

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21655

研究課題名(和文) SLC15A3によるリソソーム物質環境と炎症応答の新規制御機構の解析

研究課題名(英文) A study on SLC15A3 as new regulator of molecular environment in lysosome and inflammation

研究代表者

大島 大輔 (Ohshima, Daisuke)

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・上級研究員

研究者番号：70769653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リソソーム局在型アミノ酸トランスポーターSolute carrier protein (SLC)15A3が炎症応答に果たす役割を解析し、エンドリソソームを基軸とする炎症シグナルの新規制御機構を解明することを目的として研究を行った。Slc15a3遺伝子欠損マウスを作製したが、胸腺、脾臓、リンパ節など各リンパ器官における免疫細胞の分化や増殖に顕著な異常は見られなかった。継続してSlc15a3欠損マウスを用いた疾患モデルを作製して、SLC15A3の疾患治療標的としての可能性について検証を行っている。

研究成果の概要(英文)：A lysosome-resident, amino acid/oligopeptide transporter, SLC15A4, plays a critical role of the inflammatory response and SLC15A4 is possible therapeutic target in pathogenesis of inflammatory diseases. One of the SLC15 family members, SLC15A3 has highly conserved regions of SLC15A4, but its molecular functions have not been elucidated. SLC15A3 deficient mice were developed, but they showed no significant phenotypes such as cell proliferation and differentiation in the thymus, spleen, and lymph node. Several disease models are developed using SLC15A3 deficient mice, and they will be continuously analyzed to find a novel role of lysosomal transporter.

研究分野：分子生物学

キーワード：アミノ酸トランスポーター 炎症

1. 研究開始当初の背景

細胞は、細胞膜上に発現するチャネルやトランスポーターを介してイオンやアミノ酸などさまざまな分子を細胞の外内やり取りしている。このような細胞内環境の制御は、恒常性の維持や細胞内消化などの生命現象に深く関わる重要な機構である。これまでにプロトン共役型アミノ酸トランスポーター SLC15A4 が TLR7/9 依存的な炎症応答に必須であり、自己免疫疾患の病態形成に重要であることを報告している。SLC15A4 はヒスチジンを含むオリゴペプチドに高い輸送活性を示し、免疫細胞のリソソーム/後期エンドソームに局在する。Slc15a4 欠損細胞では、エンドリソソームの pH 制御異常とそれに伴う mTOR 活性の低下が認められ、mTOR 依存的な TLR7/9 シグナルと IFN 産生の破綻が明らかとなった。この結果は、炎症シグナルの伝達に SLC15A4 を介したエンドリソソーム内のアミノ酸、及びプロトン環境の適切な制御が必須であることを示している。

SLC15A3 は、SLC15A4 と同じ SLC15 ファミリーに属し、SLC15A4 とアミノ酸配列の高い相同性を持つ。免疫細胞における優先的な発現、及びリソソーム局在という共通点を有する一方で、SLC15A3 は炎症シグナルで強い発現誘導を見せること、免疫細胞の中で発現するサブセットが SLC15A4 と異なるという独自性を有する。これまでに、SLC15A3 はエンドリソソームにおいて NOD2 リガンドであるムラミルジペプチド (MDP) により惹起される炎症を媒介すること、リソソームの細管構造形成に関わることが示唆されている (Nakamura et al., Nature 2014) が、詳細な分子機構は明らかではなかった。また細胞内の局在と輸送基質特異性において高い類似性を示す 2 つのトランスポーターの機能的独立性と補完関係については解析がなされていない。Slc15a4 欠損マウスのループモデルにおいて病原性抗体の産生が抑制されることから、高い相同性を持つ SLC15A3 が炎症病態に関与する可能性が高く、その検証は重要である。一方で、炎症刺激依存的にその発現が強く誘導されるという SLC15A3 の性状からは、リソソーム機能もしくはリソソーム依存的な炎症シグナルの負の制御因子としての可能性も示唆されることから、SLC15A3 と SLC15A4 がそれぞれ独立に果たす役割と機能的補完関係について詳細に解析を行うことで、これまで報告のない新たな炎症制御機構の解明に発展する期待がある。

2. 研究の目的

SLC15A4 によるリソソーム内のアミノ酸環境を制御は、TLR7/9 及び NOD1 依存的な炎症応答に必須である。SLC15A4 と高い相

同性を有し、免疫細胞に優先した発現を示す SLC15A3 は、その発現分布パターンと炎症刺激により発現誘導する性状から、SLC15A4 と異なる独自の役割を持つことが強く示唆される。しかしながら免疫応答における機能と重要性については十分な解析がなされていない。本申請は、リソソーム局在型アミノ酸トランスポーター SLC15A3 が免疫応答に果たす役割を解析し、エンドリソソームシステムを基軸とする炎症シグナルの新規制御機構の解明を目的とする。

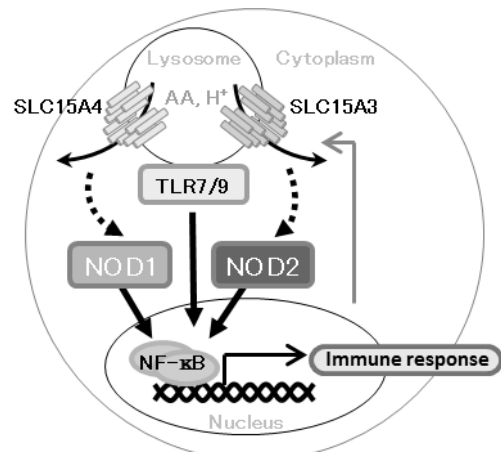


図. SLC15A3 と SLC15A4 を介した NF-κB 活性化経路の予想図

[目的 1] Slc15a3 欠損マウスを用い、マクロファージ、樹状細胞の炎症応答における SLC15A3 の役割と分子基盤を明らかにする。

[目的 2] Slc15a3 欠損、Slc15a4 欠損、及びこれら両者の二重欠損マウスを用いた炎症応答と病態の比較解析により、これらトランスポーターの役割の類似性と相違性を明らかにする。

[目的 3] Slc15a3 欠損マウスを用い、疾患モデルマウスを構築して、SLC15A3 の治療標的としての可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 炎症細胞における SLC15A3 の機能解析

Slc15a3 欠損マウス骨髄から誘導したマクロファージ、及び樹上細胞を用いて、さまざまなサイトカイン刺激に対する炎症応答を遺伝子ノックアウト/タンパク質発現やシグナル伝達の変化について解析を行った。またマウスマクロファージ細胞株において、ウイルスを用いて導入した shRNA による Slc15a3 遺伝子ノックダウン細胞を樹立して、同様の解析を行った。

(2) SLC15A3/SLC15A4 二重欠損マウスの作出

Crispr/Cas9 法で作出した Slc15a3 欠損マウスと Slc15a4 欠損マウスを交配して、SLC15A3/SLC15A4 二重欠損マウスを作出した。

(3) 疾患の治療標的因子としての SLC15A3 の解析

Slc15a3 欠損マウスを用いた複数の疾患モデルを構築して、表現型の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 炎症細胞における SLC15A3 の機能解析

SLC15A4 は TLR7/9 依存的な炎症応答に必須であり、Slc15a4 欠損細胞では、mTOR 依存的な TLR7/9 シグナルと IFN 産生の破綻が見られる。SLC15A4 と相同性の高い SLC15A3 の炎症応答の機能について解析する目的で、Slc15a3 欠損マウスの骨髄由来の免疫細胞において解析を行った。その結果、TLR7/9 のリガンドを含む炎症刺激に対して、野生型細胞に比して、顕著な応答の差は示さなかった。同様に、Slc15a3 ノックダウン細胞においても、炎症応答と分化において野生型細胞と顕著な相違が見られなかった。SLC15A3 は炎症応答依存的に発現が誘導されるタンパク質であることから、炎症応答過程、特に収束する過程において機能発現が見られることが示唆され、引き続き炎症応答における SLC15A3 の機能の解析を行う。

(2) SLC15A3/SLC15A4 二重欠損マウスの作出

SLC15A3/SLC15A4 二重欠損マウスの作出に成功し、解析を行った。二重欠損マウスはメンデル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は見られなかった。SLC15A3 と SLC15A4 の機能的な独立性が示唆される結果が得られたので、(1)とも関連して、今後も炎症応答における機能の独立性と代償関係について解析を行う。

(3) 疾患の治療標的因子としての SLC15A3 の解析

SLC15A4 と同様に Slc15a3 遺伝子欠損マウスを用いて、疾患の治療標的となり得るのかについて検証を行った。創薬事業における特許等の知的財産権との関係上、ここでは詳細な記載は控えるが、本研究によって得られた材料と知見を基に、疾患治療標的としての可能性についてトランスポーターの機能に焦点を当てた解析を今後も展開していく。

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 1 件)

Kobayashi T, Tsutsui H, Shimabukuro-Demoto S, Yoshida-Sugitani R, Karyu H, Furuyama-Tanaka K, Ohshima D, Kato N, Okamura T, Toyama-Sorimachi N.

Lysosome biogenesis regulated by the amino-acid transporter SLC15A4 is critical for functional integrity of mast cells.

Int Immunol. 2017 Dec 31;29(12):551-566.

〔学会発表〕(計 1 件)

OHSHIMA Daisuke, KOBAYASHI Toshihiko, SORIMACHI-TOYAMA Noriko.

Regulation of innate immune responses by oligopeptide transporter SLC15A3.

第 45 回日本免疫学会総会(沖縄県沖縄コンベンションセンター、2016 年 12 月)

〔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

大島 大輔 (Ohshima, Daisuke)

その他の部局等 国立国際医療研究センター・上級研究員

研究者番号: 70769653

(2) 研究分担者

なし

()

研究者番号:

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号 :

(4)研究協力者
なし ()