

厚生省特定疾患

代謝系疾患調査研究班
アミロイドーシス分科会

1998年度研究報告書

1999年3月

分科会長 石原得博

厚生省特定疾患

代謝系疾患調査研究班 アミロイドーシス分科会

1998年度研究報告書

**ANNUAL REPORT OF THE AMYLOIDOSIS RESEARCH COMMITTEE,
SURVEYS AND RESEARCH ON SPECIFIC DISEASE,
THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE OF JAPAN**

1999年3月

March 1999

分科会長 石原得博

山口大学医学部病理学第一講座

Chairman: Tokuhiro ISHIHARA

The First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

目 次

総合研究報告	5
次期研究班計画	17
平成10年度総括研究報告	23
平成10年度分担研究報告	31
平成10年度事業報告	175
平成10年度分科会会員名簿	179
研究成果の刊行に関する一覧表	183

平成8,9,10年度まとめ

総合研究報告

石原得博

山口大学医学部病理学第一講座

総合研究報告概要

I. 研究目標

アミロイドーシスは単一の疾患ではなく、現在少なくとも17種類のアミロイド蛋白が発見されている。厚生省特定疾患アミロイドーシス調査研究班で昭和50年に作成した旧分類では対応できないため、新分類およびその代表的な疾患の診断基準、重症度基準を作成する。代表的な疾患を1)ALアミロイドーシス、2)家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)、3)透析アミロイドーシス、4)脳アミロイドーシス、5)その他に分け、それぞれについて以下の点を明らかにする。1)ALアミロイドーシス：全国的な疫学調査、アミロイド原性蛋白の一次構造を決定し、新しい治療法を開発する。2)FAP：新たな遺伝子をスクリーニングするための蛋白化学・分子生物学的手法を開発する。トランスジェニックおよびノックアウトマウスを用いて、異型トランスサイレチン(TTR)がポリニューロパチーを起こす機序を解明するとともに肝臓移植（屍体肝移植、生体部分肝移植）や血液浄化法による治療法についてさらに検討する。3)透析アミロイドーシス：apolipoprotein E(apoE)とその多型性を明らかにし、アミロイドーシスの発症機序を解明する。透析の治療法、その変換とアミロイドーシスの病態を対比検討し、今後の治療法の方向性を明らかにする。4)脳アミロイドーシス：重症度や治療効果の判定に使用可能な生物学的マーカーとして確立し、血液を用いたより簡便で侵襲性の少ないマーカーを開発する。老人斑や脳血管アミロイドにおける β 蛋白沈着機序を明らかにし、家族性アルツハイマー病(FAD)脳におけるpresenilin遺伝子発現の役割を解明する。A β を過剰に産生するトランスジェニックマウスを用いて、脳、血液A β を経時的に測定してその代謝過程と蓄積過程を明らかにする。5)その他：血清アミロイドA遺伝子型とAAアミロイドーシスの関連性を明らかにする。実験的アミロイドーシスにおいてamyloid enhancing factor(AEF)の本態および線維形成機序を明らかにする。マウス老化アミロイドーシスについて、アミロイド線維蛋白共沈蛋白質を同定し発症機序を明らかにし、遺伝子治療法を開発する。

各種アミロイドーシス症例の疫学および臨床病理学的に検索し、その病型分類を臨床家に伝え、また、これらの疾患に共通のアミロイド線維形成機序を解明し、新たな治療法を開発する。

II. 研究成果

この3年間でアミロイドーシスの各分野での研究はめざましく発展し、その成果は世界的にも評価されている。その代表的な成果を以下箇条書きに掲載する。

1. 各種アミロイドーシス共通の発症機序

1)アミロイド促進因子(AEF)：実験的マウスアミロイドーシスにおいて、AEF投与により約36時間でアミロイドが沈着する事を明らかにした²⁾。またユビキチンにAEF効果があることを証明した。

2)アミロイド線維形成機序：蛍光色素チオフラビンT(ThT)を用いたアミロイド線維の分光蛍光定量法を開発した。ヒトおよびマウスアミロイドーシスにおいて、アミロイド線維形成の重合核依存性重合モデルを確立した^{2,3)}。 β_2 -ミクログロブリン(β_2 -m)を用いた試験管内fA β_2 -m線維伸長反応により、アミロイド線維の伸長が観察され、ThT蛍光定量法により、その伸長反応は一次反応速度論モデルに従うことを明らかにした。老化促進マウスのアミロイドーシス発症機序をさらに明らかにした⁴⁾。アミロイド線維(AApoA IIおよびAA)を静注することによって、アミロイド沈着を著しく促進できることを証明した⁵⁾。マウス老化アミロイド線維核(AApoA II)が消化管を経由してマウス個体内に侵入しアミロイド蛋白(apoA-II)の構造変換を引き起こし、アミロイド沈着を誘導、促進するという「蛋白質構造伝播仮説」を実証した。また、アミロイド沈着マウスと同居させた若年マウスにアミロイドが沈着することを証明した。プリオン病は消化管を通してプリオン線維の伝播が示唆されているが、アミロイドーシスではAApoA IIの伝播が世界で最初の報告であり注目に値する。

3)共存蛋白：amyloid P component(AP)，apolipoprotein E(apoE)およびubiquitinはヒトおよび実験的マウスアミロイドーシスで証明されるが、アミロイド線維形成には直接関与していないことを示唆した⁹⁾。さらに、apoE欠損マウス¹⁰⁾およびserum amyloid P component(SAP)欠損マウス¹¹⁾ではAAアミロイドーシスが惹起され、apoEおよびSAPはアミロイドーシス発症には必ずしも必要でないことを証明した。

2. 免疫グロブリン性アミロイドーシス

1)全身性ALアミロイドーシスにおける末梢神経、筋障害の臨床的特徴、治療経験について報告し、早期診断の重要性を強調した。多発性骨髄腫患者において、総コレステロール、トリグリセライド高値例に多くアミロイド沈着を認め、これらが骨髄腫合併アミロイドーシスの指標となる可能性を示唆した。限局性ALアミロイドーシスにおけるアミロイド周囲の形質細胞のモノクローナリティーを証明し、そのアミロイド蛋白が形質細胞に由来することを示唆した¹²⁾。限局性アミロイドーシスでは、シェーグレン症候群との合併がしばしばみられることと¹³⁾、全身性とは異なる“多発性”限局性アミロイドーシス症例を報告した。

2)アミロイド原性L鎖可変領域(NIG93V)の遺伝子を構築し、組み換え体NIG93V 大量調整を可能とし、*in vitro*での線維形成能の分析法を確立した。アミロイド原性L鎖の一次構造を明らかにし¹⁴⁻¹⁶⁾、アミロイド原性L鎖を標的として遺伝子治療の基礎的検討を開始した。全身性ALアミロイドーシスにおけるBence-Jones蛋白の解析、*in vitro* fibrillogenesisについて報告した。*in vitro*の実験系はALアミロイド沈着に関わる因子の解明、その制御法の開発に有用と考える。

3)ヒト骨髄腫細胞株¹⁷⁻¹⁹⁾をSCID-hIL6 トランスジェニックマウスの腹腔内への移植することが可能となり、実験的にALアミロイドーシスを惹起する可能性を示唆した。

4)犬にALアミロイドーシスが発症することを明らかにした²⁰⁾。*In vivo*でのALアミロイドーシスの実験モデルがなかったため、貴重な報告であり、今後発症機序の解明・治療法の開発に役立つと考える。

3. 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)

1)FAP I型はトランスサイレチン(TTR)の30番目のバリンがメチオニンに置換したMet30の症例が多く、熊本県荒尾地区(153名)、長野県小川村(250名)に見られる。それに加え、最近TTRSer50Ileの症例が福岡県糟屋郡(22例)、TTR Tyr114Cys長崎県国見町(23例)に発見された。さらにこれらの新たな病態を明らかにした²¹⁻²⁴⁾。また、ゲルソリン由来であるFAP IV型の本邦例を報告した²⁵⁾。

2)質量分析法を用いたFAP関連変異トランスサイレチン(TTR)の検出法の確立^{26,27)}と5種類の新たなTTR分子異常を発見した。また、一方のアレルに54番目のコドンのグルタミン酸がリジンに置換した新たな症例を報告した。

3)スウェーデン、オーストラリアにて脳死肝臓移植を受け、全例成功し社会復帰をしている²⁸⁻³¹⁾。生体部分肝移植を施行したFAP患者11名の術前、術後の臨床経過の検討より、本疾患において生体肝移植が治療効果があることを証明し、また移植手術を安全に施行でき、かつ術後の回復も良好と考えられる適応基準を確立した^{32,33)}。ドミノ肝移植を含む屍体肝移植がFAP患者に治療効果があることを明らかにした^{34,35)}。

4)FAPにおけるアミロイド形成過程での活性酸素障害の関与の証明とFAPのfree radical scavengerによる治療的展望を示した^{36,37)}。FAPのアミロイド沈着における原因蛋白であるTTRが受けるpost-translation modificationの関与を提示した。

5)標的遺伝子組み換え法を用いて作製したTTR欠損マウスにFAPの病因となる30番目のコドンのバリンがメチオニンに置換したヒト変異*ttr*遺伝子を導入し、ヒト異型TTRのみを産生するFAPホモ接合体症例に近似したトランスジェニックマウスモデル作製に成功した^{38,39)}。トランスジェニックマウスを用いてアミロイド形成と環境要因について検討し、遺伝子の要因以外に環境要因の存在を示唆し、またVal→Met置換による高次構造の変化にともない、フリーになったCys10の-SH側鎖の存在がアミロイド形成の促進因子であることを示した。

4. 透析アミロイドーシス

1)臨床的に1045症例を対象として、apolipoprotein E(apoE)ならびに α 1-antichymotrypsinの遺伝子多型が手根管症候群発症に及ぼす影響を検討し、apoE4遺伝子が透析アミロイドーシス発症のリスクファクターであることを明らかにした⁴⁰⁾。

2)虎ノ門病院で開発した逆濾過ダイアライザーは、従来の透析方法で簡便に β_2 -mの除去率を、血液濾過透析と同等に増加させることが出来、透析医会コンセンサス会議で第3のダイアライザーとして認められた。

3)チオフラビンT蛍光定量法による*in vitro*実験系により³⁾、 β_2 -mアミロイド線維伸長反応の特性を明らかにし、*in vitro*のアミロイド線維伸長反応モデルを確立した。

4)透析患者組織におけるアミロイド沈着部位のadvanced glycation end products(AGEs)修飾現象がアミロイド線維に如何なる役割を持つかをアミロイド伸長モデルにより検討した。AGEs化 β_2 -mの効果はnative β_2 -mによるアミロイド線維伸長重合モデルに対し反応を阻害することを明らかにした。リコンビナント β_2 -mを用いても、上記アミロイド線維伸長が起こることが確認され、このモデルが透析アミロイド線維形成機構の解明につながると考えられる。

5. 脳アミロイドーシス

アルツハイマー病(AD)の発症機序として、initial event としてのA β 脳アミロイドーシスとsecondary event としての神経原線維変化の出現(tauopathy)の重要性が明らかになりつつある⁴¹⁻⁴⁵⁾。その為、A β 脳アミロイドーシスの研究は我々研究班において極めて重要な課題であり、以下のような多くの成果をあげている。

1)アルツハイマー病では、対照に比べて、血漿中のA β 分子種には変化がみられないが、髄液中のA β 分子種ではA β 42の有意な減少が認められ、アルツハイマー病の診断マーカーの一つになりうることを示唆した⁴⁶⁾。さらに、A β 脳アミロイドーシスとしてのADの生物学的マーカーを確立した。脳脊髄液tau、A β 40/42の生理的変動を明らかにするとともに、その診断や治療効果の臨床的評価に有用であることを示した^{47,48)}。

2)アルツハイマー病やDown症候群脳内アミロイドの沈着に関する分子機構を探ってきた⁴⁹⁾。特に、剖検脳の直接的分析によって脳内アミロイド沈着に早期発症型原因遺伝子(プレセニン1, APP)および危険因子(apoE)が如何に制御するかについて、分析を進めてきた。その結果、早期発症型原因遺伝子がアミロイド2成分であるA β 1-42/43の沈着亢進と連動していること、apoEがA β 1-40の沈着亢進に相関していることを明らかにした⁵⁰⁾。プレセニンが生理的条件下ではN末端/C末端/APP複合体を形成してA β 42の生成を調節していること、病的条件下ではC末端が神経原線維変化とともに蓄積していることを明らかにした。ELISAや免疫組織化学的検索の結果において、プレセニン1(PS1)変異脳では、変異部位によってはA β 40も孤発性アルツハイマー病に比べて増加傾向を示すことが明らかとなり、APP717変異とPS1変異とでは、A β 代謝に対する作用様式が異なる可能性を示唆した⁵¹⁻⁵⁴⁾。

3)アルツハイマー病の開始因子としてのA β 42を過剰産生するトランスジェニックマウスを作製して脳アミロイド沈着機序を検討した。10ヶ月のトランスジェニックマウスで脳内A β は著明に増加し、大脳皮質にびまん性老人斑を認めるとともに皮質内血管壁にもA β 沈着が認められ、脳内A β 過剰生成は脳アミロイドの沈着を引き起こすことを証明した⁵⁵⁻⁵⁹⁾。

4)最近増加しつつある高齢者の脳アミロイドアンギオパチー(CAA)による脳皮質下出血症例の臨床病理学的検討を行った⁶⁰⁻⁶⁶⁾。高齢者の孤発性の遺伝的危険因子を検討し、PS1遺伝子イントロン7の多型がCAAに関連すること、 α 1-antichymotrypsinのシグナルペプチドの多型がアルツハイマー病に合併するCAAの程度と関連することを初めて明らかにした。

6. その他のアミロイドーシス

1)反応性AAアミロイドーシスの前駆体蛋白であるserum amyloid A(SAA)について検索し、新しく同

定したSAA1の多型、SAA1 γ がAAアミロイドーシスの危険因子であることを明らかにした^{67,68)}。また、SAAの遺伝子頻度には人種差があり、SAA1 γ は日本人の6割、中国人の7割が少なくとも1つの遺伝子を有するが、豪州イギリス系白人、ハンガリー人には非常に稀な多型である。AAアミロイドーシスの危険因子のSAA1 γ は日本人にとって重要な危険因子であることを示唆した。

2)免疫組織化学的および免疫電顕的検索によりソマトスタチン由来の新しいタイプのアミロイドを発見した⁶⁹⁾。

3)限局性心房アミロイド(IAA)について検索し、65歳以上の高齢者剖検心100例中91例に心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)由来のアミロイドの沈着が認められた。また、手術中に採取した25例中19例のIAAについて免疫組織化学的および免疫電顕的に検索し、一部のアミロイドはANPの合成あるいは分泌機構の障害により心筋細胞の胞体小器官内で形成されることを証明した⁷⁰⁾。

4)原発性皮膚アミロイドーシスおよび脂漏性角化症に伴うアミロイドについて免疫組織化学的に検索し、それぞれサイトケラチンに対する反応が若干異なるが、アミロイドがサイトケラチン由来であることを示唆した。

7. アミロイド蛋白を中心にしたアミロイドーシスの新分類を作成した。(表1)新分類を完成させたことはこの研究班の大きな成果であり、旧分類とも大部分で対応し、現在では論文のみでなく教科書でもこの分類が主体である^{71,72)}。

8. 新分類に対応した診断基準を作成した。[免疫グロブリン性、反応性AA、老人性TTRアミロイドーシス、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)、透析アミロイドーシス、脳アミロイドーシス、皮膚アミロイドーシス]

9. 重症度分類を作成した。[ALアミロイドーシス(表2)およびFAP(表3)]

10. 1997年2月開催のシンポジウム『難病研究の進歩Ⅳ』-病態の解明と治療戦略-においてアミロイドーシスについてこの研究班の成果を石原分科会長が報告した⁷³⁾。1997年3月東京で開催の第11回東京都精神研シンポジウムで森、東海林班員が発表した。1997年8月アミロイドーシスの発症機序と治療法についてのワークショップを行った。1998年8月アメリカ合衆国メイヨ・クリニックで開催の第8回国際アミロイドーシス・シンポジウムにおいて、分科会の班員および研究協力者の多くが研究成果を発表した⁷⁴⁾。

11. 患者からの特定疾患申請をもとにした日本のアミロイドーシスの各都道府県別の疫学的調査を行った。平成8年度は840人で、対前年度増加は219人であった。また、疫学班と協力しての全国疫学調査を行う。(1999年2月)

以上のように、最初の目的以上の成果があがり、さらに新たな問題点「アミロイドーシスがプリオン病と同様に伝播するか否か」が生じた。この点は次期研究班の大きな課題である。また、治療面において肝臓移植以外の根本的な治療法の開発には至らなかった点が課題として残っている。

表1 アミロイドーシスの分類

アミロイドーシスの病型	アミロイド蛋白	前駆体蛋白
I 全身性アミロイドーシス		
1. 免疫グロブリン性アミロイドーシス (多発性骨髄腫の有無を記載する)		
1) ALアミロイドーシス	AL	L鎖 (κ , λ)
2) AHアミロイドーシス	AH	IgG1 (γ 1)
2. 反応性AAアミロイドーシス (基礎疾患がある場合は記載する)		
AA	AA	アポSAA
3. 家族性アミロイドーシス		
1) FAP*I	ATTR	トランスサイレチン
2) FAP II	ATTR	トランスサイレチン
3) FAP III	AApoA I	アポA I
4) FAP IV	AGel	ゲルソリン
5) 家族性地中海熱 (FMF)	AA	アポSAA
6) Muckle-Wells症候群	AA	アポSAA
7) 家族性アミロイドーシス		リゾチーム
8) 家族性腎アミロイドーシス		フィブリノーゲンA α
4. 透析 (A β 2M) アミロイドーシス	A β 2M	β_2 -ミクログロブリン
5. 老人性アミロイドーシス	ATTR	トランスサイレチン
II 限局性アミロイドーシス		
1. 脳アミロイドーシス		
1) アルツハイマー型痴呆 (ダウン症候群)		
A β	A β	β 前駆体蛋白
2) 脳血管アミロイドーシス		
A β	A β	β 前駆体蛋白
3) 遺伝性アミロイド性脳出血 (オランダ型)		
A β	A β	β 前駆体蛋白
4) 遺伝性アミロイド性脳出血 (アイスランド型)		
ACys	ACys	シスタチンC
5) クロイツフェルト・ヤコブ病 ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群		
AScr	AScr	スクレイピー前駆体蛋白
2. 内分泌アミロイドーシス		
1) 甲状腺髄様癌		
ACal	ACal	(プロ) カルシトニン
2) II型糖尿病・インスリノーマ		
AIAPP	AIAPP	IAPP (アミリン)
3) 限局性心房性アミロイド		
AANF	AANF	心房ナトリウム利尿ペプチド
3. 皮膚アミロイドーシス		
AD	AD	ケラチン?
4. 限局性結節性アミロイドーシス		
AL	AL	L鎖 (κ , λ)

*FAP: 家族性アミロイドポリニューロパチー

表2 ALアミロイドーシスの重症度基準

Stage 1	ALアミロイドの沈着が証明されているが、臨床症状、異常身体所見がなく、異常免疫グロブリン/ベンス・ジョーンズ蛋白の検索を含め検査上異常を認めない。
Stage 2	検査上は異常免疫グロブリン/ベンス・ジョーンズ蛋白の存在あるいはアミロイドによる臓器障害を示す異常を認めるが、臨床症状は認めないか軽微である。
Stage 3	手根管症候群、四肢の関節腫大、巨舌等の局所症状のいずれかを認める。
Stage 4	胃腸障害（とくに頑固な下痢）、肝臓腫大、高度の蛋白尿、末梢神経障害、自律神経障害、不整脈等の心伝導障害および皮膚に容易に出血斑を生じる状態のいずれかを認める。日常生活に多くの介護を要する。
Stage 5	神経筋障害による起立歩行不能（寝たきり）状態、麻痺性イレウス、肝不全、腎不全、あるいは心不全のいずれかを認める。原則として入院治療を必要とする。

表3 FAPの重症度基準

Stage 1 (無症状期)	原因遺伝子(変異トランスサイレチンまたはゲルソリン)を認めるが、自覚的、他覚的に全く異常を認めない。
Stage 2 (初期)	症状の主体は下腿のしびれ感・疼痛、胃腸症状(便秘、下痢、食欲不振)、陰萎、立ちくらみなどの自覚症状であるが、四肢の筋力低下はないか軽度である。通常の日常生活が可能で、職業に従事出来る。
Stage 3 (中期)	下肢の感覚障害、筋力低下が明らかで、高度な起立性低血圧、胃腸症状(頑固な下痢または便秘、交代性の便秘と下痢のくり返し、嘔吐発作)、排尿障害などの自律神経障害がある。日常生活に支障があるが、ほぼ自立している。
Stage 4 (進行期)	感覚障害、筋萎縮・筋力低下が上下肢におよび、歩行障害が目立ち、四肢遠位部に火傷、無痛性潰瘍をくり返し、種々な自律神経障害が高度である。また、人工ペースメーカーの植え込みが必要なことが多い。日常生活に多くの介護を要する。
Stage 5 (高度進行期)	尿便失禁状態で、全身のるいそうが目立ち、歩行不能で車イス生活または臥床状態である。また、腎臓、心臓を代表とする内臓器官の機能不全がある。在宅訪問看護または入院療法が必要である。

文 献

- 1) 横田忠明、石原得博. Amyloid enhancing factorについて. 細胞 1997;29:26-29.
- 2) Naiki H, Gejyo F, Nakakuki K. Concentration-dependent inhibitory effects of apolipoprotein E on Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* 1997;36:6243-6250.
- 3) Naiki H, Hashimoto N, Gejyo F, et al. Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 1997;4:223-232.
- 4) Higuchi K, Kogishi K, Wang J, et al. Accumulation of pro-apolipoprotein A-II in mouse senile amyloid fibrils. *Biochem J* 1997;325:653-659.
- 5) Wang J, Kitagawa K, Higuchi K, et al. Regulation of the metabolism of plasma lipoprotein A-II. *Biochem Biophys Acta* 1997;1345:248-256.
- 6) Han XS, Hosokawa M, Higuchi K, et al. Age-related changes in blood pressure in senescence-accelerated mouse(SAM); aged SAMP1 mice manifest hypertensive vascular diseases. *Lab Anim Sci* 1998;48:97-104.
- 7) Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. The senescent-accelerated mouse. *Meth Enzym* (in press).
- 8) Higuchi K, Kogishi K, Ishihara T, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation dependent. *Lab Invest* 1998;78:1535-1542.
- 9) Cui D, Hoshii Y, Ishihara T, et al. An immunohistochemical study of amyloid P component, apolipoprotein E and ubiquitin in human and murine amyloidosis. *Pathol Int* 1998;48:362-367.
- 10) Hoshii Y, Kawano H, Ishihara T, et al. Amyloid A protein amyloidosis induced in apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol* 1997;151:911-917.
- 11) Togashi S, Ishihara T, Maeda S, et al. Serum amyloid P component enhances induction of murine amyloidosis. *Lab Invest* 1997;77:525-531.
- 12) Setoguchi M, Hoshii Y, Ishihara T, et al. Case report: Conjunctival AL amyloidosis associated with a low-grade B-cell lymphoma. (submitted).
- 13) Hāraguchi H, Ohashi K, Yamada M, et al. Primary localized nodular tongue amyloidosis associated with Sjogren's syndrome. *ORL* 1997;59:60-63.
- 14) Isobe T, Kametani F, Shinoda T. V-domain deposition of λ Bence Jones protein in the renal tubular epithelial cells in a patient with the adult Fanconi syndrome with myeloma. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 1998;5:117-120.
- 15) Alim MA, Yamaki S, Shinoda T, et al. Structural relationship of lambda type light chains with AL amyloidosis. *Clin Immunol & Immunopathol* (in press).
- 16) Mawenyega K, Hara Y, Shinoda T, et al. Characterization of three human immunoglobulin κ amyloidogenic light chains of different structure. *Amyloid & Amyloidosis* (in press).
- 17) Mahmoud MS, Ishikawa H, Fujii R, Kawano MM. Induction of CD45 expression and proliferation in U-266 myeloma cell line by interleukin-6. *Blood* 1998;92:3887-3897.
- 18) Ishikawa H, Kawano MM. Biological significance of heterogeneity in human myeloma cells. *Int J Hematol* 1998;68:363-370.
- 19) Fujii R, Ishikawa H, Mahmoud MS, Asaoku H, Kawano MM. MPC-1-CD49e-immature myeloma cells included CD45+ subpopulations that could proliferate in response to IL-6 in human myelomas. *Br J Haematol* 1999; (in press).
- 20) Ramos-Vara JA, Takahashi M, Ishihara T, et al. Intestinal extramedullary plasmacytoma associated with amyloid deposition in three dogs: An ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Ultrastruct Pathol* 1998;22: (in press).

- 21) Date Y, Nakazato M, Kangawa K, et al. Detection of three transthyretin gene mutations in familial amyloidotic polyneuropathy by analysis of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Neurol Sci* 1997;150:143-148.
- 22) Ohnishi A, Ando Y, Hoshii Y, et al. Denervation of eccrine glands in patients with familial amyloidotic polyneuropathy type I. *Neurology* 1998;51:714-721.
- 23) Ando Y, Anan I, Suhr O, et al. Detection of variant protein in the hair: A new diagnostic method in familial polyneuropathy(FAP)(Met 30). *Br Med J* 1998;316:1500-1501.
- 24) Nakazato M, Kishikawa M, Shimizu A, et al. Twelve abnormal transthyretins in systemic amyloidosis in Japan. *Amyloid and Amyloidosis* (in press).
- 25) Akiya S, Hoshii Y, Nakazato M, et al. Lattice corneal dystrophy type II associated with familial amyloid polyneuropathy type IV. *Ophthalmology* 1996;103:1106-1110.
- 26) Nishikawa M, Nakazato M, Matsuo H, et al. Simple detection of abnormal serum transthyretin from patients with familial amyloidotic polyneuropathy by high performance liquid chromatograph / electrospray using material precipitated with specific antiserum. *J Mass Spectrom* 1996;31:112-114.
- 27) Ikeda S, Tokuda T, Nakamura A, et al. Transthyretin Met 30 familial amyloid polyneuropathy in China. Usefulness of mass spectrometry for screening a variant TTR in serum. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 1997;4:104-107.
- 28) Ando Y, Suhr O, Ando M, et al. Liver transplantation in Japanese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Lancet* 1997;350:593-594.
- 29) Suhr O, Ando Y, Holmgren G, et al. Liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). A comparative study of transplanted and non-transplanted patient's survival. *Transplant Int* 1998;11:S160-163.
- 30) Suhr O, Ando Y, Holmgren G, et al. Improvement in the polyneuropathy associated with familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Neurology* 1998;51:926-927.
- 31) Adams D, Samuel D, Nakazato M, et al. Liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy: Study of cohort of 40 patients. (submitted).
- 32) Ikeda S, Takei Y, Yanagisawa N, et al. Partial liver transplantation from living donors in familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 1997;4:18-23.
- 33) Ikeda S, Takei Y, Yanagisawa N, et al. Peripheral nerves regenerated in familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Ann Int Med* 1997;127: 618-620.
- 34) Ando Y, Ericzon BG, Ando M, et al. Reuse of a Japanese familial amyloidotic polyneuropathy patient's liver for a cancer patient: The domino liver transplantation procedure. *Intern Med* 1997;36:847.
- 35) Schmidt HHJ, Nashan B, Nakazato M, et al. Familial amyloidotic polyneuropathy as a model for domino liver transplantation. (submitted).
- 36) Sakashita N, Ando Y, Takahashi K, et al. Familial amyloidotic polyneuropathy Type I with extracellular superoxide dismutase mutation: A case report. *Hum Pathol* 1998;13:845-850.
- 37) Ando Y, Suhr O, Salhy ELM. Oxidative stress and amyloidosis. *Histol Histopathol* 1998;13:845-850.
- 38) Kohno K, Palha JA, Maeda S, et al. Analysis of amyloid deposition in a transgenic mouse model of homozygous familial amyloidotic polyneuropathy. *Am J Pathol* 1997;150:1497-1508.
- 39) Takaoka Y, Tashiro F, Maeda S, et al. Comparison of amyloid deposition in two lines of transgenic mouse that model familial amyloidotic polyneuropathy, type I. *Transgenic Res* 1997;6:261-269.
- 40) Gejyo F, Kimura H, Suzuki S, et al. Apolipoprotein E and α 1-antichymotrypsin in dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int* 1997;53:S75-S78.
- 41) Nakamura S, Tamaoka A, Shoji S, et al. Characterization of amyloid β protein(A β) subtype (A β 40 and A β 42(43) in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 1997;26:52-61.

- 42) Hoshino S, Tamaoka A, Takahashi M, et al. Emergence of immunoreactivities for phosphorylated-tau and amyloid- β protein in chronic stage of fluid-percussion injury in rat brain. *Neuroreport* 1998;9:1879-1883.
- 43) Funato H, Yoshimura M, Tamaoka A, et al. Quantitation of amyloid β -protein(A β) in the cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1998;152:1633-1640.
- 44) Ono S, Matsuno S, Tamaoka A, et al. Presence of amyloid β protein in skin biopsies of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and non-ALS controls. *Lancet* 1998;351:956-957.
- 45) Takeda K, Hossain S, Shinoda T, et al. Interaction of NACP/ α -synuclein with β /A4 and effect on the fibril formation in vitro. *Amyloid & Amyloidosis* (in press).
- 46) Tamaoka A, Sawamura N, Shoji S, et al. Amyloid β protein 42(43) in cerebral fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1997;148:41-45.
- 47) Kanai M, Matsubara E, Shoji M, et al. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A β 1-40 and A β 1-42(43) in Alzheimer's disease: A study in Japan. *Ann Neurol* 1998;44:1-26.
- 48) Shoji M, Matsubara E, Kanai M, et al. Combination assay of CSF Tau, A β 1-40 and A β 1-42(43) as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1998;158:134-140.
- 49) Tokuda T, Fukushima T, Ikeda S, et al. Plasma levels of amyloid β proteins A β 1-40 and A β 1-42(43) are elevated in Down's syndrome. *Ann Neurol* 1997;41:271-273.
- 50) Sudoh S, Kawamura Y, Sakaki Y, et al. Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid β -protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites. *J Neurochem* 1998;71:1535-1543.
- 51) Tamaoka A, Fraser PE, Mori H, et al. Amyloid-beta-protein isoforms in brain of subjects with PS1-linked, betaAPP-linked and sporadic Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 1998;56:178-185.
- 52) Sodeyama N, Itoh Y, Yamada M, et al. The presenilin 1 intronic polymorphism is not associated with Alzheimer type neuropathological changes or sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:548-551.
- 53) Sato S, Kamino K, Sakaki Y, et al. Splicing mutation of presenilin-1 gene for early-onset familial Alzheimer's disease. *Human Mutation Supplement 1* 1998;S91-S94.
- 54) Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, et al. Lack of genetic associations of α 1-antichymotrypsin polymorphism with Alzheimer type neuropathological changes of sporadic Alzheimer's disease. *Dement Geriat Cog Disord* (in press).
- 55) Shoji M, Kawarabayashi T, Sato M, et al. Systemic overexpression of a C-terminal fragment of human amyloid β protein precursor causes accumulation of Alzheimer β amyloid fibrils in pancreas of transgenic mice. *Gerontology* 1996;42:48-56.
- 56) Kawarabayashi T, Shoji M, Sato M, et al. Accumulation of β amyloid fibrils in pancreas of transgenic mice. *Neurobiol Aging* 1996;17:215-222.
- 57) Kawarabayashi T, Igeta Y, Shoji M, et al. Lysosomal generation of amyloid beta protein species in transgenic mice. *Brain Res* 1997;765:343-348.
- 58) Igeta Y, Kawarabayashi T, Shoji M, et al. Apolipoprotein E accumulates with the progression of A beta deposition in transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:1228-1235.
- 59) Shoji M, Kawarabayashi T, Hirai S, et al. Accumulation of amyloid β protein transgenic mice. *Neurobiol Aging* 1998;19:S59-63.
- 60) Castano EM, Prelli F, Shoji M, et al. The length of amyloid- β in hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis. Dutch type: Implication for the role of amyloid- β 1-42 in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1996;271:32185-32191.
- 61) Itoh Y, Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly: the clinicopathological features, pathogenesis, and risk factors. *J Med Dent Sci* 1997;44:11-19.

- 62) Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, et al. Vascular variant of Alzheimer's presenilin-2(PS-2) gene to 1q42.1 by fluorescence in situ hybridization. *Neurosci Lett* 1997;221:205-207.
- 63) Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, et al. Association of α 1-antichymotrypsin polymorphism with cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1998;44:129-131.
- 64) Kato S, Gondo T, Ishihara T, et al. Confocal observation of senile plaques in Alzheimer's disease: Senile plaque morphology and relationship between senile plaque and astrocytes. *Pathol Int* 1998;48:332-340.
- 65) Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, et al. Butyrylcholinesterase K variant and cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* (in press).
- 66) Izumihara A, Ishihara T, Iwamoto N, Yamashita K, Ito H. Postoperative outcome of 37 patients with lobar intracerebral hemorrhage related to cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 1999;30:29-33.
- 67) Baba S, Masago SA, Tajahashi T, et al. A novel allelic variant of serum amyloid A, SAA1 gamma: genomic evidence, evolution, frequency, and implication as a risk factor for reactive systemic AA-amyloidosis. *Hum Mol Genet* 1995;303:1083-1087.
- 68) Baba S, Miyamoto S, Kawashima M, et al. Serum amyloid A gene polymorphism and AA-amyloidosis. *Amyloid & Amyloidosis* (in press).
- 69) Takahashi M, Hoshii Y, Ishihara T, et al. Multihormone-producing islet cell tumor of the pancreas associated with somatostatin-immunoreactive amyloid. Immunohistochemical and immunoelectron microscopic studies. *Am J Surg Pathol* 1998;22:360-367.
- 70) Takahashi M, Hoshii Y, Ishihara T, et al. Ultrastructural evidence for the formation of amyloid fibrils within cardiomyocytes in isolated atrial amyloid. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 1998;5:35-42.
- 71) 石原得博. 肝アミロイドーシス. 肝臓病学 (戸田剛太郎、清澤研道他) 医学書院1998;pp468-475.
- 72) 石原得博. アミロイドーシス. 内科学教科書 (黒川清、松澤佑次) 文光堂 1999;(印刷中).
- 73) 石原得博. アミロイドーシス シンポジウム難病研究の進歩Ⅶ 難病医学研究財団 1998;pp23-36.
- 74) VIII International Symposium on Amyloidosis. August 7-11, 1998. Mayo Clinic Rochesta, Minnesota, USA.

次期研究班計画

石原得博

山口大学医学部病理学第一講座

次期研究班計画

アミロイドーシスは単独の疾患ではなく多くの疾患が含まれているので、出来るだけ多くの疾患を対照にして、網羅的にならないようにこの3年間の研究成果を踏まえて研究を続けたい。各種アミロイドーシスの共通点、免疫グロブリン性、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)、透析アミロイドーシス、脳アミロイドーシスおよびその他に分けて、次のような点を明らかにしたい。

1. 各種アミロイドーシスの共通点

- 1) 老化促進マウスのアミロイドーシスで、プリオン蛋白と同様の「蛋白質構造伝播仮説」を実証したが、他のアミロイドーシスにおいてこの仮説が成り立つか否かを明らかにしなければならない。特殊な型のアミロイドーシスであるが、アミロイドーシスが伝播する事が明らかとなれば、ヒトからヒトへの伝播のみでなく、食用として使用されている牛や鳥類にも比較的高頻度にアミロイドーシスが発症しているので、社会的にも問題が大きく早急に結論を出さねばならない。
- 2) アミロイド促進因子 amyloid enhancing factor(AEF)の本態およびその作用機序を明らかにする。実験的アミロイドーシスでは2日以内にアミロイドーシスを発症させる物質で、ヒトの各アミロイドーシスでも共通していると考えられ、この解明はアミロイドーシス発症予防には重要である。
- 3) アルツハイマー病の老人斑を含め殆どのアミロイドーシスに共通して沈着している apolipoprotein E(Apo E), amyloid P component(AP)等の意義を明らかにする。

この解明はアミロイドーシスの治療法開発には必要である。

2. 免疫グロブリン性アミロイドーシス (ALおよびAHアミロイドーシス)

このアミロイドーシスは以前の原発性アミロイドーシスと骨髄腫に合併するアミロイドーシスの大部分が含まれている。既に、19世紀の終りには発見されているが、実験モデルが殆どなく、その研究成果は他のアミロイドーシスに比し遅れている。今回重点研究に指定され、内木グループの研究成果に期待しているが、*in vitro*が中心であるので、*in vivo*の研究はこの研究班が主体で行う。

- 1) 予後が非常に悪いALアミロイドーシスでは早期治療が必要であり、その早期診断法と治療法を確立する。
- 2) アミロイド原性の免疫グロブリンのサブタイプを明らかにする。
- 3) 動物実験モデルを作製し、その発症予防および治療法を確立する。
- 4) アミロイドーシスを合併する多発性骨髄腫のタイプを明らかにし、その合併症の予防および早期治療法を開発する。
- 5) ALアミロイドーシス患者への骨髄移植や化学療法について検討する。

3. 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)

- 1) 生体部分肝移植および屍体肝移植の治療効果の判定法を確立する。
- 2) 倫理的に十分配慮し、FAP患者家系に対する発症前遺伝子診断の実施体制を確立する。特に、肝移植を受けた患者が結婚、妊娠をした場合の子宮内胎児診断の適応・実施に対する社会的合意等について検討する。
- 3) 倫理面を考慮しながら、FAP患者の肝移植に対する全国レベルでの調整を行う。
- 4) 正常TTRの投与、チオール化合物、TTRの主要産生臓器である肝臓に的を絞った遺伝子治療法等の肝移植以外の治療法を開発する。
- 5) 既に60種類以上のTTRmutationが発見されているが、さらに新たなTTRmutationによるFAPの孤発例および家族例を発見する。
- 6) 肝臓に存在するTTR受容体を精製し、その構造を決定する。FAP患者ではTTRの代謝が低下してい

ることから、FAP患者および FAPトランスジェニックマウスにおいてTTR受容体の機能を正常と比較検討し、FAPの病態との関連を研究する。

7) トランスジェニックおよびノックアウトマウスを用いて、アミロイドーシスの発症機序を解明し、その治療法を開発する。

4. 透析アミロイドーシス

20年以上の透析歴のある殆どの患者に発症する透析アミロイドーシスの予防法および治療法を開発することは、15万人を越える透析患者のためには重要なことであり、アミロイドーシスの面からの研究が必要である。

1) β_2 ミクログロブリン(β_2 m)を有効に除去する透析膜およびアミロイド沈着による関節および骨病変に対する治療法を開発する。

2) 透析アミロイド沈着部位におけるadvanced glycation end products(AGEs)修飾現象を解明する。リコンビナント β_2 mを用いて、アミロイド線維形成機構を明らかにする。

3) β_2 mを過剰発現するトランスジェニックマウス等の透析アミロイドーシス動物実験モデルを作製し、その治療法を開発する。

5. 脳アミロイドーシス

アルツハイマー病(AD)において β 蛋白ストリーが考えられるようになって以来、ADの研究を脳アミロイドーシスの面からアプローチすることは重要であり、この班の責務と考える。

1) 脳脊髄液診断マーカー(tau, A β 40/42)の普及と治療法の解明：脳アミロイドーシスとしてのADの生物学的マーカー(脳脊髄液tau, A β 40/42)が有用であることを示したので、世界各国との共同研究を開始して、この方法をさらに世界的に普及させる。また早期診断や治療効果の評価に役立てたい。エストロジェン、抗炎症薬などの効果を共同研究によって明らかにして、現時点での効果ある薬物を客観的に明らかにする。

2) ヒトのADの脳病変に酷似したトランスジェニックマウスの開発に成功しているので、そのマウスを用いて、A β の沈着機序、神経原線維性変化、神経細胞の減少の機序を明らかにし、A β の沈着の予防法を開発する。また、A β 過剰産生トランスジェニックマウスとTTRやSAPノックアウトマウスを掛け合わせて、脳アミロイド沈着におけるTTRおよびSAPの役割を明らかにする。

3) 神経細胞内蓄積病tauopathyとsynucleinopathyとADの関連を解明する。変異tauおよび変異 α -synucleinトランスジェニックマウスを作製して、AD脳におけるtauopathyとsynucleinopathyの機序を明らかにする。

4) 高齢者に増加しつつある脳アミロイドアンギオパチー(CAA)による皮質下出血症例を把握し、CAAの早期診断法を確立する。また、出血に及ぼすシスタチンCの役割を明らかにする。

6. その他のアミロイドーシス

1) 関節リウマチ(RA)患者に合併する反応性AAアミロイドーシスの前駆体蛋白であるserum amyloid A(SAA)について検索し、SAA1 γ が危険因子であるか否かを明らかにする。長期RA患者において、消化管および腹壁脂肪織の生検により早期にアミロイドーシス沈着を証明し、アミロイド沈着の進行の抑制および治療法を開発する。

2) 皮膚アミロイドーシスの発症機序を解明し、その治療法を開発する。まず、そのアミロイド蛋白を生化学的に同定する。また、適応外医薬品の4に分類された皮膚アミロイドーシスにおけるセファランチンの有効性を検討する。

3) 高齢者の大動脈や椎間板には殆ど全例に沈着しているアミロイド蛋白の由来を明らかにし、またその他の新しいタイプのアミロイドーシスの症例を発見する。

7. 全国疫学調査

1999年2月に疫学班と協力して行うアミロイドーシス全国疫学調査のデータの分析を行う。また、特定疾患治療対象個人票を集積し、アミロイドーシスの病態を把握する。

最終的には各種アミロイドーシスの発症機序を明らかにし、その予防法および治療法を開発する。

平成10年度

総括研究報告

石原得博

山口大学医学部病理学第一講座

総括研究報告概要

I. 研究目標

この研究班は最終年度なので、過去の2年間の研究成果を踏まえ、さらに評価委員会の意見を参考にして次のような目標をたてる。アミロイドーシスの代表的な疾患を1)ALアミロイドーシス、2)家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)、3)透析アミロイドーシス、4)脳アミロイドーシス、5)その他に分け、次の様な項目を中心に研究をする。1)ALアミロイドーシス：アミロイド原性蛋白の一次構造を決定し、その前駆体蛋白産生細胞である形質細胞および骨髄腫細胞の特異性を明らかにする。2)FAP：トランスサイレチン(TTR)の分子異常を確実にスクリーニング出来る手法として、質量解析を用いた変異蛋白の検出法を確立する。60種類以上のTTRmutationによる病態の差を明らかにする。また新たなTTRmutationを発見する。肝臓移植（屍体肝移植、生体部分肝移植）による治療法の確立、さらに血漿吸着療法に加えて、甲状腺ホルモン誘導体の経口療法の開発および大量TTR投与によるdown regulation療法の可能性を追求する。3)透析アミロイドーシス：透析の治療法、その変換とアミロイドーシスの病態を対比検討し、今後の治療法の方向性を明らかにする。4)脳アミロイドーシス：脳脊髄液A β 40/42とtauによるアルツハイマー病(AD)の生物学的マーカーの治療に対する反応を明らかにして、重症度や治療効果の判定に使用可能な生物学的マーカーとして確立し、血液を用いたより簡便で侵襲性の少ないマーカーを開発する。AD脳に沈着するA β 分子種をELISAや免疫組織化学的に解析する。A β を過剰に産生するトランスジェニックマウスを用いて、脳、血液A β を経時的に測定してその代謝過程と蓄積過程を明らかにする。5)その他：血清アミロイドA遺伝子型とAAアミロイドーシスの関連性を明らかにする。実験的アミロイドーシスにおいてamyloid enhancing factor(AEF)の本態および線維形成機序を明らかにする。マウス老化アミロイドーシスをモデルとして、アミロイド線維形成機構の解明と治療法開発のための基礎システムとしての培養細胞系を利用したアミロイド線維形成系の確立を目指す。

以上、各種アミロイドーシスについての目的を果たすと共に、それぞれに共通のアミロイド線維形成機序を解明し、新たな治療法を開発し、研究成果を患者に還元する。

II. 研究成果

1. 各種アミロイドーシス共通の発症機序

- 1)アミロイド促進因子(AEF)：実験的マウスアミロイドーシスにおいて、ユビキチンにAEF効果があることを証明した。
- 2)アミロイド線維形成機序： β_2 ミクログロブリン(β_2 -m)を用いた試験管内fA β_2 -m線維伸長反応により、アミロイド線維の伸長が観察され、ThT蛍光定量法により、その伸長反応は一次反応速度論モデルに従うことを明らかにした。老化促進アミロイドーシスのマウスについて詳細に研究し^{1,2)}、さらに、そのアミロイド線維核(AApoA II)が消化管を経由してマウス個体内に侵入しアミロイド蛋白(apoA-II)の構造変換を引き起こし、アミロイド沈着を誘導、促進するという「蛋白質構造伝播仮説」を実証した³⁾。また、アミロイド沈着マウスと同居させた若年マウスにアミロイドが沈着することを証明した。プリオン病では消化管を通してプリオン線維の伝播が示唆されているが、アミロイドーシスではAApoA IIの伝播が世界で最初の報告であり画期的である。
- 3)共存蛋白：amyloid P component(AP)、apolipoprotein E(apoE)およびubiquitinはヒトおよび実験的マウスアミロイドーシスで証明されるが、アミロイド線維形成には直接関与していないことを示唆した⁴⁾。

2. 免疫グロブリン性アミロイドーシス

- 1)全身性ALアミロイドーシスにおける末梢神経、筋障害の臨床的特徴、治療経験について報告し、早期