

2) AA アミロイドーシス :

① 臨床的研究 : RAに続発する本症がRA患者の生命予後に与える影響を検討するために、2000年～2004年の5年間の日本病理剖検輯報よりRA、アミロイドーシスと記載のある剖検例を抽出し解析した(寺井)。RAにおいて加齢が本症発症に及ぼす影響を明らかにするため本症合併RA 388例を解析した(奥田)。RAに本症を合併した15例に対し生物学的製剤(インフリキシマブ、エタネルセプト、トシリズマブ)を使用し、臨床効果を検討した(西)。さらに、インフリキシマブ、エタネルセプトに対して治療抵抗性であったが、トシリズマブが有効であったRA症例を報告した(田中)。AAアミロイドーシスに対するヒト化抗IL-6受容体抗体(トシリズマブ)を用いたSAA産生抑制による治療法確立のために、AAアミロイドーシス臨床研究会を立ち上げ、臨床試験を推進した(吉崎ほか)。

② 基礎的研究 : 生検試料中のAA蛋白を定量する方法を確立し、生検部位による量的差異について検討した(山田俊幸)。AA前駆蛋白SAAとその会合体であるHDLとの親和性を表面プラズモン解析を利用した装置BIAcoreを用いSAA1アイソタイプ別に調べた(山田俊幸)。

3) FAP :

① FAPの肝移植治療の長期効果に関する研究 : 肝移植後10年以上フォローしたFAP ATTR V30M患者2例の剖検組織を、肝移植未施行のまま発症後10年目に死亡したFAP ATTR V30M患者(典型的非移植患者)と詳細に比較検討し、FAPに対する肝移植の長期的な効果について病理組織学的に解析した(安東)。

② FAPの新規治療法開発に関する研究 : 最近アミロイド線維形成に対し抑制効果を示すことが報告されたシクロデキストリン(CyD)誘導体を用いて、TTRアミロイド線維形成に対する影響を検討した(安東)。

4) 透析アミロイドーシス :

① 臨床的研究 : 透析アミロイドーシスによる破壊性脊椎関節症(DSA)に関する腹膜透析(CAPD)と血液透析(HD)の違いについては明らかにするために、透析歴10年以上の長期透析患者(CAPD27名、HD82名)における、DSAの病態について検討

した(高市)。試験管内で $\beta 2$ -m線維形成促進効果を認めたリゾリン脂質について、HD患者71名における透析アミロイドーシスの発症・進展との関連性を臨床的に検討した(内木)。血漿リゾリン酸(LPA)、血漿リゾフォスファチジルコリン(LPC)濃度は、それぞれcolorimetric assay、及びenzymatic assayで測定した。単純骨レントゲンによる骨嚢胞の評価、及び下条らによる透析アミロイドーシススコア(DRAスコア)を用いた。

② 基礎的研究 : 透析アミロイドーシスのモデルマウス開発を目指してヒト $\beta 2$ -m ($h\beta 2m$)のみを高発現するトランスジェニックマウス($hB2MTg^{+/+}m\beta 2m^{-/-}$)を作製し、 $\beta 2m$ アミロイドーシス誘発を試みた(樋口)。

5) 脳アミロイドーシス :

① アミロイド β 蛋白($A\beta$)沈着分子病態解明とAD診断治療法開発 : 酸化ストレスが $A\beta$ 蓄積と関連し、 $A\beta$ 産生に関わる β セクレターゼと γ セクレターゼ(プレセニリン1(PS1)複合体)が、脂質ラフトと呼ばれる膜ドメインに局在することから、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて、酸化ストレス物質であるethacrynic acid (EA)の負荷が脂質ラフトにおけるこれらのセクレターゼに及ぼす影響を検討した(玉岡)。脂質ラフトにおける $A\beta$ 、タウ蛋白、 α -シヌクレイン(αS)蓄積との関係を脳アミロイドモデルTg2576、神経原線維変化を再現するTgTauP301L、Lewy小体様封入体を再現するTg α SYNを用いて検討した(東海林)。我が国で血圧降下剤として使用されている3種類のアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)に関して培養細胞を用いて $A\beta$ 産生への影響を調べた(水澤)。 $A\beta(1-42)$ ($A\beta 42$)、 $A\beta(1-40)$ ($A\beta 40$)及び αS の試験管内凝集反応系に6種類の抗パーキンソン病(PD)薬関連化合物(dopamine, selegiline, levodopa, pergolide, bromocriptine, trihexyphenidyl)を添加し、 $A\beta$ 線維及び αS 線維形成・不安定化過程に及ぼす化合物の影響を、分光蛍光定量法、電子顕微鏡、原子間力顕微鏡を用いて解析した(山田正仁)。もの忘れ外来におけるAD診断のための脳脊髄液(CSF)検査の有用性を検討した(東海林)。レビー小体型認知症(DLB)とADの鑑別におけるCSF検査の有用性を検討する目的で、DLB、AD患者CSF中の αS 、 $A\beta 42$ 、総タウ蛋白(tau)、リン酸化タウ蛋

白 (ptau) 濃度を測定した (山田正仁)。

②CAAに関する研究：CAA関連血管炎に起因する髄膜脳症を呈した症例にステロイド療法を施行し、その後の病態変化を剖検所見を含めて検討した (池田)。Aβ蛋白前駆体のAβ分子領域内のアミノ酸置換Asp23Asn変異を伴い、早期発症認知症と高度CAAを特色とするアイオワ家系脳を生化学的に解析した (玉岡)。

③BRI2 関連蛋白に関する研究：家族性認知症の診断法の確立とBRI2関連蛋白の脳内の分布やADとの関連について検討するため、原因アミロイド蛋白であるABriとADanとBRI2の分泌部位に対する抗体を作成しBRI2測定系を構築し、AD脳をBRI2抗体で免疫染色した (中里)。

6) アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発およびその他のアミロイドーシス：

①老人性全身性アミロイドーシス(SSA)に関する研究：野生型TTR由来のアミロイドが全身臓器に沈着する予後不良の疾患であるSAAの疫学病態を明らかにするために、手根管症候群患者 27 名のSSAを検討した (池田)。

②アミロイドイメージングに関する研究：プローブBF-227 によるアミロイドイメージングの基礎的検討を昨年度までに終了し、本年度はヒトにおける^[11C]BF-227 探索的臨床研究として、まず最初に正常健常人のPET画像を撮影した (工藤)。

③血清アミロイドP成分 (Sap) のアミロイドーシス発症への関与に関する研究：すべてのアミロイド沈着の共通成分であるSap の*in vivo*での関与を解明するために、無Sapマウスを用いて、ADマウスモデル (Tg2576) のAβアミロイド沈着、アポリポ蛋白質AIIアミロイド (AApoAII) 沈着におけるSapの関与を解析した (前田)。

④アミロイドによるアミロイドーシス伝播あるいは促進現象に関する研究：独自に開発したapoA-IIの合成部分ペプチドを用いた*in vitro* 線維形成システムとマウスapoA-IIアミロイドーシス (AApoAII) 高発症モデルマウス (*Apoa2^c* トランスジェニックマウス：*Apoa2^c*Tg) を用い、アミロイド線維の形成及び伝播機構を解析した (樋口)。

異なった種類のアミロイド蛋白が同一個体に沈着する場合、お互いの沈着を促進するかどうか

を人体例で検討する目的で、全身性Aλアミロイドーシスと老人性全身性アミロイドーシスが共存する2例において、それぞれのアミロイド蛋白の分布を検討した (星井)。

食品としてビーフを摂取する時にウシに沈着しているアミロイドが人体に入った場合、個体のアミロイドーシス発症を促進する可能性がある。そのため、ウシ由来のAAアミロイドをウサギに投与することによる伝播モデル作成を試みた (松井)。

(倫理面への配慮)

患者を対象とする臨床研究 (診断、治療、遺伝子解析等)、疫学研究等については各施設の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。遺伝子組み換え動物を含む動物実験に関しては、各施設の指針に基づき動物実験委員会等の承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

1) ALアミロイドーシス：

①治療法の検討 (新規プロトコールによる臨床試験を含む)：本研究班AL分科会はボルテゾミブ、メルファラン、デキサメタゾンの3剤併用 (BMD療法) の治療プロトコールを作成、全国 11 施設からなる臨床試験体制 (班員 5 名及び研究協力者 9 名が参加) を構築した。対象は 20 歳以上 65 歳以下の既治療例とし、ボルテゾミブの安全性を確保するため適格基準を厳しく設定した。主要評価項目はBMD療法の安全性であり、副次的評価項目は 6 ヶ月後の血液学的効果および臨床効果 (臓器効果) とした。予定症例数は 10 例とした。

ALアミロイドーシス 75 例を対象としたHDM+ASCT療法、MP療法、VAD療法、無治療例の比較検討では、HDM+ASCT施行 11 例のうち、高度心アミロイドーシスの 1 例を除き 10 例は全例生存中で経過良好で、腎病変合併例の 75%で 50%以上の蛋白尿減少効果を認め優れた治療効果が示唆された。また他治療と比較すると HDM群の平均生存曲線が他治療群より有意に優れており、これは心臓合併症の有無に無関係であった。VAD療法は心臓合併症を有する場合にMP療法よりも予後不良になる傾向があった。

HDM+ASCT療法の適応外患者10例中9例にrisk adapted approach によるASCTを施行し3年生存率65%と良好な結果であった。前治療においてVAD療法は重篤な臓器障害例に対しては不利益が多かった。安全性と治療強度の両立を目的としたdouble ASCTを4例に行い3例でCRを得た。幹細胞採取においてはG-CSF単独動員で採取可能であり、ASCT時の体液管理においてsivelestat sodium hydrateが有用であった。

②遊離軽鎖測定法の検討：治療前後のFLCの検討では、治療後に血清FLCの κ/λ 比は正常化し、HPLC+ELISA法で遊離軽鎖の消失を確認し、治療に伴う軽鎖産生抑制を $\kappa \cdot \lambda$ それぞれに数値的に定量することが可能であった。

③凝固系の検討：ALアミロイドーシス 9 例の凝固系を測定したところ、すべての症例で過剰線溶を認めたが、骨髄腫症例ではこの異常を認めなかった。また、ALアミロイドーシス症例骨髄中の形質細胞においてuPAが産生されていることが判明した。

④新規治療法開発のための基礎的研究：恒常的NF- κ B活性は細胞膜上のCD54 発現の強度測定で定量可能であり、MGUS形質細胞は、正常骨髄形質細胞同様にCD54 発現が極めて高く、逆に、骨髄腫細胞ではCD54 発現は有意に低いことを確認した。CD54 発現の極めて高いMGUS形質細胞は生存安定性が高く、p53 遺伝子のDNA結合領域に点変異を認めずp53 蛋白が正常に機能していた。

2) AA アミロイドーシス：

①臨床的研究：日本病理剖検輯報から抽出されたRA1225 例の死因第1位は感染症 32.8%、2位呼吸器疾患 20.2%、3位アミロイドーシス 11.3%であった。一方、反応性アミロイドーシス剖検例の原因疾患の中でRAの比率は78%であった。

RA 発症リスクの解析では、RA 発症年齢とアミロイド診断までの RA 罹病期間は逆相関した ($p<0.0001$)。性比(女/男)はRA 全体では4.02、本症合併RA 群では8.05であり、本症は女性で有意に高率であった ($p<0.0001$)。SAA1 exon3 多型の検討では、SAA1.3+群の本症発症までの罹病期間は SAA1.3- 群と較べて有意に短かった ($p=0.0011$)。

RA による本症 15 例に対する生物学的製剤(イ

ンフリキシマブ、エタネルセプト、トシリズマブ)の治療効果の検討では、治療開始前に正常腎機能及び Stage1-3 CKD 例は腎機能改善または不変であったが、Stage4 CKD 例は全例血液透析治療に移行した。治療開始後に胃・十二指腸粘膜生検組織のアミロイド沈着領域の減少が全例でみられ、2例ではアミロイドが消失していた。インフリキシマブ、エタネルセプトに対して治療抵抗性であったがトシリズマブが有効であったRA 症例では、トシリズマブ投与開始後、速やかに CRP は陰性化し、SAA も 10 mg/ml 以下に安定し、下痢が改善、回盲部・直腸生検でのアミロイド沈着が消失した。

トシリズマブによる全国多施設共同臨床試験では、昨年度までに作成した臨床試験プロトコールに基づき、平成 20 年度より研究を開始し、順調に患者登録が進んだ。

②基礎的研究：胃十二指腸生検組織のAAを定量すると、定量値は十二指腸球部>同第2部>胃前庭部となり、十二指腸球部が優位であり、また、組織診で陰性でも定量される、つまり陽性となる例が多くみられた。

SAA1 アイソタイプと HDL との親和性解析では、親和性の高い順に、SAA1.5>SAA1.1=SAA1.3であった。

3) FAP：

①FAPの肝移植治療の長期効果に関する研究：肝移植後 10 年以上フォローした FAP ATTR V30M 患者 2 例では、肝移植未施行のまま発症後 10 年目に死亡した FAP ATTR V30M 患者(典型的非移植患者)と比較して、末梢神経、甲状腺、消化管、腎臓をはじめとする多くの諸臓器でごく軽度の TTR アミロイド沈着しか認めず、特に十二指腸へのアミロイド沈着に関しては、剖検時移植前の生検組織像に比べ著しく減少していた。一方、心筋細胞周囲では中等度、さらに舌の小唾液腺周囲では重度のアミロイド沈着を認めた。

②FAPの新規治療法開発に関する研究： β -CyDは、TTR のアミロイド線維形成を有意に抑制し、TTRアミロイド線維形成過程における β シート構造の増加を抑制した。本抑制効果は、各種分岐 β -CyD間の分岐糖鎖の差異により大きく変化し、

GUG- β -CyD が最も著明なアミロイド線維形成の抑制効果を示した。

4) 透析アミロイドーシス :

①臨床的研究 : CAPD患者 27名は男 15名、女 12名、平均透析年数 12.1 ± 1.8 年(10-17)、HD患者 82名は男 53名、女 29名、平均透析年数 19.7 ± 8.4 年(10-46)であった。明らかにDSAと診断された症例は、CAPD患者では頸椎DSAが 6/27名(23%)、腰椎DSAが 6/27名(23%)にみられ、DSA患者の平均透析年数は 12.3 ± 2.7 (10-17)年、HD患者では頸椎DSAが 9/82名(11%)、腰椎DSAが 4/82名(5%)で、DSA患者の平均透析年数は 33.1 ± 7.6 (21-46)年であった。DSAの発症はCAPD患者に多く、透析歴も短かった($p < 0.01$)。また、HD患者では頸椎DSAは腰椎DSAの約2倍であったが、CAPD患者においては頸椎DSAと腰椎DSAは同数であった。

血液透析患者におけるリゾリン脂質濃度と透析アミロイドーシスとの関連については、LPA濃度は、健常者に比べ血液透析患者で有意に高値を示した。一方、LPC濃度は、健常者に比べ血液透析患者で有意に低値を示した。また、LPA・LPC濃度のいずれもDRAスコアとは有意な相関を示さなかった。しかし単純骨レントゲンによる手根骨骨嚢胞数とLPC濃度との間には正相関の傾向を認めた。

②基礎的研究 : トランスジェニックマウス(hB2MTg^{+/+}m β 2m^{-/-})の血中h β 2m濃度は長期透析患者の約4倍であった(193 mg/L)。自然発症マウス(~25M)、及びアミロイド線維(A β 2M及びAApoAII)投与による誘発マウス(~25M)では、A β 2Mアミロイドの沈着は観察されず、AApoAIIの沈着のみが観察された。透析アミロイドーシスの主要な沈着部位である関節にもAApoAIIの沈着のみが観察された。

5) 脳アミロイドーシス :

①A β アミロイド沈着分子病態解明とAD診断治療法開発 : ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞に対する酸化ストレス物質EAの負荷により、PS1 mRNA、脂質ラフトのPS1蛋白が増加し、抗酸化物質であるNACによりこの増加は抑制された。動物モデルを用いた脂質ラフトにおける蛋白凝集の検討では、Tg2576ではA β 蓄積の超早期からA β oligomer

が、TgTauP301LおよびTg α SYNにおいてもそれぞれtauおよび α Sが蓄積し、Tg2576に高コレステロール食を投与するとA β oligomerが増加した。NPC1 KOによるコレステロール代謝障害は脂質ラフトにtau、APP、GSK3 β 、 α Sの蓄積を促進し、ptau陽性のpretangle蓄積を引き起こした。

ARBのA β 産生への影響を検討したところ、olmesartanはAPPwt細胞における培養液中A β 40およびA β 42を濃度依存的に減少させ、losartanはAPPwt細胞における培養液中A β 40を減少させ、valsartanは2mMの高濃度でAPPswe細胞における培養液中のA β 42とA β 42/40の比を低下させたが、それを培養液に添加した細胞の γ セクレターゼ構成各因子の蛋白量には明らかな変化は認められなかった。抗PD薬のA β や α S凝集に対する影響をみると、trihexyphenidyl以外の抗PD薬関連化合物は、濃度依存性にA β 凝集及び α S凝集を抑制し、既存のA β 凝集体、及び α S凝集体を不安定化した。特に強い作用を示したのはdopamineであり、有効濃度(EC₅₀)は生理的濃度であった。A β と α Sに対する凝集抑制作用の強弱関係には良い相関がみとめられた。

もの忘れ外来におけるCSF検査ではAD群でA β 42の低下、総tau及びAD indexの有意な上昇がみられ、ADの鑑別に有用であった。ADとDLBの鑑別では、CSF α S濃度はDLB群とAD群で差を認めなかったが、DLB群の α S濃度は罹病期間と有意に相関し、罹病期間が長くなるにつれてCSF α S濃度は低下した。CSF A β 42濃度はDLB群とAD群間で差がなく、CSF tau、CSF ptau濃度はDLB群に比べAD群で有意に上昇していた。¹²³I-MIBGシンチでは、DLB群でAD群と比較して有意にH/M比の低下、washout rateの高値を認めた。

②CAAに関する研究 : CAA関連血管炎に伴い右半球白質にび慢性の高信号領域と腫脹が見られた症例にステロイドを投与して症状が改善し、剖検時のCAAは生検時より軽度であった。

Asp23Asn変異を伴うアイオワ家系脳では、大脳皮質の可溶性A β オリゴマーが孤発例とは異った様態を示し、A β のN末端の切断が見出された。

③BRI関連蛋白に関する研究 : ABriとADanに対する測定系ではそれぞれ感度 20fmol/tubeと

70fmol/tubeのRIAを構築した。BRIの分泌部位に対する測定系も感度 30fmol/tubeのRIAを構築した。BRIに対する抗体による免疫染色では神経細胞内に染色性を認めるとともに、老人斑のA β 染色陽性の周囲に染色性を認めた。

6) アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発およびその他のアミロイドーシス：

①老人性全身性アミロイドーシス(SSA)に関する研究：手根管症候群患者 27 名のSSAを検討した結果、37%に滑膜組織へのアミロイド沈着を認め、その全てがTTR由来のアミロイドであった。年齢別に検討すると、アミロイドの陽性率は 50 歳未満で 14%、50 歳代で 25%、60 歳代で 25%、70 歳代で 43%、80 歳代で 80%であり、加齢に伴って陽性率は上昇し、男女別では男性で陽性率が高い傾向にあった。

②アミロイドイメージングに関する研究：正常健康人 2 名に [^{11}C]BF-227 を静脈内投与後 55 分および 70 分までのPET画像の観察では、投与直後から主要代謝部位である肝において放射能集積が見られた後、肝代謝の結果と思われる胆嚢に放射能集積が見られた。しかし、腎、消化管には特記すべき放射能集積が見られなかった

③血清アミロイドP成分(Sap)のアミロイドーシス発症への関与に関する研究：ADマウスモデル(Tg2576)で、Tg2576/*Sap*^{+/+}とTg2576/*Sap*^{-/-}におけるA β アミロイド沈着を比較したところ、Sapの有無によって、A β アミロイドの沈着時期や程度に差異を認めなかった。*Sap*^{-/-}マウスと*Sap*^{+/+}マウスに50 μg のAApoA II線維を尾静脈に注入したところ、両群マウスの種々の臓器におけるAApoA II沈着時期や程度には、差異を認めなかった。

④アミロイドによるアミロイドーシス伝播あるいは促進現象に関する研究：apoA-IIアミロイド線維形成及び伝播機構の解析では、AApoAIIアミロイドーシスを極めて発症し難いF型apoA-II (*Apoa2*^f)の合成部分ペプチドを用いた*in vitro*線維形成解析から、apoA-IIの9、16、62番のアミノ酸配列が線維形成に重要であることを見いだした。次に、合成ペプチドから4°Cで作製した線維を*Apoa2*^cTgにる場合には積極的に考慮すべきと考えられた。また、VAD療法は心合併症を有する場合にMP療法よ

投与することにより、37°C生成線維に比較して有意に高頻度のアミロイド線維沈着を誘発し、4°C生成線維の高い沈着促進力(伝播能力)を示唆した。4°C生成線維は37°C生成線維とは超微形態が若干異なり、各種タンパク質変性操作に高い感受性(脆弱性)を示した。

2例の全身性AL(A λ)アミロイドーシス・SSA共存例において、それぞれのアミロイド蛋白の分布を検討したところ、2例共に検索した全臓器にアミロイド沈着がみられ、抗 λ 鎖抗体の反応性は、ほぼコンゴレッド染色陽性部位に一致していた。一方anti-TTR(115-124)陽性像は、心臓、肺に限定しており、コンゴレッド陽性部の一部にのみ陽性像が見られた。

ウシAAアミロイド伝播モデルの作製では、飛節潰瘍罹患ウサギにアジュバント等による炎症刺激と伴にウシアミロイドを投与するとAAアミロイドーシスを誘発できるが、ウサギの足底部の剃毛等により飛節潰瘍様病態を人為的に作成した場合は、AAアミロイドーシスの誘発には至らなかった

D. 考察

1) ALアミロイドーシス：ボルテゾミブ(BOR)、メルファラン(MEL)、デキサメタゾン(DEX)の3剤併用(BMD療法)による安全性と有用性を検証する臨床試験プロトコルを立案し、多施設共同研究体制を構築した。原発性ALアミロイドーシスに対するBOR使用の報告はいずれも単剤あるいはDEXとの併用であり、奏効率が高く効果発現が早い。本治験のように、MEL/DEXとの併用はいまだ報告されておらず新しい有用な治療法として期待される。しかし、BORには有害事象も多いことから、本試験を安全性を確保するため用量設定試験(臨床第I/II相試験)として立案した。現在、参加施設において倫理審査中である。本症に対する各種治療の成績の比較では、HDM+ASCT療法は心臓疾患の有無に係らず、そのほかのVAD,MP療法および無治療に比べて良好な生存率であった。HDM+ASCT療法は、その他の治療法に比べ優れた治療効果が期待でき、適応があり予後不良になる傾向があり、心臓アミロイドーシス合併例に対するVAD療法には慎重であるべ

きと考えられた。

HDM+ASCT療法は重篤な臓器障害がある場合、適応外となってしまうことが問題となる。適応外患者の治療経験から、前治療をせずG-CSF単独動員で幹細胞を採取し、**risk adapted approach** によるASCTを実施すれば、適応外患者に対しても可能であることが示唆された。しかし、治療強度が下がると寛解率の低下を招く可能性があり、治療強度の確保のため**double ASCT**や前治療、後治療の工夫が必要と考えられる。

本症の治療評価においてはFLC測定が重要である。本研究により、治療経過中に κ/λ 比が正常域にある場合でもHPLC+ELISA法では血清遊離軽鎖を高感度に検出し、遊離軽鎖の絶対量を指標とすることが可能であることが明らかとなった。

さらに、本症の凝固系の検討から、形質細胞から産生されたuPAが過剰線溶の原因となり、その結果、出血傾向をきたすことが示唆された。他のAAアミロイドーシス等では過剰線溶が見られないことなどから、形質細胞由来のuPAが過剰線溶をきたす一方で、免疫グロブリン軽鎖を修飾しアミロイド原性を高めるといふ仮説を想定し今後の研究を進めて行く。この仮説が証明されれば、uPA阻害薬が本症の進展予防に有効である可能性もある。

本症を含むMGUSの単クローン性形質細胞はCD54発現/NF- κ B活性、p53遺伝子発現が極めて高く、正常骨髄形質細胞に似て安定性が高い。本症の形質細胞は正常骨髄形質細胞とよく似て、**senescence**状態にあるものと考えられ、骨髄腫細胞とは異なる。現在、骨髄腫に対する治療法が本症治療に応用されているが、本症形質細胞の生物学は骨髄腫のそれとは異なっており、そうした視点による新規治療法開発の必要性を示している。

2) **AA アミロイドーシス**：日本病理剖検輯報(2000-2004年)を用いた解析では、本症はRAにおける死因の第3位を占めており、これは1985-89年の調査結果と同様であり、一方、本症の中でRAを原因疾患とする比率は78%であり、1985-89年の61%と比べ増加していた。今後、RAにおける新しい免疫抑制療法の導入が進むにつれ本症合併頻度が低下することが期待される。

RAにおける本症合併リスクの解析では、加齢

とSAA1 exon3多型がリスクとして抽出された。この結果からは、高齢発症のRAに対しては強力な免疫抑制、炎症コントロールが必要であるということになるが、臓器機能低下を来していることが多い高齢者には感染症などの合併症に対して細心の注意を払いながら治療を行う必要がある。

RAに合併する本症の治療では、生物製剤治療(インフリキシマブ、エタネルセプト、トシリズマブ)によって胃粘膜のアミロイド沈着領域は減少することが明らかになった。一方、腎機能の改善効果は高度の腎不全例ではみられず血液透析が必要になったことから、より早期での生物製剤による治療開始の必要性が示された。

抗TNF製剤抵抗性の本症患者にトシリズマブが奏功し消化器症状と共にアミロイド沈着が消失した例があり注目される。本研究班AAアミロイドーシス分科会のメンバーはトシリズマブの治療効果を他の生物製剤と比較しながら検証するため、より大規模な会員組織からなるAA臨床研究会を立ち上げ、そこで、トシリズマブのみならず、レミケード、エンブレル等他の生物製剤投与患者も登録し臨床研究を進めている。平成20年度は順調に患者登録が進行しており、平成22年度までに成果を出す予定である。

AAアミロイドーシス診断に胃十二指腸生検による組織診断の有用性が確立されている。本研究により、AA定量法が組織診によるアミロイド検出よりも感度が高いこと、十二指腸球部で最大であることが示された。アミロイドーシスの診断や経過観察においても本定量法の有用性が示唆された。

アミロイドゲネシスに前駆蛋白SAAの安定性が重要と考えられることから、SAAとその会合体であるHDLとの親和性をSAA1アイソタイプ別に調べたところ、親和性の高い順にSAA1.5>SAA1.1=SAA1.3であった。これはSAA1.5で血中濃度が高くなるという臨床的観察に合致したが、アミロイドーシス促進的であるSAA1.3と、防御的であるSAA1.1との間にHDL親和性に差異はなく、アミロイドゲネシスにおける他因子の関与が考えられた。

3) **FAP**：肝移植後のアミロイド沈着の変化について、全身的に病理組織学的評価を行ったとする報

告はこれまでなかった。肝移植後 10 年以上フォローした FAP ATTR V30M 患者の剖検組織では、末梢神経、甲状腺、消化管、腎臓をはじめとする多くの諸臓器でごく軽度の TTR アミロイド沈着しか認めず、特に十二指腸へのアミロイド沈着に関しては、剖検時移植前の生検組織像に比べて著しく減少していたことから、発症早期の FAP 患者に対する肝移植は、臨床症状の進行を抑制するのみならず、移植前に沈着していたアミロイドも著しく減少させていることが明らかになった。全身組織のアミロイド沈着に対する肝移植の効果を実証した本研究結果がもつ意味は極めて大きい。しかし、一方で、肝移植は心臓や舌の小唾液腺へのアミロイド沈着の進行を阻止できない可能性が高いことが示された。これは肝移植後も患者の予後を決定する主要因子である心アミロイド沈着が進行みられることを示唆しており、臨床で極めて重要な指摘である。心臓や唾液腺には、TTR アミロイドの沈着を増長させる何らかの要因が存在している可能性があり、これは老年性全身性アミロイドーシスで野生型 TTR が心臓に沈着しやすいという事実と合致している。

FAP に対する肝移植治療については、病状が進行した患者には無効で、ドナーも不足しているなど多くの問題点がある。従って、肝移植によらない新たな治療法の開発が期待される。本研究では、最近アミロイド線維形成に対し抑制効果を示すことが報告されたシクロデキストリン(CyD) 誘導体を用いて、CyD、特に GUG- β -CyD が著明なアミロイド線維形成の抑制効果を有することが明らかになった。CyD 誘導体は安全性に優れ医薬品製剤にも広く利用されており、FAP の新規薬物療法としての更なる検討が期待される。

3) **透析アミロイドーシス**：透析アミロイドーシスに関する CAPD と HD の比較では、DSA の発症は CAPD 患者に多く、発症までの透析歴も短く、CAPD の方が HD よりも本症を発症しやすいと考えられた。これは両者における β 2-m 除去効率の差に関連している可能性がある。さらに、理由は明らかでないものの、CAPD 患者では HD 患者に比し、特に腰椎 DSA の発症頻度が高いことが判明した。

HD 患者におけるリゾリン脂質濃度と透析ア

ミロイドーシスとの関連については、血漿 LPA・LPC 濃度と透析アミロイドーシスの重症度には有意な関連を認めなかったが、血漿 LPC 濃度が高いほど手根骨骨嚢胞が多い傾向にあり、早期の骨嚢胞形成に LPC が関与している可能性が推測された。今後、同様に試験管内で β 2-m 線維形成促進効果を認めている遊離脂肪酸などを含めた詳細な検討を予定している。

本症モデル動物の作製をめざし、 $h\beta$ 2m 高発現トランスジェニックマウス($hB2MTg^{+/+}m\beta$ 2m $^{-/-}$)を作製に成功した。しかし、自然発症マウス(~25M)、及びアミロイド線維 ($A\beta$ 2M 及び AApoAII) 投与 による誘発マウス(~25M)では、 $A\beta$ 2M アミロイドの沈着は観察されなかった。これらの結果は血中 $h\beta$ 2m 濃度の上昇と seeding 効果だけではアミロイド沈着を誘発できないことを示唆している。今後このモデルマウスを用いて、透析アミロイドーシス発症に必須な新たな因子の解析を行う予定である。

5) **脳アミロイドーシス**：酸化ストレス物質投与実験系において、酸化ストレスは、脂質ラフトにおける PS1 蛋白の発現増加を介して $A\beta$ 産生に促進的に作用する可能性が示唆された。また、モデル動物脳を用いた脂質ラフトの検討から、脂質ラフトは蛋白凝集体蓄積の共通開始部位であり、コレステロール代謝障害は脂質ラフトにおける蛋白蓄積を促進し AD 病理を促進する可能性があり、脂質ラフトにおけるコレステロール制御は AD など神経変性疾患の根本的治療法になりうると考えられた。

近年、血圧降下剤 ARB の抗認知症作用が注目されているが、本研究により valsalan などの ARB が γ セクレターゼ・モジュレーターとして $A\beta$ 40 と $A\beta$ 42 の産生比率を変化させる可能性があることが示唆された。そのメカニズムの解明はアルツハイマー病の治療戦略において重要な役割を示す可能性がある。近年の疫学研究では、抗 PD 薬が抗 PD 効果のみならず、抗 AD 効果も示すことが注目されている。本研究では、trihexyphenidyl 以外の抗 PD 薬関連化合物、特に dopamine が強い $A\beta$ 及び α S 凝集抑制および凝集体不安定効果を有することが明らかになった。 $A\beta$ と α S に対する凝集抑制作用の強弱には良い相関がみとめられ、同

様の作用機序による可能性がある。これらの抗 PD 薬は、AD や、LBD、PD といった α S 異常症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。

AD 診断における CSF マーカー検査の有用性が再確認された。DLB では CSF- α S 濃度と罹病期間が相関したことから、脳内の α S 沈着を反映して CSF- α S 濃度が低下する可能性が示唆された。しかし、CSF- α S 測定は DLB と AD との鑑別において有用とはいえ、より疾患特異的な α S 分子種（リン酸化 α S、オリゴマーなどの凝集体など）を測定する必要がある。また、CSF tau、CSF ptau 濃度は DLB、AD 間で有意差を認めたがオーバーラップが大きく、DLB、AD の鑑別には 123 I-MIBG シンチがもっとも有用と考えられた。

CAA 関連血管炎症例の検討ではステロイド療法の有効性が示唆された。高度の CAA を病理学的特色とする $A\beta$ Asp23Asn 変異（アイオワ変異）に関連した $A\beta$ 蓄積・分解機序を明らかにするため脳を生化学的に解析した結果、可溶性オリゴマーの多様性が示され、N 末端の切断がオリゴマーあるいは皮質の非線維性沈着物の除去にかかわることが示唆された。見出された N 末端の切断は $A\beta$ の沈着よりはむしろ除去に関連するものと思われた。

AD 脳の老人斑の抗 $A\beta$ 抗体陽性のアミロイドの部位に BRI 蛋白が共沈していることが示され、BRI が AD のアミロイド沈着にも関わっている可能性が示され、その関与の詳細について今後の検討が必要である。BRI の分泌部位に対する測定系を確立したので、今後この測定系を用いて AD の CSF 中の BRI 動態を解明する予定である。

6) アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発およびその他のアミロイドーシス:

①老人性全身性アミロイドーシス(SSA)に関する研究: 今回の検討で TTR アミロイドの沈着は加齢に伴って高頻度に発生する生理的現象であることが示唆された。加齢に伴う TTR アミロイドの沈着がある閾値を越えると、手根管症候群や心不全の発症を含む臨床病態をひきおすものと考えられるが、それを明らかにするには、対照群を含めた多数例での検討が必要である。

②アミロイドイメージングに関する研究: プローブ BF-227 による正常健常人の PET 画像では、肝代謝の結果と思われる胆嚢に放射能集積が見られた。しかし、腎、消化管には特記すべき放射能集積が見られなかったことから、 ^{11}C BF-227 はヒトアミロイドーシス（特に AA アミロイドーシス）において有用な診断ツールとなる可能性が高いことが示唆された。今後、アミロイドーシス患者において臨床応用を行う。

③血清アミロイド P 成分 (Sap) のアミロイドーシス発症への関与に関する研究: Sap の有無によって、 $A\beta$ アミロイド沈着に差異を認めなかったが、Tg2576 では血液脳関門により Sap の脳実質への移行が阻害されていることが示唆されており、ヒト AD とは病態が異なっていた。AApoA II アミロイド線維核を投与実験では、Sap の有無で差がなかったことから、AApoA II アミロイド線維形成過程における伸張反応を促進しないことが示された。線維核形成への Sap の関与を検討するため、今後、線維核を投与しない実験系での解析が必要である。

④アミロイドによるアミロイドーシス伝播あるいは促進現象に関する研究: apoA-II アミロイド線維形成及び伝播機構の解析では、我々の AApoA II アミロイドーシスを基本モデルとした *in vitro* 線維形成システムと *Apoa2⁰Tg* による *in vivo* 解析システムの併用・活用は、1) 分子レベルからのアミロイドーシス発症・伝播機構の解明や、2) 生体内物質や各種薬剤の線維形成促進・抑制効果の解析に非常に有用であることが示された。

全身性 AL ($A\lambda$) アミロイドーシス・SSA 共存例のアミロイド蛋白の分布の検討では、それぞれのアミロイド蛋白の分布はこれまでに知られている AL アミロイドーシス、SSA の沈着様式として矛盾しないものであり、今回の共存例においては、一方のアミロイド蛋白は他方のアミロイド蛋白の沈着を促進していない可能性が高いと考えられた。アミロイドの cross-seeding 現象（あるアミロイド蛋白が重合核として異なった種類のアミロイド蛋白の凝集を促進する現象）はすべてのタイプのアミロイドに共通して起こる現象ではない可能性がある。

RA のような炎症状態を有する個体がウシのアミロイドに曝露された場合に本症の発症が促進

される可能性があるため、ウシ由来食品の安全性という観点から、ウシ AA アミロイド接種によるアミロイドーシス動物モデルの作製は重要な課題である。今後、ウシ由来のアミロイドによるアミロイドーシス誘発のための条件をさらに詳細に検討する予定である。

アミロイドによるアミロイドーシス伝播あるいは促進現象が、ヒトで起こりうるかという点については、RA 患者がアミロイドの沈着のあるウシ由来食品に曝露されるケースなどが考えられる。今後、ヒトでの伝播の可能性を検討するための疫学的研究を立案していく予定である。

E. 結論

病型ごとの戦略及び全病型に共通する課題の研究により、疫学病態調査、治療プロトコル確立、新規診断・予防・治療法開発等を行った。AL では HDT+ASCT 療法の有用性の検討に加え、BMD 療法の新規治療プロトコルによる全国多施設臨床試験体制を構築した。AA では IL-6 受容体抗体トシリズマブによる世界初の AA 全国多施設臨床試験を開始し患者登録が順調に進行した。FAP では肝移植後にも心臓では沈着が増加するという重要な知見を得、非移植治療の新しい候補薬を開発した。透析アミロイドーシスでは β_2 -m 線維形成促進作用を有するリゾリン脂質の血中濃度が手根骨骨嚢胞病変と関連する可能性を示した。脳アミロイドーシスでは脂質ラフトにおける酸化ストレスや脂質代謝異常が $A\beta$ 産生や凝集を促進すること、ARB の $A\beta$ 産生抑制作用や抗 PD 薬関連化合物の $A\beta$ 凝集抑制作用を示した。アミロイドイメーキング開発はヒトでの探索的臨床研究に進んだ。アミロイドーシスの“伝播”現象の実験的研究が進行し、ヒトにおける“伝播”に関する疫学的研究の立案段階となった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(主要原著論文のみを下に示す。発表の詳細は分担研究報告を参照のこと)

1) Zhang B, Une Y, Fu X, Yan J, Ge F, Yao J,

Sawashita J, Tomozawa H, Kametani F, Higuchi K: Fecal translation of AA amyloidosis in the cheetah contributes to high incidence of disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 105:7263-7268, 2008.

2) Nishida S, Hagihara K, Shima Y, Kawai M, Kuwahara Y, Arimitsu J, Hirano T, Ogata A, Yoshizaki K, Kawase I, Kishimoto T, Tanaka T: Rapid improvement of AA amyloidosis by humanized anti-IL-6 receptor antibody treatment. *Ann Rheum Dis*, in press.

3) Nishikawa T, Hagihara K, Isobe T, Matsumura A, Song J, Tanaka T, Kawase I, Naka T, Yoshizaki K: Transcriptional complex formation of c-Fos, STAT3, and hepatocyteNF-1 α is essential for cytokine-driven c-reactive protein gene expression. *J Immunol* 180:3402-3501, 2008.

4) Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Zeledon ME, Hirahara T, Hirai T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Inomata H, Uchino M: Effect of liver transplantation on transthyretin Tyr114Cys-related cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 70:123-128, 2008.

5) Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T: Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by Conjugation of α -Tocopherol. *Mol Ther* 16:734-740, 2008.

6) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M: Medical procedures and risk for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Japan, 1999-2008. *Emerg Infect Dis* 15: 265-271, 2009.

7) Ozawa D, Yagi H, Ban T, Kameda A, Kawakami T, Naiki H, Goto Y: Destruction of amyloid fibrils of a β_2 -microglobulin fragment by laser beam irradiation. *J Biol Chem* 284:1009-1017, 2009.

8) Lee YH, Chatani E, Sasahara K, Naiki H, Goto Y: A comprehensive model for packing and hydration for amyloid fibrils of β_2 -microglobulin. *J Biol Chem* 284:2169-2175, 2009.

9) Sekijima Y, Kelly JW, Ikeda S: Pathogenesis of and therapeutic strategies to ameliorate the transthyretin amyloidosis. *Curr Pharm Des* 14:3219-30, 2008.

- 10) Ono K, Hirohata M, Yamada M: α -synuclein assembly as a therapeutic target of Parkinson's disease and related disorders. *Curr Pharm Des* 14:3247-3266, 2008.
- 11) Hirohata M, Ono K, Yamada M: Non-steroidal anti-inflammatory drugs as anti-amyloidogenic compounds. *Curr Pharm Des* 14:3280-3294, 2008.
- 12) Takemoto F, Ubara Y, Kaname S, Katori H, Sawa N, Hoshino J, Suwabe T, Higa Y, Nakanishi S, Nagata M, Ohashi K, Takaichi K: Hyporeninemic hypoaldosteronism from secondary amyloidosis. *Kidney International* 74:542, 2008.
- 13) Abroun S, Otsuyama K, Shamsasenjan K, Islam A, Amin J, Iqbal MS, Gondo T, Asaoku H, Kawano MM: Galectin-1 supports the survival of CD45RA(-) primary myeloma cells in vitro. *Br J Haematol* 142:754-765, 2008.
- 14) Sakata M, Chatani E, Kameda A, Sakurai K, Naiki H, Goto Y: Kinetic coupling of folding and prolyl isomerization of β_2 -microglobulin studied by mutational analysis. *J Mol Biol* 382:1242-1255, 2008.
- 15) van der Hilst JC, Yamada T, Op den Camp HJ, van der Meer JW, Drenth JP, Simon A: Increased susceptibility of serum amyloid 1.1 to degradation by MMP-1: potential explanation for higher risk of type AA amyloidosis. *Rheumatology* 47:1651-1654, 2008.
- 16) Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Ookoshi T, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N, Yoshida H, Miyazaki R, Goto Y, Naiki H: Growth of β_2 -microglobulin-related amyloid fibrils by non-esterified fatty acids at a neutral pH. *Biochem J* 416:307-315, 2008.
- 17) 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* 14:563-570, 2008.
- 18) Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda

S: Transthyretin Accelerates Vascular A β Deposition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Brain Pathol* 19:48-57, 2009.

19) Kanazawa T, Uchihara T, Takahashi A, Nakamura A, Orimo S, Mizusawa H: Three-Layered Structure Shared Between Lewy Bodies and Lewy Neurites- Three- Dimensional Reconstruction of Triple-Labeled Sections. *Brain Pathol* 18:415-422, 2008.

20) Kuwano R, Takei N, Miyashita A, Tsukie T, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kimura H, Kakita A, Takahashi H, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Odani S, Kuwano S: Genetic association study on i n and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese. *Genomics*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願・取得

安東由喜雄

1) 発明の名称：アミロイド線維形成抑制剤

出願番号：特願 2008-260965

出願日：2008年10月7日

東海林幹夫

1) 発明の名称：パーキンソン病モデルトランスジェニックマウス

特許番号：特許第 4174212 号

取得日：2008年8月22日

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)
総括研究報告書

アミロイドーシスに関する調査研究

研究代表者 山田正仁 金沢大学医薬保健研究域医学系 脳老化・神経病態学 (神経内科学) 教授

研究要旨 アミロイドーシス各病型[①AL、②AA、③家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)、④透析、⑤脳 (アルツハイマー病、脳アミロイドアンギオパチー)]ごとの戦略、及び全病型に共通する課題の研究により、疫学病態調査、治療プロトコル確立、新規診断・予防・治療法開発等を行った。AL では新規 BMD 療法全国多施設臨床試験を進め、自家末梢血幹細胞移植療法及び他の治療オプションの有用性を検討した。AA では IL-6 受容体抗体トシリズマブによる世界初の AA 全国多施設臨床試験が進行した。FAP では多数の肝移植例の解析において発症早期の移植がより有効であることを示し、さらに非移植治療として siRNA 療法開発研究において画期的な成果を得た。透析アミロイドーシスでは世界初の本症診断基準を作成し、その妥当性を検証した。脳アミロイドーシスではアポリポ蛋白 E がアイソフォーム特異的にアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) 凝集に影響すること、フェノール化合物が *in vitro* 及び *in vivo* で $A\beta$ 凝集沈着を抑制することを示した。アミロイドイメーキング開発では AA 患者における探索的臨床研究が進行した。アミロイドーシスの”伝播”に関する研究では、AA アミロイドーシスのウシの舌内唾液腺のアミロイド沈着とウシ AA アミロイドによるウサギにおける本症誘発を報告し、”伝播”の分子機構及びその抑制法を解明するためのマウス老化アミロイドーシスモデルを確立した。

研究分担者

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 教授	奥田恭章	道後温泉病院リウマチセンター 副院長
樋口京一	信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野 教授	安東由喜雄	熊本大学大学院生命科学研究部病態情報解析学分野 教授
玉岡 晃	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 教授	中里雅光	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野 教授
高市憲明	虎の門病院腎センター内科 部長	工藤幸司	東北大学未来医工学治療開発センター前臨床応用部門 教授
山田俊幸	自治医科大学臨床検査医学 教授	水澤英洋	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学 教授
内木宏延	福井大学医学部医学科病因病態学講座分子病理学領域 教授	星井嘉信	山口大学大学院医学系研究科情報解析医学系病理形態学分野 講師
今井裕一	愛知医科大学内科学講座腎臓・リウマチ膠原病内科 教授	西 慎一	新潟大学医歯学総合病院血液浄化療法部 准教授
島崎千尋	社会保険京都病院 副院長	畑 裕之	熊本大学医学部附属病院血液内科講師
吉崎和幸	大阪大学先端科学イノベーションセンター 特任教授	松井高峯	帯広畜産大学畜産学部基礎獣医学教授
東海林幹夫	弘前大学大学院医学研究科附属脳神経血管病態研究施設脳神経内科学講座 教授	岩坪 威	東京大学大学院医学系研究科神経病理学分野 教授
麻奥英毅	広島赤十字・原爆病院検査部 部長	小池春樹	名古屋大学医学部附属病院神経内科助教
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分野 教授		

小野賢二郎 金沢大学附属病院神経内科 助教

A. 研究目的

アミロイドーシスの分子病態に基づく早期診断・治療法の開発・確立を目的とし、病型ごとの戦略並びに全病型共通の発症機構研究により、本症の発症動向の把握と共に、早期診断、治療成績の向上、新規診断、予防・治療法の開発を行う。

1) **AL アミロイドーシス**: 本症診断後の 50% 生存は約 1 年である。本症に対する治療法として自家末梢血幹細胞移植併用療法の有効性が報告されているが、適応になる患者は限られる。そこで、新規治療プロトコールによる全国多施設臨床試験、その他の治療オプションの検討を行い、さらに AL の分子病態解明に基づく新規診断・治療法開発研究を行う。

2) **AA アミロイドーシス**: 本症は関節リウマチ (RA) 患者の 5-10% に合併し、その場合の予後は不良である。RA における本症発症及び予後規定因子の解明、診断・治療指針の作成、分子病態解明に基づく新規治療法の開発、全国多施設共同臨床試験によるその有用性確立をめざす。

3) **家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)**: 本症の根本治療には肝移植があるが、長期的にみた移植の有効性や問題点を明らかにする。さらに、移植非適応例にも可能な新規治療法の開発が必要であり、トランスサイレチン (TTR) 沈着機構解明に基づく TTR 分子標的治療開発をめざす。

4) **透析アミロイドーシス**: 腎移植が少ないわが国では長期透析患者が多く、20 年以上の長期透析例では本症は必発である。本症合併の危険因子同定と発症予防、診断基準策定を含む早期発見法確立、 β_2 -ミクログロブリン (β_2 -m) 凝集過程解明による新規治療法開発をめざす。

5) **脳アミロイドーシス**: アルツハイマー病 (AD)、脳アミロイドアンギオパチー (CAA) 等で脳に蓄積するアミロイドを標的とした新しい早期診断マーカー、予防・治療法の開発を行う。

6) **アミロイドーシスに共通する発症・伝播機構解明に基づく診断・予防・治療法開発およびその他のアミロイドーシス**: 全病型に共通するアミロイド沈着機構を統合的に研究し、診断、予防・治療

法への応用を行う。特に、アミロイドイメージングの臨床診断への応用を行う。また、アミロイドによるアミロイドーシス発症促進 (“伝播”) 現象の意義、分子機構を解明する。

B. 研究方法

1) AL アミロイドーシス:

① **AL アミロイドーシスの発症要因、病態解明、診断に関する研究**: 本症の発症機序解明のため、102 例の monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) 患者における無症候性のアミロイド沈着を検討し (麻奥)、本症を含む MGUS 由来の単クローン性形質細胞の NF- κ B 活性、p53 遺伝子等につき検討を加えた (河野)。本症では線溶異常が合併しやすいことが知られている。その実態や機序を明らかにするため全国調査を行った (畑)。消化管は本症の好発部位である。消化管限局性 AL アミロイドーシスについて臨床病理学的に検討し、全身性と比較した (松田)。本症の免疫組織化学的診断を標準化するために、抗ヒト κ 鎖ウサギモノクローナル抗体 (clone H-16E) の有用性を検討した (星井)。

② **治療法の検討 (新規プロトコールによる臨床試験を含む)**: 大量メルファラン (HDM) + 自家末梢血幹細胞移植療法 (ASCT) の有用性を腎組織所見を含め検討した (高市)。一方、HDM + ASCT 療法は治療リスクのため、その適応例が限られるので、本研究班の AL 分科会は新規治療法としてボルテゾミブ (BOR)、メルファラン (MEL)、デキサメタゾン (DEX) の 3 剤併用 (BMD 療法) による安全性と有用性を検証する臨床試験を推進し、BOR/DEX 治療経験を報告した (島崎ほか)。また、それ以外の治療として、血液透析 (HD) による遊離軽鎖 (FLC) 除去療法の有用性について検討した (今井)。

2) AA アミロイドーシス:

① **臨床的研究**: 昨年度までに確立した生検材料の AA 定量法を用い、AA 合併 RA 22 例の胃、十二指腸生検を評価し、部位別の比較、継時的変化の評価を行った (奥田)。AA 合併 RA 58 例について腎におけるアミロイド沈着と腎障害の関連を検討した (西)。AA 合併 RA に対する生物学的製剤 (エタネルセプト・トシリズマブ) による治療に

伴う腎機能の変化について検討した（中村）。AA アミロイドーシスに対するヒト化抗IL-6 受容体抗体（トシリズマブ）を用いたSAA産生抑制による治療法確立のために、本研究班AA 分科会メンバー他からなるAAアミロイドーシス臨床研究会による臨床試験を推進した（吉崎ほか）。

② 基礎的研究：AAモデルマウスによる研究を推進するため、マウスSAAに対する新しいモノクローナル抗体を作成し、この抗体を用いて高感度SAA測定系を確立しマウスAAアミロイドーシスの解析を行った（山田俊幸）。

3) FAP :

① FAPの病態及び肝移植治療の効果に関する研究：FAP剖検心組織の病理学的解析、培養平滑筋細胞への患者血清由来TTRアミロイド線維投与、患者血清中のIV型コラーゲン測定により、FAPにおけるアミロイドと基底膜との関連を検討した（安東）。長野県の集積地出身のFAP患者の末梢神経障害の自然経過を電気生理学的に検討した（池田）。肝移植を受けたFAP 45 例の術後経過を検討した（池田）。FAP患者（ATTR Tyr114Cys）からの生体ドミノ肝移植を受けた患者の剖検所見を検討した（小池）。

② FAPの新規治療法開発に関する研究：FAPにおける難治性眼アミロイドーシスに対する治療法開発のため、TTR発現を選択的にノックダウンするsiRNAをヒト網膜色素上皮細胞株（ARPE-19）、V30M TTRトランスジェニックラットの眼硝子体へ投与し、TTR発現抑制効果を検討した（安東）。抗TTR siRNA発現アデノウイルス随伴ウイルスベクター（AAV8）を作成し、V30M TTRトランスジェニックマウスへ経静脈的に投与しTTR抑制効果を検討した（水澤）。

4) 透析アミロイドーシス :

腹膜透析(CAPD)患者における透析アミロイドーシス発症要因を明らかにする目的で、血液透析(HD)あるいはCAPDを導入し10年以上経過観察できた患者（HD 18 例、CAPD 6 例）における破壊性脊椎関節症(DSA)発症、血清 β_2 -m等のデータを検討した（高市）。透析アミロイドーシスの診断基準（案）を作成し、その有用性を実証するために、60名の透析患者を対象とした横断的調査を実施した（西）。

5) 脳アミロイドーシス :

① アミロイド β 蛋白 (A β) 沈着分子病態解明とAD診断治療法開発：ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞及び変異型APP過剰発現SH-SY5Y細胞に酸化ストレス物質ethacrynic acid (EA)を負荷し酸化ストレスがA β 産生に与える影響を検討した（玉岡）。アンギオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) がA β 産生に与える影響を野生型及び変異型APP発現HEK293 細胞を用いて検討した（水澤）。*In vitro*のA β 凝集における気液界面等の効果（内木）、アポリポ蛋白E (apoE) アイソフォーム特異的な効果を検討した（岩坪）。ワイン関連ポリフェノール等のフェノール化合物の*in vitro*におけるA β 凝集抑制効果(小野)、ADモデルマウス (Tg2576) におけるAD病理予防効果を検討した（山田正仁）。ADモデルマウス (Tg2576) においてメラトニン経口負荷試験が脳内A β 蓄積を反映するかどうかを検討した（東海林）。タウオパチーモデル動物の脳脊髄液 (CSF) タウを測定し脳内におけるタウ蓄積との関連を検討した（東海林）。AD診断における頭部MRI、脳血流SPECT、FDG-PET、CSFマーカー[A β 42/タウ (total) /リン酸化タウ]の有用性をAD 207 例において比較検討した（山田正仁）。

② BRI2 関連蛋白に関する研究：家族性英国/デンマーク型認知症 (FBD/FDD) はBRI遺伝子変異に起因する。BRIの分泌部位に対する抗体を作成し測定系を構築、ADその他の神経変性疾患のCSF中のBRI2 を測定した（中里）。FBDで沈着するアミロイド蛋白ABriのN末端にはピログルタミン酸残基を有するが、それが中枢神経に限らず末梢にも存在するかどうかを検討した（玉岡）。

6) アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発およびその他のアミロイドーシス :

① アミロイドイメーシングに関する研究：プローブBF-227 によるアミロイドイメーシング研究において、本年度はヒトにおける[¹¹C]BF-227 探索的臨床研究として、正常健常人 2 名、AAアミロイドーシス患者 1 名のPET画像を撮影した（工藤）。

② マウス老化アミロイドーシス及びウシアミロイドーシス伝播に関する研究：apoA-IIが沈着するマウス老化アミロイドーシスモデルとHSF1 (heat

shock factor 1) ノックアウトマウスを用いて、マウス老化アミロイドーシスに対するHSF1の抑制機構を検討した(樋口)。独自に開発したapoA-IIの合成部分ペプチドを用いた*in vitro*線維形成システムとマウス apoA-II アミロイドーシス(AApoAII)高発症モデルマウス(*Apoa2^c*トランスジェニックマウス:*Apoa2^cTg*)を用い、アミロイド線維の形成及び伝播機構を解析した(樋口)。

食品としてビーフを摂取する時にウシに沈着しているアミロイドが人体に入った場合、個体のアミロイドーシス発症を促進する可能性がある。ウシの舌は食用となる。そのため、ウシのAAアミロイドーシスについて舌を含め詳細に検討し、ウシ由来のAAアミロイドをウサギに投与することによる伝播モデル作成を試みた(松井)。

(倫理面への配慮)

患者を対象とする臨床研究(診断、治療、遺伝子解析等)、疫学研究等については各施設の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。遺伝子組み換え動物を含む動物実験に関しては、各施設の指針に基づき動物実験委員会等の承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

1) ALアミロイドーシス:

①ALアミロイドーシスの発症要因、病態解明、診断に関する研究:102例のMGUS患者の8.8%(9例)に無症候性アミロイド沈着を認め、一方、多発性骨髄腫では23.3%に無症候性アミロイド沈着を認めた。M蛋白のタイプでは無症候性アミロイドーシス例はMGUSと同様に完全型M蛋白が多く、 κ 型 $>$ λ 型であり、BJPを有する例は少なかった。一方原発性ALアミロイドーシス患者ではBJP- λ 型が多くを占めていた。

ALアミロイドーシス合併例を含むMGUS由来の単クローン性形質細胞は正常形質細胞と同程度にCD54を強く発現し、p53変異を認めなかった。これは、CD54発現が弱く1/3に点変異を求める骨髄腫細胞と対照的であった。

本症に合併する線溶異常の全国調査において、ALアミロイドーシス35例、アミロイドーシス非

合併骨髄腫31例を検討したところ、plasmin/plasmin inhibitor complex (PIC)がアミロイドーシス例で有意に増加していた。骨髄標本の検討ではアミロイドーシス例の形質細胞はウロキナーゼ型プラスイミノゲンアクチベータ(uPA)を発現していたが、骨髄腫例では1例を除き発現していなかった。

消化管限局性ALアミロイドーシス9例の検討では、沈着アミロイドは λ 型が多く、消化管内沈着部位は上部のみが4名(44%)、下部のみが3名(33%)、両者が2名(22%)であり、診断の契機は検診が5名(56%)、消化管出血が3名(33%)等であった。長期観察例は自覚症状なく経過しており、全身性への移行は見られなかった。

抗ヒト κ 鎖ウサギモノクローナル抗体(clone H-16E)の免疫組織化学的有用性の検討では、A κ 型アミロイドーシス症例の消化管及び肝臓のほとんどが陽性に染色された。

②治療法の検討: HDM+ASCT療法を施行した5例の検討では、臨床的寛解例では、4年後に糸球体アミロイド沈着の改善が示唆された。一方、治療効果に関わらず、硬化糸球体の率は全例で増加した。

AL分科会は、HDM+ASCT以外の有効な新規治療法として、BOR、MEL、DEXの3剤併用(BMD)療法の有用性を検証する臨床試験を立案し、現在進行中である。心不全で発症したALアミロイドーシスの76歳女性例に対してBOR/DEXを実施したところ、FLCは速やかに低下し、心機能も改善した(EF36% \rightarrow 68%)。副作用として末梢神経障害を認めた。

ALアミロイドーシスにおけるHDによるFLC除去の有効性を検討した。透析前後のFLC除去率をみると、血液濾過透析療法(HDF)の方がHDよりも除去率が高く、またPS膜がPEPA膜よりも除去率が優れていた。PS膜によるHDFで血中FLCは低値で長期に安定し、臓器障害の進行を認めなかった。

2) AAアミロイドーシス:

①臨床的研究: AA合併RA患者の消化管生検のAA定量法による評価では、アミロイド沈着は胃と較べて十二指腸で明らかに優位であった。また、

治療でSAAを十分抑制し得た例では沈着は継時的に減少した。一方、SAAが比較的高値の例でもAA定量値が改善する例もあった。

AA 合併 RA 例の腎アミロイド沈着と腎障害の関連を検討したところ、クレアチニンと沈着量は正の相関、クレアチニンクリアランスと沈着量は負の相関を示した。また、AA 合併 RA に対する生物学的製剤（エタネルセプト・トシリズマブ）による治療に伴う腎機能の変化についてみると、血清アルブミン、推算糸球体濾過量は治療で有意に改善した。

AA アミロイドーシスに対するヒト化抗 IL-6 受容体抗体（トシリズマブ）を用いた全国多施設臨床試験において、現在までに 30 例をエントリーし、研究が進行した。

②基礎的研究：マウスSAAのN末端側とC末端側にエピトープを有する 2 つのモノクローナル抗体を得た。この抗体を用いて高感度SAA測定系を確立し、AAアミロイドーシス惹起後 2 ヶ月を放置したマウスの血清SAAを測定したところ軽度の異常を認め、アミロイド担マウスは軽度の炎症状態を持続していることが判明した。

3) FAP :

①FAPの病態及び肝移植治療の効果に関する研究：FAP剖検心組織の病理学的解析、培養平滑筋細胞への患者血清由来TTRアミロイド線維投与実験により、FAP患者の心筋及び血管平滑筋においては、基底膜にアミロイド線維形成、沈着がおこり、基底膜は肥厚し、IV型コラーゲン、ラミニンなどの基底膜成分が増加した。FAP患者血清のIV型コラーゲン濃度は未発症キャリア、健常人と較べ増加していた。

長野県の集積地の FAP の末梢神経障害の自然経過の検討では、全経過を通じ下肢を中心とした軸索障害が進行し、発症 5 年以内に stage II まで進行し、約半数において約 7 年で下肢末梢神経機能が全廃した。

肝移植を受けた FAP 45 例の術後経過をみると、移植後 3 年以内に 7 名が死亡し、3 年以上生存した 32 名中 24 名は社会復帰可能となり、7 割の患者で何らかの症状改善がみられた。予後良好の症例の方が、移植前の全身状態が良い傾向にあった。

FAP 患者 (ATTR Tyr114Cys) からの生体ドミノ

肝移植を受けた、潰瘍性大腸炎＋原発性胆汁性胆管炎患者がバーキットリンパ腫により 8 年後に死亡し、剖検所見を検討したところ、アミロイド沈着が、ドナー由来と考えられる肝臓以外にも、交感神経節、心臓、消化管粘膜下血管、末梢神経などに認められた。中枢神経系には沈着はなかった

②FAPの新規治療法開発に関する研究：TTR発現を選択的にノックダウンするsiRNAをヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19)、V30M TTRトランスジェニックラットの眼硝子体へ投与したところ、*in vitro*及び*in vivo*の両者において、TTR発現を選択的に抑制した。

siRNA 発現 AAV8 を V30M TTR トランスジェニックマウスへ経静脈的に投与したところ、変異 TTR の発現のみを特異的に抑制し、肝毒性を回避し副作用はみられなかった。

4) 透析アミロイドーシス :

CAPD 患者における透析アミロイドーシス発症要因の検討では、透析導入後 10 年の経過で DSA と診断された患者は HD が 0% に対し CAPD は 50% と高率であった。血清 β_2 -m は CAPD 群が HD 群よりも有意に高値であり、一方、血清尿素窒素、クレアチニン、アルブミンは両群間に有意差を認めなかった。CAPD 患者で DSA 発症群と非発症群を比較すると発症群で β_2 -m は高値であった。

透析アミロイドーシス診断基準は臨床的所見（主要症状 5 項目／副症状 3 項目）と病理学的所見からなり、臨床診断例は主要症状 2 項目以上、臨床的疑い例は主要症状 1 項目＋副症状 1 項目以上、病理学的診断例ではそれに加えて病理学的所見が必要となる。臨床診断例および臨床的疑い例は透析年数とともに増加した。病理診断を実施していた例は少なかった。

5) 脳アミロイドーシス :

①A β 沈着分子病態解明とAD診断治療法開発：SH-SY5Y細胞及び変異型APP過剰発現SH-SY5Y細胞は酸化ストレス物質EA負荷によりプレセニリン 1 (PS1) mRNA、脂質ラフトのPS1 蛋白、A β 分泌が増加した。ARB6 種は、高濃度で、活性体への変換型不活体がA β 産生を抑制する傾向を示した。*In vitro*のA β 凝集は、気液界面なしでは 5 μ M 以下の濃度では凝集しなかったが、気液界面あり

の条件、あるいはポリプロピレンのディスクを入れて攪拌するとA β 重合反応が促進された。*In vitro*のA β 凝集系にapoE E2、E3、E4 を添加したところ、E4 を添加した場合は他のアイソフォームと較べてプロトフィブリル維持効果が弱く、線維形成が早期に進行した。ブドウ種由来のポリフェノールのメガナチュラルはA β の β シートへの2次構造変換、オリゴマー形成、プロトフィブリル形成、線維形成のすべての過程を*in vitro*で抑制し、A β の細胞毒性を軽減させた。ADモデルマウス (Tg2576) に各種フェノール化合物を投与したところ、ロスマリン酸等の化合物はA β 沈着、不溶性A β 、A β オリゴマー濃度を有意に低下させ、可溶性A β 濃度を有意に増加させた。ADモデルマウス (Tg2576) において、認知機能が正常な段階でもメラトニン経口負荷によって脳内A β 蓄積を反映して血液中にA β 排泄がみられた。タウオパチーモデル動物の神経原線維変化 (NFT) 蓄積、脳不溶性tau増加を反映して、CSFタウは上昇した。AD診断における頭部MRI、脳血流SPECT、FDG-PET、CSFマーカーの陽性率を比較検討したところ、CDR0.5 (ほぼ軽度認知障害レベル) ではCSFマーカーが、CDR1 (軽症) ではCSFに加えFDG-PETが、CDR2以上では全ての検査の陽性率が高かった。

②BRI2 関連蛋白に関する研究：FBD/FDDの原因遺伝子BRI2関連蛋白の測定系を確立した。CSF中のBRI2 はADにおいて他の神経変性疾患に較べて高い傾向を示した。FBDで沈着するアミロイド蛋白ABriのN末端にはピログルタミン酸残基を有するが、それが中枢神経系に限らず末梢にも存在していた。

6) アミロイドーシスに共通する発症・伝播機構解明に基づく診断・予防・治療法開発およびその他のアミロイドーシス：

①アミロイドイメーシングに関する研究：¹¹C]BF-227探索的臨床研究として、健常人2名、AAアミロイドーシス患者 (非常に早期) 1名のPET画像を撮影したところ、健常者と患者の間に特記すべき違いはみられなかった。42例のAA患者の消化管生検標本のBF-227染色では、標本ごとに染色像にかなりの違いがみられた。

②マウス老化アミロイドーシス及びウシアミロイドーシス伝播に関する研究：HSF1ノックアウトマ

ウスを用いてマウス老化アミロイドーシスに対するHSF1の抑制機構を検討したところ、*Hsf1*^{-/-}マウスでは、重度なapoA-IIアミロイド沈着とそれに伴う心機能の低下が認められた。apoA-II *in vitro*線維形成システムを用いた研究では、F型apoA-IIの48-65番アミノ酸配列領域に強力な線維形成阻止能があること、B型apoA-II合成ペプチド由来線維には*in vivo*で沈着促進能を有することが判明した。

AAアミロイドーシスのウシの検索では、腎、肝などの通常の沈着部位に加え、舌内唾液腺にアミロイド沈着を認めた。ウシ由来のAAアミロイドを炎症刺激 (飛節潰瘍+ブドウ球菌死菌等) 後のウサギに投与することによって、7羽中3羽にAAアミロイドーシスが誘発された。

D. 考察

1) ALアミロイドーシス：

MGUSとALアミロイドーシスとの関連について検討したところ、MGUSの8.8%に無症候性アミロイドーシスを認め、その頻度は骨髄腫と比較すると少なかった。M蛋白のタイプは原発性ALアミロイドーシスではBJP- λ 型が多いのに対して、無症候沈着例は完全型M蛋白 ($\kappa > \lambda$) が多く、アミロイド原性が低いものと考えられた。アミロイド原性が高いとアミロイドーシスを早期に合併し、一方、アミロイド原性が低いものでも長期に量的負荷がかかると遅発性に症候性になる可能性がある。

ALアミロイドーシス合併例を含むMGUSの形質細胞は正常骨髄形質細胞と同様の細胞生物学的性質を示しており、恒常的NF- κ B活性が高くp53遺伝子変異もなく、増殖活性は強くないが、長期生存には有利な状態にあると考えられる。

ALアミロイドーシスにおける線溶異常の多施設共同研究では、本症における過剰線溶と、その基盤になると考えられる形質細胞のuPA発現が確認された。プラスミンによるBJP修飾がアミロイドーシス発症や進展に関与している可能性があり、詳細な病態解明は治療法開発につながる可能性がある。

本症は消化管に好発するが、消化管限局性アミロイドーシスの場合、進行はある時点から停止性

で、制御不能な出血や通過障害などをきたさずに、全身性に移行することなく長期間経過することが明らかになった。限局性の場合、基本的に予後良好であることから、ALアミロイドーシスの診断では全身性との鑑別に十分留意する必要がある。

抗ヒトκ鎖抗体 (clone H-16E) はAκアミロイドの大部分を染色したことから、Aκの免疫組織化学的同定に有用な抗体と考えられた。従来、ALではN末端から定常領域までが主にアミロイドとして沈着するとされてきたが、このκ鎖抗体はC末端部分を抗原としており、多くの例のAκアミロイドはC末端部分を含んでいることが新たに示された。

本症に対する治療では、HDM+ASCT療法の有効性が注目され、適応例では治療の第一選択となっている。本療法を施行し臨床的寛解が得られた場合、長期的には腎臓におけるアミロイド沈着を改善する可能性が示された。本療法により完全寛解に至ればアミロイド沈着を抑制するだけでなく、一旦沈着したアミロイドを除去できることが示唆される。

一方、HDM+ASCT療法は、重篤な臓器障害がある場合、適応外となってしまうことが問題となる。そのため、AL分科会では、BMD療法の全国多施設臨床試験を実施中である。本報告のようにBORの有用性を示す症例が報告されてきており、BMD療法の有用性が期待される。しかし、時には心毒性により心不全がおこる場合もあるなど、重篤な副作用の可能性を考慮し慎重な投与が必要である。

また、血液透析療法では、PS膜によるHDFによって最も効率的にFLCが除去され、血清FLCは低値を維持し臓器障害の進行抑制に効果がある可能性が示唆された。HDM+ASCTの施行できない例において、有用な治療オプションになる可能性がある。

2) AA アミロイドーシス :

RAにおけるAA発症の感度の高い検出は重要な課題である。今回、消化管生検のAA定量法による評価では、沈着量において十二指腸が最も多く、診断及び進行評価のための生検部位として十二指腸が最も優れていることを確認した。さらに、治療でSAAを十分抑制し得た例では沈着は継時的に減少する一方で、SAAが完全に抑制できなくても沈着が改善する例などもあり、SAA値以

外のファクターもアミロイド沈着に関与している可能性が示唆された。

AA合併RAの腎障害の検討では、クレアチニンは腎組織におけるアミロイド沈着量を反映すること、血清アルブミン、推算糸球体濾過量が生物学的製剤(エタネルセプト・トシリズマブ)による治療効果判定の指標となりうることが示唆された。AAアミロイドーシスにおいて腎障害は予後決定因子であり、アミロイド沈着と腎機能障害の関係の解明や適切な治療効果の判定基準の確立に向けた研究が必要である。

AAアミロイドーシスに対するヒト化抗IL-6受容体抗体(トシリズマブ)を用いた全国多施設臨床試験については、現在までに30例が登録されたが、生物学的製剤による治療の普及に伴い、新たな臨床試験参加者の確保が困難になりつつある傾向にあり、今後、登録者増加のための方策をとる必要がある。

マウスモデルを用いたAAアミロイドーシスの解明のため、マウスSAAに対するモノクローナル抗体を作成し、それを用いた高感度SAA測定系を確立した。これらはAA研究のための有用なツールとなるものである。

3) FAP :

FAPにおけるアミロイド沈着と基底膜との関連の検討結果から、基底膜におけるアミロイド線維形成と基底膜成分の増加が連鎖的におこっていることが示唆された。基底膜はすべてのアミロイド沈着の好発部位であり、アミロイド蛋白と基底膜構成成分の相互作用に関する分子レベルでの解明が必要である。また、血清中のIV型コラーゲンはアミロイド沈着の指標になる可能性がある。

また、長野県の集積地のFAPの末梢神経障害の自然経過が明らかになった意義は大きい。これらのデータは、今後行われる種々の治療介入において貴重な対照データとなるものと思われる。また、肝移植などの治療介入はできるだけ早期に、少なくとも発症5年以内に行うべきことが示された。

肝移植を受けたFAP45例の術後経過の検討では、死亡症例は術後早期にはグラフト不全や門脈や肝動脈の血栓症が死因となり、その後は合併症

が死因となっていた。3年以上の経過例では7割が何らかの症状改善がみられたが、術後の問題として、心アミロイドーシス、排尿障害、眼アミロイドーシス、精神症状、胆管吻合部狭窄などがあつた。肝移植においては、これらの点に十分留意する必要がある。

FAP 患者 (ATTR Tyr114Cys) からの生体ドミノ肝移植を受けた例の8年後の剖検で、無症候性に、アミロイド沈着が広範囲に認められた。これまでの同様の報告と併せ、ドミノ肝移植では長期間を経ればレシーピエントにアミロイド沈着をきたすことを十分考慮する必要がある。

FAP の新規治療法開発に関する研究では、siRNA 療法について画期的な成果を得た。TTR 発現を選択的にノックダウンする siRNA の硝子体投与が TTR 発現を選択的に抑制したことから、難治性眼アミロイドーシスの治療法の1つとなる可能性が示唆された。さらに、siRNA 発現 AAV8 を V30M TTR トランスジェニックマウスへ経静脈投与によって副作用なく変異 TTR の発現のみを特異的に強く抑制したことから、本治療は FAP の根本的治療法となる可能性がある。今後、ヒトでの臨床応用をめざし、霊長類を用いた長期的な安全性確認などの研究を行っていく必要がある。

4) 透析アミロイドーシス：

昨年度、HD よりも CAPD よりも透析アミロイドーシスを発症しやすいことを報告したが、今年度はその要因を検討した。血清 β_2 -m は CAPD 群が HD 群よりも有意に高値であり、CAPD 患者で DSA 発症群と非発症群を比較すると発症群で β_2 -m は高値であったことから、CAPD における β_2 -m 高値が DSA 発症に関与していることが推測される。

透析アミロイドーシス診断基準はこれまでになく、本研究班の診断基準が世界初のものである。この診断基準を使うと透析経過年数と共に臨床診断例が増え、特に15年以上となると発症件数は急増し、この診断基準は実施臨床妥当なものと思われる。しかし、手根管症候群や弾撥指を呈した例の約1/3が手術を受けているにも関わらず病理学的診断例が少ないことが問題であり、今後、病理学的確定診断例を増やして本診断基準の診断精度を高めるためには、透析治療に携わる医師

に対する啓発活動が必要と思われる。

5) 脳アミロイドーシス：

A β 産生の制御メカニズムを解明し抑制することは脳アミロイドーシス治療開発に直結する。酸化ストレスは PS1mRNA 発現を増加させ脂質ラフト PS1 蛋白を増加させ、A β 分泌を促進させたことから、抗酸化物質による AD 治療の可能性が示唆された。また、ARB の不活体が A β 産生を抑制した。使用した濃度が高いため日常臨床で用いられている薬剤量では効果がある可能性はほとんどないが、その作用機序の解明は AD 創薬につながる可能性がある。

A β 凝集の抑制は脳アミロイドーシス治療法開発の重要なターゲットである。In vitro の A β 凝集系の解析で、気液界面や疎水性プラスチック表面が重要な役割を果たすことが明らかになった。脳内では細胞膜リン脂質表面、基底膜などの細胞外マトリックス成分等の生体界面が、それらに対応する重合核形成の場である可能性が示唆される。また、A β 凝集系に apoE E4 を添加すると、他のアイソフォームと較べてプロトフィブリル維持効果が弱く、線維形成が早期に進行したことから、E4 は A β の不溶化が進行しやすく AD 発症を促進する可能性が考えられる。抗 A β 凝集療法開発については、ポリフェノールを中心とするフェノール化合物がオリゴマー形成を含む A β 凝集、沈着過程を阻害することが in vitro 及び in vivo の研究で明らかになった。今後、これらの化合物の AD 予防、治療への臨床応用が期待される。

治療法開発と共に、脳アミロイドーシスの早期診断法の確立が急務となっている。モデルマウスにおいてメラトニン経口負荷によって脳内 A β 蓄積を反映して血液中に A β 排泄がみられたことから、この負荷試験は脳内 A β 沈着のマーカーとして有用である可能性がある。また、タウオパチーモデルマウスの検討から、CSF タウは脳内の NFT 及び不溶性タウ蓄積を反映するマーカーであることが確認された。AD 診断における頭部 MRI、脳血流 SPECT、FDG-PET、CSF マーカーの比較では、CDR0.5 では CSF マーカーが最も陽性率が高かった。今後、各種検査の方法及び評価法の標準化、それに基づく比較検討が必要である。

FBD/FDD の原因遺伝子 BDI 関連蛋白が AD に

において他の神経変性疾患に較べて高い傾向を示したことは興味深い。老人斑に BRI2 免疫活性が認められていることから、BRI2 が FBD/FDD ばかりでなく、A β 凝集、AD 発症にも関与している可能性がある。また、FBD で沈着する ABri の N 末端のピログルタミン酸生成が中枢神経系に限らず末梢にもみられることから、ピログルタミン酸を標的とした治療法開発上、末梢組織の ABri 沈着は有用な指標となりうることが示唆される。

6) アミロイドーシスに共通する発症・伝播機構解明に基づく診断・予防・治療法開発およびその他のアミロイドーシス：

[¹¹C]BF-227を用いたアミロイドイメージングの探索的臨床研究が進行した。AA アミロイドーシス患者 1 例と健常者間に特記すべき違いがみられなかったのは、当該患者が非常に早期のステージにあり、アミロイド沈着が乏しかったためと推測される。実際、AA アミロイドーシスと診断された消化管生検標本の BF-227 染色をみると、標本ごとに陽性所見（沈着量）にかなりの違いがみられている。今後、患者数を増やし、イメージング所見と生検所見を対比させることにより、イメージングの精度を検証していく必要がある。

マウス老化 (apoA-II) アミロイドーシスの *in vitro* 及び *in vivo* モデルを用いたアミロイド線維形成・伝播機構の解析研究が一段と進展した。HSF1 ノックアウトマウスを用いた研究で、*Hsf1*^{-/-}マウスでは apoA-II アミロイド沈着が促進されることから、アミロイド沈着には HSF1 が重要な役割を果たし、Hsps の発現促進による治療の可能性が示唆された。apoA-II *in vitro* 及び *in vivo* 線維形成システムを用いた研究では、F 型 apoA-II ペプチド (48-65 番アミノ酸配列領域) の重合阻害効果、B 型 apoA-II 合成ペプチド由来線維の沈着促進効果が明らかとなった。今後、マウス老化アミロイドーシス以外のアミロイドーシスについても、アミロイドーシス関連蛋白の線維形成機構、伝播機構、抑制物質探索を行うにあたり、本研究手法は非常に有用な試験系と考えられる。

ウシの検索では、通常の沈着部位に加え、舌内唾液腺に AA アミロイド沈着を認めること、ウシ由来の AA アミロイドの投与によりウサギに AA

アミロイドーシスが誘発されることが明らかになった。舌組織は牛タンとして食用に供される部位である。RA などの慢性炎症を有するヒトがウシ由来アミロイドを摂取した場合、AA アミロイドーシスを誘発する可能性がある。ウシ由来食品の安全性という観点から、ウシ AA アミロイド投与によるアミロイドーシス動物モデルの作製は重要な課題である。食品等に含まれるアミロイドによるアミロイドーシス伝播あるいは促進現象が、実際にヒトで起こりうるかという点を検証するために、今後、基礎研究から疫学的研究まで幅広い研究を推進する必要がある。

E. 結論

病型ごとの戦略及び全病型に共通する課題の研究により、疫学病態調査、治療プロトコル確立、新規診断・予防・治療法開発等を行った。AL では HDM+ASCT 療法の有用性の検討に加え、新規 BMD 療法による全国多施設臨床試験を推進し、その他の治療オプションとして HDF の有用性を示した。AA では IL-6 受容体抗体トシリズマブによる世界初の AA 全国多施設臨床試験が進行した。FAP では肝移植例の長期予後の解析等により移植の適応条件を明確にし、非移植治療として siRNA 治療開発研究を行いモデル動物で画期的な成果を得た。透析アミロイドーシスでは世界初の本症診断基準を作成し、実地臨床における妥当性を検証した。脳アミロイドーシスでは ApoE E4 がアイソフォーム特異的に A β 線維形成を促進すること、フェノール化合物が *in vitro* 及び *in vivo* でオリゴマー形成を含む A β 凝集・沈着を抑制することを示した。アミロイドイメージング開発はアミロイドーシス患者における探索的臨床研究に進んだ。アミロイドーシスの“伝播”については、伝播機構に関する分子レベルでの基礎的研究、ウシの舌等の食用部位におけるアミロイド沈着の検出やウシ由来アミロイドによる伝播実験が進行した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(主要原著論文のみを下に示す。発表の詳細は分担研究報告を参照のこと)

- 1) Ono K, Condrón MM, Teplow DB: Structure-neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14745-14750, 2009.
- 2) Chatani E, Lee YH, Yagi H, Yoshimura Y, Naiki H, Goto Y: Ultrasonication-dependent production and breakdown lead to minimum-sized amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11119-11124, 2009.
- 3) Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T: A β immunotherapy: intracerebral sequestration of A β by an anti-A β monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble A β . *J Neurosci* 29:11393-11398, 2009.
- 4) Ashihara E, Kawata E, Nakagawa Y, Shimazaki C, Kuroda J, Taniguchi K, Uchiyama H, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Kamitsuji Y, Inaba T, Taniwaki M, Kimura S, Maekawa T: β -catenin small interfering RNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model. *Clin Cancer Res* 15:2731-2738, 2009.
- 5) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M: Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid β aggregation pathway. *Am J Pathol* 175:2557-2565, 2009.
- 6) Ueda M, Misumi Y, Mizuguchi M, Nakamura M, Yamashita T, Sekijima Y, Ota K, Shinriki S, Jono H, Ikeda SI, Suhr OB, Ando Y: SELDI-TOF mass spectrometry evaluation of variant transthyretins for diagnosis and pathogenesis of familial amyloidotic polyneuropathy. *Clin Chem* 55:1223-1227, 2009.
- 7) Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda S: Transthyretin accelerates vascular A β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 19:48-57, 2009.
- 8) Susuki S, Sato T, Miyata M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, Ando Y, Kai H: The endoplasmic reticulum-associated degradation of transthyretin variants is negatively regulated by BiP in mammalian cells. *J Biol Chem* 284:8312-8321, 2009.
- 9) Kawaji T, Ando Y, Hara R, Tanihara H: Novel therapy for transthyretin-related ocular amyloidosis a pilot study of retinal laser photocoagulation. *Ophthalmology*, in press.
- 10) Misumi Y, Ando Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Uchino M: Chain reaction of amyloid fibril formation with induction of basement membrane in familial amyloidotic polyneuropathy. *J Pathol* 219:481-490, 2009.
- 11) Zhao W, Wang J, Ho L, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM: Identification of antihypertensive drugs which inhibit amyloid- β protein oligomerization. *J Alzheimers Dis* 16:49-57, 2009.
- 12) Ho L, Chen LH, Wang J, Zhao W, Talcott ST, Ono K, Teplow D, Humala N, Cheng A, Percival SS, Ferruzzi M, Janle E, Dickstein DL, Pasinetti GM: Heterogeneity in red wine polyphenolic contents differentially influences Alzheimer's disease-type neuropathology and cognitive deterioration. *J Alzheimers Dis* 16:59-72, 2009.
- 13) Jin H, Sanjo N, Uchihara T, Watabe K, St. George-Hyslop P, Fraser PE, Mizusawa H: Presenilin-1 holoprotein is an interacting partner of sarco endoplasmic reticulum calcium-ATPase and confers resistance to endoplasmic reticulum stress. *Journal of Alzheimer's Disease*, in press.
- 14) Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [^{11}C]BF-227 PET. *Eur J Nuc Med*, in press.
- 15) Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Yaegashi N, Kase Y, Arai H: A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid β proteins in vitro and in vivo. *J Neurochem* 1009:1648-1657, 2009.
- 16) Okamoto S, Wixner J, Obayashi K, Ando Y, Ericzon BG, Frimán S, Uchino M, Suhr OB: Liver