

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860372

研究課題名(和文) アミロイドーシスの診断法を革新し、病態に迫る病理組織プロテオーム解析法の確立

研究課題名(英文) Establish the diagnostic system for amyloidosis using modified proteomic method.

研究代表者

田崎 雅義 (Tasaki, Masayoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・助教

研究者番号：50613402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドを作る蛋白質は36種類あり、その種類により各疾患に分類され、治療法も異なる。そのため、本疾患群の診断には、正確にアミロイド原因蛋白質を同定することが重要である。本研究では、アミロイドに特異性の高い新たな抽出法を開発し、正確にアミロイド原因蛋白質を同定できるシステムを確立するとともに、質量分析装置を用いて、ALアミロイドーシスの予後予測マーカーの開発、病態解析を行う。プロテイナーゼKを用いた解析法は、アミロイドの検出率を増加させることが明らかとなった。ALアミロイドーシスにおいて質量分析による解析で、多種のL鎖由来ペプチドを検出でき、予後予測マーカーとなりうる候補ペプチドを同定した。

研究成果の概要(英文)：There are 36 kinds of amyloid precursor proteins that make amyloid fibrils. Amyloidosis is classified as each disease according to type of amyloid precursor protein, and the treatment is different. For this reason, it is extremely important to accurately identify the amyloid precursor protein for typing of amyloidosis. In this study, we developed a new extraction method for amyloid and establish a system that can accurately identify amyloid precursor protein. In addition, we tried to pick up candidates as prognostic markers using mass spectrometry for AL amyloidosis. It revealed that the analytical method using proteinase K increased the detection rate of amyloid precursor protein. In AL amyloidosis, many type of peptides derived from L chain could be detected by using mass spectrometry. In addition, candidate peptides may become a prognostic marker for AL amyloidosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アミロイドーシス 質量分析 診断

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは、可溶性の蛋白質が難溶性アミロイド線維へと変化し、諸臓器に沈着することで重度の臓器障害を引き起こす難治性の疾患群である。アミロイドを作る蛋白質は、36種類報告され、その種類により治療法が異なる。そのため、本疾患群の診断は、患者病理組織から正確にアミロイド蛋白質を同定することが極めて重要である。近年、LC-MS/MS (質量分析装置) を用いたアミロイド沈着ホルマリン固定組織の診断法が、アミロイド原因蛋白質の同定法として、有用であることが明らかとなった。申請者も、本手法を用い、アミロイド沈着組織を解析し、診断してきた。しかし、本システムでは、アミロイド原因蛋白質以外の蛋白質も数多く検出されるため、アミロイド原因蛋白質を見誤る可能性があり、アミロイドに特化した解析手法の開発が急務である。

AL アミロイドーシスは、免疫グロブリンL鎖がアミロイドを形成し、臓器不全を引き起こす、極めて予後の悪い難治性アミロイドーシスである。本疾患患者における stage の平均生存率は3.5ヶ月と極端に短い。患者の中には、急激に病態が進行し、死に至るケースも存在するため、早期に予後を予測できるマーカーの開発が急務である。また、根治的な治療法は、未だ開発されておらず、新規治療法を開発するためにもL鎖アミロイド線維形成機構の解明が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、アミロイドに特異性の高い新たな抽出法を開発し、これまでに我々が構築してきたプロテオームの技術を応用したアミロイド組織診断システムに組み込むことで、より正確な診断が可能なシステムの構築を行うとともに、AL アミロイドーシスの予後予測マーカーの同定および病態解析を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アミロイドに特異性の高い蛋白質抽出法の開発

各種アミロイドーシス (FAP、SSA、AL、AA、原因不明アミロイドーシスなど) のホルマリン固定組織切片を用いて検討した。コンゴレッド染色後のホルマリン固定病理組織切片からレーザーマイクロダイセクションを用いてアミロイドを採取した。その後、各種界面活性剤 (SDS、Zwittergent、CHAPS) や変性剤 (尿素やGnHCl)、酵素 (プロテイナーゼ K) を用いて蛋白質を抽出し、トリプシンでペプチド化した。得られた溶液を LC-MS/MS (質量分析装置) で解析することで、検出される蛋白質に占めるアミロイドの割合を検討した。銀染色、ウエスタンブロッティングにより、プロテイナーゼ K 処理後のサンプルの性状を評価した。

(2) AL アミロイドーシスの予後予測マーカーの探索および病態解析

AL アミロイドーシス患者のアミロイド沈着病理組織切片を用いた。コンゴレッド染色後の組織切片から、レーザーマイクロダイセクションによりアミロイドを採取した。その後、トリプシン消化により、ペプチドを抽出し、LC-MS/MS により解析した。L鎖の検出率を検討するために、従来のデータベースに免疫グロブリンのデータが充実した Immunogenetics を統合させたデータベースを作成し、従来のデータベースと比較検討した。また、データベースマッチングにより、アミロイドを構成しているL鎖由来のペプチドのプロファイリングを実施するとともに、予後を予測できるペプチドの探索を行った。解析結果から同定できたL鎖のリコンビナント蛋白質を作成し、チオフラビン T を用いたアミロイド線維形成能を評価した。

4. 研究成果

(1) 各種蛋白質抽出法を検討した結果、プロテイナーゼ K をアミロイド原因蛋白質の抽出過程で用いることで、質量分析装置で検出される蛋白質に占めるアミロイド原因蛋白質の割合が増加することが明らかとなった。本解析法は、いずれのアミロイドーシス (FAP、SSA、AL、AA) の原因蛋白質同定にも有用であることがわかった。プロテイナーゼ K を処理することで、アルブミンやアポリポ蛋白質 E などアミロイド沈着部位に存在する非特異的な蛋白質の検出ペプチド数が有意に減少することがわかった。銀染色やウエスタンブロッティングを用いた解析により、アミロイドは、他の蛋白質に比べプロテイナーゼ K に抵抗性を示すことがわかった。質量分析装置を用いた解析法の開発を行う中で、原因不明の角膜アミロイドーシスのアミロイド原因蛋白質を同定でき、その診断に有用であったことを海外英文誌に報告した (業績参照)。さらに、複数の原因不明のアミロイド沈着症例から、過去に報告の無い、新規アミロイド原因蛋白質を同定し、現在、論文投稿に向け準備中である。

(2) 質量分析装置を用いて、AL アミロイドーシスの病理組織切片を解析した結果、従来のデータベースに Immunogenetics を統合させることで、L鎖の検出ペプチド数が増加することが明らかとなった。これにより、従来法では検出できなかった領域のL鎖由来ペプチドを検出することが可能となり、診断にも有用である。本データベースを用いて解析した結果、定常領域の検出頻度としては、IGLC3、IGKC4 が比較的多く、可変領域は、型では、IGLV3、IGLV6 が多く認められることが明らかとなった。さらに、アミロイド沈着臓器に着目すると消化管や心臓では、型が型より多く検出された。これらL鎖のプロファイリングは、AL アミロイドーシスの病態を紐解く一助となると考えられ、国内和文誌に報告し

た（業績参照）。また、予後不良患者では、複数の症例で IGLC2 が認められ、予後予測マーカーとなる可能性が示された。さらに、症例数を増やし検討中である。質量分析装置で同定できた L 鎖の配列からペプチドを作製し、チオフラビン T により解析したところ、本ペプチドのアミロイド形成能が確認され病態の一因を明らかにした。

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 14 件)

1. Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Kinoshita Y, Matsumoto S, Mizukami M, Masuda T, Misumi Y, Yamashita T, Ando Y. Identification of amyloid precursor protein from autopsy and biopsy specimens using LMD-LC-MS/MS: the experience in Kumamoto University. *Amyloid*, 2017 (in press). 査読無, DOI: 10.1080/13506129.2017.1286583.
2. 杉本俊哉、田崎雅義、山下太郎、植田光晴、安東由喜雄、大林光念、奥野豊、畑裕之. AL アミロイドーシスにおける質量分析を用いた沈着ペプチド解析. *臨床血液*, 2017 (in press). 査読有
3. Huang G, Ueda M, Tasaki M, Yamashita T, Misumi Y, Masuda T, Suenaga G, Inoue Y, Kinoshita Y, Matsumoto S, Mizukami M, Tsuda Y, Nomura T, Obayashi K, Ando Y. Clinicopathological and biochemical findings of thyroid amyloid in hereditary transthyretin amyloidosis with and without liver transplantation. *Amyloid*, 2017 (in press). 査読有, DOI: 10.1080/13506129.2016.1276440.
4. Masuda T, Ueda M, Suenaga G, Misumi Y, Tasaki M, Izaki A, Yanagisawa Y, Inoue Y, Motokawa H, Matsumoto S, Mizukami M, Arimura A, Deguchi T, Nishio Y, Yamashita T, Inomata Y, Obayashi K, Ando Y. Early skin denervation in hereditary and iatrogenic transthyretin amyloid neuropathy. *Neurology*, 2017 (in press). 査読有
5. Misumi Y, Ueda M, Yamashita T, Masuda T, Kinoshita Y, Tasaki M, Nagase T, Ando Y. Novel screening for transthyretin amyloidosis by using fat ultrasonography. *Ann Neurol*, 2017 (in press). 査読有, DOI: 10.1002/ana.24914.
6. Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Motokawa H, Kinoshita Y, Suenaga G, Yanagisawa A, Toyoshima R, Misumi Y, Masuda T, Yamashita T, Ando Y. Rapid detection of wild-type and mutated transthyretins. *Ann Clin Biochem*, 2016;53:508-10. 査読有, DOI: 10.1177/0004563215605541.
7. Yoshimura Y, Kuwabara T, Shiraishi N, Kakizoe Y, Tasaki M, Obayashi K, Ando Y, Mukoyama M. Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy found with abnormal urinalysis at a general health checkup. *Nephrology (Carlton)*, 2016;21:341-2. 査読有, DOI: 10.1111/nep.12610.
8. Yamashita T, Ueda M, Saga N, Nanto K, Tasaki M, Masuda T, Misumi Y, Oda S, Fujimoto A, Amano T, Takamatsu K, Yamashita S, Obayashi K, Matsui H, Ando Y. Hereditary amyloidosis with cardiomyopathy caused by the novel variant transthyretin A36D. *Amyloid*, 2016;23:207-208. 査読有
9. Yanagisawa A, Ueda M, Sueyoshi T, Nakamura E, Tasaki M, Suenaga G, Motokawa H, Toyoshima R, Kinoshita Y, Misumi Y, Yamashita T, Sakaguchi M, Westermark P, Mizuta H, Ando Y. Knee osteoarthritis associated with different kinds of amyloid deposits and the impact of aging on type of amyloid. *Amyloid*, 2016;23:26-32. 査読有, DOI: 10.3109/13506129.2015.1115758.
10. Tasaki M, Ueda M, Matsumoto K, Kawaji T, Misumi Y, Eiki D, Suenaga G, Obayashi K, Yamashita T, Tanihara H, Ando Y. Clinico-histopathological and biochemical analyses of corneal amyloidosis in gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Amyloid*, 2015;22:67-9. 査読有, DOI: 10.3109/13506129.2014.983222.
11. Yanagisawa A, Ueda M, Sueyoshi T, Okada T, Fujimoto T, Ogi Y, Kitagawa K, Tasaki M, Misumi Y, Oshima T, Jono H, Obayashi K, Hirakawa K, Uchida H, Westermark P, Ando Y, Mizuta H. Amyloid deposits derived from transthyretin in the ligamentum flavum as related to lumbar spinal canal stenosis. *Mod Pathol*, 2015;28:201-7. 査読有, DOI: 10.1038/modpathol.

12. 田崎雅義、大林光念、安東由喜雄. プロテオミクスを利用した臨床検査: アミロイドーシス診断におけるプロテオーム解析法の有用性. 臨床病理, 2015;63:980-5. 査読無
 13. Misumi Y, Doki T, Ueda M, Obayashi K, Tasaki M, Tamura A, Ando Y. Myopathic phenotype of familial amyloid polyneuropathy with a rare transthyretin variant: ATTR Ala45Asp. Amyloid, 2014;21:216-7. 査読有, DOI: 10.3109/13506129.2014.932277.
 14. 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
- 〔学会発表〕(計 13 件)
1. 田崎雅義、大林光念、植田光晴、野村隼也、松本紗也加、水上真由美、山下太郎、安東由喜雄. MALDI-TOF MS を用いた簡便かつ迅速な血清異型 TTR 検出法の開発. 第 27 回生物試料分析学会年次学術集会. 2017.2.11-12, 朱鷺メッセ, 新潟
 2. 田崎雅義、大林光念、安東由喜雄. 疾患特異的蛋白質を如何に同定し、診断および病態解析に繋げるか～臨床プロテオーム解析による試み～. 第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会. 2016.12.2-4, 熊本県民交流会館パレア, 熊本
 3. 田崎雅義、大林光念、安東由喜雄. 質量分析法の基礎と応用、レーザーマイクロダイセクションを組み合わせた組織検査について. 第 65 回日本医学検査学会, 2016.9.3-4, 神戸ポートピアホテル, 神戸国際会議場, 神戸
 4. Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Yamashita T, Ando Y. Development of detection method for serum variant transthyretins using MALDI-TOF mass spectrometry. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science, 2016.8.31-9.4, Kobe International Congress Center, Kobe, Japan
 5. 田崎雅義、植田光晴、星井嘉信、大林光念、木下祐美子、水上真由美、松本紗也加、三隅洋平、山下太郎、安東由喜雄. 新規アミロイドーシスの組織学的、生化学的解析. 第 4 回日本アミロイドーシス研究会学術集会, 2016.8.19, KKR ホテル東京, 東京
 6. Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Kinoshita Y, Matsumoto S, Mizukami M, Masuda T, Misumi Y, Yamashita T, Ando Y. Identification of amyloid precursor protein from autopsy and biopsy specimens using LMD-LC-MS/MS: the experience in Kumamoto University. XV International Symposium on Amyloidosis. 2016.7.3-7, Uppsala, Sweden
 7. 田崎雅義、安東由喜雄. 質量分析法を用いたアミロイドーシスの診断・病態解析における新展開. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 2015.11.19-22, 長良川国際会議場, 岐阜
 8. 田崎雅義、安東由喜雄. 各種プロテオーム解析技術を駆使して挑むアミロイドーシス～病型診断から病態解析まで～. 第 55 回日本臨床化学学会年次学術集会. 2015.10.30-11.1, 大阪大学コンベンションセンター, 大阪
 9. 田崎雅義. レーザーマイクロダイセクション-LC-MS/MS システムによる病理組織切片を用いたアミロイド原因蛋白質の同定. 第 3 回日本アミロイドーシス研究会学術集会. 2015.8.21, KKR ホテル東京, 東京
 10. 田崎雅義、植田光晴、大林光念、本川拓誠、北川敬資、荻泰裕、三隅洋平、山下太郎、安東由喜雄. プロテアーゼ K を利用した質量分析装置によるアミロイドーシス診断. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 2014.11.22-25, 福岡国際会議場, 福岡
 11. 田崎雅義、安東由喜雄. プロテオミクスを利用した臨床検査～アミロイドーシス診療体制構築事業におけるプロテオミクスの貢献～. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 2014.11.22-25, 福岡国際会議場, 福岡
 12. 田崎雅義、大林光念、植田光晴、荻泰裕、北川敬資、久原春代、大隈雅紀、池田勝義、安東由喜雄. アミロイドーシス診断事業の 2 年間の取り組み: 血清、組織プロテオミクス解析を駆使した診断システムの貢献度. 第 54 回日本臨床化学学会年次学術集会. 2014.9.5-7, 東京大学本郷キャンパス, 東京
 13. Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Koike H, Ogi Y, Kitagawa K, Suenaga G, Sobue G, Ando Y. Aging accelerates wild-type transthyretin amyloid deposits in

cardiac tissues of male FAP patients.
XIV International Symposium on
Amyloidosis. 2014.4.27-5.1, Indiana,
USA.

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