

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870541

研究課題名(和文) FAPの発症を規定する断片化TTRの形成機構の解明および新規病態マーカーの開発

研究課題名(英文) Fragmentations of transthyretin in familial amyloid polyneuropathy

## 研究代表者

植田 光晴 (Ueda, Mitsuharu)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60452885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者のアミロイドを生化学的に解析すると、断片化したトランスサイレチン(TTR)が検出される。試験管内で形成させたTTR凝集物を神経系の培養細胞に添加したところ、ヒトで観察されるものと類似したTTRの断片化が観察された。生化学的に解析したところ、TTRのC末端側ペプチドが複数観察された。また、断片化部位から、TTRの断片化に關与する酵素の候補が判明し、さらに、TTRのC末端側がアミロイド形成に重要な役割を果たしていることも判明した。今後は、本知見を基に、新たな診断法や治療法の開発を行うと共に、本症の病態モデルの作成も行う。

研究成果の概要(英文)：Fragmentations of transthyretin (TTR) were reportedly found in amyloid deposits in familial amyloid neuropathy (FAP). However, the mechanism and pathological roles of the TTR fragmentations in FAP remain to be determined. To elucidate the mechanism involved in TTR fragmentations, we investigated how TTR fragments were formed in cultured cells. Recombinant TTR was employed in this study. Several kinds of cultured cells were incubated for 24 hours with soluble TTR or TTR aggregates formed in vitro by pretreating in an acidic buffer. After incubation, cell lysates were examined by SDS-PAGE and amino-acid sequence analysis to detect TTR fragments. TTR fragments were detected in lysates of neuron (SH-SY5H) and astrocyte (U87MG) cell lines which were incubated with TTR aggregates, but not in those which were incubated with soluble TTR. Amino-acid sequence analysis revealed that cleavages of TTR were made at C-terminal portions.

研究分野：神経内科学、アミロイドーシス

キーワード：トランスサイレチン アミロイドーシス

## 1. 研究開始当初の背景

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、トランスサイレチン (TTR) 遺伝子変異により生じる代表的な遺伝性全身性アミロイドーシスであり、末梢神経障害を中心とした全身の症候を呈し、未治療だと発症後 10 年以内に死に至る難病である。日本 (熊本県と長野県)、ポルトガル、スウェーデンから本疾患の大きな家系が当初報告されたが、近年、その他の地域からも多くの症例や家系が報告されている。同一の TTR 遺伝子変異 (Val30Met) を持つ FAP でも、地域間で発症年齢や浸透率が大きく異なっており、TTR 遺伝子変異以外の遺伝的な背景が両者で異なることも報告されている。近年、高齢発症のスウェーデン FAP 患者のアミロイドを生化学的に解析すると、断片化した TTR が検出されることが多いことが判明した。これらの知見から、TTR の断片化が FAP の病態に深く関与し、発症の抑制・遅延に何らかの役割を果たしている可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、断片化 TTR の生成機構を明らかにし、FAP の発症を規定する重要な因子を解析すると共に、TTR 断片化機構から新たな治療法へ開発の糸口を探求することである。

## 3. 研究の方法

(1) リコンビナント TTR の作成および変性  
大腸菌で発現・精製したリコンビナント TTR (野生型および変異型) を酸性バッファー中で変性させ、細胞培養や酵素反応実験に用いた。

(2) 細胞培養での断片化 TTR 生成の検討  
各種臓器由来の細胞株に変性した TTR を加え、FAP 患者から検出されるものと類似した断片化 TTR が生成されるか検証した。また、TTR 断片化に関与していると予測される分子の探索を実施した。

(3) 断片化 TTR のアミロイド形成性の解析  
リコンビナント断片化 TTR を作成し、in vitro でのアミロイド形成性を確認した。

## 4. 研究成果

断片化 TTR に対する抗体を用いて解析を行ったところ、本邦の非集積地出身の高齢発症 FAP 患者のアミロイドから断片化 TTR が検出されるが、集積地出身で若年発症の FAP 患者のアミロイドからは全長 TTR のみが検出されることが確認された。本結果は、スウェーデン患者での解析結果 (高齢発症患者で断片化 TTR が検出される) と一致している。

試験管内で形成させた TTR 凝集物を神経系の培養細胞に添加したところ、ヒトで観察されるものと類似した TTR の断片化が観察された。電気泳動後に断片化 TTR をアミノ酸シーケンスで確認したところ、TTR の C 末端側のペプチドが複数観察された。また、

断片化部位から、TTR の断片化に関する酵素の候補が判明した。候補分子を siRNA でノックダウンした細胞に TTR 凝集物を加えると TTR の断片化が減少したことから、本分子が TTR の断片化を担っている可能性が高いと考えられた。

観察された TTR フラグメントのリコンビナント蛋白を作成し、試験管内でアミロイド形成性を確認したところ、全長 TTR と比較してアミロイド原性が高いことが確認できた。

TTR の断片化機構は本症の病態に関与している可能性がある。また、TTR の C 末端側はアミロイド形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

今後は、本知見を基に、新たな診断法や治療法の開発を行うと共に、本症の病態モデルの作成も行う。

## 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 20 件)

1. Obayashi K, Tasaki M, Jono H, Ueda M, Shinriki S, Misumi Y, Yamashita T, Ohshima 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)
2. 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, Westermark P. Amyloid fibrils containing fragmented ATTR may be the standard fibril composition in ATTR amyloidosis. *Amyloid*, 2013;20:142-150. (査読有)
3. Sakashita N, Kagawa S, Date R, Ueno T, Nakagawa T, Yamashita T, Obayashi K, Ohshima T, Ueda M, Horiguchi H, Ando Y, Takeya M. Marked cardiomegaly in a patient with familial amyloidotic polyneuropathy after orthotopic liver transplantation: a case study. *Pathol Int* 2013;63:260-265. (査読有)
4. 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)

5. 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)
6. 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, Westermark 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*, 2014;85:740-746. (\*contributed equally) (査読有)
7. Shinriki S, Jono H, Ueda M, Obayashi K, Nakamura T, Ota K, Ota T, Sueyoshi T, Guo J, Hayashi M, Hiraki A, Nakayama H, Yamashita S, Shinohara M, Ando Y. Stromal Expression of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Correlates with Poor Differentiation and Adverse Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Histopathology*, 2014;64:356-364. (査読有)
8. 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;12:574-583. (査読有)
9. 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;21:216-217. (査読有)
10. Guo J, Shinriki S, Su Y, Nakamura T, Hayashi M, Tsuda Y, Murakami Y, Tasaki M, Hide T, Takezaki T, Kuratsu J, Yamashita S, Ueda M, Li J, Ando Y, Jono H. Hypoxia suppresses cylindromatosis (CYLD) expression to promote inflammation in glioblastoma: possible link to acquired resistance to anti-VEGF therapy. *Oncotarget*, 2014; 5:6353-6364. (査読有)
11. Nakahara K, Ueda M, Yamada K, Koide T, Yoshimochi G, Funayama M, Kim J, Yamakawa S, Mori A, Misumi Y, Uyama E, Hattori N, Ando Y. Juvenile-onset parkinsonism with digenic parkin and PINK1 mutations treated with subthalamic nucleus stimulation at 45 years after disease onset. *J Neuro Sci*, 2014; 345:276-277. (査読有)
12. Ueda M, Ando Y. Recent advances in transthyretin amyloidosis therapy. *Transl Neurodegener*, 2014;3:19. (査読有)
13. 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;22:67-69. (査読有)
14. 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;28:201-207. (査読有)
15. Nakamura T, Shinriki S, Jono H, Ueda M, Nagata M, Guo J, Hayashi M, Yoshida R, Ota T, Ota K, Kawahara K, Nakagawa Y, Yamashita S, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M, Ando Y. Osteopontin-integrin v 3 axis is crucial for 5-fluorouracil resistance in oral squamous cell carcinoma. *FEBS Lett*, 2015;589:231-239. (査読有)
16. Nakamura T, Shinriki S, Jono H, Guo J, Ueda M, Hayashi M, Yamashita S, Zijlstra A, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M, Ando Y. Intrinsic TGF- 2-triggered SDF-1-CXCR4 signaling axis is crucial for drug resistance and a slow-cycling state in bone marrow-disseminated tumor cells. *Oncotarget*, 2015;6:1008-1019. (査読有)
17. Wada N, Kawano Y, Fujiwara S, Kikukawa Y, Okuno Y, Tasaki M, Ueda M, Ando Y, Yoshinaga K, Ri M, Iida S, Nakashima T, Shiotsu Y, Mitsuya H, Hata H. Shikonin, dually functions as a proteasome inhibitor and a necroptosis inducer in multiple myeloma cells. *Int J Oncol*, 2015;46:963-972. (査読有)
18. Masuda T, Ueda M, Ueyama H, Shimada S, Ishizaki M, Imamura S, Yamamoto T, Ando Y. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical

cysts caused by compound heterozygous mutations in MLC1, in patients with and without subcortical cysts in the brain. *J Neurol Sci*, 2015;351:211-213. (査読有)

19. Miura Y, Devaux JJ, Fukami Y, Manso C, Belghazi M, Wong AH, Yuki N, CNTN1-CIDP Study Group (Fujimura H, Toshio Fukutake T, Iwanami H, Kusaka H, Kuwabara S, Okuma Y, Ueda M, Yamamoto T). Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain*, 2015 (e-pub ahead of print). (査読有)
20. Ueda A, Ueda M, Nagatoshi A, Hirano T, Ito T, Arai N, Uyama E, Mori K, Nakamura M, Shinriki S, Ikeda K, Ando Y. Genotypic and phenotypic spectrum of CADASIL in Japan: the experience at a referral center in Kumamoto University from 1997 to 2014. *J Neurol*, 2015. (in press) (査読有)

[学会発表](計18件)

1. Ueda M, Kluge-Beckerman B, Liepnieks J, Mizuguchi M, Ando Y, Benson M. Fragmentation of amyloid-forming transthyretin in cultured cells and a test tube. *The VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy*. Nov 10-13, 2013, Rio de Janeiro, Brazil.
2. Ueda M, Kluge-Beckerman B, Liepnieks J, Mizuguchi M, Misumi Y, Ando Y, Benson M. Fragmentations of TTR in cultured cells. *The XIVth International Symposium on Amyloidosis*. April 27-May 1, 2014, Indianapolis, IN.
3. Ueda M, Ando Y. Amyloidogenicity of transthyretin and diseases. *The 10th Japan-China Cooperative Life Science Symposium*. Oct 27, 2014, Kumamoto, Japan.
4. 植田光晴、大林光念、池田勝義、安東由喜雄：臨床化学からのチーム医療への貢献 NST シンポジウム「一致団結！臨床検査とチーム医療」、第60回日本臨床検査医学会学術集会, Oct 31-Nov 3, 2013, 神戸
5. 植田光晴、田崎雅義、荻泰裕、北川敬資、柳澤哲大、井上泰輝、三隅洋平、増田曜章、黄冠男、久原春代、大隈雅紀、池田勝義、大林光念、山下太郎、安東由喜雄：質量分析法によるアミロイドーシス診断法の確立。「平成24・25年度学会推進プロジェクト研究」報告、第61回日本臨床検査医学会学術集会, Nov 22-25, 2014, 福岡
6. 植田光晴、水口峰之、安東由喜雄：トランスサイレチンの断片化機構の解析と病態への関与。第2回アミロイドーシス研究会学術集会, Aug 22, 2014, 東京
7. 植田光晴、安東由喜雄：家族性アミロイドポリニューロパチーの病態解析と治療における展望。第56回日本神経学会学術大会, May 20-23, 2015, 新潟
8. 植田光晴、Barbara Kluge-Beckerman、Juris J. Liepnieks、水口峰之、安東由喜雄、Merrill D. Benson。FAPの病態の鍵を握るトランスサイレチン断片化機構の解析。第54回日本神経学会総会, May 29-June 1, 2013, 東京
9. 植田光晴、田崎雅義、三隅洋平、山下太郎、松本光希、川路隆博、谷原秀信、大林光念、安東由喜雄：膠様滴状角膜変性症による角膜ラクトフェリンアミロイドーシスの一例。第1回日本アミロイドーシス研究会学術集会, Aug 30, 2013, 東京
10. 植田光晴、Barbara Kluge-Beckerman、Juris J. Liepnieks、田崎雅義、大林光念、Merrill D. Benson、安東由喜雄：FAP病態の鍵を握るトランスサイレチン断片化機構の解明と検出。第60回日本臨床検査医学会学術集会, Oct 31-Nov 3, 2013, 神戸
11. 植田光晴、Barbara Kluge-Beckerman、Juris J. Liepnieks、大嶋俊範、水口峰之、三隅洋平、大林光念、Merrill D. Benson、安東由喜雄：FAP発症年齢に影響するTTR断片化生成機構の解析。第55回日本神経学会学術大会, May 21-24, 2014, 福岡
12. 植田光晴、大嶋俊範、三隅洋平、山下太郎、大林光念、安東由喜雄：肝移植後に長期経過した家族性アミロイドポリニューロパチー患者の病理学的検討。第55回日本神経病理学会総会学術研究会, June 5-7, 2014, 東京
13. 植田光晴、豊島梨沙、水口峰之、Barbara Kluge-Beckerman、Juris J. Liepnieks、田崎雅義、三隅洋平、山下太郎、Merrill D. Benson、安東由喜雄：トランスサイレチン断片化機構およびアミロイド形成へ与える影響の解析。第87回日本生化学会大会, Oct 15-18, 2014, 京都
14. 植田光晴：アミロイドーシスの診断と新規治療薬。第17回巨椋循環器カンファレンス, July 20, 2013, 宇治
15. 植田光晴：トランスサイレチンアミロイドーシスの病態解明を目指して～米国インディアナ大学 留学報告～。熊本神経カンファレンス, 2013年2月21日、
16. 植田光晴、安東由喜雄：動物モデルとアミロイドーシスの伝播。アミロイドーシスに関する調査研究班 夏のワークショップ2013。July 25-26, 2013, 別府
17. 植田光晴、安東由喜雄：FAP診療の現状

と今後の展望．ピンダケル発売 1 周年記念シンポジウム，Jan 24，2015，東京

18. 植田光晴、安東由喜雄：アミロイドーシスや蛋白凝集病の診断における質量分析への期待．第一回ダイレクトバイオロジー研究会，Feb 13，2015，東京

〔図書〕(計 4 件)

1. 植田光晴、安東由喜雄．アミロイドーシス検査における質量分析．編集「医用質量分析ガイド」診断と治療社（東京）2013,pp115-120.
2. 植田光晴、安東由喜雄．AL アミロイドーシス 病理「多発性骨髄腫 Updating 第 6 巻」医薬ジャーナル社（東京）2014, pp81-87.
3. 植田光晴、田崎雅義、安東由喜雄．アミロイド蛋白の質量分析．「多発性骨髄腫 Updating 第 6 巻」医薬ジャーナル社（東京）2014, pp96-99.
4. 植田光晴、安東由喜雄．AST・ALT 高値．松尾収二 編集「考える臨床検査．スクリーニング検査で異常値をみたら？」文光堂（東京）2015, pp77-83.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/neurology/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

植田 光晴 (UEDA MITSU HARU)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60452885