

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791885

研究課題名(和文) オプチニューリンとその緑内障関連変異体の分子機能解析および網膜血流調節の検討

研究課題名(英文) Molecular analyses of glaucoma-associated mutations in OPTN gene and retinal blood flow

研究代表者

峯岸 ゆり子 (Minegishi, Yuriko)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・分子細胞生物学研究部・研究員

研究者番号：20621832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：家族性緑内障原因変異となるオプチニューリン(OPTN)のE50K変異タンパクを発現させたマウス網膜では、E50K変異タンパクの沈着が認められ、神経変性疾患特有な異常タンパクの凝集性・疎水性の関与が疑われた。実際にE50K変異を有する家族性緑内障患者の末梢血より疾患特異的iPS細胞を樹立し、OPTN動態について検討し、E50K変異を有するiPS細胞から神経細胞誘導時に疎水性OPTNの増加を見出した。E50KはTBK1と強結合性を獲得しており、TBK1阻害剤処理により前述のE50Kの疎水化が軽減されることを見出し、E50K緑内障発症の根底には変異タンパクの異常凝集が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The optineurin (OPTN) E50K mutation was first identified in familial glaucoma. We have previously described an E50K mutation-carrying transgenic (E50K-tg) mouse that exhibited glaucomatous phenotypes. Further phenotypic analysis of these E50K-tg mice revealed the abnormal localization of E50K mutant protein deposits in retina, indicating a mutant protein aggregation/insolubility. Neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) from E50K-glaucoma patients exhibited increased insolubilized OPTN. The E50K mutant strongly interacted with TBK1 and treatment with a TBK1 inhibitor abrogated the aberrant insolubility of E50K. Here, we delineated the underlying pathoetiology of E50K-glaucoma associating with mutant protein aggregation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：緑内障 家族性緑内障 遺伝子変異 オプチニューリン Optineurin E50K 正常眼圧緑内障

### 1. 研究開始当初の背景

オプチニューリン(Optineurin:OPTN)は、様々なタンパクと相互作用し、主に細胞内の物流やNF Bの活性抑制に関連して機能することで知られ、2002年にそのアミノ酸50番目のグルタミン酸(E)がリシン(K)と変異したE50K変異が家族性開放隅角緑内障(POAG)の原因として報告されている。また2010年には家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子としてもOPTNの別変異が報告されており、OPTNの神経細胞内での機能と関連し、その変異による神経変性疾患発症機序の解明が強く期待されている。当研究部ではこれまでに、野生型OPTNを発現する遺伝子改変マウスモデルを比較対象に、E50K変異を含む数種のOPTN変異タンパクを発現するOPTN遺伝子改変マウスについて作製し、E50K変異タンパクを発現するE50Kトランスジェニックマウスでのみ、周辺網膜からの視神経節細胞の脱落が有意であり、またPOAG様に経時的な視神経節細胞の脱落、および網膜の菲薄化が起こることを報告している。近年のゲノム解析技術の革新により多くの疾患関連遺伝子変異が報告されつつあるが、その病因・病態発症機序の解析は未だ未解明で後回しにされている現状も多く、また数多く報告される遺伝子変異が果たして実際に疾患発症に寄与しているかどうかの検討が不十分である可能性も否定できない状況であった。

### 2. 研究の目的

本件のE50K緑内障のみならず、将来的な新規治療法確立のためには、その疾患発症・病態の根底にある機序の解析が必須である。我々はE50Kトランスジェニックマウスで惹起される緑内障様病態についてさらなる病理解析・所見を行い、E50K変異が引き起こす病態発症機序について明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

### 3. 研究の方法

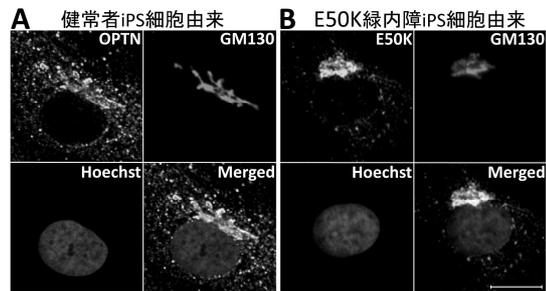
E50Kトランスジェニックマウス網膜について、フラットマウント法、パラフィン切片を用い、このマウスにおける網膜病理について詳細な検討を行った。病理的所見をもとに、細胞内での局在について強制発現系を用いた検討に加え、実際のE50K緑内障患者末梢血より疾患特異的iPS細胞を樹立し、神経細胞へと分化誘導したのち、E50K変異を有する細胞における内在発現レベルでのOPTNの細胞内局在について検討を行った。また細胞内におけるE50K変異タンパクの生化学的特徴について検討するため、強制発現系とあわせ、上述の疾患特異的iPSを用いた検討を行った。またE50K変異タンパクに特有な結合分子をLS-MS/MSを用いて同定し、このE50K変異タンパクに強い結合性を示した分子の阻害剤処理によって、細胞内でのE50Kタンパクの動態について検討を行った。

### 4. 研究成果

E50Kトランスジェニックマウス網膜では、Glial fibrillary acidic protein(GFAP)陽性となるMüller細胞の反応性グリオシスの過剰な増進、およびE50K変異タンパクの沈着性局在を認め、多くの神経変性疾患に特有な変異タンパクの凝集性・疎水化の獲得が関与していることが考えられた。

そこで内在発現レベルでの検証のため、E50K変異を有する実際の緑内障患者末梢血より疾患特異的iPS細胞を樹立し、OPTNタンパクの動態について検討を行い、疾患特異的iPS細胞由来サンプルでの、疎水性OPTNタンパクの増加と細胞内での凝集性局在を認めた(図1)。

図1: 健常者から樹立したiPS細胞、もし



くはE50K緑内障患者より樹立したiPS細胞から、神経細胞へと分化誘導後の、抗OPTN抗体を用いたOPTNの細胞内局在結果。(Minegishi, Y. et al., *Hum Mol Genet* 2013より改変引用。)

A: 健常者由来の誘導神経細胞では細胞質内に散在性の局在が認められた。

B: E50K変異を有する緑内障患者由来の誘導神経細胞ではOPTNが細胞内核周囲に凝集して局在していることが明らかとなった。

これらの結果は、初めて内在レベルでのE50K変異タンパクの動態についてその疎水性と凝集性について明らかにしたものであり、E50K変異タンパクが神経細胞内において直接的な影響をもたらしていることを示唆するものであった。強制発現系を用いた解析でも同様に、E50K変異タンパクの細胞内での凝集性の局在、また疎水分画での検出増加についての結果が得られたことから、これらの所見をもとに、同様の分子生物学的手法およびLC-MS/MSを用いたプロテオミクスによる解析を行い、E50Kタンパクに特有な結合分子としてTANK-binding kinase 1(TBK1)を同定した(図2)。

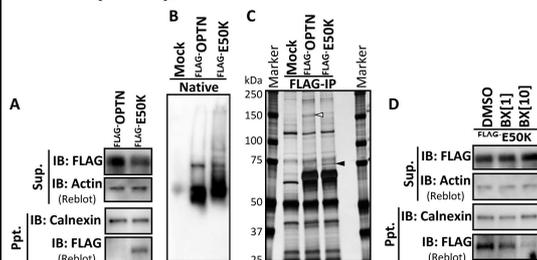


図 2: 強制発現系による E50K 変異体タンパクの持つ疎水性 (A)、細胞内での複合体形成の違い (B)、特異的結合分子の有無 (C、黒矢印が TBK1) と、LC-MS/MS により同定された TBK1 に対する阻害剤処理による、E50K 変異タンパクの疎水性の解消 (D) (Minegishi, Y. et al., *Hum Mol Genet* 2013 より改変引用。)

免疫沈降法と銀染色を用いた LC-MS/MS プロテオミクス解析から E50K 変異タンパクは TBK1 に対する強い結合性を獲得しており、また TBK1 阻害剤処置により、前述の E50K 変異タンパクの疎水化が軽減されることを見出した。以上の結果から、E50K 緑内障発症の根底には変異タンパクの異常凝集性が関与していることが示唆された。

E50K トランスジェニックマウスにおいて認められた反応性グリオシスの亢進による GFAP シグナルの増強から、当初はアストロサイトが持つ血流調節に関しても影響があるのではないかと考え、強制発現下での細胞外放出を促進する刺激下で、培養液中に放出されるプロスタグランジン E2 (PGE2) について ELISA による検討を行い、E50K 変異体強制発現下では血流調節に重要な PGE2 の細胞外放出が、正常 OPTN を強制発現させた時と比較して減少することについても報告している (Minegishi, Y. et al., *Hum Mol Genet* 2013)。しかしこの結果が E50K 変異タンパク発現による直接的・一次的なものであるか、もしくは間接的・二次的なものであるのかについては、今後、細胞種を単離した実験系での詳細な検討が必要であると考えられる。

E50K 緑内障が 2002 年に初めて報告されて以来、この変異タンパクによりなぜ網膜視神経節細胞死が惹起され、緑内障を発症するのか、従来の眼圧調節による治療が奏功しない理由はなぜであるかは長らく不明であった。今回の本検討により、E50K 緑内障発症の根底となる神経細胞内における直接的な機序の一端について明らかとすることができたと考え、また今後の治療研究、治療選択についての有用な知見を得ることができたと考えられる。治療法開発を念頭に、今後も新規モデル動物の開発、実験系の改良、抗体作製などを駆使して E50K 緑内障の病態について解明するとともに、網膜疾患と細胞機能との関連性について明らかにしていきたい。

#### 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 1 件)

1. Minegishi, Y., Iejima, D., Kobayashi, H., Chi, Z.L., Kawase, K., Yamamoto, T., Seki, T., Yuasa, S., Fukuda, K. and Iwata, T. (2013) Enhanced optineurin E50K-TBK1 interaction evokes protein

insolubility and initiates familial primary open-angle glaucoma. *Human molecular genetics*, 22, 3559-3567. (査読有、doi:10.1093/hmg/ddt210)

[学会発表](計 7 件)

1. 峯岸ゆり子, 岩田岳。オプチニューリンのアミノ酸 E50K 変異による遺伝性緑内障の発症機序。第 19 回東北眼疾患病態研究会。仙台。2014 年 5 月 19 日。(招待講演/日本語)
2. Minegishi, Y., Iwata, T. Etiologic dynamics of optineurin E50K mutant in iPSC from open angle glaucoma patient. Neuroscience 2013. San Diego, CA, USA. 2013 年 11 月 13 日。(ポスター発表/英語)
3. Minegishi, Y., Iejima, D., Kobayashi, H., Chi, Z.L., Kawase, K., Yamamoto, T., Seki, T., Yuasa, S., Fukuda, K., Iwata, T. Distinct protein complex formation evokes insolubility of OPTN and mislocalization in iPSC-derived neural cells from E50K-POAG patients. ARVO2013. Seattle, WA, USA. 2013 年 5 月 5 日。(ポスター発表/英語)
4. 峯岸ゆり子, 家島大輔, 小林宏明, 池在龍, 川瀬和秀, 山本哲也, 関倫久, 湯浅慎介, 福田恵一, 岩田岳。緑内障原因遺伝子オプチニューリンと E50K 変異によるタンパクの不溶化と病態発症との関連。第 17 回眼科分子生物学研究会。静岡。2013 年 2 月 24 日。(口頭発表/日本語)
5. 峯岸ゆり子, 小林宏明, 家島大輔, 岩田岳。オプチニューリン E50K 変異体による正常眼圧緑内障の病態機序の解明。第 5 回 Retinal Research Meeting。東京。2012 年 12 月 8 日。(口頭発表/日本語)
6. Minegishi, Y., Kobayashi, H., Iwata, T., Comparative functional analysis of optineurin and its glaucoma-related mutant E50K by mammalian cell-based LC-MS/MS proteomics. XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research. Berlin, Germany. 2012 年 7 月 25 日。(ポスター発表/英語)
7. Minegishi, Y., Iwata, T., Aberrant accumulation of glaucoma-associated OPTN E50K mutant protein potentiates the glaucomatous retinal vulnerability. XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research. Berlin, Germany. 2012 年 7 月 23 日。(口頭発表/英語)

〔図書〕(計 1 件)

1. 峯岸ゆり子: 日本人のヒット論文  
本音で語る苦労話 第5回 オプチニ  
ューリン E50K 変異による遺伝性緑内  
障発症の機序 『Retina Medicine』中  
澤徹編。先端医学社。東京。2014 秋。  
(印刷中)

〔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

峯岸 ゆり子 ( MINEGISHI, Yuriko )  
東京医療センター 臨床研究センター  
感覚器センター 分子細胞生物学研究部  
研究員

研究者番号：20621832

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：