例でも、生検組織のアミロイド沈着部位を質量分析法で解析することで、その原因蛋白質の同定が可能であった。

### ③アミロイド原因蛋白質の伝搬機構の解析

マウス ApoA-II の線維形成阻害ペプチドはアミロイド線維形成初期の線維核と相互作用し、線維のさらなる形成・伸長を抑制すると考えられ、62 番アミノ酸がマウス AApoAII アミロイドーシスの発症を左右する最重要分子であることが示唆された。本結果から、他のアミロイドーシスでも同様の線維阻害ペプチドの効果を検討することで、新規のアミロイド阻害薬の開発に発展する可能性がある。

## E. 結論

### 1) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)

FAP に対する肝移植は、多くの臓器におけるアミロイド沈着を抑制するものの、心臓、舌など一部の臓器では、移植後も野生型 TTR による病態の進行を抑制困難な場合がある。また、末梢神経障害が肝移植後も進行しやすい高齢の FAP 患者では、移植の適応に慎重に判断する必要がある。

FAP 肝を用いたドミノ肝移植後には、無症候でもアミロイド沈着が出現していないか慎重に継続的な精査を行う必要がある。

TTR 安定化剤であるジフルニサルが肝移植の実施が困難である高齢発症の FAP 患者でも末梢神経障害の進行を抑制できる可能性がある。

ベルベットモンキーは本疾患の病態を反映していると考えられ、治療法開発などに使用するモデル動物として有用と思われる。

### 2) AL アミロイドーシス

全身性 AL アミロイドーシスに対する ASCT は、適格症例を厳密に選択し、慎重な全身管理を行うことで、有効性の高い治療法となる。また、完全寛解が得られなくとも追加の化学療法が効果を示す可能性がある。

AL アミロイドーシスに対する新規治療法として BMD 療法を考案し臨床試験を実施している。

### 3) AA アミロイドーシス

IL-6 を標的とした TCZ は AA アミロイドーシスに対して優れた治療効果を示すことが、多施設共同研究で明らかになった。

腎臓に沈着した AA アミロイドは治療後も除去されにくく、消化管に沈着したアミロイドとは治療反応性が異なっていた。

低分子化合物であるトファシチニブは、AA アミロイドーシスに対する治療として有用である可能性がある。

新規の抗 AA76 抗体は、AA アミロイドーシス診断の優れたツールになりうる。

### 4) 脳アミロイドーシス

脳アミロイドーシスでは、A $\beta$ 凝集に対する、Sortilin、ApoE、フェノール化合物、スタチンの影響、及び可溶性 A $\beta$ における毒性 A $\beta$ コンフォマーの存在を報告した。また、家族性アルツハイマー病 (FAD PSEN1 I143T)、老齢ネコ科動物における A $\beta$ 沈着機構及を明らかにし、さらに、アル

ツハイマー病における微小脳出血の影響、脳アミロイド血管症に対する副腎皮質ステロイドによるアミロイド退縮メカニズムを明らかにした。また、 $\alpha$ シヌクレイン封入体のオートファジー、および細胞外プロテアーゼによる分解系についても報告した。

### 5) 透析アミロイドーシス

日本透析医学医会の統計資料より HDA の代表的症状である CTS の手術既往歴が低下していることが判明した。透析アミロイド症診断基準の各臨床項目が患者 QOL に与える影響が明らかになった。 $\beta$ 2-m アミロイド線維は細胞表面に付着し、壊死及びアポトーシスの両者を引き起こすことで毒性を発揮すると考えられる。

### 6) アミロイドーシスに共通する発症・伝搬機構の解析および診断・治療法の開発など

新たなアミロイドイメージング技術や質量分析による原因蛋白質の同定は、本症の早期診断に役立つと考えられる。

マウス ApoAII アミロイドーシス伝搬機構の詳細な解析結果から、線維阻害作用を持つ合成ペプチドによるアミロイドーシスの新たな治療法の開発が期待できる。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

(主要論文のみを以下に示す。発表の詳細は分担研究報告を参照のこと)

1. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A: Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135: 3380-3391, 2012.
2. Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Iwanari H, Osawa S, Morohashi Y, Li T, Wong PC, Chiba S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T, Iwatsubo T: Neutralization of the  $\gamma$ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene* 31:787-798, 2012.

3. Takeo K, Watanabe N, Tomita T, Iwatsubo T: Contribution of  $\gamma$ -secretase cofactors to the formation of catalytic pore of presenilin 1. *J Biol Chem* 287:25834-25843, 2012.
4. Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zheng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, Iwatsubo T: Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 76:410-422, 2012.
5. Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiie Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M: Phenolic compounds prevent amyloid  $\beta$ -Protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding. *J Biol Chem* 287: 14631-14643, 2012.
6. Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M: Cross-seeding effects of amyloid  $\beta$ -protein and  $\alpha$ -synuclein. *J Neurochem* 122: 883-890, 2012.
7. Ishigami N, Tokuda T, Ikegawa M, Komori M, Kasai T, Kondo T, Matsuyama Y, Nirasawa T, Thiele H, Tashiro K, Nakagawa M: Cerebrospinal fluid proteomic patterns discriminate Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Mov Disord* 27: 851-857, 2012.
8. Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y: the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Altered  $\gamma$ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 4: 344-352, 2012.
9. Serizawa S, Chambers JK, Une Y: Beta amyloid deposition and neurofibrillary tangles spontaneously occur in the brains of captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Veterinary Pathology* 49: 304-312, 2012.
10. Machida K, Tsuchiya-Suzuki A, Sano K, Arima K, Saito Y, Kametani F, Ikeda S: Postmortem findings in a patient with cerebral amyloid angiopathy actively treated with corticosteroid. *Amyloid* 19:47-52, 2012.
11. Motomiya Y, Uji Y, Ando Y: Capillary electrophoretic profile of  $\beta$ 2-microglobulin intermediate associated with hemodialysis. *Ther Apher Dial* 16: 350-354, 2012.
12. Yoshimura Y, Lin Y, Yagi H, Lee YH, Kitayama H, Sakurai K, So M, Ogi H, Naiki H, Goto Y: Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 14446-14451, 2012.
13. Yanagi K, Sakurai K, Yoshimura Y, Konuma T, Lee YH, Sugase K, Ikegami T, Naiki H, Goto Y: The monomer-seed interaction mechanism in the formation of the  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibril clarified by solution NMR techniques. *J Mol Biol* 422: 390-402, 2012.
14. Chatani E, Yagi H, Naiki H, Goto Y: Polymorphism of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibrils manifested by ultrasonication-enhanced fibril formation in trifluoroethanol. *J Biol Chem* 287: 22827-22837, 2012.
15. Ando Y, Ueda M: Diagnostics and therapeutic approaches to transthyretin amyloidosis. *Curr Med Chem* 19: 2312-2323, 2012.
16. Misumi Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Ohshima T, Ando Y, Uchino M: Relationship between amyloid deposition and intracellular structural changes in familial amyloidotic polyneuropathy. *Human Pathol* 43: 96-104, 2012.
17. Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers JK, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y: Aged vervet monkeys developing transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: A valid pathological model of the human disease. *Lab Invest* 92: 474-484, 2012.
18. Yamashita T, Ando Y, Okamoto S, Misumi Y, Hirahara T, Ueda M, Obayashi K, Nakamura M, Jono H, Shono M, Asonuma M, Inomata Y,

- Uchino M: Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 78: 637-643, 2012.
19. Koike H, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Nakamura T, Watanabe H, Kamei H, Kiuchi T, Sobue G: The impact of aging on the progression of neuropathy after liver transplantation in transthyretin Val30Met amyloidosis. *Muscle Nerve* 46: 961-964, 2012.
  20. Koike, H Tanaka F, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Fujitake J, Kawanami T, Kato T, Yamamoto M, Sobue G: Natural history of transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy: analysis of late-onset cases from non-endemic areas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83: 152-158, 2012.
  21. Ohno Y, Mita A, Ikegami T, Masuda Y, Urata K, Nakazawa Y, Kobayashi A, Terada M, Ikeda S, Miyagawa S: Temporary auxiliary partial orthotopic liver transplantation using a small graft for familial amyloid polyneuropathy. *Am J Transplant* 12: 2211-2219, 2012.
  22. Furukawa K, Ikeda S, Okamura N, Tashiro M, Tomita N, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Cardiac positron-emission tomography images with an amyloid-specific tracer in familial transthyretin-related systemic amyloidosis. *Circulation* 125: 556-557, 2012.
  23. Yamada T, Okuda Y: AA amyloid quantification in biopsy samples from stomach. *Ann Clin Lab Sci* 42: 3-6, 2012.
  24. Saiki O, Kuhara M, Kikuchi N, Shiraishi S, Uda H: Evaluation of lasting high levels of CRP among the patients with metabolic syndrome. *Inflammation* 35: 730-735, 2012.
  25. Migita K, Koga T, Satomura K, Izumi M, Torigoshi T, Maeda Y, Izumi Y, Jiuchi Y, Miyashita T, Yamasaki S, Aiba Y, Komori A, Nakamura M, Motokawa S, Kawakami A, Nakamura T, Ishibashi H: Serum amyloid A triggers the MSU-mediated mature interleukin-1beta production from human synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 14: R119, 2012.
  26. Migita K, Nakamura T: TBK1: a potential therapeutic target in RA. New data on a key inflammatory pathway. *Rheumatology (Oxford)* 51: 588-589, 2012.
  27. Nakamura T, Higashi S, Tomoda K, Tsukano M, Shono M: Effectiveness of etanercept vs cyclophosphamide as treatment of patients with amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 51: 2064-2069, 2012.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし