

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860685

研究課題名(和文) 補体調節因子系の解析システムの構築とこれを用いた非典型溶血性尿毒症症候群の診断

研究課題名(英文) Establishment of the diagnostic system of patients with atypical hemolytic uremic syndrome, and analysis of the characteristics of aHUS patients in Japan

研究代表者

吉田 瑤子 (Yoshida, Yoko)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90649443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は本邦における非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)患者の診断システムの構築と、これを用いた本邦aHUS患者の病態解析を目的として行った。研究期間内に106例のaHUS患者の集積をなし得、71例について溶血試験、抗H因子(CFH)抗体解析、遺伝子解析を行った。結果、溶血試験では17例の患者(17/71, 24%)に異常を認め、うち12例にCFH関連異常を認めた。71例中21例の患者にC3:p.11157T変異を認め、本邦好発の変異である可能性が示唆されるとともに、本変異は関西地域に多いという地域特異性も認められた。本研究成果は、本邦aHUS患者の早期診断・早期治療の向上に貢献しうると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish the diagnostic system of aHUS patients in Japan and analyze the characteristics of these patients. Through this work, we identified one-hundred three aHUS patients. Among 71 aHUS patients in Japan, 24% (17/71) had severe (>50%) hemolysis, and 12 of 17 patients had the CFH-related abnormalities. Twenty-one patients had C3-p.11157T mutations, which was a high-frequency mutation in our aHUS cohort. Most interestingly, a geographical distribution of gene mutations of aHUS patients showed that the patients carrying the C3-p.11157T mutation were only found in an extremely restricted area (Kansai district including Mie, Nara, Kyoto, and Osaka) and not found in other areas of West Japan. These results will be able to contribute to the early diagnosis and treatment of aHUS patients in Japan.

研究分野：血栓止血学

キーワード：aHUS 補体 Factor H C3

1. 研究開始当初の背景

血栓性微小血管症 (TMA) は全身の微小血管に血小板血栓が生じることによる血小板減少や臓器不全 (特に腎や脳)、微小血管で赤血球が破壊されることによる溶血性貧血の3徴候を示す疾患の総称であり、代表的な疾患が血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) と溶血性尿毒症症候群 (HUS) である。TTP と HUS は非常によく似た症状を呈するが、両者の成因は大きく異なる。TTP は止血因子である von Willebrand 因子の特異的切断酵素 ADAMTS13 活性の低下により生じる。一方、HUS の約 90% は O157 等の志賀毒素産生性大腸菌の感染を契機に発症するが、残りの約 10% は補体活性化経路の制御異常によって生じる先天性疾患であり、非典型 HUS (atypical HUS, aHUS) と称される (Noris et al. NEJM 2009)。

aHUS に関する病態解析は 1980 年代より欧米を中心に盛んに行われ、患者の約 70% で補体活性化の第二経路に属する補体調節因子 (H 因子 (CFH)、I 因子 (CFI)、B 因子 (CFB)、C3、MCP、トロンボモジュリン (THBD)) の遺伝子異常が報告されている (Noris et al. CJASN 2010)。さらに、aHUS 患者の約 5~10% に CFH に対する自己抗体が認められている。これに対し、本邦における aHUS 解析は大きく立ち遅れ、申請者が研究を開始した 2011 年当時、遺伝子解析まで施行された症例はわずか 2 例であった (天野ら. 日本小児科学会雑誌 2011)。そのため、具体的な患者数や遺伝子背景、腎機能の予後などに関するデータは全く得られておらず、解析は急務であると考えられた。

奈良医大輸血部は 1998 年より、本邦 TMA 解析センターとして機能し、全国の TMA 患者の診断・登録を行ってきた。申請者らは、これら TMA 症例の中に 56 例の「先天性 aHUS」疑い症例を同定した。患者の中には確定診断が得られないまま保存的治療が行われ、小児期から末期腎不全に至る例も存在したこと、また抗補体作用を有する薬剤が aHUS のあらたな治療薬として導入されつつあったこと等から、本薬剤の適正使用のためにも本邦 aHUS 患者の実態を正確に把握する必要があった。このような疫学背景から、申請者は本邦における aHUS 患者の病態解析を研究テーマとし、2011 年より研究を開始した。

患者解析の手法として、奈良医大輸血部で蛋白質レベルの補体調節因子の機能解析を行い、国立循環器病研究センター研究所 (研究協力者 宮田敏行先生) で疾患関連因子の遺伝子解析を行うシステムを構築した。結果、奈良医大で補体調節因子の機能解析を行った 20 例中 7 例に異常を認め、うち 3 例に CFH の遺伝子変異を (うち 1 例は信州大にて実施)、2 例に CFH 自己抗体の存在を確認した。さらに、6 例の患者に C3 変異を同定し、欧米とは異なる遺伝的背景がある可能性も示唆された。そこで、本研究は申請者らが樹立した aHUS 患者解析システムをさ

らに発展させることで、本邦における aHUS 患者の特色を明らかにし、診断法の確立を行うこととした。

なお、本研究期間内に奈良医大輸血部の藤村吉博教授がご退任されたこと、ならびに aHUS の最終的な臓器障害は腎死であり、今後の研究に際しては腎臓内科医の知識を要すると考えられたことから、2014 年 9 月より一連の解析システムが東大病院腎臓・内分泌内科 (南学正臣教授) へ移行した。これより申請者も同研究室へ異動したため、本報告書では 2014 年 8 月末までの奈良医大での研究成果と、2014 年 9 月から 2015 年 3 月末までの東大病院での研究成果を記載する。

2. 研究の目的

本邦 aHUS 患者診断システムの構築ならびに病態解析を通して、その疾患背景を明らかにし、診断・治療の発展に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

患者集積 (研究協力者 藤村吉博先生、松本雅則先生)

奈良医大輸血部に TMA 解析の依頼があった症例の中で現病歴、既往歴、家族歴等から aHUS が疑われる症例について、患者ならびに患者家族検体の集積を行った。集積した aHUS 疑診患者について、患者の Natural History (既往歴、家族歴、発症誘因と考えられるイベント (感染の有無) の探索など) を聴衆した。

補体調節因子の蛋白質学的解析

蛋白質学的解析は、奈良医大輸血部及び東大病院腎臓・内分泌内科で主に以下の手法を用いて実施した。

a) 羊赤血球を用いた定量的溶血試験 (補体調節因子の機能解析)

Mg²⁺ 存在下で羊赤血球に患者血漿を添加し反応させた後に、羊赤血球の溶血の強さを吸光度にて測定した。陽性コントロールとして、正常人血漿に FH 活性阻害 mAb (072) を添加した血漿による溶血度を 100% として患者の溶血度を定量的に算出した

b) CFH 添加による溶血補正試験

溶血試験において陽性反応が得られた場合には CFH 添加試験を実施し、溶血が補正されるか否かを判定した。溶血の補正が見られれば CFH の機能異常を疑った。

c) 抗 CFH 抗体スクリーニング

ELISA 法 (Abnova 社) と Western blot (WB) 法を用いて判定した。WB 法では、精製 CFH を 5% PAGE で SDS-PAGE 電気泳動し、PVDF 膜へ

転写、スキムミルクでブロッキング後に、患者血漿(スキムミルクで100倍希釈したもの)と室温で90 min 反応させた。洗浄後、anti-human IgG-HRP と室温で1h 反応させ、ECL-Plus (Perkin Elmer 社) を用いてバンドの検出を行った。

疾患候補因子の遺伝子解析

遺伝子解析は、国立循環器病研究センター研究所、分子病態部の宮田敏行部長にご協力いただき、CFH、CFI、CFB、C3、CD46、THBD の6つの因子について解析を実施して頂いた。

なお、一連の患者解析に際しては、奈良医大、国立循環器病研究センター、東大病院の倫理委員会の承認を得ており、患者や患者家族の同意の下、実施した。

4. 研究成果

aHUS 患者集積・コホートの樹立

2014年8月末までに奈良医大輸血部で集積した aHUS 患者は計90例(男性60例、女性30例)であった。さらに、2014年9月から2015年3月末までに東大病院において集積した aHUS 症例は計16例(男性13例、女性3例)であった。東大病院では、現在奈良医大の患者コホートを全て引き継いだことから、計106例(男性73例、女性33例)という本邦最大の aHUS コホートの樹立を成し得た。aHUS の発症に性差は無いとされるが、今回我々が確立したコホートは、男性が優位に多かった。さらに、海外では妊娠が aHUS 発症の1つのトリガーとして報告されているが、今回集積した患者コホートでは、妊娠を契機に aHUS を発症した症例は1例も存在しなかった。

蛋白質学的解析及び遺伝子解析

106例の aHUS 患者のうち、同意が得られ、一連の解析を終えた71例について報告する。溶血試験では17例(17/71, 24%)の患者に明らかな溶血亢進(溶血度50%以上)を認め、その内訳は、H因子変異:5例、H因子抗体:7例、C3変異:1例、変異未同定:4例であった。本成績より、溶血度50%以上がCFH関連異常を疑う1つの指標であることを証明した。

溶血試験で溶血度が50%以下を示した54例中25例の患者にC3異常を認めた。興味深いことに、25例の患者のうち21例が、1157番目のイソロイシンがスレオニンに置換する C3-p.11157T の同変異を有していた。本変異は溶血試験では異常を示さなかったことから、同定にはPCRと制限酵素処理により容易に変異を検出できる RFLP 解析が有用であった。以下、実際の解析例を示す。

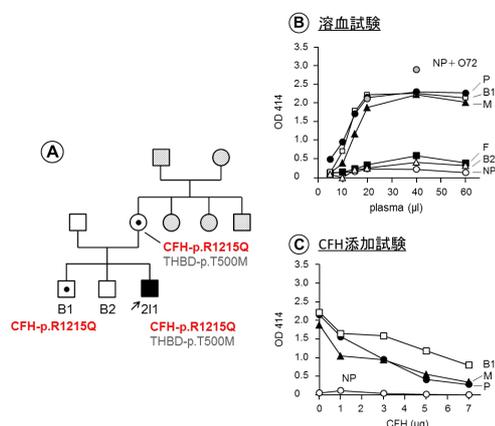


図1: CFH: p.R1215Q 変異を認めた aHUS-21 家系における溶血試験と CFH 添加試験
患者(P)、母親(M)、長男(B1)に明らかな溶血亢進を認め(1-B)、この溶血はCFH添加により補正された(1-C)、溶血試験で異常を認めた3例にCFH異常を同定した(1-A)。

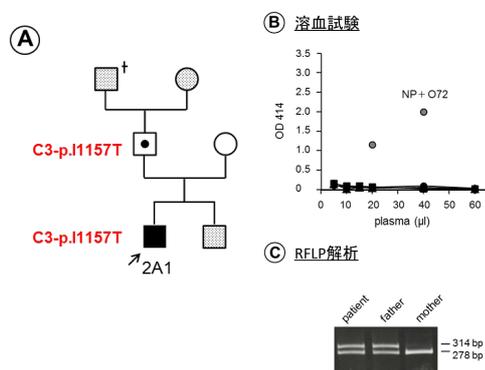


図2: C3: p.I1157T 変異を認めた aHUS-2A 家系
溶血試験では患者、父、母に異常を認めなかったが(2-B)、患者と父にC3異常が同定された(2-A)、I1157T 変異の検出には、RFLP 解析が有用であった(2-C)。

溶血試験に異常をもたらす C3 変異の同定

前述したように、1例のみC3で溶血亢進を示した症例が存在し、本症例は1105番目のリシンがグルタミン酸に置換する K1105Q 変異を有していた(図3)。立体構造解析の結果、この K1105Q 変異はCFHのC末領域との相互作用に関連する領域であることが判明した。一方、溶血亢進を示さなかった I1157T 変異はCFHのN末領域との相互作用に関連する領域であったことから、このようなCFHとの相互作用の違いが溶血亢進に影響を与える可能性が示唆された(図4)。なお、立体構造解析は国立循環器病研究センターの宮田敏行先生と秋山正志先生に実施して頂いた。

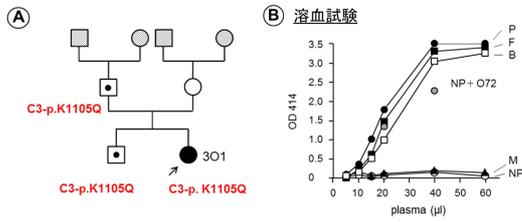


図 3: C3: K1105Q 変異を認め、溶血試験にて異常を認めた aHUS-3O 家系
溶血試験 (3-B) において、異常を認めた患者 (P)、父親 (F)、兄 (B) に C3: K1105Q 変異を認めた (3-A)。

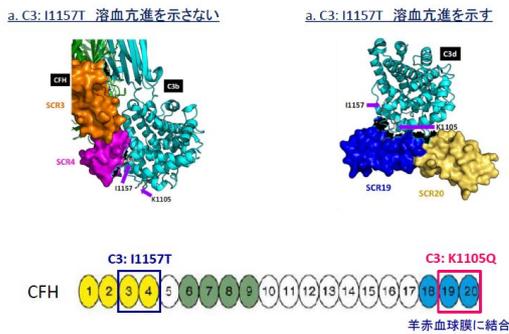


図 4: C3: p.I1157T 変異と C3: p.K1105Q 変異の CFH 結合部位の比較

aHUS 患者に同定された異常因子の頻度

本邦 aHUS 患者における遺伝子変異の頻度を欧米と比較した表を下記に示す。

| 遺伝子異常及び抗CFH抗体 | 頻度 (%) | |
|---------------|--------|-----------|
| | 欧米 (※) | 日本 (n=71) |
| CFH | 20~30% | 7% |
| anti-CFH Ab | 5~10% | 17% |
| C3 | 2~10% | 35% |
| CD46 (MCP) | 10~15% | 4% |
| THBD | 3~4% | 4% |
| CFB | 1~4% | 1% |
| CFI | 4~10% | 0% |
| unidentified | ~30% | 32% |

表 1: 本邦 aHUS 患者 71 例に見られる遺伝子変異の頻度と欧米との比較。

Noris et al. 2010, Maga et al. 2010, Fremaux-Bacchi et al. 2013

上記の結果より、本邦は欧米に比して C3 異常の頻度が高い可能性が示唆されたが、本邦好発の C3: p.I1157T 変異は全て関西地域に集積していたこと (図 5) 患者コホートの約 60% は西日本の症例であったことから、このような地域特異性が C3 異常の頻度増加に影響を与えた可能性も示唆された。東大で集積した 16 例の患者のうち C3 変異を有していた症例は 1 例のみであったことから、本邦に

おける C3 変異頻度の解釈は今後も検討していく必要があると考える。

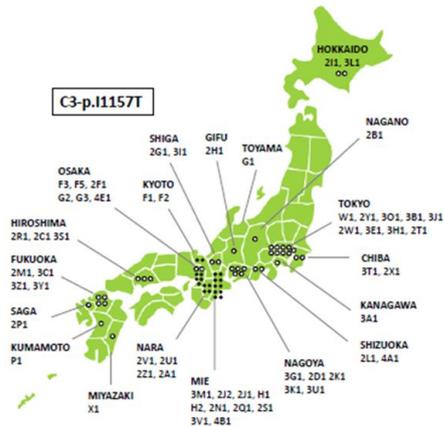


図 5: 奈良医大で集積した本邦 aHUS 患者 90 例の日本における分布 (黒丸印: C3-p.I1157T 変異の保有者)

本研究成果より、本邦 aHUS 患者の約半数は溶血試験と RFLP 解析により迅速に診断可能であることが示唆され、これは本邦 aHUS 患者の早期診断・治療に貢献することが期待される。今後は、原因変異未同定症例の精査等を通して、病態解析を進展させていく所存である。

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 22 件)
(欧文: 査読あり)

1. Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirota-Ikejima H, Uchida Y, Ohya Y, Kokubo T, Fujimura Y. A Novel Quantitative Hemolytic Assay Coupled with Restriction Fragment Length Polymorphisms Analysis Enabled Early Diagnosis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and Identified Unique Predisposing Mutations in Japan. PLOS One 10, pp.e0124655, 2015
doi: 10.1371/journal.pone.0124655.
2. Hisano M, Ashida A, Nakano E, Suehiro M, Yoshida Y, Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y, Hattori M. Autoimmune-type atypical hemolytic uremic syndrome treated with eculizumab as first-line therapy. Pediatr Int 57, pp.313-317, 2015
doi: 10.1111/ped.12469.
3. Imamura H, Konomoto T, Tanaka E, Hisano S, Yoshida Y, Fujimura Y, Miyata T, Nunoi H. Familial C3 glomerulonephritis associated with

- mutations in the gene for complement factor B. *Nephrol Dial Transplant* 30, pp.862-864, 2015
doi: 10.1093/ndt/gfv054.
4. Ohta T, Urayama K, Tada Y, Furue T, Imai S, Matsubara K, Ono H, Sakano T, Jinno K, Yoshida Y, Miyata T, Fujimura Y. Eculizumab in the treatment of atypical hemolytic uremic syndrome in an infant leads to cessation of peritoneal dialysis and improvement of severe hypertension. *Pediatr Nephrol* 30, pp.603-608, 2015
doi: 10.1007/s00467-014-2975-4.
 5. Matsukuma E, Imamura A, Iwata Y, Takeuchi T, Yoshida Y, Fujimura Y, Fan X, Miyata T, Kuwahara T. Postoperative atypical hemolytic uremic syndrome associated with complement c3 mutation. *Case Rep Nephrol* 2014, pp.784943, 2014
doi: 10.1155/2014/784943.
 6. Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T. Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: Concentration of C3 p. I1157T mutation. *Int J Hematol* 100, pp.437-442, 2014
doi: 10.1007/s12185-014-1655-2.
 7. Fan X, Yoshida Y (26 名中 2 番目), Matsumoto M, Nangaku M, Miyata T, Fujimura Y, et al. Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol* 54, pp.238-246, 2013
doi: 10.1016/j.molimm.2012.12.006.

「他、2 報」

(欧文：査読なし)

8. Sawai T, Nangaku M, Ashida A, Fujimaru R, Hataya H, Hidaka Y, Kaname S, Okada H, Sato W, Yasuda T, Yoshida Y, Fujimura Y, Hattori M, Kagami S. Diagnostic criteria for atypical hemolytic uremic syndrome proposed by the joint committee of the Japanese society of nephrology and the Japan pediatric society. *Clin Exp Nephrol* 18, pp.4-9, 2014
doi: 10.1007/s10157-013-0911-8.

「他 1 報」

(和文：査読なし)

9. 吉田瑶子, 松本雅則. 補体関連因子の異常による aHUS, *臨床血液* 56, pp.185-193, 2015

10. 加藤秀樹, 吉田瑶子, 南学正臣. 補体・凝固関連 aHUS の病態, *日腎会誌* 56, pp.1058-1066, 2014
11. 吉田瑶子, 藤村吉博. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の病態と治療戦略, *血液内科* 69, pp.589-594, 2014
12. 吉田瑶子, 藤村吉博. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) - 病態・診断およびエクリズマブの効果 -, *Medical Practice* 31, pp.100-102, 2014
13. 吉田瑶子, 藤村吉博. 補体制御異常症関連 HUS の診断, *腎と透析* 74, pp.1103-1108, 2013
14. 藤村吉博, 吉田瑶子, 範新萍, 宮田敏行. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS), *臨床血液* 54, pp.351-360, 2013
15. 吉田瑶子, 松本雅則, 早川正樹, 藤村吉博. Atypical HUS, *日本アフェレシス学会雑誌* 31, pp.27-32, 2012

「他 4 報」

〔学会発表〕(計 26 件)

【国外】

(シンポジウム：査読なし)

1. Matsumoto M, Yoshida Y. 「New Insights on Thrombotic Microangiopathy (TMA) in Japan」 『XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis』, Kyoto, Japan (July, 2011)

(ポスター発表：査読あり)

2. Yoshida Y, Fan X, Ohyama Y, Kokubo T, Matsumoto M, Yagi H, Shirokuni-Ikejima H, Miyata T, Fujimura Y. 「Atypical hemolytic uremic syndrome in Japan characterized by the inhibitory antibody-based hemolytic assay and the gene analysis.」 『The 55th Annual Meeting of American Society of Hematology.』, New Orleans, USA, (December, 2013)
3. Fan X, Yoshida Y, Miyata T, Honda S, Matsumoto M, Fujimura Y. 「Analysis of Genetic and Predisposing Factors in Japanese Patients with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome.」 『The 54th Annual Meeting of American Society of Hematology』, Atlanta, USA (December, 2012)

「他、1 件」

【国内】

(シンポジウム：査読なし)

4. 吉田瑶子. aHUS の診断, 第 62 回 日本輸血・細胞治療学会 (奈良, 2014 年 5 月)
5. 吉田瑶子. atypical HUS 診断のための検査アルゴリズム - 本邦における aHUS の患者登録と解析状況 -, 第 47 回日本小

児腎臓学会、(東京、2012年6月)

(口頭発表：査読あり)

6. 吉田 瑤子, 内田裕美子, 芦田 明, 服部元史, 松本雅則, 宮田敏行, 藤村吉博. 本邦における非典型溶血性尿毒症症候群患者の登録状況と診断法の確立、第49回日本小児腎臓病学会学術集会(秋田、2014年6月)
7. 吉田 瑤子, Xinping Fan, 大山良文, 古久保哲朗, 岩本顕聰, 森俊雄, 松本雅則, 池島裕子, 宮田敏行, 藤村吉博. 定量的溶血試験と遺伝子解析を用いた本邦 aHUS 患者の病態解析、第36回日本血栓止血学会学術集会(大阪、2014年5月)
8. 吉田 瑤子, 範新萍, 本田繁則, 芦田明, 服部元史, 松本雅則, 大山良文, 古久保哲朗, 南学正臣, 宮田敏行, 藤村吉博. 本邦の非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の患者登録とその表現型 - 遺伝子型解析、第48回日本小児腎臓病学会学術集会(徳島、2013年6月)

「他、17件」

〔図書〕(計 1 件)

1. 吉田 瑤子, 松本雅則. 『Annual Review 2015 血液』中外医学社、溶血性尿毒症症候群(HUS)の分類と治療の進歩、pp.225-231、2015

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
・東京大学腎臓・内分泌内科ホームページ
<http://www.todai-jinnai.com/iryou/ahus>
・難病ホームページ：非典型溶血性尿毒症症候群

<http://www.nanbyou.or.jp/entry/3846>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 瑤子(YOSHIDA, Yoko)
東京大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号：90649443

(2)研究分担者

若手研究(B)のため該当なし

(3)連携研究者

該当なし。

(4)研究協力者

藤村 吉博(FUJIMURA Yoshihiro)
奈良県立医科大学・輸血部・名誉教授
研究者番号：80118033

松本 雅則(MATSUMOTO, Masanori)
奈良県立医科大学・輸血部・教授
研究者番号：60316081

宮田 敏行(MIYATA, Toshiyuki)
国立循環器病研究センター研究所・脳血管
内科・シニア研究員(前 分子病態部・
部長)
研究者番号：90183970