

200500876A

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

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 池田修一

平成18(2006)年3月

目 次

[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.	FAP TTR Met30 の臨床生理学および病理学的所見	5
	- 若年発症例と高齢発症例との比較 -	
	祖父江 元	
	名古屋大学神経内科	
2.	プロテアソームを介した TTR 分解機構および FAP 新規治療法の開発研究	8
	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	
3.	肝移植後長期経過した FAP 患者の胃・腹壁脂肪沈着アミロイド動態	12
	池田修一	
	信州大学医学部神経内科、リウマチ・膠原病内科	
4.	チーターの AA アミロイドーシスの解析 (1)	15
	樋口京一	
	信州大学医学研究科加齢適応医科学系加齢生物学分野	
5.	実験的 AA アミロイドーシスの発症における triptolide の効果	20
	石原得博	
	山口大学医学部構造制御病態学講座	
6.	AA アミロイドーシスの新たな治療法の考案	24
	- AA アミロイドーシスの発症における T 細胞の役割からみた治療研究 -	
	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	
7.	関節リウマチによる反応性アミロイドーシス合併例の透析導入法の検討	29
	中野正明	
	新潟大学医学部保健学科	
8.	チーター(Acinonyx jubatus)由来アミロイドの伝達性に関する研究	33
	宇根有美	
	麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室	
9.	アミロイドーシスにおける核医学検査	40
	- 全身 ^{99m} Tc(V) DMSA シンチグラフィの検討と他のトレーサに関する文献的 考察 -	
	松田博史	
	埼玉医科大学病院核医学	
10.	超音波心筋イメージングによる心アミロイドーシスの評価	42
	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.	Autophagyによる形質細胞治療とALアミロイドーシスモデルマウス作成の試み・・・	44
	満屋裕明 熊本大学医学部血液内科	
12.	全身性ALアミロイドーシスに対するVAD単独療法の有用性についての検討・・・	48
	松田正之 信州大学医学部神経内科、リウマチ・膠原病内科	
13.	新規シャペロンによる異常凝集体解きほぐし効果の検討・・・・・・・・・・・・・・・・	52
	金子清俊 東京医科大学生理学第二講座	
14.	活性型 <i>hHSP1</i> 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・・・	56
	の抑制 樋口京一 信州大学医学研究科加齢適応医科学系加齢生物学分野	
[III]	研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	59
[IV]	班構成員名簿・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	69

[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

アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究

主任研究者 池田 修一 信州大学医学部 教授

研究要旨 本研究ではアミロイド沈着に特異的画像診断法を開発し、また全身性アミロイドーシスに有効な新規薬物治療法を確立することを目的とする。本年度は画像診断では心アミロイドーシスの鋭敏な超音波診断法が報告された。また、アミロイドーシスの病態に関しては飼育チーターで高率に発生している AA アミロイドーシスの成因、肝移植後長期経過した FAP 患者の組織へ沈着しているアミロイドの変化などで新知見が見出された。治療の領域では AL アミロイドーシスに対する VAD 単独療法の有効性、AA アミロイドーシスへの漢方薬成分の投与の試み、FAP に対する diflunisal、三価クロム (CrIII) を用いた薬物療法の提唱などが報告された。

分担研究者名

安東由喜雄 (熊本大学大学院医学薬学研究部・講師)
 石原得博 (山口大学医学部・教授)
 金子清俊 (東京医科大学医学部・教授)
 樋口京一 (信州大学大学院医学研究科・教授)
 祖父江 元 (名古屋大学院医学研究科・教授)
 中野正明 (新潟大学医学部・教授)
 宇根有美 (麻布大学獣医学部・助教授)
 松田博史 (埼玉医科大学病院・教授)
 満屋裕明 (熊本大学大学院医学薬学研究部・教授)

A. 研究目的

アミロイドーシスは全身の多臓器を障害し、また疾患特異的な症状に乏しい。このため多くの本症患者が進行期に至ってやっと診断されているのが現状である。最近、異なる病型のアミロイドーシスに対する根治療法が試みられているが、こうした治療の対象となる患者はいずれも発症早期の患者である。このためアミロイド沈着に特異的画像診断法を開発することで、発症早期のアミロイドーシス患者の診断が可能となり、また全身性アミロイドーシスに有効な新規薬物治療法を確立することで本症患者の治癒率が向上することが期待できる。

B. 研究方法

I. アミロイドーシスの画期的診断法

1) 組織ドプラ法、後方散乱信号法による心アミロイドーシスの鋭敏な検出法：

発症早期の原発性 AL-、反応性 AA-アミロイドーシスならびに FAP 患者を対象に心エコーを行い、上記の二検索法により心筋の二点間の組織ドプラの差と内因性心筋収縮力を定量化した。同時に血清中 BNP、N-terminal pro-BNP、cardiac troponin を測定し、これらの値を健常対照者と比較して、心アミロイドーシスの診断法を確立することを検討した (小山、池田)。

2) CT, MRI, RI-image によるアミロイド沈着臓器の鋭敏な検出法：

CT/MRI と Tc-99m (V) DMSA および Tc99m-Aprotinin 核種を用いた RI-image を対比させることでアミロイドーシスに特異的な画像を検討した。対象はアミロイド沈着が起る甲状腺、心臓、肝・脾であり、組織造影効果をコンピューター解析した (松田博史、池田)。

II. アミロイドーシスの画期的治療法

1) AL アミロイドーシス:対象患者を vincristine, doxorubicin, dexamethazone の三剤併用 (VAD 療法)を単独で行う群、VAD 導入療法後 Auto-PBSCT を併用したメルファラン大量静注療法を行う群とで治療効果の比較試験を行った。指標は血清・尿中の M 蛋白の消失、血清中の free light chain 濃度ならびに κ/λ の正常化とした。(池田、満屋)。

- 2) AA アミロイドーシス：有効な薬物療法の開発、進行期患者の腎機能管理の方法を検討した（石原、中野）。
- 3) FAP: TTR 四量体分子との結合性が高いことが Scripps 研究所の Kelly 博士らにより証明され、海外で市販されている diflunisal を個人輸入して FAP 患者に投与して、血清中の TTR 分子の安定性を検索した。Diflunisal は 500mg/day と 1000mg/day の二群投与とし、本薬剤の血中濃度は HPLC で半定量的に測定した。同様な作用機序を持つ三価クロム (CrIII) は transgenic mice に投与して検索した。抗体療法に関しては TTR 単量体における cryptic epitope が可溶性状態でも露出するように設計した TTR ペプチドを作成し、TTRV30M 変異を有する transgenic mice に免疫してこの変異 TTR を特異的に認識する自己抗体産生の有無を検索した。（安東、祖父江、樋口、池田）

（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

I. アミロイドーシスの診断法

組織ドプラ法、後方散乱信号法を用いて心アミロイドーシス患者の心機能解析と予後の検索を行った。両二者の指標は従来の壁厚測定、僧帽弁血流速度測定に比較して、心アミロイドーシス患者の心機能低下度をより鋭敏に反映していた。

II. アミロイドーシスの病態に関する研究

絶滅危惧種であるチーターの重要な死因は炎症に伴う全身性 AA アミロイドーシスである。国内で飼育されているチーターの本疾患罹患率は

95%であり、その成因として遺伝的背景の均一化、環境要因などが考えられる。後者の環境要因に関してはチーターの糞便中に AA アミロイド線維が排泄され、同一ケージ内の他の個体が経口的に本アミロイド線維を摂取することが全身性 AA アミロイドーシス発症の trigger となることが考えられる。FAP の若年発症群と高齢発症群との病態の違いが示された。FAP では根治療法として肝移植が定着している。本治療を受け 10 年前後経過した FAP 患者の体内のアミロイド沈着動態の変化について、5 名を対象に検索された。腹壁脂肪の吸引組織の検索では、術後 2、3 年目からアミロイド沈着は減少し、10 年目頃にはほぼ完全に消失していることが明らかにされた。

III. アミロイドーシスの治療法

- 1) AL アミロイドーシス：形質細胞異常症に対する vincristine, doxorubicin, dexamethazone の三剤併用療法 (VAD 療法) の有用性が報告された。VAD 療法は本来、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を行う前の導入療法として行われている。60 歳以上の高齢者で、全身状態がよくなくメルファラン大量静注療法を施行することが困難な患者 8 名に対して、VAD 療法を 1～2 クール行った。4 名で M 蛋白が消失して症状も改善し、臨床的に寛解したと判断できた。
- 2) AA アミロイドーシス：漢方薬“雷公藤”の主成分である triptolide が濃度依存性にマウスにおける実験的 AA アミロイドーシスの発症を抑えることが示された。関節リウマチに併発した AA アミロイドーシスに起因する腎障害に対して、透析療法を予定導入することで、導入時の合併症を減らすことができることが報告された。
- 3) FAP：本疾患のアミロイド前駆蛋白は変異トランスサイレチン (TTR) である。Diflunisal の FAP 患者への投与は 500mg/day、1000mg/day の二群とした。TTR 四量体分子への安定化作用の検討は、本蛋白を尿素または酸にとより変性させた後に SDS-PAGE / Western blotting を施行して、TTR 分子の四量体、二量体、単量体分子の比率を観察することで行った。

Diflunisal は 500mg/day の投与で患者血清中の TTR に特異的に結合して本分子の安定化を計ることが示された。また diflunisal と類似な作用を発揮する物質として Cr^{3+} の有用性が示された。

D. 考察

組織ドプラ法、後方散乱信号法を用いた心アミロイドーシス患者の心機能解析法は従来の方法に比較して非常に鋭敏である。しかし現状では手技の面を含めて、一般医家に必ずしも容易に受け入れられる方法ではない。心アミロイドーシス患者の予後を予測する方法として、今後血清中の BNP 値等も加味したより簡便な指標を確立していく必要がある。

アミロイドーシス患者への有効な治療法導入の上で、AL 型患者に対して vincristine, doxorubicin, dexamethazone の三剤併用療法 (VAD 療法) の有用性が示されたことの意義は大きい。本療法は副作用が少なく、全身状態が万全でない高齢者にも適応がある。また一般の大部屋で実施が可能なため、専門医がいない市中病院へも本療法を広げることができる。AA アミロイドーシス患者の治療への漢方薬成分の応用、本疾患の重要な臓器障害である腎病変への透析導入療法の指標などは今後さらに多数患者での検討を要する。

肝移植を受け長期経過した FAP 患者の腹壁組織において、アミロイド沈着が有意に減少していることが証明されたことは、本治療が FAP 患者の根治療法であることを改めて印象付けた。今後、FAP の主な標的臓器である末梢神経、自律神経、内臓器官へ沈着しているアミロイドの

変化を明らかにしていく必要がある。また、FAP ではアミロイド前駆蛋白を安定させることで組織へのアミロイド沈着を防ぐという発想での薬物療法が臨床的に実施された。今後多数例での臨床データの集積と分析が期待される。

E. 結論

本研究ではアミロイド沈着の特異的画像診断法と、全身性アミロイドーシスに有効な薬物治療法を確立することで、発症早期のアミロイドーシス患者の診断が可能となり、患者の治癒率が向上することを目指している。今年度は初年度であり、個々の研究分野で計画の立案と具体的方向性を定めることに主眼が置かれた。今後 2 年間で実質的な研究を行い、成果を出すことが期待される。

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)
アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

FAP TTR Met30 の臨床生理学および病理学的所見 ：若年発症例と高齢発症例との比較

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学神経内科

共同研究者 小池春樹*、飯島正博*、森恵子*、服部直樹*、山本正彦*、
安藤由喜雄**、池田修一***

*名古屋大学神経内科、**熊本大学医学部病態情報解析分野、

***信州大学医学部第三内科

研究要旨 FAP TTR Met30 は従来、集積地（長野県小川村および熊本県荒尾市）との関連で報告され、20-40 歳で発症し、浸透率が高く、著明な自律神経症状を認め、解離性感覚障害を呈し、房室伝導ブロックをきたしやすいなどの特徴があるといわれてきた。これに対して近年、50 歳以上の高齢で発症する FAP TTR Met30 が全国で散在性に報告され、従来の集積地の若年例に比べ、病初期の自律神経症状が軽度で、著明な解離性感覚障害を呈さず、心伝導障害よりも心肥大をきたしやすいなどの特徴を有することが明らかになっている。同じトランスサイレチン遺伝子の Val30Met 変異を有するにもかかわらず異なる臨床像を呈する原因は明らかになっていない。FAP TTR Met30 における若年発症例と高齢発症例の地理的分布、臨床症状の相違はポルトガルでも報告されており、現在、両者の遺伝的背景の違い等について調査が進行中である。今回、両者の臨床生理学および病理学的な比較検討を行ったところ、若年発症例（若年群）と高齢発症例（高齢群）は臨床症状の際を反映して異なった電気生理学および病理学的所見を呈することが明らかになった。特に、末梢神経においては高齢群では若年群に比べてアミロイド沈着は軽度であったが、有髄神経の障害の程度は電気生理学的にも病理学的にも高度であり、軸索再生像も目立ったことから、高齢群においては若年群に比べて病態がより長期間関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

FAP TTR Met30 は本邦においては最も一般的な FAP であり、若年発症例と高齢発症例は同じ遺伝子異常を有するにもかかわらず、異なる臨床病理学的所見を呈する。臓器ごとの間質における基質の違いや、その加齢に伴う変化、さらにはハプロタイプの違いなどが関連していると考えられ、これらの検索をすることは、FAP の病態の解明、新規治療法の開発に役立つと考えられる。集積地と関連のある若年発症例と集積地と関連のない高齢発症例を臨床、電気生理、および病理学的に比較検討することにより解明し、ひいては新規治療の開発に結びつける。

B. 研究方法

1. 対象

遺伝子診断で確定した FAP TTR Met30 の若年発症例（若年群）25 例、高齢発症例（高齢群）35 例につき末梢神経伝導検査所見の比較検討を行った。罹病期間は若年群で 5.7 ± 4.8 年、高齢群で 3.4 ± 3.5 年と若年群が長かったが、modified Rankin Scale で評価した ADL は若年群で 2.1 ± 1.1 、高齢群で 2.0 ± 0.8 と差はなかった。また、若年群 3 例、高齢群 3 例の中枢・末梢神経系、一般臓器の剖検病理所見と、それぞれ 9 例、11 例ずつの生検腓腹神経病理所見を比較検討した。発症から剖検までの期間は若年群で 12.7 ± 5.1 年、高齢群で 6.3 ± 3.5 年、生検までの期間は若年群で 2.6 ± 1.5 年、高齢群で 2.2 ± 1.4 年であった。

2. 方法

2 群間の比較には Mann-Whitney *U* test を用い、 $p < 0.05$ の場合を有意とした。末梢神経伝導検査所見に関しては若年群および高齢群それぞれにおいての罹病期間との相関についても解析した。

C. 研究結果

末梢神経伝導検査では正中および腓腹神経の感覚神経神経活動電位が高齢群において若年群に比べて有意に低下していた。異常の程度は、若年群では罹病期間と相関を示したのに対し、高齢群では病初期から異常所見が著明な例があるため罹病期間との相関は認められなかった。

生検例の腓腹神経病理所見では若年群は有髄神経が高度に脱落している例を除けば小径線維優位の脱落を呈した。高齢群は若年群と同様の小径有髄線維優位の脱落を呈する例も認めたが、再生線維が目立ち、一見、小径有髄線維が保たれている様に見える例もあった。若年群では軸索再生像は殆ど認めなかったが、高齢群では目立つ例が多かった。高齢群の有髄線維は若年群に比し有意に保たれていた ($p = 0.008$)。アミロイド沈着は若年群の 2 例を除いて、両群ともごく軽度か殆ど認めない程度であったが、全体としては若年群でより高度な傾向を認めた。

剖検例では、後根神経節と交感神経節のアミロイド沈着、神経細胞脱落は高齢群に比べ、若年群でより高度であった。アミロイド沈着は若年群では後根神経節よりも交感神経節でより高度であったのに対し、高齢群では交感神経節よりも後根神経節でより高度であった。末梢神経のアミロイド沈着は若年群でより高度であった。末梢神経のアミロイド沈着は若年群でより高度であったのに対し、Congo red 陰性・TTR 陽性の沈着物は高齢群が目立った。一般臓器のアミロイド沈着は、甲状腺、消化管、膵臓、副腎、腎臓においては、若年群が高齢群に比べより高度であったのに対し、心臓、下垂体前葉においては高齢群が若年群より高度であった。心臓のアミロイド沈着は、若年群では心内膜下に目立ったのに対し、高齢群では心筋全層にびまん性に認めた。若年群では心内膜下の心筋の萎縮を認めた。下垂体後葉、肝臓、骨格筋においては、アミロイド沈着は両群とも殆ど認めなかった。

D. 考察

高齢群と若年群は臨床症状と関連し、異なる病理所見を呈することが明らかになった。若年群の小径線維優位の脱落、後根神経節よりも交感神経節でより高度なアミロイド沈着は、著明な自律神経障害、解離性感覚障害と、高齢群の比較的保たれている無髄線維、交感神経節よりも後根神経節でより高度なアミロイド沈着は、比較的軽度な自律神経症状、全感覚障害と対応する。また、心臓に関しては、若年発症例では、伝導系を含めた心内膜下のアミロイド沈着、心筋の萎縮が高度であるために心伝導障害が高率に発生し、高齢発症例では心筋全層へのびまん性のアミロイド沈着により心肥大を来すものと考えられる。発症から剖検例までの期間は高齢群より若年群の方が長く、病期の違いで組織のアミロイド沈着量の違いの一部は説明可能と思われるが、腓腹神経、心臓、下垂体の所見については他の要素を考える必要があり、今後更に検索が必要と思われる。

E. 結論

若年群と高齢群は臨床症状と関連し、異なる電気生理学のおよび病理所見を呈することが明らかになった。神経伝導検査所見および高齢群が目立った軸索再生像は、高齢群においては若年群に比べて病態がより長期間関与している可能性を示唆している。高齢群はアミロイド沈着が若年群に比べて軽度であるにもかかわらず有髄線維の減少が高度であり、Congo red 陰性・TTR 陽性の沈着物は若年群に比べて多く認めたことから、nonfibrillar なアミロイドの前駆体等も特に高齢群においては神経障害に関与している可能性が推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Iijima M, Yamamoto M, Hirayama M, Tanaka F, Katsuno M, Mori K, Koike H, Hattori N, Arimura K, Nakagawa M, Yoshikawa H, Hayasaka K, Onodera O,

Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakazato M, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G. Clinical and electrophysiologic correlates of IVIg responsiveness in CIDP. *Neurology* 2005; 64: 1471-1475.

2) Koike H, Hirayama M, Yamamoto M, Ito H, Hattori N, Umehara F, Arimura K, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Kaji R, Hayasaka K, Nakagawa M, Sakoda S, Matsumura K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Kira J, Nakashima K, Oka N, Sobue G. Age associated axonal features in HNPP with 17p11.2 deletion in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1109-1114.

3) Mori K, Iijima M, Koike H, Hattori N, Tanaka F, Watanabe H, Katsuno M, Fujita A, Aiba I, Ogata A, Saito T, Asakura K, Yoshida M, Hirayama M, Sobue G. The wide spectrum of clinical manifestations in Sjogren's syndrome-associated neuropathy. *Brain* 2005; 128: 2518-2534.

4) Sone J, Hishikawa N, Koike H, Hattori N,

Hirayama M, Nagamatsu M, Yamamoto M, Tanaka F, Yoshida M, Hashizume Y, Imamura H, Yamada E, Sobue G. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease showing motor-sensory and autonomic neuropathy. *Neurology* 2005; 65: 1538-1543.

5) Koike, H, Iijima M, Mori K, Hattori N, Sobue. G Thiamine deficiency neuropathy in Japan. *Recent Advances in Neurology* 2005; 2: 45-55.

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

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

プロテアソームを介した TTR 分解機構および FAP 新規治療法の開発研究

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学大学院医学薬学研究部病態情報解析学

共同研究者 佐藤卓史*、薄 聖子*、宮田将徳*、甲斐広文*

*熊本大学薬学教育部分子機能薬学講座

研究要旨 家族性アミロイドーシス (FAP) の治療戦略として diflunisal (DF) などを用いた TTR 四量体の安定化が考えられる。しかし、本研究室の細胞評価系実験により、一部の変異トランスサイレチン (TTR) に対する DF の安定化作用が小さいことが明らかになった。そこで、DF の治療効率上昇を目的とし、本研究室が TTR 四量体安定化因子として同定した必須微量元素 Cr^{3+} の臨床適用に向けた基礎検討を行った。マウスへの $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 投与実験を行った結果、 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ は経口でも吸収され、過剰量連日投与でも毒性を示さなかった。また、新規治療法開発を目的とし、種々の変異 TTR を用いて、細胞内挙動を検討した。その結果、単量体の amyloidogenic TTR はプロテアソームで分解され、細胞外分泌が抑制されていることが明らかになった。以上より、FAP の Cr^{3+} 補充療法としての $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 経口投与の有用性、および細胞内特異的な TTR 四量体の不安定化が FAP 新規治療法につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在、FAP の有効な治療法は肝移植のみであり、精力的に研究が進められている治療法は DF などの small molecule を用いた方法である。しかし、胃腸管障害等の DF の副作用を考慮した場合、可能な限り低濃度で治療を行う必要があり、その治療効率を上昇させることが重要である。また、FAP の新規治療法の開発も望まれる。そこで、DF の治療効率上昇および FAP 新規治療法の開発を目的とした。

B. 研究方法

1. マウスへの $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 投与実験

Crj: CD1 (ICR) 系統雄マウスに対し、 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の腹腔内連続投与 (臨床量: 0.019 mg/day, 過剰量: 10, 100 倍量, 8 週間), あるいは混餌による投与 (0.12, 1.2 mg/kg, 12, 23 週間), 混水による投与 (0.098, 0.98 mg/kg, 3 週間) を行った。血液, 尿, 諸臓器におけるイオン濃度は、ICP-MS を用いて測定した。臓器は、全て灰化し、灰化溶液を希釈したものを測定溶液とした。

2. 哺乳類細胞を用いた TTR の分泌・分解機構の検討

WT TTR の他, 10 種類の変異 TTR, および各 TTR に四量体形成を阻害する変異 (F87M/L110M) を導入した M-TTR の遺伝子ベクターを作製し, 以下の方法を用いて検討した。分泌パターン解析は, CHO-K1 細胞あるいは HeLa 細胞に各 TTR 遺伝子を導入し, 24 時間後に無血清培地に交換し, さらに 24 時間後に medium および cell lysate を回収した。四量体安定化作用の評価は, CHO-K1 細胞に TTR 遺伝子を導入し, 24 時間後に T4 あるいは DF 含有 (0-10 μM) の無血清培地に交換し, さらに 24 時間後の medium と cell lysate を回収した。分解の検討は, HeLa 細胞に TTR 遺伝子を導入し, 42 時間後にタンパク質合成阻害剤である cyclohexamide (CHX) (500 μM) およびプロテアソーム阻害剤である MG-132 (30 μM) 含有培地に交換した。その後, 経時的に 0, 2, 6 時間後の medium および cell lysate を回収した。以上, 回収したサンプルは全て, SDS-PAGE および

Western blotting 法を用いて解析した。細胞内局在の解析は、TTR 遺伝子を HeLa 細胞に導入し、48 時間後に 4% paraformaldehyde で固定した後、免疫蛍光染色法により行った。

C. 研究結果

マウスへの $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 投与実験の結果、 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ は経口でも吸収されること、および過剰量連続投与でも毒性を示さないことが明らかになった。また、Cr の体内動態の指標としては尿中 Cr が有効であることが示唆された。

哺乳類細胞を用いた TTR 分泌パターン解析の結果、non-amyloidogenic TTR は四量体、二量体、単量体として検出できたが、amyloidogenic TTR では四量体バンドは検出されなかった。Medium 中に検出される TTR 単量体量を指標とし、thyroxine (T_4) および DF による TTR 四量体安定化作用を検討した結果、安定化作用は変異体によって異なることが明らかになった。non-amyloidogenic TTR ではある程度の安定化作用が認められたが、V30M TTR, L55P TTR, E54K TTR ではほとんど認められなかった。過去の報告と一致して、D18G TTR は分泌されず、A25T TTR は T_4 および DF 処理により、細胞外分泌量が上昇した。M-TTR に関しては、non-amyloidogenic M-TTR は分泌されたのに対し、amyloidogenic M-TTR は分泌されなかった。免疫蛍光染色の結果、分泌される TTR および non-amyloidogenic M-TTR は小胞体 (ER) と Golgi 体を經由することが明らかになったが、分泌されなかった D18G TTR および amyloidogenic M-TTR は、ER retention することが明らかになった。さらに、プロテアソーム阻害実験により、D18G TTR および V30M M-TTR はプロテアソームを介して分解されていることが明らかになった。WT TTR や WT M-TTR のプロテアソームによる分解は認められなかったが、V30M TTR は一部プロテアソームによる分解を受けていることが示唆された。

D. 考察

今回の検討より、non-amyloidogenic TTR は単量体でも分泌されるが、amyloidogenic TTR は単量体では分泌されずに分解されると考えられる。

従って、TTR の分泌および分解の制御機構は小胞体に存在しており、TTR 単量体の folding 状態が重要な制御因子であると考えられる。本研究室は、小胞体内特異的に amyloidogenic TTR 四量体を不安定化させることで、細胞外分泌の阻害が可能だと考えている。Amyloidogenic TTR の細胞外分泌量の減少は FAP 治療に応用できる可能性があり、今後、TTR の小胞体シャペロンとの相互作用および詳細な分解機構等を検討する予定である。また、FAP 患者の大部分がヘテロ接合体であるため、ヘテロ接合体モデルを用いた検討も行う予定である。ヘテロ接合体の場合、細胞内で四量体を不安定化すると、WT TTR は単量体として分泌されると予測されるが、分泌後の四量体形成は数秒で起こると考えられる。この場合、 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の併用療法が有効だと考えている。

E. 結論

FAP の Cr^{3+} 補充療法として $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の経口投与が有用であることを示し、細胞内特異的な「TTR 四量体の不安定化」という独創的な発想 FAP 新規治療法につながる可能性を提起した(図 1)。未来の FAP 治療には、TTR 変異体の特性を活かした多方面からの治療アプローチが必要と考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

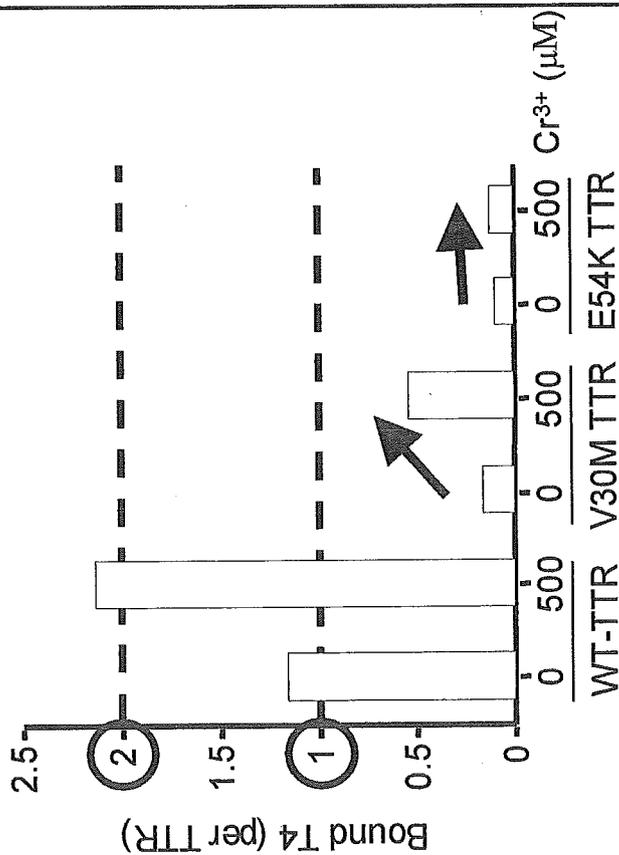
1) Takashi Sato, Yukio Ando, Seiko Susuki, Fumi Mikami, Shinji Ikemizu, Msdsski Nakamura, Ole Suhr, Makoto Anraku, Toshiya Kai, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, Mineyuki Mizuguchi, Yuriko Yamagata, Hirofumi Kai. Chromium (III) ion and thyroxine cooperate to stabilize the transthyretin tetramer and suppress in vitro amyloid fibril formation. FEBS letter 580: 491-496, 2006

2. 学会発表

- 1) Seiko Susuki. Cooperation between Chromium (III) Ion and Thyroxine to Stabilize Transthyretin Tetramer and Suppresses Amyloid Fibril Formation. The 6th International Symposium on Familial Amyloid Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders and The 5th International Workshop on Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy. La Jolla, California, USA. August 24-26, 2005
 - 2) Takashi Sato. Secretion pattern of TTR differed with mutation. The 6th International Symposium on Familial Amyloid Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders and The 5th International Workshop on Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy. La Jolla, California, USA. August 24-26, 2005
 - 3) 薄 聖子. FAP 発症制御因子 Cr (III) の臨床応用に向けての基礎検討. 疾患プロテオミクス最前線. 熊本県立劇場. 9月 2-3 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

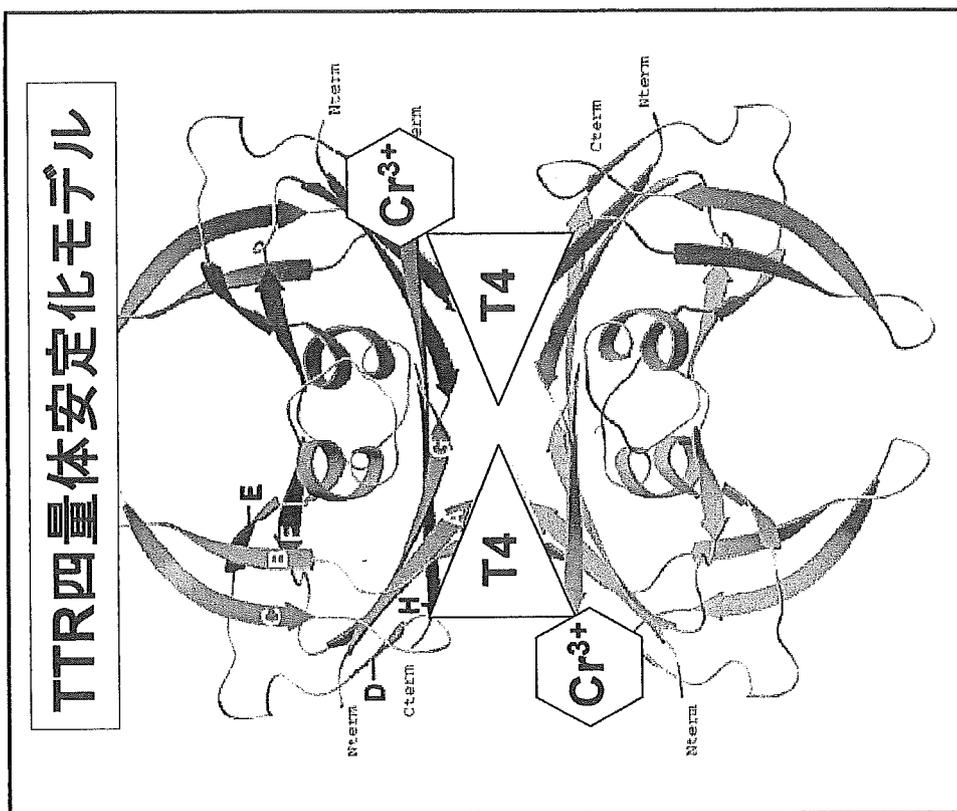
Cr³⁺ によるTTR四量体安定化の作用解析

[¹²⁵I]T₄ binding assay



⁵¹Cr³⁺ binding assay

TTR四量体に2個のCr³⁺が結合することが明らかとなった。



FEBS Letter, 2006

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

肝移植後長期経過した FAP 患者の胃・腹壁脂肪沈着アミロイド動態

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 矢崎正英*、土屋彩子*、武井洋一*、亀谷富由樹**

*信州大学医学部神経内科、リウマチ・膠原病内科、**東京都精神医学総合研究所

研究要旨 肝移植後長期経過した FAP 患者の沈着アミロイド動態を明らかにするために、移植後約 9～12 年経過した FAP 患者(Val30Met)の移植前後の腹壁脂肪沈着アミロイドについて、病理学的にアミロイド沈着量の変化を検討し、生化学的には液体クロマトグラフィー・質量分析計を用いて、沈着アミロイド線維の正常型トランスサイレチン (TTR) と変異型 TTR の構成比を検索した。また肝移植後の胃粘膜アミロイドについては、同様に正常型 TTR と変異型 TTR の構成比について検索した。結果については、肝移植前後の腹壁脂肪吸引生検は 5 名で施行され、全例アミロイド沈着の減少を認めた。質量分析計による正常型 TTR と変異型 TTR の構成比については、肝移植後では変異型 TTR の比率の低下を認めた。肝移植後の胃粘膜アミロイドの検索についても、同様に正常型 TTR が優位に沈着していた。以上の結果から、沈着アミロイドは必ずしも安定ではなく、肝移植後長期に経過すると、変異 TTR を主体としたアミロイド線維が融解する可能性が示唆される。

A. 研究目的

肝移植療法は、FAP 患者に対して唯一確立された治療法である。血清中の TTR は、ほとんどが肝臓で産生されるため、肝移植療法にて変異 TTR の供給は停止する。しかしながら、特に心臓では、術後も正常型 TTR が沈着し、数年の経過で臓器障害を引き起こす可能性があることが報告されている。一方、移植後長期経過した患者の沈着アミロイドの動態についての検索はなされておらず、沈着が進行するのか、不変なのか、あるいは沈着した線維が融解するのかは不明である。今回我々は、肝移植後長期経過した FAP 患者の沈着アミロイドの動態を検討するために、肝移植前後の腹壁脂肪沈着アミロイドと胃粘膜沈着アミロイドについて、病理学的・生化学的に分析した。

B. 研究方法

肝移植後約 9 から 12 年経過した FAP 患者 5 名 (Val30Met、表 1) の移植前後の腹壁脂肪沈着アミロイドについて、病理学的にアミロイド沈着量の変化を検討した。生化学的には、組織沈着アミロ

イドを抽出後、塩酸グアニジンで可溶化し、透析・脱塩を行った。得られた検体を SDS-PAGE 解析・免疫ブロット解析にて約 15kD の TTR のバンドを同定し、トリプシンにてゲル内消化を施行した後、液体クロマトグラフィー・質量分析計を用いて、沈着アミロイド線維の正常型 TTR と変異型 TTR の構成比を検索した。また肝移植後の胃粘膜アミロイドについては、同様に正常型 TTR と変異型 TTR の構成比について検索した。

(倫理面への配慮)

今回検索した患者に対しては、本研究の主旨を説明し、腹壁脂肪吸引生検・胃粘膜生検に関しては、検査について十分に説明と同意を行い、承諾を得た後施行した。

C. 研究結果

1) 腹壁脂肪沈着アミロイドの病理学的検索

腹壁脂肪吸引生検にて得られた脂肪組織の塗抹標本についてアルカリ・コンゴ赤染色を施行。その沈着量を検討後、残存組織よりアミロイド線維を抽出した。

結果については、全例アミロイド沈着は減少し、ほとんど沈着が認められない標本も存在した(図1)。

2) 腹壁脂肪沈着アミロイドの正常型TTRと変異型TTRの構成比

沈着アミロイドの構成比について表2にまとめた。術前は変異型TTR優位に沈着していたが、術後は正常型TTRの比率が上がる傾向にあり、長期経過した患者では、沈着TTR自体検出されないか、あるいは、沈着TTRが検出されても、変異型TTRのピークは検出されなかった。

3) 胃沈着アミロイドの検索

肝移植後9から12年経過時点での胃粘膜生検組織よりアミロイドを抽出し、正常型TTRと変異型TTRの構成比を検出した(表3)。肝移植後の腹壁脂肪アミロイドにおける結果と同様に、全例正常型TTR優位にアミロイド線維が構成されていた。

D. 考察

今回の結果では、腹壁沈着アミロイドは、全例で減少・消失していた。また沈着アミロイドの生化学的検索では、正常型 TTR が優位に沈着し、特に移植後長期経過後の腹壁アミロイドでは、そのほとんどが正常型 TTR で構成されていた(表2)。肝移植後長期経過後の胃粘膜沈着アミロイドにおいても、患者4以外は変異型 TTR のピークは同定できなかった。患者4においても、正常型 TTR と変異型 TTR の比は、80:20%で、正常型 TTR が優位であった(表3)。

一方、腹壁沈着アミロイドの移植前のデータでは、変異型 TTR は検出され、また肝移植を受けていない患者においても、変異型 TTR は検出されており、抽出過程で、特に変異型 TTR のみが逸脱した可能性は低いものと考えられた。また、移植後の胃粘膜沈着アミロイドと腹壁沈着アミロイドの結果がほぼ同一であったので、腹壁アミロイド検出における、コンゴ赤染色の影響は少ないものと考えられた。以上の結果より、肝移植療法後長期経過した FAP 患者においては、沈着アミロイドが変異型 TTR 優位に融解・減少している可能性があり、沈着アミロイドは必ずしも安定

ではないことを示唆している。

他のアミロイドーシス、特に AL、AA アミロイドなどでは、沈着アミロイドの融解・消失が報告されている。FAP 患者においては、Holmgren らが、肝移植後の患者で、SAP シンチの取り込みの減少を報告しているが[1]、実際に(病理学的に)アミロイド沈着の減少は証明されていない。よって今回の我々の結果は、FAP 患者においても、肝移植後には沈着アミロイドは融解・減少し得ることを示している。

文献

(1) Holmgren G, et al. Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. Lancet 341; 1113-16,1993.

E. 結論

FAP 患者においても、沈着アミロイドは必ずしも安定ではなく、肝移植後長期に経過すると、変異 TTR を主体としたアミロイド線維が融解する可能性が示唆される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

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
特記事項なし

表1 肝移植施行FAP患者

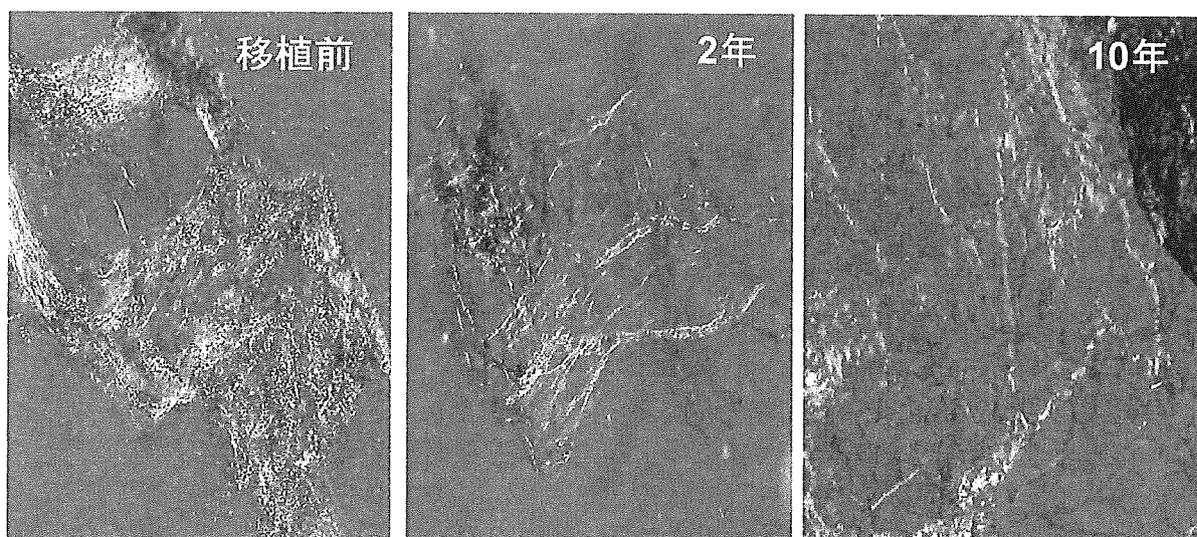
患者(性)	発症	移植時年齢	肝移植後 経過年数	肝移植後 臨床症状
1(女)	28	31	12	改善
2(男)	40	43	10	腎機能悪化
3(男)	35	38	10	改善
4(男)	33	35	9	改善
5(女)	39	40	9	改善

表2 腹壁脂肪アミロイドにおける正常型と変異型TTRの構成比(W:V)

患者	肝移植前	移植後(早期)	移植後(長期)
1(F)	ND	100:0 (4年)	100:0 (12年)
2(M)	48:52	100:0 (2年)	ND (10年)
3(M)	ND		ND (10年)
4(M)	0:100		ND (9年)
5(F)	43:57	91:9 (2年)	100:0 (9年)
(F) 26ys	27:73		
(M) 64ys	61:39		

下段の26歳女性と64歳男性は、肝移植未施行者。ND:検出不可

図1 患者2 経時的腹壁脂肪吸引生検



肝移植後10年後の生検組織には、ほとんどアミロイド線維は認められていない。コンゴ赤染色。

表3 胃アミロイドにおける正常型と変異型TTRの構成比(W:V)

Case (Sex)	構成比(W:V)
1(F)	100:0 (12 ys after LT)
2(M)	100:0 (10 ys after LT)
3(M)	100:0 (10 ys after LT)
4(M)	100:0 (9 ys after LT)
5(F)	80:20 (9 ys after LT)
(F) Control: 26ys	33:67 (Before LT)

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

チーターの AA アミロイドーシスの解析 (1)

分担研究者 樋口 京一 信州大学医学研究科加齢適応医科学系加齢生物学分野
 共同研究者 付 笑影*、張 蓓茹*、巖 景民*、姚 俊潔*、葛 鳳霞*、張 桓宇*、
 澤下 仁子*、森 政之*、亀谷富由樹**、宇根 有美***

信州大学医学研究科加齢生物学分野、**東京都精神医学総合研究所

***麻布大学獣医学部獣医学科

研究要旨 絶滅危惧種であるチーターの重要な死因は炎症に伴う AA アミロイドーシスである。非常に高率な AA アミロイドーシス発症のメカニズムを明らかにするための基本的情報とツールを得るために、チーターの AA アミロイドタンパク質の分離精製と一次構造の決定、特異的抗体の作成、及び SAA 遺伝子の分離と塩基配列決定を行った。更にアミロイドーシスが発症したチーターの糞及び尿中のアミロイド線維の解析を行った。

A. 研究目的

絶滅危惧種であるチーターの我が国における飼育下での最も重要な死因は、炎症に伴う AA アミロイドーシスであり、個体数増加の妨げとなっている。非常に高率な AA アミロイドーシス発症の原因としては、発症率が非常に高く、しかも重篤な胃炎・腸炎による血液中 SAA 濃度の急激な上昇が第一の原因であるとされている。しかし、多頭飼育によるストレスの蓄積や飼料組成等の飼育環境要因や、飼育頭数の減少に伴う近親交配の増加による、遺伝子の均一化等の遺伝的要因の関与が示唆されているが、十分には解明されていない。我々はマウス老化 (AApoAII) アミロイドーシスや反応性 (AA) アミロイドーシスで提唱されている「アミロイド線維の伝播による発症促進」の可能性にも注目している。チーターの AA アミロイドーシスの発症メカニズムを明らかにして、アミロイドーシスの治療、予防を目指すとともに、ヒト AA アミロイドーシスの貴重なモデルとして、アミロイド線維の伝播が発症に果たす役割の解明や治療・予防法の開発へと発展させることが最終的な目的である。

そのための基本的情報とツールを得るために、アミロイドタンパク質の分離精製と一次構造の決定、特異的抗体の作成、SAA 遺伝子の分離と

塩基配列の決定をおこなった。更に糞、尿中のアミロイド線維の解析を行った。

B. 研究方法

アミロイド症により死亡したチーター C-66 及び C-68 の肝臓を用いた。Pras らの方法により水抽出分画としてアミロイド線維を分取した。アミロイド線維分画を 0.1 N NaOH で部分分解した後 (37°C、1 h)、ウサギに免疫して、特異的抗体を作成した。アミロイド線維を SDS 電気泳動 (PAGE) で分離し、CBB 染色後、得られた各バンドを切り出し、タンパク質を溶出した。タンパク質をトリプシン消化後、LC-MS-MS で各ペプチドのアミノ酸配列を決定した。アミロイドタンパク質の一次構造とネコの SAA cDNA の塩基配列を参考にして数組の primer を作成し、チーターの genomic DNA より、PCR で SAA 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物の塩基配列を決定して、さらにゲノムウオーキングで SAA 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定を行った。

チーターの糞と尿から Pras らの方法でアミロイド線維分画を抽出し、Western blotting で AA タンパク質を検出し、さらに電子顕微鏡でアミロイド線維を観察した。

(倫理面への配慮)

アミロイド線維を廃棄する際には1NのNaOH中でオートクレーブして完全に分解してから棄却した。

C. 研究結果

チーターAAタンパク質はSDS-PAGEでは分子量9,000~12,000の2本のmajor bandsと2本のminor bandsを示した。これらのbandsを抽出し、アミノ酸配列を決定した結果、SAA (全長111アミノ酸)のN末から93アミノ酸までのペプチドが最も長く、N末、C末が欠けているペプチドも存在した(図1)。Abyssinian catのAAと2ヶ所のみアミノ酸が異なり、マウスやヒトと比較するとC末端近くに8アミノ酸の挿入が認められた。

チーターAAタンパク質に対する特異抗体は、SDS-PAGE後のWestern blot 解析ではチーター肝臓のAA線維と反応し、モノマーのみでなく、ダイマー、トリマー、テトラマー等のバンドが検出された(図2)。ヒトのAAタンパク質では8アミノ酸が欠失するため、チーターのAAよりも分子量が小さい、モノマー、ダイマー、トリマー、テトラマー等のバンドが検出された。ウシ、マウスのAAタンパク質では、高分子のバンドのみが検出された。マウスのAApoAIIアミロイド線維タンパク質とは全く反応しなかった。免疫組織染色では検討した全ての動物種のAAアミロイド沈着と反応した。

ネコのcDNAの塩基配列を基にして、最初にPCRでチーターのSAA遺伝子の一部を増幅し、塩基配列を決定した。この塩基配列を利用してゲノムウォーキングでエンハンサー/プロモーター領域を含む約5.5 kbpのチーターSAA遺伝子の塩基配列を決定した。チーターSAA遺伝子は4つのエクソンからなる遺伝子であり、ATGの翻訳開始コドンは第2エクソンに存在した。

重篤なアミロイド沈着が観察されたチーター(C68)の糞のアミロイド線維分画にAAタンパク質が抽出され、典型的なアミロイド線維の存在が確認された(図3)。尿中にはAAアミロイドタンパク質は検出されなかった。

D. 考察

宇根らは、飼育下チーターのAAアミロイド-

シスが多頭飼育で重篤化する原因としてはヘリコバクターピロリの感染による胃炎・腸炎を提唱している。樋口らはマウスAApoAIIやAAアミロイドーシスで「アミロイド線維による伝播」を提唱してきた。しかしAAアミロイドーシス発症を引き起こす①SAA濃度の上昇、②SAAのAAアミロイド線維への重合の機構は不明な点が多い。チーターの重篤なAAアミロイドーシスの発症機構を解明するためには、AAの一次構造や、SAA遺伝子の塩基配列等の基本的情報と、抗体やDNA等の研究用ツールをまず獲得することが重要である。本研究でこの目的がほぼ達成された。

アミロイドーシスを発症しているチーター糞中にアミロイド線維が含まれることが明らかになったが、実際にこのアミロイド線維がAAアミロイドーシスの発症促進に寄与するかどうかを明らかにするためには、今後の研究が必要である。

E. 結論

チーターのAAアミロイドーシスの発症機構の解明のための基本的情報とツールを得た。これらを利用してチーターの糞中にAAアミロイド線維が存在することを明らかにした。

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)