

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860885

研究課題名(和文)皮膚アミロイド線維形成機序の解明

研究課題名(英文)Study on mechanisms of cutaneous amyloid fibril forming

研究代表者

峯 嘉子(MINE, Yoshiko)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：90381235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドーシスは、正常あるいは異常タンパク質が「何らかの契機」でその構造をシートに変え不溶性線維として体内に蓄積し、組織障害を起こす疾患群であるが、未だそのアミロイド線維形成機序は不明であると言って良い。皮膚アミロイドーシスを材料として検討を進め、ケラチン5の1部分がアミロイド線維を形成することを証明した。さらに本研究ではアミロイド線維に共存する細胞外マトリックス分子(ECM-X)を同定しそれをレコンビナント分子として調整し、それとケラチン5由来ペプチド相互作用を契機として線維形成が促進する可能性を証明した。本研究の成果はアミロイド線維形成の抑制方法の開発にもつながると考える。

研究成果の概要(英文)：Amyloidosis is a group of disease that destroys cells or tissues by accumulating insoluble materials with beta-sheet structure in cells. The precise mechanisms are not fully understood yet. Using cutaneous amyloidosis, we immunohistochemically demonstrated that cytokeratin(CK) 5 was collocated with amyloid fibrils (AF) in the dermis. We succeeded to show that one of synthetic peptides covering c-terminus of CK5 could form AF. Furthermore, we found a member of extracellular matrix (ECM-X) codistributed with AF in the dermis. By in vitro AF assay with ThT, we demonstrated that recombinant ECM-X accelerated F formation of CK5-derived peptide. Taken these, cutaneous AF formation proceeds with a help of special bystander such as ECM-X. The results of this unique points of AF formation may help drug development to amyloidosis in any organs.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アミロイド ケラチン 弾性線維

1. 研究開始当初の背景

皮膚アミロイドーシス (AD) ではアミロイド線維沈着量が少ないため純粹単離することが困難であり、また角化細胞が近傍に存在するので精製過程でケラチンが混入しやすいため、従来より免疫染色による検討のみが行われてきた。1980年代にはアミロイド沈着部分にケラチンが共存することが示された。しかし1990年代アミロイド線維に基底膜成分が含まれることも示され、さらに2000年代には数種類の異なったケラチン分子がアミロイド線維と共存することが示された。その後この分野の研究は止まっておりADのアミロイド線維の起源は現在でも確定できていない。ケラチンがアミロイド線維を形成することは他臓器では知られておらず、申請者はADのアミロイド線維形成には表皮・真皮の微小環境の存在が関与していると考えた。このような背景から、本研究ではまず以下の研究に発展させる。

ADのアミロイド線維に存在するケラチン分子の同定を行う。従来よりさらに厳密にケラチン種特異的染色が可能な抗体を選び免疫染色を行う。申請者らは予備実験で、アミロイド沈着部位にケラチン5が共存していることを見出した。

試験管内アミロイド線維形成アッセイのシステムにて、上記で同定したケラチン分子がアミロイド線維を形成しうるかを検証する。(本アッセイ法は、アルツハイマー病のβアミロイドタンパク質の線維形成アッセイ方法のケラチンへの初めての応用となる。)

申請者は予備実験の段階でADのアミロイド沈着が通常の塊状のみではなく、線維状にみえることも見出した。さらに真皮のこの位置で線維状構造物の1つとして弾性線維を想定し、数種類の弾性線維随伴分子 (MAP) を免疫染色にて検討したところアミロイド沈着と1種類のMAP分子が共存していた。

これまでも、アミロイドPタンパク質、apoEタンパク質、プロテオグリカンなどアミロイド線維と共存する物質は知られてきたが、その存在意義は不明部分も多い。現時点では、アミロイド線維を形成しうる蛋白質が「何らかの契機」により構造変化を起こしseed (種) となり、それが核になって線維形成が急速に進行すると推論されている。この仮説に基づいて、真皮上層においてのケラチンと弾性線維随伴分子 (MAP) との相互作用が、長年の疑問である「何らかの契機」として関与している可能性を詳細に解析することを思いついた。

2. 研究の目的

(1) アミロイド沈着部位に共存するケラチン分子を同定する：

サンプルは、アミロイド苔癬、班状アミロイドーシス、腫瘍随伴性アミロイドーシス、皮膚原発性結節性アミロイドーシスで、これらを用いて疾患特異性を精査する。抗体は現在市販されている抗ケラチンモノクローナル抗体で特異性が明らかな抗体のみを用いて免疫染色する。これにより、異なったケラチンがアミロイド沈着部位に共存するという過去の報告から想定される「他の臓器のアミロイドーシスにはみられない特徴」の真偽を検討する。

(2) アミロイド沈着部位に共存する弾性線維随伴分子を同定する：

弾性線維随伴分子 (MAP) の抗体を準備して、共染するMAPを免疫染色にて同定する。

(3) 試験管内線維形成アッセイにより、ケラチン分子のアミロイド線維形成能を検討する：

多くのアミロイド線維を形成する蛋白質は、αヘリックスから何らかの契機でβシートへの構造変換を受け、アミロイド線維へと伸長する。そこで申請者はケラチンαヘリックスドメインが角化細胞損傷をうけて部分分解さ

れ、単体になり構造変換を起こすという仮説を基に以下を明らかにする。

予備実験で存在を確認したCK5への抗体はC末端部位を認識するため、アミロイド蛋白質はCK5のC末端を含んでいると考えた。そこで、C末端部位の α ヘリックス部位をレコンビナント蛋白質、もしくは合成ペプチドで作成し、試験管内での構造変化を ■ β シートへの構造変換(円二色性(CD)スペクトル測定)で、ならびにアミロイド線維形成能力を ■コンゴ赤結合試験、 ■チオフラビンT結合試験、 ■電子顕微鏡での線維観察にて証明する。

(4) 弾性線維随伴分子がケラチンのアミロイド線維形成を促進するか検討する：

真皮における何らかの因子がケラチンをアミロイド線維へと変換すると考え、分子間同士の結合の可能性を固相の実験系にて検討する。このためには、MAPは糖鎖を有する生理的な構造を保っていることが望ましく、レコンビナントタンパク質はほ乳類細胞で作成し精製する。さらにMAPがケラチンのアミロイド線維形成活性へ及ぼす影響を、この2分子を共存させた上で試験管内アッセイにて検討する。

3. 研究の方法

本研究は以下の計画に従って進めていった。

1. アミロイド沈着部位でのケラチン分子の共存の証明
2. アミロイド沈着部位での弾性線維随伴分子の共存の証明
3. ケラチン分子の試験管内アミロイド線維形成能力の検定
4. 試験管内アミロイド線維形成に対する弾性線維随伴分子の促進活性

■抗ケラチン抗体による染色で複数のケラチン分子がアミロイド沈着部位に共存しているという結果が生じている。そこで抗体の特異性の検討を行うため琉球大学皮膚科の高橋健造が参加した。高橋は、ケラチン代謝・構造解析に豊富な知識を有している

(JDS 2009; JID 2009)。

■長崎大学皮膚科の宇谷厚志は、皮膚科専門医単位のための教育講演でアミロイドーシスを受け持つなど豊富な知識を有し、症例サンプルを多数現有している(日本皮膚科学会雑誌 2007)。

■東京薬科大学病態生化学の片桐文彦は、アミロイド線維形成アッセイの専門家として参加する。基底膜ラミニン分子がアミロイド線維を試験管内で形成することを報告している(Biochemistry 2010, 2013)。

■大分大学医学部生化学の佐々木隆子は長年にわたり細胞外マトリックスのレコンビナント蛋白質作成(J. Biol. Chem, 2007)に携わっており弾性線維随伴分子(MAP)の作成専門家として参加した。

今回、彼らの参加により、ケラチンのアミロイド線維形成を免疫組織学的評価と生化学的検証の両面から検討し、ADのアミロイド線維の由来を明らかにし、さらに試験管内アミロイド線維形成に対する弾性線維随伴分子の促進活性の有無を詳細に検証することが可能である。

平成 26 年度

(1) アミロイド沈着部位でのケラチンの同定

準備の済んでいる斑状、丘疹状アミロイドーシス、アミロイド苔癬、皮膚腫瘍随伴性続発性アミロイドーシス及び、陰性コントロールとして限局性皮膚結節性マイロイドーシス、原発性アミロイドーシスなどの症例の組織標本を用いて行う。すでに、ケラチン1, 5, 6, 10, 14, 16, 17のモノクロー抗体で染色条件を決定している。これまで数例のADに対してケラチン染色を行った。

(2) アミロイド沈着部位に共存する弾性線維随伴分子のスクリーニング

弾性線維随伴分子の fibrillin-1, fibulin-4, -5, elastin, LTBP-1, -2, -3, -4, versican, hyaluronan に対する抗体を使用し

て染色する。すでに抗体は取得・購入し、染色条件は決定している。

(3) ケラチン分子の試験管内アミロイド線維形成能力の検定

免疫染色で共存が証明されたケラチン5のC末端 α ヘリックス部分を6つの20-30アミノ酸残基の合成ペプチドで作成し、試験管内アミロイド線維形成能力を検定した。

■予備実験で、ケラチン5の合成ペプチドだけが、試験管内で β シート構造（アミロイド線維基本構造）に構造変化した。このアッセイ方法の条件設定を用いて、他のケラチン分子に範囲を拡げて検証した。

■チオフラビンT結合試験：ケラチン5由来のペプチドは β アミロイド（A β 22-35）と同様にアミロイド線維を形成した。他のペプチドでの検討、また形成速度などの検討を行った。このほか■Congo-red結合試験 ■電子顕微鏡による線維形成を確認した。

平成27年度

(1) アミロイド沈着部位でのケラチンの同定

ADの臨床型に応じて症例数を増やして、データの補強を行った。

(2) ケラチン分子の試験管内アミロイド線維形成能力の検定を継続して行う。

アミロイド線維を形成しうるケラチン候補分子の線維形成活性測定を継続する。またケラチン分解過程においてどの程度分解を受けるとアミロイド線維を形成しやすい性質を獲得するかなどはレコンビナントタンパク質、合成ペプチドを用いて検討した。

(3) 試験管内アミロイド線維形成に対する弾性線維随伴分子の促進活性

27年度は弾性線維随伴分子をレコンビナントタンパク質としてほ乳類動物細胞で作成し、試験管内アミロイド形成への影響をみた。免疫染色で共存することが判明した1種類のMAP分子をレコンビナントタンパク質として発現させ精製した（佐々木）。このレコ

ンビナントタンパク質を、ケラチン由来合成ペプチドと混合し、その結合能力を固相アッセイで、ならびにアミロイド線維形成促進活性を時間的生成量でモニターすることをを行う。

4. 研究成果

(1) アミロイド沈着部位に共存するケラチン分子を同定した：

アミロイド苔癬、斑状アミロイドーシス、腫瘍随伴性アミロイドーシス、皮膚原発性関節性アミロイドーシスを用いて抗ケラチンモノクローナル抗体で特異性が明らかな抗体のみを用いて免疫染色した。これによりケラチン5がアミロイド沈着部位に共存することが判明した。

(2) アミロイド沈着部位に共存する弾性線維随伴分子を同定した：

弾性線維随伴分子（MAP）の市販されている抗体を準備して、MAPの1つであるECM-Xを免疫染色にて共染することを証明した。

(3) 試験管内線維形成アッセイにより、ケラチン分子のアミロイド線維形成能を検討した：

CK5、ならびにCK1, 14の相同部位のC末端部位を30本の合成ペプチドで作成した。試験管内での構造変化を、 β シートへの構造変換を円二色性（CD）スペクトル測定で、ならびにアミロイド線維形成能力をコンゴ赤結合試験、チオフラビンT結合試験、電子顕微鏡での線維観察にて証明した。

(4) 弾性線維随伴分子がケラチンのアミロイド線維形成を促進するか検討した：

真皮における何らかの因子がケラチンをアミロイド線維へと変換すると考え、分子間同士の結合の可能性を固相の実験系にて検討した。レコンビナントタンパク質はほ乳類細胞で作成し、ペプチドと共存させケラチンのアミロイド線維形成活性へ及ぼす影響をみたと

ころ、明らかに線維形成促進作用を有していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

1. Mine Y, Iwanaga A, Ikehara S, Koike Y, Takamura N, Utani A: Pseudoxanthoma elasticum-like skin lesions with congenital erythropoietic porphyria. Eur J Dermatol 24(3): 401-402, 2014 (査読有)
DOI: 10.1684/ejd.2014.2335

〔学会発表〕（計2件）

1. 上尾大輔、阿南 隆、波多野 豊、藤原作平、大久保佑美、與崎マリ子、峯 嘉子、宇谷厚志：家族性アミロイドーシスの1家系。第67回日本皮膚科学会西部支部学術大会（2015/10/17～10/18, 長崎市・長崎ブリックホール他）
2. 宇谷厚志、片桐文彦、佐々木隆子、野水基義、臼井 文、鋤塚さやか、峯 嘉子：皮膚アミロイドはケラチン由来か？ 第22回分子皮膚科学フォーラム（2015/4/17～4/18, 高知市・ホテル日航高知旭ロイヤル）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯 嘉子 (MINE, Yoshiko)

長崎大学・病院（医学系）・助教

研究者番号：90381235