

筋萎縮性側索硬化症の新規原因遺伝子 optineurin の同定

丸山 博文*

要旨：筋萎縮性側索硬化症は運動神経の変性・脱落により筋力低下・筋萎縮をきたす。今回血族結婚の家系で発症した ALS 患者からのアプローチにより新たな原因遺伝子として optineurin (OPTN) を同定した。エクソンの欠失・ナンセンス変異・ミスセンス変異をみいだした。機能的に OPTN は NF- κ B の活性を抑制するが、変異により抑制効果は消失した。ミスセンス変異の症例では脊髄運動神経細胞質に抗 OPTN 抗体陽性の凝集体様構造物を見とめた。さらに SOD1 変異例や孤発例においても抗 OPTN 抗体陽性細胞質内封入体を見とめた。これらの結果は ALS に共通した発症機序に Optineurin が関与していることを示唆している。

(臨床神経 2012;52:1-5)

Key words: 筋萎縮性側索硬化症, オプチニューリン, 一塩基多型, 血族結婚, Nuclear factor kappa B

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は上位・下位運動ニューロンの障害により筋力低下・筋萎縮をきたす。人工呼吸器などのサポートがなければ発症後数年で呼吸不全により死亡する不治の難病であり、根本的治療法の開発が求められている。その病態機序解明のてがかりとして原因遺伝子の同定が必須である。同じく神経変性疾患であるアルツハイマー病やパーキンソン病において、まれな遺伝性のもので原因遺伝子の同定により、病態に関与する物質が同定され、それに基づいて治療法の開発が進められているのがよい例である。

ALS においては約 10% が家族性であり、最初に原因遺伝子として同定されたのは superoxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子であり¹⁾、家族性の約 20% を占める。さらにこの数年で TAR DNA binding protein (TARDBP)²⁾ や fused in sarcoma/translated in liposarcoma (FUS/TLS)^{3,4)} が同定された。今回、血族結婚の家系で発症した ALS 患者からのアプローチにより新たな原因遺伝子としてオプチニューリン (Optineurin: OPTN) を同定した⁵⁾ので紹介したい。

1. 候補領域の抽出について

疾患の原因遺伝子同定にあたり、従来では大家系を把握し、連鎖解析から候補領域を絞りこみ、遺伝子を同定する方法がとられてきた。しかし ALS では余命が短いため、第一患者発症時には罹患した親は死亡している。また第二患者発症時には第一患者が死亡している事が多く、家系としての検体を取

集することが困難であり、通常のアプローチが有効でない。一方で ALS の多発地帯が存在し、これまで様々な環境要因が検討されたが、はっきりとした原因は指摘されていない。そのため、この多発は血族結婚による劣性遺伝性 ALS によるものと想定した。そのばあい、原因遺伝子は同祖の領域に存在するため、ホモ接合が連続する領域が候補となる。この領域抽出のため、高密度の single nucleotide polymorphism (SNP, 一塩基多型) を利用した。SNP が連続してホモ接合である領域を血族結婚由来の ALS 患者で解析し、それらが重なる部分を抽出することにした。これには Homozygote Fingerprinting (HF) 法をもちいた⁶⁾。両親が血族結婚の患者 6 名について高密度 SNP を解析し、ホモ接合が連続する領域を抽出し、共通する部分を候補領域とした。それにより chromosome 10 に 2.5 メガ (2.5×10⁶) 塩基対の領域が抽出された。

2. Optineurin 遺伝子変異の同定について

候補領域には 17 個の遺伝子が存在し、それらのエクソンおよびその周囲をシーケンスすることにより Optineurin 遺伝子の変異を同定した (Fig. 1)。血族結婚由来の家系で兄弟が発症している症例においてエクソン 5 の欠失のホモ接合をみいだした。イントロン 4 に存在する AluJb とイントロン 5 に存在する AluSx に共通する配列をみとめ、その間が欠失する Alu-mediated recombination の状況であった。これによりフレームシフトが生じ、蛋白質ができたとしても 58 アミノ酸の短いものとなる。またエクソン 12 のナンセンス変異 (c.1502C>T, Q398X) のホモ接合をみとめた。このばあいウェスタンブロッティングで Optineurin (OPTN) 蛋白が消失していたが、Nonsense-mediated mRNA decay の機序が考え

*Corresponding author: 広島大学原爆放射線医科学研究所分子疫学研究分野 [〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3]
 広島大学原爆放射線医科学研究所分子疫学研究分野
 (受付日: 2011 年 10 月 25 日)

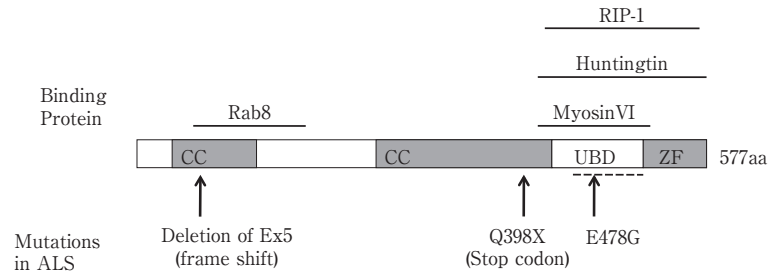


Fig. 1 Schema of OPTN gene.

Binding proteins are listed at the upper part. Mutations in ALS are listed at the lower part of OPTN gene. Dotted line indicates sequences that resemble NEMO. CC; coiled coil, UBD; ubiquitin binding, ZF; zinc finger domain.

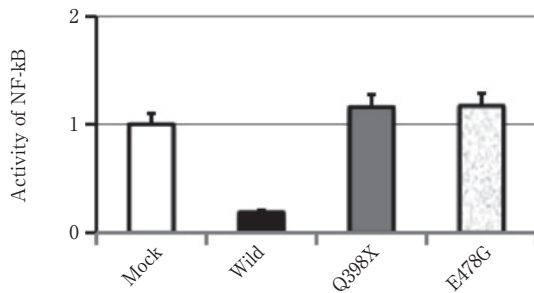


Fig. 2 Luciferase assay to assess the ability of OPTN. The mock, Q398, E478G types lack the inhibit activation of NF-κB.

られた。

さらに孤発性 ALS をふくめて OPTN 変異をスクリーニングしたところ、孤発例 1 例に同じナンセンス変異をみとめた。Q398X 変異をみとめる両者は病歴聴取上姻戚関係のみとめなかったが、人類遺伝学的に興味深いことに、ハプロタイプを比較すると OPTN 遺伝子をふくむ 0.9 メガ塩基対にわたりハプロタイプを共有しており同祖であることが推測された。また兄弟発症がみとめられる 2 家系 4 症例においてエクソン 14 のミスセンス変異 (c.1743A>G, E478G) のヘテロ接合のみとめた。この部位は種をこえて広く保存され、かつ類似の蛋白質でも DFxxER モチーフのコンセンサス配列として認識されており、機能的に重要な働きをしているアミノ酸であると考えられる。なおこれら 3 種類の変異は正常コントロールではみとめず、緑内障のこれまでの論文でも報告がなく、ALS 特異的である。

われわれはさらに主として白人からなる ALS 患者の検体において Optineurin の遺伝子変異について検討した。家族性 124 家系、孤発性 563 例のシーケンスでは新たな c.964T>C 変異のみとめたがアミノ酸変異はおこさず、意味のある変異はみとめなかった⁷⁾。他グループからは日本人および白人において Optineurin 変異の報告が複数なされている。なお Optineurin 変異による ALS は OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) では ALS12 として取り扱われている。

3. Optineurin 変異陽性症例の臨床経過

変異陽性例について初発症状に特徴的な傾向はみとめていない。Exon5 の欠失 2 例では発症年齢が 30 歳代で人工呼吸器装着も発症 1~2 年後とやや進行が早い印象がある。ミスセンス変異・ナンセンス変異の症例では呼吸器装着したにもかかわらず 1 年半で死亡した症例もあれば、経過 10 年後も呼吸器装着なく生存している例もあり、特段の傾向をみとめない。頭部画像所見では発症後 10 年以降前頭・側頭葉の萎縮が著明となっていく⁸⁾。これが Optineurin 変異に特徴的なものか、ALS の長期経過によるものかについては、大脳萎縮の視点をふまえた ALS 全体での今後の症例の蓄積が必要である。

4. Optineurin について

Optineurin は当初アデノウイルスの Early region 3 (E3) 14.7-kDa protein と関連する蛋白質として同定され、FIP-2 (for 14.7K-interacting protein) と命名された⁹⁾。16 個のエクソン、577 アミノ酸からなり、脳・網膜・骨格筋に高発現している。構造的には複数の coiled coil (CC) ドメインおよび C 末側に ubiquitin binding domain (UBD)・zinc finger (ZF) ドメインを有する。N 末側には Rab8, C 末側には Huntingtin (htt) や Myosin VI といった蛋白質が結合する (Fig. 1)。2002 年には家族性正常眼圧緑内障において変異がみとめられ¹⁰⁾、optic neuropathy inducing protein として Optineurin という名前が一般化した。緑内障の原因変異として多数報告されたが、正常コントロールで変異をみとめずかつ人種をこえて広くみとめられている変異は E50K である。Optineurin は C 末側に NEMO (nuclear factor kappa B [NF-κB] essential modulator) と類似する配列 (Fig. 1 点線部分) を有し、ユビキチン化された RIP (receptor-interacting protein) に対して NEMO と競合することによりその働きを阻害する¹¹⁾。生理的には NEMO/IKK (I kappa B kinase) 複合体は活性化を受けると NF-κB を活性化するため、結果として OPTN は NF-κB の活性化を阻害する。

変異の影響を評価するため、NSC-34 細胞(マウス運動神経

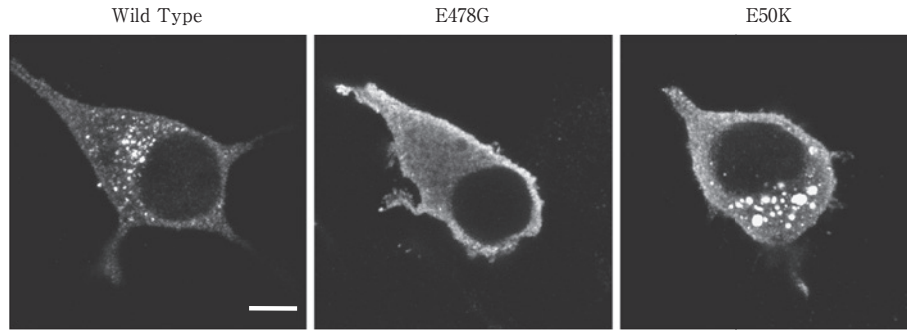


Fig. 3 Localization of OPTN.

The wild type shows many fluorescent granules. E478G OPTN shows a reduced number of granules. E50K OPTN becomes large granules. Scale bar, 10 μ m.

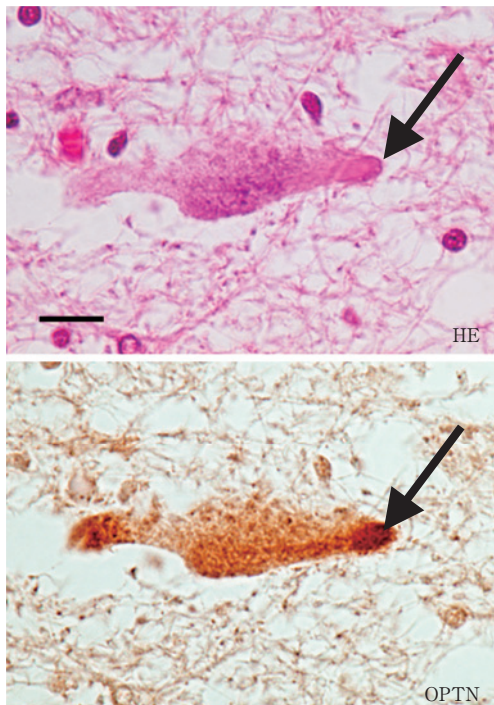


Fig. 4 Neuropathology of the lumbar spinal cord.

The eosinophilic retention is immunolabelled with anti-OPTN antibody. Scale bar, 20 μ m.

細胞とニューロプラストーマの融合細胞)に OPTN 遺伝子を導入して NF- κ B 活性を測定した (Fig. 2). Wild type を導入した細胞では活性を抑制するが, Q398X および E478G 変異を導入した細胞では抑制効果は消失していた. 一方, 緑内障の変異である E50K を導入したばあい, Wild type と同様に活性を抑制する. この傾向は tumor necrosis factor- α (TNF- α) で刺激した後も同様であった. 細胞内の分布も Wild type では顆粒状物質が Golgi 装置に近接していたが, E478G 変異を有するばあい, 顆粒数が減少し, Golgi 装置への近接も減少していた. E50K 変異では顆粒の大きさは大きくなるものの Golgi 装置と近接していた (Fig. 3). これらのことから ALS と緑内障の発症メカニズムはことなっていることが考えられる. ま

た NF- κ B とともに自然免疫に関係する IRF3 (interferon regulatory factor 3) の活性化を, 生理的には OPTN は抑制する. この抑制作用も ALS の変異では消失するが, 緑内障の変異では消失しない. この結果は自然免疫, とくにウイルス感染に対する反応が ALS 発症に関与する可能性を示唆している¹²⁾.

生化学的研究により, Myosin VI や Rab8 との関連で Optineurin はゴルジ装置の維持や膜の輸送, exocytosis に重要な働きをし¹³⁾, さらに Rab8/OPTN/htt 複合体を形成してゴルジ装置からの輸送に関係していると考えられている¹⁴⁾. 後述するようにミスセンス変異症例の病理所見においてゴルジ装置の fragmentation がみとめられており, この点からも興味深い.

また疾患との関連をみたものでは, 常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎において TNF- α によって誘導された Optineurin (論文では FIP2 とされている) を介して腎嚢胞が形成されると報告されている¹⁵⁾. ゲノムワイド関連解析では骨 Paget 病の遺伝的関連因子として報告されており, Optineurin のイントロン 6 に存在する rs1561570 のマイナーアレルのオッズ比は 0.65 と, 骨 Paget 病に抑制的であることが示されている¹⁶⁾.

5. ALS 運動神経細胞における Optineurin

E478G 変異を有する患者脊髄の病理所見として, 後索は保たれ側索は脱髄し, 前角運動神経細胞は減少していた. 残存運動神経細胞質には skein-like の封入体のみとめ, p62 および TDP-43 抗体が陽性であったが, 抗 OPTN 抗体には陰性であった. またエオジン好性の細胞質内凝集体様構造物のみとめ, これらは抗 OPTN 抗体陽性であった (Fig. 4). 前角細胞の 70% に Golgi 装置の fragmentation をみとめ, その頻度が増加していた¹⁷⁾. また孤発性 ALS 患者のエウキチンや TDP-43 抗体で染まる細胞質内封入体が抗 OPTN 抗体でも染まっていた. 加えて SOD1 変異陽性の家族性 ALS 患者では抗 SOD1 抗体で染まる封入体が抗 OPTN 抗体でも染まっていた. さらに FUS/TLS 変異陽性症例や BIBD (basophilic inclusion body disease) 症例においてニューロンの細胞質内塩基

性封入体が OPTN・FUS・MyosinVI の抗体で共通して染色される¹⁸⁾。このように ALS に大きくかかわっている TDP-43・SOD1・FUS と OPTN が関連することは、多くの ALS の発症機序に OPTN が影響している可能性が考えられる。

今後はモデル動物の作製や生化学的検討をおこない、Optineurin とこれらの蛋白質がどのようにかかわっているのかを解明していきたい。

まとめ

われわれの報告以降、VCP (valosin-containing protein)¹⁹⁾や UBIQLIN2 (ubiquilin2)²⁰⁾が ALS の原因遺伝子として報告されている。最近になり C9ORF72 遺伝子のノンコーディング部分の GGGGCC くりかえしの伸長が、染色体 9p21 に連鎖した frontotemporal dementia (FTD) および ALS の原因遺伝子として報告された²¹⁾²²⁾。今後も新世代シーケンサーの利用の増加にともない、新たな ALS の原因遺伝子の報告がなされると思われる。これらの遺伝子産物がどのように ALS 発症に関与しているのか解明していき、有効な治療法の開発につなげなければならない。

謝辞：大学院時代からご指導いただいております広島大学教授の川上秀史先生に深く御礼申し上げます。またこれまで様々なご指導をいただきました広島大学名誉教授の中村重信先生、広島大学教授の松本昌泰先生に御礼申し上げるとともに、一緒に研究をおこなってきた同僚および沢山の共同研究者の方々に感謝いたします。さらに研究にご協力いただいた患者さんおよびそのご家族に深謝いたします。

文 献

- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;319:1668-1672.
- Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, LeClerc AL, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009;323:1205-1208.
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009;323:1208-1211.
- Maruyama H, Morino H, Ito H, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010;465:223-226.
- Huqun, Fukuyama S, Morino H, et al. A quantitatively-modeled homozygosity mapping algorithm, qHomozygosityMapping, utilizing whole genome single nucleotide polymorphism genotyping data. *BMC Bioinformatics* 2010;11(Suppl 7):S5.
- Sugihara K, Maruyama H, Kamada M, et al. Screening for OPTN mutations in amyotrophic lateral sclerosis in a mainly Caucasian population. *Neurobiology Aging* 2011; 32:1923.e9-1923.e10.
- Ueno H, Kobatake K, Matsumoto M, et al. Sever brain atrophy in familial amyotrophic lateral sclerosis with mutation of OPTN after long-term survival: a case series. *J Medical Case Reports*, in press.
- Li Y, Kang J, Horwitz MS. Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. *Molecular Cellular Biology* 1998;18:1601-1610.
- Rezaie T, Child A, Hitchings R, et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 2002;295:1077-1079.
- Zhu G, Wu CJ, Zhao Y, et al. Optineurin negatively regulates TNF α -induced NF- κ B activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Current Biology* 2007;17:1438-1443.
- Sakaguchi T, Irie T, Kawabata R, et al. Optineurin with amyotrophic lateral sclerosis-related mutations abrogates inhibition of interferon regulatory factor-3 activation. *Neuroscience Letters*, in press.
- Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, et al. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biology* 2005;169:285-295.
- Toro D, Alberch J, Lazaro-Diegues F, et al. Mutant Huntingtin impairs post-Golgi trafficking to lysosomes by delocalizing optineurin/Rab8 complex from the Golgi apparatus. *Molecular Biology Cell* 2009;20:1478-1492.
- Li X, Magenheimer BS, Xia S, et al. A tumor necrosis factor- α -mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Medicine* 2008;14:863-868.
- Albagha OM, Visconti MR, Alonso N, et al. Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN, and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nature Genetics* 2010;42:520-524.
- Ito H, Nakamura M, Komure O, et al. Clinicopathologic study on an ALS family with a heterozygous E478G optineurin mutation. *Acta Neuropathologica* 2011;122:223-229.
- Ito H, Fujita K, Nakamura M, et al. Optineurin is colocalized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathologica* 2011;121:555-557.
- Johnson JO, Mandrioll J, Benatar M, et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial

- ALS. *Neuron* 2010;68:857-864.
- 20) Deng HX, Chen W, Hong ST, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 2011;477:211-215.
- 21) Renton AE, Majounie E, Waite A, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011;72:257-268.
- 22) DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011;72:245-256.

Abstract

Identification of a new causative gene of amyotrophic lateral sclerosis; optineurin

Hirofumi Maruyama, M.D., Ph.D.

Department of Epidemiology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating disorder characterized by degeneration of motor neurons of the primary motor cortex, brainstem and spinal cord. ALS patients die within 3 to 5 years without respiratory support. Detecting the causing gene is necessary to elucidate ALS.

We identified mutations of optineurin (*OPTN*) in ALS. We found three types of mutation of *OPTN*: a homozygous deletion of exon 5, a homozygous Q398X nonsense mutation and a heterozygous E478G missense mutation within its ubiquitin-binding domain. Cell transfection experiments showed that the nonsense and missense mutations of *OPTN* abolished the inhibition of activation of nuclear factor kappa B. The missense mutation revealed a cytoplasmic distribution different from that of the wild type.

A case with the E478G mutation showed *OPTN*-immunoreactive cytoplasmic retention, and Golgi fragmentation was identified in 70% of the anterior horn cells. TDP-43- or SOD1-positive inclusions of sporadic and *SOD1* cases of ALS were also immunolabelled with anti-*OPTN* antibodies. Furthermore, optineurin is co-localized with fused in sarcoma (*FUS*) in basophilic inclusions of ALS with *FUS* mutation and in basophilic inclusion body disease.

Our findings suggest that *OPTN* is involved in the great part of pathogenesis of ALS.

(*Clin Neurol* 2012;52:1-5)

Key words: Amyotrophic lateral sclerosis, Optineurin, single nucleotide polymorphism, consanguineous marriage, Nuclear factor kappa B
