



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: 高住, 美香 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000243

論文内容要旨

しめい 氏名	高住 美香
学位論文題名	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
【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。今回、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、補体制御因子 sMAP と H 因子(fH)とを融合させた新規の融合蛋白 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、sMAP 全長と fH SCR1~5 の cDNA を PCR クローニングし TOPO ベクターへ組み込みシーケンスを確認した。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 pCAG-Bsd PA tag-C ベクターに組み込んだ。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, Western blotting, および mass spectrometry で sMAP-fH の産生を評価した。同様に, MAP44-fH も作製した。in vitro における sMAP-fH のレクチン経路, 第二経路阻害作用は, C3 deposition assay, 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 (500 µg/mouse, 8.9 nmol)をマウス腹腔内に投与後, 経時的に採取した血清を用いて 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 (710 µg/mouse, 8.9 nmol), PBS を投与したマウスの血清を用いた。 【結果】 CHO 細胞で産生し, 精製した sMAP-fH は, SDS-PAGE, Western blotting, mass spectrometry でマウス sMAP とマウス fH を有するタンパクであることが示された。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 腹腔内投与後の血清では, sMAP-fH は生体内で MBL および ficolin A と複合体を形成していた。さらに sMAP-fH 投与後の血清では, 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 zymosan 上の 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 の濃度と相関していた。 【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能を有し, 新規治療薬となる可能性がある。	

学位論文審査結果報告書

平成 30 年 1 月 9 日

大学院医学研究科長 殿

下記の通り、学位論文の審査を終了したので報告致します。

【審査結果要旨】

氏 名：

高住 美香

学位論文題名：

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

補体の活性化経路には、(i) 抗原-抗体複合体に依存する古典経路、(ii) 微生物細胞壁等を認識する第 2 経路、(iii) 病原体の糖鎖を認識するレクチン経路、の 3 つがある。レクチン経路では、マンノース結合タンパク質(MBL)及び ficolin などの糖鎖認識タンパク質による糖鎖の結合に引き続いて、MBL-associated

serine protease (MASP)-1、MASP-2 等が活性化される。この MASP-2 の活性化は内因性 inhibitor である Small MBL-associated protein (sMAP) により阻害され活性制御を受けている。一方、MASP-1 の活性化は内因性 inhibitor である mannose-binding lectin-associated protein of 44 kDa (MAp44) により阻害される。また、第 2 経路に置いて factor H (fH) は、補体 C3 活性化の内因性 inhibitor として作用する。高住氏は、fH と sMAP 及び MAp44 との融合タンパク質を作製し、in vitro 及び in vivo における補体活性の抑制能を示した。特に、今回の研究で新たに作製された sMAP-fH 融合タンパク質が、MAp44-fH に比べて in vivo においてレクチン経路の顕著な抑制能を示したことは重要な発見である。また、sMAP-fH は第 2 経路の in vivo での活性も抑制した。即ち、作製された融合タンパク質は、虚血・再還流など、レクチン経路及び第 2 経路の活性化が組織障害に関わる病態への治療応用が期待される。従って、本論文は学位論文に相応しいと考える。

論文審査委員 主査 橋本康弘

副査 山本俊幸

副査 野地秀義