

令和元年6月11日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16244

研究課題名(和文) Emery-Dreifuss型筋ジストロフィーの核膜構造と核内Ca動態の検討

研究課題名(英文) Structure of nuclear envelope and Nuclear calcium transient of Emery Dreifuss muscular dystrophy

研究代表者

下島 正也 (Shimajima, Masaya)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：00613754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：エメリードレフュス型筋ジストロフィー(EDMD)の病態解明のため、原因蛋白であるエメリン、ラミン、ネスプリンをノックダウンし、核膜陥入層の評価、及び本疾患のメカニズムの解明を行った。エメリン、ラミンA/Cをノックダウンさせたラット胎仔心筋、EDMD由来のiPS細胞を作製した。エメリン、ラミンA/Cの発現量が減少することで、核膜陥入層の減少、及び核面積が増大が認められたことより、核の構造維持にラミンA/Cが関与している可能性が示唆された。また、pERKの発現量については有意差はみられなかったものの、血清存在下にてHDAC3の核内の分布が低下することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エメリードレフュス型筋ジストロフィー(EDMD)のメカニズムについては、様々な研究報告がなされているが、エメリンやラミンといった核蛋白の異常が原因であることを除いてあまり解明されていない。今回、エメリンが欠損したときと同様にラミンノックダウン時にも核の構造変化をきたすこと、また、HDAC3のようなヒストン脱アセチル酵素の分布の変化もきたしていることを示唆されるような結果が得られたことより、HDAC3によって制御されるシグナルの更なる解析をすすめることによって、EDMDの病態解明及び創薬につながっていく可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) is caused by nuclear envelope protein such as emerin, lamin and nesprin. To examine the role of lamin, emerin and nesprin in cardiomyocyte, we produced EDMD-iPS derived cardiomyocyte, rat neonate cardiomyocyte during siRNA-mediated lamin, emerin and nesprin. The incidence of cardiomyocyte with nuclear invagination was significantly decreased and the nuclear size was significantly increased. These data suggest that lamin has a pivotal function in the maintenance of nuclear invagination and nuclear size. To clarify mechanism of EDMD, the expression of pERK and HDAC3 was assessed. Although the expression of pERK was not changed significantly, the distribution of HDAC3 in nuclear was decreased under horse serum condition.

研究分野：循環器内科

キーワード：エメリードレフュス型筋ジストロフィー ラミン エメリン 心筋症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー(EDMD)は、核蛋白の異常によって、心筋障害、上下肢の筋力低下、関節拘縮を3徴とする疾患であり、病態、及び治療法は明らかにされていない。エメリンは核内膜に位置する核蛋白の一つであり、核の構造維持、クロマチン構造維持、転写活性の調整、核内のシグナル伝達経路と核内で多彩な機能を有している。EDMD はエメリン欠損、(Circulation.2005;111:3352-3358)、ラミン変異(Hum Mutat. 2011;32:152-67)、ネスプリン変異(Muscle Nerve, 2015 51:145-147)において心筋障害が生じることが報告されている。核内カルシウム動態は、細胞質カルシウム動態に追従する動態を示しているが、細胞質と核内のカルシウム動態の違いには核膜が重要な役割を果たしている (J Cell Sci. 2008;121:186-95)。核膜には一部陥入している部位があり、その部位よりカルシウムの放出が始まっており、核膜陥入が核内カルシウム動態に重要な役割を果たしている (Biochem Biophys Res Commun.2003;308:826-33)。このカルシウム動態がカルシウム濃度依存性シグナルでありかつ、心肥大シグナルであるCAMK やHDAC の発現に重要な役割を果たしている(Eur J Clin Invest.2006;36:614-20)。大動脈狭窄(TAC)モデルマウスにおいて、TAC 1週間後で核膜陥入が減少し、細胞質のカルシウムとは独立して、核内カルシウム動態が変化することが報告されている(Circulation.2014;130:244-55)。しかしながら、核膜蛋白の異常により心筋の核内カルシウム動態が変化するという報告はほとんど見られていない。我々は、EDMD の原因蛋白のひとつであるエメリンのノックダウンさせた胎児心筋、疾患特異的iPS 細胞由来の心筋細胞を用いてエメリンが核膜陥入に寄与していること、核内カルシウム動態を変化させることを発見した。今回、EDMD の原因蛋白であるラミン、ネスプリンの異常によっても同様の核膜陥入の減少および核内カルシウム動態の変化をきたしていることが予想され、核内カルシウム濃度依存性に発現が病態に寄与している可能性があるのではないかと考えられた。これらの検討によりEDMD の病態解明及び創薬への足掛かりになるのではないかと考えている。

2. 研究の目的

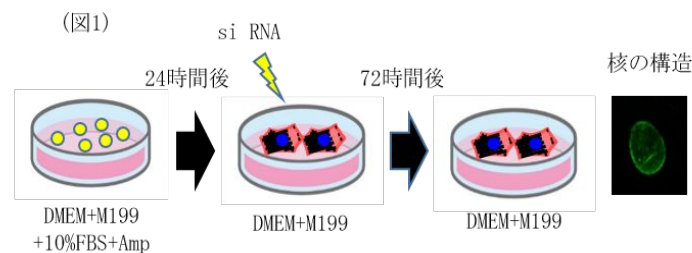
EDMD の原因蛋白であるラミン、ネスプリンの核膜陥入及び核内カルシウム動態に対する役割を明らかにし、治療応用へと展開することを目的とする。具体的な計画内容として、(1) ネスプリン、ラミンをノックダウンしたラット胎児心筋を用いて核の構造、核内カルシウム動態の評価(2) 核膜陥入の減少および、カルシウム動態の変化後における核内転写因子の挙動の変化に関して検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) siRNA を用いて、ラミン A/C、ネスプリンをノックダウンさせた新生仔心筋を作製することを試みる。具体的には、ラット新生仔より心筋を取り出し、ラット新生仔心筋を、パーコールを用いて抽出した。その後、ゼラチンとファイブロネクチンコーティングしたディッシュの上で24時間培養した。その後、リポフェクタミンを用いて siRNA を導入し、72時間後に qPCR を用いてラミン A/C、ネスプリンの発現量を評価した。

(2) ラミン A/C、ネスプリンをノックダウンさせた新生仔心筋の核膜陥入層の変化を、共焦点顕微鏡を用いて評価する。具体的には、siRNA 添加72時間後にラミン B の免疫染色を行うことで、核膜を同定し、核膜陥入層の割合を及び、Hochest 染色にて核を同定し核面積を評価する(図1)。

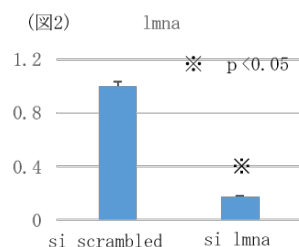
(3) EDMD 患者より作製した疾患特異的 iPS 細胞を用いて、核蛋白の変化によって生じると考えられる下流シグナル(ERK、NFAT、HDAC3)を免疫染色、qPCR、ウエスタンブロット法を用いて評価した。



4. 研究成果

(1) ラミンノックダウン心筋の系の構築

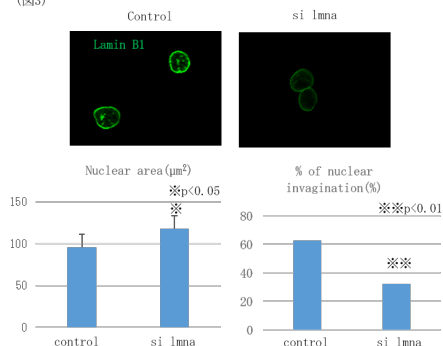
ラミン A/C 及び、ネスプリンをノックダウンさせた系を作成する必要があった。持続時間は短いものの、比較的簡易的に行うことのできる siRNA を用いて、ラミン A/C、ネスプリンのノックダウンを行った。siRNA にてノックダウンさせた72時間後に、ラミン A/C、ネスプリンの発現量を qPCR を用いて評価を行った。ラミン A/C をノックダウンさせた胎児心筋の系を確立することができたが、(図2) ネスプリンについては、何種類かの siRNA を用いてノックダウンを試みるも、十分なノックダウン効果を得ることができなかった。



(2) ラミンノックダウン新生仔心筋の形態学的評価

ネスプリンをノックダウンさせたラット新生仔心筋の系が構築できず、ラミン A/C をノックダウンさせた新生仔心筋の系のみで、核膜陥入層の評価を行った。核膜の評価にはラミン B1 を用いた。ラミン A/C をノックダウンさせた群は、コントロール群と比較して有意に核膜陥入層の減少、核面積の増加を認めた(図 3)。これは以前報告したエメリンをノックダウンさせた新生仔心筋にきたした変化と同様であり、ラミン A/C がエメリンと同様に核膜陥入層の形成に関わっていることが示唆された。

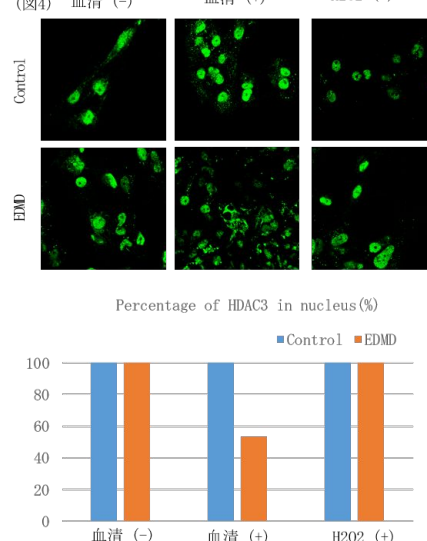
(図3)



(3) EDMD の病態解析

EDMD の病態解明のために EDMD 患者由来の iPS 細胞から作製した心筋細胞を用いて各種解析を行った。まずは、EDMD では ERK のシグナルを介してアポトーシスの亢進をきたしているとの報告があり、ERK、pERK の免疫染色を行ったところ、pERK の蛍光輝度の上昇が EDMD 由来患者では優位に認められたため、ウエスタンブロットを行ったが、蛋白発現量には有意差は認められなかった。また、カルシウムがセカンドメッセンジャーとなる NFAT についても免疫染色を施行したが、核内への NFAT の細胞内分布、移行率に有意差は認められなかった。また、エメリンが HDAC3 の活性化をコントロールしているとの報告があったため、HDAC3 の免疫染色を行ったところ、血清存在下にて HDAC3 の核内蓄積が低下していることが示唆された(図 4)。

(図4) 血清 (-) 血清 (+) H202 (+)



(4) 今後の展望

本研究において、ラミンをノックダウンさせることで、エメリンをノックダウンさせたときの同様の核の構造変化をきたす可能性があることが示唆された。今後、エメリンと同様の核内カルシウム動態をきたすかどうかを検討していく。現在、EDMD 由来 iPS 細胞にマイクロアレイのデータ解析中であり、HDAC3 によって制御されるシグナルの発現の変化について検討中である。今後これらのことが解明されることで、EDMD の更なる病態解明、及び創薬に貢献できるものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

下島正也: エメリンが核膜陥入層及び、核内カルシウムに重要な役割を果たす、査読なし、金沢大学十全医学会雑誌 127 巻 2 号、49-50、2018

〔学会発表〕(計 1 件)

Masaya Shimojima: Emery Dreifuss Muscular Dystrophy is caused by change of nuclear invagination and calcium transient. American Heart Association Scientific Sessions 2017,

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山岸正和、林研至、吉田昌平、岡田寛史

ローマ字氏名：Yamagishi Masakazu, Hayashi Kenshi, Yoshida Shohei, Okada Hirofumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。