

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460592

研究課題名(和文) インターロイキン17産生ヘルパーT細胞を制御する新規ヘルパーT細胞の応用可能性

研究課題名(英文) Th17-suppressing novel regulatory T cells and the use thereof

研究代表者

仁木 敏朗 (Niki, Toshiro)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：40558508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫正常化因子ガレクチン9は自己免疫疾患やガンなどの難治性疾患根治の可能性をもつ新規薬剤シーズであり、我々は作用機序解明と承認を目指すべき対応疾患の特定に取り組んでいる。本研究においてガレクチン9の作用機序にTNF受容体スーパーファミリーの4-1BBを介した細胞内シグナル伝達が関与していることが判明した。さらにガレクチン9投与が、1)薬剤耐性大腸ガンに不完全なオートファジーを誘導してガンを殺傷、2)虚血再灌流障害マウスモデルにおける生存率の大幅な改善、3)HIVを潜伏細胞より目覚めさせ、同時に遺伝子に変異を導入して不活性化することを発見しそれぞれ学術論文にまとめた。

研究成果の概要(英文)：Galectin-9 an endogenous immunomodulator can normalize skewed immune balance and hence is supposed to have utilities for the treatment of refractory diseases including autoimmunities and cancers. We have been seeing galectin-9 as a promising seed molecule and have been studying it to elucidate the therapeutic mode-of-action and an appropriate disease indication for IND application. Through this research, we uncovered that the mode-of-action included signal transduction through a TNF-receptor superfamily 4-1BB and that the administration of galectin-9 demonstrated unprecedented therapeutic activities including 1)cytotoxicity in drug-resistant colon cancer cells by inducing incomplete autophagy, 2)drastic improvement of survival in an ischemia-reperfusion injury model in mice, 3)reactivation HIV from latently-infected cells and introduction of mutation in the viral genome. These results were summarized in research or patent articles and accepted for publications.

研究分野：免疫学

キーワード：ガレクチン 自己免疫疾患 ガン アレルギー

1. 研究開始当初の背景

ガレクチン9は炎症や感染により血中濃度が顕著に上昇する動物レクチンで、免疫を正負両方向に調節し、正常化することが知られていた。これらの作用はガレクチン9がターゲットとなる細胞表面の受容体に結合することで引き起こされるが、そもそもガレクチン9は細胞質の蛋白質であり、それを分泌する細胞は長く不明であった。我々はCD4 T細胞の一部に、TCR刺激によってガレクチン9を分泌する細胞群が存在することを発見してThGal-9と命名した。ThGal-9はガレクチン9の分泌メカニズム解明に有用な材料となると考えられる。我々はガレクチン9の臨床応用を目標として研究を続けているが、ガレクチン9を分泌する細胞には、薬剤産生装置としての応用や、より直接的に細胞療法の材料としての応用が考えられる。

2. 研究の目的

ガレクチン9分泌メカニズムの解明

ガレクチン9を分泌するT細胞の応用可能性探索

先ずであるが、ガレクチン9はシグナルペプチドをもたず、細胞質蛋白質としての機能も知られているため、蛋白質発現と分泌が必ずしも一致しないことが研究を困難にしている。研究開始時点においてガレクチン9を能動的に分泌することが明らかな細胞はThGal-9のみであり、この細胞はガレクチン9分泌機構解明には必須の材料である。

またについては、ThGal-9をガレクチン9生産系として用いれば、臨床応用において大腸菌等で作成するリコンビナント蛋白質よりも安全面等で優位になる可能性がある。またガレクチン9分泌を誘導する因子を発見出来れば、体内ガレクチン9量を調節して疾患治療に応用出来るかもしれない。さらにThGal-9そのものを患者に移入する免疫細胞療法の見通しがつけば、リコンビナントガレクチン9投与による治療法と比較して臨床開発のハードルが低くなる可能性がある。

3. 研究の方法

ガレクチン9分泌メカニズムを解明する材料としてThGal-9を用いる。ThGal-9は非常に少ない細胞集団であり、調製は容易でないため、ガレクチン9分泌能を有する株化T細胞の探索も行う。これらの細胞に能動的なガレクチン9分泌を惹起させる刺激を探索し、刺激による細胞の変化を遺伝子および蛋白質発現レベルで調べる。また通常の分泌経路を用いない分泌システムとしてエクソソームによる分泌が知られているので、ガレクチン9の分泌がこの経路を介しているのか調べる。

ガレクチン9分泌細胞の応用可能性を探る

には先ずこの細胞の性質を知る必要がある。同細胞のガレクチン9生産系としての能力、in vivoで使用可能なガレクチン9分泌促進刺激、ガレクチン9分泌細胞の分化増殖方法を調べる。また細胞免疫療法として臨床開発が進んでいるTr1とTregの開発について調査し、ThGal-9を含むガレクチン9分泌細胞を開発するメリットを考察する。

4. 研究成果

ThGal-9を含むガレクチン9分泌細胞をガレクチン9生産系として利用できる可能性を調べたが、試みた条件のいずれにおいても生産性は低く、今後生産性が100倍上昇したとしても生産系としての利用価値は無いと判断された。また、分泌メカニズムにエクソソームの関与を調べたが、少なくともT細胞においてはエクソソーム画分にガレクチン9は含まれておらず、この可能性も否定された。

ガレクチン9を分泌する株化細胞を探索した結果、マウスT細胞株TK-1がガレクチン9を構成的に分泌することが判った。様々な薬剤の作用を調べたところ、TK-1はTLRアゴニスト刺激でガレクチン9分泌を増加させたため、TLRアゴニストはガレクチン9誘導剤として開発できる可能性がある。またこの発見はTLRアゴニストの薬効の少なくとも一部にはガレクチン9の作用が関与している可能性を示しており、TLRアゴニストの効果を判定するサロゲートマーカーとして、ガレクチン9測定が有用となる可能性も考えられる(投稿準備中)。

ガレクチン9のT細胞からの分泌はTNF受容体スーパーファミリーのひとつ4-1BBの刺激によっても誘導された。4-1BBはガレクチン9と同様に免疫を正負両方向に調節することが知られており、そのアゴニスト抗体は自己免疫疾患やガンの治療薬として臨床開発が進められている。ガレクチン9と4-1BBの作用の類似性に着目して研究を行った結果、ガレクチン9は4-1BBの活性を正に調節する因子であることが明らかとなり、両者の機能類似性の理由が判明した(J Exp Med. 2014 211:1433-1448)。

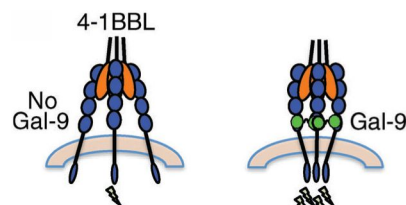


図1 ガレクチン9による4-1BBの調節
ガレクチン9と複合体を形成していない4-1BBは、4-1BBLが結合しても細胞内にシグナルを伝達できない

リコンビナントガレクチン9のPK/PDをマウス関節リウマチモデルで調べたところ、投与

したりコンビナントガレクチン9が体内から完全に排出された後も効果が持続することが判った。リコンビナントガレクチン9は *in vitro* で ThGal-9 を増加させて過剰免疫を抑制することが知られていたが、同作用が *in vivo* でも起こることが示唆された。これはリコンビナントガレクチン9投与が間接的な細胞免疫療法として機能することを意味している(投稿準備中)。当初想定していた ThGal-9 の細胞免疫療法は、患者末梢血から CD4 T 細胞を精製し、ThGal-9 分化刺激を与えた後に、ThGal-9 (全 CD4 T 細胞の数パーセント)を精製して患者へ戻すステップより構成されており、コストが高すぎるために患者と社会の利益にならない可能性が心配される。それに比してリコンビナントガレクチン9投与による間接的細胞免疫療法は、より広く用いられる可能性が高い治療法と考えられるため、今後はリコンビナントガレクチン9の臨床応用に集中して研究を加速するべきだと考えている。

多くのガン患者で血漿中にガレクチン9が分泌されることが知られている。ガレクチン9の研究が本格的に開始された当初はその免疫抑制活性に注目が集まったため、現在でも特にガン分野では「ガレクチン9 = 免疫抑制剤」という固定概念が強く、ガンで上昇するガレクチン9が抗ガン免疫を抑制していると考えられる研究者は多い。我々は「ガレクチン9 = 免疫正常化因子」の観点より、ガンにおけるガレクチン9の作用を調べた。KRAS 変異薬剤耐性大腸ガンを用いて実験を行ったところ、予想に反してガレクチン9は免疫を介さない直接作用によってガン細胞に不完全なオートファジーを誘導し、殺傷することが判った(Autophagy. 2015 11:1373-1388)。

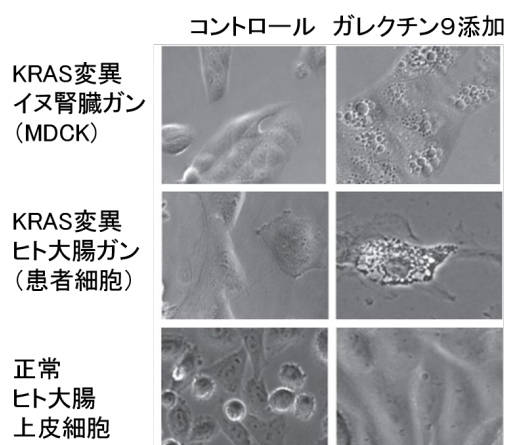


図2 リコンビナントガレクチン9を添加すると KRAS 変異薬剤耐性ガン細胞内に泡状の構造が現れ、やがて細胞死が起こる。これは不完全なオートファジー誘導の結果である。一方でリコンビナントガレクチン9は正常細胞に影響を与えない。

HIV 感染によって患者血漿中ガレクチン9濃

度が直ちに上昇し、HAART 治療によって低下することが、HIV 感染高リスクグループの血漿測定等から明らかとなった。HIV の主なターゲットは CD4 T 細胞であり、ガレクチン9は ThGal-9 より分泌されていることが示唆された。我々は過去にガレクチン9が HIV 感染を抑制する *in vitro* 結果を発表しているが、別グループではガレクチン9が HIV 感染を促進する報告をしており対立している。我々は HIV 潜伏感染 T 細胞へのガレクチン9の作用を検討したところ、ガレクチン9が潜伏感染を解除すると同時に抗ウイルス酵素を誘導して眠りから覚めた HIV ゲノムに変異を導入することが判った。この発見はガレクチン9投与によって HIV 感染症の根治が可能になることを示唆している。今後集中的に取り組む課題の一つである(PLoS Pathogen に投稿中)。

臓器移植モデルにガレクチン9を投与すると、ドナー抗原特異的な免疫寛容が誘導されて拒絶反応が抑制されることが我々の研究ですでに明らかとなっている。我々は臓器移植において問題となる虚血再灌流障害においてもガレクチン9投与で治療できるのではないかと考え、マウス肝虚血再灌流障害モデルでの薬効を調べたところ、用量依存的な障害抑制が確認された。肝移植の免疫抑制剤として、またドナー肝臓の保存液としてガレクチン9を開発できる可能性が示された(Liver Transpl. 2015 21:969-981)。

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 26 件)

Hattori T, Chagan-Yasutan H, Shiratori B, Egawa S, Izumi T, Kubo T, Nakajima C, Suzuki Y, Niki T, Alisjahbana B, Telan E. Development of Point-of-Care Testing for Disaster-Related Infectious Diseases.

Tohoku J Exp Med. 2016;238(4):287-93. doi: 10.1620/tjem.238.287. (査読有)

Tadokoro T, Morishita A, Fujihara S, Iwama H, Niki T, Fujita K, Akashi E, Mimura S, Oura K, Sakamoto T, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Himoto T, Hirashima M, Masaki T. Galectin-9: An anticancer molecule for gallbladder carcinoma. Int J Oncol. 2016 Mar;48(3):1165-74. doi: 10.3892/ijo.2016.3347. (査読有)

Takano J, Morishita A, Fujihara S, Iwama H, Kokado F, Fujikawa K, Fujita K, Chiyo T, Tadokoro T, Sakamoto T, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Kobara H, Mori H, Niki T, Hirashima M, Masaki T. Galectin-9 suppresses the proliferation of gastric cancer cells in vitro. *Oncol Rep*. 2016 Feb;35(2):851-60. doi: 10.3892/or.2015.4452. (査読有)

Rosen HR, Biggins SW, Niki T, Gralla J, Hillman H, Hirashima M, Schilsky M, Lee WM; Acute Liver Failure Study Group. Association Between Plasma Level of Galectin-9 and Survival of Patients With Drug-Induced Acute Liver Failure. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016 Apr;14(4):606-612.e3. doi: 10.1016/j.cgh.2015.09.040. (査読有)

Hasibuan FM, Shiratori B, Senoputra MA, Chagan-Yasutan H, Koesoemadinata RC, Apriani L, Takahashi Y, Niki T, Alisjahbana B, Hattori T. Evaluation of matricellular proteins in systemic and local immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbiol Immunol*. 2015 Oct;59(10):623-32. doi: 10.1111/1348-0421.12320. (査読有)

Kobayashi K, Morishita A, Iwama H, Fujita K, Okura R, Fujihara S, Yamashita T, Fujimori T, Kato K, Kamada H, Niki T, Hirashima M, Okano K, Suzuki Y, Masaki T. Galectin-9 suppresses cholangiocarcinoma cell proliferation by inducing apoptosis but not cell cycle arrest. *Oncol Rep*. 2015 Oct;34(4):1761-70. doi: 10.3892/or.2015.4197. (査読有)

Wiersma VR, de Bruyn M, Wei Y, van Ginkel RJ, Hirashima M, Niki T, Nishi N, Zhou J, Pouwels SD, Samplonius DF, Nijman HW, Eggleton P, Helfrich W, Bremer E. The

epithelial polarity regulator LGALS9/galectin-9 induces fatal frustrated autophagy in KRAS mutant colon carcinoma that depends on elevated basal autophagic flux. *Autophagy*. 2015;11(8):1373-88. doi:

10.1080/15548627.2015.1063767. (査読有)

Lhuillier C, Barjon C, Niki T, Gelin A, Praz F, Morales O, Souquere S, Hirashima M, Wei M, Dellis O, Busson P. Impact of Exogenous Galectin-9 on Human T Cells: CONTRIBUTION OF THE T CELL RECEPTOR COMPLEX TO ANTIGEN-INDEPENDENT ACTIVATION BUT NOT TO APOPTOSIS INDUCTION. *J Biol Chem*. 2015 Jul 3;290(27):16797-811. doi: 10.1074/jbc.M115.661272. (査読有)

Hirao H, Uchida Y, Kadono K, Tanaka H, Niki T, Yamauchi A, Hata K, Watanabe T, Terajima H, Uemoto S. The protective function of galectin-9 in liver ischemia and reperfusion injury in mice. *Liver Transpl*. 2015 Jul;21(7):969-81. doi: 10.1002/lt.24159. (査読有)

Fujita K, Iwama H, Sakamoto T, Okura R, Kobayashi K, Takano J, Katsura A, Tatsuta M, Maeda E, Mimura S, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Morishita A, Yoneyama H, Yamana Y, Himoto T, Okano K, Suzuki Y, Niki T, Hirashima M, Masaki T. Galectin-9 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma via apoptosis in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 2015;46(6):2419-30. doi: 10.3892/ijo.2015.2941. (査読有)

Katsura A, Morishita A, Iwama H, Tani J, Sakamoto T, Tatsuta M, Toyota Y, Fujita K, Kato K, Maeda E, Nomura T, Miyoshi H, Yoneyama H, Himoto T, Fujiwara S, Kobara H, Mori H, Niki T, Ono M, Hirashima M, Masaki T. MicroRNA profiles following metformin treatment in a mouse model of

- non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Med*. 2015 Apr;35(4):877-84. doi: 10.3892/ijmm.2015.2092. (査読有)
- Mrizak D, Martin N, Barjon C, Jimenez-Pailhes AS, Mustapha R, Niki T, Guigay J, Pancré V, de Launoit Y, Busson P, Moralès O, Delhem N. Effect of nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes on human regulatory T cells. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Dec 12;107(1):363. doi: 10.1093/jnci/dju363. (査読有)
- Shiratori B, Leano S, Nakajima C, Chagan-Yasutan H, Niki T, Ashino Y, Suzuki Y, Telan E, Hattori T. Elevated OPN, IP-10, and neutrophilia in loop-mediated isothermal amplification confirmed tuberculosis patients. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:513263. doi: 10.1155/2014/513263. (査読有)
- Madireddi S, Eun SY, Lee SW, Nemčovičová I, Mehta AK, Zajonc DM, Nishi N, Niki T, Hirashima M, Croft M. Galectin-9 controls the therapeutic activity of 4-1BB-targeting antibodies. *J Exp Med*. 2014 Jun 30;211(7):1433-48. doi: 10.1084/jem.20132687. (査読有)
- Tandon R, Chew GM, Byron MM, Borrow P, Niki T, Hirashima M, Barbour JD, Norris PJ, Lanteri MC, Martin JN, Deeks SG, Ndhlovu LC. Galectin-9 is rapidly released during acute HIV-1 infection and remains sustained at high levels despite viral suppression even in elite controllers. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014 Jul;30(7):654-64. doi: 10.1089/AID.2014.0004. (査読有)
- Zhang Q, Luan H, Wang L, He F, Zhou H, Xu X, Li X, Xu Q, Niki T, Hirashima M, Xu G, Lv Y, Yuan J. Galectin-9 ameliorates anti-GBM glomerulonephritis by inhibiting Th1 and Th17 immune responses in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014 Apr 15;306(8):F822-32. doi: 10.1152/ajprenal.00294.2013. (査読有)
- Kojima R, Ohno T, Iikura M, Niki T, Hirashima M, Iwaya K, Tsuda H, Nonoyama S, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line. *PLoS One*. 2014 Jan 20;9(1):e86106. doi: 10.1371/journal.pone.0086106. (査読有)
- Kadowaki T, Morishita A, Niki T, Hara J, Sato M, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Masaki T, Hattori T, Matsukawa A, Hirashima M. Galectin-9 prolongs the survival of septic mice by expanding Tim-3-expressing natural killer T cells and PDCA-1+ CD11c+ macrophages. *Crit Care*. 2013 Dec 9;17(6):R284. doi: 10.1186/cc13147. (査読有)
- Katoh S, Shimizu H, Obase Y, Oomizu S, Niki T, Ikeda M, Mouri K, Kobashi Y, Hirashima M, Oka M. Preventive effect of galectin-9 on double-stranded RNA-induced airway hyperresponsiveness in an exacerbation model of mite antigen-induced asthma in mice. *Exp Lung Res*. 2013 Dec;39(10):453-62. doi: 10.3109/01902148.2013.850558. (査読有)
- Chagan-Yasutan H, Ndhlovu LC, Lacuesta TL, Kubo T, Leano PS, Niki T, Oguma S, Morita K, Chew GM, Barbour JD, Telan EF, Hirashima M, Hattori T, Dimaano EM. Galectin-9 plasma levels reflect adverse hematological and immunological features in acute dengue virus infection. *J Clin Virol*. 2013 Dec;58(4):635-40. doi: 10.1016/j.jcv.2013.10.022. (査読有)

21 Ma CJ, Li GY, Cheng YQ, Wang JM, Ying RS, Shi L, Wu XY, Niki T, Hirashima M, Li CF, Moorman JP, Yao ZQ. Cis association of galectin-9 with Tim-3 differentially regulates IL-12/IL-23 expressions in monocytes via TLR signaling. PLoS One. 2013 Aug 14;8(8):e72488. doi: 10.1371/journal.pone.0072488. (査読有)

22 Cai L, Zhou H, Fang Z, Yuan J, Niki T, Hirashima M, He W, Chen ZK. Galectin-9 in combination with rapamycin induces cardiac allograft tolerance in mice. Transplantation. 2013 Aug 27;96(4):379-86. doi: 10.1097/TP.0b013e31829b07b5. (査読有)

23 Gooden MJ, Wiersma VR, Samplonius DF, Gerssen J, van Ginkel RJ, Nijman HW, Hirashima M, Niki T, Eggleton P, Helfrich W, Bremer E. Galectin-9 activates and expands human T-helper 1 cells. PLoS One. 2013 May 31;8(5):e65616. doi: 10.1371/journal.pone.0065616. (査読有)

24 Moritoki M, Kadowaki T, Niki T, Nakano D, Soma G, Mori H, Kobara H, Masaki T, Kohno M, Hirashima M. Galectin-9 ameliorates clinical severity of MRL/lpr lupus-prone mice by inducing plasma cell apoptosis independently of Tim-3. PLoS One. 2013 Apr 9;8(4):e60807. doi: 10.1371/journal.pone.0060807. (査読有)

25 Fujihara S, Mori H, Kobara H, Rafiq K, Niki T, Hirashima M, Masaki T. Galectin-9 in cancer therapy. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov. 2013 May;7(2):130-7. Review. PubMed PMID: 23514536. (査読有)

26 Golden-Mason L, McMahan RH, Strong M, Reisdorph R, Mahaffey S, Palmer BE, Cheng L, Kulesza C, Hirashima M, Niki T, Rosen HR. Galectin-9 functionally impairs natural killer cells in humans and mice.

J Virol. 2013 May;87(9):4835-45. doi: 10.1128/JVI.01085-12. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)
Niki T, Fukunaga H, Natori T, Hara A, Takeda K, Ezaki T, Potential functions of galectin-9 in mucosal immunity. 日本細菌学会国際シンポジウム(岐阜県・岐阜市・長良川国際会議場 2015.3.26)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)
名称: ガレクチン9を分泌する細胞、その製造方法及びその用途
発明者: 平島光臣、仁木敏朗、大水総一、有川智博、門脇健
権利者: 株式会社ガルファーマ
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/078623
出願年月日: 2011.12.9
国内外の別: 日、米、欧、中、加、印、韓

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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