

## 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 名古屋大学大学院医学系研究科腎臓内科 教授

研究協力者：加藤規利 名古屋大学医学部附属病院腎臓内科

### 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。

また、早期診断が除外診断に頼ることもあり臨床的な混乱を招いている実情がある。2015 年に作成した aHUS 診療ガイド以降、長期作用型の抗 C5 抗体薬の出現や、各国で Consensus Opinion 等が発刊されており、令和 5 年度中の改訂を目指す。

#### 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 は補体介在性 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、名古屋大学 aHUS 全国調査研究に基づき、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。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 病的バリエーション保有例、抗 CFH 抗体陽性例以外の検出率が低いこと、ヒツジ赤血球という生体材料を用いることから、溶血度が不安定である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、新たな補体機能検査を開発する。

また今回、長期作用型の抗 C5 抗体薬の上市、本邦での PMS データに関する報告や、海外での抗 C5 抗体薬投与、あるいは投与中止に関わる知見が蓄積してきており、aHUS 診療ガイドの改訂を行う。

## B. 研究方法

ヒツジ赤血球溶血試験において 0-72 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。

ガイド改訂に関しては、日本小児科学会、日本腎臓学会、日本血液学会、日本補体学会、日本移植学会の各学会より委員を選出し、今回の期間中、2 回のガイド改訂委員会を開催した。論文検索式を作成し、CQ 「aHUS に対し抗 C5 抗体薬は推奨されるか」について、エビデンスに基づき、推奨文を作成した。ガイドは関連学会等を通して広くパブリックコメントを求めた。

## C. 研究結果

2022 年度の 1 年間に、aHUS 事務局に相談のあった 66 例 77 検体の溶血試験を行った。事務局に於いて aHUS 臨床診断を行ったのが、研究期間の 3 年間で 33 症例に上り、保因者診断が 2 症例である。遺伝学的検査を行った 29 例のうち、溶血試験陽性例は 8 例であった。7 例が CFH の病的バリエーション保有例であり、1 例が C3 病的バリエーション保有例であった。反対に溶血試験が陰性であった症例の中に 1 例 CFH 病的バリエーション保有例が含まれた。検体の温度管理の問題の可能性もあるが、今まで感度が 100%であったため考察が必要である。

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。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、死細胞を除く工夫をおこなった。

ガイド改定に関して、本年度 2 回、通算 10 回の改訂会議を行った。CQ の推奨

文作成には、論文検索式を用いて、アウトカムの益と害をデルファイ法にて採点した。推奨度に関しては成人と小児に分けて、Grade Grid 法にて投票を行い決定に至った。

#### D. 考察

ヒツジ赤血球溶血試験によって、CFHの関与する aHUS に関しては、高い感度、特異度を持って、診断が可能であった。逆にその他の遺伝子、あるいは病的バリエーション検出ない症例では、aHUS であっても陰性となる。不完全ではあるが、CFHの機能異常が重篤な病態を招くこと、CFHの病的変異は aHUS の多数を占めることを考えると、一定の評価ができると考えられる。

ヒツジ赤血球溶血試験の欠点を担保するために、細胞株 X を用いた検査の開発は進んでおり、溶血試験で検出しなかった症例でも陽性になる症例があった。ただしそれが本当に補体介在性の TMA なのかについてはさらなる考察が必要である。

aHUS 診療ガイドはパブリックコメントを受け、最終段階の校正中である。

#### 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。

細胞株を用いた新規補体機能検査では、更に症例を重ねて検証が必要である。

本年度中に aHUS 診療ガイドの発刊を目指す。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Uwatoko R, Shindo M, Hashimoto N, Lio R, Ueda Y, Tatematsu Y, Kato N, Maruyama S, Hayashi T. Relapse of atypical hemolytic uremic syndrome triggered by COVID-19: a lesson for the clinical nephrologist. J Nephrol 2023;1-4.

##### 2. 学会発表

1) 丸山彰一、池田洋一郎、要伸也、加藤規利、松本雅則、石川由美子、下野明彦、宮川義隆、南学正臣、柴垣有吾、岡田浩一：成人非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) 患者に対するエクリズマブ市販後調査の解析：第65回日本腎臓学会学術総会、2022年神戸市

2) Noritoshi Kato, Diagnosis and treatment of aHUS based on the Japanese clinical guide. The 12<sup>th</sup> Chronic Kidney Disease Frontier Meeting. Special Lecture 1, February 18, 2023

##### 3. 一般向け講演会

なし

#### H. 知的財産権の出現・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし