

ビンスワンガー病と診断した。1985年8月肺炎で死亡(87歳)。遺伝子検索は実施していない。

## B. 研究方法

剖検脳脊髄について、病理組織学的、免疫組織化学的に検討した。

## C. 研究結果

肉眼的所見：脳重 1220 g。脳動脈に硬化はなかった。ホルマリン固定脳の前額断スライスで、側頭葉萎縮、脳室拡大、大脳半球の広範な不全軟化と中小梗塞、基底核と視床のラクナ状態、橋底部の萎縮を認めた。

組織学的所見：脳と脊髄のKB染色(図2)で、皮質厚はほぼ保たれていたが、大脳白質はU線維を残して広範な脱髄所見を認め、その中に小梗塞が散在していた。橋底部は萎縮し、小梗塞が多発していた。延髄錐体と脊髄側索は淡明化していた。

HE染色標本(図3a)で、大脳皮質には円形でコアを欠くCWP様の大きな老人斑が多発していた。これらは、コンゴ赤染色(図3b)と嗜銀染色(図3c)では淡く染色され、免疫組織学的に、Aβ強陽性(図3d)、AT8弱陽性であった。その一部は中心部にアミロイドアンギオパチーが存在し、いわゆる plaque-like angiopathy あるいは(drüsig Entartung, (Scholz)<sup>4)</sup>の形状を示した(図4)。CWPと plaque-like angiopathy は、小脳皮質にも多数が認められた。典型的老人斑はほとんど認めなかった。髄膜血管と大脳皮質の小血管には多数のアミロイドアンギオパチーが認められ、コンゴ赤染色とAβ染色では強陽性であった。NFTは大脳皮質に広範に出現していた。

## D. 考察

本例の大脳皮質には多数のNFTとCWPが認められ、これらに関してはプレセニリン-1遺伝子異常(PS1-Δ9)による家族性アルツハイマー病に非常によく似た所見であった<sup>1) 2)</sup>。この他に、ビンスワンガー病様の広範な大脳白質の脱髄と小梗塞散在、橋の萎縮と小梗塞多発という血管性痴呆に合致する所見も認められた。プレセニリン-1遺伝子変異(PS1-Δ9)家族性アルツハイマー病

に記載されているような延髄錐体と脊髄側索の脱髄も認められたが、これらは原発性変性よりも大脳白質変性や橋底部の多発小梗塞による二次変性である可能性が高い。

Leら<sup>3)</sup>は、顕著なアミロイドアンギオパチーと白質脳症を伴った孤発性晩発性アルツハイマー病患者17例の脳病理所見を再検討した結果、3例にCWPを認めた。このうち、87歳女性例ではCWP優位であったが、他の2例では典型的老人斑やび慢性老人斑に混じってCWPが認められた。広範な大脳白質変性も認められたが、錐体路変性は顕著な例と欠く例とがあった。

一方、本例では、血管との関連性を有する巨大な plaque-like angiopathy が大脳と小脳の皮質に多数認められ、これとCWPが老人斑のほとんどを占めた。このような所見は、これまでに報告されているプレセニリン-1遺伝子変異の家族性アルツハイマー病やCWPが出現する孤発性晩発性アルツハイマー病の症例には記載されていない<sup>1) 2) 3)</sup>。本例では、CWPと plaque-like angiopathy の出現部位も形状は共通していたので、両者間には密接な関連があることが推定される<sup>5)</sup>。一方、plaque を伴わない通常のアミロイドアンギオパチーと plaque-like angiopathy では、コンゴ赤に対する染色性は異なっていたので、この両者間では沈着しているAβの性状や成因は同一ではない可能性がある。

アルツハイマー型痴呆に出現する白質脳症については、大脳皮質の神経細胞変性脱落に起因する二次的変性であるとする説と血管性要因によるものであるとの説がある<sup>6)</sup>。本例では過去に高血圧の既往があり、臨床的に偽性球麻痺や強制泣きのような血管性痴呆に特徴的な症状を伴い、大脳白質や橋に小梗塞やラクナ梗塞を認めたので、ビンスワンガー病と考えたが、皮質変性に続発した可能性も否定はできない。ビンスワンガー病の成因は、白質を灌流する髄質動脈硬化による慢性虚血と考えられている。本例ではアミロイドアンギオパチーは髄膜と皮質の小動脈に限られ、白質動脈には認められなかったが、アミロイドアンギオパチーが何らかの関与をしている可能性がある。

このように、本例は臨床的にはビンスワンガー

病を示唆するものであったが、病理学的はアルハイマー病病変とビンスワンガー病類似の白質病変を認め、さらに多数の CWP と plaque-like angiopathy を伴っていた。今後、このような症例を蓄積し、臨床症状の特徴、CWP や plaque-like angiopathy の成因、白質病変の成因などを検討する必要がある。

#### E. 結論

CWP はプレセニリン-1 遺伝子変異による家族性アルツハイマー病に特有のものではない。本例では、CWP、plaque-like angiopathy、アミロイドアンギオパチー、ビンスワンガー型白質脳症は密接な関連をもっていると考えられた。

#### 文献

- 1) Crook R, Verkkoniemi A, Perez-Tur J, et al. Nature Med 2000;4:452-455
- 2) Verkkoniemi A, Somer M, Rinne JO, et al. Neurology 2000;54:1103-1109
- 3) Le TV, Crook R, Hardy J, Dickson DW. J Neuropathol Exptl Neurol 2001;60:1051-1061
- 4) Sholz W. Z Ges Neurol Psychiat 1938;162:694-715

5) Miyakawa T, Shimoji A, Kuramoto R, Higuchi Y. Virchows Arch [Cell Pathol] 1982; 40:121-129

6) Brun A, Englund E. Ann Neurol 1986; 19:253-262

#### 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

1) Kuzuhara S, et al : Cotton wool palaeques, plaque-like angiopathy, neurofibrillary tangles and leukoencephalopathy in a Japanese man clinically presenting with Binswanger's disease. The9th International Conference on Alzheimer'd disease and Related Disorders, Philadelphia, July 17-22, 2004 に応募

#### 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 脳CT

脳室拡大と白質の低吸収域、および基底核の小梗塞を認める。

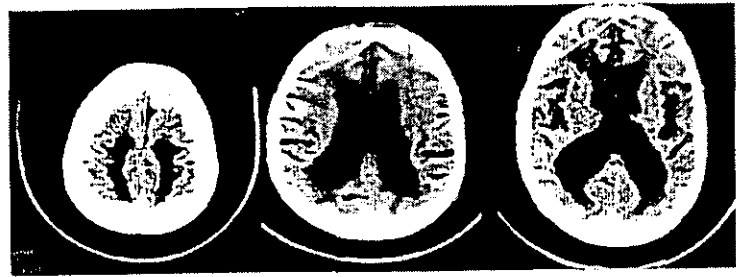


図2 髄鞘染色標本 (KB染色)

2 a. 大脳白質の淡明化とU線維の保存、小梗塞多発、2 b. 海馬萎縮は軽度、2 c. 橋底部の萎縮と小梗塞多発、2 d. 延髄錐体の淡明化、2 e. 脊髓錐体の淡明化。

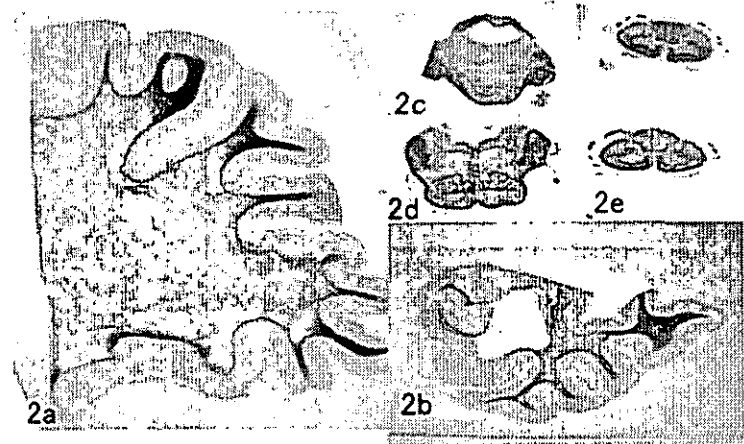


図3 側頭葉皮質に多発する cotton wool plaque の各種染色所見

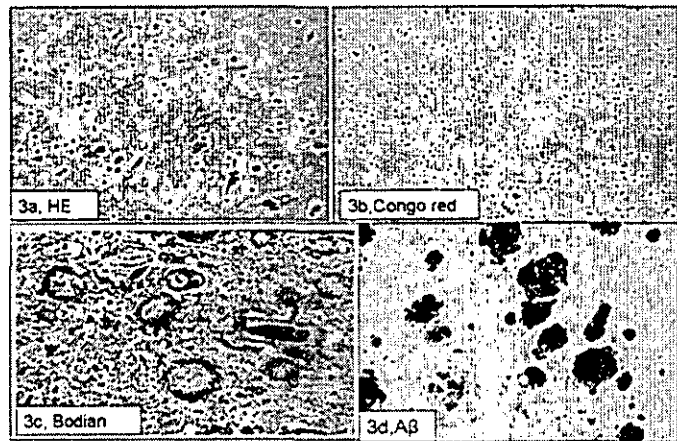
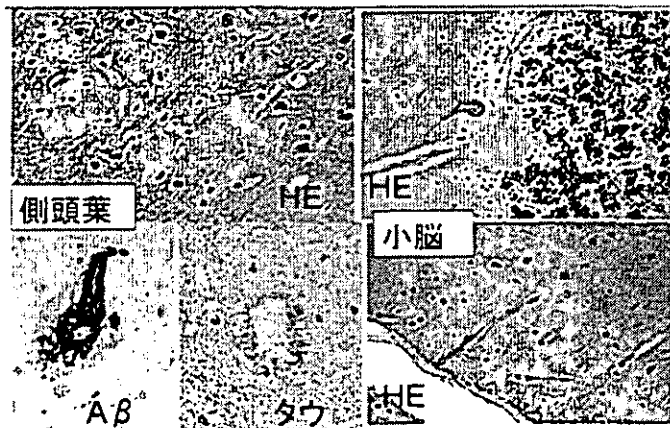


図4 側頭葉と小脳の plaque-like angiopathy の各種染色所見



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

アミロイドーシス研究の観点から見たプリオン病研究

分担研究者 水澤英洋 東京医歯大大学院脳神経機能病態学

共同研究者 坂口末廣<sup>1</sup>、堀内基広<sup>2</sup>、金子清俊<sup>3</sup>、村本 環<sup>4</sup>、毛利資郎<sup>5</sup>、佐伯圭一<sup>6</sup>、  
 袖山信幸<sup>7</sup>

1 長崎大学大学院感染分子病態学、2 北海道大学大学院獣医学研究科、3 国立精神神経センター神経研究所疾病研究第7部、4 東北大学大学院創生応用医学研究センター、5 九州大学大学院実験動物学、6 東京大学大学院農応用免疫学、7 東京医歯大学大学院脳神経機能病態学

研究要旨 プリオン病はアミロイドーシスの一つであり、その研究とアミロイドーシス一般の研究とは相互に周知しあい、また協力しあうことでより大きな相乗的効果が得られるものと期待される。本研究ではそのためにプリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班における研究成果をアミロイドーシス班において報告し種々意見交換を行った。具体的には、プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班会議抄録集を配布して全ての研究を紹介するとともに、とくに基礎的研究を中心に口演にて解説し討議を行った。共同研究の推進など今後の成果が期待される。

A. 研究目的

プリオン病は、異常プリオン蛋白を介して伝播する特異な疾患であるが、アミロイドが沈着する点は他のアミロイドーシスと共通している。さらに、アミロイドーシス進行の機序としてアミロイド線維の自体が起点となること、沈着修飾因子が想定されること、宿主の遺伝性要因が関与すること、プリオン病以外のアミロイドーシスも実験的に伝播できる可能性あること等、病態メカニズムにも類似点が多く見られる。本報告の目的は、プリオン病研究班における成果を紹介しアミロイドーシス研究の発展に寄与することである。

B. 研究方法

本年度のプリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班の研究成果より、アミロイドーシス研究と関連が深いものやその方面へ発展が見込める研究を紹介した。

C. 研究結果、D. 考察

坂口らは2種類のマウス順応プリオン株である Chandler株及び22L株の持続感染細胞を用いて異

種(ハムスター、ヒト)のプリオン蛋白及び単一アミノ酸変異を有するマウスプリオン蛋白を感染細胞に遺伝子導入し、それらの異常型への変換とマウスプリオン蛋白に対する変換抑制効果について検討し、Q185RとQ218Kのマウスプリオン蛋白は、それぞれの感染細胞にて異なる変換効率及び抑制効果を呈し、プリオン株特異的な変換機構が存在することを示唆した。

堀内らは従来の方法より8-10倍の感度を持つ異常プリオン蛋白検出システムを独自に開発し、その感度と試料調整法による違いを動物脳を用いて検討した。金子らは、正常プリオン蛋白の生理的切断部位は、異常プリオン蛋白立体構造の鍵となるβシート領域と重なり、しかも極めて疎水性の高い部分に位置するため、正常プリオン蛋白分解酵素がアクセスする際及び異常プリオン蛋白への変換の際に、何らかの分子シャペロン様分子の関与が示唆されることから、正常に folding された分子を認識し、それを unfold する活性を検出する系を出芽酵母を用いて確立し検討した結果、actin-interacting protein 2 の oligomeric form である unfoldin を新たに同定

し、F-actin への作用を ATP 存在の有無による違い等の観点から詳細に検討した。

村本らはglycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーを欠く分泌型変異プリオン蛋白を発現するトランスジェニックマウスを作製、プリオン接種により脳組織内に蛋白分解酵素耐性の分泌型プリオン蛋白の蓄積と多数のプリオン蛋白アミロイドの沈着を認めた。一方、びまん性の異常プリオン蛋白の沈着や海綿状変性は乏しく、マウスは接種後400-500日以上神経障害症候を呈することなく生存可能であった。したがって、GPIアンカーはプリオン蛋白異常化、プリオン形成・アミロイド形成には必要なく、異常プリオン蛋白による神経変性惹起に重要であると思われた。

毛利らはヒト型プリオン蛋白を産生するノックインマウスを作製し、硬膜移植後Creutzfeldt-Jakob病のプラーク型のプリオンを接種することにより、濾胞樹状細胞への異常なプリオン蛋白沈着と脳内接種による伝達を確認し、硬膜移植後Creutzfeldt-Jakob病は2タイプとも感染性のプリオン病であることが明らかになった。

佐伯らは、プリオン蛋白のアポトーシス抑制機能部位についてプリオン蛋白遺伝子欠損不死化神経細胞株にN末端のオクタリピート領域や疎水性領域などを欠失したcDNAを導入しアポトーシス抑制が認められないことを示し、プリオン蛋白のアポトーシス抑制効果にはオクタリピート領域だけでなく疎水性領域も重要であることが示唆された。

## E. 結論

これらのプリオン蛋白とその代謝や異常化に関する研究は、種々のアミロイド蛋白が重合して発症すると考えられているアミロイドーシスの研究と相互に関連する側面が多く、両研究班の今後のさらなる協力と発展が期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Atarashi R, Nishida N, Shigematsu K, Goto S, Kondo T, Sakaguchi S, Katamine S. Deletion of

N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-deficient mice from PrP-like protein/Doppel-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* 278: 28944-28949, 2003

- 2) Kim C-L, Umetani A, Matsui T, Ishiguro N, Shinagawa M, Horiuchi M. Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology* 320:41-52, 2004
- 3) Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y. Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. *Biophys J* 85:1176-1185, 2003
- 4) Taguchi Y, Mohri S, Ironside JW, Muramoto T, Kitamoto T. Humanized knock-in mice expressing chimeric PrP showed varied susceptibility to different human prions. *Am J Pathol* 163:2585-2593, 2003
- 5) Satoh K, Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Ironside JW, Nagashima K, Yamada M, Sato T, Mohri S, Kitamoto T. Association of an 11-12kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases. *J Gen Virol* 84:2885-2893, 2003
- 6) Sakudo A, Lee D-C, Saeki K, Nakamura Y, Inoue K, Matsumoto Y, Itohara S, Onodera T. Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 308:660-667, 2003

### 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

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

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

分担研究者 前田秀一郎 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・生化 1  
 共同研究者 Lan Wei\*、伊藤禎洋\*\*、Xiaoying Fu\*\*\*、樋口京一\*\*\*、  
 河野裕夫\*\*\*\*、Dan Cui\*\*\*\*、石原得博\*\*\*\*、徳田隆彦\*\*\*\*\*、  
 山村研一\*\*\*\*\*  
 \*山梨大学大学院医学工学総合研究部・生化 1、\*\*山梨大学・総合分析実験  
 センター、\*\*\*信州大学・大学院・医学研究科加齢生物学、  
 \*\*\*\*山口大学・医・構造制御病態学、\*\*\*\*\*信州大学・医・第三内科学、  
 \*\*\*\*\*熊本大学・発生医学研究センター

研究要旨 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) type I 患者由来のトランスサイレチン (TTR) から成るアミロイド線維 (ATTR) 画分が、ATTR の沈着を *in vivo* で促進するかどうかを明らかにするため、FAP type I の病因となるヒト変異 *ttr* 遺伝子を選び、高齢になるとヒト ATTR を種々の臓器に沈着する FAP のトランスジェニックマウスモデルに FAP type I 患者の心臓由来の ATTR 画分を投与した。この結果、ヒト ATTR 画分を投与したマウス全てで種々の臓器にアミロイドの沈着を認めたが、蒸留水のみを投与した 5 匹の対照マウスには認めなかった。しかし沈着したアミロイドは、抗マウス AApoAII 抗体とのみ結合し、抗ヒト TTR 抗体とは結合しなかった。本実験により、AApoAII 沈着が ATTR により促進されること、また ATTR は、AApoAII に比べ、ATTR による沈着促進効果が低いことが明らかとなった。本実験結果から、外来 ATTR の摂取により FAP の発症が促進される可能性は、極めて低いと考えられる。

A. 研究目的

アミロイドーシスは、高齢者における種々の臓器の機能障害を惹起しており、患者数は今後益々増加すると予想される。しかし、未だその発症機構の詳細は不明で、安全で確実な治療法は無い。一方、FAP の病因は、*ttr* 遺伝子の変異であるが、発症には、主因となる *ttr* 遺伝子変異のほか、老化、環境因子や他の蛋白質が関与すると考えられる。これら因子を同定できれば、発症時期を遅らせることができるであろう。また、狂牛病やクロイツフェルトヤコブ病の感染源の病的プリオンもアミロイドに分類され、 $\beta$  構造を多く含んだアミロイド線維様の異常プリオン蛋白質による発症促進効果に基づく感染機構が注目され

ている。同様に、アポリポ蛋白、ApoA-II がアミロイドを形成して沈着するマウス老化アミロイドーシスモデルにおいても ApoA-II アミロイド線維 (AApoAII) やヒトのアミロイド線維によるアミロイドーシスの経口感染の可能性が報告されている。従って、種々のアミロイドーシスを予防または治療する手立てを開発すること、また、ヒトのアミロイドーシスでも種々のアミロイドの摂取により、発症が促進されるかどうかを明らかにすることは、喫緊の研究課題と考えられる。

そこで本研究では、FAP 患者由来のヒト TTR から成るアミロイド線維 (ATTR) 画分が、ATTR の沈着を *in vivo* で促進するかどうかを明らかにすることを目的に遂行する。このため、FAP の

病因となるヒト変異 *ttr* 遺伝子を運び、高齢になるとヒト ATTR を種々の臓器に沈着する FAP のトランスジェニックマウスモデルに FAP 患者の心臓から抽出した ATTR 画分を投与して、ATTR による ATTR 沈着促進効果を調べた。

## B. 研究方法

本来の 5'上流領域 6kb を含むヒト変異 *ttr* 遺伝子 (Val30Met 点変異をもつ *ttr* 遺伝子) を運ぶ FAP のトランスジェニックマウスモデルと我々が作製した無 TTR マウスの交配により、FAP のモデルマウス株を作製した。これらマウスにおける内在性の *ttr* 遺伝子型は、*ttr*<sup>+/+</sup>、*ttr*<sup>+/-</sup>、*ttr*<sup>-/-</sup> と様々だが、これらのマウスで、ATTR の沈着時期や程度に差異が無いことを先に見出している。マウス血中のヒト TTR 量は抗ヒト TTR 抗体によるウェスタンブロット法で決定した。

8~13 カ月齢のこれらマウス 9 匹に、FAP type I 患者心臓から抽出した ATTR (Val30Met 点変異をもつ TTR 由来)画分を 1mg/ml の濃度で含む蒸留水、0.1ml を尾静脈から 1 回注入した。対照群として、同月齢の FAP のモデルマウス 9 匹に蒸留水のみを 1 回注入した。注入 4 カ月後あるいは 12 カ月後にこれらマウスを解剖し、全身種々の臓器のアミロイド沈着を、コンゴ赤染色組織標本を偏光顕微鏡下で観察する方法で検索した。沈着アミロイドの主成分は、抗ヒト TTR 抗体、抗マウス AA 抗体、抗マウス AApoAII 抗体を用いて免疫組織化学的手法で同定した。

本研究での動物実験は、山梨大学総合分析実験センターの実験指針に基づき、実験計画ごとに事前に委員会による審査を受け、承認されており、動物愛護の観点から倫理的に問題は無いと考えられる。

## C. 研究結果

まず、FAP type I 患者心臓から抽出した ATTR の性状を、電子顕微鏡、SDS-PAGE 法およびウェスタンブロット法で解析し、主成分がヒト ATTR であることを確認した。次にこの ATTR 画分 0.1mg を、8~13 カ月齢の上記 FAP のモデルマウス 9 匹に、尾静脈から注入した。対照群として、同月齢の FAP のモデルマウス 9 匹に蒸留水のみを

注入した。これら実験に用いた 18 匹のマウス血中のヒト TTR 濃度をウェスタンブロット法で調べたところ、ほぼ等しく、平均値は、27 ± 4.9 mg/dl であった。

まず、注入 4 カ月後に、13 カ月齢でヒト ATTR 画分を投与したマウス 4 匹と蒸留水のみを投与した同月齢の 4 匹の対照マウスを解剖し、全身種々の臓器のアミロイド沈着を調べたが、8 匹の何れにも沈着を見出せなかった。また、他の研究グループが作製した FAP のモデルマウスで報告されている、コンゴ赤で染色されない、非線維性の TTR の沈着も認めなかった。そこで残りの 10 匹を、ヒト ATTR 画分あるいは蒸留水のみを投与後、12 カ月で解剖してアミロイドの沈着を調べた。この結果、ヒト ATTR 画分を投与した 5 匹の全てで種々の臓器にアミロイドの沈着を認めた。一方、蒸留水のみを投与した 5 匹の対照マウスの何れにも沈着を認めなかった (表 1)。沈着したアミロイドの主成分を明らかにするために、抗ヒト TTR 抗体、抗マウス AA 抗体、抗マウス AApoAII 抗体を用いて免疫組織化学的手法で解析した。この結果、ヒト ATTR を注入した 5 匹のマウス全てで、アミロイドは AApoAII 抗体とのみ結合し、抗ヒト TTR 抗体や抗マウス AA 抗体とはしなかった (表 1)。さらに、何れのマウスにも非線維性の TTR の沈着も認めなかった。

## D. 考察

本実験で我々は、8~13 カ月齢の FAP のモデルマウスに、FAP type I 患者の心臓から抽出した ATTR 画分 0.1mg を尾静脈から 1 回注入した。この結果、ヒト ATTR 画分は、ATTR ではなく、AApoAII の沈着を促進した。本実験結果は、AApoAII 沈着が ATTR により促進されること、また ATTR は、AApoAII に比べ、ATTR による沈着促進効果が低いことを示している。

ATTR は、四量体の異型 TTR が単量体に解離して生じた立体構造の変化した単量体が重合して形成されると考えられている。従って ATTR 沈着においては、TTR 四量体の単量体への解離に長時間を要するために、ATTR を投与しただけでは、ATTR の沈着を促進できなかったと考えられる。

## E. 結論

AApoAII 沈着が ATTR により促進されること、また ATTR は、AApoAII に比べ、ATTR による沈着促進効果が低いことを見出した。本実験結果から、ATTR の沈着が、ATTR により促進される、すなわちアミロイド線維の摂取による伝播が、FAP の発症を促進している可能性は、極めて低いと考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 前田秀一郎：家族性アミロイドポリニューロパチー. 別冊・医学のあゆみ 疾患モデル動物—病因解析での役割と限界 pp. 60-64, 2004.
- 2) Maeda S: Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. *Amyloid: J. Protein Folding Disord*, 10 (Suppl 1) : 17-20, 2003.
- 3) Kato G, Maeda S: Production of mouse ES cells homozygous for Cdk5-phosphorylated site mutation

in *c-src* alleles. *J Biochem*, 133 : 563-9, 2003.

- 4) Nakamura M, Ando Y, Nagahara S, Sano A, Ochiya T, Maeda S, Kawaji T, Ogawa M, Hirata A, Terazaki H, Haraoka K, Tanihara H, Ueda M, Uchino M, Yamamura K: Targeted conversion of the transthyretin gene in vitro and in vivo. *Gene Therapy*, *in press*.

### 2. 学会発表

- 1) 伊藤禎洋, 手塚英夫, 岡田芳家, 玉置寿男, 大森弘子, 坂本美穂子, 尾崎由基男, 神庭重信, 山村研一, 前田秀一郎: 血清アミロイド P 成分 (SAP) の欠損は、自己免疫疾患を惹起しない 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 10 日 ~13 日, 2003 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



表 1. FAP モデルマウスでのアミロイド沈着

ATTR 注入時 の月齢	遺伝子型 ( <i>ttr</i> )	ATTR 注入	AApoAII 沈着	ATTR 沈着
11	-/-	+	+	-
11	-/-	-	-	-
11	+/-	+	+	-
11	+/-	+	+	-
11	+/-	-	-	-
9	+/+	+	+	-
9	+/+	-	-	-
8	-/-	+	+	-
8	-/-	-	-	-
8	-/-	-	-	-

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

中枢神経系に主病変を有する TTR アミロイドーシスの生化学的検討

分担研究者 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  
 共同研究者 三橋成輝、池田修一 信州大学第三内科  
 安東由喜雄 熊本大学臨床検査医学  
 清水優子 東京女子医大神経内科

研究要旨 主として髄膜に TTR アミロイドが沈着する meningeal-type TTR アミロイドーシスのうち、本邦で診断された 3 症例(Asp18Gly, Ala25Thr, Tyr114Cys)を中心に臨床的および生化学的な検討を行った。これら 3 症例の臨床症状および中枢神経系以外へのアミロイド沈着の程度は変異によって異なっていたが、共通する所見として、髄液蛋白濃度の著明な増加、および脳・脊髄 MRI での髄膜の広汎な enhancement が認められた。meningeal-type TTR アミロイドーシス症例では、血清中 TTR の質量分析法では変異 TTR が検出されなかった。一方、髄液中では微量ながら変異 TTR が検出された。さらに、meningeal-type TTR アミロイドーシス症例では血清中の TTR tetramer fraction に変異 TTR が検出されず、これらの変異 TTR は TTR tetramer の形成に参加できない可能性が示唆された。また、このような TTR 分子の tetramer 形成能が meningeal-type の表現型発現に関与していることが推測された。

A. 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチーの原因遺伝子であるトランスサイレチン(TTR)遺伝子については、これまで 80 を超える変異が報告されている。最も頻度の高い Val30Met 変異では末梢神経障害を主症状として全身の諸臓器にアミロイド沈着を認めるが、一部の TTR アミロイドーシスには、主として髄膜にアミロイドが沈着する表現型を呈する変異型が存在する。このような meningeal type TTR アミロイドーシスの臨床的な特徴およびその特異なアミロイド沈着の発症機序を明らかにする目的で、本邦で診断された変異型を中心にその臨床症状、画像所見、髄液中および血清中 TTR の生化学的性質を検討した。

B. 研究方法

1. 対象

meningeal-type および non meningeal-type TTR アミロイドーシスとして以下の TTR 変異を有する患者を対象とした。

1)meningeal-type TTR :

本邦で報告された 3 種類の変異型をそれぞれ有する 3 症例(Asp18Gly、Ala25Thr、Tyr114Cys)、および米国の meningeal-type TTR アミロイドーシス家系(Val30Gly、Tyr69His)の症例。

2)non meningeal-type :

Ala25Ser、Val30Leu、Val30Met、Asp38Ala、Ser50Arg、Thr60Ala、Tyr69Ile、Tyr114His の各変異 TTR を有する症例。

2. 方法

1)臨床的検討

本邦で報告された 3 種類の変異型(Asp18Gly、Ala25Thr、Tyr114Cys)を有する 3 症例の meningeal type の臨床像と脳・脊髄の MRI 所見を比較検討した。

2)生化学的検討

①対象患者の髄液 100  $\mu$ l、血清 20  $\mu$ l をそれぞれ抗ヒト TTR 抗体(DAKO)で免疫沈降させ、MALDI/TOF 型質量分析計で解析した(IP-Mass 分析)。これにより血清および髄液中の変異/正常 TTR の存在比について検討した。②Asp18Gly、

Ala25Tyr、Tyr114Cys の各変異を有する患者 3 名の Val30Met 患者血清中から HiPrep Sephacryl S-200HR カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより TTR の tetramer fraction を分離して、この fraction 中に含まれる TTR について①と同様に IP-Mass 分析により検討した。

### 3. 倫理面への配慮

今回の研究で対象とした患者は全て成人の FAP 発症者で信州大学第三内科あるいは共同研究者の医療施設を受診した患者である。また被検者から血液あるいは髄液を採取するにあたっては、信州大学の倫理委員会承認された方式に従って、実験の目的と方法の十分な説明を行い informed consent を得た後に検体の採取を実施した。

## C. 研究結果

### 1. 臨床的検討

今回検討した3種類の変異型(Asp18Gly、Ala25Thr、Tyr114Cys)を有する3症例の臨床症状のまとめを表1に示す。各症例の臨床症状については、Asp18Gly患者は、めまい、失神発作を主症状として明らかな末梢神経障害の症状・所見はなかった。Ala25Thr患者は深部感覚障害による不安定歩行を主症状として腱反射の減弱、四肢の異常感覚などの症状から当初はCIDP (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy) が疑われた。Tyr114Cys患者は自律神経障害をとまなう多発神経炎症状が前景に立ち、そこに脳神経障害および中枢神経系の血管障害が合併していた。以上のように患者の臨床像はTTR変異の違いにより変異型ごとに異なっていた。また、Ala25Thr患者ではこれまでにを行った生検組織の検索で髄膜以外の部位にアミロイド沈着を認めないのに対して、Asp18Gly、Tyr114Cys患者では髄膜以外の臓器にもアミロイド沈着を認め、この中枢神経系以外へのアミロイドの沈着の程度も、変異型によって異なっていた。以上のように臨床症状および検査所見については、3症例ともに髄膜に著明なアミロイド沈着を有するmeningeal-typeのTTRアミロイドーシスではあるものの、変異型によりかなり異なっていた。しかしmeningeal-type TTRアミロイ

ドーシスとして3症例に共通して認められる臨床所見が存在し、それらは、髄液蛋白が著明な高値をとること(表1)、MRIで脳および脊髄の髄膜が広範に造影されること(図1)の2点であった。

### 2. 生化学的検討

#### 1) IP-Mass 分析

対象患者の血清中 TTR の IP-Mass 分析では、non meningeal-type ではすべての検討症例において正常型と変異型 TTR のピークが明瞭に検出されたが、meningeal-type では、いずれも変異型のピークが認められなかった(図 2)。一方、髄液中 TTR の IP-MASS 分析では、Ala25Thr および Tyr114Cys の両症例で、血清中では認めなかった変異型のピークを比較的明瞭に認め、Asp18Gly 症例についても、わずかな変異型のピークを認めた。non meningeal-type では血清同様すべての症例で変異型 TTR の明瞭なピークを認めた(図 3)。

対象患者髄液中 TTR の IP-MASS 分析で得られた mass spectrum での正常型と変異型 TTR のピークの高さをもとに、正常型 TTR に対する変異型 TTR の存在比を計算した。Asp18Gly、Ala25Thr および Tyr114Cys 症例ではその存在比は、それぞれ、 $10.8 \pm 2.0$ 、 $21.9 \pm 2.5$ 、 $23.5 \pm 1.2\%$  であった。non meningeal-type の各症例では、同様に計算した正常型 TTR に対する変異型 TTR の存在比は 82.2-111.0% の範囲にあり、meningeal-type では、non meningeal-type と比較して変異型 TTR の比率が明らかに低下していた(表 2)。

#### 2) TTR の tetramer fraction の分析

本邦の meningeal-type<sup>3</sup> 症例および non-meningeal type として Val30Met<sup>3</sup> 例の血清各 1ml 中から、ゲルろ過クロマトグラフィーにより TTR の tetramer fraction を分離し、その IP-MASS 分析を行った。meningeal type では、全血清と同様に tetramer fraction に変異型の明らかなピークを認めなかった。non-meningeal type はいずれも変異型の明瞭なピークを認めた(図 4)。

## D. 考察

今回検討した 3 種類の変異型(Asp18Gly、Ala25Thr、Tyr114Cys)を有する 3 症例の meningeal type TTR アミロイドーシスにおいては、臨床症状および検査所見は変異型によりかなり異なっていた。しかし、meningeal-type TTR アミロイドーシスに共通する所見として、①髄液蛋白が著明な高値をとること、②MRI で脳および脊髄の髄膜が広範に造影されること、の 2 点が 3 症例に共通して認められた。これらのような共通して認められる所見が、meningeal type TTR アミロイドーシスという特異な TTR アミロイドーシス病型の診断および発症機序を考えるうえで重要な点であると考えられた。

また、meningeal type TTR アミロイドーシスの症例においては、最近 TTR amyloidosis の診断に用いられている、血清中 TTR の IP-Mass 分析では変異 TTR が検出されなかった。このことは新規の変異型を診断にする場合に IP-Mass 分析を用いる際には特に留意する必要があると考えられる。

一方髄液中 TTR の IP-Mass 分析では、微量ながら変異 TTR が検出された。このような結果は、meningeal type TTR アミロイドーシス症例においては血清中と髄液中で変異 TTR の産生・分泌様式あるいは存在様式が異なっていることを示しており、meningeal type TTR アミロイドーシスが全身臓器よりも髄膜にアミロイド沈着の主座を有するという臨床所見と対応しており興味深い。また meningeal-type TTR アミロイドーシス症例の血清中 TTR tetramer fraction の分析では、tetramer fraction に変異 TTR が検出されなかった。このことは、meningeal type TTR アミロイドーシスにおいては、変異 TTR が tetramer 形成に参加できない可能性を示唆しており、このような特異な変異を有する一部の TTR 分子の物理的・化学的性質が meningeal type の表現型発現に関与していると考えられた。

## E. 結論

1) meningeal type TTR アミロイドーシスの診断上、髄液中の著明な蛋白増多所見および造影 MRI による脳・脊髄の広範な髄膜の造影所見が有用である。

2) meningeal-type TTR アミロイドーシス患者においては、しばしば TTR アミロイドーシスの診断および screening に用いられる血清中 TTR の IP-MASS 分析では変異 TTR が検出されない。このことは TTR アミロイドーシスの診断上留意すべき事柄である。

3) meningeal-type TTR アミロイドーシスの発症機序として、このような臨床症状を発現する変異型においては、血清中と髄液中で変異 TTR の産生あるいは存在様式が異なっていることが重要であると考えられた。さらにこのような変異 TTR の物理化学的性質の分子的基盤として、meningeal-type TTR アミロイドーシスを発症する変異型では変異 TTR monomer が TTR tetramer 形成に参加できない可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sekijima Y, Hammarström P, Matsumura M, Shimizu Y, Iwata M, Tokuda T, Ikeda S, Kelly JW: Energetic Characteristics of the New Transthyretin Variant A25T May Explain Its Atypical Central Nervous System Pathology. Lab Invest 83: 409-417, 2003.

### 2. 学会発表

1) 三橋成輝、大出貴士、矢崎正英、徳田隆彦、池田修一：トランスサイレチン型アミロイドーシス患者の髄液中変異/正常 TTR 存在比の検討. 第 44 回日本神経学会総会. 横浜 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

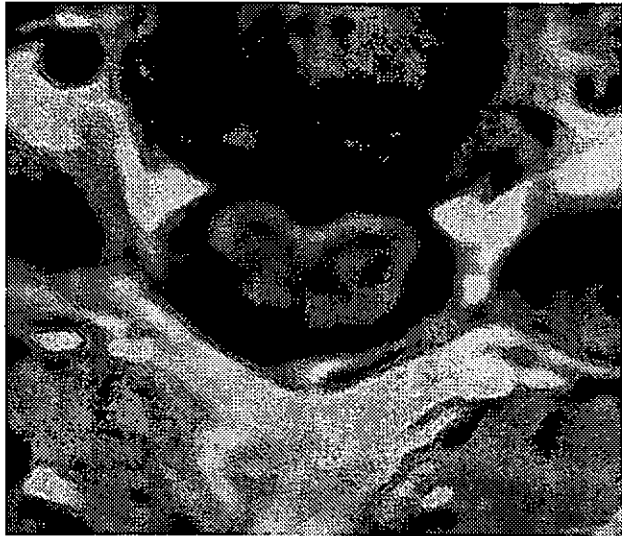


図1 Tyr114Cys 患者のMRI像  
T1強調画像, Gd造影(+)

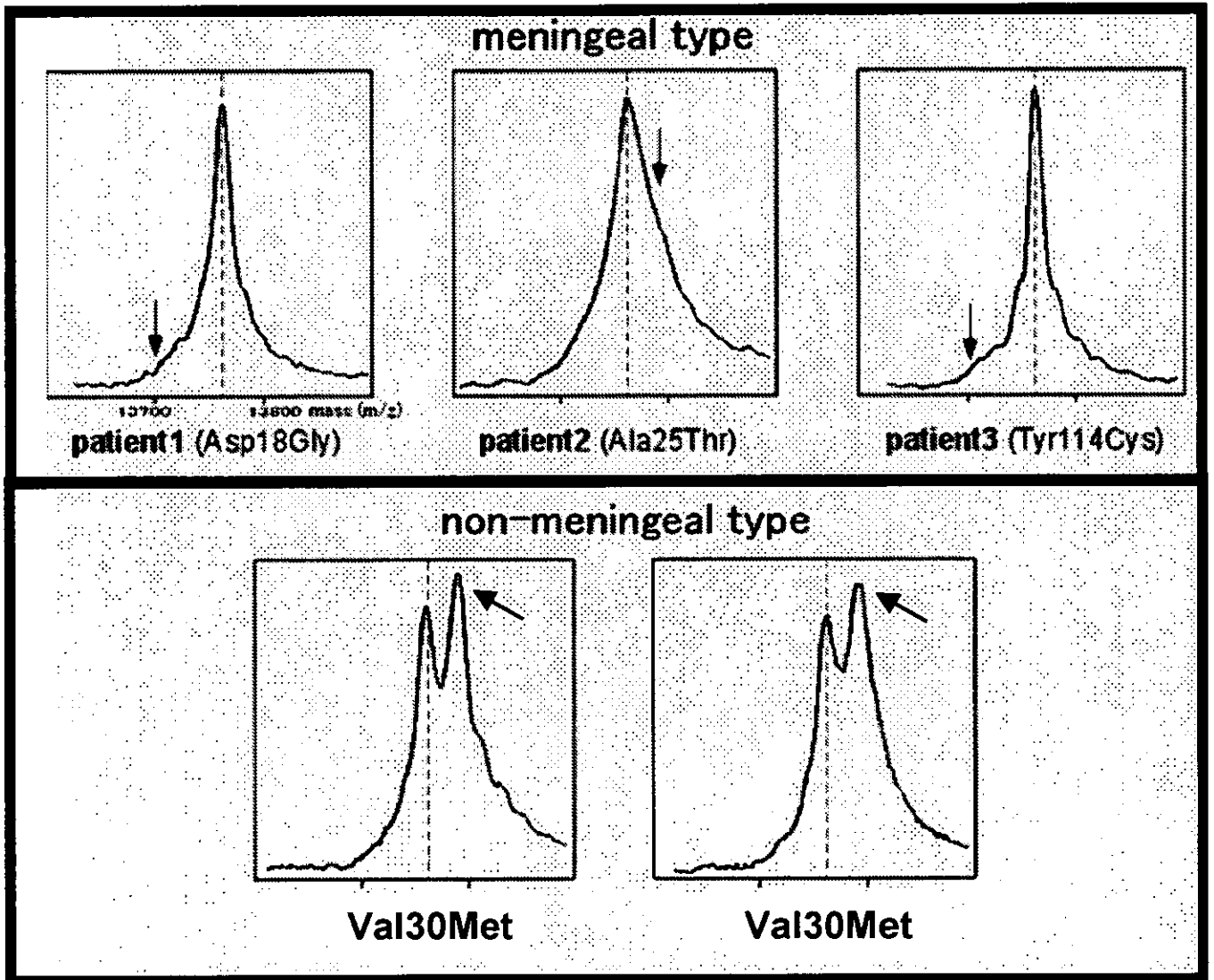


図2 血清中TTRのIP-Mass分析

上段 : meningeal type、下段 : non meningeal type

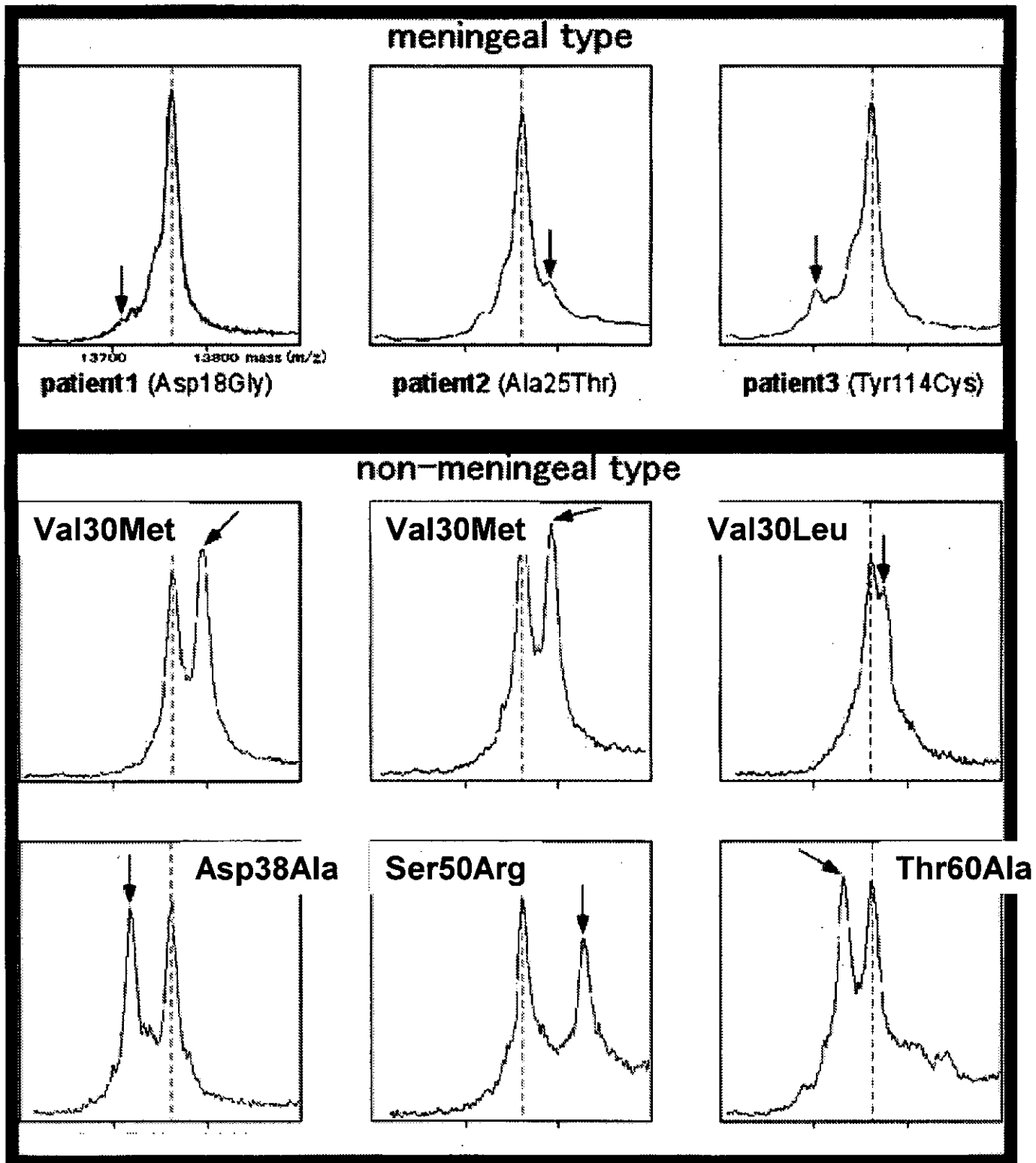
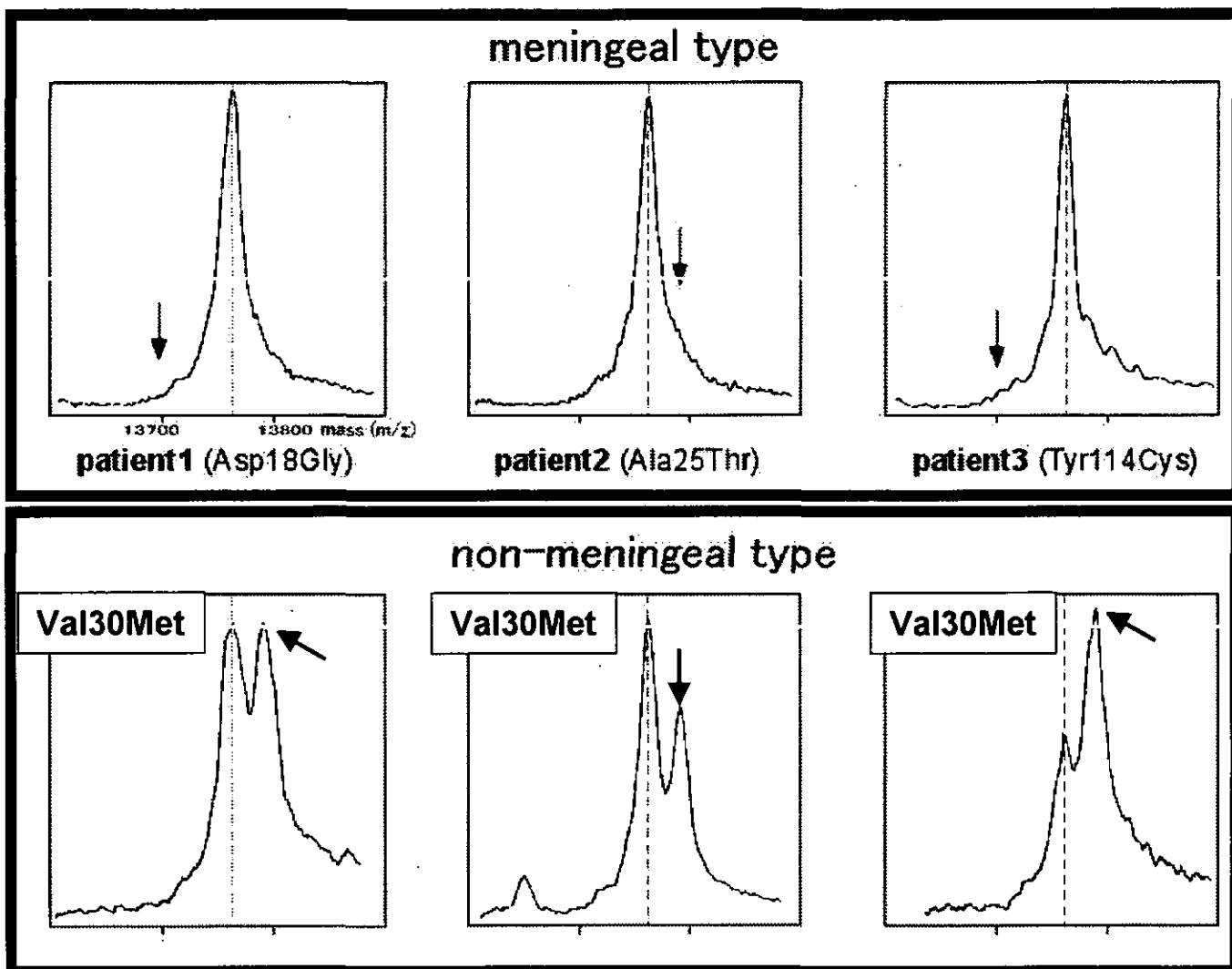


図3 髄液中TTRのIP-Mass分析

上段 : meningeal type、中・下段 : non meningeal type



**図4 血清中TTR tetramer fractionのIP-Mass分析**  
 上段 : meningeal type、下段 : non meningeal type



変異型	age	sex	主訴	現病歴	現症	家族歴	検査所見
Asp18 Gly	42	M	dizziness, 失神	40歳 全身倦怠感 42歳 めまい感(dizziness), 失神発作	四肢腱反 射亢進, Romberg (+)	なし	CSF: xanthochromia, 髄液蛋白 196mg/dl, 軽度硝子体混濁, 99mTcピロリン酸心筋シンチでの 異常集積, MRIで髄膜が広汎に enhancement(+), 胃・十二指腸・ 髄膜の生検でアミロイド沈着(+)
Ala25 Thr	45	M	不安定歩行, vertigo, 右手 の異常感覚	41歳 めまい(vertigo),嘔吐 43歳 歩行時の不安定性 44歳 右手の異常感覚	四肢腱反 射減弱, 深部感覚 障害, wide based gait, Romberg (+)	なし	CSF: xanthochromia, 髄液蛋白 297mg/dl, 四肢遠位部でのNCV低 下, MRIで髄膜が広汎に enhancement(+), 髄膜の生検でア ミロイド沈着(+), 胃・十二指 腸・sural nerve・腹壁脂肪には アミロイド沈着(-)
Tyr114 Cys	34	M	下肢筋力低 下, 複視, 嘔 吐	31歳 交代性下痢・便秘 32歳 impotence, 排尿障害, 失神発作 33歳 眼瞼下垂, 複視, 下肢の異常感覚 38歳 左皮質下出血	硝子体混 濁 (motos manus), 角 膜潰瘍, 右片麻痺, 失語, polyneuro pathy (advanced stage)	+	CSF: 髄液蛋白178mg/dl, MRIで髄膜が広汎に enhancement(+), sural nerveと腹 壁脂肪にはアミロイド沈着(+)

表1 meningeal-type TTRアミロイドーシス患者の臨床像

patient No.	TTR mutation	variant/normal TTR ratio(%)
<meningeal type>		
1	Asp18Gly	(10.8±2.0)
2	Ala25Thr	21.9±2.5
3	Tyr114Cys	23.5±1.2
<non-meningeal type>		
4	Val30Met	111.0±2.2
5	Val30Met	95.9±2.3
6	Val30Leu	90.5±3.0
7	Asp38Ala	100.6±2.0
8	Ser50Arg	82.2±1.0
9	Thr60Ala	98.0±4.5

表2 髄液中の変異TTRと正常TTRの存在比

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

## 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

分担研究者 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

共同研究者 山下太郎<sup>1</sup>、中村政明<sup>2</sup>、植田光晴<sup>1</sup>、孫統国<sup>2</sup>、原岡克樹<sup>3</sup>、  
寺崎久泰<sup>3</sup>、平井俊模、北島美香、鷺見幸彦、内野 誠<sup>1</sup>

<sup>1</sup>熊本大学大学院医学薬学研究部、<sup>2</sup>脳神経科学講座神経内科学分野、

<sup>3</sup>消化器内科学、<sup>4</sup>放射線診断学、<sup>5</sup>国療中部病院神経内科

**研究要旨** FAP ATTR Tyr114Cys 患者における中枢神経症状に対する脳アミロイドアンギオパチーの関与について検討した。対象は FAP ATTR Tyr114Cys 患者 8 名 (男性 2 名、女性 6 名、46.0±6.8 歳)。これら患者の神経症状、髄液所見、画像所見、1 名の剖検脳脊髄の解析を行った。3 例に脳出血、2 例に一過性脳虚血発作、1 例に変動する意識障害、2 例に急速に進行する痴呆が確認された。髄液蛋白、髄液 IgG は罹病期間に相関して上昇していたが、IgG% は上昇していなかった。脳脊髄造影 MRI では、髄膜血管の増強効果および、髄液腔への Gd の漏出が認められた。脳脊髄の病理標本では、髄膜および脳実質の血管周囲への著明なアミロイド沈着と、血管内から脳実質へのアミロイドの噴出所見が確認された。以上より、FAP ATTR Tyr114Cys における中枢神経症状発現には脳アミロイドアンギオパチーが深く関与していると考えられた。また、FAP ATTR Tyr114Cys における脳アミロイドアンギオパチーでは、血液脳関門が破綻している可能性も示唆された。

### A. 研究目的

これまでいくつかのタイプのトランスサイレチン関連 FAP において、髄膜アミロイドーシスによる中枢神経徴候が報告されているが、その詳細な病態については不明な点が多い。さらに、FAP に対しては肝臓移植が有効であることが明らかとなってきたが、異型 TTR は肝臓移植後も脳脈絡叢で産生され続けることから、肝臓移植が、FAP における中枢神経症状の発現を阻止できるのかどうかは重要な問題と考えられる。FAP における中枢神経徴候発現機構の検討は、FAP に対する治療法の開発、選択に重要であるとともに、中枢神経症状を来す他のアミロイドーシスにも様々な情報を提供すると思われるため、本邦における FAP ATTR Tyr 114Cys 患者の中枢神経症状、病態発現機序などについて検討した。

### B. 研究方法

対象は、長崎県島原市に集積地をもつ、FAP ATTR Tyr 114Cys 患者 8 名 (男性 2 名、女性 6 名、46.0±6.8 歳)。これら患者の、神経症状、画像所見、髄液所見、1 名の剖検脳脊髄の解析を行った。

### C. 結果及び考察

中枢神経徴候：FAP Cys114 患者 8 人中 3 例に脳出血がみられていた。その他、変動する意識障害が 1 例、急速に進行する痴呆が 2 例、一過性脳虚血発作が 2 例で認められた。詳細は以下の通りである。

脳出血：脳出血を来した 3 例は、比較的若年で、非高血圧性、非外傷性、多発性の脳出血を、前頭葉、小脳、前頭葉に来していた。3 例とも保存的治療が選択されたが、1 名が死亡し、1 名は意識障害が持続しており、予後は不良であった。

脳血管におけるアミロイドの沈着：急速に進行した痴呆後に死亡した患者から得られた剖検脳組織では Congo-red 染色にて脳髄膜に著明なアミロイドの沈着を認め、髄膜アミロイドーシスを来していた。注目すべきことに、髄膜のみならず、髄膜の脳血管、さらに、脳実質の血管にアミロイドの沈着を認め、病理学的に脳アミロイドアンギオパチーの像を呈していた。アミロイドは、過マンガン酸カリウム抵抗性であり、抗 TTR 抗体陽性で、A $\beta$ 、シスタチン C などに対する抗体に反応せず、TTR によるものと考えられた。

脳アミロイドアンギオパチーでは、脳出血が有名であるが、それ以外に、一過性脳虚血発作、脳梗塞、変動する意識障害、急速に進行する痴呆などの症候を来することが知られている。FAP ATTR Tyr 114Cys の中枢神経徴候は、脳アミロイドアンギオパチーのそれに一致し、FAP ATTR Tyr 114Cys における中枢神経徴候発現には脳アミロイドアンギオパチーが深く関与していると考えられた。

髄液所見：FAP ATTR Tyr 114Cys 患者では髄液蛋白の上昇が知られている。我々の検討では、髄液蛋白は初期には正常であったが、罹病期間に相関し上昇していることが明らかとなった。さらに髄液の IgG にも、蛋白同様に上昇がみられるが、IgG%に上昇はないことから、髄液中の IgG は中枢性の産生でなく、脳表面の血管透過性亢進により血液成分が漏出したものである可能性が高いものと考えられた。同様に、その他の髄液蛋白も、血液成分が漏出したものである可能性が考えられた。

造影 MRI 所見：ガドリニウム造影後、経時的に FLAIR 画像を撮影したものでは、髄液腔へガドリニウムが漏出している像が確認された。ガドリニウムの脳室への漏出は脳表よりやや遅れて出現しており、脳表面へ漏出したガドリニウムの主体は脈絡叢由来でなく、脳表の血管から直接漏出したものと考えられた。24 時間後の画像では、頭頂部のみガドリニウムの停滞がみられた。

髄膜アミロイドーシスの MRI 所見：FAP ATTR Tyr 114Cys では脊髄のガドリニウム造影 MRI にて髄膜の増強効果が見られることが知られていた。

今回の検討により、この現象はアミロイドアンギオパチーによる脊髄表面の血管透過性亢進を反映している可能性が考えられた。さらに今回、CISS 法で撮影での撮影を行ったところ、脊髄と硬膜をつなぐ、索状の構造物がみられることが明らかとなった。髄膜に沈着したアミロイドをとらえた所見と考えられた。

脳血管構造の破綻を示す病理所見：FAP ATTR Tyr 114Cys 患者剖検脳脊髄の血管を注意深く観察すると、著明なアミロイドの沈着に加え、動脈瘤や、アミロイドが血管内から外へむかって噴出する像がみられた。組織学的にも脳アミロイドアンギオパチーによる血管構造の破綻、血液脳脊髄液関門、血液脳関門の破綻が示された。

中枢神経実質へのアミロイドの沈着：脊髄の表面では、アミロイドが脊髄表面に沈着し、実質内へ浸潤する像も観察された。脈絡叢からの異型 TTR 産生に加え、アミロイドアンギオパチーにより、血管から異型 TTR が髄液腔に漏出してきたことが深く関与していると考えられた。

以上のことより、FAP ATTR Tyr 114Cys では髄膜の血管においては、アミロイド沈着が認められ、蛋白、IgG、アミロイドの漏出がみられ、血液髄液関門の破綻が生じていることが示された。また、脳実質においても血管へのアミロイドの沈着、アミロイドの血管から脳実質への噴出像が見られることから、脳血液関門が障害されている可能性が示唆された。この脳血液関門の破綻も、FAP Cys114 における脳アミロイドアンギオパチーにおける中枢神経症状の発現に関与している可能性が推察された。

肝臓移植の効果：肝臓移植を受けた患者は 3 例であったが、移植を受けなかった患者のうち 3 例が死亡、1 例が JCS100、1 例が寝たきりとなっているのに対し、移植を受けた患者に死亡はなく、また脳出血も生じていなかった。移植を受けなかった患者で、死亡した 3 例のうち 2 例は痴呆症状の出現後に死亡したのに対し、肝臓移植を受けた患者では一過性の意識障害出現後も改善がみられていた。このように、肝臓移植が FAP ATTR Tyr