

平成21年6月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591265

研究課題名（和文）糖鎖を介する生体内機能分子へのレクチン経路の関与と疾病への影響

研究課題名（英文）Contribution of intravital functional molecules through sugar chains to the lectin pathway, and its influence to diseases.

研究代表者

寺井 格 (TERAI ITARU)

酪農学園大学・酪農学部・教授

研究者番号：40337043

研究成果の概要：

L-フィコリン（L-FCN）とH-フィコリン（H-FCN）は、日齢0～5で血清値の上昇傾向が認められ、出生前後での急激な外界変化への対応のために、これらが上昇したものと考えられた。生体内機能性糖蛋白に活性酸素による酸化ストレスを加えると、マンノース結合レクチン（MBL）との結合性の上昇が認められた。このことから、MBLを中心としたレクチン経路が活性酸素による虚血再灌流障害発症の一因をなす可能性が示唆された。塩基性蛋白に対し、ヒトMBLはCa依存性に、ヒトL-FCNはCa非依存性に結合したが、ヒトH-FCNでは結合は認められなかった。ヒストンなどの塩基性蛋白の処理にMBLやL-FCNが関与している可能性が示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：

(1) マンノース結合レクチン	(2) 補体活性化	(3) レクチン経路
(4) 活性酵素	(5) 虚血再灌流障害	(6) 糖鎖
(7) フィコリン	(8) 塩基性蛋白	

1. 研究開始当初の背景

ヒト血中に存在するマンノース結合レクチン（MBL）は、糖鎖を認識・結合しそれ自

身でオプソニン活性を有するレクチンである。MBLはプロテアーゼ（MBL associated serine protease: MASP）と複合体を形成し

ており、特定の糖鎖と結合すると補体系を活性化する。この補体活性化経路をレクチン経路とよぶ。MBL は特定の糖鎖構造を有するウイルス、細菌、寄生虫、真菌等の異物排除に寄与し、MBL の遺伝子変異による欠損症では種々の反復感染を招来する。近年、感染症のみならず慢性関節リウマチ、SLE、川崎病、原発性胆汁性肝硬変症、アルツハイマー病、糖尿病（インスリン抵抗性と肥満）などへの関与も指摘されており、甲状腺ホルモンや成長ホルモン投与で MBL 合成促進が認められるなど臨床的重要性が増している。MBL 欠損症に対しては最近補充療法が考えられており、現在、1, 2, 3 相試験が行われている。近年、mannose 残基に結合した MBL に多形核白血球 (PMN) が凝集し、PMN から活性酸素の産生や PAF などの走化性因子の放出が見られたこと、虚血・再灌流 (ischemia-reperfusion; I/R) による酸化ストレスが MBL の血管壁への沈着とレクチン経路の活性化を促進すること、腹部大動脈瘤修復術後の I/R により血中 MBL の消費が起きること、MBL ノックアウトマウスに腎の I/R を施すと MBL 依存性に腎障害が起きること、MBL 高値では拒絶反応を起こし腎移植は失敗すること、シアル酸が外れているアポトーシス細胞に MBL が結合し、マクロファージ (Mφ) が MBL レセプター (calreticulin / CD91) を介してそれらを飲込む現象がみられたこと、およびサイトカイン分泌への MBL の関与、などが次々と報告され、MBL の炎症反応などへの積極的関与が注目されている。

MBL には 3 種類の MASP (MASP-1, 2, 3) と sMAP (MAp19) が結合しており、MASP-2 に C4 と C2 分解活性がある。ごく最近、遺伝子変異に基づく MASP-2 の欠損が見つかった。レクチン経路は古典経路の原始型と考えられるが、MASP-1, 2, 3 あるいは sMAP の機能分担は不明であり MBL への結合の化学量論的比率も未

解明のままである。近年、MASP-1, 2, 3 や sMAP に結合しレクチン経路を活性化する物質としてフィコリンが同定された。フィコリンはコラーゲン様ドメインとフィブリノーゲン様ドメインをもつ蛋白質のファミリーで、ヒトでは 3 種類のフィコリンが同定されている。そのうち、2 種類 (L-フィコリンと H-フィコリン) がレクチン活性の有る血清蛋白質で、MBL と同様にオプソニンとしての機能を持つと共にレクチン経路による補体活性化能を有している。これらはいずれも生体防御レクチンとして自然免疫に働いていると考えられるが実体は不明な点が多い。

2. 研究の目的

補体活性化レクチン経路を起動する MBL とフィコリンならびに関連蛋白の生体内動態を知り、他の生体内機能分子の分子変性と MBL やフィコリンとの結合性を検討することにより虚血再灌流障害や炎症との関係を明らかにすると共に、それら病態の発症予防対策の一助とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 補体活性化レクチン経路を起動する MBL とフィコリンならびに関連蛋白の生体内動態を知るために、L-FCN、H-FCN、MASP-1、MASP-2、MASP-3 の ELISA 系を確立した。いずれも、特異抗体を microtiter plate (NUNC) に固相化し、ビオチン化した他の特異抗体で検出するサンドイッチ ELISA 法を用いた。抗体のビオチン化は常法に従った。固相用抗体および検出用抗体として、L-FCN は MAb-anti-human-L-FCN (GN4) 10 μ g/ml と Biotinylated MAb-anti-human-L-FCN (GN5) を、H-FCN は MAb-anti-human-H-FCN (4H5) 1 μ g/ml と Biotinylated PAb-Rb-anti-human-H-FCN (福岡赤十字血液センターから供与)

を、MASP-1 は MAb-anti-human-MASP-1 (Santa Cruz 社、50839) 2 μ g/ml と Biotinylated MAb-anti-human-MASP-1 (Santa Cruz 社、50843) を、MASP-2 は MAb-anti-human-MASP-2 (Hycult 社、6G12) 1 μ g/ml と Biotinylated MAb-anti-human-MASP-2 (Hycult 社、8B5) を、MASP-3 は MAb-anti-human-MASP-1/3 (R&D 社、1E2) 2 μ g/ml と Biotinylated MAb-anti-human-MASP-3 (Abcam 社、65901) を用いた。検体と固相化抗体との反応は室温 2 時間、ビオチン化抗体による検出反応は 4°C 一夜、ストレプトアビジンとビオチン化抗体による検出反応は室温 2 時間とした。発色には 0-phenyldiamine を用い、492 nm で吸光度を測定した。検量線を求める際に、プール血清を標準血清として用い、それを 100 U/ml として定量値を表出した。各々の抗原につき、ELISA を用いて各種血清の濃度測定を行ったが、L-FCN と H-FCN については、年齢変化、特に出生直後の変動にスポットをあてて測定した。

(2) ヒト免疫グロブリンを始めとする生体内機能性糖蛋白を固相化したマイクロタイタープレートに、37°C、硫酸銅溶液 (0.1~100 mM) と過酸化水素 (0.1~1000 mM) による酸化ストレスを加え、ブロックした後、2.5 mM CaCl_2 或いは 10 mM EDTA 存在下、活性酸素で変性した機能性糖蛋白へのヒト MBL の結合性を調べた。生体内機能性糖蛋白としては Invertase, ヒトミエローマ IgE (Des) や IgM (Loy)、IgA₂M₂ (Kur) を用い、ビオチン化 MBL でその結合性を調べた。

(3) microtiter plate を各種塩基性蛋白でコートし、ブロックした後、さらに、2.5 mM CaCl_2 或いは 10 mM EDTA 存在下、ビオチン化 MBL を添加するか、または、MBL 或いは L-FCN、

H-FCN を添加し、それらのビオチン化抗体 (Biotinylated MAb-anti-human-MBL (3E7)、Biotinylated MAb-anti-human-L-FCN (GN5)、Biotinylated MAb-anti-human-H-FCN (4H5)) による検出反応にて、結合性を調べた。塩基性蛋白としては、Histone (from calf thymus), Protamine (from salmon), Poly-L-Lys, Poly-D-Lys, Poly-L-Arg, Poly-(Lys-Tyr=4:1)、Poly-(Lys-Tyr=1:1)、Poly-(Lys-Tyr=1:9)、Poly-L-His、Lysozyme (from egg white)、Crystalline (from bovine eye lens)、Fibronectin (from human plasma)、Myelin Basic Protein (MBP; from bovine brain) を、コントロールとしてヒト血清アルブミン (HSA) を、他の参考生体分子として鮭皮コラーゲン、牛骨ゼラチン、DNA (<50bp) を用いた。

4. 研究成果

(1) L-フィコリン (L-FCN) と H-フィコリン (H-FCN) 各々の出生直後の変動にスポットをあて、臍帯血 (日齢0) ならびに日齢1から5までの毎日の静脈血につき血清濃度測定を行った。その結果、MBL 程の顕著な上昇 (図 1-A) ではないものの、L-FCN (図 1-B) と H-FCN (図 1-C) 共に日齢0~5 で血清値の上昇傾向が認められた。このことは、MBL と同様に、出生前後での急激な外界変化への対処のために、L-FCN、H-FCN も上昇したものと考えられた。

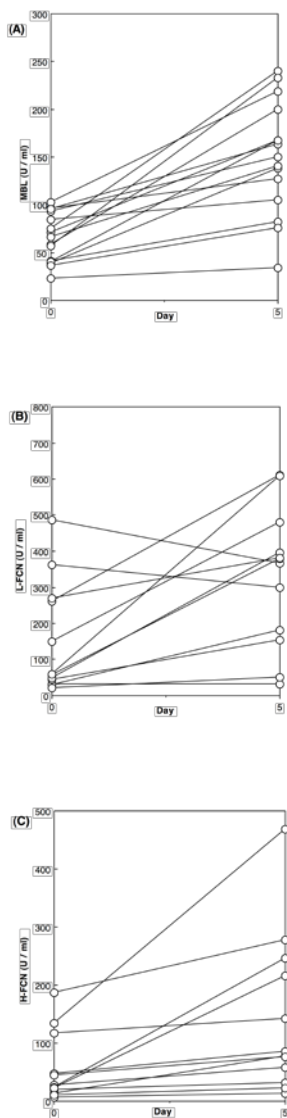


図1. 日齢0と5での血清値の変化 (A:MBL、B:L-FCN、C:H-FCN)

(2) ヒト免疫グロブリン (Igs) を始めとする生体内機能性糖蛋白に、過酸化水素-硫酸銅溶液による酸化ストレスを加え、酸化変性した機能性糖蛋白へのヒト MBL (マンノース結合レクチン) の結合性を調べた。

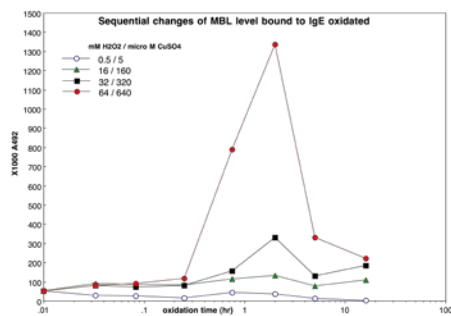


図2. 各種条件下 (酸化剤濃度、酸化時間)、37°Cで酸化後の IgE (Des) と MBL との結合性変化

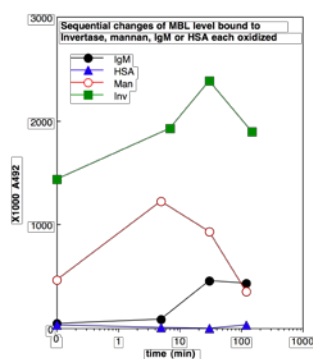


図3. IgM (Leu)、HSA、Mannan (Man)、Invertase (Inv) の酸化処理 (50 mM H₂O₂、0.5 mM CuSO₄、37°C) 時間と MBL 結合性の変化

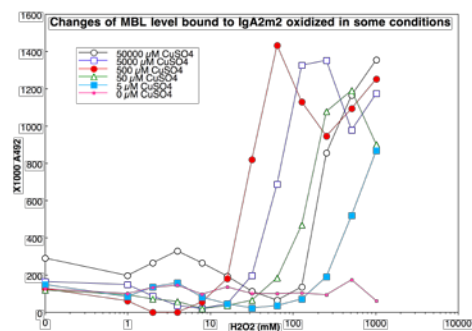


図4. IgA₂M₂ (Kur) の各種酸化条件 (酸化時間 100 分、37°C) による MBL 結合性の変化

糖鎖含量が多い Invertase、ヒトミエローマ IgE (Des) や IgM (Loy)、IgA₂M₂ (Kur) では、MBL 結合性の上昇が認められた (図2、3、4)。た

だし、酸化試薬濃度、反応時間、或いは両者共に多すぎると結合性が低下し(図2,3,4)、糖蛋白質の個々に酸化変性に於ける至適試薬濃度、至適反応時間があることが分かった。結合はEDTAで阻害され、Ca依存性であると考えられた。マンナンも同様の反応を行うと、ある至適条件下では結合性の増大が認められた(図3)。生体内に生じた活性酸素がN型糖鎖を切断するとの報告があることより、結合性の増大は、活性酸素により糖鎖末端のシアル酸やガラクトースを含む部分が除去され、マンノースなどのMBL結合性の糖鎖が末端に露出したことにより生じ、結合性の低下は、活性酸素による糖鎖の切断が更に進み、マンノースなどの糖鎖が除去されたことにより生じたと考えられた。臓器移植や心臓・大血管の手術後、再度血流が回復する場合に臓器障害が認められるが、その再灌流障害を引き起こす原因はいまだに明らかになっていない。最近、虚血再灌流(I/R)により傷害を受けた血管内皮細胞にMBLが結合、レクチン経路が活性化されるという報告がなされた。MBLは、糖鎖末端のシアル酸やガラクトースを除去したり、酸などで変性した免疫グロブリン(Igs)と結合し、レクチン経路を活性化することを我々は確認しており、I/R障害に関しては、急激な血流再開と酸素負荷により活性酸素が生じ、血管内皮細胞表面分子やIgsなどの糖蛋白質の糖鎖を切断し、それにMBLが結合する、あるいは傷害された血管内皮細胞に変性Igsが結合し、それにMBLが結合、レクチン経路が活性化される、という可能性が考えられる。今後、L-FCN、H-FCNについても同様実験を行う予定である。

(3) マイクロタイタープレートを塩基性蛋白でコートし、塩基性蛋白とヒトMBLとの結合性を調べた。

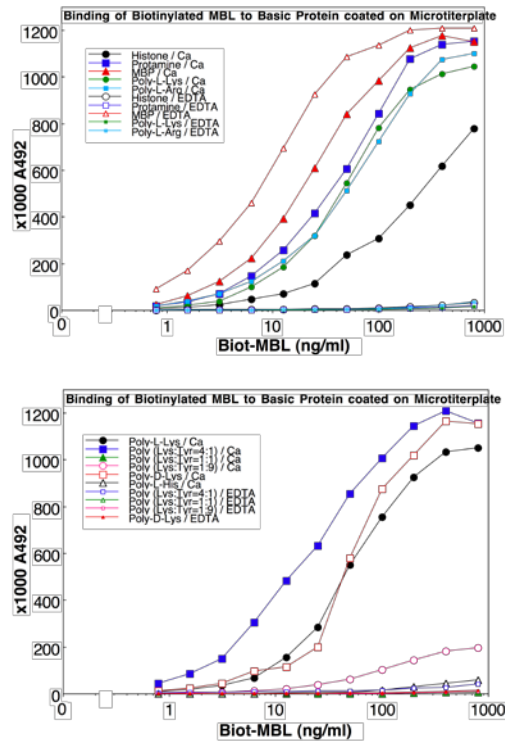


図5. 各種塩基性蛋白(一定量固相化)とビオチン化MBL(可変量)との結合(Ca²⁺あるいはEDTA存在下)

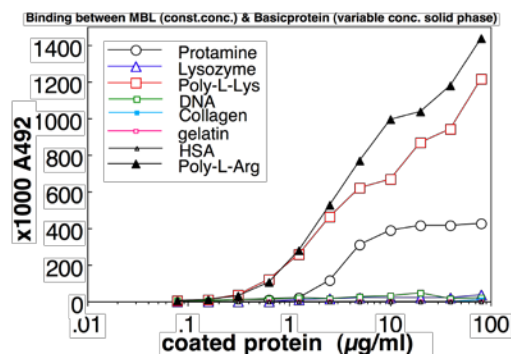


図6. 各種塩基性蛋白(可変量を固相化)とMBL(一定量)との結合(Ca²⁺存在下)

塩基性蛋白として、Histone, Protamine, Poly-L-Lys、Poly-D-Lys、Poly-L-Arg, Poly-(Lys-Tyr=4:1)がCa²⁺依存性にMBLと結合した(図5,6)。MBPはCa²⁺非依存性にMBLと結合した。塩基性蛋白のPoly-(Lys-Tyr=1:1)、Poly-(Lys-Tyr=1:9)、

Poly-L-His、Lysozyme、Crystalline、Fibronectin、及び非塩基性蛋白のHSA、コラーゲン、ゼラチン、DNAではMBLとの結合は認められなかった。各種血清蛋白とPoly-L-Lysとの結合をみると、C反応性蛋白(CRP)や血清アマロイドP成分(SAP)では結合がみられたが、 α_2 マクログロブリン、C1q、C1インヒビター、IgA、IgG、IgMでは結合が認められなかった。Histoneなどの塩基性蛋白は細胞がアポトーシスなどにより死滅した際に体内に放出されるが、これら塩基性蛋白の処理にCRPやSAPなどが関与しているといわれており、MBLもその一翼を担う可能性が考えられる。

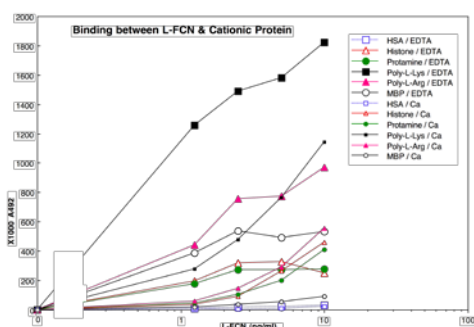


図 7. 各種塩基性蛋白(一定量固相化)とL-FCN(可変量)との結合(Ca^{2+} あるいはEDTA存在下)

塩基性蛋白に対し、ヒトMBLは Ca^{2+} 依存性に結合したが(図5)、ヒトL-FCNは Ca^{2+} 非依存性に結合し(図7)、ヒトH-FCNでは結合は認められなかった。また、L-FCNは Ca^{2+} 存在下よりはEDTA存在下で塩基性蛋白と結合しやすい傾向が認められ、この性質はCRPと類似していた。ヒストンなどの塩基性蛋白の処理に、MBLの他にL-FCNも関与している可能性がある。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺井 格 (TERAI ITARU)

酪農学園大学・酪農学部・教授

研究者番号：40337043

(2) 研究分担者

真船 直樹 (MAFUNE NAOKI)

酪農学園大学・酪農学部・教授

研究者番号：70241304

(3) 連携研究者

小林 邦彦 (KOBAYASHI KUNIHICO)

北海道大学・その他部局・名誉教授

研究者番号：60091451