

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790557

研究課題名(和文) 脇役が語るアミロイドーシスの診断および治療～アミロイド共存蛋白質の世界～

研究課題名(英文) Supporting characters may go to the heart of amyloidogenesis: Amyloid associated protein world

研究代表者

田崎 雅義 (TASAKI, MASAYOSHI)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：50613402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド線維に共存する蛋白質は、アミロイドーシスの病態に深く関与していることが知られている。本研究では、質量分析装置を用いて、早期の診断マーカーや治療分子となりうる新規アミロイド共存蛋白質を同定することを目的とした。本解析の結果、アミロイド沈着組織のLC-MS/MSを用いた解析で、クラスタリンやビトロネクチンをはじめとするいくつかの候補蛋白質を同定した。家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者では、健康者に比べ、有意な血清クラスタリン濃度の増加を認めた。さらに、FAPの心臓において、ビトロネクチンの沈着量とTTRの沈着量に有意な相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：It is well known that some co-localized proteins with amyloid fibrils, which are called amyloid associated proteins, may play important roles in amyloidosis. Then, we tried to pick up the strong candidates as early diagnostic markers and/or therapeutic molecules of amyloidosis in this study. As the results of our studies, we could detect some strong candidates, such as clusterin and vitronectin. Serum clusterin levels of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) patients was significantly higher than that of healthy volunteers. Moreover, significant higher correlation between vitronectin and TTR deposition was observed in the cardiac tissues of FAP patients.

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 プロテオミクス アミロイド共存蛋白質 臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは、遺伝子変異や血中濃度上昇などにより可溶性の蛋白質が難溶性アミロイド線維へと変化し、重度の臓器障害を引き起こす難治性の疾患群である。

アミロイドーシスの診断は、臨床症状や遺伝子診断、病理所見を組み合わせ、総合的に判断している。本疾患群は、病態が進行すると治療効果が乏しいため、早期診断が極めて重要であるが、本疾患の特殊性からこれらの診断法を駆使しても、診断に苦慮するケースも少なくない。このため、アミロイドーシスを発症早期で特定できる新たな早期診断マーカーが必要である。

本疾患群は、未だに根治的な治療法がなく、新規治療法の開発が急務とされている。治療法の実現には、まず、アミロイド沈着機構を解明する必要がある。アミロイド沈着機構の解析の一つの方向性として、近年、注目されているのが、アミロイド沈着の鍵を握るアミロイド線維に共存する蛋白質(アミロイド共存蛋白質)の解析である。これまでに、血清アミロイド P (SAP) や Apo E などがアミロイド共存蛋白質として報告され、特に、SAP はアミロイド線維形成を促進する因子として働くことが明らかとなってきた。このように、アミロイド共存蛋白質は、アミロイド沈着機構において極めて重要な役割を担っている。上述のように、共存蛋白質の解析の重要性が高まっているが、組織からの解析が困難であることから、研究は進まず、未だに早期診断マーカーの開発および治療分子の探索には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、アミロイド線維に共存する蛋白質に着目し、質量分析装置を駆使して、各種アミロイドーシス患者のアミロイド沈着組織から、新規アミロイド共存蛋白質を網羅的に同定する。さらに、同定された共存蛋白質の機能を解析し、治療分子や早期診断マーカーの開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)アミロイド沈着部位に存在するアミロイド共存蛋白質の探索

各種全身性アミロイドーシス患者(AL アミロイドーシス、AA アミロイドーシス、老人性全身性アミロイドーシス(SSA)、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP))のホルマリン固定組織切片をコンゴレッド染色後、アミロイド陽性部位を Laser microdissection で採取し、蛋白質抽出およびペプチド消化したのち、LC-MS/MS でアミロイド共存蛋白質の網羅的解析を実施した。

(2)アミロイド共存蛋白質による早期診断法の実現および機能解析

ELISA 法を用いて FAP 患者および健常者の

血清クラスタリン濃度を測定した。

アミロイド共存蛋白質のアミロイド沈着組織での局在を免疫組織化学染色により評価した。

チオフラビン T を用いた検討により、アミロイド共存蛋白質のアミロイド線維形成に与える影響を評価した。

4. 研究成果

(1) アミロイド沈着組織の網羅的解析の結果、治療分子や早期診断マーカーとなりうる蛋白質が多数同定された。同定された蛋白質の中には、クラスタリンなどの細胞外分子シヤペロン、ビトロネクチンなどの細胞外マトリックスやマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)などの蛋白質が多数含まれていた。

(2)

クラスタリンの新規早期診断マーカーとしての可能性を探索するために、FAP 患者血清のクラスタリン濃度を測定した。その結果、FAP では、健常者に比べ、有意に血清クラスタリン濃度の増加を認めた($P < 0.05$)。また、FAP キャリアでも血清クラスタリン濃度が上昇している傾向が示され、早期診断マーカーとなり得る可能性が示された。クラスタリンの早期診断法の実現を目指した迅速測定法については、現在も検討中である。

FAP 患者組織を用いた免疫組織化学解析において、クラスタリンおよびビトロネクチンがアミロイドと共局在することが明らかとなった。FAP 患者の心臓を用いた解析において、ビトロネクチンの組織への沈着量は、アミロイドの沈着量と有意な相関を示すことが明らかとなった。ビトロネクチンのアミロイド線維形成機構への関与が示唆された。

チオフラビン T を用いたアミロイドの形成抑制実験では、ビトロネクチンなどがアミロイド線維形成を抑制するというデータは出ず、治療標的分子の特定には至らなかった。(1)で同定された蛋白質リストから、治療標的分子となり得る候補蛋白質を再度検討中である。

アミロイド沈着組織を質量分析装置で解析していく過程で、副産物として、FAP において、性差や年齢によって組織に沈着するアミロイドの構成成分が変化するという病態を見出し、本研究は、これまでに明らかとなっていないアミロイド形成メカニズムを紐解く一助となった(業績参照)。

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 14 件)

1. Kajihara R, Sakamoto H, Tanabe K, Takemoto K, Tasaki M, Ando Y, Inui S. Protein Phosphatase 6 Controls BCR-Induced Apoptosis of WEHI-231 Cells by Regulating Ubiquitination of

- Bcl-xL. *J Immunol.* 2014 (in press). 査読有
2. Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, Go C, Tasaki M, Uchimura K, Kadomatsu T, Tian Z, Smolka C, Sawa T, Takeya M, Tomizawa K, Ando Y, Araki E, Akaike T, Braun T, Oike Y, Bober E, Yamagata K. SIRT7 Controls Hepatic Lipid Metabolism by Regulating the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cell Metab.* 2014;19:712-21. 査読有
 3. Isono K, Jono H, Ohya Y, Shiraki N, Yamazoe T, Sugasaki A, Era T, Fusaki N, Tasaki M, Ueda M, Shinriki S, Inomata Y, Kume S, Ando Y. Generation of familial amyloidotic polyneuropathy-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2014;12:574-83. 査読有
 4. 田崎雅義、大林光念、植田光晴、安東由喜雄. パラフィン包埋ホルマリン固定組織切片を利用した LMD-LC-MS/MS システムによる新たなアミロイドーシス診断法の構築. *臨床病理.* 2014;62:291-6. 査読無
 5. Usuku H, Obayashi K, Shono M, Oshima T, Tasaki M, Yasuda H, Ogawa H, Ando Y. Usefulness of plasma B-type natriuretic peptide as a prognostic marker of cardiac function in senile systemic amyloidosis and in familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid.* 2013;20:251-5. 査読有
 6. Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Koike H, Kitagawa K, Ogi Y, Jono H, Su Y, Suenaga G, Oshima T, Misumi Y, Yoshida M, Yamashita T, Sobue G, Ando Y. Effect of age and sex differences on wild-type transthyretin amyloid formation in familial amyloidotic polyneuropathy: a proteomic approach. *Int J Cardiol.* 2013;170:69-74. 査読有
 7. Oshima T, Kawahara S, Ueda M, Kawakami Y, Tanaka R, Okazaki T, Misumi Y, Obayashi K, Yamashita T, Ohya Y, Ihse E, Shinriki S, Tasaki M, Jono H, Asonuma K, Inomata Y, Westermarck P, Ando Y. Changes in pathological and biochemical findings of systemic tissue sites in familial amyloid polyneuropathy more than 10 years after liver transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013 (in press). 査読有
 8. Obayashi K, Misumi Y, Watanabe T, Ando T, Akagami T, Tasaki M, Shinriki S, Ueda M, Yamashita T, Shinichi H, Ando Y. Dominant cardiac type of familial amyloidotic polyneuropathy associated with a novel transthyretin variant Thr59Arg. *Muscle Nerve.* 2013;48:839-841. 査読有
 9. Ihse E, Rapezzi C, Merlini G, Benson M, Ando Y, Suhr O, Ikeda SI, Lavatelli F, Obici L, Quarta C, Leone O, Jono H, Ueda M, Lorenzini M, Liepnieks J, Ohshima T, Tasaki M, Yamashita T, Westermarck P. Amyloid fibrils containing fragmented ATTR may be the standard fibril composition in ATTR amyloidosis. *Amyloid.* 2013;20:142-150. 査読有
 10. Obayashi K, Tasaki M, Jono H, Ueda M, Shinriki S, Misumi Y, Yamashita T, Oshima T, Nakamura T, Ikemizu S, Anan I, Suhr O, Ando Y. Impact of antibodies against amyloidogenic transthyretin (ATTR) on phenotypes of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) ATTR Valine30Methionine. *Clin Chim Acta.* 2013;419:127-131. 査読有
 11. Su Y, Jono H, Misumi Y, Senokuchi T, Guo J, Ueda M, Shinriki S, Tasaki M, Shono M, Obayashi K, Yamagata K, Araki E, Ando Y. Novel function of transthyretin in pancreatic alpha cells. *FEBS Lett.* 2012;586:4215-4222. 査読有
 12. Su Y, Misumi Y, Ueda M, Shono M, Tasaki M, Guo J, Jono H, Obayashi K, Senokuchi T, Yamagata K, Ando Y. The occurrence of islet amyloid polypeptide amyloidosis in Japanese subjects. *Pancreas.* 2012;41:971-973. 査読有
 13. Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers J, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y. Aged vervet monkeys developing transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: A valid pathological model of the human disease. *Lab Invest.* 2012;92:474-484. 査読有
 14. Jono H, Anno T, Motoyama K, Misumi Y, Tasaki M, Oshima T, Mori Y, Mizuguchi M, Ueda M, Shinriki S, Shono M, Obayashi K, Arima H, Ando Y. Potential use of glucuronylglucosyl- α -cyclodextrin as a novel therapeutic tool for familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid.* 2012;19(Suppl 1):50-2. 査読有
- [学会発表](計 9件)
1. 田崎雅義、大林光念、久原春代、植田光晴、荻泰裕、北川敬資、大隈雅紀、池田勝義、安東由喜雄. アミロイドーシス診断構築事業の2年間の取り組み: 血清お

- よび組織プロテオミクス解析法を駆使した診断システムの貢献度. 第 59 回日本臨床検査医学会九州地方会、第 25 回日本臨床化学会九州支部総会合同プログラム. 2014.3.5, 熊本市医師会館, 熊本
2. Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Koike H, Kitagawa K, Ogi Y, Suenaga G, Sobue G, Ando Y: Effect of age and sex differences on transthyretin amyloid formation in FAP. 2013.11.11-13. Rio de Janeiro, Brazil
 3. 田崎雅義、植田光晴、大林光念、北川敬資、荻泰裕、小池春樹、大嶋俊範、三隅洋平、山下太郎、祖父江元、安東由喜雄. TTR 型家族性アミロイドポリニューロパチーにおける組織沈着 TTR アミロイドのプロテオーム解析. 第 60 回日本臨床検査医学会, 2013.10.31-11.3, 神戸国際会議場, 神戸
 4. 田崎雅義、植田光晴、大林光念、北川敬資、荻泰裕、大嶋俊範、三隅洋平、安東由喜雄. 組織マスマススペクトルメトリー解析法を用いた全身性アミロイドーシスの病型診断における前向き検討. 第 38 回日本医用マスマススペクトル学会年会, 2013.9.26-27, 神戸市産業振興センター, 神戸
 5. 田崎雅義、植田光晴、荻泰裕、北川敬資、神力悟、城野博史、大林光念、安東由喜雄. アミロイド抽出法を改良した質量分析装置によるアミロイドーシスの診断. 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会シンポジウム, 2013.8.30-9.1, あわぎんホール, 徳島
 6. 田崎雅義、植田光晴、三上紗弥香、韓美英、大嶋俊範、板東泰彦、神力悟、宇宿弘輝、城野博史、大林光念、安東由喜雄: 組織プロテオーム解析による新規アミロイドーシス診断法の開発. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 2012.11.29-12.2, 国立京都国際会館, 京都
 7. Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Hata H, Jono H, Suenaga G, Su Y, Shinriki S, Yamashita T, Ando Y. Typing of amyloidosis by proteome analysis 12th Meeting of the Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine, 2012.11.29-12.1, Kyoto, Japan
 8. 田崎雅義、畑裕之、實吉拓、中嶋淑心、田尻景子、安達政隆、富田公夫、神力悟、城野博史、大林光念、安東由喜雄: LC-MS/MS による骨髄腫に伴う軽鎖沈着症の診断および病態解析. 第 52 回日本臨床化学会年次学術集会、2012.9.6-8, いわて県民情報交流センター, 岩手
 9. Tasaki M, Jono H, Ueda M, Hara R, Obayashi K, Kawaji T, Sah D, Fan Y, Yamashita T, Ando Y. RNAi therapy using

cholesterol-conjugated siRNA for TTR-related ocular amyloidosis. 13th International Symposium on Amyloidosis, 2012.5.6-10, Groningen, The Netherlands

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田崎 雅義 (TASAKI MASAYOSHI)
熊本大学・生命科学研究部・助教
研究者番号: 50613402