

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650030

研究課題名(和文) 発癌防止におけるアポトーシス依存的貪食反応の役割

研究課題名(英文) Role for apoptosis-dependent phagocytosis in cancer prevention

研究代表者

中西 義信 (Nakanishi, Yoshinobu)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：40172358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期のチェックポイントに検知されて修復過程に入った異常細胞のうち、完全修復に至らなかった細胞はアポトーシス依存的に貪食除去されると考えられる。しかし、貪食の必要性は示されていない。研究代表者は、チェックポイントとアポトーシスを同時に阻害して発癌を起こさせるショウジョウバエ実験系において、アポトーシスではなく貪食を阻害した時の発癌の有無を調べることにした。発癌が起これば、癌細胞予備軍の除去にアポトーシスだけでなく貪食も必要と結論される。最初の1年半をかけて発癌モデルが完成し、貪食の必要性をみる動物の作成に入った。しかし、研究期間内に完成せず、当初の目的を達成することができなかった。

研究成果の概要(英文)：During cell division cycle, the check point system scrutinizes cells if they possess defects. Cells found to bear defects get off the cycle for repair, and those not repaired completely undergo apoptosis-dependent phagocytosis. Although the requirement of apoptosis has been shown, that of phagocytosis remains to be known. In a model system using fruit fly *Drosophila*, cancer develops when both check point and apoptosis are inhibited. We aimed at examining the occurrence of cancer when phagocytosis, not apoptosis, is inhibited together with check point. We succeeded in establishing a cancer model spending first 1 and half years and started to generate animals with defects in check point and phagocytosis. However, we were unable to achieve it before the period of time for this research ended. Therefore, we could not accomplish the purpose.

研究分野：生化学

キーワード：癌 アポトーシス 貪食 ショウジョウバエ チェックポイント

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖の過程では、細胞周期のチェックポイントにおいて染色体構造や細胞サイズなどの検定に合格した細胞のみが分裂を許される。不合格の判定がくだると、その細胞はいったん周期を外れて修繕が行われ、正常化された細胞は再び周期に戻り分裂に向う。しかし、不具合の程度が大きいなどの理由で修復不能となった細胞にはアポトーシスが誘導され、その細胞は生体から除かれる。この一連の過程は、発癌にいたる可能性のある異常細胞 (= 癌細胞予備軍) を除去するための生体防御の仕組みに位置づけられる。

アポトーシス細胞は貪食により除去される。アポトーシスの初期段階にある細胞の表層には「貪食目印」となる構造が出現し、免疫細胞などの食細胞が特異的受容体を使ってそれを認識して貪食が起きる。つまり、これまで研究代表者が明らかにしてきたように、「アポトーシスは要除去細胞を貪食目印でマーキングする反応であり、貪食が起きて初めて「細胞死」が完了する」のである。

細胞周期途中で修復不能とされた「癌細胞予備軍」もアポトーシスに依存した貪食除去を受けているはずである。研究代表者は、アポトーシスを起こした異常細胞が貪食除去されない時に、それがアポトーシスを脱して増殖することで癌が発生するのではないかと考えた。これを検証するために、遺伝学的実験を駆使できるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いた研究を計画した。ショウジョウバエでは癌の発生や転移の実験系が確立されており、これを利用して新規抗癌剤の開発も試みられている。また、アポトーシス細胞貪食の仕組みはショウジョウバエとヒトを含めた哺乳類とで共通である。

2. 研究の目的

細胞周期のチェックポイント機構に感知されて修復過程に入った異常細胞のうち、完全修復に至らなかったものは癌細胞の予備軍となる。生体はこれらの細胞をアポトーシスで除去して発癌を防止する仕組みを持つ。一般にアポトーシス細胞は貪食除去されるが、発癌防止に貪食反応が必要か否かは不明である。本研究の目的はこの点を検証することにある。貪食の必要性が示されたならば、制癌のための医療法開発をめざす研究に新たな視点が与えられる。

3. 研究の方法

“細胞分裂関連遺伝子の発現抑制と同時にアポトーシスを阻害すると癌が発生する”と

いうショウジョウバエの実験系を利用し、アポトーシスではなく貪食を阻害したときの影響を調べる。そのために、以下の順に実験を進める。

- (1) 研究代表者の手で発癌モデル系を再現させる。
- (2) 癌細胞予備軍の貪食を規定する分子を同定する。
- (3) 貪食を阻害した時に癌が発生するかどうかを調べる。

4. 研究成果

(1) 発癌モデルショウジョウバエ株の作成
他研究者により報告された方法に基づき、細胞周期チェックポイントに必要な遺伝子 *bub3* の発現を RNAi で抑制し、同時に caspase 阻害タンパク質 p35 を発現させてアポトーシスを阻害する。この変化を、細胞種特異的な GAL4-UAS システムを利用して、成虫原基のひとつである翅原基の後側で誘導させた。同じ細胞が GFP を発現する工夫も導入して、幼虫から取り出した翅原基を顕微鏡下に観察した。その結果、変化を誘導したショウジョウバエの翅原基では、陰性コントロールショウジョウバエと比較して、後側が大きくなることがわかった (図 1)。

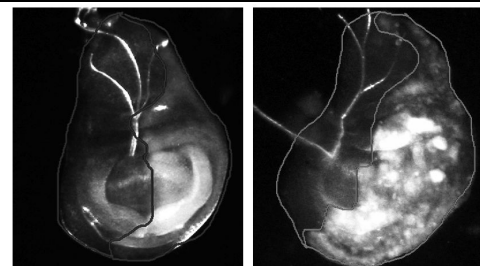


図 1. 幼虫から単離された翅原基の実体蛍光顕微鏡像

GFP 由来シグナルが白色で示されている。翅原基の輪郭および前側 (anterior part) と後側 (posterior part) との境界に人工的な線が引かれている。右側の像では後側が大きいがわかる。

左: *en-GAL4 UAS-GFP/+ ; +/+* (コントロール)
右: *UAS-bub3IR/en-GAL4 UAS-GFP ; UAS-p35/+*

原基の前側と後側の顕微鏡画像での面積を求めると、全体に対する後側の比 (顕微鏡像での面積比の解析) がコントロールショウジョウバエでは約 0.45 であるのに対して、誘導ショウジョウバエの原基では約 0.65 と、1.5 倍ほど大きくなっていることがわかった。この数値は報告された論文に記載された数値と同程度であり、発癌モデルショウジョウバエの樹立に成功したと結論された。

また、発癌ショウジョウバエの原基では、後側の形状が変化し、GFP 陽性の領域がスポット状に現れ、さらに細胞増殖の程度の違いにより生じる濃淡の縞模様が正常時とは異なる

ることがわかった。これらの変化は癌発生の仕組みと関係しているかもしれない、今後の重要な解析対象となる。

(2) 過剰増殖した細胞の貪食

過剰増殖した翅原基の細胞を標的とする貪食反応を行い、貪食の有無を調べ、貪食が観察されたら貪食目印分子と貪食状態を同定する。しかし、発癌モデルショウジョウバエ株の作成に当初の見込みより大幅に時間を要し、この課題のための実験を本研究の期間内に開始することができなかった。

(3) 貪食受容体を欠損させた発癌モデルショウジョウバエの樹立

アポトーシス阻害のかわりに貪食を阻害するために、研究代表者が見いだしたショウジョウバエの主要な貪食受容体である Draper と integrin α PS3- β v を欠損させることを考えた。そのため、8つの工程に及ぶショウジョウバエの交配と染色体交叉を計画した。この作業に思いのほか時間を要し、現在は工程4の *en-GAL4 UAS-GFP betaInt-nu²* という遺伝型のショウジョウバエ株ができた段階にある。次の工程は、この株に Draper 欠損変異である *dpr^{delta5}* を導入することであり、ただいま作業が進行中である。

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 3 件)

(1) Nainu, F., Tanaka, Y., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. Protection of insects against viral infection by apoptosis-dependent phagocytosis. *J. Immunol.* 195 (2015), 5696-5706, 査読有

(2) Li, Z., Venegas, V., Nagaoka, Y., Morino, E., Raghavan, P., Audhya, A., Nakanishi, Y., and Zhou, Z. Necrotic cells actively attract phagocytes through the collaborative action of two distinct PS-exposure mechanisms. *PLoS Genet.* 11 (2015), e1005285, 査読有

(3) Malmevik, J., Rogers, M.-L., Nilsson, M., Nakanishi, Y., Rush, R. A., Sims, N. R., and Muyderman, H. Selective transfection of microglia in the brain using an antibody-based non-viral vector. *Brain Res.* 1586 (2014), 12-22, 査読有

[学会発表](計 10 件)

(1) 中西義信、細胞貪食による生体恒常性の維持、文部科学省 新学術領研究「転写代謝システム」転写代謝セミナー、2015年12月、筑波大学生命領域学際研究センター(つくば市)

(2) Firzan Nainu, Ymiko Tanaka, Akioko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi、Apoptosis-dependent phagocytosis of virus-infected cells in *Drosophila*: an

evolutionarily conserved antiviral mechanism、第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会合同大会 ワークショップ：糖鎖を利用した、異物と宿主の生存戦略、2015年12月、神戸ポートアイランド(神戸市)

(3) 野中さおり、永長一茂、中井雄治、金谷匠人、星ちはる、中西義信、アポトーシス細胞貪食時の食細胞で活性化する転写因子 Tailless の同定、第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会合同大会、2015年12月、神戸ポートアイランド(神戸市)

(4) Firzan Nainu, Yumiko Tanaka, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi、Targeted elimination of virus-infected cells by apoptosis-dependent phagocytosis in *Drosophila melanogaster*、TOLL 2015, Targeting Innate Immunity、2015年10月、Palacio de Congresos de Mabella (Marbella, Spain)

(5) Yoshinobu Nakanishi、Apoptosis-dependent phagocytosis of virus-infected cells as antiviral immunity in *Drosophila*、Gordon Research Conferences: Apoptotic Cell Recognition & Clearance-Physiological significance and pathological consequences、2015年6月、University of New England (Biddeford, ME, USA)

(6) 中西義信、ショウジョウバエにおける細菌とウイルスの感染への防御機構、第23回病害動物の生理分子生物談話会、2015年3月、金沢大学宝町キャンパス(金沢市)

(7) Firzan Nainu, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi、Involvement of apoptosis-dependent phagocytosis in protection of insect against viral infection、第87回日本生化学会大会、2014年10月、京都国際会議場(京都市)

(8) 野中さおり、中井雄治、中西義信、永長一茂、Alteration of gene expression pattern in phagocytes after phagocytosis of apoptotic cells、第87回日本生化学会大会、2014年10月、京都国際会議場(京都市)

(9) Firzan Nainu, Akiko Shiratsuchi, Kaz Nagaosa, Yoshinobu Nakanishi、Role for apoptosis-dependent phagocytosis in antiviral immunity of *Drosophila*、第11回日本ショウジョウバエ研究会、2014年6月、金沢歌劇座(金沢市)

(10) Saori Nonaka, Yuji Nakai, Yoshinobu Nakanishi, Kaz Nagaosa, Possible role for phagocytosis receptors in transcription control during larval development of *Drosophila*、第11

回日本ショウジョウバエ研究会、2014年6月、金沢歌劇座（金沢市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 義信（NAKANISHI, Yoshinobu）
金沢大学・医薬保健研究域薬学系・教授
研究者番号：40172358

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：