

腸内リボ核酸を撲滅して骨折のない世界を実現する

研究代表者

丸山健太 生理学研究所

共同研究者

高山靖規 昭和大学

武村直紀 大阪大学



1. 研究の背景と達成目標

空前絶後の超高齢化社会に突入した本邦において、寝たきりや要介護の主な原因となっている骨粗鬆症の解決は喫緊の課題であるが、安価でかつ有効な骨粗鬆症治療薬は存在しない。申請者らは、メカノセンサーの一種である Piezo1 が腸管上皮に発現し、これが腸内の糞便に存在している RNA を認識することで骨形成を抑制するセロトニンの産生を誘導していることを見出した。また、Piezo1 を腸管上皮で特異的に欠損させると血中のセロトニン濃度が低下し骨量が顕著に増加した。そこで本研究では、如何なる RNA 形態が Piezo1 のリガンドとなってセロトニンを誘導しているのかを解明すると同時に、腸内 RNA の除去法を開発することで、革新的な骨量増加医薬の開発に挑む。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

我々は腸管上皮に発現する Piezo1 のシグナルが当該細胞からセロトニンを産生させていることを突き止めた。糞便上清をタンパク分画/DNA 分画/RNA 分画に分離して Piezo1 を発現した細胞にふりかけたところ、RNA 分画をふりかけた際にのみカルシウム応答が生じたことから、Piezo1 は糞便に含まれる RNA を認識していると考えられた。そこでさまざまな形態の RNA を調整してカルシウムイメージング・パッチクランプ法でスクリーニングを行ったところ、細菌由来の一本鎖 RNA が Piezo1 のリガンドであることを突き止めた。また、阻害剤を用いた生化学的解析によって、Piezo1 の下流で Calpain や Akt のシグナルが Piezo1 を介したセロトニンの誘導に必須であることを同定した (Sugisawa et al, *Cell* 2020)。また、Piezo1 を欠損する腸上皮細胞のトランスクリプトーム解析からは、カルシニューリン経路が Piezo1 の下流で重要な役割を果たしていることが判明した。一本鎖 RNA を選択的に分解する RNaseA を 1 カ月にわたって注腸すると老齢マウスの骨量増加をもたらすことが明らかとなったが、RNaseA を単に経口投与するだけでは骨量の増加は得られなかった。その一方で、我々は 1 週間に 1 度、合計 4 回の注腸投与で血中セロトニン濃度を低下させると同時に、骨量を増やすことのできる RNA 分解酵素-マトリゲル複合体の条件を見出した。

3. 研究成果

我々は、Piezo1 が腸管上皮と骨代謝細胞で発現していることを見出した。そこで、腸と骨における Piezo1 が果たす役割を明らかにするため、腸管上皮特異的 Piezo1 欠損マウス(Villin Cre-Piezo1^{flx/flx})、破骨細胞特異的 Piezo1 欠損マウス(LysM Cre-Piezo1^{flx/flx})、ならびに骨芽細胞特異的 Piezo1 欠損マウス(Coll1a1 Cre-Piezo1^{flx/flx})を作成し、これらマウスの表現型解析を行った。その結果、破骨細胞特異的 Piezo1 欠損マウスと骨芽細胞特異的 Piezo1 欠損マウスの骨量は正常である一方、腸管上皮特異的 Piezo1 欠損マウスの骨量は顕著に上昇していることがわかった (図 1)。骨形態計測を実施したところ、腸管上皮特異的 Piezo1 欠損マウスの骨では骨芽細胞による骨形成が亢進し

ており、これが骨量増加の原因と考えられた。近赤外蛍光プローブを経口投与して *in vivo* における腸管の蠕動運動を Shimazu SAI-1000 イメージングシステムで観察したところ、腸管上皮特異的 Piezo1 欠損マウスの腸蠕動は野生型と比較して顕著に低下していることが明らかとなった(図 1)。また、腸管上皮特異的 Piezo1 欠損マウスに野生型マウスが 1 週間で全滅する濃度の DSS を投与して腸炎を惹起したところ、9 割が生じた。大腸の組織学的解析を実施したところ、驚くべきことに、腸管上皮特異的 Piezo1 欠損マウスでは DSS による大腸炎が殆ど生じていなかった(図 1)。以上より、腸管上皮の Piezo1 は骨形成を負に制御すると同時に腸蠕動の促進と腸炎の増悪をもたらす因子であることが明らかとなった。腸管上皮特異的 Piezo1 欠損マウスの表現型が発現する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、腸蠕動の促進と腸炎の増悪をもたらすと同時に骨形成を抑制するホルモンであるセロトニンの発現が Piezo1 を欠損する腸管上皮で低下していた。そこで腸管上皮特異的 Piezo1 欠損マウスに 1 カ月間セロトニンを投与したところ、腸蠕動・DSS 腸炎・骨代謝は野生型と同程度となった。それ故、Piezo1 は腸管上皮のセロトニン内分泌機構における枢軸分子であることが明らかとなった。Piezo1 が腸蠕動による機械刺激に応じてセロトニンを誘導しているのかどうかを検証するため、STREX system を用いて腸管上皮に伸展収縮刺激を加えたところ、予想に反して野生型ならびに Piezo1 を欠損する腸管上皮で同程度のセロトニンの産生亢進が観察された。それゆえ、腸管上皮の Piezo1 は機械刺激に応じて活性化しているわけではないことが推測された。次に、腸管上皮の Piezo1 が腸内細菌依存的にセロトニンを産生しているかどうかを明らかにするため、抗生物質カクテルをマウスに投与することで腸内細菌を激減させたところ、野生型マウスでは腸管上皮のセロトニン産生が抑制されて骨量の上昇がみられた一方、腸管上皮特異的 Piezo1 欠損マウスでは当該現象が観察されなかった。これらの結果は、糞便に含まれるなんらかの腸内細菌由来の分子が Piezo1 のリガンドとなっている可能性を示唆する。実際、糞便溶解上清を Piezo1 を発現させた細胞にふりかけると Ca 応答が観察されたことから、当該仮説の蓋然性は高いものと考えられた。そこで糞便溶解上清をタンパク質分画・DNA 分画・RNA 分画の3つにわけて Ca イメージングを実施したところ、RNA 分画でのみ Ca 応答が観察され、RNA が Piezo1 を活性化しうることが明らかとなった。また、糞便溶解上清を一本鎖 RNA を分解する RNaseA で処理すると、糞便溶解上清の Piezo1 の活性化能が消失したことから、一本鎖 RNA が Piezo1 のリガンドとなっていることが推測された。実際、人工合成された一本鎖 RNA は Piezo1 を発現させた HEK293T 細胞に Piezo1 電流を誘発したことから、糞便中の一本鎖 RNA は Piezo1 の天然リガンドであることがわかった。一般に、老齢マウスの骨形成速度は若年マウスと比べて低下していることが知られている。そこで、老齢マウスの糞便溶解上清の RNA 量を測定したところ、若年マウスと比べて有意に増加していた。また、老齢マウスの血中セロトニン濃度は若年マウスと比べて上昇している一方、老齢マウスの腸管上皮における RNaseA の発現量は若年マウスと比べて低下していた。これらの結果は、腸管内における一本鎖 RNA 量が加齢に伴う骨形成速度の低下と関連している可能性を示唆する。老齢マウスの腸管内に存在する一本鎖 RNA の生理学的意義を明らかにする目的で、老齢の野生型マウスに 1 カ月にわたって RNaseA を注腸する実験をおこなった。その結果、RNaseA を注腸されたマウスでは血中セロトニン濃度の低下をともなった骨量の上昇と腸蠕動の低下が認められた。これに加えて我々は、1 週間に 1 度、合計 4 回の注腸投与で血中セロトニン濃度を低下させると同時に骨量を増やすことのできる RNA 分解酵素-マトリゲル複合体の条件を見出した。

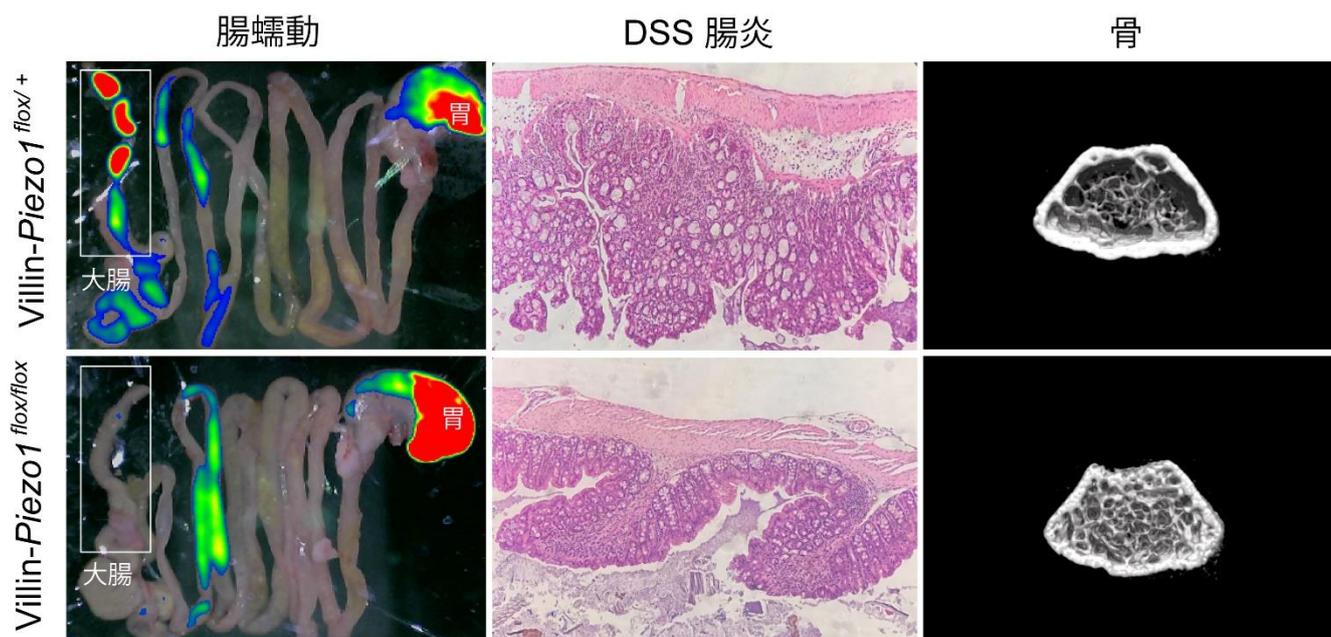


図1 腸管上皮特異的 Piezo1 欠損マウスの腸と骨の表現型

(左) 近赤外蛍光プローブを経口投与後 4 時間のプローブ腸内分布像 (中) DSS 腸炎を誘発した腸組織(右) 大腿骨の CT 像

4. 今後の展開

現在、1 カ月に 1 度の注腸で、十分に血中セロトニン濃度を低下させうる RNA 分解酵素-マトリゲル複合体の条件同定を目指した研究をすすめている (基幹技術については特許出願を検討中)。

5. 発表実績

原著

*は責任著者を示す

1. Sugisawa E, Kondo T, Kumagai Y, Kato H, Takayama Y, Isohashi K, Shimosegawa E, Takemura N, Hayashi Y, Sasaki T, Martino MM, Tominaga M, **Maruyama K***.
Nociceptor-derived Reg3γ prevents endotoxic death by targeting kynurenine pathway in microglia.
Cell Rep 38: 110462. 2022
2. **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.
Zinc finger protein St18 protects septic death by inhibiting VEGF-A from macrophages.
Cell Rep 32: 107906. 2020
3. Sugisawa E, Takayama Y, Takemura N, Kondo T, Hatakeyama S, Kumagai Y, Sunagawa M, Tominaga M, **Maruyama K***.
RNA sensing by gut Piezo1 is essential for systemic serotonin synthesis.
Cell 182: 609-624. 2020

総説

*は責任著者を示す

1. Okumo T*, Takayama Y*, **Maruyama K***, Kato M, Sunagawa M*.
Senso-Immunologic Prospects for Complex Regional Pain Syndrome Treatment.
Front Immunol 12: 786511. 2022
2. **Maruyama K***.
Senso-immunology : crosstalk between nociceptive and immune systems.
FEBS J 289: 4132-4145. 2022

主な海外講演

1. **Maruyama K**: Senso-immunology. *International Symposium of Seoul National University School of Dentistry*, Zoom, 2021 (特別講演)
2. **Maruyama K**: Crosstalk between Nociceptive system and Osteo-immune system. *Joint Symposium of KUCM-YUCM-YUCD-NIPS*, Zoom, 2021 (シンポジウム)
3. **Maruyama K**: New players in skeletal system and their unexpected roles: novel molecules for novel therapies. *The 4thCSI/JSI/KAI Joint Symposium*, Korea, 2015 (シンポジウム)

主な国内講演

1. **丸山健太**: 感覚免疫学 *慶應医学賞ライジングスター賞講演会* 慶應義塾大学 Zoom, 2022 (特別講演)
2. **丸山健太**: 感覚免疫学 *野口研究所講演会* 如水会館 Zoom, 2022 (特別講演)
3. **丸山健太**: 感覚免疫学 *国際SHR シンポジウム* Zoom, 2022 (シンポジウム)
4. **丸山健太**: Senso-immunology. *18th Bone Biology Forum* クロスウェーブ幕張, 2022 (招待講演)
5. **丸山健太**: 感覚免疫学 *第4回三融会・武田神経科学シンポジウム* 武田薬品工業株式会社 Zoom, 2022 (シンポジウム)
6. **丸山健太**: 感覚免疫学 *第71回日本薬学会関西支部総会* 近畿大学 Zoom, 2021 (特別講演)
7. **丸山健太**: 微生物による骨破壊のメカニズム *第126回日本解剖学会総会・第98回日本生理学会大会 合同シンポジウム* Zoom, 2021 (シンポジウム)

主な受賞

1. **丸山健太**: 令和 3 年 井上リサーチアワード
2. **丸山健太**: 令和 3 年 長寿科学賞
3. **丸山健太**: 令和 3 年 日本医師会医学研究奨励賞
4. **丸山健太**: 令和 4 年 慶應医学賞ライジングスター賞
5. **丸山健太**: 令和 4 年 若手研究者賞 自然科学研究機構
6. **丸山健太**: 令和 4 年 柿内三郎記念奨励研究賞 日本生化学会
7. **丸山健太**: 令和 4 年 岡本研究奨励賞 成人血管病振興財団
8. **丸山健太**: 令和 5 年 わかしゃち奨励賞