

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790146  
 研究課題名 (和文) ガレクチンによるステロイドホルモン活性および免疫バランス調節機構の  
 解明  
 研究課題名 (英文) Regulatory mechanisms of sexual steroid activities and immune balance  
 by galectin  
 研究代表者  
 小林 純子 (仁尾 純子) (KOBAYASHI-NIO JUNKO)  
 北海道大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：70447043

## 研究成果の概要：

ガレクチンは、 $\beta$ -galactosideを認識するレクチンで、卵巣にはgalectin-1とgalectin-3が発現する。本研究では、黄体の退行メカニズムにおけるガレクチンの役割を明らかにし、黄体機能調節因子がガレクチンの発現調節に重要な役割を果たす可能性を示した。また、ガラクトサミン肝炎モデルを用いて、リンパ系組織におけるガレクチンの役割を検討し、galectin-3が肝炎の発症に関与することを見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：細胞組織化学、ガレクチン

## 1. 研究開始当初の背景

ガレクチンはガラクトースを含む糖鎖を特異的に認識する内在性レクチンで、上皮系、免疫系、神経系など生体内に広く存在する。ガレクチンは、細胞質内や細胞膜、細胞外マトリックスに存在する特定の糖鎖を認識して、細胞の増殖と分化、アポトーシス、炎症反応、がん転移を調節するほか、病原微生物との相互作用も有する。最近では、シグナル伝達の中継点となる脂質ラフトの安定化を介して、細胞内シグナリングに直接関与することが注目されている。哺乳類では15種類のガレクチンサブタイプ (galectin-1～galectin-15) が存在し、これらは組織・細胞特異的な発現をする

といわれるが、発現細胞の同定など形態学的解析は遅れており、小数のサブタイプについて断片的に報告されているだけであった。ガレクチンは、細胞質と核に存在するほか細胞外にも分泌されるが、シグナルペプチドをもたないことから未知の経路により分泌される。最もよく研究されている galectin-3 は、N末端ドメインの脱リン酸化により細胞質から核へ移行するという。ガレクチンの働きは局在によって異なり、例えば、galectin-3 は細胞質内ではアポトーシスを抑制するが、細胞外ではアポトーシスを誘導する。しかし、これらの局在に関するデータは *in vitro* の実験系によるものが多く、*in vivo* におけるガレクチン発現

の体系的な研究は行われていなかった。ひとつの理由として この分野における形態学者の参画がなかったことがあげられる。

我々はこれまでに マウスの消化管と泌尿器におけるガレクチン発現細胞を サブタイプ特異的な遺伝子プローブを用いて特定の細胞に特定のガレクチンサブタイプが発現することを明らかにしてきた。卵巣にもガレクチン (galectin-1 と galectin-3) が存在し、黄体に特異的に発現していた。しかし、これらガレクチンの発現は妊娠黄体では完全に消失する。黄体における galectin-3 の発現は、プロジェステロンを非活性型に変換する酵素である 20 $\alpha$ -HSD の発現と密接に関連しており、ガレクチンがプロジェステロンの代謝に関与していることを示唆した。

マウスの黄体におけるプロジェステロン活性を調節する主な外来因子は、下垂体より分泌される PRL と子宮由来の PGF2 $\alpha$ で、両者の作用は拮抗することが知られている。PRL はプロジェステロン活性に促進的に働くが、PGF2 $\alpha$ は分解酵素である 20 $\alpha$ -HSD の発現を促して、プロジェステロン活性に抑制的に働くという。galectin-3 は 20 $\alpha$ -HSD と関連して発現することから、PGF2 $\alpha$ のシグナリングに関与している可能性が考えられる。

一方、リンパ節・脾臓・胸腺などのリンパ系組織においても galectin-1 と galectin-3 が発現し、リンパ球の増殖とアポトーシスを調節するといわれるが、*in vivo*での発現細胞の同定は行われていない。最近、プロジェステロンは Th1/Th2 免疫バランスを調節する重要な因子であり、リンパ球に発現する 20 $\alpha$ -HSD が重要な役割を果たすと報告された。また、PRL は Th1 側に、糖質コルチコイドやプロジェステロンなどのステロイドホルモンとプロスタグランジン E2 (PGE2) は Th2 側に免疫バランスを傾けることが知られている。ガレクチン (特に galectin-3) はアレルギーで増加するので、免疫バランスの調節に関与する可能性が高く、そこではガレクチンによるプロジェステロンの活性調節が重要な役割を果たすことが予想される。しかし、ガレクチン-ステロイドホルモン-PRL/PG (PG: プロスタグランジン) の関係に注目した研究は これまでなされていない。黄体細胞と免疫系組織におけるプロジェステロン活性調節とガレクチンの関係を明らかにすることは、免疫バランスを調節する仕組みを解明する格好のモデルにな

ると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、第一に卵巣とリンパ系組織において ガレクチン (特に galectin-1 と galectin-3) がステロイドホルモン活性調節にどのように関与するかを PRL と PG のシグナリングに注目して明らかにすることを目的とする。第二に、ガレクチンが Th1/Th2 免疫バランスにどのように関与するかを明らかにし、免疫バランス調節因子 (PRL, PG, ステロイドホルモンなど) のシグナリングにおけるガレクチンの役割を分子レベルで解析する。

## 3. 研究の方法

研究方法は主に遺伝子特異的プローブを用いた *in situ hybridization* 法により、ガレクチン、ステロイドホルモンの生合成に関与する酵素群および黄体の退行や免疫バランスを調節する因子 (PRL, PG) のレセプターの発現変化を検索することにより行った。また、特異抗体を用いた免疫組織化学により、卵巣とリンパ系組織におけるガレクチン発現細胞を同定した。リンパ系組織におけるガレクチンの役割を明らかにするため、ガラクトサミン肝炎モデルを作製し、ガレクチンの発現動態を検索した。

## 4. 研究成果

特異抗体を用いて、黄体におけるガレクチン発現細胞を免疫組織化学により検索したところ、galectin-1は血管周囲に散在する線維芽細胞に、galectin-3は浸潤マクロファージに存在することが明らかとなった。黄体の退行が進むにつれて、黄体細胞自身もガレクチンを発現するようになるが、これら古い黄体ではアポトーシス細胞数が顕著に少ないことを発見した (図1)。galectin-3を細胞質に強く発現する黄体細胞はアポトーシスに抵抗性を示す一方で、細胞質の断片化 (demarcation) により黄体のサイズを縮小する現象が観察された。

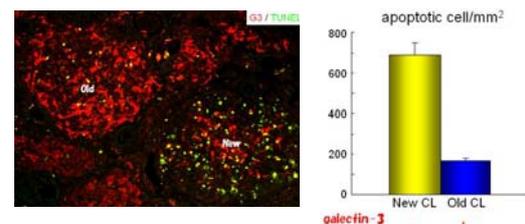


図1 成熟マウスの黄体におけるアポトーシス細胞 galectin-3 を発現する古い世代の黄体 (old) では、新しい黄体 (New) に比較して TUNEL 陽性細胞数が顕著に少ない。

次に、黄体の退行を調節する因子であるPRLとPGF2 $\alpha$ がガレクチンの発現に与える影響について検討した。マウスの卵巣におけるガレクチンとPRLおよびPGF2 $\alpha$ レセプターの発現を比較すると、PRLレセプターの発現が強い黄体にはgalectin-1が、PGF2 $\alpha$ レセプターの発現が強い黄体にはgalectin-3が発現することがわかった。また、分娩後3日目のマウスを強制離乳してPRLの刺激をなくすと、後分娩発情により形成された新しい黄体におけるgalectin-1の発現が増強し、次いでgalectin-3と20 $\alpha$ -HSDの発現が増加する現象が認められた。つまり、PRLの刺激がなくなると galectin-1の発現が増強し、黄体が退行を開始することがわかった。同様にPRLの産生を阻害する薬剤であるプロモクリプチンを投与すると、黄体におけるgalectin-1の発現が有意に増強した。一方、PGF2 $\alpha$ の産生を阻害するインドメタシン投与により黄体内へ侵入するgalectin-3陽性マクロファージ数の増加が認められた。これらの結果から、マウスの黄体におけるガレクチンの発現は、PRLやPGF2 $\alpha$ により別々に調節をうけて黄体の退行に関与する可能性が示された。

さらに全身の免疫バランス調節におけるガレクチンの役割を明らかにするため、リンパ系組織におけるガレクチンおよびステロイドホルモンの生合成に関与する酵素群の発現解析をin situ hybridization法と免疫組織化学により行った。特に 全身の免疫バランスに重要な役割を果たすといわれる20 $\alpha$ -HSD、PRLおよびPGE2レセプターの発現とガレクチンとの関係に注目して解析を行ったが、リンパ系組織における20 $\alpha$ -HSD、PRLおよびPGE2レセプターは非常に弱く、検出が不可能であった。そこで、ガラクトサミン (GalN) を腹腔内に投与して作製したGalN肝炎モデルを用いて、ガレクチンの役割を検討した。GalN肝炎モデルでは、肝臓およびリンパ系組織におけるgalectin-3の発現が増強し、抗galectin-3抗体を事前に投与することにより炎症を抑制できることを発見した。また、性周期により炎症の程度が異なり、血中プロジェステロン濃度が高い場合にはGalN投与により誘導される炎症が抑制されることを見出した。GalN肝炎の発症におけるガレクチンの役割は未だ明らかではないが、プロジェステロンの作用によりリンパ球表面の糖鎖構造が変化することがガレクチンとの相互作用に重要であることが予想された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件) 全て査読あり

1. Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Yajima T, Iwanaga T  
Cellular expression of a monocarboxylate transporter (MCT1) in the mammary gland and sebaceous gland of mice.  
*Histochem Cell Biol* 131:401-409, 2009
2. Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T  
Immunohistochemical localization of six galectin subtypes in the mouse digestive tract.  
*J Histochem Cytochem* 57:41-50, 2009
3. Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T  
Histochemical demonstration of monocarboxylate transporter in the perineurium of mice with special reference to GLUT1.  
*Biomed Res* 29:297-306, 2008
4. Yanase H, Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T  
Cellular expression of a sodium-dependent monocarboxylate transporter (Slc5a8) and the MCT family in the mouse kidney.  
*Histochem Cell Biol* 130:957-966, 2008
5. Takahashi-Iwanaga H, Nio-Kobayashi J, Habara Y, Furuya K  
A dual system of intercellular calcium signaling in glial nets associated with lanceolate sensory endings in rat vibrissae.  
*J Comp Neurol* 510:68-78, 2008
6. Nio J, Iwanaga T  
Galectins in the mouse ovary: concomitant expression of galectin-3 and progesterone degradation enzyme (20 $\alpha$ -HSD) in the corpus luteum.  
*J Histochem Cytochem* 55:423-432, 2007

[学会発表] (計4件)

1. 小林 純子, 岩永 敏彦  
肝臓のクッパー細胞における galectin-3 の発現と抗 galectin-3 抗体による肝炎の

抑制

第 114 回 日本解剖学会 総会・全国学術集会, 2009 年 3 月 29 日, 岡山

2. 小林 純子, 岩永 敏彦  
マウスの退行期黄体に発現するガレクチンは、プロラクチンにより発現調節をうける  
第 28 回 日本糖質学会年会, 2008 年 8 月 19 日, つくば
3. Nio-Kobayashi J and Toshihiko Iwanaga:  
Differential immunohistochemical localization of six galectin subtypes in the digestive tract of mice.  
第 23 回国際レクチン会議, 2008 年 7 月 14 日, スターリング, スコットランド
4. 小林 純子, 渡邊 加奈子, 岩永 敏彦  
サブタイプ特異的抗体を用いたマウスの消化管におけるガレクチンの局在解析

日本解剖学会 第 53 回 東北・北海道連合支部学術集会, 2007 年 9 月 29 日, 札幌

[その他]

研究室ホームページ:

<http://www.med.hokudai.ac.jp/~anat-3w/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 純子 (仁尾 純子) (KOBAYASHI-NIO JUNKO)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 70447043

(2) 分担研究者

なし

(3) 連携代表者

なし