

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	TTR アミロイドーシスに対する診断・薬物療法の新たな展開と AL アミロイドーシスに対する化学療法の総括
研 究 分 担 者	池田修一
所 属 機 関	信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
<p>i) TTR アミロイドーシスに対する診断・薬物療法の新たな展開</p> <p>TTR アミロイドーシスは野生型 TTR に由来する老人性全身性アミロイドーシス(SSA)と変異型 TTR に関連する家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)に大別される。SSA と診断された 20 名の臨床像の解析では 70%が男性であり、平均発症年齢は 71.2 歳であった。臨床症状では 13 名に手根管症候群(CTS)を認め、11 では本症状が SSA の初発であった。約半数に腎機能障害を認め、経過中に脳梗塞や腎梗塞などの塞栓症を 5 名に認めた。特発性 CTS 患者の中で 34 名に滑膜組織への TTR アミロイドの沈着が見出されており、CTS が SSA の初発症状とみなされると結論された。</p> <p>肝移植の適応とならない高齢発症の ATTRVal30MetFAP 患者 18 名(平均年齢 66.3±7.3 歳)を対象としてジフルニサル 500mg/day の投与を行った。対照として 27 名の同一変異遺伝子を有する FAP 患者(平均年齢 67.6±6.4 歳)をおいた。尺骨神経の CMAP の低下率は、ジフルニサル投与群で 6.6%±14.7%/年、対照群で 30.5%±15.2%/年であり、ジフルニサル投与群で CMAP の振幅の低下率が小さかった (p=0.003)。また対照群では試験開始前の状態で脛骨神経の CMAP が検出可能であった 10 名全員が 32.0 ヶ月の経過観察期間中に CMAP の検出が不能となったが、ジフルニサル投与群において同様の経過を辿ったのは 12 名中 4 名 (33.3%) であった (p=0.002)。以上の結果からジフルニサルは高齢発症の ATTRVal30MetFAP 患者の末梢神経機能の悪化を抑制しうると考えられた。</p> <p>ii) AL アミロイドーシスに対する化学療法の総括</p> <p>AL アミロイドーシスに対する根治療法として自家末梢血幹細胞移植を併用したメルファラン大量静注療法 (HDM/SCT) が広く行われている。われわれは 2003 年から本治療法を導入して 30 名に施行したので、その結果を後方視的に分析した。尚、血液学的寛解(complete recovery: CR)は免疫固定法で M 蛋白が血清・尿の両者で陰性、かつ血清 free light chain (FLC) κ/λ 比が正常であることと定義した。HDM/SCT 施行時年齢は 55.8 歳、性別では男性 16、女性 14 であり、κ型 11 名/λ型 19 名であった。観察期間は 5～133 ヶ月で平均 67.7 ヶ月であった。30 例中 4 例が非寛解、4 例が寛解後の再発であり、HDM/SCT による寛解率は約 71%と計算される。これら 8 例に対しては追加の化学療法 (VAD、HDM/SCT-tandem、MDex、BDex) が行われた。この中で organ progression がない患者(non-CR ながら very good partial response)の予後は良好であった。以上より AL アミロイドーシスに対する化学療法の最終目標として、各患者ごとに血清 FLC を臓器障害の進行のないレベルに抑制していくことが重要であろうと考えられた。</p>	

タ イ ト ル	モデル動物を用いたアミロイドーシスの伝播機構の解析
氏 名	樋口京一
所 属 機 関	信州大学大学院医学系研究科疾患予防医科学系加齢生物学講座
<p>①抗線維形成ペプチドによるマウス AApoAII アミロイドーシスの発症抑制</p> <p>マウスの亜種 <i>Mus spretus</i> から Apolipoprotein A-II (ApoA-II) の新変異体 (F 型) を発見し、F 型 ApoA-II を持つマウスでは AApoAII アミロイドーシスの発症や伝播が著しく抑制されることを明らかにした。F 型 ApoA-II のアミロイドーシス抑制機構を明らかにするために、ApoA-II の合成部分ペプチドを用いた <i>in vitro</i> 線維形成解析システムを駆使し、F 型 C 末端ペプチド(48-65)の強力な線維形成抑制作用を明らかにした。さらに ApoA-II トランスジェニックマウスに、AApoAII 線維を投与してアミロイドーシスを誘発すると同時に F 型 C 末端ペプチドを継続投与した結果、アミロイド線維の沈着が有意に抑制されることを示した。F 型 C 末端ペプチドは、アミロイド線維の末端へ結合し、線維伸張反応を抑制する可能性が示唆された。線維沈着抑制作用の詳細な分子機構の解明が進めば、アミロイドーシスの伝播及び発症の抑制や治療に有効な物質の探索、分子設計への応用が期待される。</p> <p>②チーターやマウスの Serum Amyloid A (SAA) 遺伝子の解析</p> <p>近年飼育下チーターでは AA アミロイドーシスの罹患率が急速に高まり、主要な死因となっている。一方、マウスは実験的 AA アミロイドーシスの解析に広く用いられて来たが、CE/J マウスでは発症が起こらないことが報告されている。チーターゲノム中には遺伝子重複による 4 種類の SAA 遺伝子 (SAA1A, SAA1B, SAA3A, SAA3B) が存在し、多数の塩基多型が存在するが、蛋白質レベルでは SAA1、及び SAA3 はそれぞれ単一であることが判明し、SAA1 蛋白質の単一性が、アミロイドーシスへの高感受性の一因である可能性が考えられた。SAA1A 遺伝子上流の NFκB 反応領域での多型(-97 ; GGG vs GG)と AA アミロイドーシスの重篤度との相関が示唆されたが、より詳細な解析が必要である。CE/J 系マウスの AA アミロイドーシス抵抗性の原因は SAA1, SAA2 のどちらもが Q30L アミノ酸置換を含む SAA2.2 をコードしている事である事が明らかになった。</p> <p>③マウス AApoAII アミロイド沈着は小胞体ストレスを誘導する</p> <p>AApoAII アミロイド線維の沈着は、肝臓と腎臓で小胞体分子シャペロン GRP78 の mRNA 及びタンパク質発現量の増加を誘導した。細胞周囲のアミロイド沈着によって細胞内 GRP78 量が増加することが免疫組織染色法によりした。さらに小胞体ストレスシグナル伝達因子 <i>Eif2ak3</i>, <i>Atf6</i>, <i>Atf4</i>, <i>Ddit3 (Chop)</i>, <i>Xbp-1s</i> の mRNA 発現量が増加した。肝臓と腎臓でアポトーシス促進因子 <i>Bax</i> の発現増加と TUNEL 染色陽性細胞の増加が認められた。しかし心臓では GRP78 や小胞体ストレスシグナル伝達因子の発現変化は確認できなかった。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。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	スタチンのアミロイドβ蛋白産生抑制機序の検討
氏 名	玉岡 晃
所 属 機 関	筑波大学医学医療系神経内科学
<p>アルツハイマー病(AD)の病態にコレステロールが関与することが指摘されており、コレステロールの合成を阻害する薬剤であるスタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害剤) による AD 有病率の減少や、アミロイドβ蛋白(Aβ)生成の修飾作用が報告されている。しかし、そのメカニズムの詳細は明らかでない。今回我々は、初代培養神経細胞を用いて、スタチンの Aβ 産生低下作用およびその作用機序について検討した。</p> <p>本研究では、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を pitavastatin (PV) または atorvastatin (AV) で 4 日間処理した後、培養上清中の Aβ濃度をサンドイッチ ELISA により定量、細胞溶解液中の APP, Thr668 位のリン酸化 APP (P-APP) などのタンパク発現をウエスタンブロッティングで解析した。また、培養上清中の分泌型 APP (sAPP) および細胞溶解液中の APP C 末端断片 (CTF) の総量を免疫沈降-ウエスタンブロット法で解析した。さらに、細胞の細胞表面蛋白のビオチン化実験を用いて、細胞表面の APP, P-APP の発現レベルを同様に解析した。細胞内コレステロール量をコレステロールオキシダーゼを用いた酵素法により定量した。また、PV または AV で処理した細胞に組換えアデノウイルスを用いて、ヒト APP を過剰発現し、同様に解析した。</p> <p>既に、ラット初代培養大脳皮質神経細胞において、PV(0.1～5 mM)処理により、培養上清中の Aβ40, Aβ42 の産生量が濃度依存的に減少することと細胞溶解液中の成熟型 APP の発現レベルが低下することを示してきたが、PV または AV (0.2～5 mM) 処理により、濃度依存的に Aβ40, Aβ42 の分泌レベルが低下し、成熟型 APP と P-APP の発現レベルが低下した。また、これらのスタチンが細胞内コレステロールを顕著に減少させることが明らかになった。Aβ産生低下がコレステロール低下によるか、それ以外のメカニズムによるかを明確にするため、PV または AV と同時にコレステロールを添加してその効果を調べた。その結果、コレステロールの補充では、PV, AV による Aβ分泌量と APP レベルの低下は抑制されなかった。一方、メバロン酸とスタチンで共処理した場合、Aβ分泌と成熟型 APP, P-APP レベルの低下の回復を認めたが、コレステロールとスタチンで共処理した場合、及びファルネシルピロリン酸 (FPP) またはゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) とスタチンで共処理した場合は回復を認めなかった。PV, AV 処理により、sAPP, CTF の総量には明らかな変化を認めなかった。さらに、細胞表面蛋白のビオチン化実験では、スタチン処理した細胞において、細胞表面の成熟型 APP レベルは変化しなかったが、細胞表面の P-APP レベルの低下を認めた。組換えアデノウイルスを用いて APP を過剰発現した場合も、PV または AV 処理した細胞では対照に比べて、同様に Aβ分泌量が減少し、成熟型 APP レベルの低下も認められた。</p> <p>以上より、スタチンは、APP の成熟化のみならずリン酸化に影響し、Aβ 産生を低下させること、その作用はコレステロールの減少、プレニル化の変化とは別の機序を介することが示唆された。細胞表面の P-APP の低下は、エンドサイトーシスなどの APP の細胞内輸送に影響している可能性が考えられた。</p>	

タ イ ト ル	透析アミロイドーシス
氏 名	高市憲明
所 属 機 関	虎の門病院
<p>透析アミロイドーシスは透析患者の血漿中に高濃度に存在する β2MG が長期間かけてアミロイドとして蓄積することにより発症すると考えられているが、実際に体内に蓄積しているアミロイド量の推定は困難である。AL アミロイドーシス患者では血漿 PIC 濃度が蓄積アミロイド量と関連する可能性が示唆されている。透析アミロイドーシスのマーカーとして血漿中 PIC 濃度が使用できる可能性があるかどうかを検討したところ、血漿 PIC 濃度 1.05μg/ml をカットオフ値とすると透析アミロイドーシスの診断の感度は 63%、特異度は 78% となり AL アミロイドーシスの場合よりは感度特異度ともに低下するが、ある程度有用であると考えられた。</p> <p>横断的研究では血清 β2MG 濃度と透析アミロイドーシス発症の関連は明らかではないが、発症には β2MG 負荷が長期間継続することが必要である。透析アミロイドーシスを発症するために必要な β2MG 負荷量を検討する目的で、手根管手術歴があり長期間の β2MG 濃度の検討が可能であった血液透析患者 28 名 (24～62 歳) の検討を行った。透析前後の平均 β2MG 濃度を手根管手術までの年数で積分したものを“必要 β2MG 負荷量 (mg/L 年)”と定義すると以下の計算式が得られた。この式により、手根管手術までの必要 β2MG 負荷量をあらかじめ推定し、個々の患者の透析条件決定の参考にすることができると考える。</p> <p>必要 β2MG 負荷量 = 1600 - 20 x 透析導入年齢 ($r = -0.7451$ $p < 0.05$)</p> <p>透析アミロイドーシスの病勢を適切に評価し、患者身体機能をもとにした透析アミロイドーシス臨床重症度分類 (Amyloid Clinical Stage: A-stage) を当院で外来維持透析を施行中の 140 名の結果を用いて作成した。診断は厚生労働省透析アミロイド診断基準に従い、主要 5 症状 (多関節痛・バネ指・手根管症候群 (CTS)・透析脊椎症 (脊柱管狭窄症もしくは破壊性脊椎症)・骨嚢胞) を評価対象項目とした。また患者 QOL は SF-36version2 を用いた。多変量解析により有意な症状を決定し重み付けを行い、最大点数を 10 点とすると、A-stage index の計算式は以下のようを得られた。但し、症状が存在する場合は 1、存在しない場合を 0 とする。</p> <p>A-stage index = 多関節痛 x3 + バネ指 x2 + CTS x2 + 透析脊椎症 x3</p> <p>更に、身体機能をもとに判断すると、透析アミロイドーシスの臨床重症度を Stage 1(4 点以下)、Stage 2(5~7 点)、Stage 3(8 点以上) の 3 段階に分類するのが適当と考えた。</p> <p>治療により蓄積したアミロイドが減少するかどうかは必ずしも明らかではない。我々はこれまでに AL アミロイドーシス治療に伴い腎のアミロイド沈着が減少した症例を報告してきた。また原病の治療に伴い消化管の AA アミロイド沈着が減少したとする報告も存在する。関節リウマチによる AA アミロイドーシスにより透析を継続している患者で、トシリズマブ治療により関節リウマチのコントロールと平衡して、消化管のアミロイド沈着が減少し、心機能の改善・心サイズの減少を示した患者を報告した。この症例は、原病のコントロールにより心臓における AA アミロイド沈着も減少する可能性があること強く示唆するものである。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	SAA 線維化機構の解明と AA76 に着目した AA アミロイドーシス診断法開発
氏 名	山田俊幸
所 属 機 関	自治医科大学
<p>AA アミロイドーシス発症に及ぼす SAA アイソフォームの影響を分子レベルで解明することを目的とした。アミノ酸置換を含む中間領域ペプチドでは、アイソフォームにより線維形成能が異なることが明らかとなったが、全長タンパク質ではアイソフォームによる線維形成能の違いは認められなかった。すなわち、切断される C 末端領域の存在がアミロイド線維の形成に影響を及ぼす可能性があることが推察された。</p> <p>また、SAA は血中では HDL に結合しているためアミロイド形成に影響するであろう脂質との結合性を検討したところ、N 末端領域 (SAA 1-27 残基) からなるフラグメントペプチドが、ホスファチジルコリンを構成成分とするリポソームに対して結合能を持つことが示された。</p> <p>AA アミロイドーシスにおいては血清アミロイド A(SAA)が限定分解を受けた N 末端部分 (AA) が線維化して沈着する。最も普遍的な AA は SAA の 76,77 残基間切断により生じた AA76 であるため、その特異的検出は AA アミロイドーシスの診断に直結する。ここではまず、AA76 の検出のための新規モノクロナル抗体を確立した。AA アミロイドーシス患者消化管粘膜の免疫組織化学では、従来の抗体がアミロイド沈着以外に前駆体 SAA と想定される血管組織に陽性反応を示すのに対し、新規抗体はアミロイド沈着に特異的であった。新規抗体は AA アミロイドーシス診断の優れたツールと期待される。</p> <p>上記と同等な発想で、イムノプロットによる AA76 (サイズ) の検出が AA アミロイド沈着の検出に有用であるか検討した。アミロイドーシス既診断患者の未固定の胃粘膜組織において、イムノプロットによる AA76 の検出はコンゴレッド染色、免疫組織化学に比べ検出感度が高く、陰性例で検出されることはなかった。腹壁脂肪生検材料においても AA76 検出の有用性が示唆された。以上より、未固定生体組織を材料としたイムノプロットによる AA76 の検出は AA アミロイドーシスの有用な診断ツールとなりうる。</p>	

タ イ ト ル	ヒトアミロイドーシス発症の分子機構解明-透析アミロイドーシスを中心に-
氏 名	内木宏延
所 属 機 関	福井大学医学部医学科 病因病態医学講座分子病理学領域
<p>(i) <u>脳アミロイドアンギオパチー (CAA) 試験管内モデルの開発</u> : Periarterial drainage pathway により輸送される Aβ 40 と脳動脈中膜基底膜との相互作用は CAA の発症機序として有力視されており、これを試験管内で再現することにより、CAA の試験管内モデルを構築した。第一に、基底膜分子の微弱な線維形成促進作用を検出するため、実験系を徹底的に改良した。96 穴各ウェルを capping する事により気液界面を排除し、Aβ 1-40 濃度を可能な限り下げ、CSF 環境を模倣するためアルブミンを添加した。次いで線維形成を惹起しにくい攪拌子としてセファローズ 4B ビーズを採用し、表面に基底膜分子を共有結合させた。反応溶液を 1 rpm という低速度で回転させると、ビーズが沈む際に表面は反応溶液の相対流に曝されるが、これを periarterial drainage flow と見做した。さらにチオフラビン T 蛍光の立ち上がり時点、すなわち重合核形成相の終了時点を測定し、Kaplan-Meier 生存解析を行った。これらの工夫により、種々の基底膜分子が Aβ アミロイド線維形成を有意に促進することを証明し、CAA 発症における periarterial drainage pathway モデルの妥当性を明らかにした。アミロイド沈着は前駆蛋白質が存在するだけでは起こらず、沈着局所に存在する様々な生体分子と前駆蛋白質が相互作用することにより始めて起こると考えられる。</p> <p>(ii) <u>β2-ミクログロブリン (β2-m) アミロイド線維による細胞傷害機序の解明</u> : 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。β2-m アミロイド線維の沈着が骨・関節破壊を引き起こす機序を明らかにするため、ウサギ滑膜線維芽細胞由来の株細胞 (HIG-82) に対する β2-m アミロイド線維の細胞傷害機序を解析した。β2-m アミロイド線維添加群は、β2-m モノマー添加群、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細胞の viability が低下していた。光学顕微鏡で観察すると、アミロイド線維添加群では、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を認めると共に、アポトーシス小体と考えられる核の断片化も認めた。アポトーシスの誘導が起こっていることを TUNEL 染色により確認した。また、アミロイド線維添加群に Congo-red 染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、添加したアミロイド線維は細胞表面に付着していた。さらに電顕観察により、添加したアミロイド線維が細胞内のエンドソームやリソソームに取り込まれ、一部でこれらの膜構造を破壊する像を認めた。以上の知見より、β2-m アミロイド線維は関節や腱組織を構成する細胞に取り込まれた後、オルガネラ膜を破壊することにより、アポトーシスとネクローシスの両経路を惹起して細胞死を引き起こすと考えられる。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	透析アミロイドーシス; 発症機転からその先制医療へのアプローチまで
氏 名	本宮善恢
所 属 機 関	医療法人翠悠会
<p>透析アミロイドーシス (透析アミロイド症) 発症の枢軸的プロセス解明を目的とし、(1) 原因蛋白 β_2 ミクログロブリン (β_2m) のアミロイド化機構、(2) アミロイド蓄積機序、(3) 治療戦略への糸口の三段階に仕分けて研究した。</p> <p>○第一段階 (2011 年) β_2 アミロイド化機構</p> <p>β_2 アミロイド化の鍵となる中間体 β_2m (intermediate β_2m, I-β_2m) をキャピラリー電気泳動 (CE) で捉え、血中での存在様式を確認した。</p> <p>I-β_2m は正常な立体構造 β_2m (Native β_2m, N-β_2m) と CE にてほぼ明確に分画され、N-β_2m より陰極側に泳動される。I-β_2m は健常者血清でも検出されることから β_2m は溶液中では出目的に一部立体構造がアンフォールドした β_2m (I-β_2m) と動的平衡状態で存在し、I-β_2m の推定濃度比は血中 β_2m の健常者で約 10%、透析例で約 5-10%であった。さらに透析により大きく N-β_2m → I-β_2m へのシフトが見られ透析終了後の血清では I-β_2m は約 16%であった。</p> <p>この様なアミロイド原性を有する中間体 β_2m を含む I-β_2m の動きから透析アミロイド症の発症に透析操作自体が強く係っていると考えられた。</p> <p>○第二段階 (2012 年) β_2m 組織蓄積機構</p> <p>前年度に続き、CE で I-β_2m 解析を行い、まず I-β_2m がヘパリンと親和性を有することを CE 上で可視的に確認した。つまり、I-β_2m 中に間質組織の主成分グリコサミノグリカンと親和性を持つ β_2m 分子が含まれていることを明らかにした。</p> <p>次いで透析後の血清リバウンド像から I-β_2m 分画中に、より明確に立体構造の崩れた分画 (I-β_2m') が透析中に産生され、組織に沈着する可能性を指摘した (β_2m shuttle 仮説)。</p> <p>○第三段階 (2013 年) β_2m 92-99—至近中間体 β_2m</p> <p>従来から透析アミロイド組織にほぼ普遍的に確認されていた N 末端欠損バリエント $\Delta N6\beta_2m$ の高いアミロイド原性が十分に文献上確認されたことを踏まえて、先ず $\Delta N6\beta_2m$ では C 末端 92-99 がアンフォールドしていることを明らかにした。</p> <p>その上で $\Delta N6\beta_2m$ を用いて C 末端 92-99 がアンフォールドした中間体 β_2m 92-99 の測定系を確立した。$\Delta N6\beta_2m$ の高いアミロイド原性から、同じく C 末端がアンフォールドしている β_2m 92-99 は I-β_2m 中でもアミロイド原性の高い至近中間体と考えられる。</p> <p>そこで通常血液透析、オンライン血液濾過透析および β_2m 吸着カラム接続透析それぞれで血中 β_2m 92-99 濃度を測定し、現行の透析法の妥当性に言及した。透析前後の血中 β_2m 92-99 の推移から現行の透析療法の高い生体適合性が確認され、また、血中 β_2m 濃度のコントロール—the lower, the better—の重要性を再確認した。</p>	

タ イ ト ル	全身性アミロイドーシスの病態の解明と治療法の開発
氏 名	今井裕一
所 属 機 関	愛知医科大学 腎臓・リウマチ膠原病内科
<p>1. 凝固・線溶系マーカーによる全身性・限局性アミロイドーシスの鑑別</p> <p>全身性と限局性の鑑別に際して凝固線溶系マーカーが有用かどうかを明らかにするために、A 群：活動性・進行性全身型 9 例、B 群：完全寛解中の全身型 6 例、C 群：限局型 6 例、D 群：monoclonal gammopathy of undetermined significance 5 例、E 群：非寛解の慢性腎炎 22 例、F 群：完全寛解の腎炎 7 例を対象とした。INR-PT, APTT, antithrombin, thrombin anti-thrombin complex (TAT), fibrinogen, FDP-D dimer, plasminogen, plasmin-α2-plasmin inhibitor complex (PIC)を測定した。①全身性アミロイドーシスでは、凝固と同時に線溶系も活性化している。②限局性と全身性の鑑別に TAT, fibrinogen, PIC が有用である。③治療により TAT, fibrinogen, PIC が正常化することから、治療のマーカーとなる可能性があることが明らかになった。(Suga N, et al. Differential diagnosis of localized and systemic amyloidosis based on coagulation and fibrinolysis parameters. Amyloid 19(2): 61-65, 2012)</p> <p>2. 転移性肺癌を有した AA 型全身性アミロイドーシスでのサイトカイン・SAA の解析</p> <p>71 歳男性。9 年前に右腎細胞癌(淡明細胞癌)にて右腎摘出。7 年前に左肺に孤立性転移病変を指摘され、CRP は 5.0-10.0 mg/dl で推移していた。2 年前に難治性下痢のため、直腸粘膜生検にて AA アミロイドーシスと診断、血清 Cr 2.7 mg/dL。腎癌の左肺への転移性肺腫瘍を原因とする AA アミロイドーシスと判断し、転移性肺腫瘍を切除した。病理組織では、淡明細胞癌の周囲に単核球の浸潤があり、Congo red 染色では、腫瘍周囲の血管壁や気管支隔壁にアミロイド沈着を認めた。抗 amyloid A 抗体による染色では、腫瘍細胞と単核球には染色されず、アミロイド沈着部位に一致して染色された。抗 IL-6 抗体による染色では、腫瘍細胞には染色されず、腫瘍細胞の周囲に浸潤する単核球が染色された。悪性腫瘍関連の AA 型全身性アミロイドーシスが存在し、腫瘍に反応した細胞から IL-6 が産生されることが AA 型全身性アミロイドーシスの原因であることが明らかになった。(Nobata H, et al. Systemic AA amyloidosis in a patient with lung metastasis from renal cell carcinoma. Amyloid 19: 197-200, 2012)</p> <p>3. 末期腎不全に至った AL アミロイドーシス患者の治療法の選択</p> <p>血液透析に導入された AL アミロイドーシスの治療指針を作成するために、透析膜・透析条件の検討を行い、polysulfone (PS) 膜を使用した haemodiafiltration (HDF)が最も軽鎖の除去に優れていること、さらに 4 年生存率が 50%と高いことが明らかになった。(現在、論文作成中である。)</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	AA アミロイドーシスのトシリズマブによる治療研究
氏 名	吉崎 和幸
所 属 機 関	大阪大学大学院工学研究科
<p>●研究要旨：平成 20 年に医師主導の自主臨床研究として、トシリズマブを用いた AA アミロイドーシス治療研究を開始した。平成 22 年 9 月に患者登録を締切り、平成 24 年 9 月末で観察を終了した。その後解析に入り、現在まとめと共に発表の準備を行っている。</p> <p>●研究目的：難治性 AA アミロイドーシスの治療の可能性を明らかにし、新たな治療法の確率を目指す。SAA 産生抑制による IL-6 阻害薬（トシリズマブ）を用いた治療法の確率を目的とした。</p> <p>●研究方法：全国 30 施設のアミロイドーシス専門医による医師主導型の臨床研究を行った。関節リウマチ合併 AA アミロイドーシス患者 35 例を、トシリズマブ使用群と非使用群とに分けて 2 年間の継続治療を行った。評価は、腎への AA アミロイド沈着有無を胃幽門部の AA アミロイド沈着有無で評価した。また、蛋白尿やクレアチニン値などの腎障害も評価した。患者が特定されないように配慮した。</p> <p>●研究結果：全国のアミロイドーシス専門 30 施設、35 症例で行った。研究計画書に従って施設の許可のもとに行い、トシリズマブ群（23 症例）では胃幽門部のアミロイド沈着の減少を病理学的に検索（コンゴレッド、BF-227 染色）し、沈着した AA 蛋白量においても確認できた。また、前駆物質の SAA の著減も観察でき、尿中蛋白の低下物質も認められた。2 年間の観察では腎機能の改善はなかったが、悪化は無く機能維持が認められた。非トシリズマブ群（12 症例）ではアミロイド沈着や SAA の低下、蛋白尿のいずれも有意な減少は認められなかった。両群比較は、組織中のアミロイド蛋白がトシリズマブ群で有意差が認められた。</p> <p>●考察・結果：血清アミロイド A、胃幽門部組織の AA アミロイド蛋白の沈着、および病理学的組織染色による解析から、トシリズマブ群では治療後の有意な減少が認められた。このことは、AA アミロイドの前駆蛋白である SAA の産生を抑制することが新たな AA アミロイドの組織への沈着を抑制するばかりでなく、既に沈着していた AA アミロイドも減少させることが示された。即ち、トシリズマブによる IL-6 の阻害が AA アミロイドーシス治療に有効であることが強く示された。しかしながら、尿蛋白が減少を示したものの腎機能の改善は客観的には認められなかった。ただし、2 年間に腎機能の悪化を認めなかったことは不変のため有効ともとれ、腎透析への移行が抑制されたことは患者にとって有意義であったとも考えられる。今回は特に組織の AA アミロイドの沈着を種々の検査法で確認し、特に組織中の AA 蛋白の定量や BF-277 を用いた組織沈着の検定法は、今回初めて行った。なお、統計学的評価は大阪大学未来医療センターで行い、研究実施者や製薬関連会社とは別に独立して解析した。</p>	

タ イ ト ル	AB アミロイドーシスの神経毒性機序の解明と治療法開発
氏 名	東海林幹夫
所 属 機 関	弘前大学大学院医学研究科脳神経内科
<p>AB アミロイドーシスの脳内蓄積がアルツハイマー病(AD)の発症の分子学的基盤と考えられている。しかし AB アミロイドーシスの神経毒性発現機序や tauopathy 誘発機序などはまだ明らかになっていない。我々はこれらの発症機序を解明すると共に AB 経口免疫による新たな AD 病態修飾薬の開発を行った。</p> <p>1. 変異 APP 産生マウス Tg2576 と変異 tau 産生マウス TgTauP301L との double transgenic mouse(double Tg)を作製し、AB oligomer 蓄積による tauopathy と神経毒性の誘発機序の解明を行った。Double Tg では樹状突起のリン酸化 tau 蓄積が増加しており、lipid rafts に AB oligomer とリン酸化 tau が共に蓄積していた。Lipid rafts には Fyn の著増と NMDA receptor、AMPA receptor の増加が認められた。Postsynaptic lipid rafts の AB amyloidosis によって誘発された tauopathy はグルタミン酸神経毒性を介したシナプス障害と神経細胞死を引き起こす可能性があると考えられた。以上の検討から lipid rafts は AB oligomer の神経毒性を阻止するための target になりうると思われた。</p> <p>2. SH-SY5Y 細胞を用いて AB 重合体がシナプス・神経変性を惹起する分子メカニズムを解析した。SH-SY5Y 細胞で sortilin をノックダウンすると AB 重合体の神経毒性が抑制された。この sortilin ノックダウンでは p75^{NTR} 依存性アポトーシス抑制が認められた。AB 重合体存在下、細胞膜上で sortilin と p75^{NTR} の death シグナリング受容体形成が誘導され、AB 重合体特異的モノクローナル抗体(72D9)で細胞外 AB 重合体を特異的に制御すると、sortilin と p75^{NTR} の death シグナリング複合体形成が阻害され、細胞外 AB 重合体の神経毒性も中和されることが明らかとなった。以上の検討より Sortilin は細胞外 AB 重合体の神経毒性発現を直接制御するばかりでなく、細胞内 AB 重合体やタウの分解・クリアランスも制御しうる重要な分子と考えられた。</p> <p>3. 変異 APP 産生マウス TgCRND8 を用いて AB 経口ワクチンの開発を行った。ダイズグロブリンの 3 カ所に AB の Th1 刺激部位 4-10 を挿入した組換えダイズ蛋白 M1 を作製した。M1 またはダイズ 11S グロブリン W を TgCRND8 (M1 投与群 n=12, W 投与群 n=12) に 2 カ月齢より毎週 1mg, 8 カ月または 12 カ月まで経口投与した。モリス水迷路試験にて行動評価を行った。M1 投与群では W 投与群に比べて水面下に隠されたプラットフォームまでの到達時間が投与 3 カ月後より改善し、到達水泳距離は 6 カ月後より改善し、12 カ月後まで認められた。12 カ月投与マウスの脳 AB の免疫染色では M1 投与群で W 投与群に比べて AB 占有面積の有意な減少を認めた。髄膜脳炎や脳出血は認めなかった。新たな AB 経口免疫療法は行動障害を有意に改善し、従来の免疫療法で認められた髄膜脳炎や血管炎、微小出血などの副作用もないことから今後有望な AD 治療法になりうると思われた。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	AL amyloidosis に対する治療と新規薬剤使用による長期生存への可能性
氏 名	麻奥英毅
所 属 機 関	広島赤十字・原爆病院 血液内科
<p>AL アミロイドーシスは、異常形質細胞より産生されるモノクローナル免疫グロブリンの軽鎖に由来するアミロイド蛋白が全身臓器に沈着し、臓器障害を来す疾患である。AL アミロイドーシスに対する治療としてはメルファラン大量療法を用いた自家末梢血幹細胞移植があるが、既に多臓器障害を来した患者や高齢者に対しては適応外となることがある。また、自家移植後の治療反応性が血液学的部分寛解(PR)までの症例においては、アミロイドーシスを進行させないためには初期治療後の維持療法が重要になってくる。最近、多発性骨髄腫治療で用いられている Bortezomib や Revlamide などの新規薬剤の使用が AL アミロイドーシスの初期治療や維持療法にも有効であることが報告されてきている。</p> <p>① 当院で 2006 年 1 月より 2012 年 6 月までに自家末梢血幹細胞移植術を施行した AL アミロイドーシス症例を対象とし後方視的に解析した 23 症例において、移植後に血液学的寛解(CR)症例が 13 例、血液学的 PR 症例が 8 例であった。移植後観察期間中央値は 1205 日 (80 日～2836 日) であり、2013 年 11 月現在 17 例が生存している。移植後 1 年以内の死亡例は 2 例(移植後 day80, day248)のみで、これは新規薬剤導入前であった。移植後維持療法として、1 例に Bortezomib と Revlamide が、2 例に Bortezomib が使用された。再燃後治療としては、7 例に Bortezomib が、1 例に再移植が施行された。</p> <p>② 2009 年 3 月より 2011 年 12 月までに自家移植も含めた初期治療において血液学的 CR に入らなかった症例に対し、Bortezomib を使用した維持療法を施行した。7 症例に Bortezomib を使用した維持療法が施行され、6 症例で継続され、1 症例は増悪傾向を認めた。6 症例は free light chain 定量の維持が出来ており、その中でも 40mg/L 以下を維持できた症例は 2 症例であった。</p> <p>③ 当院にて加療した AL アミロイドーシス患者のうち、70 歳以上の 3 症例の高齢者患者を対象として、高齢者に対する Bortezomib + Dexamethasone (BD)療法の有効性について検討し、治療効果としては血液学的 CR 1 症例、PR 2 症例であった。3 症例とも病状悪化するまでは QOL を低下させることなく外来通院治療が可能であった。3 症例とも 2013 年 6 月の時点で生存し、発症からの生存期間は 4 年 7 か月、4 年、2 年 7 か月である。</p> <p>上記のように、多発性骨髄腫に対する新規薬剤の AL アミロイドーシス患者への使用により、AL アミロイドーシス患者の予後は著しく改善されていく見通しである。今後は、①多くの AL アミロイドーシスを治療可能な時点で紹介して頂くために近隣施設への周知、②患者それぞれに対応した治療アルゴリズムの作成に力をいれていく。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	AA アミロイドーシスに対する生物学的製剤別治療効果の比較・検討
氏 名	奥田恭章
所 属 機 関	道後温泉病院リウマチセンター
<p>リウマチ性疾患に合併する AA アミロイドーシスに対する抗サイトカイン療法の有用性に関する報告は近年多く見られるが、TNF 阻害 (TNF) と IL-6 阻害 (TCZ) の有用性を直接比較した報告はこれまでになく、臨床的有用性の比較を行った。 Kaplan-Meier 法による治療継続率は TCZ (25 例) が TNF (34 例) に較べ有意に高い継続率を示し ($p=0.0024$)、Cox 比例ハザード分析による抗サイトカイン療法の中止阻害の因子として TCZ が抽出された。前駆物質 SAA の推移は、TCZ では正常値を達成したが、TNF では低下は認めるも正常化はできなかった ($p=0.0143$)。また eGFR は、TCZ はより腎機能障害進行期において投与されたにもかかわらず有意な改善を認めたが ($p=0.0127$)、TNF では有意な改善は認められなかった。TCZ は治療開始時に 13 例に蛋白尿を認め、最終観察時に 10 例が陰性化した。TNF は、治療開始時に 3 例に蛋白尿を認め、1 例が陰性化した。最終観察時、CDAI (原疾患活動性指標) における寛解または低疾患活動性の達成率は、TCZ は TNF に較べ有意に高値だった ($p=0.003$)。以上より、AA アミロイドーシス治療において TCZ は TNF より高い臨床的有用性を認めた。</p> <p>次に AA アミロイド蛋白沈着量の改善効果の点から、AA アミロイドーシスに対して検出感度のもっとも高い十二指腸に対して経時的に AA 蛋白の定量生検を行い、薬剤別効果を比較した。検体は ELISA 法にて AA 蛋白組織沈着量 (ng/mg of tissue) の推移を、SDS-PAGE 抗 SAA 抗体によるイムノブロットにて AA 蛋白であることを確認した。最終評価時に AA 蛋白減少例は、非生物学的製剤群： 1/7(14.3%)、TNF： 4/6(66.7%)、TCZ： 8/8(100%) であった。沈着量推移は、初回沈着量を 100 % として最終評価沈着量 (中央値) は、非生物学的製剤群：194.3%、TNF： 84.6 %、TCZ： 14.0% であった。非生物学的製剤群は有意の増加 ($p=0.0469$)、TNF は有意差を認めず ($p=0.6875$)、TCZ は有意の減少を示した ($p=0.0078$)。各製剤投与中の SAA ($\mu\text{g/ml}$) (中央値) は、非生物学的製剤群： 58.1、TNF： 20.3、TCZ： 3.0 であった ($p=0.001$)。3 群で TCZ はもっとも SAA 抑制効果が高く、AA 蛋白の優れた turnover 効果を認めた。</p> <p>アバタセプト (ABT) は、抗原提示細胞と T 細胞間の共刺激シグナルを阻害し T 細胞活性化を抑制し、関節リウマチ (RA) の活動性を抑制する生物学的製剤 (CTLA-4 -Ig) である。今回、ABT 使用中に関節リウマチに対して二次無効、SAA の上昇とともに急速に AA アミロイドーシスを発症した症例を経験し、TCZ への変更後、SAA 正常化、上昇した腎機能は改善した。</p> <p>また、ABT を用いたマウス (ヒトアポ E ノックインマウス) による AA 蛋白沈着抑制及び SAA 抑制実験では抑制効果は全く認めなかった。</p> <p>以上より、SAA の正常化能、臓器障害改善能、AA 蛋白の turnover 効果の高い TCZ が、現在もっとも AA アミロイドーシス治療に適した生物学的製剤であると考えられる。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	霊長類トランスサイレチンに関する基礎的研究
氏 名	水口 峰之
所 属 機 関	富山大学大学院医学薬学研究部
<p>家族性アミロイドポリニューロパチーや老人性全身性アミロイドーシスでは、ミスフォールディングしたトランスサイレチン (TTR) が凝集し、アミロイド線維になって臓器に沈着する。本研究の目的は、霊長類 TTR の立体構造、構造安定性、凝集性を研究し、サルをモデル動物とした病態解析や治療法開発のための基礎的データを集積することである。平成 23-25 年度の研究により、四量体構造の安定性はベルベットモンキー TTR が最も低く、ニホンザル TTR が最も高いことがわかった。また、カニクイザル TTR の構造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。さらに我々は、ベルベットモンキー TTR、カニクイザル TTR、ニホンザル TTR、コモンマーモセット TTR の X 線結晶構造解析に成功した。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。また、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 である。ニホンザル TTR とカニクイザル TTR の立体構造を調べた結果、ニホンザル TTR とカニクイザル TTR では 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、39 番目のアミノ酸残基周辺の表面電荷分布の違いが、TTR の構造安定性に影響を与える可能性が考えられる。これらの結果は、老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る分子メカニズムを解明するために重要な知見である。</p> <p>さらに我々は、ヒト TTR の中性子構造解析に世界で初めて成功し、ヒト TTR の立体構造内部に存在する水素結合ネットワークを発見した。この研究により、多数の水分子と His88 を含む水素結合ネットワークが TTR の立体構造を安定化しており、ネットワークの破壊が TTR アミロイドーシスの原因の 1 つであることが明らかになった。</p> <p>TTR のアミロイド線維形成を抑制する天然化合物の探索も行った。68 種類の天然化合物を用いて、これらの化合物がアミロイド線維形成を抑制するかどうかを調べた。その結果、マメ科のヨーロッパカンゾウに含まれるグラブリジンや、シソ科の植物に含まれるロスマリン酸などが TTR の線維形成を抑制することが分かった。これらの天然化合物は十分な線維形成抑制効果を示し、その効果はジフルニサルと同程度であった。さらに、グラブリジン-TTR 複合体、ロスマリン酸-TTR 複合体の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定し、これらの天然化合物と TTR の結合様式を解明した。グラブリジンと TTR の結合は、Ala108 との CH-π相互作用や Lys15 との水素結合によって安定化されていることが判明した。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	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
氏 名	工藤幸司
所 属 機 関	東北大学病院臨床研究推進センター
<p>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 in vivo 画像診断）を提供することを最終目的とする。トシリズマブ（ヒト型 IL6 受容体抗体）の治療効果を患者様の胃幽門輪生検標本における BF-227 染色を指標に検討した。また併せてアミロイドに親和性を有するとともに生体を透過する領域に励起および蛍光波長を有する近赤外線蛍光プローブを用いた簡便・廉価・迅速なアミロイドーシス診断法開発を目指して、同病動物モデルにおける同蛍光プローブを用いた基礎検討を実施した。BF-227、THK 化合物はいずれも分担研究者らによって開発されたアミロイドに親和性を有するプローブ（低分子有機化合物）である。</p> <p>B. 研究方法および結果</p> <p>1.BF-227 を用いたトシリズマブの臨床効果の検証</p> <p>アミロイドーシス患者様の胃幽門輪標本の BF-227 染色を実施し、鏡見・撮影して標本全体に占める BF-227 の染色領域を求めた。</p> <p>トシリズマブ投与群に有意な BF-227 染色領域の減少（治療効果）が認められた。</p> <p>2. APPT g マウスマウスにおける Aβ の近赤外線蛍光プローブによる描出</p> <p>脳内に Aβ が蓄積する APP Tg マウスに THK-265 を静脈内投与して、小動物用蛍光イメージング装置（IVIS-100）で頭部皮膚上からの in vivo 画像を撮影した。</p> <p>THK-265 投与 3 分後に Tg マウスにおいて月齢依存的、且つ有意な蛍光強度の増強が認められた（in vivo 光イメージング法で Tg マウスの Aβ を検出することができた）。</p> <p>3.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</p> <p>M.Butyricum と adjuvant を投与して作製したモデルマウスに THK-5XY を静脈内投与して、小動物用蛍光イメージング装置で背側皮膚上からの in vivo 画像を撮影した</p> <p>モデルマウスの背側部上(脾臓、腎臓等)において著明な THK-5XY の集積が認められた。</p> <p>4.近赤外線蛍光プローブを用いたモデルマウスにおける薬剤の臨床効果の検証</p> <p>M.Butyricum と adjuvant 投与直後にマウス型 IL6 受容体抗体を投与し、2 and/or 4 週間後に THK 化合物を静脈内投与して、小動物用蛍光イメージング装置で背側皮膚上からの in vivo 画像を撮影した。</p> <p>予備試験ではマウス型 IL6 受容体抗体に治療効果が認められたが、さらに追試中。</p> <p>C まとめ</p> <p>1.トシリズマブの臨床効果を胃幽門輪標本の BF-227 染色で裏付けることができた。</p> <p>2.In vivo において簡便・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を用いた診断法の基礎検討を実施した。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	家族性アルツハイマー病(PSEN1 I143T)におけるアミロイド β_{43} の神経毒性の解析、および新たなガンマ・セクレターゼ結合蛋白の解析
氏 名	水澤 英洋
所 属 機 関	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 (神経内科)
<p>平成 23～24 年度は、家族性アルツハイマー病 (FAD) (PSEN1 I143T) は、E206A、A431E などの変異とともに頻度の高い FAD 遺伝子変異であるとされており (Rogaeva et al, 2001)、これまでに海外も含めて 7 家系の報告がある。プレセニリン 1 蛋白 (PS1) の第 2 膜貫通領域 (TM2) 内の変異であり、臨床所見の特徴として、発症年齢が 30～50 歳 (平均 32.5) と若年性 AD としても非常に早期に発症し、平均罹病期間は 8.7 年と進行も早い。認知機能障害の他に失調症状、てんかん発作、ミオクロヌス、転倒傾向、錐体路徴候など Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (PRNP P105L) 類似の症状を呈する。MRI や脳血流 SPECT では早期から頭頂葉と海馬が萎縮し、後方領域が広範囲に高度の血流低下を呈する。</p> <p>病理所見の特徴として、老人斑が主に抗 amyloid β ($A\beta$) 42 抗体と $A\beta$ 43 抗体で染色され、瘻性を呈した症例を含め cotton wool plaque を認めた例は報告されていない (Heckmann, et al, 2004; Keller et al, 2010)。PSEN1 I143T 変異における $A\beta$ 43 の病態への関与を調べるため、PSEN1 および PSEN2 の knockout (DKO) マウスの線維芽細胞 (DKO-MEF) と HEK293 細胞を用いて $A\beta$ 40、$A\beta$ 42、$A\beta$ 43 の発現量を調べたところ、各細胞で I143T 変異を有する PS1 を過剰発現させた状態で、$A\beta$ 42/40 比が野生型に比べ高値であったが、$A\beta$ 43 の発現量の増加は認められなかったことより、PSEN1 変異による FAD において、沈着する $A\beta$ 43 が多いとされる病型においても、$A\beta$ 43 の発現量は必ずしも多くはなく、$A\beta$ 43 の臨床病型へ及ぼす影響は必ずしも大きくはないと思われた。</p> <p>平成 25 年度は新たなガンマ・セクレターゼ結合蛋白 X の解析を行い、siRNA にて内因性の蛋白 X をノックダウンした細胞においては、アミロイド前駆蛋白の減少が認められ、蛋白 X は APP の発現調節や安定性に関与している可能性が示唆され、更なる解析を進めている。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	透析アミロイド-シスに関する臨床ならびに病理学的研究
氏 名	西 慎一
所 属 機 関	神戸大学大学院腎臓内科
<p>平成 23～25 年度において、透析アミロイド-シス (HDA)発症への炎症の関与、シャペロン分子の関与について、臨床ならびに病理学的研究を行った。</p> <p>平成 23 年度には、「透析アミロイド-シス診断基準と炎症反応」をテーマに、厚生労働省アミロイド-シス研究班により作成された HDA 診断期基準により確定診断例とされた症例と炎症性マーカーとの関連を検討した。慢性炎症あるいは酸化ストレスが HDA の発症を助長すると言われていたが、HDA 診断確定群と診断非確定群において、炎症性マーカー (CRP、WBC、ferritin、アルブミン)を比較検討した。透析年数増加に伴い診断確定例が増加することが確認された。しかし、炎症性マーカーと骨関節病変、診断確定例との間に関連性はなく、炎症性マーカーを HDA 診断の補助診断マーカーとして利用することは難しいと考えられた。</p> <p>平成 24 年度には、「免疫電顕による透析アミロイド-シス分子シャペロンに関する超微形態研究」をテーマに、HDA 発症に関わるシャペロン分子の局在を 82 ミクログロブリン由来アミロイド細線維との関連で検討した。シャペロン分子としては、アミロイド P 蛋白、ApoE 蛋白、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどが知られている。透析患者の手根管症候群手術時に得た病変滑膜を材料とし、4%パラフォルムアルデヒドにて固定。免疫電顕用樹脂内に組織を浸透させ紫外線重合にて包埋した。超薄切片上にて、一次抗体として、各種シャペロン分子候補に対する抗体を反応させ、次にプロテイン A 金コロイドを反応させ、電子顕微鏡下で各シャペロン分子の局在を観察した。アミロイド沈着物内のアミロイド細線維に対して、シャペロン分子物質は、細線維表面にまとわりつくような立体的高次元構造を形成していることが示唆された。ただし、アミロイド P 蛋白のみは、アミロイド細線維間に主に存在し、特異な役目を果たしている可能性があると考えられた。シャペロン分子はアミロイド細線維の組織親和性、あるいはアミロイド沈着体としての組織内安定性を形成しているのではないかと推測された。</p> <p>最終年度の平成 25 年度には、「透析アミロイド-シスと慢性炎症指標 (CI index)との関係」をテーマに、HDA 発症に関して、慢性炎症が関与しないか再度臨床的研究を行った。厚生労働省アミロイド-シス研究班により作成された HDA 診断基準に基づき、HDA と診断された症例 60 例と HDA 臨床症状、そして新たに設定した栄養・酸化ストレス指標 (CI index)、$CI\ 1=CRP \times ferritin \div Alb$ (アルブミン)あるいは $CI2=CRP \div Alb$ との関係を検討した。HDA 診断各実例、疑い例、非診断例それぞれの CI index は、HDA 診断確実例で高くなる傾向が認められた。しかし、群間に有意差は得られなかった。対象症例数が 60 例と少なく、今後症例数を更に増やして検討していく予定である。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	AL アミロイドーシスの病態解析
氏 名	畑 裕之
所 属 機 関	熊本大学大学院生命科学研究部生体情報解析学
<p>①AL アミロイドーシスにみられる過剰線溶の解析</p> <p>AL アミロイドーシス症例の凝固系検査を行い、過剰線溶を PIC の値で定量化、過剰線溶の原因として考えられるウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター(uPA)の発現を免疫染色で検討した。対照として良性 M タンパク血症、多発性骨髄腫症例を用いた。uPA 発現は、純化した形質細胞から得た RNA を用いて real time PCR でも検討した。AL アミロイドーシスでは PIC が高値を示し、1.5μg/ml をカットオフとすると感度 92.7、特異度 89.7 と診断にきわめて有用であることが判明した。PIC は治療が奏功した症例で著減し、病勢も反映すると考えられた。uPA は患者骨髄形質細胞に免疫染色で発現が認められたが、RNA 解析では、アミロイド沈着臓器での発現もみられた。PIC が AL アミロイドーシスの診断に十分役立つことを示すとともに、プラスミンの増加が本疾患に特異的であることを証明した。過剰線溶の原因となるプラスミンは特異性の低いプロテアーゼであり、これが臓器細胞外マトリックスを破壊し、アミロイド沈着を促進する可能性がある。また、プラスミンが免疫グロブリン軽鎖を修飾し、アミロイド原性を高める可能性を提唱した。</p> <p>②診断困難な AL アミロイドーシスの病因解析</p> <p>M タンパクを有し、コンゴレッド陽性病変をもつものの、同部の免疫染色では確定診断ができなかった症例を 4 例経験した。マススペクトロメトリーの解析により、これらは、全例λ型 (IGLC2) の M タンパクを病変部に有した。興味深いことに、全例移植を含む治療に抵抗性を示した。これら症例の骨髄から純化した形質細胞より mRNA を抽出し、免疫グロブリン軽鎖の塩基配列を同定したところ、IGLL5 の発現を確認した。IGLL5 はマス解析で得られた IGLC2 と相同性を示すタンパクであり、実際にアミロイド組織を抗 IGLL5 抗体で染色したところ、IGLL5 の存在が確認された。これらより IGLC2 が AL アミロイドーシスの原因となることが判明し、共通点として 1 : λ型の M タンパクを有する、2 : 通常の抗体による免疫染色が陰性である、3 : アミロイドが複数の臓器に沈着している、4 : 移植を含む治療が奏功しない、の 4 点が示唆された。これらの症例には、幹細胞移植も奏功しにくいことから、IGLC2 が変成したアミロイドは、溶出しにくい可能性も示唆される。これら症例は、AL アミロイドーシスのなかでも特殊な病態を呈しており、アミロイド変成機序を解析することが、予後不良群への治療法開発につながると期待される。</p> <p>③幹細胞移植の適応とならない症例への VCD 療法</p> <p>現在進行中の MVP 療法による臨床試験に不適格である症例や、幹細胞移植無効例、移植後再発例、ボルテゾミブ無効例などに bortezomib/cyclophosphamide/dexamethasone 療法 (VCD 療法) を施行し、血液学的寛解、臓器改善効果を認めた。新薬による治療の選択肢を考える上で有益な結果が得られた。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	動物のアミロイドとアミロイド症に関する研究
氏 名	宇根有美
所 属 機 関	麻布大学獣医学部病理学研究室
<p>動物の様々なタイプ of 自然発生性アミロイド症を病理学的、疫学的、分子生物学的検索および蛋白解析し、アミロイド沈着の発生要因、病理発生を解明して、アミロイド研究に貢献することを目的とした。以下は平成 23～25 年度研究のまとめである。</p> <p>1. ネコ科動物におけるアルツハイマー病 (AD) 関連病変の解析</p> <p>動物で初めて自然発生性に AD の特徴病変 (Aβ 沈着、高リン酸化タウ蓄積 (AT8)・神経原線維変性 (NFT)、大脳萎縮) を有する動物を発見し、比較医学的に解析した。その結果、ネコ科動物に共通して、老人斑を形成しない瀰漫性 Aβ 沈着がみられ、Aβ の N 末端領域のアミノ酸配列がヒトとは異なることを遺伝子および蛋白解析により明らかにし、Aβ 沈着パターンに関連する可能性があることを推察した。また、AT8 の蓄積はネコ科動物の進化系統樹上の 8 つのクラスターのうちネコ亜科に属する 3 つのクラスターのみでみられることを明らかにした。特にチーター (50 頭) では Aβ および AT8 とともに、比較的若年齢層から高率に出現し、NFT を形成すること。ヒトの AD と同様に AT8 はユビチキン化され、主として神経細胞内に蓄積し、活性型 p-GSK3β が存在し 3R および 4R タウの凝集がみられることを明らかにした。また、近年、細胞内 Aβ の毒性が注目されているが、犬とネコ科動物 9 種 (42 頭) について検討したところ、検査したイエネコ 9 頭 (6 歳～24 歳、平均年齢 14.3 歳) のみに、神経細胞内に Aβ が沈着していた。2 種類の沈着パターンがあり、大顆粒状型では、コア形成、ドーナツ状など構造物が認められた。なお、大顆粒状の神経細胞内 Aβ 沈着と、細胞外 Aβ 沈着のスコアおよび高リン酸化タウ蓄積との相関はなかった。</p> <p>2. サバンナモンキーの老人性 TTR アミロイド症に関する研究</p> <p>本疾患を 1 頭のサバンナモンキーに見出したことから症例を収集し、サルにおける本疾患の病理学的特徴と TTR アミノ酸配列を明らかにするとともに、特に関節病変について検討した。その結果、ヒトに類似する病態が確認され、さらにアミロイド沈着は全身の関節に及び、ヒト TTR と同様に V122I の置換が明らかになった。</p> <p>3. その他の動物におけるアミロイド症</p> <p>超高齢のアシカの脳における脳血管アミロイドーシスにおいて、特異な、異なる種類の Aβ の分節性の血管沈着を確認した。自然発生性全身性 AA アミロイド症のモルモットの腎臓に糸球体非 AA アミロイド症を確認した。</p> <p>各種動物の自然発生性アミロイド症を解析することによる、新たなる疾患モデル動物の開拓は、新規の発生機序や治療ターゲットの発見に繋がる可能性がある。さらに動物の系統進化と罹患偏向との関連を検討することで、疾患の起源を探索することにもなる。</p>	

タ イ ト ル	アミロイドβペプチドの分解、凝集、蓄積課程に関する研究
氏 名	岩坪 威
所 属 機 関	東京大学大学院医学系研究科 神経病理学分野
<p>アルツハイマー病 (AD)の病因としてアミロイドβペプチド (Aβ)が凝集、蓄積する過程において神経細胞死を引き起こすと考える「アミロイド仮説」が提唱されている。しかし、神経細胞において産生、分泌された Aβが脳内でどのように代謝を受け、さらに一部は凝集、蓄積に至るのかその詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究では①ヒトアストロサイトーマ由来培養細胞上清中に含まれる分泌型セリンプロテアーゼ KLK7 が新規 Aβ分解プロテアーゼであること、②apolipoprotein E (apoE)はアイソフォーム特異的に Aβのオリゴマー化及び凝集に関与すること、③CLAC は Aβアミロイド蓄積をより成熟化させる作用があることを見いだした。以下詳細に記述する。</p> <p>①KLK7はアストロサイトーマ由来新規 Aβ分解プロテアーゼである ラット初代培養系を用い、神経細胞から分泌される Aβ量と、神経・グリア細胞共培養系から分泌される Aβ量に違いが存在することを見出し、これらの細胞間において Aβ産生・代謝において何らかの機能的相関があると考えた。そしてヒトアストロサイトーマ由来培養細胞 CCF-STTG1 や U87 の培養上清中に、Aβを分解するセリンプロテアーゼ活性が存在することを明らかにした。さらに各種阻害剤および RNAi スクリーニングにより、組織型カクレインファミリー分子の一つである KLK7 がその責任酵素であることを見出した。これまでに KLK7 は AD 患者 CSF において特異的に低下していることや、Braak stage と比例して前頭葉における発現量が低下していることが報告されており、AD 病変を修飾する可能性が指摘されていたが、本研究により脳内 Aβ代謝経路に直接的に関与していることが明らかとなった。また世界で初めてアストロサイト系細胞由来Aβ分解酵素の同定に成功し、グリア細胞を標的とした新たな AD 治療薬開発に繋げうる成果を得た。</p> <p>②apoE はアイソフォーム特異的に Aβのオリゴマー化及び凝集に関与する apoE の遺伝多型であるε4 アレルは AD 発症の遺伝的危険因子として知られる。apoE がどのようにアイソフォーム特異的に AD 発症に関わるか明らかにするため、まず apoEε2/ε2、ε3/ε3、ε4/ε4 アレルの AD 患者脳より TBS 可溶性 Aβ\squareoligomer 量を検討したところ、ε4/ε4 AD 患者脳で Aβ oligomer 量が有意に上昇していることがわかった。また Aβ\squareprotofibril を用いた <i>in vivo</i> seeding 実験により apoE3 は apoE4 に比べ、Aβ蓄積を有意に減少させることを見だし、そのメカニズムとして apoE3 は Aβ\squareprotofibril から fibril への構造変化を抑制するが、apoE4 はその作用が弱いことを見いだした。以上の結果 apoE はアイソフォーム特異的に Aβのオリゴマー化及び凝集課程に影響を与えることにより AD 発症に関わる可能性を示した。</p> <p>③CLAC はアミロイド蓄積をより成熟化させる作用がある CLAC は AD 脳老人斑に蓄積する非 Aβアミロイド構成タンパク質である。CLAC が Aβ蓄積に及ぼす影響を明らかにするため、CLAC 前駆体タンパク質(CLAC-P)を神経細胞に過剰発現するトランスジェニック (tg)マウスを作出し、APP tg マウスと交配して検討を行った。その結果 APP/CLAC-P 二重 tg マウスでは、APP tg マウスに比べ可溶及び不溶 Aβ量に違いはないものの、Thioflavin S (ThS)陰性のびまん性アミロイド斑が減少し、中小型の境界明瞭な ThS 陽性アミロイド斑数が有意に増加した。これは CLAC が凝集した Aβに作用してよりβシート構造の豊富な成熟したアミロイド斑として蓄積させる働きがあることを示す。</p>	

平成 23～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	家族性アミロイドポリニューロパチーの病態解明と新規治療の開発
氏 名	小池春樹
所 属 機 関	名古屋大学医学部神経内科学
<p>近年, 遺伝子診断の技術の進歩とともに, 高齢で発症し, 集積地との関連を認めない FAP ATTR Val30Met 症例が全国に散在性に分布していることが明らかになった. 肝移植は FAP の治療法として確立されているが, 高齢発症例では移植後も心アミロイドーシスが進行することが報告されている. また, 移植後の QOL を規定する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. 我々は, 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. 症例 1 (60 歳発症, 男性, 非集積地出身) は 62 歳時, 症例 2 (40 歳発症, 男性, 非集積地出身) は 41 歳時, 症例 3 (28 歳発症, 男性, 非集積地出身) 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. 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. 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異常所見を認めない. このことから, 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. 非集積地例は高齢であるが故に肝移植の適応にならない症例が多いが, diflunisal や tafamidis などのトランスサイレチンを安定化させてアミロイド沈着を抑制する薬剤が近い将来に使用可能になることが予想され, このような症例の自然歴の把握が重要な課題となってきた. そこで, 我々は, 集積地との関連のない 50 歳以上発症の FAP ATTR Val30Met 48 家系 50 例 (男性 43 例, 女性 7 例) の自然歴を検討した. 上肢と下肢の感覚障害の出現時期はそれぞれ 66.0 ± 6.1 (mean \pm SD) 歳と 65.1 ± 6.5 歳, 上肢と下肢の運動障害の出現時期はそれぞれ 66.3 ± 5.8 歳と 66.5 ± 6.2 歳であった. 下痢/便秘と起立不耐性の出現時期は 66.4 ± 5.8 歳と 66.4 ± 6.3 歳であった. 排尿障害は 67.4 ± 6.7 歳時に出現した. 杖と車椅子使用開始時期はそれぞれ 67.7 ± 6.6 歳と 68.9 ± 6.0 歳であった. 心不全の症状は 69.3 ± 6.2 歳時に出現した. 発症年齢は 51-77 歳と多様であったが, 上記の臨床的な指標がそれぞれの症例で出現する順序は一様な傾向があった. 死亡時年齢は 70.0 ± 6.0 歳であり, 発症から死亡までの期間は 7.3 ± 2.9 年であった. 死因は心不全 (21 例中 8 例) と突然死 (21 例中 7 例) が多くを占めた. 以上のことから, 非集積地の高齢発症 FAP ATTR Val30Met の経過は発症年齢に関係なく比較的均一であり, 短期間のうちに症状が完成すると考えられた. また, 非集積地の高齢発症型 FAP ATTR Val30Met は, 従来型の集積地の若年発症型 FAP ATTR Val30Met とは異なる経過を呈すると考えられた.</p>	