

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07905

研究課題名（和文）FAPの新規疾患修飾療法を最大限活かすサロゲートマーカーと発症予兆検知指標の確立

研究課題名（英文）Establishment of surrogate markers and indicators for disease onset to maximize the effect of novel disease-modifying therapies for TTR-FAP

研究代表者

増田 曜章（Masuda, Teruaki）

大分大学・医学部・講師

研究者番号：50464459

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：TTR-FAPの早期診断、進行度評価、治療効果判定に有用な新規サロゲートマーカーの開発を行った。本研究で用いた発汗機能解析法はアミロイドニューロパチーによる発汗機能障害を正確かつ迅速に検出でき、電気化学皮膚コンダクタンスが、病理組織学的な皮神経脱落、神経生理検査異常、臨床症候を反映することを、はじめて明らかにした。さらにアミロイドーシスによる臓器障害を早期から捉える複数の血液バイオマーカーを同定した。特に本研究で用いた発汗機能解析法は、TTR-FAPのみならず、ALアミロイドーシスやシエグレン症候群などでも小径線維の異常を同定でき、様々な末梢神経障害の診断に極めて有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてTTR-FAPの早期診断および病態評価に有用な複数の新規バイオマーカー候補を明らかにした。特に本研究で用いた発汗機能解析法は、小径線維障害に起因する臨床症状、病理組織学的変化および生理学的変化をそれぞれ反映していた。そのため、アミロイドニューロパチーのみならず、他の末梢神経障害疾患においても、小径線維ニューロパチーに伴う感覚障害や自律神経障害で悩まれている患者に、本解析法を応用することで、診断精度の向上、早期治療、ひいては患者のQOL向上につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated novel surrogate markers for early diagnosis, assessment of the disease progression, and determination of treatment efficacy in patients with TTR-FAP. The sudomotor testing used in this study can accurately and rapidly detect sweat gland dysfunction due to amyloid neuropathy, and electrochemical skin conductance was shown to reflect histopathological cutaneous denervation, neurophysiologic abnormalities, and clinical manifestations. Additionally, we have identified multiple blood biomarkers that effectively capture organ damage during the initial stages of amyloidosis. Notably, the sudomotor testing can identify small fiber damages not only in TTR-FAP but also in AL amyloidosis and Sjogren's syndrome, etc. Thus, it is extremely useful for the diagnosis of various peripheral neuropathy.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：小径線維ニューロパチー 発汗機能解析 アミロイドーシス 自律神経障害 表皮内神経密度 トランスサイレチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス (hereditary transthyretin (ATTRv) amyloidosis/トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー (transthyretin-type familial amyloid polyneuropathy: TTR-FAP) は、TTR の遺伝子変異により生じる代表的な遺伝性全身性アミロイドーシスである。本症の治療法として、1990年代から異型 TTR の産生抑制を目的として施行されてきた肝移植療法が長らく第一選択であったが、2013年からは四量体安定化薬が、2019年からは TTR の遺伝子発現の抑制を目的とした small interfering RNA (siRNA) 療法が、それぞれ実用化され、本邦では肝移植療法は施行されなくなった。さらに TTR gene editing 療法の開発もすすんでおり、新たな disease modifying therapy (DMT) の出現とともに、本症の治療環境は目覚ましく変化・発展してきている。新規 DMT は、いずれも早期治療介入が最も進行抑制効果を示すため、本症の早期診断の重要性が増している。本症は、末梢神経、心臓、消化管、眼などの全身諸臓器の細胞外にアミロイド沈着が生じ、多彩な臨床症候を呈するが、温痛覚障害や自律神経障害などの小径線維ニューロパチー (small fiber neuropathy: SFN) で発症する症例が最も多いため、SFN の評価が重要となる。研究代表者は過去 5 年間、小径線維ニューロパチーに関する研究を継続しており、「小径線維ニューロパチーにおける革新的な評価法の確立と新たな診断マーカーの探索」(2015~2017 年度、若手研究(B))、そして「新視点に基づく FAP の超早期診断法の確立」(2018~2019 年度、若手研究) に努めた。これらの研究の成果として、皮神経に着目した病理学的検査法や小径線維障害を反映する自律神経機能検査が TTR-FAP の超早期診断の核となることを明らかにしてきた。しかし、最も信頼性が高いとされる皮神経障害の病理組織学的解析法は、検査が煩雑で解析まで時間がかかる (3-4 日程度)、限られた施設でしか施行できない、低侵襲ではあるが、繰り返し行った場合に傷跡が残ってしまうなど、実臨床への応用に向けて解決すべき課題が認められている。

2. 研究の目的

過去の研究代表者自身の若手研究 (B) (2015~2017 年度)、および若手研究 (2018~2019 年度) の内容を、新知見を加えて更に発展させるために、本研究では、(1) 自身がこれまで確立した皮神経に着目した病理学的検査法を上回る、TTR-FAP の小径線維ニューロパチーに関するハイスループットスクリーニング法の確立、(2) 早期診断、早期治療に有用な発症の予兆を捉える血液バイオマーカーの確立、(3) 新規 DMT についての正確、かつ簡便なサロゲートマーカーの確立、を目的として行った。さらには、本研究で検討した手法が他のアミロイドニューロパチーなど SFN を引き起こす他疾患に応用ができないかを追加検討をした。

3. 研究の方法

本研究では、TTR-FAP 患者、未発症 TTR 遺伝子異常保因者、健常人ボランティア、疾患対照患者 (野生型トランスサイレチン (ATTRwt) アミロイドーシス、AL アミロイドーシス、シエーグレン症候群など、SFN を認める疾患) を対象として、以下の項目を中心に研究を行った。

(1) 発汗機能解析

小径線維障害に伴う症状の中でも、最も早期から出現する症候の一つである発汗機能障害に着目し、全国の研究施設に先立ち導入した最新の発汗機能検査機器である SUDOSCAN (Impeto Medical, Paris, France) を用いて発汗機能を、以下の方法で解析した。

ステンレススチール電極に両手掌および両足底をのせて低電圧 (4V 未満) をかける。

汗腺から放出された Cl⁻ が引きつけられ、Cl⁻ とステンレススチール電極のニッケルとの間で電気化学反応がおこり、電気化学皮膚コンダクタンス: Electrochemical Skin Conductance (ESC) を測定 (単位: microsiemens (μS)) する。

両手掌、両足底での測定値の平均をそれぞれ、hands ESC、feet ESC と定義する。

(2) 末梢神経障害の定量的評価

大径神経障害の評価目的にて代表的検査法である神経伝導検査を、小径線維障害の評価目的としては、CASE-IV を用いた温痛覚閾値の評価 (定量的感覚検査) を、臨床的指標の評価としては、FAP Kumamoto clinical score を用いて、それぞれ末梢神経障害の重症度評価を行った。

(3) バイオマーカーの検討

小径線維ニューロパチーおよびアミロイドーシスに伴う臓器障害を反映する新規バイオマーカー探索のため、血清ニューロフィラメント、GDF-15 など複数の候補物質を測定した。また特異的抗 TTR 抗体を用いた血中および生検皮膚組織の新規測定法の開発を行った。

(4) 皮神経障害の病理学的解析

下腿腓腹部 (外踝より 10cm 上方) から 3mm パンチ皮膚生検にて採取した皮膚を、抗 PGP

9.5 抗体および抗 Collagen-IV 抗体で免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、表皮内神経線維密度 (intraepidermal nerve fiber density: IENFD)、汗腺周囲神経線維密度 (sweat gland nerve fiber density: SGNFD) など皮神経障害を定量的に解析した。

4. 研究成果

健康人ボランティアに比べて、TTR-FAP 患者では feet ESC や hands ESC の低下を認め (図 1)、V30M 変異のみならず、非 V30M 変異の TTR-FAP 患者においても低下していた。特に hands ESC に比べて、feet ESC の低下が顕著であったのは、TTR-FAP が下肢末梢優位のニューロパチーの病型をとることが多いためと考えた。また、feet ESC は、自律神経障害の重症度、感覚障害の重症度、温痛覚閾値、IENFD、その他 (腓腹神経 SNAP など神経伝導検査のパラメーター)、とそれぞれ相関を認めることが明らかとなった (図 2)。さらに、神経伝導検査など従来のニューロパチーの評価法では異常が捉えられない発症早期の症例においても、feet ESC は低下しており、TTR-FAP のニューロパチーの早期診断に有用であると考えられた。SUDOSCAN は、3 分間程度で簡便に行える評価法であり、従来の定量的感覚検査、病理組織学的解析、神経伝導検査に比べて、非侵襲的で、迅速かつ簡便な評価法であり、TTR-FAP のニューロパチーの進行度評価法として極めて有用であると考えた。一方で、未発症 TTR 遺伝子異常保因者 (未発症キャリア) の段階では feet ESC や hands ESC の低下は示さないことが明らかとなった。これまでの研究代表者が先行研究として報告したように、IENFD が、未発症 TTR 遺伝子異常保因者の段階から異常を認める点を考慮すると、超早期診断の観点では、本研究の発汗機能解析は、IENFD より早期から小径線維障害を反映する評価法ではないが、未発症 TTR 遺伝子異常保因者に比べると、TTR-FAP の feet ESC は優位に低下することから、TTR-FAP のニューロパチー発症のバイオマーカーになりうる。また、siRNA 療法など新規 DMT 治療の導入前後での測定など経時的に評価したところ、症状改善症例では feet ESC も改善するなど、feet ESC は病勢に一致して推移しており、TTR-FAP の治療モニタリングにも有用であることが明らかとなった。

血清バイオマーカーの検討では、最も信頼性の高いと考えられる NF-L と同様に、より測定が簡便な pNF-H においても健康人ボランティアと比較して、TTR-FAP 患者では有意に上昇していた。pNF-H は感覚障害の重症度、自律神経障害の重症度、温痛覚閾値と相関を示したが、IENFD とは相関を示さなかった。また、未発症 TTR 遺伝子異常保因者の段階では上昇は認めなかった。その他、血中および生検皮膚組織内のミスフォールド TTR の評価法の確立も目指したが、臨床応用できる精度の高い測定系の確立はできなかった。その他、血漿中 GDF-15 の検討では、小径線維障害度と相関は示さなかったものの、BNP、高感度トロポニン T、IVSTd (拡張末期心室中隔壁厚) など、様々な心アミロイドーシスのバイオマーカーと相関を示した。また、GDF-15 は、BNP、高感度トロポニン T とは異なり、未発症 TTR 遺伝子異常保因者の段階から上昇しており、超早期診断に有用な新規バイオマーカー候補であることを明らかとした。

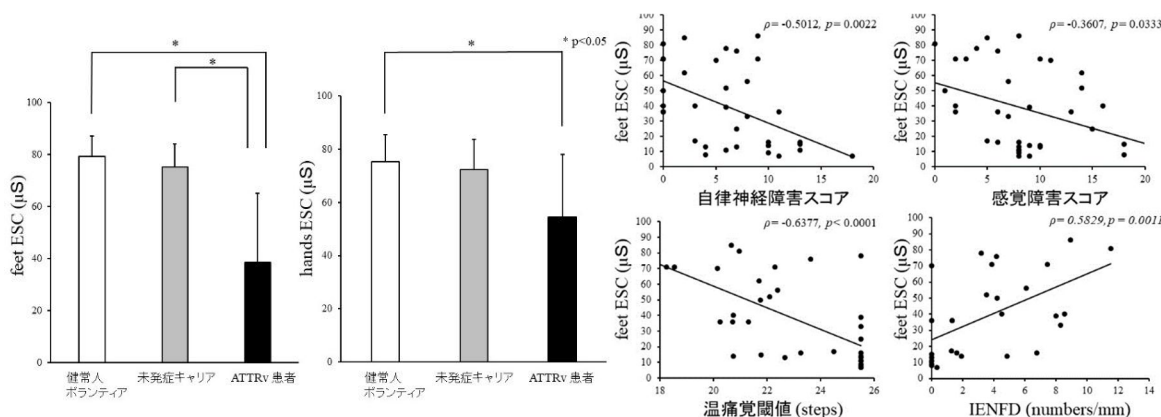


図1: ATTRvにおける発汗機能低下

図2: Feet ESC と臨床パラメーターとの関連

さらに、本研究では、TTR-FAP 以外のアミロイドニューロパチーを引き起こす AL アミロイドーシス、ATTRwt アミロイドーシスを疾患対照群として検討を行ったところ、AL アミロイドーシスは TTR-FAP と同様に高度に feet ESC 低下を認めた。一方、野生型 TTR が原因となる ATTRwt アミロイドーシスでは一部の症例では低下は認めるものの、その程度は TTR-FAP よりは軽微であることが多く、アミロイドニューロパチーでも SFN の障害度に差があることがわかった。さらに、シェーグレン症候群や血管炎性ニューロパチーなど他の末梢神経障害疾患でも feet ESC は低下しており、feet ESC の解析は、様々なニューロパチーを引き起こす疾患に、広く臨床応用できる可能性が示唆された。

以上、本研究において、TTR-FAP の早期診断および病態評価に有用な新規サロゲートマーカー候補の探索を行った。特に、本研究で用いた発汗機能解析は、非侵襲的で簡便かつ、繰り返し施行可能であり、SFN の進行度評価に極めて有用であること、さらにアミロイドニューロパチーによる皮神経脱落の病理組織学的変化を反映することを、我々がはじめて明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inoue Yasuteru, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Ando Yukio, Ueda Mitsuharu	4. 巻 762
2. 論文標題 Metformin attenuates vascular pathology by increasing expression of insulin-degrading enzyme in a mixed model of cerebral amyloid angiopathy and type 2 diabetes mellitus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136136 ~ 136136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2021.136136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsushita Hiroaki, Isoguchi Aito, Okada Masamitsu, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Tsutsui Chiharu, Yamaguchi Narumi, Ichiki Yuko, Sawashita Jinko, Ueda Mitsuharu, Mizuguchi Mineyuki, Ando Yukio	4. 巻 7
2. 論文標題 Glavonoid, a possible supplement for prevention of ATTR amyloidosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08101 ~ e08101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e08101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima Naoya, Takashio Seiji, Morioka Mami, Nishi Masato, Hirakawa Kyoko, Hanatani Shinsuke, Masuda Teruaki, Ueda Mitsuharu, Tsujita Kenichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Preclinical diagnosis of wild-type transthyretin amyloid cardiomyopathy in a patient undergoing carpal tunnel release	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 250 ~ 253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jccase.2021.04.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikura Hidehiko, Kitakata Hiroki, Endo Jin, Moriyama Hidenori, Sano Motoaki, Tsujikawa Hanako, Sawano Mitsuaki, Masuda Teruaki, Ohki Takahiro, Ueda Mitsuharu, Kosaki Kenjiro, Fukuda Keiichi	4. 巻 65
2. 論文標題 Three patients of transthyretin amyloidosis in a Japanese family with amyloidogenic transthyretin Thr49Ser (p.Thr69Ser) variant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 104451 ~ 104451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmg.2022.104451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada Masamitsu, Misumi Yohei, Masuda Teruaki, Takashio Seiji, Tasaki Masayoshi, Matsushita Hiroaki, Ueda Akihiko, Inoue Yasuteru, Nomura Toshiya, Nakajima Makoto, Yamashita Taro, Shinriki Satoru, Matsui Hirotaka, Tsujita Kenichi, Ando Yukio, Ueda Mitsuharu	4. 巻 8
2. 論文標題 Plasma growth differentiation factor 15: a novel tool to detect early changes of hereditary transthyretin amyloidosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 1178 ~ 1185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.13176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsushita Hiroaki, Isoguchi Aito, Okada Masamitsu, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Ichiki Yuko, Ueda Mitsuharu, Ando Yukio	4. 巻 25
2. 論文標題 Amyloid fibril formation is suppressed in microgravity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100875 ~ 100875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tasaki Masayoshi, Okada Masamitsu, Yanagisawa Akihiro, Nomura Toshiya, Matsushita Hiroaki, Ueda Akihiko, Inoue Yasuteru, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Yamashita Taro, Nakamura Takayuki, Miyamoto Takeshi, Obayashi Konen, Ando Yukio, Ueda Mitsuharu	4. 巻 28
2. 論文標題 Apolipoprotein AI amyloid deposits in the ligamentum flavum in patients with lumbar spinal canal stenosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13506129.2020.1858404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ma Yihong, Ueda Mitsuharu, Ueda Akihiko, Shinriki Satoru, Nagatoshi Akihito, Isoguchi Aito, Okada Masamitsu, Tasaki Masayoshi, Nomura Toshiya, Inoue Yasuteru, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Yamashita Taro, Matsui Hirotaka, Ando Yukio	4. 巻 415
2. 論文標題 Novel dot-blot assay for detection of vascular Notch3 aggregates in patients with CADASIL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 116931 ~ 116931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2020.116931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増田曜章
2. 発表標題 変わりゆくATTRvアミロイドーシスの 診断と治療
3. 学会等名 第162回日本神経学会東海北陸地方会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田曜章
2. 発表標題 ATTRアミロイドーシスの早期診断の実践
3. 学会等名 第8回日本アミロイドーシス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田曜章
2. 発表標題 変わりゆくATTRvアミロイドーシスの 診断と治療～最適な治療を目指して～
3. 学会等名 第32回 日本末梢神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田曜章
2. 発表標題 遺伝性神経難病の診断・治療の歩みと発展 ～トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチーをテーマに～
3. 学会等名 第26回日本難病看護学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田曜章、三隅洋平、村上華純、野村隼也、岡田匡充、井上泰輝、田崎雅義、大林光念、安東由喜雄、植田光晴
2. 発表標題 アミロイドニューロパチーにおけるSUDOSCANを用いた発汗機能解析と臨床指標との関連
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田 曜章, 三隅 洋平, 野村 隼也, 岡田 匡充, 井上 泰輝, 大林 光念, 安東 由喜雄, 植田 光晴
2. 発表標題 新手法:SUDOSCANを用いたトランスサイレチンアミロイドニューロパチーの病態解析
3. 学会等名 第31回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田 曜章, 植田 光晴, 三隅 洋平, 野村 隼也, 岡田 匡充, 井上 泰輝, 田崎 雅義, 山下 太郎, 大林 光念, 安東 由喜雄
2. 発表標題 Sudoscanによる遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスの発汗機能解析の有用性
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田曜章, 三隅洋平, 村上華純, 野村隼也, 岡田匡充, 井上泰輝, 大林光念, 安東由喜雄, 植田光晴
2. 発表標題 遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスの小径線維ニューロパチー評価の新手法: Sudoscanの有用性の検討
3. 学会等名 第50回日本神経生理学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東将希、増田曜章、三隅洋平、松原崇一朗、植田光晴
2. 発表標題 SUDOSCANを用いたシェーグレン症候群関連ニューロパチーの治療効果判定
3. 学会等名 第39回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 増田曜章、安東由喜雄	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 126
3. 書名 脳神経内科 96巻, アミロイドーシスの血圧調節障害と自律神経障害	

1. 著者名 安東 由喜雄, 磯口 藍斗, 一木 裕子, 井上 泰輝, 植田 光晴, 大林 光念, 岡田 匡充, 城野 博史, 田崎 雅義, 野村 隼也, 増田 曜章, 松下 博昭, 三隅 洋平, 山下 太郎, 渡邊 礼美	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学と看護	5. 総ページ数 136
3. 書名 21世紀の疾患: 神経関連アミロイドーシス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植田 光晴 (Ueda Mitsuharu) (60452885)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安東 由喜雄 (Ando Yukio) (20253742)	長崎国際大学・薬学部・教授 (37303)	
研究分担者	大林 光念 (Obayashi Konen) (90361899)	熊本大学・大学院生命科学研究部（保）・教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関