

令和 3 年 10 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08812

研究課題名(和文) ウイルス感染は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症に関与するか？

研究課題名(英文) Is viral infection involved in ALS onset?

研究代表者

福士 雅也 (Masaya, Fukushi)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：50313515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ALSは、運動ニューロン(運動の指令を大脳から筋肉まで伝える神経)が選択的に変性・脱落し、その結果、筋肉が動かなくなり、2～5年で呼吸筋麻痺により死亡する。現在、日本では約1万人の患者がいるものの、有効な治療法は確立されていない。我々は、これまでにオプチニューリンがALSの原因遺伝子であることを突き止めた(Nature, 2010)。家族性ALS患者ではオプチニューリンが機能欠失していることから、本研究では、オプチニューリン・ノックアウトマウスや、そのマウス細胞にウイルス感染を行った。その結果、オプチニューリン欠損では、野生型コントロールよりもIFN $\beta$ 産生量が増加することが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、ALSに対する効果的な治療法は確立していない。このため、本研究を行う事により、ALSの発症メカニズムを解き明かすことができると考えている。本研究により、ALS原因遺伝子オプチニューリンの欠損は、ウイルス感染時、IFN $\beta$ 産生量が増加することを明らかにできた。もし、ウイルス感染がALS発症に関与していることを明らかにできた場合、ワクチン接種などにより、原因遺伝子を保有している人でもALS発症を予防することができるようになるかも知れない。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neuro-degenerative disease characterized by systemic and progressive muscle weakness from loss of motor neurons in the brain and spinal cord. Genomic analysis of several patients with familial ALS showed that they have loss-of-function mutations in their optineurin gene (OPTN). OPTN was also shown to be involved in autophagy and the transcriptional activity of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B). However, the mechanism by which OPTN mutations cause ALS remains unknown. In this study, we analyzed the relationship between OPTN and interferon beta (IFN $\beta$ ), which plays a central role in innate immunity, using Optn-knockout (KO) mice, mouse embryonic fibroblasts (MEFs), mouse brain cells and human fibroblasts isolated from OPTN-ALS patients.

研究分野：ウイルス学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ウイルス感染 インターフェロン・ベータ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロン (運動の指令を大脳から筋肉まで伝える神経) が選択的に変性・脱落する疾患で、筋肉が動かなくなり、発症から 2~5 年で呼吸筋麻痺により死亡する。現在、日本では約 1 万人の患者がいるものの、有効な治療法がないことから、発症メカニズムの解明および治療法の開発が望まれている。我々は、家族性に発症した 4 家系 7 人の ALS 患者の解析から、オプチニューリン (Optineurin) が原因遺伝子であることを報告した (*Nature*, 2010)。また、オプチニューリンが、インターフェロン・ベータ (IFN $\beta$ : ウイルス感染時、宿主から産生される抗ウイルス因子。自然免疫の中心的な役割を担う) の産生を調節する転写因子 IRF-3 と相互作用することを報告した。その後、オプチニューリンがインターフェロン・ベータ (IFN $\beta$ ) の産生を抑えることを明らかにした (未発表)。

### 2. 研究の目的

われわれは、オプチニューリンがインターフェロン・ベータ (IFN $\beta$ ) の産生を抑えることを明らかにした。近年、IFN $\beta$  の過剰産生が神経疾患を引き起こす “IFN 病” が提唱されている。このため本研究課題では「オプチニューリンの変異を有するヒトでは、ウイルス感染の度に IFN $\beta$  が過剰に産生され、これが必要以上に炎症を強め、運動ニューロンの変性、そして ALS 発症に繋がる」という仮説 (図 1) を立て研究を進めた。

### 3. 研究の方法

オプチニューリン KO マウスを作製した。本 KO マウスを用いて、ウイルスや細菌の感染実験へ行った。

#### ① ウイルス (Sendai Virus) の経鼻感染

本マウスにウイルス (Sendai Virus [Cantell Strain]) を経鼻接種で肺へ感染させ、肺中 IFN $\beta$  量を ELISA で測定した。肺中・血中 IFN $\beta$  量、肺中ウイルス量、マウス生死、体重を含めた全身状態の変化も同時に検討した。

#### ② LPS および人工核酸の腹腔内投与

これまでの我々の結果から、培養細胞レベルで、オプチニューリンの有無が、LPS あるいは人工核酸刺激による IFN $\beta$  産生に影響することが判った (未発表)。このため、LPS や人工核酸をオプチニューリン KO マウスへ腹腔内投与し、マウス生死、全身状態、血中 IFN $\beta$  量を検討する。マウスへの致死量 LPS 投与は、ヒトのエンドトキシンショックのモデルであり、重度肝障害から個体死に至る。このため、肝臓の病理組織学的検討も必要になってくるかも知れない。また、血中 IFN $\beta$  量以外に、TNF $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカイン量も ELISA などで検討する。

#### ③ ALS 患者細胞での IFN $\beta$ 産生の検討

オプチニューリン変異 ALS 患者細胞へのウイルス感染を行い、IFN $\beta$  産生を検討する。また、オプチニューリン以外の ALS 原因遺伝子 (SOD1 など) に変異がある ALS 患者細胞を米国 NINDS から入手、検討する。さらに、ALS のほとんどは遺伝的要因のない孤発性 ALS であることから、これらについても京都大学などから細胞を入手し検討する。

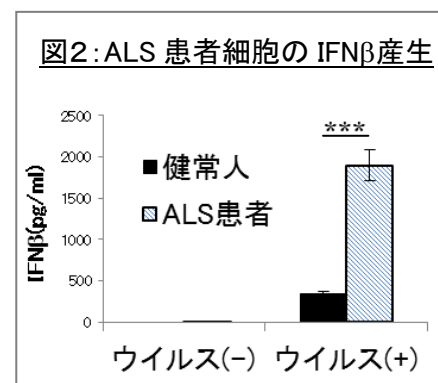
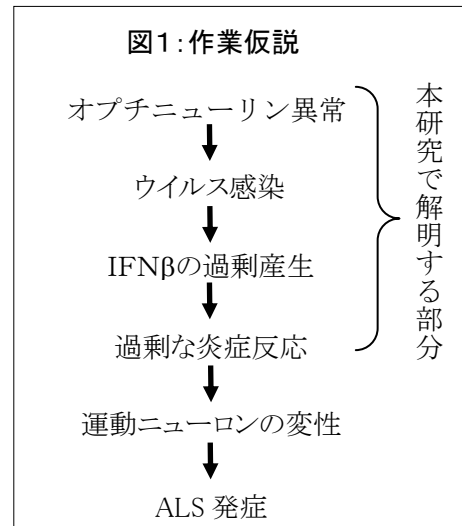
#### ④ 炎症性サイトカインの検討

IFN $\beta$  は種々の炎症性サイトカインを誘導することから、炎症性サイトカインの網羅的解析を抗体アレイにて行う。検体は ALS 患者細胞 (ウイルス感染・非感染) の培養上清を用いる。

### 4. 研究成果

本研究課題で以下のことが判った。

- ① オプチニューリン欠損 ALS 患者由来細胞にウイルス感染させると、健常人細胞の場合より、IFN $\beta$  (ウイルス感染によって感染細胞から産生されるサイトカイン。周囲の非感染細胞を抗ウイルス状態にする) の産生が増加した (図 2)。この現象は、培養細胞株、マウス胎仔線維芽細胞、マウス脳細胞でも同様に観察された。
- ② このメカニズムは、オプチニューリン欠損によりオートファジー不全が起こり、ウイルス RNA が分解されず蓄積、これを細胞内センサーが検知、IFN $\beta$  増加を招いていた。
- ③ オプチニューリン欠損 ALS 患者由来細胞へのウイルス感染では、IFN $\beta$  産生が増加することが判った。しかし、この現象は、SOD-1、FUS など、他の ALS 原因遺伝子



- に変異のある ALS 患者由来細胞へのウイルス感染で、IFN $\beta$ 産生の増加は確認できなかった。
- ④ オプチニューリン欠損マウスにウイルス感染させると、野生型マウスの場合より、肺中の IFN $\beta$ 量が多く、ウイルス増殖が抑えられ、生存率が高くなった。
  - ⑤ ALS 患者細胞（ウイルス感染・非感染）の培養上清を用い、炎症性サイトカインの網羅的検討を行った。その結果、複数の炎症性サイトカインの上昇が見られた。このため、これらについて個別に ELISA を行い定量解析を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 福土雅也、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 原因遺伝子オプチニューリンの欠損は、病原体感染によるインターフェロン・ベータ産生を増加させる、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年
- ② 福土雅也、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 原因遺伝子オプチニューリンは、病原体感染時のインターフェロン・ベータ産生を抑制する 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年
- ③ Masaya Fukushi、Optineurin, a causative gene of amyotrophic lateral sclerosis, is involved in interferon beta expression、第 45 回日本免疫学会年会、2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

<https://home.hiroshima-u.ac.jp/isaikin/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

① 研究分担者氏名：川上秀史

ローマ字氏名：Hideshi Kawakami

所属研究機関名：広島大学

部局名：原爆放射線医科学研究所

職名：教授

研究者番号（8 桁）：70253060

② 研究分担者氏名：外丸祐介

ローマ字氏名：Yusuke Sotomaru

所属研究機関名：広島大学

部局名：自然科学研究支援開発センター

職名：教授

研究者番号（8桁）：90309352

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：坂口剛正

ローマ字氏名：Takemasa Sakaguchi

※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。