

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460654

研究課題名(和文) 遺伝性血管性浮腫における自己免疫異常の病態解明と早期診断・治療を目指す研究

研究課題名(英文) Autoimmune disorder in hereditary angioedema

研究代表者

佐藤 信之 (SATO, Nobuyuki)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70621944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性血管性浮腫(HAE)において、血清学的免疫異常を呈する症例を散見する。これまでにこれを証明する基礎的実験の報告はなく、今回これを証明するため、18名のHAE患者の血清を用いて実験を行った。結果は、HAE患者が血清学的免疫異常を呈する原因と考えられるオプソニン化能の低下と免疫複合体可溶性の低下を確認することができた。また、数例で抗C1q抗体の検出を認め、これは血清免疫複合体濃度と正の相関傾向にあった。HAE患者で認められる、血清学的免疫異常の所見は、HAEの病態である低補体血症に伴うオプソニン化能の低下や免疫複合体可溶性の低下に起因する可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：Some patients with hereditary angioedema (HAE) exhibit immunological abnormalities. Low levels of complement components are characteristic of HAE and in other settings are thought to reduce elimination of apoptotic cells and immune complex (IC). Serum samples from 18 patients with HAE were collected when free from angioedema attack and compared with normal human pooled sera (NHPS). Opsonization was measured as the rate of phagocytosis of apoptotic Jurkat cells by macrophages incubated with serum. IC solubilization in serum was analyzed by quantifying peroxidase (PO) released from a synthetic IC composed of PO and anti-PO antibodies. Anti-C1q antibody levels were detected. Serological immunological abnormalities were detected in 12 patients. Opsonization in serum samples from each patient with HAE was lower than that in NHPS. The rate of IC solubilization was lower in serum from HAE patients than NHPS. Some patients had high serum anti-C1q antibody levels with increased serum IC levels.

研究分野：補体学

キーワード：遺伝性血管性浮腫 自己免疫異常 オプソナイゼーション 免疫複合体可溶性

1. 研究開始当初の背景

遺伝性血管性浮腫 (HAE: hereditary angioedema) は、身体各所 (頭部、四肢、胸部、腹部、背部、臀部の皮膚、気道粘膜、腸管粘膜など) に突発的な血管性浮腫の出現と消退を繰り返す疾患である。数時間で自然消失する軽症発作から、気道粘膜浮腫による窒息で死亡する重症発作まで発作時の症状や重症度は多岐にわたる。そのうち腸管浮腫による急性腹症例に対しては、明らかな器質的疾患を見いだせないままの診断的開腹術を施行されることも多い。HAE の原因は、遺伝的な C1-インヒビター (C1-INH) の欠損あるいは機能不全により、局所で産生された血管透過性物質であるブラジキニンにより皮膚や粘膜に浮腫を生じる (HAE type I・II) と定義されている。しかし、最近では C1-INH が関与しないものの、ブラジキニンの産生過多を生じる HAE with normal C1-INH の疾患概念が提唱され、全世界で病態解明が急がれている。現在、発作時におけるわが国での唯一の救命的治療法は、ブラジキニンの産生を抑制する C1-INH (血液製剤) の静脈内投与であり、これは症状の速やかな改善と、患者 QOL の向上、救命率の上昇に寄与している。しかし、劇的な効果をもつ C1-INH の投与が可能なのは、HAE の確定診断を有している症例に限られている。しかしながら、この疾患における大きな問題は、診断すること自体は比較的容易であるにもかかわらず、疾患認知度の低さを背景として、HAE の確定診断を得ることが容易ではないことである。有病率は約 5~10 万人に 1 人とされ、人口比で日本には、2000-3000 人の患者数が推定されるが、日本ではこの疾患に対する医師の認知度が約 40% と低く、実際の患者数は不明であり、現在のところおよそ 400 名ほどしか確認されていない。そのような現状の背景には、症状の出現が全身の多部位にわたるため、発作時に受診する診療科が多岐にわたっており、欧米のような HAE を専門とする診療体制がわが国では整っていない点が挙げられる。また、わずかに数年前の 2010 年に World Allergy Organization (WAO) より HAE の診断ガイドラインが提唱され、国内においても日本補体学会から HAE 診断ガイドラインが策定されている。しかし、多くの症例で HAE の病態が自己免疫疾患と類似していることが、さらに HAE の確定診断を得るための障壁となっていると推測される。C1-INH の低下に伴い、カリクレイン・キニン系ではブラジキニンの産生過多により突発性浮腫を生じるとともに、補体系では慢性的に補体因子 (C4・C2) が欠乏し、補体因子を必須とする免疫複合体の可溶化やオプソニン化に障害をもたらし、これに伴い自己免疫異常を合併していると推察される。実際、HAE 患者では自己抗体陽性例や自己免疫疾患合併例が多く報告されている。しかし、現在のところその機序は不明である。実際、症状が出

現してから HAE という診断が確定するまでに、平均で十数年を要し、確定診断の困難さが伺える。今後 HAE における自己免疫異常の病態解明が、HAE の診断をより迅速にかつ正確に行ううえでの鍵の 1 つであると考えられる。さらには、早期治療へとつながる道筋になると考えられる。これまでに HAE 患者における自己免疫疾患の有病率などの報告はあるものの、それらの機序を解明し、裏付けるような基礎実験はまったく行われておらず、報告がないのが現状である。

2. 研究の目的

上記背景をもとに、本研究の主目的は、HAE 患者の血清を用いて、健常人血清と比較することで、HAE 自己免疫に関する病態を解明することとした。これらを解明することができれば、より迅速に HAE の診断と治療を可能にすることができ、HAE 患者の QOL 上昇や、予防できる死亡や不要な開腹術施行を防ぐことができると考えられる。得られた結果は、関連学会での発表、論文化による社会への公表などを行い、HAE ガイドラインの改定・策定に関して、本研究結果を提言することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 順天堂大学順天堂医院腎・高血圧内科に通院し遺伝子検査で HAE と確定診断された患者 18 名 (女性 10 名、男性 8 名) において、2013 年 11 月~2014 年 10 月の非発作時に血液検査を施行し、遠心分離により得られた血清を用いた。本研究はヘルシンキ宣言に遵守し、順天堂大学倫理委員会の認定 (No. 25-325) を受け、患者に対し十分な説明を行ったうえで、書面による同意を得た。同様に健常人からも血液を採取し、遠心分離したものを混ぜ、プール血清として保存した。得られた血清は、-80℃ で 500 μ l ずつ容器にて凍結保存し、都度使用され、残血清は毎回破棄した。

(2) 得られた患者・健常者の血液を用いて、C1-INH 活性、C1-INH 定量、C4、C1q、免疫複合体濃度 (C1q 法)、抗核抗体、クリオグロブリンを外部委託にて測定した。

(3) 市販されているヒト T 細胞リンパ腫細胞である Jurkat 細胞に一定の紫外線を照射し、アポトーシスを誘導させたアポトーシス細胞に、健常人あるいは HAE 患者の血清を一定量反応させ、市販のヒト単球白血病細胞である THP-1 細胞から、PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) を添加することによって分化させたマクロファージによる、アポトーシス細胞の貪食能を測定し、オプソニン化能の指標とした。この際、アポトーシス細胞の貪食能は、マクロファージ 100 細胞中、マクロファージがアポトーシス細胞を捕捉あるいは貪食している割合を指標とした。

(4) 紫外線を照射したアポトーシス細胞に健常人あるいはHAE患者の血清を添加し、市販の抗補体因子抗体(抗C1q抗体、抗iC3b抗体、抗C4d抗体)を用いて、フローサイトメトリーで検知することにより、血清下でのアポトーシス細胞の表面に沈着した補体因子(C1q、iC3b、C4d)を検索した。

(5) マクロファージや単球が細胞表面に有している補体受容体1(CR1)、補体受容体3(CR3)、補体受容体4(CR4)を、それぞれ抗補体受容体1抗体(抗CR1抗体)、抗補体受容体3抗体(抗CR3抗体)、抗補体受容体4抗体(抗CR4抗体)を用いて、補体受容体を阻害したのち、血清下でのマクロファージのアポトーシス細胞貪食能を測定した。

(6) ペルオキシダーゼ(P0)を基質として、抗ペルオキシダーゼ抗体(抗P0抗体)と反応させ、抗原抗体反応により免疫複合体(P0-抗P0抗体)を産生させた。産生された免疫複合体に健常人あるいはHAE患者の血清を混ぜ、上清に溶解したペルオキシダーゼ(P0)をTMB(tetramethylbenzidine)を用いて測定することにより、免疫複合体可溶性の指標とした。

(7) 市販の抗C1q抗体ELISAキットを用いて、健常人あるいはHAE患者の血清における抗C1q抗体濃度を測定した。この際、用いたELISAキットが推奨するプロトコールに則って測定を行った。

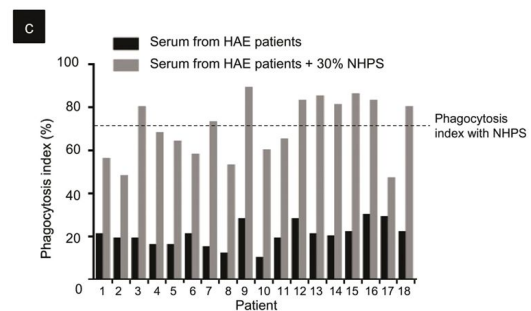
(8) 得られた結果をGraphPad Prism 6Jを用いて統計学的に処理し、比較検討し、データをまとめた。

4. 研究成果

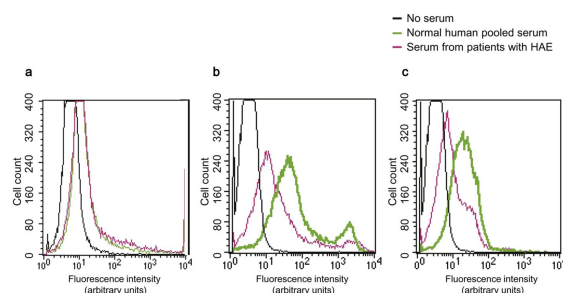
(1) 18名のHAE患者の平均年齢は46.7歳だった。2名ずつ4組の家族関係があった。3名はそれまで無症状で経過していた。15名は症状の出現あり、10~39歳に初発症状を呈していた。初発症状出現から、HAEの診断が確定されるまでに平均で24.3年を要した(0~61年)。症状を呈した際にヒトC1インアクチベーター製剤を投与したことがあるのは12名だった。2名は喉頭浮腫による窒息歴があり、気管切開の処置を受けるほど重症な発作を呈したことがあった。

(2) 血液検査では、全ての患者でC1-INH活性の低下を認めた。17名はC4の低下も認めた。C1qの低下、免疫複合体濃度の上昇、抗核抗体陽性、クリオグロブリン偽陽性など、何らかの血清免疫学的異常を呈していたのは12名に及び半数以上の患者が示した(12/18名:66.7%)。

(3) Jurkat細胞に紫外線を照射し、アポトーシスが誘導されたことを、市販のAnnexin VとPropidium iodideを利用したkitを使用し、確認した。健常人血清を用いて、血清濃度30%でマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食が平衡に達することが示されたため、本実験系で用いる血清濃度を30%と決定した。30%健常人血清を用いた場合、およそ70%のマクロファージがアポトーシス細胞を貪食することが示されたが、30%HAE血清を用いた場合は、およそ10~30%に低下を認めた。30%HAE血清に、さらに30%健常人血清を添加したところ、再度およそ70%まで貪食能の回復を認めた。

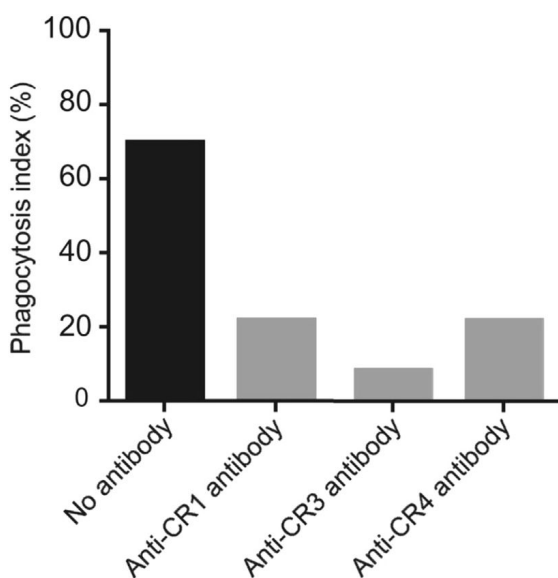


(4) アポトーシス細胞に血清を添加した際に、細胞表面に沈着した補体因子を検出した。C1q、C4d、iC3bは血清の添加がない場合よりも、血清の添加がある場合に検出された。さらに、健常人血清を添加した場合とHAE血清を添加した場合で、C1qの沈着は同程度であったが、C4dとiC3bはHAE血清を添加した場合よりも健常人血清を添加した場合のほうが、より多くの沈着を認めた。健常人血清とHAE血清を添加した場合のC1qの検出が同程度だった理由は、本実験では明らかではなかった。

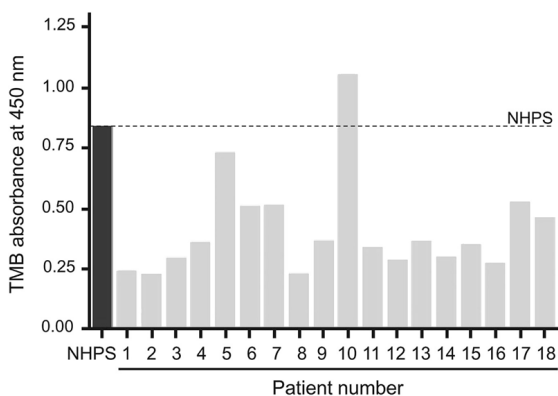


(5) マクロファージ表面上の補体受容体(補体受容体1(CR1)、補体受容体3(CR3)、補体受容体4(CR4))をそれぞれ抗補体受容体抗体(抗補体受容体1抗体(抗CR1抗体)、抗補体受容体3抗体(抗CR3抗体)、抗補体受容体4抗体(抗CR4抗体))でブロックすることで、マクロファージがアポトーシス細胞を貪食する貪食能が有意に低下した。このことより、マクロファージがアポト

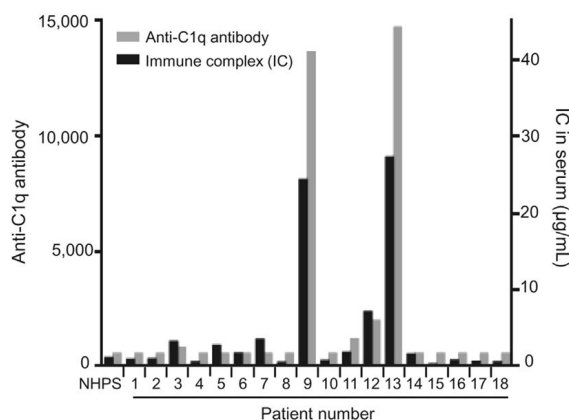
ーシス細胞を貪食・捕捉する過程で補体受容体 (CR) が関与することが推察された。



(6) 免疫複合体可溶化能は、健常人血清よりも HAE 血清のほうが有意に低かった。ただし、1 人の HAE 患者で健常人血清よりも高い免疫複合体可溶化能を示したが、本実験ではこの結果に対する明らかな原因は不明だった。



(7) 18 名の HAE 患者のうち、少なくとも 3 名で抗 C1q 抗体の高値を検出し、これらの HAE 患者では血清免疫複合体濃度の上昇も認められた。さらに、抗 C1q 抗体と血清免疫複合体濃度の相関性を認めていた。これは、抗 C1q 抗体陽性例では、C1q が担っているアポトーシス能の低下や免疫複合体可溶化能低下により、血清免疫複合体濃度が高値になると推察された。



(8) まとめ

今回得られた実験結果から、考察できることは、HAE 患者では、低補体血症に伴うと考えられる、オプソニン化能の低下や免疫複合体可溶化能の低下が認められ、さらにこれらの免疫学的異常により自己免疫異常を示唆する血清学的所見が認められている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Daisuke Honda, Isao Ohsawa, Nobuyuki Sato, Hiroyuki Inoshita, Satoshi Mano, Yasuhiko Tomino, Yusuke Suzuki, Diminished capacity of opsonization and immune complex solubilization, and detection of anti-C1q antibodies in sera from patients with hereditary angioedema, *Allergology International*, in press, 査読有. doi: 10.1016/j.alit.2017.03.008.

Ohsawa I, Honda D, Nagamachi S, Hisada A, Shimamoto M, Inoshita H, Mano S, Tomino Y, Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of hereditary angioedema: survey data from 94 physicians in Japan, *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2015 Jun;114(6):492-8. 査読有. doi: 10.1016/j.anai.2015.03.010.

Ohsawa I, Honda D, Nagamachi S, Hisada A, Shimamoto M, Inoshita H, Mano S, Tomino Y, Clinical and laboratory characteristics that differentiate hereditary angioedema in 72 patients with angioedema, *Allergol Int.* 2014 Dec;63(4):595-602. 査読有. doi: 10.2332/allergolint.14-0A-0700.

Atsuko Hisada, Mamiko Shimamoto, Isao Ohsawa, Daisuke Honda, Seiji Nagamachi, Hiyori Suzuki, Hiroyuki Inoshita, Kisara Onda, Satoshi Mano, Satoshi Horikoshi,

Yasuhiko Tomino, Clinical and histological characteristics in patients with non-IgA mesangioproliferative glomerulonephritis, Juntendo Medical Journal Vol.61, p41-48. 査読有 . https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmj/61/1/61_41/_article.

DAISUKE HONDA, KISARA TSUESHITA, ISAO OHSAWA, TOMOKO MIYASHITA, HIROYUKI INOSHITA, MAMIKO SHIMAMOTO, SATOSHI HORIKOSHI, SHINJI MORIMOTO, YOSHINARI TAKASAKI, YASUHIKO TOMINO, Clinical Significance of Renal Interstitial Fibrosis in Patients with Lupus Nephritis, Juntendo Medical Journal 2015. 61(4), 418-425. 査読有 . https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmj/61/4/61_418/_article.

〔学会発表〕(計5件)

Isao Ohsawa, Daisuke Honda, Atsuko Hisada, Hiroyuki Inoshita, Kisara Onda-Tsueshita, Satoshi Mano, Nobuyuki Sato, Satoshi Horikoshi, Differential diagnosis between hereditary and mast cell-mediated angioedema, 26th International Complement Workshop, 2016/9/5, Kanazawa, Japan.

Daisuke Honda, Isao Ohsawa, Hiroyuki Inoshita, Nobuyuki Sato, Satoshi Mano, Satoshi Horikoshi and Yasuhiko Tomino, Activity of cleaving enzymes for bradykinin in sera from patients with hereditary angioedema, 26th International Complement Workshop, 2016/9/5, Kanazawa, Japan.

Daisuke Honda, Isao Ohsawa, Nobuyuki Sato, Atsuko Hisada, Hiroyuki Inoshita, Satoshi Mano and Yasuhiko Tomino, The low opsonization and immune complex solubilization ability in sera from HAE patients, The European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2015/6/8, Barcelona, Spain.

Isao Ohsawa, Daisuke Honda, Seiji Nagamachi, Atsuko Hisada, Mamiko Shimamoto, Hiroyuki Inoshita, Satoshi Mano and Yasuhiko Tomino, Current manifestations, diagnosis and treatment of hereditary angioedema (HAE): survey data from ninety-four physicians in Japan, The European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2015/6/9, Barcelona, Spain.

本田大介、大澤勲、佐藤信之、清水友希、

毎熊政行、日高輝夫、鈴木仁、井尾浩章、堀越哲、富野康日己、遺伝性血管性浮腫の急性発作治療薬へのアクセスが困難であった一例、日本臨床免疫学会、2015/10/23、神戸国際会議場、兵庫県、神戸

〔図書〕(計1件)

大澤勲ら、「難病 遺伝性血管性浮腫」、出版：医薬ジャーナル社、2016年、128頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 信之 (SATO, Nobuyuki)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：70621944

(2) 研究分担者

大澤 勲 (OHSAWA, Isao)
順天堂大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：60407252

杖下 (恩田) 紀更 (TSUESHITA, Kisara)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：60465044

井下 博之 (INOSHITA, Hiroyuki)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：80646117

(3) 連携研究者

富野 康日己 (TOMINO, Yasuhiko)
順天堂大学・医学部・名誉教授
研究者番号：60130077