

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16211

研究課題名(和文) Slc7a5によるヒトB細胞の制御機構および膠原病治療標的としての有用性の究明

研究課題名(英文) Amino acid transporter Slc7a5 regulates inflammatory responses of human B cells

研究代表者

鳥越 雅隆(Torigoe, Masataka)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：40793146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞は自己抗体や炎症性サイトカインの産生などを介して様々な膠原病を増悪させる。膠原病の治療ではステロイドや様々な免疫抑制薬が主体となる。しかし、既存の治療法では薬剤抵抗性や副作用の問題で病状の改善が困難な症例も少なからず存在し、更なる新規治療の創出が必要である。アミノ酸トランスポーターのSlc7a5はアミノ酸輸送を調節することで癌細胞や一部の免疫細胞の活動を制御することが近年判明した。一方、B細胞におけるSlc7a5の発現や役割については報告が無かった。当研究では、ヒトB細胞の免疫応答にSlc7a5が深く関与し、Slc7a5を阻害することでB細胞機能も制御しうることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠原病治療の分野では、多くの疾患において現在もステロイドや免疫抑制薬がその中心である。しかし、ステロイドは高用量や長期の使用により骨粗鬆症や皮膚菲薄化などが問題となり、免疫抑制薬も様々な副作用の為に中止されることも少なくない。また、これらの治療薬でも病態制御の困難な症例も時に経験される。B細胞は、多くの膠原病の病態形成において主要な役割を有している。アミノ酸トランスポーターSlc7a5によるB細胞制御は既存の治療法に無い全く新しい戦略であり、難治例での現状打開も期待されうる。

研究成果の概要(英文)：B cells contribute to the pathogenesis of various rheumatic diseases, through the production of autoantibodies and inflammatory cytokines. Corticosteroids and various immunosuppressive drugs are the main stay for the treatment of rheumatic diseases. However, refractory cases are sometimes experienced, who exhibit adverse events or resistance to conventional therapy. Thus, development of a novel therapy is desirable. Recently, it was reported that an amino acid transporter, Slc7a5 regulates the activity of cancer cells and certain immune cells through regulating amino acid transport. Meanwhile, the expression and role of Slc7a5 in B cells have never been investigated. In the present study, we revealed that Slc7a5 was closely involved in the immune response of human B cells, and could be a new strategy to control B cell function.

研究分野：膠原病

キーワード：膠原病 B細胞 Slc7a5 アミノ酸トランスポーター mTORC1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膠原病の中でも特に関節リウマチ(RA)や全身性エリテマトーデス(SLE)では、活性化した B 細胞から産生された自己抗体が組織や細胞へ結合・沈着し、臓器障害が生じる。従って病態の key player である B 細胞の過剰な炎症応答を抑制することが有効な治療戦略となる。既存の治療法では重篤な副作用や治療抵抗性を呈す症例も多く、これを解決するためには新たな作用機序を備えた治療法の開発が必要である。

近年、癌細胞やリンパ球の働きを制御する新たなメカニズムとして細胞内代謝が注目を集めている。細胞内代謝の調節シグナルである mTORC1(mammalian target of rapamycin complex 1)は、核酸やタンパク質、脂質などの生合成を促進する。これにより細胞は増殖したり、サイトカインなどの炎症メディエーターの合成・分泌が可能となる。我々は過去に健常人由来の B 細胞で実験を行い、その抗体産生細胞(plasmablast)への分化や IL-6 産生に mTORC1 の活性化が必須であることを明らかにした。さらに、SLE 患者の B 細胞で mTORC1 活性が異常に亢進しており、同シグナルが病態形成へ関与し、かつ治療標的となりうることを示した。

mTORC1 の活性化には通常、アミノ酸トランスポーター Slc7a5 (Solute carrier family 7 member 5) を介した Leucine の細胞内流入が必要である。つまり、Leucine は mTORC1 の活性化を制御する作用を有している。癌治療の分野ではこれを応用し、癌細胞の Slc7a5 を阻害することで mTORC1 を抑制し、制癌作用をもたらす治療法が実用化されつつある。しかし、B 細胞では Slc7a5 の役割のみならず、発現そのものについても全く報告が無い。

### 2. 研究の目的

当研究では、前述の仮説に基づきヒト B 細胞での Slc7a5 の役割を詳細に解明する。さらに、膠原病患者の検体や疾患モデルマウスも用いて、実際の病態に対する Slc7a5 の関与や、膠原病における新規治療標的としての有用性を実証することを目指す。

上記の目的を達成するために、ヒト B 細胞の抗体産生などの免疫応答における Slc7a5 の役割を in vitro の実験で詳細に解明することを計画した。ヒト CD19<sup>+</sup> total B 細胞を刺激し、Slc7a5 発現をウェスタンブロットやフローサイトメトリー法によりタンパク質レベルで同定する。また、放射性同位体を用いて Slc7a5 を介した Leucine の細胞内流入も確認する。次に、特異的阻害薬などで Leucine 輸送を抑制し、B 細胞の mTORC1 活性や免疫応答 ( plasmablast 分化、抗体産生、サイトカイン産生 ) への影響を確認する。

### 3. 研究の方法

上記の目的を達成するために下記の実験を行った。

RA や SLE の病態形成に重要な TLR 9 リガンドや様々な炎症メディエーターを用いて膠原病モデルの in vitro 条件を検討し、B 細胞刺激時の Slc7a5 発現亢進、Leucine の細胞内流入を確認する。次に、Slc7a5 の機能を阻害し、B 細胞の mTORC1 活性や plasmablast 分化、抗体産生、サイトカイン産生へ与える影響を明らかにした。

#### 実験 1. ヒト B 細胞における Slc7a5 の発現を検証。

健常人末梢血から、リンパ球分離溶液を用いて PBMC(peripheral blood mononuclear cells) を分離し、さらに磁気ビーズを用いた positive selection により CD19<sup>+</sup> total B 細胞を分離した。この B 細胞を、RA や SLE の重要な炎症メディエーターである TLR9 リガンドや IFN $\gamma$ 、IL-6 といった刺激で活性化させ、Slc7a5 の発現上昇をフローサイトメトリー法やウェスタンブロット法により蛋白レベルで確認した。

#### 実験 2. Slc7a5 を介したロイシンの細胞内流入の検証。

ヒト B 細胞において、Slc7a5 の発現上昇時に Leucine の細胞内流入が生じることを、<sup>14</sup>C 標識 Leucine の細胞内取り込み実験によって検証した。また、Slc7a5 阻害薬(BCH)を用いて Slc7a5 を阻害し、Leucine 取り込みの抑制について確認した。

#### 実験 3. Slc7a5 による B 細胞の免疫応答の制御の解明。

実験 2. の方法で Slc7a5 を阻害し、これによる B 細胞の mTORC1 活性や免疫応答(plasmablast 分化、抗体産生、サイトカイン産生)の変化をフローサイトメトリー法や ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)、CBA ( Cytometric Bead Array ) で評価した。また阻害薬ではなく、Leucine-free 培養液で Slc7a5 を無機能化する実験も実施し、これにより阻害薬の off-target 効果の可能性を可及的に除外でき、Slc7a5 の Leucine 輸送の役割を明確に検証した。

### 4. 研究成果

上記の方法により以下の点を明らかにした。

・ヒト B 細胞の活性化時に Slc7a5 の発現が上昇することを蛋白レベルで確認した。

関節リウマチや全身性エリテマトーデスの病態に特異的な炎症メディエーターである TLR9 リガンドをヒト B 細胞へ加えて刺激し、無刺激群と比較して、細胞表面上の Slc7a5 の発現が蛋白レベルで亢進することをフローサイトメトリー法で確認した。また、同様の結果を RT-PCR で mRNA レベルでも確認した。

・ Slc7a5 を介したロイシンの細胞内流入を確認した。

刺激により活性化したヒト B 細胞において、Slc7a5 の発現上昇に一致して 14C 標識 Leucine の細胞内取り込みが亢進することを確認した。また、Slc7a5 阻害薬の BCH を作用させると、Leucine 取り込みが抑制されることも確認した。

・ Slc7a5 によるロイシン輸送が B 細胞の免疫応答に重要な役割を果たすことを明らかにした。

Slc7a5 阻害薬にて B 細胞の Leucine 流入を阻害した結果、B 細胞における mTORC1 活性、plasmablast 分化、IgG 産生、サイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$ ) 産生が著明に抑制された。また、阻害薬でなく Leucine-free 培養液を用いて Leucine 流入を阻止したところ、阻害薬と同様に mTORC1 活性や plasmablast 分化が抑制された。

また、Slc7a5 は B 細胞が一旦 plasmablast へ分化し終えた後には、発現がむしろ低下することが確認された。つまり、Slc7a5 は B 細胞が plasmablast へ分化する途中過程において重要な役割を果たしているが、分化成熟後の plasmablast ではその重要性は低減していくことが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Torigoe Masataka, Maeshima Keisuke, Ozaki Takashi, Omura Yuichi, Gotoh Koro, Tanaka Yoshiya, Ishii Koji, Shibata Hirotaka	4. 巻 5
2. 論文標題 l-Leucine influx through Slc7a5 regulates inflammatory responses of human B cells via mammalian target of rapamycin complex 1 signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 885-891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2018.1510822.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥越雅隆
2. 発表標題 アミノ酸トランスポーター Slc7a5を介したヒトB細胞の制御機構の解明
3. 学会等名 第8回癌・炎症と抗酸化研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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