

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07406

研究課題名(和文)カルシウムホメオスタシスの制御に基づく筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic strategy for muscular dystrophy based on regulation of calcium homeostasis

研究代表者

松村 喜一郎(Matsumura, Kiichiro)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50260922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：筆者らが細管集合体ミオパチー患者において見いだしたSTIM1遺伝子におけるユニークな新規変異の分子病態を解明するため、患者リンパ球から疾患特異的iPS細胞を作製してその解析を行った。このiPS細胞に対して骨格筋への分化誘導を行いSTIM1の局在を観察したところ、健常人由来のiPS細胞とは異なり核周囲にドット状の凝集体を多数形成した。また細胞内のカルシウム濃度を測定したところ、健常人由来のiPS細胞でみられる細胞内カルシウム応答が見られずカルシウム濃度は低値のままであった。これらの結果から筆者らが見いだしたSTIM1変異は筋細胞内カルシウムの枯渇が原因でミオパチーを発症するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに報告されていたSTIM1の変異による細管集合体ミオパチーはSTIM1の恒常的な活性化の結果生じる細胞内へのカルシウムの過剰流入が原因であるとされていた。しかし筆者らが見いだした変異は逆に細胞内カルシウムが枯渇することで発症するものと考えられた。同じSTIM1の変異でもカルシウムの過剰流入と枯渇という対極に位置する2つの事象が生じ、その両者が同じ疾患を引き起こすことが示された。このようにカルシウム濃度は筋細胞内において厳密に調節されなければならない、本研究によりSTIM1-ORA11を介したカルシウムホメオスタシスの重要性に関する理解が深まった。

研究成果の概要(英文)：Recently, we found a novel unique mutation of STIM1 gene in patients with tubular aggregate myopathy. To gain mechanistic insight into the pathogenesis, we generated iPS cells from lymphocytes of the patient. In myoblasts and myotubes differentiated from the iPS cells, immunofluorescent analysis demonstrated numerous dot-shaped aggregates of STIM1. Farther, intracellular calcium measurement revealed no significant calcium response to the increased extracellular calcium in these cells. Taken together, it is thought that the STIM1 mutation we found leads to the depletion of intracellular calcium and finally causes tubular aggregate myopathy.

研究分野：筋ジストロフィー

キーワード：細管集合体ミオパチー STIM1 カルシウムホメオスタシス

1. 研究開始当初の背景

過去 20 年余の研究成果により様々な筋ジストロフィーで原因遺伝子が明らかとなりその分子病態が盛んに研究されている。これらの中でも主要な原因蛋白質群の一つ、ジストロフィン糖蛋白複合体の異常により各種の筋ジストロフィーが発症する事が明らかにされてきた。これには小児期に発症する最も代表的な筋ジストロフィーである Duchenne 型筋ジストロフィー、本邦で特異的に高頻度で発症する福山型先天性筋ジストロフィー、さらに様々なタイプの肢帯型筋ジストロフィーなどが含まれる。このジストロフィン糖蛋白複合体は細胞外基底膜と細胞膜、さらに細胞骨格を強固に連結する分子架橋として機能しており、ここに異常が生じると筋細胞膜が物理的ストレスにさらされて脆弱化することが筋細胞変性の一因と考えられている。一方でこれまでの膨大な研究から、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蛋白分解酵素の活性化などが惹起され、その結果筋細胞は変性・壊死に陥るものと考えられてきた。従って主要な筋ジストロフィーの発症機序として、ジストロフィン糖蛋白複合体構成蛋白質の異常 筋細胞膜の脆弱化 筋細胞内へのカルシウム過剰流入 筋細胞の変性・壊死という道筋が想定される。しかしこのシナリオにおいて、筋細胞膜脆弱化からカルシウムの過剰流入へと到る過程の分子レベルでの解明は進んでいない。

近年筋細胞の主要なカルシウム調節機構として STIM1-ORAI1 シグナリングが注目を集めている (STIM1: stromal interaction molecule 1)。STIM1 は筋小胞体に存在する膜蛋白質で、筋小胞体のカルシウムセンサーとして機能している。STIM1 は通常二量体として存在しているが、筋小胞体内部のカルシウム濃度の減少により立体構造が変化し筋細胞膜から T 管に存在するカルシウムチャンネルである ORAI1 と結合する。その結果細胞外から細胞内へカルシウムが流入する。そして興味深いことに Duchenne 型筋ジストロフィーのモデル動物である *mdx* マウスではこの STIM1-ORAI1 シグナリングが亢進していること、*mdx* マウスやサルコグリカン欠損マウスに 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、さらには STIM1 が常に活性化された状態となる機能獲得型の変異により遺伝性の細管集合体ミオパチー (tubular aggregate myopathy: 以下 TAM) が発症することなどが相次いで報告された。その結果同シグナリングとジストロフィン糖蛋白複合体、さらにはより広範な筋疾患との関連性が徐々に浮かび上がってきている。

2. 研究の目的

筆者らは最近 TAM の一家系において STIM1 のユニークな変異を見いだした (Neurol Genet. 2016; 2(1): e50)。それまでに報告されていた TAM における STIM1 の変異は全て管腔内ドメインの EF hand 領域における点変異である。この変異では STIM1 が筋小胞体内のカルシウムを感じできずその存在下でも恒常的に ORAI1 を活性化する。このため過剰なカルシウム流入が生じてしまう。これに対して申請者らが同定したのは STIM1 の細胞質内ドメインの CTID におけるフレームシフト変異であった。培養筋芽細胞である C2C12 にこの変異を有する STIM1 を過剰発現させたところ野生型の STIM1 で見られるカルシウム流入の増加が観察されなかった。したがってこの変異においてはカルシウムの過剰流入ではなく枯渇が原因で TAM を引き起こしている可能性がある。このことはカルシウム濃度は筋細胞内において厳密に調節されなければならない、STIM1-ORAI1 を介したカルシウムホメオスタシスの重要性を示している。そこで TAM にを含む筋疾患全般における STIM1-ORAI1 シグナリングの意義を検討し、同シグナルを標的とした筋疾患に対する治療法を開発することを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

筋疾患に対して STIM1-ORAI1 シグナリングが及ぼす影響を検討するために、筆者らが報告した新規 STIM1 変異を有する TAM 患者の疾患特異的 iPS 細胞を国内共同研究により作製し解析した。まず始めに患者末梢血よりリンパ球を単離し、これら細胞に Addgene から入手したプラスミド pCE-hOCT3/4、pCE-hSK、pCE-hUL、pCEmp53DD、pCXB-EBNA1 をエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。そして 20-30 日後にコロニーをピックアップした。樹立した iPS 細胞に対して bFGF と EGF を用いて EZ-sphere 法により 12 週間の筋分化誘導を行った。そして ERBB3 陽性、CD271 陽性の細胞をセルソーターにより分取した。これら筋分化した iPS 細胞を用いて免疫蛍光抗体法で STIM1 の局在と形態に関する解析を行った。さらに Fura-2 を用いた細胞内カルシウム動態の観察を行った。

4. 研究成果

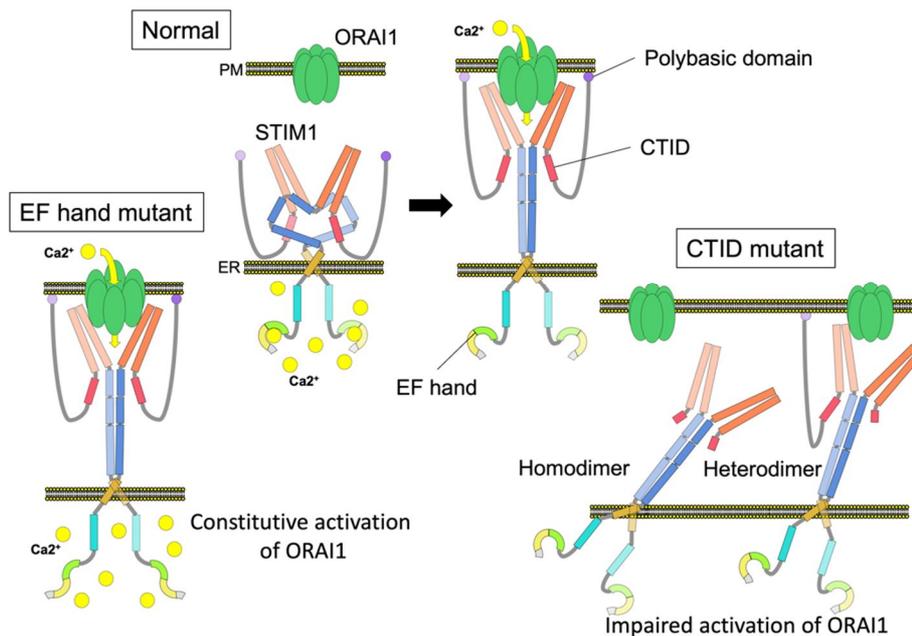
これまでの解析は筆者らが報告した変異を有する STIM1 を過剰発現させた株化細胞を用いて研究を行ってきた。しかしこれでは実際の筋細胞とは条件が大きく異なり、また過剰発現の影響も除外することはできない。そこでより生理的な条件下で、しかも筋肉系の細胞を用いて STIM1-ORAI1 シグナリングの解析を行うために iPS 細胞の作製を試みた。そして上記方法により筆者らが見いだした STIM1 変異を有する TAM の疾患特異的 iPS 細胞を 10 クローン樹立することに成功した。樹立したクローンすべてにおいて未分化マーカーの発現、マイコプラズマが陰性であるこ

と、核型が正常であることを確認した。またこの中の 3 クローンについては STIM1 の変異を認め、患者由来の変異が保たれていることを確認した。さらに増殖・未分化維持が良好である 2 クローンについては骨格筋分化への誘導を行いスフェア形成を確認した。そして分化誘導を行った後 1 週間に接着培養を行ったところ、健常者由来の細胞同様に筋管細胞が形成され細胞の自発的収縮が観察された。

次に 4 週間の分化誘導を行った筋芽細胞を用いて STIM1 の免疫染色を行った。この結果患者由来の細胞では核周囲の細胞質にドット状の凝集体が多数認められ、これは我々が過去に報告した変異 STIM1 を過剰発現させたときに見られる凝集体と類似の形状を示していた。最後に 12 週間の分化誘導を行った筋管細胞を用いて細胞内カルシウム応答を解析した。細胞外液のカルシウム濃度を 0 とし、SERCA 阻害剤であるタプシガルギンを加えることで筋小胞体内のカルシウムを枯渇させた。その後細胞外にカルシウムを添加し細胞内のカルシウムを Fura-2 でモニタリングした。この結果健常者由来の筋管では細胞外液にカルシウムを加えると細胞内の濃度も直ちに上昇したが、患者由来の筋管では細胞内カルシウムの上昇は認められなかった。

これらは以前筆者らが過剰発現の系で観察したものと合致する結果である。そしてこれらの結果がより生体に近い患者由来の iPS 細胞より分化した筋細胞において確認できたことは本疾患の病態を理解する上で大変重要な示唆が得られたものと考えられる。下に筆者らがこれまでに提唱してきた STIM1 変異による細胞内カルシウムホメオスタシスの異常に関する模式図を示す。二量体として筋小胞体 (ER) に存在している STIM1 は小胞体に十分なカルシウムが存在すると折りたたまれた立体構造を取っている。そして正常な状態 (下図 Normal) では小胞体内のカルシウム濃度が低下すると EF hand がそれを感知して引き伸ばされた構造へと変化し、筋細胞膜上の ORAI1 と結合する。そしてカルシウムチャンネルである ORAI1 からカルシウムが流入する。これまでに報告されてきた EF hand の変異 (下図 EF hand mutant) では EF hand がカルシウムと結合できない状態となることから、これが小胞体のカルシウムが不足しているとの誤ったシグナルとなり STIM1 は引き伸ばされて ORAI1 からカルシウムの過剰流入が起こる。一方で筆者らが見いだした CTID 変異 (下図 CTID mutant) では筋細胞膜と結合して STIM1-ORAI1 結合を安定化している polybasic domain を欠いている。これがホモ二量体を形成した場合はもちろん、ヘテロ二量体であった場合にも STIM1-ORAI1 の安定した結合が損なわれ ORAI1 からのカルシウム流入が阻害される。今回の研究から得られた結果は同じ STIM1 の変異からカルシウムの過剰流入と枯渇という対極に位置する 2 つの事象が生じうるとするこの仮説の正当性をさらに裏付けるものである。

STIM1変異と細胞内カルシウムホメオスタシスの異常



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ikeda M, Taniguchi-Ikeda M, Kato T, Shinkai Y, Tanaka S, Hagiwara H, Sasaki N, Masaki T, Matsumura K, Sonoo M, Kurahashi H, Saito F.	4. 巻 18
2. 論文標題 Unexpected Mutations by CRISPR-Cas9 CTG Repeat Excision in Myotonic Dystrophy and Use of CRISPR Interference as an Alternative Approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev	6. 最初と最後の頁 131-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2020.05.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 Fumiaki Saito
2. 発表標題 Reduction of mRNA aggregation in myotonic dystrophy by CRISPR interference
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斉藤史明
2. 発表標題 CRISPR/Cas9による筋強直性ジストロフィーのCTGリピート除去に伴う遺伝子変異とCRISPR interference法の有用性に関する検討
3. 学会等名 第6回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2020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
連携研究者	斉藤 史明 (Saito Fumiaki) (40286993)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	

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
---------	---------