

令和元年6月21日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21066

研究課題名(和文) フィブリノーゲン型腎アミロイドーシスの分子病態解明と診断・新規治療法開発への応用

研究課題名(英文) Elucidation of molecular pathogenesis of AFib amyloidosis and therapeutic development

研究代表者

吉長 恒明 (Yoshinaga, Tsuneaki)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：30770226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：FGA遺伝子の4899_4902delAGTG変異が導入されたヒト型fibrinogenを産生するChinese Hamster Ovary(CHO)細胞の検体を用いて解析を行った。細胞培養の途中で採取される培養上清(細胞外成分)とCHO細胞自体を破壊して採取される細胞破砕液(細胞内成分)を用いた。異常A鎖を検出するため、細胞破砕液において免疫沈降法の後、SDS-PAGEゲルを切り出し質量分析法を用いた。正常A鎖からは600の末端まで検出され、異常A鎖では475近傍までであり、その後は検出できなかった。生成された蛋白は正常型に比べ、より不安定で分解しやすいと判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦初の変異を有するフィブリノーゲン型アミロイドーシスの細胞モデルを用いて、変異蛋白の解析を行った。本変異を有する患者血漿からは異常fibrinogenが検出できなかったことから異常A鎖をもつフィブリノーゲンは早期の段階で生体内のプロテアーゼで分解されており、その断片が一部アミロイド構造にいたって腎臓などに沈着すると想定している。本研究結果からはこの変異を有するフィブリノーゲンA鎖が野生型に比べ、より早期の段階で分解されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We performed the analysis of variant protein using a sample of Chinese Hamster Ovary (CHO) cells producing human type fibrinogen into which 4899_4902 delAGTG mutation of FGA gene. We compared the two sample ; culture supernatant and the disrupted cell. in order to detect an abnormal protein, SDS-PAGE was performed after immunoprecipitation in a cell lysate, and the gel was cut out and to mass spectrometry. In the result, the protein generated from the normal A chain was detected up to the end of 600, the abnormal A chain was around 475, and could not be detected thereafter, and it was found that the produced protein was more unstable and prone to degradation than the normal type.

研究分野：神経内科

キーワード：アミロイドーシス 腎アミロイドーシス フィブリノーゲン 遺伝性アミロイドーシス

1. 研究開始当初の背景

本邦における遺伝性アミロイドーシスの実状

アミロイドーシスは、原発性 AL アミロイドーシス (免疫グロブリンの軽鎖由来の蛋白がアミロイド線維となる) に代表される非遺伝性アミロイドーシスと、アミロイド前駆蛋白をコードする遺伝子内の変異に起因する遺伝性アミロイドーシスに大別される。本邦で最も代表的な遺伝性アミロイドーシスは、トランスサイレチン (TTR) 遺伝子変異に起因する家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) である。一方、欧米諸国では FAP 以外に、腎臓が主体に障害されるフィブリノーゲン型アミロイドーシス (AFib アミロイドーシス) が有名であり、FAP に次いで患者数が多い。しかしながら、これまで本邦では一例も同定されていなかった。

フィブリノーゲン型アミロイドーシスは、遺伝性腎アミロイドーシスの代表疾患であり、欧米諸国に患者が集積している。研究代表者は、国内では初となる本アミロイドーシス患者を同定した。本症では過去に 9 種の遺伝子変異が同定されているが、自験例では、既報告とは異なる新規の 4 塩基欠失によるフレームシフト変異であった (c.4899_4902delAGTG)

本症ではフィブリノーゲンのフラグメントがアミロイド線維を形成することは明らかにされているが、どのような機序でアミロイド原性を持つフラグメントが形成されるのかは不明である。

今回我々は、本患者の遺伝子変異 (新規変異) を組み込んだ CHO 細胞系を確立し、変異蛋白の産生動態の解析から、アミロイド原性フラグメントが形成される機序を解明する。

本患者のアミロイド蛋白を生検組織から抽出し、タンデムマスで解析したところ、610 個のアミノ酸で構成される fibrinogen A 鎖の 411 番から始まる 136 個のアミノ酸 (分子量約 13kDa) で形成されていることを確認している (図 1)。

患者 (下段がこの患者のアミロイド蛋白の一次構造) では、523 番以降のアミノ酸は、フレームシフト変異で全て置換され、正常配列 (上段) と異なっている。

本患者の遺伝子変異を含めて、これまで報告された全てのアミロイド関連変異は、C 末端側の 520 番から 554 番目の配列内に生じている。アミロイド蛋白の長さ自体は、変異によって差はあるものの、全ての変異で 500-520 番の配列が共通しており、520 番以降の部位に変異が生じると、構造変化などから、本来 fibrinogen や fibrin を破壊する蛋白分解酵素により 500-520 番とその近傍の配列が、うまく切断できずに凝集する可能性を考えている。

海外では肝腎移植の有効性が確立しているが、本邦では施行は困難であり、本研究の成果で、本アミロイドーシスの発症機序への解明と肝腎移植以外の治療法開発へ繋げたい。

2. 研究の目的

今回の研究では、特に日本人に独自に生じた新規変異による AFib アミロイドーシスの分子病態を解析することで、AFib アミロイドーシスの発症機序を解明し、まだ診断できていない本邦患者に対しての早期診断法の検討、新たな治療戦略の確立を目指す。

3. 研究の方法

CHO 細胞に患者変異を導入・培養後、産生される fibrinogen 蛋白を解析し、変異 fibrinogen の機能、thrombin 添加による fibrin 生成機能、plasmin などの蛋白分解酵素に対する反応から、野生型と比較した変異蛋白の分子動態を解析する。

4. 研究成果

FibrinogenA 鎖遺伝子の 4899_4902delAGTG 変異が挿入されたヒト型 fibrinogen を産生する Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞の検体を用いて解析を行った。細胞培養の途中で採取される培養上清 (細胞外成分) と CHO 細胞自体を破壊して採取される細胞破砕液 (細胞内成分) を用いて比較検討の方法をとった。これらの溶液内の異常 A 部位の検出を最優先とし、まず細胞破砕液において SDS-PAGE をし、通常の CBB 染色と免疫沈降法 (抗フィブリノーゲン抗体) を用いて実験を施行した。数か所の陽性バンド部位からゲルを切りとり、質量分析計にかけたが A 鎖自体が検出されなかった。

以前施行された Western blot の陽性部位と照らし合わせ (陽性バンドと異なる分子量の位置) 陽性バンド以外を狙って A 検出部位をバンド上 (白抜き) で同定することができた (図 2)。

次に質量分析計で検出された結果について述べる。

実験の結果、検出されたペプチド (黄色文字) を比較すると 1 (523AGTG) では C 末端側の検出率が悪く、分解されている。しかし変異を含むペプチド (赤色文字) は検出できなかった。ゲル末端に関して de novo sequence を行っても同様であった。

質量分析の結果得られたペプチドは正常 A 鎖で 600 の末端近くまで検出されるが、異常 A 鎖では 475 近傍までのみであり、その後は検出されなかった (図 3)。

生成された蛋白は正常型に比べ、より不安定で分解しやすいことが質量分析結果からも推測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

された。この変異 A 鎖の断端がゲルのより分子量の小さいところに流れていないか de novo シークエンス (ペプチドの一部のみでも推測する方法) を用いておこなったが、変異ペプチドの断端は得られなかった。
変異ペプチドが同定できないため、分解を遅らせるプロテアーゼの投与はおこなわなかった (介入前後での結果比較が難しいため)。

図 1: 本患者のアミロイド蛋白のシークエンス

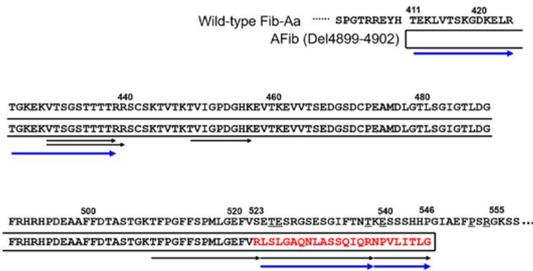
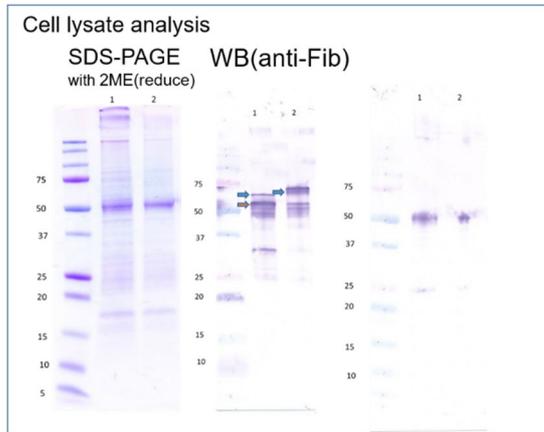


図 2: 細胞破砕液の SDS-PAGE を行ったゲルと抗フィブリノーゲン抗体を用いた Western blotting



SDS-PAGE shows no differences in 1 ($\Delta 523AGTC$) and 2 (wild-type) but, WB(anti-Fib) shows differences such as arrows.

図 3: LC-MS/MS で得られたペプチド

Fibrinogen A alpha peptide 1($\Delta 523AGTC$)
(with del4893 mutation(Japanese original))
MFSMRIVCLVLSVVGTAWADSGEGDFLAEGGGVGRPRVVERHQ
SACKDSWPFCSDEDWNYKCPSGCRMGLIDEVNQDFTNRINKLNLSFEYQKNNKDS
HSLTTNIMEILRGDFSSANNRDNTYNRVSEDLRSRIEVLKRVIEKVQHIQLLQKNVR
AQLVDMKRLEVDIDIKIRSCRGSCSRALAREVDLKDYEQQKLEQVIAKDLLPSRDR
QHLPLIKMKPVPDLVPGNFKSQKQVPEWKALDMPQMRMELERPGGNEITRGGSTS
YGTGSETESPRNPSSAGSWNSGSSGPGSTGNRNPSSGTTGGTATWKPSSGPGSTGSW
NSGSSGTGTGNQNPSPRPGSTGTWNPSSSERGSAGHWTSESSVSGSTGQWHSSEGS
FRPDSPGSGNARPNPDWGTFFEEVSGNVSPGTRREYHTEKLVTSKDKELRTGKEKVT
SGSTTTTRRSCSKTVTKTVIGPDGHKEVTEVVTSDEGSDCPEAMD LGLT LSGIGTLDG
FRHRHPDEAAFFDTASTGKTFPGFFSPMLGEFVRLSLGAQNLASSQIQRNPVLIITLGG
De novo Peptide

Fibrinogen A alpha (wild type) peptide 2(wild type FGA)
MFSMRIVCLVLSVVGTAWADSGEGDFLAEGGGVGRPRVVERHQ
SACKDSWPFCSDEDWNYKCPSGCRMGLIDEVNQDFTNRINKLNLSFEYQKNNKDS
HSLTTNIMEILRGDFSSANNRDNTYNRVSEDLRSRIEVLKRVIEKVQHIQLLQKNVR
AQLVDMKRLEVDIDIKIRSCRGSCSRALAREVDLKDYEQQKLEQVIAKDLLPSRDR
QHLPLIKMKPVPDLVPGNFKSQKQVPEWKALDMPQMRMELERPGGNEITRGGSTS
YGTGSETESPRNPSSAGSWNSGSSGPGSTGNRNPSSGTTGGTATWKPSSGPGSTGSW
NSGSSGTGTGNQNPSPRPGSTGTWNPSSSERGSAGHWTSESSVSGSTGQWHSSEGS
FRPDSPGSGNARPNPDWGTFFEEVSGNVSPGTRREYHTEKLVTSKDKELRTGKEKVT
SGSTTTTRRSCSKTVTKTVIGPDGHKEVTEVVTSDEGSDCPEAMD LGLT LSGIGTLDG
FRHRHPDEAAFFDTASTGKTFPGFFSPMLGEFVSETESRGSESGIFTNKESSHHHPG
IAEFPFRGKSSSYKQFTSSTSYNRGDSTFESKSYKMADEAGSEADHEGHTSRGHAHSRVP

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Ogawa Y, Nakamura K, Ezawa N, Yamaguchi T, Yoshinaga T, Miyazaki D, Kosho T, Sekijima Y. A novel CACNA1A nonsense variant in a patient presenting with paroxysmal exertion-induced dyskinesia. *J Neurol Sci* 399:214-216, 2019 (査読あり)
2. Shintani Y, Okada A, Morita Y, Hamatani Y, Amano M, Takahama H, Amaki M, Hasegawa T, Ohta-Ogo K, Kanzaki H, Ishibashi-Ueda H, Yasuda S, Shimazaki C, Yoshinaga T, Yazaki M, Sekijima Y, Izumi C. Monitoring treatment response to tafamidis by serial native T1 and extracellular volume in transthyretin amyloid cardiomyopathy. *ESC Heart Failure* 6:232-236, 2019 (査読あり)
3. Miyake Z, Nakamagoe K, Ezawa N, Yoshinaga T, Hashimoto R, Sato T, Sekijima Y, Tamada A. Late-onset Transthyretin (TTR)-familial Amyloid Polyneuropathy (FAP) with a Long Disease Duration from Non-endemic Areas in Japan. *Intern Med* 58:713-719, 2019 (査読あり)
4. Ezawa N, Katoh N, Oguchi K, Yoshinaga T, Yazaki M, Sekijima Y. Visualization of multiple organ amyloid involvement in systemic amyloidosis using ¹¹C-PiB PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 45:452-461, 2018 (査読あり)
5. Yazaki M, Yoshinaga T, Sekijima Y, Kametani F, Okumura N. Hereditary Fibrinogen A_α-Chain Amyloidosis in Asia: Clinical and Molecular Characteristics. *Int J Mol Sci* :19, 2018 (査読あり)
6. Sekijima Y, Koyama S, Yoshinaga T, Koinuma M, Inaba Y. Nationwide survey on cerebrotendinous xanthomatosis in Japan. *J Hum Genet* 63: 271-280, 2018 (査読あり)
7. Yoshinaga T, Nakamura K, Ishikawa M, Yamaguchi T, Takano K, Wakui K, Kosho T, Yoshida K, Fukushima Y, Sekijima Y: A novel frameshift mutation of SYNE1 in a Japanese family with autosomal recessive cerebellar ataxia type 8. *Hum Genome Var* 4:17052, 2017 (査読あり)
8. Yoshinaga T, Yazaki M, Ohno M, Kodama S, Koyama J, Sekijima Y. Cardiac Amyloidosis Associated With Amyloidogenic Transthyretin V122I Variant in an Elderly Japanese Woman. *Circ J* 81:893-894, 2017 (査読あり)
9. Yoshinaga T, Yazaki M, Kametani F, Sekijima Y, Iesato Y, Miyahara T, Tsuchiya-Suzuki A, Sano K, Higuchi K, Ikeda SI. Marked biochemical difference in amyloid proportion between intra- and extraocular tissues in a liver-transplanted patient with hereditary ATTR amyloidosis. *Amyloid* 24:17-23, 2017 (査読あり)
10. Fujita T, Ichikawa S, Okitsu Y, Fukuhara N, Yoshinaga T, Yazaki M, Harigae H. Primary AL amyloidosis presenting with systemic lymphadenopathy with calcification. *Int J Hematol* 104:641-643, 2016 (査読あり)
11. Sekijima Y, Yazaki M, Oguchi K, Ezawa N, Yoshinaga T, Yamada M, Yahikozawa H, Watanabe M, Kametani F, Ikeda S. Cerebral amyloid angiopathy in posttransplant patients with hereditary ATTR amyloidosis *Neurology* 87:773-81, 2016 (査読あり)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

12. Nakagawa M, Sekijima Y, Yazaki M, Tojo K, Yoshinaga T, Doden T, Koyama J, Yanagisawa S, Ikeda SI. Carpal tunnel syndrome: a common initial symptom of systemic wild-type ATTR (ATTRwt). Amyloid 23:58-63, 2016 (査読あり)
13. Yoshinaga T, Yazaki M, Sekijima Y, Kametani F, Miyashita K, Hachiya N, Tanaka T, Kokudo N, Higuchi K, Ikeda S. The pathological and biochemical identification of possible seed-lesions of transmitted transthyretin amyloidosis after domino liver transplantation. J Path Clin Res 2:72-79, 2016 (査読あり)
14. Abe R, Sekijima Y, Kinoshita T, Yoshinaga T, Koyama S, Kato T, Ikeda SI. Spinal form cerebrotendinous xanthomatosis patient with long spinal cord lesion J Spinal Cord Med 39:726-9, 2016 (査読あり)

[学会発表](計 13 件)

1. 吉長恒明、矢崎正英、上原剛、亀谷富由樹、小松修、関島良樹 消化管アミロイドーマ患者から同定した野生型シスタチン C 型アミロイドーシス(第 2 報) 第 6 回日本アミロイドーシス研究会 2018 年 8 月 長野県松本市
2. 吉長恒明、加藤修明、上野賢一、佐藤充人、矢崎正英、亀谷富由樹、安田日出夫、渡邊恭平、関島良樹、肝腎精巣アミロイドーシスを呈した遺伝性 AApoA1 型アミロイドーシスの一例 第 142 回信越地方会 2018 年 6 月 新潟県新潟市
3. 吉長 恒明、矢崎 正英、亀谷 富由樹、関島 良樹 ドミノ移植後レシピエントにおける医原性アミロイドーシスの臨床病理学的検討(第 2 報) 第 59 回日本神経学会学術集会 2018 年 5 月 北海道札幌
4. 吉長 恒明、加藤 修明、矢崎 正英、関島 良樹 本邦初の遺伝性アミロイドーシス患者の同定:Lasermicrodissection(LMD)を用いたアミロイド蛋白解析の有効性 第 115 回日本内科学会総会 2018 年 4 月 京都府京都市
5. Yoshinaga T, Yazaki M, Sekijima Y, Kametani F, Uehara T, Komatsu O, Sekijima Y First Case of Wild-Type Cystatin C Amyloidosis Identified from Granulomatous Amyloidoma in the Rectum th International Symposium on Amyloidosis. March, 2018 Kumamoto
6. Yoshinaga T, Yazaki M, Sekijima Y, Kametani F, Okumura N. Production and biochemical analysis of mutated fibrinogen A α produced by CHO cells with Δ 523 AGTC in FGA (Japan original mutation) th International Symposium on Amyloidosis. March, 2018 Kumamoto
7. 吉長恒明、加藤修明、上野賢一、佐藤充人、矢崎正英、亀谷富由樹、安田日出夫、渡邊恭平、関島良樹、肝腎精巣アミロイドーシスを呈した遺伝性 AApoA1 型アミロイドーシスの一例 第 5 回日本アミロイドーシス研究会 2017 年 8 月 京都
8. 吉長恒明、矢崎正英、亀谷富由樹、上原剛、小松修、関島良樹 消化管アミロイドーマ患者から同定した野生型シスタチン C 型アミロイドーシスの一例 第 5 回日本アミロイドーシス研究会 2017 年 8 月 京都
9. 吉長恒明、矢崎正英、関島良樹、亀谷富由樹、池田修一 ドミノ肝移植レシピエントにおける医原性アミロイドーシスの臨床生化学的検討. 第 34 回日本神経治療学会総会 2016 年 11 月 米子
10. 吉長恒明、矢崎正英、関島良樹、亀谷富由樹、池田修一 ドミノ移植後アミロイドーシスの臨床病理学的検討 一施設検討 第 4 回日本アミロイドーシス研究会学術集会 2016 年 8 月 東京

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

11. Yoshinaga T, Yazaki M, Sekijima Y, Ikegami T, Miyagawa S, Ikeda S
Clinicopathological characterizations of transmitted transthyretin amyloidosis after domino liver transplantation: a single-center experience th International Symposium on Amyloidosis. May, 2016 Upusala
12. Yoshinaga T, Yazaki M, Sekijima Y, Kametani F, Hachiya N, Higuchi K, Ikeda S. The first pathological and biochemical identification of seed-lesions of transmitted transthyretin amyloidosis after domino liver transplantation th International Symposium on Amyloidosis. May, 2016 Upusala
13. 吉長恒明、矢崎正英、関島良樹、亀谷富由樹、池田修一 De novo amyloidosis(医原性 FAP)における生化学的解析とその臨床像 第 57 回 日本神経学会学術大会 神戸 2016 年

〔図書〕(計 3 件)

14. 吉長 恒明、矢崎 正英 日本人で見出された遺伝性腎アミロイドーシス アミロイドーシスの最新情報 医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社:739-742
15. 吉長 恒明、関島 良樹
脳腱黄色腫症の画像所見の特徴 神経内科 2017;86(3):368-373
16. 吉長 恒明、最新アミロイドーシスのすべて 診療ガイドライン 2017 と Q&A CQ 7-9 医歯薬出版株式会社、p64-70

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

代表者：吉長恒明 (Tsuenaki Yoshinaga)

信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科、助教/信州大学先鋭領域融合研究群 バイオメディカル研究所

研究協力者：奥村伸生(Nobuo Okumura)

信州大学保健学科

矢崎正英(Masaide Yazaki)

信州大学保健学科/信州大学先鋭領域融合研究群 バイオメディカル研究所

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。