

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07141

研究課題名（和文）好中球分化における糖鎖及びガレクチン9の役割の解明

研究課題名（英文）Significance of sugarchan recognition by Galectin-9 in neutrophil differentiation

研究代表者

有川 智博 (Arikawa, Tomohiro)

東北医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：70452670

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）：Gal-9欠損マウスの骨髄細胞をフローサイトメトリー解析により詳細に解析したところ、顆粒球やマクロファージの起源となる細胞の比率に関して、Gal-9欠損マウスの方がWTマウスよりも高いことがわかった。我々はこれまでにGal-9欠損マウスは野生型マウスと比して自己免疫疾患が増悪することを明らかにしたが、以上の結果を合わせて考えると、この増悪メカニズムの一端は、自己免疫疾患に関わる好中球やマクロファージといった炎症に関わる細胞群がGal-9欠損により増加したことに起因するものと考えられる。将来的にGal-9タンパク質を使用した臨床応用が期待できる基盤研究となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は核酸やタンパク質に続く第三の生命鎖と呼ばれ、糖鎖とその認識によるタンパク質の機能修飾及び細胞制御は生命現象を理解する上で無視できない重要な概念の一つとして注目を浴びている。一連の研究でGalectin-9 (Gal-9)がマクロファージ及び好中球の分化や機能を修飾することや、さらに抗血小板凝集作用を明らかにした。本研究課題による成果は、血小板凝集作用におけるGal-9の膜動態制御の解明を目的とした発展的研究へと展開でき、血栓症等の臨床応用も期待できるものとなった。

研究成果の概要（英文）：A detailed analysis of bone marrow cells from Gal-9 knock out (KO) mice by flow cytometry revealed that the property of granulocyte-macrophage progenitors (GMPs), which originate from granulocytes and macrophages, in Gal-9 KO mice was higher than those in wild-type (WT) mice. We have previously shown that Gal-9 KO mice exhibit an exacerbation of autoimmune diseases compared to WT mice. Taken together, the exacerbation mechanism by which Gal-9 deficiency leads to exacerbation of murine autoimmune disease model may be partly due to an increase in the number of inflammation-related cells such as neutrophils and macrophages, which are involved in autoimmune diseases. Our current study is a basic research that future clinical application would be expected.

研究分野：糖鎖免疫学

キーワード：Galectin-9 造血幹細胞 骨髄 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸やタンパク質に続く第三の生命鎖と呼ばれ、糖鎖とその認識によるタンパク質の機能修飾及び細胞制御は生命現象を理解する上で無視できない重要な概念の一つとして注目を浴びている。近年我々はガレクチン9 (Gal-9)が活性化ヘルパーT細胞の細胞死を誘導し、免疫制御に関わることを明らかにしてきた。Gal-9を含めたガレクチンファミリーの一部はノックアウトマウスが作製され、表現型解析が進められてきたが、骨髄幹細胞(Hematopoietic stem cells)の分化への影響に関する報告に関しては皆無であった。

2. 研究の目的

糖転移酵素(β GalT-1)欠損マウスでは、末梢血中における好中球の増加が認められる点や、好中球による炎症を主体とする抗コラーゲン抗体誘導関節炎において Gal-9 欠損マウスは野生型マウスよりも重篤化する点に注目し、本研究では Gal-9 による造血幹細胞への分化誘導機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄薄切試料を用いた Gal-9 と CD34 の蛍光二重免疫染色 Gal-9 の局在解析: マウス骨髄を用いて、CD34 陽性細胞 (造血幹細胞) での Gal-9 タンパク質の発現を確認した。

(2) ヒト臍帯血細胞 (CD34 陽性細胞) を用いた好中球分化系と in vitro 解析: ヒト臍帯血には免疫担当細胞への多様な分化能を持つ CD34 陽性細胞が豊富に含まれる。この細胞を用いた好中球分化系にリコンビナント Gal-9 タンパク質を添加し分化への影響を解析した。また、Gal-9 タンパク質は糖認識タンパク質であり、ガラクトースに強い親和性を示すため、グルコースとガラクトースの二糖であるラクトース Lactose をこの分化系に添加し、内因性 Gal-9 タンパク質の生理作用阻害実験を行った。

(3) マウス造血幹細胞由来細胞への影響解析: 造血幹細胞由来の好中球への分化に Gal-9 欠損の影響が認められたことから、他の造血幹細胞由来細胞群を解析し、Gal-9 による他作用の有無について検証した。

4. 研究成果

ガレクチンは β -ガラクトシドに対して特異的結合性を示す動物レクチンである。構造上、プロトタイプ、キメラタイプ、タンデムリピートタイプの3種(図1)に分類され、ガレクチンの種類によって各種糖鎖に対する結合親和性に差がみられる。糖鎖転移酵素(β GalT-1)は Gal-9 が高親和性を示す O-glycan 糖鎖のガラクトースを付加する酵素であり、Asano らは β GalT-1 欠損マウスの末梢好中球数が野生型マウスに比して3倍にも増加することを報告している (Asano et al., *Blood*, 2004)。好中球は Tim-3 を発現しないとされており、Tim-3/Gal-9 pathway では説明できないこれらの現象の解明を目的とし、Gal-9 欠損マウス及び野生型 C57Bl6J マウスの骨髄細胞のフローサイトメトリー解析を行った。本研究では Gal-9 欠損マウス骨髄での顆粒球、単球前駆細胞 (Granulocyte-Macrophage Progenitors: GMPs, c-kit⁺Sca-1⁺CD16/32^{hi}CD34^{hi} cells) の比率上昇(図2B及び2C)や、Gal-9 欠損により末梢血レベルでも好中球過多になることを確認した(投稿準備中)。この結果は、好中球やマクロファージの過剰反応を主体とする III 型アレルギーに対する Gal-9 の炎症抑制を理解する上で、大変興味深い知見である。以上、Asano らの研究結果と我々のデータを合わせて考えると、 β GalT-1 によってガラクトースを付加された Tim-3 ではない糖タンパク質を介して Gal-9 が作用する可能性が示唆され、Gal-9 と

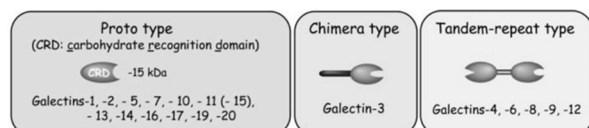


図1 Galectinファミリー。構造上、3つのタイプに分類される。

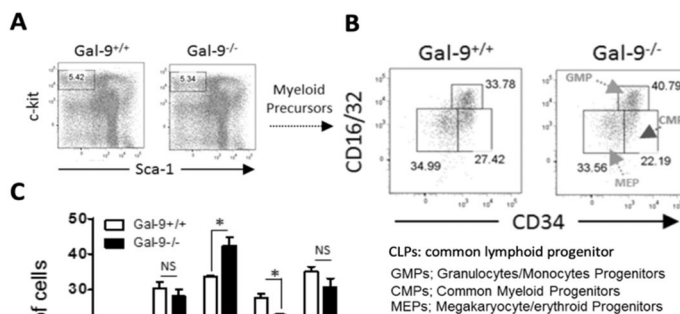


図2 Gal-9欠損マウスの造血幹細胞分化過程において、好中球・単球の前駆細胞であるGMPs比率増加が認められる。(投稿準備中)

以上、Asano らの研究結果と我々のデータを合わせて考えると、 β GalT-1 によってガラクトースを付加された Tim-3 ではない糖タンパク質を介して Gal-9 が作用する可能性が示唆され、Gal-9 と

その結合タンパク質には多様な組み合わせと未知の生理作用が存在することが示された。今後、糖鎖と糖タンパク質、そして糖鎖認識タンパク質であるレクチンの存在意義を知るためには、生理現象ごとに変わりうる標的（糖タンパク質）毎に機能を解析する必要がある。

造血幹細胞分化や巨核球等の機能に関与する Gal-9 の報告はほとんどないため、本研究は造血系細胞への作用解明に対する基盤研究となった。一方、さらに Gal-9 欠損マウスを用いた一連の研究の中で、Gal-9 欠損マウスでは野生型マウスと比較して出血時間が短縮する（図 3）ことが明らかにされ、この点も本研究課題から派生して得られた成果である。

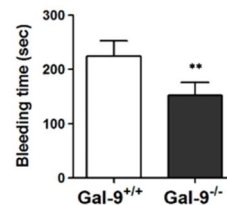


図3 Gal-9欠損マウスは出血時間が短縮する。(未発表データ)

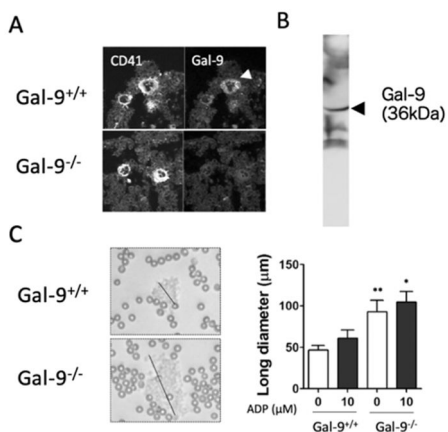
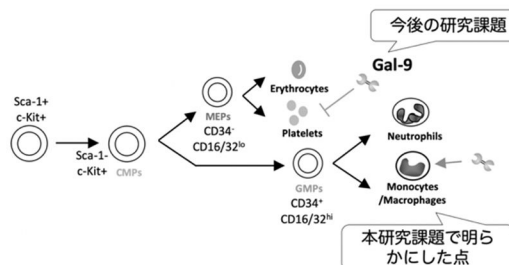


図4 A: Gal-9は血小板を産生するCD41陽性巨核球で発現する。B: 血小板を用いたGal-9タンパク質のウェスタンブロット。C: *in vitro*でマウス血小板を刺激した。Gal-9欠損マウス由来血小板は凝集活性が高い。(未発表データ)

その後の詳細な解析から、骨髄において Gal-9 は CD41 陽性巨核球に発現すること（図 4A, arrowhead）、さらに血小板内でも局在が維持されていること（図 4B, arrowhead）から、血栓形成に関与する可能性が示唆された。事実、Gal-9 欠損マウス由来血小板を用いた *in vitro* 系実験では野生型に比べて強い血小板凝集が認められること（図 4C）がわかっているため、仮説としてはかなり信憑性が高いと考えている。

以上の結果から今後は本研究成果で得られた造血幹細胞分化現象からさらに発展させ、「血液凝固作用に焦点を当てた Gal-9 の生理機能と標的分子探索」を目的とする研究課題へと展開する（仮説図）。本研究で得られる成果は、血小板凝集に起因する疾病の治療応用も期待できるため、基礎研究の範囲に留まらず、新たな学術領域を拓く研究となり得る。



仮説図 これまでのデータから推測される Gal-9の作用点とその機能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okuda K, Watanabe N, Hashimoto M, Doai M, Kawai Y, Takahashi T, Arikawa T, Ooiso K, Sunatani Y, Iwabuchi K, Kajinami K, Matoba M	4. 巻 154
2. 論文標題 Preliminary quantitative evaluation of radiation-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes after cardiac dual-isotope imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Radiation and Isotopes	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.apradiso.2019.108890.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami K, Miyasaka T, Ohno I, Ohta N, Masuda-Suzuki C, Tateda Y, Kusano Y, Shoji F, Kitaya S, Nakamura Y, Arikawa T, Kawano T, Takayanagi M, Takahashi T	4. 巻 25
2. 論文標題 Altered Immune Regulation of Dendritic Cells and Enhanced Cytokine Production of T Cells in the Pathogenesis of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Arch Allergy Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000512591.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ayaka Mitomo, Tomohiro Arikawa, Shengjun Liao, Hiromi Sakata-Haga, Hiroki Shimada, Toshihisa Hatta, Mitsuomi Hirashima, Hiroshi Kawabata, Hiroki Shoji
2. 発表標題 Galectin-9 positively regulates platelet production in mice
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂田 ひろみ (Sakata-Haga Hiromi) (50294666)	金沢医科大学・医学部・准教授 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------