

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. 研究実施体制

(1)「機能・シグナル解析」グループ

- ① 研究代表者：福井 宣規（九州大学生体防御医学研究所、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 主たる共同研究者：横山 茂之（理化学研究所横山構造生物学研究室、上席研究員）
- 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 主たる共同研究者：俵 修一（アステラス製薬(株) 研究本部、海外研究担当）
- 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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

1. 哺乳類において、全部で11種類のDOCKファミリー分子が発現しているおり、これらはその構造や低分子量 G タンパク質に対する特異性から 4 群に分類される。DOCK8 は DOCK-C ファミリーに属する分子であり、その変異は、ヒトにおいて複合型免疫不全症を惹起することが知られているが、その生理的機能の詳細は不明であった。「機能・シグナル解析」グループでは、ノックアウトマウスを新たに作成することで、DOCK8 を欠損した樹状細胞は、リンパ節実質への集積が障害されており、その結果 T 細胞を活性化できないことを見出した。DOCK8 欠損樹状細胞は、障害物のない二次元環境下では正常に動くことができるが、コラーゲンファイバー間隙の遊走や、subcapsular sinus floor の通過がひどく障害されていた。さらに、DOCK8 が Cdc42 特異的な GEF であることを明らかにし、「構造解析」グループと共同して、DHR-2 ドメインと Cdc42 の複合体の構造決定に成功した。DOCK8 欠損樹状細胞において、Cdc42 の活性化は障害されていなかったが、活性化した Cdc42 が先端端の膜に局在せず、結果として、アメーバ様の極性形成と運動性が顕著に障害されていた。以上より、DOCK8 は活性化 Cdc42 の局在を制御することで、樹状細胞の間質組織内での遊走を制御していることが明らかとなった¹⁾。
2. DOCK2 の発現は免疫細胞特異的であり、その欠損によりアロ移植心臓の長期生着が可能になり、自己免疫性モデルマウスの疾患発症を完全にブロックできる。このことから、DOCK2 は免疫難病を治療あるいは予防するための分子標的になると期待される。「機能・シグナル解析」グループでは、DOCK2 の DHR-2 ドメインに直接作用することにより、Rac の活性化を抑制する化合物として CPYPP を同定した。CPYPP をリンパ球に加えても、細胞の viability には影響を与えない。しかしながら、リンパ球を CPYPP で処理することで、ケモカイン受容体や抗原受容体を介した Rac 活性化がブロックされ、その結果遊走応答や増殖応答が顕著に抑制された。また、DOCK2 欠損の場合と同様に、形質細胞様樹状細胞を CPYPP で処理することで、TLR9 を介した I 型インターフェロンの産生が選択的に抑制された。以上より、DOCK2 を介した炎症応答を化合物を使って抑制できることを初めて実証した²⁾。
3. DOCK2 DHR-2 ドメインは、lobe A、lobe B、lobe C の 3 つの保存された構造小単位からなり、lobe B と lobe C を介して Rac と会合する。一方 lobe A は、二量体形成に関わっているが、その機能的意義は不明であった。「機能・シグナル解析」グループでは、lobe A を欠損した変異体 (Δ lobe A) を用いて、DOCK2 二量体形成の役割を *in vitro* および *in vivo* で解析した。リコンビナントタンパク質を用いた解析から、lobe A は DHR-2 ドメインの二量体形成に必須であったが、その欠損は Rac GEF 活性に影響を与えなかった。しかしながら、

DOCK2を欠損したT細胞に野生型のDOCK2および Δ lobe Aを発現させ、その遊走応答を解析した結果、野生型のDOCK2を発現した場合と異なり、 Δ lobe Aを発現する細胞では運動性の回復が認められず、これに一致してRac活性化も障害されていた。以上より、細胞膜上でのRacの発現量が限られている生理的な状況下では、lobe Aを介したDOCK2の二量体形成は、Rac活性化および細胞運動に重要な役割を演じることが明らかとなった³⁾。また、アルツハイマー病マウスモデルを用いてDOCK2欠損により、アミロイド斑の沈着が有意に現象することを見いだすと共に⁴⁾、IVV法を用いてDOCK2会合分子の探索を行った⁵⁾。

4. DOCK1とDOCK5は、マクロファージや樹状細胞といった免疫細胞に加え、マウス胎児線維芽(MEF)細胞において発現するRac活性化分子である。「機能・シグナル解析」グループでは、DOCK1/DOCK5欠損MEFを用いて、PDGF刺激によるRacの活性化及びperipheral ruffle形成がDOCK1とDOCK5により協調的に制御されているのに対し、DOCK1の単独欠損によりdorsal ruffle形成が障害されることを見出した。DOCK1はDOCK5と異なり、C末のpolybasic amino acid clusterを介してphosphatidic acid (PA)と結合し、dorsal ruffle膜へ局在した。また、PA産生を触媒する酵素であるPLDを遺伝学的及び薬理的にブロックしたところ、dorsal ruffleの形成は顕著に抑制された。以上より、PDGF受容体の下流でPLDが活性化し、PAの産生を介してDOCK1の局在をコントロールすることで、dorsal ruffle形成を選択的に制御していることが明らかとなった⁶⁾。また、CPYPPがDOCK1にも作用し、がん細胞の浸潤・転移をブロックすることを実証した⁷⁾。
5. DOCK2およびDOCK1がin vivoでRacを効果的に活性化するにはN末端の領域がELMOと会合することが必要である。「構造解析」グループでは、DOCK2およびDOCK1について試料調製条件の改良を行い、DOCK1に関してELMO1およびRac1を含んだ三者複合体の結晶化、さらにはX線回折データの取得が可能になった。本年度は、重原子置換体結晶等のデータ収集および解析の結果、三者複合体の立体構造を分解能4.0Åで決定した。さらに、得られた複合体構造から、DOCK1のDHR-2ドメインまたはRac1との相互作用が予想されるELMO1のアミノ酸残基を同定した。今後、それらのアミノ酸変異体が、DOCK1との複合体中でRac1のGDP/GTP交換反応に対してどのような影響を与えるのかin vitro実験を行う。
6. 「創薬研究」グループでは、ハイスループットスクリーニング(HTS)により得られた初期段階のヒット化合物(2骨格)について、類縁化合物を収集しin vitro評価(免疫細胞の機能に対する阻害活性評価)を実施した。また、DOCK2 DHR-2とRac1との複合体の構造情報を基に、in silicoで相互作用をブロックする化合物の探索を開始した。DHR-2結合を志向した化合物ライブラリー(1st round 約600個)を作製しスクリーニング(GEFアッセイ)を実施した結果、12化合物に阻害活性(IC₅₀=30-100 μM)が認められた。更にDocking study及びDruggabilityを指標に選択された類縁化合物ライブラリー(2nd round 約400個)をスクリーニングした結果、13化合物に阻害活性(IC₅₀=6-30 μM)の向上が認められた。さら

に、血管移植モデルを用いて DOCK2 欠損の影響を評価し、血管内膜肥厚及び内膜への T・B 細胞の浸潤が有意に抑制されることを見いだした。これは、DOCK2 阻害剤が、移植医療の現場で問題となっている慢性拒絶に有効であることを示唆する結果である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Pieczyk M, Habiro K, Katakai T, Hanawa-Suetsugu K, Kukimoto-Niino M, Nishizaki T, Shirouzu M, Duan X, Uruno T, Nishikimi A, Sanematsu F, Yokoyama S, Stein JV, Kinashi T, Fukui Y: DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. **Blood**, 119: 4451-4461, 2012 (DOI: 10.1182/blood-2012-01-407098)
2. Nishikimi A, Uruno T, Duan X, Cao Q, Okamura Y, Saitoh T, Saito N, Sakaoka S, Du Y, Suenaga A, Kukimoto-Niino M, Miyano K, Gotoh K, Okabe T, Sanematsu F, Tanaka Y, Sumimoto H, Honma T, Yokoyama S, Nagano T, Kohda D, Kanai M, Fukui Y: Blockade of inflammatory responses by a small-molecule inhibitor of the Rac activator DOCK2. **Chem. Biol.**, 19: 488-497, 2012 (DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.03.008)
3. Terasawa M, Uruno T, Mori S, Kukimoto-Niino M, Nishikimi A, Sanematsu F, Tanaka Y, Yokoyama S, Fukui Y: Dimerization of DOCK2 is essential for DOCK2-mediated Rac activation and lymphocyte migration. **PLoS ONE** 7:e46277, 2012 (DOI: 10.1371/journal.pone.0046277)
4. Cimino PJ, Yang Y, Li X, Hemingway JF, Cherne MK, Khademi SB, Fukui Y : Ablation of the microglial protein DOCK2 reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. **Exp. Mol. Pathol.**, 94(2):366-371, 2013 (DOI: 10.1016/j.yexmp.2013.01.002.)
5. Fujimori S, Hirai N, Ohashi H, Masuoka K, Nishikimi A, Fukui Y, Washio T, Oshikubo T, Yamashita T, Miyamoto-Sato E : Next-generation sequencing coupled with a cell-free display technology for high-throughput production of reliable interactome data. **Scientific Reports** 2:1-5, 2012 (DOI: 10.1038/srep00691)

6. Sanematsu F, Nishikimi A, Watanabe M, Hongu T, Tanaka Y, Kanaho Y, Côté JF, Fukui Y: Phosphatidic acid-dependent recruitment and function of the Rac activator DOCK1 during dorsal ruffle formation. **J. Biol. Chem.**, 2013 in press (DOI: 10.1074/jbc.M112.410423)

7. Laurin M, Huber J, Pelletier A, Houalla T, Park M, Fukui Y, Haibe-Kains B, Muller WJ, Jean-François Côté J-F: The Rac-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2013 accepted

(3-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)