

平成25年度特別経費（プロジェクト分）
「香川グライコリソース（希少糖・ヒト型糖鎖）を用いたナノ糖質生命科学研究推進事業」
研究グループ別研究成果報告書

（本報告書は、必要に応じてホームページ上で公開しますので、知的財産に関連する記述等については注意してください。）

| 研究組織 | | | | |
|--|---------------------------|---------------------------|---|-----|
| 研究グループの組織について記述してください。メンバーは教員ばかりでなく、本研究に携わっている非常勤職員・学生も記載してください。 | | | | |
| 研究課題名 | ガレクチン9を利用した非拡散性局所免疫抑制剤の開発 | | | |
| グループリーダー | 氏名 | 所属・職名 | 連絡先 | |
| | 西 望 | 総合生命科学研究センター・准教授 | TEL | 本人 |
| | | | e-mail | 秘書等 |
| | | nnishi@med.kagawa-u.ac.jp | | |
| メンバー | 氏名 | 所属・職名 (学年) | 分担事項・役割等 | |
| | 伊藤 愛子 | 総合生命科学研究センター・研究員 | 融合タンパク質発現用ベクターの作製 組換えタンパク質の発現・精製 ガレクチンの機能解析 | |

平成25年度研究成果概要

研究成果概要についてわかりやすく記載してください。できるだけ、図を挿入してください。すでに当該年度に外部に発表を行った成果については、研究業績欄の業績番号と対応させてください。

移植・再生医療においては拒絶反応の制御が不可欠であるが、現在一般的に使用されている免疫抑制剤は、日和見感染などの問題を引き起こす可能性がある。移植局所において免疫反応を調節する機能を備えた医療用素材は、この問題を解決する手段の1つと考えられる。ガレクチン9 (Gal-9) は、自然免疫と獲得免疫の両面に働いて免疫システムのアンバランスを調整する機能を持ち、動物実験において拒絶反応を抑制することが報告されている。一般的な免疫抑制剤と異なり、Gal-9は過剰な免疫抑制を引き起こしにくいものの、全身性投与により有害な副作用が生じる可能性は否定できない。本年度は、コラーゲンを含む移植用材料の高機能化に利用することを目的として、Gal-9とコラーゲナーゼ由来のコラーゲン結合ドメイン (CBD) 及びコラーゲン結合性ペプチド (CBP) から構成される非拡散性局所免疫抑制剤の開発を行った。

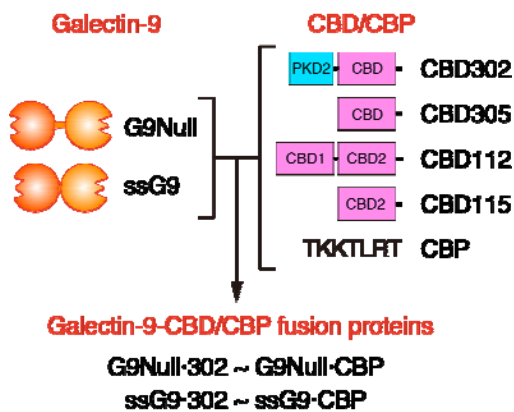


図1 コラーゲン結合性 Gal-9 の模式図

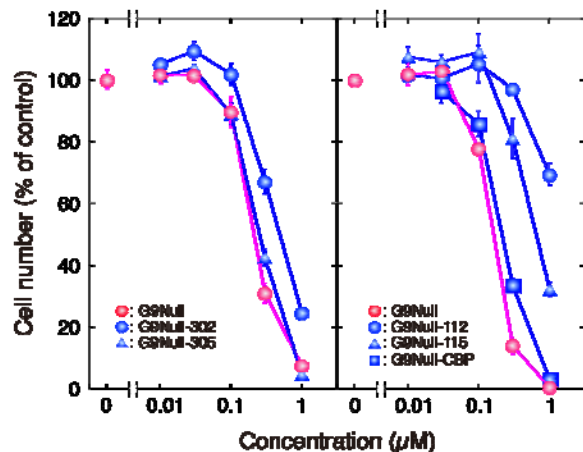


図2 Jurkat 細胞に対するコラーゲン結合性 Gal-9 の細胞死誘導活性

構造の異なる2種類の Gal-9 (G9Null1, 安定化型; ssG9, 高溶解性安定化型) と4種類の CBD (CBD302/305, CBD112/115) 及びコラーゲン結合性ペプチド (CBP) を組み合わせ、計10種類のコラーゲン結合性 Gal-9 (G9-CBD/CBP) を作製し、組換え蛋白質の生産性、Jurkat 細胞に対する細胞死誘導活性 (溶液状態での活性)、及び不溶性コラーゲンに対する結合活性を調べた。その結果、G9Null1-CBD302 と ssG9-CBD302 は比較的生産性が高く、対照として用いた G9Null1 の 40-80% 程度の細胞死誘導活性を保持し、コラーゲン結合活性も CBD302 と同等であった。コラーゲン結合性 Gal-9 で処理 (ラクトース存在下) したコラーゲン膜は、Jurkat 細胞の細胞死を誘導できなかったが、Gal-9 (G9Null1, ssG9) で処理 (ラクトース非存在下) したコラーゲン膜は、Jurkat 細胞の細胞死を強く誘導した。予想とは異なる結果となったが、Gal-9 で処理したコラーゲン素材を、免疫抑制機能を持つ移植用材料として利用できる可能性が示された。

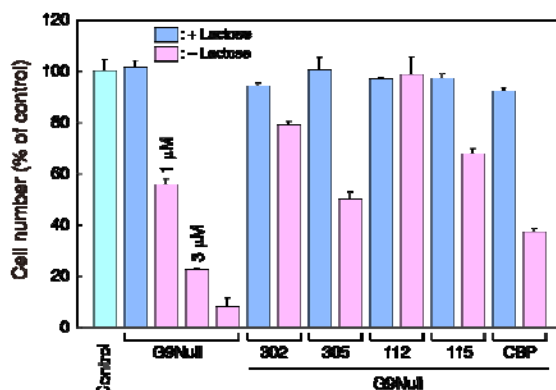


図3 コラーゲンに結合した Gal-9 とコラーゲン結合性 Gal-9 の細胞死誘導作用

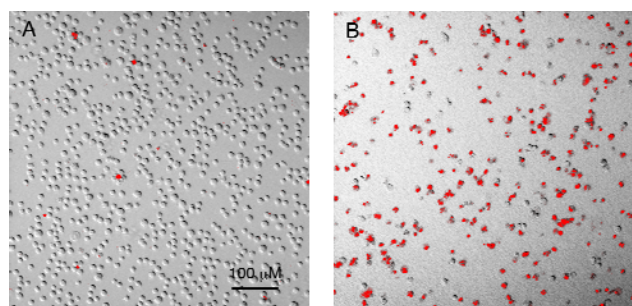


図4 Gal-9 で修飾されたビトリゲル膜上での Jurkat 細胞のアポトーシス (PI 染色) A, 対照膜; B, Gal-9 修飾膜

今後の展望

本事業期間内（平成22－25年度）に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究発展の展望について記載してください。図を挿入してもかまいません。

ガレクチン9で修飾したコラーゲン素材を移植医療に利用するために、以下の研究を進める予定である。

1. コラーゲン素材の決定：臨床応用を念頭に置いて、市販の研究用及び医療用コラーゲン膜の中から、Gal-9との結合性を指標として最適な素材を選択する。また、将来的な応用拡大の可能性を考慮し、膜以外の素材（パウダー、ゼラチンゲル等）の利用も検討する。

2. 修飾条件の決定：2種類のGal-9改変体（G9Null, ssG9）を用いて、Gal-9の結合量、活性化T細胞に対する接触依存的細胞死誘導活性、Gal-9の溶出量、を指標として修飾条件を決定する。

3. 2の結果に基づいて、最適と考えられる修飾コラーゲン素材を作製する。コラーゲン素材単独移植モデルと皮膚移植モデルを用いて、*in vivo*での接触依存性免疫抑制機能を調べる。

特記すべき事項

本研究に関する受賞（学生対象の賞も含む）・プレスリリース・大型外部資金獲得につながった等、特記すべき事項があれば記述してください（ささいなことでもかまいません）。本欄は必須ではありませんので、「該当なし。」でも可ですが、できるだけ記載してください。

該当なし

研究業績

本研究に関連した、平成25年度中の発表した、[1] 査読がある原著論文 (Corresponding Author には*印を付す。), [2] 著書, [3] 招待講演, [4] 学会発表 (発表者には○印), [5] 産業財産権 (特許等), [6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等) を通し番号を付して記入してください。本事業の参加者にはアンダーラインを引いてください。記入欄が足りない場合は、用紙を追加してください。

[1] 査読がある原著論文

1. Fukata Y, Itoh A, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Matsushita O, Nishi N. Direct cytotoxic effect of galectin-9 localized on collagen matrices on human immune cell lines. *Biochim Biophys Acta*. (2014) in press
2. Saito W, Uchida K, Ueno M, Matsushita O, Inoue G, Nishi N, Ogura T, Hattori S, Fujimaki H, Tanaka K, Takaso M. Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A*. (2014) in press
3. Uchida K, Matsushita O, Naruse K, Mima T, Nishi N, Hattori S, Ogura T, Inoue G, Tanaka K, Takaso M. Acceleration of periosteal bone formation by human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A*. (2014) in press
4. Ueno M, Nishi N, Nakagawa T, Chiba Y, Tsukamoto I, Kusaka T, Miki T, Sakamoto H, Yamaguchi F, Tokuda M. Immunoreactivity of glucose transporter 5 is located in epithelial cells of the choroid plexus and ependymal cells. *Neuroscience*. (2014) in press
5. Asahina Y, Kamitori S, Takao T, Nishi N, Hojo H. Chemoenzymatic synthesis of the immunoglobulin domain of Tim-3 carrying a complex-type N-glycan by using a one-pot ligation. *Angew Chem Int Ed Engl*. (2013) 52(37): 9733-7.
6. Itoh A, Fukata Y, Miyanaka H, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Nishi N. Optimization of the inter-domain structure of galectin-9 for recombinant production. *Glycobiology*. (2013) (8):920-5.
7. Nonaka Y, Ogawa T, Oomizu S, Nakakita S, Nishi N, Kamitori S, Hirashima M, Nakamura T. Self-association of the galectin-9 C-terminal domain via the opposite surface of the sugar-binding site. *J Biochem*. (2013) 153(5):463-71.

[2] 著書

該当なし

[3] 招待講演

該当なし

[4] 学会発表(○は発表者)

1. ○深田陽子, 伊藤愛子, 中村隆範, 西 望 「ガレクチン9を利用した非拡散性局所免疫抑制剤」第86回日本生化学会大会 2013年9月(横浜)
2. ○野中康宏, 小川崇, 大水総一, 中北慎一, 神鳥成弘, 西 望, 平島光臣, 中村隆範, 「ガレクチン-9のN、C末端ドメインの構造およびリガンド相互作用についての解析」第86回日本生化学会大会 2013年9月(横浜)
3. ○寺岡美沙, 吉田裕美, 西 望, 中北慎一, 神鳥成弘, 「ヒトガレクチン9変異体のX線構造と糖親和性の解析」第86回日本生化学会大会 2013年9月(横浜)
4. ○吉田裕美, 西 望, 寺岡美沙, 山下 哲, 神鳥成弘, 「安定型ヒト由来ガレクチン9変異体のX線結晶構造解析」第13回日本蛋白質科学会年会 2013年6月(鳥取)
5. ○野中康宏, 小川崇, 中北慎一, 西 望, 神鳥成弘, 平島光臣, 中村隆範, 「タンデムリピート型ガレクチン-9のNおよびC末ドメインの水溶液中での挙動の解析」第13回日本蛋白質科学会年会 2013年6月(鳥取)

[5] 産業財産権 (特許等)

国際出願番号 PCT/JP2013/077514 : 「ガレクチン9の改変タンパク質」 (2013年11月20日)
発明者: 西 望, 伊藤愛子; 出願人: 国立大学法人香川大学 (基礎出願番号: 特願 2012-254349)

[6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等)

該当なし