

令和 2 年 7 月 28 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19045

研究課題名(和文) 生体防御コレクチンCL-K1の3MC症候群の病態への関与とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Study on the involvement of collectin CL-K1 in the pathogenesis of 3MC syndrome and elucidation of its molecular mechanism

研究代表者

松田 泰幸 (Matsuda, Yasuyuki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10532252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：コレクチンCL-K1の遺伝子欠損と3MC症候群の病態との間に関連性が見い出されたことから、CL-K1が個体発生や成長発育に関与する可能性が示唆されている。本研究の目的は、3MC症候群の治療法確立の可能性を模索するため、本疾患の病態や発症原因を明らかにすることである。本研究では、CL-K1が別のコレクチンCL-L1と相互作用することを明らかにすることができた。このことから、3MC症候群の病態発症にCL-K1だけでなくCL-L1も関与する可能性を示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3MC症候群の発症原因は不明なままであり、根本的な治療法や予防法の確立には至っていない。本研究の目的は、3MC症候群で生じる病態やその発症機序を明らかにすることで、治療法や予防法開発の糸口となる知見を得るところにある。本研究結果では、3MC症候群の発症に別のコレクチンCL-L1も関与する可能性があることを示唆することができた。この成果は、本疾患の将来的な治療法、予防法開発において有用な情報となる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The association between the gene defect of collectin CL-K1 and the pathology of 3MC syndrome has been found, suggesting that CL-K1 may be involved in growth and development. The purpose of this study is to elucidate the pathogenesis of 3MC syndrome in order to explore the possibility of establishing a medical treatment for it. I found that CL-K1 interacts with collectin CL-L1, suggesting that CL-L1 may also be related to the pathogenesis of 3MC syndrome.

研究分野：分子生物学

キーワード：コレクチン 3MC症候群 発生 自然免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

(1) コレクチンは、その内部にコラーゲン様領域と  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域（CRD）を持つタンパク質の総称である。コレクチンは、「古典的コレクチン」と「新規コレクチン」に分類される。古典的コレクチンは、CRDにより微生物などの糖鎖を認識し排除するという、自然免疫関連分子であると考えられてきた。例えば、古典的コレクチンに分類されるマンナン結合レクチン（MBL）は、細菌の膜の構成成分であるマンナン糖鎖を認識することで、1）補体の活性化、2）細菌のオプソニン化、3）細菌凝集能による物理的な排除、といった多岐にわたる作用メカニズムを介して感染防御効果を発揮している。遺伝病の一つである嚢胞性繊維症の患者で、MBLに遺伝子変異のある人は、肺での感染症を重症化させることが報告され、MBLの補充療法が肺感染症予防に利用できる可能性を指摘している。実際、MBL欠損患者である2歳の女の子が、度重なる感染性を起こしていたが、数回のMBLの補充療法によって、その後3年以上にわたり健康であることをValdimarssonらが報告している。また、MBLが病原体に対する生体防御において重要であることは、MBL欠損マウスを用いた感染実験からも示されている。このように、古典的コレクチンは自然免疫関連分子であると認識されてきた。

(2) 一方、新規コレクチンは、古典的コレクチンのCRD間で保存されているアミノ酸配列を基に、ESTデータベースをスクリーニングすることで発見された。現在までのところ、3種類の新規コレクチン分子（腎臓コレクチン-1（CL-K1）、胎盤コレクチン-1（CL-P1）、肝臓コレクチン-1（CL-L1））の同定されている。これら新規コレクチンは、MBLと同様に細菌への結合能や糖鎖結合活性を示すがゆえに、自然免疫に関与することを示唆してきた。実際、CL-P1がヒトの血管内皮細胞膜上で酵母のファゴサイトーシスに重要な役目を果たすことを近年報告している。また、CL-K1においても補体の活性化に関与する可能性が示唆されている。ところが最近、Rooryckらにより、3MC症候群（Carnevale, Mingarelli, Malpuech, Michels Syndrome）という形態形成に異常をきたす遺伝子病にCL-K1欠損が関与していることが報告され、CL-K1が自然免疫のみならず形態形成にも関与していることが示唆された。

(3) 3MC症候群は、ヒトにおいて、顔の特徴的な変形、口唇裂や口蓋裂、頭蓋骨癒合症、学習障害、生殖器や手足および膀胱腎臓の異常を含む、様々な発生的特徴を示す常染色体劣性遺伝病である。これまで本疾患の発症原因は不明であったが、この発見により、CL-K1が自然免疫のみならず形態形成にも関与することが示唆されることとなった。

(4) 当研究室で作製したCL-K1欠損マウスは、易致死性であること、小型で低体重であること、口蓋裂を起こすことが明らかとなり、3MC症候群で生じる表現型がマウスにおいても確認された。また、CL-P1についても当研究室ではすでにKOマウスを作製済みであり、2系統のES細胞由来KOマウスが完全胎生致死を示すなど、CL-P1の形態形成における重要性を示唆する結果が得られた。さらに、CL-L1においても胚発生の初期から発現していることを明らかにしており、CL-K1やCL-P1と同様に、形態形成への関与を示唆する結果が得られた。このように、新規コレクチンは自然免疫のみならず、形態形成にも関与する分子である可能性が考えられた（図1）。

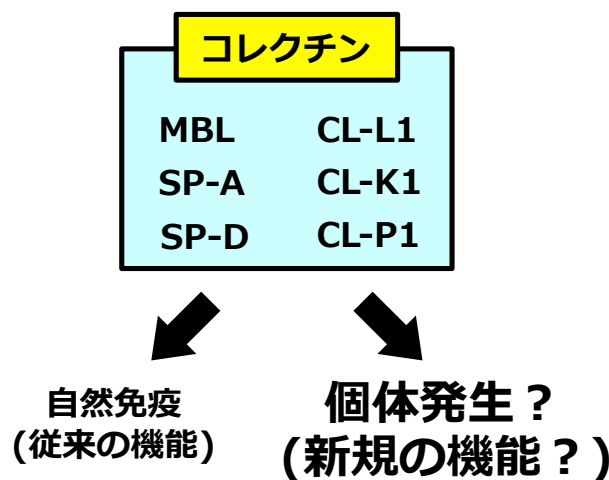


図1: コレクチンの種類と機能

## 2. 研究の目的

(1) ヒトの形態形成に異常をきたす遺伝病 (3MC 症候群) の患者において、これまで自然免疫分子として認識されてきたコレクチン CL-K1 の欠損が報告されているが、CL-K1 欠損による形態形成異常の詳細についてはいまだ不明な点が多い。本研究の目的は、CL-K1 欠損が個体レベルや分子レベルでどのような影響を与えているのかを調べることにより、3MC 症候群の全貌を明らかにし、発生異常をきたす種々の疾患に対する治療法や予防法につなげることである。

## 3. 研究の方法

(1) CL-K1 の欠損がどのような形態的異常や機能的異常を生じさせているのかを明らかにするため、CL-K1 欠損マウスを用いた表現型解析を行った。3MC 症候群では口蓋裂を始めとする骨形成に異常が認められるケースが多いため、具体的には、CL-K1 欠損マウスの骨の 3 次元画像を野生型マウスと比較し、骨の形成不全や骨密度など、骨の形成に差があるかどうかを調べた。3 次元画像は、小動物用の X 線断層撮影装置を利用して行った。また、3MC 症候群において異常が認められる臓器に着目し、10 週齢の CL-K1 欠損マウスおよび野生型マウスで HE 染色による組織観察を行い、CL-K1 欠損マウスと野生型マウスで臓器の形態に差があるかどうかを組織学的な観点から調べた。採取した組織はパラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィン包埋し切片を作製し、HE 染色を行った。

(2) 3MC 症候群の発症機序は不明なままである。3MC 症候群に関わる分子の全貌を明らかにし、治療法や予防法につなげる有効な知見を得るため、CL-K1 と相互作用する未知分子の探索を行った。まず、CL-K1 をヒト血漿から精製するため、抗 CL-K1 抗体を架橋したカラムを作製した。このカラムに等量の PBS で希釈したヒト血漿をアプライし、PBS でカラムを洗浄した後、0.1 M グリシン塩酸 (PH 2.7) でカラムからの溶出を行い、CL-K1 精製画分とした。この溶出画分のウェスタンブロットを行い、CL-K1 および各種タンパク質の検出を行った。

(3) CL-K1 との相互作用を検証するため、Dynabeads を利用したプルダウン法を行った。予め抗 CL-K1 抗体を結合させた Dynabeads に CL-K1 精製画分 (研究の方法(2)) を添加し、十分に反応させた後、上清を取り除き、0.1 M グリシン塩酸 (PH 2.7) を添加して溶出を行い、beads 結合画分とした。その後、ウェスタンブロットを行い、抗 CL-K1 抗体、および相互作用候補分子に対する抗体でそれぞれ検出を行った。また、プルダウン法に利用する抗体を相互作用候補分子に対する抗体に置き換えて同様の実験も行った。さらに、プルダウン法で使用する試料を CL-K1 精製画分 (研究の方法(2)) の代わりに、CL-K1 および相互作用候補分子を CHO 細胞に共発現し、無血清培地で培養した培養上清を用いた場合の検証も行った。

## 4. 研究成果

(1) 小動物用の X 線断層撮影装置を用いて CL-K1 KO マウスと野生型マウスの骨の 3 次元画像解析を行った。その結果、CL-K1 KO マウスでは、野生型マウスに比べて骨密度が低下していることが明らかとなった。また、脊椎の形態に野生型との差異が認められるなど、骨形成異常を示すデータが得られた。さらに、CL-K1 欠損マウス臓器の組織切片を作製し、形態観察を行った。その結果、CL-K1 欠損マウスでは野生型マウスと比べて、糸球体のサイズが大きく、数も多くなっていることが明らかとなった。

(2) CL-K1 と相互作用する未知分子の探索を行うにあたり、CL-K1 は別のコレクチン CL-L1 と類似した遺伝子構造をとっていることから、CL-K1 が CL-L1 と相互作用している可能性を考えた。血漿から精製した CL-K1 精製画分のウェスタンブロットを行い、抗 CL-L1 抗体で検出を試みたところ、CL-L1 に相当するサイズのバンドが検出された。一方、別のコレクチンである MBL を比較対象として用いたが、得られた CL-K1 画分からは MBL は検出されなかった。このことから、CL-K1 は生体内において CL-L1 と相互作用している可能性が示唆された。

(3) CL-K1 との相互作用をプルダウン法で検証した結果、抗 CL-K1 抗体によって得られた CL-K1 画分からは CL-L1 が検出され、抗 CL-L1 抗体によって得られた CL-L1 画分からは CL-K1 が検出された。この結果は、試料を血漿から精製した CL-K1 精製画分とした場合においても、CL-K1 および CL-L1 を CHO 細胞で共発現させた培養上清とした場合においても得られた。一方、別のコレクチンである MBL を比較対象として CHO 細胞で CL-K1 と共発現させたが、この培養上清を用いてプルダウン法を行い、両者の相互作用を検証したが、相互作用は認められなかった。これらの結果から、CL-K1 と CL-L1 は生体内で互いに相互作用した状態で機能していることが示唆された。また、CL-K1 の欠損が 3MC 症候群に関与していることから、CL-K1 と

相互作用している CL-L1 も 3MC 症候群に関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Yuko Tashima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Toshiyuki Miyata\*, Plasminogen Tochigi mice exhibit phenotypes similar to wild-type mice under experimental thrombotic conditions, *PLoS ONE* 12(7), e0180981 (2017) 査読有  
DOI : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180981>
- ② Insu Hwang<sup>†</sup>, Kenichiro Mori<sup>†</sup>, Katsuki Ohtani<sup>†</sup>, Yasuyuki Matsuda, Nitai Roy, YounUck Kim, Yasuhiko Suzuki, Nobutaka Wakamiya\*, Collectin Kidney 1 plays an important role in innate immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection, *J. Innate Immun.* 9(2), 217-228 (2017) 査読有  
DOI : 10.1159/000453316
- ③ Nitai Roy<sup>†</sup>, Katsuki Ohtani<sup>†</sup>, Yoshihiko Hidaka, Yoshiro Amano, Yasuyuki Matsuda, Kenichiro Mori, Insu Hwang, Norimitsu Inoue, Nobutaka Wakamiya, Three pentraxins C-reactive protein, serum amyloid p component and pentraxin 3 mediate complement activation using Collectin CL-P1, *Biochim. Biophys. Acta* 1861(2), 1–14 (2017) 査読有  
DOI : 10.1016/j.bbagen.2016.11.023
- ④ Nitai Roy<sup>†</sup>, Katsuki Ohtani<sup>†</sup>, Yasuyuki Matsuda<sup>†</sup>, Kenichiro Mori, Insu Hwang, Yasuhiko Suzuki, Norimitsu Inoue, Nobutaka Wakamiya, Collectin CL-P1 utilizes C-reactive protein for complement activation, *Biochim. Biophys. Acta* 1860(6), 1118–1128 (2016) 査読有  
DOI : 10.1016/j.bbagen.2016.02.012

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① Yasuyuki Matsuda, Katsuki Ohtani, Nitai Roy, Kenichiro Mori, Insu Hwang, Nobutaka Wakamiya, Collectin CL-LK activates the complement system via binding to DNA, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会), 2017 年
- ② Yasuyuki Matsuda, Katsuki Ohtani, Nitai Roy, Insu Hwang, Kenichiro Mori, Nobutaka Wakamiya, Structural characterization of novel collectins, CL-L1, CL-K1, and CL-LK in blood, XXVIth INTERNATIONAL COMPLEMENT WORKSHOP, 2016 年

## 6. 研究組織

研究分担者、研究協力者はなし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。