

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08253

研究課題名（和文）iPS細胞を用いたSTIM1ミオパチーの骨格筋・心筋の病態の解明と治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of the Pathology of STIM1 Myopathy in Skeletal and Cardiac Muscles and Development of Therapeutic Approaches Using iPSCs

研究代表者

柴 直子（Shiba, Naoko）

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：00639289

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：STIM1遺伝子変異によるミオパチーは進行性に全身の骨格筋萎縮、筋力低下を来し、時に心筋傷害を合併する常染色体優性遺伝性の神経筋疾患である。STIM1は細胞内外のカルシウムの恒常性の維持に重要な働きをしているタンパク質であり、その機能の破綻によりカルシウム動態に異常を来すことが根本的な原因と考えられているが、その病態や自然歴は不明な点が多く、治療法がまだ確立されていない。本研究では、患者由来iPS細胞およびそのisogenicコントロール細胞から心筋細胞及び骨格筋細胞を作成し、病態メカニズムと治療薬の開発を目指して研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

STIM1は生体内でCa²⁺恒常性の維持に重要な働きを担うことが知られているが、STIM1遺伝子変異によるミオパチーの病態は不明な点が多く治療法が確立されていない。本研究は、本疾患の骨格筋と心筋の病態について患者由来iPS細胞から、心筋細胞および骨格筋細胞を作成し、両細胞について比較解析を行うことでそれぞれの臓器での病態を明らかにし、原因に基づく治療法を開発することを目的として研究を進めた。骨格筋分化誘導に難渋したが、特定のセーフハーバー領域へのTet-On-MyoD1強制発現システムの導入を行うことで短期間での高純度の骨格筋作成が可能となり、今後の骨格筋病態研究に応用し得る成果である。

研究成果の概要（英文）：Myopathy caused by STIM1 gene mutations is a progressive autosomal dominant hereditary neuromuscular disorder characterized by generalized skeletal muscle atrophy, muscle weakness, and occasionally concomitant myocardial injury. STIM1 is a protein that plays an important role in maintaining the homeostasis of calcium inside and outside cells, and it is believed that the disruption of its function is the underlying cause of abnormal calcium dynamics. However, since it is a new disease concept, many aspects of its pathophysiology and natural history are still unknown, and there is no established treatment. In this study, we generated cardiac and skeletal muscle cells from patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs) and their isogenic control cells to investigate the pathogenic mechanisms and develop therapeutic drugs.

研究分野：神経筋疾患

キーワード：ミオパチー STIM1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Stromal interaction molecule 1 (STIM1) は小胞体膜上に存在し、小胞体内の Ca^{2+} 濃度を感知し、細胞膜上に存在する ORAI1チャネルを介する細胞外から細胞内への Ca^{2+} の流入を制御することで、細胞内外の Ca^{2+} の恒常性の維持に重要な役割を担っている (図1)。2013年に STIM1遺伝子異常により進行性のミオパチーを来すことが報告され (以下、STIM1 ミオパチーとする) (Bohm, et al. *Am J Hum Genet* 92, 271-278 (2013))、患者の筋芽細胞や線維芽細胞を用いた解析では筋小胞体内の Ca^{2+} 濃度に関わらず ORAI1から細胞内への Ca^{2+} 流入が常に亢進していることが確認されているが、その病態については不明な点が多く、有効な治療法はまだ確立されていない。心筋伝導障害や収縮能低下を合併した症例も散見され (Hedberg, et al. *J Neurol* 261, 870-876 (2014))、STIM1が心筋でも強く発現している点からも、他の神経筋疾患同様に心筋症による心不全のリスクが高いと推察される。心筋における STIM1の働きについては当疾患が発見される以前から基礎研究の分野では注目されており、大動脈結紮による心後負荷モデルラットの肥大心筋では STIM1遺伝子の発現が亢進し、心筋リモデリングへの関与が示唆されている (Troupes, et al. *Circ Res* 121, 125-136 (2017))。また、STIM1過剰発現モデルマウスでは心筋肥大を来し、その培養心筋細胞の解析では細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的な上昇および拡張期の小胞体からの Ca^{2+} 放出が不規則かつ高頻度で認められることが報告されている (Correll, et al. *J Mol Cell Cardiol* 87, 38-47 (2015))。そのメカニズムとして、STIM1を介する ORAI1からの Ca^{2+} 流入が増加し細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することで、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性リン酸化酵素 (CaMKII) の活性化、SERCA から小胞体内への Ca^{2+} の汲み上げを抑制する phospholamban (PLB) のリン酸化活性化が誘導され細胞内 Ca^{2+} 濃度が相乗的に上昇し、拡張期には細胞内 Ca^{2+} 濃度が十分に低下せず拡張不全を来し、収縮期には小胞体内 Ca^{2+} 濃度の低下から Ca^{2+} 放出が減少し収縮不全を来すと考えられている。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇による小胞体やミトコンドリア代謝へのストレス、 Ca^{2+} のそのものの細胞毒性も心筋細胞の傷害に関与している可能性が考えられる。また、STIM1を過剰発現させた培養心筋細胞に対して ORAI1 ブロッカーである BTP2を投与すると拡張期の細胞内への Ca^{2+} 異常放出が消失し、さらに、細胞死が抑制されることが報告されており、これらの知見は STIM1 ミオパチーの臨床に応用し得ると考えられる。

2. 研究の目的

STIM1 ミオパチー患者の心筋・骨格筋傷害のメカニズムについて、患者由来 iPS 細胞から分化誘導して作成した心筋細胞および骨格筋細胞を解析し、病態を明らかにするとともに治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

患者由来の iPS 細胞から心筋細胞、骨格筋細胞に分化誘導し、分子生物学的、形態学的、生理学的実験手法を用いて疾患の細胞の性質について解析する。正常コントロールとして、患者由来の iPS 細胞の遺伝子変異を CRISPR/Cas9 システムを用いて修復した iPS 細胞から作成した。

患者由来の iPS 細胞を用いた本研究の実施については、信州大学遺伝子解析倫理委員会で承認が得られ、患者および保護者への研究概要の説明および書面での同意を取得した。

4. 研究成果

STIM1遺伝子変異を有する患者の皮膚線維芽細胞に対してエピゾーマルベクターを用いて *Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*L-Myc* を遺伝子導入することにより iPS 細胞を作成した。100塩基の1本鎖オリゴヌクレオチド をドナーとして

CRISPR/Cas9システムでノックインすることで患者変異を修復した iPS 細胞をコントロールとして使用した(図1)。得られた iPS 細胞に対して AAVS1遺伝子領域にカルシウム感受性蛍光タンパク遺伝子である GCaMP7遺伝子をノックインした。

これらの細胞からマトリゲル®と Activin A、BMP-4、XaV を用いて心筋細胞を作成し、その表現型について解析した。分化50日目の心筋細胞の RNA-Seq

による網羅的な遺伝子発現解析では複数の発現変動遺伝子(CASQ1, CASQ2 低下、c-FOS 上昇など)が検出された。共焦点蛍光顕微鏡を用いた Ca²⁺イメージングにて細胞内 Ca²⁺動態を解析し、患者由来細胞で不整リズムが有意に増加していた。STIM1抗体を用いた心筋細胞の免疫染色では患者由来細胞で異常凝集を認め

た(図2)。ウェスタンブロットでは CaMKII による PLB のリン酸化が促進されていることが確認され、仮説どおりの細胞内 Ca²⁺濃度の増加が示唆された。上記の結果を受け細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア活性の解析、CHOP 抗体などを用いた小胞体ストレスの評価、トリパンブルーを用いたネクロシスの評価、カスパーゼ活性アッセイによるアポトーシスの評価などを行う予定である。

さらに、STIM1過剰発現モデルに対する効果が報告されている ORAI1拮抗薬である BTP2、ミトコンドリア酵素活性低下に対して有効性が確認されているビタミンやカルニチンなど、効果が期待される薬剤を培養心筋・骨格筋細胞に投与しその効果について検証する予定である。

iPS 細胞からの骨格筋作成については、分化誘導プロトコールの確立に難渋した。まずは HGF、FGF2、IGF1、BMP-1 レセプター阻害剤などを用いた directed differentiation 法を試みたが解析可能な純度の骨格筋が得られず、MyoD 1 強制発現による direct differentiation 法を検討した。はじめに、センダイウイルスを用いたキットによって分化誘導を行ったところ、field

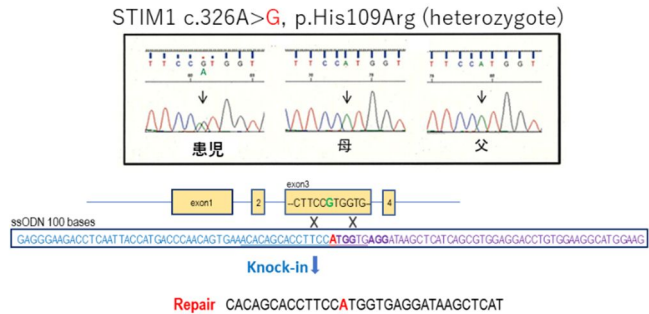


図 1. CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子変異の修復

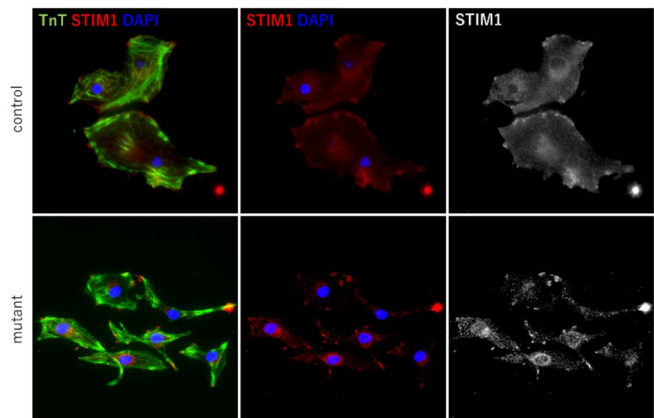


図 2. 心筋細胞 (day40) の免疫染色 トロポニン(緑) STIM1(赤) 患者由来細胞では細胞質内に STIM1が凝集している。

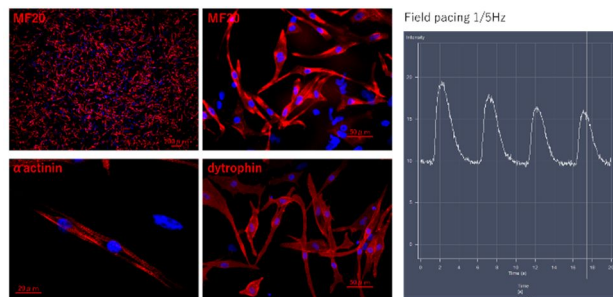


図 3. センダイウイルスキットを用いた骨格筋細胞 (day19) の免疫染色と 1/5Hz field pacing 下の Ca²⁺イメージング

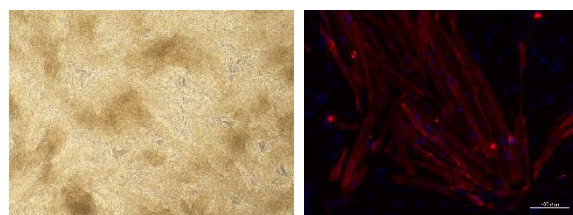


図 4. Tet-on-MyoD1 強制発現による骨格筋細胞 (day14) の位相差(左)と MHC 免疫染色(右)

stimulation 下での Ca^{2+} イメージングによる解析が可能な程度に成熟した骨格筋が得られたが（図 3）分化誘導効率が安定しないため断念した。次に、iPS 細胞に対して Tet-On-MyoD1 強制発現系をセーフハーバーである CLYBL 領域に TALEN プラスミドを用いて遺伝子導入し、ドキシサイクリン投与による MyoD1 強制発現による分化誘導を検討した。培養条件によっては高純度の骨格筋細胞が得られることが分かった（図 4）が、分化誘導効率の安定化や成熟化に関しては課題が多く、さらなる条件検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 柴直子, 高野亨, 稲葉雄二, 嶋田祥子, 藤森充帆, 夏目岳典, 新美妙美, 福山哲広	4. 巻 53S
2. 論文標題 STIM1遺伝子異常によるtubular aggregate myopathyの1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 脳と発達	6. 最初と最後の頁 S342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴直子, 高野亨, 稲葉雄二, 嶋田祥子, 藤森充帆, 夏目岳典, 新美妙美, 福山哲広
2. 発表標題 A case of tubular aggregate myopathy with miosis and hyposplenism caused by STIM1 mutation
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴直子, 佐藤充人, 中村昭則
2. 発表標題 ABD1領域の変異によるDMD心筋症に対するエクソンスキッピング治療の検討
3. 学会等名 精神・神経疾患研究開発費「疾患モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発」
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------