

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670478

研究課題名(和文) 補体因子MASP-1/3を標的とする新規製剤の開発とSLEモデル動物への治療効果

研究課題名(英文) Development of complement component MASP-1/3 inhibitors for treatment of lupus animal models.

研究代表者

関根 英治 (SEKINE, Hideharu)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40363759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SLEなど補体レクチン経路と第二経路が病態に關与する疾患に対する新規治療法の開発を目的に、2つのリコンビナント蛋白(MAp44-Ig, MAp44-fH)を開発した。その結果、マンナンコートプレートを用いたin vitroの実験ではMAp44-fHが最も強くレクチン経路と第二経路の活性化を抑制した。MAp44-fHをマウス腹腔内に投与し、48時間後までに採血した血清を用いたin vivoの実験でも、レクチン経路と第二経路の活性化の抑制効果が認められた。今後は同薬をSLEモデルマウスに投与しその治療効果を判定する。

研究成果の概要(英文)： We generated two recombinant proteins (MAp44-Ig, MAp44-fH) to treat diseases that are associated with activation of the complement lectin and alternative pathways such as lupus. In vitro experiments using mannan-coated microplates showed that MAp44-fH has stronger effect on the lectin and alternative pathway inhibition compared to MAp44-Ig. In vivo experiments by using sera from mice that received peritoneal administration of MAp44-fH showed inhibitory effect of the lectin and alternative pathways. MAp44-fH will be administrated to murine lupus models afterwards.

研究分野：補体学

キーワード：補体 レクチン経路 第二経路 MASP-1/3 MAp44

1. 研究開始当初の背景

補体系は約 30 種類の蛋白で構成される自然免疫機構であり、補体成分 C3 の活性化は病原体の排除や炎症の惹起に中心的に作用する。C3 を活性化する補体経路は、古典経路・レクチン経路・第二経路の 3 つがある。

レクチン経路の活性化に必須である MBL-associated serine protease-1 (MASP-1) と、その同一の遺伝子から転写されるスプライシングバリエーションの MASP-3 (MASP-1/3) は、第二経路の補体 D 因子を活性型 (fD) に変換するために必須の補体因子 (酵素) である。従って、Masp1/3-ノックアウト (KO) マウスではレクチン経路と第二経路が活性化されない (Takahashi (連携研究者), et al. *J Exp Med* 2010)。一方、MASP-1 遺伝子のもう一つのスプライシングバリエーションである MAp44 は、MASP-1/3 と異なり酵素活性部位 (SPD) を欠くため、MASP-1/3 の作用を阻害する内因性調節因子として働く (図 2)

自己免疫疾患の全身性エリテマトーデス (SLE) では、自己抗体による免疫複合体の形成が補体活性化のトリガーとなるため、古典経路が糸球体腎炎などの臓器障害に中心的に作用するとされてきた。一方、申請者らは、SLE モデルマウス (MRL/lpr 系) における糸球体腎炎への C3 の役割 (Sekine, et al. *J Immunol* 2001) や自己抗体産生 B 細胞の関与 (Sekine, et al. *J Immunol* 2004; Sekine, et al. *J Immunol* 2006; Sekine, et al. *PNAS* 2007) を明らかにし、その治療法として第二経路の活性化を阻害する H 因子 (fH) と補体受容体 CR2 との融合タンパク CR2-fH の有効性を示した (Sekine, et al. *Arthritis Rheum* 2011; Sekine, et al. *Mol Immunol* 2011)。

近年、SLE のループス腎炎の糸球体に、MBL や Ficolin などのレクチン経路の補体分子の沈着が相次いで報告され、ループス腎炎の病態へのレクチン経路の関与が示唆されている。これらを背景に、報告者らがレクチン経路と第二経路が活性化されない Masp1/3-KO SLE モデルマウス (MRL/lpr 系) を作製し、その病態を解析したところ、血清 C3 レベル、糸球体 C3 沈着レベル、タンパク尿、腎病理所見が著明に改善することを見出し、Masp1/3 が糸球体腎炎の病態機構に作用することを明らかにした (2013 年米国リウマチ学会 (ACR)・口演発表)。以上の結果から、補体因子 MASP-1/3、すなわちレクチン経路と第二経路が病態機構に関与する疾患に対して MASP-1/3 を標的とする新規治療法の可能性が示された。

2. 研究の目的

以上を背景に、本研究では補体・レクチン経路と第二経路の活性化に作用する補体因子 MASP-1/3 を阻害する 2 種類の生物学的製剤 (抗 MASP-1/3-SPD モノクローナル抗体、リコンビナントタンパク MAp44-Ig) を開発し、それを MASP-1/3 が臓器障害に関与すること

が判明している SLE モデルマウスの糸球体腎炎を対象に投与し、その効果を検証しながら、同製剤を用いる新規治療法の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では MASP-1/3 を標的として補体・第二経路の活性化を阻害する新規生物学的製剤の開発のため、以下の手順に従って研究を進める。

(1) MASP-1/3 を標的とするモノクローナル抗体の作製

報告者らが保持する Masp1/3-KO マウスに、すでに作成済のリコンビナントマウス MASP-1 (rMASP-1) と rMASP-3 蛋白を免疫し、定法に従って特異的な抗体を産生するハイブリドーマを作成する。抗 MASP-1-SPD と抗 MASP-3-SPD モノクローナル抗体産生株を ELISA とウエスタンブロット法で選別し、ラージスケールで培養後、抗体精製カラムを用いてモノクローナル抗体を精製する

(2) リコンビナントタンパク MAp44-Ig の作成

マウス肝 cDNA ライブラリーをもとに、制限酵素アダプター配列付加プライマーを用いて PCR 法にて MAp44 cDNA をクローニングする。

遺伝子配列を確認後、マウス免疫グロブリン IgG1 (hinge-CH2-CH3) をエンコード済の発現ベクター (pFUSE-mIgG1-Fc1) に MAp44 cDNA を組み込み、リコンビナント融合タンパク MAp44-Ig をエンコードする発現ベクターを作成する。

発現ベクターを CHO 細胞にトランスフェクトして培養液を回収し、プロテイン A カラムで MAp44-Ig (図 1) を精製する。

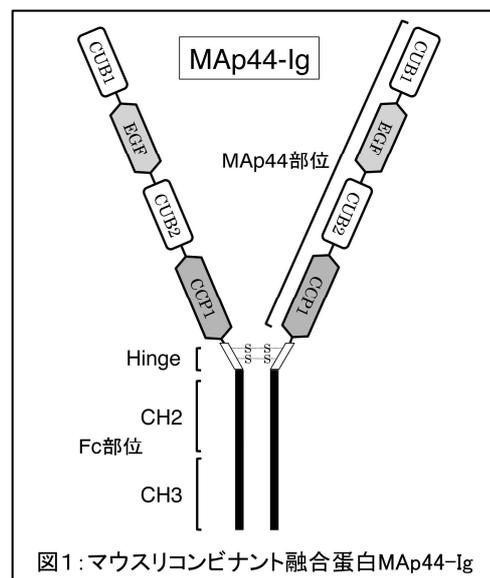


図 1: マウスリコンビナント融合蛋白 MAp44-Ig

(3) モノクローナル抗体と融合タンパクのレクチン経路と第二経路阻害作用の検証

1) *in vitro*での阻害作用の検証

野生型マウスの血清に抗 MASP-1/3-SPD モノクローナル抗体または MAp44-Igを加えて室温で1時間反応させ、反応液をマンナンコーティングのマイクロプレートに加えて、C3沈着の程度を FITC-anti-C3 抗体で検出する。C3沈着の減少が観察されれば、レクチン経路と第二経路が阻害されたと評価する。

2) *in vivo*での阻害作用の検証

野生型 C57BL/6 マウスの腹腔内に抗 MASP-1/3-SPD モノクローナル抗体または MAp44-Igを投与し、経時的に採血する。得られた血清をマンナンコーティングのマイクロプレートに反応させ、C3沈着の程度を HRP-anti-C3 抗体で検出する。C3沈着の減少が観察されれば、レクチン経路と第二経路が阻害されたと評価する。

(4) 疾患モデル動物への応用

SLE モデルマウス(MRL/*lpr* 系と NZB/W F1 系)の糸球体腎炎を治療対象とし、抗 MASP-1/3-SPD モノクローナル抗体または融合タンパク MAp44-Ig の投与による治療効果を評価する。

1) モノクローナル抗体投与群、融合タンパク投与群、生理食塩水投与群(各12匹/群)に分類し、腎炎発症後(MRL/*lpr* 系:14週齢～、NZB/W F1系:22週齢～)に週2回(計8週間)、モノクローナル抗体、融合タンパク、生理食塩水を腹腔内投与する。投与量は研究計画(3)-2)のデータより算出する。

2) 投与前および投与開始後2週間毎に血清を採取し、レクチン経路と第二経路の阻害効果を確認する。また、尿中アルブミン排泄量、血清 C3 値、免疫複合体値、抗 dsDNA 抗体値を ELISA で測定する。さらに BUN・血清クレアチニン値を測定し、腎機能の評価する。

3) 投与開始8週後に腎を回収し、糸球体への IgG, C1q, C3 沈着レベルを蛍光抗体法で評価する。また、H&E と PAS 染色にて腎の病理組織学的評価を行う。

4. 研究成果

(1) MASP-1/3を標的とするモノクローナル抗体の作製

Masp1/3-KO マウスに、リコンビナントマウス MASP-1(rMASP-1)と rMASP-3 蛋白を免疫し、定法に従って特異的な抗体を産生するハイブリドーマの作製を試みた。免疫されたマウスの血清に抗 MASP-1-SPD と抗 MASP-3-SPD は産生され

なかった。その理由として、Masp1/3-KO マウスで欠損させた遺伝子の部位は Masp1 遺伝子の第2エクソンであり、その下流に位置する SPD 領域のエクソンが破壊されていなかったために、欠損させた第2エクソンをスキップして極少量の SPD 領域の mRNA の転写が生じ、その結果 SPD 領域の蛋白に対する免疫寛容が成立してしまっただけと考えられた。

(2) リコンビナントタンパク MAp44-Ig の作成

発現ベクターを CHO 細胞にトランスフェクトして培養液を回収し、プロテイン A カラムで MAp44-Ig を精製し、SDS-PAGE で展開した。その結果、約 80kDa のバンドが認められ、マスペクトロ解析の結果マウス MAp44-Ig であることが確認された(図2)。

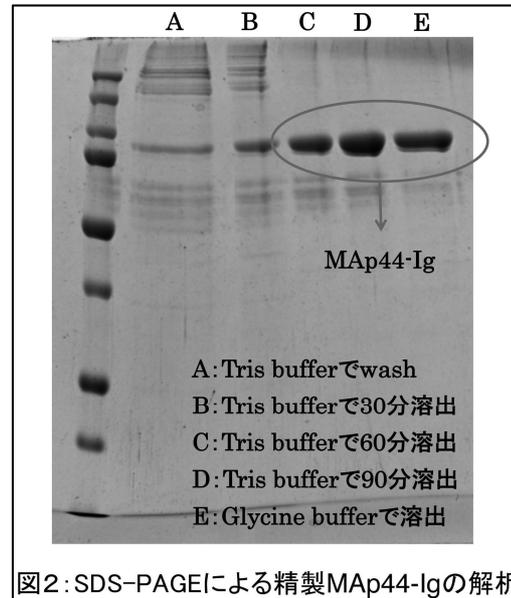


図2: SDS-PAGEによる精製MAp44-Igの解析

(3) *in vitro*におけるリコンビナントタンパク MAp44-Ig のレクチン経路と第二経路の阻害作用

*in vitro*におけるリコンビナントタンパク MAp44-Ig のレクチン経路と第二経路の阻害作用を、野生型マウスの血清

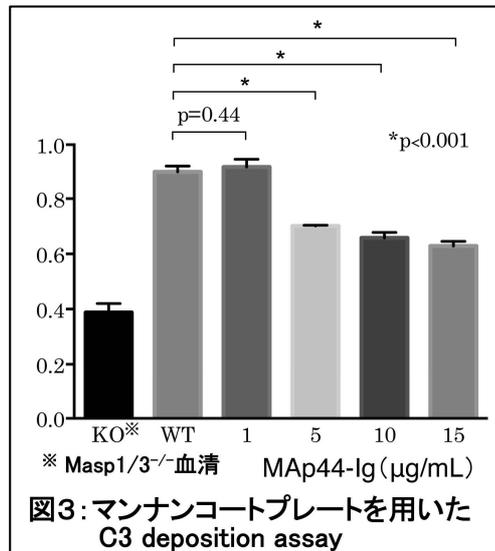


図3: マンナンコートプレートを用いた C3 deposition assay

に MAp44-Ig を加えて室温で 1 時間反応させ、反応液をマンナンコーティングのマイクロプレートに加えて、C3 沈着の程度を HRP-anti-C3 抗体で検出した。ポジティブコントロールとして野生型血清のみを、ネガティブコントロールとして、MASP-1/3 ノックアウトマウス血清を用いた。その結果、MAp44-Ig の容量依存的に C3 沈着の減少が観察され、MAp44-Ig は *in vitro* でレクチン経路と第二経路の阻害作用を有することが判明した。

(4) *in vitro* におけるリコンビナントタンパク MAp44-Ig と MAp44-fH とのレクチン経路と第二経路の阻害作用の比較

MAp44-Ig が第二経路の阻害作用を有しないことを想定し、MAp44 と第二経路の制御因子である H 因子 (fH) の N 末端の 5 つの short consensus repeat (SCR) を融合した MAp44-fH を作製した。H 因子は、C3 転換酵素 C3bBb を C3b と Bb に解離失活させ、さらに I 因子とともに作用して C3b を iC3b に分解することで第二経路を制御する因子であり、N 末端の 4 つの SCR にその活性を有する。作製法は、マウス肝 cDNA から H 因子の N 末端の 5 つの SCR 遺伝子をクローニングし、これを 4 つのアミノ酸配列リンカー (GGGGS) 4 で接続し、C 末端に PA-Tag を付加する発現ベクター (pCAG-Hyg PA tag-C) に組み込んで CHO 細胞にトランスフェクトし、MAp44-fH を産生させた。これを抗 PA 抗体カラムで精製して SDS-PAGE で展開し、マスマスペクトロ解析で当該バンドがマウス MAp44-fH であることを確認した。

MAp44-Ig と MAp44-fH とを用いてマンナンコートプレートを用いた C3 deposition assay を行った結果、MAp44-Ig よりも MAp44-fH の方が有意に強く C3 沈着レベルを抑制したことが判明した (図 4)。

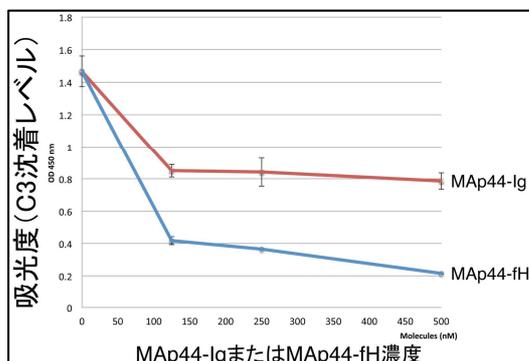


図4: C3 deposition assayによるMAp44-Igと MAp44-fHの補体抑制能の比較

(5) *in vivo* におけるリコンビナントタンパク MAp44-fH の腹腔内投与後の血中濃度と補体抑制能の動態解析

図 4 の解析結果をもとに、より強い補体抑制効果が望める MAp44-fH を用いて *in vivo* における MAp44-fH の腹腔内投与後の血中濃度と補体抑制能の動態解析を行った。

野生型 C57BL/6 マウスの腹腔内に MAp44-fH を 500 μ g 投与し、1、2、4、8、16、24、48 時間ごとに眼窩静脈叢から採血し血清を回収した。これをもとに抗 PA 抗体を用いた ELISA 法で、血清 MAp44-fH 濃度を測定した。その結果、腹腔内投与 1 時間で血清濃度がピークとなり、48 時間でピーク時の 10% 程度に減少することが判明した (図 5)。

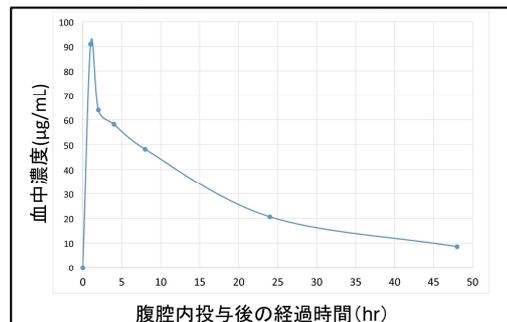


図5: 腹腔内投与後の血中MAp44-fH濃度の動態変化

さらに、経時的に採血した上記の血清を用いて、*in vivo* での補体抑制効果を、マンナンコートプレートアッセイで評価したところ、MAp44-fH 投与前の血清 (pre) と比較して C3 活性の有意な抑制効果がみとめられ、その効果は 48 時間後でも持続した (図 6)。

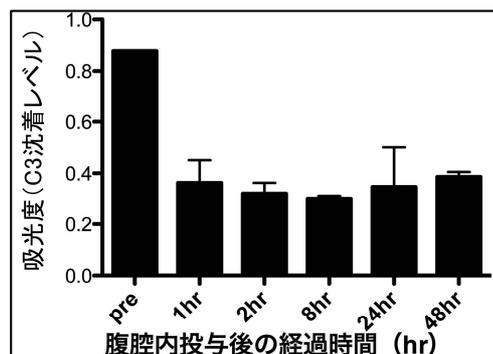


図6: MAp44-fH腹腔内投与後の血清を用いた補体抑制能の動態変化

MAp44-fH の血中濃度が投与後 48 時間目までに減少したにもかかわらず、補体抑制効果が長時間持続した理由として、血中で MBL と複合体を形成している MASP-1 または MASP-3 (MBL・MASP-1/3 複合体) の多くが MAp44-fH と置換されて MBL・MAp44-fH 複合体となり、レクチン経路の活性化をトリガーとする補体活性化の抑制状態が保たれたことが推測された。

一方、遊離型の MAp44-fH は比較的分子量が小さいため、血中から優先的にクリアランスされ、それが血中濃度に反映されたためと推測された。

以上の結果から、本研究で申請者らが作製した新規のリコンビナント蛋白 MAp44-Ig は *in vitro* において補体活性化の抑性能を有し、さらに MAp44-fH は MAp44-Ig と比較して補体抑性能に優れ、*in vivo* でも持続的に補体活性化を抑制することが判明した。

今後の研究計画として、MAp44-fH を SLE モデルマウスに投与し、その治療効果を判定し、SLE に対する新規治療薬の開発を目指す。

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5件)

関根英治. 膠原病への補体の関与と抗補体療法の可能性. *医学のあゆみ*, 57:854-860, 2016.

Hashimoto T, Tsuruta D, Yasukochi A, Imanishi H, Sekine H, Fujita T, Wanibuchi H, Gi M, Kárpáti S, Sitaru C, Zone JJ, Endo D, Abe S, Nishino T, Koji T, Ishii N. Granular C3 dermatosis. *Acta Derm Venereol*, 2016. [Epub ahead of print]

関根英治, 大森智子, 町田豪. 補体異常値を示す疾患とそのメカニズム. *補体*, 52:14-26, 2015.

Genster N, Takahashi M, Sekine H, Endo Y, Garred P, Fujita T. Lessons learned from mice deficient in lectin complement pathway molecules. *Mol Immunol*, 61:59-68, 2014.

Takahashi M, Sekine H, Fujita T. Comment on "the pro-factor D cleaving activity of MASP-1/3 is not required for alternative pathway function". *J Immunol*, 192:5448-5449, 2014.

[学会発表](計8件)

町田豪. IFN- γ receptor は MRL+/+マウスの脾臓における自己反応性辺縁帯B細胞の濾胞内局在を促進する. Rheumatology Conference 2016, 2016年6月4日, 東京都.

関根英治, 高住美佳, 大森智子, 町田豪, 石田由美, 高橋実. 補体制御因子を応用した抗補体薬の開発と今後の展開. 第27回免疫細胞療法研究会, 2016年5月9日, 福島県福島市.

高住美佳, 高橋実, 大森智子, 町田豪, 坂本夏美, 石田由美, 関根英治. マウス型リコンビナントタンパク rmMAp44-PA, rmMAp44-Ig の作製と補体レクチン経路の阻害作用. 第52回日本補体学会, 2015年8月21~22日, 愛知県名古屋市.

Asano T, Sato S, Kobayashi H, Kariya Y, Ito H, Hoshi K, Yoshida A, Ugawa Y, Takahashi

M, Sekine H, Hirohata S, Watanabe H, Ohira H, Hashimoto Y. Upregulation of complement C3 and Alpha-2-Macroglobulin in cerebral fluid of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. 2015-Annual scientific meeting of the American College of Rheumatology (ACR), November 15, 2015, San Francisco, USA.

坂本夏美, 町田豪, 高橋実, 関根英治. 補体因子 MASP-1/3 欠損の MRL/lpr マウスでは補体第二経路の活性化が抑制され、糸球体腎炎が改善される. Rheumatology Conference 2015, 2015年6月6日, 東京都.

Machida T, Sakamoto N, Gilkeson GS, Sekine H. A dual role for IFN- γ in development of peripheral B cells in lupus-prone MRL/lpr mice. 2015-Annual scientific meeting of the American College of Rheumatology (ACR), November 15, 2014, Boston, USA.

戸塚直也, 高橋実, 町田豪, 石田由美, 関根英治. 腹膜炎-敗血症モデルにおける補体因子 MASP-1/3 の役割. 第51回補体シンポジウム, 2014年8月22~23日, 兵庫県神戸市.

関根英治. 炎症性疾患に自然免疫はどう関与するのか~補体の役割を中心に~. 第23回日本集中治療医学会東北地方会, 2014年6月28日, 山形県山形市.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0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0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:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

関根英治 (SEKINE, HIDEHARU)

福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40363759

(2)研究分担者

町田 豪 (MACHIDA, TAKESHI)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80583632

(3)連携研究者

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