

～第55回日本補体学会学術集会 優秀賞受賞記念寄稿～

MRL/*lpr* マウスのループス様糸球体腎炎における MASP-1/3 の役割

関根 英治

福島県立医科大学 免疫学講座

Roles of the complement system in the development of lupus-like glomerulonephritis in MRL/*lpr* mice

Hideharu Sekine

Department of Immunology, Fukushima Medical University

1. はじめに

2018年8月北九州市小倉で開催された第55回日本補体学会学術集会での筆者の演題「MRL/*lpr* マウスのループス様糸球体腎炎における MASP-1/3 の役割」に対して、日本補体学会より優秀賞を賜りました。これまで本研究に携わっていただきました多くの関係者の皆様に厚く御礼申し上げますとともに、今後とも補体関連疾患の病態機構の解明に努めて参りたいと思います。この誌面をお借りして、受賞演題の研究に至るまでの背景を述べさせていただきます。

2. SLE のモデル動物「MRL/*lpr* マウス」

本研究で用いられた MRL/*lpr* マウスとは、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)のモデル動物として広く用いられている動物です。SLE につきましては、本誌他頁の塚本浩氏の総説に詳しく掲載されておりますので、そちらをご参照頂きたいと思います。MRL/*lpr* マウスは、1978 年に米国 Jackson 研究所の Murphy らにより、LG、AKR、C57BL/6、C3H の計 4 系統の交雑を経て近交系として確立されました¹⁾。このマウスではリンパ球の著しい増殖がみられ、その原因遺伝子は当初 *lpr*

(*lymphoproliferation*) 遺伝子と命名されました。

後に *lpr* 遺伝子は *Fas* 遺伝子と同一であることが証明されています²⁾。従いまして、MRL/*lpr* マウスは *Fas* 遺伝子の突然変異を原因とする自己免疫性リンパ増殖症候群(autoimmune lymphoproliferative syndrome; ALPS)のモデル動物としても用いられています。MRL/*lpr* マウスが全身性自己免疫疾患の SLE のモデル動物として用いられる理由は、*Fas* 遺伝子に突然変異があるからではなく、SLE の疾患特異的自己抗体である抗 dsDNA 抗体や抗 Sm 抗体をはじめ、多彩な自己抗体が自発的に産生されるからです。また、これらの自己抗体によって形成された抗原抗体複合体が、血管壁や糸球体などの組織に沈着し、古典経路から開始される補体系の活性化により、SLE でみられるものと類似した臓器障害が引き起こされることも重要な根拠です。このマウスの腎障害の形成には補体系が大きく関与していますが、糸球体への抗原抗体複合体の沈着により、好中球やメサングウム細胞などが Fc 受容体を介して直接活性化され、病態形成に関与していることも指摘されています。また、血小板の凝集や凝固系の活性化に伴う血管内皮の障害など、ループス様糸球体腎炎の病態形成には複雑な階層構造が存在します。

3. MRL/lprマウスの腎障害と補体

1) C3欠損 MRL/lprマウスの腎障害

筆者のこれまでの研究歴を述べさせていただきます。筆者は1993年に福島県立医科大学を卒業後、同大学名誉教授の粕川禮司先生が主催する第二内科学講座(現リウマチ膠原病内科)に大学院生として入局しました。研究テーマは、脊索動物のホヤでレクチン経路の認識分子の同定を行うことで、同大学第二生化学講座(現免疫学講座)で藤田禎三先生に指導して頂きました。研究の結果、MBLの原型とも言えるGlucose-binding lectin(GBL)を同定し、生物進化上、古典経路に先んじてレクチン経路が出現したことを証明することができました³⁾。それ以上に私にとって意義が大きかったことは、藤田先生から補体学の薫陶を受けることができたことです。大学院修了後、臨床研修2年目の1999年に、SLEの大家であるGary Gilkeson教授が主催する米国サウスカロライナ医科大学のリウマチ・免疫学部門に留学するチャンスが巡って来ました。先にそこに留学していた医局の先輩の渡辺浩志先生が、B因子ノックアウトのMRL/lprマウスで糸球体腎炎が改善することを報告し⁴⁾、私はその後釜としての留学でした。それまでループス腎炎のメカニズムは、古典経路の活性化がメインとなって引き起こされるという考え方が主流でしたが、渡辺先生の報告は、第二経路の活性化の貢献度も大きいのではないかという考え方へのターニングポイントになりました。もしそうであれば、C3の活性化を抑制すれば腎炎が改善するはずとの考えから、留学先で私に与えられた最初の研究テーマは、C3ノックアウトのMRL/lprマウスの解析でした。結果は意外にも、野生型よりC3ノックアウトのMRL/lprマウスの方が、糸球体障害の指標となるタンパク尿が悪化するというもので

した⁵⁾。その原因を詳しく調べてみると、糸球体へのIgG(抗原抗体複合体)の沈着量は、野生型よりC3ノックアウトのMRL/lprマウスの方が多いということが判明しました。その理由として、C3ノックアウトのMRL/lprマウスでは、C3による免疫複合体の可溶化作用が失われたために、糸球体で目詰まりを起こし、結果的に糸球体障害が強く発現されたことが推測されました。つまりC3は、炎症を引き起こすという増悪因子としての側面と、免疫複合体を可溶化し生体内からのクリアランスを促すという良性因子としての側面を有するということになります。その当時の1998年にはMarina Botto氏が、C1qノックアウトマウスでは糸球体にアポトーシス小体が多量に沈着し、血清中の抗核抗体が高値になるという衝撃的な論文をnature genetics誌で報告していました⁶⁾。C3ノックアウトのMRL/lprマウスの解析結果を2000年のICWで報告した時には多くの参加者から病態機構の解釈について質問され、拙い英語で必死に答えていたことを思い出します。SLEでは、補体系の活性化は抗原抗体複合体の形成に伴い古典経路から開始されますが、古典経路の補体成分の欠損者はSLEを高率に発症します⁷⁾。この現象はlupus paradoxとして知られており、SLEにおける補体の役割の二面性を如実に表しています。

米国留学中にはこの研究以外にも、MRL/lprマウスの腎臓に浸潤しているB細胞が作る自己抗体が体細胞高頻度変異により、多彩なアフィニティを獲得していることを見出した研究や⁸⁾、MRL/lprマウスのMHC領域にIgG3へのクラススイッチに必要な遺伝子が存在することを見出した研究などを行いました⁹⁾。私の研究生活はまさにMRL/lprマウスと共にあると言って過言では無いほどです。

2) 選択的第二経路阻害薬 CR2-fH による MRL/lpr マウスの治療効果

4年間の留学を終え、2003年に旧第二内科に帰局しましたが、留学中に粕川先生が退官された後でした。時代は細胞性免疫が全盛期(今もそうかもしれません)を迎え、医局での私の場所はありませんでした。1年半、これまでの留学経験が全く活かされない日々が続いていたのを救ってくれたのは Gilkeson 教授で、Faculty のポジションまで用意して再度迎え入れてくださいました。再渡米後、私は留学していた時の研究の続きを行うことができ、思いっきり補体学に没頭することができました。

MRL/lpr マウスの腎障害で第二経路が増悪因子としてはたらいっているのであれば、第二経路の活性化を抑制すれば、腎障害が改善するはずです。折しもサウスカロライナ医科大学の Steve Tomlinson 教授が、第二経路を選択的に抑制する H 因子と補体受容体 2 (CR2) との融合タンパク質 CR2-fH を完成させ、その効能を調べ始めたところでした。そこで私は Gilkeson 先生の仲介で、Tomlinson 先生と共同研究を開始し、第二経路の選択的抑制薬である CR2-fH を MRL/lpr マウスに投与し腎障害が改善するかどうか調べました。結果は狙い通り、MRL/lpr マウスの腎障害が見事に改善され¹⁰⁾、別の SLE モデル動物である NZB/W F1 マウスでも同様な効果が確認できました¹¹⁾。つまり、ループス腎炎の治療法として、古典経路を温存し、第二経路を選択的に抑制する治療法が有効であることが強く示唆されました。ちょうどその頃、藤田先生から帰国のお誘いを頂きました。NIH のグラントも獲得でき研究も波にのっていましたが、家族の事情も鑑み帰国することを決意し、米国での約 10 年間の研究生活に別れを告げました。帰国することを Gilkeson 先生に

伝えた時の彼の大きなため息は、今でも忘れることができません。Gilkeson 先生には本当にお世話になりました。

3) MASP-1/3 欠損 MRL/lpr マウスの腎障害

2010 年に藤田先生の免疫学講座に加入させて頂いた当時は、故高橋実先生が *Masp1* 遺伝子をノックアウトした mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 と MASP-3 の二重欠損マウスでは、レクチン経路の活性化能に加えて第二経路の活性化能も喪失することを発見した時でした¹²⁾。その当時は、ループス腎炎にレクチン経路が関与するかどうかはまだ手付かずの状態でしたので、九州大学から講座に加入した町田豪先生との共同研究で MASP-1/3 欠損の MRL/lpr マウスを作成し、解析を進めました。今回受賞対象となった研究です。解析の結果、野生型と比較して MASP-1/3 欠損の MRL/lpr マウスではタンパク尿がほとんどみられず、腎臓の組織学的なダメージも改善されました¹³⁾。その改善度は、第二経路の活性化能を喪失した B 因子や D 因子欠損の MRL/lpr マウスよりも高いことから、MRL/lpr マウスの腎障害にはレクチン経路を通じた補体の活性化が少なからず関与することが推測されました^{4,14)}。

MRL/lpr マウスの腎臓でレクチン経路が活性化されるメカニズムは、その存在自体も含めて不明です。しかし、糸球体への MBL の沈着が観察されることから、糸球体に沈着している抗原抗体複合体の糖鎖を MBL が認識している可能性も考えられますが、古典経路から開始され、第二経路の活性化を通じてダメージを受けた糸球体のネオエピトープを MBL が認識し、レクチン経路が二次的に活性化している可能性も考えられます。

一方、MASP-1にはレクチン経路の補体因子としてMASP-2を活性化する役割がありますが、プロトロンビンやフィブリノーゲンなどの凝固因子に作用してフィブリンの形成を促すことで凝固系に関与することも報告されています¹⁵⁾。MASP-1/3欠損のMRL/lprマウスで腎障害が著明に抑制された理由は、凝固因子としてのMASP-1の機能が失われたためなのかもしれません。

4. おわりに

SLEのループス腎炎の病態形成に、どの補体経路がどのくらい関与しているのか、その全容はまだ解明されていません。筆者らのグループは、さまざまな補体成分をノックアウトしたSLEのモデル動物の解析や、SLEモデル動物への選択的第二経路阻害薬の投与を通じて、その解明に関わってきました。特にMASPやレクチン経路の関与については、今回の研究成果はその入り口に辿り着いた程度であり、本格的な解明はこれからです。Masp1遺伝子から転写されるMASP-1は1992年に藤田先生と松下操先生によって報告され、レクチン経路の存在が初めて世に示されました¹⁶⁾。それから10年、同じMasp1遺伝子からMASP-3というスプライシングバリエントが存在することが報告され、その機能は長らく不明のままでした¹⁷⁾。そして2010年、高橋

実先生がMASP-1とMASP-3の共通エクソンを破壊することにより、MASP-1/3二重欠損マウスを作成し、MASP-1とMASP-3のどちらか、または両方が第二経路のD因子の活性化にも必須であることを報告し¹²⁾、この時作成されたマウスが今回の研究成果に結びつきました。そして本年、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集により、MASP-1単独欠損マウスとMASP-3単独欠損マウスが作成され、当講座の大学院生の林学氏が、MASP-1はMASP-2を活性化することでレクチン経路の活性化に作用し、MASP-3はD因子を活性化することで第二経路の活性化にそれぞれ独立して作用することを報告しました¹⁸⁾。補体成分欠損のSLEのモデル動物を用いたこれまでの報告を、表1にまとめましたので、ご参照いただけますと幸いです。

今回の受賞にあたりまして、Gilkeson先生と藤田先生の2人の恩師、MRL/lprマウスの解析につきまして深遠なるご助言を賜りました愛媛大学名誉教授の能勢眞人先生、ノックアウトマウスの作成とその解析につきまして多大なご助言とご協力を賜りました遠藤雄一先生と石田由美様、そしてこれまでの研究に関わりました多くの関係者の皆様に深く感謝と敬意を表しますとともに、今後ともループス腎炎の病態機構と補体系の全容解明に向けて努めて参りたいと思います。

表1 補体遺伝子ノックアウトによるSLEモデルマウスの表現型の変化

Knockout genes	古典経路				C3		レクチン経路+ 第二経路	第二経路	
	C1q		C4				MASP-1/3	Factor B	Factor D
	マウス系統	129 × B6*	MRL+/+	B6 129×B6 BALB/c×129x B6	(129×B6)lpr	(129×B6)lpr	MRL/lpr	MRL/lpr	MRL/lpr
ANA titer	上昇 (55%)	上昇	上昇	上昇	不変	不変	不変	低下	不変
抗DNA抗体値		上昇	上昇	上昇	不変	不変	改善	改善	改善
血清C3レベル					不変	増悪	不変	低下	不変
糸球体IgG沈着レベル			増悪	増悪	不変	増悪	低下	低下	低下
糸球体C3沈着レベル						増悪	著明に改善	改善	不変
蛋白尿			不変			不変	改善	改善	改善
糸球体腎炎	発症 (25%)	悪化	不変	発症	不変	不変	不変	改善	改善
生存率	悪化	悪化							不変
文献	3	19	20	21	21	5	13	4	14

*B6 = C57BL/6

[謝辞]

第 55 回日本補体学会学術集会にて、日本補体学会より優秀賞を賜り、また、本受賞寄稿を発表させて頂き、感謝致します。

[利益相反]

筆者は本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はありません。

[文献]

- 1) Murphy ED, Roths JB. Autoimmunity and lymphoproliferation: Induction by mutant gene *lpr*, and acceleration by a male-associated factor in strain BXSB mice. In: Rose NR, Bigazzi PE, Werner NI eds. Genetic Control of Autoimmune Disease. Elsevier North Holland Inc., New York; p207-220 (1978)
- 2) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317 (1992)
- 3) Sekine H, Kenjo A, Azumi K, Ohi G, Takahashi M, Kasukawa R, Ichikawa N, Nakata M, Mizuochi T, Matsushita M, Endo Y, Fujita T. An ancient lectin-dependent complement system in an ascidian: novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Immunol* 167: 4504-4510 (2001)
- 4) Watanabe H, Garnier G, Circolo A, Wetsel RA, Ruiz P, Holers VM, Boackle SA, Colten HR, Gilkeson GS. Modulation of renal disease in MRL/*lpr* mice genetically deficient in the alternative complement pathway factor B. *J Immunol* 164: 786-794 (2000)
- 5) Sekine H, Reilly CM, Molano ID, Garnier G, Circolo A, Ruiz P, Holers VM, Boackle SA, Gilkeson GS. Complement component C3 is not required for full expression of immune complex glomerulonephritis in MRL/*lpr* mice. *J Immunol* 166: 6444-6451 (2001)
- 6) Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, Loos M, Pandolfi PP, Walport MJ. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet* 19: 56-59 (1998)
- 7) Lintner KE, Wu YL, Yang Y, Spencer CH, Hauptmann G, Hebert LA, Atkinson JP, Yu CY. Early Components of the Complement classical activation pathway in human systemic autoimmune diseases. *Front Immunol* 7: 36 (2016)
- 8) Sekine H, Watanabe H, Gilkeson GS. Enrichment of anti-glomerular antigen antibody-producing cells in the kidneys of MRL/MpJ-Fas^{lpr} mice. *J Immunol* 172: 3913-3921 (2004)
- 9) Sekine H, Graham KL, Zhao S, Elliott MK, Ruiz P, Utz PJ, Gilkeson GS. Role of MHC-linked genes in autoantigen selection and renal disease in a murine model of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 177: 7423-

7434 (2006)

- 10) Sekine H, Kinser TT, Qiao F, Martinez E, Paulling E, Ruiz P, Gilkeson GS, Tomlinson S. The benefit of targeted and selective inhibition of the alternative complement pathway for modulating autoimmunity and renal disease in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 63: 1076-1085 (2011)
- 11) Sekine H, Ruiz P, Gilkeson GS, Tomlinson S. The dual role of complement in the progression of renal disease in NZB/W F₁ mice and alternative pathway inhibition. *Mol Immunol* 49: 317-323 (2011)
- 12) Takahashi M, Ishida Y, Iwaki D, Kanno K, Suzuki T, Endo Y, Homma Y, Fujita T. Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *J Exp Med* 207: 29-37 (2010)
- 13) Machida T, Sakamoto N, Ishida Y, Takahashi M, Fujita T, Sekine H. Essential roles for mannose-binding lectin-associated serine protease-1/3 in the development of lupus-like glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *Front Immunol* 9: 1191 (2018)
- 14) Elliott MK, Jarri T, Ruiz P, Xu Y, Holers VM, Gilkeson GS. Effects of complement factor D deficiency on the renal disease of MRL/lpr mice. *Kidney Int* 65: 129-138 (2004)
- 15) Kozarcanin H, Lood C, Munthe-Fog L, Sandholm K, Hamad OA, Bengtsson AA, Skjoedt MO, Huber-Lang M, Garred P, Ekdahl KN, Nilsson B. The lectin complement pathway serine proteases (MASPs) represent a possible crossroad between the coagulation and complement systems in thromboinflammation. *J Thromb Haemost* 14: 531-545 (2016)
- 16) Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 176: 1497-1502 (1992)
- 17) Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, Vorup-Jensen T, Jensenius JC. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 15: 127-135 (2001)
- 18) Hayashi M, Machida T, Ishida Y, Ogata Y, Omori T, Takasumi M, Endo Y, Suzuki T, Sekimata M, Homma Y, Ikawa M, Ohira H, Fujita T, Sekine H. Cutting Edge: Role of MASP-3 in the Physiological Activation of Factor D of the Alternative Complement Pathway. *J Immunol* 203: 1411-1416 (2019)
- 19) Mitchell DA, Pickering MC, Warren J, Fossati-Jimack L, Cortes-Hernandez J, Cook HT, Botto M, Walport MJ. C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. *J Immunol*, 168: 2538-2543 (2006)
- 20) Paul E, Pozdnyakova OO, Mitchell E, Carroll MC. Anti-DNA autoreactivity in C4-deficient mice. *Eur J Immunol* 32: 2672-2679 (2002)
- 21) Einav S, Pozdnyakova OO, Ma M, Carroll

MC. Complement C4 is protective for lupus disease independent of C3. *J Immunol* 168: 1036-1041 (2002)