

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00983

研究課題名(和文) 硫酸基転移酵素SULT2B1bの発現制御機構と生体機能の統合的理解

研究課題名(英文) Analyses for expression and function of the sulfotransferase SULT2B1b

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) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：DOCK2は、リンパ球の遊走・活性化に不可欠なRac活性化分子であり、その変異はヒトにおいて重篤な免疫不全症を発症する。研究代表者は最近、硫酸基転移酵素SULT2B1bによって生成されるコレステロール硫酸(CS)がDOCK2の内因性阻害物質として機能することを見出した。本研究では、がんを対象に解析を行い、1) 大腸がんといった特定のがんではCSの産生が亢進している事；2) CSを産生するがん細胞では、産生しないがん細胞と比較して、抗腫瘍免疫や免疫チェックポイント阻害に抵抗性を示す事を明らかにした。そこで、化合物スクリーニングを実施し、SULT2B1bの選択的阻害剤候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、新しいがんの免疫回避メカニズムの理解につながるものであり、その学術的意義は大きい。また現在、免疫チェックポイント阻害やCAR-T細胞療法に加え、iPS細胞を用いてがん特異的T細胞を増幅・移入する試みもなされているが、これらの免疫療法が効果を発揮するには、T細胞ががん組織に浸潤することが必要である。本研究の成果により、臨床応用可能なSULT2B1b阻害剤が開発され、がんの免疫回避環境を破壊することができれば、その社会的、経済的インパクトは大きいと期待される。

研究成果の概要(英文)：DOCK2 is a Rac activator critical for migration and activation of lymphocytes and its mutations cause severe immunodeficiency in humans. We recently found that cholesterol sulfate (CS), a lipid product of the sulfotransferase SULT2B1b, acts as a DOCK2 inhibitor and prevents tissue infiltration by effector T cells. In this study, we analyzed expression and function of CS, mainly focusing on cancer tissues and obtained the following results. 1) CS is abundantly produced in certain types of human cancers such as colon cancers. 2) CS-producing cancer cells exhibited resistance to cancer-specific T cell transfer and immune checkpoint blockade. Then, we screened chemical library and identified candidate compounds of SULT2B1b inhibitors.

研究分野：機能生物化学

キーワード：遺伝子発現 生理活性脂質 生体機能

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体には免疫監視機構が発動しにくい組織や空間が存在し、これを免疫特権部位 (immune-privileged site) と呼ぶ。例えば、胎児が母体の免疫系からの攻撃を回避するメカニズムを有していることは良く知られた事実であり、眼球や精巣、脳、がん組織においても同様の抑制機構が存在すると考えられている。この免疫特権という概念は、1948年に Peter Medawar 博士 (1960年ノーベル生理学・医学賞受賞) により提唱されたものであるが、70年経った今も、免疫特権の実体は依然として不明である。

DOCK ファミリー分子は、DHR-2 ドメインを介して低分子量 G タンパク質を活性化する新しいタイプのグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である。研究代表者は、免疫系特異的に発現する分子として DOCK2 を同定し、DOCK2 がケモカイン受容体や抗原受容体の下流で機能する Rac 活性化分子であり、リンパ球の遊走や免疫シナプス形成に不可欠であることを世界に先駆けて明らかにした (Fukui et al *Nature* 2001; Sanui et al *Immunity* 2003; Nombela-Arrieta et al *Immunity* 2004; Jiang et al *J Exp Med* 2005; Tanaka et al *Nature Immunol* 2007; Sakai et al *Blood* 2013)。また、DOCK2 は好中球の遊走や活性酸素産生においても重要な役割を演じており (Kunisaki et al *J Cell Biol* 2006; Nishikimi et al *Science* 2009; Watanabe et al *J Immunol* 2014)、その変異はヒトにおいて重篤な免疫不全症を発症する (Dobbs et al *N Engl J Med* 2015)。このように DOCK2 は免疫監視機構において中心的役割を演じている。

SULT2B1a と SULT2B1b は、3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) を供与体として、基質に硫酸基を付与する硫酸基転移酵素である。これらの分子は、alternative splicing によって同一の遺伝子から生成されるが、SULT2B1a が主にプレグネロンを硫酸化するのに対して、SULT2B1b はコレステロール硫酸 (CS) の産生に重要な役割を演じている。SULT2B1b は、妊娠時の胎盤や子宮、がん組織でその発現が上昇することが報告されているが、その発現制御機構も機能的意義も明らかではない。

研究代表者は、CS が DOCK2 の内因性阻害物質であり、DOCK2 の DHR-2 ドメインに高い親和性で会合し、その Rac 活性化をブロックすることで、リンパ球や好中球といった免疫細胞の遊走・浸潤を抑制することを見出した (Sakurai et al *Science Signal* 2018)。このような抑制効果は、CS から硫酸基をとったコレステロールや、硫酸基を酢酸基に変えたコレステロール酢酸では認められない。また、同じ硫酸基があっても DHEA 硫酸や SULT2B1a によって生成されるプレグネロン硫酸には、DOCK2 に対する抑制効果はない。一方、CS は古典的な GEF である Tiam1 や Trio の Rac 活性化には影響を与えなかった。このことから、CS は DOCK2 の特異的・選択的阻害剤であることが示された。

マウスにおいて SULT2B1b は、定常状態では涙に脂質成分を供給するハーダー腺に最も強く発現していた。この結果と一致して、ハーダー腺では大量の CS が産生されており、その産生は *Sult2b1* 遺伝子欠損マウス (SULT2B1a と SULT2B1b がいずれも欠損する) では消失した。CS 産生の有無が眼内炎症に及ぼす影響を明らかにするために、2つのモデルを用いて解析したところ、CS が産生できないと炎症細胞浸潤が亢進したが、いずれにおいても CS を点眼することで

抑制された (Sakurai et al *Science Signal* 2018)。このことから、SULT2B1b は、他の組織においても、局所的に CS を産生することで、免疫回避のための微小環境形成に寄与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの妊娠時胎盤やがん組織を用いて、

- ①SULT2B1b の遺伝子発現制御機構を解明し、
- ②その発現を個体レベルでモニターできるレポーターマウスを開発すると共に、がん組織等を対象に、
- ③SULT2B1b を介した CS 産生の免疫回避における機能的重要性を実証し、
- ④SULT2B1b の選択的阻害剤の探索・開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

Sult2b1b 遺伝子発現発現

- ヒトおよびマウス由来の胎盤サンプルを用いて RNAseq を行い、*Sult2b1b* 遺伝子の発現を妊娠の時系列に沿って実施する。また、RNAseq のデータを基に、*Sult2b1b* 遺伝子を発現する胎盤の細胞を特定する。
- 大腸がん、胃がん、食道がん、肺がんといった種々のヒトがんの手術検体（がん組織と正常組織）を対象に、*Sult2b1b* 遺伝子発現を解析すると共に、最終産物である CS の産生を、質量分析イメージングを用いて解析する。

SULT2B1b の発現をモニターできるレポーターマウスの開発

- SULT2B1b の発現を個体レベルでモニターできるノックインマウスを作製する。このマウスを用いて、これまで検討できていなかった組織における SULT2B1b の発現を詳細に解析すると共に、妊娠における胎盤や子宮内膜における発現を、時系列を追って解析する。

免疫回避におけるCSの機能的重要性の実証

- SULT2B1b の発現を欠く C57BL/6 マウス由来の乳がん細胞株 (E0771) に、SULT2B1b を強制発現した細胞株 (E0771-SULT) を開発し、これを用いて、CS の産生が免疫細胞の動き (trans-cancer migration) や T 細胞の活性化、NK 細胞による killing にどのように影響するのか、in vitro で解析する。
- E0771 と E0771-SULT に、ネオ抗原として、I-Ab 分子に OVA 抗原ペプチドを共有結合させた MHC クラス II 分子を発現させたがん細胞株を樹立している。これらのがん細胞株を C57BL/6 マウスに移植し、OTII TCR トランスジェニックマウス由来の CD4⁺ T 細胞を移入することで、抗がん免疫応答における CS の関与を、マウス個体で解析する。また、同様な実験を OVA 抗原を発現させたがん細胞株と OTI CD8⁺ T 細胞を用いて実施する。
- E0771 と E0771-SULT を C57BL/6 マウスに移植し、免疫チェックポイント阻害剤の効果に及ぼす CS の影響を、マウス個体で解析する。必要に応じて、E0771 と E0771-SULT に PDL1 を高発現させる細胞株を開発し、使用する。

SULT2B1b の選択的阻害剤の探索・開発

- SULT2B1b の結晶構造と類縁タンパク質の阻害剤情報があり in silico スクリーニングに適した条件が整っている。そこで、これらの情報に基づいて、in silico スクリーニングを実施する。得られた候補化合物に関して生化学的に解析すると共に、前述した E0771#22 の CS 産生

阻害を指標に、ヒット化合物を絞り込む。

4. 研究成果

Sult2b1b 遺伝子の発現制御

- single cell RNAseq の解析から、CS 合成酵素である SULT2B1b が合胞体栄養膜細胞で発現しており、その発現が妊娠中期に亢進することを明らかにした。
- 大腸がん 28 例、腎臓がん 5 例、前立腺がん 7 例に関して CS の定量解析を行い、その結果、大腸がんと前立腺がんで CS の産生が亢進していること、腎臓がんではほとんど産生がないことを見出した。さらに、当初の予定に加えて、CS イメージングと組み合わせることで、大腸がんサンプルにおいて、CS の産生と CD8+ T 細胞の浸潤が逆相関することを明らかにした。

SULT2B1b の発現をモニターできるレポーターマウスの開発

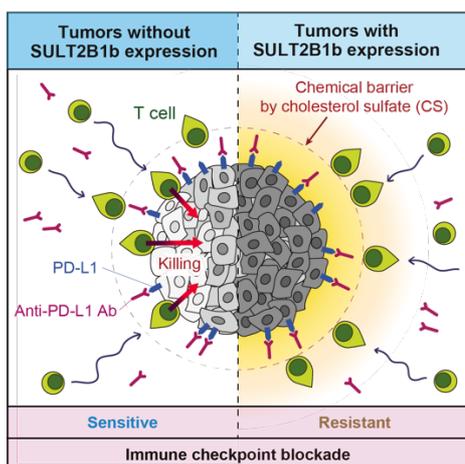
- CRISPR/CAS9 のシステムを用いて、SULT2B1b のレポーターマウスを新たに開発し、SULT2B1b が合胞体栄養膜細胞で発現していることを確認した。

免疫回避におけるCSの機能的重要性の実証

SULT2B1b の発現を欠く乳がん細胞株 E0071 に、SULT2B1b を強制発現した細胞株 (E0771-SULT) を樹立した。この細胞株では、CS の産生はもちろん、細胞外への CS の分泌が亢進しており、in vitro での増殖には違いがないものの、1) syngeneic マウスに移植した場合、腫瘍の増大が早いこと、2) 免疫チェックポイント阻害に抵抗性を示すこと、3) 人工的なネオ抗原として I-Ab/OVA 複合体を発現させ、マウスに移植し、それを認識する CD4+ T 細胞を移入した場合、T 細胞移入に抵抗性を示すことを実証した。同様の結果は、肺がん細胞株 3LL において CS を過剰産生させた場合にも認められた。また、OVA 抗原を発現する T リンパ腫細胞株 EL4 を用いて解析を行い、CS の産生により、CD8+ T 細胞による免疫応答も障害されることも示した。以上の成果は、CS が腫瘍の免疫回避において重要な役割を演じることを実証するものである。

SULT2B1b の選択的阻害剤の探索・開発

SULT2B1b の結晶構造と類縁タンパク質の阻害剤情報を基に、6,900,000 化合物を対象としたインシリコスクリーニングを実施し、442 個の候補化合物に関してウェットスクリーニングを行い、最終的に有望な化合物を 2 つ同定した。うち 1 つの化合物 (C3) は、マウスに投与することで、免疫チェックポイント阻害に抵抗性を示す E0771-SULT を感受性に変える効果があった。以上の成果は、がんの免疫回避を克服するための突破口となるものと期待される。



CS の作用機序を模式的に示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Koga T, Sasaki F, Saeki K, Tsuchiya S, Okuno T, Ohba M, Ichiki T, Iwamoto S, Uzawa H, Kitajima K, Meno C, Nakamura E, Tada N, Fukui Y, Kikuta J, Ishii M, Sugimoto Y, Nakao M, Yokomizo T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression of leukotriene B4 receptor 1 defines functionally distinct DCs that control allergic skin inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell. Mol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-00559-7	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 Sakurai T, Kukimoto-Niino M, Kunimura K, Yamane N, Sakata D, Aihara R, Yasuda T, Yokoyama S, Shirouzu M, Fukui Y, Uruno T.	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 Sci. Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000873
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 R, Kunimura K, Watanabe M, Uruno T, Yamane N, Sakurai T, Sakata D, Nishimura F, Fukui Y	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 2021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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamikaseda Y, Uruno T, Kunimura K, Harada A, Saiki K, Oisaki K, Sakata D, Nakahara T, Nakahara-Kido M, Kanai M, Nakamura S, Ohkawa Y, Furue M, Fukui Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Target inhibition of EPAS1-driven IL-31 production by a small-molecule compound.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Allergy Clin. Immun.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.03.029	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 D, Uruno T, Matsubara K, Andoh T, Yamamura K, Magoshi Y, Kunimura K, Kamikaseda Y, Furue M, Fukui Y	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 J. Allergy Clin. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1130-1133
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 K, Sakata D, Tun X, Uruno T, Ushijima M, Katakai T, Shiraishi A, Aihara R, Kamikaseda Y, Matsubara K, Kanegane H, Sawa S, Eberl G, Ohga S, Yoshikai Y, Fukui Y	4. 巻 29
2. 論文標題 The S100A4 protein is essential for 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
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 Kunimura K, Uruno T, Fukui Y	4. 巻 32
2. 論文標題 DOCK-family proteins: key players in immune surveillance mechanisms	5. 発行年 2020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 Tatsuguchi T, Uruo T, Sugiura Y, Sakata D, Izumi Y, Sakurai T, Hattori Y, Oki E, Kubota N, Nishimoto K, Oyama M, Kunimura K, Ohki T, Bamba T, Tahara H, Sakamoto M, Nakamura M, Suematsu M, Fukui Y	4. 巻 34
2. 論文標題 Cancer-derived cholesterol sulfate is a key mediator to prevent tumor infiltration by effector T cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 277-289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac002	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 Tatsuguchi T, Uruno T, Sugiura Y, Oisaki K, Takaya D, Sakata D, Izumi Y, Togo H, Hattori Y, Kunimura K, Sakurai T, Honma T, Bamba T, Nakamura M, Kanai M, Suematsu M, Fukui Y	4. 巻 609
2. 論文標題 Pharmacological intervention of cholesterol sulfate-mediated T cell exclusion promotes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 183-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.035	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 福井 宣規
2. 発表標題 IL-31の産生と痒み伝達の分子基盤: 基礎生物学から創薬研究へ
3. 学会等名 国際痒み学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井 宣規
2. 発表標題 IL-31産生の分子基盤の解明とその創薬研究への展開
3. 学会等名 日本薬理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福井宣規、坂田大治、中原剛士、古江増隆
2. 発表標題 IL-31の産生と痒み伝達の分子基盤
3. 学会等名 第50回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kunimura K, Yamamura K, Fukui Y
2. 発表標題 The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to atopic skin inflammation via IL-31 induction
3. 学会等名 American Association of Immunologist Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

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 American Association of Immunologist Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakata D, Fukui Y
2. 発表標題 Identification of the molecule required for transmission of IL-31-induced itch sensation in the spinal cord
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井宣規
2. 発表標題 IL-31による痒み伝達の分子基盤
3. 学会等名 環境医学研究所・順天堂かゆみ研究センター第5回学術シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井宣規
2. 発表標題 ヘルパーT細胞におけるIL-31の産生を阻害する低分子化合物の開発
3. 学会等名 環境医学研究所・順天堂かゆみ研究センター第7回学術シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 SULT2B1b阻害剤、CS生成阻害剤、及び抗がん免疫増強作用を有する医薬組成物	発明者 福井宣規 他	権利者 国立大学法人九州大学 他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-173456	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
研究分担者	宇留野 武人 (Uruno Takehito) (80532093)	九州大学・生体防御医学研究所・准教授 (17102)	

	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	杉浦 悠毅 (Sugiura Yuki)		
研究協力者	生長 幸之助 (Oisaki Kounosuke)		
研究協力者	高谷 大輔 (Takaya Daisuke)		

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			
米国	イリノイ大学			