

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08717

研究課題名（和文）絶対定量的質量分析法を用いたアミロイド前駆蛋白質の同定

研究課題名（英文）Absolute quantification of amyloid precursor proteins using mass spectrometry

研究代表者

堂本 裕加子（新谷裕加子）（Domoto, Yukako）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30596961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：アミロイド前駆蛋白質13種類に由来する特異的なペプチド配列98種を選び、ペプチド鎖を合成、同位体標識を用いた液体クロマトグラフィー質量分析法によりアミロイド前駆蛋白質の絶対定量を行った。30例のアミロイドーシス剖検症例において、それぞれ病型に当たるアミロイド前駆蛋白質が多く検出され、免疫組織化学的結果と合致し、アミロイド病型の同定が可能であった。

また、共沈着していると考えられるアポリポ蛋白質も多く検出され、病型にあたるアミロイド前駆蛋白質の沈着量と正の相関を示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドーシスは難治性疾患であるが、アミロイド前駆蛋白質の種類によって、血清アミロイドA蛋白（AA）、トランスサイレチン（ATTR）、2ミクログロブリン（Ab2M）、免疫グロブリン軽鎖（kappa、lambda）（AL）などの病型が存在し、病型によっては治療法が確立されていることから、病型診断が重要である。しかし、通常の診断業務で行われる免疫組織化学的染色では偽陽性や偽陰性が生じ病型診断が困難なことがしばしば経験される。本研究で行った同位体標識を付加した液体クロマトグラフィー質量分析法による絶対定量法は上記の5つの病型については診断可能であり、有用なツールになると考える。

研究成果の概要（英文）：98 kinds of specific peptide sequences derived from 12 kinds of amyloid precursor proteins were selected, amino-acid residues were synthesized, and absolute quantification of amyloid precursor proteins was performed by liquid chromatography mass spectrometry using isotope labeling. Many amyloid precursor proteins corresponding to each type of amyloidosis were detected in 30 autopsy cases, which was consistent with the immunohistochemical results. In addition, many apolipoproteins, which are considered to be co-deposited, were also detected, showing a positive correlation with the amount of each amyloid precursor protein.

研究分野：心血管病理

キーワード：アミロイドーシス プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは単一のアミロイド前駆蛋白質がシート構造を形成して沈着することにより生じると考えられており、約 30 種類のアミロイド前駆蛋白質が報告されている。アミロイド前駆蛋白質の同定は、通常の診断業務の中では免疫組織化学的に行われるのが一般的である。しかし、複数のアミロイド前駆蛋白質が陽性となる症例が少なからずあり、しばしば診断に苦慮する。特に、免疫グロブリン軽鎖や重鎖アミロイドーシスは、免疫組織化学的に陰性となることも多く、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) を用いる必要性が指摘され始めている。ただし、LC-MS で直ちにアミロイド前駆蛋白質が同定できるわけではない。特に、定常域と可変域とからなる免疫グロブリンの重鎖はアミロイドの前駆蛋白質としては稀とされているが、Manabe^ら¹⁾によれば、アミロイドーシスでは主に可変域が沈着すると報告している。可変域は個人差が大きく、データベースを用いる質量分析法では、検出に限界があるため、確実に可変域を同定するためにはアミノ酸配列分析を行う必要がある。更に、質量分析法ではデータベースと一致すれば、病態に関係のない蛋白質も全て検出されるため、重要かつ病態に関係のある蛋白質を見分けることが難しいことしばしばである。

アミロイドーシスの診断はコンゴレッド染色と偏光性の有無で判断されるが、実際の治療にはその病型の確定が重要である。免疫グロブリン軽鎖 (、) を原因とする AL アミロイドーシスでは、形質細胞の増殖をきたす多発性骨髄腫を背景に生じることが多く、原疾患の治療が有用である。同様に、血清アミロイド A 蛋白質の沈着する AA アミロイドーシスは慢性炎症性疾患に伴うことが多く、原疾患の治療が優先される。一方、トランスサイレチンの沈着する ATTR アミロイドーシスでは、トランスサイレチンが不安定化することで臓器に沈着することがわかっており、トランスサイレチン四量体安定化剤が開発され、家族性に加えて孤発例 (老人性) にも投薬の適応が拡大されたことで、近年注目を集めている。

2. 研究の目的

申請者は、日常の病理診断業務において、アミロイドーシスの病型診断が免疫組織化学的検討のみでは難しい症例や、定性的な LC-MS を用いても、複数のアミロイド前駆蛋白質が検出される症例を経験した。こうした背景から、新たなアミロイドーシスの病型診断法の確立が必要であると考え、同位体ラベルを付加した LC-MS によるアミロイド前駆蛋白質の絶対定量法を考案した。定性的な LC-MS の普及に伴って、文献的には複数のアミロイド前駆蛋白質が検出された症例が数例報告されており、本ツールが複数のアミロイド前駆蛋白質の量比にも言及することができ、アミロイド沈着機序の解明につながると考えた。

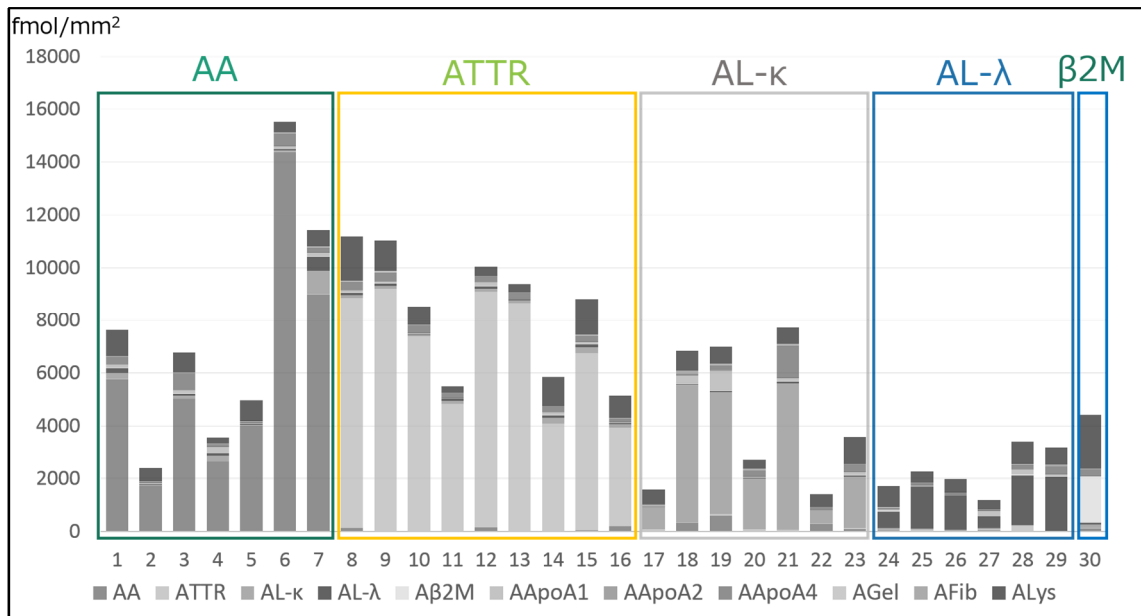
3. 研究の方法

13 種類のアミロイド前駆蛋白質に由来する特異的なペプチド配列 98 種を選び、無細胞蛋白質合成系 (PURE system)²⁾ を用いてペプチド鎖を合成、同位体標識を用いた LC-MS を行って、アミロイド前駆蛋白質の絶対定量を行った。同時に免疫組織化学に用いる抗体の選出や条件検討、この結果との比較、共沈着物との量比等も検討した。

4. 研究成果

1) アミロイドーシス剖検症例 30 例の心臓を用いて、アミロイド沈着部をレーザーマイクロダイセクションで回収し、トリプシン消化した。同位体を付加したペプチド鎖とともに、LC-MS を行い、12 種類のアミロイド前駆蛋白質に由来する 53 種類の同位体ペプチド鎖の定量に成功した。

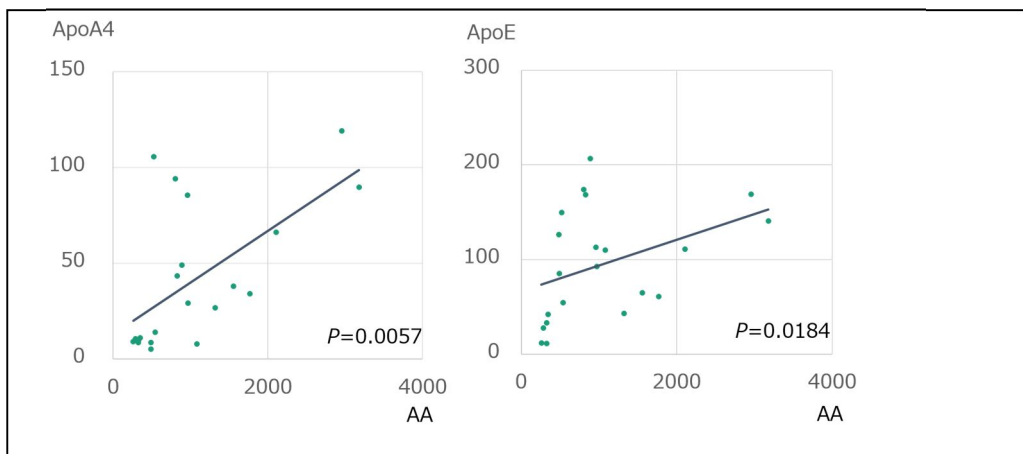
図1 . アミロイド前駆蛋白質の定量結果



この結果，最も多く沈着し，その原因と考えられたアミロイド前駆蛋白質（図1 . AA ; Serum Amyloid A、ATTR ; Transthyretin、AL-κ ; 軽鎖，AL-λ ; 軽鎖，β2M ; β2ミクログロブリン）以外にも種々の Apolipoprotein が多く共沈着していることが明らかとなり免疫組織化学的検討結果とも一致していた.免疫グロブリン軽鎖については検出量が十分といえないものの，病型診断に有用なツールと考えられた.

2) 病型にあたるアミロイド沈着物と Apolipoprotein などの共沈着物の沈着量に正の相関がみられることがわかった (図2).

図2 . Amyloid A (AA) と Apolipoprotein A4 (ApoA4) , E (ApoE) の沈着量の相関図



本研究に用いた絶対定量法により，AL アミロイドーシスの前駆蛋白質である免疫グロブリン軽鎖の検出は充分とは言い難かったが，AA，AL，ATTR，β2M の診断は可能と考えられ，今後の改良により有力な診断ツールになると考えられる.また，アポリポ蛋白質が共沈着しており，その量が病型に当たるアミロイド前駆蛋白質と相関していたことから，アミロイド沈着機序に関係している可能性が示唆された.

*1 Manabe et al. Am J Kidney Dis., 2015;66(6): 1095-1100

*2 Narumi R, Shimizu Y, Ode KL, Ueda HR, et al. Proc Natl Acad Sci [Internet] 113 (24): E3461-7, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato M, et al	4. 巻 7
2. 論文標題 Blood Vessel Invasion Is a Strong Predictor of Postoperative Recurrence in Endometrial Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Gynecol Cancer.	6. 最初と最後の頁 875-881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IGC.0000000000001262.	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 Kadowaki H. et al	4. 巻 2
2. 論文標題 Enormous Aneurysm in Coronary Artery Fistula With Immunoglobulin G4-Related Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Can J Cardiol.	6. 最初と最後の頁 230e1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cjca.2018.11.030	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 Hirakawa Y, et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 Nutcracker Syndrome with the Superimposition of Thin Basement Membrane Syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 411-414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1433-18	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 Kawazoe Y, et al	4. 巻 7
2. 論文標題 Faster R-CNN-Based Glomerular Detection in Multistained Human Whole Slide Images	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Imaging	6. 最初と最後の頁 91 (1-19)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jimaging4070091	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 Adachi Y, Kinoshita O, Hatano M, Shintani Y, Naito N, Kimura M, Nawata K, Nitta D, Maki H, Ueda K, Amiya E, Takimoto E, Komuro I, Ono M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Successful bridge to recovery in fulminant myocarditis using a biventricular assist device: a case report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Med Case Rep.	6. 最初と最後の頁 295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13256-017-1466-1.	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 Yasuda K, Tanaka T, Ishihara S, Otani K, Nishikawa T, Kiyomatsu T, Kawai K, Hata K, Nozawa H, Masui Y, Shintani Y, Watanabe T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Intestinal perforation after nivolumab immunotherapy for a malignant melanoma: a case report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Surg Case Rep.	6. 最初と最後の頁 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-017-0370-7.	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 Shirota G, Gonoi W, Ikemura M, Ishida M, Shintani Y, Abe H, Fukayama M, Higashida T, Okuma H, Abe O.	4. 巻 131
2. 論文標題 The pseudo-SAH sign: an imaging pitfall in postmortem computed tomography.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Legal Med.	6. 最初と最後の頁 1647-1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00414-017-1651-1	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 Shiratori H, Nishikawa T, Shintani Y, Muro K, Sasaki K, Yasuda K, Otani K, Tanaka T, Kiyomatsu T, Hata K, Kawai K, Nozawa H, Ishihara S, Fukayama M, Watanabe T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Perforation of jejunal diverticulum with ectopic pancreas.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 137-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-017-0712-9.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堂本裕加子
2. 発表標題 絶対定量的質量分析法を用いたアミロイド前駆蛋白質の同定
3. 学会等名 第108回日本病理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----