

令和元年6月19日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04762

研究課題名(和文) プログラム細胞貪食による不要自己細胞除去の仕組みと意義

研究課題名(英文) Mechanisms and consequences of elimination of unwanted cells by programmed phagocytosis

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物に現れる不要自己細胞は、アポトーシスなどの変性により被貪食能を獲得して排除される。この現象は広く生体恒常性維持に寄与することから、名称を「プログラム細胞貪食」とし、シヨウジョウバエを使って仕組みと意義の解明に取り組んだ。

まず、アポトーシス細胞の貪食を誘導するシグナル伝達経路として進化的に保存される二つの経路を同定した。次に、アポトーシス細胞を貪食した食細胞では貪食受容体が増えて食活性が亢進することを示し、これを"食細胞がその後に出会う不要自己細胞の排除を確実にするための食細胞プライミング機構"と解釈した。最後に、プログラム細胞貪食がウイルス感染症と発癌の軽減に寄与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：本研究の成果は、プログラム細胞貪食が不要自己細胞の安全な排除のための主要な反応であり、その仕組みは種を越えて保存されていることを示した。そして、自然免疫が生体を外的の侵入から守る役割だけでなく、生体内で生じた変性細胞を排除することで恒常性維持にも寄与することが明らかになった。

社会的意義：原因が不明とされる疾患の中に、プログラム細胞貪食の不全によって発症するものが見つかる可能性がある。また、プログラム細胞貪食を亢進させて疾患の予防や治療を行う医療の開発も期待される。

研究成果の概要(英文)：Unwanted own cells that emerge in multicellular organisms undergo structural changes, through apoptosis for example, and are eliminated by phagocytosis. This phenomenon contributes to the maintenance of tissue homeostasis. We named this phenomenon as 'Programmed Phagocytosis' and intended to clarify its mechanisms and consequences using *Drosophila melanogaster* as an animal model.

We first showed the existence of two signaling pathways for the induction of phagocytosis of apoptotic cells. Then, we found that phagocytes increase their phagocytic activity through enhanced expression of engulfment receptors upon the engulfment of apoptotic cells, and interpreted this event as 'Phagocyte Priming' to ensure the elimination of unwanted cells that phagocytes encounter thereafter. Finally, we showed that programmed phagocytosis lessens the pathology of viral diseases and cancer.

研究分野：免疫生化学

キーワード：感染症 癌 シグナル伝達 免疫学 薬学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の体内には除去を必要とする自己細胞が一生を通じて頻りに現れる。このような‘要除去自己細胞’には、役割を終えた細胞・病変した細胞・発生や形態形成を妨げる細胞・生体機能の確立を妨げる細胞などが含まれる。これらの細胞は速やかにかつ安全に生体から排除されることが必要である。これまでの研究により、要除去自己細胞は貪食反応によって取り除かれることがわかった。すなわち、除去を必要とする自己細胞はアポトーシスを起こし、食細胞が持つ貪食受容体のリガンドとなる構造を表層に発現させる。そして、食細胞はこのリガンドを認識する受容体を使って標的を捉えて貪食し、取り込まれた細胞はリソソームに運ばれて消化される。この一連の反応は短時間のうちに起こり、生体中でアポトーシス細胞を検出することが難しいほどである。また、貪食されるまでの過程でアポトーシス細胞での細胞膜透過性の制御は維持されるため、細胞内容物が漏出して組織を傷害することはない。この「変性自己細胞のアポトーシス依存貪食」は、生物種を越えて進化的に保存された現象である。

最近になって、アポトーシスとは異なる様式の細胞死であるネクローシスを起こした細胞もアポトーシス細胞を標的とする反応と同様の仕組みで貪食除去されることが、研究代表者らにより明らかにされた (*PLoS Genet.* 11:e1005285, 2015)。また、細胞死などの変性を受けずに癌細胞が食細胞の標的となる場合があることも報告されている (Feng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112:2145, 2015)。これらの事実は、貪食による不要自己細胞の除去が、アポトーシス依存の反応に限定されずに生体内で広く起きて、生体恒常性の維持に寄与していることを示唆する。そこで本研究では、この現象の名称を「プログラム細胞貪食」と改めて、その仕組みと意義の全般に結論を導くことを目的とする。

### 2. 研究の目的

#### 2-1. プログラム細胞貪食を誘導する情報伝達経路の解明

要除去自己細胞が食細胞に貪食されるための情報伝達経路を明らかにする。

#### 2-2. プログラム細胞貪食の生体恒常性維持における役割の解明

プログラム細胞貪食がウイルス感染症と癌の防止に寄与するかどうかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

キショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) をモデル動物として利用し、遺伝学を駆使した *in vivo* 実験を行い、現象の検証とそれに関与する遺伝子・タンパク質を同定する。

### 4. 研究成果

#### プログラム細胞貪食を誘導する情報伝達経路の解明

##### 1. プログラム細胞貪食を誘導する情報伝達経路

ショウジョウバエの食細胞について遺伝学的手法を用いて解析した。その結果、二種類の貪食受容体、Draper とインテグリン  $\alpha$ PS3- $\beta$ v、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) の活性化を導いてアポトーシス細胞の貪食反応が開始されることがわかった (図 1、論文 8)。

貪食誘導性経路は、最初に線虫 (*Caenorhabditis elegans*) で示され、次いで哺乳類とショウジョウバエ (本研究) で明らかにされた。その結果、いずれの生物でも類似の分子が情報因子として使われる経路が存在することがわかり (図 2)、“アポトーシス依存的な貪食による不要細胞の除去”が、現象のみならず仕組みについても進化的に保存されたものであることが明らかになった (論文 4)。

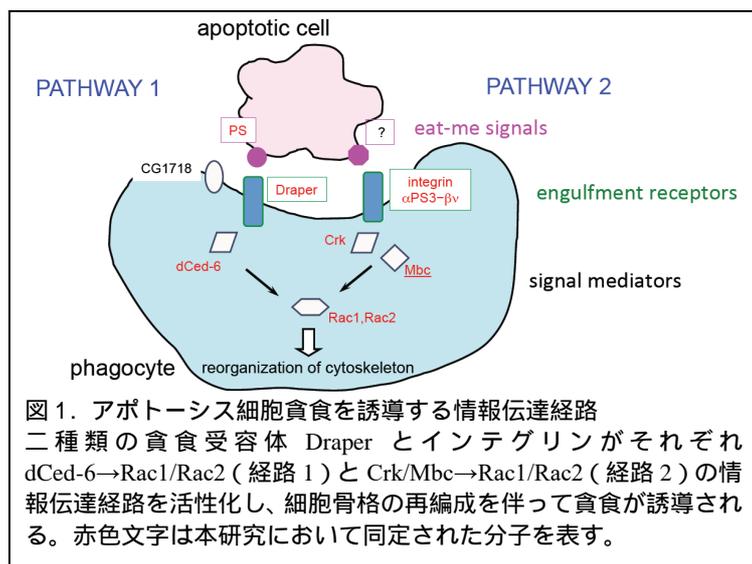


図 1. アポトーシス細胞貪食を誘導する情報伝達経路  
二種類の貪食受容体 Draper とインテグリンがそれぞれ dCed-6→Rac1/Rac2 (経路 1) と Crk/Mbc→Rac1/Rac2 (経路 2) の情報伝達経路を活性化し、細胞骨格の再編成を伴って貪食が誘導される。赤色文字は本研究において同定された分子を表す。

## 2. 食細胞の貪食活性のプライミング

ショウジョウバエ食細胞にアポトーシス細胞を添加すると貪食活性が高まることがわかった(論文2)。この効果には貪食が必要であり、貪食受容体の増加を伴っていた。よって、アポトーシス細胞と接した貪食受容体が情報伝達経路を活性化して貪食を起こさせると同時に貪食受容体の生産増大を導いていると考えられた。この現象は、初めてアポトーシス細胞を貪食した食細胞が、次に出会うアポトーシス細胞を確実に貪食除去するための“プライミング機構”であると考えられた。

さらに、この現象には転写抑制因子の Tailless が関与していることがわかり(論文8)。その後の解析で「Tailless の脱リン酸化による活性化 Tailless による別の転写抑制因子 Krüppel をコードする遺伝子の転写阻害 貪食受容体 Draper とインテグリン  $\alpha$ PS3 をコードする遺伝子の Krüppel による転写阻害の解除 貪食受容体の生産促進 貪食活性の増大」という一連の経路の存在が示唆された(図3、論文1)。

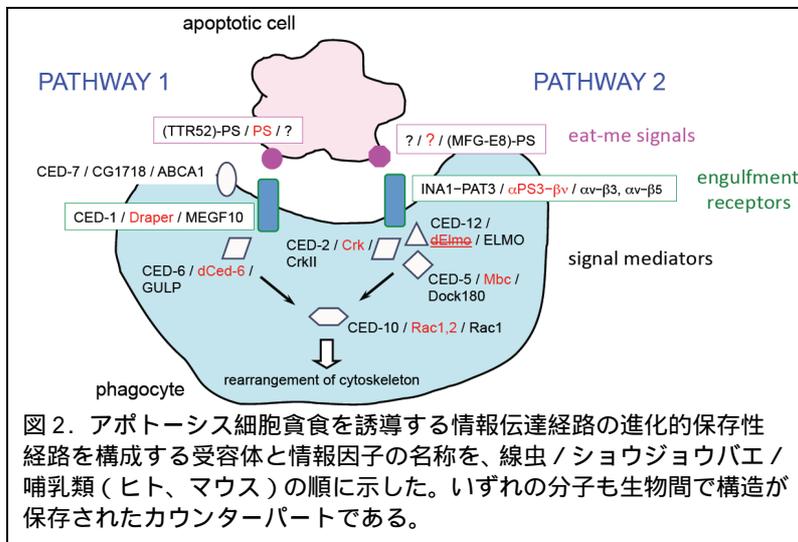


図2. アポトーシス細胞貪食を誘導する情報伝達経路の進化的保存性経路を構成する受容体と情報因子の名称を、線虫/ショウジョウバエ/哺乳類(ヒト、マウス)の順に示した。いずれの分子も生物間で構造が保存されたカウンターパートである。

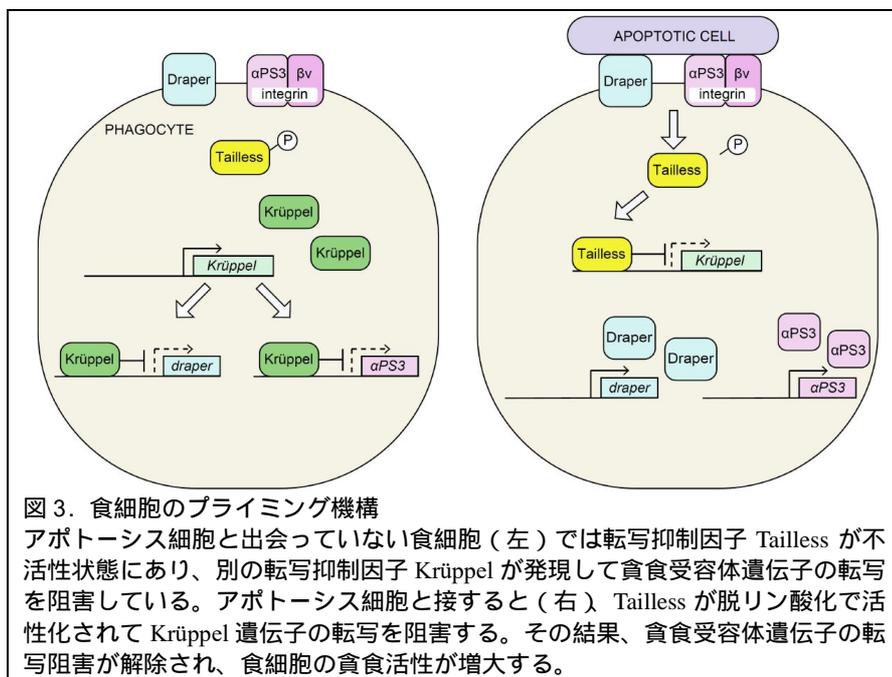


図3. 食細胞のプライミング機構

アポトーシス細胞と出会っていない食細胞(左)では転写抑制因子 Tailless が不活性状態にあり、別の転写抑制因子 Krüppel が発現して貪食受容体遺伝子の転写を阻害している。アポトーシス細胞と接すると(右)、Tailless が脱リン酸化で活性化されて Krüppel 遺伝子の転写を阻害する。その結果、貪食受容体遺伝子の転写阻害が解除され、食細胞の貪食活性が増大する。

## プログラム細胞貪食の生体恒常性維持における役割の解明

### 3. プログラム細胞貪食によるウイルス感染症の軽減

研究代表者らは、ショウジョウバエを宿主とするウイルス感染系を用いて、ウイルス感染細胞がアポトーシスを起こして食細胞に貪食され、これによりウイルス感染宿主の生存が延長されることを示していた(*J. Immunol.* 195:5696, 2015、論文5)。本研究期間において、ウイルス感染細胞にアポトーシスが誘導される仕組みを調べたが、確かな結論を導く結果は得られなかった。

### 4. プログラム細胞貪食による発癌の軽減

プログラム細胞貪食の発癌防止への寄与の有無を調べるために、他研究者が樹立したショウジョウバエ発癌モデル(Dekanty et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:20549, 2012)を使うことにした(図4)。この実験系では、細胞周期とアポトーシスを同時に阻害することにより癌を誘発する。まず、この実験を再現させ、次いで、ウイルス感染させた時の発癌程度の変化を調べた。すると、ウイルス感染が癌化の程度を抑えることがわかった(論文2)。これは、ウイルス感染によって食細胞がプライミングを受けて貪食活性が高まり、癌細胞が貪食除去されたためであると考えられた。癌細胞が被貪食能を獲得する仕組みは不明である。

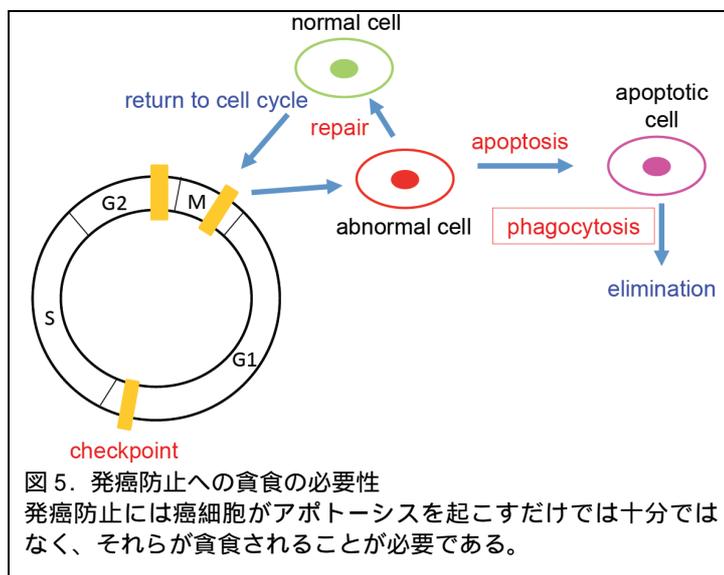
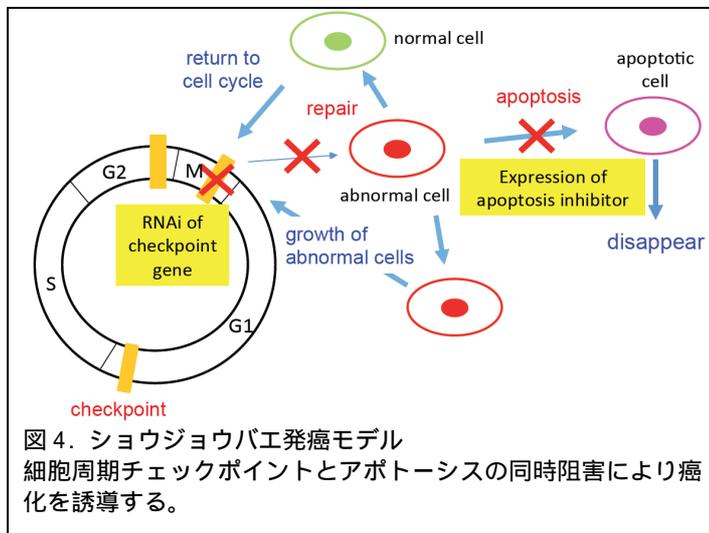
そこで、発癌防止への貪食の寄与をより直接的に知るため、アポトーシスのかわりに貪食を阻害した時の癌の程度を調べた。そのために、貪食受容体の Draper とインテグリン  $\beta$ v の両方を作れない遺伝子変異をショウジョウバエに導入した。その結果、アポトーシス阻害なしでも貪食を阻害すれば同等レベルでの発癌が観察された。よって、発癌防止にはアポトーシス誘導だけでは

不十分であり、アポトーシスを起こした癌細胞が貪食によって除去（消化）されることが必要であるとわかった(図5、論文準備中)。癌細胞がアポトーシスを起こしても、何らかの仕組みで増殖を続けることがあると推測される。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- 1) Nonaka, S., Sono, M., Hoshi, C., Kanetani, T., Nakayama, H., Dohmae, N., and Nakanishi, Y.  
Transcription repressor- mediated control of engulfment receptor expression in *Drosophila* phagocytes.  
Exp. Cell Res. 381, 10-17 (2019)  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.04.032>
- 2) Rahmatika, D., Kuroda, N., Zhang, M., Nainu, F., Nagaosa, K., and Nakanishi, Y.  
Inhibitory effects of viral infection on cancer development.  
Virology 528, 48-53 (2019)  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.12.008>
- 3) Nonaka, S., Kawamura K., Hori, A., Salim, E., Fukushima, K., Nakanishi, Y., and Kuraishi, T.  
Characterization of Spz5 as a novel ligand for *Drosophila* Toll-1 receptor.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 506, 510-515 (2018)  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.096>
- 4) Nonaka, S., Shiratsuchi, A., Nagaosa, K., and Nakanishi, Y.  
Mechanisms and significance of phagocytic elimination of cells undergoing apoptotic death.  
Biol. Pharm. Bull. 49, 1819-1827 (2017)  
doi: <http://doi.org/10.1248/bpb.b17-00478>
- 5) Nainu, F., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y.  
Induction of apoptosis and subsequent phagocytosis of virus-infected cells as an antiviral mechanism.  
Front. Immunol. 8, 1220 (2017)  
doi: 10.3389/fimmu.2017.01220
- 6) Ekowati, H., Arai, J., Damana Putri, A. S., Nainu, F., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y.  
Protective effects of *Phaseolus vulgaris* lectin against viral infection in *Drosophila*.  
Drug Discov. Ther. 11, 329-335 (2017)  
doi:10.5582/ddt.2017.01071
- 7) Nonaka, S., Hori, A., Nakanishi, Y., and Kuraishi, T.  
Phagocytosis assay for apoptotic cells in *Drosophila* embryos.  
J. Vis. Exp. 126: e56352 (2017)  
doi:10.3791/56352 (2017)
- 8) Nonaka, S., Ando, Y., Kanetani, T., Hoshi, C., Nakai, Y., Nainu, F., Nagaosa, K., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y.  
Signaling pathway for phagocyte priming upon encounter with apoptotic cells.  
J. Biol. Chem. 292, 8059-8072 (2017)  
doi:10.1074/jbc.M116.769745
- 9) Shiratsuchi, A., Nitta, M., Kuroda, A., Komiyama, C., Gawasawa, M., Shimamoto, N., Tuan, T. Q., Morita, T., Aiba, H., and Nakanishi, Y.  
Inhibition of phagocytic killing of *Escherichia coli* in *Drosophila* hemocytes by RNA chaperon Hfq.  
J. Immunol. 197, 1298-1307 (2016)



doi:10.4049/jimmunol.1501953

[学会発表](計 21 件)

- 1) 2018年9月7日(国内開催の国際集会、ポスター発表)  
福岡市、福岡リーセントホテル  
The 3<sup>rd</sup> Asian Invertebrate Immunity Symposium 2018  
Role for outer membrane protein OmpC on *Escherichia coli* virulence for control infection in host  
A. Shiratsuchi, Y. Amagasa, S. Yamashita, Y. Nakanishi
- 2) 2018年9月6日(国内開催の国際集会、口頭発表)  
福岡市、福岡リーセントホテル  
The 3<sup>rd</sup> Asian Invertebrate Immunity Symposium 2018  
Phagocyte priming mediated by transcription factor Tailless in *Drosophila*  
S. Nonaka, C. Hoshi, T. Kanetani, M. Sono, K. Nagaosa, Y. Nakai, Y. Nakanishi
- 3) 2018年2月6日(海外集会、招待講演、口頭発表)  
ゼント市、ベルギー、Inflammation Research Center  
The First UGent-KanazawaU Joint Seminar on Cell death modalities: regulation, phagocytosis and relevance to diseases (Organizers: Dmitri V. Krysko, Yoshinobu Nakanishi and Peter Vandenabeele)  
Maintenance of tissue homeostasis by phagocytic elimination of apoptotic cells  
Y. Nakanishi
- 4) 2017年12月6~9日(国内学会、ポスター発表)  
神戸市、ポートアイランド  
2017年度生命科学系学会合同年次大会  
Identification of transcription factor Tailless responsible for phagocyte priming  
野中さおり、星ちはる、金谷匠人、宗野真衣、中井雄治、永長一茂、中西義信
- 5) 2017年12月6~9日(国内学会、ポスター発表、学生筆頭)  
神戸市、ポートアイランド  
2017年度生命科学系学会合同年次大会  
Protective effects of *Phaseolus vulgaris* lectin against viral infection in *Drosophila*  
H. Ekowati, J. Arai, A. S. Damana Putri, F. Nainu, A. Shiratsuchi, Y. Nakanishi
- 6) 2017年12月6~9日(国内学会、ポスター発表、学生筆頭)  
神戸市、ポートアイランド  
2017年度生命科学系学会合同年次大会  
Activation of *E. coli* two-component system EnvZ-OmpR by host factor  
野添亜美、小宮山千晴、山本兼由、石浜明、中西義信、白土明子
- 7) 2017年11月26日(国内学会の地方会、口頭発表、学生筆頭)  
金沢大学、金沢市  
日本薬学会北陸支部第129回例会  
タバコ成分による大腸菌情報経路の活性変動と環境適応  
木戸浦悠斗、中西義信、白土明子
- 8) 2017年11月3日(海外学会、招待講演、ポスター発表、学生筆頭)  
Four Points By Sheraton Makassar, Makassar, Indonesia  
The 3<sup>rd</sup> Makassar International Symposium on Pharmaceutical Sciences  
Induction of apoptosis in virus-induced cells in *Drosophila* as an innate immune response  
T. Matsuda, A. Shiratsuchi, F. Nainu, Y. Nakanishi
- 9) 2017年11月3日(海外学会、招待講演、口頭発表)  
Four Points By Sheraton Makassar, Makassar, Indonesia  
The 3<sup>rd</sup> Makassar International Symposium on Pharmaceutical Sciences  
Maintenance of health by cell death  
Y. Nakanishi
- 10) 2017年9月27日(海外学会、招待講演、口頭発表)  
Saarland University, Saarbrücken, Germany  
Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society  
Maintenance of tissue homeostasis by apoptotic cell death  
Y. Nakanishi
- 11) 2017年6月3日(国内学会の地方会、口頭発表、学生筆頭)  
金沢大学、金沢市  
日本生化学会北陸支部第35回大会  
Examination of environmental factors that affect cancer development and progress in *Drosophila*  
Dini Rahmatika Ismed、黒田奈々恵、Firzan Nainu、中西義信
- 12) 2017年6月3日(国内学会の地方会、口頭発表)  
金沢大学、金沢市  
日本生化学会北陸支部第35回大会

- 転写因子 Tailless を介した食細胞プライミング機構  
野中さおり、金谷匠人、星ちはる、中井雄治、永長一茂、中西義信
- 13) 2016 年 11 月 27 日 (国内学会の地方会、口頭発表)  
北陸大学薬学部、金沢市  
日本薬学会北陸支部第 128 回例会  
Protective effect of Phaseolus vulgaris lectin against viral infection in *Drosophila*  
Heny Ekowati、荒井潤子、Ayu Sekarani Damana Putri、Firzan Nainu、中西義信
- 14) 2016 年 11 月 27 日 (国内学会の地方会、口頭発表)  
北陸大学薬学部、金沢市  
日本薬学会北陸支部第 128 回例会  
転写因子 Tailless によるアポトーシス細胞貪食促進機構の解明  
金谷匠人、野中さおり、中西義信
- 15) 2016 年 10 月 16 日 (国際学会、ポスター発表)  
Yuanzheng Qizhen Hotel, Hangzhou, China  
Second Asian Invertebrate Immunology Symposium  
Posttranscriptional regulation of bacterial genes for persistence infection in *Drosophila*  
A. Shiratsuchi, Y. Nakanishi
- 16) 2016 年 9 月 28 日 (国内大学での講演、招待)  
岩手医科大学薬学部、仙台市  
アドバンスト教育プロジェクト 薬学セミナー  
自己細胞の貪食除去による生体恒常性の維持  
中西義信
- 17) 2016 年 9 月 27 日 (国内学会の全国会、口頭発表・ポスター発表)  
仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス、仙台市  
第 89 回日本生化学会大会  
アポトーシス細胞貪食時の食細胞における遺伝子発現変動の機構と意義の解明  
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
- 18) 2016 年 9 月 25 日 (国内学会の全国会、ポスター発表)  
仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス、仙台市  
第 89 回日本生化学会大会  
RNA シャペロン Hfq による細菌の宿主持続感染への役割  
白土明子、小宮山千晴、黒田阿友美、中西義信
- 19) 2016 年 9 月 25 日 (国内学会の全国会、口頭発表・ポスター発表)  
仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス、仙台市  
第 89 回日本生化学会大会  
*Drosophila* C virus 感染免疫へのショウジョウバエ Draper の働き  
小宮山千晴、中西義信、白土明子
- 20) 2016 年 9 月 6 日 (海外大学での講演、招待)  
Faculty of Pharmacy, Hasanuddin University, Makassar, Indonesia  
Maintenance of tissue homeostasis by phagocytic removal of altered own cells  
Y. Nakanishi
- 21) 2016 年 5 月 28 日 (国内学会の地方会、口頭発表、学生筆頭)  
金沢大学、金沢市  
日本生化学会北陸支部第 34 回大会  
ヘモサイトによる黄色ブドウ球菌の貪食を規定する Draper の細胞外領域の解析  
有原大貴、中西義信、白土明子
- [図書](計 0 件)  
[産業財産権]  
○出願状況(計 0 件)  
○取得状況(計 0 件)  
[その他] 該当なし

## 6. 研究組織

- (1)研究分担者 該当なし  
(2)研究協力者 該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。