

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15277

研究課題名(和文) STIM2スプライシング制御機構の解明と新規心不全治療戦略の構築

研究課題名(英文) Elucidation of Stim2 splicing mechanism and development of a novel therapeutic strategy of heart failure

研究代表者

伊藤 淳平 (Ito, Jumpei)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：30897583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心不全患者では心筋細胞内Ca²⁺濃度が上昇し心機能の悪化を惹起しているため、Ca²⁺濃度を調節するタンパク質を標的とした創薬が心機能改善に有効である。本研究では、選択的スプライシングによりストア作動性カルシウム流入(Storage-operated calcium entry: SOCE)に対して相反する作用を持つ2つのアイソフォームを有するSTIM2に着目し、そのスプライシング機構の一端を解明した。また、アンチセンスオリゴによりこのスプライシング変化を調整することに成功した。本研究成果はSTIM2.1/STIM2.2比の制御がSOCE活性の微調整を介し心不全治療標的としての有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果はSTIM2のスプライシング制御が心不全治療の標的として有効であることの証明のみならず、核酸医薬としてのアプローチが心不全の治療・予防法に効果的であることを示唆する。核酸医薬はあらゆる遺伝子に有効であることから、他の疾患の治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on STIM2, which has two spliced variants with opposing effects on store-operated calcium entry (SOCE) by alternative splicing. We performed transversal aortic constriction in a mouse to uncover the Stim2 alternative splice mechanisms in the pressure-overloaded heart. In pressure-overloaded hearts, the expression of Stim2 splice variants was changed in cardiomyocytes. Next, we identified the splicing factor that modulates this Stim2 alternative splicing by pull-down assay and mass spectrometry. This factor interacts with specific sequences in Stim2 pre-mRNA. Then, we modulated this splicing change by using antisense oligos in vitro and in vivo. Thus, these results might help to develop a novel heart failure treatment that provides fine-tune SOCE activity by adjusting the STIM2.1/STIM2.2 ratio.

研究分野：薬理学

キーワード：心不全 選択的スプライシング スストア作動性カルシウム流入 STIM2 核酸医薬 アンチセンスオリゴ

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、心不全に対しカルシウムチャネル拮抗薬や遮断薬などカルシウム依存性シグナルを制御して心臓リモデリングを抑制する治療薬が投与されているが、病的な心臓リモデリング下で活性化される Ca^{2+} 流入がどのように起きるかは未だ不明な点が多い。ストア作動性カルシウム流入 (Storage-operated calcium entry: SOCE) 機構は、細胞内において小胞体 (ER) における Ca^{2+} の枯渇を感知して形質膜 Ca^{2+} チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入を促す機構であり、カルシウムシグナルを伝達する主要なメカニズムの一つである (Parekh AB and Putney JW Jr. *Physiol Rev.* 2005)。SOCE 活性はその構成タンパク質の一つである ER 膜タンパク質 STIM1 やストア作動性カルシウムチャネルのポアを形成するサブユニット Orai によって制御される (Cahalan MD. *Nat Cell Biol.* 2009, Lewis RS. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011)。心不全患者の心筋細胞内では STIM1 の発現増加が観察されており、SOCE の活性化が心不全や心肥大の進行に寄与すると考えられている。従って、SOCE 活性の制御に関わる分子の同定や機能解明は新規治療薬開発に向け重要な課題である。しかしながら、主な SOCE の制御分子である STIM1 は心臓内において過剰発現しても抑制しても圧負荷に対し心不全を発症するため心不全治療の標的として困難であった (Hulot JS, et al. *Circulation.* 2011. Correll RN, et al. *J Mol Cell Cardiol.* 2015. Bénard L, et al. *Circulation.* 2016.)

本研究で対象となる STIM2 は SOCE を活性化し心不全で発現が増加する STIM2.2 と、そのスプライス変異体 STIM2.1 の存在が報告されている。STIM2.1 は 2015 年に同定されて以降、培養細胞を用いた研究から SOCE の抑制的な機能を有すること、ヒトの心不全心筋を用いた Real-time PCR から mRNA の発現が低下するといった報告があるが生理学的ならびに病理学的な面からの知見は不十分である。特に細胞レベルでの解析により SOCE の活性を制御する自然な分子として可能性を秘めているにも関わらず、心臓を始めとした組織における役割そして圧負荷や心筋梗塞といったストレス下での役割は明らかとなっていない。 Ca^{2+} は細胞内において重要なシグナル伝達因子であることから、本研究成果は心不全の治療のみならず他組織の治療法確立に向けても重要な結果を提示するものである。

また、近年アンチセンスオリゴやアプタマー、siRNA などを用いた核酸医薬が注目されている。スプライシング異常を正常化するアンチセンスオリゴは我が国でも認証されており、今後多くの遺伝子を標的とした核酸医薬が主流になると予想される。天然分子でありながら SOCE の活性化を制御し心不全の抑制因子として期待される STIM2.1 への選択性を高める核酸医薬の開発は新たな心不全治療薬としてのみならず、今後の核酸医薬の普遍化につながる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、STIM2 のスプライシング制御機構を明らかにして、STIM2 を標的とした心不全の新規治療薬に向けた基礎データを積み上げることである。心不全の治療法としては細胞膜上に存在する受容体を標的とした新規治療薬の開発が進められているが、スプライシング制御を目指した心不全に対する核酸医薬はまだない。

STIM1 や SERCA (筋小胞体カルシウムポンプ) など小胞体上に存在する Ca^{2+} を主導的に制御するタンパク質を標的とした心不全に対する創薬は細胞死や制御の破綻などが報告されており困難である。サブタイプである STIM2 は、STIM1 に比べると、SOCE 活性が弱く脇役的存在である上に、そのスプライシング変異体である STIM2.1 は SOCE に対して抑制的に働いており SOCE 活性はより軽微になっている。そのような分子をターゲットにすると、体に負担の少ない安全性の高い薬物ができる可能性が高い。

3. 研究の方法

A. 本研究では、STIM2 のスプライシングに注目し、横行大動脈縮窄術 (TAC) によりマウスの心臓に圧負荷をかけて心不全を誘導する心臓圧負荷モデルを作製し、その選択的スプライシングの変化を RT-PCR 後の電気泳動でのサイズの検討および特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR を用いて確認する。

B. STIM2.1 および STIM2.2 の発現を AAV (adeno-associated virus) を用い過剰発現およびノックダウンさせ、心不全の進行に変化が見られるかを超音波診断法 (心エコー) や組織重量、ウェスタンブロット法、組織染色により確認する。SOCE の活性を抑制する STIM2.1 の過剰発現または上昇させる STIM2.2 の発現低下が心不全を改善するかどうかを検証する。

C. STIM2 のスプライシング調節因子の同定を心臓組織抽出液と 5' 末端をピオンチンで修飾した RNA を用いて RNA プルダウンアッセイを行い、結合したタンパク質を質量分析によって同定

する。

D. 同定したスプライシング調節分子を過剰発現もしくは欠損させて STIM2.1/STIM2.2 比の変化を確認する。また、RNA 上の配列に変異を導入し、スプライシング調節分子の正確な結合領域を同定する。

E. スプライシング調節分子ならびに結合配列を同定したら、結合配列を標的としたアンチセンスオリゴを細胞に導入し選択的スプライシングが制御できるか検討する。In vitro 系で有効性を証明できた後、マウス心臓に TAC を施し in vivo でもアンチセンスオリゴが制御するかを確認し、最終的には心不全を抑制もしくは改善するかを検討する。

4. 研究成果

A. Stim2 のスプライシング変化に注目し、横行大動脈縮窄術 (TAC) によりマウスの心臓に圧負荷をかけて心不全を誘導する心臓圧負荷モデルを作製し、Stim2 スプライス変異体の発現が変化するかを検討した。選択的スプライシングの変化を RT-PCR およびリアルタイム PCR を用いて解析した結果、心臓圧負荷モデルにおいて有意に変化していることが確認された。

B. STIM2.1 および STIM2.2 の発現を AAV (adeno-associated virus) を用いてノックダウンさせ、心不全の進行に変化が見られるかを超音波診断法 (心エコー) や組織重量、ウェスタンブロット法などにより確認した。その結果、AAV による Stim2 の発現を低下させたマウスに心臓圧負荷を加えるとコントロール群と比較してより心機能が悪化することが明らかとなった。さらに、AAV を用い STIM2.1 および STIM2.2 の発現を増加させ圧負荷により誘導される心不全に対する影響を解析したところ、コントロール群に対し変化することが示唆された。

C. Stim2 の選択的スプライシングに関与する因子の同定を試みた。心臓組織抽出液と 5' 末端をピオンチンで修飾した合成 RNA を用いて RNA プルダウンアッセイを行い、結合したタンパク質を質量分析によって解析したところ、あるスプライシング調節因子が検出された。

D. 検出されたスプライシング調節分子をクローニングし、マウス筋芽細胞株 C2C12 に過剰発現させることで STIM2.1/STIM2.2 比が変化することを確認した。また、同様に C2C12 細胞にスプライス調節分子を過剰発現させることでストア作動性カルシウム流入が変化することも確認した。さらに、本スプライシングに関与する exon や intron をクローニングしミニ遺伝子を作製し、バイオインフォマティクスツールにより複数予測された RNA 上の結合配列に変異を導入し、結合配列領域の同定を行った。その結果、本スプライシング調節因子の結合領域が同定された。

E. 同定したスプライシング調節分子の結合領域特異的な核酸を用い、STIM2.1/STIM2.2 比の変化やストア作動性カルシウム流入が変化することを確認した。マウス心臓においても TAC を施したマウス心臓に対し、アンチセンスオリゴが有意に心機能の低下や肥大を抑制することを確認した。

以上の結果は STIM2 のスプライシング制御機構の一端を明らかにし、STIM2 のスプライシング制御を目的とした核酸医薬が心不全に対し有用であることを証明した。

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 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hajime Abe, Yohei Tanada, Shigemiki Omiya, Mihai-Nicolae Podaru, Tomokazu Murakawa, Jumpei Ito, Ajay M Shah, Simon J Conway, Masahiro Ono, Kinya Otsu	4. 巻 14
2. 論文標題 NF- B activation in cardiac fibroblasts results in the recruitment of inflammatory Ly6C hi monocytes in pressure-overloaded hearts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.abe4932	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 淳平、大津 欣也、朝日 通雄
2. 発表標題 フェリチノファジーによって放出される鉄はマウス心筋細胞死と心不全を誘導する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 SOCE異常症を治療又は予防するための医薬組成物	発明者 学校法人大阪医科薬科大学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-161627	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------