

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03824

研究課題名（和文）慢性疾患における細胞応答の相互作用機序

研究課題名（英文）Analysis of crosstalk mechanisms of cellular responses in chronic diseases

研究代表者

村上 智彦（Murakami, Tomohiko）

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：50510723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレスは炎症応答を単独で誘導するのではなく、炎症応答時にその応答を増強する効果があることがわかった。この炎症応答の増強の結果、小胞体ストレスは炎症性サイトカインIL-6などの発現を促進する。また本研究の結果から、小胞体ストレス関連疾患における慢性炎症は、小胞体ストレスによる炎症応答の増強が関わっていることが推察され、炎症の慢性化機構に関しても小胞体ストレスが関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレスと慢性炎症の相互作用機序とその役割の解明は、関連する疾患の発症機構および生体制御の理解につながり、新しい細胞応答の概念構築に結びつくと考えられる。特に不明な点が多い炎症の慢性化メカニズムにも小胞体ストレスによる炎症増強効果が関与する可能性が示唆される。さらに、この作用機序を阻害することで、小胞体ストレスおよび慢性炎症関連疾患に対する新規治療戦略に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study found that endoplasmic reticulum stress does not induce an inflammatory response alone, but rather has the effect of enhancing that response during an inflammatory response. As a result of this enhanced inflammatory response, ER stress promotes the expression of inflammatory cytokines such as IL-6. The results of this study suggest that chronic inflammation in endoplasmic reticulum stress-related diseases is related to the enhancement of the inflammatory response by endoplasmic reticulum stress, and that endoplasmic reticulum stress may be involved in the development of chronic inflammation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：炎症 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

膜貫通型タンパク質あるいは分泌型タンパク質はその合成過程において小胞体内に一旦運び込まれ、様々な修飾を受けて機能をもったタンパク質に成熟する。しかし、細胞内外からの各種の刺激によりこのタンパク質の成熟の過程が阻害されると、不良タンパク質となって小胞体内に蓄積し、細胞にダメージを与える。細胞にとってこの小胞体機能異常である小胞体ストレスは極めて重篤な事態で、直ちに小胞体ストレスから回避するため、小胞体膜上に存在する小胞体ストレスセンサーを起点として防御システムを活性化させる。この応答系は小胞体ストレス応答と呼ばれ、酵母から哺乳細胞に至るまで真核細胞に広く保存されている。このように小胞体はタンパク質の成熟を支えるための必要不可欠なオルガネラであるとともに、小胞体ストレス時に細胞死から身を守るシグナル発信基地としての役割を併せ持つことが知られている。また、小胞体ストレス応答は細胞の危機的状態から回避するためだけのシステムではなく、特定の細胞の分化・成熟にも重要な役割を演じていることが知られている。一方、生体制御に必須である小胞体ストレス応答の機能障害が様々な疾患の発症に深く関与することも明らかにされ、小胞体ストレス応答機構の解明は小胞体ストレスが関与する疾患の発症機構の解明に重要であると注目されている。

近年、小胞体ストレスは糖尿病、肥満、神経変性疾患、骨軟骨疾患、がん、歯周炎などの発症に関与することが報告されてきた。一方、小胞体ストレスからこれら疾患発症に至る詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。興味深いことに、これら小胞体ストレス関連疾患は、慢性炎症とも深く関与していることがよく知られている。これが偶然とは考え難いことから、小胞体ストレスと慢性炎症は未知の細胞応答系で相互に作用していることが強く示唆されており、小胞体ストレスと慢性炎症の関連性を学術的に証明することができれば、疾患の新規治療法あるいは予防法の開発に応用できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

小胞体ストレスと慢性炎症が疾患患部で同時に観測されることが偶発的な現象とは考え難いことから、小胞体ストレスと慢性炎症をつなげる未知の細胞応答系が存在する可能性が高い。小胞体ストレスと慢性炎症の相互作用に関わる遺伝子あるいはシグナルを同定し、小胞体ストレスと慢性炎症をつなぐ新規の細胞応答を発見することができれば、小胞体ストレスと慢性炎症の関連性を学術的に証明することができる。さらにその研究成果は学術的な価値に留まらず、この細胞応答を阻害することで疾患の新規治療法あるいは予防法に応用できる可能性がある。そこで本研究では、小胞体ストレスと慢性炎症の相互作用に関わる遺伝子あるいはシグナルを同定し、その機能解析を行うことで、小胞体ストレスと慢性炎症の相互作用機序とその役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレスおよび炎症で誘導される遺伝子の同定

小胞体ストレスおよび炎症時に誘導される遺伝子の同定を行うために、小胞体ストレス誘導薬ツニカマイシンあるいは炎症を誘導するリポ多糖を骨髄由来マクロファージ培養細胞に負荷し、発現変動を示す遺伝子をマイクロアレイあるいはRNA シーケンスを用いて、網羅的に探索した。これに加え、実際の疾患患部では小胞体ストレスと炎症が共に生じていることを鑑みて、培養細胞に小胞体ストレスと炎症を共に誘導し、発現変動を示す遺伝子の探索を行った。

(2) 小胞体ストレスおよび炎症で誘導される遺伝子の機能解析

同定した遺伝子あるいはその関連遺伝子が、小胞体ストレスシグナルあるいは炎症応答に関わるか否かを検討するために、培養細胞を用いた過剰発現実験、shRNA による Knockdown 実験等を実施し、生化学的あるいは分子細胞生物学的アプローチによる機能解析を行い、小胞体ストレスシグナルと炎症応答の関連性およびその相互作用を検証した。同定された遺伝子がコードするタンパク質や関連経路に阻害薬が存在する場合は、その阻害薬を用いた添加実験を行った。

(3) 同定したターゲット遺伝子欠損マウスを用いた機能解析

小胞体ストレスと炎症で相乗的に発現が誘導される遺伝子を同定し、その遺伝子欠損マウスを入手した。この遺伝子欠損マウスと野生型マウスから細胞および組織を単離し、遺伝子発現等

を比較解析することで、小胞体ストレス応答と炎症応答に対するターゲット遺伝子の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレスおよび炎症で誘導される遺伝子の同定

マクロファージ培養細胞に小胞体ストレス誘導薬ツニカマイシン、炎症を誘導するリポ多糖、あるいはツニカマイシンとリポ多糖を共に誘導し、マイクロアレイあるいは RNA シークエンスによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、小胞体ストレスと炎症を共に負荷した時に相乗的な発現誘導を示す遺伝子群を見出した。この遺伝子群のパスウェイ解析を行ったところ、その多くが炎症あるいは免疫応答関連経路であり、小胞体ストレス応答関連経路はほとんど含まれていなかった。この結果は、少なくともこの実験系において、小胞体ストレスは炎症応答を増強する効果があり、炎症は小胞体ストレス応答に関与しないことを示していた。これらの遺伝子の発現変動は RT-qPCR においても同様に確認された。したがって、小胞体ストレスと炎症を共に負荷することで、炎症応答が小胞体ストレスにより増強されていることが判明した。

(2) 小胞体ストレスおよび炎症で誘導される遺伝子の機能解析

マイクロアレイあるいは RNA シークエンスによる網羅的な遺伝子発現解析の結果、小胞体ストレスによる炎症応答の増強が生じていることを見出した。そこで炎症応答を誘導する起点となる因子としては転写因子が重要であることから、転写因子の着目し、機能解析を進めた。転写因子の中で、小胞体ストレスによる増強効果が特に強い転写因子に着目し、ER stress-induced inflammatory factor (ERIF) と考え、詳細な解析を行った。ERIF は炎症関連の転写因子として報告があるが、小胞体ストレスとの関係性は知られていなかった。

ウエスタンブロッティング法により、ERIF は小胞体ストレスによりタンパク質レベルで誘導されていることを確認した。また小胞体ストレスと炎症を誘導することで、ERIF はタンパク質レベルで増加することを確認した。続いて、レンチウイルスシステムを用いて ERIF をマクロファージ培養細胞に過剰発現し、発現誘導される炎症関連遺伝子を探索した。その結果、炎症性サイトカインである IL-6 などを含む複数の炎症関連遺伝子が ERIF によって誘導されることが判明した。

そこで IL-6 について更に詳細に解析を進めた。興味深いことに、小胞体ストレス単独刺激において IL-6 mRNA の発現誘導も確認されたが、細胞上清中の IL-6 濃度を ELISA 法にて測定したところ、分泌には至っていなかった。この現状は小胞体ストレス単独では炎症応答の完全な誘導には至らないことを示していた。したがって、小胞体ストレスによる炎症誘導効果は炎症が生じている時に限られることが示唆される。

(3) 同定したターゲット遺伝子欠損マウスを用いた機能解析

ERIF の機能を詳細に調査するために ERIF 遺伝子欠損マウスを入手した。この ERIF 遺伝子欠損マウスから細胞を単離し、リポ多糖および小胞体ストレス刺激における炎症応答について解析を行ったところ、ERIF 遺伝子欠損細胞における炎症応答が減弱していることを見出した。この現象は小胞体ストレスによる炎症応答への作用がこの転写因子を介していることを示していた。続いて、さらに詳細に小胞体ストレスによる炎症応答への影響を調べるために、小胞体ストレス状態有無においてマクロファージに炎症を惹起し、それらの遺伝子発現変動を RNA シークエンスにて網羅的に解析した。小胞体ストレスによって増強される炎症経路を探索した結果、ERIF の経路に加え、未同定であった他の炎症経路にも小胞体ストレスの影響が及んでいることを確認した。これらの結果は、炎症応答に対する小胞体ストレスの影響は ERIF に留まらず、複数の炎症経路に波及していることを強く示唆していた。

(4) まとめ

以上の結果から、小胞体ストレスは炎症応答を単独で誘導するのではなく、炎症応答を増強する効果があることがわかった。この炎症応答の増強因子の一つとして ERIF がかわり、炎症性サイトカイン IL-6 の発現などを促進する。また本研究の結果から、小胞体ストレス関連疾患における慢性炎症は、小胞体ストレスによる炎症応答の増強が関わっていることが推察され、不明な点が多い炎症の慢性化機構に関しても小胞体ストレスが関与している可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ruengsinpinya Lerdluck, Murakami Tomohiko, Nakamura Eriko, Takahata Yoshifumi, Hata Kenji, Nakaminami Yuri, Okae Hiroaki, Nishimura Riko	4. 巻 533
2. 論文標題 G protein subunit 1 is an important mediator of the late stage of endochondral ossification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 90 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.119	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 Murakami Tomohiko, Takahata Yoshifumi, Hata Kenji, Nishimura Riko	4. 巻 62
2. 論文標題 Role of interleukin-1 and inflammasomes in oral disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 242 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.07.003	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 Murakami Tomohiko, Nakaminami Yuri, Takahata Yoshifumi, Hata Kenji, Nishimura Riko	4. 巻 23
2. 論文標題 Activation and Function of NLRP3 Inflammasome in Bone and Joint-Related Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5365 ~ 5365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23105365	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 S. Kobayashi, K. Hata, Y. Takahata, T. Murakami, N. Uzawa, R. Nishimura
2. 発表標題 Identification of Chondrocyte-specific Sox9 Enhancers Important for Skeletal Development
3. 学会等名 ASBMR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林紗知、波多賢二、高畑佳史、村上智彦、西村理行
2. 発表標題 軟骨細胞におけるSox9 遺伝子のエンハンサー領域の同定と機能解析
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林紗知、波多賢二、高畑佳史、村上智彦、高野洋志、八尾良司、鶴澤成一、西村理行
2. 発表標題 軟骨細胞におけるSox9遺伝子の発現制御機構の解明
3. 学会等名 第6回日本骨免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lerdluck Ruengsinpinya, Eriko Nakamura, Yoshifumi Takahata, Kenji Hata, Yuri Nakaminami, Riko Nishimura, Tomohiko Murakami
2. 発表標題 GNB1 (G protein subunit 1) is required for the late stage of endochondral ossification
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上智彦、Lerdluck Ruengsinpinya、中村恵理子、高畑佳史、波多賢二、西村理行
2. 発表標題 Gタンパク質サブユニットbeta 1はNLRP3インフラマソームを負に制御する
3. 学会等名 第6回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murakami T
2. 発表標題 ER stress and bone metabolism
3. 学会等名 日本内分泌学会学術総会 日韓シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 軟骨・骨・関節疾患の予防または治療用医薬組成物および軟骨・骨・関節疾患の予防または治療用薬剤のスクリーニング方法	発明者 村上智彦、西村理行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-213230	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 軟骨・骨・関節疾患の予防または治療用医薬組成物および軟骨・骨・関節疾患の予防または治療用薬剤のスクリーニング方法	発明者 村上智彦、西村理行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/043187	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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
研究協力者	西村 理行 (Nishimura Riko)		
研究協力者	波多 賢二 (Hata Kenji)		
研究協力者	高畑 佳史 (Takahata Yoshifumi)		

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			
米国	National Institutes of Health			