

38	CXCL14が認識する警告物質の同定と受容体の機能解明	原 孝彦
----	-----------------------------	------

【目的】 ケモカイン CXCL14 は、非メチル化 CpG の連続配列を持つ DNA (CpG DNA) と複合体を形成することで細胞内取り込みと Toll-like receptor 9 (TLR9) 経路の活性化を促進する。我々は最近、膜タンパク質 Igsf8 が CpG DNA-CXCL14 の細胞内取り込み受容体として働いていることを発見した。さらに、脂質の取込み受容体である CD36 も CpG DNA-CXCL14 に結合するが、CD36 は TLR9 経路を抑制する働きを担っていることが判明した。本研究では、CXCL14 が認識する DNA の特異性を検証するとともに、自然免疫反応における Igsf8 と CD36 の生理的役割を解明することを目指した。

【方法】 DNA-CXCL14 との結合能、細胞内取り込み能、サイトカイン誘導能の解析には、ヒト胎児腎臓由来 293T 細胞株、マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞株、そして C57BL/6N マウスの骨髄から取り出して分化誘導させた Bone marrow-derived macrophage (BMDM) を用いた。動物実験には、CRISPR-Cas9 システムを利用して作出した *Igsf8*-KO マウスと外部から購入した *CD36*-KO マウスを用いた。FACS や Enzyme-linked immunosorbent assay 等の実験方法の詳細は、先行論文に記載した。統計解析には Prism 8 software (GraphPad) を使い、Two-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 によって統計的有意差を検定した。

【結果】 CXCL14 が非メチル化 CpG DNA だけでなく、cGAS/STING 経路のリガンドである double strand DNA (dsDNA) にも結合するかどうかを調べた。dsDNA の代表として Interferon stimulatory DNA (ISD) を Cy3-標識して、結合と取り込み実験を行った。293T 細胞に *Igsf8* あるいは類縁の *Igsf* を発現させ、CXCL14 有る無し条件下で結合実験を行った結果、CXCL14 存在下では、ISD は *Igsf8*、*Igsf3*、*Rage* タンパク質と強く結合した。また、Cy3-ISD の細胞内取り込みは、CXCL14 存在下でのみ有意に上昇した。ワクチンアジュバントとして使用されている Alum は、自己 dsDNA を介した免疫反応に関与していることが示唆されている。そこで、Alum の CXCL14 および ISD に対する結合能を調べた。Alum は ISD に直接結合したが、CXCL14 存在下では ISD との結合が増強されることが判明した。さらに、BMDM を Alum、CXCL14、ISD で同時に刺激した場合だけ、*IFN-β* の分泌量が有意に増加した。マウスの免疫実験では、Alum は SARS-CoV2 Spike タンパク質に対する IgG1 抗体価を上昇させたが、*Igsf8*-KO マウスではこの抗体価上昇は起こらなかった。したがって、Alum/CXCL14/dsDNA 複合体は、*Igsf8* と結合して細胞内へ取り込まれ、*IFN-β* 分泌経路を活性化している可能性が示唆された。最後に同系メラノーマ移植マウスモデルを用いて、WT マウスと *CD36*-KO マウス腫瘍の遺伝子発現比較を行った。その結果、炎症抑制サイトカインをコードする *Il-10* mRNA の発現レベルが、*CD36*-KO マウスの腫瘍では有意に低下していた。この実験結果は、CD36 は IL-10 の分泌誘導を介して、CpG ODN-CXCL14 刺激による TLR9 経路の活性化 (=抗がん免疫) を負に制御している可能性を示唆している。

Igsf8 と CD36 を介して調節される CpG DNA-CXCL14 による自然免疫応答 (総括図)

