

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

家族性アルツハイマー病 (*PSEN1* I143T) におけるアミロイド β_{43} の神経毒性について

研究分担者 水澤英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)
研究協力者 三條伸夫、テムチナ、堀匠、日熊麻耶
東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)

研究要旨 [目的] 若年発症で認知機能障害の他に失調症状、てんかん発作、ミオクローヌス、錐体路徴候などの症状を呈し、進行の早い家族性アルツハイマー病(FAD)(*PSEN1* I143T)の病理所見の特徴として、老人斑が主に抗 amyloid β (A β)₄₂ 抗体と A β ₄₃ 抗体で染色されることが報告された。そこで、*PSEN1* I143T 変異における A β ₄₃ の病態への関与を調べるため、HEK293 細胞を用いて A β ₄₀、A β ₄₂、A β ₄₃ の発現量を測定し、他の *PSEN1* 遺伝子変異と比較した。[方法] A β ₁₁₋₂₈ を認識する抗体を capture としている ELISA プレート(WAKO)を使用し、検出には A β ₄₂ と A β ₄₃ を特異的に認識するとされている抗体を用いた ELISA 法(Saito et al, 2011)を確立した。スウェーデン型変異を有する amyloid precursor protein (APP)を安定発現させた HEK293 細胞に FAD 遺伝子変異を有する PS1 を発現させて、培養液中に産生される A β ₄₀、A β ₄₂、A β ₄₃ の発現量を測定した。[結果および考察] I143T 変異を有する PS1 を過剰発現させた細胞では、A β ₄₂ 産生量や A β ₄₂/A β ₄₀ 比が野生型に比べ高値であったが、A β ₄₃ の発現量や A β ₄₃/A β ₄₀ 比の増加は認められなかった。[結論] *PSEN1* 変異による FAD において、沈着する A β ₄₃ が多いとされる病型においても、A β ₄₃ の発現量は必ずしも多くはなく、A β ₄₃ の臨床病型へ及ぼす影響は必ずしも大きくはないと思われる。

A. 研究目的

家族性アルツハイマー病(FAD)(*PSEN1* I143T)は、E206A、A431E などの変異とともに頻度の高い FAD 遺伝子変異であることが報告されており(Rogaeva et al, 2001)、これまでに本邦、ベルギー、南アフリカ、スウェーデンなどで 7 家系の報告がある。プレセニン 1 蛋白(PS1)の第 2 膜貫通領域(TM2)内の変異であり、臨床所見の特徴として、発症年齢が 30~50 歳(平均 32.5)と若年性 AD としても非常に早期に発症し、早期に起立歩行不能となり、平均罹病期間は 8.7 年と進行も早い。認知機能障害の他に失調症状、てんかん発作、ミオクローヌス、錐体路徴候など Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病(*PRNP* P105L)類似の症状を呈する。MRI や脳血流 SPECT では早期から頭頂葉と海馬が萎縮し、後方領域が広範囲に高度の血流低下を呈する。病理所見の特徴として、老人斑が主に抗 amyloid β (A β)₄₂ 抗体と A β ₄₃ 抗体で染色される。瘻性を呈した症例を含め cotton wool plaque を認めた

例は報告されていない (Heckmann, et al, 2004; Keller et al, 2010)。近年、A β ₄₃ が FAD の病態へ関与していることを示唆する報告がなされた(Saito et al, 2011)が、*PSEN1* I143T 変異における A β ₄₃ の病態への関与を調べるため、線維芽細胞(DKO-MEF)と HEK293 細胞を用いて A β ₄₀、A β ₄₂、A β ₄₃ の発現量に関して、他の *PSEN1* 遺伝子変異と比較した。

B. 研究方法

FAD 原因遺伝子の 1 種である *PSEN1* I143T 変異における A β ₄₃ の病態への関与を調べるため、A β ₄₀、A β ₄₂、A β ₄₃ を特異的に測定できる ELISA システムを確立し、スウェーデン型変異を有するアミロイド前駆蛋白(APP)を安定発現させた HEK293 細胞に I143T、M146V、deltaE9 の 3 種類の FAD 原因遺伝子を有する *PSEN1* を各々過剰発現させて A β ₄₀、A β ₄₂、A β ₄₃ の産生量を ELISA 法にて測定し、比較した。

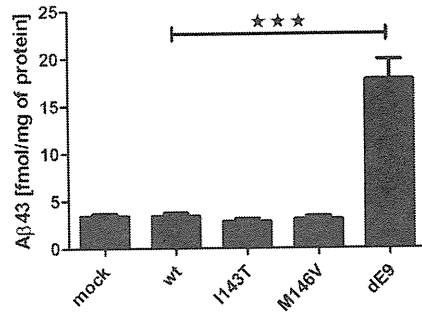
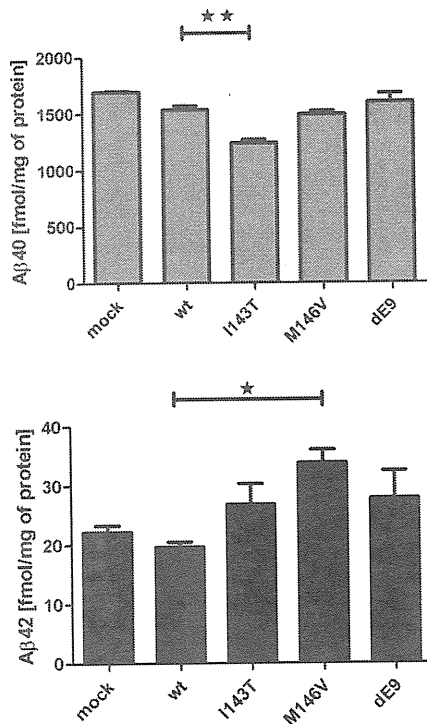
(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた研究のため、該当せず。

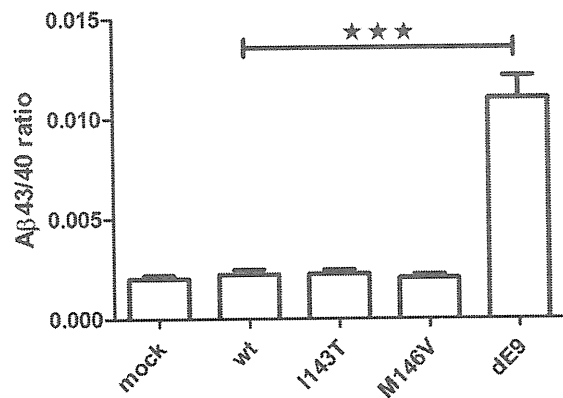
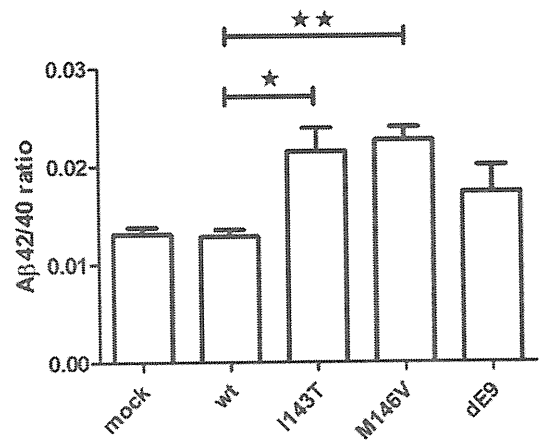
C. 研究結果

まず、preliminaryな実験として、市販されている複数のELISAキットを用いて、 $A\beta_{43}$ を測定した。現在市販されているELISAプレートは $A\beta_{43}$ をカルボキシル基末端(C末端)側の抗体でcaptureするもの、 $A\beta_{43}$ のアミノ酸残基11から28部位を認識する抗体でcaptureするもの、 $A\beta_{43}$ のアミノ基末端(N末端)でcaptureするものの3種類がある。各々のプレートで一定量の $A\beta_{43}$ を含んだ溶液中の $A\beta_{43}$ を測定したところ、 $A\beta_{43}$ のアミノ酸残基11から28部位を認識する抗体でcaptureするプレートが最も感度が高かった。このプレートと抗ヒト $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、 $A\beta_{43}$ 抗体に2次抗体を組み合わせることで $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、 $A\beta_{43}$ のELISAシステムを完成させた。

I143T、M146V、deltaE9の3種類のFAD原因遺伝子を有するPSEN1を過剰発現させた細胞が産生する $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、 $A\beta_{43}$ は下図のようになっており、I143T変異では $A\beta_{40}$ は減っていたが、 $A\beta_{43}$ の増加は認められなかった。



一方、deltaE9では著明な $A\beta_{43}$ の産生増加が認められた。更に、 $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ 、および $A\beta_{43}/A\beta_{40}$ を計算し他と下図のようになっており、I143Tでは $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ が上昇していた。



D. 考察

上記結果と各遺伝子変異における発症年齢をグラフにしたところ、 $A\beta_{40}$ の産生量の減少、あるいは $A\beta_{42}$ の産生量増加が発症年齢と相関を認めていた。病理組織における免疫染色では $A\beta_{42}$ と $A\beta_{43}$ がプラーク・コアに認められていたが、発症

年齢との関連性においては Aβ₄₃ の関与は少ないことが推測された。

E. 結論

PSEN1 変異による FAD において、沈着する Aβ₄₃ が多いとされる病型においても、Aβ₄₃ の発現量は必ずしも多くはなく、Aβ₄₃ の臨床病型へ及ぼす影響は必ずしも大きくはないと思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 三條伸夫、水澤英洋: 中年期の厳格なコントロールが高齢期での発症予防に. 特集 認知症診療新時代. *朝日 medical* 8:23-4, 2011.
- 2) 三條伸夫、水澤英洋: IV. 治療の実際. *認知症 Q&A*, 中外医学社, 2011 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) 三條伸夫、テムチナ、金海峰、堀匠、水澤英洋: 全長型 presenilin 1 は細胞内 Ca²⁺の安定化を介して caspase-12 活性を抑制する. 第 52 回日本神経学会学術大会、東京、5.19、2011.
- 2) Temuchina, Sanjo N, Hori T, Fraser PE, Mizusawa

H: An Effect of I143T PSEN1 Mutation on the Generation of Amyloid β in Culture Cells. Alzheimer's Association International Conference, Paris, France, 7.16-21, 2011.

3) Sanjo N, Temichina, Jin H, Uchihara T, Watabe K, Hori T, 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. The 13th International ATPase Conference, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, CA, USA, 9.27-10.2, 2011.

4) 堀匠、三條伸夫、松本祐希子、萩谷久美子、水澤英洋: アルツハイマー病患者の記銘力障害に対するドネペジルの効果の検討. 第 30 回日本認知症学会総会、東京、11.11-13、2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

[Ⅲ] ワークショップ・研究報告会プログラム
及び国際シンポジウム報告

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

夏のワークショップ 2011
プログラム・抄録集

日 時：平成 23 年 7 月 28 日(木) 14：00～17：45
29 日(金) 8：40～12：20

場 所：阿蘇の司ビラパークホテル
熊本県阿蘇市黒川 1230
TEL 0967-34-0811、FAX 0967-34-0816
ホームページ <http://www.asovilla.jp/>

アミロイドーシスに関する調査研究班
研究代表者 安東由喜雄
事務局：熊本大学大学院生命科学研究部病態情報解析学分野
〒860-8556 熊本県熊本市本荘 1-1-1
TEL 096-373-5283
FAX 096-362-7540
E-mail amyloid@fc.kuh.kumamoto-u.ac.jp

連絡事項

- ・発表は時間厳守をお願い致します。
- ・発表は全て、PowerPoint ファイルを Windows PC プロジェクターで投影して行います。
- ・意見交換会
日時：7月28日（木）18:40～
場所：阿蘇の司ビラパークホテル
- ・会場までのアクセス



空港から車、レンタカーの場合

- ・阿蘇熊本空港より 35分

JRの場合（阿蘇駅まで）

- ・熊本駅より（豊肥本線）特急で1時間
阿蘇駅より車で3分

バスの場合

- ・熊本駅より九州横断バス約1時間40分、
カドリードミニオン前下車 徒歩5分

車の場合

- ・福岡方面 九州自動車道～熊本IC～国道
57号線 約2時間

平成 23 年 7 月 28 日(木)

テーマ：アミロイドーシスの診断・病態解析・治療はどこまでわかっているのか

[研究代表者挨拶]

(14:00-14:15)

新たに始まるアミロイドーシス班会議の方針と、本日のワークショップについて

アミロイドーシスに関する調査研究班

研究代表者 熊本大学大学院生命科学研究部病態情報解析学分野 安東由喜雄

[講演 1] アミロイド形成機構

座長：水口峰之

アミロイド線維形成・沈着の分子機構 — 最近の知見から

(14:15-14:50)

(講演 30 分、質疑応答 5 分)

福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域 内木宏延

[講演 2] 老人性全身性アミロイドーシス up-to-date

座長：安東由喜雄

老人性全身性アミロイドーシスの実態と治療への展望

(14:50-15:25)

(講演 30 分、質疑応答 5 分)

信州大学医学部内科 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科) 池田修一

休憩 (15:25~15:45)

[講演 3] 透析アミロイドーシス up-to-date

座長：高市憲明

透析アミロイドーシスの現状と問題点

(15:45-16:20)

(講演 30 分、質疑応答 5 分)

翠悠会診療所 本宮善恢

[講演 4] FAP—治療に焦点を当てて

座長：池田修一

A. FAP 患者に対する肝移植治療の効果と問題点

(16:20-16:45)

(講演 20 分、質疑応答 5 分)

熊本大学医学部附属病院 中央検査部 大林光念

B. トランスサイレチンアミロイドーシスに対する薬剤治療の効果と問題点

(16:45-17:10)

(講演 20 分、質疑応答 5 分)

信州大学医学部 遺伝子診療部 関島良樹

[講演 5] 脳アミロイドアンギオパチー up-to-date

座長：玉岡 晃

脳アミロイドアンギオパチーの現状と問題点

(17:10-17:45)

(講演 30 分、質疑応答 5 分)

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) 山田正仁

意見交換会 (18:40～)

平成 23 年 7 月 29 日(金)

[講演 6] プリオン病

座長：山田正仁

アミロイドーシスの観点から見たプリオン病の病態 (8:40-9:15)

(講演 30 分、質疑応答 5 分)

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分野 水澤英洋

[講演 7] アルツハイマー病 up-to-date

座長：水澤英洋

A β アミロイドーシスを標的としたアルツハイマー病治療法の開発 (9:15-9:50)

(講演 30 分、質疑応答 5 分)

弘前大学大学院脳神経内科学 瓦林 毅

[講演 8] AL アミロイドーシス up-to-date

座長：今井裕一

A. AL アミロイドーシス診断の問題点 (9:50-10:15)

(講演 20 分、質疑応答 5 分)

熊本大学医学部附属病院血液内科 畑 裕之

B. AL アミロイドーシスに対する治療の最前線 (10:15-10:40)

(講演 20 分、質疑応答 5 分)

社会保険京都病院血液内科 島崎千尋

休憩 (10:40~10:55)

[講演 9] AA アミロイドーシス up-to-date

座長：吉崎和幸

A. 診断と病態解析の現状

(10:55－11:20)

(講演 20 分、質疑応答 5 分)

自治医科大学臨床検査医学 山田俊幸

B. AA アミロイドーシス治療の現状

(11:20－11:45)

(講演 20 分、質疑応答 5 分)

道後温泉病院リウマチセンター 奥田恭章

[講演 10] アミロイドーシスの伝播

座長：宇根有美

アミロイドーシスの伝播に対する提言—どこまでわかっているのか？ どう対処すべきか？

(11:45－12:20)

(講演 30 分、質疑応答 5 分)

信州大学大学院医学系研究科加齢適応医科学系加齢生物学分野 樋口京一

[閉会挨拶]

アミロイドーシスに関する調査研究班

研究代表者 熊本大学大学院生命科学研究部病態情報解析学分野 安東由喜雄

昼食 (12:20～)

アミロイドーシス夏のワークショップ 2011 抄録

[演 題 名] アミロイド線維形成・沈着の分子機構 — 最近の知見から

[演 者] 氏名：内木宏延

所属：福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域

[共同研究者] 氏名：長谷川一浩、大越忠和、小澤大作、伴 匡人 所属：同 上

[目的]アミロイドーシスの本態は、アミロイド線維の形成とその組織への沈着である。従って、アミロイド線維形成の分子機構を試験管内で詳細に解析することは、アミロイドーシス発症の分子機構を解明するために不可欠の研究手段と言える。われわれはこれまでに、独自に開発した分光蛍光定量法及び反応速度論的実験系を駆使し、アルツハイマー病患者脳に認められる A β アミロイドーシス、および長期血液透析患者に発症する β 2-ミクログロブリン (β 2-m) アミロイドーシスをモデル疾患に選び、アミロイド線維形成過程を説明する重合核依存性重合モデル、および線維伸長過程を説明する一次反応速度論モデルを構築、様々な生体分子及び有機化合物の線維形成過程に及ぼす影響を解析して来た。本ワークショップでは β 2-m アミロイドーシスに関する我々のデータを中心に、「in vitro アミロイド線維形成機構」に関する世界の研究動向を概観する。

[方法]われわれは、アミロイド線維形成の分子機構を試験管内で詳細に解析するため、蛍光色素チオフラビン T を用いたアミロイド線維の分光蛍光定量法を世界に先駆けて開発した (Naiki et al. Anal Biochem 1989 ; 177 : 244-249)。その後本法は、様々なアミロイド線維の試験管内形成実験に広く利用され、アミロイド線維形成機構解明に向けた生化学研究に不可欠のツールとなった。近年、NMR を始めとする多彩な構造生物学・蛋白質科学的手法が次々に導入され、in vitro アミロイドサイエンスは精緻を極めている。

[結果および考察] β 2-m アミロイドの沈着が主に関節組織や腱組織に認められることは、 β 2-m がこれらを構成する種々の細胞外マトリクス分子と特異的相互作用を起こし、線維形成に至る可能性を示唆している。代表的アミロイド共存分子である apoE や、ヘパリンなどのグリコサミノグリカン、軟骨組織に豊富に含まれるデコリン、バイグリカン等のプロテオグリカンは、中性 pH における β 2-m アミロイド線維の脱重合を抑制した。これらの分子は、線維表面に結合することで線維構造を安定化していると考えられる。さらにわれわれは、生体脂質のリゾリン脂質や遊離脂肪酸を添加することで、中性反応溶液中で β 2-m アミロイド線維伸長反応が起きることを示した。その分子機構として、これらの分子が β 2-m の天然構造を部分的にほぐすと共に、線維表面に結合し、線維構造を安定化させることにより脱重合を阻害することを明らかにした。一方近年、細胞外における蛋白質の品質管理機構が注目されるようになり、細胞外分子シャペロンがその一躍を担うことが示されつつある。その代表である α 2-マクログロブリン (α 2M) は、 β 2-m アミロイド線維と共に組織に沈着し、血液透析患者血清中での α 2M と β 2-m の複合体形成も報告されている。最近われわれは、 α 2M が β 2-m に結合することにより、生理条件下における β 2-m 線維形成反応を抑制することを明らかにした。

[結論]天然構造のアミロイド前駆蛋白質は、血中、あるいは沈着局所に存在する様々な生体分子と相互作用する。その結果異常構造を獲得し、重合核依存性重合モデルに従いアミロイド線維を形成、組織に沈着する。形成したアミロイド線維表面にも様々な生体分子が結合し、線維構造を安定化することによりアミロイド線維沈着を促進する。一方、線維形成の各過程を阻害する生体分子群（細胞外分子シャペロン）も存在する。

アミロイドーシス夏のワークショップ 2011 抄録

[演 題 名] 老人性全身性アミロイドーシスの実態と治療への展望

[演 者] 氏名：池田修一

所属：信州大学医学部内科（脳神経内科、リウマチ・膠原病内科）

[共同研究者] 氏名：関島良樹

所属：同上

氏名：福島加奈

所属：同上

[目的]

本邦における老人性全身性アミロイドーシス（senile systemic amyloidosis: SSA）の臨床像を明らかにし、本疾患の治療への展望を述べる。

[方法]

過去5年間に当科でSSAと診断した患者の臨床像と治療法を分析した。

[結果および考察]

患者数は18名（男性12名、女性6名）で、年齢は65～97歳であった。9名に手根管症候群がみられ、本症状が初発と考えられた。全例心房細動があり、2名で脳塞栓が、1名で腎梗塞がみられた。11名で腹壁の外科的皮膚生検を行い、8名でTTR免疫反応性のアミロイド沈着が見られた。アミロイドは深部皮下脂肪組織に斑状に分布しており、個々のアミロイド沈着は少量であった。心不全に対しては一般的な対症療法が行われていた。3名にはdiflunisalの投与が行われ、2年間以上服薬している1名では心機能の改善がえられた。

[結論]

SSAの病像とその自然経過は以下のように考えられた。60～70歳代に手根管症候群で発症し、数年後に心房細動が加わる。同じ頃、心房細動に起因する全身的塞栓症が起こりうる。最終的には手根管症候群発症から10数年して、心不全を発症する。心不全を併発した本症患者の予後は3～5年である。SSAの病理組織学的診断には心内心筋生検が多用されているが、より侵襲の少ない方法として腹壁の外科的皮膚生検が有用と考えられる。

アミロイドーシス夏のワークショップ 2011 抄録

[演 題 名] 透析アミロイドーシスの現状と問題点

[演 者] 氏名：本宮善恢
所属：翠悠会診療所

[共同研究者] 氏名：安東由喜雄 所属：熊本大学病態情報解析学分野
氏名：宇治義則 所属：富山大学附属病院検査部
氏名：森田弘之 所属：森田シャントアミロイド治療クリニック
氏名：供田文宏 所属：富山大学医学部第二内科

[目的] 日本の透析医学会での透析アミロイド症の最終集計（1999 年末）では、透析 10 年目から 15 年で手根管解放術施行（CTS Op）例は 6.0%、20 年から 25 年で 45.3%となっている。その後最近の動向は不明だが、10 年以上生存例は依然として増加の一途にあり、発症数は増えていると思われる。しかしながら 90 年以降 high flux、high performance membrane の導入、濾過型透析への切り替え、加えて β_2 -microglobulin (β_2m) 吸着カラムの導入により発症は明らかに遷延していると思われ、病態も軽減傾向にあると予想される。この歯止め効果は、よりパワーアップした透析モードの普及によるが、今後は心肺機能の低下した高齢者でも遂行可能なシステムのコンプライアンス アップがのぞまれる。本報告ではその点について触れたうえ、以下の二点を取り上げた。

[方法および結果]

1. 透析アミロイド症の臨床レベルでのアミロイド中間体：

Stoppini の報告(1997 年)⁽¹⁾に基づき β_2m C 末端 92-99 位 peptide に対するモノクローナル抗体 (mAb92-99) を作製し、18 例のアミロイド組織で免疫染色を行った。

その結果、 β_2m 沈着部位でも mAb92-99 陰性、陽性の混在がみられ、かつ mAb 陽性組織でも Congo red 陰性、陽性部位の混在がみられた。また Congo red 陽性部位ではすべて mAb 陽性であった。このことから C 末端が unfold した β_2m バリエントがアミロイド中間体であると考えた。

さらに Heegard らの方法 (2000 年)⁽²⁾に準じ、臨床検体 (血清) を用いて直に capillary electrophoresis (CE) 解析を行い、透析患者に限らず健常者を含め、 β_2m は体液内では 10%強の中間体の peak と常に動的平衡状態を保って存在していること、および mAb92-99 affinity column により、その中間体 peak は C 末端が unfold した β_2m バリエントからなることを確認した。

また中間体 β_2m 濃度および総 β_2m に対する中間体の%比率ともに導入時年齢、透析年数と相関なく、CTS Op 例、非 Op 例での比較でも有意差は見られなかった。したがって血清-中間体 β_2m 濃度および%比率とも透析アミロイド症発症の予知および予後予測因子とはなりえない。

2. シャドーファクターとしてのヘパリンの関与：

CE 系に低分子ヘパリンを臨床濃度域で (0.5-4.0 U/mL) で添加し、 β_2m との相互作用を検討した。その結果、①ヘパリン濃度 4.0 U/mL までは、ヘパリンと native β_2m との相互作用はみられず、一方、中間体 β_2m とは 1.0 U/mL 以上で相互作用を示した。②ヘパリン添加により中間体 β_2m は、よりランダムな構造をとると考えられた。

[考察] 臨床検体にて中間体 β_2m は C 末端が unfold した分子種であることを確認した。その血中濃度は臨床背景に関係なく、一義的に血中総 β_2m 濃度に依存しており、現行の透析戦略“the lower, the better”(下げれば下げる程是いい)を正当化する結果と言える。

出典 文献 (1) Stoppini M, et al. Eur J Biochem. 1997;249:21-26.

文献 (2) Heegard NH, et al. J Chromatogr A. 2000;894:319-327.

アミロイドーシス夏のワークショップ 2011 抄録

[演 題 名] FAP 患者に対する肝移植治療の効果と問題点

[演 者] 氏名：大林光念

所属：熊本大学医学部附属病院 中央検査部

[共同研究者] 氏名：安東由喜雄、植田光晴、田崎雅義、川原理美、大嶋俊範、神力 悟、
庄野 信、城野博史

所属：熊本大学大学院生命科学研究部病態情報解析学分野

[目的]

肝移植後の FAP 患者について、術後の臨床経過について詳細に検討するとともに、術後死亡し、剖検に至った症例について、全身各臓器、組織へのアミロイドの沈着量やアミロイドを構成する変異型 TTR と野生型 TTR の比率を調べ、同治療の効果と問題点について考察する。

[対象および方法]

対象は、2011 年 6 月 20 日までに当院でフォローした肝移植後の FAP 患者 43 名。これらの患者における術後の生存率や各種検査成績、臨床症状の変化について詳細に検討した。また、このうち死亡した 4 名について、コンゴレッド染色や抗 TTR 抗体を用いた免疫染色により、剖検で採取し得たあらゆる臓器、組織へのアミロイド沈着量を調べた。さらに、これらの患者の各臓器、組織におけるアミロイドを構成する変異型 TTR と野生型 TTR の比率を、質量分析法により定量し、5 名の非移植患者の剖検で得られた臓器、組織でのデータと比較した。

[結果]

1. 肝移植後の FAP 患者 43 名の 5 年生存率は 100%、10 年生存率は 91.4% であった。しかし、43 名中 10 名で術後に心アミロイドーシスの進行が、17 名で眼アミロイドーシスの進行が、さらに 1 名にニューロパチーの増悪が見られた。
2. 肝移植を施行した患者では、腎臓、甲状腺、消化管をはじめ、多くの臓器で明らかにアミロイドの沈着量が減少していた。一方、眼、脊髄、心臓、肺、舌といった臓器では、肝移植を施行した症例でも重度のアミロイド沈着を認めた。
3. 質量分析法による解析の結果、非肝移植患者ではアミロイドを構成する変異型 TTR と野生型 TTR の比率が臓器によって異なっていた。一方、肝移植患者では、術後十二指腸へのアミロイド沈着量の減少を認めた例が存在した。また、心臓、肺、舌といった術後も重度のアミロイド沈着を認めた部位を含め、眼、脊髄を除くほぼ全ての臓器で主として野生型 TTR がアミロイドの主体であった。

[結論]

肝移植が FAP 患者に対する治療法として有効であることは揺るぎないが、本治療には肝移植後も変異型 TTR を主な原料とするアミロイドが沈着し続ける眼や脊髄のみならず、心臓、肺、舌といった臓器で野生型 TTR を主体としたアミロイドの沈着を認め、これらが移植後の臨床症状悪化の原因となっている。

アミロイドーシス夏のワークショップ 2011 抄録

[演 題 名] トランスサイレチンアミロイドーシスに対する薬剤治療の効果と問題点

[演 者] 氏名：関島良樹
所属：信州大学医学部 遺伝子診療部

[共同研究者] 氏名：東城加奈 所属：信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
氏名：森田 洋 所属：信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
氏名：小山 潤 所属：信州大学医学部循環器内科
氏名：池田修一 所属：信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

[目的] トランスサイレチン (TTR) 遺伝子の変異は家族性アミロイドーシス (家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)、家族性アミロイド心筋症 (FAC) など) の原因であり、これまでに約 100 種類の変異が報告されている。一方、野生型 TTR は老人性全身性アミロイドーシス (SSA) の原因となる。家族性アミロイドーシスに対しては肝移植療法の有効性が確立しているが、様々な理由により移植の適応とならない症例が多数を占め、ドナー不足や侵襲性などの問題点も存在している。また、肝移植は SSA に対しては無効である。我々は、肝移植に代わる新たな TTR アミロイドーシスに対する治療法を開発することを目的として研究を行っている。

[方法] トランスサイレチン (TTR) は 127 個のアミノ酸からなる単量体が四量体を形成した分子量 55kDa の蛋白質で、TTR がアミロイドを形成するためには、四量体から単量体への解離と単量体の変性が必要である。我々は、TTR 四量体構造を安定化させる低分子化合物をスクリーニングし最も有望であった diflunisal を用いて、TTR アミロイドーシスを標的とした薬物治療の臨床応用を試みている。健常者を対象にした第一相の臨床試験を経て、現在 FAP 患者 24 名および SSA 患者 5 名に対するオープンラベル試験、FAP 患者 140 名を対象としたランダム化比較試験 (国際・多施設共同試験) を行っている。

[結果および考察]

オープンラベル試験では 2 名の患者が腎機能の悪化により脱落したが、薬剤の中止により回復した。感染症、肺癌、腎癌、脳梗塞で各 1 名が脱落したが diflunisal との関連は否定的であった。Diflunisal の内服により血中 TTR 四量体が安定化され TTR 濃度が有意に上昇した。Diflunisal の投与を受けた患者の臨床 FAP スコアの悪化は平均 1.4/年であり、既報告の FAP の自然経過に比べ進行が緩徐である傾向を認めた。ランダム化比較試験は患者登録が終了し、2012 年中に終了する予定である。Diflunisal に加えて、米国の FoldRx 社により同様の作用機序をもつ新薬 (tafamidis) が開発され、18 ヶ月間の臨床試験により FAP に対する有効性が証明された。Tafamidis は海外で FAP 治療薬として認可される見込みであり、本邦での臨床試験も計画している。

[結論]

Diflunisal および tafamidis の臨床試験結果から、蛋白質の天然構造の安定化という戦略は、TTR アミロイドーシスに対して有効であると考えられる。一方、Diflunisal や tafamidis の内服のみでは、TTR アミロイドーシスを根治できない可能性が高く、遺伝子治療や免疫療法など他の disease-modifying therapy との組み合わせが必要であると予想される。

アミロイドーシス夏のワークショップ 2011 抄録

[演題名] 脳アミロイドアンギオパチーの現状と問題点

[演者] 氏名：山田正仁

所属：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）

[目的] 脳アミロイドアンギオパチー（CAA）に関する現状、問題点を明らかにし、今後の課題を示す。

[方法] 孤発性 A β 型 CAA に焦点をあて、疫学、病因・病態、診断、治療等について、これまでの調査研究結果をレビューし、問題点を抽出する。

[結果および考察]

1. 疫学：A β 型 CAA の病理学的保有率は加齢と共に増加し、アルツハイマー病（AD）では約9割にみられる。本研究班脳アミロイドーシス分科会による調査において、CAA 関連脳葉型脳内出血の有病率は人口 10 万対 7.49 人（年齢 \geq 55 歳）と推定され女性に優位であった。CAA に関連する病態は脳出血以外にも多様であり、病態ごとに疫学を明らかにする必要がある。
2. 病因・病態：A β 型 CAA における脳血管 A β 沈着の機序については、遺伝性的なもの（オランダ型など）については研究が進んでいる。患者の大多数を占める孤発性 CAA については加齢と AD が最大のリスクであり、アポリポ蛋白 E や TGF- β 1 遺伝子多型との関連が報告されているものの不明な点が多い。脳血管 A β 沈着の分子機構をに関する研究をさらに推進する必要がある。CAA は脳血管障害（脳葉型脳出血、皮質微小出血・梗塞、皮質クモ膜下出血、白質脳症、血管炎・CAA 関連炎症）の原因となり、認知症と密接に関連する。CAA 保有者が脳血管障害を惹起する機序・リスク、CAA 及び CAA 関連血管障害が認知機能低下に関与するメカニズムを明らかにする必要がある。
3. 診断：CAA 関連脳出血の診断では Boston 診断基準（Knudsen et al. Neurology 2001）がある。微小出血の検出には MRI T2*画像等が用いられているが、微小病変（出血・梗塞）の検出の向上が課題である。アミロイドイメージングは脳アミロイド沈着を描出するが、脳実質（老人斑）と血管（CAA）の沈着とを区別することはできない。CAA では脳脊髄液中の A β 42 ばかりでなく血管アミロイドの主成分である A β 40 も低下することが報告されたが（Verbeck et al. Ann Neurol 2009）、マーカーとしての価値を確立し、さらに血液マーカーを探索する必要がある。
4. 治療／抗アミロイド療法と CAA：CAA 関連脳内出血に対する外科的治療では、大多数の例で制御不能な出血を惹起することなく手術可能である（Hirohata et al. Eur J Neurol 2010）。CAA 関連炎症・血管炎に対し副腎皮質ステロイド、免疫抑制薬の有効性が多数例で示唆されている。一方、現在 CAA そのものを標的とした治療法はなく、開発研究を推進する必要がある。近年、AD に対する抗アミロイド療法開発が進展し、A β 免疫療法（能動・受動）の臨床試験において、CAA 及び CAA 関連微小出血の増加（Boche et al. Brain 2008）、血管原性浮腫の合併（Salloway et al. Neurology 2009）などが報告された。AD に対する抗アミロイド療法、特に免疫療法では、CAA 関連脳血管障害の合併に対する対策が必要である。

[結論] 孤発性 A β 型 CAA の現状、問題点を報告した。

アミロイドーシス夏のワークショップ 2011 抄録

[演 題 名] アミロイドーシスの観点から見たプリオン病の病態

[演 者] 氏名：水澤英洋

所属：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分野

[共同研究者] 氏名：北本哲之

所属：東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野

氏名：岩城 徹

所属：九州大学大学院医学研究院神経病理学分野

氏名：田中元雅

所属：脳科学総合研究センター田中研究ユニット

[目的] アミロイドーシスの観点からは、プリオン病は限局性アミロイドーシスの中の脳アミロイドーシスの1つとして分類されている。この場合のアミロイド蛋白は APrP で前駆体蛋白はプリオン蛋白、とくに正常プリオン蛋白(PrPc)は病原性を示さないことから異常プリオン蛋白(PrPsc)ということになる。アミロイドの定義は、コンゴ・レッド染色で赤橙色に染まり、偏光顕微鏡下で複屈折性を示しエメラルド・グリーンを呈する物質であるが、プリオン病の大部分を占める孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)では、PrPsc は大脳皮質などの灰白質にびまん性に存在しシナプス・パターンと呼ばれ“アミロイド”ほとんど認められない。これまでの研究成果を踏まえて、アミロイド蛋白としての PrPsc の病原性について考察する。

[方法] これまでのプリオン病の病理学的、生化学的、分子生物学的、分子遺伝学的研究成果を再検討して、現時点でのプリオン病の病態における PrPsc のアミロイド蛋白としての関わりを明らかにする。ヒトプリオン蛋白以外のプリオンについても検討する。

[結果および考察] プリオン病に於ける PrPsc の分布について多くはシナプス・パターンであるが、MV2、VV2 などの孤発性 CJD、Gerstman-Straeussler-Scheinker 症候群など遺伝性プリオン病の一部、変異型 CJD などでは斑状の PrPsc 沈着を認める。また、CJD からマウスへの感染実験でもコンゴ・レッド染色陽性の Kuru 斑が認められ、電顕でも直径 7~10nm のアミロイド細線維が観察されている。PrPc に比べて PrPsc は β シート構造の含量が 3% から 40% に著増していると言われており、PrPsc がアミロイド原性蛋白であることは確実と思われる。このことは、髄液中の PrPsc を検出する方法として最近注目されている QUICK 法では、PrPsc の検出法としてアミロイド蛋白を認識する Thioflavine T を用いていることから伺える。

他方、全身性アミロイドーシスはもとより、Alzheimer 病や脳血管アミロイドーシスなどのようにアミロイド蛋白が多量に蓄積することが発症に深く関わるアミロイドーシスと、プリオン病の発症機序が同じかどうかについては検討を要する。例えば、視床型孤発性 CJD や家族性致死性不眠症では脳内に蓄積している PrPsc の免疫組織学的検出は困難で、ウエスタン・ブロッティングで辛うじて検出できる程度であり、少なくとも蓄積量と神経変性の程度とは相関しない。また、プロテアーゼ感受性 PrPsc をもつプリオン病も報告されている。

[結論] プリオン病は、伝達性を有する異常プリオン蛋白(PrPsc)をアミロイド蛋白とする脳アミロイドーシスの1つである。しかし、PrPsc が神経障害をきたすメカニズムとしては単純な PrPsc の沈着では説明が困難であり、その解明は今後の課題である。

アミロイドーシス夏のワークショップ 2011 抄録

[演 題 名] A β アミロイドーシスを標的としたアルツハイマー病治療法の開発

[演 者] 氏名：瓦林 毅
所属：弘前大学大学院脳神経内科学

[共同研究者]	氏名：高村歩美	所属：弘前大学大学院脳神経内科学
	氏名：若佐谷保仁	所属：同上
	氏名：仲田 崇	所属：同上
	氏名：松原悦朗	所属：同上
	氏名：東海林幹夫	所属：同上

[目的] Amyloid β protein (A β)アミロイドーシスはアルツハイマー病(AD)で最も早期に出現する病変である。現在、A β oligomer の脳内蓄積が AD 発症の原因と考えられており、これを標的とした治療法が開発されている。我々は A β oligomer 特異抗体を作成し、ヒト嗅内野と脳脊髄液(CSF)を用いて A β oligomer 蓄積機構を解析した。さらに A β oligomer 特異抗体による受動免疫療法の効果も A β amyloidosis モデルマウス (Tg2576)を用いて検証した。

[方法] 1) A β 1-42 tetramer を抗原として、抗 A β oligomer 特異抗体 1A9 と 2C3 を作製した。2C3 を用いた A β oligomer の ELISA 系を確立した。ヒト嗅内野を生理食塩水で抽出し、可溶性 A β oligomer の量と Braak NFT stage との相関を検討した。AD 10 例と正常コントロール 10 例の CSF で size exclusion chromatography と ELISA を用いて A β monomer と A β oligomer 量を測定した。2) 1A9 または 2C3 を Tg2576 マウスに 4 月齢から毎週 0.4mg/kg の尾静脈内投与を 9 カ月間行い、4 種類の記憶検査(Y-maze test, novel object cognition test, Morris water maze, cued and fear conditioning test)の後に解剖した。脳内 A β oligomer 量を抗 A β oligomer 抗体 A11 による dot blot で判定した

[結果および考察] 1) ヒト嗅内野の可溶性分画中の A β 12 mer 量は AD を 100%とすると Braak NFT stage I-II で 45%、III-IV で 60%の量で蓄積した。A β 12 mer の蓄積は認知症状の出現に先行して出現し、NFT stage の進行と共に増加すると考えられた。CSF 中のリポ蛋白関連 A β monomer は AD とコントロールで差を認めなかったが、リポ蛋白非結合 A β monomer は AD で減少していた。一方、リポ蛋白を除去した CSF 中に 4-35-mer に相当する A β oligomer を認めた。CSF 中の A β oligomer 量は AD で増加を認めた。CSF 中の A β oligomer/monomer 比も AD でコントロールに比べて有意に増加した。このことから AD では A β とリポ蛋白との結合の減少によるリポ蛋白非結合型 A β が凝集して oligomer を形成する可能性が考えられた。2) 抗 A β oligomer 特異抗体 1A9 または 2C3 投与マウスでは 4 種類の行動検査のすべてで改善を認めた。シナプス蛋白の PSD-95 や dendric spine のシナプス蛋白 doublecortin の染色の改善を認め、変性 neuron のマーカーである Fluoro-Jade B (FJB)の染色は著明に減少した。また、脳 A β oligomer 量の減少を認めた。これらより脳 A β oligomer の減少はシナプス変性と神経変性から脳を保護し、記憶機能を改善すると考えられた。

[結論] 嗅内野の A β oligomer 量は AD の認知機能障害と相関すると考えられた。A β oligomer の形成には A β とリポ蛋白との結合の減少が関わっていることが示唆された。A β oligomer 抗体を用いた抗体療法は有望な AD の根本療法と考えられた。

アミロイドーシス夏のワークショップ 2011 抄録

[演題名] AL アミロイドーシス診断の問題点

[演者] 氏名：畑 裕之
所属：熊本大学医学部附属病院血液内科

[共同研究者] 氏名：大嶋俊範、大林光念、植田光晴、安東由喜雄
所属：熊本大学病態情報解析学分野
氏名：内場光弘
所属：熊本大学輸血細胞治療部

[目的] AL アミロイドーシスの診断は容易ではない。今回は、当科の症例を分析し、診断に関する問題点を明らかにし、診断アルゴリズムを改良することを目的とする。

[方法] 当科で経験した AL アミロイドーシス(疑いを含む)症例 11 例を詳細に解析した。項目として、障害臓器とその生検の有無、過マンガン酸カリ阻害試験結果、免疫染色での免疫グロブリン軽鎖の有無、免疫電気泳動、Free Light Chain の結果、PIC、d-dimer の増加について検討した。

[結果] 以下の 4 点を検証した。

- 1 : AL アミロイドーシスの原因分子である免疫グロブリン軽鎖 (Bence Jones Protein ; BJP) は、3 例のみに検出された。FreeLite 検査は 8 例に施行され、異常は 7 例に認められた。
- 2 : アミロイドによる障害臓器の生検は、8 例に施行され、全例にアミロイドが証明された。一方、障害臓器以外の部位の生検は 3 例で行われており、心生検を拒否した 1 例で、アミロイドの証明ができなかった。
- 3 : 免疫染色は 6 例で施行され、確定できたのは 4 例であった。残り 2 例は判定困難例であり、うち 1 例は山口大学で確定可能であった。
- 4 : 過マンガン酸カリウム阻害試験は 7 例で施行され、阻害を認めたのは 3 例のみであった。また、同一症例内で阻害の結果が臓器ごとに異なることもあった。
- 5 : PIC 測定は 9 例で施行され、8 例で 1.45 以上の増加を認めたが、同時に d-dimer の増加が 1 名に認められた。

[結論] BJP の検出については、FreeLite 検査が有効である。障害臓器の生検が施行できればアミロイドの検出は可能であるが、心アミロイドーシスの際には、安全かつ簡便な生検は困難な点が今後の課題である。免疫染色による診断が望ましいが、判定不能例があることが問題である。過マンガン酸カリウム阻害試験の結果は免疫染色と異なることが多く、特異性が低いことが改めて示された。当科が提唱する PIC 検査は、ほぼ全例に異常を示したが、血栓症による擬陽性に留意すべきである。上記のことを考慮し、専門施設でなくても診断が可能ないように、診断アルゴリズムを改良する必要がある。

[謝辞] 症例の検査についてご協力いただいている当院循環器内科、腎臓内科、消化器内科の先生方に深謝申し上げます。

アミロイドーシス夏のワークショップ 2011 抄録

[演題名] AL アミロイドーシスに対する治療の最前線

[演者] 氏名：島崎千尋
所属：社会保険京都病院血液内科

[共同研究者] 氏名：淵田真一	所属：社会保険京都病院血液内科
氏名：岡野 晃	所属：同上
氏名：初瀬真弓	所属：同上
氏名：村頭 智	所属：同上

[目的] AL アミロイドーシスに対する治療理念は原因となる前駆蛋白である免疫グロブリン軽鎖の産生を早期に抑制することにある。この理念に基づき多くの治療が検討されてきた。なかでも自家末梢血幹細胞移植は予後不良の本症においても長期生存をもたらしてきた。しかし、移植適応症例は心アミロイドーシスなどを除く一部の全身状態良好な症例に限られる。したがって、多くを占める移植適応外の症例に対する新たな治療法の開発は緊急の課題である。近年、多発性骨髄腫に対する治療薬として開発されたサリドマイド (THAL)、レナリドミド (LEN)、ボルテゾミブ (BOR) などの新規薬剤が AL アミロイドーシスにも有用であることが報告されている。そこで、これら新規薬剤を用いて治療を行った自験例を紹介し、海外における治療の現状と今後の展開について述べる。

[方法] 症例 1: 68 歳、女性。IgG λ 。ネフローゼ症候群にて発症。腎、肝、消化管に沈着。MEL/DEX ③→auto-PBSCT→BOR/DEX③→BOR/THAL/DEX①→CTD (CPM/THAL/DEX) ③。
症例 2: 61 歳、女性。IgG λ 。胃幽門狭窄にて発症。舌・顎下腺・心・胃・十二指腸・結腸・直腸に沈着。MEL/DEX ③→LEN/DEX5⑤。
症例 3: 67 歳、女性。IgG λ 。心不全にて発症。心筋生検で AL アミロイドーシスと診断。HD-DEX ①→BOR/DEX①にて CR を獲得。その後、MP→THAL→BOR/DEX。
症例 4: 63 歳、女性。BJP λ 型。ネフローゼ症候群で発症。腎、神経、筋肉に沈着。VAD③→auto-PBSCT②→HD-DEX→BOR②。

[結果および考察] 症例 1 では MEL/DEX、auto-PBSCT 無効、BOR/DEX で免疫電気泳動上 M 蛋白の消失をみたが腹水増量。CTD で全身状態改善し退院となった。症例 2 では MEL/DEX 無効であったが LEN/DEX で M 蛋白の著減 (IgG5800 → 1209)、NT-proBNP (1239→399) の低下を認めた。症例 3 では BOR/DEX により速やかな CR 達成と心機能の改善を認めた。症例 4 では BOR により CPK の低下、筋力の回復を認めた。新規薬剤は HD-DEX や MEL/DEX 無効例にも有用であることが示唆された。今後、その有用性を前方視的試験で明らかにすることが重要である。

[結論] 新規薬剤では従来の治療法に比較しより早期に、かつより強力に軽鎖を減少させる可能性があり、移植非適応例にも安全に使用可能であることが示唆された。