

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

アミロイドーシスに関する調査研究

研究代表者 山田正仁 金沢大学医薬保健研究域医学系 脳老化・神経病態学（神経内科学） 教授

研究要旨 アミロイドーシス各病型〔①AL、②AA、③家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）、④透析、⑤脳（アルツハイマー病、脳アミロイドアンギオパチー）、⑥老人性全身性アミロイドーシス（SSA）〕ごとの戦略、及び全病型に共通する課題の研究により、病因・病態調査解明研究、治療プロトコル確立、新規診断・予防・治療法開発等を行った。AL では過剰線溶の解明と診断応用、自家末梢血幹細胞移植療法併用化学療法の長期効果解明、血液濾過透析などの他の治療オプションの有用性の検討を行い、新規 BMD 療法全国多施設臨床試験計画を推進した。AA では生物学的製剤使用による予後の改善を明らかにし、IL-6 受容体抗体トシリズマブによる世界初の AA 全国多施設臨床試験が進行した。FAP では非集積地における孤発例の臨床病理学的特徴を示し、肝移植例の解析において沈着アミロイドの退縮がおこることを示した。透析アミロイドーシスでは細胞外シャペロンによるアミロイド形成抑制機構、長期透析におけるアミロイド沈着関連因子を解析し、研究班による世界初の本症診断基準の妥当性を検証した。脳アミロイドーシスではアポリポ蛋白 E のアイソフォーム特異的なアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) 凝集促進効果、アルツハイマー病患者脳脊髄液における $A\beta$ オリゴマー形成促進環境および $A\beta$ オリゴマーの増加等を報告した。SSA ではわが国の高齢者剖検例における有病率、肺病変の存在を明らかにした。アミロイドイメーキング開発では FAP 患者における心アミロイド沈着を初めて検出した。アミロイドーシスの伝播に関する研究では、マウス老化アミロイドーシスの個体間伝播のメカニズムを解明し、ウシ AA アミロイドは 121°C 加熱処理後もマウスに伝播可能であることを示した。アミロイドーシスの伝播に関する国際シンポジウムを開催し、「アミロイドーシス診療ガイドライン 2010」を発刊した。

研究分担者

池田修一	信州大学医学部内科学脳神経内科、 リウマチ・膠原病内科 教授	麻奥英毅	座 教授 広島赤十字・原爆病院検査部 部長
樋口京一	信州大学大学院医学研究科加齢生 物学分野 教授	奥田恭章	道後温泉病院リウマチセンター 副院長
玉岡 晃	筑波大学大学院人間総合科学研究 科疾患制御医学専攻 教授	安東由喜雄	熊本大学大学院生命科学研究部病態 情報解析学分野 教授
高市憲明	虎の門病院腎センター内科 部長	中里雅光	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸 内分泌代謝学分野 教授
山田俊幸	自治医科大学臨床検査医学 教授	工藤幸司	東北大学未来医工学治療開発センタ ー前臨床応用部門 教授
内木宏延	福井大学医学部医学科病因病態学講 座分子病理学領域 教授	水澤英洋	東京医科歯科大学大学院医歯学総合 研究科脳神経病態学 教授
今井裕一	愛知医科大学内科学講座腎臓・リウ マチ膠原病内科 教授	星井嘉信	山口大学大学院医学系研究科情報解 析医学系病理形態学分野 講師
島崎千尋	社会保険京都病院 副院長	西 慎一	神戸大学大学院医学研究科腎臓内科 腎・血液浄化センター 特命教授
吉崎和幸	大阪大学先端科学イノベーションセ ンター 特任教授	畑 裕之	熊本大学医学部附属病院血液内科 講師
東海林幹夫	弘前大学大学院医学研究科附属脳神 経血管病態研究施設脳神経内科学講		

松井高峯 帯広畜産大学畜産学部基礎獣医学
教授
岩坪 威 東京大学大学院医学系研究科神経病
理学分野 教授
小池春樹 名古屋大学医学部附属病院神経内科
助教
小野賢二郎 金沢大学附属病院神経内科 助教

A. 研究目的

アミロイドーシスの分子病態に基づく早期診断・治療法の開発・確立を目的とし、病型ごとの戦略並びに全病型共通の発症機構研究により、本症の発症動向の把握と共に、早期診断、治療成績の向上、新規診断、予防・治療法の開発を行う。

1) **AL アミロイドーシス**：本症診断後の 50 % 生存は約 1 年である。治療法として自家末梢血幹細胞移植併用療法の有効性が報告されているが、適応になる患者は限られる。AL の分子病態解明に基づく新規診断・治療法の開発研究、新規治療プロトコルによる全国多施設臨床試験、その他の治療オプションの検討を行う。

2) **AA アミロイドーシス**：本症は関節リウマチ (RA) 患者の 5-10% に合併し、RA の予後不良因子である。本症発症及び予後規定因子の解明、分子病態解明に基づく新規治療法の開発、全国多施設共同臨床試験によるその有用性確立をめざす。

3) **家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)**：非典型例の診断法開発、根本治療法である肝移植の長期的な有効性や問題点の解明、トランスサイレチン (TTR) 沈着機構解明に基づく新規治療開発をめざす。

4) **透析アミロイドーシス**：腎移植が少ないわが国では長期透析患者が多く、20 年以上の長期透析例では本症は必発する。本症合併の危険因子同定と発症予防、診断基準策定を含む早期発見法確立、 β_2 -ミクログロブリン (β_2 -m) 凝集過程解明による新規治療法開発をめざす。

5) **脳アミロイドーシス**：アルツハイマー病 (AD)、脳アミロイドアンギオパチー (CAA) 等で脳に蓄積するアミロイドを標的とした新しい早期診断マーカー、予防・治療法の開発を行う。

6) **老人性全身性アミロイドーシス (SSA)**：本症のわが国における実態を解明し、診断法を確立し、

治療法を開発する。

7) **アミロイドーシスに共通する発症・伝播機構解明に基づく診断・予防・治療法開発等**：全病型に共通するアミロイド沈着機構を統合的に研究し、診断、予防・治療法への応用を行う。特に、アミロイドイメージングの臨床診断への応用を行う。また、アミロイドによるアミロイドーシス発症促進 (“伝播”) 現象の意義、分子機構を解明する。重点課題の研究を一段と推進するために国際シンポジウムを開催する。わが国における本症の診療水準を向上させるため、診療ガイドラインを作成する。

B. 研究方法

1) **AL アミロイドーシス**：

① **AL アミロイドーシスの発症要因、病態解明、診断に関する研究**：本症では過剰線溶が合併しやすいことが知られている。本症 46 例及びアミロイド沈着のない骨髄腫または MGUS 61 例について plasmin/plasminogen inhibitor complex (PIC) を定量し、urokinase 型 plasminogen activator (uPA) を検討した (畑)。全身性及び限局性アミロイドーシスの両者において PIC を測定した (今井)。本症の発症におけるアポリポ蛋白 E (apoE) E4 の関与を明らかにするため、本症 51 例を対象に apoE E4 抗体を用い免疫組織化学的検索を行った (星井)。

② **治療法の検討**：自家末梢血幹細胞移植療法 (ASCT) 併用を含む強力な化学療法を行った 47 名について長期効果を検討した (松田)。ASCT および非 ASCT 治療法の治療成績を明らかにすることを目的とした全国多施設共同研究を計画した (麻奥)。本研究班の AL 分科会は新規治療法としてボルテゾミブ (BOR)、メルファラン (MEL)、デキサメタゾン (DEX) の 3 剤併用 (BMD 療法) による安全性と有用性を検証する臨床試験計画を推進中であるが、臨床試験における血清遊離軽鎖 (FLC) の有用性を検討した (島崎ほか)。それ以外の治療オプションとして、血液濾過透析 (HDF) による遊離軽鎖 (FLC) 除去療法の有用性について検討した (今井)。

2) **AA アミロイドーシス**：

① **臨床的研究**：AA アミロイドーシスの臨床像の変遷と長期予後の変化を明らかにする目的で、本

症合併 RA405 例について年代別に診断時年齢、炎症マーカー値、長期予後等について解析した（奥田）。AA 合併 RA について、生物学的製剤使用による予後の変化を、非使用例と比較し、治療効果に影響を与える因子についても検討した（西、中村）。AA アミロイドーシスに対するヒト化抗 IL-6 受容体抗体（トシリズマブ）を用いた SAA 産生抑制による治療法確立のために、本研究班 AA 分科会メンバー他からなる AA アミロイドーシス臨床研究会による臨床試験を推進した（吉崎ほか）。

② **基礎的研究**: ヒト apoE ノックインマウスに AA アミロイドーシスを惹起し、抗マウス SAA モノクローナル抗体、抗ヒト apoE 抗体を用いて、SAA と AA の動態を解析した（山田俊幸）。ヒト母乳における SAA の存在について解析した（公文）。

3) FAP :

① **病態及び肝移植治療の効果に関する研究**: 家歴を認めない非集積地の FAP ATTR Val30Met 15 例を解析した（小池）。肝移植後 FAP 患者における組織沈着アミロイドのターンオーバーをみるために、脂肪沈着アミロイドと胃粘膜アミロイドを肝移植前後で比較した（池田）。

② **基礎的研究**: トランスサイレチンアミロイドーシスの霊長類モデルを確立するため、各種サル（旧世界ザル 13 種、新世界ザル 8 種、キツネザル 2 種）の剖検例を検討し、さらに TTR 遺伝子配列を検索した（安東）。

4) 透析アミロイドーシス :

30 年程度の長期透析患者 14 名における手根管症候群の発症に関わる因子を明らかにする目的で血清 β_2 -m 等を解析した（高市）。透析歴 42 年の超長期透析患者にみられた透析アミロイドーシスについて臨床及び病理所見を検討した（高市）。研究班が作成した透析アミロイドーシスの診断基準（「アミロイドーシス診療ガイドライン 2010」参照）の有用性を実証するために、透析施設 3 施設、計 60 名の透析患者を対象とした調査を実施し、併せて炎症性マーカーの診断的意義を検討した（西）。細胞外シャペロンである α_2 -マクログロブリン (α_2 M) の β_2 -m 線維形成過程に与える影響を解析した（内木）。

5) 脳アミロイドーシス :

① **アミロイド β 蛋白 (A β) 沈着分子病態解明と AD**

診断治療法開発: ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いてスタチン (pitavastatin: PV) の A β 代謝への影響を検討した（玉岡）。エストロゲンが A β オリゴマー形成に与える影響を photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP)法を用いて検討した（山田正仁）。A β 凝集における apoE アイソフォーム特異的效果を APP 遺伝子改変マウスへの A β 凝集体注入実験により検討した（岩坪）。PICUP 法で作成した A β オリゴマーを分離抽出し、オリゴマーの構造と細胞毒性等の相関を検討した（小野）。Tau 発現マウス TgTauP301L および A β 蓄積マウス Tg2576 と TgTauP301L との double transgenic mouse を用い、脳脊髄液 (CSF) 中や脳内蓄積 tau 等を検討した（東海林）。AD 患者 CSF 環境が A β オリゴマー形成に与える影響を PICUP 法で検討した（山田正仁）。AD 患者 CSF 中の A β オリゴマーを検討した（東海林）。非認知症白内障患者の水晶体における A β の定量化を試みた（玉岡）。Wechsler Memory Scale-Revised (WMS-R)の Logical Memory II を用いた J-ADNI の軽度認知障害 (MCI) 診断基準を参照し、有用な MCI 診断基準について検討した（水澤）。

② **BRI2 関連蛋白に関する研究**: 家族性英国/デンマーク型認知症 (FBD/FDD) は BRI 遺伝子変異に起因する。BRI の分泌部位に対する抗体を作成し測定系を構築、AD その他の神経変性疾患の CSF および血中の BRI2 を測定し、その分子型を検討した（中里）。

6) **老人性全身性アミロイドーシス (SSA)**: 181 連続剖検例と SSA と診断された 11 例を解析した。

7) **アミロイドーシスに共通する発症機構解明に基づく診断・予防・治療法開発等**:

① **アミロイドイメージングに関する研究**: プローブ BF-227 によるアミロイドイメージング研究を行った。AA アミロイドーシス臨床試験登録患者の消化管生検の BF-227 陽性所見を治療経過で比較した（工藤）。CAA および FAP 患者を対象に BF-227 によるイメージングを実施した（池田、工藤）。

② **マウス老化アミロイドーシス及びウシアミロイドーシス伝播に関する研究**: apoA-II が沈着するマウス老化アミロイドーシスモデルにおいて、異なった時期の糞に含まれるアミロイド線維の生化学的

特性と伝播力を解析した（樋口）。食品としてビーフを摂取する時にウシに沈着しているアミロイドが人体に入った場合、個体のアミロイドーシス発症を促進する可能性がある。ウシの AA アミロイドーシスのアミロイドの熱処理が伝播に及ぼす影響を解析した（松井）。

③シンポジウム開催・ガイドライン作成：世界的権威者を招聘する国際シンポジウムを企画した。全国の患者が早期診断と最適な治療を受けることができるようにするため、一般医師を対象とする診療ガイドラインを作成した。

（倫理面への配慮）

患者を対象とする臨床研究（診断、治療、遺伝子解析等）、疫学研究等については各施設の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。遺伝子組み換え動物を含む動物実験に関しては、各施設の指針に基づき動物実験委員会等の承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

1) AL アミロイドーシス：

①AL アミロイドーシスの発症要因、病態解明、診断に関する研究：過剰線溶に注目した PIC の定量では、カットオフ値を 1.5 $\mu\text{g/ml}$ とした場合、アミロイドーシス非合併の骨髄腫あるいは MGUS に対する全身性 AL アミロイドーシスの診断上の感度 92.7%、特異度 89.7%という良好な結果であった。また、アミロイド沈着臓器では約 10 倍 uPA の発現が亢進していた。さらに、限局性アミロイドーシスに対する診断上の感度 83%、特異度 94.1%であり、PIC の異常の有無は全身性と限局性との鑑別においても良好な結果を示した。

ApoE E4 抗体による免疫組織化学的検討では、51 例中 40 例（78.4%）でアミロイドが E4 陽性であった。

②治療法の検討：高用量メルファラン（HDM）＋ASCT 療法治療群は非 ASCT 治療群と比べ、FLC κ/λ 比正常化率、5 年生存率共に高かった。FLC κ/λ 比を正常化することができれば、いずれの治療群でも生命予後、臓器障害ともに良好な結果が得られた。ASCT 治療群と非 ASCT 治療法の治療成績と予後影響因子を明らかにすることを目的とした

全国多施設共同後方視調査研究を立案した。

AL 分科会は、HDM+ASCT 以外の有効な新規治療法として、BOR、MEL、DEX の 3 剤併用（BMD）療法の有用性を検証する臨床試験を立案し、現在計画が進行中である。臨床試験に用いるおける血清 FLC 測定の有用性と問題点を検討したところ、FLC は診断、予後予測、モニタリングに有用であったが、19 例中 2 例において FLC が正常の例があるなど問題点が見いだされた。

AL アミロイドーシスにおける HDF による FLC 除去の有効性を検討した。透析前後の FLC 除去率をみると、HDF では PS 膜が優れた除去率を示し、FLC 産生量より除去量が大きくなる透析条件で HDF 療法を実施したところ、血中 FLC 濃度を低下させ、臓器障害の進行を認めなかった。

2) AA アミロイドーシス：

①臨床的研究：AA 合併 RA 患者の診断年齢は、年代を経るごとに高齢化し、診断前の CRP 値は年代と共に有意に低下した。RA における AA の合併頻度も有意に低下した。生存率は年代を経るごとに有意に改善した。生物学的製剤使用例は非使用例と比較して生命予後、透析導入などの臨床経過において優れていた。本症合併の遺伝的リスクとされる SAA1.3 アリルは RA 発症あるいは AA 診断から治療開始までの時間が有意に短かったが、治療経過と効果には関連しなかった。

AA アミロイドーシスに対するヒト化抗 IL-6 受容体抗体（トシリズマブ）を用いた全国多施設臨床試験において、患者のインフォームドコンセントを得て 38 例を登録した。

②基礎的研究：マウス AA アミロイドーシスモデルの検討では、惹起後 2 日目には AA と SAA がみられ、55 日目には、低分子 SAA を残し SAA と高分子の AA が消失した。apoE は分解産物が 21 日目から脾臓で検出され、55 日目にも残存していた。ヒト母乳中に SAA が存在していること、その量は出産後 3 日目にピークに達し以後は変動しないことを示した。

3) FAP：

①病態及び肝移植治療の効果に関する研究：非集積地の FAP 孤発例の検討では、自律神経障害を 7 例に、解離性感覚障害を 15 例中 2 例のみに認めた。腓腹神経生検では大径および小線維両者の脱落と

軸索変性所見を認め、胸部レントゲンと心エコーで14例中11例にアミロイド沈着を示唆する所見を認めた。初期にはCIDPと診断されている例が多く、診断に神経生検が有用であった。

肝移植前後での腹壁脂肪沈着アミロイドを比較するとアミロイドが著しく減少しており、構成成分も変異型TTR優位から野生型TTR優位へと変化していた。胃粘膜アミロイドについては、沈着量の変化は一定しなかったが、やはり野生型TTRが優位になっていた。

②基礎的研究：高齢アフリカミドリザル6頭中3例でTTRアミロイドーシスを病理学的に認め、不整脈や心拡大、心エコー異常などのアミロイド沈着を示唆する臨床所見もみられた。TTR遺伝子配列では、アフリカミドリザルのTTRは122番目のアミノ酸がイソロイシンであった。

4) 透析アミロイドーシス：

透析歴30年前後の長期透析患者で手根管症候群がある群とない群を比較すると、血清 β_2 -m濃度に有意差を認めなかった。手根管症候群のある群には女性が多かった。透析歴42年の超長期透析患者は透析アミロイドーシスによる高度の破壊性脊椎症による両下肢完全麻痺、高度の消化管拡張による腹部膨満（人工肛門造設）などを示し、剖検にて椎骨、消化管、肺などの高度のアミロイド沈着を認めた。

透析アミロイドーシス診断基準を適用すると、透析年数の増加と共に臨床診断例、臨床的疑い例が増加する傾向が確認された。炎症マーカーは、診断主要症状である骨関節症状や、臨床診断の判定と有意な関連を示さなかった。

β_2 -mアミロイド線維形成反応系に α 2Mを添加したところ、 α 2Mは濃度依存的にアミロイド線維形成を抑制した。 β_2 -mは α 2Mのテトラマーとダイマーに結合しており、特にダイマーと強く結合していた。

5) 脳アミロイドーシス：

①A β 沈着分子病態解明とAD診断治療法開発：ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いPVのA β 代謝への影響を検討したところ、A β 分泌の減少、細胞内APPの減少、および成熟化の変化を認めた。PICUP法によるA β オリゴマー形成抑制効果の検討では、エストリオール、エストラジオール、エ

ストロゲンの順でA β 40および42のオリゴマー形成を抑制したが、アンドロゲン、テストステロンは効果に乏しかった。APP遺伝子改変マウスへのA β 凝集体注入実験によりA β 凝集におけるapoEアイソフォーム特異的効果を検討したところ、E4存在下で形成させたプロトフィブリルの注入はE3のそれと較べて、脳内アミロイド蓄積量を増加させた。A β オリゴマーの構造と細胞毒性の関連の検討では、ダイマー、トライマー、テトラマーと数が増加するにつれて、 β シート構造が増加しseed活性や細胞毒性が増強した。Tau発現マウスTgTauP301LのCSFと血漿の68kD tauは脳の不溶性tau蓄積と関連した。Tg2576とTgTauP301Lのdouble transgenic mouseの解析ではTgTauP301Lと比較しリン酸化tauの蓄積が促進された。

AD患者のCSFがA β オリゴマー形成に与える影響を検討したところ、ヒトのCSFはA β 40および42のオリゴマー形成を抑制したが、抑制力はAD患者CSFが対照群よりも有意に弱かった。AD患者CSF中のA β オリゴマーの検討では、A β オリゴマー化の指標であるオリゴマー/モノマー比がAD群で対照群より有意に高かった。非認知症白内障患者の水晶体にA β を検出しA β x-42は 7.88 ± 18.67 pg/mgであった。MCI診断基準についての検討では、WMS-RのLogical Memory IIを採用するか否かによりMCIの診断数やADへの転化率に差が生じた。

②BRI2関連蛋白に関する研究：BRI2濃度をADと非AD変性疾患とで比較すると血中では差がなかったが、CSF中ではADで高い傾向を示した。CSF中にはBRI2分泌型より大きな分子型が存在した。

6) 老人性全身性アミロイドーシス (SSA)：181連続剖検例中SSAを6例に認めた。80歳以上では3/26 (11.5%)であった。SSA患者の生検の陽性率は、心筋生検が100%、消化管生検が38%、腹壁皮膚生検が33%であった。SSAの多くの例では、胸部CT上、小結節やすりガラス状陰影といった異常所見を認めた。

7) アミロイドーシスに共通する発症・伝播機構解明に基づく診断・予防・治療法開発等：

①アミロイドイメーシングに関する研究：AAアミロイドーシス臨床試験登録患者の消化管生検で

は、BF-227 陽性所見は 82 症例中 64 例にみられ、トシリズマブ投与開始 1 または 2 年後に 12 例中 6 例で改善がみられた。CAA 患者では大脳半球に、FAP 患者では心臓に BF-227 の取り込みがみられた。

② マウス老化アミロイドーシス及びウシアミロイドーシス伝播に関する研究: AApoAII が沈着するマウス老化アミロイドーシスモデルでは、4 ヶ月後に糞中にアミロイド線維が検出され 7 ヶ月後まで増加したが、15 ヶ月後にはほとんど検出されなかった。特に 7 ヶ月後の糞は伝播力が最強であり、そのアミロイド線維を解析すると C 末端 68-78 番目のアミノ酸配列が欠失している低分子サイズの apoA-II が検出された。ウシの AA アミロイドは 121°C 以上の熱処理でコンゴレッドおよびチオフラビンに対する染色性が著しく減衰したが、121°C 熱処理後のアミロイドの接種によりマウス 9 匹中 1 匹にアミロイドの沈着が誘発された。

③ シンポジウム開催・ガイドライン作成: 2011 年 1 月 27 日、スウェーデン・ウプサラ大学の Westermark 教授、ドイツ・チュービンゲン大学の Jucker 教授などを招聘し International Symposium on Transmission of Amyloidosis を東京で開催し、研究班内外から多数の研究者が参加した（詳細は別掲のプログラム参照）。一般医師向けにアミロイドーシス全体及び各病型の診断、治療法を解説した「アミロイドーシス診療ガイドライン 2010」を作成した。2010 年 12 月 20 日に発刊し、研究班ホームページ (<http://amyloid.umin.jp/>) 上に掲示した。

D. 考察

1) AL アミロイドーシス:

AL アミロイドーシスにおける線溶異常の解析では、PIC の定量が骨髄腫あるいは MGUS における本症の有無の診断に非常に優れた成績を示すこと、また全身性 AL アミロイドーシスから限局性 AL アミロイドーシスを鑑別するのも有用であることが明らかとなった。過剰線溶にはアミロイド沈着部位で観察される uPA 産生が関連しているものと思われるが、沈着したアミロイド線維がどのように関与しているのかを解明することが今後の課題である。

apoE E4 が AD の危険因子であることは確立して

いるが、AL アミロイドーシスでどうかは検討が不十分である。本研究において E4 の陽性率は 78.4% であり、日本人における E4 保有率の報告 13.5% と較べて明らかに高率であった。E4 は全身性 AL アミロイドーシスにおける強力な危険因子である可能性がある。

本症に対する治療では、HDM+ASCT 療法の有効性が注目され、適応例では治療の第一選択となっている。HDM+ASCT 群は非 ASCT 治療群と較べてよい治療成績を示したが、臓器障害の少ない軽症者が HDM+ASCT 群に選択されているため、解釈には慎重を要する。しかし、いずれの治療群でも FLC κ/λ 比を正常化することができれば生命予後と臓器機能障害を改善することができることが明らかになった。重篤な有害事象を防止し最大の治療効果を得るためには、化学療法前に臓器障害を正確に評価し最適な治療法を選択する必要がある。さらに、わが国における ASCT および非 ASCT 治療法の両者の治療成績と予後影響因子を明らかにすることを目的とした全国多施設共同研究を立案した。

HDM+ASCT 療法は、重篤な臓器障害がある場合、適応外となってしまうことが問題となる。そのため、AL 分科会では、BMD 療法の全国多施設臨床試験を推進中である。臨床試験における血清 FLC 測定の有用性と問題点を検討したところ、血清 FLC の測定は診断、予後予測ばかりでなく、臨床試験における治療効果判定に有用であることが明らかになった。一方でデータが正常範囲を示す症例があることが明らかになった。これらの症例に対する効果判定基準を確立することが今後の重要な課題である。

治療オプションとして、FLC を除去する HDF 療法を検討したところ、HDF 療法により血清 FLC は低値を維持し臓器障害は進行しないことが示された。HDM+ASCT の施行できない例において、有用な治療選択肢になる可能性がある。

2) AA アミロイドーシス:

AA 合併 RA 多数例の長期的な観察研究により、本症の診断時の臨床像の変化（高齢化、炎症マーカーの低下、頻度の減少）、予後の改善が明らかになった。これは感度の優れた消化管生検スクリーニングにより無症状あるいは早期に診断できるよう

になったこと、薬物療法が抗リウマチ薬単剤治療の時代から、メソトレキセート他の免疫抑制薬の使用、さらには生物学的製剤（抗サイトカイン療法）へと進歩してきたことに関連しているものと思われる。

本症に対する生物学的製剤の使用により、生命予後が有意に改善し、透析導入が減っていることが示された。また、AA 合併のリスクとされる SAA1.3 アリルは生物学製剤の治療効果には関連しなかった。AA 合併 RA では生物学的製剤がより有効であるとの知見が集積しつつある。最も強力に SAA を抑制するヒト化抗 IL-6 受容体抗体（トシズマブ）を用いた全国多施設臨床試験が進行中であり、その結果が待たれる（2012年終了予定）。

マウスモデルを用いた AA アミロイドーシスの基礎的研究では、脾臓に SAA と AA が沈着するが、SAA および高分子 AA はターンオーバーが早く、低分子 AA がアミロイドとして沈着していることが明らかになった。アミロイド特異的な分解、ターンオーバーの様式が示唆される。アミロイド（前駆体）蛋白の分解、沈着、除去の動態を理解し治療法を開発するために重要な知見である。

ヒトの母乳における SAA の存在を新たに見出した。母乳中の SAA の生理的な意義の解明は今後の課題であるが、自然免疫に関与し防御的に作用している可能性がある。

3) FAP :

非集積地の家族歴を認めない FAP は高齢発症で自律神経症状がめだたない例がしばしばあり、解離性感覚障害をほとんどみとめず、末梢神経線維脱落に小径優位という特徴がないなど、FAP の典型例とは臨床病理像が著しく異なることが確認された。そのため、CIDP などの他の末梢神経障害と誤診されていることも多い。腓腹神経生検でアミロイド沈着を認めない場合もある。心エコーなどで心障害を検出することは診断上有用である。TTR 遺伝子検索を積極的に行う必要がある。

肝移植前後での脂肪組織のアミロイドの解析から、肝移植によりアミロイドの退縮が実際に起こっていることが確認された。肝移植後は野生型 TTR の沈着が優位になってくることから、TTR アミロイドは融解と新たな沈着を繰り返しているものと考えられ、そのバランスにより沈着量は規定

されているものと推定される。変異型 TTR は野生型 TTR よりもアミロイド原性が高いため肝移植による変異型 TTR の除去によりアミロイド沈着量はダイナミックに減少していくものと思われる。変異型 TTR のみならず、野生型 TTR の沈着を抑制するような抗アミロイド療法を確立することが、FAP および SSA の治療法確立のために重要である。TTR 四量体安定化薬であり臨床試験で効果を示している diflunisal や tafamidis が肝移植以外の治療法として期待される。

FAP の霊長類モデルに関する研究では、アフリカミドリザルがヒト TTR アミロイドーシスの優れたモデル動物であることを見出した。興味深いことには、アフリカミドリザルの TTR の 122 番目のアミノ酸はイソロイシンであり、ヒトにおいては TTR Val122Ile が FAP に関連する変異であることと合致している。ヒト TTR アミロイドーシスを研究する上で、本サル種は貴重なモデル動物になるものと思われる。

4) 透析アミロイドーシス :

30 年前後の長期血液透析患者における手根管症候群の有無に関する検討では、手根管症候群の有無で血清 β_2 -m 濃度に有意差を認めなかった。透析療法の現況によると、1983 年に透析導入された患者の 26 年生存率は 15.6% であった。すなわち、今回の検討対象は全身状態が良好な一部の患者群であり、そうした一群においては手根管症候群の有無は血清 β_2 -m 濃度以外の因子が影響している可能性がある。透析歴 42 年の超長期透析患者の剖検を含む検討により、本症では骨関節病変ばかりでなく、消化器系病変を生じイレウスなどの重篤な症状を呈することが明らかとなった。長期透析例では消化器系合併症にも十分注意をする必要がある。

本研究班は世界で初めて本症の診断基準を作成し「アミロイドーシス診療ガイドライン 2010」に掲載した。多数の透析患者に本診断基準を適用すると、透析年数の増加と共に、本診断基準を満たす例が増加していき、本診断基準は信頼のおける診断方法と考えられた。慢性炎症が本症の発症を助長すると言われているが、炎症マーカーは主要症状である骨関節症状や診断基準による診断例と関連しなかった。従って、炎症マーカーを診断基準に取り入れる意義は少ないものと考えられる。

試験管内 β_2 -m 線維形成系を用いた実験で、細胞外シャペロンである $\alpha 2M$ が β_2 -m 線維形成を抑制することが明らかになった。 $\alpha 2M$ は生体内で β_2 -m アミロイド線維形成抑制に関与している可能性がある。こうした細胞外シャペロンの蛋白質品質管理機構を解明することは本症の予防・治療法の開発につながる。

5) 脳アミロイドーシス：

$A\beta$ 産生、凝集に関連する分子機構解明と制御法開発研究を行った。スタチンは細胞内 APP の減少および成熟化の変化を介して $A\beta$ 産生を抑制することが考えられた。エストロゲンが $A\beta$ オリゴマー形成抑制作用を有することを見出した。エストロゲンは生体内で AD 発症を抑制しており、類似化合物は予防治療薬候補になる可能性がある。マウスへの $A\beta$ 凝集体注入実験により、apoE はアイソフォーム特異的にプロトフィブリルの seed 効果を調節する可能性が示唆された。E4 は他と較べてアミロイド蓄積が進行しやすく、それが AD 発症促進に作用している可能性がある。 $A\beta$ オリゴマーの構造と細胞毒性の関連の検討では、オーダー依存性に seed としての構造活性や細胞毒性が増強することが明らかになり、その最初のステップであるモノマーからダイマーへの構造変化の抑制が最重要ターゲットと考えられた。各種遺伝子改変マウスを駆使した研究から、CSF tau は脳の不溶性 tau 蓄積と関連すること、 $A\beta$ 蓄積がリン酸化 tau の蓄積を促進することなどが明らかになった。

一方、患者 CSF を用いた研究で、AD 患者の CSF は $A\beta$ のオリゴマー化を促進すること、CSF 中ではオリゴマー/モノマー比が有意に高いことが明らかになった。オリゴマーあるいはオリゴマー化を促進する生体環境の検出は診断に有用であり、その抑制は治療の最重要標的と考えられる。また、非認知症白内障患者の水晶体に $A\beta$ が蓄積していることを見出した。今後、AD 患者での検討が必要である。MCI 診断基準の検討では、WMS-R の Logical Memory II は MCI から AD への転化の予測に有用であることなどが明らかになった。今後、こうした検討に基づき、臨床現場で使われる MCI 診断基準が標準化されることが望まれる。

AD における BRI2 の検討から、BRI2 は FBD/FDD ばかりでなく AD においても発症に何らかの関与

をしている可能性が考えられた。今後、 $A\beta$ 蓄積過程との相互作用などを解析していく必要がある。

6) 老人性全身性アミロイドーシス (SSA)：剖検例による SSA の頻度は 80 歳以上では 11.5% であり、欧米よりも低かった。生検では心筋に全例で陽性所見が得られたが、高齢者において比較的 안전한生検部位として、検出率を念頭においた上で消化管生検や腹壁皮膚生検も考慮すべきである。また、SSA で肺病変がみられることを初めて報告した。TTR アミロイド沈着の影響が疑われる。

7) アミロイドーシスに共通する発症・伝播機構解明に基づく診断・予防・治療法開発等：

BF-227 によるアミロイドイメーシング研究では、FAP 患者で心臓に陽性所見がみられた。脳アミロイドーシスではアミロイドイメーシング研究の成績が既に多数報告されている。本剤を用いたイメーシングは TTR アミロイド蓄積の評価にも有用であり、今後、抗アミロイド療法における治療効果の評価などへの応用が期待される。

AApoAII が沈着するマウス老化アミロイドーシスの伝播に関する研究では、伝播力が強く生化学的特性が異なる AApoAII アミロイド線維がアミロイドーシス発症中期の糞中に出現し、個体間の伝播に役割を果たしている可能性が考えられた。伝播力が強い分子種の構造特性の同定は、伝播メカニズムの解明とそれに基づく伝播予防法の開発のために極めて重要である。また、ウシの AA アミロイドは 121°C の熱処理後も、マウスへの伝播性 (amyloid enhancing factor 活性) が保持されていることが示された。牛肉等の食品等に含まれるアミロイドによるアミロイドーシス伝播あるいは促進現象が、実際にヒトで起こりうるかという重要な課題を、今後、疫学的研究を含め検証していく必要がある。

2011 年 1 月 27 日開催の International Symposium on Transmission of Amyloidosis では、Westermarck 教授、Jucker 教授などを交え、全身性アミロイドーシス及び脳アミロイドーシスの伝播について活発で有意義な討論を行った。このテーマは蛋白質 misfolding 病全体に共通するホットな問題として急速に研究が進展することが期待される。「アミロイドーシス診療ガイドライン 2010」を発刊した (2010 年 12 月 20 日)。本症ガイドラインの発刊は初めてのことであり、本ガイドラインがわが国

における本症の診療水準の向上に貢献し、本症の患者が早期に診断され最適な治療を受けるようになることが期待される。本領域の進歩は著しく、今後、定期的にガイドラインは改訂されていく必要がある。

E. 結論

病型ごとの戦略及び全病型に共通する課題の研究により、疫学病態調査、治療プロトコル確立、新規診断・予防・治療法開発等を行った。AL では PIC 測定の診断的有用性を確立し、HDM+ASCT 療法等の有用性を確認し、新規 BMD 療法による全国多施設臨床試験計画を推進、その他の治療オプションとして HDF の有用性を示した。AA では生物学的製剤導入による予後の改善が明らかになり、IL-6 受容体抗体トシリズマブによる世界初の AA 全国多施設臨床試験が進行した。FAP では非集積地の非典型例の診断法、肝移植後長期経過例の解析により TTR アミロイドが退縮していく過程を解明した。透析アミロイドーシスでは研究班による世界初の本症診断基準の信頼性を検証し、細胞外シャペロン $\alpha 2M$ が β_2 -m アミロイド線維形成を抑制している可能性を示した。脳アミロイドーシスでは A β オリゴマーの構造-毒性相関、AD 患者 CSF におけるオリゴマー形成促進、apoE アイソフォーム特異的なプロトフィブリル seed 効果の調節などを示した。SSA の実態を解明し肺病変の存在を初めて指摘した。アミロイドイメーシング開発では FAP の心臓におけるアミロイド蓄積を検出した。アミロイドーシスの伝播については、マウスにおける糞を介した伝播機構、ウシのアミロイドの伝播性の熱処理抵抗性などを報告した。International Symposium on Transmission of Amyloidosis (2011.1.17) を開催した。「アミロイドーシス診療ガイドライン 2010」を発刊した (2010.12.20)。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(主要原著論文のみを下に示す。発表の詳細は分担研究報告を参照のこと)

- 1) Song SN, Tomosugi N, Kawabata H, Ishikawa T, Nishikawa T, Yoshizaki K: Down-regulation of hepcidin resulting from long-term treatment with an anti-IL-6 receptor antibody (Tocilizumab) improves anemia of inflammation in multicentric Castleman's disease. *Blood* 116: 3627-3634, 2010.
- 2) Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y: In vivo visualization of α -synuclein deposition by [11C]-BF-227 PET in multiple system atrophy. *Brain* 133:1772-1778, 2010.
- 3) Qian J, Yan J, Ge F, Zhang B, Fu X, Tomozawa H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloid fibrils deposited in skeletal muscle exhibit amyloidosis-enhancing activity. *PLoS Pathogens* 6:e1000914, 2010.
- 4) Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf OM: Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 75:1766-1772, 2010.
- 5) Takagi S, Tominaga A, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T: Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the γ -secretase. *J Neurosci* 30:15943-15950, 2010.
- 6) Fukumoto H, Takahashi H, Tarui N, Matsui J, Tomita T, Hirode M, Sagayama M, Maeda R, Kawamoto M, Hirai K, Terauchi J, Sakura Y, Kakihana M, Kato K, Iwatsubo T, Miyamoto M: A non-competitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates A β pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:11157-11166, 2010.
- 7) Arima H, Yamashita S, Mori Y, Hayashi Y, Motoyama K, Hattori K, Takeuchi T, Jono H, Ando Y, Hirayama F, Uekama K: In vitro and in vivo gene delivery mediated by lactosylated dendrimer/ α -Cyclodextrin conjugates (G2) into hepatocytes. *J Control Release* 146:106-117, 2010.
- 8) Wang J, Ono K, Dickstein D, Arrieta-Cruz I, Zhao

- W, Qian X, Iamparello A, Ferruzzi MG, Pavlides C, Ho L, Hof P, Teplow DB, Pasinetti GM: Carvedilol as a potential novel agent for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, in press.
- 9) Kawaji T, Ando Y, Hara R, Tanihara H: Novel Therapy for Transthyretin-related Ocular Amyloidosis A Pilot Study of Retinal Laser Photocoagulation. *Ophthalmology* 17:552-555, 2010.
- 10) Ono K, Condrón MM, Teplow DB: Effects of the English (H6R) and Tottori (D7N) familial Alzheimer disease mutations on amyloid β -protein assembly and toxicity. *J Biol Chem* 285:23186-23197, 2010.
- 11) Watanabe N, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T: Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: participation of transmembrane domains 2 and 6 in the formation of initial substrate binding site of γ -secretase. *J Biol Chem* 285:19738-19746, 2010.
- 12) Yagi H, Ozawa D, Sakurai K, Kawakami T, Kuyama H, Nishimura O, Shimanouchi T, Kuboi R, Naiki H, Goto Y: Laser-induced propagation and destruction of amyloid β fibrils. *J Biol Chem* 285:19660-19667, 2010.
- 13) Ozawa D, Hasegawa K, Lee YH, Sakurai K, Yanagi K, Ookoshi T, Goto Y, Naiki H: Inhibition of β_2 -microglobulin amyloid fibril formation by α_2 -macroglobulin. *J Biol Chem*, in press.
- 14) Koike H, Kiuchi T, Iijima M, Ueda M, Ando Y, Morozumi S, Tomita M, Kawagashira Y, Watanabe H, Katsuno M, Shimoyama Y, Okazaki Y, Kamei H, Sobue G: Systemic but asymptomatic transthyretin amyloidosis 8 years after domino liver transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, in press.
- 15) Katoh N, Matsuda M, Tsuchiya-Suzuki A, Ikeda S: Regression of gastroduodenal amyloid deposition in systemic AL amyloidosis after intensive chemotherapies. *Brit J Haematol*, in press.
- 16) Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [11C]BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37:934-941, 2010.
- 17) Matsumoto L, Takuma H, Tamaoka A, Kurisaki H, Date H, Tsuji S, Iwata A: CpG demethylation enhances alpha-synuclein expression and affects the pathogenesis of Parkinson's disease. *PLoS One* 5:e15522, 2010.
- 18) Ono K, Yamada M: Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, in press.
- 19) Chatani E, Ohnishi R, Konuma T, Sakurai K, Naiki H, Goto Y: Pre-steady-state kinetic analysis of the elongation of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin with tryptophan mutagenesis. *J Mol Biol* 400:1057-1066, 2010.
- 20) Konuma T, Chatani E, Yagi M, Sakurai K, Ikegami T, Naiki H, Goto Y: Kinetic intermediates of β_2 -microglobulin fibril elongation probed by pulse-labeling H/D exchange combined with NMR analysis. *J Mol Biol* 405:851-862, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願・取得

山田正仁、小野賢二郎、内木宏延

1) 発明の名称：アルツハイマー病の検査方法

特許番号：特許第 4568840 号

取得日：平成 22 年 8 月 20 日

東海林幹夫

1) 発明の名称：アルツハイマー病の検査法、アルツハイマー病に対して治療効果を有する物質のスクリーニング方法およびアルツハイマー病の検査キット

出願番号：特願 2010-48003

出願日：平成 22 年 3 月 4 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし