

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

Health and Labour Science Research Grants, Research on Measures for Intractable Diseases
Research Committee for Epochal Diagnosis and Treatment of Amyloidosis in Japan

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 池田修一

平成19(2007)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. ハンチンチンによる神経細胞内凝集体生成機構の解明 5
金子清俊
東京医科大学医学部神経生理学講座
2. 抗酸化物質は強力に α -シヌクレイン線維 (faS) 形成を抑制し、既存の faS を不安定化する . . . 8
山田正仁
金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学 (神経内科学)
3. 髄膜脳症で発症しステロイドが奏功した脳アミロイドアンギオパチーの 69 歳女性例 11
池田修一
信州大学医学部内科学 (脳神経内科, リウマチ・膠原病内科)
4. 血液透析患者血中 intermediate β_2 -microglobulin 13
—新たな病態解析のツールとしての重要性—
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
5. ApoA-II トランスジェニックマウス (*Apoa2^C* Tg) の開発と老化アミロイドーシス 19
樋口京一
信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野
6. アミロイドタンパク質オリゴマーに関する研究 23
亀谷富由樹
財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所
7. チーターの AA アミロイドーシスの解析 26
樋口京一
信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野
8. チーターのアミロイド症の生前診断法に関する研究 31
宇根有美
麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室
9. 牛由来 AA アミロイドの子豚への投与試験 37
山田学
独) 動物衛生研究所

| | | |
|-----|--|----|
| 10. | 牛由来 AA アミロイド投与による実験的ウサギ AA アミロイドーシス | 39 |
| | 松井高峯 | |
| | 帯広畜産大学獣医学科家畜病理学教室 | |
| 11. | FITC 標識アミロイド線維および FITC 標識合成ペプチドの投与による実験的 AA アミロイドーシスの発症促進効果についての検討 | 43 |
| | 石原得博 | |
| | 山口大学大学院医学系研究科情報解析医学系学域病理形態分野 (旧病理学第一講座) | |
| 12. | 関節リウマチによる反応性アミロイドーシスに対する生物学的製剤の治療効果の検討 | 47 |
| | 中野正明 | |
| | 新潟大学医学部保健学科 | |
| 13. | 本邦における家族性地中海熱 — 全国調査結果 (一次調査) — | 51 |
| | 松田正之 | |
| | 信州大学医学部内科学 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科) | |
| 14. | 胸部アミロイドーシス SPECT 検査用製剤 — ^{99m} Tc-Aprotinin の合成およびイメージング | 53 |
| | 松田博史 | |
| | 埼玉医科大学病院核医学診療科 | |
| 15. | AL アミロイドーシスモデルマウス作成と、BJP 吸着療法の試み | 57 |
| | 満屋裕明 | |
| | 熊本大学附属病院血液内科 | |
| 16. | 原発性全身性 AL アミロイドーシスにおける化学療法の血液学的治療効果予測 | 60 |
| | 松田正之 | |
| | 信州大学医学部内科学 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科) | |
| 17. | 網膜光凝固術による家族性アミロイドポリニューロパチーの眼症状進行抑制の可能性 | 64 |
| | 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 | |
| 18. | 高齢発症 transthyretin-related FAP (Ala97Gly, Val94Gly および Val30Met) の臨床病理学的検討 | 67 |
| | 祖父江 元 | |
| | 名古屋大学神経内科 | |
| 19. | 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者に対するジフルニサルを用いた新たな薬物療法の開発 | 69 |
| | 池田修一 | |
| | 信州大学医学部内科学 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科) | |
| [Ⅲ] | 研究成果の刊行に関する一覧表 | 73 |
| [Ⅳ] | 班構成員名簿 | 81 |

[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な画像診断法の開発、アミロイドーシスの伝播の可能性に関する研究ならびに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^{99m}Tc-Aprotininを用いた scintigram がアミロイドーシス診断に応用可能であることが報告された。病態に関してはAAアミロイドーシスを発症した牛から抽出したアミロイド線維を小ブタ、ウサギへ伝播させる実験が開始された。またヒトで本疾患を発生させる家族性地中海熱のわが国における一次調査結果が報告された。治療薬開発ではFAP患者に対するdiflunisalの安全性と短期治療効果が報告された。

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・教授）

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）

松田正之（信州大学医学部・助教授）

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）

山田正仁（金沢大学大学院医学研究科・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）

亀谷富由樹（東京都精神医学総合研究所・主任研究員）

松井高峯（帯広畜産大学獣医学科・教授）

山田 学（動物衛生研究所・主任研究員）

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な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る。また全身性アミロイドーシスの成因解明と有効な新規

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) RI-imageによるアミロイド沈着臓器の鋭敏な検出法：

^{99m}Tc-aprotinin核種を用いたRI-imageによりアミロイドーシスに特異的な画像の描出を検討した。（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：対象患者に 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：本疾患の伝播の可能性について、高齢牛・飼育チーターを対象として実験動物系の作成に取り組む（池田、宇根、樋口、松井、山田学）。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、松田正之）。

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 (池田)。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)

- 4) 脳内におけるアミロイド類似物質の産生代謝機序の解明を行う。(金子、亀谷、山田正仁)

(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。認知症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

^{99m}Tc-aprotinin の合成、保存条件が検討され、安全性が確認された。このため健常ボランティアに注射して、生理的動態を観察した結果、本核種は非特異的集積が極めて軽度であることが判明した。

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全身性 AA アミロイドーシスであり、国内で飼育されているチーターの本疾患罹患率は 95% である。またその成因として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 となると考えられる。こうした疫学データを基に、ヒトを含む大型哺乳動物での AA アミロイドーシスの

伝播の可能性について、今年度は本症罹患牛の腎臓から抽出したアミロイド線維を飛節潰瘍を持つウサギに投与したところ、高率に本アミロイドーシスを発症させることが出来た。またヒトにおいて本疾患の原因となる家族性地中海熱 (FMF) について、本邦で初めて疫学アンケートをしたところ、59 名の患者の一次調査情報が得られた。

III. アミロイドーシスの治療法

- 1) AL アミロイドーシス：BJP の選択的吸着カラムの臨床応用が開始された。形質細胞異常症に対する化学療法として vincristine, doxorubicin, dexamethazone の三剤併用療法 (VAD 療法)、メルファラン大量静注 + 自己末梢血幹細胞移植 (Auto-PBSCT) が行われている。これら化学療法の治療評価として、血清中アミロイド原性 FLC 濃度と κ/λ 比が検討された。前者が 200mg/L 以下になることが治療効果と相関していた。
- 2) AA アミロイドーシス：関節リウマチに併発した AA アミロイドーシス患者 9 名に Infliximab、Etanercept 等の生物学的製剤を導入し、その臨床経過が報告された。
- 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。またこの TTR 四量体分子を安定化させることで、FAP のアミロイド産生を抑えることができると推測される。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。また本薬剤を FAP 患者 4 名に最長 2 年に渡って投与されたが、有害事象がなかった。また網膜光凝固が FAP の眼病変の伸展抑制効果があることが報告された。
- 4) 脳アミロイドアンギオパチー (CAA) の治療：CAA に起因する脳出血の再発予防にステロイド大量投与が有効であることが示された。

IV. 脳内におけるアミロイド類似物質の産生代謝機序

A β オリゴマーの不安定に関与する因子として荷電状態の変化が挙げられる。また抗酸化物質は α -synuclein の線維形成を抑制し、huntintin の

凝集体形成過程では 14-3-3 が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

D. 考察

アミロイド沈着臓器の特異的検出法として PET 検査が研究されているが、scintigramの方がより簡便である。^{99m}Tc-aprotinin 核種とアミロイド線維との結合性は既に欧米で証明されており、本邦での導入が急がれる。

AA アミロイドーシスが伝播可能なことはマウスでは実証済みであるが、大型動物では従来困難であった。今回、ウサギにおいて本実験が可能となったことは、ヒトでの病因的意義を解明する上で重要な進歩と考えられる。また FMF は地中海沿岸の民族で多発しており、本邦ではその疾患概念すらよく知られていない。近年、遺伝子診断が可能となり、コルヒチンで AA アミロイドーシスへの伸展も防げる。今後、本邦 FMF 患者の遺伝子異常と臨床像の対比の検索が必要である。

AL アミロイドーシス患者に対する強力な化学療法の有効性を実証するためには、治療効果の指標を見出す必要がある。血清中 FLC 濃度の定量化は本病型のアミロイド前駆蛋白を直接計っており、化学療法の有効性を鋭敏に反映すると考えられる。また VAD 療法単独、VAD とそれに続くメルファラン大量静注＋自己末梢血幹細胞移植の両治療法の比較において後者の治療を受けた患者において有意に予後が改善されることが示された意義は大きい。

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 diflunisal による薬物療法が臨床実施に移された。今後多数例での臨床データの集積と分析が

期待される。

脳内におけるアミロイド関連物質の生成・代謝については不明な点が多いが、A β 、 α -synuclein、huntintin の線維形成過程とその阻止物質の研究が伸展しだしたことは、今後の脳アミロイドーシス研究発展につながる。

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 AL、AA、FAP 等の全身性アミロイドーシスの各分野で新知見が見出された。特にアミロイド前駆蛋白の凝集阻止を目指す薬物の開発は今後の応用範囲が広いと考えられる。

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

ハンチンチンによる神経細胞内凝集体生成機構の解明

分担研究者 金子清俊 東京医科大学医学部神経生理学

共同研究者 八谷如美*、小見和也**

*東京医科大学医学部神経生理学、**東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 ハンチントン舞踏病の原因蛋白質である polyQ 伸張型ハンチンチンによる細胞内封入体の形成機構について検討した。PolyQ 伸張型ハンチンチンを遺伝子導入した cell line においては、N-末端側の 17 アミノ酸部分が凝集体形成に必須であることが明らかとなった。この細胞内封入体を回収し、14-3-3 蛋白質のそれぞれの isoform 毎に解析した結果、14-3-3 beta, gamma eta, 及び zeta の共存が認められた。

A. 研究目的

ハンチントン舞踏病の原因蛋白質である polyQ 伸張型ハンチンチンによる細胞内封入体の形成機構について検討し、最終的に蛋白質凝集によるコンフォメーション病の発症機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

1. 様々な deletion mutant を含む、蛍光ラベルした polyQ 伸張型ハンチンチンを神経芽細胞由来の cell line に遺伝子導入し、細胞内封入体の形成過程を経時的に観察する。
2. 封入体に含まれるハンチンチン以外の候補蛋白質として、14-3-3 蛋白質とその isoform に着目し、それぞれについて生化学的解析を行う。
3. siRNA により 14-3-3 のそれぞれの isoform をノックダウンした後に、ハンチンチン凝集体形成の変化について検討する。

(倫理面への配慮)

本実験においては、市販されている培養細胞のみを用いたため、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

PolyQ 伸張型ハンチンチンを遺伝子導入した cell line においては、先行研究のごとく exon 1 部

分のみを有する組み換え体が最も凝集体形成能が高かった。さらに、exon 1 の中でも N-末端側の 17 アミノ酸部分が凝集体形成に必須であることが明らかとなった。この細胞内封入体を回収し、14-3-3 蛋白質のそれぞれの isoform 毎に解析した結果、14-3-3 beta, gamma eta, 及び zeta の共存が認められた。これらの 14-3-3 isoform をそれぞれ siRNA にてノックダウンした結果、14-3-3 eta 及び zeta のノックダウンにより、細胞内封入体形成の著明な低下が観察された。

D. 考察

従来、PolyQ 伸張型ハンチンチンによる細胞内封入体形成には、異常伸張した polyQ が重要な因子であると考えられてきたが、それ以外の因子の関与は同定されていなかった。今回の我々の研究により、少なくとも 14-3-3 eta 及び zeta が必須であることが明らかとなった。これらの分子は、ハンチンチンによる凝集体形成を阻止するための新しい標的となり得る可能性がある。

E. 結論

1. ハンチンチンの N-末端側 17 アミノ酸が凝集体形成に必須であることが明らかとなった。
2. 従来知られていた polyQ の異常伸張以外に、14-3-3 の特定の isoform の存在が、polyQ 伸張型ハンチンチンを含む細胞内封入体形成

に必須であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*. 13:1-5, 2006.
- 2) Furuya K, Kawahara N, Yamakawa Y, Kishida H, Hachiya NS, Nishijima M, Kirino T, Kaneko K: Intracerebroventricular delivery of dominant negative prion protein in a mouse model of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dura graft transplantation. *Neurosci Lett*. 402:222-226, 2006
- 3) Ohnishi Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H: Assessment of allele-specific gene silencing by
- 9) 八谷如美, 金子清俊: 正常型プリオンたんぱく質の正体は? - その推定される機能 -. *現代化学*. 422:26-31, 2006.
- 10) 八谷如美, 金子清俊: プリオンたんぱく質は正常人では何をしているのか? *科学*, 76:1138-1142, 2006.
- 11) 八谷如美, 金子清俊: 正常Prion蛋白の機能と異常化(感染)のメカニズム. *Brain Medical*, 印刷中

2. 学会発表

- 1) Imagawa M, Kozuka Y, Omi K, Watanabe K, Hachiya NS, Kaneko K: Ultrastructural analysis of the aberrant endoplasmic reticulum network in Huntington protein-depleted neuro2a cells. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June 18 - 23, 2006
- 2) Iwanami N, Sankawa U, Yamakawa Y, Nishijima M, Kaneko K, Saido TC: Chlorophyll derivatives inhibit the conversion of prion protein. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry

RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles. *J RNAi Gene silencing*. 2:154-160, 2006

- 4) Hachiya NS, Imagawa M, Kaneko K: The possible role of protein X, a putative auxiliary factor in pathological prion replication, in regulating a physiological endoproteolytic cleavage of cellular prion protein. *Med Hypotheses*, in press
- 5) Hachiya NS, Kaneko K: Investigation of laser microdissected inclusion bodies. *Methods in Cell Biology* vol 82: Laser manipulation of cells and tissues (Berns M and Greulich KO ed.), Academic Press (New York), in press
- 6) 八谷如美, 金子清俊: プリオン蛋白質異常化の分子機構. *化学療法の領域*. 22:63-68, 2006.
- 7) 金子清俊: 牛海綿状脳症と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. *TMDC MATE*. 242:12-13, 2006.
- 8) 金子清俊: プリオン病 - 牛海綿状脳症 (BSE) と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 -. *BRAIN*. 83:4-5, 2006.
- and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June 18 - 23, 2006
- 3) Hachiya NS, Watanabe K, Imagawa M, Kaneko K: More than a thousand-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p/Dld2p. 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Prague, June 24-28, 2006
- 4) Hachiya NS, Kaneko K: Intracellular Trafficking of Fluorescent Cellular Prion Protein in Differentiated Cells: Selective but Constant Reduction of Anterograde Velocity in the Neurites. 46th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Diego, Dec 9-14, 2006
- 5) 今川美登里, 八谷如美, 小見和也, 小塚芳道, 金子清俊. 培養細胞における正常型プリオン蛋白質の挙動 - GFP 融合蛋白質安定発現株での輸送速度及び siRNA による発現阻害効果の検討について -. 2006 年プリオン研究会. 盛岡, 9.2-3, 2006

- 6) 池袋 一典, 小笠原 大輔, 金子 清俊, 早出 広司. マウスプリオンアプタマーの探索とそのセンシングへの応用 (Selection of the aptamer for prion and its application to sensor system). 日本化学会バイオテクノロジー部会. 京都, 9.28-30, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
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

**抗酸化物質は強力に α -シヌクレイン線維 ($f\alpha S$) 形成を抑制し、
 既存の $f\alpha S$ を不安定化する**

分担研究者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科)

共同研究者 小野賢二郎

金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科)

研究要旨 脳内の α -シヌクレイン(αS)凝集がレビー小体病(LBD)や多系統萎縮症(MSA)の病態形成上、重要な役割を果たしていると考えられている。今回、我々は蛍光色素チオフラビン S(ThS)法、電子顕微鏡を主に用いて α -シヌクレイン線維($f\alpha S$)形成・不安定化過程に及ぼすさまざまな抗酸化物質の影響を解析した。その結果、ドコサヘキサエン酸とエイコサペンタエン酸以外のすべての化合物が濃度依存性に $f\alpha S$ 形成を抑制するばかりでなく、既存の $f\alpha S$ を不安定化した。これらの分子はアルツハイマー病だけでなく、LBD や MSA の予防および治療薬開発に向けて有力な基本分子になる可能性がある。

A. 研究目的

脳内の α -シヌクレイン(αS)凝集が LBD や MSA の病態形成上、重要な役割を果たしていると考えられている。これまで我々は、さまざまな抗酸化物質がアルツハイマー病 β -アミロイド線維($fA\beta$)形成を抑制するばかりでなく、既存の $fA\beta$ を不安定化することを明らかにしてきた。今回、我々はさまざまな抗酸化物質が α -シヌクレイン線維($f\alpha S$)形成・不安定化過程に及ぼす影響を解析した。

ドコサヘキサエン酸とエイコサペンタエン酸以外のすべての化合物が濃度依存性に $f\alpha S$ 形成を抑制するばかりでなく(図1)、既存の $f\alpha S$ を不安定化した(図2)。電顕観察においても、反応時間に依存した $f\alpha S$ の線維形成抑制や既存線維の不安定化を確認した。作用の強弱の関係はタンニン酸 = NDGA = Cur = RA = ミリセチン > カンフェロール = フェルラ酸 > カテキン = エピカテキン > リファンピシン = テトラサイクリンであった。

B. 研究方法

ThS を用いた分光蛍光定量法、及びネガティブ染色後の電子顕微鏡観察等を主に用いてノルジヒドログアイアレチン酸(NDGA)、クルクミン(Cur)、ローズマリー酸(RA)、フェルラ酸、ワイン関連ポリフェノール類(タンニン酸、ミリセチン、カンフェロール、カテキン、エピカテキン)、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、リファンピシン、テトラサイクリンが、 $f\alpha S$ 形成・不安定化過程に及ぼす影響を解析した。

D. 考察

今回の実験で我々は、ドコサヘキサエン酸とエイコサペンタエン酸以外の抗酸化物質が濃度依存性に $f\alpha S$ 形成を抑制するばかりでなく、既存の $f\alpha S$ を不安定化することを確認した。以前に我々はこれらの物質が $fA\beta$ 形成を抑制するばかりでなく、既存の $fA\beta$ を不安定化することを明らかにしてきたが、 $f\alpha S$ に対する効果の強弱関係と $fA\beta$ に対する効果の強弱関係は大変相関していることが分かった。よって、 $A\beta$ 凝集と αS 凝集には共通の機序が働いている可能性がある。

(倫理面への配慮)

検体等を用いておらず、問題なしと判断した。

機序に関してこれまでの報告と合わせ、 αS あるいは $f\alpha S$ と結合し線維形成の阻害作用、あるいは線維不安定化作用を発揮しており、化合物の三次元構造や水酸基の数が αS あるいは $f\alpha S$ への結合

C. 研究結果

性に影響を与えていると推測される。

E. 結論

これらの分子はアルツハイマー病だけでなく、LBD や MSA の予防および治療薬開発に向けて有力な基本分子になる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ono K, Yamada M. Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro. *J Neurochem* 97: 105-115, 2006.

2) Ono K, Noguchi-Shinohara M, Yoshita M, Naiki H, Yamada M. Cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies patients enhances alpha-synuclein fibril formation in vitro. *Exp Neurol*, in press.

3) Ono K, Yamada M. Vitamin A potently destabilizes preformed alpha-synuclein fibrils in vitro: implications for Lewy body diseases.

Neurobiol Dis, in press.

4) Ono K, Hirohata M, Yamada M. Anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing activities of anti-Parkinsonian agents for alpha-synuclein fibrils in vitro. *J Neurosci Res*, in press.

2. 学会発表

1) Ono K, Yamada M. Potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects of antioxidant compounds for alpha-synuclein. The 4th International Workshop on DLB and PD. Yokohama, November 2-4, 2006.

2) 小野賢二郎、山田正仁: 抗酸化物質の強力な α シヌクレイン線維不安定化作用。第 6 回パーキンソン病研究会。舞浜。2006 年 8 月 26 日。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

レビー小体病治療薬およびレビー小体病予防薬。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図1. NDGA (A)、Cur (B)、RA (C) の α S 形成抑制作用

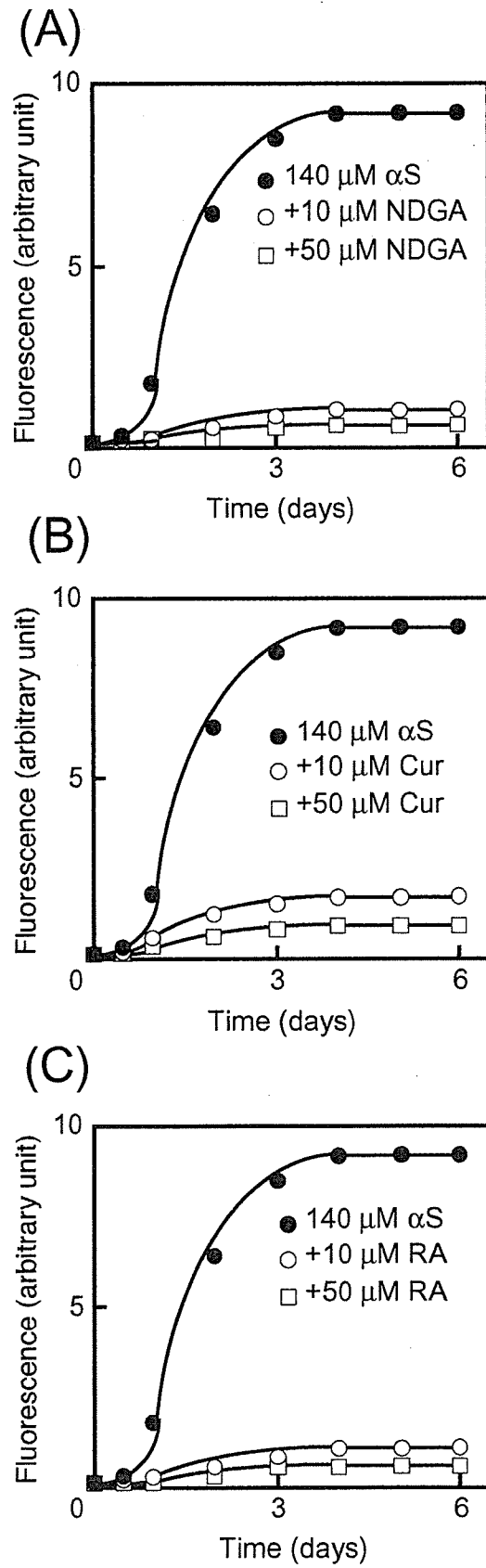
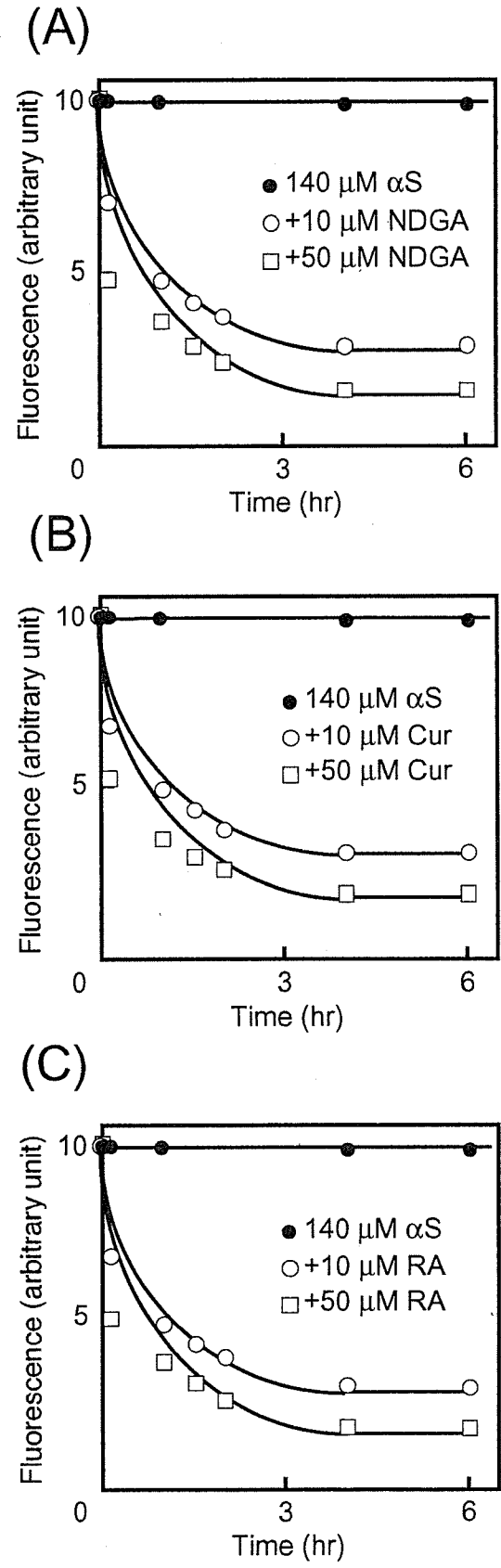


図2. NDGA (A)、Cur (B)、RA (C) の既存の α S に対する不安定化作用



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

髄膜脳症で発症しステロイドが奏効した 脳アミロイドアンギオパチーの 69 歳女性例

分担研究者 池田修一 信州大学医学部内科学 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)

共同研究者 町田香津子、下島吉雄、内藤康介、五野貴久

信州大学医学部内科学 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)

研究要旨

脳アミロイドアンギオパチーは脳血管壁へのアミロイド沈着症であり、孤発性あるいは高齢者ではアミロイド蛋白の多くはアミロイドβ (Aβ) 蛋白である。脳アミロイドアンギオパチーは非高血圧性脳出血や白質脳症の原因の疾患のひとつであり、脳出血の特徴としては脳葉型であり、再発、多発する傾向にある。また、血管炎を伴う白質脳症がみられることもある。治療について、根本的治療はないとされているが副腎皮質ステロイドホルモンの治療が急性期治療として奏効した症例について画像を併せ検討した。

A. 研究目的

脳アミロイドアンギオパチーは非高血圧性脳出血や白質脳症等をきたす疾患である。副腎皮質ステロイドホルモン治療が有効であった症例について病態と機序を検討した。

B. 研究方法

対象は当科で経験した 2 症例。各症例とも高血圧歴はなく、脳卒中の家族歴なし。

[症例 1] 69 歳女性、右片麻痺と運動性失語で発症し、意識障害も出現。頭部 MRI では左大脳髄膜・脳溝・深部白質の信号異常を認めた。水頭症を合併し、脳室腹腔内シャント術を施行。施行後に嘔吐、意識障害が出現し、頭部 MRI で右大脳白質に広範囲の高信号性変化を認めた。

[症例 2] 65 歳女性、23 日間に 4 回の皮質下脳出血を発症。頭痛、物忘れ、見当識障害が認められ、右不全片麻痺、昏睡に至った。血沈上昇や自己抗体陽性所見あり。

2 症例とも脳生検前から副腎皮質ステロイドホルモン治療を開始した。

(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。認知症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

各症例も脳生検にて血管壁に Aβ 型蛋白沈着が認められ、脳アミロイドアンギオパチーと診断。副腎皮質ステロイドホルモン点滴療法と経口維持療法を施行。症例 1 は、意識障害は改善し、片麻痺も軽快し独歩可能となったが、水頭症に対しての脳室腹腔内シャント術後に反対側 (右側) の大脳白質浮腫が増悪し、意識障害も出現し臥床状態となった。濃グリセリンは全く効果なく、低用量の副腎皮質ステロイドホルモン治療でも効果がなく、高用量の投与を施行。自発性低下、歩行不能となったが、車椅子乗車や経口摂取は可能となった。症例 2 では意識レベルは改善し、右片麻痺も改善傾向で、歩行器使用で歩行可能となった。副腎皮質ステロイドホルモンの開始後は脳出血の再発はない。また、副腎皮質ステロイドホルモ

ン開始前後の髄液 A β 蛋白の測定では使用前は高値を示していたが、使用後は基準値内に低下した。

D. 考察

症例 1 では発症当初から頭部 MRI でくも膜下腔内の信号変化があり、髄液所見ではキサントクロミーが認められ、くも膜下出血を起していると考えられた。アミロイド沈着は脳皮質血管だけでなく、髄膜血管にも沈着し、これが破綻し、くも膜下出血がおこる。髄液所見では著明なキサントクロミー・総蛋白上昇を認めたことからアミロイドアンギオパチーを基礎にくも膜下腔に微小出血を繰り返し、meningisms から水頭症に至ったと考えられる。また、頭部 MRI にて白質脳症が認められたが、副腎皮質ステロイドホルモンへの反応性があったことから、典型的な病理所見は得られなかったが血管炎の合併の可能性が考えられた。脳アミロイドアンギオパチーにおいて血管壁の破綻を導く因子として指摘されているのが頭部外傷、脳外科手術、抗血小板・抗凝固剤等があるが、症例 1 では、発症時は転倒の際の側頭部打撲、再増悪時は脳質腹腔シャント術に伴う脳組織の損傷と急激な脳圧変化が誘引になったと考えられる。副腎皮質ステロイドホルモンの作用は脳浮腫を全般的に軽減すること、脳内 A β の産生抑制（高用量～中等量では神経免疫患者での髄液

A β 減少の報告あり)、合併している血管炎を抑制すると考えられる。

E. 結論

脳アミロイドアンギオパチーは高齢者のみならず、60 歳代でも発症する疾患であり、副腎皮質ステロイドホルモンは急性期治療として有用である。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1) 町田香津子：髄膜脳症で発症しステロイドが奏効した脳アミロイドアンギオパチーの 69 歳女性例。日本神経学会関東地方会、東京都、2006 年 11 月 25 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

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定期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

血液透析患者血中 intermediate β_2 -microglobulin —新たな病態解析のツールとしての重要性—

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 本宮善恢*、宇治義則**

*医療法人翠悠会診療所、**熊本大学大学院医学薬学研究部病態情報解析学

研究要旨 健常者、保存期腎不全患者、血液透析患者の血中 β_2 ミクログロブリン(β_2 -m)のアミロイド中間体をキャピラリー電気泳動法を用いて検出、検量した。

中間体(intermediate β_2 -m, I- β_2 m)は健常者を含めた全例に検出され、総 β_2 -m 血中濃度のほぼ 10%に相当する濃度であり、総 β_2 -m 濃度と強い相関 ($r = 0.534$, $P = 0.0002$)が確認された。

I- β_2 m の透析による除去は天然構造体(native) β_2 -m (N- β_2 m) に比べ 1/3 程度と著しく悪く、かつ透析中は両者の平衡は I- β_2 m 側へシフトしていることが確認された。さらに透析終了後 1 時間での組織から血管内へのリバウンドの解析では I- β_2 m に選択的な間質組織におけるエントラッピングを強く示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

これまでアミロイド前駆蛋白 β_2 ミクログロブリン (β_2 -m)の *in vitro* でのフォールディングスタディで、ネイティブ分子ならびにアミロイド蛋白双方に共通した中間体として一部アンフォールドした構造体が重要であることが確認されている (Chiti F, 2001)。透析アミロイドーシスはその中間体が臨床試料(組織)で唯一検証出来ているアミロイドーシスである (Bellotti V, 1998, Motomiya Y, 2005)。またその中間体がN末端のみならずC末端がアンフォールドしていることも確認されている (Motomiya Y, 2005)。

数年前よりこの β_2 -m の中間体をキャピラリー電気泳動法 (Capillary Electrophoresis, C.E)により直接視覚的に同定できることが報告されたが、まだ臨床試料での確認は報告されていない。今回同意を得た健常者、保存期腎不全患者、血液透析患者の血清を用いて β_2 -m の C.E 解析を行なった。

B. 研究方法

同意を得た健常者 (N=5, 49 ± 10 歳), 保存期腎不全患者 (N=5, 77 ± 8 歳)および血液透析患者 (N=37, 54 ± 9 歳、透析期間 231 ± 72 ヶ月)の血清を遠心濾過フィルター、セントリザルト(Sartorius AG)

(カットオフ 20,000 ダルトン)、を通した上で C.E システム (P/ACE 2100, Beckman Coulter Instrument Inc.)を用いて図 1 に示す泳動条件で C.E を行なった。透析患者における採血は、a)透析開始時 b)透析終了時、および c)透析終了後 1 時間とし、透析による除去(透析効率)の検討には a)および b)、組織から血管内へのリバウンドの検討には b)、c)を用いた。(倫理面への配慮)

使用した患者および健常者の血清に関しては、医療法人翠悠会診療所でインフォームド・コンセントが得られたものを用いた。

C. 研究結果

1. β_2 m 中間体 (I- β_2 m) は健常者を含め普遍的に体液中に存在し、天然構造体 (N- β_2 m) とおよそ 1:9 の動的平衡にある (図 1)。
2. I- β_2 m 濃度は総 β_2 m 濃度に強く依存している (図 2)。
3. I- β_2 m の透析効率は著しく悪く、on-line HDF においても除去率は 25%程度である。
4. 透析中より N- β_2 m \rightarrow I- β_2 m へのシフトが進んでいる (図 3)。
5. I- β_2 m にはリバウンド現象は見られず透析後間

質組織でエンタラッピングされると考えられる(図4)。

D. 考察

C.E で同定される I- β_2m に関しては(1)コンゴレッド、アミノナフタリンスルホン酸(ANS)、スラミンおよびヘパリンなどの SO_3^- 基含有物質との半ば選択的な結合性、(2)アセトニトリル、トリフルオロエタノールの干渉(Heegaard NHH, 2001)、(3) Cu^{++} による干渉、(4)CD(円二色性)スペクトラムの変化に符号(Heegaard NHH, 2001)、(5) $\Delta N6\beta_2m$ 、 $\Delta 58K\beta_2m$ での検証で、アミロイドジェニックなコンフォーマーのアンサンプルであることが確認されており、さらに I- β_2m はシード存在下での凝集を中性条件下でも起こすことも確認されている(Chiti F, 2001)。

今回の研究で I- β_2m が常態的に存在し、その濃度は総 β_2m に依存することを明らかに出来たことは、現行の β_2m 除去効率化を図る透析指針への論理的根拠と妥当性を与えたものと評価できる。またリバウンド現象に関する解析で得られた I- β_2m 間質組織への半ば選択的トラッピングの可能性はアミロイドーシス発症機序解明につながる新知見である。

E. 結論

透析アミロイドーシスの前駆蛋白 β_2m は体液中では普遍的にアミロイドジェニックな中間構造体と共存しており、この中間体は間質の含硫ムコ多糖分子と高い親和性を有する為組織蓄積性が高い。また中

間体 β_2m は分子サイズが大きく、その中間体の透析性は著しく低いと常にネイティブ β_2m と動的平衡にある為、現行の透析効率のより向上化を図ることが理にかなった治療戦略である。

透析アミロイドーシスにおいて我々はアミロイド組織にアミロイド中間体が存在することを既に報告しているが、今回未病の状態で既に中間体が常に存在することを明らかにした。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Motomiya Y, Ando Y, Haraoka K, Sun X, Morita H, Amano I, Uchimura T, Maruyama I. Studies on unfolded β_2 -microglobulin at C-terminal in dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int* 67(1): 314-320, 2005

2. 学会発表

1) β_2 -microglobulin の新たな走査線。本宮善恢、森田弘之、天野泉、安東由喜雄。第52回日本臨床検査医学会総会・第45回日本臨床化学会年会連合大会 2005年 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

分析条件

キャピラリー: 50 μm (I.D.) X 57 cm
(有効波長50 cm)

測定波長: 200 nm

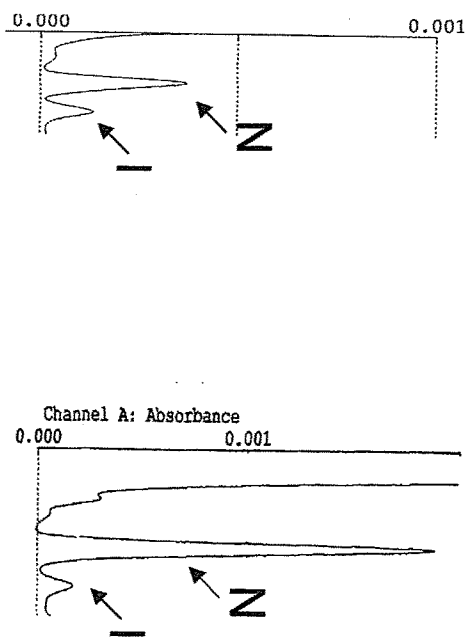
温度: 24°C

注入: 5 psi、10s (12.5 nL)

印加電圧: 15 kV (80 - 90 μA)

緩衝液: 100 mM リン酸緩衝液
(pH 7.3)

Serum $\beta_2\text{m}$



| | Control | HD |
|----------------------|---------------|----------------|
| $\beta_2\text{m}$ | 1.4 ± 0.2 | 28.2 ± 6.9 |
| I- $\beta_2\text{m}$ | 0.2 ± 0.1 | 2.5 ± 1.5 |
| N- $\beta_2\text{m}$ | 1.2 ± 0.1 | 25.7 ± 6.5 |

(mg/L)

