

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790541

研究課題名 (和文) アミロイドーシスにおける前駆蛋白質の代謝動態解明と新たな検査法の開発

研究課題名 (英文) Metabolism of amyloid proteins and methods for detecting amyloid proteins

研究代表者

植田 光晴 (UEDA MITSU HARU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：60452885

研究成果の概要 (和文)：【1. AA アミロイドーシスに関する研究】AA アミロイドーシス惹起マウスモデルを用いて、血漿中に遊離した形態でアミロイド促進因子である amyloid enhancing factor (AEF) が存在することをはじめて確認した。さらに、細胞外分泌膜小胞であるエクソゾームが血漿中に遊離した AEF を運搬する役割を担っていることも明らかにした。本結果は、全身性アミロイドーシスにおける臓器間の伝搬機構の解明に重要な知見であると考えられた。しかし、ヒト AA アミロイドーシス患者さんの血漿中には、マウスに対する AEF 効果が確認できなかった。ヒトとマウスという異なった種間での実験によるため、確認できなかった可能性がある。

【2. TTR アミロイドーシスに関する研究】

各種霊長類の病理組織を用いて、アミロイド沈着の有無を検証し、アフリカミドリザルにのみ TTR アミロイドーシスが確認された。本サル種の TTR アミノ酸配列は、他のサル種とは一部異なることが判明した。また、カニクイザルと比較すると TTR の血中濃度や四量体安定性が低下していた。特異的な TTR 配列がアミロイド形成に重要な役割を果たしている可能性がある。本動物種は貴重な TTR アミロイドーシス疾患モデルであると考えられた。また、霊長類内の TTR 配列の多様性と病気を生じるヒト TTR 変異の報告部位とに関連性が観察された。

研究成果の概要 (英文)：Systemic AA amyloidosis is one of the most severe complications of chronic inflammatory disorders, particularly rheumatoid arthritis. It is well known that, similar to an infectious prion protein, amyloid-enhancing factor (AEF) acts as a transmissible agent in AA amyloidosis. However, how AEF transmits AA amyloidosis in vivo remained to be fully elucidated. In the present study, we focused on finding cell-free forms of AEF and its carriers in circulation by using the murine transfer model of AA amyloidosis. We first determined that circulating cell-free AEF existed in blood and plasma in mice with systemic AA amyloidosis. Second, we established that plasma exosomes containing AA amyloid oligomers derived from serum amyloid A had AEF activity and could transmit systemic AA amyloidosis via a prion-like mechanism. These novel findings should provide insights into the transmission mechanism of systemic amyloidosis.

We previously reported that two cases of aged vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) spontaneously developed TTR amyloidosis and showed clinical symptoms mimicking human TTR amyloidosis. However, the pathogenesis of TTR amyloidosis in vervet monkeys and relationship to the human disease remained to be elucidated. The aims of the present study were to elucidate the pathogenesis of TTR amyloidosis in the vervet monkeys, and to verify pathological relationship to the human TTR amyloidosis. First, using over 120 tissue specimens of various primates and clinical cardiac findings of vervet monkeys and crab-eating macaques, we showed that aged vervet monkeys developed TTR amyloidosis mainly causing cardiac dysfunction by means of physicochemical examinations, but other non-human primates showed neither TTR amyloid deposits nor cardiac dysfunctions. Next, we determined that vervet monkeys had the species-specific TTR allele. Taken together, we propose that the aged vervet monkeys mimic the human TTR amyloidosis and the monkey is a precious species as an animal model for this hereditary disease of human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：アミロイドーシス、血清蛋白質、質量分析

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは、種々の原因による濃度上昇や遺伝子変異などにより、通常は可用性の蛋白質がアミロイド線維を形成し、臓器障害を引き起こす難治性の疾患群である。前駆蛋白質の構造変化がアミロイドの形成要因であり、パーキンソン病などの多くの難病と同じくコンフォメーション病に分類される。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 が引き起こす AA アミロイドーシスや、TTR が原因となる FAP や、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。これらの疾患で沈着するアミロイド線維は類似した構造や性質を有しており、本疾患群に共通した病態が存在すると考える。

2. 研究の目的

最も病態を左右すると思われる因子にしぼり、アミロイドーシスの病態解析と新たな検査法の開発である。研究対象はアミロイド原因蛋白質 (前駆蛋白質) の濃度上昇が要因の AA アミロイドーシスと前駆蛋白質の遺伝子変異が原因の家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) である。以下の代表的なアミロイド形成過程を持つ2疾患に関連する病態解析を行った。

AA アミロイドーシスのアミロイド前駆蛋白質である SAA は、立体構造が変化することで amyloid enhancing factor (AEF) となり、一旦、AEF が形成されるとアミロイド線維のシードとして働くことによって、SAA の重合が促進され、アミロイド線維が形成されると考えられている。我々は、血漿中に AEF が存在するか、存在するのであればどの様な存在形態で存在するのか検証した。

FAP モデル動物として、ヒト TTR 遺伝子

を導入したげっ歯類モデルが開発し、治療法の開発や病態解析に用いてきたが、詳細な検討にはヒトの病態により近い動物モデルが必要である。一方、これまでヒト以外の動物種で TTR アミロイドーシスを自然発症した報告はなかったが、高齢のアフリカミドリザルで TTR アミロイドーシスが生じた例が近年報告された。本研究の目的は、アフリカミドリザルをはじめとした霊長類の TTR アミロイドーシスの発生頻度や発症要因などを解析し、ヒトにおける病態との関連性やモデル動物としての可能性を検証することである。

3. 研究の方法

【AA アミロイドーシスに関する研究】

C3H/ HeN マウスの腹腔内に AEF、背部皮下に 2%硝酸銀を投与し、AA アミロイドーシスモデルマウスを作製した。7日後に血漿を採取し、超遠心法によりエキソソームを分離した。そのエキソソームを AEF の代わりに 2%硝酸銀とともに投与し、7日後に脾臓などの諸臓器を採取した。これらの諸臓器のコンゴレッド染色を施行し、アミロイド沈着の有無を確認した。分離したエキソソームの解析には電子顕微鏡、ウエスタンブロット法、質量分析装置である SELDI-TOF MS を用いた。

【TTR アミロイドーシスに関する研究】

各種サル (124例) を用いて TTR アミロイドの沈着頻度を解析した。アフリカミドリザルとカニクイザルを対象に、脳の Aβ アミロイド、膵臓での IAPP アミロイド沈着の有無を調べた。また、アフリカミドリザル 14頭、カニクイザル 8頭を対象に、心電図、心エコー、血中 ANP 値を解析した。また、血中 TTR 濃度、血中 TTR 四量体構造の安定性を解析した。これらの霊長類の TTR 遺伝子配列を解析し、ヒトとの相同性を検証した。また、ヒトにおける病原性変異と霊長類内のア

ミノ酸配列の多様性との比較を行った。

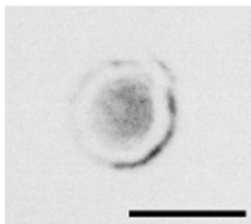
(倫理面への配慮)

本研究で実施した動物実験は、本学の倫理委員会で承認を受け実施した。

4. 研究成果

【AA アミロイドーシスに関する研究】

(1)本モデルマウスの血漿から超遠心法により分離・精製したエクソソーム分画には、50-100 nm の小胞が存在することが確認でき、またウエスタンブロット法で、エクソソームマーカーである Tsg-101 陽性を示すこと、血漿からエクソソームを分離することができた。



(左図) 分離したエクソソームの電子顕微鏡写真、スケールは 100 nm

(2) 硝酸銀のみを投与した群では全例でアミロイド沈着は認めなかったが、血漿と硝酸銀を投与したマウスでは、5例中4例(80%)、エクソソームと硝酸銀を投与したマウスでは15例中8例(53%)にアミロイド沈着像を認めた。(3) ウエスタンブロット法と SELDI-TOF MS による解析でエクソソーム内には、アミロイド前駆蛋白である SAA が存在し、重合した SAA オリゴマーも観察された。

【結語】エクソソームはアミロイドのシードである AEF の運搬を担っている可能性があり、本疾患の病態に重要な役割を果たしている可能性がある。

【TTR アミロイドーシスに関する研究】

高齢アフリカミドリザル7頭中3頭で TTR アミロイドーシスを確認した。しかし、他の霊長類では TTR アミロイド沈着は確認できなかった。しかし、高齢のアフリカミドリザルとカニクイザルは両種ともに A β と IAPP アミロイドの沈着を高頻度に認めた。

アフリカミドリザル 14 頭中 7 頭で、不整脈や心拡大などの異常所見を認め、4 頭は心エコーで心室壁運動の明らかな低下 (EF 55% 未満) を認めた。また、血中 ANP 値の低下所見も認めた。これらの異常な心症候は高齢のカニクイザルでは観察されなかった。

アフリカミドリザルとカニクイザルの血

TTR の四量体安定性を解析したところ、カニクイザルと比べアフリカミドリザルの TTR 四量体は、単量体へと解離しやすい傾向が認められた。また、アフリカミドリザルの血中 TTR 濃度は、カニクイザルの血中 TTR 濃度の

約半分に低下していた。

各種霊長類の TTR 遺伝子配列を解析したところ、アフリカミドリザルの TTR のみ、種特異的な配列を認めた。TTR 遺伝子配列の情報を基に、TTR 分子の系統樹を作成したところ、一般的な霊長類の系統樹と同様であった。

これらの結果から、アフリカミドリザルは生物種として、TTR アミロイドーシスを発症しやすい要因を持っていると考えられた。また、アフリカミドリザルはカニクイザルと比較して、血中 TTR の四量体は単量体へと解離しやすく、血中 TTR 濃度が低下していたことも、TTR の安定性が低下し、蛋白質の品質管理機構を受け、細胞外への分泌効率が低下しているためと想定された。今後さらなる検証が必要である。本研究で得られたアフリカミドリザルの所見は、ヒト TTR アミロイドーシスの所見と類似しており、本サル種はヒト TTR アミロイドーシスの貴重な疾患モデル動物であると考えられた。

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 2 2 件)

1. Misumi Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Ohshima T, Ando Y, Uchino M. Relationship between amyloid deposition and intracellular structural changes in familial amyloidotic polyneuropathy. *Hum Pathol*, 2011 (in press). (査読有)
2. Kugimiya T, Jono H, Saito S, Maruyama T, Kadowaki D, Misumi Y, Hoshii Y, Tasaki M, Su Y, Ueda M, Obayashi K, Shono M, Otagiri M, Ando Y. Loss of functional albumin triggers acceleration of transthyretin amyloid fibril formation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Lab Invest*, 2011 (in press). (査読有)
3. Sueyoshi T, Ueda M, Jono H, Irie H, Sei A, Ide J, Ando Y, Mizuta H. Wild-type transthyretin-derived amyloidosis in various ligaments and tendons. *Hum Pathol*, 2011 (Epub ahead of print). (査読有)
4. Asahina A, Yokoyama T, Ueda M, Ando Y, Ohshima N, Saito I, Tadokoro E, Hasegawa K. Hereditary Gelsolin Amyloidosis: A New Japanese Case with Cutis Laxa as a Diagnostic Clue. *Acta Derm Venereol*, 2011;91:201-203. (査読有)
5. Obayashi K, Yamashita T, Tasaki M, Ueda M, Shono M, Jono H, Ohshima T,

- Ohya Y, Asonuma K, Inomata Y, Ando Y. Amyloid neuropathy in a younger domino liver-transplanted recipient. *Muscle Nerve*, 2011;43:449-450. (査読有)
6. Okabe H, Beppu T, Hayashi H, Ishiko T, Masuda T, Otao R, Hasita H, Jono H, Ueda M, Shinriki S, Ando Y, Baba H. Hepatic stellate cells accelerate the malignant behavior of cholangiocarcinoma cells. *Ann Surg Oncol*, 2011;18:1175-1184. (査読有)
 7. Koike H, Kiuchi T, Iijima M, Ueda M, Ando Y, Morozumi S, Tomita M, Kawagashira Y, Watanabe H, Katsuno M, Shimoyama Y, Okazaki Y, Kamei H, Sobue G. Systemic but asymptomatic transthyretin amyloidosis 8 years after domino liver transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010 (Epub ahead of print). (査読有)
 8. Ohya Y, Jono H, Nakamura M, Hayashida S, Ueda M, Obayashi K, Misumi S, Asonuma K, Ando Y, Inomata Y. Effect of recipient-derived cells on the progression of familial amyloidotic polyneuropathy after liver transplantation: a retrospective study. *Ann Clin Biochem*, 2010;47:529-534. (査読有)
 9. Tasaki M*, Ueda M*, Ochiai S, Tanabe Y, Murata S, Misumi Y, Su Y, Sun X, Shinriki S, Jono H, Shono M, Obayashi K, Ando Y. Transmission of circulating cell-free AA amyloid oligomers in exosomes vectors via a prion-like mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010;400:559-562 (*contributed equally). (査読有)
 10. Ito Y, Takakura S, Ichiyama S, Ueda M, Ando Y, Matsuda K, Hidaka E, Nakatani K, Nishioka J, Nobori T, Kajiyama N, Kimura H. Multicenter evaluation of prototype real-time PCR assays for Epstein-Barr virus and cytomegalovirus DNA in whole blood samples from transplant recipients. *Microbiol Immunol*. 2010;54:516-522. (査読有)
 11. Ota T, Ota K, Jono H, Fujimori H, Ueda M, Shinriki S, Sueyoshi T, Shinohara M, Ando Y. Midkine expression in malignant salivary gland tumors and its role in tumor angiogenesis. *Oral Oncol*, 2010;46:657-661. (査読有)
 12. Ota K, Fujimori H, Ueda M, Jono H, Shinriki S, Ota T, Sueyoshi T, Taura M, Taguma A, Kai H, Shinohara M, and Ando Y. Midkine expression is correlated with an adverse prognosis and is down-regulated by p53 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2010;37:797-804. (査読有)
 13. Kono S, Manabe Y, Tanaka T, Fujii D, Sakai Y, Narai H, Omori N, Ueda M, Ando Y, Abe K. A case of familial amyloid polyneuropathy due to Phe33Val TTR with vitreous involvement as the initial manifestation. *Intern Med* 2010;49:1213-1216. (査読有)
 14. 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* 2010;39:41-47. (査読有)
 15. 谷口昌光、谷口央、毛利渉、植田光晴、安東由喜雄. Notch3 Cys93Tyr 変異 CADASIL の 1 例. 内科 106, 177-180, 2010 (査読有)
 16. Misumi Y, Ando Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Uchino M. Chain reaction of amyloid fibril formation with induction of basement membrane in familial amyloidotic polyneuropathy. *J Pathol* 2009;219:481-490. (査読有)
 17. Koike H, Ando Y, Ueda M, Kawagashira Y, Iijima M, Fujitake J, Hayashi M, Yamamoto M, Mukai E, Nakamura T, Katsuno M, Hattori N, Sobue G. Distinct characteristics of amyloid deposits in early- and late-onset transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *J Neurol Sci* 2009;287:178-184. (査読有)
 18. Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Okamoto S, Misumi Y, Nakamura M, Takashi O, Uchino M. A rapid and sensitive prenatal diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Val30Met by mass spectrometry. *Prenat Diagn* 2009;29: 930-933. (査読有)
 19. Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, Oike Y, Endo M, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Yoshitake Y, Shinohara M, Ando Y. Humanized Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody Suppresses Tumor Angiogenesis and In Vivo Growth of Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:5426-5434. (査読有)
 20. 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;100:1735-1739. (査読有)
21. 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;55:1223-7. (査読有)
 22. 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; 111:219-25. (査読有)
- [学会発表] (計14件)
1. 植田光晴、中村未那弥、揚山直英、中村紳一朗、James Kenn Chambers、庄野信、城野博史、大林光念、宇根由美、安東由喜雄：霊長類におけるトランスサイレチンの解析—ヒトTTR型アミロイドーシスとの関連性—。第50回日本臨床化学会，Sep 23-25, 2010, 山梨県立県民文化ホール，甲府
 2. 植田光晴、安東由喜雄：家族性アミロイドポリニューロパチー、老人性全身性アミロイドーシスと疾患モデル動物。第107回関西実験動物研究会，Sep 10, 2010, 滋賀医科大学，滋賀
 3. 植田光晴、中熊るみ、毛利聡子、西田紗央里、終中智恵子、大隈雅紀、神力悟、庄野信、城野博史、大林光念、池田勝義、安東由喜雄。熊本大学中央検査部における遺伝性神経疾患に対する遺伝子検査。第17回日本遺伝子診療学会大会，Aug 5-7, 2010, 三重県医師会館，津
 4. 植田光晴、揚山直英、中村紳一朗、三隅洋平、大嶋俊範、山下太郎、大林光念、安東由喜雄。TTRアミロイドーシスを発症したミドリザルの解析—疾患モデル開発に向けて—。第51回日本神経学会総会，May 20-22, 2010, 東京国際フォーラム，東京
 5. Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Chambers J, Misumi Y, Nakaguma R, Shinriki S, Shono M, Jono H, Obayashi K, Une Y, Ando Y. Analyses of vervet monkeys suffering from ATTR amyloidosis: A candidate model animal for human TTR-related amyloidosis. *XII International Symposium on Amyloidosis*. April 18-21, 2010, Rome. Crowne Plaza Rome-St. Peter's Rome, Italy.
 6. 植田光晴、安東由喜雄：CKDの病態について。H21年度臨床検査講習会，Mar 8, 2010, 熊本県医師会館，熊本
 7. 植田光晴、安東由喜雄：タクロリムスのAAアミロイドーシス抑制効果—モデルマウスを用いた検討を中心に—。熊本SLE学術講演会，Oct 6, 2009, 熊本大学，熊本
 8. 植田光晴、安東由喜雄：新たな遺伝学的検査法を用いた病態解析と検査への応用。シンポジウム「臨床化学の若い力で発信しつつある新たな検査、病態解析法」、第49回日本臨床化学会，Sep 18-20, 2009, 長崎大学，長崎
 9. 植田光晴、揚山直英、中村紳一朗、中熊るみ、三隅洋平、田崎雅義、村田翔、蘇宇、田邊祐子、城野博史、大林光念、堀端洋子、大隈雅紀、池田勝義、安東由喜雄：アミロイドーシスを発症したサルにおけるTTRの解析—ヒトに最も近い疾患モデルの開発に向けた取り組み—。第長崎大学，49回日本臨床化学会，Sep 18-20, 2009, 長崎大学，長崎
 10. 植田光晴、揚山直英、中村紳一朗、中熊るみ、三隅洋平、田崎雅義、村田翔、蘇宇、田邊祐子、城野博史、大林光念、堀端洋子、大隈雅紀、池田勝義、安東由喜雄：アフリカミドリザルに自然発症したTTR型アミロイドーシスの解析。第56回日本臨床検査医学会，Aug 26-29, 2009, 札幌コンベンションセンター，札幌
 11. 植田光晴、安東由喜雄：遺伝性神経疾患と感染症に対する迅速かつ簡便な診断システムについて。モーニングセミナー、第27回日本神経治療学会，June 11-12, 2009, 崇城大学市民ホール，熊本
 12. 植田光晴、三隅洋平、山下太郎、大林光念、城野博史、内野誠、安東由喜雄：FAP早期治療に向けたSELDI-TOF MSを用いたハイスループットなスクリーニング法の確立。第27回日本神経治療学会，June 11-12, 2009, 崇城大学市民ホール，熊本
 13. 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, 仙台国際センター，仙台

〔図書〕(計2件)

1. 植田光晴、安東由喜雄. 臨床試験 I – III phase study. 日本臨床検査同学院遺伝子分析科学認定士制度委員会 編集 「遺伝子検査技術—遺伝子分析科学認定士指導者のためのテキスト—」宇宙堂八木書店(東京)2011 (in press).
2. 植田光晴、安東由喜雄. 病理組織標本を用いた遺伝子変異解析. 「検査室のためのわかりやすい SNP 解析マニュアル」、日本臨床検査自動化学会、東京、2011 (in press).

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学大学院生命科学研究部病態情報解析学分野のホームページ

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/diagnostic/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 光晴 (UEDA MITSUHARU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：60452885