

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590342

研究課題名(和文) 補体関連分子MASP-1による新規なD因子活性化機構

研究課題名(英文) Investigation for complement D factor activation by MASP-1/3

研究代表者

高橋 実(Takahashi, Minoru)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00285024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：補体系のうち、レクチン経路は外来微生物の糖鎖を認識し、補体を活性化する。MASPはその主たる酵素で、レクチン経路の中心的な役割を持つ。その主たる酵素MASPには3種類あることがわかっている。そのうちのMASP-1/3は補体第二経路のD因子の活性化に働くが、本研究はそのメカニズムを明らかにすることであった。成果としては、期間中にヒトでのMASP-1/3欠損症が見つかり、その患者の血清を手に入れて、詳細に解析したところ、ヒトでもMASP-1/3は第二経路の活性化に働くことが明らかとなった。この結果は、MASP-1/3が普遍的に働いていることを示した。

研究成果の概要(英文)：In complement system, lectin pathway activates complement by recognition of sugar chains on microbes. MASP has a pivotal role in the lectin pathway. Three MASPs (MASP-1, MASP-2 and MASP-3) were identified. We reported that MASP-1/3 activate complement D factor(fD), which is essential for the alternative pathway. In this study, we will investigate the mechanisms for activation of fD by MASP-1/3. During this study, MASP-1/3 defected patients were found. We found that MASP1/3 is essential for alternative pathway in human as well as mouse.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：補体 MASP ノックアウトマウス 3MC症候群 レクチン経路

1. 研究開始当初の背景

補体は自然免疫の一翼を担う一方、時に腎炎や虚血再還流等での補体依存性組織障害を起こす。その活性化経路には古典経路、第二経路、レクチン経路が存在する(図1参照)。異物を認識分子が認識すると活性化因子(プロテアーゼ)がC3を限定分解(活性化)し、生体防御反応を起こす。古典経路は抗体による免疫複合体を認識するが、レクチン経路は抗体を必要とせず、マンノース結合レクチン(MBL)やficolinが病原体の糖鎖構造を認識する。従って初期感染や幼児などの獲得免疫が未発達の状態での生体防御に重要な役割を担う。古典経路の活性化因子C1rとC1sと相同性のある新たなセリンプロテアーゼ、MASPがMBLに結合し、補体を活性化することが当講座により発見された(J Exp Med.1992,176:1497)。その後の研究においてMASPにはMASP-1、MASP-2、MASP-3の3種類あることがわかった(総説 Nat Rev Immunol.2002,2:346)。MASPの機能に関してはMASP-2が古典経路のC1sと同様にC4とC2を活性化すること以外はわかっていない。当講座はMASP-1には直接C3を分解する活性があることを報告した(Immunobiology.1995,194:443)。さらに最近、MASP-1が血液凝固系に関わる因子群(フィブリノーゲン、第XIII因子)や血小板活性化受容体(PAR4)を基質とする可能性が報告されているが、いずれも生体では確認されていない。申請者らはMASPの生体での役割を検討するためにMASPの欠損マウスを作って解析を進めている(J Immunol.2006,177:8626; J Immunol.2008,180:6132)。最近の成果として、MASP-1が血液中で補体D因子前駆体の活性化を担っていて、補体第2経路にも関与していることを初めて報告した(図1参照、J Exp Med.2010,207:29)。この結果はMASP-1が生体内でレクチン経路以外にも働いていることを意味し、国内外で注目を集めた。D因子は主に脂肪細胞より分泌され、瞬時に活性化される。未解決な課題として、主に肝臓で合成・分泌されるMASP-1がどのようにしてD因子を認識して、活性化するのかということである。リコンビナントMASP-1をMASP-1/3欠損血清に加えても第2経路の活性化は回復しなかった。この理由としてリコンビナントMASP-1は発現の段階で既に活性化型に転じており、血清中のプロテアーゼ阻害因子であるC1インヒビター等により、速やかに不活性化されるのではないかと考えている。

2. 研究の目的

本研究はMASP-1によるD因子活性化機構の分子レベルでの解明を目指す。また脂肪局所で第2経路が活性化された結果生じるC3の分解産物であるC3desArgが近傍の脂肪細胞の脂質代謝をコントロールしていると考えられている(Lipids.1991,26:495)。実際、MASP-1/3KOには成長遅延がみられたことから、MASP1/3KOにおける脂肪代謝異常を詳細に調べてみる。また上記の結果はマウスでの結果であり、これがヒトでも起こっているのか解明する。

3. 研究の方法

MASP-1またはMASP-3が血液中でD因子前駆体を活性化する機構を生化学的手法を用いて明らかにする。またウイルスベクター発現系を使い、MASP1/3KOマウスにMASP-1またはMASP-3を導入し、第二経路が回復するかを検討する。

4. 研究成果

23年度は内因性MASP-1の性状と活性化機構の同定を目指し、MASP-1のC末のプロテアーゼドメインを蛍光タンパク質GFPと入れ替えたキメラタンパク質(MASP-1/eGFP)を生体に発現するマウスTg-MASP-1/eGFPを大阪大学微生物病研究所との共同研究で作成した。

24年度は23年度に作成したTg-MASP-1/eGFPマウスとMASP-1/3欠損マウスを交配させることにより、活性のあるMASP-1/3がないマウスを作成した。これは内因性MASP-1がMASP-1/eGFPのキメラタンパク質を分解している可能性があり、MASP-1からGFPが外れてしまっていることが考えられたためである。現在もこのマウスを系統維持して、MASP-1/3が特に胎児期でどこに局在しているのか、組織を詳細に調べている。またMASP1/3欠損マウスにおける脂肪組織、および血中における脂質の代謝異常を調べた。実際、MASP1/3欠損マウスでは成熟脂肪細胞の大きさが正常よりも小さいことが判明した。さらにこの欠損マウスの血清を使い、血中の脂質量を測定した。その結果、肥満ホルモンとして知られるレプチンが有意に低下していることが分かった。また総コレステロール、HDLがMASP1/3欠損マウスで有意に低下していることが観察された。

また、ヒトD因子の解析も行った。まず、昆虫細胞を用い、ヒトD因子のcDNAを組み込み、発現を試みた。その結果、得られた組換え体は第二経路を活性化しない前駆体であることが判明した。これにヒト由来のリコンビナントMASP-1を加えることで、活性化型に転ずることも示した。

25年度 デンマークの研究グループから、MASP-1/3を欠損した3MC症候群の患者から採

取した血清を共与された。この血清を使って、補体第二経路の活性化能を測定したところ、正常血清に比べて、ほとんど活性がないことがわかった。さらにこの患者血清に含まれる補体 D 因子は分子量が正常よりも若干、大きいことも判明した。

まとめると、MASP-1/3 が補体 D 因子の活性化に必須であることは種を超えて普遍的に存在していることがわかった。さらに研究を遂行することで MASP-1/3 が 3MC 症候群の発症機序にどのように関与するかを解明する基盤となる結果である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Ruseva M. M., Takahashi M., Fujita T. and Pickering M. C., 2014. C3 dysregulation due to factor H deficiency is mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASP)-1 and MASP-3 independent in vivo. *Clin Exp Immunol* 176, 84-92.
2. Takahashi M., Sekine H., Endo Y. and Fujita T., 2013. Comment on "Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function". *J Immunol* 190, 2477.
3. Sekine H., Takahashi M., Iwaki D. and Fujita T., 2013. The Role of MASP-1/3 in Complement Activation. *Adv Exp Med Biol* 734, 41-53.
4. Kodama T., Sekine H., Takahashi M., Iwaki D., Machida T., Kanno K., Ishida Y., Endo Y. and Fujita T., 2013. Role of complement in a murine model of peanut-induced anaphylaxis. *Immunobiology* 218, 844-50.
5. Endo Y., Iwaki D., Ishida Y., Takahashi M., Matsushita M. and Fujita T., 2012. Mouse ficolin B Has an ability to form complexes with mannose-binding lectin-associated serine proteases and activate complement through the lectin pathway. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, 105891.
6. La Bonte L. R., Pavlov V. I., Tan Y. S., Takahashi K., Takahashi M., Banda N. K., Zou C., Fujita T. and Stahl G. L., 2012. Mannose-binding lectin-associated serine protease-1 is a significant contributor to coagulation in a murine model of occlusive thrombosis. *J Immunol* 188, 885-91.
7. Takahashi M., Sekine H., Endo Y. and Fujita T., 2013. Comment on "Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function". *J Immunol* 190, 2477.
8. Banda N. K., Takahashi M., Takahashi K., Stahl G. L., Hyatt S., Glogowska M., Wiles T. A., Endo Y., Fujita T., Michael Holers V. and Arend W. P., 2011. Mechanisms of mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 activation of the alternative pathway of complement. *Mol Immunol* 49, 281-9.
9. Iwaki D., Kanno K., Takahashi M., Endo Y., Matsushita M. and Fujita T., 2011. The Role of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease-3 in Activation of the Alternative Complement Pathway. *The Journal of Immunology* 187, 3751-3758
10. 高橋 実, 2011, 補体 D 因子の活性化と MASP-1、臨床免疫・アレルギー科、56、78-83
11. Takahashi K., Chang W. C., Takahashi M., Pavlov V., Ishida Y., La Bonte L., Shi L., Fujita T., Stahl G. L. and Van Cott E. M., 2011. Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. *Immunobiology* 216, 96-102.
12. Schwaeble W. J., Lynch N. J., Clark J. E., Marber M., Samani N. J., Ali Y. M., Dudler T., Parent B., Lhotta K., Wallis R., Farrar C. A., Sacks S., Lee H., Zhang M., Iwaki D., Takahashi M., Fujita T., Tedford C. E. and Stover C. M., 2011. Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion

injury. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 7523-8.

〔学会発表〕(計4件)

1. 高橋 実、岩城大輔、遠藤雄一、藤田禎三、MASP1 遺伝子産物の多様性について、補体シンポジウム、名古屋市(2011)招待講演
2. Takahashi M., Yuichi E, Fujita T., Developmental abnormalities in Masp1/3-deficient mice. XXIV. International Complement Workshop, Greece (2012)
3. 高橋 実、関根英治、遠藤雄一、藤田禎三、MASP1/3 欠損マウスにおける形態異常・3MC 症候群との関連、補体シンポジウム、大阪市(2012)
4. 高橋 実、遠藤雄一、Alexandra Antonoli, Wilhelm Schwaeble, 藤田禎三、関根英治、MASP-1 および MASP-3 の機能 ヒトとマウスの違いについて、補体シンポジウム、旭川市(2013)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 実 (TAKAHASHI, Minoru)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：00285024

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：