

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461297

研究課題名(和文) 神経変性疾患の新規原因蛋白 p62 とユビキリン 2 の関連と治療的蛋白分解亢進

研究課題名(英文) Therapeutic protein degradation and relationship between p62 and ubiquilin 2, new proteins causative for neurodegenerative diseases

研究代表者

平野 牧人 (HIRANO, Makito)

近畿大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50347548

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)：本研究は、筋萎縮性側索硬化症[ALS]の原因蛋白ubiquilin2やp62/SQSTM1に関する研究であり、ALS患者と対照者iPS細胞由来の神経細胞を用いた。免疫染色の結果、p62遺伝子変異のある患者細胞の細胞質内に、p62の凝集が認められた。このような細胞質内凝集はALS病理像に特徴的所見である。一方、遺伝子変異のないALS患者細胞には軽度のみ、対照細胞には認められなかった。凝集に、ubiquilin2や他のALS原因蛋白は共局在しなかった。iPS細胞由来神経細胞において、オートファジー促進剤や抗酸化剤の一部により、凝集の形成抑制が見られた。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to clarify ubiquilin 2, a novel amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related protein that the research manager helped to identify, and p62 of which mutations in the first Japanese patients were found by the manager. We used pluripotent stem (iPS) cells of patients with ALS and controls. We found neurons derived from iPS cells of a patient with a p62 mutation had aggregations of p62, a pathological hallmark of ALS. However, the aggregates were not positive for ubiquilin 2 or valosin-containing protein (VCP). Control neurons were negative for p62. Cells of a p62-negative patient had mild aggregations. Treatment of an autophagy-inducer and an antioxidant reduced aggregation.

研究分野：神経内科

キーワード：p62

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の新規原因蛋白 ubiquilin2 の発見に携わった(*Nature* 2011;477:211)。この蛋白は、蛋白分解に直接関与する初めての ALS 原因蛋白である。その後、欧米では孤発性 ALS にも変異が確認されたが、残念ながら日本では現在に至るまで変異の報告はない。

p62は*SQSTM1*遺伝子にコードされる蛋白であり、2011年孤発性や家族性ALSの一部に遺伝子変異が同定され(*Arch Neurol*. 2011)、私たちの研究により、日本にも本遺伝子異常を有する孤発例が存在することが明らかとなった(*Neurology* 2013;80:458)。ubiquilin2 同様ユビキチン様ドメインとユビキチン関連ドメインを有しており、ユビキチン-プロテアソーム系およびオートファジー系の蛋白分解に関与している。p62はALS、アルツハイマー病、パーキンソン病、多系統萎縮症など種々の神経変性疾患の病理組織において、凝集体中に蓄積することが以前より報告されているためp62は凝集のマーカー蛋白とされていたが、遺伝子変異の同定により、単なるマーカーではなく、病態に本質的な関与をしていると考えられるようになった。しかし、その病態機序について、不明な点が多い。

神経変性疾患はパーキンソン病、ALS、多系統萎縮症等に分類されるが、中間的な病像を示すこともあり、例えばALSでは自律神経障害や(*J Neurol Sci* 2007; 254:78)、パーキンソニズムの合併例も存在する(*Neurology* 2002;58:90)。病理学的にも、p62陽性細胞質内の封入体形成という共通点がある。以上から共通する病態機序の存在が予想されるが、それに関する研究は乏しい。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞(人工多能性幹

[iPS]細胞を含む)を用いて、ubiquilin2とp62というALSや認知症の原因であり、蛋白分解に関する2つの鍵分子の機能や相互作用を明らかにし、異常蓄積蛋白の除去を促進することでALSの病態解明と治療薬候補の探索を目的とした。

## 3. 研究の方法

複数のALS患者(p62変異陽性患者と変異陰性患者)および対照から線維芽細胞を樹立し、それらからiPS細胞の作製、さらに分化誘導による神経細胞を作製した。神経細胞であるかはTuj1陽性であるかで判断した。さらに細胞障害の定量、形態変化変化、神経突起の進展障害などをALSと対照を比較した。p62はオートファジーに関与するので、オートファジー促進剤を負荷する。また、酸化ストレスで増加し、Keap1やNrf2と関連するとされるので、抗酸化剤などにより、細胞モデルに対する治療的介入を行う。iPS細胞由来神経細胞を用いて、ALS蛋白ubiquilin2、p62やvalosin-containing protein (VCP)の発現の検討や、オートファジーの活性化、抗酸化剤による変化について免疫染色により評価した。また、本研究では種々の異なる原因で生じている孤発性ALSや認知症患者も対象としており、できるだけ多くの患者iPS細胞を樹立し、数種のiPS細胞で確認された知見を他のiPS細胞で確認する作業が必要であると考えられたため、線維芽細胞の樹立を試みた。

## 4. 研究成果

複数のALS患者および複数の対照由来のiPS細胞を神経幹細胞さらに神経細胞へ分化誘導は成功した。細胞形態、突起進展などは明らかな異常がなかった。免疫染色で検討した結果、細胞質にp62の凝集が、p62遺伝子変異陽性ALS患者由来細胞にみられた。一方変異陰性孤発例では、凝集は

見られるが少量であった。凝集を他の ALS 関連蛋白に対する抗体で染色したが、残念ながら、ALS 原因蛋白 Ubiquilin2 や VCP は共局在していなかった。また、p62 は酸化ストレスにより発現が増加するとされ、この時に関連するストレスマーカーである Nrf2 や Keap1 の免疫染色も検討したが凝集への共局在は見られなかった。更に、p62 は変異により NF- $\kappa$ B の活性化を生じるとされているが、凝集のみられた細胞においても活性化 NF- $\kappa$ B のマーカーである核内移行は増加していなかった。

p62 凝集をマーカーとして、iPS 細胞由来神経細胞における、凝集の形成抑制がオートファジー促進剤や抗酸化剤により、可能かを検討した。その結果、オートファジーの促進薬である薬剤 X や抗酸化作用を有する薬剤 Y を培養液に添加することで、p62 の凝集は減少した。一方、別の抗酸化剤レチノイン酸には凝集抑制効果がなく、オートファジー促進作用のあるバルプロ酸では細胞形態の変化などを来し、凝集の評価が困難であった。

本研究ではできるだけ多くの患者 iPS 細胞樹立を目指したが、認知症を伴う ALS 患者や新たな原因蛋白変異例を含む 15 例分の線維芽細胞を樹立した。iPS 細胞作製中である。また、iPS 細胞も新たに 2 例分(別の ALS 遺伝子陽性例を含む)について樹立し、染色体異常のないことを確認した。これらは公的バンクへの供与を行う。

##### 5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 19 件)

1. 平野牧人、中村雄作、楠 進. 日本の Valosin-containing protein 関連筋萎縮性側索硬化症. 臨床神経学 査読有 2016 e-pub.
2. 平野牧人 ALS と *SQSTM1* 神経内科 82(4) 査読無 360-365, 2015
3. Hirano M, Nakamura Y, Saigoh K, Sakamoto H, Ueno S, Isono C, Mitsui Y, Kusunoki S. VCP gene analyses in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis identify a new mutation. **Neurobiol Aging** 査読有 2015;36(3):1604 e1-6.
4. Hirano M, Isono C, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S, Nakamura Y. Rotigotine Transdermal Patch Improves Swallowing in Dysphagic Patients with Parkinson's Disease. **Dysphagia** 査読有 2015;30(4):452-456.
5. Saigoh K, Mitsui J, Hirano M, Shioyama M, Samukawa M, Ichikawa Y, Goto J, Tsuji S, Kusunoki S. The first Japanese familial case of spinocerebellar ataxia 23 with a novel mutation in the PDYN gene. **Parkinsonism Relat Disord** 査読有 2015;21(3):332-334.
6. Isono C, Hirano M, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S, Nakamura Y. Differential Progression of Dysphagia in Heredity and Sporadic Ataxias Involving Multiple Systems. **Eur Neurol**. 査読有 2015;74(5-6):237-242.
7. Hamada Y, Hirano M, Kuwahara M, Samukawa M, Takada K, Morise J, Yabuno K, Oka S, Kusunoki S. Binding specificity of anti-HNK-1 IgM M-protein in anti-MAG neuropathy: possible clinical relevance. **Neurosci Res** 査読有 2015;91:63-68.
8. Hirano M, Satake W, Ihara K, Tsuge I, Kondo S, Saida K, Betsui H, Okubo K, Sakamoto H, Ueno S, Ikuno Y, Ishihara R, Iwahashi H, Ohishi M, Mano T, Yamashita T, Suzuki Y, Nakamura Y, Kusunoki S, Toda T. The

- First Nationwide Survey and Genetic Analyses of Bardet-Biedl Syndrome in Japan. **PLoS One** 査読有 2015;10(9):e0136317.
9. Sakamoto H, Akamatsu M, Hirano M, Saigoh K, Ueno S, Isono C, Kusunoki S, Nakamura Y. Multiple system involvement in a Japanese patient with a V31A mutation in the SOD1 gene. **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener** 査読有 2014;15(3-4):312-314.
  10. Titulaer MJ, Hoftberger R, Iizuka T, Leypoldt F, McCracken L, Cellucci T, Benson LA, Shu H, Irioka T, Hirano M, Singh G, Calvo AC, Kaida K, Morales PS, Wirtz PW, Yamamoto T, Reindl M, Rosenfeld MR, Graus F, Saiz A, Dalmau J. Overlapping demyelinating syndromes and anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. **Ann Neurol** 査読有 2014;75(3):411-428.
  11. Ueno S, Hirano M, Sakamoto H, Kusunoki S, Nakamura Y. Eyelid tremor in a patient with anti-caspr2 antibody-related encephalitis. **Case Rep Neurol** 査読有 2014;6(2):222-225.
  12. Samukawa M, Hamada Y, Kuwahara M, Takada K, Hirano M, Mitsui Y, Sonoo M, Kusunoki S. Clinical features in Guillain-Barre syndrome with anti-Gal-C antibody. **J Neurol Sci** 査読有 2014;337(1-2):55-60.
  13. Saida K, Inaba Y, Hirano M, Satake W, Toda T, Y. S, Sudo A, Noda S, Hidaka Y, Hirabayashi K, Imai H, Kurokawa T, Koike K. A Case of Bardet-Biedl Syndrome Complicated with Intracranial Hypertension in a Japanese Child. **Brain Dev** 査読有 2014;36(8):721-724.
  14. Takeda A, Shimada H, Tamura A, Yasui M, Yamamoto K, Itoh K, Ataka S, Tanaka S, Ohsawa M, Hatsuta H, Hirano M, Sakamoto H, Ueno S, Nakamura Y, Tsutada T, Miki T. A case of anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis with multiple sclerosis-like demyelinated lesions. **Mult Scler Related Disord** 査読有 2014;3(3):391-397.
  15. Ikeda M, Hirano M, Shinoda K, Katsumata N, Furutama D, Nakamura K, Ikeda S, Tanaka T, Hanafusa T, Kitajima H, Kohno H, Nakagawa M, Nakamura Y, Ueno S. Triple A syndrome in Japan. **Muscle Nerve** 査読有 2013;48(3):381-386.
  16. Ogawa I, Saigoh K, Hirano M, Mtsui Y, Sugioka K, Takahashi J, Shimomura Y, Tani Y, Nakamura Y, Kusunoki S. Ophthalmologic involvement in Japanese siblings with chorea-acanthocytosis caused by a novel chorein mutation. **Parkinsonism Relat Disord** 査読有 2013;19(10):913-915.
  17. Isono C, Hirano M, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S, Nakamura Y. Differences in dysphagia between spinocerebellar ataxia type 3 and type 6. **Dysphagia** 査読有 2013;28(3):413-418.
  18. Sakamoto H, Hirano M, Samukawa M, Ueno S, Maekura S, Fujimura H, Kuwahara M, Hamada Y, Isono C, Tanaka K, Kusunoki S, Nakamura Y. Details of treatment-related difficulties in men with

anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. **Eur Neurol** 査読有 2013;69(1):21-26.

19. Sakamoto H, Hirano M, Nose K, Ueno S, Oki T, Sugimoto K, Nishioka T, Kusunoki S, Nakamura Y. A case of severe ganciclovir-induced encephalopathy. **Case Rep Neurol** 査読有 2013;5(3):183-186.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 平野牧人, 中村雄作, 西郷和真, 阪本 光, 上野周一, 鈴木秀和, 楠 進. 孤発性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子解析による新規変異同定とカウンセリングの問題点. 人類遺伝学会 2015 年 10 月 17 日 京王プラザホテル(東京).
2. Hirano M, Nakamura Y, Saigoh K, Sakamoto H, Ueno S, Isono C, Kusunoki S. Analyses of the VCP gene in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis identify the novel mutation that increases susceptibility to oxidative stress. Annual Meeting of American Neurological Association. 2015 年 9 月 27 日 Chicago Marriott Downtown Magnificent Mile (米国シカゴ).
3. Isono C, Hirano M, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S, Nakamura Y. Improvement of swallowing functions by rotigotine transdermal patch in patients with Parkinson's disease. Annual Meeting of American Neurological Association. 2015 年 9 月 26 日 Chicago Marriott Downtown Magnificent Mile (米国シカゴ).
4. Hirano M, Nakamura Y, Saigoh K, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S. Analysis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis detects a novel VCP mutation. 神経学会総会 2015 年 5 月 21 日 朱鷺メッセ(新潟市).
5. Isono C, Hirano M, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S, Nakamura Y. More rapid progression of dysphagia in spinocerebellar ataxia type 3 than in type 6. Annual Meeting of American Neurological Association. 2014 年 10 月 13 日 Baltimore Marriott Waterfront (米国ボルチモア).
6. Saigoh K, Mitsui J, Hirano M, Sioyama M, Ichikawa Y, Goto J, Tsuji S, Kusunoki S. The novel mutation spinocerebellar ataxia (SCA23) with head tremor in Japanese family. Annual Meeting of American Neurological Association. 2014 年 10 月 13 日 Baltimore Marriott Waterfront (米国ボルチモア).
7. Hirano M, Nakamura Y, Saigoh K, Sakamoto H, Ueno S, Mitsui Y, Kusunoki S. Analyses of the COQ2 gene in Japanese patients with multiple system atrophy and other neurodegenerative diseases. Annual Meeting of American Neurological Association. 2014 年 10 月 13 日. Baltimore Marriott Waterfront (米国ボルチモア).
8. 平野牧人, 中村雄作, 阪本 光, 上野周一, 三井良之, 西郷和真, 楠 進. 多系統萎縮症および常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症における COQ2 遺伝子解析. 日本神経学会総会 2014 年 5 月 23 日 福岡国際会議場(福岡市).
9. 阪本 光, 平野牧人, 上野周一, 赤松舞子, 中村雄作, 楠 進. 多系統の障害をきたした SOD1 変異例. 神経学会総会 2014 年 5 月 22 日 福岡国際会議場(福岡市).
10. 平野牧人, 中村雄作, 寺村岳士, 江良 折実, 西郷和真, 阪本 光, 上野周一, 福田寛二, 楠 進. p62/SQSTM1/遺伝子変異を有する筋萎縮性側索硬化症の線維芽細胞と iPS 細胞の解析. 日本人類遺伝学

会 2013年11月21日 江陽グランドホテル(仙台市).

11. Hirano M, Nakamura Y, Saigoh K, Sakamoto H, Ueno S, Isono C, Kusunoki S. Annual Meeting of American Neurological Association. Novel mutations in the SQSTM1 gene encoding p62 in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. 2013年10月14日 Hilton New Orleans Riverside(米国ニューオーリンズ).
12. 平野牧人、中村雄作、阪本 光、上野周一、西郷和真、楠 進. 孤発性筋萎縮性側索硬化症における p62/SQSTM1 遺伝子の解析. Neuro2013. 2013年6月21日 国立京都国際会館(京都市).
13. 平野牧人、中村雄作、阪本 光、上野周一、西郷和真、楠 進. 孤発性筋萎縮性側索硬化症における C9ORF72, UBQLN2, PFN1, p62/SQSTM1 遺伝子解析. 日本神経学会総会. 神経学会総会 2013年5月31日 東京国際フォーラム(東京).

〔図書〕(計 3 件)

1. 平野牧人、楠 進. GM2 ガングリオシドシス 南山堂医学大辞典第 20 版 2015 年 pp971.
2. 磯野千春、平野牧人、中村雄作 脊髄小脳変性症(SCD). DVD で学ぶ神経内科の摂食嚥下障害 医歯薬出版 2014 年 pp28-36.
3. 平野牧人. 神経症候群(第 2 版)IV 日本臨床社 2014 年 pp495-497.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 牧人 (HIRANO, Makito)  
近畿大学 医学部附属病院 准教授  
研究者番号: 50347548

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし