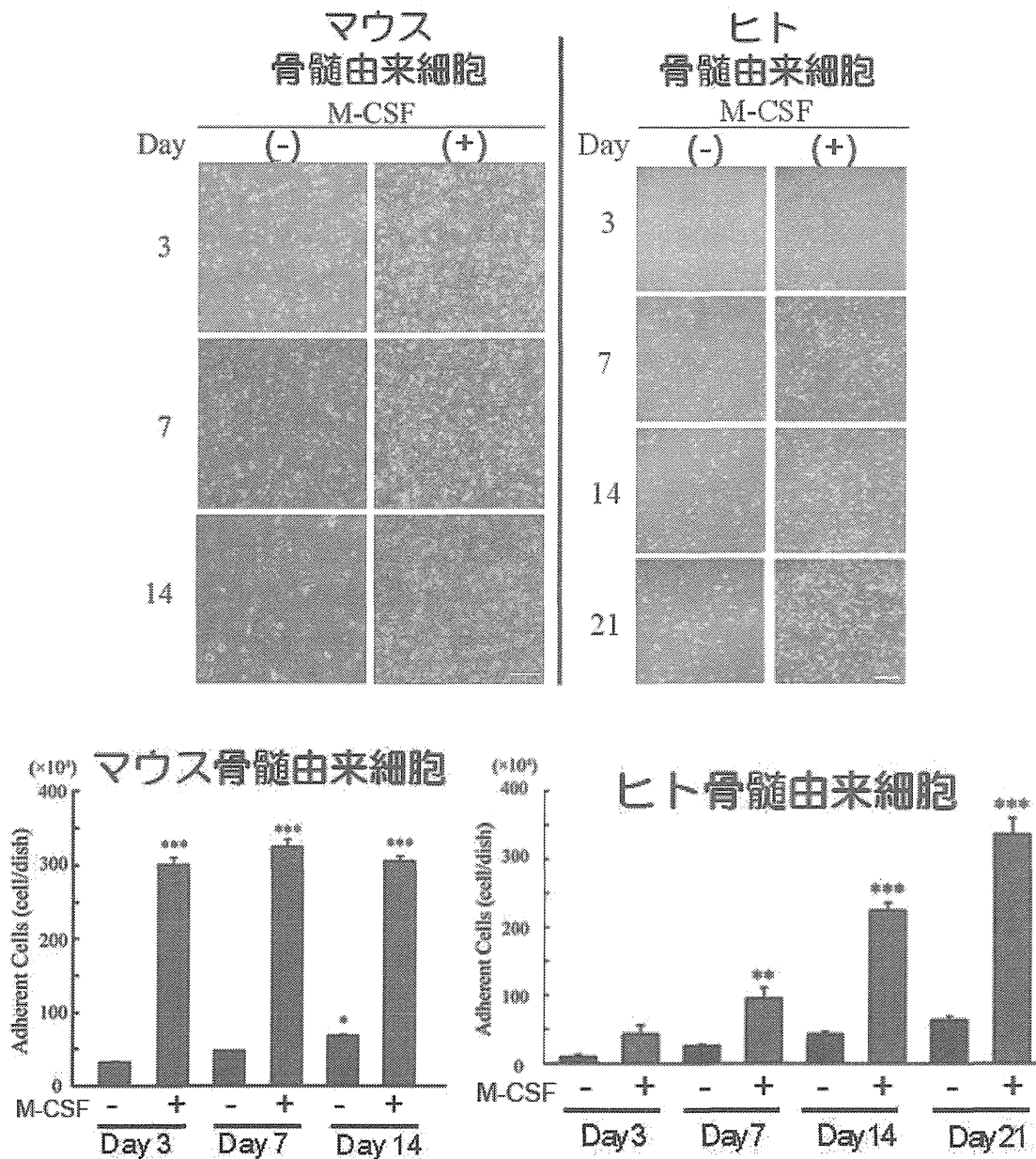


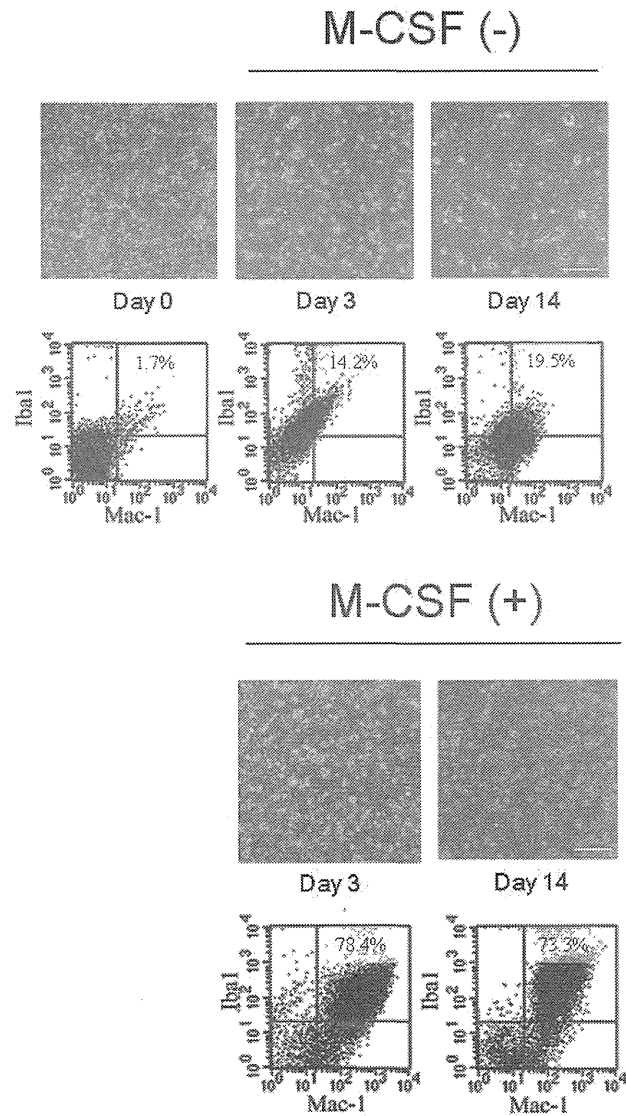
図 1 : M-CSF 処置による付着細胞数の変化



マウスおよびヒト骨髄由来細胞を培養すると培養ディッシュへの付着細胞数が経時的に増加し、M-CSF 処置によってこの増加が促進した。

M-CSF: macrophage-colony stimulating factor. Scale bars: 200 μm . ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. M-CSF (-) at the same time point.

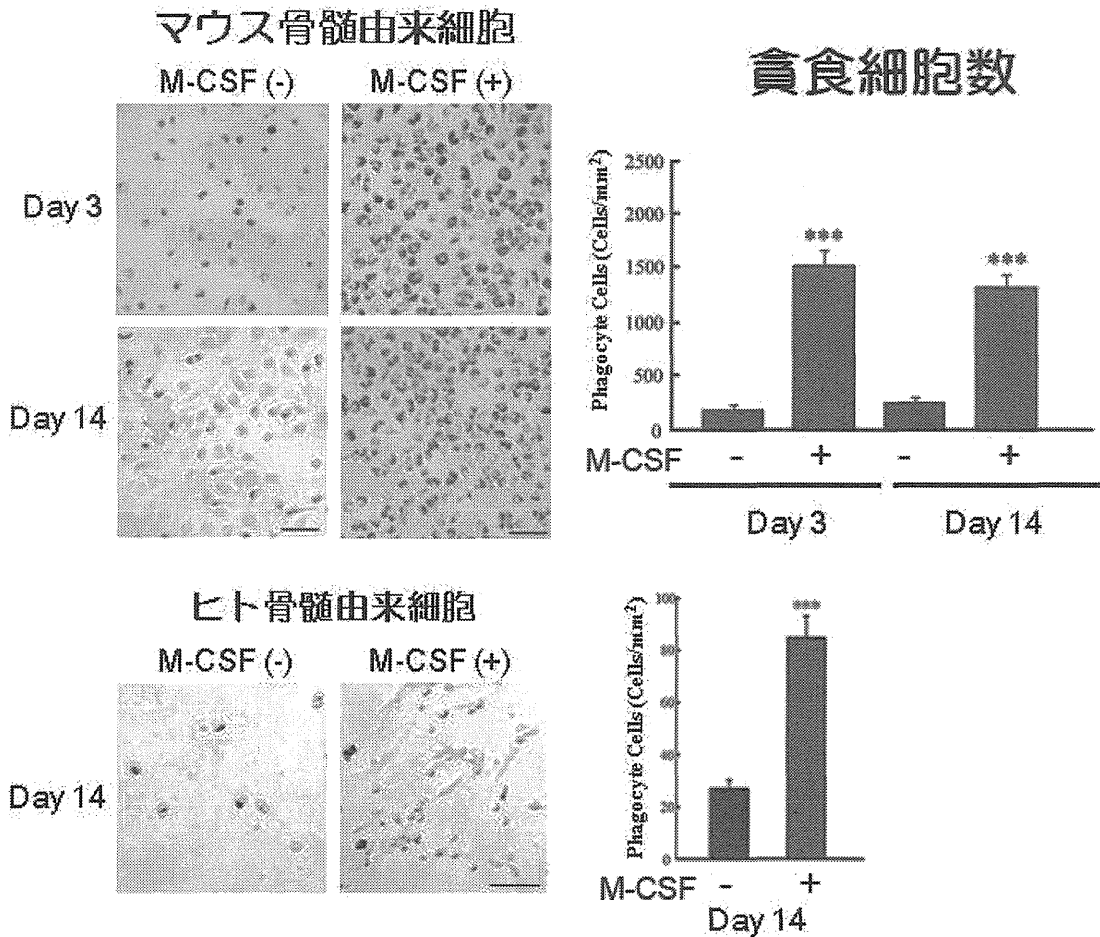
図 2：骨髄由来細胞の分化状態の解析



マウス骨髄由来の付着細胞について、ミクログリアマーカー(CD11b, ionized calcium-binding adapter molecule 1) を発現する細胞数をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、培養日数依存的にミクログリア陽性細胞数の増加が見られた。さらに、M-CSF 処置によりミクログリアマーカーを発現する細胞数は顕著に増加した。

Mac-1: mouse CD11b, Iba1: ionized calcium-binding adapter molecule 1. Scale bars: 200 μ m.

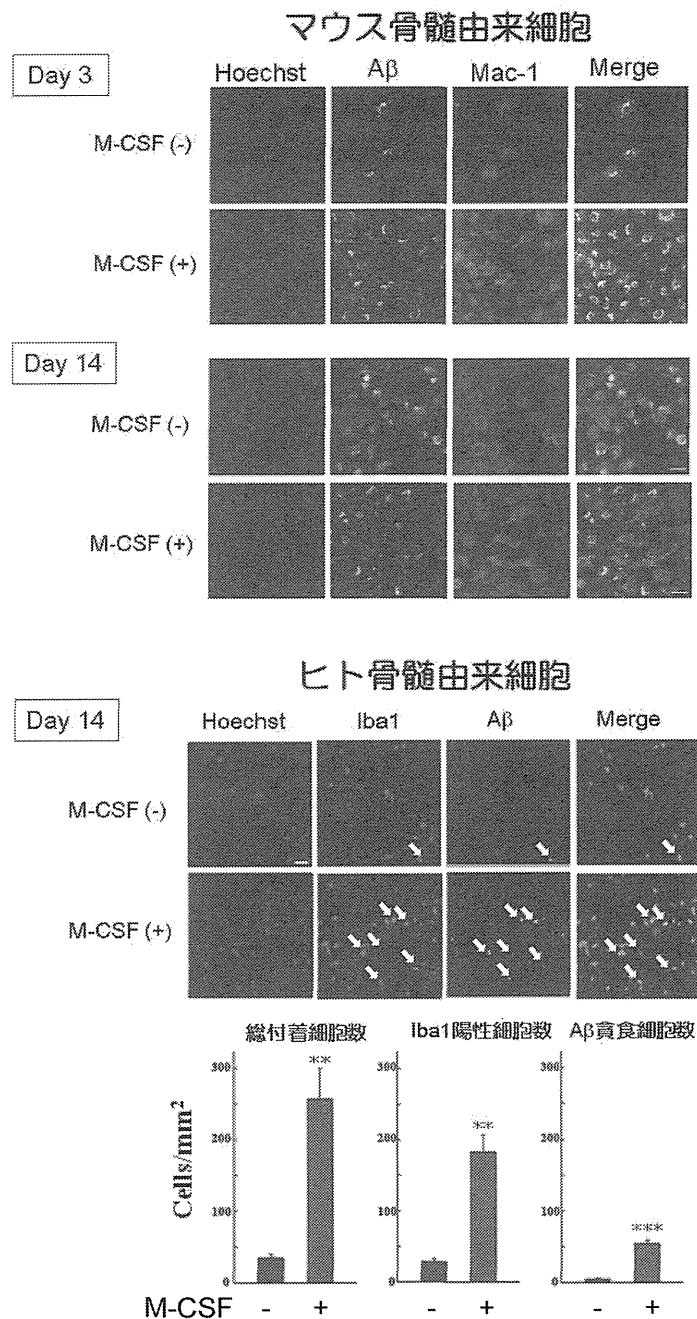
図 3 : 骨髄由来細胞の貪食機能の解析 (鉄粒子の貪食)



鉄粒子の貪食機能についてマウス骨髄由来細胞およびヒト骨髄由来 CD34 陽性造血幹細胞を用いて解析した。その結果、付着細胞の一部が鉄粒子を貪食しており、M-CSF を処置することで貪食細胞数が有意に増加することが明らかとなった。

M-CSF: macrophage-colony stimulating factor. Scale bars: 200 μ m. *** $P < 0.001$ vs. M-CSF (-).

図 4 : 骨髄由来細胞の貪食機能の解析 (A β の貪食)



A β の貪食機能について共焦点レーザー顕微鏡にてマウス骨髄由来細胞およびヒト骨髄由来 CD34 陽性造血幹細胞を用いて解析した。その結果、付着細胞の一部が A β を貪食しており、M-CSF を処置することで貪食細胞数が有意に増加することが明らかとなった。

M-CSF: macrophage-colony stimulating factor. Scale bars: 20 μ m (マウス骨髄由来細胞), 20 μ m (ヒト骨髄由来細胞). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. M-CSF (-).

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

フェノール化合物は特異的結合によって A β オリゴマー形成及びシナプス毒性を抑制する

研究分担者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)

共同研究者 小野賢二郎*、Lei Li**、高村雄策***、吉池裕二****、池田篤平*、西条寿夫***、高島明彦****、David B. Teplow*****、Michael G. Zagorski**

*金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)

**Department of Chemistry, Case Western Reserve University

***富山大学大学院医学薬学研究部システム情動科学

****国立長寿医療研究センター研究所

*****Department of Neurology, David Geffen School of Medicine at UCLA

研究要旨 近年、 β アミロイド蛋白(A β)凝集過程で生じる A β オリゴマーが強い細胞毒性を有し、アルツハイマー病(AD)の発症に関与していることが示唆されている。我々は、以前に *in vitro* と *in vivo* 両方においてミリセチン (Myr) やロズマリン酸 (RA) が A β 凝集を抑制することを報告した。我々は今回、Myr、RA、クルクミン、フェルラ酸、ノルジヒドロログアイアレチン酸の A β オリゴマー形成における影響を photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP)、原子間力顕微鏡を用いて検討した。また、human embryonic kidney (HEK) 293 細胞を用いた MTT assay にて細胞毒性、マウスの海馬スライスを用いて Long term potentiation (LTP) および Long-term depression (LTD) を解析してシナプス毒性を検討した。さらに ¹⁵N でラベルした A β を用いて Nuclear Magnetic Resonance (NMR)で解析し、A β の結合部位を調べた。今回検討したフェノール化合物のなかで Myr 及び RA が強力に A β オリゴマー形成を抑制し、細胞およびシナプス毒性を軽減した。Myr は NMR にて有意なケミカルシフトを示した。Myr や RA などのフェノール化合物は異なった結合形式で A β の早期凝集過程と毒性を抑制したことから、AD の予防・治療の有力な基本分子と考えられる。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の病態において、 β -アミロイド蛋白 (A β) の凝集・蓄積が AD の発症機構に重要な役割を果たしていると考えられている (アミロイドカスケード仮説)。従来、脳アミロイドとして蓄積する A β 線維 (fA β) が神経毒性を発揮すると考えられていたが、最近、可溶性オリゴマーの毒性に注目が集まっている。

さまざまな疫学的研究は適度の赤ワイン飲用者には AD の発症抑制効果が見られることを示唆している。我々は以前に *in vitro* と *in vivo* 両方においてミリセチン (Myr) やロズマリン酸 (RA) が A β 凝集を抑制することを報告した。今回、こ

れらの機序を明らかにするためフェノール化合物の A β 凝集とオリゴマーによる細胞及びシナプス毒性への効果を調べた。

B. 研究方法

Myr、RA、クルクミン、フェルラ酸、ノルジヒドロログアイアレチン酸の A β オリゴマー形成における影響を photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP)にて重合反応を行った後、SDS-PAGE を用いて分析した。そのうえで、原子間力顕微鏡を用いて形態学的評価を行った。解析した。また、Human embryonic kidney (HEK) 293 細胞を用いた MTT assay により細胞毒性、マ

ウスの海馬スライスを用いて CA1 領域の field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP)を記録し、Long term potentiation (LTP) および Long-term depression (LTD) に及ぼす影響を解析した。さらに ^{15}N でラベルした $\text{A}\beta$ を用いて Nuclear Magnetic Resonance (NMR)で解析し、ポリフェノールが結合する $\text{A}\beta$ の特定領域を調べた。

(倫理面への配慮)
問題なし。

C. 研究結果

フェノール化合物は全て $\text{A}\beta$ のオリゴマー形成を抑制し、特に Myr や RA が強い抑制効果を示した。また、Myr は NMR にて有意なケミカルシフトを示した一方で、RA はケミカルシフトを示さなかった。また、Myr や RA は、MTT assay にてオリゴマーによる細胞毒性を抑制するだけでなく、fEPSP 解析にて、LTP 抑制や LTD 増強といったシナプス毒性も軽減させた。

D. 考察

本研究で Myr や RA をはじめとするフェノール化合物が $\text{A}\beta$ 凝集過程における早期の段階であるオリゴマー形成を濃度依存性に抑制し、細胞およびシナプス毒性を軽減することを明らかにした。NMR では Myr は $\text{A}\beta_{42}$ モノマーに有意に結合する一方で RA はモノマーには結合を示さなかった。RA は NMR で detect できない低分子オリゴマー、あるいは構造変換したモノマーに結合することによって $\text{A}\beta$ オリゴマー形成を抑制すると考えられた。その他の Myr をはじめとするフェノール化合物は、 $\text{A}\beta$ モノマーに複数の特異的結合部位、すなわち、Arg(5)、Ser(8)、Gly(9)、His(13)、Lys(16)、Asp(23)、Ile(31)に結合することでオリゴマー形成を抑制することが考えられた。

E. 結論

Myr や RA などのフェノール化合物は異なった結合形式で $\text{A}\beta$ の早期凝集過程と毒性を抑制したことから、AD の予防・治療の有力な基本分子と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirohata M, Ono K, Takasaki JI, Takahashi R, Ikeda T, Morinaga A, Yamada M: Anti-amyloidogenic effects of soybean isoflavones in vitro: fluorescence spectroscopy demonstrating direct binding to $\text{A}\beta$ monomers, oligomers and fibrils. *Biochim Biophys Acta (Molecular Basis of Disease)* 1822: 1316-1324, 2012.
- 2) Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiie Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M: Phenolic compounds prevent amyloid β -Protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding. *J Biol Chem* 287: 14631-14643, 2012.
- 3) Ono K, Mochizuki H, Ikeda T, Nihira T, Takasaki JI, Teplow DB, Yamada M: Effect of melatonin on α -synuclein self-assembly and cytotoxicity. *Neurobiol Aging* 33: 2172-2185, 2012.
- 4) Ono K, Yamada M: Vitamin A and Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int* 12: 180-188, 2012.
- 5) Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M: Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein. *J Neurochem* 122: 883-890, 2012.
- 6) Sakai K, Ono K, Harada H, Shima K, Notoya M, Yamada M: Parkinson's disease showing progressive conduction aphasia. *Neurol Sci* 33: 399-402, 2012.
- 7) Sakai K, Hayashi S, Sanpei K, Yamada M, Takahashi H: Multiple cerebral infarcts with a few vasculitic lesions in the chronic stage of cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *Neuropathology* 32: 551-556, 2012.
- 8) Samuraki M, Matsunari I, Chen WP, Shima K, Yanase D, Takeda N, Matsuda H, Yamada M: Glucose metabolism and gray-matter concentration in apolipoprotein E $\epsilon 4$ positive normal subjects. *Neurobiol Aging* 31: 2321-2323, 2012.
- 9) Shima K, Matsunari I, Samuraki M, Chen WP, Yanase D, Noguchi-Shinohara M, Takeda N, Ono K,

- Yoshita M, Miyazaki Y, Matsuda H, Yamada M: Posterior cingulate atrophy and metabolic decline in early stage Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33: 2006-2017, 2012.
- 10) Sugano K, Yokogawa M, Yuki S, Dohmoto C, Yoshita M, Hamaguchi T, Yanase D, Iwasa K, Komai K, Yamada M: Effect of cognitive and aerobic training intervention on older adults with mild or no cognitive impairment: a derivative study of the nakajima project. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2: 69-80, 2012.
- 11) Takahashi R, Ono K, Ikeda T, Akagi A, Noto D, Nozaki I, Sakai K, Asakura H, Iwasa K, Yamada M: Coagulation and fibrinolysis abnormalities in familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid* 19: 129-132, 2012.
- 12) Yamada M: Predicting cerebral amyloid angiopathy-related intracerebral hemorrhages and other cerebrovascular disorders in Alzheimer's disease. *Front Neurol* 3: 64, 2012.
- 13) Yamada M, Naiki H: Cerebral amyloid angiopathy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107: 41-78, 2012.
- 14) 小野賢二郎, 山田正仁: 認知症の阻止を狙った治療薬開発研究「A β 凝集機構解明から予防・治療薬開発へ」*日本認知症学会誌* 26: 1-6, 2012.
- 15) 佐村木美晴, 小野賢二郎, 山田正仁: 認知症診断に役立つ臨床検査: PET. *認知症の最新医療* 2: 22-26, 2012.
- 16) 佐村木美晴, 山田正仁: アルツハイマー型認知症. *Suzuken Medical* 15: 4-6, 2012.
- 17) 佐村木美晴, 山田正仁: 疾患 SUMMARY: アルツハイマー型認知症. *Suzuken Pharma* 15: 6, 2012.
- 18) 篠原もえ子, 山田正仁: どう診断する? — 認知症の診断. *内科* 109: 757-762, 2012.
- 19) 篠原もえ子, 山田正仁: 認知症の問題とは? *臨床検査* 56: 8-12, 2012.
- 20) 篠原もえ子, 山田正仁: 薬剤による認知機能障害. *Brain and Nerve* 64: 1405-1410, 2012.
- 21) 島 啓介, 松成一朗, 佐村木美晴, 陳 偉萍, 柳瀬大亮, 篠原もえ子, 竹田のぞみ, 小野賢二郎, 吉田光宏, 宮崎吉春, 松田博史, 山田正仁: 早期アルツハイマー病における後部帯状回萎縮と代謝低下. *金沢大学十全医学会雑誌* 121: 70-71, 2012.
- 22) 浜口 毅, 山田正仁: β アミロイドの propagation による進展. *Current Therapy* 30: 336-340, 2012.
- 23) 山田正仁: アミロイドーシスの臨床. *画像診断* 32: 1100-1110, 2012.
- 24) 山田正仁: アルツハイマー病の病態と診断. *日本医師会雑誌* 141: 534-538, 2012.
- 25) 佐村木美晴, 山田正仁: 認知症診断のアルゴリズム. 辻 省次 (編) *アクチュアル脳・神経疾患の臨床 認知症 神経心理学的アプローチ*, 中山書店, 東京, pp20-25, 2012.
- 26) 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と他の診断ツールとの比較. レビー小体型認知症研究会 (編) *レビー小体型認知症の最前線 5th. Anniversary*. 株式会社 harunosora, 東京, pp18-23, 2012.
- 27) 吉田光宏, 山田正仁: DLB における MIBG 心筋シンチグラフィの診断的価値の確立に向けて. レビー小体型認知症研究会 (編) *レビー小体型認知症の最前線 5th. Anniversary*, 株式会社 harunosora, 東京, pp103-106, 2012.
- 28) 山田正仁: Lewy 小体型認知症の臨床的特徴とその診断基準は? 中島健二, 和田健二 (編) *認知症診療 Q&A92*. 中外医学社, 東京, pp67-69, 2012.
- 29) 山田正仁: 「Lewy 小体型認知症」と「認知症を伴う Parkinson 病」は同じ病気ですか? 症状の違いはあるのでしょうか? 中島健二, 和田健二 (編) *認知症診療 Q&A92*, 中外医学社, 東京, pp70-71, 2012.
- 30) 山田正仁: アミロイドポリニューロパチー. 小林祥泰, 水澤英洋 (編) *神経疾患最新の治療 2012-2014*, 南江堂, 東京, pp311-313, 2012.

2. 学会発表

- 1) Yamada M. Protein aggregation as a therapeutic target of cerebral amyloidosis. *Clinical Neuroscience Seminar*, Southampton, May 8, 2012.
- 2) Hirohata M, Ono K, Takasaki J, Yamada M. Anti-amyloidogenic effects of isoflavones *in vitro*: fluorescence spectroscopy demonstrating direct interactions between isoflavones and A β s.

Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2012, Vancouver, July 14-19, 2012.

3) Ono K, Takasaki J, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M. Vitamin A has anti-oligomerization effects on amyloid- β *in vitro*. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2012, Vancouver, July 14-19, 2012.

4) Matsunari I, Samuraki M, Shima K, Wei-Ping Chen, Noguchi-Shinohara M, Ono K, Yoshita M, Miyazaki Y, Matsuda H, Yamada M. Hippocampal glucose metabolism is reduced in some, but not all patients with Alzheimer's disease: the Ishikawa brain imaging study. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Milan, October 27-31, 2012.

5) 赤木明生, 岩佐和夫, 坂井健二, 本崎裕子, 小野賢二郎, 杉山 有, 山田正仁: 新規トランスサイレチン遺伝子変異 (TTR Leu58arg) を有する家族性アミロイドポリニューロパチー家系の臨床的検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.22-25, 2012.

6) 小野賢二郎, 高崎純一, 吉池裕二, 廣畑美枝, 池田篤平, 森永章義, 高島明彦, 山田正仁: ビタミン A による A β オリゴマー形成抑制効果. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.22-25, 2012.

7) 高橋良一, 小野賢二郎, 池田篤平, 赤木明生, 能登大介, 野崎一朗, 坂井健二, 朝倉英策, 岩佐和夫, 山田正仁: 家族性アミロイドポリニューロパチーの凝固・線溶異常. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.22-25, 2012.

8) 廣畑美枝, 小野賢二郎, 高崎純一, 森永章義, 池田篤平, 山田正仁: NSAIDs は β アミロイド蛋白オリゴマー形成抑制作用およびシーディング抑制作用を有する. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.22-25, 2012.

9) Ono K, Takasaki J, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M: Vitamin A inhibits A β oligomerization *in vitro*. 第 35 回日本神経科学大会 Neuroscience 2012, 名古屋, 9.18-21, 2012.

10) 小野賢二郎, Lei Li, 高村雄策, 吉池裕二,

池田篤平, 西条寿夫, 高島明彦, David B. Teplow, Michael G. Zagorski, 山田正仁: フェノール化合物は特異的結合によって A β オリゴマー形成及びシナプス毒性を抑制する. 第 31 回日本認知症学会学術集会, 筑波, 10.26-28, 2012.

11) 廣畑美枝, 小野賢二郎, 高崎純一, 高橋良一, 池田篤平, 森永章義, 山田正仁: イソフラボンの β アミロイド蛋白モノマー・オリゴマー・線維への作用の検討. 第 31 回日本認知症学会学術集会, 筑波, 10.26-28, 2012.

12) 山田正仁: DLB 診断のための MIBG 心筋シンチグラフィ. 第 6 回レビー小体型認知症研究会, 横浜, 11.10, 2012.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 (申請中を含む)

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

透析患者の手根管症候群手術既往歴の疫学調査

研究分担者 西 慎一 神戸大学大学院腎臓内科 腎血液浄化センター*

共同研究者 山縣邦弘**、中井 滋***、星野 純一****、椿原美治*****、

筑波大学医学医療系腎臓内科学**、藤田保健衛生大学臨床工学科***、虎ノ門病院分院

内科****、大阪大学大学院医学系研究科腎疾患統合医療学寄付講座*****

研究要旨 透析アミロイドーシス(HDA)は多彩な骨関節症状を呈する。そのため加齢に伴う骨関節症状と鑑別も必要である。近年透析患者が高齢化しているが、透析アミロイドーシスの骨関節症状の有病率が上昇しているのか、逆に低下しているのか、この疑問に関する明確なエビデンスがない状況である。そこで、日本透析医学会の統計調査資料を利用し、この問題に関する分析調査を行った。手根管症候群(CTS)はHDAの最も代表的な症状である。CTSの手術既往歴が1999年と2010年に調査されており、この2年分の調査結果を背景要因も含めて検討した。その結果、CTS手術既往歴は、4.9%から3.4%に減少していた。この2調査期間で、背景要因として透析患者の平均年齢は上昇していたが、尿素除去透析効率(Kt/V)、透析前BUN(血液尿素窒素)、透析前血清クレアチニン値に改善がみられた。特に、透析エンドトキシン濃度が低下していることが、この2調査期間での大きな変化であった。HDAの代表的症状であるCTSの既往歴が低下していることから、近年HDAの発症は抑制されている可能性が示唆された。その原因として、透析効率の改善、透析液の清浄化が関与していると推測された。

A. 研究目的

透析アミロイドーシス(HDA)は、透析歴、加齢、炎症、酸化ストレスなどにより発症率が増加すると言われている。近年透析患者の高齢化が進行しており、HDAの発症が増加していることも懸念されていた。しかし、大規模なHDAに関する疫学的調査はなくその実態は不明であった。日本透析医学会では毎年透析患者の実態調査を施行している。1999年と2010年に、手根管症候群(CTS)の手術既往歴が調査されている。この資料を基に、HDAの疫学的調査を試み、CTSの有病率とその背景因子の変化も検討した。

B. 研究方法

日本透析医学会の統計調査資料を調査対象とした。1999年と2010年に、手根管症候群(CTS)の手術既往歴が調査されており、その頻度の推移、血中 β_2 ミクログロブリン濃度との関係、透析背景因子の中で比較可能なデータを比較した。

(倫理面への配慮)

日本透析医学会の統計調査資料は、患者よりデータ登録の際の同意を得ているものであり、匿名化されたデータの集計結果であることから、特定の患者の個人情報への漏えいなどに繋がる心配はなく、特段の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

1999年(調査対象者96,381人)及び2010年(調査対象者229,968人)ともに、CTS手術既往歴は、透析年数とともに増加していた。特に透析歴25年以上の長期透析患者では、手術既往歴がどちらの年度も約半数以上の症例に認められた(表1、図1)。

1999年から2010年にかけて、CTS手術既往歴は、患者全体においては4.9%から3.4%に減少していた。透析年数毎にCTS手術既往歴を検討した場合、透析歴20~25年では40.3~20.0%に、透析歴25年以上では69.7~45.7%にまで低化していた(図1)。

2010年度におけるCTS手術既往歴と透析前 β_2 ミクログロブリン濃度との関連を検討したが、二つ

のパラメーターの間に相関関係はみられなかった。

1999年から2010年にかけて、透析患者の平均年齢は、62.1歳から66.2歳まで増加していた(表1)。透析方法の解析では、血液透析、血液透析濾過、血液濾過、腹膜透析の比率は、この2調査期間ではほとんど変化がないと判断された。

しかし、尿素除去透析効率(Kt/V)、透析前BUN(血液尿素窒素)、透析前血清クレアチニン値には改善がみられた(表1)。特に、透析エンドトキシン濃度が低下していることが、この2調査期間での大きな変化であった(図2)。

D. 考察

HDAの代表的症状であるCTSの手術既往歴は、日本透析医学会の統計調査資料から判断すると、長期透析患者においても低下していることが分かった。この調査は横断的調査であり、必ずしも同一症例が対象となっていない。しかし、大規模調査であり相当数の透析患者の実態が調査よされている。従って、高齢化がある背景においても透析歴長期化の中で、HDAの発症有病率とその手術歴つまり重篤化は減少している推測される。

この2機関で透析方法には大きな相違はなく、この抑制傾向の背景には、透析効率の改善、透析液の清浄化が関与していると推測された。特に、透析液清浄化が意味する透析液エンドトキシン濃度の低下は、透析治療中に透析膜を介して患者血中にエンドトキシンが移行することが防止され、透析患者の持続的慢性炎症が抑制されることが期待されている。

このような透析治療に関与する病態改善が、CTSの発症、CTSの重篤化抑制に繋がっている可能性が示唆された。

しかし、今回の調査では、個々人のデータを分析したものではなく、全体症例のデータを解析したものであり、未熟な解析である。HDA手術歴のある症例とない症例の比較など、個々人のデータを用いた詳細なデータ解析が今後の課題である。

E. 結論

日本透析医学医会の統計資料よりHDAの代表的症状であるCTSの手術既往歴が低下していることが判明した。本邦の透析医療において、HDAの発症は抑制されている可能性が示唆された。そ

の原因として、透析効率の改善、透析液の清浄化が関与していると推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 著者: 論文名. 雑誌名 巻: ページ, 発行年.
1. 西慎一: 透析アミロイドーシス診断基準に基づく診断と対策. 透析フロンティア 22:24-40, 2012
 2. 門口啓, 西慎一: 透析アミロイドーシスのケアと対策. 腎と透析 72: 547-550, 2012

2. 学会発表

- 1) Shinichi Nishi, Hideki Fujii, Yoko Takeda, Keiji Kono, Kentaro Nakai, Shunsuke Goto: A Propose for Diagnostic Criteria Concerning Hemodialysis Related Amyloidosis (HDRA). アメリカ腎臓学会, サンディエゴ国際会議場, 米国, 10月30日~11月4日, 2012

西 慎一: 透析アミロイドーシス 診断と治療の Over view. 第57回日本透析医学会, 札幌市さっぽろ芸術文化の館, 6月22日, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

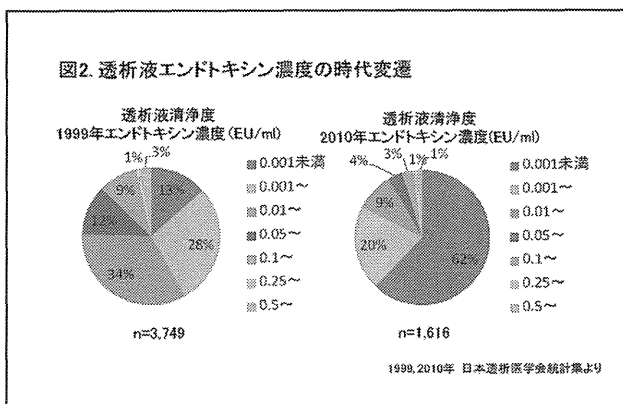
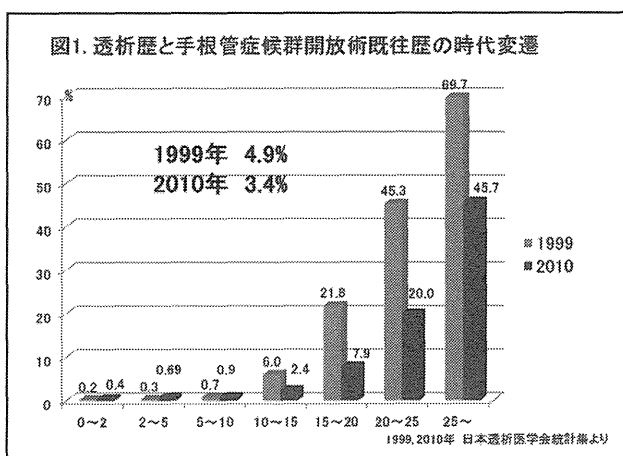
3. その他

なし

表 1. 透析患者の背景因子の時代変遷

		1999	2010
調査症例数	人	96,381	229,968
平均年齢	歳	62.1	66.2
透析効率(Kt/V)(男性)		1.26	1.3
透析効率(Kt/V)(女性)		1.47	1.52
透析前 BUN (男性)	mg/dL	73.7	63.9
透析前 BUN (女性)	mg/dL	72.0	63.4
透析前 S-Cr (男性)	mg/dL	11.7	10.8
透析前 S-Cr (女性)	mg/dL	9.9	9.1
血液透析(比率)	%	94.6	91.5
血液透析濾過(比率)	%	4.2	5.2
血液濾過(比率)	%	0.1	0.1

BUN: 血液尿素窒素, S-Cr:血清クレアチニン



厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

アミロイドの沈着部位・程度が透析患者の QOL に与える影響について

研究分担者 高市憲明 虎の門病院腎センター

共同研究者 星野純一* 澤直樹* 三瀬広記* 住田圭一* 平松里佳子* 長谷川詠子*

山内真之* 早見典子* 諏訪部達也* 乳原善文*

*虎の門病院 腎センター

研究要旨 透析アミロイド症の病勢を適切に評価するためには、画像所見と自覚・他覚症状がどの程度患者 QOL に影響を与えているかを明らかにする必要がある。今回、医師・患者双方にアンケート調査を行い、透析アミロイド症の沈着部位・程度が患者 QOL にどの程度影響しているかを検討した。

対象は外来維持透析患者 140 名 (年齢 64±11 歳、透析期間 16±12 年)。画像所見・医師診断・SF-36 調査の結果、透析アミロイド症診断基準 6 項目 (多関節痛、手根管症候群(CTS)、ばね指、骨嚢胞、破壊性脊椎関節症(DSA)、脊柱管狭窄症)のうち、関節痛・DSA は身体機能に、ばね指と DSA は疼痛に強く影響を与えていた。また疾患特異度を上げるためには、手根管症候群、ばね指、画像診断 (骨嚢胞、DSA) が重要と考えられた。さらに年齢・透析歴・患者背景因子を含めた多変量解析において、透析アミロイド症の存在は身体機能・疼痛に最も影響与える因子であった。

今回の検討にて、診断基準の各項目が患者 QOL に与える影響が明らかになった。今後は、今回の解析結果をもとに、透析アミロイド症の病勢を評価する指標 (アミロイドスコア) を作成していきたい。

A. 研究目的

透析アミロイド症の病勢を適切に評価するためには、画像所見と自覚・他覚症状がどの程度患者 QOL に影響を与えているかを明らかにする必要がある。今回、透析アミロイド症の沈着部位・程度が患者 QOL にどの程度影響しているかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

当院の外来維持透析患者を対象とし、医師および患者にアンケート調査を施行し(患者 QOL 評価は SF-36 version 2)、厚生労働省透析アミロイド症診断基準の主要症状各項目が患者 QOL に与える影響を調べた。また日常診療で通常行われている X 線検査と MRI 所見の合致率も評価した。

(倫理面への配慮)

取得した患者情報は院内のみで取り扱い、統計解析を行う際にはパスワードロックされたパソ

コンを用いた。また発表の際には匿名化した。

C. 研究結果

当院外来維持透析例のうち140名が解析対象例となった (平均年齢64±11歳、平均透析期間16±12年、男性71%、糖尿病性腎症14%)。そのうち43例が透析アミロイド症診断基準の主要臨床症状2項目以上を満たし、透析アミロイド症と診断された。内訳は、多関節痛あり28名、手根管症候群(CTS)あり25名、ばね指あり24名、骨嚢胞あり21名、破壊性脊椎関節症(DSA)あり14名、脊柱管狭窄症(CS)あり34名であった。SF-36 version2を用いて各臨床項目ごとの患者QOLをNBS(norm-based scoring, 50=国民標準値、40=-1SD、30=-2SD)で評価すると、身体機能に強く影響を与える因子はDSAと多関節痛であり、体の痛みに強く影響を与える因子はDSAとばね指であった (図1,2)。

また各項目の該当患者のうち透析歴20年以上を透析アミロイド症とした疾患特異度の検討では、

CTS、ばね指の存在、および画像所見（骨嚢胞・DSA）が高い特異度を示した。

一方透析歴・年齢が増加するに従い、身体機能・体の痛みスコアは悪化する傾向を認めたことから、年齢・性・透析歴・糖尿病・心血管疾患・脳血管疾患の有無を含めた多変量解析を施行したところ、透析アミロイド症の存在が身体機能・疼痛両者にもっとも影響を及ぼす因子であった。

また骨嚢胞の診断における単純X線とMRI所見の検討では、関節・脊椎各部位での一致率はいずれも90%以上と良好であった。

D. 考察

透析アミロイド症診断基準の各項目が患者QOLに与える影響を検討した。多関節痛・DSAは患者の身体機能に、ばね指とDSAは患者疼痛に強く影響を与えていた。またCTS、ばね指のほかに画像診断（骨嚢胞、DSA）も診断特異度を上げるために重要と考えられた。一方CSがQOLや診断特異度に与える影響は低かった。

今回の検討にて、診断基準の各項目が患者QOLに与える影響が明らかになった。今後は、今回の解析結果をもとに、透析アミロイド症の病勢を評価する指標（アミロイドスコア）を作成していきたい。

E. 結論

透析アミロイド症診断基準の各臨床項目が患者QOLに与える影響が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Suwabe T, Ubara Y, Inoue M, Kitajima I, Oohashi K, Nakano I, Takaichi K. What can we learn from a patient on dialysis for 42 years? Clin Nephrol. epub ahead of print. Jan 15, 2013

2. 学会発表

1) 川田真宏, 乳原善文, 星野純一, 諏訪部達也, 三瀬広記, 住田圭一, 平松里佳子, 山内真之, 早

見典子, 長谷川詠子, 澤直樹, 高市憲明, 大橋健一. 原発性ALアミロイドーシスに対する自家末梢血幹細胞移植(SCT)を併用した大量メルファラン療法の治療効果. 第55回日本腎臓学会総会学術集会. 横浜. 6/1-3, 2012.

2) 濱之上哲, 乳原善文, 諏訪部達也, 三瀬広記, 住田圭一, 早見典子, 平松里佳子, 長谷川詠子, 山内真之, 星野純一, 澤直樹, 高市憲明, 木脇圭一, 大橋健一, 藤井丈士. Tocilizumabが奏功した家族性地中海熱合併AA型アミロイドーシスの1例. 第42回日本腎臓学会東部学術大会. 新潟. 10/13-14, 2012.

3) 坂本憲一, 乳原善文, 住田圭一, 浜之上哲, 今福礼, 三瀬広記, 諏訪部達也, 早見典子, 平松里佳子, 山内真之, 長谷川詠子, 星野純一, 澤直樹, 大橋憲一, 藤井丈士, 高市憲明. 多彩な蛍光所見を呈したAA-アミロイド腎症合併関節リウマチの一例. 第42回日本腎臓学会東部学術大会. 新潟. 10/13-14, 2012.

4) Masahiro Kawada, Kenmei Takaichi, Yoshifumi Ubara, Junichi Hoshino, Tatsuya Suwabe, Noriko Hayami, Keiichi Sumida, Koki Mise. Autologous Stem Cell Transplantation in 18 Patients with Primary AL Amyloidosis: Long-Term Outcome. Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego. 11/1-3, 2012.

5) Satoshi Hamanoue, Yoshifumi Ubara, Tatsuya Suwabe, Koki Mise, Keiichi Sumida, Masayuki Yamanouchi, Junichi Hoshino, Kenmei Takaichi. Successful of Humanized Anti-Interleukin-6

Receptor Antibody (Tocilizumab) Therapy for a Case of AA Amyloidosis Complicated by Familial Mediterranean Fever. Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego. 11/1-3, 2012.

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

図1: 透析アミロイド症の各診断項目が患者に与える影響

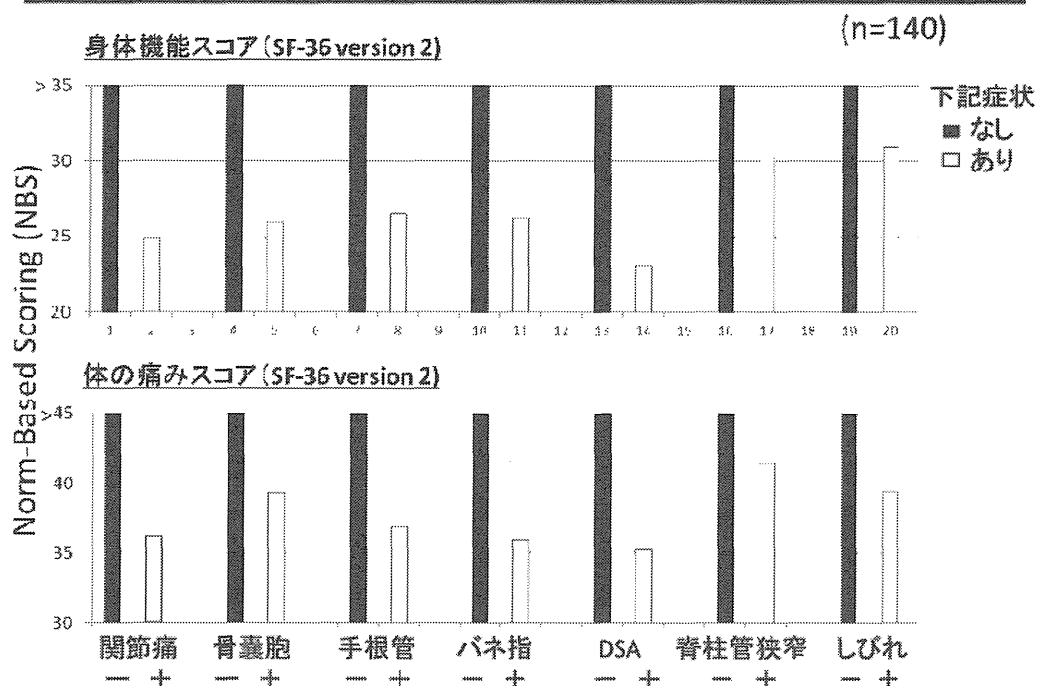


図2: 透析アミロイド症関連項目ごとの QOLおよび診断特異度に与える影響のまとめ

	多関節痛	手根管症候群	ばね指	骨嚢胞	DSA	脊柱管狭窄症	しびれ
身体機能 (NBS)	+++ 25.0	++	++	++	+++ 23.1	+	+
体の痛み (NBS)	++	++	+++	+	+++ 35.3	+	+
長期透析 (特異度)	+	+++ 93%	+++ 92%	++	+++ 89%	+	± 62%

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

C-末端 unfolded β_2 -microglobulin のモデル蛋白としての $\Delta N6\beta_2m$ の検証

研究分担者 本宮善恢 医療法人翠悠会

共同研究者 安東由喜雄*、城野博史*、宇治義則**、

*熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野、**富山大学附属病院検査部

研究要旨 透析アミロイドーシス前駆蛋白 β_2 ミクログロブリン (β_2m) のアミロイドヴァリエント $\Delta N6\beta_2m$ の構造特異性を明らかにし、C末端が unfolded した β_2m コンフォーマー $-\beta_2m 92-99-$ の測定系 (ELISA 法) を確立した。まずキャピラリー電気泳動 (CE) 上 $\Delta N6\beta_2m$ が確認されることを示した。ついで、一般のモノクローナル抗体も CE 上で同定されること、および C 末端特異抗体との反応も確認されることを示した。その上で血中 $\beta_2m 92-99$ 測定サンドイッチ ELISA を構築した。

A. 研究目的

アミロイド遷移過程では立体構造が部分的にほぐれた(unfolded)中間体分子の存在が重要である。 β_2m のアミロイド化においてもその様な中間構造体が知られているが、どの様な unfolding が特異点となるのかは確認されていない。1997年イタリアのグループから C 末端の unfolding が重要であることが報告され、以来、我々も C 末端に注目してきた。一方、2000年に N 末端が6個欠けた $\Delta N6\beta_2m$ が高いアミロイド原性を有することが確認されている。今回この variant の C 末端はほぼ完全に unfold していることを C 末端特異抗体 $mAb92-99$ (Motomiya et al. *Kidney Int*:2005) を用いて検証した。それに基づいて構築された β_2m アミロイドコンフォーマーの測定は透析アミロイドーシスの診断マーカーとして汎用し得ると考える。

B. 研究方法

遺伝子工学的に作製した $\Delta N6\beta_2m$ タンパクを用いてキャピラリー電気泳動法により、 $mAb92-99$ の特性を確認した。その上で C 末端 unfolded $\beta_2m-\beta_2m92-99-$ の血中濃度測定系 (ELISA 法) を立ち上げた。

(倫理面への配慮)

患者の血清サンプル採取は、翠悠会倫理委員会

に基づき、インフォームドコンセントのうえ提供をうけた。

C. 研究結果

1. キャピラリー電気泳動図で $\Delta N6\beta_2m$ の C 末端 unfolding を確認した (図1)。
2. $\Delta N6\beta_2m$ をスタンダードとして、アミロイド中間構造体 $\beta_2m 92-99$ の ELISA 法による測定系を立ち上げた (図2)。
3. ELISA 法では、血中 $\beta_2m 92-99$ は中性条件下では検出されなかったが、酸性下で測定可能であった (図3)。

D. 考察

β_2m では C 末端の unfolding がアミロイド化の重要な通過点と考えられている。一方、透析アミロイドーシス患者のアミロイド組織から分離される内在性ヴァリエント $\Delta N6\beta_2m$ が高いアミロイド原性を示すことが *in vitro* で明らかになってきた。本研究は中性条件下で $\Delta N6\beta_2m$ の C 末端が unfolding していることを明らかにした。このことはこのアミロイドヴァリエントでは C 末端 unfolding が常態化していることを示している。 $\Delta N6\beta_2m$ では N 末端が欠損しているが、core 構造は維持されている。従ってその強い amyloidogenicity を C 末端 unfolding に帰すことが

出来る。

これまでのところ C 末端が unfold したコンフォーマー β_2m 92-99 の報告は極めて少ない。今回開発した β_2m 92-99 測定系に新たな治療指針確立に繋がる知見を期待したい。

さらに、今回の研究では初めてモノクローナル抗体の動向が CE で直接的に検証出来ることが示された。

E. 結論

アミロイド中間体分子として重要な C 末端 unfolding の特性を $\Delta N6\beta_2m$ が有していることが確認されたので、今後中間体 β_2m の生物特性ならびに血中濃度測定のスタンダード分子として活用し得る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Motomiya Y, Uji Y, Ando Y : Capillary electrophoretic profile of β_2 -microglobulin intermediate associated with hemodialysis. *Ther Apher Dial* 16: 350-354, 2012.

2. 学会発表

1) Motomiya Y, Uji Y, Hiramatsu T, Ando Y: A conformational change of an intermediate β_2 -microglobulin associated with haemodiasysis. The 49th European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association congress Paris, France, May 24-26, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

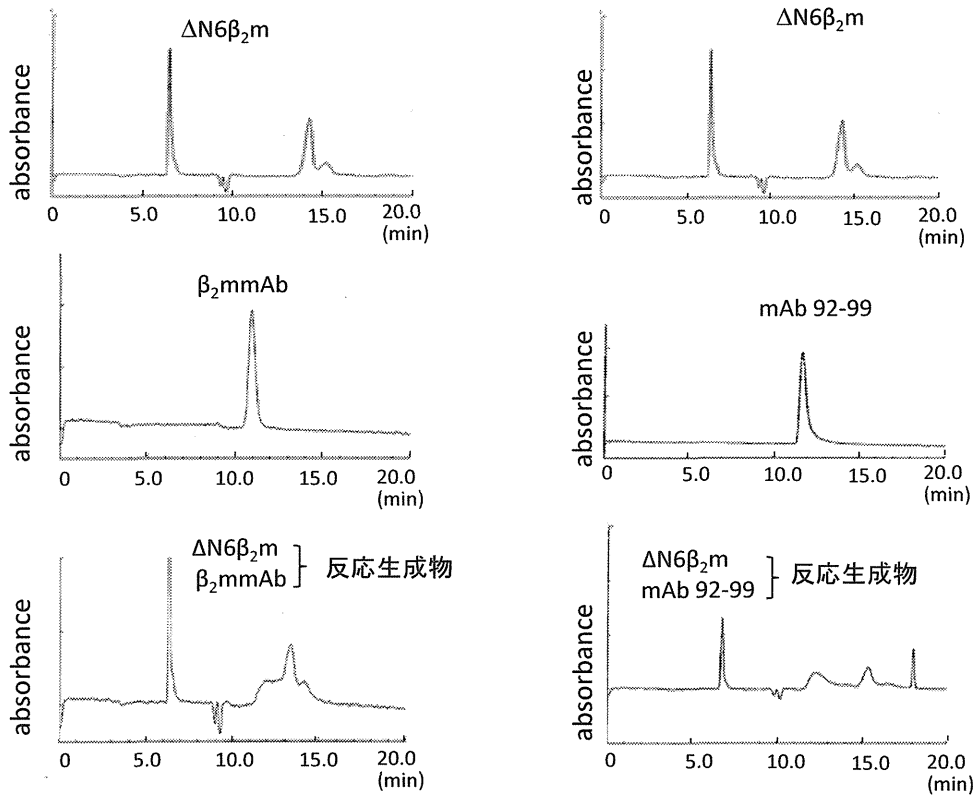


図1 キャピラリー電気泳動図

ΔN6β₂mと市販抗β₂mモノクローナル抗体の反応(左)、ΔN6β₂mとmAb92-99の反応(右)

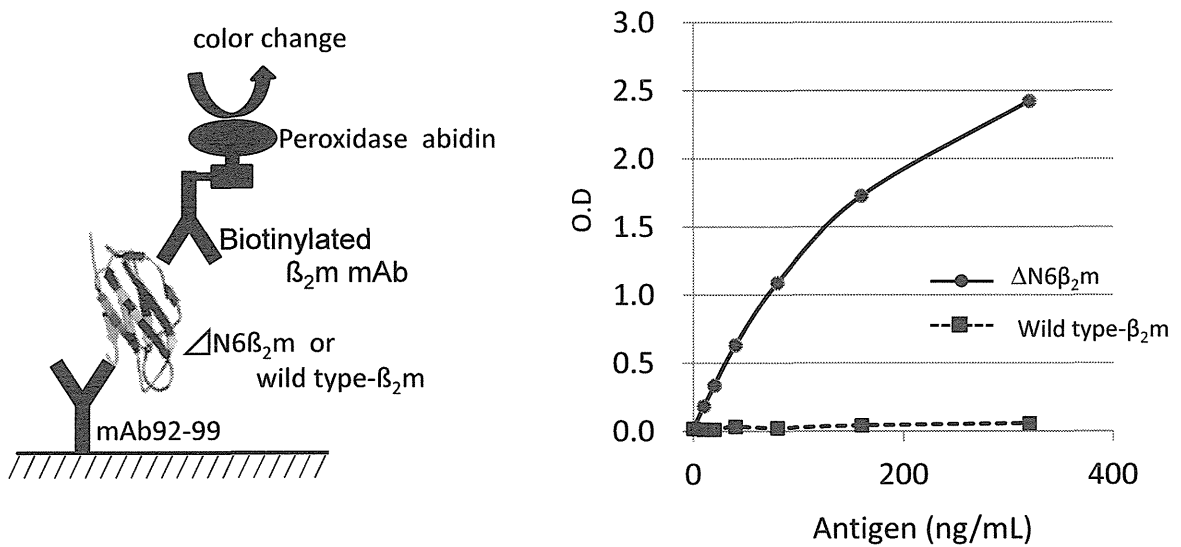


図2 ELISA法による血中β₂m92-99濃度測定方法

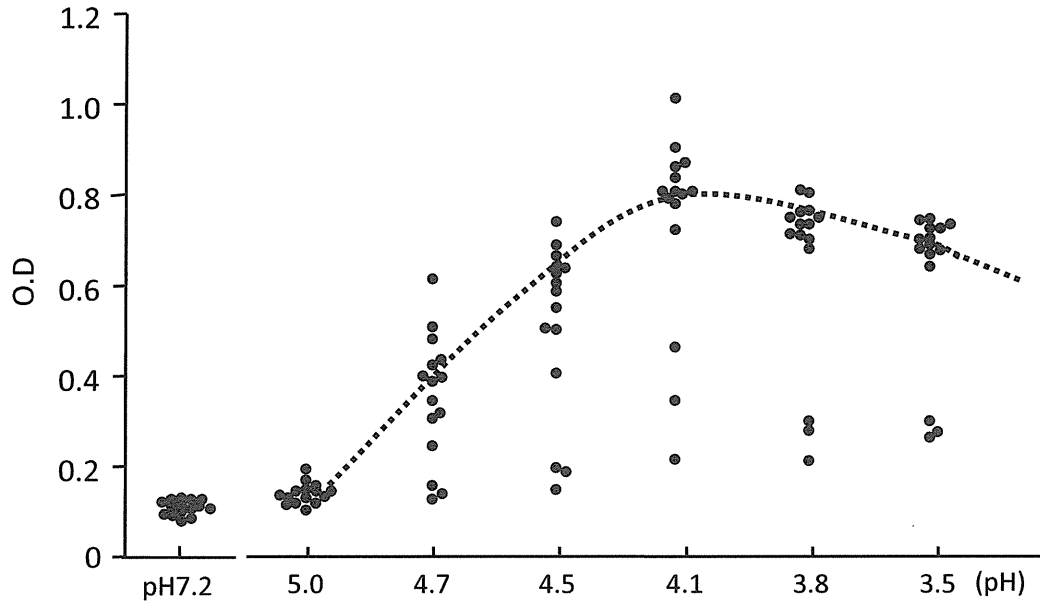


図3 血中 $\beta_2m92-99$ 濃度

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

β2 - ミクログロブリンアミロイド線維の細胞毒性に関する検討

研究分担者 内木宏延 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 大越忠和、長谷川一浩、小澤大作

福井大学医学部病因病態医学講座分子病理学領域

研究要旨 β2-ミクログロブリン(β2-m)アミロイド線維の沈着が骨・関節破壊を引き起こすメカニズムを明らかにするため、試験管内で形成したβ2-m アミロイド線維のウサギ滑膜線維芽細胞に対する細胞毒性を検討した。β2-m アミロイド線維を培養液に添加した群は、モノマー添加群、及びコントロール群と比較して有意に viability が低下しており、形態学的には壊死、ならびにアポトーシスの両方の形態変化が認められた。TUNEL 染色による検討でも、アミロイド線維投与群ではモノマー投与群、及び陰性対照に比して多くの TUNEL 陽性像が認められた。Congo-red 染色では、アミロイド線維が細胞表面に付着していることを確認した。以上の結果より、β2-m アミロイド線維はウサギ滑膜線維芽細胞の表面に付着し、壊死及びアポトーシスの両者を引き起こすことで毒性を発揮すると考えられ、β2-m アミロイド沈着による骨・関節破壊の病態に、β2-m アミロイド線維による直接の細胞傷害効果が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

透析アミロイドーシスでは、β2-ミクログロブリン(β2-m)アミロイドが主に関節、腱組織に沈着し、手根管症候群、破壊性脊椎関節症などの全身関節症状を引き起こす。骨・関節破壊を伴う進行した透析アミロイドーシスの病変を病理組織学的に観察すると、アミロイド沈着と共に単球、マクロファージの浸潤が認められる。しかしながら、β2-m アミロイド線維の沈着が骨・関節破壊を引き起こすメカニズムは未だ明らかになっていない。本研究は、試験管内で形成したアミロイド線維と培養細胞を用い、透析アミロイドーシスにおいてβ2-m アミロイド線維の沈着が破壊性脊椎関節症などの骨・関節破壊を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ウサギ滑膜線維芽細胞由来の株細胞(HIG-82)を24穴プレートに培養し、β2-m アミロイド線維、あるいはβ2-m モノマーを種々の濃度で培養液に添加した。一定時間のインキュベーションの後、LDH release assay 及びMTT reduction assay を行い、

アミロイド線維の培養細胞に対する毒性の有無と程度を評価するとともに、培養細胞染色キットによる染色を行い形態学的な評価を行った。さらに、アミロイド線維によるアポトーシス誘導の有無、程度を評価するために、DAPI 染色、TUNEL 染色の二重染色を行い、アポトーシス率を測定した。また、Congo-red 染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、添加したアミロイド線維が細胞に付着しているのか、細胞内に取り込まれているのかを検討した。

(倫理面への配慮)

試験管内実験に必要なβ2-m 線維を精製するためのアミロイド沈着組織は、患者より実験に使用する旨の同意書を得た後、手術時に採取した。

C. 研究結果

β2-mアミロイド線維を100μg/ml含む培養液でインキュベーションした群は、モノマー(100μg/ml)添加群、及びコントロール群と比較して、LDH release assay、MTT reduction assayのいずれの方法でも有意にviabilityが低下していた。光学顕微鏡で観察すると、アミロイド線維を添加した群では、