

## 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、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で承認の上で行った。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 (PIP<sub>2</sub>) から IP<sub>3</sub> 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 A<sub>2</sub> 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

ァチジルイノシトール (PI) サイクルを  
通ってPIP<sub>2</sub>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, Shirota I, 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, Nuno 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 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

Hisano 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 8<sup>th</sup> 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> <i>Clin J Am Soc Nephrol</i> ,
	c.888+40A>G	p.Trp322*	3	
aHUS	p.Leu24Cysfs*145	c.1213-2A>G	1	Miyata <i>et al</i> <i>Thromb Haemost</i> , 2015

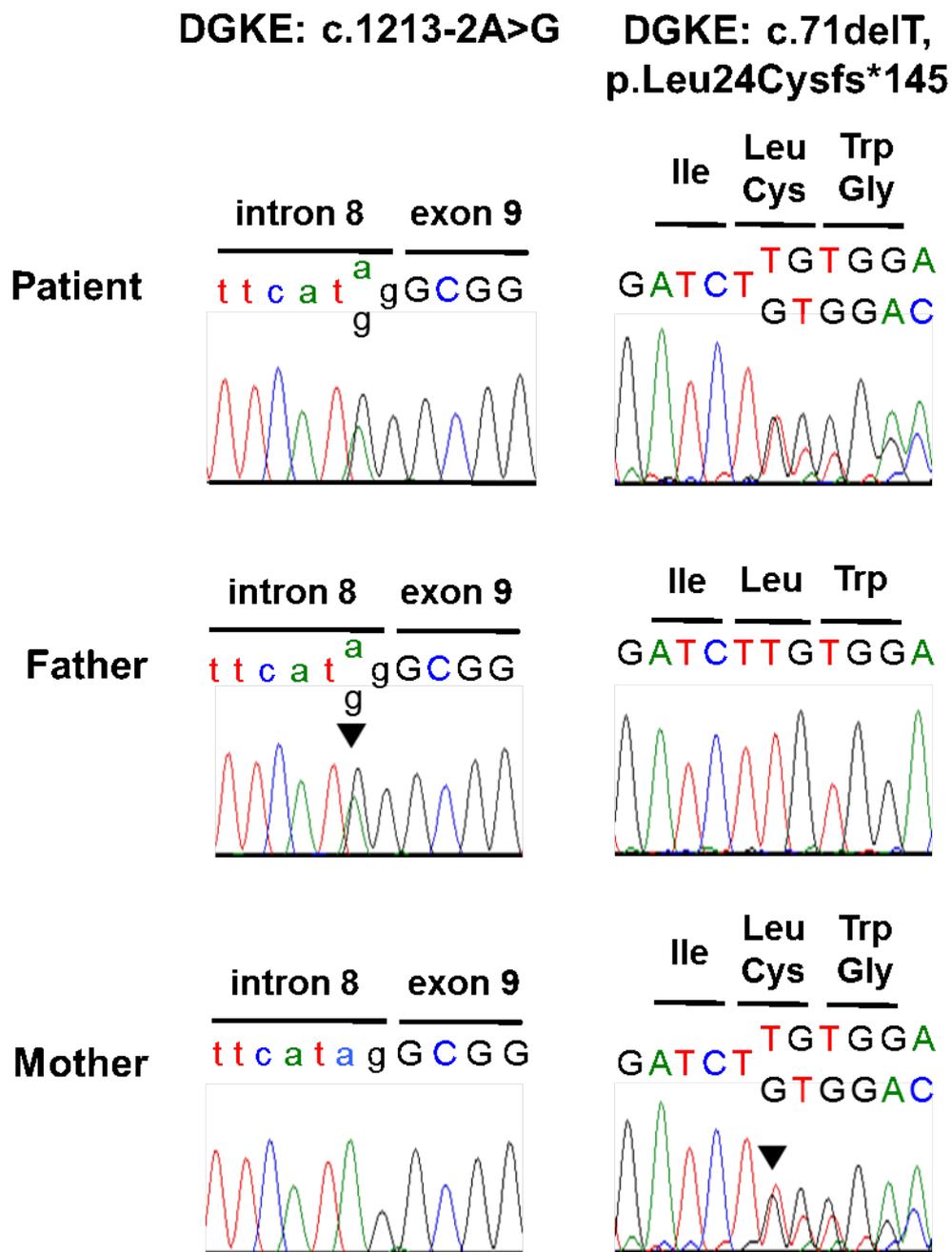
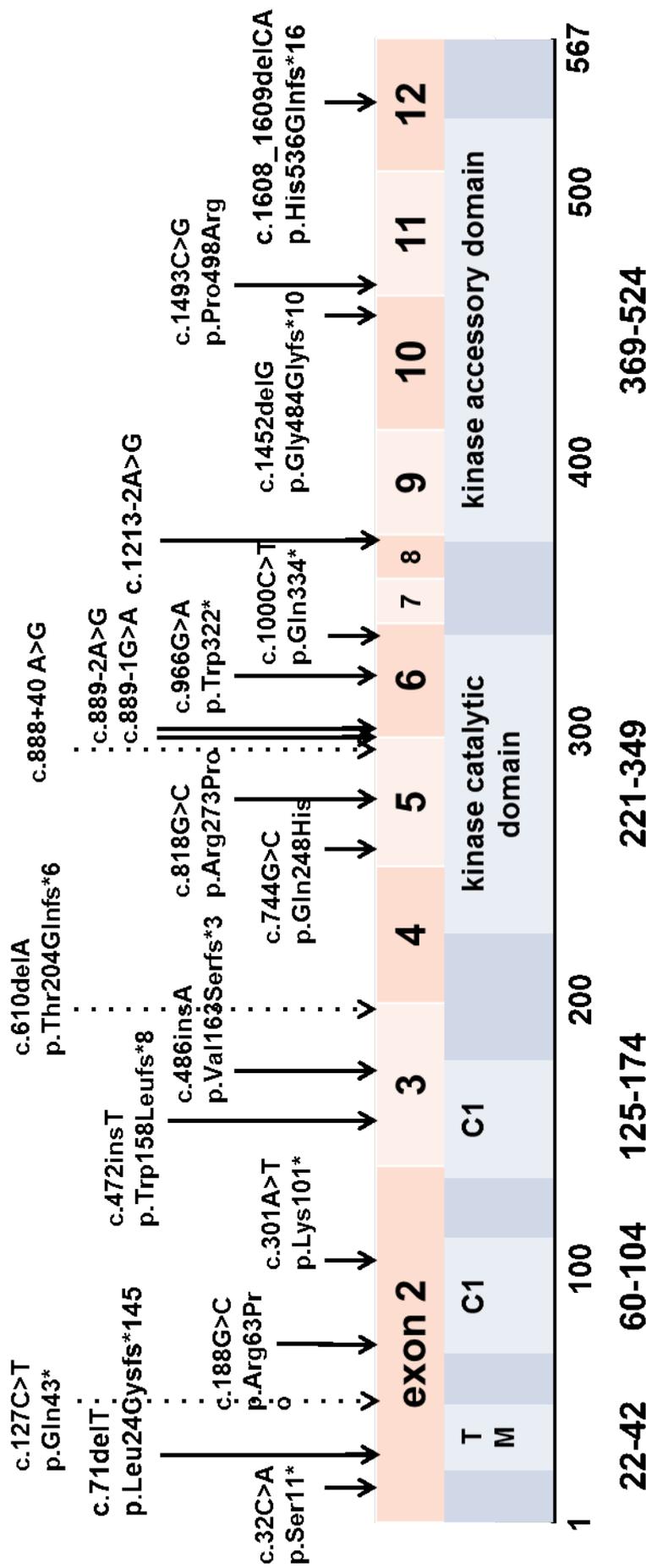


図1. 生後4ヶ月時にaHUSを発症した高血圧症を示す患者に同定されたDGKE遺伝子の複合ヘテロ変異



### アミノ酸残基数

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。

**凝固亢進状態**

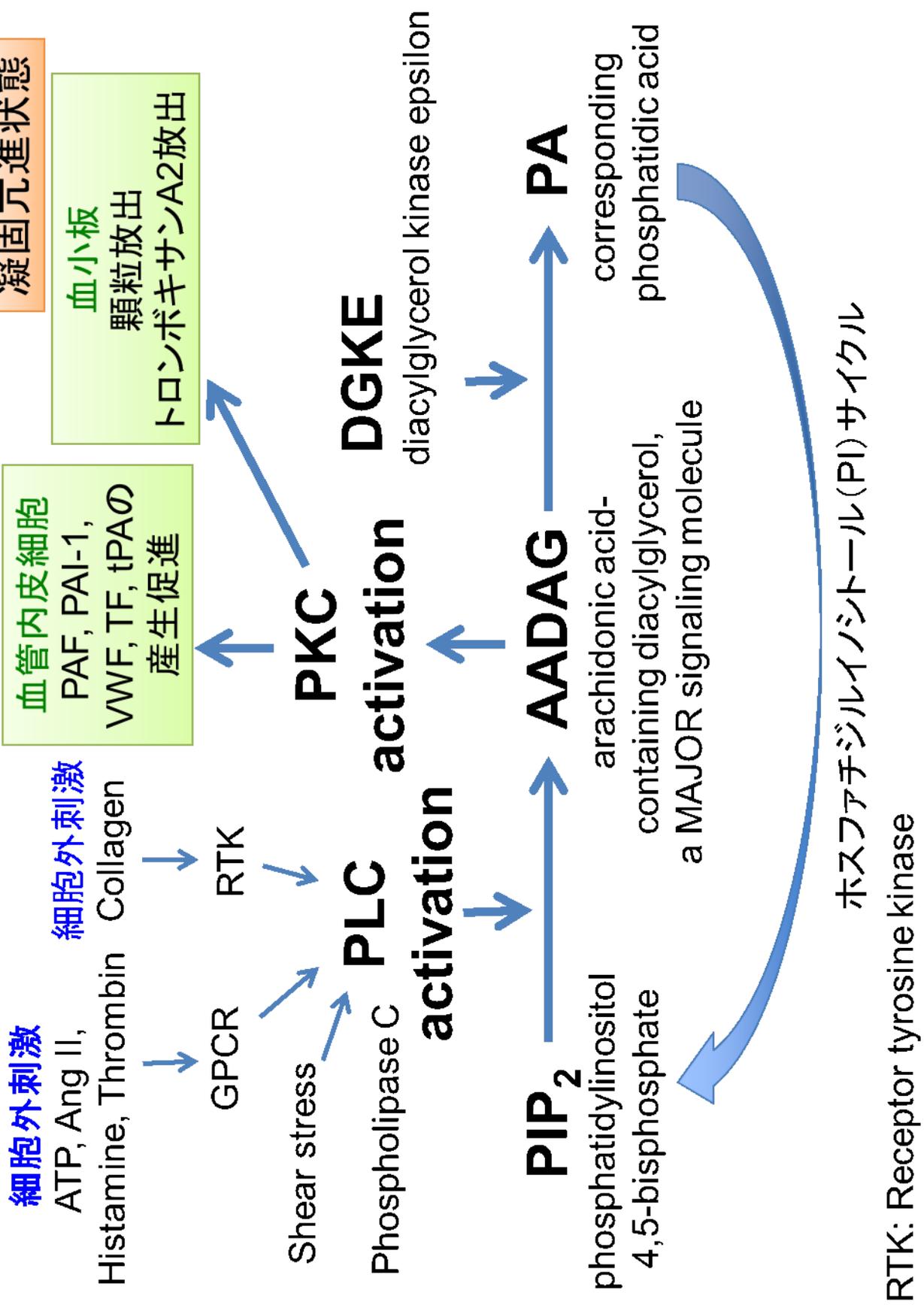


図3. DGKE活性が欠損すると持続的にAADAGシグナルが入り、PKCを活性化し凝固亢進状態になる