

Cysteine is a key factor of amyloidogenesis and importance of environment factor in type I familial amyloidotic polyneuropathy: Implications for developing an innovative therapy for amyloidosis

by

Yoshiyuki SAKAKI\*

Yutaka TAKAOKA\*, Mika OHTA\*\*, Misao SUZUKI\*\*, Ken-ichi YAMAMURA\*\*,

Kazuhisa MIYAKAWA\*\*\*, Kiyoshi TAKAHASHI\*\*\*

from

\*Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo

\*\*IMEG, Kumamoto University School of Medicine

\*\*\*Second Department of Pathology, Kumamoto University School of Medicine

Amyloidosis is a malignant disorder whose molecular processes are still unknown. Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) is a good research model to understand the process of amyloidogenesis. The hereditary form of amyloidosis, FAP, is a systemic amyloidosis characterized by the aggregation of abnormal transthyretin (TTR) into stable and insoluble fibrils. Type I FAP, the most common type, is caused by the substitution of Val to Met at position 30 of TTR. Previously, to provide an understanding of the molecular basis for amyloidogenesis, we produced a native TTR and its variant (Met30 TTR) by recombinant methods. These TTR products were crystallized to do X-ray structure analysis. Our X-ray research indicated that the thiol residue of Cys10 in Met30 TTR is free from intermolecular hydrogen-formation. Here, we present evidence that Cys10 plays important roles in Met30 TTR amyloid formation, based on a study made by using transgenic animal models. In addition, we show the relationship between amyloid and extrinsic environmental factors. This result suggests a rationale for developing an innovative treatment of type I FAP.

## 家族性アミロイドポリニューロパシー (FAP) の アミロイド沈着機構におけるAmyloid $\beta$ ( $A\beta$ ), Amyloid $\beta$ precursor protein ( $A\beta$ PP) の役割

研究者 安 東 由 喜 雄\* 寺 崎 久 泰\*\* 大 林 光 念\*\*  
山 下 太 郎\*\*\* 内 野 誠\*\*\* 安 藤 正 幸\*\*

### 目 的

近年, 家族性アミロイドポリニューロパシー (FAP)の原因蛋白であるトランスサイレチン (TTR)はアルツハイマー病において, 髄液中でアミロイドの原因蛋白である $A\beta$ 蛋白と結合することにより $A\beta$ を可溶化し, 凝集を阻害する作用が報告されている<sup>1,2)</sup>。 $A\beta$ の前駆蛋白であるAmyloid  $\beta$  precursor protein ( $A\beta$ PP)は神経系の細胞を始め全身の諸臓器で発現していることから<sup>3)</sup>, FAPにおいても $A\beta$ PPがTTRの代謝動態に影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこでわれわれは, $A\beta$ 及び $A\beta$ PPがFAP患者の組織に沈着しているアミロイドやTTRに結合しているかを病理学的, 生化学的に検討した。

### 方 法

- 1) FAP Val30Met剖検患者の脳, 消化管を用い, Congo-red染色, 及び抗TTR抗体, 抗 $A\beta$ 抗体, 抗 $A\beta$ PP抗体により免疫染色を行いアミロイドおよびTTRと $A\beta$ ,  $A\beta$ PPがassociationしているかを組織学的に検討した<sup>4)</sup>。
- 2) TTRと $A\beta$ 1-40,  $A\beta$ 1-42との結合能を検討するために,  $A\beta$ 蛋白を<sup>125</sup>Iでラベルし, 健常者及び患者の血清, 髄液を用いTTRとの結合能

を検討した。同様に健常者, homozygoteのFAP Val30Met患者血清から精製したwild type TTR, Met30 TTRを用い, <sup>125</sup>I- $A\beta$ とincubationし, 抗TTR抗体を用いて免疫沈降しそれぞれのペレットのRI活性を測定した。

- 3) アミロイドと $A\beta$ , TTRとの結合能を検討するために,  $A\beta$ , wild type TTR, TTR Met30蛋白を<sup>125</sup>Iにてラベルして, FAP Val30Met患者の硝子体手術サンプルから抽出したアミロイドとincubation後, 遠心後amyloidを回収しRI活性を測定した。
- 4) TTRと $A\beta$ PPとの結合能を検討するために, 精製したwild type TTR, Met30 TTRを $A\beta$ PPの構成成分のpeptideとincubationし, 抗 $A\beta$ PP抗体を用いて免疫沈降後, 回収されたペレットのRI活性を測定し, 結合能を比較検討した。
- 5) 健常者及びFAP Val30Met患者の血清, 及び精製したTTRと $A\beta$ 1-40, 1-42,  $A\beta$ PPのpeptideをincubation後, 抗TTR抗体を用いて免疫沈降を得た後Matrix-assisted laser desorption/time-of-flight mass spectrometer (MALDI TOF-MS)<sup>5)</sup>を行い, TTRと $A\beta$ ,  $A\beta$ PPとの結合を証明した<sup>6,7)</sup>。また, DTTや $\beta$ -MEを加えることによりその結合が消失することも検討した。

\* 熊本大学医学部臨床検査医学講座

\*\* 同 第一内科

\*\*\* 同 神経内科

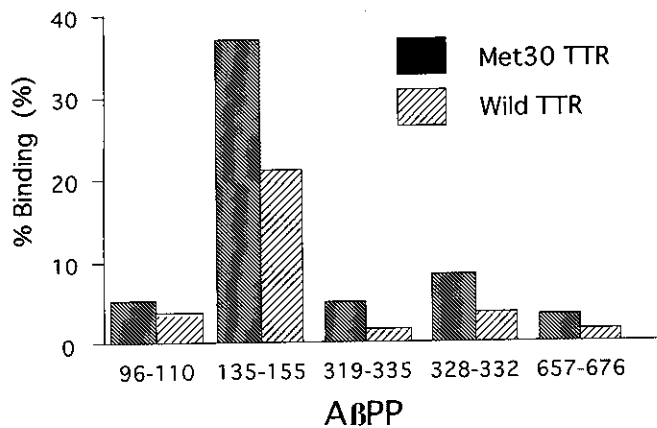


図 1. Binding of Aβ PP with <sup>125</sup>I-TTR  
 ■ : Met30 TTR, □ : Wild type TTR

### 結果及び考察

1) FAP Val30Met患者脳の大部分の血管周囲に沈着したアミロイドに一致して抗Aβ抗体の陽性像が得られた<sup>9)</sup>。しかし、脳以外の臓器の沈着アミロイドには一致する像は得られなかった。抗AβPP抗体による染色では、消化管において筋層間神経叢内の神経細胞やその近傍の支持細胞に陽性像が得られた<sup>9)</sup>。抗TTR抗体による染色ではそれらの細胞を取り囲むよう

に濃染像が認められた。

- 2) Aβ 1-40, 1-42は両TTRとも結合することが確認されたが、Met 30 TTRの方がwild type TTRに比べて結合力が強いことが確認された。
- 3) アミロイドとの結合能は、Met 30 TTRがwild typeより強く、Aβはほとんど結合を認めなかった。2, 3の結果より、Aβはアミロイド形成前のTTRの段階では結合するが、TTRがアミロイドを形成した段階では結合能が低下しており、Aβはアミロイドを形成する段階で関与する可能性が示唆された。
- 4) Aβ PPとTTRの結合能の検討では、Met 30 TTRの方が、wild type TTRより強く結合し、特にAβ PPの中でも135-155のpeptideが最も強い結合能を認めた(図1)。
- 5) MALDI TOF-MSによる解析では、分子量の変化からAβ PP135-155とMet 30 TTRのみが結合していることが確認された。DTTやβ-ME存在下で、このピークが消失することから、Aβ PP135-155とMet 30 TTRはcysteine残基を介したジスルフィド結合である可能性が示唆された(図2)。

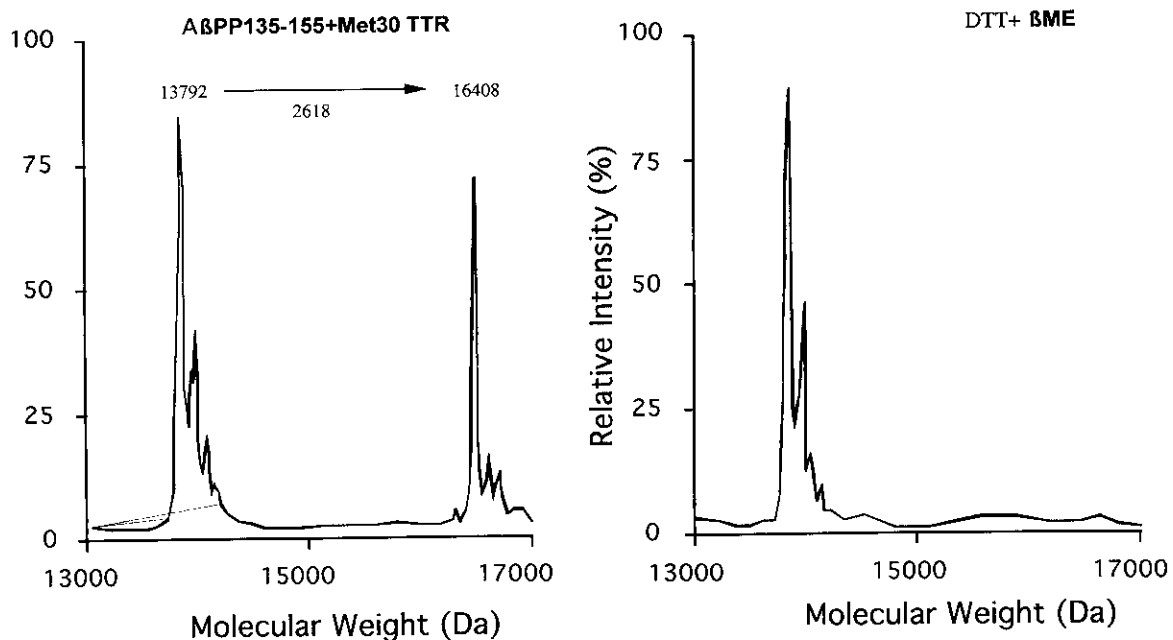


図 2 Analysis of binding of Aβ PP135-155 and TTR Met30 by mass spectrometry.  
 Free form of Met30 TTR: 13792Da, Aβ PP135-155: 2618Da

## 結 論

- 1) TTRとA $\beta$ は一部が結合し、FAPのアミロイド形成過程に関与する可能性が示唆された。
- 2) A $\beta$ PPは異型TTRと結合し、FAPのアミロイド沈着過程に深く関与する可能性が考えられた。

## 参考文献

- 1) Schwarzman AL, Gregori L, Vitek MP, et al. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(18): 8368-8372.
- 2) Serot JM, Christmann D, Dubost T, et al. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatr 1997; 63:506-508.
- 3) Cabal A, Alonso-Cortina V, Gonzalez-Vazquez LO, et al. beta-Amyloid precursor protein (beta APP) in human gut with special reference to the enteric nervous system. Brain Res Bull 1995; 38(5): 417-423.
- 4) Shirahama T, Skinner M, Westermark P, et al. Senile Cerebral Amyloid: Prealbumin as a common constituent in the neuritic plaque, in the neurofibrillary tangle, and in the microangiopathic lesion. Am J Pathol 1982; 107:41-50.
- 5) Ando Y, Suhr O, Yamashita T, et al. Detection of different forms of variant transthyretin (Met30) in cerebrospinal fluid [published erratum appears in Neurosci Lett (1998Jan) 9;240(2):121]. Neurosci Lett 1997; 238(3): 123-126.
- 6) Ramløv I, Ando Y, Ohlsson PI, et al. Detection of Met 30, Ser 6 and Met 111 Variant Transthyretin by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. Eur J Clin Invest 1998; 27: 956-959.
- 7) Terazaki H, Ando Y, Suhr O, et al. Post-translational modification of transthyretin in plasma. Biochem Biophys Res Commun 1998; 249(1): 26-30.

Role of amyloid  $\beta$  precursor protein (A  $\beta$  PP) in amyloid formation mechanism of  
familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)

by

Yukio ANDO\*

Hisayasu TERAZAKI\*\*, Konen OBAYASHI\*\*, Taro YAMASHITA\*\*\*,  
Makoto UCHINO\*\*\*, Masayuki ANDO\*\*

from

\*Department of Clinical Laboratory Medicine, Kumamoto University School of Medicine

\*\*First Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine

\*\*\*Department of Neurology, Kumamoto University School of Medicine

Recently, interaction between A  $\beta$  and transthyretin (TTR) has been focused in the recent attention. To elucidate the role of  $\beta$  protein in amyloid formation mechanism in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP), we examined the interaction between TTR and  $\beta$  protein histochemically and biochemically. In immunohistochemical study, significant association of TTR and A  $\beta$  was confirmed in FAP patients' brain. TTR immunoreactivity was observed around A  $\beta$  PP immunoreactive intestinal tissues. Purified normal and Met30 TTR showed significantly higher affinity with A  $\beta$  PP as well as A  $\beta$  and the affinity of Met30 TTR with A  $\beta$  PP was much higher than that of normal TTR. In mass spectrometry study using A  $\beta$  PP peptides, A  $\beta$  PP135-155 showed the highest affinity with Met30 TTR as well as normal TTR, which was dissociated with TTR in the presence of 1 mM of dithiothreitol. These results suggest that A  $\beta$  PP may play an important role in amyloid formation of FAP.

## アミロイド心筋症の頻度ならびに変異TTR型アミロイド心筋症の臨床診断上の問題点

研究者 中 里 雅 光

### はじめに

心アミロイドは、アミロイドーシス患者の予後を決定する重要な病態であり、全身性アミロイドーシスの中でも、特に注目される臓器疾患である<sup>1)</sup>。2500例の心剖検例について、心アミロイドーシスの検索を行い、原因蛋白による頻度分類ならびにTTR型心アミロイドーシスの解析を行った。

### 方 法

1. 心アミロイドの病理・免疫組織学的検査は、コンゴ赤染色とAL, AA, TTR, fibrinogen  $\alpha$ , リゾチームに対する抗体を用いて行った。
2. 筆者がすでに確立した方法に従い、TTR型アミロイドの蛋白と遺伝子の配列解析を行った。
3. 心筋のパラフィン包埋組織からのTTR DNAの解析は、まず切片一枚分を脱パラフィンし、lysis bufferで処理後、除蛋白した。フェノール/クロロホルムを用い、DNAを抽出した。剖検組織中のDNAはホルマリン等で変性を受け、断片化しているために、適当なプライマーセットを構築してPCRを行い、TTR遺伝子の各exonの塩基配列を決定した<sup>2)</sup>。

### 結 果

心疾患で死亡した剖検総数 2500例のうち、23例(0.92%)が心筋アミロイドーシスであった。アミロイド蛋白の免疫染色の結果、その原因蛋白は12例がA $\lambda$ , 4例がA $\kappa$ , 2例がAA, 5例がTTRで、

フィブリノーゲン $\alpha$ 鎖とリゾチームは0であった。TTR型の5例はいずれも高齢発症で末梢神経障害や自律神経障害を伴わず、またFAPやFAC (familial amyloid cardiomyopathy)の家族歴を示さなかった。アミロイド蛋白の構造決定ならびにTTR遺伝子の塩基配列解析により、3例はTTR-Met30で、2例はTTR-Ile50であった。以下にその例を示す。

#### 1. 高齢者で急速に進行したアミロイド心筋症

患者は73歳、女性で家族歴なし。65歳時検診で不整脈と狭心症を指摘された。70歳時労作時胸痛を自覚し、72歳時呼吸困難、胸痛、浮腫を訴え、うっ血性心不全の診断にて入院した。半年後に重篤な心室性不整脈を併発し、死亡した。全身浮腫、皮膚発疹出血斑と低蛋白血症(総蛋白4.6 g/dl)、尿中蛋白0.5 g/dayならびに心電図での低電位、心房細動、心室細動(ショートラン)、心エコー上の中等度の左室求心性肥大からアミロイドを疑い、心筋と胃粘膜の生検を行ったが、陰性であった。剖検所見では、全身諸臓器の血管壁や間質への著明なTTR由来アミロイド沈着を認め、心筋アミロイド沈着はSmithのgrade 3であった。心筋内血管壁へのアミロイド沈着のほか結節形成や心筋細胞周囲への沈着も見られ、アミロイドに対し巨細胞を主体とした炎症反応が見られた。剖検心から抽出したTTR遺伝子の塩基配列により、Met<sup>30</sup>TTRを同定した<sup>3)</sup>。

#### 2. 房室弁障害と左房機能障害を呈した高齢発症の心アミロイドーシス

患者は70歳、男性で家族歴なし。70歳時に労

作時狭心痛で発症。検査所見として、心電図では、虚血性変化があり、心エコーで左室壁肥厚や顆粒状輝度増強は認めず、左房経拡大、心房中隔、三尖弁と僧帽弁の肥厚が認められた。

心カテでは拘束型血行動態を示した。腎不全のため患者は72歳で死亡した。剖検心に高度のアミロイド沈着を認め、TTR遺伝子の塩基配列により、Met<sup>30</sup>TTRを同定した。

### 3. TTR Met-30のアミロイド心筋症

患者は69歳、男性で家族歴なし。59歳時労作時胸痛を自覚し、69歳時冠動脈バイパス術をうけた。69歳時原因不明の心不全にて死亡した。経過中、神経症状を疑わせる検査所見はなかった。剖検所見で心臓にのみTTR由来のアミロイド沈着を認めた。TTR遺伝子の塩基配列により、Met<sup>30</sup>TTRを同定した。

### 4. TTR Ile-50によるアミロイド心筋症

患者は70歳、男性で家族歴なし。67歳時に拡張型心筋症で発症。心臓生検にてアミロイドが検出された。69歳時より足先のしびれ出現し、70歳時突然死した。剖検なし。心臓生検試料のパラフィン包埋組織からDNAを抽出してnested PCRを行った。TTR遺伝子の各exonの塩基配列を決定し、Ile<sup>50</sup>TTRを同定した。

## 考 察

心アミロイドーシスの分類はその原因蛋白により、免疫細胞性(免疫グロブリン)、反応性(AA)、FAP(変異TTR)、家族性アミロイド心筋症(変異TTR)、老人性全身性(正常TTR)、心房限局性(心房性ナトリウム利尿ペプチド)に分類される。本邦からはアミロイド心筋症をきたす変異TTRとして、Glu18, Met30, Leu30, Ala38, Gly42, Ile50, Arg50, Arg58, Gly97, Cys114が報告されている<sup>4)</sup>。

TTR型アミロイド心筋症の臨床的特徴として、①心不全、②不整脈、③起立性低血圧、④心筋虚血発作がある。今回見いだしたTTR型アミロイド心筋症の5例はいずれも高齢発症で家族歴がなく、時に急速進行し、末梢神経障害は軽微か全くなかった。これらに加え、TTR型アミロイド心筋症の臨床診断の問題点として、一般臨床検査で特異的診断法がなく、FAPと比べ、臨床的な認識が低い

ことが挙げられる。

高齢発症で家族歴のない原因不明の心不全では、TTR型アミロイド心筋症の鑑別が必要である。

## 文 献

- 1) 磯部敬.アミロイドーシス. 東京:医学書院 1997;1:222.
- 2) Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Shirieda K, Fujimoto T, Matsukura S. Detection of three transthyretin gene mutations in familial amyloidotic polyneuropathy by analysis of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Neurol Sci* 1997;150:143-148.
- 3) Nakamura Y, Yutani C, Nakazato M, Date Y, Baba K, Goto Y. A case of hereditary amyloidosis transthyretin variant, Met 30, with amyloid cardiomyopathy, less polyneuropathy, and the appearance of giant cells. (submitted).
- 4) 中里雅光. 家族性アミロイドポリニューロパチーの臨床像と分子異常. *神経内科* 1998; 48:528-534.

Incidence of amyloid cardiomyopathy and diagnosis of transthyretin-related amyloid  
cardiomyopathy

by  
Masamitsu NAKAZATO

from  
Third Department of Medicine, Miyazaki Medical College

Cardiac amyloidosis is a distinct form of cardiomyopathy that usually carries a grave prognosis. We studied at autopsy 2500 cases of cardiac disease and found 23 cardiac amyloidosis by immunohistochemistry and DNA sequencing. Twelve are AL, 2 AA, 5 TTR, 0 fibrinogen, and 0 lysozyme. TTR mutations of five patients with TTR-related cardiac amyloidosis are three Met30 and two Ile50 TTR. All of them are late-onset of age, mild or absence of peripheral neuropathy or autonomic dysfunction, and no positive family history. Differential diagnosis of TTR-related cardiac amyloidosis is needed for the aged patients with etiology-unknown cardiac disease and absence of family history of amyloidosis.



## パラフィン切片からの家族性アミロイドポリニューロパチーの 遺伝子診断

研究者 中 里 雅 光

### はじめに

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は、トランスサイレチン(transthyretin:TTR)の遺伝子異常(ミスセンス変異)により、異常TTRがアミロイドを形成し、全身組織に沈着する常染色体優性遺伝疾患である<sup>1)</sup>。FAPには発症年齢や臨床経過の異なるいくつかのサブタイプの存在が明らかになっており、生前に診断を確定することが困難な例も多い。今回、我々はパラフィン包埋切片よりDNAを抽出し、FAPの遺伝子診断の有用性を証明した。

### 方 法

TTR由来のアミロイド沈着が確認された剖検またはnecropsyのパラフィン包埋組織を厚さ3 μmに薄切した。症例は、本邦FAP 8例と欧州FAP 6例である。切片一枚分を脱パラフィンし、lysis bufferで処理後、除蛋白した。フェノール/クロロホルムを用い、DNA100~500 ngを抽出した。剖検組織中のDNAはホルマリン等で変性を受け、断片化しているために、適当なプライマーセットを構築してPCRを行い、TTR遺伝子の各exonの塩基配列を決定した<sup>2)</sup>。

### 結 果

今回の研究により、剖検、necropsyおよび生検のパラフィン包埋組織からTTR型FAPのprototypeであるVal<sup>30</sup>→Metに加えて、Glu<sup>42</sup>→Gly、Gly<sup>47</sup>→Ala、

Ser<sup>50</sup>→Ile、Ser<sup>50</sup>→Arg、Thr<sup>60</sup>→Ala、Ser<sup>77</sup>→Tyr、Ala<sup>109</sup>→Serのアミノ酸置換を持つ、計8種類の変異TTRを発見した。以下に代表的な症例を示す。

#### 1. 高齢発症で球麻痺を呈したFAP TTR Met30

患者は70歳、男性で家族歴はなし。62歳時に両下肢の感覚・運動障害で発症し、70歳時四肢の筋力低下が出現した。71歳時構音障害、嘔下障害、舌萎縮、四肢の筋線維束攣縮が認められたが、自律神経症状はなかった。腓腹神経生検では、アミロイドを認めず、筋萎縮性側索硬化症と原因不明の末梢神経障害と診断された。72歳時腎不全で死亡した。剖検時に正中神経と舌下神経にアミロイド沈着を認めた。正中神経のパラフィン包埋組織からDNA 200 ngを抽出した。nested PCRを行い、TTR遺伝子の各exonの塩基配列を決定し、Met<sup>30</sup>TTRを見い出した<sup>3)</sup>。

#### 2. 末梢神経障害と心症状を呈したFAP TTR Ile50

患者は54歳、男性で家族歴なし。45歳時に頻回の嘔吐と体重減少で発症。49歳時には排尿困難(無緊張性膀胱)と四肢の脱力としびれ感が出現した。54歳時心不全にて死亡。

検査上、心電図での非特異的心室内伝導異常と心エコーでの心室中隔肥厚(2.2 cm)ならびにgranular sparkling appearanceを認めた。上下肢の感覚神経活動電位と下肢の運動神経活動電位は低下していた。剖検所見で鎖骨下神経、前脛骨神経、心筋にアミロイド沈着を認めた。前脛骨神経のパラフィン包埋組織からDNAを抽出した。nested PCRを行い、TTR遺伝子の各exonの塩基配

列を決定し, Ile<sup>50</sup>TTRを同定した。

### 考 察

パラフィン包埋切片から抽出したDNAを用い, TTRの遺伝子解析を行った。本法では極めて少量の組織切片から遺伝子検索が可能である。剖検例では血液や凍結組織が残されていないことが頻々あり, 生前診断の困難であったFAP症例についても, レトロスペクティブな解析ができ, 今後広く適応できる方法である。今回, 新たに死後の組織を用いて診断された症例の共通した臨床像は, 下肢優位の感覚障害, 自律神経症状と家族歴の欠如および高齢発症であった。

FAPの臨床像は多様であり, その診断にはしばしば苦慮することがある。その理由の一つは, 原因となるmutationの多様性とその解析が困難な点にある。本研究で示した新たなTTRの同定に関する方法論は, FAPの診断や病因解明に大きく寄与し得る。

### 文 献

- 1) 中里雅光. 家族性アミロイドポリニューロパチーの臨床像と分子異常. 神経内科 1998; 48:528-534.
- 2) Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Shirieda K, Fujimoto T, Matsukura S. Detection of three transthyretin gene mutations in familial amyloidotic polyneuropathy by analysis of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. J Neurol Sci 1997; 150: 143-148.
- 3) Ikeda K, Kinoshita M, Takamiya K, et al. Bulbar palsy in senile onset familial amyloid polyneuropathy (<sup>30</sup>Val→Met): transthyretin-amyloid deposits in the hypoglossal nerve root. Eur J Neurol 1998; 5:211-214.

Detection of transthyretin gene mutations in familial amyloidotic polyneuropathy  
by analysis of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues

by

Masamitsu NAKAZATO

from

Third Department of Medicine, Miyazaki Medical College

We identified eight different missense mutations of the transthyretin (TTR) gene in 14 patients with familial amyloidotic polyneuropathy by analysis of their DNAs extracted from a single formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. They are Val<sup>30</sup>→Met, Glu<sup>42</sup>→Gly, Gly<sup>47</sup>→Ala, Ser<sup>50</sup>→Ile, Ser<sup>50</sup>→Arg, Thr<sup>60</sup>→Ala, Ser<sup>77</sup>→Tyr, and Ala<sup>109</sup>→Ser. Gene analysis of archival paraffin embedded tissues is useful for the precise diagnosis of FAP and for clarifying its molecular pathogenesis in patients for whom fresh genomic DNA is not available.

## 家族性アミロイドポリニューロパシー (FAP) (Cys114) における Cysteineの重要性について —治療的観点からの検討

研究者 安 東 由喜雄\* 寺 崎 久 泰\*\* 大 林 光 念\*\*  
山 下 太 郎\*\*\* 内 野 誠\*\*\* 安 藤 正 幸\*\*

### 目 的

transthyretin (TTR)のmutationで起こる家族性アミロイドポリニューロパシー (FAP) は、近年の遺伝生化学的技術の進歩により、TTR (Met30)以外にも様々なmutationが発見されてきている<sup>1,2)</sup>。九州においても、これまで熊本県荒尾地区にMet30型の患者154例が発見されているのに加え、福岡県糟屋郡にIle50型が23例、長崎県国見町にCys114型が29例発見されており、FAPの新たなフォーカスがあることが確認されて来ている (図1)。

TTR Cys114はTTR分子の中に2箇所Cysを持ち、TTR Met30と比べ、oxidative stress等の影響を更に受けやすいことが予測される上、mutation(Cys114)の箇所がTTRの2量体の接合部に位置する事から<sup>3)</sup>、wild type TTRや他のmutationとは異なった生体内代謝動態を来す可能性が考えられる<sup>4)</sup>。そこでFAP (Cys114)患者及び未発症遺伝子保因者の血清及び髄液を用い、発症前後でのTTRの血中レベル及びpost translational modificationの違いを解析し、治療法を考察した。また大腸菌に発現したTTR Cys114を用い、蛋白の特性を解析した。

### 対象及び方法

heterozygoteの長崎県国見町出身のFAP (Cys114) 患者3例、及びその未発症遺伝子保因者

2例について、①血中TTRレベルをsingle radial immunodiffusion (SRID)及びenzyme linked immunosolvent assay (ELISA)で測定した。②血清及び髄液のTTRのpost translational modificationの解析をelectrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)を用いて検討した<sup>5,6)</sup>。③大腸菌に発現したTTR Cys114を精製し、ESI-MSを用いpost translational modificationを解析すると共にTTR抗体の反応性を解析した。

### 結果および考察

SRIDによる血中TTRレベルは遺伝子保因者の方が発症者に比べ若干高かったが、両群とも正常者、FAP (Met30)患者に比べ著しく低かった。この結果は、これまで本症患者に関するTTRの血中レベルとほぼ一致する<sup>7,8)</sup>。しかしこれをELISAで測定すると、FAP (Met30)患者の血中レベルとほぼ同

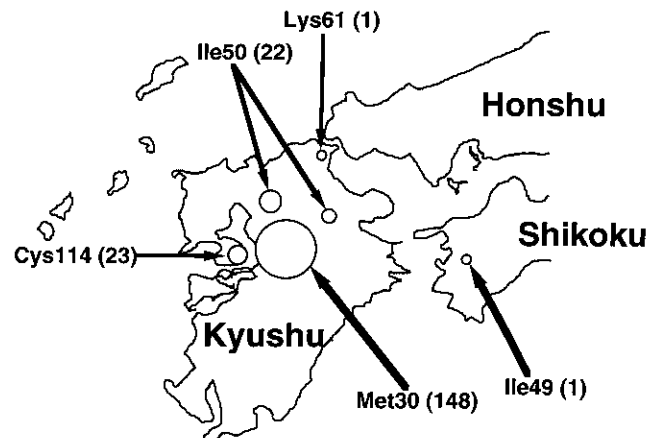


図1 九州のFAP

\* 熊本大学医学部臨床検査医学講座

\*\* 同 第一内科

\*\*\* 同 神経内科

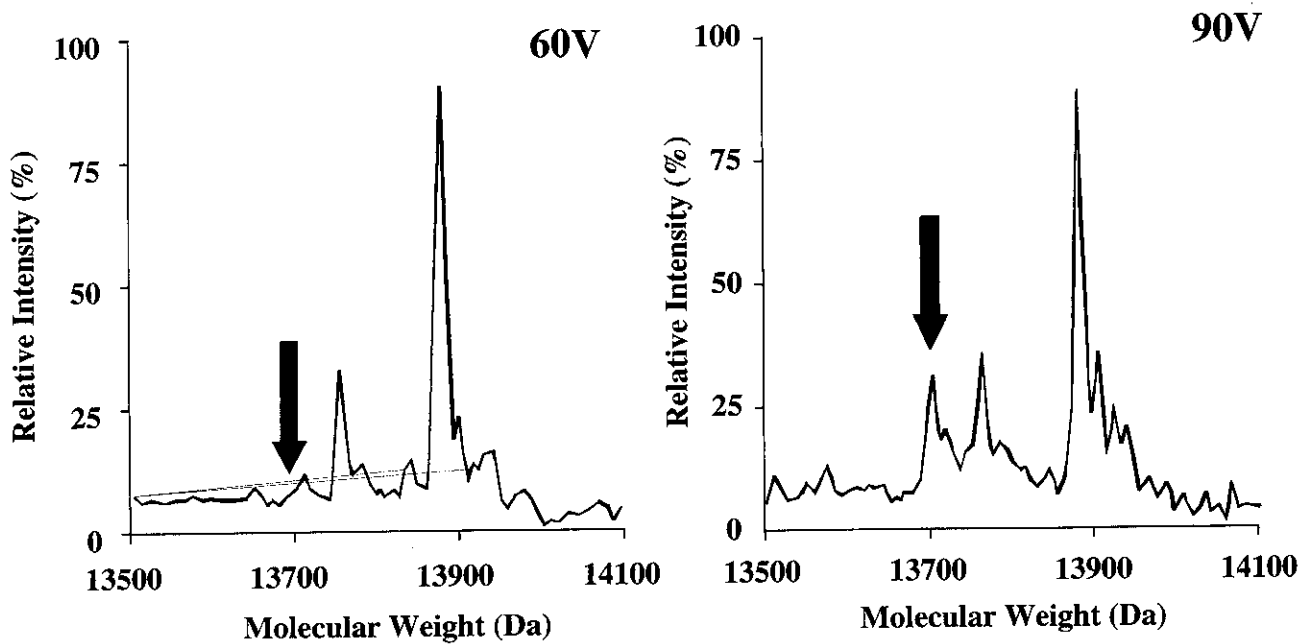


図2 Analysis of TTRs in the serum of TTR Cys114 carriers by ESI-MS

(A) and (B) serum of a 50 year-old female's FAP (Cys114) serum at 60V and 90V of the orifice corn voltage of ESI-MS, respectively. A: free form of normal, B: Cys- conjugated form of normal, C: Cys-gly- conjugated form of normal TTR, and D: free form of TTR Cys114. ↓: Sodium conjugated forms, and \*: unknown peak.

等であった。recombinant TTR Cys114における解析では、TTR抗体に対してTTR Cys114は全くimmunoreactivityを示さなかったが、ELISAによる解析では、そのレベルは測定可能となった。ESI-MSによるpost translational modificationの解析では、発症者の血清において、ESI-MSのorifice cornの電圧を通常の測定条件(60V)にすると、wild typeのfree form及びCys-conjugated form TTRのみが2大成分として同定され、TTR Cys114は全く検出されなかった。しかし血清に1mMのDTTを加えるか、orifice cornの電圧を90Vに上げるとTTR Cys114が検出されるようになった(図2)。これに対して未発症のTTR Cys114保因者においては、60VにおいてもTTR Cys114のピークが検出された。髄液を用いた解析でも同様の現象が確認された。精製したrecombinant TTR Cys114をそのままESI-MSに供するとfree formのTTR Cys114の存在が確認されるが、これをTTR抗体でsolutionから抽出してESI-MSで測定するとsignal強度が著しく減弱した。以上のことから、FAP (Cys114)患者のTTRレベルは測定法により著しく変化することが確認された<sup>9)</sup>。この変動はTTR

Cys114の立体構造がmutationにより変化し<sup>10)</sup>、TTR抗体に対する反応性が変化した可能性が考えられる。ESI-MSの解析において、orifice cornの電圧の条件やDTTの添加でTTR Cys114が検出できるようになる現象は、TTR Cys114が作るtetramerがTTR Cys114のSHを介してジスルフィド結合を作ることによりaggregateを作りやすくなっているが、ESI-MSの電圧の条件や還元剤でこの結合を解離させると検出可能になる可能性が考えられた。

## 結 論

FAP (Cys114)においては、TTRのmutationにより立体構造が変化し、TTR抗体への反応性も変化している。未発症者において検出されたTTR Cys114のピークが発症と共に検出できなくなる現象は、FAPの発症にCys114を介したmodificationが関与している可能性を示唆した。これらのことよりGSHなどのthiol化合物の治療的可能性が示唆される。

## 文 献

- 1) Benson MD, Uemichi T. Transthyretin amyloidosis.

Amyloid : Int J Exp Clin Invest 1996;3: 44-56.

- 2) Ando Y, Araki S, Ando M. Transthyretin related amyloidosis. Intern Med 1993;32: 920-922.
- 3) Ueno S, Uemichi T, Takahashi N, Yorifuji S, Tarui S. A novel variant of transthyretin (Try114 to Cys) deduced from the nucleotide sequences of gene fragments from familial amyloidotic polyneuropathy in Japanese sibling cases. Biochem Biophys Res Commun 1990;169:143-147.
- 4) Ando Y, Ikegawa S, Miyazaki A, Inoue M, Morino Y, Araki S. Role of variant prealbumin in pathogenesis of familial amyloidotic polyneuropathy: Fate of normal and variant prealbumin in the circulation. Arch Biochem Biophys 1990;274: 87-93.
- 5) Ando Y, Ohlsson PI, Suhr O, et al. A new simple and rapid screening method for variant transthyretin (TTR) related amyloidosis. Biochem. Biophys Res Commun 1996;228: 480-483.
- 6) Ando Y, Suhr O, Yamashita T, et al. A novel method for detecting normal and its variant proteins in cerebrospinal fluid. Neurosci Lett 1997;238: 123-126.
- 7) Ueno S, Fujimura H, Yorifuji S, et al. Familial amyloidotic polyneuropathy associated with the transthyretin Cys114 gene in a Japanese kindred. Brain 1992;115:1275-1289.
- 8) Haagsma EB, Post JG, De Jager AEJ, Nikkels PGJ, Hamel BCJ, Hazenberg BPC. A Dutch kindred with familial amyloidotic polyneuropathy associated with the transthyretin Cys 114 mutation. Amyloid: Int J Exp Clin Invest 1997;4: 112-117.
- 9) Altland K, Benson MD, Ferlini A, et al. Most cases of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) are associated with amino acid substitutions destabilizing the folded state of transthyretin monomers. Neuromuscular Disord 1996;6:S23.
- 10) Blake CCF, Geisow MJ, Oatley SJ, Rerat B, Rerat C. Structure of prealbumin: Secondary, tertiary and quaternary interaction determined by Fourier refinement at 1.8 angstrom. J Mol Biol 1987;121: 339-356.

Biochemical Characterization of Normal and Variant Transthyretins (TTRs) of Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP Cys114)

by

Yukio ANDO\*

Hisayasu TERAZAKI\*\*, Konen OBAYASHI\*\*, Taro YAMASHITA\*\*\*,  
Makoto UCHINO\*\*\*, Masayuki ANDO\*\*

from

\*Department of Clinical Laboratory Medicine, Kumamoto University School of Medicine

\*\*First Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine

\*\*\*Department of Neurology, Kumamoto University School of Medicine

We performed biochemical and immunological examinations of heterozygotic carriers of the Cys 114 transthyretin (TTR) mutant associated with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). The serum TTR levels of both two heterozygotic asymptomatic carriers and three symptomatic FAP Cys114 patients were very low as compared with normal values when analyzed by single radial immunodiffusion (SRID), whereas by the enzyme linked immunosolvent assay (ELISA), their total TTR concentrations did not significantly differ from the control values. Analyses of serum TTR Cys114 from asymptomatic carriers of TTR Cys 114 by means of electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) at 60 V of the orifice cone voltage revealed a small peak of the free form of TTR Cys114. The TTR Cys114 appeared in the symptomatic carriers' serum only in the presence of 1 mM dithiothreitol (DTT) or by increasing the orifice cone voltage to 90 V. This peak might derive from an aggregate of TTR Cys114, in part because of the disulfide formation of TTR Cys114. These results suggest that the low serum TTR levels of FAP Cys 114 patients derived from the decreased immunoreactivity of Cys114 TTR for TTR antibodies, arising from conformational changes occurring in the molecule.

## 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP(TTR Ile50))の 臨床病理学的解析

研究者 坂下直実\* 安東由喜雄\*\* 大林光念\*\*\*  
寺崎久泰\*\*\* 安藤正幸\*\*\* 山下太郎\*\*\*\*  
高橋 潔\* 武井 実根雄\*\*\*\*\*

### 目 的

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は、トランスサイレチン(TTR), apolipoprotein AI, gersolinの変異によって生じるが、中でも変異TTRによって発症するFAPは、臨床病型の複雑さと分子構造に対する理解から、FAPの中核をなしていると考えられる<sup>1,2)</sup>。これまでのところ、60種類を上回る異型TTRが報告されており、その種類によって異なったFAPの臨床像がもたらされることが知られている<sup>3,4)</sup>。変異TTRに由来するFAPの中では、FAP(TTR Met30)が最も代表的な病型であり、これは多発性ニューロパチー、自律神経障害、心不全、腎不全などを併発し、約10年の経過で死の転帰を迎える。しかしながら心不全や腎不全を全く示さないFAP(TTR Met30)の症例も報告されており、TTR分子の変異のみならず、TTR分子をとりまく何らかの外部要因が、FAPの発症に大きな影響をおよぼしている可能性がある<sup>5)</sup>。一方、TTR Thr45, TTR Asp45, TTR Ile50, TTR Lys59, TTR Ala60, TTR Leu68, TTR Gln89, TTR Met111, TTR Ile122といった異型TTRは心に大量のアミロイド沈着を来すことが知られている<sup>6)</sup>。中

でもFAP(TTR Ile50)は、大量のアミロイド沈着に基づく重篤な心不全と致死性不整脈をもたらす病型として知られている<sup>6,8)</sup>。FAP(TTR Met30)を対象とした過去の報告では、FAPの臨床症状と組織のアミロイド沈着量には明らかな相関が見られるとされている<sup>9,10)</sup>。しかしながらFAP(TTR Met30)以外のFAPの剖検所見に関する報告は極めて少なく、特にFAP(TTR Ile50)の系統的病理所見の報告はなされていない。異型TTRの種類とアミロイド沈着パターンとの関係を明らかにすることは、アミロイドの臓器特異性や沈着機構の解明に重要であると考えられる。

我々は、FAP(TTR Ile50)患者の剖検および生検材料の検索の機会を得たので、沈着アミロイドの分布パターンを病理組織学的に解析し、当教室に蓄積されているFAP(TTR Met30)患者の臨床病理像と比較検討し、TTR分子の変異がアミロイド沈着様式におよぼす影響について、文献的考察を含めて報告する。

### 症例提示および解析方法

症例は47歳の男性で、福岡県粕屋郡出身であり熊本県荒尾地区や長野県小川村に縁故者はいない。父親と姉はいずれも53歳にて死亡しており、死因はそれぞれ心疾患とアミロイドーシスであった。妹は臨床所見ならびに遺伝子診断にてFAP(TTR Ile50)の診断が確定している。発端者は平成2年(39

\* 熊本大学医学部第二病理

\*\* 同 臨床検査医学

\*\*\* 同 第一内科

\*\*\*\* 同 神経内科

\*\*\*\*\* 原三信病院



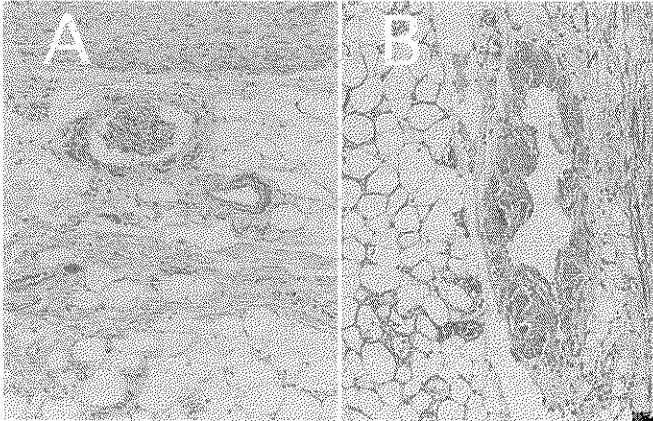


図1 FAP(TTR Met30)とFAP(TTR Ile50)の末梢血管系に対するアミロイド分布の違い

FAP(TTR Met30)では細動脈周囲に顆粒状のアミロイド沈着が見られるのに対し、FAP(TTR Ile50)では静脈およびリンパ管周囲に塊状のアミロイド沈着が見られる。(A): FAP(TTR Met30), (B): FAP(TTR Ile50)。対物レンズ×10倍, 撮影レンズ×3.3倍。

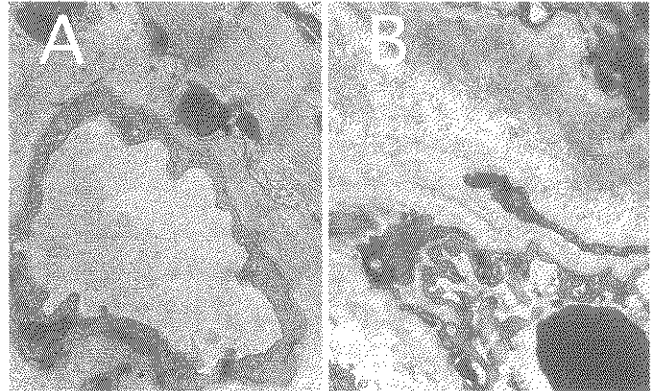


図2 FAP(TTR Met30)とFAP(TTR Ile50)のアミロイド細線維の超微形態

FAP(TTR Met30)では毛細血管周囲にはほぼ均等にアミロイド細線維が分布しているのに対して、FAP(TTR Ile50)では血管周囲には短いアミロイド細線維がまばらに分布し、血管から離れるにつれて細線維の伸長と密度の増加が見られる。(A): FAP(TTR Met30), (B): FAP(TTR Ile50)。撮影倍率×12,000倍。

歳)に下痢および体重の減少を訴え、翌年、心肥大を指摘された。この後、徐々に起立性低血圧や排尿障害、glove and stocking typeの感覚障害や末梢性四肢麻痺、視力障害も出現した。平成6年(44歳)にDNA診断によりFAP(TTR Ile50)の診断が確定した。平成9年(47歳)、心アミロイドーシスによる心不全の治療のため入院加療中、腸管穿孔による汎発性腹膜炎を発症して死亡した。

剖検・生検によって採取された組織を対象に、HE染色とCongo red染色を行い、アミロイド沈着を組織学的に検討した。アミロイド同定はCongo red染色標本を偏光顕微鏡にて観察し、偏光下複屈折像を確認して行った。アミロイド前駆蛋白の同定のため、抗ヒトTTR, kappa-, lambda-chain, amyloid A特異抗体を用いた免疫組織化学を行った。アミロイド細線維の超微形態観察のため、発端者の妹(遺伝子診断にてFAP(TTR Ile50)の診断が確定している)より得た心筋生検材料を対象に電顕観察を行った。

### 結果および考察

剖検の結果、S状結腸に穿孔を伴う潰瘍の形成と汎発性化膿性腹膜炎が認められ、これが直接死因

であると考えられた。また、これらの高度の化膿性炎症を反映して、急性脾炎と骨髄顆粒球過形成が認められた。Congo red染色および偏光顕微鏡による観察の結果、心筋間質ならびに末梢神経に大量のアミロイド沈着が認められた。また、中枢神経系を除く全身の静脈、リンパ管の周囲にも大量のアミロイドの塊状沈着を認めたが、動脈系(特に細動脈周囲)へのアミロイド沈着は軽微であった。(図1)肺胞壁、脾ランゲルハンス島に少量のアミロイド沈着を認める一方、腎、甲状腺への沈着はほとんど見られなかった。電顕によるアミロイドの超微形態観察の結果、アミロイド細線維は心筋間質の毛細血管基底膜直下より放射状に認められ、血管腔から遠くなるほど細線維の伸長が認められた。各種アミロイド前駆蛋白特異抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、本症例に見られるアミロイドは全てTTRに由来することが明らかとなった。

FAP(TTR Met30)の場合、アミロイド沈着は全身諸臓器の血管周囲(特に細動脈周囲)に認められ、多くの場合細顆粒状の沈着パターンを示す<sup>9,10)</sup>(図1)。しかし本症例では動脈系への沈着は少量で、静脈ならびにリンパ管へより多くの沈着が認められ、アミロイドの沈着パターンは細顆粒状ではな

く塊状を示していた。これらの結果より、TTR Ile50はTTR Met30と異ったメカニズムによってアミロイドを形成している可能性が示唆された。

超微形態レベルでのアミロイド細線維の観察では、FAP(TTR Met30)の場合、ほぼ均一なアミロイド細線維が血管周囲に認められるのに対して、本症例では血管腔から離れるほど細線維の伸長が認められた。(図2)このことは、血管外腔の何らかの微小環境がTTR Ile50アミロイドの形成に深く関わっている可能性を示唆している。

FAP(TTR Met30)では全身の血管系以外にも末梢神経、心、腎、甲状腺、膵などにアミロイドの沈着が認められ、これを反映した臨床症状が認められる<sup>9,10)</sup>。FAP(TTR Ile50)では心へのアミロイド沈着はFAP(TTR Met30)よりも高度であり、末梢神経への沈着はほぼ同等であったが、腎、甲状腺には血管周囲にわずかの沈着を認めるに過ぎず、極めて特異的なアミロイド分布を示していた。これらの特異的なアミロイド分布は、FAP(TTR Ile50)の臨床症状を組織学的に裏付けるものであった。

TTR Met30は $\beta$  sheet構造の中でB strandのほぼ中心に位置し、立体構造の内側に向かったmutationであるのに対し、TTR Ile50はC strandに繋がるrandom coilに位置する<sup>9)</sup>。このようなTTRの立体構造における変異アミノ酸の場所の違いや、メチオニンやイソロイシンのアミノ酸としての特性の違いがFAP(TTR Met30)とFAP(TTR Ile50)の特徴的な病像を決定している可能性が考えられる。

## 結 論

FAP(TTR Ile50)の剖検例の解析により、

- ① TTR Ile50はTTR Met30と異なるメカニズムによってアミロイドを形成する。
- ② TTR Ile50のアミロイド形成過程には血管外腔の何らかの微小環境が重要な役割を果たしている。
- ③ FAP(TTR Ile50)の臨床像は、FAP(Val30Met)とは異なった特異的なアミロイド沈着パターンによってもたらされる可能性が示唆された。

## 文 献

1) Nichols WC, Gregg RE, Brewer HB, et al. A

mutation in apolipoprotein A-I in the Iowa type of familial amyloidotic polyneuropathy. *Genomics* 1990; 8: 318-323.

- 2) Haltia M, Prelli F, Ghiso J, et al. Amyloid protein in familial amyloidosis (Finnish type) is homologous to gelsolin, an actin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 167: 927-932.
- 3) Petersen RB, Goren H, Cohen M, et al. Transthyretin amyloidosis: A new mutation associated with dementia. *Ann Neurol* 1997; 41: 307-313.
- 4) Saraiva MJM. Transthyretin mutations in health and disease. *Hum Mutat* 1995; 5: 191-196.
- 5) Araki S, Ikegawa S, Yi S, et al. Familial amyloidotic polyneuropathy in Japan - Review of recent studies in Kumamoto district. *Bol Hosp* 1988; 3: 255-259.
- 6) Saeki Y, Ueno S, Takahashi N, et al. A novel mutant (transthyretin Ile-50) related to amyloid polyneuropathy. Single-strand conformation polymorphism as a new genetic marker. *FEBS Lett* 1992; 308: 35-37.
- 7) Nishi H, Kimura A, Harada H, et al. Novel variant transthyretin gene (Ser50 to Ile) in familial cardiac amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 460-466.
- 8) Sadamatsu K, Hayashi Y, Nakamura M. Three siblings of familial amyloid cardiomyopathy with isoleucine-50 transthyretin mutation. *Int J Cardiol* 1997; 61: 151-155.
- 9) Takahashi K, Yi S, Kimura T, et al. Familial amyloidotic polyneuropathy type I in Kumamoto, Japan: A clinicopathologic, histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Hum Pathol* 1991; 22: 519-527.
- 10) Takahashi K, Sakashita N, Ando Y, et al. Late-onset type I familial amyloidotic polyneuropathy: Presentation of three autopsy cases in comparison with 19 autopsy cases of the ordinary type. *Pathol Int* 1997; 47: 353-360.

## Familial Amyloidotic Polyneuropathy (TTR Ile50): The First Autopsy Case Report

by

Naomi SAKASHITA\*

Yukio ANDO\*\*, Konen OBAYASHI\*\*\*, Hisayasu TERAZAKI\*\*\*, Masayuki ANDO\*\*\*,  
Taro YAMASHITA\*\*\*\*, Mineo TAKAI\*\*\*\*\*, Kiyoshi TAKAHASHI\*

from

\*Second Department of Pathology, Kumamoto University School of Medicine

\*\*Department of Clinical Laboratory Medicine, Kumamoto University School of Medicine

\*\*\*First Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine

\*\*\*\*Department of Neurology, Kumamoto University School of Medicine

\*\*\*\*\*Division of Urology, Hara-Sanshin Hospital

We report the first autopsy case in a pedigree of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) with a mutation of isoleucine-50 transthyretin (TTR Ile50). A 41-year-old man started to develop severe diarrhea and weight loss, followed by urinary incontinence, autonomic nervous system abnormalities, and serious heart failure; the diagnosis of FAP (TTR Ile50) was made on the basis of genetic and histochemical analysis. Six years after the initial symptoms, he died of septic shock. Autopsy revealed suppurative peritonitis, perforation of the sigmoid colon, and marked systemic amyloid deposition. The total amount of amyloid deposited in the heart was greatly increased and was much less in the thyroid gland and kidneys compared with amyloid deposits in ordinary FAP (TTR Met30). Amyloid deposition in peripheral vessel walls was prominent, particularly in lymphatics and veins. His elder sister started to develop orthostatic hypotension at age 49, followed by dysesthesia, diarrhea, and severe congestive heart failure. Endomyocardial biopsy revealed severe TTR-amyloid deposition; ultrastructural examination demonstrated that amyloid fibrils were deposited disproportionately and extended radially just around microvessels. These characteristic patterns of systemic amyloid deposition and distinct clinical manifestations, especially in the cardiovascular system, are considered specific for TTR Ile50 amyloidosis. Furthermore, it is also suggested that these differences might result from location of amino acid substitution in both TTR molecules.

## 家族性アミロイドポリニューロパシー (FAP) (TTR Met30) 患者に対する正常トランスサイレチン (TTR) 大量投与による異型TTR産生抑制効果の検討

研究者 坂下直実\* 山下太郎\*\* 安東由喜雄\*\*\*  
寺崎久泰\*\*\*\* 大林光念\*\*\*\* 橋本元範\*\*\*\*\*  
上村八尋\*\*\*\*\* 内野誠\*\* 安藤正幸\*\*\*\*

### 目 的

家族性アミロイドポリニューロパシー (FAP) (TTR Met30) は常染色体優性遺伝を示す遺伝性アミロイドーシスであり、血中の異型トランスサイレチン (TTR) がアミロイド線維として、全身の諸臓器に沈着することにより発症する<sup>2,4)</sup>。FAP (TTR Met30) 患者に対する肝臓移植は、血中の異型TTR濃度を移植前の1%以下に減少させ、症状の進行を停止あるいは改善させることが報告されているが、肝臓移植以外に血中の異型TTR濃度を減少させ、症状の進行を抑制する有効な治療法ははまだ確立されていない<sup>5,6)</sup>。生体内たんぱくの産生はその産生物の濃度に依存するフィードバック機構により制御されているが、肝臓による異型TTRの産生も、血中総TTR濃度により制御されていると考えられる。これまで血中異型TTR濃度を下げる目的で血漿交換や吸着療法が行われてきたが、有効な治療法とはなりえなかった。そこで、FAP患者に正常TTRを大量投与し、異型TTR産生抑制効果を検討した。

### 方 法

1. 低蛋白血症を来たしたFAP (TTR Met30) 患者 (37才, 男性) に対し、800 mlの新鮮凍結血漿を静注し、血中総TTR濃度、異型TTR濃度の変化を測定した。
2. C57BL/6マウスに対し、ヒト血漿より精製した正常TTR 3 mgを静注後、血中ヒトTTR濃度の変化、肝臓におけるマウスTTR mRNA発現の変化を $\beta$ -actinをコントロールとして測定した。
3. FAP (TTR Met30) 患者3人 (32才男性, 37才男性, 47才女性) に対し、ヒト血漿より精製した正常TTR 400 mgを静注し、血中総TTR濃度、異型TTR濃度の変化を測定した。この検討は熊本大学医学部倫理委員会の許可と、患者のインフォームドコンセントを得て行われた。血中TTR濃度、血中異型TTR濃度の測定、肝臓のマウスTTR mRNA発現はそれぞれ、single radial immunodiffusion method, radioimmuno assay, RNase protection assayにより測定した。

### 結果及び考案

1. 800 mlの新鮮凍結血漿静注24時間後、血中総TTR濃度は25 mg/dlから27 mg/dlへ8%の上昇が認められた。一方異型TTR濃度は8.6 mg/dlから6.1 mg/dlへと29%の減少が認められた(図1)。
2. C57BL/6マウスにおいて、3 mgの正常TTR静

\*熊本大学医学部第二病理

\*\*同 神経内科

\*\*\*同 臨床検査医学

\*\*\*\*同 第一内科

\*\*\*\*\*吉富製薬株式会社

\*\*\*\*\*国際試薬株式会社