

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ (LEAP)
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation (LEAP)
- 研究開発課題名： (日本語) DOCK ファミリー分子の生体機能と動作原理の理解に基づく革新的医薬品の創出
(英語) Innovative drug development based on the physiological functions and mechanistic basis of DOCK family proteins
- 研究開発担当者 (日本語) 九州大学生体防御医学研究所・教授・福井宣規
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Professor, Yoshinori Fukui
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) DOCK ファミリー分子の機能解析と医療応用
開発課題名： (英語) Elucidation of the physiological functions of DOCK family proteins for clinical application
- 研究開発分担者 (日本語) 九州大学生体防御医学研究所・教授・福井宣規
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Professor, Yoshinori Fukui

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

DOCK ファミリー分子は、進化学的に保存されたグアニンヌクレオチド交換因子であり、細胞骨格の再構築を介して、種々の細胞高次機能を制御する。研究開発代表者はこれまでに、DOCK2 が免疫細胞の遊走・活性化に、DOCK1 ががん細胞の浸潤・転移に、それぞれ Rac GEF として重要な役割を演じる

ことを実証してきた。本研究は、これまでの成果を踏まえ、新しいコンセプトに基づく抗がん剤リードや炎症性疾患の治療薬リードの創出を行うと共に、まだ知られていない DOCK ファミリー分子の機能や作用機序についても明らかにし、次世代の医療イノベーションの実現に貢献することを目的としている。本年度は、以下のような成果を得た。

- ①. Ras はヒトにおいて最初に同定されたがん遺伝子であり、その変異は、がん全体の 3 分の 1 に及ぶにも関わらず、いまだに有効な治療薬はない。研究代表者のグループは、DOCK1 を発現できないように遺伝子操作したがん細胞では、Ras に変異があっても、低栄養条件下での生存性および浸潤能が著しく低下することを見だし、DOCK1 の選択的阻害剤として TBOPP (TS45 と同一) を開発した。TBOPP は、DOCK2 や DOCK5 の機能を阻害することなく、DOCK1 に依存したがん細胞の浸潤やマクロピノサイトーシス、低グルタミン環境下での生存応答をブロックした。さらに、TBOPP をマウスに投与すると、変異 Ras を有するがん細胞の増殖および転移が抑制できることから、TBOPP は変異 Ras を有するがんを治療するための新たな創薬リードになると期待される。そこで、分担研究者と連携して、その構造最適化を進めた。
- ②. IL-31 は、アトピー性皮膚炎発症に重要な痒み物質で、主にヘルパーT細胞で産生されるが、その産生制御機構は不明であった。研究代表者のグループは、DOCK8 が発現できないように遺伝子操作したマウス (mutDOCK8 マウス) では、IL-31 の産生が著しく亢進し、重篤な皮膚炎を自然発症することを見いだすと共に、そのマウスの解析から、IL-31 産生に重要な分子として EPAS1 (TFX と同一) を同定した。実際、ヘルパーT細胞において EPAS1 を発現できないように遺伝子操作したマウスを作製し、mutDOCK8 マウスと交配したところ、皮膚炎の発症が完全に阻止された。EPAS1 は ARNT という分子と協調して低酸素応答を制御することが知られているが、EPAS1 による IL-31 の産生誘導に ARNT は必要ではなく、別の SP1 という分子が関与していた。さらに、IL-31 産生における EPAS1 の重要性は、アトピー性皮膚炎患者さんにおいても確認できた。このため EPAS1 は、アトピー性皮膚炎の痒みを根元から断つための新たな創薬標的になることが期待され、その創薬スクリーニング系の開発を進めた。
- ③. DOCK2 の機能を阻害する分子を同定し、機能解析や生化学的解析を行うと共に、分担研究者と連携して、その局在や構造に関する詳細な解析を進めた。この知見は、免疫応答を局所的にコントロールするための方法論の開発につながることを期待される。

DOCK family proteins are evolutionarily conserved guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and regulate various cellular functions through remodeling of the actin cytoskeleton. We have revealed that DOCK1 and DOCK2 act as Rac GEFs and play key roles in cancer metastasis/invasion and leukocyte migration/activation, respectively. Based on these findings, we will develop compounds leading to future therapy of cancers and inflammatory disorders. In addition, we aim in this project to contribute to medical innovation by elucidating undefined functions of DOCK family proteins and their mechanistic basis. In the H28 financial year, we have made the following progress.

- ①. Ras is the oncogene that was firstly identified in humans. Although Ras mutations are found in 30% of human cancers, attempts to inhibit oncogenic Ras have been unsuccessful. We found that genetic inactivation of DOCK1 ablates both macropinocytosis-dependent nutrient uptake and cellular invasion in Ras-transformed cells and developed TBOPP as a selective inhibitor

of DOCK1. TBOPP dampened DOCK1-mediated invasion, macropinocytosis, and survival under condition of glutamine deprivation without impairing the biological functions of the closely related DOCK2 and DOCK5 proteins. Furthermore, TBOPP treatment suppressed cancer metastasis and growth in vivo in mice. Thus, TBOPP could be a drug lead for treatment of cancers with oncogenic Ras mutations. Therefore, we synthesized many analogs and evaluated them for structural optimization.

- ②. Interleukin-31 (IL-31) is a cytokine implicated in itch associated with atopic dermatitis (AD), yet the mechanism controlling IL-31 production in CD4⁺ T cells remains unknown. We found that mice lacking DOCK8 spontaneously develop severe AD-like skin disease with scratching behavior, when crossed with transgenic mice expressing T-cell receptor with a particular antigen specificity (designated mutDOCK8 mice). By analyzing CD4⁺ T cells from mutDOCK8 mice, we have identified EPAS1 as a master regulator of IL-31 production. Indeed, skin disease development in mutDOCK8 mice was cancelled when they were crossed with mice lacking EPAS1 in a T cell-specific manner. Although EPAS1 is known to form a complex with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) and control hypoxic responses in various biological settings, EPAS1-mediated IL-31 promoter activation occurred independently of ARNT, but in collaboration with SP1. In addition, the importance of EPAS1 in IL-31 production was also confirmed in CD4⁺ T cells from AD patients. These results indicate that EPAS1 could be a molecular target for controlling AD-associated itch. Therefore, we developed drug screening system to target EPAS1-mediated IL-31 production.
- ③. We have identified DOCK2 inhibitor and analyzed its function, localization and structure. This finding may lead to the innovative approach that enables us to activate or inactivate immune responses locally.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 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, Oki E, Shirasawa S, Maehara Y, Kang D, Côté JF, Yokoyama S, Kanai M, Fukui Y. Targeting Ras-Driven cancer cell survival and invasion through selective inhibition of DOCK1. **Cell Rep.** 2017, in press
2. Yamamura K, Uruno T, Shiraishi 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.** 2017, 8, 13946.
3. Shiraishi A, Uruno T, Sanematsu F, Ushijima M, Sakata D, Hara T, Fukui Y. DOCK8 Protein Regulates Macrophage Migration through Cdc42 Activation and LRAP35a Interaction. **J. Biol. Chem.** 2016, 292, 2191-2202.

4. Uematsu K, Okumura F, Tonogai S, Joo-Okumura A, Alemayehu DH, Nishikimi A, Fukui Y, Nakatsukasa K, Kamura T. ASB7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation. **J. Cell. Biol.** 2016, 215, 95-106.
5. Liu Z, Man SM, Zhu Q, Vogel P, Frase S, Fukui Y, Kanneganti TD. DOCK2 confers immunity and intestinal colonization resistance to *Citrobacter rodentium* infection. **Sci. Rep.** 2016, 6, 27814.
6. Okumura F, Uematsu K, Byrne SD, Hirano M, Joo-Okumura A, Nishikimi A, Shuin T, Fukui Y, Nakatsukasa K, Kamura T. Parallel Regulation of von Hippel-Lindau Disease by pVHL-Mediated Degradation of B-Myb and Hypoxia-Inducible Factor α . **Mol Cell Biol.** 2016, 36, 1803-1817.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 免疫システムにおける DOCK ファミリー分子の機能とその制御機構, 口頭, 福井宣規, 細胞生物学会シンポジウム, 2016/6/16, 国内.
2. 生体防御システムにおける DOCK ファミリー分子の機能とその制御機構, 口頭, 福井宣規, 生体防御学会シンポジウム, 2016/7/8, 国内.
3. Rac 活性化を標的とした新しい抗がん剤創出の試み, 口頭, 福井宣規, 創薬等支援技術基盤プラットフォーム公開シンポジウム, 2016/12/7, 国内.
4. Immune regulatory functions of DOCK8 in health and diseases, 口頭, Fukui Y, 11th International Symposium of The Institute Network “Frontiers in Biomedical Sciences”, 2017/1/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. アトピー性皮膚炎発症に関わる痒み物質の産生に重要なタンパク質を発見-新しい痒み治療薬の開発に期待-, 福井宣規, プレス発表, 2017/1/10, 国内.

(4) 特許出願

公開を希望するものはない。

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 (LEAP)
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation (LEAP)

研究開発課題名： (日本語) DOCKファミリー分子の生体機能と動作原理の理解に基づく
革新的医薬品の創出
(英語) Innovative drug development based on the physiological functions and mechanistic basis of DOCK family proteins

研究開発担当者 (日本語) 九州大学生体防御医学研究所 教授 福井 宣規
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Professor, Yoshinori Fukui

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 低分子阻害剤リード開発のための分子設計とその合成展開
開発課題名： (英語) Molecular design and synthetic development of small molecule inhibitor leads

研究開発分担者 (日本語) 東京大学大学院薬学系研究科 講師 生長幸之助
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Lecturer, Kounosuke Oisaki

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：九州大学・生体防御医学研究所・福井宣規 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

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, Oki E, Shirasawa S, Maehara Y, Kang D, Côté JF, Yokoyama S, Kanai M, Fukui Y. Targeting Ras-Driven cancer cell survival and invasion through selective inhibition of DOCK1. **Cell Rep.** 2017, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 (LEAP)
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation (LEAP)
- 研究開発課題名： (日本語) DOCKファミリー分子の生体機能と動作原理の理解に基づく革新的医薬品の創出
(英語) Innovative drug development based on the physiological functions and mechanistic basis of DOCK family proteins
- 研究開発担当者 (日本語) 九州大学生体防御医学研究所・教授・福井宣規
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Professor, Yoshinori Fukui
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 質量分析技術を用いた代謝産物のイメージング解析・定量解析
開発課題名： (英語) Visualization and quantification of bioactive metabolites by mass spectrometry
- 研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学 医学部 医化学教室 専任講師 杉浦悠毅
所属 役職 氏名： (英語) Keio University School of Medicine, Department of Biochemistry, Assistant Professor, Yuki Sugiura

I. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：九州大学・生体防御医学研究所・福井宣規 総括研究報告を参照。

II. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Sugiura Y, Katsumata Y, Sano M, Honda K, Kajimura M, Fukuda K, Suematsu M. “*Visualization of in vivo metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart.*” *Sci Rep.* 2016, 6:32361
2. Miyazawa H, Yamaguchi Y, Sugiura Y, Honda K, Kondo K, Matsuda F, Yamamoto T, Suematsu M, Miura M., “*Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching*” . *Development.* 2017 ;144(1):63-73.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Development of an Imaging Mass Spectrometry Technique for Visualizing Localized Cellular Signaling Mediators in Tissues（口頭）, Yuki Sugiura, the 9th international conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2016/5/22 国外
2. Visualization of Localized Cellular Signaling Mediators in Tissues（口頭）, Yuki Sugiura, AMED-DFG Joint Workshop, 2016/3/20, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし。

(4) 特許出願

公開を希望するものはない。

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業インキュベータータイプ(LEAP)
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation (LEAP)
- 研究開発課題名： (日本語) DOCKファミリー分子の生体機能と動作原理の理解に基づく
革新的医薬品の創出
(英語) Innovative drug development based on the physiological functions and mechanistic basis of DOCK family proteins
- 研究開発担当者 (日本語) 横山構造生物学研究室 上席研究員 横山茂之
所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Structural Biology Laboratory, Distinguished Senior Scientist, Shigeyuki Yokoyama
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 標的タンパク質の構造解析と化合物の *in silico* スクリーニング
開発課題名： (英語) Structural analysis and *in silico* screening for drug target proteins
- 研究開発分担者 (日本語) 横山構造生物学研究室 上席研究員 横山茂之
所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Structural Biology Laboratory, Distinguished Senior Scientist, Shigeyuki Yokoyama

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：九州大学・生体防御医学研究所・福井宣規 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Terada, T., Kusano, S., Matsuda, T., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. Cell-Free Protein Production for Structural Biology. *Advanced Methods in Structural Biology*, (eds.) Toshiya Senda, Katsumi Maenaka, Springer Japan, 83-102, 2016.
2. 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, Oki E, Shirasawa S, Maehara Y, Kang D, Côté JF, Yokoyama S, Kanai M, Fukui Y. Targeting Ras-Driven cancer cell survival and invasion through selective inhibition of DOCK1. **Cell Rep.** 2017, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ピロリジル tRNA 合成酵素 PylRS と基質非天然型アミノ酸の X 線結晶構造, ポスター, 倉谷光央, 柳沢達男, 坂本健作, 横山茂之, 第 89 回日本生化学会大会 / 仙台国際センター, 2016/9/25, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし。

(4) 特許出願
該当なし。