

図 3. アミロイドシスマウスモデルにおける MR16-1 (ラット抗マウス IL-6 受容体抗体) の効果

生理的食塩水投与群と MR16-1 投与群との間に有意の差 (n=5、unpaired t-test、P=0.003) がみられた。

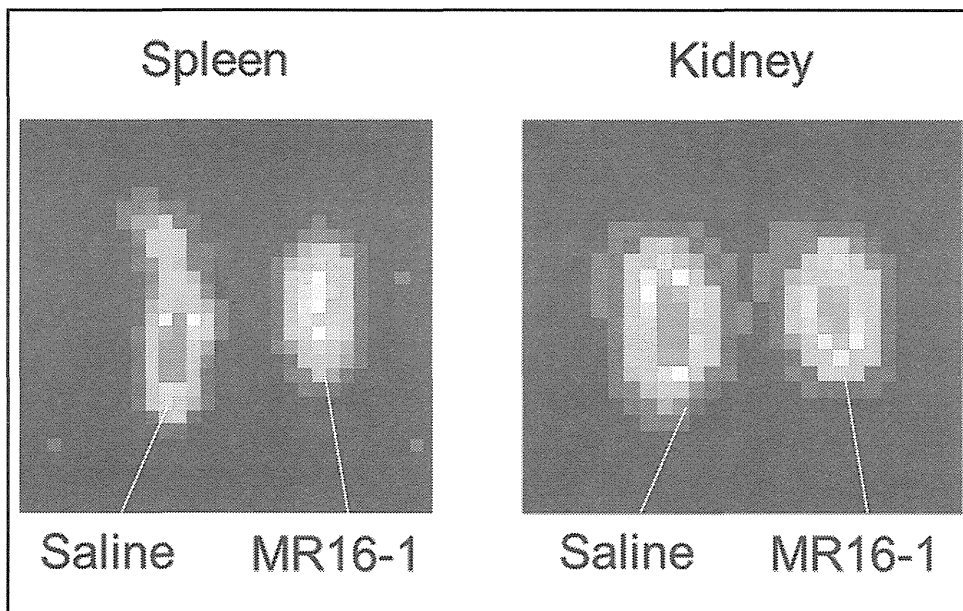


図 4. アミロイドシスマウスにおける摘出された脾臓 (左) と腎臓 (右) の画像

THK-5XY 投与 60 分後にイソフルラン深麻酔下に安楽死させて腎臓と脾臓を摘出し、インビボで用いた近赤外線蛍光イメージング装置 (フィルターも同じ) で撮影したところ、両臓器にアミロイドが蓄積していることが確かめられた

厚生労働省科学研究費補助金（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

腎臓に2種類のアミロイド蛋白の沈着がみられたモルモットの1例

研究分担者 宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

共同研究者 牧野祥之¹、亀谷富由樹²、高橋映里佳¹、菅原豪³

¹麻布大学獣医学部病理学研究室、

²公益財団法人東京都医学総合研究所認知症高次脳機能分析部門、

³麻布大学生物科学総合研究所研究室

研究要旨 動物の全身性アミロイド症のほとんどがAAアミロイド症とされている。これまでにモルモットのアミロイド症の報告はないが、我々は11例のAAアミロイド症を経験しているが、そのうちの1例の腎臓に2種類のアミロイド蛋白の沈着を認めた。詳細に解析したところ、腎臓の糸球体を除く諸臓器のアミロイドはAAアミロイドと同定されたが、糸球体に沈着していたアミロイドはポリクローンのIg kappa light chain由来のALアミロイドである可能性が示唆された。よって、本例はヒトおよび動物においても非常に稀な症例と考える。

A. 研究目的

実験動物として汎用されるモルモットには自然発生性のアミロイド症の報告はない。これまでに本研究室では、アミロイド症の11例の経験があるが、いずれもAAアミロイド症であることを確認している。今回、そのうちの1例の腎臓に、性状の異なる2種類のアミロイド蛋白が沈着するという非常に稀な症例に遭遇したため、その詳細について解析を行った。

B. 研究方法

モルモット、雌、約7歳。動物園でふれあい動物として飼育されていたが、高齢および左後肢膝部外側の拇指頭大腫瘍によりリタイアし、当研究室に研究用として提供された。大学搬入の数日後に斃死し、直ちに剖検した。全身諸臓器を病理組織学的に検索するとともに、ホルマリン固定腎組織標本からレーザーマイクロダイセクション法により、尿細管間質および糸球体アミロイドを回収し、LC-MS/MSを用いて沈着蛋白およびアミロイドのアミノ酸配列を解析した。

C. 研究結果

腎臓の糸球体および間質、脾臓、胃、腸管、肝臓にCongo-red染色陽性、緑色偏光を示すアミロイド沈着を観察した。腎臓の糸球体を除く諸臓器のアミロイドは、免疫染色によりAAアミ

ロイドと同定された。一方、糸球体のアミロイドは抗AA抗体に陰性であったが、抗IgGおよびLight Chains (lambdaおよびkappa) 抗体で陽性となり、超微形態学的に沈着物はアミロイド細線維の特徴を示した。質量分析では、腎臓の間質に認められたアミロイドは、ヒトAAとほぼ同じサイズを示し、糸球体に認められたアミロイドは、ヒトIg kappa light chainのフレームワーク領域と相同性のあるペプチドが2種類同定され、Ig lambda light chain関連ペプチドは同定されなかった。

D. 考察

糸球体には少なくとも2クローンのIg kappa light chainが存在し、それがALアミロイドを形成していたと考えられた。AAアミロイドーシスの原因として慢性炎症などがあげられるが、本例において原因と特定できるほど重篤な病変はなかった。また、ALアミロイドーシスの原因として多発性骨髄腫や形質細胞の異常増殖などがある。本例でも各所で形質細胞浸潤が観察されたが、いずれも軽微であった。さらに、骨髄では赤芽球系と偽好酸球系造血細胞の増殖亢進が認められるのみで、ALアミロイド沈着との関連は不明であった。当研究室ではモルモットのアミロイド症11例を経験しているが、本例を除いて、いずれもAAアミロイド単独の沈着で、腎臓へのアミロイド沈着はみられな

った。

E. 結論

本例は、全身性AAアミロイド症と限局性糸球体ALアミロイド症が併発した稀少なモルモットのアミロイド症の1例である。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 宇根有美, 牧野祥之: 誌上剖検・外科病理シリーズ モルモットの子宮平滑筋系腫瘍. 小動物臨床 32: 291-293, 2013
- 2) 宇根有美: 誌上剖検・外科病理シリーズ モルモットの卵胞嚢腫. 小動物臨床 32: 228-230, 2013

2. 学会発表

- 1) 牧野祥之, 楠比呂志, 田向健一, 高見義紀,

石川智子, 宇根有美: モルモット (*Cavia porcellus*) における乳腺腫瘍の病理学的検索. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜. 8月, 2013年.

- 2) 津郷孝輔, James Chambers, 植田光晴, 白井温, 宇根有美: 老齢サバンナモンキー (*Ceropithecus aethiops*) の老人性アミロイドーシス. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜. 8月, 2013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

R1.P1-*Apoa2^c* マウスにおける老化アミロイド(AApoAII)の沈着は 小胞体ストレスを誘導する

研究分担者 樋口 京一 信州大学大学院医学系研究科加齢生物学講座

共同研究者 羅 宏敏、澤下 仁子、劉 穎業、李 琳、丁 欣、宮原 大貴、森 政之
 信州大学大学院医学系研究科加齢生物学講座

研究要旨 小胞体ストレス(Endoplasmic reticulum (ER) stress) は変性タンパク質応答 (Unfolding Protein Response: UPR)ともよばれ、生体でのタンパク質の恒常性を維持するために重要な役割を果たしている。各種のアミロイドーシスでも発症や病態に関与することが報告されている。主として細胞外に AApoAII アミロイドが沈着するマウス老化アミロイドーシスを用いて、全身性アミロイドーシスにおける小胞体ストレスの関与を解析した。R1.P1-*Apoa2^c* 雌マウスに AApoAII アミロイド線維を投与してアミロイドーシスを誘発し（伝播）、2、4 ヶ月後にマウスを屠殺して肝臓、腎臓、心臓のアミロイド沈着と小胞体ストレスの解析を行った。アミロイド沈着に伴い、肝臓での小胞体分子シャペロン *Grp78/Bip (Hspa5)* の mRNA 発現量、および GRP78/BIP タンパク質の有意な増加が示された。細胞周囲のアミロイド沈着によって細胞内 GRP78/BIP 量が増加することが示された。小胞体ストレスシグナル因子 *Eif2ak3*、*Atf6*、*Atf4*、*Ddit3 (Chop)*、*Xbp1s* の mRNA 発現量とオートファジー関連因子 *Atg5* の mRNA 発現量が増加した。さらに、アポトーシス促進因子である *Bax* の発現増加が認められ、TUNEL 染色陽性細胞の増加が認められた。腎臓では、肝臓と同様に *Grp78/Bip (Hspa5)* mRNA 発現量の有意な増加が示されたが、GRP78/BIP はアミロイド線維が沈着した尿細管周囲の比較的広範囲に集積増加が認められた。*Eif2ak3*、*Atf4*、*Xbp1s* の mRNA 発現量と TUNEL 染色陽性細胞の増加が認められた。しかし心臓では小胞体分子シャペロンや小胞体ストレスシグナル因子の発現変化やアポトーシスの変化は確認できなかった。

A. 研究目的

生体にはタンパク質代謝の恒常性を維持する仕組みが備わっているが、変性タンパク質が小胞体に蓄積するのを防ぐ小胞体ストレス (ER ストレス) 反応、あるいは変性タンパク質応答 (unfolded protein response: UPR) は、EIF2AK3/PERK、ATF6、ERN1/IRE1 などの小胞体ストレスシグナル因子によって伝達される。*Grp78/Bip (Hspa5)* や *Ddit3 (Chop)* 遺伝子は ER ストレスの重要な分子マーカーである。変性タンパク質が過剰に蓄積し、小胞体ストレスの強さが細胞の回避機能を越えると、細胞死（アポトーシス）が誘導され、神経変性疾患などさまざまな疾患の原因となると考えられている。

マウス老化アミロイドーシスでは AApoAII アミロイド線維が加齢とともに全身臓器の細胞外

に沈着する。これまでに我々は熱ショック転写因子 (HSF1) 欠損マウスを用いて、熱ショック反応が AApoAII 沈着抑制に関与する事を明らかにした。本研究では、マウスにおける AApoAII アミロイドーシスと小胞体ストレスとの関係を解析した。

B. 研究方法

2 ヶ月齢の R1.P1-*Apoa2^c* 雌マウス尾静脈に AApoAII アミロイド線維 1 μg を投与し、アミロイドーシスを誘発した（伝播）。2 及び 4 ヶ月後にマウスを屠殺し、全身各臓器のアミロイド沈着量をコンゴレッド染色した組織切片を偏光顕微鏡で観察し判定した。肝、腎、および心臓の小胞体分子シャペロン *Grp78/Bip* と小胞体ストレスシグナル伝達系の遺伝子およびタンパク質の発現変

化を real-time PCR, および Western blotting で測定した。肝、腎、および心臓のアポトーシス細胞を、TUNEL 染色陽性細胞として検出を行った。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験であるので、信州大学動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、承認を得た後に実施した。

C. 研究結果

(1) アミロイド沈着: アミロイドーシス誘発 2 ヶ月後には AApoAII アミロイドが全身に沈着し、4 ヶ月後ではさらに重篤化した。肝臓、腎臓、心臓でも同様に投与 4 ヶ月後にアミロイド沈着の重篤化が認められた (図 1)。

(2) Grp78/Bip (Hspa5)の増加: アミロイド沈着に伴い、肝臓での小胞体分子シャペロン Grp78/Bip (Hspa5) の mRNA 発現量の有意な増加が RT-PCR と Real-time PCR により示された。GRP78/BIP タンパク質の増加も Western blot 解析で確認された。さらに、細胞周囲のアミロイド沈着によって細胞内 GRP78/BIP 量が増加することが免疫組織染色法により示された (図 1)。

(3) 小胞体ストレスシグナル因子の増加: アミロイド沈着によって、小胞体ストレスシグナル因子 *Eif2ak3*, *Atf6*, *Atf4*, *Ddit3* (Chop), *Xbp-1s* の mRNA 発現量が増加した (図 1)。さらにオートファジー関連因子 *Atg5* の mRNA 発現量が増加した。

(4) アポトーシス細胞の増加: 肝臓へのアミロイド沈着増加に伴い、アポトーシス促進因子 *Bax* の発現増加が認められ、TUNEL 染色陽性細胞の増加が認められた (図 2)。

(5) 腎臓での小胞体ストレスの増加: 腎臓での Grp78/Bip (Hspa5) mRNA 発現量の有意な増加が RT-PCR と Real-time PCR で示された。免疫組織染色法により、GRP78/BIP はアミロイド線維が沈着した尿細管周囲の比較的広範囲に集積増加が認められた。腎臓でも *Eif2ak3*, *Atf4*, *Xbp-1s*, *Atg5* の mRNA 発現量が増加した。アミロイド沈着によって、TUNEL 染色陽性細胞の増加が認められた。

(6) 心臓での小胞体ストレス: 心臓ではアミロイド沈着の増加による小胞体分子シャペロンや小胞体ストレスシグナル因子の発現変化やアポト

ーシスの変化は確認できなかった。

D. 考察

今回の研究では、肝臓、および腎臓での AApoAII の細胞外への沈着が小胞体ストレスを誘発し、沈着が重篤化すると、オートファジーやアポトーシスを引き起こすことが明らかになった。GRP78/BIP は小胞体ストレスのマーカーとして、また小胞体ストレスを誘導する分子として機能することが知られている。今回の研究では免疫組織染色でアミロイドの沈着と接している肝細胞のみで GRP78/BIP が増加していることが示され、アミロイド沈着と小胞体ストレスの直接的な関係が明らかになった。しかし、細胞外に沈着したアミロイドがどのようなメカニズムで小胞体ストレスを誘発するのかは不明である。アミロイド線維、オリゴマー、モノマー等が細胞内へ取り込まれるのか、リセプターが存在するのか、酸化ストレスやその他の細胞障害メカニズムが機能しているのか、より詳細な解析が必要である。

小胞体ストレスとアミロイドーシスとの関連は、アルツハイマー病患者やそのモデルマウス、家族性アミロイドポリニューロパチー患者やそのモデルマウスで報告されている。今回の研究では、肝臓と腎臓において AApoAII アミロイドの重篤な沈着があり、小胞体ストレスの 3 つの主要な経路の基本的シグナル因子である EIF2AK3/PERK、ATF6、XBP1s の増加と CHOP や ATG5 が増加し、アポトーシスを起こした細胞数が増加した。これらの結果は、細胞外に沈着するアミロイドーシスでも小胞体ストレスが発症や病態の進行に関与することを示唆している。小胞体ストレス反応はタンパク質の恒常性の維持に重要な役割を果たすが、過剰な反応はアポトーシス等の細胞障害を引き起こす。小胞体ストレスの調節がアミロイドーシスの予防や治療の新たなターゲットになると考えている。

E. 結論

細胞外への AApoAII アミロイド線維の沈着は、臓器によって異なる小胞体ストレス反応を誘発し、肝臓や腎臓ではアポトーシスを誘起することが判明した。今後は細胞外のアミロイド線維沈着

が小胞体ストレス反応を誘発するメカニズムの解明や過剰な小胞体ストレス反応を抑制する手段の検討が必要である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori M, Tian G, Ishikawa A, Higuchi K: Diversity and complexity of the mouse *Saal* and *Saa2* genes. *Exp. Anim.* 63: 99-106, 2014.
- 2) Mori M, Tian G, Higuchi K: AA amyloidosis-resistant CE/J mice have *Saal* and *Saa2* genes that encode an identical SAA isoform. *Amyloid* in press, 2014.
- 3) Higuchi K. Transmission of AA amyloidosis may cause outbreaks of amyloid A amyloidosis in chickens. *Amyloid.* 20: 59-60, 2013.
- 4) Murakami T, Ishiguro N, Higuchi K. Transmission of Systemic AA Amyloidosis in Animals. *Vet Pathol.* 2013 [Epub ahead of print]
- 5) Higuchi K, Mori M, Sawashita J: Mouse senile systemic AApoAII amyloidosis: pathology, genetics and transmission. Takeda T et al, eds. *The Senescence- Accelerated Mouse (SAM): Achievements and Future Directions.* Elsevier B.V. Amsterdam, Netherlands, pp 301-310, 2013.
- 6) 森 政之、樋口 京一: 老化のモデル生物が果たす役割。石井直明、丸山直記 編。老化の生物学 化学同人 京都 2014 (印刷中)
- 7) Qian J, Hirose M, Zhang B, Wang Y, Tian G, Luo H, Liu Y, Fu X, Ge F, Sawashita J, Mori M, Fujimoto M, Nakai A, Higuchi K: Heat shock factor 1 (Hsf1) plays a key role in AApoAII cardiac amyloidosis in mice. Hazenberg B. P.C & Bijzet J eds XIIIth International Symposium on Amyloidosis From Molecular Mechanisms Towards the Cure of Systemic Amyloidosis", Zalsman Groningen B. V, Netherlands. pp 122-125. 2013

- 8) Sawashita J, Zhang B, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Kametani F, Higuchi K: The C-terminal sequence of type F apolipoprotein A-II inhibits the polymerization of apolipoprotein A-II into amyloid fibrils in mice. Hazenberg B. P.C & Bijzet J eds XIIIth International Symposium on Amyloidosis From Molecular Mechanisms Towards the Cure of Systemic Amyloidosis" Zalsman Groningen B. V., Netherlands. pp126-129, 2013.

2. 学会発表

- 1) 劉 穎業、田 耕、羅 宏敏、李 琳、澤下 仁子、森 政之、樋口 京一: マウス老化アミロイド線維(AApoAII)の構造と伝播性の解析。第 28 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、名古屋市、2013 年 7 月 6 日。
- 2) 羅 宏敏、澤下 仁子、田 耕、劉 穎業、森 政之、樋口 京一: R1.P1-Apoa2c マウスにおける老化アミロイド(AApoAII)の沈着は小胞体ストレスを誘導する。第 28 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、名古屋市、2013 年 7 月 6 日。
- 3) 羅 宏敏、錢 金澤、王 耀勇、田 耕、澤下 仁子、森 政之、樋口 京一: マウス老化アミロイド(AApoAII)の沈着は小胞体ストレスを誘導する。日本基礎老化学会第 36 回大会、大阪市、2013 年 6 月 4-6 日。
- 4) 澤下 仁子、李 琳、田 耕、森 政之、樋口 京一: マウス F 型 ApoA-II の C 末ペプチドによるアミロイド線維形成阻害機序とアミロイドーシス発症軽減効果。日本基礎老化学会第 36 回大会、大阪市、2013 年 6 月 4-6 日。
- 5) 樋口 京一: Seeding 反応による伝播現象から見たアミロイドーシスの病態。(シンポジウム) 第 1 回日本アミロイドーシス研究会学術集会、東京、2013 年 8 月 30 日。
- 6) 樋口 京一: アミロイドーシスの分子機構と治療法開発に向けた戦略。厚生労働省アミロイドーシス研究班 夏のワークショップ、2013 年 7 月 25-26 日。
- 7) Higuchi K: Prion-like transmission of systemic amyloidoses. (Invited Speaker) Asian Pacific Prion Symposium (APPS) Nagasaki, 2013.7.21-22.

8) 劉 穎業、田 耕、羅 宏敏、李 琳、澤下 仁子、森 政之、樋口 京一：マウス老化アミロイド線維(AApoAII)の構造と伝播性の解析。第1回日本アミロイドーシス研究会学術集会、東京、2013年8月30日。

9) 澤下 仁子、張 蓓茹、李 琳、田 耕、亀谷富由樹、樋口 京一：マウスF型ApoA-IIのC末ペプチドはAApoAIIアミロイドーシスを軽減する。第1回日本アミロイドーシス研究会学術集会、東京、2013年8月30日。

10) 樋口 京一、田 耕、澤下 仁子、森 政之、細川 昌則、竹田 俊男：老化促進モデルマウス(SAM)を用いた老化および抗老化研究。(招待講演)第22回腸内フローラシンポジウム、東京、2013年11月1日。

11) 羅 宏敏、錢 金澤、王 耀勇、田 耕、澤下 仁子、森 政之、樋口 京一：マウス老化アミロイド(AApoAII)の沈着は小胞体ストレスを誘導する。第8回臨床ストレス応答学会大会、松本市、2013年11月15-16日。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

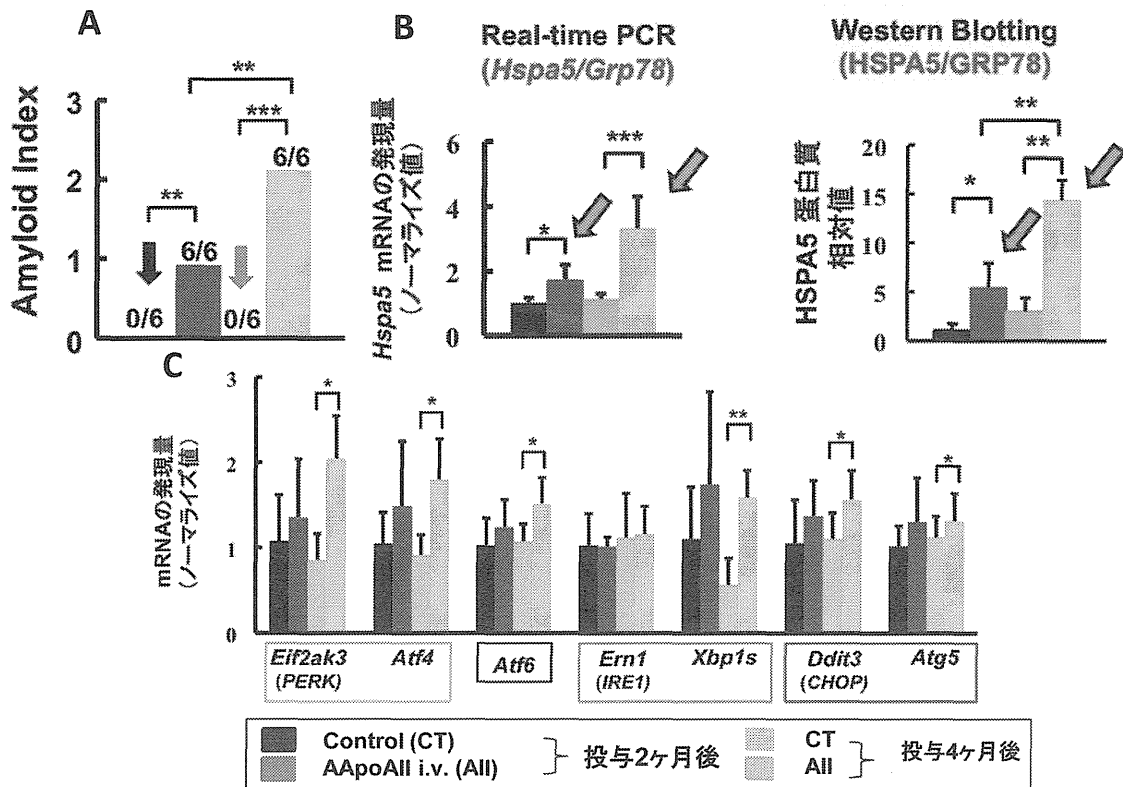


図 1. AApoAIIアミロイド沈着による小胞体ストレスの誘導。A: アミロイド線維投与後、2、4ヶ月でアミロイド沈着程度(Amyloid Index)は増加する。B: アミロイドが沈着した肝臓では *Hspa5/Grp78* 遺伝子/蛋白質の増加し、ERストレスの誘導を示した。C: アミロイドが沈着した肝臓では各種のERストレスシグナル因子遺伝子が有意に増加した。

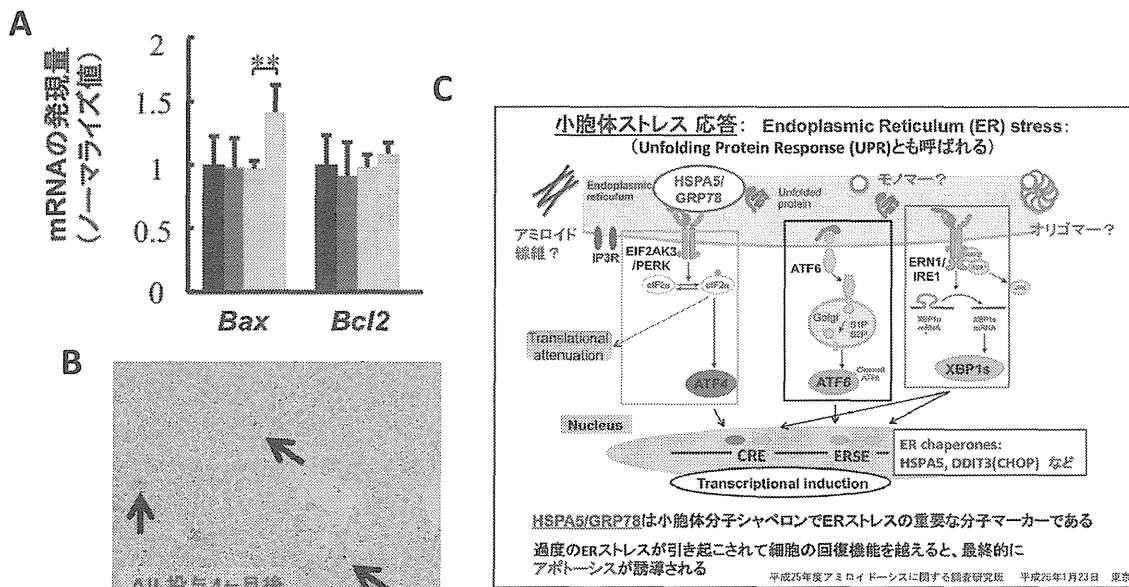


図 2. 過剰のERストレスによるアポトーシスの誘発。A: アポトーシス誘発因子 *Bax* が増加し、B: 肝細胞のアポトーシスが誘発された。C: 主として細胞外に沈着するAApoAII線維が小胞体ストレスを引き起こす機構として、アミロイド線維、オリゴマーあるいはモノマーが細胞内に侵入することが考えられるが、今後の検討課題である

厚生労働省科学研究費補助金（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

老齡カリフォルニアアシカの脳における β アミロイド沈着

研究分担者 宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

共同研究者 高橋映里佳¹、チェンバーズジェームズ²、今村英美³

¹麻布大学獣医学部病理学研究室、

²東京大学農学生命科学研究科獣医病理学研究室、

³京急油壺マリパーク水族館

研究要旨

β アミロイドの沈着により生じる老人斑、脳アミロイドアンギオパチーは、高齢者やアルツハイマー病患者の脳で高頻度に認められる病理学的な所見である。本研究では、国内最高齢のアシカの脳を検査し、 β アミロイドの沈着の特徴について調査した。結果、アシカの脳には2つの形態（小型と大型）を示す老人斑が観察された。小型の老人斑は老齡犬の脳で観察される老人斑と類似していたが、大型の老人斑は動物で報告されているいずれの老人斑とも一致せず、家族性アルツハイマー病患者の脳で観察されるcotton wool plaqueと共通の特徴がみられた。脳アミロイドアンギオパチーも確認されたが、1つの血管に β アミロイド42と40が分節状に沈着するという現象がみられた。なお、高リン酸化タウの蓄積はなく、ヒトのアルツハイマー病のように認知障害や大脳萎縮は観察されなかった。本例は、海棲哺乳類における老人斑および脳アミロイドアンギオパチーの初の報告となる。高齢のアシカでこのような病変がみられたことから、 β アミロイド沈着などのアルツハイマー病関連病変が多く種の間で恒常的に認められることが推察された。cotton wool plaque様の沈着や、脳アミロイドアンギオパチーの特徴的な沈着パターンはアシカ特有の沈着様式であることが推察される。

A. 研究目的

β アミロイド(A β)の沈着によって生じる老人斑(SP)、脳アミロイドアンギオパチー(CAA)は高齢者やアルツハイマー病(AD)患者の脳で高頻度に認められる病理学的な所見である。しかしながら、動物におけるA β 沈着の頻度は低く、報告症例数が少ないためA β 沈着の特徴は捉えられていない。今回、国内最高齢とされる貴重なアシカの脳を検査したところ、海棲哺乳類で初めてSPとCAAを確認したので報告する。

B. 研究方法

症例は、29歳11カ月の雄のカリフォルニアアシカ(*Zalophus californianus*)で、生後2歳から神奈川県的水族館で飼育されていた。生前に認知機能障害と判断される臨床症状は認められなかった。大脳の前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉および小脳の5部位を組織学的検査に供した。対照として本研究室で病性鑑定を行った若齡

のカリフォルニアアシカ2頭(1歳11ヵ月と8歳)の脳についても検索した。

C. 研究結果

肉眼的に脳の色調は褐色調であったが、明らかな萎縮はなかった。PAM染色陽性のSPは大脳皮質、特に前頭葉で高頻度に観察され、凝集性の強い小型のもの(Congo red染色陽性)と、顆粒状を示す大型のもの(Congo red染色陰性)の形態学的に異なる2つのパターンが観察された。免疫染色により、両SPともにA β 40とA β 42が同程度沈着しており、主にA β pN3により構成されていることが確認された。血管へのA β 沈着は、髄膜と実質の両方で高頻度に観察され、血管壁の重層化を認めた。血管壁におけるA β 40とA β 42の分布を2重蛍光抗体法でみたところ、それぞれのサブタイプは血管壁の異なる部位に分節状に沈着しており、同所的に沈着する部分はごく僅かであった。なお、高リン酸

化タウの蓄積はなく、神経原線維変化 (NFT) も認められなかった。

D. 考察

カリフォルニアアシカはイヌ (*Canis familiaris*) と同じイヌ亜目に属する海棲哺乳類である。本例にみられた小型円形のSPは高齢のイヌにみられるSPと形態や、A β pN3が斑の中心部に多い点が類似していた。しかし、大型のSPはこれまで動物で報告されているA β 沈着のいずれにも類似していなかった。中心部にコアを持たない大型のSPは、presenilin1遺伝子に変異を認める家族性AD患者の脳で観察される、cotton wool plaqueと共通の特徴がみられた。また、血管壁のA β 沈着パターンは、A β 40とA β 42の両方が沈着していたが、それぞれが血管壁の異なる部位に分節状に、住み分けるかのように沈着していた。これまでの報告で、イヌやクマでは主にA β 40が血管に沈着しており、AD患者、サル、ネコ、APP Tgマウス、キツツキではA β 40とA β 42の両方が沈着するとされている。本アシカでは、このような沈着様式は、ヒトでも動物でも報告されていない。本論文が、海棲哺乳類におけるSPの初の報告である。高齢のアシカでこのような病変がみられたことから、A β 沈着などのAD関連病変が多く種の間で恒常的に認められることが推察できる。しかし、cotton wool plaque様の沈着や、CAAの特徴的な沈着パターンはアシカ特有の沈着様式であることが推察される。

E. 結論

様々な種の動物の脳でアルツハイマー病関連病変が見出されているが、その頻度は低く、かなり高齢にならないと認められない。また、これまで海棲哺乳類におけるアルツハイマー病関連病変の報告はない。本例は、海棲哺乳類

におけるSP、CAAを示す初の報告であり、cotton wool plaque様のSP、異なるサブタイプのA β が分節状に沈着するCAAが観察され、他の動物ではみられないA β 沈着の特徴を認めた。高齢のアシカでこのような病変がみられたことから、A β 沈着などのAD関連病変が多く種の間で恒常的に認められることが推察できる。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takahashi E, Kuribayashi H, Chambers JK, Imamura E, Une Y. Senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in an aged California sea lion (*Zalophus californianus*). Amyloid. Revise manuscript submission (minor)

2. 学会発表

1) 津郷孝輔, James Chambers, 植田光晴, 白井温, 宇根有美: 老齡サバンナモンキー (*Ceropithecus aethiops*) の老人性アミロイドーシス. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜. 2013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

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

チーターの脳におけるタウの検討

研究分担者 宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

共同研究者 鳥山理恵子¹、高橋映里佳¹、チェンバーズジェームズ²

¹麻布大学獣医学部病理学研究室

²東京大学農学生命科学研究科獣医病理学研究室

研究要旨 我々は、ヒトのアルツハイマー病の高リン酸化タウの蓄積とβアミロイド (Aβ) の沈着および神経原線維変化 (NFT) の形成についてチータ (*Acinonyx jubatus*) で初めて確認し報告してきた。本研究では、チーターの脳における高リン酸化タウの蓄積について病理学的に解析し、ヒトのアルツハイマー病における脳病変と比較検討した。本邦で飼育されていた50頭 (10ヵ月～16歳、平均9.2歳、平均寿命13歳) の脳を解析した結果、7歳以上 (平均12.3歳) の14頭 (28%) にAβ沈着と高リン酸化タウの蓄積が認められ、うち12歳以上 (平均14.6歳) の5頭 (10%) でNFTが確認された。高リン酸化タウは主に神経細胞に局在し、3リピートタウと4リピートタウが発現していることが確認され、また、高リン酸化タウ陽性細胞では、活性型タウリン酸化酵素やユビキチン化が観察された。以上より、チーターの脳にみられる高リン酸化タウの在り様はヒトのアルツハイマー病でみられるものと類似しており、アルツハイマー病の発生段階を追うモデル動物として有用であることが示唆された。

A. 研究目的

我々はチーターにアルツハイマー病(AD)の特徴病変であるβアミロイド(Aβ)の沈着、高リン酸化タウの蓄積、神経原線維変化 (NFT) と大脳萎縮を見出し報告した。今回、チーターの脳における高リン酸化タウの在り様について解析する目的で、病理学的解析を実施した。

B. 研究方法

チーター50頭(10ヵ月～16歳)を対象とし、抗Aβ40,42抗体と抗リン酸化タウ抗体 (AT8) を用いてAβ沈着と高リン酸化タウ蓄積状況を検討し、このうち、これらの物質を共に大量に有する3頭について、Gallyas-Braak法、AT8保有細胞種の特異性、タウ高リン酸化酵素の活性状況およびユビキチン化の有無を、各種細胞マーカー (MAP2、神経細胞 ; GFAP、星状膠細胞 ; Olig-2、稀突起膠細胞) およびGSK3β(タウリン酸化酵素)、p-GSK3β(非活性型)、ユビキチンに対する抗体を用いてそれぞれ検索した。また、タウアイソフォームの年齢変遷、凝集化タウアイソフォームの特異性のために、特異抗体を用いて3RD(3リピートタウ)、4RD(4リピートタウ)の発現をみた。

C. 研究結果

50頭中14頭、24%にAβとAT8の沈着を認めた。両物質の沈着は7歳以上 (平均12.3歳)の動物で観察され、5頭(12歳未満、平均14.6歳)にNFT形成がみられた。このうち、高度の高リン酸化タウ、NFTが確認された3頭について詳細に検索したところ、AT8はMAP2およびOlig-2、GSK3βと共局在したが、GFAPとp-GSK3βとの共局在はなかった。また、AT8に一致して、顆粒状のユビキチンを観察した。若齢個体(10ヵ月)で3RDが、成体(12歳)で3、4RDが共存した。AT8陽性個体では、3RDと4RDの凝集を認めた。

D. 考察

チーターでは、タウはGSK3βの存在下で、主に神経細胞と少数の稀突起膠細胞内でリン酸化されていること、タウリン酸化細胞ではユビキチン化も生じており、ヒトのADと類似の所見が得られた。また、ヒトと同様のタウのアイソフォームの年齢変化が確認され、AT8陽性個体では両リピートタウが凝集していた。なお、同様の結果はツシマヤマネコでも報告されており、ネコ亜科動物での普遍的变化の可能性があったが、チーターでは、高リン酸化タウの蓄積

はより高率で、低年齢から確認された。

E. 結論

チーター脳におけるタウの動態はヒトのADと類似点が多く、ヒトADの発症機序解明に貢献する可能性がある。

F. 研究危険情報

なし

G. 学会発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 高橋映里佳, 鳥山理恵子, チェンバーズジエームズ, 亀谷富由樹, 宇根有美: 老齢ネコ科動物の脳におけるβアミロイド沈着と高リン酸化タウの蓄積. 第32回日本認知症学会学術集会, 長野, 2013年11月8日.

1) 鳥山理恵子, 高橋映里佳, チェンバーズジエームズ, 宇根有美: チーター (*Acinonyx jubatus*) の脳におけるタウの検討. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜, 2013年9月20日.

2) 高橋映里佳, 鳥山理恵子, チェンバーズジエームズ, 亀谷富由樹, 宇根有美: 老齢ネコ科動物のβアミロイド沈着および高リン酸化タウ蓄積に関する病理学的研究. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜, 2013年9月20日.

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 発症の鍵となる TTR 断片化機構の解析

研究分担者 植田 光晴 熊本大学神経内科

共同研究者 Barbara Kluge-Beckerman²、Juris J. Liepnieks²、水口 峰之³、大嶋 俊範¹、
三隅 洋平¹、田崎 雅義¹、大林 光念⁴、Merrill D. Benson²、安東 由喜雄¹

¹熊本大学神経内科、²インディアナ大学、³富山大学 構造生物学

研究要旨 家族性アミロイドーシスポリニューロパチー（FAP）は、トランスサイレチン（TTR）遺伝子の変異により、末梢神経障害などで TTR がアミロイド線維化する代表的な遺伝性ニューロパチーである。しかし、同じ遺伝子変異でも患者の出身地により発症年齢や浸透率が大きく異なることが知られている。すなわち、集積地（熊本や長野）の FAP 家系は発症年齢が 20-30 歳代と低く浸透率も高いが、非集積地の FAP 家系では発症年齢が 50-80 歳代と高く、浸透率も低いいため家族歴が明確でない場合が多い。本研究では、組織に沈着したアミロイドから検出される断片化 TTR に着目し、集積地と非集積地の FAP 家系で TTR 断片化の出現に差があるかなど、本症の病態と断片化 TTR が関与するか検証するとともに、TTR 断片化の生じる機構を *in vitro* で解析した。非集積地 FAP 患者の組織からは断片化 TTR が検出されたが、集積地 FAP 患者の組織からは断片化 TTR が検出されない傾向が認められた。神経由来の細胞株に TTR アミロイドを加えた場合に TTR の断片化が生じた。TTR の断片化部位を解析したところ、トリプシンの切断部位と類似していた。siRNA を用いて、トリプシノーゲンの発現を抑制すると断片化 TTR の生成も抑制された。また、試験管内で、トリプシンと TTR アミロイドを混合し、インキュベーションしたところ、細胞培養で観察されたものと類似した TTR の断片化が生じることが判明した。未変性の TTR とトリプシンをインキュベーションしても、TTR の断片化は検出されなかったことから、トリプシンによる断片化には TTR のアミロイド化が必要であると考えられた。断片化 TTR は本症の発症に関連していると考えられる。TTR の断片化はアミロイド線維形成後に生じ、トリプシンが TTR 断片化に関与していると考えられる。TTR 断片化を促進することで、沈着したアミロイドのクリアランスが亢進する可能性が考えられ、本症の新たな治療法の開発に発展する可能性がある。

A. 研究目的

家族性アミロイドーシスポリニューロパチー（FAP）は、トランスサイレチン（TTR）遺伝子の変異により、TTR がアミロイド線維化し臓器に沈着することで、末梢神経障害などを生じる代表的な遺伝性ニューロパチーである。本疾患は同じ遺伝子変異（Val30Met）でも患者の出身地により発症年齢や浸透率が大きく異なることが知られている。すなわち、集積地（熊本や長野）の FAP 家系は発症年齢が 20-30 歳代と低く浸透率も高いが、非集積地の FAP 家系では発症年齢が 50-80 歳代と高く、浸透率も低いいため家族歴が明確でない場合が多い。本研究では、組織に沈着したアミロ

イドから検出される断片化 TTR に着目し、本症の病態との関連性を検証するとともに、TTR 断片化の生じる機構を *in vitro* で解析した。

B. 研究方法

集積地 FAP 患者 21 名と非集積地 FAP 患者 8 名の生検もしくは剖検組織からアミロイド前駆蛋白質を抽出し、抗 TTR50-127 抗体（断片化 TTR に対する抗体）を用いたウエスタンブロット法で、断片化 TTR の有無を検証した。

また、各臓器由来の細胞株（神経細胞由来の SH-SY5Y、アストロサイト由来の U87MG、血管平滑筋由来の glomotel、肝細胞由来の HepG2、網

膜色素上皮細胞由来の ARPE19、マウス心筋由来の HL-1) を用い、未変性のリコンビナント TTR (V30M) と試験管内 (低 pH 下) で凝集させた TTR を加え、TTR の断片化が生じるか検証した。電気泳動で分離した後に断片化 TTR 由来のバンドを切り出し、アミノ酸シーケンスで断片化が生じている部位を解析した。

また、トリプシノーゲンとその活性化因子であるエンテロキナーゼに対する siRNA を用いて、TTR 断片化に対する作用を解析した。さらに、トリプシンと未変性、凝集 TTR を試験管内で直接混合してインキュベーションし、TTR の断片化が生じるか解析した。

(倫理面への配慮)

研究の遂行にあたり、研究内容については当施設倫理審査委員会の承認を受け、患者や家族にインフォームドコンセントを行い、同意を文書で得た。

C. 研究結果

非集積地FAP患者の組織からは断片化TTRが検出される症例が多かったが、集積地FAP患者の組織からは断片化TTRは検出されなかった。異なる臓器由来のアミロイドでも同様の傾向が確認された。各種細胞株に試験管内で凝集させたTTRを加えると、神経細胞由来であるSH-SY5YとU87MG細胞を用いた場合にTTRの断片化が生じた。TTRの断片化部位をアミノ酸シーケンスで解析したところ、リジン残基のC末端側で切断が生じていることが判明し、トリプシン様酵素による切断部位と考えられた。siRNAを用いてトリプシノーゲンの発現を抑制すると断片化TTRの生成も抑制された。また、トリプシノーゲンを活性型へ変化させるエンテロキナーゼに対するsiRNAで検討を行ったところ、同様にTTRの断片化が抑制されていた。試験管内で、直接トリプシンとTTR凝集物を混合し、インキュベーションしたところ、細胞培養で観察されたものと類似したTTRの断片化が生じていることが判明した。未変性のTTRとトリプシンをインキュベーションしても、TTRの断片化は検出されなかったことから、トリプシンによる断片化にはTTRのアミロイド化が必要であると考えられた。

D. 考察

若年発症である集積地の FAP 患者から断片化 TTR が検出されず、高齢発症である非集積地の FAP 患者で断片化 TTR が検出される傾向があったことから、組織に沈着したアミロイドに断片化 TTR が存在することと、FAP の発症年齢が高くなることに何らかの関連があると考えられる。また、*in vitro* の解析で、トリプシンが TTR の断片化に関与している可能性があることが判明した。未変性の TTR はトリプシンの断片化に対して抵抗性を示したが、凝集させた TTR は速やかにトリプシンにより断片化が生じたことから、トリプシンによる TTR の断片化は TTR の変性後に生じていると考えら、TTR 凝集物のクリアランスに関連している可能性がある。

今後は、各種の断片化 TTR を作成し、それらのアミロイド線維の形成性や毒性などの検討を行う予定である。

E. 結論

断片化 TTR は本症の発症や病態に関連していると考えられる。トリプシンが TTR 断片化に関与していると考えられ、TTR 凝集物のクリアランス機構に何らかの関連性があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oshima T, Kawahara S, Ueda M, Kawakami Y, Tanaka R, Okazaki T, Misumi Y, Obayashi K, Yamashita T, Ohya Y, Ihse E, Shinriki S, Tasaki M, Jono H, Asonuma K, Inomata Y, Westermark P, Ando Y. Changes in pathological and biochemical findings of systemic tissue sites in familial amyloid polyneuropathy more than 10 years after liver transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2014 e-pub.
- 2) Obayashi K, Tasaki M, Jono H, Ueda M, Shinriki S, Misumi Y, Yamashita T, Oshima T, Nakamura T,

- Ikemizu S, Anan I, Suhr O, Ando Y. Impact of antibodies against amyloidogenic transthyretin (ATTR) on phenotypes of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) ATTR Valine30Methionine. *Clin Chim Acta* 419:127-131, 2013.
- 3) Obayashi K, Misumi Y, Watanabe T, Ando T, Akagami T, Tasaki M, Shinriki S, Ueda M, Yamashita T, Shinichi H, Ando Y. Dominant cardiac type of familial amyloidotic polyneuropathy associated with a novel transthyretin variant Thr59Arg. *Muscle Nerve* 48:839-841, 2013.
- 4) Ihse E, Rapezzi C, Merlini G, Benson M, Ando Y, Suhr O, Ikeda SI, Lavatelli F, Obici L, Quarta C, Leone O, Jono H, Ueda M, Lorenzini M, Liepnieks J, Ohshima T, Tasaki M, Yamashita T, Westermark P. Amyloid fibrils containing fragmented ATTR may be the standard fibril composition in ATTR amyloidosis. *Amyloid* 20:142-150, 2013.
- 5) Sakashita N, Kagawa S, Date R, Ueno T, Nakagawa T, Yamashita T, Obayashi K, Ohshima T, Ueda M, Horiguchi H, Ando Y, Takeya M. Marked cardiomegaly in a patient with familial amyloidotic polyneuropathy after orthotopic liver transplantation: a case study. *Pathol Int* 63:260-265, 2013.
- 6) 植田光晴. 全身性アミロイドーシスの病態解析および診断法に関する研究. *臨床化学* 42, 56-61, 2013.

2. 学会発表

- 1) Ueda M, Kluge-Beckerman B, Liepnieks J, Mizuguchi M, Ando Y, Benson M. Fragmentation of amyloid-forming transthyretin in cultured cells and a test tube. The VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Rio de Janeiro, Brazil, Nov 10-13, 2013.
- 2) 植田光晴、Barbara Kluge-Beckerman、Juris J. Liepnieks、水口峰之、安東由喜雄、Merrill D. Benson. FAPの病態の鍵を握るトランスサイレチン断片化機構の解析. 第54回日本神経学会総会, 東京, May 29-June 1, 2013.
- 3) 植田 光晴、Barbara Kluge-Beckerman、Juris J. Liepnieks、田崎 雅義、大林 光念、Merrill D. Benson、安東 由喜雄：FAP病態の鍵を握るトランスサイレチン断片化機構の解明と検出、第60回日本臨床検査医学会学術集会, 神戸, Oct 31-Nov 3, 2013.

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、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発症することが判明した。我々は、ベルベットモンキー、カニクイザル、ニホンザル、コモンマーモセット由来 TTR の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定した。122 番目のアミノ酸が Ile になることにより、Ile122 と Tyr114 を含む疎水性側鎖のパッキングが変化することがわかった。また、39 番目のアミノ酸が Lys になることにより TTR 四量体が安定化することも示された。したがって、122 番目周辺の疎水性側鎖のパッキングと 39 番目周辺の電荷分布の変化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

昨年度までにベルベットモンキー TTR とカニクイザル TTR の X 線結晶構造解析を完了した。今年度は、ニホンザル TTR とコモンマーモセット TTR の結晶化および X 線回折実験を行った。

X 線回折実験は大型放射光施設 Spring-8 で行った。ニホンザル TTR の単結晶回折データを収集した結果、2.47 Å 分解能のデータが得られた。ニホンザル TTR の立体構造を、ヒト 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。また、コモンマーモセット TTR についても同様の方法で立体構造を決定した。

また、ベルベットモンキー TTR、カニクイザル TTR、ニホンザル TTR について、四量体の安定性を尿素による変性実験で調べた。0~7.2 M 尿素を含む TTR 溶液を準備し、グルタルアルデヒドで四量体構造を架橋した。その後、各尿素濃度での四量体構造の割合を SDS-PAGE で解析した。

（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

ニホンザル TTR とコモンマーモセット TTR の結晶構造を決定した。また、尿素変性実験の結果より、四量体構造はベルベットモンキー TTR が最も不安定で、ニホンザル TTR が最も安定であることがわかった。カニクイザル TTR の安定性は、ベルベットモンキー TTR とニホンザル TTR の中間であった。

D. 考察

122 番目のアミノ酸残基は、ベルベットモンキ

一TTR では Ile、ニホンザル TTR とカニクイザル TTR では Val である。ベルベットモンキーTTR の立体構造を精査した結果、122 番目のアミノ酸残基が Val から Ile になることによって、隣接する単量体の Tyr114 がわずかに移動することが判明した。この結果は、Tyr114 の移動によって疎水性側鎖のパッキングが変化し、TTR が不安定化されることを示唆している。

39 番目のアミノ酸残基は、ニホンザル TTR では Lys、カニクイザル TTR では Glu であり、39 番目周辺で表面電荷の分布が異なっていた。したがって、ニホンザル TTR の高い安定性は、Lys39 周辺の電荷分布に由来すると考えられる。

E. 結論

ベルベットモンキー、カニクイザル、ニホンザル、コモンマーモセット由来 TTR の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定した。本研究の結果は、122 番目と 39 番目のアミノ酸残基周辺の立体構造が四量体構造の安定性に影響を与えることを示唆している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokoyama T, Kosaka Y, Mizuguchi M: Crystal structures of human transthyretin complexed with glabridin. *J Med Chem* 57: 1090-1096, 2014.
- 2) Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Mizuguchi M, Hamaguchi T, Yamada M: Exogenous amyloidogenic proteins function as seeds in amyloid β -protein aggregation. *BBA - Molecular Basis of Disease* 1842: 646-653, 2014.
- 3) Taguchi K, Jono H, Kugimiya-Taguchi T, Nagao S, Su Y, Yamasaki K, Mizuguchi M, Maruyama T, Ando Y, Otagiri M: Effect of albumin on transthyretin and

amyloidogenic transthyretin Val30Met disposition and tissue deposition in familial amyloidotic polyneuropathy. *Life Sci* 93:1017-1022, 2013.

- 4) Yokoyama T, Mizuguchi M, Nabeshima Y, Kusaka K, Yamada T, Hosoya T, Ohhara T, Kurihara K, Tanaka I, Niimura N: Hydrogen-bond network and pH sensitivity in human transthyretin. *J Synchrotron Radiat* 20:834-837, 2013.

2. 学会発表

- 1) Ueda M, Kluge-Beckerman B, Liepnieks JJ, Mizuguchi M, Ando Y, Benson MD: Fragmentation of aggregated transthyretin in cultured cells and a test tube. IXth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Rio de Janeiro, Nov 10-13, 2013.
- 2) Chosa K, Yamakawa R, Sato T, Yokoyama T, Mizuguchi M, Suico M. A, Shuto T, Kai H: The endoplasmic reticulum-oriented drug development for familial amyloid polyneuropathy. IXth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Rio de Janeiro, Nov 10-13, 2013.
- 3) 植田光晴, Barbara Kluge-Beckerman, Juris J Liepnieks, 水口峰之, 安東由喜雄, Merrill D. Benson : FAP の病態の鍵を握るトランスサイレチン断片化機構の解析. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 5 月 29 日-6 月 1 日, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

トランスサイレチン四量体を安定化する γ -マンゴスチンおよび誘導体（出願予定）

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

アミロイドーシスにおける早期診断システムと診療支援の重要性

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 三隅洋平¹、大林光念²、田崎雅義¹、神力悟²、大嶋俊範¹、植田光晴¹

¹熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学分野

²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寄附講座

研究要旨 アミロイドーシスの治療における近年の進歩は著しく、本症を早期に診断し速やかに治療を行うことが益々重要になっている。一方、本疾患群には多種類の病型が含まれ、多彩な臨床症候、複雑な病態を呈する。また、診断においては特殊なプロセスを要する場合があることから、専門施設以外では診断に難渋する事例も多い。このような背景から、本症の早期診断および診療支援を行うことを目的に平成24年4月にアミロイドーシス診療体制構築事業を開設した。事業開始からの21月間に609例の依頼があり、内訳はALアミロイドーシスが35.2%、老人性全身性アミロイドーシス(SSA)が16.7%、TTR型FAPが16.7%、AAアミロイドーシスが8.1%、その他のアミロイドーシスが3.3%、非アミロイドーシスが20.0%であった。本事業が広く認知されるとともに依頼件数の増加傾向がみられた。アミロイドーシス診療体制構築事業は、アミロイドーシスの早期診断と診療に貢献しうるシステムであり、更に充実させる必要があると考えられる。

A. 研究目的

近年、アミロイドーシスの各臨床病型において、治療法は大きく進歩している。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)に対するTTR四量体安定化薬剤や遺伝子のサイレンシング、ALアミロイドーシスに対する造血幹細胞移植を併用した大量化学療法、AAアミロイドーシス治療における各種生物学的製剤の登場など、本症に対する原因療法が行えるようになってきている。このことから本症を早期に診断し、病型分類に基づいた適切な治療を速やかに行うことがこれまでも増して重要になっている。一方、本疾患群には多数の病型が含まれることから、アミロイド蛋白質を同定し適切な治療に導くことは専門施設以外では困難な場合がある。アミロイドーシスの早期診断と診療支援を行うため、熊本大学医学部附属病院にアミロイドーシス診療体制構築事業を開設した。本研究は、本事業の現状と課題を検証することを目的とした。

B. 研究方法

平成24年4月より全国の医療機関からのアミロイドーシスの診断依頼を受付けた。アミロイドーシスの病型診断は、臨床情報および送付された生検組織のパラフィン切片のコンゴ・レッド染色と各種免疫染色により行った。また、ルーチンの免疫染色が陰性のアミロイドーシスでは、レーザーマイクロダイセクションでアミロイドを切り出した後に液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計(LC-MS/MS)によりアミロイド原因蛋白質を同定した。また、TTR型アミロイドーシスの診断では、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置(SELDI-TOF-MS)を用いた血清診断およびDNAシークエンサーを用いてTTR遺伝子変異の同定を行った。その他の遺伝性アミロイドーシスについては、遺伝子診断を行った。

(倫理面への配慮)

提供された臨床検体および臨床情報は、厳重に管理し、学会発表および論文発表の際は匿名化した。

C. 研究結果

平成24年4月から平成26年1月までの21月間の本事業へのアミロイドーシスの診断依頼・相談件数は609例であった。日本全国の医療機関から、また神経内科、血液内科、循環器内科、腎臓内科をはじめとする多岐にわたる診療科からの依頼があった。依頼の内訳は、①ALアミロイドーシスをはじめ免疫組織染色による病型診断が困難な症例の診断依頼、②TTR型アミロイド沈着を認める症例においてFAPと老人性全身性アミロイドーシス(SSA)の鑑別を求める依頼、③原因不明のニューロパチー症例におけるFAPの鑑別の依頼の占める割合が多かった。依頼された症例の臨床病型は、ALアミロイドーシスが35.2%、老人性全身性アミロイドーシス(SSA)が16.7%、TTR型FAPが16.7%、AAアミロイドーシスが8.1%、その他のアミロイドーシスが3.3%、非アミロイドーシスが20.0%であった。TTR型FAPについては、世界初(Thr59Arg)および本邦初(Ala45Asp, Leu55Pro, Leu55Pro Glu89Lys)の遺伝子変異型を含む、10種類の変異型があった。また主治医がTTR型FAPを強く疑い、診断を依頼される症例での診断陽性率は、平成26年1月末日現在で、66.7%と、本事業開設当初3か月時点の33%と比べ大きく改善した。

D. 考察

依頼症例の分布は、医療圏および診療科によって大きく異なり、本症および本事業について更なる啓発活動をすすめる必要があると考えられた。本事業の認知度の向上とともに依頼件数の増加傾向がみられ、潜在的な本症患者が多数いることが示唆された。今後、診断効率の更なる向上と診断精度の維持とともに、患者のフォローアップ体制の確立と、依頼者からのフィードバックを受け本事業のサービス内容の拡充を行う必要があると考えられた。

E. 結論

アミロイドーシス診療体制構築事業は、アミロイドーシスの早期診断と診療に貢献しうるシステムであり、更に充実させる必要があると考えら

れる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Ando Y, Coelho T, Berk JL, Cruz MW, Ericzon BG, Ikeda S, Lewis WD, Obici L, Plante-Bordeneuve P, Rapezzi C, Said Salvi F. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet J Rare Dis*: doi:10.1186/1750-1172-8-31, 2013
- 2). Ihse E, Rapezzi C, Merlini G, Benson M, Ando Y, Suhr O, Ikeda SI, Lavatelli F, Obici L, Quarta C, Leone O, Jono H, Ueda M, Lorenzini M, Liepnieks J, Ohshima T, Tasaki M, Yamashita T, Westermarck P. Amyloid fibrils containing fragmented ATTR may be the standard fibril composition in ATTR amyloidosis. *Amyloid* 20:142-150, 2013.
- 3). Misumi Y, Ando Y, Gonçalves NP, Saraiva MJ. Fibroblasts endocytose and degrade transthyretin aggregates in transthyretin-related amyloidosis. *Lab Invest* 93:911-920, 2013
- 4). Oshima T, Kawahara S, Ueda M, Kawakami Y, Tanaka R, Okazaki T, Misumi Y, Obayashi K, Yamashita T, Ohya Y, Ihse E, Shinriki S, Tasaki M, Jono H, Asonuma K, Inomata Y, Westermarck P, Ando Y. Changes in pathological and biochemical findings of systemic tissue sites in familial amyloid polyneuropathy more than 10 years after liver transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, e-pub. doi 10.1136/jnnp-2013-305973, 2014
- 5). Obayashi K, Tasaki M, Jono H, Ueda M, Shinriki S, Misumi Y, Yamashita T, Oshima T, Nakamura T, Ikemizu S, Anan I, Suhr O, Ando Y. Impact of antibodies against amyloidogenic transthyretin (ATTR) on phenotypes of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) ATTR Valine30Methionine. *Clin Chim Acta* 419:127-131, 2013.
- 6). Obayashi K, Misumi Y, Watanabe T, Ando T, Akagami T, Tasaki M, Shinriki S, Ueda M, Yamashita T, Shinichi H, Ando Y. Dominant cardiac type of

- familial amyloidotic polyneuropathy associated with a novel transthyretin variant Thr59Arg. *Muscle Nerve* 48:839-841, 2013
- 7). Sakashita N, Kagawa S, Date R, Ueno T, Nakagawa T, Yamashita T, Obayashi K, Ohshima T, Ueda M, Horiguchi H, Ando Y, Takeya M. Marked cardiomegaly in a patient with familial amyloidotic polyneuropathy after orthotopic liver transplantation: a case study. *Pathol Int* 63:260-265, 2013.
- 8). Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Koike H, Kitagawa K, Ogi Y, Jono H, Su Y, Suenaga G, Oshima T, Misumi Y, Yoshida M, Yamashita T, Sobue G, Ando Y. Effect of age and sex differences on wild-type transthyretin amyloid formation in familial amyloidotic polyneuropathy: A proteomic approach. *Int J Cardiol* 170: 69-74, 2013
- 9). Taguchi K, Jono H, Kugimiya-Taguchi T, Nagao S, Su Y, Yamasaki K, Mizuguchi M, Maruyama T, Ando Y, Otagiri M. Effect of albumin on transthyretin and amyloidogenic transthyretin Val30Met disposition and tissue deposition in familial amyloidotic polyneuropathy. *Life Sci* 93: 1017-1022, 2013
- 10). Usuku H, Obayashi K, Shono M, Oshima T, Tasaki M, Yasuda H, Ogawa H, Ando Y. Usefulness of plasma B-type natriuretic peptide as a prognostic marker of cardiac function in senile systemic amyloidosis and in familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid* 20: 251-255, 2013
- 11). Usuku H, Izumiya Y, Sugiyama S, Kojima S, Araki S, Kurogi K, Yamamoto N, Ando Y, Ogawa H. Lower Framingham risk score and the absence of hypertension are associated with the morning peak in the circadian variation of ST-elevation myocardial infarction onset. *Hypertens Res*: doi:10.1038/hr.2013.139. , 2013
- 12). 安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチーと自律神経障害. *自律神経* 50: 109-111, 2013
- 13). 安東由喜雄, 山下太郎, 大林光念. 家族性アミロイドポリニューロパチーと自律神経障害. *Peripheral Nerve* 24:31-36, 2013
- 14). 中村 正, 安東由喜雄. アミロイドーシスの研究展開と臨床医学への還元. *臨床リウマチ* 25: 81-83, 2013
- 15). 安東由喜雄. 神経疾患ノート: 家族性アミロイドポリニューロパチー. *Clinical Neuroscience* 32: 1098-1100, 2013
- 16). 安東由喜雄. アミロイドーシスと活性酸素傷害. *医学のあゆみ* 247: 846-850, 2013
- 17). 大林光念, 安東由喜雄: 生殖細胞系遺伝子検査(遺伝学的検査). *臨床検査* 57: 738-743, 2013

2. 学会発表

- 1). Ando Y. Genotype phenotype correlation in Japanese FAP patients. VIIIth FAP Symposium and FAP liver transplantation workshop, Rio de Janeiro, Brazil, Nov 10-13, 2013.
- 2). Ando Y. Familial amyloidotic polyneuropathy in Japan. *Alnylum Meeting*, Boston, USA Mar 1, 2013
- 3). Ando Y. Familial amyloidotic polyneuropathy in Japan. *Pfizer European Meeting*, Prague, Czech Republic April 19-21, 2013
- 4). Obayashi K, Ueda M, Ando Y: Transthyretin familial amyloidotic polyneuropathy (TTR-FAP): Pathogenesis, clinical features, diagnosis, and therapies. 9th Japan-China Cooperative Life Science Symposium, Jinan, Dec 16, 2013.
- 5). Shinriki S, Jono H, Li JD, Nakamura T, Hayashi M, Guo J, Shinohara M, Ando Y: Loss of CYLD promotes cell migration through stabilized ALK5 in human oral squamous cell carcinoma cells. 104th AACR Annual Meeting 2013. April 6-10, 2013. Washington DC, USA.
- 6). Suenaga G, Ikeda T, Senju S, Komohara Y, Ogawa C, Tasaki M, Misumi Y, Ueda M, Ando Y: Involvement of M2 macrophages in the pathogenesis of FAP and efficacy of human iPS cell-derived macrophages in the treatment. IXth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy (ISFAP) and the VIIIth International Symposium on Liver Transplantation in Familial Amyloidotic Polyneuropathy. Rio de Janeiro, Brazil, Nov 11, 2013.
- 7). Ueda M, Kluve-Beckerman B, Liepnieks J, Mizuguchi M, Ando Y, Benson M. Fragmentation of amyloid-forming transthyretin in cultured cells and a test tube. The VIIIth International Symposium on