

平成22年 3月 31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790570
 研究課題名（和文）ガレクチン9の骨髄由来免疫抑制マクロファージに対する分化誘導機序
 研究課題名（英文）Gal-9 expands immunosuppressive macrophages to ameliorate T-cell-mediated inflammation.
 研究代表者
 有川 智博（ARIKAWA TOMOHIRO）
 香川大学・医学部・助教
 研究者番号：70452670

研究成果の概要（和文）：T細胞の関与する肺疾患の過敏性肺臓炎病態はリコンビナントGal-9皮下投与により抑制されるが、この効果はCD11b、Ly-6C陽性単球・マクロファージ系の抑制性細胞の誘導に起因することを明らかにした。これらの細胞群はアルギナーゼを高発現し、T-cell receptor 生合成阻害によりT細胞増殖、機能抑制に寄与する可能性が高い。In vitro系の検討でもCD11b、Ly-6C陽性で判別される当該細胞群の分化誘導作用が再現され細胞介在性の新規機序を解明し免疫学的に有意義な検討となった。

研究成果の概要（英文）：Gal-9 expands the monocytic myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) which can suppress T-cell functions in the lesion during experimental hypersensitivity pneumonitis. As well-known that MDSCs can be subdivided into Ly-6C or Ly-6G positive cells, Gal-9 induced Ly-6C positive monocytic MDSCs both *in vivo* and *in vitro*. We thus conclude that Gal-9 may be an inducer of monocytic MDSCs in the presence of bacterial component(s).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：Galectin-9, myeloid-derived suppressor cells, T-cell mediated inflammation,

1. 研究開始当初の背景

Galectin-9 (Gal-9)は好酸球の遊走因子として同定された動物レクチンの一種である。ガレクチンファミリーはβ-ガラクトシドを

認識するタンパクであり、哺乳動物において現在までに15種ホモログが同定されている。当研究室ではGal-9の機能として樹状細胞の成熟(活性化)促進、活性化T細胞やヒト慢性関節リウマチ滑膜細胞のアポトーシス

誘導作用を明らかにし、これらの結果からガレクチン9を免疫系の重要な制御因子の一つとして位置付けている。近年Th1細胞をTim-3依存的に細胞死誘導することも示され、事実、当研究室やKuchrooらの報告からGal-9投与によりマウスコラーゲン誘導関節炎モデル

(CIA)等の病態軽減効果を報告してきた。さらにマウスCIAにおいてGal-9遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比して病態が増悪することからも免疫制御因子としての重要性が示唆されていた。さらにガレクチン9投与による炎症抑制効果はTim-3発現活性化T細胞が出現する炎症慢性期のみならず炎症早期にも観察されていた。このことはTim-3を介さない抑制機序の存在を示唆している。

一方で近年、骨髄由来免疫抑制マクロファージ(Myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)の腫瘍免疫における役割が注視されているが、その他の免疫反応に対する知見は少なく、また単球系や顆粒球系MDSCsも報告されるなど不明な点が多く残されており詳細な解析が待たれていた。

2. 研究の目的

予備検討によりマウス、申請者はCIAと同様Th1型疾患と考えられている過敏性肺臓炎モデル(Experimental Hypersensitivity Pneumonitis: EHP)を用いて、CIAと同様にTh1/17細胞の抑制、制御性T細胞の誘導を再現することを確認した。一方で、炎症早期にガレクチン9投与は病態改善に対して有効であることからその他の機序が想定されていた。肺浸潤炎症細胞のFACS解析により、ガレクチン9投与マウスではコントロール群と比較し追加免疫後、一、三日目においてCD11b/Gr-1/F4/80陽性細胞比率の上昇が認められたことから、これらの細胞の同定や詳細な解析を目的としてin vitroアッセイ系を用いて解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 組織学的解析：病態解析のため、ガレクチン9投与マウス、非投与マウス肺組織に対してヘマトキシリン染色後、定量的な組織学的評価を行った。

(2) 肺胞洗浄液中サイトカインの測定、肺浸潤炎症細胞の同定：フローサイトメトリーを用いて浸潤細胞の同定とELISAによる炎症性サイトカインへの影響を解析した。

(3) 肺浸潤炎症細胞の機能解析：T細胞との共培養によりT細胞機能に対する効果を検討した。

(4) in vitro分化誘導検討：骨髄由来造血幹細胞を用いて、分化検討を行った。刺激にはガレクチン9と過敏性肺臓炎原因抗原であるT.Asahiiを組み合わせて行った。

4. 研究成果

本採択研究によって以下の項目が明らかとなった。

(1) ガレクチン9投与により過敏性肺臓炎モデルにおいても病態の軽減効果を認めた【図1】。

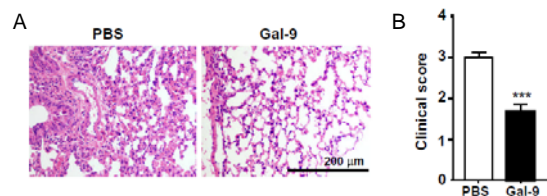


図1A：HE染色を用いた組織学的解析。ガレクチン9投与により肺浸潤細胞が減少し、病態が軽減されることがわかる。B：病態解析を定量的に行うため、肉芽形成や浸潤炎症細胞を基準に病態をスコア化し、コントロール群と比較した。統計学的に有意な減少であった。

(2) ガレクチン9投与マウスの肺局所浸潤細胞はT細胞機能を抑制する作用を有する。

【図 2】

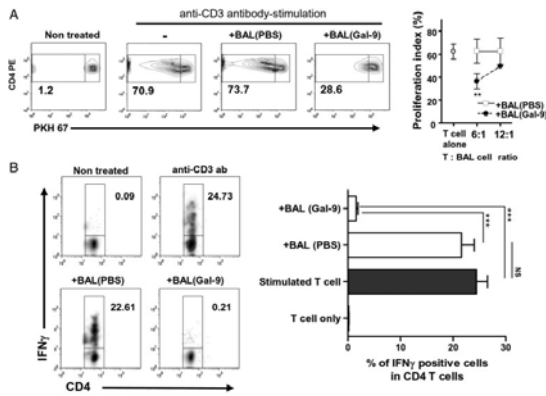


図 2 : T 細胞の抗 CD 3 抗体刺激下で、肺泡浸潤細胞 (BAL 細胞) と共培養し、増殖への影響解析、IFN gamma 産生量を定量した。A : P B S コントロールマウス由来の BAL 細胞では T 細胞増殖に影響が認められないのに対し、ガレクチン 9 投与マウス由来 BAL 細胞では増殖抑制活性が認められた。B : IFN gamma 産生に対する影響も同様の効果が認められた。

(3) 過敏性肺臓炎を惹起しガレクチン投与したマウスの肺局所において CD11b, F4/80, Ly-6C 陽性マクロファージの浸潤、局在が示された。これらの細胞は腫瘍免疫で最近注目されている顆粒球系細胞ではなく、単球・マクロファージ系細胞の形態を示した。

【図 3】

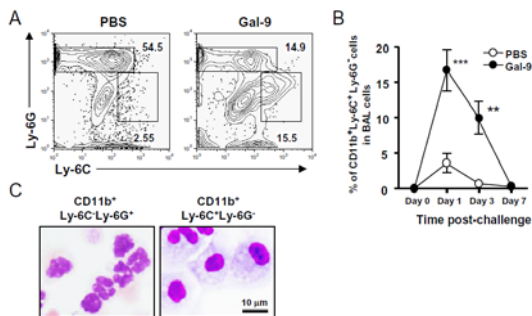


図 3 A : 抗原刺激後一日目の肺浸潤細胞フローサイトメトリー解析の結果。ガレクチン 9 投与マウスの肺泡に Ly-6C 陽性細胞が多く存在することがわかる (B は時間経過とともに Ly-6C 細胞の比率をグラフ化した

もの) C : Ly-6C 陽性細胞、Ly-6G 陽性細胞の形態学的比較。ガレクチン 9 により誘導される Ly-6C 陽性細胞は形態学的に単球・マクロファージ系細胞であった。

(4) アルギナーゼは T 細胞受容体生合成に重要なアルギニンを分解する作用があり、この作用により T 細胞に対する抗原シグナルが機能不全となり増殖・サイトカインの分泌など、T 細胞機能が低下することが明らかとなっている。当該細胞はアルギナーゼを高発現し、活性化 T 細胞の増殖、サイトカイン産生に抑制効果を示したものと考えられる。

【図 4】

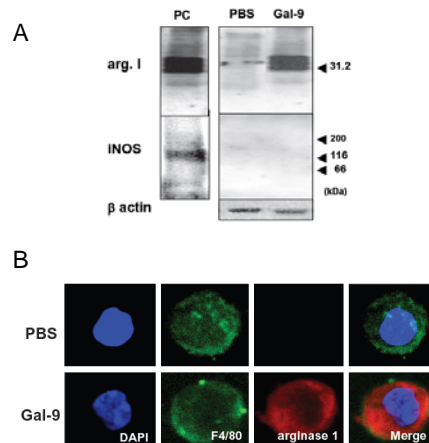
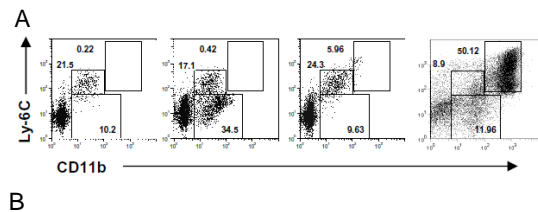


図 4 A : 肺泡浸潤細胞からマクロファージを単離 (F4/80 陽性細胞) し、ウエスタンブロット法を用いてアルギナーゼ、NOS 蛋白発現を検出した。ガレクチン 9 の投与により浸潤したマクロファージはアルギナーゼを高発現することが分かる。B : 蛍光免疫染色を用いて同様にアルギナーゼ局在を確認した。

(4) 骨髄造血幹細胞を用いた in vitro の検討により、過敏性肺臓炎抗原として用いた T. asahii と共刺激下での CD11b, Ly-6C 陽性細胞の誘導作用を確認した。【図 5】



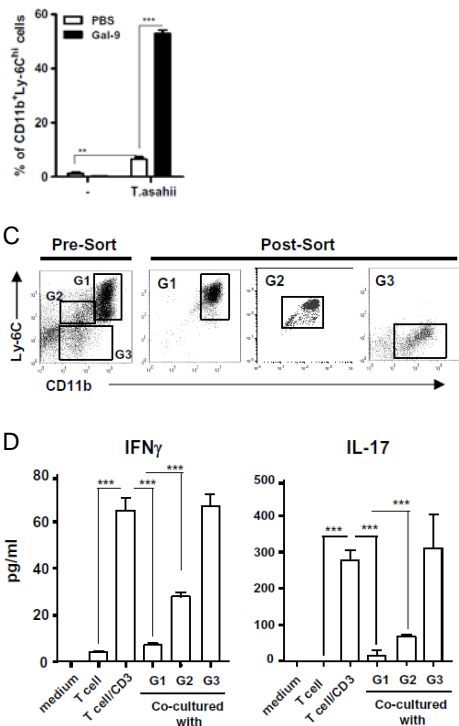


図 5 A : 骨髄造血幹細胞を用いたガレクチン 9 と T.asahii による CD11b, Ly-6C 陽性細胞分化検討。(左から、未刺激、ガレクチン 9 のみ、T.asahii のみ、共刺激条件)。共刺激条件でのみ、CD11b, Ly-6C 陽性細胞が強く誘導されることがわかる (B はグラフ化したもの。統計学的に有意であった)。C : さらにガレクチン 9 により誘導された Ly-6C 陽性細胞を単離後 (C、G 1 がガレクチン 9 で強く誘導される細胞群)、T 細胞と共培養実験を行ったところ、T 細胞から産生されるサイトカイン (インターフェロン、インターロイキン 17) を抑制することがわかった (D)。

(6) 結論

以上から、ガレクチン 9 は T 細胞の機能を抑制する作用を持つ骨髄由来抑制性単球・マクロファージを誘導することが判明し、実際に生体内で炎症に伴い発現上昇するガレクチン 9 は T 細胞制御に重要な機能を持つ可能性が示唆された。以上の結果は、免疫学的に有意義であると同時に、将来的に治療応用を見

据えた有意義な基礎研究となった。

5. 主な発表論文等 [雑誌論文] (計 2 件)

1. Galectin-9 expands immunosuppressive macrophages to ameliorate T cell-mediated lung inflammation.

Arikawa T, Saita N, Oomizu S, Ueno M, Matsukawa A, Katoh S, Kojima K, Nagahara K, Miyake M, Yamauchi A, Kohrogi H, and Hirashima M. European Journal of Immunology, 2010 Feb, 40(2):548-558. (査読有)

2. Galectin-9 ameliorates immune complex-induced arthritis by regulating Fc gamma R expression on macrophages.

Arikawa T, Watanabe K, Seki M, Matsukawa A, Oomizu S, Sakata K, Sakata A, Ueno M, Saita N, Niki T, and Hirashima M. Clinical Immunology, 2009, Nov, 133, 382-392. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. Galectin-9 ameliorates immune complex-induced arthritis by regulating Fc gamma R expression on macrophages、有川智博、渡邊浩大、松川昭博、大水総一、仁木敏朗、山内清明、平島光臣、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 2-4 日、大阪。

2. Galectin-9 expands myeloid-derived suppressor cells in T cell-mediated lung inflammation、Tomohiro Arikawa、Souichi Oomizu、Mitsuomi Hirashima、第 8 回四国免疫フォーラム、2009 年 6 月 27 日、香川。

3. ガレクチン 9 で誘導される骨髄由来細胞による過敏性肺炎モデルの発症抑制、税田直樹、小嶋圭介、興梠博次、有川智博、平島光臣、第 50 回日本呼吸器学会学術講演会、2009 年 4 月 23-25 日、東京。

4. Galectin-9 誘導 Gr-1+CD11b+F4/80+細胞のエンドトキシン誘導性肺損傷に対する抑制効果の検討、小嶋圭介、税田直樹、津村真

介, 田中麗苗, 有川智博, 塩田徹哉, 後藤英介, 平島光臣, 興梠博次、第 49 回日本呼吸器学会学術講演会、2009 年 6 月 12-14 日、東京.

5 . Galectin-9 enhances anti-tumor immunity by increasing Tim-3 homotypic interactions between dendritic cells and CD8+ T cells, Oomizu Souichi, Keiko Ngahara, Tomohiro Arikawa, et al., 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 年 12 月 1-3 日、京都.

6. 有川智博 他, ガレクチン 9 は骨髄由来抑制性マクロファージ誘導により T 細胞による炎症を抑制する. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 年 12 月 1-3 日、京都.

〔図書〕 (計 1 件)

ガレクチンをめぐって. 有川智博、谷口令奈、平島光臣, Annual review 呼吸器、(中外医学社), 2009 年 1 月発行.p. 13-18

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有川 智博 (ARIKAWA TOMOHIRO)

香川大学・医学部・助教

研究者番号 : 70452670