

令和元年6月27日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18383

研究課題名(和文)OPTN機能異常を基盤とした神経変性疾患の病理学、細胞学的検討と治療薬候補の探求

研究課題名(英文)Pathological and cytological research of neurodegenerative diseases and search for therapeutic drug candidates based on OPTN dysfunction

研究代表者

綾木 孝 (ayaki, takashi)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：60749555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：OPTNを介したオートファジー、神経炎症シグナルの解明を通じ、ALSや他の神経変性疾患(アルツハイマー病や多系統萎縮症)の病態を示した。オートファジーについては、ALSでの、複数種のタンパク凝集の存在を報告した。神経炎症系のシグナルについては、NF- κ Bシグナル分子の活性型であるリン酸化p65がアルツハイマー病とALS-OPTNの海馬で凝集していることを確認し報告した。そのほか、多系統萎縮症のミクログリアにおけるNLRP3インフラマソーム関連タンパクについて剖検脳での検討を行い、シヌクレインとNLRP3インフラマソーム関連タンパク陽性ミクログリアが増加することを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OPTNに関連したたんぱく質の異常の探求を通じて、これまで、不明であった変性疾患におけるオートファジー、神経炎症シグナルの異常がALSやアルツハイマー病や多系統萎縮症において示された。シグナル異常が変性疾患の治療対象になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Through the elucidation of OPTN-mediated autophagy and neuroinflammation signals, we examined the pathogenesis of ALS, Alzheimer's disease and multiple system atrophy. The role of autophagy in ALS has been reported by the presence of multiple protein aggregates in ALS. As for neuroinflammatory signals, we confirmed and reported that phosphorylated p65 (an active form of the NF- κ B signal molecule), is aggregated in the hippocampus of Alzheimer's disease and ALS-OPTN. In addition, we examined NLRP3 inflammasome-related proteins in multiple system atrophy microglia in autopsied brains and reported the relationship between α -synuclein and NLRP3 inflammasome-related protein-positive microglia.

研究分野：神経病理学

キーワード：optineurin NF- κ B multiple proteinopathy 神経細胞死 NLRP3インフラマソーム ミクログリア
顆粒空胞変性 直鎖型ユビキチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

丸山、伊東らは、オプチニューリン (以下 OPTN) が、家族性 ALS の原因遺伝子であることを報告した。(丸山、伊東ら *Nature*. 2010 ;465(7295):223-6.) その後、我々は OPTN 変異を伴う ALS 患者の神経病理像を世界に先駆けて報告し (伊東、綾木ら *Acta Neuropathol*. 2011 Aug;122(2):223-9、鎌田、綾木、伊東ら *Kamada et al. Neuropathology*. 2014; 34: 64-70) VCP 変異を伴う ALS でも OPTN の沈着がみられることを報告した。(綾木、伊東、山下、漆谷、高橋ら *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2: 172.)神経病理学的検討の結果、OPTN 変異を伴う ALS では、ALS の病態に関わりの深い TDP-43 の沈着が見られ、OPTN は孤発性 ALS の脊髄細胞にも異常に蓄積しており、OPTN が家族性、孤発性 ALS 全般の病態に関わることが示唆された。OPTN の機能の中で、何が ALS 発病に関連しているのかの詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OPTN を介したオートファジー、神経炎症シグナルの解明を通じ、ALS や他の神経変性疾患 (アルツハイマー病や多系統萎縮症) の病態を検討することである。OPTN はこれまでに、選択的オートファジーによる変性タンパクの処理や NF- κ B を通じた神経炎症の機能調整に関連しているとされており、これらは、ALS の発病機序や神経変性疾患一般と関連していることが想定されている。また、そこで、本研究の目的は、*in vitro* のレベルとヒト脳組織サンプルとの比較検討によって OPTN 異常がヒトにおいて神経変性疾患を引き起こす機序を検討し、治療薬候補を探求することである。

3. 研究の方法

神経病理像の異同についての検討：剖検脳脊髄液を用いて、コントロールの OPTN 変異を持った症例と孤発性 ALS、アルツハイマー病、パーキンソン病の病理像を形態組織学に、比較・検討をした。

OPTN 関連タンパク質の分布異常や形態異常の検討：OPTN の機能と関連が深いとされる、リン酸化キナーゼの TBK1、選択的オートファジーレセプター (OPTN、p62、NDP52、NBR1、Tax1bp1、Tollip)、NF- κ B タンパク (p50、p65) や、linear コピキチン、NLRP3 インフラマソーム関連タンパクについて、疾患群とコントロール群とで、免疫染色を用いた神経病理学的方法、ウェスタンブロッティングや ELISA を用いた神経生化学的手法を用いて比較検討した。

培養細胞を用いた検討：変性たんぱく質を神経・グリア培養細胞へ導入し、変性疾患やオートファジーに関連したタンパク質の挙動について検討した。また、ALS の変異型 TDP-43 を過剰発現させた培養モデル細胞を用いて、オートファジー・プロテアソーム系を促進する抗体が、変性たんぱく質の分解に与える影響についての検討を行った。

4. 研究成果

2016 年には、大阪市立大学の分子病態学の徳永 文稔教授と本研究の共同研究者の和歌山県立医科大学神経内科伊東 秀文教授らとの共同研究で、オプチニューリン (optineurin、OPTN) と直鎖状コピキチン鎖との関係が、ALS 病態において果たす役割について報告した (文献 3)。

2018 年には、ALS-OPTN の症例で、すでに知られている TDP43 以外にタウや シヌクレインの凝集がみられることを報告した (文献 10)。

神経炎症系のシグナルについて、多系統萎縮症のミクログリアにおける NLRP3 インフラマソーム関連タンパクについて剖検脳での検討を行い、シヌクレインと NLRP3 インフラマソーム関連タンパク陽性ミクログリアが増加することを報告した (文献 11)。

また、初代培養細胞から確立したミクログリアで シヌクレインフィブリルなどの凝集タンパクでの刺激を行い、IL1 β の WB を行い、増加することを確認した。また、OPC (オリゴデンドロサイト前駆体細胞) でシヌクレインの取り込みがおこり、p62 が増加していることを報告した (文献 7)。

認知症の原因の多くをしめる疾患であるアルツハイマー病の顆粒空胞変性と OPTN と NF- κ B シグナルについて、検討したところ、活性型であるリン酸化 p65 がアルツハイマー病と ALS-OPTN の海馬で凝集していることを確認し報告した (文献 15)。

また、和歌山県立医科大学神経内科伊東 秀文教授らとの共同研究で、OPTN の制御にかかわっている linear コピキチンが、アルツハイマー病において蓄積していることを報告した (文献 14)。

治療薬の候補の探索の試みとしては、滋賀医科大学脳神経内科との共同研究で、ALS の変異型 TDP-43 を過剰発現させた培養モデル細胞を用いて、オートファジー・プロテアソーム系を促進する抗体が、変性たんぱく質の分解を促進することを共同研究で報告した (文献 13)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Uchida T, Tamaki Y, Ayaki T, et al. CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. *Sci Rep*. 2016 Jan 11;6:19118.

<https://doi.org/10.1038/srep19118>

2. Kawamoto Y, [Ayaki T](#), et al. *Neurosci Lett*. 2016 15;628:207-12. Activated caspase-9 immunoreactivity in glial and neuronal cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.036>
3. Nakazawa S, Oikawa D., Ishii R, [Ayaki T](#), et al. *Nat Commun*. 2016 24;7:12547. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis.
<https://doi.org/10.1038/ncomms12547>.
4. Imamura K, Izumi Y, Watanabe A, Tsukita K, Woltjen K, Yamamoto T, Hotta A, Kondo T, Kitaoka S, Ohta A, Tanaka A, Watanabe D, Morita M, Takuma H, Tamaoka A, Kunath T, Wray S, Furuya H, Era T, Makioka K, Okamoto K, Fujisawa T, Nishitoh H, Homma K, Ichijo H, Julien JP, Obata N, Hosokawa M, Akiyama H, Kaneko S, [Ayaki T](#) et al. The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med*. 2017 May 24;9(391)
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3962>.
5. Honjo Y, [Ayaki T](#), et al. *Neuropathology*. 2017 Dec;37(6):495-501. Decreased levels of PDI and P5 in oligodendrocytes in Alzheimer's disease.
<https://doi.org/10.1111/neup.12395>. E
6. Matsuo K, Shindo A, Niwa A, Tabei KI, Akatsu H, Hashizume Y, Akiyama H, [Ayaki T](#), et al. Complement Activation in Capillary Cerebral Amyloid Angiopathy. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2017;44(5-6):343-353.
<https://doi.org/10.1159/000486091>
7. Kaji S, Maki T, Kinoshita H, Uemura N, [Ayaki T](#), et al. Pathological Endogenous α -Synuclein Accumulation in Oligodendrocyte Precursor Cells Potentially Induces Inclusions in Multiple System Atrophy. *Stem Cell Reports*. 2018 Feb 13;10(2):356-365.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.001>.
8. Honjo Y, [Ayaki T](#), et al. *Brain Res*. 2018 Feb 1;1680:39-45. FKBP12-immunopositive inclusions in patients with α -synucleinopathies.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.012>.
9. Hikiami R, Yamakado H, Tatsumi S, [Ayaki T](#), et al. *Intern Med*. 2018 Jul 1;57(13):1917-1919. Amyotrophic Lateral Sclerosis after Receiving the Human Papilloma Virus Vaccine: A Case Report of a 15-year-old Girl.
<https://doi.org/10.2169/internalmedicine.0285-17>.
10. [Ayaki T](#), et al. Multiple Proteinopathies in Familial ALS Cases With Optineurin Mutations. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018 Feb 1;77(2):128-138.
<https://doi.org/10.1093/jnen/nlx109>
11. Fangzhou Li , [Takashi Ayaki](#) et al. Nivolumab causes focal muscular inflammation without electrophysiological or muscle magnetic resonance imaging findings. *Neurology and Clinical Neuroscience* 2018; 6: 112-114
<https://doi.org/10.1111/ncn3.12193>
12. Li F, [Ayaki T](#), et al. NLRP3 Inflammasome-Related Proteins Are Upregulated in the Putamen of Patients With Multiple System Atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018;77:1055-1065.
<https://doi.org/10.1093/jnen/nly090>.
13. Tamaki Y, Shodai A, Morimura T, Hikiami R, Minamiyama S, [Ayaki T](#), et al. Elimination of TDP-43 inclusions linked to amyotrophic lateral sclerosis by a misfolding-specific intrabody with dual proteolytic signals. *Sci Rep*. 2018 Apr 16;8(1):6030.
doi: 10.1038/s41598-018-24463-3.
14. Nakayama Y, Sakamoto S, Tsuji K, [Ayaki T](#), et al. Identification of linear polyubiquitin chain immunoreactivity in tau pathology of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2019;703:53-57.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.017>.
15. Yamaguchi Y1, Ayaki T1, et al. Phosphorylated NF- κ B subunit p65 aggregates in granulovacuolar degeneration and neurites in neurodegenerative diseases with tauopathy. *Neurosci Lett*. 2019 Apr 1;704:229-235.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.036>.

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 山口裕子, 綾木 孝ら 胃腸症状の後に四肢呼吸筋麻痺のため 4 か月の経過で死亡し、SOD 陽性封入体を認め SOD 関連 ALS が疑われた剖検例 第 13 回日本神経病理学会近畿地方会 2016 年 7・9 京都大学
- (2) 李 方舟, 綾木 孝ら 運動ニューロン病、前頭葉側頭葉認知症とパーキンソンニ

ズムを呈した高齢発症の神経中間径フィラメント封入体病（NIFID）の一部検例 第 15 回
日本神経病理学会近畿地方会 2017 年 6 月 24 日 京都市

（ 3 ） 李 方舟、綾木 孝ら 被殻にヘモジデリン貪食ミクログリアを多数認めた多系
統萎縮症の剖検例 第 45 回 臨床神経病理懇話会 2017 年 11 月 4 日（土）鳥取県米
子市

（ 4 ） 綾木 孝ら 運動失調・錐体外路兆候、認知機能低下を呈し、小脳プルキンエ
細胞と大脳に p62 陽性核内封入体を認めた剖検例 第 16 回日本神経病理学会近畿地方会
2017 年 12 月 9 日 京都市

（ 5 ） 大井由貴、井谷理彦、長谷川華子、眞木崇州、葛谷聡、山下博史、綾木孝ら
症性対麻痺を呈した新規 presenilin-1 遺伝子変異による家族性アルツハイマー病の剖
検例 第 46 回 臨床神経病理懇話会 2018 年 11 月 17 日 京都

（ 6 ） 安田謙、綾木孝ら 浮腫を背景とした、脳アミロイドアンギオパチー関連脳症の一部
検例 第 17 回日本神経病理学会近畿地方会 2018 年 6 月 16 日 京都 2018 年 6
月 16 日

〔図書〕（計 0 件）

〔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：なし

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：綾木孝

ローマ字氏名：AYAKI TAKASHI

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：60749555

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。