

レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用

所属 旭川医科大学 医学部

研究者 若宮伸隆

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所エイズ第1グループ 本多三男
- (2) 大阪府立公衆衛生研究所病理課 鈴木定彦
- (3) 帝京大学薬学部 板部洋之
- (4) 扶桑薬品工業株式会社研究開発センター 岸雄一郎

要旨

コレクチン CL-P1 とホモログ遺伝子のクローニングが終了し、永久発現細胞を樹立した。マウス、ゼブラフィッシュ、ゼノパスの遺伝子ノックアウトに取り掛かった。マラリアやエイズウイルスに関する感染防御メカニズムと酸化LDLの解析に成功した。

1. 研究目的

血管は現代の高齢化社会において大きな問題となっている虚血性心疾患、脳血管障害、糖尿病などの生活習慣病において最も重要な器官である。そしてスカベンジャー受容体がこれらの成人病の発生原因と密接に関連していることが明らかになっている。主任研究者である若宮は、レクチン機能によって生体防御に関わっていると考えられているコレクチン新規遺伝子 CL-P1 の発見に成功し、本遺伝子が血管内皮に局在し、古典的スカベンジャー受容体(SR-A)に酷似しているという事実を見いだしている。このような状況下において、CL-P1 のスカベンジャー受容体としての生理的役割を明らかにし、難治性血管障害や血管炎における役割を解明する事が本研究の大きな目的である。また人口の急速な高齢化とともに、疾病全体に難治の血管炎に付随する血管障害の割合は著しく増加しており、これには血管内皮への微生物感染や微生物の結合がトリガーになっている可能性が示唆されている。研究全体の大きな目標としては、個体レベルで(ノックアウト動物などを作成して)本遺伝子の役割を明らかにし、その制御因子や増悪因子を明らかにし、種々の血管病変の発症の機序解明や創薬応用への道筋をつけることである。

2. 3. 研究方法と研究成果

1) 血管内皮細胞存在型コレクチン遺伝子 CL-P1cDNA のクローニングとゲノム解析

当初我々は、組織からの新規コレクチン蛋白の精製を試み、種々の組織から抽出操作を行ったが、蛋白レベルからは精製は困難であった。ゲノムデータベースが充実してきた1996年に我々は、本遺伝子断片を発見し、その断片から全長遺伝子のクローニングに成功した。予想されるアミノ酸742残基をコードする遺伝子が同定された。本遺伝子の疎水性プロットから、本蛋白はII型膜タンパク質であることが明らかになった。さらに従来のコレクチン同様に、本蛋白質もC末端にレクチン構造とその近傍にコラーゲン様構造を有することが明

らかになった。次に、マウス及びラット遺伝子のクローニングを、現在データベースが充実している EST database から行った。両者とも未知部分があったものの、それらの断片を利用して完全長の cDNA をクローニングした。予想されるアミノ酸シーケンスを比較すると両者は非常に高いホモロジーを有することが認められた。その後アフリカツメガエルとゼブラフィッシュの本遺伝子クローニングに成功している。クローニングされた遺伝子の比較から、そのアミノ酸数はまったく同じであり、それら下等動物においても本遺伝子は高く保存されていることが明らかになっている。一方マウスゲノム遺伝子は、マウス CL-P1cDNA のエクソンの一部を用いて、マウスゲノム遺伝子の BAC クローンを探し、目的の遺伝子断片を含むゲノム BAC クローンを得た。本クローンをシーケンスして、エクソン、イントロン構造を明らかにした。現在 ATG を含む第 1 エクソン部分における、コントロールベクターとターゲティングベクターの作成ができ、ES 細胞への遺伝子打ち込み後、相同組み換えのおこっている ES 細胞の探索をおこなっている。

2) CL-P1 抗体の作成

従来若宮らの大腸菌の部分コレクチン発現システムの系を用いて行った。発現精製された CL-P1CRD 蛋白は、水溶性でウサギ、ニワトリに免疫し、ポリクローナル抗体を得た。本抗体は今まで明らかになっている全てのコレクチン蛋白に交差性のない事がわかった。本抗体を用いて、CL-P1 蛋白発現組織の検索を、マウスの種々の切片を用いて免疫組織染色を行った。何れの組織においても、血管内皮に強い染色が得られた。従来スカベンジャー受容体は、単球に存在されていることが報告されているが、本蛋白は血管内皮に主に存在していた。

3) ヒト CL-P1 遺伝子永久発現細胞株の樹立

完全長ヒト CL-P1cDNA を発現ベクター pcDNA3.1/Myc-His(+) に組み込み、チャイニーズハムスター細胞にトランスフェクションし、Neomycin で選択して、発現量の異なる数 10 個の永久発現細胞株を樹立した。CL-P1 遺伝子発現株は、膜蛍光染色法で CL-P1 のレクチン部分に対する抗体や C 末に存在するはずの Myc-tag 抗体の両者によって膜蛍光が認められた。またウェスタンブロット法により、上記 2 種の抗体により、発現蛋白質分子量がほぼ 170 kDa の糖鎖の修飾をうけたバンドとして認められた。

4) CL-P1 の細胞内ドメインに結合する分子の探索

酵母の two hybrid システムを用いて、CL-P1 の細胞内領域に結合する分子を探索した。その結果、アダプチン複合体を形成する一分子である AP2M2 の断片をクローニングできた。そこで完全長の AP2M2 分子を作成して、酵母の two hybrid システムで CL-P1 の細胞内領域との結合をみたところ、結合することが明らかになった。又同じ系を用いて他のアダプチン分子と CL-P1 との結合を調べたが AP2M2 のような結合はみられなかった。また、結合は、それぞれの蛋白を作成し、pull down assay 法によっても、結合することを確認した。また酵母の食食実験において CL-P1 蛋白と AP2M2 は、酵母食食部位に一致して存在して、お互いが機能に関わっていることが確認された。

5) 変性 LDL (酸化 LDL) の検出系の作成と酸化変性度の異なる酸化 LDL の作成とその性状解析

モノクローナル抗体 DLH3 を用いた測定系により、健常ヒト血漿中に微量の酸化 LDL (約 0.1ng/ μ g LDL protein) が存在することを明らかにした。さらに、急性心筋梗塞患者での血漿酸化 LDL レベルは対照の約 5 倍上昇していたことから、血漿酸化 LDL レベルは動脈硬化症に伴って変動するものと考えられた。ヒト動脈硬化病変部では、マクロファージ由来の泡沫細胞内が DLH3 および抗 apoB 抗体で免疫組織化学二重染色され、酸化 LDL が泡沫細胞に限局して存在していることが示された。また、ヒト頸動脈病変部から抽出した LDL 画分中の酸化 LDL

も J774 マクロファージに見られたものと類似した部分分解物になっていることが分かった。またヒト血漿 LDL と硫酸銅との反応時間とその濃度比を変化させて、OxLDL3, OxLDL24, Fe-MMLDL4 の3つの変性 LDL を作成した。いずれも上記の DLH3 に対する反応性は変化がみられなかった。しかしながら、酸化度においては TBRAS とアルデヒド型酸化 PC の値はまったく逆相関しており、酸化 LDL の変性度に多様性のあることがわかった。

6) 細胞内寄生体であるマラリア原虫におけるコレクチンの感染阻害作用についての解析

マンナン結合レクチン(MBL)とマラリア感染あるいはマラリア重症化の関係については殆ど解析されていない。本研究では、MBL の熱帯熱マラリア原虫に対する感染防御効果について検討した。フィコールグラジエント法により分画し感染赤血球およびマラリア原虫に富んだ画分をスライドガラス上に固定し、MBL で染色した。カルシウムイオン免疫染色法を用いて熱帯熱マラリア原虫に対する MBL の結合活性について検討した。実験では MBL がメロゾイトだけでなく、輪状体や分裂体にも結合しうることが観察された。また、これらの結合がマンノースあるいは EDTA の存在下では著しく阻害されることが、観察されることからこの結合は MBL の糖鎖認識領域を介したカルシウムイオン依存的なものであるものと考えられた。次に原虫発育阻止試験を、上記のマラリアの系で行った。通常の培養液に MBL を 0.1、1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加した後 48 時間培養を行い、培養液中の原虫の数を数えた。MBL 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と高濃度ではあるがメロゾイトが赤血球に侵入した直後のステージである輪上体の比率が MBL 非存在下に培養したものに比べて有為に低下していた。以上から MBL が熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入に対する阻害効果をもつことが示された。

7) 細胞内寄生体であるエイズウイルスのコレクチンによる増殖阻止作用の解析

MBL の抗 HIV 活性を *in vitro* の系で検討するために、実験株の HIV-NDK 株 (サブタイプ B) 及び臨床分離株のサブタイプ E 型 HIV (仮称 LP 65) を PHA で blast 化したヒト PBMC 及び T cell 系の株化細胞 M8166 に感染させ、洗浄後、1 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で native 及び recombinant MBL (rMBL) を添加し、ヒト血清添加培地で培養した。培養後のウイルス量の変化の指標として培養上清中の HIV p24 抗原量を ELISA にて測定し、MBL 非添加群と比較検討した。HIV-NDK 感染 M8166 細胞に関しては、rMBL 濃度が 10 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、培養上清中の p24 抗原量が、培養後速やかに rMBL 非添加群のおよそ 50%にまで抑制された。一方 native MBL 群においてもウイルス量抑制が認められたが、その効果は rMBP よりは低かった。サブタイプ E 型臨床分離株 (LP65) についても rMBL 添加による抗ウイルス効果が認められたが、サブタイプ間での感染抑制効果の差については明確な結果は得られなかった。

4. 考察・まとめ

コレクチンの発見は、初めにウシ血清からコングルチニンが約100年前に発見され、その後血清MBLの発見、肺胞分泌液中に存在するSP-A, SP-Dの発見が続き、CL-43が1993年に最後に同定された。これらの全アミノ酸配列、塩基配列の比較から、古典的なコレクチンはMBL群, SP-A群, SP-D群の3つのコレクチングループに分類されることが明らかになった。その後新しいコレクチンは、主任研究員である若宮らにより、ESTデータベースのスクリーニングから (その当時あまりデータベース上に情報は少なかったが) 3つの新規コレクチン (CL-L1JBC1999, CL-P1JBC2001, CL-K1JBC投稿中)が発見された。CL-P1cDNA は742個のアミノ酸をコードする約2.2kbの塩基を有する遺伝子であり、cDNAから予想されるアミノ酸配列より、細胞内領域、膜貫通領域、コイルドコイル領域、コラーゲン様領域、ネック領域、糖認識領域(CRD)という構造をとることが推測された。

これらの構造は、コラーゲンを有するスカベンジャー受容体 (SR-Aタイプ) と構造上類似性がみとめられた。特にSR-AIと共通するのは、N末端から、短い細胞内領域、ロイシンジッパー構造を含む膜貫通領域、コイルドコイル領域、コラーゲン様領域とC末端に続くglobular 蛋白という全体の配列である。CL-P1では、C末端の球状蛋白質であるスカベンジャー受容体システインリッチ領域が、Cレクチンに置き換わっている。

次にCL-P1遺伝子のどの部分がこれらの異物に結合するために重要かを検討するためには、その機能ドメインの欠失株を樹立し、それらにおいて結合を検討する事が必要である。現在分泌型の欠損CL-P1の作成が完了し、さらにコラーゲン様領域のポリチャージ領域のpoint mutationによる変異CL-P1も作成がほぼ完了したので、これらを用いて、いんらんリガンドの結合にどの領域が重要なのか決定すること事を計画している。さらに本CL-P1を用いて、それぞれのリガンドにおける結合定数や阻害実験も計画している。

一方コレクチンの生物学的な検討では、細胞内寄生体であるマラリアとエイズウイルスに焦点を当てて、研究を行っている。両者とも、コレクチンによる *in vitro* のアッセイ系では有意の感染防御能が認められた。両者とも、現段階では感染を防御する中和抗体のようなイメージをいだかせる結果である。実際エイズウイルスでは、従来中和抗体がほとんど無効と考えられる臨床分離株への効果が認められたことから、治療薬としての期待がもてる可能性がでてきている。しかし結核菌に関しては、施設や実験が複雑で、まだ準備段階のため研究成果としては、上がっていない。また血管内腔での異物である変性コレステロールである酸化 LDL (悪玉コレステロール) に対する実験系では、その *in vitro* における作成と測定系が確立し、準備段階は整った。予備実験であるが、動物ではラベルした酸化 LDL は、実際の血管内皮細胞における結合や代謝系に運ばれることを観察している。一方、研究全体における貢献では、板部は酸化度が異なる酸化 LDL の作成に成功した。現在予備実験であるが、若宮はそれらの変性 LDL と、CL-P1 と他のスカベンジャー受容体の結合を検討したところ、結合にスカベンジャー受容体特異性がある結果が得られており、多くのスカベンジャー受容体が存在する意義を示唆する知見も得ている。

2年間の研究で、細胞レベル研究では、異物と CL-P1 の結合に関わる研究の材料は揃った。次の焦点である内部にシグナルを伝える分子の探索では、貪食やエンドサイトーシスにクラスリンやアダプチンが関与することが明らかになったが、さらに内部へのシグナル伝達にはどんな分子が関与するのか明確にしたい。この調節機構があきらかになると、CL-P1 発現誘導物質や貪食機能亢進機能物質の探索システムができる可能性がある。一方、*in vivo* 実験は、始まったところである。最終年度でいくつかの遺伝子ノックアウト動物を作成し、固体レベルでの様々な役割を調べるための基礎材料やモデルを作りたいと考えている。

5. 研究発表

Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuh, A., Sakamoto, T., Itabe, H., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Wakamiya, N.: The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276(47): 44222-44228, 2001.

Tsutsumi, A., Sasaki, K., Wakamiya, N., Ichikawa, K., Atsumi, T., Ohtani, K., Suzuki, Y., N., Koike, T., Sumida, T.: Mannose binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogrens syndrome *Genes Immun* 2: 99-104, 2001.

Vorup-Jensen, T., Sorensen, E.S., Jensen, U.B., Schwaeble, W., Kawasaki, T., Ma Y, Uemura K, Wakamiya, N., Jensen, T.G., Takahashi, K., Ezekowitz, A.B., Thiel, S., Jensenius, J.C.: Recombinant expression of human mannanbinding lectin. *Int. J. Immunopharmac.* 1(4): 677-87, 2001.

若宮伸隆、鈴木定彦：新規血管内皮細胞型スカベンジャー受容体 CL-P1。生化学 73(3):205-208, 2001.

Hokozaki, Y., Yoshida, M., Sekiyama, K., Seike, E., Iwamoto, J., Mitani, K., Masafumi, M., Morizone, T., Ohtani, K., Suzuki, Y., Wakamiya, N. Liver Liver 22(1): 29-34.2002.

Zhao H., Wakamiya, N., Suzuki, Y., Hamonko, M.T., Stahl, G.L.: Epitope mapping and functional characterization of a novel monoclonal antibody against human mannose binding lectin (MBL). Hybridoma and Hybridomics 21(1): 2536, 2002.

Fukuzawa, J., Nishimura, J., Hasebe, N., Haneda, T., Osaki, J., Saito, T., Nomura, T., Wakamiya, N., Kikuchi, K.: Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes. J. Biol. Chem. 277(28): 24889-24895, 2002.

Kawai, T., Suzuki, Y., Eda, S., Kase, T., Ohtani, K., Sakai, Y., Keshi, H., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Nozaki, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Wakamiya, N.: Molecular cloning of a mouse collectin liver 1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(10): 2134-2145, 2002.

Hara T, Yoshino N, Takayama N, Minamitani M, Naganawa S, Ohkubo H, Takizawa M, Izumi Y, Kantake M, Suzuki S, Takano M, Kita T, Totani R, Nagai Y, Honda M., Nakasone T. Presence of multiple HIV type 1 subtypes among mothers and children in Japan. AIDS Res Hum Retroviruses. 17(6):569-75. 2001.

Chujoh Y, Matsuo K, Yoshizaki H, Nakasatomi T, Someya K, Okamoto Y, Naganawa S, Haga S, Yoshikura H, Yamazaki A, Yamazaki S, Honda M. Cross-clade neutralizing antibody production against human immunodeficiency virus type 1 clade E and B' strains by recombinant Mycobacterium bovis BCG-based candidate vaccine. Vaccine. 20(5-6): 797-804. 2001.

Naganawa S, Sato S, Nossik D, Takahashi K, Hara T, Tochikubo O, Kitamura K, Honda M., Nakasone T.: First report of CRF03_AB recombinant HIV type 1 in injecting drug users in Ukraine. AIDS Res Hum Retroviruses. 18(15): 1145-9. 2002.

Kawahara M, Hashimoto A, Toida I, Honda M.: Oral recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin expressing HIV-1 antigens as a freeze-dried vaccine induces long-term, HIV-specific mucosal and systemic immunity. Clin Immunol. 105(3): 326-31. 2002.

Kawahara M, Matsuo K, Nakasone T, Hiroi T, Kiyono H, Matsumoto S, Yamada T, Yamamoto N, Honda M.: Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. Vaccine. 21(3-4): 158-66. 2002.

Sakaue G, Hiroi T, Nakagawa Y, Someya K, Iwatani K, Sawa Y, Takahashi H, Honda M., Kunisawa J, Kiyono H: HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses. J Immunol. 170(1): 495-502. 2003

Suzuki Y., Yoda T, Ruhul A, Sugiura W.: Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from Bacillus sp. OY1-2 isolated from soil. J Biol Chem. 276(12): 9059-65. 2001.

Suzuki Y., Suzuki A, Tamaru A, Katsukawa C, Oda H: Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis by a PCR-Based In Vitro System. J Clin Microbiol. 40(2): 501-7. 2002.

Shimada T, Inoue K, Suzuki Y., Kawai T, Azuma E, Nakajima T, Shindo M, Kurose K, Sugie A, Yamagishi Y, Fujii-Kuriyama Y, Hashimoto M.: Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. Carcinogenesis. 23(7): 1199-207. 2002.

Kawai T, Suzuki Y., Yamashita A, Inoue H.: Isolation of a novel mouse variant of the drs tumor suppressor gene. Cancer Lett. 183(1): 79-86. 2002.

Ehara, S., Ueda, M., Naruko, T., Haze, K., Itoh, A., Otuska, M., Komatsu, R., Matsuo, T., Itabe, H., Takano, T., Tsukamoto, Y., Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Yoshikawa, J. and Becker, A. E.: Oxidized low density lipoprotein relates to plaque destabilization in human coronary atherosclerotic lesions. Circulation. 103:1955-60. 2001.

Ishikawa K, Sugawara D, Wang Xp, Suzuki K, Itabe H., Maruyama Y, Lusis AJ.: Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in ldl-receptor knock out mice. Circ Res. 88(5): 506-12. 2001.

Ishikawa K, Sugawara D, Goto J, Watanabe Y, Kawamura K, Shiomi M, Itabe H., Maruyama Y.: Heme oxygenase-1 inhibits atherogenesis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Circulation. 104:1831-6. 2001.

Higashi Y, Itabe H., Fukase H, Mori M, Fujimoto Y, Satō R, Imanaka T, Takano T.: Distribution of microsomal triglyceride transfer protein within sub-endoplasmic reticulum regions in human hepatoma cells. Biochim Biophys Acta. 1581(3): 127-36. 2002.

Itabe H.: Oxidized Low-density Lipoproteins: Clarified. Biol Pharm Bull. 26(1): 1-9. 2003.

6. 知的所有権の取得状況

特に無し