

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

キーワード : 炎症、感染、自然免疫、リソソーム、自己免疫疾患、アミノ酸トランスポーター、SLC15A4、自己抗体、全身性エリテマトーデス、TLR7、モデルマウス、創薬、好中球、ケモタキシス、サルモネラ菌、マクロピノサイトーシス、processing body、翻訳制御、IL-6、神経変性疾患、オートファジー

研究成果 :

炎症応答の逸脱した制御と治癒プロセスの遅延は、感染症や免疫難病をはじめとする多くの疾患において、その病態に多大な影響を及ぼすことから、炎症反応の根幹を担う自然免疫細胞群の機能制御の基本原理の理解と、それに立脚した炎症制御基盤技術の確立は必須である。

感染炎症応答においては、治癒プロセスや免疫難病の病態形成に自然免疫細胞が重要な役割を果たすことから、これら細胞の機能制御の分子基盤を理解することが急務である。これまでに多くの自然免疫センサーや、サイトカインをはじめとする機能分子が同定され、その作用機序が明らかにされているが、様々な疾患に付随する炎症病態の克服には至っていない。近年明らかになってきた、エンドソーム、ライソゾーム、ミトコンドリアといった細胞内オルガネラの制御と恒常性の維持が、生体における免疫応答の質や強度、炎症反応の時間軸に重要であるという知見を鑑みると、オルガネラによる炎症制御の分子論の樹立は、炎症素過程をリセットするための新規基盤技術の確立に極めて有益であると考えられる。

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行い、期間中に以下の成果を得た。

【1】自己免疫疾患の病態形成におけるリソソーム局在型アミノ酸トランスポーターSLC15A4の役割

SLC15A4は免疫細胞、その中でも特に樹状細胞と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の病原体センサーであるTLR9およびNOD1の機能に必須であり、樹状細胞やマクロファージのサイトカイン産生を制御して腸炎の病態制御に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた(Sasawatari, et al.

Gastroenterology, 2011)。SLC15A4がB細胞においても高い発現を示し、全身性エリテマトーデス(SLE)の疾患関連遺伝子であるという背景から、本研究においては、B細胞の抗体産生をはじめとする種々の機能にSLC15A4が果たす役割について解析を行った。SLC15A4欠損マウスを用いることにより、①SLC15A4を欠損するとループス様疾患モデルマウスにおいて抗DNA抗体、抗snRNP抗体を含む自己抗体産生が抑制されること、②SLC15A4はB細胞によるTLR7およびTLR9依存的なI型IFN(IFN-I)産生に必要であること、③IFN-Iによる転写因子IRF7の発現誘導に必須であり、SLC15A4を欠損するとIRF7を介したIFN-Iの正のフィードバック制御が破綻すること、④これらSLC15A4の機能は、この分子がリソソームでmTORC1に依存したシグナル経路を介していることを明らかにした(Kobayashi, T., et al., *Immunity* 2014に表紙として紹介された)。特に、SLC15A4によるmTOR機能の制御は、IRF7の翻訳制御を介した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。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 阻害剤開発と免疫疾患への応用

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、SLC15A4 の機能阻害が病態改善に及ぼす効果について、既存薬による病態改善効果と比較を行い、SLC15A4 の治療標的としての優位性を明らかにした。これらの結果をふまえ、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理研・創薬医療技術基盤プログラムによって、SLC15A4 阻害剤探索のためのハイスループットスクリーニング(HTS)がスタートした。それに先だって、スクリーニングアッセイの HTS 化を試み、NF- κ B レポーターアッセイを応用した HTS 用細胞株の樹立に成功した。当該細胞株を用い、スクリーニングによって得られた候補化合物 40 化合物について、構造展開を行い、最適化を進めている。さらに日本医療研究開発機構(AMED)の創薬支援推進事業・創薬総合支援事業および創薬等支援技術基盤プラットフォームに採択され、プロジェクト統括として SLC15A4 阻害剤探索をスタートさせた。それに伴い、新たに SLC15A4 のトランスポーター活性を高感度で測定する *in vitro* アッセイ系を 2 種類考案、樹立した (AMED において特許出願検討中)。これらのアッセイによって得られた候補分子についても現在構造展開を行い、最適化を進めている。

【3】 SLC15A4 によるマスト細胞の機能制御

SLC15A4 がマスト細胞の機能およびマスト細胞が媒介するアレルギー応答に重要な役割を果たすことを見出し、論文化を進めている (Kobayashi, T., et al 投稿準備中)。また SLC15A4 に特異的なモノクローナル抗体の樹立に成功し、この抗体を用いて内在性 SLC15A4 タンパク質の性状解析を進めるとともに、理研との共同研究として結晶構造解析を開始した。

【4】 ライソゾームにおける TLR シグナルの制御機構に関する研究

SLC15A4 以外にライソゾームにおける感染炎症シグナルの伝達維持に重要な役割を果たす分子を同定する目的で、TLR9 刺激でエンドライソゾームに集積する分子群のプロテオーム解析を行っている。TLR9 リガンドを固定した磁性ナノビーズで TLR9 刺激を伝達するエンドソーム・ライソゾームを選択的に回収し、TLR9 刺激下のエンドソームで増加または減少する分子を複数同定し、それらの分子の機能解析を進めている。得られた候補分子の一つを通じて、代謝制御による新しい炎症制御経路を見出し、炎症性細胞のエネルギー代謝が炎症性サイトカインの産生に大きく影響することが強く示唆された。

【5】 MHC クラス I の cis 型抑制性受容体による新規自然免疫応答制御

急性炎症時の制御を逸脱した好中球の組織浸潤は、臓器障害や多臓器不全の原因となるが、よい制御方法は確立されていない。私たちは脂質ラフトとシグナル伝達エンドソームに焦点を当てて好中球の遊走制御機構を解析し、ケモカイン受容体下流で PI3 キナーゼおよび SHIP2 が活性化され、アクチン再構成と膜輸送の制御を介して細胞移動が起こるまでの一連の過程が、MHC-I とその cis 型受容体 Ly49Q によって媒介されるシグナルで制御されるという新たなメカニズムを明らかにした。Ly49Q は細胞内領域の抑制性モチーフに脂質脱リン酸化酵素 SHIP2 を会合し、PI3 キナーゼによる PIP3 産生からの PI(3,4)P2 産生を制御し、細胞膜における低分子量 GTPase の活性制御を介してアクチン再構成と細胞極性形成を制御することを明らかにし、論文化を行った (Handa, Y., et al. 投稿中)。

さらに、MHC-I と Ly49Q の *cis* 相互作用は、サルモネラ菌の細胞内複製を制限すること、アクチン再構成を介してマクロピノサイトーシスを制御し、Fc 受容体が媒介する貪食作用に必須の役割を果たすことを見だし、論文化を進めている (Handa, Y., et al. 投稿準備中)。

【6】神経変性疾患治療標的としてのオートファジー制御因子の探索

オートファジー制御に関わることが示唆された免疫疾患の原因遺伝子のノックアウトマウスを CRISPR/Cas9 システムによって作出し、オートファジーの制御と免疫細胞機能と免疫疾患病態について解析を進めている。予備的解析においては、当該遺伝子のノックアウトマウスではオートファジーの減弱が認められており、さらに検証とメカニズムについて解析を進めている。また、第一三共(株)との共同研究 (TaNeDS プロジェクト) で、iPS 細胞から誘導した神経細胞を用いて、オートファジー誘導に必須の因子である Beclin-1 会合分子を網羅的に検索し、神経変性疾患の治療標的の同定を進め、質量分析と先行研究による情報より候補分子を絞り込み、オートファジーに関わるかどうかを siRNA によるノックダウン法により検証した。その結果、オートファジーの正の制御に関わる可能性が強く示唆される分子を、既知のもの 1 分子、新規のもの 2 分子を候補分子として同定した。

さらに自己免疫疾患および急性炎症とその治癒過程におけるオートファジー依存的免疫制御を解析するための新たなツールとして、栄養飢餓によらずに任意の組織で人為的にオートファジーを誘導できるモデルマウスの樹立を行った。このマウスでは、オートファジー誘導活性を有するペプチドをドキシサイクリンの飲水投与によってマウス個体内に発現誘導し、任意の臓器にオートファジーを誘導することを目指したが、生化学的解析の結果、ドキシサイクリン投与によってペプチドの十分な発現が誘導されず、またオートファジーの誘導も認められなかった。さらに複数の異なる系統においてオートファジーの誘導について検討を行っている。

【7】M1 マクロファージに特徴的な IL-6 の翻訳制御機構

炎症病態の形成に重要な役割を果たすマクロファージの亜集団、M1 および M2 は、その亜集団によって炎症の増悪と沈静化における役割が異なることから、それぞれの亜集団の機能を選択的にコントロールする基盤技術は、炎症、特に慢性炎症の病態制御には有益と考えられる。これらマクロファージの亜集団の機能および機能分化を担うサイトカインや転写因子の解析はなされているものの、転写後制御については知見が少ないことから、これらマクロファージ亜集団における転写後制御機構について、RNA 代謝と翻訳制御に関わる processing body (P-body) に着目して解析を行った。M1 および M2 に分化誘導したマクロファージを用いて、炎症性サイトカイン産生の転写後制御機構の違いを検討した。M1 と M2 では、LPS 刺激による P-body 形成に差が認められ、M1 マクロファージでは P-body 構成分子である EDC4 および Dcp1a が、炎症時の IL-6 翻訳制御に重要な役割を果たしていることを報告した (Seto, E. et al. *PLoS One* 2015)。

本プロジェクト研究を通じて、複数の新規炎症制御機構が明らかとなった。とりわけ、SLC15A4 欠損マウスを用いた基盤研究より得られた知見が、SLC15A4 の機能阻害を目指した創薬事業へと展開し、AMED、理研を含む大型プロジェクトへと発展したことは、本センターミッションに即したプロジェクト研究の大きな成果であると同時に、新規治療法の開発における基盤的研究の意義を示すものとなり得た。得られた知見はすべて新規性を有するものであり、現在論文投稿中あるいは投稿準備中の過程にあるものも多いが、これら知見は免疫学領域に斬新かつ独創的な知見を導入するのみならず、医学・細胞生物学の広い領域へ波及することが期待される。本研究をサポートいただいた国立国際医療研究センターおよび関係各位に深くお礼を申し上げます。

Subject No. : 23 指 001

Title : Understanding of novel regulatory mechanisms of inflammatory responses;
Importance of organelle homeostasis and lysosomal environment control.

Chief scientist: : Noriko Toyama-Sorimachi, Ph.D. Project leader, NCGM

Key word : inflammation, infection, innate immunity, lysosome, autoimmune disease, amino acid transporter, SLC15A4, autoantibody, systemic lupus erythematosus (SLE), Toll like receptor (TLR) 7, model mouse, drug discovery, neutrophils, chemotaxis, Salmonellae, macropinocytosis, processing body, translational regulation, IL-6, neurodegenerative disease, autophagy

Abstract :

Understanding of regulatory mechanisms of inflammatory responses is critical for establishing novel therapeutic strategies since deregulation of inflammatory process including healing processes causes exacerbation of pathological conditions of various diseases. To this end, we focused on innate immune responses since innate immune cells plays key roles not only in initiation but also in chronic situation of inflammation. Although a wide variety of pathogen sensors and cytokines involved in inflammatory responses have been identified and characterized, understanding of how inflammatory responses contribute to disease pathogenesis remains insufficient.

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. Furthermore, accumulating evidence demonstrated that mitochondrial functions have a close association with inflammatory diseases. Thus, organelle-based understanding of inflammatory responses merits further study to develop novel therapeutic strategies. The purpose of this study is to identify possible therapeutic targets in inflammatory diseases through understanding of novel regulatory mechanisms of organelle-based inflammatory signals by focusing in particular on endosome/lysosome-dependent inflammatory signals.

【1】 A critical role of a lysosome-resident oligopeptide transporter, SLC15A4, in the pathogenesis of autoimmune diseases.

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. SLC15A4 possesses 12 membrane-spanning regions and carries certain types of amino acids, particularly histidine, and oligopeptides such as NOD1 ligand, tri-DAP, and carnosine, together with a proton. This transporter plays a crucial role for TLR9-triggered type I interferon (IFN-I) production in pDCs, and disruption of SLC15A4 gene causes amelioration of the pathogenesis of colitis (Sasawatari, S. et al., *Gastroenterology* 2011). We here investigated importance of SLC15A4 in B cell-intrinsic immune functions, particularly autoantibody production associated with the pathogenesis of lupus-like disease. We demonstrated that SLC15A4 in B cells is critical for production of TLR7-triggered IFN-I and autoantibodies such as anti-snRNP and anti-dsDNA in the lupus model. More importantly, we revealed that SLC15A4 was required to establish IRF7-IFN-I regulatory circuit downstream of IFNAR, and to induce germ line $\gamma 2a/c$

Researchers には、分担研究者を記載する。

transcription. Our results suggest that SLC15A4's transporter activity was necessary for providing suitable conditions in the lysosomes including pH optimization and v-ATPase integrity to exert the lysosome-dependent signaling events. Our findings revealed a novel regulatory mechanism of autoantibody production, in which SLC15A4-mediated conditioning of the lysosomal environments is an integral part of a TLR7-triggered, mTOR-dependent IRF7-IFN-I circuit that is pivotal to autoantibody production. Recent genome-wide analyses have identified a number of potential risk factors for SLE, including TLR7, IRF7, IFN-I, and SLC15A4. Although the pathogenic conditions of this multifactorial disorder cannot be explained by a single molecule in a sole cell subset, our results demonstrated that the SLC15A4 molecule plays a key role in integrating the functions of these risk factors into a sequential process that promotes autoantibody production in B cells (Kobayashi, T. et al. *Immunity*, 2014).

【2】 Development of small molecules as SLC15A4 inhibitors.

Since our studies demonstrated that SLC15A4 could be a good therapeutic target for autoimmune diseases including SLE. 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. We obtained 40 chemicals out of 60000 chemicals from the screening. In addition, the AMED program for drug discovery for SLE has started. We further established new assays for evaluating SLC15A4 transporter activities, and obtained candidate chemicals which inhibit SLC15A4 transporter activity. Currently structural expansion/modification of these chemicals is ongoing for lead generation and optimization.

【3】 An important role of SLC15A4 in mast cell functions

We found that SLC15A4 was highly expressed in mast cells and played a crucial role for mast cell effector functions both *in vitro* and *in vivo* (Kobayashi, T. et al. manuscript in preparation). In addition, we successfully established specific monoclonal antibody against SLC15A4. Using this antibody, we started characterization of endogenous SLC15A4 proteins and crystallization of this protein for crystal structure determination.

【4】 Molecular mechanisms of regulation of TLR signaling in lysosomes

To identify important molecules which regulate lysosome-dependent TLR9 signaling events to elicit cytokine production, CpG-ODN-containing lysosomes were purified, and proteins recruited to or excluded from the lysosomes in response to CpG-ODN were identified by mass spectrometry. Analyses of functional importance of these molecules by using appropriate inhibitors and knock-down system are currently ongoing.

【5】 A novel regulatory mechanism of neutrophil chemotaxis

Neutrophils rapidly migrate into inflamed tissues and cause inflammatory responses by secreting humoral factors, including proteases and chemokines, which can also contribute to the pathology of multiple organ failure. Neutrophil chemotaxis is triggered by G-protein-coupled

receptors (GPCRs), including the formyl peptide receptor, FPR. However, the mechanisms linking GPCR activation to cytoskeletal reorganization remain unclear. We demonstrated that an ITIM-bearing inhibitory receptor, Ly49Q, is crucial for FPR-triggered signals. Ly49Q loss caused FPR and PI3K γ mislocation, in association with impaired neutrophil polarity. Ly49Q was also critical for establishing the PI3K-SHIP2-axis-dependent phosphoinositide cascade downstream of FPR and for reorganizing the cytoskeleton by activating a panel of monomeric G proteins. We also found that Ly49Q-modulated signaling promoted neutrophil migration *in vitro* and *in vivo*. Our findings reveal a novel regulatory mechanism of GPCR-proximal signaling events (Handa, Y., et al. submitted).

【6】 Autophagy as a therapeutic target in neurodegenerative diseases

To develop a novel therapeutic strategy for neurodegenerative diseases, we have tried to find novel autophagy-modulating molecules. To this end, in collaboration with Daiichi Sankyo company, Beclin-1-interacting molecules were searched from iPS-derived neuron. We have successfully identified a panel of candidate molecules, and functional validation of the candidates is now ongoing by using siRNA knockdown method.

【7】 A novel regulatory mechanism of IL-6 production by processing body (PB) in M1 macrophages

Macrophages play critical roles in the onset of various diseases and in maintaining homeostasis. There are several functional subsets, of which M1 and M2 macrophages are of particular interest because they are differentially involved in inflammation and its resolution. Here, we investigated the differences in regulatory mechanisms between M1- and M2-polarized macrophages by examining mRNA metabolic machineries such as stress granules (SGs) and processing bodies (P-bodies). Human monocytic leukemia THP-1 cells cultured under M1-polarizing conditions (M1-THPs) had less ability to assemble oxidative-stress-induced SGs than those cultured under M2-polarizing conditions (M2-THPs). In contrast, P-body assembly in response to oxidative stress or TLR4 stimulation was increased in M1-THPs as compared to M2-THPs. These results suggest that mRNA metabolism is controlled differently in M1-THPs and M2-THPs. Interestingly, knocking down EDC4 or Dcp1a, which are components of P-bodies, severely reduced the production of IL-6, but not TNF α in M1-THPs without decreasing the amount of IL-6 mRNA. This is the first report to demonstrate that the assembly of EDC4 and Dcp1a into P-bodies is critical in the posttranscriptional regulation of IL-6. Thus, improving our understanding of the mechanisms governing mRNA metabolism by examining macrophage subtypes may lead to new therapeutic targets (Seto, E., et al. *PLoS ONE*, 2015).

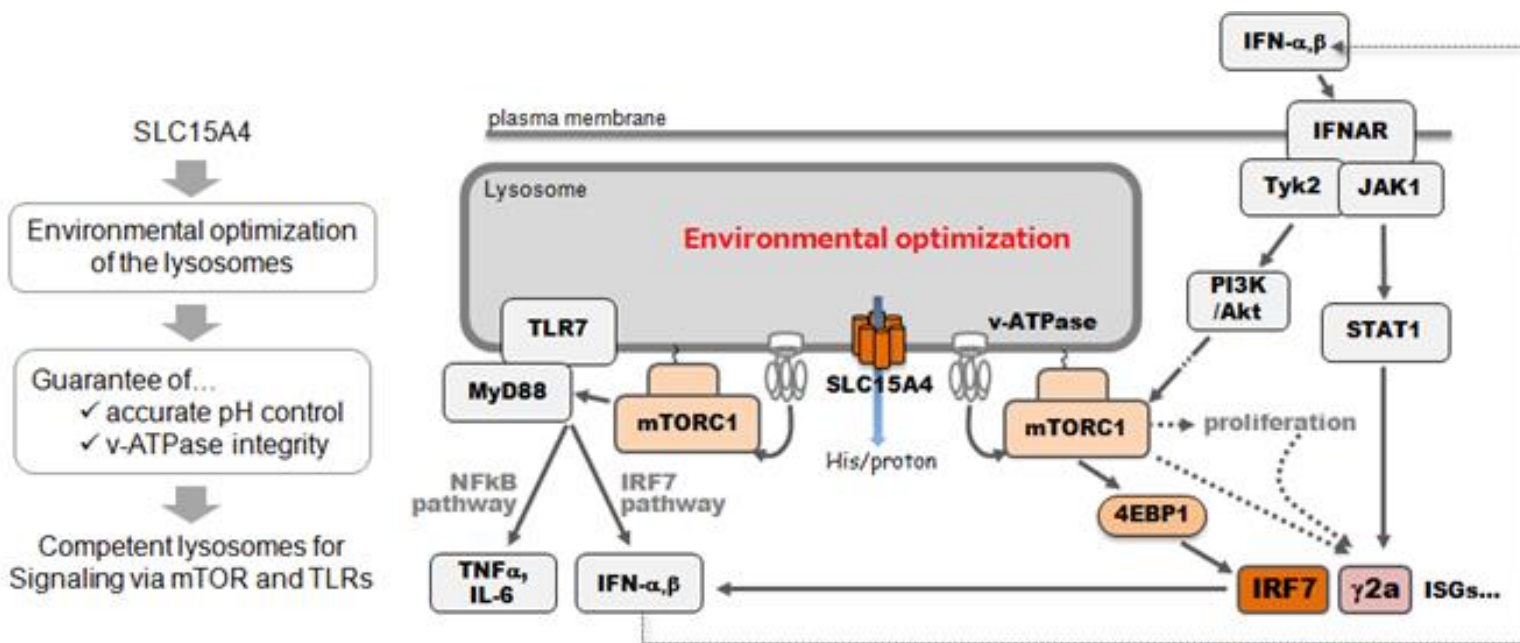
Acknowledgement

We thank Drs. M. Kasuga, T. Shimizu, H. Mitsuya, Y. Ishizaka and other members of National Center for Global Health and Medicine for supporting our project. This work was supported by a grant from the National Center for Global Health and Medicine (for N. T.-S., 23S001), the Funding Program for Next Generation World-Leading Researchers (Next Program) (for N. T.-S., LS134), and grants-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan (for N.T.-S.).

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

分子炎症制御プロジェクト 反町 典子

SLC15A4が媒介するリソソームにおけるmTOR経路とIFN-I-IRF7サーキット

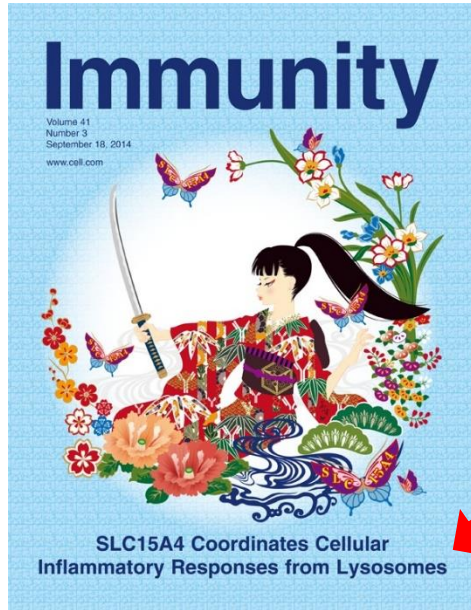


【主な成果-1】

- 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* 2014)。

自己抗体の産生におけるSLC15A4の重要性

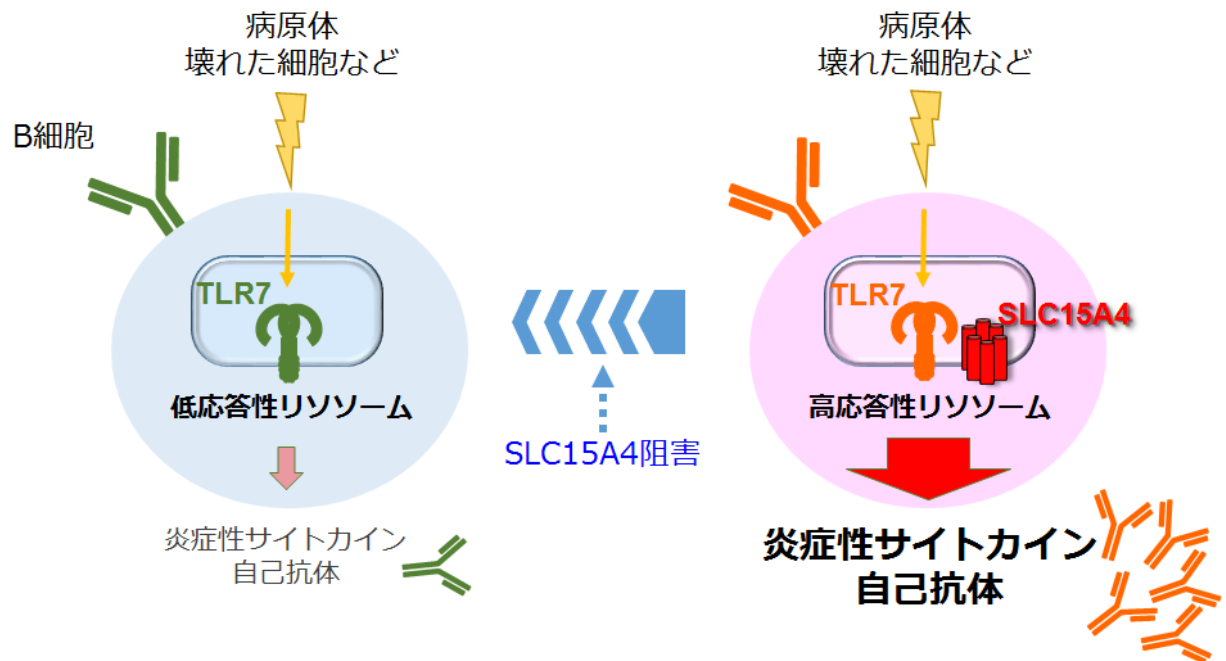
小林らの掲載論文は表紙で紹介



The histidine transporter SLC15A4 coordinates mTOR-dependent inflammatory responses and pathogenic antibody production.

T. Kobayashi, S. Shimabukuro-Demoto, R. Yoshida-Sugitani, K. Furuyama-Tanaka, H. Karyu, Y. Sugiura, Y. Shimizu, T. Hosaka, M. Goto, N. Kato, T. Okamura, M. Suematsu, S. Yokoyama, and N. Toyama-Sorimachi

Immunity 41;357-388, 2014



On the cover: The regulatory mechanism by which endolysosome-dependent Toll-like receptors (TLRs) signal is still largely unknown. Kobayashi et al. (375–388) demonstrate that maintaining the pH integrity of the endolysosome system of organelles in B lymphocytes depends on the presence of the histidine transporter SLC15A4. Proper pH homeostasis facilitates TLR7 signal transduction leading to type I interferon production, the latter being important in resistance to pathogens. The cover image illustrates that a B cell (represented by a Japanese lady in the antibody-patterned kimono) is trying to protect herself or fight against the outside (i.e., microbial antigens, TLR ligands) with the assistance of the butterflies (representing SLC15A4). Image by Ash Rinpun.

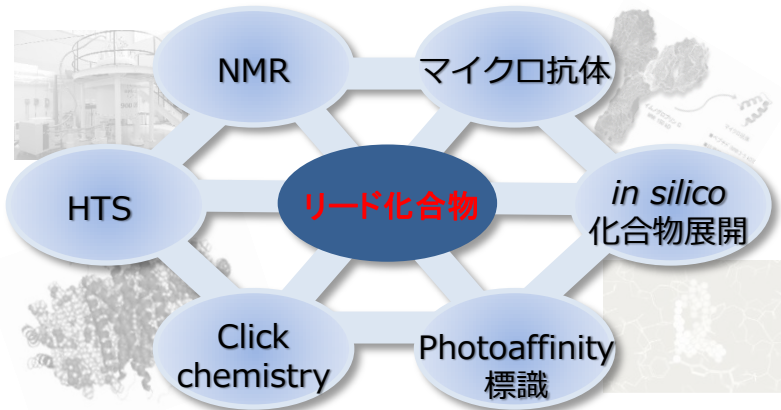
病原体や壊れた細胞由来の物質は、B細胞の中に取り込まれ、リソソームへと運ばれる。リソソームで SLC15A4 が正常に機能すると、これらの物質は TLR7 に感知され、その結果 I 型インターフェロンをはじめ、炎症性サイトカインの産生や、自己抗体の産生が起こる (左図)。リソソームに SLC15A4 を欠失したり、SLC15A4 の動きが抑えられると、TLR7 はこれらの物質をうまく認識できないか、認識したとしてもインターフェロンや自己抗体の産生を引き起こすことができない。

自己免疫疾患の治療を目指した低分子創薬



【主な成果-2】

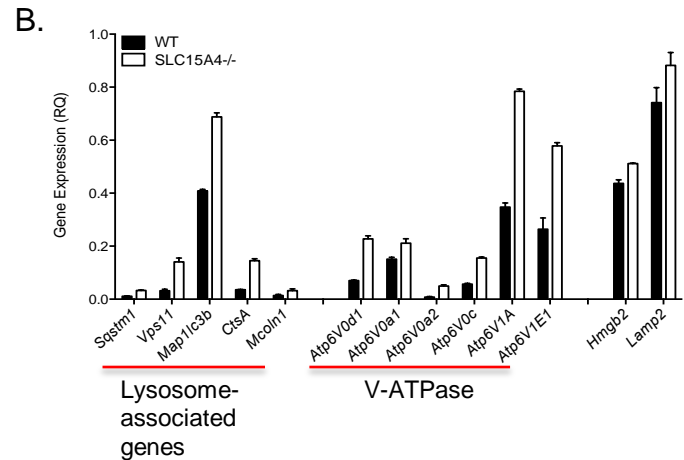
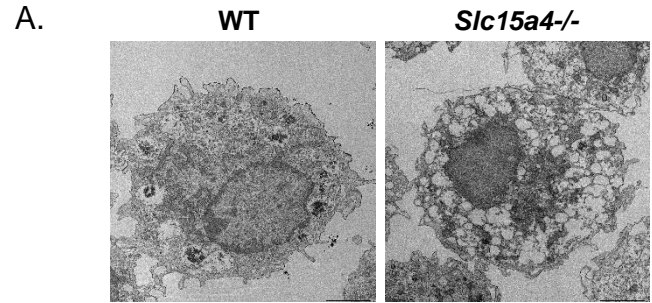
- 免疫系に高発現するSLC15A4の機能阻害が炎症性腸疾患および全身性エリテマトーデスの病態改善に有効であることが示されたため、医薬品リード化合物としての低分子阻害剤の探索をするため、理化学研究所・創薬医療技術基盤プログラムの支援でHTSを行い、阻害活性を有する分子を得た(上段図)。
- 上記と平行して日本医療研究開発機構(AMED)の創薬支援推進事業・創薬総合支援事業および創薬等支援技術基盤プラットフォームに採択され、プロジェクト統括として下図の戦略構想の下に研究チームを編成し、SLC15A4阻害剤探索をスタートさせた。それに伴い、新たにSLC15A4のトランスポーター活性を高感度で測定する*in vitro*アッセイ系を2種類樹立した(AMEDにおいて特許出願検討中)。これらのアッセイによって得られた阻害活性を有する候補分子を母核として現在構造展開を行い、最適化を進めている。



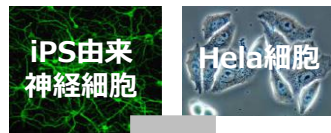
SLC15A4による肥満細胞の機能制御

【主な成果-3】

- SLC15A4は肥満細胞の分泌顆粒の形成維持に重要な役割を果たすこと、肥満細胞に依存したアレルギー応答を制御していることを見いだした(下図A)。
- SLC15A4を欠損した肥満細胞では、リソソームの生合成経路が亢進することが示唆された(下図B)。
- ヒトSLC15A4に対するモノクローナル抗体の樹立に成功し、タンパク質発現解析が可能となった。



免疫疾患におけるオートファジー制御とオートファジー新規制御因子の探索



Beclin会合分子の比較プロテオーム解析

神経特異的オートファジー制御因子

【主な成果-4】

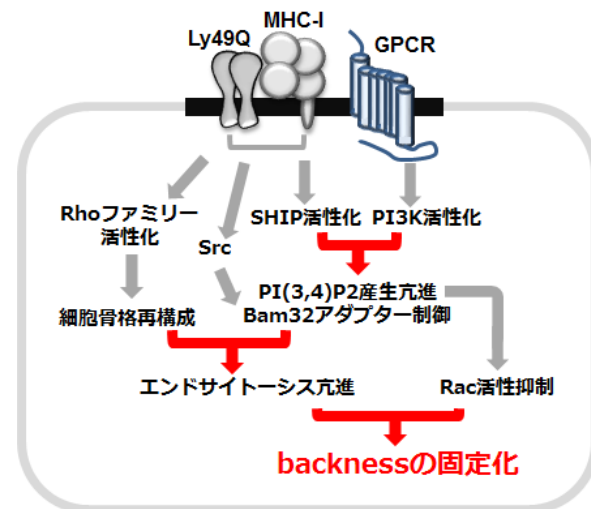
- オートファジーに依存した免疫制御を解析するための新たなツールとして、栄養飢餓に依らずに任意の組織で人為的にオートファジーを誘導できるモデルマウスの樹立を行った。
- 第一三共(株)との共同研究 (TaNeDSプロジェクト) (左図) で、神経変性疾患の治療標的の同定を目的として、iPS細胞から誘導した神経細胞を用いて、オートファジー誘導に必須の因子であるBeclin-1会合分子を網羅的に検索し、siRNAによるノックダウン実験によってオートファジー制御に関わる新規因子を同定した。

好中球の極性形成と遊走制御

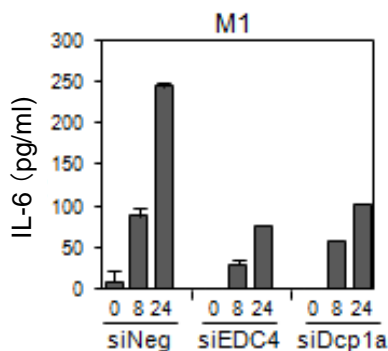
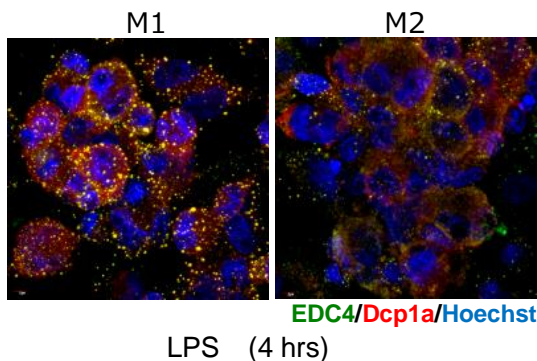
【主な成果-5】

- 好中球の細胞極性形成はGPCR単独のシグナルでは効率よく行われず、MHCクラスIとLy49Qのシス結合によるGPCRシグナルの修飾によって好中球のbacknessが固定化されること、これらのシグナルクロストークを可能にする上で、脂質ラフトが重要であることが示された。これまでに得られた知見の主たる点を右図にまとめた。(赤字はクロストークによると考えられる部分)

Handa, Y., et al. 投稿中



炎症におけるProcessing bodyの役割



【主な成果-6】

- 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(左図)、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(右図)、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。Seto, E., et al. *PLoS One* 2015.

研究発表及び特許取得報告について

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

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Shaping membrane domains by MHC class I and its cis-interacting receptor orchestrate neutrophil chemotaxis.	Handa Y., Karyu H., Hata S., Sasawatari S., Sugitani-Yoshida R., Furuyama-Tanaka K., Tanaka M., Kobayashi T., Sasaki J., Makrigiannis A.P., Sasaki T., Fukui Y., Inaba K., Sorimachi H. and Toyama-Sorimachi N.	submitted	Submitted	
Separation of intracellular vesicles and Immunoassays.	Kobayashi T, Tanaka T, Toyama-Sorimachi N.	Bio-protocol	5(16):e1571	2015
The assembly of EDC4 and Dcp1a into processing bodies is critical for the translational regulation of IL-6.	Seto E., Yoshida-Sugitani R., Kobayashi T., Toyama-Sorimachi N*.	PLoS One	10(5):e0123223	2015
Roles of ADAM8 in elimination of injured muscle fibers prior to skeletal muscle regeneration.	Nishimura D., Sakai H., Sato T., Sato F., Nishimura S., Toyama-Sorimachi N.	Mechanisms of Development	135:58-67	2015
The Histidine Transporter SLC15A4 Coordinates mTOR-Dependent Inflammatory Responses and Pathogenic Antibody Production.	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*.	Immunity	41(3):375-388	2014
Autoantibodies to IgG/HLA-DR complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility.	Jin H., Arase N., Hirayasu K., Matsuoka S., Kohyama M., Suenaga T., Saito F., Tanimura K., Nakamaru Y., Matsuoka S., Ebin 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.	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	111(10):3787-92	2014
How cells optimize vesicular environments - control of the endosomal/lysosomal environment for efficient inflammatory responses.	Kobayashi T., Tanaka T. and Toyama-Sorimachi, N.*	<Review article> J. Biochem.	154(6):491-9	2013
Specific mtDNA Mutations in Mouse Carcinoma Cells Suppress Their Tumor Formation via Activation of The Host Innate Immune System	Imanishi H., Takibuchi G., Kobayashi T., Ishikawa K., Nakada K., Mori M., Kikkawa Y., Takenaga K., Toyama-Sorimachi N., and Hayashi J.-I.	Plos One	8(9):e75981	2013
A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential.	Onai N, Kurabayashi K, Hosoi-Amaike M, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba K, Ohteki T.	Immunity	38(5):943-57	2013
Polymorphic mutations in mouse mitochondrial DNA regulate a tumor phenotype.	Takibuchi G, Imanishi H, Morimoto M, Ishikawa K, Nakada K, Toyama-Sorimachi N, Kikkawa Y, Takenaga K, Hayashi JI.	Mitochondrion	13(6):881-7	2013
Makrigiannis AP. Ly49Q positively regulates type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells in an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-dependent manner.	Rahim MM, Tai LH, Troke AD, Mahmoud AB, Abou-Samra E, Roy JG, Mottashed A, Ault N, Corbeil C, Goulet ML, Zein HS, Hamilton-Valensky M, Krystal G, Kerr WG, Toyama-Sorimachi N,	J Immunol.	15;190(8):3994-4004	2013
Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development.	Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T.	Blood.	120(24):4733-43	2012
The solute carrier family15A4 regulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice.	Sasawatari, S., Okamura, T., Kasumi, E., Tanaka-Furuyama, K., Yanobu-Takanashi, R., Shirasawa, S., Kato, N. and Toyama-Sorimachi, N.*	Gastroenterology	140:1513-25	2011
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	反町典子	生体の科学 特集号「脂質ワールド」	67(3): -	2016
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	小林俊彦、反町典子	細胞工学	134:557-561	2015
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	反町典子、小林俊彦	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

研究発表及び特許取得報告について

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	小林俊彦、反町典子	ライフサイエンス新着論文レビュー	http://first.lifesciencedb.jp/archives/9333	2014
炎症シグナル伝達の間として機能する細胞内小胞の環境制御	田中翼、小林俊彦、反町典子	生化学 ミニレビュー	85(12):1083-6	2013
ライソソーム局在型アミノ酸トランスポーター SLC14A5によるライソソーム環境管理と炎症制御	小林俊彦、岡村匡史、反町典子	「感染・炎症・免疫」	42; 10-19	2012
自然免疫系によるミトコンドリアDNA多型突然変異の認識と選択的排除	今西泰起、石川香、反町典子、林純一	細胞工学	30:416-417	2011
好中球の遊走を制御するLy49Q ー抑制性レセプターによる炎症シグナルの時空間制御ー	反町典子	臨床免疫・アレルギー科	55:348-358	2011

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
「自己免疫疾患の治療標的探索と創薬への取り組み」	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」	宮崎	2015年2月
「オルガネラホメオスタシスと炎症制御 ー創薬ターゲット同定へのアプローチー」	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	大分	2014年12月
SLC15A4 regulates TLR7/9-triggered type I interferon responses coordinating mTORC activity at lysosome.	Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N.	第43回日本免疫学会総会・学術集会	京都	2014年12月
A lysosomal oligopeptide transporter SLC15A4 regulates homeostasis and inflammatory responses of mast cells.	Toyama-Sorimachi N, Kobayashi T.	第43回日本免疫学会総会・学術集会	京都	2014年12月
An ITIM-bearing receptor Ly49Q regulates actin cytoskeleton by controlling Rac activity.	Yutaka Handa, Noriko Toyama-Sorimachi	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
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.	小林俊彦、反町典子	第9回トランスポーター研究会年会	名古屋	2014年6月
Lysosomal oligopeptide transporter SLC15A4 is critical for TLR7/9-mediated inflammatory responses.	Kobayashi T, Okamura T, Toyama-Sorimachi N.	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	神戸	2014年6月
「オルガネラホメオスタシスと免疫疾患ー細胞生物学から新規治療標的分子同定へのアプローチー」	反町典子	愛知医科大学大学院特別講義	名古屋	2014年11月
「エンドソーム・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ー」	反町典子	NCC-NCGM合同リトリート	つくばみらい市	2014年8月
「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ー」	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	京都	2014年5月
SLC15A4 regulates IgG2a autoantibody production through IRF7-type I IFN activation loop in B cells.	Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N.	42nd Annual meeting of Japan Society for Immunology.	千葉	2013年12月
The inhibitory NK receptor Ly49Q protects plasmacytoid dendritic cells from TLR9-triggering cell death by assuring lysosomal integrity.	Toyama-Sorimachi N, Tanaka M, Kobayashi T, Makrigiannis AP, Inaba K.	15th International Congress of Immunology.		2013年8月
Lysosomal oligopeptide transporter SLC15A4 regulates Toll-like receptor 7/9-mediated autoantibody production.	Kobayashi T, Okamura T, Toyama-Sorimachi N.	Presented at 15th International Congress of Immunology.	Milan, Italy.	2013年8月
さきがけ「生体における動的恒常性維持・変容機構の解明と制御」	反町典子	第2回領域会議アドバイザー特別講演	府中	2013年11月
Lysosomal transporter SLC15A4 regulates TLR7/9-mediated antibody production.	Kobayashi T, Okamura T, Toyama-Sorimachi N.	第8回トランスポーター研究会年会	熊本	2013年6月

研究発表及び特許取得報告について

Lysosomal transporter SLC15A4 regulates TLR7/9-mediated antibody production.	Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N.	100th Annual Meeting of American Association of Immunologists (Immunology 2013)	Honolulu, HI, USA.	2013年5月
「疾患治療標的としてのエンドソーム・ライソソームシステム」	反町典子	お茶ノ水がん学アカデミア第93回集会	東京	2013年4月
炎症疾患制御におけるエンドソーム・ライソソームシステムの重要性	反町典子	LEGEND SEMINAR ～免疫研究の最前線～	東京	2013年4月
「オルガネラによる炎症制御と新しい疾患治療標的」	反町典子	最先端・次世代研究開発プログラム第2回シンポジウム (H24) ～最先端のアレルギー治療と再生治療の開発研究～ 特別講演	東京	2012年12月
「からだを守る免疫の仕組みからアレルギーを考える」	反町典子	都民講座	東京	2012年10月
Lysosomal transporter SCL15A4 regulates Toll-like report 7-mediated autoantibody production.	Kobayashi, T., and Toyama-Sorimachi, N.	第41回日本免疫学会総会・学術集会	神戸	2012年12月
Regulation of endosomal transporter and maturation in TLR9 signaling.	Tanaka, T. and Toyama-Sorimachi, N.	第41回日本免疫学会総会・学術集会	神戸	2012年12月
「オルガネラホメオスタシスを基軸とした炎症応答制御機構」	反町典子	第14回免疫サマースクール2012 in NASU	那須	2012年7月
The solute carrier family15A4 regulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice	Kobayashi, T., and Toyama-Sorimachi, N.	第7回トランスポーター研究会 (JTRA2012)	京都	2012年6月
The innate immune system in host mice distinguishes cells with allogenic mitochondrial DNA and eliminates the cells from the host.	Toyama-Sorimachi, N., Imanishi, H., Ishikawa, K. and Hayashi, J.-I.	第34回日本分子生物学会年会	横浜	2011年12月
Expression levels of Ly49Q determine chemotactic ability of neutrophils.	Tanaka, M. and Toayama-Sorimachi, N.	第40回日本免疫学会総会・学術集会	千葉	2011年11月
The innate immune system in host mice targets cells with allogenic mitochondrial DNA.	Imanishi, H. and Toyama-Sorimachi, N.	第40回日本免疫学会総会・学術集会	千葉	2011年11月
The solute carrier family 15A4 reulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice.	Sasawatari, S. and Toyama-Sorimachi, N.	第40回日本免疫学会総会・学術集会	千葉	2011年11月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
「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」	反町典子	南山堂医学大辞典	株式会社南山堂	2014
「NK細胞」	反町典子	標準免疫学 第3版		2013
「NK細胞異常 (Chediak-Higashi症候群) マウス: beigeマウス」	反町典子	モデル動物利用マニュアル	(株)エル・アイ・シー	2010
「CD11」「NK細胞」「HLA抗原」MHC」「NK細胞受容体」「クラスI分子」「クラスII分子」「クラスIII分子」「多型性」	反町典子	免疫の事典	朝倉書店	2011
自己免疫疾患の病態形成メカニズムの解明 - 自己免疫疾患の新規治療法の開発へ向けて-				2014. 9. 19

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと