

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463010

研究課題名(和文) ガレクチン-1を介した新規ストレス応答反応の解明と抗ストレス治療への臨床展開

研究課題名(英文) Studies on the novel stress response through galectin -1

研究代表者

門屋 利彦 (Kadoya, Toshihiko)

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：40551875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：拘束ストレス負荷後のラット脾臓、胸腺と膵臓でガレクチン-1 (Gal-1) タンパク質含量の増加は認められたが、mRNA含量の増加は認められなかった。免疫組織化学分析の結果、脾臓では白脾髄に、胸腺では髄質にGal-1陽性細胞が認められ、ストレス負荷後に染色強度が増加した。また、CD45とGal-1は共局在していた。Gal-1が脾臓および胸腺のCD45+リンパ球細胞へ結合し、何らかの免疫応答反応を惹起していると考えられた。膵臓では小葉間毛細血管の平滑筋細胞と繊維芽細胞が染色された。染色強度がストレス負荷後に増強したことから、ストレス負荷時の膵臓での応答反応へのGal-1の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that restraint stress markedly and rapidly induces the blood level of Galectin-1 (Gal-1). In this study, we revealed that Gal-1 levels in the spleen and thymus increased after the restraint stress. Immunohistochemical analysis showed that immunoreactivity for Gal-1 was detected in the periarterial lymphatic sheath (PALS) of the spleen and in the medulla of the thymus and the staining intensity increased after restraint stress. The Gal-1 co-localized with CD45+ lymphocytes in the PALS and the medulla. These results suggested that stress-induced Gal-1 in blood may modulate the immune response through apoptosis by binding to CD45+ lymphocytes. Furthermore, Gal-1 levels in the pancreas also increased after the restraint stress and the immunoreactive cells were corresponded to fibroblasts and smooth muscle cells of blood capillary located pancreatic interlobullus. Gal-1 may participate in one of pancreatic responses against stress.

研究分野：生化学

キーワード：拘束ストレス ガレクチン-1 脾臓 胸腺 すい臓

## 1. 研究開始当初の背景

ストレス刺激によって生体は様々な応答反応を示し、精神障害や胃潰瘍などの疾患に至る例も知られている。歯科領域においても、歯周病をはじめとする顎口腔領域における種々の疾患に関与するとされるブラキシズムの原因のひとつとしてストレスが挙げられている。

ストレスに対する生体応答の反応メカニズムの詳細を明らかにすることは、ストレス状態を客観的かつ簡便に評価する方法や抗ストレス薬の開発などの臨床応用へとつながる。神奈川歯科大学の笹栗、佐藤らは拘束ストレス負荷モデルラットの脳内 NO レベルが上昇すること、そしてその反応が biting (木片などを噛ませる) させることによって緩和されることを示した (Miyake ら、Redox Report, 2008; 1: 31-39)。また、申請者らとの共同研究で、同モデルを用いた評価において、ストレス負荷によってガレクチン-1 (Gal-1) の血中濃度が上昇することを発見した。更に、その後の研究によって、ストレス負荷後の血中 Gal-1 濃度の上昇が、視床下部-下垂体-副腎皮質系を介した反応ではなく、交感神経系を介した応答反応であることを明らかにした (Iwamoto ら、Glycoconjugate J, 2010; 27: 419-425)。また、ストレス負荷後に免疫系臓器である脾臓と胸腺で増加していることも示した。

Gal-1 は、 $\alpha$ -ガラクトシドに特異的に結合する動物レクチンで、細胞の接着、増殖、あるいは免疫系細胞のアポトーシス等へ関与することが報告されている (Perillo ら、J Mol Med. 1998; 76: 402-412)。また、神経幹細胞の増殖と神経細胞の分化への関与 (Kajitani ら、Cell Death Differ. 2009; 16: 417-427) や酸化型ガレクチン-1 の損傷末梢神経の再生促進作用が報告されている (Horie ら、J Neurosci. 1999; 19: 9964-9974、Inagaki ら、Eur J Biochem. 2000; 267: 2955-2964)。損傷末梢神経の再生促進作用はマクロファージを介していることも報告され (Horie ら、J Neurosci. 2004; 24: 1873-1880)、炎症反応との関連も示唆される。また、Gal-1 が歯周組織に存在すること、及び、歯周組織に口腔内細菌 *Porphyromonas gingivalis* を作用させるとその発現が上昇することが報告されている (Kogawa ら、Clin Cosmet Investig Dent 2011; 3:1-8)。

## 2. 研究の目的

これまでの研究によって、拘束ストレス負荷によって Gal-1 の血中濃度が上昇すること、そしてその応答反応は交感神経系を介したものであることを明らかにしてきた。また、ストレス負荷後の脾臓と胸腺で Gal-1 含量が増加していた。本研究は、ストレス負荷後に増加する血中 Gal-1 の作用、機能について解明し、その反応メカニズムに基づいた診断薬や抗ストレス医薬品の開発などの臨床応用

の可能性について検討することが目的である。脾臓と胸腺における Gal-1 の増減について詳細に検討を行うと共に、その他の臓器での Gal-1 の増減を解析し、変動のある臓器についてはその詳細を調べる。また、増減の認められた細胞での作用について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ストレス負荷動物モデルとして、SD ラット雄 10~12 週齢を用いて、四肢拘束ストレス負荷 (30 分間) を与えた。

(2) コントロール(C)、ストレス負荷直後(S)、ストレス負荷解放 30 分後(SR30)、解放 60 分後(SR60)のラットから、深麻酔下で血液及び各種臓器を採取した。各臓器をラクトースとプロテアーゼインヒビター群を含む PBS でホモゲナイズ後、遠心分離して得られた上清について、ウエスタン分析を行った。

(3) ストレス負荷ラットおよびコントロールラットを深麻酔後、4%ホルマリンと 0.2%ピクリン酸の混合液で灌流固定し、脾臓、胸腺、膵臓を摘出した。同液にて 1 日間固定した後作製組織切片を抗 Gal-1 抗体溶液、ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体溶液とアビジン-HRP 複合体溶液で順次インキュベートした後、ジアミノベンジジンで可視化した。

(4) 脾臓、胸腺、膵臓から抽出した total RNA から cDNA を作製した。LightCycler system (Roche)を用いた Real-time RT-PCR によって定量を行った。

(5) ヒトリンパ球系細胞株として THP-1、U937、HL-60 を用い、蛍光標識 GAL-1 の細胞への結合を共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察した。

## 4. 研究成果

(1) ストレス負荷後の脾臓と胸腺について、ウエスタン分析と Real-time RT-PCR によってタンパク質と mRNA の増減について調べた。結果を Fig.1 と Fig.2 に示す。ストレス負荷後の脾臓と胸腺で Gal-1 タンパク質含量の増加は認められたが、Real-time RT-PCR 分析の結果、両臓器において Gal-1 mRNA 含量の増加は認められなかった。したがって、脾臓と胸腺で増加した Gal-1 タンパク質は、血液を介して運ばれてきたものであることが強く示唆された。

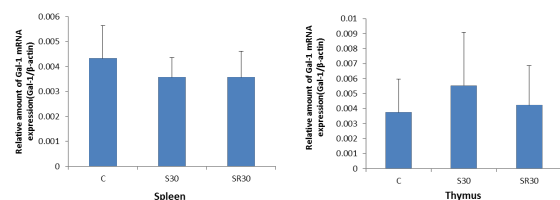


Fig 1. Western blotting analysis of Gal-1 protein in spleen and thymus.

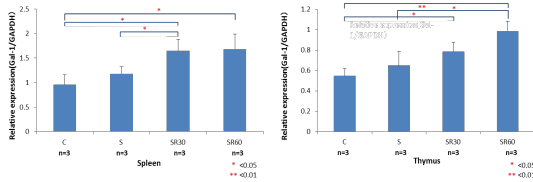


Fig 2. Real-time PCR analysis of Gal-1 mRNA in the thymus and spleen.

(2) 四肢拘束ストレス負荷直後、30 分後、60 分後の脾臓と胸腺について、免疫組織化学分析によって Gal-1 の分布を調べた結果を Fig.3 に示す。脾臓では白脾髄に、胸腺では髄質に Gal-1 陽性細胞が特異的に染色されていた。また、コントロール群に比べてストレス負荷群でより強い染色が認められた。更に、蛍光抗体法を用いて、これらの組織での Gal-1 と CD45 の分布について調べた。結果を Fig.4 に示す。脾臓では細動脈周囲リンパ組織鞘、胸腺では髄質において、CD45 と Gal-1 が共局在していた。以上の結果は、ストレス負荷によって血中で増加した Gal-1 が脾臓および胸腺の CD45+リンパ球細胞へ結合することによって、何らかの免疫応答反応を惹起している可能性を示す。

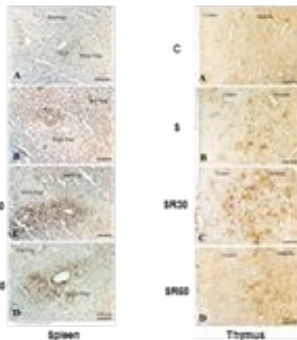


Fig. 3 Gal-1 protein localization in the thymus and spleen.

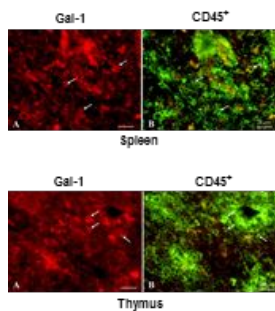


Fig.4 Localization of Gal-1 and CD45+ in the spleen and thymus

(3) 脾臓と胸腺での Gal-1 の作用について調べるため、ヒトリンパ球系細胞株として HTP-1、U937、HL-60 を用いてこれらの細胞への Gal-1 の結合について検討を行った。ウエスタンブロッティングの結果、THP-1 に CD45 の強い発現が認められた。更に、Gal-1 がリンパ球系細胞に特異的結合を示すかを検討するために、蛍光標識 Gal-1 の細胞への

結合を共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察した結果、THP-1 に対する Gal-1 の特異的結合が確認された。現在、培養細胞系を用いたストレス条件下での Gal-1 の T リンパ球系細胞への作用について検討を進めている。

(4) 各種臓器でのウエスタン分析検討の結果、脾臓においても拘束ストレス負荷後の Gal-1 タンパク質含量の増加傾向が認められた (Fig.5)。一方、Real-time RT-PCR 分析の結果、Gal-1 mRNA 含量の増加は認められず (data not shown)、脾臓で増加した Gal-1 タンパク質も、脾臓および胸腺と同様、血液中で増加した Gal-1 タンパク質の一部が脾臓に集積していることが示唆された。

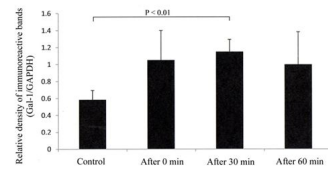


Fig.6 Western blotting analysis of Gal-1 protein in pancreas

(5) 四肢拘束ストレス負荷直後、30 分後、60 分後の脾臓について、免疫組織化学分析によって Gal-1 の分布を調べた結果を Fig.3 に示す。小葉間毛細血管の平滑筋細胞と繊維芽細胞が強く染色され、コントロール群に比べてストレス負荷群でより増強された。これらの結果は、ストレス負荷による脾臓での応答反応に Gal-1 が関与していることを示唆している。今後は、更に詳細な解析を行い、Gal-1 の組織分布とストレスによる分布変動のある細胞を確定した上で、ストレス条件下におけるその細胞に対する Gal-1 の作用について明らかにしていく予定である。

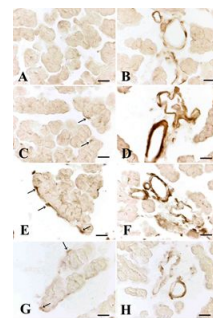


Fig. 3 Gal-1 protein localization in the pancreas  
A&B: control, C&D: S, E&F: SR30, G&H: SR60

## 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 )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

(1) T. Kadoya, K. Yamada, Y. Narimatsu, M. Oonuki, T. Yamamoto, K. Koda, K. Sasaguri  
“ Stress-induced Galectin-1 in serum

accumulates lymphoid organs and may modulate the immune response” 45nd Annual Meeting Society for Neuroscience, 2015年10月21日、Chicago

(2) 和田裕太、山田健太郎、成松侑梨、大貫真美、山本利春、笹栗健一、大石あづさ、甲田晃揚、門屋利彦 “ ストレス負荷後に血液中で増加するガレクチン-1 はリンパ器官における応答反応に關与する ” 第 88 回日本生化学会大会、2015年12月1日、神戸

(3) 和田裕太、山田健太郎、成松侑梨、大貫真美、山本利春、笹栗健一、武藤みなみ、薩秀夫、門屋利彦 “ ストレス負荷条件下におけるリンパ球系細胞へのガレクチン-1 の作用 ” 第 89 回日本生化学会大会、2016年9月（予定）仙台

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門屋 利彦 (KADOYA TOSHIHIKO)  
前橋工科大学工学部・教授  
研究者番号：40551875

### (2) 研究分担者

笹栗 健一 (SASAGURI KENICHI)  
神奈川歯科大学歯学部・講師  
研究者番号：10235286