

**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、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 (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 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.1157T 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)。

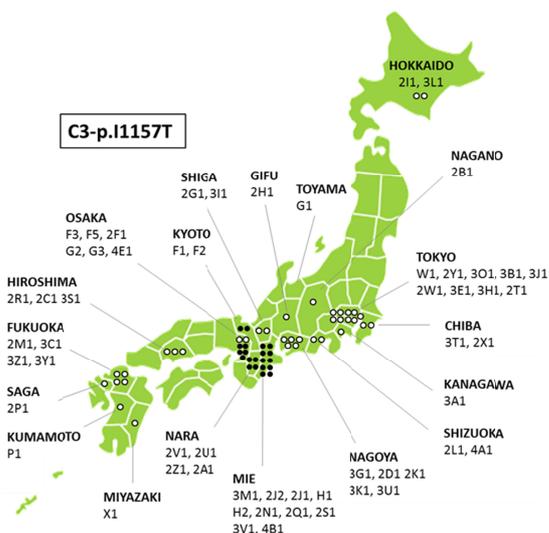


図1: 本邦aHUS患者45例の日本における分布(黒丸印:C3-p.1157T変異の保有者)

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1157T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, Scheifflinger 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

• 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) - 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

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 - 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