



TITLE:

Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- κ B pathway(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Akizuki, Mayumi

CITATION:

Akizuki, Mayumi. Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- κ B pathway. 京都大学, 2014, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/188648>

RIGHT:

京都大学	博士 (医学)	氏 名	秋月 真由美
論文題目	Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF-κB pathway (NF-κB 経路を介した Optineurin のノックダウンによる神経細胞死)		
(論文内容の要旨)			
<p>筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、脳および脊髄の運動ニューロンの進行性変性を特徴とする成人発症の神経変性疾患である。孤発性 ALS の原因は不明であり、有効な治療法は存在しない。Optineurin (OPTN) は 2002 年に Rezaie らによって原発性開放隅角緑内障 (POAG) の原因遺伝子として報告された遺伝子だが、2010 年に家族性 ALS の原因遺伝子の一つとして日本で報告された。また OPTN 変異のある ALS 患者の神経細胞内に OPTN 封入体の存在が確認されたが、それ以外にもアルツハイマー病やクロイツフェルト・ヤコブ病など他の神経変性疾患における封入体とも共局在していることが後に報告され、OPTN は様々な神経変性プロセスに関連している可能性が示唆されている。</p> <p>SOD1 や TDP-43、FUS など現在までに 10 以上の遺伝子における変異が家族性 ALS を引き起こすと報告されているが、これらの遺伝子のうち、OPTN は機能喪失によって典型的 ALS を引き起こすと考えられている唯一の遺伝子である。OPTN はタンパク質輸送、ゴルジ装置の維持、転写因子である NF-κB 経路などの細胞機能に関連すると知られている。NF-κB 経路に関しては、野生型 OPTN は NF-κB 活性を抑制するが、ALS を引き起こす変異 OPTN は、NF-κB の活性を抑制できないことが 2010 年に報告された。これは、異常な NF-κB の活性化が OPTN の変異に関連した ALS の病原性機序である可能性を示しているが、細胞死に直接関与しているかはこれまでわかっていなかった。</p> <p>そのため我々は、マウス神経芽細胞腫由来の培養細胞を用いて siRNA の手法で OPTN をノックダウンし、NF-κB の活性と細胞表現型の関係を調べた。まず OPTN ノックダウン細胞において NF-κB 活性を計測したところ、有意に活性が増加していた。これは、野生型 OPTN の正常な機能である NF-κB の活性抑制効果が、減弱したためと推測される。</p> <p>次に、OPTN のノックダウンが細胞死を引き起こすかについて、生細胞数の測定とトリパンプルーアッセイによる死細胞数の測定を行った。その結果 OPTN をノックダウンすることにより有意に細胞死を認めた。生細胞数の減少率に比べて死細胞数の割合が少なかったが、その理由としては OPTN のノックダウンが細胞増殖に影響している可能性が考えられた。</p> <p>さらに OPTN をノックダウンした細胞に野生型 OPTN を過剰発現させ、細胞死を抑制できるかどうかを検証した。野生型および POAG 関連変異である E50K は細胞死を抑制できたが、ALS 関連変異は抑制できなかった。また OPTN ノックダウンによる細胞死が NF-κB の活性増加と関連しているかを検証するため、NF-κB 活性を選択的に阻害する withaferinA 投与を行い細胞生存率を測定したところ、NF-κB 活性が完全に抑制された withaferinA の濃度において、細胞死は抑制された。</p> <p>最後に我々は NF-κB の下流分子を調べたところ、p53 や Bax、TNF-α など一部の分子で mRNA の上昇を認めた。p53 は Bax などプロアポトーシス遺伝子を活性化するアポトーシス調節因子であることが報告されており、今回の結果は OPTN の機能喪失により NF-κB が活性化し、ミトコンドリアを介したアポトーシスによる細胞死が惹起されたことが示唆された。</p> <p>我々の研究によって OPTN 変異による NF-κB 活性化が ALS 発症に深く関与しており、その抑制が治療のターゲットになり得る可能性が示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

Optineurin (OPTN) は家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子の一つとして報告された。10 以上の家族性 ALS の報告の中、OPTN は機能喪失によって典型的な ALS を引き起こすと考えられている唯一の遺伝子である。我々は Neuro2a を用い siRNA の手法で OPTN をノックダウンし、NF-κB 活性と細胞表現型を調べた。

まず OPTN をノックダウンした細胞の NF-κB 活性を調べたところ、control に対し有意に活性が増加した。また OPTN をノックダウンして細胞死測定を行ったところ、生細胞数の減少および死細胞数の増加を認めた。

次に OPTN をノックダウンした細胞に野生型 OPTN を強制発現させたところ、野生型は細胞死を抑制できたが、ALS 関連変異は細胞死を抑制できなかった。

また OPTN のノックダウンによる細胞死が NF-κB 活性増加を介しているかを検証するため、NF-κB 活性を選択的に阻害する withaferinA の投与を行ったところ、細胞死は抑制された。

さらに、OPTN のノックダウンによる NF-κB の活性上昇によって誘導される下流分子を調べたところ、p53 や TNF-α 等の分子で mRNA の上昇を認めた。

本研究では、OPTN の機能喪失により NF-κB が活性化し、細胞死が引き起こされたことを示した。このことから、NF-κB 活性の抑制が ALS 治療の標的となる可能性が示された。

以上の研究は OPTN 機能喪失による細胞死のメカニズムの解明に貢献し、ALS の病態機序の解明および治療開発に寄与するところが多い

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 12 月 26 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降