

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09973

研究課題名（和文）AAアミロイドの重合と組織沈着機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of AA amyloid polymerization and tissue deposition

研究代表者

黒田 毅（Kuroda, Takeshi）

新潟大学・保健管理・環境安全本部・教授

研究者番号：00372475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：AAとALアミロイドーシスの腎組織へのアミロイドの沈着パターンと臨床データを検討した結果、両アミロイドーシスの沈着パターンが腎障害を特徴づけている事を明らかにした。またAAアミロイドーシス合併症でSAAアイソタイプの検討を行った。その結果コードされた遺伝子以外の異なるアイソタイプを持つものが高頻度に出現していた。一部でイメージングマスを行ったが腎標本においては種々のSAAアイソタイプの分布が不均一であることが確認された。両アミロイドーシスの沈着様式の違いはAAでは上記のようなSAAのバリエーションのために前駆タンパクであるSAAの重合の強度が弱くその結果、形態の違いとなったと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドーシスはAL、AA、ATTRなど前駆タンパクにより分類されるが重合しアミロイド繊維を形成し組織に沈着することにより臓器障害を引き起こす。AAとALアミロイドーシスは患者数も多く高度な腎障害に進展し透析療法が必要となる場合が多い。一方で臨床病態は異なり形態学的な所見も相違が認められる。ALアミロイドーシスは前駆タンパクの性質上均質であるが、AAでは前駆物質であるSAAに多くのアイソタイプが存在していることが明らかになり腎ではそれらのアイソタイプが各々不均一に存在していることが明らかになった。以上より形態と前駆物質の関係が認められ治療を踏まえて重合を解除する上での一助となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We examined the pattern of amyloid deposition in the renal tissues of AA and AL amyloidosis and clinical data, and found that the deposition pattern of both amyloidoses characterizes renal damage. We also examined SAA isotypes in AA amyloidosis complications. The results showed a high frequency of different isotypes other than the encoded gene. Imaging mass in some cases confirmed the heterogeneous distribution of the various SAA isotypes in the renal specimens. The difference in the deposition pattern between the two amyloidoses was attributed to the weaker polymerization of the precursor protein SAA in AA due to the above-mentioned SAA variations, resulting in the difference in morphology.

研究分野：アミロイドーシス

キーワード：アミロイドーシス 関節リウマチ 多発性骨髄腫 腎機能 血清アミロイドA アイソタイプ

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスによる腎障害は AA アミロイドーシスと AL アミロイドーシスが代表的であるが臨床病態はと腎組織での組織沈着の関係は未解決な問題も多く存在していた。アミロイドの沈着量や沈着パターンの違いが病態に影響を与えると考えられていたものの、それらを明確に区別できる方法がなかった。

2. 研究の目的

AA アミロイドーシスとして最も多い関節リウマチ合併 AA アミロイドーシスと AL アミロイドーシスの腎組織へのアミロイドの沈着パターンと臨床データを検討し、アミロイドの沈着量や沈着パターンの違いが病態に影響を与えていることを明らかにし更に沈着パターンや形態の違いの原因を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

腎生検組織の画像解析による沈着量の測定と形態計測を行い、腎生検や胃・十二指腸粘膜生検の組織を用いて両アミロイドーシスのアミロイドの沈着パターンが腎障害を特徴づけている事を明らかにし、さらに AA アミロイドにおいては LC-MS/MS を用いて SAA のアイソタイプを検討し病態に与えている影響を検討しさらにイメージング MS を用いてその分布も検討する。

4. 研究成果

1) 組織学的検討

AA アミロイドーシスも AL アミロイドーシスも沈着が高度なほど腎機能障害が高度であったが AA と AL の間には臨床的な相違が確認された。AA は蛋白尿に比べて腎機能障害が高度であったが AL アミロイドーシスでは逆に腎機能障害に比べて蛋白尿が高度であった。その理由は沈着パターンにあり AA アミロイドーシスでは血管極を中心に結節状の沈着が認められ血流障害を来しやすく AL アミロイドーシスでは血流障害となるような結節状の沈着は僅かだったがびまん性に細動脈にアミロイド沈着をみとめ糸球体の基底膜の異常が高度であることを明らかにした。この結果両アミロイドーシスの病態の違いが組織学的に説明可能となった。

2) SAA アイソタイプの検討

アミロイドの重合研究に関して、SAA のアイソタイプの相違については、AA アミロイドーシス合併症例の胃・十二指腸生検、腎生検標本を用いて AA アミロイドーシスの原因蛋白である SAA アイソタイプの検討を行った。その結果 39 症例を検討して 4 種類の SAA アイソタイプを認めるものが 5 例、4 種類の SAA アイソタイプを認めるものが 30 例、2 種類の SAA アイソタイプを認めるものが 4 例であった。通常最大 2 種の SAA 遺伝子がコードするため最大 2 種類であるはずのアイソタイプが、異なるアイソタイプを持つものが高頻度に出現することが判明した。従来報告はすべて SAA 遺伝子多形とアミロイドの検討であるため蛋白レベルの解析における結果は新

たな知見となる。これらの生検標本を用いて組織から対象患者のもつ SAA 遺伝子を抽出し遺伝子多型のタイピングを行った。約半数の症例で SAA 遺伝子のタイピングを特定したが一部では難しかった。理由としてはアミロイドの沈着が高度であることが理由として考えられたため、標本の切り出しを再び行い検討した。一部の剖検症例を用いてイメージングマスを行ったが腎標本において種々の SAA アイソタイプの分布が不均一であることが確認された。例として**図 1**に典型例の Congo-red 染色による腎のアミロイドの分布を示す。この組織におけるアミロイドを LC-MS/MS により解析し SAA のアイソフォームである SAA1.1, 1.3, 1.4, と 1.5 が認められた (**図 2**)。またアイソフォームには各々の分布に偏りが認められた (**図 3A, 3B, 3C**)。この理由は明らかではないが腎組織の電荷の影響も考察された。他に AL アミロイドーシスと AA アミロイドーシスの沈着様式の違いは AA アミロイドーシスは上記のような SAA のバリエーションのために AL アミロイドーシスと比べて前駆タンパクである SAA の重合がゆるく線維自体の強度が弱く繰り返された重合の結果、形態の違いとなったと推測された。

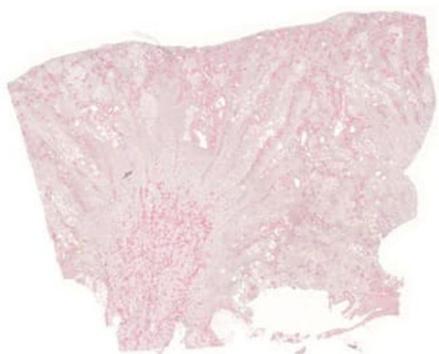


図 1 .Congo-Red 染色を行った剖検腎組織の 1 例

腎の髄質、皮質に Congo-Red 染色陽性のアミロイド沈着が認められた。

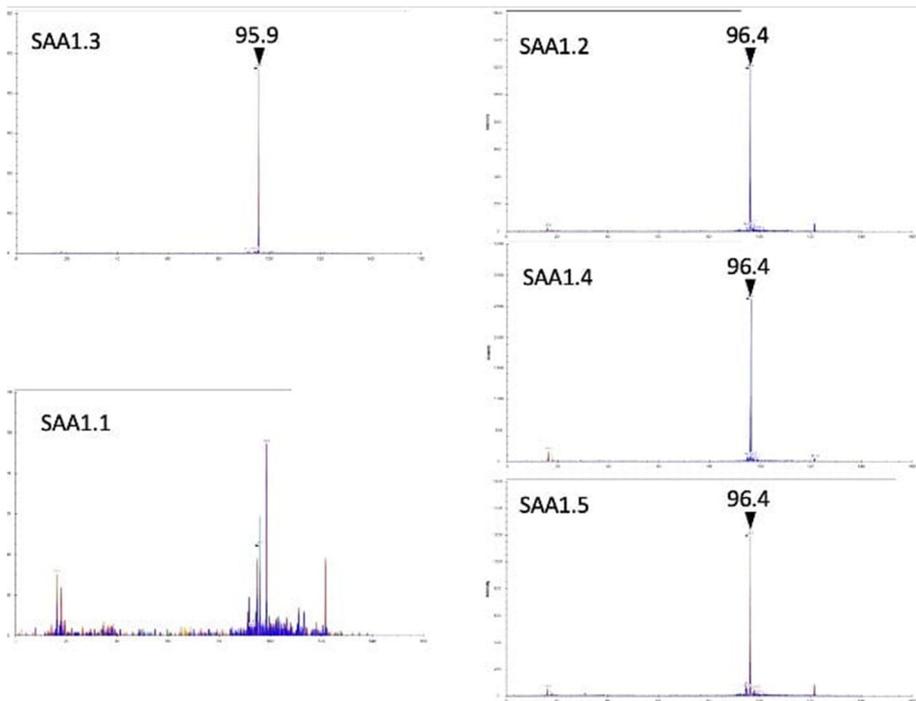


図 2 . LC-MS/MS による剖検腎の SAA の解析

組織におけるアミロイドを LC-MS/MS により解析し SAA のアイソフォームである SAA1.1, 1.3, 1.4, と 1.5 が認められた。

図 3A

Imaging MS for SAA1 isoforms

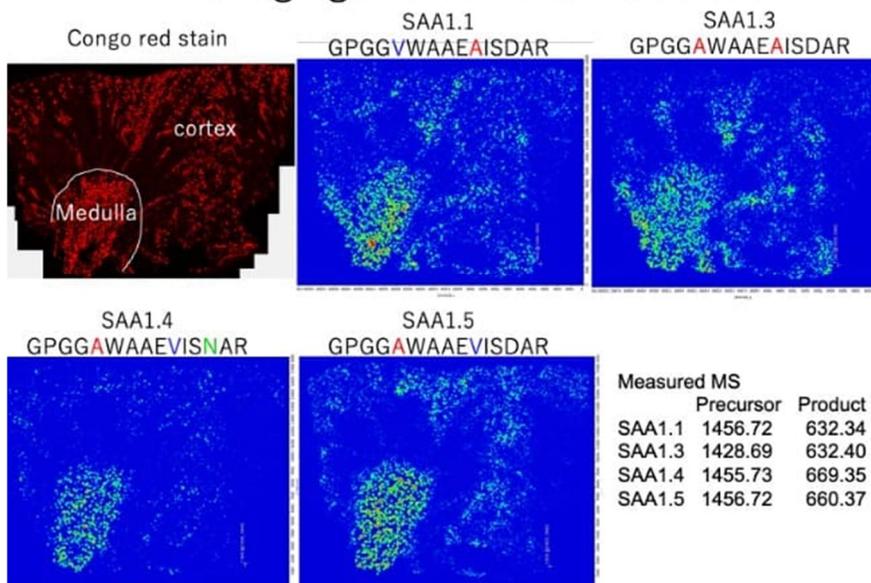


図 3B

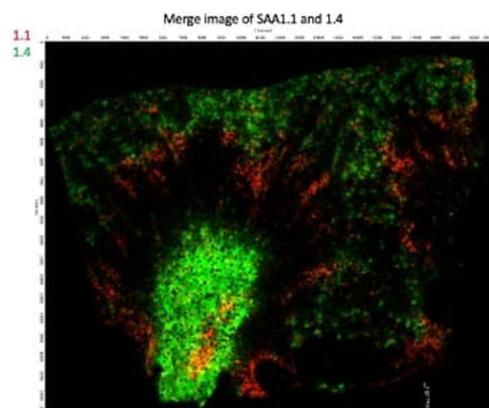


図 3C

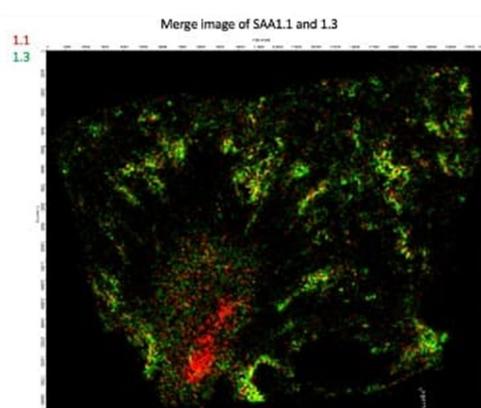


図 3 . 腎臓剖検標本の質量分析イメージング

図 3A にアイソフォームの分布を示した。SAA 1.1 と 1.3 は、皮質と髄質の両方で強い信号を示した。一方、SAA 1.4、および 1.5 は、皮質と髄質の両方で信号を示した。図 3B と 3C には、アイソフォームの合成画像を示した。SAA1.1 および 1.3 は皮質で同様の分布を示したが、SAA1.1 は髄質の葉間動脈の周囲において SAA1.3 よりも強く沈着していた。SAA1.1 と 1.4 のアイソフォームの合成画像も異なる分布を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuroda Takeshi, Ito Yumi, Imai Naofumi, Nozawa Yukiko, Sato Hiroe, Nakatsue Takeshi, Wada Yoko, Ueno Mitsuhiro, Nakano Masaaki, Narita Ichiei	4. 巻 26
2. 論文標題 Significant association between renal function and area of amyloid deposition in kidney biopsy specimens from patients with AA amyloidosis associated with rheumatoid arthritis and AL amyloidosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 125 ~ 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13506129.2019.1582512	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 Kamiie Junichi, Aihara Naoyuki, Uchida Yu, Kobayashi Daiki, Yoshida Yutaka, Kuroda Takeshi, Sakaue Motoharu, Sugihara Yutaka, Rezeli Melinda, Marko-Varga Gy?rgy	4. 巻 7
2. 論文標題 Amyloid-specific extraction using organic solvents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 100770 ~ 100770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mex.2019.100770	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 該当する
1. 著者名 Takeshi Kuroda, Yumi Ito, Naofumi Imai, Yukiko Nozawa, Hiroe Sato, Takeshi Nakatsue, Yoko Wada, Mitsuhiro Ueno, Masaaki Nakano, Ichiei Narita.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Significant association between renal function and area of amyloid deposition in kidney biopsy specimens from patients with AA amyloidosis associated with rheumatoid arthritis and AL amyloidosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kuroda Takeshi, Tanabe Naohito, Hasegawa Eriko, Wakamatsu Ayako, Nozawa Yukiko, Sato Hiroe, Nakatsue Takeshi, Wada Yoko, Ito Yumi, Imai Naofumi, Ueno Mitsuhiro, Nakano Masaaki, Narita Ichiei	4. 巻 24
2. 論文標題 Significant association between renal function and area of amyloid deposition in kidney biopsy specimens in both AA amyloidosis associated with rheumatoid arthritis and AL amyloidosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 123 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13506129.2017.1338565	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 Kuroda Takeshi, Ito Yumi, Imai Naofumi, Nozawa Yukiko, Sato Hiroe, Nakatsue Takeshi, Wada Yoko, Ueno Mitsuhiro, Nakano Masaaki, Narita Ichiei	4. 巻 24
2. 論文標題 Significant association between renal function and area of amyloid deposition evident in kidney biopsy specimens in both AA and AL amyloidosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 151 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13506129.2017.1291421	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8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 黒田毅、上家潤一、伊藤由美、今井直史、長谷川絵理子、佐藤弘恵、小林大介、中枝武司、和田庸子、中野正明、成田一衛、山田俊幸
2. 発表標題 腎組織に組織学および生化学的に特異なSAA蛋白のサブタイプを認めた関節リウマチ合併AAアミロイドーシスの1例
3. 学会等名 第8回日本アミロイドーシス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Kuroda, Junichi Kamiie, Yumi Ito, Naofumi Imai, Eriko Hasegawa, Daisuke Kobayashi, Hiroe Sato, Takeshi Nakatsue, Yoko Wada, Masaaki Nakano, Ichiei Narita, Toshiyuki Yamada
2. 発表標題 Massive renal AA-amyloidosis: a histologically and biochemically distinctive subtype of SAA protein in reactive systemic amyloidosis
3. 学会等名 The XVIIth International Symposium on Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Kuroda, Junichi Kamiie, Yumi Ito, Naofumi Imai, Eriko Hasegawa, Daisuke Kobayashi, Hiroe Sato, Takeshi Nakatsue, Yoko Wada, Masaaki Nakano, Ichiei Narita, Toshiyuki Yamada
2. 発表標題 Massive renal AA-amyloidosis: a histologically and biochemically distinctive subtype of SAA protein in reactive systemic amyloidosis
3. 学会等名 The XVIth International Symposium on Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田 毅
2. 発表標題 AAアミロイドーシスの腎障害と臨床病理学的検討
3. 学会等名 第7回アミロイドーシス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Kuroda, Yumi Ito, Naofumi Imai, Yukiko Nozawa, Hiroe Sato, Takeshi Nakatsue, Yoko Wada, Mitsuhiro Ueno, Masaaki Nakano, Ichiei Narita.
2. 発表標題 Significant association between renal function and area of amyloid deposition in kidney biopsy specimens from patients with AA amyloidosis associated with rheumatoid arthritis and AL amyloidosis
3. 学会等名 The XVIth International Symposium on Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuroda Takeshi, Ito Yumi, Imai Naofumi, Nozawa Yukiko, Sato Hiroe, Nakatsue Takeshi, Wada Yoko, Ueno Mitsuhiro, Nakano Masaaki, Narita Ichiei
2. 発表標題 Significant association between renal function and area of amyloid deposition in kidney biopsy specimens in both AA and AL amyloidosis
3. 学会等名 The XVIth International Symposium on Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒田毅、野澤由貴子、佐藤弘恵、中枝武司、和田庸子、伊藤由美、今井直史、中野正明、成田一衛
2. 発表標題 関節リウマチに合併するAAアミロイドーシスとALアミロイドーシスの腎組織所見の検討
3. 学会等名 第5回日本アミロイドーシス研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒田毅、野澤由貴子、佐藤弘恵、中枝武司、和田庸子、伊藤由美、今井直史、中野正明、成田一衛
2. 発表標題 関節リウマチ合併AAアミロイドーシスとALアミロイドーシスの腎生検組織におけるアミロイド沈着量、臨床所見、腎組織学的所見の検討
3. 学会等名 第61回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takeshi Kuroda, Hiroe Sato	4. 発行年 2017年
2. 出版社 InTech	5. 総ページ数 18
3. 書名 Lupus	

〔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	上家 潤一 (Kamiie Junichi) (10400269)	麻布大学・獣医学部・准教授 (32701)	

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	中枝 武司 (Nakatsue Takeshi) (20464000)	新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101)	
研究分担者	和田 庸子 (Wada Yoko) (30608534)	新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (13101)	
研究分担者	山田 俊幸 (Yamada Toshiyuki) (50211636)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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