

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 9 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860304

研究課題名(和文) CXCL14とそのレセプターを介した脂肪組織マクロファージの制御

研究課題名(英文) Regulation of macrophage in adipose tissue by CXCL14 and its receptor.

## 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・生体分子先端研究分野・主任研究員

研究者番号：20507678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CXCL14-KOマウスでは、肥満で誘導される脂肪組織の慢性炎症が緩和される。本研究では、CXCL14の作用を解明することにより、その炎症惹起の仕組みを解明することを目標とする。本研究では、CXCL14がTLR9リガンドであるCpG DNAと特異的に結合し、共役因子として働いていることを明らかとした。CXCL14/CpG DNA複合体は樹状細胞やマクロファージへ効率的に取り込まれ、Th1型の炎症性サイトカインの産生を非常に強く増強した。これらの結果は、CXCL14が、新しい形で自然免疫系活性化を担っていることを示している。

研究成果の概要(英文)：Disruption of CXCL14 in mice ameliorates obesity-induced chronic inflammation. We aimed to investigate how CXCL14 activates inflammatory signaling at the molecular level. We found that CXCL14 specifically bound to a TLR9-ligand, CpG DNA and acted as a cofactor. CXCL14/CpG DNA complex was efficiently incorporated into dendritic cells and macrophages and induced robust expression of Th1 type inflammatory cytokines. These results suggested that CXCL14 plays a new role for the activation of the innate immune pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード：CXCL14 炎症

1. 研究開始当初の背景

CXCL14 ノックアウトマウスでは、肥満で誘導される脂肪組織の慢性炎症と全身のインスリン抵抗性が緩和される。しかし、CXCL14の慢性炎症への関与に対する分子メカニズムについては、CXCL14の生化学的な作用が未解明のため、不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、CXCL14とその共役因子、およびレセプターへの作用を詳細に解明することにより、マクロファージなどの炎症性の免疫細胞への作用を解明し、CXCL14に依存した炎症反応の進展の仕組みを解明することを目標とする。

3. 研究の方法

放射性標識した CXCL14 を用いて、CXCR4 に対する結合様式を検討した。また、CXCL14 の CXCR4 エンドサイトーシスの誘導を解析するため、FACS を用いて、CXCR4 の細胞表面のレベルを解析した。さらに、CXCL12 活性に対する影響を調べるため、ケモタキシスアッセイを行った。CXCL14 ノックアウト (KO) マウスについては、脂肪組織を採取し、qRT-PCR により遺伝子発現を解析した。マクロファージや樹状細胞は、マウス骨髄より mCSF、または GM-CSF+IL-4 により誘導したものをを用いた。CpG DNA は C-Class の代表的な CpG DNA である ODN2395 (5'-t\*c\*g\*t\*c\*g\*t\*t\*t\*c\*g\*g\*c\*g\*c\*g\*c\*g\*c\*c\*g-3': \*はホスホロチオネート結合)を用いて実験を行った。Cy3 標識は合成の際に 5' 端に導入した。CXCL14 は徳島大学との共同研究によりペプチド合成を行った。標識は 3' 末端にリジン残基を導入し、そのアミノ基に biotin および Alexa-488 を結合させて標識した。

4. 研究成果

(1) CXCL14 結合分子の単離

CXCL14 がケモカインレセプターの一つ CXCR4 に結合し、CXCR4 アンタゴニストとして働くことを初めて見いだした。また、CXCL14 の CXCR4 アンタゴニストとしての効果の生化学的な解析をすすめた。CXCL14 は、CXCR4 に結合し、CXCR4 の細胞表面から細胞内への internalization を誘導することにより、CXCL12 活性を阻害する事を明らかにした。また、CXCL14 の C 末端部分が CXCR4 結合に必須であり、C 末端部分をダイマー化した合成ペプチドが、CXCL14 と同様の CXCR4 阻害活性を示し、新しいタイプの CXCR4 アンタゴニストである事を明らかにした。これらの結果を 2 報の論文にまとめ、発表した(Tanegashima et al., 2013a, b)。

(2) CXCL14-KO マウスの M2 マクロファージマーカー発現の解析

脂肪組織を用いた RT-PCR により、炎症性マクロファージと拮抗して抗炎症性作用を示す M2 マクロファージのマーカー (CD206) の mRNA が、CXCL14KO マウスにおいて上昇している事が明らかとなった。このことが、肥満性糖尿病病態における炎症反応の軽減に寄与する可能性が考えられる。

(3) CXCL14 による Toll-like 受容体 (TLR)-9 シグナルの増強とその分子機構

CXCL14 による CXCR4 の結合と CXCL12 シグナルの阻害は明らかとなったものの、CXCL14 ノックアウトマウスや Tg マウスの表現型から予測される炎症促進作用は、このメカニズムだけでは説明できない。炎症反応を仲介するシグナル経路として、自然免疫系に関与する Toll-like 受容体 (TLR) 経路があり、細菌や自己由来の分子による炎症惹起に重要な役割を果たしている。そこで、CXCL14 の炎症との関連について骨髄由来樹状細胞とマクロファージを用いて TLR リガンドと CXCL14 の共処理実験を行う事で検討した。すると、TLR-9 のリガンドである CpG DNA と CXCL14 の共処理により、IL-12p40, IL-6, Tnf- $\alpha$  といった炎症性サイトカインが誘導される事が明らかとなった。これらの発現誘導は TLR9-KO 細胞で完全にキャンセルされた。このメカニズムを探るため、Cy3 でラベルした CpG DNA (Cy3-CpG DNA) の細胞内への取り込みを観察したところ、CXCL14 との共処理により、CpG DNA 細胞内への取り込みが促進されていることがわかった (Fig.1)。これらの結果は、核酸 TLR リガンドの取り込みの促進というこれまで知られていなかった新しいメカニズムで CXCL14 が炎症反応を制御している事を示唆している。このメカニズムについて、CXCL14 は塩基性のタンパク質であるため、負の電荷をもつ核酸との直接の相互作用があるのではないかと考えた。そこで、CXCL14-biotin 選択的修飾タンパク (Tsuji et al., 2015) と Cy3-CpG DNA の結合実験を行った。すると、中性条件で CXCL14 は、CpG DNA の一つである ODN2395 と  $K_d$ =約 10 nM の高親和性で結合することが明らかとなった。エンドソームやリソソームの酸性条件ではこの高親和性はキャンセルされ、迅速に ( $K_{off}$ =7 min) 複合体が解離した。また、この結合はヘパリンにより阻害されることから、CXCL14 のヘパリン結合サイトが関与する事が示唆された。これらの結果から、CXCL14 は CpG DNA に特異的に高親和性結合し、この複合体が樹状細胞、マクロファージなどの免疫細胞のエンドソームやリソソームに取り込まれ、その酸

性条件で複合体解離して、エンドソームやリソソームに存在する TLR-9 を活性化することによって炎症反応を惹起する事が明らかとなった (Fig. 2)。本研究の成果として、これらの新しい CXCL14 による免疫賦活化核酸の送達システムの原理を特許出願した (特願 2016-091183)。

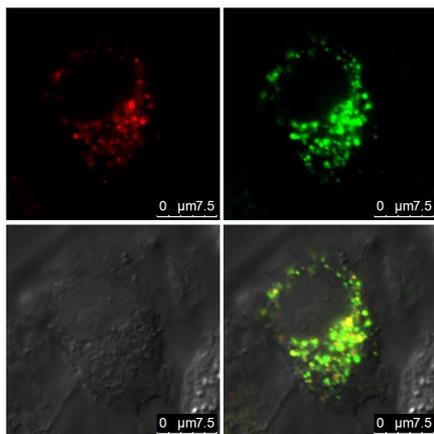


Fig. 1 骨髄由来樹状細胞への CpG DNA の取り込み

Cy3-CpG DNA(赤)と CXCL14-Alexa488 (緑)で共処理した樹状細胞を共焦点顕微鏡で観察した。CXCL14 と CpG DNA の複合体が細胞に取り込まれている様子が観察された。

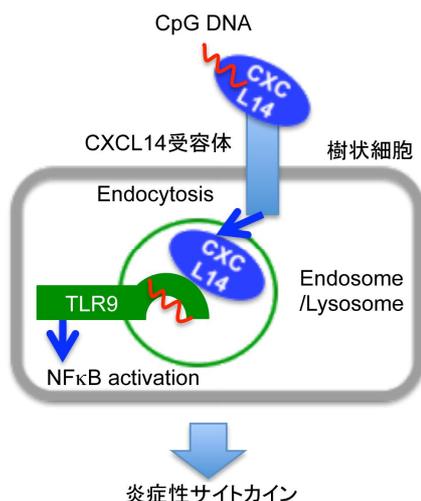


Fig. 2 CXCL14 と CpG DNA による炎症惹起の分子メカニズム

本研究の結果、(1) CXCL14 は CpG DNA に結合し、複合体形成する。(2)樹状細胞、マクロファージなどの免疫細胞のエンドソームやリソソームに受容体を介して取り込まれる。(3) エンドソームやリソソームの酸性条件で複合体解離して、エンドソームやリソソームに存

在する TLR 9 へと CpG DNA を受け渡す。これらのプロセスによって炎症反応を惹起する事が明らかとなった。

#### (4) CXCL14-KO マウスの CpG DNA への反応性

CXCL14-KOの炎症の減弱が CpG DNA への反応性で説明できるかどうかを検討するため、CXCL14-KO マウスに CpG DNA を全身性に投与する実験を行った。コントロールマウスに CpG DNA を尾静脈注射すると、炎症性サイトカインが上昇し、脾臓の活性化樹状細胞の割合も上昇した。これに対して CXCL14-KO マウスでは、これらの活性化がキャンセルされており、生理的な濃度でも CXCL14 が CpG DNA による炎症惹起に必須であることが示唆された。肥満における慢性炎症の際にも組織損傷により cell-free DNA が放出されることが示されていることから (Nishimoto et al. (2016) Science Advances 2:e1501332)、CXCL14 がこれらの自己組織由来の DNA と協調的に炎症を進展させている可能性がある。

#### (5) CpG DNA/CXCL14 経路は CXCR4 および CpG DNA 受容体 DEC205 とは独立である。

CpG DNA の骨髄由来樹状細胞への結合を FACS による蛍光強度の測定により調べたところ、CXCL14 の添加により、CpG DNA の細胞への高親和性結合が大幅に増強されていることが明らかとなった。このことは発現の高い CpG DNA/CXCL14 受容体が骨髄由来樹状細胞に存在していることを示唆している。この受容体分子の分子的な実体について、CXCL14 受容体 CXCR4、および CpG DNA の受容体として知られている DEC205 との関連について調べた。CXCR4 のコンディショナルノックアウトマウスの骨髄由来樹状細胞を用いて結合実験を行ったところ、コントロールの骨髄由来樹状細胞と同程度の結合量を示し、CXCR4 の CpG DNA/CXCL14 複合体結合への寄与は非常に小さいことが明らかとなった。また、DEC205 の過剰発現細胞への CpG DNA への結合は、CXCL14 によってむしろ阻害された。これらの結果から、これらの既知の受容体分子は CpG DNA/CXCL14 複合体の結合に重要な役割を果たしていないことが示唆される。今後は CpG DNA/CXCL14 複合体の受容体について探索を行う予定である。

#### 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 6 件 )

1. Tsuji K, Tanegashima K, Sato K, Sakamoto K, Shigenaga A, Inokuma T, Hara T, Otaka A.

Efficient one-pot synthesis of CXCL14 and its derivative using an N-sulfanylethylanilide peptide as a peptide thioester equivalent and their biological evaluation. **Bioorg Med Chem.** (2015) 23, 5909-5914. doi: 10.1016/j.bmc.2015.06.064. (査読あり)

2. Kodaka Y, Tanaka K, Kitajima K, Tanegashima K, Matsuda R, Hara T. LIM homeobox transcription factor Lhx2 inhibits skeletal muscle differentiation in part via transcriptional activation of Msx1 and Msx2. **Exp Cell Res.** (2014) 331,309-319. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.11.009. (査読あり)

3. Hara T, Tanegashima K. CXCL14 antagonizes the CXCL12-CXCR4 signaling axis (2014). **Biomol Concepts.** 5, 167-173. doi: 10.1515/bmc-2014-0007 (査読あり)

4. Tsuji K., Tanegashima K., Shigenaga A., Aihara K., Denda M., Ding H., Hara T., and Otaka A. Synthesis of antagonistic peptide for putative CXCL14 receptor protein and their identification. **Peptide Science** (2013) 2013, 31-32. <https://www.prf.or.jp/psb.html> (査読あり)

5. Tanegashima K, Tsuji K, Suzuki K, Shigenaga A, Otaka A, Hara T. Dimeric peptides of the C-terminal region of CXCL14 function as CXCL12 inhibitors. **FEBS Lett.** (2013b) 587, 3770-3775. doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.017 (査読あり)

6. Tanegashima K, Suzuki K, Nakayama Y, Tsuji K, Shigenaga A, Otaka A, Hara T. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. **FEBS Lett.** (2013a) 587:1731-1735. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.046. (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 種子島幸祐, 佐藤由紀子, 西藤 泰昌, 相垣 敏郎, 原 孝彦.  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸による HDAC の阻害は Glut1 の発現上昇を介して脳グルコース恒常性に寄与する. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 1 日-4 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) (ポスター発表).

2. Tanegashima K., Yokote N., Suzuki M. Y., Michiue T., Hara T. Functional interaction between Latrophilin-2 and Teneurin-2/4 in the migration of neural crest cells. 第 48 回日本発生生物学会年会, 2015 年 6 月 2 日-5 日, 筑波国際会議場 (茨城県つくば市). (口頭発表およびポスター発表)

3. Tanegashima K., Ohta S., K. Suzuki, K. Tsuji,

A. Shigenaga, A. Otaka, T. Hara. Modulation of CXCR4-mediated signaling pathway by CXCL14. CBSM International Joint Symposium, 2014.6.20-21, Andong, Korea. (ポスター発表)

4. Tanegashima K., Suzuki M. Y., Suzuki K., Michiue T., Hara T. Latrophilin-2 is involved in the migration and differentiation of neural crest cells. 第 47 回日本発生生物学会年会, 2014 年 5 月 28 日-30 日, ウィンク愛知 (愛知県名古屋市) (口頭発表およびポスター発表)

5. 種子島幸祐, 鈴木健司, 辻 耕平, 重永章, 大高 章, 原 孝彦. ケモカイン CXCL14 は, CXCL12-CXCR4 シグナル経路を阻害する. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日-6 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) (ポスター発表).

6. Tanegashima K., Suzuki K., Nagasawa T., Hara T. Identification of The CXCL14 Receptor: CXCL14 is a Natural Inhibitor of The CXCL12/CXCR4 Axis. 第 11 回幹細胞シンポジウム, 2013 年 5 月 17-18 日, 東京大学本郷キャンパス (東京都文京区) (ポスター発表).

〔図書〕(計 1 件)

1. 原 孝彦, 種子島 幸祐 『ケモカインと幹細胞』 CXCL12-CXCR4 軸を介した幹細胞誘引の調節因子 (2014) 日本薬理学雑誌 144: 4-7.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ケモカイン CXCL14 を利用した自然免疫活性化アジュバント  
発明者: 種子島 幸祐, 原 孝彦, 大高 章, 重永章, 高橋 伶奈, 辻 耕平  
権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所, 徳島大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-091183  
出願年月日: 2016 年 4 月 28 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔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 種子島 幸祐 (TANEGASHIMA, Kosuke) 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・主任研究員  
研究者番号: 20507678