

Collectin kidney 1 (CL-K1) plays an important role in innate immunity
against *Streptococcus pneumoniae* 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)

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

黄 仁秀

(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)

研究目的

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 *in vitro* における研究から CL-K1 は、 α 1-2 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 μ g/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 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、*in vivo* 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。

材料・方法

1) Recombinant human CL-K1 (rhCL-K1)

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。

2) 微生物

Streptococcus pneumoniae (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。*Escherichia coli* (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 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、細胞内の食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 x 10⁷ 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 x 10⁶ 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 x 10⁴ 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、肺炎炎、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 x 10⁶ 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 x 10⁶ 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 x 10⁷ CFU 感染マウスの生存率が 30 %を示したため、肺炎球菌 1 x 10⁷ 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 x 10⁶ 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。1×10⁴ 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 による食食誘導の検討

rhCL-K1 処理によりマウス単球由来細胞の大腸菌食食は増加したが、同処理の肺炎球菌では食食は増加しなかった。一方、*in vivo* における食食検討では肺における食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.