

生細胞は少なく、核濃縮や細胞質の膨化、空胞化などの壊死性の変化がみられると共に、アポトーシス小体と考えられる核の断片化も認められた。DAPI/TUNEL二重染色による検討では、アミロイド線維投与群では陰性対照、及びモノマー投与群に比して多くのTUNEL陽性像が認められた。これらの細胞をcountして、アポトーシス率を計算すると、陰性対照群では、0.004%、モノマー添加群で0.005%と低値だが、アミロイド線維添加群では8.7%と高値であった。

また、Congo-red染色を行い、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。

D. 考察

β 2-m アミロイド線維は細胞表面に付着し、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た。成書には壊死とアポトーシスは互いに背反する事象ではなく、種々の病的状態において、同時に、あるいは連続して起こると記載されており、矛盾しないと思われる。本研究の結果は、 β 2-m アミロイド沈着による骨・関節破壊の病態に、 β 2-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を示唆している。

E. 結論

β 2-m アミロイド線維はウサギ滑膜線維芽細胞(HIG-82)に対し、細胞毒性を有することを明らかにした。 β 2-m アミロイド線維は細胞表面に付着し、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る。今後、壊死やアポトーシスを誘導するメカニズムをさらに検討していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshimura Y, Lin Y, Yagi H, Lee YH, Kitayama H, Sakurai K, So M, Ogi H, Naiki H, Goto Y: Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of

formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:14446-14451, 2012.

2) Yanagi K, Sakurai K, Yoshimura Y, Konuma T, Lee YH, Sugase K, Ikegami T, Naiki H, Goto Y: The monomer-seed interaction mechanism in the formation of the β 2-microglobulin amyloid fibril clarified by solution NMR techniques. *J. Mol. Biol.* 422:390-402, 2012.

3) Chatani E, Yagi H, Naiki H, Goto Y: Polymorphism of β 2-microglobulin amyloid fibrils manifested by ultrasonication-enhanced fibril formation in trifluoroethanol. *J. Biol. Chem.* 287:22827-22837, 2012.

2. 学会発表

1) Ozawa D, Hasegawa K, Ookoshi T, Naiki H: Molecular mechanisms of β 2-microglobulin amyloid fibril formation. XIIIth International Symposium on Amyloidosis, Groningen(the Netherlands), May 6-10, 2012.

2) 小澤大作, 長谷川一浩, 李 映昊, 櫻井一正, 柳 浩太郎, 大越忠和, 後藤祐児, 内木宏延: 細胞外シャペロンによるアミロイド線維形成抑制機構の解明. 第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6,20-22, 2012.

3) 柳 浩太郎, 櫻井一正, 吉村優一, 小沼 剛, 李 映昊, 菅瀬謙治, 池上貴久, 内木宏延, 後藤祐児: アミロイド線維形成時に現れる過渡的中間体のキャラクタリゼーション. 第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6,20-22, 2012.

4) 澤下仁子, 張 蓓茹, 亀谷富由樹, 長谷川一浩, 森 政之, 内木宏延, 樋口京一: マウスF型 apoA-IIのC末ペプチドは老化アミロイドーシス高発症マウスのアミロイド沈着を軽減する. 第27回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会, 東京, 7,6-7, 2012.

5) 内木宏延: アミロイド線維形成・沈着の分子機構. 第58回日本病理学会総会秋季特別総会(ヒトの疾患解明に直結した最新の病理学研究), 名古屋

屋, 11,22-23, 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

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

肝移植後の FAP 患者における組織沈着アミロイドの病理組織学的特徴と生化学的検討

研究分担者 安東 由喜雄 熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野

共同研究者 *大嶋 俊範、*植田 光晴、*山下太郎、*三隅洋平、*田崎雅義、**神力悟、

大林光念、*大矢雄希、***阿曾沼克弘、***猪股裕紀洋

*熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野

**熊本大学医学部附属病院アミロイドーシス診療体制構築事業

***熊本大学大学院生命科学研究部小児移植外科学分野

研究要旨 肝移植は、トランスサイレチン (TTR) 型家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) に有効な治療法であるが、一部の症例では肝移植後も野生型 TTR が心臓に沈着することにより病態が進行することが報告されている。しかしながら、肝移植後長期経過した症例の全身各臓器における病態については、依然として不明な点も多く残されている。そこで、本研究では、肝移植後に長期生存し死亡した FAP 4 例の剖検例を中心に、全身各臓器における病理組織学および生化学的な検討を行い、移植後の病態変化について肝移植未施行の剖検例と比較検討を行った。全身各臓器のアミロイド沈着については、肝移植施行例で、心臓、舌など一部の臓器で野生型 TTR が主体の重度のアミロイド沈着を認めたが、腎臓、甲状腺など大部分の臓器のアミロイド沈着は肝移植未施行例と比較し、軽度であった。肝移植未施行例の各臓器におけるアミロイドの構成成分である野生型 TTR と異型 TTR の割合は、臓器によって異なっていた。また、断片化 TTR は肝移植施行例にも未施行例にも認められた。肝移植後長期経過した FAP 患者の病態は、肝移植未施行の FAP 患者の病態とは異なっており、それらの違いをさらに検証することでアミロイド沈着機構の解明につながるものと考えられる。

A. 研究目的

トランスサイレチン (TTR) 遺伝子の変異によって生じる TTR 型家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、全身の諸臓器にアミロイド沈着を引き起こす予後不良の遺伝性ニューロパチーである。肝移植は、FAP に有効な治療法であるが、一部の症例で、肝移植後も野生型 TTR が主体となり心臓でアミロイドを形成し、病態が進行することが報告されている。本研究の目的は、肝移植後に長期生存し死亡した FAP 4 例の剖検例を中心に、病理組織学および生化学的な検討を行い、移植後の病態変化について検証することである。

B. 研究方法

肝移植を施行し、長期生存後に死亡に至った FAP

Val30Met 4 例と、肝移植を施行せずに死亡に至った FAP Val30Met 7 例の剖検組織を用い、病理組織学的にアミロイド沈着の特徴を検証した。また、各組織に沈着したアミロイドから TTR を抽出し、変異型 TTR と野生型 TTR の全身各臓器における構成比率を明らかにするために質量分析装置を用いて分析を行った。さらに、FAP Val30Met 14 症例についてアミロイドを構成している TTR のフラグメント (50-127) の有無について解析した。

(倫理面への配慮)

剖検の際に、患者家族より書面による承諾を得た。また生検組織に関しては、診療上、必要な病理組織の残余組織を利用した。組織利用にあたり、患者にインフォームドコンセントを行い、同意を

得て研究を行った。

C. 研究結果

肝移植後に長期経過した症例では、心臓、舌、脊髄軟膜など一部の臓器に重度のアミロイド沈着を認めたが、消化管、腎臓、甲状腺などの大部分の臓器におけるアミロイド沈着は、肝移植が行われていない自然経過のFAPに比べて著しく軽度であった。各組織に沈着したアミロイドの変異型TTRと野生型TTRの構成比率は、肝移植未施行の症例では、心臓、舌などでは腎臓や甲状腺と比較し、野生型TTRの割合が高い傾向にあり、臓器によって異なっていたが、肝移植後に長期経過した症例では、脊髄軟膜以外の臓器でアミロイド沈着量に関わらず、野生型TTRが主体であった。また、アミロイドを構成しているTTRのフラグメントは、肝移植施行例にも未施行例にも認められたが、非集積地の症例の多くで認められた。

D. 考察

心臓、舌など一部の臓器では、他の臓器と比べ、野生型TTRが沈着しやすく、肝移植後長期経過した症例では、野生型TTRによるアミロイド沈着が進行する一方、腎臓、甲状腺など大部分の臓器では、野生型TTRが沈着しにくく、肝移植後長期経過した症例では、野生型TTRによるアミロイド沈着が進みにくいものと考えられた。肝移植後長期経過したFAP患者の病態は、肝移植未施行のFAP患者の病態とは異なっており、その違いをさらに検証することがアミロイド沈着機構の解明につながるものと考えられた。また、断片化TTRの検出は、肝移植の有無やTTRの性質、臓器の違いによる影響は低く、個体の違いによる影響が関与している可能性が高いと考えられた。

E. 結論

肝移植後長期経過した症例では、消化管、腎臓、甲状腺などの多くの臓器でアミロイド沈着は減少するものの、心臓、舌など一部の臓器では、野生型TTRが中心となりアミロイド沈着が進行する可能性がある。肝移植後の病態をさらに検証することで、アミロイド沈着機構の解明につながるものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ando Y: A report on VIIIth international symposium on familial amyloidotic polyneuropathy and VIIth international symposium on liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid* 19 (suppl 1): 1-2, 2012
- 2) Ando Y, Ueda M: Diagnostics and therapeutic approaches to transthyretin amyloidosis. *Curr Med Chem* 19: 2312-2323, 2012
- 3) Asonuma K, Ohya Y, Isono K, Takeichi T, Yamamoto H, Lee KJ, Okumura K, Ando Y, Inomata Y: Current state of domino transplantation in Japan in terms of surgical procedures and de novo amyloid neuropathy. *Amyloid* 19 (Suppl 1): 75-77, 2012
- 4) Berk JL, Suhr OB, Sekijima Y, Yamashita T, Heneghan M, Zeldenrust SR, Ando Y, Ikeda S, Gorevic P, Merlini G, Kelly JW, Skinner M, Bisbee AB, Dyck PJ, Obici L: The diflunisal trial: study accrual and drug tolerance. *Amyloid* 19 (Suppl 1): 37-38, 2012
- 5) Hayashi Y, Mori Y, Higashi T, Motoyama K, Jono H, Sah DW, Ando Y, Arima H: Systemic delivery of transthyretin siRNA mediated by lactosylated dendrimer/ α -cyclodextrin conjugates into hepatocyte for familial amyloidotic polyneuropathy therapy. *Amyloid* 19 (Suppl 1): 47-49, 2012
- 6) Hayashi Y, Mori Y, Yamashita S, Motoyama K, Higashi T, Jono H, Ando Y, Arima H: Potential use of lactosylated dendrimer (G3)/ α -cyclodextrin conjugates as hepatocyte-specific siRNA carriers for the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy. *Mol Pharm* 9: 1645-1653, 2012
- 7) Jono H, Anno T, Motoyama K, Misumi Y, Tasaki M, Ohshima T, Mori Y, Mizuguchi M, Ueda M, Shinriki S, Shono M, Obayashi K, Arima H, Ando Y: Potential use of glucuronylglucosyl- β -cyclodextrin as a novel therapeutic tool for familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid* 19 (Suppl 1): 50-52, 2012
- 8) Misumi Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Yamashita T, Ando Y: Interaction between amyloid fibril

- formation and extracellular matrix in the proceedings of VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Amyloid* 19 (Suppl 1): 8-10, 2012
- 9) Misumi Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Ohshima T, Ando Y, Uchino M: Relationship between amyloid deposition and intracellular structural changes in familial amyloidotic polyneuropathy. *Human Pathol* 43: 96-104, 2012
- 10) Motomiya Y, Uji Y, Ando Y: Capillary electrophoretic profile of β 2-microglobulin intermediate associated with hemodialysis. *Ther Apher Dial* 16: 350-354, 2012
- 11) Nakamura T, Migita K, Ando Y, Takaoka H, Suzushima H, Shiraiishi N: Amyloid A amyloidosis in a Japanese patient with familial Mediterranean fever associated with homozygosity for the pyrin variant M694I/M694I. *Mod Rheumatol*, in press
- 12) Obayashi K, Ando Y: Focus on autonomic dysfunction in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Amyloid* 19 (Suppl 1): 28-29, 2012
- 13) Su Y, Jono H, Torikai M, Hosoi A, Soejima K, Guo J, Tasaki M, Misumi Y, Ueda M, Shinriki S, Shono M, Obayashi K, Nakashima T, Sugawara K, Ando Y: Antibody therapy for familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid* 19 (Suppl 1): 45-46, 2012
- 14) Su Y, Misumi Y, Ueda M, Shono M, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Senokuchi T, Yamagata K, Ando Y: The occurrence of islet amyloid polypeptide amyloidosis in Japanese subjects. *Pancreas* 41: 971-973, 2012
- 15) Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers JK, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y: Aged vervet monkeys developing transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: A valid pathological model of the human disease. *Lab Invest* 92: 474-484, 2012
- 16) Uji Y, Motomiya Y, Ando Y: Effect of heparin on conformation of the β (2) -microglobulin molecule. *Ther Apher Dial* 16: 159-162, 2012
- 17) Yamashita S, Kimura E, Tawara N, Sakaguchi H, Nakama T, Maeda Y, Hirano T, Uchino M, Ando Y: Optineurin is potentially associated with TDP-43 and involved in the pathogenesis of inclusion body myositis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, in press
- 18) Yamashita T, Ando Y, Okamoto S, Misumi Y, Hirahara T, Ueda M, Obayashi K, Nakamura M, Jono H, Shono M, Asonuma M, Inomata Y, Uchino M: Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 78: 637-643, 2012
- 19) 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチーの末梢神経障害と治療. *Peripheral Nerve* 23: 180-187, 2012
- 20) 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) に対する肝移植の有用性と限界. *臨床神経学* 51: 1138-1140, 2012
- 21) 田崎義雅, 安東由喜雄: 質量分析法を用いた新たなアミロイドーシスの診断法. *臨床化学* 41: 41-46, 2012
- ## 2. 学会発表
- 1) Ohshima T, Kawahara S, Ueda M, Kawakami Y, Tanaka R, Misumi Y, Tasaki M, Jono H, Shinriki S, Obayashi K, Yamashita T, Ohya Y, Asonuma K, Inomata Y, Westermark P, Ando Y: Differences of histopathological features and amyloid components among various tissue sites of FAP patients after liver transplantation. 13th International Symposium on Amyloidosis, Groningen, 5.6-10, 2012.
- 2) 大嶋俊範, 大林光念, 神力悟, 城野博史, 山下太郎, 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) における甲状腺乳頭癌の有病率. 第53回日本神経学会学術大会、東京、5.22-25、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

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

FAP 患者肝を用いたドミノ移植患者剖検例における アミロイド沈着様式の検討

研究分担者 山下太郎 熊本大学 神経内科

共同研究者 小池春樹¹, 大嶋俊範², 田崎雅義², 三隅洋平², 植田光晴², 神力 悟³, 大林光念³, 城野博史⁴, 祖父江元¹, 安東由喜雄²

¹名古屋大学神経内科,

²熊本大学神経内科, ³同アミロイドーシス診療体制構築事業, ⁴同臨床薬物動態学

研究要旨 重症肝疾患患者に対する FAP 患者の肝臓を用いたドミノ移植の 8 年後に死亡した患者 2 例において、アミロイドーシスの症状はなかったが、心臓、消化管、肺、腎臓、甲状腺、皮下脂肪、腓腹神経や坐骨神経などの末梢神経、交感神経幹などの様々な部位にアミロイドの沈着を認めた。2 例の比較から、アミロイドは心臓、肺、消化管、自律神経系などから始まり、末梢神経、腎臓、甲状腺、皮下脂肪へ進展していくことが示唆された。ドミノ移植患者における医原性アミロイド沈着は、臨床症状が出現する以前に始まっていることが明らかとなり、ドミノ移植患者に対して注意深い観察が必要であると考えられた。組織切片から LMD-LC-MS/MS 法にて TTR アミロイドの構成比率を解析したところ、早期に剖検されたドミノ移植患者における異型 TTR の比率は、末期に剖検された FAP 患者よりも高く、早期には異型 TTR を主体として沈着し、その後、野生型 TTR の沈着が生じていくことが示唆された。本結果は、FAP 患者においても全身におけるアミロイドの沈着が、臨床症状発症以前に開始している可能性を示している。

A. 研究目的

トランスサイレチン (TTR) 型家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者に対する肝移植は、病態の進行を阻止することのできる唯一の確立した治療法であり、FAP 患者から摘出された肝臓は、アミロイド沈着も血管周囲にごく少量認められるだけで、肝機能に異常がないことから、深刻なドナー不足の影響により世界各地において重症肝疾患患者にドミノ肝移植されている。ドミノ移植患者においてアミロイドーシスによると考えられる症候の出現が報告されているが、その詳細な病態は十分知られていない。今回我々は FAP 患者からの摘出肝を用いて行なわれたドミノ肝移植患者の剖検例における、アミロイドの沈着様式について検討した。

B. 研究方法

患者 1 は 38 歳の男性。原発性胆汁性肝硬変症に対し 30 歳時に FAP 患者 (Y114C 型、38 歳、男

性) の肝臓をドミノ移植され、タクロリムスとミコフェノール酸を投与された。34 歳時に原発性胆汁性肝硬変症を再発し、38 歳時にバーキットリンパ腫により死亡した。経過中アミロイドーシスの症候はみられなかった。患者 2 は 61 歳の女性。44 歳時に B 型肝炎による肝癌を発症し、53 歳時に肝性脳症に対し FAP 患者 (V30M 型、40 歳、女性) の肝臓をドミノ移植され、タクロリムスとミコフェノール酸を投与された。60 歳時に膵癌を発症し、61 歳で死亡した。経過中アミロイドーシスの症候はみられなかった。これら患者の病理所見の解析を行った。

また、患者 2 の組織切片から laser microdissection (LMD) 法と liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 法にて TTR アミロイドの構成比率を解析した。

(倫理面への配慮)

本剖検は、患者家族のインフォームドコンセントを得て施行した。FAP に関する病理学的研究は、当大学の倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

症例 1：剖検組織において、TTR によるアミロイドの沈着が、肝臓、食道から大腸にわたる消化管、心臓、精巣、胸部交感神経節、手根管部の正中神経などに認められたが、腎臓や、甲状腺、皮膚、皮下脂肪、脊髄の軟膜にはみられなかった。神経線維の構造は保たれており、有髄線維密度の減少はみられなかった。症例 2：TTR によるアミロイドの沈着が、心臓、消化管、肝臓、脾臓、肺、骨格筋、唾液腺、交感神経幹などの様々な部位の血管周囲や間質などに認められた。さらに、腓腹神経や坐骨神経などの末梢神経、腎臓、甲状腺、皮下脂肪など広範囲にアミロイド沈着を認めた。脳軟膜の及び脳血管への沈着はみられなかった。LMD-LC-MS/MS 法により解析した患者 2 におけるアミロイド中の異型 TTR の比率は、心外膜、腎臓、胃において、それぞれ 93%、94%、72%であり、末期に剖検された FAP 患者よりも高かった。

D. 考察

ドミノ肝移植後、ともに 8 年経過した患者の 2 名の剖検により、ドミノ移植患者における全身諸臓器へのアミロイド沈着は、アミロイドーシスの臨床症状が出現する以前に始まっていることが示された。ドミノ移植患者におけるアミロイドーシス発症に関して、注意深い観察が必要である。また、アミロイド沈着の進展様式として、心臓、肺、自律神経などから始まり、その後、末梢神経、腎臓、甲状腺、皮下脂肪へと進行していくことが示唆された。TTR アミロイドの構成比率解析結果から、早期には異型 TTR を主体として沈着し、その後、野生型 TTR の沈着が生じていくことが示唆された。症例 1 よりも症例 2 で、アミロイドの沈着が高度であった要因として、移植時に高齢であったことも考えられ、高齢者へのドミノ移植は慎重に適応を検討すべきである。本 2 例は肝移植後に免疫抑制剤を使用していたが、経過中悪性腫瘍を発症しており、ドミノ肝移植患者、及び肝移植後の FAP

患者における悪性腫瘍に注意が必要である。本 2 例の結果は、FAP 患者においても全身におけるアミロイドの沈着が、臨床症状発症以前に開始している可能性を示している。

E. 結論

FAP 摘出肝を用いて行なわれたドミノ肝移植の 8 年後に、無症候の時期から既に医原性アミロイド沈着が出現していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Berk JL, Suhr OB, Sekijima Y, Yamashita T, Heneghan M, Zeldenrust SR, Ando Y, Ikeda S, Gorevic P, Merlini G, Kelly JW, Skinner M, Bisbee AB, Dyck PJ, Obici L; Familial Amyloidosis Consortium. The Diflunisal Trial: study accrual and drug tolerance. *Amyloid*. Suppl 1:37-8, 2012.
- 2) 山下太郎, 奥村幸祐, 大嶋俊範, 三隅洋平, 植田明彦, 菅智宏, 神力悟, 植田光晴, 城野博史, 大林光念, 山下賢, 前田寧, 安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチーにおける臨床症候に対する肝移植の長期的効果の検討. *Peripheral Nerve* 23(2): 256-257, 2012

2. 学会発表

- 1) Yamashita T, Hirano T, Hirai T, Oshima T, Okumura K, Tateishi M, Yohei M, Yamashita S, Maeda Y, Shinriki S, Ueda M, Obayashi K, Ando Y. Detection of Microbleeds in Hereditary Cerebral Amyloid Angiopathy Associated with Amyloidogenic Transthyretin Tyr114Cys Using Susceptibility-weighted Imaging. XIII International Symposium on Amyloidosis, Groningen, The Netherlands. May 6-10, 2012.
- 2) Yamashita T, Ando Y. Early TTR-FAP patient identification and diagnosis – the example of Japan. TTR-FAP Global Commercial Advisory Board. London, UK, Oct. 18-19, 2012.
- 3) Taro Yamashita1, Koji Onishi2, Kosuke

Okumura1, Toshinori Oshima1, Yasuteru Inoue1, Yohei Misumi1, Tomohiro Suga1, Akihiko Ueda1, Mitsuharu Ueda1, Satoshi Yamashita1, Yasushi Maeda1, Satoru Shinriki3, Konen Obayashi3, Naomi Sakashita4, Motohiro Takeya2, Yukio Ando1. An Autopsy Case of Transthyretin Y114C-related Cerebral Amyloid Angiopathy after Liver Transplantation. American Academy of Neurology 65th Annual Meeting, San Diego, March, 16-23, 2013.

4) 山下太郎, 大嶋俊範, 奥村幸祐, 永利聡仁, 立石真知子, 三隅洋平, 神力 悟, 植田光晴, 大林光念, 城野博史, 安東由喜雄. ATTR Y114C型脳アミロイド血管症におけるアミロイド沈着の分布の解析. 第53回日本神経学会学術大会, 東京, May 22-25, 2012.

5) 奥村幸祐, 山下太郎, 立石真知子, 大嶋俊範, 植田明彦, 三隅洋平, 平原智雄, 本田省二, 植田光晴, 大林光念, 山下賢, 前田寧, 安東由喜雄. トランスサイレチン Y114C型遺伝性脳アミロイド血管症患者における肝移植後の臨床症候の長期的変化. 第30回日本神経治療学会総会, 北九州, Nov 28-30, 2012.

6) 山下太郎, 奥村幸祐, 大嶋俊範, 三隅洋平, 植田明彦, 菅智宏, 神力 悟, 植田光晴, 城野博史, 大林光念, 山下賢, 前田寧, 安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチーにおける臨床症候に対する肝移植の長期的効果の検討. 第23回日本末梢神経学会学術集会, 福岡市, Aug 31-Sep 1, 2012.

7) 安東由喜雄, 道鬼つかさ, 山下太郎, 大嶋俊範, 田崎雅義, 三隅洋平, 神力 悟, 植田光晴, 城野博史, 大林光念. 集積地の高齢発症 FAP患者と非集積地の FAP患者における臨床症候の検討. 「難治性ニューロパチーの診断技術と治療法の開発に関する研究」班会議, 東京, Dec 3, 2012.

8) 安東由喜雄, 山下太郎, 大嶋俊範, 田崎雅義, 三隅洋平, 神力 悟, 植田光晴, 城野博史, 大林光念. 脳血管髄膜型トランスサイレチン Y114C 関連アミロイドーシスにおける肝移植の効果と限界-V30M以外の病型で効果はあるのか- 「難治性ニューロパチーの診断技術と治療法の開発に関する研究」班会議, 東京, Dec 3, 2012.

9) 山下太郎, 小池春樹, 大嶋俊範, 磯野香織, 田崎雅義, 三隅洋平, 植田光晴, 神力 悟, 大林光念, 城野博史, 祖父江元, 安東由喜雄. FAP患者肝を用いたドミノ移植患者剖検例におけるアミロイド沈着様式の検討. 平成24年度アミロイドーシスに関する調査研究班 研究報告会, 東京, Jan 24-25, 2012.

10) 山下太郎. 第13回世界アミロイドーシス学会からの最新情報. 平成24年度道しるべの会, 荒尾市, Jul 21, 2012.

11) 道鬼つかさ, 山下太郎, 森麗, 菅智宏, 本田省二, 平原智雄, 山下賢, 前田寧, 神力悟, 大林光念, 安東由喜雄. 発症当初 CIDP が疑われた非集積地の FAP 患者 5 例. 第199回日本神経学会九州地方会, 北九州, Sep 8, 2012.

12) 道鬼つかさ, 山下太郎, 森麗, 菅智宏, 本田省二, 平原智雄, 山下賢, 前田寧, 神力悟, 大林光念, 安東由喜雄. 発症当初 CIDP が疑われた非集積地の FAP 患者 5 例. 第104回熊本神経カンファレンス, 熊本市, Sep 20, 2012.

13) 道鬼つかさ, 山下太郎, 森麗, 菅智宏, 本田省二, 平原智雄, 山下賢, 前田寧, 神力悟, 大林光念, 安東由喜雄. 非集積地における家族性アミロイドポリニューロパチー患者の臨床症候. 第26回熊本自律神経研究会, 熊本市, Sep 27, 2012.

14) 山下太郎, 奥村幸祐, 大嶋俊範, 三隅洋平, 植田明彦, 菅智宏, 神力 悟, 植田光晴, 城野博史, 大林光念, 山下賢, 前田寧, 安東由喜雄. 肝移植の家族性アミロイドポリニューロパチーにおける臨床症候に対する有効性の検討. 第5回熊本臓器移植フォーラム, 熊本市, Nov 9, 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

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

霊長類トランスサイレチンの X 線結晶構造解析

研究分担者 水口峰之 富山大学大学院医学薬学研究部

共同研究者 植田光晴¹、安東由喜雄¹

¹ 熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野

研究要旨 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、トランスサイレチン (TTR) の遺伝子変異が原因で生じる常染色体優性の遺伝性疾患である。近年、全身性 TTR アミロイドーシスが高齢ベルベットモンキーで生じることが明らかにされた。我々は、ベルベットモンキー TTR (VM-TTR) およびカニクイザル TTR (CM-TTR) の X 線結晶構造解析に成功した。VM-TTR と CM-TTR の立体構造を比較した結果、Ile(Val)122 周辺の構造揺らぎの増加がアミロイドーシスの発症に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、高齢のベルベットモンキーが全身性 TTR アミロイドーシスを生じた例が報告された (Nakamura et al., Vet Pathol, 2008, 45, 67-72; Ueda et al., Lab Invest, 2012, 92, 474-484)。本研究の目的は、ベルベットモンキーにおける TTR アミロイドーシスの発症メカニズムを解明し、サルをモデル動物とした病態解析や治療法開発に向けた基礎的データを集積することである。そのために、ベルベットモンキーを含む 5 種類の霊長類 TTR の立体構造と構造安定性を調べる。

B. 研究方法

VM-TTR の結晶化は 2.0 M 硫酸アンモニウム、0.1 M トリス (pH 8.5)、18% (w/v) ショ糖の条件で、35.5 mg/mL に濃縮したタンパク質試料を用いて行った。CM-TTR の単結晶は VM-TTR とほぼ同じ結晶化条件で析出し、33.7 mg/mL に濃縮したタンパク質試料を用いた。X 線回折測定を低温 (100 K) で行うために、ショ糖濃度が 23%、28%、34% の結晶化溶液に結晶を 1 分間ずつ浸漬して抗凍結化し、液体窒素温度で保存した。

X 線回折測定は高エネルギー加速器研究機構の PF BL-5A で行った。VM-TTR、CM-TTR の単結晶回折データを収集した結果、それぞれ 1.85 Å と 1.95 Å 分解能のデータが得られた。また回折強度の誤差を表す R_{merge} とデータの完全性が、VM-TTR

で 3.8% と 99.6%、CM-TTR で 4.1% と 99.5% であり、良質なデータが得られたことがわかる。VM-TTR の立体構造をヒト由来 TTR の結晶構造 (PDB ID: 1F41) を用いた分子置換法で決定し、構造精密化ソフトウェア PHINIX.REFINE による計算と COOT を用いた手動でのモデル修正を繰り返した。その結果、立体構造モデルの信頼度を表す R_{cryst} と R_{free} をそれぞれ 20.6%、25.1% まで下げることができた。また、CM-TTR データの初期位相は VM-TTR の構造モデルを用いた分子置換法で決定し、VM-TTR と同様の方法で R_{cryst} と R_{free} をそれぞれ 18.9%、23.4% まで下げることができた。これらの数値は、VM-TTR と CM-TTR の最終モデルが十分に信頼できることを示している。

(倫理面への配慮)

問題なし。本研究では、患者と対象とする臨床研究、疫学研究、動物実験を行っていない。

C. 研究結果

VM-TTR とヒト TTR の立体構造を比較した。それぞれの 456 アミノ酸残基の C α 原子を重ね合わせた結果、VM-TTR とヒト TTR 間の R.M.S.D. は 0.72 Å であり、三次構造、四次構造共に類似していることがわかった。同様に CM-TTR とヒト TTR 間の R.M.S.D. を計算したところ、0.68 Å であり、CM-TTR もヒト TTR とほぼ同一の立体構造を保持

することがわかった。

次にVM-TTRとCM-TTRのIle(Val)122周辺の立体構造を比較した。VM-TTRでは122番目がIle、CM-TTRではValである。それぞれの460アミノ酸残基のC α 原子を重ね合わせた結果、R.M.S.D.は0.19 Åであり、両者の立体構造はほぼ同一であることがわかった。しかしながら、VM-TTRとCM-TTRで温度因子がわずかに異なっていた。温度因子は原子の揺らぎを反映するパラメータであり、運動性が高い領域は温度因子が大きくなる。120-123残基の主鎖の温度因子の平均は、CM-TTRのサブユニットA、Bでそれぞれ43.4 Å²、43.1 Å²であった。一方、VM-TTRではそれぞれ45.5 Å²、47.7 Å²であった。VM-TTRとCM-TTRの結晶が同型であることを鑑みると、これらは有意な変化である。

D. 考察

VM-TTR の 120-123 残基近傍は、CM-TTR と比較して立体構造が揺らいでいる可能性が示唆された。

E. 結論

X線結晶構造解析によってVM-TTRとCM-TTRの立体構造を決定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers JK, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y: Aged vervet monkeys developing transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: a valid pathological model of the human disease. *Lab Invest* 92: 474-484, 2012.
- 2) Yokoyama T, Mizuguchi M, Nabeshima Y, Kusaka K, Yamada T, Hosoya T, Ohhara T, Kurihara K, Tomoyori K, Tanaka I, Niimura N: Hydrogen-bond network and pH sensitivity in transthyretin: Neutron

crystal structure of human transthyretin. *J Struct Biol* 177: 283-290, 2012.

- 3) Aqai P, Fryganas C, Mizuguchi M, Haasnoot W, Nielen MW: Triple bioaffinity mass spectrometry concept for thyroid transporter ligands. *Anal Chem* 84: 6488-6493, 2012.
- 4) Mizuguchi M, Yokoyama T, Nabeshima Y, Kawano K, Tanaka I, Niimura N: Quaternary structure, aggregation and cytotoxicity of transthyretin. *Amyloid* 19 (Suppl 1): 5-7, 2012.
- 5) Jono H, Anno T, Motoyama K, Misumi Y, Tasaki M, Oshima T, Mori Y, Mizuguchi M, Ueda M, Shinriki S, Shono M, Obayashi K, Arima H, Ando Y: Potential use of glucuronylglucosyl- β -cyclodextrin as a novel therapeutic tool for familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid* 19 (Suppl. 1): 50-52, 2012.

2. 学会発表

- 1) Ueda M, Kluge-Beckerman B, Liepnieks JJ, Mizuguchi M, Ando Y, Benson MD: Transthyretin deposition in cultured cells. XIII International Symposium on Amyloidosis. From misfolded proteins to well-designed treatment. University Medical Center Groningen, Netherlands, 5.6-10, 2012.
- 2) 横山武司, 水口峰之, 鍋島裕子, 日下勝弘, 山田太郎, 細谷孝明, 大原高志, 栗原和男, 友寄克亮, 田中伊知朗, 新村信雄: トランスサイレチンにおける水素結合ネットワークと pH 感受性: ヒトトランスサイレチンの中性子結晶構造解析. 第12回日本蛋白質科学学会年会, 名古屋市, 6.20-22, 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

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

FAP における肝移植後の末梢神経障害の進行に対する加齢の影響

研究分担者 小池春樹 名古屋大学神経内科

共同研究者 大山健*, 橋本里奈*, 川頭祐一*, 飯島正博*, 亀井秀弥**, 木内哲也**,
祖父江元*

*名古屋大学神経内科 **名古屋大学移植外科

研究要旨 肝移植は家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の治療法として確立されているが、末梢神経障害に対する長期的な効果に関する検討は少ない。今回、発症早期に肝移植を施行された年齢の異なる FAP ATTR Val30Met 3 例の長期予後について末梢神経障害を中心に検討した。非集積地出身の高齢発症例 1 例 (60 歳発症, 男性; 症例 1) と集積地出身の若年発症例 2 例 (40 歳発症, 男性; 症例 2, および 28 歳発症, 男性; 症例 3) の肝移植前後の末梢神経障害を経時的に検討した。症例 1 は 62 歳時, 症例 2 は 41 歳時, 症例 3 は 30 歳時に肝移植を施行した。移植前の症状は, 症例 1 では下肢のしびれと交代性の下痢/便秘を, 症例 2 では四肢のしびれを, 症例 3 では下肢のしびれと交代性の下痢/便秘を認めたが, 筋力低下は全例で認めなかった。生検腓腹神経のアミロイド沈着は症例 1 が最も少なかった。移植後に全例で症状の改善を認めたものの, 症例 1 では 2 年後に四肢のしびれ/痛みと筋力低下が出現し, 徐々に増悪した。移植前の末梢神経伝導検査所見は, 軽度の遠位潜時の延長を認めるのみであったが, 3 年後の再検時には感覚神経活動電位は導出されず, 複合筋活動電位も著明な低下を示した。8 年後に歩行不能になり, 70 歳時に心不全のために死亡した。症例 2 は 10 年後にしびれの増悪を認めた。症例 3 は移植後 7 年経過した時点で特記すべき神経学的異常所見を認めない。以上の結果から, 加齢は FAP における肝移植後の末梢神経障害の増悪因子である可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝移植は家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の治療法として確立されているが, 末梢神経障害に対する長期的な効果に関する検討は少ない。今回, 発症早期に肝移植を施行された年齢の異なる FAP ATTR Val30Met 3 例の長期予後について末梢神経障害を中心に検討した。

B. 研究方法

非集積地出身の高齢発症例 1 例 (60 歳男性; 症例 1) と集積地出身の若年発症例 2 例 (40 歳男性; 症例 2, および 28 歳男性; 症例 3) の肝移植前後の末梢神経障害を経時的に検討した。末梢神経伝導検査は正中, 尺骨, 脛骨, 腓腹神経で測定した。腓腹神経生検で採取した神経は 2 等分し, 一方は 0.125M の中性カコジレートバッファーで希釈した 2.5% グルタルアルデヒドにて固定し, エポ

ン包埋した。薄切横断切片を作成し, トルイジンブルー染色し, 画像解析装置 (Luzex FS; Nikon) を用いて有髄線維密度を解析した。無髄線維密度は超薄切横断切片を電子顕微鏡にて 4000 倍でランダムに写真撮影し, それをもとに計測した。グルタルアルデヒド固定標本の一部は神経ときほぐし標本の作製に用いた。採取した神経のもう一方は 10%ホルマリンにて固定し, パラフィン埋包した後, 横断・縦断薄切切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン, マッソン・トリクローム, コンゴレッド染色にて評価した。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断に関しては名古屋大学および当該施設倫理委員会の承認のもと, 十分な説明を行い, 同意を得て行った。

C. 研究結果

症例1は62歳時、症例2は41歳時、症例3は30歳時に肝移植を施行した。移植前の症状は、症例1では下肢のしびれと交代性の下痢/便秘を、症例2では四肢のしびれを、症例3では下肢のしびれと交代性の下痢/便秘を認めたが、筋力低下は全例で認めなかった。生検腓腹神経の大径有髄線維密度、小径有髄線維密度、および無髄線維密度は症例1ではそれぞれ1304, 1212, および14438 fibers/mm²、症例2では2700, 1449, 2370 fibers/mm²、症例3では2015, 1515, 3530 fibers/mm²であり、同年齢の正常対照と比較して著明な有髄線維の脱落はなく、アミロイドの沈着は症例1が最も少なかった。移植後に全例で症状の改善を認めたものの、症例1では2年後に四肢のしびれ/痛みと筋力低下が出現し、徐々に増悪した。移植前の末梢神経伝導検査所見は、軽度の遠位潜時の延長を認めるのみであったが、3年後の再検時には感覚神経活動電位は導出されず、複合筋活動電位も著明な低下を示した。8年後に歩行不能になり、70歳時に心不全のために死亡した。症例2は10年後にしびれの増悪を認めた。同時期から立ちくらみと便秘も出現し、11年後に施行した自律神経機能検査で起立性低血圧とノルアドレナリン静注時の脱神経過敏を認めた。症例3は移植後7年経過した時点で特記すべき神経学的異常所見を認めない。

D. 考察

加齢はFAPにおける肝移植後の末梢神経障害の増悪因子である可能性が示唆された。

E. 結論

末梢神経障害は患者のQOLに大きく影響する重要な因子であり、高齢者における肝移植の適応には慎重な判断が必要であることと、早期からの薬物療法などの併用が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koike H, Sobue G: Clinicopathological features of

neuropathy in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin Exp Nephrol*, in press.

2. Koike H, Sobue G: Paraneoplastic neuropathy. *Handb Clin Neurol*, in press.

3. Koike H, Sobue G: The wide range of clinicopathological features in immune-mediated autonomic neuropathies. *Clin Exp Neuroimmunol*, 3: 1-14, 2013.

4. Koike H, Watanabe H, Sobue G: The spectrum of immune-mediated autonomic neuropathies: insights from the clinicopathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84: 98-106, 2013.

5. Koike H, Tanaka F, Sobue G: Transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy in Japan. In: *Amyloids: Composition, Functions and Pathology*. Editors: Halcheck IP, Vernon NR. Nova Science Publishers, in press.

6. Koike H, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Nakamura T, Watanabe H, Kamei H, Kiuchi T, Sobue G: The impact of aging on the progression of neuropathy after liver transplantation in transthyretin Val30Met amyloidosis. *Muscle Nerve* 46: 961-964, 2012.

7. Koike H, Tanaka F, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Fujitake J, Kawanami T, Kato T, Yamamoto M, Sobue G: Natural history of transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy: analysis of late-onset cases from non-endemic areas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83:152-158, 2012.

8. Koike H, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Koyano S, Momoo T, Yuasa H, Mitake S, Higashihara M, Kaida K, Yamamoto D, Hisahara S, Shimohama S, Nakae Y, Johkura K, Vernino S, Sobue G: The spectrum of clinicopathological features in pure autonomic neuropathy. *J Neurol*, 259: 2067-2075, 2012.

9. Koike H, Hama T, Kawagashira Y, Hashimoto R, Tomita M, Iijima M, Sobue G: The significance of folate deficiency in alcoholic and nutritional neuropathies: analysis of a case. *Nutrition*, 28: 821-824, 2012.

10. Koike H, Sobue G: Late-onset familial amyloid polyneuropathy in Japan. *Amyloid*, 19 Suppl 1: 55-57, 2012.
 11. Ohyama K, Koike H, Iijima M, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Sato A, Nakamura S, Sobue G: IgG4-related neuropathy: a case report. *Arch Neurol*, in press.
 12. Kawagashira Y, Koike H, Sobue G: Pathological abnormalities in anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. In: *Pathology and Genetics of Peripheral Nerve Disorders*. Editors: Vallat JM, Weis J. Wiley-Blackwell, in press.
 13. Nakanishi H, Koike H, Matsuo K, Tanaka F, Noda T, Fujitake A, Kimura S, Katsuno M, Doyu M, Sobue G: Demographic features of Japanese patients with sporadic inclusion body myositis: A single-center referral experience. *Intern Med*, 52: 333-337, 2013.
 14. Kawagashira Y, Koike H, Fujioka Y, Hashimoto R, Tomita M, Morozumi S, Iijima M, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G: Differential, size-dependent sensory neuron involvement in the painful and ataxic forms of primary Sjögren's syndrome-associated neuropathy. *J Neurol Sci*, 319: 139-146, 2012.
 15. Ohyama K, Yasui K, Hasegawa Y, Morozumi S, Koike H, Sobue G: Differential recovery in cardiac and vasomotor sympathetic functional markers in acute autonomic sensory and motor neuropathy: a case report. *Intern Med*, in press.
 16. Iida M, Koike H, Ando T, Sugiura M, Yamamoto M, Tanaka F, Sobue G: A novel MPZ mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1B with focally folded myelin and multiple entrapment neuropathies. *Neuromuscul Disord*, 22: 166-169, 2012.
 17. 小池 春樹, 祖父江 元: ANCA 関連血管炎の神経障害. *日本臨床*, 71 Suppl1; 338-340, 2013.
 18. 小池 春樹, 祖父江 元: 【Vitamin B1 と神経疾患】脚気ニューロパチーの神経病理. *神経内科*, 76; 219-225, 2012.
 19. 小池 春樹, 祖父江 元: いかに治療すべきかしびれの臨床と治療 末梢神経障害を中心に. *現代医学*, 60; 125-128, 2012.
 20. 飯島正博, 小池 春樹, 祖父江 元: 【免疫性神経疾患の治療:標準的治療とトピックス】慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー. *神経治療学*, 29; 29-34, 2012.
 21. 飯島正博, 小池 春樹, 祖父江 元: CIDP 治療における IVIg 療法の有用性. *日本臨床*, 70; 715-721, 2012.
 22. 小池春樹, 祖父江元: 栄養障害・アルコール性ニューロパチー. *新しい診断と治療の ABC 75 末梢神経障害* 最新医学社, 218-224, 2012.
 23. 小池春樹, 飯島正博, 祖父江元: 図表で見る末梢神経障害. *新しい診断と治療の ABC 75 末梢神経障害* 最新医学社, 5-8, 2012.
 24. 小池 春樹, 祖父江 元: 【自律神経系の最近のトピックス】急性自律神経ニューロパチー. *神経内科*, 78; 209-216, 2013.
 25. 橋本 里奈, 小池 春樹, 富田 稔, 川頭 祐一, 飯島 正博, 祖父江 元: Crow-Fukase 症候群における髄鞘の形態変化の特徴. *Peripheral Nerve*, 23; 95-101, 2012.
 26. 川頭祐一, 飯島正博, 小池春樹, 祖父江元: 抗 MAG 抗体陽性ニューロパチー. *新しい診断と治療の ABC 75 末梢神経障害* 最新医学社, 93-102, 2012.
 27. 川頭祐一, 飯島正博, 小池春樹, 祖父江元: 抗 MAG 抗体陽性 IgM-MGUS ニューロパチーのリツキシマブによる新規治療の可能性. *Annual Review 神経 2013* 中外医学社, 223-229, 2013.
 28. 川頭祐一, 飯島正博, 小池春樹, 祖父江元: 各種疾患 末梢神経障害 抗 MAG 抗体陽性 IgM-MGUS ニューロパチーのリツキシマブによる新規治療の可能性. *Annual Review 神経*, 223-229, 2013.
 29. 飯島正博, 小池 春樹, 祖父江 元: 【Guillain-Barré 症候群とその類縁疾患】Guillain-Barré 症候群の亜型「純粹感覚型」. *神経内科*, 78; 50-56, 2013.
2. 学会発表
1. Koike H, Sobue G: Use of IVIg in Sjögren's syndrome-associated painful neuropathy, and

- experience in diabetes. “Pain Relief with Immunoglobulin” Workshop, Liverpool, UK, Oct 4-6, 2012.
2. Koike H, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Koyano S, Momoo T, Yuasa H, Mitake S, Higashihara M, Kaida K, Yamamoto D, Hisahara S, Shimohama S, Nakae Y, Johkura K, Vernino S, Sobue G: The spectrum of clinicopathological features in pure autonomic neuropathy. PNS/Inflammatory Neuropathy Consortium Meeting, Rotterdam, The Netherlands, June 24-27, 2012.
3. Iijima M, Morozumi S, Koike H, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Tanaka F, Sobue G: Characteristics of hypertrophic form of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. PNS/Inflammatory Neuropathy Consortium Meeting, Rotterdam, The Netherlands, June 24-27, 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

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

高齢発症 ATTR Val30Met FAP 患者の末梢神経機能に対する ジフルニサルの有効性の検討

研究分担者 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

共同研究者 関島良樹^{1,2}, 東城加奈¹, 森田洋¹, 小池春樹³, 祖父江元³

¹信州大学医学部脳神経内科, リウマチ・膠原病内科, ²同附属病院遺伝子診療部,

³名古屋大学医学部附属病院神経内科

研究要旨 本邦の FAP の多くを占める高齢発症 ATTR Val30Met FAP 患者は, 通常肝移植の適応とならず, 現在のところ有効な原因療法は存在しない. そこで, TTR 四量体を安定化する薬剤であるジフルニサル的高齢発症 ATTR Val30Met FAP 患者の末梢神経機能に対する有効性を検討した. 対象は, 肝移植の適応のない 18 名の高齢発症 ATTR Val30Met FAP 患者 (平均年齢 66.3 ± 7.3 歳). 対象として, ジフルニサルの投与を受けていない 27 名の ATTR Val30Met FAP 患者 (平均年齢 67.6 ± 6.4 歳) の検討を行った. 尺骨神経の CMAP の振幅の低下率は, ジフルニサル投与群で $6.6\% \pm 14.7\%$ /年, 対照群で $30.5\% \pm 15.2\%$ /年であり, ジフルニサル投与群で有意に低下率が小さかった ($p = 0.0003$). また, 対照群では Baseline で脛骨神経の CMAP が検出可能であった 10 名全員が 32.0 ヶ月間の経過観察期間中に CMAP 検出不能となったが, ジフルニサル投与群では, 平均 43.3 ヶ月間の経過観察期間中に脛骨神経の CMAP が検出不能となったのは, 12 名中 4 名 (33.3%) であった ($p = 0.002$). ジフルニサルは高齢発症 ATTR Val30Met FAP 患者における末梢神経機能の悪化を抑制する可能性が示唆された.

A. 研究目的

本邦の家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者の約 80% は ATTR Val30Met type であり, その多くが 50 歳以降に発症する高齢発症である. これら的高齢発症 ATTR Val30Met FAP 患者は, 通常肝移植の適応とならず, 現在のところ有効な原因療法は存在しない. 本研究の目的は, TTR 四量体を安定化する薬剤であるジフルニサルの高齢発症 ATTR Val30Met FAP 患者の末梢神経機能に対する有効性を明らかにすることである.

B. 研究方法

肝移植の適応のない 18 名の高齢発症 ATTR Val30Met FAP 患者 (男性 15 名, 女性 3 名, 平均年齢 66.3 ± 7.3 歳) に対し, ジフルニサル 500mg /日を投与し, 尺骨神経および脛骨神経の複合筋活動電位 (CMAP) を経時的に評価した. 比較対象として, ジフルニサルの投与を受けていない 27 名の高齢発症 ATTR Val30Met FAP 患者 (男性 23

名, 女性 4 名, 67.6 ± 6.4 歳) の検討を行った. Baseline における尺骨神経 CMAP の振幅は, ジフルニサル群が 4.6 ± 3.1 mV, 対照群が 4.5 ± 2.1 mV. 脛骨神経 CMAP の検出率はジフルニサル群が 12/14 (85.7%), 対照群が 10/13 (76.9%). 平均観察期間はジフルニサル群が 43.3 ± 19.7 ヶ月, 対照群が 32.0 ± 20.9 ヶ月.

(倫理面への配慮)

本研究は, 信州大学医学部医倫理委員会の承認を受けた後, 全ての患者から文書でインフォームド・コンセントを取得し実施した. また, 学会・論文発表の際は, 患者を特定できないように匿名化した.

C. 研究結果

ジフルニサルの内服により, 血清中 TTR 四量体は安定化され, TTR 血中濃度が有意に増加した (内服前の TTR 血中濃度 23.5 ± 4.4 mg/dL, 内服 1 年後の TTR 血中濃度 29.8 ± 7.2 mg/dL, $p = 0.01$). 尺骨

神経のCMAPの振幅の低下率は、ジフルニサル投与群で $6.6\% \pm 14.7\%$ /年、対照群で $30.5\% \pm 15.2\%$ /年であり、ジフルニサル投与群で有意に低下率が小さかった ($p = 0.0003$)。また、対照群ではBaselineで脛骨神経のCMAPが検出可能であった10名全員が32.0ヶ月間の経過観察期間中にCMAP検出不能となったが、ジフルニサル投与群では、平均43.3ヶ月間の経過観察期間中に脛骨神経のCMAPが検出不能となったのは、12名中4名(33.3%)であった ($p = 0.002$)。

D. 考察

本研究で、末梢神経機能の指標として用いたCMAPの振幅は、FAPの末梢神経機能を最も良く反映することが報告されている。本研究の結果、ジフルニサルは高齢発症 ATTR Val30Met FAP患者におけるCMAPの悪化を抑制することが明らかになった。しかし、本研究のデザインは、Open-label Historical Control Studyであり、ジフルニサルの正確な有効性の評価にはランダム化比較試験が必要である。我々は現在FAPに対するジフルニサルの国際的なランダム化比較試験を実施しており、2013年中に結果を明らかにする予定である。

E. 結論

ジフルニサルは高齢発症 ATTR Val30Met FAP患者における末梢神経機能の悪化を抑制する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

1名がジフルニサルに関連すると考えられる腎機能障害、1名がジフルニサルに関連すると考えられる血小板減少で脱落したが、ジフルニサルの中止により腎機能障害および血小板減少は改善した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sekijima Y, Yoshida K, Tokuda T, Ikeda S. Familial Transthyretin Amyloidosis (January 2012) in: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright,

University of Washington, Seattle, 1997-2012.

Available at <http://www.genetests.org>.

2) Berk JL, Suhr OB, Sekijima Y, Yamashita T, Heneghan M, Zeldenrust SR, Ando Y, Ikeda S, Gorevic P, Merlini G, Kelly JW, Skinner M, Bisbee AB, Dyck PJ, Obici L; Familial Amyloidosis Consortium. The Diflunisal Trial: study accrual and drug tolerance. *Amyloid* 19 Suppl 1:37-38, 2012.

3) Nakagawa M, Tojo K, Sekijima Y, Yamazaki KH, Ikeda S. Arterial thromboembolism in senile systemic amyloidosis: report of two cases. *Amyloid* 19: 118-121, 2012.

4) Ohno Y, Mita A, Ikegami T, Masuda Y, Urata K, Nakazawa Y, Kobayashi A, Terada M, Ikeda S, Miyagawa S. Temporary auxiliary partial orthotopic liver transplantation using a small graft for familial amyloid polyneuropathy. *Am J Transplant* 12:2211-2219, 2012.

5) Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJ, Westermark P: Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 19:167-170, 2012.

2. 学会発表

1) Ikeda S. State of the art: Plenary session 8: Biology, clinics and prognosis in ATTR amyloidosis. XIIIth International Symposium on Amyloidosis, Groningen, May 6-10, 2012.

2) Ikeda S, Sekijima Y, Tojo K, Nakagawa M, Morita H, Koyama J. Neurological manifestations of senile systemic amyloidosis. XIIIth International Symposium on Amyloidosis, Groningen, May 6-10, 2012.

3) Sekijima Y, Tojo K, Tsuchiya-Suzaki A, Yazaki M, Ikeda S. The distribution of age at onset of ATTRVal30Met FAP in Japan. XIIIth International Symposium on Amyloidosis, Groningen, May 6-10, 2012.

4) Berk JL, Obici L, Zeldenrust SR, Sekijima Y,

Yamashita T, Heneghan M, Ikeda S, Ando Y, Gorevic P, Merlini G, Kelly JW, Skinner M Bisbee AB, Dyck PJ, Suhr OR, Familial Amyloidosis Consortium. The Diflunisal Trial: Demographics, baseline neurologic staging, and adverse events. XIIIth International Symposium on Amyloidosis, Groningen, May 6-10, 2012.

5) 池田 修一, 関島 良樹, 東城 加奈, 鈴木 彩子, 矢崎 正英. 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者の発症年齢の推移に関する検討. 第53回日本神経学会学術集会, 東京, 5月22日-24日, 2012年.

6) 永松清志郎, 田澤浩一, 池田修一, 関島良樹. 手根管症候群で発症した ATTR Tyr114His 型家族性アミロイドポリニューロパチーの1例. 第130回日本内科学会信越地方会, 新潟, 6月2日, 2012年.

7) 池田修一. 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)に対する肝移植50例のまとめ. 第32回日本末梢神経学会学術集会, 福岡, 8月31日-9月1日, 2012年.

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

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

アミロイドーシス特有の病理像を認識するプローブの探索 (7)

研究分担者 工藤 幸司 東北大学病院 臨床試験推進センター

共同研究者 小熊幸恵¹⁾、原田龍一^{1,2)}、岡村信行^{1,2)}、古川勝敏³⁾、荒井啓行³⁾、星井嘉信⁴⁾、宇田裕史⁵⁾、佐伯修⁵⁾、奥田恭章⁶⁾、中村正⁷⁾、坂井勇仁⁸⁾、和田庸子⁸⁾、中野正明⁸⁾、佐藤弘恵⁹⁾、小関由美¹⁰⁾、田村裕昭¹¹⁾、神谷百合香¹²⁾、寺井千尋¹²⁾、亀田智宏¹³⁾、谷口義典¹⁴⁾、公文義雄¹⁴⁾、松下正人¹⁵⁾、江原重幸¹⁶⁾、檜崎雅司¹⁷⁾、岩崎由恵¹⁸⁾、川上純¹⁹⁾、吉崎和幸²⁰⁾、安東由喜雄²¹⁾

東北大学病院 臨床試験推進センター¹⁾、東北大学医学系研究科機能薬理学分野²⁾、東北大学加齢医学研究所³⁾、山口大学医学系研究科情報解析医学系学域病理形態分野 (病理学第一講座)⁴⁾、堺温心会病院内科⁵⁾、道後温泉病院リウマチセンター内科⁶⁾、熊本リウマチセンターリウマチ膠原病内科⁷⁾、新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座 (第2内科)⁸⁾、新潟県立リウマチセンター⁹⁾、東京女子医大付属膠原病リウマチ痛風センター¹⁰⁾、勤医協中央病院内科 (リウマチ・膠原病)¹¹⁾、自治医科大学附属さいたま医療センターアレルギーリウマチ科¹²⁾、香川大学医学部内分泌代謝・血液・免疫・呼吸器内科¹³⁾、高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科¹⁴⁾、大阪南医療センター¹⁵⁾、神戸徳洲会病院¹⁶⁾、大阪大学免疫アレルギー内科¹⁷⁾、八尾徳洲会総合病院¹⁸⁾、長崎大学病院第一内科¹⁹⁾、大阪大学大学院工学研究科 先端材料化学領域 免疫医科学²⁰⁾、熊本大学大学院 生命科学研究部 神経内科学分野²¹⁾

研究要旨 1) アミロイドーシス患者の胃幽門輪標本を BF-227 で染色することにより、治療前に比較してトシリズマブの治療効果が示唆される結果を得ることができた。2) 近赤外線蛍光プローブ THK-265 を A β Tg マウスに投与することにより、同マウスの月齢依存的な A β の蓄積が確認され、また Wt マウスとの比較では投与 3 分後に明らかな差がみられた。3) 近赤外線蛍光プローブ THK-5XY をアミロイドーシスマウスに投与することにより、アミロイド蓄積部位 (脾臓) に一致して、THK-5XY の高集積像が観察された。

A. 研究目的

アミロイドーシスという難病に苦しむ患者様により優れた診断法 (プローブを用いたインビボ画像診断) を提供することを最終目的として、これまでにヒトアミロイドーシス標本および動物モデルにおけるアミロイド蛋白と、分担研究者らによって開発されたアミロイドリガンド BF-227 との結合性を検討し、いずれの標本および動物モデルにおいても高い結合性を示すことを確

認してきた。

一方、近年アミロイドーシス治療薬として生物学的製剤が注目されてきており、その代表的な製剤がトシリズマブ (IL-6 の抗体) (Okuda Y and Takasugi K: Arthritis & Rheumatism.54. 2997- 3000. 2006) である。これまで同薬 (トシリズマブ) のアミロイドーシス患者様における治療有用性を検証するために「AA アミロイドーシス臨床研究会」会員よりお送りいただいたアミロイドーシス

患者様の消化管生検標本の BF-227 染色を実施してきたが、それらの結果が得られたので報告する。

アミロイドーシス患者さんの最終確定診断は組織の生検を行いアミロイドの沈着を病理学的に証明することによって行われる。近年、アミロイドの沈着を証明する新しい検出法としてアルツハイマー病診断用アミロイドイメージングプローブと陽電子断層撮影装置 (PET) を用いる方法が紹介されてきた。Furukawa、Ikeda らは分担研究者らが開発したプローブ^{[11C]BF-227}により familial transthyretin-related 全身性アミロイドーシス患者の心臓に集積したアミロイド¹⁾を、また Antoni らは^{[11C]PIB}により全身性アミロイドーシス患者の心臓に集積したアミロイド、すなわち AL (免疫グロブリン L 鎖) or ATTR (トランスサイレチン)²⁾を描出できることを、それぞれ報告している。

アミロイドイメージング用プローブ・PET を用いた診断法は生検に比してより非侵襲的であり、アミロイド蓄積部位を確実に描出できるメリットがあるが、分担研究者らはそのメリットはそのままにさらに簡便・廉価・迅速なアミロイドーシス診断を可能とする近赤外線蛍光プローブの開発をも進めている。

生体は約 600nm 以下の光ではヘモグロビンの吸収により、また約 1400nm 以上の光では水の吸収により生体を透過しがたいことが知られている (図 1)。生体を透過する領域の光は「生体における分光学的窓」と呼ばれている。

今回、分担研究者らが開発した、または開発中の近赤外線蛍光プローブについての前臨床試験データを示し、若干の考察を加えたので報告する。

B. 研究方法

I. トシリズマブの臨床効果の検証

「AA アミロイドーシス臨床研究会」会員よりお送りいただいたアミロイドーシス患者様の消化管生検 (胃幽門輪の 0 時、3 時、9 時) 標本の BF-227 染色を実施した。お送りいただいた標本は以下の手順で BF-227 染色した。

1. 標本

各施設より送付された、AA アミロイドーシスを合併した関節リウマチと診断された症例の生検部位 3ヶ所 (胃幽門輪: 0、3、9 時) をサンプル毎にパラフィン包埋した未染色プレパラートを使用した。

2. 脱パラフィン処理

パラフィン切片は、100% xylene 10 分間×2 回、100% ethanol 5 分間×2 回、95% ethanol 5 分間、90% ethanol 5 分間、流水洗浄 10 分間の順で脱パラフィン化した。

3. 100 μM BF-227 溶液の調製

BF-227 を 100% エタノールで 200 μM の濃度に溶解後、純水で 100 μM にした。

4. BF-227 による染色

脱パラフィン処理をした未染色プレパラート上の標本を DAKOPEN で取り囲み、100 μM BF-227 溶液を滴下し 10 分間反応させた後、水道水で 5 回洗い反応を止めた。蛍光顕微鏡

(ECLIPSE 80i, Nikon) で観察し、デジタルカメラ (DXM 1200F, Nikon) で撮影した。観察に用いた蛍光用のフィルターは V-2A、BV-2A (ECLIPSE 80i, Nikon)、倍率は 40 倍とした。

5. 画像処理

撮影した画像は画像処理ソフト Image J (National Institutes of Health 発行) を利用して組織標本全体の面積および BF-227 染色領域を求め、以下の式から BF-227 染色領域比 (%) を求めた。

$$\text{BF-227 染色領域比 (\%)} = (\text{組織標本全体の面積} / \text{BF-227 染色面積}) \times 100$$

データとしては胃幽門輪 3 部位の BF-227 染色面積の平均と標準偏差を算出した。

II. APPT g マウスマウスにおける A β の近赤外線蛍光プローブによる描出

脳内に A β が蓄積する APPTg (Tg2576) マウス (129S6、メス、Taconic・IBL) および野生型 (Wt) マウス (129S6、メス、Taconic・IBL) の頭部の被毛をバリカン (大東電機工業株式会社、6000AD) で短く刈った後、除毛クリーム (Kanebo、epilat) 塗布の約 10 分後に濡れタオルで被毛を完全に除

去した。その後、イソフルラン (Abbote、フォーレン) の濃度 2.0 %、流量 2.0 L/min で吸入麻醉し (麻醉機: 株式会社バイオマシナリー、TK-5)、近赤外線蛍光イメージング装置 (XENOGEN、IVIS 100) に Tg マウスまたは Wt マウスを頭部の位置がずれないようにマウス用ステレオタキシック (Muromachi、IMPACT-1000A/M) を改良した固定装置に固定した。

今回の実験に用いた近赤外線蛍光プローブには $\alpha\beta$ に親和性を有し、血液-脳関門を容易に通過するとともに生体を透過する領域 (光の分光学的窓領域) に励起および蛍光波長を有する THK-265 (化学構造は図 2) を用い、その投与用量は 1 mg/kg、容量は 10 mL/kg、投与速度 1 分間かけて全量を投与し、118 分間イメージングを行った。画像撮影時のマウスの月齢は 19 ヶ月齢および 32 ヶ月齢時に画像撮影を行った。但し 19 ヶ月齢および、32 ヶ月齢マウスは同一固体を使用できなかった。なお、今回用いたフィルターは励起波長用には 615~665 nm、蛍光波長用には 695~770 nm およびバックグラウンド除去用には 575~610nm のフィルターを用いた。

画像解析には Living Image R 2.50 (XENOGEN) を使用し、除毛した頭部全体に region of interest (ROI) をとり解析を行った。ROI をとり解析を行った蛍光強度は、単位面積あたりの蛍光強度をデータとして用いた。

III. アミロイドーシスモデルマウスにおけるアミロイドの近赤外線蛍光プローブによる描出

M. Butyricum (DIFCO) のアンプルを 3 本割り、プラスチックの容器に入れた。5 ml の 0.1 M PBS (pH 7.4) に溶かし、氷冷下で Sonication を 10 秒加え、次いで 30 秒間休む工程を 30 回氷冷しながら繰り返した。30 回終わったら Freund's complete adjuvant (DIFCO) 5 ml を良く振ってから加えた。その後ホモジェナイザー (POLYTRON[®]) でよく攪拌し、液が白っぽくなって水に落とすも拡散しないことを確認した後使用した。

体重 21~26 g の SLC: C57BL/6J、雄性マウス (7 週齢) を用いた。ペントバルビタール (ネンブターール[®]、大日本製薬株式会社、アボット ラボラトリーズ) を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与した。麻

酔が効いたことを確認し、背部皮下に作製したアジュバンドをマウス 1 匹当たり 0.25 ml 投与した。針は 21 G (TERUMO[®])、シリンジはツベルクリン用 1 ml (TERUMO[®]) を使用した。1 回目の投与より 2 週間後、さらにマウスの背部皮下にアジュバンドを 0.25 ml 投与し、2 回目の投与からさらに 2 週間後以降にアミロイドーシスモデルマウスとして使用した。

マウス背部の被毛をバリカン (大東電機工業株式会社、6000AD) で短く刈った後、除毛クリーム (Kanebo、epilat) 塗布の約 10 分後に濡れタオルで被毛を完全に除去した。その後、イソフルラン (Abbote、フォーレン) の濃度 2.0 %、流量 2.0 L/min で吸入麻醉し (麻醉機: 株式会社バイオマシナリー、TK-5)、近赤外線蛍光イメージング装置 (XENOGEN、IVIS 100) にセットした。

今回の実験に用いた近赤外線蛍光プローブにはアミロイド蛋白に親和性を有するとともに、生体を透過する領域 (光の分光学的窓領域) に励起および蛍光波長を有する THK-5XY (化学構造は示しません) を用いた。投与用量は 0.3 mg/kg、投与ルートは静脈内投与とした。

なお、今回用いたフィルターは励起波長用には 615~665 nm、蛍光波長用には 695~770 nm およびバックグラウンド除去用には 575~610nm のフィルターを用いた。

(倫理面への配慮)

アミロイドーシス患者様標本を使用する場合、ヘルシンキ宣言を基準として倫理面に配慮し、標本提供許である各施設倫理委員会の承認を得た上で使用する。

動物実験においては、東北大学における動物実験に関する指針 (S 63.3.24) に従い、十分なる愛護精神をもってできるだけ動物に苦痛を与えぬように配慮する。

C. 研究結果

I. トシリズマブの臨床効果の検証

図3にトシリズマブ治療前に比較して治療1年後に著効を示した症例の胃幽門輪標本における