

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590476

研究課題名（和文） パターン認識分子フィコリンの自然免疫における役割

研究課題名（英文） Physiological role of ficolin, a pattern-recognition molecule

研究代表者

遠藤 雄一（ENDO YUICHI）

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20117427

研究成果の概要（和文）：

フィコリン(Ficolin) の生理的役割を明らかにするために、フィコリン欠損マウスを作製し、細菌感染に対する抵抗性などの表現型を解析した。その結果、フィコリンAは、セリンプロテアーゼMASPと複合体を形成し、補体レクチン経路を活性化して、細菌など非自己の補体によるオプソニン化とその排除に寄与していることが明らかになった。とくに、肺炎の主な原因細菌である肺炎球菌の感染防御に関してはフィコリンが中心的役割を持つことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

To explore the physiological role of ficolin, ficolin-deficient mice were established. Ficolin A-deficient mice lacked the lectin pathway driven by ficolin A, where ficolin A was complexed with serine protease MASP and the complex induced C3 opsonization on bacteria. By infection *in vivo*, this pathway was found to play a crucial role in the elimination of bacteria, especially of *Streptococcus pneumoniae* which is a major cause of pneumonia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	1,300,000	0	1,300,000
平成19年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成20年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫 生体防御、フィコリン、レクチン経路、補体

1. 研究開始当初の背景

自然免疫における自己と非自己の識別は、細菌やウィルスの表面の特異的な分子パターンを認識することによると考えられてい

る。申請者らは、オプソニン作用を持つレクチンとして、はじめてフィコリン（Ficolin, P35）をヒト血中に見出した（1996）。さらに、フィコリンが血中でセリンプロテアーゼ

MASP と複合体を形成し、レクチン経路と命名した経路を介して、補体系を活性化することを報告した(2000)。フィコリンは、フィブリノーゲン様ドメインを機能ドメインとして、非自己表面に存在する分子パターンの認識に関与していると推定されている。しかし、フィコリンを認識分子とするレクチン経路が、生体中で実際に何を標的として働いているのかについては不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、フィコリンが細菌などの外来異物および非自己化した細胞の認識と除去に関与することを明らかにするために、以下を目的とした。

- (1) 血清型フィコリン (フィコリン A) と非血清型フィコリン (フィコリン B) それぞれについて欠損マウスを作成し、その感染防御能力を野生型マウスと比較する。
- (2) 欠損マウスの組織異常やアポトーシスの異常を解析し、フィコリンが非自己化した細胞の認識に働くことを明らかにする。
- (3) 組換えタンパクを投与して、傷害された能力を回復させることにより、フィコリン A およびフィコリン B の機能を確認する。

3. 研究の方法

- (1) ジーンターゲット法により、フィコリン A 遺伝子およびフィコリン B 遺伝子を破壊し、それぞれフィコリン A 欠損マウスおよびフィコリン B 欠損マウスを作製した。また、両者を交配して、フィコリン A/B 欠損マウスを作製した。
- (2) フィコリン欠損マウスの各臓器の異常の有無を組織染色法で調べた。また、TUNNEL 染色法などの方法により、アポトーシスの以上の有無を調べた。
- (3) フィコリン欠損マウスの血液における補体レクチン経路の異常の有無 (MASP との複合体形成、補体の活性化、細菌との結合反応、細菌のオプソニン化など) を生化学的手法 (クロマトグラフィ、ウェスタンブロット、FACS、ELISA など) により調べた。
- (4) 血液に組換えフィコリンを添加して補体レクチン経路を再構築し、低下した活性を回復させる実験をした。
- (5) フィコリン欠損マウスに、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) を経鼻感染させ、生存率を調べた。肺の組織に残存している細菌をコロニーでカウントした。

4. 研究成果

- (1) 3種類 of フィコリン欠損マウスの肝臓、肺、脾臓などの主な臓器に、大きな組織

異常は観察されなかった。

- (2) 血液の補体レクチン経路を調べた結果、フィコリン A 欠損マウスとフィコリン A/B 欠損マウスにおいて、フィコリンを認識分子とするレクチン経路の活性が低下していることがわかった。低下した活性は、組換えフィコリン A の添加により回復した。
- (3) 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の増殖を、マンノース結合レクチン (MBL) を除いたフィコリン A 欠損マウスの血液中で調べた結果、有意に増加していることがわかった。この増殖亢進は、組換えフィコリン A の添加により抑制された。
- (4) 肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) をフィコリン A 欠損マウスに経鼻感染させて生存率を調べた結果、野生型マウスと比較し低下していることがわかった。肺組織の細菌数も高値であった。
- (5) これらの結果から、フィコリンは補体レクチン経路を介して、細菌感染に対する自然免疫に働いていることが明らかになった。とくに、肺炎球菌による肺炎の防御には大変重要な役割を果たしていることが判明した。

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 17 件)

- 1) Takahashi M, Ishida Y, Iwaki D, Kanno K, Suzuki T, Endo Y, Homma Y, Fujita T. Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *J Exp Med*, 207:29-37, 2010. (査読有り)
- 2) Endo Y, Nakazawa N, Iwaki D, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T. Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway. *J Innate Immunity*, 2:33-42, 2010. (査読有り)
- 3) Abe K, Endo Y, Nakazawa N, Kazuko K, Okubo M, Hoshino T, Fujita T. Unique phenotypes of C1s-deficiency/abnormality caused by two compound heterozygosities in a Japanese family. *J Immunol*, 182:1681-1688, 2009. (査読有り)
- 4) Arika S, Takahara S, Shibata T, Fukuoka T, Ozaki A, Endo Y, Fujita T, Koshiba T, Kawabata S. Factor C Acts as a Lipopolysaccharide-Responsive C3 Convertase in Horseshoe Crab Complement Activation. *J Immunol*, 181:

7 9 9 4- 8 0 0 1,2 0 0 8. (査読有り)

- 5) Takahashi M, Iwaki D, Kanno K, Ishida Y, Xiong J, Matsushita M, Endo Y, Miura S, Ishii N, Sugamura K, Fujita T. Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J Immunol*, 180:6132-6138, 2008. (査読有り)
- 6) Endo Y, Matsushita M, Fujita T. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. *Immunobiology*, 212:371-379, 2007. (査読有り)
- 7) Unterberger C, Hanson S, Klingenhoff A, Oesterle D, Frankenberger M, Endo Y, Matsushita M, Fujita T, Schwaeble W, Weiss EH, Ziegler-Heitbrock L, Stover C. Stat3 is involved in control of MASP2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 364:1022-1025, 2007. (査読有り)
- 8) Garlatti V, Belloy N, Martin L, Lacroix M, Matsushita M, Endo Y, Fujita T, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ, Thielens NM, Gaboriaud C. Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *EMBO J*, 26:623-633, 2007. (査読有り)
- 9) Endo Y, Liu Y, Fujita T. Structure and Function of ficolins. *Adv Exp Biol Med*, 586:265-279, 2006. (査読有り)
- 10) Endo Y, Takahashi M, Fujita T. Lectin complement system and pattan recognition. *Immunobiology*, 211:283-293, 2006. (査読有り)
- 11) Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Lynch NJ, Schwaeble WJ, Matsushita M, Okabe M, Fujita T. Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. *J Immunol*, 177:8626-32, 2006. (査読有り)
- 12) Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, Endo Y, Nishimura J, Kurokawa K, Kuwayama M, Shime H, Machii T, Kanakura Y, Meyers G, Wittwer C, Chen Z, Babcock W, Frei-Lahr D, Parker C, Kinoshita T. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in two patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*, 108:4232-6, 2006. (査読有り)
- 13) Chen X, Katoh Y, Nakamura K, Oyama N, Kaneko F, Endo Y, Fujita T, Nishida T, Mizuki N. Single nucleotide polymorphisms of ficolin 2 gene in Behçet's disease. *J. Dermatol. Sci*, 43:201-205, 2006. (査読有り)
- 14) Takahashi M, Iwaki D, Matsushita A, Nakata M, Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Cloning and characterization of mannose-binding lectin

from lamprey (Agnathans). *J Immunol*, 176:4861-4868, 2006. (査読有り)

[学会発表] (計 12 件)
(シンポジウム)

- 1) 遠藤雄一、岩城大輔、高橋実、松下操、藤田禎三 補体レクチン経路の分子基盤と系統発生 第 46 回補体シンポジウム 2009 年 8 月 22 日 福岡
- 2) 遠藤雄一、岩城大輔、高橋実、松下操、藤田禎三 認識分子フィコリンの構造と働き 第 44 回補体シンポジウム 2007 年 8 月 24 日 平塚
(一般講演)
- 3) Endo Y, Nakazawa N, Kanno K, Liu Y, Iwaki D, Takahashi M, Nakata M, Matsushita M, Okabe M, Fujita T. Ficolin A functions to eliminate pathogens through the lectin complement pathway. XXIst International Complement Workshop, 2006 10 23, Beijing: Molecular Immunology 44:166.

[図書] (計 1 件)

- 1) Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Ficolins: The structural basis for recognition plasticity. Vasta G R and Ahmed H eds. *Animal Lectins: A Functional View*. CRC Press, 503-510, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 雄一 (ENDO YUICHI)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20117427

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：