

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590695

研究課題名（和文） 老人性全身性アミロイドーシスに対する TTR 蛋白安定化を介した新規薬物療法の確立

研究課題名（英文） New therapeutic strategies to ameliorate senile systemic amyloidosis by native state stabilization of TTR protein.

研究代表者

関島 良樹 (SEKIJIMA YOSHIKI)

信州大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60322715

## 研究成果の概要（和文）：

我々はまず、SSA の主症状の一つである CTS 患者における野生型 TTR アミロイド沈着の頻度を検討した。その結果、100 名中 34 名 (34%) に滑膜組織への野生型 TTR アミロイド沈着を認め、対照群に比べ有意に高頻度であった。また、「加齢」および「男性」がアミロイド沈着の独立した危険因子であることを明らかにした。

次に、SSA 患者に対するジフルニサルの有効性と安全性を検討した。その結果、ジフルニサルの投与を受けた SSA 患者は全例で血清中 TTR 濃度が上昇し TTR 四量体構造が安定化した。ジフルニサルの臨床効果の評価には長期間のランダム化比較試験が必要である。

## 研究成果の概要（英文）：

Firstly, we measured the frequency of unrecognised wild-type TTR deposition in idiopathic CTS patients. Thirty-four (34%) of 100 patients with idiopathic CTS showed amyloid deposition in the tenosynovial tissue, and all amyloid showed specific immunolabelling with anti-TTR antibody. Direct DNA sequencing of the entire TTR gene did not reveal any mutations, indicating that all amyloid deposits were derived from wild-type TTR. Statistical analysis using logistic regression showed that the prevalence of TTR deposition in the idiopathic CTS group was significantly higher than that in controls, and age and male gender were independent risk factors for TTR amyloid deposition.

Secondly, we screened already approved prescription drugs and selected diflunisal as a candidate drug for clinical trial, because its high serum concentration after oral administration leads to high TTR binding stoichiometry. We investigated the efficacy and safety of administration of diflunisal to SSA patients. Orally administered diflunisal significantly increased serum TTR concentration and stabilized TTR tetramer structure in each patient. Long-term randomized controlled trial is necessary to determine the clinical effects of diflunisal on SSA.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：老年医学

## 1. 研究開始当初の背景

老人性全身性アミロイドーシス(SSA)は高齢者に高頻度に認められる全身性アミロイドーシスで、変性した野生型トランスサイレチン(TTR)由来のアミロイドが心臓を中心とした全身臓器に沈着する予後不良な疾患である。海外の報告では80歳以上の剖検例の25%に心臓へのTTRアミロイドの沈着が認められると報告されているが、根本的な治療法が存在しないため積極的に診断されることは少ない。しかし、著しい高齢化が進行中である我が国において、SSA患者は多数存在しており今後も患者数は増加すると考えられる。以上から本疾患の根本的な治療法の開発は急務である。

TTRは血清中ではほとんどが四量体で存在し、throxineの輸送蛋白として機能している。また我々は、TTRがアミロイドとして全身に沈着するためには、四量体が単量体に解離し、更に変性することが必要であり、TTR四量体構造の安定化がアミロイドーシス治療において重要である可能性を見いだした。*In vitro*ではTTRはリガンドであるthroxineに結合すると、四量体構造が安定化されアミロイド線維形成が抑制されるが、生体内ではTTRの99%以上がthroxineと結合しない状態で存在している。そこで、throxine結合部位に結合する薬剤を用いて四量体構造を安定化させ、アミロイド線維形成を阻害しようというのが我々のSSAに対する薬物治療の戦略である。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでの研究を発展させ、研究期間内に以下の点を明らかにすることを目標とした。

- (1) これまで明らかになっていないSSAの臨床的な頻度を明らかにする。
- (2) 既に認可されている薬剤(低分子化合物)のTTR安定化作用・アミロイド線維形成阻害作用を幅広く検討し、野生型TTRを最も強力に安定化する薬剤を特定する。
- (3) *In vitro*で最も有効であった低分子化合物を用いてSSA患者の治療を行い、安全性および臨床的効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) SSAの臨床的な頻度.

SSAの主症状の一つであるCTSを有する患者におけるSSAの頻度を検討した。対象は手根管開放術を受けた128名のCTS患者の中で特発性CTSと診断された100名(平均年齢67.3±12.1歳, 男性26名, 女性74名)。手根管開放術時に滑膜組織を採取し、コンゴールレッド染色および免疫組織染色を行った。免疫染色で抗TTR抗体陽性であった場合はTTR遺伝子の検

索を行った。対照として生前にCTSを認めなかった献体例における手根管組織を検討し、ロジスティック解析を用いて統計学的に検討した。

### (2) 野生型TTRを安定化する薬剤の検討.

野生型TTR遺伝子をコードするpmmHαプラスミドを用いて野生型TTRを大腸菌に発現させ精製した。これらの遺伝子組み替えTTRを用い、低分子化合物の野生型TTRに対する四量体安定化作用およびアミロイド線維形成阻害効果を検討した。スクリーニングする低分子化合物については、既に認可されている薬剤の中からTTRとの親和性が高いと予想されるベンゼン環を2個有する薬剤を選択した。四量体安定化作用の測定は、変性ストレスとして尿素を用い、蛍光分光高度計を用いて変性をモニターした。アミロイド線維形成阻害作用の評価には、酢酸バッファーおよび50%メタノールバッファーを用い、thioflavine T assay および turbidity (OD400) assay で線維形成をモニターした。

(3) 低分子化合物のSSAに対する臨床的効果. SSA患者に低分子化合物を経口投与し安全性および有効性を評価した。安全性については、一般診察に加え、血算、肝・腎機能検査を定期的に行った。臨床効果については、Modified Body Mass Index, 神経伝導速度, 心臓超音波, 血清BNP, hANP, 腹壁脂肪吸引生検, Tc-99m-pyrophosphate心筋シンチグラフィ, 血清中TTR四量体の安定性, 血清中TTR濃度を用いた。

## 4. 研究成果

手根管症候群開放術を施行された患者の免疫組織学的解析を行った結果、特発性CTS患者100名中34名(34.0%)に滑膜組織へのアミロイド沈着を認め、その全てがTTR由来のアミロイドであった。更に、TTR遺伝子の解析で全例が野生型TTR由来のアミロイドであることを確認した。また、対照として生前にCTSを認めなかった剖検患者32名の手根管組織の検討も行いロジスティック回帰分析を用いて統計学的に解析したところ、特発性CTS患者群では対照群に比べ有意にアミロイド陽性率が高く(オッズ比15.8, 95%信頼区間3.3-75.7), 「加齢」および「男性」が手根管への野生型TTRアミロイド沈着の独立した危険因子であることが明らかになった。この知見は、野生型TTRアミロイド沈着が高齢男性のCTSの主要な原因となっていることを示した初めての知見であり、2011年のアメリカ神経学会年次総会でもhighlight in the fieldとして取り上げられた。

野生型TTR蛋白の構造を安定化する低分子化合物については、既に認可されている薬剤をスクリーニングしたところ、非ステロイド系消炎鎮

痛剤の一つである diflunisal が *in vitro* で最も強力な効果を有していた。そこで SSA 患者に対して、diflunisal を用いた臨床試験を開始した。その結果、diflunisal の経口投与を受けた SSA 患者全例で血清中 TTR 濃度の上昇と TTR 四量体構造の安定化を認めた。また現在までに問題となる有害事象は認められていない。現在、長期的な臨床効果の評価を継続している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Tsuchiya-Suzuki A, Yazakia M, Kametani F, Sekijima Y, Ikeda SI. Wild-type transthyretin significantly contributes to the formation of amyloid fibrils in familial amyloid polyneuropathy patients with amyloidogenic transthyretin Val30Met. *Hum Pathol* 42: 236-43, 2011, 査読有り
2. Sekijima Y, Uchiyama S, Tojo K, Sano K, Shimizu Y, Imaeda T, Hoshii Y, Kato H, Ikeda SI. High prevalence of wild-type transthyretin deposition in patients with idiopathic carpal tunnel syndrome: a common cause of carpal tunnel syndrome in the elderly. *Hum Pathol*, 2011, in press, 査読有り
3. Tojo K, Tsuchiya-Suzuki A, Sekijima Y, Morita H, Sumita N, Ikeda S. Upper limb neuropathy such as carpal tunnel syndrome as an initial manifestation of ATTR Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid* 17:32-5, 2010, 査読有り
4. 関島良樹: 家族性アミロイドポリニューロパチーの病因と治療戦略. *神経治療学* 27: 801-807, 2010, 査読なし
5. Ueda M, Misumi Y, Mizuguchi M, Nakamura M, Yamashita T, Sekijima Y, Ota K, Shinriki S, Jono H, Ikeda SI, Suhr OB, Ando Y. SELDI-TOF MS evaluation of variant transthyretins for diagnosis and pathogenesis of familial amyloidotic polyneuropathy. *Clin Chem* 55:1223-7, 2009, 査読有り
6. Sekijima Y, Yoshida K, Tokuda T, Ikeda S-I (updated September 2009) Familial Transthyretin Amyloidosis in: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, Seattle. 1993-2009. Available at <http://www.genetests.org>, 査読なし
7. 関島良樹: TTR アミロイド沈着の分子機構とその抑制. *医学のあゆみ* 229:349-356, 2009, 査読なし
8. Tojo K, Sekijima Y, Machida K, Tsuchiya A, Yazaki M, Ikeda SI. Amyloidogenic transthyretin Val30Met homozygote showing unusually early-onset familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve* 37: 796-803, 2008, 査読有り
9. Kodaira M, Sekijima Y, Tojo K, Tsuchiya A, Yazaki M, Ikeda S, Hoshii Y, Tachibana S. Non-senile wild-type transthyretin systemic amyloidosis presenting as bilateral carpal tunnel syndrome. *J Peripher Nerv Syst* 13: 148-50, 2008, 査読有り
10. Sekijima Y, Kelly JW, Ikeda S. Pathogenesis of and therapeutic strategies to ameliorate the transthyretin amyloidoses. *Curr Pharm Des* 14:3219-30, 2008, 査読なし
11. 小平農, 関島良樹, 武井洋一, 土屋彩子, 東城加奈, 矢崎正英, 森田洋, 吉田邦広, 星井嘉信, 池田修一: 手根管症候群を呈した野生型トランスサイレチンアミロイドーシス4例の臨床像の検討. *末梢神経* 19:54-63, 2008, 査読有り
12. 関島良樹: 蛋白質ミスフォールディング病の発症機序と治療戦略. *信州医学雑誌* 56: 115-124, 2008, 査読なし
13. 関島良樹, 吉田邦広: 家族性アミロイドポリニューロパチーの遺伝子診断. *神経内科* 69: 513-521, 2008, 査読なし

[学会発表] (計 22 件)

1. 関島良樹 (招待講演). FAP を中心とした遺伝性ニューロパチー. 日本人類遺伝学会第 55 回大会. 2010/10/27~2010/10/30, 大宮
2. 関島良樹 (招待講演). 蛋白質天然構造の安定化を介したアミロイドーシス治療の試み. J-CAN (Japanese Consortium for Age-related Neurodegenerative disorders), 2010/8/28, 東京.
3. 関島良樹 (招待講演). 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の病因と治療戦略. 第 28 回日本神経治療学会総会, 2010/7/15~2010/7/16, 横浜.
4. 関島良樹 (招待講演). Familial amyloid polyneuropathy: Diflunisal. 第 51 回日本神経学会総会 (国際シンポジウム), 2010/5/20~2010/5/22, 東京.
5. 関島良樹, 内山茂晴, 東城加奈, 佐野健司, 清水雄策, 加藤博之, 池田修一. 特発性手根管症候群患者における老人性全身性アミロイドーシスの有病率. 第 51 回日本神経学会総会, 2010/5/20~2010/5/22, 東京.
6. Sekijima Y, Uchiyama S, Tojo K, Sano K, Shimizu Y, Imaeda T, Hoshii Y, Kato H, Ikeda SI. Prevalence of Senile Systemic Amyloidosis in Patients with Idiopathic Carpal Tunnel Syndrome. The XII International Symposium on Amyloidosis, 2010/4/18~2010/4/21, Rome.
7. Tojo K, Sekijima Y, Morita H, Koyama J,

- Suzuki A, Yazaki M, Ikeda SI. Efficacy and safety of long-term administration of diflunisal to familial amyloid polyneuropathy patients. The XII International Symposium on Amyloidosis, 2010/4/18~2010/4/21, Rome.
8. 内山茂晴, 関島良樹, 佐野健司, 今枝敏彦, 加藤博之, 池田修一. 特発性手根管症候群と屈筋腱滑膜へのアミロイド沈着の有意な関連. 第53回日本手外科学会, 2010/4/15~2010/4/17, 新潟.
  9. Sekijima Y (招待講演). Pathogenesis of and therapeutic strategies to ameliorate the transthyretin amyloidoses. International Symposium on Amyloidogenesis and Anti-Amyloid Therapies, 2010/1/28, Tokyo.
  10. 関島良樹 (招待講演). Native state stabilization を用いたアミロイドーシス治療. 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 2009/7/13~2009/7/14, 大阪.
  11. 関島良樹. FAPに対する Diflunisal を用いた治療の長期効果の検討. 第 50 回日本神経学会総会, 2009/5/20~2009/5/22, 仙台.
  12. 鈴木彩子, 矢崎正英, 関島良樹, 池田修一. 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) における野生型 TTR 関与の臓器間比較. 第 50 回日本神経学会総会, 2009/5/20~2009/5/22, 仙台.
  13. 関島良樹, 古庄知己, 和田敬仁, 涌井敬子, 櫻井晃洋, 福嶋義光, 東城加奈, 池田修一. 本邦における家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の地理的分布および臨床像についての検討. 日本人類遺伝学会第 53 回大会. 2008/9/27~2008/9/30, 横浜.
  14. Sekijima Y, Tojo K, Morita H, Koyama J, Uchiyama T, Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Ikeda S. Long-term effects of diflunisal on familial amyloid polyneuropathy. VIIth International Symposium on Familial Amyloid Poloneuropathy, 2008/9/2~2008/9/5, London.
  15. Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Sekijima Y, Takei Y, Ikeda S, Kametani F. The contribution of wild-type TTR to abdominal fat amyloid in FAP patients: an age-related change. VIIth International Symposium on Familial Amyloid Poloneuropathy, 2008/9/2~2008/9/5, London.
  16. Ikeda S, Tojo K, Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Sekijima Y, Koyama, Hoshi Y. TTR-derived amyloid deposition on punched skin biopsy in patients with senile systemic amyloidosis. VIIth International Symposium on Familial Amyloid Poloneuropathy, 2008/9/2~2008/9/5, London.
  17. Tojo K, Sekijima Y, Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Ikeda S. Val30Met transthyretin (TTR) gene dosage effects on the phenotypes of familial amyloid polyneuropathy. VIIth International Symposium on Familial Amyloid Poloneuropathy, 2008/9/2~2008/9/5, London.
  18. Yazaki M, Tsuchiya-Suzuki A, Sekijima Y, Takei Y, Ikeda S, Kametani F. The presence of wild-type TTR in gastroduodenal mucosal amyloid in FAP patients. VIIth International Symposium on Familial Amyloid Poloneuropathy, 2008/9/2~2008/9/5, London.
  19. 池田修一, 東城加奈, 土屋彩子, 矢崎正英, 関島良樹. 脳梗塞が初発症状となった老人性全身性(心)アミロイドーシス患者の臨床像. 第 49 回日本神経学会総会, 2008/5/15~2008/5/17, 横浜.
  20. 東城加奈, 土屋彩子, 矢崎正英, 関島良樹, 武井洋一, 池田修一. FAP の分布および臨床像についての検討. 第 49 回日本神経学会総会, 2008/5/15~2008/5/17, 横浜.
  21. 土屋彩子, 矢崎正英, 亀谷富由樹, 武井洋一, 関島良樹, 池田修一. FAP 患者における腹壁および胃アミロイドにおける野生型 TTR の関与. 第 49 回日本神経学会総会, 2008/5/15~2008/5/17, 横浜.
  22. 小平農, 土屋彩子, 東城加奈, 矢崎正英, 関島良樹, 武井洋一, 森田洋, 池田修一. 野生型トランスサイレチン由来アミロイドに伴う手根管症候群の臨床像検討. 第 49 回日本神経学会総会, 2008/5/15~2008/5/17, 横浜.
- ## 6. 研究組織
- (1)研究代表者
    - 関島 良樹 (SEKIJIMA YOSHIKI)
    - 信州大学・医学部附属病院・准教授
    - 研究者番号:60322715
  - (2)研究分担者
    - 森田 洋 (MORITA HIROSHI)
    - 信州大学・医学部附属病院・准教授
    - 研究者番号:10262718
    - 小山 潤 (KOYAMA JUN)
    - 信州大学・医学系研究科・准教授
    - 研究者番号:10303463