

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：63905
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18H02970
研究課題名(和文) 骨神経免疫システム包括制御理論の構築と応用

研究課題名(英文) Study of osteo-nociceptive-immune system

研究代表者

丸山 健太 (Maruyama, Kenta)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特別協力研究員

研究者番号：60724119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージで特異的にSt18を欠損させたマウスは、敗血症に脆弱であった。このマウスではVEGFの発現が亢進していたため、VEGFのシグナルを抑制する化合物を投与したところ、敗血症に対する脆弱性が改善した。St18を欠損するマクロファージでは野生型より多くのSp1がVEGFプロモーターに結合しており、St18を欠損するマクロファージから産生されるVEGFはSp1の阻害剤で抑制された。また、St18はSp1と直接結合することでSp1のVEGFプロモーターへの結合を阻害することが判明した (Maruyama et al Cell Rep, 2020)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、St18がVEGFの抑制因子であることが判明した。St18の発現を誘導することのできる化合物を発見できた場合には、VEGFのかかわる様々な疾患(敗血症、癌、糖尿病網膜症)の治療が可能となる。

研究成果の概要(英文)：St18 was initially reported as candidate tumor suppressor gene. Despite the pleiotropic functions of St18, little is known about its roles in macrophages. Here, we report that myeloid St18 is a potent inhibitor of VEGF-A. Mice lacking St18 in myeloid lineages exhibit increased retinal vasculature with enhanced serum VEGF-A concentrations. Despite the normal activation of NF- κ B target genes, these mice are highly susceptible to LPS-induced shock, polymicrobial sepsis, and experimental colitis, accompanied by enhanced vascular and intestinal leakage. Pharmacological inhibition of VEGF signaling rescued the high mortality rate of myeloid-specific St18-deficient mice in response to inflammation. Mechanistically, St18 directly binds to Sp1 and attenuates its activity, leading to the suppression of Sp1 target gene VEGF-A. Using mouse genetic and pharmacological models, we reveal myeloid St18 as a critical septic death protector.

研究分野：老年内科学

キーワード：敗血症 血管新生 血管透過性 VEGF St18

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人体の加齢性変化は、21世紀における本邦の内科学が解決しなければならない唯一にして最大の課題である。老年期を特徴付ける退行性変化の中で最も重要なものとして骨粗鬆症があり、その経済損失は既に年1兆円を超えている。また、慢性疼痛によって晩節を不幸であると感じている高齢者は増加しており、骨粗鬆症に由来する疼痛だけでも100万人程度の患者がいるものと推定されている。しかし、加齢に伴って骨粗鬆症と骨格系の疼痛が同時に生じるメカニズムについては殆ど明らかとなっておらず、内科的介入による根本的解決策は存在しない。老年医療の現場では循環機能障害や腎機能障害に伴った浮腫が頻繁に観察されるが、心腎機能の低下がないにもかかわらず突発性に生じる浮腫も多く、これらが遠因となって生じた褥瘡が契機となって敗血症となる例があとをたたない。こうした状況に関連して、本邦では老年性敗血症患者が激増しているが、残念なことに65歳以上の敗血症発症後90日の死亡率は成人の約4倍と非常に高いことが知られている。しかし、なぜ老年性敗血症が重症化しやすいのかについてはよくわかっていない。申請者の外来では「骨破壊」「疼痛」「浮腫」の3病態を晩節悲曲三重奏と呼称することで重症感染に備えた注意喚起をおこなっているが、加齢に伴って生じるこれら3つの病態を一元的に説明しうる分子メカニズムの探求についても、研究がほぼ手つかずの状態となっている。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究によって、侵害受容神経系・骨代謝系・自然免疫系は個々のシステムが独立して機能している訳ではなく、外部環境への適応を目的とした相互クロストークによる巧みな生存戦略をビルトインしていることが明らかとなってきた (*Maruyama et al Cell Rep 2017, Maruyama et al iScience 2018, Sugisawa and Maruyama Cell 2020, Maruyama FEBS J 2021*)。しかし、現時点において Osteo-neuro-immune triangle システムともいうべき恒常性の存在が広く認知されているとはいいがたく、この医学的重要性を浮き彫りにするためには、当該システムを包括的に制御する因子の同定が不可欠である。申請者は痛覚神経・破骨細胞・マクロファージの3者で特異的に発現する Zinc finger protein のひとつ St18 の加齢に伴う各細胞での発現量の低下が、老齢マウスの骨粗鬆症・疼痛・敗血症耐性と関連していることを示唆する知見を得た。そこで本研究では Osteo-neuro-immune triangle システムの鍵を握っていると考えられる St18 の標的遺伝子の同定を通じて、当該システムの生理学的地位の確立を目指す。

3. 研究の方法

マウス遺伝学・免疫学のテクニックを集学駆使することで、St18 の痛覚神経・破骨細胞・マクロファージにおける生理機能の解明を目指すと同時に、St18 の各細胞における標的遺伝子を同定する。

4. 研究成果

《マクロファージにおける St18 の機能解析とその標的遺伝子の同定》

St18 が敗血症や腸炎といった免疫現象の絡む病態において如何なる役割を果たしているのかは不明である。そこで、マクロファージで特異的に St18 を欠損させたマウスを作成し、表現型解析を実施した。その結果、意外なことに、当該マウスは炎症性サイトカイン遺伝子の発現は正常であるにもかかわらず、敗血症や DSS 腸炎ですぐに死んでしまうことが判明した。敗血症や DSS 腸炎では血管透過性が上昇することで血圧が低下し、このことが原因で個体は死に至ることが知られている。そこで、エバンズブルーを静脈に注射し、一定時間後にさまざまな臓器をとりだして当該色素の濃度を測定したところ、マクロファージで特異的に St18 を欠損させたマウスでは野生型マウスよりも濃度が高くなっていることが判明した。このことは、マクロファージにおける St18 の欠損が全身の血管透過性を高めていることを意味する。また、網膜や腸に分布する血管の数はマクロファージで特異的に St18 を欠損させたマウスで有意に増加していたことから、マクロファージにおける St18 の欠損は個体全体の血管透過性の亢進のみならず、血管新生の増大をもたらすことが判明した。次に、こうした表現型の発現する分子メカニズムを明らかにする目的でトランスクリプトーム解析をおこなったところ、血管透過性と血管新生の促進作用を持つ VEGF の発現が St18 を欠損するマクロファージで上昇していることが判明した。そこで、マクロファージで特異的に St18 を欠損させたマウスに VEGF のシグナルを抑制する Axitinib を投与したところ、敗血症と DSS 腸炎に対する死亡率は野生型と同程度となった。それ故、マクロ

ファージで特異的に St18 を欠損させたマウスの表現型は VEGF の過剰な産生に起因していると考えられた。次に、St18 が欠損するとどうして VEGF の発現が上昇するのかを明らかにする目的で、VEGF のプロモーター解析を行った。その結果、VEGF のプロモーターには Sp1 の結合配列が存在することが判明した。そこで、マクロファージの培養細胞に Sp1 を過剰発現させたところ、VEGF のプロモーターが活性化することで VEGF の発現が誘導されることが明らかとなった。また、St18 を欠損するマクロファージでは野生型より多くの Sp1 が VEGF プロモーターに結合しており、St18 を欠損するマクロファージから産生される VEGF の量は Sp1 の阻害剤をふりかけることで正常化した。最後に、生化学的解析を駆使することで St18 と Sp1 の関係性を調べたところ、St18 は Sp1 と直接結合することで、Sp1 の VEGF のプロモーターへの結合を阻害していることが判明した (Maruyama et al Cell Rep, 2020)。

《破骨細胞における St18 の機能解析とその標的遺伝子の同定》

St18 が骨代謝系において如何なる役割を果たしているのかは不明である。そこで、破骨細胞で特異的に St18 を欠損させたマウスを作成し、表現型解析を実施した。その結果、意外なことに、当該マウスは破骨細胞の融合亢進を機序とする重篤な骨粗鬆症を呈することが判明した。トランスクリプトーム解析からは、エクソソームの受容体として知られる Tim4 の発現が St18 を欠損する破骨細胞において顕著に上昇していることが明らかとなった。そこで、破骨細胞特異的 St18 欠損マウスと Tim4 欠損マウスを掛け合わせることで St18 と Tim4 の二重欠損マウスを作成したところ、破骨細胞特異的 St18 欠損マウスの骨表現型が救済された。最近になって、破骨細胞の融合がエクソソーム-Tim4 axis によって制御されているメカニズム、ならびに St18 による Tim4 の発現制御機構の解明に成功したため、当該成果をまとめた論文を準備中である。

《痛覚神経における St18 の機能解析とその標的遺伝子の同定》

St18 が痛覚神経系において如何なる役割を果たしているのかは不明である。そこで、痛覚神経で特異的に St18 を欠損させたマウスを作成し、表現型解析を実施した。その結果、当該マウスの機械刺激に対する痛覚閾値が低下していることが判明した。研究を本格化させようとした矢先、COVID19 の pandemic が発生したため、当該マウスの生理学的解析は頓挫した。今後、本研究テーマを推進するための人件費・物品費・スペースチャージが確保され次第、研究を再開する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takayama Y, Derouiche S, Maruyama K, Tominaga M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Emerging Perspectives on Pain Management by Modulation of TRP Channels and ANO1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 pii: E3411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20143411.	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 -
1. 著者名 丸山健太	4. 巻 33
2. 論文標題 感覚免疫学の視点からみた真菌感染不快情動のバイオロジー ~Dectin1シグナルを介して制御される痛みと骨炎症~	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 THE BONE	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 丸山健太	4. 巻 38
2. 論文標題 痛みは如何にして感知され、どのような意味を持つのか? ~末梢性疼痛のしられざる発生機構とその生体調節機能~	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 388-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 *Maruyama K, Takayama Y, Sugisawa E, Yamanoi Y, Yokawa T, Kondo T, Ishibashi KI, Sahoo BR, Takemura N, Mori Y, Kanemaru H, Kumagai Y, Martino MM, Yoshioka Y, Nishijo H, Tanaka H, Sasaki A, Ohno N, Iwakura Y, Moriyama Y, Nomura M, Akira S, *Tominaga M.	4. 巻 6
2. 論文標題 The ATP transporter VNUT mediates induction of Dectin-1-triggered Candida nociception.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 306-318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2018.08.007. Epub 2018 Aug 15.	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 -

1. 著者名 Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, *Martino MM.	4. 巻 7
2. 論文標題 Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Wound Care	6. 最初と最後の頁 209-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/wound.2017.0761.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 丸山健太	4. 巻 36
2. 論文標題 無痛マウスは黄色ブドウ球菌性肺炎で死なない?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3269-3270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 丸山健太	4. 巻 36
2. 論文標題 接触性皮膚炎の病態はわさびとからしの受容体で説明できる	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1487-1489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenta Maruyama*.	4. 巻
2. 論文標題 Sensory-immunology: crosstalk between nociceptive and immune systems.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS J	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) 10.1111/febs.15846.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama K*, Kidoya H, Takemura N, Sugisawa E, Takeuchi O, Kondo T, Eid MMA, Tanaka H, Martino MM, Takakura N, Takayama Y, Akira S, Vandenbon A, Kumagai Y.	4. 巻 182
2. 論文標題 Zinc Finger Protein St18 Protects against Septic Death by Inhibiting VEGF-A from Macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 609-624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107906.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugisawa E, Takayama Y, Takemura N, Kondo T, Hatakeyama S, Kumagai Y, Sunagawa M, Tominaga M, Maruyama K*.	4. 巻 6
2. 論文標題 RNA Sensing by Gut Piezo1 Is Essential for Systemic Serotonin Synthesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 609-624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.06.022. Epub 2020 Jul 7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Julier Z, Karami R, Nayer B, Lu YZ, Park AJ, Maruyama K, Kuhn GA, Müller R, Akira S, Martino MM*.	4. 巻 6
2. 論文標題 Enhancing the regenerative effectiveness of growth factors by local inhibition of interleukin-1 receptor signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Adv	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/sciadv.aba7602. eCollection 2020 Jun.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 丸山健太	4. 巻
2. 論文標題 感覚免疫学	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ブレインサイエンスレビュー2021	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) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 丸山健太	4. 巻 79
2. 論文標題 腸内細菌RNAのセロトニン誘導による腸と骨の恒常性の制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 34-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 丸山健太	4. 巻 38
2. 論文標題 腸のPiezo1はセロトニン産生を介して腸と骨の恒常性を調節する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3256-3258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 丸山健太
2. 発表標題 "Relationship between Bone, Immunity and Sensation ~How do integrated systems work?~ "
3. 学会等名 山口大学医学部大学院セミナー 山口大学医学部 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山健太
2. 発表標題 "Relationship between Bone, Immunity and Sensation ~How do integrated systems work?~ "
3. 学会等名 生理学研究所部門公開セミナー 生理学研究所 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山健太
2. 発表標題 “ 痛覚システムにビルトインされている骨自然免疫機構をあぶりだす ”
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会シンポジウム 大阪国際会議場（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山健太
2. 発表標題 “ Nociceptor orchestrates Brain Energy Metabolism to Protect Septic Death ”
3. 学会等名 痛み研究会 生理学研究所（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山健太
2. 発表標題 痛覚システムにビルトインされている骨自然免疫機構をあぶりだす
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山健太
2. 発表標題 骨 痛覚 免疫トライアングル恒常性を介した真菌性self defense機構の提唱と応用
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山健太
2. 発表標題 真菌感染随伴疼痛の発生機序とその生物学的意義に関する一考察
3. 学会等名 第138回日本薬学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山健太
2. 発表標題 微生物による骨破壊のメカニズム
3. 学会等名 日本解剖学会総会・日本生理学会大会 合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Kenta Maruyama https://www.moleculargerontology.com/

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