

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19395

研究課題名(和文) ショウジョウバエを用いた腫瘍随伴免疫細胞の比較免疫学的研究

研究課題名(英文) Comparative immunological research on tumor-associated immune cells using Drosophila

研究代表者

中西 義信 (Nakanishi, Yoshinobu)

金沢大学・薬学系・特任教授

研究者番号：40172358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類での研究で癌を助ける免疫細胞の存在がわかり、それは腫瘍随伴免疫細胞とよばれる。本研究ではショウジョウバエにそのような免疫細胞が存在するかどうかを検証した。その存在が明らかになれば、遺伝学を適用して腫瘍随伴免疫細胞の発生や機能に関わる遺伝子の包括的な同定が可能になる。まず、癌の有り無しの幼虫で免疫細胞の分布を調べたが、大きな違いはなかった。次に、免疫細胞の貪食活性を阻害した時の発癌程度を調べたが、期待の逆に増大がみられた。最後に、免疫細胞における遺伝子発現を調べると、癌の誘発で大きく変化することがわかった。その変化は免疫細胞の働きを低下させる方向であり、腫瘍随伴免疫細胞の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：ヒトを含めた哺乳類で存在が示された腫瘍随伴免疫細胞については不明な点が多く残されている。ショウジョウバエは遺伝学を駆使できるモデル生物であり、今後は腫瘍随伴免疫細胞を遺伝学的に解析することが可能となる。その結果、腫瘍随伴免疫細胞の発生や機能発揮に必要な遺伝子群の網羅的な同定が行われて、研究が大きく進展すると期待される。

社会的意義：腫瘍随伴免疫細胞の理解が進めば、この種の免疫細胞の量や質を人工的に改変するなどの、癌を予防・治療するための新たな医療の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Some types of immune cells in mammals help cancer cells and are called tumor-associated immune cells. In the present study, we verified the possible existence of such immune cells in Drosophila. If the answer is positive, studying tumor-associated immune cells with the aid of genetic approach is made possible.

Establishing a Drosophila model of cancer, we first examined the distribution of hemocytes in the vicinity of cancer cells, but this was not the case. We next examined the effects of inhibition of phagocytic activities of immune cells on cancer development, but the data showed an increase, not decrease, of the incident of cancer. Finally, we determined the pattern of gene expression in immune cells isolated from cancer-bearing and normal Drosophila. We found a clear difference in mRNA repertoire between the two groups. This change was toward a decline of immune cells' activity. Collectively, our study suggests the presence of tumor-associated immune cells in Drosophila.

研究分野：免疫生化学

キーワード：癌 自然免疫 腫瘍随伴免疫細胞 貪食 アポトーシス ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

一般に免疫は生体を疾病から守るものであるが、その逆に癌を助ける免疫細胞の存在が知られ、それらは‘腫瘍随伴免疫細胞’とよばれている。一方で、発癌防止への免疫の寄与は明らかであるため、免疫細胞には相反する働きをするものが混在していることになる。腫瘍随伴免疫細胞の理解が進めば癌を予防・治療するための新しい医療の開発が可能になるとの期待から研究が行われているが、まだ不明な点が多く残されている。この研究のさらなる進展には、遺伝学を駆使できるモデル生物での解析が必須である。

本研究ではキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) に腫瘍随伴免疫細胞が存在するかどうかを検証した。もしその存在が明らかになれば、遺伝学的な解析手法を適用して腫瘍随伴免疫細胞の発生や機能に関わる遺伝子を包括的に同定することができる。

自然免疫のみを持つショウジョウバエは、哺乳類などでの獲得免疫に働く抗体やリンパ球は持たない。しかし、ショウジョウバエには哺乳類のマクロファージや顆粒球に相当する免疫細胞が存在し、両動物種での自然免疫の仕組みは酷似している。さらに、ショウジョウバエでは癌の発生が古くから知られ、さまざまな種類の‘ショウジョウバエ癌モデル’が樹立されている。また、ヒトに使われる抗癌剤がショウジョウバエでも有効であるため、新たな抗癌剤の開発にショウジョウバエ癌モデルが利用されている。

## 2. 研究の目的

ショウジョウバエに腫瘍随伴免疫細胞が存在するかどうかを知る。

## 3. 研究の方法

研究代表者らは、細胞周期チェックポイントを阻害することで癌を誘発するショウジョウバエ癌モデル (Dekanty et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:20549, 2012) を利用した。まず、ショウジョウバエの免疫細胞であるヘモサイトを可視化し、幼虫内でのヘモサイトの存在場所を癌の有り無しで比較した。‘腫瘍随伴ヘモサイト’が存在するならば、それらが癌組織の近傍に集積していることを予想した。次に、ヘモサイトの主要な機能である食食活性を阻害した時に、癌の発生がどのような影響を受けるかを調べた。食食機能を使って癌を助ける腫瘍随伴ヘモサイトが存在すれば、食食阻害により発癌程度が減少すると考えた。最後に、癌の有り無しでヘモサイトでの遺伝子発現様式を比較した。癌の発生により腫瘍随伴ヘモサイトの質や量が増大すれば、ヘモサイト全体での遺伝子発現様式に変化がみられるはずである。

## 4. 研究成果

### 1) ショウジョウバエ癌モデルの作成

最初に、他研究者が樹立したショウジョウバエ癌モデル (Dekanty et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:20549, 2012) を再現させた。このモデルでは、ショウジョウバエに遺伝子操作を施して、幼虫の翅原基後部の細胞で細胞周期チェックポイントを阻害する (図 1)。得られたショウジョウバエの翅原基や成虫翅の後部では癌に起因すると思われる形態異常が観察され、発癌モデルが樹立されたと考えられた (Rahmatika et al., *Virology* 528:48, 2019)。なお、このショウジョウバエではヘモサイトには癌は誘導されない。

### 2) ヘモサイト分布への癌の影響

癌を助けるヘモサイトが存在するならば、それらは癌組織周辺に集まる可能性がある。そこで、幼虫内での翅原基とヘモサイトとの相対位置を調べて、翅原基が癌化している場合と正常の場合とを比較した。そのために、翅原基後部の細胞が緑色蛍光タンパク質を、ヘモサイトが赤色蛍光タンパク質を、それぞれ発現するように癌モデルを改良した。そして、幼虫丸ごとを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

その結果、ヘモサイトはほぼ幼虫全体に分散しており、癌の有り無しでその分布に大きな差異は認められなかった (図 2 & 図 3: Zhang, Nakai, Nagaosa, Yasugi, Rahmatika, Sato, Shiratsuchi & Nakanishi, 論文準備中)。この説明としていくつかの可能性が考えられる：ショウジョウバエには腫瘍随伴ヘモサイトが存在しない；存在してもヘモサイト全体の中での割合が小さいため差がみられない；存在しても腫瘍随伴ヘモサイトが癌組織周辺に局在化するわけではない。

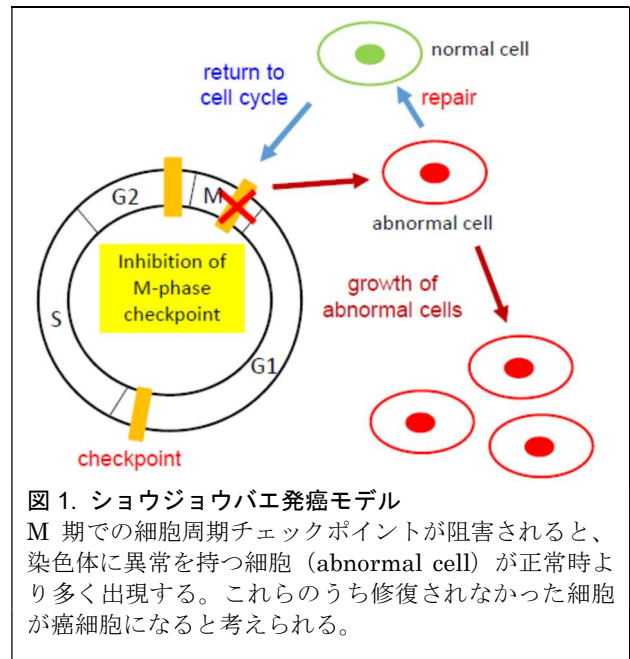


図 1. ショウジョウバエ発癌モデル

M 期での細胞周期チェックポイントが阻害されると、染色体に異常を持つ細胞 (abnormal cell) が正常時より多く出現する。これらのうち修復されなかった細胞が癌細胞になると考えられる。

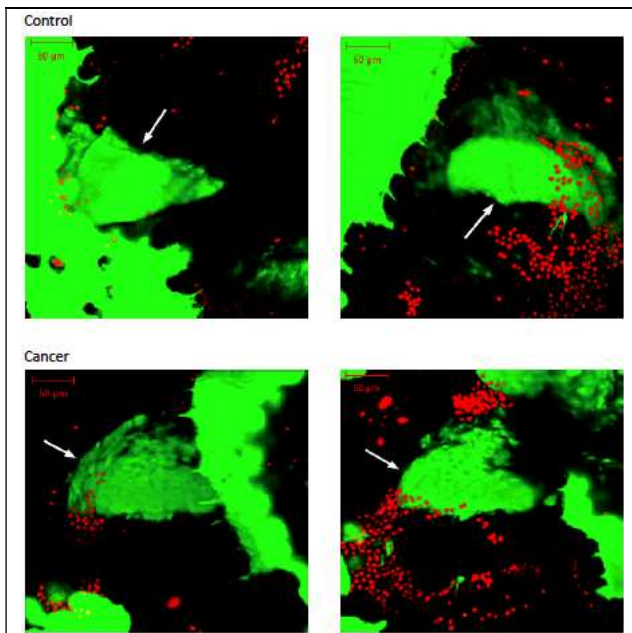


図2. 幼虫内でのヘモサイトと翅原基の観察  
幼虫のヘモサイト(赤色)と翅原基(矢印)を観察した。翅原基を含めた複数の組織が緑色蛍光タンパク質を発現する。上パネルが正常、下パネルが発癌。

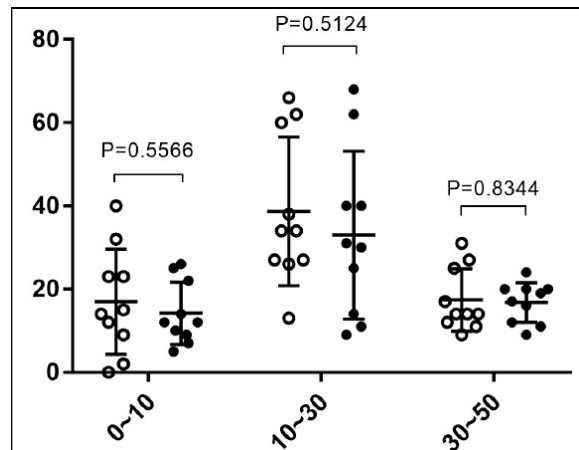


図3. 幼虫内でのヘモサイト分布への癌の影響  
図2の観察において、翅原基から0~10、10~30、30~50 μmの距離にあるヘモサイト数を測定し、結果をグラフにした。○正常；●発癌。

### 3) ヘモサイト貪食活性阻害の発癌への影響

ヘモサイトの主要な機能は細胞貪食であり、腫瘍随伴ヘモサイトがこの機能を使って癌を助けていることが考えられる。そこで、ヘモサイトの貪食活性を阻害した時の発癌程度を調べた。

以前に研究代表者は、ショウジョウバエにおける貪食反応を遺伝学的手法により解析して、二種類の貪食受容体、Draperと integrin αPS3-βv、に標的細胞が結合するとそれぞれの受容体が異なる情報伝達経路を活性化させ、それらが同一の低分子量Gタンパク質(Rac1とRac2)の活性化を導いて貪食反応が開始されることを明らかにした(図4、Nonaka et al., *J. Biol. Chem.* 292:8059, 2017)。

そこで、ショウジョウバエ癌モデルに貪食受容体のDraperと integrin βvの両方を作れない遺伝子変異を導入した。癌の発生を成虫翅の形態異常を指標にして測定した結果、期待に反して、ヘモサイトの貪食活性を阻害すると発癌程度が増大した

(表1: Zhang et al., 論文準備中)。

このことは、ショウジョウバエには腫瘍随伴ヘモサイトが存在しないか、あるいは

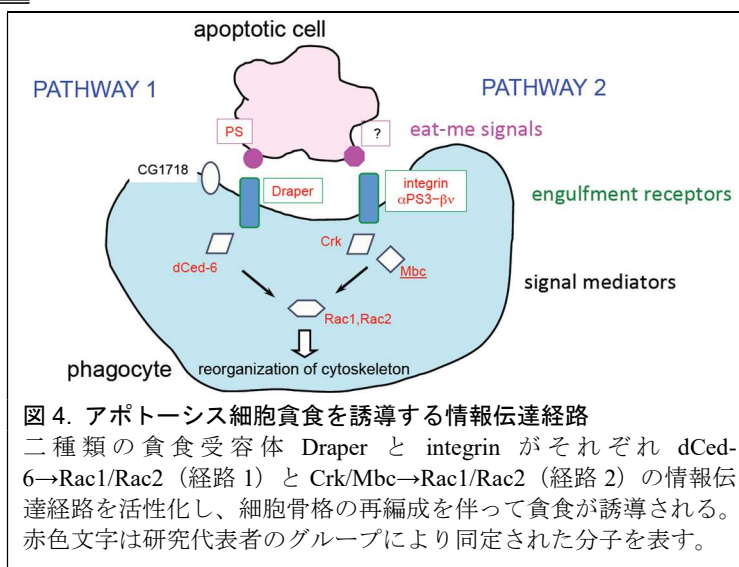


図4. アポトーシス細胞貪食を誘導する情報伝達経路  
二種類の貪食受容体Draperと integrinがそれぞれdCed-6→Rac1/Rac2(経路1)とCrk/Mbc→Rac1/Rac2(経路2)の情報伝達経路を活性化し、細胞骨格の再編成を伴って貪食が誘導される。赤色文字は研究代表者のグループにより同定された分子を表す。

ショウジョウバエ遺伝型	雄	雌	全体	発癌割合(%)
阻害なし: <i>en-GAL4 UAS-GFP</i>	1 (55)	0 (28)	1 (83)	1.2
阻害なし: <i>UAS-bub3IR</i>	1 (61)	0 (27)	1 (88)	1.1
チェックポイント阻害: <i>en-GAL4 UAS-GFP / UAS-bub3IR</i>	13 (29)	15 (33)	28 (62)	45
チェックポイント&貪食阻害: <i>en-GAL4 UAS-GFP Itgβn<sup>2</sup> / UAS-bub3IR Itgβn<sup>2</sup>; drpr<sup>Δ5</sup></i>	50 (50)	59 (59)	109 (109)	100

表1. ヘモサイトの貪食活性阻害による発癌程度の変化  
発癌誘導に起因する形態異常が観察される翅を持つ成虫数と解析した総数(カッコ内)を示した。



存在しても食食活性に依存して癌を助けるわけではないと考えられた。また、食食阻害はすべてのヘモサイトで起こるため、腫瘍随伴ヘモサイトへの影響が発癌防止に働く本来のヘモサイトでの変化に隠れてしまっている可能性も残る。

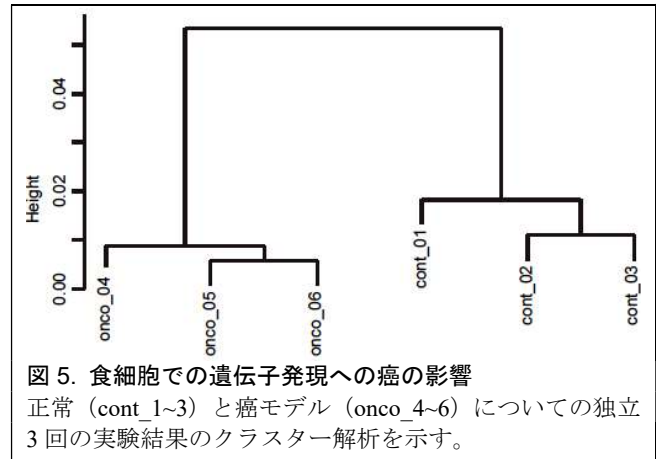
#### 4) ヘモサイトでの遺伝子発現への影響

次に、癌の有り無しでヘモサイトにおける遺伝子発現に違いが生じるかどうかを調べた。そのために、癌モデルと正常の幼虫からヘモサイトを回収し、それらについてRNAシーケンス (RNA-seq) を行って含まれる mRNA の種類と量を調べた。独立した 3 回の実験結果についてクラスター解析を行うと、正常と癌モデルとで大きく二分されることがわかり (図 5: Zhang et al., 論文準備中)、幼虫ヘモサイトでの遺伝子発現が発癌によって変化することがわかった。

個々の遺伝子を調べると、癌モデルのヘモサイトでは解糖系、精子形成、及びヌクレオシド代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現が増えている (Zhang et al., 論文準備中)。また、癌誘発によりヘモサイトでの発現が減少する遺伝子には、免疫応答、細胞食食、及び二次代謝に関係するものが多くみられた (Zhang et al., 論文準備中)。免疫応答や食食に関連する遺伝子の発現が低下すれば、ヘモサイトの癌を攻撃する能力が低下するはずである。よって、そのような変化の起きたヘモサイトが腫瘍随伴免疫細胞としての性質を獲得したと考えることができる。

#### 5) 考察

この研究では、ショウジョウバエでの腫瘍随伴免疫細胞の存在を確定するには至らなかった。しかし、最後に実施したヘモサイトにおける遺伝子発現様式の解析では癌の有り無しで違いがみられ、特に免疫関連遺伝子の発現低下が観察された。よって、癌を保持する動物ではヘモサイトの免疫細胞としての活性が低下していることが示唆され、このように性質の変化したヘモサイトが積極的に癌を助ける働きを担う腫瘍随伴免疫細胞である可能性が考えられる。今後は、担癌動物で免疫活性の低下したヘモサイトを同定して、より直接的な解析を加えて腫瘍随伴免疫細胞としての働きを検証することが求められる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nonaka, S., Sono, M., Hoshi, C., Kanetani, T., Nakayama, H., Dohmae, N., and Nakanishi, Y.	4. 巻 381
2. 論文標題 Transcription repressor-mediated control of engulfment receptor expression in Drosophila phagocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 10-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.04.032">https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.04.032</a>	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 Nainu, F., Nakanishi, Y., and Shiratsuchi, A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Fruit fly as a model organism in the study of human diseases and drug discovery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Center for Medical Education Sapporo Medical University	6. 最初と最後の頁 21-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.15114/jcme.10.21">https://doi.org/10.15114/jcme.10.21</a>	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 該当する
1. 著者名 永長一茂, 中井雄治	4. 巻 70
2. 論文標題 ショウジョウバエを用いた食品の機能性研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本家政学会誌	6. 最初と最後の頁 770-777
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.11428/jhej.70.770">https://doi.org/10.11428/jhej.70.770</a>	査読の有無 無
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 Rahmatika, D., Kuroda, N., Zhang, M., Nainu, F., Nagaosa, K., and Nakanishi, Y.	4. 巻 528
2. 論文標題 Inhibitory effects of viral infection on cancer development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 48-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.12.008">https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.12.008</a>	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 該当する

1. 著者名 Nonaka, S., Kawamura K., Hori, A., Salim, E., Fukushima, K., Nakanishi, Y., and Kuraishi, T.	4. 巻 506
2. 論文標題 Characterization of Spz5 as a novel ligand for Drosophila Toll-1 receptor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 510-515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.096">https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.096</a>	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 Yoshinaga, K., Nakai, Y., Izumi, H., Nagaosa, K., Ishijima, T., Nakano, T., and Abe, K.	4. 巻 62
2. 論文標題 Oral administration of edible wakame seaweed <i>Undaria pinnatifida</i> (wakame) modifies glucose and lipid metabolism in rats: a DNA microarray analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Nutrition and Food Research	6. 最初と最後の頁 e1700828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1002/mnfr.201700828">https://doi.org/10.1002/mnfr.201700828</a>	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shiratsuchi, A., Ariki, S., Kidoura, Y., Hasegawa, H., and Nakanishi, Y.
2. 発表標題 The effects of tobacco components on gene expression of <i>E. coli</i>
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Shiratsuchi
2. 発表標題 Regulation of bacterial virulence by mixed bacterial culture in the host
3. 学会等名 ウメア大学歯学部セミナー (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Shiratsuchi
2. 発表標題 Regulation of bacterial virulence in infectious condition
3. 学会等名 Symposium of the European Network for Aggregatibacter actinomycetemcomitans Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiratsuchi, A., Yamashita, S., Amagasa, Y., Komiyama, C., Narita, T., Yamamoto, K., Ishihama, A., and Nakanishi, Y.
2. 発表標題 Regulation of virulence of Escherichia coli in host organism: 宿主感染時の大腸菌の毒性抑
3. 学会等名 第92回生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永長一茂, 野中さおり, 中井雄治, 中西義信
2. 発表標題 Regulation of cell competition by engulfment receptors in Drosophila.: 貪食受容体による細胞競合調節機構
3. 学会等名 第92回生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西義信
2. 発表標題 Consequences of viral infection in Drosophila melanogaster
3. 学会等名 International Conference of Pharmacy Lambung Mangkura University: Therapeutic Strategy for Infectious Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白土明子
2. 発表標題 宿主感知による細菌の遺伝子発現変動と宿主との共存
3. 学会等名 日本生化学会北海道支部例会 総説講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永長一茂, 福田覚, 泉ひかり
2. 発表標題 変異細胞の除去をターゲットとした潜在的ながん予防食品探索
3. 学会等名 第26回日本がん予防学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白土明子
2. 発表標題 ショウジョウバエ遺伝学を用いた疾患モデル研究の展開
3. 学会等名 札幌医科大学病態生理リサーチカンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiratsuchi, A., Amagasa, Y., Komiyama, C., Yamashita, S., and Nakanishi, Y.
2. 発表標題 Role for outer membrane protein OmpC on Escherichia coli virulence for control infection in host.
3. 学会等名 Third Asian Invertebrate Immunology Symposium
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Nonaka, S., Hoshi, C., Kanetani, T., Sono, M., Nagaosa, K., Nakai, Y., and Nakanishi, Y.
2. 発表標題 Phagocyte priming mediated by transcription factor Tailless in Drosophila.
3. 学会等名 Third Asian Invertebrate Immunology Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永長一茂
2. 発表標題 細胞競合を利用した潜在的ながん予防食品のスクリーニング
3. 学会等名 がん予防学術大会2018高松
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	白土 明子  (Shiratsuchi Akiko)  (90303297)	札幌医科大学・医療人育成センター・教授   (20101)	
研究 分担者	永長 一茂  (Nagaosa Kazushige)  (70401891)	弘前大学・地域戦略研究所・准教授   (11101)	