

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590537

研究課題名（和文） 新規 CDM ファミリー分子によるリンパ球活性化の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular mechanism of lymphocyte activation by a novel CDM-family protein.

研究代表者

田中 芳彦 (TANAKA YOSHIHIKO)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：00398083

研究成果の概要（和文）：新規 CDM ファミリー分子に焦点をあて、Tリンパ球の活性化・分化を制御する役割と、低分子量G蛋白質活性化について解析した。遺伝子欠損マウスの解析により、脾臓・リンパ節といった2次リンパ組織においてTリンパ球が著減しており、抗原に対する増殖応答も障害されることを明らかにした。また、低分子量G蛋白質 Cdc42 に対するグアニンヌクレオチド交換因子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A novel CDM-family protein was studied for molecular mechanism of lymphocyte activation and guanine nucleotide exchange factors. The numbers of T cells in the spleen and the peripheral lymph nodes were reduced in the gene-deficient mice. Also, antigen-specific T-cell proliferation was impaired in the gene-deficient mice. Finally, the novel CDM-family protein functioned as a Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学、シグナル伝達、細胞・組織、発生・分化、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症を始めとする多くの自己免疫疾患は厚生労働省の特定疾患にも指定される難病であり、詳細な病態発症機構の解明ならびにその治療法についての社会的関心は高い。近年、自己免疫疾患では獲得免疫系における自己の形成と識別機構が破綻していることが明らかにされた。自己免疫疾患においては、なかでもヘルパーTリンパ球が中

心的役割を果たしており、ヘルパーTリンパ球の過剰な自己免疫応答の関与が示唆されている。最近になって自己免疫疾患に対する分子レベルの理解が進み、多くの知見がここ数年来蓄積され、その病態の解析が進み新しい治療の標的が明らかにされつつある。しかし、自己免疫疾患におけるヘルパーTリンパ球の自己形成の破綻にいたる制御機構などの詳細については依然不明な点が多い。生体

内においてはこれまでに自己免疫疾患との関与が知られていない分子が疾患発症に重要な役割を果たしているとも推察される。

申請者のグループはこれまでに、免疫系特異的に発現する CDM ファミリー分子として DOCK2 を同定し、この分子がケモカイン受容体や T 細胞抗原受容体の下流で機能し、Rac 活性化を介してリンパ球遊走及び免疫シナプス形成を制御することを世界に先駆けて明らかにしてきた。最近、Zizimin1 や DOCK4 といった CDM ファミリー分子が同定されるに至り、新たな CDM ファミリー分子の同定とその機能解析は細胞内で起こる高次機能を理解する上で重要であると考えられる。しかし、従来の研究のほとんどは 'gain of function' のデータに基づくものであり、DOCK2 を除いて 'loss of function' の解析はなされておらず、プライマリー細胞で解析する術がないことも研究の進展を困難なものにしている。一方、申請者は免疫系に発現する新規 CDM ファミリー分子として DOCKX を同定した。ノックアウトマウスを用いた新規 CDM ファミリー分子 DOCKX の解析は、学術的に極めて大きな意味を持つと考えられる。また、CDM ファミリー分子は新しいタイプの GEF であり、その低分子量 G 蛋白質活性化機構は世界的にも大変注目されている。それ故、本研究はこの CDM ファミリーに属する新規分子 DOCKX に焦点をあて、低分子量 G 蛋白質活性化とその生理的機能についても併せて解析することを目的としている。

2. 研究の目的

申請者はヘルパー T リンパ球のシグナル伝達機構に関連して新規 T リンパ球特異的遺伝子 *Slat* を同定し、ヘルパー T リンパ球における TCR シグナル伝達機構および分化制御機構を世界に先駆けて明らかにした (*Immunity* 18: 403-414, 2003; *J. Clin. Invest.* 117: 2164-2175, 2007)。また、Vav 欠損により転写因子 c-Maf の発現が障害され、その結果 Th1 型の免疫応答が亢進することを見いだした (*Blood* 106: 1286-1295, 2005)。さらに DOCK2 が Rac の活性化を介して IL-4 受容体の細胞内輸送をコントロールすることでヘルパー T リンパ球の分化を制御していることを突き止め、ヘルパー T リンパ球の lineage commitment を制御する新しい分子メカニズムを世界で初めて明らかにした (*Nat. Immunol.* 8: 1067-1075, 2007)。このようにこれまでに申請者はヘルパー T リンパ球のシグナル伝達機構および分化制御機構を明らかにしてきた。

この過程で申請者は、Rac 活性化を通して免疫系細胞において多彩な機能を担っている DOCK2 の Docker ドメインとのホモロジー

を基に、免疫系に発現する新規 CDM ファミリー分子として DOCKX を同定した。その生理的機能を明らかにするために既に DOCKX 欠損マウスを作製している。このマウスの初期解析により、末梢での T リンパ球が著減し、T リンパ球活性化が障害されていた。また、末梢のヘルパー T リンパ球を分化させたところ、コントロール群と比較して Foxp3⁺CD25⁺制御性 T リンパ球への分化が著しく亢進していることを見いだした。申請者はこのようにして DOCKX が制御性 T リンパ球への分化誘導を制御している可能性を見だし、この成果を発展させるべくして本研究課題を立案するに至った。多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) では、制御性 T リンパ球を除去すると疾患発症率や重症度が上昇する一方で、制御性 T リンパ球を発症前に移入することでその発症予防に効果を示すことから、制御性 T リンパ球が多発性硬化症の新たな治療法開発に向け注目を集めているが、その治療応用へ向けてさらなる分子基盤の確立が必要とされている。そこで本研究課題においては、ヘルパー T リンパ球の活性化・分化を制御する新規 CDM ファミリー分子 DOCKX の役割を詳細に解析し、獲得免疫系における自己免疫応答についての新規概念の発見を目指すと共に、得られた知見の自己免疫疾患治療への応用を目的として立案された。

3. 研究の方法

ヘルパー T リンパ球の活性化・分化における新規 CDM ファミリー分子 DOCKX の機能解析をするために、DOCKX 欠損マウスを用いて本研究を進めた。

(1) DOCKX 欠損マウスで T リンパ球が著減するメカニズムを細胞・分子レベルで詳細に解析した。蛍光色素で標識した T リンパ球を移入し 2 次リンパ組織へのホーミング活性を検討すると共に、*in vitro* で各種ケモカインに対する遊走活性を解析した。また、抗 CD3 抗体による増殖応答、接着、生存やアクチン重合といった機能を DOCKX 欠損 T リンパ球と野生型 T リンパ球間で比較解析した。さらに T 細胞受容体下流のシグナルに関して生化学的な解析を行った。

(2) DOCKX 欠損マウスの解析により、*in vitro* で Foxp3⁺CD25⁺制御性 T リンパ球 (Treg) への分化が著しく亢進していることを見いだした。この制御性 T リンパ球を CFSE ラベルした T リンパ球の増殖応答の系で共培養することにより、制御性 T リンパ球としての増殖抑制効果をコントロール群との間で比較検討した。*in vivo* における nTreg の分化の状況を DOCKX 欠損マウスと野生型マウスの間で比較検討した。

(3) ヘルパー T リンパ球の各種サブセットへの分化を詳細に解析するために、細胞内染色

FACS を用いた各種サイトカイン産生を指標として、Th1, Th2, Th17, Treg への分化を DOCKX 欠損 T リンパ球と野生型 T リンパ球間で比較解析した。

(4) DOCKX 欠損の MHC クラス II 拘束性 T 細胞受容体トランスジェニック (TCR Tg) マウスを用いて、T 細胞受容体クロノタイプ特異的単クローン抗体により、胸腺内 T リンパ球分化過程における正と負の選択を解析した。

(5) 免疫系に発現する新規 CDM ファミリー分子として同定した DOCKX が制御する低分子量 G 蛋白質を同定するために、Rac, Cdc42, Rap, RhoA を始めとした各種低分子量 G 蛋白質の GST 融合蛋白質と DOCKX の会合実験を行った。

(6) 多発性硬化症のマウスモデルとして広く用いられている実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対して制御性 T リンパ球の移入が発症抑制に効果を示すことが知られており、多発性硬化症治療への応用が期待され研究・開発が進められている。個体レベルでの多発性硬化症における制御性 T リンパ球を介した DOCKX の役割を解析するために、野生型および DOCKX 欠損マウスにミエリンオリゴ糖蛋白 (MOG) のペプチドを投与して EAE を誘導し、DOCKX 欠損が EAE の発症に及ぼす影響を比較検討した。

(7) DOCKX の発現を欠く T 細胞株に、HA タグを導入した完全長 DOCKX 及び Docker ドメインを含む欠変異体を発現する stable transfectant 細胞株を対象に、抗 HA 抗体によるアフィニティークロマトグラフィーを行い、HA ペプチドで溶出することで、DOCKX と会合する候補分子をプロテオミクスの手法により網羅的に解析した。候補分子に対して会合実験を行い、DOCKX と会合することを確認した。

(8) 抗原提示細胞とペプチドを用いて DOCKX 欠損 TCR Tg マウスと野生型 TCR Tg マウスとの間で T リンパ球の細胞増殖応答を比較し、より生理的なレベルで DOCKX が抗原特異的応答において重要な役割を果たしていることを見出した。

(9) 野生型ならびに DOCKX 欠損マウスに抗原を投与することで生体内における T リンパ球の増殖応答を比較検討し、生体内で DOCKX 欠損 T リンパ球の増殖応答が障害されることを見出した。

(10) DOCKX 欠損 TCR Tg マウスを用いて、免疫シナプスの中央部のマーカーとして TCR と

PKC θ 、周辺部のマーカーとして LFA-1 と Talin、脂質マイクロドメインのマーカーとしては GM1 を用いて、免疫シナプスおよび脂質マイクロドメイン集積における DOCKX の役割を解析した。

4. 研究成果

CDM ファミリーに属する新規分子 DOCKX に焦点をあて、ヘルパー T リンパ球の活性化・分化を制御する役割を解析するとともに、低分子量 G 蛋白質活性化とその生理的機能についても併せて解析することを目的に研究を進めた。

DOCKX 欠損マウスの解析により、脾臓・リンパ節といった 2 次リンパ組織において、B リンパ球やマクロファージの数は正常に保たれているものの、CD4⁺ならびに CD8⁺ T リンパ球が著減していることを明らかにした。一方、胸腺での T リンパ球の分化・成熟には大きな異常は認められなかった。DOCKX 欠損 T リンパ球は、2 次リンパ組織へのホーミング活性は正常に保たれているものの、抗原に対する増殖応答が障害されていた。これらのことから、T リンパ球の intrinsic なメカニズムにより DOCKX 欠損マウスでは末梢の T リンパ球が著減していると示唆された。

DOCKX 欠損が EAE の発症に及ぼす影響を比較検討したところ、DOCKX 欠損マウスでは抵抗性であることが明らかとなった。一方、DOCKX 欠損 T リンパ球では、*in vitro* での Foxp3⁺CD25⁺制御性 T リンパ球への分化が著しく亢進していた。また、DOCKX 欠損制御性 T リンパ球を CFSE ラベルした T リンパ球の増殖応答の系で共培養することにより、制御性 T リンパ球としての増殖抑制効果をコントロール群との間で比較検討したところ、増殖抑制効果に障害は認められずコントロール群と同程度の抑制活性を示した。制御性 T リンパ球が EAE 発症抑制に効果を示すことが知られてことから、DOCKX 欠損マウスが EAE に抵抗性である理由の一つとして制御性 T リンパ球を介している可能性が示唆された。

DOCKX が制御する低分子量 G 蛋白質を同定するために、Rac, Cdc42, RhoA といった低分子量 G 蛋白質の GST 融合蛋白質と DOCKX の会合実験を行い、DOCKX が Cdc42 と選択的に会合することを明らかにした。また、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) アッセイにて DOCKX が Cdc42 に対して GEF 活性を持つが、Rac に対しての GEF 活性がないことを明らかにした。

これらの研究成果に基づき、T リンパ球活性化制御において DOCKX が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。本研究において明らかとなった免疫応答におけるリンパ球活性化の制御における DOCKX の役割をさ

らに詳細に解析することで、今後、自己免疫疾患治療法開発に向けての分子基盤が確立され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 Harada Y., Tanaka Y. (equal contributor (co-first author)), 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 J.V., Kinashi T., Fukui Y.: DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood*, 119:4451-4461 (2012) [査読有]
- ② Nishikimi A., Uruno T., Duan X., Cao Q., Okumura 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.*, 19:488-497 (2012) [査読有]
- ③ Gotoh K., Tanaka Y. (equal contributor (co-first author)), Nishikimi A., Nakamura R., Yamada H., Maeda N., Ishikawa T., Hoshino K., Uruno T., Cao Q., Higashi S., Kawaguchi Y., Enjoji M., Takayanagi R., Kaisho T., Yoshikai Y., Fukui Y.: Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. *J. Exp. Med.*, 207:721-730 (2010) [査読有]
- ④ Sanematsu F., Hirashima M., Laurin M., Takii R., Nishikimi A., Kitajima K., Ding G., Noda M., Murata Y., Tanaka Y., Masuko S., Suda T., Meno C., Côté J.F., Nagasawa T., Fukui Y.: DOCK180 is a Rac activator that regulates cardiovascular development by acting downstream of CXCR4. *Circ. Res.*, 107:1102-1105 (2010) [査読有]
- ⑤ Nishikimi A., Fukuhara H., Su W., Hongu T., Takasuga S., Mihara H., Cao Q., Sanematsu F., Kanai M., Hasegawa H., Tanaka Y., Shibasaki M., Kanaho Y., Sasaki T., Frohman M.A., Fukui Y.: Sequential regulation of DOCK2 dynamics

by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science*, 324:384-387 (2009) [査読有]

- ⑥ Gollmer K., Asperti-Boursin F., Tanaka Y., Okkenhaug K., Vanhaesebroeck B., Peterson J.R., Fukui Y., Donnadieu E., Stein J.V.: CCL21 mediates CD4⁺ T cell costimulation via a DOCK2/Rac-dependent pathway. *Blood*, 114:580-588 (2009) [査読有]

[学会発表] (計 12 件)

- ① Harada Y., Tanaka Y., Terasawa M., and Fukui, Y. Identification of a signaling molecule critical for dendritic cell migration in three-dimensional environments. The 9th Global COE International Symposium and 8th young investigators forum, 2012 年 1 月 21-23 日、福岡
- ② Ogawa K., Tanaka Y., Terasawa M., Duan X., Sanematsu F., and Fukui Y. Regulation of FcεRI-mediated mast cell degranulation by the atypical GEF. The 10th Global COE International Symposium and 7th young investigators forum, 2011 年 12 月 22-23 日、Singapore
- ③ Sakai Y., Tanaka Y., and Fukui Y. Regulation of NK cell-mediated cytotoxicity by the atypical Rac activators. The 10th Global COE International Symposium and 7th young investigators forum, 2011 年 12 月 22-23 日、Singapore
- ④ Harada Y., Tanaka Y., Terasawa M., and Fukui, Y. Identification of a signaling molecule critical for dendritic cell migration in three-dimensional environments. The 10th Global COE International Symposium and 7th young investigators forum, 2011 年 12 月 22-23 日、Singapore
- ⑤ 錦見昭彦、田中芳彦、福井宣規、免疫系特異的な Rac 活性化因子 DOCK2 を標的とした免疫抑制剤の開発、第 40 回日本免疫学会総会、2011 年 11 月 27-29 日、千葉
- ⑥ Sakai Y., Tanaka Y., and Fukui Y. The atypical Rac activator DOCK5 regulates osteoclast function for bone homeostasis. The 7th Global COE International Symposium and 6th young investigators forum, 2011 年 12 月 22-23 日、Singapore
- ⑦ Gotoh K., Tanaka Y., Nishikimi A., Nakamura R., Yamada H., Hoshino K., Kaisho T., Yoshikai Y., and Fukui Y.

Critical role of DOCK2 in type I IFN induction in plasmacytoid dendritic cells. The 14th international congress of immunology, 2010年8月22-27日、神戸

- ⑧ Gotoh K., Tanaka Y., Nishikimi A., Nakamura R., Yamada H., Higashi S., Uruno T., Yoshikai Y., and Fukui Y. Critical Role of DOCK2 in Type I IFN Induction in Plasmacytoid Dendritic cells. The 5th International Symposium of Institute Network, 2010年6月24-25日、金沢
- ⑨ 後藤和人、田中芳彦、福井宣規、TLRを介した形質細胞様樹状細胞活性化におけるDOCK2の役割、第20回 Kyoto T Cell Conference、2010年6月4-5日、京都
- ⑩ Gotoh K., Tanaka Y., and Fukui Y. Critical role of DOCK2 in Type I IFN induction in plasmacytoid dendritic cells. The 5th Global COE International Symposium, 2010年2月24-25日、Singapore
- ⑪ 後藤和人、田中芳彦、錦見昭彦、吉開泰信、福井宣規、形質細胞様樹状細胞によるI型インターフェロン産生におけるDOCK2の役割、第39回日本免疫学会総会、2009年12月2-4日、大阪
- ⑫ 田中芳彦、福井宣規、免疫応答を司る免疫系受容体のメンブレントラフィックを介した時間的空間的制御、第82回日本生化学会大会(シンポジウム)、2009年10月21-24日、神戸

[図書] (計2件)

- ① 田中芳彦、福井宣規：形質細胞様樹状細胞におけるDOCK2を介したI型インターフェロン産生の制御機構。臨床免疫・アレルギー科, 56:728-735 (2011)
- ② 田中芳彦、福井宣規：自然免疫システムにおけるDOCK2の機能とその制御。細胞工学, 30:538-544 (2011)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 芳彦 (TANAKA YOSHIHIKO)
九州大学・生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：00398083

(2) 研究分担者

なし
(3) 連携研究者
なし