

課題番号	LS088
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成25年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	新規原因遺伝子 Optineurin を中心とした筋萎縮性側索硬化症の発症機序の解明
研究機関・ 部局・職名	広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授
氏名	丸山博文

1. 当該年度の研究目的

ナンセンス変異患者由来のクローン化されたiPS細胞についてはニューロンさらには運動神経細胞への分化条件を検討し、モデル細胞の作製をめざす。  
Optineurin (OPTN)ノックアウトマウスの飼育を継続し、モデルマウスを作製、継代をすすめる。このモデルマウスの表現型・および病理学的検討を行う。  
ノックアウトマウス由来のMEF (mouse embryonic fibroblast)細胞については生化学的解析を行う。  
劣性遺伝性症例について抽出された候補領域において新規原因遺伝子を同定する。

2. 研究の実施状況

Optineurin 遺伝子の Q398X ホモ接合変異症例・E478G ホモ接合変異症例・E478G ヘテロ接合変異を有する症例について皮膚からヒト人工多能性幹細胞 (iPS)を樹立しました。この iPS 細胞については共同研究機関の埼玉医科大学発生・分子・再生部門での検討により、TET1 (ten-eleven translocation 1)を導入することにより神経誘導効率が約 60 倍に向上することが判明しました。また、この iPS 細胞を運動神経に分化させることができました。  
筋萎縮性側索硬化症モデルマウスについては OPTN ノックアウトマウスについて飼育を継続し、純化を進めています。このマウスを使用し、筋萎縮の有無・運動量・歩行障害・握力・嚥下障害による栄養不良の有無・体重について評価を行っています。一部個体については脳・脊髄の病理学的評価を行い、神経細胞の変化やグリア細胞の動向について検討しています。またヒトで筋萎縮性側索硬化症を発症させる変異である E478G のノックインマウスについても樹立できました。  
E478G 変異をアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)に組み込みマウス腰髄に注入したところ、後肢に軽度の運動障害を認めました。  
OPTN をノックダウンした細胞の検討では NF-κB の活性抑制効果が消失しました。このモデル細胞を用いた検討により選択的 NF-κB 阻害剤では細胞死が抑制されることがわかりました。  
ヒトの OPTN モノクローナル抗体も作製できました。筋萎縮性側索硬化症患者の大脳皮質・小脳においてウェスタンブロッティングによる解析で OPTN 特異的なバンドを確認できました。さらにこれら抗体を組み合わせることにより OPTN タンパク質の測定系を開発することができました。

Q398X ホモ接合患者の病理学的検索ではゴルジ装置の断片化を認め、OPTN の機能喪失により発症していることが推測されました。

### 3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計18件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 16 件</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•H Maruyama, H Morino, R Miyamoto, N Murakami, T Hamano, H Kawakami. Exome sequencing reveals a novel <i>AVO10</i> mutation in a Japanese patient with autosomal recessive spinocerebellar ataxia. <i>Clinical Genetics</i>, 85 (3), 296–297, 2014 (ISSN: 0009–9163) DOI: 10.1111/cge.12140</li> <li>•Ai Miyashiro, Katsunobu Sugihara, Toshitaka Kawarai, Ryosuke Miyamoto, Yuishin Izumi, Hiroyuki Morino, Hirofumi Maruyama, Antonio Orlandaccio, Hideshi Kawakami. Oromandibular dystonia associated with SCA36. <i>Movement Disorders</i>, 28 (4), 557–559, 2013 (ISSN: 1531–8257) DOI: 10.1002/mds.25304</li> <li>•Mayumi Akizuki, Hirofumi Yamashita, Kengo Uemura, Hirofumi Maruyama, Hideshi Kawakami, Hideo Ito, Ryosuke Takahashi. Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF-κB pathway. <i>Journal of Neurochemistry</i>, 126 (6), 699–704, 2013 (ISSN: 0022–3042) DOI: 10.1111/jnc.12326</li> <li>•Takamichi Sugimoto, Kazuhide Ochi, Naohisa Hosomi, Tetsuya Takahashi, Hiroki Ueno, Takeshi Nakamura, Yoshito Nagano, Hirofumi Maruyama, Tatsuo Kohriyama, Masayasu Matsumoto. Ultrasonographic nerve enlargement of the median and ulnar nerves and the cervical nerve roots in patients with demyelinating Charcot–Marie–Tooth disease. <i>Journal of Neurology</i>, 260 (10), 2580–2587, 2013 (ISSN: 0340–5354) DOI: 10.1007/s00415–013–7021–0</li> <li>•Masahiro Nakamori, Tetsuya Takahashi, Tomokazu Nishikawa, Yu Yamazaki, Takashi Kurashige, Hirofumi Maruyama, Koji Arihiro, Masayasu Matsumoto. Molecular markers for granulovacuolar degeneration are present in rimmed vacuoles. <i>PLOS ONE</i>, 8 (11), e80995, 2013 (ISSN: 1932–6203) DOI: 10.1371/journal.pone.0080995</li> <li>•Hiroyuki Morino, Ryosuke Miyamoto, Shizuo Ohnishi, Hirofumi Maruyama, Hideshi Kawakami. Exome sequence reveals a novel <i>TTC19</i> mutation in an autosomal recessive spinocerebellar ataxia patient. <i>BMC Neurology</i>, 14 (1), 5, 2014 (ISSN: 1471–2377) DOI: 10.1186/1471–2377–14–5</li> <li>•Seika Nakamura, Reika Wate, Satoshi Kaneko, Hideo Ito, Mitsuaki Oki, Ayako Tsuge, Masato Nagashima, Shinya Asayama, Kengo Fujita, Masataka Nakamura, Hirofumi Maruyama, Hideshi Kawakami, Hirofumi Kusaka. An autopsy case of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with the I113Y <i>SOD1</i> mutation. <i>Neuropathology</i>, 34 (1), 58–63, 2014 (ISSN: 1440–1789) DOI 10.1111/neup.12049</li> <li>•Ikuko Takeda, Tetsuya Takahashi, Kazuhide Ochi, Takashi Kurashige, Yukari Shinozaki, Masahiro Nakamori, Koji Arihiro, Hirofumi Maruyama, Masayasu Matsumoto. Fiber type-specific expression of LDL receptor-related protein 6 in a human skeletal muscles. <i>Pathobiology</i>, 81 (2), 94–99, 2014 (ISSN: 1015–2008) DOI: 10.1159/000357238</li> <li>•T Homma, U Nagaoka, A Kawata, Y Mochizuki, H Kawakami, H Maruyama, S Matsubara, T Komori. Neuropathological features of Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis with p.N352S mutation in <i>TARDBP</i>. <i>Neuropathology and Applied Neurobiology</i>, 40 (2), 231–236, 2014 (ISSN: 0305–1846) DOI: 10.1111/nan.12090</li> <li>•Masaki Kamada, Yuishin Izumi, Takashi Ayaki, Masataka Nakamura, Seiko Kagawa, Eiji Kudo, Wataru Sako, Hirofumi Maruyama, Yoshihiko Nishida, Hideshi Kawakami, Hideo Ito, Ryuji Kaji. Clinicopathologic features of autosomal recessive amyotrophic lateral sclerosis associated with optineurin mutation. <i>Neuropathology</i>, 34 (1), 64–70, 2014 (ISSN: 1440–1789) DOI 10.1111/neup.12051</li> <li>•Ryosuke Miyamoto, Hidetaka Koizumi, Hiroyuki Morino, Toshitaka Kawarai, Hirofumi Maruyama, Yohei Mukai, Ai Miyashiro, Wataru Sako, Yuishin Izumi, Hideshi Kawakami, Ryuji Kaji. DYT6 in Japan – genetic screening and clinical characteristics of the patients. <i>Movement Disorders</i>, 29 (2), 278–280, 2014 (ISSN: 1531–8257) DOI: 10.1002/mds.25745</li> <li>•Ryosuke Miyamoto, Hiroyuki Morino, Akio Yoshizawa, Yoshimichi Miyazaki, Hirofumi Maruyama, Nagahisa</li> </ul>
----------------------	---

様式19 別紙1

	<p>Murakami, Kei Fukuda, Yuishin Izumi, Shinya Matsuura, Ryuji Kaji, Hideshi Kawakami. Exome sequence reveals a novel <i>MRE11</i> mutation in a patient with progressive myoclonic ataxia. <i>Journal of the Neurological Sciences</i>, 337 (1-2), 219-223, 2014 (ISSN: 0022-510X) DOI: 10.1016/j.jns.2013.11.032</p> <p>・Taku Homma, Utako Nagaoka, Akihiro Kawata, Yoko Mochizuki, Hideshi Kawakami, Hirofumi Maruyama, Shiro Matsubara, Takashi Komori. Authors' reply to Drs M van Blitterswijk, R Rademakers and LH van den Berg. <i>Neuropathology and Applied Neurobiology</i>, 40, 359-360, 2014 (ISSN: 0305-1846) DOI: 10.1111/nan.12105</p> <p>・Ryoichi Yagi, Ryosuke Miyamoto, Hiroyuki Morino, Yuishin Izumi, Masahito Kuramochi, Takashi Kurashige, Hirofumi Maruyama, Noriyoshi Mizuno, Hidemi Kurihara, Hideshi Kawakami. Detecting gene mutations in Japanese Alzheimer's patients using semiconductor sequencing. <i>Neurobiology of Aging</i>, 35 (7), 1780.e1-1780.e5, 2014 (ISSN: 0197-4580) DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.023</p> <p>・Hiroki Ueno, Hikaru Tomimura, Takeshi Yoshimoto, Kazuhide Ochi, Eiichi Nomura, Hirofumi Maruyama, Masayasu Matsumoto. Paroxysmal dysarthria and ataxia in chronic lymphocytic inflammation with pontine perivascular enhancement responsive to steroids. <i>Neurology and Clinical Neuroscience</i>, 2 (1), 13-15, 2014 (ISSN: 2049-4173) DOI: 10.1111/ncn3.69</p> <p>・Hirofumi Maruyama, Hideshi Kawakami. Optineurin and amyotrophic lateral sclerosis. <i>Geriatrics &amp; Gerontology International</i>, 13, 528-532, 2013 (ISSN: 1444-1586) DOI: 10.1111/ggi.12022 (掲載済み一査読無し) 計1件</p> <p>・丸山博文、川上秀史. ALS12 (optineurin). <i>神経症候群 II、別冊日本臨床 No.27</i>: 496-499, 2014 (ISSN 0047-1852) (未掲載) 計1件</p> <p>・Yoko Mochizuki, Akihiro Kawata, Hirofumi Maruyama, Taku Homma, Kazuhido Watabe, Hideshi Kawakami, Takashi Komori, Toshio Mizutani, Shiro Matsubara. A Japanese patient with familial ALS and a p.K510M mutation in the gene for FUS (<i>FUS</i>) resulting in the totally locked-in state. <i>Neuropathology</i>, in press</p>
<p>会議発表 計4件</p>	<p>専門家向け 計4件</p> <p>・川浪文、永井真理子、早川英規、仁平古子、水野美邦、丸山博文、川上秀史、西山和利、AAV1 を用いた変異 Optineurin 発現 ALS モデルの作成、第 54 回日本神経学会学術大会、2013/5/30、東京</p> <p>・丸山博文、筋萎縮性側索硬化症の新規原因遺伝子の同定、第 55 回日本老年医学会学術集会、2013/6/6、大阪</p> <p>・秋月真由美、山下博史、植村健吾、丸山博文、川上秀史、伊東秀文、高橋良輔、Optineurin のノックダウンによって NF-<math>\kappa</math>B を介した神経細胞死を認めた、<i>Neuro2013</i>、2013/6/21、京都</p> <p>・川上秀史、平木啓子、大澤亮介、鈴木秀規、吉澤明生、倉持真人、森野豊之、和泉唯信、梶龍児、加藤英政、丸山博文、OPTN-ALS 患者由来 iPSC 細胞研究に向けて、平成 25 年度 ALS 分科班班会議、2014/1/17、東京</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計2件</p>	<p>・丸山博文、川上秀史. ALS の病態関連遺伝子と遺伝子変異「Optineurin」、すべてがわかる ALS・運動ニューロン疾患、p181-187, 2013 (ISBN: 978-4-521-73443-9)</p> <p>・森野豊之、川上秀史、丸山博文、吉澤明生, Optineurin 遺伝子変異を導入した ALS モデルマウスの解析. 平成 24 年喫煙科学財団研究年報、p403-407, 2013</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>広島大学原爆放射線医科学研究所分子疫学研究分野 <a href="http://home.hiroshima-u.ac.jp/epidem/bloxom/cgi/Contents/introduction.htm">http://home.hiroshima-u.ac.jp/epidem/bloxom/cgi/Contents/introduction.htm</a></p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>広島大学学術講演会 NEXT 明日を拓く科学「筋萎縮性側索硬化症へのオプチニューリンの関与」2014/3/7 広島大学東広島キャンパス(ライブラリーホール)、大学職員・一般 50 名程度、オプチニューリンによる筋萎縮性側索硬化症発症の機序について説明。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計0件</p>	

様式19 別紙1

その他	
-----	--

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の累計)	③当該年度受領額	④(=①-②-③)未受領額	既返還額(前年度迄の累計)
直接経費	129,000,000	92,600,000	36,400,000	0	0
間接経費	38,700,000	27,780,000	10,920,000	0	0
合計	167,700,000	120,380,000	47,320,000	0	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執行額	②当該年度受領額	③当該年度受取利息等額 (未収利息を除く)	④(=①+②+③)当該年度合計収入	⑤当該年度執行額	⑥(=④-⑤)当該年度未執行額	当該年度返還額
直接経費	1,144	36,400,000	0	36,401,144	36,401,144	0	0
間接経費	0	10,920,000	0	10,920,000	10,920,000	0	0
合計	1,144	47,320,000	0	47,321,144	47,321,144	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	11,561,213	解析機器・実験試薬
旅費	245,380	研究成果発表旅費(学会)
謝金・人件費等	16,001,260	博士研究員・研究補助員人件費
その他	8,593,291	DNA解析費用・飼育費用など
直接経費計	36,401,144	
間接経費計	10,920,000	
合計	47,321,144	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
				0		
				0		
				0		