

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23111008

研究課題名(和文) オプチニューリン遺伝子異常による脳内環境の変化と神経変性の関わり の 解明

研究課題名(英文) Brain environment and neurodegeneration based on optineurin mutations

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 90,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子として同定したoptineurinの機能を解析し、モデル動物を作成するため、optineurinのノックアウトマウスを作成した。

マウスES細胞に、相同組み替えを用いて、OPTN欠損させ、OPTN欠損マウスを得た。コントロールとOPTN欠損マウスを体重と運動機能(ロータロッド試験)について110週に渡って経時的に測定したが、両者の間で有意な差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the function of optineurin, which we found as a causative gene of amyotrophic lateral sclerosis, and to make the model mouse of amyotrophic lateral sclerosis, we made the optineurin knock-out mouse. We observed the behavior and body weight of the knock-out mouse, and we found no difference between the controls and the knock-out mouse.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経疾患 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

われわれが ALS の原因遺伝子として同定したオプチニューリン (OPTN) は多様な分子機構に関与しており、NF- κ B に関連した炎症調節機能だけでなく、ユビキチン結合能を介してオートファジーにも関与することが明らかになってきている。

2. 研究の目的

オプチニューリン遺伝子異常による神経変性メカニズムと周辺環境に及ぼす影響を明らかにする。

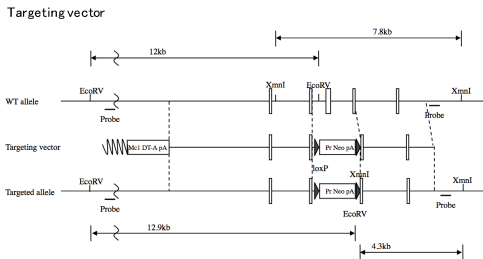
3. 研究の方法

(1)ノックアウトマウスの作製であり、ES 細胞でオプチニューリン遺伝子をノックアウトした後、キメラマウスを作製し、F1 を得た。DNA 解析の結果、ノックアウトマウスが生まれており、ホモ接合マウスを得て、体重、ロタロッド、生存曲線等を検討した。

(2) オプチニューリン E478G 変異を持ったマウスを作成するため、ゲノム編集技術を用いて、マウスに同変異を導入した。

(3)オプチニューリン遺伝子異常をもつ筋萎縮側索硬化症患者より、同意を得て、皮膚生検し、繊維芽細胞を得た。山中法を改良した独自の誘導方法にて、その後の分化誘導に偏向性の少ない iPS 細胞を誘導した。

4. 研究成果



(1)マウス ES 細胞で、オプチニューリン遺伝子をノックアウトした (図 1)。

図 1

コントロールのマウスと比較して、体重等に変化を認めるものの、2 年を経過した時点で、明らかな筋萎縮等、臨床的な筋萎縮性側索硬化症の症状は出ていない。

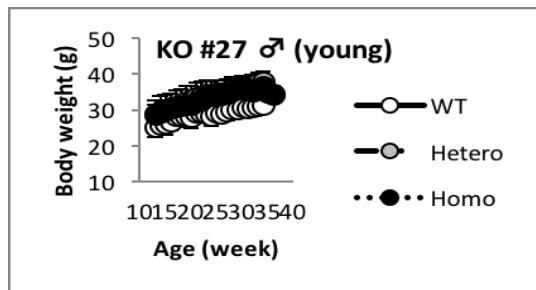


図 2

長期の飼育による経過、および組織学的解析を行う予定である。

(2)ゲノム編集酵素 TALEN を用いて、優

生遺伝形式をとる OPTN の E478G 変異を導入したノックインマウスを得た。長期飼育、表現系の解析を行っているが、著変はない。(3)OPTNE478G 変異を持つ複数の患者から、繊維芽細胞および血液細胞より、複数の iPS 細胞クローンを得た。神経細胞への分化は得られたが、運動ニューロンとしてのマーカー確認を行っている。

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 29 件)

1: Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita-Sugahara Y, Nakachi Y, Kato H, Okuda A, Tamaru S, Bornha NN, Banskoya K, Aigaki T, Sato-Miyata Y, Ohnuma K, Suzuki T, Nagao A, Maehata H, Matsuda F, Higasa K, Nagasaki M, Yasuda J, Yamamoto M, Fushimi T, Shimura M, Kaiho-Ichimoto K, Harashima H, Yamazaki T, Mori M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. PLoS Genet. 2016 Jan 7;12(1):e1005679. doi:10.1371/journal.pgen.1005679. eCollection 2016 Jan. 査読有

2: Morino H, Matsuda Y, Muguruma K, Miyamoto R, Ohsawa R, Ohtake T, Otobe R, Watanabe M, Maruyama H, Hashimoto K, Kawakami H. A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. Mol Brain. 2015 Dec 29;8:89. doi:10.1186/s13041-015-0180-4. 査読有

3: Gomez CM, Kawakami H. Neurogenetics: The expanding horizons of diagnosis and disease pathogenesis. Neurology. 2015 Mar 17;84(11):1070-1. doi:10.1212/WNL.0000000000001372. 査読有

4: Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. Cell Rep. 2015 Feb 3;10(4):537-50. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.051. 査読有

5: 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;2:172. doi: 10.1186/s40478-014-0172-0. 査読有
- 6: Morino H, Pierce SB, Matsuda Y, Walsh T, Ohsawa R, Newby M, Hiraki-Kamon K, Kuramochi M, Lee MK, Klevit RE, Martin A, Maruyama H, King MC, Kawakami H. Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features. *Neurology.* 2014 Nov 25;83(22):2054-61. doi:10.1212/WNL.0000000000001036. 査読有
- 7: 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 Oct;34(5):504-9. doi: 10.1111/neup.12130. 査読有
- 8: Mochizuki Y, Kawata A, Hashimoto T, Akiyama H, Kawakami H, Komori T, Oyanagi K, Mizutani T, Matsubara S. An autopsy case of familial amyotrophic lateralsclerosis with FUS R521G mutation. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014 Jun;15(3-4):305-8. doi:10.3109/21678421.2014.881500. 査読有
- 9: 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
- 10: Ono T, Suzuki Y, Kato Y, Fujita R, Araki T, Yamashita T, Kato H, Torii R, Sato N. A single-cell and feeder-free culture system for monkey embryonic stem cells. *PLoS One.* 2014 Feb 5;9(2):e88346. doi: 10.1371/journal.pone.0088346. eCollection 2014. 査読有
- 11: 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
- 12: Lohmann K, Schmidt A, Schillert A, Winkler S, Albanese A, Baas F, Bentivoglio AR, Borngräber F, Brüggemann N, Defazio G, Del Sorbo F, Deuschl G, Edwards MJ, Gasser T, Gómez-Garre P, Graf J, Groen JL, Grünewald A, Hagenah J, Hemmelmann C, Jabusch HC, Kaji R, Kasten M, Kawakami H, Kostic VS, Liguori M, Mir P, Münchau A, Ricchiuti F, Schreiber S, Siegesmund K, Svetel M, Tijssen MA, Valente EM, Westenberger A, Zeuner KE, Zittel S, Altenmüller E, Ziegler A, Klein C. Genome-wide association study in musician's dystonia: a risk variant at the arylsulfatase G locus? *Mov Disord.* 2014 Jun;29(7):921-7. doi: 10.1002/mds.25791. 査読有
- 13: 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 Neurol Sci.* 2014 Feb 15;337(1-2):219-23. doi:10.1016/j.jns.2013.11.032. 査読有
- 14: 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
- 15: Kamon M, Katano M, Hiraki-Kamon K, Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A, Nishimoto M, Kato H, Okuda A. Identification of Ccr4-not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2014 Sep 15;23(18):2170-9. doi:10.1089/scd.2013.0326. 査読有
- 16: 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
- 17: 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

18: Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Suzuki A, Hirasaki M, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Katsura Y, Satta Y, Deakin JE, Graves JA, Kuroki Y, Ono R, Ishino F, Ema M, Takahashi S, Kato H, Okuda A. In vivo function and evolution of the eutherian-specific pluripotency marker UTF1. PLoS One. 2013 Jul 9;8(7):e68119. doi:10.1371/journal.pone.0068119. Print 2013. 査読有

19: 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

20: 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. 査読有

21: 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

22: Izumi Y, Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Nishinaka K, Uda F, 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

23: 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

24: Fujino N, Ota C, Suzuki T, Suzuki S, Hegab AE, Yamada M, Takahashi T, He M, Kondo T, Kato H, Yamaya M, Kubo H. Analysis of gene expression profiles in alveolar epithelial type II-like cells differentiated from human alveolar epithelial progenitor cells. Respir Investig. 2012 Sep;50(3):110-6. doi:10.1016/j.resinv.2012.07.002. 査読有

25: 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

26: Hirose H, Kato H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A. Mouse ES cells maintained in different pluripotency-promoting conditions differ in their neural differentiation propensity. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2012 Mar;48(3):143-8. doi: 10.1007/s11626-012-9486-z. 査読有

27: Kohama C, Kato H, Numata K, Hirose M, Takemasa T, Ogura A, Kiyosawa H. ES cell differentiation system recapitulates the establishment of imprinted gene expression in a cell-type-specific manner. Hum Mol Genet. 2012 Mar 15;21(6):1391-401. doi:10.1093/hmg/ddr577. 査読有

28: 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;5:573. doi: 10.1186/1752-1947-5-573. 査読有

29: Sakaguchi T, Irie T, Kawabata R, Yoshida A, Maruyama H, Kawakami H. Optineurin with amyotrophic lateral sclerosis-related mutations abrogates inhibition of interferon regulatory factor-3 activation. Neurosci Lett. 2011 Nov 21;505(3):279-81. doi: 10.1016/j.neulet.2011.10.040. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Hiroyuki Morino, Yukiko Matsuda, Ryosuke Ohsawa, Keiko Hiraki, Takashi Kurashige^{*1}, Yuishin Izumi^{*2}, Yu Yamazaki^{*1}, Tetsuya Takahashi, Akihiko Takashima, Yoshiyuki Soeda, Tomohiro Miyasaka, Makoto Higuchi, Naruhiko Sahara, Tetsuya Sahara, Hitoshi Shimada, Hirofumi Maruyama, Hidefumi Ito, Hideshi Kawakami: A novel insertion mutation of *MAPT* causes FTDP-17 with distinct pathology. ASHG 64th Annual Meeting. San Diego(USA), 2014/10/20

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.R Miyamoto, H Morino, H Maruyama, Y Izumi,
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(U.S.A.),
2012/11/8

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

加藤 英政 (KATO HIDEMASA)
愛媛大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 : 50292123