

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 宿主応答を司る細胞骨格制御機構の解明とその応用

2 研究者氏名: 福井 宣規

技術員: 稲吉 あゆみ (研究期間 H.15.11.1~H.19.3.31)

技術員: 野田 繭子 (研究期間 H.15.11.1~H.18.6.30)

3 研究のねらい:

免疫応答の根幹をなす種々の細胞高次機能は、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巧妙に制御されている。しかしながら、免疫細胞 (例えばリンパ球は大部分が核で、細胞生物学的解析に不向きであるため、その制御機構の分子レベルでの理解は進んでいない。CDM ファミリーは線虫から哺乳類に至るまで保存された分子群で、低分子量 GTP 結合蛋白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、この分子がケモカイン受容体や T 細胞抗原受容体の下流で機能する Rac 活性化のマスター分子であり、リンパ球遊走や免疫シナプス形成に不可欠であることを明らかにしてきた。

本研究では、DOCK2 を含む CDM ファミリー分子に焦点をあて、各種受容体刺激から細胞骨格再構築に至るシグナル伝達機構を解明し、その免疫系の発生・分化・恒常性維持や免疫応答における役割を個体レベルで明らかにすると共に、その理解に立脚して、移植片拒絶や自己免疫疾患といった免疫難病の新しい治療法、予防法の開発に資する基礎研究を展開することを目的とした。

4 研究成果:

### ① DOCK2 によるリンパ球ホーミングの制御機構

DOCK2 欠損 B 細胞では、ケモカイン刺激によるインテグリン活性化が著しく障害されており、その結果生体内で血管内皮細胞に接着する B 細胞の数が著減することを見いだした。これまでに辺縁帯 B 細胞の脾臓での局在に、インテグリン活性化が重要であることが報告されている。DOCK2 欠損マウスではこの辺縁帯 B 細胞が著減しており、この表現型は恐らく DOCK2 欠損 B 細胞におけるインテグリン活性化の異常に起因するものと考えられる。このように B 細胞においては、DOCK2 はインテグリン活性化を介してリンパ球ホーミングを制御していることが明らかとなった。一方、DOCK2 欠損 T 細胞をケモカインで刺激した場合、ICAM-1、VCAM-1 に対する接着性は全く正常であった。そこで、DOCK2 の T 細胞ホーミングにおける役割を明らかにするため、血管内皮細胞と T 細胞との相互作用をタイムラプスを用いて解析した。この結果、DOCK2 は血管内皮細胞への接着や細胞間隙への侵入には必須ではないが、血管内皮細胞上での運動(lateral motility)に必要であることを明らかとなった。以上より、同じリンパ球でも T 細胞と B 細胞では、ホーミング

の制御機構が異なる可能性が示唆された。

#### ②NKT 細胞の発生における DOCK2 の役割

多様性に特徴づけられるリンパ球の中で、NKT 細胞は極めて限られた抗原受容体を発現するという点で特殊な存在である。DOCK2 欠損マウスでは、胸腺、脾臓、肝臓のいずれにおいても NKT 細胞が著減しており、そのリガンドである $\alpha$ GalCer を投与してもサイトカイン産生はほとんど認められず、ConA 誘導性肝炎に対しても抵抗性を示した。骨髄キメラマウスを用いた解析から、DOCK2 が T 前駆細胞に発現していることが、NKT 細胞の分化・発生に必要であることが明らかになった。以上より、DOCK2 は胸腺内分化過程において、TCR の抗原認識を介して NKT 細胞の分化を制御していると考えられた。

#### ③創薬の分子標的としての DOCK2 の有用性

免疫系は生体にとって感染に対する必須の防御機構であるが、一方免疫応答したための病態、例えば自己免疫疾患、移植片拒絶は、現代医学が解決すべき問題としてクローズアップされている。自己免疫疾患や移植片拒絶はその成因こそ異なるが、いずれも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、Rac 活性化を介した細胞骨格の再構築を必要とする。そこで、DOCK2 欠損がこれらの病態にどのように影響するのか、疾患モデルを用いて解析した。野生型マウスにアロ心臓を移植すると、激しい細胞浸潤を伴い全例が8日以内に拒絶されたが、DOCK2 欠損マウスをレシピエントとした場合は、100日以上の上着例も含め、グラフトの長期生着が可能となった。詳細な解析から、DOCK2 を欠損したレシピエントでは、アロ反応性 T 細胞のプライミングおよび移動が障害されていることが明らかとなった。また、自己免疫性糖尿病を自然発症する NOD マウスにおいても、DOCK2 を欠損することで疾患発症を完全に阻止できた。以上より、DOCK2 は新規免疫抑制剤開発の分子標的となる可能性が示唆された。

#### ④DOCK2-GFP ノックインマウスの開発

DOCK2 の発見以降、その細胞内動態は国内外の多くの細胞生物学者や免疫学者が関心を寄せているテーマであった。この重要な問題を解決すべく、DOCK2 遺伝子の最終エクソン直下に GFP をコードする遺伝子を挿入したノックインマウスを作製した。このマウスを用いることで、極めて生理的な条件下で DOCK2 動態のダイナミズムを可視化できるのみならず(後述)、DOCK2 会合分子の網羅的解析が可能になった。

#### ⑤DOCK2 による好中球遊走の制御機構

好中球は極めて運動性の高い、生体防御システムの最前線で機能する白血球である。これまでノックアウトマウスを用いた解析より、好中球の遊走や活性酸素産生において、Rac が重要な役割を演じることが明らかにされているが、Rac 活性化に関わる分子は不明であった。DOCK2 欠損

好中球では、fMLP刺激によるRac活性化が障害されており、その結果leading edgeにおけるFアクチン及びPIP<sub>3</sub>の集積が消失することを見いだした。さらに、GFPノックインマウスを用いて、DOCK2がPIP<sub>3</sub>と会合し、PI3K依存的に細胞膜移行することを明らかにした。興味深いことに、DOCK2によるRac活性化は、持続したPIP<sub>3</sub>の集積やAktのリン酸化には重要であったが、PIP<sub>3</sub>の産生そのものには全く影響しなかった。以上より、DOCK2は好中球の遊走において、RacとPIP<sub>3</sub>間の正のフィードバックループで機能するRac活性化分子であるが、そのフィードバック機構はPI3Kの触媒活性を介したものではないことが明らかとなった。

#### ⑥その他

ヘルパーT細胞分化や自然免疫系におけるDOCK2の新しい機能とその分子機構を解明した。また、DOCK2以外の数種類のCDMファミリー分子を対象に、ノックアウトマウスを新たに作製し、その生理的機能の一端を明らかにした。

#### 5 自己評価:

本研究課題の開始に際して、1) DOCK2シグナル伝達機構、2) 細胞運動の分子基盤、3) 免疫シナプス形成の分子機構とその意義、4) DOCK2を標的とした宿主応答制御法の開発、5) 他のCDMファミリー分子の機能とシグナル伝達機構という5つの柱のもと、13のテーマを設定したが、未発表のデータも含めると、概ね計画通りに進行したと言える。このように、多くの遺伝子改変マウスの作製と解析を可能にしたのは、技術員の人的サポートによるところが大きい。今後は、未発表の成果をきちんとした形でまとめること、及び本研究で得られたシーズを大きく発展させることに力を注いでいきたいと考えている。唯一反省すべきは、ウイルス感染とDOCK2という当初予定したテーマに関して、きちんとした研究が出来なかった点であろう。興味深いことに最近、HIV感染T細胞において、DOCK2がHIV Nefと複合体を形成することが報告された。それ故、DOCK2シグナルはAIDS発症にも関与している可能性があり、この点は今後の検討課題としたい。

#### 6 研究総括の見解:

免疫系に特異的に発現するDOCK2がケモカイン受容体やT細胞受容体の下流で機能するマスター分子で、リンパ球遊走や免疫シナプス形成に不可欠の分子であるという、本研究者自身の従来の研究成果を踏まえて、本研究では、DOCK2によるリンパ球ホーミングの制御機構、NKT細胞の発生におけるDOCK2の役割、DOCK2による好中球遊走の制御機構などの研究課題において極めて重要な研究成果を挙げ、この分野の研究に大きい貢献をした。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Handa Y, Suzuki M, Ohya K, Iwai H, Ishijima N, Koleske AJ, Fukui Y, Sasakawa C: *Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry via ELMO–Dock180 machinery. **Nature Cell Biol.**, 2006 in press

2. Kunisaki Y, Nishikimi A, Tanaka Y, Takii R, Noda M, Inayoshi A, Watanabe K, Sanematsu F, Sasazuki T, Sasaki T, Fukui Y: DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. **J. Cell Biol.**, 174: 647–652, 2006
3. Shulman Z, Pasvolsky R, Woolf E, Grabovsky V, Feigelson SW, Erez N, Fukui Y, Alon R: DOCK2 regulates chemokine-triggered lateral lymphocyte motility but not transendothelial migration. **Blood**, 108: 2150–2158, 2006
4. Kunisaki Y, Tanaka Y, Sanui T, Inayoshi A, Noda M, Nakayama T, Harada M, Taniguchi M, Sasazuki T, Fukui Y: DOCK2 is required in T cell precursors for development of V $\alpha$ 14 natural killer T (NKT) cells. **J. Immunol.** 176: 4640–4645, 2006
5. García-Bernal D, Sotillo-Mallo E, Nombela-Arrieta C, Samaniego R, Fukui Y, Stein JV, Teixidó J: DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 **J. Immunol.**, 177: 5215–5225, 2006
6. Jiang H, Pan F, Erickson LM, Jang MS, Sanui T, Kunisaki Y, Sasazuki T, Kobayasi M, Fukui Y: Deletion of DOCK2, a regulator of the actin cytoskeleton in lymphocytes, suppresses cardiac allograft rejection. **J. Exp. Med.**, 22: 1121–1130, 2005
7. Nombela-Arrieta C, Lacalle RA, Montoya MC, Kunisaki Y, Megías D, Marqués M, Carrera AC, Mañes S, Fukui Y, Martínez-A C, Stein JV: Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase  $\gamma$  during T and B lymphocyte homing. **Immunity**, 21: 429–441, 2004
8. Kunisaki Y, Masuko S, Noda M, Inayoshi A, Sanui T, Harada M, Sasazuki T, Fukui Y: Defective fetal liver erythropoiesis and T-lymphopoiesis in mice lacking phosphatidylserine receptor. **Blood**, 103: 3362–3364, 2004

#### 総説

1. 福井宣規: 好中球遊走を制御する Rac 活性化分子 DOCK2、実験医学、2006 印刷中
2. 福井宣規: リンパ球の運動性を制御する分子 DOCK2、医学のあゆみ、213:2915–2920、2005
3. 福井宣規: 免疫シナプス形成を制御する CDM ファミリー分子 DOCK2、Molecular Medicine 増刊「免疫 2005」41: 75–83、2004
4. 福井宣規: MHC による免疫システムの構築、ゲノム医学、4: 331–336、2004

#### 受賞

平成15年度日本免疫学会賞 2003.12.9

#### 招待講演

Fukui Y, Kunisaki Y, Nishikimi A:

DOCK2 is a Rac activator critical for neutrophil chemotaxis

The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2006 年 12 月 11-13 日、Osaka, Japan

Fukui Y:

Remodeling of the actin cytoskeleton in lymphocytes: from molecular mechanism to its clinical application.

The 8th FIMSA / IIS Advanced Immunology Course: Focus on Clinical Immunology, 2006 年 3 月 1-5 日、New Delhi, India

Fukui Y:

DOCK2, a regulator of the actin cytoskeleton in lymphocytes, is a novel molecular target for controlling allo-graft rejection and autoimmune diseases.

The 4th International Symposium of Kyoto T Cell Conference, 2005 年 4 月 8-10 日、kyoto, Japan

Fukui Y:

Remodeling of the actin cytoskeleton by the CDM family protein DOCK2: its critical role in migration and function of lymphocytes.

The 33<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2003 年 12 月 18-10 日、Fukuoka, Japan

Fukui Y:

Signaling and function of DOCK2, a regulator of the actin cytoskeleton in lymphocytes、German-Japan Immunology Meeting、2003 年 12 月 4-6 日、Nagasaki, Japan

その他 国内招待講演 6件