

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業））

分担研究報告書

自己免疫性出血症治療の「均てん化」のための実態調査と「総合的」診療指針の作成
に関する研究

分担研究課題

自己免疫性出血病 XIII/13 症例の精査と

自己免疫性第 V・X 因子欠乏症における抗第 V・X 因子自己抗体の検出

研究分担者 惣宇利正善 山形大学医学部 准教授

研究要旨

新規に確立した第 XIII 因子(F13)インヒビターを高感度に検出する F13 活性測定法を用いて、研究期間にわたり、53 例の自己免疫性出血病 XIII/13(AH13)疑い症例を精査し、11 例の AH13 を同定した。過去に診断された症例を含めた 13 例の AH13 症例について、F13 抗原及び抗 F13 抗体の経過を追跡した。について、第 V 因子インヒビター（自己免疫性第 V 因子欠乏症）が疑われた 5 症例のうち 4 例について、抗第 V 因子自己抗体の検出に成功し、また、1 例の自己免疫性第 X 因子欠乏症例における抗第 X 因子自己抗体も確認した。

A. 研究目的

自己免疫性出血病 XIII/13 (AH13) は、第 XIII 因子 (F13) に対する自己抗体を生じた結果血中の F13 抗原・活性が著しく低下し、重篤な出血を呈する後天性疾患である。抗 F13 自己抗体には、不活性型の A サブユニット (F13-A) と結合し活性化を阻害する Aa 型、活性化した F13-A を認識し触媒活性を阻害する Ab 型、B サブユニット (F13-B) に結合しクリアランスを促進する B 型が存在することを我々は

これまでに明らかにしている。AH13 の確定診断にあたっては、抗 F13-A 抗体の検出に AMED 研究費で開発されたイムノクロマト法 (キューメイ研究所) について、分担研究者により良好な成績が示されているものの、抗 F13-B 抗体に対するイムノクロマト法は現在も実用段階には至っておらず、ELISA による各サブユニットの定量、活性の 5 段階混合試験、フィブリン架橋反応、抗 F13 自己抗体のドットブロット解析といった一連の精査が不可欠

である。
汎用されている従来のF13活性測定法(アンモニア放出法・ダンシルカダベリン取り込み法)ではAa型・Ab型いずれかのインヒビターを見落とす危険性があり、また血漿の状態による影響を受けやすく低感度(アンモニア放出法)あるいは測定対象物の沈殿化による煩雑な手技と沈殿物の難溶性(ダンシルカダベリン取り込み法)といった問題点があるため、より簡便かつ高感度にインヒビターを検出できる活性測定法の確立がAH13の確定診断における課題であった。

自己免疫性第V因子欠乏症(AF5D)は第V因子(F5)に対する自己抗体によりF5活性が欠乏し出血傾向を示す疾患で、その頻度は後天性血友病Aに次ぐものとみられている。F5インヒビターはPT・APTTの交差混合試験で検出可能であるものの、抗F5自己抗体の検出は必ずしも容易ではない。第X因子(F10)に対する自己抗体による自己免疫性F10欠乏症(AF10D)は極めて稀とされている。

本分担研究では、まず期間早期により簡便かつ高感度にインヒビターを検出するF13活性測定法を確立し、AH13を疑われた症例の精査に用いた。確定診断されたAH13症例について、F13抗原および抗F13自己抗体の経過を追跡した。また、F5あるいはF10インヒビターが疑われた症例について、抗F5・F10抗体の検出を検討した。さらに、症例のスクリーニングにおいて無フィブリノゲン(Fbg)血症が

疑われた症例について、遺伝子変異の検索を行った。

B. 研究方法

新規活性測定法について、フィブリン多量体化阻害剤存在化でビオチン標識アミンをトロンビン、カルシウムとともに血漿と反応し、血漿中に存在する α_2 -プラスミンインヒビター(α_2 -PI)に取り込まれたビオチンをELISAにより定量検討した。F13各サブユニットおよび異種四量体はELISAにより定量した。フィブリン架橋反応について、血漿にトロンビンとカルシウムを加えて生じたclotをSDS-PAGE解析した。抗F13抗体は、組換え体F13-A、F13-Bを用いたDot blot法により検出し、また、ELISA法により定量した。

抗F5自己抗体について、Protein A-Sepharoseを用いて症例血漿からIgG分画を調製し、精製F5タンパク質を固相化したプレートを用いたELISAにより、F5と反応するIgGを検出した(固相法)。また、あらかじめ精製F5とIgG分画を液相でインキュベートした後、マウス抗F5抗体をコートしたプレートにF5とともに結合するIgGを検出した(液相法)。

抗F10自己抗体は、精製F10タンパク質を固相化したプレートに希釈した血漿を反応させて検出した。

無Fbg血症疑い症例のFbgの3種類の遺伝子(FGA, FGB, FGG)について、PCR増幅してその塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、山形大学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

[簡便な活性測定法の検討] ビオチン標識アミンを血漿に添加し、フィブリン多量体化阻害剤存在化でトロンビンおよびカルシウムと反応させた。反応停止後、抗₂-PI抗体を固相化したプレートに移し、酵素標識ストレプトアビジンを用いてELISAを行ったところ、F13に依存した₂-PIへのビオチンの取り込みが検出された。短時間(5分間)の取り込み反応でも高感度に活性が検出され、また、健常血漿との5段階混合試験でAa型、Ab型ともに高感度に阻害が検出された。

[AH13疑い症例の精査] AH13疑い53例について精査を行った。新規活性測定法による5段階混合試験で、11例にF13活性の阻害が認められた。11例のインヒビター症例のうち、3例ではdot blot解析で抗F13-A抗体陰性であり、共同研究分担者が行ったイムノクロマト法では1例が陰性～弱陽性であったが、11例ともにELISAによりF13-Aに対する抗体が検出されたことから、AH13と診断された。

抗F13-A抗体陰性の症例のうち、dot blot解析において2例に抗F13-B抗体が検出され、そのうち1例についてF13-A抗原が検出感度以下であったことから、洗浄血小板のF13-Aを検討したところ、immunoblot解析で検出を認めず先

天性F13-A欠乏症が強く示唆された。

抗F13抗体がいずれとも陰性の1例において、F13-A抗原量に対する比活性が低いにもかかわらず、5段階希釈試験で阻害を認めなかった。トロンビン処理後の血漿についてフィブリノゲンB鎖の切断の遅延を認め、F13-A活性化ペプチドの切断の障害もWestern blot解析で確認された。正常血漿との混合試験で活性化ペプチドの切断が阻害されること、患者血漿をより高濃度のトロンビンで処理した場合にF13比活性が正常レベルに回復することから、トロンビン活性の阻害(インヒビター)が強く示唆された。

[AH13症例の経過追跡] 過去にAH13(Aa型)と診断された13例について、F13抗原および抗F13-A抗体の経過を測定した。2例は診断後6ヶ月以内にF13-A抗体が検出感度以下となり、F13異種四量体の回復を認めた。8例では検出可能なレベルの抗F13-A抗体が残存するにもかかわらず、ほぼ正常レベルに異種四量体が検出された。2例は13ヶ月後に抗F13-A抗体がほぼ検出不可能なレベルにまで低下したにもかかわらず、F13抗原は依然として低レベルであった。1例は診断から5年が経過しても抗F13-A抗体陽性かつ異種四量体陰性であった。

[自己免疫性F5欠乏症の抗F5自己抗体検出] F5インヒビターの存在が強く疑われた5例について、血漿からIgG分画を調製し、dot blot解析を行ったところ、1例に抗F5 IgGが検出された。精製F5

タンパク質を用いた固相法による ELISA を行なったところ、2 例に抗 F5 IgG の存在が確認された。液相法での ELISA も検討したところ、固相法で陰性であった 1 例に F5 と結合する IgG が検出された。

[自己免疫性 F10 欠乏症の抗 F10 抗体検出] F10 インヒビターの存在が疑われた 1 例について、精製 F10 を用いた固相法 ELISA により抗 F10 IgG が検出された。本症例の抗 F10 IgG は、2 ヶ月後に再説された血漿ではほぼ検出不可能なレベルにまで抗 F10 IgG が消失していた。

[無 Fbg 血症の遺伝子解析]

班研究調査の過程で無 Fbg 血症が疑われた症例について、Fbg 遺伝子 (FGA, FGB, FGG) の塩基配列を解析した。FGA のイントロン C からエクソン IV にかけて、1,241 塩基の欠失がホモ接合性に同定された。FGB, FGG には遺伝子変異を認めなかった。FGA 1,241 塩基の欠失は母親にもヘテロ接合性に確認されたことから、先天性無 Fbg 血症であると判断された。

D. 考察

本研究にあたって新規に確立した活性測定法により、11 例の F13 インヒビターを検出した。このうち 3 例では Dot blot 解析では陰性であり、1 例はイムノクロマト法で陰性～弱陽性であったが、ELISA 法で抗 F13-A 抗体陽性と判定されており、的確な AH13 診断を裏付けている。過去の症例も合わせて検討したところ、Aa 型、Ab 型ともに 1:1 交差混合試験で 50%以上

の阻害率を示すこと、ROC 試験で極めて良好な感度および特異性を表していることから、F13 インヒビターの検出に有用であると考えられる。

現在、本法の免疫クロマト化も実現可能であることを実証しており、開発を進めている。

本研究期間中 2 例に抗 F13-B 抗体が陽性に検出されたが、F13-B 抗原量の著しい低下は認めず、活性阻害も検出されていない。過去に抗 F13-B 抗体陽性に検出された症例のほとんどで F13-B 抗原の著しい低下を認めておらず、しばしば健常人血漿でも抗 F13-B 抗体が陽性に検出されていることから、疾患原因であるか否かの判断は極めて難しい。抗 F13-B 抗体が陽性に検出された 2 例のうち 1 例は、血漿のみならず血小板内の F13-A も検出されなかったことから先天性 F13-A 欠乏症の可能性が極めて高い。後天性 F13 欠乏症疑いで精査した結果先天性 F13-B 欠乏症と同定された症例もあり、常に先天性欠乏症も考慮すべきである。

抗 F13 抗体が陰性でありながら、F13 の活性化に障害を示し、トロンビンインヒビターの存在が疑われる症例にも遭遇した。過去にはフィブリン形成が阻害された症例も経験したが、本症例ではフィブリノーゲン B 鎖の切断も部分的に障害されているものの、フィブリンクロットの形成には遅延を認められなかった。(プロ)トロンビンに対する抗体の検出も試みたが、健常人コントロールでも陽

性に検出されるなど、信頼できる検出方法を確立できていない。今後、合成基質を用いた直接的なトロンビン活性測定によるインヒビター検出を検討する必要がある。

AH13 疑い症例の精査でしばしばフィブリ(ノゲン)が低下した例に遭遇する。本研究では1例の無 Fbg 血症症例が遺伝子解析で確定診断された。同定された1,241塩基配列の欠失は先に日本人症例で報告があり、日本人の創始者変異である可能性がある。Fbg 欠乏についても的確な抽出・診断が望まれる。

本研究で経過を追跡した13例とも、総抗 F13-A 抗体は大幅に減少しており、免疫抑制効果が認められる。しかしながら、年を超えて一定レベルに抗体が残存するケースがほとんどであり、ほぼ完全に抗体が消失していたのは2例のみであった。2例ともに診断当時の抗体レベルが他の症例と比べて相対的に低く、3～6ヶ月と短期間で検出可能レベル以下に減少していた。おそらく、抗体発生から比較的早期に診断を受けたことで、免疫抑制が有効に機能したものと推測される。多くの症例では低レベルの抗体を保持しながらも F13 異種四量体の回復が認められていることから、多クローンに発生した抗体のうち、有害なクローンは低減・消失し、無害なクローンが定常化したものと想像される。これらの症例では再燃する可能性もあり、持続したモニタリングが必要である。

本研究では4例の抗 F5 抗体症例が同定された。抗 F5 抗体の検出について、希釈血漿では正常血漿でも陽性に検出されたことから、Protein A-Sepharose で調製した IgG 分画で特異的な自己抗体の検出が可能となった。しかしながら、Protein A で回収されないサブタイプの抗 F5 自己抗体が存在する可能性もあり、F5 抗原の安定入手を含め、血漿もしくは血清での抗 F5 自己抗体の検出法を検討する必要がある。抗体の検出について、dot blot で陽性を確認できたのは1症例のみであり、3例は検出できなかった。固相法の ELISA では dot blot 陽性を含めて3例に抗 F5 IgG が検出され、一例は固相法では陰性であるものの液相法では陽性に認められた。一方、Dot blot 陽性の症例では液相法では著しく反応性が低下するなど、症例(抗体)による液相と固相との反応性の違いは、抗体を検出する上で考慮すべき問題である。また、血漿・血清で直接検出することは今のところ不可能であり、新たな抗体検出法を検討する必要がある。

本研究事業では初めて F10 に対する自己抗体を有する症例が確認された。本症例の抗 F10 抗体は直接血漿から検出でき、抗 F5 抗体と比べて容易であった。しかしながら、抗 F5 抗体と同様の液相と固相との反応性の問題を生じる可能性は十分予想され、今後の注意が必要である。

E . 結論

高感度にインヒビターを検出する F13

活性測定法を確立し、11例のAH13症例を確定診断した。多くの症例では、抗F13抗体は低レベルに持続する可能性が高く、長期にわたるモニタリングが必要である。F5インヒビター症例4例について、抗F5抗体の検出に成功した。F10インヒビター症例について、抗F10抗体を検出した。抗体の検出に際して、液相と固相との反応性の違いを考慮すべきであることを指摘した。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchida E, Watanabe K, Arai R, Yamamoto M, **Souri M**, Osaki T, Ichinose A, Miura O, Koyama T. Autoimmune Hemorrhaphilia Resulting from Autoantibody against the A Subunit of Factor XIII. Intern Med. 2015;54(18):2383-7.
- 2) Ichinose A, Osaki T, **Souri M**; Japanese Collaborative Research Group (JCRG) on AH13 (supported by the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare). Clinical features of 32 new Japanese cases with autoimmune haemorrhaphilia due to anti-factor XIII antibodies. Haemophilia. 2015 Sep;21(5):653-8.
- 3) **Souri M**, Osaki T, Ichinose A. The Non-catalytic B Subunit of Coagulation Factor XIII Accelerates Fibrin

Cross-linking. J Biol Chem. 2015 May 8;290(19):12027-39.

- 4) Osaki T, Sugiyama D, Magari Y, **Souri M**, Ichinose A. Rapid immunochromatographic test for detection of anti-factor XIII A subunit antibodies can diagnose 90 % of cases with autoimmune haemorrhaphilia XIII/13. Thromb Haemost. 2015 Jun;113(6):1347-56.

- 5) **Souri M**, Osaki T, Ichinose A. Anti-factor XIII A subunit (FXIII-A) autoantibodies block FXIII-A2 B2 assembly and steal FXIII-A from native FXIII-A2 B2. J Thromb Haemost. 2015 May;13(5):802-14.

- 6) Kotake T, **Souri M**, Takada K, Kosugi S, Nakata S, Ichinose A. Report of a patient with chronic intractable autoimmune hemorrhaphilia due to anti-factor XIII/13 antibodies who died of hemorrhage after sustained clinical remission for 3 years. Int J Hematol. 2015 Jun;101(6):598-602.

- 7) Tsuda M, Kiyasu J, Sugio K, Hidaka D, Ikeda M, Fujioka E, **Souri M**, Osaki T, Yufu Y, Ichinose A. Spontaneous splenic rupture accompanied by hepatic arterial dissection in a patient with autoimmune haemorrhaphilia due to anti-factor XIII antibodies. Haemophilia. 2016, 22:e314-7.

8) **Souri M**, Mokuda S, Inanami H, Osaki T, Takasugi K, Ichinose A.

Non-autoimmune combined factor XIII A and B subunit deficiencies in rheumatoid arthritis patients treated with anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody (tocilizumab). *Thromb Res.* 2016, 140:100-5.

9) Kojima M, Ichinose A, **Souri M**, Osaki T, Kawai H, Amaki J, Numata H, Miyamoto M, Ogiya D, Tsuboi K, Ogawa Y, Ozawa S, Ando K. Successful bypass surgery for esophageal carcinoma under adequate factor XIII/13 replacement therapy in a case of intractable autoimmune hemorrhaphilia due to anti-Factor XIII/13 antibodies. *Int J Hematol.* 2016, 103:341-7.

10) Arishima H, Neishi H, Kikuta KI, Morita M, Hosono N, Yamauchi T, **Souri M**, Ichinose A. Lobar Hemorrhage Induced by Acquired Factor XIII Deficiency in a Patient with Cerebral Amyloid Angiopathy. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017, 26:e203-e205.

11) Ogawa Y, Yanagisawa K, **Souri M**, Mihara M, Naito C, Takizawa M, Ishizaki T, Mitsui T, Handa H, Osaki T, Nojima Y, Ichinose A. Successful Management of a Patient with Autoimmune Hemorrhaphilia due to Anti-Factor XIII/13 Antibodies Complicated by

Pulmonary Thromboembolism. *Acta Haematol.* 2017, 137:141-147.

2. 学会発表

1) Souri M, Osaki T, Ichinose A. Development of a novel assay method of coagulation factor XIII activity for the detection of its inhibitor in plasma. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Toronto, Canada. June, 2015.

2) Souri M, Osaki T, Ichinose A. Overlooked role of the non-catalytic B subunit for coagulation factor XIII (plasma transglutaminase) in fibrin cross-linking. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会 神戸 2015 年 12 月

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他