

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17917

研究課題名(和文) 遺伝性血管性浮腫におけるブラジキニン分解酵素活性の解析により病態解明を目指す研究

研究課題名(英文) Analysis of cleaving enzymes activities for bradykinin in hereditary angioedema

研究代表者

本田 大介 (Honda, Daisuke)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：50790094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C1インヒビターの遺伝的欠損あるいは機能不全による遺伝性血管性浮腫(I型・II型)において、血管性浮腫の出現や消退に関与する可能性のあるブラジキニン分解酵素群(NEP、ACE、DPP4、APP、CPN)活性を測定したところ、発作時のCPN活性の有意な上昇およびDPP-4活性の有意な低下、また発作時でも腹痛症例と非腹痛症例におけるACE活性に有意な差が認められた。この結果は、ブラジキニン分解酵素活性を測定することにより、遺伝性血管性浮腫発作の閾値や重症度を予測できることが可能となり、新規治療薬開発の一助となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性血管性浮腫は、5万人に1人の有病率の希少疾患である。急性発作時には、四肢などの皮膚の浮腫のみならず、激しい腹痛(腸管浮腫)や窒息(喉頭浮腫)により致命的となることもあるが、病態の解明は進んでいない難病である。致命的な急性発作が起きる機序を解明することで難病患者の生活の質を維持することにつながるため、本研究結果のよって得られたブラジキニン分解酵素群活性のデータを蓄積することで、病態の解明や新薬の開発につながるが見出された。

研究成果の概要(英文)：In hereditary angioedema (type I/II) due to the deficiency or dysfunction of C1-inhibitor, we analyzed cleaving enzymes (NEP, ACE, DPP4, APP, CPN) activities for bradykinin which can potentially cause the occurrence and disappearance of acute attacks. As a result, the activities of CPN and DPP4 at acute attacks significantly elevated and decreased, respectively. In addition, there was a significant difference in the activity of ACE between abdominal attacks and non-abdominal attacks. These results can be leading to knowing new mechanisms in hereditary angioedema.

研究分野：補体

キーワード：遺伝性血管性浮腫 ブラジキニン ブラジキニン分解酵素 C1インヒビター 血管性浮腫 腸管浮腫 喉頭浮腫

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性血管性浮腫 (Hereditary angioedema : HAE) は、主に C1 インヒビター (C1-INH) の遺伝子変異に伴う C1-INH の欠損あるいは機能不全によってブラジキニン (BK) の過剰産生をきたし、身体各所に発作性浮腫の出現と消退を繰り返す常染色体優性遺伝性疾患である。HAE 未診断患者の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されないまま不要な開腹術が施行され、著しい QOL の低下を招くことや、未診断時に喉頭浮腫をきたし窒息死した症例が報告されていることより、HAE の早期診断・早期治療が重要である。有病率は、50,000-100,00 万人に 1 人とされ、わが国にも約 2500 人の患者がいると推計されるが、疾患認知度の低さや鑑別すべき疾患が多いことを背景として、実際には 400-500 名程度しか確定診断されておらず、症状が出現してから HAE の診断が確定するまでに平均で十数年を要している。HAE の早期診断・早期治療を可能とするためには、可及的速やかな病態解明が必要な状況である。HAE の浮腫は、数時間で自然軽快する症例から、長時間経過しても浮腫が消褪しない症例、局所の発作に留まる軽症例、気道粘膜浮腫による窒息で死亡する最重症例まで、その持続時間や重症度は多岐にわたり、同一の遺伝子変異を有する家系内においても異なった臨床症状を呈することが知られている。このことから、遺伝子変異以外の要因が浮腫消褪や重症度を規定する病態に関与することが示唆されるものの、これまでに浮腫消褪の程度や重症度に関する病態を調べる基礎的研究はほとんどなされていない。一方、疫学的研究においては、発作に関して性差や地域差、人種差はないと考えられているため、浮腫の重症度や消褪の病態に関与していると考えられるのは、浮腫の直接的な要因である BK であると推測することができる。

## 2. 研究の目的

HAE の病態に関する遺伝子変異以外の要因として、浮腫の直接的な要因である BK の血行動態が浮腫消褪や重症度を規定する病態に関与していると考えられるが、BK は体内で BK 分解酵素群 (Angiotensin converting enzyme (ACE)、Aminopeptidase P (APP)、Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV)、Neprilysin (NEP)、Carboxypeptidase N (CPN)) によってわずか数十秒という短時間で分解されるため、BK そのものを測定することは困難であることから、BK の血行動態を左右する BK 分解酵素 (NEP、ACE、DPP4、APP、CPN) 活性を測定することで BK の血行動態を間接的に解析し、血管性浮腫発作の出現・消退などの病態の機序を解明することを目的とした。さらに、HAE の浮腫消褪や重症度を規定する病態の機序を明らかにすることで、疾患概念や疾患全体の系統的な病態解明につながり、HAE 確定診断患者の QOL 向上や致死率の低下に寄与するのみならず、未診断患者の HAE の早期診断・早期治療に結びつく可能性が高いと考えられた。また、BK 分解酵素群のうち DPP-IV と ACE に関して、これらを標的とした全世界で頻用されている糖尿病治療薬 (DPP-IV 阻害薬) や高血圧治療薬 (ACE 阻害薬) は、BK 分解酵素を阻害することにより、副作用として BK を介した血管性浮腫がもたらされることがあり、最近の臨床的問題事項となっている。本研究の遂行により、糖尿病や高血圧といった common disease の頻用治療薬の副作用に関する情報も得ることができ、HAE 分野のみならず広く研究成果を学術的に波及できる可能性があると考えられる。

## 3. 研究の方法

### 1. 患者の臨床基礎データを収集する

臨床データとして、年齢、性別、初発年齢、現病歴、既往歴 (気管切開術施行歴、開腹術施行歴)、家族歴、内服歴、発作頻度、発作重症度、発作部位、浮腫消褪までの時間など、HAE の浮腫消褪や重症度に関する病態を解明するうえで重要な病歴聴取を詳細に行う。

### 2. 非発作時・発作時の患者検体を採取し、冷凍保存する

HAE 患者から静脈血採血 (20mL) を採取後、遠心分離し、0.5mL ずつ分注し冷凍保存する。

### 3. HAE 患者の非発作時・発作時の BK 分解酵素群活性を測定する

ACE、APP、DPP-IV、NEP、CPN の酵素活性を Kuoppala らの方法 (Am J Physiol Heart Cir Physiol 2000) を参考にして、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いて測定する。また、市販されている測定キットを用いて酵素活性を測定したところ、良好な結果が確認されており、RP-HPLC による解析が不成功に終わった場合の代替測定法として使用可能である。

### 4. BK 分解酵素群活性の測定結果と HAE 患者の臨床基礎データを比較する

得られた HAE 患者の BK 分解酵素群活性の結果と、臨床基礎データを比較検討する。さらに、同一家系内でのデータの比較検討、同一患者における発作時・非発作時のデータの比較検討を行い、HAE の浮腫消褪や重症度を規定する病態の解析を行う。

### 5. 成果の発表

HAE における BK 分解酵素群活性と発作出現・消褪のメカニズム、発作様式・重症度の関連性、

HAE の病態解明に関して、国内外を問わず関連学会（日本アレルギー学会、日本補体学会、European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress、C1 Inhibitor Deficiency Workshop など）で発表、また論文文化し医学雑誌で発表する。

#### 4 . 研究成果

非発作時と発作時の患者検体における、BK 分解酵素群活性を解析したところ、NEP 活性と ACE 活性の正の相関を認めた。発作時の CPN 活性の有意な上昇および DPP-4 活性の有意な低下が認められた。この結果が得られた原因については、現在考察中である。また、発作時において腹痛症例と非腹痛症例における ACE 活性に有意な差が認められた。今後、腸管と ACE 活性の関連性を検討していく方針である。HAE において、一般的に C1-INH 値と重症度は相関しないとされるが、今回の結果でも、血液結果から得られた C1-INH 値と発作回数や重症度に明らかな差は認められなかった。DPP4 活性は加齢に伴い有意に低下するが、今回の結果では、非発作時 ( $41.9 \pm 15.4$  歳) と発作時 ( $44.9 \pm 16.0$  歳) の群において、年齢の有意差はなく、発作時に DPP4 活性が有意に低値を示したのは、年齢差による影響ではないと考えられる。糖尿病患者や肥満で DPP4 活性は上昇するとされるが、今回の結果では、糖尿病患者や肥満者はいない。正常人血清の NEP 活性は極めて低いが、重症呼吸器疾患 (ARDS、敗血症性肺炎など) で上昇することがある。今回の結果では、健康人血清に比べて全ての HAE 血清で高値を示し、いずれの症例も重症感染の併発はない。高濃度 BK において主な分解酵素は CPN であり、低濃度 BK において主に ACE であり、BK 分解における酵素活性の強度は、 $ACE \gg NEP = DPP4$  とされる。今回の結果では、十分な検討はできないが、HAE の BK 分解にも関連する可能性がある。以上より、本実験で得られたこれらの結果は、BK 分解酵素活性を測定することにより、HAE 発作の閾値や重症度を予測できることが可能となり、新規治療薬開発の一助となる可能性が示唆された。本研究結果のよって得られた BK 分解酵素群活性のデータを蓄積することで、病態の解明につながるが見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Daisuke Honda, Isao Ohsawa, Satoshi Mano, Hisaki Rinno, Yasuhiko Tomino, Yusuke Suzuki.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cut-off value of C1-inhibitor function for the diagnosis of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intractable Rare Dis Res.	6. 最初と最後の頁 42-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/iridr.2020.03099.	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 Daisuke Honda, Isao Ohsawa, Keiichi Iwanami, Hisaki Rinno, Yasuhiko Tomino, Yusuke Suzuki.	4. 巻 -
2. 論文標題 A case of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency with recurrent abdominal pain diagnosed 40 years after the occurrence of the initial symptom.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-021-01338-1.	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 DAISUKE HONDA, ISAO OHSAWA, KEIKO TAKAHASHI, HISATSUGU TAKAHARA, KEN SHOJI, MASASHI NAGANO, HISAKI RINNO, YASUHIKO TOMINO, YUSUKE SUZUKI	4. 巻 65
2. 論文標題 Significant Fluctuations in Total Complement Hemolytic Activity as a Nutritional Parameter After Transition from Hemodialysis to Online Hemodiafiltration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 77-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14789/jmj.2019.65.JMJ18-0A08	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Daisuke Honda, Isao Ohsawa, Yasuhiko Tomino, Yusuke Suzuki.
2. 発表標題 Comparison of consultation behavior at acute attacks before and after prescription of bradykinin B2 receptor antagonist (Icatibant) in patients with hereditary angioedema.
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Honda, Isao Ohsawa, Hisatsugu Takahara, Hisaki Rinno, Yasuhiko Tomino, Yusuke Suzuki.
2. 発表標題 Evaluation for the measurement results of C1-inhibitor activity and suggestion in the diagnostic cut-off value of C1-inhibitor activity in patients with hereditary angioedema type I/II.
3. 学会等名 European Academy of Allergy and Clinical Immunology, on-line presentation (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田 大介
2. 発表標題 遺伝性血管性浮腫の新しい知見と治療法～疾患認知度向上のための啓蒙活動と疾患スペクトラム拡大のジレンマ～
3. 学会等名 第37回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Honda
2. 発表標題 Japan HAE status
3. 学会等名 JUMP HAE Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田 大介
2. 発表標題 遺伝性血管性浮腫の診断時における血液検査反復の意義
3. 学会等名 第56回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------