

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591246

研究課題名(和文) ALSにおけるOptineurinの神経細胞毒性に関する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism caused by the neurotoxicity of OPTN mutations in ALS

研究代表者

森野 豊之 (Morino, Hiroyuki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：10397953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：われわれがALSの原因遺伝子として同定したOPTNは多様な分子機構に関連しており、オートファジーへの関与が重要であると指摘されていた。OPTNノックアウトマウスとノックインマウスを樹立し、胚性線維芽細胞と胚性幹細胞を作製した。個体レベルでは今までのところ表現型でALSを思わせるような異常は認められていないが、病理学的に脊髄前角細胞の脱落を認めた。培養細胞による検討ではオートファジーに関連する異常は認められなかったが、細胞内のオルガネラに重要な役割を果たしていることが確認された。さらに患者線維芽細胞由来のiPS細胞を分化させて、神経細胞内におけるOPTNの病態への関与を詳細に明らかにしていく。

研究成果の概要(英文)：We identified novel mutations of optineurin (OPTN) as a cause of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and OPTN is involved in various molecular mechanisms. We created OPTN knockout mice and knock-in mouse, and established mouse embryonic fibroblasts and ES cells for experiments with cultured cell lines. At this moment, we have not obtained a pathological phenotype, but pathological analysis revealed neuronal loss of the anterior horn of the spinal cord. There was not any significant change in the autophagy-associated molecules in the analysis using the MEF. However, it is indicated that OPTN plays an important role in cellular organelle regulation. We are aiming at revealing the detail of pathogenesis caused by OPTN mutation by iPS-derived neuron induced from the patient's fibroblast.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態 筋萎縮性側索硬化症

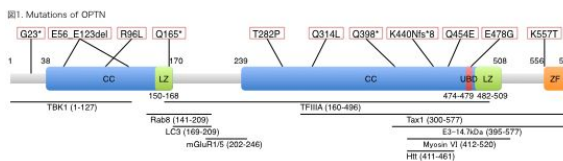
### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位下位の運動ニューロンの選択的脱落によって発症後3年程度でほとんどの患者が人工呼吸器のサポートなしには呼吸不全で死亡する神経難病の1つである。この疾患は運動ニューロンの特異的な障害という点でも興味深い。病理組織学的に神経変性疾患一般に共通する封入体形成を特徴とし、アルツハイマー病における老人斑やパーキンソン病における Lewy 小体と同様に残存する運動ニューロン内に Bunina 小体やユビキチン陽性封入体を認める。このような細胞内封入体形成と神経細胞死の関わりは以前から指摘されていたが、防御的に働いているという考えも根強くある。その形成メカニズムはプロテアソームに関連して研究されてきたが、最近ではオートファジーの関与も示されている。

われわれは ALS の原因遺伝子として全く新規の Optineurin を同定した。この分子は炎症や細胞内輸送など従来考えられていた ALS の主たる発症機序とは異なる機能を有しており、これらのうち本研究では細胞内輸送機構に注目し、この遺伝子異常を持つ病態モデル細胞を用いて、将来的には治療法の開発にも繋がるような細胞内分子機能を明らかにできることが期待される。

### 2. 研究の目的

今回われわれが同定した OPTN の遺伝子異常には、劣性遺伝形式で発症する Exon 5 の欠失と Q398X、優性遺伝形式で発症する E478G の3種類があり、Exon 5 の欠失と Q398X では OPTN の機能が消失し、E478G は種を超えて保存されている DFxxER モチーフに位置することを確認している。われわれの発見以来、家族性 ALS で OPTN の変異を認める家系が相次いで報告されている (図1)。

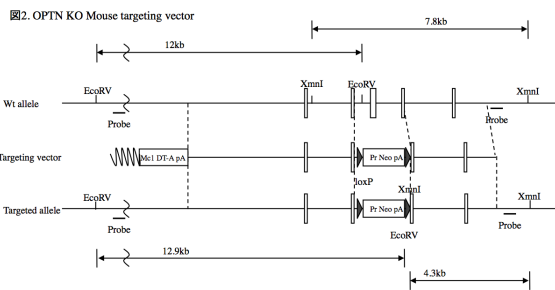


OPTN は NF- $\kappa$ B や TNF といった炎症関連分子との関連があるだけでなく、Huntingtin や Myosin VI などを通して軸索輸送やメンブレントランスポートに関与しており、OPTN の機能異常によってゴルジからライソソームに至る輸送の経路が障害される可能性も考えられる。このことから ALS の封入体形成に OPTN が関与している可能性が強く示唆され、OPTN の細胞内動態を明らかにすることによって本疾患の発症メカニズムの解明に繋がるだけでなく、広く神経変性疾患一般において封入体形成のメカニズムを理解する上で重要な知見が得られるものと期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデルマウスの作成

前述したように、OPTN の変異には優生遺伝形式をとるものと劣性遺伝形式をとるものがあり、劣性遺伝のものでは正常の蛋白質が合成されないことから機能欠失により発症にいたると考えられる。そのため、劣性遺伝形式の動物モデルとしてジーンターゲットング法を用いてマウス ES 細胞にターゲットングベクターを導入し (図2)、キメラマウスからヘテロおよびホモの OPTN 欠失マウスを得たのちに C57BL/6 で戻し交配を行なっている。OPTN ノックアウトマウスの表現形を観察するとともに、培養細胞系での検討を行う目的でノックアウトマウスの胎仔からマウス胚性線維芽細胞 (MEF) を作製し T 抗原にて不死化させた。これと並行して優生遺伝形式をとる OPTN の E478G 変異を導入したトランスジェニックマウスの作製も試みた。



#### (2) 行動学的・病理学的評価

OPTN ノックアウトマウスを2系統維持しており、遺伝型はサザンブロットおよび PCR にて確認した。このうち#27 系統の野生型の雄雌を2匹と3匹、ヘテロノックアウトの雄雌を6匹と5匹、ホモノックアウトの雄雌を4匹と3匹の計23匹を対象に、身体的評価として体重測定、行動学的評価として rotarod テストと foot-print テストを行った。また、病理学的検討として脊髄前角の神経神経脱落を解析した。

#### (3) 培養細胞を用いた解析

培養細胞を用いた解析ではオートファジーに関連する分子の変化やストレスグラニューールの形成について検討した。また、患者の同意を得て培養・増殖した皮膚由来の線維芽細胞から Yamanaka 法によって iPS 細胞を作製した。さらに、得られた iPS 細胞を運動ニューロンに分化させる際にマーカーとなる蛍光タンパクを HB9 プロモータの下流に組み込んだベクターを遺伝子導入した。

### 4. 研究成果

#### (1) モデルマウスの樹立

一昨年度までに OPTN ノックアウトマウス及び変異マウスを作製し、それから得られた線維芽細胞を不死化することによって OPTN の細胞内機能を明らかにするためのシステムを構築したほか、ノックアウトマウスの戻し交配と変異マウスの遺伝的純化を進める

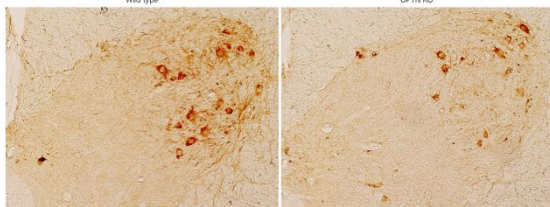
とともに、個体数の確保と行動学および病理学的評価のための準備を行った。

TALEN を用いたノックインマウスの作製では、649 個の胚に TALEN mRNA と相同組換えを起こすための ssODN を注入し、55 匹の産仔が得られ、そのうち 19 個体で遺伝子改変を認めたと、目的の E478 変異が入っているものは 2 個体だった。既に germline transmission を確認しており、現在繁殖を行っている。

### (2) OPTN ノックアウトマウスの病理学的異常

OPTN ノックアウトマウスについては、今のところ明らかな体重減少や運動機能障害の兆候は認められていないが、体重に関してはむしろ野生型の方が低値で、野生型、ノックアウトともに 35 週齢まででは減少傾向はみられず、rotarod テストでは個体差に起因するグループ間の差が生じているものの遺伝型による一定の傾向は認めなかった。病理学的解析では脊髄前角の神経細胞は 6 ヶ月齢で野生型に比べて減少していた (図 3)。

図3. Neuronal loss of spinal cord



### (3) OPTN 変異による病態メカニズム

培養細胞を用いた検討では、OPTN とオートファジーやストレスグラニュール、細胞内輸送などとの関連について解析を行い、オートファジーやストレスグラニュールに対する影響は認められなかったが、細胞内のオルガネラを調節する上で重要な機能を認めた。患者由来の線維芽細胞から得られた iPS 細胞は神経分化への誘導まで行うことが出来ており、今後運送ニューロンへの分化を行い神経細胞死を引き起こすメカニズムをさらに探索していく予定である。

これらの研究の結果、OPTN の機能欠失が神経細胞死を引き起こすメカニズムの一部が明らかになり、ALS の病態形成における OPTN の関与を解明することができた。本研究成果は学会及び論文にて発表する予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 21 件)

1: Mochizuki Y, Kawata A, Maruyama H, Homma T, Watabe K, Kawakami H, Komori T, Mizutani T, Matsubara S. A Japanese patient with familial ALS and a p.K510M

mutation in the gene for FUS (FUS) resulting in the totally locked-in state. *Neuropathology*. 2014 May 19. doi: 10.1111/neup.12130. 査読有

2: Homma T, Nagaoka U, Kawata A, Mochizuki Y, Kawakami H, Maruyama H, Matsubara S, Komori T. Neuropathological features of Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis with p.N352S mutation in TARDBP. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014 Feb;40(2):231-6. doi: 10.1111/nan.12090. 査読有

3: Yagi R, Miyamoto R, Morino H, Izumi Y, Kuramochi M, Kurashige T, Maruyama H, Mizuno N, Kurihara H, Kawakami H. Detecting gene mutations in Japanese Alzheimer's patients by semiconductor sequencing. *Neurobiol Aging*. 2014 Jul;35(7):1780.e1-5. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.023. 査読有

4: Morino H, Miyamoto R, Ohnishi S, Maruyama H, Kawakami H. Exome sequencing reveals a novel TTC19 mutation in an autosomal recessive spinocerebellar ataxia patient. *BMC Neurol*. 2014 Jan 7;14:5. doi: 10.1186/1471-2377-14-5. 査読有

5: Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Miyazaki Y, Maruyama H, Murakami N, Fukada K, Izumi Y, Matsuura S, Kaji R, Kawakami H. Exome sequencing reveals a novel MRE11 mutation in a patient with progressive myoclonic ataxia. *J Neuro Sci*. 2014 Feb 15;337(1-2):219-23. doi: 10.1016/j.jns.2013.11.032. 査読有

6: Kamada M, Izumi Y, Ayaki T, Nakamura M, Kagawa S, Kudo E, Sako W, Maruyama H, Nishida Y, Kawakami H, Ito H, Kaji R. Clinicopathologic features of autosomal recessive amyotrophic lateral sclerosis associated with optineurin mutation. *Neuropathology*. 2014 Feb;34(1):64-70. doi: 10.1111/neup.12051. 査読有

7: Miyamoto R, Koizumi H, Morino H, Kawarai T, Maruyama H, Mukai Y, Miyashiro A, Sako W, Izumi Y, Kawakami H, Kaji R. DYT6 in Japan-genetic screening and clinical characteristics of the patients. *Mov Disord*. 2014 Feb;29(2):278-80. doi: 10.1002/mds.25745. 査読有

8: Nakamura S, Wate R, Kaneko S, Ito H, Oki M, Tsuge A, Nagashima M, Asayama S, Fujita K, Nakamura M, Maruyama H, Kawakami H, Kusaka H. An autopsy case of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with the I113T SOD1 mutation. *Neuropathology*. 2014 Feb;34(1):58-63. doi: 10.1111/neup.12049. 査読有

9: Maruyama H, Morino H, Miyamoto R,



- Murakami N, Hamano T, Kawakami H. Exome sequencing reveals a novel ANO10 mutation in a Japanese patient with autosomal recessive spinocerebellar ataxia. *Clin Genet*. 2014 Mar;85(3):296-7. doi: 10.1111/cge.12140. 査読有
- 10: Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, Kawakami H, Ito H, Takahashi R. Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- B pathway. *J Neurochem*. 2013 Sep;126(6):699-704. doi: 10.1111/jnc.12326. 査読有
- 11: Maruyama H, Morino H, Izumi Y, Noda K, Kawakami H. Convenient diagnosis of spinal and bulbar muscular atrophy using a microchip electrophoresis system. *Am J Neurodegener Dis*. 2013;2(1):35-9. <http://www.ajnd.us/files/ajnd1212003.pdf> 査読有
- 12: Maruyama H, Kawakami H. Optineurin and amyotrophic lateral sclerosis. *Geriatr Gerontol Int*. 2013 Jul;13(3):528-32. doi: 10.1111/ggi.12022. 査読有
- 13: Miyashiro A, Sugihara K, Kawarai T, Miyamoto R, Izumi Y, Morino H, Maruyama H, Orlandaccio A, Kawakami H, Kaji R. Oromandibular dystonia associated with SCA36. *Mov Disord*. 2013 Apr;28(4):558-9. doi: 10.1002/mds.25304. 査読有
- 14: Izumi Y, Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Nishinaka K, Uda K, Kameyama M, Maruyama H, Kawakami H. Cerebellar ataxia with SYNE1 mutation accompanying motor neuron disease. *Neurology*. 2013 Feb 5;80(6):600-1. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182815529. 査読有
- 15: Sugihara K, Maruyama H, Morino H, Miyamoto R, Ueno H, Matsumoto M, Kaji R, Kitaguchi H, Yukitake M, Higashi Y, Nishinaka K, Oda M, Izumi Y, Kawakami H. The clinical characteristics of spinocerebellar ataxia 36: a study of 2121 Japanese ataxia patients. *Mov Disord*. 2012 Aug;27(9):1158-63. doi: 10.1002/mds.25092. 査読有
- 16: Ueno H, Kobatake K, Matsumoto M, Morino H, Maruyama H, Kawakami H. Severe brain atrophy after long-term survival seen in siblings with familial amyotrophic lateral sclerosis and a mutation in the optineurin gene: a case series. *J Med Case Rep*. 2011 Dec 12;5(1):573. doi: 10.1186/1752-1947-5-573. 査読有
- 17: Tanaka E, Maruyama H, Morino H, Kawakami H. Detection of large expansions in SCA8 using a fluorescent repeat-primed PCR assay. *Hiroshima J Med Sci*. 2011 Sep;60(3):63-6. [http://ir.lib.hiroshima-u.ac.jp/metadb/up/kiyo/AA00664312/HiroshimaJMedSci\\_6\\_0\\_63.pdf](http://ir.lib.hiroshima-u.ac.jp/metadb/up/kiyo/AA00664312/HiroshimaJMedSci_6_0_63.pdf) 査読有
- 18: Hagiwara K, Morino H, Shiihara J, Tanaka T, Miyazawa H, Suzuki T, Kohda M, Okazaki Y, Seyama K, Kawakami H. Homozygosity mapping on homozygosity haplotype analysis to detect recessive disease-causing genes from a small number of unrelated, outbred patients. *PLoS One*. 2011;6(9):e25059. doi: 10.1371/journal.pone.0025059. 査読有
- 19: Ito H, Nakamura M, Komure O, Ayaki T, Wate R, Maruyama H, Nakamura Y, Fujita K, Kaneko S, Okamoto Y, Ihara M, Konishi T, Ogasawara K, Hirano A, Kusaka H, Kaji R, Takahashi R, Kawakami H. Clinicopathologic study on an ALS family with a heterozygous E478G optineurin mutation. *Acta Neuropathol*. 2011 Aug;122(2):223-9. doi: 10.1007/s00401-011-0842-y. 査読有
- 20: Sugihara K, Maruyama H, Kamada M, Morino H, Kawakami H. Screening for OPTN mutations in amyotrophic lateral sclerosis in a mainly Caucasian population. *Neurobiol Aging*. 2011 Oct;32(10):1923.e9-10. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.024. 査読有
- 21: Snapinn KW, Larson EB, Kawakami H, Ujike H, Borenstein AR, Izumi Y, Kaji R, Maruyama H, Mata IF, Morino H, Oda M, Tsuang DW, Yearout D, Edwards KL, Zabetian CP. The UCHL1 S18Y polymorphism and Parkinson's disease in a Japanese population. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011 Jul;17(6):473-5. doi: 10.1016/j.parkreldis.2011.01.019. 査読有
- [学会発表](計 22件)
1. 川上秀史, 平木啓子, 大澤亮介, 鈴木秀規, 吉澤明生, 倉持真人, 森野豊之, 和泉唯信, 梶龍兒, 加藤英政, 丸山博文: OPTN-ALS 患者由来 iPS 細胞研究に向けて. 平成 25 年度神経変性疾患に関する調査研究班分科班「病態に根ざした ALS の新規治療法開発」会議. 東京, 2014/1/17
  2. Kawakami H, Morino H, Miyamoto R, Maruyama H: Novel C10orf2 mutations cause Perrault syndrome. American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, Boston, USA, 2013/10/23
  3. 川浪文, 永井真貴子, 早川英規, 仁平友子, 水野美邦, 丸山博文, 川上秀史, 西山和利: AAV1 を用いた変異 Optineurin 発現 ALS モデルの作製. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013/5/30
  4. 鎌田正紀, 池田和代, 久米広大, 浦井由光, 出口一志, 峠哲男, 宮本亮介, 杉原勝宣, 森野豊之, 丸山博文, 川上秀史: VCP

- 変異を認めた MND+IBM の臨床像と家族性 ALS における VCP 変異の頻度 . 第 54 回日本神経学会学術大会 , 東京 , 2013/5/31
5. 森野豊之, 宮本亮介, 丸山博文, 川上秀史 : Perrault 症候群の新規原因遺伝子 . 第 54 回日本神経学会学術大会 , 東京 , 2013/5/31
  6. 和泉唯信, 宮本亮介, 森野豊之, 吉澤明生, 西中和人, 宇高不可思, 亀山正邦, 丸山博文, 川上秀史 : 次世代シーケンサーで確認した SYNE1 変異による脊髄小脳変性症の臨床像 . 第 54 回日本神経学会学術大会 , 東京 , 2013/5/31
  7. 杉原勝宣, 丸山博文, 宮本亮介, 森野豊之, 上野弘貴, 松本昌泰, 北口浩史, 雪竹基弘, 東靖人, 西中和人, 織田雅也, 和泉唯信, 川上秀史 : 脊髄小脳失調症 36 型の臨床的特徴および日本人失調症患者 2121 人の病型別検討 . 第 54 回日本神経学会学術大会 , 東京 , 2013/6/1
  8. Y Izumi, R Miyamoto, H Morino, A Yoshizawa, K Nishinaka, F Udaka, M Kameyama, H Maruyama, H Kawakami : Cerebellar ataxia with SYNE1 mutation accompanying motor neuron disease. 65th American Academy of Neurology Annual Meeting, San Diego, USA, 2013/3/20
  9. R Miyamoto, H Morino, H Maruyama, Y Izumi\*1, R Kaji, H Kawakami : Exome sequence identifies a novel MRE11 mutation in a patient with generalized myoclonic tremor. 62nd Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 2012/11/8
  10. 杉原勝宣, 丸山博文, 宮本亮介, 森野豊之, 上野弘貴, 北口浩史, 雪竹基弘, 東靖人, 西中和人, 織田雅也, 和泉唯信, 川上秀史 : SCA36 の臨床的特徴 . 日本人類遺伝学会第 57 回大会 , 東京 , 2012/10/27
  11. 宮本亮介, 森野豊之, 丸山博文, 和泉唯信, 梶龍兒, 川上秀史 : Exome sequencing identifies a novel MRE11 mutation in a patient with generalized myoclonic tremor. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 , 東京 , 2012/10/25
  12. 杉原勝宣, 宮本亮介, 鎌田正紀, 森野豊之, 丸山博文, 川上秀史 : ALS 関連遺伝子のスクリーニング . 第 53 回日本神経学会学術大会 , 東京 , 2012/5/25
  13. 丸山博文, 伊東秀文, 川上秀史 : 日本神経学会 2011 年度学会賞受賞者招待講演「筋萎縮性側索硬化症の新規原因遺伝子 optineurin の同定」. 第 53 回日本神経学会学術大会 , 東京 , 2012/5/23
  14. 望月葉子, 川田明広, 新井誠, 本間琢, 渡部和彦, 秋山治彦, 川上秀史, 小森隆司, 水谷俊雄, 松原四郎 : 橋核の神経細胞の脱落とともに多数の FUS 陽性構造物を広範囲な変性部位に認めたが、FUS/TLS 遺伝子には変異を認めなかった家族性 ALS の 1 例 . 第 100 回日本神経学会関東地方会 , 東京 , 2012/3/24
  15. 川上秀史 : 原因遺伝子からみた ALS . シンポジウム「筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態解明に向けて—新薬開発の糸口と将来への期待」, 第 85 回日本薬理学会年会 , 京都 , 2012/3/16
  16. 丸山博文, 和泉唯信, 伊東秀文, 森野豊之, 阿部康二, 杉原勝宣, 宮本亮介, 小島敬太郎, 川上秀史 : Optineurin 変異による筋萎縮性側索硬化症の臨床経過および原因遺伝子の頻度 . 日本人類遺伝学会第 56 回大会 , 千葉 , 2011/11/11
  17. 藤田賢吾, 伊東秀文, 金子鋭, 中村正孝, 和手麗香, 川上秀史, 日下博文 : 好塩基性封入体を伴う成人発症運動ニューロン病における optineurin の関与 . 第 52 回日本神経学会学術大会 , 名古屋 , 2011/5/20
  18. 川田明広, 平井健, 長尾雅裕, 清水俊夫, 林秀明, 磯崎英治, 松原四郎, 水谷俊雄, 川上秀史, 新井誠, 秋山治彦 : FUS/TLS 遺伝子変異を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の臨床像の検討 . 第 52 回日本神経学会学術大会 , 名古屋 , 2011/5/18
  19. 鎌田正紀, 和泉唯信, 伊東秀文, 香川聖子, 工藤英治, 丸山博文, 川上秀史, 梶龍兒 : 常染色体劣性 optineurin 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 . 第 52 回日本神経学会学術大会 , 名古屋 , 2011/5/18
  20. 丸山博文, 森野豊之, 伊東秀文, 和泉唯信, 鎌田正紀, 萩原弘一, 阿部康二, 小牟禮修, 小島敬太郎, 上野弘貴, 青木正志, 日下博文, 梶龍兒, 川上秀史 : 筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子オプチニューリンの同定および頻度・臨床症状 . 第 52 回日本神経学会学術大会 , 名古屋 , 2011/5/18
  21. Hideshi Kawakami, Hirofumi Maruyama, Hidefumi Ito : Optineurin in ALS . AAN-JSN Joint Symposium (日米神経学会合同シンポジウム)「ALS」第 52 回日本神経学会学術大会 , 名古屋 , 2011/5/18
  22. 丸山博文, 森野豊之, 和泉唯信, 伊東秀文, 川上秀史 : Optineurin は筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子である . 第 108 回日本内科学会講演会 (東日本大震災のため誌上発表)
- 〔その他〕  
ホームページ等  
原爆放射線医科学研究所 分子疫学研究分野  
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/epidem/index.html>
6. 研究組織
    - (1) 研究代表者  
森野 豊之 (MORINO, Hiroyuki)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教  
研究者番号 : 10397953
    - (2) 研究分担者

川上 秀史 (KAWAKAMI, Hideshi)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号：70253060