

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860236

研究課題名(和文) 2-ミクログロブリンアミロイド沈着による骨・関節破壊機構の解明

研究課題名(英文) analysis of the mechanism of bone and joint destruction by beta2-microglobulin amyloid deposition

研究代表者

大越 忠和 (Okoshi, Tadakazu)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：90362037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、透析アミロイドーシスにおいて、2-mアミロイド沈着が骨・関節破壊を引き起こすメカニズムを明らかにするため、2-mアミロイド線維の滑膜由来培養細胞に対する細胞毒性メカニズムを解析した。2-mアミロイド線維は、滑膜細胞に対し毒性を発揮し、エンドソームやリソソーム内にアミロイド線維が取り込まれており、その一部では取り込まれた線維によりエンドやリソソーム膜が破壊され、アミロイド線維が細胞質内に漏出していた。2-mアミロイド線維はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、さらにエンドソーム/リソソーム膜を破壊することで滑膜細胞の壊死やアポトーシスを引き起こすものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In dialysis-related amyloidosis, 2-microglobulin (2-m) amyloid fibrils deposit in the osteoarticular tissue, leading to carpal tunnel syndrome and destructive arthropathy, but the mechanism by which these amyloid fibrils destruct bone and joint tissue is not fully understood. In this study, we assessed the cytotoxic effect of 2-m amyloid fibrils on the cultured rabbit synovial fibroblasts. 2-m amyloid fibrils exerted the toxic effect on the synovial fibroblasts. When the cells were incubated with amyloid fibrils, many endosomes/lysosomes filled with amyloid fibrils were observed. Moreover, some endosomal/lysosomal membranes were disrupted by intravesicular fibrils, leading to the leakage of the fibrils into the cytosol and adjacent to mitochondria. Inhibition of endocytosis by cytochalasin D attenuated the toxicity of amyloid fibrils. These results suggest that endocytosed 2-m amyloid fibrils induce necrosis and apoptosis by disrupting endosomal/lysosomal membranes.

研究分野：病理学

キーワード：アミロイドーシス 2-ミクログロブリン 細胞毒性 滑膜細胞 エンドサイトーシス リソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは、個々の疾患に特異的な前駆蛋白質の全長、あるいは一部が、それぞれの疾患に固有の病態を背景に天然の立体構造を変化させながら重合し、不溶性のアミロイド線維を形成し、様々な組織、臓器の細胞外間質に沈着することで臓器不全を引き起こす疾患群である。申請者の所属するグループではこれまでに、アルツハイマー病患者脳に認められる $\beta$ アミロイドーシス、及び長期血液透析患者に発症する $\beta$ 2-ミクログロブリン( $\beta$ 2-m)アミロイドーシスをモデル疾患に選び、アミロイド線維形成過程を説明する重合核依存性重合モデルを構築し、様々な生体分子および有機化合物の線維形成過程に及ぼす影響を解析して来た。

これまでに、我々は生体分子であるリゾリン脂質(特にリゾフォスファチジン酸、及びリゾフォスファチジルグリセロール)が中性pH域で $\beta$ 2-mアミロイド線維の伸長反応を促進することを明らかにした。その後、オレイン酸等の遊離脂肪酸も、 $\beta$ 2-mアミロイド線維の伸長反応を促進することを報告した。

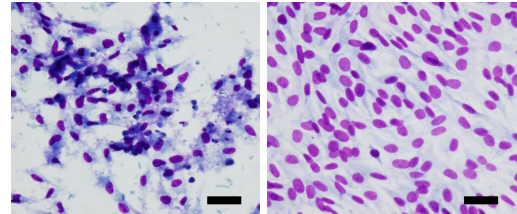
この様に、アミロイド線維形成・沈着をもたらす生体分子間相互作用は解明されつつあるが、沈着した線維がどの様に臓器傷害を引き起こすかはほとんど解明されていない。透析アミロイドーシスでは、 $\beta$ 2-mアミロイドが主に関節、腱組織に沈着し、手根管症候群、破壊性脊椎関節症などの全身関節症状を引き起こす。骨・関節破壊を伴う進行した透析アミロイドーシスの病変を病理組織学的に観察すると、アミロイド沈着と共に単球、マクロファージの浸潤が認められる。また、沈着した $\beta$ 2-mアミロイド線維はAGE化(Advanced glycation end product)などの修飾を受けていることも明らかになっている。

しかしながら、 $\beta$ 2-mアミロイド線維の沈着が骨・関節破壊を引き起こすメカニズムは未だ明らかになっていない。仮説としては、関節組織に存在する滑膜細胞や軟骨細胞に対し、 $\beta$ 2-mアミロイド線維が細胞傷害作用を持つ、これらの細胞を刺激して炎症性サイトカインの産生を誘導する、蛋白分解酵素などの組織傷害因子の産生を誘導する、 $\beta$ 2-mアミロイド線維そのものが単球・マクロファージの走化性因子として働き炎症を惹起する、などがありこれらを支持する研究報告も散見されるが、いずれも $\beta$ 2-mモノマーを用いた研究であり、これまでに $\beta$ 2-mアミロイド線維を用いて検討されたものはない。

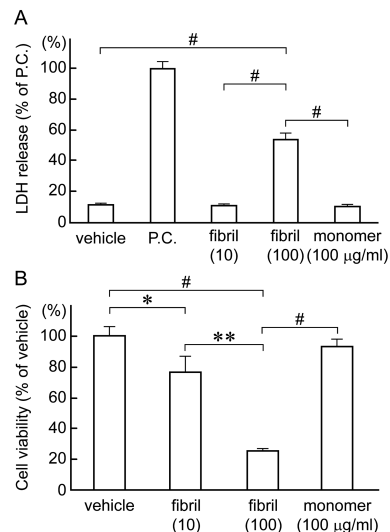
今回、これまでの研究結果を生かし、試験内で伸長させたアミロイド線維を用いて、 $\beta$ 2-mアミロイド線維が培養細胞に与える影響を解析することで、 $\beta$ 2-mアミロイド線維の沈着が骨・関節破壊を引き起こすメカニズムを明らかにしたいと考えた。

我々は、すでに $\beta$ 2-mアミロイド線維がウサギ由来滑膜細胞(HIG-82)に対して、濃度依

存性に毒性を発揮し、細胞死を引き起こすこと(下図)また、細胞死のメカニズムの一部として、アポトーシスの誘導が起こっていることをTUNEL染色により確認しており、さらに、予備的実験として行った電子顕微鏡観察で、添加したアミロイド線維が細胞内の小胞に取り込まれ、一部でこれらの膜構造が破壊されている像を認めた。



(左:  $\beta$ 2-mアミロイド線維投与群、右: コントロール。アミロイド線維投与群では、核濃縮や細胞質の膨化、空胞化などの壊死性変化と共に、アポトーシス小体と考えられる核の断片化を認めた)



(LDH アッセイ(上)は細胞膜崩壊により上清中に放出されたLDH量を反映しており、値が高いほど細胞傷害が強いことを示す。また、MTT アッセイ(下)は、ミトコンドリアの酸化還元能を示しており、値の低下がviabilityの低下を示す。)

## 2. 研究の目的

本研究では、 $\beta$ 2-mアミロイド線維のウサギ滑膜細胞、及びヒト軟骨肉腫由来株細胞に対する細胞毒性の機序を詳細に解析することで、透析アミロイドーシスにおける $\beta$ 2-mアミロイド線維の沈着が破壊性脊椎関節症などの骨・関節破壊を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目的とした。

(1)  $\beta$ 2-mアミロイド線維の滑膜細胞、及び軟骨細胞に対する細胞傷害作用のメカニズムを解析する。

(2)  $\beta$ 2-mアミロイド線維が滑膜細胞、及び軟骨細胞を刺激し、炎症性サイトカインや組織傷害因子の産生を誘導するのかを検討する。

### 3. 研究の方法

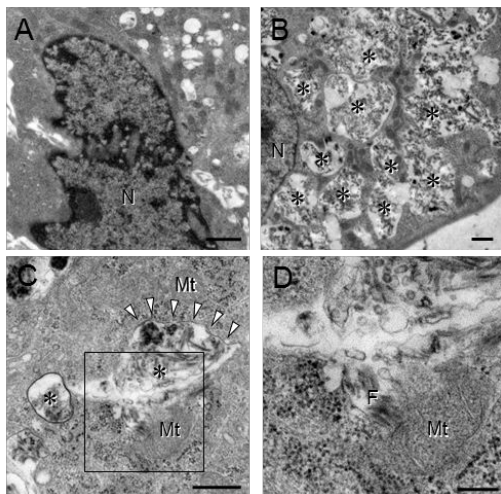
(1) ウサギ滑膜線維芽細胞由来の細胞(HIG-82)を35mmディッシュに培養し、β2-mアミロイド線維(終濃度10、100μg/ml)あるいはβ2-mモノマー(終濃度100μg/ml)を培養液に添加した。2~6時間のインキュベーションの後、投与したβ2-mアミロイド線維と細胞との相互作用、及び細胞形態変化を電子顕微鏡観察により詳細に解析した。

(2) HIG-82細胞を35mmディッシュに培養し、β2-mアミロイド線維(終濃度10μg/ml)あるいはβ2-mモノマー(終濃度10μg/ml)を培養液に添加した。12時間のインキュベーションの後、固定し、ライソトラッカー及び抗β2-m抗体+蛍光二次抗体による染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) 24穴プレートに培養したHIG-82細胞に、β2-mアミロイドとともに、エンドサイトーシス阻害効果を持つサイトカラシンDを加えて2日間インキュベートし、β2-mアミロイド線維の細胞毒性を抑制するか否かを検討した。

### 4. 研究成果

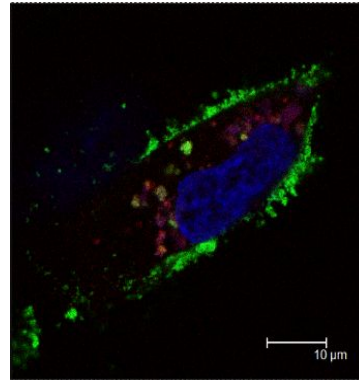
(1) 電子顕微鏡観察では、アミロイド線維投与2時間後には、アミロイド線維がエンドソーム、あるいはリソソームと考えられる細胞質内の小胞内に取り込まれており、6時間後ではこれらの膜の断裂や融合による細胞質内巨大空胞の形成、アミロイド線維の細胞質内への漏出を認めた。細胞質内に漏出したアミロイド線維の一部はミトコンドリアに近接していた。また、核縁における核クロマチンの凝集像などアポトーシスを示唆する核の変化も認められた。



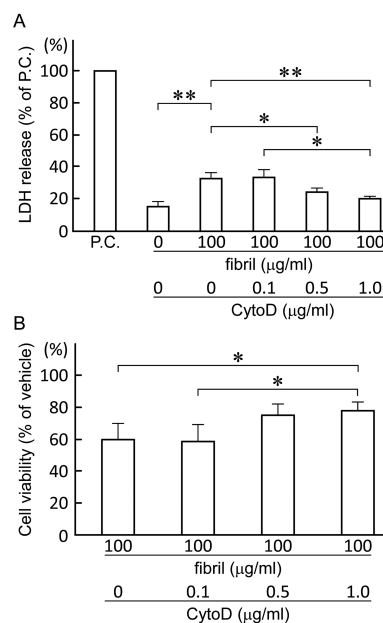
(N:核、F:アミロイド線維、Mt:ミトコンドリア、\*:アミロイド線維を含むエンドソーム/リソソーム、◻:エンドソーム/リソソーム膜。右下図DはCの囲み部分の拡大)

(2) リソソーム(赤)、β2-m(緑)、核(青)を蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察

した。β2-mアミロイド(顆粒状の緑色蛍光)は、細胞表面に付着するのみならず、細胞内にも散在し、一部はリソソーム(赤色)と一致し黄色の蛍光を示したことから、投与したβ2-mアミロイド線維は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、リソソームへ運ばれると考えられた(下図)。



(3) エンドサイトーシスを阻害するサイトカラシンDは、濃度依存性にアミロイド線維の毒性を抑制したことから、β2-mアミロイド線維がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることがβ2-mアミロイド線維の細胞毒性メカニズムに関与していると考えられた。(下グラフ: Fibril:β2-mアミロイド線維、CytoD:サイトカラシンD)



以上の結果より、β2-mアミロイド線維はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソームやリソソーム膜を破壊し細胞質内に漏出することで、ネクローシスとアポトーシスの両方を引き起こすことを明らかにし、膜損傷に伴うリソソーム酵素の細胞質内への漏出や、アミロイド線維とミトコンドリアなど細胞内小器官との相互作用により細胞傷害が引き起こされるという新規の細胞傷害機構を提案した(論文)。

滑膜細胞は、ヒアルロン酸の分泌や滑液中

の老廃物の除去，滑液中の電解質濃度の制御など，関節周囲組織のホメオスタシスを保っている。 $\beta_2$ -m アミロイド線維の沈着により滑膜細胞が傷害されることが，透析アミロイドーシスにおける骨・関節破壊の発症・進行に關与している可能性が示唆される。

今後、炎症性サイトカインや組織傷害因子の産生の誘導に關して、及びアミロイド線維の軟骨細胞に対する毒性の検討など、今回の研究期間内に行えなかった項目についても研究を進めていく予定である。

#### 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4件)

大越忠和、内木宏延、アミロイド線維の形成、沈着と臓器障害の分子機構、医学のあゆみ、査読無、258 巻、2016 (印刷中)

大越忠和、小澤大作、山口格、長谷川一浩、内木宏延、アミロイドーシスの発症メカニズムについて、病理と臨床、査読無、34 巻、2016、454-459

Naiki H、Okoshi T、Ozawa D、Yamaguchi I、Hasegawa K、Molecular pathogenesis of human amyloidosis: Lessons from  $\beta_2$ -microglobulin-related amyloidosis、Pathology International、査読有、66 巻、2016、193-201  
DOI: 10.1111/pin.12394.

Okoshi T、Yamaguchi I、Ozawa D、Hasegawa K、Naiki H、Endocytosed  $\beta_2$ -Microglobulin Amyloid Fibrils Induce Necrosis and Apoptosis of Rabbit Synovial Fibroblasts by Disrupting Endosomal/Lysosomal Membranes: A Novel Mechanism on the Cytotoxicity of Amyloid Fibrils、PLoS One、査読有、6 巻、2015、e0139330  
DOI: 10.1371/journal.pone.0139330.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

大越 忠和 (OKOSHI, Tadakazu)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号：90362037

##### (2)研究協力者

内木 宏延 (NAIKI, Hironobu)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号：10227704

長谷川 一浩 (HASEGAWA, Kazuhiro)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号：60324195

小澤 大作 (OZAWA, Daisaku)

福井大学・テニユアトラック推進本部・助教

研究者番号：60554524