

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04070

研究課題名(和文) SLC15A4によるリソソーム生合成制御と炎症制御

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of lysosome biogenesis and inflammation 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・分子炎症制御プロジェクト長

研究者番号：30217468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞に高発現するアミノ酸トランスポーターSLC15A4は、エンドリソソーム小胞に局在してToll様受容体(TLR)7およびTLR9が媒介する炎症応答に必須の役割を果たす。

本研究では新たに、SLC15A4がmTORC1を介してリソソーム生合成のマスター転写因子TFEBの機能を制御することにより、マスト細胞の分泌顆粒形成と恒常性の制御を担うことを明らかにした。さらに、内因性のI型インターフェロンによるマスト細胞の新たな制御機構を発見した。本研究はマスト細胞によるアレルギー応答の新たな制御機構を明らかにしたものであり、新たな疾患制御戦略に有益なものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マスト細胞はアレルギー応答を担う細胞であり、分泌顆粒の放出によって即時型アレルギー応答が惹起されるほか、免疫応答の調節に重要な役割を果たす。アミノ酸トランスポーターSLC15A4およびI型インターフェロンによるマスト細胞の分泌顆粒形成の制御機構は、新規メカニズムの発見であり、アレルギー応答におけるマスト細胞の機能制御法の開発に有益な知見である。またリソソームと分泌顆粒の生合成制御は不明な点が多く、本研究は、免疫学や細胞生物学領域に新規性の高い知見を導入したのみならず、I型インターフェロンが用いられる肥満細胞腫治療に新たな可能性を提示するものである。

研究成果の概要(英文)：Solute carrier family (SLC) member 15A4 is a lysosome-resident, proton-coupled oligopeptide transporter, and preferentially expressed in immune cells, including dendritic cells and B cells. SLC15A4 is critical for the TLR7- and TLR9-mediated inflammatory responses, for which SLC15A4's transporter activity is required to optimize pH and other conditions in the late endosomes/lysosomes for lysosome-dependent signaling events including mTORC1 activation.

In the current study, we revealed that the biogenesis and maintenance of secretory granules of mast cells is strictly dependent on SLC15A4. Our results indicated that SLC15A4 promotes the proper function of the mTORC1-TFEB axis in mast cells, and that TFEB dysregulation alters secretory-granule conditions, disturbing mast-cell secretory functions and the IL-33 signaling pathway. Furthermore, we revealed a novel regulation mechanism of mast cell homeostasis, in which type I interferon controls lysosome-related organelle biogenesis.

研究分野：免疫学

キーワード：アミノ酸トランスポーター マスト細胞 リソソーム mTORC1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫細胞は、リソソームの分解機能を限定的に制限し、この小胞空間を様々な目的に利用することで、細胞特異的な機能発現を達成している。例として、樹状細胞における抗原プロセッシングと提示、TLR によるリガンド認識とシグナル伝達、NK 細胞や CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害性顆粒などがあげられる。とりわけ、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していると考えられ、この制御機構の理解は新規治療戦略の樹立に極めて重要である。

申請者はこれまでに、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 Solute carrier protein 15A4 (SLC15A4) に着目し、この分子がリソソーム内物質環境(主としてプロトンと特定のアミノ酸)を制御することにより、樹状細胞および B 細胞が媒介する TLR 依存的な炎症応答と疾患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た (Sasawatari, S et al. *Gastroenterology* 2011, Kobayashi, T., et al. *Immunity* 2014)。SLC15A4 は、プロトンと共役してヒスチジンおよびヒスチジンを含む短鎖ペプチドをリソソーム内腔から細胞質へ輸送してい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、炎症性腸疾患の疾患関連遺伝子としても報告されている。SLC15A4 はプラズマ樹状細胞における TLR7/9 シグナルに依存した I 型インターフェロン(IFN-I)や炎症性サイトカイン産生に必須であり、さらには病原体センサーである NOD1 のリガンドを細胞質へ輸送する責任分子である (*Gastroenterology* 2011)。この分子はまた、B 細胞における TLR7 依存的 IFN-I 産生と、IFN-I 受容体の下流で mTORC1 依存的に IFR7 の翻訳を媒介し、マウスループモデルにおいて IFN-I-IRF7 サーキットを介した病原性抗体産生を担う (*Immunity* 2014)。さらに申請者らは、SLC15A4 がマスト細胞の機能に重要な役割を果たしていることを見出した。樹状細胞、B 細胞といった異なる細胞種で共通する SLC15A4 の動作機序は、炎症刺激存在下での mTORC1 の活性制御であり、mTORC1 活性の変容がマスト細胞機能に重要である可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、SLC15A4 が担う、炎症刺激依存的なリソソーム生合成制御を理解し、自己免疫疾患の新規制御機構を明らかにすることを通じて創薬ターゲットを探索する。そのために、(1) SLC15A4 による mTORC1 制御と炎症応答制御機構の解明、(2) 炎症細胞におけるリソソーム生合成応答の実態と重要性の検証、(3) SLC15A4 相同分子 SLC15A3 による免疫制御機構、を明らかにする。これらを通じて、免疫細胞に特有の制御機構および制御因子を探索し、自己免疫疾患の新規創薬ターゲットとしての可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) SLC15A4 による mTORC1 制御と炎症応答制御機構の解明

SLC15A4 会合分子を、タグ付加 SLC15A4 を用いた免疫沈降法および近位依存性ビオチン標識法によって網羅的に探索した。同定された分子について会合、共局在を生化学的及び免疫組織学的手法によって検証し、炎症応答における機能解析を行った。

#### (2) 炎症細胞のリソソーム生合成制御機構と炎症応答における役割

マスト細胞を FcεRI 架橋および IL-33 によって刺激を行い、刺激前後において定量的 PCR によって、CLEAR (coordinated lysosomal expression and regulation) ネットワークとしてリソソーム生合成制御に関わる遺伝子 (Sqstm1, Vps11, Mcoln1 Lamp2, Atp6v0 構成因子群、TFEB 等) の mRNA の変動を明らかにした。また TFEB およびその変異遺伝子導入株を用いて、マスト細胞における mTORC1 と CLEAR ネットワークの連関が分泌顆粒生合成に果たす役割を検討した。

#### (3) SLC15A3 による免疫制御機構

SLC15A3 欠損マウスおよび SLC15A3/SLC15A4 二重欠損マウスを用いた炎症病態解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) SLC15A4 による mTORC1 制御と炎症応答制御機構の解明

近位依存性ビオチン標識法により、複数の新規 SLC15A4 会合分子を同定した。また mTORC1 構成分子である mTOR, RagA, RagC, Lamtor との相互作用が確認され、免疫組織染色によっても後期エンドソームからリソソームにかかる小胞で SLC15A4 と mTORC1 の共局在が確認された。同定された分子のエンリッチメント解析によって、SLC15A4 が関与する複数の細胞機能を同定し、オートファジー制御における SLC15A4 の新たな役割を見出した (投稿中)。会合分子の同定とそこから明らかになった新たな SLC15A4 の機能にかかる知見は、このトランスポーターの重要性を示すとともに、トランスポーターの基質輸送以外の新たな動作機序につながる重要な知見となった。

また、SLC15A4 は SLE の治療標的となりうることから、ヒトプラズマ細胞様樹状細胞株 CAL1 細胞で SLC15A4 をノックダウンし、ヒト SLC15A4 の機能解析を行った。その結果、SLC15A4 はヒト細胞においても mTORC1 の活性制御に重要な役割を果たしており、さらに TLR7/8/9 に依存した I 型インターフェロン産生において必須であることが確認されたことから (投稿準備中)、ヒトにおいても SLC15A4 阻害は I 型インターフェロン産生の抑制を介して SLE の病態改善に資

する可能性が強く示唆された。これによって SLC15A4 の治療標的としての妥当性が示されたことから、阻害剤探索に継続的に取り組んでいる。

## (2)炎症細胞のリソソーム生合成制御機構と炎症応答における役割

SLC15A4 欠損マスト細胞において、リソソーム関連オルガネラであるヒスタミン顆粒の異常を見出し、そのメカニズムの解明を個なった。SLC15A4 欠損マスト細胞は、分泌顆粒の開口放出の亢進によって抗原依存的なヒスタミンおよびセロトニンの分泌が増加していることを見出した (図 1) (Kobayashi et al. *Int Immunol.* 2017、Editor's choice として紹介)。

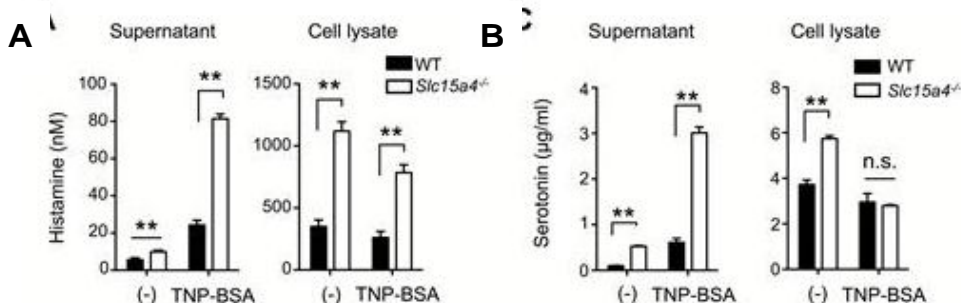


図 1. SLC15A4 欠損マウス由来マスト細胞におけるヒスタミン(A)およびセロトニン (B) の分泌と産生の増加. 白抜きバーが SLC15A4 欠損マウス由来マスト細胞、黒バーが野生型マウス由来マスト細胞のデータを示す。抗原として用いた TNP-BSA と抗 TNP IgE 抗体によって IgE 受容体 (FcεRI) を架橋した際のヒスタミンおよびセロトニンの分泌量と、細胞内含有量を比較した。( Kobayashi et al. *Int. Immunol.* 2017 より引用)

そのメカニズムとして、SLC15A4 を欠損するマスト細胞では mTORC1 の活性低下が認められ、それに伴って TFEB のリン酸化が減弱し、その結果 TFEB の核内移行が亢進すること、TFEB が制御する CLEAR 遺伝子ネットワークの発現が上昇し、リソソームの生合成が亢進することを明らかにした (図 2)。SLC15A4 はまた、IL-33 や LPS 刺激によるマスト細胞の炎症性サイトカイン産生を制御し、気道炎症に重要な役割を果たしていることも見出した。

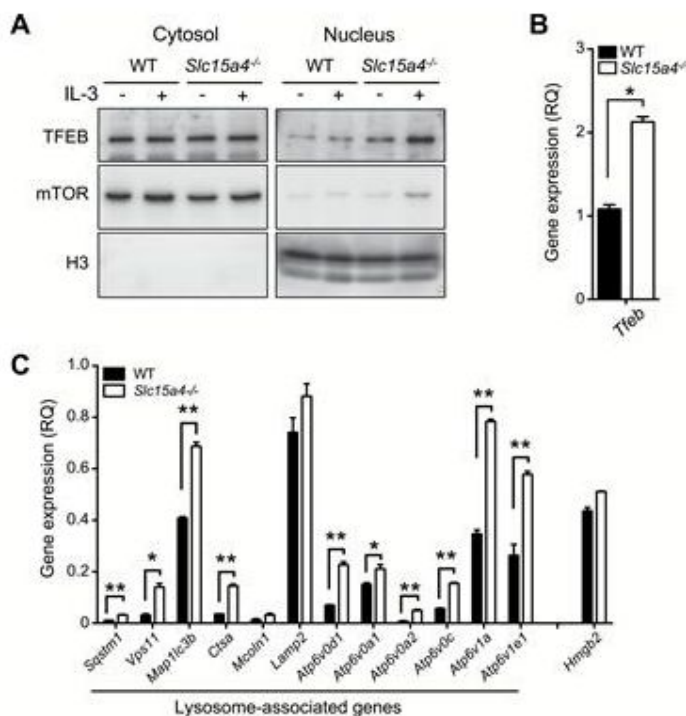
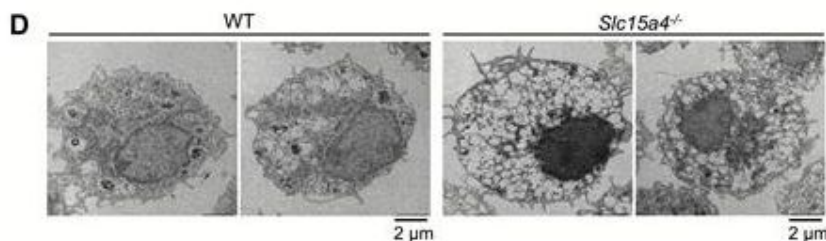


図 2. SLC15A4 欠損マウス由来マスト細胞における TFEB の活性上昇とリソソーム生合成経路の亢進  
mTORC1 によって負の制御を受けている転写因子 TFEB の核内への移行をウエスタンブロットによって検討した。SLC15A4 欠損マスト細胞では TFEB の核内移行が亢進しており(A)、その結果 TFEB 自身の転写が増強する (B)。また、TFEB がマスター転写因子として制御している一連のリソソーム生合成に関わる遺伝子の転写も SLC15A4 欠損マスト細胞で増強している(C)。その結果として、SLC15A4 欠損マスト細胞では、分泌顆粒の異常形成が認められる (D)。  
Kobayashi et al. *Int Immunol.* 2017 より引用



興味深いことに、抗原-IgE 複合体によって惹起される急性期の全身性アナフィラキシー反応は、SLC15A4 欠損マウスではヒスタミンやセロトニンの分泌が亢進しているにも関わらず症状が著しく軽減し、体温低下も軽度な推移を示した。これについては、SLC15A4 が血管内皮細胞に低レベルながら発現し、ヒスタミン応答性に重要な役割を果たすことを見出し、SLC15A4 欠損下でマスト細胞からのヒスタミン等の分泌量が増加したにも関わらず、血管透過性の亢進が引き起こされなかったことが強く示唆された。

### (3) SLC15A3 による免疫制御機構

SLC15A3 欠損マウスおよび SLC15A3/SLC15A4 二重欠損マウスを用いて、それぞれのトランスポーターが炎症病態形成に果たす役割を検討した。その結果、SLC15A3 は炎症応答において SLC15A4 とは異なる役割を果たし、SLC15A3 と SLC15A4 には機能的重複性が存在しないこと、また SLC15A3 は SLC15A4 とは異なる炎症病態の制御に関わることを見出し、論文投稿準備を進めている。これらの知見は SLC15A4 を標的とした薬品探索に有益な知見となるとともに、SLC15A3 の新たな疾患治療標的としての可能性を示す研究成果となった。

### (4) I 型インターフェロンによるマスト細胞の新規制御機構 (Kobayashi et al. *PLoS Biol.* 2019)

SLC15A4 によるマスト細胞の機能解析を解析する過程で、I 型インターフェロンがマスト細胞の恒常性維持と機能制御に果たす役割を見出し、そのメカニズムを解析した。I 型インターフェロン受容体遺伝子の欠損によって、内因性および外因性 I 型インターフェロンの刺激を欠く IFNAR1 欠損マウスは、抗原と IgE によって惹起される全身性アナフィラキシーショックが著しく増悪することを見出し、そのメカニズムとして、マスト細胞がニッチにおいて恒常的に産生される低レベルの I 型インターフェロンによって機能抑制を受けていること、I 型インターフェロンシグナルが欠損すると、成熟型マスト細胞が増加し、全身性および局所のアレルギー応答が亢進することを報告した。さらに I 型インターフェロンシグナルがどのようにマスト細胞の機能を制御するかを解析した結果、一般的に IFNAR 下流で機能する STAT1/STAT2 のほかに、STAT3 が極めて重要な役割を果たしていることを見出し、新たな I 型インターフェロンシグナル経路の存在を示した。

I 型インターフェロンは肥満細胞腫の治療に用いられているが、その作用機序は不明な点が多かった。本研究により、I 型インターフェロンによるマスト細胞の恒常性と機能の新しい制御機構が明らかとなった。また I 型インターフェロンによるマスト細胞機能制御における STAT3 の重要性が新たに示されたことにより、今後さらなる検証が必要ではあるものの、副作用の強い I 型インターフェロンに代わる治療法として STAT3 阻害剤の適応についての可能性が示された。

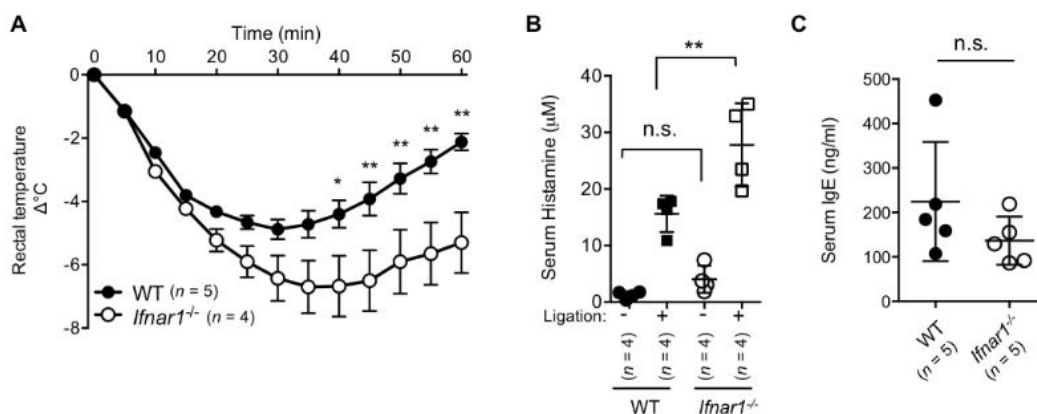


図 1. IFNAR1 欠損マウスの抗原依存的なアレルギー応答の解析

IFNAR1 欠損マウスでは、抗原-IgE 依存的に誘導される全身性アナフィラキシーショックが著しく増悪する (A)。 *Ifnar1<sup>-/-</sup>* が IFNAR1 欠損マウス、 *Ifnar1<sup>+/+</sup>* が野生型マウスを示す。(B) 全身性アナフィラキシーショックの増悪に伴い、IFNAR1 欠損マウスでは血中ヒスタミン濃度が野生型マウスと比較して増加している。(C) 血中 IgE 濃度は IFNAR1 欠損と野生型マウスの間で差は認められない。(Kobayashi et al. *PLoS Biol.* 2019 より引用)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Chang HW, Kanegasaki S, Jin F, Deng Y, You Z, Chang JH, Kim DY, Timilshina M, Kim JR, Lee YJ, Toyama-Sorimachi N, Tsuchiya T.	4. 巻 75
2. 論文標題 A Common Signaling Pathway Leading to Degranulation in Mast Cells and Its Regulation by CCR1-ligand.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 1371-1381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.14186	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 該当する

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 Watanabe-Takahashi Miho, Yamasaki Shinji, Murata Masayuki, Kano Fumi, Motoyama Jun, Yamate Jyoji, Omi Jumpei, Sato Waka, Ukai Hirofumi, Shimasaki Kentaro, Ikegawa Masaya, Tamura-Nakano Miwa, Yanoshita Ryohei, Nishino Yuri, Miyazawa Atsuo, Natori Yasuhiro, Toyama-Sorimachi Noriko, Nishikawa Kiyotaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Exosome-associated Shiga toxin 2 is released from cells and causes severe toxicity in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-29128-9	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 小林俊彦、向井康治朗、田口友彦、反町典子	4. 巻 69
2. 論文標題 炎症・感染応答を担うオルガネラ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 99-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 反町典子、小林俊彦	4. 巻 265
2. 論文標題 エンドリソーム環境に依存した自然免疫応答偏向	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1094-1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kobayashi T, Tsutsui H, Shimabukuro-Demoto S, Yoshida-Sugitani R, Karyu H, Furuyama-Tanaka K, Ohshima D, Kato N, Okamura T, Toyama-Sorimachi	4. 巻 29
2. 論文標題 Lysosome biogenesis regulated by the amino-acid transporter SLC15A4 is critical for functional integrity of mast cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 551-566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxx063.	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 Wang XX, Hu Y, Keep RF, Toyama-Sorimachi N, Smith DE.	4. 巻 124
2. 論文標題 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.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 94-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2016.11.012.	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 該当する

1. 著者名 小林俊彦、向井康治朗、田口友彦、反町典子	4. 巻 69
2. 論文標題 炎症・感染応答を担うオルガネラ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫アレルギー科	6. 最初と最後の頁 99-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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16件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kobayashi, T., Nguyen-Tien D., 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 The 48th Annual meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nguyen-Tien D., Kobayashi T., Dohmae N., Taguchi T., Toyama-Sorimachi, N.
2. 発表標題 SLC15A3 inhibits autophagy in macrophages and dendritic cells.
3. 学会等名 The 48th Annual meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 反町典子
2. 発表標題 エンドリソソームに依存した炎症制御-疾患横断的治療標的の探索に向けて
3. 学会等名 免疫サマースクール2019 in 愛媛（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kobayashi, T., Toyama-Sorimachi, N.
2. 発表標題 Regulation of the allergic inflammation by non-canonical type I interferon signaling.
3. 学会等名 6th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon (国際学会)
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 the allergic inflammation by non-canonical type I interferon signaling.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi, T., Toyama-Sorimachi, N.
2. 発表標題 Controlling the innate immune signaling by the proton-coupled peptide transporters.
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 反町典子、小林俊彦
2. 発表標題 リソソーム局在型アミノ酸トランスポーターに依存した炎症制御機構
3. 学会等名 感覚免疫研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林俊彦、筒井俊充、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
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 小林俊彦、反町典子
2. 発表標題 炎症シグナルのハブとしてのエンドリソソームとその制御機構
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林俊彦, 筒井英充, 大島大輔, 反町典子
2. 発表標題 リソソーム局在型オリゴペプチドトランスポーターSLC15A4によるマスト細胞の炎症応答制御機構
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kobayashi T, Tsutsui H, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N
2. 発表標題 Regulatory role of SLC15A3 in the systemic inflammation.
3. 学会等名 第46回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kobayashi T, Tsutsui H, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N.
2. 発表標題 Regulatory role of a lysosome-resident oligopeptide transporter SLC15A4 in the inflammatory responses of mast cells.
3. 学会等名 Annual meeting of the International Cytokine and Interferon Society (Cytokines 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Noriko Toyama-Sorimachi, Toshihiko Kobayashi
2. 発表標題 Lysosome-resident amino acid/oligopeptide transporter, SLC15A4, as a therapeutic target for systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 第32回年会薬物動態学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Noriko Toyama-Sorimachi
2. 発表標題 トランスポータータンパク質を標的とした自己免疫疾患治療薬の探索
3. 学会等名 第138年会日本薬学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 反町研究室 <a href="http://square.umin.ac.jp/Sori_Lab/">http://square.umin.ac.jp/Sori_Lab/</a> 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 <a href="http://square.umin.ac.jp/Sori_Lab/">http://square.umin.ac.jp/Sori_Lab/</a>
---

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