



# AA アミロイドーシス発症制御因子の解明

## ーアミロイドーシスの病態に関わる糖鎖合成制御因子と翻訳後修飾ー

### 1. 研究の目的

アミロイドーシスは、原因となる前駆タンパク質が線維状の構造をもつアミロイドとして組織に沈着し、細胞や組織の機能を障害することで起こる疾患の総称である。代表的な全身性アミロイドーシスである AA アミロイドーシスは炎症性疾患の合併症として発症するケースが多く、抗炎症作用を示す生物製剤の開発により発症頻度は低下傾向を示しているが、炎症性疾患をもっているにもかかわらず AA アミロイドーシスを発症すると人とならない人がおり、この違いを引き起こす原因は明らかでない。アミロイド前駆タンパク質の変異や翻訳後修飾と糖鎖に着目し、AA アミロイドーシスの進展への関与を調べる。病理学的な解析から、AA アミロイドーシス患者組織で、翻訳後修飾を受けた血清アミロイド A (SAA) 分子や細胞外マトリクス成分である硫酸化糖鎖の一種、グリコサミノグリカン (GAG) が検出されていることから、これらがアミロイドーシスの病態に深く関わる可能性が示唆されているが、その分子基盤は不明であるため、本研究で明らかにする。

### 2. 研究の計画

#### (1) SAA 由来アミロイド線維の細胞毒性に及ぼす翻訳後修飾の影響

前年度において、SAA由来アミロイド線維のヒト胎児腎細胞 (HEK293) に対する毒性を評価したところ、細胞内の脱水素酵素活性を測定するMTTアッセイでは化学修飾の有無によらず同様の濃度依存的な毒性を示したのに対して、細胞膜損傷に伴う細胞内物質の漏出を検出するLDHアッセイではいずれの試料も毒性を示さない結果となった。また、アミロイド線維添加時の細胞の様子を顕微鏡で観察したところ、MTT試薬の添加により細胞外にその代謝物と思われる突起状の結晶が出現した。すなわち、アミロイド線維の非添加時には認められない異常現象が起こることから、アミロイド線維が細胞に対して「毒性」を示していると考えられたが、「細胞死」のような明確なものではないことが示された。以上の結果を踏まえ、アミロイド線維がもたらす細胞への異常現象を、その根底にあるメカニズムとともに明らかにすることを計画した。

#### (2) GAGによるアミロイド線維形成促進機構とヒト臨床検体におけるEXTL2遺伝子の発現変化に関する解析

- ① これまでの解析から、EXTL2欠損マクロファージではカテプシンの活性化の亢進によりSAAのプロセッシング能が上昇している可能性が示唆されている。SAAはインフラマソームの一種である NLRP3 の活性化を介してプロカスペーゼ1からカスペーゼ1への変換を引き起こすことが知られているため、野生型マウス及びEXTL2遺伝子欠損マウスから腹腔マクロファージを単離し、SAAで刺激した後、カスペーゼ1の活性化レベルを測定した。
- ② ヒトの臨床検体を用いてEXTL2遺伝子の発現を調べた。また、抗EXTL2抗体を用いて組織染色を行い、タンパク質レベルでのEXTL2の発現を調べた。

### 3. 研究の成果

#### (1) SAA 由来アミロイド線維の細胞毒性に及ぼす翻訳後修飾の影響

MTT アッセイと同様に脱水素酵素活性を測定するが、MTT アッセイとは異なり発色色素が細胞内に取り込まれない WST-8 アッセイによる毒性評価を行った結果、SAA 由来アミロイド線維を添加しても酵素活性がほとんど低下しないことが認められた。このことは、SAA 由来アミロイド線維が酵素活性に直接作用するのではなく、細胞内に取り込まれた後、細胞内での発色色素の代謝過程に関与することを示唆している。実際に、MTT アッセイにおいて認められる“毒性”は、単に生成した物質のエキソサイトーシスがアミロイド線維によって促進された結果を反映しているに過ぎないという指摘もある。そこで、MTT 代謝物のエキソサイトーシスに関与することが示唆されている Sigma-2 受容体 (J. Neurosci. Res. 2021; 99: 1161-1176.) の阻害剤存在下において MTT アッセイを行った。その結果、阻害剤非存在下と同様の挙動が認められ、Sigma-2 受容体を介した MTT 代謝物のエキソサ

イトーシス促進が細胞への異常現象をもたらしている可能性は低いと考えられた。

(2) GAGによるアミロイド線維形成促進機構とヒト臨床検体におけるEXTL2遺伝子の発現変化に関する解析

- ① 野生型マウス及びEXTL2遺伝子欠損マウスから腹腔マクロファージを単離し、SAAで刺激した後、SAAのプロセッシングに関与するカテプシンの活性化に関わるカスパーゼ1の活性化レベルを測定した。予想通り、野生型マクロファージと比較して、EXTL2欠損マクロファージでカスパーゼ1の活性が高かった。
- ② ヒトの臨床検体(腎臓・大腸)を用いて、AAアミロイドーシス患者でEXTL2遺伝子の発現が劇的に低下していることが明らかになった。EXTL2遺伝子と同じファミリーに属するEXTI1遺伝子の発現は、AAアミロイドーシス患者においてもコントロール検体とほぼ同じレベルの発現を示した。抗EXTL2抗体を用いて組織染色を行うことで、タンパク質レベルでもEXTL2の発現が低下していることが示された。

#### 4. 研究の反省・考察

(1) SAA由来アミロイド線維の細胞毒性に及ぼす翻訳後修飾の影響

SAA由来アミロイド線維が細胞内での発色色素の代謝過程に関与すると考えられたことから、まずはどのようにSAA由来アミロイド線維が細胞へ取り込まれるかを調査する必要がある。具体的には、Aβペプチド由来アミロイド線維の細胞内取り込みにおいて関与が指摘されているヘパラン硫酸プロテオグリカンや細胞表面受容体を介した取り込み機構を解明する。また、SAAの翻訳後修飾に伴う線維形態の差異が示唆されていることから、今後、細胞への取り込みや細胞毒性に及ぼす翻訳後修飾の影響についても調べる。

(2) GAGによるアミロイド線維形成促進機構とヒト臨床検体におけるEXTL2遺伝子の発現変化に関する解析

- ① EXTL2遺伝子の欠損により、SAAのプロセッシングに関与するカテプシンの活性化に関わるカスパーゼ1の活性化が起きていることが明らかとなった。SAA受容体としてP2X7受容体が知られており、この受容体の活性化によりインフラマソームが活性化し、カスパーゼ1の活性化を促進することが知られている。EXTL2遺伝子の欠損により合成される疾患関連GAGがどのような機序でP2X7受容体の活性化に関与するかについて調べる必要がある。
- ② AAアミロイドーシス患者の検体を可能な限り入手し、EXTL2遺伝子の発現をRNAレベル及びタンパク質レベルで調べたが、ポピュラーな疾患でないため入手できた検体数に限りがああり、調べた検体数は10例に満たなかった。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 田中将史、寶田徹、山田俊幸、灘中里美、北川裕之  
血清アミロイドAの化学修飾が構造特性やアミロイド線維形成に及ぼす影響  
日本薬学会 第143年会、札幌、2023年3月 (ポスター)

(3) 出版物

なし