

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07083

研究課題名（和文）補体因子MASP-3を活性化する血中プロテアーゼの同定

研究課題名（英文）Identification of the protease in blood that activates complement factor MASP-3

研究代表者

町田 豪（Machida, Takeshi）

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80583632

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）：補体因子MASP-3は、多くの補体因子とは異なり活性化型として循環しているが、その活性化機構は不明である。我々は、組換えMASP-3が血清中ならびにマウス生体内で活性化型に変換されることを見出した。クロスリンク共免疫沈降法を用いて、MASP-3と複合体を形成する分子を複数同定し、MASP-3の活性化能の有無について精査を行った。また、MASP-3が補体レクチン経路の認識分子と複合体を形成する生理的意義として、その活性化への直接的寄与はなく、MASP-3を生体内に長期間保持する役割を担うことを新たに見出した。本研究により、不明な点が多いMASP-3の生体内における動態が一部明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MASP-3は補体第二経路の活性化に必須の因子であり、補体による生体恒常性の維持を担う一方で、補体が無秩序に活性化されると、多くの炎症性疾患を引き起こすことが知られている。これらの疾患における研究で、第二経路の抑制が有効な治療戦略であることが見出されているが、第二経路の他の補体因子であるD因子やB因子は血中濃度が非常に高く、第二経路の最上流に位置し血中濃度が低いMASP-3を標的とした治療戦略は、より効果的で実用的なものとなり得る。本研究では、MASP-3の生体内における動態を一部明らかにしたもので、有効な治療法が確立されていない種々の補体介在性の炎症性疾患の分野において大きな意義を持つ。

研究成果の概要（英文）： Unlike most complement factors, MASP-3 circulates in an activated form, but the mechanism of activation is unknown. Using recombinant MASP-3, we found that MASP-3 is converted to its activated form in serum and in vivo after intravenous administration in mice. Using the crosslinking co-immunoprecipitation strategy, we identified several molecules that form complexes with MASP-3 at least transiently and examined their ability to activate MASP-3. In addition, we newly found that the physiological significance of complex formation of MASP-3 with recognition molecules of the lectin complement pathway is not its direct contribution to MASP-3 activation, but its role in the long-term retention of MASP-3 in vivo. Our results partially clarified the dynamics of MASP-3 in vivo, which has remained unclear.

研究分野：免疫学

キーワード：MASP-3 補体 第二経路

1. 研究開始当初の背景

補体系は、複数の補体成分およびプロテアーゼが連鎖的に活性化されるカスケード反応を介して炎症を惹起する免疫機構である。補体の活性化は、その制御機構が正常に機能している条件においては、病原体の排除やアポトーシス細胞の除去など、生体恒常性の維持に重要な役割を果たす。一方で、無秩序に活性化が増幅されると、種々の炎症性疾患の原因ともなり得る。そのため、補体の活性化機構の解明は、種々の炎症性疾患の病態制御のために重要である。

補体系は、古典経路、レクチン経路、第二経路という3つの異なる活性化経路を通じて活性化される。これら3経路では、活性化の引き金となる病原体・異物等のリガンドを異とするが、いずれの経路も補体成分 C3 の活性化に至る。C3 が活性化されると補体後期経路が活性化され、アナフィラトキシンの産生や膜侵襲複合体の形成を促し、炎症を惹起する。3経路の中でも第二経路は、C3 の活性化産物として異物表面に結合した C3b 分子を起点として、さらなる C3 の持続的な活性化を促す増幅ループとしての機能を持つ。抗 D 因子抗体を用いた第二経路の阻害実験では、古典経路またはレクチン経路の活性化を初発点とするアナフィラトキシン産生および膜侵襲複合体の形成を 80%以上抑制するという報告があり(Harboe *et al. Clin Exp Immunol*, 138:439, 2004; *Mol Immunol*, 47:373, 2009)。いずれの経路が起点となる場合においても、続発する第二経路(増幅ループ)の活性化が炎症を強く惹起することが示唆される。以上より、補体の活性化機構、特に第二経路(増幅ループ)の活性化機構の解明は、補体が関与する種々の炎症性疾患の病態制御において喫緊の課題であると考えられる。

MASP (Mannose-binding lectin-associated serine protease) は、補体セリンプロテアーゼの1種である。MASP-1、2、3の3種が同定されており、そのうちMASP-1とMASP-3は同一の *Masp1* 遺伝子にコードされているスプライシングバリエーションである。MASP はレクチン経路を活性化する酵素として発見されたが、筆者らのグループが作製した MASP-1/MASP-3 二重欠損マウスにおいて、第二経路の活性化が起こらないことが発見された(Takahashi *et al. J Exp Med*, 207:29, 2010)。さらに当グループは、MASP-1とMASP-3それぞれの特異的エクソンを遺伝子編集により除去したMASP-1またはMASP-3単独欠損マウスを作製し、MASP-1はレクチン経路の活性化に、MASP-3はD因子の活性化を通じて第二経路の活性化に、それぞれ独立して寄与することを世界で初めて証明した(Hayashi *et al. J Immunol*, 203:1411, 2019)。本成果を加え、補体の活性化機構は概ね解明されたが、MASP-3が活性化されるメカニズムは未だ解明されていない。

MASP-3は、CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2の5つのドメインからなるHeavy chainと、セリンプロテアーゼドメイン(SPD)からなるLight chainから構成される。MASP-3のHeavy chainはMASP-1と完全に同一であり、いずれも同様にレクチン経路の認識分子であるMBL、ficolin、CL-11と複合体を形成する。MASP-1はレクチン経路の活性化酵素である一方、MASP-3はレクチン経路の活性化に必須の酵素ではないため、これらの認識分子と複合体を形成する生理学的意義は不明である。

当グループは、PA タグ融合リコンビナントマウス型MASP-3 (rmMASP-3-PA) を作製し、マウス血清中で37℃静置するだけでrmMASP-3-PAが活性化することを見出した。また、その活性化が、セリンプロテアーゼ阻害剤(Futhan、FOY、FOIPAN)またはCa²⁺イオン選択的金属プロテアーゼ阻害剤(EGTA)存在下で抑制されることも明らかにした。本現象はマウスにおいてだけでなく、PA タグ融合リコンビナントヒト型MASP-3 (rhMASP-3-PA) と正常ヒト血清を用いた実験においても同様であった。in vitro 実験のみならず、マウスへの静脈内投与によるin vivo 実験でもrmMASP-3-PAの活性化が認められ、当グループによって、血中にMASP-3を活性化するCa²⁺依存型プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、またはその両方の性質を持つプロテアーゼが存在することが明らかにされた。

2. 研究の目的

本研究では、rmMASP-3-PAを用いたクロスリンク共免疫沈降法を用いて、マウス血清からMASP-3と相互作用する分子の単離同定と、当該分子によるMASP-3活性化能の有無を明らかにすることを目的とした。また、MASP-3がMASP-1と同様にレクチン経路の認識分子と複合体を形成する生理学的意義は明らかにされておらず、本研究では、その複合体形成がMASP-3の活性化に関与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)クロスリンク共免疫沈降法を用いたMASP-3活性化酵素の単離同定

rmMASP-3-PAをMASP-3欠損マウス血清と混合し、血清中の標的酵素とrmMASP-3-PAとの酵素-基質複合体として単離するために、SH基クロスリンカーであるdithiobis(succinimidyl propionate)(DSP)を加えて37℃で一晩反応させた。反応後の液を抗PAタグ抗体ビーズと混合して4℃で一晩反応させ、遠心分離後にPBSでビーズを洗浄した。洗浄後のビーズをグリシン塩酸緩衝液(pH 2.5)中で静置することで抗体と酵素-基質複合体を分離し、複合体が含まれる上清

を回収した。SH 基クロスリンカーとして使用した DSP による架橋はジスルフィド結合を含むため、還元条件での SDS-PAGE により複合体を解離して泳動することで、単離されるタンパク質の検出を行った。また、クロスリンク共免疫沈降後の混合液を LC-MS/MS 解析に供し、クロスリンカー非存在下で共免疫沈降を実施したサンプルのデータと比較することで、クロスリンク処置サンプルにのみ特異的に検出されるタンパク質を同定した。

(2) 血漿の分画化による MASP-3 活性化酵素の濃縮および単離同定

正常ヒト血漿を、エタノール分画法ならびに各種クロマトグラフィーを用いて、15 種の分画を調製した。画分をそれぞれ rmMASP-3-PA と混合して 37 °C で 6 時間反応させ、SDS-PAGE で泳動して抗 PA 抗体を用いた Western blotting により、MASP-3 の活性化レベルを評価した。

(3) MASP-3 のレクチン経路認識分子との複合体形成の MASP-3 活性化反応への関与

MASP-3 の Heavy chain における CUB1、CUB2 ドメインに 4 種の 1 アミノ酸置換 (E49A、D102A、H218A、Y225A) をそれぞれ施した変異型 rmMASP-3-PA を作製した。野生型および 4 種の変異型 rmMASP-3-PA を野生型 C57BL/6J マウスに尾静脈投与して経時的に採血を行って血清を調製し、血清中の MASP-3 の活性化および血中保持の動態を、抗 PA 抗体を用いた Western blotting により調べた。また、サンドイッチ ELISA ならびに抗 PA 抗体を用いた免疫沈降法により、各種 rmMASP-3-PA のレクチン経路認識分子との結合の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) クロスリンク共免疫沈降法を用いた MASP-3 活性化酵素の単離同定

rmMASP-3-PA と抗 PA 抗体ビーズをそれぞれ、または両者共に用いたクロスリンク共免疫沈降法によって得られた検体を SDS-PAGE に供した結果、両者を混合したサンプルにのみ出現するタンパク質のバンドは確認されなかった。単離されたタンパク質が目視で確認できない収量である可能性が考えられたため、得られた検体を LC-MS/MS に供して、両者混合サンプルにのみ検出されるタンパク質の同定を試みた。その結果、10 種以上のタンパク質が同定され、我々はその中で 1 種のセリンプロテアーゼに着目した。当セリンプロテアーゼのノックアウトマウスを導入し、血清を採取して、血清中の MASP-3 の活性化状態を、抗 MASP-3 特異的抗体を用いた Western blotting にて評価した。その結果、当ノックアウトマウスの血清では、野生型と同様に活性化型 MASP-3 の Light chain のバンドが強く検出された。当ノックアウトマウス血清を用いて、rmMASP-3-PA と混合する *in vitro* での MASP-3 活性化反応の確認を Western blotting にて実施した。その結果、野生型マウス血清と比較して差は認められなかった。また、当ノックアウトマウスの血清中の D 因子の活性化状態ならびに第二経路活性化能の測定を行った結果、いずれも野生型と同等に活性化が認められ、着目したセリンプロテアーゼは、少なくとも生体内において、MASP-3 の活性化に必須の役割を担っていないことが明らかになった。現在、LC-MS/MS 解析で同定したその他の分子について、同様に検討を進めている。

(2) 血漿の分画化による MASP-3 活性化酵素の濃縮および単離同定

rmMASP-3-PA の活性化レベルを評価した結果、15 種のヒト血漿分画のうち、各精製ステップの最終段階として得られた画分のうち、2 つの画分について活性化 MASP-3 の Light chain が検出された。本研究において、目的酵素の単離同定戦略が有効である可能性を強く示すことができたため、現在さらなる血清成分の分画化および、クロスリンク共免疫沈降法ならびに LC-MS/MS 解析による MASP-3 と相互作用する分子の同定を進行しており、MASP-3 を活性化する血中プロテアーゼを同定していく。

(3) MASP-3 のレクチン経路認識分子との複合体形成の MASP-3 活性化反応への関与

野生型および 4 種の変異型 rmMASP-3-PA (E49A、D102A、H218A、Y225A) をそれぞれマウスに尾静脈投与して、経時的な血清中の MASP-3 活性化および血中保持の動態を Western blotting で評価した。その結果、投与した 5 種の未活性化型 rmMASP-3-PA はいずれも投与後 30 分時点で既に活性化型に変換されていることが明らかになり、野生型-変異型間で差は認められなかったが、生体内において合成された MASP-3 が非常に効率的に活性化されるメカニズムの存在が明らかになった。一方で、未活性化型 rmMASP-3-PA の血中動態を比較した結果、いずれの変異型と比較しても野生型 rmMASP-3-PA は長期間保持されることが見出された。第二経路の MASP-3 がレクチン経路の認識分子と複合体を形成する本メカニズムは、MASP-3 の活性化反応自体には寄与しないが、未活性化型分子を長期間保持することで、活性化型 MASP-3 が代謝されても血中に活性化型 MASP-3 を新たに作り出して常に保持する役割を担っていることが推察された。これまで、第二経路の因子である MASP-3 がレクチン経路の認識分子と複合体を形成する生理学的意義は全く不明であったが、本研究はその一端を初めて明らかにした成果である。本研究の成果は、査読付き論文ならびに国内・国際学会にて発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiroki Maehara, Koki Norikawa, Keiichiro Tanaka, Yutaka Kato, Akihito Kasai, Ryo Mukai, Tomoko Omori, Takeshi Machida, Hideharu Sekine, and Tetsuju Sekiryu	4. 巻 14
2. 論文標題 Complement activation products in tears of dry eye and meibomian gland dysfunction.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-46634-7	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 Yuya Fujita, Haruki Matsumoto, Kenji Inada, Michio Onizawa, Kenji Saito, Yuya Sumichika, Shuhei Yoshida, Jumpei Temmoku, Naoki Matsuoka, Tomoyuki Asano, Shuzo Sato, Takeshi Machida, and Kiyoshi Migita	4. 巻 47
2. 論文標題 C5a stimulation induces caspase-1 activation and mature IL-1 production in human peripheral blood mononuclear cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 68-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/25785826.2023.2292665	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 Hiroki Maehara, Koki Norikawa, Keiichiro Tanaka, Yutaka Kato, Akihito Kasai, Tomoko Omori, Takeshi Machida, Hideharu Sekine, and Tetsuju Sekiryu	4. 巻 23
2. 論文標題 Tear fluid and complement activation products in tears after ocular surgery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12886-023-03037-6.	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 町田豪、関根英治	4. 巻 98
2. 論文標題 重症筋無力症の病態：補体の役割と活性化のメカニズム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 809-815
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 Hideharu Sekine, Takeshi Machida, and Teizo Fujita	4. 巻 313
2. 論文標題 "Factor D" in "Alternative Pathway / Amplification Loop Basics"	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 15-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.13155	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 Kohei Kusakari, Takeshi Machida, Yumi Ishida, Tomoko Omori, Toshiyuki Suzuki, Masayuki Sekimata, Ikuo Wada, Teizo Fujita, and Hideharu Sekine	4. 巻 13
2. 論文標題 The complex formation of MASP-3 with pattern recognition molecules of the lectin complement pathway retains MASP-3 in the circulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 907023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.907023	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 町田豪, 関根英治	4. 巻 80
2. 論文標題 補体の多面性: 自然免疫・獲得免疫と補体	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1728-1734
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 Yutaka Kato, Yasuharu Oguchi, Tomoko Omori, Akihito Kasai, Masashi Ogasawara, Yukinori Sugano, Kanako Itagaki, Akira Ojima, Yumi Ishida, Takeshi Machida, Hideharu Sekine, Tetsuju Sekiryu	4. 巻 2
2. 論文標題 Age-Related Maculopathy Susceptibility 2 and Complement Factor H Polymorphism and Intraocular Complement Activation in Neovascular Age-Related Macular Degeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmology Science	6. 最初と最後の頁 100167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xops.2022.100167	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 Keiichiro Tanaka, Yasuharu Oguchi, Tomoko Omori, Yumi Ishida, Hiroaki Shintake, Ryutaro Tomita, Akihito Kasai, Masashi Ogasawara, Yukinori Sugano, Kanako Itagaki, Akira Ojima, Takeshi Machida, Hideharu Sekine, and 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 8464
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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takeshi Machida, Hiroto Monoe, Yumi Ishida, Teizo Fujita, and Hideharu Sekine
2. 発表標題 Lack of MASP-1 results in delayed onset of renal dysfunction and prolonged survival in lupus-prone MRL/lpr mice
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 町田豪
2. 発表標題 補体レクチン経路の活性化機構と炎症性疾患への関与
3. 学会等名 日本比較免疫学会第 34 回学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeshi Machida, Hiroto Monoe, Yumi Ishida, Teizo Fujita, and Hideharu Sekine
2. 発表標題 Lack of MASP-1 results in delayed onset of albuminuria and prolonged survival in lupus-prone MRL/lpr mice
3. 学会等名 The 29th International Complement Workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 物江洋人、町田豪、石田由美、藤田禎三、関根英治
2. 発表標題 MASP-1欠損MRL/lprマウスではループス様腎炎による腎機能障害の発症が遅延し、生存期間が延長する
3. 学会等名 第59回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大森智子、町田豪、石田由美、石龍鉄樹、関根英治
2. 発表標題 ヨウ素酸ナトリウム誘発網膜障害モデルマウスにおけるMASP-1の役割
3. 学会等名 第58回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2022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 第57回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2021年

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

〔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	関根 英治 (Sekine Hideharu) (40363759)	福島県立医科大学・医学部・教授 (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
---------	---------