

平成30年6月18日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08227

研究課題名(和文)筋疾患の新規治療標的の創出をめざす一酸化窒素依存的カルシウム放出の生理機能解析

研究課題名(英文)Pathophysiological role of NO-induced calcium release in skeletal muscle

研究代表者

三上 義礼(MIKAMI, Yoshinori)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80532671

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)：一酸化窒素(NO)は骨格筋や脳に発現する1型リアノジン受容体(RyR1)の3636番目のシステインをS-ニトロシル化修飾して活性化し、細胞質にカルシウムを放出する(NO-induced calcium release (NICR))。このシステインをアラニンに変異させたノックインマウスはRyR1の発現やリアノジン結合能、NICR活性が野生型マウスと差が見られず、正常であった。骨格筋ではNICRが消失していたものの、運動機能への異常は確認できなかった。一方、脳において、側頭葉てんかんに伴う海馬の神経細胞死が、ノックインマウスで軽減しており、NICRは神経細胞死の引き金となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The type 1 ryanodine receptor (RyR1) is predominantly expressed in the skeletal muscle and brain. Nitric oxide (NO) induces calcium release from sarcoplasmic/endoplasmic reticulum through S-nitrosylation of Cys at 3636 (Cys-3636) in RyR1. In order to elucidate the pathophysiological role of NO-induced calcium release (NICR) in vivo, we generated a knock-in (KI) mouse line, in which the Cys-3636 was replaced by Ala to prevent its S-nitrosylation. We showed that NICR was silenced in both neurons and skeletal muscle cells from KI mice. However, the exercise function of KI mice was not altered. In the brain, we provided evidence that NICR exacerbates neurodegeneration in the hippocampus following epileptic seizures, suggesting that RyR1 is a promising therapeutic target candidate to ameliorate the neurodegenerative effect of status epilepticus.

研究分野：生理学、薬理学

キーワード：一酸化窒素 リアノジン受容体 カルシウム 骨格筋 神経細胞死 NICR S-ニトロシル化

1. 研究開始当初の背景

ガス状生理活性物質のひとつ一酸化窒素 (NO) は、生理活性物質として血管拡張などの生理機能に関係するほか、中枢神経系では神経細胞間コミュニケーションに関わり、記憶形成に重要な役割を担っている。NO の生理作用として、可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化して cGMP 産生を促す経路に加え、タンパク質のシステイン残基を化学的に修飾して機能を制御する S-ニトロシル化を介した cGMP 非依存性経路が知られている。

細胞内 Ca²⁺ ストアである小胞体の膜上に存在する 1 型リアノジン受容体 (RyR1) は、骨格筋や神経細胞に局在している。RyR1 の 3636 番目のシステイン残基は、NO によって S-ニトロシル化修飾を受け、小胞体から細胞内に Ca²⁺ を放出する。この現象を NO-induced Ca²⁺ release (NICR) と呼ぶ (Kakizawa, Yamazawa et al., *EMBO J*, 2012.)。NICR は小脳シナプス可塑性に関与すること、NICR を抑制する RyR1 阻害薬ダントロレンは脳虚血モデルマウスにおいて梗塞巣を縮小させることが報告されている (Kakizawa, Yamazawa et al., *EMBO J*, 2012)。しかし、NICR と細胞死の直接的な機序には不明な点が多い。

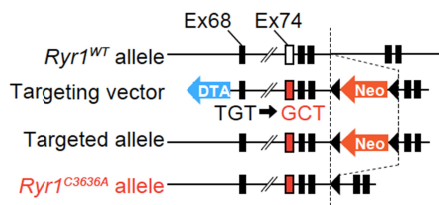
2. 研究の目的

加齢に伴う筋力低下や筋萎縮、筋ジストロフィーや ALS に代表される神経筋難病は、その発症機序と早期予防・治療法の研究が求められている。本研究は、この NICR が、骨格筋においてどのような生理的、および、病態生理学的役割を担っているかを明らかにする。さらに、サルコペニアや難治性筋疾患に対し、骨格筋に存在し、興奮収縮連関の中心となる RyR1 を標的とした予防・治療戦略を立てることを目指す。

3. 研究の方法

RyR1^{C3636A} ノックインマウス

本研究の動物実験は、東京大学医学部・医学系研究科動物実験委員会、および、東邦大学実験動物委員会の承認を得て実施した。RyR1 において S-ニトロシル化修飾を受ける 3636 番目のシステインをアラニンに変異させた RyR1-C3636A ノックインマウス (RyR1^{C3636A} マウス) を用いて解析を行った。



骨格筋の解析

骨格筋における NICR の計測には、初代培養細胞を用いた。マウス新生仔の後肢をコラゲナーゼで分散した後、20% ウシ正常血清を含む DMEM 培地で培養し、筋衛星細胞を増

殖させた。コンフルエントになった時点で 2% ウマ血清を含む培地に置換し、分化させることで、筋管細胞の形成を誘導した。

Ca²⁺ イメージングは、Fura-2-AM を用いて測定し、340 nm と 380 nm の蛍光強度比を取り、絶対的な Ca²⁺ 濃度を算出した。

リアノジン結合アッセイ

リアノジン受容体の活性を解析するために、³H]リアノジン結合アッセイを実施した。マウス大腿筋からマイクロゾーム画分を精製し、Murayama et al., Plos One, 2015 に従ってアッセイを行った。

トレッドミル走行試験

マウスに運動負荷をかけるために、トレッドミル走行装置 (メルクエスト社) を用いて、走行試験を実施した。疲労度を計測する方法では、5 m/min から、毎分 1 m/min ごとに加速していき、マウスが走行不能になるまで加速を継続していく。長距離で継続的に走らせる実験では、5 回/週、1 時間/日のペースで、12 m/min の速度での走行試験を 1 ヶ月行った。

神経細胞での解析

神経細胞での解析では、初代培養神経細胞を用いた Ca²⁺ イメージング、NO による神経細胞死の誘導を行い、野生型マウスと RyR1^{C3636A} ノックインマウス由来の神経細胞で比較を行った。

Ca²⁺ イメージングは Fura-2-AM で計測し、神経細胞死は -チューブリンの免疫染色による形態変化の確認と、JC-1 によるミトコンドリアの膜電位消失を指標とした細胞死の判定を行った。

このほか、カイニン酸誘発側頭葉てんかんモデルを用いた海馬の神経細胞死を Fluoro Jade-C 染色で評価した。

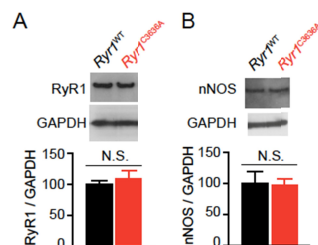
代謝の評価

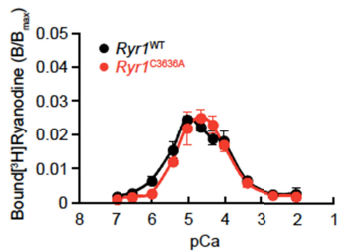
マウスの糖代謝を調べる目的で、経口グルコース負荷試験、および、インスリン負荷試験を実施した。

4. 研究成果

骨格筋における解析

骨格筋では野生型マウス、および、RyR1^{C3636A} マウスの間で RyR1 や神経型 NO 合成酵素 (nNOS) の蛋白発現量に差は見られなかった (右図)。また、リアノジン結合アッセイを実施したところ、両者の間に有意な差は見られなかった。





マウス胎児大腿筋より初代培養骨格筋細胞を作製したところ、増殖・分化は正常に起こり、電気刺激に対する応答も同等であった。しかし、NO ドナー化合物 NOC7 を作用させた際に起こる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、 $Ryr1^{C3636A}$ マウス由来の骨格筋細胞では確認されなかった。

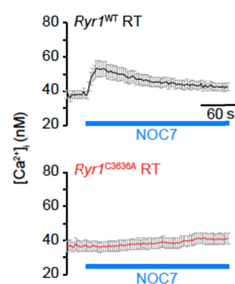
トレッドミル走行装置によって、野生型マウスと RyR1-C3636A マウスを比較した。走行速度を加速させ、短期的な走行能力・疲労度を比較したところ、両者に差は見られなかった。一方、長期間継続して（1ヶ月、1時間/日）走行させる試験を実施したが、両者とも走行状況に差がなく、生理機能面では NICR の影響は見られないと考えられる。現在、筋肥大への影響なども踏まえて、さらなる研究を展開しているところである。

骨格筋はエネルギー代謝・糖代謝において重要な臓器である。骨格筋の代謝に着目して、NICR の生理的、および、病態生理学的な役割から、筋疾患やサルコペニアにおける NO-RyR1 シグナルの寄与を明らかにすることを目的として、実験を実施した。 $Ryr1^{C3636A}$ マウスに糖負荷試験・インスリン負荷試験を実施したところ、野生型マウスと比較して、血糖値の推移に変化がみられた。糖代謝への NICR の寄与が示唆されるデータが得られており、運動だけでなく代謝も含めた NICR の意義について、今後の研究につながる結果を得られた。このほか、骨格筋が萎縮するストレプトゾトシン (STZ) 誘発 1 型糖尿病モデルマウスを用いた解析も実施し、STZ 投与による後肢の骨格筋重量の減少を確認している。

神経系における NICR

骨格筋での解析と並行して、神経細胞死における NICR の病態生理学的役割を明らかにしたので、今回合わせて報告する。

初代培養神経細胞に Ca^{2+} インジケータ Fura2 をロードし、NO ドナー化合物 NOC7 を作用させると、野生型マウス ($Ryr1^{WT}$ マウス) では NICR が起こり細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したが、 $Ryr1^{C3636A}$ マウスで同様の実験をしたところ、NICR が消



失していた。

マウス海馬スライスに NMDA を作用させ、てんかん誘発刺激を与えると、 $Ryr1^{WT}$ マウス由来の海馬では RyR1 の S-ニトロシル化が検出された。これは刺激に伴う NO 産生亢進によるものである。なお、 $Ryr1^{C3636A}$ マウスでは RyR1 の S-ニトロシル化修飾は検出されなかった。

そこで、神経細胞死における NICR の病態生理学的役割を明らかにする目的として、カイン酸 ($40mg \cdot Kg^{-1}$) を腹腔内投与し、側頭葉てんかんモデルマウスを作出した。投与 24 時間後に海馬を摘出し、凍結切片を作製して、神経変性マーカーである Fluoro Jade C (FJC) による染色、Nissl 染色を行った。野生型マウスでは、海馬 CA3 領域において、FJC 陽性の神経細胞死に伴う神経変性が確認され、Nissl 染色では神経細胞の凝集が確認された。一方、 $Ryr1^{C3636A}$ マウスでは、てんかん発作の重篤度は野生型との間で有意な差は見られなかったにもかかわらず、海馬 CA3 領域における FJC 陽性の神経変性が有意に低下していた。なお、RyR 阻害薬ダントロレンの投与でも海馬神経変性抑制効果を確認しており、RyR1 Cys-3636 の S-ニトロシル化を介した NICR が神経細胞死の引き金となっていることが明らかとなった。

また、初代培養神経細胞に NO ドナー化合物 NOC7 を作用させると、神経突起が縮退し、ミトコンドリアの膜電位感受性色素で神経細胞死の初期のマーカーとなる JC-1 による染色により神経細胞死が進行していることが観察された。この現象は $Ryr1^{C3636A}$ 由来の初代培養神経細胞では起こらず、ダントロレン投与でも抑制された。NO による RyR1 Cys-3636 の S-ニトロシル化を介した神経細胞死が *in vitro* でも実証された。

成果の発表

神経細胞における NICR の病態生理学的意義、および、骨格筋の基礎的な解析データについては、EBioMedicine 誌に発表した (Mikami *et al.*, *EBioMedicine*, **11**, 253-261, 2016.)。同時に、EBioMedicine 誌ホームページのトップで表示されるスライド画像にも採用され、大きく注目を浴びた。

本研究について発表した第 39 回日本分子生物学会年会において、研究代表者は優秀発表賞を受賞した。

第 90 回日本薬理学会年会(2016 年・長崎)において、研究代表者は公募シンポジウムのオーガナイザーと務めると共に、『神経細胞の生死を司るガスメディエーターの病態生理学的役割』として NO の病態生理学的役割の内容も含めた講演を行った。

2018 年 1 月には NICR などの小胞体カルシウムシグナルに関する総説論文を共著で発表し、*Antioxidant & Redox Signaling* 誌に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Okubo Y, Mikami Y, Kanemaru K & Iino M. Role of endoplasmic reticulum-mediated Ca^{2+} signaling in neuronal cell death. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2018. 査読有

DOI: 10.1089/ars.2018.7498

Mikami Y, Kakizawa S & Yamazawa T. Essential Roles of Natural Products and Gaseous Mediators on Neuronal Cell Death or Survival. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**. E1652. 2016. 査読有

DOI: 10.3390/ijms17101652

<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/10/1652>

三上義礼、大久保洋平. 細胞内カルシウムストア、*脳科学辞典*、2016 年、査読有

DOI : 10.14931/bsd.7107

<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/細胞内カルシウムストア>

Mikami Y, Kanemaru K, Okubo Y, Nakaune T, Suzuki J, Shibata K, Sugiyama H, Koyama R, Murayama T, Ito A, Yamazawa T, Ikegaya Y, Sakurai T, Saito N, Kakizawa S & Iino M. Nitric Oxide-induced Activation of the Type 1 Ryanodine Receptor Is Critical for Epileptic Seizure-induced Neuronal Cell Death. *EBioMedicine*, **11**, 253-261, 2016. 査読有、

DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.08.020

Kubota J, Mikami Y, Kanemaru K, Sekiya H, Okubo Y & Iino M. Whisker experience-dependent mGluR signaling maintains synaptic strength in the mouse adolescent cortex. *The European Journal of Neuroscience*, **44**, 2004-2014, 2016. 査読有、

DOI: 10.1111/ejn.13285

Mikami Y & Yamazawa T, Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sciences*, **139**, 69-74, 2015. 査読有、
DOI: 10.1016/j.lfs.2015.08.005

〔学会発表〕(計 19 件)

三上義礼、伊藤雅方、瀧口正悟、村上慎吾、富田太郎、行方衣由紀、田中光、赤羽悟美：Defective SR Ca^{2+} uptake in the heart of diabetic mouse、第 95 回日本生理学会大会、2018 年

三上義礼、伊藤雅方、瀧口正悟、村上慎吾、富田太郎、行方衣由紀、田中光、赤羽悟美：糖尿病に合併した心機能障害 - 心筋細胞内カルシウムシグナル制御破綻のメカニズム -、第 14 回東邦大学 5 学部合同学術集会、2018 年

三上義礼、有田通恒：臓器間神経ネットワークを介したエネルギー代謝調節の分子機序解明、第 151 回東邦医学会例会、2018 年

三上義礼、伊藤雅方、杉本結衣、瀧口正悟、富田太郎、村上慎吾、行方衣由紀、田中光、赤羽悟美：Molecular mechanisms underlying dysregulation of intracellular Ca^{2+} signaling in diabetic cardiomyopathy model mouse heart、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年

三上義礼、伊藤雅方、杉本結衣、瀧口正悟、富田太郎、村上慎吾、行方衣由紀、田中光、赤羽悟美：心筋細胞内 Ca^{2+} シグナル制御破綻に起因する拡張障害の分子機構、第 27 回日本循環薬理学会、2017 年

Kakizawa S, Kishimoto Y, Mikami Y, Miyazaki T, Maruyama T, Nagai M, Yamamoto S, Yamazaki D, Watanabe M, Yamazawa T, Adachi-Akahane S, Iino M : Involvement of Nitric Oxide-Induced Calcium Release (NICR) Through Type 1 Ryanodine Receptor in Extinction of Cerebellum-Dependent Motor Learning. 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (CaBP20), 2017

三上義礼、伊藤雅方、杉本結衣、瀧口正悟、富田太郎、村上慎吾、行方衣由紀、田中光、赤羽悟美：糖尿病性心筋症における心筋 Ca^{2+} シグナル異常と左室拡張障害、生理学研究所 研究会 2017 「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」、2017 年

三上義礼、伊藤雅方、杉本結衣、瀧口正悟、富田太郎、村上慎吾、行方衣由紀、田中光、赤羽悟美：糖尿病モデルマウスにおける心筋 Ca^{2+} シグナル異常と拡張障害、第 136 回日本薬理学会関東部会、2017 年

三上義礼：神経細胞の生死を司るガスメディエーターの病態生理学的役割、第 90 回日本薬理学会年会、シンポジウム、

2017 年

三上義礼、金丸和典、大久保洋平、中畝拓哉、鈴木純二、柿澤昌、柴田和輝、小山隆太、村山尚、伊藤明博、山澤徳志子、伊藤雅方、富田太一郎、村上慎吾、赤羽悟美、池谷裕二、櫻井隆、齊藤延人、飯野正光：てんかんモデルマウスにおける 1 型リアノジン受容体の S-ニトロシル化を介した神経細胞死。第 94 回日本生理学会大会、2017 年

三上義礼、金丸和典、大久保洋平、中畝拓哉、鈴木純二、柿澤昌、村山尚、柴田和輝、小山隆太、伊藤明博、山澤徳志子、伊藤雅方、富田太一郎、村上慎吾、赤羽悟美、櫻井隆、池谷裕二、齋藤延人、飯野正光：一酸化窒素は 1 型リアノジン受容体の S-ニトロシル化修飾を介して神経細胞死を誘導する。第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

三上義礼、金丸和典、大久保洋平、柿澤昌、村山尚、柴田和輝、小山隆太、山澤徳志子、赤羽悟美、櫻井隆、池谷裕二、飯野正光：1 型リアノジン受容体の S-ニトロシル化修飾による活性化と神経細胞死。第 2 回日本筋学会学術集会、2016 年

三上義礼、金丸和典、小田康弘、柿澤昌、柴田和輝、杉山弘樹、小山隆太、伊藤明博、村山尚、山澤徳志子、渡辺雅彦、池谷裕二、齊藤延人、櫻井隆、飯野正光：Nitric oxide-induced calcium release: S-nitrosylation of the type 1 ryanodine receptor and neuronal cell death。第 93 回日本生理学会大会、2016 年

中畝拓哉、鈴木純二、三上義礼、金丸和典、飯野正光：Alteration in neuronal mitochondrial functions in response to nitric oxide-induced Ca^{2+} release via type 1 ryanodine receptor。第 89 回日本薬理学会年会、2016 年

三上義礼、金丸和典、小田康弘、柿澤昌、柴田和輝、杉山弘樹、小山隆太、伊藤明博、村山尚、山澤徳志子、渡辺雅彦、池谷裕二、齊藤延人、櫻井隆、飯野正光：S-nitrosylation of the type 1 ryanodine receptor mediates neuronal cell death。第 89 回日本薬理学会年会、2016 年

三上義礼、金丸和典、小田康弘、柿澤昌、柴田和輝、小山隆太、村山尚、山澤徳志

子、池谷裕二、櫻井隆、飯野正光：1 型リアノジン受容体の一酸化窒素による活性化と神経細胞死、筋生理の集い 2015 年

木村由佳、三上義礼、大隅貴美子、津金麻美子、岡淳一郎、豊福優希子、小池伸、渋谷典広、永原則之、小笠原祐樹、木村英雄：脳の TRPA1 チャンネルを活性化するシグナル分子としてのポリサルファイドとその生合成。第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会、2015 年

木村由佳、三上義礼、大隅貴美子、津金麻美子、岡淳一郎、木村英雄：硫化水素由来のポリサルファイドは、ラット脳で TRPA1 を活性化するシグナル分子として働く。第 38 回日本神経科学大会、2015 年

三上義礼、金丸和典、小田康弘、柿澤昌、柴田和輝、杉山弘樹、小山隆太、伊藤明博、山澤徳志子、渡辺雅彦、池谷裕二、齊藤延人、飯野正光：1 型リアノジン受容体の S-ニトロシル化を介した神経細胞死。第 38 回日本神経科学大会、2015 年

〔その他〕

ホームページ

東邦大学医学部生理学講座統合生理学分野ホームページ

https://www.toho-u.ac.jp/med/lab/lab_uniphysio.html

東邦大学研究・教育実績データベース ホームページ

https://www.toho-u.ac.jp/research/work/kenkyu_db.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 義礼 (MIKAMI, Yoshinori)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80532671