

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：37404

研究種目：基盤 C 一般

研究期間：2010～2012

課題番号：22500795

研究課題名（和文） ガレクチン-9 誘導能をもつ食品成分の探索とその機能性解析

研究課題名（英文）

The search of the functional ingredient of the food having the regulatory activity of galectin -9 expression and the functional analysis

研究代表者

坂田 敦子 (SAKATA ATSUKO)

尚絅大学・生活科学部・教授

研究者番号：70167849

研究成果の概要（和文）：

U937 細胞およびヒト PBMC を用いて、ガレクチンファミリー分子の中で、特に多様な免疫調節作用をもつガレクチン9の発現調節活性を指標に、食品の機能性成分の探索を行った。結果、フコイダンは強い炎症性サイトカイン誘導活性と同時にガレクチン9発現抑制活性を有することがわかった。レイシ抽出液やカテキンにはガレクチン9発現調節活性は認められなかった。本研究により、フコイダンは、免疫抑制的機能をもつガレクチン9の発現を低下させることにより単球/マクロファージ系細胞を活性化へ誘導している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Using U937 cells and human PBMC, we searched for the functional ingredient of the food having the regulatory activity of galectin-9 expression which had particularly a variety of immunoregulatory action in galectin family molecules. In the result, fucoidan, not lychee extract or catechin, had inhibitory activity of galectin-9 expression with strong inflammatory cytokine induction, suggesting the possibility that fucoidan might enhance the inflammatory cytokine production by reducing expression of galectin-9 which has an immunosuppressive function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食と栄養

キーワード：ガレクチン-9、免疫調節、機能性食品

1. 研究開始当初の背景

ガレクチン(galectin)ファミリー分子は、第3の生命鎖といわれる糖鎖に対する識別機構、すなわちポリNアセチルラクトサミンに富む糖鎖結合分子に対する親和性特性(LacNAc; (Gal b1→4GlcNAc)を認識)を有し、さらに炭水化物認識ドメインのアミノ酸配

列の類似性によって定義される動物レクチンである。Proto type, Chimera type および tandem-repeat type の3群に分類され、現在までにガレクチン-1から-14までが報告されている。この数年来、このガレクチン分子が種々の生物反応に関与することが次々と報告され、新たな動物レクチンファミリー

として注目を集めている。すなわちガレクチン-1 および-3 が単に細胞外蛋白として細胞外マトリックスへの細胞接着を修飾するに留まらず、発生、腫瘍転移、炎症や免疫制御にまで幅広く関与している。特に同分子がT細胞アポトーシス誘導の閾値を修飾したり、その発現がマクロファージや炎症細胞の活性化状況に付随するなど、免疫炎症応答性の制御に深く関与していることが示唆されている。

平島ら（本研究連携研究者）はガレクチンファミリー分子の一つであるガレクチン-9のユニークな免疫調節機能の解明を進めている。ガレクチン-9は活性化T細胞より産生遊離され、好酸球に対し選択的に強い遊走反応を惹起するという他のガレクチン分子にはない生物学的特性を示す。二価のb-ガラクトシド結合能をもつ分子量約3万のレクチンとして、連携研究者である平島が世界に先駆けて生物学的機能の面から明らかにした（J. Biol. Chemistry, 1998）。ガレクチン-9は、従来報告されているガレクチン-1, 3が生体に比較的恒常的に発現しているのに対して、その発現誘導と組織病理学的局在の特性に関して、高度の選択性を示し、細胞組織応答性にかなりユニークな機能を果たしていることが予想されている。

我々はこれまで自己免疫疾患について病態とその発症機序についての研究を行っており、ヒト自己免疫疾患病態組織解析では、自己免疫慢性炎症組織、たとえばシェーグレン症候群の唾液腺炎症組織における導管上皮細胞などにガレクチン-9の強い発現誘導があること、またガレクチン-9 改変体は *in vitro* において関節リウマチ患者由来滑膜細胞に強いアポトーシスを誘導し、他のガレクチン分子はこのような活性は認められなかったことを報告した（Arthritis and Rheumatism, 2007）。また近年、我々および平島らの共同研究により、ガレクチン-9が自己免疫モデルや急性炎症モデル実験においては免疫炎症抑制物質として作用することを報告した。すなわちガレクチン-9はTregの誘導、Th1やTh17細胞のTim-3を介したアポトーシス誘導によって自己免疫反応を抑制する（Arthritis & Rheumatism, 2007; Clin Immunol., 2008）。

さらに最近平島らは、ガレクチン-9が3型過敏症やLPS誘導急性炎症反応を抑制性マクロファージ（Clin Immunol., 2009）や骨髄性抑制細胞（MDSC: CD11b Gr-1陽性細胞）の誘導により抑制することを明らかにした。これに対して免疫反応が抑制される悪性腫瘍モ

デルでは、ガレクチン-9はMDSC減少、NK細胞活性増強 plasmacytoid DC様マクロファージ誘導やCD8T細胞機能亢進樹状細胞（DC）誘導により免疫反応を正常化すること（J. Immunol., 2008; Clin Immunol., 2009）、またガレクチン-9の自然免疫増強作用（Science, 2007）やTGF- β 誘導間葉系幹細胞の軟骨細胞分化促進作用（BONE, 2009）など、ガレクチン-9が免疫抑制のみならず免疫賦活や分化促進作用を有するなど、多彩でユニークな作用をもつことを報告している。

このようにガレクチン-9は免疫応答の抑制的制御など炎症反応のプロセッシング制御に深く関与する一方、悪性腫瘍や軟骨細胞分化では免疫賦活や細胞分化促進作用など、多様な免疫制御機能をもつことから、医薬品としての臨床応用が期待されている。しかし、ガレクチン-9分子の誘導/制御メカニズムならびに腸管免疫機構におけるガレクチン-9の役割についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ガレクチンファミリーという新しいレクチン分子群の発現誘導を指標に食品成分を解析し、有用な免疫制御機能性成分を分離精製し、新規機能性食品成分として研究開発するための基礎的知見を得ることである。とりわけガレクチン-9は、従来報告されているガレクチン-1, 3が生体に比較的恒常的に発現しているのに対して、その発現誘導と組織病理学的局在の特性に関して、高い特異性を示していること、自己免疫疾患など免疫応答過剰状態では抑制的制御作用を示す一方、悪性腫瘍など免疫低下状態では免疫賦活作用を示し、また軟骨細胞分化過程では促進作用を有するなど、生体を正常な状態に戻そうとするユニークな免疫調節機能をもつ分子である。

そこで、本研究では、ガレクチン-9誘導あるいは抑制などガレクチン-9発現調節能をもつ食品や食品成分を探索し、その成分の機能解析を行うために、免疫機構の中で貪食作用、抗原提示作用を有し、TNF α 、IL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインを産生して自然免疫と獲得免疫の両方で重要な役割を果たしている単球/マクロファージ系細胞を用いて、ガレクチン-9発現と炎症性サイトカイン産生に及ぼす食品の機能性成分の探索を行った。

探索する食品成分として、先ず海藻由来多糖類で免疫賦活作用が報告されているフコイダン、キノコ由来 β -グルカンをもつレイ

シ抽出液、抗酸化能とともに抗炎症作用をもつ緑茶カテキンについて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞調製および培養方法

本研究で用いたヒト単球系細胞株 THP-1 細胞およびヒト単芽球系細胞株 U937 細胞は Health Protection Agency 社より購入した。またヒト末梢血単核細胞は、ヘパリン加末梢血を比重遠心法にて分離・調製した。

THP-1 細胞 4×10^5 cells/mL を $10 \mu\text{g/mL}$ LPS 存在・非存在下 24hr 培養後、上清中のサイトカイン量を調べた。U937 細胞は Konishi ら (Journal of Toxicology and Environmental Health, 2001) の方法に準じて分化誘導を行った。U937 細胞 4×10^5 cells/mL を播種し、 10ng/mL PMA で 24hr プレ培養後、 $10 \mu\text{g/mL LPS}$ で刺激し、さらに 24hr 培養した。

(2) 炎症性サイトカイン測定法

培養上清中の炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6) は BIOSOURCE 社サイトカイン測定キットを用い、ELISA 法で行った。

(3) RT-PCR によるガレクチン分子の検出

培養細胞から QIAGEN 社, RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出し、Super Script III Platinum one-step qPCR System (invitrogen 社) を用い、24~30 cycle で RT-PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動によりガレクチン分子のバンドを検出した。プライマーとして下記を用いた。

β actin (S: gagaattccatggatgatgatcgccgcg, AS: tagaattcctagaagcattttgctgggacg, 1, 145bp),

ガレクチン 9 (S: gagaggaagacacacatgcctttc, AS: gaccacagcattctcatcaaaacg, 483/560bp),
ガレクチン 1 (S: tggtcgccagcaacctgaatctca, AS: gttgagg, 346bp),

B : U937 (S: cttctggacagccaagtg, AS: ggtcagg, 374bp)

(4) 食品成分の調製

鹿角霊芝粉末 (株式会社なが茶) 0.2g を DNase free D. W に懸濁後、 80°C で 30 分加熱、冷却後、 $3,000\text{rpm}$, 25°C で 10 分間遠心分離した。上清を $0.22\mu\text{m}$ フィルターで濾過滅菌し、 10x PBS で等張化してレイシ抽出液を調製した。フコイダン (Dextra 社) は、 10mg/mL となるよう $1 \times \text{PBS}$ に溶解し、 $0.22\mu\text{m}$ フィルターで濾過滅菌してを用いた。カテキンは、緑茶カテキン粉末 (長良サイエンス社) 50mg を PBS で溶解し、 $0.22\mu\text{m}$ フィルターでろ過滅菌後、 10mg/mL に調製して使用した。

4. 研究成果

(1) ヒト単球系細胞株における炎症性サイトカイン産生能とガレクチン-9 発現の検討

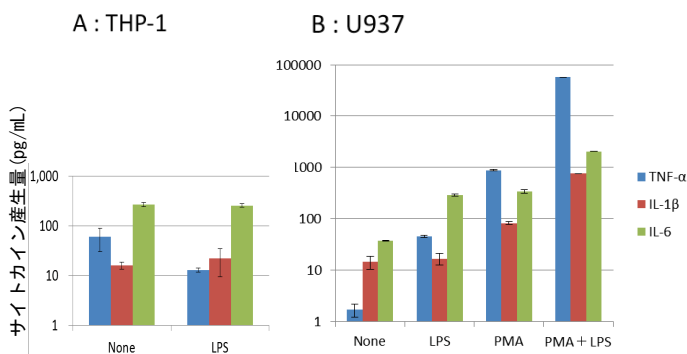
ガレクチン-9 発現調節能をもつ食品成分探索の簡易スクリーニング系を確立するために、ヒト単芽球系細胞株 U937 とヒト単球系細胞株 THP-1 の $10 \mu\text{g/mL LPS}$ 刺激に対する炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 産生能を比較した (図 1)。なお、U937 細胞は予め 10ng/mL PMA , 24hr 前処理して用いた。

結果、THP-1 細胞の無刺激時における TNF- α , IL-1 β , IL-6 産生量はそれぞれ 59.9 ± 29.5 , 16.0 ± 2.5 , $270.2 \pm 24.0\text{pg/mL}$ であった。LPS 単独刺激でもそれぞれ 13.0 ± 1.2 , 21.8 ± 12.5 , $255.5 \pm 19.5\text{pg/mL}$ であり、THP-1 細胞の LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生量は無刺激時とほぼ同程度で低かった (図 1, A)。

これに対し、U937 細胞は、無刺激の場合、TNF- α , IL-1 β のサイトカイン産生量はそれぞれ 1.7 ± 0.5 , $14.4 \pm 4.2\text{pg/mL}$ といずれも低く、IL-6 は検出限界以下であった。LPS 単独刺激では TNF- α , IL-1 β , IL-6 産生量はそれぞれ 45.2 ± 2.1 , 16.8 ± 4.2 , $289.1 \pm 14.0\text{pg/mL}$ であり、PMA 単独刺激では 879.2 ± 25.9 , 82.1 ± 5.05 , $342 \pm 29.46\text{pg/mL}$ であった。さらに PMA+LPS 刺激ではそれぞれ $57,248.0 \pm 14.2$, 759.5 ± 0.3 , $2,044.5 \pm 3.1\text{pg/mL}$ と高かった。PMA+LPS 刺激は、LPS 単独または PMA 単独刺激に比べ、約 10~1,000 倍の強く炎症性サイトカインを産生した (図 1, B)。

このことから、食品成分の検討には、よりサイトカイン産生能が高い U937 細胞を用いることにした。

図 1 ヒト単球系細胞株における炎症性サイトカイン産生能の比較



(2) U937 細胞を用いた食品成分の検討

次に U937 細胞を食品成分 (レイシ抽出液 1.65mg/mL レイシ相当濃度、フコイダン 0.5mg/mL 、カテキン $50\mu\text{g/mL}$) 存在下、24hr 前培養を行い、これら食品成分が U937 細胞の増殖、生存率、炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響について調べた。

各食品成分存在下の U937 細胞の無刺激、LPS 単独刺激、PMA 単独刺激、PMA+LPS 刺激

時の増殖活性および生存率を表 1 に示した。

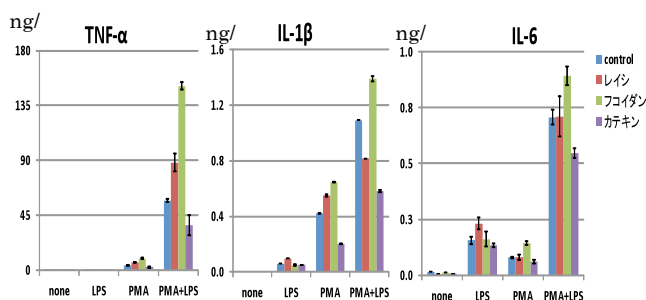
表 1 U937 細胞増殖活性および生存率に及ぼす食品成分の影響

レイシおよびフコイダンは U937 細胞の無刺激、LPS 単独刺激、PMA 単独刺激、PMA+LPS 刺激による細胞増殖ならびに生存率に対して明らかな影響はみられなかった。

一方、カテキンを加えて培養した場合、食品成分を加えなかった control に比べ、全ての刺激において培養後の細胞数が約半数以下に減少し、また生存率も低下していた (data not shown)。特に PMA 単独刺激、PMA+LPS 刺激の細胞増殖と生存率の低下は著しかった。カテキン存在下ではアポトーシス小体などの断片化が認められたことから、カテキンによる細胞数の減少はアポトーシス誘導によるためと考えられた。

次に炎症性サイトカイン産生能に及ぼす食品の影響について調べた。結果を図 2 に示す。

図 2 炎症性サイトカイン産生能に及ぼす食品成分の影響



食品成分非存在下で U937 細胞を無刺激 (none)、LPS 単独刺激、PMA 単独刺激、PMA+LPS 刺激した場合、TNF-α は、無刺激、LPS 単独刺激ではほとんど誘導されず、PMA 単独刺激で僅かな産生誘導 ($3.8 \pm 0.2 \text{ ng/mL}$) がみられた。また PMA+LPS 刺激により $57.2 \pm 1.1 \text{ ng/mL}$ の強い TNF-α 産生が認められた。この PMA+LPS 刺激による TNF-α 産生に対して、レイシは約 1.5 倍、フコイダンは 2.6 倍と強く産生増強した。一方カテキンは、0.6 倍と TNF-α 産生を抑制した (図 2, TNF-α) IL-1β 産生量は、TNF-α の場合と異なり、PMA 単独刺激で $0.42 \pm 0.002 \text{ ng/mL}$ と明らかな IL-1β 産生がみられ、PMA+LPS 刺激ではさらに $1.09 \pm 0.26 \text{ ng/mL}$ と強い産生が認められた。これに対し、フコイダンは PMA 単独刺激時の約 1.5 倍、PMA+LPS 刺激時の約 1.3 倍の増強作用があることがわかった。レイシはフコイダンの

ような増強活性は示さなかった。またカテキンは TNF-α 同様、PMA 単独刺激、PMA+LPS 刺激による IL-1β 産生強く抑制した (図 2, IL-1β)。

IL-6 産生は、LPS 単独刺激時 $155.6 \pm 15.34 \text{ pg/mL}$ 、PMA 単独刺激時 $80.0 \pm 2.97 \text{ pg/mL}$ の産生がみられ、PMA+LPS 刺激時により $707.6 \pm 33.61 \text{ pg/mL}$ の強い産生が認められた。この PMA+LPS 刺激に対して、レイシは control とほぼ変わらず、フコイダンは 1.3 倍増強し、カテキンは 0.8 倍抑制した (図 2, IL-6)。

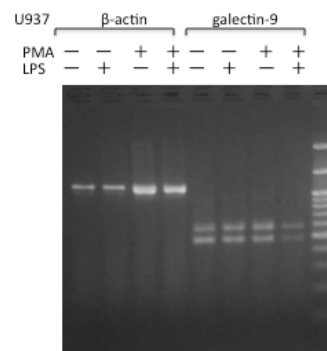
以上、レイシ、フコイダン、カテキンの食品成分の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響についてまとめると、レイシは LPS 単独刺激、PMA 単独刺激、PMA+LPS 刺激時において TNF-α 産生を増強した。フコイダンは PMA 単独刺激で TNF-α、IL-1β、IL-6 の産生を増強した。特に TNF-α については、PMA 単独刺激、PMA+LPS 刺激時の約 2.6 倍の産生上昇することから、フコイダンには強い TNF-α 産生誘導活性があることがわかった。一方、カテキンは TNF-α、IL-1β、IL-6 全てについて産生を抑制し、特に PMA 刺激で TNF-α 産生量が約 0.6 倍に減少し、PMA 単独刺激、PMA+LPS 刺激で IL-1β 産生量がほぼ半減し、強いサイトカイン産生抑制作用がみられた。

(3) U937 細胞のガレクチン-1, 3, 9 発現ならびに食品成分の影響

次に U937 細胞をガレクチン-9 発現調節能食品成分探索の簡易スクリーニング系に用いるために、U937 細胞を無刺激ならびに LPS 単独、PMA 単独、PMA+LPS で刺激後、total RNA を抽出し one step RT-PCR (24cycle) によりガレクチン-9 の発現を調べた (図 3)。

結果、U937 細胞は、無刺激でもガレクチン-9 の mRNA を発現しており、また LPS 単独刺激、PMA 単独刺激でも同様のバンドが検出された。これに対して PMA+LPS 刺激では、ガレクチン-9 のバンドは抑制されていた (図 3)。

図 3 U937 細胞における galectin-9 の RT-PCR 産物



次に無刺激、PMA+LPS 刺激 U937 細胞のガ

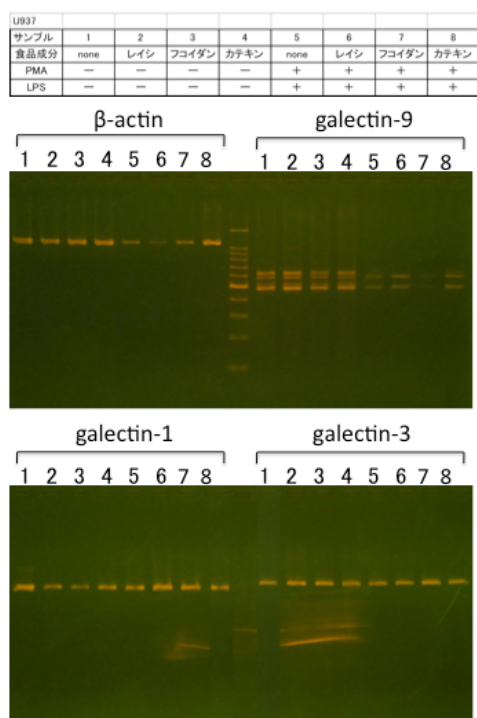
レクチン 1, 3, 9mPNA 発現に対する食品成分の影響を PT-PCR で調べた。結果を図 4 に示す。無刺激の U937 細胞は、ガレクチン 1, 3, 9 を発現していた (図 4, lane1)。これに対してレイシ, フコイダン, カテキンのいずれの食品成分も影響を及ぼさなかった (図 4, lane2-4)。一方, PMA+LPS 刺激では、前述 (図 3) 同様、ガレクチン 9 の発現は低下した (図 4, galectin-9, lane5)。これに対し、レイシ, カテキンはほとんど影響がみられなかった (図 4, galectin-9, lane6, 8)。しかしフコイダンは PMA+LPS 刺激で低下したガレクチン 9 の発現をさらに低下させることが分かった (図 4, galectin-9, lane7)。

ガレクチン 1, 3 発現に対するフコイダンの影響は全く認められなかった (図 4, galectin-1, 3, lane7)。広く普遍的に発現しているガレクチン 1, ガレクチン 3 の発現に対して、フコイダンは影響を及ぼさないことがわかった。

フコイダンについて炎症性サイトカイン産生増強活性の結果 (前述、図 2) と本実験結果を総合的に判断すると、炎症性サイトカイン産生とガレクチン 9 発現は逆相関の関係にあり、フコイダンは抑制的調節機構を担うガレクチン 9 の発現をさらに低下させることにより細胞を強く活性化の方向へ誘導しているのではないかと推定された。

本実験から、レイシ, フコイダン, カテキンの中でガレクチン 9 の発現を増強する成分を見出すことはできなかった。

図 4 U937 細胞の galectin-1, 3, 9 発現に及ぼす食品成分の影響

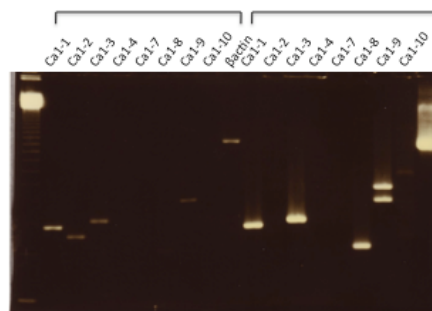


(4) ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) におけるガレクチンファミリー分子の発現ならびに炎症性サイトカイン産生に及ぼす食品成分の影響

正常細胞でも U937 細胞と同様の傾向がみられるか、PBMC を用いてガレクチンファミリー分子発現とサイトカイン産生誘導について食品成分 (フコイダン, レイシ) の影響を調べた。

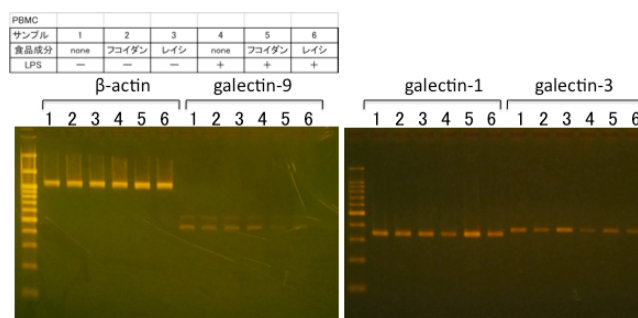
まず、PBMC におけるガレクチンファミリー分子 (ガレクチン 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10) の発現を PT-PCR で調べた結果を図 5 に示す。PBMC は無刺激 (control) でガレクチン 1, 2, 3, 7, 9 発現していた (図 5, 左)。これを PMA+ionomycin で 24hr 刺激すると、ガレクチン 2 のバンドが消失する一方、ガレクチン 8 のバンドが出現し、ガレクチン 1, 3, 7, 8, 9 の発現が確認された (図 5, 右)。

図 5 PBMC におけるガレクチンファミリー分子の発現



次に PBMC をフコイダンおよびレイシで 24hr 前処理後、LPS 刺激・無刺激を行った時のガレクチン 1, 3, 9 発現とその時の培養上清中の炎症性サイトカイン量を調べた。

図 6 ヒト PBMC の galectin-1, 3, 9 発現に及ぼす食品成分の影響



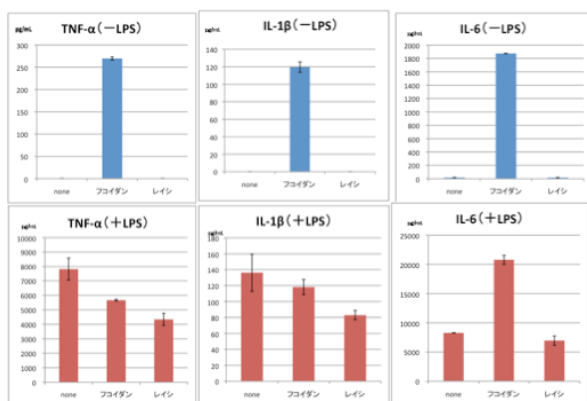
無刺激時、ガレクチン 1, 3, 9 はすべて発現しており、フコイダンやレイシはこれらに対して影響を及ぼさなかった (図 6, 左右ゲル、lane1-3)。またガレクチン 1, 3 の発現は LPS 刺激時、ほとんど変わらなかった (図 6, 右ゲル、lane4-6)。

一方、LPS 刺激時でも、ガレクチン 9 のバンドは検出された (図 6、左ゲル、lane4) が、そのバンドはフコイダン存在下で不明瞭となり (図 6、左ゲル、lane5)、フコイダンによるガレクチン 9 の発現低下が示唆された。またレイシによってもやや発現の低下傾向が認められた (図 6、左ゲル、lane6) が、この低いレベルの発現の強弱の比較は通常の RT-PCR では困難であり、さらに定量性 RT-PCR などの方法により明らかにしていく必要がある。

PBMC における食品成分の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べるために培養上清中の炎症性サイトカイン産生量を比較した。結果を図 7 に示す。無刺激時、フコイダン存在下の培養上清中の TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 濃度は、それぞれ 269.71 ± 3.59 、 119.54 ± 5.97 、 $1,874.01 \pm 2.55$ pg/mL であり、フコイダン単独で強い炎症性サイトカイン誘導活性を有することがわかった (図 7、上段)。しかしレイシにはそのような活性は認められなかった (図 7、上段)。

さらに LPS 刺激による TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 産生は、それぞれ $7,820.15 \pm 766.37$ 、 136.13 ± 23.41 、 $8,284.07 \pm 15.74$ pg/mL と著しく高かった (図 7、下段)。このとき、TNF- α および IL-1 β についてフコイダンは LPS 刺激以上の増強活性は認められなかったが、IL-6 については、 $20,784.09 \pm 771.09$ pg/mL と LPS 刺激の 2.5 倍の産生増強活性が認められた (図 7、下段)。

図 7 PBMC の炎症性サイトカイン産生に及ぼす食品成分の影響



以上のことより、ヒト PBMC でも U937 同様、フコイダンが炎症性サイトカインを強く産生誘導する状況において、ガレクチン 9 発現を強く抑制することが分った。

本研究では、U937 細胞およびヒト末梢血単核細胞を用いて、ガレクチンファミリー分子の中で、特に多様な免疫調節作用をもつガレクチン 9 の発現調節活性と免疫調節活性を指

標に食品の機能性成分の探索を行った。結果、 β -グルカンを含むレイシ抽出液や抗酸化能・抗炎症作用もつカテキンにはガレクチン 9 発現調節活性作用は認められなかった。一方、フコイダンは強い炎症性サイトカイン誘導活性と同時にガレクチン 9 発現抑制活性を有することがわかった。

フコイダンが免疫抑制的機能をもつガレクチン 9 の発現を低下させることにより単球/マクロファージ系細胞を活性化へ誘導している可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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

坂田 敦子 (SAKATA ATSUKO)

尚綱大学・生活科学部・教授

研究者番号 : 70167849

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

平島 光臣 (HIRASHIMA MITUOMI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号 : 70109700