

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19488

研究課題名(和文)変異TTR型家族性アミロイドポリニューロパチーにおけるグリコサミノグリカンの役割

研究課題名(英文)Role of glycosaminoglycans in ATTR amyloidosis

研究代表者

西辻 和親 (NISHITSUJI, Kazuchika)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：40532768

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)：トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー(I型FAP)は原因タンパク質である変異型トランスサイレチン(TTR)が異常に凝集することによりアミロイドと呼ばれる線維状の不溶性物質を形成し、それが様々な臓器に沈着することによって引き起こされる難治性の疾患である。本研究では、TTRの異常な凝集に関与し得る生体分子としてグリコサミノグリカンに着目し、その一種であるヘパラン硫酸とその多硫酸化アナログヘパリンについて、TTRの凝集ならびに細胞取り込みおよびI型FAP病態に関与する可能性を発見した。

研究成果の概要(英文)：Transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) is characterized by transthyretin (TTR) deposition in various tissues, including the kidneys. Amyloid depositions in vivo contain protein components and non-protein constituents besides the main protein fibrils. The non-protein constituents include glycosaminoglycans (GAGs), and are thought to be involved in the pathogenesis and pathology of protein aggregation diseases, such as protein aggregation and protein aggregate-induced tissue/organ damages. Here, we showed that heparan sulfate and heparin, members of naturally occurring GAGs, promoted the aggregation of TTR and mediated the cellular interaction of TTR fibrils. Furthermore, heparan sulfate were accumulated in the kidneys of patients having TTR-FAP. Our results will assist in the design of anti-amyloid agents.

研究分野：医化学一般

キーワード：グリコサミノグリカン ヘパラン硫酸 アミロイド アミロイドーシス

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスとは、前駆体タンパク質が凝集して形成されるアミロイドと呼ばれる線維状の不溶性物質が様々な臓器に沈着することにより引き起こされる難治性疾患である。家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は遺伝性アミロイドーシスであり、変異型のトランスサイレチン(TTR)やアポリポタンパク質A-Iを原因タンパク質とするものが知られている(Koike H, Expert. Opin. Med. Diagn., 2010)。このうち、TTRを原因タンパク質とするI型FAPは日本国内で最も患者数が多く、長野県と熊本県に集積地が存在する(Ando Y, Arch. Neurol., 2005、Ikeda S., Neurology, 2002)。TTRは肝臓で産生されるため主な治療法は肝移植であるが、原因となる異常タンパク質の産生を抑制することはできてもアミロイドの沈着とそれにより引き起こされる臓器障害の改善には至っていないのが現状である。

グリコサミノグリカンは種々の細胞が合成する直鎖状の細胞外糖鎖であり、主要な部分はアミノ糖とウロン酸の二糖が数十回繰り返す二糖繰り返し領域によって構成される。グリコサミノグリカンは構成単糖の種類や硫酸化パターンなどの違いにより、ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸などに分類される。グリコサミノグリカンは様々なアミロイドーシス患者組織においてアミロイドと共沈着することが報告されており(Snow AD, Lab. Invest., 1987)。アミロイドーシスの発症や病態に関与することが示唆されている。我々はこれまで、限局性アミロイドーシスの一種であるアルツハイマー病の原因タンパク質アミロイドβ(Aβ)の細胞取込みが細胞表面上のグリコサミノグリカンにより仲介されること(Nishitsuji, J. Biol. Chem., 2011)、アルツハイマー病患者脳やモデルマウス脳にヘパラン硫酸が蓄積していることを明らかにした(Hosono-Fukao, Am. J. Pathol., 2012)。これらの結果から、I型FAPにおいてもグリコサミノグリカンは重要な役割を果たすことが考えられた。

2. 研究の目的

I型FAPの病態におけるグリコサミノグリカン、特にヘパラン硫酸の役割はまだよく分っていない。本研究では、TTRの不溶性線維形成やTTR線維-細胞間相互作用に対するヘパラン硫酸の影響を明らかにすることにより、I型FAPのアミロイドーシス病態に対するヘパラン硫酸の関与を検索することを目指した。

3. 研究の方法

(1) TTR線維化の評価

Fmoc固相合成法もしくは大腸菌由来の野生型あるいはV30M型(最も頻繁にみられる変異型)TTR12-35、105-123、81-127アミノ酸残基の各断片を用いた。12-35断片はN末端側に位置し、ヘパリン結合部位を有することが報告されており(Noborn, PNAS, 2011)、105-123及び81-127断片はC末端側で患者組織に沈着が多くみられる(Bergström, JPathol, 2005)。ヘパラン硫酸の多硫酸化アナログであるヘパリンをヘパラン硫酸のモデルとして使い、線維の形成は線維/アミロイド構造を特異的に認識するチオフラビンT(ThT)の蛍光モニタリングにより評価した。

(2) 培養細胞を用いた実験系

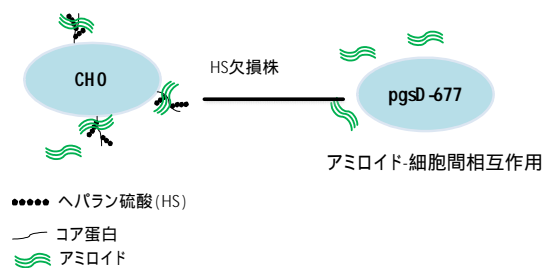


図1 培養実験系の概念図。

TTR断片を37℃で7日間インキュベートすることにより得られたTTR線維を用いた。線維-細胞間の相互作用に対するヘパラン硫酸の影響を調べるため、CHO(Chinese Hamster Ovary)細胞とそのヘパラン硫酸欠損株 pgsD-677細胞を用いた。培養した細胞を蛍光標識した線維と共にインキュベート

し、共焦点顕微鏡により TTR 線維陽性細胞を観察した。概要を図 1 に示した。

4. 研究成果

ヘパラン硫酸の多硫酸化アナログであるヘパリンの存在下において、TTR の線維形成は大幅に促進されることが分かった (図 2)。

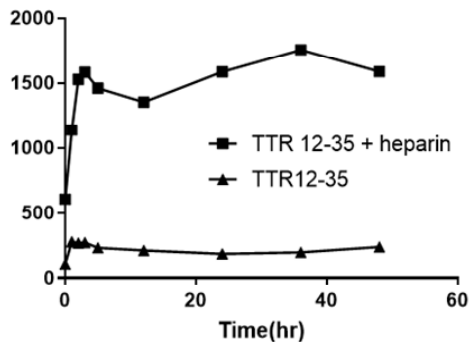


図 2 TTR 線維化に対するヘパリンの影響。

また、ヘパラン硫酸欠損株では TTR 線維と相互作用した TTR 線維陽性細胞数が大きく減少あるいは消失していた (図 3)。

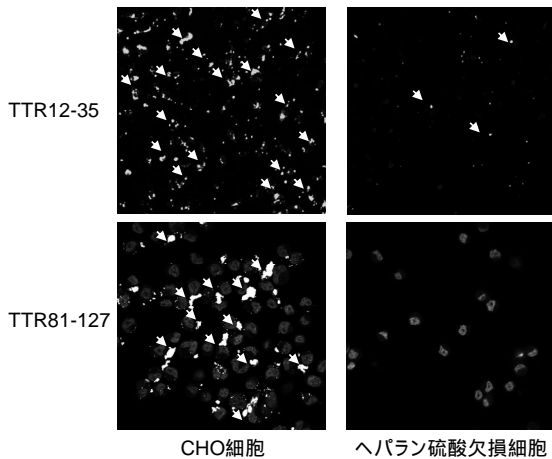
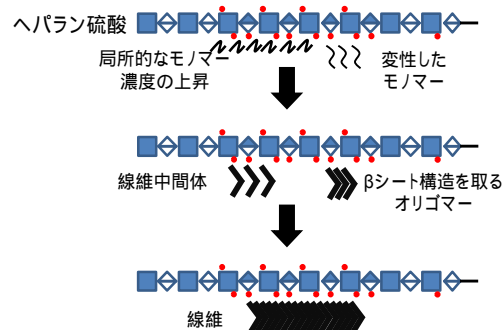


図 3 TTR 線維-細胞間相互作用に対するヘパラン硫酸の影響 (矢印は TTR 線維陽性細胞を示す)。

以上の結果から予想されるヘパラン硫酸の I 型 FAP における役割の概念を図 4 に示す。当初の仮説通り、細胞表面上のヘパラン硫酸は TTR 線維の形成及び TTR 線維-細胞間相互作用を制御することにより、I 型 FAP のアミロイドーシス病態に寄与している可能性が示唆された。ヘパラン硫酸は硫酸化修飾を受けることが知られており、その度合いによりヘパラン硫酸糖鎖内部に硫酸化が多い、ある

(i) TTR 線維化の促進作用



(ii) TTR 線維-細胞間相互作用の仲介

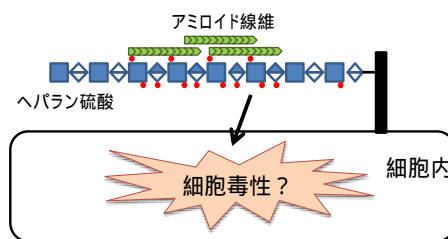


図 4 本研究の結果から予想されるヘパラン硫酸の I 型 FAP における役割。

いは少ないドメインが形成される。これらのドメインを標的にしたさらなる研究の発展が期待された。

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 11 件)

1. Mikawa S., Mizuguchi C., Nishitsuji K., Baba T., Shigenaga A., Shimanouchi T., Sakashita N., Otaka A., Akaji K., Saito H. Heparin Promotes Fibril Formation by the N-Terminal Fragment of Amyloidogenic Apolipoprotein A-I. **FEBS Lett** 590:3492-3500, 2016 査読有 doi: 10.1002/1873-3468.12426.
2. 西辻 和親、内村 健治、アミロイドーシスにおけるヘパラン硫酸多硫酸化ドメイン及び Sulf の役割 . **Medical Science Digest** 42(13): 608-612, 2016 http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/05msd/msd2016_12.html 査読無

3. Kameyama H., Nakajima H., ***Nishitsuji K.**, Mikawa S., Uchimura K., Kobayashi N., Okuhira K., Saito H., Sakashita N. Iowa mutant apolipoprotein A-I (apoA-I_{Iowa}) fibrils target lysosomes. **Sci Rep** 6, 30391, 2016 査読有 (*corresponding author) doi:10.1038/srep30391
4. Uchida T., Tamaki Y., Ayaki T., Shodai A., Kaji S., Morimura T., Banno Y., **Nishitsuji K.**, Sakashita N., Maki T., Yamashita H., Ito H., Takahashi R., Urushidani M. CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. **Sci Rep** 6, 19118, 2016 査読有 doi: 10.1038/srep19118
5. ***Nishitsuji K.**, Saito H., Uchimura K. Enzymatic remodeling of heparan sulfate: a therapeutic strategy for systemic and localized amyloidoses? *Neural Regen Res* 11:408-409, 2016 査読有 (*corresponding author) doi: 10.4103/1673-5374.179043
6. Nakajima H., ***Nishitsuji K.**, Kawashima H., Kuwabara K., Mikawa S., Uchimura K., Akaji K., Kashiwada Y., Kobayashi N., Saito H., Sakashita N. The polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents apoA-I_{Iowa} amyloidosis in vitro and protects human embryonic kidney 293 cells against amyloid cytotoxicity. **Amyloid** 23:17-25, 2016 査読有 (*corresponding author) doi: 10.3109/13506129
7. Takechi-Haraya Y., Nadai R., Kimura H., **Nishitsuji K.**, Uchimura K., Sakai-Kato K., Kawakami K., Shigenaga A., Kawakami T., Otaka A., Hojo H., Sakashita N., Saito H. Enthalpy-driven interactions with sulfated glycosaminoglycans promote cell membrane penetration of arginine peptides. **Biochim Biophys Acta - Biomembranes** 1858:1339-1349, 2016 査読有 doi: 10.1016/j.bbamem.2016.03.021
8. Otsuka R., Harada N., Aoki S., Shirai K., **Nishitsuji K.**, Nozaki A., Hatakeyama A., Shono M., Mizusawa N., Yoshimoto K., Nakaya Y., Kitahata H., Sakaue H. C-terminal region of GADD34 regulates eIF2 α dephosphorylation and cell proliferation in CHO-K1 cells. **Cell Stress Chaperones**, 21:29-40, 2016 査読有 doi: 10.1007/s12192-015-0633-9
9. Kuwabara K., ***Nishitsuji K.**, Uchimura K., Hung SC., Mizuguchi M., Nakajima H., Mikawa S., Kobayashi N., Saito H., Sakashita N. Cellular interaction and cytotoxicity of the Iowa mutation of apolipoprotein A-I (apoA-I_{Iowa}) amyloid mediated by sulfate moieties of heparan sulfate. **J Biol Chem** 290:24210-24221, 2015 査読有 (*corresponding author) doi: 10.1074/jbc.M115.652545
10. Ohmoto T., ***Nishitsuji K.**, Yoshitani N., Mizuguchi M., Yanagisawa Y., Saito H., Sakashita N. K604, a specific acylCoA:cholesterol acyltransferase 1 inhibitor, suppresses proliferation of U251MG glioblastoma cells. **Mol Med Rep** 12:6037-6042, 2015 査読有 (*corresponding author) doi: 10.3892/mmr.2015.4200
11. Hosono T., Mouri A., **Nishitsuji K.**, Jung CG., Kontani M., Tokuda H., Kawashima H., Shibata H., Suzuki T., Nabehsima T., Michikawa M. Arachidonic or docosahexaenoic acid diet prevents memory impairment in tg2576 Mice. **J Alz Dis** 48:149-162,

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 亀山泰和、西辻和親、奥平桂一郎、小林典弘、斎藤博幸、坂下直実、G26R 変異型アポリポタンパク質 A1 線維の細胞毒性はリソソーム依存的である、第 4 回日本アミロイドーシス研究会学術集会、2016 年 8 月 19 日、KKR ホテル東京(東京都千代田区)
2. 大塚良、原田永勝、水澤典子、吉本勝彦、西辻和親、高石和美、中屋豊、阪上浩、北畑洋、GADD34 の C 末端領域を欠損した CHO-K1 細胞の樹立、第 253 回徳島医学会学術集会、2016 年 7 月 24 日、徳島県医師会館(徳島県徳島市)
3. **Nishitsuji K.**, Kuwabara K., Uchimura K., Hung SC., Kobayashi N., Saito H., Sakashita N. Cellular interaction and cytotoxicity of amyloid fibrils of the Iowa mutant of apolipoprotein A-I (apoA-I_{Iowa}) are mediated by sulfate moieties of heparan sulfate. **The XVth International Symposium on Amyloidosis**, 2016 年 7 月 3-7 日、Uppsala (Sweden)
4. 亀山泰和、西辻和親、小林典裕、斎藤博幸、坂下直実、ApoA-I 線維はオートファジー/リソソーム系の機能を障害する、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12-14 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)
5. 灘井亮、武知佑樹、西辻和親、内村健治、加藤くみ子、重永章、川上徹、大高章、北條裕信、坂下直実、斎藤博幸、アルギニンペプチドの細胞膜透過はグリコサミノグリカン糖鎖へのエンタルピー依存的結合によって促進される、日本膜学会第 38 年会、2016 年 5 月 10-11 日、早稲田大学(東京都新宿区)
6. 市野農人、奥平桂一郎、川原遥華、木村仁、辻大輔、西辻和親、堂前純子、道川誠、坂下直実、伊藤孝司、斎藤博幸、グリア細胞における ABCA7 発現制御機構の検討、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26-29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
7. 川原遥華、奥平桂一郎、辻耕平、津田雄介、森本恭平、木村仁、假屋園大和、大村理紗、市野農人、杉原涼、西辻和親、重永章、坂下直実、大高章、斎藤博幸、光応答性アポ A-I 模倣ペプチドの開発研究、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26-29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
8. 亀山泰和、西辻和親、小林典裕、斎藤博幸、坂下直実、AApoA1 アミロイドーシスにおけるオートファジー・リソソーム系の役割、日本病理学会第 61 回秋期特別総会、2015 年 11 月 5-6 日、東京大学安田講堂(東京都文京区)
9. 桑原香織、西辻和親、山下太郎、小林典裕、内村健治、安東由喜雄、斎藤博幸、坂下直実、AApoAI アミロイドーシスにおけるヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの役割、第 3 回アミロイドーシス研究会、2015 年 8 月 21 日、KKR ホテル東京(東京都千代田区)
10. 西辻和親、桑原香織、小林典裕、内村健治、坂下直実、斎藤博幸、ApoA-I アミロイドの毒性に対するヘパラン硫酸糖鎖の影響、日本膜学会第 37 年会、2015 年 5 月 14-15 日、早稲田大学(東京都新宿区)
11. 桑原香織、西辻和親、内村健治、小林典弘、斎藤博幸、坂下直実、ApoAI アミロイドの毒性に対するヘパラン硫酸糖鎖の影響、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日・5 月 2 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西辻 和親 (NISHITSUJI, Kazuchika)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号・40532768