

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池 田 修 一

平成17(2005)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. 全身性アミロイドーシスの治療の実態 (AL, AA, ATTR) .....5  
池田修一  
信州大学医学部第三内科
2. AL アミロイドーシス発症および治療に関する骨髓腫細胞の細胞生物学的研究 .....8  
—CD45 陽性未熟型骨髓腫細胞の増殖動態と漢方薬黄芩に対する感受性—  
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. 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 .....13  
検討  
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)
4. AL アミロイドーシスに対する siRNA 治療法の開発 .....16  
今井浩三  
札幌医科大学医学部第一内科
5. AL アミロイドーシスの原因である単クローン性形質細胞に対する治療法開発の試 .....20  
み  
満屋裕明  
熊本大学医学部附属病院血液内科
6. 重篤な臓器障害を有する AL アミロイドーシスに対する自家造血幹細胞移植 .....24  
併用大量化学療法  
麻奥英毅  
広島赤十字原爆病院 輸血部・検査部
7. 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 .....28  
無血清アミロイド P 成分 (Apcs) マウスを用いた Apcs 機能の解析  
前田秀一郎  
山梨大学大学院医学工学総合研究部・生化 1
8. TTR アミロイドーシスの遺伝子多型と臨床像 .....32  
中里雅光  
宮崎大学医学部第 3 内科
9. TTR アミロイドーシス患者体液中の変異 TTR の生化学的検討：特に中枢神経系に .....34  
主病変を有する TTR アミロイドーシスについて  
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
10. 家族性アミロイドポリニューロパチーの新たな診断・治療法の開発 .....42  
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

11. マウスモデルを用いたアミロイドーシス発症機構の解明 .....47  
樋口京一  
信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野
12. A $\beta$ の高感度分析法を用いた $\gamma$ セクレターゼによるAPP切断部位の検討 .....53  
亀谷富由樹  
東京都精神医学総合研究所分子神経生物
13. Alzheimer型痴呆および変性型痴呆性疾患の $\beta$ アミロイド関連生物学的マーカーの研究 —脳脊髄液、血小板 BACE1 .....58  
葛原茂樹  
三重大学医学部神経内科
14. アルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維形成阻害・分解薬の開発および脳アミロイドアングリオパチーに関する研究 .....62  
山田正仁<sup>1)</sup>、小野賢二郎<sup>1)</sup>、浜口 毅<sup>1)</sup>、廣畑美枝<sup>1)</sup>、吉田光宏<sup>1)</sup>、内木宏延<sup>2)</sup>、長谷川一浩<sup>2)</sup>、高島明彦<sup>3)</sup>、吉池裕二<sup>3)</sup>、池田修一<sup>4)</sup>、玉岡 晃<sup>5)</sup>、葛原茂樹<sup>6)</sup>、東海林幹夫<sup>7)</sup>、安東由喜雄<sup>8)</sup>、徳田隆彦<sup>9)</sup>  
金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科)<sup>1)</sup>、福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域<sup>2)</sup>、理化学研究所脳科学総合研究センター<sup>3)</sup>、信州大学医学部第三内科<sup>4)</sup>、筑波大学臨床医学系神経内科<sup>5)</sup>、三重大学医学部神経内科<sup>6)</sup>、岡山大学大学院神経病態内科学<sup>7)</sup>、熊本大学臨床検査医学<sup>8)</sup>、信州大学大学院加齢適応医科学<sup>9)</sup>
15. アルツハイマー病の危険因子とアミロイド $\beta$ 蛋白及び酸化ストレスについて .....65  
—モデル動物を用いた検討—  
玉岡 晃  
筑波大学臨床医学系神経内科
16. Transgenic mouseを用いた脳アミロイド治療法の検討 .....70  
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
17. 日本のプリオン病の現状 .....73  
水澤英洋  
東京医歯大大学院脳神経機能病態学
18. 慢性炎症におけるSAA発現機構 —肝腫瘍細胞株を用いたIL-6,IL-1,TNF $\alpha$ 刺激によるSAAIプロモーター発現機構の解析 .....81  
吉崎和幸  
大阪健康体育部健康医学第一部門
19. マウスAAアミロイドーシスモデルにおける抗体のin vivo応用： .....87  
発症抑制、吸収促進効果の検討  
山田俊幸  
順天堂大学医学部臨床病理学
20. 関節リウマチ合併AAアミロイドーシスの臨床像の変遷 .....89  
—消化管生検スクリーニングによる評価を中心に—  
高杉 潔  
道後温泉病院リウマチセンター内科

21.	中性 pH での $\beta$ 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維伸長に及ぼす界面活性剤の影響 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）	92 95
22.	透析アミロイドーシスに関する研究 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）	
23.	透析アミロイドーシスによる骨病変（破壊性脊椎症・骨嚢胞）への治療 一薬物治療と外科治療の現況— 原 茂子 虎の門病院健康管理センター	100
[III]	研究成果の刊行に関する一覧表	105
[IV]	班構成員名簿	127

## [ 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。本年度は全身性アミロイドーシスに対する治療実態をまとめた。AL アミロイドーシス 12 名に自己末梢血幹細胞移植(Auto-PBSCT)を併用した大量化学療法が行われ、11 名でM蛋白消失を含む寛解が得られた。Auto-PBSCT の適応外患者 7 名には VAD 療法 2 クールのみ行い、4 名で血液学的寛解が得られた。蛋白濾出性胃腸症を伴う AA アミロイドーシス 2 名に消化管ホルモンのアナログである octreotide が投与され、著効がみられた。FAP については過去 11 年間に国内で 43 名の患者に対して肝移植が行われた。男女比は 21:22、手術時の年齢は 40±9 歳であり、手術様式は生体移植が 41 名、脳死体からが 2 名、遺伝子変異は Val30MetTTR 型が 36 名、non-Val30MetTTR 型が 6 名であった。最長生存者は術後 11 年、10 年生存率は 78%である。また TTR 分子を安定化させる薬物療法、組織へ沈着したアミロイドを標的とした免疫抗体療法も開発段階にある。

## 分担研究者名

今井浩三 (札幌医科大学・学長)  
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 (信州大学大学院医学研究科・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 (信州大学大学院医学研究科・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・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 (道後温泉病院リハビリセンター・理事長)  
山田俊幸 (順天堂大学医学部・助教授)

## 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。また発生機序として複数のサイトカインの動態が注目されている。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 50 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。このため肝移植以外の治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 16 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の臨床像の変移を把握すること、3) 脳アミロイドアンギオパチー(CAA)の治療法開発を主眼とした。

## 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 患者の臨床像の変異、予後調査を腎障害との関連で検討し(高杉、下条)。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)。
- 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の過去 10 年間における治療効果の評価ならびに薬物療法、免疫抗体療法の開発も行った(安東、池田)。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安定化因子の検討を行った(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)、また骨病変への外科治療効果を検討した(原)。
- 5) 脳アミロイドーシス：A $\beta$ アミロイド線維の *in vitro* での形成阻害薬、分解薬の開発(山田)、transgenic mice を用いた新薬の開発(東海林)を行った。また酸化ストレスと A $\beta$ アミロイドの関連(玉岡)、神経変性疾患における A $\beta$ 関連物質の検索が行われた(葛原)。
- 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、血管新生阻害、autophagy 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+細胞が漢方薬の一部に強い感受性があることを見出した。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 AL アミロイドーシス患者に Auto-PBSCT を併用した大量化学療法で治療し、心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 AL アミロイドーシス 8 名に自己末梢血幹細胞移植 (Auto-PBSCT) を併用した大量化学療法が行われ、8 名全員で M 蛋白消失を含む寛解が得られた。Auto-PBSCT の適応外患者 7 名には VAD 療法 2 クールのみ行い、4 名で血液学的寛解が得られた。

- 2) AA アミロイドーシス：山田はアポ E ノックアウトマウスを用いて AA アミロイドーシスの発病の有無を検討した。吉崎は肝芽腫由来の HepG2 細胞を用いて、IL-6、IL-1、TNF $\alpha$  刺激と SAA1 産生との関連を明らかにした。高杉は 1990～2003 年間に前半と後半の 7 年ごとに分けて、本病態を合併した RA 患者の頻度を検討した。前半が 7.83%、後半が 5.74% で、明らかに低下傾向が見られた。
- 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。池田は過去 11 年間に国内で 43 名の患者に対して肝移植が行われ、最長生存者は術後 11 年、10 年生存率は 78% であることを報告した。また TTR 四量体分子の安定化作用を示す diflunisal が FAP の治療薬として使えることを示した。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を述べ、クロムその他の新たな治療薬についても言及した。中里は非集積地における ATTRVal30Met 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 名の血清と髄液中 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、これにグルコサミノグリカン等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く、これらには個体の加齢現象が強く影響していることを報告した。原は本病態の破壊性脊椎症に対して外科治療が有用であることを示した。

- 5) 脳アミロイドーシス：山田はニコチン、赤ワイン関連ポリフェノール、クルクミン等が A $\beta$  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 APOE4 が酸化ストレスの増強、脳内 A $\beta$  の神経毒性を増すことを示し、東海林はメラトニンが transgenic mice において A $\beta$  アミロイドの産生抑制を示すことを明らかにした。葛原は神経変性疾患における A $\beta$  とその関連物質を測定したが、疾患との間に一定の傾向は得られなかった。
- 6) その他のアミロイドーシス：樋口はマウス ApoAII アミロイドーシスの伝播を防ぐ方法として、アミロイド線維をオートクレーブ、高濃度アルカリ処理などが有効であることを報告した。

#### 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、その有効性が示された。FAP については肝移植以外の治療法が模索されている。特に既に市販薬として海外で使用されている diflunisal は、近日中に日米欧で大規模な臨床試験が開始される予定である。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 $\beta$  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、実用薬としてのメラトニンは今後、臨床試験等を行う価値がある。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、また治療実態が明らかにされた。2) FAP、脳アミロイドーシスで治療薬として使える具体的薬品が出てきたことの意義は大きい。

**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（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班 分担研究報告書

## 全身性アミロイドーシスの治療の実態 (AL, AA, ATTR)

分担研究者 池田修一 信州大学第三内科

共同研究者 松田正之、五野貴久、武井洋一、伏見智久、中村昭則、矢崎正英、徳田隆彦  
信州大学第三内科

**研究要旨** 全身性アミロイドーシス三病型 (AL, AA, ATTR) について過去に施行して来た治療法の有効性を検討した。AL アミロイドーシスに対しては基礎疾患である形質細胞異常症を根治させる目的で大量化学療法を施行した。VAD 療法 2 クールによる導入療法後、メルファラン大量静注と自己末梢血幹細胞移植を施行した 8 名においては本療法後血中の M 蛋白が消失して、血液学的には完全寛解と判断された。上記療法が施行できなかった 7 名には VAD 療法 8 クールのみを行ったが、4 名では血液学的に完全寛解が得られた。AA 型全身性アミロイドーシスでは本疾患に起因する蛋白濾出性胃腸症の治療として消化管ホルモンのアナログである octoreotide を 2 例に投与して著効が得られた。FAP については過去 11 年間に 25 名に対して肝移植が行われた（生体肝移植 24 うち 1 名は再移植あり、脳死体からの移植 1 名）。肝移植に伴う合併症で 3 名、原疾患の増悪で 2 名、de novo cancer の併発で 1 名の合計 6 名が死亡している。生存者 18 名中 17 名は通常の社会生活に復帰している。全身性アミロイドーシス患者は確実に治療可能となった。

### A. 研究目的

全身性アミロイドーシス三病型 (AL, AA, ATTR) について、有効な治療法を開発すること。

### B. 研究方法

AL, AA, ATTR 型全身性アミロイドーシスに対して過去数年間に施行した治療法の有効性を検討した。また ATTR 型家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) については肝移植の長期的治療効果を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は信州大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。また対象者には事前に十分なインフォームド・コンセントを施行した。

### C. 研究結果

1) 原発性 AL アミロイドーシス: 本疾患の根治療法に関しては、平成 13 年に池田らが本邦で初めて VAD 療法とそれに続く Auto-PBSCT を併用したメルファラン大量療法を 2 名に実施して成功した。そこで平成 14 年度に分科会で心機能を重視した独

自の適応基準を作成した。また導入療法として VAD 療法を 2 クール行うこととし、メルファラン投与量は欧米より少ない  $140\text{mg}/\text{m}^2$  とした。現在までに当科で 8 名の患者に同療法を施行し、全員が血液学的完全寛解を示している。また本療法が適応外の 7 名に対しては VAD 単独療法を行い、4 名が血液学的完全寛解を得ている。尚、血液学的完全寛解例はネフローゼ症候群の改善など、臨床症状も明らかに軽快している

2) AA 型全身性アミロイドーシス: 本疾患に起因する蛋白濾出性胃腸症の治療は難治である。今回本症状を主訴とする 32 歳男性 (基礎疾患不明) と 57 歳女性患者 (基礎疾患: RA) に対して消化管ホルモンのアナログである octoreotide を 2 例に投与して著効が得られた。両患者は受診時一日数リットルに及ぶ激しい下痢症状に悩まされており、当初はステロイドパルス療法を中心とする副腎皮質ステロイド療法を行った。しかし本治療では胃腸症状のコントロールが困難であったため、octoreotide を  $50\mu\text{g}/\text{day}$  から開始して、 $100\mu\text{g}/\text{day}$  まで増量した。本薬剤の投与により下痢症状は急速に改善した。ま

た本症を引き起こす遺伝性疾患である家族性地中海熱患者2名が遺伝子診断で確定され、コルヒチンを中心とする予防薬の投与が開始された。

3)ATTR型FAP: 過去11年間に過去11年間に信州大学病院では25名に対して肝移植が行われた(生体肝移植24うち1名は再移植あり、脳死体からの移植1名)。肝移植に伴う合併症で3名、原疾患の増悪で2名、*de novo cancer*の併発で1名の合計6名が死亡している。生存者18名中17名は通常の社会生活に復帰している。国内では同年間に43名の患者に対して肝移植が行われた。男女比は21:22、手術時の年齢は40±9歳であり、手術様式は生体移植が41名、脳死体からが2名、遺伝子変異はVal30MetTTR型が36名、non-Val30MetTTR型が6名であった。最長生存者は術後11年、10年生存率は78%である。移植後神経症状の進行は確実に停止するが、緑内障、硝子体混濁等の眼病変の出現は阻止できない。また心アミロイドーシスの増悪が起こりうる事が判明した。FAPに対する新たな治療戦略としてTTR四量体分子を安定化させる薬物療法、沈着アミロイドに対する免疫抗体療法の2法が考えられる。前者については米国Scripps研究所のKelly博士らとの共同研究で、海外で市販されている抗炎症薬diflunisalが常用量で血清中のTTR四量体分子を十分安定化させる作用があることが明らかとなった。既に2名のFAP患者に対して個人輸入で薬を購入してdiflunisalの投与を開始し、同時に本薬剤の血中動態の検索が行われている。

#### D. 考察

全身性アミロイドーシスに対する治療指針を確立することを過去3年間の目標として来た。その中で原発性ALアミロイドーシスに対する大量化学療法、FAPへの肝移植を中心に計画したことの相当部分を達成できた。またFAPに関しては懸案である肝移植以外の薬物療法への足固めができたことは大きな成果と考えている。今後の展望については、ALアミロイドーシスに対する強力化学療法の長期的治療効果と臓器アミロイド変化の判定、AAアミロイドーシスへの抗サイトカイン療法の確立、FAPに対するより有効な薬物療法の開発が急がれる。

#### E. 結論

全身性アミロイドーシス三病型(AL, AA, ATTR)について、有効な治療法のstrategyが示されたと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Ikeda S: Cardiac amyloidosis: heterogenous pathogenic backgrounds. *Intern Med* 43: 1107-1114, 2004.
- Gono T, Matsuda M, Shimojima Y, Ishii W, Koyama J, Sakashita K, Koike K, Hoshii Y, Ikeda S. VAD with or without subsequent high-dose melphalan followed by autologous stem cell support in AL amyloidosis: Japanese experience and criteria for patient selection. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 11: 245-256, 2004.
- Fushimi T, Takei Y, Touma T, Kudoh S, Yamamoto K, Hoshii Y, Ishihara T, Ikeda S: Bilateral localized amyloidosis of the ureters: clinicopathology and therapeutic approaches in two cases. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 11: 260-264, 2004.
- Mitsubishi S, Yazaki M, Tokuda T, Yamamoto K, Ikeda S. MRI analysis on a patient with the V30M mutation is characteristic of leptomeningeal amyloid. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 11: 265-267, 2004.
- Jin K, Takahashi T, Nakazaki H, Date Y, Nakazato M, Tominaga T, Itoyama Y, Ikeda S: Familial leptomeningeal amyloidosis with a transthyretin variant Asp18Gly representing repeated subarachnoid haemorrhages with superficial siderosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75: 1463-1466.
- Yazaki M, Fushimi T, Tokuda T, Kametani F, Yamamoto K, Matsuda M, Shimojo H, Hoshii Y, Higuchi K, Ikeda S: A patient with severe renal

- amyloidosis associated with an immunoglobulin  $\gamma$ -heavy chain fragment. *Am J Kidney Dis*, 2004, 43: e23-e28.
7. Yoshinaga T, Takei Y, Katayanagi K, Ikeda S. Postmortem findings in a familial amyloid polyneuropathy patient with homozygosity of the mutant Val30Met transthyretin gene. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 11: 56-60, 2004.
  8. Koike H, Misu K, Sugiura M, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Mukai E, Ando Y, Ikeda S, Sobue G. Pathology of early- vs late-onset TTR Met30 familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 63: 129-138, 2004.
  9. Iijima-Dohi N, Shinji A, Shimizu T, Ishikawa S, Mukawa K, Nakamura T, Maruyama K, Hoshii Y, Ikeda S. Recurrent gastric hemorrhaging with large submucosal hematomas in a patient with primary AL systemic amyloidosis: endoscopic and histopathological findings. *Intern Med* 43: 468-472, 2004.
  10. Matsubara E, Sekijima Y, Tokuda T, Urakami K, Amari M, Shizuka-Ikeda M, Tomidokoro Y, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Ikeda S, Murakami T, Abe K, Otomo E, Hirai S, Frangione B, Ghiso J, Shoji M. Soluble A $\beta$  homeostasis in AD and DS: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins. *Neurobiol Aging* 25: 833-841, 2004.
  11. Fu X, Korenaga T, Fu Li, Xing Y, Guo Z, Matsushita T, Hosokawa M, Naiki H, Baba S, Kawata Y, Ikeda S, Ishihara T, Mori M, Higuchi K. Induction of AApoAII amyloidosis by various heterogenous amyloid fibrils. *FEBS Lett* 563: 179-184, 2004.
2. 学会発表
1. 武井洋一、池田修一、徳田隆彦、中里雅光、安東由喜雄: 本邦の non-Val30MetTTR による家族性アミロイドポリニューロパチーの臨床病理学的所見. 第 101 回日本内科学会総会. 平成 16 年 4 月、東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

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班 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 陽性未熟型骨髄腫細胞の増殖動態と漢方黄芩に対する感受性—

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、大津山賢一郎、劉 尚勤、馬 梓

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 アミロイドーシスには、原発性および骨髄腫に合併する続発性のものも形質細胞の単クローン性増殖がある。この形質細胞の増殖には、骨髄腫の研究から未熟型骨髄腫細胞の増殖が関与している。この未熟型骨髄腫細胞の増殖・生存を規定しうる分子として、CD45 とミトコンドリア膜分子 VDAC-1 が同定された。一方で、骨髄腫細胞に恒常的に活性が亢進している NF- $\kappa$ B 活性を抑制しうるものとして、漢方薬黄芩が選別された。さらに、黄芩の成分であるバイカレインに強い抗 NF- $\kappa$ B 活性が認められた。従って、AL アミロイドーシスおよび骨髄腫の治療戦略として、抗 NF- $\kappa$ B 活性のあるバイカレインの有用性が示唆された。また、治療の標的分子として CD45 や VDAC-1 に注目すべき基盤的知見が得られた。

### A. 研究目的

AL アミロイドーシスを発症する骨髄腫細胞には未熟型と成熟型の骨髄腫細胞があるが、骨髄腫の発症および進展には未熟型骨髄腫細胞の増加が極めて重要である。従って、この未熟型骨髄腫細胞の増殖に関係する分子を標的とした分子標的治療の基礎的研究を行う。一方で、骨髄腫細胞の生存に関係する分子の一つとして NF- $\kappa$ B が明らかにされたので、抗 NF- $\kappa$ B 作用を示す薬剤をスクリーニングし、その作用機序を明らかにする。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

- 1) 患者骨髄腫細胞の表面抗原解析: AL アミロイドーシス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、既報のごとく抗 CD38 抗体を使用した多重染色を行い、未熟型、成熟型の骨髄腫細胞を同定した。
- 2) CD45+と CD45-の U266 細胞株での遺伝子発現の相違を検索: PCR-selected cDNA

subtraction kit (Clontech) および Microarray (AceGene Human 30K, Hitachi) で発現が異なる遺伝子をスクリーニングした。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: CD45+と CD45-の U266 細胞あるいは CD45 遺伝子導入と非導入細胞とで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、UV 照射、血清除去、ER ストレス (Thapsigargin 処理) 等処理後、生存率、アポトーシス誘導およびミトコンドリア膜電位を測定した。4) 抗炎症作用のある漢方薬から骨髄腫細胞の増殖抑制作用のあるもののスクリーニング: 黄連解毒湯などの漢方薬を水抽出後、骨髄腫細胞株 U-266 と共培養して、増殖抑制活性のあるものを選別した。更に、その中の成分の作用についても検討し、患者骨髄腫細胞への感受性も検討した。

### C. 研究結果

IL-6 による未熟型骨髄腫細胞の増殖には、CD45 分子の存在が必須であることを確認した。そこで、CD45+と CD45-の未熟型骨髄腫細胞での

遺伝子発現プロファイリングを検討すると、CD45+細胞はミトコンドリア膜分子 VDAC-1 を強く発現していた。CD45+骨髄腫細胞株は、各種ストレスに対する感受性が亢進しており、このことはCD45 遺伝子導入細胞およびVDAC-1 遺伝子導入細胞でも確認された。

一方、骨髄腫細胞の生存にはNF- $\kappa$ B の恒常的活性化が重要と考えられている。抗炎症作用のある漢方薬からのスクリーニングにより、黄連解毒湯などが未熟型骨髄腫細胞の生存・増殖を抑制した。黄連解毒湯から黄芩を除いたものはその抑制活性が減弱し、逆に黄芩単独で強い抑制活性を示した。更に、黄芩の成分であるバicaleinに強い増殖抑制活性のあることがわかった。バicaleinは強く抗NF- $\kappa$ B 活性を示した。

#### D. 考察

AL アミロイドーシスには、原発性および骨髄腫に合併する続発性のものも形質細胞の単クローン性増殖がある。従って、その形質細胞の増殖・生存を抑制することは、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。本年度の研究成果により、未熟型骨髄腫細胞、中でもCD45+未熟型骨髄腫細胞はミトコンドリア膜分子 VDAC-1 を強く発現してアポトーシス感受性が亢進していることが明らかとなった。今後の形質細胞の増殖抑制の治療戦略において、CD45 分子と VDAC-1 分子が標的分子となりうると思われる。一方、骨髄腫細胞の増殖・生存に深く関わりを持つNF- $\kappa$ B 活性を抑制しうるものも治療の標的分子となる。本年度の研究成果により、漢方薬の黄芩、さらにその成分であるバicaleinが強く抗NF- $\kappa$ B 活性を示して、未熟型骨髄腫細胞の増殖を抑制した。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どのような分子に焦点を当てたらよいかを示唆する重要な結果である。

#### E. 結論

1. 未熟型骨髄腫細胞のアポトーシス感受性を規定している分子として、CD45 とミトコン

ドリア膜分子 VDAC-1 を同定した。

2. CD45 遺伝子導入および VDAC-1 遺伝子導入の骨髄腫細胞株で、各種ストレスに対するアポトーシス感受性の亢進を確認できた。
3. 抗NF- $\kappa$ B 活性を示すものとして、漢方薬の中から黄芩を選別した。さらその成分バicaleinに強い抗NF- $\kappa$ B 活性のあることを見出した。今後の形質細胞の増殖・生存を抑制し得るもの、AL アミロイドーシスの治療として、大いに期待できる。

#### 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 Myeloma cells that highly express IL-6 receptor  $\alpha$ . *Blood* 103:2291-2298,2004.
- 2) Li F, Tsuyama N, Ishikawa H, Obata M, Abroun S, Liu S, Otsuyama K, Zheng X, Ma Z, Maki Y, Kawano MM : A rapid translocation of CD45RO but not CD45RA to lipid rafts in IL-6-induced proliferation in Myeloma. *Blood* (in press)
- 3) Ma Z, Otsuyama K, Liu S, Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, Obata M, Li F, Zheng X, Maki Y, Miyamoto K, Kawano MM: Baicalein, a component of *Scutellaria Radix*, identified from *Huang-Ling-Jie-Du-Tang* (HLJDT), leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human Myeloma cells. *Blood* (in press)
- 4) Liu S, Ishikawa H, Li F, Ma Z, Otsuyama K, Asaoku H, Abroun S, Zheng X, Tsuyama N, Obata M, Kawano MM: Dehydroepiandrosterone can inhibit the proliferation of myeloma cells and the interleukin-6 production of bone marrow mononuclear cells from patients with Myeloma. *Cancer Research* (in press)

## 2. 学会発表

- 1) Kawano MM : Heterogenous expression of CD45 on myeloma cells and its biological significance. (invited speaker) Multiple Myeloma 2004, Torino, Italy, April 22-24, 2004.
  - 2) 大津山賢一郎、劉 尚勤、馬 梓、李 富君、Saeid Abroun、鄭 旭、槇 泰子、津山尚宏、小幡雅則、石川秀明、河野道生 : DHEA ホルモンの骨髄腫細胞増殖および IL-6 産生に及ぼす作用について 第 66 回日本血液学会総会、京都、2004 年 9 月 18 日
  - 3) 李 富君、津山尚宏、石川秀明、小幡雅則、Saeid Abroun、劉 尚勤、大津山賢一郎、鄭 旭、馬 梓、槇 泰子、河野道生 : 骨髄腫細胞株では CD45 分子は IL-6 刺激により脂質ラフトに移行する。第 66 回日本血液学会総会、京都、2004 年 9 月 18 日
  - 4) 劉 尚勤、石川秀明、津山尚宏、李 富君、Saeid Abroun、大津山賢一郎、鄭 旭、馬 梓、槇 泰子、小幡雅則、河野道生 : 骨髄腫細胞のアポトーシス感受性を制御する CD45 と VDAC-1 の発現亢進 第 66 回日本血液学会総会、京都、2004 年 9 月 18 日
  - 5) 馬 梓、劉 尚勤、大津山賢一郎、Saeid Abroun、李 富君、鄭 旭、槇 泰子、津山尚宏、小幡雅則、石川秀明、河野道生 : 黄連解毒湯及びその構成物質バイカレインによる骨髄腫細胞増殖に及ぼす作用について 第 66 回日本血液学会総会、京都、2004 年 9 月 18 日
  - 6) Li F, Tsuyama N, Ishikawa H, Obata M, Abroun S, Liu S, Otsuyama K, Zheng X, Ma Z, Maki Y, Kawano MM: IL-6-induced CD45RO, RB translocation to lipid rafts in Myeloma cells. 46<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Hematology, San Diego, I.U.S.A., Dec.4-7, 2004.
  - 7) Liu S, Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Ma Z, Maki Y, Obata M, Kawano MM: CD45 defines signaling thresholds critical for proliferation and apoptosis in Myeloma cells. 46<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Hematology, San Diego, I.U.S.A., Dec.4-7, 2004.
  - 8) Otsuyama K, Ma Z, Liu S, Li F, Abroun S, Zheng X, Maki Y, Tsuyama N, Obata M, Ishikawa H, Kawano MM: DHEA can inhibit the proliferation of myeloma cells and the IL-6 production of bone marrow mononuclear cells from the myeloma patients. 46<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Hematology, San Diego, I.U.S.A., Dec.4-7, 2004.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし



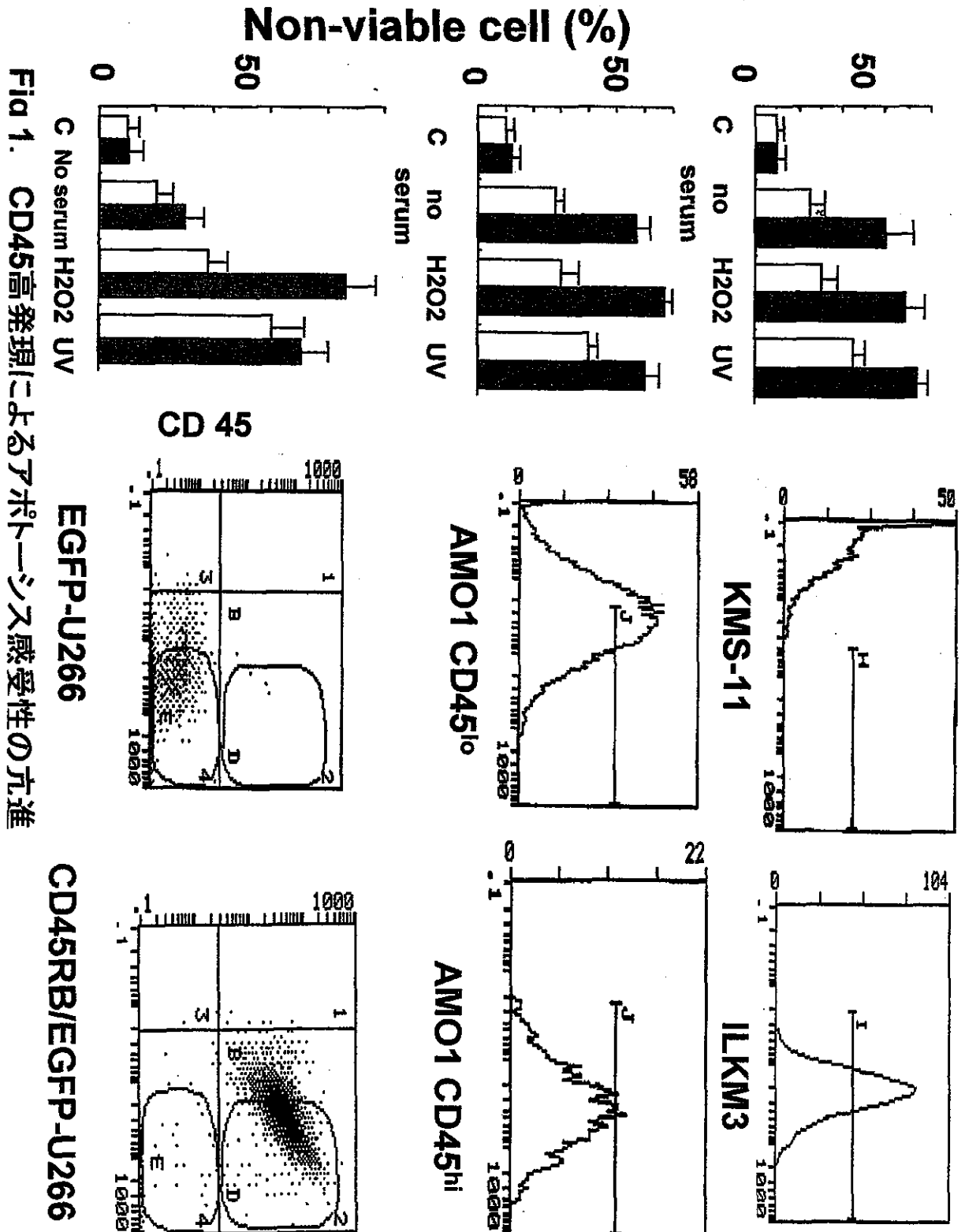
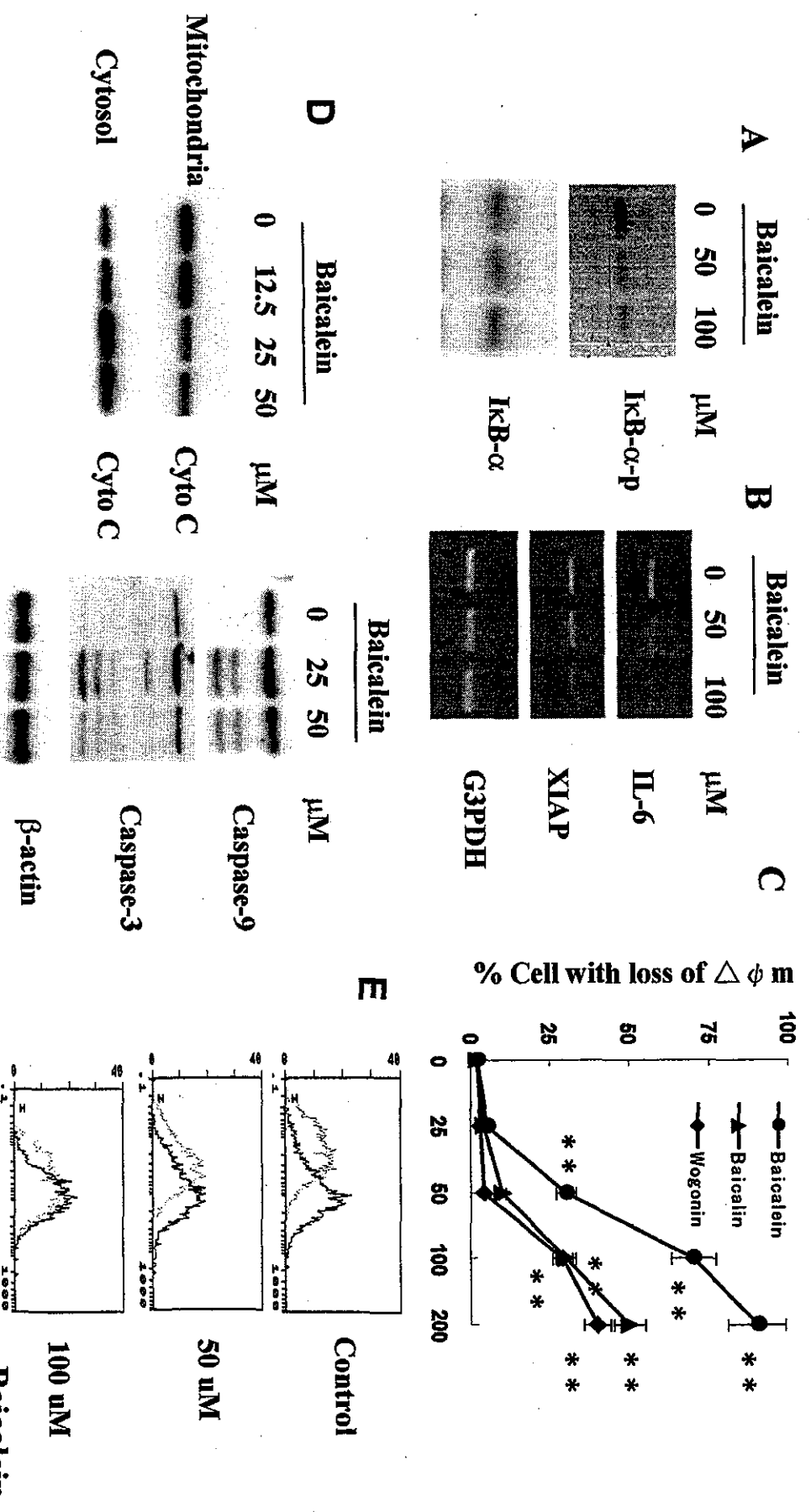


Fig 1. CD45高発現によるアポトーンシス感受性の亢進



**Fig.2** BaicaleinはNF-kB活性を抑制して、増殖抑制作用を示す  
**A:** IκBαの酸化の抑制 **B:** IL-6, XIAP遺伝子発現抑制 **C:** ミトコンドリア膜電位消失  
**D:** Cyto C放出促進とCaspase活性化 **E:** NF-kB活性の抑制

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班 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\*、木山真紀子\*\*、崔丹\*、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** 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 $\lambda$ 鎖および $\kappa$ 鎖可変領域に対するポリクローナル抗体を作製し、その有用性を検討した。免疫グロブリン $\lambda$ 鎖可変領域サブグループV $\lambda$ VIとして報告されている配列ARの1-19番目および79-90番目に相当する合成ペプチド、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖可変領域サブグループV $\kappa$ Iとして報告されている配列BREの1-19番目に対する相当する合成ペプチドに対するウサギポリクローナル抗体(抗V $\lambda$ VI1-19、抗V $\lambda$ VI79-90、抗V $\kappa$ I1-19)を作製した。これらの抗体を用いて、これまでに免疫組織化学的にタイプが決定されているA $\lambda$ 型22例、A $\kappa$ 型11例、AA型5例、ATTR型5例の全身性アミロイドーシス剖検例のホルマリン固定パラフィン切片について免疫組織化学的検討を行った。抗V $\lambda$ VI1-19はA $\lambda$ 型22例中21例に陽性、抗V $\lambda$ VI79-90はA $\lambda$ 型22例中12例に陽性、抗V $\kappa$ I1-19はA $\kappa$ 型11例中10例に陽性であった。これらの抗体はホルマリン固定パラフィン切片にて染色性良好であり、また抗L鎖定常領域抗血清では陽性とならないALアミロイドーシス例を検出できる可能性があり、アミロイドの免疫組織化学的診断に有用と考える。

### A. 研究目的

ALアミロイドーシスは市販の抗体ではしばしば免疫組織化学的診断が困難な場合がある。我々はこれまで、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いるが、免疫組織化学的診断率のさらなる向上を目的として、平成14年度～16年度、免疫グロブリン $\lambda$ 鎖および $\kappa$ 鎖可変領域に対するポリクローナル抗体の作製を試み、その有用性について検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

1990年から2004年にA $\lambda$ 、A $\kappa$ 、AA、TTR、 $\beta$ 2ミクログロブリンに対する抗体および抗 $\lambda$ 118-134、抗 $\kappa$ 116-133を用いて免疫組織化学的にタイプ決定を行った全身性アミロイドーシス剖検例のうち、A $\lambda$ 型22例(抗 $\lambda$ 118-134陽性21例、陰性1例)、A $\kappa$ 型11例(抗 $\kappa$ 116-133陽性10例、陰性1例)、AA型5

例の腎臓、ATTR型5例の心臓のホルマリン固定パラフィン切片を用いた。

#### 2. 方法

抗体の作製：免疫グロブリン $\lambda$ 鎖V $\lambda$ VIサブグループとして報告されている配列ARの1-19番目および79-90番目に相当するアミノ酸配列のN末端側にシステインを付加した直鎖ペプチド(CDFMLTQPHSVSEPGKTVT; 20mer)およびCSGLKTEDEADYY; 13mer)を合成し、KLHを担体としてウサギに免疫し、抗血清を作製した。さらにアフィニティー精製を行い抗V $\lambda$ VI1-19および抗V $\lambda$ VI79-90として使用した。同様に免疫グロブリン $\kappa$ 鎖V $\kappa$ Iサブグループとして報告されている配列BREの1-19番目に相当する直鎖ペプチド(DIQMTQSPSSLSASVGRV; 19mer)を合成し、KLHを担体としてウサギに免疫し、抗血清を作製、さらにアフィニティー精製を行い、抗V $\kappa$ I1-19として使用した。ペプチド合成および抗体作製については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。

免疫組織化学的検討：ホルマリン固定パラフィン切片を脱パラフィン後水洗中に100%蟻酸処理を1分行った後、内因性ペルオキシダーゼおよび非特異反応のblockingを行い、一次抗体として抗Vλ VI1-19 (21 μg/ml)、抗Vλ VI79-90 (14.5 μg/ml)あるいは抗Vκ I 1-19 (35.5 μg/ml)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にて発色を行った。

ELISA：抗Vλ VI1-19についてはVλ VI1-19、Vλ I 2-19、Vλ II 2-19、Vλ III1-19、Vκ I 1-19に相当する合成ペプチドを抗原として、抗Vλ VI79-90についてはVλ VI(AR)79-90、Vλ VI(SUT)79-90、Vλ II(BUR)78-89に相当する合成ペプチドを抗原として、抗Vκ I 1-19についてはVκ I 1-19、Vκ II 1-19、Vκ III1-19、Vκ IV1-19、Vλ VI1-19に相当する合成ペプチドを抗原としてELISAによる交叉反応性の検討を行った。

### C. 研究結果

免疫組織化学的検討：抗Vλ VI1-19はAλ型22例中21例陽性で、抗λ 118-134陰性例は陰性であった。Aκ型、AA型、ATTR型は陰性であった。抗Vλ VI 79-90はAλ型22例中12例陽性で、抗λ 118-134陰性例も陽性となった。Aκ型 AA型、ATTR型は陰性であった。抗Vκ I 1-19はAκ型11例中10例陽性であり、抗κ 116-133陰性例も陽性となった。Aλ型22例中1例にも明瞭な陽性反応が見られた。陽性例の染色性は様々であった。なお抗Vκ I 1-19はAA型において一部部分的な弱い反応が見られた。

ELISA：抗Vλ VI1-19はVλ I 2-19、Vλ II 2-19、Vλ III1-19と種々の程度に交叉反応を示したが、Vκ I 1-19とは反応しなかった。抗Vλ VI79-90はVλ VI(SUT)79-90、Vλ II(BUR)78-89と良好に反応した。抗Vκ Iは抗Vκ II 1-19、抗Vκ IV1-19と弱いながら交叉反応がみられたが、Vκ III1-19、Vλ VI1-19とは反応しなかった。

### D. 考察

今回作製した抗体は、これまでに作製した抗L鎖定常領域抗血清では認識しえないL鎖可変領域主体のALアミロイドーシスを検出できる可

能性がある。L鎖可変領域は多様性に富んでいることから、今回作製した抗体でALアミロイドーシス全例を認識しうるわけではないが、ELISAではいずれも抗原としたサブグループ以外のサブグループと交叉反応を示し、免疫組織化学的検討では抗Vλ VI1-19は95.5%、抗Vκ I 1-19は90.9%と陽性率が高く、抗Vλ VI79-90も54.5%の陽性率であった。L鎖可変領域に対する抗体でありながら、幅広い症例を検出できる抗体を作製しえた。Aλ型で抗Vκ I 1-19陽性となった症例については、抗Vκ I 1-19がλ鎖と交叉反応を起こしている可能性やAλアミロイドにκ鎖がトラップされたものを検出した可能性も完全には否定はしえないが、Aλ型、Aκ型の共存の可能性も考えられる。

### E. 結論

抗Vλ VI1-19、抗Vλ VI79-90および抗Vκ I 1-19はホルマリン固定パラフィン切片にて染色性良好であり、また定常領域を含まないALアミロイドーシス例を検出できる可能性があり、ALアミロイドの免疫組織化学的診断に有用な抗体である。

### 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

星井嘉信、崔丹、河野裕夫、木山真紀子、石原得博、免疫グロブリンL鎖可変領域抗体の作製およびALアミロイドーシスの免疫組織化学的診断への応用. 第93回日本病理学会(2004)

### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし