

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19516

研究課題名（和文）TTRアミロイドーシス発症・進展の鍵を握るイオンチャネル障害の解析

研究課題名（英文）Analysis of ion channel impairment in the pathogenesis of TTR amyloidosis

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（医）・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）アミロイドーシスはTTRを前駆タンパクとする致死的な全身性アミロイドーシスである。病理学的解析により、TTRアミロイド沈着が病初期よりイオンチャネルが豊富に存在する心筋横細管組織を中心に沈着し、TTRアミロイド沈着量とカルシウムチャネル量の減少が相関することが明らかとなった。心筋培養細胞系および蛍光カルシウムイオンプローブを用いた解析により、TTRアミロイド線維がカルシウムイオンチャネル機能を障害する可能性が示された。細胞外マトリックスのTTRアミロイド線維によるイオンチャネル障害がTTRアミロイドーシスの細胞障害、臓器障害において重要な病態であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Transthyretin (TTR) amyloidosis is a fatal systemic amyloidosis in which both wild type and mutant TTR form amyloid fibrils. Our pathological analysis revealed that TTR amyloid deposits were deposited mainly in the myocardial transverse tubule where ion channels are abundantly present. The amount of TTR amyloid deposition correlates with the decrease in calcium channel. Analysis using myocardial cell line and fluorescent calcium ion probe showed that TTR amyloid fibrils impairs calcium ion channel function. These data suggest that ion channel failure caused by TTR amyloid deposits is an important pathogenesis of TTR amyloidosis.

研究分野：アミロイドーシス

キーワード：アミロイドーシス トランスサイレチン イオンチャネル 横細管

1. 研究開始当初の背景

トランスサイレチン(Transthyretin: TTR) アミロイドーシスは、遺伝子変異のある TTR によって引き起こされる遺伝性 TTR アミロイドーシス(家族性アミロイドポリニューロパチー: Familial amyloid polyneuropathy: FAP)と、遺伝子変異のない TTR によって引き起こされる野生型 TTR アミロイドーシス(老人性全身性アミロイドーシス: Senile systemic amyloidosis: SSA)に分類される。TTR は主に肝臓で産生される輸送蛋白質で、通常は安定な四量体として存在するが、遺伝性 TTR アミロイドーシスにおいては、遺伝子変異により TTR 四量体の安定性が失われて単量体への解離、自己重合によりアミロイド線維を形成し、末梢神経、心臓、腎臓、消化管をはじめ全身に沈着することにより組織・臓器障害を惹起する。一方、野生型 TTR アミロイドーシスは野生型 TTR に由来するアミロイドが心臓を中心に、全身の腱・靭帯組織などに沈着するが、本症において、本来は安定な四量体構造をとる野生型 TTR が何故アミロイド線維を形成するのかについては、組織の老化やアミロイド分解能低下などの関与が示唆されているが詳細は不明である。

TTR アミロイドーシスの病態において、細胞外マトリックスに沈着した TTR アミロイド線維がどのような機構により細胞障害を引き起こすのかについては圧迫、血管障害、代謝障害など諸説が提唱されているが詳細は解明されていない。特に心筋へのアミロイド沈着は、刺激伝導障害による房室ブロック、洞不全症候群、心房細動、心室頻拍など多彩な不整脈を惹起し突然死の原因となる。作業心筋線維周囲への沈着により心室壁肥厚、拡張障害による心不全を引き起こす。我々は、これまでに心筋の細胞外マトリックスへの TTR アミロイド沈着が細胞内構造の変化を引き起こし、細胞機能障害の主要な原因となることを明らかにしたが、TTR アミロイドが如何に細胞、臓器機能を障害するのかについては未解明の課題として残されている。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝性および野生型 TTR アミロイドーシスにおいて、TTR アミロイド沈着はイオンチャンネルが豊富に存在する細胞・組織に好発するという病理学的根拠に立脚し、TTR アミロイド沈着が細胞のイオンチャンネル機能に如何に関わるのか詳細を明らかにし、本症の細胞、臓器機能に関する病態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TTR アミロイド沈着とイオンチャンネルの局在および量的変化についての検討

心筋組織はアミロイド沈着が顕著に起こる組織環境であり、かつ心筋に豊富に存在するイオンチャンネルは心筋機能において極め

て重要な役割を果たす。心筋横細管は、細胞膜が基底膜など細胞外マトリックスを伴って横紋筋細胞の中心部に深く陥入した管状の構造で、同部位に豊富に存在する L 型カルシウムイオンチャンネルから流入したカルシウムイオンにより筋小胞体からのカルシウムイオン放出が速やかに起こり、興奮収縮連関において重要な役割を果たしている。TTR アミロイドーシス患者およびコントロール患者の剖検心筋組織を用いて、コンゴ・レッド染色、チオフラビン S 染色、TTR 免疫染色、L 型カルシウムイオンチャンネル免疫染色、透過型電子顕微鏡観察を行い、TTR アミロイド沈着量とイオンチャンネルの局在および量的関係を検討した。

(2) TTR アミロイドおよびオリゴマーがイオンチャンネルの機能に及ぼす影響についての検討

ラット由来の心筋初代培養細胞および培養心筋細胞株(H9C2)、マウス骨格筋初代培養細胞に蛍光カルシウムイオンプローブ(Fluo4)を添加して細胞内カルシウム濃度の経時的变化を可視化し、TTR アミロイド線維(断片化 TTR を用いて *in vitro* で形成)、TTR オリゴマー、野生型 TTR を添加し、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を定量した。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞における TTR アミロイド沈着とイオンチャンネルの局在についての検討

種々の量のアミロイドが沈着した TTR アミロイドーシス患者の剖検心臓組織の解析(コンゴ・レッド染色、チオフラビン S 染色、電子顕微鏡)により、病初期より心筋細胞に深く嵌入した横細管内にアミロイド線維が顕著に沈着することが明らかとなり(図1)、イオンチャンネルと TTR アミロイド沈着の関連が示唆された。

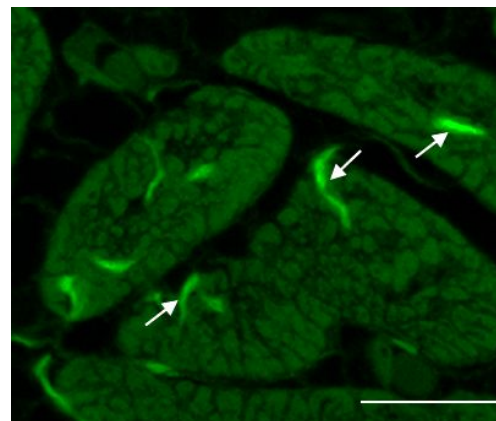


図1. 遺伝性 TTR アミロイドーシス剖検心筋組織のチオフラビン S 染色(矢印は横細管内のアミロイド沈着, Bar = 50 μ m)

(2) TTR アミロイド沈着とイオンチャンネルの量的変化についての検討

TTR アミロイドーシス患者およびコントロール患者の剖検心筋組織を用いて、抗L型電位依存性カルシウムチャンネル抗体、抗TTR抗体を用いた共焦点免疫蛍光顕微鏡観察により、アミロイド沈着した心筋では細胞膜カルシウムチャンネルが減少している傾向が認められ(図2)、アミロイド沈着によるイオンチャンネル機能の障害が示唆された。

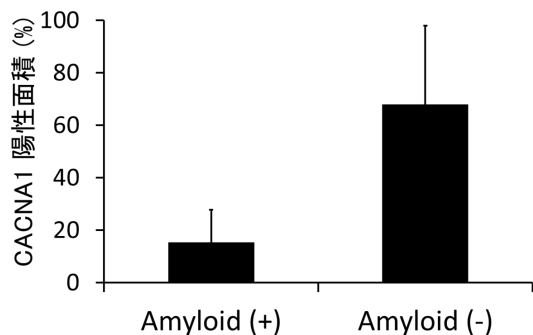


図2. アミロイド沈着による電位依存性カルシウムチャンネル抗体(CACNA1)陽性面積の減少

(3) TTR アミロイドおよびオリゴマーがイオンチャンネルの機能に及ぼす影響についての検討

ラット由来の心筋初代培養細胞およびマウス骨格筋初代培養細胞にTTRアミロイドを添加し、蛍光カルシウムイオンプローブ(Fluo4)による細胞内カルシウム濃度の経時変化を観察したところ、TTRアミロイドの添加により、細胞内カルシウムイオンの蛍光強度のピーク/ボトム比が減少する傾向が得られ(図3, 4)、TTRアミロイドによりカルシウムイオンチャンネル機能が障害されることが示唆された。

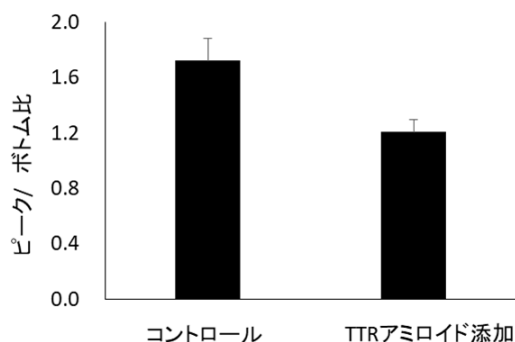


図3. マウス骨格筋初代培養細胞にTTRアミロイド添加によるカルシウムイオンチャンネル障害(カルシウムイオンプローブの蛍光強度のピーク/ボトム比の低下傾向)

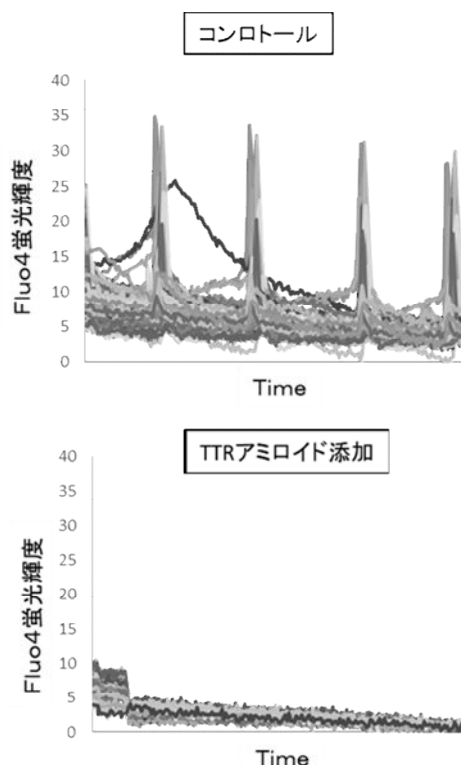


図4. ラット由来の心筋初代培養細胞にTTRアミロイド添加によるカルシウムイオンチャンネル障害

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計7件)

Yamashita T, Ueda M, Misumi Y, Masuda T, Nomura T, Tasaki M, Takamatsu K, Sasada K, Obayashi K, Matsui H, Ando Y. Genetic and clinical characteristics of hereditary transthyretin amyloidosis in endemic and non-endemic areas: experience from a single-referral center in Japan. *J Neurol*. 査読有, 2018, 134-140.

DOI: 10.1007/s00415-017-8640-7

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*. 査読有, 2017, 2192-2197.

DOI: 10.1212/WNL.0000000000004016.

Suenaga G, Ikeda T, Masuda T, Motokawa H, Yamashita T, Takamatsu K, Misumi Y, Ueda M, Matsui H, Senju S, Ando Y. Inflammatory state exists in familial amyloid polyneuropathy that may be triggered by mutated transthyretin. *Sci Rep*. 査読有, 2017, 1579.

DOI: 10.1038/s41598-017-01775-4.

Inoue Y, Ueda M, Tasaki M, Takeshima A,

Nagatoshi A, Masuda T, Misumi Y, Kosaka T, Nomura T, Mizukami M, Matsumoto S, Yamashita T, Takahashi H, Kakita A, Ando Y. Sushi repeat-containing protein 1: a novel disease-associated molecule in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 査読有, 2017, 605-617.

DOI: 10.1007/s00401-017-1720-z

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.* 査読有, 2017, 604-608.

DOI: 10.1002/ana.24914.

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.* 査読有, 2017, 24-29.

DOI: 10.1080/13506129.2016.1276440.

Suenaga G, Ikeda T, Komohara Y, Takamatsu K, Kakuma T, Tasaki M, Misumi Y, Ueda M, Ito T, Senju S, Ando Y. Involvement of Macrophages in the Pathogenesis of Familial Amyloid Polyneuropathy and Efficacy of Human iPS Cell-Derived Macrophages in Its Treatment. *PLoS One.* 査読有, 2016, e0163944.

DOI: 10.1371/journal.pone.0163944.

〔学会発表〕(計3件)

Misumi Y, Oshima T, Ueda M, Yamashita T, Tasaki M, Masuda T, Obayashi K, Ando Y. Occurrence factors and clinical picture of iatrogenic transthyretin amyloidosis after domino liver transplantation. The XVth International Symposium on Amyloidosis. 2016, 7月13-16日, Uppsala, Sweden

Misumi Y, Kinoshita Y, Nomura T, Ueda M, Teruaki Masuda, Yamashita T, Ando Y. Effects of fibroblasts on the morphology of transthyretin amyloid deposition. The XXIII World Congress of Neurology, 2017, 9月16-21日, 京都

Misumi Y, Masuda T, Ueda M, Yamashita T, Ando Y. Noninvasive screening method for ATTRm amyloidosis by using fat ultrasonography. The XVIth International Symposium on Amyloidosis, 2018, 3月26-29日, 熊本

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