

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15195

研究課題名(和文)炎症カスケード解析からこじ開けるアミロイドニューロパチの病態制御

研究課題名(英文)Control of amyloid neuropathy from the aspect of inflammation

研究代表者

安東 由喜雄 (ANDO, Yukio)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：20253742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：FAPの病態と炎症との関連を明らかにする為、血清中の炎症性サイトカインの濃度を測定及び末梢血から分離した単核球(PBMC)中のT細胞、B細胞、単球などの免疫細胞について、炎症性マーカーあるいは炎症性サイトカインの発現の高い細胞の割合を算出した。FAPでは、炎症関連サイトカイン、単球を主体にしたinflammasomeが活性化されIL-1 やIL-6が分泌される事が判明した。マクロファージについても解析する為FAP患者組織切片に対し各種マーカーに対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行ったところ、FAPではM2マクロファージが増加しアミロイド形成にも重要な働きをしている可能性があることが判明した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of inflammation on the pathogenesis of familial amyloid polyneuropathy (FAP), we measured the concentrations of various kinds of cytokines, and counted the T, B and monocytes in the peripheral blood in FAP patients and controls. Those analyses revealed activated inflammasome, such as inflammatory related cytokines, and monocytes secreted IL-1 and IL-6. NO significant results were obtained in the complement association in those analyses. Immunohistochemical analyses revealed that, M2 macrophages might play an important role in the amyloidogenesis of this disease in compared to immunohistochemical findings in controls, those in FAP patients.

研究分野：神経内科、アミロイド シス学、検査医学

キーワード：家族性アミロイドポリニューロパチー トランスサイレチン 炎症 サイトカイン マクロファージ
アミロイド沈着機構 インターロイキン 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

炎症との関連が全く考えられていなかったいくつかのタイプのアミロイド シスや神経変性疾患で、病態と炎症との関連が徐々に明らかにされてきている。トランスサイレチン(TTR)の遺伝的変異が原因で起こる家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は未だに炎症との関連は不明のまま治療が先行してきた。肝移植は、発症早期の患者にしか有効性を示さないなどいくつかの問題がある。また TTR は四量体で機能するため、その安定化剤であるタファミジスが開発されたが、4 割の患者が non-responder であり、その効果も限定的で進行した患者にはほとんど効果がない。FAP のアミロイド沈着機構には解き明かされていない重要な部分があり、より有効で理想的な治療法を開発するためには、FAP のアミロイド沈着機構と臓器障害に関する新たな仮説に基づいた斬新な視点からのアプローチが不可欠である。本研究では炎症が FAP の病態発現の鍵になるという仮説を立てて研究を行う。

2. 研究の目的

近年炎症とアミロイドーシスとの関係が注目されている。家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の原因蛋白質であるトランスサイレチン(TTR)は反急性期炎症蛋白質でありインターロイキン 1、6 の経路を経て発現する。また組織沈着アミロイドは生体にとって「異物」であり炎症細胞がその防御に関与する可能性があるが、炎症と発症・病態進展との関連は不明のままである。そこで、FAP 患者の血清、組織、モデルマウスを用いて補体活性化経路、炎症関連バイオマーカーの発現を検討すると共に、末梢血から分離した免疫細胞(CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、単球、マクロファージ)の培養系で、組織から抽出したアミロイドや TTR を共存させ、炎症サイトカイン分泌量の変化、発現誘導が起こるかを検証する。これらの知見を元に **FAP の病態に生体内の炎症が与える影響と病態発現・進展のメカニズムを明らかにする。**

3. 研究の方法

1. 血清中の炎症性サイトカイン濃度の比較検討

FAP 患者 20 名、健常者 20 名の血清中に含まれる IL-1 β 、IL-6、IL-12 といった炎症性サイトカインの濃度を ELISA 法により測定、比較検討した。

2. 補体活性化経路の解析

患者検体を用いて組織沈着アミロイドでの各種の補体の共存を検討した。

3. FAP モデルマウスに対する補体阻害剤の効果

上記の解析結果で病態との関連が強い補体に対する阻害剤をモデルマウスに投与し、病理学的な変化や表現型に及ぼす影響を検証した。

4. 組織中に存在する抗炎症作用を有するマクロファージ数の変化の検討

FAP 患者心臓組織切片および FAP 以外の疾患患者心臓組織切片を用いて、免疫組織化学染色を行い、炎症に関わる作用を有するマクロファージについて FAP 患者に特異的な変化がないか検証した。

5. TTR がマクロファージを介して炎症誘導を起こすメカニズムについての検討

FAP では炎症と病態との関連について未だ不明であるが、アルツハイマー病においては炎症と病態との関連が強く示唆されており、その一つにマクロファージが A β を貪食することで細胞内の Inflammasome が活性化され、IL-1 をはじめとした炎症誘導性サイトカインが分泌されることが知られている。そこで、FAP の原因蛋白質である TTR においても同様にマクロファージの Inflammasome を活性化する作用があるか検証する。具体的には、単球から分化させたマクロファージを凝集させた TTR と共培養し、マクロファージが TTR 凝集物を貪食したかどうかを ELISA 法、ウエスタンブロットで解析する。更に、A β が Inflammasome を活性化し IL-1 を発現する過程に関する蛋白質であるカテプシン B、NLRP3、ASC、caspase-1 について、蛋白質発現量をウエスタンブロットにより解析し、TTR による炎症誘導のメカニズムに迫った。

6. 培養細胞を用いた解析

培養細胞 (SH-SY5Y) に変性 TTR やオリゴマー、アミロイドを添加し、さらに補体や自己抗体、患者由来のマクロファージを加え、オリゴマーやアミロイドに対する貪食能、細胞障害等の変化を解析する。

4. 研究成果

1. 血清中の炎症性サイトカイン濃度の比較検討

FAP 患者 20 名、健常者 20 名の血清中に含まれる IL-1 β 、IL-6、IL-12 といった炎症性サイトカインの濃度を ELISA 法により測定により測定したところ、IL-6 が優位に上昇していた。

2. 補体活性化経路の解析

患者検体を用いて組織沈着アミロイドでの

各種の補体の共存を検討したところ、C3b がアミロイド中に共存していた。

3. FAP モデルマウスに対する補体阻害剤の効果

C3b 抗体をトランスジェニックマウス ATTR V30M に2週間にわたり投与したが、TTR 沈着などの病理学的な変化や表現型に及ぼす影響は認められなかった。

4. 組織中に存在する抗炎症作用を有するマクロファージ数の変化の検討

熊本大学で保管している FAP 患者心臓組織切片 10 例、FAP 以外の疾患患者 (主にがん患者) 心臓組織切片に関して、免疫組織化学染色を行い、炎症に関わる作用を有するマクロファージについて検討したところ、M1 マクロファージは減少傾向にあるが、M2 マクロファージは増加していることが判明した。

5. 各免疫細胞に対し TTR が与える影響の検討

健常者末梢血から、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、単球を分離し、培養液中に TTR を共存させ、発現蛋白質の変化を解析したところ、特に単球が TTR を貪食し、Inflammasome が活性化され IL-1 や IL-6 が分泌されることが判明した。またこの時、カテプシン B、caspase-1 などの蛋白質発現量が上昇していた。

6. 培養細胞を用いた解析

培養細胞 (SH-SY5Y) に変性 TTR やオリゴマー、アミロイドを添加実験を行ったところ、患者由来のマクロファージがオリゴマーやアミロイドに対する貪食能が高いことが判明した。

まとめ

以上2年間の研究から、FAP のアミロイド沈着機構には炎症が深く関与しており、その阻止法を考案することが新たな治療法の開発に結び付くと思われる。アミロイド沈着機構に対する補体の関与は小さいと考えられるが、マクロファージは、組織アミロイド沈着の制御に大きく関与しており、マクロファージを活性化してアミロイドを除去する strategy は治療の選択肢として重要であると考えられる。近い将来自己の iPS マクロファージを用いて、(これに我々が開発中のアミロイド抗体などを組み合わせる) 本タイプのアミロイドシスの治療が可能になる可能性が考えられる。また、現在ある治療法と「抗炎症療法」との併用などの観点から FAP の根治療法を考えていくことも極めて重要であると考えられた。更にこの現象をもとに

蛋白質が凝集し病気を引き起こす、他のプロテノパチーを研究している研究者と情報交換を行い、治療戦略を深めていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計30件)

- 1) [Misumi Y, Ueda M, Yamashita T, Masuda T, Kinoshita Y, Tasaki M, Nagase T, Ando Y.](#) Novel screening for transthyretin amyloidosis by using fat ultrasonography. *Ann Neurol*. 査読有 in press, 2017. DOI: 10.1002/ana.24914.
- 2) [Misumi Y, Narita Y, Oshima T, Ueda M, Yamashita T, Tasaki M, Obayashi K, Isono K, Inomata Y, Ando Y.](#) Recipient aging accelerates acquired transthyretin amyloidosis after domino liver transplantation. *Liver Transpl*. 査読有 22: 656-664, 2016. DOI: 10.1002/lt.24371.
- 3) [Yanagisawa A, Ueda M, Sueyoshi T, Nakamura E, Tasaki M, Suenaga G, Motokawa H, Toyoshima R, Kinoshita Y, Misumi Y, Yamashita T, Sakaguchi M, Westermarck P, Mizuta H, Ando Y.](#) Knee osteoarthritis associated with different kinds of amyloid deposits and the impact of aging on type of amyloid. *Amyloid*. 査読有 23: 26-32, 2016. DOI: 10.3109/13506129.2015.1115758.
- 4) [Ando Y, Sekijima Y, Obayashi K, Yamashita T, Ueda M, Misumi Y, Morita H, Machii K, Ohta M, Takata A, Ikeda S.](#) Effects of tafamidis treatment on transthyretin(TTR) stabilization, efficacy, and safety in Japanese patients with familial amyloid polyneuropathy(TTR-FAP) with Val30Met and non-Val30Met:A phase III, open-label study. *J Neurol Sci*. 査読有 15:266-271, 2016. DOI: 10.1016/j.jns.2016.01.046.
- 5) [Jono H, Su Y, Obayashi K, Tanaka Y, Ishiguro A, Nishimura H, Shinriki S, Ueda M, Ikeda K, Yamagata K, Ichihara K, Ando Y.](#) Scientific Committee for the Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry. Sources of variation of transthyretin in healthy subjects in east and southeast asia: Clinical and experimental evidence for the effect of alcohol on transthyretin metabolism. *Clin Chim Acta*. 査読有 458: 5-11, 2016. DOI:

10.1016/j.cca.2016.04.011.

- 6) Yamashita T, Ueda M, Saga N, Nanto K, Tasaki M, Masuda T, Misumi Y, Oda S, Fujimoto A, Amano T, Takamatsu K, Yamashita S, Obayashi K, Matsui H, Ando Y. Hereditary amyloidosis with cardiomyopathy caused by the novel variant transthyretin A36D. *Amyloid*. 査読有 23:207-208, 2016. DOI: 10.1080/13506129.2016.1202228.
- 7) Suenaga G, Ikeda T, Komohara Y, Takamatsu K, Kakuma T, Tasaki M, Misumi Y, Ueda M, Ito T, Senju S, Ando Y. Involvement of macrophages in the pathogenesis of familial amyloid polyneuropathy and efficacy of human iPS cell-derived macrophages in its treatment. *PLoS One*. 査読有 11:e0163944, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0163944.
- 8) Hosoi A, Su Y, Torikai M, Jono H, Ishikawa D, Soejima K, Higuchi H, Guo J, Ueda M, Suenaga G, Motokawa H, Ikeda T, Senju S, Nakashima T, Ando Y. Novel antibody for the treatment of transthyretin amyloidosis. *J Biol Chem*. 査読有 25: 25096-25105, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M116.738138.
- 9) Koike H, Ikeda S, Takahashi M, Kawagashira Y, Iijima M, Misumi Y, Ando Y, Ikeda SI, Katsuno M, Sobue G. Schwann cell and endothelial cell damage in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*. 査読有 87:2220-2229, 2016. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003362.
- 10) Hawkins PN, Ando Y, Dispenzeri A, Gonzalez-Duarte A, Adams D, Suhr OB. Evolving landscape in the management of transthyretin amyloidosis. *Ann Med*. 査読有 47:625-638, 2015. DOI: 10.3109/07853890.2015.1068949.

[学会発表](計49件)

- 1) Yamashita T, Ueda M, Tasaki M, Masuda T, Misumi M, Takamatsu K, Obayashi K, Ando Y: Amyloidosis Medical Practice Center in Japan by Kumamoto University. VI Advance and Research in TTR Amyloidosis, Feb 24-25, 2017, Vienna, Austria.
- 2) Ando Y: Antibody therapy for familial amyloid polyneuropathy. XVth International

Symposium on amyloidosis, Uppsala, Jul 3-7, 2016, Uppsala, Sweden.

- 3) Yamashita T, Ando Y: Establishment of a Diagnostic Center for Amyloidosis in Japan by Kumamoto University, XVth International Symposium on amyloidosis, Uppsala, Jul 3-7, 2016, Uppsala, Sweden.
- 4) Ueda M, Mizuguchi M, Misumi Y, Tasaki M, Suenaga G, Matsumoto S, Mizukami M, Masuda T, Yamashita T, Kluge-Beckerman B, Liepnieks JJ, Benson MD, Ando Y: Role of C-terminal portion of transthyretin on amyloid formation, XVth International Symposium on amyloidosis, Uppsala, Jul 3-7, 2016, Uppsala, Sweden.
- 5) Misumi Y, Oshima T, Ueda M, Yamashita T, Tasaki M, Masuda T, Obayashi K, Ando Y: Occurrence factors and clinical picture of iatrogenic transthyretin amyloidosis after domino liver transplantation, XVth International Symposium on amyloidosis, Uppsala, Jul 3-7, 2016, Uppsala, Sweden.
- 6) Kinoshita Y, Misumi Y, Ueda M, Tasaki M, Masuda T, Suenaga G, Inoue Y, Obayashi K, Yamashita T, Ando Y: Multiple nodular pulmonary and subcutaneous amyloidosis associated with Sjögren syndrome. XVth International Symposium on amyloidosis, Uppsala, Jul 3-7, 2016, Uppsala, Sweden.
- 7) 安東由喜雄: 抹消神経障害の鑑別と治療の最前線・FAPの治療戦略, 第57回日本神経学会学術大会, May 18-21, 2016, 神戸.
- 8) 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチーと自律神経障害, 第59回日本自律神経学会, Nov 10-11, 2016, 熊本.
- 9) 安東由喜雄: 臨床化学を通して我々は何をやってきたのか, 第56回日本臨床化学会, Dec 2-4, 2016, 熊本.
- 10) 植田光晴, 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチーの病態解析と新たな治療戦略への展開。ワークショップ「アミロイド再考: これまでとこれから」, 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会, Dec 1, 2015, 神戸.
- 11) 山下太郎, 田崎雅義, 増田曜章, 大嶋俊

範、軸丸美香、高松孝太郎、三隅洋平、植田光晴、大林光念、安東由喜雄：アミロイドーシス診療体制構築事業の平成26年度病型診断の報告。第56回日本神経学会学術大会，May 20-23, 2015, 新潟。

〔図書〕(計 3件)

- 1) 安東由喜雄：医歯薬出版株式会社，最新アミロイドーシスのすべて -診療ガイドライン 2017 と Q&A 「アミロイドーシスの分類」，2017, 2- 8.
- 2) 植田光晴、山下太郎、安東由喜雄：医歯薬出版株式会社，最新アミロイドーシスのすべて -診療ガイドライン 2017 と Q&A 「アミロイドーシスの診断」，2017, 17-23.
- 3) 山下太郎、植田光晴、安東由喜雄：医歯薬出版株式会社，最新アミロイドーシスのすべて -診療ガイドライン 2017 と Q&A 「遺伝性 ATTR アミロイドーシス/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」，2017, 32-52.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：新規なアミロイド線維生成抑制剤
発明者：城野博史、有馬英俊、安東由喜雄、
本山敬一、東大志
権利者：国立大学法人熊本大学
種類：特許
番号：PCT/JP2016/067373
出願年月日：2016/6/10
国内外の別：外国

6. 研究組織

(1)研究代表者

安東 由喜雄 (ANDO, Yukio)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20253742

(2)研究分担者

大林 光念 (OBAYASHI, Konen)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：90361899

山下 太郎 (YAMASHITA, Taro)
熊本大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号：90381003

植田 光晴 (UEDA, Mitsuharu)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60452885

三隅 洋平 (MISUMI, Yohei)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：80625781

田崎 雅義 (TASAKI, Masayoshi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：50613402