

機関番号：16201
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570133
 研究課題名(和文) 内在性ガレクチン9による血管内皮細胞のインターフェロン感受性調節作用
 研究課題名(英文) Modulation of interferon action by intrinsic galectin-9 in cultured human endothelial cells.
 研究代表者
 西 望 (NISHI NOZOMU)
 香川大学・総合生命科学研究センター・准教授
 研究者番号：10145047

研究成果の概要(和文)：siRNA を利用したガレクチン9ノックダウンの結果から、ヒト血管内皮細胞において内在性ガレクチン9がインターフェロン作用を調節(抑制)している可能性が示唆された。しかし、低濃度で効果を示す新世代 siRNA を用いた確認実験から、当初の結果は siRNA のオフターゲット効果によるものであることが分かった。最終年度に行った実験結果は、ガレクチン9が血管内皮細胞における小胞体ストレスと何らかの関連性を持つことを示唆しており、現在、その分子の実態を明らかにするために研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：Knockdown experiments using siRNA of galectin-9 suggested that intrinsic galectin-9 modulates IFN action in cultured human endothelial cells. Confirmation experiments using new-generation siRNAs, however, demonstrated that the observation was due to the off-target effects of old-generation siRNAs. The experiments carried out on the last year suggested the relationship between galectin-9 and endoplasmic reticulum stress (ER stress) in human endothelial cells. I am continuing to investigate the role of galectin-9 in endothelial cells in relation to ER stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ガレクチン、血管内皮細胞、インターフェロン、ケモカイン、RNA 干渉

1. 研究開始当初の背景

ガレクチン9は、主としてその細胞外作用の解析から、自然免疫と獲得免疫の両面で働く免疫機能調節因子としての位置付けが確立されつつある。私達は、ガレクチンファミ

リーの中でもタンデムリピート型に属するメンバー、特にガレクチン9を主要な研究対象として多面的な解析を行い、a) 構造と糖鎖結合特異性、b) T細胞の細胞死誘導作用、c) 樹状細胞に対する分化誘導作用、d) 腫瘍

細胞に対する細胞死誘導作用、e) アレルギー、自己免疫疾患における役割、などを報告してきた。しかし、b)-d)はガレクチン9を細胞外から作用させた結果であり、生理的役割との関連は必ずしも明らかではない。

一方、血管内皮細胞 (HUVEC) や線維芽細胞において、ガレクチン9の発現がインターフェロン (IFN) により強く誘導されることが報告されている (他のガレクチンは誘導されない)。血管内皮細胞における内在性ガレクチン9の役割を検討する目的で、siRNA によるノックダウンを行った結果、無刺激状態における Stat1 のリン酸化が亢進するとともに、典型的な IFN 応答遺伝子産物である CXCL10/IP-10 の産生が増加した。この効果は抗 IFN- β 抗体によりほぼ完全に抑制されること、また対照 siRNA や他のガレクチン (ガレクチン1, 3) に対する siRNA はこのような効果を示さないことから、短鎖 RNA による非特異的な作用ではないと考えられた。ガレクチン9をノックダウンした細胞を IFN- α で刺激すると、CXCL10 と RANTES の産生が顕著に増加し、CCL2/MCP-1 と CXCL8/IL-8 の産生は抑制された。これらの結果は、内在性ガレクチン9が血管内皮細胞自身の産生する IFN- β や外来性 IFN に対する感受性調節因子である可能性を示していた。

2. 研究の目的

本研究では、血管内皮細胞における IFN シグナル伝達と内在性ガレクチン9の関係を調べることにより、ガレクチン9による IFN 感受性調節メカニズムの解明を目的とした。このために以下の点を明らかにすることを目指した。a) 内在性ガレクチン9の作用場所 (細胞内あるいは細胞外 [オートクライ的なメカニズム])、b) 既知の IFN シグナル伝達経路のどのポイントに作用するか、c) 細胞内で働く場合、IFN シグナル伝達/調節因子 (IFN 受容体、JAK、Stat、SOCS、SHP-1 など) との直接相互作用の有無、d) 直接相互作用が示された場合、相互作用の様式とリン酸化などに及ぼす効果、e) 細胞外で働く場合、その作用を仲介する因子 (ガレクチン9シグナル伝達系) の同定、f) ヒト T 細胞株と末梢血 T 細胞におけるガレクチン9のノックダウン効果。

3. 研究の方法

(1) ガレクチン9をノックダウンした血管内皮細胞に、細胞外から組換え型ガレクチン9を作用させ、Stat1 のリン酸化と CXCL10 産生を指標としてノックダウン効果に対する影響を調べる。ノックダウン効果に影響がない場合は、内在性ガレクチン9の作用場所は細胞内と判断する。影響が認められた場合は、ラクトース (ガレクチン9と糖鎖の相互作用に対する阻害剤) 及び N-, O-結合型糖鎖合成阻

害剤の効果、細胞外から加えた組換え蛋白質の局在を調べ、細胞膜受容体の関与を明らかにする。

(2) 複数のケモカイン産生に対する主要なガレクチン (ガレクチン1, 3, 8, 9) のノックダウン効果を、無刺激状態と IFN- α / β / γ 刺激条件下で調べ、IFN のシグナル伝達に関与する2種類の Stat (Stat1, Stat2) のリン酸化レベルとの関連を検討する。Stat リン酸化とケモカイン産生の相関が示された場合は、Stat より上流の因子、すなわち JAK と IFN 受容体のリン酸化に対するガレクチン9のノックダウン効果を調べる。

(3) 内在性ガレクチン9の作用場所が細胞内と判断された場合は、ガレクチン9が Stat、JAK、あるいは IFN 受容体 (IFN- α / β 受容体) と直接相互作用することにより、IFN シグナル伝達に影響を与える可能性を検討する。無刺激状態と IFN 刺激後の血管内皮細胞抽出液の免疫沈降 (抗ガレクチン9抗体使用) を行い、各シグナル伝達因子に対する抗体を用いたウェスタンブロットにより分析する。

(4) 内在性ガレクチン9がオートクライ的なメカニズムにより、細胞膜受容体を介して作用することが示された場合は、組換え型ガレクチン9固定化カラムを用いて、血管内皮細胞膜画分から受容体候補分子のアフィニティー精製を行う。アフィニティー精製標品の直接アミノ酸配列決定もしくはトリプシン分解産物の TOF-MS 解析により、受容体候補分子の同定を試みる。

4. 研究成果

本研究を開始するまでに得られたデータから、ガレクチン9ノックダウンの効果は siRNA の非特異的な作用ではないと考えていた。しかし、ガレクチン9のノックダウンに使用した siRNA mixture (4種類の siRNA [siG9-5, -6, -7, -8]の混合物) の各成分の効果を個別に検討した結果、siG9-6は Stat1 リン酸化の亢進と CXCL10 産生を誘導したが、ガレクチン9に対するノックダウン効果を示さず、一方、SiG9-5, -7, -8はガレクチン9に対するノックダウン効果を示したが、Stat1 リン酸化や CXCL10 産生に影響を与えなかった。この結果は、これまでに得られたデータが siG9-6 のオフターゲット効果によるものであることを示している。このため、低濃度で十分なノックダウン効果が得られる新世代の siRNA (Ambion 社製) を用いて、データの取り直しを行い、3種類の siRNA によりオフターゲット効果の現れない低濃度 (1 nM 以下) において、十分なノックダウン効果が得られることが分かった。しかし、これらの siRNA は血管内皮細胞における IFN- γ によ

る CXCL9 の発現誘導に対して抑制効果を示さなかった。以上の研究結果は、siRNA によるノックダウンは極めて有用な手法であるが、非特異的な応答を引き起こす可能性があり、特に免疫機能に関する研究においては、結果の解釈に注意が必要であることを示している。

新世代の siRNA を用いた研究成果から、旧タイプの siRNA によって得られた実験結果が、オフターゲット効果（インターフェロン様効果）によるものであることが判明し、本研究の基盤としてきた手掛かりが失われた。このため、研究の方針を変更し、ガレクチン9を含むガレクチンファミリーに共通する重要な問題である分泌メカニズム（ガレクチンは非古典的分泌経路を介して分泌されると考えられているがその詳細は不明である）を血管内皮細胞／インターフェロン刺激の系を用いて検討した。その結果、A23187 処理により細胞内ガレクチン9の減少（対照の約40%に減少）と、培地中の濃度増加が再現性良く観察された。しかし、培地中に検出される量は刺激後 24 時間で 0.5 ng/ml 以下であり、細胞内減少分の 5% 程度であった。さらに、古典的分泌経路の阻害剤である brefeldin A を添加すると、細胞内ガレクチン9は10%以下に低下し、培地中ではほとんど検出されなかった。この細胞内ガレクチン9の減少は、bafilomycin A1（リソゾームにおける蛋白質分解阻害剤）により阻害されることから、brefeldin A はガレクチン9の分解を促進したものと考えられる（シクロヘキシミドやピューマイシンで蛋白質合成を阻害しても、24 時間では細胞内ガレクチン9の減少は認められない）。brefeldin A や A23187 は ER ストレスを引き起こすことから、細胞内ガレクチン9の減少と ER ストレスの関連が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 14 件）

- ① Yoshida H, Teraoka M, Nishi N, Nakakita S, Nakamura T, Hirashima M, Kamitori S. X-ray structures of human galectin-9 C-terminal domain in complexes with a biantennary oligosaccharide and sialyllactose. *J Biol Chem* 2010 285:36969-36976 査読有
- ② Miyanaka H, Nakamura T, Nishi N. Tissue-Specific Expression of Fucosylated Glycosphingolipid Species in Rat Prostate. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010 74:1261-1266 査読有
- ③ Katoh S, Nobumoto A, Matsumoto N, Matsumoto K, Ehara N, Niki T, Inada H, Nishi N, Yamauchi A, Fukushima K, Hirashima M. Involvement of Galectin-9 in Lung Eosinophilia in Patients with Eosinophilic Pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol* 2010 153:294-302 査読有
- ④ Dardalhon V, Anderson AC, Karman J, Apetoh L, Chandwaskar R, Lee DH, Cornejo M, Nishi N, Yamauchi A, Quintana FJ, Sobel RA, Hirashima M, Kuchroo VK. Tim-3/Galectin-9 Pathway: Regulation of Th1 Immunity through Promotion of CD11b+Ly-6G+ Myeloid Cells. *J Immunol* 2010 185:1383-1392 査読有
- ⑤ Yoshida Y, Nishi N, Nakakita S, Kamitori S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a protease-resistant mutant form of human galectin-8. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* 2009 F65:512-514 査読有
- ⑥ Nobumoto A, Oomizu S, Arikawa T, Katoh S, Nagahara K, Miyake M, Nishi N, Takeshita K, Niki T, Yamauchi A, Hirashima M. Galectin-9 expands unique macrophages exhibiting plasmacytoid dendritic cell-like phenotypes that activate NK cells in tumor-bearing mice. *Clin Immunol* 2009 130:322-330 査読有
- ⑦ Niki T, Tsutsui S, Hirose S, Aradono S, Sugimoto Y, Takeshita K, Nishi N, Hirashima M. Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. *J Biol Chem* 2009 284:32344-32352 査読有
- ⑧ Nagae M, Nishi N, Murata T, Usui T, Nakamura T, Wakatsuki S, Kato R. Structural analysis of the recognition mechanism of poly-N-acetyllactosamine by the human galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain. *Glycobiology* 2009 19:112-117 査読有
- ⑨ Nagae M, Nishi N, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J, Wakatsuki S, Kato R. Structural analysis of the human galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain reveals unexpected properties that differ from the mouse orthologue. *J Mol Biol* 2008 375:119-135 査読有
- ⑩ Iwaki J, Minamisawa T, Tateno H, Kominami J, Suzuki K, Nishi N, Nakamura T, Hirabayashi J. Desulfated galactosaminoglycans are potential ligands for galectins: evidence from

frontal affinity chromatography.
Biochem Biophys Res Commun 2008
373:206-212 査読有

- ⑪ Seki M, Oomizu S, Sakata KM, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, Ito K, Takeshita K, Niki T, Saita N, Nishi N, Yamauchi A, Katoh S, Matsukawa A, Kuchroo V, Hirashima M. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. Clin Immunol 2008 127:78-88 査読有
- ⑫ Nobumoto A, Nagahara K, Oomizu S, Katoh S, Nishi N, Takeshita K, Niki T, Tominaga A, Yamauchi A, Hirashima M. Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. Glycobiology 2008 18:735-744 査読有
- ⑬ Nishi N, Abe A, Iwaki J, Yoshida H, Itoh A, Shoji H, Kamitori S, Hirabayashi J, Nakamura T. Functional and structural bases of a cysteine-less mutant as a long-lasting substitute for galectin-1. Glycobiology 2008 18:1065-1073 査読有
- ⑭ Yamamoto H, Nishi N, Shoji H, Itoh A, Lu LH, Hirashima M, Nakamura T. Induction of cell adhesion by galectin-8 and its target molecules in Jurkat T cells. J Biochem (Tokyo) 2008 143:311-324 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 宮中宏、伊藤愛子、中村隆範、西 望 前立腺におけるフコシル化スフィンゴ糖脂質の組織特異的発現 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010. 12. 09 神戸国際展示場 (兵庫県)
- ② Shigehiro Kamitori, Hiromi Yoshida, Shinichi Nakakita, Misa Teraoka, Nozomu Nishi, Takanori Nakamura, Mitsuomi Hirashima, Jun Hirabayashi X-ray Structure of Galectin-9 C-terminal Domain in Complex with N-linked Oligosaccharide with a Branch. The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010)、2010. 08. 02 幕張メッセ (千葉県)
- ③ Hiromi Yoshida, Misa Teraoka, Nozomu Nishi, Takanori Nakamura, Mitsuomi Hirashima, Shigehiro Kamitori Crystal structure of the C-terminal

carbohydrate recognition domain of human galectin-9

35th FEBS Congress、2010. 06. 28
Gothenburg, Sweden

- ④ 吉田裕美、西望、寺岡美沙、中北慎一、中村隆範、平島光臣、神鳥成弘 ヒト由来ガレクチン 9 の C 末端糖鎖認識ドメイン・シアリルラクトース複合体およびプロテアーゼ耐性型ヒト由来ガレクチン 8 の X 線結晶解析 第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010. 06. 17 札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑤ 西 望、井本 (山本) ひとみ、東海林博樹、中村隆範 血管内皮細胞におけるガレクチン 9 の機能解析 第 82 回日本生化学会大会、2009. 10. 24 神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑥ 吉田裕美、西望、中北慎一、神鳥成弘 プロテアーゼ耐性変異型ヒトガレクチン 8 の X 線結晶解析 第 82 回日本生化学会大会、2009. 10. 22 神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑦ Jun Iwaki, Hiroaki Tateno, Sachiko Nakamura-Tsuruta, Noboru Uchiyama, Nozomu Nishi, Toshikazu Minamisawa, Junko Kominami, Takanori Nakamura, Jun Hirabayashi CREST 国際シンポジウム「獲得免疫と糖鎖生物学」Frontal affinity chromatography reveals a common binding rule for galectins、2009. 03. 23 かずさアカデミアホール (千葉県) 国立京都国際会館 (京都府)
- ⑧ Liang-Hao Lu、中川竜介、加塩裕美子、伊藤愛子、東海林博樹、西 望、平島光臣、山内清明、中村隆範 Characterization of Galectin-9-Induced Death of Jurkat T Cells 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008. 12. 12 神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑨ 西 望、安部暁美、岩城隼、吉田裕美、伊藤愛子、東海林博樹、神鳥成弘、中村隆範、平林淳 Cys 残基を Ser 残基に置換したガレクチン-1 変異体 (安定化ガレクチン-1) の機能と構造 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008. 12. 12 神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑩ 大水総一、永原慶子、有川智博、延本篤也、仁木敏朗、西 望、山内清明、

平島光臣

Galectin-9 enhances anti-tumor immunity by increasing Tim-3 homotypic interactions between dendritic cells and CD8+ T cells.
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、
2008. 12. 01

- ⑪ Hiromi Yoshida, Akemi Abe, Nozomu Nishi, Takanori Nakamura, Shigehiro Kamitori
Structural basis of a cysteine-less mutant as a long-lasting substitute for galectin-1
XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography、2008. 08. 24
大阪国際会議場（大阪府）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~rec/Site/HOME_M.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 望 (NISHI NOZOMU)

香川大学・総合生命科学研究センター・
准教授

研究者番号：10145047