

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16975

研究課題名（和文）加齢黄斑変性における補体因子MASP-1/3の役割と、新規補体阻害薬の治療効果

研究課題名（英文）Role of complement factor MASP-1/3 in age-related macular degeneration and therapeutic effect of novel complement inhibitors

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：滲出型加齢黄斑変性（nAMD）患者の前房水やMASP-1/3 欠損 AMD様病変モデルマウスを用いて、レクチン経路（LP）と第二経路（AP）の補体因子であるMASP-1/3のnAMDの病態における役割の解明を試みた。nAMD患者の前房水中では、対照疾患患者に比べてC4a/C4比とC3a/C3比の高値が認められ、nAMD患者眼内においてAPに加え、LPと古典経路の一方または両方が活性化していることが明らかとなった。また、MASP-1/3 欠損 AMD様病変モデルマウスでは、野生型に比べAMD様病変の改善傾向が認められた。以上より、nAMDの病態へのMASP-1/3の関与が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、第二経路に加え、眼内におけるレクチン経路と古典経路の一方または両方の活性化が滲出型加齢黄斑変性の病態に関与することが明らかとなった。よって、MASP-1/3を標的とする治療法が有効である可能性が強く示唆された。これらの成果は、滲出型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、滲出型加齢黄斑変性の新規治療法や新規診断法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to clarify the role of complement factor MASP-1/3 of the lectin and alternative pathways in the development of neovascular age-related macular degeneration (nAMD). In patients with nAMD, the ratios of aqueous humor levels of C4a/C4 and C3a/C3 were significantly higher than in cataract patients, providing conclusive evidence for intraocular activation of the lectin and/or classical pathway in nAMD eyes. Furthermore, using mouse model of laser-induced choroidal neovascularization, which has been used extensively studies of nAMD, we found that the nAMD-like lesion was alleviated in mice deficient for MASP-1/3 compared to wild-type mice, although there was no significant difference between them. Our results strongly suggest the contribution of MASP-1/3 in the development of nAMD.

研究分野：免疫学

キーワード：加齢黄斑変性 補体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然免疫の補体系は、古典経路・レクチン経路・第二経路のいずれかを通じて活性化し、病原微生物や自己のアポトーシス細胞の排除に働くが、その過程で炎症による臓器障害を引き起こすことがある。

近年、加齢黄斑変性(AMD)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求められている。ゲノムワイド相関解析の結果、補体第二経路の制御因子であるH因子の遺伝子多型との相関が示され、AMDの病態への第二経路の関与が注目されているが、近年、レクチン経路も炎症のトリガーとして発症初期に関与することも示唆されている(Joseph, et al. *J Biol Chem* 2013)。

研究代表者が所属する研究室では、補体因子MASP-1とMASP-3(MASP-1/3)を欠損したマウスの解析で、MASP-1/3がレクチン経路と第二経路の活性化に必須の補体因子であることを明らかにした(Takahashi, et al. *J Exp Med* 2010)。

また最近申請者らは、レクチン経路の補体制御因子「MAp44」と、第二経路の補体制御因子H因子(fH)を融合させた補体阻害薬MAp44-fHを作製し、本薬が*in vitro*の実験で、レクチン経路と第二経路の両者を阻害することを確認した。

以上を背景に、研究代表者は補体因子MASP-1/3は滲出型AMDの病態機構に関与すると推察した。また、研究代表者らが開発した補体阻害薬MAp44-fHは、滲出型AMDの新規治療薬になる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、滲出型AMD患者の前房水やMASP-1/3を欠損した滲出型AMD様病変モデルマウスを用いて、AMDの病態における補体因子MASP-1/3の役割を明らかにする。さらに、研究代表者らが開発したレクチン経路と第二経路の活性化を阻害する新規の補体阻害薬MAp44-fHを用いて、滲出型AMD様病変モデルマウスに対する新規治療薬としての有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 滲出型AMD患者の前房水中における補体タンパク質の解析

滲出型AMD患者では、抗VEGF抗体を眼内注入する治療の際に前房水(50~100 μ L)を採取し、解析時まで-80℃で保存した。白内障(対照疾患)では、白内障手術の際に副産物として吸引される前房水液(50~100 μ L)を採取した。対象者は福島県立医科大学(本学)附属病院で治療を受けた患者で、かつ当研究への参加を承諾した滲出型AMD患者と白内障患者のみとした。

採取した前房水中の補体タンパク質(C4、C3、C4a、C3a、MASP-2)濃度および抗体アイソタイプ(IgM、IgA、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)濃度を、ELISA法またはBead-based immunoassay法を用いて測定した。各群の測定結果を統計学的解析により比較検討し、滲出型AMDの病態と各補体タンパク質との関連を明らかにした。

(2) MASP-1/3 KO 滲出型AMD様病変モデルマウスの作製

MASP-1/3 KO または野生型 C57BL/6 マウスの網膜に、三種混合薬(塩酸メドトミジン 0.3 mg/kg mouse、ミダゾラム 4.0 mg/kg mouse、酒石酸ブトルファノール 5.0 mg/kg mouse)腹腔内麻酔下でグリーンレーザー照射(サイズ 100 μ m、照射時間 0.1 秒、100 mW、4 発/眼)し、滲出型AMD様病変である脈絡膜新生血管(CNV)を誘導した。レーザー照射前と照射後6日目に、暗順応下光刺激による網膜電図にて視機能を評価した。レーザー照射後7日目に、網膜フラットマウント標本作製し、血管内皮(CD102)に対する蛍光抗体を用いてCNVを染色し、各群のCNV面積を評価した。

(3) 滲出型AMD様病変モデルマウスへの補体阻害薬MAp44-fHの治療効果

12週齢の野生型 C57BL/6 マウスにMAp44-fH 1000 nMを腹腔内投与した。投与前および投与開始後1、2、4、8、24、48時間毎に採血し、血清を回収した。回収した血清を用いて、抗PA抗体によるELISA法にて血中濃度をモニタリングした。また、MAp44-fHがレクチン経路の認識分子であるMBLまたはficolin-Aと血中で複合体を形成しているかを確かめるため、上述の血清を用いてマンナンまたは抗ficolin-A抗体コートプレートによるELISA法にて、MBLまたはficolin-Aと複合体を形成しているMAp44-fHレベルを測定した。さらに、*in vivo*におけるレクチン経路と第二経路の抑制効果をそれぞれマンナンコートプレートC4 depositionアッセイ法とザイモザンアッセイ法で評価した。

4. 研究成果

(1) 滲出型AMD患者の前房水中における補体タンパク質の解析

滲出型AMD群の前房水では、対照疾患群に比べC4とC3濃度は有意な低値、C4aとC3a濃度およびC4a/C4比とC3a/C3比は高値を示した(図1)。対照疾患群に比べて滲出型AMD群でC4a/C4比およびC3a/C3比が高値を示したことから、滲出型AMD患者の眼内で古典経路とレクチン経路の一方または両方が活性化していることが明らかとなった。

次に、滲出型AMD群の病態への古典経路の関与を調べるため、滲出型AMD患者および対照疾患患者前房水中の抗体アイソタイプ濃度を測定したところ、対照疾患群と比較してIgG2濃

度は滲出型 AMD 群で有意な高値を認めたが、それ以外の抗体アイソタイプでは有意差は認められなかった(図2)。さらに、各抗体アイソタイプ濃度とC4a/C4比との相関解析を行ったところ、滲出型 AMD 群の IgG1 と C4a/C4 比との間 ($r_s = -0.52, p = 0.035$) および対照疾患群の IgA と C4a/C4 比との間で負の相関を認めた ($r_s = -0.70, p = 0.043$)。しかしながら、古典経路が関与する全身性エリテマトーデスでは、自己抗体レベルと C4a/C4 比および C3a/C3 比との相関は正であるため、滲出型 AMD 群において古典経路が関与することを示唆する所見は得られなかった。

一方、滲出型 AMD 群の病態へのレクチン経路の関与を調べるため、滲出型 AMD 患者前房水中の MASP-2 の濃度を測定したところ、対照疾患群と比較して MASP-2 の濃度は有意な低値を認めた(図3)。これは、滲出型 AMD 患者眼内においてレクチン経路の活性化により MASP-2 が消費されたためと考えられた。また、MASP-2 濃度と C4a/C4 比との相関解析を行ったところ、レクチン経路の活性化を示唆する負の相関の傾向を認めた ($r_s = -0.45, p = 0.075$) が、統計学的な有意差には達しなかった。今後、例数を増やして検討する予定である。

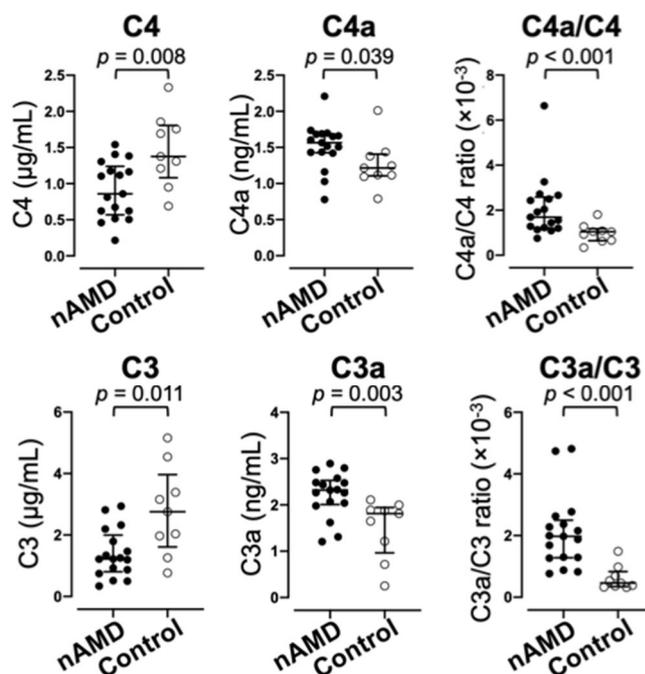


図1. 滲出型AMD (nAMD)と対照疾患 (Control) 患者前房水中の補体タンパク質レベル

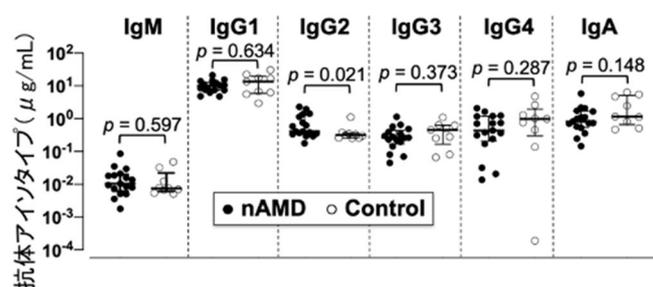


図2. 滲出型AMD (nAMD)と対照疾患 (Control) 患者前房水中の抗体アイソタイプレベル

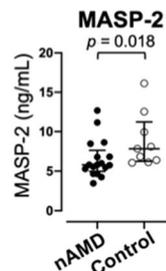


図3. 滲出型AMD (nAMD)と対照疾患 (Control) 患者前房水中のMASP-2レベル

(2) MASP-1/3 KO 滲出型 AMD 様病変モデルマウスの作製

MASP-1/3 KO または野生型 C57BL/6 マウスの網膜にレーザー照射し、脈絡膜新生血管病変を誘導した。まず、レーザー照射による視機能の変化を評価するため、レーザー照射前と照射後6日目に、暗順応下光刺激による網膜電図を測定した。その結果、MASP-1/3 KO マウスでは、野生型マウスに比べレーザー照射後6日目に、b波の減衰が有意差に達しなかったものの軽減する傾向がみられた。

次に、レーザー照射後7日目に、網膜フラットマウント標本を作製し、蛍光標識抗 CD102 抗体を用いて CNV 面積を測定した。その結果、有意差に達しなかったものの、野生型マウスと比べて MASP-1/3 KO マウスでは、CNV 面積の縮小傾向がみられた。今回、有意差に達しなかった理由として検体数が少なかったことが考えられる。今後は、引き続き実験を行い、検体数を増やして再検討する予定である。

(3) 滲出型 AMD モデルマウスへの補体阻害剤 Map44-fH の治療効果

野生型の C57BL/6 マウスに Map44-fH を腹腔内投与し、経時的に血清を回収した。この血清を用いて ELISA 法にて血清 Map44-fH 濃度を測定した。Map44-fH は、投与後4時間で血中濃度最大値となり、投与後48時間で体内からほとんどがクリアランスされた(図4)。

次に、Map44-fH がレクチン経路の認識分子である MBL または ficolin-A と血中で複合体を形成しているかを確かめるため、ELISA 法にて、MBL または ficolin-A と複合体を形成している Map44-fH レベルを測定した。Map44-fH は、血中で MBL または ficolin-A と複合体形成しており、投与後4時間で ficolin-A との複合体形成は最大値、投与後24時間で MBL との複合体形成は最大値となった(図5)。

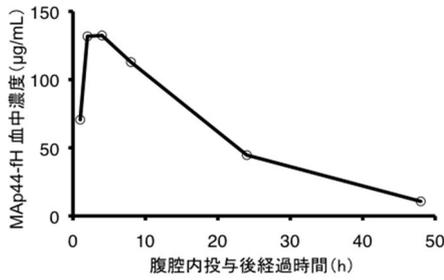


図4. 腹腔内投与後の血中MMap44-fHの動態変化

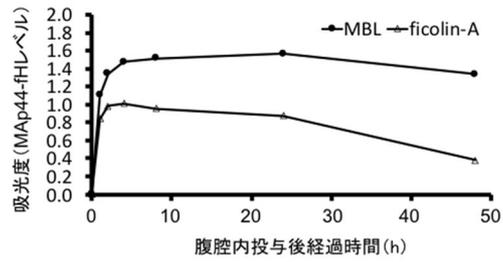


図5. MMap44-fH腹腔内投与後の血中におけるMMap44-fHとMBL/ficolin-Aとの複合体形成

さらに、*in vivo*でのレクチン経路の抑制効果を確認するため、上述の血清を用いてマンナンコートプレート C4 deposition アッセイを行ったところ、MMap44-fH 投与マウスでは、投与前血清と比べて明らかなレクチン経路の抑制は認められなかった(図6)。また、*in vivo*での第二経路の抑制効果を確認するため、上述の血清を用いてザイモザン C3 アッセイを行ったところ、MMap44-fH 投与マウスでは、投与前血清に比べて投与後 48 時間まで第二経路を抑制した(図7)。*In vivo*において、MMap44-fH がレクチン経路を抑制できなかったのは、MMap44 が主に MASP-1/3 と競合し、レクチン経路の活性化に必須である MASP-2 を競合阻害できなかったためと考えられる。以上から、MMap44-fH はレクチン経路と第二経路を抑制する補体阻害薬として有望とは言えないと考えた。

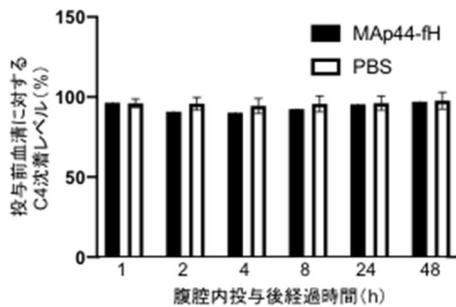


図6. レクチン経路抑制効果

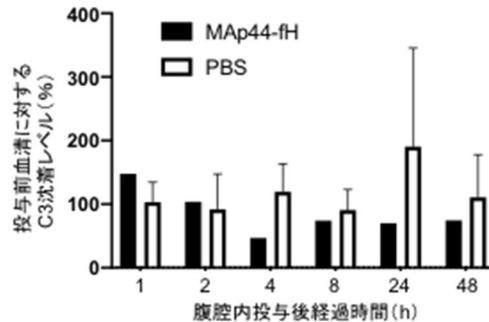


図7. 第二経路抑制効果

本研究の結果、滲出型 AMD 患者の眼内において、レクチン経路と古典経路の一方または両方の活性化が滲出型 AMD の病態に関与していることが明らかとなった。今後は、レクチン経路と古典経路のどちらが滲出型 AMD の病態に関与するかを AMD 患者前房水や AMD 様病変モデルマウスを用いて検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

1. 著者名 Omori T, Oguchi Y, Machida T, Kato Y, Ishida Y, Ojima A, Itagaki K, Shintake H, Tomita R, Kasai A, Sugano Y, Ogasawara M, Sekine H, Sekiryu T	4. 巻 63
2. 論文標題 Evidence for activation of lectin and classical pathway complement components in aqueous humor of neovascular age-related macular degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmic Res	6. 最初と最後の頁 252-258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1159/000503258	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 Takasumi M, Omori T, Machida T, Ishida Y, Hayashi M, Suzuki T, Homma Y, Endo Y, Takahashi M, Ohira H, Fujita T, Sekine H	4. 巻 34
2. 論文標題 A novel complement inhibitor sMAP-FH targeting both the lectin and alternative complement pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 6598-6612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1096/fj.201902475R	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 Oguchi Y, Sekiryu T, Omori T, Kato Y, Ogasawara M, Sugano Y, Itagaki K, Ojima A, Machida T, Sekine H	4. 巻 195
2. 論文標題 Anaphylatoxin concentration in aqueous and vitreous humor in the eyes with vitreoretinal interface abnormalities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Eye Res	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） doi: 10.1016/j.exer.2020.108025	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 Hayashi M, Machida T, Ishida Y, Ogata Y, Omori T, Takasumi M, Endo Y, Suzuki T, Sekimata M, Homma Y, Ikawa M, Ohira H, Fujita T, Sekine H	4. 巻 203
2. 論文標題 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 J Immunol	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） DOI: https://doi.org/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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 林学、石田由美、町田豪、尾形裕介、大森智子、高住美香、遠藤雄一、関亦正幸、伊川正人、大平弘正、藤田禎三、関根英治
2. 発表標題 MASP-1、MASP-3はレクチン経路、第二経路の活性化に独立して寄与する
3. 学会等名 第55回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤寛、大口泰治、大森智子、町田豪、関根英治、石龍鉄樹
2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変成の前房水中補体分解産物の検討
3. 学会等名 第38回日本眼薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayashi M, Ishida Y, Machida T, Ogata Y, Omori T, Takasumi M, Endo Y, Ikawa M, Ohira H, Fujita T, Sekine H
2. 発表標題 MASP-1 and MASP-3 play independent roles in activation of the lectin and alternative complement pathways
3. 学会等名 XXVII International Complement Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高住美香、高橋実、大森智子、町田豪、石田由美、関根英治
2. 発表標題 補体レクチン経路と第二経路を標的とする新規抗補体薬sMAP-fHの開発
3. 学会等名 第54回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大森智子, 大口泰治, 町田豪, 石田由美, 加藤寛, 石龍鉄樹, 関根英治
2. 発表標題 加齢黄斑変性におけるレクチン経路の関与の可能性
3. 学会等名 第56回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato Y, Sekiryu T, Oguchi Y, Omori T, Machida T, Sekine H
2. 発表標題 Complement activation product levels in aqueous humor of patients with age-related macular degeneration
3. 学会等名 ARVO annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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