

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07313

研究課題名(和文) CXCL14と自然免疫活性化核酸による腫瘍免疫誘導メカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of cooperation between CXCL14 and DNA for activation of 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Toll-like Receptor (TLR) 9のリガンドである CpG DNA は抗腫瘍免疫応答に必須な Th1型の免疫応答を強く活性化する。そこで、本研究では、これまで解明してきたCXCL14によるCpG DNAの送達分子メカニズムとその腫瘍免疫における役割について解析を行った。CXCL14ノックアウトマウスでは、CpG DNAの抗腫瘍効果がキャンセルされており、生体内のCXCL14がCpG DNAの抗腫瘍効果に必須であることが示唆された。また、CXCケモカインの持つCpG DNAへの結合能と、取り込み受容体への結合が抗腫瘍免疫の誘導に重要な役割を果たしている可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、CXCL14とCpG DNA複合体が腫瘍免疫を生体内でも活性化していることを見出した。CpG DNAを用いた腫瘍免疫誘導には効率の良い送達システムの構築が必要である。本研究で、CXCL14の関与とそのCpG DNA細胞内送達分子メカニズムが解明されたことで、その開発に貢献できると考える。本研究で得られた成果は、免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療に抵抗性の患者群のうち、樹状細胞の活性化が不十分な場合への治療に繋がる成果が期待できるほか、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、どのような制御が行わ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 DNA, a ligand for Toll-like Receptor (TLR) 9, strongly activates the Th1-type immune response, which is essential for antitumor immune response. We have shown that CXCL14 enhanced uptake of CpG DNA into dendritic cells by direct binding of CpG DNA. In this study, we analyzed the molecular mechanism of delivery of CpG DNA by CXCL14 and its role in tumor immunity. In CXCL14 knockout mice, the antitumor effect of CpG DNA was canceled, suggesting that CXCL14 is essential for the antitumor effect of CpG DNA in vivo. In addition, we showed that the binding ability of CXC chemokines to CpG DNA and the binding to uptake receptors may play important roles in the induction of antitumor immunity.

研究分野：分子生物学

キーワード：CXCL14 CpG DNA tumor immunity innate immunity TLR9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Toll-like Receptor (TLR) 9のリガンドである20-30 merのCpG オリゴヌクレオチド (CpG ODN) は抗腫瘍免疫応答に必須なTh1型の免疫応答を強く活性化する。しかし、CpG ODNはTLR9の存在するエンドソームやリソソームへの送達効率が低く、効率の良い送達システムを用いることが必須である。細胞外のDNAを細胞内へと送達する生体内のメカニズムについては不明な点が多かったが、我々の研究により、ケモカインCXCL14がCpG ODNの細胞内送達を大幅に亢進し、CpG ODNの樹状細胞活性化能を大幅に増強することが解明された (Tanegashima et al. 2017 eBioMedicine 24: 247-256)。

2. 研究の目的

本研究では、今までわかっていなかったCXCL14によるCpG DNAや細胞外のDNAの細胞内への送達のメカニズムについて、分子生物学的に解明すると同時に、その腫瘍免疫における役割について解明することを目的とする。

3. 研究の方法

マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7、骨髄由来樹状細胞、ヒト樹状細胞由来細胞株 CAL-1細胞などへの結合および取り込み実験には、Cyanin 3 ラベルした合成DNAを4°C 1時間または37°C 1時間反応させ、FACS解析したデータを用いた。CpG DNAなどの活性評価は、これらの細胞が活性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により検定することにより評価した。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 DNA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。

4. 研究成果

ケモカインCXCL14は細胞遊走を誘導する一般的なケモカインの機能とは別に、Tlr9を介した自然免疫応答を誘導するCpG DNAと高親和性の複合体を形成し、その取り込み増強を介してCpG DNAの活性を大幅に増強する。まず、同じく核酸による自然免疫応答を誘導するcGAS/STING経路をCXCL14が増強するかについて研究を行なった。cGASリガンドに関しては、既知のcGASリガンドとCXCL14の組み合わせについて、Raw264.7細胞や骨髄由来樹状細胞などを用いて自然免疫応答が誘導されるかどうかを調べたが、反応性が上昇する組み合わせは見つからなかった。次に、CXCL14がCpG DNAの活性をヒトでも増強できるかについて、ヒト樹状細胞株CAL-1を用いて反応性を検討した。マウスの細胞に比べて、CAL-1の活性化は高活性型のCpG DNAを用いる必要があるなど、種間の差が見られたが、CXCL14はヒトの樹状細胞由来のCAL-1に対してもCpG DNAの細胞への結合、取り込み、活性増強を誘導し、マウス細胞と同様にCXCL14がCpG DNAの腫瘍免疫応答を増強できる可能性が示唆された。

次に、CXCL14の腫瘍免疫に与える影響を調べるため、腫瘍免疫に感受性の高いB16F10腫瘍を皮下移植してCpG DNAおよびCpG DNAとCXCL14を組み合わせ投与する実験を行なった。これまで実験に用いていた骨髄由来樹状細胞の活性化を十分に誘導できるCpG DNA (ODN2395)を投与した腫瘍移植マウスでは、腫瘍の縮小は見られなかったことから、腫瘍免疫の誘導には

高い活性を持つCpG DNAが必要であることが明らかとなった。そこで、ヒト細胞株CAL-1の活性化を誘導できる高活性型CpG DNAを用いて実験を行なったところ、単独でもB16F10腫瘍を縮小できることが明らかとなった。しかし、CXCL14との組み合わせ投与では、効果は増強しなかった。そこで、CXCL14ノックアウト(KO)マウスにB16F10腫瘍を皮下移植して高活性型CpG DNAを腫瘍内投与する実験を行なったところ、野生型マウスでは、B16F10腫瘍に高活性型CpG DNAを投与した群の腫瘍は縮小したのに対して、CXCL14-KOマウスでは、CpG DNA投与群でB16F10腫瘍の縮小が抑えられないことが明らかとなった。このことは、生体内で発現するCXCL14がCpG DNAの抗腫瘍効果に必須な役割を果たしていることを示している。

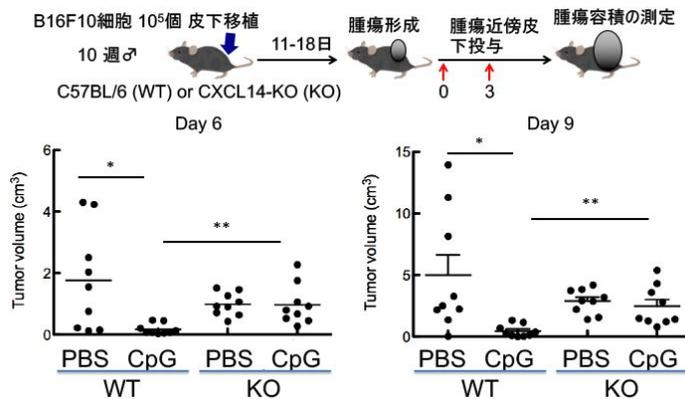


図1 CXCL14によるCpG DNAの腫瘍免疫増強。メラノーマ移植マウスの腫瘍の大きさをドットプロットで示した。野生型マウスでは高活性型CpG DNA (CpG) 投与後6, 9日ともに有意に腫瘍の縮小が見られたのに対して、CXCL14-KOマウスでは、CpG投与群でも腫瘍の大きさに変化が見られず、生理的な濃度のCXCL14がCpG DNAの活性に必要であることを明らかとした。

最後に、これまでの研究で明らかとしたCXCL14/CpG DNAの抗腫瘍免疫活性の分子メカニズムを探るため、CXCL14部分ペプチドおよび近縁のCXCケモカインを用いたCXCL14/CpG DNAの作用機序の解析を行なった。興味深いことに、CpG DNAへの結合性はCXCL12, CXCL4, CXCL14に共通の機能にもかかわらず、CXCL14, CXCL4のみがCpG DNAの樹状細胞への取り込み増強とそれに伴った抗腫瘍免疫にかかわるIL-12の分泌増強を誘導した。CXCL14によるCpG DNA取り込み増強は、クロルプロマジンおよび抗CXCL14抗体により阻害され、CXCL14受容体によるclathrin依存的なエンドサイトーシスが取り込み増強に重要であることが明らかとなった。また、CXCL14部分ペプチドの解析では、N末端と、CXCL14(41-47)の2つのループ構造が取り込み増強に必須であり、受容体への相互作用が示唆された。さらに、CpG DNAとCXCL14の結合様式をシミュレーションにより明らかとし、N末端ループ構造とC末端のalpha-helixの協調的な作用でCpG DNAの結合を行っていることが示唆され、実際の結合実験のデータと一致した。これらの結果から、CXCケモカインの持つCpG DNAへの結合能と、取り込み受容体のエンドサイトーシスが抗腫瘍免疫の誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

本研究ではこの取り込み受容体を探索するため、Raw264.7のcDNA libraryなどを用いた発現クローニングにより単離したCpG DNA/CXCL14受容体候補を複数単離した。今後はこれらのCpG DNA/CXCL14受容体の作用メカニズムの解明と、その制御による腫瘍免疫増強について研究を進展させる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rina Iwase, Naoto Naruse, Miho Nakagawa, Risa Saito, Akira Shigenaga, Akira Otaka, Takahiko Hara, and 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 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 -

1. 著者名 Yokote N., Suzuki-Kosaka Y. M., Michiue T., Hara T., Tanegashima K.	4. 巻 63
2. 論文標題 Latrophilin2 is involved in neural crest cell migration and placode patterning in <i>Xenopus laevis</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 29-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1387/ijdb.180184kt.	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 種子島 幸祐, 岩瀬 璃奈, 中川 美帆, 斎藤 理佐, 成瀬 公人, 重永 章, 大高 章, 原 孝彦
2. 発表標題 CXCケモカインのCpG ODN細胞内送達活性の分子メカニズム
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 種子島 幸祐, 三井貴洋, 成瀬公人, 辻 耕平, 重永 章, 大高 章, 原 孝彦
2. 発表標題 CXCL14 delivers CpG DNA, and enhances TLR9 signaling in dendritic cells and macrophages
3. 学会等名 第19回遺伝子デリバリー研究会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福山美智子、井口智弘、小松谷啓介、川島育夫、下仲基之、種子島幸祐、原孝彦、山本正雅、笠原浩二
2. 発表標題 ケモカインSDF-1 によるJurkat T細胞移動の脂質ラフトを介するシグナル伝達
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 種子島 幸祐, 三井貴洋, 岩瀬 璃奈, 成瀬公人, 重永 章, 大高 章, 原 孝彦
2. 発表標題 CpG DNAとCXCL14による自然免疫系の協調的な調節メカニズム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 美帆, 種子島 幸祐, 三井貴洋, 成瀬 公人, 重永 章, 大高 章, 佐久間 啓, 原 孝彦
2. 発表標題 ケモカインCXCL14の脳内ミクログリアに対する働き
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三井 貴洋, 種子島 幸祐, 成瀬 公人, 重永 章, 大高 章, 原 孝彦
2. 発表標題 CpG DNA/CXCL14複合体に対する候補受容体の発現クローニング
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩瀬 璃奈, 成瀬 公人, 種子島 幸祐, 重永 章, 大高 章, 原 孝彦
2. 発表標題 CXCL14とCpG DNAの相互作用によるTLR9活性化の特異性と責任領域の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人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 http://www.igakuken.or.jp/stem-cell/

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