

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 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570144

研究課題名（和文） パターン認識分子 H-フィコリンの自然免疫における役割

研究課題名（英文） Role of H-ficolin, a recognition molecule in innate immunity

研究代表者

遠藤 雄一（ENDO YUICHI）

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20117427

研究成果の概要（和文）：

ヒト H-フィコリンの役割を解明するために、フィコリン欠損マウスに一過性に H-フィコリンのみを発現するモデルマウスを作成した。このマウスの血清中では、H-フィコリンはセリンプロテアーゼ MASP および sMAP と複合体を形成した。H-フィコリンは、肺炎球菌を認識し補体系を活性化した。肺炎球菌による感染実験は継続中である。これらの結果は、H-フィコリンが細菌感染の初期防御に関与することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

To define the role of human H-ficolin in vivo, we generated a model mouse, ficolins A/B double-deficient mouse transiently expressing H-ficolin. In the serum, H-ficolin formed the complexes with serine proteases MASPs and sMAP. H-ficolin recognized a bacterial strain, *Streptococcus pneumonia* D39, and led to complement activation on this bacterium. The susceptibility of this mouse to bacterial infection is in progress. These results suggest that H-ficolin is involved in first defense against bacterial infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学、生体分子、蛋白質、レクチン、補体

1. 研究開始当初の背景

N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に特異的に結合する新規タンパク P35 (のちにL-フィコリンと改名) および P35 関連タンパク (M-フィコリンと改名) を見出し、新たなドメイン構造を有するレクチンであることを報告した (*J Biol Chem* 271:2448,1996; *Genomics* 36:515, 1996)。フィコリンは、血中ではセリンプロテアーゼ Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs)と結合しており、補体活性化経路の1つであるレクチン経路を活性化する (*J Immunol* 164:2281,2000 ; *J Immunol* 175:3150-3156,2005)。フィコリンおよび MASP 相同分子は、ヒトから脊索動物ホヤに至る動物種に広く存在することを示した (*J Immunol* 161:4924,1998; *J Biol Chem* 276:19959,2001; *J Immunol* 170:4701,2003; *Immunogenet* 55:29,2003 など)。以来、国内外において、フィコリンの構造 (X 線結晶回折を含む) と機能、血中濃度や遺伝子多型と各種疾患との関連性について調べられてきた。

レクチン経路の認識分子としては、フィコリンの他にマンノース結合レクチン (MBL) と CL-K1 (collectin11)が知られている。これらの認識分子は、体内に侵入してきた微生物 (細菌等) 表面の PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)や体内でできた異常細胞を認識すると考えられている。この認識に伴って、MASPs が活性型に転換する。活性型 MASP-2 は補体 C2, C4 を活性化し、MASP-1/3 は補体第二経路の D 因子、B 因子を活性化すると考えられている。MBL については、基礎研究と臨床研究の両面から感染の初期防御に働くこと

が示されてきた。最近、CL-K1 は胚発生における形態形成に働くことが明らかになった。しかし、フィコリンの機能については、*in vitro* の解析から MBL と同様に感染防御に働くと推定されているが、真の生理的役割は明らかではない。

フィコリンのレクチン活性はフィブリノーゲン様ドメインにあり、共通して N-アセチルグルコサミンを認識する。ヒトでは、これまで3種類のフィコリンが同定されてきた。このうち、L-フィコリンと H-フィコリンは、主に肝臓で産生され血中に存在する。M-フィコリンは、主に末梢血単球で産生されるが、血中にはほとんど検出されない。系統発生的解析から、L-フィコリンはマウスのフィコリン A に、M-フィコリンはマウスのフィコリン B に相同もしくはごく近い存在であることが判明した。一方、H-フィコリンはヒトなど霊長類のみに存在する。マウスの遺伝子は偽遺伝子化していることが判明した (*Genomics* 84:737, 2004)。

2. 研究の目的

本研究では、フィコリンのなかでも、ヒトなど限られたほ乳類にのみ見られる H-フィコリンに注目し、遺伝子改変マウスと組換えフィコリンを駆使した解析により、*in vivo* での働きと作用機構とを明らかにする。このために、H-フィコリンのみを発現したモデルマウスを作成し、その表現型を解析する。とくに、H-フィコリンが非自己の認識分子であることを示すとともに、他のフィコリンとは何が異なり、なぜ一部のほ乳類にのみ必要なのかを明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト H-フィコリンを発現するマウスを作成するために、フィコリン A/B ダブル欠損マウスに組換えヒト H-フィコリンを静注するか、またはベクターを静注して H-フィコリンを *in vivo* 発現させた。一過性にヒト H-フィコリンを発現したマウスの表現型は、形態学的、生化学的および免疫学的手法により解析した。

① 組換え H-フィコリンは、昆虫培養細胞（ショウジョウバエ S2 細胞）と哺乳類培養細胞（CHO 細胞）を宿主細胞として作製し、天然に近い組換え蛋白を選択した。組換え H-フィコリンの性状（単量体の分子量、重合体の分子量、N 型糖鎖と O 型糖鎖の含量など）は、ウェスタンブロットやゲル濾過法で調べた。組換え H-フィコリンとプロテアーゼ MASP-2 および MASP-2 の短縮型蛋白 sMAP との複合体形成は、それぞれの組換え蛋白質を用いて、ウェスタンブロット法で調べた。その複合体による N-アセチルグルコサミン結合プレート上での補体 C4 の活性化は、ELISA 法で調べた。また、組換え H-フィコリンによる細菌（*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Aerococcus viridans* など）の認識について、ウェスタンブロット法で調べた。

② ベクター注入による H-フィコリンの *in vivo* 発現は、transposon-mediated long term gene expression 法を用いた。すなわち、発現ベクター（H-フィコリン cDNA を含む pIRCMV ベクター）と transposase をコードする pFerH ベクターを、フィコリン A/B ダブル欠損マウスの尾静脈から同時に注入した。マウス体内で発現し血液中に分泌された H-フィコリンについて、発現期間、生化学的性状および MASPs との複

合体形成、細菌上での補体活性化を、上述の同様に、ウェスタンブロット、ELISA 等により調べた。

③ H-フィコリン発現マウスの血清におけるレクチン経路の異常をフィコリン A/B ダブル欠損マウスと比較した。レクチン経路の活性は、マウス血清を GlcNAc-アガロースカラムによりマンノース溶出分画（MBL を含む）と GlcNAc 溶出分画（フィコリンを含む）に分け、それぞれの分画の GlcNAc-プレート上での C4 の活性化を指標として調べた。また、不活化した細菌上での補体 C3 の活性化・沈着は、FACS 法で調べた。

④ 細菌感染実験は、*S. pneumoniae D39* 株を感染細菌として経鼻感染により施行し、生存率を調べた。これに先立ち、野生型マウスの感染での生存率を調べ、生存率 8 割を示す細菌量を求め、感染実験に使用する細菌量とした。感染実験では、フィコリン A 単独欠損マウス、フィコリン B 単独欠損マウス、フィコリン A/B ダブル欠損マウス、フィコリン A 一過性発現フィコリン A 欠損マウス、フィコリン A 一過性発現フィコリン A/B ダブル欠損マウス、および H-フィコリン一過性発現フィコリン A/B ダブル欠損マウスの生存率を求め比較した。各フィコリン欠損マウスでの一過性のフィコリン発現には、上述の transposon-mediated long term gene expression 法を用いた。感染マウスの肺における菌数は、血液寒天培地のコロニー数として計測した。

4. 研究成果

① マウスへの投与に適した天然に近い組換え H-フィコリンを選ぶために、S2 細胞と CHO 細胞で作製した組換え体の性状を比較した、この結果、CHO 細胞で作製し

た組換え体（pcDNA3 ベクターと pIRCMV/pFFerH ベクターで作成したものの共に）は、単量体の分子量（35kDa）、重合体の分子量（400~600kDa、12~18 量体相当）において、天然 H-フィコリン（ヒト血清）に近い値を示した。また、その組換え体は、MASP-2 および sMAP に結合性を示し、H-フィコリン/MASP-2/sMAP 複合体を形成した。組換え体の性状の違いは、おもに N 型糖鎖の量に起因し、CHO 細胞で作製した組換え体の N 型糖鎖の量は S2 細胞のそれよりも多かった。さらに、細菌との結合性を調べた結果、*A. viridans* と *S. pneumonia D39* 株に結合した。

② マウスにベクターを静注して、血清中の H-フィコリンの発現を検討した結果、H-フィコリンの発現は少なくとも 10 日間確認できた。発現した H-フィコリンの分子量は天然 H-フィコリンと同じであった。また、発現した H-フィコリンは、血液中で MASPs/sMAP と複合体を形成していることがわかった。これらの結果から、H-フィコリンの一過性発現には優れた方法であることがわかった。

③ *in vivo* 発現させた H-フィコリンと MASPs/sMAP との複合体は、GlcNAc-プレート上で C4 の活性化能を示した。さらに、*S. pneumonia D39* 株に結合して C3 を活性化・沈着し、オプソニン化を亢進させることがわかった。

④ *S. pneumonia D39* 株による感染実験では、フィコリン A 単独欠損マウス、フィコリン B 単独欠損マウスおよびフィコリン A/B ダブル欠損マウスのそれぞれが、感染後 7 日までの間に生存率が約 40%にまで低下することがわかった。フィコリン A 一過性発現フィコリン A 単独欠損マウスでは、フィコリン A の発現により低下していたレ

クチン経路の活性が回復し、感染実験の生存率も有為に回復することがわかった。フィコリン A 一過性発現フィコリン A/B ダブル欠損マウスでは、フィコリン A の発現により、生存率は部分的に回復したが、統計学的に有為ではなかった。これらの結果は、*S. pneumonia D39* 株感染に対する防御には、フィコリン A とフィコリン B の両者の共存が不可欠であることを示唆している。これらの結果に基づいて、H-フィコリンの生存率に及ぼす影響を調べた。検討は現在も継続中である。

これらの結果は、以下のように考察・結論できる。

1 H-フィコリンはマウス血中において、MASP や sMAP と複合体を形成し、レクチン経路の認識分子として働くことがわかった。組換え体の性状の比較から、H-フィコリンの構造と機能には N 型糖鎖の正確な付加が不可欠であることがわかった。すなわち、N 型糖鎖の付加は、H-フィコリン単量体の重合を促進し、結果として MASPs/sMAP との複合体形成に寄与することが明らかになった。

2 マウス個体への組換え H-フィコリンの投与による H-フィコリン発現マウスの作成には、大量の高度に精製された組換え体が必要であった。とくに、組換え体の精製法については再検討(プロテアーゼの混入)が必要であることが判明した。一方、ベクター投与による H-フィコリン一過性発現マウスの作成は、有用な方法であった。このことから、今回の H-フィコリン発現マウスの作成には、後者を用いた。

3 H-フィコリンは、病原性のある *S. pneumoniae* を認識し、この細菌上でレクチン経路を惹起することがわかった。この

ことから、H-フィコリンも生体防御の一翼を担うことが明らかになった。しかし、細菌に対する認識能力は、他のヒトフィコリンであるL-フィコリン(マウスフィコリンAに相当)やM-フィコリン(マウスフィコリンBに相当)に比較すると、かなり限定的であった。

4 H-フィコリンの *S. pneumoniae* に対する認識は、他のフィコリンのそれと重複しており、認識自体はH-フィコリンの特異的機能とは考えられなかった。今後、この認識が補体系の各成分の活性化にどのような機構で働くのか、また補体以外の因子を活性化することはあるのか等の詳細な検討が必要である。また、感染防御における各フィコリンの作用の質的・量的比較は困難であった。従って現時点では、H-フィコリンがなぜ霊長類のみに見られ、げっ歯類ではなぜ偽遺伝子化したのかについては、明確な解答は得られていない。今後、H-フィコリンの機能解析では、生体防御とは異なる面からのアプローチが必要と考えられる。

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 14 件)

Endo Y, Iwaki D, Ishida Y, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T. Mouse ficolin B has an ability to form complexes with mannose-binding lectin-associated serine proteases and activate complement through the lectin pathway. *J Biomed Biotech*, 査読有, 2012:e105891, 2012. doi: 10.1155/2012/105891

Endo Y, Takahashi M, Iwaki D, Ishida Y, Nakazawa N, Kodama T, Matsuzaka T, Kanno K, Liu Y, Tsuchiya K, Kawamura I, Ikawa M, Waguri S, Wada I, Matsushita M, Schwaebler WJ, Fujita T. Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecule, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol*, 査読有, 189:5860-5866,

2012. doi: 10.4049/jimmunol.1200836

Pan Q, Chen H, Wang F, Jeza VT, Hou W, Zhao Y, Xiang T, Zhu Y, Endo Y, Fujita T and Zhang XL. L-ficolin binds to the glycoproteins hemagglutinin and neuraminidase and inhibits influenza A virus infection both in vitro and in vivo. *J Innate Immun*. 査読有, 4:312-324, 2012. doi: 10.1159/000335670

Hummelshoj T, Ma YJ, Munthe-Fog L, Bjarnsholt T, Moser C, Skjoedt MO, Romani L, Fujita T, Endo Y and Garred P. The interaction pattern of murine serum ficolin-a with microorganisms. *PLoS One*, 査読有, 7:e38196, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0038196

Tagawa K, Yoshihara T, Shibata T, Kitazaki K, Endo Y, Fujita T, Koshiba T and Kawabata S. Microbe-specific c3b deposition in the horseshoe crab complement system in a c2/factor B-dependent or -independent manner. *PLoS One*, 査読有, 7:e36783, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0036783

Ali YM, Lynch NJ, Haleem KS, Fujita T, Endo Y, Hansen S, Holmskov U, Takahashi K, Stahl GL, Dudler T, Girija UV, Wallis R, Kadioglu A, Stover CM, Andrew PW, Schwaebler WJ. The Lectin Pathway of Complement Activation Is a Critical Component of the Innate Immune Response to Pneumococcal Infection. *PLoS Pathogens*, 査読有, 8:e1002793, 2012. doi: 10.1371/journal.ppat.1002793

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*, 査読有, Dec;61(4):559-62. doi: 10.2332/allergolint.12-RAI-0471, 2012.

Endo Y, Iwaki D, Ishida Y, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T. Mouse ficolin B has an ability to form complexes with mannose-binding lectin-associated serine proteases and activate complement through the lectin pathway. *J Biomed Biotech*. 査読有, 2012:e105891, 2012.

Endo Y, Matsushita M, Fujita T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol*. 査読有, 43:705-712,2011.

遠藤雄一. 補体レクチン経路と凝固系の協調作用—補体系研究の新展開—. 日本血栓止血学会誌, 査読有, 22:164-170, 2011.

Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Fujita T. The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. *J Immunol*. 査読有, 187:3751-3758, 2011.

Banda NK, Takahashi M, Takahashi K, Stahl GL, Glogowska M, Wiles TA, Endo Y, Fujita T, Michael Holers V, Arend WP. Mechanisms of mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 activation of the alternative pathway of complement. *Mol Immunol*, 査読有, 49:281-289, 2011.

Endo Y, Nakazawa N, Iwaki D, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T. Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway. *J Innate Immunity*, 査読有, 2:33-42, 2010.

Takahashi M, Ishida Y, Iwaki D, Kanno K, Suzuki T, Endo Y, Homma Y, Fujita T. Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *J Exp Med*, 査読有, 207:29-37, 2010.

[学会発表] (計 6 件)

Endo Y, Takahashi M, Matsushita M, Shwaeble WJ, Fujita T. Orthology between human and mouse ficolins, and roles of mouse ficolins A and B in host defense. 12th Congress of The International Society of Developmental & Comparative Immunology (国際比較免疫学会). July 9-13, 2012, Fukuoka, Japan.

兒玉利尚、遠藤雄一、高橋実、岩城大輔、藤田禎三、関根英治. MASP-3 の *in vivo* 補体第二経路活性化における役割. 第 49 回補体シンポジウム 8 月 24 日 大阪.

高橋実、関根英治、遠藤雄一、藤田禎三. MASP1/3 欠損マウスにおける形態異常-3MC 症候群との関連. 第 49 回補体シンポジウム 8 月 24 日 大阪.

高橋実、岩城大輔、遠藤雄一、藤田禎三. MASP1 遺伝子産物の多様性について. 第 48 回補体シンポジウム. 2011 年 9 月 3 日、名古屋.

Endo Y, Nakazawa N, Kanno K, Iwaki D,

Takahashi M, Matsushita M, Okabe M, Fujita T. Establishment of three lineages of ficolin-deficient mice and their phenotypes. 14th International Congress of Immunology (国際免疫学会)、2010 年 8 月 24 日、神戸.

遠藤雄一、松坂友裕、石田由美、岩城大輔、高橋実、松下操、藤田禎三. 認識分子 Ficolin 欠損マウスの表現型、第 47 回 補体シンポジウム、2010 年 9 月 10、福島.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤雄一 (ENDO YUICHI)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20117427

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

藤田禎三 (FUJITA TEIZO)
福島県立医科大学・名誉教授
研究者番号：20134223
