

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430115

研究課題名(和文) ヒト変異型Racによる細胞癌化におけるDOCKファミリー分子の役割

研究課題名(英文) Role of DOCK family proteins in malignant transformation by human oncogenic Rac

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量Gタンパク質であるRacおよびRasの活性型変異は、ヒトの様々ながんにおいて高頻度に見つかる。本研究では、Rac特異的活性化因子であるDOCK1の遺伝的欠損、およびその選択的阻害剤TBOPPによって、変異型RacやRasを有するがん細胞株の細胞浸潤および低栄養条件下での生存性が抑えられることを明らかにした。また、マウスにおいても、TBOPPの投与によって、がん細胞の増殖および転移が抑制された。以上より、変異型RacおよびRasによる細胞癌化においてDOCK1が重要な役割を担うことを明らかにすると共に、DOCK1がRacやRasに変異を有するがんの新しい創薬標的となることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Oncogenic mutations in the small G proteins Rac and Ras are frequently found in a variety of human cancers. In this study, we found that genetic ablation of the Rac specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 or its pharmacological inhibition by its selective inhibitor TBOPP suppressed the survival and invasion of Rac/Ras-driven cancer cells. Moreover, the growth and invasion of these cancer cells transplanted in mice were effectively suppressed by treatment with TBOPP. Thus, DOCK1 plays critical roles in malignant transformation by oncogenic Rac and Ras, and may be a good therapeutic target for Rac/Ras-driven cancers.

研究分野：生物化学

キーワード：がん 浸潤・転移 阻害剤 Rac Ras DOCK1

### 1. 研究開始当初の背景

Rho, Rac, Cdc42, Ras といった低分子量 G タンパク質は、細胞内分子スイッチとして働き、シグナル伝達や細胞骨格制御を通じて様々な細胞高次機能を制御している。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)と称される分子群の働きによって、GDP を結合した「不活性化型」から GTP を結合した「活性化型」へと変換され、その機能を発現する。

近年メラノーマをはじめとしたヒトの癌において、Rac の活性化型変異 (N92I, P29S 等) が相次いで報告され、注目を集めている。変異型 Rac は、恒常的に活性化型として存在し、細胞の癌化を引き起こしていると考えられているが、変異型 Rac が、細胞内に元々存在する GEF 分子群とどのように機能的に相互作用するのかについては不明である。

一方、Ras に変異を有するがんは、ヒトのがん全体の3分の1を占め、特に、膵臓癌や大腸がん、肺癌などでは、非常に高頻度 (30-95%) に変異が認められる。しかしながら、変異 Ras そのものは創薬標的として適した構造を持たないため、これを直接ターゲットにした有効な治療薬は未だに開発されていない。従来からの研究から、変異 Ras による悪性形質転換には、Rac の働きが重要であることが知られていたがその詳細な分子機序は不明であった。最近の研究から、Rac は、がん細胞において、細胞外からの栄養源の取り込み (マクロピノサイトーシス) や、細胞外基質への浸潤を制御することでがん化に寄与していると考えられるが、変異 Ras の下流において Rac の活性化を担う制御因子の実体は不明である。

DOCK ファミリー分子は、DOCK-A、B、C、D、4つのサブファミリーからなる Rac/Cdc42 に特異的な GEF であり、ヒトやマウスにおいては 11 種類存在する。このうち、DOCK-A サブファミリーに属する DOCK1、2、5 は、Rac に特異的な GEF として働く。DOCK2 は、免疫系に限局して発現し、ケモカイン受容体や抗原受容体の下流で Rac を活性化し、リンパ球や好中球の遊走および活性化に重要な役割を演じている。一方、DOCK1、5 は免疫系を含む、より広範な細胞種・組織に発現しており、dorsal ruffle や peripheral ruffle といった細胞骨格構造の再編成を介して、細胞運動や形態変化を制御する。DOCK1 はこれまで多くのがんにおいて、浸潤能や転移能を規定する分子であると報告されているが、その詳細については解明されていない。

代表者は、以前、免疫制御を目的として、DOCK2 阻害剤 CPYPP を開発した。CPYPP は、Tiam や TRIO といった DOCK ファミリーとは異なる GEF 分子群に対しては作用せずに DOCK2

の活性を阻害する点で有用であったが、DOCK-A サブファミリーである DOCK1、2、5 の選択性に乏しい等、動物での利用には問題があった。そこで、この経験に基づいて、DOCK1 の機能制御を目的として、20 万を超える化合物ライブラリーを新たにスクリーニングし、ヒット化合物の構造最適化を行って、DOCK1 の GEF 活性を選択的に抑える低分子阻害剤を開発した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト変異型 Rac、および Rac を介した変異型 Ras による細胞癌化において DOCK1 の役割を明らかにするとともに、DOCK1 の選択的阻害剤を用いて、癌化を制御することを目的とする。

このため、

(1) 変異型 Rac または変異型 Ras を導入したマウス線維芽細胞 (MEF)、および Rac や Ras に変異を有するがん細胞株を用いて、細胞増殖、マクロピノサイトーシス、浸潤における DOCK1 の役割を明らかにする。

(2) DOCK1 の選択的阻害剤 TBOPP を用いて、Rac や Ras に変異を有するがん細胞株の増殖、マクロピノサイトーシス、および浸潤に対する抑制効果を検討する。

(3) マウスへの移植モデルを用いて、変異型 Ras を有するがん細胞の増殖、浸潤・転移に対する DOCK1 の選択的阻害剤の抑制効果を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 変異型 Rac/Ras による細胞癌化における DOCK1 の役割

野生型マウス由来の MEF および、DOCK1 ノックアウトマウス由来の MEF に、レトロウイルスベクターを用いて変異型 Rac(N92I)、または変異型 Ras (H-Ras G12V) を過剰発現させた細胞株を作製し、細胞のマトリゲル内への浸潤能、マクロピノサイトーシス活性、グルタミンを枯渇させた低栄養条件下での生存性を比較検討する。

#### (2) 変異型 Rac/Ras を有するがん細胞株の浸潤と生存における DOCK1 の役割

変異型 Rac(N92I) を有するヒト線維芽肉腫株 HT-1080、および変異型 Ras を有するヒト大腸がん細胞株 DLD-1(K-Ras G13D)、およびマウス肺がん細胞株 3LL(K-Ras G12C) を用いて、ゲノム編集や RNA サイレncing によって DOCK1 遺伝子発現を欠損した細胞株を作製し、上記同様に細胞のマトリゲル内への浸潤能、マクロピノサイトーシス活性、低栄養条件下での生存性を調べ、DOCK1 の機能を明らかにする。

#### (3) DOCK1 選択的阻害剤によるがん細胞の増殖、浸潤の制御

上記 HT-1080、および DLD-1、3LL 細胞株を用いて、細胞のマトリゲル内への浸潤能、マクロピノサイトーシス活性、低栄養条件下での生存性に対する DOCK1 選択的阻害剤 TBOPP の阻害効果を検討する。

#### (4) DOCK1 選択的阻害剤によるマウスにおけるがん細胞の増殖、浸潤の制御

変異型 Ras を有する高転移性のマウス肺がん細胞株 ex-3LL (K-Ras G12C) をマウスに移入し、肺への浸潤・転移に対する TBOPP の効果を検討する。また、DLD-1、3LL をマウスに移植し、がんの生着・増殖に対する TBOPP の効果を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 変異型 Rac/Ras による細胞癌化における DOCK1 の役割

Rac1 N92I を過剰発現する野生型 MEF および DOCK1 ノックアウト MEF を作製し、その細胞外基質への浸潤、細胞外からの栄養源の取り込みを担うマクロピノサイトーシス、細胞の生存に必要なアミノ酸であるグルタミンを欠乏した培養液中での細胞生存性を調べた。Rac1 N92I の過剰発現によって、野生型 MEF の細胞浸潤、マクロピノサイトーシス活性、生存性はいずれも亢進していた。一方、DOCK1 ノックアウト MEF においては、上記すべての活性は低下しており、Rac1 N92I の過剰発現細胞においても亢進することはなかった。また、同様の現象は、変異型 Ras (H-Ras G12V) を過剰発現させた MEF においても観察された。このことから、DOCK1 は変異型 Rac および変異型 Ras による細胞癌化に重要な役割を演じることが明らかとなった。

また、変異型 Ras を過剰発現した DOCK1 ノックアウト MEF において低下した細胞浸潤能やマクロピノサイトーシス活性は、野生型 DOCK1 の addback によって回復した。一方、DOCK1 の Rac 活性化能力を特異的に欠失させた変異体 (V1534A) を add-back した場合には、回復が見られなかった。以上より、変異型 Ras による細胞癌化において、DOCK1 による Rac 活性化が重要であることが明らかとなった。

#### (2) 変異型 Rac/Ras を有するがん細胞株の浸潤と生存における DOCK1 の役割

マウス肺がん細胞株 ex-3LL (K-RasG12C)、およびヒト大腸がん細胞株 DLD-1 (K-RasG13D) をもとに、DOCK1 を発現できないように遺伝子操作した DOCK1 欠損細胞を作製した。これらの細胞浸潤、マクロピノサイトーシス、細胞生存を調べたところ、対照となる細胞に比べて、いずれも顕著に低下していた。この結果から、変異 Ras によるがん細胞の浸潤、生存応答において、DOCK1 が重要な働きをしていることが明らかとなった。

#### (3) DOCK1 選択的阻害剤によるがん細胞の増

#### 殖、浸潤の制御

TBOPP は、試験管内の RacGEF アッセイにおいて、IC50 値 8.4 マイクロモルで DOCK1 による Rac 活性化を抑制するが、他の GEF である DOCK2 や DOCK5、Tiam1 による Rac 活性化には影響しない。HT-1080、DLD-1、および 3LL 細胞を 12.5 マイクロ M の TBOPP で前処理したところ、細胞浸潤、マクロピノサイトーシス、および生存が顕著に抑制された。この結果は、TBOPP によって DOCK1 遺伝子欠損の効果を再現できることを示している。一方、免疫応答に重要な働きをするリンパ球の遊走や生存には、DOCK2 を介した Rac 活性化が必要であるが、TBOPP はリンパ球の遊走および生存には影響しなかった。このことから、DOCK1 選択的阻害剤 TBOPP は、細胞レベルにおいても DOCK1 と DOCK2 を識別していることが明らかとなった。

#### (4) DOCK1 選択的阻害剤によるマウスにおけるがん細胞の増殖、浸潤の制御

実際に、マウス個体内において、TBOPP ががんの増殖や浸潤を抑えられるかどうかを検討するために、高転移性のマウス肺がん細胞株 ex-3LL をマウスの尾静脈から移入して、TBOPP または溶媒のみを投与し、2 週間後の肺転移を比較した。その結果、TBOPP の投与群 (0.67 mg/マウス、移入後 0、1、3、5 日に投与) では、コントロール群 (溶媒のみ投与) に比べて、肺の転移巣の数が激減し、転移の結果としての肺重量の増加も、正常肺と同程度にまで抑えられた。また、3LL 細胞や DLD-1 細胞をマウスの背側皮下に移植して、その生着・増殖度を調べたところ、いずれも TBOPP (1 mg/300 マイクロリットル、0.7 マイクロリットル毎時) の持続投与によって、顕著に抑制され、週間後の腫瘍サイズはコントロール群の 1/5~1/3 となった。一方で、TBOPP の投与によって、マウスのリンパ球の数や体重変化には影響が無く、明らかな副作用は認められなかった。

本研究により、変異型 Rac および変異型 Ras を有するがん細胞において DOCK1 が、細胞増殖および浸潤の制御に重要な働きをしていることが明らかとなった。このため、DOCK1 は、これらのがんの新たな創薬標的になることが期待される。

### 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 6 件)

1. Tajiri H\*, Uruno T\*, Shirai T, Takaya D, Matsunaga S, Setoyama D, Watanabe M, Kukimoto-Niino M, Oisaki K, Ushijima M, Sanematsu F, Honma T, Terada T, Oki E, Shirasawa S, Maehara Y, Kang D, Cote J-F, Yokoyama S, Kanai M, Fukui Y. Targeting

Ras-driven cancer cell survival and invasion through selective inhibition of DOCK1. Cell Reports 19: 969-980, 2017. 査読有

2. Yamamura K, Urano T, Shiraisi 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. 8: 13946, 2017. 査読有

3. Shiraisi A, Urano T, Sanematsu F, Ushijima M, Sakata D, Hara T, Fukui Y. DOCK8 protein regulates macrophage migration through Cdc42 protein activation and LRAP35a protein interaction. J. Biol. Chem. 292: 2191-2202, 2017. 査読有

4. Yanagihara T, Sanematsu F, Sato T, Urano 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. 6: 8820, 2015. 査読有

5. Watanabe M, Terasawa M, Miyano K, Yanagihara T, Urano T, Sanematsu F, Nishikimi A, Cote J-F, 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

6. Ogawa K, Tanaka Y, Urano T, Duan X, Harada Y, Sanematsu F, Yamamura K, Terasawa M, Nishikimi A, Cote J-F, 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

〔学会発表〕(計2件)

1. 宇留野武人、福井宣規 Rac 活性化機能を標的とした新規がん治療薬. 実用化に向けた P-DIRECT アカデミア創薬シーズ発表会、2015年8月19日、東京日本橋

2. 田尻裕匡、宇留野武人、渡邊真裕紀、前原喜彦、福井宣規 DOCK1 as a novel molecular target for controlling cancer invasion and metastasis. 第26回日本消化器癌発生学会総会、2015年11月19日-20日、米子

〔図書〕(計1件)

1. 宇留野武人、福井宣規 免疫抑制剤開発の新しい分子標的としての DOCK2、実験医学増刊、羊土社、32:184-189, 2014  
〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

1.  
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: 国立大学法人九州大学  
種類: 特願  
番号: 特願 2015-39071  
出願年月日: 2015.2.27  
国内外の別: 国内

2.  
名称: PYRIDINONE COMPOUND AND USE THEREOF  
発明者: Yoshinori FUKUI, Takehito URUNO, Motomu KANAI, Shigeki MATSUNAGA, Takahiro SHIRAI, Shigeyuki YOKOYAMA, Teruki HONMA, Mutsuko NIINO, Daisuke TAKAYA  
権利者: Kyushu University  
種類: PCT  
番号: PCT/JP2016/55927  
出願年月日: 2016.2.26  
国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/>

6. 研究組織

研究代表者  
宇留野 武人 (URUNO, Takehito)  
九州大学・生体防御医学研究所  
免疫遺伝学分野・准教授  
研究者番号: 80532093