

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	Roy Nitai Chandra (ロイ ニタイ チャンドラ)
<p>学位論文題目</p> <p>Collectin CL-P1 Utilizes C-Reactive Protein for Complement Activation (コレクチンCL-P1は、CRPを用いて補体経路を活性化する)</p> <p>共著者名</p> <p>大谷克城, 松田泰幸, 森健一郎, 黄仁秀, 鈴木定彦, 井上徳光、若宮伸隆</p> <p><i>Biochimica et Biophysica Acta</i> (掲載予定)</p> <p>研究目的</p> <p>CRPは、ペントラキシンファミリーに属する血漿タンパク質であり、感染や損傷に際した炎症応答に関与している。また、ペントラキシンタンパク質 (PTX) は、C1q、コレクチンなどととも、また単独で微生物表面に結合し、補体経路を活性化することが知られている。近年、Fujitaらは、スカベンジャー受容体のなかでも、特にC型レクチン様ドメインを有するスカベンジャー受容体LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor 1) のみが、CRPに結合してC1qが関与する補体系を活性化するユニークな機能をもつことを報告している⁽¹⁾。一方、Ohtaniらは、C型レクチンドメイン、コラーゲン様ドメイン、コイルドコイルドメイン、および膜貫通ドメインを有するII型膜タンパク質コレクチンCL-P1 (collectin placenta 1) を同定し、本分子がスカベンジャー受容体としての活性を持つことを報告している⁽²⁾。また、その後Moriらの研究によりCL-P1は、コラーゲン様ドメインを介して酸化LDLや微生物と結合するばかりでなく、その分子内部に存在するレクチンドメインである糖鎖認識領域 (carbohydrate recognition domain, CRD) を介して微生物表面糖鎖を認識することが明らかになっている⁽³⁾。本研究では、コレクチンCL-P1発現細胞と組換えヒトCL-P1を用いて、以下の5つの疑問を焦点に、補体活性化の新経路について検討を行った。①LOX-1で見出されたCRPを利用する補体活性化経路がヒト細胞/ヒト補体の同種の系で補体活性化がみられるのか? ②本補体活性化が他のスカベンジャー受容体</p>			

でもみられる反応なのか？③本補体活性化がスカベンジャー受容体のどの領域が活性化に関与するのか？④本補体活性化がどのような補体経路を利用して補体系を活性化するのか？⑤本補体活性化が、実際の生体ではどのような機能を担うのか？

材 料 ・ 方 法

1. 細胞培養と遺伝子導入

チャイニーズハムスター卵巣培養細胞株 (CHO/IdIA7) は、5%のウシ胎仔血清を含んだHAM's F-12培地で、37℃、5% CO₂の条件下で培養し、Lipofectamine LTXを用いて遺伝子導入を行った。ヒト胎児由来腎臓293細胞 (HEK293) は、10%のウシ胎仔血清を含んだDMEM高グルコース培地で培養し、上記と同様の方法で遺伝子導入を行った。

2. 組換えヒトCL-P1の発現と精製

インスリンシグナルペプチドおよびFLAGタグ配列がN末端に付加されるように作製された発現ベクターpcDNA3.1に、CL-P1の細胞外領域 (59-742) をコードするcDNAを組み込んだプラスミドをExpi293-F細胞に遺伝子導入し、7日間培養した後、培養上清を回収し、anti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA) を用いて組換えヒトCL-P1を精製した。

3. CRPの結合および阻害実験

CRPの結合実験は、遺伝子導入24時間後のCHO/IdIA7細胞を、Alaxa 555ラベルされたCRPと反応することにより行った。CRP結合阻害実験には、予めpoly(I)あるいはpoly(C)、またホスホコリンを最終濃度1 mMになるように調整し、それをCL-P1、LOX-1発現細胞に添加した。発現させたCL-P1およびLOX-1は、抗myc抗体およびAlaxa 488抗マウスIgGにより可視化した。核の染色は、Hoechst 33342を用いて行った。

4. CRPとCL-P1の結合実験 (ELISA)

組換えヒトCL-P1 (0.1 µg) あるいはBSA (0.1 µg) を96ウェルプレートに固相化し、ビオチンラベルCRPを添加し、ビオチン・アビジン-ペルオキシダーゼ溶液 (Elite ABC kit, Vector Laboratories) を37℃で1時間反応させ、ペルオキシダーゼの基質 (SureBlue TMB microwell peroxidase substrate) を添加し450 nmの吸光度測定し、その結合を評価した。

5. 沈着した補体C3成分および終末補体複合体 (TCC) の検出 (ELISA)

組換えヒトCL-P1あるいは熱不活化BSAを固相化し、1%のヒト血清、C1q欠損血清、あるいはプロパジン欠損血清を、CRP、熱不活化CRP、あるいはCRP/ポリミキシンBの存在下あるいは非存在下で反応させた。一部の実験では、C1q欠損血清およびプロパジン欠損血清にC1qおよびプロパジンをそれぞれ添加した。C3沈着は、ウサギ抗ヒトC3dポリクローナル抗体を用いて検出した。TCC 沈着実験では、補体制御因子factor H欠損10%血清を用いて行った。TCC は、ウサギ抗ヒトC5b-9ポリクローナル抗体を用いて検出した。

6. 培養細胞上に沈着した補体C3成分および終末補体複合体 (TCC) の検出

CL-P1遺伝子導入HEK293細胞に、10%のヒト血清、C1q欠損血清、あるいはプロパジン欠損血清、10%のfactor H欠損血清を、CRPの存在下あるいは非存在下で反応させ、細胞表面のC3とTCCは、ウサギ抗ヒトC5b-9ポリクローナル抗体で検出した。また、CL-P1遺伝子導入HEK293細胞でのTCC検出実験培地中に含まれるSC5b-9濃度を、SC5b-9測定ELISAキット (MicroVue SC5b-9 plus EIA Kit) を用いて測定した。

成 績

2つのスカベンジャー受容体 CL-P1、LOX-1とCRPの相互作用検討の結果、CRPは、CHO細胞膜上に発現させたCL-P1およびLOX-1と結合した。また、CRPは、ELISAによる検討においても、CL-P1と濃度依存的に結合した。CRP/CL-P1間の結合は、ホスホコリン、Poly(I)によって濃度依存的に阻害されたが、EDTA、Poly(C)では阻害されなかった。次に、CL-P1のドメイン欠損変異体を用いた解析により、CL-P1はコラーゲン様ドメインおよびコイルドコイルドメインを介してCRPと結合することが明らかとなった。また、コラーゲン様ドメインには正電荷を帯びたクラスター領域が3箇所存在するが、その内、アミノ末端側から数えて1番目と3番目のクラスター領域が、CRPとの結合に関与することが明らかになった。

次に、ELISA系を用いて補体の活性化について検討したところ、CL-P1に結合したCRPが補体を活性化すること、熱不活化CRPを添加した際は補体の活性化が消失することが明らかになった。さらに、CL-P1を発現させたHEK293細胞上で、CRPによるC3沈着が明らかになった。また、C1qがC3の沈着部位に観察されること、正常血清の代わりにC1q欠損血清を用いるとC3の沈着が消失することから、CL-P1/CRPによるC3活性化は、C1q依存性であることが明らかとなった。

次に、プロパジン欠損血清では、正常血清に比べてC3沈着が低下し、プロパジンを添加することによってC3沈着の回復を認めた。また、CRPを添加したCL-P1発現細胞表面でプロパジンの結合を確認し第2経路の活性化が増幅経路として働いている可能性が明らかになった。

正常血清では、CL-P1/CRPを介したC3沈着は細胞表面上で観察されたが、TCCの沈着は検出されなかった。しかし、このC3沈着細胞表面で補体制御因子factor H沈着が検出されたことより、factor H欠損血清を用いてTCC沈着の検討を行ったところ、CL-P1/CRPによる、細胞表面でのTCC沈着が観察された。また、TCC沈着後の血清含有培養上清を用いた解析では、CL-P1発現細胞においてCRP依存的にTCCの分解産物であるSC5b-9濃度が上昇していることが明らかになった。また、同様の結果は、ELISA系においても確認された。

考 案

我々は、スカベンジャー受容体としての役割を担うコレクチンCL-P1が、CRPと結合し、ヒト細胞とヒト補体系の同種での補体活性化機構を、本研究で初めて明らかにした。本研究により、CL-P1はコラーゲン様ドメインおよびコイルドコイルドメインを介して、CRPのB表面と結合し、結合したCRPが自己細胞表面上で、C1qを利用した古典経路およびプロパジンを利用した第二経路を活性化していることが明らかになった。

従来、CRPによる補体活性化は、終末補体複合体 (TCC) を形成せず補体活性化前期成分C3までの活性化が報告されていたが、本研究により、factor H欠損血清において終末補体複合体 (TCC) の沈着が起こること、また、factor Hの再添加によりTCC沈着が抑制されることが明らかになった。このことから、血清中に含まれるfactor Hは、たとえば炎症や損傷によってCRP濃度が上昇した場合においても、終末補体複合体 (TCC) の形成を抑制でき、生体の組織損傷や過剰炎症の抑制に重要な役割を果たしている可能性が明らかになった。




結 論

CL-P1は、急性炎症等におけるCRPの血中濃度上昇時に、CRPを補足することで自己の細胞表面で補体系を活性化することが考えられる。本結果は、CL-P1を主に発現する血管等の組織において、炎症時の補体活性化メカニズムの解明に新しい知見を提供すると考えられる。

引 用 文 献

1. Fujita, Y., Yamaguchi, S., Kakino, A., Iwamoto, S., Yoshimoto, R., Sawamura, T. Lectin-like oxidized LDL receptor 1 is involved in CRP-mediated complement activation. *Clin. Chem.* 57, (2011) 101398–1405.
2. Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Itabe, H., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Wakamiya, N. The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, (2001) 44222–44228.
3. Mori, K., Ohtani, K., Jang, S., Kim, Y., Hwang, I., Roy, N., Matsuda, Y., Suzuki, Y., Wakamiya, N. Scavenger receptor CL-P1 mainly utilizes a collagen-like domain to uptake microbes and modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840, (2014) 3345–3356.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	Roy Nitai Chandra
<p>審査委員長 <u>谷口 隆信</u> </p> <p>審査委員 <u>小林 博也</u> </p> <p>審査委員 <u>中省 文隆</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Collectin CL-P1 Utilizes C-Reactive Protein for Complement Activation (コレクチン CL-P1 は、CRP を用いて補体経路を活性化する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>大谷克城, 松田泰幸, 森健一郎, 黄仁秀, 鈴木定彦, 井上徳光、若宮伸隆</p> <p><i>Biochimica et Biophysica Acta</i> 1860 (2016) 1118–1128</p>			
<p>CRP は炎症に伴って血漿中に出現する蛋白質として古くから知られており、補体系の活性化に関わっていることが示されている。申請者らは細胞膜型のレクチンである CL-P1 が CRP を介して古典的な補体活性経路を駆動することを示し、この機構の詳細について報告している。</p> <p>実験結果から CL-P1 はコラーゲン様ドメインおよびコイルドコイルドメインを介して、CRP の B 表面と結合し、C1q を利用した古典経路およびプロパジンを利用した第二経路を活性化していると考えられる。更に、CRP は細胞溶解を起こすことなく、結合した細胞上で古典経路を活性化することが知られていたが、補体 H 因子が終末補体複合体の形成を抑制していると推察された。</p> <p>本論文の論旨は明確であり、細胞表面の CL-P1 が CRP を結合して古典的補体経路のプラットフォームとして機能しているという知見は、免疫学領域に新しい方向性をもたらすものと評価される。また、補体 H 因子との相互作用も重要な発見であり、難病に指定されている非典型溶血性尿毒症症候群の治療に道を開くものである。</p> <p>委員の質問に対して具体的かつ明快な説明がなされ十分な知識を有していた。以上の結果を総合し、本審査委員会は本論文を博士論文として相応しいものと判定した。</p>			