

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25年 5月27日現在

| | |
|-----------|--|
| 機関番号 | 21601 |
| 研究種目 | 若手研究 (B) |
| 研究期間 | 2011~2012 |
| 課題番号 | 23790542 |
| 研究課題名(和文) | 補体セリンプロテアーゼ MASP-1 を標的としたループス腎炎の 新規治療戦略 |
| 研究課題名(英文) | Functional analysis of MASP-1 as a therapeutic target for lupus-prone nephritis in MRL/lpr mice |
| 研究代表者 | |
| | 町田 豪 (MACHIDA TAKESHI) |
| | 福島県立医科大学・医学部・免疫学講座・助教 |
| | 研究者番号 : 80583632 |

研究成果の概要 (和文) : MASP-1 KO MRL/lpr マウスを作製し、MASP-1 欠損による補体第二経路活性消失が MRL/lpr マウスのループス様腎炎病態に与える影響について検討した。MASP-1 KO MRL/lpr マウスでは、野生型と比較して補体 C3 消費の抑制・抗 dsDNA 抗体値低下・腎糸球体病変の抑制が認められ、MASP-1 による補体第二経路活性化がループス腎炎などの自己免疫性炎症病態に関与することが示された。本成果により、MASP-1 がヒト SLE におけるループス腎炎の新たな治療標的対象として有効であることが示された。

研究成果の概要 (英文) : Lupus-prone MRL/lpr mice deficient for MASP-1, a serine protease essential for activation of the alternative complement pathway, were generated and analyzed for development of autoimmune lupus-prone disease. Aged MASP-1 KO MRL/lpr mice showed reduced serum C3 consumption, reduced serum anti-dsDNA levels, and no/moderate glomerulonephritis compared to age-matched wild-type littermates, indicating that suppression of MASP-1 would be an effective therapeutic strategy for human lupus nephritis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2011年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2012年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医薬歯学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：アレルギー・免疫関連疾患、全身性エリテマトーデス

1. 研究開始当初の背景

ヒト全身性エリテマトーデス(SLE)において主要な死因となっている腎不全の発端となるループス腎炎では、自己抗体が形成する免疫複合体による補体系の活性化が主要なメカニズムであると考えられている。中でも補体第二経路構成因子の特異的阻害がループス腎炎病態の軽減に有効であることが報

告されており、種々の活性化因子の抑制ならびに阻害因子の投与による治療の有効性を検討する研究が行われている(*J Immunol*, 164, 786, 200; *Kidney Int*, 65, 129, 2004; *Arthritis Rheum*, 63, 1076, 2011)。近年、申請者らのグループは、補体レクチン経路の活性化に機能する因子として同定された MASP-1 が補体第二経路活性化に必須の因

子であることを発見した (*J Exp Med*, 207:29, 2010)。現在までに MASP-1 を標的とした第二経路活性阻害がループス腎炎病態に与える影響については検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、MASP-1 遺伝子ノックアウト SLE モデルマウスを作製し、自己抗体の産生が開始される 12 週齢から、およそ半数が死亡する 24 週齢までの自己抗体産生・補体値・腎炎病態を調べることで、本分子の自己免疫性腎炎病態への関与を明らかにすると共に、本分子を標的としたループス腎炎の治療戦略の有効性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MASP-1 KO MRL/lpr マウスの作製

申請者の所属講座で作製された MASP-1 KO C57BL/6 マウス (*J Immunol*, 180:6132, 2008) をヒト SLE モデルマウスである MRL/lpr マウスに戻し交配して、MASP-1/3 KO MRL/lpr マウスを作製した。戻し交配の各世代において、第 4, 5, 7, 10, 17 番染色体における 12 種のマイクロサテライトマーカーおよび *Fas* 遺伝子の遺伝子型を PCR によりチェックしながら、より次世代交配に適した個体を用いて戻し交配を行った。

(2) 血清生化学的評価

MASP-1 野生型・ヘテロ・KO マウス各 6 匹から 12-24 週齢の 2 週毎にイソフルラン吸入麻酔下で 200 μ L 程度眼底採血し、血清を調製した。ELISA により、ザイモザンを用いた補体第二経路活性・血清 C3 量・血清抗 dsDNA 抗体値を評価した。

(3) 蛋白尿の評価

MASP-1 野生型・ヘテロ・KO マウス各 6 匹から 12-24 週齢において 2 週間毎に代謝ケージを用いて 1 日採尿し、ELISA により 1 日尿中のアルブミン量を測定し、蛋白尿を評価した。

(4) 腎の病理組織学的解析

24 週齢において、MASP-1 野生型・ヘテロ・KO マウス各 6 匹を屠殺し、腎を採取してパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色により病理解析を行った。

(5) 免疫担当細胞集団の解析

24 週齢において、MASP-1 野生型・ヘテロ・KO マウス各 3 匹を屠殺し、脾臓・腹腔リンパ節を採取して、CD4/CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞集団を FACS により解析した。

4. 研究成果

MASP-1 KO MRL/lpr マウスを戻し交配により作製した。戻し交配 3 世代目までにおいて、疾患感受性領域とされている 13 種全てのマイクロサテライトマーカーが MRL/lpr マウスのホモ型に置換された。さらに 4 世代以上戻し交配を行い、7-9 世代戻し交配したマウスを解析に用いた。

12-24 週齢における各群 MRL/lpr および C57BL/6 マウスから採血して血清を調製し、補体第二経路活性・C3 量・抗 dsDNA 抗体値を測定した。本マウスは、既報の MASP-1 KO C57BL/6 (*J Exp Med*, 207:29, 2010) と同様に、EGTA 存在下においてザイモザンに対する C3 沈着活性を示さず (図 1)、本マウスにおける第二経路活性消失が確認された。本成果により、MASP-1 は補体消費量が高い MRL/lpr マウスにおいても第二経路活性化に極めて重要であることが示された。

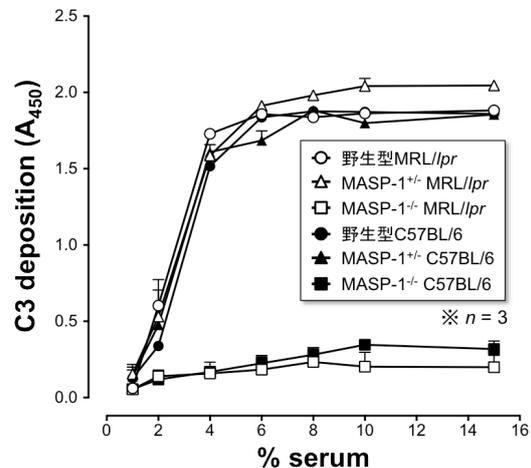


図1. MRL/lprマウス血清中の第二経路活性

12-24 週齢まで 2 週毎に採血して調製した血清中の C3 量を ELISA にて測定した結果、MASP-1 KO MRL/lpr マウスは、野生型 MRL/lpr マウスと比較して有意に高い C3 レベルを維持していた (図 2)。ヒト SLE 患者では血清における CH50、C3、C4 がしばしば低値を示し、

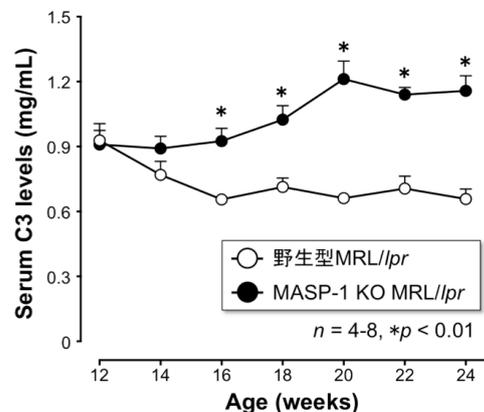


図2. MRL/lprマウスの血清C3レベル

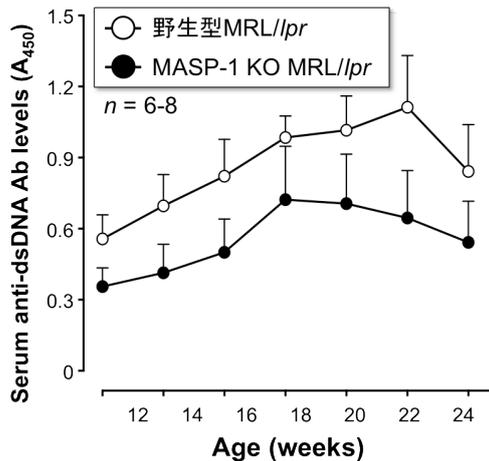


図3. MRL/lprマウス血清中抗dsDNA抗体値

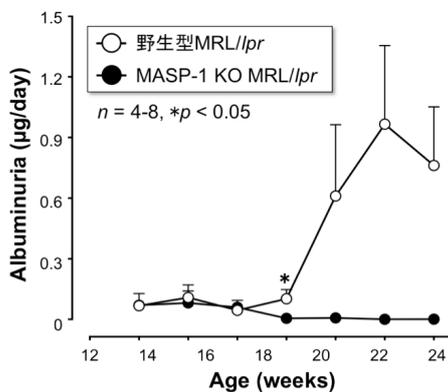


図4. MRL/lprマウスの尿中アルブミン日量

疾患活動性の指標として用いられている (*Arthritis Rheum*, 28:904, 1985)。C3 をノックアウトした MRL/lpr マウスでは、全補体経路の活性が消失してしまうため、古典経路活性消失による自己抗原クリアランス異常を来し、腎炎病態が悪化した (*J Immunol*, 166:6444, 2001)、第二経路構成因子である B 因子・D 因子をノックアウトした (*J Immunol*, 164:786, 2000; *Kidney Int*, 65:129, 2004)、または第二経路抑制因子である H 因子を投与した MRL/lpr マウス (*Arthritis Rheum*, 63:1076, 2011) では、血清 C3 消費抑制に伴い、蛋白尿・血清抗 dsDNA 抗体値・腎糸球体への IgG・C3 沈着の低下が認められ、病理学的評価においても腎炎病態が有意に改善した。以上のことから、第二経路活性化がループス腎炎における腎での補体消費による炎症の主要な増悪因子であることが強く示唆される。本研究において、MASP-1 KO MRL/lpr マウスについてこれらの評価を行った結果、血清抗 dsDNA 抗体低値 (図 3)、蛋白尿の低下 (図 4)、24 週齢における糸球体腎炎の発症抑制 (図 5) が認められた。

24 週齢における各群マウスの脾臓免疫担当細胞の挙動を FACS により検討した結果、MASP-1 KO MRL/lpr マウス脾臓におけるヘル

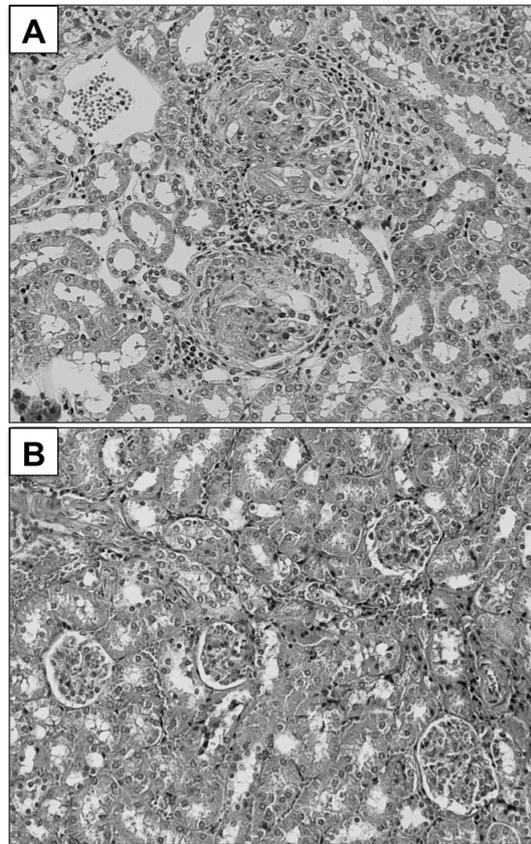


図5. (A)野生型および (B)MASP-1 KO MRL/lprの腎所見

パー T 細胞 (CD3⁺CD4⁺)、細胞傷害性 T 細胞 (CD3⁺CD8⁺)、成熟 B 細胞 (CD19⁺IgM⁺)、マクロファージ (CD11b⁺MHC classII⁺)、樹状細胞 (CD11c⁺MHC classII⁺) 集団のポピュレーションは野生型とほぼ同等であり、MASP-1 欠損は免疫担当細胞レベルにおいて影響を及ぼさないことが示された (データ非表示)。

上記の結果より、MASP-1 KO MRL/lpr マウスではループス様腎炎における糸球体病変が抑制されることが示され、ループス腎炎の治療標的として有効であることが示唆されたが、24 週齢における各群マウスの体重を測定した結果、野生型 (37.7 ± 4.5 g, n = 3)、MASP-1 KO (27.4 ± 2.8 g, n = 2) であり、MASP-1 KO MRL/lpr マウスにおける成長抑制が認められた。MASP-1 は補体系において D 因子を活性化して第二経路を活性化させることが知られているが、近年 MASP-1 が顔面骨格異常・頭蓋骨癒合症・口唇口蓋裂等を主病変とする 3MC 症候群の発症に関与することが報告された (*Nature Genet*, 43, 197, 2011)。MASP-1 KO C57BL/6 においても骨格異常が見出されており (論文投稿準備中)、MASP-1 KO MRL/lpr マウスは骨形成異常等により発育が著しく阻害されていることが示唆される。今後、MRL/lpr マウスにおける全身性自己免疫性炎症に対する MASP-1 の機能ならびに治療標的としての有効性を正確に評価するために、抗 MASP-1 抗体の投与による後天的な MASP-1 抑

制実験系を確立し、同様にループス腎炎への効果について検討していく必要がある。

本研究では、MASP-1 KO MRL/*Ipr* マウスを用いて、ループス様腎炎病態への MASP-1 の関与と治療標的としての有効性について検討を行った。その結果、MASP-1 KO MRL/*Ipr* マウスでは、自己抗体値・C3 消費の低下、糸球体腎炎発症抑制が認められ、MASP-1 がヒトループス腎炎の治療標的として有効であることが示された。今後、抗 MASP-1 抗体を投与する実験を行うことで、より正当なループス様腎炎抑制効果を見出し、ヒトループス腎炎の新規治療法を確立していく予定である。

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3件)

(1) Kodama T, Sekine H, Endo Y, Takahashi M, Iwaki D, Machida T, Kanno K, Ishida Y, Fujita T, Involvement of both the lectin and classical pathways in peanut-induced complement activation and anaphylaxis, *Immunobiology*, **218**, 844, 2012, 査読有

(2) Machida T, Ishibashi A, Kirino A, Sato J, Kawasaki S, Niimura Y, Honjoh K, Miyamoto T, Chloroplastic NADPH-dependent thioredoxin reductase in *Chlorella vulgaris* alleviates environmental stresses in yeast with 2-Cys peroxiredoxin. *PLoS ONE*, **7**, e45988, 2012, 査読有

(3) Ohki S, Shibata M, Gonda K, Machida T, Shimura T, Nakamura I, Ohtake T, Koyama Y, Suzuki S, Ohto H, Takenoshita S, Circulating myeloid-derived suppressor cells are increased and correlate to immune suppression, inflammation, and hypoproteinemia in patients with cancer. *Oncol Rep*, **28**, 453-458, 2012, 査読有

[学会発表] (計6件)

(1) 町田豪、坂本夏美、山内直人、関根英治、MRL/*Ipr* マウスで系統特異的に観察される IFN- γ 誘導性 B 細胞欠損、研究連携セミナー 2012、2012 年 12 月 18 日、福島県立医科大学

(2) Machida T, Sakamoto N, Suzuki E, Zhang X, Reily CM, Gilkeson GS, Sekine H, Lack of interferon regulatory factor-1 accelerates development of interstitial nephritis, renal vasculitis, and pulmonary granulomas with predominant Th2 polarity in MRL/*Ipr* mice. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 7 日, 神戸国際会議場

(3) Sekine H, Machida T, Sakamoto N, Suzuki E, Zhang X, Reily CM, Gilkeson GS, IRF-1

deficient lupus-prone MRL/*Ipr* mice show reduced glomerulonephritis but develop severe interstitial nephritis, renal vasculitis and pulmonary granulomas with propensity for Th2 polarity. 2012-Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 2012 年 11 月 10 日, Washington DC, USA

(4) Kodama T, Endo Y, Takahashi M, Iwaki D, Machida T, Fujita T, Sekine H, Role of complement in a murine model of peanut-induced anaphylaxis. XXIV International Complement Workshop, 2012 年 10 月 12 日, Crete, Greece

(5) Machida T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Ruiz P, Fujita T, Gilkeson GS, Sekine H, IRF-4 deficient lupus-prone MRL/*Ipr* 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, 2011 年 11 月 27 日, 幕張メッセ

(6) Sekine H, Machida T, Suzuki E, Kinser TTH, Avila EM, Ruiz P, Reilly CM, Gilkeson GS, Interferon regulatory factor-4 deficient lupus-prone MRL/*Ipr* mice show strong propensity for Th1 polarity and develop granulomatous lesions in multiple organs. 2011-Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 2011 年 11 月 6 日, Chicago, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

町田 豪 (MACHIDA TAKESHI)

福島県立医科大学・免疫学・助教

研究者番号: 80583632

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし