

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2009

課題番号：19390227

研究課題名（和文） 腎組織に存在する新規コレクチン分子の基盤的解析

研究課題名（英文） Basic analysis of new collectins in renal tract.

研究代表者

若宮 伸隆 (WAKAMIYA NOBUTAKA)

旭川医科大学・医学部医学科・教授

研究者番号：20210867

研究成果の概要（和文）：初年度において、各種リコンビナントコレクチン作成とその抗体作成を行った。遺伝子改変動物の作成については、ノックアウトマウスはCL-P1、CL-K1について両者とも、キメラマウスが樹立でき、さらにヘテロマウス作成が終了し、精子保存にてノックアウト表現型解析に進んでいる。平成22年度末の時点で、CL-P1は、仔マウスとして誕生せず、胎生致死に関与する遺伝子であると考えられた。一方、CL-K1ノックアウトマウスは無事誕生し、一見正常に見えた。しかしながら、ノックアウトマウス個体が野生型の通常マウスに比較して小型であることや、誕生個体が少ないことより、個体発生や生育に関与する遺伝子である可能性がでていいる。腎組織における検討では、局在は異なるが両コレクチンの存在することが、本研究により再確認されたが、上記マウスを用いた病態における意義については十分な解析結果が得られていない、今後の検討が待たれる。

研究成果の概要（英文）：

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
20年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
21年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科

キーワード：腎疾患、コラーゲン、レクチン

1. 研究開始当初の背景

現在、慢性腎不全から人工透析へと移行する患者は、毎年3万人規模で増加しており、一方、透析患者は、そのコントロール・機器の進歩により、透析患者の長期予後が改善されてきた。しかし、この透析患者数の増加は、国民の医療費を増大させる大きな原因となっており、慢性腎疾患から人工透析に至る患者数を減少させることは非常に重要な意味をもつ。現在、腎不全の原因は、糖尿病性腎症とIgA腎症などの慢性糸球体腎炎からの進展が主であるが、はっきりした原因が何であるかについては明らかになっていない。しかしながら、何らかの物質が糸球体に結合、沈着し、そのことが引き金になって、免疫・炎症系の活性化が引き起こされ、これらの炎症が繰り返しおこることで、糸球体と尿細管にダメージが加えられ、その後メサンギウム細胞や糸球体基底膜の肥厚や異常増殖がおこり、過レベルが低下すると、それを補うために糸球体と尿細管の過能の異常代償がおこる、その結果さらに炎症性因子の過剰分泌に伴う結合組織・繊維化増大や糸球体・尿細管破壊に進展、この悪性サイクルが長期に続き腎不全に至ると考えられている。これら腎炎の治療としては、劇症型や急性型には、免疫抑制剤やステロイドの投与による免疫システムの抑制が行われる。一方、慢性型や長期の腎不全への移行を防ぐ方法としては、腎血流量を低下させ、炎症性因子の減少をもたらすと考えられているACE阻害薬などの処方による、腎機能正常化をめざす治療法が期待されている。近年、IgA腎症においては、血中のIgAがその糖鎖にムチン様の異常糖鎖をもつこと、これらのムチン型糖鎖を有するIgAが、患者の糸球体に異常沈着し、血中にも高濃度で存在することが報告されている。しかも、新しい治療法として、ステロイドのパルス療法と扁桃切除の組み合わせにより、血中の異常IgA低下にとともに、IgA腎症の治癒することが報告されている。一方、糖尿病においても、AGE化合物が産生され、これらが腎組織に蓄積され、腎障害をおこす可能性が明らかになっている。しかしながら、糖尿病やIgA腎症などでは、「なぜこれらの物質が腎臓の糸球体に結合し、沈着しやすいのか？」糸球体と尿細管などには、これらの糖鎖に対応するレクチン様分子やAGE化合物の受容体とされているRAGEやスカベンジャー受容体の報告はなく、そのメカニズムの解明に突破口が無かった。申請者である若宮は、ウイルスインヒビターとしての

MBL研究から研究をスタートしたが、生体防御レクチンとは異なる、3つの新規レクチン遺伝子の同定に成功し、新規レクチン群の局在探索の過程で、新規レクチンが、腎組織にあることを予備実験で見出した。

2. 研究の目的

申請者は、本研究で、CL-K1とCL-P1遺伝子の腎臓での発現や局在を分子レベルで明らかにすること、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスやそれらと他の腎疾患モデルマウスと交配させたマウスを作り、それらの病態観察とその場における新規レクチンの発現状態の比較検討を行うこと、動物やヒトの種々の腎疾患の病態とレクチン分子の相互関係を明らかにし、個体レベルでのそれらの役割を解明することを大きな目的としている。

3. 研究の方法

研究計画として以下の4つのプロジェクトに分けられ、それぞれ遂行された。

- (1) リコンビナントCL-K1・CL-P1作成とそれらの抗体作成を行い、各種リガンドとの結合検討
- (2) CL-K1・CL-P1ノックアウトマウスとトランスジェニックマウス樹立。
- (3) 腎疾患モデルマウスや上記マウスとの交配による腎病態解析とレクチンの局在検討
- (4) ヒトにおける種々の腎疾患におけるCL-K1とCL-P1の発現解析と病態との役割検討

4. 研究成果

(1) リコンビナントレクチンは、大腸菌とハムスター卵巣(CHO)細胞を用いて行い、抗原を過免疫して、ポリクローナル抗体と単クローン抗体を作成した。リコンビナントレクチンに対して、糖質に対する反応性や各種リガンドに対する反応性も同時に検討された。また、得られた上記抗体の特異性に関する検討は、ELISA法によって検討され、現時点での最適な組み合わせを見出した。しかしながら、中和抗体を含め、さらなる適切組み合わせセットを決定するには、さらなる多くの種類の抗体作成が必要であると考えられた。

(2) 遺伝子改変動物の作成については、ノックアウトマウスはCL-P1、CL-K1について両者とも、キメラマウスが樹立でき、さらにヘテロマウス作成が終了し、精子保存にて

マウスの種の保存が確認できてから、ノックアウト解析に進んでいる。CL-P1では、ヘテロマウスの掛け合わせによる仔マウスとしてヌルノックアウトマウスが誕生せず、さらに妊娠7日、10.5日においても胎仔が存在せず、CL-P1ノックアウトマウス表現型は早期胎生致死であると考えられた。一方、同じく作成されたCL-K1ノックアウトマウスでは無事に仔マウスは誕生し、一見正常マウスに見えた。しかしながら、本KOマウスにおいてもノックアウト同士の掛け合わせでは胎生致死である結果がでており、いずれのコレクチンにおいても、妊娠初期の形態形成に関与することが明らかになった。トランスジェニックマウスについては、CL-P1、CL-K1両遺伝子において、ベクター作成が行われ、すでに受精卵への打ち込みを行う段階となっている。マウス作成による、胎生胚における局在とその後のマウスにおける発現局在の検討を次に行い、ノックアウトマウスへのノックインによる表現型回復検討に用いる予定である

(3) 腎疾患モデルマウスにおける組織染色や腎機能不全モデルの作成を行った。次に、遺伝子改変マウスと腎疾患マウスとの交配による腎病態解析とコレクチンの局在検討の予定であったが、平成21年度にCL-K1 KOマウスが樹立できたので、現在交配を行っているところである。遺伝子解析により、交配マウスが作成できた時点で次の検討を行うことを予定している。

(4) ヒトにおける種々の腎疾患におけるCL-K1とCL-P1の発現解析と病態との役割検討腎疾患についての検討は、ヒトでの各種腎炎や腫瘍が存在する市販組織切片を用いての検討を行っている。その局在としては、尿細管や糸球体において、その発現が正常腎でも認められている。さらに、上記腎疾患組織サンプルでは、一部腎炎においてコレクチン遺伝子の発現増強が見られる所見が得られているが、そのステージや腎障害のレベルによって、その発現が相関するか否かなどについては統計学位的な優位差を確認できていない。

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20件)

1. Shimizu, T., Nishitani, C., Mitsuzawa, H., Ariki, S., Takahashi, M., Ohtani, K., Wakamiya, N., Kuroki, Y.: Mannose binding lectin and lung collectins interact with Toll-like receptor 4 and MD-2 by different mechanisms. *B.B.A.* 1790:1705-1710. 2009.
2. Jang S-J, Ohtani K, Fukuoh A, Yoshizaki T,

- Fukuda M, Motomura W, Mori K, Fukuzawa J, Kitamaoto N, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya, N.: Scavenger receptor collectin placenta 1 (CL-P1) predominantly mediates zymosan phagocytosis by human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 284(6): 3956-65. 2009.
3. Kumei S, Motomura W, Yoshizaki T, Takakusaki K, Okumura T.: Troglitazone increases expression of E-cadherin and claudin 4 in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 380(3):614-9. 2009.
4. Tsuchiya Y, Takahashi N, Yoshizaki T, Tanno S, Ohhira M, Motomura W, Tanno S, Takakusaki K, Kohgo Y, Okumura T.: A Jak2 inhibitor, AG490, reverses lipin-1 suppression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 382(2):348-52. 2009.
5. Adhikari BR, Pandey BD, Ghimire P, Shrestha B, Khadka M, Yoda T, Suzuki Y. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the direct detection of human pulmonary infections with environmental (nontuberculosis) mycobacteria. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 212-214. 2009.
6. Motomura W, Yoshizaki T, Ohtani K, Okumura T, Fukuda M, Fukuzawa J, Mori K, Jang SJ, Nomura N, Yoshida I, Suzuki Y, Kohgo Y, Wakamiya, N.: Immunolocalization of a novel collectin CL-K1 in murine tissues. *J Histochem Cytochem* 56(3):243-52. 2008.
7. Edagawa A, Kimura A, Doi H, Tanaka H, Tomioka K, Sakabe K, Nakajima C, Suzuki Y. Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 105:2104-2114. 2008.
8. Matsuoka M, Aye KS, Kyaw K, Tan EV, Balagon MV, Saunderson P, Makino M, Nakajima C, Suzuki Y. A novel method to simply detect mutations conferring drug resistance in *Mycobacterium leprae* based on a DNA microarray, and its applicability in developing countries. *J. Med. Microbiol.* 57: 1213-1219. 2008.
9. Pandey BD, Poudel A, Yoda T, Tamaru A, Oda N, Fukushima Y, Lekhak B, Risal B, Acharya B, Sapkota B, Nakajima C, Taniguchi T, Phetsuksiri B, Suzuki Y. Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of

- Nepalese patients. *J. Med. Microbiol.* 57: 439-43. 2008.
10. Higuchi M, Matsuo A, Shingai M, Shida K, Ishii A, Funami K, Suzuki Y, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Combinational recognition of bacterial lipoproteins and peptidoglycan by chicken Toll-like receptor 2 subfamily. *Dev. Comp. Immunol.* 32:147-55. 2008.
 11. Kawai T, Kase T, Suzuki Y, Eda S, Sakamoto T, Ohtani K, Wakamiya, N.: Anti-influenza A virus activities of mannan-binding lectins and bovine conglutinin. *J Vet Med Sci.* 69(2):221-4. 2007.
 12. Ohhira M, Motomura W, Fukuda M, Yoshizaki T, Takahashi N, Tanno S, Wakamiya, N., Kohgo Y, Kumei S, Okumura T.: Lipopolysaccharide induces adipose differentiation-related protein expression and lipid accumulation in the liver through inhibition of fatty acid oxidation in mice. *J Gastroenterol.* 42:969-78. 2007.
 13. Yoda T, Suzuki Y, Yamazaki K, Sakon N, Kanki M, Aoyama I, Tsukamoto T. Evaluation and Application of Detecting Norovirus using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Med. Virol.* 79:326-334. 2007
 14. Matsuba T, Suzuki Y, Tanaka Y. Association of the Rv0679c protein with lipids and carbohydrates in Mycobacterium tuberculosis/Mycobacterium bovis BCG. *Arch. Microbiol.* 187:297-311. 2007

[学会発表] (計 1 4 件)

1. K Ohtani, K Azumi, S-J Jang, K Mori, W Motomura, I Yoshida, Y Suzuki, N.Wakamiya, N.; Molecular Cloning and Characterization of Novel Ascidian Collectins. Prague (Czech Republic), 2009.6.
2. Wakamiya, N., Ohtani K, Azumi K, Jang S-J, Mori K, Fukuzawa J, Yoshida I, Suzuki Y.: Cloning and characterization of novel Ascidian collectins. INTERLEC-23. Stirling (Scotland), 2008.7.

[図書] (計 1 件)

1. Suzuki Y, Ohtani K, Wakamiya, N.: The novel collectins, CL-L1, CL-P1 and CL-K1. *COLLAGEN-RELATED LECTINS IN INNATE IMMUNITY* Kilpatrick D. edd. Research Spotlight, KereLa, India. p85-101. 2007. (REVIEW).

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: コレクチン活性を有する hCL-K1 ポリペプチド
 発明者: 若宮伸隆、その他 4 名
 権利者: 扶桑薬品工業株式会社
 種類: PCT
 番号: JP2007/057632
 出願年月日: 2007.4.05
 国内外の別: 国外

○取得状況 (計 5 件)

名称: 組換えマンナン結合タンパク質
 発明者: 若宮伸隆
 権利者: 扶桑薬品工業株式会社
 種類: PCT
 番号: 11/241035 号
 取得年月日: 2009.08.11.
 国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/microbio/microbiology.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若宮伸隆 (WAKAMIYA NOBUTAKA)
 旭川医科大学・医学部・教授
 研究者番号: 20210867

(2) 研究分担者

大谷 克城 (OHTANI KATSUKI)
 旭川医科大学・医学部・助教
 研究者番号: 90396367
 鈴木 定彦 (SUZUKI YSUHIKO)
 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授
 研究者番号: 90206540
 吉田 逸朗 (YOHIDA ITSURO)
 旭川医科大学・医学部・准教授
 研究者番号: 20041816
 本村 亘 (MOTOMURA WATARU)
 旭川医科大学・医学部・助教
 研究者番号: 70374791
 張 成宰 (JANG SEONG-JAE)
 旭川医科大学・医学部・特任助教
 研究者番号: 50466497

(3) 連携研究者

無し