

## 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12日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592158

研究課題名（和文） 血液及び唾液中の新規ストレスマーカーとしてのガレクチン-1の役割と作用機序の解明

研究課題名（英文） The role of galectin-1 as a novel stress marker in serum and saliva  
研究代表者

門屋 利彦（KADOYA TOSHIHIKO）

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：40551875

研究成果の概要（和文）：四肢拘束ストレス負荷後のラット血中ガレクチン-1（GAL-1）濃度の上昇は交感神経を介した応答によることが示唆された。また、ストレス負荷後の脾臓と胸腺において GAL-1 含量の増加傾向、筋肉で減少傾向が見られた一方で、これらの臓器中の GAL-1 遺伝子発現に増減が見られなかった、これらの結果から、ストレス負荷により交感神経を介した応答として、これらの臓器からの GAL-1 の血中への放出と蓄積が起こると推定された。

研究成果の概要（英文）：The in vivo experiments using the restraint stress model demonstrated the stress-induced increase of Galectin-1 (GAL-1) in serum is regulated by the sympathetic nervous system. The GAL-1 levels in thymus and spleen increased and the level in muscle decreased at 30 min after the restraint stress, while there was no change in the mRNA levels of the organs.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生化学、神経科学、タンパク質化学、分離科学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：ストレス、ガレクチン-1、プロテオーム

#### 1. 研究開始当初の背景

様々なストレス刺激を受けた場合、生体はストレス応答を示す。歯科領域においても、ストレスと歯周病の間には深い関係があると考えられている。また、歯周病や歯の破折など顎口腔領域における種々の疾患に関与するとされるブラキシズムの原因のひとつとしてストレスが挙げられる。故に、ストレス状態を迅速かつ正確に把握することは臨床において意味があり、客観的かつ簡便に評

価する方法の開発が望まれている。そのためには、ストレスマーカーとなる因子の発見と、その因子の役割と作用機序を明らかにする必要がある。

笹栗、佐藤らは拘束ストレス負荷モデルラットの脳内 NO レベルが上昇すること、そしてその反応が biting させることによって緩和されることを示した (Miyake ら、Redox Report, 2008 (13) 1, 31-39)。また、門屋、笹栗らの共同研究によって、同モデルを用い

たストレス負荷によってガレクチン-1 (GAL-1) の血中濃度が上昇することを明らかにした。

GAL-1 は、 $\beta$ -ガラクトシドに特異的に結合する動物レクチンで、細胞表面の糖鎖や糖タンパク質糖鎖に結合し、細胞の接着、増殖、あるいは免疫系細胞のアポトーシス等へ関与することが報告されている (Perillo ら、*J Mol Med.* 1998; 76: 402-412)。また、神経細胞死を起こすサイニン酸投与マウスのアストロサイトで発現が増加し、神経幹細胞の増殖と神経細胞へ分化することが示された (Kajitani ら、*Cell Death Differ.* 2009; 16: 417-427)。更に、GAL-1 分子内の 3 組の SS 結合によって架橋された酸化型 GAL-1 が末梢損傷神経の再生を促進する因子として同定されている (Horie ら、*J Neurosci.* 1999; 19: 9964-9974、Inagaki ら、*Eur J Biochem.* 2000; 267: 2955-2964)。この作用はマクロファージを介していることも報告 (Horie ら、*J Neurosci.* 2004; 24: 1873-1880) され、炎症反応との関連も示唆されている。このように GAL-1 は、免疫系や神経系でサイトカイン様の機能を有する多機能タンパク質と考えられるが、精神的ストレス負荷時の応答反応と GAL-1 との関連についての報告はない。

## 2. 研究の目的

生体のストレス応答時の GAL-1 の作用機序について解明することにより、ストレスマーカーとしての GAL-1 の可能性や抗ストレス薬開発、歯周病などの歯科領域疾患の治療法開発などの切り口への足掛かりとなると考えられる。本研究は、ストレス負荷時において血液中に放出される GAL-1 について、発現・分泌組織および標的組織・細胞の同定を行い、ストレス負荷時における GAL-1 を介したストレス応答反応メカニズムを明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

(1) ストレス負荷動物実験として、四肢拘束ストレス負荷ラットモデルを用いた。

(2) ストレス負荷応答時の GAL-1 の分泌機序を検討するため、6-ヒドロキシドーパミンにより化学的交感神経切除術を施したラットと副腎摘除術を施したラットを用いた。

(3) ストレス負荷後、血液あるいは各種臓器を採取し、ラクトースとプロテアーゼインヒビター群を含む PBS 中でホモゲナイズ後、遠心分離して得られた上清について、分析を行った。

(4) GAL-1 タンパク質含量は、ウエスタンブロットリング法および ELISA 法を用いて分析した。ウエスタンブロットリング分析での検出は、化学発光法を用い、LAS4000 イメージアナライザーで検出した。GAL-1 mRNA は、リアルタイム PCR 法により分析した。

## 4. 研究成果

(1) 拘束ストレス負荷による血中 GAL-1 濃度の変動メカニズムの検討のため、6-ヒドロキシドーパミン処理によって化学的交感神経切除を施したラットと副腎摘除ラットを用いて、血中 GAL-1 濃度を調べた。交感神経切除ではストレス負荷群とコントロール群の血中 GAL-1 濃度に差異は認められなかった。これに対し、副腎摘除ラットではストレス負荷群で有意に血中 GAL-1 濃度の上昇がみられた。これらの結果から、拘束ストレス負荷後の血中 GAL-1 濃度の上昇は交感神経を介した反応によることが示唆された。

(2) 拘束ストレス負荷後に脾臓、胸腺、大腸、小腸、筋肉 (大腿部) などの臓器を採取し、臓器中の GAL-1 含量について、ウエスタンブロットリング法および ELISA 法で調べた。ウエスタンブロットリング法による分析結果を図 1 に示す。脾臓と胸腺においてストレス負荷による GAL-1 含量の増加傾向が見られた。一方、筋肉では GAL-1 含量の減少傾向が見られた。現在、その他の臓器についても、GAL-1 の変動を調べているところである。

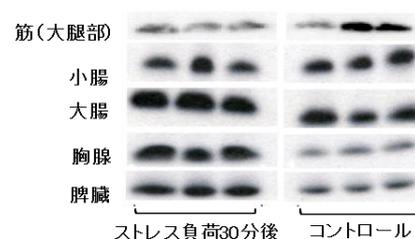


図 1 拘束ストレス負荷 30 分後の臓器中の GAL-1 含量分析 (ウエスタンブロットリング)

(3) 拘束ストレス負荷後に GAL-1 含量の増加傾向が見られた脾臓と胸腺について、ストレス負荷後の臓器中の GAL-1 mRNA をリアルタイム PCR 法により分析した結果、拘束ストレス負荷前後において発現量に差は認められなかった。この結果は、これらの臓器中で増加した GAL-1 は、ストレス負荷後に同組織中で合成されたものではなく、定常状態で含有している GAL-1 が血中に放出されたものであることを示唆している。現在、その他の臓器について、リアルタイム PCR 法を用いて、拘束ストレス負荷前後の遺伝子発現の変化について、調べているところである。

(4) 今回得られた結果から、ストレス負荷後に以下のような応答反応が起こっていることが示唆される。ストレス負荷後に交感神経を介した反応によって GAL-1 が筋肉などから血中に放出され、この GAL-1 が脾臓と胸腺に蓄積することによって同臓器中の GAL-1 含量が増加する。図 2 に今回の結果から示唆される、ストレス負荷後の応答としての GAL-1 の血中濃度上昇とその標的臓器について、まとめた。

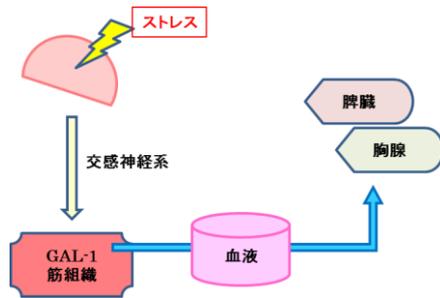


図 2 ストレス負荷後の血中 GAL-1 の増加とその標的臓器

本研究で、ストレス負荷によって血中 GAL-1 濃度が上昇すること、そして、血中への GAL-1 の分泌が交感神経系を介していることを明らかにした。また、血中への GAL-1 の放出ならびに標的臓器の候補を挙げることができた。これらの結果は、世界初の新規の知見であり、新たに発見されたストレス応答プロセスとして、今後のストレス分野の研究において重要な発見となると考えられ、また、ストレスに対する臨床的対処方法の開発への切り口に繋がることを期待される。今後、この新たに発見されたストレス応答プロセスにおける GAL-1 の役割について詳細に調べ、臨床応用へのアプローチの切り口を提案していきたいと考えている。

## 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 5 件)

- ① Y. Kogawa, K. Nakajima, K. Sasaguri, N. Hamada, H. Kawasaki, S. Sato, T. Kadoya, H. Horie “Oxidized galectin-1 tempers the LPS-induced increase of pro-inflammatory cytokine mRNA in cultured macrophages.” *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, 2011, 3, 1-8 査読有
- ② M. Iwamoto, C. Taguchi, K. Sasaguri,

K. Kubo, H. Horie, T. Yamamoto, M. Onozuka, S. Sato and T. Kadoya “The Galectin-1 level in serum as a novel marker for stress.” *Glycoconjugate Journal*, 2010, 27, 419-425 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 門屋利彦, 岩本真由子, 小泉創, 堀江秀典, 越野江利子, 宮原初美, 山本利春, 笹栗健一 “ストレス負荷による生体組織中のガレクチン-1 含量の変動解析” 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡
- ② 高久静香, 柳澤比呂子, 渡部和彦, 中別府雄作, Françoise Poirier, 堀江秀典, 門屋利彦, 三五一憲 “GDNF は RET-PI3K 経路を介して DRG ニューロンの神経突起伸長ならびに Galectin-1 の発現を誘導する” 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡
- ③ 宮本大, 松浦遼太郎, 堀江秀典, 門屋利彦 “ガレクチン-1 および酸化型ガレクチン-1 刺激マクロファージタンパク質のプロテオーム解析” 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡
- ④ T. Kadoya, M. Iwamoto, S. Koizumi, H. Horie, E. Koshino, T. Yamamoto, K. Sasaguri “Restraint Stress affects Galectin-1 Level in Serum and Organs of Adult Rats” 42nd Annual Meeting Society for Neuroscience、2012 年 10 月 12 日、New Orleans
- ⑤ 宮本大, 松浦遼太郎, 堀江秀典, 門屋利彦 “酸化型ガレクチン-1 刺激によるマクロファージタンパク質のプロテオーム解析” 日本生化学会関東支部例会、2012 年 6 月 26 日、前橋
- ⑥ 三五一憲, 柳澤比呂子, 堀江秀典, 門屋利彦 “GDNF による DRG ニューロンの神経突起伸長促進ならびに galectin-1 発現誘導のメカニズム” 第 21 回日本病態生理学会、2011 年 8 月 20 日、東京
- ⑦ K. Yoshimura, F. Kametani, T. Miyazaki, H. Suzuki, Y. Sakamoto, M. Kato, M. Nishina, M. Suzuki, K. Kitamura, T. Kadoya “Proteomics for macrophages stimulated by oxidized or reduced galectin-1, or bovine serum albumin” 40th Annual Meeting Society for Neuroscience、2010 年 11 月 14 日、Washington DC (USA)
- ⑧ 岩本真由子, 田口千穂, 笹栗健一, 山本利春, 堀江秀典, 門屋利彦, 佐藤貞夫, 小野塚實 “新規ストレスマーカーとしての血清中 Galectin-1 の検討 A serum Galectin-1 as a new marker for stress”

第 33 回日本神経科学会  
Neuroscience2010、2010年9月4日、神戸

- ⑨ 堀江秀典、古川幸枝、中島仰、笹栗健一、濱田信城、川崎陽久、門屋利彦、佐藤貞夫 “酸化型ガレクチン-1による神経損傷後の修復機構 Repair mechanism regulated by oxidized galectin-1 after nerve injury” 第33回日本神経科学会 Neuroscience2010、2010年9月3日、神戸

[図書] (計1件)

- ① K. Sango, H. Yanagisawa, K. Watabe, H. Horie, T. Kadoya “Galectin-1 as a multifunctional molecule in the peripheral nervous system after injury” Chapter 3 in Basic Principles of Peripheral Nerve Disorders (edited by Seyed Mansoor Rayegani), InTech d.o.o., Rijeka, Croatia, pp.31-46 (ISBN 978- 953-51-0407-0), 2012

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門屋 利彦 (KADOYA TOSHIHIKO)  
前橋工科大学・工学部・教授  
研究者番号：40551875

### (2) 研究分担者

笹栗 健一 (SASAGURI KENICHI)  
神奈川歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：10235286

### (3) 連携研究者

堀江 秀典 (HORIE HIDENORI)  
神奈川歯科大学・歯学部・客員教授  
研究者番号：80046135