

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860873

研究課題名(和文)膜性増殖性糸球体腎炎における補体B因子の関与の解析

研究課題名(英文) Involvement of the complement factor B in the etiology of membranous proliferative glomerulonephritis

研究代表者

今村 秀明 (Imamura, Hideaki)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20433063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：補体B因子におけるCFB p.S367R変異について、蛋白立体構造の解析から本変異が補体B因子の機能獲得性変異に関与することを初めて報告した。また、soluble C5b-9等の補体成分を測定し、本変異により補体第二経路が持続的に活性化されていることを証明した。さらにCFB p.S367Rの変異型蛋白の作成に成功し、機能解析を行う予定であったが、変異蛋白の大量培養が実現に至らなかった。研究計画を一部変更し、血栓性微小血管症(aHUS, STEC-HUS, 二次性TMA)症例におけるsoluble C5b-9等の補体因子を測定し、これらの疾患の一部に補体異常活性が関与していることを証明した。

研究成果の概要(英文)：We reveal that CFB p.S367R has gain-of-function effects in CFB from the finding including structure-function relationship of CFB p.S367R and elevated soluble C5b-9 levels which indicate continuous activity of the complement alternative pathway. This is the first report that demonstrates the involvement of CFB in the etiology of MPGN. However, culturing a large quantity of CFB p.S367R was unsuccessful. Evaluation of soluble C5b-9 levels in patients with thrombotic microangiopathy(TMA) revealed complement activations contribute not only in the etiology of atypical hemolytic uremic syndrome, but also in shiga toxin producing E.coli-associated HUS and secondary TMA.

研究分野：小児腎疾患

キーワード：膜性増殖性糸球体腎炎 補体 非典型溶血性尿毒症症候群

1. 研究開始当初の背景

膜性増殖性糸球体腎炎(membranoproliferative glomerulonephritis: MPGN)は、小児期の慢性糸球体腎炎の5~10%を占め、副腎皮質ステロイド剤等による治療が行われる。本邦では学校検尿の普及により重症例は減少したとされるが、副腎皮質ステロイド剤の長期投与に伴う成長障害等の副作用が問題となるほか、一部は治療抵抗性で末期腎不全に至る。病因については腎組織での補体活性亢進が考えられており、免疫染色では糸球体係蹄でのC3や他の補体成分、ならびに免疫グロブリンの沈着を特徴とする。その病因については不明な点が多いが、近年、MPGNの組織学的特徴よりC3腎症という概念が提唱され、補体第二経路の異常に伴う発症が注目されるようになった。

2. 研究の目的

C3腎症の組織学的特徴を満たす家族性MPGN症例において同定した、第二経路活性に関わる補体B因子(complement factor B: CFB)の新規遺伝子変異について蛋白機能解析を行い、MPGN発症のメカニズムと補体抑制による治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

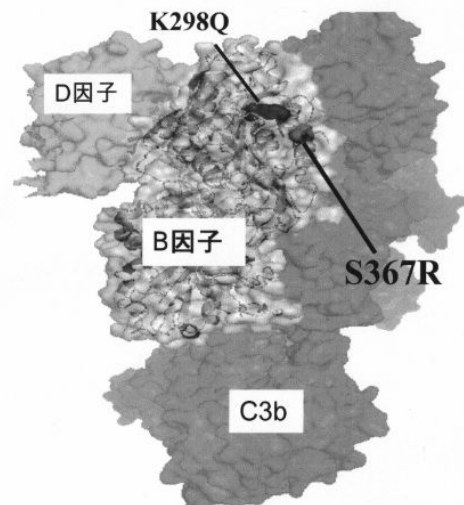
CFB p.S367R変異について、蛋白立体構造や過去の報告から、その機能への影響を推測する。さらに変異蛋白を作成し、蛋白大量培養のうちに、Surface Plasmon Resonance (SPR) 解析による蛋白機能解析を行い、本変異がCFBの機能獲得性変異であることを証明する。

4. 研究成果

補体B因子におけるCFB p.S367R変異について、蛋白立体構造の解析から本変異が補体B因子の機能獲得性変異に関与することを報告した。MPGN同様に補体活性異常で発症する非典型溶血性尿毒症症候群において、CFB変異に伴う発症が数家系報告されているが、こ

れらはいずれもCFB蛋白のvon Willebrand factor type Aドメインに位置する変異であり、今回の変異も同ドメインに位置するものであった¹⁾。さらにCFB蛋白の立体構造では、補体D因子やC3bとの直接的な結合部位ではなかったものの、蛋白機能解析で機能獲得性変異が既に証明されているp.K323E/Qに隣接した部位に存在しており、補体活性を制御する補体H因子の作用を減弱させることで持続的な補体第二経路活性に関与すると考えられた(図1)。これは、膜性増殖性糸球体腎炎の原因として補体B因子の関与を示した初めての報告となった。

図1. 補体B因子、D因子、C3bの結合とp.S367Rの変異部位

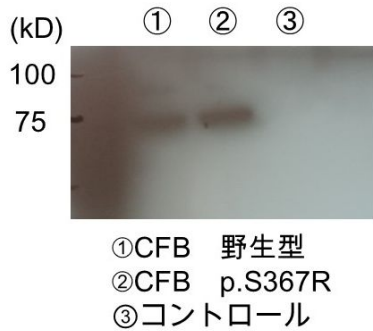


また、soluble C5b-9等の補体成分を測定し、健常者との比較を行ったうえで、本変異により補体第二経路が持続的に活性化されていることを証明した。

次に、CFB p.S367R変異蛋白の精製に着手した。野生型CFB cDNA クローンに site-directed mutagenesisの手法を用いてCFB変異(c.1099A>C)を導入し変異型CFB cDNA クローンを作成した。それぞれをPCRで増幅し、分泌型ベクターに導入した。導入後に再度シーケンシングを行い、目的とした変異が導入されたこと、他の変異が存在しないことを確認

した。それぞれの分泌ベクターをCHO細胞へトランスフェクトし、培養液中に分泌された蛋白を抗His抗体を用いてWestern blot法で確認後、蛋白を精製した(図2)。

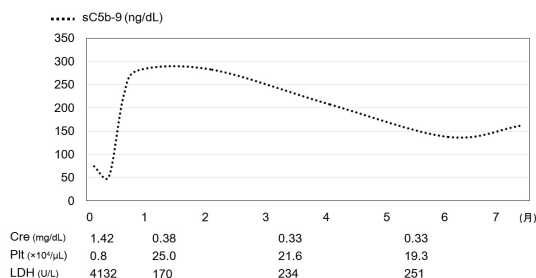
図2. 蛋白のWestern blot法による確認
(CFB蛋白: 72kD)



さらに蛋白の大量培養後に機能解析を行う予定であったが、変異蛋白の大量培養が実現に至らなかった。

研究計画を一部変更し、血栓性微小血管症(TMA)症例における soluble C5b-9 等の推移について検討した。ELISA 法による測定系を確立し、患者血清による検討を行った。正常コントロールは 32.1 ± 12.6 ng/dL であり、血漿検体による既報とは大きく異なった。補体介在性の病態である非典型溶血性尿毒症候群(atypical hemolytic uremic syndrome; aHUS)症例では、急性期に著増がみられ補体活性を反映するものと考えられたが、治療後の寛解期にも高値で推移しており、病勢を反映するバイオマーカーとしては不十分と考えられた(図3)。

図3. aHUS 症例における血清 sC5b-9 推移



一方で、志賀毒素関連溶血性尿毒症症候群や二次性血栓性微小血管症症例においても急性期に血清 soluble C5b-9 の上昇が確認され、これらの症例の一部ではその数値が病勢を反映して変動した。以上から、非典型溶血性尿毒症症候群以外の血栓性微小血管障害の一部にも、補体異常活性が関与していることを明らかとした。

今後は、ひきつづき CFB 変異蛋白の大量培養、機能解析に取り組む予定である。また、血栓性微小血管症における補体活性の関与についても、症例数を増やして臨床像との検討を継続する予定である。

参考文献

1) Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T et al. Complement factor B mutations in atypical hemolytic uremic syndrome disease relevant or benign? J Am Soc Nephrol 2014; 25: 2053-2065

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Imamura H, Konomoto T, Tanaka E, Hisano S, Yoshida Y, Fujimura Y, Miyata T, Nuno H. Familial C3 glomerulonephritis associated with mutations in the gene for complement factor B. Nephrology Dialysis Transplantation. 2015;30(5):862-864. 査読有

今村秀明、田中悦子、此元隆雄. 糸球体疾患 膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)新分類と C3 glomerulopathy. 小児科診療 2014;77(6):729-736. 査読無

[学会発表](計3件)

山田愛、中川緑、木下真理子、澤大介、織田真悠子、今村秀明、上村幸代、此元隆雄、盛武浩、布井博幸. エクリズマブ投与により救命し得た移植関連血栓性微

小血管障害合併神経芽腫．第 119 回日本小児科学会学術集会 2016 年 5 月 14 日．北海道札幌市

今村秀明、山元綾子、阪口嘉美、織田真悠子、此元隆雄、南学正臣、宮田敏行、大塚泰史、布井博之．非典型溶血性尿毒症症候群を合併した NEMO 遺伝子異常症の 1 例．第 119 回日本小児科学会学術集会．2016 年 5 月 15 日．北海道札幌市

今村秀明、此元隆雄、阪口嘉美、織田真悠子、大塚泰史、吉田瑶子、加藤秀樹、南学正臣、宮田敏行、布井博之．エクリズマブが著効した抗 H 因子抗体非典型溶血性尿毒症症候群 (DEAP-HUS) の 1 例．第 46 回日本腎臓学会西部学術集会 .2016 年 10 月 14-15 日 (発表予定)．宮崎県宮崎市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1) 研究代表者

今村 秀明 (IMAMURA, Hideaki)

宮崎大学医学部助教

研究者番号：20433063

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：