

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 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：26461493

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と疾患概念の確立

研究課題名(英文) Studies for the evaluation of bradykinin cleaving enzymes and the establishment of Japanese disease condition of hereditary angioedema

研究代表者

大澤 勲(Ohsawa, Isao)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60407252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性血管性浮腫(HAE)と他の血管性浮腫を比較し、HAEでは発症年齢、家族歴、浮腫の出現場所が特徴で、初診時の病歴聴取の重要性を示していた。また、診断に際しC4濃度の測定がスクリーニングに最適で、確定診断にはC1-INH活性の測定が重要であることが明らかになった。171名のHAE患者の検討では、診断の遅れが浮き彫りになり、生命を脅かす重症例の存在や、QOLの低下、治療薬の選択肢がないことが明らかになった。

BK分解酵素群の活性に発作時の特徴が発見され、発作の出現機序の一部が解明でき、重症度判定や、個々の患者に合った治療薬の選択の根拠になる可能性が見いだせた。

研究成果の概要(英文)：In the 1st study, the medical history and laboratory data of patients with hereditary angioedema (HAE) were compared to those with other types of angioedema(AE). Early onset of AE, positive family history, recurrent AE in the extremities and GI tract, and suffocation are distinctive in HAE. A low serum C4 level is a useful marker for differential diagnosis of HAE. In the 2nd study, we explore the clinical manifestations, quality of life (QOL), and treatment of Japanese patients with HAE. HAE was a severe condition characterized by recurrent AE attacks as same as the other western countries. Delayed diagnosis and limited use of specific therapies exacerbate the burden on HAE patients.

In the 3rd study, we aimed to measure the activity of bradykinin (BK) cleaving enzymes to evaluate the pathogenesis of AE during an attack of HAE. Our results appear to imply a link between differences in activity of cleaving enzymes for BK and the manifestation and disappearance of AE.

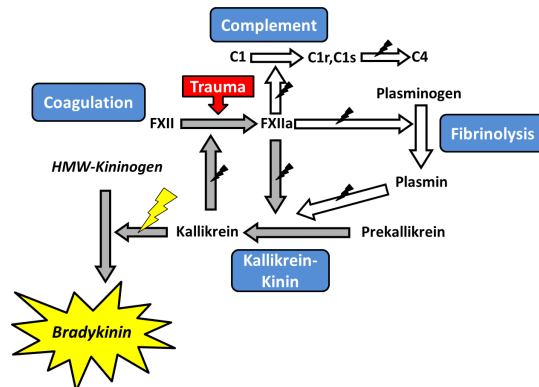
研究分野：免疫学

 キーワード：遺伝性血管性浮腫 C1-inhibitor ブラジキニン アンジオテンシン転換酵素 アミノペプチダーゼP
DPP-IV

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝性血管性浮腫 (HAE: hereditary angioedema) は常染色体優性遺伝形式をとり、約5万人に1人の有病率と推定されているが、医師における疾患認知度は40%前後と低く (Ohsawa I, et al. Pharma Medica 2011、岩本和真、秀道広、他、アレルギー 2011)、初発症状から診断まで20年以上が経過していた。しかし、近年の医師や製薬メーカーによる積極的な啓発活動や患者会の設立・活動の活発化により、新たな患者の発見が相次いでいる。

(2) HAE はセリンプロテアーゼ・インヒビター・ファミリーであるセルピンに属する C1-inhibitor (C1-INH) の遺伝的な欠損を背景に、凝固系 XII 因子の活性化などから局所でブラジキニン (BK) が産生されることにより、突発的な浮腫の出現をみる。産生された BK は、皮膚や粘膜の毛細血管内皮細胞にある BK2 型受容体を介して、毛細血管からの水分流出を起し、浮腫の出現消退を繰り返す。



多くの場合、初発症状は10歳前後で、発作そのものは数時間から数日で自然軽快する。しかし、時として生ずる口腔、舌、喉頭などの気道浮腫は窒息に至り、生命を脅かす。また消化管浮腫では腸閉塞症状と類似した著しい腹痛、嘔吐を呈し、核の左方移動を伴う末梢血白血球増多や血液濃縮の所見などから、急性腹症と診断され無用な外科的手術を受ける症例があとを絶たない (Zuraw B, N Eng J Med 2008、Ohsawa I, et al. BMC Gastroenterol 2013、Ohsawa I, et al. Int Med 2004)。このように発作時の症状は、全身どこにでも出現する可能性があり、患者が受診する診療科は多岐に及ぶ。このことが、HAE の認知度の低さと相まって、診断を遅らせている。一方、たとえ診断がついたとしても、医療者側も周囲に本疾患のスペシャリストがいなければ、相談することもできず、孤立する面も多々見受けられている。

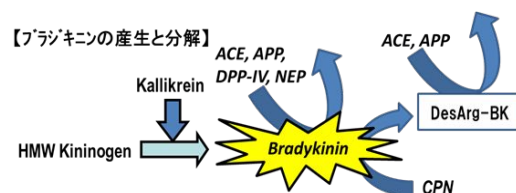
(3) HAE の病型は、従来より C1-INH の産生低下型 (type I)、活性低下型 (type II) に分類されていたが、最近、C1-INH に異常のみられない型 (type III もしくは HAE with normal C1-inhibitor といわれる) が報告 (Bork K, et al. Clin Immunol 2011) されている。type I と II は臨床的な症状や経過に違いはなく、およそ患者の85%がI型、15%がII型であ

る。本邦では、世界で3番目に発作時の治療約であるヒト血漿分画製剤 (C1-インアクチベーター製剤) の点滴静注による治療法が認可されているものの、現在、欧米諸国で行われている発作時の BK 受容体拮抗薬やカリクレイン阻害薬による治療、短期・長期予防としての C1-インアクチベーター製剤は導入されておらず、本邦の患者の QOL は諸外国に比べて、大きく後れを取っていると言わざるを得ない。

(4) 一方、遺伝学的には、85%の症例に HAE の家族歴を認めるが、15%の症例では、患者本人が遺伝学的異常の発端者であり、AE の家族歴を認めない。このような de novo mutation は、C1-INH の遺伝子が11番染色体のキアズマ近傍に位置していることから、遺伝子変異を起こしやすいことが原因であると考えられており、家族歴のない孤発例では、初診時の診断がさらに難しくなっている現状を招いている (Zanicheli A. et al. Ann Allergy Asthma Immunol 2016)。

(5) 1980年代より、HAE の発作が、C1-INH の欠損を背景に発症することに異論はないが、従来は補体系の活性亢進からアナフィラキシンである C3a、C5a が浮腫の起こるメカニズムであると考えられていた。しかし、Davis III らの C1-INH と BK 受容体のノックアウトマウスの実験結果 (Han, ED, et al. J Clin Invest 2002) をはじめ多くの知見が集まり、現在では HAE の浮腫出現は局所で産生された BK 出現に由来すると考えられるようになった。

(6) 一方、HAE 患者では常に C1-INH の活性が低下 (50%未満に) 低下しているにも関わらず、発作は突発的にしか起こらず、普段は健常人と全く変わらぬ生活をしている。また、血清中の C1-INH 活性の値と、発作の起きやすさには必ずしも一致しないことがある。このことは、HAE の発作が C1-INH の遺伝的欠損だけでは説明できない点として重要である。また、遺伝学的に明らかな C1-INH 欠損があるにも関わらず、生涯一度も浮腫の発作のない症例や、C1-INH に異常を認めず家系内の女性に発症する前述の症例群 (HAE type III) が発見され、C1-INH の異常以外の要因が浮腫の発症に関係していると想定され、世界中で検討が始まっている。



(7) 以前より HAE の発作が月経やピル内服などに起こりやすいことは知られていた。また、最近提唱された HAE type III のほとんどは女性患者で、月経周期、妊娠、ピルの内服などの女性ホルモンの過剰と関連して血管性浮腫を発症すると報告され始めている。HAE の発作の出現に女性ホルモンがカギを握

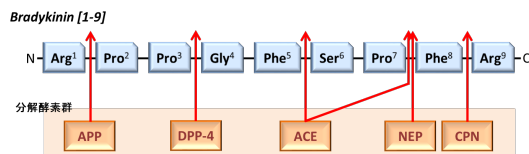
っていることは、臨床的に明らかである。他の研究では、女性ホルモンが BK 分解酵素群の活性に影響することも明らかになっていて、今後複数の因子が AE の出現に関与するであろうと考えられていた (Duan QL, et al. J Allergy Clin Immunol 2009)。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、今回は大きく二つの目的を設定した。

(1)世界から後れを取っている本邦の HAE 患者の現状を明らかにするために、我々は多くの HAE 患者の臨床的背景を集積し、学会活動や論文文化により、広く医師や医療従事者に広めることに大きな意義を感じてきた。そこでまず、これまでに本邦で大規模な調査のなされていない HAE 患者の臨床常用を集め解析することで、HAE の啓発に努めるとともに、新薬導入のための基礎データを作ることを目的とした。さらには、明らかにされた現状をもとに、日本補体学会のガイドラインの改定につなげることを意図した。

(2) 健常者の BK は複数の分解酵素 [Angiotensin converting enzyme (ACE), Aminopeptidase P (APP), Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-IV), Neprilysin (NEP), Carboxypeptidase N (CPN)] により数分で失活するが、HAE 患者ではこれらの BK 分解酵素の活性低下が浮腫の発生に関与する可能性があると考えられる。



HAE 患者の血清中のこれら BK 分解酵素群の働きを包括的に検討できれば、C1-INH の欠損のみでは説明不可能な HAE の発症機序の解明ができるかと推察できた。また、症例ごとの BK 分解酵素群の活性が明らかになれば、本邦で唯一使用可能な発作時の C1-インアクチベーター製剤に加え、近年開発され欧米で使用中のカリクレイン阻害薬や BK 受容体拮抗薬などを適切な症例の適切な時期に使うことが可能となり、治療の効率化、迅速化とともに無駄な医療費の削減につながると考えられた。そこで、基礎的研究として、HAE 患者の BK 分解酵素群の活性を測定し、発作と非発作時の比較検討を行うことで、発作のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を始めた。

3. 研究の方法

以下のいずれの研究も順天堂醫院の臨床研究のための倫理委員会の承諾を得た。

(1) 臨床的研究

HAE と他の原因による血管性浮腫 (AE) の臨床的相違：臨床現場で遭遇する AE の原因は、アレルギーが圧倒的に多い、その次に薬剤性、自己免疫疾患に続発するもの、原因不

明のものなどがある。そこで、順天堂醫院へ通院中の様々な原因の AE 患者 72 名を対象に、HAE 患者とそれ以外の AE 患者の臨床的な相違について検討した。AE の分類には Lang, Abere, Hide らの分類を用い (Ann Allergy Asthma Immunol. 2012)、HAE の診断には Agostoni らの診断基準を用いた (Allergy Clin Immunol 2004)。現病歴、家族歴、薬歴の聴取と初診時(非発作時)の採血(C1-INH 活性, C1-INH 濃度, C3, C4, CH50)を行った。また、患者の現病歴、家族歴、薬歴臨床などを詳細に聴取し検査結果と比較検討した。

HAE 患者の全国規模の実態調査：日本全国で HAE を診療している医師 387 名にダイレクトメールでアンケート調査を行った。質問内容は、患者の病歴、家族歴、これまでの治療歴、薬歴などで、特に QOL に関する調査は詳細に行った。返信されたデータを項目ごとに統計学的に処理を行い考察した。

(2) 基礎的研究

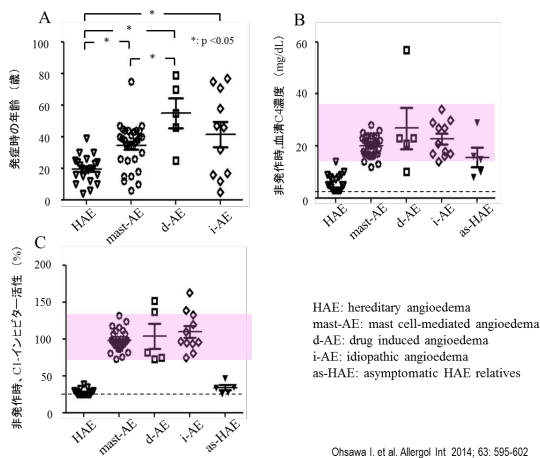
BK 分解酵素群の活性の解析：順天堂醫院に通院加療中の HAE 患者 20 名 32 検体(非発作時：18 検体、発作時：14 検体(非腹痛発作/腹痛発作 = 8/6))と健常人の血清を採取し、冷凍保存した。対象患者には、3 回の非発作時血清を採取した 1 名、2 回の非発作時血清を採取した 1 名、1 回の非発作時血清と 2 回の発作時血清を採取した 1 名、1 回の非発作時血清と 1 回の発作時血清を採取した 3 名、3 回の発作時血清を採取した 1 名、2 回の発作時血清を採取した 2 名が含まれていた。患者からは発作の詳細(部位、発作から治療開始までの時間など)を詳細に聴取した。

BK 分解酵素である、NEP、ACE、CPN、DPP-4、APP1、APP2 の酵素活性を、それぞれの基質の分解産物検出を利用した ELISA 法にて測定した。また、全患者の血清 C4・C1-inhibitor・C1q 値を測定し、酵素活性の結果と比較検討した。

4. 研究成果

(1) 臨床的研究

全 AE 患者の内訳は、HAE 23 名、Mast cell-mediated AE (mast-AE) 33 名、drug-induced AE (d-AE) 5 名、idiopathic AE (i-AE) 11 名であった。HAE では他の AE に比して発症年齢 (19.5 ± 8.0 歳) が有意に低く、AE の家族歴 (82.6%) も有意に多かった。HAE における AE の出現部位としては、四肢、頸部、陰部、喉頭、消化管に多いことが特徴で、既往歴には気道閉塞による気管切開 (2 名) と腹痛による入院 (4 名) があつた。血清 C4 濃度は基準値以下が HAE で 95.6%、mast-AE で 6%、d-AE で 1%、i-AE で 0%であった。C1-inhibitor 活性は HAE 全例で 50%未満であったが、その他の AE で 50%未満の症例は認められなかった。また併せて検討された家族内で未発症の HAE5 例もすべて C1-INH 活性は 50%未満であった。

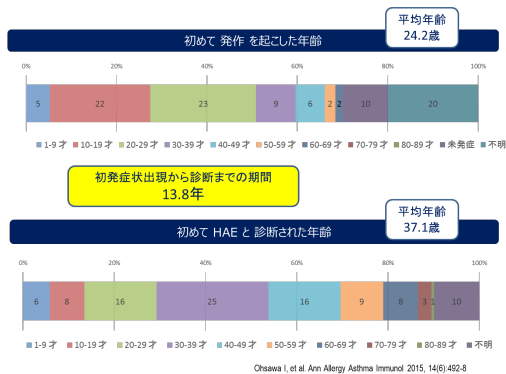


Ohswa I. et al. Allergol Int 2014; 63: 595-602

以上のことから、HAE と他の AE を比較した場合、AE の発症年齢、家族歴、出現場所が特徴であることが分かった。このことは、初診時の詳細な病歴聴取の重要性を示していると考えられた。また、診断に際しては、数時間から数日で結果の得られる血清中の C4 濃度が疾患のスクリーニングに最適で、確定診断には C1-INH 活性の測定が決め手となることも確認できた(Allergol Int, 2014, 595-602 に掲載済み)。

合計 94 名の医師から、計 171 名に及ぶ HAE 患者の臨床データが集積できた。初回発作時の平均年齢は 24.2 歳で、欧米諸国の報告(10 歳代)と比べると高かった。今回の調査対象が主に成人の診療をしている医師であったことが原因の一つと考えられ、今後は小児例も含めた広い対象とすることが肝要であると考えられた。

AE の家族歴を持つものは、全体の 76.6% で、欧米諸国と大差はなく、堀内らの先行研究(Yamamoto T, Horiuchi T, et al. Am J Med Sci 2012)と同様に日本における HAE の遺伝的な特殊性は見つからなかった。一方、初診から HAE の確定診断まで、平均 13.8 年が経過していた。認知度の低さからくる診断の遅れも諸外国と同程度であった。



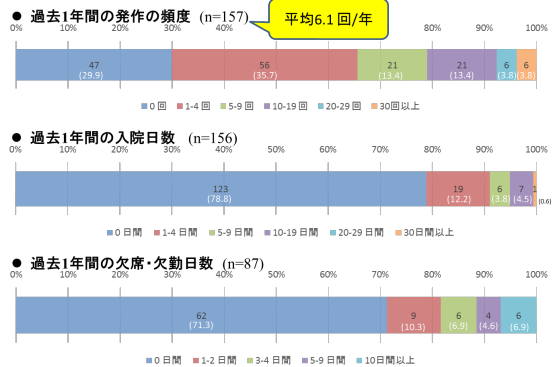
Ohswa I. et al. Ann Allergy Asthma Immunol 2015, 14(6):482-8

一年間の AE の発作頻度は、平均 6.1 回であった。今回のアンケート調査は医師から得たものであり、患者がすべての発作を申告していない可能性があり、今後は患者自身による発作の記録の集積が重要であると考えられた。

HAE 患者の難病申請は 63.2%にとどまり、十分な医療を受けていない可能性が考えられた。

HAE 患者の QOL をみても、一年間の発作による入院日数は一日以上が 20%以上の症例にあり、うち 5%は 10 日以上入院していた。また、発作による欠勤・欠席は、28%が一日以上経験しており、7%で 10 日以上も見られた。

過去に窒息により気道確保がなされたのは全体の 9.4%で、そのうち 2 人は 3 回以上の経験があった。また、過去に原因不明の腹



痛で腹部切開手術を受けた症例は 2.8%であった。

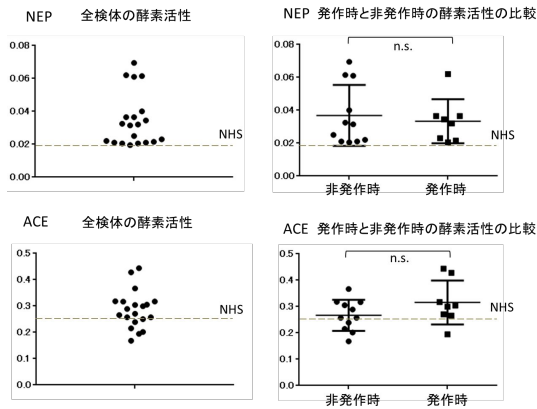
発作時の C1-インアクチベーター製剤の投与は、52.6%の症例になされていたが、副腎皮質ホルモンが使われている症例も 7.1%に認めた。本邦の治療薬のバリエーションの少なさが、露呈する結果となった。また、発作の予防にはトラネキサム酸が 42.7%の症例に使われ、アンドロゲンが 11%症例に使われていた。アンドロゲンの発作の抑制効果は抜群である。しかし、連用による副作用(糖尿病、男性化、肝がんなど)と保険適応上の懸念があり、早急に新薬の導入が必要であると考えられた。

以上、二つの臨床研究は、国内外で発表され、英文による論文化もなされた。更には日本で初の HAE の解説書「難病 遺伝性血管性浮腫 HAE (医薬ジャーナル)」の刊行にもつながった。そして、日本補体学会学術総会と日々 HAE の診療にあたっている医師らの意見交換の場である HAE フォーラム(平成 28 年 3 月と 29 年 3 月)において、議論され共有することができ、遺伝性血管性浮腫(HAE)ガイドラインの改定にも寄与することができた。

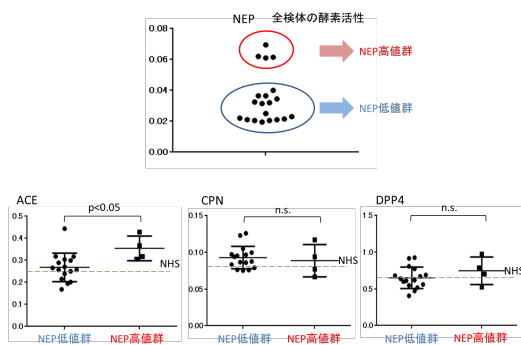
(2) 基礎的研究

BK 分解酵素群の活性を測定し解析した結果、NEP 活性と ACE 活性、CPN 活性と APP1 活性、APP1 活性と APP2 活性の間には有意な正の相関が認められた。

HAE の非発作時、非腹痛発作時、腹痛発作時の 3 つの状態の検体を比較すると、非腹痛発作時と腹痛発作時の DPP4 活性は非発作時に比較して有意に低く、非腹痛発作時の ACE 活性は、非発作時と腹痛発作時に比較して有意に高かった。



NEP 活性の高い群と低い群で比較すると、NEP 活性の高い群では、ACE 活性が高く、CPN



活性と DPP-4 活性には差がなかった。

血清 C4 および C1q の濃度、C1-inhibitor 活性と BK 分解酵素群の活性の間には、有意な相関は認められなかった。

以上より、種々の BK 分解酵素活性を測定することにより、BK 分解という側面から HAE 発作の閾値や重症度を解明する方策の提案をすることができた。今後更に症例を増やし検討することで、個々の患者に合った治療薬の選択の根拠になる可能性が見いだせた。我々の検討方法を活用すれば、新しい疾患概念である HAE type III の病態の定義や HAE における新規治療薬開発の一助となる可能性も同時に示唆された。これらの結果は、26th International Complement Workshop で発表し、Japanese Travel Award を受賞することができた。

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7件)

本田大介、大澤 勲、井下博之、他、Diminished capacity of opsonization and immune complex solubilization, and detection of anti-C1q antibodies in sera from patients with hereditary angioedema、Allergol Int、査読有、in press、2017

大澤 勲、本田大介、井下博之、他、Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of hereditary

angioedema: survey data from 94 physicians in Japan、Annals of Allergy, Asthma & Immunology、査読有、2015、492-498

大澤 勲、本田大介、井下博之、他、Clinical and Laboratory Characteristics That Differentiate Hereditary Angioedema in 72 Patients with Angioedema、Allergol Int、査読有、2014、595-602

大澤 勲、他、遺伝性血管性浮腫 (HAE) ガイドライン 改定2014年版、補体、査読有、2014、24-30

大澤 勲、他、遺伝性血管性浮腫とその問題点、補体、査読有、2016、20-30

[学会発表](計20件)

本田大介、大澤 勲、The low abilities of opsonization and immune complex solubilization in sera from HAE patients、1st HAE Japan scientific meeting、京王プラザ、東京、2015年1月

本田大介、大澤 勲、井下博之、他、The low opsonization and immune complex solubilization ability in sera from HAE patients、European Academy of Allergy and Clinical Immunology、Balcerona、2015年6月

大澤 勲、本田大介、井下博之、他、Clinical manifestations, diagnosis and treatment of hereditary angioedema (HAE): survey data from ninety-four physicians in Japan、European Academy of Allergy and Clinical Immunology、Balcerona、2015年6月

本田大介、大澤 勲、井下博之、他、Activity of cleaving enzymes for bradykinin in sera from patients with hereditary angioedema、Activity of cleaving enzymes for bradykinin in sera from patients with hereditary angioedema、26th International Complement Workshop 金沢、2016年9月

本田大介、大澤 勲、井下博之、恩田紀更、他、Differential diagnosis between hereditary and mast cell-mediated angioedema、26th International Complement Workshop、ホテル日航金沢、金沢、2016年9月

[図書](計4件)

大澤 勲、東京医学社、JOHNS、単一遺伝子異常と疾患-遺伝性血管性浮腫、2014、763

大澤 勲、金原出版、小児科、遺伝性血管性浮腫と他の浮腫との見分け方、2014、301

大澤 勲、アレルギーの臨床、新しい診療技術-270-遺伝性血管性浮腫の実践的鑑別診断、2015、1283

大澤 勲 (編者)、他、医薬ジャーナル、

難病 遺伝性血管性浮腫HAE、27 .治療、
2016、59 (執筆部分)

〔その他〕

ホームページ等

大澤 勲、Web 遺伝性血管性浮腫情報セン
ター、
<http://www.hae-info.jp/index.html>、の
運営

大澤 勲、NPO 法人 HAEJ、副理事として
患者会の運営に 関与 Web
<http://haej.org/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

恩田紀更 (ONDA, Kisara)
順天堂大学・医学部・非常勤助教
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