

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07610

研究課題名（和文）第二経路の補体因子MASP-3の活性化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the activation mechanism of the complement factor MASP-3 of the alternative complement pathway

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） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：活性化型で循環する補体因子MASP-3は、生体内でレクチン経路の糖鎖認識分子(LP PRMs)と複合体を形成しているが、その免疫学的意義は不明である。本研究では、認識分子との複合体形成能を欠く4種類の変異型リコンビナントマウスMASP-3（rmMASP-3）と野生型rmMASP-3をマウスに投与し、生体内における活性化動態を比較検討した。

その結果、両者とも生体内で速やかに活性化型に変化した。変異型rmMASP-3は野生型rmMASP-3よりも生体内から早期にクリアランスされることが判明した。以上より、LP PRMsとの複合体の形成は、生体内でのMASP-3の維持に寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、第二経路の補体因子であるMASP-3が、なぜレクチン経路の認識分子と複合体を形成するのか、その意義を世界で初めて見出したものであり、補体系のメカニズムの全容解明に大きく貢献する成果である。

補体第二経路は、さまざまな炎症性疾患における増悪因子として知られており、今後MASP-3を標的とする治療戦略を開発する上で、重要な知見をもたらした成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：MASP-3 circulates in an active form and forms a complex with recognition molecules of the lectin complex pathway (LP PRMs) in vivo, but its immunological significance is unknown. In this study, four types of mutant recombinant mice MASP-3 (rmMASP-3), which lack the ability to form a complex with LP PRMs, and wild-type rmMASP-3 were administered to mice, and their activation kinetics in vivo were investigated.

As a result, it was found that both of them rapidly changed to the activated forms in the circulation. However, the mutant rmMASP-3 was cleared from the circulation earlier than the wild type rmMASP-3. From these results, it was shown that the complex formation of MASP-3 with LP PRMs is required for the maintenance of MASP-3 in vivo.

研究分野：免疫学

キーワード：補体因子 MASP-3 第二経路 レクチン経路 認識分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

補体系は、古典経路・レクチン経路・第二経路の3つの酵素カスケード反応で構成される自然免疫機構である。古典経路とレクチン経路は、それぞれ微生物への抗体や糖鎖認識分子の結合により活性化が開始され、その結果、補体 C3 の結合により微生物は食細胞に認識され(オプソニン化) 貪食処理される。一方、第二経路は C3 の活性化を増幅し、炎症を引き起こす C3a と C5a を多量に産生する。

Masp1 遺伝子から転写される2つの補体因子 MASP-1 と MASP-3 は、両者間で構造が共通のドメインである糖鎖認識分子への複合体形成部位(H鎖)と、両者間で構造が異なる酵素活性(L鎖)で構成される。近年申請者らは、補体系における MASP-1 と MASP-3 の個別の役割を明らかにするために、MASP-1 と MASP-3 の各酵素活性部位(L鎖)に特異的なエクソンを CRISPR/Cas9 で切除編集し、MASP-1 単独欠損マウスと MASP-3 単独欠損マウスを作成し解析を行った。その結果、MASP-1 はレクチン経路の活性化に作用し、MASP-3 は第二経路の活性化に作用する補体因子であることを明らかにした(Hayashi, M et al. *J Immunol*, 203:1411-1416, 2019)。

上記で述べたように、生体内において MASP-1 と MASP-3 は、H鎖を介してレクチン経路の糖鎖認識分子(MBL-A, MBL-C, ficolin-A, ficolin-B, CL-K1, CL-L1)と複合体を形成している。MASP-1 は生体内で未活性化型として存在し、MASP-1 と糖鎖認識分子との複合体が、微生物表面の糖鎖に結合すると MASP-1 の3次元構造が変化し自己活性化することが明らかになっている。

一方、申請者らがマウス血清中の MASP-3 の活性化状態を解析した結果、MASP-1 とは異なり、MASP-3 の大部分は活性化型として存在することを見出した(Hayashi, M et al. *J Immunol*, 203:1411-1416, 2019)。しかし、MASP-1 同様に MASP-3 の活性化にレクチン経路の糖鎖認識分子との複合体形成を必要とするのか、また、どの糖鎖認識分子が MASP-3 の活性化に関与するのかが同定されておらず、MASP-3 活性化のメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究は、生体内での MASP-3 の活性化におけるレクチン経路の糖鎖認識分子の関与の有無を明らかにするために、糖鎖認識分子との複合体形成能を欠く4種類の変異型リコンビナントマウス MASP-3(rmMASP-3)と野生型 rmMASP-3 を作成してマウスに投与し、生体内における rmMASP-3 の活性化動態を比較検討した。

3. 研究の方法

(1) rmMASP-3 の作成

ヒト MASP-1/3 H鎖の CUB1 ドメインと CUB2 ドメインに存在する認識分子との結合に重要な4つのアミノ酸(CUB1: Glu⁴⁹, Asp¹⁰²; CUB2: His²¹⁸, Tyr²²⁵)の配列は、マウス MASP-1/3 H鎖のそれと共通である³⁾。本研究では、それらを Ala に置換した4種類の変異型 rmMASP-3 と野生型 rmMASP-3 を、CHO 細胞を用いて作成した。なお、それらのリコンビナントタンパク質のC末端側には PA tag を融合した。

(2) rmMASP-3 とレクチン経路の糖鎖認識分子との複合体形成能の評価

変異型または野生型 rmMASP-3 を混合した野生型マウス血清を、マンナンまたは GlcNAc をコートしたマイクロプレートに反応させ、各種 rmMASP-3 とレクチン経路の認

識分子との複合体の沈着の有無を HRP 標識抗 PA 抗体で評価した。

(3) 生体内における rmMASP-3 の活性化動態の評価

各種 rmMASP-3 100 μ g を野生型および MASP-3 欠損マウスの尾静脈内に投与し、経時的に採血した。血清中の活性化型 rmMASP-3 を、抗 PA 抗体を用いた Western blotting で検出し、各種 rmMASP-3 の活性化動態を比較検討した。

(4) D 因子の活性化と第二経路の活性化能の評価

各種 rmMASP-3 を MASP-3 欠損マウスの尾静脈内に投与し、投与後の血清中の D 因子の活性化と、第二経路の活性化能の回復を、Western blotting とザイモザンに対する C3 deposition assay でそれぞれ評価した。

4. 研究成果

(1) rmMASP-3 とレクチン経路の糖鎖認識分子との複合体形成能の評価

各種 rmMASP-3 とレクチン経路の糖鎖認識分子との複合体形成能を評価した結果、マイクロプレート上への野生型 rmMASP-3 の沈着は検出されたが、変異型 rmMASP-3 の沈着はすべて検出されなかった。

(2) 生体内における rmMASP-3 の活性化動態の評価

生体内における各種 rmMASP-3 の活性化動態を評価した結果、野生型および MASP-3 欠損マウスにおいて、変異型 rmMASP-3 は野生型 rmMASP-3 と同様に活性化型に変化した。しかし、野生型 rmMASP-3 は、投与後 12 時間経過後でも血清中で検出されるのに対し、変異型 rmMASP-3 は投与後 6 時間後までに検出されなくなった。

(3) D 因子の活性化と第二経路の活性化能の評価

各種 rmMASP-3 投与後の、MASP-3 欠損マウス血清中の D 因子の活性化と、第二経路の活性化能の回復を評価した結果、野生型 rmMASP-3 を投与したマウスの血清と同様に、変異型 rmMASP-3 を投与したマウスの血清でも、血清中の D 因子の活性化と第二経路の活性化能の回復が認められた。

(4) 総括

生体内において、レクチン経路の糖鎖認識分子は MASP-3 の活性化に必須ではないが、循環中における MASP-3 の維持に寄与することが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Anna S Swierzko, Dariusz Jarych, Gabriela Gajek, Karolina Chojnacka, Paulina Kobiela, Maja Kufelnicka-Babout, Mateusz Michalski, Katarzyna Sobczuk, Agnieszka Szala-Pozdziej, Misao Matsushita, Jan Mazela, Iwona Domzalska-Popadiuk, David C Kilpatrick, Jaroslaw Kalinka, Hideharu Sekine, Maciej Cedzynski	4. 巻 12
2. 論文標題 Polymorphisms of the FCN2 Gene 3'UTR Region and their clinical associations in preterm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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) 10.3389/fimmu.2021.741140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Keiichiro Tanaka, Yasuharu Oguchi, Tomoko Omori, Yumi Ishida, Hiroaki Shintake, Ryutaro Tomita, Akihito Kasai, Masashi Ogasawara 1, Yukinori Sugano 1, Kanako Itagaki, Akira Ojima, Takeshi Machida, Hideharu Sekine, Tetsuju Sekiryu	4. 巻 11
2. 論文標題 Changes in complement activation products after anti-VEGF injection for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration and pachychoroid disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-87340-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takasumi Mika, Omori Tomoko, Machida Takeshi, Ishida Yumi, Hayashi Manabu, Suzuki Toshiyuki, Honma Yoshimi, Endo Yuichi, Takahashi Minoru, Ohira Hiromasa, Fujita Teizo, Sekine Hideharu	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 The FASEB Journal	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) 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 Yasuharu, Sekiryu Tetsuju, Omori Tomoko, Kato Yutaka, Ogasawara Masashi, Sugano Yukinori, Itagaki Kanako, Ojima Akira, Machida Takeshi, Sekine Hideharu	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 Experimental Eye Research	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) 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 Manabu, Abe Kazumichi, Fujita Masashi, Takahashi Atsushi, Sekine Hideharu, Ohira Hiromasa	4. 巻 15
2. 論文標題 Association between serum ficolin-1 level and disease progression in primary biliary cholangitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0238300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yutaka, Oguchi Yasuharu, Omori Tomoko, Shintake Hiroaki, Tomita Ryutaro, Kasai Akihito, Ogasawara Masashi, Sugano Yukinori, Itagaki Kanako, Ojima Akira, Machida Takeshi, Sekine Hideharu, Sekiryu Tetsuju	4. 巻 61
2. 論文標題 Complement activation products and cytokines in pachychoroid neovasculopathy and neovascular age-related macular degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	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) 10.1167/iovs.61.13.39	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 関根英治	4. 巻 10
2. 論文標題 感染症と補体・凝固線溶系	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis Medicine	6. 最初と最後の頁 274 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Manabu, Machida Takeshi, Ishida Yumi, Ogata Yusuke, Omori Tomoko, Takasumi Mika, Endo Yuichi, Suzuki Toshiyuki, Sekimata Masayuki, Homma Yoshimi, Ikawa Masahito, Ohira Hiromasa, Fujita Teizo, Sekine Hideharu	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 The 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 -

1. 著者名 Machida Takeshi, Hayashi Manabu, Fujita Teizo, Sekine Hideharu	4. 巻 203
2. 論文標題 Response to comment on “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 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3091 ~ 3092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1901087	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 Hata Junya, Machida Takeshi, Matsuoka Kanako, Hoshi Seiji, Akaihata Hidenori, Hiraki Hiroyuki, Suzuki Toshiyuki, Ogawa Soichiro, Kataoka Masao, Haga Nobuhiro, Ishibashi Kei, Homma Yoshimi, Sekine Hideharu, Kojima Yoshiyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Complement activation by autoantigen recognition in the growth process of benign prostatic hyperplasia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-019-57001-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

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 Research	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) 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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takeshi Machida, Kohei Kusakari, Yumi Ishida, Tomoko Omori, Toshiyuki Suzuki, Masayuki Sekimata, Teizo Fujita, and Hideharu Sekine
2. 発表標題 The significance of complex formation of MASP-3 with pattern recognition molecules of the lectin complement pathway in the long-term retention of MASP-3 in the circulation
3. 学会等名 28th International Complement Virtual Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草刈 浩平、石田 由美、大森 智子、鈴木 俊幸、関亦 正幸、町田 豪、関根 英治
2. 発表標題 MASP-3の活性化におけるレクチン経路の認識分子の役割
3. 学会等名 日本補体学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideharu Sekine, Mika Takasumi, Tomoko Omori, Takeshi Machida, Yumi Ishida, and Teizo Fujita
2. 発表標題 A fusion protein of sMAP and factor H inhibits both the lectin and alternative complement pathways in vivo
3. 学会等名 The 17th European Meeting on Complement in Human Disease (EMCHD 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
研究分担者	町田 豪 (Machida Takeshi) (80583632)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	林 学 (Hayashi Manabu) (80745787)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	

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			
ポーランド	Polish Academy of Sciences			