

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08987

研究課題名(和文) 高齢者の消化管出血を来す新疾患EFEMP1アミロイドーシスの病態解明と発症予測

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenesis and diagnostic method of age-related EFEMP1 amyloidosis

研究代表者

田崎 雅義 (Tasaki, Masayoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・助教

研究者番号：50613402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドーシスはタンパク質がアミロイド線維へと変化し、諸臓器に沈着することで臓器障害を引き起こす疾患群である。我々は、新規アミロイド原因タンパク質、EFEMP1を同定したが、本アミロイドーシスの病態は不明なままである。本研究では、EFEMP1アミロイドーシスの病態の一端を明らかにした。EFEMP1アミロイドの沈着頻度・沈着量は加齢とともに増加する。特に消化管や肺で高頻度に認める。EFEMP1のC末端領域がアミロイド形成能が高い。本アミロイド沈着部位に多数の分泌タンパク質が存在する。本アミロイドはコンゴールレッド染色での染色性が乏しく、FSB染色と免疫染色が病理診断に有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規アミロイド原因タンパク質としてEFEMP1を同定し、本アミロイドーシスの病態の一端を明らかにした。これまで、長年見過ごされていた病態を解明できたことで、本研究の成果は、今後の治療法や検査法の開発に繋がると考えられる。また、本研究成果が評価され、EFEMP1は新型のアミロイド原因タンパク質として、国際アミロイドーシス学会のアミロイド分類委員会より承認を得た(*Benson et al., Amyloid 2020)。アミロイドーシス研究において、新たなアミロイド原因タンパク質を見出したことは極めて重要な成果であり、アミロイド形成メカニズムを明らかにするのに役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Amyloidosis is a group of disorders characterized by the deposition of amyloid fibrils in extracellular space. We newly identified EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) as a novel amyloid precursor protein. However, the pathogenesis is not fully understood. In this study, we investigated the pathogenesis of novel EFEMP1 amyloidosis. Our study revealed the following findings. 1) The occurrence and amount of EFEMP1 amyloid increased with age in GI tract, lung and bladder. 2) C-terminal region of EFEMP1 formed nonbranching fibrils. 3) Many proteins were identified from amyloid-laden tissues by mass spectrometry. 4) FSB staining and immunohistochemistry with anti EFEMP1 antibodies are superior to detect EFEMP1 amyloid deposits in tissues.

研究分野：検査医学、老年医学、脳神経内科学

キーワード：アミロイドーシス アミロイド 老化 EFEMP1 静脈

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可溶性のタンパク質がアミロイド線維へと変化し、諸臓器に沈着することで臓器障害を引き起こす疾患群の総称である。これまでに、アミロイドを形成するタンパク質は、**35** 種以上報告されている。しかしながら、今尚、原因タンパク質が不明のアミロイドも存在する。我々は、原因不明の消化管出血を来し、消化管に重度のアミロイド沈着を認める高齢患者を経験した。質量分析装置を用いて、本アミロイドの構成成分を解析した結果、**EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1)** 由来のペプチドが多量に検出された。**EFEMP1** は過去にアミロイド原因タンパク質としての報告はなく、新規のアミロイド原因タンパク質であることが明らかとなった。しかしながら、これまで見逃されていたアミロイドーシスであるため、本 **EFEMP1** アミロイドーシスの病態は不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、**EFEMP1** アミロイドーシスの病態を明らかにすること、および診断マーカーの開発に繋がる知見を得ることを目的とし、研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) EFEMP1 アミロイドーシスの病理学的解析

60 歳以上の全身剖検組織 (心臓、腎臓、消化管、肺、膀胱など) を対象に、コンゴレッド染色および抗 EFEMP1 抗体を用いた免疫組織化学染色を用いて、EFEMP1 アミロイドの沈着頻度および沈着量を検討した。加えて、下肢静脈瘤患者の静脈組織を対象に、同様に、EFEMP1 アミロイドの沈着頻度を検討した。

EFEMP1 アミロイド沈着組織を対象に、コンゴレッド染色、FSB 染色、チオフラビン T 染色を行い、各種アミロイド染色法の検査法としての有用性を検討した。

(2) EFEMP1 アミロイドの線維形成能および毒性の評価

EFEMP1 由来ペプチド (N 末端領域、C 末端領域) を作成し、*in vitro* におけるアミロイド線維形成能を電子顕微鏡下で評価した。

作成した EFEMP1 の C 末端由来のアミロイド線維をヒト臍帯静脈内皮細胞株 (HUVEC) に添加し、MTS アッセイや Tube formation assay により、EFEMP1 アミロイドの細胞へ与える影響を評価した。

(3) EFEMP1 アミロイドーシスのバイオマーカー探索

EFEMP1 アミロイドの沈着部位に含まれる構成成分を明らかにするために、ホルマリン固定組織切片をコンゴレッド染色後、laser microdissection によりアミロイド陽性部位を分取した。その後、トリプシン消化によるペプチド化を行い、LC-MS/MS を用いて測定、解析した。コントロールとして、EFEMP1 アミロイド沈着を認めない病理組織を用いた。

(4) EFEMP1 アミロイドの沈着様式の検討

ホルマリン固定病理組織切片からアミロイドを抽出し、各種抗 EFEMP1 抗体 (N 末端、C 末端) を用いたウエスタンブロットングによりアミロイドの沈着様式を解析した。さらに、これら各種抗 EFEMP1 抗体を用いた免疫組織化学染色も実施した。

4. 研究成果

(1) EFEMP1 アミロイドーシスの病理学的解析

60 歳以上の剖検組織を用いた EFEMP1 アミロイドの沈着頻度の検討において、大腸、小腸、胃、肺および膀胱の静脈に高頻度に EFEMP1 アミロイドの沈着を認めることを明らかにした。さらに、その沈着頻度は、年齢とともに増加することが明らかとなった。また、EFEMP1 アミロイドの沈着量も、年齢とともに増加することがわかった。EFEMP1 アミロイドを認めた患者においては、前述の臓器以外に膵臓、脾臓などの静脈にも EFEMP1 アミロイドが沈着することを突き止めた。

一方で、下肢静脈瘤を発症した患者の下肢静脈組織において、EFEMP1 アミロイドの沈着を検討した結果、消化管や肺などに比べ、沈着頻度は低く、かつ沈着量もわずかであることがわかった。

EFEMP1 アミロイドーシス症例を蓄積する中で、結腸癌患者の手術病理組織から偶発的に EFEMP1 アミロイドを同定し、国際英文誌に報告した (Tasaki et al., *Amyloid* 2021)。

本アミロイドのコンゴレッド染色像は、他のアミロイドーシスのアミロイドと比べ弱陽性であり、これまで本アミロイドが同定されなかった一因と考えられた。

EFEMP1 アミロイドーシスにおける病理学的な診断精度の向上を目指し、各種アミロイド染色法の検討を実施した。その結果、コンゴレッド染色やチオフラビン T 染色に比べ、FSB 染色が本アミロイドの検出に優れることがわかった。抗 EFEMP1 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色を併用することでさらに EFEMP1 アミロイドを検出しやすくなることがわかった。

(2) EFEMP1 アミロイドの線維形成能および毒性の評価

EFEMP1 由来の各種領域のペプチド(N末端、C末端)を作製し、*in vitro* でアミロイド形成能を評価した結果、C末端由来ペプチドが高いアミロイド形成能を有していた。

EFEMP1 C末端ペプチドから作成したアミロイドは、HUVEC に対して濃度依存的に毒性を誘導した。

(3) EFEMP1 アミロイドーシスのバイオマーカー探索

アミロイド沈着部位の LC-MS/MS を用いた解析の結果、アミロイド共存蛋白質として知られている apolipoprotein E、serum amyloid P、apolipoprotein AIV や vitronectin に加え、多数の候補蛋白質が同定できた。バイオマーカーの候補として、組織沈着可溶性タンパク質に着目し、コントロール群と比較した結果、apolipoprotein E、apolipoprotein AIV、clusterin、補体群、AMBp などが多く患者組織から検出された。

(4) EFEMP1 アミロイドの沈着様式の検討

病理組織から EFEMP1 アミロイドを抽出し、LC-MS/MS で解析した結果、EFEMP1 の C 末端領域由来ペプチドが多数検出された。

EFEMP1 アミロイドを病理組織から抽出し、各種 EFEMP1 抗体(N末端認識抗体、C末端認識抗体)を用いたウエスタンブロッティングを実施した結果、10kDa 付近に C 末端認識抗体に反応する EFEMP1 由来のバンドが認められた。EFEMP1 は約 55kDa の蛋白質であることから、断片化した C 末端領域の EFEMP1 が主体となりアミロイドを形成している可能性が高いことがわかった。

各種 EFEMP1 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、C 末端認識抗体や市販のモノクローナル抗体がアミロイドと良好な反応性を持つことがわかった。

本研究で得られた EFEMP1 アミロイドーシスの知見をまとめて、英文誌に報告した (Tasaki et al., *J Pathol* 2019)。

(5) EFEMP1 アミロイドを探索する過程で得られた新たな知見

EFEMP1 アミロイドの全身分布を調べる中で、腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯では、EFEMP1 アミロイドの沈着は認めなかったものの、Apolipoprotein AI 由来のアミロイドが沈着していることを明らかにし、本疾患との関連をまとめ、国際英文誌に報告した (Tasaki et al., *Amyloid* 2021)。

EFEMP1 アミロイドの LC-MS/MS 解析を実施する中で、複数の症例において、過去に報告のない、新規アミロイドの候補タンパク質を同定した。さらに、新規アミロイド候補タンパク質が試験管内でアミロイド線維様構造をとることが明らかとなった。本蛋白質は、EFEMP1 に次ぐ、新規アミロイド原因タンパク質として考えられるため、引き続き検討を行う予定である。

本研究で得られた EFEMP1 アミロイドーシスに関する知見をまとめ、他の老化関連アミロイドーシスとあわせて考察した総説を国際英文誌に投稿中である。

(6) その他

本研究により、EFEMP1 アミロイドーシスの病態の一端を明らかにした。本成果が認められ、EFEMP1 は新型のアミロイド原因タンパク質として、国際アミロイドーシス学会のアミロイド分類委員会より承認を得た (*Benson et al., *Amyloid* 2020)。

*Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Sipe JD, Westermarck P. Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*. 2020;27:217-222.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tasaki Masayoshi, Okada Masamitsu, Yanagisawa Akihiro, Nomura Toshiya, Matsushita Hiroaki, Ueda Akihiko, Inoue Yasuteru, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Yamashita Taro, Nakamura Takayuki, Miyamoto Takeshi, Obayashi Konen, Ando Yukio, Ueda Mitsuharu	4. 巻 28
2. 論文標題 Apolipoprotein AI amyloid deposits in the ligamentum flavum in patients with lumbar spinal canal stenosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 107 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13506129.2020.1858404	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 Tsukamoto Yoshitane, Tasaki Masayoshi, Fujii Hitoshi, Tsujie Masaki, Ueda Mitsuharu	4. 巻 28
2. 論文標題 EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 amyloid incidentally found in surgically resected specimens of Colon cancer: a case report emphasising on an unrecognised type	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 136 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13506129.2020.1841624	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 Tasaki M, Milani P, Foli A, Verga L, Obici L, Basset M, Bozzola M, Ferraro G, Nuvolone M, Morbini P, Capello G, Ueda M, Obayashi K, Paulli M, Ando Y, Merlini G, Palladini G, Lavatelli F.	4. 巻 134
2. 論文標題 Simple, reliable detection of amyloid in fat aspirates using the fluorescent dye FSB: prospective study in 206 patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 320-323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019000420	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 該当する

1. 著者名 Tasaki M, Ueda M, Hoshii Y, Mizukami M, Matsumoto S, Nakamura M, Yamashita T, Ueda A, Misumi Y, Masuda T, Inoue Y, Torikai T, Nomura T, Tsuda Y, Kanenawa K, Isoguchi A, Okada M, Matsui H, Obayashi K, Ando Y.	4. 巻 247
2. 論文標題 A novel age-related venous amyloidosis derived from EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 444 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5203	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 Swuec P, Lavatelli F, Tasaki M, Pissoni C, Rognoni P, Maritan M, Brambilla F, Milani P, Mauri P, Camilloni C, Palladini G, Merlini G, Ricagno S, Bolognesi M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cryo-EM structure of cardiac amyloid fibrils from an immunoglobulin light chain AL amyloidosis patient.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09133-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 田崎雅義、安東由喜雄	4. 巻 68
2. 論文標題 オミックス検査学における質量分析の役割-現状と展望-(3) 各種質量分析装置の特徴を活かした多角的なアミロイドーシス診断 現状と課題	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床病理	6. 最初と最後の頁 614-620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 田崎雅義、大林光念、安東由喜雄、植田光晴	4. 巻 68
2. 論文標題 アミロイドーシスにおける病理学的検査のUp to date	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床病理	6. 最初と最後の頁 768-773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 田崎雅義、大林光念、安東由喜雄、植田光晴	4. 巻 50
2. 論文標題 新規アミロイド原因蛋白質EFEMP1の同定および本分子の疾患との関連	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 124-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masayoshi Tasaki, Mitsuharu Ueda, Yoshinobu Hoshii, Aito Isoguchi, Toshiya Nomura, Masamitsu Okada, Yasuteru Inoue, Teruaki Masuda, Yohei Misumi, Taro Yamashita, Konen Obayashi, Yukio Ando
2. 発表標題 EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1: A novel age-related amyloid precursor protein
3. 学会等名 The XVII International Symposium On Amyloidosis
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田崎雅義、植田光晴、大林光念、安東由喜雄
2. 発表標題 EFEMP1アミロイドの沈着頻度および至適病理学的診断法の検討
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田崎雅義、植田光晴、星井嘉信、磯口藍斗、山下太郎、大林光念、安東由喜雄
2. 発表標題 質量分析装置を用いた新規アミロイド原因蛋白質、EFEMP1の同定
3. 学会等名 第59回日本臨床化学学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田崎雅義、磯口藍斗、植田光晴、星井嘉信、岡田匡充、野村隼也、井上泰輝、増田曜章、三隅洋平、山下太郎、大林光念、安東由喜雄
2. 発表標題 EFEMP1 C末端領域のアミロイド形成能および細胞毒性
3. 学会等名 第7回日本アミロイドーシス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田崎雅義
2. 発表標題 アミロイドーシスの診断法開発と臨床応用
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayoshi Tasaki, Francesca Lavatelli, Angelo M. Minnella, Marco Di Girolamo, Elena Antoniazzi, Margerita Bozzola, Giovanni Ferraro, Mario Nuvolone, Giovanni Palladini, Konen Obayashi, Yukio Ando, Giampaolo Merlini, Laura Obici
2. 発表標題 Characteristics of TTR fragmentation pattern in ATTR patients carrying various mutations
3. 学会等名 XVIth International Symposium on Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 安東由喜雄、磯口藍斗、一木裕子、井上泰輝、植田光晴、大林光念、岡田匡充、城野博史、田崎雅義、野村隼也、増田曜章、松下博昭、三隅洋平、山下太郎、渡邊礼美	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学と看護社	5. 総ページ数 136
3. 書名 21世紀の疾患：神経関連アミロイドーシス	

〔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
研究分担者	安東 由喜雄 (Ando Yukio) (20253742)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	大林 光念 (Obayashi Konen) (90361899)	熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・教授 (17401)	
研究分担者	山下 太郎 (Yamashita Taro) (90381003)	熊本大学・病院・非常勤診療医師 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
イタリア	University of Pavia		