

Figure 1. Aλ型アミロイドーシス例 左:抗Vλ VI1-19、右:抗Vλ VI79-90  
アミロイドはいずれの抗体でも良好に染色されている。

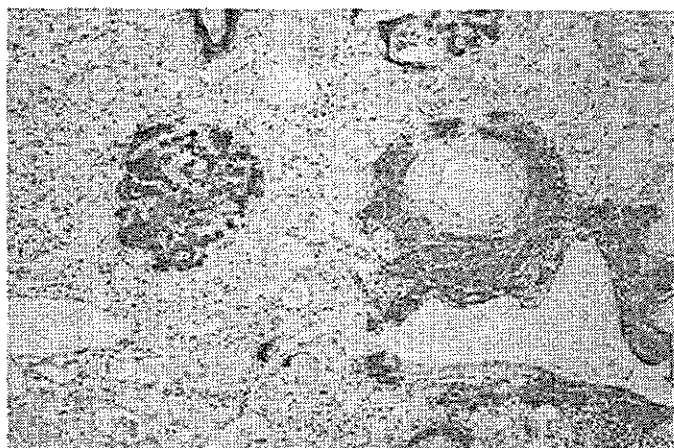


Figure 2. Aλ型アミロイドーシス例 左:抗Vλ VI1-19、右:抗Vλ VI79-90  
アミロイドは抗Vλ VI1-19では良好に染色されているが、抗Vλ VI79-90では陰性である。

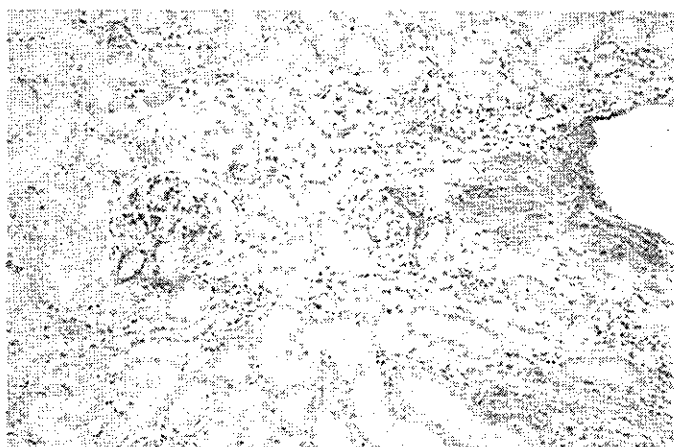


Figure 3. Aκ型アミロイドーシス例 抗Vκ I 1-19  
アミロイドは抗Vκ I 1-19で良好に染色されている。

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班 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、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 $\lambda$  領域の cDNA の塩基配列を決定した。この配列に基づいて合成 siRNA を作成し、培養細胞に導入した。さらに、合成オリゴ DNA を pSilencer に導入し、ステムループ型 siRNA 発現ベクター(short hairpin RNA; 以後 shRNA)を作製し、同様に培養細胞に導入した。合成 siRNA, shRNA ともに導入細胞では、上清中の $\lambda$ 鎖濃度の低下が認められた。

### A. 研究目的

AL アミロイドーシスは、骨髓腫と同様に抗癌剤を用いた化学療法が行われることが多い。末梢血幹細胞移植を併用した大量化学療法も行われるが、生命予後も含めてその治療成績は十分とは言えない。そこでわれわれは、L鎖そのものをターゲットにする治療が必要と考え、患者のアミロイド原性 L 鎖をクローニングし、アンチセンス DNA(AS-DNA)を用いて、*in vitro* および *in vivo* において L 鎖産生抑制効果を報告してきた。さらに、siRNA にても、AS-DNA よりも少量で L 鎖産生抑制効果を示すことを報告した。

*in vivo* における siRNA 投与経路としては、合成 siRNA、ウイルスベクター、shRNA などが考えられ、このうちで、最も容易に投与できると考えられるのは合成 siRNA だが、RNA のため生物学的に不安定である。shRNA は、DNA のため安定性は長期間の抑制効果が得られる可能性があると考えられている。

今回我々は、CDR 特異的な siRNA および shRNA 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 $\lambda$ ) 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 siRNA の導入

RPMI 8226 の $\lambda$ 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-DNA を作製した。さらに CDR 2, 3 において、AS-DNA に対応した部位にそれぞれ 21, 20 塩基の長さの合成 siRNA を作製した。コントロールは、Non-specific Control XI (DHARMACON 社)を用いた。

shRNA は、pSilencer 1.0-U6(Ambion 社)を用い、ApaI と EcoRI の間に上述の siRNA CDR 2, 3 をそれぞれ挿入して作製した。CDR 2 においては、ループの塩基数が通常の 9 塩基である CDR 2-9 と、センス、アンチセンスは同様だが、ループ配列が microRNA 由来で塩基数が 10 塩基の CDR 2-10 も作製した。CDR 3 においては、ループの塩基数が通常の 9 塩基のもののみ作製し、CDR 3 と表記した。

これらを Lipofection 法により培養細胞に導入し、上清中の遊離 $\lambda$ 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 $\lambda$ mRNA の増幅

骨髓腫細胞株 RPMI 8226 を材料に RT-PCR を行い、V $\lambda$  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 $\lambda$  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合成 siRNA の効果

RPMI8226 の V $\lambda$  cDNA 塩基配列に基づいて、CDR- 2, 3 それぞれに対する合成 siRNA を作製して RPMI8226 に導入し、導入後の培養上清中の  $\lambda$  鎖濃度を測定し、コントロール siRNA の  $\lambda$  鎖濃度を 100% としたときの siRNA CDR 2, 3 の  $\lambda$  鎖濃度の割合を示した(Figure 1)。48 時間後には、40% の抑制効果を認めた。しかし、72 時間、96 時間後には減弱し、120 時間後にはまったく抑制効果は認められなくなった。

## 3. 培養細胞系における shRNA の効果

合成 siRNA と同様に CDR-2, 3 それぞれに対する shRNA を作製して RPMI8226 に導入し、導入後の培養上清中の  $\lambda$  鎖濃度を測定し、空のベクターを導入したものの  $\lambda$  鎖濃度を 100% としたときの shRNA CDR 2-9, 2-10, 3 の  $\lambda$  鎖濃度の割合を示した(Figure 2)。

全体を通して、shRNA による抑制効果は認められたが、合成 siRNA ほど顕著ではなかった。特に、microRNA 由来の shRNA 効果を期待して作製した 10 塩基の CDR 2-10 を用いた場合には、120 時間後においても 30% 程度の抑制効果を認めた。

## 4. 培養細胞系における合成 siRNA と shRNA の効果の比較

CDR 2,3 領域において、合成 siRNA、shRNA について同時に抑制効果を検討した(Figure 3)。

48 時間後の合成 siRNA が最も強く抑制を受けていた。しかしながら、合成 siRNA では時間と共に抑制効果は減弱し、120 時間後にはまったく抑制効果が認められなかったが、shRNA においては、120 時間経過しても抑制効果は認められ、合成 siRNA に比較して効果が持続することが示唆された。

## D. 考察

我々は、これまでの研究で、骨髄腫マウスモデルに移植された腫瘍内に AS-ODN を投与することにより、 $\lambda$  鎖の血中濃度を著明に抑制することが可能であることを示した。 $\lambda$  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。さらに昨年、合成 siRNA が AS-DNA 以上の抑制効果を認めることを示してきた。しかしながら、合成 siRNA は RNA であることから生体内で非常に不安定であり、*in vivo* における投与には工夫が必要である。そこで、今回、我々は、DNA であることから安定性が高く、長期間の抑制効果が得られる可能性があるとされる shRNA を作製した。今回の研究において、shRNA は、*in vitro* においてはあがあるが、長時間の抑制効果を認めた。このことは、shRNA の導入効率の改善等により抑制効果を高める工夫ができれば、合成 siRNA と同様の抑制効果を持ちつつ、効果の持続も期待できると考えられる。

我々はこれまでの実験において、PCR 法にて、臨床材料から単クローン性  $\lambda$  鎖を同定することが可能であるということも示してきた。以上から、個々の患者毎に単クローン性  $\lambda$  鎖を同定し、siRNA を作製、導入することにより、アミロイドーシスで特異的に増加している免疫グロブリンのみを抑制する可能性が示唆され、オーダーメイド治療の開発につながると考えられた。

## E. 結論

RT-PCR 法によって髄腫細胞株の  $\lambda$  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 siRNA と shRNA を作製した。siRNA および shRNA を培養細胞に導入することにより、 $\lambda$  鎖の産生が抑制された。さらに、shRNA は合成 siRNA に比較して、抑制効果が持続した。

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Morimoto Y, Toyota M, Satoh A, Murai M, Mita H, Suzuki H, Takamura Y, Ikeda H, Ishida T, Sato N, Tokino T, Imai K. Inactivation of class II transactivator by DNA methylation and histone deacetylation associated with absence of HLA-DR induction by interferon-gamma in haematopoietic tumour cells. *Br J Cancer*. 90:844-852, 2004

2. 学会発表

宮地佐栄、中村聡子、見田裕章、林 敏昭、吉本満、石田禎夫、今井浩三：ALアミロイドーシスにおけるsiRNA治療の試み. 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 京都府京都市、9月17日～19日、2004年.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

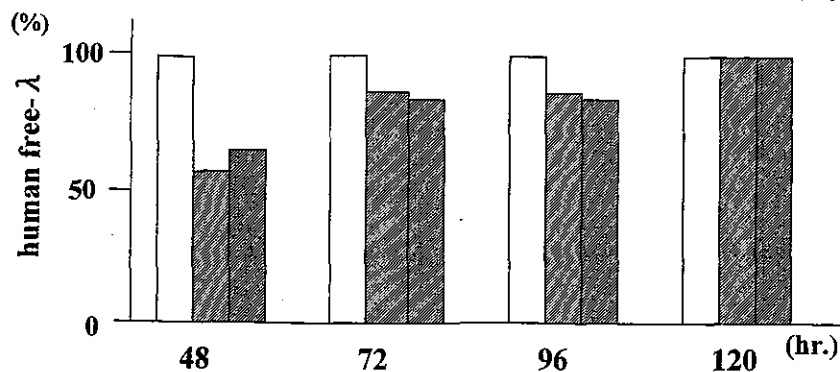


Figure 1. RPMI8226 への siRNA (CDR2, 3) 導入による λ 鎖産生の抑制

□ siRNA(control)    ▨ siRNA CDR-2    ▩ siRNA CDR-3

siRNA controlの入鎖濃度を100%としたときのそれぞれの割合を示す。  
48時間後には抑制効果が最も強くなるが、120時間後には抑制効果は認められない。

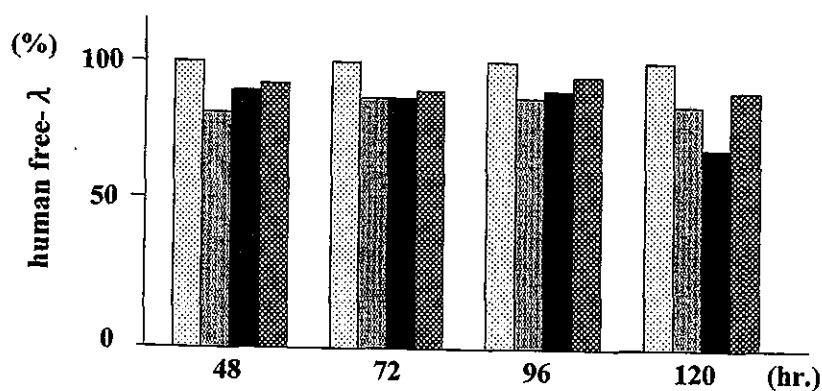


Figure 2. RPMI8226 への shRNA 導入による λ 鎖産生の抑制

▨ Mock vector    ▩ shRNA CDR 2-9    ■ shRNA CDR 2-10    ▨ shRNA CDR 3

CDR 2, 3に対する shRNA を導入し λ 鎖産生を検討した。  
Mock vectorの入鎖濃度を100%としたときのそれぞれの割合を示す。  
合成 siRNA ほどの抑制効果は認められないが、抑制効果は持続する。

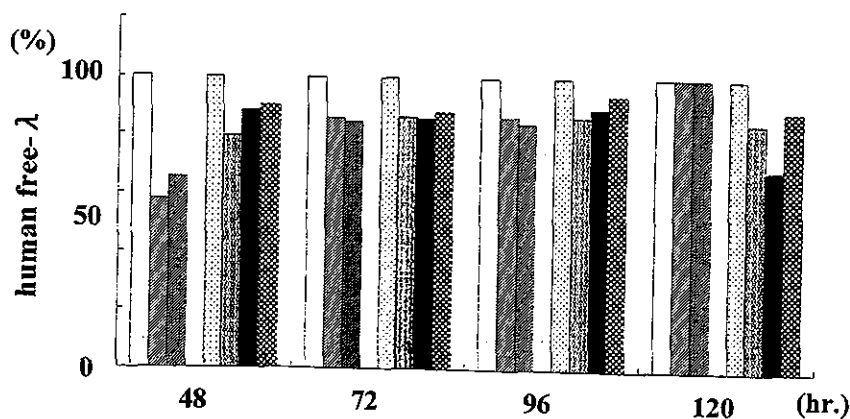


Figure 3. RPMI8226 への siRNA および shRNA 導入による λ 鎖産生の抑制

□ siRNA(control)    ▨ siRNA CDR 2    ▩ siRNA CDR 3  
▨ Mock vector    ▩ shRNA CDR 2-9    ■ shRNA CDR 2-10    ▨ shRNA CDR 3

Figure 1, 2 をあわせて示す。ともに導入後は、λ 鎖産生が低下する。  
しかし、抑制効果は合成 siRNA が強く、持続時間は shRNA の方が長い。

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 治療法開発の試み

分担研究者 畑 裕之、中村美紀、満屋裕明 熊本大学医学部第2内科

共同研究者 後藤知巳\* \*熊本大学医学部分子遺伝学

研究要旨 我々は、骨髄腫に対する新規治療法を開発を目的とし、骨髄腫細胞の生物学的特性(大量の免疫グロブリン産生による小胞体ストレス、血管新生による進展、サリドマイドへの感受性)に着目し、この2年間に以下の研究を遂行した。①XBP-1 遺伝子活性化を検討し、小胞体ストレス負荷状況による形質細胞の分類を行った。②SCID マウスモデルを用いた一酸化窒素合成酵素阻害剤(L-NAME)による血管新生抑制の可能性を検討した。③形質細胞の電子顕微鏡観察およびLC3の Western blot を行い、サリドマイドの抗腫瘍効果の機序を検討した。これらは、AL アミロイドーシスの新規治療法を開発する上で有用である。

### 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。我々は形質細胞の生物学的特性に基づく新規治療法を開発を研究テーマとしてきたが、特に以下の3点に注目した。1:形質細胞は大量のたんぱく質(免疫グロブリン)を産生すること。2:骨髄腫の進展は血管新生に依存すること。3:骨髄腫はサリドマイドに感受性を示すことである。本研究の目的は、骨髄腫に対する新規治療を最終的に AL アミロイドーシスに応用することである。

#### 1:形質細胞の小胞体ストレス

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。近年、小胞体がタンパク質の folding を検知し、misfolding を検出すると小胞体にストレスが負荷されシャペロンを誘導する機構が判明しつつある。本研究で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、過剰の小胞体ストレス負荷がアポトーシスを誘導する可能性を検討する。さらに小胞体ストレスと予後の関係およびALアミロイドーシスにおける amyloidogenic な M タンパクによる小胞体ストレスを誘導の有無を検討する。

#### 2:骨髄腫の血管新生抑制療法開発

骨髄腫の進展には血管新生が関与すると考えられている。本研究では、虚血による VEGF の産生に一酸化窒素が関与している点に注目し、一酸化窒素合成酵素阻害剤の血管新生に与える影響を検討する。

#### 3:サリドマイドによる形質細胞への autophagy 誘導

サリドマイドが骨髄腫の治療に有効であることは知られているが、その機序は不明であるため、サリドマイドの作用機序を解明することを目的とした。

### 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および、骨髄腫細胞株を用いた。小胞体ストレスにより活性化される転写因子XBP-1の活性化をRT-PCRで検討し、予後との関連を検討した。骨髄腫細胞株 12PEをSCIDマウスに移植し、一酸化窒素合成阻害剤であるL-NAME (N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester) を1.2 g/kgの濃度で腹腔内投与した。50 μg/mlのサリドマイドを骨髄腫細胞にin vitroで投与し、24時間後に形態の変化を電子顕微鏡などで観察した。

### C. 研究結果

### 1 : 形質細胞の小胞体ストレス

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)。骨髓腫、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、細胞株と同様の方法で XBP-1 の活性化を判定した。XBP-1 活性化は年齢、性とは無関係であったが、骨髓腫の病期別に見ると Stage III の例に多く見られた (図 2A、 $p < 0.01$ )。骨髓腫患者では 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 2B)。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髓より形質細胞を純化し、同様の検討を行ったところ、XBP-1 は非活性型であり、骨髓腫としては予後良好群に属した (図 3)。しかし、この症例は約 3 ヶ月の経過でアミロイドーシスによる心不全で死亡した。

### 2 : 骨髓腫の血管新生抑制療法開発

骨髓腫細胞株を SCID マウスに移植し 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、実際に臨床の場で使用されている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 4)。

### 3 : サリドマイドによる形質細胞への autophagy 誘導

骨髓腫細胞にサリドマイドを投与し形態の変化を顕微鏡、電顕で検討した。サリドマイド投与後には細胞質に特徴的な空胞を認め、形態的には autophagy であることが示された (図 5)。

## D. 考察

骨髓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。すなわち活性型 XBP-1 を示す症例は予後不良である。しかし 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、骨髓腫に対比すれば予後良好群に属し、AL アミロイドーシスにおける形質細胞の増殖能は低く、予後はアミロイドの沈着に規定されることが示唆された。また 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も示された。

一酸化窒素合成酵素阻害剤が血管新生を阻害し、抗腫瘍効果を発揮することが示された。この効果は既存の抗がん剤の効果を凌駕しており、難治性腫瘍としての AL アミロイドーシスにおいても有用な治療法であることが示唆される。マウスモデルでは、L-NAME による治療関連死は認められず、安全に投与可能な薬剤となりうる。

autophagy は細胞が飢餓に陥る際に、細胞内オルガネラを処理しエネルギーを再生する機構である。サリドマイドが autophagy をなぜ誘導するのかは不明であり、autophagy が細胞死につながるメカニズムも解明されていない。しかし、サリドマイドが何らかの機序で骨髓腫細胞に飢餓を誘導し、autophagy を介した細胞死 (autophagic cell death) を誘導する可能性が示されたことで、本研究は、腫瘍細胞への新しいアプローチにつながると期待され、ひいては AL アミロイドーシスの治療に応用可能であると期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 severe 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 endothelial growth factor and angiopoietin-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) Uneda S, Hata H. Angiopoietins expression by

- human myeloma cells. *Haematologica* 88:(06), 2003  
 ELT21  
 ([http://www.haematologica.org/e-letters/2003\\_06/ELT21.htm](http://www.haematologica.org/e-letters/2003_06/ELT21.htm))
- 5) 畑裕之、サリドマイドの作用機序。 *Cancer Frontier* 5:70-74, 2003.
- 6) 采田志麻、畑裕之、骨髓腫細胞と血管新生。 *血液腫瘍科* 48: 3, 268-273, 2004.
- 7) 多発性骨髓腫の診療指針 (疫学)、畑裕之、文光堂、 2004.
2. 学会発表
- 1) Nakamura M, Hata H, Tatetsu H, Sonoki T, Uneda S, Okuno Y, Mori M, Gotoh T, Mitsuya H. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis in myeloma cells. 45th American Society of Hematology. San Diego, CA, USA, Dec 9, 2003.
- 2) 中村美紀、畑裕之、奥野豊、満屋裕明。患者純化骨髓腫細胞の小胞体ストレス、第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会、平成 16 年 (2004 年) 9 月 17 日 (金) ~19 日 (日)
- 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



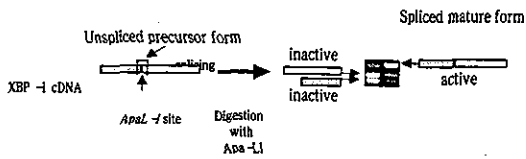


図1: XBP-1 の活性化の検出

XBP-1 遺伝子を RT-PCR で増幅し、制限酵素 Apa-LI で切断すると活性型は Apa-LI 部が欠失し切断されない。

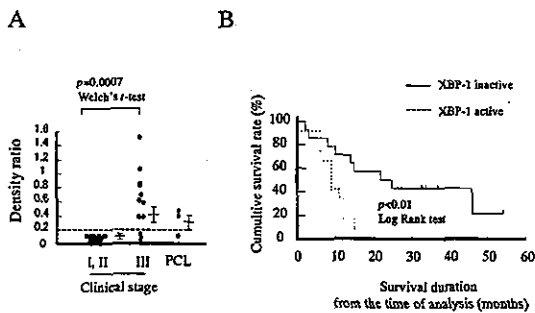


図2: XBP-1 活性化は StageIII に多く(A)、活性化は予後不良因子である(B)。

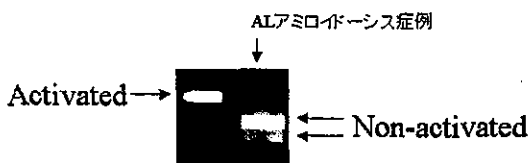


図3: AL アミロイドーシス症例の

形質細胞内 XBP-1 は非活性型である。

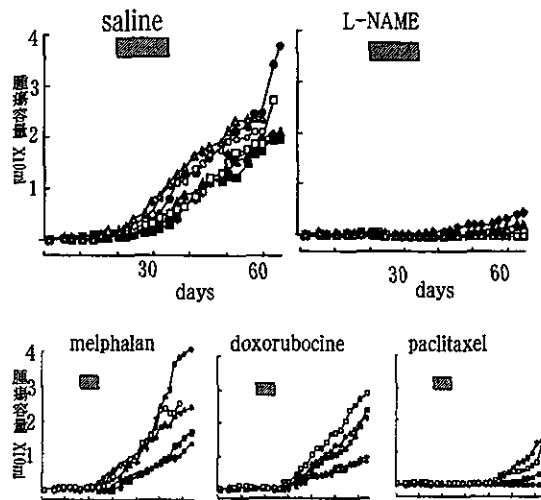


図4: 一酸化窒素合成酵素阻害剤は in vivo において骨髄腫細胞の増殖を阻害し、その効果は Melphalan, Doxorubicin をしのぐ。

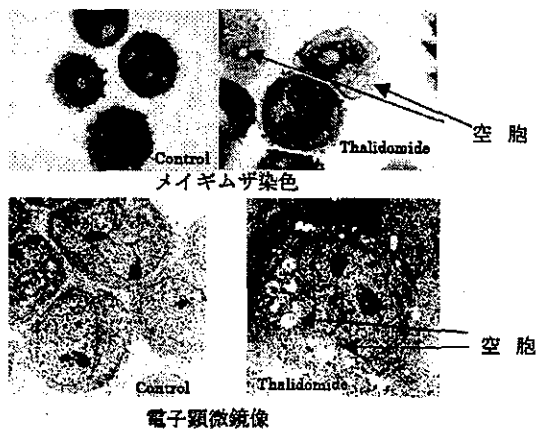


図5: サリドマイドによる骨髄腫細胞の形態変化。細胞質に変性したオルガネラを含む空胞を認め、Autophagy に特徴的な所見であった。

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

## 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併用大量化学療法

分担研究者 麻奥英毅 広島赤十字・原爆病院 検査部

共同研究者 沖川佳子\* 広島赤十字・原爆病院、\*第四内科

**研究要旨** 原発性全身性ALアミロイドーシスに対し自家造血幹細胞移植併用大量化学療法が有用であるが、重篤な臓器障害を有する患者においては前治療、幹細胞採取および大量化学療法それぞれの段階でリスクが大きく治療関連死が多い。そこで重篤な臓器障害を有する患者にも適応しうる治療法を確立することを目的とし、1. 移植までのリスクの軽減をはかるため、前治療を短縮または省略する。また幹細胞動員はG-CSF単独で行う。2. 可能であれば十分な治療強度を確保するためにdouble transplantを行う。以上の方針で自家造血幹細胞移植を試みた。4例の患者を対象とした。全例自家造血幹細胞移植を施行し得た。3例はG-CSF単独動員で幹細胞を採取し、いずれも充分量採取できた。2例はdouble transplantが可能であった。3例は完全緩解となり、臓器障害の改善が認められPerformance statusの著しい改善を認めた。結論] 高齢者や重篤な臓器障害を有する患者に対してもこの治療方針で自家造血幹細胞移植併用大量化学療法が施行可能であり、予後の改善が期待できる。

### A. 研究目的

原発性全身性ALアミロイドーシスに対し現在もっとも有効な治療は自家造血幹細胞移植併用大量化学療法である。しかし重篤な臓器障害を有する患者においては、治療の各過程においてリスクが大きく、造血幹細胞移植が施行困難となる可能性や治療関連死をきたす可能性が高い。これらの患者に対し施行可能でかつ十分な効果を期待できる自家造血幹細胞移植療法を確立することを目的とする。

### B. 研究方法

本研究班により作成された「自己末梢血幹細胞移植を併用したメルファラン大量静注療法の治療指針」の適応症例以外の患者を対象とし、以下の治療方針で自家造血幹細胞移植を行う。

1. 本研究班治療プロトコルを基準とする。
2. 心機能障害の強い患者は前治療をVAD 1回のみとするか、もしくは行わない。
3. 造血幹細胞動員はG-CSF単独で行う。
4. 十分な造血幹細胞が採取でき、かつ1回

目の移植後本研究班治療プロトコルの適応基準を満たす臓器障害の改善が認められた場合、2回目の移植を行う。

5. 1回目の大量化学療法では患者の状態に応じメルファランの減量を行う。2回目の大量化学療法では原則として減量しない。(図1)

(倫理面への配慮)

治療に当たっては、繰り返し説明を行い十分な理解を得た上で文書により同意を得た。

### C. 研究結果

症例(表1): 対象患者は4例である。3例は原発性ALアミロイドーシス患者であり、1例は多発性骨髄腫に併発した全身性ALアミロイドーシス患者である。

症例1. 67才女性。IgG- $\kappa$ , BJP(+). 全肺野にアミロイドーシス病変を認め、肝、胃にもアミロイド沈着を認めたが、心、腎機能は正常。PS1  
 症例2. 56才女性。BJP- $\lambda$ 。心、腎、腸管アミ

ロイドーシスを認め、また自律神経障害のため強い起立性低血圧があり失神発作を繰り返す。

#### PS3

症例3. 67才男性。BJP- $\lambda$ 。心、腎、腸管アミロイドーシスを認め、本例も強い起立性低血圧があり失神発作を繰り返す。PS4

症例4. 45才女性。IgG- $\lambda$  多発性骨髄腫。心、腎、腸管アミロイドーシス。出血傾向が強く全身に出血斑、及び下血。起立性低血圧。PS3

症例2、3、4、は治療経過中血圧維持のためカテコラミンの持続投与が必要であった。

治療経過 (表2): 症例1. は67才であったが心、腎障害がなく、本研究班治療プロトコールを遂行できた。十分な造血幹細胞も採取でき、88日の間隔で2回目の移植を行った。症例2. 症例3. は前治療をVAD1コースにとどめ、造血幹細胞採取はG-CSF単独で行った。症例2. は2回の移植に十分な幹細胞が採取でき、さらに1回目の移植後心機能、低血圧の改善を認めたため109日の間隔で2回目の移植を施行できた。症例4. は多発性骨髄腫患者であることからVADを2コース施行したが、その間にアミロイドーシス症状が進行し全身状態の悪化を来した。幹細胞はG-CSF単独で行った。本症例は造血幹細胞輸注時心原性ショックを来したが速やかに回復。その後は安定している。

効果 (表3): 症例1. 2. 3. は移植後M蛋白が消失。臓器障害の明らかな改善を認めている。症例2. は1回目の移植後1ヶ月半で独歩退院。2回目の移植後も順調に経過し日常生活に復帰している。症例3. は車椅子での退院まで3ヶ月要したがその後の改善は著しく、移植後7ヶ月の時点でほぼ通常の日常生活を送れるまでに回復した。症例4. は移植後2ヶ月であるが、M蛋白が残存、臓器障害の進行はないが明らかな改善も認めない。

#### D. 考察

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の問題は、移植に至るまでの過程で臓器障害が進行し、移植困難となることである。今回このリスクを軽減し速やかに移植を施行する治療スケジュールを

試みた。治療強度は低下するが、それでも腫瘍量の少ない原発性ALアミロイドーシスに対して十分な効果を認めた。さらに、低下した治療強度を補い、深い緩解を得ることでの長期予後の改善をめざし double transplant を試みた。G-CSF単独動員で2回の移植に足る造血幹細胞が採取可能か、また1回目の移植後、障害臓器の改善が得られるかがポイントであったが、2例において充分量の幹細胞が採取できた。2例とも1回目の移植後、臓器障害の改善が認められ3ヶ月以内に2回目の移植を施行できた。前治療を短縮した2例を含め3例の原発性ALアミロイドーシス患者において1回の移植で完全緩解が得られ、その後臓器機能の回復、全身状態の改善を認めた。移植時の大量化学療法は障害臓器に大きな負担をかける。障害の強い例では減量して1回目の移植を行い、臓器機能の回復を待って2回目の移植を full dose の大量化学療法で行えば安全かつ効果的な治療となり得る。

多発性骨髄腫において自家造血幹細胞移植併用大量化学療法の生存曲線は下がり続けており、現時点では治癒が得られるとは言えない。Double transplant の評価もまだ一定していないが、single transplant に比べ無病生存期間は延長している。ALアミロイドーシスの患者にとって再発はその時点からアミロイドの沈着が進行することを意味しているため、無再発生存期間の延長をめざした治療戦略が必要である。Double transplant はそのための有効な手段と考えられる。

#### E. 結論

前治療を省略し G-CSF 単独で幹細胞を採取することで重篤な臓器障害を有するALアミロイドーシスに自家造血幹細胞移植を施行でき、効果的であった。Double transplant は施行可能であり有効な治療戦略となりうる。

#### 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  
なし。

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。

図1. 重篤な臓器障害を有するALアミロイドーシスに対する治療スケジュール

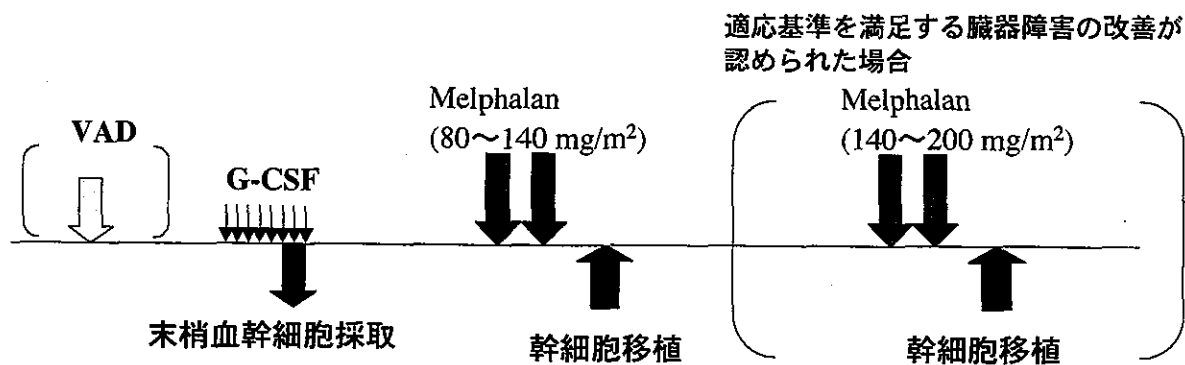


表1. 症例

	症例1. 67才女性	症例2. 56才女性	症例3. 67才男性	症例4. 45才女性
PS	1	3	4	3
臓器障害	肺 (%VC74.4)	心不全 EF 52% 低血圧・起立性低血圧 ネフローゼ (尿蛋白量7.2g/day) 腸管障害 (下痢)	心不全 EF 43% 低血圧・起立性低血圧 ネフローゼ (尿蛋白量4.2g/day) 腸管障害 (下痢)	心不全 EF 65% 両側胸水 低血圧・起立性低血圧 ネフローゼ (尿蛋白量5.3g/day) 腸管障害 (下痢、下血) 皮下出血、粘膜出血
BM plasma cell	6.0%	6.5%	5.2%	15.0%
診断	原発性ALアミロイドーシス IgG-κ、BJP(+)	原発性ALアミロイドーシス BJP-λ	原発性ALアミロイドーシス BJP-λ	多発性骨髄腫 ALアミロイドーシス IgG-λ

表2. 治療経過

	症例1.	症例2.	症例3.	症例4.
前治療	VAD2回	VAD1回	VAD1回	VAD2回
幹細胞動員方法	VP16+G-CSF	G-CSF単独	G-CSF単独	G-CSF単独
採取幹細胞数	9.07×10 <sup>6</sup> /kg	7.11×10 <sup>6</sup> /kg	2.38×10 <sup>6</sup> /kg	2.9×10 <sup>6</sup> /kg
大量化学療法	LPAM 140mg/m <sup>2</sup>	LPAM 140mg/m <sup>2</sup>	LPAM 140mg/m <sup>2</sup>	LPAM 140mg/m <sup>2</sup>
移植間隔	88日	109日		
2回目大量化学療法	LPAM 140mg/m <sup>2</sup>	LPAM 140mg/m <sup>2</sup>		

表3. 治療効果

症例		移植前	移植後	予後
症例1.	PS	1		0
	%VC	74.4	89.1	22M生存
	%FVC	72.1	84.9	(1回目移植後16M)
	M蛋白	(+)	(-)	
症例2.	PS	3		1
	EF	52%	65%	17M生存
	尿蛋白量	7.2g/day	2.1g/day	(1回目移植後14M)
	M蛋白	(+)	(-)	
症例3.	PS	4		1
	EF	43%	69%	10M生存
	尿蛋白量	4.2g/day	1.1g/day	(移植後7M)
	M蛋白	(+)	(-)	
症例4.	PS	3		3
	EF	49%	50%	6M生存
	尿蛋白量	5.3g/day	2.1g/day	(移植後2M)
	M蛋白	(+)	(+)	

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

## 遺伝子改変マウスを用いた遺伝性アミロイドーシスの発症予防法の開発： 無血清アミロイド P 成分(Apcs)マウスを用いた Apcs 機能の解析

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・生化学

共同研究者 玉置寿男<sup>\*\*</sup>、伊藤禎洋<sup>\*\*\*</sup>、手塚英夫<sup>\*\*\*</sup>、神庭重信<sup>\*\*</sup>、

坂本美穂子<sup>\*\*\*\*</sup>、尾崎由基男<sup>\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>山梨大学・大学院・医学工学総合研究部・生化学、

<sup>\*\*</sup>山梨大学・大学院・医学工学総合研究部・精神神経科学、

<sup>\*\*\*</sup>山梨大学、総合分析実験センター、<sup>\*\*\*\*</sup>山梨大学・大学院・

医学工学総合研究部・臨床検査医学

**研究要旨** 種々のアミロイドーシスで沈着する、異なるアミロイドに共通の微量成分、血清アミロイド P 成分 (Apcs) の欠損が、英国の研究グループが報告したように、全身性紅斑性狼瘡様の重度の自己免疫疾患を惹起するかどうかを明確にすることを目的に、我々が独自に作製した無 Apcs マウスを用いて研究を進めた。マウス第 1 番染色体上の Apcs 遺伝子を含む領域には、マウス系統特異的に全身性紅斑性狼瘡を惹起する原因遺伝子群が存在する。そこで、この無 Apcs マウス (C57BL/6 X 129/Sv/Ev) と C3H/He マウスを交配させて得た無 Apcs マウスの血中抗核抗体価を測定したところ、対照野生型マウスと差異を認めなかった。一方、我々は先に、C57BL/6 に 10 世代戻し交配した、血中抗核抗体価の高い無 Apcs マウスは、腎炎に罹患しないこと、無 Apcs マウス作製に用いた ES 細胞が由来した 129/Sv/Ev マウスの Apcs 遺伝子近傍の約 6.2-cM の領域をもつことを見出している。そこで、この領域上において、脾で高発現することにより、マウスの系統特異的に血中抗核抗体価を上昇させると報告されている *Irf1* 遺伝子の発現量を、無 Apcs マウスと対照野生型マウスとで比較解析した。この結果、C57BL/6 マウスと交配させて得た無 Apcs マウスの抗核抗体価が高いのは、Apcs の欠損によるものではなく、129/Sv/Ev マウス由来の *Irf1* 遺伝子などの自己免疫疾患の原因遺伝子が、C57BL/6 マウスの遺伝的背景の中で高発現していることに由来することを示唆する結果を得た。また Apcs は、*Irf1* 遺伝子の異常な発現に何ら関与しないことを見出した。

### A. 研究目的

先に我々は、種々のアミロイドーシスで沈着する異なるアミロイドに共通の微量成分、APCS が、アミロイドーシスの発症にどう関与するかを明らかにするために、標的遺伝子組換え法を用いて、無 Apcs マウス株を作製した。一方その後、英国のグループが作製した無 Apcs マウスでは、高い頻度で抗核抗体と全身性紅斑性狼瘡様の重度の糸球体腎炎を認めると報告された。重篤な自己免疫疾患に罹患するのであれば、アミロイドーシス研究に無 Apcs マウスを用いることができない。しかし、マウス第 1 番染色体上の Apcs 遺伝子を

含む領域には、マウス系統特異的に全身性紅斑性狼瘡を惹起する原因遺伝子群が存在する。一方、我々が作製した無 Apcs マウスも対照野生型マウスに比べ、血清中の抗核抗体価が顕著に上昇していた。しかし、糸球体腎炎の所見は認められず、平均寿命の短縮等の異常を認めなかった。そこで本研究は、Apcs 欠損が、全身性紅斑性狼瘡様の重度の自己免疫疾患を惹起するかどうかを明確にすることを目的に遂行する。

### B. 研究方法

#### 1. 抗核抗体価

C3H/He マウスと無 *Apcs* マウス (C57BL/6 X 129/Sv/Ev) を交配させて得た 12~13 カ月齢の無 *Apcs* マウスと同月齢の対照野生型マウスの血中抗核抗体価を、Hep-2 細胞によるキットを用いて蛍光抗体法で、比較解析した。

## 2. *Ifi202* 遺伝子発現量

*Ifi202* 遺伝子の脾での発現量は、ノーザンブロット法や Real-time RT-PCR 法で解析した。

## 3. マウス *Apcs* の強制発現

アデノウイルス発現ベクターにマウス *Apcs* cDNA を組み込み、*Apcs* 欠損マウスの尾静脈に注入し、*Apcs* を肝で高発現させて *Ifi202* 遺伝子の発現量の変化を調べた。

## 4. 実験動物および飼育条件

マウスは日本クレア株式会社から購入した。マウスの飼育およびマウスを用いた実験は、山梨大学の動物実験専門委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1. 血清抗核抗体価の比較解析

C3H/He マウスと無 *Apcs* マウス (C57BL/6 X 129/Sv/Ev) を交配させて得た 12~13 カ月齢の無 *Apcs* マウス 50 匹と同月齢の対照野生型マウス 41 匹の血中抗核抗体価を、比較解析したところ、両者に差異を認めなかった。従って、血中抗核抗体価は、*Apcs* の欠損のみでは、上昇しないことが明らかとなった。

### 2. *Ifi202* 遺伝子発現量の比較解析

マウス第 1 番染色体上の *Apcs* 遺伝子を含む領域には、*Ifi202* 遺伝子が存在し、脾での高発現により、マウスの系統特異的に血中抗核抗体価を上昇させるが、腎炎は惹起しないと報告されている。また、C57BL/6 マウスでは、この遺伝子は、ほとんど発現していないが、C3H/He や 129/Sv/Ev では、高発現していることが知られている。そこで、C57BL/6 マウスに戻し交配させて得た、抗核抗体価の高い無 *Apcs* マウスと C3H/He マウスと交配させて得た、対照野生型マウスと抗核抗体価に差異を認めない無 *Apcs* マウスについて、脾における *Ifi202* 遺伝子の発現量を、それぞれの対照野生型マウスと比較した。

この結果、C57BL/6 マウス系統の無 *Apcs* マウスでは、対照野生型マウスに比べ、*Ifi202* 遺伝子

の発現量が顕著に増加していたが、C3H/He マウス系統の無 *Apcs* マウスでは、対照野生型マウスとほぼ同量が発現していた。上記のように、C57BL/6 マウスと交配させて得た無 *Apcs* マウス血清中の抗核抗体価は、対照野生型マウスに比べて顕著に高いが、C3H/He マウスと交配させて得た無 *Apcs* マウス血清中の抗核抗体価は、対照野生型マウスと同程度である。従ってこれらの結果は、*Apcs* 遺伝子ではなく *Ifi202* 遺伝子の発現量の差異が抗核抗体価の差異と良く相関することを示している (表 1)。

### 3. *Apcs* は、*Ifi202* 遺伝子の発現を抑制するか

さらに *Apcs* が、C57BL/6 マウスの遺伝的背景の中では、*Ifi202* 遺伝子の発現を抑制することによって、抗核抗体価を調節している可能性を考え、組換えアデノウイルスによる発現系を用いて、抗核抗体価の高い無 *Apcs* マウスの肝で、マウス *Apcs* cDNA を高発現させたが、*Ifi202* 遺伝子の発現は抑制されなかった。また先に、C57BL/6 マウスと交配させて得た、抗核抗体価の高い無 *Apcs* マウスにヒト *APCS* 遺伝子を高発現させても、血中抗核抗体価は、低下しないことを見出している。

## D. 考察

我々は、C3H/He マウスと無 *Apcs* マウス (C57BL/6 X 129/Sv/Ev) を交配させて得た 12~13 カ月齢の無 *Apcs* マウスと同月齢の対照野生型マウスの血中抗核抗体価を比較解析し、*Apcs* の欠損のみでは、血中抗核抗体価は上昇しないことを見出した。また、*Apcs* 遺伝子ではなく *Ifi202* 遺伝子の発現量の差異が抗核抗体価の差異と良く相関することを見出した (表 1)。さらに先に、9~12 カ月齢の内在性 *Apcs* 欠損ヒト *APCS* 遺伝子高発現トランスジェニックマウスと対照無 *Apcs* マウスについて、血清抗核抗体価を測定し、何れも同様に高いことを見出した。

以上の結果は、C57BL/6 マウスと交配させて得た無 *Apcs* マウスの抗核抗体価が高いのは、*Apcs* の欠損によるものではなく、129/Sv/Ev マウス由来の *Ifi202* 遺伝子などの自己免疫疾患の原因遺伝子が、C57BL/6 マウスの遺伝的背景の中で発現しているためではないかと考えられた。また、組換えアデノウイルスによる発現系を用いて、*Apcs*

は、*Irf202* 遺伝子の発現を抑制しないことを明らかにした。

#### E. 結論

*Apcs* の欠損は、重篤な自己免疫疾患を惹起しない。従って無 *Apcs* マウスを用いて、ヒトのアミロイドーシスの発症に *Apcs* がどう関与するかを解析できると結論できる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tamaoki T, Tezuka H, Okada Y, Ito S, Shimura H, Sakamoto M, Endo T, Ozaki Y, Kanba S, Maeda S: Avoiding the effect of linked genes is crucial to elucidate the role of *Apcs* in autoimmunity. *Nature Medicine* 11(1): 11-12, 2005.
- 2) Wei L, Kawano H, Fu X, Cui D, Ito S, Yamamura K, Ishihara T, Tokuda T, Higuchi K, Maeda S:

Deposition of transthyretin amyloid is not accelerated by the same amyloid *in vivo*. *Amyloid* 11(2): 113-120, 2004.

- 3) 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* 11(10): 838-846, 2004.

##### 2. 学会発表

なし

#### 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



表 1. マウス血中抗核抗体価と *Ifi202* 遺伝子発現量の比較

遺伝的背景	マウス血中抗核抗体価		<i>Ifi202</i> 遺伝子発現量	
	無Apcsマウス	対照野生型マウス	無Apcsマウス	対照野生型マウス
C57BL/6	▲	▼	▲	▼
C3H/He	—	—	—	—
	▲ 高い	▼ 低い	— 差異が無い	

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

## TTR アミロイドーシスの遺伝子多型と臨床像

分担研究者 中里雅光 宮崎大学医学部第三内科

共同研究者 伊達 紫\*、塩見一剛\*

宮崎大学医学部、\*第三内科

**研究要旨** FAP 疑い 104 例の TTR 遺伝子解析から、30 例の一塩基置換による TTR 遺伝子異常を検出した。約 1/3 の症例が 65 歳以上の高齢者であり家族歴の不明なものが多くみられた。典型的な FAP の臨床像を呈する症例は極めて少なく、心不全症状を主徴とし循環器内科を受診する例や中枢神経症状のみを呈する症例も存在した。特に中枢性アミロイドーシスは、臨床像からだけでは診断が困難なことが予想され、本研究により明らかになった MRI での脳脊髄軟膜の造影効果は、アミロイドの沈着を反映する所見として有用であると考えられた。

### A. 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は、トランスサイレチン(TTR)分子異常に起因する遺伝性疾患で、prototype である Met30 型以外にも数多くの TTR 変異が見出されている。それらの中には末梢神経症状や自律神経症状を欠く例、あるいは高齢発症の例も含まれており、診断が困難な例も多い。今回私たちは、3年間の研究のまとめとして、TTR 由来の心アミロイドーシス、高齢発症のアミロイドーシス、中枢性アミロイドーシスに焦点を絞り、遺伝子診断の結果に基づき解析した臨床像について検討した。

### B. 研究方法

TTR アミロイドーシス疑いの患者白血球、剖検組織、パラフィン包埋切片より TTR 全エキソンの塩基配列を決定した。患者血清 5 μl を飛行時間型質量分析法で解析し、血清型 TTR の検索を行った。生検組織あるいは剖検組織の TTR 免疫染色を施行し、TTR 由来のアミロイド沈着を証明した。

(倫理面への配慮)

いずれの患者に対しても患者とその家族に十分な説明を行い、理解を得た後、文書にて同意を確認し、TTR 解析ならびに TTR 遺伝子解析を行った。患者とその家族の情報が外部に漏洩しない

ように、十分な情報の管理を行った。

### C. 研究結果

FAP疑いの患者、104例の遺伝子診断の結果、30例にTTR遺伝子異常を認めた。20例の患者はTTRアミロイド沈着を認めたが、遺伝子解析の結果、正常TTRであった。心アミロイドーシスはMet30型3例、Ile50型3例、Glu18型1例で、Met30型は、全例65歳以上の高齢発症であった。この中には、心筋組織で巨細胞を伴ったアミロイド浸潤を認め、心不全徴候の出現から死亡に至るまで6ヶ月といった例もあり、急速に病状が進行する点が特徴であった。Glu18型心アミロイドーシスは、新規のTTR遺伝子変異で、de novo mutationであった。同変異における心筋アミロイド浸潤に特徴的な低電位ECGは、病状の進行をよく反映していた。高齢発症例は12症例あり、11例がMet30型変異で、いずれも非集積地の出身であった。緑内障、小脳失調、脊髄後索症状および錐体路症状で発症し、脊髄生検でTTRアミロイド沈着を認めた中枢性アミロイドーシスは、遺伝子診断の結果、Gly18型leptomeningeal amyloidosisであることが判明した。特徴的所見として、髄液タンパクの上昇およびMRI T1強調画像におけるびまん性のleptomeningeal enhancement効果が認められた。

#### D. 考察

FAP 疑いの 104 例の遺伝子解析から、30 例の TTR 型アミロイドーシスを診断した。末梢神経症状を欠く心アミロイドーシス例ならびに 65 歳以上の高齢発症例の頻度が高く、特に心アミロイドーシス例は、症状の進行が急激であった。中枢神経症状で発症した TTRGly18 型アミロイドーシスはハンガリーの家系に次ぐ 2 家系目の報告で、両家系とも中枢神経症状を主体とした臨床像を呈する点において一致していた。その後の MRI の経過では、頭痛に伴い一過性に出現する FLAIR での脳槽、シルビウス裂の高信号所見、T2 強調画像での脳表のヘモジデリン沈着所見がとらえられており、反復するくも膜下出血を示唆していた。

#### E. 結論

これまで取り組んできた FAP の遺伝子診断と臨床像の解析から、TTR アミロイドーシスには家族歴がはっきりせず、高齢発症で末梢神経症状や自律神経症状を欠く例も多くみられること、非集積地の Met30 型アミロイドーシスの大半が高齢発症であったことなどが明らかになった。TTR 変異に基づく全身性アミロイドーシスには、中枢神経症状のみで発症する病型もあり、特徴的な MRI 所見は、中枢性アミロイドーシスの診断に重要である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表.

1) Jin K, Sato S, 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. 75:1463-1466. 2004.

##### 2. 学会発表

1) 神 一敬、佐藤滋、高橋敏行、野村宏、高瀬貞夫、伊達紫、中里雅光、富永悌二、糸山泰人、池田修一：家族性髄膜アミロイドーシス (Asp18GlyTTR 型) の兄弟例. 第 45 回日本神経学会総会東京 5 月 11 日 2004 年

2) 伊達 紫、中里雅光：当科で診断した過去 5 年間のトランスサイレチン型アミロイドポリニューロパチー(FAP). 第 45 回日本神経学会総会東京 5 月 11 日 2004 年)

#### 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

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:  
特に中枢神経系に主病変を有する TTR アミロイドーシスについて

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、矢崎正英、関島良樹、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 免疫沈降法と質量分析法とを組み合わせた IP-Mass 分析法により被検者の血清中に存在する変異 TTR を検出する診断法は TTR アミロイドーシスの臨床診断に有用である。しかし leptomeningeal-type TTR アミロイドーシスでは、正常 TTR との mass difference からは IP-Mass 分析で検出されるはずの変異 TTR が IP-Mass 分析では検出できない。leptomeningeal-type TTR アミロイドーシス症例では、血清中からは変異 TTR が検出されなかったが、髄液中では微量ながら変異 TTR が検出された。さらに leptomeningeal-type 症例では、髄液中の TTR tetramer fraction に変異 TTR が検出されず、変異 TTR は monomer fraction に存在していた。以上の結果からは、leptomeningeal-type TTR アミロイドーシスを生ずる変異 TTR は TTR の生理的な tetramer 形成に参加できずに不安定な monomer として存在すること、そしてこのような TTR 分子の蛋白化学的性質(特に tetramer 形成能)が leptomeningeal-type という特異な表現型の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(FAP)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、約 100 種類の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 FAP の病型を呈する。我々は従来から免疫沈降法と質量分析法とを組み合わせた IP-Mass 分析法により患者血清中の変異 TTR を検出することで、FAP 患者の迅速診断サービスとして全国の医療機関から依頼を受けた検体の分析を行ってきた。このような臨床的活動の過程で、通常の TTR アミロイドーシスとは異なり、血清中に変異 TTR が検出されない TTR アミロイドーシス患者が存在し、そのような患者では主として髄膜にアミロイドが沈着する leptomeningeal-type と呼ばれる表現型を呈することが、昨年度までの検討で明らかになってきた。今年度は我々のこれまでの IP-Mass 法による TTR アミロイドーシス診断を総括するとともに、また昨年度までの leptomeningeal-type

TTR アミロイドーシスの主に臨床的な検討に引き続いて、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、leptomeningeal-type TTR アミロイドーシス患者の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

1) IP-Mass 分析法による FAP 患者の迅速診断  
1999 年以降、国内外の医療施設から診断を依頼された FAP あるいは TTR アミロイドーシスが疑われた患者 121 例の血清を対象として後述する IP-Mass 分析を行った。

2) leptomeningeal-type 患者体液中 TTR の生化学的分析

leptomeningeal-type および non - leptomeningeal - 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 leptomeningeal-type TTR :