

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659303

研究課題名（和文）ミスフォールディング病の病態解析・治療を旨とした自己抗体の解析

研究課題名（英文）Analysis of autoantibodies for targeting pathogenesis and therapy of misfolding diseases.

研究代表者

安東 由喜雄 (ANDO YUKIO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20253742

研究成果の概要（和文）：家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP ATTR V30M) のトランスジェニックラットおよび患者の血清中に存在する異型TTRに対する自己抗体を同定し、これら自己抗体の存在とFAPの発症年齢や症状進行との関連、更には本自己抗体が認識するエピトープを検討した。日本人およびスウェーデン人患者に、抗ATTR V30M抗体が認められた。又、全て高齢発症であった。エピトープとして、ATTR24-35、およびATTR105-115が候補に挙げた。FAP ATTR V30Mの新規抗体治療を開発していく上での一つのターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We examined presence or absence of anti-variant transthyretin (TTR) antibody in both transgenic rats and familial amyloidotic polyneuropathy (FAP ATTR V30M). In significant numbers of Japanese and Swedish FAP patients, the antibody was present. All patients were late onset cases. As epitopes of TTR variant, ATTR24-35, and 105-115 were listed. When we consider the novel therapy for FAP, this findings are very important and give some hint for the essential therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ミスフォールディング病、トランスサイレチン、アミロイドーシス、ミスフォールディング、自己抗体、エピトープ、家族性アミロイドポリニューロパチー、遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病やポリグルタミン病などのミスフォールディング病は、細胞内において、ユビキチン・プロテアソーム蛋白分解系や分子シャペロンなどを介した異常蛋白質の制御機構の破綻が病態を引き起こす。一方、細胞内は正常に機能するが、細胞外に凝集体

の沈着を生じる疾患としてアルツハイマー病に代表されるアミロイドーシスがある。家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、原因蛋白質トランスサイレチン (TTR) がミスフォールディングを起こし、細胞外に凝集物 (アミロイド線維) が沈着する。生体には、防御機構として、立体構造の変化したミス

オールディング蛋白質を管理する、細胞「外」の蛋白質品質管理機構が存在するのではないかと仮説を立てた。本研究では、蛋白質の細胞「外」の品質管理機構の担い手として、構造変化を来たしたミスフォールディング蛋白質(非自己)を処理する免疫機構、特に自己抗体産生機構が機能していると考え、本観点からFAPの病態解析を行う。TTRはアミロイド形成過程で抗原性も変化していると想定し、自己抗体の検索を行う。本研究で得られた知見は、アミロイドーシス、ミスフォールディング病の診断・治療法の開発に大きく寄与すると期待できる。

アミロイドーシスは蛋白質のミスフォールディング病の一種であり、細胞「外」の蛋白質凝集体が、その病態の主因である。治療戦略として、ワクチン・抗体療法が考案され、特にアルツハイマー病で一定の成果はあがっている。具体的には、人工的に病原蛋白質を免疫の標的のすると、凝集体の除去効果があることが判明した。しかし、本治療法は病態の改善効果や正常型の蛋白質への反応を含めた副作用の問題で、現状では実用に程遠いと言わざるを得ない。生体における「免疫」と「ミスフォールディング蛋白質」の関連性が十分に理解されていないことが、これらの問題が生じている一因と考えられる。

2. 研究の目的

パーキンソン病やポリグルタミン病などのミスフォールディング病は、細胞内において、ユビキチン・プロテアソーム蛋白分解系や分子シャペロンなどを介した異常蛋白質の制御機構の破綻が病態を引き起こす。一方、細胞内は正常に機能するが、細胞外に凝集体の沈着を生じる疾患としてアルツハイマー病に代表されるアミロイドーシスがある。家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は、原因蛋白質トランスサイレチン(TTR)がミスフォールディングを起こし、細胞外に凝集物(アミロイド線維)が沈着する。生体には、防御機構として、立体構造の変化したミスフォールディング蛋白質を管理する、細胞「外」の蛋白質品質管理機構が存在するのではないかと仮説を立てた。本研究では、蛋白質の細胞「外」の品質管理機構の担い手として、構造変化を来たしたミスフォールディング蛋白質(非自己)を処理する免疫機構、特に自己抗体産生機構が機能していると考え、本観点からFAPの病態解析を行う。TTRはアミロイド形成過程で抗原性も変化していると想定し、自己抗体の検索を行う。本研究で得られた知見は、アミロイドーシス、ミスフォールディング病の診断・治療法の開発に大きく寄与すると期待できる。

3. 研究の方法

(1). 様々な存在形式の TTR がもつ抗原性の解析

前述の各解析で得られた TTR 或いは TTR ペプチド断片を、TG ラット、WT ラット、ウサギに投与し、産生誘導される抗体を精製する。特に、我々が開発したヒト TTR を導入した TG ラット (Ueda, Ando et al. BBRC, 2007) への各 TTR 投与により、遺伝子導入された通常の構造をもつ TTR とは異なった構造をもつヒト TTR への特異的な抗体が産生されることが期待できる。また、本 TG ラットは 18 カ月齢以降で、消化管に TTR 沈着を認めるようになるため、月齢 (6、12、18、24 カ月齢) により各存在形式の TTR 投与や検体の採取を行い、経時的な解析を実施した。

また、以下の特徴が知られている既存の各種 TTR 抗体と精製された各存在形式の TTR との反応性を Biacore や ELISA、イムノブロットなどで検証し、新たに得られた抗体との違いを検証した。抗 TTR 抗体 (市販の抗体) (native な TTR と反応)、抗 TTR115-124 抗体 (FAP 患者組織で沈着している amyloidogenic な TTR と反応し、native な TTR とは反応しない抗体 (Gustavsson et al., Am J Pathol, 1994))、抗 TTR39-44 抗体 (amyloidogenic な TTR と反応する抗体 (Palha et al., J Mol Med, 2001))。

(2). 様々な存在形式の TTR に対する自己抗体の解析

前述の各存在形式の TTR に対して反応する抗体が、FAP や SSA 患者の血清に存在するか、Biacore や ELISA、イムノブロットなどで検証する。また、抗 TTR 抗体を持つ患者血清で、異型 TTR と野生型 TTR の定量的な分離測定を、SELDI-TOF MS (Ueda, Ando et al., Clin Chem, 2009) で実施し、抗体保持と TTR 濃度との関連性を検証した。

4. 研究成果

(1) 前述の各解析で得られた TTR 或いは TTR ペプチド断片を、TG ラット、WT ラット、ウサギに投与し、産生誘導される抗体を精製した。特に、我々が開発したヒト TTR を導入した TG ラット (Ueda, Ando et al. BBRC, 2007) への各 TTR 投与により、遺伝子導入された通常の構造をもつ TTR とは異なった構造をもつヒト TTR への特異的な抗体が産生されることが期待できる。解析の結果、ATTR24-35、および ATTR105-115 が候補に挙げた。

(2) 次に家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP ATTR V30M) 患者の血清中に存在する異型 TTR (ATTR V30M) に対する自己抗体を同定

し、これら自己抗体の存在とFAPの発症年齢や症状進行との関連、更には本自己抗体が認識するエピトープを検討した。

解析の結果、日本人患者3名、スウェーデン人患者8名の計11名で、抗ATTR V30M抗体陽性と考えられた。又、この8名は全て高齢発症であった。ELISA法による検討の結果、抗ATTR V30M抗体が認識するエピトープとして、TGラット同様、ATTR24-35、およびATTR105-115が候補に挙げた。この内、ATTR24-35を認識する抗ATTR V30M抗体を持つと考えられた患者10名で、血中抗ATTR V30M抗体レベルと発症年齢との間に強い正の相関を認めた($r=0.833$, $p<0.05$)。これらの所見は、FAP ATTR V30M患者の症状の進行、あるいは同一の遺伝子変異を持ち乍、発症年齢の異なる群が存在する理由を説明しうる一つの材料となり、又、今回同定したエピトープは、FAP ATTR V30Mの新規抗体治療を開発していく上での一つのターゲットとなる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 27 件)

① Ando Y, Coelho T, Berk JL, Cruz MW, Ericzon BG, Ikeda S, Lewis WD, Obici L, Planté-Bordeneuve V, Rapezzi C, Said G, Salvi F. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet J Rare Dis* 8:31, 2013 doi: 10.1186/1750-1172-8-31 査読有

② Obayashi K, Tasaki M, Jono H, Ueda M, Shinriki S, Misumi Y, Yamashita T, Oshima T, Nakamura T, Ikemizu S, Anan I, Suhr O, Ando Y. Impact of antibodies against amyloidogenic transthyretin (ATTR) on phenotypes of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) ATTR Valine30Methionine. *Clin Chim Acta* 419:127-31, 2013. doi: 10.1016/j.cca.2013.02.002. 査読有

③ Asonuma K, Ohya Y, Isono K, Takeichi T, Yamamoto H, Lee KJ, Okumura K, Ando Y, Inomata Y. Current state of domino transplantation in Japan in terms of surgical procedures and de novo amyloid neuropathy. *Amyloid*, 19 Suppl 1: 75-77, 2012. doi: 10.3109/13506129.2012.674582 査読有

④ Berk JL, Suhr OB, Sekijima Y, Yamashita T, Heneghan M, Zeldenrust SR,

Ando Y, Ikeda S, Gorevic P, Merlini G, Kelly JW, Skinner M, Bisbee AB, Dyck PJ, Obici L. Familial Amyloidosis Consortium. The Diflunisal Trial: study accrual and drug tolerance. *Amyloid*, 19 Suppl 1: 37-38, 2012 doi: 10.3109/13506129.2012.678509 査読有

⑤ Hayashi Y, Mori Y, Yamashita S, Motoyama K, Higashi T, Jono H, Ando Y, Arima H. Potential use of lactosylated dendrimer (G3)/ α -cyclodextrin conjugates as hepatocyte-specific siRNA carriers for the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy. *Mol Pharm* 9: 1645-1653, 2012. doi: 10.1021/mp200654g 査読有

⑥ Hayashi Y, Mori Y, Higashi T, Motoyama K, Jono H, Sah DW, Ando Y, Arima H. Systemic delivery of transthyretin siRNA mediated by lactosylated dendrimer/ α -cyclodextrin conjugates into hepatocyte for familial amyloidotic polyneuropathy therapy. *Amyloid* 19 Suppl 1: 47-49, 2012. doi: 10.3109/13506129.2012.674581 査読有

⑦ Jono H, Anno T, Motoyama K, Misumi Y, Tasaki M, Oshima T, Mori Y, Mizuguchi M, Ueda M, Shinriki S, Shono M, Obayashi K, Arima H, Ando Y. Potential use of glucuronylglucosyl- β -cyclodextrin as a novel therapeutic tool for familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid* 19 Suppl 1: 50-52, 2012 doi: 10.3109/13506129 査読有

⑧ Misumi Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Yamashita T, Ando Y. Interaction between amyloid fibril formation and extracellular matrix in the proceedings of VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Amyloid*, 19 Suppl 1: 8-10, 2012. doi: 10.3109/13506129.2012.674987 査読有

⑨ Motomiya Y, Uji Y, Ando Y. Capillary electrophoretic profile of β 2-microglobulin intermediate associated with hemodialysis. *Ther Apher Dial*, 16: 350-354, 2012. doi: 10.1111/j.1744-9987.2012.01069.x. 査読有

⑩ Obayashi K, Ando Y. Focus on autonomic dysfunction in familial amyloidotic

polyneuropathy (FAP). *Amyloid* 19 Suppl 1: 28-29, 2012. doi: 10.3109/13506129.2012.673514. 査読有

⑪ Su Y, Misumi Y, Ueda M, Shono M, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Senokuchi T, Yamagata K, Ando Y. The occurrence of islet amyloid polypeptide amyloidosis in Japanese subjects. *Pancreas* 41: 971-973, 2012, doi: 10.1097/MPA.0b013e318249926a 査読有

⑫ Su Y, Jono H, Torikai M, Hosoi A, Soejima K, Guo J, Tasaki M, Misumi Y, Ueda M, Shinriki S, Shono M, Obayashi K, Nakashima T, Sugawara K, Ando Y. Antibody therapy for familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid* 19 Suppl 1: 45-46, 2012. doi: 10.3109/13506129.2012.674075. 査読有

⑬ Su Y, Jono H, Misumi Y, Senokuchi T, Guo J, Ueda M, Shinriki S, Tasaki M, Shono M, Obayashi K, Yamagata K, Araki E, Ando Y. Novel function of transthyretin in pancreatic alpha cells. *FEBS Lett* 586: 4215-22, 2012. doi: 10.1016/j.febslet.2012.10.025 査読有

⑭ Uji Y, Motomiya Y, Ando Y. Effect of Heparin on Conformation of the β (2)-Microglobulin Molecule. *Ther Apher Dial*, 16: 159-162, 2012. doi: 10.1111/j.1744-9987.2011.01039.x 査読有

⑮ Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers J, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y. Aged vervet monkeys developing transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: A valid pathological model of the human disease. *Lab Invest* 92: 474-484, 2012 doi: 10.1038/labinvest.2011.195. 査読有

⑯ Yamashita T, Ando Y, Okamoto S, Misumi Y, Hirahara T, Ueda M, Obayashi K, Nakamura M, Jono H, Shono M, Asonuma K, Inomata Y, Uchino M. Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 78: 637-643, 2012 doi: 10.1212/WNL.0b013e318248df18 査読有

⑰ 植田光晴、安東由喜雄. 最新の神経難病

治療と今後の展望: アミロイドーシス. *医薬ジャーナル* 48: 1307-1314, 2012. 査読無

⑱ 大林光念. 熊本大学医学部附属病院で新たにスタートしたアミロイドーシス診療体制構築事業. *Schnellar* 83: 3-7, 2012. 査読無

⑲ 大林光念、大嶋俊範、山下太郎、安東由喜雄. C線維の機能評価にA δ 特異的痛覚閾値検査を組み合わせた小径線維ニューロパチーの早期診断. *末梢神経* 23: 321-322, 2012. 査読有

⑳ 山下太郎, 奥村幸祐, 大嶋俊範, 三隅洋平, 植田明彦, 菅智宏, 神力悟, 植田光晴, 城野博史, 大林光念, 山下賢, 前田寧, 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチーにおける臨床症候に対する肝移植の長期的効果の検討. *末梢神経* 23: 256-257, 2012. 査読有

㉑ Ando Y. A report on VIIIth international symposium on familial amyloidotic polyneuropathy and VIIth international symposium on liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid* 19 Suppl 1: 1-2, 2012 doi: 10.3109/13506129.2012.673513 査読有

㉒ Ando Y, Ueda M. Diagnostics and therapeutic approaches to transthyretin amyloidosis. *Curr Med Chem* 19: 2312-2323, 2012 doi: 10.3109/13506129. 査読無

㉓ 安東由喜雄. 学際的連携がひらく末梢神経機能再建への展望 - 家族性アミロイドポリニューロパチーの末梢神経障害と治療. *末梢神経* 23: 180-187, 2012 査読有

㉔ 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) に対する肝移植の有用性と限界. *臨床神経学* 51: 1138-1140, 2012. 査読有

㉕ 安東由喜雄: アミロイドーシス. *医薬ジャーナル* 48: 91-98, 2012 査読無

㉖ 大林光念, 安東由喜雄: 臨床化学からみたアミロイドーシス. *臨床化学* 41: 4, 2012 査読有

㉗ 田崎義雅, 安東由喜雄: 質量分析法を用いた新たなアミロイドーシスの診断法. *臨床化学* 41: 41-46, 2012 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① Ando Y. Familial amyloidotic polyneuropathy in Japan. Alnylam Meeting, March 1, 2013, Alnylam Pharmaceutical, U. S. A
- ② Ando Y. Mass spectrometry as a useful diagnostic tool for hereditary amyloidosis. 19th International mass spectrometry conference, Dec 1, 2012, ICC Kyoto, Kyoto, Japan
- ③ 大林光念、田崎雅義、神力悟、宇宿弘輝、池田勝義、安東由喜雄. 専門性、地域性を生かした検査部の新しい試み: アミロイドーシス診療体制構築事業. 第 59 回日本臨床検査医学会年次学術集会 Nov 29- Dec 2, 2012. 京都国際会議場、京都
- ④ 安東由喜雄: あなたならどうする自律神経障害の臨床: 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP) と自律神経障害. 第 65 回日本自律神経学会総会, Oct 25-26, 2012, 都市センターホテル、東京.
- ⑤ 大林光念、山下太郎、大嶋俊範、安東由喜雄. 全身性アミロイドーシスの診断と自律神経障害. 第 65 回日本自律神経学会総会 Oct 25-26, 2012. 都市センターホテル、東京
- ⑥ Yamashita T, Ando Y. Early TTR-FAP patient identification and diagnosis - the example of Japan. TTR-FAP Global Commercial Advisory Board. Oct. 18-19, 2012. London, UK
- ⑦ 大林光念、田崎雅義、神力悟、植田光晴、城野博史、安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチー患者における異型トランスサイレチンに対する自己抗体の存在とその意義. 第 52 回日本臨床化学会年次集会 Sep6-8, 2012, いわて県民情報交流センター、盛岡
- ⑧ 安東由喜雄: 学際的連携がひらく末梢神経機能再建への展望, アミロイドニューロパチーの病態解析と神経障害, 第 23 回日本末梢神経学会, Aug 30, 2012. 九州大学医学部百年講堂、福岡
- ⑨ 安東由喜雄: 神経疾患の疼痛, 家族性アミロイドポリニューロパチーの疼痛について. 第 34 回日本疼痛学会, Jul 20, 2012, 熊本国際交流会館、熊本
- ⑩ Ando Y. New therapeutic approaches for

familial amyloidotic polyneuropathy XIII International Symposium on Amyloidosis, May 6-10, 2012. Groningen, The Netherland

⑪ Obayashi K. Detection of autoantibodies against ATTR in patients with FAP ATTR V30M. XIIth International Symposium on Amyloidosis, May 6-10, 2012, Groningen, The Netherland

⑫ 城野博史、安野貴幸、本山敬一、三隅洋平、田崎雅義、大嶋俊範、森由匡、水口峰之、植田光晴、神力悟、庄野信、大林光念、有馬英俊、安東由喜雄. シクロデキストリンの包接特性を活用した家族性アミロイドポリニューロパチーの新規治療薬の開発. 日本薬学会第 132 年会, Mar 28-31, 2012. 北海道大学、札幌

〔図書〕(計 3 件)

① 安東由喜雄: 標準臨床検査医学, 医学書院, 東京, 2013, 456, pp. 160-161、pp. 370-376

② 安東由喜雄: 先天性代謝異常ハンドブック 中山書店, 東京, 2013, 456, pp. 348-349

③ 安東由喜雄: 今日の神経疾患治療指針 第 2 版 医学書院, 東京, 2013, 1136, pp. 973-976

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安東 由喜雄 (ANDO YUKIO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 20253742

(2) 研究分担者

大林 光念 (OBAYASHI KONEN)

熊本大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号: 90361899

城野 博史 (JONO HIROFUMI)

熊本大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 40515483