

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

## 免疫グロブリン L 鎖 C 末端部分に対する抗体を用いた 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

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、小野龍宣、崔丹、河野裕夫

山口大学医学部構造制御病態学講座

**研究要旨** アミロイドーシスの免疫組織化学的診断、治療への応用、発生病理の解明を目的とする、さまざまな全身性アミロイドーシスに対する部位特異的抗体の作製の一環として、免疫グロブリン L 鎖 C 末端部分近傍に対する抗体 (抗 $\lambda$  194-211) を作製した。病理解剖によりえられた全身性アミロイドーシス例 A $\lambda$  型 11 例、A $\kappa$  型 6 例の脾臓、A $\lambda$  型 1 例の肝臓のホルマリン固定パラフィン切片を用いて免疫組織化学的検討を行うとともに、A $\lambda$  型 4 例のアミロイド水抽出物について Western blotting を行った。免疫組織化学に抗 $\lambda$  194-211 は 11 例の A $\lambda$  アミロイドーシス全例に多少なりとも陽性像が見られたが、染色の濃さや染色される範囲は症例によりまちまちであった。Western blotting では 4 例いずれも full length の L 鎖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、11kDa 以下のバンドも存在した。今回の研究で A $\lambda$  アミロイドーシス例では多少なりともアミロイド中に L 鎖 C 末端部分が含まれていることおよび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 $\lambda$  アミロイドーシス例が存在することが示唆された。

### A. 研究目的

我々はこれまでアミロイドーシスの免疫組織化学的診断、治療への応用、発生病理の解明を目的として、さまざまな全身性アミロイドーシスに対する部位特異的抗体の作製を行ってきた。今年度はその一環として免疫グロブリン L 鎖 C 末端部分近傍に対する抗体 (抗 $\lambda$  194-211) を作製し、A $\lambda$  アミロイドーシスの免疫化学的および免疫組織化学的検討を試みた。A $\kappa$  アミロイドーシスについては、大部分の症例でアミロイド沈着物中に定常領域のフラグメントおよび full length の L 鎖が含まれていることが報告されており、定常領域主体の A $\kappa$  アミロイドーシス例も数例報告されているが、A $\lambda$  アミロイドーシスに関してはこれまでこのような報告はない。これまでの我々の研究の中で、以前作製、報告した抗 $\lambda$  159-175 による A $\lambda$  アミロイドーシス例の Western blotting により、15kDa 以下にもバンドが数本確認され、A $\lambda$  アミロイドーシスも A $\kappa$  アミロイドーシス同様アミロイド沈着物中

に定常領域主体のフラグメントが含まれているのではないかと考え、今回の研究に着手した。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

免疫組織化学的検討には病理解剖によりえられた A $\lambda$  アミロイドーシス 11 例、A $\kappa$  アミロイドーシス 6 例の脾臓、A $\lambda$  アミロイドーシス 1 例 (脾臓と重複する症例) の肝臓のホルマリン固定パラフィン切片を用いた。Western blotting には A $\lambda$  アミロイドーシス 4 例 (脾 3 例、肝 1 例) のアミロイド水抽出物および市販の  $\lambda$  Bence Jones Protein (BJP)、 $\kappa$  BJP、SAA、トランスサイレチン (TTR) を用いた。アミロイドはいずれも抗 $\lambda$  118-134、抗 $\kappa$  116-133、抗 AA 抗体、抗 TTR 抗体 (DAKO A/S)、抗  $\beta$  2 ミクログロブリン抗体 (Nordic immunology)、Dr. Glenner より供与された抗 A $\lambda$  および抗 A $\kappa$  抗体を用いた免疫組織化学的検討によりタイプの決定が行われている。

(倫理面への配慮)

承諾を得て実施された病理解剖例を対象としている。個人が特定されることがないように配慮した。

## 2. 方法

抗体の作製：免疫グロブリンλ鎖C末端部分近傍(λ 194-211: CQVTHEGSTVEKTVAPTE)に相当する合成ペプチドをKLHを担体としてウサギに免疫し抗血清を作製、アフィニティー精製を行い、抗λ 194-211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(特急一貫サービス・アフィパック)を利用した。

免疫組織化学的検討：免疫組織化学的検討にはダコAutostainerを用いた。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λ 118-134(1:1600)または抗λ 194-211 (0.25 μg/ml) を室温30分間反応させた。二次抗体としてEnvision+ ポリマー試薬(2倍希釈, DAKO A/S)を室温30分間反応させた後、DAB+(DAKO A/S)にて発色を行った。

Western blotting：AλアミロイドはPrasらの方法に準じて水抽出を行い、粗抽出したアミロイドを8M尿素にて溶解、Laemmli sample buffer, 5%βメルカプトエタノールと混和し、99℃6分加熱後、遠心し、上清をサンプルとした。各サンプルを15-25% gradient gelを用いてSDS-PAGEを行った後、PVDF膜に転写し、免疫染色を行った。免疫染色では一次抗体として抗λ 118-134(1:8000)あるいは抗λ 194-211(0.095 μg/ml)、二次抗体としてGoat Anti-Rabbit Immunoglobulin, HRP(1:1000, DAKO A/S)を室温60分反応させ、TMBで室温10分間呈色反応を行った。

## C. 研究結果

免疫組織化学に抗λ 194-211は11例のAλアミロイドーシス全例に多少なりとも陽性像が見られたが、染色の濃さや染色される範囲は症例によりまちまちであった。Aκアミロイドーシス例ではアミロイドは全く染まらないか、部分的に弱く染色された。

Aλアミロイド水抽出物の抗λ 194-211による

immunoblottingでは、4例いずれもfull lengthのL鎖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、11kDa以下のバンドも存在した。抗λ 194-211陽性のバンドは必ずしも抗λ 118-134陽性のバンドとは一致していなかった。抗λ 194-211はλ BJPとは良好に反応したが、κ BJP, SAA, TTRとは反応しなかった。なお免疫組織化学的に抗λ 118-134がほとんど染まっていない症例でも、Western blottingでは抗λ 118-134陽性のバンドがみられた。

## D. 考察

今回の抗λ 194-211を用いた検討によりAλアミロイドーシス例では多少なりともアミロイド中にλ鎖C末端部分が含まれていることおよび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Aλアミロイドーシス例が存在することが示唆された。ALアミロイドーシスではアミロイド沈着物中に複数の分子量のアミロイド線維が含まれていることがしばしばあり、C末端部分近傍を含むアミロイド線維の量や分布の差、あるいは立体構造の違いにより、抗λ 194-211の免疫組織化学的な染色性に差が生じたと考えられる。免疫グロブリンλ鎖定常領域の分子量は約11kDaであるので、抗λ 194-211によるimmunoblottingでみられた11kDa以下のバンドは、ほとんどあるいは全く可変領域を含んでいない可能性がある。またAλアミロイド沈着物中にfull lengthのL鎖とともに、様々な分子量のC末端側フラグメントが含まれているとすると、full lengthのλ鎖がアミロイドとして沈着した後で、タンパク分解を受けている可能性があるかもしれない。

なお以前作製、報告した抗λ 118-134は、Aλアミロイドのほとんどの症例を検出するが、アミロイド中に118-134の部分が含まれていても、免疫組織化学的に明らかな陽性像を示さない場合があることが判明した。このような症例ではアミロイドの立体構造上、抗λ 118-134が抗原決定基と反応できないことが示唆される。

## E. 結論

Aλアミロイドーシス例では多少なりともア

ミロイド中に鎖 C 末端部分が含まれていることおよび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 $\lambda$ アミロイドーシス例が存在することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

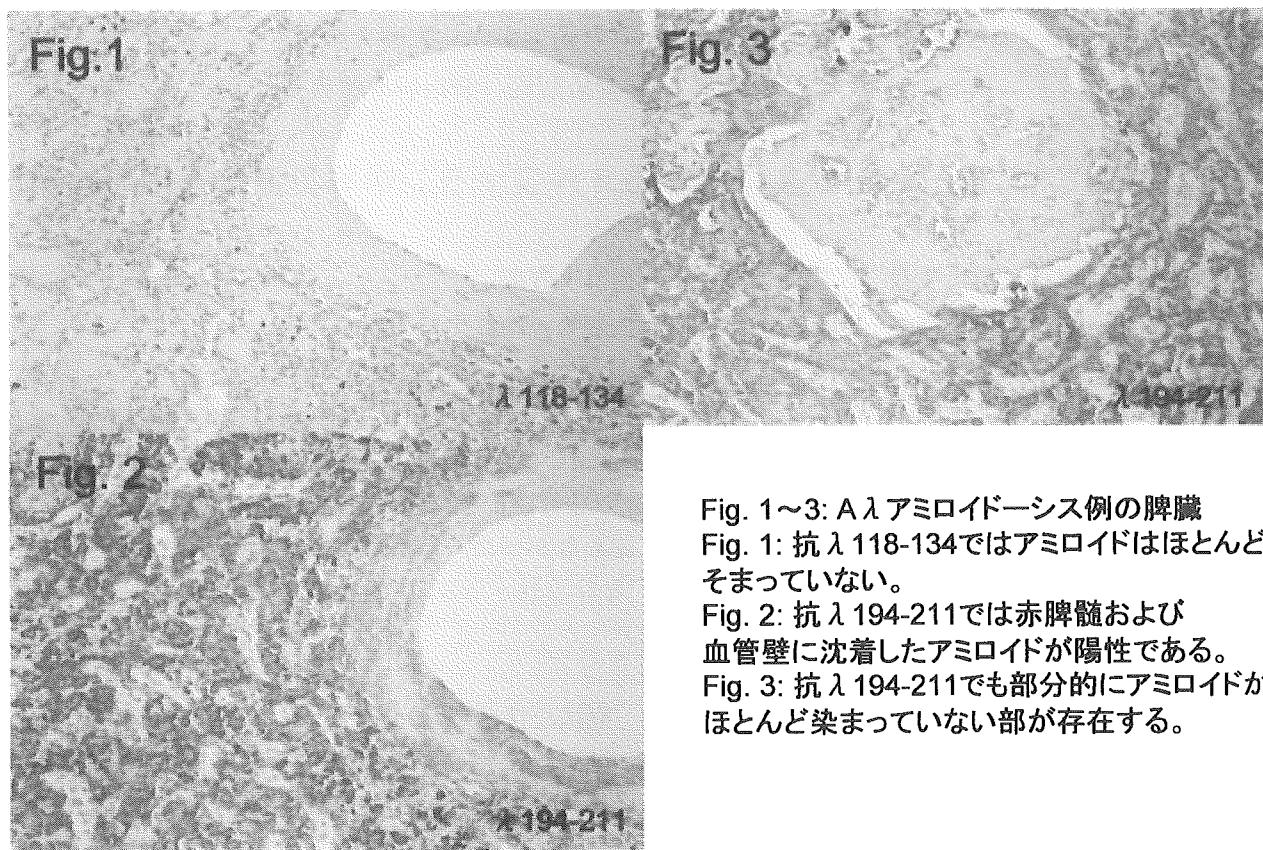


Fig. 1～3: Aλアミロイドーシス例の脾臓  
 Fig. 1: 抗λ 118-134ではアミロイドはほとんどそまっていない。  
 Fig. 2: 抗λ 194-211では赤脾髄および血管壁に沈着したアミロイドが陽性である。  
 Fig. 3: 抗λ 194-211でも部分的にアミロイドがほとんど染まっていない部が存在する。

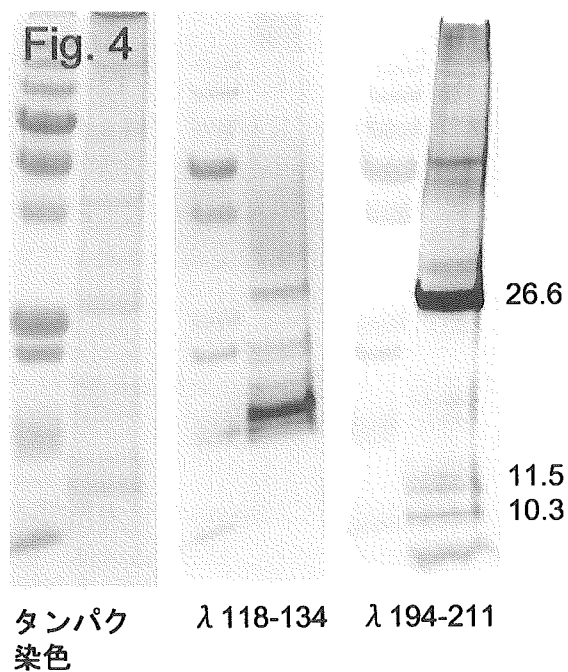


Fig. 4: Fig.1～3と同一症例のアミロイド粗抽出物のWestern blotting  
 λ 116-134で明瞭なバンドが複数みられる。  
 λ 194-211ではfull lengthのL鎖と考えられる約26.6kDaのバンドとともに、約11.5kDaおよび10.3kDaのバンドがみられる

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

## 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

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 片山雄太 広島赤十字・原爆病院第4内科

**研究要旨** 原発性 AL アミロイドーシスに対する新たな治療法としてメルファラン中等量療法を検討した。対象は骨髄腫患者 4 例でメルファラン 20-60mg/m<sup>2</sup> 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 goodPR を得た。以上より原発性 AL アミロイドーシスの治療選択肢としてメルファラン中等量療法を今後検討すべきと考えた。

### A. 研究目的

原発性 AL アミロイドーシスの治療としては自家造血幹細胞移植併用メルファラン大量療法が現在最も有効な治療法であるが、その適応は若年者で臓器障害の軽い患者に限られる。臓器障害の強い患者に対しては VAD 療法や dexamethason 大量療法が試みられている。メルファランは形質細胞腫瘍に対してはキードラッグの一つであり大量療法の有用性は明らかであるが、最近では幹細胞のサポートを必要としない中等量療法の有用性が報告されてきた。種類の臓器に様々な程度の障害をきたす AL アミロイドーシスの治療においてより有効で適切な治療法の選択肢を広げる目的でメルファラン中等量療法が AL アミロイドーシスに適用できるか検討する。

### B. 研究方法

メルファラン中等量療法を行った骨髄腫患者の経過、毒性、効果を分析し、臓器障害を有する原発性 AL アミロイドーシス患者に対する同療法適用の可能性及びメルファランの至適投与量を検討した。対象患者は治療抵抗性進行期多発性骨髄腫患者 2 例、Light chain disease 患者 1 例、アミロイドーシス合併多発性骨髄腫患者 1 例である。

症例 1 は 67 才男性 IgG- $\lambda$  多発性骨髄腫。VAD

療法を含む 3 レジメンの前治療に抵抗性となり汎血球減少、高 Ca 血症、腎障害 (Cr 3.12mg/dl)、多発骨病変を有している。メルファラン 60mg/m<sup>2</sup> 投与。症例 2 は 68 才女性 IgG- $\kappa$  多発性骨髄腫。本例も 3 レジメンの前治療に抵抗性となり汎血球減少、高 Ca 血症、腎障害 (Cr 1.37mg/dl)、多発骨病変を有している。メルファラン 20mg/m<sup>2</sup> 投与。症例 3 は 52 才男性 IgG- $\lambda$  MGUS。Light chain disease による腎障害 (Cr 3.14mg/dl)。メルファラン 60mg/m<sup>2</sup> 投与。症例 4 は IgA- $\lambda$  多発性骨髄腫。全身性 AL アミロイドーシス合併により心不全 (NYHA II、EF 40%、BNP1620pg/ml)、消化管出血をきたしている。メルファラン 30mg/m<sup>2</sup> 投与。

全例文書にてインフォームド・コンセントを得た上でメルファラン中等量療法を施行した。

### C. 研究結果

毒性) 白血球数 < 1000/ $\mu$ L 以下の期間は、症例 1 は 44 日、症例 2 は 11 日、症例 3 は 14 日、症例 4 は 3 日。症例 1 は 38℃ 以上の発熱を有する感染症を併発したが抗生剤投与で改善した。血小板数 < 30000/ $\mu$ L 以下の期間は、症例 1、2 は治療前から原疾患による減少があり判定不能。症例 3 は 12 日。症例 4 は 9 日。

症例 1 に grade 1、症例 2 に grade 2、症例 4 に grade 3 の肝機能異常を認めたが症例 4 については心不全

によるうっ血肝の合併が考えられた。肝障害はいずれも改善した。その他症例1、2、4に軽度の下痢を認めた。症例4はアミロイドーシスによる心不全を合併していたが急激な心不全の悪化は認めなかった。

効果) 症例1は前治療でVAD抵抗性であったが good PRを得、効果は3ヶ月持続した。症例4も血液学的には緩解に近いgood PRを得たが、心不全が徐々に進行。治療後4ヶ月で死亡した。症例2、3はNCであった。

#### D. 考察

多発性骨髄腫患者に対するメルファラン 60mg/m<sup>2</sup> の中等量療法の報告では grade 3-4 の白血球減少の期間は平均 7 日 (2-20) である。また腎障害を有する骨髄腫患者に対する 25mg/m<sup>2</sup> の中等量療法の報告では平均 13.8 日の白血球減少を認めている。今回の検討でも症例 1 を除き白血球減少期間は 3-14 日であった。症例 1 は 44 日と骨髄抑制が遷延したが、その原因として原疾患による骨髄造血不全に加え腎障害の存在があると考えられた。我々は以前の検討で、腎障害を有する骨髄腫患者においてはメルファランの血中 AUC (area under the curve) が高値となる可能性を認めていたが、C. Vigneau とも腎障害の程度とメルファランの血中 AUC が相関する事を示している。よって腎障害の強い患者においてはメルファランの毒性が強くなる可能性がある。

少数例ではあるが今回の検討ではメルファラン中等量療法の毒性は骨髄抑制が主でありそれ以外の毒性は比較的軽度であった。

現在原発性 AL アミロイドーシスの治療において自家造血幹細胞移植併用メルファラン大量療法の適応とならない患者に対しては VAD 療法や dexamethasone 大量療法が推奨され、それぞれ 50%、30%の有効率が期待できる。しかし adriamycin の心毒性、vincristin の神経毒性、dexamethasone の体液貯留などの副作用のため心筋障害、神経障害の強い患者ではこれらの治療

も適応とならないことがある。メルファラン中等量療法はそのような患者に対しても使用できると考えられる。骨髄腫に対するメルファラン 25mg/m<sup>2</sup> の中等量療法+経口 dexamethasone 療法では CR30%を含む 80%の有効率を認めたとの報告があり、AL アミロイドーシスに対しても同療法が試みられ preliminary な報告であるが 55%の有効率を認めている。今回の我々の検討でも VAD 療法無効例にも効果を認めていることから AL アミロイドーシス治療の新たな選択肢として期待できる。しかし先述したように腎障害の強い患者においては骨髄抑制が遷延する可能性があり注意を要する。メルファランの投与量は我々の経験およびいくつかの報告から、臓器障害を有する患者に対しては 20-30mg/m<sup>2</sup> が適当と思われるが、患者の適応も含めさらに検討が必要である。

#### E. 結論

メルファラン中等量療法は原発性 AL アミロイドーシスの新たな治療として検討すべきである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 麻奥英毅：多発性骨髄腫とアミロイドーシス. アミロイドーシスの基礎と臨床 2005.

##### 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

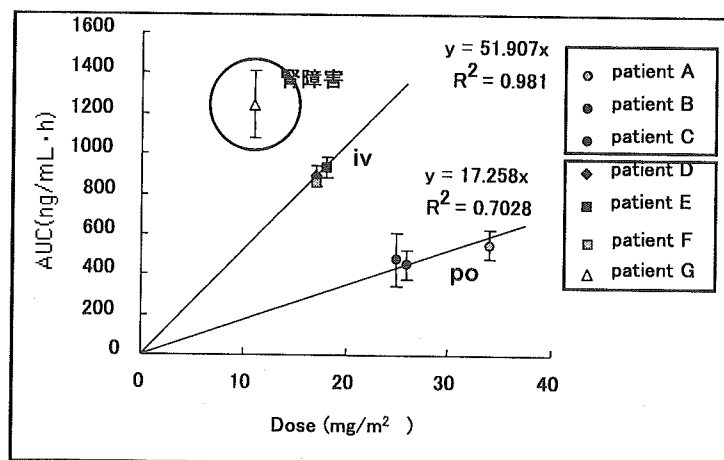
### Patients findings

Case1 H.T.	Case2 K.M.	Case3 Y.S.	Case4 S.K.
67y male	68y female	52y male	56y male
2002年発症	1998年発症	Light chain disease	全身性amyloidosis
前治療抵抗性	前治療抵抗性	MGUS	MM
進行期 MM	進行期MM	IgG-λ	IgA-λ CS1
IgG-λ CS3	IgG-κ CS3	PS 1	PS 4
PS 3	PS 3	腎障害 Cr 3.14	心不全
汎血球減少	汎血球減少		NYHA II EF40%
高Ca血症	高Ca血症		BNP 1620pg/ml
腎障害 Cr3.12	腎障害 Cr 1.37		消化管出血
多発骨病変	多発骨病変		
LPAM	LPAM	LPAM	LPAM
60mg/m <sup>2</sup>	20mg/m <sup>2</sup>	60mg/m <sup>2</sup>	30mg/m <sup>2</sup>

### Toxicity and Response

Toxicity	Case1 H.T.	Case2 K.M.	Case3 Y.S.	Case4 S.K.
WBC<1000	44 days	11 days	14 days	3 days
PLT<30000	—	—	12 days	9 days
GOT/GPT	Grade 1	Grade 2	—	Grade 3
diarrhea	Grade 2	Grade 1	—	Grade 1
Response	Good PR	NC	NC	Good PR

### Comparison of AUC between p.o. and i.v.



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

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

分担研究者 島崎千尋 京都府立医科大学血液・腫瘍内科

共同研究者 麻奥英毅<sup>a</sup>、畑裕之<sup>b</sup>、石田禎夫<sup>c</sup>、澤村守夫<sup>d</sup>、鈴木憲史<sup>e</sup>、松田正之<sup>f</sup>、

中尾眞二<sup>g</sup>、今井裕一<sup>h</sup>、安倍正博<sup>i</sup>、原田実根<sup>j</sup>、村上博和<sup>k</sup>、山田正仁<sup>l</sup>

<sup>a</sup>広島赤十字原爆記念病院血液内科、<sup>b</sup>熊本大学血液内科、<sup>c</sup>札幌医科大学第一内科、<sup>d</sup>独立行政法人国立病院機構西群馬病院血液内科、<sup>e</sup>日本赤十字医療センター血液内科、<sup>f</sup>信州大学神経内科・リウマチ膠原病内科、<sup>g</sup>金沢大学血液内科、<sup>h</sup>愛知医科大学腎臓・膠原病内科、<sup>i</sup>徳島大学第一内科、<sup>j</sup>九州大学第一内科、<sup>k</sup>群馬大学医学部保健学科、<sup>l</sup>金沢大学神経内科

研究要旨 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い。本研究では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の有用性と安全性を検討し、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て臨床試験を計画した。

A. 研究目的

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の報告は少ない。そこで、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の有用性と安全性を検討し、安全性と有効性の高い新規治療方法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

これまでの海外における自家末梢血幹細胞移植の報告を詳細に検討し、より安全性と有効性が高く、かつこれまでにない新しい治療プロトコールを共同研究者を中心に作成した。また、本疾患がまれであることから、本研究の実施にあたって全国の患者に参加していただけるように北海道から九州まで全国 11 施設を拠点病院として臨床試験に参加していただくこととした。2005 年 12 月 23 日にプロトコール検討会(京都)を開催し、臨床試験実施責任者(金沢大学神経内科:山田正仁教授)、効果安全性評価委員(群

馬大学保健学科:村上博和教授)、参加施設代表者全員でプロトコールの検討を行った。検討会での議論を踏まえ、プロトコールを修正し、さらにメールで議論を継続し、最終的な臨床試験実施計画書を完成させた。

(倫理面への配慮)

本試験はヘルシンキ宣言の理念に従うものであり、患者の自由意志による同意に基づいて行われる。患者に対する人権擁護の配慮、不利益や危険性については文書による説明と同意を得、各施設の IRB(Institutional Review Board)の審査を経て実施することとした。また、多施設共同研究であることから、各症例の臨床データは臨床研究事務局に報告されるが、その際は患者の匿名化を行い、個人の情報が公表されることのないように配慮した。

C. 研究結果

原発性ALアミロイドーシスに対する新規治療プロトコールを完成させた。対象は65歳以下の症



例で、診断には1) 全身諸臓器にALアミロイドの沈着を認めること。2)原因となる基礎疾患あるいは共存する合併症がないこと、とし、1)については山口大学構造制御病態学で免疫組織学的検討を含む中央診断を行うこととした。

試験の目的は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の有用性と安全性を検討することであり、主要評価項目は中等量メルファランによる寛解導入療法の安全性、副次的評価項目は1) 中等量メルファランによる寛解導入療法における採取CD34陽性細胞数の評価、2) 中等量メルファランによる寛解導入療法の効果、3)自家末梢血幹細胞移植の安全性、4) 自家末梢血幹細胞移植の血液学的治療効果、5) 自家末梢血幹細胞移植の臨床的効果（臓器反応性）、とした。適応基準については、自家末梢血幹細胞移植を併用したメルファラン大量療法は、臓器障害を有する症例においては高い治療関連死亡をもたらす可能性があることから、risk-adapted approachを採用し、適応基準をgood riskの症例に限定した。具体的には以下の基準をすべて満たすことを条件とした。1)年齢；65歳以下、2)心機能；EF $\geq$ 45%、BNP $\leq$ 50pg/ml、3)血圧；収縮期圧 $\geq$ 90 mmHg、4)酸素飽和度； $\geq$ 95%、5)Performance status  $\leq$ 2、6)白血球数 $\geq$ 3000/ $\mu$ l、好中球 $\geq$ 2000/ $\mu$ l、血小板 $\geq$ 70000/ $\mu$ l、Hb $\geq$ 9g/dl、7)血清クレアチニン $\leq$ 2mg/dl、8)血清AIP $\leq$ 正常値3倍、9)血清直接ビリルビン $\leq$ 2mg/dl、10)治療に支障をきたすような慢性疾患（とくに呼吸器および神経系の疾患、重度の糖尿病）がないこと、である。寛解導入はメルファラン20mg/m<sup>2</sup>で行いday5より末梢血幹細胞採取のためにG-CSF 400  $\mu$ g/m<sup>2</sup>あるいは10  $\mu$ g/kgを皮下投与する。3例実施し、重篤な有害事象（grade3以上の非血液毒性）が2例に見られた場合は試験を中止する。1例の場合は、さらに3例追加し、2例に重篤な有害事象（grade3以上の非血液毒性）が見られた場合は中止する。1例以下の場合は30mg/m<sup>2</sup>に増量し3例実施する。白血球の回復期に血液成分分離装置を用いて末梢血幹細胞を採取する。幹細胞採取はCD34+細胞として2 x 10<sup>6</sup>/kg以上を目標とし、2-3日間連日アフエレーシスを行う。ついで、末梢血幹細胞採取2ヶ月以内にメルファラン大量療法を行う。メルファラ

ンは70mg/m<sup>2</sup>をday-3、-2に投与（計140mg/m<sup>2</sup>）し、day 0に解凍した幹細胞を輸注する。移植後はday 1よりG-CSFを300  $\mu$ g/m<sup>2</sup>あるいは5  $\mu$ g/kgを点滴静注する。効果判定基準は第10回アミロイドおよびアミロイドーシスに関する国際シンポジウム・コンセンサスオピニオンの判定基準を用い、血液学的効果と臨床効果（臓器反応性）を評価する。有害事象の判定にはCTCAE Ver.3.0日本語訳JCOG/JSCO版で評価する。症例登録期間は1年間、追跡期間は2年間とすることとした。

#### D. 考察

自家末梢血幹細胞移植をどのような症例にどのようなタイミングで行うか、また寛解導入療法は必要なかどうか、いまだ明らかではない。中等量メルファランで寛解導入後に移植を行う治療戦略は海外でもみられず、病状の進行を抑えつつ早期の移植が可能な斬新な治療方法と考えられる。本療法の安全性が確認できれば、今後より大規模な臨床第 II 相試験へ移行したい。各施設の IRB が通過次第、臨床試験が開始される予定である。

#### E. 結論

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寛解導入療法と自家末梢血幹細胞移植による新しい治療プロトコールによる臨床試験実施計画書を作成した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shimazaki C, Fujii H, Yoshida T, Chou T, Nishimura M, Asaoku H, Miyawaki S, Ishii A, Ishida T, Taniwaki M, Iida S, Takagi T, Takatsuki K. Reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. Results from the Japan Myeloma Study Group (JMSG). Int J Hematol 81:342-348, 2005.
- 2) Shimazaki C, Uchida R, Nakano S, Namura K, Fuchida S, Okano A, Okamoto M, Inaba T. High

serum bone-specific alkaline phosphatase level after bortezomib- combined therapy in refractory multiple myeloma: Possible role of bortezomib on osteoblast differentiation. *Leukemia* 19:1102-1103, 2005.

3)Ochiai N, Yamada N, Uchida R, Fuchida S, Okano A, Okamoto M, Ashihara E, Inaba T, Shimazaki C. Nitrogen-containing bisphosphonate incadronate augments the inhibitory effect of farnesyl transferase inhibitor tipifarnib on the growth of fresh and cloned myeloma cells in vitro. *Leuk Lymphoma* 46:1619-1625, 2005.

4)Ochiai N, Yamada N, Uchida R, Fuchida S, Okano A, Hatsuse M, Okamoto M, Ashihara E, Shimazaki C. Combination therapy with thalidomide, incadronate and dexamethasone (TID) for relapsed or refractory multiple myeloma. *I J Hematol* 82: 243-247, 2005.

5)Nakano S, Namura K, Uchida R, Fuchida S, Okano A, Okamoto M, Shimazaki C. Unbalanced chromosomal translocation of der(15)t(1;15)(q21;p13) in multiple myeloma. *Int J Hematol* 81:437-438, 2005.

6)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.

7)Machii T, Chou T, Suzuki M, Ohe Y, Katagiri S, Kitano K, Fujiyama Y, Izumi T, Shimazaki C, Nanba K, Ohashi Y, Kitani T, and members of the Cladribine Study Group. Phase II clinical study of cladribine in the treatment of hairy cell leukemia. *Int J Hematol* 82:230-235, 2005.

8)Takahashi R, Nakano S, Namura K, Yamada N, Uchida S, Fuchida S, Okano A, Okamoto A, Ochiai N, Shimazaki C. Plasmacytoma of the urinary bladder in renal transplant recipient. *Int J Hematol* 81:225-227, 2005.

9)Imai Y, Chou T, Tobinai K, Tanosaki R, Morishima Y, Ogura M, Shimazaki C, Taniwaki M, Hiraoka A, Tanimoto M, Koike T, Kogawa K, Hirai H, Yoshida T,

Tamura K, Kishi K, Hotta T. Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34 (+) progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution in non-Hodgkin's lymphoma (NHL): results of Japanese phase II study. *Bone Marrow Transplant* 35:479-487, 2005.

10)Yamada N, Uchida R, Fuchida S, Okano A, Okamoto M, Ochiai N, Iwasa H, Shimazaki C. CD5<sup>+</sup> Epstein-Barr virus<sup>+</sup> intravascular large B-cell lymphoma in the uterus coexisting with huge myoma. *Am J Hematol* 78:221-224, 2005.

11)Okano A, Nakano S, Namura K, Yamada N, Uchida R, Fuchida S, Okamoto M, Ochiai N, 159:Shimazaki C. Unique three-way chromosomal translocation of t(3;14;18)(q27;q32;q21) in follicular lymphoma.. *Cancer Genet Cytogenet* 174-176, 2005.

12)Fuchida S, Nakano S, Yamada N, Uchida R, Okano A, Okamoto M, Maruya E, Saji H, Shimazaki C. Successful non-T-cell-depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation (SCT) with reduced-intensity conditioning from the other child for late graft failure after the first HLA-haploidentical SCT for MDS/overt leukemia based on fetomaternal microchimerism. *Bone Marrow Transplant* 35:1631-1632, 2005.

13)Hatsuse M, Murakami S, Haruyama H, Inaba T, Shimazaki C. Inflammatory pseudotumor of the spleen complicated with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 34:619-620, 2005.

14)Okamoto A, Namura K, Uchiyama H, Kajita Y, Inaba T, Nakamura S, Shimazaki C. Cytotoxic T-cell non-Hodgkin's lymphoma of the thyroid gland. *Am J Hematol* 80:77-78, 2005.

15)Tamagawa R, Katoh N, Shimazaki C, Okano A, Yamada S, Ichihashi K, Masuda K, Kishimoto S. Lymphoma in a patient with large-plaque parapsoriasis treated with PUVA. *Eur J Dermatol* 15:265-267, 2005.

16)Fuchida S, Yamada N, Uchida R, Okano A, Okamoto M, Ochiai N, Shimazaki C. Malignant lymphoma presenting as a cardiac tumor and superior vena caval syndrome successfully treated by

haploidentical stem cell transplantation. *Leuk Lymph* 46:1517-1521, 2005.

17) 島崎千尋. 骨髄腫：病態の理解と新しい治療法. 造血幹細胞移植. 分子細胞治療 4:46-52, 2005.

18) 島崎千尋. 多発性骨髄腫の診断基準・病型分類・病期分類・予後予測分類. *内科* 95:1684-1688, 2005.

19) 島崎千尋. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *内科* 95:1704, 2005.

20) 島崎千尋. 多発性骨髄腫治療における造血幹細胞移植の役割. *血液・腫瘍科* 50:367-373, 2005.

21) 島崎千尋. 造血幹細胞移植の適応と治療成績. 多発性骨髄腫. *日本内科学会誌* 94: 1331-1336, 2005.

22) 島崎千尋. 多発性骨髄腫の治療の進めかたー標準的初期治療はー. *Medical Practice* 22:1395-1398, 2005.

23) 島崎千尋. 多発性骨髄腫に対する分子標的治療. *臨床医* 33:1939-1941, 2005.

24) 島崎千尋. 母児間免疫寛容に基づく血縁者間 HLA 不一致移植. *Hematological Malignancy* 33:1-4, 2005.

## 2. 学会発表

1) Fukuda S, Shinagawa K, Sawamura M, Sakai A, Saburi Y, Imamura Y, Maruyama T, Tamaki S, Kamimura T, Tuda H, Gondo H, Hino N, Shimazaki C, Miyata A, Tajima F, Takemoto Y, Miwa A, Harada M. Phase I/II study of tandem high-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma. 10<sup>th</sup> International Myeloma Workshop. Sydney, Australia. 2005 Apr 10-14.

2) Hara M, Shinagawa K, Imajo K, Nagafuji K, Fukuda T, Shimazaki C, Eto E, Gondo H, Kawano F, Harada M for Japan Study Group for Cell Therapy and Transplantation (JSCT). Randomized phase II study of maintenance chemotherapy versus high-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation as post-remission therapy for AML. 10<sup>th</sup> Asian-Pacific Bone Marrow Transplantation. Hangzhou, China, 2005 Oct 14.

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. 47th Annual Meeting of American Society of haematology. 2005 Dec 10-13, Atlanta, USA.

4) 角南一貴、品川克至、澤村守夫、坂井晃、佐分利能生、今村豊、村山徹、玉木茂久、上村智彦、津田弘之、権藤久司、日野理彦、島崎千尋、宮田明、但馬史人、武元良整、三輪哲義、張高明、原田実根. 多発性骨髄腫(MM)に対する自家末梢血幹細胞移植併用大量化学療法(タンデム移植)の第 1/2 相試験. 第 67 回日本血液学会/第 47 回日本臨床血液学会総会. 平成 17 年 9 月 17 日-19 日; 横浜.

5) 淵田真一、志村和穂、内山人二、谷口享子、中野園子、岡本雅司、内田亮、岡野晃、芦原英司、島崎千尋. 難治性造血器腫瘍における母児間免疫寛容に基づく HLA 不一致血縁者間造血幹細胞移植. 第 67 回日本血液学会/第 47 回日本臨床血液学会総会. 平成 17 年 9 月 17 日-19 日; 横浜.

6) 岡本雅司、志村和穂、内山人二、中野園子、名村享子、内田亮、淵田真一、岡野晃、芦原英司、島崎千尋、竹中秀也、加藤則人、岸本三郎. 皮膚硬化を有するステロイド抵抗性慢性移植片対宿主病に対する rituximab の効果. 第 67 回日本血液学会/第 47 回日本臨床血液学会総会. 平成 17 年 9 月 17 日-19 日; 横浜.

7) 内田亮、赤松園子、志村和穂、内山人二、谷口享子、岡本雅司、島崎千尋. Bortezomib が著効し、骨形成マーカーが上昇した難治性多発性骨髄腫の 2 例. 第 30 回日本骨髄腫研究会総会. 平成 17 年 11 月 12 日; 京都

8) 清水一之、名倉英一、島崎千尋、畑裕之. 本邦多発性骨髄腫患者における顎骨壊死 (ONJ) の実態. 第 30 回日本骨髄腫研究会総会. 平成 17 年 11 月 12 日; 京都

9) 島崎千尋. 多発性骨髄腫に対する自家造血幹細胞移植の現状. (概説講演) 第 30 回日本骨髄

腫研究会総会。平成 17 年 11 月 12 日；京都

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)  
 アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

## モデルマウスを用いた FAP 発症機構の解析 —ATTR 沈着は seeding に依存しない?

分担研究者 樋口京一 信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野

共同研究者 付 笑影\*、巖 景民\*、是永龍巳\*、姚 俊潔\*、張 桓宇\*、張 倍茹\*、  
 葛 鳳霞\*、澤下仁子\*、森 政之\*、池田修一\*\*、前田秀一郎\*\*\*、樋口京一\*  
 \*信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野、\*\*信州大学医学部第3内科、  
 \*\*\*山梨大学大学院医学工学総合研究部

**研究要旨** 我々はこれまでマウス AApoAII や AA アミロイドーシスを用いて、アミロイド線維によるアミロイド線維伸長反応促進がアミロイドーシス発症に重要な役割を担っていることを示してきた (アミロイドーシスの伝播)。このようなアミロイド線維による発症促進が家族性アミロイドポリニューロパチ (FAP) でも起こりうるのかを明らかにすることは FAP の発症機序を解明し、予防、治療法を開発するために重要である。前田らが作成した FAP のモデルマウス (Met30TTR トランスジェニックマウス) 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。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。しかし、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると 2 種類のアミロイド線維の沈着場所は異なっていた。

### A. 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチ (FAP) では、トランスサイレチン (TTR) の 1 アミノ酸が置換した異型 TTR がアミロイド線維を形成して組織に沈着する。しかし、TTR 遺伝子の同一変異 (Met30) が主要な発症原因であっても、発症年齢には、ポルトガル人と日本人の多くは 30~40 歳代、スウェーデン人は平均 56 歳と地域による差が認められている。また、同一家系内でも、個人によって、発症年齢に 20~30 年にわたる違いがある例がしばしば見出されている。さらに、スウェーデンの FAP 家系の人々がアメリカ合衆国に移住して、数世代を経ると早く発症する傾向が認められている。さらに FAP 患者の家系では、同一家系内で世代が進むほどその発症年齢が若年化するという表現促進現象 (anticipation) が認められることが知られており、この表現促進現象は母から子への母系遺伝の際に最も顕著に認められると報告されている。これらのことから FAP の発症には、主因となる TTR 遺伝子変異のほかに、環境因子や

他の蛋白質が関与することが予想されている。

マウス AApoAII アミロイドーシスや、AA アミロイドーシスで報告されているアミロイド線維による発症促進 (伝播) が、FAP でも発症要因となるのかを、前田らが作成したモデルマウスを用いて解析した。

### B. 研究方法

**FAP モデルマウス**: 前田らが作成したヒト型 FAP モデルマウス (*hMet30TTR*Tg, *mTtr*+/, *hMet30TTR*Tg, *mTtr*+/-, *hMet30TTR*Tg, *mTtr*-/-) を用いた。信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験施設の SPF 環境で飼育した。

**ATTR アミロイド線維の経口投与**: Met30ATTR および Ala38ATTR アミロイド線維は、FAP 患者の心臓より Pras らの方法で抽出し、ソニケーション後、2 ヶ月齢の FAP モデルマウスに 20 µg を胃ゾンデで 2 週間毎日投与した。投与開始後、3、6、9、12、18、24 ヶ月で屠殺し、全身の臓器を採取し、アミロイドの沈着を検討した (図 1A)。

AApoAII アミロイド線維の尾静脈投与：  
AApoAII アミロイド線維をマウスの肝臓より  
Pras らの方法で抽出し、ソニケーション後、2  
ヶ月齢のマウスに 100  $\mu\text{g}$  を尾静脈に投与した。  
投与開始後、3、6、9、12ヶ月で屠殺し、  
全身の臓器を採取し、アミロイドの沈着を検討  
した(図 1B)。

アミロイド沈着の検出：各臓器のアミロイド  
沈着はコンゴ赤染色後の緑色偏向で確認した。  
各臓器切片をヒト TTR 特異的抗体とマウス  
apoA-II 抗体で蛍光免疫染色し、共焦点レーザー  
顕微鏡で観察した。また、アミロイド沈着した  
主要な臓器から Pras らの方法で線維を抽出し、  
Western blotting 法と電子顕微鏡で解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いた研究である。実験  
に供したマウスの飼育状態が良好な環境になる  
ように、また屠殺に際しては苦痛が最小限にな  
るように配慮した。実験計画書を信州大学医学  
部動物実験委員会に提出し、承認を得て、信州  
大学医学部動物実験に関する指針に沿って行っ  
た。

遺伝子組換え実験は信州大学遺伝子組換え実  
験等安全委員会の承認を得ている。

アミロイド線維による伝播に関しては、ヒト  
や正常マウスへの伝播/発症の危険は無いと考え  
られるが、アミロイド線維を扱う際は、手袋と  
マスクを着用し、使用した器具やアミロイド線  
維は焼却するか、1 N NaOH 中でオートクレー  
ブ処理することになっている。

### C. 研究結果

ATTR線維経口投与群：Met30ATTR投与したマ  
ウス、Ala38ATTR投与したマウスは、どの群（内  
在性 *Ttr* が、ホモ、ヘテロ、ヌル、の3群）でも、  
投与後18ヶ月以降にアミロイドの沈着が観察さ  
れた（肝、心、肺、舌、胃など）。アミロイド沈  
着組織より、Prasらの方法でアミロイド線維文画  
を抽出し、Western blotting法(図 2A)と免疫電子顕  
微鏡(図 3)では、AApoAIIとATTR線維が両方とも  
検出されたが、共焦点レーザー顕微鏡で観察す  
ると2種類のアミロイド線維の沈着場所は異なっ

いた。一方、DWを投与したマウスでは24ヶ月  
後でもアミロイド沈着は認められなかった。

AApoAII線維尾静脈投与群：AApoAII線維を100  
 $\mu\text{g}$  尾静脈投与した場合には、アミロイド沈着は  
早くなり、投与3ヶ月後からアミロイド沈着が観  
察できた。一方、DWを投与したマウスでは12ヶ  
月後でもアミロイド沈着は認められなかった。  
Western blotting法(図 2B)では、AApoAIIとATTR  
線維が両方とも検出された。

### D. 考察

マウス AApoAII や AA アミロイドーシスで示  
された線維核によるアミロイドーシスの発症促  
進（伝播）が、他種類のアミロイドーシスで成  
立するかを解明することはアミロイドーシスの  
発症機序を解明し、アミロイドーシスの予防や  
治療法を開発するために重要である。患者数が  
多く、肝臓移植以外に有効な治療法が存在しな  
い FAP では、いくつかの事実が、「外部からの  
既存のアミロイド線維の侵襲」が発症に何らか  
の役割を果たす可能性を示唆している。したが  
ってモデル動物を使った解析が必須である。

我々の解析では、アミロイド線維の FAP モデル  
マウスへの投与によって、AApoAII と ATTR  
両方の沈着が促進されたが、2 種類アミロイド  
線維の沈着場所は異なっていた。この結果から、  
アミロイド線維投与による ATTR 沈着の促進は  
seeding 効果によらないことが示唆された。今後、  
促進のメカニズムについて、さらに詳細な検討  
が必要である。

### E. 結論

FAP モデルマウスではアミロイド線維投与に  
よって、ATTR 沈着が AApoAII の沈着とともに、  
促進されるが、seeding 効果によらないことが示  
唆された。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Tojo K, Tokuda T, Hoshii Y, Fu X, Higuchi K,

- Matsui T, Kametani F, Ikeda S. Unexpectedly high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. *Amyloid* 12: 103-108, 2005
- 2) Yan J, Fujii K, Yao J, Kishida H, Hosoe K, Sawashita J, Takeda T, Mori M, Higuchi K. Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice. *Exp Gerontol.* 41: 130-140, 2006
- 3) 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)
- 4) 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)

## 2. 学会発表

- 1) 付笑影、是永龍巳、Zhang Huanyu, 巖景民、澤下仁子、森政之、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス；飼育室における伝播。日本基礎老化学会第 28 回大会、東京、6 月 16 日、2005 年
- 2) 巖景民、藤井健志、岸田秀之、細江和典、姚俊潔、澤下仁子、森政之、樋口京一：SAMP1 マウスを用いた還元型 Coenzyme Q10 の抗老化作用の解析。日本基礎老化学会第 28 回大会、東京、6 月 16 日、2005 年
- 3) 付笑影、是永龍巳、Zhang Huanyu, 巖景民、内木宏延、澤下仁子、森政之、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス；飼育室における伝播の可能性。第 20 回老化促進モデル(SAM)研究協議会、東京、7 月 29 日、2005 年
- 4) 澤下仁子、亀谷富由樹、森政之、樋口京一：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関連 apoA-II アミノ酸配列の解析。第 20 回老化促進モデル(SAM)研究協議会、東京、7 月 29 日、2005 年
- 5) 巖景民、藤井健志、岸田秀之、細江和典、姚俊潔、森政之、樋口京一：SAMP1 マウスを用いた還元型 Coenzyme Q10 の抗老化作用の解析。第 20 回老化促進モデル(SAM)研究協議会、東京、7 月 29 日、2005 年
- 6) Higuchi K : Transmission of mouse systemic amyloidosis. The 4th Asia-Pacific IAP Congress (IAP 2005). Beijing China, August 26, 2005
- 7) Ge F, Yao J, Fu X, Guo Z, Zhang B, Yan J, Zhang H, Li G, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloidosis in the transgenic mice of apolipoprotein A-II (*Apoa2<sup>c</sup>*). The 4th Asia-Pacific IAP Congress (IAP 2005). Beijing China, August 24, 2005
- 8) Fu X, Korenaga T, Zhang H, Yan J, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloidosis: The possible transmission in the mouse room. 文化省特定領域 タンパク質の一生 国際会議、兵庫/淡路市、10 月 30 日、2005 年
- 9) Yan J, Nakamura A, Guo Z, Fu X, Mori M, Higuchi K.: Initiation and fibrillization of AA amyloidosis by MRP-14 amyloid fibril. 文化省特定領域 タンパク質の一生 国際会議、兵庫/淡路市、10 月 30 日、2005 年
- 10) Yao J, Ge F, Fu X, Guo Z, Zhang B, Yan J, Zhang H, Li G, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloidosis in the transgenic mice of apolipoprotein A-II (*Apoa2<sup>c</sup>*). 文化省特定領域 タンパク質の一生 国際会議、兵庫/淡路市、10 月 30 日、2005 年
- 11) Sawashita J, Mori M, Kamatani F, Higuchi K: Amyloid fibril formation by the two distinctive sequences of apolipoprotein A-II associated with the mouse senile amyloidosis. 文化省特定領域 タンパク質の一生 国際会議、兵庫/淡路市、10 月 30 日、2005 年
- 12) 張倍茹、付笑影、葛鳳霞、巖景民、張桓宇、澤下仁子、森政之、樋口京一：活性化 hHSF1 トランスジェニックマウスにおける AApoAII アミロイドーシスの抑制。第 10 回臨床ストレス蛋白質研究会、熊本、11 月 26 日、2005 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



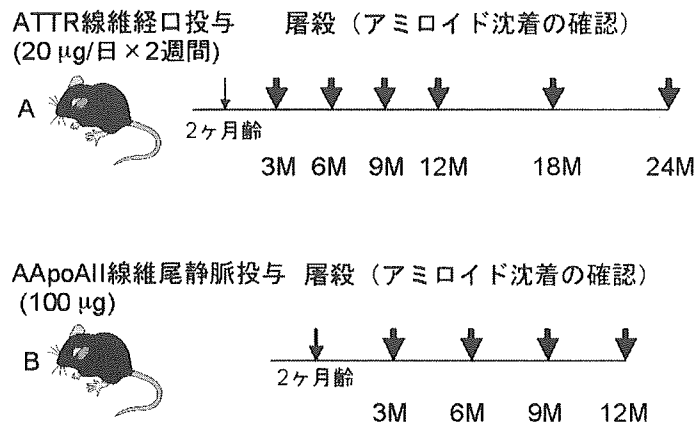


図1. 実験のスケジュール。A. ATTR線維経口投与実験、  
B. AApoAII線維尾静脈投与実験

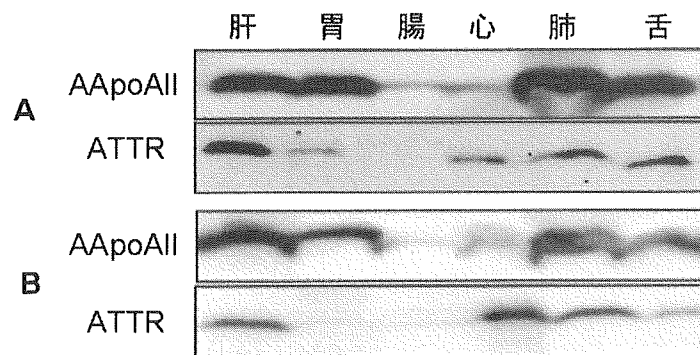


図2. 各臓器のアミロイド線維分画のWestern blotting  
解析。A. ATTR線維経口投与18ヶ月後、B. AApoAII線  
維静脈投与12ヶ月後

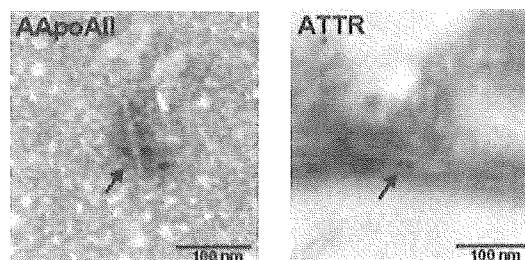


図3. 免疫電子顕微鏡写真。ATTR線維経口投与18ヶ  
月後、マウスの肝臓より抽出したアミロイド線維

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

## 変異 TTR の安定性と細胞の Quality Control System が アミロイドーシス発症に及ぼす影響の検討

分担研究者 池田修一 信州大学医学部 神経内科, リウマチ・膠原病内科

共同研究者 関島良樹<sup>\*, \*\*</sup>, J.W. Kelly<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>信州大学医学部 神経内科, リウマチ・膠原病科, <sup>\*\*</sup>The Scripps Research Institute

**研究要旨** 変異 Transthyretin (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はこれまで不明であった。われわれは変異 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ることを明らかにした。

### A. 研究目的

TTR は全身性のアミロイドーシスをきたす代表的なタンパク質で、生体内では主に血清および髄液中に存在し、thyroxine (T<sub>4</sub>)と retinol binding protein の輸送を行っている。TTR 遺伝子の変異は家族性アミロイドーシスの原因であり、これまでに約 100 種類の変異が報告されている。TTR アミロイドーシスの臨床像は変異の種類により大きく影響される。例えば、L55P 変異は 10 歳代に発症する非常に重症な全身性アミロイドーシスをきたすが、V122I 変異を有する患者は 60 歳以降に発病する。一方、T119M 変異はアミロイドーシスの発症に対して抑制的に作用する。TTR の変異はアミロイドーシスの臓器特異性にも影響を及ぼす。通常は肝臓で産生された血清中の TTR が全身組織に沈着し末梢神経障害や心筋障害を発症するが、D18G や A25T 変異は脳の脈絡層で産生された髄液中の TTR が髄膜や同部位の血管壁に沈着し、中枢神経障害を発症する。今回の研究では、遺伝性 TTR アミロイドーシスの発症機序を解明するため、変異 TTR の安定性と細胞の Quality Control System がアミロイドーシス発症に及ぼす影響を検討した。

### B. 研究方法

32 種類の変異 TTR を大腸菌を用いて作成し、尿素による変性と分光蛍光光度計で TTR の熱力

学的・動力的安定性を解析した。また、酢酸バッファーおよびメタノールバッファー中でのアミロイド線維形成傾向を turbidity (OD<sub>400</sub>)を用いて評価した。更に、BHK 細胞からの変異 TTR の分泌効率をパルスチェイス法で解析した。また、免疫蛍光顕微鏡を用いて TTR の細胞内局在を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトや実験動物を対象として用いておらず、倫理面の問題がないと判断した。

### C. 研究結果

アミロイドーシスの臨床像は熱力学的安定性と密接に関連しており、全てのアミロイド原性を有する変異 TTR は野性型に比べて熱力学的に不安定であった<sup>1)-5)</sup>。一方、アミロイドーシスに対して抑制的に働く変異は野性型に比べて熱力学的に安定であった<sup>1)-3), 6)</sup>。興味深いことに、中枢神経優位にアミロイド沈着をきたす変異は熱力学的に最も不安定であった<sup>1)-5)</sup>。予想に反して、臨床的に最も重症な変異はエネルギー学的に中等度に不安定であり、エネルギー学的に最も不安定な変異の臨床像は比較的軽症であった<sup>1)-3), 6)</sup>。

多くの変異 TTR は野性型と同等の細胞からの分泌効率を示したが、非常に不安定な中枢神経型の変異 TTR の分泌効率は著しく低下していた。

不安定な変異 TTR は小胞体には局在するもののゴルジ体にはほとんど存在しておらず、小胞体残留を受けていた。更に、これらの不安定な変異 TTR はプロテアソームによる小胞体関連分解を受けていた<sup>1)3)</sup>。

TTR のリガンドである T<sub>4</sub> は野性型 TTR の分泌効率には影響を与えなかったが、非常に不安定な中枢神経型変異 TTR の分泌効率を濃度依存的に増加した<sup>1)3)</sup>。

#### D. 考察

全てのアミロイド原性を有する変異 TTR は野性型に比べてエネルギー学的に不安定であり、変異 TTR のタンパク質としての不安定性が、TTR アミロイドーシス発症の根本的な原因であると考えられた。

*In vitro* では TTR の不安定性とアミロイド原性は非常に良く相関していたが、エネルギー学的に最も不安定な変異の臨床像は比較的軽症であり、これらの変異 TTR の細胞からの分泌は抑制されていた。これは、非常に不安定な変異 TTR は、細胞の Quality Control System により細胞内で分泌前に分解されるため、血清中の濃度が低下し<sup>7)</sup>、重症な全身性のアミロイドーシスをきたさないためと考えられた。

これらの非常に不安定な変異 TTR は主に中枢神経系に沈着する。これは脈絡層では T<sub>4</sub> の存在により非常に不安定な TTR の構造が一時的に安定化されるため髄液中への分泌効率が増加し、髄液を介して中枢神経系にアミロイドとして沈着すると推測された。

#### E. 結論

1. 変異 TTR のタンパク質としての不安定性が、TTR アミロイドーシス発症の根本的な原因である
2. 非常に不安定な変異 TTR はプロテアソームによる小胞体関連分解を受けるため生体でのアミロイド原性はむしろ低下する
3. 脈絡層での T<sub>4</sub> による不安定な変異 TTR の安定化が、中枢神経有意にアミロイドが沈着する機序として考えられる

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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

2) 関島良樹：Transthyretin アミロイドーシスの発症メカニズム. *実験医学* 23 : 2162-2165, 2005

3) 関島良樹, 池田修一：家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の病態の多様性と薬物療法への展望, *Annual Review 神経* 2006, p75-82, 中外医学社, 東京, 2006

4) 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: 409-17, 2003

5) Hammarström P, Sekijima Y, White JT, Wiseman RL, Lim A, Costello CE, Altland K, Garzuly F, Budka H, Kelly JW: D18G transthyretin is monomeric, aggregation prone, and not detectable in plasma and cerebrospinal fluid: a prescription for central nervous system amyloidosis? *Biochemistry* 42: 6656-6663, 2003

6) Sekijima Y, Dendle MT, Wiseman RL, White JT, D'Haese W, Kelly JW: R104H may suppress transthyretin amyloidogenesis by thermodynamic stabilization, but not by the kinetic mechanism characterizing T119M trans-suppression. *Amyloid* in press

7) Mitsuhashi S, Yazaki M, Tokuda T, Sekijima Y, Washimi Y, Shimizu Y, Ando Y, Benson MD, Ikeda S. Biochemical characteristics of variant transthyretin causing hereditary leptomeningeal amyloidosis. *Amyloid* 12: 216-225, 2006

##### 2. 学会発表

1) 関島良樹, JW Kelly, 池田修一. TTR の安定性と細胞の Quality Control System がアミロイド

一シス発症に及ぼす影響の検討. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島. 2005 年 5 月 25-27 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