

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19242

研究課題名（和文）構造特異的自家蛍光を利用したアミロイドの非標識検出およびタイピング

研究課題名（英文）label-free detection and typing of amyloid using structure-specific autofluorescence

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：当研究では独自に開発したハイパースペクトル蛍光顕微鏡を用いてリスザルの脳のA $\beta$ 病変を解析し、リスザルのA $\beta$ が紫外励起下で特徴的な二峰性ピークを有する蛍光スペクトルを有することを明らかにした。同様の解析をチンパンジー、アカゲザル、フサオマキザル、シロテテナガザル、フラミンゴのA $\beta$ 病変で実施したところ、チンパンジーのA $\beta$ 病変の蛍光スペクトルはリスザルと同様だった一方で、他の動物種の蛍光スペクトルは大きく異なっていた。リスザルとアカゲザルの脳組織の比較解析に基づき、何らかの化学的修飾が蛍光スペクトルの差異に寄与していることが示唆されたが、その同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、天然由来の何らかの蛍光物質が、A $\beta$ 病変の自家蛍光に関与している可能性が高いことが明らかとなった。また、その蛍光物質を組織切片より分離させる条件を決定した。この生体由来色素は天然のアミロイドプローブとして、アミロイドPET等に利用できる可能性がある。アルツハイマー型認知症は社会問題化しており、その診断に資する天然プローブの発見は社会的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：Amyloid (A $\beta$ ) is an abnormal protein that accumulates in the brains of Alzheimer's disease patients. In this study, we analyzed A $\beta$  lesions in squirrel monkey brains using our originally developed hyperspectral fluorescence microscope and found that squirrel monkey A $\beta$  has a fluorescence spectrum with a characteristic bimodal peak under UV excitation. Similar analyses were performed on A $\beta$  lesions of chimpanzees, rhesus monkeys, fuchs monkeys, white rhesus macaques, and flamingos. The fluorescence spectrum of A $\beta$  lesions of chimpanzees was similar to that of squirrel monkeys, while the fluorescence spectra of other animal species were very different. Based on Raman spectroscopic analysis of squirrel monkey and rhesus monkey brain tissue, it was suggested that some chemical modification contributed to the differences in fluorescence spectra, but this could not be identified.

研究分野：獣医学

キーワード：アミロイド 認知症 自家蛍光

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アミロイドは生体由来のタンパク質の誤った折りたたみによって生じ、局所あるいは全身に蓄積することで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、原因となるタンパク質の種類によって多様な病型（人で36種、動物で10種）に分類される。アミロイドーシス患者数は年々増加しており、例えばアミロイドの蓄積で発症するアルツハイマー病は2030年には全世界で6,500万人が罹患すると予想されている（Masoumi et al., *Neuropeptides*, 2018）。しかしながら治療法は確立されておらず、早期かつ正確な診断が予後好転の鍵となる。現在アミロイドーシスは、摘出した組織の病理組織学的検索によって確定診断される。ただしこの方法には、『採材した僅かな領域しか評価できない』『確定診断まで時間がかかる』『高い専門性を要する』など多くの制約が存在する。応募者は本研究に先駆け、アミロイドが構造特異的な自家蛍光を有することを明らかにし、これを利用することによって、非標識で簡単迅速にアミロイドを検出出来る可能性を見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では動物症例の解析に基づき、基礎～臨床研究分野に新たな突破口を拓く革新的技術である自家蛍光を利用したアミロイドーシスの非標識イメージングおよび病型タイピングに挑戦する。

### 3. 研究の方法

応募者はアミロイドの非標識イメージングを実現するため、本研究に先駆け、励起光と蛍光の双方でスペクトル解析が可能な蛍光分光顕微鏡を新規開発した。本研究では当顕微鏡を用いて、リスザル、チンパンジー、アカゲザル、フサオマキザル、シロテテナガザル、フラミンゴのA病変の非染色組織切片から蛍光分光画像を取得する。続いて同一切片を用いて免疫組織化学を実施し、アミロイド沈着部位を確認する。蛍光分光撮影データを用いて多変量解析を行い、これを免疫組織化学像と照合し、アミロイドを特異的に検出する測定モデルを構築した。

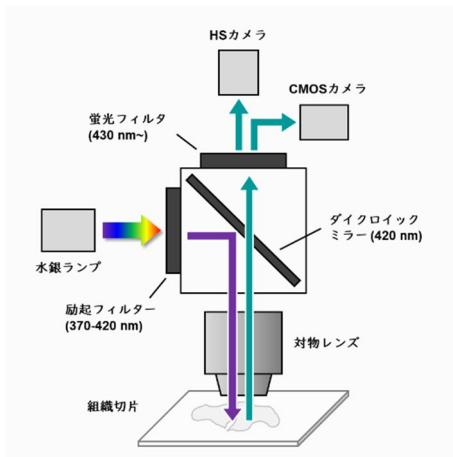
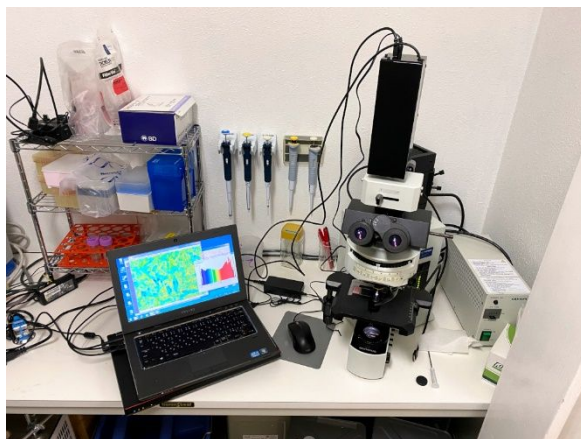


図1. 蛍光分光顕微鏡の設置図および概念図：

蛍光顕微鏡にハイパースペクトルカメラおよび CMOS カメラを装着している。  
36万画素の1ピクセル毎に400-800nmの波長帯のスペクトル情報を取得可能である。

### 4. 研究成果

当研究では独自に開発したハイパースペクトル蛍光顕微鏡を用いてリスザルの脳のA病変を解析し、リスザルのAが紫外励起下で特徴的な二峰性ピークを有する蛍光スペクトルを有することを明らかにした（*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 36(1); 41-45, 2024）。同様の解析をチンパンジー、アカゲザル、フサオマキザル、シロテテナガザル、フラミンゴのA病変で実施したところ、チンパンジーのA病変の蛍光スペクトルはリスザルと同様だった一方で、他の動物種の蛍光スペクトルは大きく異なっていた。リスザルとアカゲザルの脳組織を用いたラマン分光解析に基づき、何らかの化学的修飾が蛍光スペクトルの差異に寄与していることが示唆されたが、その同定には至らなかった。そこでこの蛍光に寄与する物質の同定を試みた。

まずは組織切片から蛍光物質を抽出することを目的に溶剤の検討を行ったところ、ある濃度のギ酸溶液を用いることで蛍光が減退することを明らかにした。今後は溶出液の解析を実施し、蛍光物質の同定を試みる。

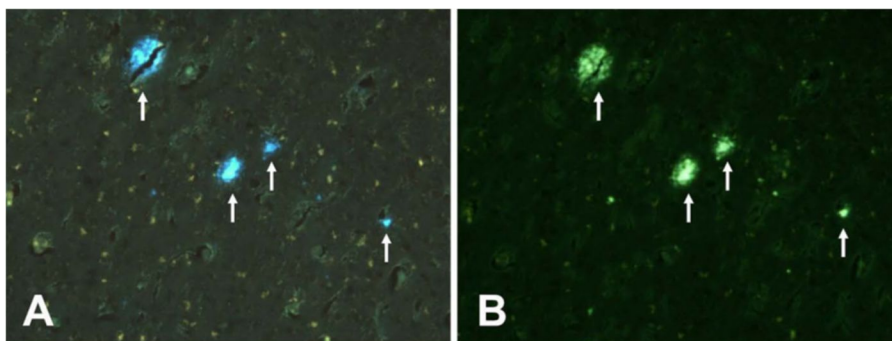


図2. リスザルの脳アミロイド 病変の自家蛍光：  
 A) 近紫外励起下でアミロイドプラークが青白い蛍光を発している。  
 B) 同一切片のチオフラビン蛍光染色像。自家蛍光に一致した陽性像が確認できる。

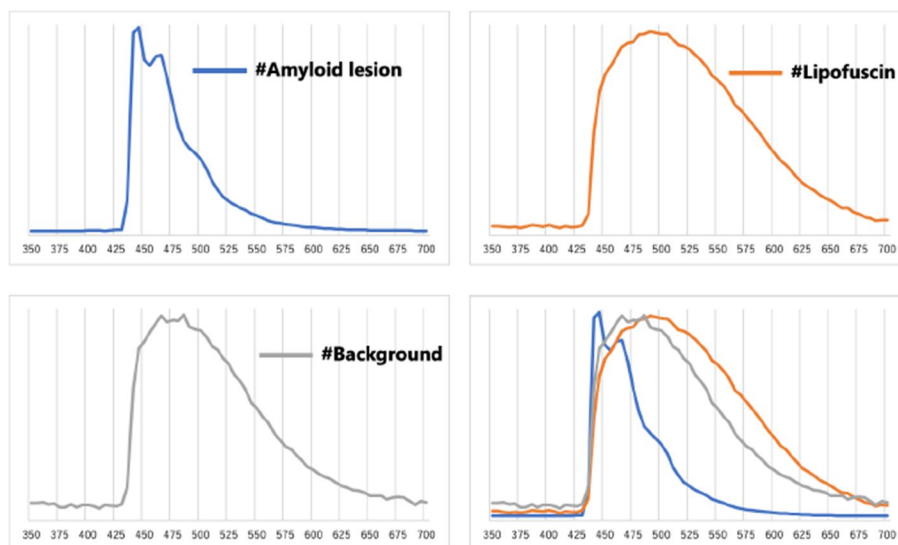


図2. リスザルの脳アミロイド 病変の自家蛍光スペクトル：  
 アミロイド病変では440と460nmの位置に特徴的な二峰性ピークが観測された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kobayashi Kyoko, Iwaide Susumu, Sakai Hiroki, Kametani Fuyuki, Murakami Tomoaki	4. 巻 60
2. 論文標題 Keratinic amyloid deposition in canine hair follicle tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 60～68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/03009858221128924	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, OBA Ryohei, KOBAYASHI Natsumi, MURAKAMI Tomoaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Local administration of amyloid enhancing factor initiates in situ amyloid A deposition followed by systemic lesions in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Animals	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） 10.1538/expanim.22-0125	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 Murakami Tomoaki, Kaku Toshisuke, Tsukakoshi Kaori, Iwaide Susumu, Itoh Yoshiyuki, Hisada Miki, Nomura Kohji, Kubo Rikako, Ikebukuro Kazunori, Sassa-O' Brien Yukiko, Kametani Fuyuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Identification of novel amyloidosis in dogs: -S1-casein acquires amyloidogenicity in mammary tumor by overexpression and N-terminal truncation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 203～213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/03009858221148511	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 Sedghi Masoud Niki, Iwaide Susumu, Itoh Yoshiyuki, Hisada Miki, Une Yumi, Murakami Tomoaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Apolipoprotein A-IV amyloidosis in a cotton-top tamarin (Saguinus oedipus)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 1～3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13506129.2023.2169603	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 Masoud Niki Sedghi, Iwaide Susumu, Itoh Yoshiyuki, Hisada Miki, Harada Tomoyuki, Murakami Tomoaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of Ameloblastin as an Amyloid Precursor Protein of Amyloid-Producing Ameloblastoma in Dogs and Cats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary Sciences	6. 最初と最後の頁 166 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vetsci10020166	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 村上智亮	4. 巻 51
2. 論文標題 ハイパースペクトル非標識イメージングに基づく病理診断サポート技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 528-532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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, Ito Nanami, Ogino Shiori, Kobayashi Natsumi, Koyama Satoshi, Hisamoto Shumpei, Kondo Hiroataka, Itoh Yoshiyuki, Hisada Miki, Hoshino Yuki, Nakagawa Daisuke, Matsubara Yuki, Nakamura Shin ichi, Satoh Hiroshi, Shibuya Hisashi, Murakami Tomoaki	4. 巻 261
2. 論文標題 Fibrinogen A chain amyloidosis outbreaks in Japanese squirrels (Sciurus lis): a potential disease model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 96 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.6150	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 Inoue Masaki, Miyazaki Shinya, Kobayashi Natsumi, Kangawa Akihisa, Murakami Tomoaki	4. 巻 51
2. 論文標題 Pathological Characterization of Spontaneous AA Amyloidosis in Microminipigs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 257 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/01926233231204019	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, NAKAYAMA Yutaro, CHAMBERS James K, UCHIDA Kazuyuki, NAKAGAWA Daisuke, YAMANASHI Yumi, BANDO Haruna, MURAKAMI Tomoaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Senile plaques and phosphorylated tau deposition in a super-aged rhesus monkey ( <i>Macaca mulatta</i> )	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1296 ~ 1300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.23-0313	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 Oba Ryohei, Ujike Naoki, Ono Yuki, Okano Takayuki, Murakami Tomoaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Label-free autofluorescence and hyperspectral imaging of cerebral amyloid- lesions in aged squirrel monkeys	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Diagnostic Investigation	6. 最初と最後の頁 41 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/10406387231204876	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 Murakami Tomoaki, Kobayashi Natsumi, Iwaide Susumu, Itoh Yoshiyuki, Hisada Miki, Izawa Takeshi, Kuwamura Mitsuru	4. 巻 31
2. 論文標題 Identification of calcitonin receptor-stimulating peptide 1-derived amyloid in a feline C-cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 142 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13506129.2023.2282361	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 Natsumi, Iwaide Susumu, Fukui Hiroto, Une Yumi, Itoh Yoshiyuki, Hisada Miki, Murakami Tomoaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Apolipoprotein C-III amyloidosis in white lions ( <i>Panthera leo</i> )	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Veterinary 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) 10.1177/03009858241230100	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, Takemae Hitoshi, Oba Mami, Owaku Kenta, Kobayashi Natsumi, Itoh Yoshiyuki, Kozono Takuma, Hisada Miki, Miyabe-Nishiwaki Takako, Watanuki Koshiro, Yanai Tokuma, Inoue Hisafumi, Murakami Tomoaki	4. 巻 175
2. 論文標題 Systemic AL kappa chain amyloidosis in a captive Bornean orangutan ( <i>Pongo pygmaeus</i> )	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 105315 ~ 105315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rvsc.2024.105315	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Tomoaki Murakami, Niki Sedghi Masoud, Yoshiyuki Itoh, Miki Hisada, Yumi Une
2. 発表標題 Apolipoprotein A-IV amyloidosis in a Cotton-top tamarin ( <i>Saguinus oedipus</i> )
3. 学会等名 XVIII. Internathinal Symposium on Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Susumu Iwaide, Nanami Ito, Shiori Ogino, Daisuke Nakagawa, Shin-ichi Nakamura, Yoshiyuki Itoh, Miki Hisada, Hiroataka Kondo, Hisashi Shibuya, Yuki Hoshino, Hiroshi Sato, Tomoaki Murakami
2. 発表標題 Frequent Occurrence of Fibrinogen Amyloidosis in Japanese Squirrels ( <i>Sciurus Iis</i> )
3. 学会等名 XVIII. Internathinal Symposium on Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上智亮
2. 発表標題 限局性アミロイドーシスおよび新たに発見された動物アミロイドーシスの病理
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022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 脳アミロイド の非標識特異的イメージング手法開発の試み
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 岩出進、村上智亮
2. 発表標題 技術紹介：FFPE資料の質量分析に基づく動物アミロイド前駆蛋白質の同定
3. 学会等名 第39回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoaki Murakami, Yoshiyuki Itoh, Miki Hisada, Takeshi Izawa, Mitsuru Kuwamura
2. 発表標題 Identification of calcitonin receptor-stimulating peptide 1-derived amyloid in feline C-cell carcinoma
3. 学会等名 The 10th ASVP and 10th JCVF Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Natsumi Kobayashi, Susumu Iwaide, Yoshiyuki Ito, Miki Hisada, Machie Tsuneyasu, Tomoko Akamine, Tomoaki Murakami
2. 発表標題 A case of a cat with two different deposition distributions of AA amyloid in the kidney
3. 学会等名 The 10th ASVP and 10th JCVF Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 Niki Sedghi Masoud, Susumu Iwaide, Tomoyuki Harada, Tomoaki Murakami
2. 発表標題 Identification of ameloblastin as an amyloid precursor protein of amyloid-producing ameloblastoma in dogs and cats
3. 学会等名 The 10th ASVP and 10th JCVF Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuka Kato, Natsumi Kobayashi, Susumu Iwaide, Tomoaki Murakami
2. 発表標題 Research on the incidence of amyloid deposition in canine mammary tumors
3. 学会等名 The 10th ASVP and 10th JCVF Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Susumu Iwaide, Hideki Watanabe, Tomoaki Murakami
2. 発表標題 Chicken anemia virus infection in a group of 12-day-old chicks immunized with the maternal antibody
3. 学会等名 The 10th ASVP and 10th JCVF Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京農工大学獣医毒性学研究室  <a href="http://www.tuat.ac.jp/~tat1vt/">http://www.tuat.ac.jp/~tat1vt/</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
---------	---------