

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09328

研究課題名(和文) STIM1シグナルを介したCa²⁺ホメオスタシスの制御による筋ジストロフィー治療研究課題名(英文) Therapeutic strategy for muscular dystrophy via regulation of STIM1 mediated Ca²⁺ + homeostasis

研究代表者

清水 輝夫 (Shimizu, Teruo)

帝京大学・医療技術学部・特任教授

研究者番号：00107666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年筋細胞におけるカルシウムの恒常性を制御する分子としてSTIM1-ORAI1シグナルが注目されている。本研究では我々が細管集合体ミオパチーで見出したSTIM1新規遺伝子変異の分子病態解析を行った。この新規変異は既報告と異なりSTIM1の細胞質内ドメインに存在し、培養筋芽細胞に対する遺伝子導入実験の結果細胞内カルシウム濃度の著明な低下を引き起こすこと、タプシガルギンにより生じるORAI1の活性化に必要なSTIM1の斑状集積を阻害することを見いだした。以上より本変異ではこれまで考えられていたカルシウムの過剰流入とは異なる機序により細管集合体ミオパチーが惹起されているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recently, STIM1-ORAI1 signaling is receiving attention as molecules regulating calcium homeostasis in skeletal muscle. In this study, we investigated the pathomechanism of a novel mutation of STIM1 we identified in a family with tubular aggregate myopathy. In contrast to the previous reports, this novel mutation resides in the cytoplasmic domain of STIM1. Gene transfer experiments using cultured myoblasts exhibit that the mutant STIM1 induces marked reduction of intracellular calcium concentration and inhibits puncta formation of STIM1 with taptsigargin, which is necessary for ORAI1 activation. Taken together, in the family with the novel mutation, tubular aggregate myopathy is caused by a distinct pathomechanism from that previously proposed, i. e. excessive influx of calcium.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋ジストロフィー 細管集合体ミオパチー カルシウムホメオスタシス STIM1 ORAI1

1. 研究開始当初の背景

この20年余の間にDuchenne型筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィンや、肢帯型筋ジストロフィーの原因遺伝子である α - δ -サルコグリカン、さらには福山型先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子フクチンなどの遺伝子異常が明らかにされてきた。これらの遺伝子異常により筋細胞膜を細胞外基底膜や細胞骨格と強固に結びつけ細胞膜の安定性に寄与しているジストロフィン糖蛋白複合体が破綻し筋細胞膜が脆弱化するものと考えられるようになった。一方で筋ジストロフィーにおいては筋細胞内へカルシウムの過剰流入が起こり、ERストレスやミトコンドリアへのカルシウムの負荷、蛋白分解酵素の活性化が引き起こされ、これらの結果筋細胞は変性・壊死に陥るものと考えられてきた。しかし筋細胞膜の脆弱化からカルシウムの過剰流入へと到るプロセスの分子レベルでの解明は進んでいないのが現状である。

これに関連して、近年筋細胞におけるカルシウムの恒常性を制御する分子としてSTIM1-ORAI1 シグナルが注目されている。STIM1は筋小胞体内のカルシウムセンサーとして機能し、カルシウム濃度が減少するとオリゴマーを形成し膜表面のORAI1と結合する。するとORAI1は6量体となりチャンネルを形成し、細胞外から細胞内へカルシウムが流入する。また興味深いことにSTIM1が常に活性化された状態となる機能獲得型の同変異により遺伝性ミオパチーのひとつ、細管集合体ミオパチーが発症することが明らかにされた。またDuchenne型筋ジストロフィーのモデル動物であるmdxマウスではSTIM1-ORAI1シグナルが亢進していることや、同マウスにORAI1機能阻害マウスを交配すると筋ジストロフィーが改善することなど、STIM1-ORAI1シグナルとミオパチーの関連を示唆する報告が相次いでいる。これらのことから同シグナルが筋疾患全般に対する治療戦略を構築する際の共通する分子標的となる可能性が高まってきている。

2. 研究の目的

我々は最近細管集合体ミオパチーの1家系においてSTIM1のユニークな新規変異を見いだした。これまで同疾患で報告されているSTIM1の変異は全て管腔内ドメインにおけるアミノ酸置換を伴う点変異であったが、我々の症例は細胞質ドメインに存在するフレームシフト変異であった。この変異はSTIM1とORAI1の相互作用に重要と考えられている部位に生じていることから、本変異ではSTIM1-ORAI1シグナルの破綻からミオパチーが発症する可能性が推測される。本研究ではこの細管集合体ミオパチーにおける新規STIM1変異についてカルシウム動態や細胞の生存に与える影響を検討し、これにより筋疾患全般に対するカルシウムホメオスタシスの制御に基づく新しい治療法の基礎

を築くことを最終目標として本研究を開始した。

3. 研究の方法

(1)細胞質ドメイン変異STIM1の細胞内局在と形態の変化に関する解析

まず始めに我々が見いだした細胞質ドメインの新規変異であるc.1450_1451insGAをPCR法をベースに用いた手法により野生型STIM1に導入し、発現プラスミドを作製した。そして骨格筋に対する同変異STIM1発現の影響を検討するために、C2C12筋芽細胞へ野生型と変異を有するSTIM1遺伝子のトランスフェクションを行った。遺伝子導入3日目に蛍光顕微鏡を用いてSTIM1の細胞内の分布を観察すると共に、形態的な差異を定量的に解析した。

(2)変異STIM1が細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響の検討

変異STIM1が細胞内のカルシウム濃度どのような影響を及ぼすのかを検討するために、野生型および変異STIM1をHEK293細胞へトランスフェクションした。遺伝子導入2日後に培養液中にFura-2を添加し、顕微鏡にて各々の細胞のカルシウムイメージを取得し細胞内カルシウム濃度を測定した。

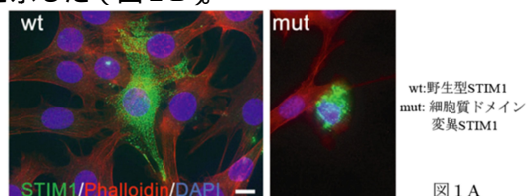
(3)タプシガルギン添加によるSTIM1の斑状集積形成の検討

培養細胞上清へのタプシガルギン添加の影響を比較検討するために、これまでに報告されている管腔内ドメインの点変異を野生型のSTIM1に導入して発現プラスミドを作製した。これと我々が見いだした細胞質ドメインの新規変異を導入したプラスミドをHela細胞にトランスフェクションしタプシガルギンを添加後、各変異STIM1の細胞内分布を蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1)細胞質ドメイン変異STIM1の細胞内局在と形態の変化に関する解析

野生型STIM1と細胞質ドメインの新規変異STIM1をC2C12筋芽細胞にトランスフェクションしてその細胞内の分布および形態を観察した。その結果野生型STIM1は細胞質内に広くびまん性に分布するのに対して、細胞質ドメイン変異STIM1は核周囲に限局し凝集体様の外観を呈した(図1A)。定量的解析の結果野生型STIM1は70%以上がびまん性分布を示したのに対して細胞質ドメイン変異STIM1の90%以上が凝集体様の分布を示した(図2B)。



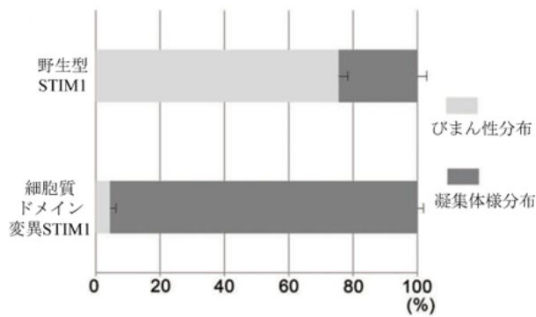


図 1 B

(2)変異 STIM1 が細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響の検討

既報告の管腔内ドメイン変異 STIM1 は ORAI1 の恒常的な活性化により細胞内カルシウム濃度を上昇させることが報告されている。そこで細胞質ドメイン変異 STIM1 では細胞内カルシウム濃度がどのように変化するかをカルシウムインジケータである Fura-2 を用いて検討した。その結果管腔内ドメイン変異とは逆に、細胞質ドメイン変異では野生型と比較して細胞内カルシウム濃度が低下することが明らかとなった (図 2)。

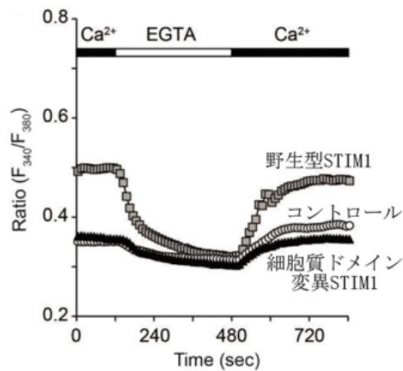
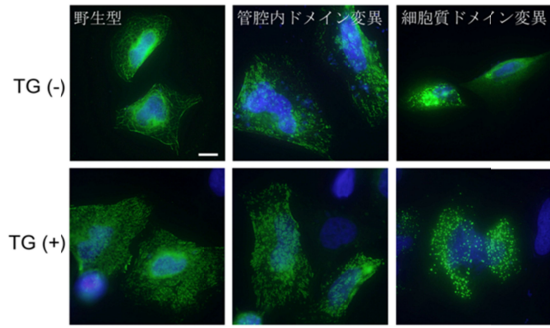


図 2

(3)タプシガルギン添加による STIM1 の斑状集積形成の検討

タプシガルギンは SERCA1 の阻害薬であり、培養上清に添加することにより小胞体内のカルシウムを枯渇させる作用を有する。これまでの研究から野生型 STIM1 はタプシガルギン添加により斑状の集積を形成することが知られており、一方管腔内ドメイン変異 STIM1 ではタプシガルギン添加の有無にかかわらず斑状集積を形成することが報告されている。そして STIM1 が ORAI1 を活性化するにはこの斑状集積形成が必要である。そこで管腔内ドメイン変異と細胞質ドメイン変異 STIM1 を培養細胞にトランスフェクトした後にタプシガルギンを添加して、STIM1 の斑状形成を観察した。その結果細胞質ドメイン変異ではタプシガルギン未添加の状態では前述のように凝集体様の分布を示し、さらにタプシガルギン添加後は野生型や管腔内ドメイン変異と全く異なり細胞質内にドット状の分布を示した (図 3)。



TG: タプシカルキン

図 3

(4) 考察

これらの研究結果により細胞質ドメイン変異は管腔内ドメイン変異と全く異なる機序により筋細胞に障害を与えている可能性が示された。すなわち野生型の STIM1 は 2 量体を形成しており、小胞体内のカルシウムが減少すると立体構造が変化し ORAI1 と結合、これを活性化する。その結果 ORAI1 から細胞内へカルシウムが流入する (図 4 A)。

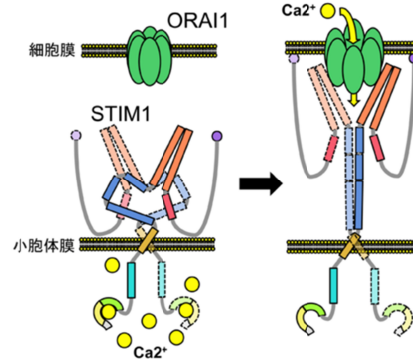


図 4 A

一方、管腔内ドメイン変異ではカルシウムが STIM1 に結合できなくなりためカルシウムの存在を感知できず、STIM1 は立体構造を変化させ ORAI1 を活性化する。その結果カルシウムの恒常的な流入が生じる (図 4 B)。

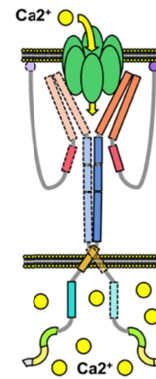


図 4 B

これに対して細胞質ドメイン変異では細胞質ドメインにおけるフレームシフトのために細胞膜と結合して ORAI1 との安定な相互作用に寄与する多塩基性ドメインを欠いている。このため小胞体内のカルシウムの枯渇を STIM1 が感知しても ORAI1 を適正に活性化することができず、細胞内のカルシウム濃度が低下するものと考えられた (図 4 C)。

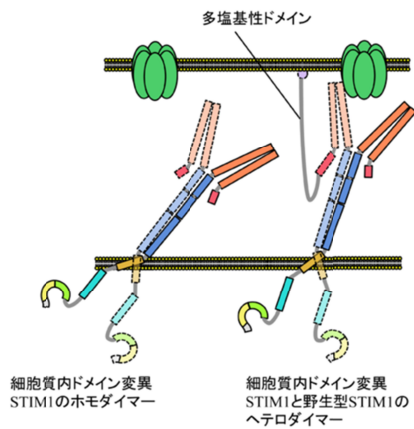


図 4 C

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4件)

- 1) Katsuta W, Aihara M, Hirose N, Saito F, Hagiwara H. Changes in oxidative stress severity and antioxidant potential during muscle atrophy and reloading in mice. *J Phys Ther Sci*. 2018; 30: 42-46. (査読有)
- 2) Aihara M, Hirose N, Katsuta W, Saito F, Maruyama H, Hagiwara H. A new model of skeletal muscle atrophy induced by immobilization using a hook-and-loop fastener in mice. *J Physic Ther Sci* 2017; 29: 1779-1783. (査読有)
- 3) Rader EP, Turk R, Willer T, Beltrán D, Inamori K, Peterson TA, Engle J, Prouty S, Matsumura K, Saito F, Anderson ME, and Campbell KP. Role of dystroglycan in limiting contraction-induced injury to the sarcomeric cytoskeleton of mature skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113: 10992-10997. (査読有)
- 4) Okuma H, Saito F, Mitsui J, Hara Y, Hatanaka Y, Ikeda M, Shimizu T, Matsumura K, Shimizu J, Tsuji S, Sonoo M. Tubular aggregate myopathy caused by a novel mutation in the cytoplasmic domain of *STIM1*. *Neurol Genet* 2016 February 1, doi: <http://dx.doi.org/10.1212/NXG.000000000000050> (査読有)

[学会発表](計19件)

- 1) 斉藤史明. Cas9 nickase を用いた筋強直性ジストロフィーにおける伸長 CTG リピート配列の除去. ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会合同大会). 神戸. 2017.12.6
- 2) Saito F. Excision of expanded CTG repeat of myotonic dystrophy with CRISPR/Cas9 genome editing. 23rd World congress of neurology. Kyoto. Japan Sep 19, 2017.
- 3) Hagiwara H. Changes in myokines IL6 and IL15 in serum and muscle during muscle atrophy

and reloading in the mouse disuse model. 23rd World congress of neurology. Kyoto. Japan Sep 17, 2017.

- 4) 斉藤史明. Excision of myotonic dystrophy CTG repeat using CRISPR/Cas9 genome editing. 第3回日本筋学会学術集会. 東京. 2017.8.4
- 5) 萩原宏毅. 廃用性筋萎縮と再荷重過程の酸化ストレス度および抗酸化力の変化. 第3回日本筋学会学術集会. 東京. 2017.8.4
- 6) 斉藤史明. 筋強直性ジストロフィーに対するゲノム編集治療の基礎的研究. 第2回日本ゲノム編集学会. 大阪. 2017.6.29
- 7) Shimizu T. Tubular aggregate myopathy caused by a novel mutation in the cytoplasmic domain of STIM1. 21st International congress of the World Muscle Society. Granada, Spain. Oct 6, 2016.
- 8) 斉藤史明. CRISPR/Cas9 による筋強直性ジストロフィーにおける伸長 CTG リピート配列の除去. 第89回日本生化学会大会. 仙台. 2016.9.26
- 9) 清水輝夫. Tubular aggregate myopathy における細胞質ドメイン変異 STIM1 の機能解析. 第2回日本筋学会学術集会. 東京. 2016.8.5
- 10) 萩原宏毅. ギプス固定による廃用性筋萎縮と再荷重のプロセスにおけるサイトカインと酸化ストレスマーカーの動態. 第2回日本筋学会学術集会. 東京. 2016.8.5
- 11) 清水輝夫. Novel mutation of STIM1 causes dysregulation of Ca^{2+} homeostasis in tubular aggregate myopathy. 第57回日本神経学会学術大会. 神戸. 2016.5.20
- 12) 真先敏弘. Rambukkana Anura. Recapitulation of ML-induced reprogramming of Schwann cells by artificial methods. 第57回日本神経学会学術大会. 神戸. 2016.5.18
- 13) 真先敏弘. Similarity of Schwann cell dedifferentiation in ML-induced reprogramming and Wallerian degeneration. 第57回日本神経学会学術大会. 神戸. 2016.5.18
- 14) 萩原宏毅. Dynamics of myokines in the process of muscle atrophy and reloading in the mouse disuse model. 第57回日本神経学会学術大会. 神戸. 2016.5.20
- 15) 斉藤史明. α -dystroglycan N 末端ドメインの過剰発現がマウス骨格筋に及ぼす影響に関する検討. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会). 神戸. 2015.12.2
- 16) 萩原宏毅. キフス固定法に代わる新規筋萎縮誘発法の開発. 第1回日本筋学会学術集会. 東京. 2015.8.8
- 17) 清水輝夫. Tubular aggregate myopathy における STIM1 の新規変異と C2C12 筋芽細胞への影響. 第1回日本筋学会学術集会. 東京. 2015.8.8
- 18) 斉藤史明. Analysis of the functional role of α -dystroglycan N-terminal domain in vivo. 第56回日本神経学会学術大会. 新潟. 2015.5.20
- 19) 斉藤史明. Tubular aggregate myopathy に

おける新規 STIM1 変異と筋芽細胞に及ぼす影響 .第 56 回日本神経学会学術大会 .新潟 . 2015.5.20

〔図書〕(計 2 件)

1) 大熊秀彦, 斉藤史明, 松村喜一郎 . 骨格筋症候群 (第 2 版)-その他の神経筋疾患を含めて-[上] 筋ジストロフィーおよび膜イオンチャンネル異常症 肢帯型筋ジストロフィー 常染色体劣性型 LGMD, LGMD2G, 日本臨床 2015; 0047-1852 別冊骨格筋症候群(上): 122-123.

2) 大熊秀彦, 斉藤史明, 松村喜一郎 . 骨格筋症候群 (第 2 版)-その他の神経筋疾患を含めて-[上] 筋ジストロフィーおよび膜イオンチャンネル異常症 肢帯型筋ジストロフィー 常染色体劣性型 LGMD, LGMD2H, 日本臨床 2015; 0047-1852 別冊骨格筋症候群(上): 124-125.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水輝夫 (Shimizu Teruo)
帝京大学・医療技術学部・特任教授
研究者番号 : 00107666

(2) 研究分担者

真先敏弘 (Masaki Toshihiro)
帝京科学大学・医学教育センター・教授
研究者番号 : 00585028

萩原宏毅 (Hagiwara Hiroki)

帝京科学大学・医療技術学部・教授
研究者番号 : 80276732

(3) 連携研究者

松村喜一郎 (Matsumura Kiichiro)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号 : 50260922

斉藤史明 (Saito Fumiaki)

帝京大学・医学部・准教授
研究者番号 : 40286993