

200500856A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山田正仁

平成18(2006)年3月

目 次

[I] 総括研究報告

主任研究者 山田正仁	1
------------------	---

[II] 分担研究報告

1. ALアミロイドーシスに対する治療法の基礎的研究	11
－PPAR β リガンドのスクリーニングとその増殖抑制作用－	
河野道生	
山口大学・大学院医学系研究科・生体シグナル解析医学講座	
2. 免疫グロブリンL鎖C末端部分に対する抗体を用いた	16
ALアミロイドーシスの生化学的および免疫組織化学的検討	
石原得博	
山口大学医学部構造制御病態学講座	
3. 原発性ALアミロイドーシスに対するメルファラン中等量療法適用の検討	20
麻奥英毅	
広島赤十字・原爆病院検査部	
4. 原発性ALアミロイドーシスに対する中等量メルファランによる	23
寛解導入療法と自家末梢血幹細胞移植療法。新規プロトコールの作成	
島崎千尋	
京都府立医科大学血液・腫瘍内科	
5. モデルマウスを用いたFAP発症機構の解析	28
－ATTR沈着はseedingに依存しない？	
樋口京一	
信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野	
6. 変異TTRの安定性と細胞のQuality Control Systemが	33
アミロイドーシス発症に及ぼす影響の検討	
池田修一	
信州大学医学部神経内科、リウマチ・膠原病内科	
7. 家族性アミロイドポリニューロパチーのアミロイド沈着過程における	36
ニトロソ化の役割	
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	
8. siRNAによる家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)の遺伝子	41
治療における <i>in vivo</i> でのインターフェロン誘導の回避に関する検討	
水澤英洋	
東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科学)	

9. FAPの肝移植の効果に関する検討	44
ー肝移植10年後に死亡したFAP ATTR V30M患者の剖検例を通してー	
安東由喜雄	
熊本大学大学院医学薬学研究部、病態情報解析学分野	
10. FAP患者肝を利用したドミノレシピエントの胃粘膜へのアミロイド沈着	49
池田修一	
信州大学医学部神経内科、リウマチ・膠原病内科	
11. 新たなガンマ・セクレターゼ調節因子の検索	51
水澤英洋	
東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科学)	
12. Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1)の発現に関する解析	53
玉岡 晃	
筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻	
神経病態医学分野(神経内科学)	
13. 脳A β 42選択的除去法の検討	55
東海林幹夫	
弘前大学医学部脳神経統御部門	
14. 遺伝性アルツハイマー病における脳内A β アミロイド沈着への	58
血清アミロイドP成分の関与に関する研究	
前田秀一郎	
山梨大学・大学院・医学工学総合研究部・生化学	
15. アルツハイマー病患者の脳脊髄液は β アミロイド線維形成を促進する	62
山田正仁	
金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科)	
16. 我が国における脳アミロイドアンギオパチーに関する全国疫学調査	66
山田正仁	
金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科)	
17. Cerebral Amyloid Angiopathyの脳脊髄液マーカー研究	71
葛原茂樹	
三重大学医学部神経内科	
18. secondary amyloidosisにおける脂質代謝機構の検討	75
ー高SAA血症マウスのDNAマイクロアレイによる解析ー	
中里雅光	
宮崎大学医学部第三内科	
19. AAアミロイドーシスのIL-6阻害療法ー(1)ー	78
ーヒト化抗IL-6受容体抗体によるSAAの減少とその理論的裏付けー	
吉崎和幸	
大阪大学保健センター	

20. アミロイド原性SAAアイソタイプ、SAA1の特異測定	84
山田俊幸 自治医科大学臨床検査医学	
21. AAアミロイドーシス合併関節リウマチにおける診断時無症候例の経過と予後に関する検討	86
奥田恭章 道後温泉病院リウマチセンター内科	
22. リゾリン脂質による $\beta 2$ -ミクログロブリン アミロイド線維の伸長反応促進効果	91
内木宏延 福井大学医学部医学科 病因病態医学講座・分子病理学領域	
23. advanced-glycation-endproducts (AGE) 化 $\beta 2$ microglobulin による培養破骨様細胞の活性化	94
今井裕一 愛知医科大学 腎臓・膠原病内科	
24. 透析アミロイドーシス滑膜病変における macrophage migration inhibitory factor (MIF)に関する検討	98
下条文武 新潟大学大学院 腎膠原病内科学分野	
25. 透析アミロイドーシスに関係する患者要因の分析	102
高市憲明 虎の門病院腎センター	
26. マウス老化アミロイドーシス関連apoA-IIのアミロイド線維形成機構	107
樋口京一 信州大学大学院医学研究科 加齢生物学分野	
27. アミロイドーシス特有の病理像を認識するプローブの探索	112
工藤幸司 東北大学先進医工学研究機構高度通信分野	
[Ⅲ] 研究報告会、ワークショップ等プログラム	117
①夏のワークショッププログラムおよび抄録(平成17年7月7日-8日)	
②ALアミロイドーシス分科会：ALアミロイドーシス臨床試験検討会プログラム (平成17年12月23日)	
③平成17年度研究報告会プログラム(平成18年2月9日-10日)	
[Ⅳ] 研究成果の刊行に関する一覧表	159
[Ⅴ] 班構成員名簿	181

[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 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学（神経内科）教授

研究要旨 アミロイドーシス各病型 [①AL、②AA、③家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)、④透析、⑤脳 (アルツハイマー病 (AD)、脳アミロイドアンギオパチー (CAA))] ごとの戦略および全病型に共通する基盤的研究により、アミロイドーシスの疫学解明、治療プロトコル確立、新規診断・予防・治療法開発を行った。AL ではメルファランによる寛解導入と自家末梢血幹細胞移植療法からなる新規治療プロトコルを策定し全国多施設共同臨床試験体制を初めて構築した。AA では無症候時の早期診断の臨床的意義を明らかにし、抗 IL-6 療法が優れた治療効果を有する可能性を示した。FAP では肝移植治療の問題点（移植後の進行やドミノ移植レシピエントにおけるアミロイド沈着）を示し、さらに変異トランスサイレチン分子の不安定性等による沈着機構の解明、遺伝子治療の開発を行った。透析アミロイドーシスでは、透析患者における本症発症・進展の危険因子、リゾリン脂質によるアミロイド形成促進を見出した。脳アミロイドーシスでは、AD 患者は A β 線維形成に適した脳脊髄液環境を有していること、AB42 特異抗体による免疫療法が AD モデル動物に有効であること等を示し、CAA の全国規模の疫学調査を世界で初めて実施した。アミロイドイメージング開発研究を行い、各種アミロイド蛋白と高い結合性を示す化合物を報告し、アミロイドーシス全病型のイメージングに有用なプローブである可能性を示した。

分担研究者	島崎千尋	京都府立医科大学大学院医学研究科
下条文武	新潟大学医歯学総合病院（第二内科）腎臓内科 教授	血液病態制御学 講師
池田修一	信州大学医学部内科学第三 教授	吉崎和幸
樋口京一	信州大学医学部大学院医学研究科（加齢生物学分野）病態生化学 教授	東海林幹夫
玉岡 晃	筑波大学人間総合科学研究科病態制御医学 教授	弘前大学医学部付属脳神経血管病態研究施設神経統御学部門 教授
高市憲明	虎の門病院腎センター内科、腎臓病部長	麻奥英毅
山田俊幸	自治医科大学臨床検査医学 助教授	広島赤十字病院・原爆病院検査部部長
前田秀一朗	山梨大学大学院医学工学総合研究部病態医化学生化学講座第一教室 教授	石原得博
内木宏延	福井大学医学部医学科病因病態学講座分子病理学領域病理学 教授	山口大学医学部医学科構造制御病態学講座 教授
今井裕一	愛知医科大学医学部内科学講座腎臓・膠原病内科 教授	河野道生
葛原茂樹	三重大学大学院医学部生命医科学専攻神経感覚医学講座神経病態内科学 教授	山口大学大学院医学研究科生体シグナル解析医学講座血液学 教授
		奥田恭章
		医療法人千寿会道後温泉病院内科（リウマチ科） 部長
		安東由喜雄
		熊本大学医学部大学院医学薬学研究部病態情報解析学神経内科検査医学 講師
		中里雅光
		宮崎大学医学部第三内科 教授
		工藤幸司
		東北大学先進医工学研究機構高度情報通信分野 教授
		水澤英洋
		東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学 教授

A. 研究目的

アミロイドーシスの分子病態に基づく早期診断・治療法の確立を目的とする。本症は診断が遅れることが多く、また、一部で適応となる肝移植等を除けば有効な根本治療がないのが現状である。アミロイドーシス病型ごとの戦略並びに全病型共通の発症機構の基盤的研究により、本症の早期診断、治療成績の向上、新規診断、予防・治療法の開発を行う。研究成果は、本症に悩む多数の患者、さらには多数の発症リスク保有者に対する医療、保健に貢献する。

- 1) **AL アミロイドーシス**：自己末梢血幹細胞移植併用療法の有用性を高めるプロトコルを確立し、早期の移植治療を可能にする。本症診断後の 50 % 生存は約 1 年であり、新規プロトコルによる臨床試験を実施するとともに、AL の分子病態に基づく新規診断・治療法開発研究を行う。
- 2) **AA アミロイドーシス**：本症は難治性で確立された治療法はなく、AA 発症のリスクを有する多数の関節リウマチ (RA) 患者にとって本研究の必要性は高い。リウマチ性疾患における本症発症の危険因子の解明、早期診断・治療指針の作成、分子病態解明に基づく抗サイトカイン療法の確立をめざす。
- 3) **家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)**：本症の治療法である肝移植の有効性や問題点を明らかにすること、肝移植が適用できない患者にも応用可能な治療法の開発が急務である。肝移植の最適化と共に、トランスサイレチン (TTR) 沈着機構の解明とその制御により、新規予防・治療法 (抗 TTR アミロイド療法) 開発をめざす。
- 4) **透析アミロイドーシス**：長期透析患者数と共に本症は増加している。早期発見法、治療法確立のために、腎移植を含む治療法の治療成績の向上、 β_2 -ミクログロブリン (β_2 -m) 線維形成過程の解明による新規治療法開発をめざす。
- 5) **脳アミロイドーシス**：アルツハイマー病 (AD) を中心とする本症の克服は大きな社会的課題である。本研究ではアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) 沈着の分子病態解明を通じ、アミロイドを標

的とした新しい早期診断マーカー、新規予防・治療法の開発を行う。また、高齢者に多発する脳アミロイドアンギオパチー (CAA) の診断マーカー探索、疫学的解明を行う。

- 6) **アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発**：各種アミロイドーシスに共通するアミロイド沈着機構を統合的に研究し、診断、予防・治療法への応用を行う。特に、特異的プローブを用いたアミロイドイメージングは診断への応用が期待される。また、アミロイドーシスの一種であるプリオン病では疾患の伝播が大きな問題となっている。プリオン病に留まらずアミロイドーシス全体に渡って、アミロイドによるアミロイドーシス発症促進 (“伝播”) 現象がみられる可能性があり、その機序の解明は、食品や環境の安全性確保のために重要である。

B. 研究方法

1) **AL アミロイドーシス**：

① **新規プロトコルによる臨床試験**：原発性 AL アミロイドーシスに対する治療法の一つとして自家末梢血幹細胞移植が注目されているが、本邦における実施例はいまだ少なく、至適プロトコルの開発、全国多施設共同臨床試験を計画した (島崎ほか)。さらに、新たな治療オプションとしてメルファラン中等量療法を検討した (麻奥)。

② **AL 特異抗体作製**：診断、治療への応用、発生病理解明の目的で免疫グロブリン λ 鎖 C 末端近傍に対する抗体 (抗 λ 194-211) を作製した (石原)。

③ **抗 NF- κ B 治療法の開発**：アミロイド原性の免疫グロブリン L 鎖を産生する骨髄腫細胞を標的とする治療法を開発する目的で、抗 NF- κ B 活性を有する化合物を検討した (河野)。

2) **AA アミロイドーシス**：

① **臨床的研究**：AA アミロイドーシスの経過、予後を明らかにするために、診断時無症候の AA アミロイドーシス合併 RA87 例の臨床経過と予後を調査した (奥田)。AA アミロイドーシスを高頻度に合併するキャッスルマン病、RA でヒト化抗 IL-6 レセプター抗体 (アクテムラ) を用い

た IL-6 機能阻害療法を上記疾患で行い、さらに SAA の産生機序を肝細胞を用いて解析した (吉崎)。

② 基礎的研究：前駆体蛋白 SAA の 2 つのアイソタイプである SAA1 と SAA2 を分別定量する測定法の開発を試みた (山田俊幸)。AA 血症モデルマウスを作製し、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現について、DNA マイクロアレイを用いて解析した (中里)。

3) FAP：

① AP の肝移植に関する研究：肝移植後 10 年目に死亡した FAP 患者の剖検組織について臨床病理学的、生化学的検討を行い、肝移植の効果、肝移植後の FAP の病態変化を解析した (安東)。FAP 肝を利用したドミノ肝移植を施行したドミノレシピエント 4 名について、胃粘膜生検を施行し、アミロイド沈着の有無を検索した (池田)。

② AP の発症機構解明および新規治療法開発に関する研究：FAP のモデルマウス (Met30TTR) に FAP 患者の心臓より抽出したアミロイド線維を経口投与してアミロイド沈着の促進を検討した (樋口)。変異 TTR がアミロイドーシスを発症させるタンパク質・細胞レベルでの機序を解明するため、変異 TTR のエネルギー学的な安定性とアミロイド原性／分泌効率との関係を検討した (池田)。FAP において、活性酸素傷害がアミロイド形成を促進させることが知られているため、ニトロソ化を受けた TTR のアミロイド形成能を検討した (安東)。siRNA による FAP の遺伝子治療開発の目的で変異 TTR 遺伝子に対し特異的な siRNA を作製し、更に siRNA 治療に伴うインターフェロン *in vivo* 誘導を回避する方法を検討した (水澤)。

4) 透析アミロイドーシス：

① 臨床的研究：透析アミロイドーシスの発症に関係する因子を明確にするために、長期透析患者の患者要因を解析した (高市)。透析アミロイドーシス滑膜病変における macrophage migration inhibitory factor (MIF) の発現とその役割について検討した (下条)。

② 基礎的研究：透析アミロイドーシス骨病変における破骨細胞の関与を明らかにするために、U937 細胞を破骨様細胞に分化させ、 $\beta 2\text{-m}$ の影

響を検討した (今井)。 *In vitro* $\beta 2\text{-m}$ アミロイド線維形成系を用い、種々のリゾリン脂質の $\beta 2\text{-m}$ アミロイド線維伸長促進効果を解析した (内木)。

5) 脳アミロイドーシス：

① A β アミロイド沈着分子病態解明と AD 診断治療法開発：ベータおよびガンマ・セクレターゼは APP からの A β 産生に関与する。ガンマ・セクレターゼの新たな調節因子をガンマ・セクレターゼの構成因子 Aph-1 に対する抗体を用い解析した (水澤)。主要なベータ・セクレターゼである BACE1 の産生量が培養細胞系に酸化ストレスを負荷することで変化するかどうかを解析した (玉岡)。AD 脳では A β 線維 (fA β) 形成が促進された状態にあるが、*in vitro* fA β 実験系を用い、AD 患者と non-AD 患者の脳脊髄液が fA β 形成に及ぼす影響を解析した (山田正仁)。AD 脳の AB 沈着に血清アミロイド P 成分 (Apc; Sap) がどう関与するかを解明するために、AD モデルマウス (Tg2576) と Sap ノックアウトマウスを用い解析した (前田)。AB42 分子種特異的モノクローナル抗体を用い、AD モデルマウス (Tg2576) に受動免疫療法を行った (東海林)。

② CAA に関する研究：CAA および CAA に関連する中枢神経系限局性血管炎 (IACNS) の全国疫学調査を行った (山田正仁)。孤発性 CAA 脳脊髄液中の tau および A β 関連マーカーを検討した (葛原)。

6) アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発：マウス老化アミロイドーシスにおけるアミロイド線維形成機構解明のため、原因蛋白であるアポリポ蛋白 A-II (apoA-II) の *in vitro* における線維重合反応を解析した (樋口)。アミロイドイメージング開発の目的で、ヒトのアミロイドーシス各病型とアミロイドーシス動物モデルのアミロイドとプローブ候補化合物との結合性を検討した (工藤)。

(倫理面への配慮)

患者を対象とする臨床研究 (診断、治療、遺伝子解析等)、疫学研究等については各施設の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。遺伝子組み換え動物を含む動物実験に関しては、各施設の指針に基づ

き動物実験委員会等の承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

1) AL アミロイドーシス:

①新規プロトコールによる臨床試験：中等量メルファランによる寛解導入療法と自家末梢血幹細胞移植療法からなる原発性 AL アミロイドーシス治療プロトコールを提案し、安全かつ有効性の高い治療方法を確立することを目的とした、全国 11 施設が参加する臨床試験を体制を構築した。

また、メルファラン中等量療法の試みとして、骨髄腫患者 4 例でメルファラン 20-60mg/m² を投与した。毒性は骨髄抑制が主でその他の臓器毒性は軽微であった。しかし腎障害の強い患者では骨髄抑制が遷延する可能性が示された。心アミロイドーシス合併患者でも心機能の急激な悪化は認めなかった。前治療で VAD 抵抗性となった例も含め 2 例に good PR を得た。

②AL 特異抗体作製：作製した抗λ 194-211 抗体は免疫組織化学に 11 例全例で Aλアミロイドと反応した。Western ブロットでは、いずれも L 鎖全長に相当するバンドとともに、20kDa 以下のバンドが複数みられた。

③抗 NF-κB 治療法の開発：副腎皮質ホルモンのデキサメサゾンとフラボノイドのバイカレインに強い PPARβ活性化能が認められた。骨髄腫細胞株をデキサメサゾンやバイカレインで刺激すると、核内にて PPARβと NF-κB p65 との結合が認められ NF-κB 活性が抑制され、増殖・生存が強く抑制された。

2) AA アミロイドーシス:

①臨床的研究：AA アミロイドーシス診断時、有症候群の 5 年生存率、10 年生存率はそれぞれ 53%、38.4%であるのに対して、無症候群はそれぞれ 91.9%、74.3%であり (p<0.0001)、早期診断例は積極的な関節リウマチのコントロールにより予後及び経過は良好であった。

キャッスルマン病、RA に対する IL-6 機能阻害療法により、80%の患者で CRP、SAA の正常値化が認められた。肝細胞における SAA の産生増強には IL-6 が必須で、3 者刺激下では IL-6 阻

害が SAA 産生をほぼ完全に抑制した。

②基礎的研究：酵素免疫測定法による SAA1 特異測定系の構築し、血清中では健常者、RA 患者ともに SAA1 濃度が総 SAA の 70~80%を占めていた。

SAA 血症マウスの肝では SAA1 および 2 の遺伝子発現が増加、一方、脂質代謝関連遺伝子の発現は低下していた。

3) FAP:

①FAP の発症機構解明および新規治療法開発に関する研究：FAP モデルマウスへの FAP アミロイド線維投与実験では、投与 18 ヶ月以降に AApoAII の沈着が認められ、同時に ATTR の沈着も観察されたが、2 種類のアミロイド線維の沈着場所は異なっていた。

変異 TTR のエネルギー学的な安定性が *in vitro* でのアミロイド原性と quality control system を介した細胞からの分泌効率を規定し、生体でのアミロイドーシスの重症度と臓器特異性に深く関与していた。

TTR のニトロソ化の影響を検討すると、ニトロソ化を受けた TTR は wild type, V30M 変異とも非ニトロソ化 TTR より有意にアミロイド形成能が高く、更に V30M のほうが wild type より更にアミロイド形成能が高かった。

FAP の遺伝子治療では、FAP 変異遺伝子に対し特異的な siRNA を作製することに成功した。しかし、化学合成 siRNA をカチオニックリポソーム法で *in vivo* に投与した場合、血中にインターフェロンが誘導された。そこで、siRNA に 2'-O メチル化などの化学修飾を施すことによりインターフェロン誘導を軽減できることを確認した。

②FAP の肝移植に関する研究：肝移植 10 年後の剖検例の検討では、肝移植後に、緑内障の出現、神経伝導検査所見の軽度の悪化、心エコー上悪化と心アミロイドーシス進行がみられた。心抽出アミロイドの TTR を解析すると約 75%が正常型 TTR であり、肝移植後に正常 TTR がアミロイドとして沈着したと考えられた。

FAP 肝のドミノ移植を受けた 4 名のレシピエントの検討で、肝移植後 4 年で胃粘膜生検を施行した 2 名で同部位にアミロイド沈着を認めた。

4) 透析アミロイドーシス:

①臨床的研究: 透析アミロイドーシス発症に関与する透析患者の要因の検討では、アミロイドスコアには加齢が、手根管症候群の発症には高カリウム血症が危険因子である可能性が示唆された。

MIF の関与を検討すると、MIF は滑膜病変に発現しており、透析アミロイドーシスを通常合併する透析歴 20 年以上の患者は、20 年未満の患者に比して、血清 MIF 値は有意に高値であった。

②基礎的研究: AGE 化した $\beta 2\text{-m}$ は破骨様細胞に対し、最も強い酸素ラジカル・酒石酸耐性酸フォスファターゼの産生増強作用を示した。

In vitro $\beta 2\text{-m}$ アミロイド線維形成系で、中性 pH 域で親水基に陰性荷電を持つリゾフォスファチジン酸、リゾフォスファチジルグリセロール、及びリゾフォスファチジルセリンが $\beta 2\text{-m}$ アミロイド線維の伸長促進効果を示した。

5) 脳アミロイドーシス:

①A β アミロイド沈着分子病態解明と AD 診断治療法開発: 新たなガンマ・セクレターゼ調節因子探索の結果、ある蛋白で presenilin、nicastrin、Aph-1 との結合が確認され、別の蛋白で Aph-1 とのみ結合が確認された。

培養細胞に対する酸化処理の影響を検討すると、BACE1 濃度は増加する傾向があることを認めた。

ヒト脳脊髄液は fA β 形成を抑制したが、non-AD 患者群の方が AD 患者群に比し、強い抑制効果を示した。

AD 脳の A β 沈着への Sap の関与をみた実験では、25 カ月齢の高齢マウスにおいては、Sap が脳内 A β アミロイドの沈着を促進した。

AD モデルマウスに対する AB42 抗体による治療実験では、脳内老人斑の除去、その際に可溶化された AB42 分子種の脳外への選択的クリアランス増加を認めた。

②CAA に関する研究: CAA 関連脳出血、IACNS の診断基準を作成後、全国 884 施設 1378 部門に郵送によるアンケート方式で第 1 次全国調査 (過去 5 年間) を実施、CAA 関連脳出血のべ 794 例、CAA 関連他病態 21 例、IACNS 64 例を見出した。

その結果をもとに第 2 次全国調査を実施し、CAA 関連脳出血 総数 303 例 (平均 74.9 ± 8.4 歳) の詳細なデータが集計された。CAA 関連脳出血の全国患者数 (5 年間) は 2882 人と推定された。

脳葉型脳出血 (CAA 疑い) 症例の髄液では AD と同様のマーカーの変化が認められた。また、病理学的に診断された CAA 症例において、CAA の病期進行と A $\beta 42$ 値が逆相関していた。

6) アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発: マウス apoA-II のアミロイド線維の形成は B 型 apoA-II と C 型 apoA-II のアミノ酸組成の相違とは無関係で、両型に共通の 16 番目のアミノ酸 (Gln) を鍵として N 末と C 末配列の相互作用により線維を形成することが示された。

アミロイドイメージング用プローブの探索研究では、BF-227 がヒトのアミロイドーシス各病型とアミロイドーシス動物モデルのアミロイドのいずれとも高い結合性を示した。

D. 考察

1) AL アミロイドーシス: 中等量メルファランによる寛解導入療法と自家末梢血幹細胞移植療法からなる原発性 AL アミロイドーシスの新規治療プロトコールを作成し、全国 11 施設が参加する臨床試験をわが国で初めて計画し、実施体制を構築し得た。来年度より臨床試験を開始する予定である。また、メルファラン中等量療法は今後検討すべき AL 治療のオプションであることが示唆された。

AL 特異抗体作製では、A λ アミロイドーシスのアミロイド中に入鎖 C 末端部分が含まれていること、アミロイド沈着物中に定常領域主体のフラグメントを含んでいる A λ アミロイドーシス例が存在することが明らかになった。今後、この抗体の診断や治療への応用を行う。

AL アミロイドーシスの治療戦略として、抗 NF- κ B 活性のあるデキサメサゾンとバイカレインを併用した治療法の可能性が示唆された。

2) AA アミロイドーシス: AA アミロイドーシス診断時無症候群の解析により、RA 経過中に AA を無症候時に早期診断できた例は積極的な RA のコントロールにより予後及び経過は良好であ

り、リスク保有者の早期診断の重要性が明確になった。

AA 関連疾患における抗 IL-6 療法の有効性が実証され、IL-6 阻害が SAA 抑制に最も有効であることが示された。今後、抗 IL-6 療法を AA アミロイドーシス治療へ応用していくための臨床試験を計画する。

SAA1 の測定系の構築に成功した。現行の SAA 総濃度測定値は、ほぼ SAA1 の値を代表しているとみなしていいと考えられた。

高 SAA 血症マウスにおける肝遺伝子発現解析により、AA アミロイドーシスにおける脂質代謝異常の関与が示された。

3) **FAP**: 肝移植 10 年後の FAP 剖検例の解析により、肝移植では心臓、眼の新たなアミロイド沈着を抑制できないことが示唆され、FAP 患者への肝移植の適応では移植前の心アミロイドーシスの評価が特に重要であることが明らかになった。

FAP 肝のドミノ移植を受けたドミノレシピエントの検討では、組織へのアミロイド沈着が肝移植後数年で病理組織学的に明らかになり、予想以上に早期に FAP を発症する危険性が示唆された。これは FAP の関与するドミノ肝移植において、十分留意されなければならない。今後、すべてのドミノレシピエントについて同様の調査が必要である。

FAP モデルマウスへの FAP アミロイド線維投与実験の結果から、TTR 線維形成は他のアミロイドとは異なり、seeding に依存しない可能性が示唆された。

変異 TTR のエネルギー学的な安定性がアミロイド原性や細胞からの分泌効率を規定することにより FAP の病態を形成していることから、その修飾が治療法開発のキーであることが明らかになった。

TTR のニトロソ化反応については、FAP のアミロイド沈着好発部位は血管周囲で、NO が最も作用するところであることから、TTR のニトロソ化反応が TTR アミロイド沈着に重要な役割を果たすことが示唆された。

siRNA を用いた FAP の遺伝子治療法を開発した。インターフェロン誘導など解決すべき問題

点も多いが、siRNA の高い抑制効果から、今後臨床応用へ向けた進展が期待される。

4) **透析アミロイドーシス**: 長期透析患者が透析アミロイドーシスを発症する最大の危険因子は加齢であり、加齢に関連して透析アミロイドーシス発症に関与する生体分子を解明していく必要がある。

透析患者における MIF の検討より、MIF は透析アミロイドーシス滑膜病変の進展に関与している可能性が考えられた。また、破骨様細胞の解析により、透析アミロイドーシスの進展に AGE 化 $\beta 2-m$ による破骨細胞の活性化が寄与している可能性が示唆された。

In vitro $\beta 2-m$ アミロイド線維形成系を用いた実験で、リゾリン脂質が生体内における $\beta 2-m$ アミロイド線維の形成、沈着の過程に関与している可能性が示唆された。

5) **脳アミロイドーシス**: A β 産生に関与するガンマ・セクレターゼ、BACE1 の検討では、ガンマ・セクレターゼ複合体は既に報告している 4 因子の他に、その活性を調節する因子などが複数存在することが示唆された。その調節メカニズム解明により新規治療法の手がかりが得られる可能性がある。また、酸化ストレスが BACE1 の発現増加を介して AD の病態に関与している可能性が示唆された。

患者脳脊髄液の解析により、AD では fA β 形成に適した髄液環境を有しており、その検出や制御が診断や治療の重要な標的であることが明らかになった。また、AD 脳への A β 沈着には Sap が関与していることが AD 動物モデルで明らかになった。A $\beta 42$ 分子種特異的モノクローナル抗体による受動免疫療法は脳に沈着する A $\beta 42$ の選択的除去が可能であり、アルツハイマー病の病態特異的な治療法として有望と考えられた。

CAA に関する研究では、世界初の CAA 全国疫学調査を実施し、全国患者数が推計され、本疾患が少なからぬ頻度 (2882 人/5 年) で全国に存在することが明らかになった。現在、多数例による臨床像の解析が進行しつつある。CAA の脳脊髄液の解析では AD と同様の変化がみられたことから、CAA と AD の密接な関連が示され、AD と同様に脳脊髄液マーカーの解析が CAA

診断に有用である可能性が示唆された。

6) アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発：マウス老化アミロイドーシスにおける ApoA-II アミロイド線維形成に関与するアミノ酸配列が明らかになり、線維形成機構のキーとなる部分と考えられた。

アミロイドイメージング開発研究では、BF-227 は、いずれのアミロイド蛋白とも高い結合性を示す優れたプローブ化合物であることが示された。BF-227 は AD におけるアミロイドイメージングに応用されつつあり、すべてのアミロイドーシスの検出に有用なイメージングプローブとして臨床応用を進めていく予定である。

E. 結論

アミロイドーシス各病型ごとの戦略および全病型に共通する基盤的研究により、疫学調査、治療プロトコル、新規診断・予防・治療法開発等を行った。AL では新規治療プロトコルによる、わが国初の全国多施設臨床試験体制を構築した。AA では抗 IL-6 療法が強力な新規治療法になる可能性を示した。FAP では肝移植後の長期経過に伴う問題点、新規治療法 (TTR 安定化、siRNA 治療等) の可能性を示した。脳アミロイドーシスでは、AD は A β 線維形成に適した脳脊髄液環境を有すること、AD モデル動物における A β 42 受動免疫療法の有効性などを示し、CAA 全国疫学調査を世界で初めて実施した。アミロイドイメージング開発研究に行い、アミロイドーシス全病型のイメージングに有用と考えられるプローブ化合物を見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(主要原著論文のみを下に示す。発表の詳細は分担研究報告を参照のこと)

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. *Nat Med* 11:11-12, 2005.

2) Sekijima Y, Wiseman LR, Matteson J, Hammarström P, Miller SR, Sawkar AR, Balch WE, Kelly JW. The biological and chemical basis for tissue selective amyloid disease. *Cell* 121:73-85, 2005

3) Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 106:2854-2861, 2005.

4) Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman's disease. *Blood* 106:2627-2632, 2005.

5) 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* 105:3295-3302, 2005.

6) 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* 105:3312-3318, 2005.

7) Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y. Quinoline and benzimidazole derivatives. Candidate probes for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:10857-10862, 2005.

8) 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 Res* 65:2269-2276, 2005.
- 9)Zhang H, Sawashita J, Fu X, Korenaga T, Yan J, Mori M, Higuchi K. Transmissibility of mouse AApoAII amyloid fibrils: inactivation by physical and chemical methods. *FASEB J*, 2006 (in press)
- 10)Ohayagi Y, Asahara H, Chui DH, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, Yamada T, Kikuchi H, Taniwaki T, Murai H, Ikezoe K, Furuya H, Kawarabayashi T, Shoji M, Checler F, Iwaki T, Makifuchi T, Takeda K, Kira J, Tabira T. Intracellular A β 42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J* 19:255-257, 2005.
- 11)Korenaga T, Yan J, Sawashita J, Matsusita T, Naiki H, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Fu X. Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am J Pathol*, 2006 (in press)
- 12)Ikeda M, Shoji M, Kawarai T, Kawarabayashi T, Matsubara E, Murakami T, Sasaki A, Tomidokoro Y, Ikarashi Y, Kuribara H, Ishiguro K, Hasegawa M, Yen SH, Davies P, Chishti M A, Harigaya Y, Okamoto K, Abe K, Carlson GA, St.George-Hyslop P, Westaway D. Accumulation of filamentous tau in the cerebral cortex of human tau R406W transgenic mice. *Am J Pathol* 166:521-531, 2005.
- 13)Kanno T, Yamaguchi K, Naiki H, Goto Y, Kawai T. Association of thin filaments into thick filaments revealing the structural hierarchy of amyloid fibrils. *J Biol Chem* 149:213-218, 2005.
- 14)Kihara M, Chatani E, Sakai M, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. Seeding-dependent maturation of β_2 -microglobulin amyloid fibrils at neutral pH. *J Biol Chem* 280:12012-12018, 2005.
- 15)Raman B, Ban T, Yamaguchi KI, Sakai M, Kawai T, Naiki H, Goto Y. Metal ion-dependent effects of clioquinol on the fibril growth of an amyloid β peptide. *J Biol Chem* 280:16157-16162, 2005.
- 16)Ohhashi Y, Kihara M, Naiki H, Goto Y. Ultrasonication-induced amyloid fibril formation of β_2 -microglobulin. *J Biol Chem* 280:32843-32848, 2005.
- 17)Nakaya Y, Yamane T, Shiraishi H, Wang HQ, Matsubara E, Sato T, Dolios G, Wang R, De Strooper B, Shoji M, Komano H, Yanagisawa K, Ihara Y, Fraser P, St. George-Hyslop P, Nishimura M. Random mutagenesis of presenilin 1 identifies novel mutation exclusively generating long amyloid β peptides. *J Biol Chem* 280:19070-19077, 2005.
- 18)Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, et al. Wild-type PINK1 Prevents Basal and Induced Neuronal Apoptosis, a Protective Effect Abrogated by Parkinson Disease-related Mutations. *J Biol Chem* 280:34025-34032, 2005.
- 19)Saito Y, Yokota T, Mitani T, Anzai M, Miyagishi M, Taira K, Mizusawa H. Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 280:42826-42830, 2005.
- 20)Nakamura M, Yamashita T, Ueda M, Obayashi K, Sato T, Ikeda T, Washimi Y, Hirai T, Kuwahara Y, Yamamoto MT, Uchino M, Ando Y. Neuroradiologic and clinicopathologic features of oculoleptomeningeal type amyloidosis. *Neurology* 65:1051-1056, 2005
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
- 河野道生
特許第 3630453 号「IL-6 レセプター抗体を有効成分とする未熟型骨髄腫細胞治療剤」
- 安東由喜雄
部位特異的遺伝子変換促進剤及び遺伝子治療剤（申請中）
アミロイドーシスの予防及び治療のための医薬（申請中）
- 東海林幹夫
脳 A β 42 選択的除去療法。特願 2003-317443。
- 山田正仁
アルツハイマー病の検査方法。特願 2005-104850。
- 工藤幸司
アミロイド蓄積性疾患の新規診断用装置およびその操作方法。特願 2005-322230。

コンフォーメーション病診断および治療用の
長波長蛍光物質を含む組成物。特願 2005-
347818。

コンフォーメーション病の診断用プローブ。
特願 2005-371821。

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

AL アミロイドーシスに対する治療法の基礎的研究 -PPAR β リガンドのスクリーニングとその増殖抑制作用-

分担研究者 河野 道生

山口大学・大学院医学系研究科・生体シグナル解析医学講座

共同研究者 大津山賢一郎、馬 梓

山口大学・大学院医学系研究科・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対する治療戦略として、抗 NF-kB 作用に注目した。その一つとして、PPAR 活性化能を示し得るものを PPRE β -luciferase assay からスクリーニングした。その結果、副腎皮質ホルモンの cortisol(dexamethasone)と flavonoid の baicalein に強い PPAR β 活性化能が認められた。骨髄腫細胞株を dexamethasone や baicalein 刺激すると、核内にて PPAR β と NF-kB p65 との結合が認められ NF-kB 活性が抑制され、増殖・生存が強く抑制された。Dexamethasone と baicalein は、患者骨髄腫細胞にも相乗的に作用して、その増殖・生存を強く抑制した。従って、AL アミロイドーシスの治療戦略として、抗 NF-kB 活性のある dexamethasone と baicalein とを併用した治療法の有用性が示唆された。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスに対する治療戦略として、その腫瘍細胞である形質細胞(骨髄腫細胞)の増殖・生存に深く関わっている NF-kB 活性を抑制するものが標的となる。その一つとして、PPAR を介する抗 NF-kB 作用に注目して、PPAR β リガンドとなり得る物質をスクリーニングし、骨髄腫細胞に対する増殖・生存の抑制活性を明らかにする。

B. 研究方法

1. 対象

1) PPAR β 特異的 responsive element (PPRE β)を luciferase 遺伝子に連結した PPRE β -luciferase assay による PPAR β 活性化能の検討: PPRE β を luciferase を含んだ発現ベクター(pGL3-promoter vector)に連結したものを構築した。これを pSV- β galactosidase control vector とともに Hela 細胞へ lipofection で共感染させた。活性をスクリーニングするものとして、各種 prostaglandin(PG)(D2, E2 α , J2 等)、HETE、副腎皮質ホルモン(pregnenolone, DHEA, DHEA-S, androstendione, cortisol, dexamethasone)や flavonoids (baicalein, baicalin, wogonin)等を検討した。

2) in vitro 増殖および生体活性: 骨髄腫細胞株 (U266 等)および AL アミロイドーシスを含む骨髄腫患者からの骨髄腫細胞を in vitro で培養した後、フローサイトメーター(Epics Elite ESP, Coulter)で生細胞数を測定した。骨髄腫患者からの骨髄腫細胞については、十分なるインフォームド・コンセントを得た後、行われた。

3) PPAR β 活性化による遺伝子発現: 上記 PPRE-luciferase assay で PPAR β 活性化能があると同定された物質を骨髄腫細胞株に添加培養後、常法のごとく RT-PCR で標的遺伝子である *ILK*, *PPAR γ* の発現を検討した。

4) 免疫沈降およびウエスタン・ブロット: 骨髄腫細胞株を IL-1 α と baicalein あるいは dexamethasone で刺激後、核分画を抽出した後、常法のごとく抗 PPAR β 抗体で免疫沈降を行った。更に、抗 NF-kB(p65)抗体でウエスタン・ブロットを行った。

5) kB site への NF-kB DNA 結合能: 上記と同様に採取した核抽出物を Trans AMTM NF-kB p65 Transcription factor assay kit (Active Motif)を用いて測定した。

C. 研究結果

PPAR β 活性化能を示すものとして、既報のPGJ2に加えて、副腎皮質ホルモンのDHEA-Sやcortisol(dexamethasone)およびbaicaleinが強い活性を示すことが初めて明らかとなった(表—1)。特に、dexamethasoneとbaicaleinに注目すると、これらは相乗的にPPRE-luciferase assayでPPAR β 活性化能を示し、骨髄腫細胞株に対しても標的遺伝子*ILK*, *PPAR γ* の発現を相乗的に亢進させた。PPAR β 活性化能を有するdexamethasoneとbaicaleinはPPAR β のリガンドと考えられたので、dexamethasoneあるいはbaicalein刺激後の核分画において、PPAR β とNF-kB p65との結合の有無を検討した。確かに、PPAR β とNF-kBとの結合が確認された。更に、dexamethasoneとbaicaleinは骨髄腫細胞株および患者骨髄腫細胞の*in vitro*増殖・生存を相乗的に抑制した(図—1)。

D. 考察

これまでの研究班の研究成果から、漢方薬「黄連解毒湯」に含まれる黄ゴンの成分であるbaicaleinが骨髄腫細胞の増殖・生存を抑制することが既に明らかにされていた。本年度の研究成果により、baicaleinはdexamethasoneとともにPPAR β のリガンドとして働き、相乗的にPPAR β 活性化能を示し、また核内でNF-kB p65と結合して抗NF-kB活性を示すことも明らかになった。その結果として、dexamethasoneとbaicaleinは骨髄腫細胞株および患者骨髄腫細胞の*in vitro*増殖・生存を相乗的に抑制した。このことは、dexamethasoneとbaicaleinあるいは黄連解毒湯との併用療法はALアミロイドーシスの治験の対象となりえることを示唆している。今後の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もある。

E. 結論

1. PPRE β -luciferase assayによるPPAR β 活性化能の検討を行った。
2. 副腎皮質ホルモンDHEA-S, cortisol(dexamethasone)およびflavonoidであるbaicaleinに強いPPAR β 活性化能が認められた。
3. Dexamethasoneとbaicaleinとは相乗的に強いPPAR β 活性化能があった。

4. 核内において、PPAR β とNF-kB p65との結合を確認した。
5. 患者骨髄腫細胞に対して、Dexamethasoneとbaicaleinとは相乗的に作用してその増殖・生存を抑制した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 105:3295-3302, 2005.
- 2) 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* 105: 3312-3318, 2005.
- 3) 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* 65: 2269-2276, 2005.

2. 学会発表

- 1) Kawano MM, Ishikawa H: The function and movement of CD45 molecule in interleukin-6-induced Myeloma cell proliferation. (invited speaker) 10th International Myeloma Workshop, Sydney, Australia, April 10-14, 2005.
- 2) 大津山賢一郎、劉尚勤、馬梓、李富君、Saeid Abroun、鄭旭、榎泰子、Iqbal M、津山尚宏、小幡雅則、石川秀明、河野道生: PPARbetaを介する骨髄腫細胞の増殖機構—DHEAによる増殖抑制作用— 第67回日本血液学会総会、横浜、

2005年9月17~19日

3)馬 梓、大津山賢一郎、劉 尚勤、Saeid Abroun、李 富君、鄭 旭、榎 泰子、津山尚宏、小幡雅則、石川秀明、河野道生：低分子化合物バйкаレインによる骨髄腫細胞の増殖抑制機構 第67回日本血液学会総会、横浜、2005年9月17~19日

4) Ma Z, Liu S, Otsuyama K, Kawano MM: Baicalein inhibits IL-6-mediated multiple signaling cascades through Jak family kinase in human myeloma cells. 47th Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta, U.S.A., Dec.10-13, 2005.

5) Otsuyama K, Liu S, Li F, Abroun S, Asaoku H, Kawano MM: PPAR β -mediated suppression of the growth and survival in human myeloma cells

counteracting NF-kB activity. 47th Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta, U.S.A., Dec.10-13, 2005.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許第3630453号「IL-6レセプター抗体を有効成分とする未熟型骨髄腫細胞治療剤」

2. 実用新案登録

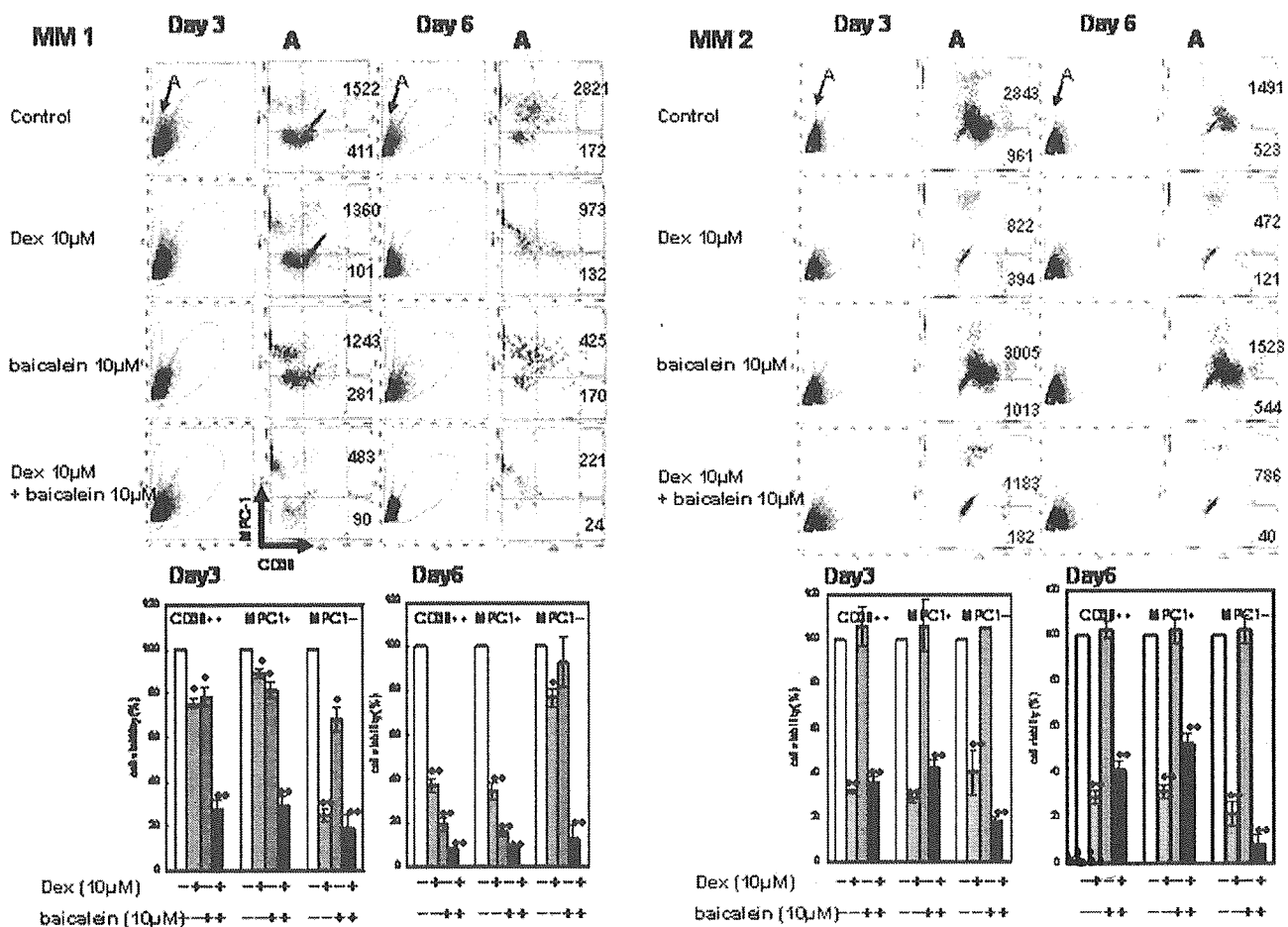
なし

3. その他

なし

表1 低分子化合物刺激によるルシフェラーゼ活性

	components	2.5 μ M	10 μ M
flavonoids	baicalein	1.3倍	1.9倍
	baicalin	1.0	1.2
	wogonin	0.9	0.5
steroids	DHEA	1.2	1.3
	DHEA-S	1.7	2.2
	Pregnenolon	0.9	1.3
	Androstendion	1.1	1.5
	Hydrocortisone	1.9	2.1
	Dexamethasone	2.7	3.2
prostaglandins	PGD ₂	1.3	1.4
	PGE ₂	1.2	1.9
	PGF _{2α}	1.7	2.7
	PGI ₂	1.9	2.6
	15d-PGJ ₂	1.2	3.3
hydroxyeicosatetraenoic acid	5(S)-HETE	1.0	1.1
	8(S)-HETE	1.9	0.9
	12(S)-HETE	1.1	0.9
	15(S)-HETE	1.3	1.7
PPAR agonists	carbacyclin	1.5	3.9
	troglitazone	3.5	3.1
	Wy14,643	2.0	3.4



図—1 患者骨髄腫細胞に対する dexamethasone と baicalein の相乗的な増殖・生存の抑制作用