

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462502

研究課題名(和文)胎盤栄養膜細胞の浸潤能獲得におけるガレクチンファミリーによる制御機構

研究課題名(英文)Regulation of acquirement of invasiveness in placental trophoblasts by galectin family

研究代表者

東海林 博樹 (SHOJI, Hiroki)

金沢医科大学・一般教育機構・教授

研究者番号：10263873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ガレクチンはガラクトシドと結合するタンパク質群であり、主に免疫系や癌浸潤などの制御に関わる。我々はこれまでに、ガレクチン4がラット胎盤由来の栄養膜細胞株(Rcho-1細胞)の浸潤獲得制御に関わる可能性を示してきた。本研究では、ガレクチン4がRcho-1細胞の細胞間接着に影響を及ぼすことにより浸潤能獲得制御に関わるらしいことを見いだした。さらに、Rcho-1細胞分化過程でガレクチン4の発現は抑制されるが、この発現制御と浸潤能獲得の両方にオートファジーが関与することを示した。本研究の結果は、ガレクチンファミリーが胎盤栄養膜細胞の浸潤能獲得制御において重要な役割を担うことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Galectins bind beta-galactoside, and have been shown to regulate immune-system and tumor invasion etc. We have previously shown that galectin 4 possibly has roles in regulation of acquirement of invasiveness in rat placental trophoblast cell line (Rcho-1). Expression of galactin 4 is specifically down regulated during the differentiation of Rcho-1 cells. In the present study, we have shown that galactin 4 may regulate cell-cell adhesion in Rcho-1 cells. Also, we have shown that autophagy may play important roles both in down-regulation of galactin 4 expression and in the acquirement of invasiveness. The results of present study suggested that Galectins and autophagy have important roles in regulation of acquirement of invasiveness in placental trophoblasts.

研究分野：分子生物学, 生化学, 発生生物学

キーワード：ガレクチン 胎盤 栄養膜細胞 浸潤 オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

胎盤の正常な形成には胎児栄養膜細胞が母体組織へ適切に浸潤することが重要である。不十分な浸潤は妊娠高血圧症候群など、また過剰な浸潤は癒着胎盤など、いずれも妊娠に伴う重篤な合併症の主因になると考えられている。しかし、こうした病態発症の分子機構はもとより、そもそも栄養膜細胞の浸潤性細胞 (invasive trophoblast) への分化機構についても分子レベルでは不明な点が多い。

一方最近、ガレクチンとよばれる一群のレクチンファミリーが胎盤形成に重要であると注目を集めている。ガレクチンはガラクトシドを認識する動物レクチンファミリーであり、哺乳類では19のメンバーが知られている (ガレクチン1~20; 種によりメンバーに違いがある)。その機能は発生・分化の制御、免疫調節、腫瘍形成など多岐におよぶとされるが、胎盤においては免疫寛容の成立や、栄養膜細胞の浸潤に重要な役割と報告が散見される (引用文献1)。また我々は長年ガレクチンの胚発生や免疫制御における機能解析を行ってきたが、最近、ラット胎盤栄養膜幹細胞株 (Rcho-1細胞) のinvasive trophoblastへの分化初期に、ガレクチン4が特異的に発現抑制されることを報告した (図1; 平成23-25 基盤研究(C) 研究成果および引用文献2)。

### 2. 研究の目的

本研究では胎盤栄養膜細胞による浸潤能獲得の分子機構について、ガレクチン機能を中心に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) RNA Seq 解析はタカラバイオ株式会社に委託した。

(2) ガレクチン4タンパク質の発現は免疫組織化学法により行った。

(3) ガレクチン4過剰発現実験には pEF1α-IRES-ZsGreen1 vector (Clontech) を用いた。また細胞の接着性の解析にはタイムラプス顕微鏡を用いた。

(4) オートファジー阻害剤は 3-Methyladenine と Bafilomycin を用いた。浸潤活性の解析には、24 well BME-coated Cell Invasion kit (Trevigen, Inc.)。

### 4. 研究成果

#### (1) ガレクチン4 isoform の解析

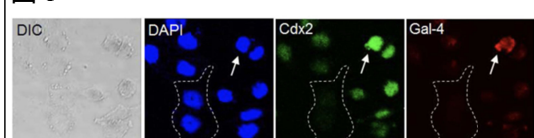
我々はこれまでに Rcho-1 細胞で発現するガレクチン4は、従来知られているものよりも分子量が小さい新規 isoform (以下 smallGal4 とよぶ) である可能性が高いことを指摘してきた。今回この実体を解明する目的で、次世代シーケンサーによる RNA Seq 解析を行った。その結果、従来知られている mRNA よりも短い、選択的スプライ

シング isoform が同定された (以下 short mRNA とよぶ)。この short mRNA では、従来のエキソン3と4間のイントロン中の配列が新規エキソンとして加わり、エキソン1-3が欠失している。これにより、コードされるタンパク質も従来型よりも分子量が小さいものになると推測された。さらに、データベース解析からは、ラット short mRNA と同様の ORF をコードするヒトガレクチン4の新規 mRNA も見つかった。そこで、RT-PCR 法によりラット short mRNA の cDNA をクローニングした後、Rcho-1 細胞や COS7 細胞に導入し、ウェスタンブロット法により発現タンパク質を解析した。その結果、ラット short mRNA がコードするタンパク質は Rcho-1 に検出される smallGal4 よりもさらに分子量の小さいものであった。よって、smallGal4 の由来についてはさらなる検討が必要と判断されたが、Rcho-1 細胞ではガレクチン4遺伝子の発現について、一層複雑な制御が行われている可能性が示された。

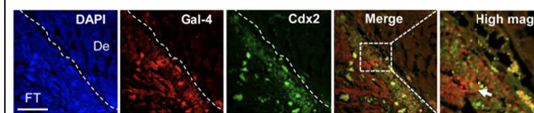
#### (2) ガレクチン4の発現様式の解析

Rcho-1 細胞分化系ならびに胎盤におけるガレクチン4タンパク質の発現について、分化マーカーと比較しつつ解析した。その結果、*in vitro* と *in vivo* のいずれにおいてもガレクチン4タンパク質は、未分化な栄養膜細胞のマーカー (Cdx2) との共局在が観察された (図1)。この結果は、Rcho-1 細胞分化過程におけるガレクチン4の発現抑制が重要であることを支持するものである。

図1



(a) Rcho-1 細胞分化系におけるガレクチン4とCdx2の発現

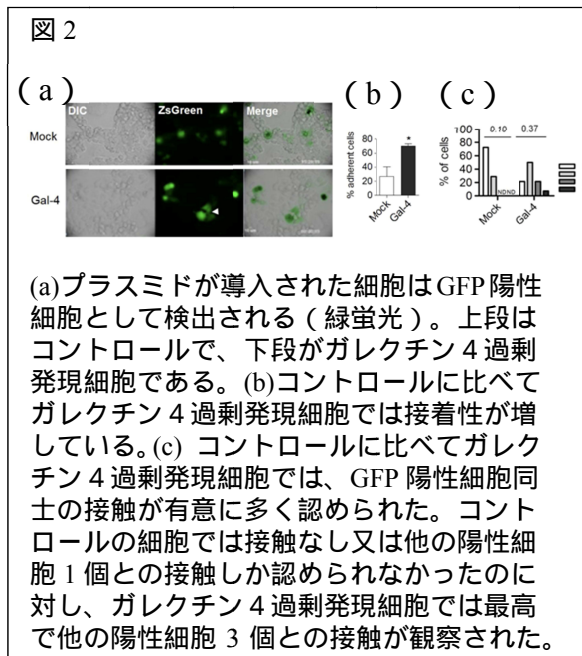


(b)胎盤におけるガレクチン4とCdx2の発現

#### (3) Rcho-1 細胞でガレクチン4を過剰発現すると発現細胞同士の接着性が増加する

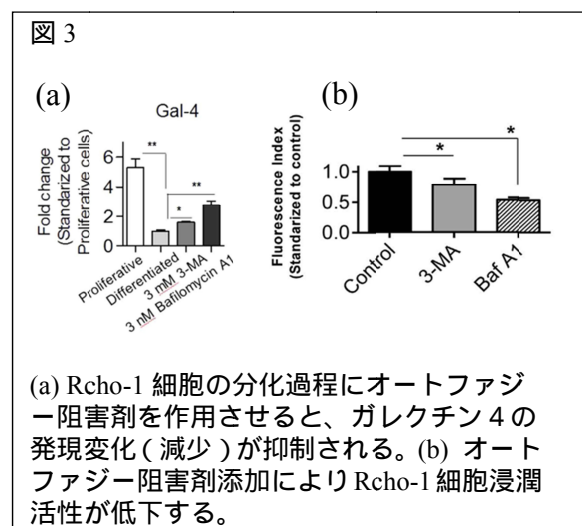
ガレクチン4とGFPを同時に発現するプラスミドを構築してRcho-1細胞に一過性に導入した後、GFP陽性細胞の挙動を解析した。すると、コントロール (GFPのみ過剰発現) に比べて、ガレクチン4過剰発現細胞同士の接触が増加していた (図2)。この結果は、未分化 Rcho-1 細胞中でガレクチン4タンパク質が細胞間の接着に促進的に

働く可能性を示している。さらには、このことが未分化栄養膜細胞の上皮様形質維持に寄与しており、浸潤能獲得の際にはガレクチン4発現を抑制して接着性を低下させている可能性が考えられる(図2)。



#### (4) オートファジーによる浸潤能獲得制御とガレクチン4

我々はこれまでにRcho-1細胞の分化過程におけるガレクチン4の発現変化(減少)の上流ではオートファジーが関与することを示してきた。今回この点についてさらなる解析を行い、オートファジー阻害剤添加により、ガレクチン4の発現変化(減少)が抑制されるとともに、Rcho-1細胞の浸潤活性も抑制されることが明らかとなった(図3)。



#### (結論)

胎盤栄養膜細胞による浸潤能獲得の制御にはガレクチンの発現調節とオートファジーによる制御が重要である可能性が示された。

#### (引用文献)

1. Kolundzic, N., *et al.* (2011) Galectin-1 is part of human trophoblast invasion machinery--a functional study in vitro. *PLoS One* 6, e28514

2. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nishi N, Tatsuno T, Ishigaki Y, Tomosugi naohisa, Yamahiro C, Hata T, Takegami T, Nakamura T, Mogami H, Yamaguchi K, Otani H, Hatta T, and Shoji H (2012) Expression pattern of Galectin 4 in rat placenta. *Placenta*, Oct;33(10):885-7.

#### 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3件)

Arikawa T, Liao S, Shimada H, Inoue T, Sakata-Haga H, Nakamura T, Hatta T, Shoji H (2016) Galectin-4 expression is down-regulated in response to autophagy during differentiation of rat trophoblast cells. *Sci Rep*. 査読有 2016 Aug 30;6:32248. doi: 10.1038/srep32248.

Simamura E, Arikawa T, Ikeda T, Shimada H, Shoji H, Masuta H, Nakajima Y, Otani H, Yonekura H, Hatta T (2015) Melanocortins Contribute to Sequential Differentiation and Enucleation of Human Erythroblasts via Melanocortin Receptors 1, 2 and 5. *PLoS One*. 査読有 2015 Apr; 10 (4): e0123232. doi: 10.1371/journal.pone.0123232

Nonaka Y, Ogawa T, Yoshida H, Shoji H, Nishi N, Kamitori S, Nakamura T (2015) Crystal structure of a *Xenopus laevis* skin proto-type galectin, close to but distinct from galectin-1. *Glycobiology*. 査読有 2015 Jul; 25(7):792-803. doi: 10.1093/glycob/cwv020

#### [学会発表](計18件)

坂田 ひろみ、島田 ひろき、狩山 信生、有川 智博、東海林 博樹、八田 稔久. ゼブラフィッシュ骨格観察のための簡易透明化法の開発と解析法の検討. 第122回日本解剖学会・全国学術集会. 2017年3月28日-30日.長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

三浦公実, 坂上大昌, 島田ひろき, 王賀, 塚田剛史, 坂田ひろみ, 廖生俊, 有川

智博, 東海林博樹, 八田稔久. 胎児脳発達を促進する母胎間白血球抑制因子(LIF)シグナルリレー発動の検出方法の検討 第122回日本解剖学会・全国学術集会. 2017年3月28日-30日. 長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

Hatta T, Tsukada T, Shimada H, Arikawa T, Shoji H, W He, Sakata H. Immune-endocrine communication between mother and fetus contributes to fetal brain development. Third Myanmar-Japan international Symposium (Myanmar, Patein University '16.12.3~4).

Shengjun Liao, Arikawa T, Shimada H, Sakata-Haga H, Hatta T, Shoji H. Autophagy contributes to the differentiation of rat trophoblast cells, partially through down regulating Galectin-4 expression. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月30日-12月2日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小川崇, 野中康宏, 東海林博樹, 館野浩章, 平林淳, 西望, 中村隆範. ヒト大腸がんおよび正常腸組織におけるガレクチン-4の発現及び機能解析. 第89回日本生化学会大会. 2016年9月25日~27日. 仙台国際センター/東北大学川内キャンパス(宮城県仙台市)

野中康宏, 小川崇, 吉田裕美, 東海林博樹, 西望, 神鳥成弘, 中村隆範. ヒトガレクチン-1とツメガエルガレクチン-Vaの比較による、ガレクチンの構造と機能についての解析. 第89回日本生化学会大会. 2016年9月25日~27日. 仙台国際センター/東北大学川内キャンパス(宮城県仙台市)

廖生俊, 有川智博, 島田ひろき, 坂田ひろみ, 八田稔久, 石垣靖人, 東海林博樹. Significance of autophagy and down-regulation of Galectin-4 expression during differentiation of rat trophoblast cells. 第52回金沢医科大学医学学会学術集会. 2016年7月16日. 金沢医科大学(石川県河北郡内灘町)

有川智博, 東海林博樹. The impact of galectin-9 deficiency in murine granulopoiesis. 第52回金沢医科大学医学学会学術集会. 2016年7月16日. 金沢医科大学(石川県河北郡内灘町)

野中康宏, 小川崇, 吉田裕美, 東海林博樹, 西望, 神鳥成弘, 中村隆範. ヒトガレクチン-1とツメガエルガレクチン-Vaの糖鎖選択性を決める構造的要因について. 第16回日本蛋白質科学会年会. 2016年6月7日(火)~9日(木). 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

吉村衣里子, 杉原諒, 三浦公実, 島田ひろき, 東伸明, 三谷真弓, 狩山信生, 有川智博, 東海林博樹, 八田稔久: GFP マウス胎仔の透明化による心臓発生過程の立体画像化, 第121回日本解剖学会・全国学術集会. 2016年3月28日-30日. ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

小川崇, 東海林博樹, 野中康宏, 館野浩章, 平林淳, 西望, 中村隆範: ツメガエル消化管およびヒト大腸がん細胞におけるガレクチン-4の発現及び機能解析. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会. 2015年12月1日-4日. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

野中康宏, 小川崇, 吉田裕美, 東海林博樹, 西望, 神鳥成弘, 中村隆範. ツメガエル皮膚ガレクチンの立体構造とアロステリックな挙動についての解析. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会. 2015年12月1日-4日. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

有川智博, 島田ひろき, 八田稔久, 中村隆範, 東海林博樹. オートファジーによるガレクチン4発現制御を軸とした胎盤形成機構の解明. 第34回日本糖質学会年会. 2015年7月31日-8月2日. 東京大学(東京都文京区)

野中康宏, 小川崇, 吉田裕美, 東海林博樹, 西望, 神鳥成弘, 中村隆範. ツメガエル皮膚ガレクチンの構造・機能解析と galectin-1 との比較. 第15回日本蛋白質科学会年会. 2015年6月24日-26日. あわぎんホール(徳島県徳島市)

野中康宏, 吉田裕美, 小川崇, 東海林博樹, 西望, 神鳥成弘, 中村隆範. アフリカツメガエル皮膚由来ガレクチンの立体構造と機能の解析. 第87回日本生化学会大会. 2014年10月15日-18日. 国立京都国際会館(京都府京都市)

小川崇, 東海林博樹, 野中康宏, 館野浩章, 平林淳, 西望, 中村隆範. ツメガエル消化管およびヒト大腸がん細胞におけるガレクチン-4の発現及び機能解析. 第87回日本生化学会大会. 2014年10月15日-18日. 国立京都国際会館(京都府京都市)

内芝舞実, 島村英里子, 坂田ひろみ, 島田ひろき, 東伸明, 有川智博, 東海林博樹, 福井義浩, 八田稔久. ラット新生児の定量的人工哺育システムの開発. 第54回日本先天異

常学会．2014年7月26日-27日．麻布大学（神奈川県相模原市）

有川智博，島田ひろき，島村英里子，大谷浩，八田稔久，東海林博樹．オートファジーによるガレクチン4発現制御を軸とした胎盤形成機構の解明．第54回日本先天異常学会．2014年7月26日-27日．麻布大学（神奈川県相模原市）

野中康宏，吉田裕美，小川崇，東海林博樹，西望，神鳥成弘，中村隆範．アフリカツメガエルの皮膚および遍在型ガレクチンの立体構造解析．第14回日本蛋白質科学会年会．2014年6月25日-27日．ワークピア横浜/横浜産貿ホールマリネリア（神奈川県横浜市）

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

東海林 博樹 (SHOJI, Hiroki)  
金沢医科大学・一般教育機構・教授  
研究者番号：10263873

### (2)研究分担者

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

### (3)研究協力者

八田 稔久 (HATTA, Toshihisa)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20238025