

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791726

研究課題名(和文) ガレクチン制御性オートファジーを介した胎盤形成機構の解明

研究課題名(英文) Autophagy regulates galectin-4 expression in the rat trophoblast cell line and affects its differentiation

研究代表者

有川 智博 (ARIKAWA, Tomohiro)

金沢医科大学・一般教育機構・講師

研究者番号：70452670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤での母子間インターフェイスの構築には、胎児栄養膜細胞の母体組織への浸潤が必須である。我々は、オートファジーや細胞極性形成への関与が指摘され、かつ胎盤で発現がみられるガレクチンファミリーの胎盤における機能解析を行った。ラット栄養膜細胞(Rcho-1)分化に伴って発現が消失するガレクチン4に焦点をあて機能解析した結果、ガレクチン4強制発現によりRcho-1細胞分化に特徴的な細胞形態の変化(細胞の巨大化)が観察されなくなった。またラット胎盤(12dpc)でのガレクチン4発現は、母体脱落膜よりも胎児側組織に高いことから、ガレクチン4が栄養膜細胞の母体浸潤に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the expression of Gal4 in placentation. We utilized Rcho-1 cells derived from rat placenta and this cell line has been well established as a model system for trophoblast differentiation. The expression of Gal4 was revealed to be lower in differentiated Rcho-1 cells than that in proliferative cells. Of interest, overexpression of Gal4 during Rcho-1 differentiation resulted in moderate reduction of both cell mobility and cell enlargement. Notably, immunohistochemical analysis showed that Gal4 is preferentially located in the maternal-fetal zone of rat placenta, indicating that Gal4 would negatively regulate differentiation of Rcho-1 cells and/or limit their invasive property.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：Galectin-4 Autophagy MMP Invasive trophoblast Placenta

1. 研究開始当初の背景

胎盤は出生後に生じる唯一の臓器であり、胎児への栄養供給やガス交換、免疫学的支援などを司る胎児発生にとって重要な器官である。胎盤が形成される際には、胎児栄養膜細胞が母体脱落膜、子宮筋層へ適切に浸潤していくことが重要であり、その異常は、流産や子宮内胎児発育遅延、妊娠高血圧症などの疾患と関連が深いことが知られている。そして、この胎児栄養膜細胞が浸潤していく環境は、血管形成が不十分なため、低酸素・低栄養環境にあると考えられている。低酸素・低栄養刺激は細胞にオートファジーを誘導する「飢餓」刺激となり得る。よってオートファジーが胎盤栄養膜細胞の浸潤を正に制御すると考えられているが、詳細は不明である。

「糖鎖」は「遺伝子」と「タンパク質」に続く生命の第3の鎖とも呼ばれ、生物にとって必要不可欠な役割を果たしており、前述の通りガレクチンなどの糖鎖認識タンパクとともに近年注目を浴びている。糖鎖の生理学的な意義は未だ不明な点が多く、そのため近年では「糖鎖暗号」という言葉で表現されるが、糖鎖の持つ情報は次のような複数のルートで他の分子に伝達されることがわかっている。

- (1)糖鎖付加によるタンパク質本体の構造変化および他の分子との相互作用の変化
- (2)糖鎖-糖鎖間相互作用
- (3)レクチンによる糖鎖認識を介した情報伝達

レクチンには、ガレクチンの他に、Siglec、Cタイプレクチンなどがあり、いずれも「糖鎖を特異的に認識して結合、架橋形成(糖鎖と糖鎖の橋渡し)するタンパク」で、他の(1)、(2)のルートよりも特異性が高いことが知られ、糖鎖情報の伝達において特徴的な役割を果たしていると考えられている。レクチンが糖鎖に結合した後、どのような反応がおこるかはレクチンの種類によって大きく異なるため、レクチンは糖鎖暗号の「解読者」と言える。我々はこのガレクチンの胎盤形成における役割の解明を目指している。

2. 研究の目的

本研究では胎盤形成過程でのLC3発現に注目し、「オートファジーとGal-4を中心とした胎盤形成機構の解明」を目的とした。in vivo の解析では、ラット胎盤を、さらに in vitro 解析ではラット絨毛癌由来栄養膜細胞株(Rcho-1細胞)を用いた。Rcho-1細胞の分化系におけるGal-4の発現パターンや生理作用について、分化におけるオートファジーの発動の観点から解析することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1)組織学的解析: ラット胎盤のHE染色とGal-4、LC3の免疫組織化学
- (2)オートファジー阻害剤を用いた分化抑制実験(栄養膜細胞分化特異的マーカーの発現解析、MMP発現、活性)
- (3)Gal-4の蛍光免疫細胞化学
- (4)フローサイトメトリーによる細胞の形態解析
- (5)タイムラプスによるRcho-1細胞の動態解析

4. 研究成果

本採択研究によって以下の結果が得られた。

図1

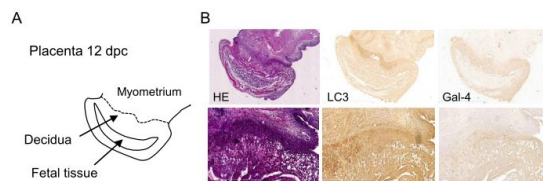
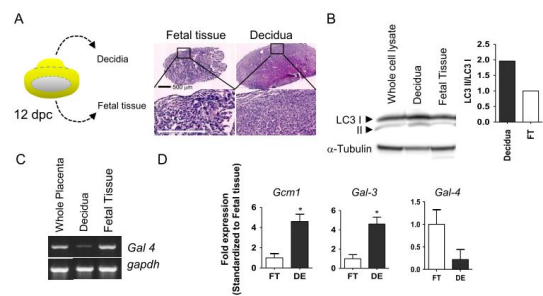


Figure 1. Immunohistochemical analysis for LC3 and Gal-4 was performed in 12 dpc rat placentas. The typical data from three independent specimens each stage was shown. It was observed that Gal-4 protein is not abundant in the maternal side of decidua where LC3 is strongly observed.

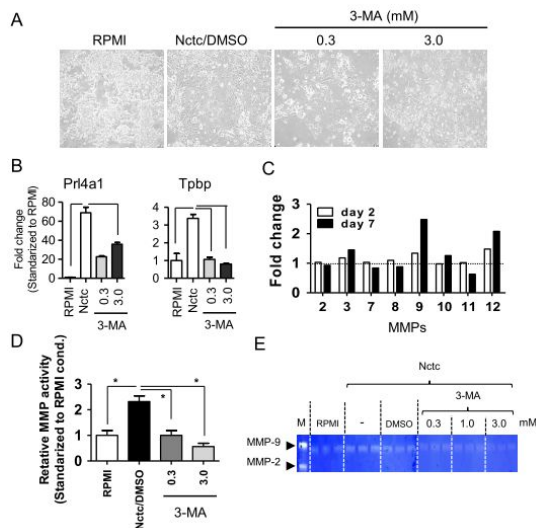
【図1】ガレクチン4の発現パターンとLC3の局在解析。胎盤構造の模式図(A)。12dpcのラット胎盤におけるLC3タンパク及びGal-4の発現は、母体脱落膜を境にして発現パターンに違いがみられる(B)。

図2



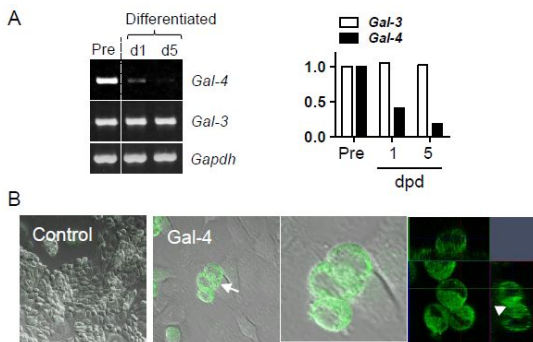
【図2】脱落膜におけるLC3タンパクの局在とGal-4の詳細な発現パターン解析(A, Bはそれぞれラット12dpcにおける胎盤構造の模式図、剥離後の組織像を示す)。12dpcのラット胎盤におけるLC3タンパク及びGal-4の発現はそれぞれ母体脱落膜と、栄養膜細胞を中心とした胎児側に局限していることがわかった(C, D)。

【図3】



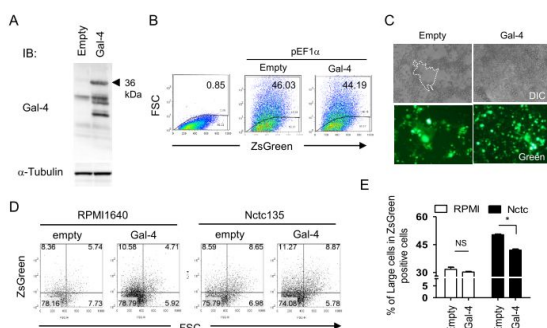
【図3】オートファジーの阻害剤である3-Methyladenine (3-MA)を分化培地に添加したところ、形態の変化(A)や分化マーカーの発現が低下する(B)。分化に伴って胎児側から母体側への栄養膜細胞の浸潤能に重要であるMMP-9が発現してくるが(C)、その酵素活性が3-MA添加により抑制され(D, E)、さらにGal-4発現が低下せずに維持された (data not shown)。

【図4】



【図4】ラット栄養膜細胞(Rcho-1)の分化に伴い、Gal-4の発現が低下する(A)。Gal-4タンパクはラット栄養膜細胞では細胞質に存在することがわかった(B)。

【図5】



【図5】Rcho-1細胞でのGal-4過剰発現実験。Gal-4強制発現の結果、Rcho-1分化に特有である細胞の大型化の抑制(B)や細胞運動の抑制(data not shown)が観察された。

【結論】

Gal-4は、Rcho-1細胞の浸潤性栄養膜細胞への分化や機能的特徴を抑制する生理作用を有しており、さらにこのGal-4はオートファジーによって発現が負に制御されることで、栄養膜細胞が母体への浸潤能を獲得する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計8件)

1. T cells control innate hyperinflammation in LPS endotoxemia by downregulating macrophage TNF production via IRAK-1-mediated IL-10 expression. Inoue M, Arikawa T, Chen YH, Moriwaki Y, Price M, Brown M, Perfect JR, Shinohara ML. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, in press. (査読有)

2. Significance of sugar chain recognition by galectins and its involvement in disease-associated glycosylation. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nakamura T, Hatta T, and Shoji H. *Congenital Anomalies*, 2014, in press. (査読有)

3. Inhibition of influenza A infection by galectin-9. Hattori T, Arikawa T, Fujioka Y, Maruyama J, Nakayama Y, Ohba Y, Niki T, Miyazaki T, Hirashima M, and Kida H. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 2013; 61(1&2); 5-18. (査読有)

4. 「ガレクチンによる糖鎖認識と免疫における意義」(An emerging role of sugar chain recognition by Galectins in immunity). 有川智博, 東海林博樹, 平島光臣. *臨床化学*, 2013, 42(1), pp. 36-43.

5. 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. *Clinical Immunology*, 2012, 142(3):296-307. (査読有)

6. Galectin-9 suppresses Th17 cell development

in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner. Oomizu S, Arikawa T, Niki T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, Yamauchi A, and Hirashima M. *Clinical Immunology*. 2012, 143(1):51-8. (査読有)

7. Expression pattern of Galectin 4 in rat placentation. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nishi N, Tatsuno T, Ishigaki Y, Tomosuginaohisa, Yamahiro C, Hata T, Takegami T, Nakamura T, Mogami H, Yamaguchi K, Otani H, Hatta T, and Shoji H. *Placenta (Short Communication)*. 2012,33(10):885-7. (査読有)

8. Cell surface galectin-9 expressing Th cells regulate Th17 and Foxp3+ Treg development by secreting galectin-9. *Oomizu S, *Arikawa T, Niki T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, Yamauchi A, and Hirashima M. (*Equal contribution). *PLoS ONE*. 2012;7(11):e48574. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

1. Role of autophagy in rat trophoblast differentiation. 有川智博、森尾佳苗、島村英理子、島田ひろき、八田稔久、東海林博樹. 大36回 日本分子生物学会. 2013年12月3~6日. 神戸(神戸国際会議場)

2. マウス γ ヘルペスウイルスはIL-27依存的に肺炎症を惹起する. 渡部 明子、伊藤 龍生、有川 智博、榊原 修平、菊谷 仁、安居 輝人、義江 修. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10~12日. 神戸(神戸国際会議場)

3. Galectin-9は細胞およびマウスにおけるインフルエンザAウイルスの感染を抑制する. 服部 ともえ、丸山 容一朗、中山 洋佑、大場 雄介、仁木 敏郎、有川 智博、宮崎 忠昭、平島 光臣、喜田 宏. 第60回 日本ウイルス学会. 2012年11月13~15日. 大阪(グランキューブ大阪)

4. Analysis of the Galectin 4 expression during trophoblast differentiation in rat placentation. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Hatta T, Shoji H. 国際胎盤学会. 2012年9月18~21日. 広島(広島国際会議場)

5. Regulated expression of Galectin-4 in rat placentation. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Otani H, Hatta T, and Shoji H. 先天異常学会. 2012年7月6~8日. 東京(東京女子医科大学).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有川 智博 (ARIKAWA, Tomohiro)
金沢医科大学・一般教育機構・講師