

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07056

研究課題名(和文)炎症応答制御におけるリソソーム局在アミノ酸トランスポーターの役割

研究課題名(英文)Role of lysosome-resident amino acid transporters in inflammatory response

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、リソソーム局在アミノ酸トランスポーターSLC15A3を介した新規炎症シグナルの制御機構、および慢性炎症疾患の病態制御における役割の解明を目的として行った。研究期間を通じ(1) SLC15A3による炎症制御機構の解析、(2)炎症応答におけるSLC15A3発現細胞の同定と役割の解明、(3) SLC15A3会合分子の探索を行い、SLC15A3がTMPD投与によって誘導される肺炎症・肺胞出血の病態維持に重要な役割を果たしていること、特にSLC15a3を高発現する炎症性単球や好中球におけるこの分子の機能が重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、リソソーム局在アミノ酸トランスポーターSLC15A3を介した新規炎症シグナルの制御機構、および慢性炎症疾患の病態制御における役割の解明を通じて、SLC15A3による新規炎症制御機構を明らかにすることを試みた。本研究の一部は既に学会等において公表済みであり、アミノ酸トランスポーターによる細胞内代謝変化を介した免疫応答の制御機構は、免疫学のみならず細胞生物学領域にも大きなインパクトと波及効果をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：This research project was conducted to reveal the novel inflammatory signaling via a lysosome-resident amino acid transporter SLC15A3 and the molecular mechanism how this transporter contributes to the pathology of chronic inflammation. Throughout the period, we analyzed (1) the regulation mechanism of inflammation by SLC15A3, (2) identified the cell types that are positive for SLC15A3 during the inflammatory responses (3) searched the SLC15A3-associated molecules in order to understand the molecular machinery of SLC15A3-mediated inflammatory responses. As a result, we found out that SLC15A3 plays an important role in maintaining the pulmonary inflammation and symptom of diffuse alveolar hemorrhage, which was mostly mediated by inflammatory monocytes or neutrophils that express SLC15A3 gene at high level. We also identified several SLC15A3-associated molecules by research collaboration, and predicted the SLC15A3-mediated signaling pathways.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 リソソーム トランスポーター

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持つことが明らかになっている。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) においては、微生物や死細胞に由来する核酸を認識する TLR 分子種は、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、シグナル伝達を行う (文献 1)。しかしながら、エンドソーム/リソソームにおける炎症シグナルの制御機構は不明な点が多い。この細胞内コンパートメントは、小胞輸送に伴って局在変化や小胞内酸性化がおこり、緻密に制御されたこれらのプロセスは、小胞内プロテアーゼや mTORC1 の活性制御も介して炎症シグナルの重要な制御機構の一部となっている。私たちは、ダイナミックに配置と環境が変化するこれらの小胞空間でどのように炎症シグナルが伝達されるか? という視点から、エンドソーム/リソソームの環境に依存した炎症応答制御機構の解明に取り組んできており、これまでに免疫細胞に優先して発現するリソソーム局在型アミノ酸トランスポーターである Solute carrier protein 15A4 (SLC15A4) が、プラズマ細胞様樹状細胞、B 細胞やマスト細胞においてリソソームを介した細胞応答に重要な働きをすることを報告してきた (文献 2-4)。これらの成果を元に、私たちはトランスポーターによる基質輸送がリソソーム内の物質環境を適切にコントロールし、リソソームをシグナル伝達のハブとして機能させ、炎症惹起に重要であるという新しい概念を提示した (図 1)。

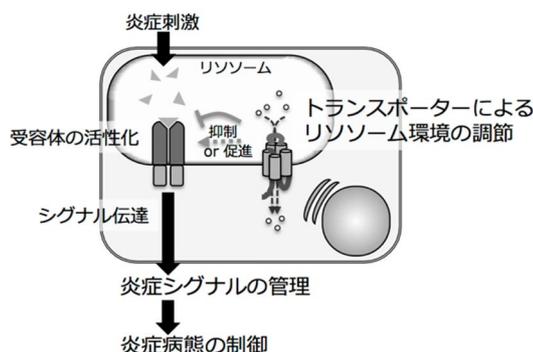


図1 炎症刺激による受容体の活性化はリソソームの環境によって変化する。すなわち、炎症シグナルの強度、持続時間が変化する。トランスポーターはリソソーム内外の物質輸送によってリソソーム環境の調節をする重要な役割を持つが、トランスポーターと炎症応答の相互作用の全容はよくわかっていない。申請者らはSLC15A4によるアミノ酸、ペプチド輸送が炎症応答の制御に重要であることを発見した (Immunity 2014)。

しかしながら、リソソームには SLC15A4 以外にも多数のトランスポーターが発現しており、これらのトランスポーターの役割の重複など、トランスポーターによるリソソーム機能制御には不明な点が数多く残されていた。SLC15A4 と相同性を有する SLC15A3 もリソソームに発現することが知られていたが、機能、また炎症応答における役割はほとんど解析されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、リソソーム局在アミノ酸トランスポーター SLC15A3 を介した新規炎症シグナルの制御機構、および慢性炎症疾患の病態制御における役割の解明を目的として、まずファミリー分子 SLC15A4 との機能相違、重複を検討した上で、(1) SLC15A3 に依存した炎症応答を担う細胞を明らかにし、(2) その細胞における炎症シグナルの伝達に SLC15A3 がどのように寄与するかをリソソーム環境に着目して解析を行い、さらに(3) SLC15A3 依存的に炎症を制御するシグナル因子について、炎症の収束という視点も含めて探索を行う、以上 3 点を中心に解析を行うこととした。

3. 研究の方法

ミネラルオイルの一種である TMPD (別名 Pristane) はマウスの腹腔に投与すると、ヒト SLE の病態に類似したびまん性肺胞出血 (Diffuse Alveolar Hemorrhage: DAH) と貧血を伴う持続的な炎症

を引き起こすことが知られている。SLC15A3 欠損マウスにおいては、TMPD によって誘導される肺出血の病態が著しく改善される（図2）ことが分かっていたため、SLC15A3 欠損マウスにおいて、TMPD によって誘導される急性期の炎症応答に野生型と差異があるかを、血中および腹腔洗浄液中の

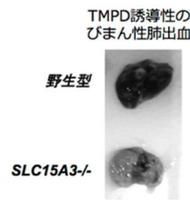


図2 SLC15A3欠損マウスにおける炎症病態の軽減
野生型において認められる肺出血の出現率は SLC15A3^{-/-}マウスにおいては非常に低下する。
野生型(6/8個体 = 75%) vs SLC15A3^{-/-}(1/8個体 = 12.5%)

炎症性サイトカイン量、また腹腔浸潤炎症細胞における炎症関連遺伝子群の発現量を指標として検討した。さらに、TMPD 投与によって腹腔および肺に浸潤してくる炎症細胞の数、種類、活性化状態について、フローサイトメトリーと組織化学的手法を用いて経時的に解析し、その上で炎症後期に認められるびまん性肺出血と貧血の発症率、および重症度を指標としてこれらトランスポーターの炎症反応における役割を、特に炎症の収束という視点から検証した。

一方、トランスポーターという分子の構造上、SLC15A3 が直接シグナル分子として機能することは考えにくく、SLC15A3 依存的な炎症制御因子が存在する可能性が想定された。これまでリソソームのアミノ酸トランスポーターには機能に重要な会合分子が報告されていることも鑑み、SLC15A3 近傍で相互作用を行う分子を、近位依存性ビオチン化法 (Bio-ID 法) (文献 5) を用いて探索した。同定された分子については、細胞株での遺伝子導入と生化学解析によって会合を検証し、さらに shRNA によるノックダウンによって炎症シグナルへの影響を解析することにより、SLC15A3 依存的な炎症シグナルの制御経路を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

本研究は、リソソーム局在アミノ酸トランスポーターSLC15A3を介した新規炎症シグナルの制御機構、および慢性炎症疾患の病態制御における役割の解明を目的として行った。目的に述べた通り、(1) SLC15A3による炎症制御機構の解析、(2)炎症応答におけるSLC15A3発現細胞の同定と役割の解明、(3) SLC15A3会合分子の探索を行い、それぞれ成果を得た。

(1) TMPDの腹腔内投与によってもたらされるびまん性肺出血と貧血を伴う持続的な炎症モデルにおいて、SLC15A3欠損マウスにおいては、TMPD投与によって誘導される肺炎症・DAHの病態改善を見出し、炎症に伴う肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン産生の変化が起きていることを明らかとした。また、炎症後期において肺組織への炎症細胞の浸潤パターンに違いがあることを見出した。

(2) 骨髓キメラの解析により、この表現型が血液細胞のSLC15A3欠損に依存することを明らかとした。また、TMPD投与後の腹腔内および肺組織浸潤細胞のうち、炎症性単球、マクロファージや好中球においてSlc15a3が高発現を示すことを明らかにした。抗Gr-1抗体投与による好中球の除去実験の結果、好中球が炎症病態の改善に寄与することを示唆する結果を得た。SLC15A3欠損好中球の遺伝子発現解析から、好中球におけるSLC15A3欠損は、炎症初期においては野生型と炎症関連遺伝子の発現パターンに差は見られないが、炎症後期において野生型より抗炎症性の発現パターンを示すことを見出した。これらの結果から、SLC15A3は好中球やマクロファージ

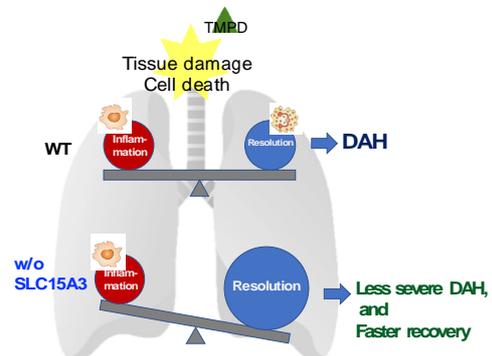


図3 TMPD誘導性肺炎症の制御におけるSLC15A3の役割
SLC15A3は好中球、マクロファージに高発現している。
SLC15A3の欠損は好中球の性質を抗炎症性に傾け、その結果、肺炎症からの早期組織修復を促進する。

の炎症応答の維持に必要であり、この遺伝子の欠損マウスにおける肺炎症の改善は、これら炎症細胞の性質を抗炎症へ偏向させたことによるものと考えられた(図3)。

(3) SLC15A3分子の機能を明らかにするため、近位ピオチン標識法(Bio-ID法)を改良した手法を用いて、SLC15A3相互作用分子の同定を共同研究で行なった。質量分析(LC-MS/MS)を用いて網羅的に会合分子を同定し、パスウェイ解析を行なった。その結果細胞内輸送に関わる分子群が濃縮されてきた。

これらの成果については学会3件において発表を行い、また最終年度後半、論文化に着手した。

<引用文献>

- 1) Kagan JC, and Barton GM. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014. 7(3): a016253.
- 2) Sasawatari S et al. *Gastroenterol*, 2011.
- 3) Kobayashi T et al. *Immunity*, 2014.
- 4) Kobayashi T et al. *Int Immunol*, 2017.
- 5) Roux KJ et al. *J Cell Biol*, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi T, Shimabukuro-Demoto S, Tsutsui H, Toyama-Sorimachi N	4. 巻 17
2. 論文標題 Type I interferon limits mast-cell-mediated anaphylaxis by controlling secretory-granule homeostasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3000530	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi T, Nguyen-Tien D, Ohshima D, Karyu H, Shimabukuro-Demoto S, Yoshida-Sugitani R, Toyama-Sorimachi N	4. 巻 -
2. 論文標題 Human SLC15A4 is crucial for TLR-mediated type I interferon production and mitochondrial integrity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab006	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kobayashi T, Nguyen-Tien Dat, Toyama-Sorimachi N
2. 発表標題 Unique role of an oligopeptide transporter SLC15A3 in the lung inflammation and resolution
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nguyen-Tien D, Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N
2. 発表標題 SLC15A3 inhibits autophagy in macrophage and dendritic cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N
2. 発表標題 Controlling the innate immune responses by the lysosome-resident oligopeptide transporters.
3. 学会等名 9th FAOPS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nguyen-Tien D, Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N
2. 発表標題 A novel mechanisms of lung fibrosis mediated by an amino acid transporter
3. 学会等名 Keystone Symposia, Fibrosis and tissue repair (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林俊彦、筒井英充、反町典子
2. 発表標題 肺組織の炎症と修復におけるペプチドトランスポーター-SLC15A3の役割
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi T, Tsutsui H, Toyama-Sorimachi N
2. 発表標題 Regulation of allergic response by non-canonical type I interferon signaling.
3. 学会等名 6th Annual meeting of the International Cytokine and Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	グエンティエン ダット (Nguyen-Tien Dat)		
研究協力者	田口 友彦 (TAGUCHI TOMOHIKO)		
研究協力者	堂前 直 (DOHMAE NAOSHI)		
研究協力者	出本 志保 (DEMOTO SHIHO)		
研究協力者	狩生 ひとみ (KARIU HITOMI)		
研究協力者	吉田 玲子 (YOSHIDA-SUGITANI REIKO)		
連携研究者	岡村 匡史 (OKAMURA TADASHI) (00333790)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他・室長 (82610)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------