

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390113

研究課題名（和文）血管増殖関連分子を利用した血管損傷・血管炎の定量的測定法開発の基盤的研究

研究課題名（英文）Basic study of evaluation system in vascular diseases

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

研究成果の概要（和文）：本研究で作成できた CL-K1 の KO マウスについての表現型解析では、KO マウスは、低体重であり、生育不全を認めた。つぎに、マウスにおける CL-K1 の発現解析のための、マウス CL-K1 発現系の作成と、抗体作成を行い、プロタイプの測定システムを開発した。一方、CL-P1KO マウスでは、TG マウスの作成が終了し、TG 発現による発現を組織染色と real time PCR により選択し、KO マウスと TG マウスの交配を行い、胎生致死の改善ができるかどうかの検討を行った。

研究成果の概要（英文）：The basic study of CL-P1 and CL-K1 has been performed by using recombinant collectins and gene-modified mice. Both established recombinant collectins could produce their antibodies, which were used for the development of ELISA system and evaluation of tissue expressions in those mice and human. The knock-out mice with CL-P1 and CL-K1 have been established. CL-K1 KO mice were analyzed using above antibodies. The prototype ELISA system for the evaluation of its blood concentration was established. The CL-P1 KO and TG mice have been established and their complementation experiments have been performed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査医学

キーワード：コレクチン、血管、損傷

1. 研究開始当初の背景

レクチン研究は、糖タンパク質を精製するための研究ツールとして植物レクチン研究で開始された。その後動物レクチンの発見と膜型肝臓レクチン研究から糖タンパク質のリサイクリングを行うエンドサイトーシス受容体として認知された（Kawasaki, JBC1970）。さらに、川崎、山科らのマンノ

ース結合レクチンの発見により、生体防御に関与するコレクチン分子の存在が明らかにされた Kawasaki, BBRC1979, Super, Lancet, 1989)。申請者らは reverse genetic 法により 3 種のコレクチン遺伝子群（CL-L1, CL-P1, CL-K1）を世界で初めてクローニングし、本遺伝子群の遺伝子名を HUGO に委託され COLEC と命名した。申

請者らは、CL-P1 遺伝子が 742 個のアミノ酸をコードする膜タンパクとしてヒトやマウスの血管内皮に発現し、酸化変性させた LDL(酸化 LDL)や微生物(酵母、大腸菌、黄色ブドウ球菌)と結合すること、さらにヒト血管内皮細胞株の遺伝子発現抑制実験で、酵母のファゴサイトーシスに直接関与することを明らかにし、生体防御に関与することを見出した(Ohtani, JBC2001, Jang:JBC2009)。一方、CL-K1 遺伝子は CL-L1 発見(Ohtani: JBC1999)時にその存在が明らかになり 2006 年本遺伝子クローニングが行われ(Keshi, Micro&Immunol.2006)、その後マウスにおいて血管平滑筋細胞に存在することを明らかにした(Motomura, J Histochem Cytochem 2008)。さらに申請者らはゼブラフィッシュ CL-P1 をクローニングし、ゼブラフィッシュにおいて血管内皮細胞に存在して血管形成に関わることを発見し、ノックアウトマウスで胎生致死の結果を得ている。さらに、CL-P1 が種々の酸化ストレス刺激によりその発現が増加すること(Koyama, Hokkaido Igakushi2005)、通常は膜タンパクとして存在する CL-P1 が、刺激後には培養液中に分泌型 CL-P1 として放出されることを見いだしている。

2. 研究の目的

本研究ではまず血管から主に分泌される 2 つのコレクチンの血液での測定システムを MUSTag 法を用いて樹立し、血管損傷の定量的検査法を開発するための基盤研究を行うことを初期目的としている。そのためには分泌型 CL-P1 のリコンビナント部分 CL-P1 の作成とリコンビナント CL-K1 の作製を行い、それらを用いた単クローン抗体や天然型 CL-P1、CL-K1 の多クローン抗体の作成が当初の課題となる。多量体構造をとる分子であるために高分子量をもつタンパク質で、作成した抗体のパネル化とグループ分けして十分に解析し、数種の適正な測定組み合わせを見出し、MUSTag 法を用いて高感度、同時多検体測定システムの樹立を初年度と 2 年度に行う。さらにこの期間に動物での血管損傷モデル等を構築し、上記システムを利用しての血管損傷測定系のプロトタイプを樹立することを計画している。さらに、同時並行してその他の血管増殖因子関連の抗体を準備し、血管新生、増殖、損傷などに関与すると考えられる抗体をできるだけ用意し、それらを一括して検出できる測定システムを、同様に mus-tag 法を用いた高感度測定系を樹立する。

3. 研究の方法

<平成 22 年、23 年>

(1) 分泌型 CL-P1 の測定システム樹立

- ①. CL-P1 発現システムの構築
 - a. 大腸菌、酵母、バキュロウイルスによる CL-P1 発現システムの構築
 - b. 真核細胞を用いた CL-P1 発現システムの構築
- ②. 上記のリコンビナント CL-P1 の発現
- ③. 上記で発現作成された CL-P1 蛋白の精製
- ④. 上記 CL-P1 蛋白の機能解析
- ⑤. 発現 CL-P1 蛋白の動物(兔、ニワトリ、マウス)の免疫
- ⑥. マウス単クローン抗体の作成
- ⑦. ポリクローナル抗体の採血
- ⑧. 単クローン抗体の機能評価と検討
- ⑨. 抗体の組み合わせによる分泌型 CL-P1 プロトタイプ測定システムの組み上げ

(2) CL-K1 の測定システム樹立

- ①. CL-K1 発現システムの構築
 - a. 大腸菌、酵母、バキュロウイルスによる CL-K1 発現システムの構築
 - b. 真核細胞での CL-K1 発現システムの構築
- ②. 上記のリコンビナント CL-K1 の発現
- ③. 上記の CL-K1 蛋白の精製
- ④. 上記の CL-K1 蛋白の機能解析
- ⑤. 選択された CL-K1 蛋白の動物(兔、ニワトリ、マウス)の免疫
- ⑥. マウス単クローン抗体の作成
- ⑦. ポリクローナル抗体の採血
- ⑧. マウス単クローン抗体の機能評価と検討
- ⑨. 抗体の組み合わせによる分泌型 CL-K1 プロトタイプ測定システムの組み上げ

(3) 血管増殖関連因子: VEGF, FGF, PIGF, Angiopoietin の精製蛋白質やリコンビナント蛋白質の購入を行う。また、スタンダードになる抗体の購入も別個行う。

- ①. 動物(兔、ニワトリ、マウス)の免疫
- ②. マウス単クローン抗体の作成
- ③. ポリクローナル抗体の採血
- ④. 単クローン抗体の機能評価と検討
- ⑤. 抗体の組み合わせによる各種因子のプロトタイプ測定システムの組み上げ

(4) MUSTag 法測定システムの構築を行う。

- ①. MBL 高感度 ELISA 測定システムの MUSTag 法に応用し、モデル測定系を作製する。
- ②. CL-P1 の複数の測定システムを MUSTag 法に応用し、測定系を構築する
- ③. CL-K1 の複数の測定システムを MUSTag 法に応用し、測定系を構築する
- ④. 血管増殖関連因子も同様に、MUSTag 法での測定システムの組み上げを行う

<平成 23 年、24 年度>

(1) 分泌型 CL-P1 の測定システムの評価

- ①. 分泌型 CL-P1 測定システムのプロトタイプ測定システムの評価と選択

- ②. 分泌型 CL-P1 測定システムの測定システムのスタンダード測定の確立
- ③. 分泌型 CL-P1 測定システムでの血液サンプルでのスタンダード測定の確立
- ④. 分泌型 CL-P1 測定システムでの正常健康人の血液での検討
- ⑤. 分泌型 CL-P1 測定システムでの動物での血液でのスタンダード検討
- ⑥. 分泌型 CL-P1 測定システムで、血管損傷動物モデルでの血液での検討
- ⑦. 分泌型 CL-P1 測定システムで、ヒト疾患モデルとなりうる疾患対象を循環器内科講座と協力して選択し、前方研究としてフォローアップしていく

(2) CL-K1 の測定システムの評価

- ①. CL-K1 測定システムのプロトタイプ測定システムの評価と選択
- ②. CL-K1 測定システムの測定システムのスタンダード測定の確立
- ③. CL-K1 測定システムでの血液サンプルでのスタンダード測定の確立
- ④. CL-K1 測定システムでの正常健康人の血液での検討
- ⑤. CL-K1 測定システムでの動物での血液でのスタンダード検討
- ⑥. CL-K1 測定システムで、血管損傷動物モデルでの血液での検討
- ⑦. CL-K1 測定システムで、ヒト疾患モデルとなりうる疾患対象を循環器内科講座と協力して選択し、前方研究としてフォローアップしていく

(3) 血管増殖関連因子: VEGF, FGF, PIGF, Angiopoietin 測定システムの評価

- ①. 血管増殖関連因子測定システムのプロトタイプ測定システムの評価と選択
- ②. 血管増殖関連因子測定システムの測定システムのスタンダード測定の確立
- ③. 血管増殖関連因子測定システムでの血液サンプルでのスタンダード測定の確立
- ④. 血管増殖関連因子測定システムでの正常健康人の血液での検討
- ⑤. 血管増殖関連因子測定システムでの動物での血液でのスタンダード検討
- ⑥. 血管増殖関連因子測定システムで、血管損傷動物モデルでの血液での検討
- ⑦. 血管増殖関連因子測定システムで、ヒト疾患モデルとなりうる疾患対象を循環器内科講座と協力して選択し、前方研究としてフォローアップしていく。

4. 研究成果

申請者らの発見した新規コレクチン分子 CL-P1、CL-K1 は、直近の研究により両分子がげっ歯類やヒトで血管内皮細胞と血管平滑筋細胞に存在する事、さらにゼブラフィッシュ

に血管領域に存在し遺伝子 knockdown 実験から血管形成に関与する事から、本両遺伝子が血管新生や血管構築に深く関与する可能性を推測した。本研究で、作成できた CL-K1 の KO マウスについての表現型の解析では、KO マウスは、表現型低体重であり、生育不全を認めた。つぎに、マウス CL-K1 発現系の作成と、抗体作成を行った。一方、ヒト CL-K1 では抗体作成が成功し、プロタイプであるが血中濃度測定システムを開発した。一方、CL-P1KO マウスでは、胎生致死の再確認を行い、胎生期のいつの時期に致死に至るかの検討を行った。さらに、CL-P1TG マウスの作成により、TG 発現による発現を組織染色と real time PCR により、発現の高い系統を選択し、KO マウスと TG マウスの交配を行い、胎生致死の改善ができるかどうかの検討を行った。その後、血管新生・増殖・損傷に関連して分泌するコレクチン分子や血管内皮細胞増殖因子群に対する抗体を利用して、高感度で且つ、一括して同時測定できるような、血管損傷測を測定できるシステム開発を引き続き行っている。

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)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Hosoda R, Kuno A, Hori Y, Ohtani K, Wakamiya N, Oohiro A, Hamada H, Horio Y. : Differential cell-protective function of two resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) glucosides against oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.* 344(1):124-32. 2013.
DOI: 10.1124/jpet.112.198937.
- ② 大谷克城、若宮伸隆 : 新規コレクチンは生体防御と形態形成に関与する二重機能性分子である, *生化学* 85(1): 38-42, 2013
<http://www.jbsoc.or.jp>
- ③ Yoshizaki T, Ohtani K, Motomura W, Jang S-J, Mori K, Kitamoto N, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N. : Comparison of human blood concentrations of Collectin Kidney 1 (CL-K1) and Mannan-binding lectin (MBL). *J Biochem.* 151(1):57-64, 2012.
DOI: 10.1093/jb/mvr114.
- ④ Ohtani, K., Suzuki, Y., Wakamiya, N. : Biological functions of the novel collectins CL-L1, CL-K1, and CL-P1, *J Biomedicine and Biotechnology*, volume 2012, Article ID 493945, 8pages, DOI:10.1155/2012/493945

- ⑤ Matsushita M, Kilpatrick D. C., Lee B. L, and Wakamiya N.: Soluble Host-Defense Lectins, Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2012, Article ID 275970, 2 pages, DOI:10.1155/2012/275970
- ⑥ Horiuchi T, Ohi H, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M, Okada N, Seya T, Yamamoto T, Endo Y, Hatanaka M, Wakamiya N, Mizuno M, Nakao M, Okada H, Tsukamoto H, Matsumoto M, Inoue N, Nonaka M, Kinoshita T.: Guideline for Hereditary Angioedema (HAE) 2010 by the Japanese Association for Complement Research - Secondary Publication. Allergol Int. 2012;61(4):559-62. DOI:10.2332/allergolint.12-RAI-0471
- ⑦ Kim Y-U, Ohtani K, Mori K, Jang S-J, Suzuki Y, Wakamiya N: Gene regulation function of the three specificity protein-1 (Sp1) within the human collectin placenta-1 proximal promoter. Gene and Genomics 33:275-283. 2011. DOI: 10.1007/s13258-011-0001-9.
- ⑧ Koyama S, Ohtani K, Fukuzawa J, Yao N, Fukuda M, Jang S-J, Hasebe N, Kikuchi K, Itabe H, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N: The induction of human CL-P1 expression in hypoxia/reoxygenation culture condition and rat CL-P1 after ischemic/reperfusion treatment. Biochimica et Biophysica Acta 1810:836-842. 2011. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.013.
- ⑨ Fukuda M, Ohtani K, Jang S-J, Yoshizaki T, Mori K, Motomura W, Yoshida I, Suzuki Y, Kohgo Y, Wakamiya N: Molecular cloning and functional analysis of scavenger receptor zebrafish CL-P1. Biochimica et Biophysica Acta 1810:1150-1159. 2011. DOI:10.1016/j.bbagen.2011.09.016.
- ⑩ Takeuchi M, Ohtani K, Ma Y, Kato S, Semba S, Katoh T, Wakamiya N, Taniguchi T.: Differential effects of cyanidine and cyanidin-3-glucoside on human cell lines. Food Science and Technology Research. 17(6):515-521, 2011. <http://www.jsfst.or.jp/journal/index.html>
- [学会発表] (計26件)
- ① N. Wakamiya, K. Ohtani, T. Yoshizaki, K. Mori, Y. Suzuki: The biological functions and blood concentration of CL-K1. 10th Jenner Glycobiology and Medicine symposium. Den Haag (Netherland), 2012. 3. 31-4. 3.
- ② K. Ohtani, K. Mori, Y. Matsuda, I. Yoshida, Y. Suzuki, N. Wakamiya: The Biological Functions of the Novel Collectins CL-L1, CL-K1, and CL-P1. 12th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology. Fukuoka (Japan), 2012. 7. 9-13.
- ③ N. Wakamiya, N. K Ohtani, T. Yoshizaki, T. K. Mori, Y. Matsuda, I. Yoshida, Y. Suzuki: The biological functions and blood concentration of CL-K1. International Carbohydrate Symposium. Madrid (Spain), 2012. 7. 22-27.
- ④ 大谷克城、本村亘、吉崎隆之、森健一郎、松田泰幸、黄仁、ロイニタイ、吉田逸朗、鈴木定彦、若宮伸隆: コレクチン CL-K1 の組織における発現検討、第49回補体シンポジウム (2012年8月24-5日、大阪)
- ⑤ 大谷克城、本村亘、吉崎隆之、森健一郎、松田泰幸、黄仁、ロイニタイ、吉田逸朗、鈴木定彦、若宮伸隆: コレクチン CL-K1 のマウスおよびヒト組織における発現検討、第31回日本糖質学会 (2012年9月17-20日、鹿児島)
- ⑥ N. Wakamiya, K. Ohtani, Y. Suzuki: The biological functions and tissue expressions in Collectin Kidney 1 (CL-K1). International Complement Workshop. Chania, Crete (Greece), 2012. 10. 10-15.
- ⑦ 大谷克城、本村亘、吉崎隆之、森健一郎、松田泰幸、黄仁、ロイニタイ、吉田逸朗、鈴木定彦、若宮伸隆: 組織におけるコレクチン CL-K1 の生化学的検討、第85回日本生化学会 (2012年12月14-16日、福岡)
- ⑧ N. Wakamiya. Collectin kidney 1 (CL-K1) in blood is detected by a novel ELISA system. 16th European Carbohydrate symposium (2011. 7)
- ⑨ N. Wakamiya, K. Ohtani, T. Yoshizaki, K. Mori, Y. Suzuki: The biological functions of collectin kidney 1 (CL-K1). INTERLEC-24 (2011. 7)
- ⑩ 大谷克城、吉崎隆之、森健一郎、本村亘、松田泰幸、黄仁秀、吉田逸朗、金然

旭、鈴木定彦、若宮伸隆：コレクチン CL-K1 の糖鎖特異性と機能解析、第 30 回日本糖質学会年会（平成 23 年 7 月）

- ⑪ 大谷克城、吉崎隆之、森健一郎、本村 亘、松田泰幸、黄 仁秀、吉田逸朗、金 然旭、鈴木定彦、若宮伸隆：コレクチン CL-K1 の機能、第 84 回日本生化学会大会（平成 23 年 9 月）
- ⑫ 大谷克城、吉崎隆之、森健一郎、本村 亘、松田泰幸、黄 仁秀、吉田逸朗、金 然旭、鈴木定彦、若宮伸隆：コレクチン CL-K1 の機能とヒト血中濃度について、第 34 回日本分子生物学会年会（平成 23 年 12 月）

〔図書〕（計 1 件）

1. シンプル微生物学、南山堂、東匡伸・小熊恵二・掘田博編集、分担執筆（2011）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 3 件）

名称：新規コレクチンの製造方法
発明者：若宮伸隆、芥子宏行、大谷克城、坂本隆志、岸雄一郎
権利者：扶桑薬品工業株式会社種類：
番号：特願 2011-284799
出願年月日：2011. 12. 27
国内外の別：国内

○取得状況（計 8 件）

名称：新規スカベンジャーレセプター
発明者：若宮伸隆
権利者：扶桑薬品工業株式会社
種類：特願 2001-558245
番号：2001-558245
取得年月日：2011. 02. 18
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/microbiology.html>

<http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

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・講師

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 (YOSHIDA ITSURO)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20041816

森 健一郎 (MORI KENICHIRO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70610236

松下 操 (MATSUSHITA MISA0)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：00165812

松田 泰幸 (MATSUDA YASUYUKI)

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：10532252

(3) 連携研究者

該当者無し