

図3-1. 高度のアミロイド沈着により肝細胞索は離開.  
C-68ビヨンディの肝臓. HE染色.

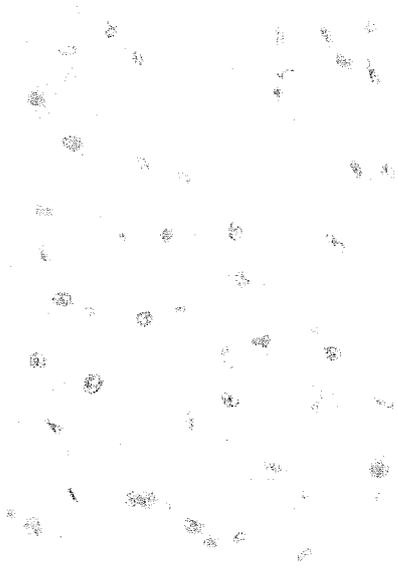


図3-2. 高度なアミロイド沈着で  
肝細胞は萎縮.  
アルカリコンゴレッド染色.



図3-3. 肝臓：蛍光顕微鏡下.  
アルカリコンゴレッド染色.

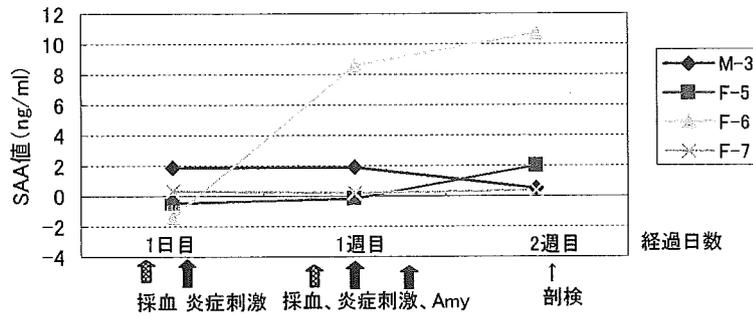
表1. 猫を用いたチーター由来アミロイド (Amy) の伝達実験

	総数	炎症刺激	観察期間	接種材料	匹数
実験1	4 匹	1%硝酸銀1ml×2 回	2 週間	Amy.100mg、IP	3 匹
				NT	1 匹
実験2	4 匹	カゼイン+アジュバンド×7 回	1 週間	Amy.10mg、IP	2 匹
				Amy.100mg、IP	2 匹
実験3	4 匹	カゼイン+アジュバンド×17 回(うち3 回は肝接種前)	2 週間	肝臓3g、IP	2 匹
				肝臓5g、IP	2 匹
実験4	6 匹	カゼイン+アジュバンド×17 回(うち3 回はAmy.接種前)	2 週間	Amy.1000mg、IP	4 匹
				Amy.1000mg、IV	2 匹

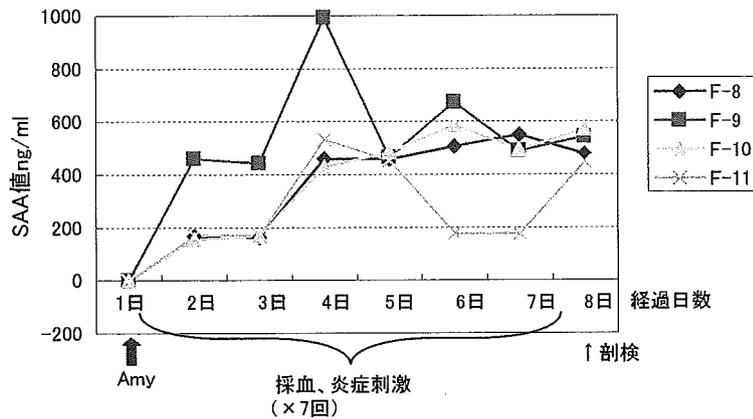
炎症刺激：10%カゼイン溶液 (SIGMA) 1ml と Freund Adjuvant 1ml を皮下注射。

グラフ1

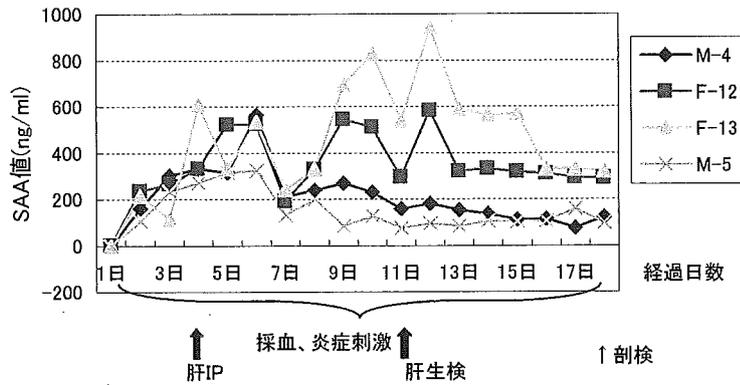
実験1 硝酸銀を刺激剤としたときのSAA値の変化



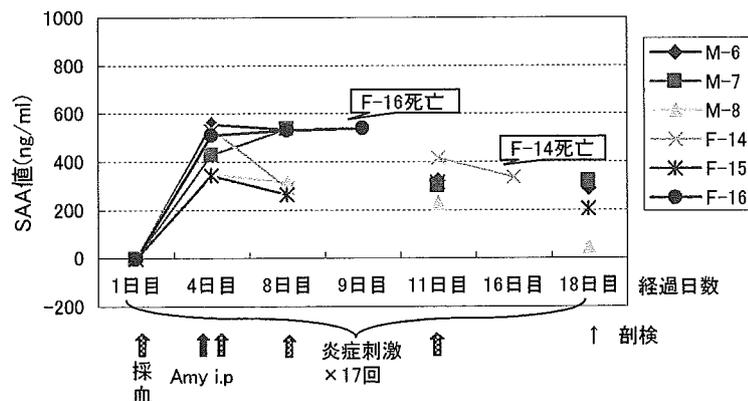
実験2 カゼインとアジュバンドを炎症刺激としたときのSAA値の変化



実験3 カゼインとアジュバンドを炎症刺激としたときのSAA値の変化



実験4 カゼインとアジュバンドを炎症刺激としたときのSAA値の変化



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

## アミロイドーシスにおける核医学検査 全身<sup>99m</sup>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

分担研究者 松田博史 埼玉医科大学病院核医学

共同研究者 今林悦子\*、久慈一英\*

埼玉医科大学病院、\*核医学

**研究要旨** これまで当院では、アミロイド検出を目的として、<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA (pentavalent technetium-99m dimercaptosuccinic acid) による全身シンチグラフィを撮像してきたが、<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA の集積は非特異的と云われている。1995年5月～2006年1月までに撮像された<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA 画像を再評価した。また、<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA による全身シンチグラフィと滑膜の非特異的な活動性炎症の指標となる<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>による関節シンチグラフィ検査を2週間以内の間隔で施行されていた12人の慢性リウマチ患者の関節の炎症所見についての比較を行った。144の関節領域について比較したところ<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA と<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>の集積は同程度の関節が121関節領域と多かったが、<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA の方が集積の強い関節が16関節領域、<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>の方が集積の強い関節が7関節領域と集積の程度が異なる関節も認められた。集積の差はAA アミロイド関連物質との結合など特異的な所見による可能性が考えられた。今後は<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA の画像に関しては病理所見や滑液内物質との対比を行い集積機序の解明に努めたい。また心筋の評価についてより適切に行えると考えられる<sup>99m</sup>Tc-aprotinin の臨床的評価を行う予定である。

### A. 研究目的

これまで当院では、アミロイド検出を目的として、<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA による全身シンチグラフィを撮像してきた。<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA のアミロイドへの集積に関しては数症例報告があるが、他の軟部組織腫瘍や骨腫瘍、頭頸部腫瘍、甲状腺髄様癌、急性腸炎などにも集積することが知られており、その集積は非特異的とされている。集積機序に関しては様々な報告があるが、定説はない。<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA のアミロイドシンチグラフィとしての適性の再評価を行い、他の適切な薬剤の可能性に関して検索を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

1995年5月～2006年1月までに当院にてアミロイドーシスの精査として撮像された69例の<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA画像の検討を行った。また、リウマチ膠原病内科に入院中に、<sup>99m</sup>Tc(V)DMSAによる全

身シンチグラフィと滑膜の非特異的な活動性炎症の指標となる<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>による関節シンチグラフィ検査を2週間以内の間隔で施行された12人の慢性関節リウマチ患者の関節の画像所見についての比較を行った。

#### 2. 方法

<sup>99m</sup>Tc(III)DMSAは通常腎静態シンチグラフィ製剤として用いられている。DMSAにあらかじめ重炭酸ナトリウム溶液(NaHCO<sub>3</sub>)を加え<sup>99m</sup>Tc(V)DMSAを調整した(Yokoyama A, et.al. Int J Nucl Med Biol 1985; 12: 273-279)。

<sup>99m</sup>Tc(V)DMSAと<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>の画像の比較は左右の①肩、②肘、③手と指、④股、⑤膝、⑥足と趾について、すなわち12関節領域に分けて行った。

### C. 研究結果

<sup>99m</sup>Tc(V)DMSA画像の検討では原発性肺アミロイドーシス(AL)における肺への異常集積増加もあったが、急性間質性肺炎、胃潰瘍穿孔による後

腹膜膿瘍への集積もみられ従来の報告どおりに非特異的であった。心アミロイドーシスの患者では血液プール像のため心筋集積の評価ができなかった。

慢性リウマチ患者の関節への集積では12人144関節領域への集積のうち、 $^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{DMSA}$ と $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の集積が同程度の関節が121関節領域、 $^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{DMSA}$ の方が集積の強い関節が16関節領域、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の方が集積の強い関節が7関節領域あった。

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ 画像の所見が非特異的な炎症への集積であるとすれば、 $^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{DMSA}$ との所見の差異はAAアミロイド関連物質との結合など特異的な所見を見ている可能性があると考えられた。

#### D. 考察

$^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{DMSA}$ の集積は非特異的とされているが、甲状腺髄様癌への集積などアミロイドの関与を考えさせられる報告もあり、また、急性腸炎などの炎症への集積に関しても反応性のAAアミロイド関連物質が関与している可能性が考えられる。慢性関節リウマチ患者の関節への集積も、炎症変化への非特異的集積を示す $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の所見と比較し異なることから、アミロイド前駆蛋白などとの結合の可能性があると考えられた。今後は病理所見が得られた場合はアミロイドの確認を行ったり、滑液内のアミロイド関連物質の解析などを行うことによって $^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{DMSA}$ とアミロイドーシスの関連を再検討し、可能であれば集積機序の解明に努めたい。心筋集積の評価は $^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{DMSA}$ では難しく、血液プールの消失する24時間後に評価し得たとの報告もあるが、3半減期以上の時間経過に伴う画像の劣化が著しく情報は減少する。文献的に他にアミロイドに特異的に結合するシンチグラフィ製剤として知られているものに $^{111}\text{In} \beta 2\text{-microglobulin}$ や $^{123}\text{I} \text{SAP}$ があるが一般病院施設での調整は難しい。製剤供

給を受けることが可能と考えられる製剤として、 $^{99m}\text{Tc-aprotinin}$ がある。 $^{99m}\text{Tc-aprotinin}$ については腹部以外のアミロイドーシスの評価に有用であるという報告が近年相次いでいる(Schaadt BK, et. al. J Nucl Med 2003; 44: 177-183)。 $^{99m}\text{Tc-aprotinin}$ はヨーロッパではすでに腎シンチグラフィ製剤として臨床使用されている薬剤で、今後当院における臨床使用を検討中である。血液プール像は約10分で消失するため心筋の評価も可能とされている。ただし、 $^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{DMSA}$ も $^{99m}\text{Tc-aprotinin}$ も肝、腎、脾の腹部臓器には生理的集積があるため腹部領域の診断は難しく、今後の課題となる。

#### E. 結論

非特異的とされる $^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{DMSA}$ の集積も反応性AAアミロイド関連物質などへの結合について再評価の余地があると考えられた。 $^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{DMSA}$ では評価の難しい心アミロイドーシスに関しては文献的に有用とされている $^{99m}\text{Tc-aprotinin}$ での評価を今後検討したい。

#### 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

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

## 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

分担研究者 池田修一 信州大学医学部内科 (神経内科、リウマチ・膠原病内科)  
研究協力者 小山 潤  
信州大学医学部循環器内科

**研究要旨** 心アミロイドーシス、特に原発性アミロイドーシスでは、患者の心病変の重症度は予後規定因子として最も重要である事が知られており、心病変の程度の客観的評価が望まれている。従来左室壁厚、僧帽弁血流速パターン、Tei indexなどが予後規定因子として重要である事が報告されてきたが、心筋そのもののイメージングである超音波後方散乱信号 (integrated backscatter) や、ストレインドプラ法は心筋のアミロイド沈着をより直接的に評価できる可能性がある。これらの方法が患者予後推定に役立ち、臨床的に有用な指標となるかどうかを検討した。

### A. 研究目的

従来心アミロイドーシスの心臓超音波検査法による重症度評価は、心筋の肥厚程度、僧帽弁血流速パターンの評価が一般的であったが、これらの指標は心病変がかなり進行した時点で異常が明らかとなるため、病初期の心筋病変を定量化する事ができる鋭敏な検査法が望まれていた。超音波後方散乱信号解析、ストレインドプラ法は心筋の内因性収縮能を鋭敏に反影することが様々な疾患で言われている。これらの方法を心アミロイドーシスの評価に応用する事で、その診断的意義を検討した。

### B. 研究方法

生検で原発性アミロイドーシスの診断が確定している患者を、超音波後方散乱信号解析 (integrated backscatter : IB)、ストレインドプラ法を用いて画像を収集した。IB解析には、左室基部短軸断面像を記録し、心室中隔および後壁の心筋の心周期によるIBの変化量 (cyclic variation of IB)を解析した。ストレインドプラ法に関しては、心尖部2腔像、4腔像を記録し、心室基部、中部、心尖部の長軸方向の心筋のひずみ (ストレイン) を算出し、定量化した。心不全の有無、心筋肥厚の有無によるグループ分けを行い、値を比較した。また cyclic variation of IBに関しては、予後との

関連を検討した。IB、ストレイン解析画像は、市販の装置の設定に付属しており、記録は通常的心臓超音波検査時に約5分検査時間を追加する事を患者に説明の上、同意を得て行った。

### C. 研究結果

cyclic variation of IBは心病変が進行するとともに減少を示した。これらは僧帽弁血流パターンや壁厚の変化よりも鋭敏に変化を示した。これらの指標は予後不良な心不全発症群のサブグループ解析でも予後不良群を検出可能であった。ストレインドプラ法による左室長軸方向の心筋のひずみに関しても、鋭敏に心筋の変化を検出可能であった。従来使用されていた左室内径短縮率(FS)や、僧帽弁血流パターンの異常は、心不全を発症してから初めて異常を示したのに対し、IB解析、ストレインドプラ法ともに、無症候群における潜在性心機能異常を検出する事が可能であった。いずれの指標も多変量解析において生命予後推定における独立規定因子となり、これらは従来の指標と比べ、より正確に予後を推定可能であった。

### D. 考察

超音波心筋イメージングは、アミロイド沈着による左室機能異常を鋭敏に検出可能な方法であると考えられる。FS、左室壁肥厚、僧帽弁流入速

波形の異常は左室の機能的ダメージがかなり進んだ時点でしか異常として反影されない。一方で、超音波心筋イメージングは左室心筋の機能情報をより直接的に評価する事により、subclinicalな異常を検出する事が可能と考えられた。

#### E. 結論

IB 法、ストレインドプラ法ともにアミロイドーシスの心病変の評価において鋭敏な指標である事が判った。今後は治療の選択や、治療効果判定にこれらの方法を用い、臨床的意義を明らかにしたい。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Koyama J, Ray-Sequin PA, Davidoff R, Falk RH. Usefulness of pulsed tissue Doppler imaging for evaluating systolic and diastolic left ventricular function in patients with AL (primary) amyloidosis.

Am J Cardiol 89: 1067-1071, 2002

2) Koyama J, Ray-Sequin PA, Falk RH. Prognostic significance of ultrasound myocardial tissue characterization in patients with cardiac amyloidosis. Circulation 106: 556-561, 2002

3) Koyama J, Ray-Sequin PA, Falk RH. Longitudinal myocardial function assessed by tissue velocity, strain, and strain rate tissue Doppler echocardiography in patients with AL (primary) cardiac amyloidosis. Circulation 107: 2446-2452, 2003

##### 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

## 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

分担研究者 満屋裕明 熊本大学医学部血液内科

共同研究者 畑 裕之、奥野 豊 熊本大学医学部血液内科

研究要旨 ①3年間に8例のALアミロイド症例を経験し、うち3例に末梢血幹細胞移植併用大量メルファラン療法を行った。1例有効、2例無効であり、1例に出血性サイトメガロ腸炎の重篤な副作用を認めた。②侵襲性の低い治療開発のため、サリドマイドの形質細胞に対する作用機序を検討した。サリドマイドはクラリスロマイシンとの併用で形質細胞へ特異的な空胞を誘導し、空胞化はオートファジーであることが確認されたことから、これら薬剤がオートファジーの最終段階を停止させ細胞死を誘導する可能性が示され、オートファジー阻害が新たな形質細胞治療となる可能性が示された。③新しい治療法の開発、アミロイド生成機序の解明のため動物モデル作成を試みた。アミロイドが心臓に沈着した症例よりBJPのアミノ酸配列を決定したがアミノ酸変異は認めなかった。このcDNAを発現ベクターに組み込み、マウス形質細胞株に導入後マウス腹腔内へ注入した。

### A. 研究目的

ALアミロイドーシスの治療にメルファラン大量化学療法が導入され効果が認められている。しかし重篤な臓器障害を有する例は適応とならず、より侵襲度の低い治療開発が望まれる。サリドマイドは骨髄腫に有効であり、ALアミロイドーシスにも有効性が報告されているが作用機序は不明である。サリドマイドが臓器障害の重篤なALアミロイドーシスの治療に有用である可能性を探り、かつ作用機序を解明し新規治療開発の端緒とすることを目的とした。新規治療開発にはALアミロイドーシスモデルマウスが必要であるため、マウスモデルの確立も目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. オートファジーの検出

形質細胞株にサリドマイド、クラリスロマイシンを50 $\mu$ g/ml投与し、20時間培養後形態変化を顕微鏡で観察した。同時にLC3-IからLC3-IIへの変化をウェスタンブロットで観察した。一部の実験では、オートファジー阻害剤である3-methyladenine (3MA)を100 mMを添加した。

#### 2. マウスモデル

心臓に沈着し、4ヶ月の経過で死亡したBJP- $\lambda$ 型ALアミロイドーシス患者骨髄より形質細胞を純化、cDNAを作成、RT-PCRでBJP- $\lambda$ 鎖をクローニングした。このcDNAをマウス $\beta$ グロビンプロモーターを持つ発現ベクターpCAGGSに組み込み、マウス非分泌型形質細胞株X63に導入後Balb/cマウス腹腔内に注入、一部では発現ベクターを尾静脈より注射した。

### C. 研究結果

サリドマイドは単独では形態変化、増殖能に変化を与えなかったが、クラリスロマイシンは著明な空胞化を誘導、これはFCS除去でさらに著明であった(図1)。電顕で、空胞化はオートファジーに合致することが確認された。LC3-IからLC3-IIへの変化は、サリドマイド単独では認められなかったが、クラリスロマイシンは単独でLC3-IIへの変化を誘導し、これは両者併用で著明であった(図2)。空胞化はオートファジー阻害剤である3MAで阻害された。以上より、サリドマイド、クラリスロマイシンはオートファジーによる空胞化を顕在化させることが判明した。

心アミロイドーシス患者骨髄より純化した形質

細胞よりmRNAを得、cDNAを作成、 $\lambda$  鎖cDNAをRT-PCRを用いて作成、得られたcDNAの塩基配列よりアミノ酸配列を決定したところ、変異は認められなかった(図3)。このcDNAを発現ベクターに組み込み、マウス非分泌型骨髄腫細胞株に導入、Balb/cマウス腹腔内に注入した。一部のマウスでは、ベクターを尾静脈より注入した。現在まで注入後2週間経過しているが、まだ変化は見られていない。

#### D. 考察

今回の検討で、クラリスロマイシンは形質細胞にオートファジーを顕在化させることが判明、この作用はサリドマイドと併用することでより顕著となった。オートファジーは、本来飢餓下におけるエネルギーの再利用機序であり、生存に有利に働く機構である。サリドマイド、クラリスロマイシンは臨床的に骨髄腫に効果を示し、我々の*in vitro*での検討でも骨髄腫細胞にネクロシスを誘導することから、これら薬剤は形質細胞のオートファジーを誘導するものの、その最終段階で停止させるため、細胞死を誘導する可能性が強いと考えられる。今後、この仮説を検証するために、オートリゾソームの蓄積をアクリジンオレンジ染色、lysotracker 染色で検証予定である。心アミロイドーシス症例骨髄から微量の形質細胞を純化、さらに BJP アミノ酸配列を決定、発現させる系を確立できた。現在、この BJP が *in vivo* でアミロイドへ変性することを検証するために、BJP を発現させた形質細胞株をマウスに注入している。アミロイドの沈着が見られるにはさらに観察期間が必要であり、今後経時的に観察予定である。

アミロイドがマウスに沈着すれば、BJP のアミノ酸配列の一部をペプチドとし、マウスに免疫することで、抗体誘導療法の可能性も検討することができる。現在、ネフローゼを呈した AL アミロイド症例尿より BJP を得、mass spectrometry によりアミノ酸配列を解析中であり、定常部分のアミノ酸変異を確認しているが、この方法を用いれば、短期間に BJP 由来ペプチドが作成可能である。このペプチドを用いて BJP に対する抗体を誘導する系、siRNA を用いた BJP 産生抑制の系を動

物モデルで確立したい。これらの効果が確立されれば、ヒトへの応用も期待される(図4)。

発現された BJP を純化すれば、長期的かつ大量の BJP が入手可能となる。この BJP を用いてアミロイド繊維の伸長を *in vitro* で検証、至適 pH、伸長促進因子の検索を行う予定である。

#### E. 結論

オートファジーを介する新規治療法の可能性が示された。AL アミロイドーシス患者からの BJP クローニング系が確立され、今後、これまで不明であった AL アミロイドーシスの進展機序解明に寄与すると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hata H. Bone lesions and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1a) in human multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma* 46: 967-972, 2005
- 2) Tatetsu H, Okuno Y, Nakamura M, Matsuno F, Sonoki T, Taniguchi I, Uneda S, Umezawa K, Mitsuya H, Hata H. Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor-KB inhibitor, induces apoptosis in multiple myeloma cells in an IKB $\alpha$ -independent manner. *Mol Cancer Ther* 4: 1114-1120, 2005
- 3) Nakamura M, Gotoh T, Okuno Y, Tatetsu H, Sonoki T, Uneda S, Mori M, Mitsuya H, Hata H. Activation of the endoplasmic reticulum stress pathway is associated with survival of myeloma cells. *Leukemia and Lymphoma* 47: 531-539, 2006

##### 2. 学会発表

- 1) Nakamura M, Kamimoto T, Yoshimori T, Okuno Y, Takeya M, Mitsuya H, Hata H Induction of autophagy in myeloma cells with thalidomide and clarithromycin. 47<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology, Atlanta, GA, USA. Dec 10, 2005.

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

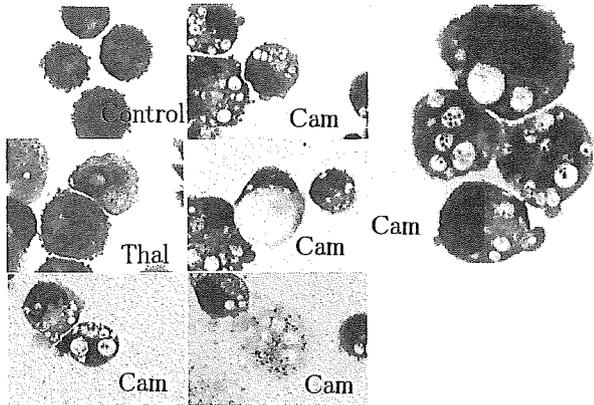


図 1: 形質細胞株 KMM-1 への空胞誘導  
FCS(-)、Thal: thalidomide, Cam: clarithromicin  
各々 50 μg/ml 添加。20 時間培養  
細胞質に内容物を伴う空胞を認める。

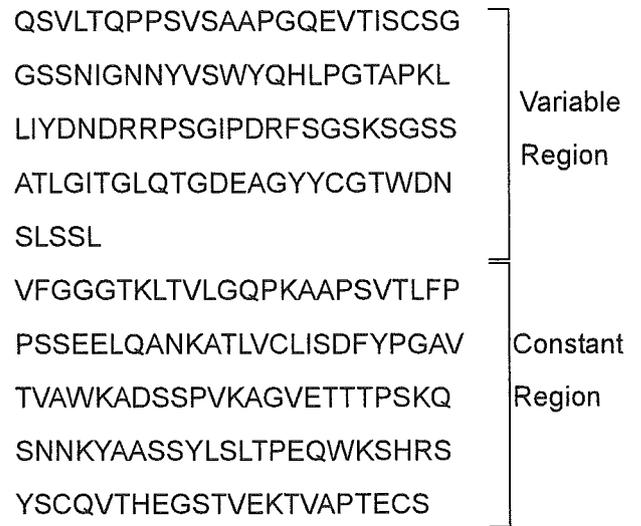


図3: 心アミロイドーシス患者由来 BJP ラムダ鎖の  
アミノ酸配列。定常部分に変異は見られなかつた。

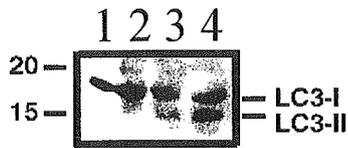


図 2: 形質細胞株12PE への LC3-II 誘導  
1: Control、2: Thal、3: Cam、4: Thal+Cam  
各々 50 μg/ml 添加。20 時間培養 (western blot)  
CAM は単独または thal との併用で LC3-I から II  
への変化を誘導した。

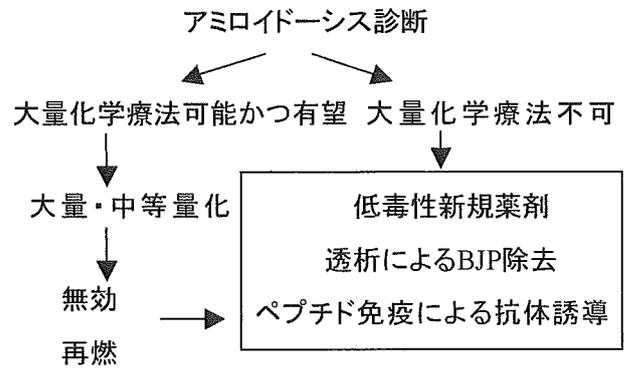


図 4: AL アミロイドーシスへの治療戦略

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 分担研究報告書

## 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

分担研究者 松田正之 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 伏見智久、五野貴久、下島恭弘、田澤浩一、吉田拓弘、  
 加藤修明、池田修一  
 信州大学医学部神経内科、リウマチ・膠原病内科

**研究要旨** 原発性 AL アミロイドーシスにおける VAD (vincristine, doxorubicin, dexamethasone) 単独療法の有用性について検討した。対象は当科で作成した治療方針決定のためのフローチャートに則って本治療法を選択された患者 8 名 (平均年齢 60 歳、45~71 歳)。4 名 (50%) では 1~3 クールの VAD 療法後に M 蛋白が消失して血液学的完全寛解に至り、その後の経過観察の中で尿中蛋白や血中 BNP の減少など臓器障害の改善が認められた (寛解例)。残りの 4 例では心不全や全身浮腫の悪化などの理由で血液学的寛解に至る前に治療の中止を余儀なくされ、予後は不良であった (非寛解例)。治療施行前のデータの解析では、非寛解例と比較して寛解例で腎機能がよく保たれている傾向が見られた。大量メルファラン+自己末梢血幹細胞移植の適応にならない場合、心機能が保たれクレアチニンクリアランスが 50 ml/min 以上、尿蛋白が 3.5 g/day 以下の症例では VAD 単独療法が有力な選択肢になると考えられた。

### A. 研究目的

原発性 AL アミロイドーシスの治療には異常形質細胞を標的とした化学療法が用いられている。特に自己末梢血幹細胞移植を併用した melphalan 大量療法は根治を期待できる治療として本邦においても定着しつつある。しかし本療法は治療関連死が 10~40%に及ぶことから、高齢者や臓器障害が進行した症例では適応外となることが多く、そうした症例をいかに治療していくかが早急に解決すべき重要な課題となっている。今回我々は原発性 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検討した。

### B. 研究方法

対象は当科で複数臓器からの生検で AL アミロイドの沈着が確認され、骨髄所見から原発性と診断された患者 8 名 (平均年齢 60 歳、45~71 歳)。当科で用いている治療方針決定のためのフローチャート (Gono et al. Amyloid 11: 245-256, 2004) に則って VAD (vincristine, doxorubicin, dexamethasone) 単独療法を施行した (図 1)。治療期間は血中および尿中の M 蛋白が陰性化する

(血液学的完全寛解) までとし、VAD の終了後は interferon- $\alpha$  300 万単位/週で後療法を行なった。なお、治療の意義・方法・予想される副作用などについては文書を用いて十分な説明を行ない、患者から同意を得た。治療前後で骨髄内異常形質細胞、血中 free light chain (FLC)  $\kappa/\lambda$  比は正常化して骨髄中異常形質細胞は著減した (寛解例)。それに伴い腎機能低下例ではクレアチニンクリアランス (CCr) が徐々に正常化し尿蛋白は陰性化した (表 1)。副作用として全例で浮腫の増悪と 1 例で血圧低下が見られたが、いずれも症状は軽度で一過性であった。血液学的完全寛解状態は VAD 療法終了後長期にわたって持続し、死亡例はなく生存期間は最長で治療開始から 3 年 6 か月に及んでいる (図 2)。

### C. 研究結果

8 例中 4 例 (50%) が VAD 療法を 1~3 クール施行後に血液学的完全寛解に至り、血中 FLC  $\kappa/\lambda$  比は正常化して骨髄中異常形質細胞は著減した (寛解例)。それに伴い腎機能低下例ではクレアチニンクリアランス (CCr) が徐々に正常化し尿蛋白は陰性化した (表 1)。副作用として全例で浮腫の増悪と 1 例で血圧低下が見られたが、いずれも症状は軽度で一過性であった。血液学的完全寛解状態は VAD 療法終了後長期にわたって持続し、死亡例はなく生存期間は最長で治療開始から 3 年 6 か月に及んでいる (図 2)。

一方、残りの 4 例中 1 例は本人の希望で 1 クール終了後に治療を中止し、3 例は腎・心機能の悪

化、浮腫の増悪、腸管麻痺等の副作用が強く VAD の継続が困難であった。いずれも M 蛋白は治療後に消失せず、臨床症状に改善は見られなかった（非寛解例）。3 例が治療終了後 1 年以内に死亡し、残りの 1 例は血液透析に移行している（図 2）。

寛解例と非寛解例の VAD 療法開始前の腎機能を比較検討すると、前者がいずれも  $\text{CCr}$  が 50 mL/分以上に保たれ 1 日尿蛋白量が 3.5g 以下であったのに対し、後者では 4 例中 3 例で  $\text{CCr}$  が 40 mL/分以下、1 日尿蛋白量が 5.5g 以上であった。寛解例と非寛解例とで心機能には明らかな差異はなかった。

#### D. 考察

VAD 療法は多発性骨髄腫で有用性が証明されており、原発性 AL アミロイドーシスでも melphalan 大量療法の前治療として、あるいは単独で使用されている。レジメの中に含まれる doxorubicin に心毒性、vincristine に末梢神経毒性がある関係で、原発性 AL アミロイドーシスで使用される場合にはこれらの臓器の障害がないか軽度の症例に限られる。今回我々は、当科で作成した治療方針決定のためのフローチャートに従って melphalan 大量療法の適応からはずれた症例に VAD 療法を単独で用い、血液学的完全寛解を 50% に認め、従来からの報告とほぼ同様の結果が得られた。興味深いことに完全寛解に至った症例では VAD 療法の追加なしでも臨床効果が長期間にわたって持続し、全例で臓器障害（主に腎機能）の改善を認めた。このことは interferon- $\alpha$  を用いた後療法の効果に加えて、原発性 AL アミロイドーシスでは M 蛋白を産生する異常形質細胞の量が少ないために血液学的完全寛解に一度達すれば、長期の経過の中で臓器障害の改善も期待できる可能性があることを示唆している。

一方、今回の我々の検討では VAD 療法の副作用として 8 例全例で浮腫の増悪が見られた。一部の症例では腎・心機能の悪化、血圧低下、腸管麻痺が見られ、4 例では遷延する副作用のために血液学的完全寛解に至る前に治療の中止を余儀なくされた。寛解例と非寛解例の治療開始前の臨床データを比較すると、前者でクレアチニンクリアランスが高く 1 日尿蛋白が少ない傾向が見られ、

VAD 療法の継続可能性を示す指標として腎糸球体機能が重要であることが示唆された。今回の我々の検討では最初の患者選択の段階で心不全のある者は除外されているため、寛解例と非寛解例の治療開始前における心機能には明らかな差異は認められなかった。

#### E. 結論

VAD 単独療法を施行した 8 例中 4 例（50%）で血液学的完全寛解と、長期の経過の中で臓器障害の改善が認められた。Melphalan 大量療法の適応にならない場合であっても、心エコー上重篤な心機能障害が見られず、一日尿蛋白 3.5g 以下、 $\text{CCr}$  50 mL/分以上の症例では VAD 単独療法によって予後を改善できる可能性があり、治療選択肢として積極的に考慮すべきである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shimojima Y, Matsuda M, Gono T, Ishii W, Fushimi T, Hoshii Y, Yamada T, Ikeda S. Correlation between phenotypes of plasma cells and serum levels of free light chain in AL amyloidosis. *Amyloid* 12: 33-40, 2005
- 2) Fushimi T, Takahashi Y, Kashima Y, Fukushima K, Ishii W, Kaneko K, Yazaki M, Nakamura A, Tokuda T, Matsuda M, Furuya R, Ikeda S. Severe protein losing enteropathy with intractable diarrhea due to systemic AA amyloidosis, successfully treated with corticosteroid and octreotide. *Amyloid* 12: 48-53, 2005
- 3) Shimojima Y, Matsuda M, Gono T, Ishii W, Koyama J, Yamamoto K, Shimodaira S, Sakashita K, Koike K, Ikeda S. High-dose melphalan followed by autologous stem cell support in systemic AL amyloidosis with multiple organ involvement. *Intern Med* 44: 484-489, 2005
- 4) Matsuda M, Gono T, Shimojima Y, Ishii W, Fushimi T, Sakashita K, Koike K, Yamada T,

Ikeda S. Serum levels of free light chain before and after chemotherapy in primary systemic AL amyloidosis. Intern Med 44: 428-433, 2005

- 5) 松田正之：原発性 AL アミロイドーシス—臨床像と診断法— アミロイドーシスの基礎と臨床、pp. 105-111、金原出版、東京、2005
- 6) 松田正之：原発性 AL アミロイドーシス —形質細胞異常症の検出法と治療法— アミロイドーシスの基礎と臨床、pp. 112-119、金原出版、東京、2005

2. 学会発表

- 1) 五野貴久、松田正之、下島恭弘、石井亘、田澤浩一、吉田拓弘、池田修一、坂下一夫、小池健一、山田俊幸：原発性 AL アミロイドーシスにおける血清 free light chain の検討. 第 102 回日本内科学会総会（大阪）、2005. 4. 8
- 2) 吉田拓弘、松田正之、五野貴久、下島恭弘、石井亘、田澤浩一、池田修一、坂下一夫、小池健一：原発性 AL アミロイドーシスにおける flow cytometry を用いた骨髓内形質細胞の

検討. 第 102 回日本内科学会総会（大阪）、2005. 4. 8

- 3) 松田正之、田澤浩一、吉田拓弘、下島恭弘、五野貴久、池田修一：M 蛋白血症を伴う多発神経炎における骨髓内形質細胞の検討. 第 46 回日本神経学会総会（鹿児島）、2005. 5. 27
- 4) 伏見智久、五野貴久、下島恭弘、松田正之、池田修一：VAD 療法が奏効した AL アミロイドーシスの 2 例. 第 117 回日本内科学会信越地方会（長野）、2005. 10. 15

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

図1. VAD療法

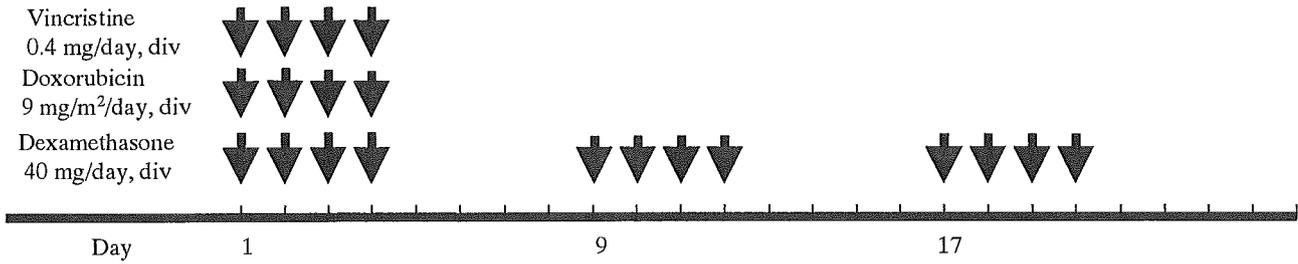
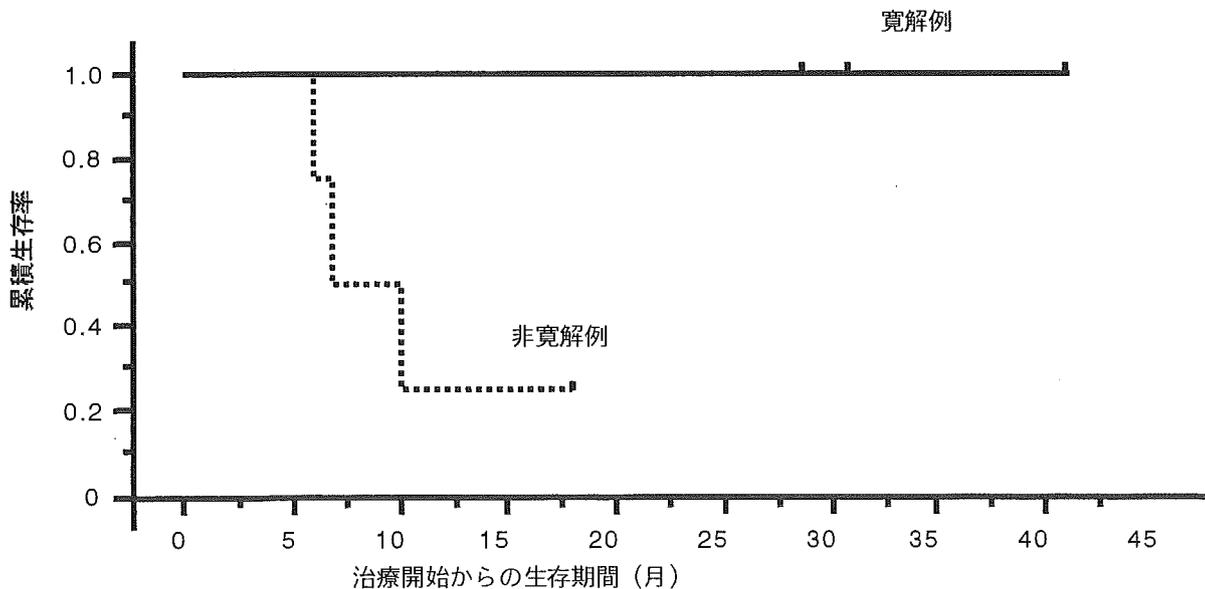


表1. VAD単独療法の結果

年齢・性	M-蛋白	主要障害臓器	VAD療法	転帰	
1*	45・F	尿BIPλ	心臓	1クール	心不全の進行により死亡
2**	54・F	尿BIPλ	腎臓	2クール	腎症状改善なし
3*	54・M	尿BIPλ	腎臓	2クール	腎不全の進行により死亡
4	62・F	IgAκ	心臓・腎臓	1クール	ネフローゼ症候群完全寛解
5	62・F	IgGλ・尿BIPλ	腎臓	2クール	ネフローゼ症候群完全寛解
6	67・M	尿BIPλ	消化管・膀胱	3クール	M-蛋白陰性化、症状の進行なし
7*	68・M	IgGλ	腎臓	2クール	腎不全の進行により死亡
8	71・M	IgGλ・尿BIPλ	腎臓	2クール	ネフローゼ症候群完全寛解

\*副作用のためにVAD継続困難、\*\*本人の希望により治療中止

図2. 寛解例と非寛解例の生存曲線 (Kaplan-Meier法)



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

## 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

分担研究者 金子 清俊 東京医科大学生理学第二講座

研究協力者 八谷 如美\*、大久保卓哉\*\*

\*東京医科大学生理学第二講座、\*\*東京医科歯科大学大学院脳神経病態学

**研究要旨** 我々は新規クラスの分子シャペロン (Unfoldin) を同定した。Unfoldin は、プリオンをはじめとする異常凝集蛋白質に対しても、類を見ないほどの高度の解きほぐし活性を発揮する。実際の生体内凝集体に対する解きほぐし能を検討するために、モデル系としてまずピック病脳に蓄積する異常凝集体であるピック小体を用いた検討を行った。レーザーマイクロダイセクターでピック小体を単離回収し、ウエスタンブロット法における抗体との反応性を指標として検討した結果、Unfoldin はサンプルバッファー処理にすら極めて抵抗性の高いピック小体を容易に解きほぐし、抗体による検出能を 1,000 倍以上改善した。

### A. 研究目的

神経変性疾患において疾患特異的に認められる細胞内封入体の構成成分の解析は、これまで強い変性剤を用いて周囲の細胞内容物や組織を取り除くことによって単離した細胞内封入体を材料とした解析や、既存の抗体による免疫組織染色を用いた顕微鏡観察によって行われてきた。しかしながら、細胞内封入体そのものの構成成分については未だ十分に知られていない。そこで我々は非固定標本を材料としてレーザーマイクロカッターを用い、物理的に細胞内封入体を単離することにより、固定や変性処理などの生化学的処理によって失われる不安定な微量蛋白質を含め、解析することを計画した。まず細胞内封入体として比較的サイズの大きいピック小体を選び、その構成成分を解析した。

同時に我々は、強力な解きほぐし活性を有する新規分子シャペロン、Unfoldin を同定した。Unfoldin の分子量は 58 キロダルトンで、試験管内で蛋白質の高次構造をほぐす活性から Unfoldin と命名した。Unfoldin を高純度に精製し電子顕微鏡を用いて一分子の形態を低角度回転蒸着法により観察したところ、直径約 10nm、中央に約 2nm のホールを持つリング状構造が観察された。さらに Unfoldin は、プリオン蛋白質、アミロイドベータ

ペプチド(1-42)、アルファシヌクレインなどの異常凝集体の高次構造を試験管内で解きほぐした。

そこで次に、実際の生体内凝集体に対する Unfoldin の解きほぐし能を検討した。検討材料として、ピック病脳に蓄積する異常凝集体であるピック小体を用いた後に、BSE 感染脳からの BSE プリオンの検出も試みた。

### B. 研究方法

- (1) ピック病剖検脳から厚さ 5  $\mu\text{m}$  の凍結切片を製作し、抗リン酸化タウ抗体 AT8 にて免疫組織染色後、スライドガラス上でレーザーマイクロカッターにてピック小体を単離、回収した。得られた約 1  $\mu\text{g}$  の微量サンプルを 2 %SDS 溶液にて溶解し、抗リン酸化タウ抗体 AT100 を一次抗体としてウエスタンブロット法で検出した。
- (2) ピック病剖検脳の凍結切片で 4 リピートタウ抗体による免疫組織染色を行った。(3) ピック病剖検脳ホモジネートから 1 %サルコシル不溶性画分を精製し、大腸菌由来アルカリフォスファターゼによる脱リン酸化を行った。
- (3) 孤発性 Pick 病剖検脳組織の凍結切片 (5 ミクロン厚) から、まず抗リン酸化 tau 抗体 (AT8) による免疫染色にて Pick 小体を同定し、レー

ザーマイクロダイセクション法を用いて Pick 小体を単離・回収した。

- (4) Pick 小体を構成するリン酸化 tau の分子種の解析を行なうために、回収した Pick 小体を SDS-PAGE にて分離した後、抗リン酸化 tau 抗体 (AT8 及び AT100) を用いたイムブロッティングを行った。脳組織切片からの Sarkosyl 不溶性分画は、定法により回収した。

Unfoldin による回収した Pick 小体の解きほぐし処理は、既に報告した方法により行った。

(倫理面への配慮)

本実験において用いたヒト剖検試料の取り扱いに関しては、国立精神・神経センター及び東京医科大学の倫理規定に従った。

### C. 研究結果

従来ピック病剖検脳ホモジネートのウエスタンブロットでは主に 3 リピート由来の異常リン酸化タウ 60,64 kDa のバンドが検出されることが知られているが (図 1, lane 2)、今回の我々の研究により、高純度なピック小体では 69 kDa の明瞭なバンドのみ検出されることが明らかとなった (図 1, lane 5)。ピック小体の純粋な構成蛋白質は、脳ホモジネートサンプルからは得られない新しい知見であり、その形成にはタウ蛋白のエクソン 2, 3 が関与している可能性がある。

次にピック病の脳内に蓄積するピック小体を Unfoldin 処理後にウエスタンブロット法により検討した結果、古典的な処理では単離した 500 個のピック小体を用いても異常リン酸化タウシグナルの検出が困難であったが、Unfoldin 処理後には、わずか数個若しくは 1 個のピック小体によって単一のタウシグナルを鮮明に検出できた (図 2)。

すなわち、Unfoldin はサンプルバッファー処理にすら極めて抵抗性の高いピック小体を容易に解きほぐし、抗体による検出能を 500 倍以上改善した。電子顕微鏡観察でも同様に、経時的なピック小体の解きほぐし像が得られた (図 3)。

### D. 考察

Unfoldin は試験管内での基質特異性が認められずに、高度の解きほぐし活性を有していることが

従来の我々の研究で明らかとなっていたが、この活性が実際の脳内沈着物に対しても有効であることが実証された。

実際の応用例として、BSE プリオンを含む高凝集性蛋白質のウエスタンブロットによる検出感度を、Unfoldin 処理により大幅に改善できる可能性が示唆される。

また、プロテオーム解析の主役は、液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析計 (MS/MS) の組み合わせであるが、試料調整の段階において、対象となる生体細胞・組織の構成タンパク質群の難溶性、高凝集性が大きな課題となっている。従って、異常凝集体に限らず、膜蛋白質を多く含む解析試料を Unfoldin により事前処理することで、この問題の改善につながるかもしれない。

### E. 結論

従来ピック病の全脳ホモジネートを用いた知見と異なり、単離されたピック小体の構成蛋白質は、主に 3 リピート由来の以上リン酸化タウ 69kDa であることが示唆された。

Unfoldin は実際に生体内凝集体に対する解きほぐし能を有することが確認された。これにより、BSE プリオンを含む異常凝集蛋白質の抗原抗体反応による検出感度を大幅に改善できる可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

とくになし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Yamazaki M, Mori O, Mizusawa H, Sakasegawa Y, Kaneko K. More than a 100-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric actin interacting protein 2/d-lactate dehydrogenase protein 2. *Anal Biochem* 2005;347:106-111.
- 2) Ohkubo T, Sakasegawa Y, Toda H, Kishida H, Arima K, Yamada M, Takahashi H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K. Three-repeat tau 69 is a

major tau isoform in laser-microdissected Pick bodies. Amyloid in press

主要構成蛋白は異常リン酸化タウ 69kDa である。第 28 回日本分子生物学会年会。福岡, 12.7-10, 2005.

2. 学会発表

- 1) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Over a hundredfold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p/D1d2p. 45th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec 10-14, 2005.
- 2) 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 有馬邦正, 山田光則, 水澤英洋, 八谷如美, 金子清俊. ピック小体の

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

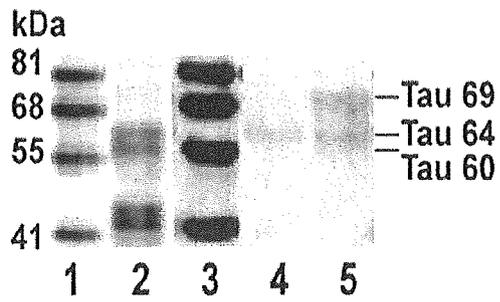
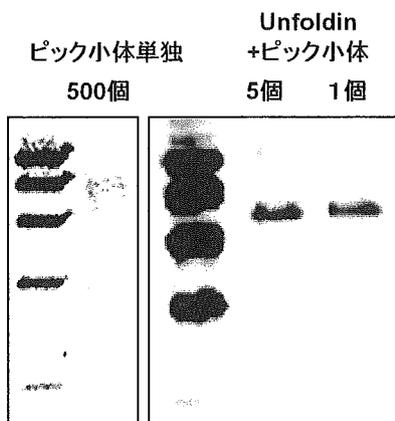
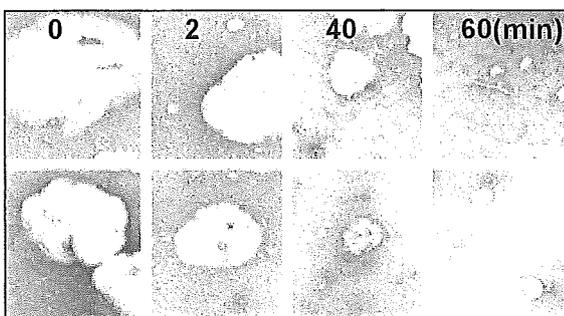


図1:レーザーマイクロカッターで単離されたピック小体のウエスタンブロット解析。



(図2: Unfoldinによるウエスタンブロット法 検出感度の著明な改善)



(図3: Unfoldinによるピック小体解きほぐしの電顕像。スケールバー: 4 μm)

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

## 活性型 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

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 張 倍茹\*、付 笑影\*、葛 鳳霞\*、巖 景民\*、姚 俊潔\*、張 桓宇\*、  
 澤下 仁子\*、森 政之\*、中井 彰\*\*

\*信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野、

\*\*山口大学大学院医学研究科生化学第二

**研究要旨** マウス老化アミロイドーシスでは、apoA-II がアミロイド線維(AApoAII) を形成して全身に沈着する。活性型 *hHSF1* を過剰発現したトランスジェニックマウスを用いて、マウス老化アミロイドーシスに対する *hHSF1* の抑制機構について検討した。雌 *Apoa2<sup>c</sup>* アリルを持つ *hHSF1<sup>+/-</sup>* 及び *hHSF1<sup>-/-</sup>* マウスを使用した。*hHSF1<sup>+/-</sup>* マウスでは心臓のみに活性型 *hHSF1* タンパク質の発現が認められた。また、心臓においては、*hHSF1* タンパク質の過剰発現による Hsp27 及び Hsp70 タンパク質の発現量が増加していた。1 µg の AApoAII アミロイド線維を投与 2 ヶ月、及び 4 ヶ月後の心臓へのアミロイド沈着は、*hHSF1<sup>+/-</sup>* マウスでは *hHSF1<sup>-/-</sup>* マウスよりも有意に低いことが分かった。心臓以外の臓器では、有意差が認められなかった。アミロイド線維沈着により、心筋細胞の主な構造タンパク質である  $\alpha$ -actin 量が顕著に減少したが、*hHSF1<sup>+/-</sup>* マウスでは減少が抑制された。活性型 *hHSF1* の過剰発現による AApoAII アミロイドーシス治療の有効性が示唆された。

### A. 研究目的

マウス老化アミロイドーシスでは、apoA-II がアミロイド線維(AApoAII) を形成して、全身性に細胞外に沈着する。現在までに、ポリグルタミン病やプリオン病等の様々なタンパク質のミスフォールディングが原因である疾患の発症や治療には Hsps タンパク質 (Heat shock proteins) が重要な役割を持つことが示唆されてきた。即ち、Hsps は、分子シャペロンとしてタンパク質のフォールディングを調節する機能を持つので、タンパク質のミスフォールディング(アミロイド線維形成) の抑制、ミスフォールディングタンパク質の分解、アポトーシスの抑制等により、異常タンパク質の細胞障害を減らすなどの効果が報告されている。したがって、heat shock 応答を利用したアミロイドーシスの新たな治療戦略の可能性を検討した。Hsps の高発現は HSF1 が Hsps 遺伝子の 5' 領域に存在する HSE (heat shock element) と結合することによって誘導できる。

我々は、活性型 *hHSF1* のトランスジェニックマウスを用いて、マウス AApoAII アミロイドーシスに対する *hHSF1* の抑制機構について検討した。

### B. 研究方法

1、動物： 活性型 *hHSF1* を発現した雌トランスジェニックマウスとアミロイドーシスを発症しやすい apoA-II の対立遺伝子 (*Apoa2<sup>c</sup>*) を持つ雄 R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* マウスを交配した。第 2 世代の、*Apoa2<sup>c</sup>* アリルを持つ雌 *hHSF1<sup>+/-</sup>* マウス及び *hHSF1<sup>-/-</sup>* マウスを使用した。

2、AApoAII アミロイドーシスの誘発： 2 ヶ月齢のマウスに、1 µg の AApoAII アミロイド線維を尾静脈に投与し、AApoAII アミロイドーシスを誘発した。投与後、2 ヶ月及び 4 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。

3、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、