

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659481

研究課題名（和文）CXCL14 は行動刺激物質のセンサーとして働くか

研究課題名（英文）Role of CXCL14 as a sensor for behavior-stimulating substance

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・生体分子先端研究分野・副参事研究員

研究者番号：80280949

研究成果の概要（和文）：

CXCL14の役割を理解するために、CXCL14受容体の同定を試みた。THP-1細胞株を用いて候補GPCRのノックダウン実験とcDNA rescue実験を行った結果、CXCL14がCXCR4に高親和性で結合すること、そしてオーファンGPCR（仮称GPR14）がCXCL14のシグナル伝達に必須であることを見出した。CXCL14はCXCL12の細胞誘引活性を交叉阻害した。GPR14の発現は粘膜系組織で強く、CXCL14の発現場所とほぼ一致していた。GPR14と相互作用する成分がCXCL14による摂食行動調節と密接に関連しているものと推察される。

研究成果の概要（英文）：

In order to understand the role of CXCL14, I attempted to identify CXCL14 receptor molecules. As a result of GPCR knockdown experiments and cDNA rescue experiments using THP-1 cell line, I found that CXCL14 binds to CXCR4 with high affinity, and that another orphan GPCR (GPR14) was indispensable for the CXCL14-mediated signal transduction. CXCL14 cross-inhibited the chemotactic activity of CXCL12. GPR14 was abundantly expressed in mucosal tissues along with CXCL14. Therefore, GPR14-interacting molecules could be involved in the feeding behavior control by CXCL14.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学

1. 研究開始当初の背景

CXCL14は癌組織で発現消失する77アミノ酸から成るCXC型のケモカインとして、1999年に遺伝子クローニングされた。その後の研究により、CXCL14は組織マクロファージ、未成熟樹状細胞、ナチュラルキラー細胞を走化性移動させることが判明した。しかし、CXCL14-KOマウスでは、

免疫系や炎症応答に顕著な異常は観察されなかった。予想外なことに、CXCL14-KOマウスは摂食量減少による低体重を示し(Tanegashima et al. *PLoS ONE*, 2010)、肥満性2型糖尿病を発症しにくくなっていた(Nara et al. *J. Biol. Chem.*, 2007)。CXCL14の発現量は肥満時の内臓脂肪で増加し、脂肪内慢性炎症の元となるマクロファージ動員を促進して

いた。さらに CXCL14 は、血糖値調節の主要組織である骨格筋において、インスリンによる糖吸収を部分抑制した。したがって、肥満個体においては、CXCL14 はマクロファージと骨格筋に働きかけてインスリン抵抗性を惹起する悪玉因子として作用すると推察される。

一方中枢では、CXCL14 は視床下部に発現し、絶食時におこる食欲促進因子 *NPY*, *AgRP* の発現誘導に必要であった。CXCL14-KO マウスは、新しい環境へ移動したときの摂食行動開始が 1 日遅れ、雌 KO マウスは出産後の哺育を放棄した。このように、CXCL14 はエネルギー摂取、環境への適応、仔の認識といった哺乳類個体の生存に必須な様々な機能に関わっているように思える。このようなケモカインは他に例がなく、これらの生理的機能を「走化性」という生物活性のみで統一的に理解するのは困難である。

2. 研究の目的

CXCL14 は、組織マクロファージの走化性因子の一種である。しかし、他のケモカインの場合と異なり、CXCL14-KO マウスは新しい環境での摂食行動に時間がかかり、出産後の仔育てをしない。CXCL14 が中枢神経系を介した行動制御に関与しているのは明白である。一方、これまで見過ごされてきたが、CXCL14 の発現レベルは、乳頭・小腸・外陰唇・陰茎・胃・気管・舌といった末梢の粘膜性器官や組織で顕著に高い。数あるケモカインの中で、CXCL14 だけが小腸や外生殖器などの粘膜組織で多量に発現しているのには理由があるはずである。そこで、本研究では、「CXCL14 は、外から入り込んでくる行動刺激物質のセンサーとして働く」という仮説の基に、CXCL14-KO マウスと野生型マウスのプロテオーム・メタボローム比較、および生化学的アプローチにより、CXCL14 と結合する物質を探索する。また、これまで未解明であった CXCL14 受容体と細胞内シグナル伝達機構の解明を試みる。CXCL14 と摂食行動との関係を理解する手掛かりを得ることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

動物実験には、C57BL/6 系の CXCL14-KO マウス、同腹ヘテロマウス、あるいは同一の飼育環境にて長期維持した野生型 C57BL/6 マウスを用いた。CXCR4-KO マウスは長澤丘司博士(京都大学)より、GPR14-KO マウスはウェルカムトラストマウスバンクより、それぞれ入手した。すべての動物実験は、所属研究機関の動物倫理委員会、および遺伝子組換え生

物安全委員会にて承認されたプロトコールに則って実施した。

各種遺伝子 mRNA の発現レベルは、Roche 社の LightCycler480 system を用いた Real time PCR により決定した。メタボローム解析は外部へ受託した。

CXCL14 受容体と CXCL14 シグナル伝達系の解析には、ヒト単球系白血病細胞株 THP-1、ヒト単球系白血病由来細胞株 Jurkat、マウス Pro-B 細胞株 BaF/3、そして各種 KO マウス胎仔肝臓由来の未成熟樹状細胞様細胞 (Mac1 陽性細胞を IL-4/GM-CSF 存在下で *in vitro* 分化誘導したもの) を用いた。THP-1 細胞にレトロウイルスベクターを用いて、候補 GPCR 遺伝子に対する siRNA、あるいは cDNA 発現ベクターを導入した。上記の細胞を、KURABO 社のケモタキセルを用いた走化性試験、あるいは ¹²⁵I 標識 CXCL14 (または ¹²⁵I 標識 CXCL12) を用いた *in vitro* binding assay に供した。

4. 研究成果

CXCL14 を多量に発現している代表的な組織として小腸・内蔵脂肪組織・脳を選び、CXCL14-KO マウスと野生型マウスの各臓器をそれぞれ有機溶媒で抽出した後、低分子メタボローム解析に供した。その結果、前者において不飽和脂肪酸分画の減少傾向が認められた。

次に、肝臓・脂肪組織から代謝中間体を有機溶媒で抽出し、メタボローム解析に供した結果、CXCL14-KO マウスでは肝臓の Acetyl-CoA や Malonyl-CoA レベルが有意に低下していることが判明した。CXCL14-KO マウスの肝臓では絶食後のケトン体レベルが 2 倍以上高かったことも、脂肪酸合成における CXCL14 の重要性を示唆する。上記の知見と合致して、CXCL14-KO マウスでは脂肪代謝を制御する転写調節因子の mRNA 発現レベルが顕著に低下していた。現在、サンプルマウスの匹数を増やして、本実験結果の再現性を確かめているところである。

CXCL14 活性化物質の探索については、CXCL14 を高発現するマウス臓器からのアフィニティー精製を試みたが、成功には至らなかった。それを達成するには、まず CXCL14 受容体の分子コンポーネントを解明することが優先事項と考え、残りの時間を受容体の同定と性状分析に費やした。CXCL14 はマクロファージ系細胞を誘引するケモカインであるが、ケモタクシス活性は非常に弱い。我々は以前、抗 CXCL14 モノクローナル抗体 MAB730 (R&D system) を CXCL14 と共存させることでアッセイすると、THP-1 細胞に対する細胞誘引活性が 100 倍以上高まることを見出していた

(Tanegashima et al, *Exp. Cell Res.*, 2010)。このケモタクシスアッセイ系に、候補 GPCR の siRNA ノックダウン実験と cDNA rescue 実験とを組み合わせ、CXCL14 受容体分子の探索を進めた結果、CXCL14 受容体には CXCR4 と GPR14 (オーファン GPCR) という、2 種類の GPCR 分子が必須の役割を果たしていることを見出した。次に、¹²⁵I 標識 CXCL14 の THP-1 細胞に対する特異的結合量を測定した結果、¹²⁵I-CXCL14 に対する高親和性結合は CXCR4 cDNA の過剰発現により増加し、siRNA を介したノックダウンによって減少した (図 1)。また、*in vitro* binding assay においても、CXCR4 は ¹²⁵I-CXCL14 と高親和性で結合した。GPR14 については同様の ¹²⁵I-CXCL14 結合活性は観察されなかったが、GPR14 は細胞内プロセッシングを受けるため、最終結論を得るためにはさらなる生化学的解析が必要である。

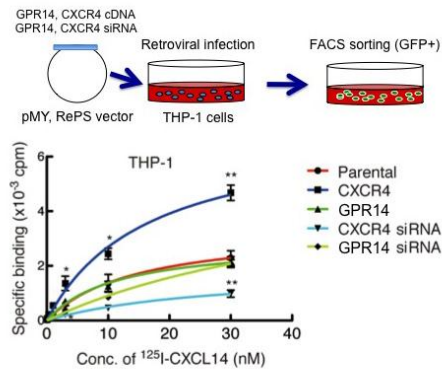


図1. CXCL14は、CXCR4に高親和性で結合する

上記はヒト細胞を用いた実験の結果であるが、CXCR4-KO あるいは GPR14-KO マウス胎仔肝から *in vitro* 分化誘導した未成熟樹状細胞様細胞においても、CXCL14 に対する走化性と CXCL14 刺激後の ERK のリン酸化 (いずれも MA730 抗体存在下) が有意に減弱していた。GPR14 mRNA は、CXCL14 mRNA と同様に、肺・子宮・味蕾などの粘膜系組織に強く発現していた。また、GPR14 mRNA は、CXCL14 反応性の THP-1 細胞に高レベルで発現しており、CXCL14 に反応しない Jurkat 細胞では検出されなかった。

以上の一連の実験結果から、機能的な CXCL14 受容体には、CXCR4 と GPR14 の両者が使われていると結論した。GPR14 と相互作用する成分が CXCL14 の活性と密接に関連しているものと推測される。

CXCR4 は、造血幹細胞や T 細胞の動

員、そして癌細胞の悪性増殖と転移にも関与する重要なケモカイン CXCL12 の受容体である。そこで、CXCL14 が CXCL12 の活性に影響を与えるかどうかについて、次に検討した。驚くべき事に、生理的な濃度の CXCL14 は THP-1, Jurkat, BaF/3 細胞の CXCL12 走化性を完全にブロックした (図 2)。活性阻害を示す濃度 (100 nM) の CXCL14 は、¹²⁵I-CXCL12 の CXCR4 への結合に影響を与えなかった。したがって、CXCL14 による CXCL12 の活性阻害は、CXCR4 上でのリガンド結合部位の競合ではなく、アロステリックな構造変化によるものと推察される。この予想と合致して、CXCL14 で刺激した THP-1 細胞上の CXCR4 は、20 分以内に細胞内に取り込まれ、これは CXCL12 刺激した場合とほぼ同様であった。CXCL14 の単独刺激では ERK のリン酸化はおこらないが、100 nM の CXCL14 は CXCL12 刺激による ERK のリン酸化を顕著にブロックした。以上の一連の実験結果は、CXCL14 が CXCL12 の natural inhibitor として作用することを示唆している。

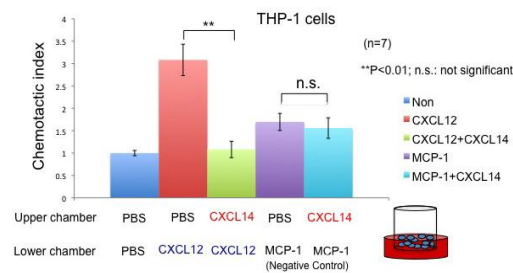


図2. CXCL14は、CXCL12による細胞走化をブロックする

CXCL12-CXCR4 シグナル伝達系は、non-signaling 受容体 CXCR7 によって微調節されていることが知られている。一方、数あるケモカインの中で、CXCL12 と CXCL14 だけはアミノ酸配列が魚類からヒトまで広く保存されている。したがって、CXCL14 は CXCL12-CXCR4 シグナル伝達系を fine tuning するもうひとつの重要な分子であると推察される。また、CXCL14 自身のシグナル伝達には CXCR4 と GPR14 の存在が必要であるという実験事実を考え合わせると、CXCL14 の示す多様な生理的機能は、CXCL14 受容体の活性化と CXCL12 の活性阻害の総和としてとらえていかなければならない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. K. Tanegashima, K. Suzuki, Y. Nakayama, K. Tsuji, A. Shigenaga, A. Otaka, and T. Hara. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS Letters*, 587: 1731-1735, 2013. (doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.046) 査読有
2. T. Hara and K. Tanegashima. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals. *J. Biochem.*, 151: 469-476, 2012. (doi: 10.1093/jb/mvs030) 査読有
3. 種子島幸祐, 原 孝彦. CXCL14. 臨床免疫・アレルギー科, 57: 330-335, 2012. 査読無
4. K. Tsuji, A. Shigenaga, Y. Sumikawa, K. Tanegashima, K. Sato, K. Aihara, T. Hara, and A. Otaka. Application of N to C- or C to N-directed sequential native chemical ligation to the preparation of CXCL14 analogs and their biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.*, 19: 4014-4020, 2011. (doi:10.1016/j.bmc.2011.05.018) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 原 孝彦, 種子島幸祐, 鈴木健司, 辻耕平, 重永 章, 長澤丘司, 大高 章. CXCL12-CXCR4軸を介した幹細胞誘引の調節因子. 第86回日本薬理学会年会 (招待講演). 2013年3月21~23日, 福岡.
2. 種子島幸祐, 鈴木健司, 原 孝彦. ケモカインCXCL14とその受容体を介した脂肪蓄積制御. 第33回日本肥満学会. 2012年10月10~11日, 京都.
3. T. Hara, K. Tanegashima, K. Tsuji, K. Suzuki, Y. Nakayama, A. Shigenaga, T. Nagasawa, M. Mori, and A. Otaka. CXCL14 acts as a natural inhibitor for CXCL12/CXCR4 signaling. Gordon Research Conference "Chemotactic Cytokines" (Invited oral presentation). 2012年5月27日~2012年6月1日, Il Ciocco, Italy.
4. 鈴木健司, 種子島幸祐, 中山由紀, 重永 章, 大高 章, 長澤丘司, 森 正明, 原 孝彦. Identification of G protein coupled receptors which constitute the functional CXCL14 receptors. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月13-16日, 横浜.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : CXCR4 活性阻害ペプチド及びその用途

発明者 : 原 孝彦, 大高 章, 重永 章, 種子島幸祐

権利者 : 原 孝彦, 大高 章, 重永 章, 種子島幸祐

種類 : 特許

番号 : 2011-251758

出願年月日 : 2011 年 11 月 17 日

国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/stem-cell/>

6. 研究組織

(1) 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

・生体分子先端研究分野・副参事研究員

研究者番号 : 80280949

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし