

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07320

研究課題名(和文) 新型アミロイドから迫る変形性膝関節症の病態解明および早期診断システムの構築

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenesis and diagnostic method in knee osteoarthritis related to a novel amyloid

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)・教授

研究者番号：50613402

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)：アミロイドーシスは、蛋白質がアミロイドを形成し、臓器障害を引き起こす疾患である。これまでに、42種類のアミロイド原因蛋白質が同定されているが、未だに原因不明のアミロイドも存在する。本研究では、変形性膝関節症に認める原因不明アミロイドの解析を行い、アミロイド原因蛋白質の候補を同定し、生化学的および病理学的特徴を明らかにした。アミロイド原因蛋白質の候補として、PLA2G2Aを同定した。in vitroにおいて、PLA2G2Aが線維様構造物を形成することがわかった。原因不明アミロイドの病理学的特徴を明らかにした。PLA2G2Aは、アミロイド共存蛋白質の可能性もあることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、変形性膝関節症に認められる原因不明アミロイドの候補蛋白質として、PLA2G2Aを同定した。これまで不明であったアミロイドの候補蛋白質を同定し得たことは、本疾患の病態を明らかにするうえで、大きな前進といえる。また、原因不明アミロイドの病理学的特徴を明らかにしたことで、他のアミロイドーシスとの鑑別法として活用できる可能性がある。さらに、PLA2G2Aはアミロイド共存蛋白質としての可能性も示され、アミロイドーシス全般の病態に関与しているかもしれない。本研究で得られた研究成果をベースに、詳細な検討がなされることで、変形性膝関節症やアミロイドーシスの病態解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Amyloidosis is a disease caused by amyloid deposits in various organs. Although 42 amyloid precursor proteins have been identified, amyloid derived from unknown origin still exists. In this study, we identified a candidate protein for amyloid and investigated its biochemical and pathological features in knee osteoarthritis. Our study revealed the following findings. 1) PLA2G2A was identified as a candidate amyloid precursor protein. 2) PLA2G2A formed fibril-like structures. 3) Novel amyloid deposits were well-stained with Congo red. 4) PLA2G2A has a potential as an amyloid associated protein.

研究分野：検査医学

キーワード：アミロイドーシス 変形性膝関節症 老化 新型アミロイド

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは可溶性の蛋白質が難溶性のアミロイド線維へと変化し、様々な臓器に沈着することで臓器障害を引き起こす難治性の疾患群である。アミロイドーシスの発症要因は様々で、老化、遺伝、炎症、血中での原因蛋白質濃度の増加などが挙げられる。アミロイドを形成する蛋白質は、トランスサイレチンやアミロイド ペプチドなどをはじめ、ヒトにおいて42種類以上報告されている。一方で、今尚、原因蛋白質が不明なアミロイドーシスも存在することが報告されている。そのため、原因不明アミロイドーシスの検査法や治療法を開発するためには、まず、原因不明アミロイドを形成する蛋白質の同定が急務とされている。我々は、これまでの検討で、変形性膝関節症患者の膝組織に、原因蛋白質不明のアミロイドが沈着していることを突き止めた。しかしながら、その原因蛋白質は未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、変形性膝関節症における原因不明アミロイドーシスから新規アミロイド原因蛋白質を同定し、本疾患の病態解明や検査法の開発に繋がる基礎検討を行うことを目的に研究を実施した。

## 3. 研究の方法

(1) アミロイドを形成する候補蛋白質の同定および検出ペプチド領域の検証

ホルマリン固定膝組織切片をコンゴ・レッド染色後、レーザーマイクロダイセクション(Laser micro dissection: LMD)によりアミロイド陽性部位を採取した。アミロイド沈着組織を含むチューブを、加温(98、90分)・超音波処理後、トリプシン消化(一晚)によりペプチド化し、質量分析装置(Liquid chromatography tandem mass spectrometry: LC-MS/MS)でアミロイド原因蛋白質の同定を試みた。アミロイド沈着を認めない(非アミロイド沈着)領域も同様の手法を用いて解析し、測定結果をアミロイド群と比較することで、アミロイドに特異的な蛋白質を検証した。さらに、同定された蛋白質の検出ペプチド領域を評価した。

(2) 原因不明アミロイドの病理学的評価

(1)で同定された候補蛋白質、phospholipase A2 group IIA (PLA2G2A)蛋白質に対する市販抗体を用いて、原因不明アミロイドの沈着を認めるホルマリン固定膝組織を対象とした、免疫組織化学染色を実施した。さらに、PLA2G2Aに対する抗血清も作成し、同様の手法を用いて、抗血清の染色性を評価した。また、原因不明アミロイドの病理組織での沈着様式をコンゴ・レッド染色により評価した。偏光顕微鏡下での観察も実施した。

(3) *in vitro*におけるアミロイド線維形成能の評価

リコンビナント PLA2G2A蛋白質を作成し、*in vitro*における PLA2G2A のアミロイド線維形成能を電子顕微鏡により構造学的に評価した。アミロイド線維形成能を評価するために、様々な条件下(pH、温度、振とうなど)で検討した。

(4) 各種アミロイドーシス患者組織のプロテオーム解析

各種アミロイドーシス患者の病理組織切片からアミロイド陽性部位を LMD で採取し、トリプシン消化後、LM-MS/MS で測定した。同定された蛋白質リストの中に、PLA2G2A が含まれているかを評価し、PLA2G2A のアミロイド共存蛋白質(アミロイド線維の沈着部位に共存する蛋白質)としての可能性を検証した。

## 4. 研究成果

(1) アミロイドを形成する候補蛋白質の同定および検出領域の検証

変形性膝関節症患者の膝組織に沈着する原因不明アミロイドを対象に、質量分析装置を用いて解析したところ、全例でアミロイド候補蛋白質として PLA2G2A を同定できた。同時に、アミロイド線維に共存することが知られている apolipoprotein E や clusterin などの共存蛋白質も検出できた。この結果から、アミロイドが正確に分取され、LC-MS/MS で解析できていることが示された。一方で、アミロイド非沈着領域の解析を実施したところ、PLA2G2A は検出されず、この結果から、PLA2G2A は、アミロイド沈着部位に特異的な蛋白質である可能性が示された。また、質量分析装置で同定された PLA2G2A のペプチド領域を解析した結果、p.31-53、p.58-73 および

p.105-120 の領域が検出されていることが明らかとなった。N 末端や C 末端の近傍のペプチド領域も検出されたため、特定領域のみではなく、蛋白質全体として本病態に関与している可能性が示された。

さらに、異なるタイプの LC-MS/MS (質量分析装置) を用いて原因不明アミロイドを解析したところ、これまでの結果と同様に PLA2G2A が検出できた。一方で、同定できた PLA2G2A 由来のペプチド数は限定的であった。

#### (2) 原因不明アミロイドの病理学的評価

原因不明のアミロイドを認めるホルマリン固定膝組織切片を対象に、市販の PLA2G2A に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を施行したところ、アミロイド沈着部位と抗 PLA2G2A 抗体の陽性像が一致する症例が認められた。抗 PLA2G2A 抗体の特異性を検証するために、同種コントロール一次抗体を用いて免疫組織化学染色を実施したところ、アミロイド部位は染色されず、市販の抗 PLA2G2A 抗体が特異的に膝組織における原因不明アミロイドの沈着部位と反応している可能性が示された。一方で、染色性が必ずしも良好でない症例も存在したため、PLA2G2A に対する抗血清を新たに作成し、免疫組織化学染色を実施したところ、良好な染色性を示す症例が認められた。

原因不明アミロイドは、コンゴ・レッド染色性に優れ、偏光顕微鏡下でも明瞭なアップルグリーンを呈することがわかった。また、本アミロイドは粒状に組織へ沈着し、トランスサイレチンアミロイドーシスのように、組織の広範にアミロイド沈着を認める症例は確認できなかった。アミロイドの沈着様式やコンゴ・レッドの染色性からも、既知のアミロイドの沈着と鑑別できる可能性が示された。

#### (3) *in vitro*におけるアミロイド線維形成能の評価

リコンビナント PLA2G2A 蛋白質をチューブ内でインキュベーションしたところ、電子顕微鏡下において、線維様構造物を確認することができた。しかしながら、その量は限定的で、チューブ内の一部の蛋白質のみ線維様形態へと変化したことが推察された。PLA2G2A 蛋白質における、線維様構造物の形成能やその線維形態は、反応条件 (pH、温度、振とうなど) によって様々であった。

#### (4) 各種アミロイドーシス患者組織のプロテオーム解析

各種アミロイドーシス (ATTR、AL アミロイドーシスなど) 患者の様々なホルマリン固定組織 (心臓、腎臓、肺、靭帯など) 切片から LMD によりアミロイドを分取し、トリプシン消化後、LC-MS/MS で解析したところ、PLA2G2A が同定される症例を認めた。全 33 例のうち、PLA2G2A の検出率は 70% 以上であった。そのうち、PLA2G2a の検出ペプチド数は、1~22 本と幅広く、症例によって様々であった。これらの結果から、PLA2G2A は、アミロイド線維に共存する蛋白質としての可能性もあることが考えられた。

#### (5) その他

原因不明アミロイドーシスを各種臓器および症例から探索する中で、本研究の副産物として、本邦初のアミロイドーシス、稀なタイプのアミロイドーシスやアミロイド類似疾患を同定したため、国際英文誌に報告した (Tasaki et al., 2022, 2023, 2024)。さらには、既存のアミロイドーシスに属さない 2 つ目のアミロイド原因蛋白質の候補を複数症例から同定し、現在も詳細な検討を進めている。

これまで報告されているアミロイド原因蛋白質の中には、apolipoprotein A1 や apolipoprotein AIV などのように、アミロイド原因蛋白質とアミロイド共存蛋白質の両方の側面を持つものが存在する。今後は、PLA2G2A 蛋白質がアミロイド原因蛋白質である可能性とアミロイド共存蛋白質である可能性、また、両方の性質を有する可能性を探るため、詳細かつ慎重に検討を重ね、本疾患の治療法の開発に繋がる病態解明や検査法の開発に繋げる研究を展開することが重要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 Tasaki Masayoshi, Nomura Toshiya, Uchiyama Koichi, Misumi Yohei, Nakahara Keiichi, Oyama Yuzo, Uesugi Noriko, Ueda Mitsuharu	4. 巻 29
2. 論文標題 Fibrinogen A $\alpha$ -chain amyloidosis associated with a rare frameshift pathogenic variant p.Arg547GlyfsTer21	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 276 ~ 277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13506129.2022.2074292	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, Misumi Yohei, Nomura Toshiya, Kamba Tomomi, Ueda Mitsuharu	4. 巻 29
2. 論文標題 Detection of semenogelin 1 amyloidosis through immunohistochemical staining with novel antiserum developed based on mass spectrometric peptide mapping analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 278 ~ 280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13506129.2022.2101920	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 Goto Mizue, Tasaki Masayoshi, Ueda Mitsuharu	4. 巻 73
2. 論文標題 Early onset Congo red positive fibrillary glomerulonephritis associated with glomerular DNAJB9 deposits mimicking renal amyloidosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 106 ~ 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13300	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, Oishi Toshiyuki, Ueda Mitsuharu	4. 巻 72
2. 論文標題 EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) amyloid deposits in the lower rectum from aged patient with bloody stools	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 217 ~ 218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13199	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 Suzuki Yuji, Tasaki Masayoshi, Kakisaka Keisuke, Nishiya Masao, Nomura Toshiya, Nakao Mitsuki, Sugawara Erika, Takikawa Yasuhiro, Ueda Mitsuharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Possible transmission of leukocyte chemotactic factor 2 amyloidosis after interpopulational liver transplantation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 1~3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13506129.2024.2322480	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田崎雅義、大矢雄希、野村隼也、三隅洋平、植田光晴
2. 発表標題 当アミロイドーシス診療センターで経験したEFEMP1アミロイド沈着症例
3. 学会等名 第9回日本アミロイドーシス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田崎雅義、三隅洋平、野村隼也、大林光念、植田光晴
2. 発表標題 セメノゲリンアミロイドの検出に有用な免疫組織化学染色用抗体の開発
3. 学会等名 第62回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田崎雅義、野村隼也、三隅洋平、大林光念、植田光晴
2. 発表標題 遺伝性フィブリノーゲンアミロイドーシスの病理学的特徴および質量分析による診断の注意点
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tasaki, Masayoshi, Misumi Yohei, Nomura Toshiya, Obayashi Konen, Ando Yukio, Ueda Mitsuharu
2. 発表標題 Histological and proteomic analyses of semenogelin 1 amyloid deposits.
3. 学会等名 XVIII. International Symposium on Amyloidosis (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田崎雅義、岡田匡充、野村隼也、増田曜章、三隅洋平、宮本健史、大林光念、安東由喜雄、植田光晴
2. 発表標題 腰部脊柱管狭窄症における各種アミロイド沈着と臨床指標の関連
3. 学会等名 第8回日本アミロイドーシス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田崎雅義、岡田匡充、野村隼也、増田曜章、三隅洋平、宮本健史、大林光念、安東由喜雄、植田光晴
2. 発表標題 腰部脊柱管狭窄症におけるapolipoprotein AIアミロイドの同定
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021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	水口 峰之  (Mizuguchi Mineyuki)  (30332662)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授   (13201)	

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	植田 光晴  (Ueda Mitsuharu)  (60452885)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授    (17401)	
研究分担者	宮本 健史  (Miyamoto Takeshi)  (70383768)	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)	

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