

2014/5051A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患政策研究事業

非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の全国調査研究

(H26-難治等(難)一般-016)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 南学 正臣

平成 27 (2015) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患政策研究事業

非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の全国調査研究

(H26-難治等(難)-一般-016)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

平成 27 (2015) 年 5 月

研究組織

研究代表者 南学 正臣 東京大学 腎臓・内分泌内科

研究分担者 藤村 吉博 奈良県立医科大学 輸血部・第三内科

宮田 敏行 国立循環器病研究センター 分子病態部

丸山 彰一 名古屋大学 腎臓内科

加藤 秀樹 東京大学 腎臓・内分泌内科

目 次

I. 総括研究報告	
非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の全国調査研究	1
南学正臣 (東京大学 腎臓・内分泌内科)	
II. 分担研究報告	
1. 非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の集積と蛋白質学的手法を用いた 病態解析	9
藤村吉博 (奈良県立医科大学 輸血部)	
2. 東京大学、名古屋大学における非典型溶血性尿毒症症候群診断体制の 確立	16
丸山彰一 (名古屋大学 腎臓内科)	
加藤秀樹 (東京大学 腎臓・内分泌内科)	
3. 非典型溶血性尿毒症症候群患者に見られた diacylglycerol kinase ϵ の 遺伝子変異	22
宮田敏行 (国立循環器病研究センター 分子病態部)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	33

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患政策研究事業)
総括研究報告書

非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の全国調査研究

研究代表者 南学 正臣 東京大学腎臓・内分泌内科 教授

研究要旨：非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)は血栓性微小血管症(TMA)のうち、志賀毒素産生性大腸菌感染による溶血性尿毒症症候群、ADAMTS13活性の著減による血栓性血小板減少性紫斑病、二次性TMA疾患を除いた、補体関連因子の異常を主な原因とする症候群である。本研究班は、平成26年度より厚生労働科学研究 難治性疾患等政策研究事業の採択を受け、aHUSの全国的な疫学的調査ならびに病態解析を開始した。本年度の活動を通して、我々は本邦最大となる106名のaHUS患者コホートの樹立を成し得た。さらに、奈良県立医科大学輸血部からaHUS患者診断システムを移行し、東大病院において羊赤血球を用いた溶血試験と補体H因子に対する自己抗体の解析系を立ち上げた。また、国立循環器病研究センター協力のもと複数の補体遺伝子解析による診断系を樹立した。これらの蛋白質学的・遺伝学的解析手法を用いて、71例の患者解析を行った結果、本邦aHUS患者では欧米とは異なる遺伝子背景を持つ可能性が示唆された。現在、本成果を活かし、aHUSの診断基準、ガイドラインの改訂作業を行っており、本年度中の公表に向けて取り組んでいる。本研究の成果は、我が国におけるaHUS患者の医療水準の向上に貢献することが期待される。

A. 研究目的

非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)は、血栓性微小血管症(TMA)のなかで、志賀毒素による溶血性尿毒症症候群(HUS)やADAMTS13の異常による血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、基礎疾患のある二次性TMAを除いた、補体関連の異常を主な原因とする症候群である。1998年に補体調節蛋白の1つであるH因子の遺伝子異常が原因として報告されてから、本邦においても様々な補体調節因子の遺伝子異常が報告されているが、全国レベルでの発症数、原因遺伝子の頻度、予後に関しては

不明である。aHUSの診断には非常に特殊な補体調節因子等の蛋白質学的解析(羊赤血球を用いた溶血試験等)や遺伝学的検査が必要であり、大半の大学病院では実施できず、診断の保険収載もされていない。従来、本邦におけるaHUS患者解析は分担研究者である藤村吉博と宮田敏行が、その解析系を樹立し、奈良県立医科大学-国立循環器病研究センター連携の下、aHUS疑い患者の補体調節因子等の蛋白質学的解析、遺伝子診断を施行してきた。その結果、2013年末までに77名の先天性aHUS患者を診断し、うち45例につ

いて解析を実施し、海外との原因遺伝子頻度の違いなどを報告してきた (Fan X, et al. 2014, Yoshida Y, et al. 2015)。

2014年より、これら aHUS 患者の解析システムは東大病院腎臓・内分泌内科（及び名古屋大学）に全面的に移行した。本研究は、東京大学、名古屋大学において aHUS 疑い症例の診断、治療コンサルテーションを行なうシステムの確立を目指すとともに、従来の aHUS 研究を発展させ、その病態および疫学的実態をより詳細に解明し、本邦 aHUS 患者の実情に即した診断基準、ガイドラインの策定を通じて、aHUS 患者の診断・治療の質を高めることを目的とする。

B. 研究方法

1) aHUS診断体制の樹立

従来、本邦 aHUS 患者の解析は奈良県立医科大学の藤村吉博、国立循環器病研究センターの宮田敏行らを中心に実施されてきた。平成26年度に本研究の採択を受け、東大病院及び名古屋大学では、これら aHUS 解析を引き継ぎ、TMAに含まれる疾患の中で、TTPに関しては奈良県立医科大学輸血部、aHUSに関しては東大腎臓内分泌内科（東日本の解析拠点）と名古屋大学（西日本の解析拠点）、そして遺伝子診断は引き続き国立循環器病研究センター研究所で施行する本邦 TMA 解析のネットワークシステムを樹立した。

2) 対象症例

aHUS の診断基準は代表研究者の南学と分担研究者の藤村が委員として加わった日本腎臓学会と日本小児科学会合同のワ

ーキンググループによって、2013年に作成された。本診断基準においては、aHUSを広く定義することで本疾患の認知度を高めることを目的としたことから、aHUSは「TMAから典型HUSとTTPを除外した疾患」とであると定義された。よって、本診断基準では、aHUSは遺伝性の補体制御異常や抗H因子抗体によるもの（狭義のaHUS）だけでなく、代謝性、感染、薬剤性、妊娠関連、自己免疫疾患・膠原病、骨髄移植・臓器移植関連のaHUS（二次性TMA）も含まれる”広義のaHUS”を指す。しかしながら、本来はaHUSという名称は補体系遺伝子異常によるTMAのみを指す用語として用いられていることから、現在、本邦でも診断基準の改訂が行われ、補体関連aHUSと二次性TMAを区別する方向で話が進められている。

上記のような経緯を踏まえ、本研究ではTMAからHUS、TTP、二次性TMAを除外し、臨床的に補体関連aHUSが疑われる症例を対象とし、以下の解析を実施した。

3) 補体調節因子の蛋白質学的解析

患者血漿を用いた補体調節因子の蛋白質学的解析は、分担研究者である藤村吉博の指導の下、奈良県立医科大学において実際の検査を行っていた技官(吉田)が、2014年度に東京大学に異動したことから、東京大学で分担研究者である加藤、吉田が解析の樹立を行った。具体的には、羊赤血球を用いた定量的溶血試験、H因子蛋白量定量、抗H因子抗体検査 (ELISA法、ウエスタンブロット)、血漿中のCHHR1とCFHR3蛋白のウエスタンブロット法を用いた半定量を施行した。

4) 遺伝子検査

東大で匿名化した患者血球を国立循環器病研究センター研究所に輸送し、分担研究者である宮田敏行が、既知の原因遺伝子として知られているH因子、MCP、I因子、B因子、C3、THBD、DGKE、CFHR5の遺伝子解析をサンガー法にて行った。なお、一部のサンプルは東大医学部ゲノム医学センターにご協力いただき、次世代シーケンサーを使用したwhole exome解析を実施した。

5) 疫学的調査

aHUSの臨床試験を開始するにあたり、東大医学部ヒトゲノム倫理委員会の承認を受け、大学病院医療情報ネットワーク研究センターにおけるUMIN-CTRにて臨床試験登録を開始した。調査方法としては、調査票を各医療機関へ送付し、各主治医に臨床項目、臨床経過、薬剤使用状況などの経過を記載して頂き、得られたデータの集積を行った。また本疾患は希少疾患であり、一元的な本邦の疫学調査が必要と考えられたことから、大学病院臨床試験アライアンスと契約し、ACReSSという患者登録・解析システムを構築した。このシステムを用いてaHUS疫学調査の前向き、後ろ向き研究を開始し、日本腎臓学会、日本小児科学会を通じて研究協力の呼びかけを行った。また、奈良県立医科大学輸血部においてaHUSと診断された患者のコホート研究の移行も開始した。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学における臨床研究、疫学研究倫理委員会とヒトゲノム・遺伝子解析研究の承認を得ており、名古屋大

学においても現在、申請中である。

各医療機関でaHUS疑いの患者を診断し、本人、家族の同意が得られた場合は東大病院の専門外来を受診していただき、詳細な問診、家族歴の聴取などを行い、解析の同意を得た上で採血を行った。なお、東大病院を受診できない症例については、各医療機関で“東大病院において解析を施行すること”について当該施設の倫理委員会に申請していただき、承認後に患者の同意を得たうえで実施した。

C. 研究結果

1) aHUS 患者コホートの樹立

2014年9月より東大病院において本格的にaHUS患者の解析受入れを開始し、2015年3月末までに45件の解析の問い合わせを受けた。そのうち、臨床的に補体関連異常によるaHUSが疑われた症例は16例(男性13例、女性3例)であった。奈良医大輸血部(分担研究者 藤村)で2014年8月末までに集積したaHUS患者は計90例(男性60例、女性30例)であったことから、東大病院で集積した症例と合計すると、計106例(男性73例、女性33例)という本邦最大のaHUSコホートの樹立を成し得た。

2) 蛋白質学的解析及び遺伝子解析

106例のaHUS患者のうち、同意が得られ、一連の解析を終えた71例について報告する。

溶血試験では17例(17/71, 24%)の患者に明らかな溶血亢進(溶血度50%以上)を認め、その内訳は、H因子変異:5例、H因子抗体:7例、C3変異:1例、変異未

同定：4例であった。溶血試験で溶血度が50%以下を示した54例の患者の内訳は、C3変異：25例、CD46（MCP）変異：3例、トロンボモジュリン（THBD）変異：3例、B因子変異：1例、変異未同定：22例、であった。

従来、本邦は欧米に比してC3異常の頻度が高い可能性が示唆されていたが、これにはC3変異の地域特異性やコホート集積地域の偏りが関与している可能性があった。奈良医大と東大で実施した解析結果を見ると、依然として本邦ではC3異常の頻度が高いが（25/71, 35%）、東大で集積した16例の患者のうちC3変異を有していた症例は1例のみであったことから、本邦におけるC3変異頻度の解釈は今後も検討していく必要があると考える。

3) 施策面

平成27年1月よりaHUSが指定難病としてあらたに登録されたことを受け、重症度分類の作成や、指定医向け難病テキスト作成、難病センターのホームページ作成（<http://www.nanbyou.or.jp/entry/3846>）、などの啓蒙に取り組んだ。

4) aHUS患者の臨床登録

東大病院に解析依頼があった16例のaHUS患者については、随時、解析依頼主治医に質問票や家系図の作成を依頼し、データが得られた症例から随時、登録を行っている。また、過去にaHUSと診断された患者の臨床登録を希望する旨の連絡を13施設より受け、随時、これらの施設が有する症例の登録も行っている。

D. 考察

aHUS患者解析システムの移行、解析の実施については、支障なく遂行することができた。aHUSコホートについて、従来、奈良医大輸血部で集積したaHUS患者の多くは小児例であったが、東大病院への移行後は、腎臓内科等からの成人aHUS症例の紹介も増えており、より幅広い年齢層での症例蓄積が見込まれた。

溶血試験や抗H因子抗体解析、遺伝子解析の結果、約70%の症例で原因遺伝子と考えられる変異を同定したが、患者に同定された変異が新規の変異であった場合（特に孤発例の症例では）、aHUSの原因であるか否かを判断することが非常に困難であった。また、約3割の患者では遺伝子変異が同定されず、このような症例の精査についても検討していく必要がある。さらに今後は、原因遺伝子毎の予後についてのデータを収集することで、現在施行されている血漿交換療法への反応の予測や、補体C5に対するモノクローナル抗体療法の適正使用を目指す。

また、本研究班で実施した蛋白質学的・遺伝子学的診断法は保険収載されていない。aHUSは超希少疾患ではあるが確立された遺伝病であり、診断は本来、保険医療で行われるべきものであると考える。確たる診断法の実績を作り、保険医療での検査、診断への道筋にしたいと考える。

E. 結論

本研究を通して、本邦におけるaHUSの疫学的側面及び遺伝子背景が明らかとなりつつあり、本邦aHUS患者の診断・診療

の質の向上に貢献しうると考える。今後も本研究活動を通して、本邦 aHUS 患者の疾患背景を明らかにし、aHUS 診断基準の改訂など、施策面にも積極的に反映させていきたいと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(欧文)

・Miyata T, Uchida Y, Fujimura Y, et al. Atypical haemolyticuremic syndrome in a Japanese patient with DGKE genetic mutations. **Thromb Haemost** (in press)

・Yoshida Y, Miyata T, Fujimura Y, et al. A Novel Quantitative Hemolytic Assay Coupled with Restriction Fragment Length Polymorphisms Analysis Enabled Early Diagnosis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and Identified Unique Predisposing Mutations in Japan. **PLoS One**, 10, e0124655, 2015

・Yada N, Fujioka M, Fujimura Y, et al. STEC:O111-HUS complicated by acute encephalopathy in a young girl was successfully treated with a set of hemodiafiltration, steroid pulse, and soluble thrombomodulin, under plasma exchange. **Clinical Case Reports**, 3, 208-212, 2015

・Hisano M, Ashida A, Fujimura Y, et al. Autoimmune-type atypical hemolytic uremic syndrome treated with eculizumab

as first-line therapy. **Pediatrics Int**, 57, 313-317, 2015

・Imamura H, Fujimura Y, Miyata T, et al. Familial C3 glomerulonephritis associated with mutations in the gene for complement factor B. **Nephrol Dial Transplant**, 30, 862-864, 2015

・Ohta T, Urayama K, Fujimura Y, Miyata T, et al. Eculizumab in the treatment of atypical hemolytic uremic syndrome in an infant leads to cessation of peritoneal dialysis and improvement of severe hypertension. **Pediatr Nephrol**, 30, 603-608. 2015

・Matsukuma E, Fujimura Y, Miyata T, et al. Postoperative atypical hemolytic uremic syndrome associated with complement c3 mutation. **Case Rep Nephrol**, 2014. 784943. 2014

・Matsumoto T, Fujimura Y, Miyata T et al. Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: Concentration of C3 p.I1157T mutation. **Int J Hematol**, 100. 437-442. 2014

(和文)

・古瀬智、加藤秀樹. TTP/HUS と血液浄化. 腎臓・泌尿器科 (印刷中) 2015

・加藤秀樹. 血栓性微小血管症, 腎臓内科レジデントマニュアル改訂第7版, 200-203, 2015

・加藤秀樹、吉田瑤子、南学正臣. 補体・凝固関連 aHUS の病態. **日本腎臓学会誌** 56, 1058-1066, 2014.

- ・加藤秀樹、南学正臣. 非典型HUS. 細胞, 46, 68-71, 2014.
- ・金光 剛史、加藤 秀樹、南学 正臣. 溶血性尿毒症症候群(HUS). 内科【内科疾患最新の治療 明日への指針】(第3章)腎臓, 113, 1162-1163, 2014.
- ・藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病と溶血性尿毒症症候群. 小児科, 55, 1663-1674, 2014
- ・吉田瑤子, 藤村吉博. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の病態と治療戦略. 血液内科. 69, 589-594, 2014
- ・吉田瑤子, 藤村吉博、宮田敏行. 非典型HUSにおける補体異常とその解析. 細胞, 46, 57-60, 2014
- ・吉田瑤子, 藤村吉博. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) -病態・診断およびエクリズマブの効果-. Medical Practice, 31, 100-102, 2014
- ・藤村吉博. 血栓性微小血管障害症(TMA)であるTTPとHUSの診断と治療 update. 日本医師会雑誌. 143, 86-88, 2014
- ・宮田敏行、中村敏子. 病態生理と病理、補体反応. 救急・集中治療, 26, 668-673, 2014.

2. 学会発表

- ・ Omura T, Watanabe E, Ohtsuka Y, Yoshida Y, Kato H, Nangaku M, Oda S. An adult case of thrombotic microangiopathy due to non-Shiga toxin Escherichia coli associated enterocolitis successfully treated with eculizumab, WFSICCM, 2015
- ・Yoshii Y, Matsumoto M, Kurumatani N, Isonishi A, Uemura M, Hori Y, Hayakawa M, Yagi H, Bennett CL, Fujimura Y. Introduction of a Quick Assay for ADAMTS13 Activity Improved a Survival of Acquired TTP Patients Who Received Platelet Transfusions. The 56th Annual meeting of American Society of Hematology (San Francisco/USA, Dec 8, 2014)
- ・ Yagi H, Hayakawa M, Yamaguchi N, Yamashita K, Taniguchi S, Matsumoto M, Tsubaki K, Fujimura Y. Decreased Platelet Thrombus Size, Due to a Heightened Proteolysis of VWF By ADAMTS13, Is Quickly Restored after Valve Replacement in Aortic Stenosis Patients. The 56th Annual meeting of American Society of Hematology (San Francisco/USA, Dec 7, 2014)
- ・ Fujimura Y, Miyata T. Thrombotic microangiopathy (TMA) with special references to a registry of congenital TMAs in Japan, The 3rd ASEAN Federation of Hematology (AFH 2014) (Bangkok, October 23-25, 2014)
- ・ Miyata T. Thrombotic ADAMTS13, 2014 Suzhou International Symposium on Basic and Translational Vascular Research (China, October 11-13, 2014)
- ・ Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y. Registry of congenital TMAs in Japan”, The 8th congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis 2014 (Hanoi, October 9-11, 2014)
- ・ Miyata T, Fujimura Y, Symposium 2, Thrombosis, leukocytes and vascular cells, Registry of hereditary

thrombotic microangiopathies in Japan, The 18th International Vascular Biology Meeting (Kyoto, April 14-17, 2014)

・南学正臣. TMA: HUS と atypical HUS. 第112会 日本内科学会 教育講演 (2015年4月11日)

・藤村吉博. TMA: 最近の考え方と治療法の選択. Nagoya Hematology Forum 特別講演 (名古屋、2015年2月6日)

・南学正臣. 糸球体疾患の最近の進歩: FSGS と aHUS. 第44会 日本腎臓学会東部学術大会 教育講演 (東京、2014年10月24日)

・藤村吉博. ADAMTS13 と血小板輸血-過去、現在、未来. 第20回 ADAMTS13研究会 特別講演 (奈良、2014年9月18日)

・宮田敏行、内田裕美子、吉田瑤子、池島裕子、Fan Xinping、芦田明、和田英夫、大塚泰史、中村健治、石川智朗、八田和大、服部元史、久野正貴、才田謙、西尾健治、瀧本智仁、幡谷浩史、大原敦子、川村尚久、波多江健、松本雅則、加藤秀樹、南学正臣、藤村吉博. 日本人の非典型溶血性尿毒症症候群患者41人の遺伝子解析, 第51回補体シンポジウム (神戸、2014年8月22-23日)

・藤村吉博. TMA の診断と治療の UPDATE. 第13回 VOD/TMA 発症予防に関する臨床研究会 (大阪、2014年8月1日)

・芦田明、山本大助、吉田瑤子、範新萍、松本雅則、宮田敏行、藤村吉博、玉井浩. 日本人家系で非典型溶血性尿毒症症候群の原因と同定された C3 変異の分子構造解析, 第57回日本腎臓学会学術総会 (横浜、2014年7月4-6日)

・藤村吉博. TTP, HUS, aHUS の鑑別診断と治療. 第59回臨床病理近畿支部例会 (天理、2014年6月21日)

・藤村吉博. 本邦 TMA の診断と治療の進歩. 第18回 Skill Up Nephrology in Tokai (名古屋、2014年6月5日)

・吉田瑤子、内田裕美子、宮田敏行、芦田明、服部元史、松本雅則、藤村吉博. 本邦における非典型溶血性尿毒症症候群患者の登録状況と診断法の確立, 第49回日本小児腎臓病学会学術集会 (秋田、2014年6月5-7日)

・吉田瑤子、範新萍、古久保哲朗、岩本顕聰、森俊雄、松本雅則、池島裕子、宮田敏行、藤村吉博. 定量的溶血試験と遺伝子解析を用いた本邦 aHUS 患者の病態解析, 第36回日本血栓止血学会学術集会 (大阪、2014年5月29日-31日)

・田井義彬、西尾健治、大野史郎、吉本清巳、赤井靖宏、吉田瑤子、松本雅則、藤村吉博、池島裕子、宮田敏行. インフルエンザ感染から血栓性微少血管障害をきたして診断された非典型尿毒症症候群の1例, 第36回日本血栓止血学会学術集会 (大阪、2014年5月29-31日)

・池島裕子、Xinping Fan、平井秀憲、本田繁則、吉田瑤子、藤村吉博、Johanna A. Kremer Hovinga、Bernhard Lammle、宮田敏行. 腎障害を示した先天性血栓性血小板減少性紫斑病患者の補体制御因子の遺伝子解析, 第36回日本血栓止血学会学術集会 (大阪、2014年5月29日-31日)

・宮田敏行. シンポジウム「TTP と HUS (総会長シンポジウム)」, TTP/HUS の遺伝子解析, 第62回日本輸血・細胞治療学会総会 (奈良、2014年5月16日)

・芦田明、山本大助、吉田瑤子、範新萍、松本雅則、宮田敏行、藤村吉博、玉井浩. 非典型溶血性尿毒症症候群の原因として日本人で同定された補体因子 C3 遺伝子異常の分子構造解析, 第 117 回日本小児科学会学術集会(名古屋、2014 年 4 月 11-13)

3. その他

・第一回、第二回 日本腎臓学会と日本小児科学会の合同で非典型溶血性尿毒症症候群診断基準改訂委員会を開催した

(2014 年 10 月、2015 年 4 月)

・日本腎臓学会において、本研究班への「非典型溶血性尿毒症症候群の臨床登録のお願い」を公示した (2015 年 3 月)

・日本小児科学会において、本研究班への「非典型溶血性尿毒症症候群の臨床登録のお願い」を公示した (2015 年 3 月)

・日本腎臓学会、日本小児科学会において「エクリズマブ使用に関する注意喚起のお願い」の周知を行った(2014 年 6 月)

・厚生労働省の新規の指定難病申請に向けて申請した。また疾患特異的な重症度分類を策定した

・難病情報センター 「非典型溶血性尿毒症症候群」のホームページ執筆

・「非典型溶血性尿毒症症候群」指定難病テキスト作成

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

無し

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患政策研究事業)
研究分担者報告書

非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の集積と蛋白質学的手法を用いた病態解析

分担研究者 藤村吉博 奈良県立医科大学 輸血部 名誉教授
第三内科 特任教授

研究要旨: 奈良県立医科大学輸血部は 1998 年より本邦における血栓性微小血管症 (TMA) 患者の解析を開始し、過去十数年にわたり、全国の TMA 患者の診断・病態解析を実施してきた。従来、輸血部は TMA の中でも血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の研究を中心に行い、本邦における先天性・後天性 TTP 患者の病態解析を成し得た。一方、集積した TMA 症例の中には TMA 発作の頻回性や、家族性に症状を認めることから「先天性 aHUS」が強く疑われる症例が存在した。このような疫学背景から、2011 年より当輸血部において本邦 aHUS 患者の病態解析を開始した。

2014 年 8 月末までに、奈良医大輸血部で集積した aHUS 患者は計 90 例 (男 60 例、女 30 例) であった。患者解析の手法として定量的溶血試験と抗 Factor H (CFH) 抗体解析を樹立し、同意が得られた 58 例の解析を実施した。結果、溶血試験で異常を認めた症例が 12 例存在し (12/58, 21%)、うち 3 例が CFH 遺伝子異常を、6 例が CFH 自己抗体を有していた。溶血亢進を認めなかった 45 例中 25 例に C3 異常を認め、そのうち 21 例が C3-p. I1157T の同変異を有していた。これより本邦では欧米に比して C3 異常の頻度 (25/58, 43%) が高い可能性が示唆されたが、変異の地域特異性や患者コホートの集積地域に偏りが見られたことから、今後はより全国レベルで aHUS 患者の背景を探索する必要性が示唆された。

本研究を通して、本邦最大の aHUS 患者コホートの樹立を成し得、その病態背景を明らかにした。2014 年 9 月に aHUS 患者解析システムが東大病院へと移行したが、藤村らが樹立した解析系は引き続き診断法として用いられており、本研究の成果は aHUS 患者診断法の向上に寄与することができたと考える。

A. 研究目的

血栓性微小血管症 (TMA) は全身の微小血管に血小板血栓が生じることによる血小板減少や、臓器不全 (特に腎や脳)、微小血管で赤血球が破壊されることによる溶血性貧血の 3 徴候を示す疾患の総称であり、代表的な疾患が血栓性血小板減少

性紫斑病 (TTP) と溶血性尿毒症症候群 (HUS) である。TTP は von Willebrand 因子の特定切断酵素である ADAMTS13 活性の低下により生じる。一方、HUS の約 90% は O157 等の志賀毒素産生性大腸菌の感染を契機に発症するが、残りの約 10% は補体活性化経路の制御異常によって生じる

先天性疾患であり、非典型 HUS (aHUS) と称される。HUS は腎機能障害が顕著であるが、特に aHUS では患者の約 25%が末期腎不全に至るとされ、予後不良である。

aHUS は補体活性化経路の 1 つである第二経路の制御異常により発症し、患者の約 60%で第二経路に属する因子の遺伝子異常が同定されている。これまでに、補体制御因子である Factor H (CFH) や Factor I (CFI)、CD46 (MCP) やトロンボモジュリン (THBD) の異常の他、補体活性化因子である Factor B (CFB) や補体成分 C3 の異常が報告されている。また、最近では血小板活性化に必須のアラキドン酸代謝経路シグナルを遮断する diacylglycerol kinase ϵ (DGKE) の遺伝子異常が高血圧を呈する aHUS 患者で同定されるなど、補体系以外の因子の異常も注目されている。

奈良県立医科大学輸血部は 2011 年より aHUS 患者の解析を開始し、本邦初となる aHUS 患者解析システムの構築を成し得た。具体的には、輸血部で aHUS 患者の血漿を用いた蛋白質学的解析 (溶血試験、抗 H 因子抗体解析など) を実施し、国立循環器病研究センターの宮田敏行部長のもとで疾患候補遺伝子の遺伝子解析を施行した。この結果、本研究班として活動を始める以前の 2013 年 12 月末で 77 例の aHUS 患者の集積を成し得た。

このような状況の中、2014 年 3 月末で分担研究者である藤村が奈良医大輸血部を退任したことから、同部で実施してきた TTP の病態解析は後任の松本雅則教授に一任した。一方、aHUS については最終的な臓器障害は腎死であり、さらなる研

究の発展には腎臓内科医の知見を要すると考えたことから、奈良医大における aHUS 解析は 2014 年 8 月末でいったん終了し、一連の解析システムを東大病院腎臓・内分泌内科 (南学正臣教授、加藤秀樹助教) へ移行することとした。

上記のような背景を踏まえ、本研究は奈良医大輸血部で 2014 年 8 月末までに集積した aHUS 患者の解析を通して、その病態背景を学術的に解明し、診断・治療に寄与することを目的とした。また、aHUS 解析システムの東大病院への移行に際して、本邦における TMA 診断ネットワーク構築の樹立を目指した。

B. 研究方法

1) 対象症例

奈良医大輸血部に TMA 解析の依頼があった症例の中で現病歴、既往歴、家族歴等から aHUS が疑われる症例について患者ならびに患者家族の同意を得たうえで、血漿ならびに血球の集積を行い、下記 2)、3) に示す方法で解析を実施した。

2) 解析方法

a) 羊赤血球を用いた定量的溶血試験

溶血試験とは患者血漿と羊赤血球を混合し、羊赤血球が溶血を起こすか否かを判定する試験である。藤村らは、CFH 活性を阻害するモノクローナル抗体 (O72) の作成に成功し、本抗体を正常人血漿に添加すると羊赤血球が溶血を起こすことを同定した。さらに、この O72 抗体による羊赤血球の溶血度は CFH 異常を有する患者血漿が示す溶血度とほぼ同程度であることを見出した。これより CFH 活性阻

害 O72 抗体を用いた、“定量的溶血試験”を樹立した (Yoshida Y, Miyata T, Fujjimura Y et al., PLoS ONE, 2015)。

溶血試験の具体的な手法としては、まず患者血漿 (5~60 μ L) を羊赤血球 (終濃度 2.5×10^6 cell/ μ L) と混合させ、37°C で 30 min 反応させた。陽性コントロールとして、正常人血漿に O72 抗体を添加し (終濃度 200 μ g/mL) 室温で 30 min 反応させたものを、上記と同様に羊赤血球と混和して反応させた。反応後、停止液を加えて遠心を行い、上清の吸光度 (414 nm) を測定して羊赤血球の溶血度を算出した。なお、O72 添加血漿で得られた吸光値を「100%溶血」と定義して、患者血漿の溶血度を定量的に算出した。溶血試験において羊赤血球の溶血 (溶血度 50%以上) を認めた症例については、CFH 添加試験を実施した。

b) H 因子自己抗体解析

H 因子抗体の解析は、ウェスタンブロット法を用いて行った。精製 CFH を 5% PAGE で SDS-PAGE 電気泳動し、PVDF 膜へ転写、スキムミルクでブロッキング後に、患者血漿 (スキムミルクで 100 倍希釈したもの) と室温で 90 min 反応させた。洗浄後、anti-human IgG-HRP と室温で 1h 反応させ、ECL-Plus (Perkin Elmer 社) を用いてバンドの検出を行った。

3) 遺伝子解析

患者、患者家族の血球 (約 300 μ L) を国立循環器病研究センター研究所の宮田敏行部長の下へ送付し、疾患候補因子の遺伝子解析を行っていただいた。

(倫理面への配慮)

検体採取に際しては、各施設の主治医より十分な説明を行い、書面での同意を得た。また、遺伝子解析に関しては、奈良医大および国立循環器病研究センターの倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) aHUS 患者の集積

2014 年 8 月末までの間に計 90 例の本邦最大の aHUS 患者コホートの樹立を成し得た。男女の内訳は、男性 60 人、女性 30 人と男性の比率が高い傾向が見られた。また、海外では妊娠が aHUS 発症の 1 つのトリガーとして報告されているが、我々が集積した患者の中で妊娠を契機に aHUS を発症した症例は 1 例も存在しなかった。

2) 溶血試験・抗 H 因子抗体解析

集積した 90 例の患者のうち、解析の同意が得られた 58 例について実施した。58 例のうち、溶血試験で明らかな溶血亢進 (溶血度 50%以上) を認めた症例は 12 例であり (12/58, 21%)、うち 3 例に CFH 変異、6 例に抗 H 因子抗体、1 例に C3 異常を認め、残りの 2 例では原因変異が同定されなかった。本成績より、溶血度 50%以上が CFH 関連異常を疑う 1 つの指標である可能性が示唆された。一方、変異が同定されなかった 2 症例のうち、1 例では家族性に溶血亢進が認められたことから、何らかの新規遺伝子変異の可能性も示唆された。

一方、溶血亢進を示さなかった 45 例中 25 例の患者に C3 変異を認めた。特に 21

例は 1157 番目のイソロイシンがスレオニンに置換する C3-p. I1157T の同変異を有しており、本変異の保有者は全例関西地域 (特に三重県) に集積していた (図 1)。

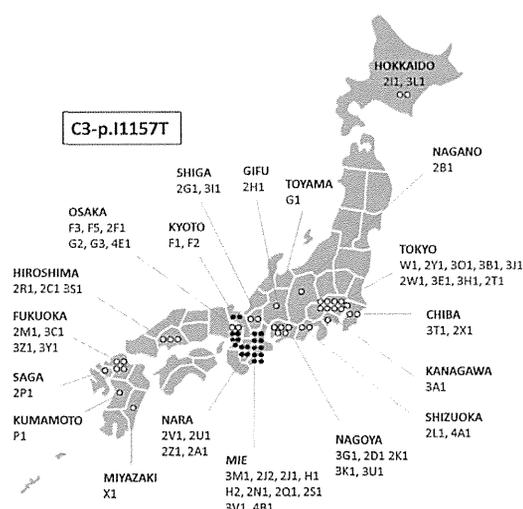


図 1: 本邦 aHUS 患者 45 例の日本における分布 (黒丸印: C3-p. I1157T 変異の保有者)

これより、本邦における C3 変異の地域特異性が示唆された。これら変異は溶血試験では異常を示さなかったことから、同定には PCR と制限酵素処理により容易に変異を検出できる RFLP 解析が有用であった。また、上記に示すように 1 例のみ C3 で溶血亢進を示した症例が存在し、1105 番目のリシンがグルタミン酸に置換する K1105Q 変異であった。立体構造解析の結果、この K1105Q 変異は CFH の C 末領域との相互作用に関連する領域であることが判明した。一方、溶血亢進を示さなかった I1157T 変異は CFH の N 末領域との相互作用に関連する領域であったことから、このような CFH との相互作用の違いが溶血亢進に影響を与える可能性が示唆され

た (立体構造解析は国立循環器病研究センターの宮田敏行部長、秋山正志先生に実施して頂いた。)

3) TMA 解析ネットワークの構築

東大病院腎臓・内分泌内科における aHUS 患者解析システムの樹立に際しては、奈良医大で確立した溶血試験、抗 CFH 抗体解析を引き続き実施することとなった。これより、奈良医大で得た精製 CFH ならびに CFH 活性阻害抗体 (072) を MTA 締結の下、東大病院腎臓・内分泌内科へ譲渡した。患者検体の移行については奈良医大、東大病院、両者の倫理委員会の承認を得た。実際の移行に際しては、解析依頼主治医及び患者の同意が得られた症例について、順次、検体の移行を行った。

上記の aHUS 解析の移行に伴い、本邦 TMA 症例の解析に際しては、奈良医大輸血部は TTP を (松本雅則教授)、東大病院・名古屋大学は aHUS を (南学正臣教授、丸山彰一准教授、加藤秀樹助教)、そして国立循環器病研究センターは TMA 患者の遺伝子解析を (宮田敏行部長) 担当することとし、本邦 TMA 患者のネットワークづくりを成し得た。

本研究成果の一部は英語論文化し、報告を行った (Yoshida Y, Miyata T, Fujjimura Y et al., PLoS ONE, 2015)。別紙に、本邦 aHUS 患者 58 例の分布 (図 1) と本邦と欧米における aHUS 患者に同定された遺伝子変異等の頻度を下記に示す (表 1)。

遺伝子異常及び 抗CFH抗体	頻度(%)	
	欧米 (※)	日本 (n=58)
CFH	20~30%	7%
anti-CFH Ab	5~10%	16%
C3	2~10%	43%
CD46 (MCP)	10~15%	5%
THBD	3~4%	5%
CFB	1~4%	2%
CFI	4~10%	0%
unidentified	~30%	22%

表 1: 本邦と欧米における aHUS 患者に見られる補体系因子の異常とその頻度

D. 考察

本研究より、溶血試験は CFH 関連異常を同定するのに有用な試験であることが示されたが、一方で CFH 関連以外の因子の異常の検出は困難であり、遺伝子解析に頼らざる負えない現状であった。将来的には、蛋白質学的にも H 因子以外の異常を同定することができる試験の樹立が望まれる。

また、本邦では欧米に比べて C3 異常が多い傾向が示されたが (表 1)、同時に C3 症例は関西地域に集積していることも判明した (図 1)。しかしながら、我々が集積した aHUS 患者の約 60%は関西地域の症例であったことから、患者集積地域の偏りが C3 異常の頻度の増加に影響を与えた可能性も示唆された。これより、今後はより全国レベルで患者解析を行うことが重要であると考えます。

E. 結論

本邦 aHUS 患者の診断システムを構築し、溶血試験と RFLP 解析の組み合わせにより患者の約 60%は早期に診断可能であること

が示された。東大病院・名古屋大学への aHUS 患者解析システムの移行に伴い、今後はより全国レベルでの患者集積が可能となり、病態解析の発展が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 著書

・ Fujimura Y, Kokame K, Yagi H, Isonishi A, Matsumoto M, Miyata T. Chapter 5. Hereditary deficiency of ADAMTS13 activity - Upshaw-Schulman syndrome. ADAMTS13 book. Springer (edited by George Rodgers) (in press) 2015

2. 論文発表

(欧文)

・ Isonishi A, Bennett CL, Plaimauer B, Scheiflinger F, Matsumoto M, Fujimura Y. Poor-responder to plasma exchange therapy in acquired TTP is associated with ADAMTS13 inhibitor boosting: Visualization of an ADAMTS13-inhibitor complex, and its proteolytic clearance from plasma. **Transfusion** (in press) 2015

・ Miyata T, Uchida Y, Ohta T, Urayama K, Yoshida Y, Fujimura Y. Atypical haemolyticuremic syndrome in a Japanese patient with DGKE genetic mutations. **Thromb Haemost** (in press)

・ Kato S, Tanaka M, Isonishi A, Matsumoto M, Samori T, Fujimura Y. A rapid, fully automatic and highly sensitive ADAMTS13 gold particle immunoassay using a

- routine biochemistry analyser. **Brit J Haematol** (in press) 2015
- Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirotani-Ikejima H, Uchida Y, Oyama Y, Kokubo T, Fujimura Y. A Novel Quantitative Hemolytic Assay Coupled with Restriction Fragment Length Polymorphisms Analysis Enabled Early Diagnosis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and Identified Unique Predisposing Mutations in Japan. **PLoS One**, 10, e0124655, 2015
 - Yada N, Fujioka M, Bennett CL, Inoki K, Miki T, Watanabe A, Yoshida T, Hayakawa M, Matsumoto M, Fujimura Y. STEC:O111-HUS complicated by acute encephalopathy in a young girl was successfully treated with a set of hemodiafiltration, steroid pulse, and soluble thrombomodulin, under plasma exchange. **Clinical Case Reports**, 3, 208-212, 2015
 - Hisano M, Ashida A, Nakano E, Suehiro M, Yoshida Y, Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y, Hattori M. Hattori M. Autoimmune-type atypical hemolytic uremic syndrome treated with eculizumab as first-line therapy. **Pediatrics Int**, 57, 313-317, 2015
 - Imamura H, Konomoto T, Tanaka E, Hisano S, Yoshida Y, Fujimura Y, Miyata T, Nunoi H. Familial C3 glomerulonephritis associated with mutations in the gene for complement factor B. **Nephrol Dial Transplant**, 30, 862-864, 2015
 - Ohta T, Urayama K, Tada Y, Furue T, Imai S, Matsubara K, Ono H, Sakano T, Jinno K, Yoshida Y, Miyata T, Fujimura Y. Eculizumab in the treatment of atypical hemolytic uremic syndrome in an infant leads to cessation of peritoneal dialysis and improvement of severe hypertension. **Pediatr Nephrol**, 30, 603-608. 2015
 - Matsukuma E, Imamura A, Iwata Y, Takeuchi T, Yoshida Y, Fujimura Y, Fan X, Miyata T, Kuwahara T. Postoperative atypical hemolytic uremic syndrome associated with complement c3 mutation. **Case Rep Nephrol**, 2014. 784943. 2014
 - Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T. Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: Concentration of C3 p.I1157T mutation. **Int J Hematol**, 100, 437-442. 2014
- (和文)
- 藤村吉博. 血漿中の ADAMTS13 による血栓症の治療. 血液事業. (in press) 2015
 - 藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病と溶血性尿毒症症候群. 小児科, 55, 1663-1674, 2014
 - 吉田瑤子, 藤村吉博. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の病態と治療戦略. 血液内科. 69, 589-594, 2014
 - 藤村吉博, 石西綾美. TTP の病態. 日本腎臓学会誌. 56, 1043-1051, 2014

- ・藤村吉博, 松本雅則, 石西綾美, 八木秀男, 小亀浩市, 宮田敏行. 血栓性血小板減少性紫斑病. 臨床血液. 55, 93-104, 2014
- ・吉田瑤子, 藤村吉博. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) 一病態・診断およびエクリズマブの効果ー. Medical Practice, 31, 100-102, 2014
- ・藤村吉博. 血栓性微小血管障害症(TMA)であるTTPとHUSの診断と治療update. 日本医師会雑誌. 143, 86-88, 2014

3. 学会発表

(国際学会)

- ・Yoshii Y, Matsumoto M, Fujimura Y, et al. Introduction of a Quick Assay for ADAMTS13 Activity Improved a Survival of Acquired TTP Patients Who Received Platelet Transfusions. The 56th Annual meeting of American Society of Hematology (San Francisco/USA, Dec 8, 2014)
- ・Yagi H, Hayakawa M, Fujimura Y, et al. Decreased Platelet Thrombus Size, Due to a Heightened Proteolysis of VWF By ADAMTS13, Is Quickly Restored after Valve Replacement in Aortic Stenosis Patients. The 56th Annual meeting of American Society of Hematology (San Francisco/USA, Dec 7, 2014)
- ・Fujimura Y. Registry of congenital thrombotic microangiopathy in Japan. The 3rd ASEAN Federation of Hematology Congress. Plenary lecture (Bangkok, Oct 23, 2014)

(国内学会)

- ・藤村吉博. TMA：最近の考え方と治療法の選択. Nagoya Hematology Forum 特別講演 (名古屋、2015年2月6日)
- ・藤村吉博. ADAMTS13と血小板輸血ー過去、現在、未来. 第20回ADAMTS13研究会 特別講演 (奈良、2014年9月18日)
- ・藤村吉博. TMAの診断と治療のUPDATE. 第13回VOD/TMA発症予防に関する臨床研究会 (大阪、2014年8月1日)
- ・藤村吉博. TTP, HUS, aHUSの鑑別診断と治療. 第59回臨床病理近畿支部例会 (天理、2014年6月21日)
- ・藤村吉博. 本邦TMAの診断と治療の進歩. 第18回Skill Up Nephrology in Tokai (名古屋、2014年6月5日)

3. その他

- ・第二回 日本腎臓学会と日本小児科学会の合同の非典型溶血性尿毒症症候群診断基準改訂委員会に参加 (2015年4月23日)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特になし