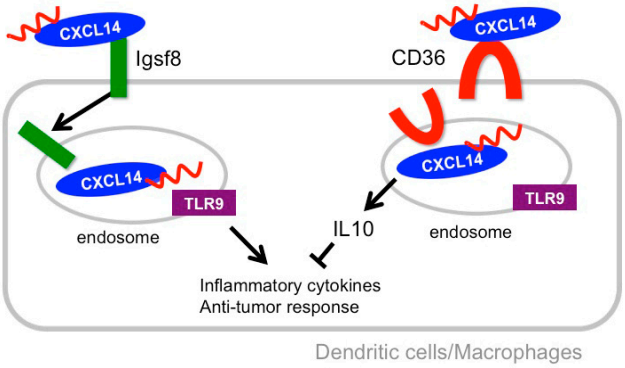
| 38　CXCL14が認識する警告物質の同定と受容体の機能解明 | 原　孝彦 |
|---|---|

**【目的】**ケモカイン CXCL14 は、非メチル化 CpG の連続配列を持つ DNA（CpG DNA）と複合体を形成することで細胞内取り込みと Toll-like receptor 9（TLR9）経路の活性化を促進する。我々は最近、膜タンパク質 Igsf8 が CpG DNA-CXCL14 の細胞内取込み受容体として働いていることを発見した。さらに、脂質の取込み受容体である CD36 も CpG DNA-CXCL14 に結合するが、CD36 は TLR9 経路を抑制する働きを担っていることが判明した。本研究では、CXCL14 が認識する DNA の特異性を検証するとともに、自然免疫反応における Igsf8 と CD36 の生理的役割を解明することを目指した。

**【方法】**DNA-CXCL14 との結合能、細胞内取り込み能、サイトカイン誘導能の解析には、ヒト胎児腎臓由来 293T 細胞株、マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞株、そして C57BL/6N マウスの骨髄から取り出して分化誘導させた Bone marrow-derived macrophage（BMDM）を用いた。動物実験には、CRISPR-Cas9 システムを利用して作出した *Igsf8*-KO マウスと外部から購入した *CD36*-KO マウスを用いた。FACS や Enzyme-linked immunosorbent assay 等の実験方法の詳細は、先行論文に記載した。統計解析には Prism 8 software（GraphPad）を用い、Two-way ANOVA による分散解析後、コントロール群に対する Dunnett's multiple comparison によって統計的有意差を検定した。

**【結果】**CXCL14 が非メチル化 CpG DNA だけでなく、cGAS/STING 経路のリガンドである double strand DNA（dsDNA）にも結合するかどうかを調べた。dsDNA の代表として Interferon stimulatory DNA（ISD）を Cy3-標識して、結合と取り込み実験を行った。293T 細胞に Igsf8 あるいは類縁の Igsf を発現させ、CXCL14 有る無しの条件下で結合実験を行った結果、CXCL14 存在下では、ISD は Igsf8、Igsf3、Rage タンパク質と強く結合した。また、Cy3-ISD の細胞内取り込みは、CXCL14 存在下でのみ有意に上昇した。ワクチンアジュバントとして使用されている Alum は、自己 dsDNA を介した免疫反応に関与していることが示唆されている。そこで、Alum の CXCL14 および ISD に対する結合能を調べた。Alum は ISD に直接結合したが、CXCL14 存在下では ISD との結合が増強されることが判明した。さらに、BMDM を Alum、CXCL14、ISD で同時に刺激した場合だけ、IFN-β の分泌量が有意に増加した。マウスの免疫実験では、Alum は SARS-Co-V2 Spike タンパク質に対する IgG1 抗体価を上昇させたが、*Igsf8*-KO マウスではこの抗体価上昇は起こらなかった。したがって、Alum/CXCL14/dsDNA 複合体は、Igsf8 と結合して細胞内へ取り込まれ、IFN-β 分泌経路を活性化している可能性が示唆された。最後に同系メラノーマ移植マウスモデルを用いて、WT マウスと *CD36*-KO マウス腫瘍の遺伝子発現比較を行った。その結果、炎症抑制サイトカインをコードする *Il-10* mRNA の発現レベルが、*CD36*-KO マウスの腫瘍では有意に低下していた。この実験結果は、CD36 は IL-10 の分泌誘導を介して、CpG ODN-CXCL14 刺激による TLR9 経路の活性化（＝抗がん免疫）を負に制御している可能性を示唆している。

Igsf8 と CD36 を介して調節される CpG DNA-CXCL14 による自然免疫応答（総括図）



# 38. CXCL14 が認識する警告物質の同定と受容体の機能解明

原　孝彦

東京都医学総合研究所 基礎医科学研究分野 幹細胞プロジェクト

Key words：CXCL14，DNA，自然免疫，CD36，Igsf8

## 緒　言

非メチル化 CpG DNA は、マクロファージや樹状細胞の Toll-like receptor 9（TLR9）を活性化するリガンドとして、感染症やがんに対する免疫防御に重要な役割を担っている。我々は、CXC タイプのケモカインの 1 種である CXCL14 が低濃度の CpG oligodeoxynucleotide（ODN）と高親和性で結合し、それをマクロファージや樹状細胞内の TLR9 にリレーすることで Th1 型サイトカイン（IL-12、IL-6、TNFα）の産生を強力に誘導することを発見し、2017 年に報告した［1，2］。我々の発見がきっかけとなり、現在では DNA 運搬は CXC 型ケモカインの新たな生理的機能であることが認知されている［3，4］。CXCL14 ノックアウト（KO）マウスでは、皮膚の主要常在菌である黄色ブドウ球菌が野生型マウスより多く繁殖し［5］、B16F10 メラノーマ細胞を皮下移植したときの生存日数が野生型マウスと比べて短くなった。したがって、CXCL14 は CpG DNA の増感剤として感染症や癌に対する皮膚の免疫監視に重要な役割を果たしている。

CXCL14 は全長 77 アミノ酸から成り、アミノ酸 1-12 が CpG DNA との結合に、41-47 が CXCL14 受容体との結合に必須である。CXCL14 は黄色ブドウ球菌の DNA に結合し、それを樹状細胞内に運び入れることで TLR9 を活性化した［5］が、CXCL14 に認識される DNA の配列や構造特性はまだ解明されていない。メラノーマ細胞についても CXCL14 結合物質の実体は不明である。CXCL14 は魚類から哺乳類まで高度に保存されていること、マウスやヒトでは粘膜組織や脳にも大量に発現していることから、CXCL14 は黄色ブドウ球菌だけでなく、細胞内外に存在する様々な「警告物質」のセンサーとして働いていると推察される。

本研究では、1）CXCL14 が結合する黄色ブドウ球菌の DNA 配列を同定し、それを手掛かりにして、類似の DNA 配列を有する共生微生物や体内遺伝子を探索すること、そして、2）DNA-CXCL14 受容体の役割分担を解明することを目標に掲げた。我々は最近、最終糖化産物 AGE の受容体である RAGE が CpG ODN-CXCL14 の細胞内取込み受容体として働いていることを発見した。RAGE と構造的に類似した Igsf8 や Igsf3 タンパク質も、CpG ODN-CXCL14 複合体に結合する。さらに我々は、脂質の取込み受容体である CD36 も CpG ODN-CXCL14 に結合することを見出したが、RAGE、Igsf8、Igsf3 と異なり、CD36 は TLR9 経路を弱める働きを担っていた。Igsf8 や CD36 が CpG DNA を受け取った後、細胞内のどこへ運ばれていくのかを明らかにすれば、TLR9 自然免疫系の新たな制御機構を証明できると期待される。本研究の実施によって、CXCL14 に結合する「警告物質」の実体と、CpG DNA の細胞内送達の生理的意義を解明することを目指した。

## 方　法

### 1. 動物実験

*Igsf8*-knockout（KO）マウスは、C57BL/6N マウスの受精卵に gRNA と Cas9 タンパク質を注入することで得られた第 1 エクソンに 10 bp の欠失を持つヘテロ個体を交配することにより産出した。*CD36* -KO マウスはジャクソン研究所より購入した。マウスは 12 時間間隔の明暗サイクルを持つ Specific pathogen free の動物飼育室にて維持し、すべての動物実験プロトコルは、東京都医学総合研究所の動物実験倫理委員会にて事前承認を受けた。

**2. 細胞培養**

293T 細胞株は、10% heat-inactivated fetal bovine serum（FBS、Biosera）と 1% Penicillin/Streptomycin （PS、Sigma）を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）培地（Nacalai tesque）を用いて培養した。RAW264.7 細胞株は、10% FBS と 1% PS を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地（Nacalai tesque）を用いて培養した。培養は、37℃、5% $CO_2$の条件下で行った。Bone marrow-derived macrophage（BMDM）は、マウス頸骨の骨髄細胞を M-CSF（20 ng/mL、Peprotech）存在下で 7 日間分化誘導したものを用いた。

**3. 実験試薬**

Interferon stimulatory DNA (ISD) として知られている double strand DNA (dsDNA) は、5'-CTACATACAGATCTACTAGTGATCTATGACTGATCTGTACATGAT-3'と 5'-ATCATGTACAGATCAGTCATAGATCACTAGTAGATCTGTATGTAG-3' のアニーリングによって調製した。ヒト CXCL14（77 アミノ酸残基）は、ペプチド研究所で受託合成した。Alum は LSL 社、クロロプロマジン（Chl）と酸化 Titan 粒子は Sigma 社より、それぞれ購入した。

**4. Igsf 分子結合実験**

pcdna3-GFP にマウス *Igsf2*、*Igsf3*、*Igsf8*、*Rage* cDNA を挿入したベクターを、PEI-Max（Polysciences）を用いて 293T 細胞に導入した。トリプシン処理した細胞を Cy3-ISD、あるいは Cy3-ISD/CXCL14 複合体と 4℃で 30 分間反応させた。$GFP^+$細胞のうち、Cy3-ISD に結合した細胞の割合を FACS LSR-FortessaX-20（BD Bioscience）を用いて測定した。

**5. dsDNA の取り込み実験**

RAW264.7 を Chl 有無の条件下、37℃で 30 分間前処理し、Chl 処理を継続したまま、Cy3-ISD、あるいは Cy3-ISD/CXCL14 複合体と 37℃で 1 時間反応させた。その後、細胞を FITC anti-mouse/human CD11b Antibody（M1/70、Biolegend）で染色し、$CD11b^+$細胞のうち、Cy3-ISD に結合した細胞の割合を FACS LSR-FortessaX-20 を用いて測定した。

**6. Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）**

播種した BMDM を Nanoparticle 存在または非存在下で 37℃で 6 時間処理し、培養上清を回収した。培養上清中の IFN-β の濃度検定には Mouse IFN-beta DuoSet ELISA（R&D systems）を用いた。マウスの抗体価測定実験では、SARS-CoV-2 S1 タンパク質（Biolegend）をコートした ELISA plate に 2 倍ずつ段階希釈したマウス血清を入れて 1 時間反応させた後、Anti-mouse IgG1-biotin（RMG1-1、Biolegend）抗体と反応させた。Avidin-POD（BD Bioscience）と反応させた後、TMB の発色による吸光度を Varioskan マイクロプレートリーダー（Thermo）を用いて測定した。吸光度が background（血清なし）の 2 倍以上になる最大希釈率を抗体価とした。

**7. 統計解析**

細胞株の解析では継代数の異なる細胞を用いた実験、初代細胞の実験では別個体から調製した細胞を用いた実験を、それぞれ biological replicates として統計解析した。FACS、顕微鏡画像、抗体価測定の統計解析には Prism 8 software（GraphPad）を用い、Two-way ANOVA による分散解析後、コントロール群に対する Dunnett's multiple comparison によって統計的有意差を検定した。

# 結　果

## 1. CXCL14 は dsDNA にも結合する

当初、CXCL14 が結合する黄色ブドウ球菌の DNA 配列を特定することを試みたが、ゲノム DNA のサイズが巨大であり、配列上の手掛かりも得られなかったため断念した。そこで、CXCL14 が非メチル化 CpG DNA だけでなく dsDNA にも結合するかどうかを調べることにした。dsDNA は、TLR9 とは別の自然免疫系である cGAS/STING 経路を活性化することが知られている。dsDNA の代表として ISD を Cy3-標識して結合実験を行った。293T 細胞に Igsf8 あるいは類縁の Igsf を発現させ、CXCL14 有る無しの条件下で結合実験を行った結果、CpG ODN の場合と異なり、CXCL14 非存在下では、ISD は Igsf8、Igsf3、Rage タンパク質にほとんど結合しなかった。一方、CXCL14 存在下では、ISD は Igsf8、Igsf3、Rage タンパク質と強く結合した。CpG ODN と結合しない Igsf2 は、CXCL14 存在下でも ISD と結合しなかった。

## 2. CXCL14 は dsDNA の細胞内取り込みを増強する

ISD は CXCL14 存在下でのみ Igsf8 と結合した。次に、CXCL14 存在／非存在下での Cy3-ISD の細胞内取り込みについて解析した。RAW264.7 細胞にクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤である Chl 有り無しの条件下で 30 分間培養した後、Cy3-ISD±CXCL14 を添加し、37℃で 1 時間反応させてから FACS 解析を行った。その結果、Cy3-ISD の取り込みは CXCL14 存在下でのみ有意に上昇した。また、Cy3-ISD の取り込み上昇は Chl 処理によって完全に阻害されたため、ISD＋CXCL14 の取り込みは、CpG ODN の場合と同様にクラスリン依存性エンドサイトーシスであることが示唆された。

## 3. CXCL14 は水酸化アルミニウム（Alum）に結合する

ワクチンアジュバントとして使用されている Alum は、その効果が DNase I 消化によってキャンセルされることから、自己 dsDNA が Alum を介した免疫反応に関与していることが示唆されている。そこで、Alum の CXCL14 および ISD に対する結合能を調べた。Alum にビオチン、あるいはビオチン化 CXCL14 を添加して 4℃で 30 分間反応させた後、Streptavidin-PE と反応させてから FACS 解析した結果、Alum は CXCL14 にも結合した。次に CXCL14 存在下での Alum と ISD の結合能を解析した結果、Alum は ISD と単体でも有意に結合したが、CXCL14 存在下では ISD との結合が増強されることが判明した。したがって、CXCL14 は dsDNA だけでなく Alum アジュバントの細胞内送達をも増強する免疫賦活剤であることが示された。

## 4. Alum/CXCL14/ISD による IFN 応答の活性化とワクチンアジュバント活性

Alum/CXCL14/ISD 複合体が IFN 応答を誘導するかどうかを知るために、BMDM を Alum あるいは Titanium（免疫活性化能が低い無機塩）±ISD±CXCL14 存在下で 6 時間培養し、培養上清中の IFN-β濃度を ELISA によって定量した。その結果、BMDM に Alum/CXCL14/ISD の 3 者を同時に添加した場合だけ、IFN-β の分泌量が有意に増加した（図 1）。

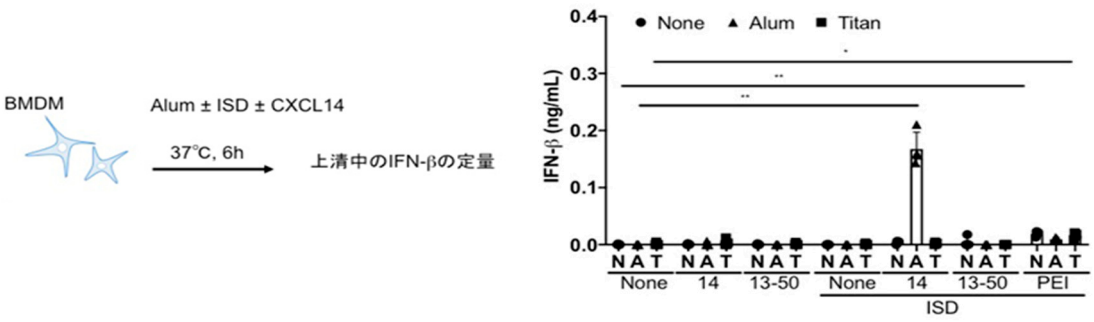



図 1. dsDNA は CXCL14 と Alm 共存下でのみ、IFN-β分泌を誘導する
表記の条件下でマウス BMDM を処理したときに分泌された IFN - β の量を、ELISA 法によって測定した。Two-way ANOVA 解析の後、各群間の差を Dunnett's multiple comparison により有意差検定した（**$P$<0.01、 *$P$<0.05）。

次に、この Alum/CXCL14/ISD に対する *in vivo* 免疫応答に CXCL14/dsDNA 受容体である Igsf8 が関与しているかどうかを調べるために、*Igsf8* -KO マウスを用いて免疫実験を行った。野生型 （WT）マウスと *Igsf8* -KO マウスに SARS-CoV-2 Spike タンパク質＋PBS、あるいは＋Alum のワクチンミックスを 3 週おきに 2 回皮下注入し、14 日後の血清の抗体価を測定した。WT マウスにおいて、Alum は SARS-Co-V2 Spike タンパク質に対する IgG1 抗体価を上昇させたが、*Igsf8* -KO マウスではこの抗体価上昇は起こらなかった。以上の結果は、Alum/CXCL14/dsDNA 複合体が、細胞表面で Igsf8 と結合して細胞内へ取り込まれ、IFN-β分泌経路を活性化している可能性を示唆している。

**5. CD36 欠損によって、IL-10 産生量が減弱する**

C57BL/6 マウスの同系メラノーマ細胞株 B16F10 の皮下移植実験系において、高活性型 ODN である ODN602A（投稿準備中）を腫瘍内に投与すると腫瘍のサイズは劇的に縮小したが、その後癌は再増殖してきた。一方、*CD36*-KO マウスを用いて同様の実験を行ったところ、メラノーマの再増殖が WT マウスと比べて有意に抑制された。そこで、この同系メラノーマ移植マウスモデルを用いて、WT マウスと *CD36* -KO マウス腫瘍の遺伝子発現比較を行った。その結果、炎症抑制サイトカインをコードする *Il-10* mRNA の発現レベルが、*CD36* -KO マウスの腫瘍では有意に低下していた。*CD36* -KO マウスから調製した BMDM においても、CpG ODN±CXCL14 刺激による *Il-10* mRNA の発現誘導が有意に減弱していた（図 2）。以上の実験結果は、CD36 は IL-10 の分泌誘導を介して、CpG ODN-CXCL14 刺激による TLR9 経路の活性化（＝抗がん免疫）を負に制御していることを示唆する。

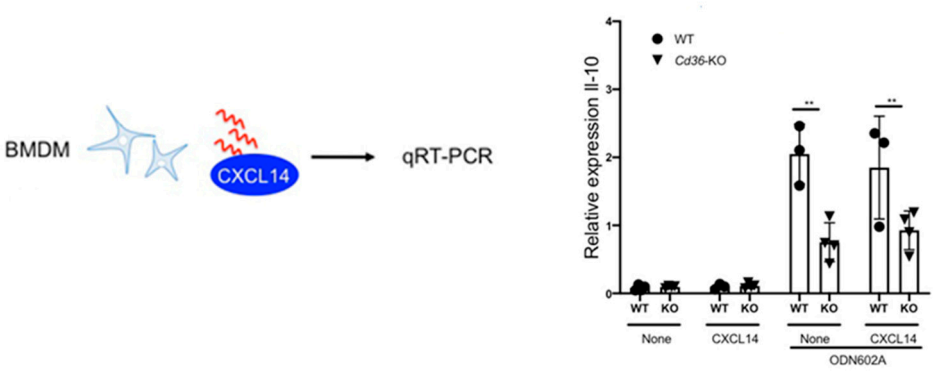



図 2. CpG ODN-CXCL14 による *Il-10* の発現誘導は、CD36 によって負に調節される
WT マウスと *CD36*-KO マウスの BMDM を CpG ODN±CXCL14 の条件下で刺激した際の *Il-10* mRNA の発現レベルを定量的 RTP-PCR によって決定した。Two-way ANOVA 解析の後、各群間の差を Dunnett's multiple comparison により有意差検定した（**$P$<0.01）。

## 考　察

本研究では、これまで我々が解明してきたケモカイン CXCL14 による CpG DNA の細胞内取り込み促進が、CpG 配列がない dsDNA でも起こることを証明した。さらに、Alum 粒子の存在下では CXCL14/dsDNA がマクロファージの IFN-β分泌を誘導することを明らかにした。そして最後に、Alum アジュバントを使った SARS-CoV-2 Spike タンパク質に対する抗体価の上昇が、Igsf8 に依存していることを示した。これまで、Alum の DNA 依存的な I 型 IFN 誘導能に関しては、Alum による好中球の活性化に伴った DNA 放出によってマクロファージ等が活性化して IFN-β が誘導される、というモデルが提唱されてきた。しかし、本研究で示した通り、dsDNA 単体の取り込み効率は低く、このモデルでは Alum アジュバントの活性を十分に説明できない。また、CXCL14 は dsDNA の取り込みを増強できるが IFN-β誘導には至らなかったことから、細胞質への DNA 送達が必要な cGAS/STING 経路の活性化には、Alum/CXCL14/dsDNA/Igsf8 が複合的に働くことが重要であると推察される。Alum は粒子径が 100 nm 程度であり、CXCL14/dsDNA のみを加えた時におこる取り込み様式とは異なり、Phagocytosis によって細胞内に取り込まれる可能性がある。今後、Alum 存在／非存在下での CXCL14/dsDNA の細胞内動態を詳しく調べることで、Alum/CXCL14/dsDNA による IFN-β誘導の分子メカニズムに迫れるのではないかと考えている。

CD36 は、Igsf8 とは異なるタイプの CpG DNA-CXCL14 受容体である。本研究によって、*CD36*-KO マウスでは CpG ODN による *Il-10* 誘導が弱くなっていることが初めて明らかとなった。CXCL14 によって endosome へ運ばれた CpG ODN は TLR9 経路を活性化することで IL-6 や TNFα といった Th1 型の炎症性サイトカインを分泌誘導する。一方、TLR9 経路からは炎症応答にブレーキをかける IL-10 の分泌も同時に誘導されている。CD36 がこの IL-10 誘導の役割を担っているとすれば、CD36 が抑制性の CpG DNA-CXCL14 受容体として働くことを示す強い証拠となる。CD36 は脂肪を細胞内に取り込むスカベンジャー受容体の代表的膜タンパク質である。脂肪酸酸化は抗炎症作用を持つことが示されており、CD36 と *Il-10* 遺伝子の転写誘導との関係を正確に証明できれば、学術的に重要な発見となる。さらに、CD36 アンタゴニストががん免疫活性化剤として役立つ可能性も浮上してくる。本研究の成果に基づいて、CpG DNA-CXCL14 や dsDNA-CXCL14 複合体によって惹起される自然免疫反応における CD36 の生理的な役割について、詳細に検討を重ねていく計画である。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京都医学総合研究所幹細胞プロジェクトの種子島幸祐研究員である。また、同プロジェクト所属の大学院生である高橋陸、関文哉、安藤輝、高木理子氏の研究協力を得た。

## 文　献

1) Tanegashima K, Takahashi R, Nuriya H, et al. CXCL14 acts as a specific carrier of CpG DNA into dendritic cells and activates Toll-like receptor 9-mediated adaptive immunity. EBioMedicine. 2017 Oct:24:247-256. PMID: 28928016 doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.09.012

2) Iwase R, Naruse N, Nakagawa M, et al. Identification of functional domains of CXCL14 involved in high-affinity binding and intracellular transport of CpG DNA. J Immunol. 2021 Jul 15;207(2):459-469. PMID: 34261665 doi: 10.4049/jimmunol.2100030

3) Lande R, Lee EY, Palazzo R, et al. CXCL4 assembles DNA into liquid crystalline complexes to amplify TLR9-mediated interferon-α production in systemic sclerosis. Nat Commun. 2019 May 1;10(1):1731. PMID: 31043596 doi.org/10.1038/s41467-019-09683-z

4) Du Y, Kioon MDA, Laurent P, et al. Chemokines form nanoparticles with DNA and can superinduce TLR-driven immune inflammation. J Exp Med. 2022 Jul 4;219(7):e20212142. PMID: 35640018 doi.org/10.1084/jem.20212142
5) Tsujihana K, Tanegashima K, Santo Y, et al. Circadian protection against bacterial skin infection by epidermal CXCL14-mediated innate immunity. Proc Natl Acad Sci USA. 2022 Jun 21;119(25):e2116027119. PMID: 35704759 doi.org/10.1073/pnas.2116027119