

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田修一

平成20(2008)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. 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	11
金子清俊 東京医科大学医学部神経生理学講座	
2. NSAIDsや抗酸化化合物は α -シヌクレイン蛋白凝集抑制作用および不安定化作用を有する	13
山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科)	
3. アミロイドタンパク質オリゴマーに関する研究: コラーゲンの作用について	15
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	
4. 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	19
中野正明 新潟大学医学部保健学科	
5. 本邦における家族性地中海熱患者の遺伝子異常と臨床像の検討	23
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	
6. ALアミロイドーシスの凝固異常解析およびBJP吸着療法の試み	26
満屋裕明 熊本大学医学部附属病院血液内科	
7. ELISA法を用いた血清中 free light chain の新規測定法の検討	28
松田正之 信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科	
8. Tc-99m アプロチニンの臨床利用の報告	32
—心集積を認めた家族性アミロイドポリニューロパチーの1例— 松田博史 埼玉医科大学国際医療センター核医学科	
9. 新たな手法を用いたハイスループットな異型トランスサイレチンの分析	35
—検査室で可能な迅速かつ確実なFAP診断法の確立— 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	

10.	家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の病態解析と肝移植によらない新たな治療法の開発 (3年間のまとめ)	39
	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	
11.	Transthyretin-related FAP : 若年発症例と高齢発症例の比較からみたアミロイド沈着の病態解析	45
	祖父江 元 名古屋大学神経内科	
12.	老人性全身性アミロイドーシスの臨床像の多様性について	48
	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	
13.	高齢牛に沈着した AA アミロイド線維のアミロイドーシス誘発活性	51
	樋口京一 信州大学医学系研究科加齢生物学分野	
14.	チーター (Acinonyx jubatus) の AA アミロイド症に関する研究	55
	宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室	
15.	牛アミロイド症の病理発生の免疫組織化学的解析と野外診断法の検討	69
	山田 学 (独) 動物衛生研究所	
16.	ウシ由来 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	71
	松井高峯 帯広畜産大学獣医学科病態獣医学	
17.	実験的マウス AA アミロイドーシスの発症における外来性アミロイド線維の役割および AA アミロイドーシスの治療	75
	石原得博 山口大学大学院医学系研究科構造解析病態学講座	
18.	マウス老化アミロイドーシスでの骨格筋へのアミロイド沈着	79
	樋口京一 信州大学医学系研究科加齢生物学分野	
[III]	研究成果の刊行に関する一覧表	83
[IV]	研究報告会、ワークショッププログラム	93
[V]	班構成員名簿	115

[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 — 信州大学医学部 教授

研究要旨 全身性アミロイドーシスの診断と治療法を画期的に前進させるため、以下の研究を行った。アミロイドにより特異的に結合する核種として^{99m}Tc-aprotininを生成してアミロイドーシスのRI診断法を検討した。アミロイドーシスの伝播に関する研究の一環としてAAアミロイドーシスに罹患した高齢牛の腎臓からアミロイド細線維を分離・精製して、複数の炎症刺激を加えたマウスまたは飛節潰瘍を有するウサギに投与したところ、両動物にAAアミロイドーシスが誘発された。また飼育チーターが高率に本疾患により死亡する機序として、罹患動物の糞便中へ排泄されるAAアミロイド細線維を他の個体が摂取する結果、その個体にAAアミロイドーシスが発生していることが考えられた。アミロイドーシスの治療に関してはALにおいてはBJP吸着療法の有用性、慢性関節リウマチに併発したAAではTNF- α を標的とした生物学的製剤が有効な患者では胃粘膜生検組織上のアミロイドが消退していくことが示された。FAP患者の若年発症群と高齢発症群の病態の差違が示された。また眼病変の進行抑制に網膜の光凝固が有効なことが報告された。わが国で認知度の低いアミロイドーシス関連疾患として、家族性地中海熱と老人性全身性アミロイドーシスの検索を行った。アンケート調査で全国から得られた家族性地中海熱疑い例は60名であり、年齢分布では30歳以上の成人例が相対的に高いことが本邦の特徴であった。また老人性全身性アミロイドーシスが60歳代から発症していること、心不全症状に加えて手根管症候群、脳塞栓などの症状で発病する例があることがわかった。

分担研究者：

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 (山口大学医学系研究科・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系研究科・教授)

松田正之 (信州大学医学部・准教授)

祖父江 元 (名古屋大学院医学系研究科・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系研究科・教授)

宇根有美 (麻布大学獣医学部・准教授)

松田博史 (埼玉医科大学国際医療センター・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)

山田 学 (動物衛生研究所・主任研究員)

松井高峯 (帯広畜産大学獣医学科・教授)

A. 研究目的

アミロイド沈着に特異的な画像診断法と、全身性アミロイドーシスに有効な薬物療法を確立することでアミロイドーシス患者の早期診断と治癒率が向上

する。

I. アミロイドーシスの画像診断法開発

アミロイド沈着に選択的に結合する核種を開発して、アミロイド沈着で障害された臓器を鮮明に描出する。

II. アミロイドーシスの伝播に関する研究

ヒトの健康に影響する可能性があるのは食肉に饗される動物のAAアミロイドーシスである。この病態を解明し、高等動物において本アミロイドーシスの伝播実験モデルを作成する。また飼育チーターに高率に発生しているAAアミロイドーシスについて、その伝播性を検索する。

III. アミロイドーシスの画期的治療法開発

1) ALアミロイドーシス：原因となる形質細胞異常症に対する有効な化学療法とその治療評価法を確立する。

2) AAアミロイドーシス：関節リウマチ患者の致命的合併症である。TNF- α 、IL-6等を標的とする抗サイトカイン療法を行い、本アミロイドーシスに対する根治療法を確立する。

3) FAP:熊本県と長野県にFAP家系の大集積地があり、

また弧発の 60 数家系が国内に存在する。FAP の病態解明と肝移植以外の治療法の開発は急務である。

- 4) 脳アミロイドならびにその関連蛋白の凝集機序の解明とこうした蛋白の沈着疾患に対する有効な治療法開発を目指す。

IV. 国内で認知度の低いアミロイドーシス関連疾患の検索

家族性地中海熱は遺伝性周期熱に属する疾患であり、その合併症として AA アミロイドーシスが高率に発生する。本邦では FMF は稀と考えられており、その実態は不明である。また老人性全身性アミロイドーシスも高齢者人口が急増する中で心疾患の基礎疾患として重要である。しかし我が国での両疾患の認知度は非常に低いので、これら二疾患の国内での実態を明らかにする。

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：

新規核種である ^{99m}Tc -aprotinin 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)。

II. アミロイドーシスの伝播機序の解明

- 1) 高齢牛における AA アミロイドーシスの実態調査と本アミロイドーシスの伝播に関する研究：公営屠殺場で外見上は健常として処理される 4 歳以上の高齢牛から腎臓と大腿筋を採取して、両組織におけるアミロイド沈着の頻度を検索した。またアミロイド沈着陽性の組織からアミロイド細線維を分離・精製してマウスへ $100\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$ の量で注射して、アミロイドーシスの発症を検索した。(池田、樋口)
- 2) AA アミロイドーシス罹患牛の腎臓から抽出したアミロイド細線維を種々な条件で炎症刺激を加えたウサギへ 20mg/ml の量で投与して、アミロイドーシスの発症を検索した。(松井) また同アミロイド細線維を子ブタへ投与して宿主生体反応を検索した。(山田学)
- 3) 飼育チーターの糞便中のアミロイド関連物質を検索し、またその物質のアミロイドーシス誘発性を検索する。(宇根、樋口)

III. 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：形質細胞異常症に対する大量化学療法の治療評価法として血清中の free light chain 濃度の測定法を、また新たな治療法として BJP 吸着療法を検討した。(池田、松田正之、満屋、山田俊行)。
- 2) AA アミロイドーシス：関節リウマチ(RA)に併発した本症患者に生物学的製剤である Infiximab、Etanercept を投与して、その効果を血液化学所見、胃粘膜生検上のアミロイド沈着量の変化で検討した。(中野) また漢方薬“雷公藤”の主成分である triptolide が実験的マウス AA アミロイドーシスを抑制しうるかどうかを検討した。(石原)
- 3) FAP：本症患者の各臓器におけるアミロイド沈着病態を集積地出身の若年発症患者と弧発家系出身の高齢発症患者で比較検討した。(池田、祖父江) ま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 rat 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)
- 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。(池田、金子、亀谷、山田正仁)
- #### IV. 国内で認知度の低いアミロイドーシス関連疾患の検索

- 1) 家族性地中海熱(FMF)：全国の小児科・内科を有する病院を対象に FMF に関するアンケート調査を行い、その内容をまとめた。(池田、松田正之)
- 2) 老人性全身性アミロイドーシス(SSA)：過去 3 年間に班員の所属する施設で SSA と確定診断された患者の臨床像をまとめた。(安東、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。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 RI 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。今年度は全身性アミロイドーシスが疑われる 6 名の患者に使用して、2 名で心臓に特異的集積が見られ、最終的に上記疾患の確定診断がなされた。

II. アミロイドーシスの伝播に関する研究

1) 高齢牛における AA アミロイドーシスの実態調査と本アミロイドーシスの伝播に関する研究：

長野県内で屠殺された 4 歳以上の高齢ホルスタイン牛 250 頭を検索して、8 頭の腎臓にアミロイド沈着が見られた。また 8 頭中 1 頭では筋肉にも微量のアミロイド沈着が検出された。2 頭の腎臓から抽出したアミロイド細線維を炎症刺激が加えられた 7 匹のマウスへ注射した結果、6 匹で AA アミロイドーシスの発症が確認された。同様な方法がとられた筋肉由来のアミロイド細線維では 7 匹中 1 匹のマウスで軽度のアミロイド沈着が観察された。

AA アミロイドーシス罹患牛の腎臓から抽出したアミロイド細線維を種々な炎症刺激が加えられたウサギ 341 羽に投与したところ、28 羽に本アミロイドーシスが誘発された。特に飛節潰瘍に罹患するウサギに 5 回の炎症刺激を加えた群では 20mg/ml のアミロイド細線維の静脈投与 (19 羽) と経口投与 (16 羽) のいずれの方法においても 100% の頻度でアミロイドーシスが発症した。またアミロイド沈着はアミロイド細線維投与後 1 日目から脾臓・腎臓で観察された。

本アミロイド細線維の投与を受けた子ブタ 20 頭では 1 日目と 3 日目のブタの腎臓と肝臓に少量のアミロイド沈着が見られた。特に後者の肝アミロイド沈着周囲には活性化したマクロファージ、Kupffer 細胞の動員が観察され、アミロイド除去採用と考えられた。

2) 飼育チーターの糞便中のアミロイド関連物質を検索：

糞 18 検体中 15 検体よりアミロイド細線維が検出され、これを炎症刺激が加えられたマウスへ投与したところ AA アミロイドーシスが誘発された。

III. アミロイドーシスの治療法

1) AL アミロイドーシス：血清中の free light chain 濃度をヤマサで新規に開発された ELISA キットを用

いて測定した結果は従来の Binding Site 社製キットでの値と一部解離を示した。新規法での測定結果の解釈には注意を要する。大量化学療法を施行することが困難な本症患者 5 名に BJP 吸着療法を行った。BJP は効率的に吸着され、一部の患者では臨床症状の改善が得られた。

2) AA アミロイドーシス：RA に併発した AA アミロイドーシス患者 13 名 (年齢 60±13 歳、RA 罹病歴 15±8 年) に対して、Infliximab 使用が 4 名、Etanercept 使用が 9 名で検討された。使用期間は 19±14 ヶ月、最長は 47 ヶ月であった。CRP は 12 例で陰性化し、腎機能を検索した 8 例では改善 4 例、不変 2 例、悪化 2 例であった。治療後 12 ヶ月以上の間隔で胃粘膜上のアミロイドを定量的に検索した 6 例では、消失が 1 例、有意な減少が 5 例であった。

実験的マウス AA アミロイドーシスに異種動物から抽出した AA アミロイド線維を投与したところ、同線維を中心にマウス由来の AA アミロイド線維が新たに沈着することが観察された。漢方の成分である triptolide はマウス AA アミロイドーシスの発症を抑制するのみでなく、既に同マウスに沈着しているアミロイドを退縮させる作用があることが示された。

3) FAP：本疾患の簡便な蛋白解析診断法としてプロテインチップを用いた SELDI-TOF MS が有用であることが報告された。若年発症群では末梢神経伝導速度の低下度と罹病期間は一定の関連があったが、高齢発症群では両者に有意な関連は見られなかった。また病理組織学的検索では高齢者群の甲状腺、腎臓にはほとんどアミロイド沈着を認めなかった。治療法では眼病変の抑制に網膜への光凝固が有効であることが示された。

4) 脳アミロイド：暗視野高解像度レーザーマイクログレイセクション法の開発により、 τ 、*huntintin* 等から成る神経細胞内封入体の分離・精製が容易に行えることが報告された。A β オリゴマーの安定化に関与する因子としてコラーゲンとの結合が挙げられた。また抗酸化物質、NSAIDs は α -synuclein の線維形成を抑制する作用があることが明らかにされた。

IV. 国内で認知度の低いアミロイドーシス関連疾患の検索

1) 家族性地中海熱 (FMF)：全国 1850 科にアンケート

を送付して、本症疑いの 59 例が得られた。発症年齢は幼時期から中年期まで幅広く、また主な臨床症状は繰り返す発熱、腹痛、胸痛、関節痛であった。また AA アミロイドーシスの合併は 4 例であった。こうした臨床像は地中海沿岸の民族の FMF 像と多少相違があった。

- 2) 老人性全身性アミロイドーシス(SSA):信州大学と熊本大学で確定診断がなされた 16 名の臨床像を要約した。発症年齢は 67~107 歳(中央値:76 歳)、男女比は 3 : 1 と男性優位であった。初発症状の 50%が心不全であったが、30%が脳塞栓、20%が手根管症候群で初発していた。SSA の 2 割は 60 歳代で発症しており、また 5 割は心症状以外で発病することが判明した。

D. 考察

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、高齢牛で発症した AA アミロイドーシスのアミロイド線維を用いてウサギに本疾患を伝播させる実験系が確立されたことは、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。ウサギの実験系は国際的にも初めての報告であり、学問的価値が高い。また *Infliximab*、*Etanercept* 等の生物学的製剤の使用により反応性全身性 AA アミロイドーシス患者の病態改善が明瞭に示された。さらに漢方薬の主成分である *triptolide* が本疾患の治療薬になり得る可能性が提示されたことは興味深い。

近年、国内の FAP は弧発家系出身者の報告が増加している。これらの FAP 患者の大部分は高齢発症である。本疾患では若年発症群と高齢発症群において病態と臨床像が大きく違うことが示された。

本邦で認知度が低い家族性地中海熱、老人性全身性アミロイドーシスの実態が概略的に把握できたことは今後、両疾患の原因究明・治療法開発の上で有意義である。

E. 結論

- 1) 新しい核種である ^{99m}Tc -aprotinin を用いたアミロイドーシスの RI 診断法が検討された。
- 2) 高齢牛における AA アミロイドーシスの実態調査が行われ、本アミロイドーシスの伝播性が示された。またこの実験系としてウサギを用いたモデルが確立

された。

- 3) 治療に関しては AL、AA アミロイドーシス、FAP のそれぞれに有効な治療法が客観的データを基に示された。
- 4) 国内で認知度の低いアミロイドーシス関連疾患として家族性地中海熱、老人性全身性アミロイドーシスの検索がなされ、本邦における両疾患の概略を掌握することができた。

F. 健康危険情報

マウスを用いた実験的 AA アミロイドーシスでは本疾患を惹起しやすい状態のマウスに経静脈的または経口的に微量の AA アミロイド線維を投与すると短期間で高度な全身性 AA アミロイドーシスが発生することが確立されている。この際投与された AA アミロイド線維はアミロイド増強因子 (*amyloid enhancing factor* : AEF)として作用し、体内ではこの投与されたアミロイド線維を核としてその周辺に新たなアミロイド線維の多量沈着が起っていることが証明されている。こうした現象が自然界に起りうるかに関しては、日本国内で飼育されているチーターの死因の 8 割以上が全身性 AA アミロイドーシスであり、その発生機序は罹患したチーターの糞便中へ排泄された AA アミロイド線維を同一ケージ内の他の個体が舐めることにより、その個体へ本疾患が伝播されていると考えられている。現在、チーターは絶滅危惧種に指定されている。

本研究班では全身性 AA アミロイドーシスの伝播という概念がヒトの健康に与える影響について過去 6 年間研究して来た。主な研究は食品を介してヒトがアミロイド関連物質を摂取する可能性があるか、またその場合の人体への影響についてである。具体的には高齢牛が全身性 AA アミロイドーシスに罹患することがよく知られており、本疾患に侵された牛では舌、消化管、腎・肝臓等の内臓器官に加えて、骨格筋、乳腺組織へもアミロイド沈着が起ることが過去の文献に記載されている。そこでわれわれは公営屠殺場で外見上は健常として処理されている 4 歳以上の高齢牛の腎臓を連続的に 300 頭検索した結果、5%の頻度で AA アミロイドの沈着が見いだされた。また別の 300 頭において腎臓と大腿筋を同時に採取して検索した結果 9 頭の腎臓に AA アミロイドの沈着が見られ (3%の頻度)、この 9 頭のうち 1 頭の大

腿筋においては少量ながら AA アミロイドの沈着が見いだされた。これらアミロイド沈着陽性の腎臓と筋肉からアミロイド細線維を分離・精製して炎症惹起状態のマウスへ注射したところ、腎臓からのアミロイドでは6/7の割合で、筋肉からのアミロイドでは1/7の割合でマウスにAAアミロイドーシスが発生した。また別の実験系として足底に慢性潰瘍を有するウサギ15羽に炎症刺激を加えた後に牛腎から抽出したAAアミロイド線維を投与したところ、全例にAAアミロイドーシスの発症が確認された。

以上より我が国の公営屠殺場で食肉用に処理されている高齢牛は3—5%の頻度で全身性AAアミロイドーシスに侵されていること、こうした牛の臓物を摂取することでヒトの体内へAAアミロイド線維が入りうること、さらに関節リウマチなどの慢性炎症性疾患に罹患している患者の体内へこのAAアミロイド線維が入った場合にはAEF作用を発揮して同患者に全身性AAアミロイドーシスが誘発される可能性があるかと推察される。

情報源

信州大学医学部第三内科 教授	池田修一
信州大学医学研究科加齢生物学 教授	樋口京一
帯広畜産大学獣医科 教授	松井高峯
山口大学医学部病理 教授	石原得博

参考文献

- 1) Lundmark K, Westermark GT, Nystrom S, Murphy CL, Solomon A, Westermark P. Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6979-6984, 2002.
- 2) Cui D, Kawano H, Takahashi M, Hoshii Y, Setoguchi M, Gondo T, Ishihara T. Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. *Pathol Int* 52: 40-45, 2002.
- 3) 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.
- 4) Yamada M, Nakamura K, Kobayashi Y, Horiuchi N, Doi T, Suzuki S, Sato N, Kanno T, Matsui T. Immunohistochemical distribution of amyloid deposits

in 25 cows diagnosed with systemic AA amyloidosis. *J Vet Med Sci* 68: 725-729, 2006.

- 5) Solomon A, Richey T, Murphy CL, Weiss DT, Wall JS, Westermark GT, Westermark P. Amyloidogenic potential of foie gras. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10998-11001, 2007.
- 6) Horiuchi N, Kotani Y, Koga M, Yamada M, Kobayashi Y, Matsui T. Experimental induction of amyloidosis by bovine amyloid fibrils in sore hock rabbits. *Amyloid* in press.

G. 研究発表

論文発表

1. 大林光念、安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチーの病態と治療. 腎と透析、62:226-230, 2007.
2. 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチーと
3. 石原得博: アミロイドーシスの分類. 腎と透析、62:149-153, 2007.
4. 星井嘉信、石原得博: アミロイドーシス. 病理と臨床 (臨時増刊号)、25:185-187, 2007.
5. 八谷如美、金子清俊: プリオン病. アルツハイマー病 — 基礎研究から予防・治療の新しいパラダイム — Vol. 4, 平井俊策 ed. 日本臨床社, (東京), 印刷中
6. 八谷如美、金子清俊: 正常型プリオン蛋白質の機能. プリオン病と遅発性ウイルス感染症, Vol., 水澤英洋 ed. 金原出版 (東京), 印刷中
7. 金子清俊: ウシ海綿状脳症. 「蛋白質 核酸 酵素」増刊号「キーワード: 蛋白質の一生」, Vol., 遠藤斗志也 ed. 共立出版 (東京), 印刷中
8. 八谷如美、金子清俊: 正常プリオン蛋白とその機能. プリオン病と遅発性ウイルス感染症. 日本臨床, 65:1385-1390, 2007.
9. 樋口京一: アミロイドーシスの伝播. 細胞工学, 26:177-180, 2007.
10. 松田正之: ALアミロイドーシスの治療と展望. 腎と透析, 62: 88-193, 2007.
11. 松田正之: ALアミロイドーシスの最新治療. 血液・腫瘍科, 55:484-488, 2007.
12. 松田正之: 原発性ALアミロイドーシス—臨床像と診
13. 黒田 毅、佐藤弘恵、村上修一、中野正明、下条文武: ネフローゼ症候群を呈しインフリキシマブが奏効したRAアミロイドーシスの一例. 中部リウマチ, 39 (in press).
14. 黒田 毅、中野正明、下条文武: 予後を一変させた

- 新しい治療薬「生物学的製剤」。Medical Technology, (in Press).
15. 今林悦子、松田博史: アミロイドーシスの画像診断。腎と透析, 62: 177-184, 2007.
 16. Miyazaki D, Yazaki M, Gono T, Kametani F, Tsuchiya A, Matsuda M, Takenaka Y, Hosii Y, Ikeda S: AH amyloidosis associated with an immunoglobulin heavy chain variable region(VHI) fragment: A case report. Amyloid, 2007, in press.
 17. Machida K, Tojo K, Naito K, Gono T, Nakata Y, Ikeda S: Cortical petechial hemorrhage subarachnoid hemorrhage and corticosteroid-responsive leukoencephalopathy in a patient with cerebral amyloid angiopathy. Amyloid, 2007, in press.
 18. Yamano M, Azuma A, Yazaki M, Ikeda S, Sugihara H, Matsubara H: A case with senile systemic amyloidosis who developed cardiac amyloidosis in his sixties. Amyloid, 2007, in press.
 19. Tsuchiya A, Yazaki M, Kametani F, Takei Y, Ikeda S: Marked regression of abdominal fat amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy during long-term follow-up after liver transplantation. Liver Transpl, 2007, in press.
 20. Shimojima Y, Morita H, Kobayashi S, Takei Y, Ikeda S: Ten-year follow-up of peripheral nerve function in patients with familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. J Neurol, 2007, in press.
 21. Yazaki M, Mitsunashi S, Tokuda T, Kametani F, Takei Y-I, Koyama J, Kawamorita A, Kanno H, Ikeda S-I: Progressive wild-type transthyretin deposition after liver transplantation preferentially occurs onto myocardium in FAP patients. Am J Transplant, 7:235-242, 2007.
 22. Takei Y, Gono T, Yazaki M, Ikeda S, Ikegami T, Hashikura Y, Miyagawa S, Hoshii Y: Transthyretin-derived amyloid deposition on gastric mucosa in domino recipients of familial amyloid polyneuropathy liver. Liver Transplant, 13:215-218, 2007.
 23. Tokuda T, Takei Y, Takayama B, Hoshii Y, Ikeda S: Severe amyloid deposition in mammary glands of familial amyloid polyneuropathy. Amyloid, 14:249-253, 2007.
 24. Ikeda S: Is familial amyloid polyneuropathy rare? DNA testing is changing the concept of this disease. Neurology, 69:627-628, 2007.
 25. Ueda M, Ando Y, Hakamata Y, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Himeno S, Inoue S, Sato Y, Kaneko T, Takamune N, Misumi S, Shoji S, Uchino M, Kobayashi E: A novel transgenic rat with human amyloidogenic transthyretin V30M. Biochem Biophys Res Commun, 352:299-304, 2007.
 26. Sato T, Susuki S, Suico MA, Miyata M, Ando Y, Mizuguchi M, Takeuchi M, Dobashi M, Shuto T, Kai H: ER quality control regulates the fate of transthyretin variants in the cell. EMBO J, 26:2501-2512, 2007.
 27. Koide-Yoshida S, Niki T, Ueda M, Himeno S, Taira T, Iguchi-Arigo SM, Ando Y, Ariga H: DJ-1 degrades transthyretin and an inactive form of DJ-1 is secreted in familial amyloidotic polyneuropathy. Int J Mol Med, 19:885-893, 2007.
 28. Bergström J, Patrosso MC, Colussi G, Salvatore M, Penco S, Lando G, Marocchi A, Ueda A, Nakamura M, Ando Y: A novel type of familial transthyretin amyloidosis, ATTR Asn124Ser, with co-localization of kappa light chains. Amyloid. 14:141-145, 2007.
 29. Inomata Y, Zeledon ME, Asonuma K, Okajima H, Takeichi T, Ishiko T, Ando Y: Whole-liver graft without the retrohepatic inferior vena cava for sequential (domino) living donor liver transplantation. Am J Transplant, 7:1629-1632, 2007.
 30. Yamamoto S, Wilczek H. E, Nowak G, Larsson M, Oksanen A, Iwata T, Gjertsen H, Söderdahl G, Wikström L, Ando Y, Suhr OB, and Ericzon B-G: Liver Transplantation for Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP): A single center experience during 16 years. Am J Transplant, 7:2597-604, 2007.
 31. Cui D, Kawano H, Hoshii Y, and Ishihara T: Induction of accelerated murine AA amyloid by bovine amyloid fibrils and tissue homogenates. Amyloid, 2007, in press.
 32. Liu Y, Cui D, Hoshii Y, Kawano H, Une Y, Gondo T and Ishihara T: Induction of murine AA amyloidosis by various homogeneous amyloid fibrils and amyloid-like synthetic peptides. Scandinavian Journal of Immunology, 66:495-500,

- 2007.
33. Cui D, Hoshii Y, Kawano H, Sugiyama S, Gondo T, Liu Y and Ishihara T: Experimental AA amyloidosis in mice is inhibited by treatment with triptolide, a purified traditional Chinese medicine. *International Immunopharmacology*, 7:1232-1240, 2007.
 34. Omoto M, Yokota T, Cui D, Hoshii Y, Kawano H, Gondo T, Ishihara T and Kanda T: Inactivation of amyloid-enhancing factor (AEF): study on experimental murine AA amyloidosis. *Medical Molecular Morphology*, 40:88-94, 2007.
 35. Kiyama M, Hoshii Y, Cui D, Kawano H, Kanda T and Ishihara T: Immunohistochemical and Immunochemical study of amyloid in liver affected by systemic A λ amyloidosis with antibodies against three different regions of immunoglobulin λ light chain. *Pathol Int*, 57:343-350, 2007.
 36. Hachiya NS, Kaneko K: Investigation of laser-microdissected inclusion bodies. *Methods Cell Biol*, Vol. 82, Berns M, Greulich KO ed. Academic Press (San Diego), 355-75, 2007.
 37. Yan J, Fu X, Ge F, Zhang B, Yao J, Zhang H, Qian J, Tomozawa H, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils (AApoAII) and protein A amyloid fibrils (AA). *Am J Pathol*, 171:172-180, 2007.
 38. Ge F, Yao J, Fu X, Guo Z, Yan J, Zhang B, Zhang H, Tomozawa H, Miyazaki J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Amyloidosis in transgenic mice expressing murine amyloidogenic apolipoprotein A-II (Apoa2c). *Lab Invest*, 87:633-643, 2007.
 39. Koike H, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Katsuno M, Tanaka F, Watanabe H, Doyu M, Yoshikawa H, Sobue G: Nonmyelinating Schwann cell involvement with well-preserved unmyelinated axons in CMT1A. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66:1027-1036. 2007.
 40. Oki Y, Koike H, Iijima M, Mori K, Hattori N, Katsuno M, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Shiraishi M, Yazaki S, Nokura K, Yamamoto H, Sobue G: Ataxic vs painful form of paraneoplastic neuropathy. *Neurology*, 69:564-572, 2007.
 41. Hirohata M, Ono K, Morinaga A, Yamada M: Non-steroidal anti-inflammatory drugs have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro. *Neuropharmacology*, 2008, in press.
 42. 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*, 203:579-583, 2007.
 43. Ono K, Yamada M: Vitamin A potentially destabilizes preformed alpha-synuclein fibrils in vitro: implications for Lewy body diseases. *Neurobiol Dis*, 25:446-454, 2007.
 44. 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*, 85:1547-1557, 2007.
 45. Ono K, Hirohata M, Yamada M: Anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing activity of nicotine in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Lewy body diseases. *Exp Neurol*, 205:414-424, 2007.
 46. Y. Liu, D. Cui, Y. Hoshii, H. Kawano, Y. Ue, T. Gondo and T. Ishihara: Induction of Murine AA Amyloidosis by Various Homogeneous Amyloid Fibrils and Amyloid-like Synthetic Peptides. *Scand J Immunol*, 66:495-500, 2007.
 47. Horiuchi N, Kotani Y, Koga M, Yamada M, Kobayashi Y and Matsui T: Experimental induction of amyloidosis by bovine amyloid fibrils in sore-hock rabbits. *Amyloid*, 2008, in press

学会発表

1. 池田修二, 矢崎正英, 橋倉泰彦, 宮川真一: 家族性アミロイドーシスの肝移植治療. 第27回日本医学会総会, 大阪, 2007.9.
2. 安東由喜雄: 細胞生物学会公開セミナー、怖いたんぱく質の凝集. 福岡, 2007.
3. 植田光晴、安東由喜雄: 分析化学における進歩と臨床応用. 第26回日本臨床化学会, 夏季セミナー, 伊勢, 2007.
4. 安東由喜雄: トランスサイレチン型遺伝性アミロイドーシスの診断と治療、シンポジウム「アミロイドーシスを科学する」. 第47回日本臨床化学会年会, 大阪, 2007.
5. 崔丹、河野裕夫、星井嘉信、石原得博: FITC 標識アミロイド線維投与によるマウス AA アミ

- ロイドーシス発症促進効果の検討. 第96回日本病理学会総会, 大阪, 2007.3.
6. 瀬戸口美保子、星井嘉信、河野裕夫、崔 丹、権藤俊一、石原得博: 大動脈内膜肉腫にAAアミロイドーシスを合併した1例. 第96回日本病理学会総会, 大阪, 2007.3.
 7. 八谷如美、西島佳奈、田中真由美、小塚芳道、金子清俊: 新しいレーザーダイセクションシステムの開発および蛋白質解きほぐし分子Aip2多量体(アンフォルジン)を用いた神経変性疾患病態解析への応用. 第2回臨床ストレス応答学会, 福岡, 2007.11.
 8. 田中真由美、小塚芳道、八谷如美、金子清俊: 正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の細胞内輸送機構の解析. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会, 横浜, 2007.12.
 9. 西島佳奈、田中真由美、今川美登里、小塚芳道、八谷如美、金子清俊: 細胞内に発現した蛍光タンパク質を単離する新しいレーザーダイセクションシステムの開発. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会, 横浜, 2007.12.
 10. 張 倍茹、付 笑影、張 鵬堯、錢 金澤、友澤 寛、森 政之、樋口京一: Apolipoprotein A-II の多型とマウス老化アミロイドーシス: *Apoa2*^f congenic マウスを用いた解析. 第22回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会, 酒田, 2007.7
 11. 錢 金澤、巖 景民、張 倍茹、葛 鳳霞、澤下仁子、友澤 寛、内木宏延、森 政之、付 笑影、樋口京一: マウス老化アミロイドーシスでの骨格筋へのアミロイド沈着. 第2回臨床ストレス応答学会, 福岡, 2007.11.
 12. 松田正之、五野貴久、下島恭弘、吉田拓弘、加藤修明、池田修一: リンパ節腫脹を主症状とするALアミロイドーシスの臨床的検討. 第104回日本内科学会総会, 大阪, 2007.4.
 13. 小池春樹、川頭祐一、沖祐美子、飯島正博、服部直樹、山本正彦、安田武司、向井栄一郎、中里雅光、安東由喜雄、祖父江 元: 高齢発症TTR-related FAP(Ala97Gly, Val94Gly および Val30Met)の病理学的検討. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 2007.5年
 14. 黒田 毅、佐藤弘恵、村上修一、中野正明、下条文武: ネフローゼ症候群を呈しインフリキシマブが奏効したRAアミロイドーシスの一例. 第19回中部リウマチ学会, 2007.
 15. 小野賢二郎、廣畑美枝、山田正仁: アミロイドβ 蛋白およびα-シヌクレイン蛋白の異常凝集における分子間相互作用. iANS & mfSANS ワークショップ, つくば, 2007.3.
 16. 藤野みゆき、宇根有美、付笑影、樋口京一: 糞を用いたチーターのアミロイド症の生前診断法の検討. 第144回日本獣医学会学術集会, 酪農学園大学, 2007.9.
 17. 今林悦子、松田博史、久慈一英: ^{99m}Tc 標識アプロチニンキットの合成とイメージング. 第47回日本核医学会, 仙台, 2007.11.
 18. Kametani F, Kume H: Novel intracellular domain fragment of Alzheimer amyloid precursor protein (AICD) via gamma-secretase gamma-site cleavage. 神経化学 46:483, 2007.
 19. 堀内雅之、山田 学、古林与志安、松井高峯: 牛アミロイド投与によるウサギの実験的アミロイドーシス, 第144回日本獣医学会, 江別, 2007.9.
 20. Machida K, Ikeda S: Variable clinical manifestations of cerebral amyloid angiopathy (CAA) and the therapeutic approaches to this disorder. Cerebral Amyloid Angiopathy: emerging concepts, Reykjavik (Iceland), 2007.8/8-11.
 21. Berk JL, Bisbee AB, Kelly JW, Dyck PJ, Falk RH, Ando Y, Coelho T, Ikeda S, Merlini G, Suhr OB, Skinner M, the Diflunisal Investigators Consortium. Clinical trial for TTR amyloidosis using diflunisal. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p387-389, 2007.
 22. Himeno S, Ueda M, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Sun X, Misumi Y, Shinriki S, Ueda A, Uji Y, Saito S, Kim J, Meng W, Ando Y. Urinary transthyretin: a possible biochemical marker in the early stage of renal dysfunction. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p146-148, 2007.
 23. Kakizoe N, Ando Y, Kawaji T, Ando E, Sandgren O, Suhr OB, Tanihara H. Unique phenotype of vitreous amyloidosis in different endemic areas. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p149-151, 2007.
 24. Kim J, Motomiya Y, Nakamura M, Ueda M, Saito S, Misumi Y, Himeno S, Obayashi K, Shinriki S, Meng W, Semba U, Kai H, Ando Y. Role of the C-terminal

- amino acids in β 2-microglobulin amyloid formation. In “*XIth International Symposium on Amyloidosis*”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p16-18, 2007.
25. Misumi Y, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Himeno S, Ueda M, Obayashi K, Sun X, Saito S, Kim J, Shinriki S, Meng W, Ueda A, Uchino M. An autopsy case of familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Val30Met 10 years after liver transplantation: changes in the amount of amyloid deposits in the pancreas. In “*XIth International Symposium on Amyloidosis*”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p169-171, 2007.
 26. Obayashi K, Yamashita T, Ueda M, Nakamura M, Asonuma K, Inomata Y, Uchino M, Tanaka K, Ando Y. Amyloid neuropathy in a Japanese domino liver-transplanted recipient. In “*XIth International Symposium on Amyloidosis*”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p172-174, 2007.
 27. Okamoto S, Yamashita T, Ando Y, Nakamura M, Ueda M, Uchino M. Comparison of cardiomyopathy in FAP after orthotopic liver transplantation with those of non-transplanted FAP patients. In “*XIth International Symposium on Amyloidosis*”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p180-181, 2007.
 28. Saito S, Ando Y, Ueda M, Kim J, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Misumi Y, Shinriki S, Himeno S, Meng W, Ishima Y, Akaike T, Otagiri M. Effect of nitric oxide in transthyretin-related amyloidosis. In “*XIth International Symposium on Amyloidosis*”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p185-187, 2007.
 29. Sato T, Susuki S, Miyata M, Ando Y, Shuto T, Suico MA, Kai H. Inhibition of intracellular tetramerization induces the proteasomal degradation of amyloidogenic transthyretin variants. In “*XIth International Symposium on Amyloidosis*”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p188-190, 2007.
 30. Shinriki S, Ueda M, Yamashita T, Obayashi K, Sun X, Himeno S, Ueda A, Misumi Y, Saito S, Kim J, Meng W, Shinohara M, Ando Y. Amyloid deposition in the tongue of patients with familial amyloidotic polyneuropathy. In “*XIth International Symposium on Amyloidosis*”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p196-198, 2007.
 31. Ueda A, Ueda M, Yamashita T, Hirano T, Nakamura M, Misumi Y, Meng W, Ito T, Uchino M, Ando Y. Proliferation of smooth muscle cells in the tunica intima of cerebral vessels in familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Y114C. In “*XIth International Symposium on Amyloidosis*”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p202-204, 2007.
 32. Ueda M, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Misumi Y, Shinriki S, Ueda A, Zeledon R ME, Himeno S, Saito S, Kim J, Meng W, Uchino M. FK506 inhibits murine AA amyloidosis without modulating serum SAA levels. In “*XIth International Symposium on Amyloidosis*”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p99-101, 2007.
 33. Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Hirahara T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Uchino M. Effects of liver transplantation on hereditary cerebral amyloid angiopathy associated with ATTR Y114C. In “*XIth International Symposium on Amyloidosis*”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p211-213, 2007.
 34. Ando Y. Liver transplantation and new therapeutic approaches for hereditary amyloidosis. In Proceedings of XXIV World Congress of Pathology and Laboratory Medicine Meng LL (ed) ISI, Philadelphia, USA, 2007.
 35. Hachiya NS, Nishijima K, Yoshimichi K, Kaneko K: Diagnostic and therapeutic use of a novel unfolding chaperone, oligomeric actin-interacting protein 2 (Aip2p), for neurodegenerative diseases. 3rd Annual Therapeutic Strategies against Neurodegenerative Conditions. San Francisco, Sept 20-21, 2007.
 36. Kaneko K: Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and variant CJD. National Assembly Compound. Seoul, Nov 23, 2006.
 37. Koike H, Oki Y, Kawagashira Y, Iijima M, Yamamoto M, Hattori N, Yoshikawa H and Sobue G: Nonmyelinating Schwann cell involvement with well preserved unmyelinated axons in CMT1A. Peripheral Nerve Society 2007 Biennial Meeting; Salt Lake City,

USA: 2007, July 14-18.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1) 特許取得

金子清俊：高効率抗体スクリーニング方法. 日本
patent 第 4022367 号. 10.5 2007.

安東由喜雄：HMGB1 のアミロイドーシスへの保護作用（特許出願中）

山田正仁：レビー小体病治療薬およびレビー小体病
予防薬（特許出願）。

2) 実用新案登録

安東由喜雄：HMGB1 のアミロイドーシスへの保護作用（特許出願中）

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

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 東京医科大学医学部 神経生理学講座

共同研究者 八谷如美*

東京医科大学医学部、*神経生理学講座、

研究要旨 プリオン蛋白質、ハンチンチン、異常リン酸化タウなどの凝集性蛋白質により形成されるプリオン凝集体、ハンチンチン凝集体、ピック小体など封入体の性状解析を行うとともに、高感度診断法や治療法の開発を見据え、蛋白質凝集体の解きほぐし効果を有する新規シャペロン“oligomeric Aip2p”を用いた検討を行った。その結果、新規に開発した高解像度レーザーマイクロダイセクターを用いて標的構造物のみを単離し、生化学的に解析するモデル系を確立した。また、oligomeric Aip2pによる前処理を通じ、高凝集性蛋白質の検出感度を1,000倍以上改善することに成功した。また、疾患組織試料の直接解析にとどまらず、疾患原因難溶性蛋白質の蛍光型組み換え体を培養細胞系に発現させ、蛍光を指標に生細胞内において封入体の形成過程をリアルタイムに追跡しつつ、これも新たに開発した暗視野高解像度レーザーマイクロダイセクターにより、封入体を経時的に回収する系の確立の目途が立った。

A. 研究目的

凝集性蛋白質及びそれにより形成される封入体の性状解析を行うとともに、高感度診断法や治療法の開発を見据え、蛋白質凝集体の解きほぐし効果を有する新規シャペロン“oligomeric Aip2p”を用いた検討を行った。

B. 研究方法

高凝集性蛋白質の効率的な解析手法を確立することを目的とする。高凝集性蛋白質は各種神経疾患の原因となるにも関わらず、これまでそれに対する効率的な解析手法は存在しておらず、必要性は高い。本研究により、これまで解析困難であった凝集体などの構成成分の解析が容易となり、各種神経疾患の原因解明への貢献が期待される。

Oligomeric Aip2pの解きほぐし効果は、世界に先駆けて我々の研究室が解明したため、その独創性は極めて高い。また、特にoligomeric formの精製がいまだ困難であるため、oligomeric Aip2pを用いた研究は、我々の研究室に限定されている状況である。

（倫理面への配慮）

本研究は、患者や動物を対象としていないため、特段の配慮は必要ないと考える。必要な場合には、東京医科大学並びに関連施設の倫理規定に従っ

て対応する。

C. 研究結果

新開発の高解像度レーザーマイクロダイセクターを用いて、プリオン凝集体、ハンチンチン凝集体、ピック小体などの標的構造物のみを単離し、生化学的に解析するモデル系を確立した。また、oligomeric Aip2pによる前処理を行うことで、これらの疾患原因蛋白質などの高凝集性蛋白質の検出感度を1,000倍以上改善することに成功した。

また、これまでの疾患組織試料の直接解析にとどまらず、疾患原因となるような難溶性蛋白質の蛍光型組み換え体を培養細胞系に発現させ、蛍光を指標に生細胞内において封入体の形成過程をリアルタイムに追跡しつつ、新開発の暗視野高解像度レーザーマイクロダイセクターにより封入体を経時的に回収する系の確立の目途が立った。

D. 考察

今後、細胞内封入体の成長過程を経時的にフォローし蛋白質プロファイリングを行うことで、疾患の進行状況と対応した封入体関連蛋白質群の解析が可能となることが期待される。

E. 結論

1. 新開発の高解像度レーザーマイクロダイセクターを用いて標的構造物のみを単離し、生化学的に解析するモデル系を確立した。
2. Oligomeric Aip2pによる前処理を通じ、高凝集性蛋白質の検出感度を1,000倍以上改善した。
3. 新開発の暗視野高解像度レーザーマイクロダイセクターにより、蛍光型難溶性蛋白質の封入体を生細胞から経時的に回収する系の確立の目途が立った。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hachiya NS, Kaneko K: Investigation of laser-microdissected inclusion bodies. *Methods Cell Biol.* Berns M, Greulich KO ed. Academic Press (San Diego), 82: 355-75, 2007.
- 2) 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.* 68(3): 670-673, 2007.
- 3) Shirakawa T, Nakano K, Hachiya NS, Kato N, Kaneko K. Temporospacial patterns of COX-2

expression and pyramidal cell degeneration in the rat hippocampus after trimethyltin administration. *Neurosci Res.* 59(2): 117-23, 2007.

- 4) Omi K, Hachiya NS, Tanaka M, Tokunaga K, Kaneko K. 14-3-3zeta is indispensable for aggregate formation of polyglutamine-expanded huntingtin protein. *Neurosci Lett.* 431:45-50, 2008.

2. 学会発表

- 1) Hachiya NS, Nishijima K, Yoshimichi K, Kaneko K: Diagnostic and therapeutic use of a novel unfolding chaperone, oligomeric actin-interacting protein 2 (Aip2p), for neurodegenerative diseases. 3rd Annual Therapeutic Strategies against Neurodegenerative Conditions, San Francisco, Sept 20-21, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
金子清俊. 高効率抗体スクリーニング方法. 日本 patent 第4022367号. 10.5 2007.
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

NSAIDs や抗酸化化合物は α -シヌクレイン蛋白凝集抑制作用および不安定化作用を有する

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 廣畑美枝、小野賢二郎、森永章義

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 (α S) 凝集がパーキンソン病 (PD)、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。近年の疫学研究では、さまざまな抗酸化化合物や非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の抗 PD 効果が報告され注目される。我々は、 α S を生体条件下で凝集させる試験管内モデルを確立し、蛍光色素チオフラビン S (ThS) 法、原子間力顕微鏡等を用いて α -シヌクレイン線維 ($f\alpha$ S) 形成・不安定化過程に及ぼす化合物の影響を解析して、これらの抗酸化化合物や NSAIDs が、抗 α S 作用をもつかどうかを検討した。その結果、解析した抗酸化化合物や NSAIDs は、濃度依存性に $f\alpha$ S 形成を抑制し、既存 $f\alpha$ S を不安定化することを確認した。さらに特に顕著な作用を持つ化合物を見出した。これらの分子は、PD、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

パーキンソン病 (PD) は、神経変性疾患の第二位を占めており、PD の病態解明、およびこれに基づく予防法や治療法の開発が急務である。PD の神経病理学的特徴は、 α -シヌクレイン蛋白 (α S) の神経細胞内蓄積 (Lewy bodies, Lewy neurites) である。また、PD 以外に α S 凝集がみられる疾患には、レビー小体型認知症 (DLB)、多系統萎縮症 (MSA) があり、いずれも神経難病である。近年の疫学研究では、さまざまな抗酸化化合物や非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の抗 PD 効果が報告され注目されている。我々は、 α S を生体条件下で凝集させる試験管内モデルを確立し、これらの抗酸化化合物や NSAIDs が、抗 α S 作用をもつかどうかを検討した。

B. 研究方法

チオフラビン S を用いた分光蛍光定量法、電子顕微鏡・原子間力顕微鏡による形態観察による解析を用いて、生体条件下での $f\alpha$ S 形成反応系、 $f\alpha$ S 不安定化反応系を *in vitro* で確立した。その上で、さまざまな抗酸化化合物や NSAIDs が、 $f\alpha$ S 形成・不安定化過程に及ぼす影響を詳細に検討した。
 (倫理面への配慮)

問題なし。

C. 研究結果

解析した抗酸化化合物や NSAIDs は、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。その形態学的観察においても、 $f\alpha$ S の線維形成抑制や既存線維の不安定化を確認した。まず、抗酸化化合物において顕著な作用を示したのは、ノルジヒドログアイアレチン酸、クルクミン、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)、フェルラ酸であった。一方、NSAIDs で特に強い作用を示したのは、イブプロフェン、アスピリン、アセトアミノフェン、サリシダックスルフィドであった。

D. 考察

今回の研究で我々は、抗酸化化合物や NSAIDs 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。これらの抗酸化化合物や NSAIDs は、 $f\alpha$ S に対する直接作用で抗 $f\alpha$ S 作用を及ぼすことが明らかになった。この抗 $f\alpha$ S 作用の強弱関係は、概して、我々が既に報告してきたこれらの有機化合物の示す抗 β -ア

ミロイド線維($\alpha\beta$)作用との良い相関がみとめられた。 αS 凝集抑制は、 $A\beta$ 凝集抑制と同様の作用機序による可能性がある。

E. 結論

解析したこれらの抗酸化化合物や NSAIDs は、PD, 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, 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*, 203: 579-583, 2007.
- 2) Ono K, Yamada M. Vitamin A potently destabilizes preformed alpha-synuclein fibrils in vitro: implications for Lewy body diseases. *Neurobiol Dis*, 25: 446-454, 2007.
- 3) 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*, 85: 1547-1557, 2007.
- 4) Ono K, Hirohata M, Yamada M. Anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing activity of nicotine in vitro:

implications for the prevention and therapeutics of Lewy body diseases. *Exp Neurol*. 205: 414-424, 2007.

5) Hirohata M, Ono K, Morinaga A, Yamada M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro. *Neuropharmacology*, 54: 620-627, 2008.

6) 吉田光宏、山田正仁:シヌクレイノパチーと MIBG シンチ。 *Dementia Jpn*, 21: 68-80, 2007。

7) 吉田光宏、山田正仁:レビー小体型認知症の脳画像・心筋シンチ。 *精神医学*, 49: 699-705, 2007。

2. 学会発表

1) 山田正仁、吉田光宏、篠原もえ子:DLB の画像診断:MIBG 心筋シンチグラフィーと他の診断ツールとの比較。第1回レビー小体型認知症研究会。横浜。2007年11月10日。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得(申請中を含む)

レビー小体病治療薬およびレビー小体病予防薬(申請中)。

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

アミロイドタンパク質オリゴマーに関する研究：コラーゲンの作用について

分担研究者 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

研究要旨 種々のアミロイドタンパク質は共通のアミロイド線維形成機序を持ち、アミロイドタンパク質が変性し、オリゴマーを形成した後、それらがシードとなり、さらにアミロイド線維形成にいたると考えられている。したがって、アミロイドタンパク質オリゴマーを解析することで、アミロイド症の早期診断および治療についての情報が得られると考えられる。そこで本研究では種々のアミロイドタンパク質のオリゴマーの化学的特性等を解析し、その検出法の開発について検討した。

A. 研究目的

種々のアミロイドタンパク質は共通のアミロイド線維形成機序を持ち、アミロイドタンパク質が変性し、オリゴマーを形成した後、それらがシードとなり、さらにアミロイド線維形成にいたると考えられている。最近、アミロイド症のモデル動物等を用いた解析から、アミロイドタンパク質の供給が止まると、アミロイド線維沈着の進行が止まり、あるいは減少も見られ、症状が改善することが判明した。このことは、アミロイド症において早期診断が非常に重要であることを示している。そこで本研究ではアミロイド線維形成にいたる過程のアミロイドタンパク質のオリゴマーの化学的特性等を解析し、その検出法を開発し、アミロイド症の早期診断、治療につながる知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

A β 、amylin、TTR等のアミロイドタンパク質を可溶化した直後と37°Cで16時間インキュベートした後の溶液中に存在するアミロイドタンパク質を、Native-PAGE、SDS-PAGE、イムノブロットイング、質量分析器等を用いて解析し、オリゴマー形成について検討した。TTR等は先に0.5% TFAで16時間変性させたのちに37°Cで16時間インキュベートした。さらに、コラーゲンビーズを用い、コラーゲンとアミロイドタンパク質オリゴマーとの相互作用について、コラーゲンビーズに吸着した分画および非吸着分画に分けて解析し

た。

（倫理面への配慮）

実験材料として使用したA β 、amylin、TTR等のアミロイドタンパク質およびコラーゲン等は市販のものを用いているので、倫理面では特に問題はない。

C. 研究結果

TTRはpH3で変性させたのち、37°Cでインキュベートすることで、可溶性オリゴマーを形成した。このオリゴマーはNative-PAGEではスメア状の泳動像を示した。これらのオリゴマーはSDS存在下では容易にモノマーに解離した（図1）。コラーゲンビーズ存在下では、一部オリゴマーがコラーゲンビーズに結合した（図2）。結合したオリゴマーはSDSによって容易にかい離し、SDS-PAGEでは、コントロールのTTRと同様の泳動像を示した。これらのバンドを質量分析器で解析するとオリゴマーを生じたTTRには化学的な修飾は全く存在せず、またオリゴマー中にもコラーゲンの混入は観察されなかった。

A β は37°Cでインキュベートすることで、可溶性オリゴマーを形成した。SDS存在化では、TTRと同様に容易にかい離した（図3）。コラーゲンビーズ存在下では、オリゴマーだけでなく、コントロールA β も一部コラーゲンビーズに結合した。結合したA β はSDSで容易に溶出されるが、SDSに耐性を示すオリゴマーが存在し、SDSに可溶化された際に生じるモノマーも通常のモノマーとは電気泳動にお