

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871165

研究課題名(和文) SLC15A4によるライソゾーム環境管理と炎症制御の相互作用

研究課題名(英文) Role of SLC15A4 in controlling lysosomal environment and inflammatory responses

研究代表者

小林 俊彦 (Kobayashi, Toshihiko)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40613203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞はライソゾームを分泌やシグナル伝達の間として利用しており、そのために独自のライソゾームの環境制御システムを持っている。本研究では、免疫細胞のライソゾームに局在するアミノ酸トランスポーターSLC15A4が、自然免疫センサーのTLR7やTLR9を介した免疫応答を制御するメカニズムの解析を行った。その結果、ライソゾームのSLC15A4が近傍に局在するmTORの活性に影響を与えることによりTLR7/9のシグナル伝達、特にI型インターフェロンの産生を制御するという新しい炎症制御機構を明らかにし、その成果をImmunity誌に発表した。

研究成果の概要(英文)：Immune cells have a unique regulation system of endo/lysosomes to harness their inflammatory signaling that results in secretion of mediators or cytokines. Our project aimed to reveal the molecular mechanism how the inflammatory response that takes place in the lysosome, such as Toll-like receptor (TLR) signaling, is controlled by SLC15A4, a lysosome-resident amino acid transporter. We found the novel mechanism that SLC15A4 regulates the activity of mTOR complex that is essential for the type I interferon signaling triggered by TLR7 or TLR9. We also found that this regulatory mechanism played a key role in production of pathogenic autoantibodies in the autoimmune disease model. Our finding suggested that SLC15A4 could be a therapeutic target of inflammatory diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫の炎症応答制御機構 ライソゾーム アミノ酸輸送 TLR 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

一般にトランスポーターは細胞内外の物質の摂取・排出を行う分子群であるが、免疫系でのトランスポーターの果たす役割については、よくわかっていない。

トランスポーターは、ATPの加水分解エネルギーを利用して輸送を行うABC (ATP binding cassette)ファミリーと、ATPのエネルギーを用いないで輸送を行うSLC (Solute carrier) ファミリーの二つに大別されている(1)。ヒトにおいては300種類以上のSLC遺伝子が同定されているが、免疫系におけるトランスポーターの解析はほとんどなされていない。特に細胞内小器官であるライソゾームに局在するトランスポーターについては免疫応答との関連性においてほとんど報告がなく、炎症応答時におけるライソゾームの制御機構はブラックボックスである。一方で、近年ライソゾームはタンパク質分解の場だけでなく、シグナル応答の場として注目を集めている(2)。特に自然免疫においては核酸を認識するTLR3,7,9はライソゾームへの局在が応答に必要であることが知られており(3)、ライソゾーム環境はこれらTLRを介した炎症応答を左右するファクターとして重要である。申請者らはこれまでに、SLC15A4が細胞内のライソゾームに局在しアミノ酸のヒスチジンを主な輸送基質とするトランスポーターであること、この分子がTLR7, TLR9, NOD1といった自然免疫応答に関与していることを発見した。しかしSLC15A4とTLR応答を結ぶライソゾームの動態については未だに不明であった。

2. 研究の目的

本研究はそのライソゾームに局在するトランスポーターの1つであるSLC15A4とTLR応答制御の関係を生化学的・分子生物学的な手法によって解明することを目的とした。

申請者が研究テーマにしているSLC15A4は、疾患関連遺伝子としての報告は複数あるものの、免疫系に関しては申請者以外ではアメリカ Scripps 研究所の B. Beutler らを含む2カ所のグループが発表しているのみであった。Beutler らのグループは化学物質で誘導した変異マウスを用いて、形質細胞様樹状細胞(pDC)の1型インターフェロン産生に重要な分子としてSLC15A4を同定した(4)が、このトランスポーターのTLR9およびTLR7活性化における役割は明らかにはしていない。一方、われわれは独自に作製したKOマウスを用いて解析を行い、SLC15A4がTLR9に加えてNOD1に対する応答性にも重要であることを見出した(5)。これはNOD1のリガンドがSLC15A4を介して細胞質への輸送されるため、SLC15A4の欠損によってリガンドの輸送が障害されることによる。TLR7,9のリガンドの場合、SLC15A4欠損細胞においても細胞内への輸送は障害されていないこと

から、ライソゾームにおけるTLR7,9の活性化異常が低応答性の原因であると推測された。

一般にライソゾーム環境は細胞の受容体が適切なシグナリングをする上で厳密に制御されている。特にpHやイオン環境の調節がライソゾーム内の酵素の活性制御において重要である。樹状細胞ライソゾーム内pH変化の測定など細胞生物学的手法によりライソゾーム環境の相違を解析してきたが、それらの結果からはSLC15A4がなぜTLR7,9の応答に必要なのか説明できていなかった。本研究では生化学的手法を用いることにより直接ライソゾームの性状解析を行い、ライソゾーム内の成分分析からSLC15A4によるライソゾーム環境の維持機構を明らかにすることを目指した。抗SLC15A4抗体の樹立は、SLC15A4特異的な小胞の分離、細胞内動態の観察といった解析に加えてTLR7,9による炎症制御のツールとして、本研究を遂行する上で不可欠であると位置付けた。

特異的な抗体を用いてライソゾーム局在性トランスポーターSLC15A4の炎症応答の制御機構を解明するとともに、樹立した抗体をSLC15A4の機能制御に用いることでTLR7,9およびNOD1を介した炎症応答の抑制への応用を期待する。これまでに申請者らはSLEモデル系を用いてSLC15A4の欠損が自己免疫疾患の病態を改善することを発見した。すなわち、この分子の制御がTLR7,9を介した自己免疫疾患の病態改善につながる可能性を示唆したため、機能解析と同時に、SLC15A4の機能を制御し、炎症を抑制するような抗SLC15A4モノクローナル抗体の樹立を目指した。

3. 研究の方法

申請者らはライソゾームに局在するアミノ酸トランスポーターSLC15A4が自然免疫系のDNAのセンサーであるTLR9あるいはRNAセンサーのTLR7の応答に関与することを明らかとしてきたが、その機能的連関については不明のままであった。本研究ではSLC15A4に対するモノクローナル抗体を樹立し、(1)生化学的・(2)細胞生物学的解析を行うことで、SLC15A4によるTLR制御メカニズムを解析した。一方、(3)抗体によるSLC15A4の機能調節を介した炎症応答の抑制についてin vitroで検討を行い、その効果を確認した上で、疾患モデルマウスを用いた抗体の炎症抑制効果について検討をすすめることを目指した。これら一連の解析を通じて、SLC15A4をターゲットとした炎症性自己免疫疾患の治療法開発の分子基盤の確立を試みた。

(1) 生化学的解析

TLR リガンドである DNA/RNA 応答性の変化を、SLC15A4 がライソゾームの環境に与える影響から検討する。野生型と SLC15A4 KO 由来の樹状細胞を利用し、リガンド結合磁性ビーズを用いてリガンド刺激後の細胞のライソゾームを分離した後、その中に含まれる成分を HPLC あるいは質量分析 (MS) によって解析する。また、樹立した抗 SLC15A4 抗体を用い、SLC15A4 の含まれるライソゾームのみを単離することで、SLC15A4 がライソゾーム環境に与える影響をより正確に分析する。

(2) 細胞生物学的解析

SLC15A4 が TLR7 および TLR9 の細胞内局在および輸送系に与える影響を明らかにする。抗 SLC15A4 抗体もしくは HA タグを付加した SLC15A4 および蛍光タンパク質融合 TLR7,9 を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察する。また、抗体のヒト分子への交差反応性を検討した上で、ヒト SLC15A4 の細胞内局在についても検討を加える。

特にこれまでの知見から、TLR7 および TLR9 の活性化の場とされるライソゾームとの共局在化の時空間的解析を進める。また、SLC15A4 がライソゾーム自体の形態・微細構造に与える効果について、電子顕微鏡を用いて観察する。具体的には野生型と KO マウス由来の樹状細胞を単離し、TLR 刺激の有無において、ライソゾームの形態・形成を透過型電子顕微鏡で比較観察する。

なお、(1)(2)に関連して、抗 SLC15A4 抗体が樹立されない場合、生化学的解析は SLC15A4 にエピトープタグを付加することで細胞株での強制発現、あるいはレトロウイルスを利用した樹状細胞への発現系を用いて行うこととした。

(3) 抗 SLC15A4 抗体の樹立

SLC15A4 は細胞内に発現すること、また 12 回膜貫通タンパク質であることからモノクローナル抗体を得るには高い技術が必要である。申請者らは SLC15A4 を細胞表面に強制的に発現させる方法と BALB/c 系統の SLC15A4 欠損マウスを利用する方法を組み合わせることで、より確実性の高いモノクローナル抗体の樹立を目指した。

4. 研究成果

細胞のライソゾームは、外界から取り込んだ物質や自身のオルガネラを分解する場であることは知られているが、免疫応答においては、取り込んだ異物を認識し、免疫反応を惹起するシグナル伝達の場合としての重要性が明らかになりつつある。H+共役型アミノ酸輸送体である SLC15A4 は、B 細胞や樹状細胞をはじめとする免疫細胞に発現しており、それら細胞内でヒスチジンやオリゴペプチドをライソゾーム内腔から細胞質へ輸送することが知られているが、免疫応答における

役割は十分解明されていない。

本研究は、SLC15A4 が抗体産生機能と SLE の病態形成に果たす役割を明らかにすることを目的とし、TLR7 依存性ループス様疾患モデルを用いて解析を行った。その結果、SLC15A4 欠損マウスにおいては抗 DNA 抗体、抗 RNP 抗体いずれの自己抗体も産生が減弱することを見出した。特に I 型インターフェロン (IFN) に依存して産生される抗体クラスである IgG2a/IgG2c の減少が顕著に認められ、この自己抗体産生の低下が B 細胞の機能異常に起因することを明らかにした。

IgG2c 抗体産生を制御する I 型 IFN 産生機構がどのように SLC15A4 によってコントロールされているか、その分子機構についても詳細な解析を行った。その結果、TLR7 刺激存在下において、SLC15A4 は IRF7 の転写制御および核内移行を媒介することによって I 型 IFN の産生を誘導することを明らかにした。さらに興味深いことに、SLC15A4 は TLR7 刺激下でライソゾームにおける mTOR の活性化に必須であること、また I 型 IFN がその受容体 IFNAR1/2 を介してさらに IRF7 の発現を増幅して I 型 IFN を量産するという調節サーキットにおいて、mTOR 依存性の IRF7 翻訳制御にも必須の役割を果たすことを見出した。SLC15A4 欠損 B 細胞では、このサーキットが破綻し、その結果 TLR7 によって誘導される IgG2c 遺伝子の転写が認められなかった。以上より、SLC15A4 は I 型 IFN によって誘導される自己抗体産生と、それに依存した自己免疫疾患の病態に中心的な役割を果たすことが明らかとなった (図 1)。

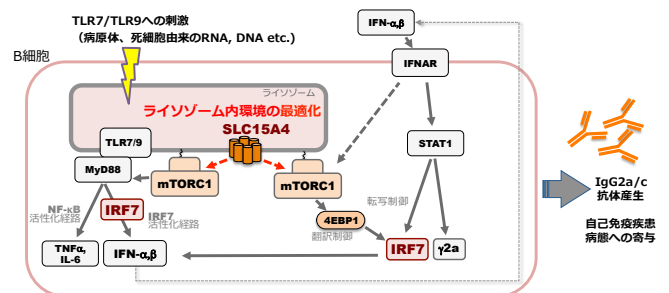


図1 SLC15A4を介したライソゾーム内環境の最適化が TLR7/9のIFN誘導シグナルを制御する

これらの成果をまとめ、2014年9月 Cell press 姉妹誌の *Immunity* に発表した。SLC15A4 によるこのような統合的なシグナルの制御は、自己抗体産生を伴う自己免疫疾患の病態形成に重要であると考えられ、本研究によって、SLC15A4 の機能阻害が SLE などの自己免疫疾患の治療標的となる可能性が示された。

一方で、本研究における解析の根幹となる抗 SLC15A4 モノクローナル抗体の

樹立については、当初の計画より遅れたものの、SLC15A4 KO マウスにヒト SLC15A4 発現細胞を複数回免疫することにより、SLC15A4 の立体構造を認識すると考えられるクローンを得ることができた (図 2)。

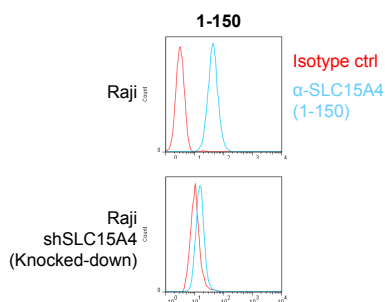


図2 樹立した抗SLC15A4抗体による SLC15A4の染色 (ヒトB細胞株(Raji))

抗体の性状解析も終了しており、今後の SLC15A4 の機能の生化学的・細胞生物学的な解析において非常に強力なツールとなることが期待される。

<引用文献>

- 1) Degorter MK et al. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* . 2012; 52:249-73.
- 2) Murphy JE et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2009; 107:17615-22
- 3) Barbalat R et al. *Annu Rev Immunol* . 2011; 29:185-214.
- 4) Blasius AL et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2010; 107:19973-8.
- 5) Sasawatari S et al. *Gastroenterology* . 2011; 140:1513-25.

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 5 件)

1. Seto E, Yoshida-Sugitani R, Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N. The assembly of EDC4 and Dcp1a into processing bodies is critical for the translational regulation of IL-6. *PLoS One*: 10 (5): e0123223. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0123223
2. Kobayashi T, Demoto-Shimabukuro S, Yoshida-Sugitani R, Furuyama-Tanaka K, Karyu H, Sugiura Y, Shimizu Y, Hosaka T, Goto M, Kato N, Okamura T, Suematsu M, Yokoyama S, Toyama-Sorimachi N. The histidine transporter SLC15A4 coordinates mTOR-dependent inflammatory responses and pathogenic antibody production. *Immunity* 41(3):375-388, 2014. doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.011.

3. Imanishi H, Takibuchi G, Kobayashi T, Ishikawa K, Nakada K, Mori M, Kikkawa Y, Takenaga K, Toyama-Sorimachi N, Hayashi J. Specific mtDNA Mutations in Mouse Carcinoma Cells Suppress Their Tumor Formation via Activation of the Host Innate Immune System. *PLoS One*: 8(9):e75981. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0075981.

4. 小林俊彦、反町典子：細胞内アミノ酸輸送に依存した新たな TLR シグナル制御機：細胞工学 34 巻 6 号 pp557-561. 秀潤社 2015 年

5. 田中翼、小林俊彦、反町典子：炎症シグナル伝達の場合として機能する細胞内小胞の環境制御：生化学 みにれびゅう 85 巻 12 号 pp1083-86. 2013 年

[学会発表] (計 9 件)

1. Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N. SLC15A4 regulates TLR7/9-triggered type I interferon responses coordinating mTORC activity at lysosome. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、2014 年 12 月 10-12 日、京都
2. Toyama-Sorimachi N, Kobayashi T. A lysosomal oligopeptide transporter SLC15A4 regulates homeostasis and inflammatory responses of mast cells. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、2014 年 12 月 10-12 日、京都
3. 小林俊彦、反町典子：SLC15A4 によるライソゾームのアミノ酸調節と I 型インターフェロン産生機構の相互作用。第 9 回トランスポーター研究会年会、2014 年 6 月 14-15 日、名古屋。
4. Kobayashi T, Okamura T, Toyama-Sorimachi N. Lysosomal oligopeptide transporter SLC15A4 is critical for TLR7/9-mediated inflammatory responses. 第 22 回 マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム、2014 年 6 月 2-3 日、神戸
5. Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N. SLC15A4 regulates IgG2a autoantibody production through IRF7-type I IFN activation loop in B cells. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会、2013 年 12 月 11-13 日、千葉
6. Kobayashi T, Okamura T, Toyama-Sorimachi N. Lysosomal

oligopeptide transporter SLC15A4 regulates Toll-like receptor 7/9-mediated autoantibody production. Presented at 15th International Congress of Immunology, August 2013, Milan, Italy.

7. Toyama-Sorimachi N, Tanaka M, Kobayashi T, Makrigiannis AP, Inaba K. The inhibitory NK receptor Ly49Q protects plasmacytoid dendritic cells from TLR9-triggering cell death by assuring lysosomal integrity. Presented at 15th International Congress of Immunology. August 2013, Milan, Italy.
8. Kobayashi T, Okamura T, Toyama-Sorimachi N. Lysosomal transporter SLC15A4 regulates TLR7/9-mediated antibody production. 第8回トランスポーター研究会年会、2013年6月15-16日、熊本.
9. Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N. Lysosomal transporter SLC15A4 regulates TLR7/9-mediated antibody production. Presented at Immunology 2013, May 2013, Honolulu, HI, USA.

[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

出本 志保 (DEMOTO, Shiho)
清水 有紀子 (SHIMIZU, Yukiko)
田中 香織 (TANAKA-FURUYAMA, Kaori)
吉田 玲子 (YOSHIDA-SUGITANI, Reiko)
狩生 ひとみ (KARIU, Hitomi)