

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15660

研究課題名(和文) 質量分析を用いた新規動物アミロイドーシス同定への挑戦

研究課題名(英文) Challenges in Identifying Novel Animal Amyloidosis Using Mass Spectrometry

研究代表者

村上 智亮 (Murakami, Tomoaki)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10728447

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)：動物アミロイドの新たな同定手法としてレーザーマイクロダイセクション-質量分析法を確立した。同法を用いて、犬の乳腺腫瘍随伴アミロイドーシス、ツシマヤマネコの全身性アミロイドーシス、犬の毛包腫瘍随伴アミロイドーシス、ニホンリスの全身性アミロイドーシスの原因蛋白質としてそれぞれ-S1-casein、EFEMP1、keratin 5、フィブリノゲンを同定し、その詳細な病理発生メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究開始時には、動物で同定されているアミロイドーシスは10種類のみで、最近10年間で動物の新規アミロイド蛋白質は発見されていなかったが、研究代表者は本研究期間の2年間で5種類の新規アミロイド蛋白質を同定した。これらの中には人で未発見のものも含まれており、これを元に人での発生予測を行うことで疾患の発生を未然に防ぐことが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Laser microdissection-mass spectrometry was established as a new identification method for animal amyloid. Using this method, we identified -S1-casein, EFEMP1, keratin 5, and fibrinogen as amyloidogenic proteins of mammary tumor-associated amyloidosis in dogs, systemic amyloidosis in Tsushima leopard cats, hair follicle tumor-associated amyloidosis in dogs, and systemic amyloidosis in Japanese squirrels, respectively. Furthermore, the detailed pathological mechanism of these amyloidosis were elucidated.

研究分野：獣医学

キーワード：アミロイド アミロイドーシス プロテオミクス 質量分析 病理学

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイドとは、生体由来のタンパクの誤った折りたたみによって生じる異常型の線維タンパクであり、局所あるいは全身に蓄積することによってアミロイドーシスを生じる。

アミロイドーシスは人や動物の進行性の難治性疾患であり、アルツハイマー病やパーキンソン病など多くの病型が存在し、その患者数は年々増加傾向にある。各病型は原因となるアミロイドの種類によって分類され、人では36種が同定されている一方、動物で同定されているのは10種のみである。アミロイドーシスの病態研究は主に動物モデル(実験的発症モデル又は自然発症モデル)を用いて実施されるが、人の病態に対応する十分な自然発症モデル動物が確立出来ない状況にあった。

## 2. 研究の目的

比較病理学的研究により人の病態解析に貢献することは獣医病理学者の使命であるにも関わらず、動物アミロイドーシスの解析手段が限られていることは大きな課題であり、「従来法で同定できない未知のアミロイドは何者なのか?」は本研究課題の核心をなすシンプルかつ重要な学術的「問い」である。

本研究では、免疫組織化学が抱える問題を克服するため、新たな動物アミロイドーシス同定手法としてレーザーマイクロダイセクション-質量分析(LMD-MS)法を確立する。さらに、LMD-MS法を用いて、応募者がこれまで同定出来なかった多様な動物種のアミロイドーシスを解析し、動物における未分類(人で発見されているが、動物では未発見のもの)及び新規(人と動物の双方で未発見のもの)アミロイドーシスを探索する。

## 3. 研究の方法

- LMD-MS法の確立**: LMDにより選択的に回収したアミロイドを、可溶化・トリプシン消化し、LC-MS/MSを用いた質量分析によりアミロイドタンパク候補を選抜し、免疫組織化学による確認にてアミロイドを同定する。初年度はLMD-MS法による動物アミロイド解析の最適化のため、アミロイドの可溶化・消化方法や特異的な定性評価に必要な回収量、LC/MS/MSの測定条件、質量分析データの解析ソフトウェア(MASCOT, Protein pilotなど)使用するデータベース(Swiss-Prot, NCBIなど)について比較検討を実施する。
- 動物における Amyloid signature protein (ASP) の決定**: 人ではApolipoprotein EやClusterin等のASPが病型に関係なくアミロイドと共沈着することが知られている。LMD-MS法によるASPの検出は、LMDによりアミロイドが確実に回収できている指標となり、評価の信頼性を高める上で有効となるが、動物におけるASPは不明である。本研究ではまず、イヌとネコにおける複数病型のアミロイドーシス症例を用いてLMD-MSを実施し、アミロイド以外の沈着成分を解析する。その中で病型に関係なく検出されたタンパクについて各種動物のアミロイドーシス症例を用いた免疫組織化学を実施し、アミロイド沈着部位との共局在を証明することで各動物種のASPを決定する。
- 未分類動物アミロイドーシスの解析**: 歯原性腫瘍やC細胞腫瘍、毛包腫瘍に随伴するアミロイドーシスは人ではそれぞれアミロイドタンパクが同定されている(それぞれODAM, Calcitonin, cytokeratin-5)。一方、動物では同様の病態が確認されているにも関わらずアミロイドタンパクは同定されていない。そこで、上記の腫瘍に相当する動物症例を用いてLMD-MSを実施し、アミロイドタンパクを同定する。解析に用いる症例は既に十分数を確保済みである。
- 新規アミロイドーシスの解析**: 獣医学領域において、免疫組織化学では同定出来ないアミロイドーシス症例がしばしば報告されている。応募者も現在、イヌの乳腺腫瘍随伴性アミロイドーシスやツシマヤマネコの全身性アミロイドーシスを経験し、それぞれ免疫組織化学では同定出来ないことを確認した上で、アミロイドタンパクの候補を絞りつつある。本研究ではこれらの症例に加え、未同定の症例を収集し、LMD-MSによる同定を試みる。LMD-MSの結果、新規アミロイドタンパクが疑われた場合、免疫電子顕微鏡法、遺伝子解析、in vitroでの線維形成能評価を実施し、新規アミロイドタンパクであることを証明する。

## 4. 研究成果

LMD-MS法を動物アミロイドーシス診断手技として完全に確立した。LMD-MS法に基づき、ネコのAmyloid signature proteinとして、Apolipoprotein E, Apolipoprotein AI, Apolipoprotein AIVを決定し、人における主要なASPであるSerum amyloid P componentが動物において発現しないことを発見した。さらに、犬猫のALアミロイドーシス診断において、LMD-MS法が有効であることを見いだした。ALアミロイドーシスの原因蛋白であるImmunoglobulin light chainは可変領域を有し、免疫学的手法での検出が困難であることから、本法は新たな診断法のスタンダー

ドとして期待される。

さらに LMD-MS 法を用いて、犬の乳腺アミロイドーシスの原因蛋白質として  $\kappa$ -S1-casein を、ツシヤママネコの全身性アミロイドーシスの原因蛋白質として EFEMP1 を、犬の毛包腫瘍随伴アミロイドーシスの原因蛋白質として keratin 5 を同定し、その詳細な病理発生メカニズムを明らかにした。犬の乳腺において  $\kappa$ -S1-casein は発現上昇と N 末端の切除によってアミロイドを形成することが明らかとなった。ツシヤママネコでは、猫科に特異的な EFEMP1 のアミノ酸変異がアミロイド形成に寄与することが示唆された。犬の毛包腫瘍では、アミロイド沈着にいくつかパターンが存在すること、パターン毎に keratin 5 の断片化の部位が異なること、柴犬では有意に発生率が高く、それが柴犬特有のアミノ酸変異に由来することを明らかにした。 $\kappa$ -S1-casein および keratin 5 は人でも未同定のアミロイド蛋白質であるが、in vitro でのペプチド伸長実験の結果から、人でも十分にアミロイドーシスの原因となり得ることが示唆された。さらに、LMD-MS 法を用いてカスリハタの全身性アミロイドーシスおよびニホンリスの腎アミロイドーシスのアミロイド原因蛋白質としてフィブロネクチン、フィブリノゲンと同定した。本研究開始時には、動物で同定されているアミロイドーシスは 10 種類のみで、最近 10 年間で動物の新規アミロイド蛋白質は発見されていなかったが、研究代表者は本研究期間の 2 年間で 5 種類の新規アミロイド蛋白質を発見・同定した。

## 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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ujike Naoki, Iwaide Susumu, Ono Yuki, Okano Takayuki, Murakami Tomoaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Intrinsic fluorescence?based label-free detection of bovine amyloid A amyloidosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Diagnostic Investigation	6. 最初と最後の頁 130 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/10406387211049217	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 Miyazaki Shinya, Kobayashi Yuki, Kametani Fuyuki, Kobayashi Kyoko, Iwaide Susumu, Yanai Tokuma, Murakami Tomoaki	4. 巻 59
2. 論文標題 Systemic amyloidosis derived from EFEMP1 in a captive Tsushima leopard cat	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 152 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03009858211048650	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 Iwaide Susumu, Yanai Tokuma, Murakami Tomoaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Proteopathic lesions in the brain of a super aged chimpanzee (Pan troglodytes)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Primatology	6. 最初と最後の頁 222 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/JMP.12530	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 IWAIDE Susumu, UJIKE Naoki, KOBAYASHI Kyoko, SASSA Yukiko, MURAKAMI Tomoaki	4. 巻 83
2. 論文標題 Species-barrier on the cross-species oral transmission of bovine AA amyloidosis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 962 ~ 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0713	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 KOBAYASHI Hiroto, IWAIDE Susumu, UJIKE Naoki, MURAKAMI Tomoaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Oxazolone-induced gastrointestinal disorders enhance the oral transmission of AA amyloidosis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0022	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 Kitpipatkun Pitipat, Sutummaporn Kripitch, Kato Konosuke, Murakami Tomoaki, Kobayashi Kyoko, Nakazawa Yasumoto, Tanaka Ryou	4. 巻 -
2. 論文標題 Silk fibroin/polyurethane patch implantation in hyperglycemic rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomaterials Applications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0885328221999227	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 Kawasaki Haruka, Murakami Tomoaki, Badr Yassien, Kamiya Sato, Shimizu Kaori, Okada Ayaka, Inoshima Yasuo	4. 巻 46
2. 論文標題 In vitro and ex vivo expression of serum amyloid A3 in mouse lung epithelia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Lung Research	6. 最初と最後の頁 352 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01902148.2020.1809750	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 Ono Ayumi, Nakayama Yumi, Inoue Maki, Yanai Tokuma, Murakami Tomoaki	4. 巻 57
2. 論文標題 AA Amyloid Deposition in the Central and Peripheral Nervous Systems in Flamingos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 700 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985820939976	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 Kadota Ayumi、Iwaide Susumu、Miyazaki Shinya、Mitsui Ikki、Machida Noboru、Murakami Tomoaki	4. 巻 57
2. 論文標題 Pathology and Proteomics-Based Diagnosis of Localized Light-Chain Amyloidosis in Dogs and Cats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 658 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985820934113	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 Shimada Kazumi、Honda Tadakatsu、Kato Kounosuke、Hori Ryosei、Ujike Naoki、Uemura Akiko、Murakami Tomoaki、Kitpipatkun Pitipat、Nakazawa Yasumoto、Tanaka Ryou	4. 巻 -
2. 論文標題 Silk fibroin-based vascular repairing sheet with angiogenic-promoting activity of SVVYGLR peptide regenerated the damaged vascular in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomaterials Applications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0885328220928660	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 MURATA Eriko、KOZAKI Satoi、MURAKAMI Tomoaki、SHIMIZU Kaori、OKADA Ayaka、ISHIGURO Naotaka、INOSHIMA Yasuo	4. 巻 82
2. 論文標題 Differential expression of serum amyloid A1 and A3 in bovine epithelia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 764 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0473	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 Miyazaki S.、Kadota A.、Mitsui I.、Murakami T.	4. 巻 177
2. 論文標題 Amyloid Signature Proteins in Feline Amyloidosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Pathology	6. 最初と最後の頁 10 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcpa.2020.03.007	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21件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上未紗紀、寒川彰久、伊藤喜之、久田美貴、村上智亮
2. 発表標題 マイクロミニピッグにおけるAAアミロイドーシスの病因解明の試み
3. 学会等名 第9回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠原利気、井澤武史、村上智亮、伊藤喜之、久田美貴、伊藤このみ、芳井祐友、喜屋武樹、田中美有、桑村充
2. 発表標題 カスリハタに発生した全身性アミロイド症の1例
3. 学会等名 第9回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩出進、中川大輔、中村進一、伊藤喜之、久田美貴、村上智亮
2. 発表標題 ニホンリス ( <i>Sciurus lis</i> ) にみられた全身性アミロイドーシスの病因解明
3. 学会等名 第9回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上智亮
2. 発表標題 構造予測および <i>in vitro</i> 試験に基づく犬乳腺腫瘍随伴アミロイドーシスの病態機序解明
3. 学会等名 第9回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩出進、村上智亮
2. 発表標題 伝播性AAアミロイドーシスにおけるアミロイド沈着初発部位の探索
3. 学会等名 第38回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上智亮
2. 発表標題 動物AAアミロイドーシスの病態多様性と伝播
3. 学会等名 第8回日本アミロイドーシス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩出進、村上智亮
2. 発表標題 マウスの局所臓器へのAAアミロイドを直接投与することで誘発されるアミロイド沈着分布および全身移行動態の経時的評価
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 大場涼平、小野雄樹、岡野誉之、村上智亮
2. 発表標題 リスザルの脳アミロイド の非標識蛍光イメージング
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 宮崎新也、小林由紀、亀谷富由樹、小林杏子、岩出進、柳井徳磨、村上智亮
2. 発表標題 老齡ツシマヤマネコにみられた全身性EFEMP1アミロイドーシス
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 小林杏子、酒井洋樹、亀谷富由樹、村上智亮
2. 発表標題 犬の毛包腫瘍におけるアミロイド沈着の原因蛋白質同定の試み（続報）
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩出進、佐々悠木子、村上智亮
2. 発表標題 マウスにおける牛AAアミロイドーシス経口伝播時の「種の壁」に関する研究
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上智亮
2. 発表標題 ラット乳腺における新規アミロイドーシスの同定
3. 学会等名 第8回JCVP学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桐生直哉、小林杏子、村上智亮、坂井昌樹、山本佑
2. 発表標題 マゼランペンギンの趾瘤を伴った全身性アミロイドAアミロイドーシスの一例
3. 学会等名 第8回JCVP学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩出進、柳井徳磨、村上智亮
2. 発表標題 超高齢チンパンジーにおける脳の病理組織学的検索
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoaki Murakami, Toshisuke Kaku, Rikako Kubo, Kaori Tsukakoshi, Kazunori Ikebukuro, Yukiko Sassa, Fuyuki Kametani
2. 発表標題 WHAT IS THE AMYLOID PROTEIN IN CANINE MAMMARY TUMOR-ASSOCIATED AMYLOIDOSIS?
3. 学会等名 The XVII International Symposium on Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林杏子、酒井洋樹、村上智亮
2. 発表標題 犬の毛包腫瘍におけるアミロイド沈着の発生率調査および原因蛋白同定の試み
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上智亮、郭俊佑、久保梨夏子、塚越かおり、池袋一典、佐々悠木子、野村耕二、亀谷富由樹
2. 発表標題 犬の乳腺腫瘍関連アミロイドーシスの原因蛋白質の同定および病態機序解明
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 氏家直毅、村上智亮
2. 発表標題 AAアミロイドーシス罹患牛から抽出したアミロイド線維の蛍光指紋解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩出進、佐々悠木子、塚越かおり、村上智亮
2. 発表標題 Ex vivo / in vivo試験系を用いた $\beta$ -シヌクレインフィブリルの経口伝播経路の検証
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門田亜弓、三井一鬼、町田登、村上智亮
2. 発表標題 ALアミロイドーシス診断におけるレーザーマイクロダイセクション質量分析法の有用性
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井大輝、村上智亮、村上義彦
2. 発表標題 キトサン-高分子ミセル複合化ゲルシートの創傷治癒効果 ~ラットの円形切除創を用いた治癒過程評価~
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 生体試料中のミスフォルディングタンパク質検出方法	発明者 村上智亮、氏家直毅	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-146762	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>東京農工大学 獣医毒性学研究室Webページ  <a href="http://www.tuat.ac.jp/~tat/ivt/">http://www.tuat.ac.jp/~tat/ivt/</a>          東京農工大学 研究者プロフィール  <a href="https://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/49/0004842/profile.html">https://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/49/0004842/profile.html</a></p>
--

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	Oregon State University		