

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592423

研究課題名(和文)胎盤形成におけるガレクチンファミリーの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of the roles of Galectins during placentation

研究代表者

東海林 博樹 (SHOJI, Hiroki)

金沢医科大学・一般教育機構・准教授

研究者番号：10263873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ガレクチンはガラクトシドを認識する動物レクチンファミリーであり、哺乳類では19のメンバーが知られている(種によりメンバーに違いがある)。本研究では、胎盤組織形成の分子機構について、ガレクチン機能を中心に解明することを目的とした。ラット胎盤由来栄養膜細胞株Rcho-1細胞分化系を中心に、栄養膜細胞分化におけるガレクチン機能の分子機構を解析した。その結果、未分化Rcho-1細胞で発現しているガレクチン4の発現が抑制されることが分化制御に重要である可能性が示され、ガレクチンファミリーによる胎盤栄養膜細胞分化制御機構の一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Galectins comprise a family of animal lectin that bind to beta-galactoside-containing carbohydrates. In this study, we aimed to clarify the roles of galectins during placentation. A analysis of functions of galectins during the differentiation process of rat trophoblast cell line (Rcho-1 cell) revealed that down regulation of Galectin 4 expression may be involved in the promotion of trophoblast cell differentiation. The findings of current study contribute to the understanding of the regulatory mechanisms of placentation by members of galectin family.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ガレクチン 胎盤 妊娠 栄養膜細胞 invasive trophoblast 浸潤

1. 研究開始当初の背景

ガレクチンはガラクトシドを認識する動物レクチンファミリーであり、哺乳類では19のメンバーが知られている(種によりメンバーに違いがある)。その機能は発生・分化の制御、免疫調節、腫瘍形成など多岐におよぶとされる。

胎盤には多種のガレクチンタンパク質が比較的大量に含まれることが古くから知られ、また最近では、胎盤特異的に発現する新規ガレクチン遺伝子も同定されている。さらに、2007年にBloisらは、ガレクチン1が胎盤の免疫寛容の成立に重要であることを示した。ガレクチン1ノックアウトマウスでは、野性型に比べて子宮内で死亡吸収されてしまう胎児が有意に多いのである。一方同じく2007年、Daltonらはヒト絨毛癌由来栄養膜細胞株(Rcho-1細胞)の栄養膜合体体への分化過程において、ガレクチン3が重要な役割を果たす可能性を指摘した。これらのことから、ガレクチンファミリーは胎盤の免疫寛容に寄与する一方、胎盤組織形成にも一役買っている可能性があるが、そのメカニズムは不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、胎盤組織形成の分子機構について、ガレクチン機能を中心に解明することを目的とする。十数種のガレクチン分子種のうち、特に胎盤組織形成に重要な分子種を明らかにする。ラット胎盤由来栄養膜細胞株 Rcho-1 細胞分化系を中心に、栄養膜細胞分化におけるガレクチン機能の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイおよび RT-PCR 法により Rcho-1 細胞の分化前後、およびその他の培養細胞や組織等におけるガレクチン遺伝子発現を比較する。

(2) 免疫組織化学法およびウェスタンブロット法により Rcho-1 細胞やラット胎盤組織等におけるガレクチンタンパク質の分布を解析する。

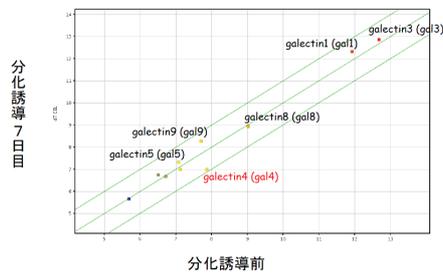
(3) Rcho-1 細胞にガレクチン発現プラスミドを導入し、強制発現の効果を用いて解析する。

4. 研究成果

ラット胎盤由来栄養膜細胞株 Rcho-1 細胞の分化過程における各種ガレクチン遺伝子の発現変化を解析した。DNA マイクロアレイによる解析の結果、ガレクチン1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12の発現が認められ、このうちガレクチン4については、分化に伴い発現が抑制されることが判明した(図1)。RT-PCR 法によりさらなる解析を行ったところ、ガレクチン4は分化誘導開始後24時間以内の比較的早い段階で発現が抑制され

【図1】

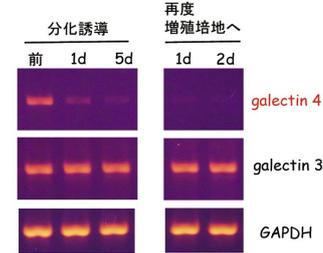
Rcho-1 細胞分化前後における各種ガレクチン mRNA の発現 -DNA micro array-



ていた。この分化誘導は、増殖用の培地から低栄養培地への交換により行うが、再度増殖用培地に戻してもガレクチン4の発現は復帰しないこと(図2)、またガレクチン4を高発現する別の細胞株(結腸がん由来)で同じ処理を行っても、発現レベルに影響が認められないことなどから、栄養膜細胞の分化に伴う現象であることが示唆された。

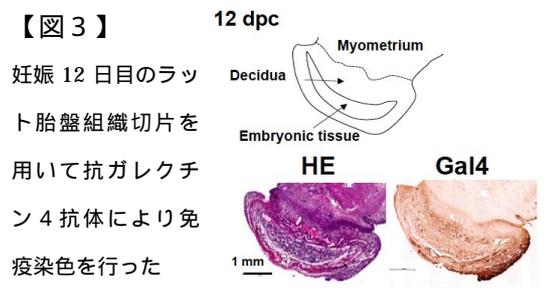
【図2】

Rcho-1 細胞分化誘導直後に galectin 4 mRNA の発現が低下する



さらに、ガレクチン4タンパク質について、ラット胎盤における分布を解析したところ、母体脱落膜や、脱落膜と接する胎児組織など、母胎間の境界領域に検出された(図3)。これらのことから、ガレクチン4が胎盤形成における栄養膜細胞の分化制御に関わる可能性が示された。

【図3】



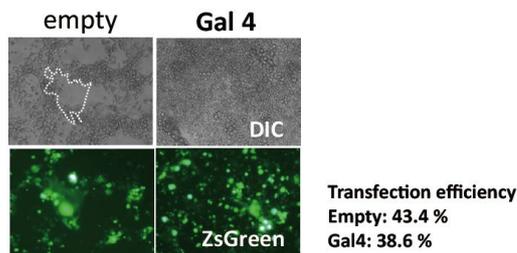
また、Rcho-1 は浸潤性の栄養膜巨細胞や合体栄養膜細胞に分化するとされるが、当研究室での分化状態について DNA マイクロアレイの結果を精査したところ、浸潤性の栄養膜巨細胞への分化がより顕著であった。そこで栄養膜細胞の浸潤性細胞への分化と、ガレクチン4の関わりに着目して解析を進めた。まず、浸潤性細胞よりも合体体への分化傾向が強いとされるマウス栄養膜幹細胞

(trophoblast stem cell: TS 細胞)におけるガレクチン 4 の発現について解析したところ、分化にともなう発現レベルに変化は認められなかった。この結果はガレクチン 4 の発現抑制が、浸潤性細胞への分化機構と関わりが深いことを示唆するものである。そこで次に、Rcho-1 細胞にガレクチン 4 を強制発現させ、分化誘導後もガレクチン 4 発現が維持される状態にしたときの影響を解析した。その結果、通常 Rcho-1 分化系では分化とともに大型細胞が増加するが、ガレクチン 4 強制発現系ではこれが抑制傾向にあることが分かった。すなわち、コントロールと比較して、分化誘導後も小型の細胞が多かったのである(図 4)。さらに強制発現の効果について、タイムラプス動画により詳細に解析したところ、細胞の運動性が抑制傾向にあることが観察された。栄養膜細胞の浸潤性細胞への分化が EMT (上皮間葉移行) 様の現象であることを考え合わせると、ガレクチン 4 の強制発現がこれを抑制していると考えられた。

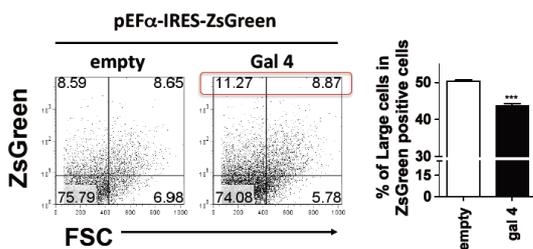
【図 4】ガレクチン 4 強制発現実験

Rcho-1 細胞にガレクチン 4 発現プラスミドを導入すると、対象に比べて大型化する細胞が減少した。

(A) 細胞の形態を示す



(B) フローサイトメーターによる解析結果



以上の結果から、Rcho-1 細胞が未分化状態で発現しているガレクチン 4 が、減少あるいは消失することが、浸潤性の栄養膜巨細胞への分化機構に重要であることが示唆された。

一方、Rcho-1 細胞におけるガレクチン 4 タンパク質の発現を詳細に解析したところ、従来知られているタンパク質よりも分子量が小さい新規 isoform の存在が示唆された。さらにヒト胎盤組織やヒト胎盤由来栄養膜細胞株 JEG3 細胞におけるガレクチン 4 mRNA の発現を解析すると、スプライシング isoform

が見つかり、Rcho-1 細胞に見つかった isoform と関連する分子である可能性が示唆された。よって、胎盤栄養膜細胞の分化制御にはガレクチン 4 新規 isoform が重要である可能性が高い。

本研究により、ガレクチンファミリーによる胎盤栄養膜細胞分化制御機構の一端が明らかとなった。また、従来から注目されているガレクチン 13(妊娠高血圧症候群発症リスクマーカーとして期待されている)に加えて、ガレクチン 4 も臨床応用に向けた研究開発への発展が期待できる。

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)

1. T cells control innate hyperinflammation in LPS endotoxemia by downregulating macrophage TNF production via IRAK-1-mediated IL-10 expression. Inoue M, Arikawa T, Chen YH, Moriwaki Y, Price M, Brown M, Perfect JR, Shinohara ML. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, Apr 8;111(14):5295-300. (査読有)

2. Significance of sugar chain recognition by galectins and its involvement in disease-associated glycosylation. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nakamura T, Hata T, and Shoji H. Congenital Anomalies, 2014, 54(2):77-81. (査読有)

3. Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner. Oomizu S, Arikawa T, Niki T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, Yamauchi A, and Hirashima M. Clinical Immunology. 2012 Apr;143(1):51-8. (査読有)

4. Galectin-9 signaling prolongs survival in murine lung-cancer by inducing macrophages to differentiate into plasmacytoid dendritic cell-like macrophages. Kadowaki T, Arikawa T, Shinonaga R, Oomizu S, Inagawa H, Soma G, Niki T, Hirashima M. Clinical Immunology, 2012 Mar 142(3):296-307. (査読有)

5. Expression pattern of Galectin 4 in rat placentation. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nishi N, Tatsuno T, Ishigaki Y, Tomosugi naohisa, Yamahiro C, Hata T, Takegami T, Nakamura T, Mogami H, Yamaguchi K, Otani H, Hata T, and Shoji

H. Placenta (Short Communication). 2012 Oct;33(10):885-7. (査読有)

6. Effects of melanocortins on fetal development. Simamura E, Shimada H, Shoji H, Otani H, Hatta T. *Congenital Anomalies*, 2011 Jun;51(2):47-54.

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 森尾佳苗、有川智博、島村英理子、島田ひろき、八田稔久、東海林博樹. Role of autophagy in rat trophoblast differentiation. 日本分子生物学会. 2013年12月5日. 神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

2. 小川崇、東海林博樹、野中康宏、館野浩章、平林淳、西望、中村隆範. ツメガエル消化管およびヒト大腸がん細胞におけるガレクチン-4の発現及び機能解析. 第86回日本生化学会大会、2013年9月12日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

3. 仲島百合子、島村英理子、島田ひろき、有川智博、東海林博樹、増田浩子、大谷浩、八田稔久.メラノコルチンによるヒト赤芽球の分化調節機構. 第53回日本先天異常学会学術集会. 2013年7月21日-23日.大阪千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

4. 島田ひろき、島村英理子、東海林博樹、有川智博、東伸明、八田稔久. Leukemia inhibitory factor は insulin-like growth factor を介して Fibroblast growth factor 2 の神経幹/前駆細胞の増殖作用を増強する. 第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学会大会、第23回日本神経回路学会大会合同大会. 2013年6月22日. 国立京都国際会館(京都府京都市)

5. 小川崇、東海林博樹、野中康宏、館野浩章、平林淳、西望、中村隆範. ツメガエル消化管およびヒト大腸がん細胞におけるガレクチン-4の発現及び機能解析. 第85回日本生化学会大会、2012年12月16日. マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

6. 島村英理子、島田ひろき、有川智博、東海林博樹、大谷浩、八田稔久.メラノコルチンレセプター-1, 2, 5伝達シグナルによる赤芽球の分化制御. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月19-21日. 国立京都国際会館(京都府京都市)

7. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Hatta T, Shoji H. Analysis of the Galectin 4 expression during trophoblast differentiation in rat placentation. 第18回 国際胎盤学会. 2012年9月18-21日.

広島国際会議場(広島県広島市)

8. 有川智博、島村英理子、島田ひろき、八田稔久、東海林博樹. ガレクチンによる制御を介した胎盤形成・維持機構の解析. 第52回日本先天異常学会学術集会. 2012年7月6日-8日. 東京女子医科大学弥生記念講堂(東京都新宿区)

9. T.Hatta, H.Shimada, E.Simamura, H.Shoji, N.Higashi: Leukemia inhibitory factor induces expression of insulin-like growth factor 1 and 2 in the forebrain of rat fetuses via maternal-fetal leukemia inhibitory factor signal pathway, Society for Neuroscience 2011, (Washington, '11.11).

10. E.Simamura, H.Shimada, H.Shoji, H.Otani, T.Hatta: Maternal-placental-fetal leukemia inhibitory factor signal pathway contributes stage-specific differentiation from fetal neural stem/progenitor cells to astrocytes, Society for Neuroscience 2011, (Washington, '11.11).

11. 小川崇、東海林博樹、野中康宏、館野浩章、平林淳、西望、中村隆範. アフリカツメガエル消化管におけるガレクチンファミリーの発現解析. 第84回日本生化学会大会、2011年9月23日. 国立京都国際会館(京都府京都市)

12. H.Shimada, E.Simamura, H.Shoji, N.Higashi, T.Hatta: LIF induced elevation of insulin-like growth factor 1 in fetal forebrain via maternal-fetal LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway, The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2011.09.15 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

13. 島村英理子、島田ひろき、東海林博樹、大谷浩、八田稔久: ラット母獣 LIF 投与は母胎間 LIF-ACTH-LIF シグナルリレーを介して胎児脳におけるアストロサイト様細胞の分化を促進する, 第34回日本神経科学大会, 2011年9月15日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

14. 東海林博樹、島村英理子、石垣靖人、西望、中村隆範、島田ひろき、八田稔久: ラット胎盤由来細胞株 Rcho-1 におけるガレクチンファミリーの発現, 第51回日本先天異常学会学術集会, 2011年7月23日. 砂防会館別館(東京都千代田区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

東海林 博樹 (SHOJI, Hiroki)
金沢医科大学・一般教育機構・准教授
研究者番号：10263873

(2)研究分担者

有川 智博 (ARIKAWA, Tomohiro)
金沢医科大学・一般教育機構・講師
研究者番号：70452670

(3)連携研究者

島村 英理子 (SIMAMURA, Eriko)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：00267741