

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300132

研究課題名(和文) オプチニューリン機能異常を基盤としたALSの発症機序解明と新規治療候補薬の開発

研究課題名(英文) Investigation of pathomechanism and novel therapeutic strategy for ALS on the basis of optineurin dysfunction

研究代表者

伊東 秀文 (Ito, Hidefumi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20250061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは当該研究で、オプチニューリンの機能異常によってNF- $\kappa$ Bが過剰に活性化し、それによるp53やTNF $\alpha$ の遺伝子発現増加、インターフェロン $\gamma$ 過剰産生がひきおこされ細胞死が誘導されることを明らかにした。さらにこの細胞死はNF- $\kappa$ Bの選択的阻害薬であるwithaferin Aによって抑制されることを見出した。さらに、オプチニューリン遺伝子変異マウスにTDP-43が蓄積していること、孤発性・遺伝性ALS患者のTDP-43封入体にオプチニューリンが共存していることも明らかにした。以上から、withaferin AがTDP-43蓄積を呈するさまざまな型のALSの治療薬となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We knocked down OPTN in neuronal cells and examined the resulting NF- $\kappa$ B activity and phenotype. First, we confirmed the loss of the endogenous OPTN expression after siRNA treatment and found that NF- $\kappa$ B activity was increased in OPTN-knockdown cells. Next, we found that OPTN knockdown caused neuronal cell death. Then, overexpression of OPTN WT or OPTN E50K with intact NF- $\kappa$ B-suppressive activity, but not overexpression of ALS-related OPTN mutants, suppressed the neuronal death induced by OPTN knockdown. This neuronal cell death was inhibited by withaferin A, which selectively inhibits NF- $\kappa$ B activation. Lastly, involvement of the mitochondrial proapoptotic pathway was suggested for neuronal death induced by OPTN knockdown. Taken together, these results indicate that inappropriate NF- $\kappa$ B activation is the pathogenic mechanism underlying OPTN mutation-related ALS.

研究分野：神経内科学

キーワード：オプチニューリン 筋萎縮性側索硬化症 NF- $\kappa$ B ゴルジ装置断片化 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

われわれは 2010 年に FALS の新規原因遺伝子 optineurin (OPTN) を報告した (Maruyama H, Morino H, Ito H, et al. Nature 2010)。OPTN は NF- $\kappa$ B 活性化と炎症性サイトカイン産生を抑制することが知られており、OPTN-ALS では NF- $\kappa$ B の過剰活性化とともに TNF、I 型インターフェロンを始めとする炎症性サイトカインの産生が亢進していると予測される。OPTN-ALS 剖検例は現在、世界中でわれわれの所有する 2 例のみである。

2. 研究の目的

1) OPTN-ALS 患者 2 例の剖検脳、OPTN 遺伝子を改変したモデル動物及び培養細胞、OPTN-ALS 患者の末梢血から誘導した樹状細胞を用いて、OPTN 変異による ALS 発症のメカニズムを解明する。

2) SALS 患者の剖検脳を用いて、SALS の神経細胞変性過程における OPTN の役割を解明する。

3) OPTN 遺伝子改変モデル動物及び培養細胞を用い、OPTN の機能を制御して ALS の根本治療につながる候補化合物を発見する。

3. 研究の方法

1) OPTN 遺伝子をノックダウンした培養細胞を観察し、細胞死を定量評価するとともに、NF- $\kappa$ B の過剰活性化をルシフェラーゼアッセイ法により検索する。これらの変化が野生型 OPTN 強制発現、および OPTN 機能制御薬により正常化するかどうかを検討する。

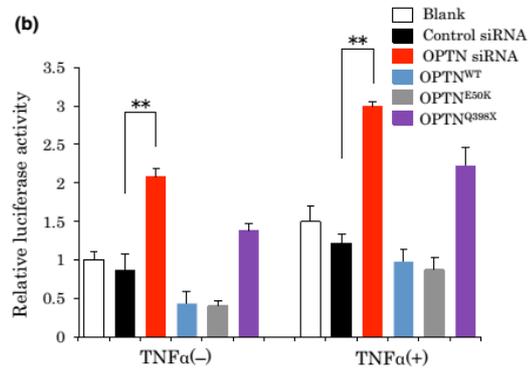
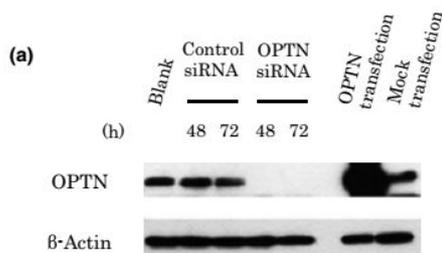
2) OPTN 遺伝子をノックアウトしたマウスの行動および神経病理学的変化を解析することにより、OPTN 変異の *in vivo* における効果を検証する。

3) OPTN-ALS 患者の末梢血から形質細胞様樹状細胞を誘導し、二重鎖 RNA 刺激による炎症性サイトカイン産生能を評価する。

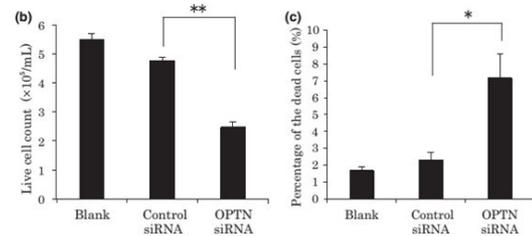
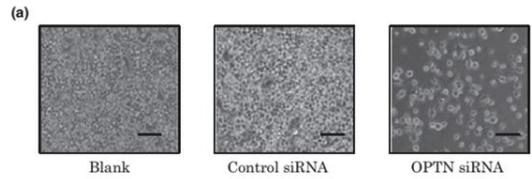
4) OPTN-ALS および SALS 患者の剖検脳における OPTN 関連蛋白の細胞内局在の変化を検討する。

4. 研究成果

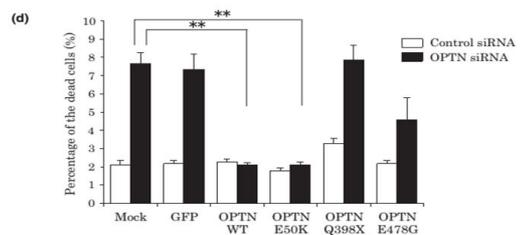
1) OPTN 遺伝子改変細胞を用いた解析  
培養細胞 (Neuro2a 細胞) を用いて siRNA による OPTN のノックダウン (OPTN KD) を行った。結果、western blot で siRNA を導入した細胞での OPTN の消失を確認したうえで、この細胞では NF- $\kappa$ B パスウェイが亢進していることを明らかにした。



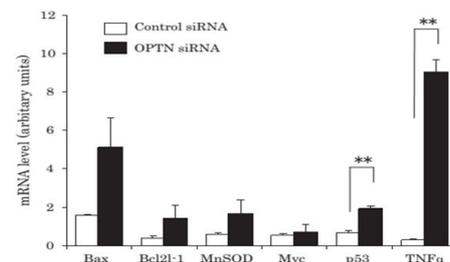
この OPTN KD 細胞の細胞死を検討したところ、トリパンブルーアッセイにおいて、細胞死が亢進していることを見出した。



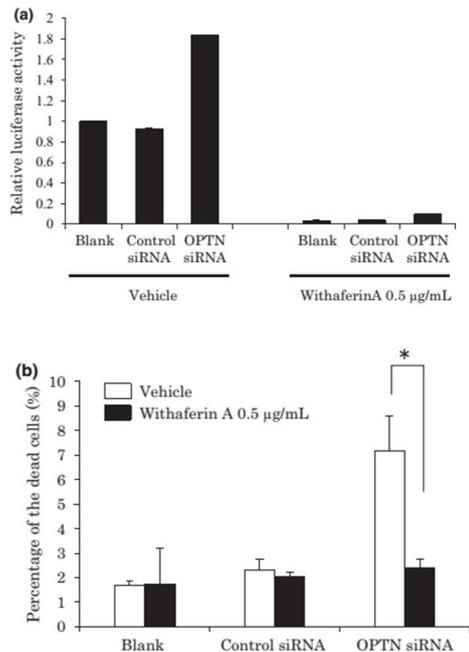
さらにこの細胞死は OPTN KD 細胞に野生型 OPTN あるいは ALS に関与しない変異 OPTN を強制発現することで抑制されたが、ALS に関与する Q398X および E478G 変異 OPTN の強制発現では抑制されないことを明らかにした。



この OPTN KD 細胞において mRNA の発現レベルを測定したところ、NF- $\kappa$ B のターゲット遺伝子である p53、TNF の遺伝子発現が有意に増加しており、BAX、Bcl21-1、MnSOD の遺伝子発現が増加の傾向を示した。



この細胞に対し、NF- $\kappa$ B の選択的阻害薬である withaferin A を投与したところ、細胞死が有意に抑制された。



以上の検討から、OPTN ノックダウン細胞は NF- $\kappa$ B の過剰活性化によりアポトーシスによって死滅すること、この細胞死が withaferin A によって抑制されることが示され、withaferin A が ALS の新たな治療薬となる可能性を見出した。

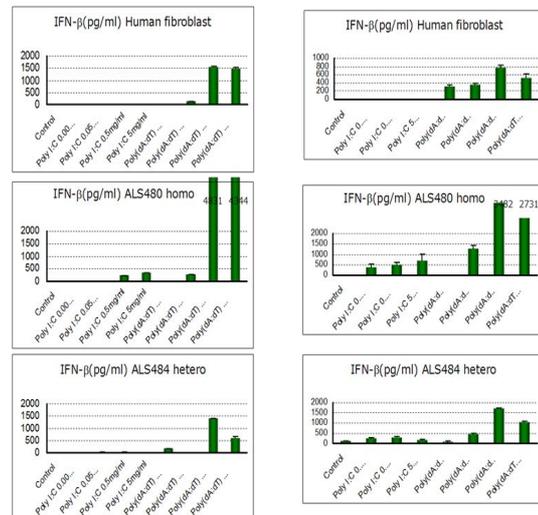
### 2) OPTN 遺伝子変異モデル動物の解析

OPTN ノックアウトマウスは連携研究者である川上秀史教授らのグループで作製した。このマウスを研究期間終了までの1年半観察し、神経病理学的に検索したが、病的な行動異常・病理学的変化は見出されなかった。そこで研究期間を1年延長し、このマウスを2年間にわたり観察したところ、末梢神経に TDP-43 の蓄積が観察された(未発表データ)。この結果から、OPTN 変異が神経細胞における TDP-43 の蓄積に直接関与していることが明らかとなった。

### 3) OPTN-ALS 患者における炎症性サイトカインの測定

OPTN-ALS 患者から採取した fibroblast を二重鎖 RNA(poly I:C)で刺激して培養して、培養上清中のインターフェロン  $\beta$  を ELISA で測定して健常人と比較したところ、ALS E478G ホモ > ALS E478G ヘテロ > 健常人由来 fibroblast の順で IFN- $\beta$  が誘導された。この結果より、患者検体において IFN- $\beta$  の産生が亢進している可能性が示唆された(未発表データ)。

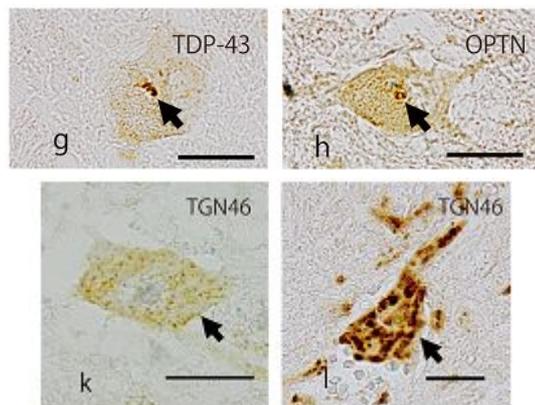
### IFN- $\beta$ production of familial ALS Pt's fibroblast



### 4) OPTN 関連蛋白の局在異常の検討

OPTN 変異 ALS 症例、孤発性 ALS 症例、OPTN 遺伝子改変細胞において RIP-1, huntingtin, MyoVI, HAP1, dynactin などに対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったが、いずれも有意な所見が得られなかった。一方、NF- $\kappa$ B のサブユニットである p65 の免疫染色による検討を行ったところ、OPTN 変異の症例では、優性例 (E478G)、劣性例 (Q398X) の剖検例ともアセチル化された p65 が細胞質に凝集体を形成している像が観察された(未発表データ)。さらに、SALS 患者においても、解析したすべての TDP-43 封入体に OPTN と NF- $\kappa$ B p65 subunit が病的に蓄積していることを見出した(未発表データ)。この結果は SALS の病態に OPTN, NF- $\kappa$ B が関与していることを強く示唆している。

さらに、われわれが新たに見出した VCP 変異のある ALS 症例の剖検脳で OPTN の染色性を確認したところ、脊髄前角細胞の細胞質で OPTN が凝集しており、Golgi 装置が断片化していることを発見した。これは OPTN が他の遺伝性 ALS の病態にも広く関わっていることを示唆している。



## 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 25 件)

1. Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, Warita H, Kato M, Tateyama M, Ando R, Izumi R, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Ito H, Urushitani M, Nagatomi R, Takahashi R, Aoki M. Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J Cell Sci.* 2014 Dec 15;127(24):5204-17. doi: 10.1242/jcs.150961. Epub 2014 Nov 6.
2. Ayaki T, Ito H, Fukushima H, Inoue T, Kondo T, Ikemoto A, Asano T, Shodai A, Fujita T, Fukui S, Morino H, Nakano S, Kusaka H, Yamashita H, Ihara M, Matsumoto R, Kawamata J, Urushitani M, Kawakami H, Takahashi R. Immunoreactivity of valosin-containing protein in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in a case of its novel mutant. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Dec 10;2(1):172.
3. Ito H. Basophilic inclusions and neuronal intermediate filament inclusions in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Neuropathology.* 2014 Mar 27. doi: 10.1111/neup.12119.
4. Kawamoto Y, Ito H, Ayaki T, Takahashi R. Immunohistochemical localization of apoptosome-related proteins in Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain Res.* 2014 Jul 7;1571:39-48. doi: 10.1016/j.brainres.2014.05.007. Epub 2014 May 13.
5. 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.
6. Oono M, Okado-Matsumoto A, Shodai A, Ido A, Ohta Y, Abe K, Ayaki T, Ito H, Takahashi R, Taniguchi N, Urushitani M. Transglutaminase 2 accelerates neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis through interaction with misfolded superoxide dismutase 1. *J Neurochem.* 2014 Feb;128(3):403-18. doi: 10.1111/jnc.12441.
7. 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.
8. Murata KY, Sugie H, Nishino I, Kondo T, Ito H. A primigravida with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Muscle Nerve.* 2014 Feb;49(2):295-6. doi: 10.1002/mus.24055.
9. Kawamoto Y, Ito H, Ihara M, Takahashi R. XIAP immunoreactivity in glial and neuronal cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Clin Neuropathol.* 2014 Jan-Feb;33(1):76-83. doi: 10.5414/NP300610.
10. Honjo Y, Horibe T, Torisawa A, Ito H, Nakanishi A, Mori H, Komiya T, Takahashi R, Kawakami K. Protein disulfide isomerase P5-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;38(3):601-9. doi: 10.3233/JAD-130632.
11. Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, Kawakami H, Ito H, Takahashi R. Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- $\kappa$ B pathway. *J Neurochem.* 2013 Sep;126(6):699-704. doi: 10.1111/jnc.12326.
12. Asayama S, Wate R, Kaneko S, Asayama T, Oki M, Tsuge A, Nagashima M, Morita J, Nakamura S, Nakamura M, Nishii M, Fujita K, Saito A, Nakano S, Ito H, Kusaka H. Levodopa challenge test and (123)I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy for diagnosing Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 2013 Sep;128(3):160-5. doi: 10.1111/ane.12104.
13. Matsui H, Gavinio R, Asano T, Uemura N, Ito H, Taniguchi Y, Kobayashi Y, Maki T, Shen J, Takeda S, Uemura K, Yamakado H, Takahashi R. PINK1 and Parkin complementarily protect dopaminergic neurons in vertebrates. *Hum Mol Genet.* 2013 Jun 15;22(12):2423-34. doi: 10.1093/hmg/ddt095.
14. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F,

- Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. Response to comment on "Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells". *Sci Transl Med*. 2013 Jun 5;5(188):188lr2. doi: 10.1126/scitranslmed.3005697.
15. Shodai A, Morimura T, Ido A, Uchida T, Ayaki T, Takahashi R, Kitazawa S, Suzuki S, Shirouzu M, Kigawa T, Muto Y, Yokoyama S, Takahashi R, Kitahara R, Ito H, Fujiwara N, Urushitani M. Aberrant Assembly of RNA Recognition Motif 1 Links to Pathogenic Conversion of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem*. 2013 May 24;288(21):14886-905. doi: 10.1074/jbc.M113.451849.
  16. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 Deficiency Induces a Decrease in Cathepsin D Activity, Fingerprint-like Inclusion Body Formation, and Selective Degeneration of Dopaminergic Neurons. *FEBS Lett*. 2013 May 2;587(9):1316-25. doi: 10.1016/j.febslet.2013.02.046.
  17. Nakamura M, Kaneko S, Ito H, Jiang S, Fujita K, Wate R, Nakano S, Fujisawa J, Kusaka H. Activation of Transforming Growth Factor- $\beta$ /Smad Signaling Reduces Aggregate Formation of Mislocalized TAR DNA-Binding Protein-43. *Neurodegener Dis*. 2013;11(4):182-93. doi: 10.1159/000338151.
  18. Nakamura M, Kaneko S, Wate R, Asayama S, Nakamura Y, Fujita K, Ito H, Kusaka H. Regionally different immunoreactivity for Smurf2 and pSmad2/3 in TDP-43-positive inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013;39:144-56.
  19. Shodai A, Ido A, Fujiwara N, Ayaki T, Morimura T, Oono M, Uchida T, Takahashi R, Ito H, Urushitani M. Conserved Acidic Amino Acid Residues in a Second RNA Recognition Motif Regulate Assembly and Function of TDP-43. *PLoS One*. 2012;7(12):e52776. doi: 10.1371/journal.pone.0052776.
  20. Tashiro Y, Urushitani M, Inoue H, Koike M, Uchiyama Y, Komatsu M, Tanaka K, Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Ito H, Takahashi R. Motor Neuron-specific Disruption of Proteasomes, but not Autophagy, Replicates Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem*. 2012 Dec 14;287(51):42984-94.
  21. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med*. 2012 Aug 1;4(145):145ra104.
  22. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa M, Kaji R, Tsuji S. The TRK-Fused Gene Is Mutated in Hereditary Motor and Sensory Neuropathy with Proximal Dominant Involvement. *Am J Hum Genet*. 2012 Aug 10;91(2):320-9.
  23. Honjo Y, Ito H, Horibe T, Shimada H, Nakanishi A, Mori H, Takahashi R, Kawakami K. Derlin-1-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2012 Jul 11;23(10):611-5.
  24. Sako W, Ito H, Yoshida M, Koizumi H, Kamada M, Fujita K, Hashizume Y, Izumi Y, Kaji R. NF- $\kappa$ B expression in patients with sporadic ALS and hereditary ALS with optineurin mutations. *Clinical Neuropathology*. 2012 Nov-Dec;31(6):418-23
  25. Kasahara S, Miki Y, Kanagaki M, Kondo T, Yamamoto A, Morimoto E, Okada T, Ito H, Takahashi R, Togashi K. "Hot cross bun" sign in multiple system atrophy with predominant cerebellar ataxia: A comparison between proton density-weighted

imaging and T2-weighted imaging. Eur J Radiol. 2012Oct;81(10):2848-52.

〔学会発表〕(計 60 件)

1. Ayaki T, Ito H, Komure O, Tatsumi S, Urushitani M, Kawakami H, Takahashi R. Neuropathological features in an autopsied case of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with mutation of optineurin gene. The 3rd Congress of Asian Society for Neuropathology, Seoul, Korea, 2014 年 11 月 6 日
2. 河本恭裕、綾木孝、漆谷真、伊東秀文、高橋良輔. シヌクレイノパチーにおけるアポトーシス関連タンパク質の免疫組織化学的検討 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月 23 日
3. 本城靖之、綾木孝、堀部智久、富山貴美、森啓、伊東秀文、高橋良輔、川上治司. アルツハイマー型認知症剖検脳における GADD34 の局在の検討 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月 21 日
4. 森野豊之、他 6 名、伊東秀文、川上秀史. MAPT の新規挿入変異を認めた FTDP17 の 2 家系. 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月 21 日
5. 秋月真由美、山下博史、植村健吾、丸山博文、川上秀史、伊東秀文、高橋良輔. NF- $\kappa$ B 経路を介した Optineurin のノックダウンによる神経細胞死. 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月 21 日
6. Kajimoto Y, Ito H. Visuomotor deficits in Parkinson's disease. 17th International congress of Parkinson's disease and movement disorders. Sydney, Australia, 2013 年 6 月 16 日
7. 村上学、他 7 名、伊東秀文、他 3 名、高橋良輔. 既存薬による SOD1 転写を標的とした筋萎縮性側索硬化症新規治療薬の開発. 第 54 回日本神経学会総会学術大会. 2013 年 6 月 1 日
8. 中村正孝、他 5 名、伊東秀文、日下博文. TGF- $\beta$ /Smad シグナルによる TDP-43 凝縮抑制効果の検討. 第 54 回日本神経学会総会学術大会 2013 年 5 月 30 日
9. 池本明人、他 5 名、伊東秀文、高橋良輔. 孤発性筋萎縮性側索硬化症の脊髄における ESCRT 関連分子の免疫組織化学的検討. 第 54 回日本神経学会総会学術大会. 2013 年 5 月 30 日
10. 高真守、他 3 名、伊東秀文. T1W/T2W ratio image の錐体路描出能に関する検討. 第 54 回日本神経学会総会学術大会. 2013 年 5 月 29 日
11. 伊東秀文. 筋萎縮性側索硬化症・前頭側頭葉変性症における好塩基性封入体と神経中間径フィラメント蓄積封入体. 第 54 回日本神経学会総会学術大会 (シンポジ

ウム) 2013 年 4 月 26 日

12. 綾木孝、伊東秀文、他 10 名、高橋良輔. Valosin Containing Protein 遺伝子に新規変異を認めた筋萎縮性側索硬化症・Paget 病の剖検例 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 25 日
13. 池本明人、他 3 名、高橋良輔、伊東秀文. 孤発性筋萎縮性側索硬化症の脊髄における angiogenin 発現の検討 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 23 日

〔図書〕(計 4 件)

1. 廣西昌也、伊東秀文: パーキンソン病の非運動症状治療の進歩 「神経疾患最新の治療 2015-2017」小林祥泰、水澤英洋、山口修平編、41-43、南江堂、東京、2015.
2. Ito H. Symptoms and Signs of Parkinson's Disease and Other Movement Disorders. In: Itakura T (ed) Deep Brain Stimulation for Neurological Disorders. Springer, Switzerland 2014: 21-37.
3. 伊東秀文: 大脳皮質基底核変性症 「第 4 版 わかりやすい内科学」井村裕夫編、609-610、文光堂、東京、2014.
4. 伊東秀文: 多系統萎縮症 「パーキンソン病と運動異常」辻省次、高橋良輔編、451-458、中山書店、東京、2013.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/neurology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 秀文 (ITO HIDEFUMI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20250061

(2) 研究分担者

河本 恭裕 (KAWAMOTO YASUHIRO)

京都大学・医学研究科・非常勤講師  
研究者番号: 40335253

(3) 連携研究者

川上 秀史 (HIDESHI KAWAKAMI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号: 70253060

(4) 連携研究者

高橋 良輔 (RYOSUKE TAKAHASHI)

京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 90216771