

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~2010

課題番号：21790174

研究課題名 (和文) 雌性生殖器の恒常性維持と粘膜免疫におけるガレクチンの役割

研究課題名 (英文) Role of galectin in homeostasis and mucosal immunity in the female genital system

研究代表者

小林 純子 (仁尾 純子) (KOBAYASHI-NIO JUNKO)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70447043

研究成果の概要 (和文)：ガレクチンは、 β -galactosideを認識するレクチンで、雌性生殖器には galectin-1 と galectin-3 が発現する。本研究では、マウスの雌性生殖器においてガレクチンが特定の細胞に発現することを明らかにし、プロジェステロンやエストロジェンなどの雌性ホルモンの影響をうけて、雌性生殖器の恒常性維持や粘膜免疫に関与する可能性が示した。

研究成果の概要 (英文)：This study revealed the cell- and stage-specific expression of β -galactoside-binding lectin, galectin, in the female genital system of mice. The expression of galectin is affected by steroids such as estrogen and progesterone and may play an important role in homeostasis and mucosal immunity in the female genital system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：レクチン、ガレクチン、雌性生殖器、プロジェステロン、エストロジェン

1. 研究開始当初の背景

ガレクチンはガラクトースを含む糖鎖を特異的に認識する内在性レクチンで、上皮系、免疫系、神経系など生体内に広く存在する。ガレクチンは、細胞質内や細胞膜、細胞外マトリックスに存在する特定の糖鎖を認識して、細胞の増殖と分化、アポトーシス、炎症反応、がん転移を調節するほか、病原微生物との相互作用も有する。最近では、シグナル伝達の

中継点となる脂質ラフトの安定化を介して、細胞内シグナリングに直接関与することが注目されている。哺乳類では 15 種類のガレクチンサブタイプ (galectin-1~galectin-15) が存在し、これらは組織・細胞特異的な発現をするといわれるが、発現細胞の同定など形態学的解析は遅れており、小数のサブタイプについて断片的に報告されているだけであった。ガレクチンは、細胞質と核に存在するほか細胞

外にも分泌されるが、シグナルペプチドをもたないことから未知の経路により分泌される。最もよく研究されている galectin-3 は、N 末端ドメインの脱リン酸化により細胞質から核へ移行するという。ガレクチンの働きは 局在によって異なり、例えば、galectin-3 は細胞質内ではアポトーシスを抑制するが、細胞外ではアポトーシスを誘導する。しかし、これらの局在に関するデータは *in vitro* の実験系によるものが多く、*in vivo* におけるガレクチン発現の体系的な研究は行われていなかった。ひとつの理由として この分野における形態学者の参画がなかったことがあげられる。

我々はこれまでに マウスの消化管および尿生殖器におけるガレクチン発現細胞を サブタイプ特異的な遺伝子プローブを用いて特定の細胞に特定のガレクチンサブタイプが発現することを明らかにしてきた。卵巣では、galectin-1 と galectin-3 が黄体に発現し、性周期に伴いダイナミックに発現変動した。これらガレクチンの発現は、プロジェステロンを産生する機能的黄体では消失し、退行過程の黄体で強く発現していた。特に、galectin-3 はプロジェステロンを非活性化型に分解する酵素である 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -HSD) と相関して発現することから、galectin-3 が黄体におけるプロジェステロン活性調節に関与する可能性が示唆された。

プロジェステロンやエストロジェンなどの女性ホルモンは、卵管、子宮、膣などの雌性生殖器の機能維持に重要な役割を果たすホルモンであるが、免疫反応にも深く関与する。また、galectin-3 と発現が同調する 20 α -HSD は、リンパ球のアポトーシスを調節して免疫バランスに関与することが知られている⁵⁾。したがって、免疫反応におけるガレクチンの機能には、プロジェステロンやエストロジェンなどの女性ホルモンが深く関与するものと予想された。

子宮や膣の粘膜は、エストロジェンやプロジェステロンなど 卵巣で産生される女性ホルモンにより強く影響を受けて、性周期や妊娠に伴いダイナミックな機能的および構造的変化をとげる。また、子宮や膣は粘膜固有層にマクロファージ、樹状細胞、NK 細胞など多くの免疫担当細胞を含み、独特の粘膜免疫系を築いている。この雌性生殖器の粘膜免疫系は、女性ホルモンの支配を受けて、粘膜上皮の恒常性維持や感染防御に関与する。

申請者は予備実験により、特定の性周期において、galectin-1 陽性の線維芽細胞が上皮直下に集積し、また上皮内に galectin-3 陽性のマクロファージが侵入することを発見した。雌性生殖器におけるガレクチンの役割は未だ明らかではないが、ガレクチンが女性ホルモンによる調節を受けて、粘膜上皮の恒常性維持や粘膜免疫に関与する可能性は高い。雌性生殖器は、ガレクチンと女性ホルモンの関係および女性ホルモンが関与する粘膜免疫におけるガレクチンの役割を解明するのに格好のモデルになると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、*in situ hybridization* 法と光顕・電顕レベルの免疫組織化学により、マウスの雌性生殖器（卵管、子宮、膣）におけるガレクチンの発現を細胞レベルで明らかにすることを目的とした。特に、性周期に伴って変動するエストロジェンやプロジェステロンが、ガレクチンの発現や局在にどのような影響を与えるかに注目して、雌性生殖器の恒常性維持と粘膜免疫におけるガレクチンの役割を明らかにすることを目的とした。

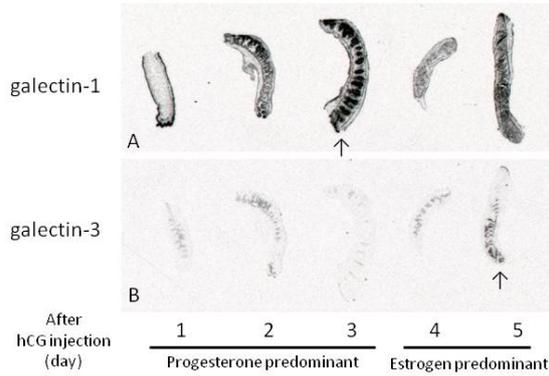
3. 研究の方法

研究方法は主に遺伝子特異的プローブを用いた *in situ hybridization* 法により、ガレクチン、エストロジェンおよびプロジェステロンレセプターの発現変化を検索することにより行った。また、特異抗体を用いた免疫組織化学により、ガレクチン発現細胞を同定した。雌性ホルモンによる影響を明らかにするため、卵巣除去マウスを作製し、エストロジェンおよびプロジェステロンを投与して発現を比較した。

4. 研究成果

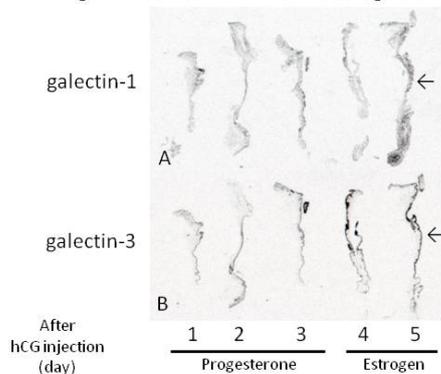
In situ hybridization 法によりマウスの子宮と膣におけるガレクチンの発現変化を検索したところ、子宮ではプロジェステロン優勢期に上皮直下で galectin-1 の発現が増強し、エストロジェン優勢期には上皮における galectin-3 の発現が増強した (Figure 1)。

Figure 1 Galectin mRNAs in the uterus of mouse



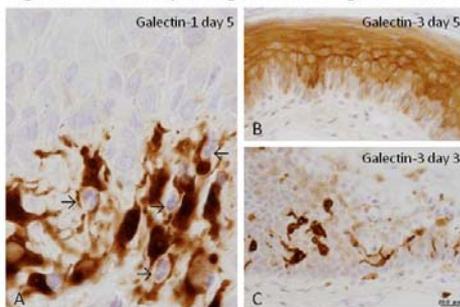
一方、膣では両ガレクチンの発現はいずれもエストロゲン優勢期に強かった (Figure 2)。

Figure 2 Galectin mRNAs in the vagina of mouse



特異抗体を用いてマウスの子宮と膣におけるガレクチン発現細胞を精査したところ、galectin-1 は間質の線維芽細胞に、galectin-3 は粘膜上皮と肥満細胞およびマクロファージに特異的に発現することがわかった。galectin-1 陽性の線維芽細胞は上皮に向かって突起を伸ばし、白血球を取り込んで上皮への侵入をサポートするような形態を示していた。一方、galectin-3 はエストロゲン優勢期に子宮および膣上皮に強く発現しており、特定の時期に galectin-3 陽性のマクロファージが上皮内に侵入していた (Figure 3)。

Figure 3 Galectin-expressing cells in the vagina of mouse



卵巣除去マウスにエストロジェンを投与すると両ガレクチンの発現が誘導されることから、雌性ホルモンはガレクチンの発現調節に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、ガレクチンのリガンド糖鎖との親和性に関与するシアル酸転移酵素などの糖転移酵素の発現も雌性ホルモンにより影響をうけることから、糖鎖とガレクチンの相互作用が雌性生殖器の恒常性維持や粘膜免疫に重要な役割を果たすことが予想される。本研究により明らかとなった所見は、ガレクチンの機能解明に重要な情報を提供すると思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件) 全て査読あり

1. Kuchiiwa T, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Yajima T, Iwanaga T. Cellular expression of monocarboxylate transporters in the female reproductive organ of mice: implications for the genital lactate shuttle. *Histochem Cell Biol* 135: 351-360, 2011
2. Teramae H, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Yajima T, Iwanaga T. The cellular expression of SMCT2 and its comparison with other transporters for monocarboxylates in the mouse digestive tract. *Biomed Res* 31, 239-249, 2010
3. Nio-Kobayashi J, Iwanaga T. Differential cellular localization of galectin-1 and galectin-3 in the regressing corpus luteum of mice and their possible contribution to luteal cell elimination. *J Histochem Cytochem* 58:741-749, 2010
4. Iibuchi R, Kamine A, Shimozuru M, Nio-Kobayashi J, Watanabe G, Taya K, Tsubota T. Changes in plasma gonadotropins, inhibin and testosterone concentrations and testicular gonadotropin receptor mRNA expression during testicular active, regressive and recrudescence phase in the captive Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *Jpn J Vet Res* 57:185-196, 2010
5. Iibuchi R, Shimozuru M, Kamine A, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Tsubota T.

- Localization of five steroidogenic enzyme mRNAs in Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*) testes during the mating season by in situ hybridization.
 J Reprod Dev 56:236-242, 2010
6. Nagai A, Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T.
 Cellular expression of the monocarboxylate transporter (MCT) family in the placenta of mice.
 Placenta 31:126-133, 2010
7. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M.
 High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity.
 Diabetes 58:1526-1531, 2009
8. Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Yajima T, Iwanaga T.
 Cellular expression of a monocarboxylate transporter (MCT1) in the mammary gland and sebaceous gland of mice.
 Histochem Cell Biol 131:401-409, 2009
9. Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T.
 Immunohistochemical localization of six galectin subtypes in the mouse digestive tract.
 J Histochem Cytochem, 57:41-50, 2009

[学会発表] (計5件)

1. 小林純子、岩永敏彦
 糖鎖認識タンパク、ガレクチンの発現解析と予想される役割
 第15回 Hindgut Club Japan、2009年12月4日、東京、専修大学 神田キャンパス
2. 小林純子、岩永敏彦
 マウスの子宮と膣におけるガレクチンの発現解析～ガレクチンは雌性ホルモンにより発現調節をうけるか
 第55回 日本解剖学会 東北北海道連合支部学術集会、2009年9月26日、仙台、東北大学 昆稜会館
3. 小林純子、岩永敏彦
 ガラクトサミン誘発性肝炎における抗 galectin-3 抗体の炎症抑制効果

第29回 日本糖質学会年会、2009年9月10日、高山、飛騨・世界生活文化センター

4. 小林純子、岩永敏彦
 マウスの黄体におけるガレクチン発現細胞の同定と発現パターン
 第115回日本解剖学会総会、2009年3月29日、岩手、岩手医科大学
5. 小林純子、岩永敏彦
 実験的肝炎におけるガレクチンの役割
 第115回 日本解剖学会総会、2009年3月28日、岩手、岩手医科大学

[その他]

研究室ホームページ：

<http://www.med.hokudai.ac.jp/~anat-3w/>

6. 研究組織
- (1)研究代表者
 小林 純子 (仁尾 純子) (KOBAYASHI-NIO JUNKO)
 北海道大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：70447043
- (2)研究分担者
 なし
- (3)連携研究者
 なし