

血管におけるレクチンを介す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

研究要旨：肝臓分泌型 MBL と血管内皮膜型 CL-P1 の2つのコレクチンで、①MBL では、動物感染実験の準備として MBL モニタリング等の基盤研究を行った。②CL-P1 では、細胞・個体レベルで生化学的・分子生物学的に、広範な機能解析を行い、基礎的知見を得た。

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)扶桑薬品工業(株)研究開発センター 岸 雄一郎
- (3)筑波大学大学院人間総合科学研究科
応用先端医学専攻臨床免疫学 堤 明人
- (4)昭和大学薬学部 板部 洋之

A. 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臓器である。また人口の急速な高齢化とともに、疾病全体における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、その原因のひとつとして血管内皮への微生物感染や微生物の結合が加齢とともに蓄積され、そのことがトリガーになって血管内皮障害をおこす可能性が示唆されている。我々が発見した血管内皮存在型のスカベンジャー受容体遺伝子CL-P1の研究は、微生物や変性LDLなどが関与する血管炎の発症要因の解明には欠くべからざる方向性のひとつであり、また血管虚血・再灌流の際における血管損傷においてMBLを中心とするコレクチンの補体活性化や血管における微生物感染に対するMBLの役割を明らかにすることは非常に重要な研究課題であると認識している。本研究の結果として血管炎や異物の接着によっておこる血管の梗塞や損傷などの予防や新たな治療法・医薬品開発にユニークで大きな知的な貢献をもたらす可能性があり、ひいてはその

ことが生活習慣病の予防や治療に結びつき、社会に多大な貢献ができると考えている。

B. C. 研究方法と成果

若宮らは、ゲノムデータベースが充実してきた1996年に、新規コレクチン遺伝子断片を発見し、その断片から新規コレクチン遺伝子のクローニングに成功した(JBC1999, 2001)。それらのホモロジーから、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ CL-P1cDNA のクローニングを行い、その遺伝子ファミリーを明らかにしている。また、MBL は最初に発見されたコレクチンであるが、その生体での感染実験など、未だ明らかになっていない部分が多い。初年度では、3カ年の準備段階として広範に全研究を推進した。特に個体レベルの実験系では、MBL の HIV 動物感染実験を行うための準備を、岸・若宮・本多の3つのグループで進めた。また、CL-P1 の個体レベルの研究のために、ゼブラフィッシュ飼育と繁殖に力をいれ、やっと定期的に繁殖できるようなシステムが完成した。現在行っているそれぞれの研究について、以下に、方法とその成果をまとめる。

1. MBL 高発現株の新規作成とそのシステム構築

共同研究者である鳥取大学鈴木助教授の協力により、新規 MBL 発現細胞株を樹立した。クローンは、従来の MBL 高発現システムをさらに、鈴木らが独自の方法で改良したものを利用した。MBL 高発現株は、都合 10 クローンを樹立した。

それぞれを、CD (chemical defined) 培地で培養し、細胞密度を調節して、培養液を集めて MBL 産生量を確認した。それらと従来の MBL 高発現細胞株を比較した。ウエスタンブロット分析では、今回の MBL 高発現細胞株は、非常に高分子量の MBL であることが推測された。また、得られた MBL 高発現株は、従来の発現株に比べて、発現量の多い点やより多量体形成が進んでいることが認められた。現在のところ、1 次スクリーニングの段階での MBL 高発現細胞株の発現蛋白質量を検定し、1 次ストックを終了した。この中の 1 株から MBL を精製し、ゲルろ過にて解析したところ、天然型に近い、多量体構造をとることが確認された。つぎに、10 株の、細胞レベルでの抗 HIV 作用について、感染研本多研究員により、定量実験をする予定である。また、多剤耐性 HIV において、同じ株由来の MBL による抗 HIV 作用を、感染研で検討することが計画されている。これらの抗 HIV 作用の最も優れている、MBL 発現細胞株の選別を行いつつ、2 次スクリーニングを並行して行っている。この株をプログラミングフリーズして、Master cell bank(MCB)とする。このなかの 1 有力株から MBL を収集して、予備的な動物実験を始めている。

2. 動物実験での MBL monitoring システムの構築

MBL の抗 HIV 効果を検討する動物実験を行うにあたって、種々の実験動物における投与したヒト MBL の測定は、血中動物 MBL 濃度とともに、非常に鍵となるアッセイ系である。扶桑薬品工業との共同研究により、ポリクローナル抗体・モノクローナル抗体を用いたプロトタイプであるが、2 つのヒト MBL 測定系を開発してきた。まず、SCID マウス血清とカニクイザル血清におけるヒト MBL 測定を ELISA 法にて行った。得られた ELISA 結果からは、モノクローナル抗体による ELISA では、まったくマウス、カニクイザル MBL に反応せず、純粋にヒト MBL のみを測定できることが明らかになった。また、一方、ポリクローナル ELISA システムでは、マウス血清で 1000 倍希釈から、カニクイザルでは 10000 倍希釈から、交差反応性が認め

られた。一方、それぞれの血中 MBL レベルであるが、それぞれ 3 個体から得られた血清を用いて、マンナンアガロースにバッチ法で結合させて、粗精製をおこない、SDS-PAGE による定量を行った。さらに、同サンプルをウエスタンブロットにアプライして、MBL であるかどうかを確認した。ヒト MBL 計算値分子量は 24020 であるが、SDS-PAGE 上では、28kD にバンドが認められる。カニクイザルは、計算上ではヒトより若干大きな 24190 であるが、SDS-PAGE 上では 27kD にバンドが見られる。マウスでは、計算上は分子量 23970 であるが、それよりさらに小さい 26kD にバンドが見られた。これらのクマシーブルー染色による、定量では、SCID マウス血中 MBL は、約 3.6~5.7 μ g/ml であり、カニクイザルでは、約 1 μ g/ml の濃度であることがわかった。

3. CL-P1 の細胞レベルの動態検討

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell=HUVEC) を CL-P1 正常発現細胞として用いて、種々のストレスに対する発現誘導を mRNA レベルで探索した。種々のストレスとして、炎症性サイトカインとして tumor necrosis factor- α (TNF α)、過酸化水素 H₂O₂、TPA 処理により、HUVEC の CL-P1 mRNA 量を RT-PCR 法にて比較検討した。総 RNA の抽出は TRIZOL を用い、クロロホルム、2-プロパノールで RNA を分離した。75% エタノールで洗浄後、ペレットを乾燥し、DEPC 処理水にて溶解した。抽出した総 RNA は分光光度計を用いて濃度を測定した。逆転写反応に 1 μ g の総 RNA を用いて、oligo(dt)-adaptor primer と RNA LA PCR kit を用いて、cDNA 化した。5 μ l の cDNA を鋳型として LA Taq polymerase と primer を用い、PCR を行った。PCR は、98°C で 10 秒、68°C で 5 分で 35 サイクル行った。また、比較の対象である LOX-1 は、98°C で 40 秒、55°C で 1 分、72°C で 1 分を 40 サイクル行った。PCR 産物のうち 9 μ l を、エチジウムブロマイドを添加した 1% アガロースゲル上で電気泳動し、紫外線下で観察し NIH-image で定量評価した。HUVEC において炎症性サイトカイン TNF α 、0, 1, 10, 100ng/ml で濃度依存性を検討し、その後 10ng/ml で 0, 2, 6, 12, 24, 48 時

間後の細胞を回収した。TPA は 100nM 添加後に同様の時間経過後に細胞を回収した。LOX-1 と CL-P1 の mRNA 動態では、前者は 12 時間をピークに一過性に増減するのに対して、CL-P1 は 12 時間後から徐々に増大することが認められた。また、 H_2O_2 は、事前に同様に濃度を変えて誘導検討を行い、適当とされる $10^{-7}M$ に希釈して、時間経過をおって、上記と同様の方法で発現を検討した。その結果、12 時間後から発現誘導が起こり、48 時間においても高値を持続した。また、抗酸化物質である NAC (N-acetylcysteine) の添加実験では、その発現誘導が完全に抑制された。

4. 酸化度の異なる OxLDL の CL-P1 に対する結合性についての検討

ヒト LDL (0.2mg/ml) に対して硫酸銅 (最終濃度 5 μM) を加えて、37°C で、3 時間インキュベートし、従来法の酸化 LDL (OxLDL₃) を調整した。さらにより強く酸化変性を進める目的で、LDL (2mg/ml) に対して硫酸銅 (終濃度 50 μM) を加えて 37°C で 24 時間インキュベートしたもの (OxLDL₂₄) を調整して用いた。また、1 μM 硫酸鉄を用いて 4°C で 96 時間反応させて微小酸化 LDL (MMOxLDL) を作成した。次に CL-P1 発現 CHO 細胞を利用して、酸化度の異なる 3 種の酸化 LDL (OxLDL) に対する結合を検討した。その結果として、MMOxLDL はまったく CL-P1 発現 CHO 細胞に対して、結合は見られなかった。一方、もっとも変性度が高いと考えられる OxLDL₂₄ は、CL-P1 発現 CHO 細胞に対し、OxLDL₃ に比べて優位に強く結合した。しかしながら、LOX-1 発現 CHO 細胞は、それに対して OxLDL₃ にもっとも強い結合が見られた。この実験事実は、多種の異物をリガンドとして補足するために、複数のスカベンジャー受容体が出現し、進化した可能性を示している。スカベンジャー受容体において、OxLDL の酸化度によって、リガンド特異性が存在する事実は、はじめての発見である。

5. 食食時における CL-P1 細胞内領域の複合体形成に関わる因子の解析

CL-P1 発現 CHO 細胞を用いて、酵母食食経過中の、CL-P1、AP2M2、クラスリンの 3 つの蛋白の相互作用について検討した。方法としては、免疫沈降法

とウエスタンブロット法を組み合わせ、複合体形成することを明らかにした。CL-P1 発現 CHO 細胞が酵母食食前とその後食食経過中に、CHO 細胞を可溶化して、まずクラスリン抗体とアダプチン抗体で、免疫沈降を行った。その後免疫沈降した分画を SDS-PAGE にアプライして、ウエスタンブロットを行い、2 次抗体に CL-P1 抗体にて、染色を行った。両抗体での免疫沈降において、CL-P1 が沈殿していることが認められた。その結果、CL-P1 と AP2M2 とクラスリンの 3 者が結合していることが明らかになった。たんぱく質合成を阻害するシクロヘキシミドを添加した条件においても、3 つの分子の結合が認められた。しかも、食食条件化で初めて 3 つのたんぱく質が結合すること、さらに食食 1 時間後にもっとも複合体形成が認められた。これは、酵母食食の時相と一致していると考えられた。

6. CL-P1 のヒトにおける組織発現解析

ヒト CL-P1 に対するマウスモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体を用いて、ヒト正常組織における CL-P1 発現を組織免疫染色法を用いて、明らかにした。方法としては、得られたヒト組織を即時に 4% パラホルムアルデヒドで 4°C 0/N で固定した。その後凍結してブロックを作成した。超薄切片を作成し、上記 2 種類の抗体を用いて、2 次抗体としてそれぞれの ABC 法を用いて、染色を行った。ヒト正常組織の血管において CL-P1 の発現が観察された。発現場所は、血管内皮と一部血管平滑筋にも観察された。以前マウスの心臓切片においては、血管内皮のみに発現がみられたが、ヒトでは分布が血管平滑筋においても、その発現が確認された。サンプルは高齢なヒト由来のために、若年のマウス血管とは、CL-P1 発現が異なる可能性も考えられた。

(倫理面での配慮) ヒトゲノム検査や組織採取は、旭川医科大学の倫理委員会の承認を得て、その規定に基づき、各位に書面によるインフォームドコンセントをとり、了解の得られた人のみに採血や組織採取を行い、実験材料として用いた。

7. 個体レベルでの CL-P1 発現意義の解析

CL-P1 の個体レベルの研究のために、ゼブラフィ

ツッシュ飼育を始め、漸く定期的に繁殖するようになった。前年度までにゼブラフィッシュ CL-P1 が、embryo 発育早期（受精後 9 時間）に mRNA が発現し、血管内皮に局在していることを認めていた。今回では、並行して多種の血管合成に関与する因子の RT-PCR を行い、血管成長因子受容体と CL-P1 発現時期がほぼ同じ時期であることを認めた。また、ゼブラフィッシュ CL-P1 に対する特異抗体を作成して、免疫組織染色を行い、血管に CL-P1 が発現していることを明らかにした。さらに本年度から RNAi 実験を行っている。予備的実験であるが、RNAi 添加によると考えられる初期形態形成の不全が見られている。しかしながら濃度依存性、5 base-mismatch 実験、mRNA 添加による RNAi 回復実験などの確認実験が、RNAi 実験のつぎの課題である。また、並行して、血管内皮に RNAi により、CL-P1 の蛋白発現の抑制が実際におこっているか？また、初期形態形成の不全の原因はなんであるのか？血管原基の形態不全が実際におこっているのか？抗体を用いない血管染色法と、抗体による血管特異的染色法を組み合わせ、CL-P1 発現と血管形成の関係についての基礎実験を行いたいと計画している。さらにこの実験結果から、CL-P1 は、脊椎動物では初期形態形成に重要な役目を担っており、マウス胎生致死の可能性も含めて、マウスノックアウト実験の不成功の原因が推測された。

8. 複数の細胞株における CL-P1 の SNPs 解析

昨年度までの研究で、ヒトゲノム CL-P1 遺伝子は、10 個のエクソンと 9 個イントロンが存在しており、SNPs の検索の結果、ゲノム遺伝子内に 6 つの SNPs (SNP1,2,3,4,5,6) を発見した。正常細胞である HUVEC, HAEC, HEL と腫瘍細胞 HS-683 (glioblastoma), SK-LMS-1 (leiomyosarcoma) を用いて、SNPs 検索を行った。その結果、SNP5 が腫瘍細胞である HS-683 に認められた。また、正常細胞では、SNP6 が見られたが、人種などに依存しているかどうかは、判定できなかった。また、HS-683 の SNP5 は、コラーゲン部分のアミノ酸置換を伴う変異であり、さらに本細胞は貪食機能が無いことから、現在 SNP と貪食機能に関する研究を開始した。それと並行して、ゲノムタイプとアレル頻度

と、種々の病態における遺伝子解析を本学から千葉大学へ異動された羽田教授と共同で行っている。

9. HIV における in vitro MBL 感染阻止実験

末梢血単核細胞および GHOST 細胞を用いたウイルス抑制効果の測定を行った。PBMC assay では 100TCID50, GHOST cell assay では GFP の陽性率を 3~5 % になるように virus を希釈した。PBMC assay では細胞に感染後 1 週間後の P24 抗原を GHOST cell assay では 4 日後の GFP の陽性率で評価した。昨年度の方法と同じで、細胞とウイルス両方を MBL で処理し、MBL がアッセイ時に常時存在する方法を用いた。アッセイ法の感染ウイルスとして、選別した 92TH014 を用いて解析した。92TH014 は米国 NIH AIDS Research & Reference Reagent Program から供与された HIV-1 subtype B' primary isolate である。MBL の native な MBL と組換え MBL を用いると HIV Th1, JRCSF, LP65, NDK のいずれのウイルスもクレイドのバリアを超えて数 $\mu\text{g/ml}$ のレベルで中和能が認められた。従って、従来の中和抗体によるクレイド特異的なバリアを超えることが明らかとなり、MBL の有用性が示唆された。MBL の実用化を目的にして組換え MBL が作成された。その HIV 抑制効果を検討した。昨年度の報告で MBL を低分子と高分子にゲルろ過にて分離すると HIV 抑制効果が分離する前と比較しその効果が低下した。本年度は native MBL が 2 lot、ゲルろ過で分離する前の組換え MBL が 2 lot、組換え MBL をゲルろ過で分画し、それを mix した組換え MBL の 5 種類を比較した。その結果、IC50 を比較すると MBL lot 1 (1.0 $\mu\text{g/ml}$), MBL lot 2 (2.4 $\mu\text{g/ml}$), 組換え MBL lot 1 (4.0 $\mu\text{g/ml}$), 組換え MBL lot 2 (4.6 $\mu\text{g/ml}$) となり HIV 抑制効果を確認した。さらに、MBL の HIV 抑制効果を担うコンポーネントを解析するために組換え MBL をゲルろ過し、それらを低分子分画及び高分子分画を mix したものを解析すると、いずれも抑制効果は無く消失した。組換え MBL の抑制効果がゲルろ過で消失することの原因については現在のところ解析できていない。

10. マウスにおける OxLDL の実験系の構築

マウスの各種リポタンパク質は、apoE ノックアウト

トマウス血漿(第一製薬、難波氏より分与)から、同様に EDTA 存在下で超遠心分離を繰り返し分画した。脱塩用ゲルろ過カラムを通して EDTA を除去した LDL (0.2mg/ml) に対して硫酸銅 (5 μ M) を加え 37°C で 3 時間インキュベートし、マウス酸化 LDL (OxLDL₃) を調製した。マウス LDL を 4-12% SDS-PAGE にアプライし、分子量約 200kDa に分離されてくる apoB-48 のバンドをゲルから切り出して回収する。ApoB-48 はゲルごと細切、ホモジェナイズし、PBS および Freund の完全アジュバントを加えてエマルジョンを作成した。これを、日本白色種(オス、2.5Kg)ウサギ 2 羽に免疫し、さらに Freund の不完全アジュバントを用いて 3 回追加免疫した。抗体価の上昇を確認後、耳静脈から採血し、血清を硫酸沈殿シグロブリン画分を調製した。当研究室で開発した、サンドイッチ ELISA による酸化 LDL 高感度測定法を用いて、種々酸化 LDL の抗原性を比較した。この方法では、酸化 LDL 上の酸化 PC を認識するモノクローナル抗体 DLH3 と、抗ヒト apoB ポリクローナル抗体を用いて、両方の抗体に反応するものを選択し定量する。この方法は、Itabe, H. *et al.*, *J. Lipid Res.* (1996) 37:45-53 に準拠している。マウス酸化 LDL の測定の場合には、抗マウス apoB ポリクローナル抗体(ウサギ抗血清硫酸沈殿画分)を用いた。遺伝子改変技術の普及に伴い、マウスモデルでの多くの検討がより有用性を増しているが、マウスの血漿 OxLDL についてはほとんど報告がない。マウスやラットなどのげっ歯類はリポタンパク代謝がヒトとは異なり、コレステロールのほとんどが HDL に分布していて、LDL の量が非常に低い。また動脈硬化を起こしにくいことから、動脈硬化症のモデル動物になりにくかった。近年、アポリポタンパク質 E (apoE) を遺伝的に欠失させたマウスでは、顕著な高コレステロール血症を起こし、大動脈で自発的な動脈硬化病変を生じることが示され、貴重な動脈硬化モデル動物として広く用いられている。既に一般に有償頒布され、日本でも入手できる。もともとマウスはほとんど LDL を持たないこと、さらにマウスの apoB に対する抗体が市販されていないことから、OxLDL の測定系も作られて

いない。そこで、我々は、マウス apoB に対する抗体を作成し、マウス OxLDL 測定系を構築した。ApoE ノックアウトマウス LDL 画分より、apoB-48 を分離し、ウサギを免疫した。種々リポタンパク質をプラスチックプレートにコートし、得られた抗血清(硫酸沈殿画分)と抗ヒト apoB-100 抗体の反応特性を比較した。抗マウス apoB-48 抗血清はマウス LDL に強く結合したが、ヒト LDL にもある程度の結合性を示し、交叉反応性はあることが分かった。最初に DLH3 抗体をコートし、マウス OxLDL を結合させた後に、抗 apoB 抗体で挟み込んで検出するサンドイッチ ELISA を行ってみると、マウス OxLDL は抗ヒト apoB-100 抗体では検出できなかったが、抗マウス apoB-48 抗体でのみ検出できることが分かり、マウス OxLDL の測定が可能が示された。

11. SLE 患者の MBL 遺伝子解析と自己抗体検出

患者および健常人の末梢血よりゲノムを調整し、MBL コドン 54 遺伝子多型(アリアル A/B)を PCR-RFLP 法により判定した。血中の MBL 濃度は ELISA により測定した。その結果、SLE166 名につき MBL 遺伝子多型を解析し、正常型ホモ(AA)は 98 名、ヘテロ(AB)は 56 名であった。血中 MBL 濃度の著明な低下を伴う異常型ホモ(BB)は 12 名であり、健常人の 160 名中 2 名に比し有意に高頻度であった。以前おこなった同様の検討と合計すると SLE 患者においては B のアリアル頻度も健常人より有意に高頻度であった。BB 患者は AA あるいは AB 患者に比し、経過中に入院を要する感染症を併発する頻度が高い傾向が見られた。治療に伴う血中 MBL 濃度の変動の傾向と患者の病態の間に一定の傾向は見られなかった。AA 患者において、血中 MBL 濃度と補体 CH50 との間には有意の正の相関が見られた。中枢神経症状、腎症状、漿膜炎等と MBL 遺伝子多型、もしくは血中濃度との明確な関連は見られなかった。最近 SLE 患者において MBL 欠損との関連が指摘されている動脈血栓症については特に詳細に検討した。血栓症の有無につき病歴が明確な SLE 患者 142 名につき検討を行い、動脈血栓症の既往を持つ患者は AA 患者 80 名中 5 名、AB 患者 53 名中 2 名、BB 患者 9 名中 1 名であった。

BB患者で動脈血栓症を既往に持つ危険性はオッズ比 2.25(95% CI 0.25-20.59)、フィッシャー直接確率法による p 値は 0.4159 であり、AA/AB 患者に比し特に高頻度であるということにはなかった。静脈血栓症既往についても同様に明らかな関連は見られなかった。一方、一般的に動脈硬化や血栓症のリスクファクターとされている採血時血中総コレステロール 2.4g/l 以上、男性、発症時 45 歳以上の 3 因子と動脈血栓症既往との間には有意な関連が見られ、さらに、これまでの多くの報告と同様、IgG クラス抗カルジオリピン抗体陽性、ループスアンチコアグラント陽性と動脈血栓症既往との間に有意な関連が見られた。また抗 MBL 自己抗体は MBL と IgG の糖鎖との結合を阻害するため EDTA を加えた ELISA にて測定した。得られたデータを SLE 患者群と健常人群との間で比較し、さらに SLE 患者群では SLE の病勢の指標となりうる各種パラメーター、臓器病変との関連を検討した。抗 MBL 抗体は検索の終了した SLE 患者 132 名中 12 名で健常人の平均+2SD より高値であり、健常人の 113 名中 2 名より有意に高頻度であった。抗体高値と血栓症を含む臨床症状との関連は明らかでなかった。抗 SP-D 自己抗体は抗 MBL 自己抗体と同様の ELISA 法で、SLE96 名、健常人 48 名でスクリーニングをおこなったが明らかに高値と思われる検体は見られなかった。

(倫理面への配慮)

本研究に関連した血液採取、遺伝子解析を含む解析は筑波大学倫理委員会の許可を得、被験者からは文書による同意を得た上でおこなわれた。

D. 考察

コレクチン分子については、約 100 年前から、その存在は明らかになっていたが、川崎らの発表が生化学的な最初の同定であった。その後、肺に存在するサーファクタントからの 2 種のアポリポプロテインの存在が明らかになり、古典的には 3 つのコレクチンファミリー (MBL, SP-A, SP-D) が報告されてきた。主任研究者である若宮は reverse genetic の手法を用いて新たに 3 つのコレクチン遺伝子群 (CL-L1=COLEC10, CL-P1=COLEC12,

CL-K1=COLEC11) を同定した。その中で CL-P1 は、組織における免疫染色では、血管内皮細胞に存在する膜型のコレクチンであった。本研究では、特に MBL と CL-P1 の 2 つのコレクチンに焦点をあてて、その血管における生体防御への応用を目指している。特に、MBL においては、前年度までの 3 カ年において、in vitro で抗 HIV 効果を広範に検討してきた。本研究は、レクチンプロジェクト班のメインテーマと捉えており、若宮、本多、岸 (大学、国立研究所、会社) による産官学 3 者で取り組んでいる。今年度からの 3 カ年で、動物での抗 HIV 効果を検討し、医療応用への第一歩を進ませたいと考えている。本年度は、MBL 発現細胞株の master cell bank の構築や動物での MBL 血中濃度測定システムの樹立などの基盤的な研究が順調に進められた。また、CL-P1 研究においても、基盤的な研究が進み、CL-P1 モノクローナル・ポリクローナル抗体などが完備したことにより、ヒト組織において CL-P1 の発現を免疫組織学的に明らかにできた。また、下等な脊椎動物である魚類においても、ゼブラフィッシュ CL-P1 特異抗体作成により、免疫組織染色で、ヒトと血管網などは異なるが、血管に CL-P1 の存在を証明した。遺伝子データベースにおける blast 検索からは、線虫やホヤなどのさらに下等な動物には CL-P1 は現在のところ明らかになっていないが、魚類のスカベンジャー受容体としては、初めてのものであり、その生理的役割が興味深い。さらに、ゼブラフィッシュ CL-P1 遺伝子に対する RNAi 実験による形態形成不全は、まだ予備的な実験であるが、スカベンジャー受容体やコレクチンが、生体の初期形態形成に関わるとする報告はなく、驚くべき結果が得られている。従来、スカベンジャー受容体はマウスのノックアウト実験から、自然免疫の面に焦点が当てられており、類似の機能を持つと予想されてきた本遺伝子であるが、この初期形態形成の関与や高度に動物間で遺伝子が保存されている事実などから、新たな生理的役割が注目される。一方、細胞レベルでの研究では、OxLDL の酸化度という観点で、分担研究者の板部らが、数種の OxLDL 作成に成功しており、それを用いて新たな視点を見

出している。従来 OxLDL には、酸化の程度を測るマーカーがいくつか存在したが、それがどういう生理的な意義と関係しているか、まったく不明であった。本研究で、酸化レベルが異なると考えられる数種の OxLDL が、おのおの別のスカベンジャー受容体に結合することがはじめて明らかになった。スカベンジャー受容体がなぜ複数存在しているかについての疑問は、現在まで明らかにされていないが、スカベンジャー受容体の、意外に狭い OxLDL に対する結合特異性のために、複数のスカベンジャー受容体が動物で分化・発展してきた可能性が推測される。また、今年度から、新たに研究班に参加した堤は、臨床医学の立場から、MBL の膠原病に対する研究を展開している。若宮らが開発した MBL 測定システムや独自の遺伝子解析技術を組み合わせて、MBL 欠損症に SLE が優位にリンクしていることを明らかにした。さらに、MBL 欠損のある SLE 患者は、入院を要する感染症を併発する頻度も高いことを見出した。このことは小児だけでなく成人においても、基礎疾患のある集団では、MBL 測定の必要性があることを示唆している。また、膠原病患者は、自己抗体の出現することが多いが、MBL に対する自己抗体も優位に出現することを明らかにした。この原因については現在解析中である。

E. 結論

前回3カ年でのHS総合事業では、遺伝子クローニングとその細胞レベルでの解析が進み、その後の研究のための材料作りに集中したが、本3カ年の取組では、より個体レベルでの機能解析に焦点をおいている。初年度の成果の総括としては、MBL では、個体レベルでの、HIV を用いた P3 感染実験がようやく実行手続きが終了し、岸・本多分担研究員と共同で、国立感染症研究所 P3 実験室において、SCIDhu マウス、サルでの実験系の準備が始まった。現在は、実験に使用する MBL の大量作成システムの遂行とそれぞれの動物での投与された MBL 測定系の作成が進められた。また、CL-P1 の動物レベルの実験では、相変わらずマウスのノックアウト実験では、難渋しているが、ゼブラフィッ

シユの RNAi 実験での、形態形成での表現型の変化が見られており、受精後初期の分化発生や形態形成にも関わっていることが明らかになってきた。また、ラットの虚血・再灌流実験では、血管内皮での発現増大の定量化とその生体での機能をさぐる検討を始めている。これらの CL-P1 研究においても、ようやく数種の抗体が用意でき、それらを用いた、ヒトやラットやゼブラフィッシュに対する免疫組織染色系が確立されつつあり、その成果として、ヒト血管において、正常状態で CL-P1 が発現していることが確認できた。CL-P1、MBL ともに、リコンビナント蛋白発現系や抗体作成による測定系も、すべて自前で作成しているので、研究成果がでるのに時間はかかっているが、動物モデルやヒトなど、個体レベルでの研究成果が出つつあり、着実に進展した初年度であったと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Muraki Y, Goto D, Matsumoto I, Wakamiya N, Sumida T. Association of mannose-binding lectin(MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann.Rheum. Dis.*:2005 64(2):311-314
- Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Wakamiya N, Sumida T. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*: 2004 136(3):585-590.
- Kitamoto N, Kobayashi T, Kato Y, Wakamiya N, Ikuta K, Tanaka T, Miyamoto H, Kato S.: Possibility of rapid detection for Variola virus using monoclonal antibody cross-reacted with Orthopoxviruses. *Microbiol. Immunol.* 印刷中
- Zhang, B., Bai, H., Liu, R., Itabe, H., Takano, T. and Saku, K.: HDL-C levels

modify the association between plasma levels of oxidatively modified LDL and coronary artery disease in men. *Metabolism*, 53 (2004) 423-429.

- Fujimoto, Y., Itabe, H., Sakai, J., Makita, M., Noda, J., Mori, M., Higashi, Y., Kojima, S. and Takano, T.: Identification of the major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim. Biophys. Acta.* 1644 (2004) 47-59.
- Kayo, S., Ohsawa, M., Ehara, S., Naruko, T., Ikura, Y., Hai, E., Yoshimi, N., Shirai, N., Tsukamoto, Y., Itabe, H., Higuchi, K., Arakawa, T. and Ueda, M.: Oxidized low density lipoprotein levels circulating in plasma and deposited in the tissues: Comparison between *Helicobacter pylori*-associated gastritis and acute myocardial infarction. *American Heart Journal*, 148 (2004) 818-25.
- Kawamura, K., Ishikawa, K., Wada, Y., Matsumoto, H., Itabe, H., Kodama, T. and Maruyama, Y.: Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction against pro-inflammatory stresses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2004) in press.
- Hamano, T, P. Sawanpanyalert, H. Yanai, S. Piyaworawong, T. Hara, S. Sapsutthipas, J. Phromjai, S. Yamazaki, N. Yamamoto, P. Warachit, M. Honda and K. Matsuo. Determination of HIV-1 CRF01_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 20 (3):337-340, 2004.
- Dewan Z, Watanabe M, Terashima K, Aoki M, Sata T, Honda M, Ito M, Yamaoka S, Watanabe T, Horie R, Yamamoto N: Prompt tumor formation and maintenance of constitutive

NF- κ B activity of multiple myeloma cells in NOD/SCID \cdot *enall* mice. *Cancer Sci* 95: 564-568, 2004.

- Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M. The normalization of guinea pig leukocyte fractions and lymphocyte subsets in blood and lymphoid tissues using a flow cytometric procedure. *Experimental Animals* 53:321-329, 2004.
 - Yamakami, K., M. Honda, M. Takei, Y. Ami, T. Nakasone, N. Kitamura, S. Nishinarita, S. Sawada, and T. Horie. Early bone marrow hematopoietic defect in SHIV C2/1-infected macaques and relevance to advance of disease. *J. Virol.* 78:10906-10910, 2004.
 - 若宮伸隆、吉田逸朗、小笠原正洋、福澤純、大谷克城、小山聡: 生体防御レクチンとしてのコレクチンファミリー. *北海道医学雑誌* 79(1):3-7, 2004.
 - 若宮伸隆: 自然免疫において MBL はどのような役割を果たすのか分子消化器病 1(2):149-155, 2004.
2. 学会発表
- Satoshi Koyama, Jun Fukuzawa, Katsuki Ohtani, Seong-Jae Jang, Atsushi Fukuoh, Nobutaka Wakamiya: The membrane type collectin CL-P1 is up-regulated in ischemia/reperfusion model in rats. *International Lectin Meeting*, 2004
 - Seong-Jae Jang, Katsuki Ohtani, Masahiro Ogasawara, Itsuro Yoshida, Nobutaka Wakamiya: Scavenger receptor hCL-P1 mediated Bacterial phagocytosis through adaptin mu2 subunit in CHO tranfectants. *International Lectin Meeting*, 2004
 - Mitsuko Fukuda, Kenta Furukawa, Tsukasa Uchida, Yuju Kondo, Wataru Motomura, Katsuki Ohtani, Nobutaka Wakamiya. *International Lectin Meeting*, 2004
 - 板部洋之: 動脈硬化と酸化ストレス 第24

回日本脳神経外科コンgres、2004、徳島、
シンポジウム

- 板部洋之、小田喜美穂、藤本康之、森雅博、
高野達哉：泡沫化マクロファージの細胞内脂
肪滴局在タンパク質 ADRP 第 46 回日本脂質
生化学会、2004、熊本
- Itabe, H. : Oxidized phosphatidyl-
cholines in human plasma and in
atherosclerotic lesions. The 2nd
International Conference on Phospholipase
A2 and the 8th International Congress on
Platelet-Activating Factor and Related
Lipid Mediators, 2004, Berlin, symposium
- 板部洋之：生体内酸化リポタンパク質の性状
と動態 日本過酸化脂質・フリーラジカル学
会第 28 回大会、2004、名古屋、シンポジウム
- 山上賢治、武井正美、網康至、仲宗根正、北村
登、三田村巧、本多三男、澤田滋正：病原性
SHIV C2/1 感染カニクイザルにおける早期骨髄
幹細胞コロニー形成の障害と病態進行への関連
性 第 18 回日本エイズ学会総会 (12/9-11, 200
4, 静岡)
- Someya K, Matsuo M, Izumi Y, Ami Y, Nakasone
T, Yamamoto N, Honda M. A novel recombinant
vaccinia DIs is replication deficient and efficiently
elicits virus-specific positive-immunity 第 18 回日
本エイズ学会総会 (12/9-11, 2004, 静岡)
- 原敬志、坂本優子、照沼裕、仲宗根正、本多
三男、山本直樹、巽正志 アフリカ由来 HIV-1
subtype C 感染性分子クローンの樹立と解析
第 18 回日本エイズ学会総会(12/9-11,2004,
静岡)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記なし