

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09776

研究課題名（和文）滲出型加齢黄斑変性の病態形成に補体レクチン経路が関与する

研究課題名（英文）The complement lectin pathway is involved in the development of exudative age-related macular degeneration

研究代表者

大森 智子（Omori, Tomoko）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50754222

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、加齢黄斑変性（AMD）におけるレクチン経路の関与を確かめるべく、レクチン経路の補体因子であるMASP-1欠損マウスを用いてAMDモデルであるヨウ素酸ナトリウム（NaIO₃）誘発網膜障害モデルマウスを作成し、その病態解析を行なった。NaIO₃投与MASP-1欠損マウスでは、NaIO₃投与野生型マウスに比べて網膜障害が軽減していたが、C3の活性化状態に違いは認められなかった。本研究により、MASP-1がAMD様病変に増悪因子として関与する可能性示されたが、AMDにおけるレクチン経路の関与については今後さらなる検討が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、加齢黄斑変性のモデルであるヨウ素酸ナトリウム誘発網膜障害モデルにおける網膜障害にMASP-1が増悪因子として作用することが示唆された。この成果は、加齢黄斑変性の病態における補体の関与への理解を深め、加齢黄斑変の新規治療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed at clarifying the involvement of lectin pathway activation in the development of age-related macular degeneration (AMD). We used MASP-1-deficient mice, which lack lectin pathway activity, and injected NaIO₃ into these mice to analyze pathology of retina degeneration. Retinal degeneration was mild in NaIO₃-injected MASP-1 mice compared with NaIO₃-injected wild type mice. On the other hand, C3 activation levels did not differ between NaIO₃-injected MASP-1 and NaIO₃-injected wild type mice. This study suggests that MASP-1 is one of the exacerbating factors in the development of AMD. Further study is needed to clarify involvement of the lectin pathway activation in the development of AMD.

研究分野：免疫学

キーワード：補体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)は、黄斑部での炎症により中心視野が障害されるため、日常生活に著しい障害をきたす。AMD は滲出型と萎縮型に大別され、本邦では前者の罹患者数が急増し、病態機構の解明と新規治療法の開発が早急に求められている。

補体系は病原微生物やアポトーシス細胞に対して古典経路、レクチン経路、または第二経路を通じて活性化し、補体因子 C3 の結合によりこれらを異物として標識し、食細胞による貪食処理を経て異物を排除する。さらに補体系は異物の表面に膜侵襲複合体(C5b-9)を形成し、直接破壊する。一方、補体系の無秩序な活性化は、多くの炎症性疾患の病態形成に関与する。これまで滲出型 AMD では、第二経路の活性化の関与が示されてきたが、レクチン経路と古典経路の関与の有無は不明である。

近年、研究代表者らは、滲出型 AMD 患者の前房水を採取し、レクチン経路と古典経路で共通の補体因子 C4 の解析を行った。その結果、滲出型 AMD 患者では白内障患者と比較して C4 の低値と、C4 の活性化産物である C4a の高値、および C4 活性化の指標となる C4a/C4 比(C4 活性化指数)の有意な高値を認め、滲出型 AMD 患者の眼内でレクチン経路と古典経路の一方または両方が活性化していることを初めて明らかにした(Omori *et al.* *Ophthalmic Res*, 2020)。さらに滲出型 AMD 患者では、レクチン経路に固有の補体因子である mannose-binding lectin associated serine-protease (MASP)-2 の有意な低値を認め、当該患者の眼内でレクチン経路が活性化している可能性を見出した。以上を背景に、研究代表者らは AMD の病態形成に補体レクチン経路が関与すると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが作成したレクチン経路の補体因子 MASP-1 欠損マウスを用いて、AMD モデルマウスを作成し、AMD 様病変の病態形成におけるレクチン経路の役割を明らかにする。AMD モデルマウスとして、ヨウ素酸ナトリウム(NaIO₃)誘発網膜障害モデルを作成した。

3. 研究の方法

MASP-1 欠損 NaIO₃ 誘発網膜障害モデルマウスの作製

7~12 週齢の野生型、および MASP-1 欠損マウス(共に雄の C57BL/6J 系)に、NaIO₃ (20 mg/kg) を静脈内投与し、網膜障害を誘発した。別個体の野生型マウスに同量の PBS を静脈内投与し、非誘発コントロールとして実験に用いた。NaIO₃ 投与後 2 日目に眼球を摘出し、網膜への C3 沈着レベルを免疫蛍光染色法にて評価した。さらに、網膜における C3 の活性化状態を神経網膜のウェスタンブロット法にて評価した。また、NaIO₃ 投与後 7 日目の網膜をヘマトキシリン・エオジンにて染色し、外顆粒層厚の測定にて網膜における組織障害の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) 網膜における組織障害

NaIO₃ 誘発網膜障害モデルでは、NaIO₃ の尾静脈投与により網膜色素上皮細胞が最初に障害され、それに続いて網膜色素上皮によって機能維持されている視細胞が障害される。

野生型 NaIO₃ 投与マウスでは、非誘発コントロールマウスに比べて視細胞の核で構成される外顆粒層が網膜周辺部を除き有意に菲薄していた(図 1、 $P < 0.05$)。一方で、MASP-1 欠損 NaIO₃ 投与マウスでは、野生型 NaIO₃ 投与マウスに比べて、網膜周辺部を除き外顆粒層の菲薄化が有意に軽減されていた(図 1、 $P < 0.05$)。このことから、MASP-1 は、NaIO₃ 誘発網膜障害モデルにおける網膜障害において、増悪因子として作用すると考えられる。

(2) 網膜における C3 沈着レベル

網膜における C3 の沈着を評価した結果、非誘発コントロールマウスでは、C3 の沈着が認められなかった。野生型 NaIO₃ 投与マウスと MASP-1 欠損 NaIO₃ 投与マウスでは、視細胞層において C3 の沈着が認められ、C3 沈着レベルは同等であった(図 2、 $P > 0.99$)。

(3) 網膜における C3 の活性化状態

網膜における C3 の活性化状態において、非誘発コントロールマウスでは、C3 の活性化産物である iC3b が認められなかったのに対し、野生型 NaIO₃ 投与マウスと MASP-1 欠損 NaIO₃ 投与マウスの網膜では、iC3b が認められた。また、野生型 NaIO₃ 投与マウスと MASP-1 欠損 NaIO₃ 投与マウス間において、未活性化型の C3 レベルと iC3b レベルおよびそれらの比である iC3b/C3 レベル比に有意差は認められなかった($P > 0.99$ 、 $P = 0.34$ 、 $P = 0.86$)。

(4) 総括

本研究により MASP-1 は、NaIO₃ 誘発網膜障害モデルマウスにおける視細胞障害に、増悪因子として作用することが示された。レクチン経路の関与については、さらなる検討が必要である。

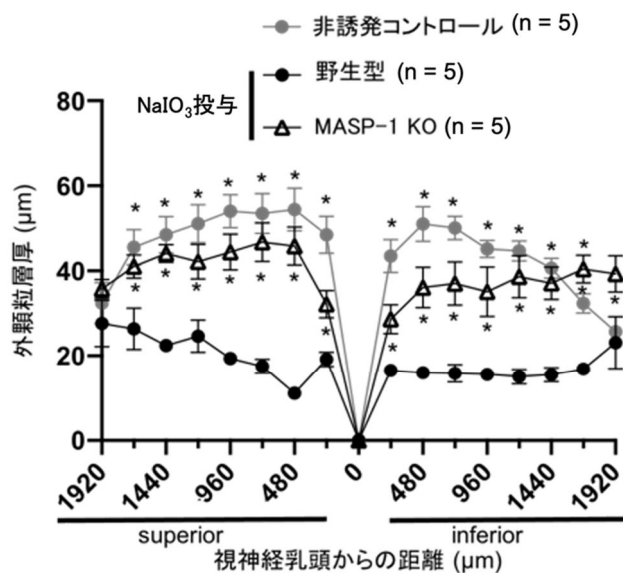


図1 NaIO₃投与後7日目の外顆粒層厚

結果は、平均値±標準誤差で表す。1-way ANOVAおよびNaIO₃投与野生型マウスを基準としたDunnettの多重比較検定を行なった(* P < 0.05)

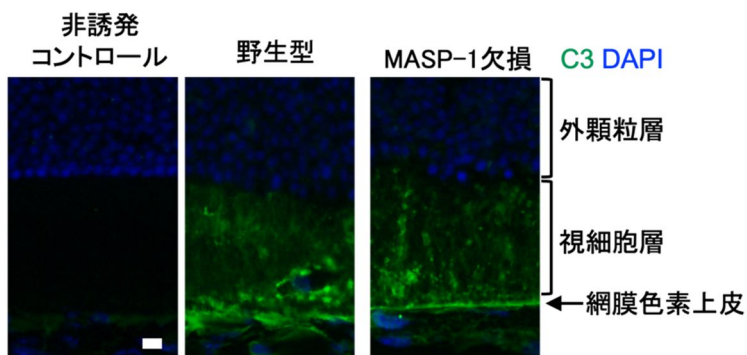


図2 網膜におけるC3の免疫染色結果
C3(緑)、DAPI(青)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Keiichiro, Oguchi Yasuharu, Omori Tomoko, Ishida Yumi, Shintake Hiroaki, Tomita Ryutaro, Kasai Akihito, Ogasawara Masashi, Sugano Yukinori, Itagaki Kanako, Ojima Akira, Machida Takeshi, Sekine Hideharu, Sekiryu Tetsuju	4. 巻 11
2. 論文標題 Changes in complement activation products after anti-VEGF injection for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration and pachychoroid disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87340-6	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 -

1. 著者名 Yutaka Kato, Yasuharu Oguchi, Tomoko Omori, Hiroaki Shintake, Ryutaro Tomita, Akihito Kasai, Masashi Ogasawara, Yukinori Sugano, Kanako Itagaki, Akira Ojima, Takeshi Machida, Hideharu Sekine, Tetsuju Sekiryu	4. 巻 61
2. 論文標題 Complement Activation Products and Cytokines in Pachychoroid Neovasculopathy and Neovascular Age-Related Macular Degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.61.13.39.	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 -

1. 著者名 Kato Yutaka, Oguchi Yasuharu, Omori Tomoko, Kasai Akihito, Ogasawara Masashi, Sugano Yukinori, Itagaki Kanako, Ojima Akira, Ishida Yumi, Machida Takeshi, Sekine Hideharu, Sekiryu Tetsuju	4. 巻 2
2. 論文標題 Age-Related Maculopathy Susceptibility 2 and Complement Factor H Polymorphism and Intraocular Complement Activation in Neovascular Age-Related Macular Degeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmology Science	6. 最初と最後の頁 100167 ~ 100167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xops.2022.100167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kusakari Kohei, Machida Takeshi, Ishida Yumi, Omori Tomoko, Suzuki Toshiyuki, Sekimata Masayuki, Wada Ikuo, Fujita Teizo, Sekine Hideharu	4. 巻 13
2. 論文標題 The complex formation of MASP-3 with pattern recognition molecules of the lectin complement pathway retains MASP-3 in the circulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.907023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大森智子、関根英治、石龍鉄樹	4. 巻 80
2. 論文標題 加齢黄斑変性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 1795~1801
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takeshi Machida, Kohei Kusakari, Yumi Ishida, Tomoko Omori, Toshiyuki Suzuki, Masayuki Sekimata, Teizo Fujita, Hideharu Sekine
2. 発表標題 The significance of complex formation of MASP-3 with pattern recognition molecules of the lectin complement pathway in the long-term retention of MASP-3 in the circulation
3. 学会等名 2021 Virtual Workshop of the International Complement Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草刈浩平、石田由美、大森智子、鈴木俊幸、関亦正幸、町田豪、関根英治
2. 発表標題 MASP-3の活性化におけるレクチン経路の認識分子の役割
3. 学会等名 第57回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大森智子、町田豪、石田由美、石龍鉄樹、関根英治
2. 発表標題 ヨウ素酸ナトリウム誘発網膜障害モデルマウスにおけるMASP-1の役割
3. 学会等名 第58回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔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
研究 分担者	石龍 鉄樹 (Sekiryu Tetsuju) (00216540)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究 分担者	関根 英治 (Sekine Hideharu) (40363759)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

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
---------	---------