

令和 4 年 5 月 8 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：19K07869

研究課題名（和文）細胞外マトリックスの老化が解き明かすトランスサイレチンアミロイドーシスの真の病態

研究課題名（英文）Analysis of extracellular matrix aging in the pathogenesis of TTR amyloidosis

研究代表者

三隅 洋平（Misumi, Yohei）

熊本大学・病院・講師

研究者番号：80625781

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：細胞外マトリックスがアミロイドーシスの病態の鍵を握る極めて重要な組織環境であることから、線維芽細胞の細胞老化によるTTR分解除去能、アミロイド形成阻止能の変化を解析するために、生体内のECMを模したコラーゲンゲルおよび線維芽細胞株による三次元培養系での解析を行った。凝集体化させたTTRおよび断片化TTRが線維芽細胞内部に多量のアミロイド線維の取り込まれ、アミロイドとリソソームマーカーの一部の共局在が認められた。アミロイドが大量に取り込まれた線維芽細胞においてはリソソームマーカーの減少、線維芽細胞内構造の著明な老化関連の変化が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスサイレチンアミロイドーシスにおいてアミロイド線維形成と除去がダイナミックに起こっている細胞外マトリックスの主要な構成細胞である線維芽細胞は、非線維性トランスサイレチン凝集体を細胞内に取り込み分解し保護的に働くが、既にアミロイド線維となったトランスサイレチンは分解し難く、細胞内蓄積および細胞老化および細胞障害を誘導することが示唆され、アミロイドーシスの病態解明に有用な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）： Extracellular matrix is an extremely important tissue environment that on the pathogenesis of amyloidosis. In order to analyze changes in TTR degradation-removing ability and amyloid formation-inhibiting ability due to cell aging of fibroblasts, we performed analysis in a three-dimensional culture system using collagen gel and fibroblast lines that imitated ECM in vivo. Large amount of amyloid fibrils, aggregated TTR, and fragmented TTR were deposited inside fibroblasts, and co-localization of amyloid and lysosomal markers was observed. Decreased lysosomal markers and marked aging-related changes in intracellular structure were observed in fibroblasts with a large amount of amyloid uptake.

研究分野：アミロイドーシスの病態解析

キーワード：アミロイド 細胞外マトリックス 線維芽細胞 トランスサイレチン 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは、種々の前駆蛋白質がその本来の構造を失って重合し、不溶性のアミロイド線維を形成して機能障害を引き起こす疾患群である。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および老人性全身性アミロイドーシスは、それぞれ変異型および野生型トランスサイレチンがアミロイド化して全身臓器を障害する致死的疾患であり、高齢者人口の増加に伴い両疾患の臨床的重要性は急速に高まっている。

トランスサイレチンは主に肝臓で産生され、四量体を形成してレチノールおよびサイロキシン(T₄)の輸送を担う血清蛋白質であるが、両疾患においてトランスサイレチンは老化に伴ってアミロイド化し、細胞外マトリックスに沈着する。

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では遺伝子変異によりトランスサイレチンの四量体構造が不安定化し、単量体への解離、重合(アミロイド線維形成)が促進され、末梢神経、心臓、消化管、腎臓、腱・靭帯を中心に沈着して多臓器障害を引き起こす。変異型トランスサイレチンは野生型トランスサイレチン同様に生下時より血中に存在し機能し続けるが、成人期以降(平均約50歳)にアミロイド化するようになる。

一方、老人性全身性アミロイドーシスにおいては、遺伝子変異のない野生型トランスサイレチンが主に高齢男性の心筋組織を中心に沈着し、致死的な心不全を生じる。本来は安定な四量体構造をとる野生型トランスサイレチンがなぜアミロイド線維を形成するかは不明である。

老化がトランスサイレチンアミロイドーシスの発症において極めて重要な因子であることは明らかであるが、老化による如何なる病態が本症の発症を決定づけているのか、そのメカニズムは未だ解明されていない。

細胞外マトリックスなどの組織環境はトランスサイレチンアミロイドーシスにおいて重要な役割を果たしていると考えられる。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においては肝移植療法により、異型トランスサイレチンの産生を遮断すると、臓器・組織に沈着したアミロイドが経時的に減少し、変異型トランスサイレチンの野生型トランスサイレチンに対する比率が経時的に減少することから、アミロイド沈着部位である細胞外マトリックスでは、アミロイド線維形成と除去がダイナミックに起こっているものと推定されている。

細胞外マトリックスは、線維芽細胞、マクロファージをはじめとする間質系細胞によって絶えずリモデリングされ、恒常性が維持されていることから、トランスサイレチンアミロイドーシスの病態におけるアミロイド線維形成、除去においてはこれらの細胞が重要な役割を果たしていると考えられるがその詳細な機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究は、トランスサイレチンアミロイドーシスにおいて、老化が決定的な発症規定因子であること、両疾患において細胞外マトリックスがアミロイド形成、分解において重要な組織環境であるという臨床病理学的根拠に立脚し、細胞外マトリックスの老化とアミロイド線維形成の関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

野生型トランスサイレチンおよび変異型(V30M)トランスサイレチンは、緩衝液に溶解させた後、酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)による酸性条件下でインキュベートして非線維性凝集体化させた。断片化トランスサイレチン(TTR81-127)は中性条件下でアミロイド線維形成した。

ヒト線維芽細胞をコラーゲン酸性溶液を使用した三次元培養下で、可溶性および非線維性凝集体化させた野生型トランスサイレチンおよび変異型(V30M)トランスサイレチン、アミロイド線維化させた断片化トランスサイレチン(TTR81-127)を加えて培養し、経時的に回収した。

コンゴ・レッド染色、免疫組織化学染色、蛍光免疫組織化学染色、電子顕微鏡、ウエスタンブロットティングにより線維芽細胞によるトランスサイレチンの分解除去能を解析した。また、各種トランスサイレチンによる線維芽細胞老化の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 可溶性トランスサイレチンに対する線維芽細胞の分解除去能

可溶性トランスサイレチン(野生型および変異型)をコラーゲンゲル内に添加し、線維芽細胞三次元培養を行い、10日間経時的にゲルを回収し、コンゴ・レッド染色、抗トランスサイレチン抗体を用いたウエスタンブロットティングによる解析では、三次元培養ゲル内トランスサイレチンの凝集体やアミロイド線維化や、蛋白量変化は認められなかったことから、線維芽細胞は可溶性のトランスサイレチンの分解・除去への関与は有意ではないことが示唆された。

(2) 非線維性トランスサイレチン凝集体に対する線維芽細胞の分解除去能

非線維性凝集体化させたトランスサイレチン(野生型および変異型)をコラーゲンゲル内に添加し、線維芽細胞三次元培養を行い、10日間経時的にゲルを回収後に解析を行い、三次元培養ゲル内トランスサイレチンの凝集体が線維芽細胞に多量に取り込まれ、多くはリソソームと共局在し(図1)、トランスサイレチン蛋白量は経時的に減少した(図2)ことから、線維芽細胞は非線維性トランスサイレチン凝集体を細胞内での分解・除去することが示唆された。

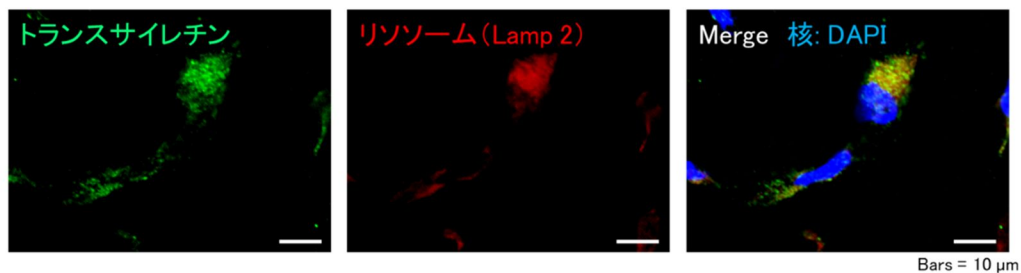


図1. 非線維性凝集体化させたトランスサイレチン(V30M)を添付したゲルの蛍光二重免疫染色

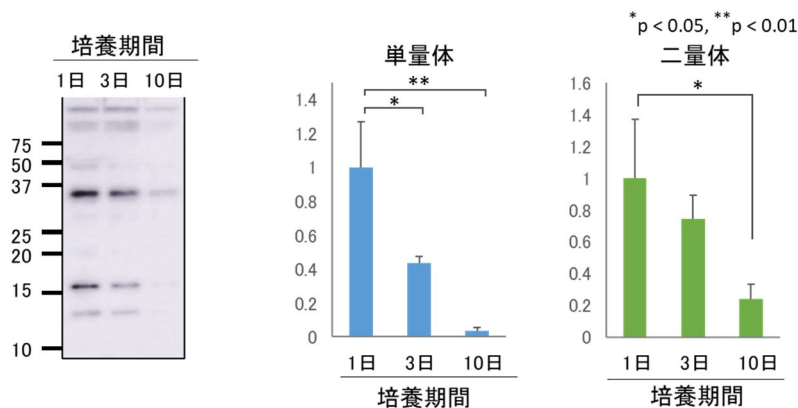


図2. 非線維性凝集体化させたトランスサイレチン(V30M)を添付したゲルのウエスタンブロッティング

(3) トランスサイレチンアミロイド線維に対する線維芽細胞の分解除去能

アミロイド線維化させた断片化トランスサイレチン(TTR81-127)をコラーゲンゲル内に添加し、線維芽細胞三次元培養を行い、10日間経時的にゲルを回収後に解析を行い、三次元培養ゲル内トランスサイレチンアミロイド線維は線維芽細胞に多量に取り込まれるものの(図3)、リソソームとは共局在せず、細胞は老化性変化を示し、トランスサイレチン蛋白量は経時的に有意な変化を示さず(図4)ことから、トランスサイレチンアミロイド線維の大部分は線維芽細胞により分解・除去されず、線維芽細胞の老化を誘導することが示唆された。

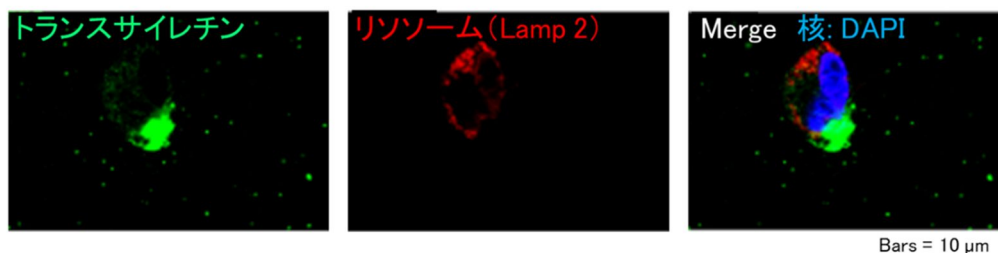


図3. トランスサイレチンアミロイド線維を添付したゲルの蛍光二重免疫染色

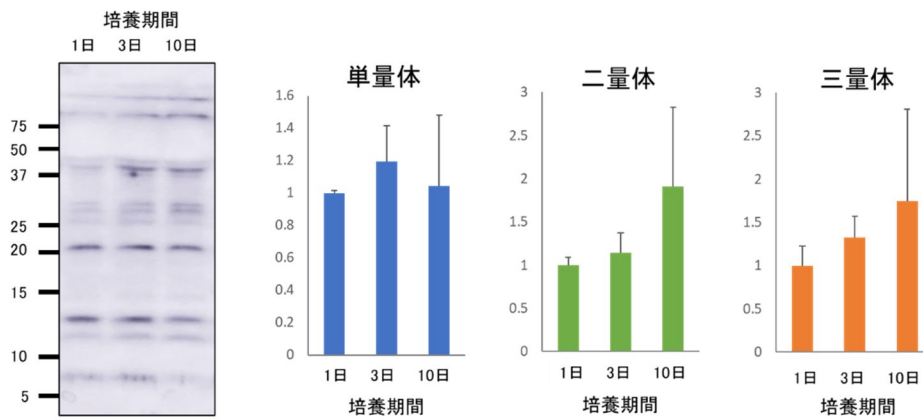


図 4. トランスサイレチンアミロイド線維(TTR81-127)を添付したゲルのウエスタンブロットティング

以上、線維芽細胞は非線維性トランスサイレチン凝集体を細胞内に取り込み分解し保護的に働くが、既にアミロイド線維となったトランスサイレチンは分解し難く、細胞内蓄積および細胞老化および細胞障害を誘導することが示唆され、アミロイドーシスの病態解明に有用な知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 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 Hirotaka, 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 Inoue Yasuteru, Ando Yukio, Misumi Yohei, Ueda Mitsuharu	4. 巻 22
2. 論文標題 Current Management and Therapeutic Strategies for Cerebral Amyloid Angiopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3869 ~ 3869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22083869	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 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 2020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 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.0000000000008320	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 Misumi Yohei, Ueda Mitsuharu, Masuda Teruaki, Tsuda Yukimoto, Nomura Toshiya, Okada Masamitsu, Inoue Yasuteru, Tasaki Masayoshi, Obayashi Konen, Yamashita Taro, Ando Yukio	4. 巻 93
2. 論文標題 Characteristics of acquired transthyretin amyloidosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e1587 ~ e1596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000008360	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三隅 洋平, 増田 曜章, 野村 隼也, 岡田 匡充, 植田 光晴, 安東 由喜雄, 山下 太郎
2. 発表標題 医原性トランスサイレチンアミロイドーシスの長期経過の検討
3. 学会等名 日本神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	井上 泰輝 (Inoue Yasuteru) (00806408)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員 (17401)	
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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	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