

質量解析によるトランスサイレチン型心アミロイドーシスの病態解明と革新的診断法開発

相澤健一

自治医科大学附属病院臨床薬理センター

【研究の背景】

トランスサイレチン(TTR)型心アミロイドーシス(ATTR-CM)は高齢心不全患者の潜在的な基礎疾患である。TTR 4 量体安定化薬の適応拡大により近年特に注目されているのが、ATTRwtアミロイドーシスである。加齢とともに野生型 TTR が心臓に蓄積することにより ATTR-CM が生じるが、その分子機序は殆ど明らかになっていない。剖検例による検討では、80 歳以上の 25%、90 歳以上の 37%に心臓へのアミロイド沈着が認められたとされている。潜在的な心アミロイドーシス患者は相当数が診断されずに存在することが想定されるが、その実態は明らかでない。また、ATTRwtアミロイドーシス患者の予後は、従来考えられているより悪い。

【目 的】

トランスサイレチン型心アミロイドーシスの予後改善のためには早期診断、早期治療介入が重要である。本研究では、三連四重極型質量分析計を用いて心アミロイドーシスを診断するハイスループット高感度分析系を構築する。心筋に加え、腹壁皮下組織や胃・十二指腸等他の組織においても低侵襲で確定診断可能か検討する。

【方 法】

(1) 質量分析による高感度分析系の構築と生検心筋中のアミロイド蛋白の定量評価

生検心筋中のアミロイド蛋白のタイピングを行い、心アミロイドーシスを確定診断する。三連四重極型液体クロマトグラフィータンデム質量分析器(LC-TQ-MS/MS)を用いて心アミロイドーシスを診断するハイスループット高感度分析系を構築し、心筋生検サンプルのスクリーニング診断を可能にする。TTR(transthyretin)、 κ -LC(immunoglobulin light chain, κ -Type)、 λ -LC(immunoglobulin light chain, λ -Type)について整合するペプチド質量とその量データを取得する。

(2) プロテオスタシス破綻に基づくアミロイド蛋白の心筋内凝集メカニズムの解明

心筋内に沈着するアミロイド蛋白の質的および量的分析を行うことにより、アミロイド蛋白のプロテオスタシス(タンパク質の恒常性)が破綻し、凝集するメカニズムにも迫る。高感度免疫沈降質量分析(IP-MS)法を用いる。具体的には、末梢血から血漿分離し、抗トランスサイレチン(TTR)抗体を用いて、TTR を免疫沈降(IP)する。沈降物をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF/MS)で解析し、TTR のフラグメントを同定する。

【結 果】

トランスサイレチン(TTR)および免疫グロブリン軽鎖(IgG-LC κ -LC、 λ -LC)の定量分析法構築を目的として、アミノ酸配列から予想される MRM トランジション(トリプシン消化断片を想定)を設定し、基本分析メソッドの検討を行った。最初に標準品タンパク質(TTR、IgG κ -LC、 λ -LC)をトリプシン消化したものを試料として、トリプル四重極分析計による MRM 分析にて検出可能な消化ペプチドを確認した。標準品タンパク質の消化ペプチドを対象とした場合、トランスサイレチンで

Coverage:97.6%、IgG κ-LC、λ-LC ではいずれも Coverage:>70%の配列に一致する消化ペプチドを検出することが可能となった。

【考 察】

プロテオスタシスは、タンパク質が翻訳され生成してから最終的に分解を受けるまでの過程におけるタンパク質の恒常性を示す。本研究では、アミロイドタンパクが最終的に不可逆的方向へ向かう変性・凝集・分解反応や、その機能に不可逆的な影響を及ぼす翻訳後修飾について、質量分析の強みを生かし、生化学的・構造生物学的なアプローチを用いて構造・機能相関を明らかにするが、これは神経変性疾患のアルツハイマー病やパーキンソン病等、同様のメカニズムに基づく多様な疾患に至る分子背景の解明に応用可能である。将来的に医療シーズや健康維持に資するシーズの創出も可能と考える。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年、トランスサイレチン4量体安定化薬であるタファミジスがATTR-CMの予後を改善することが報告され、2019年3月より保険適応となった。しかし、その薬価は非常に高額である。指定難病のため医療費助成が手厚いことから、患者自己負担は少ないが、公費負担額を大きく押し上げるため国民負担は大きい。したがって、タファミジスの適正使用は喫緊の課題であり、適応患者の確定診断法の開発は医療経済的にも重要である。

ATTR-CMの予後改善のためには早期診断、早期治療介入が重要である。現在、心アミロイドーシス診療ガイドライン(2020年版)上、心アミロイドーシスの確定診断として用いられる質量解析はlaser microdissection法(LMD)とイオントラップ型液体クロマトグラフィータンデム質量分析器(LC-IT-MS/MS)を組み合わせた方法である(LDMS)。確定診断に非常に有用である一方、スループットと感度が低い技術的困難がある。本研究は、三連四重極型質量分析計(LC-TQ-MS/MS)を用いて心アミロイドーシスを診断するハイスループット高感度分析系で生検サンプルのスクリーニング診断を可能にするものであり、臨床への貢献度は極めて高いと考えられる。

【参考・引用文献】

日本循環器学会、他：2020年版 心アミロイドーシス診療ガイドライン．2020．https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2020/04/JCS2020_Kitaoka.pdf