

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591438

研究課題名(和文) インターロイキン17産生ヘルパーT細胞への分化に伴う細胞表面糖鎖構造の変化

研究課題名(英文) The alteration of sugar chain profiling during the differentiation into IL-17-producing helper T cells

研究代表者

大水 総一(OOMIZU, Souichi)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：00444729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性炎症の成因の一つにTh17細胞の機能増進がある。ガラクトシド結合性動物レクチンであるガレクチン9はナイーブヘルパーT細胞からTh17細胞への分化を抑制する。その機構として、ガレクチン9は比較的特異的なO-結合型蛋白質に結合して抑制作用を発揮することが明らかとなった。さらにガレクチン9を表出するヘルパーT細胞がガレクチン9を高分泌しTh17細胞への分化抑制に関与していることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that the activation of Th17 cells is one of the genesis of autoimmune inflammation. Galectin-9, which is a B-galactoside binding animal lectin inhibits the differentiation of Th17 cells from naive helper T cells. The inhibitory effect of galectin-9 on Th17 differentiation is exerted by binding to the O-linked protein that is relatively specific. Furthermore helper T cells that express galectin-9 on the surface highly secrete galectin 9, and inhibit the differentiation Th17 cells.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：ガレクチン9 Th17細胞 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性炎症の成因の一つが、Th17 細胞の機能増進であることが以下のように報告されていた。

昭和大学の須田らのグループにより、リウマチ性疾患患者の関節液中 IL-17 濃度が高値であることが報告された。

東京大学医科学研究所の岩倉らのグループにより、自己免疫性疾患モデルである、コラーゲン誘導性関節炎モデルや実験的自己免疫性脳脊髄炎において、IL-17 欠損マウスで症状が抑制されることが報告された。

米国 Harvard Medical School の Kuchroo らのグループにより、ナイーブ Th 細胞に抗原および IL-6 と形質転換増殖因子 1(TGF-1)を作用させると、IL-17 を大量に分泌する Th 細胞、いわゆる Th17 細胞へ機能分化することが明らかとなった。

以上、Th17 細胞の分化制御機構を明らかにすることが、自己免疫性疾患の成因を解明する手掛かりとなる。しかし、レクチンと糖鎖の相互作用という観点から Th17 細胞分化制御についての解析は行われていなかった。

一方、申請者らのグループが発見したガラクトシド結合性レクチンであるガレクチン 9 は、コラーゲン誘導性関節炎モデルに対して発症予防効果及び治療効果を示した。さらに、ガレクチン 9 はナイーブヘルパー T 細胞から、Th17 細胞への分化を抑制する。これまでの検討から、ナイーブヘルパー T 細胞から、Th17 細胞への分化誘導 18 から 24 時間後から現れたガレクチン 9 リガンド (糖鎖) とガレクチン 9 の結合により分化が抑制されることが明らかとなった。この際、既存の糖鎖が何らかの修飾を受けた結果ガレクチン 9 リガンドとなる場合と、新たに合成された糖鎖がガレクチン 9 リガンドとなる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ガレクチン 9 による Th17 細胞の分化抑制機構を解明する目的で、以下の問題点を解決する。

(1) ガレクチン 9 による Th17 細胞の分化抑制に關与する機構、および糖鎖の種類を同定する。

(2) 細胞膜表面糖鎖プロファイリング法を開発する。さらにこの方法を用いて糖鎖構造が変化した細胞の同定を試みる。

3. 研究の方法

ガレクチン 9 による Th17 細胞の分化抑制に關与する糖鎖の種類を同定する。

糖タンパク質に対する糖鎖の結合様式には、N 結合と O 結合の 2 種類がある。そこナイーブヘルパー T 細胞から、Th17 細胞への分化誘導する細胞培養系に、N 結合型糖鎖付加阻害剤 (Swainsonine) または O 結合型糖鎖付加阻害剤 (Benzyl-N-acetyl-galactosaminide) を添加することによりガ

レクチン 9 による分化阻害作用に対する影響を検討した。

ナイーブヘルパー T 細胞から、Th17 細胞へのガレクチン 9 による分化抑制の際、既存の糖鎖が何らかの修飾を受けた結果ガレクチン 9 リガンドとなる場合も考えられる。ほ乳類の場合、ガラクトシドの末端にシアル酸が結合している。シアル酸が結合したガラクトシドの場合、ガレクチン 9 はほとんど結合しない。最近の報告で細胞膜表面にノイラミニダーゼと呼ばれるシアル酸解離酵素が存在することが報告されているため、Th17 細胞への分化に伴いシアル酸が解離しガレクチン 9 結合性の高いリガンドとなることが考えられた。そこで該当年度ではまず、糖鎖末端のシアル酸に対して結合能をもつレクチンである、SNA を蛍光色素でラベルしフローサイトメトリーにより、Th17 細胞への分化に伴いシアル酸が解離しているかどうかを検討した。

単一細胞レベルでの細胞表面糖鎖のプロファイリング法による Th17 細胞分化過程での細胞表面の糖鎖構造変化の解析。

Th17 細胞へ分化しつつある細胞を単一細胞レベルで糖鎖プロファイリングをするため、糖鎖結合性の異なるレクチン (DBA, PNA, RCA120, SBA, UEA1, WGA1, GSL1, LCA, PHA-E, PHA-L, PSA, sWGA) を蛍光色素でラベルし、細胞と結合させた後、フローサイトメトリーを用いて単一細胞あたりの糖鎖構成の変化を解析する。

4. 研究成果

ガレクチン 9 による Th17 細胞の分化抑制に關与する糖鎖の種類を同定

培養液中に O 結合型糖鎖付加阻害剤を添加した場合、ガレクチン 9 による Th17 細胞分化阻害が部分的に抑制された。しかしながら、N 結合型糖鎖付加阻害剤を添加した場合、ガレクチン 9 による Th17 細胞分化阻害に影響はみられなかった。これらの結果から、ある新規に合成される O 結合型糖タンパク質とガレクチン 9 の結合により Th17 細胞への分化が阻害されることが示された。しかしながら、この作用が部分的なものであったことから、他の経路の存在、つまり既存の糖鎖が何らかの修飾を受けた結果ガレクチン 9 リガンドとなる可能性も浮上してきた。この成果は、「Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner.」という論文の一部データとして使用され、Clinical Immunology 誌に掲載された。

次に、Th17 細胞への分化に伴いシアル酸が解離しているかどうかを検討したところ、これは細胞表面全体のシアル酸解離状態に変化は見られなかった。一方、細胞表面の全体的な糖鎖のシアル酸解離ではなく、特異的な糖鎖に対するシアル酸解離がガレクチン 9

の作用を誘導することも考えられるため、ノイラミニダーゼの阻害剤を培養液に添加して Th17 細胞への分化に対する影響を調べたところ、シアル酸の遊離を阻害しても Th17 細胞への分化に対して影響を与えなかった。これらの結果から Th17 細胞への分化にはシアル酸の遊離は影響を与えないことが明らかとなった。

単一細胞レベルでの細胞表面糖鎖のプロファイリング法による Th17 細胞分化過程での細胞表面の糖鎖構造変化の解析。

予備検討の段階で、レクチンは糖鎖に対する特異性が非常に低く、例えば一般にシアル酸に結合するといわれているレクチンである SNA と ガラクトシドに結合するガレクチン 9 を同時に染色し、フローサイトメトリーで解析したところ、その量比の違いにより染色性が異なった。つまりこれらのレクチンがお互いに同じ糖鎖も認識していることがわかり、マルチプルな解析にレクチンは不向きであることが明らかとなった。そこでサンプルに様々な種類のレクチンを単独で使用し、フローサイトメトリーにより、Th17 細胞への分化に伴いそのレクチンの結合性が変化しているかどうかを検討した。その結果、すべてのレクチンによる染色で Th17 細胞への分化を誘導した細胞とそうでない細胞との間で染色性に変化が見られなかった。この結果から Th17 細胞への分化に伴う糖鎖構造の変化は、細胞全体の糖鎖の分布が変化するのではなく、非常に少ない糖鎖構造の変化が起こっていることが考えられ、ガレクチン 9 は比較的特異的な分子に結合することにより Th17 分化抑制の作用を発揮することも予想された。

ガレクチン 9 による Th17 細胞の分化抑制に関与する機構

この研究過程で、フローサイトメトリーにより細胞表面にガレクチン 9 を表出する Th 細胞を測定したところ、Th 細胞の一部の細胞のみがガレクチン 9 を表出することが明らかとなり、その細胞を単離しその特徴を調べたところ、ガレクチン 9 表出 Th 細胞は他の Th 細胞に比べ非常にガレクチン 9 の分泌量が高いことが明らかになった。また Th17 分化誘導の際にこれらの細胞の増加が抑制された。その結果内因性のガレクチン 9 の分泌が抑制され、Th17 への分化が促進されるということが考えられた。このような内因性のガレクチン 9 分泌機構により Th17 への分化が調節されていることが示された。この結果は「Cell Surface Galectin-9 Expressing Th Cells Regulate Th17 and Foxp3+ Treg Development by Galectin-9 Secretion.」という論文の一部データとして使用され、PLoS ONE 誌に掲載された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

Galectin-9 Attenuates Acute Lung Injury by Expanding CD14⁺ Plasmacytoid Dendritic Cell-Like Macrophages.

K. Kojima, T. Arikawa, N. Saita, E. Goto, S. Tsumura, R. Tanaka, A. Masunaga, T. Niki, S. Oomizu, M. Hirashima, H. Kohrogi

American journal of respiratory and critical care medicine 184(3): 328-39, 2011

doi: 10.1164/rccm.201010-15660C.

Galectin-9 signaling prolongs survival in murine lung-cancer by inducing macrophages to differentiate into plasmacytoid dendritic cell-like macrophages.

T. Kadowaki, T. Arikawa, R. Shinonaga, S. Oomizu, H. Inagawa, G. Soma, T. Niki, M. Hirashima

Clinical Immunology 42(3): 296-307, 2012
doi: 10.1016/j.clim.2011.11.006.

Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner.

S. Oomizu, T. Arikawa, T. Niki, T. Kadowaki, M. Ueno, N. Nishi, A. Yamauchi, M. Hirashima

Clinical Immunology 43(1): 51-8, 2012
doi: 10.1016/j.clim.2012.01.004.

Possible regulatory role of galectin-9 on Ascaris suum-induced eosinophilic lung inflammation in mice.

S. Katoh, S. Oomizu, T. Niki, H. Shimizu, Y. Obase, M. Korenga, M. Oka, M. Hirashima
International Archives of Allergy and

Immunology 158(Suppl. 1): 58-65, 2012
doi: 10.1159/000337769.

Cell Surface Galectin-9 Expressing Th
Cells Regulate Th17 and Foxp3+ Treg
Development by Galectin-9 Secretion.

S. Oomizu, T. Arikawa, T. Niki, T.
Kadowaki¹, M. Ueno, N. Nishi, A. Yamauchi,
T. Hattori, T. Masaki, M. Hirashima
PLoS ONE 7(11): e48574.
doi: 10.1371/journal.pone.0048574.

Self-association of the galectin-9
C-terminal domain via the opposite surface
of the sugar binding site.

Y. Nonaka, T. Ogawa, S. Oomizu, S. Nakakita,
N. Nishi, S. Kamitori, M. Hirashima, T.
Nakamura

Journal of Biochemistry 153(5):463-71
doi: 10.1093/jb/mvt009.

〔学会発表〕(計 2件)

Critical role of galectin-9 but not
IL-10 from Type1 regulatory T cells to
regulate T helper 17 cell development.
S. Oomizu, T. Arikawa, T. Niki, K. Kadowaki,
N. Nishi, A. Yamauchi, M. Hirashima
第40回日本免疫学会、千葉 2011年11月

Galectin-9 switches monocyte
differentiation to plasmacytoid dendritic
cell-like macrophages to prolong the
survival of lung cancer-bearing mice.

K. Kadowaki, T. Arikawa, S. Oomizu, H.
Inagawa, M. Hirashima
第40回日本免疫学会、千葉 2011年11月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: ガレクチン9を分泌する細胞、その製

造方法及びその用途

発明者: 有川智広、平島光臣、門脇健、仁木
敏朗、大水総一

権利者: 株式会社ガルファーマ

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/078623

出願年月日: 2011年12月9日

国内外の別: 国内・国外

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大水 総一 (OOMIZU, Souichi)

香川大学・医学部・助教

研究者番号: 00444729

(2) 研究分担者

平島 光臣 (HIRASHIMA, Mitsuomi)

香川大学・医学部・教授

研究者番号: 70109700

(3) 連携研究者

仁木 敏朗 (NIKI, Toshiro)

香川大学・医学部・助教

研究者番号: 40558508