

課題番号 : 23指001
研究課題名 : オルガネラホメオスタシスを基軸とした新規炎症制御機構の解明
主任研究者名 : 反町典子 国立国際医療研究センター研究所 プロジェクト長
協力研究者名 : 小林俊彦 国立国際医療研究センター研究所 上級研究員
半田 浩 国立国際医療研究センター研究所 上級研究員
小路 早苗 国立国際医療研究センター研究所 特任研究員
キーワード : 炎症、感染、ライソゾーム、SLC15A4、自己抗体、全身性エリテマトーデス、TLR7、自然免疫、モデルマウス、HTS, processing body, IL-6,

研究成果 :

本研究は、炎症反応を、オルガネラホメオスタシスの破綻という新しい視点から捉え、その分子基盤に立脚した新しい炎症制御機構を明らかにし、炎症素過程をリセットする新しい方法論を樹立するとともに、感染症および免疫難病の病態理解に革新的な展開をもたらすことを目的としている。本年度はライソゾームをシグナル伝達の場合とする TLR7 による自己抗体産生機序において新しい制御機構を見出し、さらに医薬品リードの探索のためのハイスループットスクリーニングに着手したので報告する。

【1】ライソゾーム局在型アミノ酸トランスポーターSLC14A5 による自己抗体産生制御の分子機構

SLC15A4 は免疫細胞、特に樹状細胞と B 細胞に高い発現を示す、ライソゾーム局在型アミノ酸トランスポーターで、プロトンと共役してヒスチジン、オリゴペプチドをライソゾーム内から細胞質へ輸送するトランスポーターである。これまでに私たちは、この分子が樹状細胞における TLR9 および NOD1 の機能に必要であり、腸炎の病態制御に重要な役割を果たすことを報告してきた。この分子が B 細胞に高い発現を示し、①SLC15A4 は B 細胞による TLR 依存的な I 型 IFN (IFN-I) 産生に必要であること、②SLC15A4 を欠損すると lupus 様疾患モデルにおいて抗 DNA 抗体、抗 snRNP 抗体を含む自己抗体産生が抑えられること、③IFN-I による IRF7 の発現誘導に必須であること、④これらの機能は SLC15A4 によるライソゾームにおける mTOR 機能の制御を介していることを明らかにしてきた。また、SLC15A4 による mTOR 機能の制御は、IRF7-IFN-I regulatory circuit の成立に必須であり、SLC15A4 欠損マウスではこの circuit が作動しないことによる IFN-I 産生の低下と IFN 受容体(IFNAR)下流での免疫グロブリン遺伝子の転写誘導が起こらないために、自己抗体産生が抑制されることを見出した。さらに私たちは、ライソゾームにおける v-ATPase の活性制御に SLC15A4 が重要な役割を果たしており、SLC15A4 は v-ATPase の制御を通じて mTOR のシグナルに影響を与えていることを見出した。これにより、自己抗体産生の新しい制御機構が明らかとなり、SLC15A4 が自己抗体産生を伴う自己免疫疾患の治療標的分子となる可能性が強く示唆された。

【2】SLC15A4 阻害剤開発のためのハイスループットスクリーニング系の樹立

本研究成果によって SLC15A4 の機能阻害が炎症性腸疾患および全身性エリテマトーデスの病態改善に有効であることが示されたため、医薬品リード化合物としての低分子阻害剤の検索をするために HTS 化を試み、HTS 用細胞株の樹立に成功した。理研・創薬医療技術基盤プログラムによって、阻害剤の HTS がスタートした。

【3】炎症における processing body の役割とマクロファージにおける IL-6 産生の新規制御機構

M1 および M2 に分化誘導したマクロファージを用いて、炎症応答に際する processing body (PB) の役割と重要性を検討した。M1 と M2 では、LPS 刺激による PB 形成に差が認められ、PB 構成分子である EDC4 および Dcp1a の発現を抑制すると、IL-6 分泌量が減少することから、炎症時の IL-6 翻訳制御における PB の重要性が明らかになった。

Subject No. : 23 指 001
Title : Understanding of novel regulatory mechanisms of inflammatory responses;
Importance of homeostasis and vesicular environment control in organelle.
Chief scientist: Noriko Toyama-Sorimachi, Ph.D. Project leader, NCGM
Researchers : Toshihiko Kobayashi, Ph.D. Senior research fellows, NCGM
Yutaka Handa, Ph.D. Senior research fellows, NCGM
Sanae Shoji, Ph. D. Senior research fellows, NCGM
Key word : inflammation, infection, lysosome, SLC15A4, autoantibody, systemic lupus
erythematosus (SLE), Toll like receptor (TLR), innate immunity, model mouse
High-throughput screening (HTS), processing body (PB), IL-6

Abstract :

It is established that endosomes/lysosomes are important compartments to transmit inflammatory signals, and a failure of homeostatic regulation of these organelles affects the pathogenesis of various immune diseases. The purpose of this study is to identify possible therapeutic targets in inflammatory diseases through understanding of novel regulatory mechanisms of endosome/lysosome-dependent inflammatory signals.

[1] A crucial role of SLC15A4 for B cell-intrinsic autoantibody production

Solute carrier family (SLC) 15A4 is a resident lysosomal proton-coupled histidine/oligopeptide transporter, and is preferentially expressed in immune cells including dendritic cells and B cells. This transporter plays a crucial role for TLR9-triggered IFN- β production in pDCs probably by controlling lysosomal environment, and disruption of SLC15A4 gene causes amelioration of the pathogenesis of colitis. In this study, we revealed importance of SLC15A4 in B cell-intrinsic immune functions, particularly autoantibody production associated with the pathogenesis of lupus-like disease. We also showed that loss of SLC15A4's function leads to failure of the IRF7-IFN-I regulatory circuit through disturbance of mTOR pathway at the endolysosomes. Importantly, we found that SLC15A4 was necessary for regulation of the endolysosomal pH and the vATPase integrity. Our results show that SLC15A4 plays a fundamental role in the lysosome-dependent inflammatory signals and is a therapeutic target for autoimmune diseases which associated with autoantibody production.

[2] Establishment of HTS assay to search SLC15A4 inhibitors

To identify low molecular weight inhibitors against SLC15A4, we established the HTS assay using luciferase-based reporter system, and the HTS was started under the supervision of RIKEN program for drug discovery and medical technology platforms.

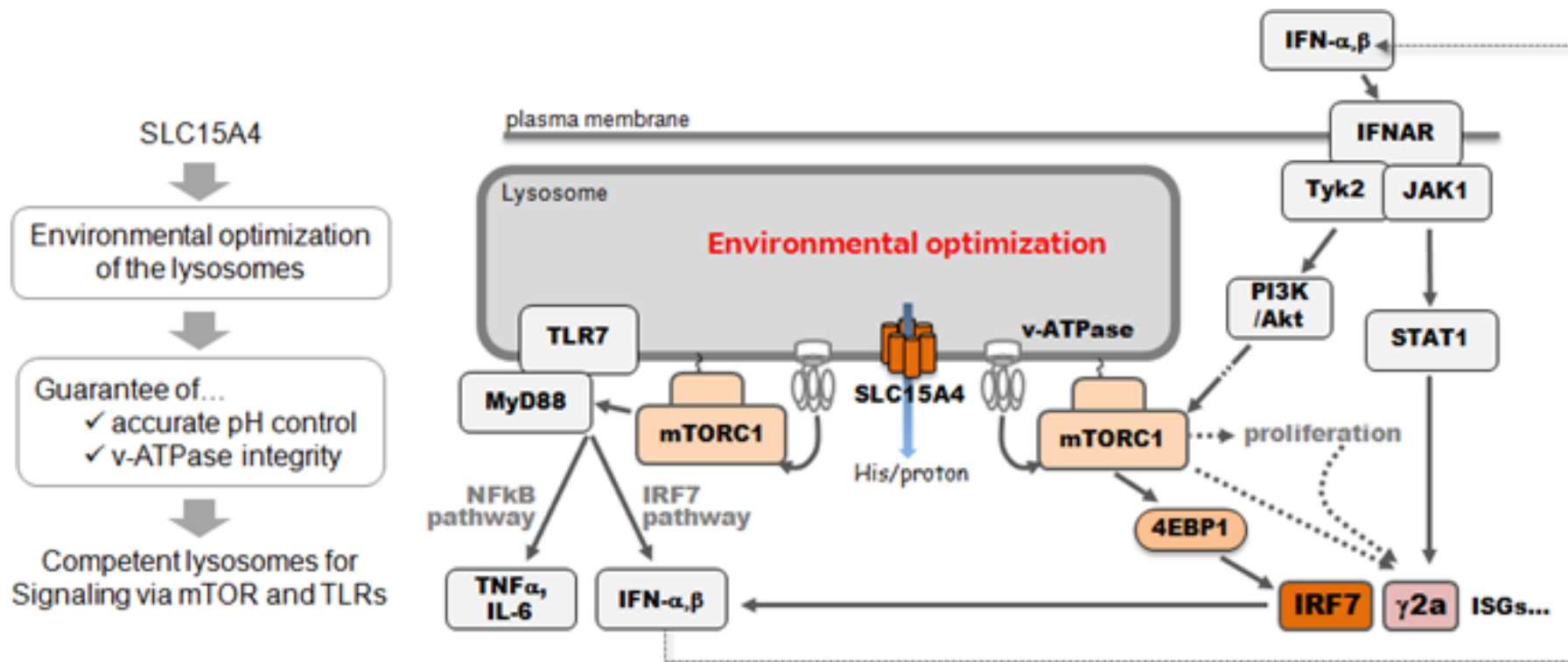
[3] A novel regulatory mechanism of IL-6 production by processing body (PB)

We investigated functional importance of PB in human macrophage and found a novel regulatory mechanism of IL-6 production by PB. When P-body assembly was inhibited in M1-THP by siRNA that targets the PB components, IL-6 but not TNF α production in M1-THP was efficiently inhibited. Our observation proposed a possibility that detailed understandings of the molecular mechanisms governing mRNA metabolism characteristic of macrophage subsets may provide novel therapeutic targets that can be exploited to fine-tune cytokine production.

Researchers には、分担研究者を記載する。

23指001 オルガネラホメオスタシスを基軸とした 新規炎症制御機構の解明

SLC15A4による mTOR経路とIFN-I-IRF7サーキットの制御



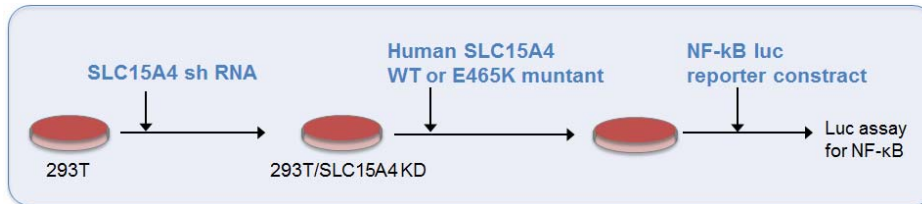
【平成25年度の主な成果】

- SLC15A4によるTLR7およびTLR9制御の分子機構の解明を進め、これまでにSLC15A4がB細胞におけるI型IFN (IFN-I) の産生に必須であること、自己抗体産生に重要な役割を果たすことを見出していたが、新たにSLC15A4がmTOR経路の活性化に重要であること、TLR7依存的にIFN-Iが産生された後、IFNAR (IFN受容体)の下流でmTOR経路に依存したIRF7の翻訳制御に重要であること、それによってIFN-I-IRF7サーキットを成立させてさらなるIFN産生と自己抗体産生を誘導することを明らかにした。さらにそのメカニズムとしてSLC15A4がvATPaseの機能に影響を与えることによってmTOR機能をコントロールすることを見出した(上図、Immunity, under revision)。

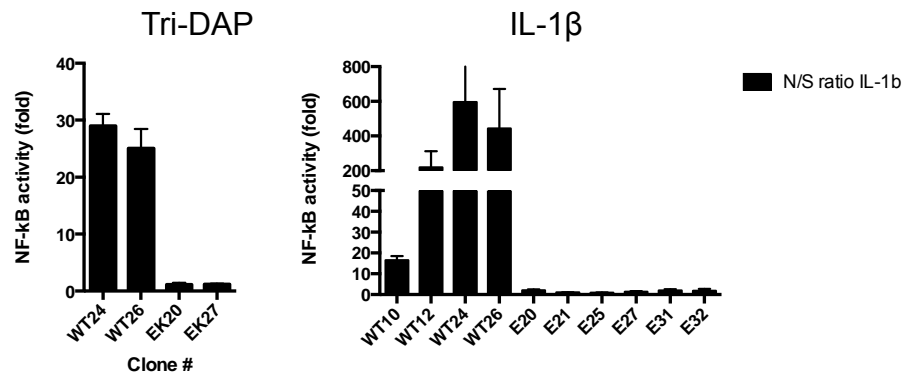
自己免疫疾患の治療を目指した低分子創薬

- 免疫系に高発現するSLC15A4の機能障害が炎症性腸疾患および全身性エリテマトーデスの病態改善に有効であることが示されたため、医薬品リード化合物としての低分子阻害剤の検索をするためにHTS化を行った (図A)。
- HTS用細胞株の樹立に成功し(図B)理化学研究所・創薬医療技術基盤プログラムの支援によって、阻害剤のHTSがスタートした。

A. HTSアッセイ系樹立の方法



B. 樹立されたスクリーニング用細胞の性状



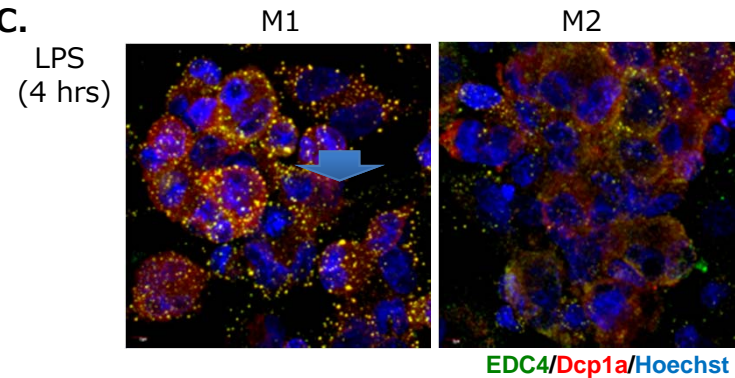
SLC15A4のトランスポーター活性依存的にNFκB活性が上昇するレポーター細胞の樹立に成功した。

理研・吉田先生のグループの御協力により**HTSスタート**
(創薬テーマとして採択)

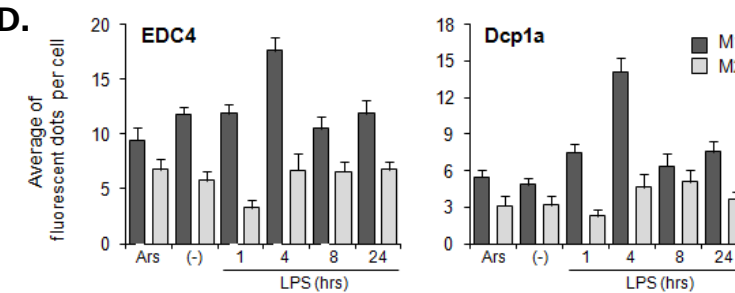
炎症におけるProcessing bodyの役割

- M1およびM2に分化誘導したマクロファージを用いて、炎症応答に際するprocessing body (PB)の役割と重要性を検討した。M1とM2では、LPS刺激によるPB形成に差が認められ(図C、D)、PB構成分子であるEDC4およびDcp1aの発現を抑制すると、IL-6分泌量が減少する(図E)ことから、炎症時のIL-6翻訳制御におけるPBの重要性が明らかになった。

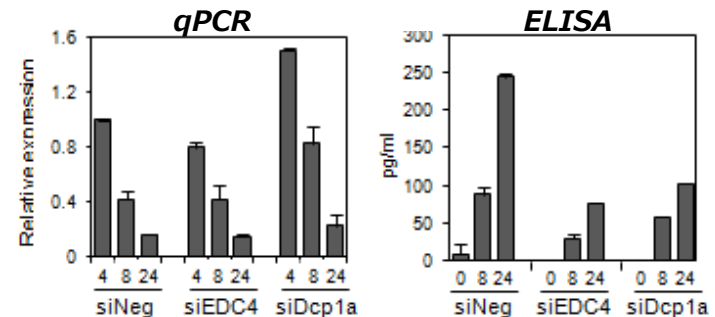
C.



D.



E.



23指001 研究業績 (2013年)

【原著論文】

1. 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.* 11;111(10):3787-92, 2014 査読有り
2. Kobayashi T., Tanaka T. and Toyama-Sorimachi, N.* How cells optimize vesicular environments – control of the endosomal/lysosomal environment for efficient inflammatory responses. <Review article> *J. Biochem.* 154(6):491-9, 2013 査読有り
3. Imanishi H., Takibuchi G., Kobayashi T., Ishikawa K., Nakada K., Mori M., Kikkawa Y., Takenaga K., Toyama-Sorimachi N., and Hayashi J.-I. 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. 査読有り
4. Onai N, Kurabayashi K, Hosoi-Amaike M, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba K, Ohteki T. A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential. *Immunity* 38(5):943-57. 2013. 査読有り
5. Takibuchi G, Imanishi H, Morimoto M, Ishikawa K, Nakada K, Toyama-Sorimachi N, Kikkawa Y, Takenaga K, Hayashi JI. Polymorphic mutations in mouse mitochondrial DNA regulate a tumor phenotype. *Mitochondrion* 13(6):881-7, 2013 査読有り

【著書】

1. 小林俊彦、IVIG の炎症抑制作用とその機序 臨床免疫・アレルギー科 59;614-619, 2013

【その他】

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
2. 標準免疫学 第3版 谷口克監修、宮坂昌之、小安重夫編集 分担執筆「NK細胞」pp211-218、2013

【学会発表】(含 講演)

1. 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ー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)

2. Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N. SLC15A4 regulates IgG2a autoantibody production through IRF7-type I IFN activation loop in B cells. 42nd Annual meeting of Japan Society for Immunology. 11-13th Dec 2013, Chiba, Japan.
3. 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. 15th International Congress of Immunology. 22-27th August 2013
4. 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. 22-27th August 2013, Milan, Italy.
5. 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, 熊本
6. Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N. Lysosomal transporter SLC15A4 regulates TLR7/9-mediated antibody production. 100th Annual Meeting of American Association of Immunologists (Immunology 2013). 3-7th May 2013, Honolulu, HI, USA.
7. 反町典子 お茶ノ水がん学アカデミア第93回集会 「疾患治療標的としてのエンドソーム・ライソゾームシステム」 2013年4月24日 東京 (招待)
8. 反町典子 LEGEND SEMINAR ～免疫研究の最前線～ 炎症疾患制御におけるエンドソーム・ライソゾームシステムの重要性 2013年4月16日 東京 (招待)

【特許】 なし

【その他特記事項】

自己免疫疾患治療を目指した創薬プロジェクトが採択された。
新規オートファジー関連因子の探索を基盤とした創薬プロジェクトがTaNeDSに採択された。