

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 -単クローン性形質細胞の恒常的 NF- κ B 活性とその定量化-

分担研究者 河野 道生 山口大学・大学院医学系研究科・細胞シグナル解析学

共同研究者 大津山賢一郎、Jakia AMIN

山口大学・大学院医学系研究科・細胞シグナル解析学

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- κ B 作用に注目した。AL アミロイドーシスからの単クローン性形質細胞の NF- κ B 活性の活性化機構とその活性の定量化を検討した。まず、骨髄腫細胞株における恒常的 NF- κ B 活性は主に RelB/p50 によると考えられた。NF- κ B 活性の定量化として、その標的遺伝子の中で CD54 に注目した。CD54 蛋白発現の強度をフローサイトメーターで測定した。AL アミロイドーシスを含む MGUS では CD54 発現の強度は、正常骨髄形質細胞と同程度あるいはそれ以上であった。逆に、骨髄腫細胞では CD54 発現は減弱していた。今後、in vitro 培養系における生存能の強弱と恒常的 NF- κ B 活性との関係を明らかにして行かなければならない。

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、一つにその産生細胞である単クローン性形質細胞を減少させることである。一般に、その単クローン性形質細胞は増殖能に乏しい反面、骨髄環境で安定に生存している。この生存機構に NF- κ B の恒常的な高い活性が深く関わっていると考えられる。単クローン性形質細胞のモデルとして骨髄腫細胞株を使用して、NF- κ B の恒常的活性化の機構を明らかにするとともに、実際の AL アミロイドーシスを含めた骨髄腫患者からの単クローン性形質細胞での NF- κ B 活性を定量的に測定し得る方法を確立する。

B. 研究方法

1. 対象及び方法

1) ヒト骨髄腫細胞株(U266, ILKM3, NOP-2 など)から常法のごとく細胞溶解液、核あるいは細胞質分画を調整し、NF- κ B ファミリータンパク (p65, RelB, c-Rel, p50, p52)特異的抗体でウェスタンブロットを行う。更に、ダイマー形成を解析するために、特異的抗体で免疫沈降を行った後ウェスタンブロットを行った。これらのデータを基にして、ゲルブト法にて κ B サイトに結合する NF- κ B ファミリータンパクを同定した。AL アミロイドーシスを含めた骨髄腫患者からの単クローン性形質

細胞で、核分画を抽出して、同様の実験を行った。

2) 既に報告されている NF- κ B 標的遺伝子の中から、その遺伝子発現が転写因子 NF- κ B により厳格に調節されているものをデータベースの上から選別した。予備実験から、膜抗原 CD54 が一つの候補として挙げられた。各種細胞株での NF- κ B 活性と CD54 蛋白発現(フローサイトメーター)との相関を確認した。AL アミロイドーシスを含めた骨髄腫患者からの単クローン性形質細胞で、CD54 発現 (PE 標識抗 CD54 抗体(IM1239, Beckman Coulter)使用)を抗 CD38 抗体を使用したマルチカラー解析でフローサイトメーター(Epics Elite ESP, Beckman Coulter)にて測定した。多クローン性 γ グロブリン血症 5 例、MGUS11 例および多発性骨髄腫 20 例で検討した。

C. 研究結果

1) ヒト骨髄腫細胞株における NF- κ B ファミリータンパクの発現は、p65, RelB, c-Rel とともに強く認められたが、ゲルブトでの特異的抗体による解析では RelB と p50 とのヘテロダイマー (RelB/p50)が恒常的 NF- κ B の主体であることがわかった (図- 1)。

2) NF- κ B活性の定量化の方法として、CD54タンパク発現はNF- κ B活性とよい相関を示した。ALアミロイドーシス及びMGUS11例からの単クローン性形質細胞は、骨

髓腫細胞 (20例) よりも CD54 発現が有意に強かった (図- 2)。その発現強度は、正常 (多クローン性) 形質細胞 (5例) のそれと同程度に強かった。

D. 考察

骨髓腫細胞株の恒常的 NF- κ B 活性は主に RelB/p50 によることが明らかになった。誘導系での NF- κ B 活性化および I κ B との関連からも今後更なる詳細な活性化機構の解析が必要である。

NF- κ B 活性の定量化として、本年度はその標的遺伝子の一つである CD54 に注目した。CD54 蛋白の発現量で NF- κ B 活性を定量的に推し量ることができそうである。簡便な表面抗原解析法で再現性よく、患者骨髓検体での測定が可能である。CD54 発現量を基に、NF- κ B 活性を推し量ると、原発性 AL アミロイドーシスを含む MGUS では、明らかに骨髓腫と比して NF- κ B 活性が高いと考えられる。今後、in vitro 培養系における生存能の強弱と恒常的 NF- κ B 活性との関係を明らかにして行かなければならない。今後の原発性 AL アミロイドーシスの治療戦略として、その恒常的 NF- κ B 活性が高いことから、NF- κ B 活性を抑制し得る薬剤がどのような作用を示しうるか検討しなければならない。

E. 結論

1. 骨髓腫細胞株の恒常的 NF- κ B 活性は、主に RelB/p50 であった。
2. NF- κ B 標的遺伝子の中で、CD54 発現は NF- κ B 活性を簡便に定量できる。
3. 正常骨髓形質細胞は、CD54 蛋白を強度に発現していた。
4. 原発性 AL アミロイドーシスを含む MGUS からの単クローン性形質細胞は、正常骨髓形質細胞と同等あるいはそれ以上の強い CD54 発現が認められた。
5. 骨髓腫からの単クローン性形質細胞 (骨髓腫細胞) では、CD54 発現は有意に正常骨髓形質細胞のそれよりも弱かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Liu S, Ishikawa H, Tsuyama N, Li F, Abroun S, Otsuyama K, Zheng X, Ma Z, Maki Y, Iqbal MS, Obata M, Kawano MM: Increased susceptibility to apoptosis in CD45(+) myeloma cells accompanied by the increased expression of VDAC1. *Oncogene* 25:419-429, 2006.
- 2) Otsuyama K, Asaoku H, Kawano MM: An increase in MPC-1- and MPC-1-CD45+ immature Myeloma cells in the progressive states of bone marrow plasmacytosis: the revised phenotypic classification of monoclonal marrow plasmacytosis (MOMP-2005). *Int J Hematol.* 83:39-43, 2006.
- 3) Zheng X, Abroun S, Otsuyama K, Asaoku H, Kawano MM: Heterogeneous expression of CD32 and CD32-mediated growth suppression in human myeloma cells. *Haematologica* 91:920-928, 2006.
- 4) Otsuyama K, Ma Z, Abroun S, Amin J, Shamsasenjan K, Asaoku H, Kawano MM: PPARbeta-mediated growth suppression of baicalein and dexamethasone in human myeloma cells. *Leukemia* 21:187-190, 2007.

2. 学会発表

- 1) 河野道生：骨髓腫細胞の不均一性と多様性教育講演第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会、福岡、2006 年 10 月 6~8 日
- 2) 馬 梓、大津山賢一郎、劉 尚勤、Saeid ABROUN、河野道生：低分子化合物バイカレインによる骨髓腫細胞の増殖抑制機構 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会、福岡、2006 年 10 月 6~8 日
- 3) Saeid ABROUN, Karim SHAMSASENJAN, 大津山賢一郎、Jakia AMIN, Zi MA, 河野道生：Galectin-1 は患者骨髓腫細胞の in vitro 生存を支持する 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会、福岡、2006 年 10 月 6~8 日
- 4) Jakia AMIN, 大津山賢一郎、Saeid ABROUN, 馬梓、Karim SHAMSASENJAN, 河野道生：多発性骨髓腫細胞における NF- κ B 活性と定量とその恒常的発現機構 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会、福岡、2006 年 10 月 6~8 日

目

5) Amin J, Otsuyama K, Uchida E, Abroun S, Shamsasenjan K, Islam K, Kawano MM: The potentials of constitutive NF-kB activation in U266 cell lines. The 44th annual meeting of American Society of Hematology, Orland, U.S.A., Dec. 9-12, 2006.

6) Otsuyama K, Amin J, Uchida E, Abroun S, Shasasenjan K, Islam K, Asaoku H, Kawano MM: Baicalein combined with dexamethasone can induce the marked PPAR β -mediated suppression of growth and survival in human myeloma cells. The 44th annual meeting of American Society of Hematology, Orland, U.S.A., Dec. 9-12, 2006.

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 **Constitutive NF- κ B activity: RelB/p50**

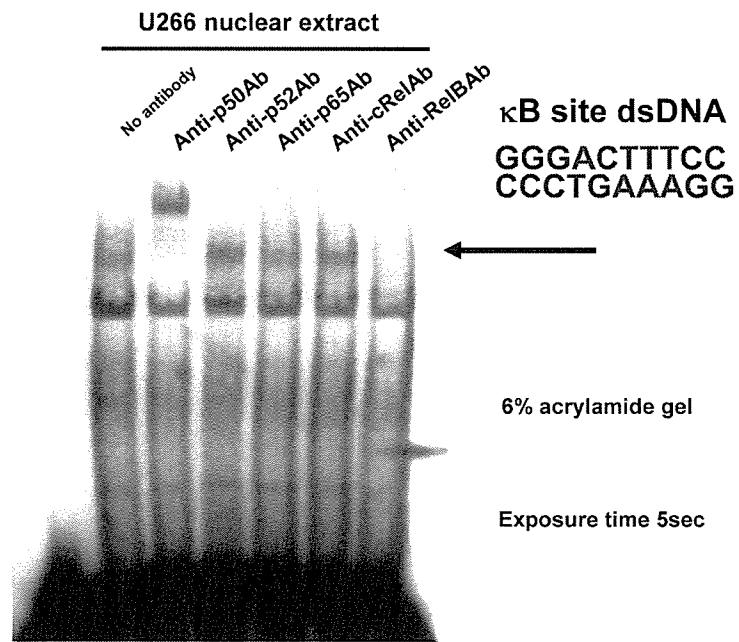


図-1 骨髄腫細胞株の恒常的 NF- κ B 活性は RelB/p50 による (Gel shift assay)

Fig. 2

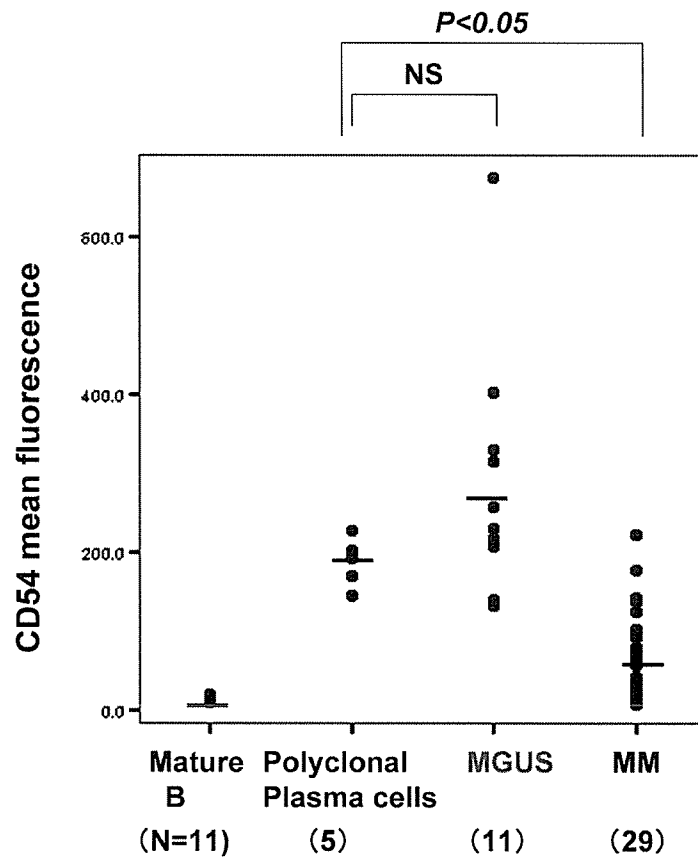


図-2 MGUS と骨髄腫における CD54 発現の強度

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 型アミロイドーシスにおける Bence Jones protein の解析

分担研究者 今井裕一 愛知医科大学医学部 腎臓・膠原病内科
 共同研究者 山田晴生 若松 亮 三浦直人 北川 渡 西川和裕
 愛知医科大学医学部 腎臓・膠原病内科

研究要旨 アミロイド線維を形成するための基本構造を明らかにするために尿中 BJP 蛋白の解析を行った。多発性骨髄腫由来のアミロイドを合併しない患者の BJP 蛋白は、Immunoglobulin Light chain κ V1 領域と 74% の相同性が認められた。急速に進行したアミロイドーシス患者の BJP 蛋白のアミノ酸解析では、アルブミンの混入と一部、FIVMTQSP の配列が確認されたが、蛋白質を同定することはできなかった。今後、アミロイド蛋白を直接解析する必要がある。

A. 研究目的

AL 型アミロイドーシスは、免疫グロブリンの断片 (主に軽鎖) が原材料となるアミロイドーシスであり、血中あるいは尿中に軽鎖あるいは M 蛋白が存在することを証明する必要がある。アミロイド形成に前駆蛋白の β シート構造の重要性が指摘されているが、立体構造あるいは線維構造を形成する要因については不明な点が多い。アミロイド線維を形成するための基本構造を明らかにするために尿中異常蛋白 (軽鎖) の解析を行った。

B. 研究方法

症例 1 : 81 歳女性 【主訴】 下肢の浮腫 【現病歴】 2006 年 4 月頃から、下肢の浮腫に気がつき、近医を受診し、尿蛋白を指摘されて当院に紹介入院。【現症】 血圧 146/66 脈拍 72/分 下肢に著明な浮腫。
【検査】 WBC 7600/ μ L, RBC 291 万/ μ L, Hb 9.1g/dl, Plt 45.9 万, TP 5.5 g/dl, Alb 2.3g/dl, BUN 85mg/dl, UA 9.3mg/dl, Cr 2.55 mg/dl, T-Cho 257mg/dl, IgG 1987mg/dl, IgA 78.6mg/dl, IgM 14.5mg/dl, 血清免疫電気泳動で IgG- κ の M 蛋白が存在し、尿の免疫固定法では、IgG- κ , κ 型 Bence Jones Protein (BJP) が認められた。骨髄穿刺で形質細胞が 33% と増加しており多発性骨髄腫と診断された。腎不全・ネフローゼ症候群の検索として腎生検の必要性を説明したが、本人および家族の同意は得られなかったため詳細は不明である。多発性骨髄腫に準じた治療を選択した。

症例 2 : 52 歳女性 【主訴】 下肢の浮腫 【現病歴】 2004 年の夏から下肢浮腫自覚。11 月に浮腫が著明。2005 年 2 月に前医で腎生検。微小変化群と診断。PSL40mg を 6 週間内服後、30mg に減量し浮腫は軽快したが蛋白尿持続。2006 年 6 月、突然浮腫が悪化し PSL30mg+シクロスポリン併用。症状の改善なく、7 月 4 日転院。直ちに腎生検を施行 【現症】 血圧 146/66, 脈拍 72/分 下腿浮腫 【検査】 WBC 12000/ μ L, RBC 457 万/ μ L, Hb 14.9g/dl, Plt 15.4 万, TP 3.9 g/dl, Alb 2.0g/dl, BUN 26.3mg/dl, UA 7.9mg/dl, Cr 1.14mg/dl, T-Cho 677mg/dl, IgG 248mg/dl, IgA 186mg/dl, IgM 69.6 mg/dl, 血中尿中免疫電気泳動では、BJP は認めなかった。尿中免疫固定法で BJP λ がわずかに検出された。骨髄穿刺では、形質細胞は 3% 程度であり AL 型アミロイドーシスと診断しピンクリスチン・アドリアマイシン・デキサメサゾンによる治療を開始した。

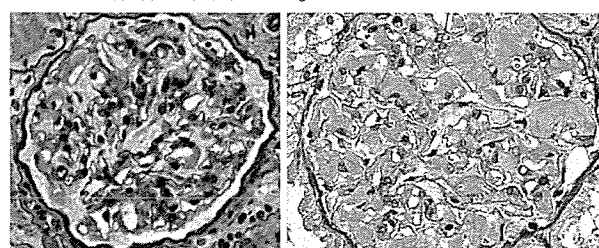


図 1 前医と当院での腎生検組織 (PAS 染色) わずか、17 ヶ月で糸球体に大量にアミロイドが沈着していた。

症例 1, 2 の尿中 BJP の検索 : ①尿を SDS-PAGE、

②Western Blotting、③アミノ酸解析の順に解析した。

(倫理面への配慮)

患者、家族の同意を得て腎生検を施行した。

C. 研究結果

症例1では、分子量25kD近傍にκ鎖の単量体が、45 kD付近に軽鎖2量体でBJPに相当する蛋白を認めた。この部分のアミノ酸配列解析で、Fab領域から42個のアミノ酸残基が解析され、軽鎖V領域の配列が得られ、Immunoglobulin Light chain κ V1領域と74%の相同性が認められた。

症例2では、軽鎖2量体、4量体に相当する部位にBJP λ鎖を認めた。この部分のアミノ酸解析では、アルブミンの混入と一部、FIVMTQSPの配列が確認されたが、蛋白のデータベースから相同性のある蛋白はみつけられなかった。

尿中BJP蛋白量に対する治療効果

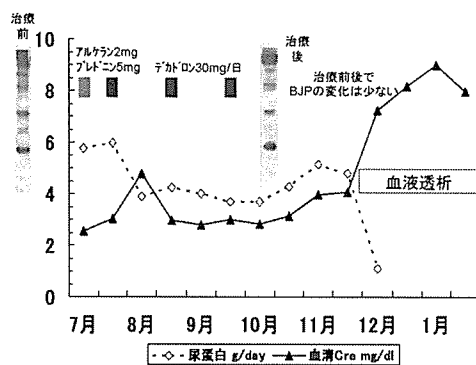


図2 症例1の経過：尿中BJPは治療前後で大きな変化はみられない。

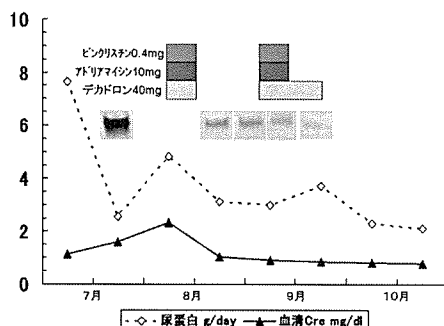


図3 症例2の経過：尿中BJPは治療後に減少し消失してきている。

D. 考察

今回の検討で以下のことがわかった。

- ① 急速に組織沈着が進行するAL型アミロイドーシスが存在すること
- ② 尿中BJPの検索にはWestern blot法が検出感度がよいこと、半定量が可能で治療効果を判定できること
- ③ 多発性骨髄腫由来のBJPは、容易にアミノ酸解析が可能であるが、アミロイドーシス患者では、アミノ酸解析が困難であること

症例2は前医で微小変化型ネフローゼ症候群として治療されている。未だに医師の間でアミロイドーシスの認識が不足している点が残念である。早期発見早期治療が患者の予後を大きく左右する。アミロイド線維を形成する要因とアミノ酸配列の関連を明らかにするためにBJPのアミノ酸解析を行ったが、FIVMTQSPという一部分が認識できたが、完全な配列は不明であった。今後は、組織に沈着したアミロイド蛋白を解析する必要がある。

E. 結論

尿中BJPの検索にはWestern blot法が検出感度がよいこと、半定量が可能であり治療効果を判定できることがわかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miura N, et al: Acute renal failure due to IgM-λ glomerular thrombi and MPGN-like lesions in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Amer J Kidney D* 48:E3-E9, 2006

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)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

呼吸器系を侵すアミロイドーシスの臨床像の多様性について

分担研究者 池田修一 信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

共同研究者 藤本圭作*、星井嘉信**

*信州大学医学部呼吸器内科、**山口大学医学部病理

研究要旨 過去 10 年間に当科において呼吸器系を侵すアミロイドーシスと診断された患者は 12 名であり、その内訳は次のようであった。原発性全身性アミロイドーシス 1 例、家族性アミロイドポリニューロパチー 1 例、限局性喉頭アミロイドーシス 5 例、気管・気管支アミロイドーシス 2 例、肺結節性アミロイドーシス 1 例、シェーグレン症候群に伴う肺結節性アミロイドーシス 2 例であった。家族性アミロイドポリニューロパチー例のアミロイドは TTR 由来であったが、他の患者のアミロイド構成蛋白は全て AL であった。また肺結節性アミロイドーシス 1 例、シェーグレン症候群に伴う肺結節性アミロイドーシス 1 例では肺外臓器にも結節状のアミロイド沈着が見られ、systemic multifocal nodular amyloidosis の様相を呈していた。

A. 研究目的

呼吸器系を侵すアミロイドーシスには複数の異なる病型が存在することが知られている。

そこで本研究では当科で経験した患者の臨床像を明らかにする目的で retrospective analysis を施行した。

B. 研究方法

過去 10 年間に呼吸器症状を主訴に当科を受診してアミロイドーシスと診断された患者の臨床像を検討した。また生検組織を用いてアミロイド蛋白の性状を免疫組織化学的に分析した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当っては可能な範囲で患者さんにその主旨を説明した。

C. 研究結果

患者の臨床像とアミロイド蛋白は要旨に示したとおりである。全身性アミロイドーシスとした根拠は血清中にアミロイド前駆蛋白が同定され、また複数の臓器がアミロイド沈着で障害されていることが明らかな患者とした。この群に属す患者は原発性全身性 AL アミロイドーシスの 67 歳女性と Asp38AlaTTR を有する家族性アミロイド

ポリニューロパチー(FAP)の 82 歳女性であった。前者は胸部 X 線上の BHL が検索の契機であり、CT では両肺野に複数の結節影が見られた。IgG λ type の M 蛋白血症があり、難治性胸水に対して胸膜癒着療法が一時的に効を奏したが、最終的には心不全で死亡した。剖検にて肺門から縦隔リンパ節周囲に高度なアミロイド沈着が見られた。FAP 患者は両下肢の異常感覚と頻回の下痢で発症し、1 年後から体動時の呼吸困難を訴えていた。呼吸困難の原因は当初、心アミロイドーシスが原因と考えられていたが、剖検組織の検索で肺胞隔壁へのび漫性のアミロイド沈着が見出された。

他の例はいずれも臨床的には呼吸器症状のみであり、初診時には気道系に限局するアミロイドーシスと診断された。しかし肺結節性アミロイドーシスの 52 歳女性は頭皮下にアミロイド結節が証明され、また胃生検組織にもアミロイド沈着が見られた。またシェーグレン症候群に伴う肺結節性アミロイドーシスと診断された 60 歳女性は、本症候群と確定される 4 年前より両側乳房の皮下、頬粘膜下に多数の結節性腫瘍が出現しており、これらの病変は生検でアミロイド沈着であることが証明されている。

D. 考察

全身性アミロイドーシスが気道系を障害して臨床症状を出現させることは稀であり、また同症状を呈する患者の大部分は AL type とされている。一方、気道系に限局するアミロイドーシスは i)肺結節型、ii)気管・気管支型、iii)び慢性肺胞中隔型に分類されている。しかし今回経験した肺結節型の2例においては、肺外の皮下組織、消化管粘膜下組織に結節状のアミロイド沈着が見出された。本所見は従来記載がなく、systemic or multifocal nodular amyloidosis というような所見である。今後、本病変の発生機序について詳細な検討を行う必要がある。

E. 結論

呼吸器系を侵すアミロイドーシスの病態の多様性について報告した。また従来知られていない病型が存在していることを指摘した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamazaki S, Kanda S, Urushihata K, Koizumi T, Fujimoto K, Kubo K, Ikeda S: Laryngo-tracheo-bronchial amyloidosis presenting severe airway stenosis. *Internal Medicine* 45: 1021-1022, 2006.

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：臨床試験の進捗状況

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*、安倍正博**、松田正之***、鈴木憲史****、畑裕之*****、
 山田正仁*****

*広島赤十字原爆病院血液内科、**徳島大学医学部血液内科、

***信州大学医学部神経内科・リウマチ膠原病内科、

****日本赤十字医療センター血液内科、*****熊本大学医学部血液内科、

*****金沢大学医学部神経内科

研究要旨 原発性 AL アミロイドーシスに対する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、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による新しい臨床試験を実施した。平成 18 年 5 月より登録を開始し、平成 18 年 11 月の時点で目標症例数 6 例の登録が終了した。年齢は 44 歳から 61 歳。臓器病変は腎 (5 例)、消化管 (3 例)、神経 (2 例)、心臓 (1 例) であった。寛解導入療法において grade3 以上の重篤な非血液毒性はみられなかった。採取 CD34+細胞数は 2~5 回のアフレーシスで計 $0.08\sim 2.27 \times 10^6/\text{kg}$ であり、6 例中 2 例でのみ目標 CD34+細胞数 ($2 \times 10^6/\text{kg}$) を採取し得た。採取不良例では他の幹細胞動員療法が行われ、現時点で 3 例に自家末梢血幹細胞移植が行われた。中等量メルファランによる寛解導入療法は、安全性には問題ないが幹細胞採取効率に問題が残り、より効率のよい幹細胞採取方法を確立することが重要と考えられた。幹細胞移植の有用性については今後の経過観察による評価が必要である。

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て臨床試験を開始した。今回はその進捗状況を報告する。

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ルを作成した。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。

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/ μ l、好中球 \geq 2000/ μ l、血小板 \geq 70000/ μ 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/m²で行いday5より末梢血幹細胞採取のためにG-CSF 400 μ g/m²あるいは10 μ 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/m²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 10⁶/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/m²をday-3、-2に投与(計140mg/m²)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 μ g/m²あるいは5 μ 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。

(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

平成18年5月より登録を開始され、現在までにMel 20mg/m²群3例の安全性が確認され、引き続き30mg/m²群3例が登録され、平成18年11月の時点で目標症例数6例の登録が終了した。年齢は44歳から61歳、男性4例、女性2例。臓器病変は腎(5例)、消化管(3例)、神経(2例)、心臓(1例)、骨髄(1例)であった。寛解導入療法におけるgrade3以上の重篤な非血液毒性はみられなかった。血液毒性については、白血球数が500/ μ l以下に低下したのは1例のみであった。血小板数は6例中4例で50000/ μ l以下に低下したがすみやかに回復した。赤血球輸血を要したものは1例、血小板輸血は3例(10Uが2例、20Uが1例)で行われた。以上より、中等量メルファランによる寛解導入療法の安全性が確認された。

幹細胞採取については、採取CD34+細胞数は2~5回のアフエレーシスで計0.08~2.27 x 10⁶/kgで、1例では末梢血中のCD34+細胞が少ないため採取が行われなかった。6例中2例でのみ目標CD34+細胞数(2 x 10⁶/kg)を採取し得た。幹細胞数不足例では他の動員レジメンで採取中である。以上より、中等量メルファランによる寛解導入療法における幹細胞採取効率は不良と考えられた。

血液学的効果についてはFree light chain (FLC)の測定が有用と考えられた。自験例ではlambda FLCが寛解導入前、導入後、移植後1ヶ月でそれぞれ70.4、41.8、27と減少した(正常値5.7~26.7 mg/L)。

現時点で、他の動員レジメンにより5例で目標CD34+細胞数(2 x 10⁶/kg)が採取され、そのうち3例で自家末梢血幹細胞移植が行われているが、重篤な有害事象の報告はない。

D. 考察

中等量メルファランによる寛解導入療法は安全に実施可能であるが、幹細胞採取効率は不良であり、より効率的な採取方法を確立することが重要と考えられた。血液学的効果については現時点で評価困難であるが、FLC の低下を認めた症例も有り、FLC の測定が評価に有用と考えられた。今後、自家末梢血幹細胞移植の効果も含め、全症例の経過を観察する予定である。

E. 結論

中等量メルファランによる寛解導入療法は安全に実施可能であるが、幹細胞採取効率は不良である。自家末梢血幹細胞移植の効果については今後の経過観察による評価が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okamoto M, Okano A, Akamatsu S, Ashihara E, Inaba T, Takenaka H, Katoh N, Kishimoto S, Shimazaki C: Rituximab is effective for sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Leukemia* 20:172-173, 2006.
- 2) Shimazaki C, Kobayashi Y, Inaba T, Taniwaki M: Dexamethasone reduces the risk of bortezomib-induced pulmonary complications in Japanese myeloma patients. *Int J Hematol* 84:90-91, 2006.
- 3) Okamoto M, Inaba T, Yamada N, Uchida R, Fuchida S, Okano A, Shimazaki C, Taniwaki M: Expression and role of MHC class I-related chain in myeloma cells. *Cytotherapy* 8:509-516, 2006.
- 4) Tamagawa R, Takenaka H, Katoh N, Shimazaki C, Bamaba H, Kishimoto S: Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease presenting with dysphagia. *Eur J Dermatol* 16:92-93, 2006.
- 5) Uchida R, Nakano S, Namura K, Yamada N, Fuchida S, Okano A, Okamoto M, Ochiai N, Shimazaki C: Is splenectomy a contraindication for patients with myelodysplastic syndromes complicated by splenomegaly? *Ann Hematol* 85:198-199, 2006.

6) Kusaba T, Hatta T, Tanda S, Kameyama H, Tamagaki K, Okigaki M, Inaba T, Shimazaki C, Sasaki S: Histological analysis on adhesive molecules of renal intravascular large B cell lymphoma treated with CHOP chemotherapy and rituximab. *Clin Nephrol* 65: 222-226, 2006.

7) Saito Y, Takenaka H, Chin T, Ueda E, Katoh N, Shimazaki C, Inaba T, Kishimoto S: Cytomegalovirus in cutaneous ulcers in a patient with adult-T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol* 86:181-182, 2006.

8) Shimura K, Shimazaki C, Taniguchi K, Akamatsu S, Okamoto M, Uchida R, Nomura K, Inaba T, Horiike S, Kanamura N, Taniwaki M: Hyperbaric oxygen in addition to antibiotic therapy is effective for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a patient with multiple myeloma. *Int J Hematol* 84:343-345, 2006.

9) 島崎千尋：多発性骨髄腫に対するインターフェロン療法. 特集「インターフェロン治療学—最新の基礎・臨床研究—」*日本臨床* 64:1291-1296, 2006.

10) 島崎千尋：多発性骨髄腫. 造血幹細胞移植の現在. *Mebio Oncology* 3:46-53, 2006.

11) 島崎千尋：多発性骨髄腫. 特集「内科疾患最新の治療—専門家からのアドバイス」*内科* 97:1338-1339, 2006.

12) 島崎千尋：Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). 特集「内科疾患最新の治療—専門家からのアドバイス」*内科* 97:1352, 2006.

13) 島崎千尋：原発性アミロイドーシス. 特集「内科疾患最新の治療—専門家からのアドバイス」*内科* 97:1353, 2006.

14) 島崎千尋：個々の疾患の移植適応. 多発性骨髄腫. 特集「多様化する造血幹細胞移植の適応と方法—いつ、誰に、どのように—」*内科* 98:254-257, 2006.

15) 内田亮、島崎千尋：多発性骨髄腫に対するサリドマイド・デキサメサゾン療法. *血液・腫瘍科* 53:210-216, 2006.

2. 学会発表

- 1) Shimazaki C: Current status of autologous stem cell transplantation for multiple myeloma in Japan.

The 11th United States – Japan Clinical Trials Summit. Recent Advances in Multiple Myeloma Treatment. Kyoto, Japan, 2006.4.7-8.

2) Shimazaki C: Recent advance in non-T-cell depleted HLA haploidentical stem cell transplantation based on fetomaternal microchimerism. Advance in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond Unrelated Donor Transplantation. Soule, Korea, 2006.10.14.

3) 島崎千尋、村上博和、高木敏之：多発性骨髄腫の治療の現状—骨髄腫研究会・治療の実態調査より—。(会長要望講演)第31回日本骨髄腫研究会総会。伊香保、2006.11.11.

4) 内田亮、芦原英司、佐藤澄、木村晋也、河田英里、谷口享子、岡本雅司、志村和穂、島崎千尋、谷脇雅史、前川平：骨髄腫細胞に対する $\gamma\delta$ T細胞の認識機構と抗腫瘍効果。第68回日本血液学

会／第48回日本臨床血液学会総会。福岡、2006.10.6-8.

5) 淵田真一、島崎千尋、内田亮、岡本雅司、平位秀世、稲葉亨、谷脇雅史：サリドマイドの骨髄腫細胞の chemotactic migration に対する作用。第68回日本血液学会／第48回日本臨床血液学会総会。福岡、2006.10.6-8.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

心アミロイドーシス患者の自家造血幹細胞移植後経過

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*、名越久朗*、太田逸郎*、湯浅博美*

*広島赤十字・原爆病院 第四内科、

研究要旨 心アミロイドーシスを有する原発性全身性 AL アミロイドーシスに対する risk adapted approach による自家造血幹細胞移植併用メルファラン大量療法 (HDM/SCT) の中期的効果を検討した。対象は心不全を有する AL アミロイドーシス患者 3 例である。2 例は double HDM/SCT を行い、2 例は CR、1 例は nearCR を得た。それぞれ HDM/SCT 後 2 年 10 ヶ月、2 年 8 ヶ月、1 年 6 ヶ月経過しており、全例緩解を維持。3 例とも臓器障害の改善、著明な QOL の改善をみとめた。また沈着アミロイドの消失の可能性も確認した。Risk adapted (double) HDM/SCT は心不全を含む重篤な臓器障害を有する全身性 AL アミロイドーシス患者に施行可能であり、有用である。

A. 研究目的

重篤な臓器障害を有する全身性 AL アミロイドーシスに対しては安全性を考慮し risk adapted な自家造血幹細胞移植が必要である。我々は安全性と治療強度の維持を目的に risk adapted double HDM/SCT を検討し、施行可能であることを示してきた。今回 HDM/SCT を行った心不全を有する心アミロイドーシス患者の中長期的効果を検討し、risk adapted (double) HDM/SCT の有用性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

対象：心アミロイドーシスを有する原発性全身性 AL アミロイドーシス患者 3 例。症例 1 56 才女性。心不全、ネフローゼ、腸管障害、起立性低血圧。PS4 poor risk。VAD 1 コース後 double HDM/SCT 施行 (初回、2 回目とも Mel 140mg/m²)。症例 2 67 才男性 心不全、ネフローゼ、腸管障害、起立性低血圧。PS4 poor risk。VAD1 コース後 HDM/SCT 施行 (Mel 140mg/m²) 症例 3 43 才男性。心不全 PS3 poor risk。先行治療無し。double HDM/SCT 施行 (初回 Mel 90mg/m²。2 回目 Mel 140mg/m²) (表 1)

方法：HDM/SCT 前、後 3 ヶ月、最近、の血液学的状態、臓器障害の程度、全身状態 (QOL)

を比較する。

(倫理面への配慮)

本治療を行うに当たって倫理委員会の承認を得、また患者に対して十分な説明を繰り返し行った上文書で同意を得た。

C. 研究結果

症例 1 は 2 年 10 ヶ月経過。症例 2 は 2 年 8 ヶ月経過。症例 3 は 1 年 6 ヶ月経過。

血液学的効果：症例 1 と 2 は CR 継続中、症例 3 は nearCR 継続中。

臓器障害：3 例とも血圧の上昇、CTR, EF, BNP の改善を認めた。症例 1 と 2 は起立性低血圧の消失、ネフローゼの改善、腸管障害 (下痢の頻度) の改善を認めている。また症例 1 は胃粘膜生検、腹壁脂肪生検ともアミロイドの消失を認めた。しかし大腸粘膜生検ではアミロイドの沈着を認めた。症例 2 は腹壁脂肪生検でアミロイドの消失を確認した。全身状態：全例 PS0、QOL の著明な改善を認め社会復帰をしている。(表 2)

D. 考察

原発性全身性 AL アミロイドーシスに対し自家造血幹細胞移植併用メルファラン大量療法が

有用な治療法であることはすでに認知されてきたが、心アミロイドーシスによる心不全に代表される重篤な臓器障害を有する患者においては治療関連死が多く発生することが問題である。これに対し risk adapted approach が提唱され我々もその安全性について確認してきた。しかし、melphalan の投与量低下に伴う治療効果の低下が報告されている。そのため我々は安全性の確保と治療強度を維持する目的で double transplantation を試みている。今回報告した 3 例中 2 例に double HDM/SCT を行い、施行可能であることを確認した。

次に本治療の有用性を明らかにするため、特に重篤な臓器障害を有する患者において治療後の生命予後だけでなく、障害臓器の改善が認められるかどうか中長期的検討をおこなった。3 例中 2 例に血液学的 CR を得、1 例に nearCR を得た。それぞれ 2 年 10 ヶ月、2 年 8 ヶ月、1 年 6 ヶ月緩解を維持しており、その結果 3 例とも臓器障害の改善と QOL の著明な改善をきたし社会復帰を果たしている。また 2 例において胃粘膜生検、腹壁脂肪生検で治療前に認められたアミロイドを今回認めなかったことから、血液学的緩解を長期持続することで沈着アミロイドが消失する可能性があることを確認した。

以上により臓器障害を有する全身性 AL アミロイドーシス患者に対し risk adapted approach による HDM/SCT は有効な治療法と考える。また poor risk 患者に対しては risk adapted double HDH/SCT が有用な治療法となり得る。

原発性全身性 AL アミロイドーシスに対し HDM/SCT は約 40%～50%の血液学的完全緩解が得られる。そして完全緩解例と非完全緩解例では予後に有意な差が認められることが報告されている。症例 3 は緩解状態を維持しているものの完全緩解には至っていない。今後の課題としてこのような例に対する維持強化療法の検討が必要である。

E. 結論

Risk adapted (double) HDM/SCT は心不全を含む重篤な臓器障害を有する全身性 AL アミロイドーシス患者に施行可能であり、血液学的緩解を得られる。血液学的緩解を中長期維持することにより、重篤な臓器障害の改善、QOL の著明な改善を得られる。以上より risk adapted (double) HDM/SCT は心不全を含む重篤な臓器障害を有する全身性 AL アミロイドーシス患者に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 治療法

	症例1	症例2	症例3
前治療	VAD1コース	VAD1コース	なし
動員方法	G-CSF単独	G-CSF単独	G-CSF単独
採取幹細胞数 ×10 ⁶ /kg	7.11	2.38	4.11
大量化学療法	Mel 140mg/m ²	Mel 140mg/m ²	Mel 90mg/m ²
移植間隔	106日		135日
2回目大量化学療法	Mel 140mg/m ²		Mel 140mg/m ²

表2. 経過

症例1. 56才女性	移植前	2回目移植前	移植後3ヶ月	2年10ヶ月
PS	4	1	1	0
M蛋白	(+)	(+/-)	(-)	(-)
BP mmHg	90/62	102/68	106/64	110/74
CTR %	58	53	52	52
EF %	52	64	61	52
BNP pg/ml	250	189	168	51.2
腸管障害	(+++)	(+)	(+/-)	(+/-)
起立性低血圧	(+)	(-)	(-)	(-)
尿蛋白量 g/day	7.2	2.1	0.78	0.6
腹壁脂肪生検	amyloid(+)		amyloid(-)	大腸粘膜生検
胃粘膜生検	amyloid(+)		amyloid(-)	amyloid(+)

症例2. 67才男性	移植前	移植後3ヶ月	2年8ヶ月
PS	4	2	0
M蛋白	(+)	(+/-)	(-)
BP mmHg	90/40	102/64	118/69
CTR %	53	48	46
EF %	43	48	61
BNP pg/ml	231		93.5
腸管障害	(++)	(+/-)	(+/-)
起立性低血圧	(+++)		(+/-)
尿蛋白量 g/day	4.2	2.4	0.07
腹壁脂肪生検	amyloid(+)		amyloid(-)

症例3. 43才男性	移植前	2回目移植前	移植後3ヶ月	1年6ヶ月
PS	3	2	2	0
M蛋白	(+)	(+)	(+/-)	(+)
BP mmHg	93/72	100/70	108/64	
CTR %	62	63	48	49
EF %	48	48	50	50
BNP pg/ml	895	479	ND	ND
腸管障害	(-)	(-)	(-)	(-)
起立性低血圧	(-)	(-)	(-)	(-)
尿蛋白量 g/day	(-)	(-)	(-)	(-)
腹壁脂肪生検	amyloid(+)			ND

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

自己末梢血幹細胞移植併用メルファラン大量療法を行った 原発性 AL アミロイドーシス 4 例の成績

分担研究者 高市憲明 虎の門病院腎センター

共同研究者 香取秀幸、星野純一 虎の門病院腎センター

研究要旨 原発性 AL アミロイドーシスは、アミロイド蛋白の全身諸臓器への沈着により多臓器の機能障害をきたし、MP 療法での median survival が 1.5 年といわれる予後不良の疾患である。近年自己幹細胞移植 (auto-PBSCT) を用いた大量メルファラン療法が導入され良好な治療成績が報告されている。アミロイド治療班会議小委員会で検討されていたプロトコルを基に当院でも治療プロトコルを作成しこれに基づいて治療を行った 4 症例について成績を解析した。4 症例の内、3 症例については蛋白尿の減少を認め、心機能も改善ないしはほぼ不変という臨床症状の改善がみられた。しかし、メルファランを減量せざるを得なかった 1 例では腎障害が進行し心機能も増悪し死亡に至ったが、診断後の生存期間は 3 年 11 月であった。経過中感染症や肝障害がみられたが治療により改善した。メルファラン大量療法自体による死亡は認められなかった。原発性 AL アミロイドーシスに対する自己末梢血幹細胞移植併用メルファラン大量療法は生命予後の改善が期待できる治療法である。

A. 研究目的

原発性 AL アミロイドーシスは、アミロイド蛋白が全身諸臓器へ沈着することにより各種臓器の機能障害をきたす予後不良の疾患である。従来から行われてきた MP 療法では、median survival が 1.5 年とされている。近年自己幹細胞移植 (auto-PBSCT) を用いた大量メルファラン療法が試みられ良好な治療成績が報告されている。

当院でも同治療を希望する患者の求めに応ずるため、アミロイド治療班会議小委員会で検討されていたプロトコルを基に治療プロトコルを作成し院内審査委員会の承認を得た。これに基づいて治療を行った 4 症例について成績を解析した。

B. 研究方法

1. 対象

組織学的に 2 臓器以上の臓器に AL アミロイドの沈着を認め、原因となる基礎疾患や共存とする合併症のない患者を対象とした。

2. 治療方法

- 1) 導入療法として VAD 療法を 2 クール実施する。
- 2) G-CSF 10 μ g/kg/日を 4 日間連続投与し、CD34 陽

性細胞を採取する。

- 3) Melphalan 140mg/m²を投与。
- 4) 採取していた抹消血幹細胞を移植する。

(倫理面への配慮)

作成した治療計画書は院外委員を含む当院の審査委員会で承認を得た。患者には説明文書を用いた説明を行った上で本人からの同意を得た。

C. 研究結果

症例 1)

54 才、男性。2003 年 7 月健診で尿蛋白を指摘された。頑固な便秘も認めていた。同年 10 月他院を受診し尿蛋白 2.3g/日、TP 6.0g/dl、Alb 3.7g/dl、APTT・PT 延長と第 X 因子低下を指摘された。2004 年 2 月当院を紹介受診した。当院検査にて、凝固異常 (APTT 51.3", PT-INR 1.77)を認め、切除した大腸ポリープ、皮膚・脂肪生検、腎生検で AL アミロイドの沈着が確認された。2004 年 12 月メルファラン大量療法を実施した。

当初 3-4g/日認めていた蛋白尿は治療後に 1g/日以下へと著明な減少を認めた。当初より腎障害の障

害は認めていなかったが、その後増悪することも無かった。凝固異常は正常化した。心機能低下の臨床症状は認めないが、BNP は若干高値であった。経過中肝障害を認めたが保存的に改善した。現時点で、診断後 3 年 6 ヶ月経過しているが、通常の生活を送っている。

症例 2)

65 才、男性。2002 年 9 月より食欲低下を自覚した。2003 年 6 月 13kg の体重減少のため他院に入院した。蛋白尿を認めて行った腎生検で AL アミロイドの沈着を認めた。胃生検でもアミロイドが証明された。心電図でも PQ 延長からアミロイドーシスを疑われていた。2003 年 10 月当院を紹介受診し 2005 年 5 月大量メルファラン療法を実施した。

約 3g/日認めていた尿蛋白は VAD 療法後 1g/日程度まで減少し、大量メルファラン治療後陰性化した。腎障害は当初より認めず経過中増悪も認めなかった。心機能低下の臨床症状は認めず、起立性低血圧の軽減がみられた。経過中肺炎および肝障害が発症したが、治療により改善した。現在、診断後 3 年 5 ヶ月経過しているが通常の生活を送っている。

症例 3)

31 才、男性。2004 年 4 月労作時呼吸困難、めまいを自覚した。同年 6 月駅の階段を上る時失神発作のため他院に入院し、うっ血性心不全に対して治療と精査を行った。7 月当院に転院。心筋生検で AL アミロイドが検出され、蛋白尿精査のため行った腎生検でもアミロイドの沈着が確認された。2005 年 3 月大量メルファラン療法を実施した。

治療後蛋白尿は 1.8g/日から 0.5g/日へと減少した。当初より腎障害は認めず経過中増悪も認めなかった。心機能は改善し BNP 値は 408 pg/ml から 172pg/ml と漸減している。現在診断後 2 年 6 ヶ月経過したが、通常の勤務をしている。

症例 4)

50 才、男性。2001 年 10 月他院で蛋白尿を指摘された。2002 年 8 月腎生検で AL アミロイドーシスと診断された。2003 年 10 月他院で MP 療法を施行された。2004 年 1 月当院を受診した。心電図で低電位を認め、心筋生検でアミロイド沈着が確認された。同年 8 月メ

ルフアラン大量療法を行った。MP 療法の既往があったため骨髄への移植細胞の生着不全を避ける目的でメルファランの量を 70%に減量して行った。

蛋白尿は減少せず、腎障害は次第に悪化し透析療法導入となった。心機能も次第に低下し不整脈も出現した。最終的に BNP は 7420 pg/ml まで上昇した。消化管症状、起立性低血圧も認めるようになり死亡に至った。生存期間は診断後 3 年 11 ヶ月メルファラン大量療法後 1 年 10 ヶ月であった。

D. 考察

原発性 AL アミロイドーシスの 4 例に対して自己末梢血幹細胞移植を併用したメルファラン大量療法を施行した。

計画通りの治療が行えた 3 例では蛋白尿の改善を認めた。また、1 例では明らかな心機能の改善を認めた。2 例では心機能低下の症状は認めていない。これらの 3 例はそれぞれ診断後、3 年 6 ヶ月、3 年 5 ヶ月、2 年 6 ヶ月経過しているが通常の日常生活が遅れており極めて経過が良好である。

メルファランを減量せざるをえなかった 1 例では腎機能・心機能は次第に低下し死亡に至ったが、生存期間は診断後 3 年 11 ヶ月メルファラン大量療法後 1 年 10 ヶ月であり従来の一般的経過から考えると生存期間が多少延長した可能性はあると思われた。

有害事象として大量メルファラン療法自体による死亡は認めず、経過中感染症、肝障害を認めた症例があったが治療で改善した。原病の予後を考えると許容される範囲の有害事象と思われた。

E. 結論

原発性 AL アミロイドーシスに対する自己末梢血幹細胞移植を併用したメルファラン大量療法は、生命予後の延長が期待できる治療法である。

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okuda I, Ubara Y, Takaichi K, Kitajima I, Motoi N, Hara S and Kokubo T: Genital β 2-microglobulin

amyloidoma in a long-term dialysis patient. *Am J Kidney Dis* 2006;48:E35-E39

2) Ubara Y, Tagami T, Subabe T, Sogawa Y, Hoshino J, Higa Y, Nomura K, Sawa N, Katori H, Takemoto F, Hara S, Watanabe T, Ohashi K and Takaichi K: Systemic AA-amyloidosis related to MPO-ANCA microroscopic polyangiitis: A case report. *Amyloid* 2006;13:178-183

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)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

トランスジェニックラット (ヒト ATTR V30M) の開発 —ATTR 代謝動態解析の新たなツールとして—

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 植田光晴*、三隅洋平*、姫野真悟**、中村政明***、山下太郎*、
 大林光念**、袴田陽二****、内野誠*、小林英司****

*熊本大学大学院 医学薬学研究部 神経内科学、**同 病態情報解析学、

国立水俣病総合研究センター、*自治医科大学 臓器置換研究部

研究要旨 アミロイド原性トランスサイレチン (ATTR) の代謝動態を生体で解析するため ATTR V30M 遺伝子を導入したトランスジェニック (TG) ラットを開発・解析した。アルブミンをプロモーターとしてヒト ATTR V30M をラットに遺伝子導入し、肝臓、脳、眼を含めた諸臓器でヒト ATTR の発現が確認された。質量分析装置を用いた解析から、TG ラットの血中ヒト ATTR はラット TTR と四量体を形成していると考えられた。高齢 TG ラットの消化管にヒト ATTR の沈着が確認されたが、現在までのところアミロイド沈着は認められていない。正常肝を TG ラットに移植すると、血清ヒト ATTR 濃度が検出感度以下に低下した。これらの結果から本 TG ラットは肝移植前後などの ATTR 代謝動態の解析に有用と考えられる。

A. 研究目的

遺伝子変異を生じたトランスサイレチン (TTR) であるアミロイド原性 TTR (ATTR) は家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の原因蛋白質である。ATTR は肝臓で大部分が産生されるため、本疾患に対する治療として、ATTR を産生する肝臓を正常肝と入れ替える肝移植が行われ、一定の治療効果が確認されている。しかし、肝移植後の長期予後や肝移植前後の ATTR 代謝動態は不明な点が多い。また、FAP のモデル動物であるトランスジェニック (TG) マウスは肝移植実験が困難であるが、ラットは肝移植を行うことが可能である。本研究の目的は、肝移植前後などで ATTR 代謝動態を解析するため、ヒト ATTR V30M を導入した TG ラットを開発し、解析することである。

B. 研究方法

アルブミンをプロモーターとしてヒト ATTR V30M を DA ラットに導入した。各組織 (肝臓、脳、眼、肺、腎臓、心臓、精巣、骨格筋) にお

るヒト ATTR の mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR で解析した。

血清、髄液、脳、眼、肝臓で、ヒト ATTR の存在をウサギ抗ヒト TTR 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark) を用い、ウエスタンブロットで確認した。血清ヒト ATTR 濃度をウサギ抗ヒト TTR 抗体 (DAKO) を用い ELISA で測定した。

TG ラットの血中における ATTR のフォームを質量分析装置で解析した。

また各組織でコンゴレッド染色とウサギ抗ヒト TTR 抗体 (DAKO) を用いて免疫組織化学染色を行った。加えて、正常 DA ラットの肝臓を TG ラットに移植し、血清 ATTR 濃度の変化を解析した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は熊本大学動物資源開発研究施設で行い、熊本大学動物実験における倫理基準に基づき動物実験を行った。

C. 研究結果

本TGラットの肝臓、脳、眼、肺、腎臓で、ヒトATTRの発現が確認された。一方、心臓、精巣、骨格筋では発現が確認されなかった。また、ウエスタンブロットにより、ヒトATTRが肝臓、脳、眼、血液、髄液に存在することも確認された。

血清ヒトATTR濃度と肝臓でのヒトATTR mRNAレベルは、オスにおいて高く性差が認められた。オスTGラットの睾丸摘出を行うと、ヒトATTRの血清濃度は減少した。

TGラットの血清を質量分析装置で解析し血中ATTRのフォームを調べたところ、導入したヒトATTRと内在するラットTTRが同時に検出された(図1)。

組織学的な検討で、高齢ラットの消化管、特に直腸でヒトATTRの沈着を認めた(図2)。一方、2歳齢のTGラットでも、コンゴレッド染色陽性像は認められなかった。

また、TGラットに正常ラットの肝臓を移植すると、移植後1日目からヒトATTRの血清濃度が検出感度以下に減少した。

D. 考察

今回新たに開発したTGラットは、アルブミンをプロモーターとしてヒトATTR V30Mを導入したが、ヒトと同様に肝臓、脳、眼でATTRの発現が確認された。肝移植後に、FAPの眼アミロイド沈着が進行する症例が存在するため、肝移植後に眼から産生されるATTRの代謝動態は重要であるが、従来のFAPモデル動物であるTGマウスは眼でATTRの発現が確認されていない。本TGラットは眼で産生されるヒトATTRの代謝動態が解析できる初めてのモデル動物である。

血清ヒトATTR濃度と肝臓でのヒトATTR mRNAレベルは、オスにおいて高く性差が認められた。オスTGラットの睾丸摘出を行うと、ヒトATTRの血清濃度は減少したが、メスのATTRレベルまでは減少しなかった。この結果から、本TGラットでのヒトATTR発現に部分的に男性ホルモンが影響していると考えられた。

質量分析装置で解析した結果、TGラットの血中では、ヒトATTRとラットTTRが混在して四量体を形成していることが予測された。

組織学的な検討で、高齢ラットの消化管、特に直腸でヒトATTRの沈着を認めたが、コンゴレッド染色陽性像は認められなかった。前アミロイド状態のヒトATTRが沈着をきたしていると考えられる。

TGラットに正常ラットの肝臓を移植すると、移植後1日目からヒトATTRの血清濃度が検出感度以下に減少した。本TGラットの血中ヒトATTRは肝臓由来が主体であることが判明した。また、肝移植後のヒトATTR代謝動態が解析可能であることも確認できた。

E. 結論

本TGラットは、生体内におけるATTRの代謝動態を解析できる新たなツールと考えられる。特に、肝移植後の各臓器でのATTR動態解析に有用と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Sun X, Ueda M, Yamashita T, Nakamura M, Bergström, ZEledon-Ramirez ME, Okajima M, Misumi S, Shoji S, Moyomiya Y, and Ando Y: Lipid droplets are present in amyloid deposits in familial amyloidotic polyneuropathy and dialysis related amyloidosis. *Amyloid* 13: 20-23, 2006.
- 2)Rimessi P, Spitali P, Ando Y, Mazzaferro V, Pastorelli F, Tassinari CA, Calzolari E, Salvi F, and Ferlini A: Transthyretin RNA profiling in livers from transplanted patients affected with familial amyloidotic polyneuropathy and identification of a dual transcription start point. *Liver Int* 26:211-220, 2006.
- 3)Sato T, Ando Y, Susuki S, Mikami F, Ikemizu S, Nakamura M, Suhr O, Anraku M, Kai T, Suico MA, Shuto T, Yamagata Y, and Kai F: Chromium (III) ion and thyroxine cooperate to stabilize the transthyretin tetramer and suppress in vitro amyloid fibril formation. *FEBS lett* 580:491-496,2006.
- 4)Zeledon RME, Ando Y, Asonuma K, Nakamura