

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07389

研究課題名（和文）ProteomeとLipidomeを組み合わせたアミロイド沈着機序の解明

研究課題名（英文）The Elucidation of the mechanism of amyloid deposition by combining proteome and lipidome

研究代表者

堂本 裕加子（新谷裕加子）（Yukako, Shintani-Domoto）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30596961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アミロイドーシスは、生体内に存在するアミロイド前駆蛋白質（APP）が不溶性のアミロイド線維を形成し細胞基質に沈着する疾患である。現在、APPは40種類以上報告されているが、沈着機序については明らかになっていないことが多い。申請者は液体クロマトグラフィー質量分析法とイメージング質量分析法を用いて、APPのうち頻度の高いSerum Amyloid AとTransthyretinに由来するペプチド鎖の生体内での存在比や組織内分布についての報告を行った。今後は背景組織における内因性プロテアーゼに着目し、研究を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、診断のための病理検査に伴って得られるヒトのホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体を用いて、複数の質量分析法を行い、トリプシン消化ペプチド鎖の組織内分布を示すことでアミロイド線維形成と内因性プロテアーゼに関する考察を報告した。

FFPE検体は非侵襲的な方法で得られ、また、各施設において長期保存されているため、希少例が多く含まれている。したがって、FFPE検体を用いて、疾患病態の解明に取り組む試みはアミロイドーシスに限らず他の多くの疾患に応用可能であり、病理検体を用いる全ての研究者にとって有益な研究となり得る。

研究成果の概要（英文）：Amyloidosis is a disease in which amyloid precursor protein (APP) are deposited in the extracellular matrix and cause organ damage. Currently 42 different APPs have been reported. In the recent years, therapies for some subtypes of amyloidosis have been established but it remains unclear how APP peptides are truncated in vivo during the process of deposition as amyloid. We investigated the distribution of Serum Amyloid A (SAA) and transthyretin (TTR) derived tryptic peptides using Imaging mass spectrometry (MS) and liquid chromatography MS. We showed that the N-terminal SAA2-15 plays a critical role in the formation of SAA fibrils.

研究分野：アミロイドーシス

キーワード：アミロイド プロテオーム 心血管病理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスとは、アミロイド前駆蛋白質が不溶性のアミロイド線維を形成し、様々な臓器の細胞外間質に沈着することで、臓器障害をきたす疾患群の総称である。アミロイド線維を形成する前駆蛋白質の種類は現在 40 種類以上が同定されており、個々の前駆蛋白質のアミノ酸配列は異なっているものの、シート構造をとり、DFS (direct fast scarlet) あるいは Congo red 染色で陽性となるという共通した特徴を持っている。

申請者は先の「絶対定量的質量分析法を用いたアミロイド前駆蛋白質の同定」( 科研費課題番号 17K08717 ) で、アミロイドーシス剖検例 30 例の心臓のホルマリン固定パラフィン包埋 ( FFPE ) 検体からアミロイド沈着部をレーザーマイクロダイセクション ( LMD ) で回収し、PURE システムを用いて 13 種類のアミロイド前駆蛋白質に由来する 98 種類の同位体ペプチド鎖の絶対定量を行った ( 文献#1 )。各症例とも AA ; Serum Amyloid A、ATTR ; Amyloid transthyretin、AL- ; 軽鎖、AL- ; 軽鎖、2M ; 2 ミクログロブリン等のアミロイド前駆蛋白質が同定され、病型を決定し得た ( 文献#2 )。さらに、アミロイド共沈着蛋白質であるアポリポ蛋白質 ( ApoA1 ; Apolipoprotein A1、ApoA4 ; Apolipoprotein A4、ApoE ; Apolipoprotein E ) が病型に相当する蛋白質と正の相関を示すことが分かった ( 図 1 : 文献#1 の Fig. 5 )。

図 1

Table 5. Spearman's rank correlation coefficient for Group 2 amyloid proteins with Group 1 amyloid proteins in major amyloid subgroups.

Subgroup / Protein		Apo A1		Apo A4		Apo E		Lysozyme	
		r	p	r	p	r	p	r	p
AA	SAA	0.352	NS	0.414	<0.01	0.367	NS	0.122	NS
ATTR	TTR	0.450	<0.01	0.372	<0.01	0.493	<0.001	-0.117	NS
ALκ	IGK	0.575	<0.001	0.508	<0.01	0.694	<0.0001	0.073	NS
ALλ	IGL	0.082	NS	0.661	<0.0001	0.121	NS	0.265	NS

B2M, beta-2-microglobulin; IGK, immunoglobulin kappa light chain; IGL, immunoglobulin lambda light chain; SAA, serum amyloid A; TTR, transthyretin

## 2. 研究の目的

上記の知見から、アミロイド線維形成におけるアポリポ蛋白質の関与について検討するために、Imaging 質量分析法を用いて、各蛋白質の組織内分布を観察した。

## 3. 研究の方法

AA、ATTR 症例の心筋の FFPE 検体から、アミロイド沈着部を 2-3mm 径の円柱状にくり抜き Tissue array ブロックを作製した。予備実験で得た液体クロマトグラフィー質量分析法 ( LC-MS ) で検出されたトリプシン消化ペプチド鎖の  $m/z$  を参考にイオンイメージを取得し、連続切片の Congo red 染色、HE、免疫組織化学的染色結果と比較した。

## 4. 研究成果

各蛋白質に由来するペプチド鎖 ; SAA 4 個、TTR 1 個、ApoE 2 個、ApoA4 1 個、vitronectin 6 個のイオンイメージを得た。特に SAA 由来の 4 個のペプチド鎖の組織内分布を観察したところ、最も N 末端に位置する SAA2-15 が Congo red 陽性領域ときれいに一致しているのに対し、SAA47-62、SAA48-62、SAA63-67 は Congo red 陽性領域よりも広く分布していた ( 図 2 : 文献#2 の Fig.1 を改変 )。すなわち、同じ蛋白質に由来するペプチド鎖の組織内分布が異なることを示した。これは SAA の N 末端が、アミロイド線維形成に重要な役割を果たしていることを意味している。一方で、アミロイド線維形成は線維形成と同時に生体内に存在する内因性プロテアーゼにより消化されている可能性も考えられた。

図 2

N末端①はCongo-red陽性領域に一致しているが、②③④は一致していない部分があった。

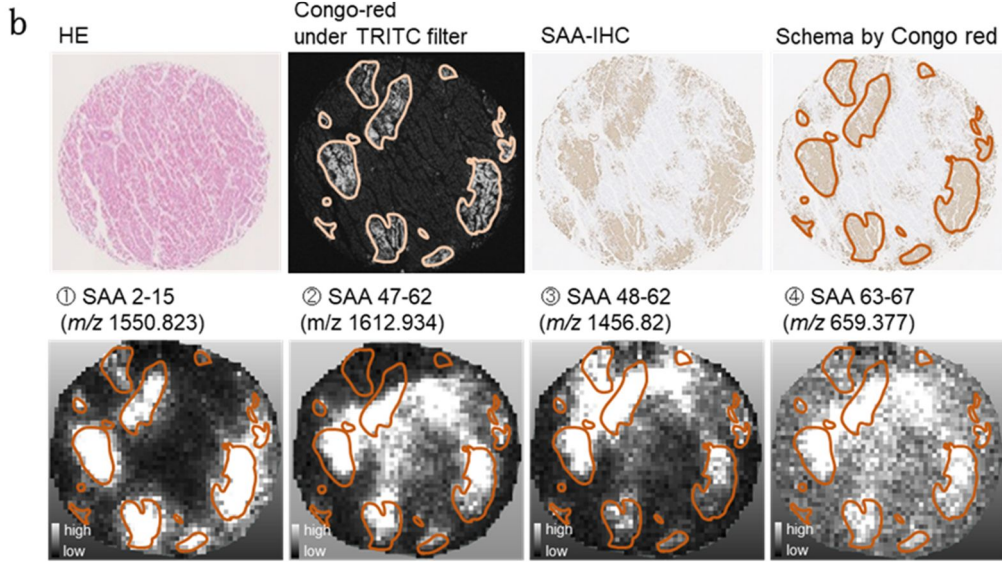
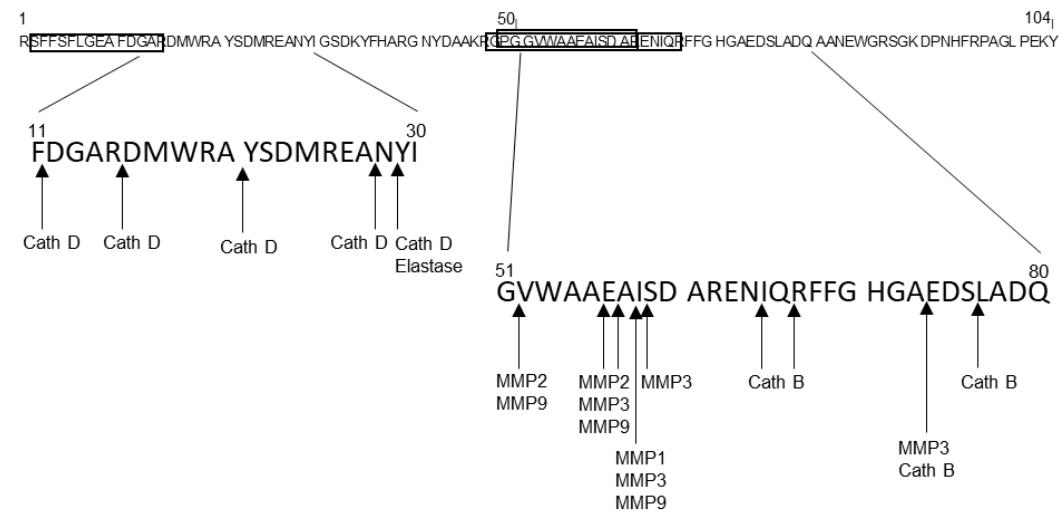


図 3 (文献#2 の Supplemental Fig. 4) に SAA を切断しうる内因性プロテアーゼについて既報告をもとに図示した。今後はこれらのプロテアーゼが生体内でどのようにアミロイド線維を代謝するのか、その機序について検討していく。

図 3



参考文献

- #1 Ogawa M, Shintani-Domoto Y (equal contribution), et al. Mass spectrometry-based absolute quantification of amyloid proteins in pathology tissue specimens: Merits and limitations. PLoS One. 15(7):e0235143. 2020.
- #2 Shintani-Domoto Y (corresponding author), et al. N-terminal peptide fragment constitutes core of amyloid deposition of serum amyloid A: An imaging mass spectrometry study. PLoS One. Oct 14;17(10):e0275993. 2022.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shintani-Domoto Yukako, Sugiura Yuki, Ogawa Makiko, Sugiyama Eiji, Abe Hiroyuki, Sakatani Takashi, Ohashi Ryuji, Ushiku Tetsuo, Fukayama Masashi	4. 巻 17
2. 論文標題 N-terminal peptide fragment constitutes core of amyloid deposition of serum amyloid A: An imaging mass spectrometry study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0275993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0275993	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 -

1. 著者名 Kawazoe Yoshimasa, Shimamoto Kiminori, Yamaguchi Ryohei, Nakamura Issei, Yoneda Kota, Shinohara Emiko, Shintani-Domoto Yukako, Ushiku Tetsuo, Tsukamoto Tatsuo, Ohe Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Computational Pipeline for Glomerular Segmentation and Association of the Quantified Regions with Prognosis of Kidney Function in IgA Nephropathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2955 ~ 2955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics12122955	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 Naiki Hironobu, Yamaguchi Aina, Sekijima Yoshiki, Ueda Mitsuharu, Ohashi Kenichi, Hatakeyama Kinta, Ikeda Yoshihiko, Hoshii Yoshinobu, Shintani-Domoto Yukako, Miyagawa-Hayashino Aya, Tsujikawa Hanako, Endo Jin, Arai Tomio, Ando Yukio	4. 巻 2
2. 論文標題 Steep increase in the number of transthyretin-positive cardiac biopsy cases in Japan: evidence obtained by the nation-wide pathology consultation for the typing diagnosis of amyloidosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13506129.2023.2180334	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 Suenaga Atsuhiko, Sawa Naoki, Ikuma Daisuke, Oba Yuki, Sekine Akinari, Yamanouchi Masayuki, Hasegawa Eiko, Mizuno Hiroki, Suwabe Tatsuya, Kono Kei, Shintani-Domoto Yukako, Kinowaki Keiichi, Ohashi Kenichi, Suzuki Yoshiyuki, Miyazono Motoaki, Takemura Tamiko, Yamaguchi Yutaka, Ubara Yoshifumi	4. 巻 2
2. 論文標題 A Case of Immunoglobulin G4-related Tubulointerstitial Nephritis with Simultaneous Resolution of Plasma Cell Infiltration and Fibrosis after Steroid Treatment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1121 ~ 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.1121-22	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 Shintani Domoto Yukako, Ishino Kousuke, Naiki Hironobu, Sakatani Takashi, Ohashi Ryuji	4. 巻 72
2. 論文標題 Autopsy case with concurrent transthyretin and immunoglobulin amyloidosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 65 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13179	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 Tamamitsu Ayaka Monoi, Nakagama Yu, Domoto Yukako, Yoshida Kenichi, Ogawa Seishi, Hirono Keiichi, Shindo Takahiro, Ogawa Yosuke, Nakano Katsutoshi, Asakai Hiroko, Hirata Yoichiro, Matsui Hikoro, Inuzuka Ryo	4. 巻 62
2. 論文標題 Poor Myocardial Compaction in a Patient with Recessive &lt;i>MYL2</i> Myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 445 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.20-639	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 Matsunaga Ryu, Kanazawa Yoshikazu, Matsuno Kunihiko, Kakinuma Daisuke, Tokura Taichiro, Marumo Atsushi, Yui Shunsuke, Ando Fumihiko, Masuda Yuka, Hagiwara Nobutoshi, Nomura Tsutomu, Kato Shunji, Yoshiyuki Toshiro, Domoto Yukako, Sakatani Takashi, Ohashi Ryuji, Inokuchi Koiti, Yoshida Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 An advanced case of gastric histiocytic sarcoma treated with chemotherapy and gastrectomy: a case report and review of literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1053 ~ 1059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-021-01438-y	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 Makiko Ogawa, Yukako Shintani-Domoto, Yoshiki Nagashima, Koji L Ode, Aya Sato, Yoshihiro Shimizu, Kenichi Ohashi, Michael H A Roehrl, Tetsuo Ushiku, Hiroki R Ueda, Masashi Fukayama	4. 巻 7
2. 論文標題 Mass spectrometry-based absolute quantification of amyloid proteins in pathology tissue specimens: Merits and limitations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0235143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0235143. eCollection 2020.	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 Okii Rikako, Hirakawa Yosuke, Kimura Hitomi, Honda Kenjiro, Hinata Munetoshi, Abe Hiroyuki, Domoto Yukako, Tanaka Goh, Nagase Takahide, Nangaku Masaomi	4. 巻 59
2. 論文標題 Renal Effects after Pembrolizumab Treatment for Non-small Cell Lung Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 977 ~ 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3928-19	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 -

1. 著者名 Yamaguchi Ryohei, Kawazoe Yoshimasa, Shimamoto Kiminori, Shinohara Emiko, Tsukamoto Tatsuo, Shintani-Domoto Yukako, Nagasu Hajime, Uozaki Hiroshi, Ushiku Tetsuo, Nangaku Masaomi, Kashihara Naoki, Shimizu Akira, Nagata Michio, Ohe Kazuhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Glomerular Classification Using Convolutional Neural Networks Based on Defined Annotation Criteria and Concordance Evaluation Among Clinicians	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 716 ~ 726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2020.11.037	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 -

1. 著者名 Fukayama Maiko, Domoto Yukako, Sato Shinichi, Asano Yoshihide	4. 巻 48
2. 論文標題 Case of aquagenic urticaria: Case report and the results of histopathological examination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 88 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15615	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 Tamamitsu Ayaka Monoi, Nakagama Yu, Domoto Yukako, Yoshida Kenichi, Ogawa Seishi, Hirono Keiichi, Shindo Takahiro, Ogawa Yosuke, Nakano Katsutoshi, Asakai Hiroko, Hirata Yoichiro, Matsui Hikoro, Inuzuka Ryo	4. 巻 62
2. 論文標題 Poor Myocardial Compaction in a Patient with Recessive <i>MYL2</i> Myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 445 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.20-639	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13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堂本裕加子
2. 発表標題 アミロイドサイエンスにおけるプロテオーム解析の可能性
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長谷川湧生、宮田隆宏、堂本裕加子、藤井雄文、石野孔祐、工藤光洋、坂谷貴司、大橋隆治
2. 発表標題 質量分析法を用いた左室の心筋におけるタンパク質の発現量と年齢との相関について
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊 仁、長峯 理子、堂本 裕加子、石野 孔祐、中村 緑佐、住吉 真治、小西 英一
2. 発表標題 質量分析で診断確定し得た移植腎に再発したコンゴー赤染色陽性DNAJB9陽性細線維性腎炎の一例
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河野 圭、澤 直樹、乳原 善文、堂本 裕加子、藤井 丈士、高澤 豊、大橋 健一
2. 発表標題 ALアミロイドーシス患者における腎臓へのアミロイド沈着と腎機能・腎予後に関する病理組織学的検討
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堂本裕加子 (1st of 5)
2. 発表標題 アミロイドーシスの病型診断における免疫組織化学の限界と質量分析法の可能性
3. 学会等名 第9回アミロイドーシス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎海、堂本裕加子 (2nd of 7)
2. 発表標題 皮膚アミロイドーシスと周囲環境に関する検討. アミロイドーシス学会学会
3. 学会等名 第9回アミロイドーシス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堂本裕加子、石野 孔祐、藤井 雄文、坂谷 貴司、大橋 隆治
2. 発表標題 アミロイドーシスの病型診断における免疫組織化学の限界と質量分析法の可能性
3. 学会等名 第44回心筋生検研究会学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堂本裕加子、野村征太郎、大出晃士、木下修、阿部浩幸、牛久哲男、小室一成、小野稔、上田泰己、深山正久
2. 発表標題 Proteomic analysis of the failing human heart after left ventricular assist device support
3. 学会等名 第44回心筋生検研究会学会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 堂本裕加子 (1st of 5)
2. 発表標題 アミロイドーシスの病型診断における免疫組織化学の限界と質量分析法の可能性
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺島日菜子、堂本裕加子 (2nd of 5)
2. 発表標題 免疫組織化学と質量分析法を用いたカテプシン D の心組織内分布、年齢との相関について
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堂本裕加子
2. 発表標題 質量分析法による絶対定量法を用いたアミロイドーシス診断系の開発
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堂本裕加子、杉浦悠毅、小川真喜子、杉山栄二、阿部浩幸、坂谷貴司、大橋隆治、牛久哲男、深山正久
2. 発表標題 イメージング質量分析法を用いた血清アミロイド A ペプチド断片の可視化 血清アミロイド A の N 末端ペプチド鎖は選択的にアミロイド沈着を起ししやすい
3. 学会等名 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 堂本裕加子、大出晃士、永島良樹、木下修、阿部浩幸、小野稔、上田泰己、牛久哲男、深山正久
2. 発表標題 左室補助人工心臓装着前後における心筋蛋白質のプロテオミクス Proteomic analysis of the failing human heart after left ventricular assist device support
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 堂本裕加子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 436
3. 書名 非腫瘍性疾患病理アトラス 腎	

〔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

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		
米国	Memorial Sloan Kettering Cancer Center		