

2003.0789

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

アミロイドーシスに関する調査研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 池田修一

平成16(2004)年3月

[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. AL アミロイドーシ形質細胞における小胞体ストレス5
満屋裕明
熊本大学医学部第2内科
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8
- CD45 陽性骨髄腫細胞に強く発現するミトコンドリア膜分子 VDAC-1 について -
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. AL アミロイドーシスに対する siRNA 治療法の開発14
今井浩三
札幌医科大学医学部第一内科
4. リスクを有する AL アミロイドーシス患者に対する自家造血幹細胞移植併用メルフ17
ァラン大量療法
麻奥英毅
広島赤十字原爆病院 輸血部・検査部
5. 腎尿路系を侵す稀な免疫細胞性(AL)アミロイドーシス21
池田修一
信州大学医学部第三内科
6. マウス老化アミロイドーシスの伝播防止処理効果に関する検討23
樋口京一
信州大学大学院医学研究科加齢生物学
7. 抗免疫グロブリンκ鎖可変領域抗体およびアミロイド特異的抗トランスサイレチン27
抗体作製の試み
石原得博
山口大学医学部構造制御病態学講座 (病理学第一講座)
8. γセクレターゼによるアミロイド前駆体タンパクのプロセシング部位の検討31
亀谷富由樹
東京都精神医学総合研究所分子神経生物
9. 赤ワイン関連ポリフェノールのアルツハイマー病βアミロイド線維分解作用34
山田正仁
金沢大学大学院脳老化・神経病態学
10. Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE-1) 抗体の作成とヒト脳における BACE-1 の36
解析
玉岡 晃
筑波大学臨床医学系神経内科
11. 実験的頭部外傷ラット脳の慢性期におけるアミロイドβ蛋白の定量39
- 対照群との比較検討も含めて -
玉岡 晃

12. ヒト血液中に抗脳アミロイド抗体が存在する42
東海林幹夫
岡山大学大学院医歯学研究科神経病態内科学
13. Alzheimer 型痴呆の血液マーカー研究46
—血小板アミロイド前駆体蛋白の生化学的分析
葛原茂樹
三重大学医学部神経内科
14. わが国における脳アミロイドアンギオパチーおよび中枢神経系限局性血管炎に関する第一次全国調査49
池田修一²⁾, 玉岡 晃³⁾, 葛原茂樹⁴⁾, 東海林幹夫⁵⁾, 安東由喜雄⁶⁾, 徳田隆彦^{2,7)}, 山田正仁¹⁾
金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科)¹⁾, 信州大学医学部第三内科²⁾, 筑波大学臨床医学系神経内科³⁾, 三重大学医学部神経内科⁴⁾, 岡山大学大学院神経病態内科学⁵⁾, 熊本大学臨床検査医学⁶⁾, 信州大学大学院加齢適応医科学専攻⁷⁾
15. 臨床的にピンスワンガー型脳血管性痴呆が疑われ、脳に顕著なアミロイドアンギオパチー、**plaque-like angiopathy** と **cotton wool plaque (CWP)**類似の球形老人斑、およびアルツハイマー神経原線維が認められた一例54
葛原茂樹
三重大学医学部神経内科
16. アミロイドーシス研究の観点から見たプリオン病研究58
水澤英洋
東京医歯大大学院脳神経機能病態学
17. 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: トランスサイレチンアミロイドは、同じトランスサイレチンアミロイドの沈着を促進するか60
前田秀一郎
山梨大学大学院医学工学総合研究部・生化 I
18. 中枢神経系に主病変を有する遺伝性 TTR アミロイドーシスの生化学的検討64
徳田隆彦
信州大学大学院加齢適応医科学系専攻分子細胞学部門
19. FAP ATTR Tyr114Cys 患者における脳アミロイドアンギオパチーの検討73
安東由喜雄
熊本大学大学院医学薬学研究部病態情報解析学
20. 非集積地におけるトランスサイレチン Val30Met 型アミロイドーシス患者の臨床像の特徴77
中里雅光
宮崎大学医学部第3内科
21. 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)に対する新たな治療法79
—異型トランスサイレチンの **cryptic epitope** をターゲットとした免疫療法—
安東由喜雄
熊本大学大学院医学薬学研究部臨床検査学

22.	アポ E を標的としたアミロイドーシスの診断・治療の基礎検討	84
	山田俊幸 順天堂大学医学部臨床病理学	
23.	肝腫瘍細胞株を用いた IL-6, IL-1 刺激による SAA1 プロモーター発現機構の解析	86
	吉崎和幸 大阪健康体育部健康医学第一部門	
24.	AA アミロイドーシス (AMY) を合併した関節リウマチ (RA) における SAA1, -13SNP (-13SNP) の生命予後及び臨床経過への影響	90
	高杉 潔 道後温泉病院リウマチセンター内科	
25.	関節リウマチによる反応性アミロイドーシス合併例の予後の解析	93
	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 (第二内科)	
26.	全身性 Castleman 病による 2 次性アミロイドーシスに対し自家末梢血幹細胞移植を施行した慢性腎不全例	97
	原 茂子 虎の門病院健康管理センター	
27.	AA アミロイドーシスに対する治療方針の確立	101
	吉崎和幸 ^{1),2)} 、池田修一 ³⁾ 、今井浩三 ⁴⁾ 、下条文武 ⁵⁾ 、原 茂子 ⁶⁾ 、高杉 潔 ⁷⁾ 、山田俊幸 ⁸⁾ 大阪大学健康体育部健康医学第一部門 ¹⁾ 、大阪大学大学院医学系研究科分子病態学専攻生理病態学 ²⁾ 、信州大学医学部第三内科 ³⁾ 、札幌医科大学医学部第一内科 新潟大学大学院医歯学総合研究科内科環境医学講座 ⁵⁾ 、虎ノ門病院分院腎センター血液浄化療法部 ⁶⁾ 、道後温泉病院リウマチ内科 ⁷⁾ 、順天堂大学医学部臨床病理学講座 ⁸⁾	
28.	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ドデシル硫酸ナトリウムの影響	106
	内木宏延 福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域 (第 2 病理)	
29.	30 年以上の長期透析歴患者における透析アミロイドーシスの臨床病態に関する調査	109
	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 (第二内科)	
30.	透析アミロイドーシス骨病変への etidronate disodium 長期使用の臨床的検討	113
	原 茂子 虎の門病院健康管理センター	
[III]	研究成果の刊行に関する一覧表	119
[IV]	班構成員名簿	137

[I] 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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AA アミロイドーシス患者の治療実態が明らかにされた。患者は1:8で圧倒的に女性が多く、基礎疾患の大部分が関節リウマチ(RA)である。平均発症年齢は54歳、RA発症から平均15年の罹患歴があった。AAアミロイドーシスの治療としては副腎皮質ステロイドホルモンの増量が多く用いられていた。また本症患者では約半数が診断後短期間で透析導入を必要とした。脳アミロイドアンギオパチー(CAA)および本病態に合併しうる中枢神経系限局血管炎(isolated angitis of the CNS: IACNS)の初めての疫学調査がわが国で行われた。一次調査の段階でCAA関連脳出血例715例、CAAに関連した他の病態21例、IACNS63例が見出された。AL、FAP、透析関連アミロイドーシスの領域でも治療法を中心に有用な知見が報告された。

分担研究者名

今井浩三 (札幌医科大学・教授)
 東海林幹夫 (岡山大学医学部・助教授)
 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 (宮崎大学医学部・教授)
 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)
 玉岡 晃 (筑波大学臨床医学系・助教授)
 原 茂子 (虎の門病院健康管理センター・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患者の致命的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 15 年度は 1) AL-アミロイドーシス患者に対する Auto-PBSCT を併用したメルファラン大量静注療法を班員が所属する施設で広めること、2) 国内の AA-アミロイドーシス患者に対する薬物療法の現状を把握すること、3) 脳アミロイドアンギオパチー(CAA)および本病態に合併しうる中枢神経系限局血管炎(isolated angiitis of the CNS: IACNS)のわが国で初めての疫学調査を行うことを主眼とした。

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)。免疫グロブリンκ鎖可変領域に対する抗体およびアミロイド特異的抗トランスサイレチン抗体を作成し、両蛋白由来の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 Auto-PBSCT を併用した強力な化学療法をわが国の患者に施行した(池田、麻奥、下条、今井、満屋)。

2) AA アミロイドーシス：アポEを指標とした本アミロイドーシスの診断・治療の基礎的データの収集が開始された(山田俊)。本アミロイドーシスを合併した RA 患者の予後調査を腎障害との関連で検討し(下条)、同様に本病態に対する SAA1、-13SNP の生命予後に対する影響も検討された(高杉)。ヒト肝細胞を用いて SAA1 発現に対する複数のサイトカインの相乗効果を、RT-PCR にて検討した(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国内の現状把握が行われた(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) : FAP 患者に対する肝移植以外の治療法の開発(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)。中枢神経病変を主体とする家族性 TTR アミロイドーシスの臨床像と遺伝子異常の検討が行われた(徳田)。

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形成に対する中性 pH でのドデシル硫酸ナトリウムの影響を検討した(内木)。30年以上の長期透析患者における透析アミロイドーシスの臨床像の調査を行い(下条)、また本病態への etidronate disodium の長期治療効果を検討した(原)。

5) 脳アミロイドーシス: 赤ワイン関連ポリフェノールの A β アミロイド線維の分解作用(山田)、BACE-1 抗体の作成とヒト脳における局在ならびに頭部外傷ラットにおける慢性期の A β 定量の検討が行われた(玉岡)。またヒト血液中における抗脳アミロイド抗体(東海林)、アミロイド前駆蛋白を指標とした Alzheimer 病診断のための血清マーカーの検索が行われた(葛原)。脳アミロイドアンギオパチー(CAA)および本病態に合併しうる中枢神経系限局血管炎(isolated angiitis of the CNS: IACNS)のわが国で初めての疫学調査を企画した(山田、玉岡、東海林、徳田、葛原、安東、池田)。

6) その他のアミロイドーシス: マウス老化アミロイドーシスの伝播防止処理効果の検討が行われた(樋口)。

(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：満屋は本疾患の治療法として小胞体ストレス誘導療法の可能性を検索した。河野はアミロイドーシスを合併したヒト骨髄腫細胞の細胞表面抗原を検索し、CD45+細胞は VDAC-1 を強く発現してストレスに高感受性であることより、治療への strategy があると考察した。今井は本疾患に対する遺伝子治療の一環として、L 鎖 V 領域の CDR 配列を標的に作成した siRNA を培養骨髄腫細胞へ導入することで、L 鎖産生抑制を示すことが出来た。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、症状が改善した例を報告した。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、従来の L 鎖定常領域に対する抗体では陰性例が陽性反応を示すことを確認した。池田は腎尿路に限局する AL アミロイドーシス 3 例の臨床病理像を報告した。
- 2) AA アミロイドーシス：山田はアポ E を指標とする新たな本疾患の診断法の検討を開始した。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、SAA1 相乗効果の発現に NF- κ B、C/EBP β 系のみならず、JAK-STAT 系も強く関与していることを証明した。高杉は本病態を合併した RA 患者の予後に -13SNP 表現型が影響していること、下条は本病態で透析導入を行った患者の予後は非透析例とほぼ同じであることを報告した。原は本病態による腎不全を併発した Castleman 病患者に Auto-PBSCT を行い、透析からの離脱を含む病態が改善した例を報告した。吉崎は分科会報告として、AA-アミロイドーシス患者に対する薬物療法の国内調査では副腎皮質ステロイドホルモン使用が最も多く、次いで免疫抑制剤の追加であることを明らかにした。
- 3) 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)：前田は transgenic mice を用いた実験から、外来性の ATTR 経口摂取では FAP 類似病態の発生がないことを報告した。安東は FAP に対する新たな治療法として ATTR Y78P の免疫療法が有用であること、FAP ATTR Tyr114Cys 患者における中枢神経症状の発現機序として脳アミロイドアンギオパチーが重要であることを明らかにした。中里は非集積地における ATTR Val30Met の臨床像を報告した。徳田は中枢神経症状を主体とする TTR 型 FAP 患者 5 名の血清中 TTR の動態が通常の TTR 型 FAP とは異なることを明らかにした。
- 4) 透析アミロイドーシス：内木は *in vitro* での $\beta 2$ microglobulin 由来のアミロイド線維形成には本蛋白の部分変性が必要であり、これに何らかの生体界面活性物質が作用することが重要であることを明らかにした。下条は 30 年以上の長期透析患者に起った透析アミロイドーシスの臨床像を検討して、手根管症候群、骨関節病変などに対して外科的手術が必要な例が多いことを報告した。原は本病態の骨嚢胞に対して etidronate disodium 治療が有用であることを示した。
- 5) 脳アミロイドーシス：山田は赤ワイン関連ポリフェノールが A β アミロイド線維の形成抑制のみならず、既に沈着した本アミロイドの分解作用を有することを明らかにした。玉岡は頭部外傷後ラットモデルでは慢性期に脳内 A β 濃度が増加すること、BACE1 はヒト脳では神経細胞に発現しており、Alzheimer 病では神経細胞当たりの BACE1 発現量が増加していることを示した。東海林はヒト血清中には A β 40 の monomer と dimer、A β 42 の monomer に対する抗体が一定の比率であることを明らかにした。葛原は血小板由来の β APP を指標とした AD の診断法を検索し、また臨床的には Binswanger 型脳血管性痴呆を呈した患者において cotton wool 老人斑を無数に認めた例を報告した。山田は脳アミロイドアンギオパチー(CAA)および本病態に合併しうる中枢神経系限局血管炎 (isolated angitis of the CNS: IACNS) の一次調査の段階で CAA 関連脳出血例 715 例、CAA に関連した他の病態 21 例、IACNS 63 例が見出されたことを報告した。

6) その他のアミロイドーシス：樋口はヒト Val30MetTTR 遺伝子を組み込んだ transgenic mice に ATTRVal30Met ならびに ATTRAsp38Ala アミロイド線維を経口的に投与を繰り返したが、アミロイドーシスの発症促進効果は得られなかったことを報告した。

D. 考察

今年度は昨年度に引き続いてアミロイドーシス全般の治療と予後に関する検討が行われた。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班員が所属する複数の施設で実施された。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、今年度は副腎皮質ステロイドホルモン、免疫抑制剤の使用状況が明らかとなった。この分野は基礎疾患である RA の治療薬が年々新たに開発されており、新薬の導入により AA アミロイドーシス併発の減少が期待される。FAP については肝移植以外の治療法が模索されている。また透析関連アミロイドーシスでは骨嚢胞の進展を阻止する薬物療法、長期経過を有する患者への外科的治療法の検討結果が明らかにされた。Alzheimer 病に代表される脳アミロイドーシスでは A β アミロイドの沈着とそれを阻止する機序の検索が行われ、同時に脳アミロイドアンギオパ

チー(CAA)の実態調査が開始された。一次調査の段階だが、わが国には予想以上の数の本症患者がいることが推測される。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、FAP を中心に進歩が見られた。2) AA-アミロイドーシス、透析関連アミロイドーシスの長期予後が明らかにされた。3) わが国における AA アミロイドーシスの治療の実態と脳アミロイドアンギオパチー(CAA)および本病態に合併しうる中枢神経系限局血管炎(isolated angiitis of the CNS: IACNS)の一次調査の結果が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

分担研究報告参照。

[Ⅱ] 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

AL アミロイドーシス形質細胞における小胞体ストレス

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*、中村美紀*、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 アミロイドーシスでは一般に形質細胞の増殖は盛んではなく、何らかの増殖抑制機序が存在する可能性がある。形質細胞で大量に産生される M タンパクが小胞体に過剰な負荷 (小胞体ストレス) をかけている可能性を考え、骨髄腫患者から形質細胞を純化し、小胞体ストレスの有無を XBP-1 遺伝子の活性化を指標として検討した。骨髄腫患者のうち 29 例中 8 例において XBP-1 遺伝子の活性化を認め、そのような症例は予後不良であった。すなわち、活性型 XBP-1 が形質細胞の小胞体ストレスを回避させ、その結果、腫瘍細胞が生存することが予後不良因子となると考えられた。1 例ではあるが AL アミロイドーシス由来形質細胞を純化し検討したところ、XBP-1 の活性化は検出されず、AL アミロイドーシスにおいて M タンパクは小胞体ストレスの原因とならないことが示された。

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 タンパクが成因である。形質細胞は大量の免疫グロブリンを産生する事から、きわめて小胞体に富む細胞であるが、近年、小胞体がタンパク質の folding を検知し、misfolding を検出するとシャペロンを誘導する機構が判明しつつある。小胞体に過剰負荷 (小胞体ストレス) がかけると細胞はアポトーシスを起こすことも知られている。形質細胞の腫瘍である多発性骨髄腫の新規治療法を開発するために、我々は小胞体ストレスからアポトーシスに至る経路を詳しく解析してきた。一方、AL アミロイドーシスにおいては M タンパクが形質細胞の小胞体ストレスを誘導しているかどうかは不明である。本研究では、AL アミロイドーシスの病態解析として、AL アミロイドーシス由来形質細胞の小胞体ストレスの検出を試み、AL アミロイドーシスと骨髄腫の形質細胞の性状を比較した。

B. 研究方法

骨髄腫患者および AL アミロイドーシス患者よ

り形質細胞を磁気ビーズで純化したものを材料とし、骨髄腫細胞株における小胞体ストレスにより発現、活性化される転写因子 XBP-1 の活性化を RT-PCR 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: 骨髄腫細胞株の小胞体ストレス
 骨髄腫細胞株 U266, 12-PE バーキット細胞株 Raji に小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin を作用させ、アポトーシスを誘導し mRNA を抽出し XBP-1 を RT-PCR で増幅、Apa-LI で処理することで活性型 XBP-1 を検出する系を確立した (図 1)。U266 では活性型 XBP-1 が誘導されるが 12-PE では Tg 処理前後で変化はなく、Northern では XBP-1 の発現減少がみられたため、活性型 XBP-1 の増加が Tg により誘導される小胞体ストレスからのアポトーシスの抑制に関連することが示唆された。

2: 患者由来形質細胞における小胞体ストレス
 骨髄腫、AL アミロイドーシス患者より磁気ビー

ズにより形質細胞を純化した。その後、細胞株と同様の方法で XBP-1 の活性化を判定した。骨髄腫患者では 29 例中 8 例において XBP-1 が活性化しており、これは予後不良因子であった (図 2)。XBP-1 活性化は年齢、性とは無関係であったが、骨髄腫の病期別に見ると Stage III の例に多く見られた ($p < 0.01$)。このことが、XBP-1 の活性化と予後不良との関連に寄与したと考えられる。全身性にアミロイドの沈着を認めた AL アミロイドーシス患者骨髄より形質細胞を純化し、同様の検討を行ったところ、XBP-1 は非活性化型であり、骨髄腫では予後良好群に属した (図 3)。しかし、症例は約 3 ヶ月でアミロイドーシスによる心不全で死亡した。

D. 考察

今回の検討では、以下の点が確認された。1 : 骨髄腫細胞は、小胞体ストレスでアポトーシスに陥るが、XBP-1 の活性化を誘導できる細胞ではアポトーシスを回避することができる。2 : 骨髄腫細胞は定常状態で XBP-1 の活性化において多様性を示し、それは予後と関連する。すなわち活性化型 XBP-1 を示す症例は予後不良である。3 : AL アミロイドーシスにおいては形質細胞の XBP-1 は活性化しておらず、骨髄腫に対比すれば予後良好群に属した。1 例の検討に過ぎないが、我々の結果からは、AL アミロイドーシスを plasma cell dyscrasia と見た際に、本疾患は、きわめて腫瘍の増殖が遅い indolent な腫瘍であることになる。しかしながら、今回解析した症例はきわめて予後不良であり、AL アミロイドーシスの予後は形質細胞の増殖ではなく、アミロイドの沈着に規定されることがあらためて示唆された。同時に、我々の予想とは異なり AL アミロイドーシスにおいて、amyloidogenic な M タンパクは小胞体ストレスの原因とはならないことが示唆された。今後、さらに症例を集積して AL アミロイドーシス患者由来形質細胞に小胞体ストレスの負荷が存在するか、を検討する予定である。同時に、AL アミロイドーシス患者形質細胞から M タンパクの mRNA を得、recombinant の M タンパクを非分泌型形質細胞株に発現させ、小胞体ストレスが誘導されるかどうかを直接検証する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uneda S, Hata H, Matsuno F, Nagasaki A, Harada N, Mitusya Y, Matsuzaki H, Mitsuya H: A nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine-methyl-ester, exerts potent antiangiogenic effects on plasmacytoma in a newly established multiple myeloma sever combined immunodeficient mouse model. *Br J Haematol* 120: 396-404, 2003.
 - 2) Uneda S, Matsuno F, Sonoki T, Taniguchi I, Kawano F, Hata H: Expressions of vascular endothrial growth factor and angiotensin-2 in myeloma cells. *Haematologica* 88: 113-115, 2003.
 - 3) Uneda S, Hata H, Matsuno F, Harada N, Mitsuya Y, Kawano F, Mitsuya H: Macrophage inflammatory protein-1 alpha is produced by human multiple myeloma (MM) cells and its expression correlates with bone lesions in patients with MM. *Br J Haematol* 120: 53-55, 2003.
 - 4) S. Uneda, H. Hata. Angiotensin expression by human myeloma cells. *Haematologica* 88:(06), 2003 ELT21
- ##### 2. 学会発表
- Miki Nakamura, Hiroyuki Hata, Hiro Tatetsu, Takashi Sonoki, Shima Uneda, Yutaka Okuno, Masataka Mori*, Tomomi Gotoh*, and Hiroaki Mitsuya. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis in myeloma cells. 45th American Society of Hematology. San Diego, CA, USA, Dec 9, 2003.

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

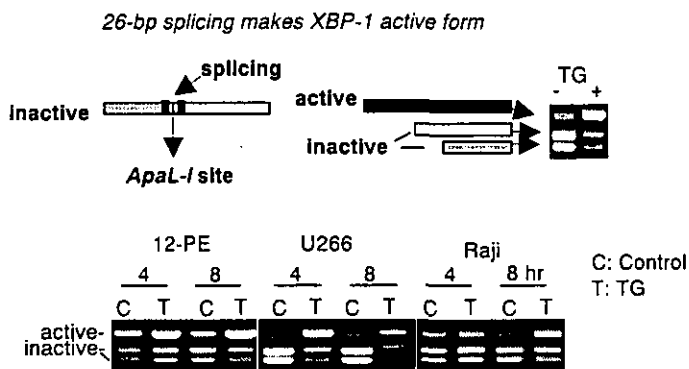


図1: 骨髄腫細胞株における活性型XBP-1の検出法

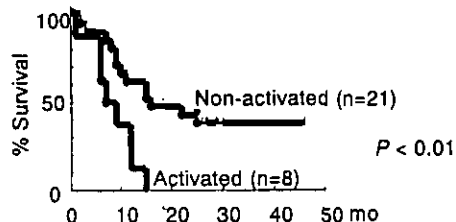
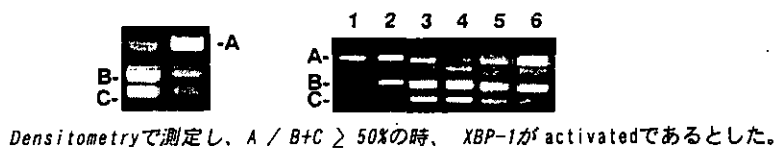
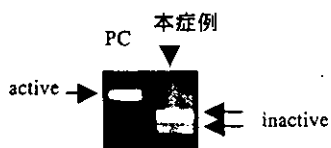


図2: 活性型XBP-1は骨髄腫の予後不良因子である。



PC: Positive control

図3: ALアミロイドーシス症例由来形質細胞のXBP-1は非活性型である。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 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
 -CD45 陽性骨髄腫細胞に強く発現するミトコンドリア膜分子 VDAC-1 について-

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、劉 尚勤、津山 尚宏、小幡雅則

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 骨髄腫に由来する AL アミロイド沈着には骨髄腫細胞の増殖が背景にある。AL アミロイドーシスを惹起する骨髄腫細胞の増殖、特に未熟型骨髄腫細胞の増殖をいかにして抑制するかが、AL アミロイドーシスの発症および進展を防ぐ意味で極めて重要である。本年度では、未熟型骨髄腫細胞の中で CD45-と CD45+細胞とで増殖因子 IL-6 に対する反応が異なることから、CD45-と CD45+未熟型骨髄腫細胞とでいかなる遺伝子発現が異なるかをマイクロアレイによる解析等により明らかにした。CD45+未熟型骨髄腫細胞で発現上昇していた遺伝子として、VDAC(voltage dependent anion channel)-1 遺伝子を同定した。更に、CD45+未熟型骨髄腫細胞は血清除去、H₂O₂ 処理、あるいは UV 照射等のストレス刺激に対して感受性が亢進していた。この作用は、CD45 のフォスファターゼ阻害剤 vanadate や src キナーゼ阻害剤 PP2 により抑制された。以上より、未熟型骨髄腫細胞の中で増殖因子 IL-6 に直接的に反応して増殖する CD45+未熟型骨髄腫細胞は、ある一面でいわゆるストレス刺激に感受性が高いことが明らかになった。未熟型骨髄腫細胞の増殖を抑制して、結果として AL アミロイドーシスの発症・進展を抑制する上で重要な知見と考えられる。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスを惹起する骨髄腫の進展には、未熟型骨髄腫細胞の増加が深く関わっている。未熟型骨髄腫細胞の細胞生物学的性状を明らかにすることが極めて重要である。本年度は、未熟型骨髄腫細胞の中でも増殖因子 IL-6 に直接的に反応して増殖する CD45+未熟型骨髄腫細胞が CD45-細胞と遺伝子発現がいかに異なるかを明らかにし、それが細胞生物学的性状にどう関係しているかを検討した。

B. 研究方法

1. 対象

1) 骨髄腫細胞株 U-266 から CD45+と CD45-細胞をセル・ソーターで分取した。2) PCR-based differential display と microarray による発現遺伝子の探索: CD45+と CD45-細胞からそれぞれ

RNA を抽出した後、PCR-select cDNA subtraction kit (Clontech) あるいは microarray (AceGene Human 30K, Hitachi) で発現が異なる遺伝子スクリーニングした。定量 RT-PCR で確認した。3) 各種ストレス刺激に対するアポトーシス感受性の検討: 細胞に血清除去、H₂O₂ 処理、UV 照射、あるいは化学療法剤 (メルファラン、サリドマイド等) 処理した後、生存率、アポトーシス誘導およびミトコンドリア膜電位等をフローサイトメーターで測定した。4) cytochrome C 遊離と caspase 活性化: ストレス処理後の細胞抽出液あるいはミトコンドリア分画において、ウエスタンブロットで解析した。5) ストレス刺激によるアポトーシス誘導における CD45 フォスファターゼ阻害剤 vanadate あるいは src キナーゼ阻害剤 PP2 の効果を検討した。

C. 研究結果

CD45+U-266 細胞で有意に遺伝子発現が亢進していたものが少なくとも 25 個の遺伝子で確認された。その中でミトコンドリア膜局在の VDAC-1 に注目した (図-1)。CD45+未熟型骨髄腫細胞は、H₂O₂, UV 照射、血清除去、ER ストレス (Thapsigargin 処理) 等のストレス刺激に対して CD45-細胞よりも明らかにアポトーシス感受性が亢進していた (図-2)。化学療法剤の中では、メルファランには高感受性であったが、サリドマイドには感受性がなかった (表-1)。CD45+未熟型骨髄腫細胞のアポトーシス高感受性の機序として、ストレス処理後ミトコンドリアからの cytochrome C 遊離の亢進、caspase 9, caspase 3 の活性化が確認され、確かにミトコンドリアを介するアポトーシス亢進であった。このアポトーシス亢進作用は、vanadate あるいは PP2 処理で抑制された。

D. 考察

AL アミロイドーシスの多くは骨髄腫に合併するものであり、骨髄腫の発症および進展を抑制することは、AL アミロイドーシスの治療として極めて重要である。骨髄腫の発症および進展には、これまでの研究により未熟型骨髄腫細胞の増加が関与していると考えられる。本年度の研究結果により、増殖因子 IL-6 に直接的に反応して増殖する CD45+未熟型骨髄腫細胞が、ミトコンドリア膜に局在する VDAC-1 の発現を亢進しており、ストレス刺激によりこの VDAC-1 からの cytochrome C 遊離が亢進することでアポトーシスの感受性が高まっている可能性が示唆された。また、CD45+未熟型骨髄腫細胞は、化学療法剤の中でメルファランに高感受性であったが、サリドマイドに感受性がなかったことも、今後の骨髄腫および AL アミロイドーシスの治療戦略として大切な結果である。

E. 結論

1. CD45+未熟型骨髄腫細胞に発現上昇している遺伝子として VDAC-1 遺伝子を同定した。
2. CD45+未熟型骨髄腫細胞は、血清除去、H₂O₂ 処理、UV 照射、ER ストレスおよび化学療

法剤処理で明らかに CD45-細胞よりもアポトーシス高感受性であった。

3. アポトーシス高感受性の機序として、ミトコンドリアを介するアポトーシス亢進であった。
4. CD45 フォスファターゼ阻害剤 vanadate および src キナーゼ阻害剤 PP2 はアポトーシス高感受性を抑制した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Obata N, Kawano MM: receptor synergy of interleukin-6(IL-6) and insulin-like growth factor-I in the IL-6 receptor α highly expressing myeloma cells. Blood (in press, 2004)

2) Tsuyama N, Ishikawa H, Abroun S, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Obata M, Kawano MM: The regulatory mechanism of IL-6-dependent proliferation of human myeloma cells. Hematology 8:409-411, 2003.

2. 学会発表

1) 河野道生: 多発性骨髄腫の臨床: MGUS から myeloma まで 教育講演、第 45 回日本臨床血液学会総会、大阪、2003 年 8 月 29 日

2) Kawano MM, Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Obata M: Phenotypic heterogeneity of myeloma cells and its biological significance. (invited speaker) 9th International Workshop of Multiple Myeloma, Salamanca, Spain, May 23-27, 2003.

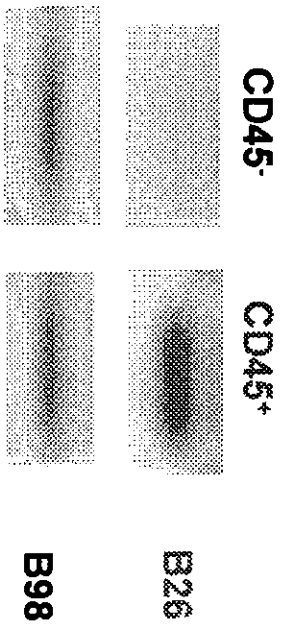
3) Liu S, ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Obata M, Kawano MM: CD45+ myeloma cells accompanied by VDAC-1 expression are sensitive to apoptosis. 45th annual meeting of American Society of Hematology, San Diego, U.S.A., December 6-9, 2003.

H. 知的所有権の取得状況

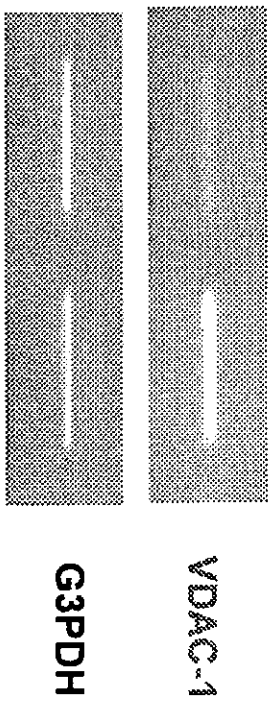
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

VDAC-1 is highly expressed in CD45+ immature myeloma cells

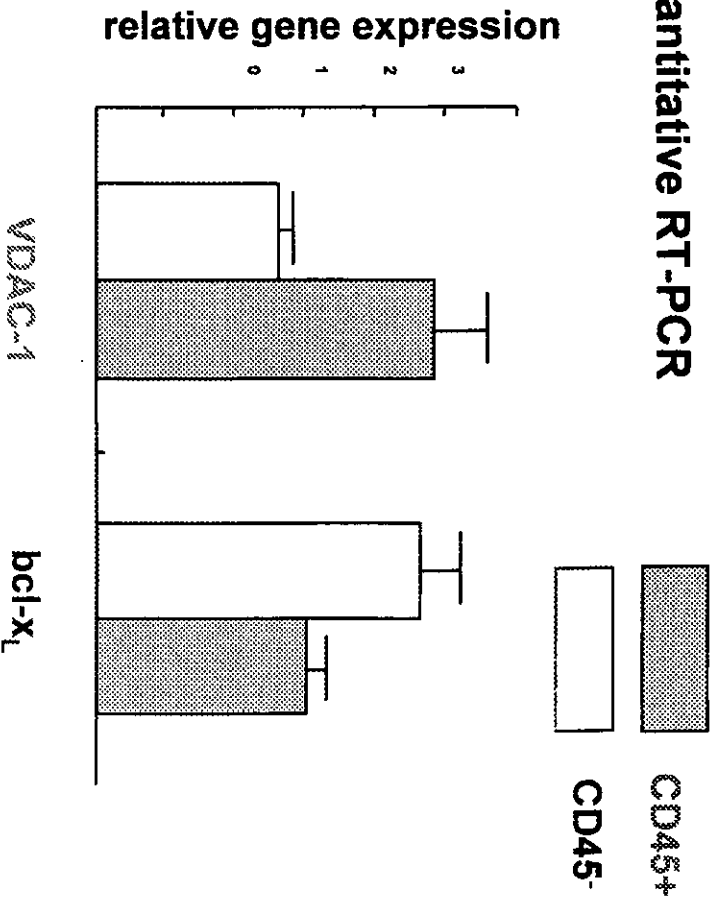
A: cDNA subtraction and differential screening



B: RT-PCR



D: quantitative RT-PCR



C: Mitochondrial expression

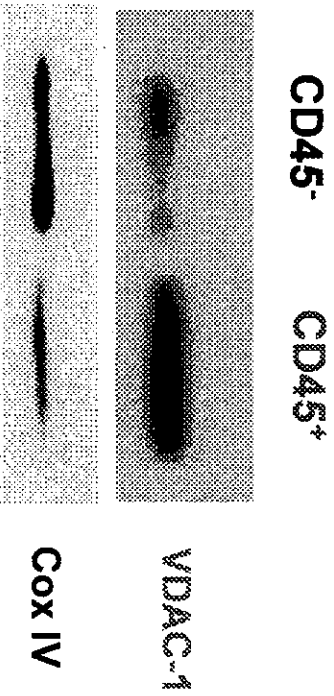


図-1 CD45+未熟型骨髄腫細胞で VDAC-1 遺伝子の発現が亢進している。

A. PCR-based subtraction 法で CD45+細胞で発現上昇している遺伝子として VDAC-1(B26)遺伝子の同定。B. RT-PCR による確認。C.ミトコンドリア分画での発現亢進。D. 定量 PCR による確認。

CD45⁺ U266 cells was sensitive to oxidative stress (H₂O₂ 0.1 μM)

12h

24h

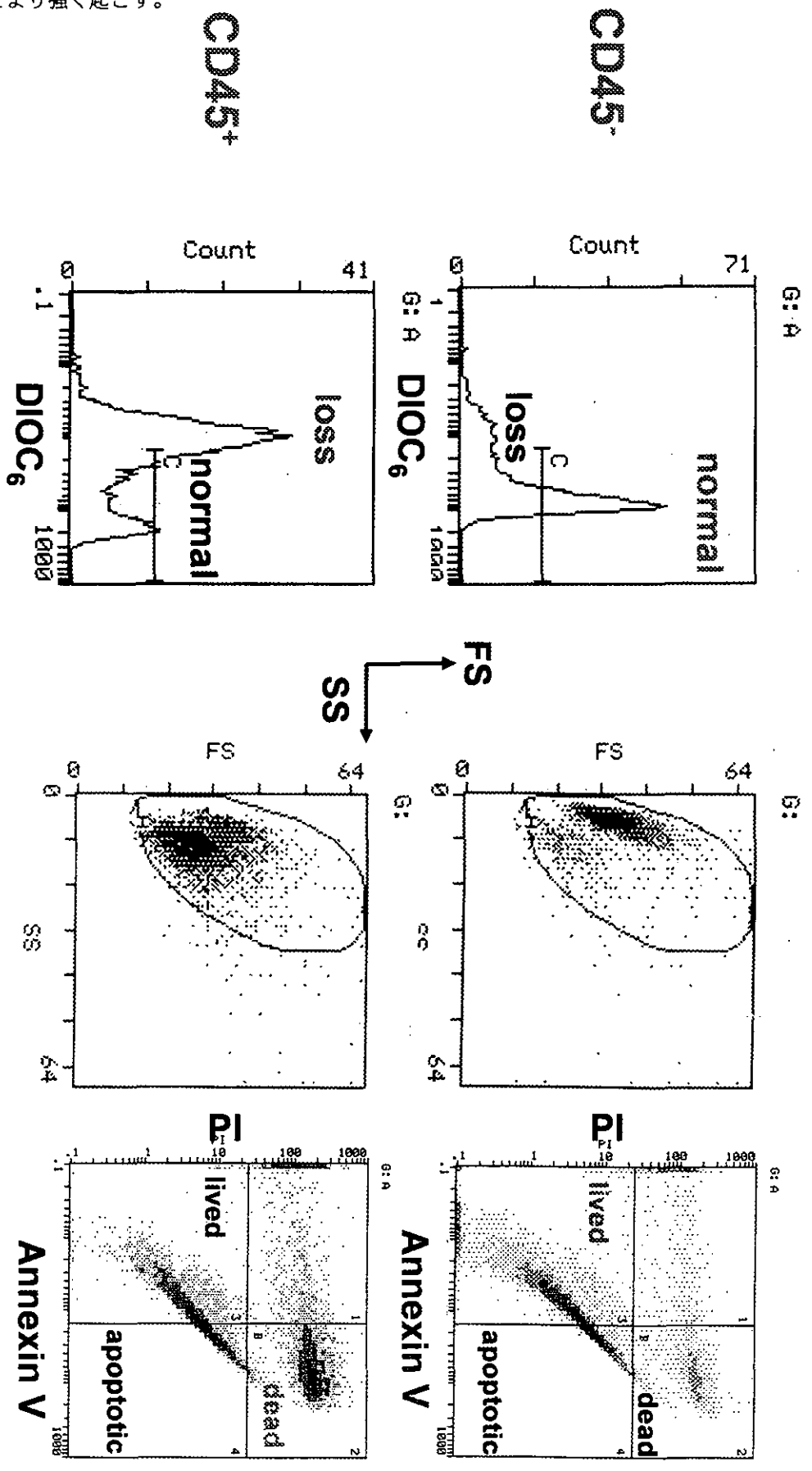


図-2 CD45+未熟型骨髓腫細胞におけるストレス高感受性。
 CD45+U-266 細胞は、H₂O₂ 処理によりミトコンドリア膜電位 (mitochondrial membrane potential)の低下、生存率(cell viability)の低下(FS/SS, Annexin V/PI staining)をより強く起こす。

Mitochondrial membrane potential Cell viability

Effects of apoptotic stimuli in CD45⁻ and CD45⁺ 266 cells

	CD45 ⁻ U266	CD45 ⁺ U266
Serum Depletion	+	++
Oxidative stress (H ₂ O ₂)	+	++
UV Irradiation	+	++
Heat Shock	+	++
Hypertonic Condition	+	+
Melphalan	+	++
Doxorubicin	+	+
Dexamethason	-	-
IFN- γ	+	++
IFN- α	-	-
PMA	+	+
Ionomycin	+	+
Fas Antibody	-	-
Trail	-	-
Thalidomide	-	-
TG	+	++
Tunicamycin	-	-
ATRA	-	-
As ₂ O ₃	+	++

-:Resistant. +:Sensitive. ++ More sensitive

表-1 CD45⁻と CD45⁺未熟型骨髓腫細胞における各種ストレス刺激に対するアポトーシス感受性

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

AL アミロイドーシスに対する siRNA 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 宮地佐栄*、中村聡子*、見田裕章*、吉本 満*、石田禎夫*
 札幌医科大学医学部、*第一内科

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) および short interference RNA(以下 siRNA)による L 鎖産生抑制について検討した。

骨髓腫細胞株 RPMI8226 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 AS-ODN および siRNA を作成し、培養細胞に導入した。AS-ODN、siRNA ともに導入細胞では、上清中の λ 鎖濃度の低下が認められたが、siRNA の方が少量でより λ 鎖産生抑制されることが示唆された。

A. 研究目的

我々は、高用量の抗癌剤投与が困難な例であっても、アミロイド原性 L 鎖の産生を抑制する手段として、アンチセンス DNA による治療の可能性を検討してきた。そして、患者骨髓液や末梢血から、単クローン性 L 鎖をクローニングし、さらに CDR 領域を標的として作成したアンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-ODN)を用いて、in vitro および in vivo において L 鎖の産生が抑制されることを示した。

RNA interference は二本鎖 RNA が引き金となっておこる配列特異的な遺伝子の発現抑制機構であり、標的 mRNA の分解を伴うことを特徴とする。この現象は高等動物の細胞においては、インターフェロンなどが誘導され、特定の遺伝子発現を抑えるのには向かないと思われていたが、合成した siRNA を細胞に導入すると RNA interference を起こしえることが、近年明らかになった。この siRNA は、AS-ODN よりも少量で高い効果が期待できるとされており、今回我々は AS-ODN と同様に siRNA を用いて in vitro における L 鎖産生抑制効果を検討した。

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 および siRNA の導入
 RPMI 8226 の λ 鎖塩基配列を基に、相補性決定領域 (complementarity determining region: CDR) 1, 2, 3 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。

さらに CDR 2, 3 において、AS-ODN に対応した部位にそれぞれ 21, 20 塩基の長さの siRNA を作製した。コントロールは、Non-specific Control XI (DHARMACON 社)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。

C. 研究結果

1. 骨髓腫細胞株における V λ mRNA の増幅

骨髓腫細胞株 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 \sim 4、CDR-1 \sim 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。