

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02406

研究課題名(和文) 腫瘍の免疫回避機構におけるRac活性化因子DOCK1の機能

研究課題名(英文) Role of the Rac activator DOCK1 in immune evasion by tumor

研究代表者

宇留野 武人 (Urano, Takehito)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：80532093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、がん細胞が免疫系の監視・攻撃から逃れる仕組み(免疫回避)におけるDOCK1及び関連分子の機能的な重要性を調べた。DOCK1はRac活性化を介してインターフェロン誘導性遺伝子の発現及び転写因子STAT3の活性調節に関与し、腫瘍部への免疫細胞浸潤を制御することが判った。一方、腫瘍によって産生され、免疫細胞の遊走と活性化を制御するDOCK2の内因性阻害因子として働く脂質代謝産物を同定した。以上よりDOCK1及び関連分子の腫瘍-免疫相互作用における重要性が明らかになった。本成果は腫瘍免疫をターゲットにした新たな治療戦略の開発につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの悪性化において、がん細胞が周囲の免疫細胞の攻撃から逃れるメカニズム(免疫回避)の重要性が明らかとなっている。しかしながら、腫瘍-免疫細胞相互作用の実体には不明な点が多い。本研究課題は、DOCK1及び関連分子を介した免疫回避の仕組みの一端を明らかにし、既知の免疫抑制機構とは異なる新たな免疫回避機構の存在を示すことが出来た。その成果は将来的には腫瘍免疫をターゲットにした新たな治療戦略の開発や診断マーカーの創出につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The role of DOCK1 and its related proteins in tumor immune evasion was investigated. DOCK1-Rac signal was associated with the expression of some of the interferon-responsive genes as well as STAT3 phosphorylation. Genetic ablation of DOCK1 in cancer cells resulted in marked infiltration of immune cells into tumor in vivo. A lipid metabolite that functions as an endogenous inhibitor of DOCK2 and regulates immune cell motility was identified. Thus, the study elucidates the critical roles of DOCK1 and related proteins in tumor-immune interactions, which could be exploited for the future development of novel anticancer therapeutics.

研究分野：機能生化学

キーワード：腫瘍制御 細胞骨格 シグナル伝達 低分子量Gタンパク質 免疫回避

1. 研究開始当初の背景

がんは、多くの先進国で長年死因の第一位を占め、大きな社会問題となっており、現代医学が対策を迫られる喫緊の課題である。腫瘍は、従来その逸脱した生存・増殖能および浸潤・転移能によって特徴づけられてきたが、近年新たな特性として免疫系の監視または攻撃から逃れる「免疫回避能」に注目が集まっている (Cell 144:646, 2011; Semin Cancer Biol 35:S185, 2015; Cell 168:707, 2017)。がん組織の微小環境 (tumor microenvironment: TME) において、がん細胞は免疫抑制性のサイトカインや細胞表面分子、代謝酵素の生成を介して、ナチュラル・キラー (NK) 細胞や CD8+T 細胞といった細胞障害性を有する免疫細胞の攻撃から逃れている (免疫回避)。この免疫回避機構の発動に重要な因子の一つがインターフェロン γ (IFN γ) である。IFN γ は、活性化した NK 細胞や T 細胞から放出され、がん細胞表面に発現する IFN 受容体に結合し、Jak-STAT 系を介した細胞内シグナル伝達を惹起して様々な遺伝子発現を誘導する (Nat Rev Immunol 6:836, 2006; Semin Oncol 41:156, 2014)。中でも、IFN γ 刺激に応答して発現する PD-L1 (PD-1 ligand 1) は、免疫細胞表面に発現する PD-1 (programmed cell death-1) 受容体を介して免疫細胞の活性化を抑制することで、免疫回避に重要な役割を演じることが明らかとなっている (Nat Rev Immunol 8:467, 2008)。実際、PD-1/PD-L1 システムを標的にした抗体療法は、悪性黒色腫 (メラノーマ) において劇的な治療効果をもたらすことが示された (N Engl J Med 366:2443, 2012; N Engl J Med 369:134, 2013)。しかしながら、該療法に対して抵抗性を示すケースも多く報告されており、他の標的分子の探索や作用機序に関する研究が世界中で精力的に進められている。

DOCK1 は、線虫からヒトまで進化的に保存された低分子量 G タンパク質 Rac の特異的な GEF (GTP/GDP 交換反応促進因子=活性化因子) であり、Rac 活性化を介して細胞骨格の再編成を制御し、細胞運動や細胞膜動態など様々な細胞活動を調節する。がん細胞においては、DOCK1-Rac シグナルはマクロピノサイトーシスを介した細胞外からの栄養取り込みを促進して低栄養条件下でのがん細胞の生存及び増殖を支えると共に、細胞浸潤突起 (invadopodia) の形成を促し、浸潤・転移を亢進し、がんの悪性化に寄与している (Genes Dev 28:533, 2014; Cell Reports 2017)。DOCK1 の高発現や機能変異は様々ながん種の悪性化に寄与することが報告されており、がん細胞の浸潤・転移や生存・増殖亢進といった観点から機能解析がなされてきたが、腫瘍免疫回避における DOCK1 の機能については従来不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍免疫回避における DOCK1 の関与とその分子機序を明らかにすることにある。またその知見に基づいた新たな腫瘍免疫制御法を探索することにある。腫瘍免疫回避には、様々な腫瘍-免疫細胞相互作用が介在するが、特に、免疫回避機構の発動にはインターフェロン γ (IFN γ) が重要であり、PD-L1 以外にも様々な遺伝子が IFN γ 刺激によって発現誘導される。これらのインターフェロン誘導性遺伝子群 (Interferon stimulated genes: ISGs) は、がん細胞の DNA ダメージ応答にも関与し、化学療法や放射線療法に対する抵抗性 (悪性度) と相関することが報告されているが (PNAS 105:18490, 2008)、腫瘍免疫回避との関連性は明らかにされていない。そこで、本研究では ISGs の発現における DOCK1 の関与を調べる。

3. 研究の方法

(1) DOCK1 によって発現制御される ISG サブセットの同定

各種がん細胞株の DOCK1 欠損株を CRISPR-Cas9 システムを使ったゲノム編集によって作製し、IFN γ で処理した親株と DOCK1 欠損株から RNA を抽出し、マイクロアレイあるいは RNAseq による遺伝子発現比較解析をおこない、発現量に差がある ISGs を同定する。

(2) DOCK1 による ISG サブセットの発現調節機構の解析

各種がん細胞株の親株と DOCK1 欠損株を用いて、IFN γ シグナル伝達に関わる分子の発現、翻訳後修飾、会合を生化学的に解析する。また、同定した ISG のプロモーターを使ったレポーターアッセイ系を構築し転写調節機構を調べる。

(3) 腫瘍免疫回避における DOCK1 の関与

各種がん細胞株の親株と DOCK1 欠損株の NK 細胞や CD8+T 細胞による細胞傷害性 (51Cr 放出アッセイ) を比較検討する。

(4) DOCK1 を介した免疫回避機構の動物個体における検証

マウスがん細胞株を同系マウスに移植して腫瘍形成能と免疫細胞の浸潤度を比較検討する。さらに、マウス膵臓癌自然発症モデルである KPC モデル (LSL-KRASG12D/Trp53R172H/+ /PDX1-Cre) に DOCK1-cKO (コンディショナル欠損) を交配して、腫瘍形成及び免疫細胞浸潤を評価する。

(5) DOCK 分子を介した腫瘍免疫相互作用の制御法の探索

DOCK 機能を制御する化合物を取得するために、Rac 活性化を指標とした *in vitro* GEF アッセイを用いて既存薬ライブラリーをスクリーニングする。

4. 研究成果

(1) DOCK1 によって発現制御される ISG サブセットの同定

ゲノム編集法によって、各種マウスおよびヒトがん細胞株の DOCK1 欠損株を作製した（マウス：肺がん細胞株 3LL、大腸がん細胞株 MC38、メラノーマ細胞株 B16F10、ヒト：膵臓癌細胞株 MiaPaCa-2、大腸がん細胞株 DLD-1）。IFN γ 刺激した細胞から RNA を抽出してマイクロアレイあるいは RNA-seq による遺伝子発現を比較したところ、ヒト膵臓癌細胞株 MiaPaCa-2 において ISG15, OASL2, IFIT1, RTP4 といった ISG サブセットの遺伝子発現が DOCK1 欠損株で著しく低下していた。ISGs の転写及び発現制御に中心的な役割を果たす転写因子 STAT1 の発現は微減にとどまっていたため、翻訳後修飾や活性調節の差異が影響している可能性が考えられた。他方、B16F10 マウスメラノーマ細胞やマウス大腸がん細胞株 MC38 においても同様の実験を行ったが、DOCK1 欠損による ISGs 発現変動の差異は僅かで、むしろストレス応答やアポトーシスに関連した遺伝子群の発現が大きく低下していた。以上、DOCK1 が特定の ISGs 発現に関与することは一部のがん細胞株では示せたが、がん種あるいは細胞株によって大きな差異があることが判明した。

(2) DOCK1 によって選択的に発現制御される ISG サブセットの発現調節機構

IFN γ 刺激した細胞の STAT1 及び STAT3 のリン酸化状態をウェスタンブロット解析した結果、細胞株によらず親株と DOCK1 欠損株の間で STAT1 のリン酸化には大きな差はなかった。一方、STAT3 の活性調節に重要な 705 番目のチロシンのリン酸化は一様に低下していた。独自に開発した DOCK1 阻害剤 TBOPP で処理した場合にも該リン酸化が抑制されたことから、DOCK1-Rac1 シグナルが STAT3 活性調節に関与している可能性が高いと考えられた。生化学解析の結果、DOCK1 と STAT3 の直接会合は示せなかったが、Rac1 と STAT3 が直接会合することが判った。さらに DOCK1-Rac-STAT3 三者複合体の形成を示唆するデータも得られた。現時点で DOCK1-Rac による STAT3 の機能調節の具体的な分子機序の解明には至っていないが、相互作用ドメインの特定を含め、今後更なる解析が必要である。

(3) DOCK1 欠損がん細胞株の細胞障害性

B16F10 メラノーマ細胞株を IFN γ 刺激して OVA (ovalbumin) 抗原ペプチドと一定時間インキュベーションしたのちに、活性化した OT-I CD8T 細胞と混ぜて細胞障害性を調べた。その結果、DOCK1 欠損株では CD8T 細胞による細胞障害性が亢進していた。この際親株と DOCK1 株の間では細胞表面の PD-L1 分子及びクラス I 分子の発現レベルに差はなかった。この結果は、DOCK1 を介した STAT3 シグナル下流における ISGs 発現が CD8T 細胞による細胞障害性に対して抵抗性を付与している可能性を示す。

(4) DOCK1 を欠損した腫瘍への免疫細胞浸潤亢進

MC38 大腸がん細胞株を同系の C57BL/6 マウスに皮下移植して腫瘍形成を比較したところ、DOCK1 欠損細胞株では腫瘍径が有意に縮小した。がん組織における免疫細胞プロファイルをフローサイトメトリー解析した結果、DOCK1 欠損がん細胞株では浸潤 CD8T 細胞の割合が増加していた。一方、CD4T 細胞や NK 細胞の割合には差がなかった。マウスの膵臓がん発症モデルである KPC マウスに DOCK1 コンディショナル欠損マウスを交配して、膵臓がん発症過程における DOCK1 機能を解析した。膵臓における DOCK1 タンパク質の消失はウェスタンブロット法によって確認したが、DOCK1 欠損による膵臓の器官形成自体への影響は無かった。個体の生存率や発症頻度を経過観察中であるが(40-80 週)、DOCK1 欠損によって腫瘍形成が消失することは無く、野生型マウス同様にがんを発症する個体も見られた。膵臓臓器全体から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行なった結果、DOCK1 を欠損した膵臓では免疫関連遺伝子、特に B 細胞に特徴的な遺伝子発現が著しく亢進していた。このことは DOCK1 機能が消失した膵臓においては特定の免疫細胞集団の浸潤が亢進していることを示唆する。今後、腫瘍浸潤細胞のフローサイトメトリー解析によって細胞種を特定して機能解析を進めることによって DOCK1 を介した TME 変容の実体を解明する必要がある。

(5) 腫瘍免疫動態を制御する化合物の探索

上記に関連して、腫瘍及び免疫細胞動態の制御を目的として DOCK 分子をターゲットにした低分子阻害化合物の探索を行った。その結果、コレステロール硫酸 (Cholesterol sulfate: CS) が DOCK2 の強力な阻害活性を持つことを見出した (Sakurai, Uruno, et al. Sci Signal, 2018)。CS はサブマイクロモラー濃度で T 細胞や好中球の遊走を抑制し、Sult2B1b ノックアウトマウスを用いた解析によって、生体内では眼の免疫回避に重要であることを明らかにした。CS を産生する酵素の Sult2B1b は様々ながん細胞で高発現していることが Public cancer database から判明しており、CS を介した免疫抑制は腫瘍免疫回避機構をターゲットにした新たな治療法の

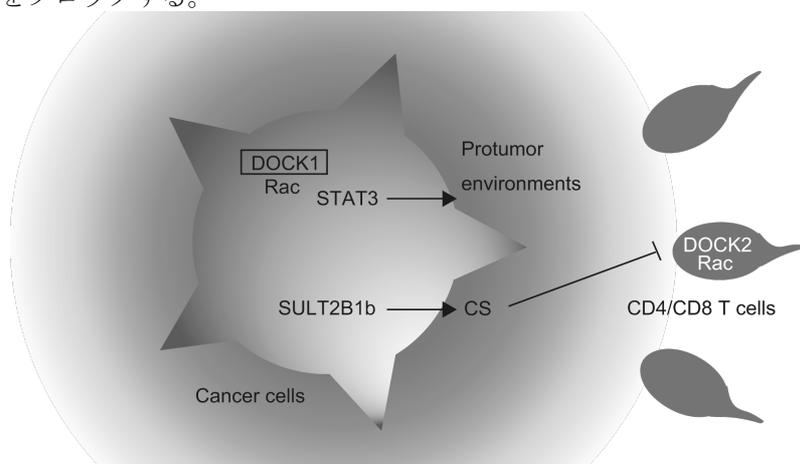
開発につながる可能性が高い。

(6) DOCK ファミリー分子を介した免疫制御機構

上記以外にも、免疫細胞動態に関連して DOCK ファミリー分子の機能解析を行い、ヒト複合型免疫不全症の責任因子である DOCK8 について、リン脂質結合特異性を決定し、細胞膜局在機構と樹状細胞の 3 次元環境下における遊走における機能的な重要性を明らかにした (Sakurai et al. Life Sci Alliance, 2021)。また、DOCK8 欠損に起因するアトピー性皮膚炎の痒み感知機構を解明し神経ペプチドの neurokinin B の介在を示した (Sakata et al. J Allergy Clin Immunol, 2018)。さらに、腸管の恒常性維持に重要な M 細胞の分化や innate lymphoid cell-3 (ILC3) の生存維持に DOCK8 が重要な役割を果たしていることも明らかにした (Kunimura et al. Cell Reports 2019; Aihara et al. Int Immunol, 2021)。これらの結果は、今後 DOCK ファミリー分子を標的とした腫瘍及び免疫細胞の動態制御の手法を研究開発する際には有用な知見になると考えられる。

図：DOCK1 及び関連分子を介した腫瘍免疫回避機構

がん細胞の周囲には DOCK1-Rac-STAT3 経路を介した免疫回避（腫瘍促進的）環境が形成される。また、SULT2B1b によって産生された CS の化学的バリアは、DOCK2-Rac を介して免疫細胞の遊走を抑制し浸潤をブロックする。



以上、本研究課題は、DOCK1 及び関連ファミリー分子を介した免疫回避の仕組みの一端を明らかにし、既知の免疫抑制機構とは異なる免疫回避機構の存在を示した（上図）。それ以外にも DOCK8 に関する研究を進めることで DOCK ファミリー分子を介した免疫動態制御に関する多くの知見が得られた。当初の目的とした DOCK1 の ISGs 発現への関与は一部のがん細胞株で確認できたのみで詳細な分子メカニズムの解明には至らなかったが、ISGs の発現制御に関わる STAT1/STAT3 分子以外の cGAS 等シグナル修飾因子の関与ががん種・細胞株によって異なるためと推測される。本課題の腫瘍-免疫細胞動態における DOCK 分子に関する研究は国内外でも独自性及び重要度が高いと考えられる。本成果は、将来的には腫瘍免疫をターゲットにした新たな治療戦略の開発や診断マーカーの創出につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sakurai Tetsuya, Kukimoto-Niino Mutsuko, Kunimura Kazufumi, Yamane Nana, Sakata Daiji, Aihara Ryosuke, Yasuda Tomoharu, Yokoyama Shigeyuki, Shirouzu Mikako, Fukui Yoshinori, Uruno Takehito	4. 巻 4
2. 論文標題 A conserved PI(4,5)P2-binding domain is critical for immune regulatory function of DOCK8	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000873-1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000873	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aihara Ryosuke, Kunimura Kazufumi, Watanabe Mayuki, Uruno Takehito, Yamane Nana, Sakurai Tetsuya, Sakata Daiji, Nishimura Fusanori, Fukui Yoshinori	4. 巻 33
2. 論文標題 DOCK8 controls survival of group 3 innate lymphoid cells in the gut through Cdc42 activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 149 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kunimura Kazufumi, Uruno Takehito, Fukui Yoshinori	4. 巻 32
2. 論文標題 DOCK family proteins: key players in immune surveillance mechanisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 5 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakata Daiji, Uruno Takehito, Matsubara Keisuke, Andoh Tsugunobu, Yamamura Kazuhiko, Magoshi Yuki, Kunimura Kazufumi, Kamikaseda Yasuhisa, Furue Masutaka, Fukui Yoshinori	4. 巻 144
2. 論文標題 Selective role of neurokinin B in IL-31-induced itch response in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1130 ~ 1133.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2019.06.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kunimura Kazufumi, Sakata Daiji, Tun Xin, Uruno Takehito, Ushijima Miho, Katakai Tomoya, Shiraishi Akira, Aihara Ryosuke, Kamikaseda Yasuhisa, Matsubara Keisuke, Kanegane Hirokazu, Sawa Shinichiro, Eberl Gerard, Ohga Shouichi, Yoshikai Yasunobu, Fukui Yoshinori	4. 巻 29
2. 論文標題 S100A4 Protein Is Essential for the Development of Mature Microfold Cells in Peyer's Patches	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2823 ~ 2834.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakurai Tetsuya, Uruno Takehito, Sugiura Yuki, Tatsuguchi Takaaki, Yamamura Kazuhiko, Ushijima Miho, Hattori Yuko, Kukimoto-Niino Mutsuko, Mishima-Tsumagari Chiemi, Watanabe Mayuki, Suematsu Makoto, Fukui Yoshinori	4. 巻 11
2. 論文標題 Cholesterol sulfate is a DOCK2 inhibitor that mediates tissue-specific immune evasion in the eye	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaao4874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aao4874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomino Takahiro, Tajiri Hirotsada, Tatsuguchi Takaaki, Shirai Takahiro, Oisaki Kounosuke, Matsunaga Shigeki, Sanematsu Fumiyuki, Sakata Daiji, Yoshizumi Tomoharu, Maehara Yoshihiko, Kanai Motomu, Cote Jean-François, Fukui Yoshinori, Uruno Takehito	4. 巻 497
2. 論文標題 DOCK1 inhibition suppresses cancer cell invasion and macropinocytosis induced by self-activating Rac1P29S mutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 298 ~ 304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.02.073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Sakurai T, Uruno T, Fukui Y
2. 発表標題 The biological function of naturally-occurring DOCK2 inhibitor in tissue-specific immune evasion.
3. 学会等名 103rd Annual meeting of American Association of Immunologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Urano T, Fukui Y
2. 発表標題 DOCK1 as a novel target for controlling RAS-driven cancer cell survival and invasion.
3. 学会等名 An AACR Special Conference on "Targeting RAS-driven cancers" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuguchi T, Urano T, Fukui Y
2. 発表標題 DOCK1 as a novel molecular target for controlling cancer cell survival and invasion.
3. 学会等名 The 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 IL-31介在性疾患の予防又は治療剤及び医薬組成物	発明者 福井宣規、坂田大治、宇留野武人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/044886	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 DOCK1阻害化合物およびその用途	発明者 福井宣規、宇留野武人、金井求、生長幸之助、堤亮祐	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-225753	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アトピー性皮膚炎の予防又は治療剤及び医薬組成物	発明者 福井宣規、坂田大治、宇留野武人、安東嗣修	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-215017	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究室ホームページ： <https://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/>

研究者情報： <https://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004217/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	福井 宣規 (Fukui Yoshinori)	九州大学・生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------