

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2012～2016

課題番号：24111007

研究課題名（和文）リンパ器官の連携を担う免疫動態の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism controlling leukocyte trafficking and its role in adaptive immune responses

研究代表者

福井 宣規 (Fukui, Yoshinori)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：60243961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 109,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫細胞の動態制御機構を解明し、免疫細胞の器官間移動に関する定量解析を行うことを目的とし、以下の成果を挙げた。1) DOCK8が免疫細胞の遊走に必須の役割を演じていることを実証し、その制御機構の全貌を解明した；2) DOCK8を発現できないように遺伝子操作したマウスでは、アトピー様皮膚炎を自然発症することを見だし、その解析から痒み物質IL-31の産生に重要な分子を同定した；3) 光変換蛍光タンパク質KikGRを発現するマウスを作成することで、定常状態や炎症モデルにおける免疫細胞の動態と性状を定量的に解析した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanism controlling leukocyte trafficking during adaptive immune responses and to obtain quantitative information on immune cell migration between lymphoid tissues. We have revealed that 1) DOCK8 plays a key role in migration of dendritic cells and macrophages by linking Cdc42 activation to actomyosin dynamics through the association with LRAP35a; and 2) CD4⁺ T cells from DOCK8-deficient mice produce large amounts of IL-31, a major pruritogen associated with atopic dermatitis, depending on the transcriptional factor EPAS1. In addition, we developed knock-in mice expressing photoconvertible protein KikGR and quantitatively analyzed migration of various subsets of leukocytes under steady and inflammatory conditions.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫応答 細胞運動 シグナル分子 低分子量Gタンパク質 蛍光プローブ イメージング アレルギー
炎症

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞の分化と免疫応答は、骨髄・胸腺・リンパ節・脾臓といったリンパ器官を主たる「場」として逐次的に引き起こされる四次元時空間事象である。免疫細胞は異なるリンパ器官を巡って産生・選別・活性化・維持されるため、免疫細胞が「動く」ということが、免疫システムの統御に不可欠であることは言うまでもない。例えばリンパ球は、骨髄・胸腺で分化・成熟した後、血行性にリンパ節などの二次リンパ組織へ移動する。ここで抗原に出会うとナイーブリンパ球は活性化されエフェクター細胞やメモリー細胞へと分化するが、抗原刺激を受けなかったリンパ球は輸出リンパ管を経てリンパ組織を離れ循環を繰り返す。一方、末梢組織に存在する樹状細胞は、抗原に暴露されると輸入リンパ管を介してリンパ節に移動し、T細胞に抗原を提示することで免疫応答を惹起する。抗原特異的T細胞の頻度が極めて低いことを考えると、免疫系はリンパ節という「場」を利用して、樹状細胞とT細胞の出会いを最大限に高めていると推察されるが、その動態制御機構の詳細は依然として不明である。例えば樹状細胞は、三次元微小環境下では、二次元環境と異なり、インテグリン非依存的に細胞外マトリックスの隙間を形を変えながら進んでいくことが報告されているが (Nature 453: 51-55, 2008)、このアメーバ様運動を制御するシグナル伝達機構やスペースを感知するメカニズムは明らかではない。また、リンパ球は免疫の場である器官内微小環境から分化・生存などのシグナルを受け動的平衡状態を維持しているため、リンパ器官の連携を理解する上で、リンパ球の状態変化と器官間移動を関連づけて定量的に解析することが重要であるが、技術的な困難さもあって、この分野の研究は進んでいない。

免疫細胞はケモカインや脂質メディエーターの濃度勾配を感知して移動するが、このためにはRac、Rap1、Cdc42、Rhoといった低分子量Gタンパク質が協調して機能することが不可欠である。これらの分子はいずれも、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)と称される分子群によって、GDPを結合した不活性型からGTPを結合した活性型へ変換されることで、その機能を発現する。従来GEFはDblホモロジー(DH)ドメインとpleckstrinホモロジー(PH)ドメインをタンデムにコードする分子として特徴づけられてきたが、近年このような構造を持たない新しいタイプのGEFとしてDOCKファミリーと呼ばれる分子群が同定され、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。DOCK8もその一つであり、その欠損はヒトにおいて重篤なアトピー性皮膚炎を伴う複合型免疫不全症を惹起するが、DOCK8の機能や作用機序の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、免疫の場の重要な機能として免疫応答を捉え、(1) DOCK8 やその関連分子の機能解析やシグナル解析を通じて、免疫細胞の動態とその制御機構を解明すると同時に、(2) 新たなマルチラベリング臓器間細胞動態評価系を開発し、器官内微小環境におけるリンパ球の状態変化と器官間移動の四次元数量的解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫細胞動態制御における DOCK8 の役割

各種免疫細胞サブセットを対象に、タキシスキャンやコラーゲンゲルを用いた細胞レベルのアッセイから、2光子共焦点レーザー顕微鏡を用いた組織あるいは個体レベルの解析まで、多階層に及ぶ多面的な解析を実施した。

(2) DOCK8 の動作原理の解明

DOCK8 会合分子の網羅的探索を行い、免疫細胞の動態制御に重要なシグナルネットワークの同定・解析を行った。また、DOCK8 の細胞内局在を制御する分子機構についても検討を加えた。

(3) DOCK8 欠損症の病態解明

抗原特異的TCRを発現するトランスジェニックマウスを用いて、T細胞の発生・分化・移動におけるDOCK8の役割を解析した。

(4) マルチラベリング臓器間細胞動態評価系の開発

光変換蛍光タンパク質KikGRを発現するマウスを作成することで、マルチラベリング臓器間細胞動態評価系を開発し、単一細胞レベルの遺伝子発現評価系と組み合わせ、定常状態や炎症モデルにおける免疫細胞の動態と性状を解析した。

4. 研究成果

(1) 免疫細胞動態制御における DOCK8 の役割

ノックアウトマウスを作成することで、DOCK8 を欠損した樹状細胞では、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での遊走応答が顕著に障害されていた。また、2光子共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析から、DOCK8 欠損樹状細胞では、subcapsular sinus floor の通過が障害されていることを見いだした。以上より、DOCK8 が間質組織での樹状細胞の運動に重要な分子であることが明らかとなった。一方、DOCK8 欠損マクロファージでは、nucleokinesis (核の移動) が障害され、その結果、三次元のみならず、二次元環境下で

の遊走も障害されていた。このように、DOCK8 欠損の影響は、樹状細胞とマクロファージで異なっていたが、これは恐らく細胞接着性の違いに起因するものと推察された。

(2) DOCK8 の動作原理の解明

DOCK8 が制御する低分子量 G タンパク質を探索した結果、Cdc42 特異的な GEF として機能することを明らかにし、その複合体の構造を決定した。DOCK8 を欠損した樹状細胞やマクロファージにおいて、ケモカイン刺激で誘導される活性型 Cdc42 の総量は変わらなかった。しかしながら、DOCK8 欠損マクロファージに野生型の DOCK8 を発現させると、遊走応答が回復するのに対して、GEF 活性のない DOCK8 変異体を発現させても、回復しなかった。このことから、DOCK8 は Cdc42 の活性化を介して、免疫細胞の運動を制御している事が明らかとなった。

LRAP35a は、Cdc42 のエフェクター分子である MRCK に会合するアダプター分子である。DOCK8 の会合分子を解析する過程で、DOCK8 が LRAP35a と会合し、myosin II regulatory light chain (MLC2) のリン酸化を制御することを見いだした。野生型の樹状細胞やマクロファージにおいて、DOCK8 と LRAP35a の相互作用をブロックすると、DOCK8 欠損細胞の場合と同様に、遊走応答が障害された。以上の結果から、DOCK8 が LRAP35a との会合を介して、Cdc42 の活性化をアクトミオシンのダイナミクスにリンクさせ、免疫細胞の動態を制御していることが明らかとなった。

(3) DOCK8 欠損症の病態解明

DOCK8 を欠損した CD4⁺ T 細胞では IL-31 の産生が著しく亢進することを見いだした。そのメカニズムを詳細に解析したところ、DOCK8 の下流で EPAS1 が作動し、IL-31 産生を誘導していることを発見した。EPAS1 は ARNT という分子と協調して低酸素応答を制御することが知られているが、EPAS1 による IL-31 の産生誘導に ARNT は必要ではなく、別の SP1 という分子が関与していた。一方、EPAS1 は細胞質から核に移行して機能するが、DOCK8 は MST1 という分子を介して、EPAS1 の核への移行を抑制していることを突き止めた。このことから、DOCK8 の下流で EPAS1 が作動し、EPAS1 が IL-31 産生に重要な役割を演じることが明らかになった。

(4) マルチラベリング臓器間細胞動態評価系の開発

皮膚炎症時に誘導される Treg において、免疫抑制関連遺伝子の発現は階層的であり、IL-10 を発現している Treg は稀で Th1 様細胞にバイアスしていること、および Treg の機能発現に、炎症部位への集積と複数の免疫抑

制関連遺伝子の発現が関わっていることを明らかにした。また、定常状態におけるエフェクター T 細胞の末梢リンパ組織への移動を定量解析すると共に、大腸炎発症時に、IL-10/CTLA-4 を高発現する Treg が誘導され、大腸から所属リンパ節に移行することを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 48 件)

Yamamura K, Uruno T, Shiraishi A, Tanaka Y, Ushijima M, Nakahara T, Watanabe M, Kido-Nakahara M, Tsuge I, Furue M, Fukui Y: The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to atopic skin inflammation via IL-31 induction. **Nature Commun.** 査読有. 8:13946. 2017. DOI: 10.1038/ncomms13946

Shiraishi A, Uruno T, Sanematsu F, Ushijima M, Sakata D, Hara T, Fukui Y: DOCK8 Protein Regulates Macrophage Migration through Cdc42 Activation and LRAP35a Interaction. **J. Biol. Chem.** 査読有. 292:2191-2202. 2017. DOI: 10.1074/jbc.M116.736306

Ikebuchi R, Teraguchi S, Vandenbon A, Honda T, Shand FH, Nakanishi Y, Watanabe T, Tomura M: A rare subset of skin-tropic regulatory T cells expressing *Il10/Gzmb* inhibits the cutaneous immune response. **Sci. Rep.** 査読有. 6:35002, 2016. DOI: 10.1038/srep35002.

Yanagihara T, Sanematsu F, Sato T, Uruno T, Duan X, Tomino T, Harada Y, Watanabe M, Wang Y, Tanaka Y, Nakanishi Y, Suyama M, Fukui Y: Intronic regulation of Aire expression by Jmjd6 for self-tolerance induction in the thymus. **Nature Commun.** 査読有 6:8820. 2015. DOI: 10.1038/ncomms9820.

Futamura K, Sekino M, Hata A, Ikebuchi R, Nakanishi Y, Egawa G, Kabashima K, Watanabe T, Furuki M, Tomura M: Novel full-spectral flow cytometry with multiple spectrally-adjacent fluorescent proteins and fluorochromes and visualization of in vivo cellular movement. **Cytometry A.** 査読有 . 87:830-42. 2015. DOI: 10.1002/cyto.a.22725.

Moalli F, Cupovic J, Thelen F, Halbherr P, Fukui Y, Narumiya S, Ludewig B, Stein JV: Thromboxane A2 acts as tonic immunoregulator by preferential

- disruption of low-avidity CD4⁺ T cell-dendritic cell interactions. **J. Exp. Med.** 査読有. 211:2507-2517. 2014. DOI: 10.1084/jem.20140137
- Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I, Nacher M, Pitaval C, Radovanovic I, Fukui Y, McEver RP, Filippi M-D, Lizasoain I, Ruiz-Cabello J, Zarbock A, Moro MA, Hidalgo A: Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. **Science** 346:1234-1238. 2014. DOI: 10.1126/science.1256478
- Watanabe M, Terasawa M, Miyano K, Yanagihara T, Uruno T, Sanematsu F, Nishikimi A, Côté JF, Sumimoto H, Fukui Y: DOCK2 and DOCK5 act additively in neutrophils to regulate chemotaxis, superoxide production, and extracellular trap formation. **J. Immunol.** 査読有. 193:5660-5667. 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1400885
- Ogawa K, Tanaka Y, Uruno T, Duan X, Harada Y, Sanematsu F, Yamamura K, Terasawa M, Nishikimi A, Côté JF, Fukui Y: DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links Fc ϵ RI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. **J. Exp. Med.** 査読有. 211: 1407-1419. 2014. DOI: 10.1084/jem.20131926
- Tomura M, Hata A, Matsuoka S, Shand FH, Nakanishi Y, Ikebuchi R, Ueha S, Tsutsui H, Inaba K, Matsushima K, Miyawaki A, Kabashima K, Watanabe T, Kanagawa O: Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. **Sci. Rep.** 査読有. 4: e6030. 2014. DOI: 10.1038/srep06030.
- Le Floch A, 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.** 査読有. 210:2721-2737. 2013. DOI: 10.1084/jem.20131324
- Nishikimi A, Kukimoto-Niino M, Yokoyama S, Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. **Exp. Cell. Res.** 査読有 (review). 319:2343-2349. 2013. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.07.024
- Kamakura S, Nomura M, Hayase J, Iwakiri Y, Nishikimi A, Takayanagi R, Fukui Y, Sumimoto H: The cell polarity protein mlnsc regulates neutrophil chemotaxis via a noncanonical G protein signaling pathway. **Dev. Cell.** 査読有. 26:292-302. 2013. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.06.008
- 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**, 査読有. 122:386-393. 2013. DOI: 10.1182/blood-2012-12-475897
- 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.** 査読有. 288:8092-8100. 2013. DOI: 10.1074/jbc.M112.410423
- Tomura M, Sakaue-Sawano A, Mori Y, Takase-Utsugi M, Hata A, Ohtawa K, Kanagawa O, Miyawaki A: Contrasting quiescent G0 phase with mitotic cell cycling in the mouse immune system. **PloS one** 査読有. 8: e73801. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0073801.
- 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** 査読有. 7:e46277. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0046277
- 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**, 査読有. 119: 4451-4461. 2012. DOI: 10.1182/blood-2012-01-407098
- 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.* 査読有. 19: 488-497. 2012. DOI: 10.1016/j.chembiol. 2012.03.008

〔学会発表〕(計 91 件)

福井宣規: 生体防御システムにおける DOCK ファミリー分子の機能とその制御機構. 生体防御学会シンポジウム、2016 年 7 月 7 日-9 日、九州大学コラボステーション (福岡)、招待講演

福井宣規: 免疫システムにおける DOCK ファミリー分子の機能とその制御機構. 第 68 回日本細胞生物学会大会、2016 年 6 月 15 日-17 日、京都テルサ (京都)、招待講演

福井 宣規: マスト細胞の脱顆粒反応における DOCK5 の役割とその制御機構、第 64 回日本アレルギー学会学術大会、2015 年 5 月 26 日-28 日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京)、招待講演

Michio Tomura: Visualization of trafficking and presentation of tumor antigen by dendritic cells. Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Function and Molecular Activities, 2015 年 1 月 26 日-28 日、京都国際会議場 (京都) シンポジウム

Fukui Y: A novel mechanism controlling Aire protein expression in the thymus. The Fourth BIZAN Immunology Symposium, 2015 年 1 月 29 日-1 月 30 日、藤井節郎記念医科学センター 多目的ホール (徳島)、招待講演

Fukui Y: Critical roles of DOCK family proteins in migration and activation of leukocytes. Keystone Symposium, 2015 年 1 月 13 日-1 月 18 日、Vancouver (Canada)、招待講演

Fukui Y: Critical roles of DOCK family proteins in migration and activation of leukocytes. The 24th Hot Spring Harbor International Symposium, 2014 年 11 月 7 日-11 月 8 日、九州大学コラボステーション (福岡)、講演

戸村道夫: 腸管免疫系における臓器間免疫細胞動態. 第 38 回阿蘇シンポジウム、2014 年 7 月 25 日-26 日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル (熊本)、教育講演

戸村道夫: 皮膚免疫制御機構における皮膚由来制御性 T 細胞の役割、第 38 回日本リンパ学会総会、2014 年 6 月 20 日-22 日、北里大学白金キャンパス薬学部コンベンションホール (東京)、教育講演

Michio Tomura: Visualization of immune response by observing cell-cycle, movement and death. New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms, COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES, 2013 年 8 月 20 日-23 日、蘇州市 (中国)、教育講演

Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. Post-GCOE Symposium and Retreat in Singapore, 2013 年 3 月 4 日-5 日、Singapore (Singapore)、招待講演

Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. Centennial Hashimoto Disease International Symposium, 2012 年 12 月 2 日-4 日、ホテル日航福岡 (福岡)、招待講演

〔図書〕(計 4 件)

Suan D, Hampton HR, Tomura M, Kanagawa O, Chtanova T, Phan TG: Optimizing fluorescence excitation and detection for intravital two-photon microscopy. *Methods Cell Biol* (Edited by P. Michael Conn) ELSEVIER、113: 311-323. (2013) DOI: 10.1016/B978-0-12-407239-8.00014-8.

Tomura M, Kabashima K: Analysis of cell movement between skin and other anatomical sites in vivo using photoconvertible fluorescent protein "Kaede"-transgenic mice. *Molecular Dermatology, Methods Mol Biol* (Edited by Cristina Has and Cassian Sitaru), Springer, 961: 279-286 (2013) DOI: 10.1007/978-1-62703-227-8_18.

戸村道夫: 蛍光色素の基本、選び方からマルチカラー解析まで、直伝! フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる!、実験医学別 (中内啓光/監, 清田純/編)、羊土社、22-33 (2013)

戸村道夫: 細胞機能を可視化する次世代のレポーターマウスのつくり方、*in vivo*イメージング実験プロトコール (石井優 編)、実験医学別冊、羊土社、212-223 (2012)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 4 件)

名称: ピリジノン化合物及びその用途
発明者: 福井宣規、宇留野武人、金井求、松永茂樹、白井孝宏、横山茂之、本間光貴、新

野睦子、高谷大輔
権利者：九州大学
種類：特許
番号：特願 2015-39071
出願年月日：2015 年 2 月 27 日
国内外の別： 国内

名称：ピリジノン化合物及びその用途
発明者：福井宣規、宇留野武人、金井求、松永茂樹、白井孝宏、横山茂之、本間光貴、新野睦子、高谷大輔
権利者：九州大学
種類：特許
番号：PCT/JP2016/055927
出願年月日：2016 年 2 月 26 日
国内外の別： 国外

名称：アトピー性皮膚炎モデル非ヒト動物及びその用途
発明者：福井宣規、山村和彦、宇留野武人、古江増隆、
権利者：九州大学
種類：特許
番号：特願 2016-034510
出願年月日：2016 年 2 月 25 日
国内外の別： 国内

名称：アトピー性皮膚炎モデル非ヒト動物及びその用途
発明者：福井宣規、山村和彦、宇留野武人、古江増隆、
権利者：九州大学
種類：特許
番号：PCT/JP2017/007198
出願年月日：2017 年 2 月 24 日
国内外の別： 国外

〔その他〕
ホームページ
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/>

メディア報道
DOCK8 とアトピー性皮膚炎に関して
新聞：朝日、毎日、読売、日本経済、産経、日刊工業、西日本等
テレビ：NHK その他

DOCK5 とアレルギーに関して
新聞：毎日、日刊工業、西日本等
テレビ：NHK その他

アウトリーチ活動
プレス発表 3 件

受賞、等
平成 25 年度 文部科学大臣表彰 科学技術賞（研究部門）受賞

6. 研究組織
(1) 研究代表者

福井 宣規 (FUKUI, Yoshinori)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：60243961

(2) 研究分担者
戸村 道夫 (TOMURA, Michio)
大阪大谷大学・薬学部・教授
研究者番号：30314321