

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590586

研究課題名(和文) 抗原特異的液性免疫応答における DOCK2 の役割とその制御

研究課題名(英文) Role of DOCK2 in antigen-specific humoral immunity

研究代表者

錦見 昭彦 (Nishikimi, Akihiko)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：70404019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量Gタンパク質Racは、B細胞の抗原受容体の下流で機能するシグナル伝達因子であることが知られている。本研究では、免疫細胞特異的に発現するRac活性化因子DOCK2が、B細胞受容体の下流におけるRac活性化に不可欠であり、DOCK2を欠損したB細胞は、免疫シナプスを正常に形成することができず、抗原刺激に応答した増殖能が低下していることを明らかにした。また、DOCK2欠損マウスは、抗原に応答した抗体産生能が障害されており、DOCK2を介したRac活性化が、液性免疫応答に重要な役割を担っていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The small G protein Rac is known to play important roles in B cell activation by acting downstream of B cell receptor (BCR). We found that DOCK2, an atypical Rac activator predominantly expressed in hematopoietic cells, is essential for BCR-mediated Rac activation. DOCK2-deficient B cells failed to form immunological synapse and displayed impaired antigen-stimulated growth in vitro. DOCK2 knock-out mice were shown to have impaired production of antibody in response to antigen immunization, indicating DOCK2 plays a critical role in humoral immunity.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞 抗原応答 シグナル伝達 抗体産生

1. 研究開始当初の背景

B 細胞は、BCR を介して抗原を認識し、細胞内に増殖、分化、活性化を促すシグナルを伝達する。B 細胞受容体の下流で機能するシグナル因子のひとつとして Rac (Rac1 および Rac2) が知られており、Rac を欠損した B 細胞では、BCR 刺激に応答した増殖や生存性の向上が障害されることが明らかになっている。Rac は Rho ファミリーに属する低分子量 G タンパク質であり、GDP に結合した不活性型から GTP に結合した活性型になることで、下流の分子にシグナルを伝える。G タンパク質において、不活性型から活性型へのコンフォメーション転換を担っているのが、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) とよばれるタンパク質である。

これまで、BCR の下流で Rac 活性化を担っている GEF は Vav (Vav1, Vav2, Vav3) であると考えられてきた。事実、Vav 欠損マウスでは、B 細胞の分化が障害されており、その B 細胞は BCR 刺激による増殖が抑制されている。しかしながら、Rac 欠損マウスと Vav 欠損マウスの表現型を比較すると、両者が必ずしも一致しないことが明らかになっている。したがって、Vav が Rac の活性化を担っているわけではない可能性を示唆される。そこで、BCR の下流におけるシグナル伝達系を理解する上で、実際に Rac 活性化を制御している因子を同定する必要がある。申請者らの研究より、T 細胞、好中球、NK 細胞、形質細胞様樹状細胞など、様々な免疫細胞において、免疫細胞に特異的に発現する GEF である DOCK2 が、Rac 活性化のマスター分子として機能していることが明らかになっており、B 細胞でも DOCK2 が Rac を制御しているのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

(1) B 細胞の抗原受容体を介したシグナル伝達系において、Rac が重要な役割を果たしていることが知られているが、抗原刺激に応答して Rac の活性化を制御する GEF は明らかになっていない。この時機能する GEF が DOCK2 であることを確認する。また、B 細胞受容体の下流で機能するその他のシグナル伝達因子における DOCK2 の役割について検討する。

(2) B 細胞の抗原刺激に対する増殖応答に Rac が重要な役割を担っていることが明らかになっている。そこで、この増殖応答における DOCK2 の役割を明らかにする。

(3) Rac はアクチン細胞骨格の再構成を制御するシグナル因子であり、リンパ球と抗原提示細胞の間で、免疫シナプスが形成される際に不可欠な因子である。そこで、DOCK2 欠損が、B 細胞と抗原提示細胞が免疫シナプスを形成する際のアクチン重合、ならびに、免疫シナプスの形態におよぼす影響について検討する。

(4) DOCK2 欠損マウス、ならびに、B 細胞特異的に DOCK2 を欠損したコンディショナルノックアウトマウスを用い、抗原特異的抗体の産生能について検討することにより、個体の液性免疫応答において、B 細胞で DOCK2 が果たす役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) B 細胞受容体を介した Rac 活性化における DOCK2 の役割
野生型および DOCK2 欠損マウスより単離した B 細胞を、抗 IgM 抗体 F(ab')₂ フラグメントで刺激したものを可溶化し、PAK-PBD を結合したビーズでプルダウンし、ウエスタンブロッティングにより、PAK-PBD に会合した Rac (活性型 Rac) を検出した。

(2) 抗原刺激に応答した B 細胞の増殖における DOCK2 の役割
野生型および DOCK2 欠損マウス由来の B 細胞を、抗 IgM 抗体 F(ab')₂ フラグメントで刺激した際の増殖応答を、³H]-チミジンの取り込みにより検討した。

(3) 免疫シナプス形成における DOCK2 の役割
B 細胞受容体のトランスジェニックマウスと DOCK2 欠損マウスを交配し、特定の B 細胞受容体発現し、かつ、DOCK2 を欠損したマウスを作製した。このマウス由来、あるいは、の B 細胞と、細胞表面に当該 B 細胞受容体が認識する抗原を発現した細胞と共培養し、免疫シナプスを形成させ、B 細胞の免疫シナプス形成における DOCK2 の有無の影響について検討した。

(4) 個体の液性免疫応答に対する DOCK2 の役割
野生型、DOCK2 欠損、あるいは、B 細胞特異的 DOCK2 欠損マウスに抗原を投与し、抗原に特異的な抗体の産生を検討した。

4. 研究成果

(1) B 細胞の抗原刺激に応答した Rac1 および Rac2 の活性化について検討したところ、DOCK2 欠損 B 細胞においていずれの活性化も障害されていた。一方、Src キナーゼや MAP キナーゼなど、他のシグナル伝達因子の活性化に対する DOCK2 欠損の影響は認められなかった。これらのことから、B 細胞の抗原受容体の下流での Rac 活性化に DOCK2 が不可欠な役割を果たしていることが示された。

(2) 抗原刺激に対する B 細胞の増殖応答について検討したところ、DOCK2 欠損細胞の増殖が、野生型の細胞に比べて著しく低下していることが示された。このことから、DOCK2 が B 細胞の抗原に応答した増殖に重要な役割を担っていることが示された。

(3) DOCK2 を欠損した B 細胞では、抗原・抗

原受容体複合体が、十分な免疫シナプスを形成せず、シグナル伝達が不完全になっていることが示唆された。また、免疫シナプス形成時のアクチン重合が障害されており、このことが、免疫シナプスが正常に形成されないことの一因となっていると考えられた。

(4) 野生型、DOCK2 欠損、あるいは、B 細胞特異的 DOCK2 欠損マウスを免疫し、抗原特異的な抗体産生について検討したところ、DOCK2 欠損マウス、ならびに、B 細胞特異的 DOCK2 欠損マウスにおいて、野生型マウスと比較して、抗体産生能が低下していた。このことから、B 細胞における DOCK2 の発現が、液性免疫応答に必須であることが示された。

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 10 件)

1. Ishihara S, Nishikimi A, Umemoto E, Miyasaka M, Saegusa M, Katagiri K. Dual functions of Rap1 are crucial for T-cell homeostasis and prevention of spontaneous colitis. *Nat. Commun.*, 6: 8982, 2015 (査読有)
DOI: 10.1038/ncomms9982.
2. 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.*, 193: 5660-5667, 2014 (査読有)
DOI: 10.4049/jimmunol.1400885.
3. Nishikimi A, Ishihara S, Ozawa M, Etoh K, Fukuda M, Kinashi T, Katagiri K. Rab13 acts downstream of the kinase Mst1 to deliver the integrin LFA-1 to the cell surface for lymphocyte trafficking. *Sci. Signal.*, 7: ra72, 2014 (査読有)
DOI: 10.1126/scisignal.2005199.
4. 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 RI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. *J. Exp. Med.*, 211: 1407-1419, 2014 (査読有)
DOI: 10.1084/jem.20131926.
5. Nishikimi A, Kukimoto-Niino M, Yokoyama S, Fukui Y. Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. *Exp. Cell Res.*, 319: 2343-2349, 2013 (査読有)
DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.07.024.
6. 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: 292-302, 2013 (査読有)
DOI: 10.1016/j.devcel.2013.06.008.
7. 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 (査読有)
DOI: 10.1182/blood-2012-12-475897.
8. Sanematsu F, Nishikimi A, Watanabe M, Hongu T, Tanaka Y, Kanaho Y, Côté J-F, Fukui Y. Phosphatidic acid-dependent recruitment and function of the Rac activator DOCK1 during dorsal ruffle formation. *J. Biol. Chem.*, 288: 8092-8100, 2013 (査読有)
DOI: 10.1074/jbc.M112.410423.
9. 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. Sci. Rep., 2: 691, 2012 (査読有)

DOI: 10.1038/srep00691.

10. 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 (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0046277.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 錦見昭彦、石原沙耶花、片桐晃子 Rap1 と filamin を介したリンパ球の接着制御生体運動合同班会議 2016、2016 年 1 月 9 日、キャンパスプラザ京都 (京都府京都市)
2. Nishikimi A, Ishihara S, Katagiri K. Rab13 is a downstream effector of Mst1 to mediate LFA-1 activation crucial for lymphocyte trafficking、第 44 回日本免疫学会学術集会、2015 年 11 月 19 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
3. Nishikimi A, Ishihara S, Ozawa M, Kinashi T, Katagiri K. Rab13 is a downstream effector of Mst1 to mediate LFA-1 activation crucial for lymphocyte trafficking、第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)
4. Ushijima M, Nishikimi A, Fukui Y. B cell-intrinsic role of DOCK2 in T cell-dependent humoral immunity, 15th International Congress of Immunology,

2013 年 8 月 24 日、Milan (Italy)

5. 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, 2013 年 3 月 4 日、Singapore (Singapore)
6. Nishikimi A, Harada Y, Tanaka T, Terasawa M, Stein JV, Kinashi T, Fukui Y. 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、2013 年 2 月 12 日、理化学研究所発生・再生科学総合研究センター (兵庫県神戸市)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: Low-molecular-weight compound capable of regulating Rac activation induced by DOCK-A subfamily molecule, and use thereof

発明者: Fukui Y, Nishikimi A, Kanai M, Kohda D, Saitoh T

権利者: Kyushu University, the University of Tokyo

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/060390

出願年月日: 2012 年 4 月 17 日

国内外の別: 国内・国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/eibutsu/bogyo/seitaibogyo.HP/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

錦見 昭彦 (NISHIKIMI, Akihiko)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号: 70404019