

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21654

研究課題名(和文) リソソーム環境が管理するアレルギー炎症応答の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism of lysosome-dependent allergic inflammation

研究代表者

小林 俊彦 (Kobayashi, Toshihiko)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・副プロジェクト長

研究者番号：40613203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アミノ酸トランスポーターSLC15A4がマスト細胞の機能と個体免疫応答に果たす役割を分子レベルで解析し、マスト細胞が媒介する炎症性疾患の新規制御機構を明らかにすることを目標とした。SLC15A4欠損マスト細胞ではリソソームの形態異常、およびヒスタミン合成亢進、またそれに伴ったIgE-抗原刺激によるマスト細胞の脱顆粒時のヒスタミン放出量の増加が認められた。その分子メカニズムとして、SLC15A4がmTORC経路および転写因子TFEBの活性化制御を介してマスト細胞のリソソーム生合成とヒスタミン等の炎症メディエーターの合成/細胞内貯蔵に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Among various immune cells, mast cells or NK cells have the specialized intracellular compartments known as the histamine granules or cytotoxic granules. Our project aimed to reveal the molecular mechanism how the mast cell functions that are dependent on endosome/lysosome system, are regulated by SLC15A4, a lysosome-resident amino acid transporter. We found that SLC15A4-deficiency in mast cells led to the abnormality in the morphology of the lysosome/secretory granules and increased histamine synthesis or storage in the granules, which resulted in the increased histamine level upon degranulation both in vitro and in vivo. In SLC15A4-deficient cells, reduced mTORC activity augmented the activity of TFEB, the master transcription factor or the lysosome biogenesis, leading to the excess formation of secretory granules of mast cells. Our finding suggested that control of the lysosome condition by SLC15A4 is critical for the functional integrity of mast cells.

研究分野：分子免疫学

キーワード：リソソーム マスト細胞 アミノ酸トランスポーター 炎症 アレルギー

1. 研究開始当初の背景

古くよりリソソームは物質分解を担うオルガネラと認識されてきたが、近年、物質の分解だけではなく、分泌やシグナル伝達の間として重要な役割を果たしていることが明らかになっている(文献1)。エンドソームからリソソームにかけては、小胞輸送に伴って時間的・空間的に限局したシグナル伝達が行われ、それによって細胞の分化、増殖、細胞運動など、多様な細胞応答が制御されている。病原体センサーとして生体防御に必須の役割を果たす Toll 様受容体 (TLR) の場合も、微生物や死細胞に由来する核酸を認識する TLR 分子種では、エンドソームからリソソームにかかる小胞内でリガンドを結合し、シグナルを伝達する(文献2)。免疫細胞の中でも、マスト細胞や NK 細胞といった細胞種は、それぞれヒスタミン顆粒や細胞傷害性顆粒として知られる分泌リソソームを機能分化させているが、これら細胞のエフェクター機能の発揮において、リソソーム環境に依存した制御機構に着眼した研究はほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、マスト細胞に特徴的な分泌リソソーム内のアミノ酸およびプロトン環境がマスト細胞の機能と個体免疫応答にどのような影響を及ぼすかを理解し、マスト細胞が媒介する炎症性疾患の新規制御機構を明らかにすることを目的とし、さらにアレルギー性疾患をはじめとする炎症性疾患の新規治療法の開発の礎となる分子基盤を構築することを目指した。

マスト細胞は、抗原と IgE の複合体や IL-33 などの刺激によって、ヒスタミンや脂質メディエーターを放出してアレルギー応答を惹起するほか、ケモカインやサイトカインを産生することにより免疫調節機能も有する細胞群である。これらの分泌はリソソーム関連オルガネラとして知られるマスト細胞の分泌型リソソームによって媒介される。これまでマスト細胞の機能制御は、抗原やサイトカインによるシグナルとメディエーター分泌に着目して進んできたが、申請者らは、このユニークな分泌顆粒の形成維持、およびエフェクター機能の発揮においても、リソソームという小胞環境に依存した制御機構が重要な役割を果たしている可能性が高いと考え、リソソームに発現するアミノ酸トランスポーター SLC15A4 をモデルにマスト細胞のリソソームの環境管理の分子機構と炎症応答機構との関連について解明を試みた。

3. 研究の方法

マスト細胞の機能制御における SLC15A4 によるリソソーム環境管理の重要性とそのメカニズムを理解するために、SLC15A4 欠損マウスを用いてマスト細胞のリソソーム性状解析と炎症応答の解析およびアレルギー炎症モデルの病態解析を行った。リソソームの性状解析では、ヒスタミンなどの含有物質の分析的解析とリソソーム生合成、およびシグナル伝達の生化学的解析に重点をおいて解析した。

4. 研究成果

本研究では、骨髄由来マスト細胞を用いた *in vitro* の実験によって、マスト細胞に特徴的な分泌リソソーム内のアミノ酸およびプロトン環境が細胞機能、特に炎症応答時のエフェクター機能にどのような影響を及ぼすかを、またマウスを用いた実験により、マスト細胞のリソソーム環境の変動が個体レベルの免疫応答に与える影響を解析した。具体的には、マスト細胞において SLC15A4 を介したリソソームに依存したシグナル伝達の重要性、②アミノ酸トランスポーター SLC15A4 によるリソソーム環境管理がマスト細胞の機能に果たす役割、について明らかにした。すなわち、SLC15A4 欠損マスト細胞におけるリソソームの形態異常、およびヒスタミン合成亢進、またそれに伴った IgE-抗原刺激によるマスト細胞の脱顆粒時のヒスタミン放出量の増加を見出した。その分子メカニズムとして、SLC15A4 が mTORC 経路および転写因子 TFEB の活性化制御を介してマスト細胞のリソソーム生合成とヒスタミン等の炎症メディエーターの合成/細胞内貯蔵に重要な役割を果たしていることを明らかとした(図1)。これらの成果を論文にまとめて、*International Immunology* 誌に発表した。

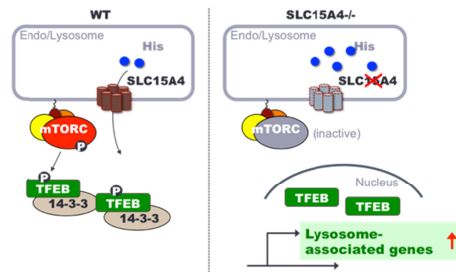


図1 SLC15A4を介したリソソーム関連遺伝子の制御
マスト細胞においてSLC15A4はmTORCによる転写因子TFEBの活性化制御を介してリソソーム生合成を調節している

また、リソソーム環境管理における SLC15A3 と SLC15A4 との機能の差異および類似点を明らかにすることを目的として、SLC15A3 の欠損マウスを作成し、SLC15A3 欠損細胞の機能解析を行なった。SLC15A3 欠損マスト細胞では、SLC15A4 同様の表現

型が得られなかったことから、これら分子の役割機能が異なることが示唆された。

<引用文献>

1) Murphy JE et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009. 107:17615-22.

2) Kagan JC, and Barton GM. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014. 7(3): a016253.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Kobayashi T, Tsutsui H, Shimabukuro-Demoto S, Sugitani-Yoshida R, Karyu H, Furuyama-Tanaka K, Ohshima D, Kato N, Okamura T, Toyama-Sorimachi N. Lysosome biogenesis regulated by the amino-acid transporter SLC15A4 is critical for functional integrity of mast cells. *Int Immunol*. 29(12):551-566. 2017. doi: 10.1093/intimm/dxx063.

2. Morita N, Yamai I, Takahashi K, Kusumoto Y, Shibata T, Kobayashi T, Nonaka MI, Ichimonji I, Takagi H, Miyake K, Takamura SA. C4b binding protein negatively regulated TLR1/2 response. *Innate Immun*. 23 (1):11-19. 2017.

3. Jennings RT, Odkhuu E, Nakashima A, Morita N, Kobayashi T, Yamai I, Tanaka M, Suganami T, Haga S, Ozaki M, Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K, Kikuchi-Ueda T, Ichimonji I, Ogawa Y, Takagi H, Yamazaki T, Miyake K, Akashi-Takamura S. Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. *Int Immunol*. 28 (10):503-512. 2016.

4. 小林俊彦、向井康治朗、田口友彦、反町典子：炎症・感染応答を担うオルガネラ：臨床免疫・アレルギー科 69 巻 1 号 pp99-106. 科学評論社 2018 年

[学会発表](計 6 件)

1. Kobayashi T, Tsutsui H, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N. Regulatory role of a lysosome-resident oligopeptide transporter SLC15A4 in the inflammatory responses of mast cells. Presented at 5th Annual meeting of the International Cytokine and Interferon Society (Cytokines 2017). November 2017,

Kanazawa, Japan.

2. Kobayashi T, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N. Regulatory role of an oligopeptide transporter SLC15A4 in inflammatory responses in mast cells. Presented at 16th International Congress of Immunology, August 2016, Melbourne, Australia.

3. Kobayashi T, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N. Oligopeptide Transporter SLC15A4 Regulates Allergic Reactions by Controlling Mast Cell Homeostasis and Inflammatory Response. Presented at Gordon Research Conference “Membrane Transport Proteins”, June 2016, Lucca (Barga), Italy.

4. Kobayashi T, Tsutsui H, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N. Regulatory role of SLC15A3 in the systemic inflammation. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会, 2017 年 12 月 12-14 日, 仙台.

5. 小林俊彦, 筒井英充, 大島大輔, 反町典子：リソソーム局在型オリゴペプチドトランスポーター SLC15A4 によるマスト細胞の炎症応答制御機構. 第 12 回トランスポーター研究会年会, 2017 年 7 月 8-9 日, 仙台.

6. Ohshima D, Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N. Regulation of innate immune responses by oligopeptide transporter SLC15A3. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会, 2016 年 12 月 5-7 日, 仙縄.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 俊彦 (KOBAYASHI, Toshihiko)
国立国際医療研究センター研究所 / 副プロジェクト長

研究者番号：40613203

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

大島 大輔 (OHSIMA, Daisuke)
筒井 英充 (TSUTSUI, Hidemitsu)
出本 志保 (DEMOTO, Shiho)
清水 有紀子 (SHIMIZU, Yukiko)
岡村 匡史 (OKAMURA, Tadashi)
田中 香織 (TANAKA-FURUYAMA, Kaori)
吉田 玲子 (YOSHIDA-SUGITANI, Reiko)
狩生 ひとみ (KARIU, Hitomi)