

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 月 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592332

研究課題名（和文） ガレクチン3による炎症性骨破壊制御：新規レセプター同定に関する分子組織学的研究

研究課題名（英文） Regulation of inflammatory bone destruction by galectin 3: Identification of the novel receptor and molecular histological research

研究代表者

李 銀姫 (LI YINJI)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90457424

研究成果の概要（和文）：

ガレクチン3はアジュバント関節炎における炎症性骨破壊を負に制御する因子であり、破骨細胞分化にも抑制的に作用する。ガレクチン3の阻害活性が糖鎖認識部位（CRD）以外の部分にあることが推定されたのでガレクチン3のN末端部位を遺伝子工学的に調製したが破骨細胞分化阻害活性のあるものが得られなかった。そこで、フリーのN末端を持たないタンDEM型ガレクチンであるガレクチン9及び2個の糖鎖結合領域のみからなるプロトタイプのガレクチンであるガレクチン1について破骨細胞分化制御能を検討したところ、ガレクチン1は破骨細胞分化には全く影響を与えなかったのに対し、ガレクチン9は破骨細胞分化を阻害することが分かった。この阻害はラクトースの添加により部分的に解除された。ガレクチン9はCRDを介する阻害作用とガレクチン3と同様のCDR非依存性阻害活性の両方を有しているものと思われる。ガレクチン9のCRD依存性の受容体について検討を行なったところ、アポトーシスに関連する膜表面分子が破骨細胞前駆細胞で検出された。本研究により炎症性骨破壊制御法が創生されるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：

Galectin 3 is the factor which regulates inflammatory bone destruction and suppresses osteoclastogenesis. As the inhibitory activity of galectin 3 was not attributed to the carbohydrate recognition domain (CRD), N-terminal region was considered to have regulatory roles in the regulation of osteoclastogenesis. N-terminal region of galectin-3 was recloned and recombinant protein was obtained, however, we have failed in obtaining active recombinant polypeptides bearing inhibitory activity on osteoclastogenesis. We then examined other types of galectin. Galectin 9 is the tandem type of galectin with two CRDs connected by a linker polypeptide. Galectin 1 is the prototype galectin composed of only two CRD. Although galectin 1 did not affect osteoclastogenesis, galectin 9 markedly inhibited osteoclastogenesis in a dose-dependent manner. The inhibition of osteoclastogenesis by galectin 9 was partly canceled by the addition of lactose. It was strongly suggested the presence of CRD-dependent mechanism as well as CRD-independent mechanism. We further examined if the galectin 9 receptor is expressed in osteoclast precursors and found that some receptor molecules regulating apoptosis are expressed in osteoclast precursors. This research would provide important tool and strategy for controlling inflammatory bone destruction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	500,000	0	500,000

年度			
年度			
総計	3,600,000	660,000	4,260,000

研究分野：医師薬学  
 科研費の分科・細目：歯学  
 キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

### 1. 研究開始当初の背景

ガレクチンはガラクトシドを持つ糖鎖に結合するレクチンであり、現在までに15種類のもので発見されている。その構造から3つのタイプ、即ち糖鎖結合ドメイン(CRD)のみから成るプロトタイプ、2個の糖鎖結合ドメインからなるタンデムリピートタイプ、そして1個の糖鎖結合ドメインとN末端側領域から構成されるキメラタイプである。ガレクチン3は唯一のキメラタイプのガレクチンであり、単球、マクロファージ、好中球、好酸球など炎症細胞が発現することが知られている。ガレクチン3は細胞増殖・分化やアポトーシスを制御するという広範な活性を有することが知られており、マクロファージによる貪食や炎症にも関与する。多くの場合、CRDがガラクトシドを持つ糖鎖に結合することによってその生理活性を生じる。炎症条件下、ガレクチン3の発現が増強されることが知られているが、その役割は不明であった。申請者等は、アジュバント関節炎ラットにおいて、骨破壊部位に浸潤しているマクロファージと顆粒球がガレクチン3を高発現することを見出した。ガレクチン3の破骨細胞分化に対する効果を *in vitro* 及び *in vivo* の両システムを用いて検討したところ、ガレクチン3が破骨細胞分化及び骨吸収機能を顕著に抑制することを見出した。更に、この抑制効果がCRDによるものでは無いということを強く示唆するデータを得た。ガレクチン3が炎症性骨破壊の場で過剰な骨破壊が起こらないように負の制御因子として作用する事と、ガレクチン3のCRD以外

の領域に強力な骨破壊阻害活性があることを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究ではガレクチン3のN末端側領域を利用した新しい炎症性骨破壊制御法を開発することを目的とした。ガレクチン3のN末端側領域のみからなるリコンビナント蛋白質(N-gal)を作成し、その骨破壊制御効果を検定するとともに、適当な標識を施したN-galをプローブとして用い、破骨細胞膜表面上に存在する新規のN-gal特異的な受容体を検索し同定することを目的とした。また炎症性骨破壊の進行に伴ったN-gal受容体の発現変動を分子組織学的に解析し、更に破骨細胞分化に於いて必須の膜表面分子RANK及び7回膜貫通型膜蛋白質DC-STAMP (Kukita T. et al. J.Exp.Med. 2004) との破骨細胞膜表面での相互作用を共焦点レーザー顕微鏡等を用いて解析することも目的とした。N末端領域が露出していないタイプのガレクチンであるタンデム型のガレクチン及び2個のCRDのみからなり、リンカー領域を持たないプロトタイプのガレクチンについても破骨細胞分化制御能を解析し、CRD非依存性の破骨細胞分化制御についての検討を加えた。

### 3. 研究の方法

ガレクチン3のN末端側領域のみからなるリコンビナント蛋白質(N-gal)を作成し、その骨破壊制御効果を検定した。更に適当な標識を施したN-galをプローブとして用い、破骨細胞膜表面上に存在する新規のN-gal特異的な受容体を検索し同定する。N-gal特異的な受容体の破骨細胞膜表面上での形態学的挙動について、破骨細胞分化に必須のRANK及びDC-STAMPの膜表面上での挙動と対応付けながら、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析を行った。新規受容体の炎症に伴う発現誘導についても解析を試みた。

#### 4. 研究成果

本研究ではガレクチン3のN末端側領域のリコンビナント蛋白質を作成し、破骨細胞分化に関わる受容体を特定することを目的とした。TAクローニング及びT7発現システムを用いてガレクチン3のN末端部分の組換え蛋白質N-galを作成し、その破骨細胞分化に対する効果を検討したが、想定していたような阻害活性はみとめられなかった。N末端部分ではなくCRDの一部も含むような領域の組換え蛋白質の作成も試みたが破骨細胞分化に対して阻害活性を持つものが得られなかった。膜融合制御分子DC-STAMPの破骨細胞分化に於ける動態についてDC-STAMP-GFP融合蛋白質についてタイムラプス解析を行なった。融合に先立ち、膜ナノチューブを介して分子の移動を認めることができた。ガレクチン3のN末端の破骨細胞分化制御に於ける重要性を検討するため、ガレクチンファミリーのなかでタンDEM型のものに着目した。タンDEM型のガレクチンは2個の球状のCRDが線状のペプチドで結合しており、キメラ型のガレクチン3のようなフリーのN末端を持たないガレクチンである。

このタンDEM型のガレクチンの中で造血系の細胞に対する反応性がありガレクチン3と類似した骨軟骨破壊抑止作用を有することが報告されているガレクチン9に着目した。ガレクチン9はガレクチン3のようなN末端が露出していない。ガレクチン3のN末端部位そのものに破骨細胞分化阻害機能があるか否かを検討する為にもガレクチン9の破骨細胞分化に対する活性を調べる必要性が浮上した。そこで、ガレクチン9についてマウス前破骨細胞細胞株RAW-D細胞を用いて破骨細胞分化制御活性を検討した。その結果、ガレクチン9は用量依存的に破骨細胞分化を抑制することが分かった。尚、2個のCRDだけから構成されるプロトタイプのガレクチン1は骨細胞分化に影響を与えなかった。マウス骨髄、ラット骨髄を用いた破骨細胞分化系でもガレクチン9による同様の阻害が認められた。この破骨細胞分化抑制効果はラクトースの添加により部分的に解除された。完全な解除は認められなかったのでガレクチン9の場合もCRDに依存しない破骨細胞分化阻害活性が存在することが推定された。しかしガレクチン9の場合はガレクチン3と異なり、ラクトースにより破骨細胞分化阻害が部分的に回復することからCRDを介する作用も重要であると考えられる。ガレクチン9がCRDを介して結合するいくつかの膜表面分子が報告されており、それらの分子の中で破骨細胞が発現する膜表面受容体様分子TIM3を見出すことができた。本研究期間内にガレクチン3のN末端側の領域の破骨細胞分化制御領域とその受容体の特定はできなかったが、ガレクチン9のCRD非依存性の阻害活性及びCRD依存性の阻害活性を見出すことができた。CRDを介する受容体を見出すことができた点は重要な成果であった。この受容体分

子は破骨細胞分化制御の新たなる標的分子となるものと思われ、新規創薬の有力なシークになるものと思われる。

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4件)

The Transcription Factor FBI-1/OCZF/LRF Is Expressed in Osteoclasts and Regulates RANKL-Induced Osteoclast Formation In Vitro and In Vivo. Kukita A., Kukita T., Nagata K., Teramachi J., Li Y-J., Yoshida H., Miyamoto H., Gay S., Pessler F., Shobuike T. *Arth Rheumatism* 63(9):2744-2754, 2011

Adenosine abolishes MTX-induced suppression of osteoclastogenesis and inflammatory bone destruction in adjuvant-induced arthritis. Teramachi J., Kukita A., Li Y-J., Ushijima Y., Ohkuma Y., Wada N., Watanabe T., Nakamura S., Kukita T. *Lab. Invest.* 91:719-731, 2011. \_

Phosphatidylserine-containing liposomes inhibit the differentiation of osteoclasts and trabecular bone loss. Wu Z., Ma H.M., Kukita T., Nakanishi Y., Nakanishi H. *J.Immunol.* 184(6)3191-3201, 2010.

A possible suppressive role of galectin-3 in up-regulated osteoclastogenesis accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. Li Y-J., Kukita A., Teramachi J., Nagata K., Wu Z., Akamine A., Kukita T. *Lab. Invest.* 89:26-37, 2009.

[学会発表](計2件)

高野登志夫、李銀姫、久木田明子、山座孝義、高橋明、鮎川保則、古谷野潔、久木田敏夫 間葉系幹細胞による炎症性骨破壊制御 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

高橋良、久木田明子、李銀姫、鮎川保則、古谷野潔、久木田敏夫 膜ナノチューブによる前破骨細胞融合制御 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

牧野友祐、山座孝義、山座治義、馬蘭、益田啓太郎、園田総一郎、城戸瑞穂、野中和明、寺田善博、久木田敏夫 ヒト過剰歯由来幹細胞の免疫細胞療法効果について 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

山座孝義、牧野友祐、山座治義、馬蘭、園田総一郎、益田啓太郎、野中和明、寺田善博、久木田敏夫 乳歯凍結保存法がヒト乳歯由来幹細胞の免疫調節能に与える影響について 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

Toshio Takano, Yin-ji Li, Akiko Kukita, Takayoshi Yamaza, Yasunori Ayukawa, Kiyoshi Koyano, Toshio Kukita. Mesenchyme stem cells markedly suppressed inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced arthritis. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Annual Meeting 2011 9月(SanDiego, USA)

Akira Takahashi, Akiko Kukita, Yin-ji Li, Hisayuki Nomiyama, Yasunori Ayukawa, Kiyoshi Koyano, Toshio Kukita. Involvement and regulatory role of membrane nanotubes in fusion of

osteoclast precursors: A possible migration and penetration of DC-STAMP protein into osteoclast precursors through intercellular bridges. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Annual Meeting 2011 9月 (SanDiego, USA)

李銀姫、久木田明子、屈鵬飛、高野登志夫、實松 敬介、二ノ宮祐三、久木田敏夫 Nordihydroguaiaretic Acid は破骨細胞分化とラットアジュバント関節炎における骨破壊を抑制する。第 29 回日本骨代謝学会、2011 年 7 月(大阪)

高野登志夫、李銀姫、久木田明子、山座孝義、鮎川保典小谷野潔、久木田敏夫 間葉系幹細胞による骨破壊制御:アジュバント関節炎ラットを用いた解析。第 29 回日本骨代謝学会、2011 年 7 月(大阪)

李銀姫、久木田明子、久木田敏夫 Nordihydroguaiaretic acid は破骨細胞の形成と骨吸収を抑制する。第 27 回 日本骨代謝学会、2009 年 7 月 (大阪)

李銀姫、久木田明子、久木田敏夫 Nordihydroguaiaretic acid による破骨細胞分化と機能の制御。第 51 回 歯科基礎医学会、2009 年 9 月 (新潟)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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

(李銀姫)

研究者番号：90457424

(2)研究分担者

(久木田敏夫)

研究者番号：70150464

(久木田明子)

研究者番号：30153266

(3)連携研究者

( )

研究者番号：