

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2016
課題番号：26670489
研究課題名(和文)川崎病における新規コレクチンCL-P1の役割解析

研究課題名(英文)Study of Kawasaki Disease

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病は、微生物感染が契機で発症するが、特定の微生物感染が問題ではなく、微生物感染がCRPなどの急性炎症タンパク質を高度に増加させる、全身血管の激しい炎症を特徴とする疾患である。申請者らは、CL-P1に焦点を当てて、持続的な血管炎症を惹起する病因の仮説構築を本研究で行った。はじめに、何かの原因で感染や炎症がおきると、急激なCRP上昇が起こる。つぎに、CRPはCL-P1に補足され、そのCRPが次にC1qを引き寄せ、この場で補体系を活性化させる。本研究では、CRPから発動される新たな補体活性化機構の可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease generally develops due to microbe infection and is a disease characterized by intense inflammation of the blood vessel in the whole body. Applicants focused on CL-P1 and went the inspection of the hypothesis to bring about sustained blood vessel inflammation in this study. Firstly, they chose CL-P1 as a candidate to bind CRP and evaluated the activation of the complement to on this occasion that an ascent of sudden CRP was generated when some infection and inflammation happened. They showed that CRP trapped by CL-P1 draws C1q, and activates a classical pathway at this place. Furthermore, it was revealed that this reaction activates the alternative pathway. These results suggest the possibility of exercised new complement activation mechanism through CRP.

研究分野：生化学

キーワード：血管炎 コレクチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 川崎病は、1967年に日本で発見されたアジアに多い急性炎症疾患で4歳までの小児に好発し、時に冠動脈瘤が形成され死に至る重篤な疾患である。その後、1982年日本で川崎病の大流行がありその際申請者も多くの患者を診てきた。2014年度統計では、川崎病の罹患率は約300(0-4歳人口10万人対)で毎年約16,000例の発症となっている。

(2) 川崎病はその病態解明について幾多の研究の変遷を繰り返している。近年は、1) 特定の微生物の探索、2) 異常炎症を引き起こす特定の遺伝子異常の探索等を、国家プロジェクトの一環として行ってきた。しかし、50年間にわたって多くの研究がなされてきたが、その予後に重要な動脈瘤発生に直結する因子や、治療に結びつくと考えられる因子は現在未だ同定されていない。

2. 研究の目的

(1) 川崎病の原因を何らかの微生物感染を契機とする血管内皮からおこる持続性血管炎であるという仮説を証明するロジックを構築する。

(2) ① CL-P1分子において川崎病の関与の可能性に関する仮説を構築する。

② CL-P1の特異的リガンドやそれを介して変動する細胞内分子の探索を行う。

③ それらの分子が実際に川崎病でどのように関与しているかの仮説の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 文献検索によってスカベンジャー受容体 LOX-1 において、急性炎症タンパク質 CRP 結合による補体活性化に関する論文を発見する (Fujita, Clin Chem, 2011)。LOX-1 は、C 型レクチンを有する分子で CL-P1 と構造上の類似性をもつことで、CL-P1 において同様の機能を有するかどうかという初期実験を開始し、その後独自の補体活性化のメカニズムの可能性を探索した。

(2) ① CL-P1 分子における CRP との結合実験を ELISA 法における方法と CL-P1 分子細胞に遺伝子導入を行い、細胞発現上における CL-P1 分子と CRP との結合を IF 法による顕微鏡観察により検証した。本結合がレクチン活性によるものか静止電荷による結合かを各種阻害物質による実験で検証した。さらに、CL-P1 分子の部分タンパク質を作成、また一アミノ酸置換の CL-P1 分子を作成してどの領域が結合に重要であるかを検討した。

② CL-P1 分子に CRP 結合から惹起される補体活性化メカニズムを前期・後期に分けて検討した。

③ CL-P1 分子に CRP 結合から惹起される補体活性化メカニズムが、増幅経路を活性化する

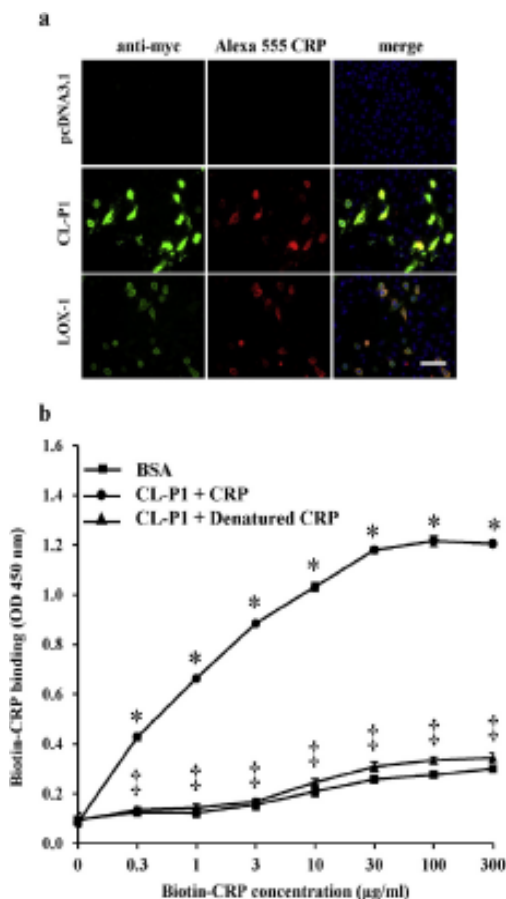
かどうかを検討した。

④ CL-P1 分子に CRP 結合から惹起される補体活性化における制御性因子の役割を検証した。

(3) CL-P1 分子に CRP 結合から惹起される補体活性化の全体像の構築を行った。

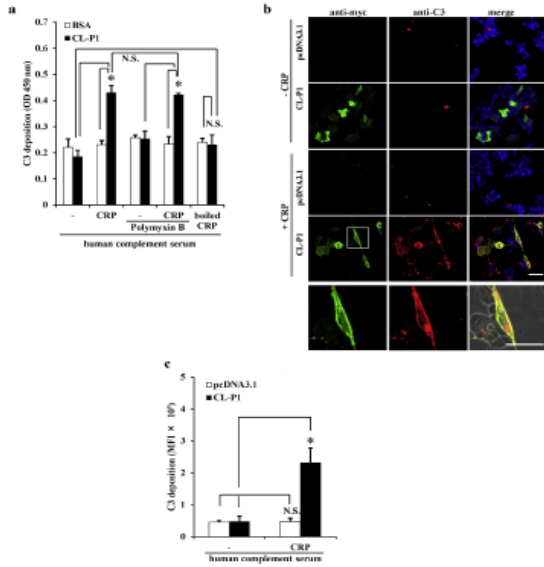
4. 研究成果

(1) CL-P1 分子における CRP との結合実験では、細胞における結合は下図 a で、ELISA 法における結合を下図 b で示す。陽性コントロール LOX-1 同様、CL-P1 は CRP 分子と細胞上でも、タンパク質を固相した microplate においても濃度依存性に結合することが明らかになった。また、阻害薬を用いた研究により CL-P1 分子と CRP の結合はレクチン領域依存性ではなく、静止電荷による結合である可能性が明らかになった (データ添付無し)。この結果は、CL-P1 のドメインの特性を明らかにした実験結果を一部用いて明らかにした (Mori, BBA, 2014)。これらの事実から、同じスカベンジャー受容体の仲間でも、CRP 分子との結合はそれぞれ結合特異性があることが明らかになった。

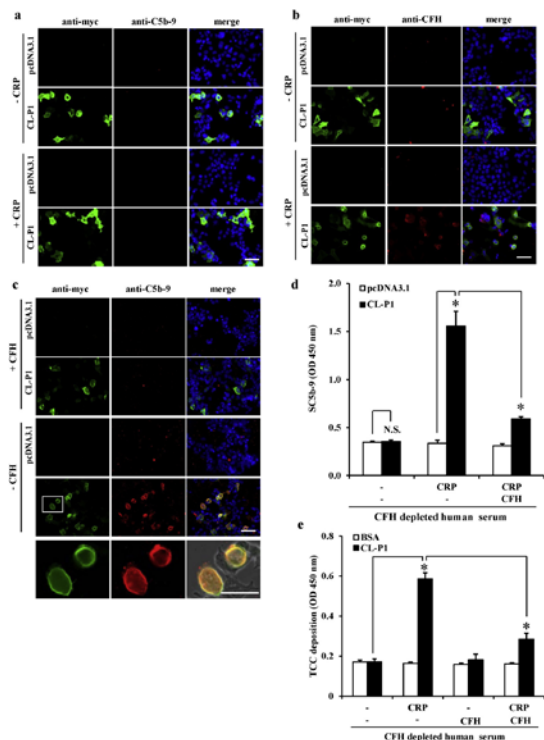


(2) CL-P1 分子に CRP 結合から惹起される補体活性化検討を行った。下図では前期活性化過程における結果を示す。

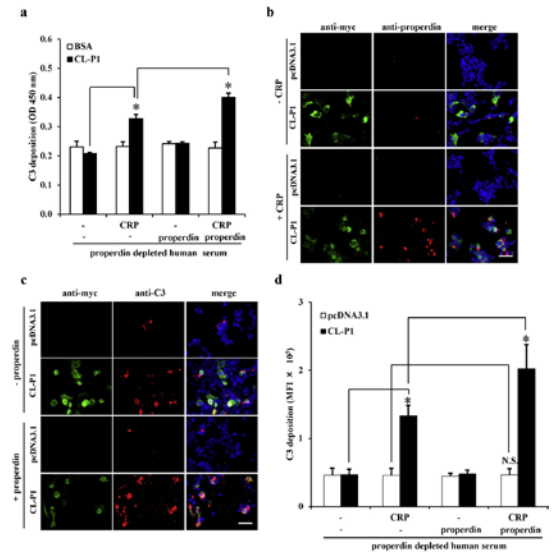
図 a は ELISA において、図 b, c では細胞上での補体成分 3 (C3) の沈着が観察された。つまり、前期補体活性化が明らかになった。



(3) ① CL-P1 分子に CRP 結合から惹起される補体活性化について下図で後期活性化経路を示す。図 a ではまったく C5b-9 という終末補体複合体 (terminal complement complex/TCC) の沈着が見られず、通常の完全補体血清においてはこの補体活性化は前期の C3 の段階でとどまることが明らかになった。② しかし、図 b にみられるように CL-P1 発現細胞における補体活性化部位において補体制御因子 H 因子 (CFH) の存在が確認された。③ 図 c において完全補体血清に替えて CFH 欠損血清を使って反応を行った。その結果、CRP 誘導性の CL-P1 発現細胞は、C5b-9 を細胞表面に観察し、補体活性化が終末経路まで達していることが明らかになった。この現象は、CL-P1 を固相化した microplate 上でもお

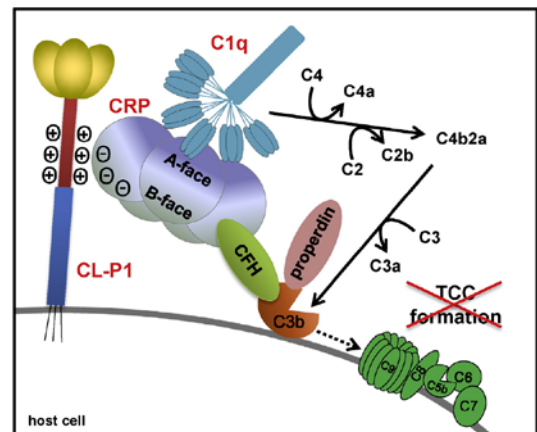


こることを明らかにした。
 (4) ① CL-P1 分子に CRP 結合から惹起される補体活性化について、下図で増幅経路の活性化を示す。図 a, b において増幅経路に参与する properdin の沈着を ELISA 系と細胞発現系において観察できる。さらに、その反応が CRP 依存性があることも認められる。② つぎに、図 c, d において properdin 欠損血清と properdin 補充血清を用いて、本補体活性化では properdin での増幅経路を認めた。しかしながら、増幅経路に参与する B 因子や D 因子の関与については、ここでは確認して



いない。今後の検討課題であろう。

(5) CL-P1 分子に CRP 結合から惹起される補体活性化の全体像を下図に示す。① 何らかの原因で急性炎症タンパク質 CRP が多量に産生される、② CL-P1 が CRP をトラップする、③ CRP をトラップした場所の近縁で補体活性化が起こる、④ 増幅経路も参加し、補体活性化が持続する。本研究によって明らかになった経路は、何らかの微生物感染を契機とする、血管内皮からおこる持続性血管炎である川崎病の病因を説明するロジックとして非常によく合致する。この仮説を解明する動物実験と臨床試験が次の課題であると考え



<引用文献>

- ① Y. Fujita, S. Yamaguchi, A. Kakino, S. Iwamoto, R. Yoshimoto, T. Sawamura, Lectin-like oxidized LDL receptor 1 is involved in CRP-mediated complement activation, *Clin. Chem.* 57 (2011) 101398-101405.
- ② K. Mori, K. Ohtani, S. Jang, Y. Kim, I. Hwang, N. Roy, Y. Matsuda, Y. Suzuki, N. Wakamiya, Scavenger receptor CL-P1 mainly utilizes a collagen-like domain to uptake microbes and modified LDL, *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (2014) 3345-3356.

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 11 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, Rasolof 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 Hyun Kim, Yeongjin Hong, Keigo Shibayama, Yasuhiko Suzuki, Nobutaka Wakamiya, Younuck Kim: Functional analysis of the receptor binding domain of SARS coronavirus S1 region and its monoclonal antibody. *Genes Genom.* 査読有、36 巻、2014、387-397
DOI: 10.1007/s13258-014-0186-9
- ⑨ 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.
- ⑩ 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.
- ⑪ 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 . *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 8 件)

- ① 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)
- ② 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)
- ③ 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)
- ④ 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)
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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
- ⑧ 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 1 件)

- ① 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：同上
 種類：特許
 番号：特許願 2016-159453 号
 出願年月日：2016 年 8 月 16 日
 国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<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

大谷 克城 (OHTANI, Katsuki)
 旭川医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：90396367