

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16215

研究課題名（和文）アミロイドーシスにおける共通する分子の機能解析に基づく病態機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of pathological mechanisms based on functional analysis of common molecules in amyloidosis

研究代表者

宮原 大貴（Miyahara, Hiroki）

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教（特定雇用）

研究者番号：90823287

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）：本研究では、マウスが加齢に伴い自然発症する全身性老化アミロイドーシスをモデルに、LC-MS/MS解析によるプロテオーム解析でアミロイド共沈着蛋白質における補体系因子の集積を明らかとした。培養細胞系でマクロファージはエンドソーム-ライソソーム経路を介して老化アミロイドを分解した。更に、薬剤誘導的に細網内皮系マクロファージを枯渇させたマウスでは伝播による誘発病態が顕著に亢進したことから、発症の初期段階でマクロファージが防御的な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を背景として、加齢性アミロイドーシスの患者数は増加の一途を辿っている。本研究で、アミロイドインタクトームを解析することで見出されたマクロファージ細胞によるアミロイドの分解機序は、生体にはアミロイド抑制機構が備わっていることを示すものであり、加齢による免疫応答の低下がアミロイドーシスの発症基盤の一つと考えられる。今後、インタクトームによって生じる組織のアミロイド好発環境とその形成機序を解明することによって、種々の病型に応用可能な予防・治療法の確立が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, using a mouse model of systemic senile amyloidosis, which occurs spontaneously in mice with aging, we revealed the accumulation of complement factors in the proteome profiles of amyloid co-deposited proteins by LC-MS/MS analysis. In a cell culture system, macrophages degraded age-related amyloid via the endosomal-lysosomal pathway. Moreover, drug-induced depletion of reticuloendothelial macrophages markedly enhanced the progression of amyloid deposition, suggesting that macrophages play a protective role in the early stages of pathogenesis.

研究分野：実験病理学

キーワード：アミロイドーシス 老化 マウス プロテオミクス マクロファージ 加齢性疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは疾患特異的な病因蛋白質が線維状構造に異常凝集し、組織に沈着する変性疾患群である。ヒトでは30種類以上の病型が報告されており、その原因は遺伝子変異、代謝異常、炎症、透析、腫瘍など多様である。特に、加齢は全てのアミロイドーシスで共通する危険因子であり、超高齢化社会を迎えた日本ではこの先も患者数の増加が確実視されている。

アミロイドーシスの病態機序は未だ解明されていないが、近年、生体内でアミロイドと共沈着する分子が見出されてきた。代表的なものとしてアポリポ蛋白質Eやクラスチリンなどの蛋白質、ヘパラン硫酸などの多糖類が挙げられ、これらを含めてアミロイドインタラクトームと呼ばれる。インタラクトームは異なる前駆蛋白質を由来とし異なる臓器に沈着するアミロイドによる疾患でありながら、種々のアミロイドーシスで共通して発見され、またゲノムワイド関連解析によってアポリポ蛋白質Eやクラスチリンは遅発性アルツハイマー病の強力な危険因子として報告されている。これらの報告から、アミロイドインタラクトームが病態と関連することは明白であるにも関わらず、『なぜアミロイドとインタラクトームが共沈着するのか？その分子メカニズムは何か？』というアミロイドーシス発症の根本の分子基盤が明らかとなっていないため、これを標的とした治療法の開発には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、マウスが加齢に伴い自然発症するマウス老化アミロイドーシスをモデルに、生体内でアミロイドとインタラクトームが共沈着に至るまでの分子機序を明らかとし、多様な臨床症状を呈するアミロイドーシスに共通する病態機序の解明と治療戦略の開発を目的とする。具体的な研究項目として、レーザーダイセクション法を駆使したアミロイド沈着のプロテオーム解析により、共沈着蛋白質の網羅的な同定と機能集積解析を実施する。この結果からアミロイドーシス病態に関連する生物学的経路を見出し、培養細胞系や病態モデルマウスを用いた解析によりアミロイド形成過程における代謝経路や細胞機能を明らかとする。本研究課題は生体分子間の相互作用を介したアミロイド形成メカニズムのブレークスルーとなり、インタラクトームを標的とした新しい治療戦略の開発に繋げることが期待できる。

3. 研究の方法

野生型マウスにおける全身性老化アミロイドーシス病態の検討

ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン (ジャクソン) から実験マウスの標準系統 C57BL/6J (C57) を導入し、12-86週齢での老化アミロイド沈着を病理学的に評価した。マウス老化アミロイドは脳を除く全身組織に沈着するため、各臓器からレーザーダイセクション法により病理組織切片上からアミロイドを選択的に切削し (>2,000,000 μm^3) 0.005% Zwittergent 溶液中で可溶化処理とトリプシン消化を行ったのち、液体クロマトグラフィータンデム型質量分析器 (LC-MS/MS) で沈着蛋白質の網羅的な同定を行った。

伝播によるマウス個体間の病態誘発モデル

研究代表者らはアミロイドを若いマウス個体に投与することで、伝播による早期誘発が可能な病態モデルを確立している。老化アミロイドが重度に沈着した老齢個体の臓器から水抽出法によりアミロイド画分を採取し、尾静脈注射で投与することで病態誘発を行った。

マクロファージ細胞によるアミロイド分解機構の検討

同定されたインタラクトームに補体系因子が集積していたことに着目し、アミロイドーシス病態におけるマクロファージ細胞を介した免疫機構の関与を検討するために、マウスマクロファージ様細胞株 J774A.1 細胞に投与しその分解機序を調べた。

4. 研究成果

野生型マウスにおける全身性老化アミロイドーシス病態の解析

ジャクソンから導入したマウスでは、40週齢の消化管の粘膜層や肺胞毛細血管の周囲からアミロイド沈着が開始し、80週齢以降は心筋間質や腎系球体にも高度な沈着が認められた。40週齢以降の全ての解析個体において老化アミロイドの沈着が認められたことから、マウス老化アミロイドーシスが高齢マウスの共通疾患であることが示唆された (図1)。しかしながら、他の飼育施設から導入した個体を解析したところ、東京都健康長寿医療センター動物実験施設 (TMIG) の C57 マウスはジャクソンと類似した病態像を呈した一方で、日本エスエルシー (SLC) の C57 マウスでは80週齢以降もアミロイド沈着が認められなかった。今後、C57 マウスの施設間の病態の差異を明らかとするために、C57 亜系統間の遺伝的浮動による老化アミロイドーシスの発症頻度の解析を進めるとともに、伝播による施設内での蔓延の可能性について検討を進める。

12週齢と86週齢のマウスの腎臓、肺、心臓、小腸からレーザーダイセクション法によりアミロイド沈着を採取しLC-MS/MS解析を行った。得られたプロテオームプロファイルの比較解析により、いずれの臓器由来のアミロイドにおいても含有量が最も高いアポリポ蛋白質 A-II が、マウス老化アミロイドの病因蛋白質として同定された。老化アミロイドの共沈着蛋白質としては、アポリポ蛋白質 E、アポリポ蛋白質 A-IV、クラスチリン、ビトロネクチンが全ての臓器で同定された。一方で免疫グロブリンやフィブリノーゲン、補体系因子は腎臓で特異的なインタラクトームとして同定した。

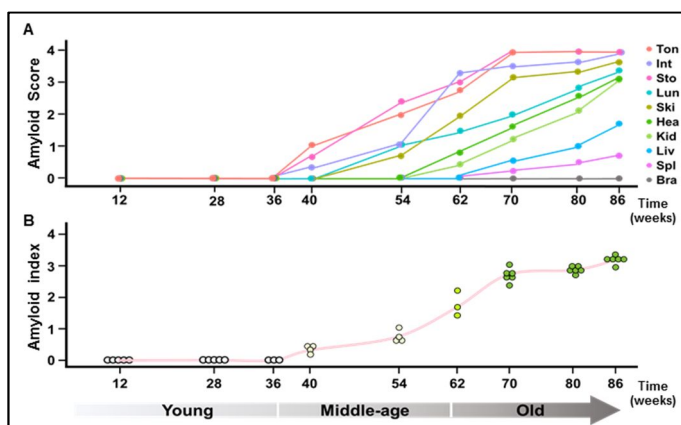


図1. ジャクソン C57 マウスの加齢に伴う各臓器 (A) と全身 (B) のアミロイド沈着程度の評価を行った。

高年齢マウスでは高度なアミロイド沈着と糸球体硬化の所見が見られ、血中の尿素窒素量や尿中のアルブミン量の有意な増加など腎機能の低下が認められた。次に、高年齢個体の小腸から抽出した老化アミロイドを 8-10 週齢のマウスへ尾静脈注射で投与し早期の病態発症を誘発させることで、腎機能低下の原因から加齢による影響を排除して解析を行った (図 2)。誘発群では 40 週齢の時点で自然発症群の 86 週齢相当の病態が再現され、高年齢群と同様のアルブミン尿を呈したことから、高年齢マウスの腎機能低下にはアミロイド沈着による影響が含まれることが示された。また、老化アミロイドによる腎病変の病理学的特徴として、糸球体のメサンギウム領域へのアミロイド沈着、ポドサイト密度の減少や足突起の異常、および糸球体におけるネフリンの低下や Fibroblast growth factor 2 の蓄積が高年齢群と誘発群の両方で認められた。

以上の結果から、老化アミロイドーシスが高年齢 C57 マウスの general pathology であり、老化研究において高年齢マウスを用いる際にはアミロイド沈着による影響を考慮する必要があることが示唆された。また副次的成果として、AApoAII アミロイドーシスが腎臓のポドサイト障害メカニズムの新たな研究モデルとなり得る可能性を示した。

以上の結果から、老化アミロイドーシスが高年齢 C57 マウスの general pathology であり、老化研究において高年齢マウスを用いる際にはアミロイド沈着による影響を考慮する必要があることが示唆された。また副次的成果として、AApoAII アミロイドーシスが腎臓のポドサイト障害メカニズムの新たな研究モデルとなり得る可能性を示した。

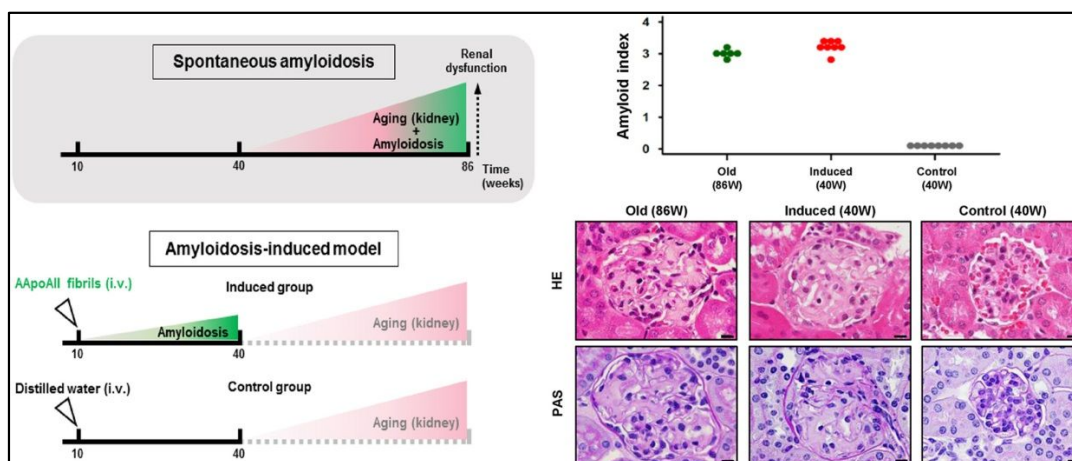


図2. 40週齢の段階では腎糸球体にアミロイド沈着は認められない (Control 群)。アミロイド投与による病態誘発を行うことで 40 週齢の段階で、自然発症の 86 週齢 (Old 群) に相当するアミロイド沈着を再現し (Induced 群)、加齢による影響を排除して腎機能指標の解析を行った。

マクロファージ細胞による老化アミロイド分解機構の解析

補体系因子が老化アミロイドのインタラクトームとして集積したこと、また近年、アポリポ蛋白質 E やクラスチリンが補体制御因子としての機能が報告されていることに着目し、免疫機構とアミロイドーシス病態との関連を調べた。マウスに投与したアミロイドは肝臓や脾臓で F4/80 や Iba1 陽性の細網内皮系マクロファージによって貪食されることが分かったため (図 3)、培養細胞系を用いて分解機序の解析を行った。マウスマクロファージ様細胞株 J774A.1 細胞にアミロイドを投与したところ、24 時間後には培地中のアミロイド量は生細胞の存在下で約 60% 減少し、細胞に付着したアミロイドも 24 時間後にほぼ消失した。この現象は、マクロピノサイトーシス阻害剤のサイトカラシン D やライソゾームの酸性化阻害剤のバフィロマイシン A1 に

よって阻害されたことから、マクロファージがエンドソーム-ライソソーム経路を介してアミロイドを分解することを明らかとした。一方で、アミロイドを投与したマクロファージ細胞では M2 マーカーの遺伝子発現が上昇やビーズ取り込み能が減少し、分解機構に過負荷が生じている可能性が示唆された。

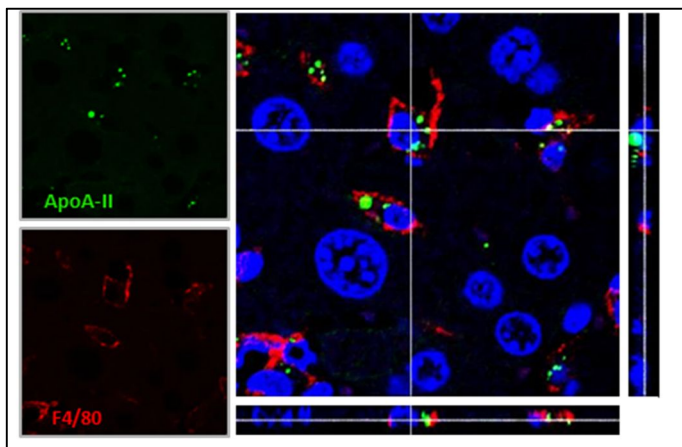


図 3. 尾静脈注射で投与したアミロイド（緑）は肝臓の F4/80 陽性のクッパー細胞（赤）によって貪食された。

次に、クロドロン酸内包リポソームの投与することで肝臓や脾臓の細網内皮系マクロファージを特異的に枯渇させ、マクロファージが伝播誘発病態に与える影響を調べた。誘発前にマクロファージを枯渇させたマウスでは、肝臓と脾臓でそれぞれ 10.6 倍と 2.5 倍のアミロイド沈着量の増加が観察された。しかしながら、誘発後にマクロファージを枯渇させたマウスでは病態に変化が認められなかった。以上の結果から、マクロファージ細胞はアミロイドを取り込み分解することによって、アミロイドーシス誘発の初期段階における病態抑制機構の一端を担うことが示唆された。一方で、既に沈着したアミロイドに対しては明確な効果を示さなかったため、今度はマクロファージの活性化を介してアミロイドの分解を促す方法の開発を目指す。

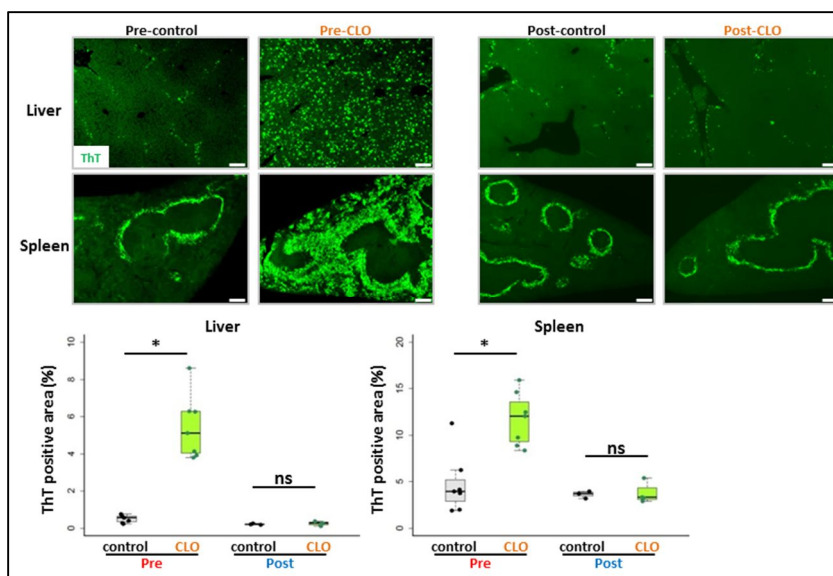


図 4. アミロイド特異的な蛍光色素であるチオフラビン T で染色し、肝臓と脾臓のアミロイド沈着量を定量解析した。クロドロン酸リポソームを投与したあと病態誘発を行ったマウス (Pre-CLO) ではコントロールリポソーム (Pre-control) を投与したマウスと比較して劇的に病態が進行した。一方でクロドロン酸と誘発の投与順番を逆にした群 (Post 群) では病態に変化は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Li Ying, Dai Jian, Kametani Fuyuki, Yazaki Masahide, Ishigami Akihito, Mori Masayuki, Miyahara Hiroki, Higuchi Keiichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Renal Function in Aged C57BL/6J Mice Is Impaired by Deposition of Age-Related Apolipoprotein A-II Amyloid Independent of Kidney Aging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	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） 10.1016/j.ajpath.2023.03.002	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 Miyahara Hiroki, Dai Jian, Li Ying, Cui Xiaoran, Takeuchi Hibiki, Hachiya Naomi, Kametani Fuyuki, Yazaki Masahide, Mori Masayuki, Higuchi Keiichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Macrophages in the reticuloendothelial system inhibit early induction stages of mouse apolipoprotein A-II amyloidosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13506129.2022.2153667	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 Cui Xiaoran, Sawashita Jinko, Dai Jian, Liu Chang, Igarashi Yuichi, Mori Masayuki, Miyahara Hiroki, Higuchi Keiichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Exercise suppresses mouse systemic AApoAII amyloidosis through enhancement of the p38 MAPK signaling pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	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） 10.1242/dmm.049327	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 李瑩、宮原大貴、代健、亀谷富由樹、森政之、樋口京一
2. 発表標題 マウスAApoAIIアミロイドーシスの腎臓病態と腎機能低下の解析
3. 学会等名 第9回日本アミロイドーシス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Cui X, Sawashita J, Dai J, Liu C, Igarashi Y, Mori M, Miyahara H, Higuchi K
2. 発表標題 Exercise suppresses mouse systemic AApoAII amyloidosis through enhancement of the p38 MAPK signaling pathway
3. 学会等名 The XVIII International Symposium on Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyahara H, Dai J, Li Y, Mori M, Higuchi K
2. 発表標題 Macrophages in the reticuloendothelial system inhibit early induction stages of mouse apolipoprotein A-II amyloidosis
3. 学会等名 The 4th Proteostasis and Disease Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyahara H, Dai J, Li Y, Hachiya N, Kametani F, Yazaki M, Mori M, Higuchi K
2. 発表標題 Macrophages in the reticuloendothelial system inhibit early propagation stages of mouse apolipoprotein A-II amyloidosis
3. 学会等名 Asia Pacific Prion Symposium 2022 (APPS2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮原大貴、樋口京一
2. 発表標題 マウス老化アミロイドーシスの病態と予防法の解析
3. 学会等名 第8回日本アミロイドーシス学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮原大貴、代健、李瑩、崔小冉、森政之、樋口京一
2. 発表標題 マウスAApoAIIアミロイドーシスにおける細網内皮系マクロファージの病態抑制機構の解析
3. 学会等名 第8回日本アミロイドーシス学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Miyahara, Xiaoran Cui, Yuichi Igarashi, Ying Li, Jian Dai, Masayuki Mori, Keiichi Higuchi
2. 発表標題 A cellular model of amyloid degradation using macrophages cultured with mouse AApoAII amyloid fibrils
3. 学会等名 The XVII International Symposium of Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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