

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890164

研究課題名（和文） 新たなアプローチによるアミロイド沈着機構の解明と原因蛋白質の検出法に関する研究

研究課題名（英文） Novel methods for detection of amyloidogenic proteins and analyses of amyloid formation.

研究代表者

植田 光晴（UEDA MITSU HARU）

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：60452885

研究成果の概要：

SELDI-TOF MS を用い、異型 TTR を迅速に検出できることを明らかにした。アミノ酸変異に由来する理論的な質量差と SELDI-TOF MS 実測値の差は良好に相関した。本システムは FAP の診断に有効と考えられる。しかし、一部の TTR 変異型の FAP で異型 TTR が検出困難であることも判明した。その理由として、(1) 野生型 TTR と質量差がわずか（15 Da 未満）である場合と、(2) 異型 TTR の産生が低下している場合があった。これらの変異型 TTR を持つ FAP は稀であるが注意が必要である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,340,000	0	1,340,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,690,000	405,000	3,095,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：アミロイドーシス、質量分析、SELDI-TOF MS、DNA マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは、可溶性である蛋白質が様々な原因（濃度の増加、遺伝子変異など）により、不溶性の線維状蛋白質であるアミロイドに形態を変え、細胞外に沈着し臓器障害を引き起こす難治性の疾患群であり確立された治療法はない。原因蛋白質（前駆蛋白質）の立体構造変化がアミロイド線維形成の引き金となるため、アミロイドーシスは、パーキンソン病などの多くの難病が属するコンフォメーション病の一つと位置づけられている。また急性期蛋白質である血清アミロイド A (SAA) や栄養アセスメント蛋白質である

トランスサイレチン（TTR）など検査医学で極めて重要な蛋白質がアミロイド前駆蛋白質となっている。SAA を前駆蛋白質として生じる AA アミロイドーシスや、TTR を前駆蛋白質として生じる家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）に加えて、アルツハイマー病、プリオン病などがアミロイドーシスに分類される。これらのアミロイド前駆蛋白質の構造やアミノ酸配列に共通した傾向は認識されていないが、形成されるアミロイド線維は類似した構造や性質を有している。

本疾患の診断、治療後の経過観察や病態解析などにアミロイド前駆蛋白質の解析が必

須であるが、多大な労力が必要でありハイスルーポットな解析法の開発が必要である。

2. 研究の目的

前駆蛋白質の濃度上昇が発症の基本的な要因である AA アミロイドーシスと、前駆蛋白質の遺伝子変異が基本的な原因である FAP の病態解析と診断および治療法の開発である。

3. 研究の方法

(1) SELDI-TOF MS を用いたアミロイド前駆蛋白質のハイスルーポットな質量分析

FAP 患者と AA アミロイドーシス患者および AA アミロイドーシスモデルマウスの血清を用いて解析を行った。

陰イオン交換体がプロテインチップのスポット表面にコーティングされた Q10 チップと陽イオン交換体がコーティングされた CM10 チップを用いて、pH3~9 のバッファーで検体を希釈し、SELDI-TOF MS で測定を行った。

(2) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析

FAP 凍結組織（心臓、腎臓）と AA アミロイドーシス惹起マウス凍結組織（肝臓、脾臓）から RNA を抽出し、Hitachi のオリゴ DNA チップである Acegene で遺伝子発現を網羅的に解析した。また、候補遺伝子の発現をリアル PCR 法で確認した。

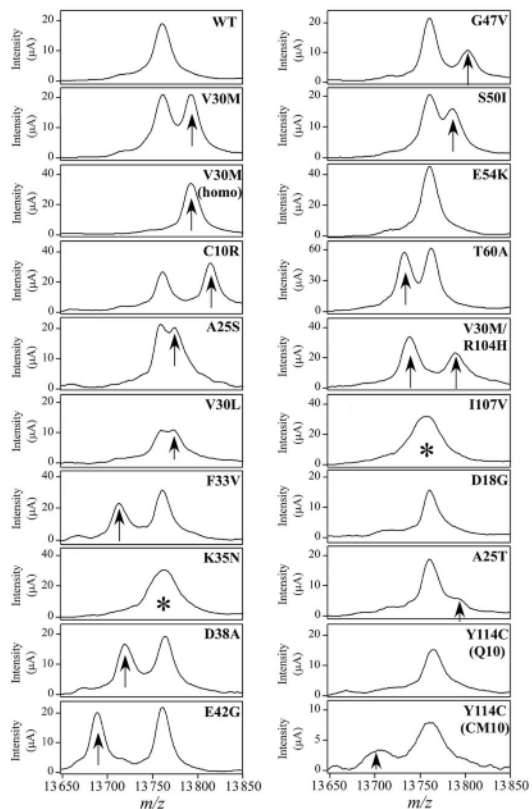
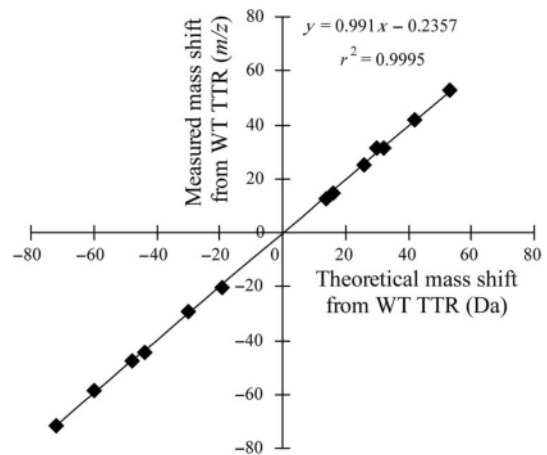
(3) 細胞培養モデルを用いたアミロイド前駆蛋白質の代謝動態解析

平滑筋由来の細胞株（Glomotel）と神経由来の細胞株（SH-SY5Y）、マクロファージ由来の細胞株（J774.1）を用いて、TTR と SAA の挙動を解析する。

4. 研究成果

SELDI-TOF MS プロテインチップを用い、FAP の病原蛋白質である異型 TTR を迅速に検出できることを明らかにした。野生型と異型 TTR（V30M）は、Q10 チップを用いて pH 7.0 の 50 mM リン酸バッファーで検体を希釈した場合に最も明瞭に観察できた。アミノ酸変異に由来する理論的な質量差と SELDI-TOF MS 実測値の差は良好に相関した（右図）。

本システムは迅速な FAP 診断に有効であると考えられる。しかし、一部の TTR 変異型の FAP で異型 TTR が血中より検出しにくいことも判明した。検出困難な理由として、(1) 野生型 TTR と質量差がわずか（15 Da 未満）である場合と、(2) 異型 TTR の産生が低下している場合があった（右図）。



これらの変異型 TTR を持つ FAP は稀であるものの、本システムを用いた診断時には注意が必要である。FAP の大部分をしめる変異型である V30M は、本システムで良好に検出できるため、FAP のスクリーニングとして有用と考えられる。また、TTR 遺伝子の DNA シーケンスとあわせて実施することで、より確実な遺伝学的解析が可能と考える。

本システムを用いて、眼房水と髄液からも異型 TTR が検出できた。また、野生型 TTR と等電点が異なる Y114C は、CM10 チップを用いて pH 3.0 の 50 mM グリシンバッファーで検体を希釈した場合にはじめて観察できた。野生型と異型 TTR の等電点の違いを利用して検

出しにくい変異型を解析できる点も本システムの利点の一つと考えられる。

AA アミロイドーシス患者血清から SAA を解析したが、SAA のアミノ酸が 1 ~ 2 つ欠落したものが混在して観察された。また、SAA 遺伝子多型やアイソタイプの存在により、血清の SAA 由来のピークが多く混在したため、複雑なピーク群となることが確認できた。

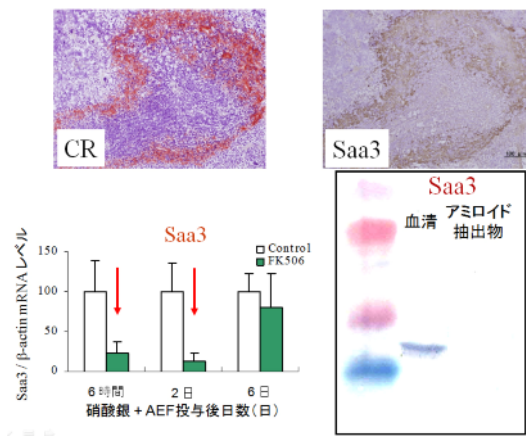
AA アミロイドーシスモデルマウス血清から、従来の解析法の主体である抗体を用いた解析 (ELISA など) では分離検出が困難であった Saa1 と Saa2 が、SELDI-TOF MS で検出できることも確認した。

AA アミロイドーシスモデルマウスと炎症のみ惹起したマウスの 2 群で、SELDI-TOF MS で得られた血清のピークパターンを分析し、濃度が変動しているいくつかのピークが確認できたが、由来蛋白質の同定までには至らなかった。今後のさらなる解析が必要である。

アミロイド形成に関連した因子の網羅的遺伝子発現解析を行った。

具体的には、マウスに AA アミロイドーシスを惹起させ、これまでにモデルマウスでアミロイド抑制効果を確認し新規の治療薬候補であるタクロリムス投与後に肝臓を採取し RNA を抽出した。タクロリムスによるアミロイド抑制効果に關与すると予測される遺伝子発現を解析するために、DNA マイクロアレイで網羅的に発現変動を解析し、Saa3 遺伝子の発現が著明に抑制されていることを明らかにした。リアルタイム PCR 法で確認したところ、Saa3 の mRNA レベルが確かに減少していることを確認した。抗マウス Saa3 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、アミロイド沈着部位と一致して Saa3 の陽性像が得られた。しかし、ウエスタンブロットの結果から、アミロイド線維抽出物には Saa3 が含まれないと考えられた。本アミロイドーシスに Saa3 がどの様に關与するのか、更なる検討が必要である (右図)。

FAP 剖検時凍結組織 (心臓、腎臓) から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを行ったが、良質な RNA が抽出困難であったため、結果にばらつきが生じ、リアルタイム PCR 法で確認した mRNA レベルとの整合性が得られなかった。剖検時に凍結組織として保存した時点で mRNA の分解がかなり進行していたものと考えられる。



平滑筋由来、神経由来、マクロファージ由来の各細胞株にアミロイド前駆蛋白質である TTR と SAA を加えて、細胞に対する影響を解析した。本システムを用いて、invitro でアミロイド形成を評価できるモデルの開発が目標であるが、本研究期間内でアミロイド形成を生じる条件の確立までには至らなかった。今後、更なる条件設定を行い検討をすすめる。

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 17 件)

Ueda M, Misumi Y, Mizuguchi M, Nakamura M, Yamashita T, Sekijima Y, Ota K, Shinriki S, Jono H, Ikeda SI, Suhr OB, Ando Y. SELDI-TOF MS evaluation of variant transthyretins for diagnosis and pathogenesis of familial amyloidotic polyneuropathy. *Clin Chem* 2009;55:1223-1227 (査読有)

Ibusuki M, Fujimori H, Yamamoto Y, Ota K, Ueda M, Shinriki S, Taketomi M, Sakuma S, Shinohara M, Iwase H, Ando Y. Midkine in plasma as a novel breast cancer marker. *Cancer Sci* 2009 (in press) (査読有)

Kudo M, Jono H, Shinriki S, Yano S, Nakamura H, Makino K, Hide T, Muta D, Ueda M, Ota K, Ando Y, Kuratsu J. Antitumor effect of humanized anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) on glioma cell proliferation. *J Neurosurg* 2009 (in press) (査読有)

Shinriki S, Ueda M, Ota K, Nakamura M, Kudo M, Ibusuki M, Kim J, Yoshitake Y, Fukuma D, Jono H, Kuratsu J, Shinohara M, Ando Y. Aberrant expression of serum amyloid A in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology*

and Medicine 2009 (in press) (査読有)
Uchiba M, Imamura T, Hata H, Tatetsu H, Yonemura Y, Ueda M, Wada Y, Mitsuya H, Ando Y. Excessive fibrinolysis in AL-amyloidosis is induced by urokinase-type plasminogen activator from bone marrow plasma cells. *Amyloid* 2009 (in press) (査読有)
植田光晴、中熊るみ、安東由喜雄 .CADASIL . *臨床病理* 57: 242-251, 2009. (査読無)
植田光晴、安東由喜雄 .アミロイドーシスに対する検査システムの構築 - 確実な早期診断、早期治療を目指した検査システムの構築 - . *日本臨床検査自動化学会会誌*, 34: 3-14, 2009. (査読無)
植田光晴、安東由喜雄 .質量分析法を用いた臨床検査 . *臨床化学* 38: 74-80, 2009. (査読無)
Ando Y, Ueda M. Novel methods for detecting amyloidogenic proteins in transthyretin related amyloidosis. *Front Biosci* 2008;13:5548-5558. (査読有)
Okamoto S, Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Misumi Y, Obayashi K, Horibata Y, Uchino M. Evaluation of myocardial changes in familial amyloidotic polyneuropathy after liver transplantation. *Intern Med* 2008;47:2133-7. (査読有)
Obayashi K, Olsson M, Anan I, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Yamashita T, Miida T, Ando Y, Suhr OB. Impact of serotonin transporter and catechol-O-methyl transferase genes polymorphism on gastrointestinal dysfunction in Swedish and Japanese familial amyloidotic polyneuropathy patients. *Clin Chim Acta* 2008;398:10-4. (査読有)
Ota K, Fujimori H, Ueda M, Shiniriki S, Kudo M, Jono H, Fukuyoshi Y, Yamamoto Y, Sugiuchi H, Iwase H, Shinohara M, Ando Y. Midkine as a prognostic biomarker in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2008;99:655-62. (査読有)
Misumi Y, Ueda M, Ueda A, Hujimori H, Shinriki S, Meng W, Kim J, Saito S, Obayashi K, Nakamura M, Ando Y, Uchino M. Ultrasonication-induced Amyloid Fibril Formation at Physiological pH. *Amyloid* 2008;15 234-239. (査読有)
Kim J, Motomiya Y, Ueda M, Nakamura M, Misumi Y, Saito S, Ikemizu S, Misumi S, Ota K, Shinriki S, Kai H, Ando Y. Role of conformational change in the C-terminus of 2-microglobulin in dialysis-related amyloidosis. *Ann Clin*

Biochem 2008;45:489-95. (査読有)
Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Zeledon ME, Hirahara T, Hirai T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Inomata H, Uchino M. Effect of liver transplantation on transthyretin Tyr114Cys-related cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2008;70:123-8. (査読有)
植田光晴、安東由喜雄 .アミロイドーシスの中におけるアルツハイマー病の位置づけ . *臨床検査* 52: 273-280, 2008. (査読無)
植田光晴、安東由喜雄 .遺伝子診断の実際「神経・筋疾患」. *臨床検査* 51: 1401-1414, 2007. (査読無)

[学会発表](計15件)

植田光晴、三隅洋平、山下太郎、中熊るみ、大隈雅紀、堀端洋子、城野博史、大林光念、池田勝義、安東由喜雄 : FAPのスクリーニングにおける SELDI-TOF MSの有用性の検討 *第50回日本神経学会総会*, May 20-22, 2009, 仙台
植田光晴、西村仁志、関根盛、平野照之、山本景一、眞部正弘、藤森裕巳、田邊裕子、堀端洋子、城野博史、大林光念、池田勝義、安東由喜雄 : 脳梗塞患者における Lp-PLA2 血中濃度の検討 . *第18回日本臨床科学会九州支部総会、第52回日本臨床検査医学会九州地方会*, Feb 14, 2009, 福岡
植田光晴、三隅洋平、山下太郎、中熊るみ、大隈雅紀、堀端洋子、城野博史、大林光念、中村政明、池田勝義、安東由喜雄 : 家族性アミロイドポリニューロパチーにおける異型 TTR の動態解析と診断における有用性 *第55回日本臨床検査医学会学術集会*, Nov 27-30, 2008, 名古屋
植田光晴、安東由喜雄 : AA アミロイドーシスに対する新たな治療標的の可能性 - 動物モデルを用いたタクロリムスのアミロイド抑制効果 - . *イブニングセッション「タクロリムスの可能性を探る」*, *第23回日本臨床リウマチ学会*, Nov 29-30, 2008, 横浜
植田光晴、中熊るみ、上村弘子、佐々木大介、浦田美秩代、康東天、安東由喜雄、上平憲 : 「リアルタイム PCR 法による EB ウィルス定量検査の精度検討」 - JMCoe 標準化アプリケーションを用いて - , *第3回九州遺伝子診断研究会*, Sep 13, 2008, 福岡
Ueda M, Misumi Y, Yamashita T, Sekijima Y, Mizuguchi M, Fijimori H, Ohya Y, Matsushima K, Horibata Y, Jono H, Obayashi K, Ikeda SI, Yukio Ando Y. A

Rapid and Reliable Method Detecting Variant Transthyretin by Surface-Enhanced Laser Desorption Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry. *The VIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and 1st International Workshop on Hereditary Amyloidosis*. September 2 - 5, 2008, London, United Kingdom.

植田光晴、三隅洋平、中熊るみ、大矢雄希、関島良樹、山下太郎、堀端洋子、城野博史、大林光念、池田修一、安東由喜雄：SELDI TOF-MS を用いた家族性アミロイドポリニューロパチーの変異型と異型 TTR レベルの関連性。第48回日本臨床化学会年次学術集会，Aug 29-31, 2008, 浜松

植田光晴、三隅洋平、山下太郎、関島良樹、岡本定久、堀端洋子、城野博史、大林光念、池田修一、内野誠、安東由喜雄：プロテインチップを用いた FAP の診断および病態解析。第49回日本神経学会総会，May 15-17, 2008, 横浜

植田光晴、安東由喜雄：当院における栄養状態アセスメントと NST 活動。第3回熊本3会合同カンファレンス，Dec 2, 2007, 熊本

植田光晴、孟薇、三隅洋平、齋藤史織、大林光念、堀端洋子、中熊るみ、中川邦子、永田四郎、安東由喜雄：SELDI-TOF MS を用いた異型トランスサイレチンの簡便かつ迅速な検出法。第54回日本臨床検査医学会学術集会，Nov 22-25, 2007, 大阪

植田光晴、孟薇、大林光念、堀端洋子、安東由喜雄：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 のアミロイド抑制効果と T 細胞の関与。第35回日本臨床免疫学会総会，Oct 19-20, 2007, 大阪

植田光晴、中川邦子、中熊るみ、中村政明、永田四郎、安東由喜雄：当院における遺伝子検査システム（感染症と遺伝性疾患に対する検査を中心として）。第2回九州遺伝子診断研究会，Sep 15, 2007, 熊本

植田光晴、安東由喜雄：遺伝子疾患の画期的診断法の確立と新たな病態解析。シンポジウム「分析化学における進歩と臨床応用」第26回日本臨床化学会夏季セミナー，July 5-7, 2007, 志摩

植田光晴、安東由喜雄、中村政明、山下太郎、大林光念、植田明彦、三隅洋平、内野誠：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 投与の遺伝子発現に及ぼす影響。第48回日本神経学会総会，May 16-18, 2007, 名古屋

植田光晴、安東由喜雄：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 投与の遺伝子発現に及ぼす影響。第51回日本リウマチ

学会総会・学術集会，Apr 26-29, 2007, 横浜

〔図書〕(計 12 件)

植田光晴、山下太郎、安東由喜雄。家族性アミロイドポリニューロパチーには肝移植しかないのか。岡本幸市、水澤英洋、棚橋紀夫 編集「EBM 神経疾患の治療 2009-2010」中外医学社(東京)，468-473, 2009

Ueda M, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Misumi Y, Shinriki S, Ueda A, Zeledon R ME, Himeno S, Saito S, Kim J, Meng W, Uchino M. FK506 inhibits murine AA amyloidosis without modulating serum SAA levels. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p99-101, 2007

Himeno S, Ueda M, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Sun X, Misumi Y, Shinriki S, Ueda A, Uji Y, Saito S, Kim J, Meng W, Ando Y. Urinary transthyretin: a possible biochemical marker in the early stage of renal dysfunction. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p146-148, 2007

Kim J, Motomiya Y, Nakamura M, Ueda M, Saito S, Misumi Y, Himeno S, Obayashi K, Shinriki S, Meng W, Semba U, Kai H, Ando Y. Role of the C-terminal amino acids in 2-microglobulin amyloid formation. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p16-18, 2007

Misumi Y, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Himeno S, Ueda M, Obayashi K, Sun X, Saito S, Kim J, Shinriki S, Meng W, Ueda A, Uchino M. An autopsy case of familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Val30Met 10 years after liver transplantation: changes in the amount of amyloid deposits in the pancreas. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p169-171, 2007

Obayashi K, Yamashita T, Ueda M, Nakamura M, Asonuma K, Inomata Y, Uchino M, Tanaka K, Ando Y. Amyloid neuropathy in a Japanese domino liver-transplanted recipient. In "XIth International

Symposium on Amyloidosis”, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p172-174, 2007

Okamoto S, Yamashita T, Ando Y, Nakamura M, Ueda M, Uchino M. Comparison of cardiomyopathy in FAP after orthotopic liver transplantation with those of non-transplanted FAP patients. In *“XIth International Symposium on Amyloidosis”*, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p180-181, 2007

Saito S, Ando Y, Ueda M, Kim J, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Misumi Y, Shinriki S, Himeno S, Meng W, Ishima Y, Akaike T, Otagiri M. Effect of nitric oxide in transthyretin-related amyloidosis. In *“XIth International Symposium on Amyloidosis”*, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p185-187, 2007

Shinriki S, Ueda M, Yamashita T, Obayashi K, Sun X, Himeno S, Ueda A, Misumi Y, Saito S, Kim J, Meng W, Shinohara M, Ando Y. Amyloid deposition in the tongue of patients with familial amyloidotic polyneuropathy. In *“XIth International Symposium on Amyloidosis”*, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p196-198, 2007

Ueda A, Ueda M, Yamashita T, Hirano T, Nakamura M, Misumi Y, Meng W, Ito T, Uchino M, Ando Y. Proliferation of smooth muscle cells in the tunica intima of cerebral vessels in familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Y114C. In *“XIth International Symposium on Amyloidosis”*, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p202-204, 2007

Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Hirahara T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Uchino M. Effects of liver transplantation on hereditary cerebral amyloid angiopathy associated with ATTR Y114C. In *“XIth International Symposium on Amyloidosis”*, Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p211-213, 2007

Zeledon R, Ando Y, Asonuma K, Nakamura M, Ueda M, Sun X, Fujii J, Inomata Y. Effect of tacrolimus and cyclosporine on transthyretin (TTR) metabolism in rats: a long term analysis. In *“XIth International Symposium on Amyloidosis”*, Skinner M, Berk J,

Connors L, Seldin D (Eds.), CRC Press, New York, p214-216, 2007

6 . 研究組織

(1)研究代表者

植田 光晴 (UEDA MITSU HARU)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：60452885

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし