

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860713

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症の発症メカニズムの解明 - オプチニューリンを中心とした新規機序 -

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenetic mechanism of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutation in optineurin

研究代表者

倉持 真人(Kuramochi, Masahito)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・特任助教

研究者番号：30589122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：運動ニューロンの神経変性により重篤な筋肉の委縮や筋力低下を生じる筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子の一つであるオプチニューリン(OPTN)は、機能不全または欠損することで疾患を発症すると考えられている。そこで、OPTN欠損マウスを作製して老齢期まで行動および組織の変化について調べたところ、正常マウスと比較して顕著な違いは見られなかった。しかし、既存のALSモデルマウスのOPTNを欠損させることで寿命が延びるという非常に興味深い結果を得ることができたことを報告する。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegeneration disease of motor neurons resulting in the atrophy and weakness of muscle. Optineurin (OPTN) is one of genes causing ALS. It is thought that dysfunction and deletion of OPTN develop ALS. Therefore, I produced OPTN knockout mouse and then examined its mice behaviorally and histologically at both the young and the old age. At the results of these experiments, there was no significantly difference between non-genetically modified mice and the OPTN knockout mice. However, the deletion of OPTN prolonged survival in a transgenic mouse model of ALS.

研究分野：神経科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 神経変性 オプチニューリン 運動ニューロン 脊髄 SOD1

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、2010年に筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子としてオプチニューリン(OPTN)を報告した(Maruyama et al, Nature)。OPTNは細胞内タンパク質の自己分解機能であるオートファジーに関与することがわかっている。ALS患者の運動ニューロン内には封入体と呼ばれるタンパク質の集合体が見られ、オートファジーが関わっていると考えられている。そこで、OPTNの機能不全および欠落がオートファジー異常を生じ、ALSを発症するという考えに至った。

(2) 変異型スーパーオキシドジスムターゼ1(mSOD1)を原因とするALS患者の運動ニューロン内において見られる封入体には、OPTNが局在することがわかっている。そこで、既存ALSモデルであるmSOD1トランスジェニックマウスにおけるOPTN機能を解析することでALS発症メカニズムを明らかにすることに着想した。

2. 研究の目的

(1) OPTNの機能不全および欠落がALSを発症すると考えられることから、OPTNノックアウトマウスを作製し、行動学的ならびに組織学的な面からALS様の症状および病態が現れるか解析する。個体レベルで確認後、培養細胞下において組織解析で見られたような状態を再現し、詳細な分子メカニズムを明らかにする。

(2) mSOD1トランスジェニックマウスとOPTNノックアウトマウスを交雑させてOPTNを欠損したmSOD1マウスを作製し、既存のALSモデルにおけるOPTN機能を調べることによりALS発症メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) OPTNノックアウトマウスの樹立確認および遺伝的背景の純化、OPTN欠損mSOD1マウスの獲得

作製したマウスのOPTNがどのレベルまで欠損しているのかをmRNA、タンパク質レベルで明らかにするためにそれぞれリアルタイムPCR法、ウエスタンブロット法によって確認した。脊髄を摘出してmRNAとタンパク質を抽出した。mRNAは逆転写酵素によりcDNAを作製し、リアルタイムPCRを行なった。タンパク質は、OPTNのN末端、C末端、中間部分を認識する抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。

二系統の遺伝的背景が混在しているためC57BL/6マウスとの戻し交配を重ねて遺伝的背景の純化を行なった。

OPTNを欠損したmSOD1マウスは、mSOD1

G93AマウスとOPTNノックアウトマウスを交配させることで獲得した。実験において比較・検討する上で、遺伝的変異を有さない野生型グループ、OPTNノックアウトグループ、mSOD1グループ、OPTNノックアウト/mSOD1グループの4グループを用意することと、mSOD1マウスの雌は妊娠しないことから、mSOD1を持ち尚且つ片側の染色体のOPTNが欠損している(ヘテロ型のOPTNノックアウト)雄マウスとヘテロ型のOPTNノックアウトの雌マウスとを交配させることで目的の4グループ分の仔マウスを用意した。

(2) 行動解析

体重測定、Jackson laboratory社の運動障害のスコアリング、運動機能評価の一つであるロータロッド試験を一週間に1回行い、経時的に解析した。

Jackson laboratory社の運動障害のスコアリングは、「正常歩行」「後肢にふるえ有」「片方の後肢の引きずり」「両後肢の引きずり」「仰向けから正姿勢に戻るまでの時間が20秒以上」の5段階評価で行った。

ロータロッド試験は横にした円柱にマウスを乗せ、円柱を回転させてどれくらいの時間落下せずに姿勢を維持していただけるかで運動機能を定量的に評価する方法である。本研究では等加速度で回転数が増える条件で行った。開始時点では4回/分、最終時の5分後には40回/分となるようにし設定した。これを1日当たり4試行行ない、1試行終了するごとに20分間以上空けて行った。

(3) 組織解析

麻酔したマウスを4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液でかん流固定し、脳および脊髄を採取した。後固定およびスクロース/リン酸緩衝液への浸漬を行った後、包埋剤で閉じ込めてブロックにし、クライオスタットで20μm厚の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色やニッスル染色、免疫染色(アセチルコリントランスフェラーゼ、GFAP、Iba1、ユビキチン)を行い、定性および定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) OPTNノックアウトマウスの解析

OPTNノックアウトマウスの樹立および遺伝的背景の純化

OPTNをmRNA、タンパク質の各レベルで解析した結果、検出されなかった(図1)。そのため、目的のノックアウトマウスが作製できたことが確認できた。また、遺伝的背景については戻し交配を順当に重ね、純化させることに成功した。しかし、純化したノックアウトマウスを獲得するのに予想以上に時間がかかってしまったため、以降の実験は未純化のマウスで先行して行った。

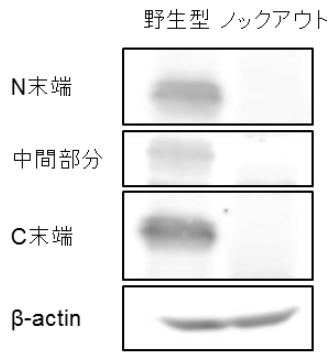


図1 抗OPTN抗体によるウエスタンブロット

行動および組織解析

若齢期から老齢期(24ヶ月齢)に至るまで体重測定(図2)および肉眼観察、ロータロッド試験(図3)を行ったが、OPTN ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して有意な行動変化は見られなかった。また、24ヶ月齢時にかん流固定を行い、脳および脊髄を染色したが組織学的な変化は認められなかった。

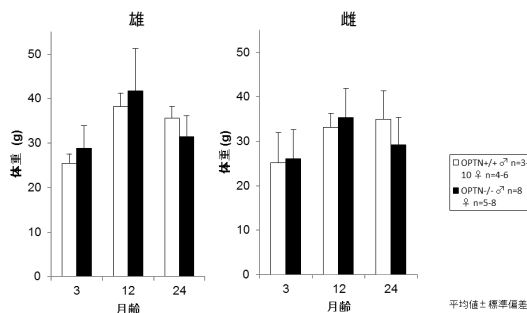


図2 体重の経時的変化

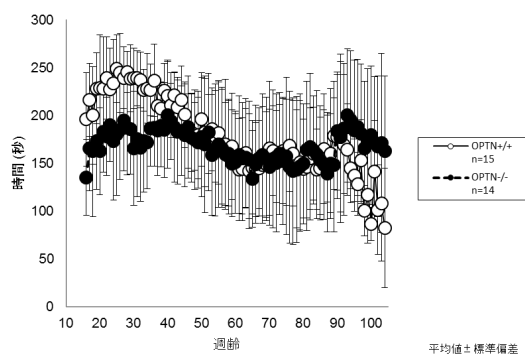


図3 ロータロッド試験

本研究期間中には遺伝的背景が未純化なマウスでしか結果が得られなかったが、他研究者に先行して一連の結果を得ることができ、顕著な ALS 症状の現れるマウスではない可能性を示すことができた。今後は遺伝的背景を純化したマウスで再度解析を行い、更に末梢の運動神経や筋肉についても解析を行うことでマウスの状態を詳細に調べる予定である。

(2) OPTN 欠損の mSOD1 マウスの解析

OPTN を欠損した mSOD1 マウスを交雑により獲得後、野生型、OPTN ノックアウト、mSOD1、OPTN ノックアウト/mSOD1 の四群のマウスを対象に生存期間について調べた。結果は、野生型および OPTN ノックアウトマウスは解析期間内に死亡した個体はならず、mSOD1 マウスは既存の報告通り平均 160 日齢で死亡した。しかし、OPTN 欠損した mSOD1 マウスは平均 180 日齢で死亡し、mSOD1 マウスと比較して 20 日間の寿命の延長が見られた。

今回の結果は OPTN が保護機構に關与しているという想定で始めたのと反して寿命の延長が見られた。これにより OPTN がないことで別の保護機構の作用が強まる、もしくは特定の条件下では OPTN があることで障害が悪化するという新規メカニズムの可能性を示すような結果を得ることができた。今後も研究を進めていき、この寿命延長のメカニズムを明らかにする予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

倉持 真人 (KURAMOCHI MASAHIITO)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・特
任助教
研究者番号：30589122

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：