

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 6月 6日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590360

研究課題名（和文） ガレクチン9による免疫制御性マクロファージの誘導とその機構

研究課題名（英文） Possible mechanisms of galectin-9-induced immunoregulatory macrophages

研究代表者

平島 光臣 (HIRASHIMA MITSUOMI)

香川大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70109700

研究成果の概要（和文）：表記課題による成果に合わせて、国内外の多くの共同研究によって Galectin-9 が免疫系細胞以外の細胞機能の制御に重要な作用を示すことを明らかにされた。Galectin がカビやカイメン等の下等動物から人まで長く保存されていることから免疫のみならず感染等を含む多くのストレスに対する防御因子として存在してきたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We described that galectin-9 regulates functions of not only immunocompetent cells but also various cells by collaboration with world-wide investigators. From our works, it is suggested that galectins including galectin-9 play a role as an important factor to overcome stress, because galectins are conserved longtime from fungi and sea sponge to human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
24年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：ガレクチン9、免疫学、癌、炎症、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

我々が見いだした Gal-9 (J. Biol. Chemistry, 1998) に関する研究報告は近年加速度的に増加している。それらの研究により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、また悪性腫瘍に対する

免疫増強物質として作用することにより治療効果を示すことが明らかにされている。すなわち Gal-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 Gal-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: CD11 b 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 Gal-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 (J. Immunol., 2008: Clin Immunol., 2009)。実際、我々は Gal-9 による自然免疫増強作用についても報告している (Science, 2007)。

2. 研究の目的

上記の事実は Gal-9 が過剰免疫状態では免疫の抑制を、免疫低下状態では免疫増強を行う免疫反応におけるホメオスタシスを司るサーモスタット作用を示す物質であることを示唆した。すなわち、Gal-9 は病因の違いにより異なる免疫調節機能を有するマクロファージ系細胞を誘導することで免疫反応を正常な状態に保っていると予想される。

その中で、MDSC や TAM はこれまでの報告から悪性腫瘍で増加し、CTL 細胞の機能抑制を起こすことで悪性腫瘍の増殖を亢進すると考えられている。また、炎症反応や感染症においても MDSC が増加して免疫反応を抑制すると考えられている。さらに、マクロファージも M1 マクロファージと M2 マクロファージの 2 種類が存在し、免疫反応の調節がなされている。しかし現在までの研究ではこれらの MDSC や M2 マクロファージの異同について体系的かつ詳細な検討がなされておらず、いわゆる Mreg の定義や分類に関しては現在も混沌としている。そこで我々は Gal-9 による炎症および腫瘍モデルでの Mreg の動態や機能の修飾作用を明らかにすることで両病態における Mreg の詳細な解析が可能となり Mreg に存在する上記の問題点が解決できると考えた。

3. 研究の方法

1) まず、in vivo 実験で炎症や腫瘍において出現する Mreg と Gal-9 投与によって出現する Mreg との phenotypical および functional な異同を明らかにする (次頁図参照)。その際、M2 マクロファージ等も比較の対象として検討する。

2) つぎに in vitro 実験で炎症や腫瘍状態での Mreg 誘導の際、Gal-9 の投与による影響について phenotypical および functional な解析を行い、Gal-9 による調節効果を詳細に検討する。

3) 現在 Gal-9 の結合タンパクとして Tim-3 や CD44 が注目されているが、予備的な研究成果ではこれら以外にも重要な結合タンパクが存在すると予想される。また、細胞表面の発現糖鎖の違いが重要である結果も明らかにしている (J. Immunol., 2008)。そこで 1) および 2) の成果や現在 100 を超える国内外の共同研究者の研究成果も併せて、Gal-9 による相反する Mreg 誘導機構の発現に関して、結合タンパクを介した signal transduction 等を免疫抑制性 Mreg および免疫増強性 Mreg を用いて分子生物学的に明らかにしたい。すなわち、この 3 年間で Gal-9 による Mreg の分化・成熟機構を明らかに出来るとともに、現在混沌としている Mreg の分類の再構築と、さらに Gal-9 のサーモスタット作用機構の解明の糸口を見い出せる。

そこで、方法として

1. 種々の in vivo 病態モデルを用いて Gal-9 投与による病態改善の確認と出現する Mreg の計時的変化とともに Phenotype や機能について既報の Mreg と比較検討を詳細に行う。
2. in vitro で Gal-9 により誘導した免疫抑制性ならび免疫増強性マクロファージと既報 Mreg との比較検討を行うとともに、in vitro での既報 Mreg 誘導における Gal-9 の効果を検討し、Mreg の分化・成熟における Gal-9 の意義と重要性を明らかにする。
3. Gal-9 による分化・成熟誘導や既報 Mreg 誘導に対する影響を Tim-3, CD44 や新たに見出した結合タンパクとの結合における signal transduction 等の検討を行うことで Gal-9 による Mreg の分化・成熟誘導機構の分子生物学的解明の糸口を探る。

4. 研究成果

本年度が 2010 年から始まった 3 年間にわたる本研究課題の最終年度であった。研究成果に関しては発表論文の項で示されているように我々が見出した Galectin-9 関連論文としては、本課題以外でも国内外の共同研究グループから多くのインパクトの高い論文が発表された。すなわち、2010 年では論文数 13 (IF=64)、以下 2011 年、論文数 9 (IF=54)、2012 年、論文数 15 (IF=110)、2013 年 3 月まで論文数 5 (IF=23) とますますの成果が得られたものとする。これまで Galectin-9 による免疫反応の制御機構としては T 細胞、その中でも Tim-3 を介したヘルパー T 細胞の制御についての発表が主体をなしていた。しかしながら、我々を中心とした最近の研究によって Galectin-9 は免疫低下状態を示す担癌

マウスではマクロファージや樹状細胞を活性化し、それら活性化された細胞によって前者ではNK細胞の活性化、後者ではCD8+細胞障害性T細胞の活性化がそれぞれ誘導されることが示された。最近の研究で上記の細胞群のみならず抗体産生を行うB細胞に対しても調節効果を示すことが明らかにされている。逆に過剰免疫ではマクロファージや樹状細胞の活性化によって免疫反応が抑制されることも示された。このような生体側の免疫状態の違いにより **Galectin-9** が相反する作用を示すが、その理由の解明によって **Galectin-9** が免疫低下や過剰免疫で免疫反応を正常状態に維持するというホメオスタシスに重要な物質として、既存の治療とは異なる副作用の少ない治療法の開発が可能になると思われる。また、これまでの研究で **Galectin-9** が免疫系の細胞以外の細胞機能の制御に重要な作用を示すことを明らかにしてきた。 **Galectin** がカビやカイメン等から保存されていることを考えると **Galectin** は古くからストレスに対する防御因子として存在してきたと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 37 件)

1. Galectin-9 expands immunosuppressive macrophages to ameliorate T cell-mediated lung inflammation. , Arikawa T, Saita N, Oomizu S, Ueno M, Matsukawa A, Katoh S, Kojima K, Nagahara K, Miyake M, Yamauchi A, Kohrogi H, and Hirashima M. , *Eur J Immunol*, 40: 548-58, 2010
2. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways, T. Kobayashi, J. Kuroda, E. Ashihara, S. Oomizu, Y. Terui, A. Taniyama, S. Adachi, T. Takagi, M. Yamamoto, N Sasaki, S Horiike, K. Hatake, A. Yamauchi, M. Hirashima, M. Taniwaki. , *Leukemia*, 24: 843-50, 2010
3. Galectin-9 induces osteoblast differentiation through the CD44/Smad signaling pathway. R. Tanikawa, T. Tanikawa, M. Hirashima, A. Yamauchi, Y. Tanaka. , *BBRC*, 394: 317-22, 2010
4. Targeting activating transcription factor 3 by galectin-9 induces apoptosis and overcomes various types of treatment resistance in chronic myelogenous leukemia. J. Kuroda, M. Yamamoto, H. Nagoshi, T. Kobayashi, N. Sasaki, Y Shimura, S Horiike, S. Kimura, A. Yamauchi, M. Hirashima, M. Taniwaki. , *Molecular Cancer Research*, 8: 994-1001, 2010
5. Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. , Valerie Dardalhon, AC. Anderson, J. Karman, L. Apetoh, R. Chandwaskar, DH. Lee, M. Cornejo, N. Nishi, A. Yamauchi, FJ. Quintana, RA. Sobel, M. Hirashima, VK. Kuchroo. , *J. Immunol.*, 185: 1383-92, 2010
6. Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. , Rashmi Mishra, Michal Grzybek, Toshiro Niki, Mitsuomi Hirashima, Kai Simons. , *PNAS*, 107 (41): 17633-38, 2010
7. A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in chronic hepatitis C infection. , John A. Mengshol, Lucy Golden-Mason, Tomohiro Arikawa, Maxwell Smith, Toshiro Niki, Ryan McWilliams, Jessica Randall, Rachel McMahan, Manu Rangachari, Evgenia Dobrinskikh, Pierre Busson, Stephen J. Polyak, Mitsuomi Hirashima, Hugo R. Rosen. , *Plos One*, 5(3): e9504, 2010
8. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8+ T cell response, Sharvan Sehrawat, Pradeep B J Reddy, Naveen Rajasagi, Amol Suryawanshi, Mitsuomi Hirashima, Barry T Rouse. , *PLoS Pathogens*, 6 (5): e1000882, 2010
9. Determination of carbohydrate-binding preferences of human galectins with carbohydrate microarrays. , T. Horlacher, MA. Oberli, DB. Werz, LH. Krock, S. Bufali, B. Stocker, R. Mishra, J. Sobek, K. Simons, M. Hirashima, T. Niki, PH. Seeberger. , *ChemBioChem*, 11: 1563-73, 2010
10. The increase of plasma galectin-9 in a patient with insulin allergy: a case report. H. Chagan-Yasutan, B. Shiratori, UR. Siddiqi, H. Saitoh, Y. Ashino, T. Arikawa, M. Hirashima, T. Hattori. , *Clin Mol Allergy*, 8: 12 (1-4), 2010
11. X-ray structures of human galectin-9 C-terminal domain in complexes with a biantennary oligosaccharide and sialyllactose, H. Yoshida, M. Teraoka, N.

- Nishi, S. Nakakita, T. Nakamura, M. Hirashima. S. Kamitori. , *J Biol Chem*, 285: 36969-76, 2010
12. Galectin-9 ameliorates acute GVH disease through the induction of T-cell apoptosis, Sakai K., Kawata E., Ashihara E., Nakagawa Y., Yamauchi A., Yao H., Nagao R., Tanaka R., Yokota A., Takeuchi M., Hirai H., Kimura S., Hirashima M., Yoshimura N., Maekawa T., *Eur J Immunol*, 41: 67-75, 2011, 2011
13. Dysregulation of TIM-3-galectin-9 pathway in the cystic fibrosis airways., Vega-Carrascal I, Reeves EP, Niki T, Arikawa T, McNally P, O'Neill SJ, Hirashima M. McElvaney NG. , *J. Immunol.*, 186: 2897-909, 2011
14. Endogenous galectin-1 and acute inflammation: emerging notion of a galectin-9 pro-resolving effect., Iqbal AJ, Sampaio AL, Maione F, Greco KV, Niki T, Hirashima M. Perretti M, Cooper D., *Am. J. Pathol.*, 178: 1201-09, 2011
15. Galectin-9 administration ameliorates CVB3 induced myocarditis by promoting the proliferation of regulatory T cells and alternatively activated Th2 cells., Lv K, Xu W, Wang C, Niki T, Hirashima M. Xiong S. , *Clin Immunol*, 140: 92-101, 2011
16. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia., Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, Weigel BJ, Hirashima M. Munn DH, Murphy WJ, Azuma M, Anderson AC, Kuchroo VK, Blazar BR. , *Blood*, 117: 4501-10, 2011
17. Galectin-9 attenuates acute lung injury by expanding CD14⁻ plasmacytoid dendritic cell-like macrophages., Kojima K, Arikawa T, Saita N, Goto E, Tsumura S, Tanaka R, Masunaga A, Niki T, Oomizu S, Hirashima M. Kohrogi H. , *Am J Respir Crit Care Med*, 184: 328-39, 2011
18. Influence of galectin-9/Tim-3 interaction on herpes simplex virus-1 latency., Reddy PB, Sehrawat S, Suryawanshi A, Rajasagi NK, Mulik S, Hirashima M. Rouse BT , *J Immunol*, 187: 5745-55, 2011
19. Galectin-9 signaling prolongs survival in murine lung-cancer by inducing macrophages to differentiate into plasmacytoid dendritic cell-like macrophages., Kadowaki T, Arikawa T, Shinonaga R, Oomizu S, Inagawa H, Soma G, Niki T. Hirashima M. , *Clin Immunol*, 142: 296-307, 2012
20. Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner, Oomizu S, Arikawa, T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, Yamauchi A, Hirashima M. , *Clin Immunol*, 143: 51-58, 2012
21. Galectin-9 ameliorates herpes simplex-induced inflammation through apoptosis, Shim JA, Park S, Lee ES, Niki T. Hirashima M. Sohn S, *Immunobiology*, 217: 657-66, 2012
22. Tim-3 is an inducible human NK cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. MK. Gleason, TR. Lenvik, V. McCullar, M. Felices, MS. O' Brien, SA. Cooley, MR. Verneris, F. Cichocki, CJ. Holman, A. Panoskaltsis-Mortari, T. Niki. M. Hirashima. B.R. Blazar, JS. Miller. *Blood*, 119: 3064-72, 2012
23. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. ZZ. Yang, DM. Grote, SC. Ziesmer, T. Niki. M. Hirashima. AJ. Novak, TE. Wizig, SM. Ansell. *J. Clin Invest*, 122: 1271-82, 2012
24. Galectin-9 binding to Tim-3 renders activated human CD4⁺ T cells less susceptible to HIV-1 infection. S. Elahi, T. Niki. M. Hirashima. H. Horton. *Blood*, 120: 682-90, 2012
25. The glycan-binding protein Galectin-9 has direct apoptotic activity towards melanoma cells. Wiersma VR, de Bruyn M, van Ginkel RJ, Sigar E, Hirashima M. Niki T. Nishi N, Samplonius DF, Helfrich W, Bremer E. *J Invest Dermatol.* 132: 2302-5, 2012
26. Contrasting acute graft-versus-host disease effects of Tim-3/galectin-9 pathway blockade dependent upon the presence of donor regulatory T cells. Veenstra RG, Taylor PA, Zhou Q, Panoskaltsis-Mortari A, Hirashima M. Flynn R, Liu D, Anderson AC, Strom TB,

Kuchroo VK, Blazar BR. *Blood*. 120: 682-90, 2012.

27. A novel monoclonal antibody for detection of galectin-9 in tissue sections: application to human tissues infected by oncogenic viruses. Barjon C, Niki T, Vèrillaud B, Opolon P, Bedossa P, Hirashima M, Blanchin S, Wassef M, Rosen HR, Jimenez AS, Wei M, Busson P. *Infect Agent Cancer*. 7: 16. 2012

28. TNFRSF25 Agonistic Antibody and Galectin-9 Combination Therapy Controls Herpes Simplex Virus-Induced Immunoinflammatory Lesions. Reddy PB, Schreiber TH, Rajasagi NK, Suryawanshi A, Mulik S, Veiga-Parga T, Niki T, Hirashima M, Podack ER, Rouse BT. *J Virol*. 86:10606-20, 2012.

29. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Fujioka Y, Ohba Y, Gorman JV, Colgan JD, Hirashima M, Uede T, Takaoka A, Yagita H, Jinushi M. *Nat Immunol*. 13: 832-42, 2012.

30. Rapid Decrease of Plasma Galectin-9 Levels in Patients with Acute HIV Infection after Therapy. Saitoh H, Ashino Y, Chagan-Yasutan H, Niki T, Hirashima M, Hattori T. *Tohoku J Exp Med*. 228: 157-61, 2012.

31. Cell surface galectin-9 expressing th cells regulate Th17 and Foxp3+ Treg development by galectin-9 secretion. Oomizu S, Arikawa T, Niki T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, Yamauchi A, Hattori T, Masaki T, Hirashima M. *PLoS One*. 7: e48574, 2012.

32. HCV-infected hepatocytes drive CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T-cell development through the Tim-3/Gal-9 pathway. Ji XJ, Ma CJ, Wang JM, Wu XY, Niki T, Hirashima M, Moorman JP, Yao ZQ. *Eur J Immunol*. 43: 458-67, 2013.

33. A possible role of galectin-9 in the pulmonary fibrosis of patients with interstitial pneumonia. Matsumoto N, Katoh S, Yanagi S, Arimura Y, Tokojima M, Ueno M, Hirashima M, Nakazato M. *Lung*. 191: 191-8, 2013.

34. Self-association of the galectin-9 C-terminal domain via the opposite surface of the sugar-binding site. Nonaka Y, Ogawa T, Oomizu S, Nakakita SI, Nishi N, Kamitori S, Hirashima M, Nakamura T. *J Biochem*. 153: 463-71, 2013.

35. Galectin-9 functionally impairs natural killer cells in humans and mice. Golden-Mason L, McMahan RH, Strong M, Reisdorph R, Mahaffey S, Palmer BE, Cheng L, Kulesza C, Hirashima M, Niki T, Rosen HR. *J Virol*. 87: 4838-45, 2013.

36. Galectin-9 in cancer therapy. Fujihara S, Mori H, Kobara H, Rafiq K, Niki T, Hirashima M, Masaki T. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 7: 130-7, 2013.

37. Galectin-9 Ameliorates Clinical Severity of MRL/lpr Lupus-Prone Mice by Inducing Plasma Cell Apoptosis Independently of Tim-3. Moritoki M, Kadowaki T, Niki T, Nakano D, Soma G, Mori H, Kobara H, Masaki T, Kohno M, Hirashima M. *PLoS One*. 8: e60807, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平島 光臣 (Hirashima Mitsuomi)
香川大学・医学部・客員研究員
研究者番号：70109700

(2) 研究分担者

大水 総一 (Oomizu Souichi)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：00444729

仁木 敏朗 (Niki Toshiro)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：40558508