

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07730

研究課題名(和文) SAA遺伝子変異に起因するAAアミロイド症の病理発生機序の解明

研究課題名(英文) Clarification of Pathogenesis of AA amyloidosis via mutant SAA gene

研究代表者

上家 潤一 (Kamiie, Junichi)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：10400269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は動物のAAアミロイド症を対象として、変異型SAAをコードする遺伝子を同定し、変異型SAAが関与するAAアミロイド症の発生機序を解明することを目的とした。犬、猫、牛、山羊に沈着するアミロイドを質量分析法で分析し、野生型と変異型SAAが沈着していることを明らかにした。また、全ての患畜は両方のSAA遺伝子を有していた。合成したペプチドを使ったアミロイド線維形成実験では、変異型は野生型より高いアミロイド線維形成能を示した。また、変異型ペプチドは野生型ペプチドのアミロイド線維形成が促進された。これらの結果から、変異型SAAがAAアミロイド症に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the presence of wild SAA and the mutant SAA in deposited amyloid in AA amyloidosis of dog, cat, cow and goat by mass spectrometry. An in vitro fibrillation assay demonstrated that the mutant SAA peptide formed typically rigid, long amyloid fibrils (10 nm wide), and the wild SAA peptide formed zigzagged, short fibers (7 nm wide). Moreover, the wild SAA peptide formed long, rigid amyloid fibrils in the presence of sonicated amyloid fibrils formed by the mutant SAA peptide. These findings indicate that the mutant SAA and wild SAA peptide mediate development of AA amyloidosis in animals via cross-seeding polymerization.

研究分野：獣医病理学

キーワード：AAアミロイド症 病理発生機序 Serum amyloid A

1. 研究開始当初の背景

本研究開始当初の病理学では、AA アミロイド症は炎症刺激によって上昇した血中 SAA がアミロイド線維を形成することで発生するとされていた。AA アミロイド症は動物種間で発生頻度に著しく差が認められ、牛やウサギでは高頻度に発生する一方、豚では SAA 上昇を伴う炎症性疾患が多発するにも関わらず非常に稀な疾患である。この発生頻度の種差の理由は明らかではない。また、ヒトでは関節リウマチ症患者の約 15% に併発する疾患であるが、血中 SAA が高値を示す長期罹患患者でも AA アミロイド症を併発しないケースがあり、この個人差の理由も明らかではない。AA アミロイド症発生の動物種差、個人差は血中 SAA 濃度の上昇だけでは説明することが出来ず、病理発生機序に関わる決定的因子の存在が示唆されるが、特定できていなかった。

2. 研究の目的

申請者は、AA アミロイドの前駆タンパク質である SAA に着目し、アミロイド線維形成を促進する SAA の変異体の存在を予想した。本研究の目的は豚、犬、猫の AA アミロイド症を対象として、アミロイド原性の高い変異型 SAA をコードする遺伝子を同定し、変異型 SAA 遺伝子が関与する AA アミロイド症の発生機序を解明することである。

3. 研究の方法

研究期間内に、罹患動物における変異型 SAA 遺伝子とタンパク質の同定、変異型、野生型 SAA のアミロイド原性の比較解析をおこなった。

罹患動物における変異型 SAA 遺伝子とタンパク質の同定：アミロイド症の動物のパラフィンブロックからゲノム DNA を抽出し、SAA 遺伝子のシーケンス解析により配列を決定する。変性剤を用いて沈着アミロイドタンパク質を抽出し、質量分析でアミノ酸配列を決定した。

変異型、野生型 SAA のアミロイド原性の比較解析：変異型、野生型 SAA を合成し、酸性条件下におけるアミロイド線維形成を、チオフラビン T 蛍光法と電子顕微鏡観察により定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) 連鎖球菌症に伴う豚の AA アミロイド症の一例を対象に、沈着アミロイドのアミノ酸配列を同定した。変性剤を用いてアミロイド沈着臓器から抽出したアミロイドを質量分析法で解析したところ、アミロイド前駆タンパク質である SAA 2 の野生型および N 末端に変異を有する変異型の特異的なアミノ酸配列がそれぞれ検出された(図 1)。さらに、変異体 SAA2 に特異的な PCR で罹患豚のゲノム DNA を解析したところ、変異型 SAA2 遺伝子が検出された(図 2)。

QSFVGEAYEGAK (変異型) pQWSFLGEAYEGAK (野生型 SAA2)

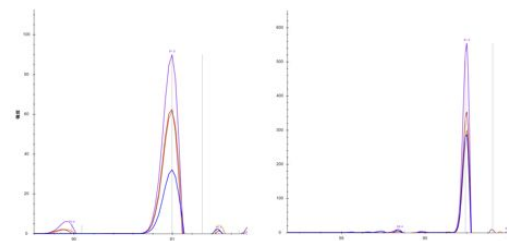


図 1 抽出アミロイドの質量分析。変異型と野生型の SAA2 が検出された。

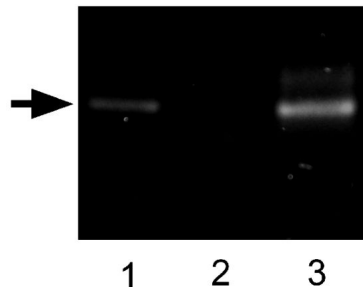


図 2 AA アミロイド症罹患豚の変異型 SAA 遺伝子の PCR。レーン 1：合成変異型 SAA 遺伝子、レーン 2：合成野生型 SAA 遺伝子、レーン 3：検体から抽出したゲノム DNA。

さらに、6 症例の豚の AA アミロイド症罹患個体を解析したところ、上記症例と同様に、野生型および変異型 SAA2 が沈着しており、全ての症例で変異型 SAA2 遺伝子を保有していた。

(2) 豚 SAA2 の野生型と変異型の合成ペプチドを 10% 酢酸溶液中に溶解し、反応させると、いずれもコンゴレッドに陽性を示す線維を形成した。アミロイド形成を示すチオフラビン T 蛍光法では、野生型 SAA2 が変異型より高い反応性を示した(図 3)。

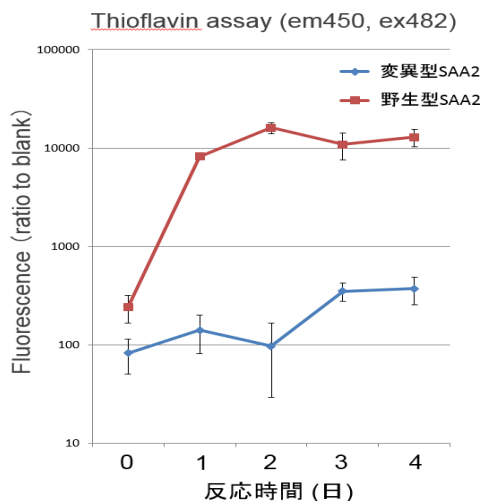


図 3 豚の野生型および変異型 SAA2 ペプチドのアミロイド線維形成。チオフラビン T 蛍光法。

電子顕微鏡による各線維の超微形態観察では、変異型が形成する線維が幅約 10nm の直

線的に伸びる典型的なアミロイド線維であったのに対し、野生型が形成する線維は短くて幅の狭い、不規則に曲がった非アミロイド様線維であった。また、変異型 SAA2 で作成したアミロイド線維の存在下では、野生型は線維形成速度が上昇し、線維の形態も変異型に類似した典型的アミロイド線維に変化した(図4)。

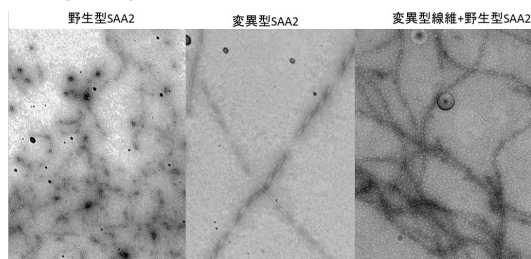


図4. 豚 SAA2 が形成する線維の超微形態像

以上の結果から、豚の AA アミロイド症では変異型 SAA が形成するアミロイド線維を核として野生型 SAA をアミロイド線維化する病理発生機序が示唆された(図5)。豚を対象とした本研究結果は Veterinary Pathology 誌に発表した。

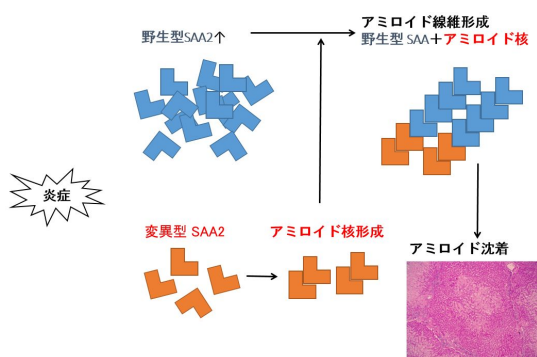


図5 本研究結果が示唆する豚 AA アミロイド症の発生機序

(3) 同様の手法で AA アミロイド症の動物、犬4症例、猫の家族性 AA アミロイド症の60症例、牛6症例、山羊5症例の沈着アミロイド中の SAA 型を解析した。全ての症例で、豚同様に野生型、変異型 SAA が検出され(図6) 猫ではそれらをコードする遺伝子も検出された。山羊で検出した変異型 SAA はこれまで報告のない新規の配列であった。

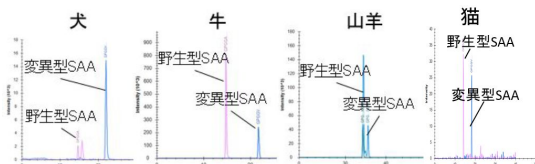


図6 犬、猫、牛、山羊に沈着する SAA 型の質量分析による同定

これらの結果から、哺乳類に共通して、変異型 SAA が関与する AA アミロイド症の発生機序が示唆された。

(4) 本研究を進める中で、ホルマリン固定材料からアミロイドを特異的に抽出する試薬を着想し、パラフィン切片からアミロイドを抽出する方法を開発し、特許出願を行なった。

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 1件)

Kamiie, J., Sugahara, G., Yoshimoto, S., Aihara, N., Mineshige, T., Uetsuka, K., Shirota, K. 2017. Identification of a Unique Amyloid Sequence in AA Amyloidosis of a Pig Associated with *Streptococcus Suis* Infection. *Vet. Pathol.* 54: 111-118. doi: 10.1177/0300985816653792.

〔学会発表〕(計 2件)

野中澗里、上家潤一、Jeff Caswell、代田欣二、シャム猫の AA アミロイドーシスにおける沈着 Serum amyloid A protein の同定、第160回日本獣医学会学術集会、2017

Junichi Kamiie, Gyorgy Marco-Varga, Kinji Shirota, Amyloid-Specific Extraction from FFPE Sections Using Organic Solvents The XVIth International Symposium on Amyloidosis, 2018

〔図書〕(計 1件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: アミロイドタンパク質を抽出する方法

発明者: 上家潤一、坂上元栄

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-30511

出願年月日: 2018年2月23日

国内外の別: 国内

取得状況(計 1件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上家 潤一 (KAMIIE Junichi)

麻布大学・獣医学研究科・准教授
研究者番号：10400269

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()