

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293090

研究課題名(和文) SLC15A4による自己免疫疾患の新規制御機構の解明

研究課題名(英文) A novel regulatory mechanism of autoimmune disease pathogenesis by SLC15A4

研究代表者

反町 典子 (Toyama-Sorimachi, Noriko)

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・その他

研究者番号：30217468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)： リソソーム局在型アミノ酸/オリゴペプチドトランスポーターSLC15A4はTLR7/9が媒介するI型インターフェロン(IFN-I)産生の制御を介して自己免疫疾患様モデル病態の形成に重要な役割を果たす。本研究では、SLC15A4によるTLR7/9制御のメカニズムとして、リソソーム内ヒスチジン排出に依存したリソソーム小胞内pHの制御、さらにはpHに依存したvATPase活性およびmTORC1の制御を明らかにした。また、この分子がマスト細胞においてmTORC1を制御し、マスト細胞での分泌顆粒の形成とアレルギー応答を制御していることを見出した。

研究成果の概要(英文)： A lysosome-resident, amino acid/oligopeptide transporter, SLC15A4, plays a crucial role in the pathogenesis of inflammatory diseases through regulation of TLR7/9-mediated type I interferon (IFN-I) productions. We found in this study that SLC15A4 loss caused the accumulations of histidine and histamine in the lysosomes, which resulted in the dysregulation of lysosomal pH. Moreover, SLC15A4-deficient cells showed the decrease of vATPase and mTORC1 activities. Our results indicated that SLC15A4 is an integral part of TLR7/9-triggered inflammatory signals by engaging the lysosomal conditioning. We also found that SLC15A4 regulated mast cell's functions through the regulation of mTORC1 activity, and played an important role in secretory granule biogenesis and allergic inflammation. These results revealed that SLC15A4-dependent regulation of mTORC1 signaling pathway has an impact not only on various immune cell functions but also on the pathogenic conditions of inflammatory diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 自己免疫疾患 アレルギー トランスポーター mTOR Toll様受容体

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞はリソソームをシグナル伝達の間として利用しており、そのために独自のリソソーム環境制御機構を有している。TLRによるリガンド認識とシグナル伝達はよい例であるが、エンドリソソームにおけるシグナルは、細胞表面でのレセプターシグナルとは時間的空間的特性が異なり、免疫応答の質や強さの制御に重要な役割を果たすことを鑑みると、この制御機構の理解は免疫疾患の新規治療戦略の樹立に極めて有益であると考えられる。

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 Solute carrier protein 15A4 (SLC15A4) は、プロトンと共役して輸送基質をリソソ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がなされているが、病態形成における役割については不明な点が多い。私たちはこれまでに、SLC15A4 欠損マウスを用いたこれまでの解析によって、SLC15A4 はプラズマ細胞様樹状細胞における TLR7/9 シグナルに依存した I 型インターフェロン(IFN-I)と種々の炎症性サイトカイン産生に必須であること、細胞内病原体センサーNOD1 のリガンドTri-DAP を細胞質へ輸送する責任分子であること、さらにこの分子が腸炎の病態形成に極めて重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。さらに、この分子の関連疾患である SLE に着目し、マウスループモデルを用いて B 細胞の SLC15A4 が TLR7 シグナルに依存した自己抗体産生に必須であることを明らかにし、さらにこの分子が IFN-I 受容体(IFNAR)の下流で mTOR 依存的に IRF7 の翻訳を制御すること、それによって IFN-I-IRF7 サークットの形成を媒介して自己抗体産生を誘導することを明らかにした。これらの知見より、SLC15A4 が自己抗体産生を伴う自己免疫疾患や炎症性腸疾患の治療標的候補分子となり得ることが示唆された。しかしながら、SLC15A4 がどのように TLR7 シグナルを制御するのか、詳細な分子基盤は明らかにはなっておらず、またこの分子の他の免疫細胞における機能についても不明である。

2. 研究の目的

本研究は、SLC15A4 による TLR7/9 シグナルと mTOR 活性の制御機構、および自己免疫疾患の病態制御における役割と分子基盤の解明を目的とした。さらに、SLC15A4 を高発現するマスト細胞における当該分子の役割を明らかにするとともに、同様に免疫細胞に発現し、SLC15A4 に高い相同性を示す SLC15A3 の機能を明らかにすることにより、これらのトランスポーターの治療標的と

しての妥当性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SLC15A4 による mTOR 制御機構

脾臓より単離した B 細胞および骨髄より Flt3L で誘導した樹状細胞を用いて、リソソーム内 pH の測定、単離リソソームのアミノ酸定量、vATPase 活性測定を行った。

(2) SLC15A4 欠損マスト細胞の機能解析

SLC15A4 欠損マウス骨髄より誘導したマスト細胞の抗原依存的およびサイトカイン依存的応答を、脱顆粒反応、サイトカイン産生等を指標にして解析した。また SLC15A4 欠損マウスにおいて、抗原特異的および IL-33 誘導性アレルギー応答を解析した。

(3) SLC15A4 阻害物質のスクリーニング系

SLC15A4 を発現する細胞株を樹立し、適切な輸送基質の選択を行い、スループットの高いアッセイ系を樹立した。

(4) SLC15A3 欠損マウスの樹立と機能解析

SLC15A3 欠損マウスを CRISPR/CAS9 法を用いて樹立し、造血系細胞の分化、機能解析を進めた。

4. 研究成果

(1) SLC15A4 による mTOR 制御機構

SLC15A4 欠損 B 細胞および樹状細胞においては、TLR7/9 アゴニストによって引き起こされるリソソーム小胞内の酸性化が阻害されることが見出され、このことが SLC15A4 欠損下での TLR7/9 に依存した INF-I 産生を減弱させる原因の一つであると考えられた。比重遠心法によってリソソーム小胞濃縮画分を単離し、小胞内アミノ酸を定量した結果(慶応大学杉浦先生、末松先生との共同研究)、SLC15A4 欠損下においてはヒスタジンおよびその代謝産物であるヒスタミンがリソソーム小胞内に蓄積することを見出した。ヒスタジンが高い緩衝能を有するアミノ酸であることを考え合わせると、SLC15A4 欠損によってリソソーム内にヒスタジンが蓄積することによって小胞内 pH に影響を及ぼしたと考えられた。また、リソソームに局在する vATPase はアミノ酸センサーとして mTORC1 の機能制御に関わること、vATPase の活性はリソソーム内 pH に依存することから、SLC15A4 欠損におけるリソソーム pH 制御異常が vATPase 活性に影響を与える可能性を検討した結果、リソソーム画分に含まれる vATPase 活性は SLC15A4 欠損下で低下することを明らかにした。これらの結果より、SLC15A4 欠損細胞では、小胞内 pH の制御異常とそれに伴う vATPase の活性低下を介して mTORC1 の活性制御に異常をきたすことが示唆された。

(2) SLC15A4 欠損マスト細胞の機能解析

マスト細胞はリソソーム関連オルガネラとしての分泌顆粒を発達させ、アレルギー性炎症に重要な役割を果たしている。SLC15A4

はマスト細胞に高発現することから、マスト細胞における分泌顆粒形成およびマスト細胞の機能における SLC15A4 の役割について解析をすすめ、以下を明らかにした。① SLC15A4 欠損マスト細胞において、マスト細胞の分泌顆粒形成に異常が認められ、②種々の刺激によるマスト細胞の応答に異常が認められた。特に SLC15A4 欠損マスト細胞においては、抗原刺激によるヒスタミン分泌および IL-33 刺激によるサイトカイン産生の異常が認められ、③そのメカニズムの一つとしてマスト細胞の mTOR 経路の異常が明らかとなった。④さらに SLC15A4 欠損によるマスト細胞の異常は、ハプテン誘導性アナフィラキシーおよび IL-33 依存性喘息モデルの病態に影響を及ぼすことを明らかにした（投稿中）。

(3) SLC15A4 阻害物質のスクリーニング系

SLC15A4 を導入した細胞株を樹立し、適切な輸送基質の選択と種々の条件の最適化を行うことにより、SLC15A4 のトランスポーター活性の定量が可能なスループットの高いアッセイ系を樹立した。アッセイ系の詳細は、阻害剤探索にかかる守秘事項に該当するため、詳細な記載は差し控えるものとする。

(4) SLC15A3 欠損マウスの樹立と機能解析

SLC15A3 欠損マウスの作出に成功し、解析を行った。SLC15A3 欠損マウスはメンデルの法則にしたがって生まれ、造血系細胞の分化に明らかな異常を認めなかった。SLC15A3 の発現は刺激依存的に誘導され、炎症応答に重要な役割を果たしている可能性が見出され、さらに詳細な解析を進めている。また SLC15A4 と SLC15A3 の二重欠損マウスの作出も完了し、表現型解析を進めた。

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 12 件)

- (1) Wang XX, Hu Y, Keep RF, Toyama-Sorimachi N, Smith DE. A novel role for PHT1 in the disposition of l-histidine in brain: In vitro slice and in vivo pharmacokinetic studies in wildtype and Pht1 null mice. *Biochem Pharmacol.* 15;124:94-102, 2017
- (2) Kobayashi T, Tanaka T, Toyama-Sorimachi N. Separation of intracellular vesicles and Immunoassays. *Bio-protocol* in press
- (3) 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 査読有り

- (4) Nishimura D., Sakai H., Sato T., Sato F., Nishimura S., Toyama-Sorimachi N, Bartsch J.W., Sehara-Fujisawa A. Roles of ADAM8 in elimination of injured muscle fibers prior to skeletal muscle regeneration. *Mechanisms of Development* 135:58-67, 2015
- (5) Kobayashi T, Shimabukuro-Demoto 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., and Toyama-Sorimachi N. The Histidine Transporter SLC15A4 Coordinates mTOR-Dependent Inflammatory Responses and Pathogenic Antibody Production. *Immunity* 41(3):375-388, 2014 査読有り
- (6) Jin H., Arase N., Hirayasu K., Matsuoka S., Kohyama M., Suenaga T., Saito F., Tanimura K., Nakamaru Y., Matsuoka S., Ebina K., Shid K., Toyama-Sorimachi N, Yasuda S., Horita T., Hiwa R., Takasugi K., Ohmura K., Yoshikawa H., Saito T., Atsumi T., Sasazuki T., Katayama I., Lanier L.L., and Arase H. Autoantibodies to IgG/HLA-DR complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(10):3787-92, 2014 査読有り
- (7) 反町典子: 細胞膜の機能的区画化におけるクラスターとドメインの概念とその制御. *生体の科学 特集号「脂質ワールド」* 67(3):220-226, 2016
- (8) 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 シグナル制御機構. *細胞工学* 134:557-561, 2015
- (9) 反町典子, 小林俊彦: リソソーム環境に依存した炎症シグナルと自己免疫疾患の病態. *実験医学増刊号「自己免疫疾患—新たな発症メカニズムと治療戦略」* 33:75-82, 2015
- (10) 小林俊彦, 反町典子: リソソームに局在するアミノ酸輸送体 SLC15A4 による炎症応答の制御 *ライフサイエンス新着論文レビュー* <http://first.lifesciencedb.jp/archives/9333> 2014.

[学会発表] (計 21 件)

- (1) Noriko Toyama-Sorimachi. Environmental control of endosomes/lysosomes by SLC15A4 is crucial for inflammatory responses and disease pathogenesis. 第 39 回日本分子生物学年会 2016 年 12 月 2 日 横浜 (招待)
- (2) 反町典子 「自己免疫疾患の新規治療標的としてのエンドリソソームシステムと創薬への取り組み」千葉大学リーディング大学院セミナー 2016 年 7 月 5 日 千葉 (招待)
- (3) Kobayashi T, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N. Regulatory role of an oligopeptide transporter SLC15A4 in

- inflammatory responses in mast cells. 16th International Congress of Immunology 2016 年 8 月 22-26 日 Melbourne, Australia.
- (4) Kobayashi T, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N. Transporter SLC15A4 Regulates Allergic Reactions by Controlling Mast Cell Homeostasis and Inflammatory Response. Gordon Research Conference “Membrane Transport Proteins”2016 年 6 月 12-17 日 Lucca (Barga), Italy
- (5) Kobayashi T, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N. The Histidine transporter SLC15A4 regulates allergic responses by tuning the endo/lysosomal condition of mast cells. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015 年 11 月 18 日 札幌
- (6) Machida A, Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N. A possible involvement of endo-exocytosis coupling machinery in granule-dependent NK cytotoxicity. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015 年 11 月 18 日 札幌
- (7) Yutaka Handa, Noriko Toyama-Sorimachi. Role of inhibitory receptor Ly49Q on SCV formation and inflammatory response triggered by Salmonella. 第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 24 日 大阪
- (8) Yutaka Handa, Noriko Toyama-Sorimachi. A cis-interaction MHC class I receptor, Ly49Q mediates macropinocytic uptake of extracellular antigens. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015 年 11 月 19 日 札幌
- (9) Noriko Toyama-Sorimachi, Yutaka Handa. MHC class I and its cis-interacting receptor shape GPCR signaling platform and orchestrate neutrophil chemotaxis. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015 年 11 月 19 日 札幌
- (10) 半田 浩, 反町 典子. サルモネラ感染における抑制性レセプターLy49Qの機構解析日本細菌学会関東支部インターラボセミナー 2015 年 8 月 6 日 東京 (招待)
- (11) 小林俊彦, 大島大輔, 反町典子「リソソーム局在型アミノ酸トランスポーターSLC15A4 の変異による局在変化とモノクローナル抗体作製への応用」第 10 回トランスポーター研究会 2015 年 6 月 20 日 東京
- (12) 反町典子 HS 財団 基礎研究講習会「自己免疫疾患の新規治療標的の同定と創薬への取り組み」2016 年 9 月 13 日 東京 (招待)
- (13) 反町典子 宮崎大学医学部・アステラス製薬共催「宮崎医学と医療の最前線を勉強する会」「自己免疫疾患の治療標的探索と創薬への取り組み」2015 年 2 月 6 日 宮崎 (招待)
- (14) 反町典子 さきがけ「炎症の慢性化機構の解明と制御」研究領域 第 8 回領域会議アドバイザー講演 「オルガネラホメオスタシスと炎症制御 -創薬ターゲット同定へのアプローチ-」2014 年 12 月 20-22 日 大分 (招待)
- (15) 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
- (16) 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
- (17) Yutaka Handa, Noriko Toyama-Sorimachi: An ITIM-bearing receptor Ly49Q regulates actin cytoskeleton by controlling Rac activity. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月、京都
- (18) 小林俊彦, 反町典子: SLC15A4 によるライソソ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.
- (19) 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
- (20) 反町典子 NCC-NCGM 合同リトリート「エンドソーム・リソソームの環境管理と炎症応答 -創薬ターゲット同定へのアプローチ-」2014 年 8 月 28-29 日 つくばみらい市
- (21) 反町典子 同志社大学 私大戦略「高次神経機能障害の発症メカニズム解明と新規治療法の開発」セミナー・「エンドリソソームの環境管理と炎症応答-創薬ターゲット同定へのアプローチ-」2014 年 5 月 9 日 京都 (招待)
- [図書] (計 1 件)
- (1) 反町典子: 南山堂医学大辞典 分担執筆「Ly 抗原、ナチュラルキラー細胞受容体、抗体媒介性細胞依存性細胞傷害」株式会社南山堂 2014
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]
- ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

反町 典子 (TOYAMA-SORIMACHI NORIKO)

国立国際医療研究センター研究所

分子炎症制御プロジェクト・プロジェクト長

研究者番号：30217468

(2) 連携研究者

小林 俊彦 (KOBAYASHI TOSHIHIKO)

国立国際医療研究センター研究所・分子炎症

制御プロジェクト・副プロジェクト長

研究者番号：40613203

(3) 連携研究者

岡村 匡 (OKAMURA TADASHI)

国立国際医療研究センター研究所・ヒト型動

物開発研究室・室長

研究者番号：00333790

(4) 連携研究者

清水 有紀子 (SHIMIZU YUKIKO)

国立国際医療研究センター研究所・ヒト型動

物開発研究室・研究員

研究者番号：00469983