

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293211

研究課題名(和文) オプチニューリン変異マウスによる筋萎縮性側索硬化症の病態解明・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of pathological mechanism and therapy for amyotrophic lateral sclerosis using optineurin mice

研究代表者

丸山 博文 (Maruyama, Hirofumi)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：90304443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000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は24ヶ月齢の時点においても生存曲線・体重・運動能力について正常コントロールとの差を認めなかった。病理学的検討では腰髄前角での運動ニューロンは軽度減少していた。また残存神経細胞内には封入体様構造物を認め、ゴルジ装置の断片化の増加を認めた。坐骨神経では軸索変性の所見を認めた。変異型ヒトSOD1トランスジェニックマウスとOPTNノックアウトマウスのダブル変異では運動障害の進行が緩和され、寿命が延長した。

研究成果の概要(英文)：We generated optineurin (OPTN) knockout (KO) mice. Compared to wild-type mice, 24-month-old OPTN-KO mice did not differ for survival curve, body weight or motor function. Inclusion body like structures were observed in the cell bodies of motor neurons in the lumbar spinal cord. Golgi fragmentation was increased. Axonal degeneration was observed in sciatic nerve. Double modification mice of SOD1 and OPTN showed elongation of life time.

研究分野：神経内科

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 オプチニューリン ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS) は治療法が確立しておらず、未だに予後不良の難病である。発症メカニズムに基づいた根本的かつ有効な治療法は存在しないため、人工呼吸器などのサポートがなければ発症 3～5 年後に死に至る。そのため発症機序に基づいた新たな治療法の開発が望まれている。

我々は新たな手法を用いることにより ALS の原因遺伝子として *Optineurin (OPTN)* を同定した。OPTN タンパクは本来、Nuclear factor kappa B (NF- κ B) の活性を抑制するが、ALS 患者に見出された変異では、この機能が喪失していた。この遺伝子変異を有さない ALS においても細胞内凝集体に OPTN が共存し、*SOD1* (superoxide dismutase 1) モデルマウス脊髄のマイクログリア内の mRNA 発現検討において OPTN が病気の進行とともに増加していることも報告されている。また培養系での検討により、OPTN を siRNA で抑制すると細胞死が増加することも報告されている。

これらの結果からは OPTN が一般的な ALS 発症メカニズムに深く関わっていることが示唆される。加えて、従来 ALS 研究では *SOD1* 遺伝子改変マウスを用いて病態解明及び薬剤開発が進められてきたが、臨床的に有効な薬剤は未だ同定されていない。このことは *SOD1* 遺伝子改変マウスでの検討の限界を示しており、OPTN 遺伝子改変マウスでの検討が必要である。

2. 研究の目的

OPTN 遺伝子改変マウスを作成し、純化・繁殖を行う。樹立した改変マウスにおける症状発現の有無を検討し、さらにどのような病理学的・生化学的変化が起こっているのか、モデル細胞の変化と同様であるのかを明らかにする。それにより NF- κ B 阻害薬を含めた治療薬のモデルマウスにおける有用性を検討する基盤を整備する。

3. 研究の方法

(1) モデルマウスの作成

OPTN ノックアウトマウス 2 種類、OPTN 変異導入マウス 3 種類の純化・繁殖を継続する。*SOD1* (G93A) 変異と OPTN ノックアウトを掛け合わせたダブル変異マウス及び GFP-LC3 と OPTN ノックアウトを掛け合わせたマウスの純化を進める。

(2) モデルマウスの評価

各々の genotype を確認し、ALS 症状を強く示すものを抽出する。生存曲線や運動量について評価する。各系統のモデルマウスの病理学的検討を運動野・腰髄の運動ニューロンを中心に挙げる。

4. 研究成果

(1) OPTN ノックアウトの確認

OPTN ノックアウトマウスについては、遺伝型は PCR に加えて腰髄組織での Western blotting により、N 末側・中間部分・C 末側の 3 種類の抗体において約 70kDa 付近のバンドの消失を認め、OPTN がノックアウトされていることを確認した (図 1)。

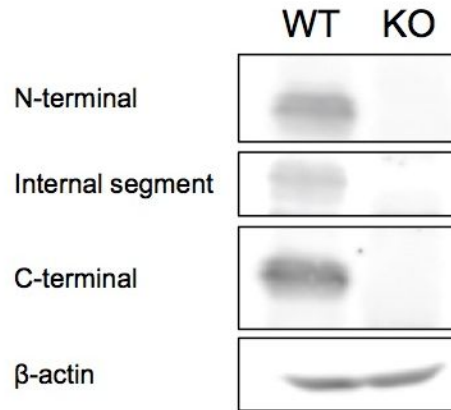


図 1 OPTN の Western blotting

また免疫組織学的にも腰髄の神経細胞内の OPTN の消失を確認した。

(2) OPTN ノックアウトマウスの病理学的変化の解析

病理学的には腰髄前角での運動ニューロンの軽度の減少を認めた。また残存神経細胞内には封入体様構造物を認めた。ヒト ALS 患者の病理所見と同様に、ノックアウトマウスにおいても運動ニューロンにおけるゴルジ装置の断片化を認めた。坐骨神経では軸索変性と思われる所見を認めた。

(3) OPTN ノックアウトマウスの臨床症状

24 ヶ月齢の時点においても生存曲線 (図 2) 及び体重やローターロードなどの運動能力について正常コントロールとの差を認めなかった。

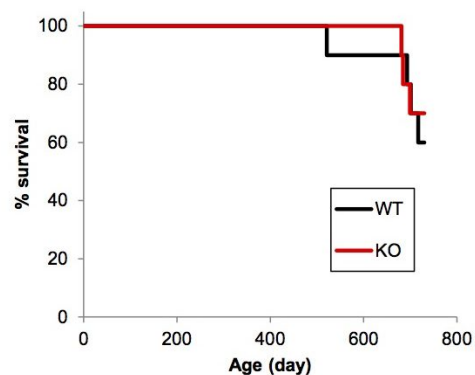


図 2 生存曲線

(4) ダブル変異マウスの状態評価

変異型ヒト *SOD1* トランスジェニックマウス

と OPTN ノックアウトマウスを掛け合わせた個体においては運動障害の進行が緩和され、寿命が延長した。OPTN 除去によって SOD1 異常の影響が緩和されることが示唆された。現在病理学的な検討を進めている。

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 35 件)

1. Hiraoka A, Maruyama H (他 10 名、8 番目) Maximum tongue pressure is associated with swallowing dysfunction in ALS patients. *Dysphagia* (査読有) 2017 印刷中、DOI 10.1007/s00455-017-9797-z
2. Matsushima M, Maruyama H (他 13 名、12 番目) Ability of the ankle brachial index and brachial-ankle pulse wave velocity to predict the 3-month outcome in non-cardioembolic stroke patients. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* (査読有) 2017 印刷中
3. Kubo S, Maruyama H (他 11 名、10 番目) Ischemic stroke mortality is more strongly associated with anemia on admission than with underweight status. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* (査読有) 2017 印刷中、DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.02.016
4. Fujii H, Maruyama H (他 6 名、6 番目) Modifications of tau protein after cerebral ischemia and reperfusion in rats are similar to those occurring in Alzheimer's disease-hyperphosphorylation and cleavage of 4- and 3-repeat tau. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (査読有) 2017 印刷中
5. Aoki S, Maruyama H (他 7 名、8 番目) Blood pressure control with cilnidipine treatment in Japanese post-stroke hypertensive patients: the CAATTEND study. *Clinical and Experimental Hypertension* (査読有) 39, 225-234, 2017. DOI: 10.1080/10641963.2016.1235183
6. Ueno H, Maruyama H (他 3 名、5 番目) Pyrimethamine-induced transient leukoencephalopathy: similarity to methotrexate encephalopathy. *Neurology and Clinical Neuroscience* (査読有) 5, 75, 2017. DOI: 10.1111/ncn3.12111
7. Nishikawa Y, Maruyama H (他 7 名、7 番目) Sex differences in variances of multi-channel surface electromyography distribution of the vastus lateralis muscle during isometric knee extension in young adults. *European Journal of Applied Physiology* (査読有) 117, 583-589, 2017. DOI: 10.1007/s00421-017-3559-3
8. Murata-Shinozaki Y, Maruyama H (他 4 名、4 番目) The origins of rimmed vacuoles and granulovacuolar degeneration bodies are similar and are associated with the Wnt signaling pathway. *Neuroscience Letters* (査読有) 638, 55-59, 2017. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.12.014
9. Sugiura T, Maruyama H (他 8 名、7 番目). Translocated in liposarcoma regulates the distribution and function of mammalian enabled, a modulator of actin dynamics. *FEBS Journal* (査読有) 283, 1475-1487, 2016. DOI 10.1111/febs.13685
10. Nishikawa Y, Maruyama H (他 8 名、8 番目) A multidisciplinary pain, agitation, and delirium management team can promote rehabilitation in the intensive care unit: A case report. *Progress in Rehabilitation Medicine* (査読有) 1, 20160010, 2016. DOI: 10.2490/prm.20160010
11. Nakamori M, Maruyama H (他 10 名、10 番目) Tongue thickness evaluation using ultrasonography can predict swallowing function in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Clinical Neurophysiology* (査読有) 127, 1669-1674, 2016、DOI 10.1016/j.clinph.2015.07.032
12. Nishikawa T, Maruyama H (他 6 名、5 番目) The identification of raft-derived tau-associated vesicles that are incorporated into immature tangles and paired helical filaments. *Neuropathology and Applied Neurobiology* (査読有) 42, 639-653, 2016. DOI: 10.1111/nan.12288
13. Naito H, Maruyama H (他 5 名、6 番目) Warfarin-resistant deep vein thrombosis during the treatment of acute ischemic stroke in lung adenocarcinoma. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* (査読有) 25, e141-145, 2016, DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.04.026
14. Nishikawa Y, Maruyama H (他 9 名、9 番目) Deviation in the recovery of the lower limb and respiratory muscles of patients with polymyositis: a preliminary clinical study. *Journal of Physical Therapy Science* (査読有) 28, 2652-2655, 2016. DOI: 10.1589/jpts.28.2652

15. Nezu T, Maruyama H (他 7 名、6 番目) Temporal trends in stroke severity and prior antithrombotic use among acute ischemic stroke patients in Japan. *Circulation Journal* (査読有) 80, 2033-2036, 2016. DOI: 10.1253/circj. CJ-16-0374
16. Aoki S, Maruyama H (他 15 名、15 番目) The multidisciplinary swallowing team approach decreases pneumonia onset in acute stroke patients. *PLoS One* (査読有) 11, e0154608, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0154608
17. 丸山博文、森野豊之、川上秀史、家族性 ALS の原因遺伝子 update、*Brain and Nerve*、査読無、68 巻、2016、1081-1086
18. 福場浩正、大森啓充、山崎雅美、丸山博文、宮地隆史、松本昌泰、人工呼吸管理下の筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者における深部静脈血栓症(DVT)の検討、*静脈学*、査読有、27 巻、2016、349-354
19. Morino H, Maruyama H, Hashimoto K, Kawakami H (他 7 名、9 番目) A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. *Molecular Brain* (査読有) 8, 89, 2015. DOI 10.1186/s13041-015-0180-4
20. Nezu T, Maruyama H (他 6 名、7 番目) A case of recurrent ischemic stroke involving sub-acute progressive intracranial cerebral arterial sclerosis prior to diagnosis with JAK2-mutated polycythemia vera. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease* (査読有) 24, e4-e6, 2015, DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.08.040
21. Nishikawa Y, Maruyama H (他 7 名、6 番目) Immediate effect of passive and active stretching on hamstrings flexibility: a single-blinded randomized control trial. *Journal of Physical Therapy Science* (査読有) 27, 3167-3170, 2015, DOI: 10.1589/jpts.27.3167
22. Hosomi N, Maruyama H (他 20 名、7 番目) The Japan Statin Treatment against Recurrent Stroke (J-STARS): a multicenter, randomized, open-label, parallel-group study. *EBioMedicine* (査読有) 2, 1071-1078, 2015. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.08.006
23. Nezu T, Maruyama H (他 8 名、7 番目) Telomere G-tail length is a promising biomarker related to white matter lesions and endothelial dysfunction in patients with cardiovascular risk: A cross-sectional study. *EBioMedicine* (査読有) 2, 960-967, 2015. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.05.025
24. Nezu T, Maruyama H (他 8 名、8 番目) Endothelial dysfunction is associated with the severity of cerebral small vessel disease. *Hypertension Research* (査読有) 38, 291-297, 2015. DOI: 10.1038/hr.2015.4
25. Morino H, Maruyama H, King MC, Kawakami H (他 10 名、12 番目) Mutations in Twinkle Primase-Helicase causes Perrault Syndrome with neurological features. *Neurology* (査読有) 83, 2054-2061, 2014, DOI 10.1212/wnl.0000000000001036
26. Mochizuki Y, Maruyama H, Homma T, Kawakami H (他 4 名、3 番目) 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* (査読有) 34, 504-509, 2014, DOI 10.1111/neup.12130
27. Ueno H, Maruyama H (他 5 名、6 番目) Paroxysmal dysarthria and ataxia in chronic lymphocytic inflammation with pontine perivascular enhancement responsive to steroids. *Neurology and Clinical Neuroscience* (査読有) 2, 13-15, 2014. DOI: 10.1111/ncn3.69
28. Yagi R, Maruyama H, Kawakami H (他 8 名、7 番目) Detecting gene mutations in Japanese Alzheimer's patients using semiconductor sequencing. *Neurobiology of Aging* (査読有) 35, 1780.e1-1780.e5, 2014. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.023
29. Miyamoto R, Maruyama H, Kawakami H (他 9 名、5 番目) Exome sequence reveals a novel *MRE11* mutation in a patient with progressive myoclonic ataxia. *Journal of the Neurological Sciences* (査読有) 337, 219-223, 2014. DOI: 10.1016/j.jns.2013.11.032.
30. Miyamoto R, Maruyama H, Kawakami H (他 9 名、5 番目) DYT6 in Japan - genetic screening and clinical characteristics of the patients. *Movement Disorders* (査読有) 29, 278-280, 2014. DOI: 10.1002/mds.25745
31. Kamada M, Maruyama H, Nishida Y, Kawakami H (他 9 名、8 番目) Clinicopathologic features of autosomal recessive amyotrophic lateral sclerosis associated with optineurin mutation. *Neuropathology* (査読有) 34, 64-70, 2014, DOI 10.1111/neup.12051
32. Homma T, Kawakami H, Maruyama H (他 4 名、6 番目) Neuropathological features of Japanese familial amyotrophic

- lateral sclerosis with p.N352S mutation in TARDBP. *Neuropathology App Neurobiology*(査読有)40, 231-236, 2014, DOI 10.1111/naa.12090
33. Takeda I, Maruyama H (他7名、8番目) Fiber type-specific expression of LDL receptor-related protein 6 in human skeletal muscles. *Pathobiology* (査読有) 81, 94-99, 2014. DOI: 10.1159/000357238
 34. Nakamura S, Maruyama H, Kawakami H, (他10名、11番目) An autopsy case of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with the I113T mutation. *Neuropathology* (査読有) 34, 58-63, 2014, DOI 10.1111/naa.12049
 35. Morino H, Maruyama H, Kawakami H (他2名、4番目) Exome sequence reveals a novel TTC19 mutation in an autosomal recessive spinocerebellar ataxia patients. *BMC Neurology*(査読有)14, 5, 2014, DOI 10.1186/1471-2377-14-5

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 中森正博、和泉唯信、織田雅也、平岡綾、吉川峰加、細見直永、丸山博文、松本昌泰、筋萎縮性側索硬化症患者における舌エコー、舌圧測定、嚥下造影検査での嚥下障害の検討、第57回日本神経学会学術大会、2016.5.19、神戸
2. 森野豊之、松田由喜子、和泉唯信、丸山博文、川上秀史、次世代シーケンサを用いた筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子スクリーニング、第56回日本神経学会学術大会、2015.5.23、新潟
3. 神原智美、竹田育子、山崎雅美、上利美智子、福場浩正、宮地隆史、丸山博文、松本昌泰、人工呼吸器管理下の筋萎縮性側索硬化症患者における気道内圧の経時変化、第56回日本神経学会学術大会、2015.5.22、新潟
4. Morino H, Maruyama H, Kawakami H (他15名、16番目) A novel insertion mutation of MAPT causes FTDP-17 with distinct pathology. American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting, 2014.10.20, San Diego, USA
5. 川上秀史、森野豊之、松田由喜子、大澤亮介、平木啓子、倉重毅志、和泉唯信、山崎雄、高橋哲也、高島明彦、添田義行、宮坂知宏、樋口真人、佐原成彦、須原哲也、島田斉、伊東秀文、丸山博文、FTDP-17の原因遺伝子 *MAPT* の新規挿入変異の同定と生化学的解析、第57回日本神経化学学会大会、2014.9.30、奈良
6. 林健太郎、本間琢、望月葉子、長尾雅裕、川田明広、小森隆司、川上秀史、丸山博文、中野今治、SOD1 遺伝子 L126S 変異を伴った家族性筋萎縮性側索硬化症の1剖検例、第55回日本神経病理総会学術研究

- 会、2014.6.6、東京
7. 望月葉子、川田明広、丸山博文、川上秀史、小森隆司、中野今治、FUS R521C 変異を伴った家族性筋萎縮性側索硬化症の1剖検例、第55回日本神経病理総会学術研究会、2014.6.6、東京
 8. 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-κB 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、2014.5.21、福岡

〔図書〕(計 2 件)

1. 丸山博文、松本昌泰、メディカ出版、神経内科で扱う疾患、神経内科看護の知識と実際、2-9、2015
2. 丸山博文、川上秀史、日本臨床社、ALS12 (optineurin)、神経症候群、496-499、2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 博文 (Maruyama Hirofumi)
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
 研究者番号：90304443

(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