

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07208

研究課題名（和文）自然免疫活性化核酸受容体による腫瘍免疫誘導メカニズム

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms of Nucleic Acid Receptors in Activating Innate Immune Responses and Tumor Immunity.

研究代表者

種子島 幸祐（TANEGASHIMA, Kosuke）

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：20507678

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：CpG ODNは抗腫瘍活性に必須なTh1型の免疫応答を強く活性化する。我々の研究により、CXCL14に代表されるCXCケモカインの非古典的な機能として、細胞内へのDNAの送達明らかとなった。CpG ODNは細胞内のTLR9受容体への送達により、抗腫瘍活性を誘導しているが、細胞外CpG ODNの受容メカニズムはまだ完全には解明されていない。本研究では、発現クローニングを行い、CpG ODN/CXCL14複合体の受容体を複数単離した。そのうちのIgsf受容体はリガンドなしでも自発的に内在化して、TLR9へのCpG ODNの受け渡しを行っていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、CpG ODN/CXCL14複合体の受容体を解明した。CpG ODNによる腫瘍免疫誘導には効率の良い送達システムの構築が重要である。細胞外のCpG ODN受容体の分子実態が解明されたことでCpG ODNの送達を改善し、抗腫瘍効果を高める新たな分子機序の解明につながると考えられる。また、DNAのような普遍的な分子が免疫系の活性化に使われる際に、どのような制御がなされているかを知る上でも学術的に意義深いと考える。

研究成果の概要（英文）：CpG ODN strongly activates Th1-type immune responses, which are essential for anti-tumor activity. Our research has revealed that CXC chemokines, exemplified by CXCL14, have a non-canonical function of delivering DNA into cells. CpG ODN is delivered to the intracellular CpG ODN receptor, TLR9, to activate anti-tumor immunity. However, receptors for the extracellular CpG ODN receptor have not been completely identified yet. In this study, we conducted expression cloning and isolated multiple candidate receptors for CpG ODN/CXCL14. Among these, we discovered that Igsf receptors spontaneously internalize without a ligand and play a crucial role in delivering CpG ODN to TLR9.

研究分野：免疫学

キーワード：CpG DNA CXCL14 Innate Immunity Tumor immunity CpG ODN

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌の非メチル化 CpG の連続 DNA 配列 (CpG DNA) を認識する Toll-like receptor (TLR) 9 は、それを模倣する 20-30 mer の CpG オリゴヌクレオチド (CpG ODN) が免疫補助剤として開発され、抗腫瘍活性に必須な Th1 型の免疫応答を強く活性化することが知られている。しかし、CpG ODN はエンドソームやリソソームに存在する TLR9 へ送達される必要があるが、細胞内への送達の分子メカニズムは不明な点が多かった。我々の研究により、CXCL14 に代表される CXC ケモカインの非古典的な機能として、細胞内への DNA の送達という機能が明らかとなり、CpG ODN の抗腫瘍活性に必須な役割をしていることが明らかとなったが、この機能の分子メカニズムや生理的にどの様な役割を果たしているかについては未解明な点が残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、CpG ODN/CXCL14 複合体の受容体を探索し、CpG ODN/CXCL14/TLR9 経路への関与と CpG ODN の抗腫瘍活性との関連について研究を行う。また、CpG ODN/CXCL14/TLR9 経路の生体内の免疫反応における生理的な意義について研究する。

3. 研究の方法

3.1. 発現クローニング

発現クローニングには、RAW264.7 細胞から In-Fusion SMARTer Directional cDNA Library Construction Kit を使用して逆転写した cDNA を用いて、発現ベクターに導入し cDNA library を作出した。JM109 大腸菌のコンピテントセルを cDNA ライブラリーで形質転換し、約 150 個の細菌コロニーをプールしたのからプラスミド DNA を抽出し、サブプールを作製した。サブプールを 293T 細胞にトランスフェクトした細胞を 30 nM Cyanine 3 (Cy3)-CpG ODN および 300 nM CXCL14 とともに 4°C で 30 分間インキュベートし、その結合性を LSRFortessa X-20 で解析した。そのヒットプールから、Sib-selection により単一クローンを単離した。

3.2. CpG ODN の取り込み、結合、活性評価実験

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7, 骨髄由来樹状細胞またはマクロファージ、HEK293T へ遺伝子導入した細胞などへの結合および取り込み実験には、Cy3 ラベルした合成 DNA を 4°C 30 分または 37°C で 1 時間反応させ、FACS 解析したデータを用いた。CpG ODN などの活性評価は、これらの細胞が活性化する際に分泌される IL-12, TNF- α , IL-6, interferon- β などのサイトカインの濃度を ELISA および遺伝子発現を quantitative RT-PCR により検定することにより評価した。

3.3. SNAP-tag によるエンドサイトーシス動態の観察

エンドサイトーシスの可視化には、SNAP タンパクとの融合タンパクを発現するベクターを RAW264.7 細胞にエレクトロポレーションした細胞を用いた。その後、細胞表面の受容体を SNAP-Surface Alexa488 を用いて 4°C で 30 分間標識し、細胞を Cy3-CpG ODN +/- CXCL14 を用いて 37°C で 1 時間処理し、イメージング用に固定した。

3.4. 腫瘍増殖の評価とノックアウト (KO) マウス

腫瘍免疫の活性化の評価には、マウスメラノーマ由来細胞株 B16F10 細胞を C57BL/6 に同系移植し、移植後 11-18 日後に腫瘍形成が認められたマウスの腫瘍近傍に CpG ODN を 2 回投与

して腫瘍容積を測定することにより抗腫瘍効果を評価した。受容体遺伝子が欠損したマウスについては、CRISPR/Cas9法で作出または Jackson Laboratory より導入した。

4 . 研究成果

まず、CXCL14/CpG ODN複合体の取り込み増強の分子メカニズムについて、ドメイン解析を行い解明した (Iwase et al., 2021 Journal of Immunology 207: 459-469)。この結果から、CpG ODN/CXCL14複合体はクラスリン依存的なエンドサイトーシスにより内在化することが明らかとなった。

CpG ODN/CXCL14受容体を探索するため、骨髄由来樹状細胞およびRAW264.7細胞から全長cDNA libraryを作製し、Cy3-CpG ODN/CXCL14の結合を指標に発現クローニングを行った。最初に骨髄由来樹状細胞cDNA libraryを用いて行った実験では、*Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein b (Gpnmb)* がクローニングされた。しかし、GpnmbはCy3-CpG ODN単独への結合が強く見られたが、Cy3-CpG ODN+CXCL14へは弱い結合性しか見られなかった。そのため、CRISPR/Cas9法によりRAW264.7でGpnmbをノックアウトした細胞でcDNA libraryを再度作製し、発現スクリーニングを行った。すると、*Scavenger receptor class-B1 (Scarb1)* および *Immunoglobulin superfamily 8 (Igsf8)* が候補分子としてクローニングされ、それぞれの分子でCy3-CpG ODN+CXCL14への結合が確認された。Scarb1, Igsf8への近縁の分子であるCd36, Igsf3, Rageも同様にCy3-CpG ODN+CXCL14への結合が確認された。

Igsf8はその遺伝子導入により、Cy3-CpG ODN+CXCL14の取り込みが増強し、樹状細胞などで見られたクロルプロマジンでの取り込み感受性が見られたことから、我々の研究で解明されたクラスリン依存的なエンドサイトーシスがIgsf8による取り込み誘導に重要であることが明らかとなった。Igsf8の細胞内traffickingについては、細胞外のIgsf8を蛍光ラベルするSNAP-tagをN末端に付加したIgsf8遺伝子をコードするベクターを用いて研究を行った。すると、Igsf8はリガンドなしでも自発的に内在化して、TLR9へのCpG ODNの受け渡しに必要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、Igsf8については、CRISPR/Cas9法により、KOマウスを作出した。Exon 1に10bpの欠失の起こったalleleを持ち、frameshiftによりIgsf8タンパクが欠損したKOマウスラインを確立し、解析を行った。KOマウスから骨髄由来樹状細胞を誘導し、Cy3-CpG ODNの取り込みとCpG ODNの活性について調べたが、野生型マウスとKOマウス間で変化は見られなかった。また、KOマウスにB16F10細胞を同系移植し、CpG ODNを2回投与して腫瘍容積を測定することにより抗腫瘍効果を評価したが、抗腫瘍活性は同様に見られた。これらの結果から、Igsf8はCpG ODNの取り込みに関与するが、活性は他のIgsfなどにより代償されていると考えられる。

一方で、Scarb1 と Cd36 は Cy3-CpG ODN と一緒に取り込まれ、細胞内で共局在した。Cd36-KO マウスより誘導した BMDM では、CpG ODN または CpG ODN+CXCL14 で刺激した際の炎症性サイトカインの誘導が逆に上昇しており、この結果から CpG ODN の抑制性の受容体として働いていることが示唆された。そこで、Cd36-KO マウスに B16F10 細胞を同系移植し、CpG ODN を 2 回投与して腫瘍容積を測定することにより抗腫瘍効果を評価したところ、抗腫瘍活性も増強していた。これらの結果から、CpG ODN の細胞外受容体に抑制性のものが存在することが明らかとなった。

この発現クローニングによる受容体の単離以外にも、CXCL14 へのクロスリンカーの導入によるプロテオミクスを用いた受容体の探索も行った。このスクリーニングにより、LRP1 が単離され、CXCL14 への特異的な結合が見られたが (Miyajima et al., 2024 ACS Chemical Biology 19: 551-

562)、現段階では CpG ODN の送達への影響は見られていない。これらの結果から、CpG ODN/CXCL14 の受容体は複数存在し、それぞれが異なった CpG ODN への反応性を示すことで、その活性を制御している可能性が示唆された (図 1)。

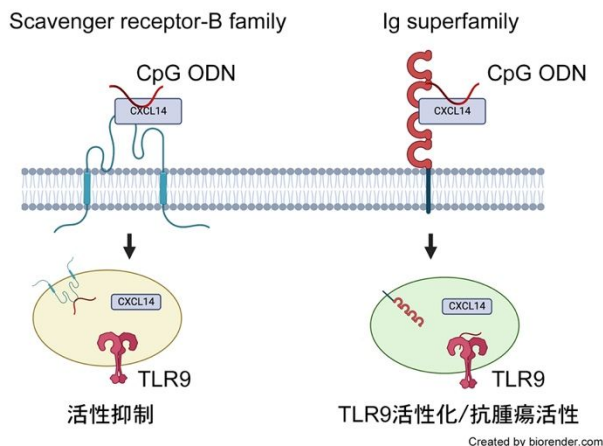


図1 CpG ODNの細胞表面受容体。本研究により、CpG ODN と CpG ODN/CXCL14 複合体に対する受容体が複数明らかとなり、それぞれの受容体に結合した際の反応性も異なっていることが明らかとなった。

CpG DNA は原核生物由来の DNA に特徴的な配列であり、この配列を検出することで細菌に対する免疫反応が活性化すると考えられている。皮膚に発現する *CXCL14* は概日周期により発現が制御されており、休息期 (ヒトでは夜) に発現が上昇することが明らかとなった。また、この発現上昇は、*RORα* と呼ばれる概日周期を制御する転写因子により直接制御されていた。一部のヒトで皮膚に常在する黄色ブドウ球菌は、過増殖が抑えられているが、黄色ブドウ球菌の排除は休息期で高く、活動期で弱くなっており、*CXCL14* の発現周期と一致していた。さらに、*Cxcl14*-KO マウスでは、休息期での黄色ブドウ球菌の排除が低下しており、この概日周期に沿った抗菌免疫のリズムが *CXCL14* の発現により制御されていることが解明された。黄色ブドウ球菌 DNA は CpG ODN と同様に *CXCL14* と複合体を形成し、マクロファージなどへの取り込みが上昇し、TLR9 依存的に炎症性サイトカインの分泌を促進した。これらの結果から *CXCL14* は、休息期で黄色ブドウ球菌の DNA と協調的に炎症反応を増強することにより、黄色ブドウ球菌の過増殖を防いでいることが明らかとなった (図 2: Tsujihana et al., 2022 PNAS 119: e2116027119)。

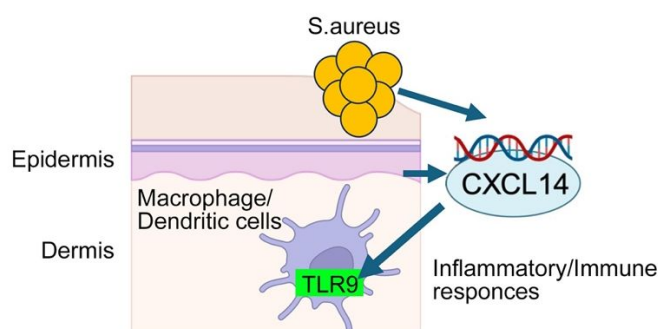


図 2 *CXCL14*/CpG DNA/TLR9 経路の抗黄色ブドウ球菌免疫。休息期に発現する *CXCL14* と黄色ブドウ球菌 DNA は複合体を形成し、マクロファージや樹状細胞の活性化を介して、抗菌免疫を発揮する。

これらの結果より、CpG ODN の抗腫瘍活性に関連する細胞表面受容体が明らかとなり、この経路が実際に抗菌免疫にも働いていることが明らかとなった。また、受容体ごとに CpG ODN への反応性が異なることから、*CXCL14*/CpG ODN 経路は単純な TLR9 への受け渡しだけでなく、CpG ODN 活性をさまざまな受容体を介して修飾している可能性が示唆された。今後、これらの分子メカニズムをさらに解明することで、抗腫瘍免疫を効率よく誘導する CpG ODN の開発や、活性調節のメカニズムの解明につながると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsujihana Kojiro, Tanegashima Kosuke, Santo Yasuko, Yamada Hiroyuki, Akazawa Sota, Nakao Ryuta, Tominaga Keiko, Saito Risa, Nishito Yasumasa, Hata Ryu-Ichiro, Nakamura Tomonori, Murai Iori, Kono Yuka, Sugawa Maho, Tanioka Miki, Egawa Gyohei, Doi Masao, Isa Tadashi, Kabashima Kenji, Hara Takahiko, Okamura Hitoshi	4. 巻 119
2. 論文標題 Circadian protection against bacterial skin infection by epidermal CXCL14-mediated innate immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2116027119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2116027119	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 Rina Iwase, Naoto Naruse, Miho Nakagawa, Risa Saito, Akira Shigenaga, Akira Otaka, Takahiko Hara, Kosuke Tanegashima	4. 巻 207
2. 論文標題 Identification of Functional Domains of CXCL14 Involved in High-Affinity Binding and Intracellular Transport of CpG DNA.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 459-469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100030.	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 種子島 幸祐, 原 孝彦	4. 巻 17
2. 論文標題 新型コロナウイルス擬似ウイルスを用いた感染性評価系の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 第17回東京都福祉保健医療学会抄録	6. 最初と最後の頁 46-47
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 Miyashita K., Yagi T., Kagaya N., Takechi A., Nakata C., Kanda R., Nuriya H., Tanegashima K., Hoyano S., Seki F., Yoshida C., Hachiro Y., Higashi T., Kitada N., Toya T., Kobayashi T., Najima Y., Goyama S., Maki S. A., Kitamura T., Doki N., Shinya K., Hara T.	4. 巻 114
2. 論文標題 Identification of compounds that preferentially suppress the growth of T cell acute lymphoblastic leukemia derived cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4032 ~ 4040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15918	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 Miyajima Rin, Tanegashima Kosuke, Naruse Naoto, Denda Masaya, Hara Takahiko, Otaka Akira	4. 巻 19
2. 論文標題 Identification of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 as a CXCL14 Receptor Using Chemically Synthesized Tetrafunctional Probes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 551 ~ 562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.3c00717	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小松谷 啓介、菊池 紀仁、小倉 潔、川島 育夫、酒井 祥太、深澤 征義、花田 賢太郎、長田 直樹、種子島 幸祐、原 孝彦、笠原 浩二
2. 発表標題 SARS-CoV-2の脂質ラフトを介した細胞侵入機構の解明
3. 学会等名 第15回セラミド研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松谷 啓介、菊池 紀仁、小倉 潔、川島 育夫、花田 賢太郎、長田 直樹、種子島 幸祐、原 孝彦、笠原 浩二
2. 発表標題 SARS-CoV-2 の脂質ラフトを介した細胞内取り込み
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 種子島 幸祐、斎藤 理佐、原 孝彦
2. 発表標題 ケモカインCXCL14とIg superfamily タンパクによるオリゴデオキシヌクレオチドの細胞内送達機構の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 理佐、種子島 幸祐、原 孝彦
2. 発表標題 Innate immune responses triggered by CpG DNA-CXCL14 complex is mediated by Immunogloblin superfamily proteins
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松谷啓介、小倉潔、菊池紀仁、川島育夫、花田賢太郎、長田直樹、種子島幸祐、原孝彦、笠原浩二
2. 発表標題 SARS-CoV-2のガングリオシドラフトを介した細胞内取り込み
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 理佐、種子島 幸祐、成瀬 公人、重永 章、大高 章、原 孝彦
2. 発表標題 Ig superfamily膜タンパク質はCpG DNA/CXCL14複合体に結合する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 種子島 幸祐、原孝彦
2. 発表標題 新型コロナウイルス擬似ウイルスを用いた感染性評価系の開発
3. 学会等名 第17回東京都福祉保健医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 陸, 種子島 幸祐, 斎藤 理佐, 原 孝彦
2. 発表標題 ケモカインCXCL14とIg superfamilyタンパクによる二重鎖DNAの細胞内送達
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 種子島 幸祐, 斎藤 理佐, 高橋 陸, 長谷部 愛佳, 原 孝彦
2. 発表標題 Fine tuning of the CpG DNA-CXCL14 complex-mediated TLR9 activation by immunoglobulin superfamily proteins and scavenger receptors.
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 種子島 幸祐, 辻花 光次郎, 椛島 健治, 岡村 均, 原 孝彦
2. 発表標題 Circadian protection against bacterial over-proliferation in the skin by the CXCL14/bacterial DNA/TLR9 pathway.
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>体内時計は夜間に自然免疫を発動 皮膚ケモカインによる自然免疫機構 https://www.igakuken.or.jp/topics/2022/0614.html 幹細胞プロジェクトホームページ https://www.igakuken.or.jp/project/detail/stem-cell.html 東京都医学総合研究所 幹細胞プロジェクトホームページ https://www.igakuken.or.jp/stem-cell/</p>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------