

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09233

研究課題名(和文) 補体系経路活性化分子は、新たな中隔形成因子の一つとなりうるのか。

研究課題名(英文) Could complement pathway activating molecules be one of the new cardiac septum shaping factors?

研究代表者

森 健一郎 (Mori, Kenichiro)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70610236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：3MC症候群は、人種、性別、環境などに依存せず発病する、心臓中隔欠損、心室中隔欠損、二分脊椎症、成長不全、発達障害、口蓋口唇裂などの症状を引き起こす、常染色体劣性遺伝子疾患である。その発病機序不明であったが、補体系活性化分子、CL-K1とMASP-1/3遺伝子変異が報告された。本研究では、CL-K1遺伝子改変マウスを利用し、発病機序解明の研究を行なった。

その結果、CL-K1が未受精卵から出産直後の胎生期に発現している事、CL-K1遺伝子改変マウスで二分脊椎症などの骨形成異常が起きている事、心臓中隔欠損がある一定の割合で引き起こされることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CL-K1、MASP-1/3は細菌、ウイルスなどの異物が生体内に侵入した際、これらの排除に機能する自然免疫分子である。これらの分子が、子宮、羊膜内で成長する、胎児体内という細菌学的に非常に清潔な領域で、胎生期の初期から発現していることを明らかにしたことである。すなわち、生体内では自然免疫系の補体系経路活性化のシグナル下で異物排除に関与する分子が、胎生期では未知の分子と相互作用し、器官形成経路に関与することを示唆する重要な結果である。

また、CL-K1ノックアウトマウスがヒト3MC症候群と非常に類似する表現型を示したことから、今後の3MC症候群発病機序解明に有用なモデルであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：3MC syndrome is an autosomal recessive genetic disorder that causes symptoms such as cardiac septal defect, ventricular septal defect, spina bifida, growth failure, developmental delay, and cleft palate and lip, which develops independently of race, gender, or environment. Although the pathogenetic mechanism was unknown, mutations in the complement pathway active molecules CL-K1 and MASP-1/3 genes have been reported. In this study, we used CL-K1 gene modified mice as a model of 3MC syndrome patients to elucidate the pathogenetic mechanism of 3MC syndrome.

Result of our study showed that CL-K1 is expressed during the embryonic period, that bone formation abnormalities such as spina bifida occur in CL-K1 knockout mice, and that cardiac septal defects are caused at a certain rate.

研究分野：免疫学

キーワード：3MC症候群 補体系 CL-K1

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

3MC 症候群は人種・性別に関係なく発病する成長不全、知的障害、口蓋口唇裂、心臓異常、二分脊椎症等の発達異常の特徴を持つ、常染色体劣性遺伝性疾患である。3MC 症候群の原因として、自然免疫分子 CL-K1、CL-L1、MASP-1/3 の遺伝子変異が報告された。これらの分子は自然免疫の補体経路を活性化することで異物排除に関わる自然免疫分子である。補体系は、25 種類以上のタンパクが複雑に関わりあう活性カスケードであり、生体内に侵入した異物除去を担う、自然免疫に属する生体防御機能である。CL-K1(Collectin Kidney-1)、CL-L1 (Collectin Liver-1) は、内部構造に糖認識領域とコラーゲン様領域を持ち、ヘテロダイマー(CL-LK)を形成し、異物表面の糖鎖を認識することで、自然免疫分子として機能するタンパクである。

MASP(Mannose Associated Serine Protease)は、CL-LK、MBL 等の異物認識タンパクと相互作用し、補体系を活性化するセリンプロテアーゼであり、MASP-1、-2、-3 が存在する。

この 2 つの異なる機能を担う分子に関して、2011 年に、非常に興味深い報告がなされた。二分脊椎症、心臓異常、成長不全、知的障害、口蓋口唇裂、頭蓋形態異常、顔面異状、骨形成異常、腎臓異常等の病態を示す疾患、3MC 症候群 (Mingarelli,-Malpuech,-Michels,-Carnevale Syndrome) と呼ばれる常染色体劣性遺伝子病の原因として、CL-K1、CL-L1、MASP-1/3 の遺伝子変異が発見された。

CL-K1、MASP-1/3 の生体防御因子としての研究は広く進んでいるが、胎生期における発現時期、発現組織、相互作用分子などの研究は始まっておらず、これらを明らかにすることで、3MC 症候群の発病機序を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

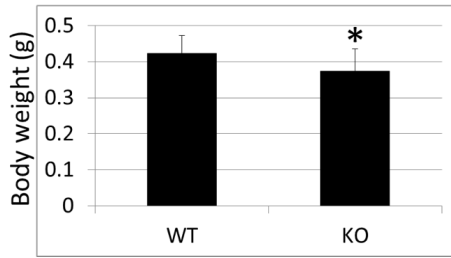
自然免疫は、異物に対する「生体防御の最前線」であり、獲得免疫が機能する前の重要な機構である。そのため、CL-K1 同様 MASP と相互作用する MBL は 1ug/ml、H-フィコリンは 15ug/ml の濃度で血中に存在するが、CL-K1 は 1/10~1/100 程度の 0.1ug/ml しか存在しない。CL-K1 が補体系を活性化させることを *in vitro* で明らかにしたが、この血中濃度の低さから必ず他の何らかの機能を持ち合わせていると考えてきた。2011 年に報告された 3MC 症候群患者での CL-K1、MASP-3 遺伝子変異は、補体因子が胎生期における器官形成に関与するという、これまで考えられていた補体因子の機能の常識を覆す発見であった。また、申請者が、CL-K1 KO マウスを作成し、表現型解析を行ったところ、3MC 症候群と非常に酷似した多くの表現型を KO マウスが再現していることを見出した。このことは、マウスはヒト 3MC 症候群発病機序解明と治療法確率の有益なモデル動物になりえると考えた。そこで、3MC 症候群発病原因であるこれら因子の、胎生期における機能解明を行うことで、「CL-K1 の本来の機能」を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

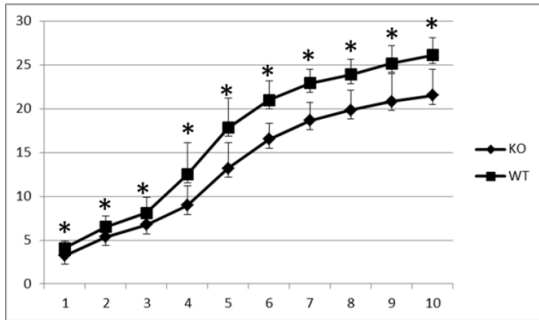
- (1) 出産直後の CL-K1KO、WT マウスの成長比較
- (2) 出産後から、10 週令までの CL-K1KO、WT マウスの成長比較
- (3) CL-K1KO、WT マウスの血液検査比較
- (4) 動物用 CT スキャンを用いた骨形成進捗比較
- (5) 骨染色を利用した骨形成進捗比較
- (6) 出産後死亡マウスの死亡原因特定

4. 研究成果

(1) 新生マウスの体重を比較したところ、図で示すように優位に低体重であった。

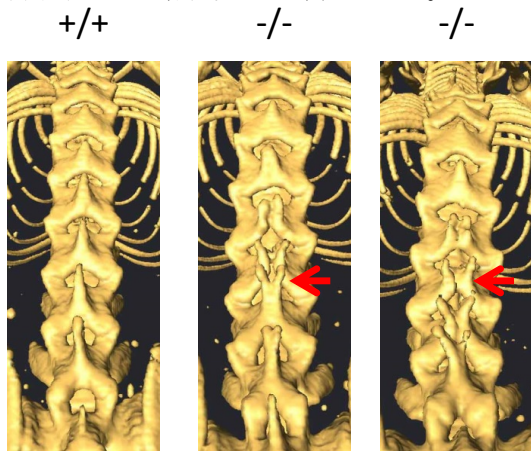


(2) 出産後から、10週令までの成長比較をCL-K1KO、WTマウスで行った結果、オスメス共にKOマウスで成長遅延が確認された。特にオスでは図で示す様に1週令から優位な成長遅延が確認され、その後もWTに成長が追いつくことはなかった。



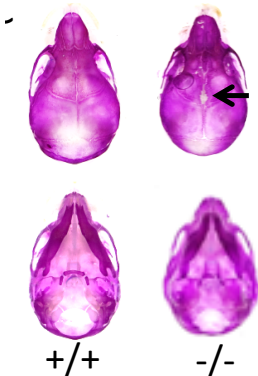
(3) CL-K1KO、WTマウスの血液検査を行った結果、BUN値がWTマウスと比較し優位に低いことが明らかとなったことから、低タンパク症や肝機能の低下などが明らかとなった。

(4) 小動物用CTスキャンを用いた骨形成比較検討の結果、両眼乖離、頭蓋形成不全、二分脊椎症(下図)による脊柱変形が確認された。

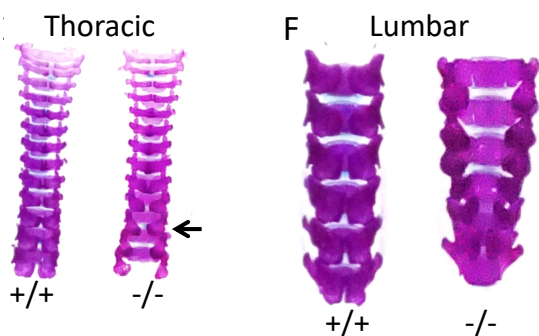


(5) 小動物用CTスキャンを用いた骨形成比較の結果を受け、アリザリンレッド・アルシアンブルーを利用した骨染色を行い、さらに詳細な骨形成比較解析を行った。

その結果、頭部では大泉門残留(下図矢印)、頭蓋成長不全、頬骨弓形成不全、舌骨形成不全が確認された。



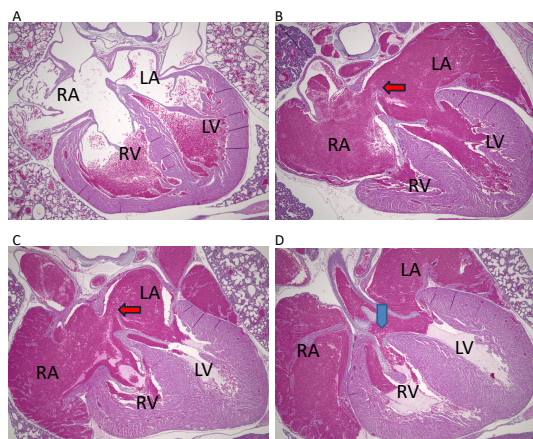
脊椎においては、下図に見られるように、胸部と腰部において二分脊椎が見られた。



(6)CL-K1 ヘテロマウス同士の交配、出産後マウスの遺伝子型解析を行ったところ、野生型：ヘテロ型：ノックアウト型の比率がメンデルの法則に乗らず、下表で示す様に WT:KO=1.00:0.71 であった。

Sex	WT	HT	KO	Total
♂	131 (1.00)	297 (2.27)	109 (0.83)	537 [1.00]
♀	147 (1.00)	307 (2.08)	89 (0.60)	543 [1.01]
Total	278 (1.00)	604 (2.22)	198 (0.71)	1080

出産後チアノーゼの症状で死亡した子マウスがおり遺伝子型を解析したところ全て KO マウスであった。死亡原因を特定するため、マウスを解剖し、HE 染色を行ったところ、死亡したマウスは下図 B, C, D 矢印に示す、心房中隔欠損であった (A は同腹の WT 子マウス)。このことから CL-K1 が心房中隔形成に重要な何らかの役割を担っていることが明らかとなった。



<引用文献>

- ① *Nature Genetics*. 43: 197-203. 2011
- ② *J Biol Chem*. 7; 274(19): 13681-9. 1999.
- ③ *Microbiol. Immunol*. 50: 1001-1013. 2006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------