

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07068

研究課題名(和文) Galectin-9 の二つの形態の機能解明と診断への応用可能性についての研究

研究課題名(英文) Functional elucidation of two forms of Galectin-9 and their potential application to diagnosis

研究代表者

仁木 敏朗 (Niki, Toshiro)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：40558508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト急性単球性白血病細胞THP1細胞がPMA刺激でエクソソームを含むExtracellular vesicle (EV)に内包されたGal-9を分泌することを示した。このGal-9はEV中に完全に内包されており、Gal-9のL型とM型のスプライシングバリエーションであった。エクソソーム中のGal-9は何らかの因子とジスルフィド結合を形成している可能性が示唆された。EV Gal-9のELISA定量方法を開発し各種疾患患者の血漿を測定した。デング熱患者ではEV Gal-9が回復期に上昇したため検体数を増やした確認が必要である。AIDS、結核、AIDS・結核では重症度を反映するような差は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gal-9は複数のリセプターに結合して多機能な作用を及ぼす免疫調節因子であり、ガン免疫療法のターゲットとしても注目されている。一方でDamage-associated molecular patternとしての一面もあり様々な感染症や慢性疾患で血中濃度が顕著に上昇するため疾患の重症度マーカーとしての研究も数多い。本科学研究費ではGal-9にEVに内包された形態が存在していることを示し、その定量方法を開発した。今後様々な疾患の診断、EV内包の分子機序解明およびGal-9抑制薬の開発等において新しい視点を与える重要な研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Human acute monocytic leukemia cell THP1 was shown to secrete Gal-9 encapsulated in exosome-containing extracellular vesicles (EVs) upon PMA stimulation. This Gal-9 was completely encapsulated in EVs and was the L- and M-type splicing variant of Gal-9. An ELISA method for the quantification of EV Gal-9 was developed, and plasma from patients with various diseases was assayed. Since EV Gal-9 was elevated in dengue fever patients during the convalescence period, confirmation by increasing the number of samples is necessary. No differences were observed in AIDS, tuberculosis, and AIDS/tuberculosis, reflecting the severity of the disease.

研究分野：免疫学

キーワード：ガレクチン9 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ガレクチン9 (Gal-9) は免疫調節活性を持つ動物レクチンで場面によって免疫を正・負両方向に調節する。天然の Gal-9 はシグナルペプチドを持たず通常は細胞質に存在するが、未知のメカニズムで分泌されてサイトカインのように振る舞う。Gal-9 の作用はマウスへのリコンビナントタンパク質の投与、およびノックアウトマウスを用いた実験で確認されており、この分野での共通認識となっている。しかし血中で検出される Gal-9 濃度はリコンビナント Gal-9 を用いて発揮される作用より 1000 倍以上低い。この説明として Gal-9 が他の細胞へ影響を与えないようにターゲット細胞に近接・接触した状態で放出 (パラクライン分泌) されることで局所濃度を大きく上昇させ、一方血中には殆ど漏れ出さないと想像した。果たしてこの想像は本当に正しいのだろうか？もしかすると大腸菌で調製したリコンビナント Gal-9 と天然の Gal-9 は活性が異なるのではないかと我々はヒト単球由来白血病細胞 THP1 を PMA 刺激するとエクソソームを含む Extracellular vesicle (EV) に内包された Gal-9 を分泌することを発見した。EV 内の Gal-9 は Triton X-100 処理によって溶出できる。エクソソーム中の Gal-9 を還元剤非存在下でウエスタンブロットすると本来の Gal-9 より大きな分子量域に複数のバンドが検出された。また予備検討においてデング熱患者の血漿を測定したところ EV Gal-9 がデング熱患者の回復期に上昇した。

2. 研究の目的

以下について明らかにすることを目的とする。EV Gal-9 とリコンビナント Gal-9 の活性差。EV 中の Gal-9 のトポロジー。Gal-9 のソーティングメカニズム。EV Gal-9 を分泌する細胞。EV Gal-9 の疾患診断への応用可能性。

3. 研究の方法

大腸菌と動物細胞ではタンパク質の翻訳後修飾等が異なるため活性に違いがある可能性がある。そこでヒト胎児腎臓細胞 HEK293T 細胞で発現した Gal-9 および THP1 細胞を PMA 処理して回収した EV 内 Gal-9 のそれぞれを調製してリセプター結合能を比較する。以前の研究において上咽頭ガン細胞が分泌するエクソソームに Gal-9 が含まれていることを示したがその Gal-9 は C 末ドメインが露出した状態で膜に組み込まれていた。THP1 細胞の EV Gal-9 でのトポロジーを調べるために、Gal-9 の N 末ドメインと C 末ドメインに対する抗体を用いたサンドイッチ ELISA を構築する。それぞれ一方を固相化抗体もう一方を二次抗体として EV Gal-9 と反応させ、どのタイミングで Triton X-100 処理すると Gal-9 を検出できるかを調べる。エクソソームへのソーティングについてはユビキチン様タンパク質のひとつ UBL3 がターゲットとなるタンパク質にジスルフィド結合で結合し輸送タグとして働くという報告がある。エクソソームへの Gal-9 ソーティングに UBL3 が関与しているのか、Gal-9 と UBL3 が結合している可能性を抗 UBL3 抗体で調べる。また UBL3 が発現すると EV Gal-9 の分泌が起こるのかモデル細胞として HEK293T 細胞を用いて調べる。エクソソームへの Gal-9 ソーティングに関与する未知の分子の可能性とその同定には免疫沈降能の高い抗 Gal-9 抗体を用いてエクソソーム中の Gal-9 を精製し、質量分析によって共沈しているタンパク質を同定する。EV Gal-9 は THP1 に特有な現象なのかそれとも Gal-9 を多く含む様々な免疫細胞で見られる一般的な現象なのかを調べるため各種免疫細胞を刺激して培養上清中に EV Gal-9 が放出されるか ELISA で定量する。血漿 Gal-9 測定は様々な感染症や慢性疾患において重症度を反映した変動を示すことが知られている。EV Gal-9 測定は疾患マーカーとしての有用性があるのか。各種疾患の血漿を測定してその重症度等との関係を検討する。

4. 研究成果

図 1 は EV 由来の天然の Gal-9 とリコンビナント Gal-9 の活性比較である。リセプター Tim3 への結合を拮抗阻害するラクトースの濃度 IC50 値で比較するとどれも同等であり、これら Gal-9 間では差はないことが判った。我々はこれまでの Gal-9 研究のほとんど全てにおいて大腸菌由来のリコンビナント Gal-9 を使用してきた。これはあらゆる発現系を試した上で動物への投与実験に必要な量を確保できる唯一の系が大腸菌であったからであるが、動物細胞との翻訳後修飾の違い等から本来の活性との違いについては心配があった。今回の実験により少なくともリセプター結合能においては天然型でもリコンビナント (動物細胞または大腸菌由来) でも同等であることが確かめられた。

上咽頭ガン細胞のエクソソームに含まれる Gal-9 は C 末側ドメインが露出していた。THP1 の場合も同様なことを調べる目的で Gal-9 の N 末と C 末側ドメインに対する二つの抗体を用いたサンドイッチ ELISA を応用した。図 2 に示すように EV における Gal-9 は N 末が露出、C 末が露出、完全内包と完全露出およびそれらが混在している可能性が考えられる。例えば N 末が露出している場合、N 末側ドメインに対する抗体を固相化すれば EV Gal-9 を結合できる。ここに C 末側ドメインに対する抗体を二次抗体として添加しても結合できないが Triton X-100 処理で EV を破壊すると結合できる。このようにして二つの抗体の一方を固相化に他方を二次抗体として用い、各抗体の反応時に Triton X-100 処理が必要かどうかで Gal-9 のトポロジーを検討した。その結果 Gal-9 は EV 中に完全に内包されていた。これは既報の上咽頭ガン細胞のエクソソームに含まれる Gal-9 とは異なる。Gal-9 がチェックポイント因子として認識されて以降、新規ガン免疫療法薬として Gal-9 中和抗体の開発が複数の研究機関で行

われているが、もし完全内包型 Gal-9 が免疫抑制の主体である場合、抗体薬には効果が期待できない。

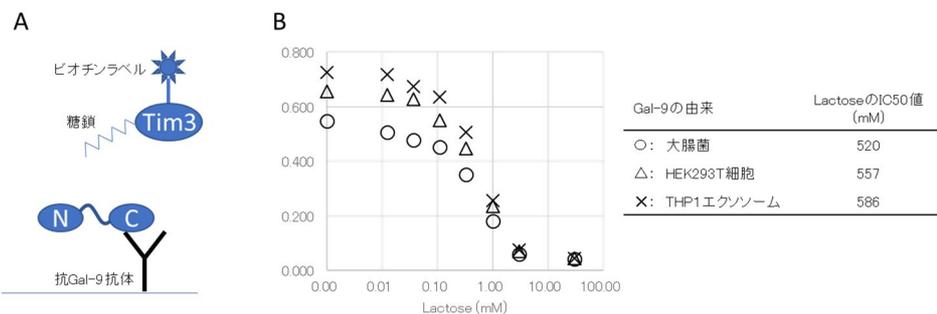


図1 Gal-9 と Tim3 結合アッセイ: (A) アッセイの模式図。Gal-9 を抗体でアッセイプレートに固相化し、ビオチンラベルした Tim-3 との結合を調べる。(B) 様々な Gal-9 の結合と Lactose による阻害効果。Lactose による阻害効果の IC50 値は Graphpad software Prism8 で計算した。

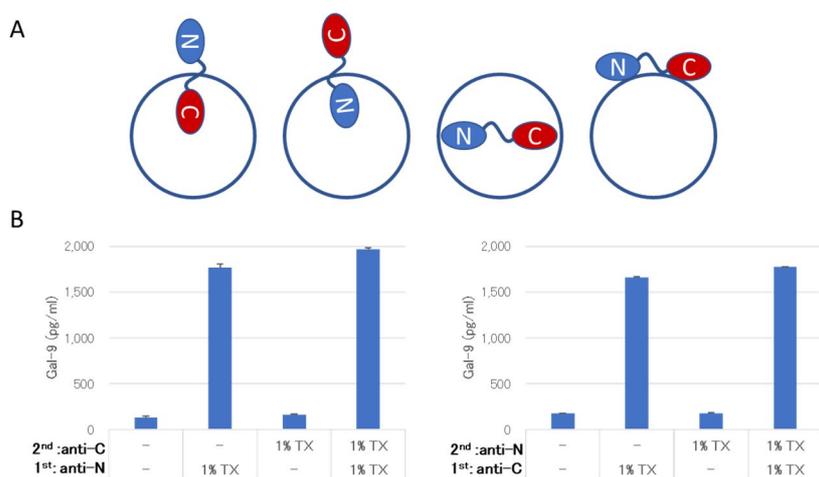


図2 エクソソーム中の Gal-9 トポロジー: (A) エクソソーム中 Gal-9 の4つの可能性。(B) 固相化抗体を抗 N-末にしても、抗 C-末にしてもその際に Triton X-100 が共存しないとシグナルが出ない。Gal-9 はエクソソーム中に完全内包されていることが示唆される。

各種 EV の中でエクソソームの研究が最も進んでおり、最近ユビキチン様タンパク質のひとつ UBL3 がエクソソームへのソーティング因子として働くことが複数の研究機関より発表されている。UBL3 はターゲットタンパク質にジスルフィド結合してエクソソームへの輸送タグとして働く。そこで Gal-9 のソーティングにも同因子が関与しているか調べた。まず THP1 細胞およびエクソソーム画分に UBL3 が検出できるかウエスタンブロッティングで調べたが、市販のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体はシグナルを検出できなかった。次に UBL3 発現プラスミドを Gal-9 発現プラスミドと共に HEK293T 細胞へ導入して EV Gal-9 分泌が起こるか調べた(図3)。UBL3 の共発現を行っても Gal-9 分泌総量も EV Gal-9 の量も上昇しなかった。これらの結果より EV Gal-9 のソーティングにおいて UBL3 の関与は低いと考えられた。

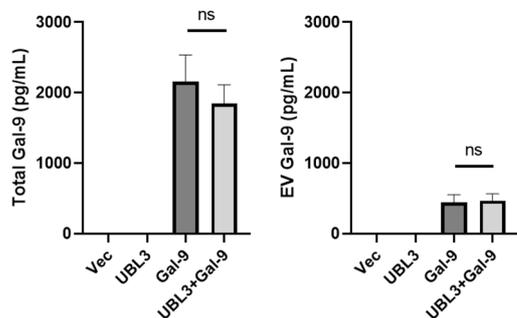


図3 HEK293T 細胞に Gal-9 と UBL3 の発現プラスミドを導入して培養上清中の全 Gal-9 と EV Gal-9 を定量。UBL3 の発現はウエスタンブロットで確認(データ不掲載)。

THP1 エクソソーム中の Gal-9 はジスルフィド結合で何らかの分子と結合して高分子化あり、その分子がエクソソームへのソーティングに関与している可能性が考えられる。候補として検討した UBL3 には可能性は低かったため未知の因子の探索を試みた。まずは高分子 Gal-9 の精製が必要で、これに適した免疫沈澱能力の高い抗体 9S2-3 を見つけ出した。精製したエクソソームを Triton X-100 で破碎し 9S2-3 を共有結合した担体を用いて Gal-9 の免疫沈澱を行うと 90% の Gal-9 が吸着した。ところが担体からの溶出は 8M 尿素を含む 4% SDS を用いても吸着量のわずか 5% しかなかった。この低回収率の理由は不明で解決策が見つからない。この状況では質量分析に供するサンプル調製に大量の試

薬が必要となり経済的に不可能である。分析に必要なタンパク量は質量分析の感度に依存するので、状況を見守りつつ再試行を考えている。EV Gal-9 分泌を高める別の刺激条件が見つければ分泌メカニズム解明に役立つと考えて様々な刺激を検討したところヒドロキシクロロキンが THP1 細胞からの Gal-9 分泌を刺激することが判った。分泌したのは EV Gal-9 ではなく遊離の Gal-9 であったので今回の研究推進には貢献しなかったが興味深い結果である。ヒドロキシクロロキンは全身性エリテマトーデスや関節リウマチに有効な薬であるがその作用メカニズムは十分に解明されていない。我々の研究ではリコンビナント Gal-9 は両疾患の動物モデルで有効性を示したので、ヒドロキシクロロキンの作用メカニズムの少なくとも一部分には Gal-9 分泌促進が関与しているのかもしれない。

近年の研究によるとエクソソームをはじめとする EV 分泌は一般的な細胞活動である。EV Gal-9 の分泌が THP1 細胞以外でも起こるのか様々な免疫細胞を用いて検討した。各細胞での誘導条件は不明なので一般的な細胞活性化刺激として PMA とイオノマイシン(IM)および PMA+IM で刺激して 24 時間毎に 3 日間培養上清をサンプリングした。THP1 細胞においては PMA 刺激が EV Gal-9 分泌には最も効率的で、刺激後 2-3 日で分泌が増加した(図 4)。表 1 は同様の実験をその他の細胞で行った結果である。結果として EV Gal-9 を大量分泌する細胞はこれらの中で THP1 細胞のみであった。例えば HMC1 細胞は THP1 より多くの Gal-9 を分泌するが殆どが遊離の Gal-9 であった。また U937 細胞は細胞内部の Gal-9 量は THP1 細胞と同等であったが分泌は殆ど無かった。これらの結果より EV Gal-9 の研究材料として THP1 細胞が唯一無二の選択だと考えられるが、その一方でこの細胞を用いた研究知見が THP1 細胞特異的で一般化できない危険性を孕む。

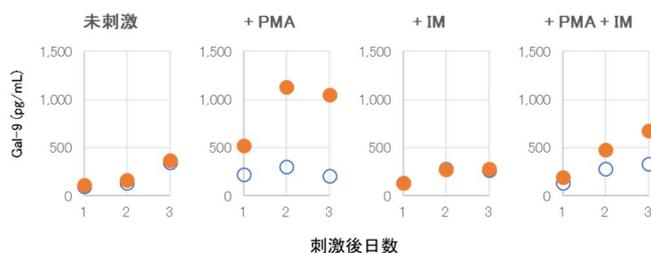


図 4 THP1 からの Gal-9 分泌: それぞれの刺激条件で 1-3 日培養し、上清中の Gal-9 濃度を Triton X-100 存在下(●)と非存在下(○)で測定。両者の差が EV Gal-9 濃度となる。

表 1 各細胞からの Gal-9 分泌: 各刺激 3 日後の結果。顕著な EV Gal-9 産生は THP1 細胞を PMA 刺激したときのみ見られた(赤字)。

細胞	系統	細胞内 pg/mg	分泌(未刺激)		分泌(+PMA)		分泌(+IM)		分泌(+PMA+IM)	
			TX(-)	TX(+)	TX(-)	TX(+)	TX(-)	TX(+)	TX(-)	TX(+)
MT2	T細胞	59	4	9	4	11	2	8	1	4
MT4	T細胞	60	1	3	1	5	0	1	1	1
THP1	単球/マクロファージ	201.465	343	367	208	1,049	266	276	332	674
U937	単球/マクロファージ	147.271	168	199	216	247	226	250	194	224
K562	単芽球	702	0	0	0	2	0	0	1	2
MHC1	マスト細胞	443.864	1,643	1,806	2,124	2,260	2,778	2,900	2,820	2,939
PMDC05	樹状細胞	134.867	293	278	ND	ND	ND	ND	ND	ND

EV Gal-9 分泌は THP1 細胞や上咽頭ガン細胞に限定された現象なのか? 健康人および様々な感染症患者の血漿を Triton X-100 の存在下と非存在下で ELISA 測定したところ多くの検体で EV Gal-9 のシグナルを検出した。EV Gal-9 は特定の細胞が起こす特殊な現象ではなく広く血中に存在する Gal-9 の一形態である。予備検討において EV Gal-9 はデング熱患者の退院時で有意な高値を示した。EV Gal-9 はデング熱からの回復を判断する血液診断マーカーの可能性がある。本研究期間は提携するサン・ラザロウ病院がコロナ対策に追われており追加の検体を得られなかった。そこで既報研究の AIDS、結核、AIDS・結核の患者血漿の残りをを用いた検討とコロナ患者血漿を用いた検討を行った。

過去の AIDS、結核、AIDS・結核研究では血漿 Gal-9 は AIDS 患者の死亡と関連した変化を示し、重症度マーカーとしての有用性が示唆された。また結核、AIDS・結核患者においても健康人と比較して大きな上昇を示しその意味では他の血漿マーカー(38 種類のケモカイン、サイトカイン)よりも優れていたが、これらの患者については死亡と関連した変化は見られなかった(Biomolecules 2020 10:1495)。今回は Triton X-100 存在下と非存在下での Gal-9 測定とそれらより算出される EV Gal-9 および分解産物を含めた全 Gal-9 を測定する Truncated Gal-9 (Tr-Gal-9)測定を行った(図 5、表 2)。EV Gal-9 測定の重症度マーカーとしての性能を期待したが、どの疾患においても重症度を反映した変動は見られず、むしろ AIDS において重症度を反映した Gal-9 測定(+/- Triton X100)や Tr-Gal-9 測定(- Triton X-100)に劣っていた。Receiver operating characteristic (ROC) curve 解析で診断能力を調べたところ Triton X-100 存在下での Gal-9 測定と Tr-Gal-9 測定が同等に優れていた。

我々は本科研費研究の直前に COVID19 患者血漿中の Gal-9 が重症度を反映することを発表した(Int. J. Mol. Sci. 2021 22:4978)。その研究では活性のある全長型の Gal-9 と分解産物も含めた全 Gal-

9 (Tr-Gal-9) の測定を行ったところ、Tr-Gal-9 測定の方が重症度をより反映した。本研究ではこれに加えて EV Gal-9 も測定する計画であったが、SARS-CoV2 の失活に 1% 以上の Triton X-100 を用いることが一般化し、EV を壊さない失活方法を用いることが難しくなった。そこで EV Gal-9 測定の代わりに全長 Gal-9、Tr-Gal-9 および両者の差から算出される分解型 Gal-9 の 3 種をそれぞれを定量した。どの Gal-9 も重症度に関連した上昇をしめしたが、分解型が最も高い診断能を示した。また分解型 Gal-9 測定はトリシズマブの効果を反映しており、治療の有効性を判断するサロゲートマーカーとしての有用性も示唆された (Int. J. Mol. Sci. 2023 24:3591)。

Gal-9 は二つの糖鎖結合部位がリンカーで結合された構造をもち、リンカー部分が様々なタンパク質分解酵素で切断されて容易に失活する。当初は活性のある全長型の Gal-9 測定が重要と考えたが、活性は無くともある程度安定な分解型 Gal-9 や分解型も含めた全ての Gal-9 測定が疾患によっては診断に有用かもしれない。Gal-9 は炎症刺激や炎症による組織破壊によって放出され血中濃度が上昇するが、多くの炎症ではタンパク質分解も促進する。よって分解型 Gal-9 は疾患における Gal-9 製造と分解の複雑なバランスの産物であり、COVID19 で見られたように疾患によってはより良い重症度マーカーとなるのかも知れない。我々は Gal-9 測定において全長型、分解型を含めた全て、および EV Gal-9 測定法を開発した。これらの測定を様々な患者血漿で試みることに有用性検討のため必要である。

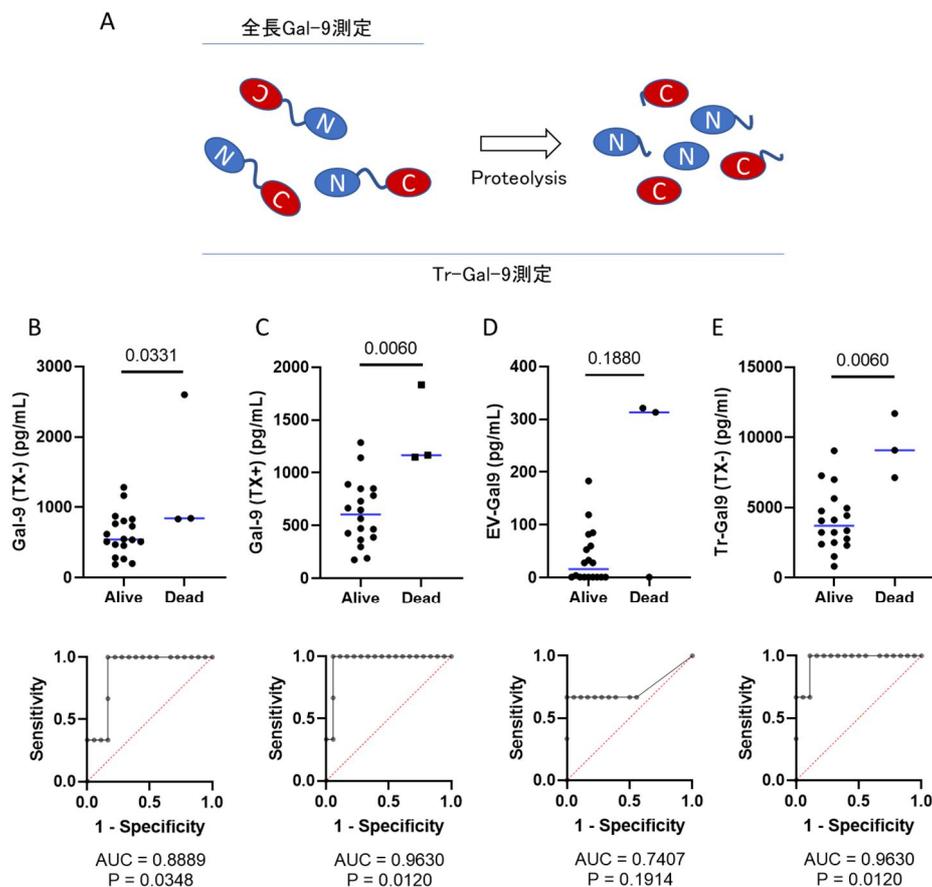


図5 AIDS、結核、AIDS・結核患者血漿での Gal-9 測定：(A) 全長 Gal-9 測定と Tr-Gal-9 測定で検出される Gal-9 分子。(B-E) AIDS 患者を登録後 12 週間以内に死亡した群と生存群に分け Mann-Whitney U テストで有意差検定を行う。Triton X-100 非存在下(B)、存在下(C)、EV Gal-9 (D)および Tr-Gal-9 (E)のそれぞれの測定結果と、Receiver operating characteristic (ROC) curve 解析の結果。EV Gal-9 測定のみ有意差が見られなかった。

疾患	測定	生存 (Median)	死亡 (Median)	P値
AIDS	Gal-9 (-TX)	544	844	0.0331
生存/死亡:	Gal-9 (+TX)	607	1165	0.0060
18/3	EV Gal-9	16	313	0.1880
	Tr-Gal-9	3709	9076	0.0060
結核	Gal-9 (-TX)	309	260	0.2534
生存/死亡:	Gal-9 (+TX)	323	301	0.5420
39/6	EV Gal-9	16	47	0.1379
	Tr-Gal-9	1612	2932	0.1058
AIDS・結核	Gal-9 (-TX)	677	637	0.6587
生存/死亡:	Gal-9 (+TX)	638	657	0.9498
21/5	EV Gal-9	1	18	0.6212
	Tr-Gal-9	3654	3178	0.8913

表 2 AIDS、結核、AIDS・結核患者血漿の Gal-9 測定。Mann-Whitney U テストで P<0.05 の測定を赤字にしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Iwasaki-Hozumi Hiroko, Maeda Yosuke, Niki Toshiro, Chagan-Yasutan Haorile, Bai Gaowa, Matsuba Takashi, Furushima Daisuke, Ashino Yugo, Hattori Toshio	4. 巻 24
2. 論文標題 Plasma N-Cleaved Galectin-9 Is a Surrogate Marker for Determining the Severity of COVID-19 and Monitoring the Therapeutic Effects of Tocilizumab	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3591 ~ 3591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Du Li, Bouzidi Mohamed S, Gala Akshay, Deiter Fred, Billaud Jean-Noel, Yeung Stephen T, Dabral Prerna, Jin Jing, Simmons Graham, Dossani Zain Y, Niki Toshiro, Ndhlovu Lishomwa C, Greenland John R, Pillai Satish K	4. 巻
2. 論文標題 Human galectin-9 potently enhances SARS-CoV-2 replication and inflammation in airway epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Cell Biology	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmcb/mjad030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yeung Stephen T., Premaux Thomas A., Du Li, Niki Toshiro, Pillai Satish K., Khanna Kamal M., Ndhlovu Lishomwa C.	4. 巻 13
2. 論文標題 Galectin-9 protects humanized-ACE2 immunocompetent mice from SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1011185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.1011185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Choukrani Ghizlane, Visser Nienke, Ustyanovska Avtenyuk Natasha, Olthuis Mirjam, Marsman Glenn, Ammatuna Emanuele, Lourens Harm Jan, Niki Toshiro, Huls Gerwin, Bremer Edwin, Wiersma Valerie R.	4. 巻 9
2. 論文標題 Galectin-9 has non-apoptotic cytotoxic activity toward acute myeloid leukemia independent of cytarabine resistance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-023-01515-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tran Bao-Tram Thi, Gelin Aurore, Durand Sylvère, Texier Matthieu, Daste Amaury, Toullec Clemence, Benihoud Karim, Breuskin Ingrid, Gorphe Philippe, Garic Florence, Brenner Catherine, Le Tourneau Christophe, Fayette Jerome, Niki Toshiro, David Muriel, Busson Pierre, Even Caroline	4. 巻 12
2. 論文標題 Plasma galectins and metabolites in advanced head and neck carcinomas: evidence of distinct immune characteristics linked to hypopharyngeal tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 2150472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2022.2150472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------