

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17440

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における補体の影響の解明と新規抗補体薬の有効性

研究課題名(英文)Relevance of complement in Inflammatory bowel disease and potential treatment with novel complement regulators

研究代表者

高住 美香(Takasumi, Mika)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10836331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患において、近年、特に補体活性化経路のレクチン経路と第二経路との関連が注目されている。本研究では、新規抗補体薬であるsMAP-Ig(レクチン経路阻害)とsMAP-FH(レクチン経路・第二経路阻害)の有効性を検証することを目的とした。野生型マウスで炎症性腸疾患モデルを作成し、治療薬としてsMAP-IgとsMAP-FHをそれぞれ投与した。sMAP-FHでは病態の改善効果は認められなかったが、sMAP-Ig投与マウスではDAI(Disease activity index)、病理組織学的スコアの改善が認められた。補体レクチン経路は炎症性腸疾患の治療のターゲットとなる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎、クローン病は近年、患者数が激増しており、病態の解明、および新たな治療法の開発が必要とされている。今回、動物実験で補体レクチン経路の阻害が病態の改善に寄与することが明らかとなった。今回使用した抗補体薬はレクチン経路を特異的に阻害するものであり、抗補体薬としてもこれまでになかった作用機序である。本研究は、炎症性腸疾患の新たな病態解明、治療法の創出につながる可能性があり、学術的にも社会的にも意義のある研究であると考えている。

研究成果の概要(英文)：In inflammatory bowel disease, lectin pathway(LP) and alternative pathway(AP) as part of the complement activation cascade were contributed to disease activity. In the past study, we generated novel complement inhibitors sMAP-FH(LP and AP regulators) and sMAP-Ig (LP regulators). Then, we evaluated the efficacy of sMAP-FH and sMAP-Ig in inflammatory bowel disease. The disease models of inflammatory bowel disease were created in wild-type mice and treated with sMAP-Ig and sMAP-FH as therapeutic agents, respectively. Although sMAP-FH did not improve the pathological condition, mice treated with sMAP-Ig showed improvement in DAI (Disease activity index) and histopathological score. Our results indicate that LP is a target for treatment of inflammatory bowel disease.

研究分野：消化器分野

キーワード：レクチン経路 補体 sMAP-Ig

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎、クローン病は長期にわたり再燃、寛解を繰り返す原因不明の炎症性腸疾患である。ステロイド、免疫調節剤、生物学的製剤での治療により病態の改善が可能となっているが、いまだ根本的な治療法は確立していない。近年、患者数が激増しており、病態の解明、および新たな治療法の開発が必要とされている。

補体系は 30 以上のタンパク質で構成される自然免疫機構である。その活性化は 3 つの活性化経路(古典経路、レクチン経路、第二経路)から始まり、C3 を活性化し病原体やアポトーシス細胞の排除や炎症物質の産生を担っている。その一方で、補体の過剰な活性化が様々な疾患と関連することが明らかとなっており、特にレクチン経路と第二経路の重要性が報告されている。レクチン経路の活性化にはセリンプロテアーゼである mannose-binding lectin (MBL) associated serine protease (MASP)-2 が必須である。過剰な補体活性化を防ぐため、MASP-2 の制御因子として small MBL-associated protein (sMAP) が、第二経路では H 因子 (FH) が経路活性化の制御因子として存在している。さらに補体の生理的機能は自然免疫だけではなく、発生、代謝、凝固、神経発達 などにも強く影響することが明らかになりつつある。

炎症性腸疾患では、腸管粘膜への補体成分沈着が認められており、その疾患活動性に補体が関与することが示唆されている。炎症性腸疾患モデルマウスでは、第二経路の欠損や抑制により腸炎の改善が認められ、さらにレクチン経路関連因子の欠損でも腸炎の改善が得られたと報告されている。このことからレクチン経路、第二経路の両経路が病態へ関与することが示唆される。しかし、レクチン経路の活性化に必須である MASP-2 の炎症性腸疾患における重要性はいまだ不明である。

sMAP は MASP-2 遺伝子のスプライシングバリエーションであり、MASP-2 を競合的に阻害する。申請者は、sMAP に着目しグロブリンとの融合蛋白である sMAP-Ig を作成し、そのレクチン経路阻害作用を確認している。さらに、sMAP と第二経路の制御因子である FH を融合させた sMAP-FH を作製し、レクチン経路と第二経路の両経路の活性化抑制に成功している。炎症性腸疾患モデルマウスにおいて、FH を利用した抗補体薬による第二経路抑制の有効性が既に証明されているが、レクチン経路、またはレクチン・第二両経路を抑制することでより効率的に病態を改善できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症性腸疾患モデルマウスにおける病態と MASP-2 の関連を明らかにし、新規抗補体薬 sMAP-Ig、sMAP-FH の有効性を検証することである。

3. 研究の方法

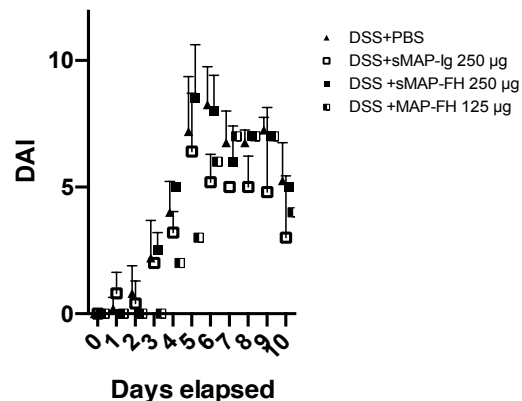
炎症性腸疾患モデルマウスの血清中の補体経路活性、および腸管の病理組織学的な評価を行いその関連を解析する。マウスは以下を検討対象群とする。(各群 5-6 匹)

C57BL/6 マウス野生型(control)	DSS(-)
C57BL/6 マウス野生型(PBS)	DSS(+)
C57BL/6 マウス野生型(PBS)	DSS(+)
C57BL/6 マウス野生型(PBS)	DSS(+)
C57BL/6 マウス野生型(PBS)	DSS(+)
MASP-1 欠損 C57BL/6 マウス(MASP-2KO)	DSS(+)

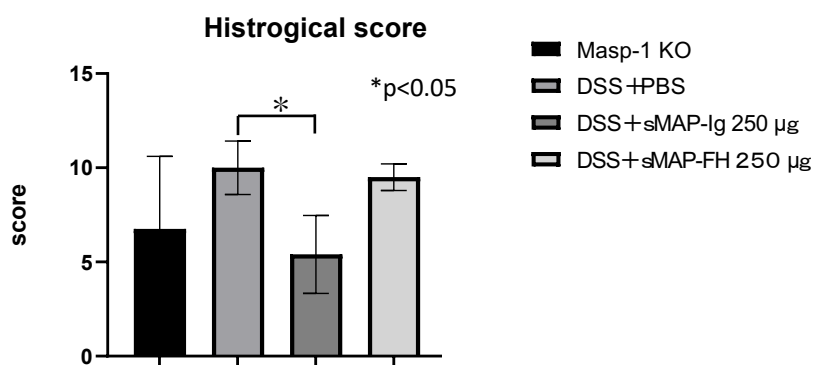
8-10 週齢のマウスに DSS3.0%を溶解した飲用水を free で飲水させ、腸炎を発症させる。DSS 含有水の飲水は 5 日間とし、その後は通常の飲用水に切り替えた。対照としての PBS、治療薬としての sMAP-FH、sMAP-Ig は DSS3.0%水の飲水開始を Day 0 とした時の Day 1, 3, 5, 7, 9 で腹腔内に投与した。連日、マウスの体重、便の性状、血便の程度を記録した。Day 10 にマウスを解剖し、血液、腸管の検体を採取した。

4. 研究成果

体重減少、便の性状、血便の程度を数値化した Disease Activity index (DAI) の結果を右図に示す。DAI は 12 点を満点とし、病態が悪いと点数が高くなる指標である。対照として PBS を腹腔内に投与した無治療のマウスに比べ、sMAP-Ig を投与したマウスで DAI は低い傾向にあった。sMAP-FH を投与したマウスでは DAI の明らかな低下は認められなかった。

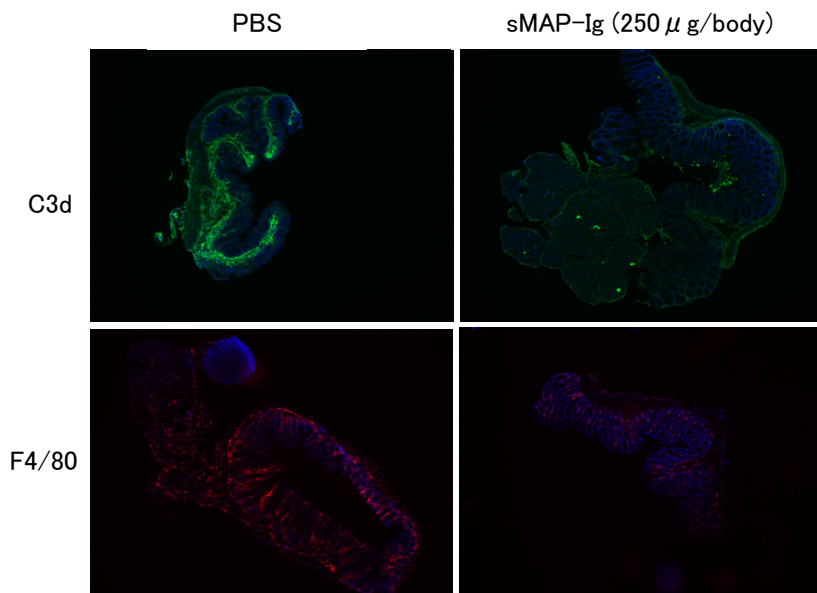


腸管の病理組織学的評価では、粘膜面の潰瘍形成の程度、炎症細胞浸潤の程度をスコア化し、0-12 点の範囲で重症度評価を行なった。



その結果、sMAP-Ig 投与群では無治療群(PBS)と比較し Histogocal score が有意に低値であり、炎症性腸疾患の障害の程度が軽度であった。sMAP-FH 投与群と MASP-1 欠損マウスでは、無治療群 (PBS) と比較し Histogical score に差は認められなかった。上記の結果から、レクチン経路の阻害は炎症性腸疾患の病態を制御することが示された。しかし、過剰な補体の抑制 (MASP-1 欠損、レクチン経路・第二経路の両経路の阻害) は逆に病態の改善には寄与しない結果であった。

腸管組織で免疫染色を行うと、補体活性化の程度を示す C3d の沈着は、無治療の PBS 群と比較して sMAP-Ig 投与群で減少していた。また、腸管組織へのマクロファージ浸潤の程度を観察するため、F4/80 の免疫染色を行うと、こちらも PBS 群と比較して sMAP-Ig 投与群で減少している結果であった。補体活性化の抑制とマクロファージ浸潤の低下が、sMAP-Ig による DSS 腸炎の病態改善に寄与していることが示唆された。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Takasumi Mika、Omori Tomoko、Machida Takeshi、Ishida Yumi、Hayashi Manabu、Suzuki Toshiyuki、Homma Yoshimi、Endo Yuichi、Takahashi Minoru、Ohira Hiromasa、Fujita Teizo、Sekine Hideharu	4 . 巻 34
2 . 論文標題 A novel complement inhibitor sMAP - FH targeting both the lectin and alternative complement pathways	5 . 発行年 2020年
3 . 雑誌名 The FASEB Journal	6 . 最初と最後の頁 6598 ~ 6612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------