

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07824

研究課題名(和文) プロテオミクスによる共存蛋白を標的とした遺伝性TTR型脳アミロイド血管症の解析

研究課題名(英文) Proteomics analysis for amyloid in hereditary ATTR cerebral amyloid angiopathy targeting coexistence protein

研究代表者

山下 太郎 (Yamashita, Taro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：90381003

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)：我々は、ブレパレート標本から、レーザーマイクロダイセクション(LMD)により関心領域を採取し、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析器(LC-MS/MS)で解析する、アミロイドのプロテオミクス解析法を確立した。本研究では、我々が疾患概念を提唱した遺伝性ATTR脳アミロイド血管症患者の剖検脳からアミロイドを採取し、網羅的解析によりアミロイド前駆蛋白質と共存蛋白質のプロファイリングを行い、アミロイド沈着機構を規定する因子を探索した。69例の解析を実施し、アミロイド前駆蛋白質と共存蛋白質のプロファイル解析を実施した。結果は英語論文をはじめ、国際学会、国内学会総会で発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、遺伝性TTRアミロイドーシスにおいては、末梢神経障害が主体であり、中神経症候を来すことは極めてまれと考えられてきた。しかし、我々の研究により、Y114C型変異を有する患者では、家族性に脳アミロイド血管症による致死性脳葉型脳出血をきたすことが明らかとなってきた。さらに、患者数が最多であるV30M型においても、認知機能低下など中枢神経症候がみられることが明らかとなってきた。本研究では、我々がシステム化したプロテオミクス解析手段を用い、本症のアミロイドを網羅的に解析し、脳血管へのアミロイド沈着機構と病態発現機序を探った。この研究結果は、本症の新たな治療法の開発に大きく役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established analytical method of deposited amyloid by liquid chromatograph - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), sampling an area of interest by laser micro die section (LMD). By the LMD-LC-MS/MS, we obtained amyloid protein from the autopsy brain of the patients with hereditary ATTR (Y114C/ V30M) cerebral amyloid angiopathy (ATTR type CAA), and performed profiling of amyloid precursor protein and the coexistence protein cyclopedically. We conducted LMD-LC-MS/MS analysis and profiling for 69 cases of ATTR type CAA analyzing amyloid precursor protein and the coexistence protein. We profiled and searched for highly concentrated or specifically presented proteins in amyloid deposited in cerebral blood vessels with proteomic analysis. We presented the results in English articles and international or domestic meetings.

研究分野：脳神経内科

キーワード：アミロイド 脳血管症 トランスサイレチン プロテオミクス解析 中枢神経症候

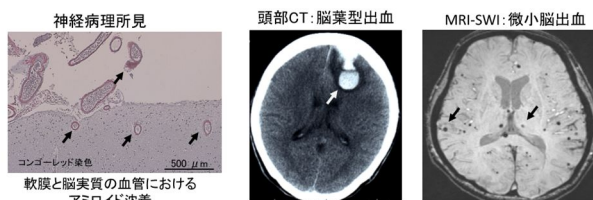
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、遺伝性 TTR アミロイドーシスにおいては、末梢神経障害が主体であり、中神経症候を来すことは極めてまれと考えられてきた。しかし、我々の研究により、Y114C 型変異を有する患者（遺伝性 ATTR 脳アミロイド血管症）では、家族性に脳アミロイド血管症による致死性脳葉型脳出血をきたすことが明らかとなってきた。さらに、患者数が最多である V30M 型においても、認知機能低下など中枢神経症候がみられることが明らかとなってきた。

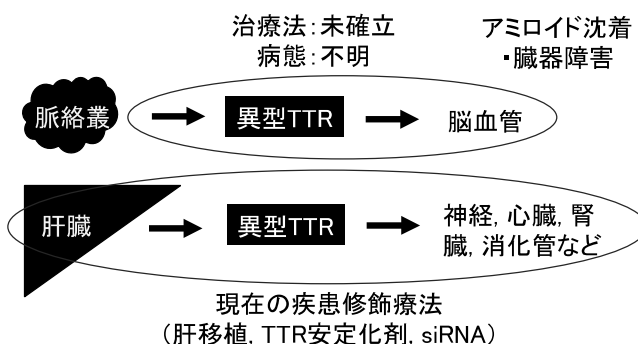
ATTR Y114C型脳アミロイド血管症

- 脳アミロイド血管症による中枢神経症候を主徴
ATTR型アミロイドーシス中唯一の家族性脳出血型
本邦唯一の遺伝性脳アミロイド血管症
- 臨床症候: 致死性脳葉型出血, 急速進行性認知症, 変動する意識
- 治療: 肝移植により, 生命予後延長, 脳出血減少
肝移植後に緩徐進行性認知症などの問題



2. 研究の目的

本研究では、我々がシステム化したプロテオミクス解析手段を用い、遺伝性 ATTR 脳アミロイド血管症のアミロイドを網羅的に解析し、脳血管へのアミロイド沈着機構と病態発現機序を探る。この研究結果は、本症の新たな治療法の開発に大きく役立つと考えられる。



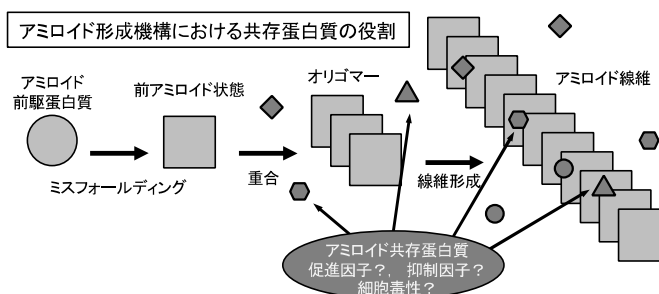
3. 研究の方法

1) プロテオミクスによる脳アミロイド血管症における沈着蛋白質のプロファイリング

プロテオミクス解析法の発展により、プレパラート上の標本から、レーザーマイクロダイセクション(LMD)により関心領域を採取し、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析器(LC-MS/MS)による解析で、蛋白質を同定することが可能となり、我々は本手法によるアミロイドの解析法を確立した(Tasaki, Yamashita et al. Int J Cardiol 2013, Tasaki Yamashita et al. Amyloid 2017)。LMD-LC-MS/MS手法により、Y114C型やV30M型患者の剖検脳組織においてアミロイドを採取し、網羅的解析によりアミロイド前駆蛋白質と共存蛋白質のプロファイリングを行い、アミロイド沈着機構を規定する因子を探索する。

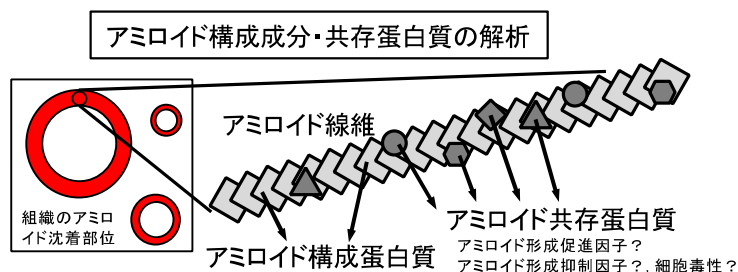
1-A) アミロイド前駆蛋白質の解析:

TTR アミロイドーシスにおいて、沈着したアミロイドには異型 TTR のみならず野生型 TTR も含まれることが知られている。野生型 TTR は異型 TTR よりアミロイド形成性は低い。しかし、80 以上の高齢者において遺伝子変異がなくても 10-20% に野生型 TTR アミロイド沈着(老人性全身性アミロイドーシス)が見られることが知られている。また、進行期に



肝移植を受けた遺伝性 TTR アミロイドーシス患者において、移植肝から産生される野生型 TTR による全身性アミロイドーシスが進行する例も知られている。本研究の LMD-LC-MS/MS 解析では、脳血管に沈着したアミロイドに異型 TTR に加えて野生型 TTR がどの程度存在するか解析することで、異型 TTR のアミロイド形成性や、移植肝(野生型)や脈絡叢(野生型と変異型)から産生された TTR の関与について明らかにする。

I-B) アミロイド共存蛋白質の解析：近年アミロイド沈着の鍵を握るアミロイド線維に共存する蛋白質（アミロイド共存蛋白質）が注目されている。これまでに、血清アミロイドP (SAP) や Apo E、クラステリン、SRPX などがアミロイド共存蛋白質として報告されている (Inoue, Yamashita, et al.



Acta Neuropathologica 2017)。特に、SAP はアミロイド線維形成を促進する因子と判明し、SAP を減少させることでアミロイドを不安定化、除去する特異抗体による臨床治験が海外で開始されている。また、アミロイド共存蛋白質には、生体防御反応としてアミロイド沈着に抑制的に働く蛋白質が存在する可能性もある。本症におけるアミロイド共存蛋白質を明らかにし、これらを標的とした治療法開発に資する。

4 . 研究成果

我々は、遺伝性 ATTR 脳アミロイド血管症患者の剖検脳の、プレパラート標本から、レーザーマイクロダイセクション (LMD) により関心領域を採取し、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析器 (LC-MS/ MS) で解析した。沈着したアミロイドの網羅的解析によりアミロイド前駆蛋白質と共存蛋白質のプロファイリングを行い、アミロイド沈着機構を規定する因子を探索した。69 例の解析を実施し、アミロイド前駆蛋白質と共存蛋白質のプロファイル解析を実施した。結果は英語論文をはじめ、国際学会、国内学会総会で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5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 Nomura Toshiya, Ueda Mitsuharu, Tasaki Masayoshi, Misumi Yohei, Masuda Teruaki, Inoue Yasuteru, Tsuda Yukimoto, Okada Masamitsu, Okazaki Takahiro, Kanenawa Kyosuke, Isoguchi Aito, Nakamura Makoto, Obayashi Konen, Shinriki Satoru, Matsui Hiroataka, Yamashita Taro, Ando Yukio | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 New simple and quick method to analyze serum variant transthyretins: direct MALDI method for the screening of hereditary transthyretin amyloidosis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Orphanet Journal of Rare Diseases | 6. 最初と最後の頁 1-2 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13023-019-1100-y | 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 Okada Masamitsu, Misumi Yohei, Masuda Teruaki, Takashio Seiji, Tasaki Masayoshi, Matsushita Hiroaki, Ueda Akihiko, Inoue Yasuteru, Nomura Toshiya, Nakajima Makoto, Yamashita Taro, Shinriki Satoru, Matsui Hiroataka, Tsujita Kenichi, Ando Yukio, Ueda Mitsuharu | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Plasma growth differentiation factor 15: a novel tool to detect early changes of hereditary transthyretin amyloidosis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 ESC Heart Failure | 6. 最初と最後の頁 1178 ~ 1185 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.13176 | 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 Nakase Taku, Yamashita Taro, Matsuo Yoshimasa, Nomura Toshiya, Sasada Keiko, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Takamatsu Kotaro, Oda Seitaro, Furukawa Yutaro, Obayashi Konen, Matsui Hiroataka, Ando Yukio, Ueda Mitsuharu | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 Hereditary ATTR Amyloidosis with Cardiomyopathy Caused by the Novel Variant Transthyretin Y114S (p.Y134S) | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Internal Medicine | 6. 最初と最後の頁 2695 ~ 2698 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2456-18 | 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 Yamashita Taro, Ohnishi Koji, Ueda Mitsuharu, Masuda Teruaki, Inoue Yasuteru, Misumi Yohei, Ueda Akihiko, Obayashi Konen, Takeya Motohiro, Ando Yukio | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Transthyretin amyloid-related cerebral angiitis after liver transplantation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Amyloid | 6. 最初と最後の頁 11 ~ 12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13506129.2019.1583179 | 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 Yamashita Taro, Ueda Mitsuharu, Nomura Toshiya, Okazaki Takahiro, Okada Masamitsu, Tsuda Yukimoto, Inoue Yasuteru, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Takamatsu Kotaro, Obayashi Konen, Inomata Yukihiro, Hibi Taizo, Ando Yukio | 4. 巻 93 |
| 2. 論文標題 Natural history and long-term effects of variant protein reduction in non-V30M ATTR amyloidosis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neurology | 6. 最初と最後の頁 714 ~ 716 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.00000000000008320 | 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 Yamashita Taro, Ueda Mitsuharu, Misawa Sonoko, Inoue Yasuteru, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Takamatsu Kotaro, Obayashi Konen, Kuwabara Satoshi, Ando Yukio | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Changes in nerve excitability indices in hereditary transthyretin amyloidosis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Amyloid | 6. 最初と最後の頁 9 ~ 10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13506129.2019.1582480 | 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 Ando Y, Yamashita T, Misumi Y, Nomura T, Sasada K, Okada M, Inoue Y, Masuda T, Ueda A, Takamatsu K, Obayashi K, Matsui H, Naiki H, Ueda M. | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 Clinical, pathological, and proteomic characteristics of newly diagnosed amyloidosis patients: Experience from a single referral center in Japan | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clin Neurol Neurosci | 6. 最初と最後の頁 1 |
| 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 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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 山下太郎, 植田光晴, 野村隼也, 岡田匡充, 田崎雅義, 増田曜章, 三隅洋平, 植田明彦, 高松孝太郎, 井上泰輝, 大林光念, 安東由喜雄 |
| 2. 発表標題 アミロイドーシス患者における神経症候の頻度 |
| 3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yamashita T, Ueda M, Nomura T, Okada M, Tasaki M, Masuda T, Misumi Y, Akihiko U, Takamatsu K, Inoue Y, Obayashi K, Ando Y |
| 2. 発表標題 Establishment of Amyloidosis Medical Practice Center in Kumamoto University Hospital |
| 3. 学会等名 Global Patient Advocacy Leaders Summit. (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山下太郎, 植田光晴, 野村隼也, 岡崎孝広, 岡田匡充, 磯口藍斗, 田崎雅義, 津田幸元, 井上泰輝, 増田曜章, 高松孝太郎, 三隅洋平, 大林光念, 安東由喜雄 |
| 2. 発表標題 野生型ATTR アミロイドーシスにおける診断のための生検部位の検討 |
| 3. 学会等名 第60回日本神経学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山下太郎, 植田光晴, 野村隼也, 磯口藍斗, 田崎雅義, 増田曜章, 三隅洋平, 植田明彦, 高松孝太郎, 井上泰輝, 大林光念, 安東由喜雄 |
| 2. 発表標題 熊本大学病院アミロイドーシス診療センター診療実績報告 |
| 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 山下太郎 |
| 2. 発表標題 遺伝性ATTR アミロイドーシス (FAP) に対する早期治療の必要性-自律神経症状に対するsiRNAの有効性・安全性 |
| 3. 学会等名 第72回 日本自律神経学会総会 ランチョンセミナー1 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

アミロイドーシス診療支援サービス
<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/amyloidunit/>

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 | 増田 曜章 (Masuda Teruaki) (50464459) | 熊本大学・病院・助教 (17401) | |
| 研究 分担者 | 植田 光晴 (Ueda Mitsuharu) (60452885) | 熊本大学・病院・教授 (17401) | |
| 研究 分担者 | 三隅 洋平 (Misumi Yohei) (80625781) | 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (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 |
|---------|---------|
|---------|---------|