

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15701

研究課題名（和文）遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスにおける脳アミロイド血管症の病態解析

研究課題名（英文）Analysis of cerebral amyloid angiopathy in hereditary ATTR amyloidosis

研究代表者

野村 隼也（Nomura, Toshiya）

熊本大学・病院・助教

研究者番号：00880080

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000円

研究成果の概要（和文）：ATTRvアミロイドーシスにおいて、脳血管へのアミロイド沈着量および血管構造変化の程度は肝移植の有無にかかわらず罹病期間に相関して進行する傾向が認められた。血管に沈着したアミロイドを構成するTTRは、脳組織においては非肝移植症例、肝移植症例とも変異型優位であった。一方、心臓組織においては、非肝移植症例では変異型優位であり、肝移植症例では野生型優位であった。肝移植後の心臓組織の血管に沈着したアミロイドの形成は移植肝由来の野生型TTRの影響を受けるが、肝移植後の脳血管に沈着したアミロイドの形成は移植肝由来の野生型TTRの影響をほとんど受けず、脈絡叢由来の変異型TTRの影響を受けることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ATTRvアミロイドーシスにおける脳アミロイド血管症の病態に脈絡叢由来の変異型TTRが多大に影響し、また、肝臓由来のTTRはほとんど影響しないことを明らかにした。これまで本疾患の治療として、肝移植療法、四量体安定化剤、遺伝子サイレシング療法が開発されたが、これらの肝臓をターゲットとした治療では本疾患の脳アミロイド血管症は抑制できない可能性があり、脈絡叢をターゲットとした治療が必要であることを本研究で明らかにできた点で学術的、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Pathological analysis of autopsied brain tissues from patients with ATTRv amyloidosis showed a correlation of CAA progression with disease duration even after LT. Mass spectrometry analysis demonstrated the proportions of variant TTR in the total TTR in CAA amyloid fibrils were extremely high regardless of liver transplantation (LT). In contrast, the proportions of variant TTR in the total TTR in amyloid fibrils of the heart vessels were high in patients who did not undergo LT and low in patients who underwent LT. These results show clear evidence that variant TTR derived from the choroid plexus was responsible for amyloid deposits in leptomeningeal vessels, regardless of LT.

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 遺伝性ATTRアミロイドーシス 脳アミロイド血管症

### 1. 研究開始当初の背景

ATTRv アミロイドーシスは、主に肝臓で産生された変異型 TTR が原因となりアミロイドを形成し、末梢神経、自律神経、心臓、腎臓、消化管などの組織に沈着することにより臓器障害を引き起こす常染色体優性の難病である。TTR 遺伝子変異は現在までに 150 種以上報告されている。V30M 型は本邦において最多であり、病初期は末梢神経障害を主徴候とする。ATTRv アミロイドーシスの治療法として、変異型 TTR の産生臓器である肝臓を入れ替える肝移植療法が行われ、本症の生命予後が大きく改善する中で、肝移植を施行した

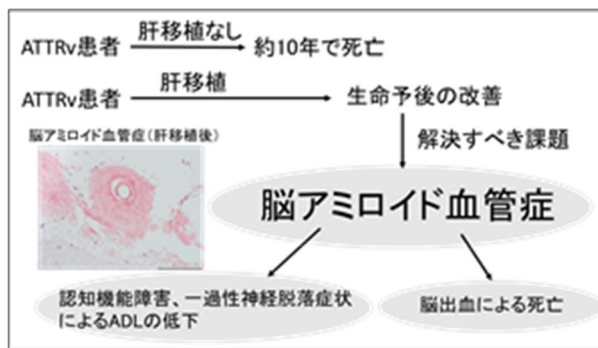


図1.肝移植後の脳アミロイド血管症

長期生存例の多くは脳アミロイド血管症を呈することが報告されてきた(Maria, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015; Sekijima, et al. Neurology, 2016) (図1)。現在までに肝移植療法を受けた 2000 例以上の ATTRv アミロイドーシス患者が近い将来、移植後の脳アミロイド血管症を呈する可能性がある。また、近年、肝移植療法以外にも、TTR 四量体安定化剤、siRNA などの遺伝子サイレンシング療法が本症の末梢神経障害の進行を抑制させることが報告され、現在、臨床応用されている (Ando, et al. J Neurol Sci, 2016; Adams, et al. N Engl J Med, 2018) が、これらの新規疾患修飾療法は肝臓で産生される変異型 TTR をターゲットとした治療であるため、脳アミロイド血管症の進行を抑制できないと考えられる。そのため、本研究により、本症の脳アミロイド血管症の病態を明らかにし、治療ターゲットを明らかにすることは重要である。これまで、肝移植後の脳アミロイド血管症の病態は、肝移植後の髄液に変異型 TTR が存在するため、脈絡叢で産生された変異型 TTR が原因となると考えられてきた (Ando, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1995)。しかし、脳血管に沈着したアミロイドを生化学的に解析する研究はこれまで十分に行われておらず、脈絡叢で産生された変異型 TTR がどの程度、脳血管に沈着したアミロイドを構成するかは未だ不明のままである。また、アルツハイマー型認知症、A $\beta$  型脳アミロイド血管症、全身性アミロイドーシスではこれまでにアミロイド共存蛋白質に着目した研究が行われており、病態への関与、診断マーカーや治療法への応用が報告されている (Ma, et al. Nature, 1994; Richards, et al. N Engl J Med, 2015; Inoue, et al. Acta Neuropathol, 2017)。しかし、本症の脳アミロイド血管症における共存蛋白質は検討されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、“脳アミロイド血管症の病態に脈絡叢由来の変異型 TTR がどの程度影響するのか、また、肝臓由来の TTR は影響するのか”という問いに答えることで脳アミロイド血管症の治療ターゲットを明らかにする。また、“アミロイド共存蛋白質が脳アミロイド血管症の病態に影響するか”という問いに答えることで、脳アミロイド血管症におけるアミロイド沈着機構の解明、さらには発症予測マーカーの開発につなげる。

### 3. 研究の方法

#### 1. ATTRv アミロイドーシスの脳血管に沈着した TTR アミロイドにフォーカスした研究

①病理学的解析：ATTRv アミロイドーシスの非肝移植患者と肝移植患者を対象（各 20 例）に、Congo red 染色と抗 TTR 抗体を用いた免疫組織染色を行い、アミロイドが沈着した脳血管の陽性率や分布、脳血管に沈着したアミロイド量を詳細に検討する。また、罹病期間とアミロイド沈着量の相関を検討する。

生化学的解析：質量分析的手法 (LC-MS/MS) を用いて、脳血管と脳以外の末梢組織 (心臓など) の血管に沈着しているアミロイドの生化学的特徴、特にアミロイドを構成する変異型 TTR と野生型 TTR の比率を詳細に検討し、脈絡叢または肝臓由来の TTR が脳血管でのアミロイド形成に与える影響を明らかにする (図2)。さらに、脳血管に沈着している TTR アミロイド沈着様式が、酵素によって切断された断片化蛋白質が変性、沈着するタイプ (断片型) であるか、原因蛋白質の全長がそのまま沈着するタイプ (全長型) であるか、を明らかにする。具体的には、アミロイド沈着脳血管からアミロイドを抽出し、抗 TTR 抗体 (N 末端認識抗体、C 末端認識抗体)を用いた Western blotting により検討する。

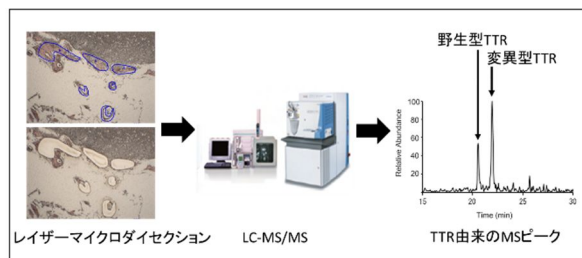


図2. 質量分析的手法を用いた、脳血管に沈着したアミロイドの生化学的解析

## 2. ATTRv アミロイドーシスの脳血管アミロイド病変に存在するアミロイド共存蛋白質にフォーカスした研究

①アミロイド共存蛋白質の同定: ATTRv アミロイドーシス症例(20 症例)のアミロイドが沈着した脳血管とコントロール症例(20 例)のアミロイド沈着のない脳血管を、レーザーマイクロダイセクションと LC-MS/MS を用いて網羅的に解析し、原因蛋白質である TTR 以外のアミロイド共存蛋白質を同定する(図 3)。

病理学的解析: ATTRv アミロイドーシス症例(20 症例)の脳血管とコントロール症例(20 例)の脳血管を対象に、同定した共存蛋白質に対する抗体を用いた免疫染色を行い、同定した共存蛋白質が ATTRv アミロイドーシス症例のアミロイドが沈着した脳血管に特異的に存在するか、TTR と共存在するかを検討する。また、脳血管に沈着したアミロイド陽性面積と着目した共存蛋白質に対する免疫染色陽性面積の相関を解析する。

アミロイド共存蛋白質の TTR アミロイド線維形成に与える影響: TTR と着目したアミロイド共存蛋白質を試験管内で反応させ、アミロイド共存蛋白質が TTR アミロイド形成に与える影響を、チオフラビン T、電子顕微鏡を用いて検討する。

発症予測マーカーの探索: 着目したアミロイド共存蛋白質に対する ELISA 法を用いて、脳アミロイド血管症を呈する ATTRv アミロイドーシス症例およびコントロール症例(各 30 例)で血中、髄液中の濃度を比較検討する。また、臨床像、罹病期間との関連性を検討する。

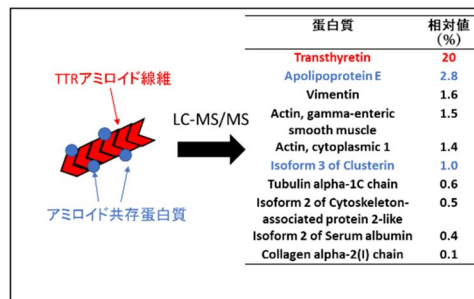


図3. 質量分析的手法を用いた、脳血管に沈着したアミロイド共存蛋白質の解析

## 4. 研究成果

### 1. ATTRv アミロイドーシスの脳血管に沈着した TTR アミロイドにフォーカスした研究

①病理学的解析: ATTRv アミロイドーシスの非肝移植 5 例と肝移植 6 例を対象に、Congo red 染色と抗 TTR 抗体を用いた免疫組織染色を行い、脳アミロイド血管症の病理学的所見を解析した。脳血管へのアミロイド沈着量および血管構造変化の程度は、肝移植の有無にかかわらず罹病期間に相関して進行する傾向が認められた(図 4)。

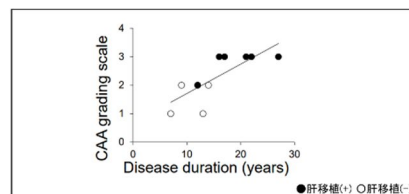


図4. 罹病期間とCAA重症度の関連

生化学的解析: 質量分析的手法(LC-MS/MS)を用いて、ATTRv アミロイドーシスの脳組織と心臓組織に沈着するアミロイドの生化学的特徴を、非肝移植 5 例と肝移植 6 例において比較検討した。その結果、血管に沈着したアミロイドを構成する TTR は、脳組織においては非肝移植症例、肝移植症例とも変異型優位であった。一方、心臓組織においては、非肝移植症例では変異型優位であり、肝移植症例では野生型優位であった。このことから、肝移植後の心臓組織の血管に沈着したアミロイドの形成は移植肝由来の野生型 TTR の影響を受けるが、肝移植後の脳血管に沈着したアミロイドの形成は移植肝由来の野生型 TTR の影響をほとんど受けず、脈絡叢由来の変異型 TTR の影響を受けることが示唆された(図 5)。

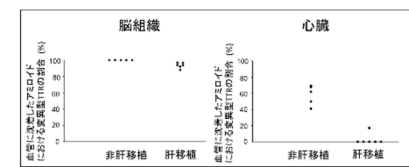


図5. 質量分析的手法を用いた脳アミロイド血管症のTTR比率解析

### 2. ATTRv アミロイドーシスの脳血管アミロイド病変に存在するアミロイド共存蛋白質にフォーカスした研究

①アミロイド共存蛋白質の同定: ATTRv アミロイドーシス症例(5 症例)のアミロイドが沈着した脳血管とコントロール症例(3 例)のアミロイド沈着のない脳血管を、レーザーマイクロダイセクションと LC-MS/MS を用いて網羅的に解析した。その結果、原因蛋白質である TTR 以外の共存蛋白質(Apolipoprotein E、Clusterin、Laminin)を同定した(表 1)。同定した共存蛋白質に対する抗体を用いた免疫染色を行い、同定した共存蛋白質が ATTRv アミロイドーシス症例において脳血管の TTR と共存在していた。

|  | ATTR V30M (n=5) |              | Ctrl (n=3)      |              | p value     |
|--|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-------------|
|  | detection ratio | average NSAF | detection ratio | average NSAF |             |
| Danohypitin  | 100             | 15.5722334   | 0               | 0            | 0.03227297  |
| Hemoglobin subunit beta  | 100             | 15.5807555   | 100             | 14.2178549   | 0.99605634  |
| Hemoglobin subunit alpha   | 100             | 4.88782448   | 100             | 4.9509523    | 0.95689282  |
| Hemoglobin subunit delta   | 100             | 4.87377029   | 66.6666667      | 8.46052624   | 0.58157198  |
| Apolipoprotein E   | 100             | 2.8699638    | 0               | 0            | 0.00351131  |
| Vimentin   | 100             | 1.65912185   | 100             | 0.96487659   | 0.22613793  |
| Actin, gamma-enteric smooth muscle                                   | 100             | 1.57258753   | 100             | 1.54306953   | 0.88502842  |
| Actin, cytoplasmic 1   | 100             | 1.468225875  | 100             | 1.565179383  | 0.169640209 |
| Histone H2B type 1-K   | 100             | 1.381381115  | 66.6666667      | 0.619684241  | 0.002057863 |
| Isoform 3 of Clusterin   | 100             | 0.98811368   | 0               | 0            | 0.00000000  |
| Tubulin alpha-1C chain   | 100             | 0.668637384  | 0               | 0            | 0.187097111 |
| Isoform 2 of Cytoskeleton-associated protein 2-like                  | 100             | 0.525530674  | 66.6666667      | 0.842747426  | 0.4362307   |
| Isoform 2 of Serum albumin   | 100             | 0.40030903   | 66.6666667      | 0.25690169   | 0.725048856 |
| Collagen alpha-2(I) chain  | 100             | 0.106082902  | 100             | 0.121699226  | 0.962672855 |
| Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein | 100             | 0.10023593   | 66.6666667      | 0.051800883  | 0.364599175 |
| Laminin subunit gamma 1  | 100             | 0.096546914  | 33.3333333      | 0.026365158  | 0.117919668 |
| Laminin subunit beta-2   | 100             | 0.079126134  | 33.3333333      | 0.021590535  | 0.033688818 |
| Isoform 2 of Vitamin A   | 100             | 0.074364861  | 100             | 0.304002949  | 0.038697579 |
| Trangipin  | 80              | 1.144194961  | 33.3333333      | 1.051181905  | 0.935288089 |
| Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase                             | 80              | 0.674156084  | 33.3333333      | 0.212921982  | 0.286642646 |

表1. 質量分析的手法を用いた脳アミロイド血管症のアミロイド共存蛋白質の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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<br>野村隼也                              |
| 2. 発表標題<br>遺伝性ATTRアミロイドーシスにおける脳アミロイド血管症の病態解析 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本神経学会学術大会                    |
| 4. 発表年<br>2021年                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|