

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08702

研究課題名(和文) CXCL14による皮膚の免疫監視メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of CXCL14-mediated skin immunosurveillance

研究代表者

原 孝彦 (HARA, Takahiko)

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・分野長

研究者番号：80280949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚のCXCL14量は日内変動しており、マウスでは昼間に高く夜間に低い。CXCL14は皮膚に常在する黄色ブドウ球菌のDNAと結合し、それを樹状細胞内へ運び込むことでTLR9経路を活性化した。菌の耳内増殖率は、昼間より夜間の方が高かった。従って、CXCL14は休眠期の皮膚で黄色ブドウ球菌が過増殖しないよう監視する役割を担っている。一方、CXCL14受容体の研究では、TLR9経路を負と正にそれぞれ調節する受容体AとCを同定した。A遺伝子KOマウスでは、同系melanomaの増殖率が低下していた。受容体Cは自発的に細胞内へ取り込まれ、CpG DNA/CXCL14と共にendosomeへ運ばれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、皮膚で日内変動するCXCL14が黄色ブドウ球菌DNAと結合してTLR9を活性化することで菌の過増殖を防いでいることを証明した。概日リズムを示すケモカインはCXCL14が初めてであり、皮膚におけるケモカインの抗菌機能も初の発見である。ケモカインの非古典的な生理機能を証明したという点でも、非常に重要な学術的研究成果である。CXCL14受容体の解析については、まだ手掛かりを得たという段階にあるが、CpG DNA-CXCL14-TLR9経路の調節がとても複雑であることを予感させる結果である。研究継続によって、皮膚科学分野のみならず、癌や感染症に対する免疫学の発展にも貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the mechanism by which the biological rhythm of the skin controls antibacterial immunity. In the epidermis of mice, CXCL14 expression was high during the day and low at night. Rhythmically expressed CXCL14 bound to the DNA of Staphylococcus aureus and activated the innate immunity system via TLR9 in dendritic cells, resulting in suppression of bacterial proliferation. Thus, CXCL14 plays an important role in protecting the skin from overproliferation of Staphylococcus aureus. In parallel to the above study, we investigated CXCL14 receptor molecules and identified a repressive receptor A and a promotive receptor C. In gene A-deficient mice, growth rate of immunocompetent melanoma cells was lowered. We also found that the receptor C was spontaneously internalized and delivered to endosome compartment with CpG DNA/CXCL14 complex.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：CXCL14 TLR9 CpG DNA 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

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、感染症や癌に対する免疫防御に重要な役割を担っている。我々は、2017 年にケモカイン CXCL14 が低濃度の CpG DNA 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, TNF $\alpha$ ) の産生を強力に誘導することを発見した<sup>1)</sup>。CpG DNA は、TLR9 経路だけでなく、マクロファージの Phagocytosis 活性も増強する。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免疫監視に重要な役割を果たしていると推察される。しかし、皮膚において CXCL14 が特定の病原体の繁殖を防ぐ働きをしているかどうかは不明であった。また、CXCL14 が CpG DNA のどのような化学構造を認識して、上記の自然免疫反応をトリガーしているのかも解明されていない状況であった。そこで本研究では、CXCL14 の皮膚における生理的機能、そして CpG DNA-CXCL14 複合体に対する受容体の解明に取り組んだ。

CXCL14 による CpG DNA の細胞内運搬には、CXCL14 特異的な細胞表面受容体が介在しているはずである。しかし、この反応には CXCL14 との高親和性結合が証明されている CXCR4<sup>2)</sup> は関与していなかった。我々は、Cy3 標識 CpG oligodeoxynucleotides (ODN)-CXCL14 を用いた cDNA ライブラリーの FACS 発現クローニング法によって、4 種類の細胞表面タンパク質 (仮称 A, B, C, D) が CpG ODN-CXCL14 と特異的に結合することを発見した (未発表)。そのひとつである受容体 A は、脂質の取り込みに関係する膜タンパク質であった。

近年、脂肪酸  $\beta$  酸化の律速酵素 ACLY を欠損させたマクロファージでは、CpG DNA 刺激による Phagocytosis の増強が起こらない、という興味深い論文が発表された<sup>3)</sup>。この論文では、Phagocytosis に伴うマクロファージ内膜系のリサイクリングに脂肪酸が必須ではないかと推察しているが、CpG DNA 刺激と脂質代謝とを結びつける証拠はまだない。CXCL14-KO マウスでは、脂肪酸の  $\beta$  酸化率が低下していた (未発表)。これらの事実を繋ぎ合わせると、CXCL14 は脂質の取り込みに関係する受容体を介して CpG DNA をマクロファージ内に輸送し、TLR9 経路と脂肪酸代謝経路の強度を相互チューニングしている可能性がある。我々が既に同定した 4 種類の膜タンパク質の動態や機能を調べていけば、CpG DNA-CXCL14 受容体の役割分担や生理的機能が見えてくる可能性がある。

## 2. 研究の目的

非メチル化 CpG DNA は、マクロファージや樹状細胞の TLR9 を活性化するリガンドとして、感染症や癌に対する免疫防御に重要な役割を担っている。我々は、CXCL14 が低濃度の CpG DNA 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 型サイトカインの産生を強力に誘導することを発見した<sup>1)</sup>。CXCL14 ノックアウト (KO) マウスでは、同系メラノーマ細胞 B16F10 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有意に短くなった (未発表)。したがって、CXCL14 は CpG DNA の増感剤として、抗癌免疫を含めた皮膚の免疫監視に重要な役割を果たしていると推察される。そこで本研究では、皮膚における CXCL14 の生理的機能を明らかにし、その分子メカニズムを解明することを目的とした。この研究が成功すれば、皮膚の免疫力増強法の開発にも道が拓かれると期待される。

## 3. 研究の方法

### 細胞培養

C57BL/6 マウスのメラノーマ由来細胞株 B16F10 とマウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Biosera) と 1% penicillin/streptomycin (PS, Sigma) を添加した RPMI 1640 培地 (Nacalai tesque) を用いて培養し、トリプシン/EDTA 処理によって剥がした後、phosphate buffered saline (PBS) で懸濁したものをを用いた。ヒト胎児腎臓由来細胞株 293T は、10% FBS と 1% PS を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium 培地 (Nacalai tesque) を用いて培養した。すべての細胞培養は、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で行った。

### 動物実験

野生型 C57BL/6N マウス (日本 SLC)、あるいは遺伝子 A-KO マウスを 3 種混合麻酔した後、B16F10 を 10<sup>5</sup> 細胞ずつ皮下移植し、5 週間飼育して生存日数を比較した。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。

### 遺伝子導入

293T 細胞の SNAP tag 発現株の作製には、pCS2<sup>+</sup>CD8 signal sequence-FLAG-SNAP に N 末端の細胞外ドメインに FLAG-SNAP tag を付与した遺伝子 C の cDNA を挿入したベクターを使用した。遺伝子導入は、293T 細胞には PEI-Max (Polysciences) を、RAW264.7 細胞には Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific)/4D-Nucleofector (Lonza) を用いたエレクトロポレーションをそれぞれ用いた。

## 顕微鏡観察

RAW264.7 細胞に発現ベクターを導入し、24 時間後に 35 mm glass bottom dish へ播き直した。細胞は、SNAP-Surface Alexa Fluor® 488 (New England BioLabs) で 4°C 30 分反応させ、直後または 37°C 1 時間反応させた後、2% パラホルムアルデヒド-PBS で固定した。免疫染色実験では、Blocking One Histo (Nacalai tesque) でブロッキングした後、Rabbit anti-EEA1 ポリクローナル抗体 (Abcam) で 1 時間反応させた。二次抗体には Alexa Fluor® 546 anti-Rabbit IgG (Thermo) を使用した。染色像は、共焦点顕微鏡 TCS SP8 (Leica) にて観察した。全ての画像データは、デコンボリューションした後、Image J による ROI ツールを用いた細胞内蛍光強度解析、および JaCoP ツールを用いた Pearson の相関係数解析に供した。

## 統計分析

画像データの統計解析には One-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 により統計解析を行った。それ以外の統計解析には、Two-way Anova および Sidak's multiple comparison を採用した。

## 4. 研究成果

本研究では、(1) 皮膚における CXCL14 の非古典的生理機能の解明、(2) 皮膚の免疫監視に必須な CpG DNA-CXCL14 受容体の同定、という 2 つの目標を設定して研究を実施した。1 つ目の課題については、CXCL14 が黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の DNA と相互作用することで、菌の過増殖を抑えることを証明した。2 つ目の課題については、CpG DNA-CXCL14 受容体候補遺伝子 C と A の KO マウスを用いて、機能未知の受容体 C が CpG DNA-CXCL14 複合体のエンドソームへの運搬を担っていること、そして受容体 A が CpG DNA-CXCL14-TLR9 経路を負に調節する受容体として働いていること、をそれぞれ証明した。

### 皮膚における CXCL14 の発現は日内変動する

皮膚における CXCL14 の発現レベルは日内変動しており、マウスでは昼間に高く、夜間に低い。我々は、CXCL14 遺伝子の転写開始点上流に時計制御因子 ROR $\alpha$  の結合コンセンサス配列が存在すること、そして ROR $\alpha$  はそこに結合して CXCL14 mRNA の転写レベルを上げることを見出した<sup>4)</sup>。すなわち、皮膚における CXCL14 遺伝子の発現は、サーカディアンリズム調節を受けている。

### CXCL14 は黄色ブドウ球菌の過増殖を抑制する

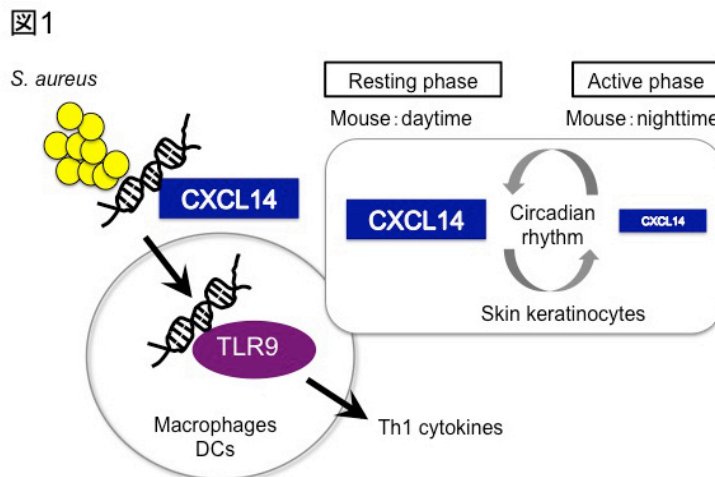
次に我々は、皮膚における CXCL14 の発現に日周リズムがあることの生理的意義を探索した。動物の皮膚表面には多数の細菌が常在しているが、その中で悪玉菌として知られている *S. aureus* を野生型マウスの耳内に感染させて増殖率を調べてみた。その結果、CXCL14 発現量が多い昼間は菌の増殖が抑えられたのに対し、CXCL14 発現レベルが低下する夜間では菌の総数が増加した。CXCL14-KO マウスの皮膚においては、*S. aureus* の耳内増殖率は、昼夜間で変化しなかった。したがって、休眠期の皮膚における *S. aureus* の増殖は CXCL14 によって抑えられていることが判明した。

CXCL14 には細菌の増殖を直接阻害する抗菌活性が報告されているが、表皮にその活性を発揮する十分な量の CXCL14 タンパク質が存在しているとは考えにくい。そこで我々は、CpG DNA に結合して TLR9 を活性化する CXCL14 の非古典的機能を疑った。CXCL14 は低濃度の CpG 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、IL-12、IL-6、TNF $\alpha$  といった Th1 型サイトカインの産生を強力に誘導する<sup>1)</sup>。我々の論文が発端となり、CXCL4 や CXCL10 にも同様の機能があることが次々と報告され<sup>5,6)</sup>、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。

CXCL14 は 77 アミノ酸から成り、N 末端側の 12 個のアミノ酸残基が CpG ODN との結合に関与している。特に 7 番目のアルギニン、8 番目のリジン、11 番目のアルギニンが CpG ODN と相互作用し、C 末端側  $\alpha$ -ヘリックスも CpG ODN-CXCL14 複合体の安定化に寄与している<sup>7)</sup>。CXCL14 は魚類から哺乳類まで高度に保存されていること、マウスやヒトでは皮膚や粘膜組織に大量に発現していることから、CXCL14 は様々な病原体や生体内異物を検知する DNA センサーとして働いていると推察されている。

上記の背景を基に研究を進めた結果、*S. aureus* の DNA は CXCL14 と特異的に結合し、マクロファージ由来細胞株や骨髄由来樹状細胞の中に運び込まれて TLR9 経路を活性化することが判明した。したがって、休眠期マウスの皮膚角化細胞から分泌された CXCL14 は、表皮の黄色ブドウ球菌から漏出した DNA に結合し、これが近傍の樹状細胞に取り込まれることで TLR9 を介した自然免疫系が活性化されると結論した (図 1)<sup>4)</sup>。この仕組みによって、休眠期のマウスの皮膚は *S. aureus* の過増殖から守られている。

皮膚角化細胞における *CXCL14* 遺伝子の発現が、なぜ体内時計支配下にあるのかは不明である。*CXCL14* はマクロファージからも産生されるが、公開されているデータベース (GEO datasets GSE25585) に拠ると、その発現は日周変動リズムを示さない。皮膚は常に細菌に曝されており、休眠期は物理的な浄化ができないため無防備な状態にある。そこで、休眠期でのみ最外層の皮膚角化細胞から *CXCL14* を分泌して *S. aureus* のような悪玉菌の大量繁殖を防いでいるのではないかと推察される。



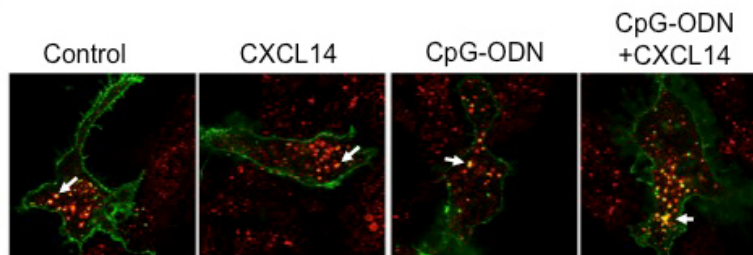
*CXCL14* は、表皮だけでなく、口腔粘膜、腸管上皮、肺上皮といった組織でも、高レベルに発現している。これらの組織においても、有害な細菌の繁殖を抑える働きをしているのかもしれない。*CXCL14* に結合する *S. aureus* DNA の構造的特徴が解明できれば、上記のような *CXCL14* 標的細菌種の同定も可能となるであろう。

### CXCL14 受容体には抑制性と促進性の2種類がある

*CXCL14* は CpG DNA と複合体を形成して、マクロファージや樹状細胞の TLR9 を活性化するが、その起点となる CpG DNA-*CXCL14* 受容体の実体はまだ解明されていない。我々は cDNA ライブラリーの発現スクリーニングとデータベース検索によって、4種類の CpG ODN-*CXCL14* 受容体 A, B, C, D を同定した。これらの内、膜タンパク質 C は CpG ODN-*CXCL14* の細胞内取込み受容体として働いていた。しかし予想外なことに、別の CpG ODN-*CXCL14* 受容体 A を遺伝子破壊した骨髄由来マクロファージでは、CpG ODN 刺激後のサイトカイン産生量が野生型マウス由来のマクロファージより増加していた。この実験事実は、抑制性受容体の存在を示唆している。促進性受容体と抑制性受容体タンパク質が *CXCL14* と結合した CpG DNA を受け取った後、どういう経路でエンドソームへと運ばれていくのかを丹念に解析していくことで、TLR9 自然免疫系の新たな制御機構の解明を試みた。

まず初めに、SNAP-tag を用いた膜表面タンパク質の蛍光標識系を立ち上げ、293T 細胞で実験系の動作を確認した。その後、RAW264.7 細胞を用いて C タンパク質の細胞内動態を解析した。その結果、受容体 C は CpG ODN-*CXCL14* に結合していても自発的に細胞に取り込まれ、EEA1 陽性の early エンドソームへと運ばれていた (図2、白矢印)。したがって、A タンパク質は CpG DNA を TLR9 へとリレーする役割を担う促進性受容体のひとつである。

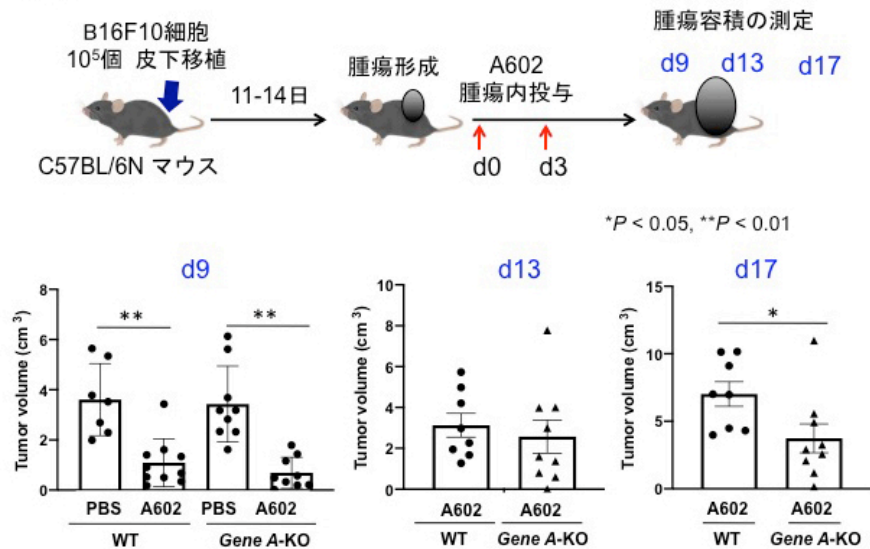
図2



緑色 : SNAP-tagged Receptor C  
赤色 : early endosome marker EEA1

一方、受容体 A に関しては、KO マウスの骨髄細胞から GM-CSF を用いて分化誘導した樹状細胞を CpG ODN+*CXCL14* で刺激したときの IL-12 分泌量が、野生型マウス由来樹状細胞と比べて高進していたことから、TLR9 経路を負に調節する受容体であると推察されていた。この現象が生理的機能と関連しているかどうかを確かめるために、A 遺伝子 KO マウスを用いて、抗腫瘍活性を有する A602 という CpG ODN の *in vivo* 効果を調べてみた。B16F10 由来の癌が形成された野生型マウスでは、A602 投与の9日後の時点で腫瘍サイズはいったん縮小するが、その後、癌細胞が再増殖して13日から17日後にかけて腫瘍サイズは再び大きくなる。興味深いことに、A-KO マウスでは、A602 投与17日後における癌細胞の再増殖が有意に抑えられていた (図3)。受容体 A の主たる役割は脂肪の取り込みであるため、この結果は脂肪代謝系が TLR9 自然免疫系のブレーキとして働いている可能性を示唆している。

図3



<引用文献>

- 1) Tanegashima K, Takahashi R, Nuriya H, Iwase R, Naruse N, Tsuji K, *et al.* CXCL14 acts as a specific carrier of CpG DNA into dendritic cells and activates Toll-like receptor 9-mediated adaptive immunity. *EBioMedicine*. 24: 247-256, 2017.
- 2) Tanegashima K, Suzuki K, Nakayama Y, Tsuji K, Shigenaga A, Otaka A, *et al.* CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS letters*. 587: 1731-1735, 2013.
- 3) Liu M, O'Connor RS, Trefely S, Graham K, Snyder NW, and Beatty GL. Metabolic rewiring of macrophages by CpG potentiates clearance of cancer cells and overcomes tumor-expressed CD47-mediated 'don't-eat-me' signal. *Nat Immunol*. 20: 265-275, 2019.
- 4) Tsujihana K, Tanegashima K, Santo Y, Yamada H, Akazawa S, R. N, *et al.* Circadian protection against bacterial skin infection by epidermal CXCL14-mediated innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 119: e2116027119, 2022.
- 5) Lande R, Lee EY, Palazzo R, Marinari B, Pietraforte I, Santos GS, *et al.* CXCL4 assembles DNA into liquid crystalline complexes to amplify TLR9-mediated interferon- $\alpha$  production in systemic sclerosis. *Nat Commun*. 10: 1731, 2019.
- 6) Du Y, Kioon MDA, Laurent P, Chaudhary V, Pierides M, Yang C, *et al.* Chemokines form nanoparticles with DNA and can superinduce TLR-driven immune inflammation. *J Exp Med*. 219: e20212142, 2022.
- 7) Iwase R, Naruse N, Nakagawa M, Saito S, Shigenaga A, Otaka A, *et al.* Identification of functional domains of CXCL14 involved in high-affinity binding and intracellular transport of CpG DNA. *J Immunol*. 207: 459-469, 2021.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 R. Iwase, N. Naruse, M. Nakagawa, R. Saito, A. Shigenaga, A. Otaka, T. Hara, and K. 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 J. Immunol.	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 K. Tsujihana, K. Tanegashima, Y. Santo, H. Yamada, S. Akazawa, R. Nakao, K. Tominaga, R. Saito, Y. Nishito, R. Hata, T. Nakamura, I. Murai, Y. Kono, M. Sugawa, M. Tanioka, G. Egawa, M. Doi, T. Isa, K. Kabashima, T. Hara, and H. Okamura.	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 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	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 原 孝彦	4. 巻 81
2. 論文標題 マウス休眠期の皮膚で働く抗菌免疫システム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience & Industry	6. 最初と最後の頁 28-29
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 原 孝彦, 種子島幸祐	4. 巻 6
2. 論文標題 体内時計とケモカイン	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 354-357
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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, 岩瀬璃奈, 中川美帆, 齋藤理佐, 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 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 Immunoglobulin 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 種子島幸祐, 齋藤理佐, 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所 幹細胞プロジェクト  
<https://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
---------	---------