

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 国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学
大学院医学系研究科腎臓内科 教授

研究協力者：加藤 規利 国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学
医学部附属病院腎臓内科 講師

研究要旨

aHUS は急速に TMA を発症し、血小板減少、溶血性貧血、AKI を含む臓器障害を呈し、多くの場合 ICU において集学的治療を要する重篤な疾患である。補体介在性 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 抗体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、補体制御蛋白をコードする遺伝子の先天的な異常、もしくは後天的な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 抗体薬が開発され、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、遺伝学的検査は結果を得るのに時間を要し、早期に確定診断に至る方法がなく、臨床上の大きな問題と考えられている。

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することによ

ってなされるが、これらは 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ばかりか、aHUS 患者で病的遺伝子変異が見つかる割合は 50-60% と低い値に留まっている。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り、浸透率の低いことを鑑みるに、補体関連遺伝子の病的変異は、aHUS 発症の素因と考えられる。

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 事務局において検査が引き継が

れた。2020年4月に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、血管内皮細胞を使った、新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、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

2021年度の1年間に、aHUS事務局に相談のあった64例80検体の溶血試験を行った。2020年度と合わせると、126症例、171検体の検査を行ったこととなる。事務局に於いてaHUS臨床診断を行

ったのが2年間で17症例に上り、保因者診断が2症例である。そのうち溶血試験陽性例は7例（保因者2例を含む）であった。7例全てがCFHの病的変異であり、感度、特異度ともに100%であった。反対に溶血試験が陰性であった12例では、C3変異3例、CFI変異1例、C3+MCP変異の合併例が1例、病的変異検出なしが7例であった。

aHUS診断の17例中、10例（59%）に既知の補体関連遺伝子の病的変異が見つかったことは、海外における報告とほぼ同じ割合であった。

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異常が示唆された。

細胞 X に付着する C3b 及び C5b-9 の評価を FACS によって確認した。理論的には C3b の付着によって感度を、C5b-9 の付着に関しては特異度をあげられることが期待される。ただし、C5b-9 陽性の細胞に関しては、死細胞が含まれることになるため、死細胞を除くなどの工夫を行い検査系の確立を進めているところである。

D. 考察

ヒツジ赤血球溶血試験によって、高い感度、特異度を持って、CFHの機能不全に起因するaHUSの診断が可能であった。これは遺伝学的検査の結果得るのに1-2ヶ月かかる事を考えると、aHUSという緊急疾患に対して、早急に抗C5抗体薬を治療に用いることができるという点で、

また遺伝学的なバックグラウンドではなく、実際の補体機能を測定しているという点で、有益であると考えられる。一方でCFH以外の因子による aHUS に関しては、全く検出することができなかった。

ヒツジ赤血球溶血試験の欠点を担保するために、血管内皮細胞株 X を用いた検査の開発が待たれる。

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) 抗 C5 抗体薬による治療効果判定を行う。(4) 抗 C5 抗体薬の減量、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 の機能異常に起因する aHUS を高い感度、特異度を持って、遺伝学的検査より早期に診断できた。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、実験系が動いていることは確認できているが、死細胞を除くなどの工夫を行い検査系の確立を進める必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文) なし

(和文) なし

(書籍)

- 1) 立忝良崇, 加藤規利, 丸山彰一. 最新ガイドラインに基づく腎・透析診療指針 2021-' 22 II. 各論 TMA. 総合医学社, 2021. 5
- 2) 加藤規利, 立忝良崇, 丸山彰一. 腎臓医が診る指定難病 遺伝性腎疾患 非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)/血栓性血小板減少性紫斑病(TTP). 腎と透析 91(1):94-102, 2021 東京医学社

2. 学会発表

- 1) 中居杏奈、宮部陽永、渡邊健太郎、川嶋萌、唐澤一徳、森山能仁、内田啓子、新田孝作、土谷健、丸山彰一、加藤規利：出産後に非典型溶血性尿毒症症候群を発症し血漿交換療法と eculizumab 投与にて奏功した 1 例：第 66 回日本透析医学会学術集会・総会 2021. 6. 4. 横浜市

H. 知的財産権の出現・登録状況

1. 特許取得

補体機能検査を特許出願予定である。

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし