

令和元年5月14日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16123

研究課題名(和文)ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインに着目した全身性アミロイドーシス新規治療戦略

研究課題名(英文)Enzymatic remodeling of heparan sulfate: a therapeutic strategy for systemic amyloidoses

研究代表者

西辻 和親 (Kazuchika, Nishitsuji)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40532768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：トランスサイレチン(TTR)アミロイドーシス(ATTRアミロイドーシス)は日本国内にも集積地が存在する難治性疾患である。本研究により、TTRアミロイド線維の形成や細胞毒性がヘパラン硫酸S-ドメイン依存的であること、糖尿病性腎症の危険因子としての報告があるグリピカン5がATTRアミロイドーシス患者腎で蓄積していることが分かった。従ってヘパラン硫酸S-ドメインがATTRアミロイドーシスに新たな治療標的となり得ることやATTRアミロイドーシスで見られる腎不全にグリピカン5が関与し得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATTRアミロイドーシスは日本国内にも患者の集積地が存在する難治性の疾患である。本疾患には肝移植の有効性が確立されてはいるが、ドナー不足、患者やドナーに対する精神・肉体的な負担、移植後のアミロイドーシス進行といった問題、病気の進行や年齢等の理由により約8割の患者は移植手術の適用とならない。従ってより一般的かつ侵襲性の低い新たな治療方法の開発が必要である。本研究により、ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインがTTR線維の形成や細胞毒性の発揮に重要であることが分かり、ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインを選択的に酵素分解することによりATTRアミロイドーシス病態を制御する新たな治療戦略が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The highly sulfated domains of heparan sulfate (HS), also known as HS S-domains, consist of repeated trisulfated disaccharide units [iduronic acid (2S)-glucosamine (NS, 6S)] and are selectively remodeled by extracellular endoglucosaminase 6-sulfatases (Sulfs). Although HS S-domains are critical for signal transduction of several growth factors, their roles in amyloidoses are not yet fully understood. Here, we found HS S-domains in the kidney of a patient with transthyretin amyloidosis. In *in vitro* assays, heparin, a structural analog of HS S-domains, promoted aggregation of transthyretin in an HS S-domain-dependent manner. Interactions of cells with transthyretin fibrils and cytotoxicity of these fibrils depended on HS S-domains. Glypican-5, encoded by the susceptibility gene for nephrotic syndrome GPC5, was found to be accumulated in the transthyretin amyloidosis kidney. Thus, we propose that HS S-domains can be a novel therapeutic targets of transthyretin amyloidosis.

研究分野：生化学

キーワード：アミロイド アミロイドーシス ヘパラン硫酸 グリコサミノグリカン 細胞外糖鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは前駆体タンパク質が凝集して形成するアミロイドと呼ばれる線維状の不溶性物質が様々な臓器に沈着する難治性の疾患である。この内、全身性アミロイドーシスの一種である ATTR アミロイドーシスは主に肝で産生される変異型トランスサイレチン (TTR) をアミロイドの前駆体タンパク質とする疾患である (Koike, Expert Opin Med Diagn, 2010)。ATTR アミロイドーシスの患者数は日本国内でも多く、長野県と熊本県に集積地が存在し、これまでに 100 を超える変異が報告されている (Ando, Arch Neurol, 2005、Ikeda, Neurology, 2002)。現在 ATTR アミロイドーシスに対する肝移植の有効性が確立されてはいるが (Shimajima, JNeurol, 2008、Yamashita, Neurology, 2012)、ドナー不足、患者やドナーに対する精神・肉体的な負担、移植後のアミロイドーシス進行といった問題が存在し、さらに病気の進行や年齢等の理由により約 8 割の患者は移植手術の適用とならない。従って本疾患に対するより一般的かつ侵襲性の低い新たな治療方法の開発が必要とされる。

ヘパリン硫酸 (HS) は種々の細胞が合成するグリコサミノグリカンの一種で、直鎖状の細胞外糖鎖である。その構成単糖の種類や硫酸化パターンなどの違いによりコンドロイチン硫酸と区別される。HS は様々なアミロイドーシス患者組織においてアミロイドと共沈着することが報告されており (Snow, Lab Invest, 1987)、アミロイドーシスの発症や病態に関与することが示唆されている。HS 内では硫酸化修飾の程度によりいくつかのドメインが形成される。その内、HS 多硫酸化ドメインは 2 位が硫酸化されたイズロン酸及び 6、N 位が硫酸化されたグルコサミンから成る 2 糖 (IdoA2S-GlcNS6S) を構成単位とし、HS とそのリガンドとの結合を制御している。この HS 多硫酸化ドメインは 6 位の硫酸基を選択的に遊離する細胞外スルファターゼ Sulf により分解を受ける (図 1)。すなわち、Sulf は HS 生合成後、細胞外において HS の酵素的改変を行う唯一の酵素である。

我々はアルツハイマー病患者脳やそのモデルマウス脳において HS 多硫酸化ドメインが Aβ と共沈着していることを報告しており (Hosono-Fukao, Am J Pathol, 2012)、他の様々なアミロイドーシスにおいても HS 多硫酸化ドメインは重要な役割を果たすと考えられるが、その研究はあまり進んでいない。我々はさらに AApoA1 アミロイドーシスの原因である apoA-I 線維の細胞取り込みや細胞毒性が HS 多硫酸化ドメイン依存性であり、酵素的改変により apoA-I 線維の細胞毒性が制御可能であることを報告した (Kuwabara, J Biol Chem, 2015)。これらを踏まえ、本研究では脳や腎臓をはじめ様々な臓器に存在する HS に着目し、その多硫酸化ドメインの酵素的改変による病態制御という ATTR アミロイドーシスの新たな治療戦略の基盤の構築を

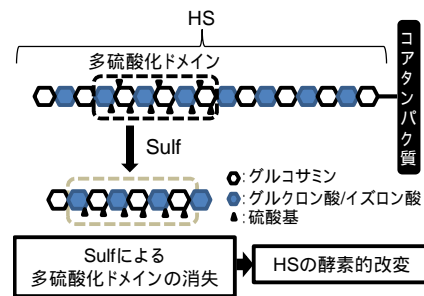


図 1 細胞外スルファターゼ Sulf による HS の酵素的改変。

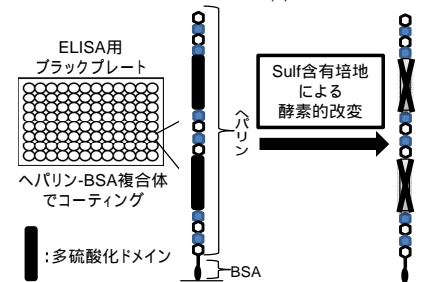
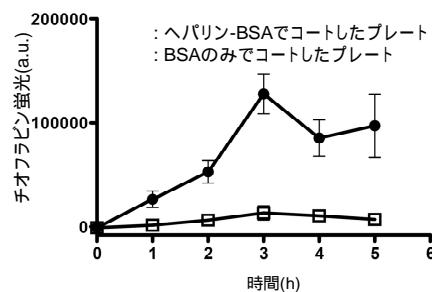


図 2 ヘパリン-BSA 複合体でコートした ELISA プレートにおける TTR 線維形成 (上)。各ウェルを Sulf 含有培地で処理することにより、HS 多硫酸化ドメインの影響を評価することができる (下)。

目指す。また HS が腎機能に深く関与することに着目し、本疾患で頻発する腎アミロイド沈着による腎障害の発症機序に関する知見を得る。

2. 研究の目的

本研究では、ヘパラン硫酸(HS)の唯一の生合成後修飾である HS 多硫酸化ドメインの細胞外脱硫酸化反応(酵素的改変)に着目し、トランスサイレチン(TTR)を原因タンパク質とする全身性アミロイドーシスの一種ATTRアミロイドーシスの HS 酵素的改変による新規治療戦略の基盤開発を行う。本疾患患者組織の抗 HS 多硫酸化ドメイン抗体を用いた免疫染色、in vitro 実験系を用いた TTR 線維形成や TTR 線維-細胞間相互作用の解析により HS 多硫酸化ドメインの本疾患への関与を探索し、さらに本疾患モデルマウスを用いて検討する。HS は腎機能に関与するため、本疾患で頻発する腎アミロイド沈着による腎障害の分子機構を HS 多硫酸化ドメインの観点から解析する。

3. 研究の方法

(1) ATTR アミロイドーシス患者組織切片の免疫染色

ATTR アミロイドーシス患者組織において HS 多硫酸化ドメインが TTR アミロイドと共存しているかどうかについて、HS 多硫酸化ドメイン特異的抗体(RB4CD12)を用いた免疫染色により解析した。アミロイド沈着はコンゴレッド及び抗 TTR 抗体による染色で検出した。また、FGF2 の腎蓄積は腎障害に関与すること(Vasko, AmJPhysRenalPhys, 2009)、HS 多硫酸化ドメイン及び Sulf は FGF シグナリングを制御すること(Lamanna, J Biol Chem, 2008)が報告されている。そこで、本疾患で頻発する腎アミロイド沈着による腎不全に関し、FGF2 が特に糸球体に蓄積しているかどうかを免疫染色により調べる。HS プロテオグリカンであるグリピカン-5(GPC5)は腎不全時における FGF2 蓄積に関与することが報告されているため(Okamoto, AmJPathol, 2015)、GPC5 の免疫染色も行う。

(2) TTR 線維化の評価

Fmoc 固相合成法もしくは大腸菌由来の野生型あるいは V30M 型(最も頻繁にみられる変異

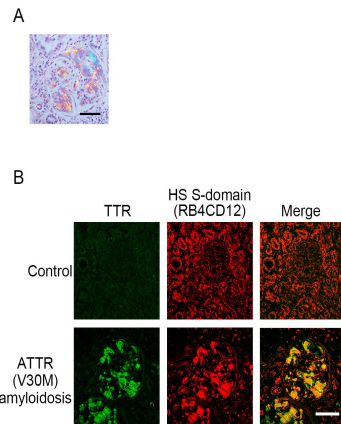


図 3 ATTR 患者腎のコンゴレッド染色 (A) と抗 TTR 抗体及び RB4CD12 抗体を用いた免疫染色像 (B)。

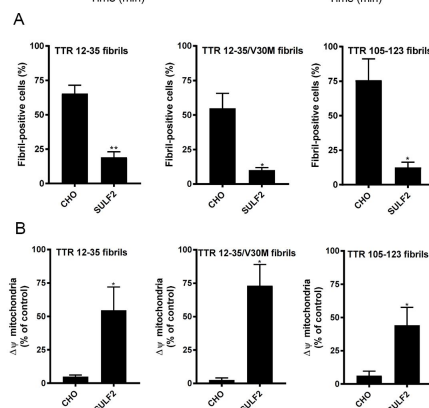
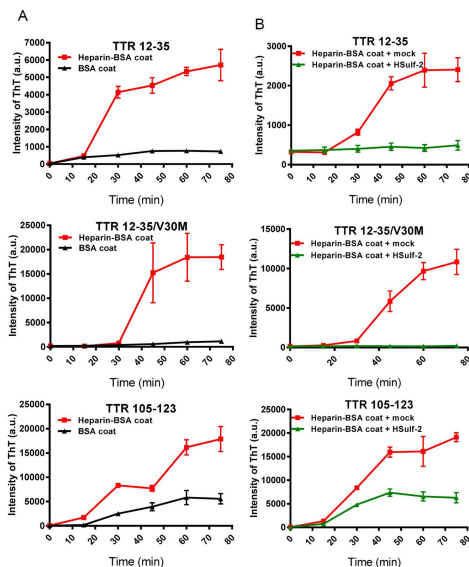


図 4,5 TTR の線維形成(図 4A,B)、TTR 線維の細胞による取り込みや細胞毒性() 患者腎のコンゴレッド染色(図 5A,B)はヘパラン硫酸多硫酸化ドメイン依存的だった。

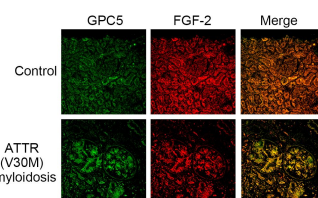


図 6 ATTR アミロイドーシス患者腎には GPC5 と FGF2 が蓄積していた。

図 2 細胞外スルファターゼによる HS の酵素的改変

型) TTR12-35、105-123、81-127 アミノ酸残基の各断片を用いた。12-35 断片は N 末端側に位置し、ヘパリン結合部位を有することが報告されており (Noborn, PNAS, 2011) 105-123 及び 81-127 断片は C 末端側で患者組織に沈着が多くみられる (Bergström, JPathol, 2005)。ヘパラン硫酸の多硫酸化アナログであるヘパリンをヘパラン硫酸のモデルとして使い、線維の形成は線維/アミロイド構造を特異的に認識するチオフラビン T(ThT)の蛍光モニタリングにより評価した。実験系の概要を図 2 に示す。ヘパリン-BSA 複合体でコートした ELISA プレートをヒト Sulf-2 安定発現細胞株の培地でしよりすることにより、ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの酵素的改変を誘導した。

(3) 培養細胞を用いた実験系

TTR 断片を 37 で 7 日間インキュベートすることにより得られた TTR 線維を用いた。線維-細胞間の相互作用に対するヘパラン硫酸の影響を調べるため、CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞とそのヘパラン硫酸欠損株 pgsD-677 細胞を用いた。また、ヒト Sulf-2 安定発現細胞株を用いてヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの影響を評価した。培養した細胞を蛍光標識した線維と共にインキュベートし、共焦点顕微鏡により TTR 線維陽性細胞を観察した。

4. 研究成果

ATTR アミロイドーシス患者腎においてヘパラン硫酸多硫酸化ドメインが TTR アミロイド線維と共沈着していることが分かった (図 3)。

また、ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの構造アナログであるヘパリンにより TTR の線維化は大幅に促進されたが、その効果はヘパラン硫酸多硫酸化ドメイン依存的であることが分かった。さまざまな TTR 断片から調製した TTR 線維の細胞による取り込みや細胞毒性 (ミトコンドリア機能障害) は細胞外ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインに依存的であった。すなわち、ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの Sulf による酵素的改変が ATTR アミロイドーシスの病態制御の新たな戦略となり得ることが示唆された (図 4,5)。

ATTR 患者腎では GPC5 や FGF2 が蓄積していた (65)。従って、ATTR アミロイドーシスでよく見られる腎障害が GPC5 の蓄積とそれに続く過剰な FGF2 シグナリングの活性化により起こる可能性が示唆された。

以上、本研究成果に基づき、ヘパラン硫酸の酵素的改変を用いた新たな全身性アミロイドーシスの治療戦略を提唱した。加えて、全身性アミロイドーシスの死因の上位を占める腎機能障害において、GPC5 の腎蓄積とそれによる FGF2 シグナリングの過剰な活性化が新たな治療標的となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, et al. Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. *Scientific Reports*. 2017;7(1).
2. Tsuneyama K, Nishitsuji K, Matsumoto M, Kobayashi T, Morimoto Y, Tsunematsu T, et al. Animal models for analyzing metabolic syndrome-associated liver diseases. *Pathol Int*. 2017;67(11):539-46.
3. Nishitsuji K, Uchimura K. Sulfated glycosaminoglycans in protein aggregation diseases. *Glycoconj J*. 2017;34(4):453-66.
4. Kimura H, Mikawa S, Mizuguchi C, Horie Y, Morita I, Oyama H, et al. Immunochemical Approach for Monitoring of Structural Transition of ApoA-I upon HDL Formation Using

Novel Monoclonal Antibodies. *Sci Rep.* 2017;7(1):2988.

5. Zhang Z, Takeda-Uchimura Y, Foyez T, Ohtake-Niimi S, Narentuya, Akatsu H, et al. Deficiency of a sulfotransferase for sialic acid-modified glycans mitigates Alzheimer's pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(14):E2947-E54.
6. Nishitsuji K. Heparan sulfate S-domains and extracellular sulfatases (Sulfs): their possible roles in protein aggregation diseases. *Glycoconj J.* 2018;35(4):387-96.
7. Nishitsuji K, Watanabe S, Xiao J, Nagatomo R, Ogawa H, Tsunematsu T, et al. Effect of coffee or coffee components on gut microbiome and short-chain fatty acids in a mouse model of metabolic syndrome. *Sci Rep.* 2018;8(1):16173.
8. Mizuguchi C, Nakamura M, Kurimitsu N, Ohgita T, Nishitsuji K, Baba T, et al. Effect of Phosphatidylserine and Cholesterol on Membrane-mediated Fibril Formation by the N-terminal Amyloidogenic Fragment of Apolipoprotein A-I. *Sci Rep.* 2018;8(1):5497.
9. Ohgita T, Takechi-Haraya Y, Nadai R, Kotani M, Tamura Y, Nishikiori K, et al. A novel amphipathic cell-penetrating peptide based on the N-terminal glycosaminoglycan binding region of human apolipoprotein E. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019;1861(3):541-9.
10. Kameyama H, Uchimura K, Yamashita T, Kuwabara K, Mizuguchi M, Hung SC, et al. The Accumulation of Heparan Sulfate S-Domains in Kidney Transthyretin Deposits Accelerates Fibril Formation and Promotes Cytotoxicity. *Am J Pathol.* 2019;189(2):308-19.

〔学会発表〕(計6件)

1. Nishitsuji K., Inoue K., Akatsu H., Tsuneyama, K. Gut dysbiosis and altered plasma short chain fatty acid profile underlie the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *The Liver Meeting 2017 (Walter E. Washington Convention Center, Washington DC), 2017*
2. Nishitsuji K. Glycosaminoglycans in protein aggregation diseases. 1st International Conference on the Glycobiology of Nervous System, (Korea University, Seoul, Korea) (招待講演), 2017
3. 亀山泰和、内村健治、山下太郎、水口峰之、坂下直実、斎藤博幸、奥平桂一郎、安東由喜雄、西辻和親 ATTR アミロイドーシスにおけるヘパラン硫酸多硫酸化ドメイン(S-ドメイン)の役割の解明 第5回日本アミロイドーシス研究会学術集会 京都, 2017
4. 亀山泰和、内村健治、山下太郎、水口峰之、坂下直実、斎藤博幸、奥平桂一郎、安東由喜雄、西辻和親 ATTR アミロイドーシスにおけるヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの役割の解明 膜シンポジウム 2017 富山, 2017
5. Kazuchika Nishitsuji, Kenji Uchimura, Taro Yamashita, Kaori Kuwabara, Hirokazu Kameyama, Mineyuki Mizuguchi, Keiichiro, Okuhira, Takashi Ohgita, Hiroyuki Saito, Yukio Ando, Pathological roles of heparan sulfate S-domains in ATTR amyloidosis, XVth International Symposium on Amyloidosis (KKR Hotel Kumamoto, Kumamoto, Japan), 2018
6. Kazuchika Nishitsuji, Kenji Uchimura, Taro Yamashita, Hirokazu Kameyama, Kaori Kuwabara, Mineyuki Mizuguchi, Shang-Cheng, Hung, Keiichiro Okuhira, Takashi Ohgita, Hiroyuki Saito, Yukio Ando, HS S-domains that accumulate in ATTR amyloidosis patients accelerate and mediate formation and cytotoxicity of transthyretin fibrils, 2018 ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR GLYCOBIOLOGY (Hilton New Orleans Riverside,

New Orleans, LA), 2018

〔図書〕(計1件)

1. 西辻和親、内村健治 アルツハイマー病 発症メカニズムと新規診断法・創薬・治療開発 5
5-6 4、アミロイド の蓄積に関わる構造糖鎖の発見、株式会社 エヌ・ティー・エス、2018

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。