

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

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

分担研究者 丸山彰一 名古屋大学 腎臓内科 准教授
分担研究者 加藤秀樹 東京大学 腎臓内分沁内科 助教

研究要旨：非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）は非常に稀な補体関連の遺伝子異常により発症する疾患である。本研究はこれまでに奈良県立医科大学で診断されたaHUS患者のコホートを引き継ぎ、疫学研究を継続するとともに、東京大学、名古屋大学においてaHUSの適切な診断拠点を確立することを目的として行った。

2014年4月より東京大学及び名古屋大学においてaHUS患者解析システムの体制整備に取り組み、患者解析の手法として溶血試験ならびにH因子抗体解析システムを樹立した。2015年3月末までに45例のaHUS患者について解析依頼を受け、うち16例の患者を補体異常関連のaHUSと診断した。溶血試験では5例の患者に明らかな溶血亢進を認め、うち2例にH因子異常を、1例にH因子抗体を認め、aHUSの診断樹立を確認した。aHUS患者の臨床登録についても、登録システムの体制を整備し、順次、患者の登録を始めている。

A. 研究目的

aHUS は非常に稀な、主に補体の異常に起因する疾患であり、透析に至る割合は約 50%程度であり、死亡率も 25%と予後不良である。また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）、遺伝学的検査が必要であり、大半の大学病院においては実施できず、診断の保険収載もされていない。

従来、分担研究者の藤村吉博らが日本で先駆的に先天性 aHUS 患者を診断してきたが 2014 年 9 月をもって一連の aHUS 患者解析システムが東京大学医学部附属病院に移行した。これより、分担研究者である丸山、加藤は奈良医大で 2014 年 8 月

末までに集積した 90 例の aHUS 患者コホートを引き継ぎ、より全国レベルでの aHUS 患者解析を継続する。

本研究では、非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）の補体系検査、遺伝子検査体制を東京大学、名古屋大学で樹立し、日本全体で 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その病態解明を行なうものである。全国規模で aHUS の発症件数の把握、診断を行い、それらの患者を登録、治療経過を観察することで、原因遺伝子別に重症度・予後を把握し、希少疾患の基礎的知見の収集を行い、本邦での診断基準、ガイドラインの策定を通じて、診断・治療の質を高めることを目的とし

た。

B. 研究方法

1) aHUS 患者の集積

東京大学および名古屋大学にて aHUS 疑い患者の診断受け入れ体制の整備を行なった。本人や家族に実際に外来を受診して頂き、また、受診できない患者は各依頼元の施設で同意を得たうえで、サンプルを郵送していただき、蛋白質学的解析や遺伝子解析を行う体制を整えた。

2) 患者血漿を用いた補体調節因子等の蛋白質学的解析

分担研究者である藤村吉博の指導の下、東京大学において患者血漿を用いた補体調節因子の蛋白質学的解析の移行、実験室のセットアップを行なった。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 またはウェスタンブロット)、CHHR1 と CFHR3 蛋白の半定量 (ウェスタンブロット) の樹立を行った。

a) 羊赤血球を用いた溶血試験

羊赤血球に患者血漿を添加し反応させたのち、溶血の強さを吸光度で測定した。本試験では正常人血漿に H 因子活性阻害モノクローナル抗体 (mAb) である 072 (奈良県立医科大学 藤村前教授より供与) を添加したものを、陽性コントロールとして用いた。また、本阻害抗体による溶血度を 100% と定義し、患者の溶血度を定量的に算出した。通常、正常人の血漿と羊赤血球を混合させても、羊赤血球は溶血を起こさない。これは、正常人血漿中

の H 因子が羊赤血球膜に結合し、血漿中の補体による攻撃から羊赤血球を保護するためであるとされる。よって、本試験において溶血の亢進が見られた場合には H 因子関連の機能異常を疑った。なお、これまでの解析結果より、C3 異常や、CD46、トロンボモジュリン等の異常の多くは溶血試験において溶血亢進を示さないことを確認していることから溶血の亢進が見られない場合は、H 因子以外の遺伝子異常を疑った。H 因子添加による溶血補正試験は、上記の溶血反応において溶血の亢進が見られた場合、血漿より精製した H 因子を添加し、溶血が補正されるか否かを調べた。本試験において溶血が補正された場合は H 因子活性の低下を疑った。

b) 抗 H 因子抗体解析

抗 H 因子抗体検査は、精製した H 因子を用いたウェスタンブロット法ならびに Abnova 社の ELISA plate を用いて抗体価測定を行った。

c) 遺伝子解析

遺伝学的検査は、血液サンプルを輸送し、分担研究者である宮田敏行が国立循環器研究センターで施行し、既知の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 の遺伝子検索をサンガー法にて行った。遺伝子診断法に関しては、一部のサンプルで、東大医学部ゲノム医学センターでの次世代シーケンサーを使用した whole exome 解析に提出した。

(倫理面への配慮)

本研究では、奈良県立医科大学の患者情報、患者サンプルの東京大学への委譲、東大での aHUS 診断、遺伝子検査、補体系検査、疫学研究に関して、東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得ている。また厚生労働省の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守している。

C. 研究結果

1) aHUS 患者の集積とコホートの樹立

奈良県立医科大学輸血部における aHUS 患者コホートの引き継ぎに関しては、同大学の倫理委員会の承認を得たことから、各主治医を通じて同意書が得られた患者から、順次東大に検体等を委譲している。

2014 年 9 月より本格的に東京大学において aHUS における補体調節因子等の蛋白質レベルでの解析系を樹立し、国立循環器病研究センター研究所との遺伝学的診断の連携を確立した。東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科のホームページで解析受付の旨を公開した。また 2015 年 1 月から、aHUS が新規に指定難病に認定されたことに伴い、難病情報センターに本研究班における検査の引き受け、疫学調査の旨を掲載した (<http://www.nanbyou.or.jp/entry/3848>)。さらに、日本腎臓学会、日本小児科学会を通じて、各学会ホームページに本研究班で実施している疫学調査への協力呼びかけを案内した。

結果、2015 年 3 月末までに aHUS 疑いで解析依頼を受けた件数は 45 件であった。このうち、二次性 TMA と考えられる疾患や TMA 以外の疾患が 25 例であった。二次

性 TMA が否定的で臨床的に aHUS が疑われる症例は 16 例であった。その他に STEC-HUS と判明した例が 2 例あった。臨床的に aHUS と二次性 TMA の判別が難しかった例は 2 例認められた。

aHUS が疑われた 16 例の男女比は、男 13 例、女 3 例であり、男性の比率が優位に高かった。また、発症時の平均年齢は 16.6 歳であった。

2) 補体調節因子の蛋白質学的解析及び遺伝子解析

臨床的に aHUS が疑われる例は、主治医より血液サンプルを送ってもらい、血漿を用いた補体系検査、遺伝子検査を行った。

aHUS 患者 16 例のうち、溶血試験では 5 例の患者に溶血度 50%以上の溶血亢進を認め、うち 2 例に H 因子異常を、1 例に H 因子抗体を認めた。奈良医大における検査成績と同様の結果を得られたことから、東大病院に置いても溶血試験の樹立を成し得たと言える。

以下、解析を実施した典型例を 2 名示す。

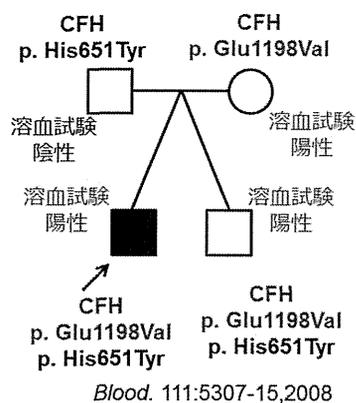
症例 1.

7 か月男児。双子の兄。3 日前から水様便が 1 日数回出現し、地域の中核病院を受診。HUS 症状を認め、志賀毒素産生大腸菌を検出しないため、当研究班に連絡があった。溶血試験では双子の兄（患児）、弟、母で溶血試験陽性を認めた。また H 因子添加試験で溶血反応の低下が認められたことから、H 因子関連の異常が強く疑われた。遺伝子解析の結果では、母親、患児、弟の CFH 遺伝子において、Blood.

111;5307-5315, 2008 に報告がある部位である 1198 番目のグルタミン酸がバリンに変わる変異が認められた。患児は、抗 C5 抗体療法を開始し、速やかに改善している。

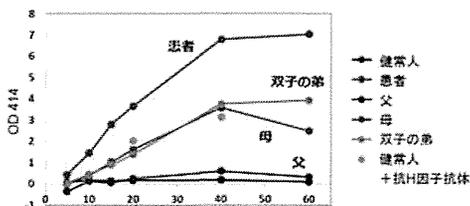
図

遺伝子解析結果



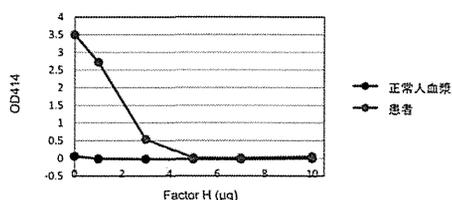
図

溶血試験結果



図

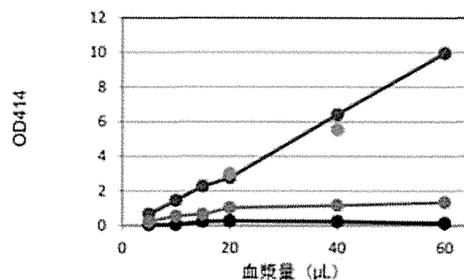
H因子添加試験結果



症例 2

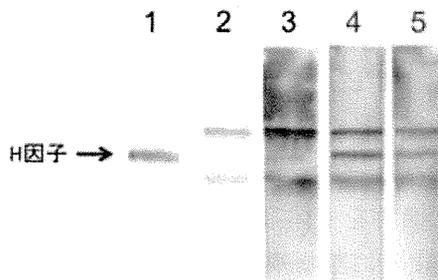
7 歳男児。HUS 症状あり、近くの大学病院に入院。志賀毒素産生大腸菌を検出しないため、当研究班に連絡があった。溶血試験が陽性であり、また血漿交換後の血漿では陰性であったため、H 因子関連の異常が疑われた。ELISA また患者血清を一次抗体として使用したウエスタンブロットにおいても、患者血漿中の抗 H 因子抗体が陽性であった。CFHR 領域の遺伝子異常に関しては現在検索中である。この患者は血漿輸注、抗 C5 抗体療法を開始し、速やかに改善している。

図



上から
患者検体
H 因子活性阻害モノクローナル抗体
血漿交換後患者血漿
正常人血漿

図



1. 1次抗体:マウス由来の抗H因子モノクローナル抗体
2次抗体: anti-mouse IgG-HRP
2. 血漿添加なし
3. 正常人血漿 (陰性コントロール)
4. 患者血漿 (血漿交換前)
5. 患者血漿 (血漿交換後)

3) aHUS患者の臨床登録

大学病院臨床試験アライアンスが開発したアクレスという登録システムを用いて東大病院臨床研究支援センターの協力の元で、aHUS患者の臨床情報を登録するシステムの構築を行い、aHUS患者登録システムを樹立した。

4) 施策面

2015年1月よりaHUSが指定難病になり、本研究班も診断基準作成、重症度分類作成、難病センターホームページの原稿作成、指定医向け難病テキスト作成、などの啓蒙に取り組んできた。また日本腎臓学会、日本小児科学会合同の非典型溶血性尿毒症症候群 診断基準改定委員会に参加し、診療ガイド作成に向けて取り組んでいる。

D. 考察

aHUS について、現在の診断基準では、純粋な遺伝性の補体系異常による aHUS だけではなく、二次性 TMA 疾患も aHUS と称しているために、二次性 TMA だが aHUS の基準を満たす疾患の検査依頼が多数認められる。現在、本研究班も参加し、日本腎臓学会と日本小児科学会の合同で、aHUS 診断基準改定が進められており、aHUS の名称を補体系異常による疾患だけとなるように診断基準改定を進める必要性があると考えられた。

本年度の研究活動を通して、16 例の aHUS

患者を新規に同定したが、これまで本邦で診断された例が約 100 例前後であることを考えると、かなりの高率で当研究班に問い合わせをいただいていると考えられる。溶血試験、H 因子抗体の解析系の樹立を成し得、本邦で唯一の体系的に aHUS を診断できる施設であることから、今後も継続して診断、疫学調査を続ける必要性があると考えられる。

E. 結論

引き続き、溶血試験、抗 H 因子抗体測定法、遺伝子診断法を用いて aHUS の診断を行い、国内での適切な診断、疫学調査を行う必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- ・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
- ・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、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.

2. 学会発表

- ・ Taku Omura, Eizo Watanabe, Yasufumi Ohtsuka, Yoko Yoshida, Hideki Kato, Masaomi Nangaku, Shigeto Oda: An adult case of thrombotic microangiopathy due to non-Shiga toxin Escherichia coli associated enterocolitis successfully treated with eculizumab 2015 WFSICCM
- ・ 宮田敏行、加藤秀樹、南学正臣、藤村吉博ら。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)
- ・ 丸山彰一。Atypical HUS の診断から治療。第 59 回日本透析医学会学術集会・総会 ランチョンセミナー(神戸、2014 年 6 月 15 日)
- ・ Nagahara Yasuko, Sato Yuka, Suzuki Yasuhiro, Kato NOoritoshi, Katsuno Takayuki, Ozaki Takenori, Kosugi Tomoki, Sato Waichi, Tsuboi Naotake Mizuno Masashi, Maruyama Shoichi, Ito Yasuhiko, Matsuo Seiichi : Successful treatment of TMA with Eculizumab in plasma exchange-refractory atypical hemolytic uremic syndrome. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology (東京、2014 年 5 月 15 日)

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 8 日、2015 年 4 月 23 日)。
- ・ 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 9 日)。

- ・ 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 12 日)。
- ・ 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 11 日)。
- ・ 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

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

研究分担者 宮田敏行 国立循環器病研究センター 分子病態部 部長
研究協力者 内田裕美子 国立循環器病研究センター 分子病態部 非常勤研究員
研究協力者 大田敏之 県立広島病院 小児腎臓科 主任部長
研究分担者 藤村吉博 奈良県立医科大学 輸血部

研究要旨

非典型溶血性尿毒症症候群 (atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS) の約半数に補体第二経路にかかわる因子の遺伝子異常が同定されている。2013年、1歳未満で高血圧を示す aHUS 患者に Diacylglycerol kinase epsilon (DGKE) のホモ接合体および複合ヘテロ接合体の遺伝子変異が報告された。本研究は日本人 aHUS 患者に DGKE 遺伝子変異の同定を目的とする。奈良県立医科大学が行っている「血栓性微小血管症 (TMA) 登録研究」から、2歳未満で aHUS を発症した患者 14 人を選び、DGKE 遺伝子の蛋白質コード領域の塩基配列解析を倫理委員会で承認の上で行った。患者 14 人のうち、1人にスプライス部位変異とフレームシフト変異を複合ヘテロ変異として同定した。補体系因子 CFH, C3, MCP, CFI, CFB, THBD には predisposing 変異を同定しなかった。患者は CFH に対する自己抗体を保有しなかった。抗補体薬エクリズマブ投与により、患者は腹膜透析からの離脱、血小板数の増加、C3 値の上昇、LDH 値の低下が観察された。生後 4 ヶ月時に血漿交換に抵抗性を示す aHUS を発症し極めて重篤な高血圧症を示す患者に、DGKE 遺伝子の複合ヘテロ変異を同定した。

A. 研究目的

溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) は、微小血管障害性溶血性貧血、血小板減少、急性腎障害を主な 3 徴候とする疾患である。HUS の約 90% は志賀毒素産生性大腸菌の感染を契機に発症する。残りの約 10% はこれらの大腸菌への感染を介さずに発症することから非典型 (atypical HUS, aHUS) と呼ばれる。aHUS の約半数に、補体第二経路にかかわる因子の遺伝子異常が同定されている。

補体第二経路の活性化で生じる C3b は、微生物などに結合してオプソニン化し、オプソニン化された微生物は食細胞により貪食される。C3b は自己細胞にも結合するが、結合した C3b は有害なので速やかに分解される。この分解に関わる因子である CFH、CFI、MCP、トロンボモジュリン (THBD) の loss-of-function の遺伝子変異、

CFH に対する自己抗体、C3b が分解を受けにくい C3 の gain-of-function の遺伝子変異、CFB の gain-of-function の遺伝子変異は、C3b の分解が障害され自己細胞が補体により障害を受けやすいと考えられ、こういった変異が aHUS 患者に同定されている。これまで、私たちは日本人 aHUS 患者を対象に前述の 6 種類の補体系遺伝子の解析を行ってきた (1, 2)。2013 年、1歳未満で高血圧を示す aHUS 患者に、補体系には関係しない Diacylglycerol kinase epsilon (DGKE) のホモ接合体もしくは複合ヘテロ接合体の遺伝子変異が報告された (3)。そこで、本研究では、日本人 aHUS 患者を対象に DGKE 遺伝子変異の同定を行った。

B. 研究方法

奈良県立医科大学が行っている「血栓

性微小血管症 (TMA) 登録研究」から、2歳未満で aHUS を発症した患者 14 人を選び、DGKE 遺伝子の蛋白質コード領域の塩基配列解析を倫理委員会承認の上で行った。aHUS の診断は古典的 3 徴候 (溶血性貧血、血小板減少、腎障害) を示し、かつ ADAMTS13 活性が著減する血栓性血小板減少性紫斑病、志賀毒素陽性 HUS、感染や移植に伴う二次性 TMA を除外することによった。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

日本人 aHUS 患者 14 人の DGKE 遺伝子の蛋白質コード領域の塩基配列解析を行ったところ、1 人に父方由来のスプライス部位変異 (c. 1213-2A>G) と母方由来のフレームシフト変異 (c72del, p. Leu24Cysfs*145) を複合ヘテロ変異として同定した (図 1)。本患者には補体系因子 CFH, C3, MCP, CFI, CFB, THBD に predisposing 変異を同定しなかった (4)。患者は CFH に対する自己抗体を保有しなかった。また、別の 1 人の患者に DGKE p. Ile195Met 変異を同定したが、ヘテロ接合体であるため、aHUS 発症に繋がるものではないと判断した。

D. 考察

本研究では、生後 4 ヶ月時に血漿交換に抵抗性を示す aHUS を発症し、極めて重篤な高血圧症を示す患者に、DGKE 遺伝子の複合ヘテロ変異を同定した (5)。日本人では初の DGKE 変異による aHUS 発症例である。

aHUS の治療は補体反応を阻害する C5 単クローン抗体である抗補体薬エクリズマブの使用や血漿療法が行われる。DGKE 欠損は補体系には関係しないので、DGKE 変異を有する aHUS 患者はこれらの治療が有効ではないと考えられる。これまでに 7 人の患者にエクリズマブが使用されたが、aHUS の再発が観察された (1)。しかし、本患者はエクリズマブ投与により、腹膜透析からの離脱、血小板数の増加、C3 値の上昇、LDH 値の低下が観察された (4)。これまで、DGKE に変異を有する aHUS 患者は、エクリズマブで病態が改善しないと報告されていたが (1)、本患者はエクリズマブが著効した点

が特筆に値する。

これまでに aHUS 患者に同定された DGKE 遺伝子変異をまとめた (表 1、図 2)。DGKE 遺伝子のホモ接合体変異もしくは複合ヘテロ接合体変異は、aHUS だけではなく

membranoproliferative-like glomerular microangiopathy (MPGN) 患者にも同定されている。DGKE 変異ヘテロ接合体は aHUS や MPGN の発症に関与しない。これまで同定された DGKE 変異は、ナンセンス変異 (p. Trp322*, p. Ser11*, p. Gln334*, p. Gln43*, p. Lys101*) やフレームシフト変異 (p. Val163Serfs*3, p. Trp158Leufs*8, p. Thr204Glnfs*6, p. Gly484Glyfs*10, p. His536Glnfs*16, p. Leu24Cysfs*145), スプライス部位変異 (c. 889-1G>A, c. 889-2A>G, c. 888+40A>G, c. 1213-2A>G) など、タンパク質の生合成に大きな影響を与える変異が多く見られ、ミスセンス変異 (p. Arg63Pro, p. Arg273Pro, p. Pro498Arg, p. Gln248His) は比較的少ない (表 1)。

DGKE は細胞内のアラキドン酸含有ジアシルグリセロール (Arachidonic acid-containing diacylglycerol, AADAG) を、それに対応するホスファチジン酸にリン酸化することにより AADAG レベルを制御している (図 3)。ATP、アンギオテンシン II、ヒスタミン、トロンビン、コラーゲンなどの細胞外刺激は、GPCR や Receptor tyrosine kinase を介してホスホリパーゼ C (PLC) を活性化し、phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) から IP₃ と AADAG を生成する (1)。AADAG は protein kinase C (PKC) を活性化し、PKC は血管内皮細胞では多種の凝固促進因子 (PAF, PAI-1, VWF, TF) と線溶因子 (tPA) の産生を促す。AADAG 依存性 PKC 活性化シグナルはトロンビンによる血小板活性化を促進し、血小板の顆粒放出やトロンボキサン A₂ の放出を行う。このように、AADAG は PKC の活性化を介して血管内皮細胞や血小板から各種因子の産生を促し凝固を亢進する。また、AADAG は DGKE によってリン酸化を受けて対応するホスファチジン酸 (PA) に変換され、PA はホスフ

アチジルイノシトール (PI) サイクルを
通ってPIP₂に戻るによりAADAGシグナル
は制御されている。したがって、DGKEが
働かないとAADAGシグナルが持続的に生
じ、その結果凝固亢進状態になると考えら
れる。

本成果はThromb Haemost誌に受理され
2015年10月号に掲載予定である(5)。

References

1. Fan X, Yoshida Y, Honda S, et al. Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*, 2013; 54: 238- 246.
2. Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, 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*, 2014; 100: 437- 442.
3. Lemaire M, Fremeaux-Bacchi V, Schaefer F, et al. Recessive mutations in *DGKE* cause atypical hemolytic-uremic syndrome. *Nat Genet*, 2013; 45: 531- 536.
4. Ohta T, Urayama K, Tada Y, 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*, 2015; 30: 603-608.
5. Miyata T, Uchida Y, Ohta T, Urayama K, Yoshida Y, Fujimura Y, Atypical haemolytic uremic syndrome in a Japanese patient with *DGKE* genetic mutations, *Thromb Haemost*, 2015, in press.

E. 結論

生後4ヶ月時に血漿交換に抵抗性を示すaHUSを発症し極めて重篤な高血圧症を示した患者に、DGKE遺伝子の複合ヘテロ変異を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*, Volume 2014, Article ID 784943, 5 pages, 2014 Nov.

- 2) 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(5), 437-442, 2014 Nov.

- 3) 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.

- 4) Hisano M, Ashida A, Nakano E, Suehiro M, Yoshida Y, Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y, Hattori M: Autoimmune-type atypical hemolytic uremic syndrome treated with eculizumab as first-line therapy. *Pediatr Int*, 57(2), 313-317, 2015.

- 5) 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(5), e0124655, 2015.

- 6) Imamura H, Konomoto T, Tanaka E,

Miyata T, Nunoi H: Familial C3 glomerulonephritis associated with mutations in the gene for complement factor B. *Nephrol Dial Transplant*, 2015 issue, in press.

7) Miyata T, Uchida Y, Ohta T, Urayama K, Yoshida Y, Fujimura Y, Atypical haemolytic uremic syndrome in a Japanese patient with *DGKE* genetic mutations, *Thromb Haemost*, 2015, in press.

8) 宮田敏行、中村敏子「補体反応」救急・集中治療、第26巻、第5・6号、徹底ガイド DICのすべて2014-2015 IV章 病態生理と病理、668-673頁(2014)

2. 学会発表

1) 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、2014 年 4 月 11-13 日、名古屋市

2) Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, Symposium 2, Thrombosis, leukocytes and vascular cells, Registry of hereditary thrombotic microangiopathies in Japan, The 18th *International Vascular Biology Meeting*, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan.

3) 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、2014 年 5 月 16 日、奈良市

4) 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、2014 年 5 月 29 日-31 日、大阪市

5) 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

Hisanō S, Yoshida Y, Fujimura Y, 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、2014 年 5 月 29-31 日、大阪市

6) 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、2014 年 5 月 29 日-31 日、大阪市

7) 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、2014 年 6 月 5-7 日、秋田市

8) 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 回日本腎臓病学会学術総会、2014 年 7 月 4-6 日、横浜市

9) 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、八田和夫、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、2014 年 8 月 22-23 日、神戸市

10) Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata, “Thrombotic microangiopathy (TMA) with special references to a registry of congenital TMAs in Japan”, The 3rd ASEAN Federation of Hematology (AFH 2014), October 23-25, 2014, Bangkok, Thailand

11) Toshiyuki Miyata, “Thrombotic

ADAMTS13” , 2014 Suzhou International Symposium on Basic and Translational Vascular Research, October 11-13, 2014, Suzhou, China

12) Masanori Matsumoto, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura “Registry of congenital TMAs in Japan” , The 8th congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis- 2014, October 9-11, 2014, Hanoi, Vietnam

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1. これまでにaHUS患者およびMPGN患者に同定されたDGKE遺伝子変異

疾患名	変異1	変異2	人数	文献
aHUS	p.Trp322* (homo)		4	Lemaire <i>et al</i> <i>Nat Genet</i> , 2013
	p.Arg63Pro	p.Val163Serfs*3	2	
	p.Trp322*	p.Ser11*	1	
	p.Trp322*	p.Trp158Leufs*8	1	
	p.Gln334* (homo)		1	
	c.889-1G>A (homo)		1	
	p.Arg273Pro (homo)		3	
MPGN	p.Gln43* (homo)		1	Ozaltin <i>et al</i> <i>J Am Soc Nephrol</i> , 2013
	p.Thr204Glnfs*6 (homo)		1	
	c.889-2A>G (homo)		1	
aHUS	p.Lys101* (homo)		1	Westland <i>et al</i> <i>J Am Soc Nephrol</i> , 2014
aHUS	p.Trp322*	p.Pro498Arg	1	Sanchez Chinchilla <i>et al</i> <i>Clin J Am Soc Nephrol</i> , 2014
	p.Gln248His	p.Gly484Glyfs*10	2	
	p.His536Glnfs*16 (homo)		1	
aHUS	c.888+40A>G (homo)		2	Mele <i>et al</i>
	c.888+40A>G	p.Trp322*	3	<i>Clin J Am Soc Nephrol</i> , Miyata <i>et al</i> <i>Thromb Haemost</i> , 2015
aHUS	p.Leu24Cysfs*145	c.1213-2A>G	1	

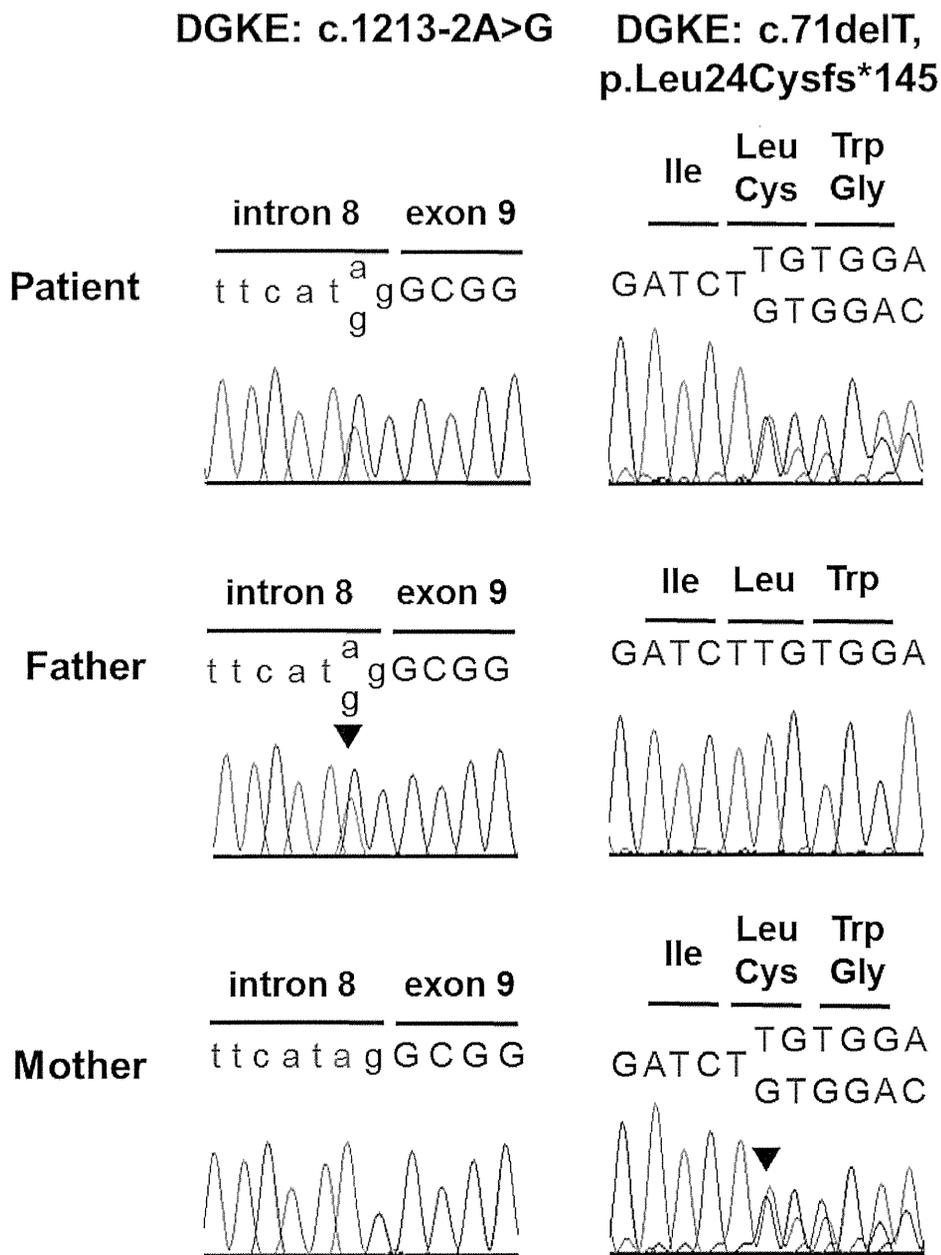


図1. 生後4ヶ月時にaHUSを発症した高血圧症を示す患者に同定されたDGKE遺伝子の複合ヘテロ変異

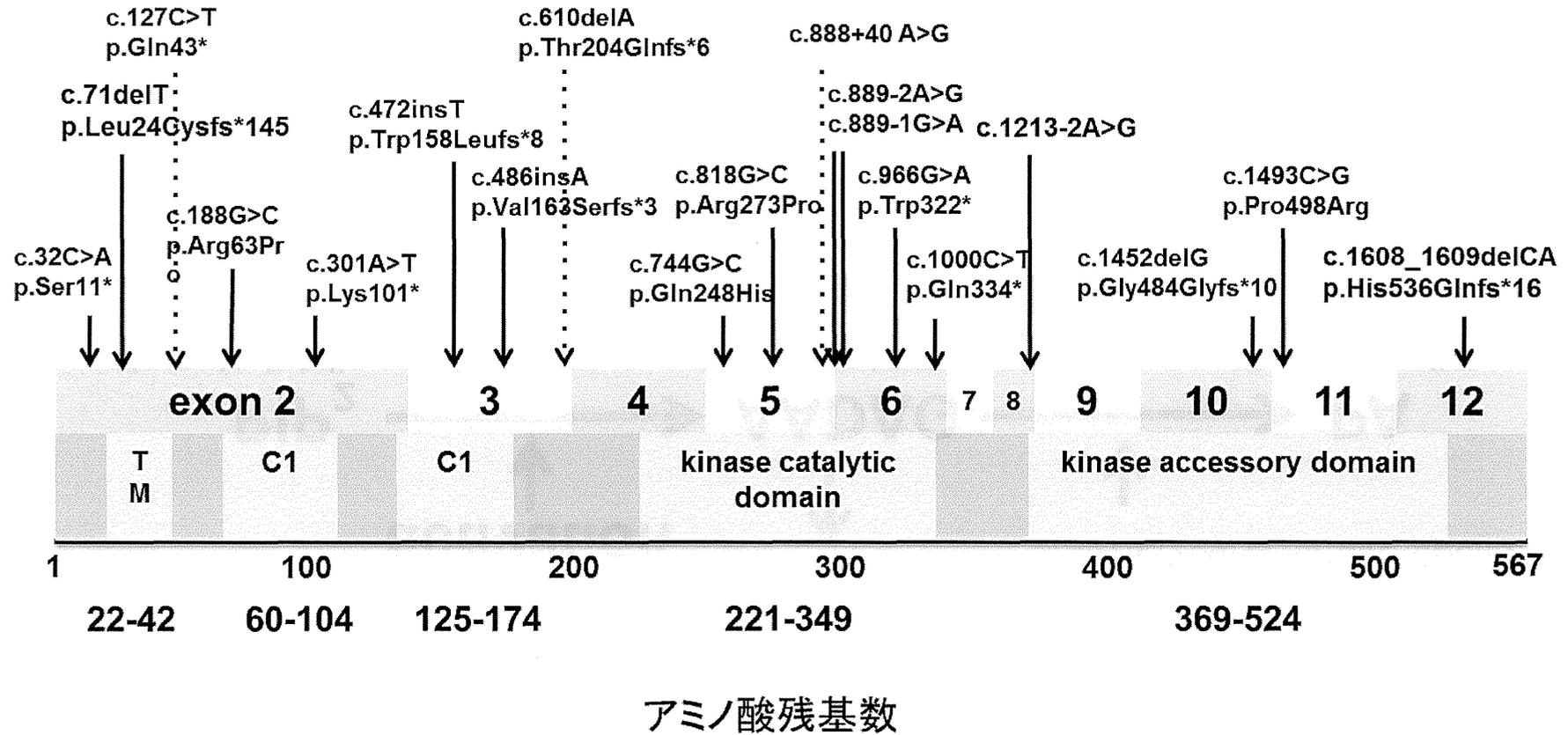
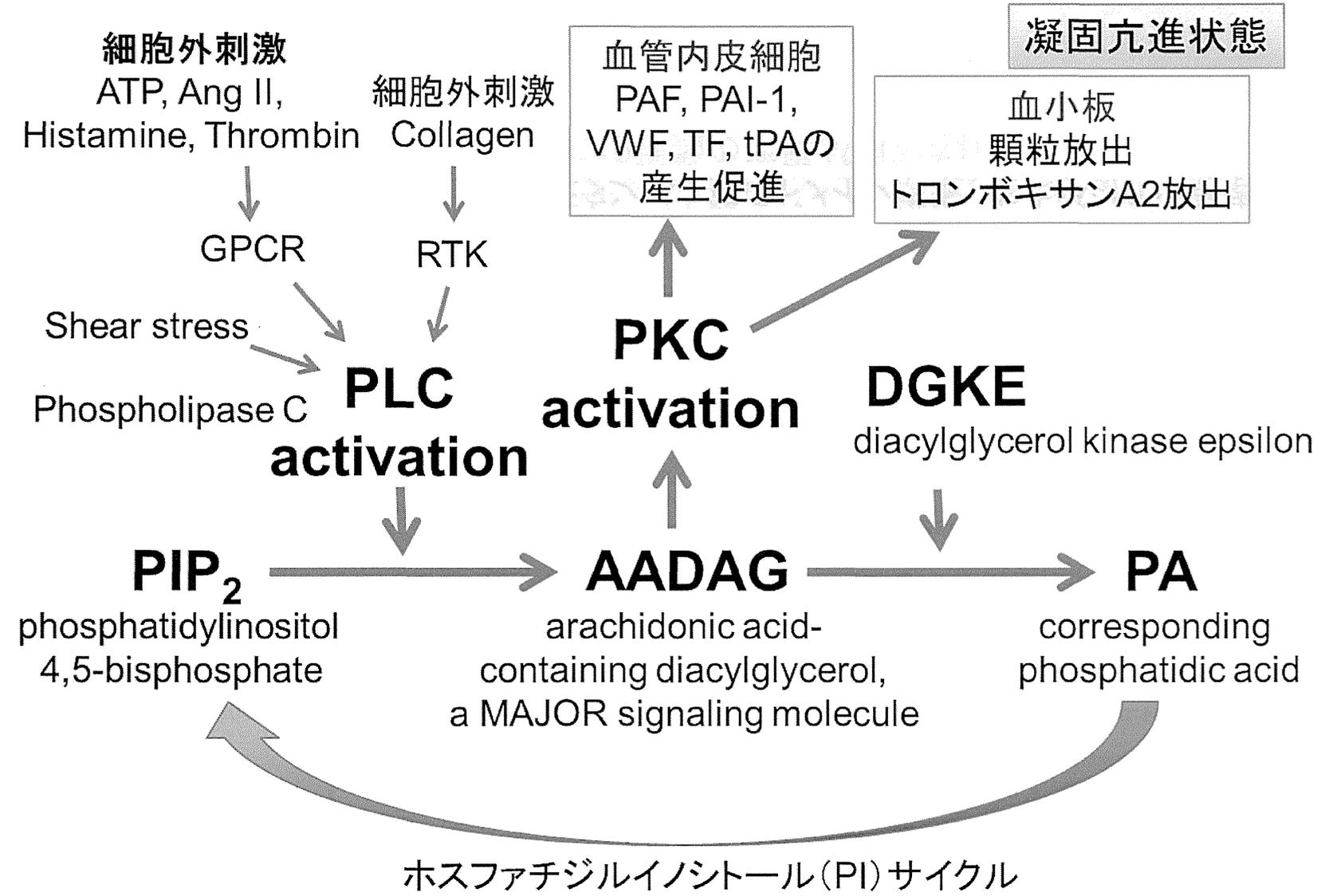


図2. DGKE遺伝子のエクソン構造、DGKEタンパク質のドメイン構造、およびaHUS患者に同定されたDGKE遺伝子変異 これまでに19種類の変異が同定された。



RTK: Receptor tyrosine kinase

図3. DGKE活性が欠損すると持続的にAADAGシグナルが入り、PKCを活性化し凝固亢進状態になる

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	784943	5	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 C3p. I1157T mutation	Int J Hematol	100(5)	437-442	2014
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
Hisano M, Ashida A, Nakano E, Suehiro M, Yoshida Y, Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y, Hattori M	Autoimmune-type atypical hemolytic uremic syndrome treated with eculizumab as first-line therapy	Pediatr Int	57(2)	313-317	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(5)	e0124655	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	in press	4	2015

Yada N, Fujioka M, Bennett CL, Inoki K, Miki T, Watanabe A, Yoshida T, Hayakawa M, Matsumoto M, Fujimura Y.	STEC:0111-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(4)	208-212	2015
Miyata T, Uchida Y, Ohta T, Urayama K, Yoshida Y, Fujimura Y	Atypical haemolyticuremic syndrome in a Japanese patient with <i>DGKE</i> genetic mutations	Thromb Haemost	in press		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	第56巻 第7号	1058-1066	2014
加藤秀樹、南学正臣	非典型HUS	細胞	第46巻 第2号	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	第113巻 第6号	1162-1163	2014
宮田敏行、中村敏子	徹底ガイド DICのすべて 2014-2015 IV章 病態生理と病理	「補体反応」救急・集中治療	第26巻、 第5・6号	668-673	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	第55巻 第11号	1663-1674	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	第143巻 第1号	86-88	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	第69巻 第4号	589-594	2014
吉田瑤子、藤村吉博	非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)ー病態・診断およびエクリズマブの効果ー	Medical Practice	第31巻 第1号	100-102	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	第46巻 第2号	57-60	2014
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
古瀬智、加藤秀樹	TTP/HUSと血液浄化	腎臓・泌尿器科	印刷中		2015

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Case Report

Postoperative Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Associated with Complement C3 Mutation

Eiji Matsukuma,¹ Atsushi Imamura,¹ Yusuke Iwata,² Takamasa Takeuchi,² Yoko Yoshida,³ Yoshihiro Fujimura,³ Xinping Fan,⁴ Toshiyuki Miyata,⁴ and Takashi Kuwahara⁵

¹ Department of Pediatrics, Gifu Prefectural General Medical Center, 4-6-1 Noishiki, Gifu 500-8717, Japan

² Department of Pediatric Cardiovascular Surgery, Gifu Prefectural General Medical Center, 4-6-1 Noishiki, Gifu 500-8717, Japan

³ Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University, 840 Shijyou-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan

⁴ Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

⁵ Department of Pediatric Cardiology, Gifu Prefectural General Medical Center, 4-6-1 Noishiki, Gifu 500-8717, Japan

Correspondence should be addressed to Eiji Matsukuma; mkuma@gifu-hp.jp

Received 6 August 2014; Revised 11 October 2014; Accepted 14 October 2014; Published 9 November 2014

Academic Editor: Kandai Nozu

Copyright © 2014 Eiji Matsukuma et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) can be distinguished from typical or Shiga-like toxin-induced HUS. The clinical outcome is unfavorable; up to 50% of affected patients progress to end-stage renal failure and 25% die during the acute phase. Multiple conditions have been associated with aHUS, including infections, drugs, autoimmune conditions, transplantation, pregnancy, and metabolic conditions. aHUS in the nontransplant postsurgical period, however, is rare. An 8-month-old boy underwent surgical repair of tetralogy of Fallot. Neurological disturbances, acute renal failure, thrombocytopenia, and microangiopathic hemolytic anemia developed 25 days later, and aHUS was diagnosed. Further evaluation revealed that his complement factor H (CFH) level was normal and that anti-FH antibodies were not detected in his plasma. Sequencing of his CFH, complement factor I, membrane cofactor protein, complement factor B, and thrombomodulin genes was normal. His ADAMTS-13 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin-1 repeats 13) activity was also normal. However, he had a potentially causative mutation (R425C) in complement component C3. Restriction fragment length polymorphism analysis revealed that his father and aunt also had this mutation; however, they had no symptoms of aHUS. We herein report a case of aHUS that developed after cardiovascular surgery and was caused by a complement C3 mutation.

1. Introduction

Thrombotic microangiopathy (TMA) is a clinical pathologic disorder characterized by the presence of microthrombi in multiple organ systems, including the kidneys and brain. Peripheral blood smears show fragmented red blood cells and thrombocytopenia [1]. TMA forms the pathophysiologic basis of several clinical syndromes, including hemolytic uremic syndrome (HUS); thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP); and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP) syndrome [2]. HUS and TTP were previously considered to be part of a single spectrum of TMA. However, recent research and chemical analysis of patients' serum have indicated that HUS and TTP are

separate entities with distinct pathogenetic processes [1]. Although HUS occurs infrequently, it is the most common TMA in the pediatric population. About 90% of cases in children are associated with Shiga-like toxin produced mainly by *Escherichia coli* 0157:H7, *Shigella dysenteriae* type 1, and other pathogens [3]. Atypical HUS (aHUS), which can be distinguished from typical or Shiga-like toxin-induced HUS, may occur secondary to infections, malignancies, drugs, pregnancy, and autoimmune disease [3].

aHUS can be sporadic or familial. More than half of patients with aHUS exhibit genetic loss-of-function mutations of regulators (complement factor H (CFH), complement factor I (CFI), membrane cofactor protein (MCP),