

(iii) 倫理面への配慮：本研究は、リコンビナント蛋白、及び凍結保存した剖検臓器より精製したアミロイド線維並びにアミロイド蛋白を使用するため、倫理面の問題は無いと判断される。

### C. 研究結果

(1) アルツハイマー病  $\beta$  アミロイドーシス：表面プラズマ共鳴法（ピアコア）を駆使し、 $fA\beta$  形成・分解をリアルタイムで解析できる開放反応系を確立した。この実験系を駆使し、 $fA\beta$  が試験管内でゆっくりと脱重合を起こすこと、及び線維伸長過程と共に脱重合過程も一次反応速度論モデルで説明できることを証明した。また、種々の有機化合物および  $\beta$  シートブレーカーペプチドの  $fA\beta$  分解作用をチオフラビン T 法を用いて比較解析し、抗酸化剤 NDGA、次いでリファンピシン(RIF)、テトラサイクリン(TC)が強力な線維分解能を有すること明らかにした。

(2) AL アミロイドーシス：全身性 AL アミロイドーシス 5 症例の新鮮凍結臓器より AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を精製した。次に、AL アミロイド線維の試験管内伸長が一次反応速度論モデルで説明できること、及び線維伸長過程が種々の生体分子により抑制的（アポ E、 $\alpha 1$ -ミクログロブリン、フィブロンネクチン）あるいは促進的（デルマタン硫酸）に修飾を受けていることを明らかにした。さらに、NDGA が濃度依存性に線維伸長を阻害した。

(3) 透析アミロイドーシス：透析アミロイド線維が中性 pH 反応液中でオリゴマー以下まで脱重合を起こすとともに、アポ E、及び種々のグリコサミノグリカン、プロテオグリカンがその脱重合反応を濃度依存性に抑制することを明らかにした。

### D. 考察

(1) アルツハイマー病  $\beta$  アミロイドーシス：興味深いことに、NDGA、RIF、TC はい

ずれも、分子構造の中にフリーラジカルスカベンジャーのモチーフを持っている。NDGA を始めとするこれら分子の線維形成抑制、あるいは分解機構の詳細は不明だが、上記モチーフを介して  $A\beta$  蛋白、あるいは  $fA\beta$  に結合し、 $A\beta$  蛋白の立体構造や安定性に影響を与えていると考えられる。また、NDGA に代表される一群の抗酸化剤は、アルツハイマー病、AL アミロイドーシスをはじめとする種々のヒトアミロイドーシスの治療薬開発に向け、有力な基本分子となる可能性がある。

(2) AL アミロイドーシス：線維伸長過程が種々の生体分子により影響を受けることは、生体におけるアミロイドの沈着が、前駆蛋白からの線維形成・沈着の各段階における様々な生体分子の阻害・促進効果の総和として起こることを示唆している。

(3) 透析アミロイドーシス：アポ E に代表されるアミロイド共存分子が線維表面に結合し、線維構造を安定化させることにより脱重合を抑制していると考えられ、アミロイド共存分子の役割の一端を示唆している。

### E. 結論

いずれのアミロイドーシスにおいても、前駆蛋白からの線維形成機構が重合核依存性重合モデルで説明できること、特に線維伸長過程が一次反応速度論モデルで説明できることを明らかにした。また、線維形成・分解の各段階が、様々な生体分子や有機化合物により抑制的あるいは促進的に修飾を受けることを明らかにした。これらの知見は、生体内アミロイド沈着の分子機構解明、及び治療薬開発に重要な示唆を与える。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Yamaguchi I, Hasegawa K, Takahashi N,

- Gejyo F, Naiki H: Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of  $\beta_2$ -microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry* 40(29): 8499-8507, 2001.
- 2) Ohhashi Y, Hagihara Y, Kozhukh GV, Hoshino M, Hasegawa K, Yamaguchi I, Naiki H, Goto Y: The intrachain disulfide bond of  $\beta_2$ -microglobulin is inessential for the immunoglobulin fold at neutral pH but essential for amyloid fibril formation at acidic pH. *J. Biochem. (Tokyo)*. 131(1): 45-52, 2002.
  - 3) Kozhukh GV, Hagihara Y, Kawakami T, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y: Investigation of a peptide responsible for amyloid fibril formation of  $\beta_2$ -microglobulin by *Acromobacter* protease I. *J. Biol. Chem.* 277(2): 1310-1315, 2002.
  - 4) Ono K, Hasegawa K, Yoshiike Y, Takashima A, Yamada M, Naiki H: Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down preformed Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils in vitro. *J. Neurochem. in press*.
  - 5) Martsev SP, Dubnovitsky AP, Vlasov AP, Hoshino M, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y: Amyloid fibril formation of mouse VL domain under acidic pH. *Biochemistry in press*.
2. 学会発表
- 1) 高橋直生、長谷川一浩、山口 格、下条文武、内木宏延：試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析。第 90 回日本病理学会総会、東京、2001 年 4 月 5-7 日。日病会誌。90(1), 318.
  - 2) 小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁、内木宏延：Alzheimer 病  $\beta$ アミロイド線維の試験管内伸長、及び脱重合機構の解析。第 42 回日本神経学会総会、東京、2001 年 5 月 11-13 日。抄録集。197.
  - 3) Yamaguchi I, Hasegawa K, Takahashi N, Gejyo F, Naiki H: Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of  $\beta_2$ -microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. IXth International Symposium on Amyloidosis, Budapest, July 15-21, 2001. Abstracts. 50.
  - 4) Takahashi N, Hasegawa K, Yamaguchi I, Gejyo F, Naiki H: Establishment of a first-order kinetic model of AL amyloid fibril extension in vitro. IXth International Symposium on Amyloidosis, Budapest, July 15-21, 2001. Abstracts. 82.
  - 5) 小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁、内木宏延：アルツハイマー病  $\beta$ アミロイド線維に及ぼす抗酸化剤 NDGA の強力な分解作用。第 20 回日本痴呆学会学術集会、津、2001 年 10 月 4-5 日。日本痴呆学会誌。15(2), 133.
  - 6) 内木宏延：アミロイド線維形成・分解機構の反応速度論的解析。第 74 回日本生化学会大会シンポジウム アミロイド線維形成の分子機構、京都、2001 年 10 月 25-28 日。生化学。73(8)、654.
  - 7) 長谷川一浩、小野賢二郎、山田正仁、内木宏延：開放反応系によるアルツハイマー病  $\beta$ アミロイド線維の分解機構の解析。第 74 回日本生化学会大会、京都、2001 年 10 月 25-28 日。生化学。73(8), 1068.
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## 長期透析患者にみられる破壊性脊椎関節症 (DSA) 以外の脊椎病変合併例の臨床的検討

分担研究者 原 茂子 虎の門病院 腎センター  
共同研究者 田上哲夫、乳原善文 虎の門病院 腎センター

**研究要旨** 長期透析例にみられるアミロイド性脊椎病変として破壊性脊椎関節症 (DSA) は良く知られているが、それ以外の脊椎病変に関しては報告が少ない。レントゲン所見から DSA 所見が軽度ないし明らかでないにもかかわらず、著明な脊髄圧迫症状を呈し、病理組織学的に透析アミロイドーシスと診断された脊椎病変合併例を経験したので報告する。

### A. 症例

症例 (表 1) は 6 例 (男性 4 例、女性 2 例) で、手術時年齢は 47-60 歳であった。脊椎疾患としては、頸部脊柱管狭窄症が 3 例、腰部脊柱管狭窄症が 3 例であった。透析歴は 25 年-31 年と全例で 25 年以上の長期透析例であった。原疾患は全例が慢性糸球体腎炎で、高血圧が 3 例、心電図異常 (左室肥大) が 1 例でみられた。透析合併症として、二次性副甲状腺機能亢進症に対する副甲状腺摘出術が 3 例、手根管症候群手術が 5 例で行われていた。

### B. 手術入院時現症および検査所見 (表 2) と臨床症状 (表 3)

Body mass index は 17-19 と肥満はない。血液検査結果は透析前値である。UN は 67-91 mg/dl、Cre 9.2-13.7 mg/dl、Ca、P に関しては 1 例で高値であり PTH intact も 537.1 pg/ml と高かった。β 2-microglobulin (β 2-MG) は 10.3-34.6 mg/l、PTH intact は副甲状腺摘出後の症例もあり、8.7-537.1 pg/ml と様々であった。単純 X 線所見では、DSA は 1 例のみでみられ、骨嚢胞は、部位は様々であるが全例に認めた。

CT、MRI 所見では、黄色靭帯と後縦靭帯の肥厚による脊柱管の狭窄像を、ミエログラフィーで

は神経根嚢像の欠損を全例で認めた。

臨床症状としては、頸部脊柱管狭窄症では、両手のしびれと上肢知覚障害を、腰部脊柱管狭窄症では、両足のしびれと間欠性跛行がみられた。症例 2 では、さらに両足のしびれ、巧緻性障害、間欠性跛行がみられ頸髄症と診断された。

### C. 手術方法と病理学的所見

手術方法は、頸部脊柱管狭窄症の症例 1-3 では、それぞれ後方固定、後方固定+前方除圧固定、頸椎後方拡大+椎弓形成術を行った。また、腰部脊柱管狭窄症の症例 4-6 では椎弓切除を行った。術中あるいは術後経過も特に大きな問題はなく、また、臨床症状、QOL も全例で改善していた。

病理組織学的所見 (表 4) では、黄色靭帯あるいは椎間板などに HE 染色で amorphus な物質の沈着を認め、Congo red 染色および β 2MG 染色陽性より透析アミロイドーシスと診断した。

### D. 考察

透析アミロイドーシスに対する対策として β 2MG の除去、ダイアランザー膜の生体適合性対策、透析液の清浄化などが行われているが、

透析アミロイドーシスによる DSA、骨嚢胞は経年的に増加し長期透析例での QOL の低下、さらに生命予後にも影響をきたしているのが現状である。当院における透析アミロイドーシス臨床像と透析期間別にみたその頻度（表 5）をみると、透析期間が長期化するにつれ、手根管症候群、DSA、骨嚢胞などの透析アミロイドーシスの頻度も高くなっているのがわかる。さらに 25 年以上の透析例では脊柱管狭窄症の頻度が高くなり、臨床的に重要な疾患となってきた。今回の脊柱管狭窄症例では、手根管症候群手術が 6 例中 5 例、骨嚢胞は全例でみられたが、DSA は 1 例で認めるのみであった。臨床症状は頸部脊柱管狭窄症では、両手のしびれと上肢知覚障害を、腰部脊柱管狭窄症では、両足のしびれと間欠性跛行がみられ、日常生活での苦痛を伴い QOL の低下がみられた。当院での症例でみると術中あるいは術後経過も特に大きな問題はなく、また、臨床症状、QOL も全例で改善していることより、手術可能であれば積極的に治療を検討すべきであると考えられた。しかしながら、症状が再発し、手術や神経ブロックを繰り返している症例もあり、今後は透析アミロイドー

シスに対する根本的治療の確立が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

- 1) 田上哲夫、原茂子、乳原善文 他：長期透析患者にみられる破壊性脊椎関節症以外の脊椎病変合併例の臨床的検討、日本透析医学会学術総会、1999 年 6 月

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1. 症例のプロフィール (手術入院時)

分担研究報告書番号3

症例	1 H.M	2 S.R	3 T.T	4 S.K	5 N.K	6 M.G
年齢	54	49	54	60	47	58
性別	female	male	male	female	male	male
脊椎疾患	頸部脊柱管 狭窄症	頸部脊柱管 狭窄症	頸部脊柱管 狭窄症	腰部脊柱管 狭窄症	腰部脊柱管 狭窄症	腰部脊柱管 狭窄症
透析歴 (年)	30	25	30	26	28	31
原疾患	CGN*	CGN	CGN	CGN	CGN	CGN
高血圧	有	有	無	有	無	無
心電図異常	無	無	無	有 (LVH)	無	無
透析合併症						
PTx**	有	無	無	有	有	無
CTS***	有	有	無	有	有	有
DSA****	有	無	無	無	無	無
骨嚢胞	有	有	有	有	有	有

\*慢性糸球体腎炎 \*\*副甲状腺摘出術 \*\*\*手根管症候群手術 \*\*\*\*破壊性脊椎関節症

表2. 入院時現症と血液検査所見 (手術入院時)

症例	1 H.M	2 S.R	3 T.T	4 S.K	5 N.K	6 M.G
身長	152.2	164.5	173.4	132.0	170.5	157.9
体重	41.0	49.2	49.6	33.5	55.8	41.4
Body mass index	17.7	16.6	16.6	19.3	19.1	16.6
生化学						
TP (g/dl)	6.4	7.1	6.2	7.4	7.4	5.9
UN (mg/dl)	76	79	80	83	67	91
Cre (mg/dl)	9.2	13.2	13.6	13.7	12.9	11.5
Na (mmol/l)	142	135	140	140	139	140
K (mmol/l)	5.4	5.1	5.3	4.6	4.6	5.6
Cl (mmol/l)	109	104	107	103	100	103
Ca (mEq/l)	4.6	4.8	4.6	5.5	4.9	4.8
P (mg/dl)	5.1	5.6	5.2	7.4	5.4	5.9
$\beta$ 2MG (mg/l)	10.3	26.7	34.6	25.6	18.5	23.5
Al ( $\mu$ g/dl)	2.8	1.7	2.7	3.0	4.8	3.3
脂質						
T-CHO (mg/dl)	197	144	148	216	147	231
TG (mg/dl)	75	52	49	97	47	170
内分泌						
PTH (pg/ml)	58.6	9.5	102.0	537.1	8.7	71.5

表3. 臨床症状

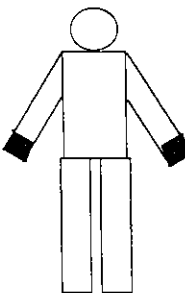
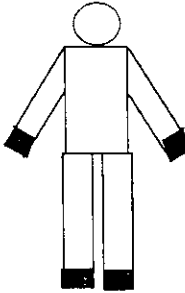
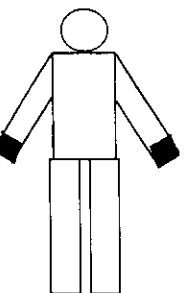
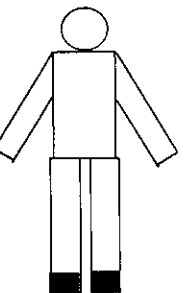
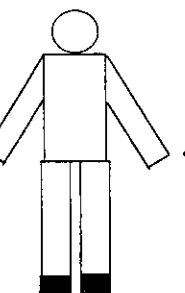
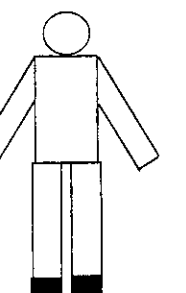
症例	1 H.M	2 S.R	3 T.T	4 S.K	5 N.K	6 M.G
脊椎疾患	頸部脊柱管狭窄症	頸部脊柱管狭窄症	頸部脊柱管狭窄症	腰部脊柱管狭窄症	腰部脊柱管狭窄症	腰部脊柱管狭窄症
						
	両手のしびれ 上肢知覚障害	両手のしびれ 上肢知覚障害 巧緻性障害 間欠性跛行	両手のしびれ 上肢知覚障害	両足のしびれ 間欠性跛行	両足のしびれ 間欠性跛行	両足のしびれ 間欠性跛行

表4. 病理組織所見のまとめ

症例	採取組織	Congo red染色	$\beta$ 2MG染色
1	軟部組織 椎間板	陽性	陽性
2	軟部組織 椎間板	陽性	陽性
3	軟部組織 椎間板	陽性	陽性
4	黄色靭帯	陽性	陽性
5	黄色靭帯	陽性	陽性
6	黄色靭帯	陽性	陽性

表5. 透析アミロイドーシス臨床像 -透析期間別にみたその頻度-

透析期間	10-14年 (n:20)	15-20年 (n:35)	20-24年 (n:14)	25年以上 (n:7)	
手根管開放術	10	17.1	35.7	42.9	(%)
破壊性脊椎関節症	25	40	28	57	(%)
骨嚢胞					
大腿骨	30	51.4	64.3	71.4	(%)
上腕骨	35	51.4	71.4	51.4	(%)
手指骨	16	48.5	42.5	42.9	(%)
脊柱管狭窄症	0	0	0	71.4	(%)

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## 透析アミロイドーシスの指標 —MMP-3 (マトリックスメタプロテアーゼ-3) 測定の意義—

分担研究者 原 茂子 虎の門病院 腎センター内科、血液浄化療法部

共同研究者 伏見智久\*、田上哲夫\*、乳原善文\*

虎の門病院 腎センター内科、血液浄化療法部

研究要旨 透析アミロイドーシスは靭帯、骨関節を病変の場として発症進展し、臨床症状として手根管症候群、破壊性脊椎関節症をはじめとした脊椎すべり症、脊柱狭窄症など脊椎関連疾患、骨嚢胞であり、その他としては、消化管や心臓にもアミロイドーシスは報告されているが、主体の病変は靭帯、骨関節である。これらの透析アミロイドーシスは、透析期間の長期化に伴いその頻度は高値となり、15年以上例では、手根管症候群、脊椎関連疾患、骨嚢胞は75%にみられる。しかしながらアミロイドーシスの診断は臨床症状や画像診断でのみであり、その発症進展および病勢、活動性さらには治療による推移を把握するマーカーはあきらかにされていない。透析アミロイドの構成成分であるβ2ミクログロブリンの血中濃度は、透析期間やアミロイドーシスの有無との相関はなく、病勢進展における推移を示すマーカーとしての意義は認められていない。そこで今回われわれは、骨関節破壊の早期変化に関与すると考えられているMMP-3(Matrix Metaprotease-3)が透析アミロイドーシスの骨関節病変の病勢および、治療による変化としてのマーカーになりうるかを検討した。MMP-3は尿素窒素、クレアチニンなど慢性腎不全因子との相関はみられなかった。透析期間の長期化とともにMMP-3は高値を示した。透析アミロイドーシスの病変の有無と関連がみられた。透析アミロイドーシスの治療としてのβ2ミクログロブリンの吸着療法下では、MMP-3は持続低値を維持することが可能であった。今後はMMP-3の産生を抑制するべき治療としての透析方法、薬物療法をおこなうことが適切である。

### A. 研究目的

透析アミロイドーシスは靭帯、骨関節を病変の場として発症進展し、臨床症状として手根管症候群、破壊性脊椎関節症をはじめとした脊椎すべり症、脊柱狭窄症など脊椎関連疾患、骨嚢胞であり、その他としては、消化管や心臓にもアミロイドーシスは報告されているが、主体の病変は靭帯、骨関節である。これらの透析アミロイドーシスは、透析期間の長期化に伴いその頻度は高値となり、15

年以上例では、手根管症候群、脊椎関連疾患、骨嚢胞75%にみられる。しかしながらアミロイドーシスの診断は臨床症状や画像診断でのみであり、その発症進展および病勢さらには治療による推移を把握する血中のマーカーはあきらかにされていない。透析アミロイドの構成成分であるβ2ミクログロブリンの血中濃度は、透析期間やアミロイドーシスの有無との相関はなく、病勢進展における推移を示すマーカーとしての意義は認められて



いない。そこで今回われわれは、骨関節破壊の早期変化に関与すると考えられている MMP-3(Matrix Metaprotease-3)が透析アミロイドーシスの骨関節病変の病勢および、治療による変化としてのマーカーになりうるのではないかと考え、アミロイドーシス所見、治療による推移と対比検討した。

## B. 研究方法

対象は、当院で維持透析を施行中の 32 例である。32 例で MMP-3 値を測定した。透析期間は 5 年未満 5 例、5～10 年は 9 例である。10～15 年は 3 例 15 年以上例は 13 例のうち 7 例は  $\beta 2$  ミクログロブリン吸着カラム併用透析を施行している。透析期間、透析アミロイドーシスの病態として手根管症候群の有無、骨嚢胞、破壊性脊椎症および脊椎関連疾患の有無と MMP-3 値を対比した。さらに  $\beta 2$  ミクログロブリン吸着カラム併用療法の有無とも対比した。維持透析例での使用した透析ダイアライザーは High Flux Membrane である。透析回数は週 3 回施行している。

## C. 研究結果

MMP-3 と、慢性腎不全による病態との関連を対比すると、尿素窒素、クレアチニン、 $\beta 2$  ミクログロブリン値と MMP-3 値には相関はみられなかった。MMP-3 値と透析期間との対比では透析期間とともに MMP-3 値は高値を示した(図-1)。透析 10 年未満群での 17 例では  $192 \pm 100 \text{ ng/ml}$ 、10 年以上例のリクセル非使用例では  $306 \pm 211 \text{ ng/ml}$  で高値の傾向を示した( $p=0.095$ )(表-1)。骨嚢胞の有無と MMP-3 との対比では、骨嚢胞が高度の症例では MMP-3 値が高値であり、骨嚢胞の有無と MMP-3 値との関連があきらかであった(図-2)。手根管症候群、骨嚢胞、破壊性脊椎関節症などの脊椎関連疾患の 3 病態のうち 1 つの病態を有する症例をアミロイドーシスありとして、アミロイドーシスの有無と MMP-3 値を対比すると、図-3 のごとくで

あり、有意差はみられないが、アミロイドーシス合併群で MMP-3 は高値を示している。アミロイド治療としての吸着カラム併用透析の有無と MMP-3 値を対比すると、10 年以上の透析例で、リクセル使用例では  $161 \pm 56 \text{ ng/ml}$  で、非使用例に比し有意に低値を示した(表-1)。 $\beta 2$  ミクログロブリンの吸着カラム併用による MMP-3 の除去率をみると  $18.7 \pm 8.9\%$  であった。吸着カラムの非併用透析例では  $5.3 \pm 7.8\%$  に比し有意に( $p=0.0007$ )吸着併用群では MMP-3 が除去されていた(表-2)。MMP-3 濃度は  $\beta 2$  ミクログロブリンとの相関はみられず、血清クレアチニン値、尿素窒素値とも相関はみられなかった。

## D. 考察

MMP-3 は軟骨細胞、繊維芽細胞および滑膜細胞から不活性型の潜在酵素として分泌されている物質である。慢性関節リウマチの早期病変のマーカーとなるとの報告がみられる。さらに MMP-3 は、関節液および体液の MMP-3 濃度測定により関節病態の定量化が可能であり、関節炎の重症度や活動性と MMP-3 濃度に相関がみとめられ、関節破壊の指標となるマーカーであることがリウマチ疾患であきらかになっている。従来透析アミロイドーシスの病態を定量化できる物質はあきらかにされていなかった。そのためにアミロイドによる関節破壊の程度と相関を示す血中物質を検出しえてない。 $\beta 2$  ミクログロブリンは透析アミロイドの構成成分ではあるが、血中濃度はその病勢や病態を反映していない。そのために病勢、治療効果の客観的把握が不可能であった。今回 MMP-3 の測定を施行にて MMP-3 濃度が透析期間とともに高値を示している。 $\beta 2$  ミクログロブリン、クレアチニン、尿素窒素との相関がみられない物質で、骨嚢胞では、骨嚢胞と MMP-3 濃度との関連性がみられた。透析期間とともに高値を示したことは長期化に伴いアミロイドーシスの合併が高頻度に認められていること

とも対応している。さらに  $\beta 2$  ミクログロブリン吸着療法施行では MMP-3 濃度が非治療群に比し持続して低値を示しが低下し、さらに 1 回の治療での MMP-3 値の下降率が高値である。治療により関節破壊の活動性が抑えられていることを示唆している。我々は吸着療法ではサイトカインが吸着されることを報告してきているが、血中のサイトカイン値は、吸着療法前後では低下するが持続した低値はみとめられなかった。一方 MMP-3 は吸着療法により持続して低値に維持されていることは、このマーカーが治療による病勢をより反映すると推察される。今後、透析アミロイドーシス対策としての透析方法、薬物療法に際しての関節破壊、活動性を血中で測定しうるマーカーになりうる。

#### E. 結論

1) 関節破壊の重症度の指標、関節炎の活動性に関与する MMP-3 濃度を維持透析例で測定し、アミロイドーシスの病勢、活動性の指標となりうるかいなかを検討した。MM-3 値は尿素窒素、クレアチニン、 $\beta 2$  ミクログロブリンとに相関はみられなかった。透析期間の長期化に伴い MMP-3 は高値を示した。

2) 透析アミロイドーシスの病態、特に骨嚢胞と MMP-3 値には関連性があきらかであ

った。

3)  $\beta 2$  ミクログロブリン吸着カラム併用例では MMP-3 値は持続して低値をしめし、吸着カラム療法で関節破壊が抑制されうると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 原 茂子、伏見智久:透析アミロイドーシス腎疾患最近の治療 2002-2004 飯野、楨野、二瓶編 南江堂 2001
- 2) 原 茂子:透析アミロイドーシス治療対策腎と骨代謝 14(1)59-66,2001

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

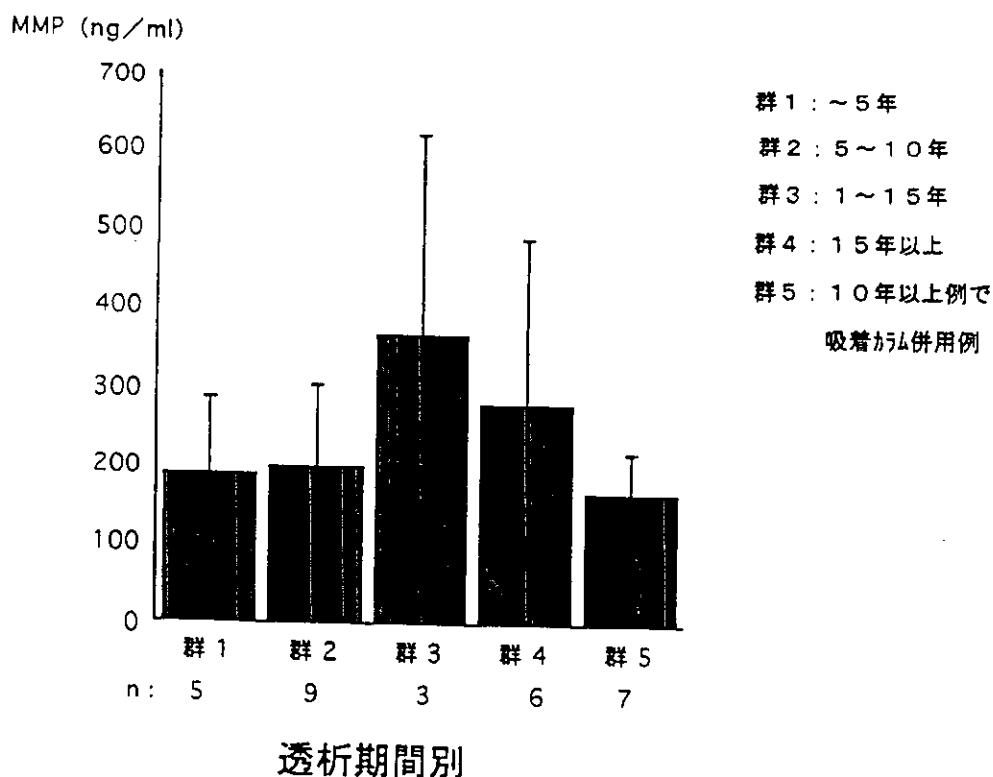
##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

図—1 透析期間別にみたMMP-3値

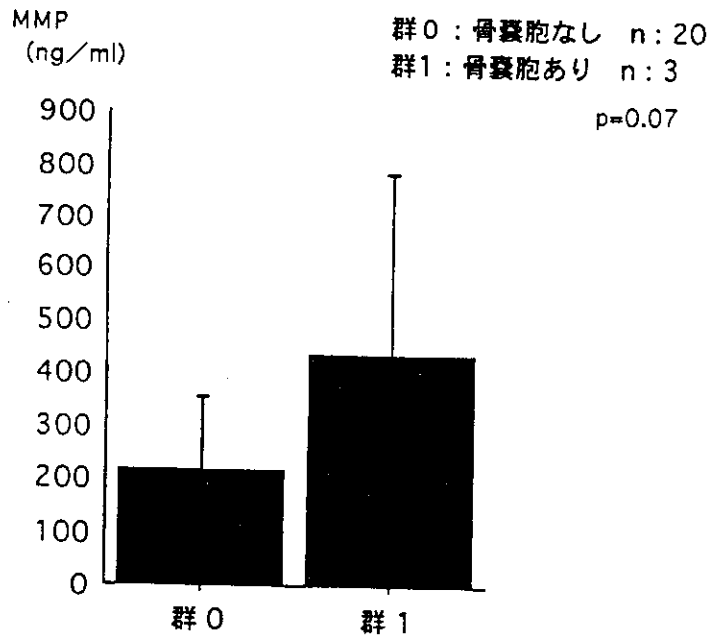


表—1 透析期間・吸着療法併用の有無とMMP-3値

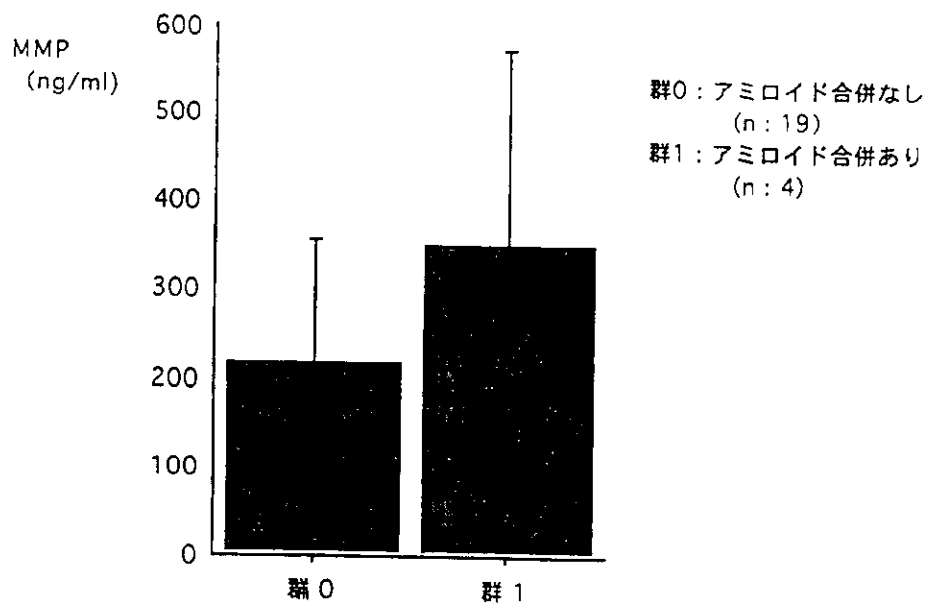
透析期間	MMP-3 値 (ng/ml)	
	10年未満	10年以上
吸着併用あり	—	161±57# (n:7)
吸着併用なし	192±100 (n:14)	306±211 ## (n:9)

# VS ## p=0.075

図—2 骨嚢胞の有無とMMP-3値の対比



図—3 アミロイド-β合併の有無とMMP-3値の対比



表—2 吸着カラム併用の有無とMMP-3下降率

吸着カラム併用の有無とMMP-3の下降率

	吸着カラム併用例 (n:7)	非併用例 (n:23)	
MMP-3値 (ng/ml)			
治療前	161 ± 57	306 ± 211	
治療後	132 ± 52	292 ± 195	
下降率 (%)	15.9 ± 10.1	3.6 ± 6.6	p=0.075

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチドによる家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の遺伝子治療の基礎的研究

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学医学部臨床検査医学

共同研究者 中村政明\*、山下太郎\*、大林光念\*、原岡克樹\*\*、寺崎久泰\*\*

熊本大学医学部、\*神経内科、\*\*同第一内科

**研究要旨** FAP の遺伝子治療の可能性を探るために、正常の TTR 遺伝子配列をもつ RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチド(ONs)を用いて *in vitro* の細胞系で ATTR V30M 遺伝子の相同組み換えが起こるかを検討した。ATTR Val30Met の遺伝子を一過性および安定に発現させた CHO 細胞に ONs をトランスフェクションした。ONs の投与 48 時間後に細胞を回収し、細胞を回収し、DNA を抽出し、PCR を行い、変異部位を含む PCR 産物をプラスミド DNA にライゲーションした後、DH5 $\alpha$  細胞にトランスフォームした。得られたコロニーからプラスミド DNA を精製し、PCR-RFLP 法およびシーケンスを行うことにより、ATTR V30M 遺伝子の正常 TTR 遺伝子への変換率を検討した。その結果、一過性発現系で約 8%、安定発現系で約 3% の修復率が認められた。今回の我々の検討で、RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチドを用いた変異 TTR 遺伝子の修復が細胞レベルで確認できたことから、現在のところ FAP に対して最も実現可能な遺伝子治療と考えられる。今後、遺伝子治療の実用化に向けて、ATTR Val30Met の遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いて、最適な遺伝子治療の条件について検討する予定である。

### A. 研究目的

FAP ATTR Val30Met は、主として肝臓で作られるトランスサイレチン (TTR) 蛋白の蛋白一次構造の 30 番目のバリンがメチオニンに置換した点変異によって起こる遺伝性アミロイドーシスに分類され、本邦に大きなフォーカスが認められる予後不良の疾患である。この疾患に対して、我々は 1994 年以來 25 名の FAP 肝移植を経験してきたが、移植により肝臓を TTR の正常の遺伝子を持つものと置換すると、FAP の臨床症状が進行しないことが明らかになった。しかしながら、肝移植は、1) ドナー不足が深刻である、2) 患者の精神的・身体的・経済的負担も大きい、3) 進行した患者など全員が受けられる治療

法ではない、4) 術中の侵襲に加え、術後の拒絶反応などで命を落とす危険性がある、5) 術後終生免疫抑制剤を服用しなければならず、将来発癌などの問題が生じ得る、6) 発症していない遺伝子保因者に施行することができない、など多くの問題を孕んでいる。従って、肝移植によらない、肝臓での異型 TTR の産生を抑制する治療法の開発が待たれる。そこで、肝臓をターゲットとした遺伝子治療がクローズアップされるようになってきた訳である。今回、我々は FAP の遺伝子治療を確立する目的で、ATTR Val30Met の遺伝子を一過性および安定に発現させた CHO 細胞を用いて、RNA/ DNA キメラオリゴヌクレオチド(ONs)による遺伝子修復が可

能かどうかを検討した。

## B. 研究方法

pIRES2-EGFP-Met30 (pIRES2-EGFP に ATTR Val30Met cDNA を組み込んだもの) を用いて、一過性および安定に ATTR Val30Met を発現させた CHO 細胞に ONs をトランスフェクションした。一過性発現系では、pIRES2-EGFP-Met30 のトランスフェクションした 6 時間後に ONs のトランスフェクションを施行した。両発現系共に、ONs 投与 48 時間後に細胞を回収し、DNA を抽出し、Met30 領域を含む TTR 遺伝子の領域を PCR 法にて増幅した。得られた PCR 産物を TA cloning vector に組み込み、DH5 $\alpha$  細胞に形質転換した。得られたコロニーからプラスミド DNA を精製し、PCR-RFLP 法を用いて、ATTR Val30Met 遺伝子の正常 TTR 遺伝子への変換率を検討した。更に、DNA シークエンスを行い、ATTR Val30Met 遺伝子の修復を確認した。

## C. 研究結果

一過性発現系に対して 50 コロニーを、安定発現形で 60 コロニーを解析したところ、一過性の発現系では 8%、安定発現系では 3.3% の遺伝子変換を認めた。また、正常 TTR に修復されたコロニーは、最終的に DNA シークエンスで確認された。

## D. 考察

遺伝子治療による肝臓での異型 TTR の産生を抑制する方法として、1) アンチセンス法、2) リボザイム法、3) ONs を用いた遺伝子修復の 3 種類の方法が考えられる。アンチセンス法やリボザイム法は *in vitro* の系ではある程度効果がみられるが、その効果は一時的なもので、TTR が代謝回転の速い蛋白であることを考慮すると、終生頻回に本治療を施行せねばならず、治療実現には克服すべき問題が山積みしていると考えられる。これに

対して Kmiec らにより提唱された ONs を用いた遺伝子修復は、DNA レベルでの遺伝子修復のため、一度組み換えがおこると、その効果は半永久的に続くと考えられ、実際にラットで FAP と同一の標的臓器である肝臓での遺伝子修復に成功したという報告もある。従って、我々は、ONs を用いた点変異 (欠失も含む) 遺伝子治療法が、FAP の最も理想的な遺伝子治療法と考えた。

今回の我々の検討で、*in vitro* の系で変異 TTR 遺伝子の修復を認めたことから、ONs による遺伝子修復法が FAP において肝移植に代わる治療法となりうる可能性が示唆された。今後、この方法による遺伝子治療の実用化に向けて、ATTR Val30Met の遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて *in vivo* での最適条件および副作用の有無について検討していく予定である。

## E. 結論

1. 培養細胞中の ATTR Val30Met 遺伝子では、RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチドにより、一過性発現系で 8.0%、安定発現系で 3.3% が正常 TTR 遺伝子に変換した。

2. 今後は、ATTR Val30Met 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて *in vivo* での修復条件などを検索し、本法による FAP 患者の遺伝子治療を行いたいと考えている。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 中村政明、安東由喜雄、内野誠: FAP の遺伝子治療. 神経内科 55 巻 (6 号): 525-529, 2001.

### 2. 学会発表

1) 中村政明、安東由喜雄、松永典子、大林光念、寺崎久泰、内野誠: RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチドによる家族性アミ

ロイドポリニューロパチー (FAP) の遺  
伝子治療-第一報. 第 42 回日本神経学会  
総会、東京、5 月 11-13 日、平成 13 年.

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得



厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者の摘出肝を移植されたドミノ移植患者の血中に異型トランスサイレチン (ATTR) に対する自己抗体が出現する！

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学医学部臨床検査医学  
 共同研究者 山下太郎\*、中村政明\*、大林光念\*、原岡克樹\*\*、寺崎久泰\*\*、  
 畑加奈子\*\*\*、田尻貴裕\*\*\*、中川和子\*\*\*、石崎高志\*\*\*  
 \*熊本大学医学部神経内科、\*\*同第一内科  
 \*\*\*熊本大学薬学部薬物治療学

**研究要旨** FAP 患者の摘出肝を移植されたドミノ移植患者にとって、新たに産生される ATTR はエイリアン蛋白であるため、自己抗体が産生される可能性がある。そこで、FAP 患者の摘出肝を移植された先天性胆道閉鎖症、及び原発性胆汁性肝硬変患者の移植後の血清を用い、TTR 濃度を測定すると共に、異型 TTR に対する自己抗体を、抗ヒト免疫グロブリン抗体を 2 次抗体として ELISA 法を用いて測定した。ドミノ肝移植患者 2 名において、異型 TTR の濃度は術後速やかに上昇していたが、正常 TTR 濃度と比較すると術後 1 週間の時点でも優位に低下していた。また、抗 ATTR Val30Met 抗体は術後早期から認められ、術後 3 ヶ月まで測定可能域にあった。FAP 患者の摘出肝を用いたドミノ肝移植患者に異型 TTR に対する自己抗体が出現したことが判明した。

### A. 研究目的

最近、移植における世界的ドナー不足の中で、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者の肝臓が異型 TTR を産生する以外はほとんど異常が認められないとの理論的背景から、FAP 患者の摘出肝を再利用し、肝細胞癌などの重症肝臓疾患患者に移植する、いわゆるドミノ肝移植が行われるようになった。しかし、ドミノ移植患者における移植後の異型 TTR の代謝動態に関してはほとんど知られていない。そこで我々は、FAP 患者の肝臓を移植されたドミノ移植患者における異型 TTR の代謝動態について検討すると共に、異型 TTR はドミノ移植患者にとって本質的にはエイリアン蛋白であるため、移植後ドミノ移植患者血中に新たに異型 TTR

に対する自己抗体が出現していないか検討を行った。

### B. 研究方法

部分生体肝移植を受けた FAP ATTR Val30Met 患者 (58 歳、男性) から摘出された肝臓を分割移植されたドミノ移植患者 2 名 (原発性胆汁性肝硬変患者、50 歳、女性及び先天性胆道閉鎖症患者、17 歳、女性) において、血中の正常及び、異型 TTR レベルを ELISA 法及び質量分析法 (MALDI/TOF MS) により測定した。さらに、ドミノ移植患者血中に異型 TTR に対する自己抗体が出現していないかを検討するために、FAP ホモ接合体患者血清から精製された ATTR Val30Met を抗原とし ELISA 法にて自己抗体の検出を行

った。

### C. 研究結果

FAP 患者の摘出肝を移植されたドミノ移植患者血中の総 TTR レベルは、移植後より徐々に上昇し、7 日目には一定となったが、異型 TTR レベルは正常 TTR に比し、著しく低下しており、FAP ATTR Val30Met 患者の異型 TTR レベルよりも更に低下していた。さらに、ドミノ移植患者では 2 名とも移植後血中異型 TTR に対する自己抗体が術後 3 日目より検出され、その後、濃度は低下傾向を示すが、術後 2 ヶ月まで血中で検出可能であった。正常対照者及び、FAP 患者からは異型 TTR に対する自己抗体は検出されなかった。

### D. 考察

ドナーとなった FAP 患者において、肝移植前の異型 TTR レベルは、正常 TTR に比しわずかに低い程度であったのに対し、その肝臓を移植されたドミノ移植患者の異型 TTR レベルは、正常 TTR に比し、著しく低下していた。本現象の原因としては、1. 移植された FAP 肝臓内での選択的異型 TTR の産生低下、2. 患者体内での異型 TTR の分解の亢進、3. 移植後ドミノ移植患者血中に新たに出現した異型 TTR に対する自己抗体によるもの、などが考えられたが、1、2 はこれまでの FAP に関する知見から可能性が低い。従って、ドミノ移植患者血中の異型 TTR レベルの低下は、自己抗体の出現により異型 TTR の一部が血流空間から除去されたことによる可能性が考えられた。解析の結果、実際に両ドミノ移植患者とも移植後早期に異型 TTR に関する抗体が出現していた。通常、肝移植後患者血中に自己抗体が出現することは、好ましいこととは考えられないが、検出された自己抗体は、FAP を引き起こす原因蛋白である異型 TTR を低下させる原因となっている可能性がある。しかし、本現象の良否については今後の症例の蓄積、長期にわたる

の経過観察が必要と考えられる。

### E. 結論

1. FAP 患者の摘出肝を移植されたドミノ移植患者血中の異型 TTR のレベルは、正常 TTR に比し、著しく低値を示していた。

2. ドミノ移植患者では移植後血中に異型 TTR に対する自己抗体が認められた。

3. ドミノ移植患者血中の異型 TTR レベルの低下は、血中異型 TTR に対する自己抗体の出現により異型 TTR の一部が血流空間から除去されたことによる可能性が考えられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Yukio Ando, Hisayasu Terazaki, Katsuki Haraoka, Takayasu Tajiri, Masaaki Nakamura, Konen Obayashi, Shogo Misumi, Shozo Shoji, Kanako Hata, Kazuko Nakagawa, Takashi Ishizaki, Shinji Uemoto, Yukihiro Inomata, Koichi Tanaka, and Hiroaki Okabe: Presence of autoantibody against ATTR Val30Met after sequential liver transplantation. Transplantation, in press, 2001.

#### 2. 学会発表

1) Hisayasu Terazaki, Yukio Ando, Takahiro Tajiri, Katsuki Haraoka, Masaaki Nakamura, Konen Obayashi, Shogo Mitsui, Kanako Hata, Kazuko Nakagawa, Takashi Ishizaki, Hiroaki Okabe, Shinji Uemoto, Koichi Tanaka, and Yukihiro Inomata: Presence of autoantibody against ATTR Val30Met after sequential liver transplantation, IXth International Symposium on Amyloidosis, Budapest, Hungary, July 15-21, 2001.

2) 畑加奈子、田尻貴裕、中川和子、石崎高

志、安東由喜雄、中村政明、大林光念、  
内野 誠: FAP のドミノ肝移植患者に異  
型 TTR の自己抗体が出現する、第 42 回  
日本神経学会総会、東京、5 月 11-13 日、  
平成 13 年.

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者の 眼症状に関する病理学的、生化学的解析

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学医学部臨床検査医学

共同研究者 原岡克樹\*、中村政明\*\*、山下太郎\*\*、安東えい子\*\*\*

熊本大学医学部\*第一内科、\*\*同神経内科、\*\*\*西日本病院眼科

**研究要旨** FAP 患者にみられる眼症状の出現時期、アミロイドの沈着程度は必ずしも他の臓器のものとは一致せず、眼には固有のアミロイド沈着機構があると考えられる。今回、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP ATTR Val30Met) 患者の剖検眼 9 例の組織学的解析を行った結果、アミロイド沈着にはパターンが存在し、アミロイド沈着と臨床所見に相関性があることが判明した。また、視神経鞘へ沈着したアミロイドは、脳脈絡叢由来の TTR から構成される可能性が示唆された。さらに、肝移植後新たに硝子体混濁および緑内障が出現した FAP 患者から得られた硝子体液および眼房水の解析により、網膜で産生された TTR がこれらの眼症状の原因となることを証明した。

### A. 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) では、肝移植を行っても眼における新たなアミロイド沈着は阻止できないことが明らかになっている。また、FAP の初発症状が眼症状であるケースも多く、眼症状が FAP の診断のきっかけとなる場合も少なくない。さらに全身症状が全く認められないにも関わらず、眼症状のみを呈する症例も存在する。これらのことから眼のトランスサイレチン (TTR) の代謝動態には、肝臓の異型 TTR 産生を制御してもコントロールできない独自の代謝システムが存在する可能性が考えられる。しかし、これまで FAP の眼症状や TTR 代謝に関して、系統的な解析はほとんど行われていない。そこで我々は、FAP の剖検眼を用いて、眼組織でのアミロイド沈着パターンを明らかにするとともに、臨床症状との比較検討、眼組織各部位の TTR の由来について検討した。さらに硝子体、シュレム管及び全房水のアミロイドを構成する TTR の由来について、肝移植後患者のサンプルを用いて生化学的検

討を行った。

### B. 研究方法

(1) アミロイド沈着パターンの解明  
検体：FAP ATTR Val30Met 患者 9 名 (日本人 3 名、スウェーデン人 6 名) の剖検眼を用いた。  
方法：ホルマリン固定パラフィン切片に対してヘマトキシリン・エオジン (HE)、コンゴ赤 (過マンガン酸処理含む)、抗 TTR 抗体を用いた免疫組織化学的染色を施行し、各部位へのアミロイド沈着程度、沈着様式・沈着頻度などを詳細に解析するとともに、アミロイドの由来として、血行性 (肝臓由来)・髄液行性 (脳脈絡叢由来)・網膜行性 (網膜色素上皮由来) の 3 点の視点から TTR の由来を考察した。

(2) 硝子体アミロイドや眼房水に含まれる TTR に関する検討  
検体：肝移植後新たに硝子体混濁および緑内障を併発した FAP (ATTR Val30Met) 患者 (女性、47 歳) の硝子体切除術時に得られた硝子体液ならびに前眼房水を用いた。