

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2013～2016

課題番号：25461280

研究課題名(和文) Optineurinによる筋萎縮性側索硬化症発症機序の解明

研究課題名(英文) The molecular functions of Optineurin in the ALS pathogenesis

研究代表者

永野 義人 (NAGANO, YOSHITO)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：50397973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子Optineurin(OPTN)が筋萎縮・筋分化においてどのように機能するかを検討した。マウス筋芽細胞C2C12を分化させたのちTweakで処理すると分化した筋線維が萎縮する。この筋萎縮モデル細胞を用いて、OPTNの蛋白・mRNAの発現を解析したが特に変化を認めなかった。OPTNをsiRNAによりノックダウンさせた細胞での検討でも筋萎縮に変化は認めなかった。一方、筋分化においてはOPTNノックダウンにより、筋分化が促進されることがわかった。以上より、OPTNはTweakによる筋萎縮には関与しないが、筋分化に対して抑制的に機能すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular functions of Optineurin(OPTN) which is one of ALS-causative gene, in muscle homeostasis, we used murine myoblast C2C12 cells. After differentiation to myotube, Tweak treatment could induce myotube atrophy. In this muscle atrophy model cells, OPTN expression levels of protein and mRNA were not changed during atrophy process. Furthermore OPTN knockdown by siRNA did not affect myotube atrophy induced by Tweak. On the other hand, OPTN may be involved in muscle differentiation process. OPTN protein expression was decreased gradually in that process, and OPTN knockdown promoted myogenic differentiation by regulating myogenic regulatory factor, such as Myf5. In summary, OPTN would not be involved in Tweak-induced muscle atrophy, however it may function as a negative regulator of muscle differentiation.

研究分野：神経内科

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 筋萎縮 Optineurin C2C12

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) はいまだ原因がわかっていない神経難病のひとつであり、治療法も確立されたものはない。病理学的には脊髄前角の運動神経細胞が死ぬことにより、脱神経状態になる結果、運動神経の末端である筋肉が萎縮する。

近年、ALS の原因遺伝子がいくつか同定されている。申請者の連携研究者である川上らは2010年に Optineurin が家族性の ALS にて変異があることを同定した (Maruyama, Kawakami et al. Nature 2010)。Optineurin の機能は未だ十分に解明されていないが、近年 NF- B の活性を調節することや autophagy receptor として機能することが報告されている (Tumbarello et al. Nat Cell Biol. 2012)。

また最近、骨格筋萎縮のメカニズムが徐々に明らかにされている。申請者の研究協力者である Duke 大学の Yao らはヒストン脱アセチル化酵素の一つである HDAC4 が MAPK 経路を介し筋萎縮を引き起こすことを報告している (Choi, Yao et al. Mol. Cell 2012)。また、NF- B 経路に関わり、ubiquitin ligase E3 でもある TRAF6 を筋肉特異的にノックアウトしたマウスでは筋萎縮が抑制され、最終的に、筋肉の蛋白分解をおこす MuRF1, Atrogin-1 などの ubiquitin ligase や autophagy 関連蛋白の発現が阻害されることで筋萎縮が抑制されることが報告されている (Paul et al. J Cell Biol. 2010)。このように筋萎縮には NF- B などの転写因子活性経路やユビキチンプロテアソーム系もしくは autophagy 系といった蛋白分解経路が重要であることが最近わかってきた。TRAF6 のユビキチン化ターゲットである NEMO と高い相同性を持つ Optineurin はこの2つの経路のどちらにも関わることが考えられるが、筋萎縮おける機能はいまだわかっていない。

本研究では Optineurin が、筋萎縮を引き起こす TRAF6 のターゲットになる可能性を分子生物学的手法ならびに動物モデルを使って明らかにするとともに、新規の ALS 治療法開発を目的とする。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 原因遺伝子である Optineurin は2つの機構 (NF- B 活性化経路と autophagy 経路) を介して筋萎縮を発症させる可能性がある。本研究は Optineurin が ALS 患者でみられる脱神経による筋萎縮にどのように関わるかを明らかにし、新規治療につなげることを目的とする。主に以下の3つを目的とする。

(1) 筋萎縮に関わる TRAF6 を介した NF- B 経路への Optineurin の関与を生化学的に解析する。

(2) Autophagy receptor としての Optineurin の筋萎縮への関与を細胞生物学的、生化学的に解析する。

(3) 脱神経モデルマウスもしくは ALS モデルマウスを用いて *in vivo* での Optineurin の筋萎縮への関与を病理学的、生化学的に解析する。

3. 研究の方法

(1) C2C12 培養細胞を用いた Optineurin 機能解析

筋芽細胞である C2C12 細胞はこれまでも筋疾患の研究のために使用されており、Myosin heavy chain (MyHC) もしくは MuRF1 と Atrogin-1 の mRNA, protein レベルの発現を解析することにより筋萎縮のモデル細胞として使用が可能である (Paul et al. Mol. Cell Biol 2012)。野生型もしくは ALS 発症の原因となる変異を入れた Optineurin のプラスミドを C2C12 細胞に遺伝子導入、または siRNA で Optineurin をノックダウンした後、前述の筋萎縮マーカー (MyHC, MuRF1, Atrogin-1) の発現を RT-PCR とウエスタンブロットングにて評価する。ポジティブコントロールとして既報のある TRAF6 ノックダウン細胞を用いる。この実験により機能を失った Optineurin が筋萎縮を促進する可能性が示唆される。同時に NF- B の活性をレポーターアッセイにて解析し、筋萎縮との関連を確認する。

TRAF6 と Optineurin 相互作用の評価 ; TRAF6 をノックアウトしたマウスの筋肉では脱神経後の筋萎縮が抑制され、a) で示した筋萎縮のマーカーも抑制される。Optineurin は TRAF6 の Lysine 63 ユビキチン化の標的分子である NEMO と高い相同性を持っており、NEMO 同様に Lysine 63 ユビキチン化を受ける可能性がある。

免疫沈降法による結合実験およびユビキチン化実験 ; C2C12 細胞に Optineurin と TRAF6 のプラスミドを遺伝子導入し、免疫沈降法にて結合およびユビキチン化を確認する。変異型 Optineurin や E3 ligase 活性のない C70A 変異型 TRAF6 を用いて同様の実験を行い、同時に筋萎縮のマーカーの評価を行う。この結果から TRAF6 による Optineurin のユビキチン化と筋萎縮の関連が示される。

TRAF6 ノックダウン細胞を用いたレスキュー実験 ; siRNA により TRAF6 をノックダウンした細胞に Optineurin を遺伝子導入した後、筋萎縮のマーカーと NF- B の解析を行う。そして siRNA 抵抗性 TRAF6 を遺伝子導入することで筋萎縮マーカーがレスキューされるかを解析し、両蛋白の相互作用を確認する。

(2) Optineurin による Autophagosome 形成促進と筋萎縮の評価

Optineurin は autophagy receptor として蛋白の分解に関わる。また TRAF6 ノックアウトした筋肉では autophagosome 形成が抑制されることが報告されている。下記の実験から TRAF6 と Optineurin の autophagosome 形成に

おける相補的な役割を確認できる。

野生型・変異型 Optineurin を C2C12 細胞に遺伝子導入し、autophagosome のマーカーである LC3, p62, Beclin1 との局在を共焦点レーザー顕微鏡にて確認する。それぞれの細胞はプロテアソーム阻害薬 MG132 とライソゾーム阻害薬 Bafilomycin A1 にて処理する。さらに、最近小胞体ストレスが筋萎縮を進めることが報告されており (Paul et al. Mol. Cell Biol. 2012)、小胞体ストレスを誘導する薬剤 thapsigargin で細胞を処理し、同様の実験を行う。

TRAF6 を siRNA でノックダウンした細胞や野生型・変異型 TRAF6 を遺伝子導入した細胞でも前述と同様の実験を行う。また TRAF6 ノックダウン細胞に Optineurin を遺伝子導入、または逆に Optineurin ノックダウン細胞に野生型・変異型 TRAF6 を遺伝子導入し、autophagosome 形成を解析する。

さらに siRNA による TRAF6、Optineurin ノックダウン細胞を用いて、それぞれの siRNA 抵抗性変異を持つプラスミドを遺伝子導入し、autophagosome 形成がレスキューされるかを確認する。

Optineurin による autophagosome 形成の生化学的解析；上記の実験系と並行して、RT-PCR もしくはウエスタンブロットングを行い、autophagy マーカーの発現を確認する。

(3) モデル動物を用いた *in vivo* での Optineurin 機能解析

マウスの坐骨神経を外科的に切り、脱神経を起こさせると前脛骨筋の萎縮が進行する。さらに前脛骨筋に electroporation にて siRNA を導入することで、筋肉内の特定の蛋白発現を抑制することができる。この場合、GFP empty vector を同時に遺伝子導入することで、siRNA が導入された筋細胞を同定することが可能である。申請者はこれらの手技を研究協力者である Duke 大学 Dr. Tso-Pang Yao 研究室にてすでに習得している。この実験を通して培養細胞で得られた結果を *in vivo* にて確認する。

坐骨神経を脱神経後、前脛骨筋での Optineurin, TRAF6, MyHC, MuRF1, Atrogin-1 の発現を RT-PCR, ウエスタンブロットング (WB) にて確認する。また、EMSA (electrophoretic mobility shift assay) を行い、筋内の NF- κ B 活性を測定する。並行して病理学的評価を Cross-sectional area (CSA) を計測することで行う。対側の脱神経処理していない前脛骨筋をネガティブコントロールとして使用する。

脱神経処理した筋としていない筋を用いて Optineurin と TRAF6 の結合、Optineurin のユビキチン化状態を WB にて確認する。

次に Optineurin の siRNA をマウスの前脛骨筋内に導入した後、脱神経を起こさせる。

2週間後、病理学的に CSA を計測し、EMSA で NF- κ B 活性の評価、RT-PCR、WB にて、MuRF1, Atrogin-1, LC3, p62, Beclin1 の発現を確認する。対側の脱神経させない筋肉をコントロールとして用いることで評価する。

ALS モデルマウスでの検討；SOD1-G93A 変異 ALS モデルマウスは脱神経による筋萎縮を生じる。このマウスを用いて、筋肉内の Optineurin の発現、ユビキチン化の評価を行う。さらに筋肉内に Optineurin siRNA を導入し、筋萎縮への影響を病理学的、生化学的に評価する。

4. 研究成果

(1) マウス筋芽細胞 C2C12 を用いた筋萎縮における Optineurin の機能評価

C2C12 細胞は低血清の培地で培養をすると筋管細胞に分化・融合を開始し、MyHC の発現が増加する。その分化した細胞に Tweak 処理を行うと筋線維の径は狭小化し MyHC の発現は低下する。この細胞モデルは広く *in vitro* での筋萎縮評価に用いられている。我々はこの筋萎縮モデル細胞を用いて、筋萎縮における Optineurin の機能の評価を行った。Tweak 処理した細胞ではウエスタンブロットングにて MyHC の発現が低下し、筋萎縮が起こっていることが確認できたが、Optineurin の発現には変化はなかった。また RT-PCR にて mRNA レベルを評価したが、Tweak 処理にて Optineurin の発現に変化は認めなかった。Optineurin に対する siRNA を C2C12 に遺伝子導入した細胞を用いて同様に筋萎縮を評価したが、Optineurin の発現が抑制されたことによる筋萎縮への影響は見られなかった。この結果から Tweak を用いた筋萎縮モデル細胞において Optineurin は関与しない可能性が示唆された。

TRAF6 と Optineurin の結合、ユビキチン化について

TRAF6 は筋萎縮に関わる NF- κ B 活性を調節する分子であり、Optineurin と高い相同性を有する NEMO と結合しユビキチン化することが報告されている。我々は TRAF6 と Optineurin が NEMO と同様に結合し、Optineurin のユビキチン化が促進される可能性を考え、C2C12 細胞に TRAF6 と Optineurin のそれぞれのプラスミドを共発現させ、免疫沈降法を用いて評価を行った。予想通り、TRAF6 は Optineurin と結合し、TRAF6 により Optineurin はユビキチン化を受けた。この結果から TRAF6 による Optineurin や NEMO のユビキチン化が NF- κ B 活性を調節し、その結果、筋萎縮にも影響を与えている可能性が考えられる。

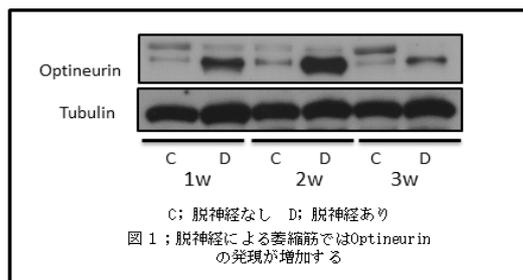
(2) C2C12 細胞を用いた筋分化における Optineurin の機能評価

C2C12 細胞の分化過程は筋萎縮と同様に NF- κ B 活性が関与することが報告されている。

OptineurinがNF- κ B経路を調節することで筋分化に関与する可能性を考え、解析を行った。C2C12細胞を低血清培地で培養し、分化を開始した細胞を経時的に回収し解析したところ、ウエスタンブロッティングにてOptineurinは経時的に徐々に蛋白発現が低下した。またsiRNAを遺伝子導入し、Optineurinをノックダウンした細胞においては、MyHCの発現する時期がコントロール細胞に比べ明らかに早く、共焦点顕微鏡での観察においてもMyHCの発現が分化3日目から出現していた。さら筋管細胞の融合も促進される傾向にあった。このことからOptineurinは筋分化においてnegative regulatorとして機能する可能性がある。さらに筋分化を調整するmyogenic regulatory factorの発現も同時に確認した。分化初期に機能するMyf5の発現がOptineurinノックダウン細胞において安定化しており、何らかの機序でMyf5の発現の安定化が、筋分化を促進している可能性が示唆された。

(3)マウス脱神経モデルにおけるOptineurinの機能評価

マウスの坐骨神経を外科的に切断することで筋萎縮を起こし、萎縮筋内でのOptineurinの発現をウエスタンブロッティング、RT-PCRにて確認した。坐骨神経を切断後、1、2、3週間後の前脛骨筋を回収し、経時的に比較したところ、外科処置をしていない筋肉に比べ、明らかにOptineurinの発現は増加することがわかった。2週間後に発現はピークとなり、3週間後は低下する傾向にあった(図1)。



このことからOptineurinは坐骨神経切除による筋萎縮において何らかの機能を有する可能性がある。一つには筋萎縮を阻止しようとする可能性ともう一つは萎縮筋を再生させようとする機能が想定される。さらなる検討をするため、Optineurinノックアウトマウスを使って実験を継続する予定にしている。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

永野 義人 (NAGANO, Yoshito)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(医)・助教
研究者番号: 50397973

(2)研究分担者

高橋 哲也 (TAKAHASHI, Tetsuya)
広島大学・病院(医)・講師
研究者番号: 00435942

松本昌泰 (Matsumoto, Masayasu)

研究者番号: 20192346
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(医)・教授

(H25~H27年度 研究分担者)

(3)連携研究者

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

(4)研究協力者

Tso-Pang Yao (YAO, Tso-Pang)
Duke University, Professor