

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成20年9月～平成26年3月

研究代表者：福井 宣規
(九州大学生体防御医学研究所、
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

自己免疫疾患や移植片拒絶はその成因こそ違え、標的組織にリンパ球が浸潤し活性化されることによって惹起される病態であり、これらのリンパ球機能はいずれも低分子量 G 蛋白質を介した細胞骨格の再構築により制御されている。このため、免疫細胞特異的に細胞骨格の再構築をブロックすることができれば、自己免疫疾患や移植片拒絶といった免疫難病の新しい治療法の開発につながる可能性がある。

CDMファミリーは線虫からヒトに至るまで保存された分子群で、低分子量 G タンパク質の上流で機能することで、細胞骨格の制御に関わっている。研究代表者はこれまでに、免疫系特異的に発現する CDM ファミリー分子として DOCK2 を同定し、この分子がリンパ球や好中球の遊走・活性化に不可欠な Rac 活性化分子であり、その欠損によりアロ移植片の拒絶や自己免疫疾患の発症がブロックできることを実証した。そこで本研究では、DOCK2 を含め免疫系に発現する 6 種類の 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た。このため、機能・シグナル解析、構造解析、創薬研究を3つの柱とし、各研究グループが有機的に連携して研究を進めた。

DOCK2はDHR-2ドメインを介してRacと会合し、GTP-GDP交換反応を触媒する。「機能・シグナル解析」グループでは、DOCK2 DHR-2 ドメインに可逆的に結合し、Rac 活性化を阻害する化合物として CPYPP を同定し、DOCK2 を介した炎症応答が低分子化合物でブロックできることを実証することで、DOCK2 を標的とした創薬に道を拓いた。また、DOCK2-GFP 融合タンパク質を発現するノックインマウスを新たに作製し、好中球遊走における DOCK2 細胞内動態の制御機構を解明すると共に、形質細胞様樹状細胞における I 型インターフェロン(IFN) の産生や NK シナプス形成といった自己免疫や移植片拒絶と密接に関連する免疫現象において、DOCK2 の新しい機能を明らかにした。さらに、ヒト免疫不全症の責任分子である DOCK8 の生理的機能を明らかにする等、DOCK2 以外の CDM ファミリー分子に関しても多くの重要な知見を得、新たな創薬シーズを提唱した。「構造解析」グループでは、DOCK2 や DOCK8 を含む複数の CDM ファミリー分子を対象に、DHR-2ドメインと低分子量 G タンパク質との複合体の構造決定を行い、その比較から Cdc42 および Rac1 の認識に関わる重要なアミノ酸残基を同定した。また、CDM ファミリー分子自身の活性化メカニズムを明らかにすべく、全長 DOCK1 タンパク質、Rac1、co-factor である ELMO1 との複合体の構造決定に取り組んだ。一方、「創薬研究」グループでは、「機能・シグナル解析」グループと連携して、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、インシリコスクリーニング、フラグメントライブラリースクリーニングを実施し、薬効や選択性の点で CPYPP より優れた化合物を新たに同定した。本研究で得られた成果は、自己免疫疾患や移植片拒絶、アレルギー、がんといった現代医学が解決を迫られている難病の克服に応用できると期待される。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 好中球遊走の基本原理を解明

概要: DOCK2-GFP 融合タンパク質を発現するノックインマウスを作製し、好中球遊走における DOCK2 細胞内動態の制御機構を詳細に解析した。その結果、ホスファチジルイノシトール3リン酸(PIP3)が産生されると DOCK2 が形質膜にリクルートされ、続いてホスファチジン酸(PA)という別のリン脂質との相互作用を介して DOCK2 が先端端に局在化するという、2段階の制御機構が働いていることを明らかにした。この成果は、Science (324:384-387, 2009)

に掲載されると共に、同号の PERSPECTIVES（ハイライト欄）において取り上げられる等、大きな反響を呼んだ。

2. 形質細胞様樹状細胞による I 型 IFN 産生の新しい制御機構を解明

概要： DOCK2 を欠損した形質細胞様樹状細胞 (pDC) では、I 型 IFN の産生が選択的に障害されることを見だし、そのメカニズムの解明に取り組んだ。その結果、核酸リガンドの取り込みに伴い、Toll-like 受容体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- α の活性化を介して、I 型 IFN 産生をコントロールするという、新しい制御機構の存在を明らかにした (J. Exp. Med. 207:721-730, 2010)。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・予防する上でも、格好の分子標的になると期待される。

3. ヒト複合型免疫不全症の責任分子 DOCK8 の生理的機能を解明

概要： DOCK8 はヒト複合型免疫不全症の責任分子であり、その機能やシグナル伝達機構は近年大きな注目を集めている。DOCK8 を欠損した樹状細胞は、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、コラーゲンといった ECM に富んだ間質組織内での遊走応答が著しく障害されていることを見だし、そのメカニズムの解明に取り組んだ。その結果、DOCK8 は活性化 Cdc42 の空間的位置をコントロールすることで、間質組織内での遊走に重要な樹状細胞の形態適応を制御していることを明らかにした (Blood 119:4451-4461, 2012)。

< 科学技術イノベーション・臨床応用に大きく寄与する成果 >

1. DOCK2 シグナルをブロックできる低分子化合物を開発

概要： 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・予防するための分子標的になると期待される。私達は、DOCK2 の DHR-2 ドメインに直接作用することにより、Rac の活性化をブロックする化合物として CPYPP を同定した (Chem. Biol. 19:488-497, 2012)。CPYPP は、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 の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。以上より、CPYPP は DOCK2 を標的とした新規免疫抑制剤を開発するためのプレリード化合物になると期待され、類縁化合物も含め、特許出願を行った。

2. CPYPP が DOCK1 にも作用し、がん細胞の浸潤・転移をブロックする事を実証

概要： DOCK1 はグリオブラストーマを初め、多くのがんにおいて、転移や浸潤、悪性化との関連性が指摘されている Rac 活性化因子である。私達はカナダのグループと協力して、臨床検体やマウスモデルを用いて、DOCK1 が HER2 陽性の乳がんの予後を規定する重要な分子であることを明らかにすると共に、CPYPP が DOCK2 のみならず DOCK1 にも作用し、乳がん細胞の浸潤を抑制する明らかにした (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:7434-7439, 2013)。以上より、CPYPP は DOCK1 を標的とした新規抗がん剤を開発するためのプレリード化合物になると期待され、類縁化合物も含め、特許出願を行った。

3. 次世代 DOCK 阻害剤の開発

概要： DOCK2 の N 末端領域と ELMO および DOCK2 DHR-2 ドメインと Rac との複合体の構造を決定し (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:3305-3310, 2012)、この情報を基に、各相互作用をブロックする化合物を同定すべく、インシリコスクリーニングを実施した。スクリーニングに際して、CPYPP とその類似化合物から得られた情報も加味して検討した。得られた化合物の中には、DOCK1 と DOCK2 を識別できる、第二世代の DOCK 阻害剤とも呼べる化

合物も含まれており、創薬に向けて今後の展開が期待できる。

§ 2. 当初の研究構想

免疫応答の根幹を為す種々の細胞高次機能は、いずれも細胞骨格の再構築により巧妙に制御されている。CDM ファミリーは線虫からヒトに至るまで保存された分子群で、低分子量 G タンパク質の上流で機能することで、細胞骨格の制御に関わっている。研究代表者は、免疫系特異的に発現する CDM ファミリー分子として DOCK2 を同定し、この分子がリンパ球や好中球の遊走・活性化に不可欠な Rac 活性化分子であり、その欠損によりアロ移植片の拒絶や自己免疫疾患の発症がブロックできることを実証した。このため本研究では、CDM ファミリー分子群の機能・構造・シグナル伝達機構を包括的に解析し、その成果に立脚して、細胞骨格制御シグナルを標的とした、全く新しいコンセプトに基づく免疫難病の治療法を開発することを目的とした。

具体的には、DOCK2 を含め免疫系に発現する 6 種類の CDM ファミリー分子を対象に、①獲得免疫や自然免疫応答における各 CDM ファミリー分子の役割を明らかにすると共に、②恒常的あるいは刺激依存的に会合する分子を同定し、③各種受容体から低分子量 G 蛋白質活性化に至るシグナル伝達経路を解明することとした。また、CDM ファミリー分子は DHR-2 と呼ばれる領域を介して低分子量 G 蛋白質と会合し GTP/GDP 交換反応を触媒するが、その構造的基盤は明らかにされていない。そこで、④種々の CDM ファミリー分子を対象に、その DHR-2 と低分子量 G 蛋白質との複合体の結晶構造を決定することとした。特に DOCK2 に関しては、⑤DHR-2 以外の機能ドメインや会合分子に関しても構造決定を行い、⑥相互作用を特異的に阻害する低分子化合物を同定し、⑦その有用性を細胞レベルおよび個体レベルで検証することを目的とした。

§3 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「機能・シグナル解析」グループ 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
福井 宣規	九州大学生体防御医学 研究所	教授	H20.10～H26.3
田中 芳彦	九州大学生体防御医学 研究所	准教授	H20.10～H25.8
錦見 昭彦	九州大学生体防御医学 研究所	助教	H20.10～H25.7
實松 史幸	九州大学生体防御医学 研究所	助教	H20.10～H26.3
段 学峰	九州大学免疫機構研究セ ンター	助教	H23.4～H25.9
宇留野 武人	九州大学生体防御医学 研究所	CREST 研究員 助教(H25.8～) 准教授(H26.2～)	H24.4～H26.3
寺澤 公男	九州大学生体防御医学 研究所	CREST 研究員	H21.4～H26.3
後藤 和人	九州大学生体防御医学 研究所	D3～D4 (学振特 別研究員 DC2)	H20.10～H22.9
東 貞行	九州大学生体防御医学 研究所	D1～D2	H21.4～H22.9
坂井 勇介	九州大学生体防御医学 研究所	D1～D4	H21.4～H25.3
原田 洋輔	九州大学生体防御医学 研究所	M1～D3、学振特 別研究員 (PD)	H21.4～H26.3
柳原 豊史	九州大学生体防御医学 研究所	D2～D4	H23.4～H26.3
小川 嘉奈	九州大学生体防御医学 研究所	M2～D3	H22.4～H26.3
渡邊 真裕紀	九州大学生体防御医学 研究所	D1～D3	H23.4～H26.3
渡邊 さやか	九州大学生体防御医学 研究所	M2	H22.4～H23.4
牛島 美保	九州大学生体防御医学 研究所	M2～D2	H23.4～H26.3
白石 暁	九州大学生体防御医学 研究所	D1～D2	H24.4～H26.3
田尻 裕匡	九州大学生体防御医学 研究所	D2	H25.4～H26.3
山村 和彦	九州大学生体防御医学 研究所	D2	H25.4～H26.3
大丸 貴子	九州大学生体防御医学	D1	H25.4～H25.9

	研究所		
春若 航一郎	九州大学生体防御医学 研究所	M1	H25.4～H26.3
稲吉 あゆみ	九州大学生体防御医学 研究所	技術員	H21.4～H26.3
笹月 健彦	九州大学高等研究院	特別主幹教授	H20.10～H22.3

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

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
横山 茂之	理化学研究所横山構造 生物化学研究室	上席研究員	H20.10～H26.3
新野(柊元)睦子	理化学研究所ライフサイ エンス技術基盤研究セン ター構造・合成生物学部 門	上級研究員	H20.10～H26.3
寺田 貴帆	理化学研究所生命分子シ ステム基盤研究領域	上級研究員	H22.4～H25.3
紙 圭一郎	理化学研究所ライフサイ エンス技術基盤研究セン ター構造・合成生物学部 門	研究員	H21.10～H26.3
西崎 智子	理化学研究所生命分子シ ステム基盤研究領域	リサーチアソシエ イト	H21.7～H25.3
青木 真理	理化学研究所ライフサイ エンス技術基盤研究セン ター構造・合成生物学部 門	テクニカルスタッフ	H25.6～H26.3
白水 美香子	理化学研究所ライフサイ エンス技術基盤研究セン ター構造・合成生物学部 門	部門長	H25.4～H26.3

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

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
古市 喜義	アステラス製薬筑 波研究所	常勤顧問	H20.10～H22.6
田村 康一	アステラス製薬米 国研究所	Senior Vice President	H20.10～H26.3
Hongsi Jiang	アステラス製薬米	Senior Director	H20.10～H26.3

	国研究所		
齊田 裕治	アステラス製薬米国研究所	Assistant Director	H20.10～H22.3
北村 幸喜	アステラス製薬筑波研究所	主管研究員	H20.10～H26.3
Teresa McNally	アステラス製薬米国研究所	Manager	H20.10～H25.5
Fan Pan	アステラス製薬米国研究所	Senior Manager	H21.4～H25.5
吉田 知弘	アステラス製薬筑波研究所	主任研究員	H21.4～H24.3
Margaret Biddle	アステラス製薬米国研究所	Manager	H21.4～H25.5
増永 太郎	アステラス製薬米国研究所	Associate Director	H22.4～H24.3
武藤 誠太郎	アステラス製薬筑波研究所	研究副本部長	H22.7～H23.3
中村 尚登	アステラス製薬筑波研究所	主任研究員	H22.7～H24.3
原田 博規	アステラス製薬筑波研究所	主管研究員	H22.7～H26.3
俵 修一	アステラス製薬筑波研究所	研究本部長付	H23.4～H25.3
手塚 和宏	アステラス製薬米国研究所	Principal Scientist	H23.4～H25.5
Terry Nakagawa	アステラス製薬米国研究所	Associate Director	H25.1～H25.5
赤松 政彦	アステラス製薬米国研究所	Manager	H25.1～H25.5
宮田 桂司	アステラス製薬筑波研究所	上席専任理事	H25.4～H26.3
阿部 純平	アステラス製薬米国研究所	Manager	H25.4～H26.3
片山 直子	アステラス製薬筑波研究所	主管研究員	H25.5～H26.3
金崎 竜一	アステラス製薬筑波研究所	主任研究員	H25.5～H26.3
嶋谷 憲一郎	アステラス製薬筑波研究所	主任研究員	H25.5～H26.3

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)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

・DOCK2 の機能とシグナル伝達機構

Morgan Huse 博士(米国 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)と免疫シナプス形成、Phillip T. Hawkins 博士(英国 The Babraham Institute)と好中球遊走、Jens V. Stein 博士

(スイス Bern 大学)とリンパ球遊走、Michael A. Frohman 博士(米国 Stony Brook 大学)と DOCK2 細胞内動態制御、Thomas J. Montine 博士(米国 University of Washington)とアルツハイマー病、Suzanne T. Ildstad 博士(米国 university of Louisville)と骨髄移植、改正教授(大阪大学)や吉開教授(九州大学)と I 型 IFN 産生制御に関する共同研究を実施した。これ以外にも現在、国内外の多数の研究者と共同研究を実施中である。

・DOCK8 の機能とシグナル伝達機構

Jens V. Stein 博士(スイス Bern 大学)、Tobias Junt 博士(スイス Novartis Pharma)、木梨教授(関西医科大学)、Helen Su 博士(NIH 小児科)、峯岸教授(徳島大学)、原教授(九州大学小児科)、古江教授(九州大学皮膚科)、倉石教授(富山大学)、横溝教授(順天堂大学)と共同研究を実施した、あるいは実施中である。

・DOCK1 の機能とシグナル伝達機構

Jean-François Côté 博士(カナダ Institut de Recherches Cliniques de Montréal)、金保教授(筑波大学)、前原教授(九州大学外科)と共同研究を実施した、あるいは実施中である。

・創薬研究

化合物の合成展開やスクリーニング、結合様態に関して、金井教授(東京大学)、長野特任教授、岡部特任教授、江頭研究員(創薬オープンイノベーションセンター)、本間先生(理化学研究所)、神田教授(九州大学)と共同研究を実施した、あるいは実施中である。

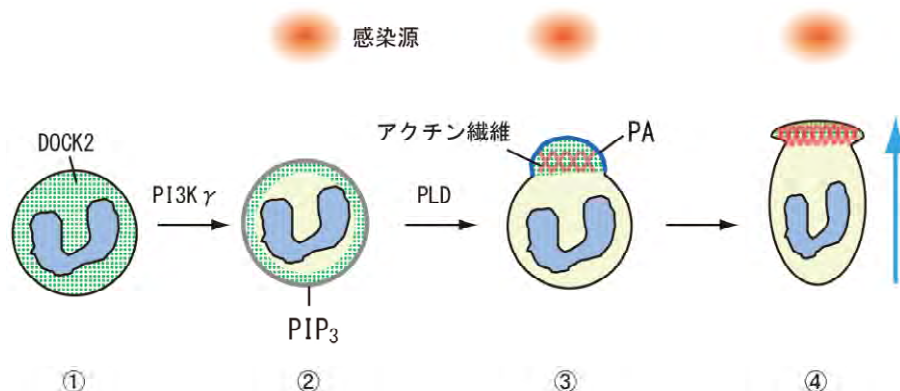
§ 4 研究実施内容及び成果

4. 1 DOCK2 の機能とシグナル伝達機構の解明(九州大学 機能・シグナル解析グループ)

(1)研究実施内容及び成果

A. 好中球遊走における DOCK2 細胞内動態の制御機構

好中球は病原微生物を貪食し、活性酸素を産生することでその除去に働く、いわば生体防御の最前線で機能する白血球であるが、近年 NETs (Neutrophil Extracellular Traps) の形成に代表されるように、炎症の惹起に重要な役割を演じることも明らかになっている。好中球は感染源を感知すると、その方向に向かって仮足を伸ばし移動する。安定した仮足を形成するには、低分子量 G タンパク質 Rac が局所的に活性化される必要がある。このため Rac 活性化を担う DOCK2 は刺激に応じて速やかに先端端に集積するが、その集積を制御するメカニズムは不明であった。「機能・シグナル解析」グループでは、GFP を融合させることで DOCK2 の細胞内局在を可視化できるようにしたノックインマウスを用いて、好中球遊走における DOCK2 細胞内動態の制御機構を解析した。その結果、ホスファチジルイノシトール3リン酸(PIP₃)が産生されると DOCK2 は形質膜に移行するが、DOCK2 が先端端へ局在化するには、ひき続いて産生されるホスファチジン酸 (PA) との相互作用が必要であることを突き止めた。このことから、2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場所に導くことで、好中球が仮足を伸張して運動する際に必要なアクチン繊維の再構成を、時間的・空間的に制御していることが明らかとなった。この成果は、Science (324:384-387, 2009)に掲載されると共に、同号の PERSPECTIVES (ハイライト欄)において取り上げられる等、学術的に大きな反響を呼んだ。



PIP3 と PA による DOCK2 細胞内動態の時間的・空間的制御機構

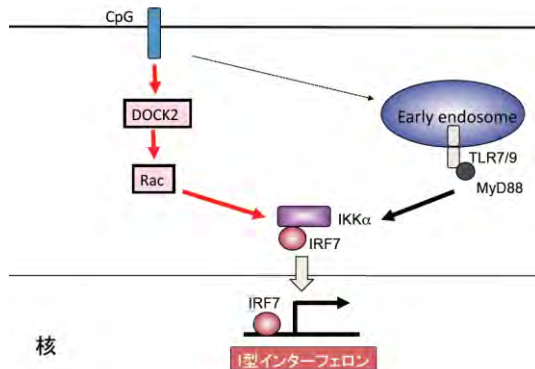
①未刺激の状態では、DOCK2 は好中球の細胞質にほぼ均一に存在する。②受容体が感染源を感知すると、PI3K γ の働きで PIP₃ が産生され、DOCK2 が形質膜に引き寄せられる。③続いて PLD の働きにより PA が産生され、それとの相互作用の結果 DOCK2 が局在化する。DOCK2 が集積した場所では、アクチン重合が惹起され、感染源に向けて仮足を伸張する。④さらに、アクチン繊維の再構成が進み、細胞が前進する。

B. DOCK2 を介した形質細胞様樹状細胞による I 型 IFN 産生制御機構

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 IFN を産生する特殊な樹状細胞である。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。そこで、「機能・シグナル解析」グループでは、そのメカニズムの解明に取り組んだ。

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- α 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- α 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- α の活性化を介して、I 型 IFN 産生を選択的にコントロールするという、新規な制御機構の存在を明らかにした (J. Exp. Med., 207: 721-730, 2010)。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・予防する上でも、格好の分子標的になると期待される。

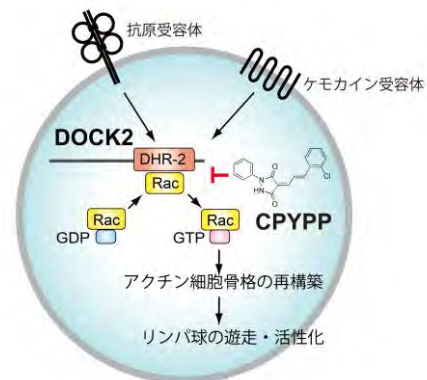


pDC における DOCK2-Rac シグナル による I 型 IFN 産生制御機構

核酸リガンドの取り込みに伴い、Toll-like 受容体による認識とは独立して DOCK2-Rac シグナル伝達系が作動する。現時点で、細胞表面で CpG を感知する受容体は同定できていない。

C. DOCK2-Rac シグナルをブロックする制御化合物の開発

DOCK2 は、リンパ球や形質細胞様樹状細胞の遊走・活性化に重要な Rac 活性化分子である。DOCK2 の発現は免疫細胞に局限しており、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。それ故、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。DOCK2 は、DOCK ファミリータンパク質に特有の DHR-2 ドメイン (DOCK homology region 2 domain) を持ち、このドメインを介して Rac と会合し、GTP-GDP 交換反応を触媒する。このため、DOCK2 シグナルをブロックする上で、DHR-2 と Rac の相互作用は最も重要なターゲットであると考えられる。「機能・シグナル解析」グループでは、この相互作用を対象にした化合物スクリーニングを行い、DHR-2 ドメインに特異的且つ可逆的に結合し、Rac に対する GEF 活性を IC₅₀ 値 20~25 μ M で抑制する化合物として、CPYPP を同定した。HEK293T 細胞を CPYPP で処理すると、DOCK2 による Rac 活性化が抑制されるが、Tiam1 や TRIO といった古典的 GEF による Rac の活性化には影響を与えなかった。このことから、CPYPP は選択性のある、cell-active な化合物であることが示された。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 IFN 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 (Chem. Biol. 19:488-497, 2012)。この成果は、多くの新聞報道やテレビ報道で取り上げられる等、社会的にも大きな反響を呼んだ。



CPYPP は、DOCK2 の DHR-2 ドメインに可逆的に結合し、Rac 活性化をブロックすることで、DOCK2 を介した炎症応答を抑制する。

D. DOCK2 ダイマー形成の機能的意義

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、まず in vitro 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。

DOCK2 は約 200 KDa の大きな分子であり、プライマリー T 細胞に完全長の DOCK2 を発現させることは困難であった。この問題を克服するため、T 細胞にコクサッキーアデノウイルス受容体 (CAR) を発現させるトランスジェニックマウスを用いて、アデノウイルスベクターにより、完全長 DOCK2 を発現させる実験系を構築した。このシステムを用いて、DOCK2 欠損 T 細胞に野生型の DOCK2 を発現させると、遊走応答が回復した。しかしながら、野生型の DOCK2 を発現した場合と異なり、 Δ lobe A を発現させても運動性の回復は認められず、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 (PLoS ONE 7:e46277, 2012)。また、このシステムを用いて、GEF 活性を欠く DOCK2 変異体では、運動性を回復できないことを確認し、DOCK2 が Rac GEF として機能することでリンパ球の遊走を制御していることを実証した。

E. DOCK2 による NK 細胞の細胞障害活性の制御機構

NK 細胞はウイルス感染細胞や腫瘍細胞の排除において重要な役割を演じる一方、骨髄移植片の拒絶に働くことが知られている。活性型の NK 受容体が標的細胞上のリガンドを認識すると、その接触面に受容体が集積し、アクチン重合が惹起され、ここに向かって溶解性顆粒 (lytic granule) が移動する。これまで NK 細胞の細胞障害活性に Rac が重要であり、Vav1、Vav2、Vav3 が受容体の種類に応じて Rac の活性化を担うというモデルが信じられてきたが、Vav は SH3 ドメインや SH2 ドメインを有しており、これらを介してアダプター分子として機能することから、Vav が本当に Rac GEF として NK 細胞の細胞障害活性を制御しているか疑問であった。そこで、「機能・シグナル解析」グループでは、NK 細胞における DOCK2 の役割について詳細に解析した。その結果、DOCK2 を欠損した NK 細胞では、活性型受容体の種類と無関係に、腫瘍細胞や MHC クラス I 分子の発現を欠く骨髄細胞に対する細胞障害活性が、著しく低下することを見いだした。標的細胞との conjugate formation は、DOCK2 欠損 NK 細胞と野生型 NK 細胞間で遜色なかったが、DOCK2 欠損 NK 細胞では受容体刺激に伴う Rac 活性化がほぼ完全に消失し、その結果、接触面におけるアクチンの重合や受容体および溶解性顆粒の集積がひどく障害されていた。この lytic synapse の形成障害は、前述したアデノウイルスベクターを用いて野生型 DOCK2 を発現させることで回復したが、Rac GEF 活性を欠く DOCK2 変異体では、回復させることができなかった。以上より、DOCK2 が NK 細胞の活性型受容体の下流で機能する Rac GEF であり、lytic synapse 形成を介して細胞障害活性を制御していることを明らかにした (Blood 122:386-393, 2013)。

4.2 DOCK8 (DOCKX) の機能とシグナル伝達機構の解明 (九州大学 機能・シグナル解析グループ)

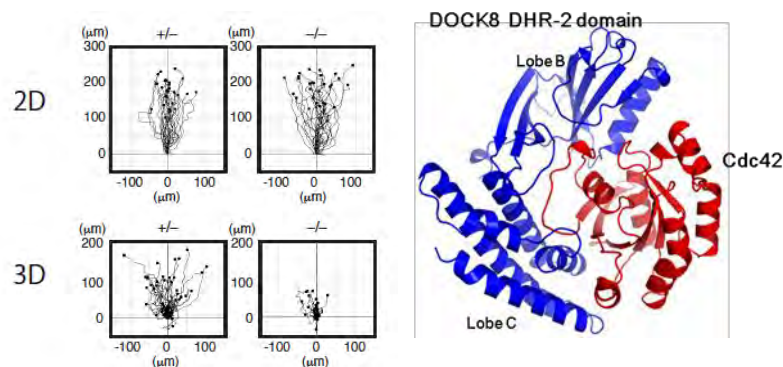
(1) 研究実施内容及び成果

A. DOCK8 による間質組織における樹状細胞の遊走制御機構

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 (高 IgE 症候群) を惹起することが知られているが、その生理的機能は不

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 を欠損した樹状細胞は、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 の活性化自身は障害されていなかったが、活性化した Cdc42 が先端端に局在せず、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 (Blood 119: 4451-4461, 2012)。



DOCK8 の生理的機能を解明

DOCK8 は Cdc42 特異的な GEF であり、活性型 Cdc42 の空間的位置をコントロールすることで、三次元微小環境下の遊走に重要な樹状細胞の形態適応を制御している

4.3 DOCK1 (DOCK180) の機能とシグナル伝達機構の解明(九州大学 機能・シグナル解析グループ)

(1)研究実施内容及び成果

A. 胚発生過程における DOCK1 の生理的機能

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、DOCK1 (DOCK180 と呼ばれる) 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 DOCK1 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 DOCK1 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、DOCK1 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、DOCK1 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、DOCK1 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 (Circ. Res. 107: 1102-1105, 2010)。

B. dorsal ruffle 形成における DOCK1 の役割とその制御機構

dorsal ruffle は細胞の背側に形成されるアクチンに富んだ円形の構造物であり、細胞の浸潤やマクロフィノサイトーシスに関与することが知られている。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 を介してホスファチジン酸 (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 (J. Biol. Chem. 288:8092-8100, 2013)。

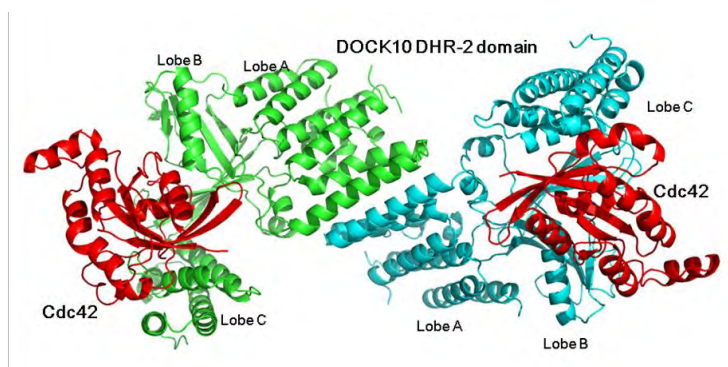
4. 4 CDM ファミリー分子群の構造解析(理化学研究所 構造解析グループ)

(1)研究実施内容及び成果

A. DHR-2ドメインと低分子量 G タンパク質の複合体の構造解析

DOCK2 は DHR-2ドメインを介して低分子量 G タンパク質 Rac と会合し、GTP-GDP 交換反応を触媒し、活性化する。DOCK2 シグナルを特異的にブロックする方法論を開発する上で、構造情報は極めて有用である。このため、種々の CDM ファミリー分子を対象に、DHR-2ドメインと低分子量 G タンパク質 (Rac1、Cdc42) との複合体の結晶構造解析を行った。大腸菌無細胞合成系を利用して、各 DOCK タンパク質の発現領域の最適化および複合体試料の調製・結晶化を行った結果、サブファミリーC に属する DOCK8、そして、サブファミリーD に属する DOCK10の DHR-2ドメインに関してそれぞれ、2.1Å および 2.8Å 分解能で Cdc42 との複合体の結晶構造決定に成功した。さらに、サブファミリーB に属する DOCK4 の DHR-2ドメインについても Rac1 との複合体の結晶構造を 3.5Å 分解能で決定した。

DOCK10 の DHR-2ドメインは3つのサブドメイン構造 (lobe A、lobe B、lobe C) を取り、lobe A によりホモダイマー化し、lobe B と lobe C により Cdc42 を結合していた。決定した DOCK10 構造は同じサブファミリーD に属する構造既知の DOCK9 と類似した構造により Cdc42 を結合していたが、DOCK9 と比較して lobe B および lobe C に対する lobe A の配置に相違が認められた。一方、DOCK8 の DHR-2ドメインはサブファミリーC に属する DOCK8 としては初めての構造決定であり、DOCK9、DOCK10 構造と同様に lobe B と lobe C を用いて Cdc42 を結合していた (図は前出)。これらの Cdc42 を結合した DOCK8-10 の構造と、Rac1 を結合した DOCK2、DOCK4 の構造比較を行った結果、Cdc42 および Rac1 の認識に関わる重要なアミノ酸残基を同定することができた。一方、DOCK2 DHR-2ドメインに関して、機能解析により同定された活性阻害化合物との複合体の構造決定を目指して、共結晶化およびソーキングを実施している。



4.5 DOCK2 シグナルを阻害する低分子化合物の探索(アステラス製薬 創薬研究グループ、九州大学 機能・シグナル解析グループ、理化学研究所 構造解析グループ)

(1)研究実施内容及び成果

A. ハイスループットスクリーニング(HTS)系の構築、及び HTS の実施

「創薬研究」グループでは、DOCK2 シグナルを阻害する化合物探索の為に、ハイスループットスクリーニング(HTS)プロトタイプを独自に構築した。この 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。このシステムを用いて、アステラスライブラリー化合物を対象として、HTS を実施した。20 μ M 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)にて実施した。その結果、用量依存性に 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た。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。HTS により得られた初期段階のヒット化合物(2 骨格)をベースに、新規類縁化合物の合成展開を行い、現在それら化合物の *in vitro* 評価(免疫細胞の機能に対する阻害活性評価)を進めている。これまでのところ、CPYPP に優る有効性を示す化合物は見いだせていない。

B. DHR-2 と Rac1 の結合構造情報を基にしたインシリコスクリーニングの実施

「創薬研究」グループでは、DOCK2 DHR-2とRac1の共結晶の構造情報を基にして、インシリコでその相互作用をブロックする低分子化合物の探索を開始した。DHR-2 と Rac1 の直接結合部位の詳細構造から、DHR-2 側に特異的なポケット構造を見出し、その構造に親和性を持つ可能性のある低分子化合物群をドッキングシミュレーション計算により抽出した。その結果から DHR-2 への結合を志向した化合物ライブラリー (1st round セット 約 600 個)を作製し、それらを *in vitro* GEF アッセイ系にてスクリーニングした結果、12 化合物に阻害活性 ($IC_{50} = 30-100 \mu M$) が認められた。更なるドッキングシミュレーション解析及び Druggability の指標から類縁化合物ライブラリー (2nd round セット約 400 個)を選択し、スクリーニングを実施した結果、一連の骨格化合物(13 個)に阻害活性の向上 ($IC_{50} = 6-30 \mu M$) が認められた。

一方、「機能・シグナル解析」グループも「構造解析」グループと連携して、東京大学創薬オープンイノベーションセンターが保有する約 15 万個の化合物を対象に、インシリコスクリーニングを実施した。スクリーニングにあたり、CPYPP とその類似化合物から得られた情報も加味して検討した。得られた 675 種類の候補化合物について、*in vitro* で DOCK2 と DOCK1 の GEF 活性に及ぼす阻害効果を検討した結果、CPYPP より薬効の強い、あるいは DOCK1 と DOCK2 を識別できる、第二世代の DOCK 阻害剤とも呼べる化合物を新たに同定した。現

在、化合物の最適化に向けて、DHR-2 との共結晶構造取得を目指している。

C. DHR-2 と Rac1 の相互作用を指標としたフラグメントライブラリースクリーニングの実施

「創薬研究」グループでは、Selcia 社技術を利用し、キャピラリー電気泳動法を用いて、DOCK2 DHR-2 ドメインと Rac1 間の相互作用を測定するアッセイ系を新たに構築した。DHR-2 の Rac1 に対する特異的な結合 (Cdc42 には非結合)、及び CPYPP による DHR-2 と Rac1 間の結合阻害作用を確認し、各種スクリーニング条件を設定した後、タンパク質-タンパク質結合阻害を志向したフラグメントライブラリー (約 1,600 化合物) のスクリーニングを実施した。その結果 12 フラグメント (5 骨格) に結合阻害活性 ($IC_{50} = 30\text{-}300 \mu M$) が認められた。これらヒット化合物は、活性は弱いながら drug-like (物性・展開可能性等) な性質を持つことから、今後の類縁体スクリーニングにより drug-like 且つ高活性の化合物創出が期待される。

D. 慢性アログラフト血管炎モデルにおける DOCK2 の役割

急性拒絶が主に T 細胞によって惹起されるのに対して、慢性拒絶はアロ抗原に反応する IgG 抗体がトリガーとなり、血管炎症をひきおこすことが主な原因であると考えられており、その治療法の開発が急務となっている。この慢性拒絶時の血管炎症に及ぼす DOCK2 欠損の影響を検討するため、Balb/c マウスの血管を、DOCK2 を発現した、あるいは発現していない C57BL/6 マウスに移植するという実験を行った。その結果、DOCK2 ノックアウトマウスをレシピエントとして使用した場合、アロ MHC に対する IgG 抗体が産生されず、血管炎の程度も著しく軽減されることを見いだした。このことから、DOCK2 は慢性拒絶をコントロールするための分子標的としても有用であることが示唆された。

4. 6 DOCK8 を標的とした創薬研究 (アステラス製薬 創薬研究グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

A. DOCK8 ノックアウトマウスを用いた移植モデルの実施

DOCK8 の移植後急性拒絶反応への関与を調べる為に、DOCK8 ノックアウトマウスを用いた心移植試験を実施した。心移植モデルとしては、BALB/c (H-2d) をドナーとし C57BL/6 (H-2b) をレシピエントとする、MHC 完全不適合間マウス心移植モデルを用いた。ドナーより心臓を摘出し、レシピエントの腹腔内に異所性心臓移植を行なった結果、DOCK8 ノックアウトマウス (レシピエント) 群に顕著なグラフト生着延長は認められなかった。また低用量タクロリムス投与群 ($0.3 \text{ mg/kg sc, day } 0\text{-}9$) においても、コントロール群と比較して、顕著なグラフト生着延長効果は認められなかった。これは、移植片を血管に直接つなぐという心臓移植の特性を反映したものである可能性が考えられたが、移植後急性拒絶反応に対する DOCK8 欠損の影響が実証されなかったため、その後の創薬スクリーニングは実施しなかった。

§ 5 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国内 (和文) 誌 0 件、国際 (欧文) 誌 23 件)

1. 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
2. Gollmer K, Asperti-Boursin F, Tanaka Y, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, Peterson JR, Fukui Y, Donnadieu E, Stein JV: CCL21 mediates CD4+ T cell

- costimulation via a DOCK2/Rac-dependent pathway. **Blood** 114: 580-588, 2009
3. 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
 4. 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
 5. 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 γ t-, and LT β R-independent lymphoid organogenesis in ocular immunity. **J. Exp. Med.** 206: 2351-2364 2009
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. Sanematsu F, Hirashima M, Laurin M, Takii R, Nishikimi A, Kitajima K, Ding G, Noda M, 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
 10. Ippagunta SK, Subbarao Malireddi RK, Shaw PJ, Neal GA, Walle LV, Green DR, Fukui Y, Lamkanfi M, Kanneganti T-D: The inflammasome adaptor ASC regulates the function of adaptive immune cells by controlling Dock2-mediated Rac activation and actin polymerization. **Nature Immunol.** 12:1010-1018, 2011
 11. Hanawa-Suetsugu K, Kukimoto-Niino M, Mishima-Tsumagari C, Akasaka R, Ohsawa N, Sekine S, Ito T, Tochio N, Koshiba S, Kigawa T, Terada T, Shirouzu M, Nishikimi A, Uruno T, Katakai T, Kinashi T, Kohda D, Fukui Y, Yokoyama S: Structural basis for mutual relief of the Rac guanine nucleotide exchange factor DOCK2 and its partner ELMO1 from their autoinhibited forms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 109:3305-3310, 2012
 12. 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
 13. 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
14. 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
 15. 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
 16. Cimino PJ, Yang Y, Li X, Hemingway JF, Cherne MK, Khademi SB, Fukui Y, Montine KS, Montine TJ, Keene CD: Ablation of the microglial protein DOCK2 reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. **Exp. Mol. Pathol.** 94:366-371, 2013
 17. Sanematsu F, Nishikimi A, Watanabe M, Hongu T, Tanaka Y, Kanaho Y, Côté JF, Fukui Y: Phosphatidic acid-dependent recruitment and function of the Rat activator DOCK1 during dorsal ruffle formation. **J. Biol. Chem.** 288:8092-8100, 2013
 18. Laurin M, Huber J, Pelletier A, Houalla T, Park M, Fukui Y, Haibe-Kains B, Muller WJ, Côté JF: The Rac-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 110:7434-7439, 2013
 19. Sakai Y, Tanaka Y, Yanagihara T, Watanabe M, Duan X, Terasawa M, Nishikimi A, Sanematsu F, Fukui Y: The Rac activator DOCK2 regulates natural killer cell-mediated cytotoxicity in mice through the lytic synapse formation. **Blood** 122:386-393, 2013
 20. Kamakura S, Nomura M, Hayase J, Iwakiri Y, Nishikimi A, Takayanagi R, Fukui Y, Sumimoto H. The Cell Polarity Protein mInsc Regulates Neutrophil Chemotaxis via a Noncanonical G Protein Signaling Pathway. **Dev. Cell** 26:26:292-302, 2013
 21. Floc'h AL, Tanaka Y, Bantilan NS, Voisinne G, Altan-Bonnet G, Fukui Y, Huse M. Annular PIP3 accumulation controls actin architecture and modulates cytotoxicity at the immunological synapse. **J. Exp. Med.** 210:2721-2737, 2013
 22. Laurin M, Dumouchel A, Fukui Y, Côté JF. The Rac-specific exchange factors Dock1 and Dock5 are dispensable for the establishment of the glomerular filtration barrier in vivo. **Small GTPases** in press, 2014
 23. Damoulakis G, Gambardella L, Rossman K, Lawson C, Anderson K, Fukui Y, Welch H, Der C, Stephens L, Hawkins P: P-Rex1 directly activates RhoG to regulate GPCR-driven Rac signalling and actin polarity in neutrophils. **J. Cell Sci.** in press, 2014

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 福井宣規:免疫系細胞高次機能を司るCDMファミリー分子DOCK2、感染・炎症・免疫、39: 20-29, 2010
2. 錦見昭彦、福井宣規:2つのリン脂質を介した好中球遊走におけるDOCK2細胞内動態の連続的制御、細胞工学、28: 824-825, 2009

3. 田中芳彦、福井宣規:自然免疫システムにおける DOCK2 の機能とその制御、細胞工学、30:538-544, 2011
4. 福井宣規:獲得免疫システムを支える白血球動態の制御機構、生化学、84:189-194, 2012
5. 實松史幸、福井宣規:心血管形成における DOCK180 の機能とその制御機構、感染・炎症・免疫、42:326-329, 2012
6. Nishikimi A, Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. Exp. Cell Res. 319:2343-2349, 2013

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 5 件、国際会議 7 件)

1. Fukui Y

Immune regulatory function of DOCK2 in health and disease.
Japan-German Immunology Seminar 2008, Fukuoka (2008, 11/3-11/6).

2. 福井宣規

免疫難病治療の新しい分子標的としての DOCK2.
第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京 (2008, 11/27-11/29)

3. Fukui Y

Critical roles of the CDM family protein DOCK2 in the immune system.
The First CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, Shanghai (2009, 11/6-11/8)

4. 福井宣規

免疫系細胞高次機能を司る CDM ファミリー分子 DOCK2
第 1 回膜生物学 Global COE Students-Organized Symposium、神戸 (2009, 11/27)

*5. Fukui Y

Immune regulatory functions of DOCK2 in health and disease
Cutting Edge Immunology and its Clinical Application: ESF-JSPS Frontier Science Conference Series for Young Researchers、Hulshort、The Netherlands (2011, 3/1-3/6)

*6. Fukui Y

Regulation of leukocyte migration and activation by the CDM family protein DOCK2:
From the molecular basis to its clinical application
The 2010 Fall Conference of The Korean Association of Immunologists、Seoul、Korea (2010, 11/18-19)

7. Fukui Y, Sanematsu F, Nishikimi A

Role of phospholipid in DOCK family protein-mediated cellular functions.
New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011、Fukuoka (2011, 11/15-11/16)

8. 福井宣規

免疫系細胞高次機能を司る CDM ファミリー分子 DOCK2-その分子基盤と創薬への応用-
平成 23 年度ターゲットタンパク研究プログラム公開シンポジウム、東京 (2012,3/12)

9. 福井宣規

樹状細胞の遊走・活性化における DOCK ファミリー分子の役割とその制御
第 32 回和漢医薬学総合研究所特別セミナー「和漢薬治療のターゲットとしての粘膜免疫機構」、富山 (2011,12/9-12/10)

10. 福井宣規

免疫細胞の遊走・活性化における DOCK ファミリー分子の役割とその制御.
さきがけ 領域会議 特別講演、大阪 (2013, 1/6-1/8)

11. Fukui Y

Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease.
Post-GCOE Symposium and Retreat in Singapore, Singapore (2013, 3/4-3/5)

12. Fukui Y

Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease.
Centennial Hashimoto Disease International Symposium, Fukuoka (2012, 12/2-12/4)

② 口頭発表 (国内会議 13 件、国際会議 12 件)

1. Fukui Y

Molecular mechanism controlling intracellular DOCK2 dynamics during neutrophil chemotaxis.
The 3rd Global COE International Symposium, Singapore (2009, 2/15-2/16)

2. 錦見昭彦, 福井宣規

リン脂質を介した Rac 活性化分子 DOCK2 の時空間制御
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸 (2008, 12/9-12/12)

3. 錦見昭彦, 田中芳彦, 福井宣規

好中球におけるリン脂質を介した Rac 活性分子 DOCK2 の時空間制御
第 38 回日本免疫学会総会, 京都 (2008, 12/1-12/3)

4. 後藤和人, 田中芳彦, 錦見昭彦, 前田直良, 石川天洋, 稲吉あゆみ, 吉開泰信, 福井宣規
形質細胞様樹状細胞の遊走・活性化における CDM family 分子 DOCK2 の役割.
第 38 回日本免疫学会総会, 京都 (2008, 12/1-12/3).

5. Gotoh K, Fukui Y

Critical role of DOCK2 in type I IFN induction in plasmacytoid dendritic cells.
The 5th Global COE International Symposium, Singapore (2010, 2/23-2/24)

6. 福井宣規

CDM ファミリー分子を介した細胞運動の制御とその機能的意義
がん特定研究5領域合同シンポジウム、東京 (2010, 1/14-1/15)

7. 後藤和人, 田中芳彦, 錦見昭彦, 吉開泰信, 福井宣規

形質細胞様樹状細胞による1型インターフェロン産生におけるDOCK2の役割
第39回日本免疫学会総会・学術集会、ワークショップ、大阪 (2009, 12/2-4)

8. 田中芳彦, 福井宣規

免疫応答を司る免疫系受容体のメンブレントラフィックを介した時間的空間的制御
第82回日本生化学会大会、シンポジウム、神戸 (2009, 10/21-10/24)

9. 福井宣規

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
CREST「免疫機構」研究領域・第一回シンポジウム、東京 (2010, 10/27)

10. 後藤和人, 田中芳彦, 福井宣規

TLR を介した形質細胞様樹状細胞活性化における DOCK2 の役割
Kyoto T Cell Conference 第 20 回学術集会、京都 (2010, 6/4-6/5)

11. Fukui Y
Immune regulatory functions of DOCK2 in health and disease
The 7th Global COE Internatioal Symposium、Singapore (2011, 2/10-2/11)
12. Fukui Y
Signaling and function of the CDM family protein DOCK2
第 8 回日独シンポジウム「免疫応答の制御と疾患」、Cuxhaven、Germany (2010, 9/26-9/29)
13. Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Nakamura R, Yamada H, Hoshino K, Kaisho T, Yoshikai Y, Fukui Y
Critical role of DOCK2 in type I IFN induction in plasmacytoid dendritic cells.
14th International Congress of Immunology、神戸 (2010, 8/22-8/27)
14. 錦見昭彦、田中芳彦、福井宣規
免疫特異的な Rac 活性化因子 DOCK2 を標的とした免疫抑制剤の開発。
第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉 (2011, 11/27-11/29)
15. 寺澤公男、宇留野武人、森沙也子、福井宣規
リンパ球遊走における DOCK2 ダイマー形成の機能的意義
第 21 回 Kyoto T Cell Conference、京都 (2011, 6/10-6/11)
16. Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Fukui Y
Identification of a signaling molecule critical for dendritic cell migration in three-dimensional environments.
The 21st Hot Spring Harbor Symposium jointly with 9th Global COE International Symposium and 8th Young Investigators Forum、Fukuoka (2012, 1/21-1/23)
17. Sakai Y, Tanaka Y, Fukui Y
Regulation of NK cell-mediated cytotoxicity by the atypical Rac activators.
The 10th Global COE International Symposium and 7th Young Investigation Forum、Singapore (2011, 12/22-12/23)
18. Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Fukui Y
Identification of a signaling molecule critical for dendritic cell migration in three-dimensional environments.
The 10th Global COE International Symposium and 7th Young Investigation Forum、Singapore (2011, 12/22-12/23)
19. 田中芳彦、原田洋輔、末次(塙)京子、新野(柊元)睦子、白水美香子、横山茂之、福井宣規
樹状細胞の3次元での動きを制御する Cdc42 活性化分子 DOCK8 (ワークショップ)
第 35 回日本分子生物学会年会、福岡 (2012, 12/11-12/14)
20. Tanaka Y, Harada Y, Terasawa M, Nishikimi A, Kinashi T, Fukui Y
DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses.
第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸 (2012, 12/5-12/7)
21. 田中芳彦、原田洋輔、福井宣規
ヒト免疫不全症の責任分子 DOCK8 の生理的機能とその制御
Kyoto T cell Conference、京都 (2012, 7/6-7/7)
22. Pan F, Nishikimi A, Xu X, Wynn C, Xia G, Kitamura K, Masunaga T, Tamura K, Fukui Y, Jiang H
Abrogation of allo-antibody response by genetic deletion of DOCK2 attenuate vascular neointimal formation after aorta transplantation
American Transplant Congress, Boston, USA (2012, 6/3-6/6)

23. Ogawa K, Tanaka Y, Fukui Y
Identification of a molecule critical for degranulation of mast cells and anaphylactic reaction.
Post-GCOE Symposium and Retreat in Singapore、Singapore (2013, 3/4-3/5)
24. Watanabe M, Nishikimi A, Terasawa M, Jean-François Côté, Fukui Y
Critical roles of DOCK2 and DOCK5 in neutrophil chemotaxis, ROS production, and NETs formation.
Post-GCOE Symposium and Retreat in Singapore、Singapore (2013, 3/4-3/5)
25. Fukui Y.
Regulation of leukocyte trafficking and T-cell immune response by DOCK family proteins.
Sixth International Workshop of Kyoto T Cell Conference (2013, 6/3-6/7)

③ ポスター発表 (国内会議 4 件、国際会議 15 件)

1. Tanaka Y, Fukui Y
T helper type 2 differentiation and intracellular trafficking of the interleukin 4 receptor- α subunit controlled by the Rac activator DOCK2.
The 2nd Global COE International Symposium joint with the 18th Hot Spring Harbor Symposium of Medical Institute of Bioregulation, Fukuoka (2008, 11/9-11/10)
2. 田中芳彦, 錦見昭彦, 後藤和人, 稲吉あゆみ, 福井宣規
アレルギー反応を制御する DOCK2-Rac シグナルを介した新しい分子メカニズムの解明
第 38 回日本免疫学会総会, 京都 (2008, 12/1-12/3)
3. Nishikimi A, Fukui Y
Molecular mechanism controlling intracellular DOCK2 dynamics during neutrophil chemotaxis.
The 4th Global COE International Symposium2009 joint with the 19th Hot Spring Harbor Symposium、Fukuoka (2009, 11/1-11/4)
4. Nishikimi A, Fukui Y
Molecular mechanism controlling intracellular DOCK2 dynamics during neutrophil chemotaxis.
The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference、Kyoto (2009, 6/1-6/4)
5. GotohK, Tanaka Y, Nishikimi A, Nakamura R, Yamada H, Higashi S, Uruno T, Yoshikai Y, Fukui Y
Critical role of DOCK2 in type I IFN induction in plasmacytoid dendritic cells.
The 5th International Symposium of Institute Network、金沢 (2010, 6/24-6/25)
6. 寺澤公男, 福井宣規
リンパ球遊走における DOCK2 ダイマー形成の機能的意義
第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉 (2011, 11/27-11/29)
7. Yanagihara T, Terasawa M, Uruno T, Mori S, Nishikimi A, Fukui Y
Functional significance of DOCK2 dimerization in lymphocyte migration.
The 10th Global COE International Symposium and 7th Young Investigation Forum、Singapore (2011, 12/22-12/23)
8. Ogawa K, Tanaka Y, Fukui Y
Regulation of FcεRI-mediated mast cell degranulation by the atypical GEF.
The 10th Global COE International Symposium and 7th Young Investigation

Forum, Singapore (2011, 12/22-12/23)

9. Watanabe M, Nishikimi A, Uruno T, Kukimoto-Niino M, Yokoyama S, Fukui Y
Structural basis of functional complex formation between DOCK2 and ELMO1.
The 10th Global COE International Symposium and 7th Young Investigation
Forum, Singapore (2011, 12/22-12/23)

10. Sanenatsu F, Fukui Y
Control of cardiovascular development by the atypical Rac activator DOCK180.
The 6th International symposium of Institute Network, 東京 (2011, 6/9-6/10)

11. Nishikimi A, Harada Y, Tanaka Y, Stein JV, T Kinashi, Y Fukui
Dock8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during
immune responses.
The 23rd CDB Meeting Building multicellular systems from Cellular Cross-Talk, 神
戸 (2013, 1/22-1/23)

12. Sanematsu F, Nishikimi A, Watanabe M, Hongu T, Tanaka Y, Kanaho Y,
Jean-Francois Côté, Fukui Y
Role of DOCK1 and its regulation during dorsal ruffle formation.
第 35 回日本分子生物学会年会、福岡 (2012, 12/11-12/14)

13. Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Stein J. V, Kinashi T, Fukui Y
DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during
immune response.
Post-GCOE Symposium and Retreat in Singapore, Singapore (2013, 3/4-3/5)

14. Ushijima M, Nishikimi A, Fukui Y
B cell-intrinsic role of DOCK2 in T cell-dependent humoral immunity.
Post-GCOE Symposium and Retreat in Singapore, Singapore (2013, 3/4-3/5)

15. Shiraishi A, Tanaka Y, Harada Y, Fukui Y
Critical role of DOCK8 in dendritic cell trafficking during T cell immune responses.
Post-GCOE Symposium and Retreat in Singapore, Singapore (2013, 3/4-3/5)

16. Tanaka Y, Fukui Y
A novel strategy for treatment of immune-related disorders by using cytoskeleton
regulating signals as targets.
JST-CREST International Symposium, 東京 (2013, 2/12-2/13)

17. Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Pieczyk M, Stein J. V, Kinashi T, Fukui Y
DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during
immune response.
JST-CREST International Symposium, 東京 (2013, 2/12-2/13)

18. Kukimoto-Niino M, Mishima-Tsumagari C, Terada T, Shirouzu M, Fukui F,
Yokoyama S
Crystal structures of the DHR-2 domain of DOCK guanine nucleotide exchange
factors bound with their substrate Rho-family GTPases.
ICSG2013-SLS, 札幌 (2013, 7/29- 8/1)

19. Kami K, Kukimoto-Niino M, Ikeda M, Wakiyama M, Shirouzu M, Fukui Y,
Yokoyama S
Structural study of DOCK180/ELMO1/Rac1 ternary complex.

ICSG2013-SLS, 札幌 (2013, 7/29- 8/1)

(4)知財出願

- ① 国内出願 (1 件)
- ② 海外出願 (1 件)
- ③その他の知的財産権
特になし。

(5)受賞・報道等

- ① 受賞
2013 年 文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門)

- ② マスコミ(新聞・TV等)報道

・「白血球の炎症反応をブロックできる化合物を発見－免疫難病に対する新しい治療薬の開発へ期待－」というタイトルでプレスリリースを行った。

概要

JST 課題達成型基礎研究の一環として、九州大学生体防御医学研究所の福井宣規主幹教授らは、DOCK2(ドック2)タンパク質の機能を阻害する化合物を同定し、これを用いて、白血球の炎症反応がブロックできることを実証しました。これは、同研究所の錦見昭彦助教、東京大学大学院薬学系研究科の金井求教授、長野哲雄教授らの共同研究の成果です。

免疫システムは、感染や病変から身を守るための防御機構として機能している反面、正常な細胞や組織に対して過剰に反応することにより、自己免疫疾患や移植片拒絶などを引き起こすことが知られています。これは、現代医学が解決すべき大きな課題のひとつであり、有効な治療薬の開発が望まれています。

2001 年に福井主幹教授らは、DOCK2 が免疫細胞に特異的に発現し、免疫応答を制御する鍵となるタンパク質であることを世界に先駆けて明らかにしました。DOCK2 は、Rac というタンパク質を活性化させ、アクチンの重合を誘導し、白血球の運動や活性化を制御します。自己免疫疾患や移植片拒絶は、リンパ球といった白血球が標的臓器に集まって、活性化されることで引き起こされる病態です。そのため、DOCK2 はこれら免疫難病をコントロールするための分子標的となる可能性があります。

共同研究グループは、約 10,000 種類の化合物の中から、DOCK2 に結合し、Rac 活性化を効果的にブロックできる化合物を同定し、CPYPP と名付けました。CPYPP をリンパ球に作用させると、リンパ球の運動や活性化が顕著に抑制されます。この成果は、自己免疫疾患や移植片拒絶といった免疫難病に対する新しい治療薬、予防薬(免疫抑制剤)の開発につながることが期待されます。

本研究成果は、2012 年 4 月 20 日に米国科学雑誌「Chemistry & Biology」に掲載されます。

掲載

朝日新聞、「免疫制御の物質 特定」、平成 24 年 4 月 20 日

毎日新聞、「白血球炎症 抑える化合物」、平成 24 年 4 月 20 日

西日本新聞、「免疫異常 抑える化合物」、平成 24 年 4 月 20 日

読売新聞、「免疫異常 抑える物質発見」、平成 24 年 4 月 21 日

日本経済新聞、「白血球の活性化 制御する化合物」、平成 24 年 4 月 23 日

NHK テレビ放送、平成 24 年 4 月 20 日

・「好中球が動くための基本原理を解明－炎症性疾患の治療応用に期待－」というタイトルでプレスリリースを行った。

概要

JST基礎研究事業の一環として、九州大学生体防御医学研究所の福井 宣規 教授らは、白血球の一種である好中球が細菌などの感染源に向かって動く際、二種類のリン脂質を使って DOCK2 というたんぱく質の細胞内での位置を制御し、細胞の形態を変化させ、効率よく運動できるようにしていることを突き止めました。

細胞が動く際、進行方向に向かって仮足を伸ばすことが知られています。福井教授らは以前に、DOCK2 が Rac という分子を活性化し、好中球の仮足形成に重要な役割を演じることを明らかにしていましたが、DOCK2 の細胞内局在を制御するメカニズムは不明でした。本研究グループは今回、緑色蛍光たんぱく質 (GFP) を融合することにより、DOCK2 の細胞内での動きを可視化できるようにした好中球を用いて解析し、ホスファチジルイノシトール3リン酸と呼ばれるリン脂質が産生されると DOCK2 が細胞膜に引き寄せられ、続いてホスファチジン酸という別のリン脂質を介して DOCK2 が局所に集積するという、2段階の制御機構が働いていることを世界で初めて明らかにしました。

好中球は生体防御において重要な役割を演じていますが、一方自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症・増悪にも関わっています。今回の成果は、このような炎症性疾患の新しい治療法の開発に役立つことが期待されます。

本研究成果は、2009年3月26日午後2時(米国東部時間)に米国科学誌「Science」のオンライン速報版で公開されます。

概要

日経産業新聞、「白血球の好中球－脂質が感染源へ誘導」、平成 21 年 3 月 27 日

③その他
特になし。

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

CREST 研究として、企業との共同研究・共同開発を既に実施している。

②社会還元的な展開活動

特記すべきことなし。

§ 6 研究期間中の活動

6. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2009年2月18日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	6人	研究進捗報告のためのミーティング
2009年12月21日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	5人	研究進捗報告のためのミーティング
2010年3月19日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	6人	研究進捗報告のためのミーティング
2010年12月1日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	10人	研究進捗報告のためのミーティング
2011年3月10日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	5人	研究進捗報告のためのミーティング
2011年6月16日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	4人	研究進捗報告のためのミーティング
2011年9月12日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	5人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年1月21-23日	The 21st Hot Spring Harbor Symposium	九州大学	180人	「Cell migration in Biology and Medicine」という国際シンポジウムを主催
2012年3月2日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	8人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年6月16日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	4人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年9月4日	チーム内ミーティング (非公開)	アステラス 米国研究所	5人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年12月18日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	5人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年12月27日	チーム内ミーティング (非公開)	理化学研究所	7人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年4月19日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	6人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年6月21日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	2人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年7月26日	チーム内ミーティング (非公開)	九州大学	4人	研究進捗報告のためのミーティング

§ 7 最後に

DOCK ファミリーは進化学的に保存された、しかしながら新しく同定されたグアニンヌクレオチド交換因子であり、その機能やシグナル伝達機構は国際的にも大きな関心を集めている。本研究では免疫応答を中心に、これら DOCK ファミリー分子の役割とその制御機構を解析し、いくつかの重要

な知見を得ると共に、**Rac** 活性化を担う触媒ユニットである **DHR-2** ドメインに会合し、炎症応答やがん細胞の浸潤・転移をブロックできる化合物を同定した。本プロジェクトスタート時に、1) 科学コミュニティで評価される基礎研究の成果を挙げる、2) 社会に貢献できるイノベーションシーズを手にする、3) ヒト病態の理解につながる成果をあげるという3つの目標を個人的に設定した。うち1) と 2) に関しては一定の成果を挙げる事ができたと自負しているが、3) に関しては決して十分な成果を挙げたとは言い難い。当初 **DOCK8** はヒト複合型免疫不全症の責任分子であることから、遺伝子改変マウスで得られた知見を、患者さん検体を用いて検証するというシステムを確立しようと試みたが、未だ十分なシステムが構築できていない。ただ本プロジェクトを通じて、臨床医や企業研究者を含め、多くの研究者と新たな人的ネットワークを形成することができたので、このネットワークを最大限活用しつつ、免疫・がん・痒みといった複数の分野で、生命現象の神秘を解き明かすという基礎研究の醍醐味を堪能しつつ、臨床の現場にその成果をフィードバックできるよう、最大限の努力を行っていきたいと考えている。