

1例、多発筋炎様筋所見2例、巨大膀胱を示す膀胱所見1例、著明な前立腺肥大1例。

次に21症例を尿蛋白と血清アルブミンでプロット(図一2)すると、12例では低アルブミン血症(<2.7 g/dL)と高度の蛋白尿(>2.8 g/day)を認めネフローゼ症候群を呈したのに対し、残りの9例では蛋白尿は軽度(<1.2 g/day)で血清アルブミンは >3.0 g/dLの対照的な2群に分類された。ネフローゼ症候群を呈した12例ではいずれも写真一1に示すように糸球体内にPAS陽性の均一な沈着物を高度に認め、コンゴレッド染色では陽性で、さらに κ または λ が免疫染色で染まりALアミロイドーシスと診断された。ネフローゼ症候群を呈する群の特徴としては、糸球体病変に高度のアミロイド沈着がみられた。一方、尿蛋白が軽度の9例では、写真一2(左)に示すように細小血管および被膜或いは被膜下、さらに尿細管の一部で、アミロイド沈着がみられている。剖検で広範に糸球体病変の検索が可能な場合であっても、写真一2(右)のように糸球体への沈着はないのが特徴であった。腎臓の立場からみると大量な蛋白尿を認め、ネフローゼ症候群を呈する群と、軽度の蛋白尿であり、minor changeと診断される群の2グループに分けられる。前者ではアミロイドによる高度の糸球体病変を呈するのに対し、後者はまったくアミロイドによる糸球体病変を呈さないといった対照的な2群に分けられる(表一3)。さらにその中間的な症例は認められなかった。

次に腎症を呈する群と呈さない群に分けて予後を検討した。図一3はネフローゼ症候群を呈したアミロイド腎症の予後である。ネフローゼ症候群例では、高度な心肥大や低電位といった心臓病変の有無によりその予後に大きな差がみられる。心臓病変のない群では、その後3例とも透析導入を要しているが、2例では長期透析が可能になっている。一方心臓病変のある7例ではいずれも予後は不良で、2例では透析導入するも透析中に血圧低下等がみられ透析困難症で死亡にいたっている。他の5例は透析導入前に死亡にいたっている。心臓病変のない症例では透析療法施行が可能であり透析施行により、予後を決める他臓器病変が出現しないかぎり長期生存が可能である。心臓病変合併症例では心機能低下のために透析療法自体を施行することが不可能となることがわかった。長期生存が得られた2症例の死因

は肝臓アミロイドによる肝不全であり、他の一例は消化管アミロイドに伴う腸穿孔が原因であった。6例においてMP(Prednisolone-melphalan)療法を行うが、いずれも血球減少等の副作用のため短期間しか使用できず、必ずしも本治療は長期的な予後には関連がないと推察された。

次に腎症のない症例での予後を(図一4)検討した。この場合でも心臓病変があるかないかで大きな違いがあることが判明した。心臓病変のある症例の予後はきわめて悪く、このうち5例にMP療法を行った。心臓病変のない4例中3例はMP療法を施行し、長期生存しているように見えるが、一方、他の1例においては、まったく無治療で経過したにもかかわらず長期生存を示している。心臓病変のある5例中2例に対してMP療法を施行しているが有意な効果は得られていない。心臓病変がないという因子の方がより予後にかかわる大きい因子である。

症例1. 心臓病変がないために長期に透析が可能であった症例。

診断時49歳男性。既往歴:41歳,48歳 副鼻腔炎手術。44歳右鎖骨骨折。

現病歴:1985年(48歳)時に右腎癌と蛋白尿指摘。右腎摘除術施行。1986年(49歳)全身浮腫にて当院入院(Alb 1.6 g/dL, 尿蛋白は20g/日)。腎生検にてAL-Amyloidosisと診断し、MP療法を1986-1988年の間施行。尿中BJPは陰性化するもネフローゼ症候群は改善せず、徐々に腎機能低下は進行。1989年(52歳)、1月直腸、S状結腸穿孔。8月再度空腸穿孔を起こし緊急回復手術を施行している。1991年(54歳)UN115mg/dL, Cre 12.4 mg/dLにて血液透析(HD)導入。以後近医にて定期透析を継続したが、1998年(61歳)時に腸穿孔に伴う腹膜炎にて死亡。ALアミロイドーシスと診断されて血液透析を7年施行しながら12年間、発症後、13年間生存しえた症例である。腎生検所見では糸球体を中心に高度のアミロイド沈着(AL- λ 型)が認められている(写真一4)。一方組織学的検索は未施行であるが、心合併症として、心電図での低電位や不整脈所見はなく、心エコー検査でも心アミロイドでみられるような心肥大所見や、アミロイドーシスに特異的な異常エコー輝度所見は見られなかった。さらに、肝臓の組織学的検索で門脈、肝動脈壁のみにアミロイド沈着を認めるものの、小葉内にはなく肝実質障害はあきらか

でなかった。

症例 2. 診断後透析導入施行するも透析困難、低蛋白血症などから短期間で死亡した症例。

診断時 71 歳の男性。既往歴としては特記すべき事項なし。1987 年下腿浮腫出現し、翌 1998 年にネフローゼ症候群と診断され腎生検施行され AL 型アミロイドーシスと診断。MP 療法開始するも 5 ヶ月で白血球減少のため中止。1999 年 1 月腎不全の進展にて当院入院。全身状態悪化のため 3 月 24 日血液透析導入するも、血圧低下等の透析困難症のために透析継続困難。高度の低アルブミン血症 (Alb 1.0-1.2g/dl) によると考え、Alb 製剤、カテコールアミン併用するも透析困難、そこで CAPD へ移行するも除水困難。尿量が維持され、高度蛋白尿 (5-10g/日) にともなう低蛋白血症が高度であると判断し、腎動脈塞栓術により腎廃絶を施行。しかしながら低アルブミン血症は改善せず、低血圧持続にてアルブミン製剤やカテコラミン製剤を併用し、CAPD、HD にて透析を継続したが、3 ヶ月後に血圧低下、難治性不整脈で死亡。剖検所見を合わせこの症例の特徴は腎、心臓、消化管に高度のアミロイド沈着を認めた。腎のみならず消化管からの高度の蛋白漏出で低タンパク(アルブミン)血症を生じ、さらに心臓病変が加わり透析継続を困難にしたと考えられた。

D. 考察

腎臓の糸球体への、アミロイド沈着に親和性があり、腎糸球体病変として“all or nothing”が推察された。糸球体に親和性をもつ群と、もたない群に分けられるかは不明であるが、糸球体でのアミロイド沈着が、より沈着を進展させるような機序により高度となりネフローゼ症候群を呈するのではないかと推察された。

E. 結論

AL-アミロイドーシス 21 症例につき腎組織所見から検討した。糸球体に沈着しネフローゼ症候群を呈する群と糸球体に全く沈着がみられず腎症を呈さない 2 グループに分類された。アミロイドによる心臓病変を呈するか否かでその予後が左右され、心臓病変の予

後は極めて不良であった。さらに ネフローゼ症候群から腎不全へと進行しても、心臓病変のない群では長期透析による生存が可能であるが、心臓病変のある群では透析維持が困難であった。Prednisolone-melphalan 併用療法に関しては、当院症例の成績からは、その効果をあきらかにしえなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

第 99 回日本内科学会講演会, 内科専門医による CPC, 腎臓の立場からみた AL アミロイドーシスについての検討

症例提示者 柳田正光, 永田浩三, Discussants- 小嶋哲人(名古屋大学), 乳原善文(虎の門病院腎センター), 大手信之(名古屋市立大学), Commentators 松本義也(愛知医科大学), 池田修一(信州大学), 伊藤雅文(名古屋大学). 内科専門医会誌(印刷中)

2. 学会発表

第 99 回日本内科学会講演会, 内科専門医による CPC, 腎臓の立場からみた AL アミロイドーシスについての検討

症例提示者 柳田正光, 永田浩三, Discussants- 小嶋哲人(名古屋大学), 乳原善文(虎の門病院腎センター), 大手信之(名古屋市立大学), Commentators 松本義也(愛知医科大学), 池田修一(信州大学), 伊藤雅文
症例提示者 柳田正光, 永田浩三,

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

臓器病変の頻度(臨床所見を呈する場合)

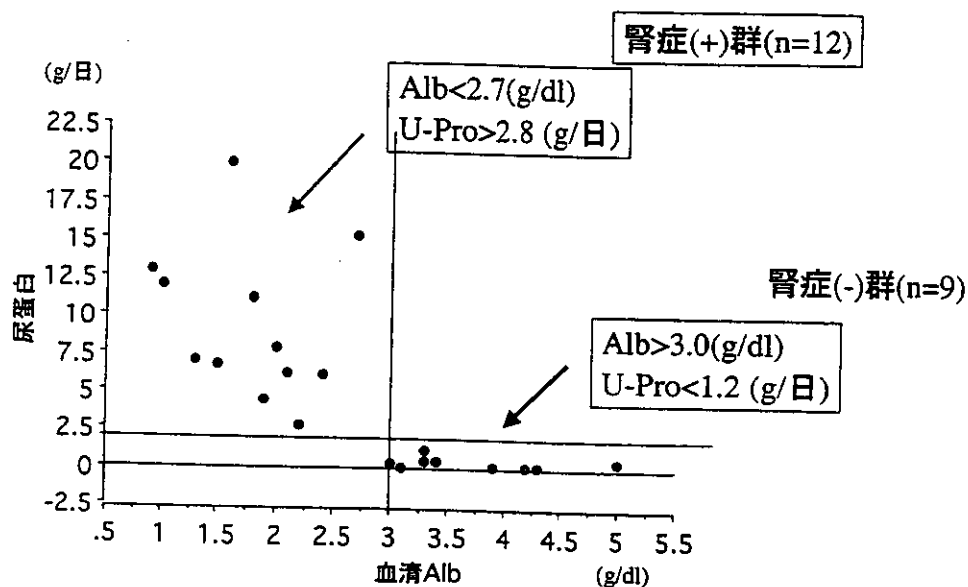
1. 腎臓病変	12例
2. 心臓病変(心肥大, 低電位の心電図異常等)	14例
3. 消化管病変	8例
4. 肝臓病変(肝腫大等)	4例
5. 肺病変(結節病変, 胸膜肥厚, 肺泡中隔肥厚)	3例
6. 皮膚病変(強皮症様皮膚硬化)	1例
7. 筋病変(多発性筋炎様)	2例
6. 膀胱病変(巨大膀胱)	1例
7. 前立腺病変(前立腺肥大)	1例

(アミロイド沈着が臓器実質に高度に沈着していることにより明らかな臓器異常所見を認めた場合とする。)

アミロイド症例における臨床所見を呈する臓器病変の頻度を示す

図-2

尿蛋白と血清アルブミンの関係



尿蛋白量とアルブミン値で2群に分類される

表—3

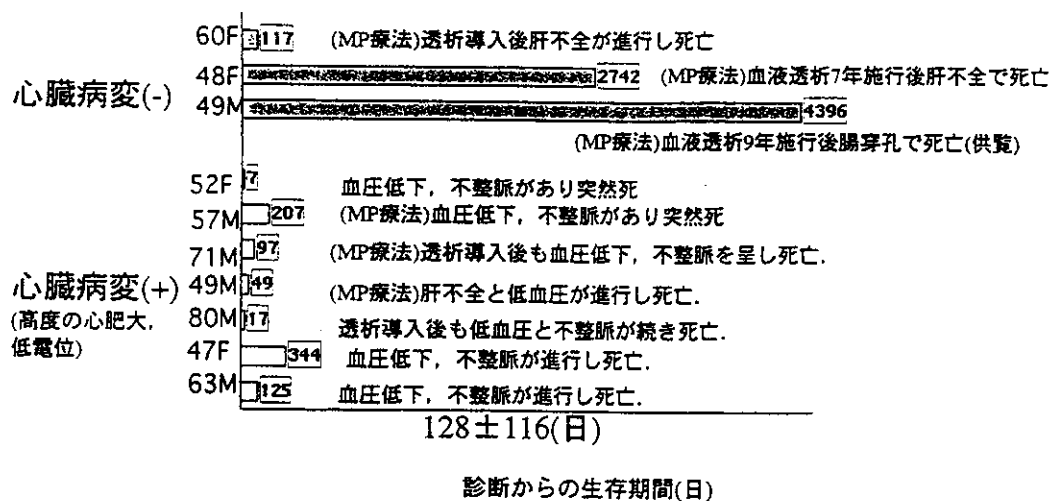
腎組織の特徴

腎症(+) 群 (n=12)	腎症(-) 群 (n=9)
S-Alb: 1.8±0.5(0.9-2.7)(g/dl) U-Pro: 9.4±4.9(2.8-20) g/日	S-Alb: 3.7±0.7(3.0-5.0)(g/dl) U-Pro: 0.4±0.4(0.03-1.2) g/日
動静脈壁のみならず、糸球体内に高度のアミロイド沈着あり。	小葉間動脈を中心とした動静脈壁、腎被膜にアミロイド沈着を認めるが、糸球体にはアミロイド沈着はない。

腎症の有無と腎組織所見との対比では、腎症群では血管のみならず糸球体内に高度にアミロイド沈着がみられ、腎症のない群では、糸球体への沈着が認められない。

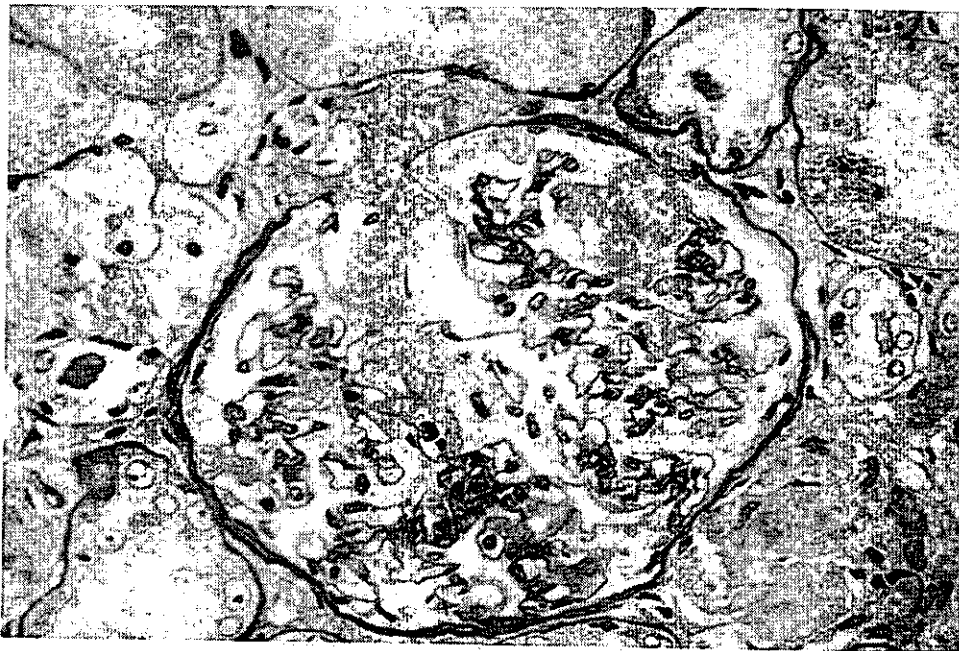
図—3

腎症(ネフローゼ症候群)のある症例の予後



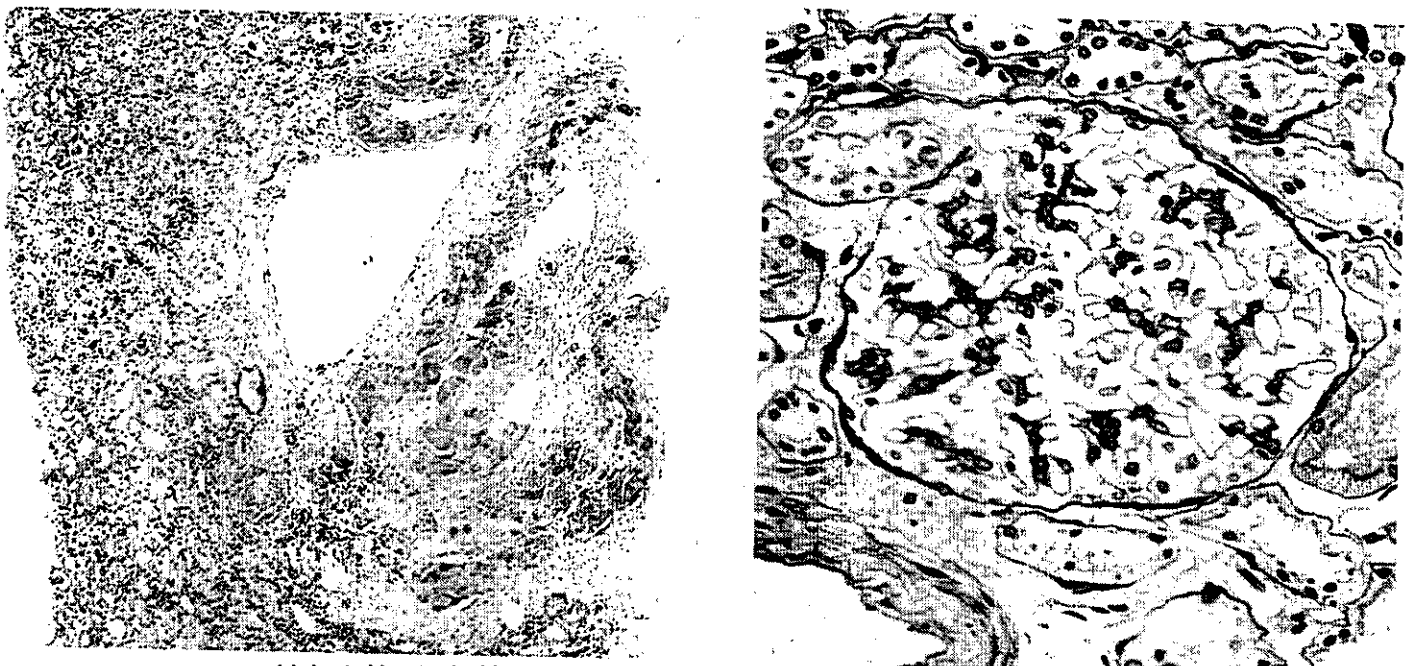
ネフローゼ症候群を呈した症例の予後では、心臓病変の有無により予後はことなる。

写真—1



糸球体内に PAS 染色で陽性無構造で均一な沈着物が認められ、コンゴ
レッド染色で陽性を示した。

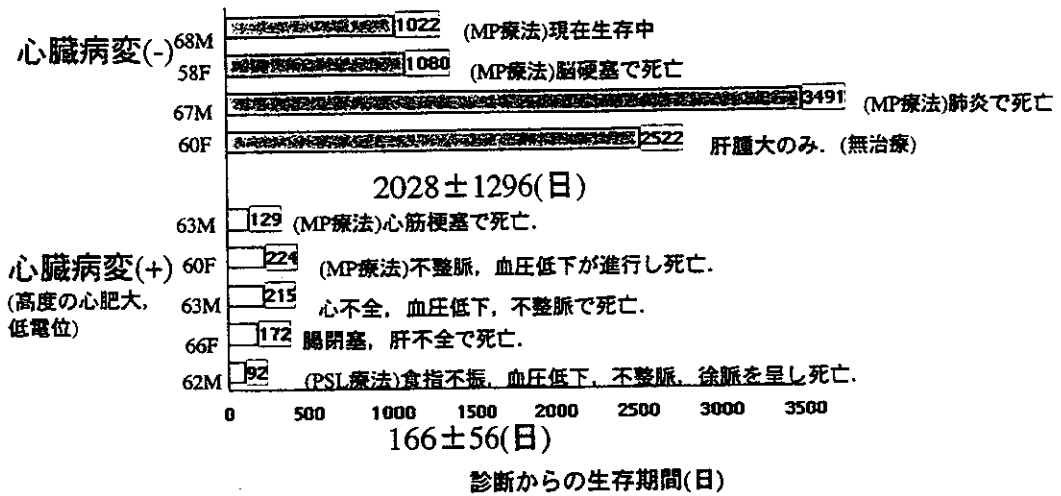
写真—2



(左) 血管、尿細管・間質にアミロイドによる無構造な均一な沈着物がみられる。
(右) 糸球体にはアミロイド沈着は認められない。

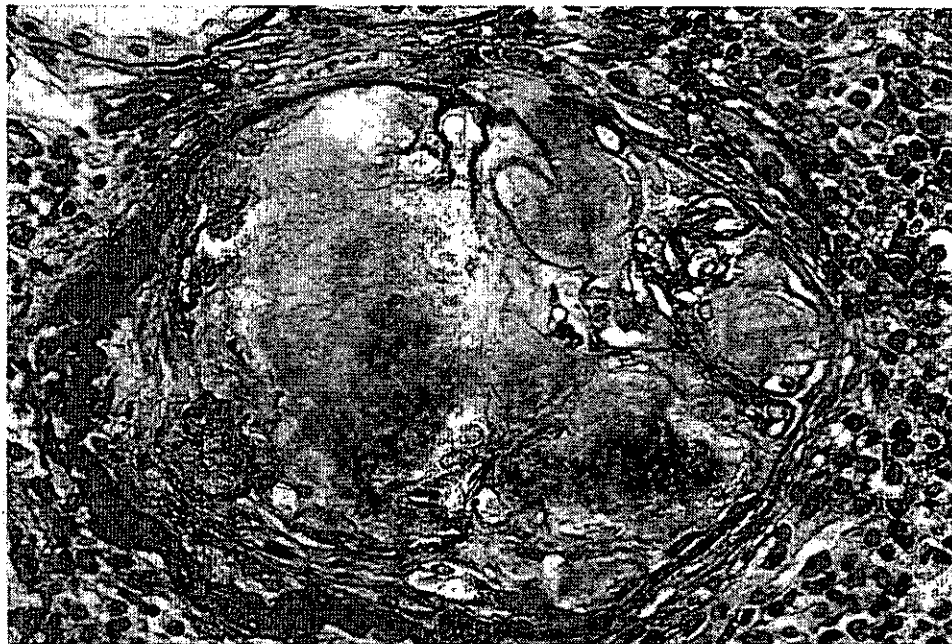
図一 4

腎症(ネフローゼ症候群)のない症例の予後



ネフローゼ症候群の無い群の予後も、ある群と同様に心病変がその予後にかかわる。

写真一 3



糸球体を中心に高度にアモイブの沈着が認められる。

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

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

分担研究者 今井浩三 札幌医科大学医学部第一内科

共同研究者 大野聡子*、吉本 満*、続 佳代**、伊東文生*

札幌医科大学医学部、*第一内科、**同神経精神科

研究要旨 AL アミロイドーシスの原因となる単クローン性 L 鎖を、特異的に抑制する治療を目指し、アンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ODN) による L 鎖産生抑制について検討した。

骨髓腫細胞株 RPMI8226 および U266 から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により V λ 領域の cDNA の塩基配列を決定した。この配列に基づいてアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ODN) を作成し、培養細胞に導入した。AS-ODN を導入した細胞では、上清中の λ 鎖濃度の低下が認められ、AS-ODN による λ 鎖産生抑制が示唆された。次に、RPMI8226 をマウス皮下に移植して骨髓腫モデルを作成し、AS-ODN を腫瘍内に投与した。投与後、腫瘍における λ 鎖 mRNA および血中のヒト λ 鎖濃度の低下が認められた。AS-ODN の投与により、血中の単クローン性 L 鎖を抑制し得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスの予後は非常に不良で、平均生存期間は約 13 ヶ月といわれている。治療は骨髓腫と同様に主に抗癌剤を用いた化学療法が行われており、近年では末梢血幹細胞移植を併用した大量化学療法も試みられているが、アミロイド沈着が多臓器に及んだ症例では効果が少なく、生命予後も含めてその治療成績は十分とはいえない。従って治療成績をより改善するためには、更に別の機序からアミロイド原性 L 鎖の産生抑制をはかることが必要と考えられる。

我々は現在、アミロイド線維の主成分となっている単クローン性 L 鎖をクローニングして、そのアンチセンスを導入して L 鎖産生を抑制する、という方法を目指している。これまでの研究では、異常形質細胞クローンの多い症例では、患者骨髓や末梢血から、RT-PCR 法によって比較的簡便に単クローン性 L 鎖を同定することが可能であった。本研究では、骨髓腫細胞株 RPMI8226 と U266 を用いて、アンチセンス DNA による L 鎖産生の抑制を、培養細胞および骨髓腫モデル動物において検討した。

B. 研究方法

1. 免疫グロブリンの塩基配列の決定

骨髓腫細胞株 RPMI 8226 (IgG λ)、U266 (IgE λ) から total RNA を抽出し、Frame work (FR) 1 と FR4 に対応したプライマーを用いて、RT-PCR を行った。得られた PCR 産物から塩基配列を決定した。

2. 培養細胞系における AS-ODN の導入

RPMI 8226 および U266 の λ 鎖塩基配列を基に、3 つの相補性決定領域 (complementarity determining region: CDR) にそれぞれ 21 塩基の長さの AS-ODN を作製した。コントロールとして、センス配列のオリゴヌクレオチド (ODN) およびランダム配列の ODN を用いた。これらを Lipofection 法により培養細胞に導入し、上清中の遊離 λ 鎖濃度を ELISA 法にて測定した。

3. 骨髓腫モデルマウスの作製と AS-ODN の導入

RPMI8226 を SCID マウス皮下に移植し、20-24 日後に 25 匹中 21 匹において腫瘍形成が認められた。移植開始より 28 日後から連続 5 日間 7.5mg/kg の ODN あるいは生理食塩水を腫瘍内に投与し、投与終了後 24 時間後及び 3 週間後の腫瘍中のヒト λ 鎖 mRNA 発現および血中のヒト λ 鎖濃度を検討した。

C. 研究結果

1. 骨髄腫細胞株における V λ mRNA の増幅

骨髄腫細胞株 RPMI 8226 および U266 を材料に RT-PCR を行い、V λ の増幅産物として矛盾ない約 330 bp のバンドを得た。回収して塩基配列を決定すると FR-1-4、CDR-1-3 の構造を備えた V λ の配列が得られた。対照として胃癌細胞株 MKN45 についても同様に RT-PCR を行ったが、バンドは認められなかった。

2. 培養細胞系における AS-ODN の効果

RPMI8226 の V λ cDNA 塩基配列に基づいて、CDR-1, 2, 3 それぞれに対する AS-ODN を作製して RPMI8226 に導入し、導入前後の培養上清中の λ 鎖濃度を測定した (図 1)。センス配列の ODN (S(R)) およびランダム配列の ODN (R(R)) に比べて、AS-ODN 導入群では、有意に λ 鎖産生量の低下を認めた。また、U-266 の λ 鎖塩基配列を基に作成した AS-ODN (AS(U)) では λ 鎖の低下を認めなかった。

同様に U-266 の V λ 塩基配列に基づいて作製した AS-ODN を U-266 に導入し、導入後の λ 鎖産生量を検討した (図 2)。RPMI8226 と同様に、コントロール群にくらべて AS-ODN 導入群では、 λ 鎖産生の抑制が観察され、また RPMI8226 に対する AS-ODN には抑制されなかった。

3. 骨髄腫モデルマウスにおける AS-ODN の効果

AS-ODN 投与終了後の腫瘍における λ 鎖 mRNA 発現を示す (図 3)。生理食塩水およびセンス鎖を投与した群では、投与終了 24 時間後および 3 週間後において、ほぼ同レベルの mRNA の発現が認められたが、AS-ODN 投与群では、投与終了 24 時間後に mRNA の発現が強く抑制されていた。3 週間後では、やや発現が回復していたが、依然として抑制効果が認められた。

AS-ODN 投与後の血中ヒト λ 鎖濃度についても検討した (図 4)。投与終了 24 時間後の血中濃度は、生食投与群およびセンス鎖投与群とはほぼ同様であったが、3 週間後の血中濃度は、コントロール群に比べて著明に低下していた。

D. 考察

昨年までの研究で我々は、PCR 法によって簡便に、臨床材料から単クローン性 L 鎖を同定することが可能であることを示してきた。これによって、個々の患者毎に単クローン性 L 鎖を同定し、アンチセンス DNA を作製、導入するなどの応用が考えられる。そこで我々は、骨髄腫細胞株の V λ 領域塩基配列を基にして AS-ODN を作製し、L 鎖産生の抑制を試みた。骨髄腫細胞株 RPMI8226 と U266 それぞれにおいて、3 つの CDR 領域に対応する AS-ODN を作製して培養細胞へ導入したところ、L 鎖産生の減少が認められた。また、RPMI8226 の AS-ODN は U266 の L 鎖産生を抑制せず、また U266 の AS-ODN は RPMI8226 の L 鎖産生に影響を与えなかった。このことは、アミロイド原性 L 鎖をターゲットとする AS-ODN を生体に投与した場合、他の免疫グロブリン L 鎖を抑制せずに、アミロイド原性 L 鎖のみを抑制しうる可能性を示している。

我々はさらに、骨髄腫マウスモデルを作製し、AS-ODN の *in vivo* における効果を検討した。その結果、移植された腫瘍内に AS-ODN を投与することにより、 λ 鎖の血中濃度を著明に抑制することが可能であった。L 鎖の血中濃度を低下させることは、アミロイドーシスの進行抑制や退縮に繋がる可能性がある。また、抗がん剤を用いた治療と組み合わせることにより、より強力に L 鎖を抑制できるかもしれない。臨床応用につなげるためには投与方法等について更なる研究が必要と考えられるが、本研究では動物モデルにおいて AS-ODN による L 鎖血中濃度の抑制が示唆されており、治療への応用が期待される。

E. 結論

RT-PCR 法によって腫瘍細胞株の λ 鎖 V 領域の塩基配列を決定し、これに基づいて CDR 領域に対応する AS-ODN を作製した。AS-ODN を培養細胞に導入することにより、 λ 鎖の産生が抑制された。また、骨髄腫細胞株を皮下に移植して作製した骨髄腫モデルマウスにおいて、AS-ODN の腫瘍内投与により、血中のヒト λ 鎖濃度の抑制が可能であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satoh Y, Hayashi T, Takahashi T, Itoh F, Adachi M, Fukui M, Kuroki M, Kuroki M, Imai K, Hinoda Y. Expression of CD66a in multiple myeloma. J Clin Lab Anal 16; 9-85, 2002.
- 2) Ohno S, Yoshimoto M, Honda S, Miyachi S, Ishida T, Itoh F, Endo T, Chiba S, Imai K: The antisense approach in amyloid light chain amyloidosis: identification of monoclonal Ig and inhibition of its production by antisense oligonucleotides in in vitro and invivo models. J Immunol 169: 4039-4045, 2002.

2. 学会発表

- 1) 石田禎夫、大野聡子、吉本満、伊東文生、今井浩三：AL アミロイドーシスに対するアンチセンス治療の開発。第26回日本骨髄腫研究会総会、山口県宇部市、10月27日、2001

年。

- 2) Ohno S, Yoshimoto M, Honda S, Miyachi S, Itoh F, Imai K: The antisense approach in AL amyloidosis: Identificaiton of monoclonal immunoglobulin and inhibition of its production by antisense oligonucleotides *in vitro* and *in vivo* models. The 5th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders & The 4th International Workshop on Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy Matsumoto Sept 25, 2002

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

申請中 2002-240083 原発性アミロイドーシスの治療方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図の説明

図 1

RPMI8226 への AS-ODN 導入による、λ鎖産生の抑制。A: CDR-1 に対する AS-ODN を導入。生食 (control)、センス配列 (S(R)) およびランダム配列 (R(R)) の ODN、U266 の CDR-1 に対する AS-ODN (AS(U)) に比べて、RPMI8226 に対する AS-ODN (AS(R)) 導入後は、有意にλ鎖産生が低下。B: CDR-2,3 に対する AS-ODN 導入後のλ鎖産生低下。Mean±SD, n=9, *: $p<0.01$.

図 2

U266 への AS-ODN 導入によるλ鎖産生の抑制。A: CDR-1 に対する AS-ODN を導入。生食、センス配列 (S(U)) およびランダム配列 (R(U)) の ODN、RPMI8226 の AS-ODN (AS(R)) に比べて、U266 の AS-ODN 導入後は、有意にλ鎖産生が低下。B: CDR-2,3 に対する AS-ODN 導入後のλ鎖産生低下。Mean±SD, n=9, *: $p<0.01$

図 3

RPMI8226 を移植した SCID マウスの皮下腫瘍におけるヒトλ鎖 mRNA の発現。マウス皮下腫瘍内に生食 (lane 2, 3)、センス ODN (lane 4, 5)、AS-ODN (lane 6, 7) を 5 日間投与。投与終了 24 時間後 (A) および 3 週間後 (B) における腫瘍中の mRNA 発現を RT-PCR 法により検討。Lane 1 は RPMI8226。

図 4

マウス血清中のヒトλ鎖濃度。マウス皮下腫瘍内に生食 (lane 2)、センス ODN (lane 3)、AS-ODN (lane 4) を 5 日間投与して 3 週間後のマウス血清中のλ鎖濃度を ELISA 法で測定。Lane 1 は SCID マウス血清。Mean±SD, n=5, *: $p<0.01$.

図1

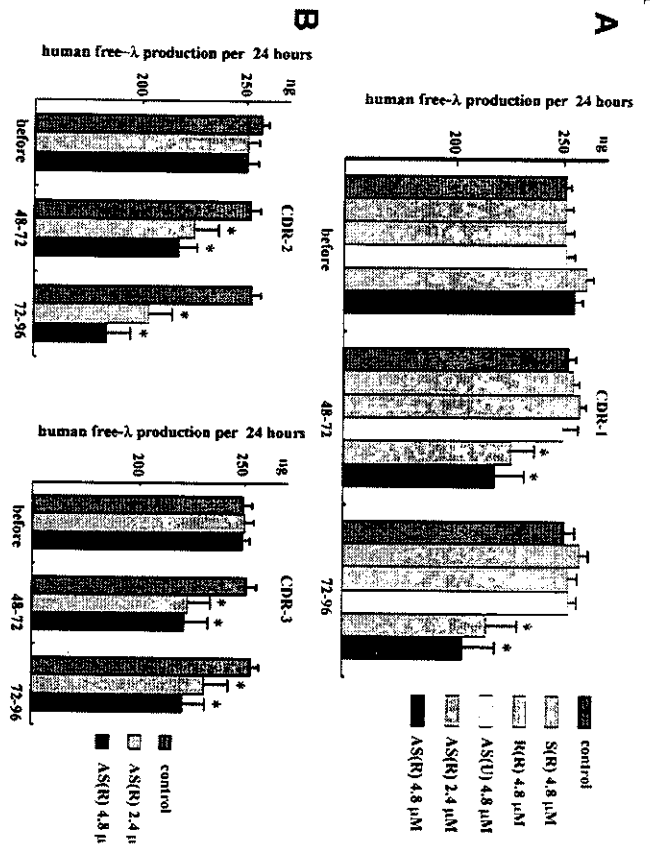


図3

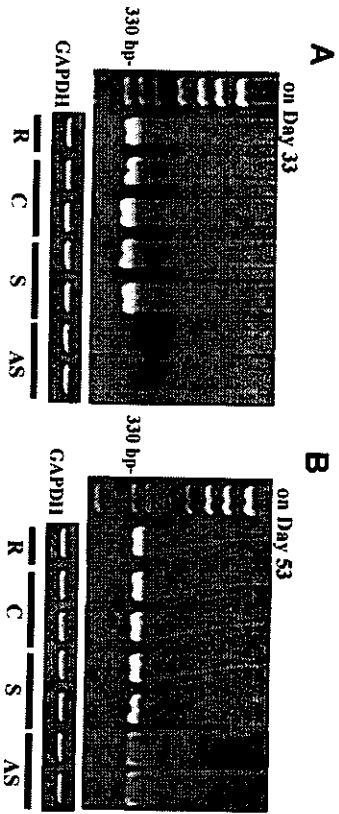


図2

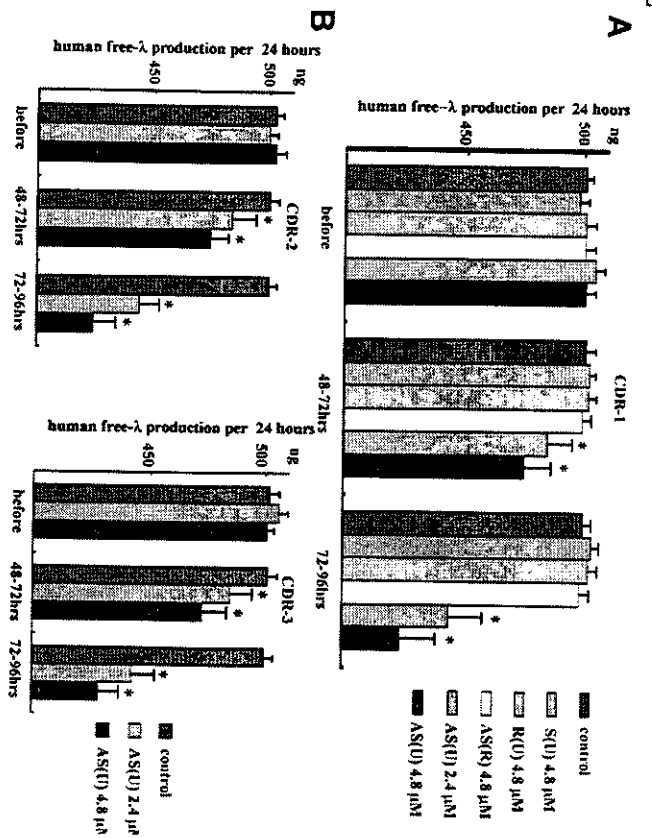
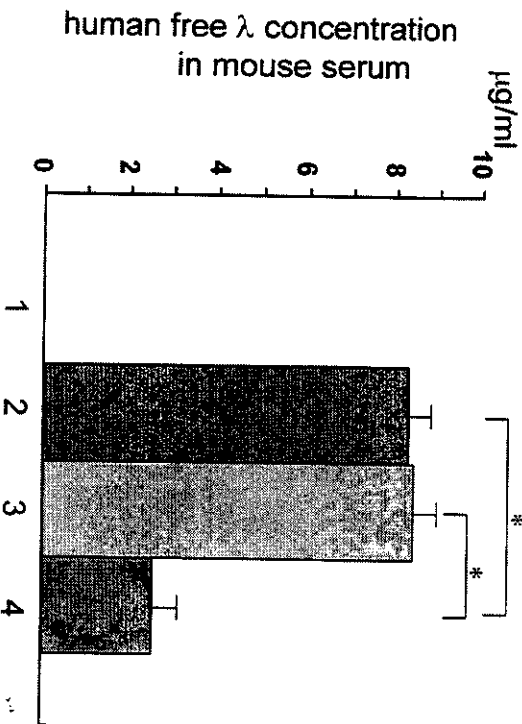


図4



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

微小生検組織を用いた生化学的なアミロイドーシスの診断法の開発

分担研究者 徳田隆彦 信州大学医学部加齢適応研究センター

共同研究者 矢崎正英*、池田修一*、亀谷富由樹**

*信州大学医学部第3内科、**東京都精神医学研究所

研究要旨 微小生検組織より沈着アミロイドを抽出し、生化学的検索法にてアミロイド蛋白を同定した。患者は71歳女性で、腎アミロイドーシスによる進行性の腎不全状態を呈していた。血清中 IgG λ型 M 蛋白陽性であった。腎生検組織の抗λ、κ型軽鎖抗体を含めた免疫組織化学的検索では全て陰性であった。この患者の十二指腸生検組織よりアミロイド蛋白を抽出し沈着アミロイドの同定を行った。SDS-PAGE 解析で認められた約 13kd のバンドのアミノ酸配列解析では、IgG 重鎖の可変領域と一致した。よって本患者の沈着アミロイドは IgG 重鎖由来、いわゆる AH amyloidosis であると診断した。次にこの抽出方法を応用し、FAP (Val30Leu)患者の心筋生検組織より沈着 transthyretin (TTR)アミロイドを抽出後質量分析を行い、沈着アミロイドの正常型・変異型 TTR の構成比を検索した。結果は沈着アミロイドの約 40% が正常型 TTR で占められていた。微小生検組織を用いたアミロイド蛋白の生化学的検索法は、沈着アミロイドの同定のみならず、その生化学的特徴の解析に応用でき非常に有用な検索法であった。

A. 研究目的

現在アミロイドーシスの診断は、組織でアミロイドの沈着が証明された後、免疫組織化学的検索、遺伝子解析、質量分析で行われるのが主流である。しかし抗体の特異性の問題、未知のアミロイド蛋白などでは確定診断が未だ困難であるのが実情である。また従来の組織より沈着アミロイドを抽出する方法では、比較的多量の材料が必要で、剖検時や手術、侵襲度の高い検査法で得られた組織を材料としていた。現在全身型アミロイドーシスでは、その型ごとに治療法が全く異なり、早期に診断できれば根治可能な症例も増えてきている。よって今後は、より早期に侵襲の少ない検査法で得られた微小生検組織で確実な診断ができるかどうかということが非常に重要になってくると考えられる。今回この研究では、微小生検組織を用いた生化学的なアミロイドーシスの診断法の確立を目的とし、免疫組織化学的検索で診断に苦慮した腎アミロイドーシス患者の十二指腸生検組織より、沈着アミロイドの同定を試みた。またこの方法の応用として、FAP 患者の心筋生検材料より TTR 由来の沈着アミロイドを抽

出し、質量分析法を用いて、沈着アミロイドの正常型・変異型 TTR の構成比について検討した。

B. 研究方法

1) 患者 1: 71歳女性。既往歴・家族歴に特記事項なし。60歳代後半より腎機能障害・貧血を指摘。70歳時に腎生検にて、糸球体、血管周囲壁に著明なアミロイド沈着を認めた(図1)。71歳時の検査所見で、血清尿素窒素、クレアチニン値の高値、正球性貧血、血清中 IgGλ型 M 蛋白を認めた。腎生検標本の免疫組織化学的検索では、抗λ、κ型軽鎖、AA、TTR、β2-MG、fibrinogen 抗体いずれも陰性であった。

十二指腸生検組織からの沈着アミロイド同定について。

十二指腸生検組織でも微量ながらアミロイド沈着が認められたため(図1)、この組織片よりアミロイド沈着を試みた。まず組織片を生理食塩水中でホモジナイズし、遠心分離を行った。この行程を三回施行し、得られた沈殿物を 6M 塩酸グアニジン内で可溶化した。透析脱塩後、得られた検体を SDS-PAGE 解析、ゲル内でプロテアーゼ消化

を行い、逆相 HPLC で分画し、アミノ酸配列解析を行った。

2) 患者 2: 50 歳女性。FAP (Val30Leu)患者。2 年前より下肢末端の感覚障害で発症。その後感覚障害の範囲は上肢にも拡がった。膀胱直腸障害などの自律神経障害も加わり、肝移植適応検討にて当科に入院した。心臓超音波検査では左室壁と、心室中隔の肥厚を認めた。前医で行われた心筋生検でアミロイド沈着を認めた(図 3)。この患者の従姉妹は肝移植を施行されたが、術後心筋アミロイドーシスが増悪し、心不全にて死亡されている。これには術後も正常型 TTR がアミロイドとして心筋に沈着していたことが証明されている (Yazaki et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2000)。心筋沈着アミロイドの正常型・変異型 TTR の構成比についての検索。

心筋生検組織を前述同様ホモジナイズ後、塩酸グアニジン内で可溶化し、透析・脱塩を行った。TTR の回収は抗 TTR 抗体を用いた免疫沈降法にて行い、質量分析にて解析した。

C. 研究結果

患者 1 の十二指腸沈着アミロイドの SDS-PAGE 解析では多数のバンドが認められたが、これまで報告されたアミロイド蛋白のほとんどが分子量 25kd 以下であるため、25kd 以下のバンドに着目し、18、17、13kd のバンドをゲルより切り出した(図 2)。ゲル内消化後のアミノ酸配列解析では、13kd のバンドより、YYVDSVEGRFTIS というアミノ酸配列が同定された。相同性検索を行い、この配列は IgG 重鎖の第 2 超可変領域と第 3FR にかけての領域をほぼ一致した。以上の結果からこの患者の沈着アミロイドは IgG 重鎖に由来している可能性が考えられた。18、17kd のバンドについてはヒストン蛋白であると同定され、これらは混雑蛋白であると考えた。

患者 2 の心筋生検組織沈着アミロイドの正常型・変異型 TTR の構成比を求める検索では、ほぼ正常型が 40%、変異型が 60%の割合で沈着していることが判明した(図 4)。

D. 考察

免疫グロブリンの重鎖由来のアミロイドーシ

スは、軽鎖由来の AL amyloidosis に対して AH amyloidosis (AH) と呼ばれ、Primary amyloidosis として分類されている。AH は非常にまれな病態として知られており、現在までに全身型の AH は 2 名の剖検例での報告があるに過ぎない。どちらも IgG 重鎖の可変領域が沈着していた。患者 1 の十二指腸沈着アミロイドのアミノ酸配列解析でも、可変領域の一部のペプチド断片が認められている。また分子量も約 13kd なので、沈着アミロイドの主な構成成分は、これまでの報告と同様に重鎖の可変領域であると考えられた。この症例については、以上の方法・結果の妥当性を検討する目的で、腎生検を再度行い腎沈着アミロイドについても検索中である。

患者 2 の心筋沈着アミロイドの生化学的検索では、沈着アミロイドのほぼ 40%は正常型 TTR で構成されていることが示された。肝移植後、心筋アミロイドの進行により死亡した患者の従姉妹の心筋沈着アミロイドでは、ほぼ 80%が正常型 TTR で構成されていた。患者 2 は平成 15 年 2 月に肝移植療法を施行されたが、我々の結果より、今後嚴重な心機能の評価が必要であることが示唆された。

E. 結論

今回我々が提示した微小生検組織を用いた生化学的診断法は、アミロイドーシスの診断のみならず、沈着アミロイド蛋白の生化学的特徴の解析にも応用可能であり、非常に有用な手法であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kotani N, Hattori T, Yamagata S, Tokuda T, Shirasawa A, Yamaguchi S, Kobayashi S, Ikeda S: Transthyretin Thr60Ala Appalachian-type mutation in a Japanese family with familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 9: 31-34, 2002
- 2) Tokuda T, Oide T, Tamaoka A, Ishii K, Matsuno S, Ikeda S: Prednisolone (30–60 mg/day) for diseases

- other than AD decreases amyloid β peptides in CSF. *Neurology* 58: 1415-1418, 2002
- 3) Ikegami T, Kawasaki S, Ohno Y, Chisuwa H, Urata K, Nakazawa Y, Hashikura Y, Terada M, Miyagawa S, Takei Yi Y, Tokuda T, Ikeda S: Temporary auxiliary liver transplantation from a living donor to an adult recipient with familial amyloid polyneuropathy. *Transplantation* 73: 628-630, 2002.
- 4) Takei Y, Hattori T, Gono T, Tokuda T, Saitoh S, Hoshii Y, Ikeda S: Senile systemic amyloidosis presenting as bilateral carpal tunnel syndrome. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 9: 252-255, 2002.
- 5) Oide T, Tokuda T, Takei Y, Takahashi H, Ito K, Ikeda S: Serial CT and MRI in a patient with

isolated angitis of the central nervous system associated with cerebral amyloid angiopathy. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 9: 256-262, 2002.

- 1) 2. 学会発表
1) 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

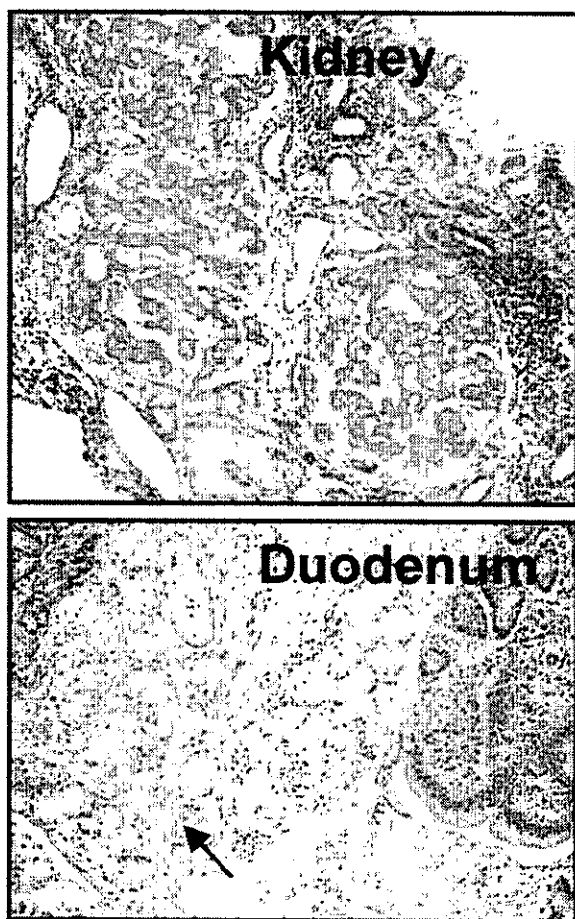


図1. 患者1の腎・十二指腸生検組織。
腎糸球体を主体に高度なアミロイド沈着を認めた。十二指腸では十二指腸腺周囲間質に微量ながらアミロイド沈着を認めた(矢印)。コンゴ赤染色

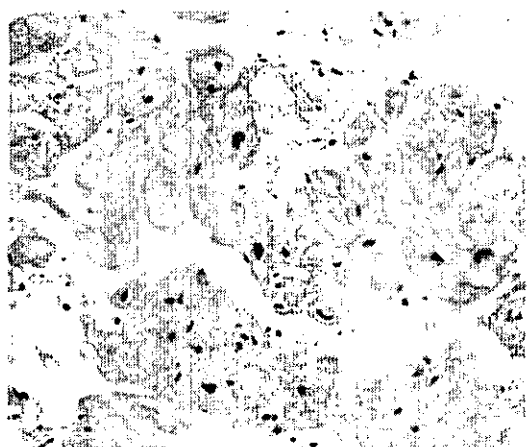


図3. 患者2の心筋生検組織。
心筋細胞周囲にアミロイド沈着を認めた。コンゴ赤染色

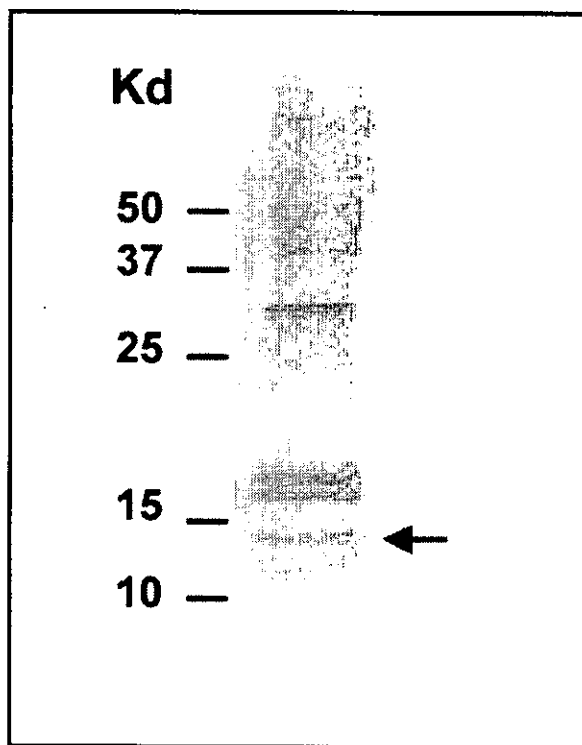


図2. 患者1の十二指腸沈着アミロイドのSDS-PAGE解析。
約13kdのバンド(矢印)のプロテアーゼ消化後のアミノ酸配列解析で、IgG重鎖の可変領域の一部断片と同一のペプチド断片が認められた。

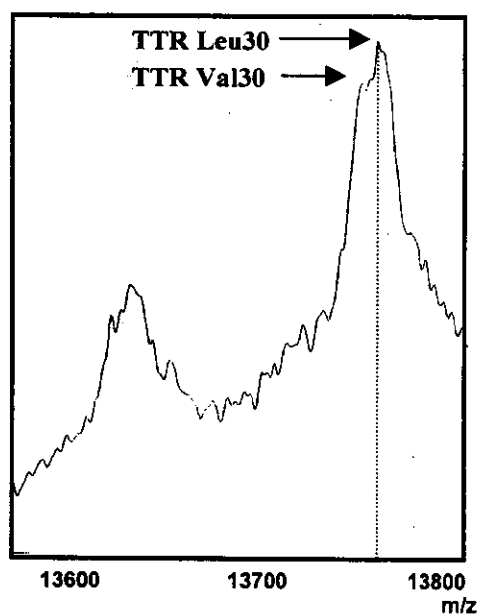


図4. 患者2の心筋沈着アミロイドの質量分析結果。
ほぼ60%が変異型TTR(Leu30)、40%が正常型TTR(Val30)の割合で構成されていた。

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

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

分担研究者 麻奥英毅 広島赤十字・原爆病院 輸血部

共同研究者 野村明子¹⁾、吉田知己²⁾、中池竜一²⁾

1) 広島赤十字・原爆病院第4内科、2) 同循環器科

研究要旨 メルファラン大量療法による自己造血幹細胞移植 (auto stem cell transplantation : ASCT) は全身性 AL アミロイドーシスに対し最も有効性が期待される治療であり現在積極的に試みられつつある。しかし心アミロイドーシスなど臓器障害により ASCT 治療関連死が多いため心アミロイドーシス患者に対応できる ASCT 療法の確立が必要である。一症例の経験を基に心アミロイドーシス患者に対する ASCT について適応を含め治療方法の検討を行った。その結果 1. 前治療として MP 療法は無効でありむしろ ASCT の機会を逸する為診断後速やかに ASCT を行うべきである。2. 治療期間の短縮と心臓への負担を軽減する目的で G-CSF 単独での幹細胞動員が望ましい。しかし G-CSF 単独でも心不全の悪化を来すことがあり注意が必要である。3. ASCT 前メルファラン大量療法は心アミロイドーシスによる心不全を含め臓器障害の程度により投与量考慮すべきである。そのためのより詳細な適応基準が必要である。または心アミロイドーシスに対応できる新たな大量化学療法を検討すべきである。

A. 研究目的

心不全を有する心アミロイドーシス患者に対する ASCT 療法を検討する。

B. 研究方法

1. 症例の検討

症例：47 才、男性、皮膚、心筋、胸膜、肝腎、骨格筋、末梢神経、小血管に病変を認める BJP- λ 型全身性 AL アミロイドーシス

治療：幹細胞採取は G-CSF 単独による幹細胞動員により行った。

大量化学療法は VMMCD 療法 (MCNU 200mg/m²day1、vincristine 0.5mg/day および dexamethasone 40mg/day day4-7 96 時間持続、LPAM 20mg/m²day4-7、cyclophosphamide 40mg/kg day9, 10：図 1) を施行した。

治療は患者・家族に危険性を全て説明し十分な理解を得た上で、患者・家族の強い希望により行った。

2. G-CSF 単独での幹細胞動員の有用性を検討する。

対象及び方法：前治療で good PR の多発性骨髄腫患者 26 例中 VP-16 または CPM での動員で採取不十分であった 5 例について G-CSF 単独での動員を行い、化学療法+G-CSF による動員との採取量の比較を行った。尚全ての患者においてインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

患者は診断時 EF 59.6%であったが、前医で MP 療法 2 コース施行後当院来院時には EF は 33%と低下していた。心臓への負担を考慮し G-CSF 単独での幹細胞動員を行ったが、採取中に心不全の一過性の悪化を認めた。幹細胞は 0.85×10^6 CD34 細胞/kg 採取できた。大量化学療法は当院において高齢の多発性骨髄腫患者に対し施行している VMMCD 療法を行ったが幹細胞移植後 6 日目に突然心停止を来した。以上の経過から以下の点が問題となった。

1. 幹細胞移植の前に治療が必要であるか。
2. 適当な幹細胞動員方法は何か。
3. 臓器障害を有する患者に対する適切な移植前大量化学療法は何か。

今回 G-CSF 単独での幹細胞動員を試みたが採取量は不十分であった。そこで条件の悪い患者を対象に G-CSF 単独での幹細胞動員の有用性について検討した。表に示すように VP-16+G-CSF または CPM+G-CSF で採取不十分であった骨髄腫患者を対象に 2 回目または 3 回目動員を G-CSF 単独で行った。採取量を比較した結果 G-CSF 単独でも化学療法+G-CSF とほぼ同程度の採取量が得られたことから採取不足は動員方法によるよりも患者側の要因が大きく影響するものと考えられた。

D. 考察

メルファラン大量療法による自己造血幹細胞移植 (auto stem cell transplantation : ASCT) は全身性 AL アミロイドーシスに対し最も有効性が期待される治療であり現在積極的に試みられつつある。全身性 AL アミロイドーシスは従来の治療ではほとんど無効で予後は不良である為、ほとんど全ての患者がその適応とされているが、アミロイドによる臓器障害のため ASCT 治療関連死は多発性骨髄腫における ASCT の 5-10 倍である。特に心アミロイドーシスの存在は大きな危険因子である。しかし従来の治療では予後が平均 4 ヶ月であることから心アミロイドーシス患者に対応できる ASCT 療法の確立が必要である。先に記したように心アミロイドーシス患者に対する ASCT にはいくつかの問題がある。まず第一に ASCT に先行する治療が必要であるのか。今回の例でも MP 療法を行ったにもかかわらず心機能は急激に低下していた。最近 AL アミロイドーシスに対し最初から ASCT を行う群と MP2 コース後に ASCT を行う群との無作為比較試験の報告が出た。それによると ASCT を施行できなかった例が初回治療 ASCT 群 17% に比べ MP 後 ASCT 群では 33% あり、大きな原因は病気の進行であった。1 年生存率はそれぞれ 70%、58% で、特に心アミロイドーシス患者においては生存期間中央値がそれぞれ 19.6 ヶ月、5.3 ヶ月と有意に初回治療 ASCT 群

が優れており先行治療として MP 療法を行う利点はないと結論された。原発性 AL アミロイドーシスは腫瘍としては MGUS に相当し腫瘍量は多くはないと考えられることから心アミロイドーシスのごとく急速に進行する例には診断後臓器障害が進行する前に速やかに ASCT をすべきである。

幹細胞動員方法に関して今回の検討では G-CSF 単独による動員は化学療法+G-CSF とほぼ同等の採取量であった。採取量不足は患者側の要因が大きいのと考えられ、AL アミロイドーシスにおいては骨髄へのアミロイド沈着が採取量に影響するという報告がある。検討症例において幹細胞採取量が十分でなかったのは初診時既に血小板減少を認めることから骨髄へのアミロイド沈着があった可能性が高い。心アミロイドーシス患者において CPM+G-CSF での動員では 5 例中 3 例が動員中に死亡し、4 例の G-CSF 単独動員では死亡例がないと言う報告もあり、G-CSF 単独での幹細胞動員が良いと考えられる。

ASCT 前大量化学療法は多発性骨髄腫に用いられるメルファラン大量療法がそのまま流用されている。しかし多発性骨髄腫においては基本的に臓器障害のない患者を対象としているのに対し AL アミロイドーシスでは多くの場合臓器障害を有している患者が対象となる。特に心アミロイドーシスでは先に記したように幹細胞動員の段階での死亡がある上、ASCT を施行し得た例もメルファラン $140\text{mg}/\text{m}^2$ では治療関連死が半数認められたという報告がある。Gertz らは障害臓器数、心筋障害の有無、腎障害の程度で患者の層別化を行い、メルファランを減量する事を提案している。このように全身性 AL アミロイドーシスにおいては臓器障害の程度によるメルファランの減量や、臓器毒性の少ないレジメンの開発が必要である。我々は検討症例に対し高齢者多発性骨髄腫患者に施行しうることを目的に考案した VMMCD 療法を ASCT 前化学療法として用いた。それでも結果として適切ではなかったかもしれない。今後毒性をさらに軽減するため CPM を除いた VMMD 療法について検討する予定である。

E. 結論

心アミロイドーシス患者においては診断後最初

から ASCT を施行すべきである。その場合幹細胞動員は G-CSF 単独での動員が望ましい。ASCT 前大量化学療法は臓器障害の程度に応じた化学療法を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) なし

2. 学会発表

1) 麻奥英毅：多発性骨髄腫に対する多剤併用大

量化学療法を前処置とした PBSCT の検討. 第 24 回日本造血細胞移植学会総会、北海道札幌市、12 月 20、21 日、2001 年.

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. Multiple myeloma ASCT regimen

	day	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MCNU	200 mg/m ²	↓											
VCR	0.5 mg/body				↓	↓	↓	↓		continuous div			
LPAM	20 mg/m ²				↓	↓	↓	↓					
CPM	40 mg/kg									↓	↓		
Dexa	40 mg/body				↓	↓	↓	↓		continuous div			
PBSCT													↓

表1. 多回数動員患者における動員方法別幹細胞採取量
(×10⁶/kg CD34cell)

症例	動員方法			前治療期間(M)
	VP16+GCSF	CPM+GCSF	GCSF	
Y.M.	0.54	0.36	0.51	101
O.S.	0.42	0.23	0.47	21
K.S.	1.94		1.30	10
O.T.	1.72		0.66	11
F.K.	1.53	0.48		8
H.S.		1.06	1.32	19
平均	1.23	0.53	0.85	

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

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 アミロイドーシスの治療への可能性

分担研究者 満屋裕明 熊本大学医学部第2内科

共同研究者 畑 裕之*、後藤知巳**

*熊本大学医学部第2内科、**熊本大学医学部分子遺伝学

研究要旨 AL アミロイドーシスは形質細胞から産生される M 蛋白により惹起される。AL アミロイドーシスの治療に応用することを目的とし、形質細胞を標的とした新規治療法の開発を試み、以下の知見を得た。1：骨髄腫患者より形質細胞を純化し Vascular Endothelial Growth Factor、Angiopoietin の産生を確認した。2：骨髄腫モデルマウスに、一酸化窒素 (NO) 合成阻害剤を投与したところ、血管新生抑制効果に基づく抗腫瘍効果を認め、その効果はメルファラン、ドキシソルビシンよりも強力であった。3：骨髄腫細胞における小胞体ストレス関連遺伝子発現、小胞体ストレス誘導による骨髄腫細胞へのアポトーシス誘導を確認した。以上より、血管新生阻害、および小胞体ストレス誘導が形質細胞をターゲットとする AL アミロイドーシスの新規治療法となりうる可能性が示された。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスは、モノクローナルに増殖した形質細胞から産生される M 蛋白が成因であることから、形質細胞を標的とした治療が根本療法である。しかし、形質細胞の腫瘍である多発性骨髄腫は、既存の抗癌剤では治癒しないことから、AL アミロイドーシスにおいても、形質細胞の根絶は困難であり、形質細胞を標的とした新しい治療法の開発が望まれる。本研究では、血管新生阻害、および小胞体ストレスを用いた新規治療法を開発する上での基礎的な実験を行い、もって AL アミロイドーシスの治療への応用を検討する。

B. 研究方法

骨髄腫患者より形質細胞を磁気ビーズで純化したものを材料とし、血管新生促進因子 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF, Angiopoietin-1, 2; Ang-1, 2) の発現を RT-PCR、免疫染色で検討した。SCID マウスに骨髄腫細胞株を移植し、一酸化窒素合成酵素阻害剤 (N^G -nitro-L-arginine methyl ester; L-NAME) による抗腫瘍効果を検討した。骨髄腫細胞株における小胞体ストレス関連遺伝子群 (ATF-4, Bip, Calreticulin, XBP-1, CHOP) の発現を

Northern blot で検討した。形質細胞に小胞体ストレス誘導剤 (Thapsigargin; TG) を添加し、アポトーシスを Annexin/PI 法で検討した。

C. 研究結果

1：血管新生抑制療法

RT-PCR では、患者由来骨髄腫細胞 36 例中 22 例に VEGF₁₆₅ の発現が、27 例に Ang-2 の発現が認められた (図 1)。VEGF₁₂₁₊, VEGF₁₆₅₊ 例の 1 年生存率は 37.6% にすぎず、一方 VEGF₁₂₁₊, VEGF₁₆₅₋ 例のそれは 87.5% であり、VEGF₁₆₅ は予後不良因子であると考えられた。骨髄腫細胞株を SCID マウスに移植し、これに L-NAME を腹腔内投与したところ、著明な抗腫瘍効果をもとめ、これは、既存の抗癌剤であるメルファラン、ドキシソルビシンの効果を凌駕し、著明な血管新生抑制作用を有する Paclitaxel と同等であった (図 2a)。この抗腫瘍効果は、血管新生を抑制することによって、腫瘍内血管密度の測定により明らかであり (図 2b)、これはマウス VEGF の産生を抑制することによって考えられた (図 2c)。

2：小胞体ストレスによるアポトーシス骨髄腫細胞株では、小胞体ストレスにより発現するとされ