

福井 宣規

九州大学生体防御医学研究所・教授

細胞骨格制御シグナルを標的とした免疫難病治療の新戦略

§1. 研究実施の概要

本研究では、免疫系に発現する CDM ファミリー分子を対象に、発生工学・実験病理学・分子イメージング・プロテオミクス・構造生物学・ケミカルバイオロジーを融合したアプローチにより、これら分子の機能とシグナル伝達機構を包括的に解析し、その理解に立脚して、免疫難病の新しい治療法や予防法を開発することを目的としている。これまでに DOCK2 がリンパ球、好中球、形質細胞様樹状細胞の遊走や活性化を制御する Rac 活性化分子であることを明らかにしたが、マクロファージや骨髄系樹状細胞では、DOCK2 欠損の影響は認められない。これは DOCK180 といった他の Rac 活性化分子による代償機能が働いているためと考えられる。そこで本年度は、DOCK180 のノックアウトマウスを作製し、この分子がケモカイン受容体 CXCR4 の下流で機能し、心血管系の発生に重要な役割を演じることを明らかにすると共に、LysM Cre のシステムを用いて、マクロファージにおいて DOCK2 および DOCK180 の発現を欠くマウスを樹立した。また、2種類の CDM ファミリー分子に関して、その DHR-2 ドメインと対応する低分子量 G タンパク質との複合体の構造決定を行うと共に、DOCK2 シグナル阻害剤開発のためのハイスループットスクリーニングを実施し、322 種類のヒット化合物を得た。さらに、新たにノックアウトマウスやノックインマウスを樹立し、CDM ファミリー分子群の機能およびシグナル伝達機構につき、詳細な解析を行った。本研究の成果は自己免疫疾患や移植片拒絶といった現代医学が解決を迫られている難病の克服に貢献できると期待される。

§ 2. 研究実施体制

(1)「機能・シグナル解析」グループ

- ① 研究分担グループ長: 福井 宣規 (九州大学生体防御医学研究所、教授) (研究代表者)
- ② 研究項目
 - ・ CDM ファミリー分子の機能とシグナル伝達機構の解明

(2)「構造解析」グループ

- ① 研究分担グループ長: 横山 茂之 (理化学研究所、領域長) (主たる共同研究者)

② 研究項目

- ・ CDM ファミリー分子群の構造解析

(3)「創薬研究」グループ

- ① 研究分担グループ長:武藤 誠太郎 (アステラス製薬、研究副本部長)(主たる共同研究者)

② 研究項目

- ・ CDM ファミリー分子のシグナル伝達を阻害する低分子化合物の探索

§3. 研究実施内容

A. CDM ファミリー分子の機能とシグナル伝達機構の解明

1. DOCK2 はリンパ球、好中球、形質細胞様樹状細胞の遊走や活性化を制御する Rac 活性化分子であるが、マクロファージや骨髄系樹状細胞では、DOCK2 欠損の影響は認められない。これは、DOCK2 欠損の影響が、DOCK180 といった他の Rac 活性化分子によって機能的に代償されているためと考えられる。そこで DOCK180 の生理的機能を明らかにするため、コンディショナル KO マウスを作製した。すべての細胞系譜で DOCK180 を欠損させたマウスは全例、心室中隔欠損 (VSD) と両大血管右室起始症(DORV)を呈し、全身の浮腫を伴い胎生後期に死亡した。また、DOCK180 欠損マウス胎児では midgut における血管形成に異常が認められた。これらの表現型はケモカイン受容体 CXCR4 の欠損マウスのそれと類似していることから、DOCK180 KO マウスから血管内皮細胞を単離し、CXCL12 で刺激したところ、Rac 活性化およびラッフル膜形成が顕著に障害されていた。以上より、DOCK180 が血管内皮細胞において CXCR4 の下流で機能する Rac 活性化分子であり、心血管形成に重要な役割を演じることを明らかにした。また、DOCK180 が dorsal ruffle 形成に重要であることを見だし、その制御機構の一端を解明した。さらに、LysM Cre のシステムを用いて、マクロファージにおいて DOCK2 および DOCK180 の発現を欠くマウスを樹立し、免疫細胞における DOCK180 の機能解析に着手した。
2. 形質細胞様樹状細胞 (pDC) は、微生物由来の核酸を細胞内に存在する TLR7/TLR9 を介して認識することで、炎症性サイトカインのみならず、大量の I 型インターフェロン (IFN) を産生することから、近年脚光を集めている細胞である。本年度、DOCK2 が pDC において I 型 IFN の産生を選択的に制御していることを見だし、そのメカニズムの解析を行った。その結果、TLR による抗原認識とは独立して DOCK2-Rac シグナル伝達系が作動し、IKK- α の活性化を介して、I 型 IFN 産生を選択的に制御するという、新しい制御機構の存在を明らかにした²⁾。pDC による I 型 IFN の産生は、SLE や乾癬といった自己免疫疾患の発症に深

く関わっていることから、DOCK2 はこのような疾患を治療・予防する上で、格好の分子標的になると期待される。

3. リンパ球に発現するインテグリンとして LFA-1 や VLA-4 が知られており、それぞれ ICAM-1/ICAM-2 や VCAM-1 をリガンドとして接着応答を惹起する。これらインテグリンのリンパ球ホーミングにおける役割を解明する為、ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1 のノックアウトマウスを用いた解析を行った。その結果、末梢リンパ節の HEV との接着応答は主に ICAM-1 によって担われているが、いずれのインテグリンも transendothelial migration やリンパ組織での運動には必須ではないことが明らかとなった³⁾。
4. ケモカインによる T 細胞の共刺激活性が、DOCK2-Rac シグナル経路に依存することを実証すると共に⁴⁾、DOCK2 が B 細胞受容体の下流で機能する Rac 活性化分子であることを見だし、B 細胞の分化や活性化、抗体産生における DOCK2 の機能解析に着手した。
5. 完全長 DOCK2 を、DOCK2 の発現を欠くプライマリー T 細胞に効率よく発現させる実験系を構築し、これを用いて、DOCK2 の活性化に重要なアミノ酸残基を複数同定した。うち1つは DOCK2 のリン酸化部位であり、このリン酸化に関与すると考えられる候補キナーゼを同定すると共に、DOCK2 活性化におけるリン酸化修飾の生理的意義を明らかにするため、その部位に1アミノ酸変異を導入したノックインマウスを、新たに樹立した。
6. 遺伝子改変マウスを用いて、DOCKX や DOCKW、DOCKZ の機能を解析し、その制御機構の一端を明らかにした。

B. CDM ファミリー分子群の構造解析

4 種類の CDM ファミリー分子を対象に、その DHR-2 ドメインと対応する低分子量 G タンパク質との複合体の試料調製および結晶化の条件検討を行った。うち2つの複合体に関して、結晶化と構造決定に成功した。また、完全長 DOCK2、DOCK180 の構造解析に向けて、性質の悪い部分を取り除いた全長タンパク質の精製と結晶化の条件検討を行った。

C. CDM ファミリー分子のシグナル伝達を阻害する低分子化合物の探索

アステラスライブラリー化合物を対象として、DOCK2 による Rac 活性化を指標に、ハイスループットスクリーニング (HTS) を実施した。具体的には、20 μM の 1 点濃度で実施した試験において 25% 以上の阻害活性を再現性よく示した化合物 1928 個を選択し、11 点濃度での用量依存性評価を、HTS 系及びネガティブスクリーニング系 (DOCK2 非依存的な Rac 活性化に対する阻害活性評価) を用いて実施した。その結果、用量依存的に DOCK2 による Rac 活性化を阻害する 322 化合物をヒットとして得て、これらの中から最終的に 2 種類の骨格の異なる化合物群が構造活性相関を示すことを見出した。また、CFSE 染色した B6 マウスの脾細胞を B6D2F1 レシピエントマウス

に移入することにより、in vivo 混合リンパ球反応(MLR)モデルを作製した。この反応は DOCK2 KO マウス (B6 バックグラウンド) の脾細胞を移入した場合には強く阻害されていたことから、in vitro スクリーニングにより選択された DOCK2 阻害化合物を評価する in vivo アッセイ系として使用できる。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1 Sanematsu F, Hirashima M, Laurin M, Takii R, Nishikimi A, Kitajima K, Ding G, Murata Y, Tanaka Y, Masuko S, Suda T, Meno C, Côté JF, Nagasawa T, Fukui Y: Dock180 is a Rac activator that regulates cardiovascular development by acting downstream of CXCR4. *Circ. Res.* 107: 1102-1105, 2010 (DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223388)
- 2 Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Nakamura R, Yamada H, Maeda N, Ishikawa T, Hoshino K, Uruno T, Cao Q, Higashi S, Kawaguchi Y, Enjoji M, Takayanagi R, Kaisho T, Yoshikai Y, Fukui Y: Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. *J. Exp. Med.*, 207: 721-730, 2010 (DOI: 10.1084/jem.20091776)
- 3 Boscacci RT, Pfeiffer F, Gollmer K, Sevilla AC, Martin AM, Soriano SF, Natale D, Henrickson SE, Andrian UH, Fukui Y, Mellado M, Deutsch U, Engelhardt B, Stein JV: Comprehensive analysis of lymph node stroma-expressed Ig superfamily members reveals redundant and non-redundant roles for ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in lymphocyte homing. *Blood*, 116: 915-925, 2010 (DOI: 10.1182/blood-2009-11-254334)
- 4 Kumar V, Scandella E, Danuser R, Onder L, Nitschke M, Fukui Y, Halin C, Ludewig B, Stein JV: Global lymphoid tissue remodeling during a viral infection is orchestrated by a B cell-lymphotoxin-dependent pathway. *Blood*, 115: 4725-4733, 2010 (DOI: 10.1182/blood-2009-10-250118)