福島県立医科大学学術成果リポジトリ
FUKUSHIMA MEDICAL UNIVERSITY

補体制御因子sMAPとH因子を融合した新規抗補体薬sMAP-FHの開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-12-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 髙住, 美香 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000243

補体制御因子 sMAP と H 因子を融合した
新規抗補体薬 sMAP-FH の開発

髙住　美香

福島県立医科大学　免疫学講座

要　旨

【背景と目的】

近年，臓器の虚血・再灌流障害や加齢黄斑変性の病態機序において，補体のレクチン経路とそれに続く第二経路の活性化が，炎症のトリガーとして働くことが示されているが，それら両方の補体経路を同時に阻害する抗補体薬は開発されていない.

一方，生体には複数の補体制御因子が存在する．mannose binding lectin(MBL)-associated serine protease (MASP)-2 のスプライシングバリアントである small MBL-associated protein (sMAP)は，N 末端の CUB1 と EGF like domain が MASP-2 と共通の構造で，レクチン経路の認識分子である MBL/ficolin と complex を形成するが，C 末端側のセリンプロテアーゼドメインを持たない構造であり，MASP-2 の代わりに MBL と結合することでレクチン経路の活性化を調節する因子である．また，H 因子(FH)は，病原体や傷害を受けた自己の細胞表面に結合した第二経路の C3 転換酵素である C3bBb を C3b と Bb に解離失活し，さらに I 因子とともに C3b を iC3b へ分解することで第二経路の活性化を制御する因子である．そこで，レクチン経路と第二経路の両者を阻害する抗補体薬の新規開発を目的に，sMAP と FH とを融合させた新規の融合タンパク sMAP-FH を作成し，生体における補体阻害作用を評価した.

【方法】

マウス肝細胞由来 cDNA を鋳型として，PCR 法でマウス sMAP 全長とマウス FH SCR1-5 ドメインの cDNA をクローニングし，TOPO ベクターへ組み込みシークエンスを確認した. その後，リンカー配列付加プライマーを用いて sMAP と FH を PCR で増幅し，In-Fusion 法で PA タグ付加発現ベクター(pCAG-Bsd PA tag-C)のマルチクローニングサイトに組み込んだ．再度シークエンスを確認した後，同発現ベクターを CHO 細胞に形質転換し，無血清培地下で sMAP-FH を産生させた. 培養上清中の sMAP-FH を抗 PA 抗体結合アフィニティーカラムで精製し，SDS-PAGE，抗 MASP-2 ポリクローナル抗体と抗 FH ポリクローナル抗体を用い

た Western blotting，および mass spectrometry で sMAP-FH の産生を評価した．同様に，MAp44 全長もマウス肝細胞由来 cDNA から PCR クローニングし，TOPO ベクターへ組み込んでシークエンスを確認した後，リンカー配列プライマーで PCR 増幅し，FH とともに In-Fusion 法で PA タグ付加発現ベクターへ組み込んだ．

in vitro における sMAP-FH のレクチン経路，第二経路阻害作用は，mannan-coated plate による C3 deposition assay，Flow cytometry を用いた zymosan assay で評価した．

in vivo における sMAP-FH のレクチン経路と第二経路の阻害作用は，sMAP-FH (0.5 mg/mouse, 8.62 nmol)をマウス腹腔内に投与後，1，2，4，8，24，および 48 時間後に採取した血清を用いて mannan-coated plate による C4 deposition assay と zymosan assay でそれぞれ評価した．また同血清中の sMAP-FH 濃度を，抗 PA 抗体を用いた ELISA 法で測定し，さらに，同血清中における sMAP-FH と MBL，または ficolin との複合体形成の有無を mannan または抗 ficolin A 抗体をコートしたプレートと抗 PA 抗体を用いた ELISA 法で評価した．対照として，腹腔内に MAp44-FH (0.69 mg/mouse, 8.62 nmol), PBS を投与したマウスの血清を用いた．

【結果と考察】

CHO 細胞で産生し，精製した sMAP-FH は，SDS-PAGE と Western blotting で同一の単一バンドとして検出され，mass spectrometry でもマウス sMAP とマウス FH を有するタンパクであることが示された．

mannan-coated plate による C3 deposition assay，Flowcytometry を用いた zymosan assay では，sMAP-FH は *in vitro* で濃度依存性に C3 deposition（レクチン経路と第二経路の活性化）を抑制した．

sMAP-FH または MAp44-FH 腹腔内投与後の血清では，mannan または抗 ficolin A 抗体をコートしたプレート上へ sMAP-FH または MAp44-FH の沈着が認められ，sMAP-FH と MAp44-FH は生体内で MBL および ficolin A と複合体を形成することが示された．さらに，sMAP-FH 投与後の血清を用いた C4 deposition assay

と zymosan assay では，MAp44-FH 群，PBS 投与群と比較して C4 deposition（レクチン経路の活性化）と C3 deposition （第二経路の活性化）の抑制が強いことが確認され，その作用は血清中の sMAP-FH の濃度と連動していた．以上から，*in vivo* における sMAP-FH の補体経路の阻害機序として，sMAP 部位による MBL/ficolin と複合体を形成する MASPs との競合阻害作用と，FH 部位による C3 転換酵素 C3bBb の解離失活作用が考えられた．

【結論】

融合タンパク sMAP-FH は，*in vitro* と *in vivo* において補体・レクチン経路と第二経路の両者の阻害作用を有し，それらの補体経路の活性化が病態に関与する疾患に対する新規治療薬となる可能性がある．

序　論

補体系は約30種類のタンパクで構成され，活性化により異物（病原微生物・抗原抗体複合体・自己のアポトーシス細胞など）の排除に作用する自然免疫機構である．補体活性化の初期反応は連鎖的なカスケード反応であり，古典経路・レクチン経路・第二経路の３つがある（図１）．いずれも補体成分C3の活性化に至り，C3はC3aとC3bに限定分解される．エステル結合活性を有するC3bは異物表面へ共有結合し，オプソニンとして食細胞による貪食処理を促し，C3aはアナフィラトキシンとして肥満細胞を直接的に活性化し，血管透過性の亢進や炎症を引き起こすことで，生体防御に関与する．異物へのC3bの結合により後期経路（溶解経路）が活性化され，最終的に異物表面に膜侵襲複合体（C5b-9）を形成して穴を開け破壊する．

古典経路とレクチン経路は，異物に補体系の認識分子が結合することで活性化が開始される．古典経路では，補体成分C1qが認識分子として異物(抗原)に結合している抗体に結合する．C1qにはセリンプロテアーゼに属する２つの補体成分C1rとC1sが未活性型 (proenzyme) の状態で結合し，複合体を形成している．C1qが抗原−抗体複合体に結合すると未活性型のC1rが自己触媒的に活性化される．活性型C1rは，未活性型のC1sを活性化し，活性型C1sは補体成分C4をC4aとC4bに限定分解する．C4aは弱いアナフィラトキシンとして作用し，C4bは異物表面上のアミノ基や水酸基に共有結合しオプソニンとして作用する．異物に結合したC4bには補体成分C2が結合し，活性型C1sがC2をC2aとC2bに限定分解する．その結果，C4bと酵素活性を有するC2aの複合体（C4b2a）が形成され，これがC3をC3aとC3bに限定分解するC3転換酵素として機能する．その結果，異物に結合した抗体の近傍である異物表面にオプソニンとして作用するC3bが結合し，アナフィラトキシンとして作用するC3aによって炎症が引き起こされ，異物を効率的に貪食処理できるようになる．

一方，レクチン経路の認識分子は，mannose-binding lectin (MBL)とficolinである．MBLは主にマンノースやN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に結合し，ficolinは主にGlcNAcやフコースに結合するレクチンである(1)．微生物表面上の糖鎖末

端ではマンノースやGlcNAcが露出していることが多いが，宿主細胞表面上の糖鎖末端ではシアル酸が結合しているためマンノースやGlcNAcが露出せず，その違いでMBLとficolinは自己と非自己を見分け，非自己である異物を認識する．古典経路の認識分子C1qと同様に，MBLとficolinにもセリンプロテアーゼに属する３つの補体成分MBL-associated serine protease-1 (MASP-1), MASP-2, MASP-3が未活性型の状態で結合し，複合体を形成している．MBL/ficolinが糖鎖に結合するとMASP-1が自己触媒的に活性化され，MASP-2を活性化する(2, 3)．MASP-2はMASP-1非存在下でも一部自己活性化すると考えられ，活性型MASP-2は古典経路の活性型C1sと同様に補体成分C4をC4aとC4bに限定分解する(4)．異物に結合したC4bには補体成分C2が結合し，活性型MASP-2が活性型C1sと同様にC2をC2aとC2bに限定分解し，古典経路と同様にC3転換酵素C4b2aが形成され，C3をC3aとC3bに限定分解する．その結果，異物に結合したMBL/ficolonの近傍，すなわち異物表面にC3bが結合し，古典経路と同様に異物を効率的に貪食処理できるようになる．一方，MASP-3の機能の詳細は不明な点が多いが，次に述べる第二経路のD因子を活性化すると考えられている(5, 6).

以上のように，レクチン経路のMBL/ficolin-MASPs複合体は，古典経路のC1q-C1r-C1s複合体と機能的にも構造的にも類似しているが，古典経路と大きく異なる点として，レクチン経路には活性化を抑制する２つの補体分子MAp44とsMAPが存在する．MAp44は，MASP-1とMASP-3を転写する*Masp1*遺伝子から選択的スプライシングで転写されるスプライスバリアントである．MASP-1とMASP-3は，N末端側に共通のドメインで構成されるheavy chainを有し，MBLやFicolinに結合する機能を有する．C末端側には異なるドメインで構成されるlight chainを有し，酵素活性を有するセリンプロテアーゼドメイン(serine protease domain; SPD)として機能する（図2A）．一方MAp44は，N末端側のheavy chainがMASP-1, MASP-3と途中まで共通のドメインを有しMBL/ficolinへ結合できるが，それよりC末端側を保持しないためセリンプロテアーゼとして機能しない．そのため，MAp44はMBL/ficolinへの結合をMASP-1またはMASP-3と競合することでレクチン経路の活性化を阻害する補体抑制因子として機能する(7, 8)．sMAPは，

MAp44と同様にMASP-2を転写する*Masp2*遺伝子から選択的スプライシングで転写されるスプライスバリアントである(図2B)．MASP-2はMASP-1, MASP-3と同様に, N末端側にMBLやFicolinに結合するheavy chainを有し, C末端側のlight chainにはセリンプロテアーゼドメイン(serine protease domain; SPD)を有する．一方sMAPは，MAp44と同様にN末端側にMASP-2の途中までと共通のドメインを有しMBL/ficolinへ結合できるが, それよりC末端側を保持しないためセリンプロテアーゼとして機能しない．そのためsMAPは，MAp44と同様にMBL/ficolinへの結合をMASP-2と競合することでレクチン経路の活性化を阻害する補体抑制因子として機能する(9). MAp44と異なる点として, sMAPは自己活性化によりC3転換酵素C4b2aの形成に直接的に作用するMASP-2を競合阻害すると考えられるため, より強くレクチン経路の活性化を阻害することが推測される．

第二経路では, 古典経路やレクチン経路のように認識分子が存在せず, 微生物表面などの固相面上でC3分子が水分子と反応することで開始される. C3(H_2O)は, 第二経路の補体因子であるB因子と結合して複合体C3(H_2O)Bを形成し，第二経路のD因子が複合体上のB因子をBaとBbに限定分解する. 小さなBa分子は放出され，酵素活性を有するBbが残存した初期C3転換酵素C3(H_2O)Bbが形成される．C3(H_2O)BbはC3をC3aとC3bに限定分解し, C3bは微生物表面上の水酸基やアミノ基に共有結合する．さらにC3bはB因子と結合してC3bB複合体を形成し，D因子による限定分解を受けて強力なC3転換酵素C3bBbが形成される．C3bBbにP因子が結合してC3bBbPが形成されると安定化し，半減期が延長する． C3bBbは，C3を限定分解して新たなC3bを生成し，さらに新たなC3bBbを拡大連鎖反応的に生成するため，増幅C3転換酵素とも呼ばれる．以上のように，第二経路が活性化されるとC3の活性化が大量に生じるため，アナフィラトキシンとして作用するC3aが大量に産生されることにより炎症が増大する．認識分子が存在しない第二経路は, 古典経路やレクチン経路の活性化で産生されたC3bを介する経路でも活性化するため, 補体活性化における第二経路の役割は, 活性化を増幅する増幅経路（回路）としての働きがより重要である．

古典経路やレクチン経路の活性化で形成されたC3転換酵素C4b2aと，第二経路の活性化で形成されたC3転換酵素C3bBbは，その作用によるC3の限定分解で生じたC3bと３分子複合体を形成してC5転換酵素C4b2a3bとC3bBb3bになり，後期経路の補体成分C5をC5aとC5bに限定分解する．C5aは，C3aと同様にアナフィラトキシン活性を有するが，白血球の走化作用も有し，食細胞を血中から病原体感染局所へ誘導することで宿主防御に関与する．一方C5bは補体成分C6, C7, C8, C9と次々に重合し，膜侵襲複合体とよばれる円筒形のC5b-9複合体を微生物細胞膜に形成し，破壊（溶菌）する．

C3の限定分解で生じたC3bは宿主の細胞に対しても結合し，第二経路とそれに続く後期経路の活性化を通じて細胞傷害性を示す．そのため，生体は補体の攻撃から自己の細胞や組織を保護する複数の補体制御因子を保持し，H因子(factor H; FH) は第二経路の活性化を選択的に制御する因子として機能する．H因子の基本構造は150 kDの一本鎖糖タンパク質であり(図3A)，連結された20個のshort consensus repeat (SCR) で構成される(10)．H因子は，C3bとその分解産物であるC3d，heparin，C-reactive protein (CRP)，亜鉛などと結合する．C3bと結合するN末端側のSCR1-4部位は，第二経路のC3転換酵素であるC3bBbやC3bBbPをC3b, Bb, Pに解離失活しさせることで，第二経路の活性化を制御する．さらにSCR1-4部位は，C3bをiC3bに分解するI因子と結合することで，I因子のcofactorとして作用する．C3bの分解産物であるiC3bはB因子との結合能力を失い，あらたなC3転換酵素の形成が阻止される(11)(図3B).

以上のように，補体系は生体防御機構として機能するが，生体が備える補体の制御能力を超える過剰な活性化が生じると，炎症による臓器障害を引き起こすことがある．補体の過剰な活性化が病態に関与する炎症性疾患は多数存在するが，いくつかの疾患では，どの補体経路の活性化が関与するかが明らかにされている．

主に第二経路の活性化が関与する疾患として，膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)の一部や非定型溶血性尿毒症症候群(aHUS)などがある．MPGNは明らかな原因疾患が無い一次性と感染等による続発性のMPGNが存在するが，

MPGN症例では低補体血症が認められ，その原因としてC3 nephritic factor(C3NeF)が発見されて以降，血清中に出現するその他の数種の補体活性因子の性質とMPGNの関係が検討された．その中で，補体制御因子であるFHの欠損症のMPGNの関連性が論じられるようになり，FH欠損に伴う第二経路の活性化がMPGNの病態の増悪に関与する可能性が考えられている．また，aHUSにおいてもFHの遺伝子異常が認められており，MPGNとの比較検討も行われている(12).

さらに，第二経路に加えてレクチン経路の活性化が関与する疾患として，臓器の虚血・再灌流障害や加齢黄斑変性などが明らかとなった(13-17)．その機序として，酸化ストレスなどによる傷害を受けた細胞表面に露出した新規の自己抗原に自然抗体であるIgMが結合し(18)，そこへMBL-MASP complexが結合することでC4，C2が分解され，C3の活性化が起こることでレクチン経路が活性化すると考えられている(19)．レクチン経路に引き続いて第二経路も活性化されることで，より強い炎症が惹起されることとなる(図4A).

近年，心虚血・再灌流モデルマウスにヒト型リコンビナントMAp44を投与し組織障害の改善効果を確認した報告や，抗Ⅱ型コラーゲン抗体誘導性関節炎モデルマウスの関節内に，ヒト型MAp44発現アデノウイルスベクターを投与し関節炎の改善効果を確認した報告がなされており，レクチン経路がその病態の増悪に関与する疾患において，MASP-1/3の調節因子であるMAp44が新規治療薬となる可能性が示唆され，MASP-1/3が治療のターゲットとなり得ると考えられた(20, 21)．一方，MASP-2に関しても，MASP-2ノックアウトマウスにおいて心筋と腸管の虚血再灌流モデルを作製すると傷害が軽度であったとの報告や，MASP-2抗体の投与で脳梗塞後の傷害が改善したとの報告があり，MASP-2は治療のターゲットとなり得る(22, 23)．さらに，補体制御因子として存在するFHとMAp44を融合させたタンパクMap44-FHが*in vitro*において補体レクチン経路と第二経路の阻害作用を有することも報告されている(24)．そこで私は，MASP-2の内因性調節因子であるsMAPとFHを融合させたタンパクsMAP-FHを作製し，その補体経路阻害作用を*in vitro*と*in vivo*で検討することでsMAP-FHの新規治療

薬としての可能性を検証することとした．sMAP-FHの作用機序としては，MBLとMASPの結合を競合阻害することで，MBL-sMAP-FH complexを形成し，それが炎症の起こっている細胞表面へ沈着することでレクチン経路の活性化を抑制すること，さらに融合させたFHが細胞表面にすでに結合しているC3bBbを解離失活させることで第二経路の活性も抑制することを想定した(図4B).

材料と方法

マウス sMAP-FH リコンビナントタンパクの作製

Wild type C57BL/6 マウス肝臓から RNA を TRIzol 液（Thermo Fisher Scientific）で抽出し，Advantage RT-for-PCR Kit（Clontech）で cDNA に変換後，これを鋳型に PCR 法でマウス sMAP 全長(residues 1–185; GenBank accession no. AJ250239)と，マウス H 因子(FH)の補体制御活性を有する short consensus repeats (SCRs) 1-5(residues 37–340 of mature protein; GenBank accession no. NM009888)(10)をコードする cDNA をクローニングした．タンパクの翻訳が開始されるよう，sMAP の 5’末端には Kozak 配列を残した(25)．sMAP の増幅のための PCR は，98℃10 秒，70℃15 秒，72℃1 分 30 秒のサイクルを 35 サイクルで行った．FH SCR1-5 ドメインの増幅のための PCR は，98℃10 秒，58℃15 秒，72℃1 分のサイクルを 35 サイクルで行った. 得られた sMAP と FH の SCR1-5 の cDNA を Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing（Thermo Fisher Scientific）を用いて pCR4 Blunt-TOPO ベクターに組み込んだ．ベクターを大腸菌 DH5α株に 42℃ 1 分間のヒートショック法で形質転換し，アンピシリン添加 LB 寒天培地へ散布し 37℃で培養した．大腸菌コロニーを 12 個拾い上げ，アンピシリン添加 LB 液体培地で培養した．QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN)を用いてベクターを精製し，塩基配列を解読して目的の塩基配列（sMAP 又は FH の SCR1～5 ドメインをコードする塩基配列）を保持するベクターを選別した．得られた sMAP 又は FH の SCR1～5 ドメインをコードする塩基配列を保持するベクターを鋳型に，sMAP と FH の SCR1～5 ドメインを接続するリンカー配列付加プライマーを用いて，マウス sMAP とマウス H 因子 SCR1～5 ドメインの cDNA を PCR 法で増幅した．リンカーは，グリシンリンカー配列 [GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGT GGTGGTGGATCC$(G4S)_4$]を組み込み, FH が自由度を持って作用できるようにす

ること，融合タンパクが抗原性を持たないようにすることを目的とした(26). PCR の条件は，98℃10 秒，75℃15 秒，72℃1 分 30 秒のサイクルを 35 サイクルで行った．得られたリンカー配列を付加したマウス sMAP をコードする cDNA と，マウス FH SCR1-5 ドメインをコードする cDNA を，In-Fusion HD Cloning Kit（Clontech）を用いて PA タグ付加発現ベクターpCAG-Bsd PA tag-C（和光純薬工業）のマルチクローニングサイトに組み込んだ(図 5)．上記の発現ベクターを大腸菌 DH5α株に 42℃1 分間のヒートショック法で形質転換し，ブラストサイジン添加LB寒天培地へ散布し37℃で培養した. 大腸菌コロニーを12個拾い上げ，ブラストサイジン添加 LB 液体培地で培養した．QIAGEN Plasmid Midi Kit（QIAGEN）を用いてベクターを精製し，塩基配列を解読して目的の塩基配列（sMAP，リンカー（$(GGGGS)_4$），及び FH の SCR1～5 ドメイン）を保持する発現ベクターを選別した．sMAP-FH をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを，Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞へトランスフェクトした．CHO 細胞は 10% fetal bovine serum (Nichirei Biosciences Inc.)，1mM Sodium Pyruvate (Thermo Fisher Scientific Inc.)を添加した Dulbecco’s Modifued Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific Inc.)で 48 時間培養した後，培地を 2-10 μg/ml の Blastcidin (Wako)を添加した EX-CELL® 325 PF CHO Serum-Free Medium (Sigma-Aldrich Co. LLC.)に入れ替えて培養を継続した. 細胞が安定して増殖するようになるまで，しばらく無血清培地での細胞培養を行った．リコンビナントタンパクは，抗 PA タグ抗体ビーズ(Wako)を用いてアフィニティークロマトグラフィにより精製した．培養上清と抗 PA 抗体ビーズを 4℃で一定時間混合させた後，カラムに通してビーズを回収し PBS でビーズを洗浄した．回収したリコンビナントタンパクを 0.1M Glycine-HCl pH2.5 buffer で溶出し，溶出液を 1M Tris-HCl pH9.0 buffer で中和した．PBS で一晩透析した後，Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)でのタンパク濃度測定を行った.

マウス MAp44-FH と sMAP リコンビナントタンパクの作成

今回，FH と融合させていない sMAP 単独のリコンビナントと，Masp1 遺伝子の

スプライシングバリアントであり同じくレクチン経路の制御因子である MAp44 と FH SCR1-5 ドメインをリンカー配列付加して融合させた MAp44-FH も作製した．sMAP 単独のリコンビナントは，Wild type C57BL/6 マウス肝臓由来の cDNA を鋳型に PCR 法でマウス sMAP 全長をコードする cDNA をクローニングした．得られた sMAP の cDNA を In-Fusion HD Cloning Kit（Clontech）を用いて PA タグ付加発現ベクターpCAG-Bsd PA tag-C（和光純薬工業）のマルチクローニングサイトに組み込んだ．MAp44-FH も同様にマウス肝由来の cDNA を鋳型に PCR 法でマウス MAp44 全長(residues 1–385; GenBank accession no. AJ250239)とマウス FH の SCRs 1-5 をコードする cDNA をクローニングした．得られた MAp44 と FH の cDNA を鋳型に MAp44 と FH の SCRs1-5 を接続するリンカー配列（$(GGGGS)_4$）付加プライマーを用いて PCR 法で増幅した．リンカー配列が付加された MAp44 と FH の cDNA を In-Fusion HD Cloning Kit（Clontech）を用いて PA タグ付加発現ベクターpCAG-Bsd PA tag-C（和光純薬工業）のマルチクローニングサイトに組み込んだ．sMAP 単独または MAp44-FH の配列が組み込まれた発現ベクターを大腸菌 DH5α株に 42℃1 分間のヒートショック法で形質転換し，ブラストサイジン添加 LB 寒天培地へ散布し 37℃で培養した．大腸菌コロニーを拾い上げ，ブラストサイジン添加 LB 液体培地で培養した．QIAGEN Plasmid Midi Kit（QIAGEN）を用いてベクターを精製し，塩基配列を解読して目的の塩基配列（sMAP 単独または MAp44-FH）を保持する発現ベクターを選別した．選別した発現ベクターを，Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞へトランスフェクトし，タンパクを産生させた．リコンビナントタンパクは，抗 PA タグ抗体ビーズ(Wako)を用いてアフィニティークロマトグラフィにより精製した．

SDS-PAGE と Western immunoblotting

作製したリコンビナントタンパクを確認するため，SDS-PAGE と Western immunoblotting を行った．精製したサンプル 10 µl を 2-メルカプトエタノール入りの 2×SDS-PAGE loading buffer で 2 倍に希釈し 80℃で 5 分間炊きだした後，

10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し展開した．泳動後のゲルは Instant blue 染色 (Sigma Aldrich) では精製されたことを確認し，polyvinylidene fluoride membrane(Immobilon P; Millipore)に転写したものでは抗 MASP-2 ポリクローナル抗体(3)，抗 FH ポリクローナル抗体(abcam)，抗 MASP-1/3 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)で Western immunoblotting を行いリコンビナントタンパクが正確に合成されているかを確認した．Western immunoblotting の検出は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent(GE Healthcare Biosciences)で行い，撮影は LAS3000(Fuji Film)を用いた．

Mass spectrometry

作製したリコンビナントタンパクの質量分析を行った．CBB 染色を行った 10%ポリアクリルアミドゲルから sMAP-FH のバンドを切り出し，50%アセトニトリルでゲルが無色になるまで脱染色を行った．ゲルが完全に乾燥するまで遠心乾燥を行い，消化のため 150ng/30μ l の trypsin / lysyl endopeptidase 溶液を加えゲルを膨潤した．trypsin は K/R， lysyl endopeptidase は K の C 末端側でペプチドボンドを切断する酵素である．37℃で一晩消化した後，0.1%TFA / 50% アセトニトリル溶液 40μ l を加え 15min 超音波処理後，液を回収しこれを 2 回繰り返して約 80μ l のペプチドを回収した．約 2μl になるまで遠心濃縮し，50μl の 0.1%TFA を加え C18 カラム(75μm x 15cm， 200nl/min)を用いて脱塩とゲルのかけらなどの不溶物の除去を行った．カラムからの溶出は 20μl の 0.1%ギ酸 /80%アセトニトリルで 2 回行い，約 2μl になるまで遠心濃縮後，20μ l の 0.1% ギ酸/2%アセトニトリル溶液を加えた．C18 カラムを用いて液体クロマトグラフィー質量分析法を行った．タンパク質の同定は，PEAKS Studio (de novo シーケンス解析・タンパク同定)(INFOCOM CORPORATION)のソフトウェアを用いた．

マンナンコートプレート上での C3 deposition assay

作製した sMAP-FH の *in vitro* での補体経路阻害作用を検証するため，mannan-coated microtiter plate を用いて C3 deposition assay を行った．Maxisorp plate(Nunc)へ 0.1M Carbonate Buffer(pH 9.6)で希釈した 100 μg/ml の mannan(Sigma Aldrich)を 100 μl/well ずつ加え，4℃湿潤環境で一晩静置した後，1%BSA/PBS でブロッキングし mannan-coated microtiter plate を作製した. 5mM $CaCl_2$/TBS buffer(140mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4)で 2%に希釈した 8〜12 週齢の Wild type C57BL/6 マウス血清と sMAP-FH を 125 nM〜1000 nM まで段階的に希釈したものを混合し，MBL と sMAP-FH の complex を形成させるため 37℃で 1 時間 pre-incubation した後，mannan-coated microtiter plate に sample を添加して 37℃で 20 分静置した．また，比較対照として私の研究室で作製した sMAP 単独，MAp44-FH のリコンビナントも同様に 125 nM〜1000 nM まで段階的に希釈し同様に反応させた．反応後，5mM $CaCl_2$/TBS/0.1%Tween buffer で wash し，8000 倍に希釈した HRP-conjugated anti-C3 antibody(Cappel)を well に添加し 30 分反応させた. wash 後, TMB Peroxidase Substrate(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.)で発色させリン酸で反応を停止した．VARIOSKAN LUX(Thermo Scientific)で 450 nm の吸光度を測定した.

Flow cytometry を用いた zymosan assay (*in vitro*)

Wild type C57BL/6 マウス血清と sMAP-FH，sMAP，MAp44-FH の各リコンビナントを 10mM $CaCl_2$/10mM $MgCl_2$/TBS buffer で希釈し，血清濃度が 10%，リコンビナント濃度が 1000 nM となるように調整した．100 μg の Zymosan A(From saccharomyces cerevisiae; Sigma Z-4250)と混合し 10 分間 37℃で反応させた. 10mM EDTA/TBS/0.05%Tween buffer を加えて反応を停止させ，10mM EDTA/TBS/0.05% Tween buffer，PBS でそれぞれ 2 回ずつ wash した後，C3 deposition の検出のために anti C3 mouse FITC conjugated(Cappel)を 30 倍希釈して添加し，氷上で 30 分反応させた．PBS で 4 回 wash した後，FACS(BD Biosciences)で蛍光の測定を行った.

sMAP-FH と MAp44-FH の血中濃度測定

12-14 週齢の Wild type C57BL/6 マウス 3 匹へ 0.5 mg(8.62 nmol)の sMAP-FH を腹腔内投与し，投与後の血中動態を測定した．投与後，1 時間，2 時間，4 時間，8 時間，24 時間でそれぞれ眼窩静脈叢から採血を行い，48 時間後には心臓採血を行った．10 分間室温静置の後 15 分氷上で静置し，遠心分離で血清を採取した．採取した血清は後の解析に使用するまで-80℃で保存した．また，対照として PBS を腹腔内へ投与した Wild type C57BL/6 マウス 3 匹でも同様に経時的採血を行った．対照として，MAp44-FH 0.69 mg(8.62 nmol)も Wild type C57BL/6 マウス 3 匹へ腹腔内投与し，同様に経時的に採血を施行した．動物実験に関しては，福島県立医科大学動物実験規定に基づいた動物実験計画に沿って行った．

投与後血中の sMAP-FH と MAp44-FH レベルの測定は ELISA で行った．Maxisorp plate(Nunc)へ 0.1M Carbonate Buffer(pH 9.6)で希釈した Anti PA tag, Rat Monoclonal Antibody(Wako)を 0.5 μg/well 加え 4℃で一晩静置した後，PBS/0.1%Tween で wash し 1%BSA/PBS で 1 時間ブロッキングした．PBS/0.1%Tween での wash 後，0.1%BSA/PBS で希釈した血清サンプル，スタンダードを well に添加し室温で 30 分静置した．再度 wash し，Anti PA tag, Rat Monoclonal Antibody, Peroxidase conjugated(Wako)を 5000 倍希釈して well へ添加し室温で 30 分静置した．wash 後，TMB Peroxidase Substrate(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.)で発色させリン酸で反応を停止し，VARIOSKAN LUX(Thermo Scientific)で 450 nm の吸光度を測定した．

***in vivo* における sMAP-FH または MAp44-FH と MBL/ficolins との complex 形成の確認**

sMAP-FH と MAp44-FH 腹腔内投与後のマウス血清中で，リコンビナントと MBL または Ficolin が complex を形成していることを確認するため，mannan ま

たは Anti-ficolin A rabbit IgG を coat した microtiter plate を用いて ELISA を行った．Mannan coated plate は上で述べたものを用いた．Anti-ficolin A rabbit IgG は 1 μg/well となるように 0.1M Carbonate Buffer(pH 9.6)で希釈し，microtiter plate に添加して 4℃で一晩静置し，1%BSA/PBS でブロッキングした．マウス血清は 2%となるよう 5mM $CaCl_2$/TBS buffer で希釈し，それぞれのプレートへ添加した．また，遊離型の sMAP-FH または MAp44-FH による影響を除外するため，投与後各時間の sMAP-FH，MAp44-FH 血中濃度に相当するように 5mM $CaCl_2$/TBS buffer で希釈した sMAP-FH または MAp44-FH のみを添加した well も準備した．室温で 30 分反応させた後，5mM $CaCl_2$/TBS/0.1%Tween buffer で wash し，5000 倍に希釈した Anti PA tag, Rat Monoclonal Antibody, Peroxidase conjugated を well に添加し室温で 30 分静置した．wash 後，TMB Peroxidase Substrate で発色させリン酸で反応を停止し，VARIOSKAN LUX で 450 nm の吸光度を測定した．

Flow cytometry を用いた zymosan assay (*in vivo*)

sMAP-FH，MAp44-FH 投与後のマウス血清を total 10%となるように 10mM $CaCl_2$/10mM $MgCl_2$/TBS buffer で希釈し 100 μg の Zymosan A(Sigma)と混合し 10 分間 37℃で反応させた．10mM EDTA/TBS/0.05%Tween buffer を加えて反応を停止させ，10mM EDTA/TBS/0.05% Tween buffer，PBS でそれぞれ 2 回ずつ wash した後，C3 deposition の検出のために anti C3 mouse FITC conjugated(Cappel)を 30 倍希釈して添加し，氷上で 30 分反応させた．PBS で 4 回 wash した後，FACS(BD Biosciences)で蛍光の測定を行った．

マンナンコートプレート上での C4 deposition assay

sMAP-FH と MAp44-FH 腹腔内投与後のマウス血清を total 2%となるように 1%BSA/5mM $CaCl_2$/TBS buffer で希釈し，上で述べた mannan-coated microtiter plate

へ添加し 37℃で 30 分間反応させた．対照として，PBS 腹腔内投与後の血清も同様に 2%に希釈し反応させた．反応後，5mM $CaCl_2$/TBS/0.1%Tween buffer で wash し，1000 倍に希釈した C4, Human, Natural(Hycult Biotech)を well に添加し氷上で 30 分静置した．Wash 後，Anti-human C4 goat IgG(Cappel)を 5000 倍希釈したものを 1 次抗体，Anti-goat IgG biotinylated(Dako)を 10000 倍に希釈したものを 2 次抗体とし，それぞれ室温で 30 分反応させた．Wash 後，VECTASTAIN ABC Standard kit(Vector Laboratories)を混合したものを well に添加して室温で 30 分反応させ wash した後，TMB Peroxidase Substrate で発色，リン酸で反応を停止し，VARIOSKAN LUX で 450 nm の吸光度を測定した．

統計解析

有意差検定は 2 群間で unpaired t test を用いて行い，$P < 0.05$ を有意差ありとした．統計ソフトは Prism 6 を使用した．

結果

sMAP-FH ，MAp44-FH，sMAP リコンビナントタンパクの作製と確認

sMAP-FH(図 6A)，MAp44-FH(図 6B)，sMAP(図 6C)を設計し，CHO 細胞へトランスフェクションした. 細胞の培養上清から精製したタンパクは SDS-PAGE, Western blotting と Mass spectrometry で確認した．Instant blue 染色を行った SDS-PAGE では，それぞれシングルバンドとして検出され，高い精度で精製できていることが確認出来た(図 7A)．Western blotting では抗 MASP-2 ポリクローナル抗体では sMAP-FH と sMAP，抗 MASP-1/3 ポリクローナル抗体では MAp44-FH, 抗 FH ポリクローナル抗体では sMAP-FH と MAp44-FH が検出されることを確認した (図 7B，C，D)．さらに，Mass spectrometry でも sMAP-FH ，MAp44-FH, sMAP が正確に作製されていることを確認した(図は示さず).

マンナンコートプレート上，zymosan 上での C3 deposition 抑制効果 (*in vitro*)

作製したリコンビナントタンパク sMAP-FH の *in vitro* でのレクチン経路阻害作用を検証するため，mannan-coated microtiter plate での C3 deposition を測定した．グラフの縦軸に吸光度，横軸に添加したリコンビナントの濃度を示した．sMAP-FH は濃度依存性に C3 deposition の阻害作用を有しており，250 nM～1000 nM の条件において，sMAP-FH は sMAP 単独に比べ有意に C3 deposition を抑制していた．さらに，既報でレクチン経路と第 2 経路の阻害作用が確認されている MAp44-FH も濃度依存性に C3 deposition 阻害作用を示したが，sMAP-FH の方がやや阻害作用が強く，1000 nM では有意差を持っていた (図 8)． 第二経路の阻害作用を検証するために Flow cytometry を用いた zymosan assay を行った．グラフは縦軸に zymosan particle 数，横軸に FITC で検出された C3 deposition を示した．赤のラインで示した zymosan only が血清と反応させていない negative

control，青のラインで示した WT がリコンビナントを添加していない血清のみの結果で positive control である. 1000 nM の条件下で sMAP-FH で sMAP, MAP44-FH よりもピークが左にシフトしており，MAp44-FH，sMAP よりも C3 deposition を抑制していることが明らかとなった(図 9A)．MFI 値で比較すると，sMAP-FH と MAp44-FH で recombinant を添加していない血清より有意に C3 deposition が低下していた. さらに, sMAP 単独と MAp44-FH に比べて有意に sMAP-FH で C3 deposition が低下していた(図 9B).

sMAP-FH と MAp44-FH の血中濃度推移

sMAP-FH，MAp44-FH とも血中濃度は腹腔内投与後 2〜4 時間で最初のピークを迎え，その後漸減していき，48 時間後には最高値の 10%程度に減少した(図 10).

sMAP-FH と MAp44-FH の *in vivo* における MBL/Ficolin との complex 形成

それぞれのリコンビナント腹腔内投与後の血清を用いて, sMAP-FH と MAp44-FH が MBL と complex を形成していること(図 11A)，sMAP-FH と MAp44-FH が Ficolin と complex を形成していること(図 11B)を確認した．縦軸に吸光度，横軸に解析に用いた血清の採取時間を示した．また，グラフ内の吸光度は，各時間の血中濃度に相当する濃度の sMAP-FH または MAp44-FH のみを添加した well での吸光度を差し引いたものを示した．mannan をコートしたプレートでは MBL と complex を形成した sMAP-FH または MAp44-FH を，Anti-ficolin A rabbit IgG をコートしたプレートでは Ficolin A と complex を形成した sMAP-FH または MAp44-FH をサンドイッチ法で検出している．sMAP-FH または MAp44-FH の血中濃度の推移と，MBL または Ficolin との complex 量はほぼ連動しており，4〜8 時間程度で complex 量はピークに達し，その後漸減していた.

マンナンコートプレート上での C4 deposition 抑制効果 (*in vivo*)

sMAP-FH または MAp44-FH を腹腔内投与した後に採取したマウス血清を用いて mannan-coated microtiter plate を用いて C4 deposition の阻害作用を検証した．リコンビナント投与前の血清での C4 deposition の吸光度を 100%とし, sMAP-FH 群，MAp44-FH 群での測定結果を比率で示した．*in vivo* での状態を反映していると思われる sMAP-FH の腹腔内投与後の血清では，各時間における sMAP-FH の血中濃度と連動して C4 deposition の阻害作用が認められた．一方, MAp44-FH は血中で MBL，ficolin と complex を 形成していることが確認されたものの，C4 deposition はほとんど阻害されない結果であった(図 12).

zymosan 上での C3 deposition 抑制効果(*in vivo*)

in vivo での sMAP-FH, MAp44-FH の第二経路阻害作用を検証するため, sMAP-FH と MAp44-FH を腹腔内投与した後に採取したマウス血清を用いて，Flow cytometry を使用した zymosan assay を行い C3 depositon の阻害作用を確認した．縦軸に zymosan particle 数，横軸に FITC で検出された C3 deposition を示した．赤のラインで示した zymosan only が血清と反応させていない negative control，オレンジのラインで示した pre がリコンビナントを投与する前の血清のみの結果で positive control である．C3 deposition の阻害作用は，各時間における sMAP-FH の血中濃度と連動し，血中濃度がピークに達する投与 4 時間後でピークが左に最もシフトしており，C3 deposition が抑制されていた(図 13A)．他の時間の血清に関しても，血中濃度に連動して C3 deposition の抑制効果が認められていた．一方，MAp44-FH 投与後の血清で同様に zymosan particle 上の C3 deposition を測定すると，血中濃度と連動して若干 C3 deposition が低下しているものの，その効果は sMAP-FH と比べると弱いものであった (図 13B). それぞれの結果を MFI 値で比較すると，腹腔内投与後 1，2，4 時間後で MAp44-FH に比べ，sMAP-FH の方が有意に C3 deposition を抑制していた(図 13C)

考察

補体は，病原微生物などの異物から自己を守るために必要な自然免疫機構であるが，過剰な活性化により増悪する病態が存在することが明らかになってきた．これまで，補体の活性化が病勢の増悪に関与するいくつかの疾患モデルマウスにおいて，レクチン経路や第二経路を阻害するタンパクの投与が治療効果を発揮するケースが報告されてきた．その例として，レクチン経路の活性化に関与する MASP-1 の競合阻害因子として作用する MAp44 は，心筋虚血のモデルマウスや，関節炎モデルマウスにおいて治療薬としての可能性が示されている(20) (21)．また，第二経路を選択的に阻害する H 因子(FH)と補体受容体 CR2 との融合タンパクである CR2-FH は，SLE モデルマウスの糸球体腎炎の治療に有効であることが示されている(27, 28)．さらに，MAp44 と H 因子(FH)の融合タンパクである MAp44-FH は，*in vitro* においてレクチン経路と第二経路の阻害作用を有することも報告された(24)．

一方，MASP-2 は MASP-1 と共にレクチン経路の活性化に作用する補体因子であるが，MASP-2 ノックアウトマウスにおいて心虚血再灌流モデルを作製すると心機能障害が抑制されるとの報告や，MASP-2 抗体の投与により脳血流傷害による影響が軽減されたとの報告がある(22) (23)．MASP-2 は生体内で主に MASP-1 により活性化されるが，自己活性化能も有しており，さらに単独で C2 と C4 を分解して C3 転換酵素である C4b2a を形成することができる点が，MASP-1 と大きく異なる(4) (29)．そのため，レクチン経路の活性化を抑制する場合，レクチン経路の活性化に必須である MASP-2 を阻害する手法は， MASP-1 を阻害する手法より効率が良いと考えられる．これまで，MASP-1/3 のスプライシングバリアントである MAp44 は治療薬としての可能性が示唆されているが，MASP-2 のスプライシングバリアントである sMAP の治療応用の可能性を示した報告は未だない．そこで今回は，MASP-1 の競合的阻害因子である MAp44 よりも MASP-2 の競合的阻害因子である sMAP の方がレクチン経路の阻害作用が高いのではないかと考え，sMAP の新規抗補体薬としての可能性を検証することとし

た．さらに，補体経路が病態の増悪に関与している疾患において，炎症の起点であるレクチン経路と増幅経路である第二経路両方を阻害できれば，より強い炎症抑制効果が得られると考え，第二経路の制御因子である H 因子(FH)を sMAP と融合させた sMAP-FH を作製した．

私が作製した sMAP-FH は sMAP 全長と FH の SCR1-5 をグリシンリンカー配列で挟んで融合させたタンパクであり，レクチン経路と第二経路の活性化が開始されて傷害を受けた細胞表面局所で特異的に作用することを想定した．sMAP-FH の作用機序として，実験結果より MBL と sMAP-FH が血清中で complex を形成することは確認されており(図 11A)，まず sMAP-FH と MBL の complex が傷害を受けた細胞の表面へ誘導され，傷害された細胞表面局所で，レクチン経路の活性化が阻害される．さらに，sMAP に融合させた FH がすでに細胞表面に沈着している C3bBb を C3b と Bb に解離失活し，次に I 因子と共に C3b を iC3b へ分解することで，第二経路の活性化も阻害される．この時，sMAP と FH の間にグリシンリンカー配列があることで FH の可動性が上昇し，より C3b へ作用しやすくなることを期待した．

最初に sMAP-FH による補体経路の阻害作用を検証するため，*in vitro* での再構築実験として mannan-coated microtiter plate を用いた C3 deposition assay を行った．この実験は，プレート上のマンナンへの血清中の MBL の結合でレクチン経路が開始され，続いて引き起こされる第二経路の活性化でプレート上に結合する C3 を検出することで，レクチン経路と第二経路の両者の総合的な活性化能を評価するものである．血清中で sMAP-FH と MBL の complex を形成させるため，2%の WT マウス血清と sMAP-FH を混合し 37℃で 1 時間 pre-incubation し実験に供した．比較対象として，sMAP 単独または MAp44-FH を血清に混合した．その結果，sMAP-FH 添加血清では sMAP 単独の添加血清と比較して sMAP-FH の濃度依存性に C3 depositon の有意な抑制効果が示された．一方，MAp44-FH 添加血清でも濃度依存性に C3 deposition の抑制効果が認められたが，1000 nM 添加血清では sMAP-FH で抑制効果が強かった．本実験では sMAP 単独の添加血清でもレクチン経路の阻害作用が示されると考えられるが，今回の実験系では第二経

路の活性化も生じたため sMAP 単独では C3 deposition が抑制しきれなかったと考えられた．以上の結果から，sMAP-FH と MAp44-FH は *in vitro* において，レクチン経路と第二経路の阻害作用を有すると考えられた．

in vitro での第二経路の阻害作用の検証として Flow cytometry を用いた zymosan assay も行った．酵母の細胞壁を主成分とする zymosan は，その表面で C3 の加水分解を触媒する作用があり，zymosan に結合した C3 を検出することで，第二経路の活性化能を評価することができる．実験の結果，sMAP-FH 添加血清では sMAP 単独，または MAp44-FH 添加血清に比べてより強い zymosan への C3 結合の抑制効果が示された．第二経路の阻害作用は H 因子(FH)部位が有しているため，sMAP と比較して sMAP-FH の方が第二経路の抑制効果が優れていることは論理上矛盾しない．しかし今回， FH を同様に有する MAp44-FH より sMAP-FH の方がより強い第二経路の阻害作用を示した．酵母の細胞壁を主成分とする zymosan は，その表面にマンナンや N-アセチルアセチルグルコサミンを有しているため，この実験系も第二経路のみならずレクチン経路の活性化も一部反映していることが想定される．今回の実験では，sMAP-FH の sMAP 部分が MAp44-FH の MAp44 部分よりも効率よくレクチン経路を阻害したために，それに接続する第二経路もより強く抑制された結果が反映されたのではないかと考えた．

次に，*in vivo* でのレクチン経路と第二経路の阻害作用の検証として sMAP-FH と MAp44-FH を腹腔内投与した後に眼窩静脈叢から経時的に採取したマウス血清を用いて，mannan-coated plate を用いた C4 deposition assay と，Flow cytometry を用いた zymosan assay を行った．その結果，C4 deposition assay，zymosan assay ともに投与後の血清で抑制効果が認められ，sMAP-FH は *in vivo* において血中濃度に連動してレクチン経路と第二経路の両方の阻害作用を有することが確認された．また，血清中での sMAP-FH と MBL，または Ficolin との complex 形成量も sMAP-FH 血中濃度と連動しており，sMAP-FH によるレクチン経路の阻害作用機序は，MBL または ficolin への複合体形成において MASP-2 に対する競合阻害であると考えられた．一方，MAp44-FH は血中での MBL，ficolin との complex 形成は確認されたものの，レクチン経路阻害作用はほとんど認められず，第二経

路阻害作用も sMAP-FH と比べると弱いものであった．MBL，ficolin と MASP-1，2 が complex を形成する際，MASP-1,2 の CUB1，EGF-like domain が MBL に入り込む．1 個の MBL または ficolin に対して，2 個の MASP が入り込むが，その組み合わせに関しては homodimer であると考えられている(30)．また，sMAP と MAp44 の CUB1, EGF-like domain のアミノ酸の homology 検索を施行すると，identity は 54%と高くない．今回 *in vivo* での評価において，sMAP-FH の方が MAp44-FH よりも強いレクチン経路阻害作用を有していたが, MASP-2 のスプライシングバリアントである sMAP が MASP-2 と MBL または ficolin との複合体の形成を特異的に阻害していると考えて矛盾しない．MAp44-FH が *in vivo* においてレクチン経路阻害作用を示さなかった原因としては，MAp44 では MASP-2 を阻害できず, MASP-2 の自己活性化によりレクチン経路が活性化されたのではないかと考えた.

sMAP-FH は強力な補体レクチン経路と第二経路の阻害作用を持ち，今後，レクチン経路や第二経路の活性化が病態の増悪に関与する疾患において，新たな治療薬となる可能性がある. 序論で述べた通り，レクチン経路と第二経路の活性化が関与する疾患として, 臓器の虚血・再灌流障害や加齢黄斑変性などが明らかとなっており, sMAP-FH の良い治療適応と考えられる(13-17). その病態として，酸化ストレスなどによる傷害を受けた細胞表面に露出した新規の自己抗原に自然抗体である IgM が結合し(18)，そこへ MBL-MASP complex が結合することで C4，C2 が分解され，C3 の活性化が起こることでレクチン経路が活性化すると考えられている(19)．レクチン経路に引き続いて第二経路も活性化されることでより強い炎症が惹起される．そこで sMAP-FH が MBL と MASP との complex 形成を競合阻害し，傷害を受けた細胞表面の自然抗体 IgM へ MBL-sMAP-FH complex が結合することでレクチン経路の活性化を阻害し，さらに FH がすでに細胞表面に沈着している C3bBb を C3b と Bb に解離失活し，次に I 因子と共に C3b を iC3b へ分解することで，第二経路の活性化も阻害される．加齢黄斑変性に関しては，疾患特異的な FH の SNP が報告されており，FH の C3b と結合する部位の機能異常により FH が正常に機能しないことが病態の増悪に関与してい

ると考えられている(31-33)．今回作成した sMAP-FH は，sMAP 部分がレクチン経路を阻害するだけではなく，MBL と complex を形成し，炎症が惹起されている部位へ到達する役割も担っている．加齢黄斑変性の病態において，sMAP-FH は炎症部位で FH を機能させることができる点でも, 治療薬として有効である可能性があると考えられた.

今回，第二経路の制御因子である FH が含まれた融合タンパクを作成したが，第二経路は関与するがレクチン経路の関与が証明されていない aHUS や MPGN においては，sMAP-FH の効果は期待できないと考えられる．その根拠として，今回の融合タンパクが有するのは FH の SCR1-5 のみで C3b へ結合する部分は有しておらず，FH 単独で炎症惹起部位へ到達することができないことが挙げられる．レクチン経路が関与していれば，MBL と結合した sMAP 部分が炎症部位へ到達する役割も担うことができるが, 第二経路のみの関与の場合, その効果が期待できないためである.

加えて, 治療薬としての価値を高めるには, 血中濃度を長時間維持させることが今後の課題である．今回の実験では腹腔内投与後の効果持続時間は長くても 24 時間程度であり, 48 時間後にはほぼクリアランスされてしまった. 既報でも，融合タンパクという点では今回と同様である CR2-FH の半減期は 8 時間程度である(34)．これまでに日米欧で承認された融合タンパク質医薬品は，受容体，サイトカイン, ペプチド, 酵素などと抗体の Fc 部分を融合させたものが多い(35)．現在，abatacept として臨床応用されている CTLA4-Ig 融合タンパクは rapid initial elimination の後に prolonged second phase が続き，その半減期は約 30 時間である(36)．また，補体全経路をブロックする Crry (complement receptor-related gene y)-Ig 融合タンパクを作製した報告では，その prolonged second phase の半減期は約 40 時間である(37)．抗体の Fc 部分と融合させることでタンパクが安定化し，血中半減期が延長すると考えられ，今後，sMAP-FH を治療薬として使用するために Ig との融合タンパクとしタンパクを安定化させることは一つの選択肢であると考えられた.

本研究では，補体レクチン経路と第二経路の両方の阻害作用を有する sMAP-

FH を作製し, その阻害作用を *in vitro* と *in vivo* でも証明することが出来た点で, 新規性が高いと考えられた．また，sMAP-FH はすでに報告されている MAp44-FH よりも強いレクチン経路，第二経路阻害作用を有し，優位性もあると考えられた.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，指導教官として実験計画から日々の実験方法にいたるまで終始丁寧なご指導，ご助言を賜りました福島県立医科大学免疫学講座，関根英治教授，故・高橋実准教授に深厚なる誠意を表します．また，度重なるディスカッションを通していつも的確なご助言を頂きました町田豪学内講師，坂本夏美助教，大森智子助教，林学助手，石田由美主任医療技師，貴重な研究資料を提供してくださいました博士研究員の遠藤雄一先生に深く感謝いたします．また，今回作製したリコンビナントタンパクの解析を快く引き受けていただきました生体物質研究部門の本間好教授と博士研究員の鈴木俊幸先生に深く感謝申し上げます．最後に，博士課程への進学の機会を与えて頂き，研究に専念出来る環境を与えて頂きました福島県立医科大学消化器内科学講座，大平弘正教授に深い感謝の意を表して謝辞と致します．

参考文献

1. Matsushita, M., Y. Endo, S. Taira, Y. Sato, T. Fujita, N. Ichikawa, M. Nakata, and T. Mizuochi. 1996. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *The Journal of biological chemistry* 271: 2448-2454.
2. Matsushita, M., S. Thiel, J. C. Jensenius, I. Terai, and T. Fujita. 2000. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165: 2637-2642.
3. Takahashi, M., D. Iwaki, K. Kanno, Y. Ishida, J. Xiong, M. Matsushita, Y. Endo, S. Miura, N. Ishii, K. Sugamura, and T. Fujita. 2008. Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180: 6132-6138.
4. Wallis, R., N. J. Lynch, S. Roscher, K. B. Reid, and W. J. Schwaeble. 2005. Decoupling of carbohydrate binding and MASP-2 autoactivation in variant mannose-binding lectins associated with immunodeficiency. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175: 6846-6851.
5. Iwaki, D., K. Kanno, M. Takahashi, Y. Endo, M. Matsushita, and T. Fujita. 2011. The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187: 3751-3758.
6. Takahashi, M., Y. Ishida, D. Iwaki, K. Kanno, T. Suzuki, Y. Endo, Y. Homma, and T. Fujita. 2010. Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *The Journal of experimental medicine* 207: 29-37.
7. Degn, S. E., A. G. Hansen, R. Steffensen, C. Jacobsen, J. C. Jensenius, and S. Thiel. 2009. MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183: 7371-7378.

8. Degn, S. E., L. Jensen, T. Olszowski, J. C. Jensenius, and S. Thiel. 2013. Co-complexes of MASP-1 and MASP-2 associated with the soluble pattern-recognition molecules drive lectin pathway activation in a manner inhibitable by MAp44. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191: 1334-1345.
9. Iwaki, D., K. Kanno, M. Takahashi, Y. Endo, N. J. Lynch, W. J. Schwaeble, M. Matsushita, M. Okabe, and T. Fujita. 2006. Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177: 8626-8632.
10. Kopp, A., M. Hebecker, E. Svobodova, and M. Jozsi. 2012. Factor h: a complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. *Biomolecules* 2: 46-75.
11. Morgan, H. P., C. Q. Schmidt, M. Guariento, B. S. Blaum, D. Gillespie, A. P. Herbert, D. Kavanagh, H. D. Mertens, D. I. Svergun, C. M. Johansson, D. Uhrin, P. N. Barlow, and J. P. Hannan. 2011. Structural basis for engagement by complement factor H of C3b on a self surface. *Nat Struct Mol Biol* 18: 463-470.
12. Dragon-Durey, M. A., V. Fremeaux-Bacchi, C. Loirat, J. Blouin, P. Niaudet, G. Deschenes, P. Coppo, W. Herman Fridman, and L. Weiss. 2004. Heterozygous and homozygous factor h deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulonephritis: report and genetic analysis of 16 cases. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15: 787-795.
13. Hart, M. L., K. A. Ceonzo, L. A. Shaffer, K. Takahashi, R. P. Rother, W. R. Reenstra, J. A. Buras, and G. L. Stahl. 2005. Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174: 6373-6380.
14. Morrison, H., J. Frye, G. Davis-Gorman, J. Funk, P. McDonagh, G. Stahl, and L. Ritter. 2011. The contribution of mannose binding lectin to reperfusion injury after ischemic stroke. *Current neurovascular research* 8: 52-63.
15. Jordan, J. E., M. C. Montalto, and G. L. Stahl. 2001. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation* 104: 1413-1418.
16. Chan, R. K., S. I. Ibrahim, K. Takahashi, E. Kwon, M. McCormack, A. Ezekowitz, M. C. Carroll, F. D. Moore, Jr., and W. G. Austen, Jr. 2006. The differing roles of the classical and mannose-binding lectin complement pathways in the events

following skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177: 8080-8085.

17. Rohrer, B., B. Coughlin, K. Kunchithapautham, Q. Long, S. Tomlinson, K. Takahashi, and V. M. Holers. 2011. The alternative pathway is required, but not alone sufficient, for retinal pathology in mouse laser-induced choroidal neovascularization. *Molecular immunology* 48: e1-8.
18. Holers, V. M., S. Tomlinson, L. Kulik, C. Atkinson, B. Rohrer, N. Banda, and J. M. Thurman. 2016. New therapeutic and diagnostic opportunities for injured tissue-specific targeting of complement inhibitors and imaging modalities. *Semin Immunol*.
19. Joseph, K., L. Kulik, B. Coughlin, K. Kunchithapautham, M. Bandyopadhyay, S. Thiel, N. M. Thielens, V. M. Holers, and B. Rohrer. 2013. Oxidative stress sensitizes retinal pigmented epithelial (RPE) cells to complement-mediated injury in a natural antibody-, lectin pathway-, and phospholipid epitope-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 288: 12753-12765.
20. Pavlov, V. I., M. O. Skjoedt, Y. Siow Tan, A. Rosbjerg, P. Garred, and G. L. Stahl. 2012. Endogenous and natural complement inhibitor attenuates myocardial injury and arterial thrombogenesis. *Circulation* 126: 2227-2235.
21. Banda, N. K., G. Mehta, T. R. Kjaer, M. Takahashi, J. Schaack, T. E. Morrison, S. Thiel, W. P. Arend, and V. M. Holers. 2014. Essential role for the lectin pathway in collagen antibody-induced arthritis revealed through use of adenovirus programming complement inhibitor MAp44 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193: 2455-2468.
22. Schwaeble, W. J., N. J. Lynch, J. E. Clark, M. Marber, N. J. Samani, Y. M. Ali, T. Dudler, B. Parent, K. Lhotta, R. Wallis, C. A. Farrar, S. Sacks, H. Lee, M. Zhang, D. Iwaki, M. Takahashi, T. Fujita, C. E. Tedford, and C. M. Stover. 2011. Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 7523-7528.
23. Orsini, F., E. Chrysanthou, T. Dudler, W. J. Cummings, M. Takahashi, T. Fujita, G. Demopulos, M. G. De Simoni, and W. Schwaeble. 2016. Mannan binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) critically contributes to post-ischemic brain injury independent of MASP-1. *Journal of neuroinflammation* 13:

213.

24. Nordmaj, M. A., L. Munthe-Fog, E. Hein, M. O. Skjoedt, and P. Garred. 2015. Genetically engineered fusion of MAP-1 and factor H domains 1-5 generates a potent dual upstream inhibitor of both the lectin and alternative complement pathways. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29: 4945-4955.
25. Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research* 15: 8125-8148.
26. Chen, X., J. L. Zaro, and W. C. Shen. 2013. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews* 65: 1357-1369.
27. Sekine, H., T. T. Kinser, F. Qiao, E. Martinez, E. Paulling, P. Ruiz, G. S. Gilkeson, and S. Tomlinson. 2011. The benefit of targeted and selective inhibition of the alternative complement pathway for modulating autoimmunity and renal disease in MRL/lpr mice. *Arthritis and rheumatism* 63: 1076-1085.
28. Sekine, H., P. Ruiz, G. S. Gilkeson, and S. Tomlinson. 2011. The dual role of complement in the progression of renal disease in NZB/W F(1) mice and alternative pathway inhibition. *Molecular immunology* 49: 317-323.
29. Dobo, J., G. Pal, L. Cervenak, and P. Gal. 2016. The emerging roles of mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) in the lectin pathway of complement and beyond. *Immunological reviews* 274: 98-111.
30. Wallis, R., and R. B. Dodd. 2000. Interaction of mannose-binding protein with associated serine proteases: effects of naturally occurring mutations. *The Journal of biological chemistry* 275: 30962-30969.
31. Hageman, G. S., D. H. Anderson, L. V. Johnson, L. S. Hancox, A. J. Taiber, L. I. Hardisty, J. L. Hageman, H. A. Stockman, J. D. Borchardt, K. M. Gehrs, R. J. Smith, G. Silvestri, S. R. Russell, C. C. Klaver, I. Barbazetto, S. Chang, L. A. Yannuzzi, G. R. Barile, J. C. Merriam, R. T. Smith, A. K. Olsh, J. Bergeron, J. Zernant, J. E. Merriam, B. Gold, M. Dean, and R. Allikmets. 2005. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 7227-7232.
32. Haines, J. L., M. A. Hauser, S. Schmidt, W. K. Scott, L. M. Olson, P. Gallins, K. L. Spencer, S. Y. Kwan, M. Noureddine, J. R. Gilbert, N. Schnetz-Boutaud, A.

Agarwal, E. A. Postel, and M. A. Pericak-Vance. 2005. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308: 419-421.

33. Edwards, A. O., R. Ritter, 3rd, K. J. Abel, A. Manning, C. Panhuysen, and L. A. Farrer. 2005. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308: 421-424.

34. Huang, Y., F. Qiao, C. Atkinson, V. M. Holers, and S. Tomlinson. 2008. A novel targeted inhibitor of the alternative pathway of complement and its therapeutic application in ischemia/reperfusion injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181: 8068-8076.

35. Ruderman, E. M., and R. M. Pope. 2006. Drug Insight: abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nature clinical practice. Rheumatology* 2: 654-660.

36. Linsley, P. S., P. M. Wallace, J. Johnson, M. G. Gibson, J. L. Greene, J. A. Ledbetter, C. Singh, and M. A. Tepper. 1992. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 257: 792-795.

37. Quigg, R. J., Y. Kozono, D. Berthiaume, A. Lim, D. J. Salant, A. Weinfeld, P. Griffin, E. Kremmer, and V. M. Holers. 1998. Blockade of antibody-induced glomerulonephritis with Crry-Ig, a soluble murine complement inhibitor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160: 4553-4560.

図の説明

図 1.　補体活性化における 3 経路.

レクチン経路は Mannose-Binding Lectin(MBL)/Ficolin とセリンプロテアーゼである MASPs(MASP-1,MASP-2,MASP-3)が complex を形成し，病原体表面の糖鎖へ MBL/Ficolin-MASP complex が結合すると C4，C2 の分解が起こり C3 転換酵素である C4b2a が形成され，補体の活性化が開始される．レクチン経路に引き続いて活性化される第二経路は増幅経路であり，第二経路が活性化されることでより強い炎症が惹起されることとなる．

今回，抗補体薬作製に利用した補体制御因子の sMAP，MAp44，FH のそれぞれの制御部位も図に示した.

図 2.　Masp1 遺伝子と Masp2 遺伝子によるスプライシングバリアント

(A) Masp1 遺伝子からは MASP-1 と MASP-3，MAp44 が転写産物として産生される．全て共通の MBL 結合部位を持ち，MASP-1 と MASP-3 は異なるセリンプロテアーゼを有する．MAp44 はセリンプロテアーゼを持たず，MASP-1 と MASP-3 の制御因子として働く.

(B) Masp2 遺伝子からは MASP-2 と sMAP が転写され，sMAP は MASP-2 の MBL 結合部位の一部のみで構成され酵素活性部位も持たない．sMAP は MASP-2 の制御因子として働く.

図 3.　補体制御因子 H 因子の構造と機能

(A) H 因子は 20 個の SCR ドメインで構成され，SCR1～4 が補体制御活性を有し，C3b が結合している細胞表面へは SCR19, 20 が細胞接着部位として機能する．

(B) 細胞表面へ接着した H 因子は，強力な C3 転換酵素である C3bBb を C3b と Bb に解離失活させ，さらに，I 因子と共に C3b を iC3b に分解する．

図 4.　酸化ストレス等による細胞傷害時の補体活性化機構と sMAP-FH による

レクチン経路と第二経路の抑制のメカニズム

(A) 傷害を受けた細胞表面でのレクチン経路，第二経路活性化の模式図．MBL と complex を形成した MASP-1，MASP-2 が，細胞表面に露出した自己抗原に付着した自然抗体 IgM を認識することでレクチン経路が活性化し，C3 が活性化されて細胞表面へ C3b が結合する．それに引き続いて第二経路が活性化し組織傷害が引き起こされる．

(B) sMAP-FH は MASP-1，MASP-2 と競合置換して MBL と complex を形成し，レクチン経路の活性化を阻害する．さらに，FH がすでに細胞表面に付着した C3bBb を C3b と Bb へ分解し，さらに C3b を iC3b に失活させることで第二経路の活性化も阻害する．

図 5.　sMAP-FH の作成方法

マウス肝より作製した cDNA より sMAP と FH を PCR でクローニングし，TOPO　ベクターへ組み込んでシークエンスを確認した．得られた sMAP 又は FH をコードする塩基配列を保持するベクターを鋳型に，sMAP と FH を接続するリンカー配列付加プライマーを用いて，マウス sMAP とマウス H 因子の cDNA を PCR 法で増幅した．その後，得られた cDNA を

発現ベクターである pCAG-Bsd PA tag-C へ InFusion 法を用いて組み込んだ.

図 6.　sMAP-FH と MAp44-FH の模式図

N 末端側に(A)sMAP 全長(CUB1，EGF like domain)，または(B)MAp44 全長(CUB1，EGF like domain，CUB2，CCP1)，C 末端側に FH の SCR1-5 を有し，間にグリシンリンカー配列(GGGGS)を 4 つ持つ融合タンパクを設計した．また，(C)sMAP 全長のみのタンパクも作製した．全てのリコンビナントタンパクの C 末端側に PA タグが付加されている．それぞれのアミノ酸配列と，相当する分子につき図示した.

図 7.　作製した sMAP-FH の発現確認

sMAP-FH を組み込んだベクターをトランスフェクションした CHO 細胞の培養上清から精製した sMAP-FH を， SDS-PAGE で展開した．(A) Instant blue 染色を行うと，sMAP-FH，MAp44-FH，sMAP それぞれが単一のバンドとして検出された．精製した 3 つのリコンビナントタンパクを SDS-PAGE で展開したポリアクリルアミドゲルを PVDF 膜へ転写し，(B) 抗 MASP-2 抗体，(C)抗 MASP-1/3 抗体，(D) 抗 FH 抗体で Western blotting を行った．抗 MASP-2 抗体では sMAP-FH と sMAP が，抗 MASP-1/3 抗体では MAp44-FH が，抗 FH 抗体では sMAP-FH と MAp44-FH がそれぞれ検出された.

図 8.　*in vitro* における sMAP-FH による C3 deposition 抑制効果

mannan をコートした 96 well プレートに WT mouse の血清にリコンビナントタンパク(sMAP-FH，MAp44-FH，sMAP-Ig)を添加混合したものを mannan コートプレート上で 20 分間反応させた後の C3 deposition を HRP conjugated anti-mouse C3 抗体で検出した．縦軸が吸光度(OD 450 nm)，横軸が添加したリコンビナントタンパクの量を示す．リコンビナントタンパク

が 0 nM の点の吸光度は，well に WT 血清のみを添加した時の結果を示している．sMAP-FH，MAp44-FH 添加血清ではともに濃度依存性に C3 deposition が減少し，その効果に有意差は認められなかった．250 nM 添加血清において sMAP より sMAP-FH の方が，500 nM 添加血清と 1000 nM 添加血清において sMAP より sMAP-FH と MAp44-FH の方が有意に C3 deposition を抑制していた．$P<0.05$(n=3)．また，1000 nM 添加血清においては MAp44-FH より sMAP-FH の方が有意に C3 deposition を抑制していた．

図 9.　*in vitro* における Flow cytometry を用いた zymosan assay

(A)10%の WT マウス血清に sMAP-FH，sMAP，MAp44-FH をそれぞれ 1000 nM となるように添加混合し，zymosan と 10 分間反応させた．zymosan のみの negative control を赤のグラフ，WT 血清のみ(recombinant(-))の positive control を緑のグラフで示した．sMAP，MAp44-FH 添加血清も recombinant(-)血清に比べるとピークが左へシフトしており C3 deposition が抑制されているが，sMAP-FH 添加血清の方がより C3 deposition を抑制していた．(B)同実験の結果を MFI 値で示した．

図 10.　sMAP-FH と MAp44-FH のマウス腹腔内投与後の血中濃度の推移

(A)sMAP-FH 0.5 mg(8.62 nmol)と(B)MAp44-FH 0.69 mg(8.62 nmol)を WT mouse の腹腔内に投与した後の血中濃度の変化．どちらのリコンビナントも最初のピークを 2〜4 時間で迎え，以後も時間経過とともに減少し 48 時間後にはほぼクリアランスされていた．(n=3).

図 11.　sMAP-FH, MAp44-FH と FicolinA，MBL の complex 形成

sMAP-FH または MAp44-FH を腹腔内投与した後に経時的に採血したマウスの血清を，(A)mannan，(B)抗 Ficolin A 抗体をコートした 96 well プレートに添加し，sMAP-FH または MAp44-FH と Ficolin A，MBL が complex

を形成していることを HRP conjugated anti-PA 抗体で検出した．sMAP-FH または MAp44-FH の血中濃度に連動して complex の量も経時的に変化していた．

図 12.　sMAP-FH または MAp44-FH 投与後血清での C4 deposition 抑制効果

mannan をコートした 96 well プレートに(A)sMAP-FH 投与後のマウス血清または(B)MAp44-FH 投与後のマウス血清を加え 30 分反応させた後の C4 deposition を anti-C4 goat IgG(1 次抗体)，Anti-goat IgG biotinylated (2 次抗体)で検出した．縦軸では，各リコンビナントの投与前の血清での C4 deposition(OD 450 nm)を 100%とした時の，各時間での C4 deposition を%で示した．sMAP-FH 投与後の血清では，血中濃度に連動して C4 deposition 抑制効果が認められた．MAp44-FH 投与後の血清では C4 deposition 抑制効果が認められなかった(n=3).

図 13.　sMAP-FH または MAp44-FH 投与後血清での C3 deposition 抑制効果

(A)sMAP-FH または(B)MAp44-FH を腹腔内投与した後に経時的に採血したマウスの血清で，Flow cytometry を用いた Zymosan assay による C3 deposition 抑制効果を確認した．sMAP-FH 投与群では 1 時間後の血清から C3 deposition は減少し，4 時間で最も減少した．その後は徐々に C3 deposition 抑制効果は薄れ，48 時間後にはほぼ投与前の血清と同等の結果となった．sMAP-FH の血中濃度に連動して C3 deposition 抑制効果も経時的に変化していた．一方，MAp44-FH では 4 時間後と 24 時間後にやや C3 deposition 抑制効果は認められるが，他の時間では投与前の血清と比べて明らかな C3 deposition 抑制効果は認められなかった．(C)各リコンビナント投与前の血清での C3 deposition(MFI)を 100％とした時の各時間での C3 deposition を%で示した．投与後，1，2，4 時間で MAp44-FH に比べ sMAP-FH で有意に C3 deposition が抑制されていた．

図1

古典経路

抗原-抗体複合体

C1q

レクチン経路

病原体上の糖鎖

sMAP

MBL/ficolin

MAp44

第二経路

微生物細胞壁など

C3(H_2O)

C1r→C1s

MASP-2←MASP-1

C4

C2

C4a

C2b

C4b

C2a

pro-fD

MASP-3→

D因子

C3a

C3b⊣H因子+I因子

B因子

Ba

増幅経路

C3bBb

Properdin

H因子

C3

C4b2a→

C3a

C3bBbP

C4b2a3b

C3b→

C3bBb3b

C5

C5a

C5b

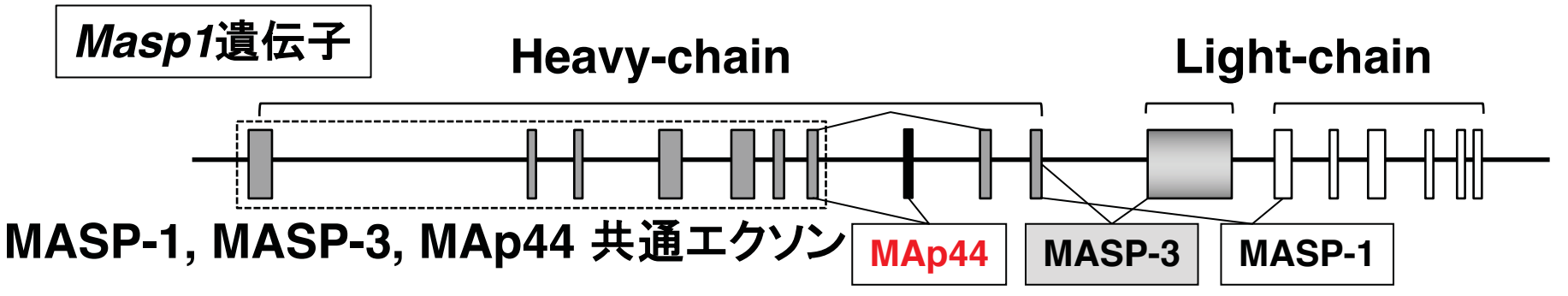
C6,C7,C8,C9

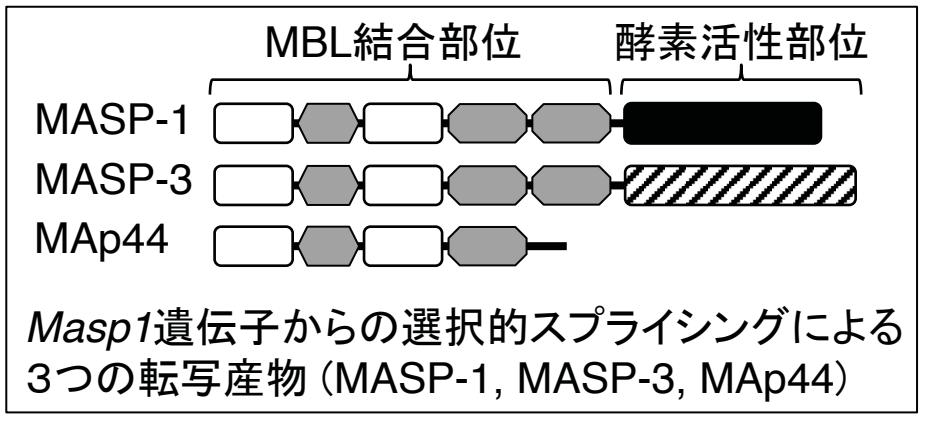
後期(溶解)経路

膜侵襲複合体(C5b-9)の形成

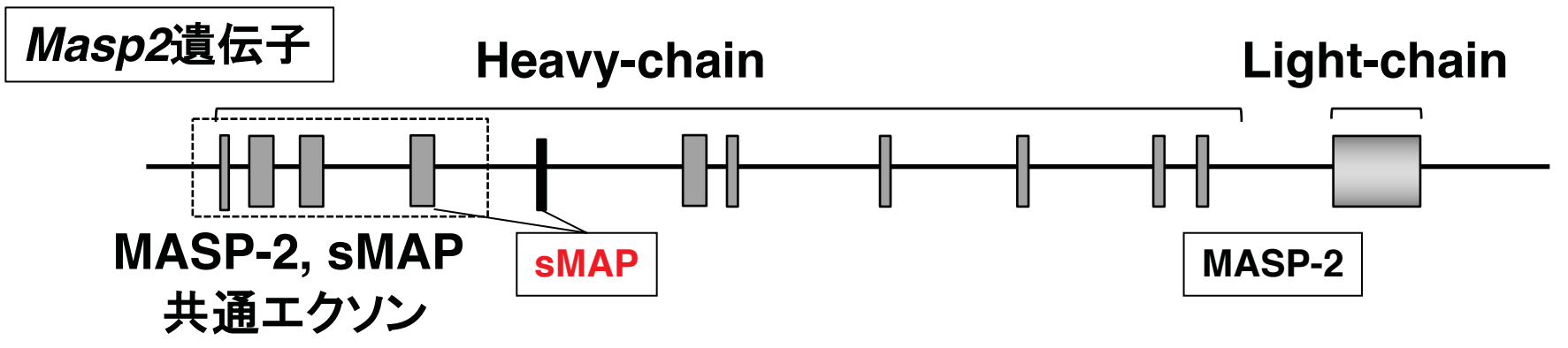
図2

A


Masp1遺伝子
Heavy-chain
Light-chain
MASP-1, MASP-3, MAp44 共通エクソン
MAp44
MASP-3
MASP-1


MBL結合部位
酵素活性部位
MASP-1
MASP-3
MAp44
Masp1遺伝子からの選択的スプライシングによる
3つの転写産物（MASP-1, MASP-3, MAp44）

B


Masp2遺伝子
Heavy-chain
Light-chain
MASP-2, sMAP
共通エクソン
sMAP
MASP-2

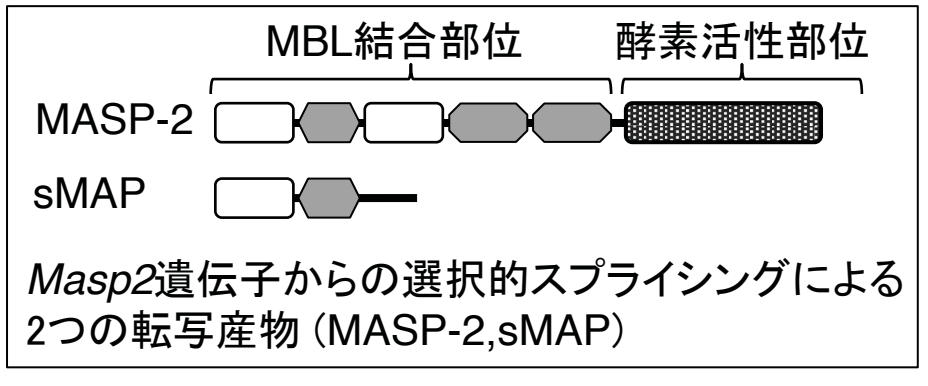

MBL結合部位
酵素活性部位
MASP-2
sMAP
Masp2遺伝子からの選択的スプライシングによる
2つの転写産物（MASP-2,sMAP）

図3

A

補体制御活性部位　　細胞表面への接着部位

B

① C3bBbをC3bとBbに解離失活　　② I因子と共にC3bをiC3bに分解

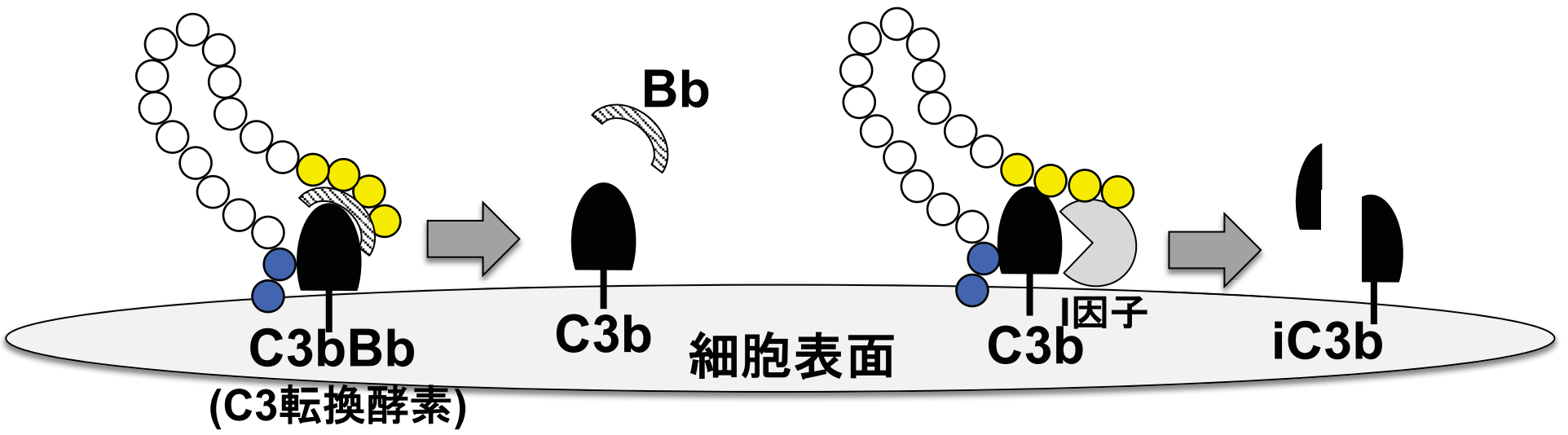
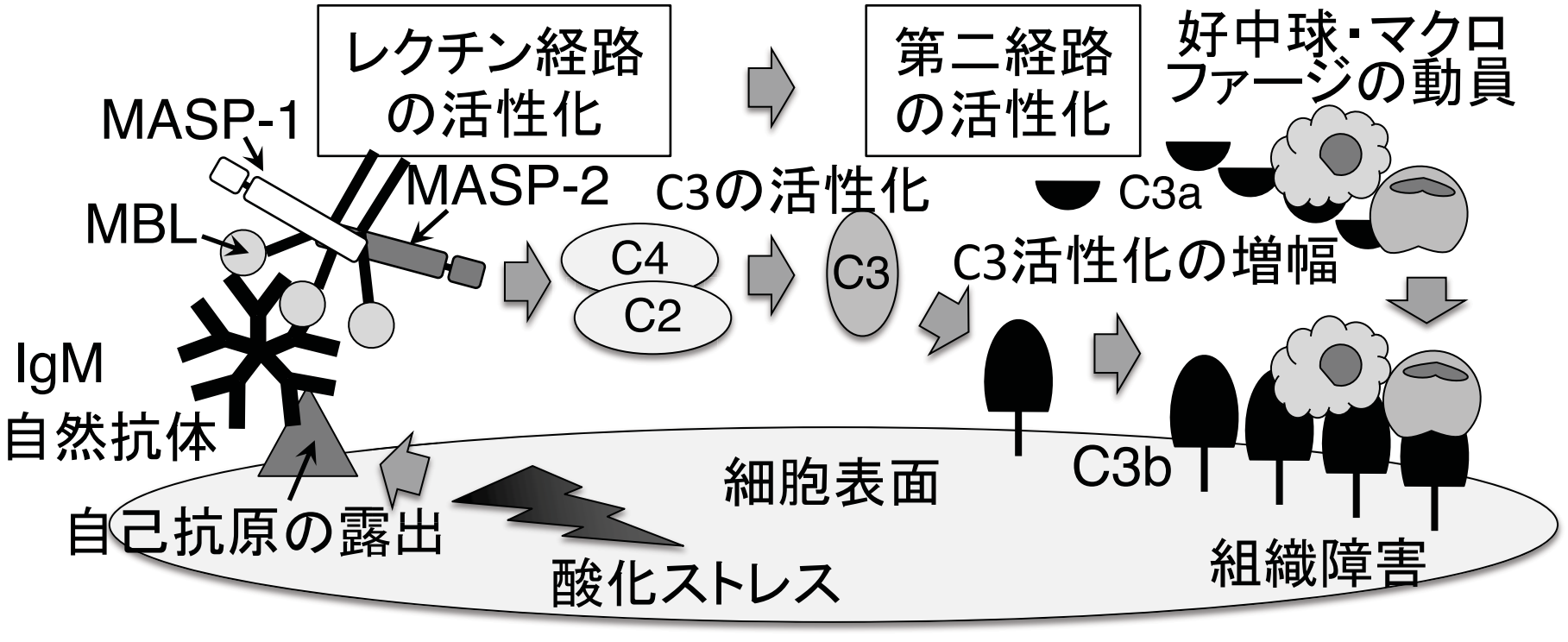


図4

A


レクチン経路
の活性化
第二経路
の活性化
好中球・マクロ
ファージの動員
MASP-1
MASP-2
MBL
C3の活性化
C3a
C4
C2
C3
C3活性化の増幅
IgM
自然抗体
細胞表面
C3b
自己抗原の露出
酸化ストレス
組織障害

B

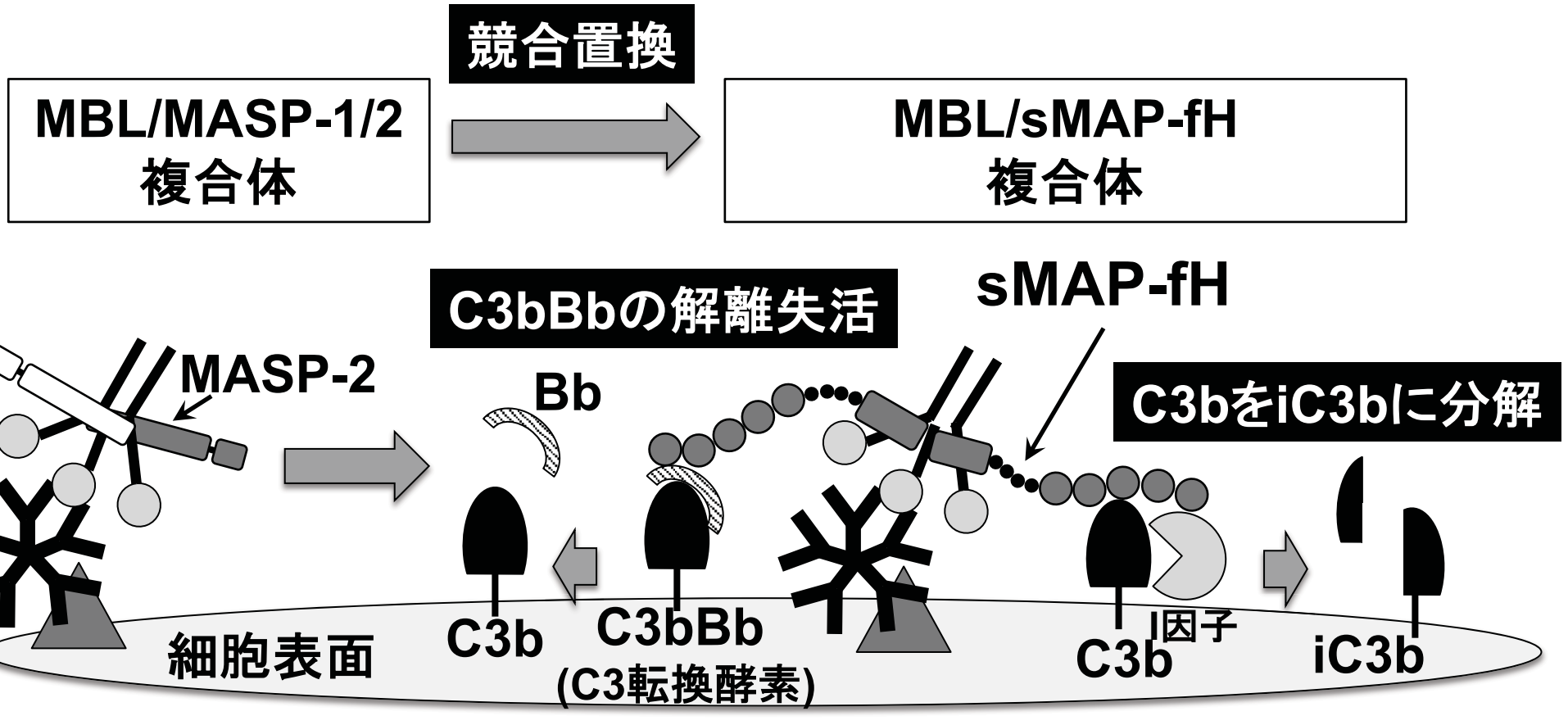

競合置換
MBL/MASP-1/2
複合体
MBL/sMAP-fH
複合体
C3bBbの解離失活
sMAP-fH
MASP-2
Bb
C3bをiC3bに分解
細胞表面
C3b
C3bBb
(C3転換酵素)
I因子
C3b
iC3b

図5

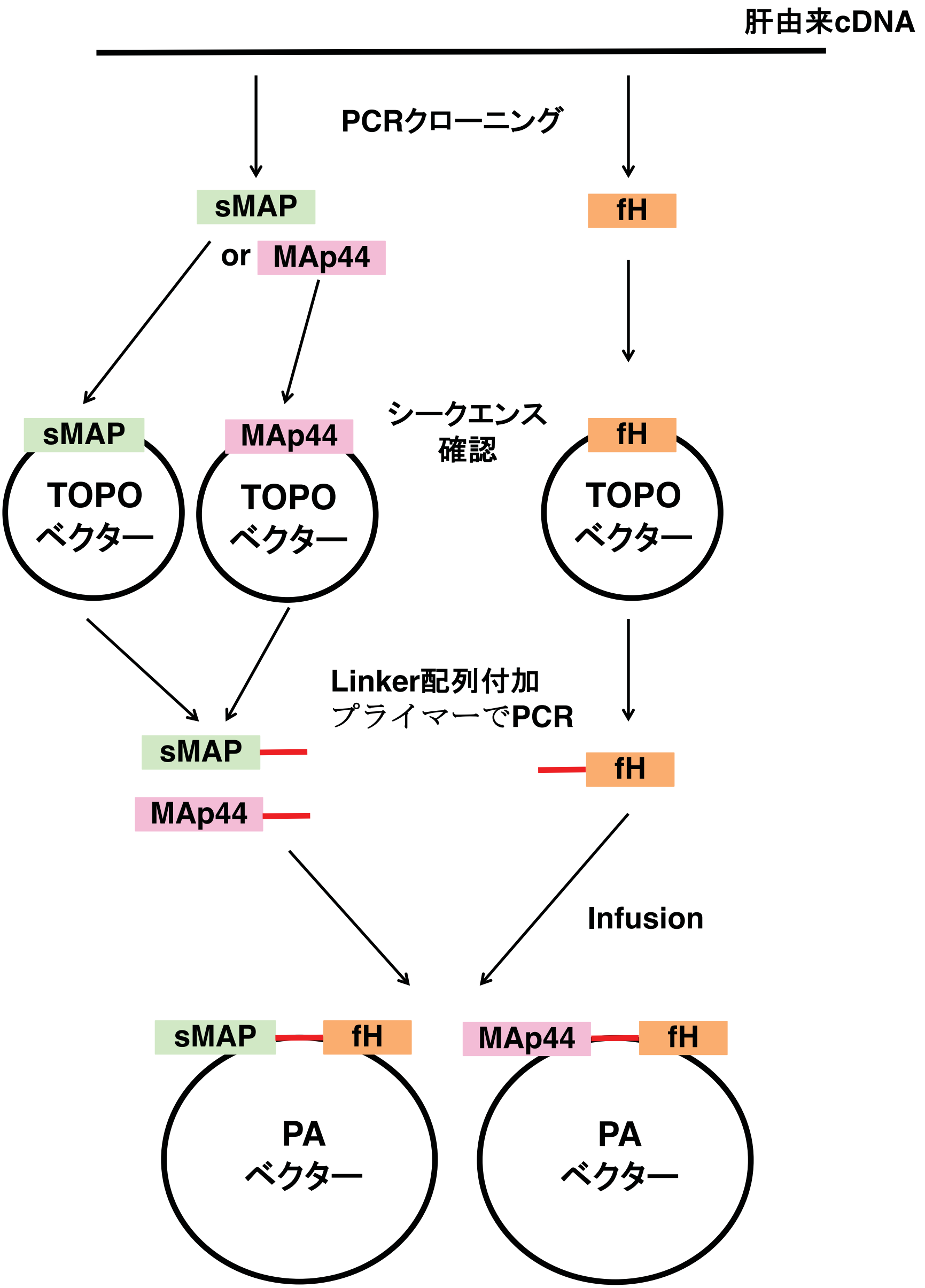
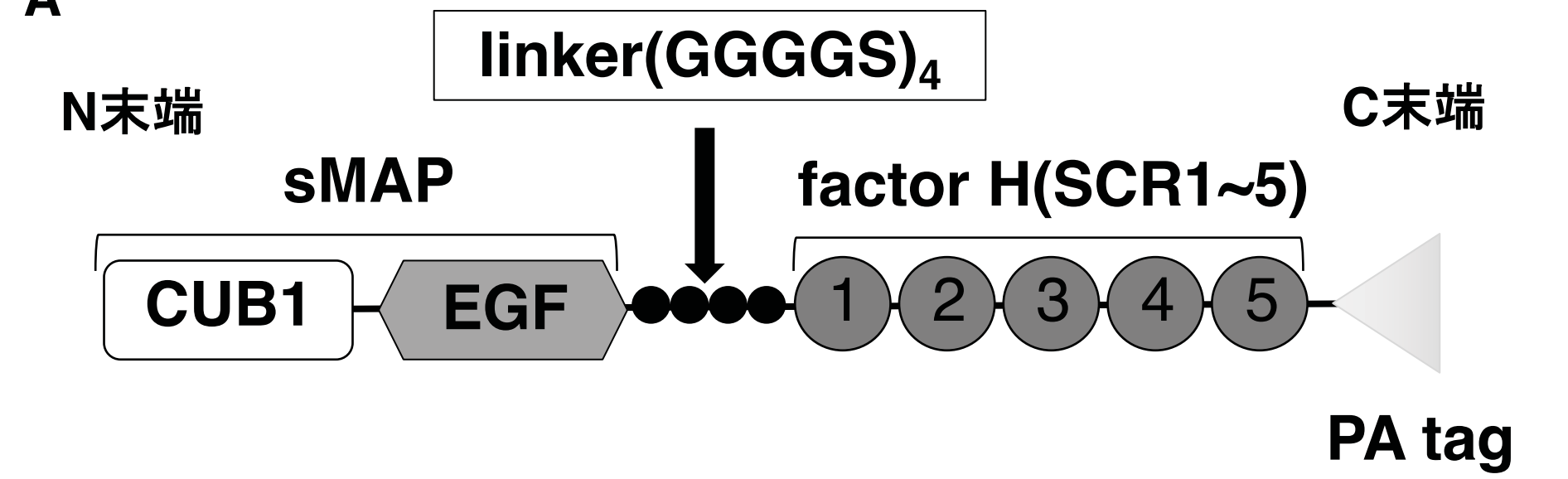

肝由来cDNA
PCRクローニング
sMAP
or
MAp44
fH
sMAP
TOPO
ベクター
MAp44
TOPO
ベクター
シークエンス
確認
fH
TOPO
ベクター
Linker配列付加
プライマーでPCR
sMAP
MAp44
fH
Infusion
sMAP
fH
PA
ベクター
MAp44
fH
PA
ベクター

図6

A



signal peptide

MRLLIFLGLLWSLVATLLGSKWPEPVFGRLVSPGFPEKYADHQDRSWTLTAPPGYRLRLY

CUB1 domain

FTHFDLELSYRCEYDFVKLSSGTKVLATLCGQESTDTEQAPGNDTFYSLGPSLKVTFHSD

EGF-like domain

YSNEKPFTGFEAFYAAEDVDECRVSLGDSVPCDHYCHNYLGGYYCSCRAGYVLHQNKHTC

sMAP 特異 domain

glycine linker

fH SCR1

SEQSLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEDCKGPPPRENSEILSGSWSEQLYPEGTQATYKCR

fH SCR2

PGYRTLGTIVKVCKNGKWVASNPSRICRKKPCGHPGDTPFGSFRLAVGSQFEFGAKVVYT

fH SCR3

CDDGYQLLGEIDYRECGADGWINDIPLCEVVKCLPVTELENGRIVSGAAETDQEYYFGQV

fH SCR4

VRFECNSGFKIEGHKEIHCSENGLWSNEKPRCVEILCTPPRVENGDGINVKPVYKENERY

fH SCR5

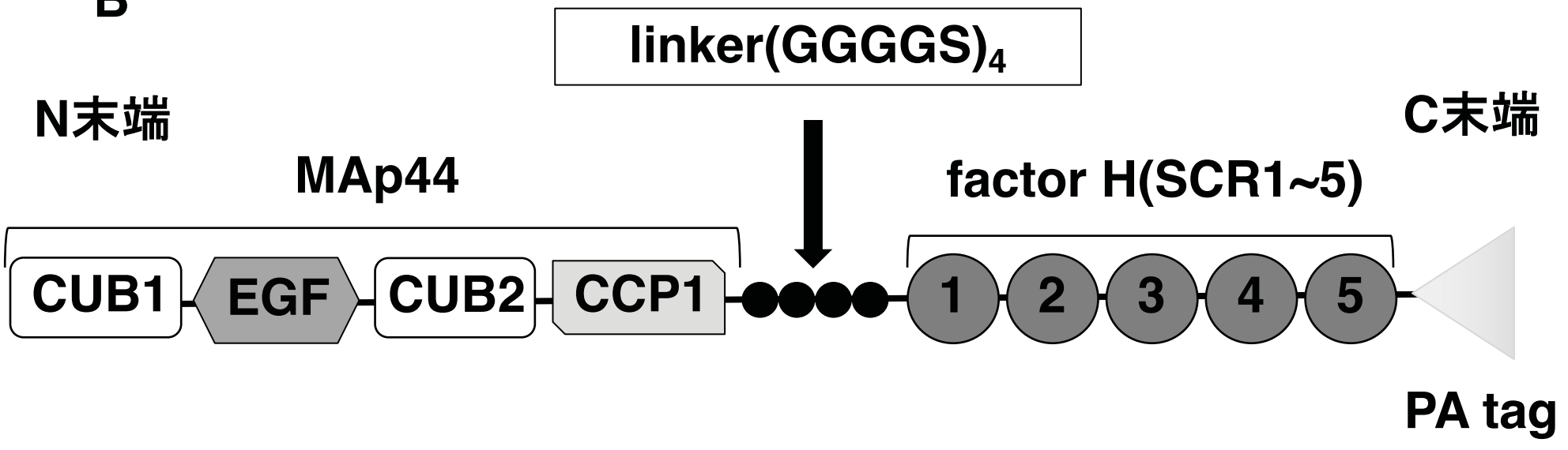
HYKCKHGYVPKERGDAVCTGSGWSSQPFCEEKRCSPPYILNGIYTPHRIIHRSDDEIRYE

PA tag

CNYGFYPVTGSTVSKCTPTGWIPVPRCTTSGVAMPGAEDDVV

図6

B



signal peptide
MRFLSFWRLLLYHALCLALPEVSAHTVELNEMFGQIQSPGYPDSYPSDSEVTWNITVPEG

CUB1 domain
FRIKLYFMHFNLESSYLCEYDYVKVETEDQVLATFCGRETTDTEQTPGQEVVLSPGTFMS

EGF-like domain
VTFRSDFSNEERFTGFDAHYMAVDVDECKEREDEELSCDHYCHNYIGGYYCSCRFGYILH

CUB2 domain
TDNRTCRVECSGNLFTQRTGTITSPDYPNPYPKSSECSYTIDLEEGFMVSLQFEDIFDIE

CCP1 domain
DHPEVPCPYDYIKIKAGSKVWGPFCGEKSPEPISTQTHSVQILFRSDNSGENRGWRLSYR

MAp44 specific domain
glycine linker
AAGNECPKLQPPVYGKIEPSQAVYSFKDQVLVSCDTGYKVLKDNEVMDTFQIECLKDGAW

fH SCR1
SNKIPTCKKSEIELEKELESEPVAEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEDCKGPPPRENSEIL

fH SCR2
SGSWSEQLYPEGTQATYKCRPGYRTLGTIVKVCKNGKWVASNPSRICRKKPCGHPGDTPF

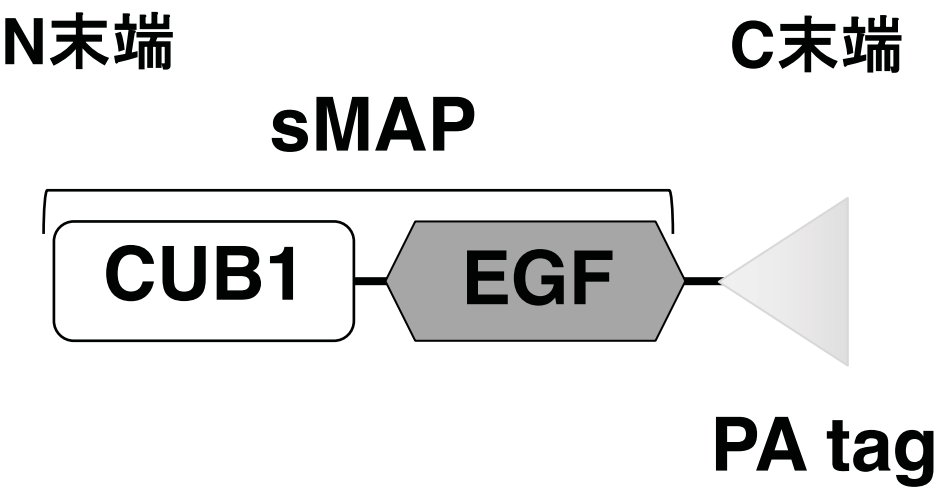
fH SCR3
GSFRLAVGSQFEFGAKVVYTCDDGYQLLGEIDYRECGADGWINDIPLCEVVKCLPVTELE

fH SCR4
NGRIVSGAAETDQEYYFGQVVRFECNSGFKIEGHKEIHCSENGLWSNEKPRCVEILCTPP

PA tag
fH SCR4
RVENGDGINVKPVYKENERYHYKCKHGYVPKERGDAVCTGSGWSSQPFCEEKRCSPPYIL

NGIYTPHRIIHRSDDEIRYECNYGFYPVTGSTVSKCTPTGWIPVPRCTTSGVAMPGAEDDVV

C



signal peptide

MRLLIFLGLLWSLVATLLGSKWPEPVFGRLVSPGFPEKYADHQDRSWTLTAPPGYRLRLY

CUB1 domain

FTHFDLELSYRCEYDFVKLSSGTKVLATLCGQESTDTEQAPGNDTFYSLGPSLKVTFHSD

EGF-like domain

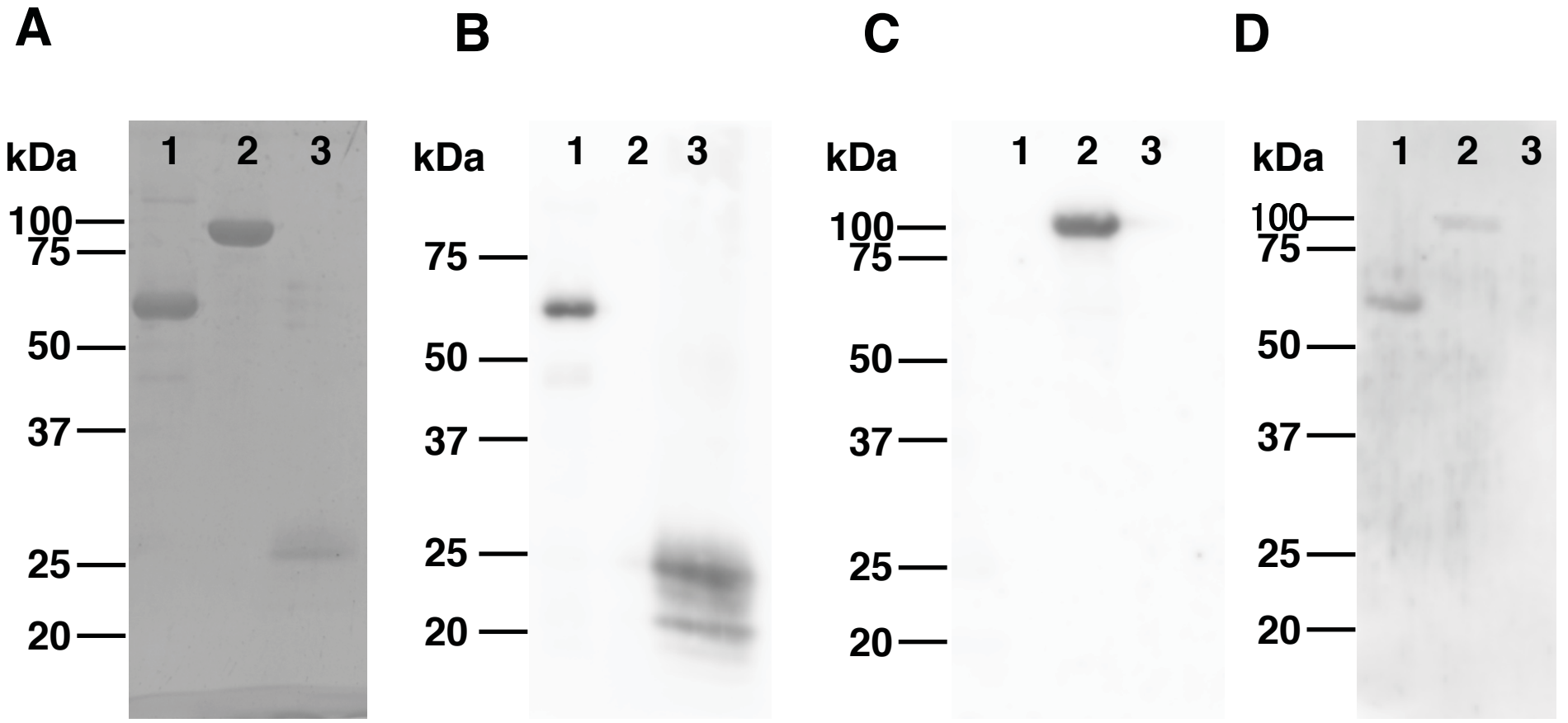
YSNEKPFTGFEAFYAAEDVDECRVSLGDSVPCDHYCHNYLGGYYCSCRAGYVLHQNKHTC

sMAP specific domain

PA tag

SEQSL GVAMPGAEDDVV

図7



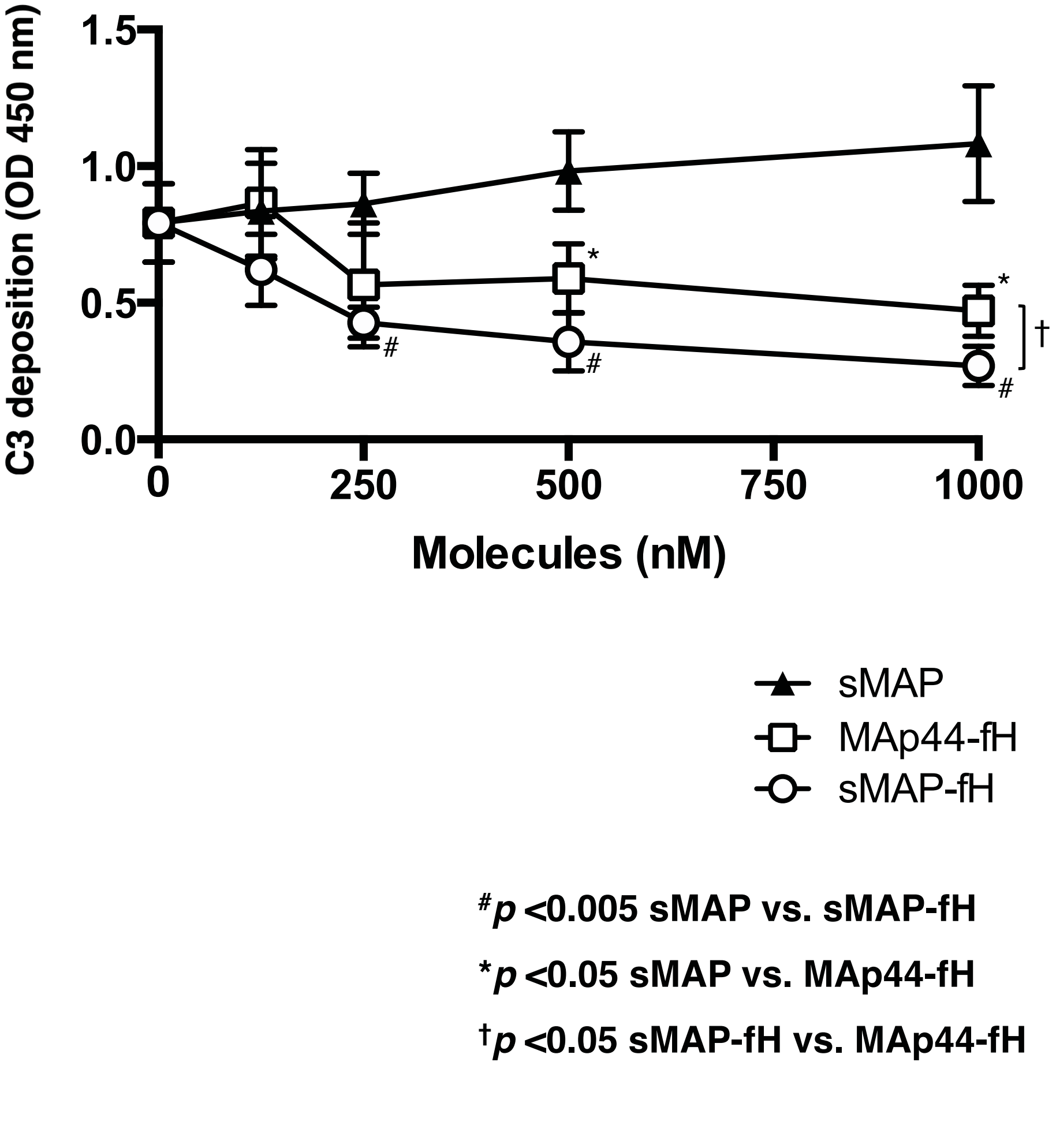
Instant blue　　anti-MASP2　　anti-MASP-1/3　　anti-FH

1: mouse sMAP-fH

2: mouse MAp44-fH

3: mouse sMAP

図8

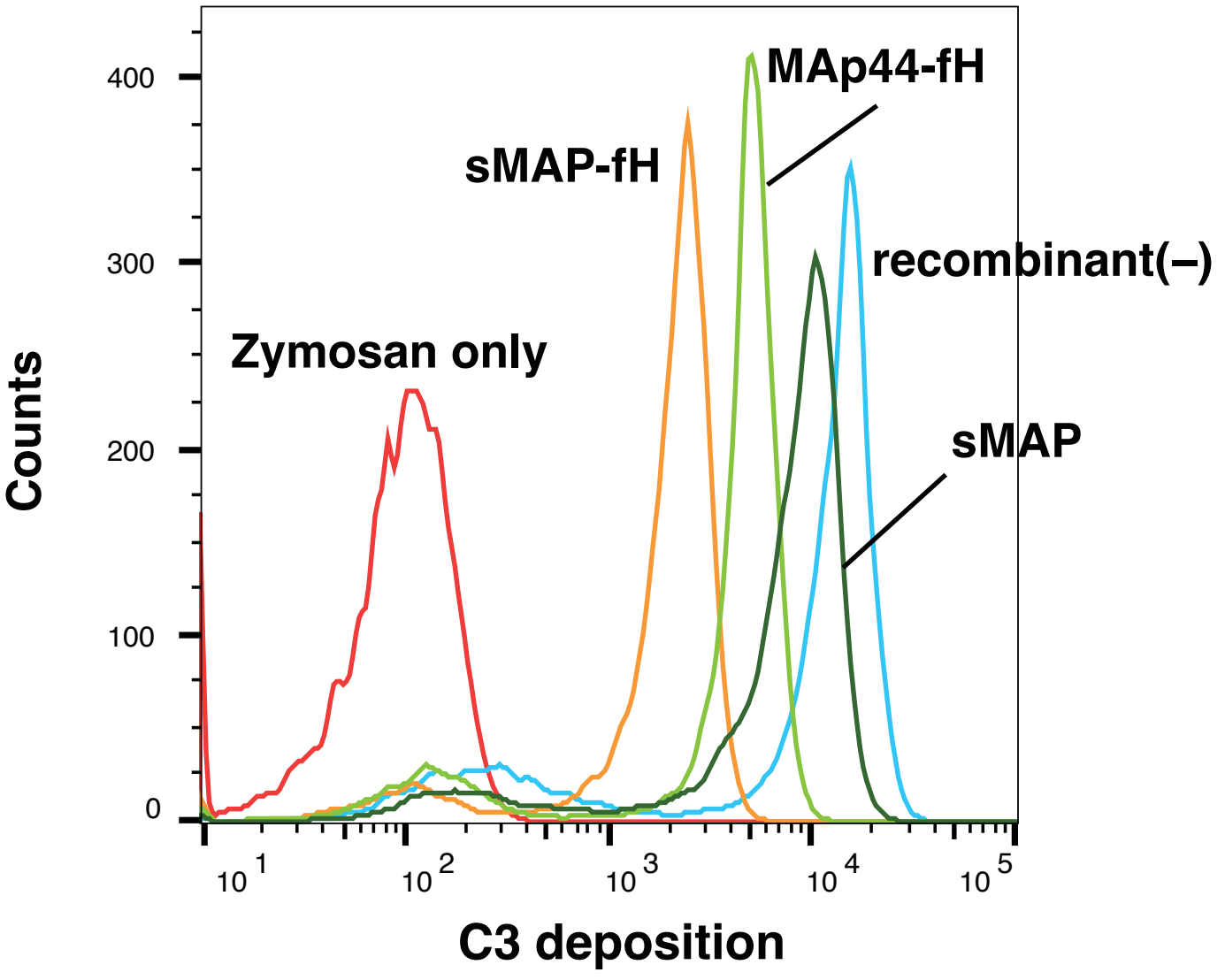


$^{\#}p$ <0.005 sMAP vs. sMAP-fH

$^{*}p$ <0.05 sMAP vs. MAp44-fH

$^{\dagger}p$ <0.05 sMAP-fH vs. MAp44-fH

A


Counts
400
300
200
100
0
Zymosan only
sMAP-fH
MAp44-fH
recombinant(–)
sMAP
10 1
10 2
10 3
10 4
10 5
C3 deposition

B

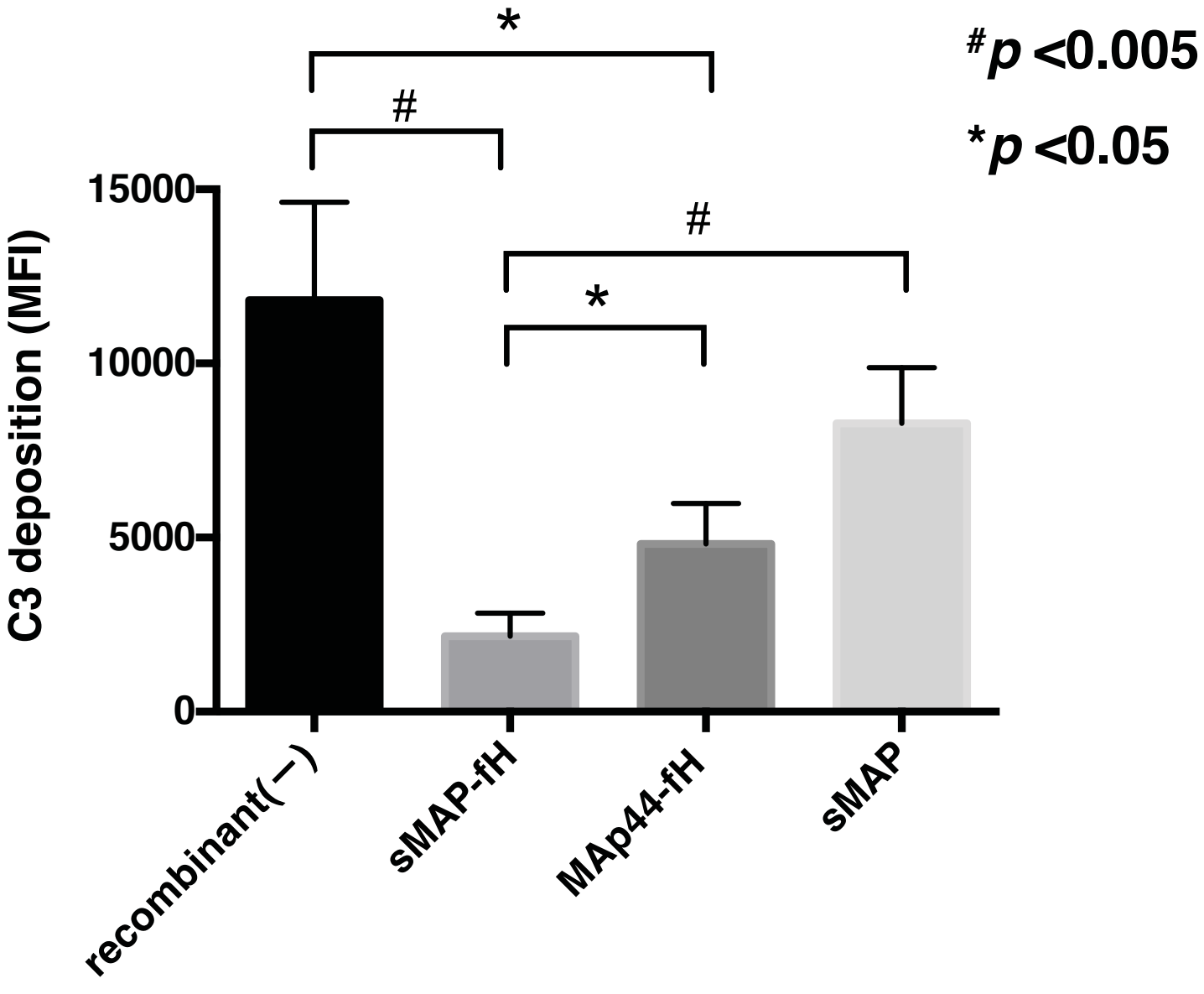
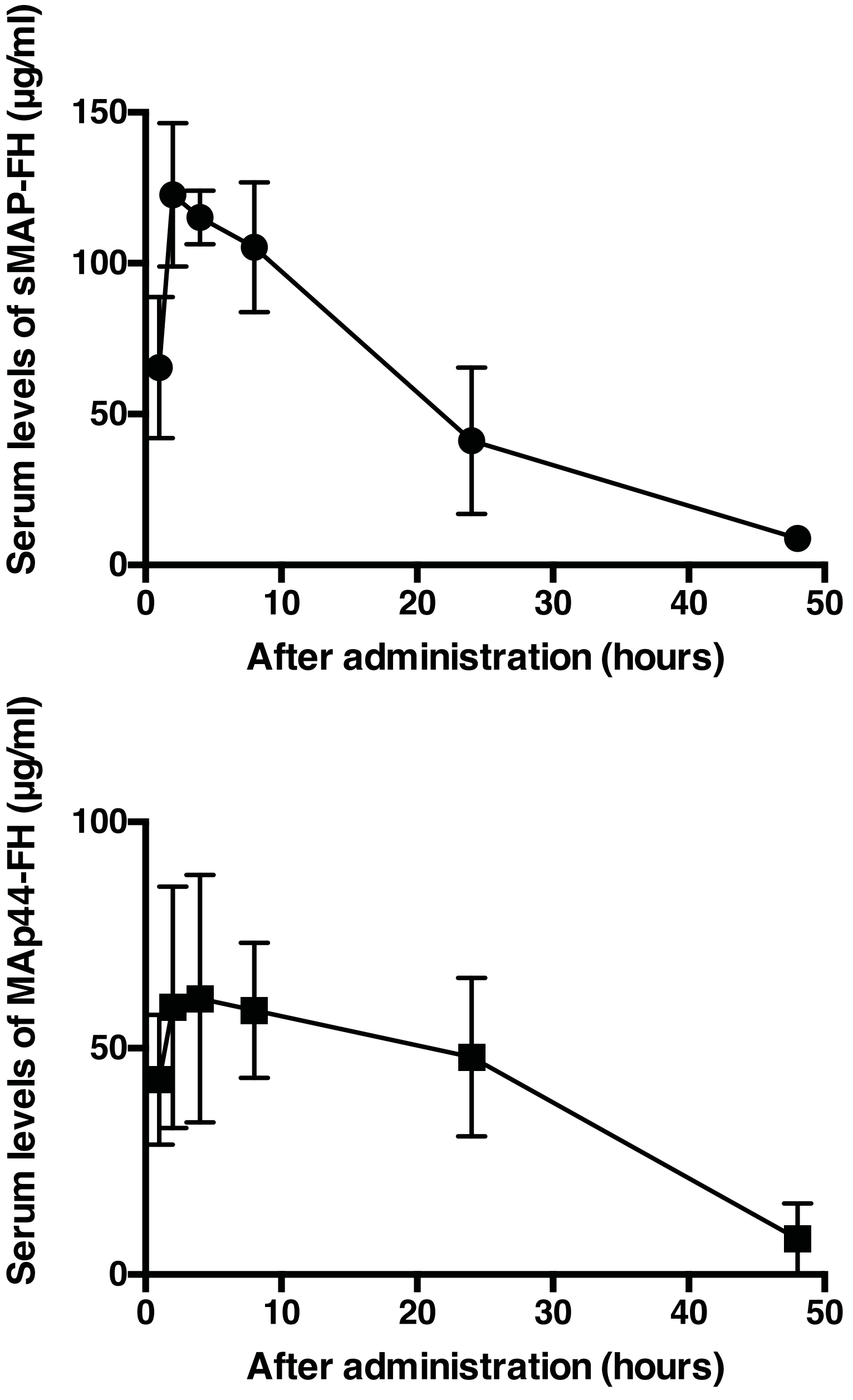

#p <0.005
*p <0.05
*
#
#
*
15000
10000
5000
0
C3 deposition (MFI)
recombinant(−)
sMAP-fH
MAp44-fH
sMAP

図10

A

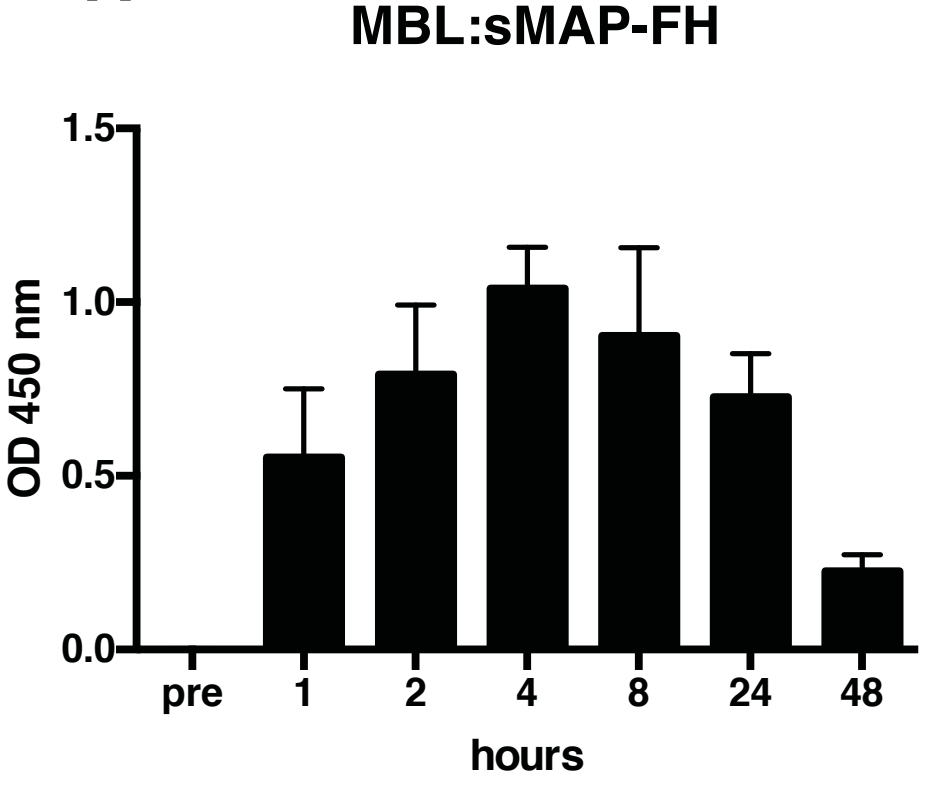

Serum levels of sMAP-FH (μg/ml)
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50
After administration (hours)

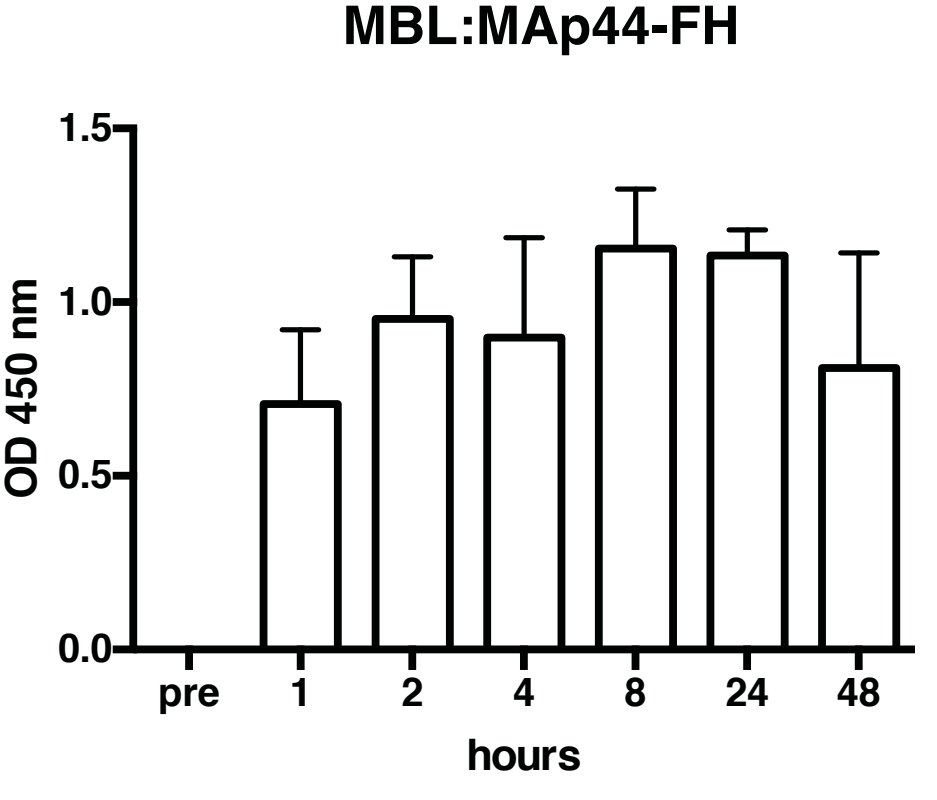
B

Serum levels of MAp44-FH (μg/ml)
100
50
0
0
10
20
30
40
50
After administration (hours)

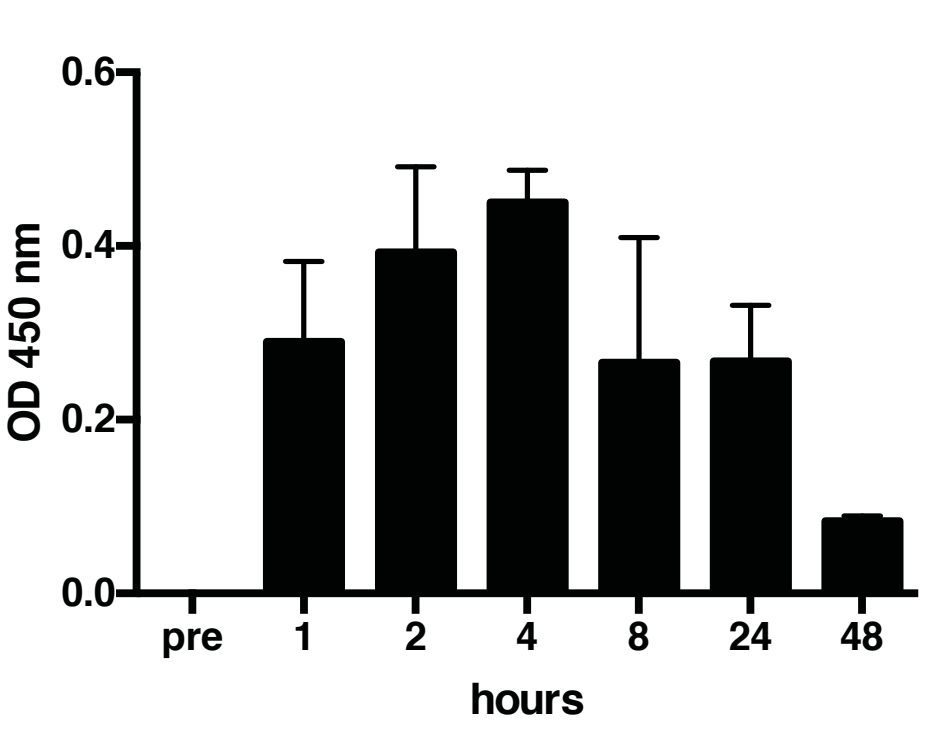
図11

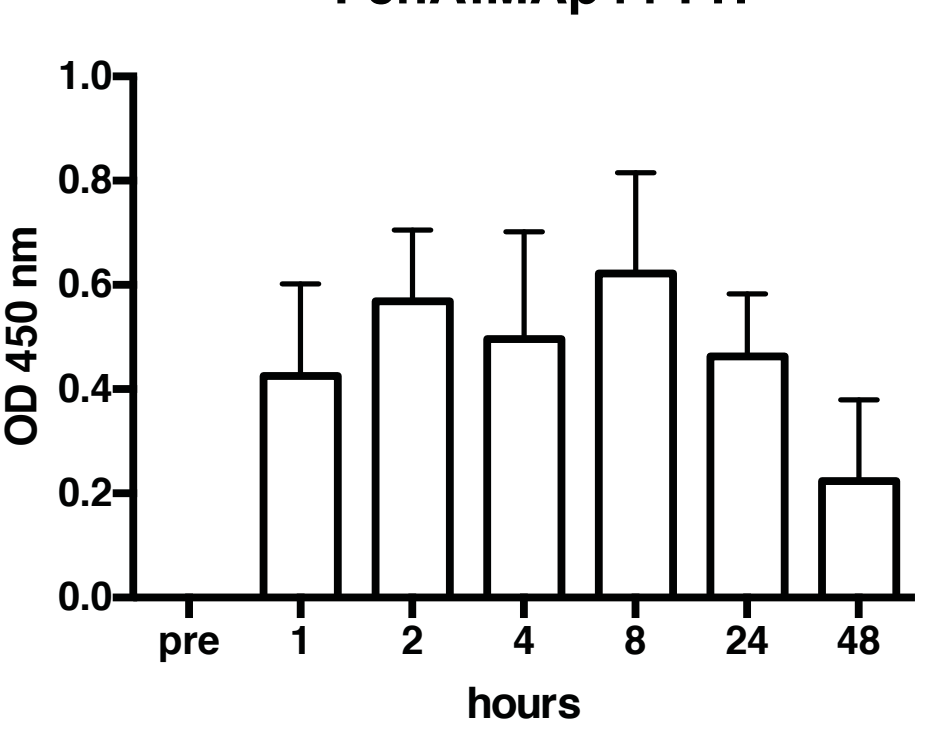
A

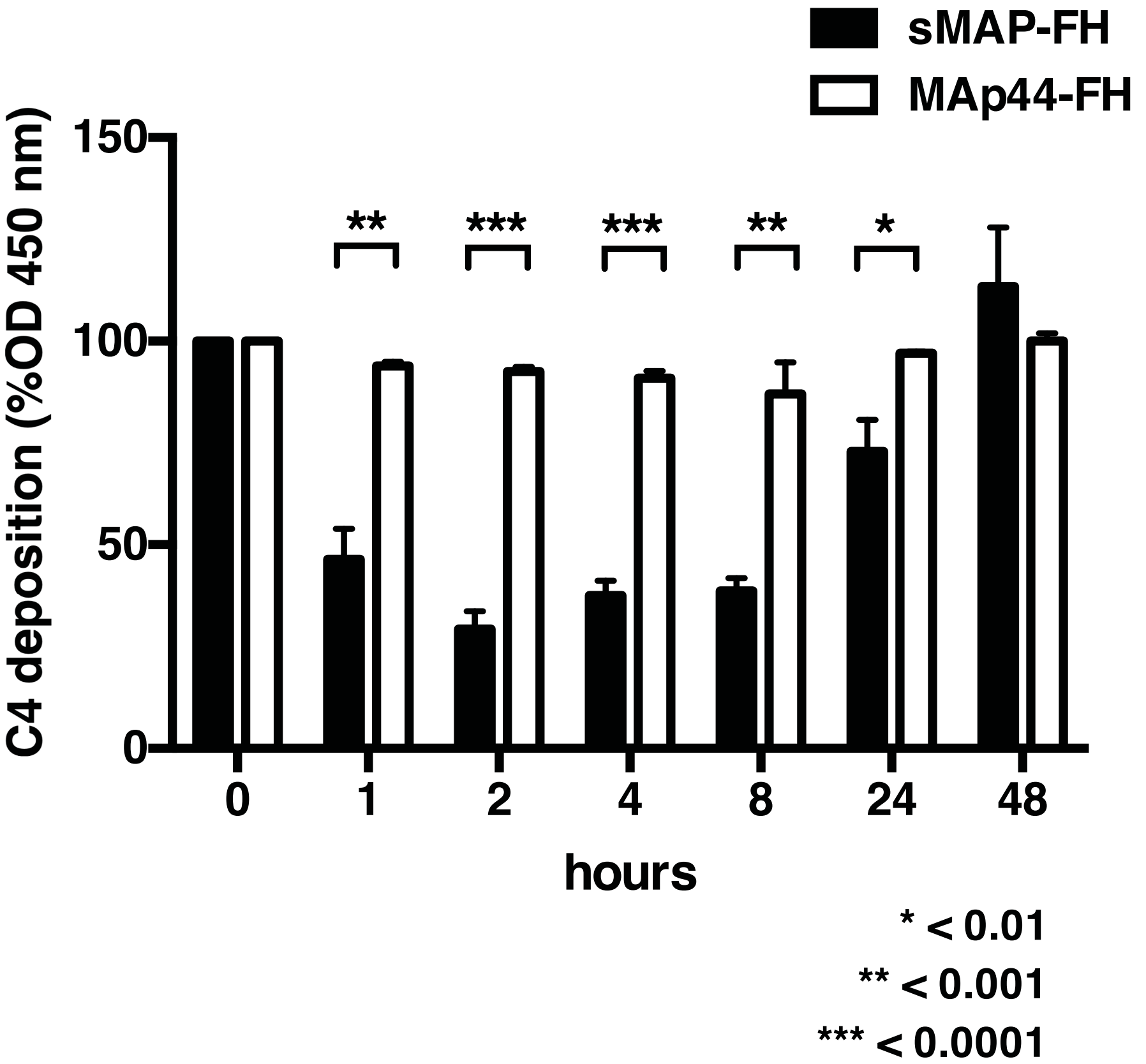

MBL:sMAP-FH
OD 450 nm
1.5
1.0
0.5
0.0
pre
1
2
4
8
24
48
hours


MBL:MAp44-FH
OD 450 nm
1.5
1.0
0.5
0.0
pre
1
2
4
8
24
48
hours

B


FcnA:sMAP-FH
OD 450 nm
0.6
0.4
0.2
0.0
pre
1
2
4
8
24
48
hours


FcnA:MAp44-FH
OD 450 nm
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
pre
1
2
4
8
24
48
hours

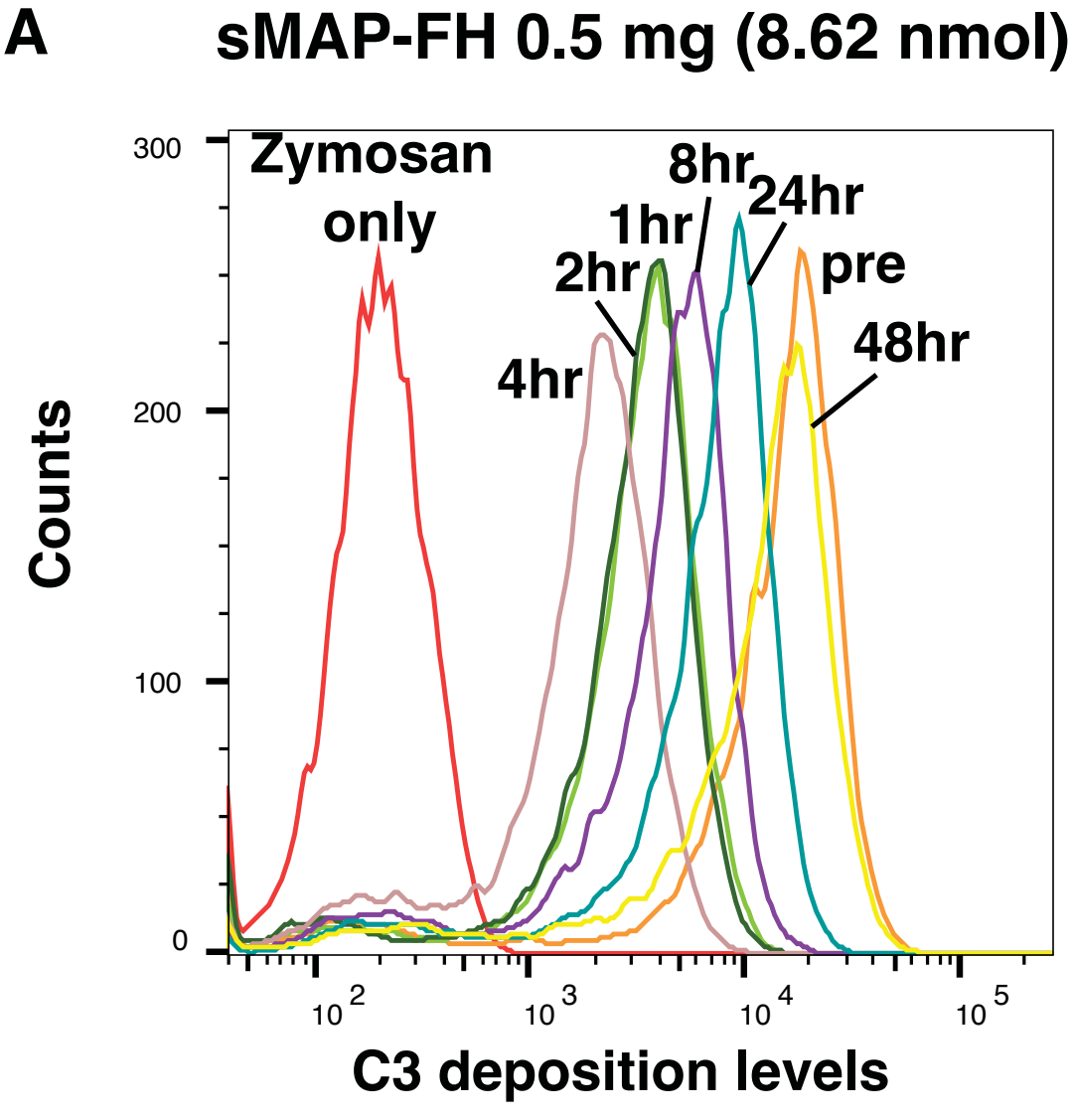


* < 0.01

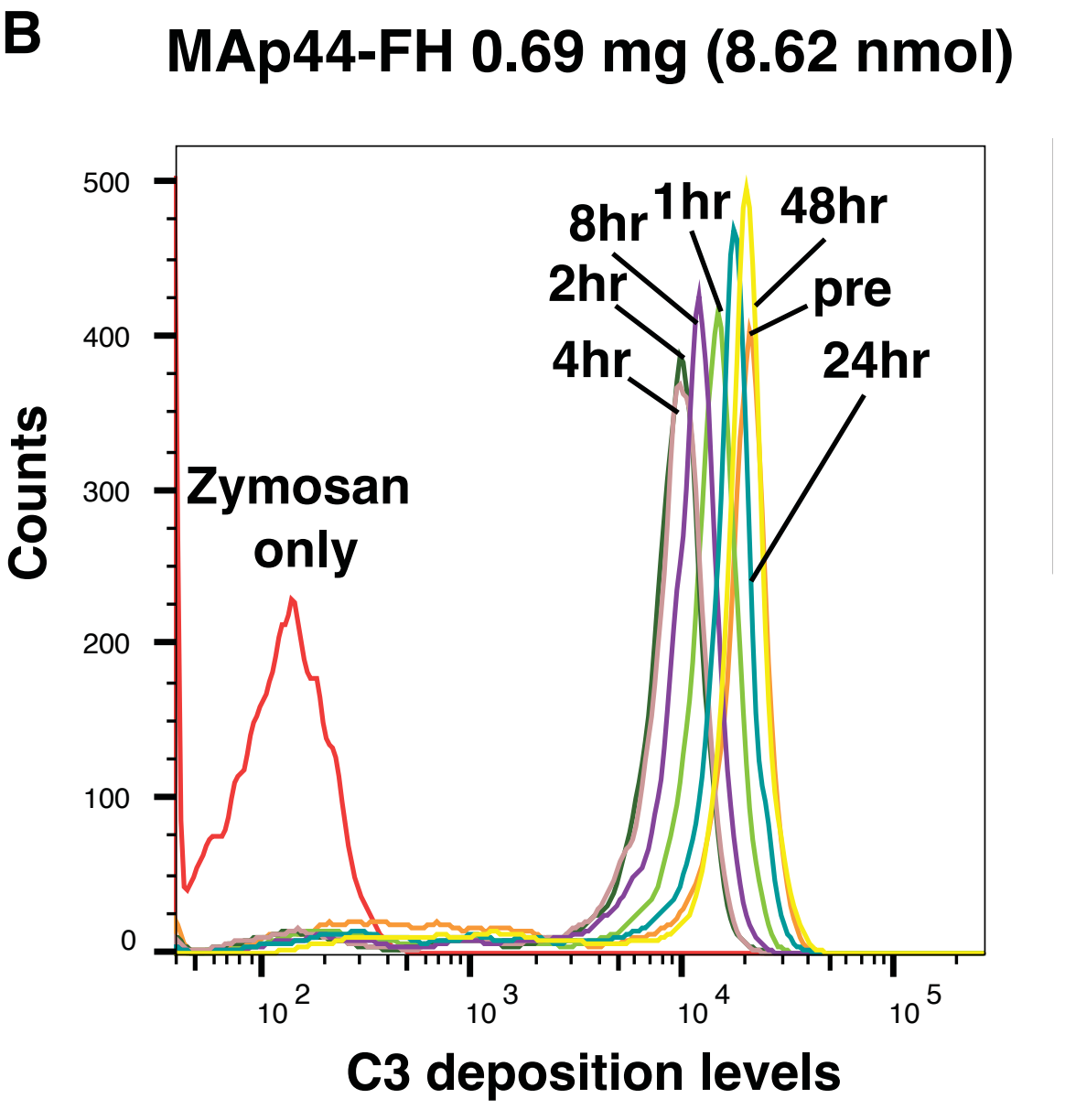
** < 0.001

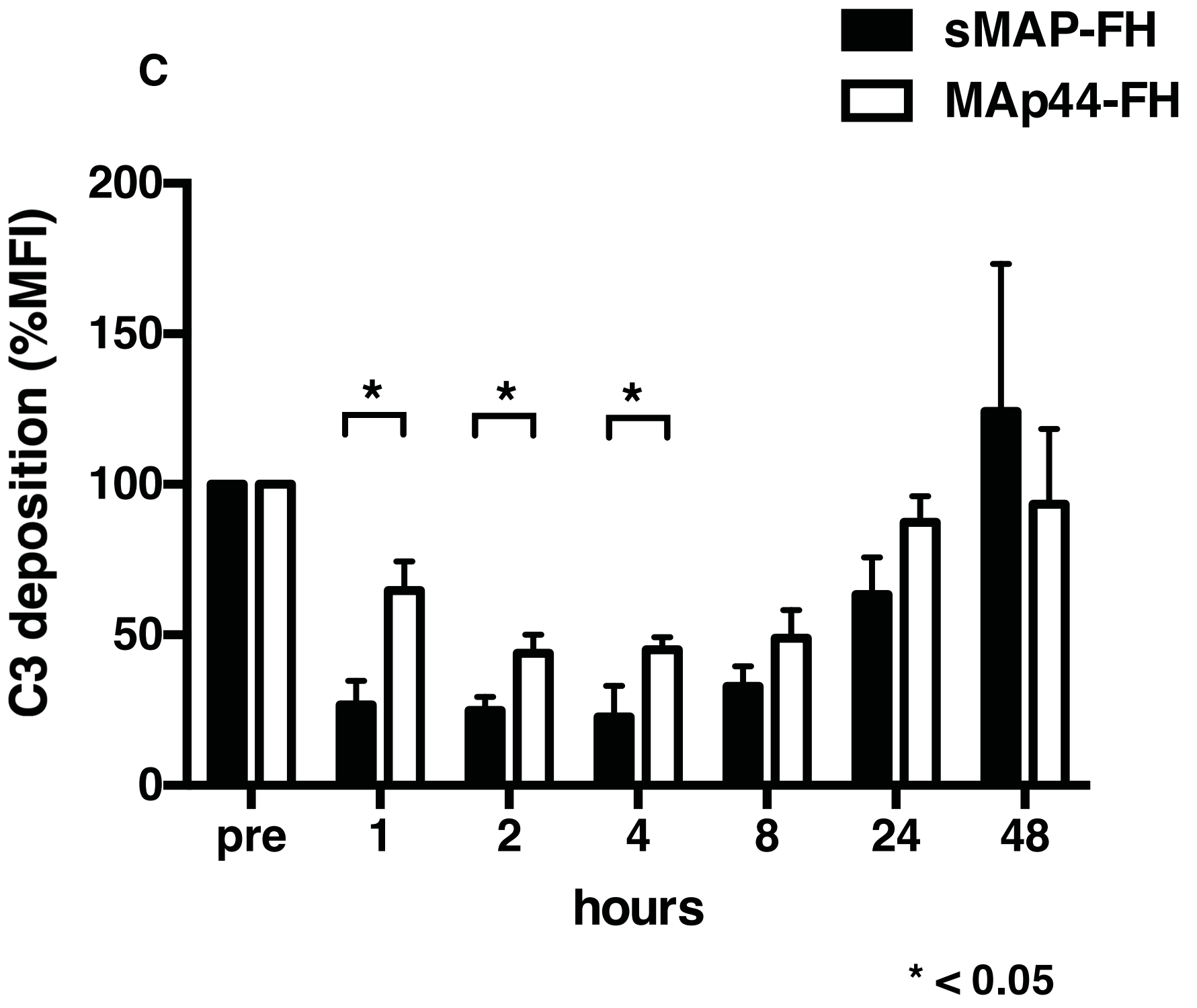
*** < 0.0001

A


sMAP-FH 0.5 mg (8.62 nmol)
Zymosan only
8hr
24hr
1hr
pre
2hr
48hr
4hr
Counts
300
200
100
0
10 2
10 3
10 4
10 5
C3 deposition levels

B


MAp44-FH 0.69 mg (8.62 nmol)
8hr
1hr
48hr
2hr
pre
4hr
24hr
Zymosan only
Counts
500
400
300
200
100
0
10 2
10 3
10 4
10 5
C3 deposition levels


C
sMAP-FH
MAp44-FH
C3 deposition (%MFI)
200
150
100
50
0
*
*
*
pre
1
2
4
8
24
48
hours

* < 0.05