

20020702

厚生労働科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

アミロイドーシスに関する調査研究

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 池田修一

平成15(2003)年3月

目 次

[I] 総括研究報告

主任研究者 池田修一	1
------------------	---

[II] 分担研究報告

1. 抗免疫グロブリンL鎖可変領域抗体によるALアミロイドーシスの免疫組織化学的 検討 石原得博 山口大学医学部構造制御病態学講座	7
2. ALアミロイドーシス発症および治療に関する骨髄腫細胞の細胞生物学的研究	10
—骨髄腫細胞亜群でのIL-6シグナル伝達の相違— 河野道生 山口大学大学院医学研究科生体シグナル解析医学講座	
3. 原発性ALアミロイドーシス腎病変についての一考察	14
原茂子 虎の門病院分院腎センター内科	
4. ALアミロイドーシスに対するアンチセンス治療法の開発	21
今井浩三 札幌医科大学医学部第一内科	
5. 微小生検組織を用いた生化学的なアミロイドーシス診断法の開発	26
徳田隆彦 信州大学医学部加齢適応研究センター神経可塑性分野	
6. 心不全を有する全身性ALアミロイドーシスに対する自己末梢血幹細胞移植	30
麻奥英毅 広島赤十字・原爆病院輸血部	
7. 骨髄腫における血管新生阻害療法と小胞体ストレス誘導療法: ALアミロイドーシス 治療への可能性	34
満屋裕明 熊本大学医学部第二内科	
8. <分科会報告> 原発性ALアミロイドーシスに対する自己末梢血幹細胞移植を併 用したメルファラン大量静注療法の治療指針	37
池田修一 ¹⁾ 、今井浩三 ²⁾ 、下条文武 ³⁾ 、麻奥英毅 ⁴⁾ 、満屋裕明 ⁵⁾ 信州大学医学部第三内科 ¹⁾ 、札幌医科大学医学部第一内科 ²⁾ 、新潟大学大学院医歯 学総合研究科内部環境医学講座 腎・膠原病内科分野 ³⁾ 、広島赤十字・原爆病院第 四内科輸血部 ⁴⁾ 、熊本大学医学部第二内科 ⁵⁾	
9. メガリン発現細胞を用いた透析アミロイドーシスの予防療法を開発するための基礎 的検討	40
下条文武 新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座 腎・膠原病内科分野	
10. β 2-ミクログロブリンのフォールディングとアミロイド線維形成	45
内木宏延 福井医科大学医学部第二病理	

11. 中性pHでの β 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維伸長に及ぼすトリフルオロエタノールとグリコサミノグリカンの影響47
内木宏延
福井医科大学医学部第二病理
12. 透析アミロイドーシスにおける病勢、治療の指標 -MMP-3の有用性51
原 茂子
虎の門病院分院腎センター内科
13. 全身性アミロイドーシスにおける apolipoprotein AI の共存56
石原得博
山口大学構造制御病態学講座
14. 遺伝子改変マウスを用いた遺伝性アミロイドーシスの発症予防法の開発：無血清アミロイドP成分(SAP)マウスを用いたSAP機能の解析59
前田秀一郎
山梨医科大学医学部生化学第一
15. 非典型的な染色パターンを呈した皮膚アミロイドーシスの一例62
安東由喜雄
熊本大学医学部臨床検査医学講座
16. 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の遺伝子治療 -Single-stranded oligonucleotides (SSOs) によるの検討-66
安東由喜雄
熊本大学医学部臨床検査医学講座
17. Transthyretin amyloid 形成に対する三価クロムイオンの作用69
安東由喜雄
熊本大学医学部臨床検査医学講座
18. FAP TTR Asp18Glu と FAP TTR Asp18Gly の臨床像の特徴71
中里雅光
宮崎医科大学医学部第三内科
19. FAP (Met30) 患者の腎組織所見からみた肝移植適応73
池田修一
信州大学医学部第三内科
20. 肝腫瘍細胞株を用いたIL-6、IL-1、TNF α 刺激によるSAA1プロモーター発現機構の解析77
吉崎和幸
大阪大学健康体育部健康医学第一部門
21. マウスAAアミロイドーシスにおけるAEF (amyloid enhancing factors) の解析84
樋口京一
信州大学医学部加齢適応研究センター
22. 関節リウマチ(RA)における関節機能再建手術後の炎症マーカーの推移88
高杉 潔
道後温泉病院リウマチセンター

23.	アミロイド成分抗体の <i>in vivo</i> 応用	92
	高杉 潔 道後温泉病院リウマチセンター)	
24.	SAA1 遺伝子多型と SAA 発現	95
	馬場 聡 浜松医科大学医学部第二病理	
25.	反応性全身性 AA アミロイドーシスの早期診断における腹壁脂肪吸引生検と SAA <i>genotyping</i> の有用性についての検討	98
	池田修一 信州大学医学部第三内科	
26.	<分科会報告> AA アミロイドーシスに対する治療指針の確立	101
	吉崎和幸 ¹⁾ 、池田修一 ²⁾ 、今井浩三 ³⁾ 、下条文武 ⁴⁾ 、原 茂子 ⁵⁾ 、高杉 潔 ⁶⁾ 、 馬場 聡 ⁷⁾ 大阪大学健康体育部健康医学第一部門 ¹⁾ 、信州大学医学部第三内科 ²⁾ 、札幌医科大学医学部第一内科 ³⁾ 、新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座 腎・膠原病内科分野 ⁴⁾ 、虎の門病院分院腎センター内科 ⁵⁾ 、道後温泉病院リウマチセンター ⁶⁾ 、浜松医科大学医学部第二病理 ⁷⁾	
27.	メラトニンによる A β アミロイドーシス治療	107
	東海林幹夫 岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経病態内科学	
28.	脳アミロイドアンギオパチー (CAA) に関連する脳出血の危険因子	114
	山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)	
29.	ニコチンによるアルツハイマー病 β アミロイド線維の分解作用	117
	山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)	
30.	ラット慢性脳虚血モデルにおける脳内アミロイド β 蛋白の解析	119
	玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科	
31.	血漿 A β 分子種に及ぼす pravastatin の効果	124
	玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科	
32.	紀伊半島の筋萎縮側索硬化症/パーキンソン痴呆複合脳および脳脊髄液の β アミロイド定量	129
	葛原茂樹 三重大学医学部神経内科	
[III]	研究成果の刊行に関する一覧表	133
[IV]	班構成員名簿	151

[I] 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括 研究報告書

アミロイドーシスに関する調査研究

主任研究者 池田 修一 信州大学医学部 教授

研究要旨 臨床病理学的に多様性を有するアミロイドーシスに対して、個々の病態に即した適切な診断法と治療法の確立を目指して研究を遂行している。本年度はALアミロイドーシス患者に対して、その基礎にある形質細胞異常症を完全に抑える目的で末梢血幹細胞移植を併用したメルファランの大量静注療法の標準的プロトコールを作成した。また同時に班員の所属する5施設で本療法を開始することとした。同様な治療指針作成はAAアミロイドーシスの分野でも検討が開始された。脳アミロイドーシスでは、既に市販されている薬剤が本アミロイドの沈着抑制作用があることが動物実験で確認され、ヒトへの応用が考えられる段階となった。その他のアミロイドーシスの分野でも発生機序、新たな治療法の試みなどで進歩が見られた。

分担研究者名

今井浩三 (札幌医科大学・教授)
 東海林幹夫 (群馬大学医学部・講師)
 下条文武 (新潟大学医学部・教授)
 樋口京一 (信州大学医学部加齢適応研究センター・教授)
 前田秀一郎 (山梨医科大学医学部・教授)
 石原得博 (山口大学医学部・教授)
 中里雅光 (宮崎医科大学医学部・講師)
 安東由喜雄 (熊本大学医学部・講師)
 山田正仁 (金沢大学医学部・教授)
 葛原茂樹 (三重大学医学部・教授)
 満屋裕明 (熊本大学医学部・教授)
 徳田隆彦 (信州大学医学部・助教授)
 馬場 聡 (浜松医科大学医学部・助教授)
 玉岡 晃 (筑波大学臨床医学系・助教授)
 原 茂子 (虎の門病院分院腎センター・部長)
 麻奥秀毅 (広島赤十字原爆病院・副部長)
 河野道生 (山口大学医学部・教授)
 吉崎和幸 (大阪大学健康体育部・教授)
 内木宏延 (福井医科大学医学部・教授)
 高杉 潔 (道後温泉病院リウマチセンター・理事長)

A. 研究目的

種々なアミロイドーシスの発生機序を分子レベルから解明し、有効な治療法を確立することを目

的とする。具体的には、1) ALアミロイドーシス：早期診断法がなく、本症患者の確定診断後の余命は1,2年である。形質細胞異常症の細胞特性を明らかにし、有効な化学療法を早急に普及する必要がある。自己末梢血幹細胞移植(Auto-PBSCT)を併用したメルファラン大量静注療法は従来の化学療法に比してその有効性が際だっており、この化学療法を標準化して広める必要がある。2) AAアミロイドーシス：RA患者の致死合併症として重要である。近年、RA患者を定期的に検査することにより本病型のアミロイドーシスを比較的早い段階で見出すことが可能となった。そこで本アミロイドーシスを合併した患者に対して、副腎皮質ステロイドホルモン・免疫抑制剤による薬物療法を行い、このアミロイドーシスの病態を緩解に導く。3) FAP：本邦では熊本県と長野県に世界で三番目の規模の患者集積地があり、またこれらとは血縁のない40数FAP家系が国内に存在する。FAPの根治療法としての肝移植が定着して来たが、患者全員が移植を受けられるわけではなく、また異常遺伝子キャリアーの発病を未然に防ぐ方法も必要である。このため薬物療法の開発は不可欠である。4) 透析アミロイドーシス：本邦では腎移植の件数が少なく、本アミロイドーシスを併発する患者は年々増加している。この数年間、透析膜の改良、薬物療法等が導入されているが、こうした治療法の有効性は判定されていない。5) 脳ア

ミロイドーシス：人口の急激な高齢化により Alzheimer 病に代表される脳アミロイドーシス患者は増加している。本アミロイドの沈着機序は分子レベルから相当開明され、疾患モデル動物(transgenic mice)も作成されている。そこでこうした *in vitro* または *in vivo* の系を用いて本アミロイドの産生を抑える薬物療法の開発が急務である。6) マウス老化アミロイドーシス：アミロイドーシス発症に関与する後天的因子を検索するのに有用である。

平成 14 年度は班員の所属する 6 施設を対称として、AL-アミロイドーシスに対する Auto-PBSCT を併用したメルファラン大量静注療法の適応基準を作成する。同様に AA-アミロイドーシス患者を副腎皮質ステロイドホルモン・免疫抑制剤により治療する際の血清マーカーを選択し、これらを指標とする薬物療法を複数設定する

B. 研究方法

- 1) AL アミロイドーシス：アミロイド惹起性の免疫グロブリンを産生する骨髄腫細胞の細胞生物学特性を知るために、悪性度別に三群に分けた細胞の表面抗原をフローサイトメトリーを用いて検索した（河野）。本疾患の確定診断には生検組織の免疫組織化学的検討が不可欠であるが、AL アミロイドを特異的に認識する抗体は入手困難である。免疫グロブリンの可変領域に対する抗体を作成し、AL アミロイドをどの程度認識するかを検討した（石原）。欧米で行われている末梢血幹細胞移植を併用した強力な化学療法をわが国の患者に施行するためのプロトコール作成を行った（池田、麻奥、下条、今井、満屋）。
- 2) AA アミロイドーシス：AA アミロイドーシスを発症しやすいマウス系列に種々な蛋白から成るアミロイド線維を静脈投与してアミロイドーシス発症の有無、重症度を検索した。そして amyloid enhancing factor との関連を検討した（樋口）。RA 患者を対象に SAA1 遺伝子の genotyping と腹壁脂肪の吸引生検を定期的に行い、早期の本症患者を見出す検討を行った（池田）。ヒト肝細胞を用いて SAA1 遺伝子多型が SAA1 産生に及ぼす影響を、RT-PCR にて検討した（馬場）。RA 患者の膝関節、脊椎手術などの major surgery に際して血清中の CRP、SAA 値を経時的に測定した（高杉）。肝芽腫由来の HepG2 細胞を用いて、種々なサイトカイン刺激と SAA1 産生との関連を検索した（吉崎）分科会を組織して、AA アミロイドーシスに対する薬物療法の標準化の検討を開始した（吉崎、池田、今井、下条、高杉）。
- 3) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)：変異 TTR 産生を抑える目的で RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチド、single-stranded oligonucleotides を作成して HepG2 細胞における変異 TTR 遺伝子の発現様式を検討した（安東）。非定型的な臨床像を呈する家族性アミロイドーシス患者の TTR 遺伝子の解析を実施した（中里）。FAP 患者の腎病変を生検と剖検組織を用いて検索し、特にアミロイド沈着程度を画像解析にて定量化した。また生検例では本所見と生体肝移植後の経過を対比した（池田）。
- 4) 透析アミロイドーシス： *In vitro* で $\beta 2$ microglobulin 由来のアミロイド線維にヘパリンなどのプロテオグリカンを投与して線維の伸長性をチオフラビン法、電子顕微鏡的観察の二法で検討した（内木）。メガリンは $\beta 2$ microglobulin の受容体である。これを利用してメガリン発現細胞をマウスに移植して、腹腔内へ投与した $\beta 2$ microglobulin の血中濃度の推移を検討した（下条）。多数の患者を対象に、透析アミロイドーシスの病勢の指標として血中のマトリックスメタプロテアーゼ値が有用であるかどうかを検討した（原）。
- 5) 脳アミロイドーシス：高齢者多数の剖検所見を基に、脳アミロイドの沈着程度と臨床症状との関連を retrospective analysis を行った。また *in vitro* でニコチンが A β 分子種の線維形成に対する影響を検索した（山田）。慢性脳虚血を持つラット脳内の A β 分子種を ELISA 法で測定した。Pravastatin を高脂血症の治療薬として服用しているヒトを対象にして血漿中の A β 分子種濃度を測定した（玉岡）。脳アミロイドーシスを発生する複数の transgenic マウスモデルを作成して、メラトニン投与によるアミロイド沈着抑制効果を病理所見、臨床症状の両面で検討した。メラトニン自体は入眠導入剤として欧

米では通常のドラッグストアで購入することが可能である（東海林）。紀伊半島出身の ALS/PDC 患者の脳実質および髄液中の A β 分子種濃度を ELISA 法で測定した（葛原）。

- 6) その他のアミロイドーシス:アミロイドP成分欠損マウスの血中の抗核抗体の測定、腎糸球体病変を検索して自己免疫疾患の有無を検討した（前田）。非定型的な皮膚アミロイドーシス病変を有する患者の生検皮膚組織を免疫組織化学的に検索した（安東）。

（倫理面への配慮）

本研究の対象となる患者に対しては研究の主旨を十分説明し（インフォームドコンセントを行う）、その後同意が得られた患者のみに適応外の薬剤投与を行う。知的障害を伴う Alzheimer 病患者の人権に配慮して、患者とともに配偶者、家族にも十分説明し、種々な検査時には書面で確認をとる。さらに特殊な療法を行う際にはそれぞれの所属する施設の倫理委員会の承認を前提とする。動物実験の場合は各施設の動物実験委員会の許可を得て行う。

C. 研究結果

- 1) AL アミロイドーシス：河野はアミロイドーシスを合併したヒト骨髄腫細胞を悪性度により三群に分け、細胞表面抗原を検索して治療マーカーを検索した。この中で CD45+細胞は IL-6 の刺激に対して最も増殖反応を示したことより、治療へ strategy がありうると考察された。原は AL アミロイドーシス患者の腎病変が糸球体を主に障害する型とその他に分類でき、後者は比較的予後がよいことを明らかにした。徳田は微量生検組織からアミロイド線維を抽出し、そのアミノ酸配列を解析することで非常に稀な L 鎖可変領域が主成分の AL アミロイドーシス患者の存在を明らかにした。石原は L 鎖可変領域に対する抗体を作成して、AL アミロイドの免疫組織化学的反応性を検討し、約 40% の例が陽性反応を示すことを確認した。今井はアミロイド惹起性の L 鎖を産生する骨髄腫細胞を標的としたアンチセンス DNA 療法を引き続き検討している。満屋は本疾患の治療法として血管新生抑制療法、小胞体ストレス誘導療法の可能性を検索した。麻奥は心障害が目立つ AL アミロイドーシス患者を Auto-PBSCT を併用した大量の化学療法で治療し、その問題点として治療前の心障害の重症度が **critical point** であることを示した。池田は分科会を組織して、本症患者に対する自己末梢血幹細胞移植を併用したメルファラン大量静注療法の適応基準、化学療法の実施要項を作成し、班員の所属する 5 施設で 3 年間に 50 名を目標として本化学療法を行うこととした。
- 2) AA アミロイドーシス：樋口はマウスモデルを用いて **amyloid enhancing factors (AEF)** の解析を行い、種々な蛋白から成るアミロイド線維自体に本活性作用があることを明らかにした。馬場は肝細胞を用いて SAA1 遺伝子多型が SAA1 産生に及ぼす影響を検討したが、本遺伝子多型は SAA1 産生には影響がなかった。高杉は RA 患者の **major surgery** において CRP、SAA が術直後に相当な高値を示し、この SAA の変動がアミロイド沈着の促進因子となる可能性を指摘した。吉崎は肝芽腫由来の HepG2 細胞を用いて、種々なサイトカイン刺激と SAA1 産生との関連を検索し、IL-6 の抑制が SAA1 産生抑制に最も有効であること、NF κ B と NFIL-6 に共同活性作用があることを確認した。また吉崎は分科会を組織して、本アミロイドーシスに対する薬物療法の標準化の検討を開始した。池田は RA 患者に合併する本アミロイドーシスの早期診断法として、腹壁脂肪吸引生検と SAA **genotyping** を組み合わせることの有用性を報告した。
- 3) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)：安東は FAP に対する遺伝子治療の開発を目的として基礎的研究を続けており、従来の RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチドを用いるより **single-stranded oligonucleotides** も使用する方がより効率的であることを報告した。また三価クロムイオンが本疾患のアミロイド形成を抑制する可能性を指摘した。中里は TTR 遺伝子 Asp18Gly 変異を持ち症状を主体とする宮城県の一家系を報告した。池田は FAP 患者の腎病変を生検と剖検所見を基に定量的に解析

し、生検所見で得られた腎病変の程度と生体肝移植後の予後がよく相関することを報告した。

- 4) 透析アミロイドーシス: 内木は透析治療にも用いられるヘパリンなどのプロテオグリカンが $\beta 2$ microglobulin 由来のアミロイド線維の安定性と伸長に寄与していることを報告した。下条はメガリン発現細胞をマウスに移植することで $\beta 2$ microglobulin の代謝が促進されることを見出し、この細胞移植療法は長期透析患者において本アミロイドーシスの併発予防法に成りうることを提唱した。原は昨年度に引き続いて患者数を増やして、透析アミロイドーシスの重症度の指標として血中のマトリックスメタプロテアーゼ値が有用であることを報告した。
- 5) 脳アミロイドーシス: 山田は高齢者多数の剖検所見を基に、脳血管アミロイドが高度な例では軽度の頭部外傷が大出血を誘発する、微小出血・梗塞を高頻度に伴っていることを報告した。またニコチンは $A\beta$ アミロイドの沈着阻止作用がある可能性を示し、**Alzheimer** 病発生と喫煙との因果関係を裏付ける可能性のある結果を提示した。玉岡はラットモデルを用いて、慢性脳虚血が脳内の $A\beta$ 分子種を有意に増加させること、高脂血症の治療薬である pravastatin の通常量の服薬ではヒト血漿中の $A\beta$ 分子種濃度に影響を与えないことを明らかにした。東海林は脳アミロイド沈着を発生する複数の transgenic マウスを作成して、メラトニン投与によるアミロイド沈着抑制効果を検討をした。その結果、脳の病理所見、臨床症状の両面で本剤の有効性を見出した。葛原は紀伊半島特有の ALS/PDC 患者の脳実質および髄液中の $A\beta$ 分子種濃度を測定して、これらは対照者と変わらないことを報告した。本疾患は tau 陽性の neurofibrillary degeneration が脳内に広範囲に出現するが、 $A\beta$ 陽性のアミロイド沈着が起らないことが病理組織学的特徴とされており、上記の結果は従来 of 病理学的概念に一致する。
- 6) その他のアミロイドーシス: 前田はアミロイド P 成分欠損マウスでは自己免疫疾患を引き起さず、アミロイド研究に使えることを確認した。安東は SAA がアミロイド苔癬形成に関与したと考えられる一例を報告した。

D. 考察

今年度はアミロイドーシスの治療の面で進歩が見られた。AL アミロイドーシスに対する Auto-PBSCT を併用した大量化学療法は本邦では昨年開始されたばかりで、その適応基準は明確にされていなかった。今年度研究班内で標準的プロトコールが作成され、これを基に本治療法が国内で広まることが期待される。同様に標準化した薬物療法が AA アミロイドーシスに関しても研究班内で検討が始まっており、来年度にはその具体的治療指針が公表されることが期待される。FAP についても肝移植以外の治療法が模索され出した。また **Alzheimer** 病に代表される脳アミロイドーシスではメラトニンが本病変の発病抑制に有用性がある可能性が詳細な動物実験から指摘された。メラトニン自体は入眠導入剤であり、欧米のドラッグストアで市販されている。本薬剤は大きな副作用もないことから、今後ヒトを対象とした臨床試験へ進むことが十分期待される。アミロイドーシスの分子発生機序については種々な病型で *in vitro* における検索が開始されているが、結論を得るにはまだ時間が必要である。

E. 結論

1) アミロイドーシスの発生機序については AL, AA アミロイドーシスを中心に進歩が見られた。2) AL-アミロイドーシスでは PBSCT を併用した大量の化学療法が実施に移され、また本療法の標準的プロトコールが作成されたことで多施設でも施行可能となった。3) 脳アミロイドーシスの治療では既に市販されている薬物が利用可能であることが動物実験から裏付けられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

分担研究報告参照。

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

[II] 分担研究報告

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

抗免疫グロブリン L 鎖可変領域抗体による AL アミロイドーシスの免疫組織化学的検討

分担研究者 石原得博 山口大学医学部構造制御病態学講座

共同研究者 星井嘉信*、崔丹*、坂田尚広**、河野裕夫*

山口大学医学部、*構造制御病態学講座、**同脳神経病態学講座

研究要旨 ALアミロイドーシスの免疫組織化学的診断率を上げることを主な目的として、免疫グロブリンL鎖可変領域に対する抗血清の作製に着手し、その有用性について検討した。Sletten K.らがVλ VIサブグループとして報告した配列 AR の 1-19 番目および 79-90 番目に相当する合成ペプチドに対する抗血清(抗 AR1-19 抗血清および抗 AR79-90 抗血清)を作製し、これまでに免疫組織化学的に Aλ 型と診断した全身性アミロイドーシス剖検例 17 例の腎臓のホルマリン固定パラフィン切片を用いて、これらの抗血清による免疫染色を行った。抗 AR1-19 抗血清は 17 例中 7 例、抗 AR79-90 抗血清は 17 例中 8 例のアミロイドに多少なりとも陽性像がみられたが、染色性は様々であった。今回作製した抗 L 鎖可変領域抗血清はホルマリン固定パラフィン切片にて使用可能であり、今後のアミロイドの免疫組織化学的診断に役立てたい。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスは代表的な全身性アミロイドーシスの一つであるが、前駆体である免疫グロブリン L 鎖の多様性のため、他のタイプのアミロイドほど免疫組織化学的な診断が容易ではない。我々はこれまで、いくつかの抗免疫グロブリン L 鎖定常領域抗血清を作製し、AL アミロイドーシスの免疫組織化学的診断に有用であることを報告してきたが、これらの抗体を用いてもすべての AL アミロイドーシス例を検出できるわけではない。今回はさらに AL アミロイドーシスの免疫組織化学的診断率を高める目的で、抗免疫グロブリン L 鎖可変領域抗血清の作製に着手した。

B. 研究方法

1. 抗血清の作製

Sletten K らが Vλ VIサブグループとして報告した配列 AR の 1-19 番目に相当する配列 DFMLTQPHSVSESPGKTVT および 79-90 番目に相当する配列 SGLKTEDEADYY の N 末端側にシステインを付加した直鎖ペプチドを合成し、

KLH を担体としてウサギに免疫し、抗 AR1-19 抗血清および抗 AR79-90 抗血清を作製した。ペプチド合成および抗体の作製についてはこれまで同様、旭テクノグラス株式会社の抗ペプチド抗体作製一貫サービスを利用した。

2. 対象

1990 年から 2000 年に行った免疫組織化学的検討で、Dr. Glenner から供与された抗 Aλ 抗体陽性であった 17 例、陰性コントロールとして抗 Aκ 抗体陽性であった 2 例、抗 AA 抗体陽性であった 2 例の全身性アミロイドーシス剖検例の腎臓のホルマリン固定パラフィン切片を用いた。

3. 免疫組織化学的検討

切片を脱パラフィン後、水洗中に抗原賦活処理として、100%蟻酸処理を 10 分間行った。3% H_2O_2 による内因性ペルオキシダーゼの阻害、および Protein Block Serum-Free (DAKO) による非特異反応の阻害を行い、一次抗体として抗 AR1-19 抗血清 (1:50)、抗 AR79-90 抗血清 (1:30) を室温 30 分間反応させた。二次抗体として DAKO EnVision+ ポリマー試薬を室温 30 分間反応させた後 DAB で 5 分間発色を行った。

ポリマー試薬を室温 30 分間反応させた後 DAB で 5 分間発色を行った。

C. 研究結果

抗 AR1-19 抗血清は Aλ アミロイドーシス 17 例中 7 例、抗 AR79-90 抗血清は 17 例中 8 例のアミロイドに、多少なりとも陽性像がみられたが、その染色性は症例によって様々であった。症例によっては以前報告した抗 L 鎖定常領域抗血清(抗 λ 118-134 抗血清)では染色性が弱く、抗 AR1-19 抗血清および抗 AR79-90 抗血清では明瞭な陽性反応が見られる例もあった。Aλ アミロイドーシス 17 例の内訳は、抗 AR1-19 抗血清、抗 AR79-90 抗血清両者とも陽性 5 例、抗 AR1-19 抗血清陽性、抗 AR79-90 抗血清陰性 2 例、抗 AR1-19 抗血清陰性、抗 AR79-90 抗血清陽性 3 例、両者とも陰性 7 例であった。Aκ アミロイドーシス 2 例、AA アミロイドーシス 2 例はいずれも明らかな陽性像はみられなかった。

D. 考察

L 鎖可変領域抗体と AL アミロイドに関するこれまでの報告としては、まず Solomon A らのグループが免疫グロブリン L 鎖のそれぞれのサブグループに特異的なポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製している。これらの抗体を用いた免疫化学的検討により、Vλ VI サブグループの M 蛋白は、AL アミロイドーシスに限局して見られ、また Aλ アミロイドーシスの 35~41% を占めることが報告されている。また Asl KH らも Vλ VI に対する抗体を用いて、限局性 AL アミロイドの免疫染色を行っている。これらの報告を参考に、我々はまず Vλ VI に対する抗血清の作製を試みることにした。

今回作製した抗血清(抗 AR1-19 抗血清、抗 AR79-90 抗血清)は、Vλ VI として報告された配列 AR の一部に相当する合成ペプチドに対する抗血清であり、免疫グロブリン L 鎖可変領域は同じサブグループ内でもアミノ酸配列がすべて同じというわけではないので、これらの抗血清で Vλ

VI サブグループ由来のアミロイドすべてが検出できるとはいえないが、今回の検討ではそれぞれ Aλ アミロイドーシスの 41% および 47% の症例において多少なりとも陽性反応が見られた。また検討した症例の中には抗 L 鎖定常領域抗血清では染色性が弱く、今回の抗血清では明瞭な陽性反応が見られるものもあった。他のサブグループとの交差反応性など、今後さらに検討をする必要があるが、このような抗血清の種類を増やすことによって、抗 L 鎖定常領域抗血清で陰性であった症例についても、タイプの決定が可能となる症例が増えることが示唆される。

今後さらに他のサブグループに対する抗血清を作製するなどして、L 鎖可変領域抗血清をアミロイドの免疫組織化学的および免疫化学的診断に役立てていきたい。

E. 結論

今回作製した抗 L 鎖可変領域抗血清はホルマリン固定パラフィン切片でも使用可能であることがわかった。今後さらに検討をすすめ、AL アミロイドの免疫組織化学的および免疫科学的診断に役立てていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
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

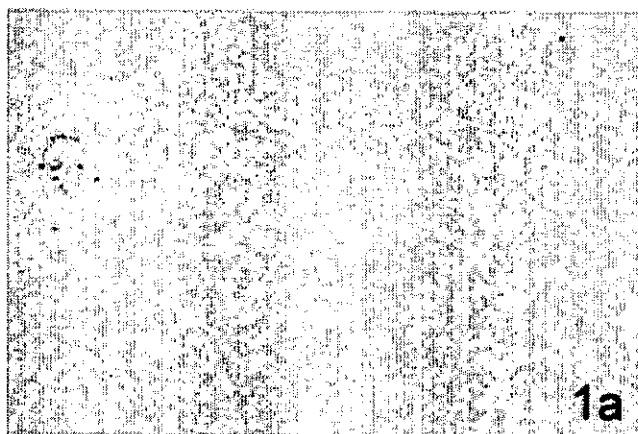


図1. Aλアミロイドーシス腎臓の免疫染色像
(その1)。a: 抗λ 118-134抗血清。b: 抗
AR1-19抗血清。c: 抗AR79-90抗血清。

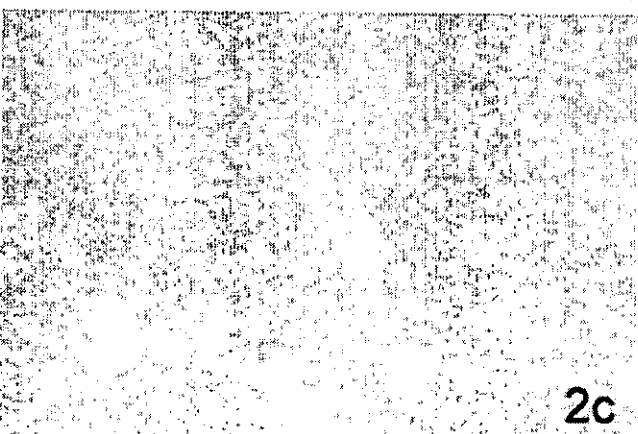
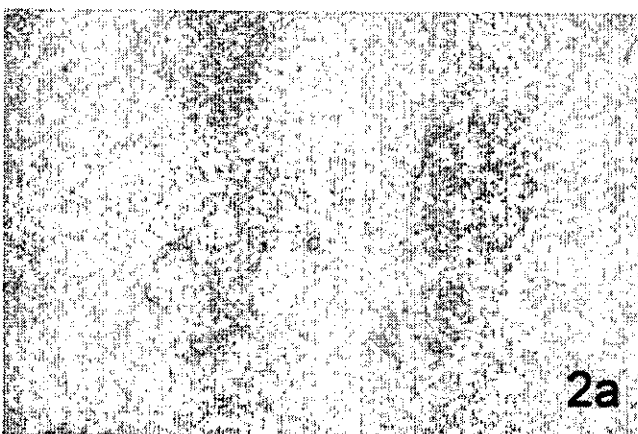


図2. Aλアミロイドーシス腎臓の免疫染色像
(その2)。a: 抗λ 118-134抗血清。b: 抗
AR1-19抗血清。c: 抗AR79-90抗血清。

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

AL アミロイドーシス発症および治療に関する骨髄腫細胞の細胞生物学的研究
－骨髄腫細胞亜群での IL-6 シグナル伝達の相違－

分担研究者 河野 道生

山口大学・大学院医学研究科・生体シグナル解析医学講座

共同研究者 石川 秀明、津山 尚宏

山口大学・大学院医学研究科・生体シグナル解析医学講座

研究要旨 AL アミロイドーシスを引き起こしやすい骨髄腫細胞はいかなる細胞であるか、あるいは生体側の要因がどのように関与しているのかを明らかにする目的で、AL アミロイドーシス合併した骨髄腫患者からの骨髄腫細胞を SCID-hIL6 transgenic mice (SCID-hIL6 Tg mice) 腹腔内に移植生存させる系を確立した。これらマウス個体に骨髄腫細胞から産生される M 蛋白(Ig)が負荷された場合に実際にアミロイド沈着が誘導されるか否かを検討した。検討した AL アミロイドーシス合併した骨髄腫患者からの骨髄腫細胞において、いずれもマウスにアミロイド沈着を誘導することはできなかつた。この結果は、単なる M 蛋白の負荷だけではアミロイド沈着を惹起できないことを示唆している

A. 研究目的

AL アミロイドーシスを惹起する骨髄腫細胞には、未熟型を主体にしたものと、成熟型を主体にしたものがある。ALアミロイドーシスの治療として、これらの骨髄腫細胞を減少させることを一義的と考えるならば、未熟型および成熟型骨髄腫細胞等の骨髄腫細胞亜群の細胞生物学的性状を十分に把握した上で治療戦略を立てる必要がある。本研究は、増殖および生存因子であるインターロイキン6(IL-6)による細胞内シグナル伝達が骨髄腫細胞亜群でどのように異なるかを明らかにして、骨髄腫細胞亜群に応じた治療戦略を新たに構築しようとするものである。

B. 研究方法

1. 対象

1) ALアミロイドーシス合併を含む骨髄腫患者からの骨髄穿刺液から骨髄単核球分画]を分離した。骨髄腫細胞株として、U-266, NOP-2, IL-KM2, IL-KM3, AM1 等を使用した。2) 細胞表面抗原解析は、既報のごとく抗 CD38, CD19, MPC-1, CD49e, CD126 (IL-6R α)あるいは CD45 抗体で多重染色後、フローサイトメーター(Epics Elite, Coulter)にて行った。

3) 細胞内シグナル STAT3, MAPK, PI3K および Akt 等の活性化は、抗リン酸化抗体を使用したウエスタンブロットで解析した。4) IL-6 刺激による遺伝子発現の解析は、マイクロアレイ(Atlas Glass Human 7.6 Microarray, Clontech)を使用し、FLA-8000(Fuji Film)のアレイスキャナーにて解析した。

C. 研究結果

アミロイドーシス合併骨髄腫患者の骨髄腫細胞は、一般の骨髄腫患者のそれらと同様に未熟型(MPC-1-CD49e-)、中間型(MPC-1+CD49e-)および成熟型(MPC-1+CD49e+)の色々な割合で構成されており、それらの比率は患者ごとあるいは同一患者でも時期より異なっていた。未熟型骨髄腫細胞は CD45 発現の相違により、CD45+と CD45-の未熟型骨髄腫細胞とに分けられ、CD45+細胞は IL-6 に反応して増殖するが、CD45-細胞は増殖しない。骨髄腫細胞株 U-266 を使用して、CD45+と CD45-細胞との IL-6 刺激後の細胞内シグナル伝達を解析すると、両細胞とも STAT3, MAPK 活性化の程度には明らかな相違は見られないが、CD45+細胞では src 型チロシンキナーゼ (Lyn, Fyn)の活性化が認められた。CD45+細胞の

IL-6 による増殖反応は、Lyn に対するアンチセンスオリゴおよび選択的阻害剤(PP2, herbimycinA)で完全に抑制された(図-1)。

IL-6 刺激後の遺伝子発現のプロファイリングでは、特異的に発現上昇したものに Ets, EGF 様膜タンパク、Helios, GPCR39, telomerase reverse transcriptase 等 12 種類があり、発現低下するものに、fucosyltransferase 1, ankyrin 1, tenascin C, SAA 9, MAPKK 14, MAPKK 7 等 54 種類があった。

D. 考察

アミロイドーシス合併骨髄腫患者からの骨髄腫細胞は、非アミロイドーシス合併患者の骨髄腫細胞と比してその細胞亜群には特に大きな差異はない。従って、一般の骨髄腫に対する治療戦略をアミロイドーシス合併骨髄腫にも適用されるべきである。骨髄腫細胞は不均一な細胞集団の集まりであり、細胞亜群により増殖能やMタンパク産生能が異なる。今年度の研究およびこれまでの研究から、細胞表面抗原の発現により明確に骨髄腫細胞亜群が識別できることは骨髄腫の病態把握にとって極めて重要な点である。本年度は、CD45+と CD45-の未熟型骨髄腫細胞で明らかに IL-6 に対する増殖反応が異なること、その機序として src 型チロシンキナーゼの活性化の有無が必要であることがあきらかとなった。更に、チロシンキナーゼ活性を抑制する薬剤で未熟型骨髄腫細胞の増殖が完全に抑制されたことは、今後の分子標的治療薬として有望であることを示唆している。また、IL-6 刺激により特異的に影響される遺伝子の探索は将来的にアミロイドーシスを含む骨髄腫の発癌機構及び治療戦略に極めて有益な情報を与えるものと考えられる。

E. 結論

1. アミロイドーシス合併骨髄腫患者からの骨髄腫細胞の表面抗原解析を行ったが、非アミロイドーシス合併患者の骨髄腫細胞と比してその細胞亜群に大きな差異はなかった。
2. 未熟型骨髄腫細胞の中には、CD45+と CD45-細胞とがあり、IL-6 に反応して増殖するのは CD45+未熟型骨髄腫細胞であった。
3. CD45+未熟型骨髄腫細胞の IL-6 による増殖反応には、src 型チロシンキナーゼの活性化が必要であり、この活性を抑制する薬剤では骨髄腫

細胞の増殖は完全に抑制された。

4. アミロイドーシス合併骨髄腫の治療で未熟型骨髄腫細胞を標的にするならば、src 型チロシンキナーゼ活性を抑制する薬剤が有力であろう。
5. IL-6 に特異的に応答する遺伝子の包括的な検討が可能となり、増殖機構に密接に関与する可能性のあるものや、分子標的治療の候補になるような遺伝子が検出されつつある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Taniguchi O, Kawano MM: Requirement of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. *Blood* 99: 2172-2178, 2002.
- 2) Ishikawa H, Tsuyama N, Mahmoud MS, Fujii R, Abroun S, Liu S, Li F, Kawano MM: CD19 expression and growth inhibition of tumours in human multiple myeloma. *Leuk Lymphom* 43:613-616, 2002.

2. 学会発表

- 1) Kawano MM, Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X.: Growth mechanism of human myeloma cells by interleukin-6. Scientific Session, The 29th World Congress of the International Society of Hematology, Seoul, Aug. 24~28, 2002.
- 2) 李 富君、津山尚宏、大津山賢一郎、石川秀明、劉 尚勤、Abroun S, 河野道生: GFP-tag によるIL-6 シグナル伝達分子の可視化ワークショップ、第 64 回日本血液学会総会、東京、2002 年 9 月 13~15 日。
- 3) Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Kawano MM: Consequence of IL-6 receptor α overexpression on IL-6-induced signals in myeloma cells. The 44th annual meeting of American Society of Hematology, Philadelphia, U.S.A., December 6-10, 2002.
- 4) Ishikawa H, Tsuyama N, Liu S, Abroun S, Li F,

Otsuyama K, Zheng X, Kawano MM: Proliferation of myeloma cells by interleukin-6 co-operated with fibroblast growth factor receptor 3-mediated signals. The 44th annual meeting of American Society of Hematology, Philadelphia, U.S.A., December 6-10, 2002.

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

AS-Lyn, PP2 or Herbimycin A blocked proliferation of myeloma cells

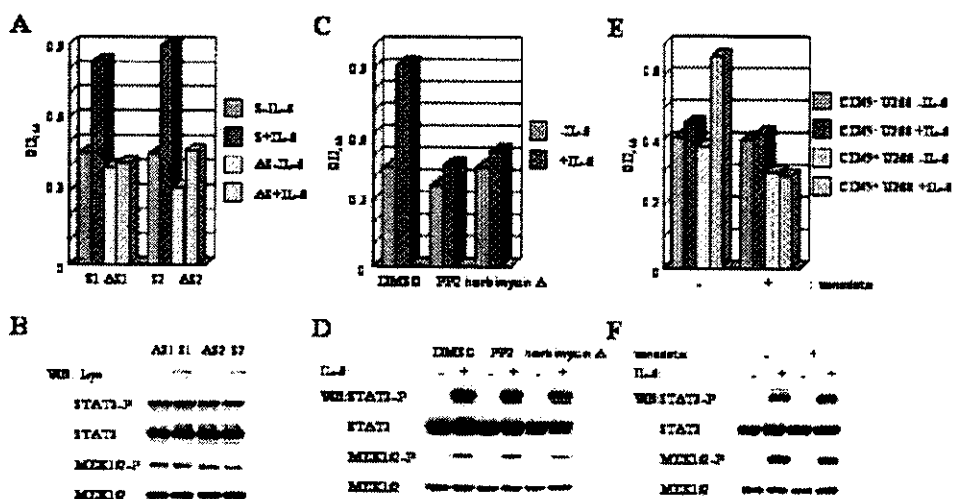


図-1 Lyn 活性を抑制する薬剤による骨髄腫細胞増殖の抑制効果

骨髄腫細胞株 U-266 に Lyn に対するアンチセンスオリゴ(A)、特異的阻害剤 (PP2,herbimycin A)(C)を添加することにより、その増殖が特異的に抑制される。

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

原発性 AL アミロイドーシスの腎病変についての一考察

分担研究者 原 茂子 虎の門病院 腎センター
 共同研究者 乳原善文*、田上哲夫*、原 重雄**
 虎の門病院腎センター*、同病理部**

研究要旨 原発性 AL アミロイドーシスの腎病変は中高年にみられるネフローゼ症候群の代表的疾患のひとつとされている、一方尿蛋白を全く呈しない群もある。この差がどこにあるのかを明らかにするために、腎へのアミロイド沈着様式を解析し、検討をおこなった。対象は当院にて剖検及び生検にて AL アミロイドーシスと診断された 21 例(男 11 例、女 10 例)でその腎組織につき検討した。尿蛋白と血清アルブミン値により低アルブミン血症 (<2.7 g/dL)と高度の蛋白尿を認め(>2.8g/dL)を認めネフローゼ症候群を呈した 1 群に対し、蛋白尿は軽度 (<1.2 g/day)で血清アルブミンは>3.0 g/dlを呈した 2 群が存在した。組織的に 1 群は高度のアミロイド沈着を伴うアミロイド病変を呈し、2 群では糸球体にはアミロイド沈着は全くみられず、沈着部位は糸球体以外の部位であった。AL アミロイドには、糸球体への親和性により、2 グループに分類され、さらには以後の腎の臨床予後を決める因子となり得ると推察された。

A. 研究目的

原発性 AL アミロイドーシスはネフローゼ症候群を呈する代表的疾患とされてきた、一方で尿蛋白がみられない群もある。

この差異がどこにあるか、腎へのアミロイド沈着様式を検討する。

B. 研究方法

今回の検討の対象例は当院で診断され、経過を観察しえた AL アミロイドーシス 21 例である。男 11 例、女 10 例と性差はない。18 例が死亡。そのうち 11 例で剖検が施行されている。腎組織学的検索は 21 例全例で施行された。21 例の臨床所見と病理組織学所見を対比検討した。

今回の検討の対象は当院にて診断され経過を検索しえた AL アミロイドーシス 21 例で男 11 例、10 例で 18 例が死亡。うち 11 例に対し剖検が施行され、腎組織については 21 例全例で組織所見が確認されている。

C. 研究結果

アミロイド診断時年齢は 45-80 歳で平均 59±9 歳。アミロイドが診断されてから死亡までの期間は平均

890±1386 日、最短 7 日、最長は 4,396 日で約 12 年。生存期間にばらつきがあるが、それは障害を受けた臓器と分布の差によるものであると考えられる。アミロイドの診断のきっかけとなった症状発現からの期間を含めて死亡までの期間を推測すると、平均 1,830±1611 日(94-5104)。一般的には λ 型が多いとされているが当院での検討でも λ 型 15 例、κ 型 6 例であった。

来院時の主訴としては、下腿浮腫といった主にネフローゼ症候群によるもの 11 名、息切れなど心不全によるものが 10 例にみられた。食欲不振、悪心嘔吐、下痢、便秘などの消化器症状が 4 名、筋力低下や上下肢のしびれ感など神経筋症状が 2 例、皮膚硬化が 1 例、喘息や肺異常陰影が 2 例であった。皮下出血斑から急性硬膜下血腫までいたった出血傾向症例も 1 例みられた。

剖検所見および臨床所見よりアミロイド沈着が実質臓器にみられ、さらに臓器障害を呈する臓器病変の頻度を図-1に示す。

21 例中、腎臓病変が 12 例、心臓病変(心肥大や低電位の心電図異常)が 14 例、消化管病変が 8 例、肝腫大等の肝臓病変が 4 例、肺病変(結節病変、莖膜肥厚、肺胞中隔肥厚)が 3 例、強皮症様皮膚効果