

aHUS の診断、治療効果判定を目的とした補体機能検査の開発研究

研究分担者：丸山彰一 名古屋大学医学部大学院医学系研究科腎臓内科 教授

研究要旨

aHUS は急速に TMA を発症し、しばしば ICU において集学的治療を要する重篤な疾患である。補体関連 TMA とも呼ばれるように、補体の異常活性化が病態の本質であり、補体活性化を抑制する抗 C5 阻害薬が開発されてからは、生存率が劇的に改善している。一方で TTP における ADAMTS13 活性測定といった、確定診断に至るバイオマーカーがなく、治療に比して診断方法の開発が遅れていることが問題である。

現在唯一とも言える補体機能測定系として、ヒツジ赤血球溶血試験が挙げられる。本研究では、aHUS 全国調査研究と紐付ける形で、aHUS の臨床像、遺伝学的背景と、ヒツジ赤血球溶血試験の有用性を評価するとともに、溶血試験の欠点補った新たな補体機能検査の開発を目指す。

A. 研究目的

非典型溶結性尿毒症症候群 (atypical hemolytic uremic syndrome: aHUS) は、補体関連遺伝子の先天的な異常、もしくは後天的な補体関連蛋白に対する自己抗体の産生による、補体第二経路の異常な活性化が引き起こす血栓性微小血管障害症 (TMA) である。昨今抗 C5 阻害薬が開発され、aHUS の治療成績は劇的に改善している。早期の治療介入によりその後の腎臓を中心とした臓器障害を軽減できるといった報告がある一方で、早期診断につながるバイオマーカーがなく、臨床上的大きな問題と考えられる。

aHUS の診断は、補体調節因子の遺伝学的検査と、抗 CFH 抗体測定、また他の TMA を引き起こす疾患を除外できることによってなされるが、これらは aHUS 発症早期に結果が得られるものではなく、それ以上に aHUS の病態の本質である、発症時の

補体系の活性化を評価する方法ではない。

aHUS における遺伝子変異の浸透率は極めて低く、変異があることが必ずしも疾患発症にはつながらないとされる。むしろ aHUS は補体関連 TMA とも称されるように、発症時の補体機能 (活性化) を評価する方法こそが診断に必要であると考えられる。ちょうどこれは、TTP において ADAMTS13 活性が 10%未滿に著減していることが診断に必須であり、先天性 TTP に見られる ADAMTS13 変異の検索は急性期には不要である事に似ている。

現在最も信頼される補体機能検査はヒツジ赤血球溶血試験である。奈良県立医科大において開発され、その後東京大学 aHUS 事務局において引き継がれた。2020 年に aHUS 事務局が名古屋大学に移管されるに伴い、本法も名古屋大学に引き継がれ、症例相談を受けた際に検査結果をフィードバックしてきている。aHUS の症例

が蓄積しており、溶血試験の診断への寄与、臨床的、遺伝学的バックグラウンドとの関連、より診断の感度をあげるための工夫に関して詳察を行う。

また、ヒツジ赤血球溶血試験にも、CFH 変異、抗 CFH 抗体陽性例以外の検出率が低いこと、赤血球のロットごとに溶血度が不安定なことといった欠点が挙げられる。このような点を補うため、マウス血管内皮細胞株を用いた、あらたな補体機能検査を提唱する。

B. 研究方法

ヒツジ赤血球溶血試験において o-72 抗体にて CFH を阻害し、陽性コントロールとしたオリジナル法に加え、エクリズマブを *in vitro* で作用させ、陰性コントロールとした変法をそれぞれの臨床検体に対して行い、診断への感度を評価する。

またヒツジ赤血球の代わりに、安定マウス血管内皮細胞株 X を用いて C3b や C5b-9 といった補体タンパクの沈着を FCM において評価した。

C. 研究結果

2020 年度の 1 年間に、aHUS 事務局に相談のあった 66 例 96 検体の溶血試験を行った。溶血度の平均は 10.7%。既報にて 75%以上を陽性とするが、75% 以上を呈したのは 2 例で、いずれも CFH 変異のある症例であった。赤血球の具合によっては十分な溶血度が見られない物があった。その際は実験系にエクリズマブを添加し溶血度の変化が大きい際は補体機能以上が示唆された。

細胞 X に付着する C3b 及び C5b-9 の評

価に関し、正常コントロールで C3b/C5b-9 が 22.6%/1.31%, o-72 陽性コントロールで 94.3%/4.23%, CFH 変異で 64.1%/4.8%, C3 変異で 27.3%/3.16%となり、CFH 変異症例でよく鑑別が出来る可能性が示唆された。

D. 考察

本研究による補体機能検査が確立することによって、(1) aHUS および二次性 TMA において、細胞膜上での補体の活性を評価する。(2) 機能検査であるため、寛解期と再発期を評価する。(3) Eculizumab による治療効果判定を行う。(4) Eculizumab の減量、および中止した際に補体活性をフォローすることで再発予測をする。以上、4つの臨床的な有用性が期待される。

E. 結論

ヒツジ赤血球溶血試験においては、CFH 変異をよく検出できた。エクリズマブを陰性コントロールとして用いることで、溶血度の低い検体の評価に役立つ可能性が示唆された。

細胞株を用いた新規補体機能検査では、FCM を用いて補体関連タンパクの細胞膜への沈着が FCM を用いて定量的に評価できた。今後症例を蓄積し更なる検証を行う。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文) なし

(和文) なし

(書籍)

- 1) 立俵良崇、加藤規利、丸山彰一. aHUS プロフェッショナル腎臓内科学. 中外医学社 2020
- 2) 加藤規利、立俵良崇、丸山彰一. 非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の診断と治療. Thrombosis Medicine. 10(3):225-231, 2020 先端医学社
- 3) 立俵良崇、加藤規利、丸山彰一. 非典型溶血性尿毒症症候群(指定難病109). Thrombosis Medicine, 11(1):289-297, 2021 先端医学社

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

本補体機能検査系を特許出願予定である。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし