

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」  
平成 20 年度採択研究代表者

福井 宣規

九州大学生体防御医学研究所免疫遺伝学分野・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。本年度は、形質細胞様樹状細胞 (pDC) の活性化における DOCK2 の役割を解析し、核酸リガンドの取り込みに伴い、Toll-like 受容体 (TLR) による認識とは独立して DOCK2-Rac シグナル伝達系が作動し、IKK- $\alpha$  の活性化を介して、I 型インターフェロン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。また、構造解析に向けてタンパク質試料の調整を行うと共に、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系を構築し、数十万種類の化合物を対象にスクリーニングを開始した。さらに、新たにノックアウトマウスを樹立し、CDM ファミリー分子群の機能およびシグナル伝達機構の解析を行った。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、教授)

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)

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:古市 喜義(アステラス製薬、常勤顧問)

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

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

#### 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. 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。pDC 活性化における DOCK2 の役割を解析する目的で、CpG DNA や R848 といった TLR リガンドで pDC を刺激したところ、DOCK2 欠損 pDC では IL-12p40、IL-6 といった炎症性サイトカインは正常に産生されるにも関わらず、I 型 IFN の産生が著しく低下することを見出した。同様の知見は、pDC にウイルスを感染させた場合においても認められた。このことから、DOCK2 は pDC において I 型 IFN の産生を選択的に制御していることが明らかとなった。

DOCK2 欠損 pDC においても、CpG DNA の取り込みは正常に起こる。しかしながら、野生型 pDC では CpG DNA 刺激に伴いアクチン重合が惹起されるのに対して、DOCK2 欠損 pDC ではこのような形態変化が全く起こらなかった。このアクチン重合は、CpG DNA をコートしたマイクロビーズで刺激した際にも認められることから、TLR9 による認識とは無関係に、細胞表面で惹起されていると考えられた。事実、TLR9 欠損 pDC を CpG DNA で刺激した場合にも、アクチン重合が観察された。野生型 pDC や TLR9 欠損 pDC では、種々の TLR リガンド刺激に伴い Rac が活性化されるが、DOCK2 欠損 pDC では、この活性化がほぼ完全に消失していた。一方、野生型 pDC にドミナントネガティブ Rac 変異体を発現させると、IL-12p40 のレベルに影響を与えることなく、I 型 IFN の産生が顕著に抑制された。このことから、核酸リガンドは TLR 非依存的、DOCK2 依存的なメカニズムにより Rac を活性化し、この Rac 活性化が I 型 IFN 産生に重要な役割を演じていることが明らかとなった。

pDC において、IRF-7 は I 型 IFN の産生に必須の転写因子であり、その活性化は IKK- $\alpha$  によって制御されている。野生型 pDC を CpG DNA で刺激すると、活性化ループ上のセリン残基がリン酸化される。しかしながら、DOCK2 欠損 pDC では、この IKK- $\alpha$  の活性

化が障害されており、その結果 IRF-7 の核移行が起こらなかった。同様の結果は、TLR9 欠損 pDC においても認められた。以上より、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- $\alpha$  の活性化を介して、I 型インターフェロン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<sup>1)</sup>。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。

2. 好中球遊走における DOCK2 細胞内動態の制御機構を解析し、ホスファチジルイノシトール3リン酸 (PIP3) とホスファチジン酸 (PA) という二種類のリン脂質が順序立てて産生され、DOCK2 を適切な時期に適切な位置に導くことにより、仮足の形成に必要なアクチンの重合を、時間的・空間的に制御していることを明らかにした<sup>3)</sup>。
3. ケモカインによる T 細胞の共刺激活性が、DOCK2-Rac シグナル系に依存することを実証すると共に<sup>4)</sup>、DOCK2 が DOCK180 と協調して、T 前駆細胞の胸腺への移入を制御すること<sup>5)</sup>、DOCK2 がミクログリアにおいても機能すること<sup>6)</sup>、を明らかにした。また、新たに数種類 DOCK2 と会合する分子を同定した。
4. 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、遺伝子導入により DOCK2 欠損 T 細胞の運動性が回復することを実証した。この実験系は、DOCK2 変異体の機能解析を進めていく上で、極めて重要な方法論になると期待される。
5. DOCK180 の生理的機能の一端を解明すると共に (論文準備中)、遺伝子改変マウスを用いて、DOCKX の機能やシグナル伝達機構、自己免疫疾患の発症や移植片拒絶における役割を検討した。また、涙腺の免疫組織形成<sup>7)</sup> やウイルス感染に伴うリンパ組織再構築<sup>2)</sup> の分子機構の一端を解明した。

## B. CDMファミリー分子群の構造解析

CDM ファミリー分子の DHR-2 ドメインについて、対応する低分子量 G タンパク質との複合体の構造解析に向け、十分量の良好な性質のタンパク質試料を用意した。また、DOCK2 の N 末端領域と ELMO の複合体の構造情報を取得し、創薬の標的としての特異性を検討した。さらに、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条件の検討を行った。その結果、ある種の添加物により精製過程のタンパク質凝集が抑制され、純度の向上した試料が得られた。

## 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

DOCK2 シグナル伝達系に対する阻害化合物探索の為に、DOCK2 により活性化される GTP 結

合型 Rac を特異的に検出するアッセイ系 (96 ウェルプレート対応可能な系) を構築した。このハイスループットスクリーニング (HTS) プロトタイプを基に、384 ウェル化及びオートメーション化に対応できる系へと検討を行い、最終的に HTS 系として最適化に成功した。次に HTS 実施 (プレート約 4000 枚程度のアッセイ) に必要なタンパクサンプルや試薬類の大量調製、資材の調達、及びパイロットスクリーニングを実施し、詳細なスクリーニング条件 (化合物濃度等) を設定し、実際のスクリーニングを開始した。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ・論文詳細情報

1. 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.*, in press, 2010 (DOI: 10.1084/jem.20091776)
2. Kumar V, Scandella E, Danuser R, Onder L, Nitschke M, Fukui Y, Halin C, Ludewig B, Stein VJ: Global lymphoid tissue remodeling during a viral infection is orchestrated by a B cell-lymphotoxin-dependent pathway. *Blood*, in press, 2010 (DOI: 10.1182/blood-2009-10-250118)
3. Nishikimi A, Fukuhara H, Su W, Hongu T, Takasuga S, Mihara H, Cao Q, Sanematsu F, Kanai M, Hasegawa H, Tanaka Y, Shibasaki M, Kanaho Y, Sasaki T, Frohman MA, Fukui Y: Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science* 324: 384-387, 2009 (DOI: 10.1126/science.1170179)
4. Gollmer K, Asperti-Boursin F, Tanaka Y, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, Peterson JR, Fukui Y, Donnadieu E, Stein JV: CCL21 mediates CD4<sup>+</sup> T cell costimulation via a DOCK2<sup>Rac</sup>-dependent pathway. *Blood* 114: 580-588, 2009 (DOI: 10.1182/blood-2009-01-200923)
5. Lei Y, Liu C, Saito F, Fukui Y, Takahama Y: Role of DOCK2 and DOCK180 in fetal thymus colonization. *Eur. J. Immunol.* 39: 2695-2702, 2009 (DOI: 10.1002/eji.200939630)
6. Cimino PJ, Sokal I, Leverenz J, Fukui Y, Montine TJ: DOCK2 is microglial

specific regulator of CNS innate immunity found in normal and Alzheimer's disease brain. *Am. J. Pathol.* 175: 1622-1630, 2009 (DOI: 10.2353/ajpath.2009.090443)

7. Nagatake T, Fukuyama S, Kim DY, Goda K, Igarashi O, Sato S, Nochi T, Sagara H, Yokota Y, Jetten AM, Kaisho T, Akira A, Mimuro H, Sasakawa C, Fukui Y, Fujihashi K, Akiyama T, Inoue J, Enninger JM, Kunisawa J, Kiyono H: Id2- ROR $\gamma$ t-, and LT $\beta$ R-independent lymphoid organogenesis in ocular immunity. *J. Exp. Med.* 206: 2351-2364, 2009 (DOI: 10.1084/jem.2009143)