

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390086

研究課題名（和文） 補体レクチン経路は第二経路の活性化に関与する

研究課題名（英文） The lectin complement pathway is involved in activation of the alternative pathway

研究代表者 藤田禎三 (Teizo Fujita)

福島県立医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：20134223

研究成果の概要（和文）：本研究は、当研究室で確立されたレクチン経路欠損マウスを用いて、補体レクチン経路と第2経路の関連の解明を目指すものである。その機能が不確定な MASP-1 に関して、第2経路の D 因子の活性化に必須の因子であることを、MASP1/3 欠損マウスを用いて明らかにした（*J Exp Med.* 207(1): 29-37, 2010）。さらに、その機能の明らかでない MASP-3 についても組換え体蛋白を作製した。組換え体 MASP-3 は、未活性型であり、その活性化には、マウス MBL-A がぶどう球菌を認識することが必要であることが判明した。また、同時に MASP-3 が第二経路の D 因子と B 因子の活性化に関与していることを明らかにした（*J Immunol.* 187:3751-8, 2012）。これらの結果から、MASP-1/3 はレクチン経路だけでなく、第二経路の活性化に関与し、自然免疫の中心的役割を果たしていることが示された。

研究成果の概要（英文）： In the lectin pathway, mannose-binding lectin (MBL) and ficolins act as pattern recognition molecules for pathogens, resulting in the activation of MBL-associated serine proteases (MASPs; MASP-1, MASP-2 and MASP-3). Among these proteases, MASP-2 is thought to be a key enzyme that cleaves C4 and C2 to assemble a C3 convertase (C4b2a). However, a physiological function of MASP-1 and MASP-3 remains unclear. To investigate the roles of MASP-1 and MASP-3, we generated a MASP-1- and MASP-3-deficient mouse model, and found that the deficient mice lacked alternative pathway activation, because Df remained as a proenzyme in the serum. MASP-1 and MASP-3 were able to convert the proenzyme of Df to an active form *in vitro*. In addition, MASP-3 was able to activate Bf of the alternative pathway. Thus, MASP-1 and MASP-3 seems to be involved in activation of both the lectin and alternative pathways, thereby, playing a central role in innate immunity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

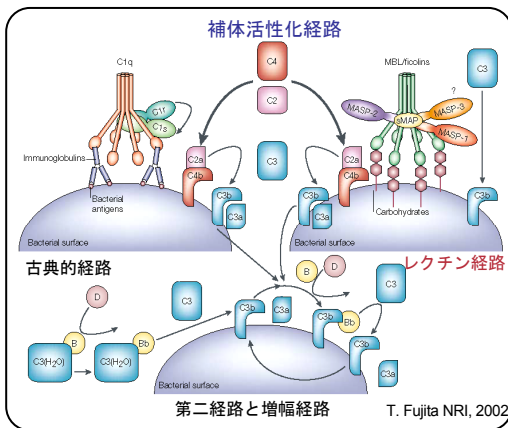
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：

キーワード：免疫学、自然免疫、補体、レクチン経路、第2経路、MASP、感染症

## 1. 研究開始当初の背景

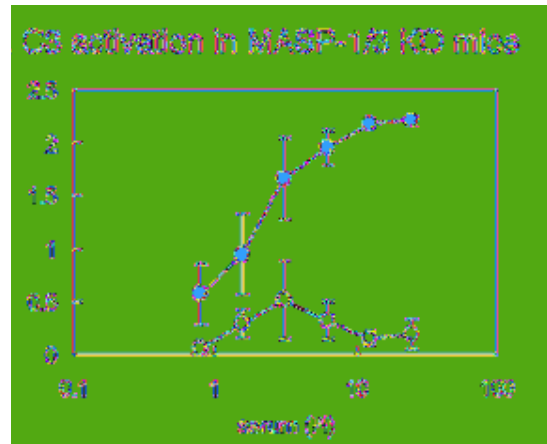
自然免疫に係る分子として、Toll は当初ショウジョウバエの背腹軸極性決定に関わる遺伝子として同定されたが、その後、ヒトとマウスで Toll 様受容体 (TLR) がクローニングされた。1999 年 5 月号の *Science* 誌特集「Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity (自然免疫における系統発生的な展望)」において、Toll 様受容体の図と並んで、パターン認識分子としてのマンノース結合レクチン (MBL) の糖鎖認識機構が初めて世界に紹介された。自然免疫の認識機構は、微生物表層に存在する一定の繰り返しパターンを持った構造を異物として認識することが明らかにされた。さらに MBL の働きと補体レクチン経路および MASP の解説がなされた。そして 2002 年 5 月号の *Nature Review Immunology* (NRI) 誌には、補体レクチン経路の自然免疫における役割と題して本申請の研究代表者のホットレビューが掲載された(下図参照)。



MBL は、微生物表層成分を直接認識する真のパターン認識分子であり、新規セリンプロテアーゼの MASP と複合体を形成し、新たな補体活性化経路 (レクチン経路) を活性化することが本申請の研究代表者により明らかにされた (*J Exp Med* 176:1497-1502, 1992)。この MASP は、現在まで、3 種類の MASP (MASP-1, 2, 3) と短縮型である sMAP の存在が明らかになっている (*Immunity* 15:127-135, 2001、および *Int Immunol* 11:859-863, 2000)。さらに申請者らはコレクチンの新たな仲間であるフィコリン (L-ficolin) を発見し、補体レクチン経路を活性化し、微生物の排除に働くことを、世界に先駆けて明らかにした (*J Biol Chem* 271:2448-2454, 1996 及び *J Immunol* 164:2281-2284, 2000)。さらに、他のふたつのフィコリン、H-ficolin (博多抗原) と M-ficolin がともに補体レクチン経路を活性化することを明らかにした (*J Immunol* 168:3502-3506, 2002) (*J Immunol* 175:3150-3156, 2005)。

これまで、申請者らは、MASP1/3 欠損マウス、sMAP/MASP2 欠損マウス、および、全 MASP 欠損

マウスを作製し、その機能が不明であった sMAP がレクチン経路の調節をしていることや MASP-1 が MASP-2 の活性化に関与していることを明らかにしてきた (*J Immunol*, 177:8626-8632, 2006, *J. Immunol.* 180(9): 6132-6138, 2008)。また、下図に示すように、MASP1/3 欠損マウス (黒丸) は、マンナンへの C3 の結合が、ワイルド (白丸) より低いという予備的な結果を得ている。



## 2. 研究の目的

本研究は、当研究室で確立されたレクチン経路欠損マウスなどを用いて、補体レクチン経路の活性化機構と第 2 経路の関連を明らかにすることを目的とする。具体的には、MASP 欠損マウスにおける補体第 2 経路の異常を明らかにするとともに、MBL とフィコリンに結合する MASP、特にその機能が不確定な MASP-1 と MASP-3 の機能を解明する。

## 3. 研究の方法

1) 上の図に示す研究結果は、マンナンに対する自然抗体が存在するので、古典的経路の影響を完全に排除したものではない。そこで、古典的経路の C4 欠損マウスと全 MASP 欠損マウスを交配し、C4/全 MASP 欠損マウスを作製する。これらのマウスは、理論的には古典的経路とレクチン経路は機能せず、第 2 経路のみが機能すると考えられるマウスである。この C4/全 MASP 欠損マウスの血清を用いて、補体活性化能を測定する。

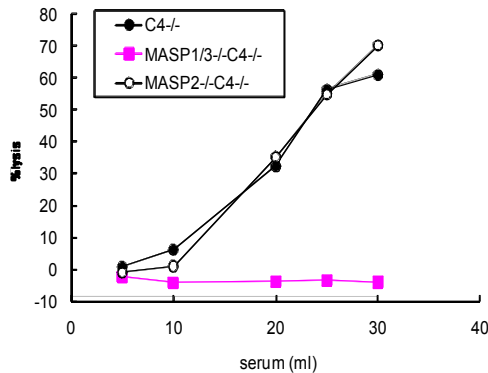
2) 上記結果をもとに、第二経路の活性化に MASP が関与していることを確認し、ついで第二経路のどの分子に異常があるかを精製した第二経路の成分を添加して検索する。

3) MASP-1 が、第二経路の活性化に関与しているかを検討する。

4) リコンビナント MASP-3 を作成し、その活性化機構を明らかにするとともに MASP-1 と同様に第二経路の活性化に関与しているかを検討する。

#### 4. 研究成果

1) C4/全 MASP 欠損マウスを作製し、第二経路の補体溶血活性を測定すると、全 MASP 欠損マウスでは、下図に示すように全く活性を示さなかった。

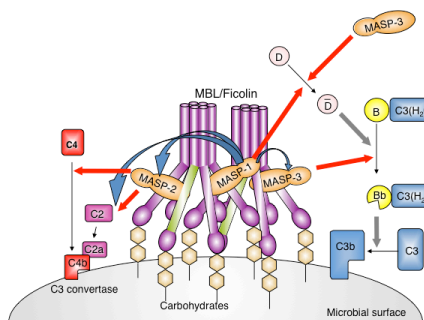


2) この溶血活性測定系にヒト D 因子を添加するとその活性は回復することが明らかになった。補体 D 因子は、血清中で既に活性型で存在すると考えられていたが、MASP1/3 欠損マウスでは、未活性型で存在することが明らかとなった。

3) この D 因子の活性化には、MASP-1 が関与することが判明した。2) の成果とともに発表論文③に公表した。

4) リコンビナント MASP-3 を作成すると、リコンビナント MASP-1 や MASP-2 と異なり、未活性型であることが判明した。その活性化機構を検討するとマウス MBL-A がブドウ球菌を認識すると MASP-3 の活性化がおこることが判明した。ついで、活性化した MASP-3 を用いて補体第二経路の活性化にどのように関与するかを検討した。その結果、第二経路の D 因子と B 因子の活性化に関与していることが明らかになった。これらの結果は、発表論文⑧に公表した。

以上のように補体レクチン経路の MASP は、補体第二経路の初期の活性化に関与していることが判明した。MASP の機能を要約した図を下に示す。



#### 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 12 件)

① Endo Y, Nakazawa N, Iwaki D, Takahashi M, Matsushita M, and Fujita T. Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway, *J Innate Immun*, 2, 33-42, 2009.

② Banda N K, Takahashi M, Levitt B, Glogowska M, Nicholas J, Takahashi K, Stahl G L, Fujita T, Arend W P, and Holers V M. Essential role of complement mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 in the murine collagen antibody-induced model of inflammatory arthritis, *J Immunol*, 185, 5598-5606, 2010.

③ Takahashi M, Ishida Y, Iwaki D, Kanno K, Suzuki T, Endo Y, Homma Y, and Fujita T. Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D, *J Exp Med*, 207, 29-37, 2010.

④ Chang W C, Hartshorn K L, White M R, Moyo P, Michelow I C, Koziel H, Kinane B T, Schmidt E V, Fujita T, and Takahashi K. Recombinant chimeric lectins consisting of mannose-binding lectin and L-ficolin are potent inhibitors of influenza A virus compared with mannose-binding lectin, *Biochem Pharmacol*, 81, 388-395, 2011.

⑤ 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. 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, 2011.

⑥ Tateishi K, Kanemoto T, Fujita T, and Matsushita M. Characterization of the complex between mannose-binding lectin trimer and mannose-binding lectin-associated serine proteases, *Microbiol Immunol*, 55, 427-433, 2011.

⑦ 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. 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, 7523-7528, 2011.

⑧ Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Matsushita M, and Fujita T. The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. *J Immunol*, 187, 3751-3758, 2011.

⑨ 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. Mechanisms of mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 activation of the alternative pathway of complement, *Mol Immunol*, 49, 281-289 2011.

⑩ La Bonte LR, Pavlov VI, Tan YS, Takahashi K, Takahashi M, Banda NK, Zou C, Fujita T, Stahl GL. Mannose-binding lectin-associated serine protease-1 is a significant contributor to coagulation in a murine model of occlusive thrombosis. *J Immunol*. 188, 885-891, 2012.

⑪ Pan Q, Chen H, Wang F, Jeza VT, Hou W, Zhao Y, Xiang T, Zhu Y, Endo Y, Fujita T, Zhang XL. L-Ficolin Binds to the Glycoproteins Hemagglutinin and Neuraminidase and Inhibits Influenza A Virus Infection Both in vitro and in vivo. *J Innate Immun*, 4, 312-324, 2012.

⑫ Endo Y, Iwaki D, Ishida Y, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T. Mouse ficolin B Has an ability to form complexes with mannose-binding lectin-associated serine proteases and activate complement through the lectin pathway. *J Biomed Biotechnol*. 2012:105891, 2012.

[学会発表] (計2件)

① 高橋 実、岩城大輔、遠藤雄一、藤田禎三、MA SP1 遺伝子産物の多機能性について、第48回補体シンポジウム、平成23年9月3日、名古屋

② 町田 豪、他7名、IRF-4 deficient lupus-prone MRL/lpr mice develop granulomatous lesions in multiple organs with strong propensity for Th1 polarity、第40回日本免疫学会学術集会、平成23年11月27日、千葉

[図書] (計1件)

① 藤田禎三、メジカルビュー社、補体への招待、2011年、16-25 ページ

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田禎三 (FUJITA TEIZO)

福島県立医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号: 20134223

### (2) 研究分担者 (2009~2010年度)

岩城大輔 (IWAKI DAISUKE)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10315492

### (3) 連携研究者

(なし)

研究者番号: