

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15789

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝疾患の病態におけるレクチン経路、第二経路の影響の解明

研究課題名(英文)Association between complement activation pathways and nonalcoholic fatty liver disease

研究代表者

林 学(Hayashi, Manabu)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80745787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：補体の活性化因子であるMASP-1とMASP-3の単独欠損マウスを作成したところ、それぞれ補体レクチン経路、そして補体第二経路特異的な活性化因子であった。脂肪肝疾患に対する影響を解明するためにMASP-1欠損マウス、MASP-3欠損マウスを用いて脂肪肝モデルマウスの解析を行った。MASP-3欠損マウスでは脂肪沈着は軽減しており、血清中ALTや肝組織を用いたRT-PCRでCOL1A1はMASP-3欠損マウスで低値であった。MASP-1欠損マウスでは有意な変化は認めなかった。これらの結果からMASP-3欠損は脂肪肝疾患に対して保護的に作用していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)はメタボリックシンドロームの肝臓における病態であるが、有病率が高く、また肝不全へ進行するため、新たな治療方法が必要とされている。補体は生体の恒常性維持のために重要な自然免疫因子であり、MASP-1とMASP-3はそれぞれ異なる補体活性化経路の重要な活性化因子であることを明らかにした。また補体第二経路の活性化因子であるMASP-3の欠損がNAFLD病態に保護的に作用する結果が得られた。本研究は補体の特に第二経路を標的とした治療方法の創出に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of MASP-1 and MASP-3 in complement activation pathway using MASP-1 deficient mice and MASP-3 deficient mice. We revealed that MASP-3 is an alternative pathway-specific serine protease, whereas MASP-1 is an lectin pathway-specific serine protease. Further, we investigated the role of MASP-1 and MASP-3 in nonalcoholic fatty liver disease. Our Oil Red O staining of hepatic lipids revealed that decrease of liver steatosis in MASP-3 deficient mice. MASP-3 deficient mice also showed low serum ALT and low expression of Col1a1 in the liver compared with wild type mice. These findings suggested that MASP-3 deficient play protective role for NAFLD in mice.

研究分野：消化器内科

キーワード：脂肪肝 補体 MASP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)はメタボリックシンドロームの肝臓における表現形と考えられており、NAFLD は肝硬変や肝細胞癌を発症しうる。肥満、糖尿病、脂質異常症と関連するが、その病態は未だ明らかではない部分が多く、病状進行の危険性の予測やより効果的な治療法の開発に NAFLD の障害経路の解明が必要とされている。

補体は C3 の活性化により病原体を排除する自然免疫経路であるが、補体活性化と様々な疾患の関わりが報告されている。病原体や抗体複合体の認識から補体活性化が始まり、異なる 3 つの活性化経路である古典経路、レクチン経路、そして第二経路が活性化することで、C3 の活性化と炎症物質の産生により免疫応答を担っている。

ヒト NAFLD 患者では C3 濃度と肝障害が相関しており、肝臓内や血清中でそれぞれの補体経路が活性化している。しかし 3 つの補体活性化経路はそれぞれ異なる酵素のカスケードからなる複雑な活性化様式を示すことから、いずれの補体活性化経路が病態と関連するかはいまだ不明である。診断や治療への応用のためには 3 つの活性化経路のうちどの経路が主に関連しているかを解明することが必要である。Mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 はレクチン経路を、MASP-3 は第二経路の活性化に必須の酵素である。そのため MASP-2 欠損マウスはレクチン経路が、そして MASP-3 欠損マウスは第二経路が失活している。本研究ではレクチン経路と第二経路の特異的ノックアウトマウスを用いて、それぞれの補体活性化経路が NAFLD の病態へ与える影響を解明することを目的とした研究を行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NAFLD における病態とレクチン経路および第二経路の関連を明らかにすることである。

3. 研究の方法

- A) MASP-1 単独欠損マウス、MASP-3 単独欠損マウスの作成と MASP-1 と MASP-3 の補体活性化における役割の解明: 補体レクチン経路、補体第二経路と NAFLD の関連の解明のために CRISPR/Cas9 システムにより MASP-1 単独欠損マウス、MASP-3 単独欠損マウスを作成し、それぞれの補体活性化経路との関連を、血清の補体活性化能、補体第二経路の活性化に必須の D 因子の活性化状態の評価により行った。
- B) NAFLD モデルマウスの作成: NAFLD モデルマウスは超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料(CDAHFD)を投与することで作成した。投与期間は 24 週とした。当初は MASP-2 欠損マウスを用いる予定であったが、補体レクチン経路のより上流のプロテアーゼである MASP-1 欠損マウスを用いた。また予定どおり MASP-3 欠損マウスを用いた。MASP-1 欠

損マウス、MASP-3 欠損マウスとそれぞれの野生型マウスを用いて、CDAHFD による NAFLD モデル群とコントロール群を以下の通り作成した。

A 群: *Masp1*^{+/+}, CDAHFD(-). B 群: *Masp1*^{+/+}, CDAHFD(+).

C 群: *Masp1*^{-/-}, CDAHFD(-). D 群: *Masp1*^{-/-}, CDAHFD(+).

E 群: *Masp3*^{+/+}, CDAHFD(-). F 群: *Masp3*^{+/+}, CDAHFD(+).

G 群: *Masp3*^{-/-}, CDAHFD(-). H 群: *Masp3*^{-/-}, CDAHFD(+).

C) 肝障害の評価：血清中の AST, ALT を測定する。

D) 肝線維化の評価：Sirius-red 染色、肝組織の cDNA を用いた RT-PCR で Col1a1 を測定し、線維化を評価する。

E) 肝脂質沈着の評価：Oil red O 染色により肝脂肪沈着を評価する。

4 . 研究成果

CRSPAR/Ca9 システムを用いて MASP-1、MASP-3 特異的プロテアーゼドメインの欠損によって、MASP-1 単独欠損マウス、MASP-3 単独欠損マウスを作成した。その結果、MASP-1 単独欠損マウスの血清はレクチン経路活性化能が欠損しており、MASP-3 単独欠損マウスの血清は第二経路活性化能が欠損していた。さらに血清中の D 因子は MASP-1 単独欠損マウスでは活性化状態で存在していたが、MASP-3 単独欠損マウスでは未活性化状態で存在していた。以上から、MASP-1 はレクチン経路の、MASP-3 は第二経路の活性化に必須のセリンプロテアーゼであることが明らかとなった。

さらに MASP-1 と MASP-3 の脂肪肝における役割解明のため、脂肪肝モデルを作成して解析を行った。MASP-1 欠損マウス、または MASP-3 欠損マウスは出生しにくく、またモデルマウス作成に期間がかかるため、モデル作成に時間がかかってしまったが、MASP-1 欠損マウス、および MASP-3 欠損マウスによる NAFLD モデルを作成できた。

NAFLD モデルにおいて、MASP-1 欠損マウスは野生型と ALT の変化は認めなかったが(142 ± 11U/L vs 166 ± 23U/L, P=0.387)、MASP-3 欠損マウスは ALT が低下していた(168 ± 10U/L vs 122 ± 10U/L, P=0.013)。

NAFLD モデルにおいて、MASP-1 欠損マウスは Sirius-red 染色による線維化の変化は認めなかったが、MASP-3 欠損マウスでは線維化の面積が軽減している傾向を認めた。また、肝組織の cDNA による RT-PCR では、Col1a1 が MASP-3 欠損マウスで低下していた(RQ: 239 ± 79 vs 64 ± 17, P=0.047)。

MASP-3 欠損マウスでは Oil red O 染色による脂肪沈着が野生型に比べて軽度であったが、MASP-1 欠損マウスでは明らかな変化は認めなかった。以上から、MASP-3 欠損は脂肪肝に保護的に作用する可能性が示唆された。今後は補体活性化やサイトカインとの関連を解析することで、MASP-3 を介した補体第二経路の脂肪肝疾患に果たす役割を解明していく予定である。

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 0件）

1. 著者名 Manabu Hayashi, Takeshi Machida, Yumi Ishida, Yusuke Ogata, Tomoko Omori, Mika Takasumi, Yuichi Endo, Toshiyuki Suzuki, Masayuki Sekimata, Yoshimi Homma, Masahito Ikawa, Hiromasa Ohira, Teizo Fujita and Hideharu Sekine	4. 巻 203
2. 論文標題 Cutting Edge: Role of MASP-3 in the Physiological Activation of Factor D of the Alternative Complement Pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1411-1416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900605	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 -

〔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
---------	---------