

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 副プロジェクト長
大島大輔 国立国際医療研究センター研究所 上級研究員
筒井英充 国立国際医療研究センター研究所 研究員
キーワード : 炎症、リソソーム、SLC15A4、SLC15A3、全身性エリテマトーデス、TLR、
I型インターフェロン(IFN-I)、自然免疫、モデルマウス、創薬、マスト細胞、アレルギー
研究成果 :

本プロジェクト研究は、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。本年度の主な成果は以下の通りである。

【1】 リソソーム局在アミノ酸トランスポーターによる免疫制御機構の理解と医薬品候補化合物の創出

- 1) 自己免疫疾患治療薬を目指したトランスポーター阻害剤の開発: 昨年度に引き続き、AMED 支援のもとに、全身性エリテマトーデスを疾患標的とした新規治療薬の探索として、SLC15A4 阻害剤としての化合物探索を行った。トランスポーター活性を測定するための一次評価系として細胞アッセイを用い、低濃度領域で当該トランスポーター活性を濃度依存的に阻害する候補化合物を複数取得した。これらの化合物の中から、濃度依存的にサイトカイン産生に対して阻害活性を示す候補化合物を複数同定し、その中で低濃度領域でサイトカイン産生阻害が認められる化合物について、物性および初期動態のプロファイリングを行った。さらにその周辺化合物を合成し、それらについても阻害活性の検討を実施し、阻害活性に重要と思われる構造情報を取得した。また今後化合物選択性の評価が必要となることから、カウンターアッセイに使用可能な細胞株を樹立し、アッセイ系を構築したほか、類似トランスポーターの活性測定系の樹立を進めた。さらに、候補化合物と標的トランスポーターの相互作用を確認し、構造情報に基づく化合物デザインを行うために NMR 解析をすすめ、トランスポーターと化合物の相互作用が検出可能となる測定条件を見いだした。
- 2) I型インターフェロン(IFN-I)による全身性アレルギー応答の制御機構: アミノ酸トランスポーターの機能解析の過程で、IFN-Iによる全身性アナフィラキシーショックの新たな制御機構を見出した。IFN-I 受容体欠損マウスにおいて全身性アナフィラキシーショックが増悪することを見だし、IFN-I 受容体下流シグナルが肥満細胞の機能を負に制御するメカニズムを解明し、論文化に着手した。これまで考えられていた IFN-I 受容体下流の主たるシグナル伝達分子である STAT1 に依存しない、新たなメカニズムによって IFN-I がアナフィラキシーを抑制しているという、新規性と独創性に富む知見に繋がり、論文化を進めている。
- 3) SLC15A3 欠損マウスにおける免疫異常と疾患治療標的としての可能性の検討: アミノ酸トランスポーター SLC15A3 欠損マウスにおいて、全身性エリテマトーデスに付随するびまん性肺胞出血(Diffuse alveolar hemorrhage: DAH)が著しく軽減することを見いだした。骨髄移植実験より、造血系細胞における SLC15A3 が DAH の病態形成に必須であることを明らかにし、また SLC15A3 欠損による病態改善のメカニズムの一つとして、肺胞内における IL-10 産生の上昇を見いだした。さらに詳細なメカニズムの解明と論文化を進めている。DAH は SLE 患者の 1-2%に認められる、極めて死亡率の高い疾患であり、本研究より SLC15A3 が DAH の治療標的となり得る可能性が示唆された。

【2】 細胞膜脂質マイクロドメインに依存した免疫応答制御機構の解明

TLRシグナルを伝達する脂質膜ドメインの重要性に着目し、自然免疫細胞のスフィンゴ脂質の攪乱がTLR依存的なサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。新たに樹立されたスフィンゴミエリン(SM)可視化プローブを用い、樹状細胞において、SM代謝がサイトカイン産生制御に極めて重要な役割を果たすことを明らかにし、スフィンゴ脂質代謝を操作することによりサイトカイン産生量をコントロールする実験系の樹立に成功した。今後この系を用いて、細胞性免疫応答の増強効果に応用が可能かどうか検討を進めていくとともに、膜スフィンゴ脂質によるTLRシグナル制御機構を明らかにしていく。

Subject No. : 23 指 001
Title : Understanding of novel regulatory mechanisms of inflammatory responses.
Chief scientist : Noriko Toyama-Sorimachi, Ph.D. Project Director, NCGM
Researchers : Toshihiko Kobayashi, Ph.D. Deputy Project Director, NCGM
Daisuke Ohshim, Ph. D. Senior research fellow, NCGM
Hidemitsu Tsutsui, Ph.D. Research fellow, NCGM
Key word : inflammation, lysosome, SLC15A4, SLC15A3, systemic lupus erythematosus (SLE), Toll like receptor (TLR), type I interferon (IFN-I) innate immunity, mouse model, drug discovery, mast cells, allergy

Abstract :

Understanding of the 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. The purpose of our project is to identify possible therapeutic targets for the treatment of inflammation-associated intractable diseases through understanding of the regulatory mechanisms of organelle-dependent inflammatory signals by focusing in particular on endosome/lysosome-dependent inflammatory signals.

【1】 Regulatory mechanism of inflammatory responses mediated by lysosomal-resident amino acid transporters and identification of drug candidate compounds.

- 1) Acquisition of drug candidates for the treatment of systemic lupus erythematosus: To discover new drug candidates for SLE, small compounds possessing inhibitory activities against a transporter, SLC15A4 were screened. Based on the compound information obtained from HTS (initiative by AMED), we proceeded to knowledge-based screening supported by Drug Discovery Initiative, The University of Tokyo. Using the two different, cell-based screening assays for evaluating the transporter activity, we successfully identified some compounds which possessed the inhibitory activity against SLC15A4-dependent cytokine production. We also performed ADME studies using hit compounds and compounds were further modified to optimize their potential as drug candidates. In addition, to increase the confidence of hit identification via our screens, we performed trial experiments to obtain an NMR spectrum of the interaction between SLC15A4 and compounds.
- 2) Regulation of allergic responses by type I interferon (IFN-I): We found that type I interferon receptor 1 (IFNAR1)-deficient mice showed exacerbation of systemic anaphylaxis induced by IgE and antigen. We also found that FcεR-dependent mast cell function was negatively regulated by IFN-I signaling. Importantly, STAT1 activation, main signaling pathway downstream of IFNAR, was not required for this negative regulatory role of IFN-I. We identified a molecule responsible for IFN-I-dependent suppression of anaphylaxis and revealed a novel regulatory mechanism of systemic anaphylaxis mediated by IFN-I and IFNAR.

【2】 Membrane lipid microdomain plays critical roles in innate immune responses.

To define novel regulatory mechanism of inflammation, we are focusing on the organization of membrane lipid microdomains in TLR9-mediated signaling process. Using a newly established sphingomyelin (SM) probe, we visualized SM microdomains in the course of inflammatory responses and found that sphingolipid metabolism, particularly production of ceramide, was important for the regulation of cytokine productions in macrophages and dendritic cells.

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

創薬コンセプト：SLC15A4トランスポーター活性阻害によるI型IFN産生抑制および病原性抗体産生の抑制

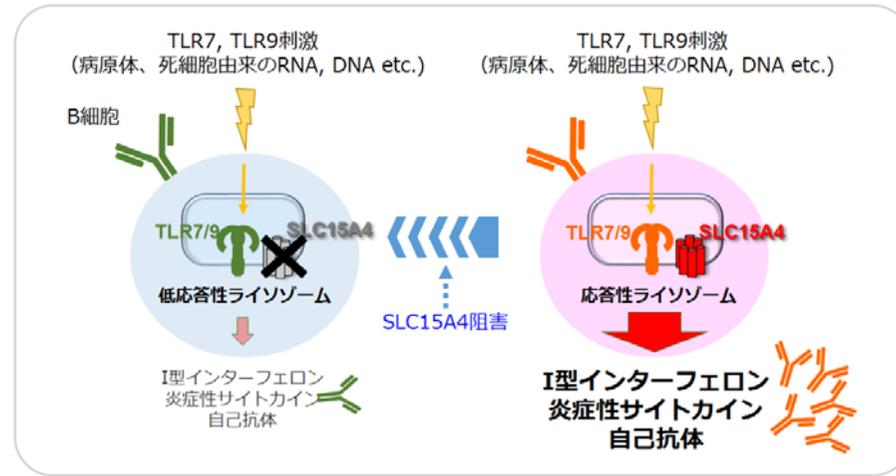
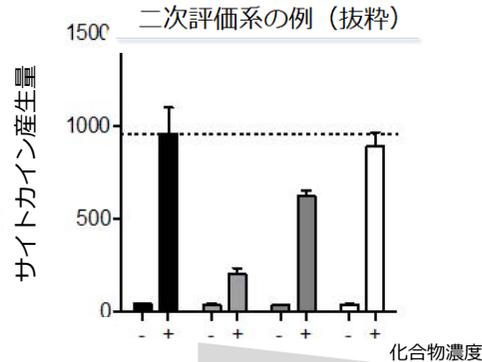
複数のトランスポーター活性評価系樹立とスクリーニング

- HTS
- 細胞アッセイによる一次評価系

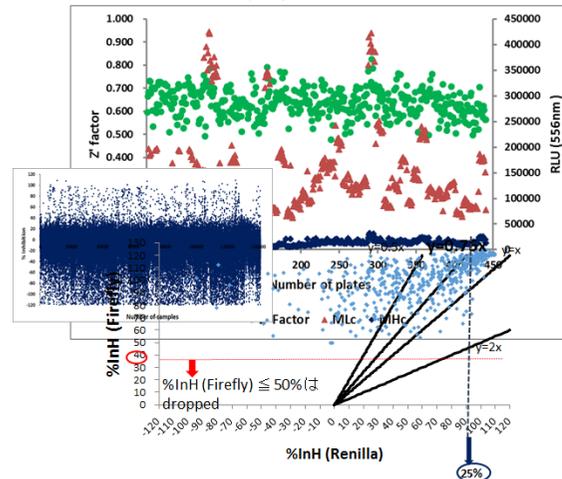
構造情報をもとにクラスタリング
候補化合物の抽出、評価
ヒット化合物の取得

構造単純化
HBD減
活性向上

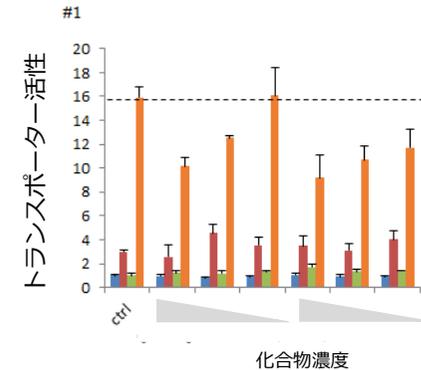
二次評価系へ



HTSの結果 (I)



一次評価系の例 (抜粋)

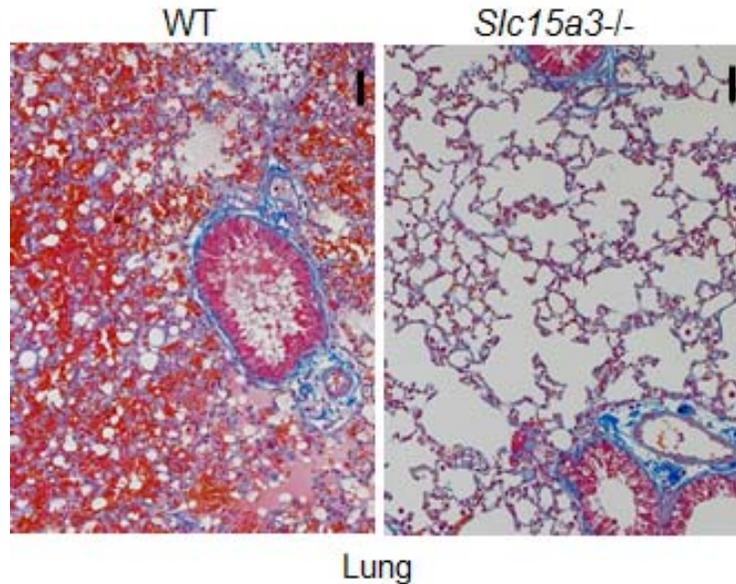


トランスポーターSLC15A4の機能欠損がループモデル疾患を改善することから、SLC15A4阻害剤としての自己免疫疾患治療薬探索を進めている。細胞アッセイとして2種類の評価系を一次評価、二次評価に使い、AMED主導の下、東京大学創薬機構の支援を受けながらヒット周辺化合物から構造最適化を試みている。H30年度は東大創薬機構BINDS支援による引き続き化合物の評価を進めている。

SLC15A3は肺炎症病態形成に必須の役割を果たす

A3 vs A4 | Identity 47.8%
Similarity 62.6%

| | | | | | | | | | |
|---------|-------|-----------|----------|------------|--------|--------|---------|--------|-----|
| SLC15A3 | MSA | PRAEEQPSR | SGERQPLV | ARGPRGPRRW | RRT | AAA | VLLVQM | LERAAF | 50 |
| SLC15A4 | MEGR | APLLGSR | RPVSAAS | AVFAG | ---- | RR | ACGAVLL | LAEL | 45 |
| SLC15A3 | GVT | SNLVLY | LNSLN | NWD | GQAS | RATLL | FLCAS | YILA | 100 |
| SLC15A4 | GVT | ANLVY | FLNGAP | ED | WEGA | QASQ | ALLFM | GLTYL | 95 |
| SLC15A3 | FLT | SLS | ILLY | LAASGL | LLTTIT | NDGR | RSFCG | ---- | 146 |
| SLC15A4 | ARA | LLS | IALY | LLG | LAFPL | LAAPRS | RSFL | CGDPR | 145 |
| SLC15A3 | SCQGS | WSSPY | CA | TTL | LV | LL | LALA | ASS | 196 |
| SLC15A4 | ASCP | ENAA | RRCA | PAT | FAG | L | VLVGL | GVAT | 195 |
| SLC15A3 | RFN | NWY | WSIN | LGA | ILSL | LV | VAF | TE | 246 |
| SLC15A4 | RFN | NWY | WSIN | LGA | ILSL | GG | IAY | I | 245 |
| SLC15A3 | ATP | VFIT | KPPT | GS | QVSS | ML | KLAF | QNC | 292 |
| SLC15A4 | GQS | VFIT | KPPT | GS | AFTD | M | FRIL | YS | 295 |
| SLC15A3 | ---- | RS | NP | GF | SP | QED | MAN | FQV | 337 |
| SLC15A4 | LF | D | S | C | K | M | R | G | 345 |
| SLC15A3 | QGL | H | L | H | I | F | N | I | 387 |
| SLC15A4 | QSL | R | L | K | I | E | I | S | 385 |
| SLC15A3 | DHL | I | D | P | L | L | R | C | 437 |
| SLC15A4 | DKL | V | D | P | V | L | R | R | 435 |
| SLC15A3 | TVP | Q | L | I | G | K | D | L | 487 |
| SLC15A4 | IN | - | Q | T | I | G | V | V | 484 |
| SLC15A3 | MQ | G | A | I | M | G | I | F | 536 |
| SLC15A4 | MQ | S | A | I | M | G | L | F | 534 |
| SLC15A3 | RY | F | L | L | A | C | I | E | 578 |
| SLC15A4 | Y | F | F | L | L | A | I | Q | 574 |



SLC15A4と相同性を示し、リソソームに局在するアミノ酸トランスポーターSLC15A3の機能解析を進めた。

Slc15a3^{-/-}/*Slc15a4*^{-/-}二重欠損マウスを用いた解析から、これら2種類のトランスポーターはそれぞれ独立した機能を果たすことが確認できている。

SLC15A3の炎症病態形成における役割について検討を進めた結果、SLC15A3を欠損すると、肺胞出血モデル病態が著しく改善することを見いだした。今後SLC15A3のDAH治療標的としての妥当性について検証を進める。

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 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----|------|
| Lysosome biogenesis regulated by the amino-acid transporter SLC15A4 is critical for functional integrity of mast cells. | Kobayashi T, Tsutsui H, Shimabukuro-Demoto S, Yoshida-Sugitani R, Karyu H, Furuyama-Tanaka K, Ohshima D, Kato N, Okamura T, Toyama-Sorimachi | Int Immunol. | 29 | 2017 |
| 炎症・感染応答を担うオルガネラ | 小林俊彦、向井康治朗、田口友彦、反町典子 | 臨床免疫アレルギー科 | 69 | 2018 |

Editor's choice
に選出

学会発表

| タイトル | 発表者 | 学会名 | 場所 | 年月 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|
| 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 (招待) | 小林俊彦、反町典子 | 第69回日本細胞生物学会シンポジウム | 仙台国際会議場 | 2017年6月13日 |
| 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 | 小林俊彦、筒井英充、大島大輔、反町典子 | 第12回トランスポーター研究会年会 | 東北大学 | 2017年7月8日 |
| Regulatory role of SLC15A3 in the systemic inflammation. | Kobayashi T, Tsutsui H, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N | 第46回日本免疫学会総会・学術集会 | 仙台国際会議場 | 2017年12月12日 |
| Regulatory role of a lysosome-resident oligopeptide transporter SLC15A4 in the inflammatory responses of mast cells. | Kobayashi T, Tsutsui H, Ohshima D, Toyama-Sorimachi N. | Annual meeting of the International Cytokine and Interferon Society (Cytokines 2017) | ANAクラウンプラザ金沢 | 2017年10月 |
| Lysosome-resident amino acid/oligopeptide transporter, SLC15A4, as a therapeutic target for systemic lupus erythematosus (招待) | Noriko Toyama-Sorimachi, Toshihiko Kobayashi | 第32回年会薬物動態学会シンポジウム | タワーホール船堀 | 2017年11月30日 |
| 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 (招待) | Noriko Toyama-Sorimachi | 第138年会日本薬学会シンポジウム | ホテル金沢 | 2018年3月27日 |

研究発表及び特許取得報告について

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 |
|------|-----|-----|----|-----|
| 該当なし | | | | |

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。