

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07887

研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子改変モデルを用いた発症機序解明・治療薬の探索

研究課題名（英文）Elucidation for pathomechanisms of amyotrophic lateral sclerosis using genetically modified models.

研究代表者

丸山 博文（MARUYAMA, Hirofumi）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：90304443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：オプチニューリンノックアウトマウスの解析では、前角細胞が減少し、細胞内空胞が増加し異常なオートファゴソームが形成され、TDP43陽性凝集体の出現を認めた。表現型には差はなかった。細胞系での評価ではオプチニューリンのノックダウンにより細胞分化が阻害され、筋分化調節因子のmRNA・タンパク発現が阻害され、筋分化の初期に関与していると考えられた。このように筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子であるオプチニューリンのモデル動物・細胞の解析により病態の一部が再現可能である。ヒト筋肉での検討では、発症早期から筋内神経束にリン酸化TDP43が蓄積しており、早期診断のバイオマーカーとなりうるということが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オプチニューリンのモデルマウス・モデル細胞は筋萎縮性側索硬化症の病態の一部を再現しており、病態モデルとして使用できることが明らかとなった。筋萎縮性側索硬化症発症メカニズムにおけるオプチニューリンの意義を解明できたことにより、治療介入の手がかりを得ることができた。中枢神経からの組織を生前に得ることは困難であるのに対し、筋生検での筋内神経束のリン酸化TDP43蓄積は検体採取による生前の評価が可能であり、かつ病気の早期から出現していることより、筋萎縮性側索硬化症のバイオマーカーとして早期診断の手がかりが得られた。また発症に至る病態を考える上で、運動神経終末からの逆行性進展機序を示唆する知見と言える。

研究成果の概要（英文）：We generated Optineurin knockout (OPTN KO) mice. Anterior horn neurons decreased. OPTN KO mice presented abnormal neuronal autophagic vacuoles, and showed TDP43 positive cytoplasmic inclusions. We could not observe significant differences in survival time, body weight, and motor functions. In model cells, OPTN knockdown inhibited myogenic differentiation accompanied by reduction of mRNA and protein expression levels of myogenin and MyoD. OPTN may play a role in early stage of muscle differentiation. Model mice and model cells of OPTN could reproduce pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We evaluated histopathology of peripheral axons in the skeletal muscle of human. Axonal phosphorylated TDP43 accumulated from early stage of ALS. TDP43 in nerve bundles may be a novel diagnostic biomarker for ALS.

研究分野：脳神経内科

キーワード：オプチニューリン 筋萎縮性側索硬化症 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

我々が筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS)の原因遺伝子として同定したオプチニューリンは、それまでは炎症や発がんとの関与が指摘されていたが、ALS との関連は全く想定されていなかった。またオプチニューリン自体の機能としても当初はNF- κ Bを介した神経炎症との関連が主に想定されていた。オプチニューリン変異が原因のALS症例は少ないものの、ALSの細胞内封入体には孤発例や他の原因遺伝子変異を有する症例においてもオプチニューリンが含まれていることが判明した。そのためALS発症に関して幅広いオプチニューリンの影響が想定されるようになった。

その後の検討により、オプチニューリンは自然免疫に関係し、オートファジー受容体であることが判明し、その他にもミトファジー・細胞分裂の調整・膜輸送や直鎖ユビキチンにも関連することが明らかになった。一方2874人のALS患者のエクソームシーケンシングによりTBK1 (TANK-binding kinase 1) が原因遺伝子として抽出された。オプチニューリンとTBK1は四量体を形成すること、TBK1はオプチニューリンをリン酸化し、オプチニューリンはTBK1の活性化・自己リン酸化に関与することからALSにおけるオプチニューリン-TBK1経路の重要性が判明した。このTBK1とオプチニューリンはともに緑内障や前頭側頭型認知症においても遺伝子変異が報告され、両者が神経変性疾患に関するコモンパスウェイを構成している重要な分子であると想定されるようになった。

これまでのオプチニューリンの遺伝子変異の検討の多くは培養細胞を用いてオプチニューリンを強制発現させた系での検討であった。また従来のALS研究ではSOD1 (superoxide dismutase 1)モデルマウスを用いて病態解明が進められ、様々な治療法の検討により基礎実験において有望な薬剤が報告され臨床応用が検討されてきたが、ヒトに対して症状を改善させるほど有効なものとは未だ確認されていない。このことはSOD1マウスでの検討の限界を示している。加えてオプチニューリンノックアウトマウスについて報告はなされているが、炎症に注目した解析にとどまっていた。また別の報告でもアクソンや髄鞘といった末梢レベルでの解析にとどまっており、いずれも運動ニューロンの変化の解析は不十分であった。

臨床面で見ると、ALSには有効な診断マーカーが存在しないため、症状が揃うまでは早期診断ができない状況にある。このことは治療介入のタイミングが遅れることを意味する。また病理学的評価においてもALSの病変の主体は中枢神経系のため生検が困難であり、可視化できる指標が求められている。

2. 研究の目的

我々が作成したオプチニューリン遺伝子改変マウスでの行動学的・病理学的評価を行い、このモデルがALS発症や治療介入のモデルとなりうるかについて検討する。

細胞系の評価として、筋肉細胞のホメオスターシスでのオプチニューリンの関与を評価する。

これらにより神経筋疾患におけるオプチニューリンの役割について検討する。

またALS発症早期から出現し、かつ客観的で可視化できる診断マーカーについて検索する。

3. 研究の方法

(1) C57/BL/6マウスにおいてオプチニューリンのエクソン8から10の間をネオマイシンカセットに置き換え、オプチニューリンノックアウトマウスを作成する。本マウスの飼育を継続し、体重・ロータロッドテスト・握力・生存曲線といった表現型を評価する。病理学的には大脳皮質・海馬・脊髄前角の神経細胞の形態学的変化や坐骨神経について病理学的に評価する。オプチニューリン変異例Q398XとE478Gの剖検脳との病理学的異同について検討する。

さらにオプチニューリンとTDP43 (TAR-DNA binding protein 43)遺伝子のダブル操作マウスおよびALS原因変異導入マウスについても検討する。

(2) 6週齢のC57BL/6マウスの左坐骨神経を麻酔下で5mm切除する。脱神経操作を加えた筋肉細胞(前脛骨筋・腓腹筋)でのオプチニューリンの挙動を評価し、さらに関連したタンパク質の変化を時間軸の評価も加えて行う。またマウス横紋筋由来C2C12細胞にsiRNA処理を加えオプチニューリンの発現をノックダウンした影響について評価を行う。

(3) 病理解剖筋肉および筋生検の検体を用いてALS患者の特徴的病理所見を見出す。病理解剖によってALSと診断された症例と非ALS症例の骨格筋組織の筋内神経束でのTDP43タンパクの発現を病理学的に評価する。さらに筋生検実施症例のうち筋疾患と診断されなかった症例についてTDP43タンパクの発現と臨床症状・Gold Coast臨床診断基準との関係について解析する。

4. 研究成果

(1) オプチニューリンノックアウトマウス(CDB0949K, KO)では3ヶ月齢以降からwild type (WT)に比して前角細胞は減少を認め、以後継続的に減少した(図1)。しかし脊髄白質・大脳皮

質・海馬・視神経における変化は認めなかった。また筋力や体重・生存曲線といった表現型には WT と差を認めなかった。CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B)陽性の細胞内空胞が8ヶ月齢以後に増加し、異常なオートファゴゾームが形成されていた。本事項についてオプチニューリン遺伝子変異症例について検討したところ、Q398X のホモ接合変異症例の前角細胞では認めしたが、E478G のヘテロ接合変異症例では認めず、変異による差が確認でき、発症メカニズムの相違が想定された。またオートファジー様空胞形成を伴った TDP43 陽性凝集体の出現を認め、14ヶ月齢以降に核から TDP43 が消失し、p62 陽性・ユビキチン陽性の凝集体が増加していた。さらに24ヶ月齢で坐骨神経は大径線維が減少し、小径線維が増加し、軸索変性をきたしていた。これらのことからオプチニューリンノックアウトマウスはオートファジー異常が関連した ALS のモデルマウスとして適切であることを示している。オプチニューリンと TDP43 ダブル操作マウスは体重・握力・ロタロッドテスト・生存期間などの行動学的評価において TDP43 の影響は認めたものの、相乗効果は認められなかった。ALS の原因変異をゲノム編集によって導入したオプチニューリン変異マウスにおいても、行動学的評価に WT との差は認めなかった。これらマウスの病理学的検討を進めている。

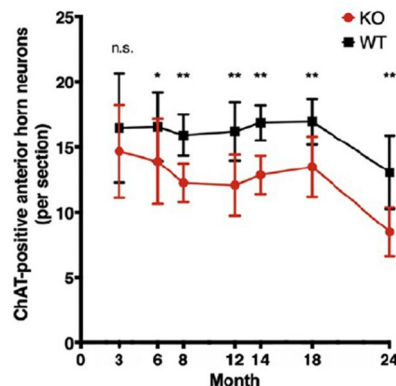


図1 運動神経数の推移

(2) 対照 (NON)と比較すると脱神経した萎縮筋 (DEN)においてオプチニューリンのタンパク質・mRNA 発現が脱神経操作の初期に増加し、NF- κ B 活性も増加していた(図2)。またその発現は筋線維膜で Pax7 と共同在し筋芽細胞に存在していた。

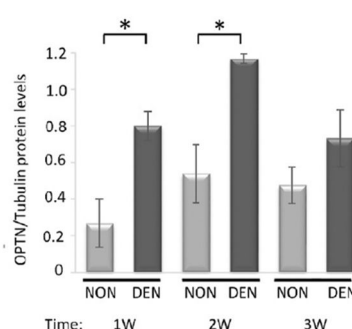


図2 脱神経でOPTNタンパク増加

TWEAK (tumor necrosis factor-like inducer of apoptosis)による *in vitro* 筋萎縮モデルにおいてはオプチニューリンの挙動に変化を認めなかったが、筋原性分化に関与していることが判明した。すなわち C2C12 細胞分化に伴いオプチニューリン mRNA は変化しないがタンパクの発現は次第に減少し、オプチニューリンをノックダウンすると細胞分化が阻害された。ノックダウンに伴い MyoD や myogenin といった筋分化調節因子の mRNA・タンパク発現は抑制された。

これらのことからオプチニューリンは筋分化の特に初期に未知のメカニズムで関与しており、神経筋疾患の発症に関与していることが考えられる。

(3) 病理解剖症例での検討では、ALS 症例 10 例の骨格筋内にある筋内神経束にリン酸化 TDP43 が蓄積しており、非 ALS 症例 12 例では TDP43 を認めなかった。TDP43 は抗ニューロフィラメント抗体と共同在し、軸索に存在することが判明した。舌・横隔膜・上腕二頭筋・腸腰筋で検討したところ筋肉による陽性率の差は認めなかった。筋疾患を除外した筋生検症例 114 例では、71 例で筋内神経束を含んでいた。このうちリン酸化 TDP43 を筋内神経束に認めた 33 例は全例が最終的に ALS と診断されていた。筋内神経束に TDP43 を認めなかった 38 例では ALS は発症しなかった。生検筋内に筋内神経束を認めなかった 43 例では 3 例のみ ALS と診断されていた(図3)。そのほかの ALS 発症に関与する FUS (fused in sarcoma)・p62・ユビキチンは軸索への蓄積を認めなかった。筋生検時点で上位運動ニューロン徴候を示さず ALS の臨床診断基準を満たさない症例であっても、リン酸化 TDP43 を認めた症例では最終的に ALS と診断されていた。

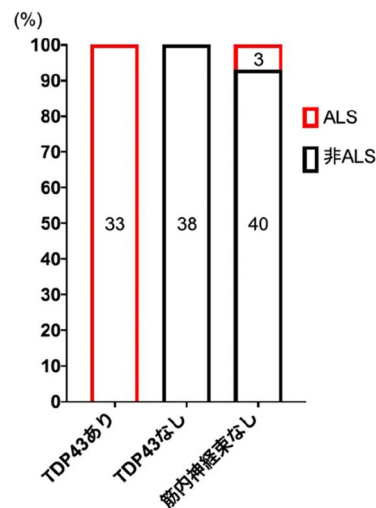


図3 ALSと診断された割合

これらのことは筋内神経束でのリン酸化 TDP43 蓄積は ALS 早期診断のための診断バイオマーカーとなりうることを示している。加えて ALS の運動神経細胞死のメカニズムが運動神経のどの部分から始まっているのかという発症機序を考える上で、細胞内輸送が関与することならびに運動神経終末からの逆行性進展機序を示唆する知見であるといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kurashige Takashi, Morino Hiroyuki, Murao Tomomi, Izumi Yuishin, Sugiura Tomohito, Kuraoka Kazuya, Kawakami Hideshi, Torii Tsuyoshi, Maruyama Hirofumi	4. 巻 79
2. 論文標題 TDP-43 Accumulation Within Intramuscular Nerve Bundles of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JAMA Neurology	6. 最初と最後の頁 693 ~ 693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamaneuro.2022.1113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsubara Tomoyasu, Izumi Yuishin, Oda Masaya, Takahashi Masatoshi, Maruyama Hirofumi, Miyamoto Ryosuke, Watanabe Chigusa, Tachiyama Yoshiro, Morino Hiroyuki, Kawakami Hideshi, Saito Yuko, Murayama Shigeo	4. 巻 41
2. 論文標題 An autopsy report of a familial amyotrophic lateral sclerosis case carrying VCP Arg487His mutation with a unique TDP 43 proteinopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 118 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kikumoto Mai, Nezu Tomohisa, Shiga Yuji, Motoda Atsuko, Toko Megumi, Kurashige Takashi, Ueno Hiroki, Takahashi Tetsuya, Morino Hiroyuki, Sone Jun, Iwasaki Yasushi, Sobue Gen, Maruyama Hirofumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Case of Neuronal Intranuclear Inclusion Disease With Dynamic Perfusion Changes Lacking Typical Signs on Diffusion-Weighted Imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology Genetics	6. 最初と最後の頁 e601 ~ e601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXG.0000000000000601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Motoda Atsuko, Takahashi Tetsuya, Watanabe Chigusa, Tachiyama Yoshiro, Ochi Kazuhide, Saito Yoshihiko, Iida Aritoshi, Nishino Ichizo, Maruyama Hirofumi	4. 巻 31
2. 論文標題 An autopsied case of ADSSL1 myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuromuscular Disorders	6. 最初と最後の頁 1220 ~ 1225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nmd.2021.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Kenichi, Araki Mutsuko, Nagano Yoshito, Motoda Atsuko, Shishido Takeo, Kurashige Takashi, Takahashi Tetsuya, Morino Hiroyuki, Kawakami Hideshi, Matsumoto Masayasu, Maruyama Hirofumi	4. 巻 123
2. 論文標題 Knockdown of optineurin controls C2C12 myoblast differentiation via regulating myogenin and MyoD expressions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Differentiation	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diff.2021.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurashige Takashi, Kuramochi Masahito, Ohsawa Ryosuke, Yamashita Yui, Shioi Go, Morino Hiroyuki, Kamada Masaki, Ayaki Takashi, Ito Hidefumi, Sotomaru Yusuke, Maruyama Hirofumi, Kawakami Hideshi	4. 巻 148
2. 論文標題 Optineurin defects cause TDP43-pathology with autophagic vacuolar formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105215 ~ 105215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2020.105215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurashige Takashi, Murao Tomomi, Mine Naoko, Sugiura Tomohito, Inazuka Yukiko, Kuraoka Kazuya, Takahashi Tetsuya, Maruyama Hirofumi, Torii Tsuyoshi	4. 巻 79
2. 論文標題 Anti-HMGCR Antibody-Positive Myopathy Shows Bcl-2-Positive Inflammation and Lymphocytic Accumulations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 448 ~ 457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shrestha Tejashwi, Takahashi Tetsuya, Li Chengyu, Matsumoto Masayasu, Maruyama Hirofumi	4. 巻 42
2. 論文標題 Nicotine-induced upregulation of miR-132-5p enhances cell survival in PC12 cells by targeting the anti-apoptotic protein Bcl-2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurological Research	6. 最初と最後の頁 405 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01616412.2020.1735817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 都甲めぐみ、中森正博、大下智彦、渡邊友彬、金谷雄平、内藤裕之、末田芳雅、北村健、野村栄一、鳥居剛、宮地隆史、山下拓史、渡邊千種、時信弘、丸山博文
2. 発表標題 ALSの栄養状態と予後の関連-CONUT scoreを用いた検討
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi Kurashige, Hiroyuki Morino, Tomomi Muraio, Yuishin Izumi, Tomohito Sugiura, Kazuya Kuraoka, Hideshi Kawakami, Tsuyoshi Torii, Hirofumi Maruyama
2. 発表標題 TDP43 accumulates in intramuscular nerve bundles of ALS patients.
3. 学会等名 27th Ubterbatuikab Congress of the World Muscle Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 T Matsubara, Y Izumi, T Komori, H Ito, M Oda, A Funai, K Hayashi, K Inoue, K Toyooka, M Kaido, H Fujimura, T Haraguchi, O Yokota, S Terada, Y Adachi, N Atsuta, G Sobue, M Aoki, H Morino, Hirofumi Maruyama, Y Saito, S Murayama
2. 発表標題 Natural history of amyotrophic lateral sclerosis with a Leu126Ser mutation in the SOD1 gene.
3. 学会等名 The PanAsian Consortium for Treatment and Research in ALS (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉重毅志、倉持真人、大澤亮介、山下結衣、塩井剛、森野豊之、鎌田正紀、綾木孝、伊東秀文、外丸祐介、丸山博文、川上秀史
2. 発表標題 Optineurin defects cause TDP43-pathology with autophagic vacuolar formation
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉重毅志、森野豊之、丸山博文、鳥居剛
2. 発表標題 孤発性筋萎縮性側索硬化症でのCFAP410発現の免疫組織学的検討
3. 学会等名 第61回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshito Nagano, Hitomi Obayashi, Tetsuya Takahashi, Takhiro Seki, Shigeru Tanaka, Norio Sakai, Masayasu Matsumoto, Hirofumi Maruyama
2. 発表標題 Histone deacetylase 10 knockout activates chaperone-mediated autophagy and accelerates the decomposition of its substrate.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 丸山博文	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2151
3. 書名 今日の治療指針 2021年版 筋萎縮性側索硬化症	

1. 著者名 丸山博文	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2079
3. 書名 今日の診断指針第8版、筋萎縮	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------