

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293124

研究課題名(和文)多機能性コレクチンCL-K1はDICにおいてどのような役割を担うのか

研究課題名(英文)The role of CL-K1 in DIC patients

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が発見したコレクチンCL-K1は、従来のコレクチン同様、自然免疫機能をもつことが推測されている。今年度は、DIC患者登録を行い、血液のサンプル収集を行った。DICの検査項目は、凝固線溶系を中心に測定した。一方、コレクチンについては、CL-K1とMBLの2つに絞って行った。従来の研究では、CL-K1は、DICの経過に相関した値をとったが、今回の日本人の測定では、DICの有無で有意な差はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：In collectin CL-K1 which Wakamiya discovered, it is supposed as well as conventional collectin that I have a natural immunity function. I performed DIC patient registration and performed sample collection of blood. I measured the inspection item of the DIC mainly on solidification fibrinolysis system. On the other hand, about collectin, I narrowed it down to two of CL-K1 and MBL. In the previous study, CL-K1 took the value that related to in progress of the DIC. However, in the measurement of this Japanese, the meaningful difference was not seen in presence of the DIC.

研究分野：免疫学

キーワード：DIC コレクチン 感染症

1. 研究開始当初の背景

申請者らが発見したコレクチン CL-K1 は、従来のコレクチン同様、自然免疫機能をもつことが推測されている。しかし、近年の常染色体遺伝病のゲノム解析の結果や CL-K1 KO マウス作成による予備研究により、個体発生や成長発育に CL-K1 が関与する可能性が窺われている。さらに Harvard 大学高橋との共同研究で、DIC 患者において、厳密な制御を受ける CL-K1 の上昇が初めて観察された。

2. 研究の目的

CL-K1 KO マウスでの動物モデル研究やヒトでは DIC 患者を焦点にあてて、CL-K1 の調節機構を解明し、臨床応用として DIC のマーカーになりうるのかを明らかにする。申請者らが積み上げてきた補体関連分子コレクチン研究が、凝固線溶系やホルモン調節機能の解析に展開する、新たな研究は全く独創的であり、コレクチンの臨床応用の為、生体の恒常性維持に関与する知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 日本 DIC 患者における、血中コレクチン CL-K1 増減の意義とそのメカニズム検討を行い、その原因を同定し、DIC の診断や治療および予後マーカーとして、CL-K1 の可能性を検討する。

(2) CL-K1 KO マウスを用いて、マウス DIC モデルでの CL-K1 の機能を明らかにする。また、現時点で使用されている DIC 治療薬の効果等を検証する。

(3) CL-K1 の形態形成能や代謝調節能を想定して、小型で出生後易致死型の CL-K1 KO マウスと野生型マウスを比較しながら、本遺伝子の機能解明を進める。形態形成については、受精後の発生段階から出生後の成熟過程における胎生致死の時期決定やその発生途中の形態や骨格の解析を行う。出生後のマウスについては血清中の生化学的データ等を測定し、その差異から CL-K1 の恒常性維持の機能について検討する。

4. 研究成果

(1) 日本 DIC 患者における、血中コレクチン CL-K1 増減の意義とそのメカニズム検討を行い、その原因を同定し、DIC の診断や治療および予後マーカーとして、CL-K1 の可能性を検討する。日本人において、DIC 患者登録を行い、血液のサンプル収集を行った。DIC の検査項目は、凝固線溶系を中心に測定した。一方、コレクチンについては、CL-K1 と MBL の 2 つに絞って行った。従来の米国 MGH Takahashi①らの研究では、CL-K1 は、DIC の経過に相関した値をとったが、今回の日本人の測定では、DIC の有無で有意な差はみられなかった。

(2) (3) CL-K1 KO マウスと野生型マウスを比較しながら、本遺伝子の機能解析の研究

では、形態形成について、両マウスでの骨格形成に差異が認められた。この異常は、ヒトでは、頭蓋骨の形成不全がある、事実とよく符合した。また、口蓋裂や口唇裂の原因となる口蓋の形成では、両マウス間に若干の際も観察された。また、出生後 4 週以内に KO マウスでは、30%のマウスが死亡するが、骨形成とは、原因が異なることがわかった。内臓臓器の異常については、循環系を中心に解析を進めている。出生後のマウスについては血清中の生化学的データ等の解析では、特に明確な異常は認められなかった。しかしながら、敗血症モデル実験において、肺炎球菌の感染実験では、CL-K1 KO マウスは野生型マウスに比して明らかに増殖細菌数も多く、そのために炎組織炎症が重傷で、生存率が低い結果が得られた。この現象に性差はなく、低体重のマウスに特徴的でもなかった。また、CL-K1 の補体活性化が、本細菌の排除に関与する可能性が示唆された。

<引用文献>

① Takahashi K, Ohtani K, Moyo P, Chigweshe L, Van Cott E, Wakamiya N: Elevated plasma CL-K1 levels are associated with a risk of disseminated intravascular coagulation (DIC). *J Thromb Thrombolysis*. 2014, 331-338.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

① Roy N, Ohtani K, Hidaka Y, Amano Y, Matsuda Y, Mori K, Hwang I, Inoue N, Wakamiya N: Three pentraxins C-reactive protein, serum amyloid p component and pentraxin 3 mediate complement activation using Collectin CL-P1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 査読有、1861 巻、2017、1-14

DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.11.023.

② Hwang I-S, Mori K, Ohtani K, Kim Y-U, Roy N, Matsuda Y, Suzuki Y, Wakamiya N: Collectin Kidney 1 plays an important role in innate immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. *J. Innate Immun*, 査読有、9 巻、2017、217-228

DOI: 10.1159/000453316.

③ Roy N, Ohtani K, Matsuda Y, Mori K, Hwang I, Suzuki Y, Inoue N, Wakamiya N: Collectin CL-P1 utilizes C-reactive protein for complement activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 査読有、1860 巻、2016、1118-1128

DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.02.012.

④ Soren W. K. Hansen, Katsuki Ohtani, Nitai Roy, Nobutaka Wakamiya: The collectins CL-L1, CL-K1 and CL-P1, and their roles in complement and innate immunity. *Immunobiology*, 査読有、221 巻、

2016、1058-1067

DOI: 10.1016/j.imbio.2016.05.012.

- ⑤ Katsuki Ohtani, Nobutaka Wakamiya
Is host defense due to complement-related lectins? Glycomicrobiology, Glycoforum <http://glycoforum.mdo.co.jp/2015/science/glycomicrobiology/GM15/GM15J.html> 査読有、GM15 巻、2016、1-11
- ⑥ Troegeler A, Lugo-Villarino G, Hansen S, Rasolofso V, Henriksen ML, Mori K, Ohtani K, Duval C, Mercier I, Bénard A, Nigou J, Hudrisier D, Wakamiya N, Neyrolles O: Collectin CL-LK is a novel soluble pattern recognition receptor for Mycobacterium tuberculosis. PLoS One. 査読有、10 巻、2015、e0132692
DOI: 10.1371/journal.pone.0132692.
- ⑦ Venkatraman Girija U, Furze CM, Gingras AR, Yoshizaki T, Ohtani K, Marshall JE, Wallis AK, Schwaeble WJ, El-Mezgueldi M, Mitchell DA, Moody PC, Wakamiya N, Wallis R: Molecular basis of sugar recognition by collectin-K1 and the defects caused by mutations associated with 3MC syndrome. BMC Biol. 査読有、13 巻、2015、27
DOI: 10.1186/s12915-015-0136-2.
- ⑧ Takahashi K, Ohtani K, Moyo P, Chigweshe L, Van Cott E, Wakamiya N: Elevated plasma CL-K1 levels are associated with a risk of disseminated intravascular coagulation (DIC). J Thromb Thrombolysis. 査読有、38 巻、2014、331-338
DOI: 10.1007/s11239-013-1042-5.
- ⑨ Mori K, Ohtani K, Jang S-J, Kim Y-U, Hwang I-S, Roy N, Matsuda Y, Suzuki Y, Wakamiya N: Scavenger receptor CL-P1 mainly utilizes a collagen-like domain to uptake microbe and modified LDL. Biochimica et Biophysica Acta、査読有、1840 巻、2014、3345-3357
DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.08.015.
- ⑩ Jang S-J, Ohtani K, Fukuoh A, Mori K, Motomura W, Yoshizaki T, Kitamoto N, Yoshida I, Kim Y-U, Suzuki Y, Wakamiya N: Scavenger receptor CL-P1 mediates endocytosis by associating with AP-2 μ 2. Biochimica et Biophysica Acta、査読有、1840 巻、2014、3227-3237
DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.07.019.

[学会発表] (計 9 件)

- ① ロイ ニタイ, 大谷克城, 日高義彦, 天野芳郎, 松田泰幸, 森健一郎, 黄仁秀, 井上徳光, 若宮伸隆、スカベンジャー受容体 CL-P1 は、Pentraxin を介して補体系を活性化する、第 54 回日本補体学会学術集会、2017 年 9 月 1-2 日、福島

- ② Yasuyuki Matsuda, Katsuki Ohtani, Nitai Roy, Insu Hwang, Kenichiro Mori, Nobutaka Wakamiya: Structural characterization of novel collectins, CL-K1, CL-L1, and CL-LK in blood. 26th International Complement Workshop. 2016.09.04-08. Kanazawa (Japan)
- ③ Insu Hwang, Kenichiro Mori, Katsuki Ohtani, Yasuyuki Matsuda, Nitai Roy, YounUck Kim, Nobutaka Wakamiya: In vitro and in vivo roles in Collectin Kidney 1 (CL-K1) with innate immunity against Streptococcus pneumoniae. 26th International Complement Workshop. 2016.09.04-08. Kanazawa (Japan)
- ④ Nitai Roy, Katsuki Ohtani, Yasuyuki Matsuda, Kenichiro Mori, Insu Hwang, Norimitsu Inoue, Nobutaka Wakamiya: Collectin CL-P1 utilizes C-reactive protein for complement activation. 26th International Complement Workshop. 2016.09.04-08. Kanazawa (Japan)
- ⑤ Yoshihiko Hidaka, Norimitsu Inoue, Yasufumi Ohtsuka, Toshihiro Sawai, Toshiyuki Miyata, Isao Osawa, Hidechika Okada, Tarou Kinoshita, Hideharu Sekine, Minoru Takahashi, Hiroshi Tsukamoto, Miki Nakao, Masaru Nonaka, Misao Matsushita, Tetsuro Yamamoto, Takahiko Horiuchi, Nobutaka Wakamiya: Establishment of the comprehensive complement examination system for complement-related diseases by the Japanese association for complement research. 26th International Complement Workshop. 2016.09.04-08. Kanazawa (Japan)
- ⑥ 若宮伸隆、「補体関連疾患研究のための新しい補体検査整備」Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Forum 2015、2015 年 9 月 12 日、東京
- ⑦ 若宮伸隆、基調講演「補体関連疾患研究のための補体検査システムの構築」第 52 回補体学会学術集会、2015 年 8 月 21-22 日、名古屋
- ⑧ Nitai Roy, 大谷克城, 松田泰幸, 森健一郎, 黄仁秀, 若宮伸隆、急性期応答蛋白質である CRP と補体活性化についての検討、Glyco-Immunology2015 糖鎖免疫、平成 27 年度難治疾患共同研究拠点研究集会(招待講演) 2015 年 8 月 19-20 日、東京
- ⑨ 大谷克城, Umakhanth Venkatraman Girija, 森健一郎, 吉崎隆之, 松田泰幸, 黄仁秀, ロイ ニタイ, RussellWallis, 若宮伸隆、新規コレクチン CL-K1 の糖鎖認識と生物学的活性についての解析、第 34 回日本糖質学会、2015 年 7 月 31-8 月 2 日、東京

[図書] (計 2 件)

- ① 若宮伸隆、抗酸化機能分析研究センター、
抗酸化機能分析研究センター2014、2015、
73 ページ
- ② Ohtani K, Suzuki Y, Wakamiya N、
Springer、Glycoscience: Biology and
Medicine, 2014、1568 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：補体系を検査する方法及びそのための
キット

発明者：若宮伸隆、大谷克城

権利者：若宮伸隆、大谷克城

種類：特許

番号：特願 2016-159453

出願年月日：2016 年 8 月 16 日、2017 年 8 月
15 日

国内外の別：国内、米国

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等旭川医科大学 微生物学講
座ホームページ

[http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/
microbio/top.htm](http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/microbio/top.htm)

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

松田 泰幸 (MATSUDA, Yasuyuki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10532252

森 健一郎 (MORI, Kenichiro)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70610236

鈴木 定彦 (SUZUKI, Yasuhiko)

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

大谷 克城 (OHTANI, Katsuki)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90396367

松下 操 (MATSUSHITA, Misao)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：00165812