

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591074

研究課題名（和文） 免疫グロブリン関連アミロイドニューロパチーにおける遊離軽鎖の神経毒性に関する研究

研究課題名（英文） Neurotoxicity of serum free light chains in patients with immunoglobulin-related amyloid polyneuropathy

研究代表者

松田 正之（MATSUDA MASAYUKI）

信州大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50239042

研究成果の概要（和文）：免疫グロブリン関連アミロイドーシスにおける血漿遊離軽鎖（free light chain, FLC）の神経毒性について検討した。精製 FLC の存在下でラット後根神経節細胞を培養し、神経突起を有する細胞の割合、神経細胞の大きさ、神経突起の数、最長の神経突起の長さ、全神経突起の総和を測定してコントロールと比較検討した。本患者からの FLC は末梢神経障害の有無に関係なく、神経細胞の大きさ以外の指標について有意な低下を示した。

研究成果の概要（英文）：The present study investigated whether or not plasma free light chains (FLC) of the patients with immunoglobulin-related amyloidosis have neurotoxicity. We cultured rat dorsal root ganglion neurons at various concentrations of purified FLC, and compared percentage of neurons with neurites, diameter of neurons, neurite number per neuron, length of the longest neurite in each neuron and total neurite length per neuron with those of controls. FLC of the immunoglobulin-related amyloidosis patients showed significant decreases in all of these parameters except for diameter of neurons compared with controls irrespective of the presence of clinically apparent peripheral neuropathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学、アミロイドーシス

1. 研究開始当初の背景

免疫グロブリン関連アミロイドーシスは大部分が軽鎖由来のアミロイド（AL）の沈着に起因し、心臓・腎臓・消化管などの複数の臓器が侵される予後不良な疾患である。厚生省の特定疾患に指定され、本邦では年間約 600-800 人の患者が発生していることが推定

されている。病気の原因となっている骨髄内異常形質細胞（plasma cell dyscrasia）を標的とした化学療法が 2000 年頃から国内外で行われるようになり本症の生命予後は飛躍的に改善しつつあるが、こうした治療によってアミロイドの前駆体である異常免疫グロブリン（M 蛋白）が消失し、血液学的寛解に至

ったとしても、臓器障害は通常直ちに軽快することはない。特に約20%の本症患者で見られる末梢神経障害は四肢の異常感覚や自律神経障害が通常長期にわたって残存し、日常生活活動に重大な影響を及ぼしている。

本疾患では従来から血漿や尿中のM蛋白が診断や治療の指標として用いられてきた。しかし、蛋白電気泳動や免疫固定法ではM蛋白が全臨床経過を通して全く検出されない患者があることや、定量評価が困難な点が問題となっている。最近開発された比濁法による血清中 free light chain (FLC) の測定は、結合型免疫グロブリンでは表出されないエピトープを抗原として用いているために特異性が高く、定量評価が可能であることから、本疾患や多発性骨髄腫の診断および治療の指標として、その有用性が欧米で広く認識されつつある。我々は本邦のALアミロイドーシス患者に化学療法を行い、FLCの κ/λ 比を正常化できれば生存率が高まること、血漿中アミロイド原性FLC濃度が骨髄中の異常形質細胞と相関することなどを明らかにしてきた。

また最近、ALアミロイドーシスによる臓器障害に、アミロイド沈着の他に血漿中FLCが直接的に関与している可能性のあることが注目されている。末梢神経障害を主症状とした患者にメルファラン大量静注+自家末梢血幹細胞移植を行ない血清FLCが正常化すると、当初懸念されたように神経症状が長期にわたって残存することなく下肢の痛みやしびれが速やかに改善して自力歩行が可能となった患者を我々は経験した。特に1名の患者では免疫固定法でM蛋白が治療後も検出され、血液学的完全寛解には至っていないにもかかわらず、神経症状は明らかに改善した。このことは、FLCがアミロイド生成に関与しているだけではなく、末梢神経に対して何らかの直接的な障害作用を有しており、化学療法によって本物質の産生が減少したことで神経症状に改善がもたらされた可能性があることを示している。血清FLCを特異的カラムで取り除くことにより、高度の自律神経症状が速やかに改善した症例や、心筋細胞に対するFLCの毒性を実験的に示した研究結果などが最近報告されており、ALアミロイドーシス患者におけるFLCの臓器毒性に関する知見が蓄積されつつある。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、今回の研究ではALアミロイドーシス患者における末梢神経障害に血漿中FLCの神経毒性が関与している可能性について明らかにする。ALアミロイドーシス患者の血漿から精製したFLCをさまざまな濃度でラット後根神経節細胞の培養系に加え、神経細胞およびそこから出る神経突起のさまざまな指標について計測し、コントロ

ール群(精製FLC不添加)と比較検討する。さらに、臨床的に明らかな末梢神経障害を呈している患者とそうでない患者から得られた精製FLCの作用に差があるかどうか検討することにより、本物質の神経毒性をさらに明確にする。

3. 研究の方法

(1) FLCの精製

凍結保存してある患者血漿50 μ lを20%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、FLCのモノマーとダイマーの両者を含む25-50kDaの部分のゲルを切り出し、ミンス後、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.05 mol/l Tris-HCl (pH 7.0)、0.1 mmol/l EDTA、0.2 mol/l NaCl から成る elution buffer でFLCを抽出。さらに純度を高める目的で、半精製されたFLCを再度20%ポリアクリルアミドゲルにかけて電気泳動を行ない、分離された蛋白をPVDF膜に転写。ヤギ抗ヒトFLC(κ , λ 鎖)抗体を用いて発色させ、その膜部分を切り出し、elution buffer (trifluoroacetic acid/ acetonitrile/ water=3:4:3)でFLCを抽出した。市販の測定用キット(Binding Site社)を用いて免疫比濁法により高濃度のFLCが得られたことを確認した。

(2) 後根神経節細胞の培養

Wisterラット(15日齢)から脊髄後根神経節を採取し、トリプシン処理を行なって神経細胞を単離。24穴プレート中でDMEM/F-12+10%牛胎児血清+神経成長因子を用い、3日間培養した。得られた細胞をさらに3日間培養し、パラホルムアルデヒドで固定後、神経節細胞に特異的に発現する抗マイクロチューブ関連蛋白抗体を用いて蛍光染色を行った。画像解析装置を用い、100ニューロンについて神経突起を有する細胞の割合、神経細胞の大きさ、神経突起の数、最長の神経突起の長さ、全神経突起の総和を測定してコントロール(精製FLC不添加)の値を得た。

(3) 神経毒性の検討

患者血漿から精製されたFLCを1 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mLになるように24穴プレート中の培養液中に添加し、3日間培養。パラホルムアルデヒドで固定後、抗マイクロチューブ関連蛋白抗体を用いて蛍光染色を行い、画像解析装置を用いて100ニューロンにつき上記の指標について測定した。

(4) 統計学的処理

結果は中央値(median)とrangeとで示し、コントロール群と患者群との比較はMann-Whitney's U testで行った。統計学的解析には市販の専用ソフト(StatView)を使用した

4. 研究成果

ALアミロイドーシス患者(臨床的に明らか

な末梢神経障害を有する者：2名、有しない者：3名)の血漿から FLC を分離精製した。

コントロール(神経突起を有するニューロンの割合：97.2%、ニューロンの直径：21.5 μ m、ニューロンあたりの神経突起数：3、最長神経突起の長さ：198.5 μ m、ニューロンあたりの全神経突起長：421.8 μ m)と比較して、AL アミロイドーシス患者では FLC 1 μ g/mL と 5 μ g/mL では著変は見られなかったが、10 μ g/mL では末梢神経障害を有する群で、神経突起を有するニューロンの割合：78.5%、ニューロンの直径：19.5 μ m、ニューロンあたりの神経突起数：2、最長神経突起の長さ：111.6 μ m、ニューロンあたりの全神経突起長：374.4 μ m と全項目で低下が見られ、ニューロンの直径以外の指標で有意差を認めた ($p < 0.01$)。FLC 20 μ g/mL では FLC 10 μ g/mL のデータと比較してさらなる低下傾向を認めたが有意差はなかった。末梢神経障害を有さない群では FLC 1 μ g/mL と 5 μ g/mL では著変は見られなかったが、FLC 10 μ g/mL で、神経突起を有するニューロンの割合：88.2%、ニューロンの直径：20.8 μ m、ニューロンあたりの神経突起数：2、最長神経突起の長さ：158.4 μ m、ニューロンあたりの全神経突起長：374.4 μ m と低下を認め、コントロールと比較してニューロンの直径以外で有意差を認めた ($p < 0.01$)。末梢神経障害のある患者とそうでない患者との比較では明らかな有意差はなかった。

以上の結果から AL アミロイドーシス患者の FLC は 10 μ g/mL 以上の濃度で神経毒性を示す可能性があると考えられた。臨床的に明らかな末梢神経障害のある患者から得られた FLC と、そうでない患者の FLC との間に明らかな差が見られなかった点については、今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。

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 8 件)

- 1) Miyazaki D, Yazaki M, Ishii W, Matsuda M, Hoshii Y, Nara K, Ikeda S. A rare nodular lung lesion consisting of adenocarcinoma and amyloid deposition in a patient with primary systemic AL amyloidosis. Intern Med 50: 243-246, 2011 (査読あり)
- 2) Katoh N, Matsuda M, Tsuchiya-Suzuki A, Ikeda S. Regression of gastroduodenal amyloid deposition in primary systemic AL amyloidosis after intensive chemotherapies. Br J Haematol 153: 535-538, 2011 (査読あり)
- 3) Matsuda M, Katoh N, Tazawa K, Shimojima Y, Mishima Y, Ikeda S. Surgical removal of amyloid-laden lymph nodes is a possible therapeutic approach in a primary systemic AL amyloidosis patient with focal lymphadenopathy. Amyloid 18: 79-82, 2011 (査読あり)
- 4) Matsuda M, Gono T, Katoh N, Yoshida T, Tazawa K, Shimojima Y, Morita H, Ikeda S. Peripheral nerve involvement in primary systemic AL amyloidosis. Eur J Neurol 18: 604-610, 2011 (査読あり)
- 5) 島崎千尋、村上博和、澤村守夫、松田正之、木下朝博、畑裕之、杉浦勇、津下圭太郎、名倉英一、小杉浩史、伊藤淳治、清水一之：単クローン性 γ グロブリン血症における血清遊離軽鎖測定の実臨床的有用性 臨床血液 51: 245-252, 2010 (査読あり)
- 6) Tazawa K, Katoh N, Shimojima Y, Matsuda M, Ikeda S. Marked shrinkage of amyloid lymphadenopathy after an intensive chemotherapy in a patient with primary systemic AL amyloidosis. Amyloid 16: 183-185, 2010 (査読あり)
- 7) Katoh N, Matsuda M, Yoshida T, Yazaki M, Sakashita K, Ikeda S. Primary AL amyloid polyneuropathy successfully treated with high-dose melphalan followed by autologous stem cell transplantation. Muscle Nerve 41: 138-143, 2010 (査読あり)
- 8) 五野貴久、松田正之：AL アミロイドーシスと神経障害 神経内科 70: 136-142, 2009 (査読なし)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 松嶋聡、岸田大、吉長恒明、田澤浩一、松田正之、池田修一：自律神経障害を主徴とする原発性全身性 AL アミロイドーシスの臨床的検討 第 52 回日本神経学会総会(名古屋)、2011. 5. 20
- 2) 松田正之、松嶋聡、下島恭弘、田澤浩一、福島和広、池田修一：AL アミロイド多発神経炎における骨髄内形質細胞と血清 free light chain の定量的検査の有用性 第 52 回日本神経学会総会(名古屋)、2011. 5. 20
- 3) 松田正之、加藤修明、福島和広、下島恭弘、森田洋、池田修一：多発神経炎を呈する全身性 AL アミロイドーシスの長期予後 第 51 回日本神経学会総会(東京)、2010. 5. 22
- 4) 松田正之：Free light chain 測定の臨床的意義 第 56 回日本臨床検査医学会総会(札幌)、2009. 8. 29
- 5) 松田正之、五野貴久、森田洋、加藤修明、小平農、吉田拓弘、田澤浩一、下島恭弘、

下島吉雄、石井亘、池田修一：免疫グロブリン関連アミロイドーシスにおける末梢神経障害の臨床生理学的検討 第 50 回日本神経学会総会（仙台）、2009. 5. 19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 正之 (MATSUDA MASAYUKI)
信州大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：50239042

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

兼子 一真 (KANEKO KAZUMA)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：80402105