

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26860672

研究課題名(和文)細胞外マトリックスリモデリングを利用したトランスサイレチンアミロイドの分解・除去

研究課題名(英文)Function of fibroblast on the clearance of transthyretin amyloid fibrils

研究代表者

三隅 洋平 (Misumi, Yohei)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：80625781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：トランスサイレチン(TTR)型家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)におけるアミロイド線維形成と分解の舞台である細胞外マトリックスの主要構成細胞である線維芽細胞のアミロイドーシスの病態との関連について解析を行った。線維芽細胞を三次元環境下で培養し、断片化TTR(線維化/非線維化)添加では、線維芽細胞周囲および内部にアミロイド線維が形成および沈着し、経時的にアミロイド沈着構造が複雑化し増大する現象がみとめられ、線維芽細胞が細胞外マトリックス中に拡散したTTR線維を細胞内および細胞周囲に集約させ、TTRアミロイド沈着形態を規定する役割を果たす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：I analyzed the function of fibroblast on the pathogenesis of transthyretin (TTR) amyloid fibrils, since fibroblast is one of the major cells of the extracellular matrix, in which amyloid fibrils are formed and degraded. Fragmented TTR amyloid deposited around and inside the fibroblasts, and the structure of amyloid deposits became large size and complicated shape with time, when fibroblasts were cultured with fragmented TTR in the 3D cell culture system. These results suggest the function of fibroblast to increase a density of amyloid fibrils in the extracellular matrix.

研究分野：アミロイドーシスの病態解析

キーワード：アミロイド トランスサイレチン 線維芽細胞 筋線維芽細胞 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

トランスサイレチン(Transthyretin: TTR)型家族性アミロイドポリニューロパチー(familial amyloidotic polyneuropathy: FAP)の病態において、アミロイド形成・沈着の機構は、アミロイドが沈着する細胞外マトリックスなどの組織環境が重要な役割を果たしていると考えられる。また、肝臓移植により異型 TTR の産生を遮断すると組織に TTR アミロイド沈着量が減少することから生体内のアミロイド沈着部位である細胞外マトリックスでは、アミロイド線維形成と除去がダイナミックに起こっているものと推定される。細胞外マトリックスは、線維芽細胞をはじめとする間質細胞によって絶えずリモデリングされ、恒常性が維持されていることから、FAP におけるアミロイド線維形成、除去においてはこれらの細胞が重要な役割を果たすと考えられるがその詳細な機構は不明である。

2. 研究の目的

(1) 線維芽細胞の細胞外におけるアミロイド分解機構についての解析

線維芽細胞は細胞外マトリックスの主要な分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)と MMP 阻害因子である tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)を産生するが、MMP はコラーゲンやプロテオグリカンなどからなる細胞外マトリックスの分解をはじめ、細胞表面タンパク質の分解、生理活性物質のプロセッシングなど多岐にわたる作用を示す。線維芽細胞が産生する MMP1、2、3、9、14 が TTR アミロイド分解能を有するかを明らかにすることを目的とした。

(2) 線維芽細胞がアミロイド沈着様式に与える影響についての解析

アミロイドーシスの病理組織においてもアミロイドに近接して線維芽細胞が認められることから、線維芽細胞がアミロイドーシスの病態に深く関わる可能性が考えられる。線維芽細胞および線維芽細胞が有する細胞外マトリックスのリモデリング能とアミロイド沈着様式の関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞が分泌する MMPs によるアミロイド分解能の解析

in vitro で MMP1、2、3、9 と TTR を反応させ、アミロイド特異的蛍光試薬であるチオフラビン T 蛍光強度、ウエスタンブロッティング、質量分析装置により、MMP の TTR 分解能を解析した。

(2) 線維芽細胞がアミロイド沈着様式に与える影響についての解析

ヒト皮膚由来の線維芽細胞初代培養を 1 型コラーゲングルによる三次元培養環境下で行い、野生型 TTR (凝集体/非凝集体)、異型 TTR (凝集体/非凝集体)、断片化 TTR (線維化/非線維化) を含む種々の TTR を添加して培養を行い、線維芽細胞がリモデリングを

行う細胞外マトリックス内でのアミロイド沈着様式を光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて解析した。

(3) 線維芽細胞の形質転換の影響についての解析

培養線維芽細胞に TGF- $\beta$  を作用させ、旺盛なコラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス産生能と MMPs 産生能を有する筋線維芽細胞を誘導し、通常の線維芽細胞との TTR アミロイドへの反応性の違いを解析した。具体的には、線維芽細胞と TGF- $\beta$  で誘導した筋線維芽細胞において、前述の線維芽細胞がアミロイド沈着様式に与える影響についての解析を行った。

4. 研究成果

(1) 線維芽細胞が分泌する MMPs によるアミロイド分解能の解析

プラスの水抽出法により FAP 患者剖検組織より TTR アミロイド線維を抽出し、invitro で各種 MMP 溶液とインキュベートした後に、抗 TTR 抗体によるウエスタンブロッティングを行ったところ、MMP1、MMP9 において、TTR 高分子重合体のバンド濃度が低下し、TTR アミロイド線維の分解が示唆された(図 1)。

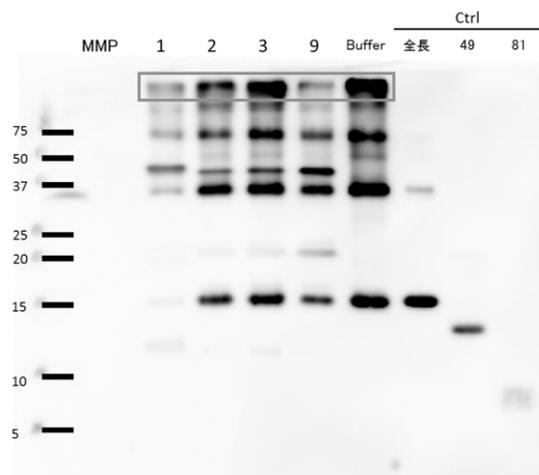


図 1 抗 TTR 抗体によるウエスタンブロッティング(枠内は TTR の高分子重合体を示す)

アミロイド線維を酢酸ウランにて染色し、線維形態の観察を行ったところ、MMP 1 および MMP9 溶液と反応後のサンプルにおいて線維密度の減少傾向を認めた。

可溶性の TTR 蛋白と各種 MMP 溶液を反応させ、質量分析装置で解析したところ、MMP9 において TTR の断片化を示唆する低分子側のピークの出現を認め、MMP9 による可溶性 TTR の分解が示唆された。

以上の結果より、線維芽細胞分泌する MMP が TTR アミロイド線維および非線維性の TTR を分解する可能性が示された。

(2) 線維芽細胞がアミロイド沈着様式に与える影響についての解析

ヒト皮膚由来の線維芽細胞初代培養を 1

型コラーゲンゲルによる三次元培養環境下で行ったところ、断片化 TTR を添加した群において、線維芽細胞周囲および内部に TTR アミロイド線維が形成および沈着し、経時的観察ではアミロイド沈着構造が増大し（図 2）、さらに複雑化する（図 3）現象がみとめられた。

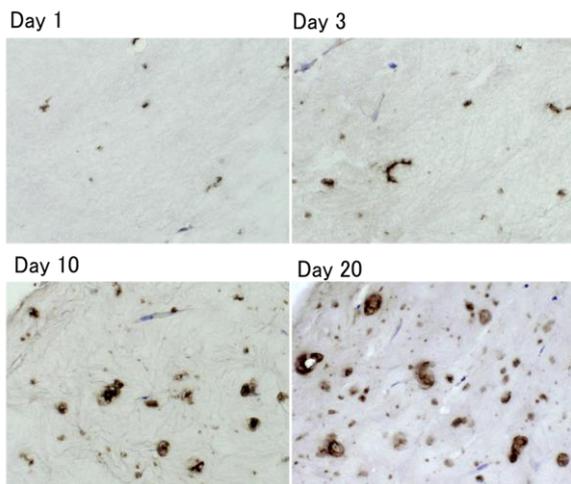


図 2. 3D 培養後の TTR 抗体による免疫染色像

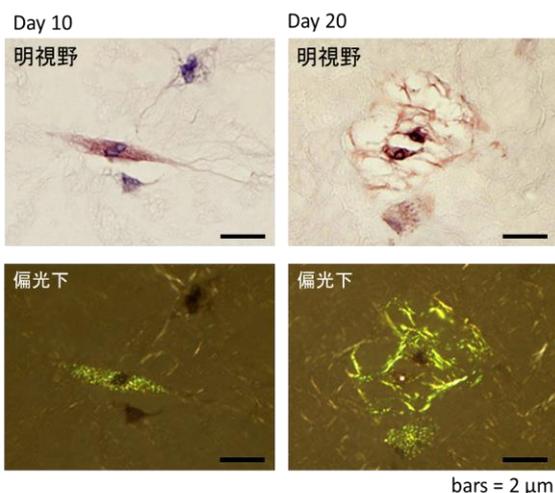


図 3. 3D 培養後のコンゴ・レッド染色像

酢酸ウランおよび鉛を用いた電子顕微鏡像および抗 TTR 抗体を用いた共焦点顕微鏡による観察では、線維芽細胞内に多量のアミロイド線維が取り込まれ蓄積している像がみとめられた。

以上の結果より、線維芽細胞が細胞外マトリックス中に拡散した TTR 線維を細胞内および細胞周囲に集約させ、TTR アミロイド沈着の形態を規定する役割を果たす可能性が示された。

### (3) 線維芽細胞の形質転換の影響についての解析

培養線維芽細胞を TGF- $\beta$  存在下で培養し、筋線維芽細胞への形質転換を誘導した。

さらに筋線維芽細胞を TGF- $\beta$  存在下で野生型 TTR (凝集体/非凝集体)、異型 TTR (凝集体/非凝集体)、断片化 TTR (線維化/非線維

化) を含む種々の TTR を添加して培養を行ったが、TGF- $\beta$  非存在下と比べて、TTR および TTR アミロイドの沈着様式に有意な差は認めなかった。

一方、FAP 剖検心臓組織および皮下組織における、 $\alpha$ SMA を用いた免疫染色とコンゴ・レッド染色による二重染色を行うと、筋線維芽細胞に近接したアミロイド沈着が認められた（図 4）。

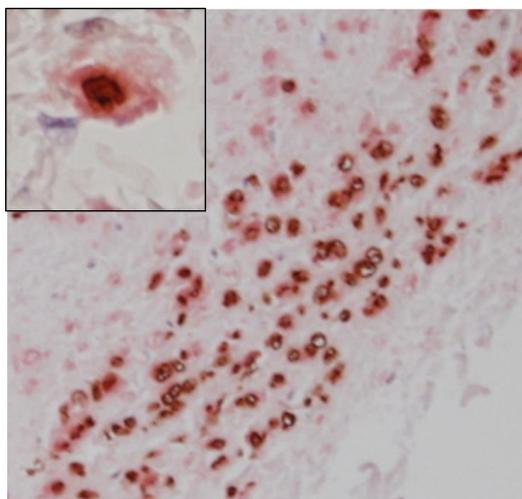


図 4.  $\alpha$ SMA 抗体による免疫染色とコンゴ・レッド染色の二重染色像 (FAP 患者の心臓剖検組織)

以上、本研究により線維芽細胞が TTR アミロイドの線維形成・沈着過程および分解過程の双方に関連していることが示唆され、アミロイドーシスの病態解明および治療法の開発に有用な知見が得られた。

### 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 5 件)

① Okumura K, Yamashita T, Masuda T, Misumi Y, Ueda A, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Yamashita S, Inomata Y, Ando Y. Long-term outcome of patients with hereditary transthyretin V30M amyloidosis with polyneuropathy after liver transplantation. *Amyloid*. 査読有, 2016, 39-45

DOI: 10.3109/13506129.2015.1123149

② Yanagisawa A, Ueda M, Sueyoshi T, Nakamura E, Tasaki M, Suenaga G, Motokawa H, Toyoshima R, Kinoshita Y, Misumi Y, Yamashita T, Sakaguchi M, Westermarck P, Mizuta H, Ando Y. Knee osteoarthritis associated with different kinds of amyloid deposits and the impact of aging on type of amyloid. *Amyloid*. 査読有, 2016, 26-32  
DOI: 10.3109/13506129.2015.1115758

③ Misumi Y, Narita Y, Oshima T, Ueda M,

Yamashita T, Tasaki M, Obayashi K, Isono K, Inomata Y, Ando Y. Recipient aging accelerates acquired transthyretin amyloidosis after domino liver transplantation. *Liver Transpl.* 査読有, 2016, 656-664

DOI: 10.1002/lt.24371

④ 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.* 査読有, 2015, in press

⑤ Kitagawa K, Misumi Y, Ueda M, Hayashi Y, Tasaki M, Obayashi K, Yamashita T, Jono H, Arima H, Ando Y. Inhibition of insulin amyloid fibril formation by cyclodextrins. *Amyloid.* 査読有, 2015, 203-204

doi: 10.3109/13506129.2015.1031373.

〔学会発表〕(計1件)

① 三隅洋平、安東由喜雄. FAP 肝を移植された二次レシピエントに生じる医原性アミロイドーシスの病態解析. 日本自律神経学会総会, 2015, 10月30日, 愛知・名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三隅 洋平 (MISUMI Yohei)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 80625781