

ショウジョウバエを用いた自然免疫に作用する化合物の探索

倉田 祥一郎

ショウジョウバエの自然免疫を制御する Toll 受容体の研究が契機となり、哺乳動物の Toll 様受容体が病原体センサーとして同定された。病原体センサーが制御する自然免疫の分子機構が明らかにされるにつれて、自然免疫が感染防御だけでなく、がん転移や、動脈硬化などの非感染性疾患の病態とも深く関わっていることが明らかになってきた。今後、自然免疫を標的とした医薬品開発の重要性がますます増してくるものと思われる。本稿では、遺伝子導入やさまざまな変異体の利用が容易なショウジョウバエの個体を用いた、自然免疫に作用する化合物の探索系を紹介する。そして、この探索系で同定された化合物には、哺乳動物の自然免疫に作用するものがあり、たとえば、がん転移を抑制する化合物も同定されてきている現状を述べる。

1. はじめに

獲得免疫系が脊椎動物だけが有する生体防御機構であるのに対して、自然免疫系はすべての多細胞生物が生まれながら有する生体防御機構である。ショウジョウバエの自然免疫系を制御する Toll 受容体の研究が契機となり、哺乳動物 Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) が病原体センサーとして同定された。そして、病原体センサーが制御する自然免疫の分子機構が明らかにされた。最近では、TLR などの病原体センサーが、病原体成分だけでなく内因性の因子をリガンドとして、がん転移や動脈硬化など、さまざまな非感染性疾患の病態にも関与していることが明らかにされつつある。文部科学省の新学術領域研究「自然炎症」では、このような病原体センサーと内因性リガンドによる恒常性維持機構を「自然炎症」と捉え、その破綻により引き起こされるさまざまな非感染性炎症疾患について研究を展開している (URL: <http://shizen-enshow.jp/index.html>)。このように、自然免疫系がさまざまな疾患と関連していることが明らかになるにつれて、自然免疫を標的とした医薬品開発の重要性が増してきている。本稿では、自

然免疫系が種間で共通性を示すことを利用して、ショウジョウバエ個体を用いて行う自然免疫に作用する化合物の探索について、話題を提供する。

2. 昆虫の自然免疫応答と自然免疫応答を制御する NF- κ B 経路の種間での共通性

昆虫は開放血管系を有しているために、外界と体内を隔てる上皮組織の内部は体液で満たされている。そして、各々の組織や器官は体液に浮遊している状態にある。したがって、上皮組織によるバリアーを通過して体内に侵入する病原体は、体液中で免疫応答にさらされる (図 1)。免疫応答は、貪食能を持つ体液細胞が示す細胞性応答と、抗菌ペプチドなどの液性因子による液性応答に大別され

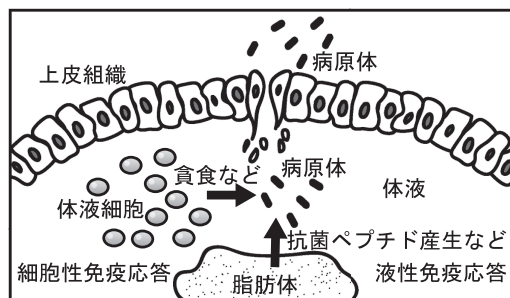


図 1 昆虫の自然免疫応答

上皮組織によるバリアーを通過した病原体は、体液中で細胞性と液性の免疫応答にさらされる。細胞性応答は、体液細胞による貪食作用などであり、液性応答には、脂肪体からの抗菌ペプチドの産生誘導などがある。

東北大学大学院薬学研究科 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

Search of compounds acting on the innate immunity using *Drosophila*

Shoichiro Kurata (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aoba 6-3, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan)

る。昆虫は、獲得免疫系を有しておらず、リンパ球や抗体に依存した免疫応答は示さない。したがって、獲得免疫の影響を排除して自然免疫応答を調べることができる。そして、遺伝子導入や、遺伝学的解析が容易なショウジョウバエは、自然免疫研究の優れたモデル生物となっている¹⁾。

液性免疫応答の一つに、抗菌ペプチドの産生誘導があげられる。抗菌ペプチドは、各々固有の幅広い特異性を示す殺菌活性を有している²⁾。ショウジョウバエでは、それぞれサブタイプが存在する7種の抗菌ペプチドが知られている。これらは、感染に応じて、主に哺乳動物の肝臓に相当する脂肪体で産生され、体液中に分泌される。たとえば、真菌が感染すると、真菌に強く作用するDrosomycinなどが選択的に産生される。一方、グラム陰性菌の感染では、グラム陰性菌に対する強い殺菌活性を持つDiptericinなどが産生される。体液中、あるいは脂肪体や体液細胞などの免疫応答細胞の表面には、病原体センサーが存在しており、体液中に侵入した病原体のペプチドグリカンや、 β -1,3グリカンなどの構成成分を認識して、抗菌ペプチド産生を誘導する(図2)。病原体センサーの下流で抗菌ペプチド産生を制御する細胞内シグナル伝達系は、Toll経路とimmunodeficiency(imd)経路と呼ばれる二つの独立したnuclear factor(NF)- κ B経路である¹⁾。たとえば、Toll経路は真菌の感染で活性化され、抗真菌ペプチドDrosomycinなどの産生を誘導する。imd経路はグラム陰性菌の感染などで活性化し、抗菌ペプチドDiptericinなどの産生を誘導する。

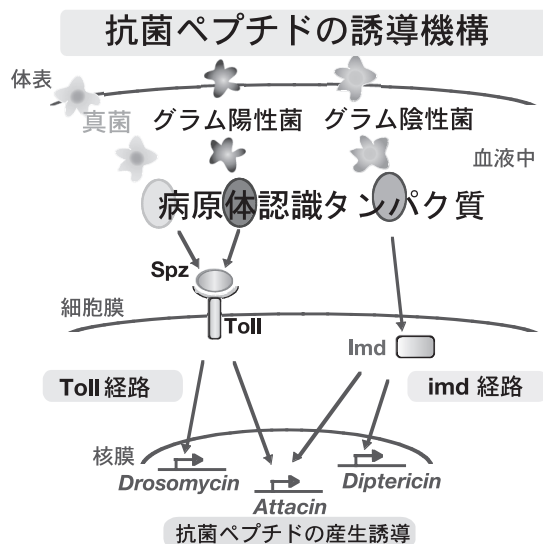


図2 ショウジョウバエでの抗菌ペプチド産生誘導機構
体内に病原体が侵入すると、体液中、あるいは体液細胞や脂肪体などの免疫応答細胞の細胞表面に存在する病原体センサー（病原体認識タンパク質）が病原体を認識し、二つの独立したNF- κ B経路、Toll経路とimd経路、を活性化し抗菌ペプチドの産生誘導を行う。真菌の感染では、主にToll経路が活性化し、抗真菌ペプチドDrosomycinなどが誘導される。グラム陰性菌の感染では、imd経路が主に活性化し、抗菌ペプチドDiptericinなどが産生される。グラム陽性菌の感染では、主にToll経路が活性化する。

これらの二つのNF- κ B経路は、種間で共通性を示す(図3)。Toll経路は、哺乳動物のTLR経路と共通性があり、Toll受容体はTLR受容体、d myeloid differentiation factor(dMyD)88, Tube, Pelleのシグナル因子は、それぞれMyD88, TNF receptor-associated factor(TrAF)6, IL-1 receptor associated kinase(IRAK)と対応している。DifとDorsalの転写因子はNF- κ B, それらの抑制因子のCactusはinhibitor of κ B(I κ B)と対応している³⁾。一方、imd経路は、哺乳動物のtumor necrosis factor(TNF)経路と共通性を示す。Imdアダプタータンパク質はreceptor-interacting protein(RIP)と、d Fas-associated death-domain protein(dFADD)はFADD, Dreddはcaspase 8, d TGF- β activated kinase(dTAK)1はMEKK, RelishはNF- κ Bに対応する³⁾。したがって、これらのNF- κ B経路は、進化的に共通の宿主防御の経路から重複して発生してきたと考えられている。

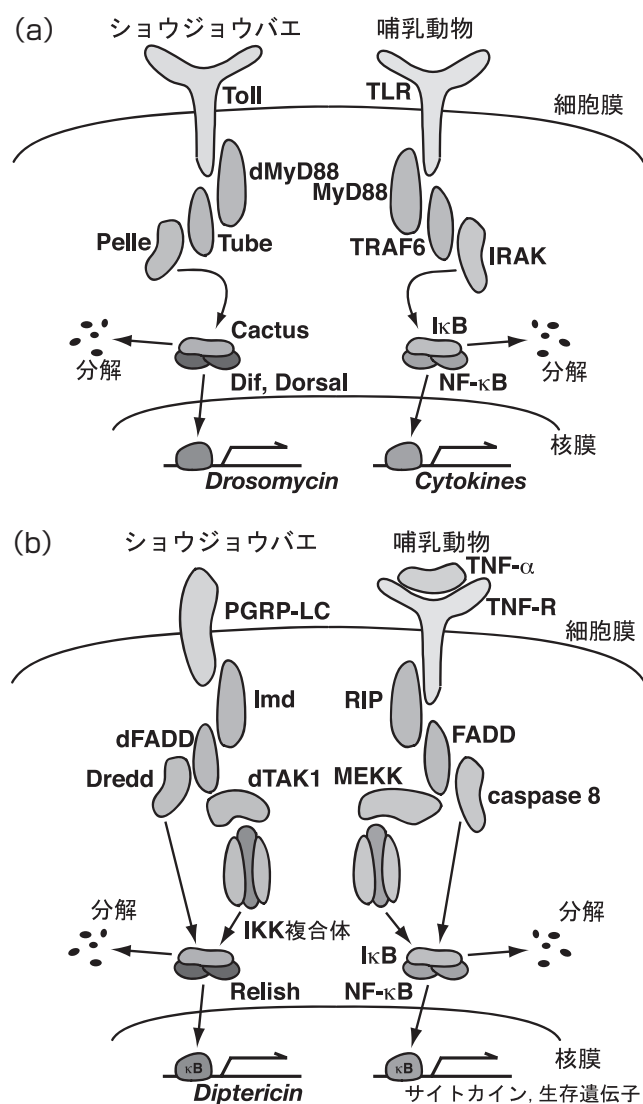


図3 自然免疫応答を制御するNF- κ B経路の種間での共通性
自然免疫応答を制御するNF- κ B経路は、種間で共通性を示す。ショウジョウバエのToll経路は、哺乳動物のTLR経路と共通性を示し(a)、imd経路は、哺乳動物のTNF経路と共通性を示す(b)。

3. ショウジョウバエを用いた NF- κ B 経路に作用する化合物の探索系

自然免疫応答を制御する NF- κ B 経路が種間で共通性を示すことから十分予想できるように、哺乳動物の NF- κ B 経路に作用する化合物の多くは、ショウジョウバエの NF- κ B 経路にも同様に作用する。たとえば、哺乳動物の TNF 経路において caspase 8 を不可逆的に阻害する Z-VAD-FMK は、ショウジョウバエの imd 経路においても相同の標的に作用する⁴⁾。このことは、ショウジョウバエの NF- κ B 経路に作用する化合物には、哺乳動物の NF- κ B 経路に作用するものがある可能性を示している。

上述したように、昆虫は開放血管系を有しているために、上皮組織に切れ目を入れれば、培養液中で生体反応をしばらく維持したまま個体培養ができる。ショウジョウバエの幼虫は、成長しても全長 3 mm に満たないために、96 穴のプレートの中で培養できる。その培養液にペプチドグリカンなどの病原体構成成分を加えれば、免疫応答が誘導される⁵⁾。その際に、Toll 経路と imd 経路の活性化をモニターできるレポーター遺伝子を遺伝子導入したショウジョウバエを用いれば、免疫応答を簡便に定量化でき、化合物が免疫応答を阻害するのか、活性化するのか判定できる(図 4)。この探索系は、個体培養系であるために、化合物

の組織への浸透性や、安定性を最初からある程度考慮して、免疫応答のさまざまなステップに作用する化合物を同定できるという特徴と、後述するように、ショウジョウバエのさまざまな変異体を組み合わせることで、化合物の標的分子を同定しやすいという利点がある^{4,5)}。

4. NF- κ B 経路に作用する化合物

これまでに、微生物抽出物や化合物ライブラリーなど 25,000 種ほどのサンプルが、この探索系にかけられている。そして、微生物抽出物の場合は、その活性をもとに化合物が単離され、構造決定がなされた結果、免疫応答を抑制する化合物と、促進する化合物が数種ずつ同定されている。その一つであるシクロペンタンジオール誘導体 TP-1 は、imd 経路を抑制する。そして、ショウジョウバエの変異体と個体培養系を組み合わせることで、その標的分子が Imd アダプター分子と dTAK1 キナーゼの間に存在することが明らかにされている⁶⁾。

さて、年間 3 億～5 億人が感染し 100 万～150 万人が死亡しているマラリア、北米で流行したウエストナイル熱、年間 50 万人以上が感染するデング熱、近年わが国での発症が確認された重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) など、昆虫／節足動物媒介性感染症の脅威は、昨今の人的交流のグローバル化や気候温暖化などによって、加速増幅されて

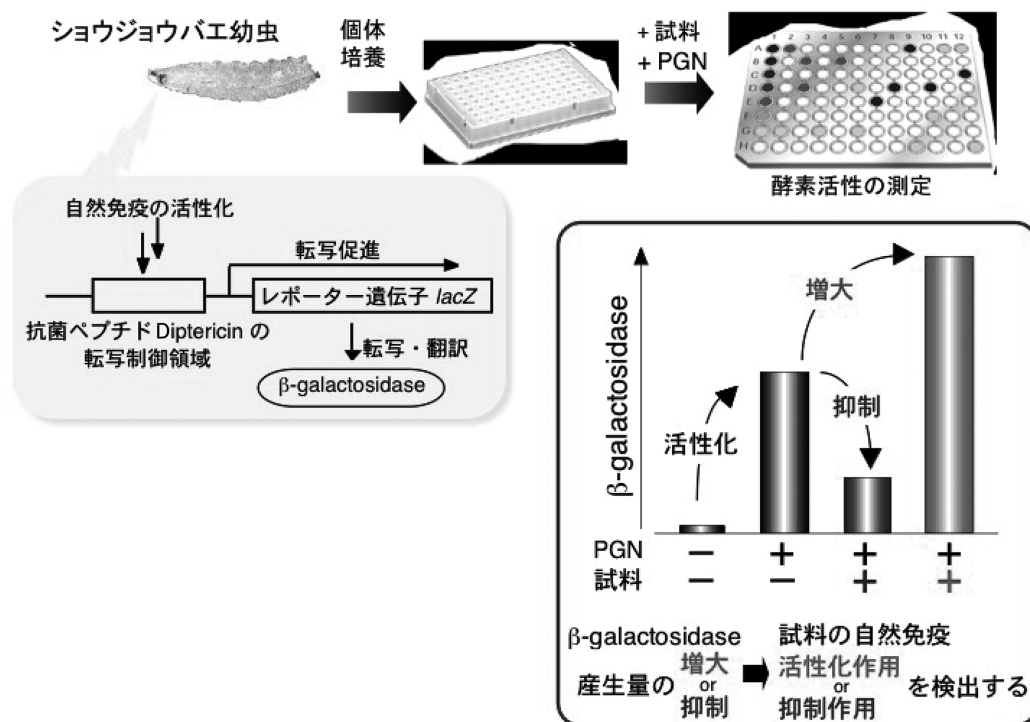


図 4 ショウジョウバエを用いた NF- κ B 経路に作用する化合物の探索系

Toll 経路、あるいは imd 経路によって発現が誘導される抗菌ペプチドの転写制御領域を用いたレポーター遺伝子を導入したショウジョウバエの幼虫を 96 穴のプレート中の培養液に入れ、個体培養を行う。培養液に細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン (PGN) などを加え、酵素活性を測定してレポーター遺伝子の発現誘導を調べる。同時に、検体試料を加えることで、それが自然免疫を抑制する活性を持つのか、あるいは活性化するのか調べるができる。

いるといわれている。昆虫によって感染症が媒介されるためには、媒介される病原体は宿主昆虫の免疫応答で排除されることなく、しかもその病原体によって宿主昆虫が感染症に陥ることがないという、昆虫の免疫応答をめぐる絶妙なバランスが成立しなくてはならない。したがって、昆虫の免疫応答に作用する化合物は、このバランスを崩すことで昆虫媒介性感染症の対策に活用できる可能性がある。実際、ショウジョウバエが媒介し、キャベツやメロンなどに軟腐病を引き起こすグラム陰性菌 *Erwinia carotovora* を用いた昆虫媒介性感染症のモデル実験において、TP-1 の投与により *E. carotovora* を保菌したキャリアーショウジョウバエだけが致死となり、保菌していないハエは影響を受けないことが示されている⁶⁾。昆虫の imd 経路は、原虫の感染防御にも重要な役割を果たしていることが示されている。imd 経路の阻害剤は、原虫感染モデル実験においても、原虫が感染した個体だけを致死にし、感染していない個体には影響を与えなかった。これらの結果は、昆虫の免疫応答に作用する化合物が、昆虫媒介性感染症の対策に活用できうることを示唆している。この場合、これまでの殺虫剤と異なり、病原体を保有するキャリアー昆虫だけを駆除するために、昆虫に対する選択圧が少なく、薬剤に対する耐性昆虫が出現しにくいことが期待できる。

imd 経路は、哺乳動物の TNF 経路と共通性があることから期待できたように、ヒトの正常内皮細胞を用いた実験で、TP-1 が TNF 経路の imd 経路の標的と同様の位置に作用して、サイトカイン産生を抑制することが明らかにされた⁶⁾。現在では、TP-1 より安定で同程度の活性を有する誘導体が開発されて、研究用の試薬として市販されている⁷⁾ (http://www.cosmobio.co.jp/product/detail/csr_20120531.asp?entry_id=9336)。また、上述の探索系では、TP-1 より強力に imd 経路を阻害するピロール誘導体 *celastramycin A* が同定されている⁸⁾。先に述べたように、近年自然免疫系が、がん転移にも関わるということが明らかにされている⁹⁾。この際、がん細胞は TNF 経路を用いて、転移先の土壌を転移しやすい状態へと導く。*celastramycin A* はヒト、あるいはマウスの培養細胞で TNF 経路を阻害する。これらの結果に呼応して、最近 *celastramycin A* がマウスのがん転移モデルで、がん転移を抑制することが示され、その際の *celastramycin A* の標的分子が同定された¹⁰⁾。これらの結果は、昆虫を用いた探索系で得た化合物が、ヒトの自然免疫に作用する医薬品のリード化合物として展開できうる可能性を示している。

5. おわりに

遺伝子導入ショウジョウバエを用いた個体レベルでの、自然免疫に作用する化合物の探索について紹介した。化合物の組織への浸透性や安定性などがある程度考慮でき、化合物の標的分子の同定が容易であるという利点がある反面、個体培養系であるために、96 穴プレートでのスクリーニングは可能であるが、ロボットなどを用いるハイスループットスクリーニングには展開できない。ショウジョウバエの卵の中の胚においても自然免疫応答は観察され、今回紹介したレポーター遺伝子を用いてモニターできる。したがって、遺伝子導入した胚を用いることで、ハイスループットスクリーニングが可能になるかもしれない。自然免疫は、当初の予想を遙かに超えて、生体の基本的な恒常性の維持に重要であり、さまざまな病態と関わるということが明らかにされつつある。昆虫の利点を利用したこれまでにないアプローチにより、自然免疫を標的とした創薬が大きく発展することを期待している。

謝辞

本稿で紹介した私どもの研究は、東北大学大学院薬学研究科 大島吉輝教授のご指導の下、科学研究費補助金、生研センターによる基礎研究推進事業、戦略的国際科学技術協力推進事業などにより支援を受けた。

文 献

- 1) Hoffmann, J.A. (2003) *Nature*, 426, 33–38.
- 2) Natori, S. (2010) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 86, 927–938.
- 3) Hoffmann, J.A. & Reichhart, J.M. (2002) *Nat. Immunol.*, 3, 121–126.
- 4) Sekiya, M., Ueda, K., Fujita, T., Kitayama, M., Kikuchi, H., Oshima, Y., & Kurata, S. (2006) *Life Sci.*, 80, 113–119.
- 5) Yajima, M., Takada, M., Takahashi, N., Kikuchi, H., Natori, S., Oshima, Y., & Kurata, S. (2003) *Biochem. J.*, 371, 205–210.
- 6) Sekiya, M., Ueda, K., Okazaki, K., Kikuchi, H., Kurata, S., & Oshima, Y. (2008) *Biochem. Pharm.*, 75, 2165–2174.
- 7) Kikuchi, H., Okazaki, K., Sekiya, M., Uryu, Y., Ueda, K., Katou, Y., Kurata, S., & Oshima, Y. (2011) *Eur. J. Med. Chem.*, 46, 1263–1273.
- 8) Kikuchi, H., Sekiya, M., Katou, Y., Ueda, K., Kabeya, T., Kurata, S., & Oshima, Y. (2009) *Org. Lett.*, 11, 1693–1695.
- 9) Hiratsuka, S., Watanabe, A., Sakurai, Y., Akashi-Takamura, S., Ishibashi, S., Miyake, K., Shibuya, M., Akira, S., Aburatani, H., & Maru, Y. (2008) *Nat. Cell Biol.*, 10, 1349–1355.
- 10) Tomita, T., Ieguchi, K., Coin, F., Kato, Y., Kikuchi, H., Oshima, Y., Kurata, S., & Maru, Y. (2014) *PLoS ONE*, in press.

著者寸描

●倉田祥一郎（くらた しょういちろう）



東北大学大学院薬学研究科教授。薬学博士。

■略歴 1963 年山形県に生る。90 年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。同年日本学術振興会特別研究員。91 年東京大学薬学部助手。95 年スイス連邦バーゼル大学博士研究員。98 年東北大学大学院薬学研究科助教授。2007 年より現職。

■研究テーマと抱負 自然免疫における病原体の認識と排除の機構，ならびに細胞運命の決定機構をショウジョウバエを用いて個体レベルで明らかにしたい。

■ウェブサイト http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei_original.html

■趣味 水泳とスキー。