

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	黄 仁秀
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Collectin kidney 1 (CL-K1) plays an important role in innate immunity against <i>Streptococcus pneumoniae</i> infection</p> <p>(新規コレクチン CL-K1 は、マウスにおける肺炎球菌感染に対して防衛的に機能する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>森 健一郎、大谷 克城、松田 泰幸、ロイ ニタイ、金 然旭、鈴木 定彦、若宮 伸隆</p> <p>Journal of Innate Immunity</p> <p>(掲載予定)</p> <p>研 究 目 的</p> <p>コレクチンは、構造内にコラーゲン様領域とカルシウム要求性の糖認識領域 (Carbohydrate recognition domain; CRD) を有するタンパク質の総称であり、体内に侵入した異物を認識・排除する自然免疫分子として知られている。Collectin kidney 1 (CL-K1) は、2006 年に同定された同様の構造を持つコレクチンファミリーに属する分子である⁽¹⁾。これまでの <i>in vitro</i> における研究から CL-K1 は、α1-2 結合を持つハイマンノース型糖鎖に高い親和性を示すことや、食道上皮、気管上皮、皮膚など異物と直に接する生体防御に関与する部位に発現していること、更に、血中濃度は約 0.34 μg/ml であり、その血中濃度は年齢・性別に依存せず、一定の濃度で存在すること、レクチン経路に関与する MASP (MASPs (MBL-associated serine proteases) と相互作用することなどが明らかになっている^(2,3)。これまでは動物モデルが存在しなかったため、<i>in vivo</i> での CL-K1 の生体防御に関する研究はない。そこで CL-K1 の個体レベルでの機能を解明する目的で、CL-K1 knock out (KO) マウスを作成し、肺炎球菌を用いて生体防御に関する検討を行った。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>1) Recombinant human CL-K1 (rhCL-K1)</p> <p>ヒト CL-K1 を安定発現する CHO 細胞株を、7 日間無血清培地で培養後、培養上清を 5 mM Ca^{2+} 存在下で mannan-agarose と反応させ、0.1 M mannose/TBSC により溶出を行い rhCL-K1 を精製した。Mannose は使用直前、PD-10 Desalting Column を利用して除去した。</p> <p>2) 微生物</p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i> (肺炎球菌) D39 株は羊血液寒天平板培地で培養し、綿棒を用いて BHI 培地に回収した。<i>Escherichia coli</i> (大腸菌) ATCC 25922 株は LB 培地で培養した。微生物は熱処理後、0.1% BSA/PBS</p>			

を用いて洗浄し、分注したものを -80°C で保存した。Zymosan A は ThermoFisher Scientific 社から購入したものを 0.1% BSA/PBS に懸濁して使用した。

3) CL-K1 の各種微生物との結合検討

ヒト血清または rhCL-K1 を各種微生物と反応後、ELISA や pull-down assay により、CL-K1 と微生物との結合を確認した。結合は rabbit anti-human CL-K1 polyclonal antibody (pAb) で検出した。結合阻害検討は結合反応液に EDTA, mannose, Poly (A), Poly (I) を添加して行った。

4) Phagocytosis assay

FITC 標識肺炎球菌または大腸菌を rhCL-K1 と反応後、マウス単球由来細胞 (J774A.1) と培養した。Trypan blue 処理により、細胞外の蛍光をクエンチングした後、細胞内の貪食量を平均蛍光強度 (MFI) で測定した。

5) マウス

CL-K1 KO マウスは CL-K1 ゲノム配列の exon 2 に neomycin resistant gene を挿入したターゲットベクターを作製し、相同組換えにより KO マウスを作製した。CL-K1 KO マウスは、PCR、southern blot、RT-PCR、western blot でゲノム、mRNA、タンパクレベルで確認を行った。

6) マウス血清を用いた C3 deposition assay

肺炎球菌または Zymosan A を wild type (WT) マウス、CL-K1 KO マウスの血清と反応し、rabbit anti-C3c pAb で補体活性化における補体因子 C3 の沈着を確認した。

7) ヒト血清を用いた C3 deposition assay

肺炎球菌と rhCL-K1 を反応した後、さらに補体系の古典経路活性化因子 IgG とレクチン経路活性化因子 Ficolin を除去したヒト血清と反応することにより CL-K1 依存的な C3 沈着を確認した。C3 deposition の検出は 6)と同様の方法で行った。

8) マウスへの肺炎球菌の接種方法と接種量の検討及び生存率比較実験

WT、CL-K1 KO マウスを麻酔後、肺炎球菌を経鼻投与した。感染菌数の決定のため、肺炎球菌の希釈系列を作成し WT マウスに接種して接種量の検討を行った。 1×10^7 CFU の肺炎球菌感染後、10 日間、マウスの生存を確認した。(WT= オス 11 匹、メス 22 匹; CL-K1 KO= オス 9 匹、メス 11 匹)

9) 感染後の肺の菌数決定及び体重変動観察

1×10^6 CFU の肺炎球菌感染 48 時間後、マウス肺のホモジネートを段階希釈し、羊血液寒天平板培地で培養を行い、感染後の肺の菌数を測定した。同時に肺炎球菌感染前後のマウスの体重を測定し、体重変動を比較した。

10) 感染後の肺の病理学的解析

1×10^4 CFU の肺炎球菌感染 48 時間後、マウス肺の H&E 染色を行い、炎症の程度を評価した。炎症は間質炎、肺胞炎、水腫、血管内皮炎、気管支炎、血栓形成、胸膜炎の 7 項目を確認し、評価は 0= absent; 1= mild; 2= moderate; 3= severe として評価した。

11) 免疫組織化学染色

1×10^6 CFU の肺炎球菌感染 6、24 時間後、マウス肺を anti-CL-K1 pAb と anti-*S. pneumoniae* pAb、anti-C3c pAb と anti-*S. pneumoniae* pAb の組合せで染色し、共焦点顕微鏡で個々の局在や共局在について観察し

た。

12) *In vivo* 貪食検討

1×10^6 CFU の肺炎球菌感染 6 時間後、マウス肺を anti-*S. pneumoniae* pAb で染色した。肺炎球菌を貪食した細胞を 100 個以上観察し、貪食細胞あたりの平均肺炎球菌数を貪食指数 (Phagocytic index) として評価した。

13) 統計解析

Student's t test や log-rank test (生存率比較) で行った。 $p < 0.05$ を統計学的に有意な差とした。

成 績

1) CL-K1 KO マウス

CL-K1 KO マウスでは CL-K1 の mRNA やタンパク質の発現は確認されなかった。また、WT マウスと比較し、CL-K1 KO マウスでは肺の肉眼的かつ組織学的な異常は確認されなかった。

2) 肺炎球菌感染実験

WT マウスを利用した感染菌数決定予備検討の結果、 1×10^7 CFU 感染マウスの生存率が 30%を示したため、肺炎球菌 1×10^7 CFU を生存率比較の接種菌数に決定した。感染後生存率の観察では、オス CL-K1 KO マウスは感染 2 日目から死亡し、全てのマウスが感染 5 日以内に死亡した。WT マウスは感染 2 日目から死亡したが、最終的に 20%のマウスが生存した。メスのマウスでも同様な結果が確認され、全体では CL-K1 KO マウスは WT マウスより生存率が有意に低下した ($p = 0.0012$)。 1×10^6 CFU の肺炎球菌感染後のマウスの肺の肺炎球菌数や体重変動に関する検討では、CL-K1 KO マウスの肺で感染後の肺炎球菌数が有意に多かった。 ($p < 0.005$)。また、CL-K1 KO マウスでは有意な体重減少が観察された ($p < 0.05$)。免疫組織化学染色により感染後のマウス肺をさらに詳しく検討した結果、WT マウス肺では感染 6 時間後に CL-K1 の量が増加し、24 時間後まで維持されていた。また、肺炎球菌の染色結果、WT マウス肺では感染 24 時間後、6 時間と比べ肺炎球菌の減少が確認されたが、CL-K1 KO マウス肺では減少は確認されなかった。 1×10^4 CFU の肺炎球菌感染後の肺の炎症を確認した結果、CL-K1 KO マウスでは WT マウスより有意に重篤な炎症が確認された ($p < 0.005$)。特に間質、肺胞、血管内皮、気管支で有意に重篤な炎症が観察された。

3) CL-K1 と肺炎球菌との結合検討

血中 CL-K1、rhCL-K1 ともに、量依存的に肺炎球菌と結合し、生理的な濃度の CL-K1 でも結合は確認できた。また、CL-K1 の肺炎球菌との結合は EDTA と mannose で阻害されたことからカルシウム依存的な CRD を介した結合が考えられた。同時に Poly (A) でも結合が阻害されたことから電荷依存的な結合も観察された。

4) CL-K1 による補体活性化能検討

rhCL-K1 添加により肺炎球菌上の C3 deposition が増加した。また、マウス血清を用いた C3 deposition assay では CL-K1 KO マウス血清の C3 deposition が WT マウス血清より有意に低かった ($p < 0.05$)。

5) CL-K1 による貪食誘導の検討

rhCL-K1 処理によりマウス単球由来細胞の大腸菌貪食は増加したが、同処理の肺炎球菌では貪食は増加しなかった。一方、*in vivo* における貪食検討では肺における貪食細胞当たりの平均肺炎球菌数は、CL-K1 KO マウスは WT マウスより低かった。

考 案

コレクチン CL-K1 は、人における CL-K1 欠損症の発見により、顔面等の骨格異常や全身の形態異常に関与することが報告されているが、コレクチンが一般的に有する生体防御に関する機能は不明であった。本研究では、CL-K1 KO マウス作製を行い、マウス個体における肺炎球菌感染に対する CL-K1 の機能を検討し、個体レベルにおける CL-K1 の肺炎球菌に対する感染防御機能を初めて明らかにした。さらに、*in vitro* の検討により、CL-K1 と肺炎球菌との結合様式を解明し、CL-K1 の補体系活性化による肺炎球菌の排除メカニズムを明らかにした。




結 論

CL-K1 は、他の生体防御レクチンに比較して血液中では低濃度で存在するが、呼吸器感染症を起こす肺炎球菌に対して感染防御機能を担うことを明らかにした。この結果は、CL-K1 が、個体レベルでの生体防御において重要な役割を担う可能性を示唆する。

引 用 文 献

1. Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, Ohtani K, Katoh T, Jang S, 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* 2006; 50(12): 1001-1013.
2. Hansen S, Selman L, Palaniyar N, Ziegler K, Brandt J, Kliem A, Jonasson M, Skjoedt M, Nielsen O, Hartshorn K, Jorgensen TJD, Skjodt K, Holmskov U: Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol* 2010; 185: 6096-6104.
3. Yoshizaki T, Ohtani K, Motomura W, Jang S, Mori K, Kitamoto N, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N: Comparison of human blood concentrations of collectin kidney 1 and mannan-binding lectin. *J Biochem* 2012; 151(1): 57-64.

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	黄 仁秀
審査委員長 迫 康仁 			
審査委員 谷口 隆信 			
審査委員 東 寛 			
<h3 style="margin: 0;">学 位 論 文 題 目</h3> <p style="margin: 10px 0 0 40px;">Collectin kidney 1 (CL-K1) plays an important role in innate immunity against <i>Streptococcus pneumoniae</i> infection (新規コレクチン CL-K1 は、マウスにおける肺炎球菌感染に対して防御的に機能する)</p>			
<p>コレクチンは体内に侵入した異物を認識・排除する自然免疫分子として知られている。その一つである Collectin kidney 1 (CL-K1) は、α1-2 結合を持つハイマンノース型糖鎖に親和性を持つこと、気管上皮などの異物に直に接する部位に発現していること、血中濃度は年齢・性別に依存せず一定であること、補体活性化のレクチン経路に関与するMASPsと相互作用することが <i>in vitro</i> の研究により明らかとなっている。本研究では、CL-K1 の <i>in vivo</i> での機能を解析するために CL-K1 ノックアウト(KO)マウスを作成し、肺炎球菌を用いた生体防御に関する検討とその機序に関する検討を実施した。</p> <p>学位申請者らは、CL-K1 KO マウスに肺炎球菌を感染させると KO マウスの生存率が有意に低下することや有意な体重減少がみられることを明らかにした。さらに、肺における肺炎球菌数は、野生型マウスでは減少するが KO マウスでは減少しないこと、KO マウスでは肺間質、肺胞、血管内皮、気管支で有意に重篤な炎症が観察されることを明らかにした。</p> <p><i>in vitro</i> の解析では、CL-K1 が肺炎球菌に結合することや、その結合様式としてカルシウム依存的に糖鎖認識領域を介するものと電気依存的なものがあること明らかにした。また、CL-K1 により補体成分である C3 の肺炎球菌への沈着が増加すること、KO マウスの血清による C3 沈着は野生型マウスの血清のそれより有意に低いこと、さらに、大腸菌を CL-K1 で処理することにより、マウス単球由来細胞の大腸菌に対する貪食活性が増強されるが、肺炎球菌に対する CL-K1 処理はマウス単球由来細胞の貪食活性に影響を与えないことを明らかにした。</p> <p>以上より、CL-K1 が補体系を活性化することにより肺炎球菌に対する防御機能を発揮することが示された。この結果は、CL-K1 が個体レベルで生体防御に重要な役割を担っている可能性を示唆するものであり、自然免疫機構を理解する上で重要な知見を与えるものである。</p>			

各委員による査問にも的確な回答が得られ、当該分野に関する知識や見識は博士にふさわしいものであり、学位論文に値すると判断いたしました。