

令和 2 年 4 月 15 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04108

研究課題名(和文)新規補体測定系の開発と構築により補体関連疾患の病態を解明する

研究課題名(英文)The development of complement analysis system for complement diseases

研究代表者

若宮 伸隆(wakamiya, nobutaka)

酪農学園大学・農食環境学群・教授

研究者番号：20210867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年難治性疾患に補体活性化の関与が疑われている。しかし現在、補体活性化と疾患病態を結びつける補体因子の適切な検査やその体制が存在しないために、その詳細は不明である。本研究の目的は、新規補体活性化測定系の開発と構築を行い、標準検査系である補体活性化分解物測定系を再整備・構築し、補体関連疾患の補体活性化病態メカニズムの解明を行うことである。成果としては、C3、C4、CH50、Ba、sC5b9、C5a、CFH、CFI、C1-INH活性、CFH-IgGを測定できる補体因子検査系10項目を樹立し、本10項目の基準値を策定し、2019年12月学会誌「補体」にて公表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年難治性疾患に補体活性化の関与が疑われているが、補体活性化と疾患病態を結びつける補体因子の適切な検査やその体制は存在しない。本研究では、日本で初めてC3、C4、CH50、Ba、sC5b9、C5a、CFH、CFI、C1-INH活性、CFH-IgGの10項目の補体因子検査系システムを樹立した。そして、10項目の基準値を策定し公開したことで、今後補体関連疾患の病態把握に、補体検査を利用できる情報を提供できたと考えている。また、本システムは国際補体学科が行っている外部評価システム(EQA)に日本唯一認証されており、国際的に非常に評価されている。

研究成果の概要(英文)：In late years, the participation of the complement activation is doubted for an intractable disease. However, the details are unidentified now because the appropriate analysis of the complement factor relating the disease condition of a patient to complement activation and the system do not exist. We will build the purpose of this study with development of the new complement activation system of measurement, and re-builds up the pro-standard analysis complement activation resolvent system of measurement and is to elucidate the complement activation condition of a patient mechanism of the complement-related disease. As result, we established complement factor assay system for ten items that could measure C3, C4, CH50, Ba, sC5b9, C5a, CFH, CFI, C1-INH activity, CFH-IgG and devised the standard value of these ten items and announced it with an official journal of a complement scientific society "Hotai" in December, 2019.

研究分野：補体学

キーワード：補体 検査系 補体関連疾患

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

補体系は、右の図1にあるように、多様な分子から成る複雑系システムである。当初、補体は、(1)抗体を補う分子として同定されたが、実際には、C3、C4を中心とする結合分子とタンパク分解酵素が次々とその補体関連分子を切断し、補体系活性化を連続させ、その過程でできる物質により、自然免疫のみならず様々の生体機能をコントロールする非常に重要なシステムであることが明らかになっている。

(2)近年難治性疾患に補体活性化の関与が強く疑われている。特に、血栓性微小血管症(TMA)や非典型性尿毒症症候群(aHUS)などの病態に補体活性化が極めて重要な働きをする可能性が明らかになった。この難治性血管炎は、抗補体薬でのみしか沈静化できないが、補体活性化と疾患病態を結びつける補体因子の適切な検査やその体制が日本ばかりか世界にも現時点では、存在しない。

### 2. 研究の目的

本研究では、局所における補体の異常活性化を明確に規定できる補体検査法の総合的な確立(新規補体活性化測定系の開発と世界標準の補体検査整備)を目標とした研究を行う。そして、この補体検査体制の構築過程で、実際の補体関連疾患の新規病態を明らかにし、種々のトリガーで誘発されるTMAやaHUSなどの補体関連性血管炎等に対して、新たな治療指針構築に資することができる新知見を見出すことが、この研究の目的である。

### 3. 研究の方法

本研究の方向性は、大きく分けて3つにしばられると考える。既に欧米では市販され検査できるが、日本でできない世界標準補体検査系の構築と評価、新規の血液の補体の異常活性化レベルを測定できる系の開発・構築と評価、具体的な補体関連疾患における、上記検査の有効性の検討・評価となると考えられる。それらを本研究では、以下の7つの方法で研究する。

- (1)世界標準の補体系検査(C3, C4, CH50, Ba, sC5b-9, C5a, CFH, CFH-IgG)を構築する。
- (2)血液の補体系異常活性化能力を評価できる新規補体活性化測定系を開発・構築する。
- (3)疾患確定した既存患者血液を研究1, 2の測定系に供し、検査の基準値を設定する。
- (4)前向き試験で収集する患者血液を(1, 2)の測定系に供し、補体活性化度を評価する。
- (5) (3, 4)の補体検査値と患者病態情報を得て、本補体関連疾患の補体活性化度を解析する。
- (6)補体関連疾患患者組織における補体活性化状態の解析を行う。
- (7)すべてのデータを統合して、関連疾患の病勢および臨床経過や重症度と各種補体濃度、補体活性化物濃度、補体活性化度との検討を行い、それらの因果関係を解析する。

### 4. 研究成果

(1)世界標準の補体系検査(C3, C4, CH50, Ba, sC5b-9, C5a, CFH, CFH-IgG)の8項目の構築から、検査項目の構築をスタートした。3年間では最終的に、2項目が増えて、10項目の補体検査系の樹立(C3, C4, CH50, Ba, sC5b-9, C5a, CFH, CFI, C1-INH活性, CFH-IgG)に成功している。さらに、健康人70名の収集により、補体検査基準値を策定した(右表:基準値)。本結果は、日本補体学会の学術誌「補体」に原著論文として報告した。また、本検査システムにおける、外部精度管理(EQA)に関しては、2019年度においては、2回のEQA2019に参加した。EQA2019では、13項目(Alternative pathway, Classical pathway, Lectin pathway, C3, C4, C1 inhibitor protein, C1 inhibitor activity, C1q, CFH, CFI, C3a, sC5b-9, Anti-CFH)にエントリーし、そのうち11項目についての妥当性評価を受けた(右図)。本補体検査のEQAによる認証は、日本では唯一の認証であり、国際的にも高い評価を受けている。

項目	単位	血清	血漿
C3	mg/dL	61.6 - 138.8	60.8 - 130.0
C4	mg/dL	11.0 - 35.0	10.8 - 33.2
CH50	CH50/ml	32.4 - 49.6	31.3 - 44.5
Ba	ng/ml	438.1 - 1545.7	245.5 - 648.7
sC5b-9	ng/ml	181.0 - 1265.8	58.4 - 311.2
C5a	ng/ml	1.25 - 27.33	0.20 - 14.22
CFH	µg/ml	237.7 - 662.9	209.9 - 654.3
CFI	µg/ml	11.2 - 41.6	44.7 - 202.7
C1-INH活性	%		79.1 - 139.5
CFH-IgG	AU/ml	393.9 - 1476.4	393.9 - 1438.5

(2)新規補体活性化測定系を開発・構築については、CRP, serum amyloid protein(SAP), PTX3と分泌型CL-P1との結合をELISAで明らかにし、同時にCL-P1の真核細胞の発現系(HEK293/CL-P1細胞)を用いてその結合を明らかにした。さらに、ヒト補体血清を用いた実験では、ELISA系およびCL-P1発現細胞において、PTXs依存性にC3bが産生される前期補体活性化が起こることを明らかにした。同時に、この活性化がCRP, SAP, PTX3と血清中に存在するC1qの結合依存的(古典経路)に起こることを明らかにした。つぎに補体活性化について完全ヒト補体血清を用いた実験条件では、終末経路への進展は見られなかった。同様の系で、各種補体因子欠損血清や精製補体等の添加実験を行い、補体活性化の抑制系について



#### CERTIFICATE OF PARTICIPATION

Survey of 08 November 2019

You have participated in the External Quality Assessment with the following analysis:

Complement Analysis 02 (Functions and proteins) (246):

Alternative pathway C3 Complement C4 Complement Complement factor I  
C1 inhibitor activity C1 inhibitor protein Classical pathway  
C1q protein Complement factor H

Complement Analysis 03 (Complement activation products) (247):

C3a  
C5b-9

Complement Analysis 05 (Auto-anti F1) (249):

Auto-anti F1 (part.)  
Auto-anti F1 (part.)

Participant:

0491

The Japanese Association for Complement

Research

Wakayama Medical University

611-0018 Wakayama

641-8209 Wakayama

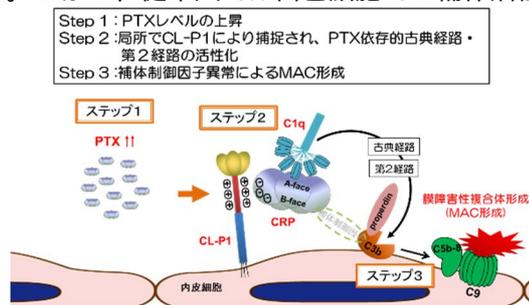
Standard: 08 November 2019

For the next external assessment

Next External Assessment



検討した結果、CRP, PTX3 は、CFH 因子が関与して終末経路への進展を制御すること、SAP では C4BP により制御されていることが明らかになった。しかし、健康人では自己細胞での補体活性化が起こらないように液性や膜型の補体制御因子が存在し、自己の組織ダメージを惹起する補体活性化が阻害され、補体活性化は C3b の前期活性化段階で停止している。しかし慢性的な何らかの原因で炎症が持続的亢進している状態では、血中の炎症マーカーが上昇している可能性が考えられ、炎症局所では PTXs 依存性の補体活性化が引き起こされ、本補体活性化メカニズムが機能する可能性があるかと推測している(右図)。



(3) 疾患確定した既存患者血液を研究1, 2の測定系に供し、検査の基準値を設定する。疾患確定した既存患者に関しては、aHUS, C3腎症、妊娠高血圧に合併するTMA, 腎移植に伴うTMA, 骨髄幹細胞移植に伴うTMAなどの疾患の患者のレジストリーを構築し、血液収集を進めているが、現時点では、症例数がそれほど多くなく、生物学的な統計ができるには、さらに症例の収集が必要であると考えている。

(4) 前向き試験で収集する患者血液を(1, 2)の測定系に供し、補体活性化度を評価。本研究においては、前向き試験を構築する過程であり、まだ補体活性化評価の検討に至っていない。

(5) (3, 4)の補体検査値と患者病態情報を得て、本補体関連疾患の補体活性化度を解析する。患者情報は、着々と大阪市立大学のREDCapにおいて、レジストリー構築を進めている。しかし、生物統計に適した症例数が集まっておらず、全体に検査する時期には至っていない。とくに、タンパク質の測定は一括検査を考えておりそれほど進んでいないが、遺伝子検査のデータは、例数は多くないが、着実に蓄積されている。

(6) 補体関連疾患患者組織における補体活性化状態の解析については、症例報告の段階であるが、移植例で補体活性化を示す、補体因子の動態観察を行った。補体活性化は、TMA発症早期にすでに補体活性化分子の増加がみとめられており、それらは、抗補体薬の投与により、沈静化していることが観察されている。同時に、行った患者組織における腎切片においても、TMAの組織像がみられており、臨床データの腎機能の低下と非常にリンクした所見が得られている。データ解析のあと、現在論文投稿中である。

(7) すべてのデータを統合して、関連疾患の病勢および臨床経過や重症度と各種補体濃度、補体活性化物濃度、補体活性化度との検討を行い、それらの因果関係を解析する。補体関連疾患の発生頻度が非常に少ないために、症例収集は非常に困難を極めている。日本で発生するほとんどの患者は、関連学会の協力により、かなりカバーできていると推測するが、それにもかかわらず症例数は少ない。今後は、諸外国との連携も考慮する必要があると考えている。

#### <引用文献>

- 1) Bonavita E, Gentile S, Rubino M, et al. PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer. *Cell*. 2015; 160(4):700-14.
- 2) Dragon-Durey MA, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C, et al. Heterozygous and homozygous factor h deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulonephritis: report and genetic analysis of 16 cases. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(3):787-95.
- 3) Jodele S, Dandoy CE, Myers KC, et al. New approaches in the diagnosis, pathophysiology, and treatment of pediatric hematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Transfus Apher Sci*. 2016; 54(2):181-90.
- 4) 香美祥二、岡田浩一、要伸也、その他. 日本腎臓学会・日本小児科学会非典型溶血性尿毒症症候群診断基準作成委員会, 非典型溶血性尿毒症症候群診断基準. *日腎会誌* 2013; 55:91-93.
- 5) 大谷克城、井上徳光、日高義彦、若宮伸隆: 日本補体学会における、補体検査系10項目の構築とそれらの基準値策定. *補体* 2019; 56:13-22.
- 6) Roy N, Ohtani K, Hidaka Y, et al. Three pentraxins C-reactive protein, serum amyloid p component and pentraxin 3 mediate complement activation using Collectin CL-P1. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017; 1861(2):1-14.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayakawa M, Ohtani K, Wakamiya N	4. 巻 25
2. 論文標題 Changes in Mannose-Binding Lectin and Collectin Kidney 1 Levels in Sepsis Patients With and Without Disseminated Intravascular Coagulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Appl Thromb Hemost.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1076029618821189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 大谷克城、日高義彦、井上徳光、若宮伸隆	4. 巻 78
2. 論文標題 補体系の役割と補体関連疾患	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 184-191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 若宮 伸隆、大谷 克城、日高 義彦、井上 徳光	4. 巻 71
2. 論文標題 特集 補体標的治療の現状と展望 補体関連疾患に対する新規治療法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 555～564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1416201316	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujita Yoko, Terashita Maho, Yazawa Masahiko, Yamasaki Yukitaka, Imamura Tomonori, Kibayashi Junichiro, Sawai Toshihiro, Hidaka Yoshihiko, Ohtani Katsuki, Inoue Norimitsu, Shibagaki Yugo	4. 巻 59
2. 論文標題 Eculizumab for Severe Thrombotic Microangiopathy Secondary to Surgical Invasive Stress and Bleeding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 93～99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.3315-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 大谷克城、井上徳光、日高義彦、若宮伸隆	4. 巻 56(2)
2. 論文標題 日本補体学会における、補体検査系10項目の構築とそれらの基準値策定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 補体	6. 最初と最後の頁 13-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hidaka, Y., Inoue, N., Ohtani, K., Ohtsuka, Y., Sawai, T., Miyata, T., Ohsawa, I., Okada, H., Kinoshita, T., Sekine, H., Tsukamoto, H., Nakao, M., Mizuno, M., Murakami, Y., Horiuchi, T., Wakamiya, N
2. 発表標題 Comprehensive analysis of complement proteins and genes in thrombotic microangiopathy in Japan.
3. 学会等名 27th International Complement Workshop. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 若宮伸隆
2. 発表標題 コレクチンと補体系について
3. 学会等名 第28回日本メイラード学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 若宮伸隆
2. 発表標題 補体の基礎
3. 学会等名 第39回日本妊娠高血圧学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦正義、東山寛、大谷克城、若宮伸隆
2. 発表標題 aHUSによる1次腎喪失後の2次移植例における補体因子の経時的観察
3. 学会等名 第55回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上徳光、福森泰雄、大谷克城、日高義彦、赤澤隆、塚本浩、若宮伸隆
2. 発表標題 日本補体学会による補体欠損症の検査方法の確立
3. 学会等名 第2回日本免疫不全・自己炎症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue N, Neki R, Ohtani K, Hidaka Y, Ida K, Yokouchi-Konishi T, Nakanishi A, Yoshimatsu J, Kokame K, Wakamiya N, Miyata T
2. 発表標題 BIOCHEMICAL AND GENETIC ANALYSES OF COMPLEMENT-RELATED FACTORS IN JAPANESE PATIENTS WITH HYPERTENSIVE DISORDERS OF PREGNANCY
3. 学会等名 17th European Meeting on Complement in Human Disease. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 小熊恵二・掘田博・若宮伸隆	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 457
3. 書名 シンプル微生物学(第6版)	

1. 著者名 谷口直之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本糖鎖化学コンソーシアム (JCGG)	5. 総ページ数 333
3. 書名 未来を作るグライコサイエンス 我が国のロードマップ	

1. 著者名 若宮伸隆	4. 発行年 2018年
2. 出版社 一般法人日本補体学会	5. 総ページ数 48
3. 書名 FOCUS よみがえる補体科学	

1. 著者名 Ohtani K, Wakamiya N.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 405
3. 書名 Glycoscience: Basic Science to Applications	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 徳光  (Inoue Norimitsu)  (80252708)	和歌山県立医科大学・医学部・教授   (24701)	
研究分担者	鈴木 定彦  (Suzuki Yasuhiko)  (90206540)	北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授   (10101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大谷 克城 (Ohtani Katsuki) (90396367)	酪農学園大学・農食環境学群・教授  (30109)	
研究分担者	松田 泰幸 (Matsuda Ysuyuki) (10532252)	旭川医科大学・医学部・助教  (10107)	削除：2018年8月30日
研究分担者	森 健一郎 (Mori Kenichiro) (70610236)	旭川医科大学・医学部・助教  (10107)	削除：2018年8月30日