

血管梗塞・炎症などにもなう血管損傷の
定量的検査法の開発

(16390161)

平成16年度～平成18年度科学研究費補助金
基盤研究(B)研究成果報告書

平成19年5月

研究代表者 若宮伸隆

(旭川医科大学医学部教授)

はしがき

血管内皮細胞に存在する膜型コレクチンCL-P1は常在性の膜蛋白であり、すべての血管に存在する。我々は、文部科学省科学研究補助金（基盤研究(B)(2)課題番号13470139）による研究の過程で、上記タンパク質を世界で初めて同定した(JBC 2001)。さらに近年の予備実験により本膜タンパク質は、種々の刺激によりその発現が増加すること、さらに通常は膜のみにしか存在しないが、ある一定の刺激後には培養液中に分泌型CL-P1の放出が認められることを見いだしている。本研究では、この分泌型CL-P1の血中での測定システムを利用して、血管損傷の定量的検査法を開発するための基盤研究をおこなうことを目的とする。そのためには分泌型CL-P1の組換えタンパク質の作成とそれらを用いた単クローン抗体の作成がその中心課題となる。多量体構造をとり高分子量をもつタンパク質であるため、作成した抗体のパネル化とグループ分けにて十分に解析し、数種の適正な測定システムの樹立を行う計画である。最終的に、数種の測定システムを使った系と他の血管損傷マーカー（血管増殖因子類：VEGF, FGF, PIGF, Angiopoietin）との比較検討を計画している。

当該分野における学術的な特色としては、血管損傷の定量的評価システムを確立できることである。血管は巨大臓器でありながら、ドップラーエコーなどを用いた血流速度や膜肥厚性などの測定やまた血管造影で血流の状態を把握する事が通常行われているが、血液そのもので血管の状態を把握できる検査法は存在しない。このような直接血管の状況をリアルタイムで迅速に把握するシステムは世界においてもまったく存在しないと考えており、全く独創的な発想である。予想される貢献としては、様々な病態の血管の状態をリアルタイムで知ることができる。さらに経過をおった測定では、前方試験でどのような病気をもつひとが血管の病気を併発しやすいのかその傾向が明らかになり、新しい予防医学の創出ができる可能性がある。また動脈硬化や血管炎では、実際には時間経過と共にどのような血管ダメージがあるのか？さらにその際に治療薬や予防薬の開発の検証に利用できる可能性がある。

内外での血管自体の血中損傷マーカーは存在しない。冠動脈の梗塞では、心筋細胞から漏出する酵素（GOT, CPK, LDH）などがマーカーであり一過性に出現を確認できるが、冠動脈のダメージを表すことはできない、また持続性の血管炎症などの疾患では身体全体の炎症マーカー（CRP）を指標にもちいている。本研究は、血管自身の損傷の結果出現する、血管内皮細胞由来の膜タンパク質の部分分解物を指標とした測定システムを開発することであり、他に比較するモノがなく独創性の高い検査法であると捉えている。

本研究では、膜型コレクチン CL-P1 の刺激による細胞外部分のプロテアーゼによる分解と、その結果分泌型コレクチンの血管内放出がおけると予想され、その分子を標的とした検査システムの開発研究である。

研究組織

- 研究代表者 若宮 伸隆 (旭川医科大学医学部教授)
研究分担者 福澤 純 (旭川医科大学医学部助手)
研究分担者 大谷 克城 (旭川医科大学医学部助手)
研究分担者 小笠原正洋 (旭川医科大学医学部助手)
研究分担者 吉田 逸朗 (旭川医科大学医学部助教授)
研究分担者 鈴木 定彦 (北海道大学人獣共通感染症センター教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	7,400,000	0	7,400,000
平成17年度	3,500,000	0	3,500,000
平成18年度	3,500,000	0	3,500,000
総計	14,400,000	0	14,400,000

研究成果発表

(1) 学会誌発表

1. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Wakamiya N, Sumida T.: Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 136 (3) : 585-90, 2004.
2. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Muraki Y, Goto D, Matsumoto I, Wakamiya N, Sumida T.: Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 64 (2) : 311-4, 2005.
3. Kitamoto N, Kobayashi T, Kato Y, Wakamiya N, Ikuta K, Tanaka T, Ueda S, Miyamoto H, Kato S.: Preparation of monoclonal antibodies cross-reactive with orthopoxviruses and their application for direct immunofluorescence test. *Microbiol Immunol.* 49 (3) : 219-25, 2005.
4. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Wakamiya N, Sumida T.: Lack of relationship between mannose-binding lectin variant alleles and risk of arterial thrombosis in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol.* 15 (6) : 459-60, 2005.
5. Koide T, Nishikawa Y, Asada S, Yamazaki CM, Takahara Y, Homma DL, Otaka A, Ohtani K, Wakamiya N, Nagata K, Kitagawa K.: Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J Biol Chem.* 281 (16) : 11177-85, 2006.
6. Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, Ohtani K, Katoh T, Jang SJ, Motomura W, Yoshizaki T, Fukuda M, Koyama S, Fukuzawa J, Fukuoh A, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N.: Identification and Characterization of a Novel Human Collectin CL-K1. *Microbiol Immunol.* 50 (12) : 1001-13, 2006.

7. Kawai T, Kase T, Suzuki Y, Eda S, Sakamoto T, Ohtani K, Wakamiya N: Anti-influenza A virus activities of mannan-binding lectins and bovine conglutinin. *J Vet Med Sci.* 69 (2) : 221-4. 2007.

(2) 口頭発表

国内学会

1. Jang SJ, Ohtani K, Fukuoh A, Ogasawara M, Wakamiya N: Scavenger Receptor hCL-P1 Mediated Bacterial Phagocytosis through Adaptin μ 2 Subunit in CHO Transfectants 日本生化学会 (横浜) 2004
2. 福澤純、矢尾尚之、小山聡、長谷部直幸、菊池健次郎、大谷克城、若宮伸隆、羽根田俊、石田裕則、板部洋之: 血液透析患者における動脈硬化進展にかかわる MTHFR 遺伝子多型と酸化 LDL との関係 日本動脈硬化学会 (福岡) 2004
3. 小山聡、張成宰、福田光子、大谷克城、福澤純、小笠原正洋、吉田逸朗、菊池健次郎、若宮伸隆: 虚血/再灌流負荷における CL-P1 の発現への影響 日本動脈硬化学会 (福岡) 2004
4. Jang SJ, Ohtani K, Fukuoh A, Ogasawara M, Wakamiya N: Scavenger Receptor hCL-P1 Mediated Bacterial Phagocytosis through Adaptin μ 2 Subunit in CHO Transfectants 日本免疫学会 (札幌) 2004
5. 芥子宏行、坂本隆志、大谷克城、鈴木定彦、若宮伸隆: 新規コレクチン CL-K1(Colecl1)の生体内局在と分子生物学的解析 日本免疫学会 (札幌) 2004
6. 福田光子、古川健太、内田司、張成宰、吉崎隆之、大谷克城、小笠原正洋、吉田逸朗、若宮伸隆: 血管内皮に発現する膜結合型コレクチン CL-P1 の機能解析—ゼブラフィッシュを用いた検討— 日本動脈硬化学会 (東京) 2005
7. 小山聡、福澤純、矢尾尚之、張成宰、大谷克城、福田光子、吉田逸朗、菊池健次郎、若宮伸隆: 新規スカベンジャー受容体 CL-P1 の生体における役割 日本動脈硬化学会 (東京) 2005
8. 矢尾尚之、福澤純、長谷部直幸、小山聡、石田裕則、板部洋之、大谷克城、若宮伸隆、菊池健次郎: 血液透析(HD)患者における MTHFR 遺伝子多型、血圧、血中酸化 LDL 値と動脈硬化性疾患との関係 日本動脈硬化学会 (東京) 2005
9. 大谷克城、小山聡、福田光子、福澤純、小笠原正洋、吉田逸朗、若宮伸隆: CL-P1 遺伝子のクローニングとその機能について 日本細菌学会北海道支部学術総会 (札幌) 2005
10. 小山聡、大谷克城、張成宰、福應温、小笠原正洋、福澤純、若宮伸隆: 膜結合型コレクチン CL-P1 の一過性虚血/再灌流負荷における発現動態 日本生化学会 (神戸) 2005
11. 福田光子、伊藤愛子、吉崎隆之、佐藤秀憲、本村亘、大谷克城、吉田逸朗、若宮伸隆: ゼブラフィッシュ CL-P1 の機能解析 日本生化学会 (神戸) 2005
12. 福田光子、大谷克城、古川健太、内田司、張成宰、吉崎隆之、本村亘、福澤純、

- 小笠原正洋、吉田逸朗、若宮伸隆:ゼブラフィッシュを用いた膜型コレクチン CL-P1 の機能解析 日本分子生物学会 (福岡) 2005
13. 滝澤万理、大谷克城、岸雄一郎、坂本隆志、鈴木定彦、若宮伸隆、本多三男: Mannose binding lectin による HIV-1 複製の非特異的抑制効果 日本免疫学会 (横浜) 2005
 14. 福澤純、小山聡、長谷部直幸、菊地健次郎、矢尾尚之、板部洋之、大谷克城、若宮伸隆: バイオインフォマティクスを応用した新規スカベンジャー受容体の発見 日本動脈硬化学会 (東京) 2006
 15. 矢尾尚之、福澤純、小山聡、櫻木均、長谷部直幸、菊地健次郎、板部洋之、大谷克城、若宮伸隆、石田裕則: 低コレステロール血症を呈する血液透析 (HD) 患者では血漿酸化 LDL 値は上昇している 日本動脈硬化学会 (東京) 2006
 16. 大谷克城、芥子宏行、坂本隆志、吉崎隆之、本村亘、張成宰、福田光子、野村直樹、佐藤秀憲、福澤純、小笠原正洋、吉田逸朗、若宮伸隆: コレクチン CL-K1 のレクチン機能についての解析 日本糖質学会 (仙台) 2006
 17. Jang SJ, Ohtani K, Motomura W, Fukuzawa J, Yoshida I, Wakamiya N: Scavenger Receptor, CL-P1 is Mainly Involved in Yeast Phagocytosis in Human Vascular Endothelial Cells. Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (Seoul) 2006
 18. 堀端重男、大谷克城、坂本隆志、岸雄一郎、木佐木博、鈴木定彦、駒野淳、山本直樹、若宮伸隆、本多三男: ヒト PBMC 移植 NOD/SCID マウスを用いた In vivo におけるマンノースバインディングレクチンの抗 HIV 活性の評価 日本免疫学会 (大阪) 2006

国際学会

1. Fukuda M, Ohtani K, Ito A, Motomura W, Suzuki Y, Wakamiya N: Molecular cloning and characterization of zebrafish CL-P1 gene. International Symposium on Glycoconjugates. (Florence) 2005
2. Jang SJ, Fukuoh A, Ohtani K, Ogasawara M, Suzuki Y, Wakamiya N: Adpatin medium chain 2 is involved in scavenger receptor CL-P1-mediated phagocytosis. International Symposium on Glycoconjugates. (Florence) 2005
3. Koyama S, Ohtani K, Jang SJ, Itabe H, Fukuzawa J, Suzuki Y, Wakamiya N: The membrane type collectin CL-P1 is up-regulated in ischemia/reperfusion condition. International Symposium on Glycoconjugates. (Florence) 2005
4. Ohtani K, Koge K, Yoshizaki T, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N: Molecular characterization of functional domains of membrane type collectin CL-P1. International Symposium on Glycoconjugates. (Florence) 2005
5. Suzuki Y, Takizawa M, Sakamoto T, Kishi Y, Ohtani K, Honda M, Wakamiya N: Mannose binding lectin (MBL) broadly neutralizes HIV-1 clade B, B', E, D. International Symposium on Glycoconjugates. (Florence) 2005

6. Jang SJ, Ohtani K, Fukuzawa J, Motomura W, Koyama S, Wakamiya N: CL-P1 controls the yeast phagocytosis in human umbilical vein endothelial cell (HUVECs). IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and FAOBMB Congress (Kyoto) 2006
7. Ohtani K, Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, Jang SJ, Motomura W, Yoshizaki T, Fukuzawa J, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N: Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. Glycobiology and Sphingobiology - Hakomori Commemorative Forum - (Tokushima) 2007

(3) 出版物

1. 大谷克城、若宮伸隆：補体系異常と感染 臨床と微生物 32(3)：261-267, 2005
2. 大谷克城、鈴木定彦、若宮伸隆：コレクチンとその免疫応答における役割 臨床免疫 45(3)：266-274, 2006
3. 吉田逸朗、若宮伸隆：シンプル微生物学【改訂第4版】，2006
4. 吉田逸朗、張成宰、若宮伸隆：薬剤耐性菌と院内感染対策 道医シリーズ第45篇 71-74, 2007
5. Suzuki Y, Ohtani K, Wakamiya N: The novel collectins, CL-L1, CL-P1 and CL-K1. Collagen-Related Lectins in Innate Immunity, 2007

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

若宮伸隆、芥子宏行、大谷克城、坂本隆志、岸雄一郎：コレクチン活性を有する hCL-K1 ポリペプチド 出願番号：特願 2006-104667、出願日：2006年4月5日