

**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、吉田瑶子、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
- ・吉田瑶子, 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
- ・吉田瑶子, 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
- ・吉田瑶子, 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 Lammler、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