

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04846

研究課題名(和文)恒常的カルシウム流入により引き起こされる筋ジストロフィーの病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis of muscular dystrophies caused by constitutive extracellular calcium influx

研究代表者

野口 悟 (Noguchi, Satoru)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第一部・室長

研究者番号：00370982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：細管集合体ミオパチー患者に見出した2種類のORAI1遺伝子変異について、患者細胞およびHEK細胞への発現系を用いた解析を行ったが、両変異体の発現細胞ではともに、細胞外液から細胞内へのカルシウムイオン流入が観察され、変異ORAI1は恒常的に活性化していることを示した。新たに作成したSTIM1優性遺伝型変異マウスは低体重を示し、骨格筋で著しい筋萎縮が観察された。この筋萎縮は筋線維萎縮によるものではなく、ジストロフィック変化に伴う、筋線維の脱落、線維化および異所性脂肪組織による置換によるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We identified two dominant mutations in ORAI1 gene in tubular myopathy patients. The patients' cells and the cells expressing the mutated ORAI1 showed constitutive activation of ORAI1 channels showing extracellular calcium entry dependent on extracellular calcium concentration. We chronologically analyzed the muscle pathology of mouse model with a dominant ORAI1 mutation. The muscle phenotypes were quite milder, nevertheless they showed necrosis and regeneration. We produced new mouse model with a dominant STIM1 mutation. These mice revealed small body weight and had atrophic muscles. On muscle pathology, severe phenotypes were observed showing remarkable dystrophic changes, necrosis and centrally-placed fibers as well as enhanced fibrosis and ectopic adipose tissue replacement.

研究分野：生物化学

キーワード：遺伝性疾患 ミオパチー カルシウム 病態 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

細管集合体 (tubular aggregates: TA) は、周期性四肢麻痺を含む様々な筋疾患骨格筋組織で認められる細胞内構造体である。光学顕微鏡レベルではゴモリ染色で赤染する蓄積物として、電子顕微鏡では規則的に積み重なったパラクリスタル様の管状構造物として観察される。筋小胞体 (SR) タンパク質を多く含むことから、SR をその起源とし、その形成に細胞内カルシウム濃度の上昇が関連すると考えられている。また、近交系の高齢野生型雄マウスに見られることから、テストステロンとの関連も報告されている。しかしながら、TA の形成機序および TA の生理学的機能は全く不明である。特に、原因の異なる多様な筋疾患で TA が出現する事実を説明できる統一的な病態機序は未だ明らかではない。近年、次世代シーケンサーを用いた原因遺伝子探索により TA を認める筋ジストロフィー (TAM) および筋無力症で、新規原因遺伝子 (*STIM1*, *GFPT1*, *DPAGT1*) が次々と同定された (*AJHG* 2013, *AJHG* 2011, *AJHG* 2011)。その中で、*STIM1* は SR にある膜タンパク質であり、SR 内カルシウム濃度を監視し、その欠乏時に細胞膜にあるストア作動性カルシウムチャネル (SOCC) の開口を促し、カルシウムを細胞外から細胞内に取り込ませる。一方、同定された遺伝子変異を有する *STIM1* は恒常的に活性化し、SR 内のカルシウム濃度に関係なく、SOCC を常に開口させることが見出されている。しかしながら、細胞内への多量のカルシウム流入から TA 形成に至る過程は説明出来ていない。また、*GFPT1*, *DPAGT1* は N-グリコシド糖鎖合成経路に関わる酵素遺伝子であり、TA 形成との関わりは説明出来ていないばかりか、カルシウムの細胞内制御との関連も全く、予期できないものである。我々は独自に、TA を有する筋疾患患者の全エクソーム解析を行い、*GFPT1* 遺伝子の新規変異患者の他に、新規原因遺伝子として *ORAI1* 遺伝子 (SOCC 分子) の優性変異を見出した (*Hum Mol Genet* 2014)。この遺伝子変異では、チャンネル孔に面したアミノ酸残基の点変異により恒常的に SOCC が開口し、*STIM1* 遺伝子変異と同様に細胞内への恒常的カルシウム流入が起こっていると考えられた。それでは、なぜ、骨格筋線維の N-グリコシド糖鎖不全により TA 形成を引き起こすのであろうか。細胞実験から *STIM1* の糖鎖結合部位への変異導入により SOCC の開口が引き起こされること (*JBC* 2014) が報告されている。我々は、これらの事実を踏まえ、これら一連の遺伝子変異が図 2 のように SOCC の恒常的開口を引き起こしているのではないかと仮説を立てた。すなわち、正常状態では SR のカルシウム貯蔵により SOCC は閉じているのに対して、*STIM1* 変異では *STIM1* の恒常的活性化による SOCC の開口を、*ORAI1* 変異では SOCC 自体の変異により恒常的開口を、*GFPT1* 及び *DPAGT1* 変異では *STIM1* タンパク質の糖鎖不全による SOCC の恒常的開口を引き起こすというものである。

2. 研究の目的

本研究では、この恒常的な細胞内へのカルシウム流

入がいかに関ジストロフィーを発症しうるのか、また、いかに TA は形成されるのかを、モデル動物を作成・解析することで、分子レベルで迫ろうとするものである。また、本研究では、SOCC の阻害薬について、スクリーニングの系を作成し、モデル動物にて前臨床研究を行い、将来の治療法の開発につなげたいと考えている。そのため、本研究では、上記の仮説を証明することにより TA の形成機序に対する統一見解を確立することを目的とした。

- 1) 新規の *ORAI1*・*STIM1* 遺伝子変異をもつ患者細胞にて SOCC の開口を解析し、変異の病態への関与を解明する。
- 2) *GFPT1* 遺伝子変異を見出した患者細胞における糖鎖不全の解析と SOCC の糖鎖不全がもたらす活性への影響を明らかにする。
- 3) Testosterone 投与による SOCC の活性化の解析とその活性化機構の詳細を明らかにする。
- 4) *ORAI1* 変異 *STIM1* 変異 TAM モデルを作成し、TAM の発症機序及び骨格筋疾患における TA の生理学的意義を個体レベルで解明する。
- 5) モデル細胞およびモデルマウス骨格筋における TA の形成過程の詳細を解析する。
- 6) モデルマウス由来骨格筋細胞にて、SOCC の活性化を抑制しうる化合物をスクリーニングする。

3. 研究の方法

(1) 新規遺伝子変異に由来する TAM 患者細胞での SOCC の開口の解析

新規 *STIM1*, *ORAI1* 遺伝子変異を見出した患者細胞を培養し、筋細胞に分化させた。筋細胞の含量が少ない場合は、アデノウイルスにより MyoD を強制発現することで、筋細胞に分化転換させた。細胞内に取り込ませた蛍光カルシウムプローブ (Fura-2) を用いて培地から細胞内への SOCC を介したカルシウム流入を蛍光顕微鏡下にて測定した。培地中のカルシウム濃度を変化させることで、細胞外環境のカルシウム濃度に対する応答を解析した。

また、新規に見出された優性変異を持つ *STIM1*cDNA または *ORAI1*cDNA を作製し、発現ベクターに入れ替えた後、HEK293 細胞にて発現させた。発現した *STIM1*, *ORAI1* の局在の確認後、前述の方法にて SOCC を介した細胞内へのカルシウム流入を測定した。

(2) TAM 患者骨格筋細胞の筋小胞体内カルシウム濃度の測定

ER-局在性シグナルのついた *cameleon* を発現するプラスミドを用いた。エレクトロポレーションにより TAM 患者細胞およびマウス細胞にトランスフェクションした。外液のカルシウム濃度を変化させ、細胞質カルシウム濃度と体内カルシウム濃度の比較を行った。

(3) *GFPT1* 変異患者細胞における糖鎖修飾の解析と SOCC の開口の解析

GFPT1 変異患者細胞内の GlcNAc および

UDP-GlcNAc 量を HPLC にて測定 (*Anal Biochem* 2010) し、健常人由来細胞と比較する。また、同細胞及び患者筋由来 STIM1 および ORAI1 タンパク質の N-型糖鎖修飾をウエスタンブロットにて解析した。患者細胞での、細胞内へのカルシウム流入を測定した。

(4) *Orai1* 遺伝子及び *Stim1* 遺伝子優性変異 TAM モデルマウスの作成

見いだした優性変異ヒト *ORAI1* G98S を骨格筋特異的プロモーター下において発現するトランスジェニックマウスを外注にて作成した。さらに、*Orai1* G100S および *Stim1* H109Q 優性変異を持つノックインマウスを *Crispr/Cas9* システムにより作成した。週齢を追って経過観察するとともに、早期 (4 週齢) 及び中期 (20 週齢) にて、マウスの運動機能 (ホイールケージでの自発運動、呼吸筋の測定、握力)、単離骨格筋の収縮力を測定した。

(5) 優性変異ノックインマウスの筋病理解析

骨格筋の病理学観察及び電子顕微鏡観察を行い、筋変性、TA 形成の有無を解析した。筋病理は、定法に従って、ルーチン染色を行った。TA は筋小胞体 (SR) タンパク質を多く含むことから、SR をその起源とし、その形成に細胞内カルシウム濃度の上昇が関連すると考えられている。SR に局在するタンパク質 *Ryr1*、*Casq1*、T 管に局在する *DHPR*、およびミトコンドリアの染色も合わせて行った。

4. 研究成果

(1) 新規遺伝子変異に由来する TAM 患者細胞での SOCC の開口の解析

新たに、*ORAI1* 変異 1 名、*STIM1* 変異 3 名の細胞に於いて SOC 開口の測定を行った。いずれの患者細胞または変異タンパク質の導入においても、細胞外から細胞内への恒常的なカルシウム流入が観察され、SOC の恒常的開口が TAM をひきおこすというコンセプトを支持していた。

(2) TAM 患者骨格筋細胞の筋小胞体内カルシウム濃度の測定

患者骨格筋細胞並びにモデルマウス線維芽細胞に、ER-局在性シグナル Ca^{2+} センサーを発現させて、SR 内のカルシウムを測定した。正常細胞、野生型細胞と比較して、患者細胞、モデルマウス細胞では、蛍光比に全く変化は見られなかった。このことは、少なくとも培養細胞レベルでは、SR 内カルシウムには影響のないものと考えられた。

(3) *GFPT1* 変異患者細胞における糖鎖修飾の解析と SOCC の開口の解析

GFPT1 遺伝子変異患者細胞において、細胞内 UDP-GlcNAc 量の減少を認めた。しかしながら、骨格筋組織における *STIM1* の糖鎖修飾の変化は検出できなかった。*GFPT1* 変異患者細胞では、(1)と同様に程度は低いものの、細胞外からの細胞外から細胞内への恒常的なカルシウム流入が観察された。また、

STIM1 の活性化を示す、PKA リン酸化部位へのリン酸化が観察された。今後、このリン酸化は、SOCE 活性化のバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

(4) *Orai1* 遺伝子及び *Stim1* 遺伝子優性変異 TAM モデルマウスの作成

優性変異したヒト *ORAI1* を過剰発現する Tg マウスを作成したが、生後致死を示した。原因については、解明できなかった。しかしながら、Tg 胎仔マウス下肢骨格筋では筋線維の崩壊などは認められなかった。*Orai1* G100S および *Stim1* H109Q 優性変異を持つノックインマウスは、通常通りメンデル則に沿って産出された。*Orai1* G100S ヘテロマウスの前脛骨筋の筋張力は低下していた。しかしながら、筋サイズには異常はなかった。筋病理では、ごく稀に、壊死線維、中心核線維、再生線維が観察された。一方、*Stim1* H109Q 優性変異ノックインマウスは、体格が小さく、骨格筋も高度に萎縮していた。

(5) 優性変異 *Stim1* ノックインマウスの筋病理解析

優性変異 *Stim1* ノックインマウスの骨格筋は、高度に萎縮が見られたが、筋壊死、再生様の組織像を示すとともに、筋線維数も減少していた。しかしながら、胎児型ミオシン重鎖陽性を示す再生筋、活性化筋衛生細胞は観察されなかった。また、線維化、脂肪浸潤が強く見られた。はっきりとした TA は観察されなかったものの、ミトコンドリアの筋線維中央での欠損と SR タンパク質、T 管タンパク質の筋線維中央での集積が見られた。このことから、モデルマウスは、筋ジストロフィー様の筋病理を示すものの、その再生能力は低く、かつ、残存する筋線維には、骨格筋カルシウム制御に関わる遺伝子の変異によって引き起こされる、コア様の構造が見られ、カルシウム動態の異常が強く示唆されるものであった。さらに、TA 出現の前段階として、コア様の構造が出現する可能性が強く示唆された。これらの情報は、未だに、分子病態のはっきりしていない本疾患の発症機序を考える上で、強い示唆を与えるものであった。

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 7 件)

1. Noguchi S, Nishino I: A novel mutation identified in a Japanese patient with LMNA-related congenital muscular dystrophy. **Human Genome Variation**, 2018 in press
2. Hara Y: Cell surface flip-flop of

phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. Nature Communications,2018 in press

3. Noguchi S, Nishino I: Two novel VCP missense variants identified in Japanese patients with multisystem proteinopathy. **Human Genome Variation**, 5, 9, 2018
4. Nishino I, Noguchi S: Sialic acid deficiency is associated with oxidative stress leading to muscle atrophy and weakness in the GNE myopathy. Hum Mol Genet. 26(16): 3081-3093, Aug, 2017
doi: 10.1093/hmg/ddx192. PMID: 28505249
5. Noguchi S, Nishino I: Muscle Weakness and Fibrosis Due to Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Events in Collagen VI Deficient Congenital Muscular Dystrophy. EBioMedicine. 15(2017): 193-202, Feb, 2017
doi: 10.1016/j.ebiom.2016.12.011. PMID: 28043812
6. Hara Y :Neurol Genet. Tubular aggregate myopathy caused by a novel mutation in the cytoplasmic domain of STIM12016 Feb 1;2(1):e50. doi: 10.1212/NXG.0000000000000050. eCollection 2016 Feb. PMID: 27066587
7. Noguchi S: Calcium Dyshomeostasis in Tubular Aggregate Myopathy. Int J Mol Sci. 17(11): E1952, Nov, 2016 PMID: 27879676 DOI:10.3390/ijms17111952
8. Hara Y : Development of a Novel Tetravalent Synthetic Peptide That Binds to

Phosphatidic Acid. PLoS One. 2015 Jul 6;10(7):e0131668. doi: 10.1371/journal.pone.0131668. eCollection 2015. PMID: 26147860

〔学会発表〕(計 45 件)

9. Noguchi S: Functional Effect of ORAI1 Mutations in Muscle Diseases. Gordon Research Conferences 2017 (Les Diablerets Conference Center), Les Diablerets, Switzerland, 6.8, 2017(6.4-6.9)
10. Noguchi S, Nishino I: Muscle Weakness and Fibrosis Due to Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Events in Collagen VI Deficient Congenital Muscular Dystrophy.International Conference on Collagen VI Disorders, Virginia, USA (the Hilton Crystal City), 2.24, 2017(2.24-2.25)
11. Hara Y : The role of phospholipid flippase in myotube formation Australian Physiological Society meeting 2017,Melbourne (Monash University) Australia,Nov.20,2017
12. Noguchi S: Sialic acid therapy in GNE myopathy: Lessons from other HIBMs. 215th ENMC International Workshop, Amsterdam, The Netherlands(NH Marquette Hotel), 11.14, 2015(11.13-11.15)
13. Noguchi S: Clinical and molecular aspects: Asian cohort. 215th ENMC International Workshop, Amsterdam, The Netherlands(NH Marquette Hotel), 11.13, 2015(11.13-11.15)
14. Noguchi S: Two events in the pathogenesis of congenital muscular dystrophy with collagen

- VI deficiency. 10th Japanese-French Workshop, Paris, France (Institute of Myology), 7.2, 2015 (7.2-7.4)
15. 野口 悟 : GNE ミオパチー : シアル酸生合成低下が引き起こす遺伝性筋疾患 . 第 38 回日本分子生物学会年回 / 第 88 回日本生化学会大会合同大会 , 神戸(神戸ポートアイランド), 12.2, 2015(12.1-12/4)
16. 野口 悟 : 遺伝性筋疾患の新たな原因遺伝子の探索と変異機能解析 . 第 3 回日本筋学会学術集会(国立精神・神経医療研究センター), 小平市 , 8.4, 2017(8.4-8.5)
17. Noguchi S, Nishino I : A mouse with exon 9 deletion in *Col6a1* as a model for dominant collagen VI-related disorders. 22nd International Congress of the World Muscle Society (Palais du Grand Large), Saint Malo, France, 10.4, 2017(10.3-10.7)
18. Nishino I, Noguchi S : Muscle growth by activin type II receptor blocking ameliorates weakness in GNE myopathy mice. 22nd International Congress of the World Muscle Society (Palais du Grand Large), Saint Malo, France, 10.5, 2017(10.3-10.7)
19. Nishino I, Noguchi S : Tubular aggregate myopathy with dystrophic features. 22nd International Congress of the World Muscle Society (Palais du Grand Large), Saint Malo, France, 10.4, 2017(10.3-10.7)
20. Noguchi S, Nishino I : Muscle Growth by Activin Type II Receptor Blocking Ameliorates Weakness in GNE Myopathy Mice. ASBMB ANNUAL MEETING/ Experimental Biology 2017 (McCormick Place Convention Center), Chicago, USA, 4.25, 2017 (4.22-4.26)
21. Nishino I, Noguchi S : S-Nitrosylation Is Responsible for Muscle Atrophy and Weakness in GNE Myopathy. ASBMB ANNUAL MEETING/ Experimental Biology 2017 (McCormick Place Convention Center), Chicago, USA, 4.24, 2017 (4.22-4.26)
22. 原 雄二 : 筋管形成におけるリン脂質フリッパーゼの役割 . 第 89 回日本生化学会年会(仙台国際センター , 東北大学) 仙台 , 9.25.2016-9.27.2016
23. Noguchi S, Nishino I : The novel STIM1 mutation with tubular aggregate myopathy and its pathogenicity. 21st International Congress of the World Muscle Society, Gradana, Spain (Palacio de Congresos de Granada), 10.6, 2016 (10.4-10.8)
24. Noguchi S, Nishino I : Variant to mutation - pathology, next generation sequencing, cellular biology. 20th International Congress of the World Muscle Society, Brighton, UK (Brighton Dome), 10.2, 2015 (9.30-10.4)
25. Noguchi S, Nishino I : High-throughput genetic testing for muscle disease and an exome database of the undiagnosed in Japan. 20th International Congress of the World Muscle Society, Brighton, UK (Brighton Dome), 10.2, 2015 (9.30-10.4)
26. Noguchi S, Nishino I : Milder phenotype of

muscular dystrophy due to POMGNT2 mutations. 20th International Congress of the World Muscle Society, Brighton, UK (Brighton Dome), 10.2, 2015 (9.30-10.4)

27. Noguchi S, Nishino I: DAG1 mutations associated with asymptomatic hyperCKemia and hypoglycosylation of α -dystroglycan. 20th International Congress of the World Muscle Society, Brighton, UK (Brighton Dome), 10.2, 2015 (9.30-10.4)

28. Noguchi S, Nishino I: Homozygous splicing mutation in *ISPD* gene in a girl with Walker-Warburg syndrome. 20th International Congress of the World Muscle Society, Brighton, UK (Brighton Dome), 10.2, 2015 (9.30-10.4)

29. Hara Y: The role of phospholipid flippases in myotube formation. Lipids, Molecular & Cellular Biology of Gordon Research Conference (Waterville Valley), USA, July 26,2015-July 31,2015.

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ncnp.go.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野口 悟 (NOGUCHI , Satoru)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター
・神経研究所・疾病研究第一部・室長

研究者番号 : 00370982

(2)研究分担者

原 雄二 (HARA , Yuji)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号 : 60362456