

# 免疫系細胞高次機能を司るCDMファミリー分子DOCK2

研究課題名：宿主応答を司る細胞骨格制御機構の解明とその応用

九州大学生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野 教授  
福井 宣規

## ● 研究のねらい：

免疫応答の根幹をなす種々の細胞高次機能は、いずれも低分子量G蛋白質を介した細胞骨格の再構築により巧妙に制御されている。しかしながら、免疫細胞—例えばリンパ球は大部分が核で、細胞生物学的解析に不向きであるため、その制御機構の分子レベルでの理解は進んでいない。CDMファミリーは線虫から哺乳類に至るまで保存された分子群で、低分子量GTP結合蛋白質の上流で機能することで細胞骨格の制御に関わっている。研究者はこれまでに、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するRac活性化のマスター分子であり、リンパ球遊走や免疫シナプス形成に不可欠であることを明らかにしてきた。

本研究では、DOCK2を含むCDMファミリー分子に焦点をあて、各種受容体刺激から細胞骨格再構築に至るシグナル伝達機構を解明し、その免疫系の発生・分化・恒常性維持や免疫応答における役割を個体レベルで明らかにすると共に、その理解に立脚して、移植片拒絶や自己免疫疾患といった免疫難病の新しい治療法、予防法の開発に資する基礎研究を展開することを目的とした。

## ● 研究の結果と考察：

### ① DOCK2によるリンパ球ホーミングの制御機構

DOCK2欠損B細胞では、ケモカイン刺激によるインテグリン活性化が著しく障害されており、その結果生体内で血管内皮細胞に接着するB細胞の数が著減することを見いだした。これまでに辺縁帯B細胞の脾臓での局在に、インテグリン活性化が重要であることが報告されている。DOCK2欠損マウスではこの辺縁帯B細胞が著減しており、この表現型は恐らくDOCK2欠損B細胞におけるインテグリン活性化の異常に起因するものと考えられる。このようにB細胞においては、DOCK2はインテグリン活性化を介してリンパ球ホーミングを制御していることが明らかとなった。一方、DOCK2欠損T細胞をケモカインで刺激した場合、ICAM-1、VCAM-1に対する接着性は全く正常であった。そこで、DOCK2のT細胞ホーミングにおける役割を明らかにするため、血管内皮細胞とT細胞との相互作用をタイムラプスを用いて解析した。この結果、DOCK2は血管内皮細胞への接着や細胞間隙への侵入には必須ではないが、血管内皮細胞上での運動(lateral motility)に必要であることが明らかとなった。以上より、同じリンパ球でもT細胞とB細胞では、ホーミングの制御機構が異なる可能性が示唆された。

### ② NKT細胞の発生におけるDOCK2の役割

多様性に特徴づけられるリンパ球の中で、NKT細胞は極めて限られた抗原受容体を発現するという点で特殊な存在である。DOCK2欠損マウスでは、胸腺、脾臓、肝臓のいずれにおいてもNKT細胞が著減しており、そのリガンドである $\alpha$ GalCerを投与してもサイトカイン産生はほとんど認められず、ConA誘導性肝炎に対しても抵抗性を示した。骨髓キメラマウスを用いた解析から、DOCK2がT前駆細胞に発現していることが、NKT細胞の分化・発生に必要であることが明らかになった。以上より、DOCK2は胸腺内分化過程において、TCRの抗原認識を介してNKT細胞の分化を制御していると考えられた。

### ③ 創薬の分子標的としてのDOCK2の有用性

免疫系は生体にとって感染に対する必須の防御機構であるが、一方免疫応答したための病態、例えば自己免疫疾患、移植片拒絶は、現代医学が解決すべき問題としてクローズアップされている。自己免疫疾患や移植片拒絶はその成因こそ異なるが、いずれも標的組織にリンパ球が浸潤し活性化されることによって惹起される病

態であり、これらのリンパ球機能は、Rac 活性化を介した細胞骨格の再構築を必要とする。そこで、DOCK2 欠損がこれらの病態にどのように影響するのか、疾患モデルを用いて解析した。野生型マウスにアロ心臓を移植すると、激しい細胞浸潤を伴い全例が8日以内に拒絶されたが、DOCK2欠損マウスをレシピエントとした場合は、100日以上の上着例も含め、グラフトの長期上着が可能となった。詳細な解析から、DOCK2を欠損したレシピエントでは、アロ反応性T細胞のプライミングおよび移動が障害されていることが明らかとなった。また、自己免疫性糖尿病を自然発症するNODマウスにおいても、DOCK2を欠損することで疾患発症を完全に阻止できた。以上より、DOCK2は新規免疫抑制剤開発の分子標的となる可能性が示唆された。

#### ④ DOCK2-GFP ノックインマウスの開発

DOCK2の発見以降、その細胞内動態は国内外の多くの細胞生物学者や免疫学者が関心を寄せているテーマであった。この重要な問題を解決すべく、DOCK2遺伝子の最終エクソン直下にGFPをコードする遺伝子を挿入したノックインマウスを作製した。このマウスを用いることで、極めて生理的な条件下でDOCK2動態のダイナミズムを可視化できるのみならず(後述)、DOCK2会合分子の網羅的解析が可能になった。

#### ⑤ DOCK2による好中球遊走の制御機構

好中球は極めて運動性の高い、生体防御システムの最前線で機能する白血球である。これまでノックアウトマウスを用いた解析より、好中球の遊走や活性酸素産生において、Racが重要な役割を演じることが明らかにされているが、Rac活性化に関わる分子は不明であった。DOCK2欠損好中球では、fMLP刺激によるRac活性化が障害されており、その結果leading edgeにおけるFアクチン及びPIP<sub>3</sub>の集積が消失することを見いだした。さらに、GFPノックインマウスを用いて、DOCK2がPIP<sub>3</sub>と会合し、PI3K依存的に細胞膜移行することを明らかにした。興味深いことに、DOCK2によるRac活性化は、持続したPIP<sub>3</sub>の集積やAktのリン酸化には重要であったが、PIP<sub>3</sub>の産生そのものには全く影響しなかった。以上より、DOCK2は好中球の遊走において、RacとPIP<sub>3</sub>間の正のフィードバックループで機能するRac活性化分子であるが、そのフィードバック機構はPI3Kの触媒活性を介したものではないことが明らかとなった。

#### ⑥ その他

ヘルパーT細胞分化や自然免疫系におけるDOCK2の新しい機能とその分子機構を解明した。また、DOCK2以外の数種類のCDMファミリー分子を対象に、ノックアウトマウスを新たに作製し、その生理的機能の一端を明らかにした。

#### ● 今後の展望：

DOCK2は移植片拒絶や自己免疫疾患といった免疫難病を治療・予防する上で格好の分子標的となると考えられるが、このためにはDOCK2を介したシグナル伝達機構の詳細な解析が必要である。本研究においても、PIP<sub>3</sub>を含め複数の会合分子を同定したが、DOCK2シグナルネットワークの全貌が解明できたとは言い難い。今後もDOCK2会合分子の同定を進めると共に、各機能ドメインと会合分子間の相互作用の持つ生理的意義を明らかにし、その構造生物学的解析を行うことで、DOCK2を標的とした創薬研究に発展させていきたいと考えている。また、興味深いことに最近、HIV感染T細胞において、DOCK2がHIV Nefと複合体を形成することが報告された。それ故、DOCK2シグナルはAIDS発症にも関与している可能性があり、この点は今後の検討課題としたい。さらに、ヒトゲノム中には11種類のCDMファミリー分子がコードされていることから、DOCK2以外のファミリー分子の機能やシグナル伝達機構を解明し、分子間のクロストークを明らかにすることも重要なテーマである。本研究で作製した遺伝子改変マウスは、この目的のために大変有用なツールになると期待している。

---

## 主要論文リスト

1. Handa Y, Suzuki M, Ohya K, Iwai H, Ishijima N, Koleske AJ, Fukui Y, Sasakawa C: *Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry via ELMO-Dock180 machinery. **Nature Cell Biol.**, 2006 in press
2. Kunisaki Y, Nishikimi A, Tanaka Y, Takii R, Noda M, Inayoshi A, Watanabe K, Sanematsu F, Sasazuki T, Sasaki T, Fukui Y: DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. **J. Cell Biol.**, 174: 647-652, 2006
3. Shulman Z, Pasvolsky R, Woolf E, Grabovsky V, Feigelson SW, Erez N, Fukui Y, Alon R: DOCK2 regulates chemokine-triggered lateral lymphocyte motility but not transendothelial migration. **Blood**, 108: 2150-2158, 2006
4. Kunisaki Y, Tanaka Y, Sanui T, Inayoshi A, Noda M, Nakayama T, Harada M, Taniguchi M, Sasazuki T, Fukui Y: DOCK2 is required in T cell precursors for development of V $\alpha$ 14 natural killer T (NKT) cells. **J. Immunol.** 176: 4640-4645, 2006
5. García-Bernal D, Sotillo-Mallo E, Nombela-Arrieta C, Samaniego R, Fukui Y, Stein JV, Teixidó J: DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1. **J. Immunol.**, 177: 5215-5225, 2006
6. Jiang H, Pan F, Erickson LM, Jang MS, Sanui T, Kunisaki Y, Sasazuki T, Kobayasi M, Fukui Y: Deletion of DOCK2, a regulator of the actin cytoskeleton in lymphocytes, suppresses cardiac allograft rejection. **J. Exp. Med.**, 22: 1121-1130, 2005
7. Nombela-Arrieta C, Lacalle RA, Montoya MC, Kunisaki Y, Megías D, Marqués M, Carrera AC, Manes S, Fukui Y, Martínez-A C, Stein JV: Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase  $\gamma$  during T and B lymphocyte homing. **Immunity**, 21: 429-441, 2004
8. Kunisaki Y, Masuko S, Noda M, Inayoshi A, Sanui T, Harada M, Sasazuki T, Fukui Y: Defective fetal liver erythropoiesis and T-lymphopoiesis in mice lacking phosphatidyserine receptor. **Blood**, 103: 3362-3364, 2004