

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249036

研究課題名(和文)これ迄の研究の総力を結集させたアミロイドーシスの早期診断・病態解析システムの開発

研究課題名(英文)Early diagnosis and analyses of the pathogenesis for amyloidosis with all our previous investigations

研究代表者

安東 由喜雄(Ando, Yukio)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：20253742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,900,000円

研究成果の概要(和文)：LC-MS/MSを用いた解析法によりアミロイド原因蛋白質を同定法するため、後ろ向き及び前向き解析を実施。すでに診断がついている各種アミロイドーシスのホルマリン固定組織を解析したところ、本解析法と臨床診断の一致率は、97%で、非常に高い一致率を示した。前向き解析として、病型診断に至っていないアミロイドーシス患者21例の組織を解析。結果、本法と臨床診断との一致率は95%であった。以上より新たなアミロイドーシス診断法として有用な方法であることが判明した。高齢者の消化管に高率に認められる未知のアミロイドーシスに対して、同方法を駆使し、Fibrin3が新たなアミロイド原因物質であることを同定発見した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the usefulness of the analyzing system using LC/MS/MS, both prospective and retrospective studies were performed. To make sure the usefulness of this analyzing system as the retrospective study, we used the formalin fixed cardiac and nerve samples in amyloidosis patients. The coincidence of this analyzing system to the diagnosed type of amyloidosis was 97%. As the prospective study, undetermined samples of amyloidosis suspected patients. Coincidence of this method and clinical diagnosis was 95%. From those results, this analyzing system was found to be useful method for amyloidosis diagnosis. To unknown amyloidosis found in the intestine of aged patients, combination of laser microdissection and LC/MS/MS system was applied. By the analysis, Fibrin3 was identified as the precursor protein of the amyloid. This protein was also found to be the component of amyloid body in the brain.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アミロイドーシス トランスサイレチン LC-MS/MS 家族性アミロイドポリニューロパチー アミロイド原因蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは、通常は可溶性の蛋白質が各種の原因により重合し、不溶性の線維状構造物であるアミロイドを形成し、組織に沈着することで様々な臓器障害を引き起こす難治性の疾患群である。本疾患には、遺伝的な要因により発症するタイプと、非遺伝的なタイプ(炎症、腫瘍、老化など)に大別される。また、アミロイドーシスが全身の諸臓器に生じる全身性のものと、限局した1臓器(脳、眼、皮膚など)のみに生じる限局性のものがある。臨床症候のみでは、これらの疾患を鑑別することが困難であるため、アミロイドの原因蛋白質の特定が診断に必要不可欠である。アミロイドーシスの原因蛋白質は、これまでの我が国の研究者による多大な貢献もあり、27種が同定されている。しかし、未だ原因蛋白質の同定に至らない症例も少なくなく、また、新たな原因蛋白質による病型が、近年も報告され続けている。一方で、本疾患群の幾つかは、最近の研究の進歩から「治療可能な」あるいは「進行を遅延しうる」疾患へと変貌を遂げつつある。具体的には家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)では肝移植や蛋白質安定化剤、ALアミロイドーシスでは化学療法および末梢幹細胞輸血、AAアミロイドーシスでは抗サイトカイン療法などで明確な治療効果が得られている。これらの治療は病初期に特に効果を示すため、早期診断が重要となるが、解析が困難であり診断が遅延する症例が少なくない。また、これらの治療法を行った後も、病態が進行し続ける症例も報告され、本疾患の根治に向け解明すべき研究課題が多く残されている。

### 2. 研究の目的

アミロイドーシスの診療では、まず的確な診断が迅速に行われることが重要であるが、解析が困難であり、診断が遅延する 경우가少なくない。また、近年の治療法の進歩により、本疾患群の幾つかは根治的な治療が実施可能となってきたため、的確な早期診断がますます重要となっている。蛋白質の異常な蓄積が原因である本疾患群は、最新の蛋白質解析技術が診断や病態解析に応用可能であり、臨床的課題に立脚したトランスレーショナルリサーチを体現することが可能であると確信する。また、原因不明のアミロイドーシスの解明、疾患の表現型の多様性、治療後に進展する新たな病態など、新たな診断マーカーの確立や疾患根治に向けて解明すべき臨床的な問題も多く残されており、本研究ではこれらの病態解析を実施する。

### 3. 研究の方法

【1】迅速なアミロイドーシス早期診断システムの構築

【1-A】病理切片を用いた質量分析によるアミロイド原因蛋白質の迅速な同定法の確立

初年度は、主として、すでに確定診断がなされている各アミロイドーシス(ALアミロイドーシス 20例(λ型 10例、κ型 10例)、

AAアミロイドーシス 20例、FAP 20例、SSA 10例、透析アミロイドーシス 10例、角膜アミロイドーシス 5例、限局性アミロイドーシス 10例(咽頭、皮膚、眼瞼、消化管など)、ゲルソリンアミロイドーシス 4例)の病理組織(ホルマリン固定・パラフィン包埋)検体を用いて検討を行う。病理組織ブロックを薄切後にレーザーマイクロダイセクションにより、顕微鏡下でアミロイド沈着部位のみを選択的に分取し、新たな蛋白質可溶性試薬である Liquid Tissue®(Expression Pathology Inc.)を用い、蛋白質の可溶化とトリプシン酵素処理を行い、ペプチド断片へ分解する。このサンプルを LC-MS/MS で解析し、ソフトウェアで候補蛋白質の同定を行う。得られた候補蛋白質と、従来の手法で得られたアミロイド原因蛋白質を比較し、方法間の違いを検証する。また、以下に列挙する検体の持つ性質により、アミロイド原因蛋白質の検出率に違いが出るのが予測されるため、これらの要因による検出率の違いを検証し、臨床応用する時の参考データとする。1.原因蛋白質の種類(分子量の大きな蛋白質の方が、トリプシン処理後のペプチド断片が多いため検出しやすいと予測される。また、蛋白質の種類によって、アミロイド線維から可溶化され易さが異なる可能性がある。)2.レーザーマイクロダイセクションで分取するアミロイド沈着の量(分取する量が多いほど、検出率が高くなると予測される。)3.分取する組織部位(組織部位の違いにより、原因蛋白質と共に検出される他の蛋白質の種類や量が異なるため、原因蛋白質の同定率に差が生じると予測される。また、アミロイド沈着部位の違いにより、原因蛋白質がアミロイドから可溶化される程度に違いが生じると予測される。)また、並行して、新規のアミロイドーシス診断時に、従来の免疫組織化学染色に加えて、本方法による解析も実施し、前向き研究も開始する。

上記の解析法に加えて、従来から本研究室で検討を行ってきた、プロテインチップを用いたレーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(SELDI-TOFMS)による血清中の変異蛋白質のハイスループットな検出法(Clin Chem, 2009)や、real-time PCR法や全自動SNPs検査装置(i-densy IS-5310)などを活用した迅速な遺伝子変異の検出法や、高感度なアミロイド検出試薬(FSB)などの活用を組み合わせ、総合的なアミロイドーシス診断システムの構築を模索する。

【2】新規のアミロイドーシス原因蛋白質の同定

従来の手法(免疫組織化学染色など)では、アミロイド原因蛋白質の同定が困難であり確定診断に至っていない症例を対象に、前述の方法と同様に、病理組織切片の沈着部位からレーザーマイクロダイセクションでアミロイドを分取し、可溶化後に LC-MS/MS で原因蛋白質の同定を試みる。また、同定された候補分子に対する抗体を入手し(市販の抗体もしくは、抗体を受託研究にて作成)組

織に沈着しているアミロイドとの反応性を免疫組織化学染色にて検討する。また、候補原因分子の遺伝子配列を解析し、遺伝子変異・多型が存在するか検証する。加えて、原因分子のリコンビナント蛋白質を作製し、変性条件下でアミロイド線維を形成するか(チオフラビンT法による蛍光強度と電子顕微鏡下で形態学的に解析)検証し、同定された分子のアミロイド形成性を *in vitro* でも検討する。新たなアミロイド原因蛋白質が同定された場合には、他の原因不明の症例を対象に、多検体を用いてこれらの蛋白質が原因となる症例がどの程度存在するか解析する。

#### 4. 研究成果

LC-MS/MS を用いた解析法が、アミロイド原因蛋白質の同定法として有用であるか検証するために、後ろ向きおよび前向き解析を実施した。

本解析法でアミロイド原因蛋白質を同定できるか検証するために、すでに診断がついている各種アミロイドーシス (AL( $\kappa$ , $\lambda$ ), AA, SSA, FAP, DRA) 患者 25 例のホルマリン固定組織(心臓、神経など)を解析した。その結果、本解析法と臨床診断の一致率は、97%で、非常に高い一致率を示した。解析結果から、本法は、様々なタイプのアミロイドーシス患者からアミロイド原因蛋白質を同定できることが明らかとなった。さらに腎臓、消化管、舌などの様々な臓器でも解析を行ったが、いずれの臓器からでもアミロイド原因蛋白質の検出は可能であった

前向き解析として、病型診断に至っていないアミロイドーシス患者 21 例の組織を解析した。解析の結果、本法と臨床診断との一致率は 95%であった。本解析例には、原因蛋白質が不明であった角膜アミロイドーシス、1 例や従来法の免疫染色ではアミロイド原因蛋白質を同定できなかった AL アミロイドーシス、3 例のアミロイド沈着量が極わずかであった FAP、1 例が含まれており、本解析法の有用性が示された。

以上より新たなアミロイドーシス診断法として有用な方法であることが判明した。

高齢者の消化管に高率に認められる未知のアミロイドーシスに対して、laser micro-dissection と LC/MS MS を組み合わせた方法を駆使し、Fibrin3 が新たなアミロイド原因物質であることを同定発見した。また本タンパク質は脳のアミロイド小体の構成タンパク質であることも併せて明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 51 件)

1. Oshima T, Kawahara S, Ueda M, Kawakami Y, Tanaka R, Okazaki T, Misumi Y, Obayashi K, Yamashita T, Ohya Y, Ihse E, Shinriki S, Tasaki M, Jono H, Asonuma K, Inomata Y, Westermarck P, Ando Y, Changes in pathological and biochemical findings of systemic tissue sites in familial amyloid polyneuropathy more than 10 years after liver transplantation, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 査読有, vol.85, 2014, 740-746  
DOI: 10.1136/jnnp-2013-305973
2. Anno T, Higashi T, Hayashi Y, Motoyama K, Jono H, Ando Y, Arima H, Potential use of glucuronylglucosyl- $\beta$ -cyclodextrin/dendrimer conjugate (G2) as a siRNA carrier for the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy, *J Drug Target*, 査読有, vol.22, 2014, 883-890  
DOI: 10.3109/1061186X.2014.939984
3. Isono K, Jono H, Ohya Y, Shiraki N, Yamazoe T, Sugasaki A, Era T, Fusaki N, Tasaki M, Ueda M, Shinriki S, Inomata Y, Kume S, Ando Y, Generation of familial amyloidotic polyneuropathy-specific induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Res*, 査読有, vol.12, 2014, 574-583  
DOI: 10.1016/j.scr.2014.01.004
4. Misumi Y, Doki T, Ueda M, Obayashi K, Tasaki M, Tamura A, Ando Y, Myopathic phenotype of familial amyloid polyneuropathy with a rare transthyretin variant: ATTR Ala45Asp, *Amyloid*, 査読有, vol.21, 2014, 216-217  
DOI: 10.3109/13506129.2014.932277
5. Kawaji T, Inoue T, Hara R, Eiki D, Ando Y, Tanihara H, Long-term outcomes and complications of trabeculectomy for secondary glaucoma in patients with familial amyloidotic polyneuropathy, *PLoS One*, 査読有, vol.9, 2014, e96324  
DOI: 10.1371/journal.pone.0096324
6. Ericzon BG, Wilczek H, Larsson M, Wijayatunga P, Stangou A, Pena JR, Frutado E, Barroso E, Daniel J, Samuel D, Adam R, Karam V,

- Poterucha J, Lewis D, Ferraz-Neto BH, Cruz MW, MUnar-Ques M, Fabregat JF, Ikeda S, Ando Y, Heaton N, Otto G, Suhr O, Liver transplantation for hereditary transthyretin amyloidosis: After 20 years still the best therapeutic alternative?, Transplantation, 査読有, 2014  
DOI: 10.1097/TP.000000000000000574
7. Misumi Y, Ado Y, Goncalves NP, Saraiva MJ, Fibroblasts endocytose and degrade transthyretin aggregates in transthyretin-related amyloidosis, Lab Invest, 査読有, vol.93, 2013, 911-920  
DOI: 10.1038/labinvest.2013.83
8. Ando Y, Coelho T, Berk JL, Cruz MW, Ericzon BG, Ikeda S, Lewis WD, Obici L, Plante-Bordeneuve P, Rapezzi C, Said Salvi F, Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians, Orphanet J Rare Dis, 査読有, vol.1186, 2013, 1750-1172  
DOI: 10.1186/1750-1172-8-31
9. 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, 査読有, 19 Suppl 1, 2012, 37-38  
DOI: 10.3109/13506129.2012.678509
10. 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, 査読有, vol.92, 2012, 474-484  
DOI:10.1038/labinvest.2011.195
11. 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, 査読有, vol78, 2012, 637-643  
DOI:10.1212/WNL.0b013e318248df18
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
- 山下 太郎 (YAMASHITA TARO)  
熊本大学・医学部附属病院・特任教授  
研究者番号：90381003
- 山下 賢 (YAMASHITA SATOSHI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：20457592
- 植田 光晴 (UEDA MITUHARU)  
熊本大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60452885
- 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
- 田崎 雅義 (TASAKI MASAYOSHI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：50613402