

令和元年5月31日現在

機関番号：82610

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07381

研究課題名(和文) アミノ酸トランスポーターSLC15A3によるマクロファージの新規活性化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of macrophage activation mechanisms via the amino acid transporter SLC15A3

研究代表者

筒井 英充 (Tsutsui, Hidemitsu)

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・研究員

研究者番号：20806822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージのライソゾーム上に選択的に発現するSLC15A3は、NODと共役することで免疫応答に関与することが過去に報告されている。一方でマクロファージは細胞の機能の制御にアミノ酸代謝を利用しているという報告があるが、その詳しいメカニズムは明らかになっていない。今回私たちは、NODを介さない経路においてもマクロファージの活性化の一部にSLC15A3が関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージや樹状細胞は自然免疫の中で重要な役割を担っている。しかし、しばしばこれら自然免疫系の細胞が異常に活性化することで自己免疫疾患が引き起こされるとも考えられている。今回我々が見出したマクロファージの活性化機構の詳細を明らかにすることができれば、自然免疫系の活性化が原因とされる免疫疾患の新しい治療法につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Amino acid transporter SLC15A3 is selectively expressed on lysosome in macrophage and dendritic cell. Previously reported that SLC15A3 conjugate with NOD and works to immune response. On the other hand, macrophage controls activation using amino acid metabolisms but detail mechanisms has not known. We found that SLC15A3 deficient macrophage defect activation when NOD independent pathways.

研究分野：免疫学

キーワード：マクロファージ アミノ酸トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ライソゾームは、ライソゾーム病と総称される疾患が示すとおり、ライソゾーム内での物質分解を担い、細胞の恒常性を維持する上で重要なオルガネラである。一方、樹状細胞やマクロファージといった一部の免疫細胞はライソゾームをシグナル伝達の間として利用しており、本来は完全分解系であるライソゾームの環境を巧みに制御し、分解機能を制限することで、ライソゾーム内におけるTLR を介したリガンド認識やシグナル伝達を可能としている。特にライソゾーム内におけるシグナル伝達は、細胞表面でのレセプターを介したシグナルとはリガンドを認識するタイミングや空間が異なり、また、免疫応答の質や強さを左右することから、このライソゾームの環境制御機構を理解することは免疫疾患の新規治療戦略の樹立に極めて重要である。樹状細胞やB 細胞に優先的に発現するライソゾーム局在型アミノ酸トランスポーター Solute carrier protein 15A4(SLC15A4)は、プロトンと共役してヒスチジン及びヒスチジンを含む短鎖ペプチドを、ライソゾーム内腔から細胞質へと輸送するトランスポーターで、全身性エリテマトーデス(SLE)、糖尿病、関節リウマチ、炎症性腸疾患において疾患関連遺伝子として報告されていた。近年の研究により、SLC15A4 が腸炎の形成に重要な働きを果たすこと(Sasawatari, et al. *Gastroenterology* 2011)、またSLE のマウスモデルであるマウスループモデルにおいて、SLC15A4 がTLR7 シグナルに依存したI 型インターフェロン産生と自己抗体産生に必須であることが明らかになり、そのメカニズムの一つとして、SLC15A4 によるライソゾームからの輸送基質の正常な汲み出しが、ライソゾームのpH 制御とそれに依存したシグナル伝達に重要であることが明らかになった(Kobayashi, et al. *Immunity* 2014)。一方でSLC15A4 と同様にライソゾーム上に選択的に発現しているアミノ酸トランスポーターであるSLC15A3 は、その機能について明らかになっている点は少ない。これまでに、LPSなどの刺激によりその発現が上昇すること、病原体を取り込んだ際に細胞質中に存在するNOD2 と共役し、炎症性サイトカインであるIL-6 を誘導することが報告されている(Nakamura, et al. *Nature* 2014)。また、マクロファージのアミノ酸代謝機構がその活性化にも深く関わることが報告されていることから(Jha, et al. *Immunity* 2015)、アミノ酸トランスポーターとしてのSLC15A3 はマクロファージの機能分化に関与することが考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、SLC15A3 によるライソゾームを利用したマクロファージの機能分化制御機構、および自己免疫疾患の病態制御における役割の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) SLC15A3 によるマクロファージの機能分化への関与の検討

SLC15A3 を欠損した骨髄誘導マクロファージではIL-4 で刺激を受けた際にM2 マーカーの発現が低いことを見出したが、その他の刺激に対する応答性についてはまだ十分には検討していない。そこで、野生型またはSLC15A3 欠損マクロファージを、LPS、IL-4 の刺激だけでなく、GM-CSF や、IL-10、TGF- β 、CSF-1 など、複数の活性化物質を用いて検討し、種々のM1/M2 マーカーや発現タンパク質について、そのmRNA の発現レベルを比較検討していく。

(2) SLC15A3 欠損がマクロファージの機能に及ぼす影響の検討

(1)で検討した野生型またはSLC15A3 欠損マクロファージの活性化によるM1/M2 マーカーとされるiNOS、Arginase 1、MMR、resistin-like molecule α 、Chitinase-like protein や、マーカー

ーではないが産生するとされるタンパク質であるIL-1b、TNF、IL-12、IL-18などの産生量や発現量をフローサイトメトリーやELISA、Western Blotなどを用いて検討していく。これらに差が認められた場合、トランスポーター活性変異型の作出を進める。トランスポーター活性の測定方についてはすでに申請者が所属する研究部で樹立済みである。

(3) SLC15A3 欠損マウスを用いたEAE モデルでの検討

多発性硬化症のマウスモデルであるExperimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)では、病態形成にM2型マクロファージが重要であることが示唆されており(Keating, et al. *Immunol. Cell Biol.* 2009)、M2型マクロファージへの分化異常が認められるSLC15A3欠損マウスでは野生型に比べ病態に異常が生じる可能性が高い。そのため、Myelin Oligodendrocyte Glycolipid(MOG35-55)と、フロイト不完全アジュバントにM.TuberculosisH37 Ra 死菌を加えたものをマウスのテールベースに2ヵ所感作し、その後百日咳毒素の腹腔内投与を行うことによってEAEモデルを作成し、臨床スコアを比較する。SLC15A3欠損と野生型マウスの間で臨床スコアに差異が認められた場合、血清中の抗体価の測定、病理学的解析を行う。また、脾臓、リンパ節におけるマクロファージおよびEAE発症前後のミクログリアの表現型を、M1/M2マーカーを中心に解析する。さらに、感作後14日後の鼠径リンパ節を採取し、フローサイトメーターを用いてCD4+T細胞を単離、MOG再刺激によるT細胞のサイトカイン産生や、増殖反応の比較を行う。

4. 研究成果

今回検討した、マウスを用いた多発性硬化症や全身性エリテマトーデスモデルにおいては、SLC15A3の病態形成への関与は認められなかった。SLC15A3欠損マクロファージを用いたマクロファージの活性化への検討においては、炎症性サイトカインの産生に部分的な影響が認められたことから、マクロファージの活性化経路へのSLC15A3の部分的な関与が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。