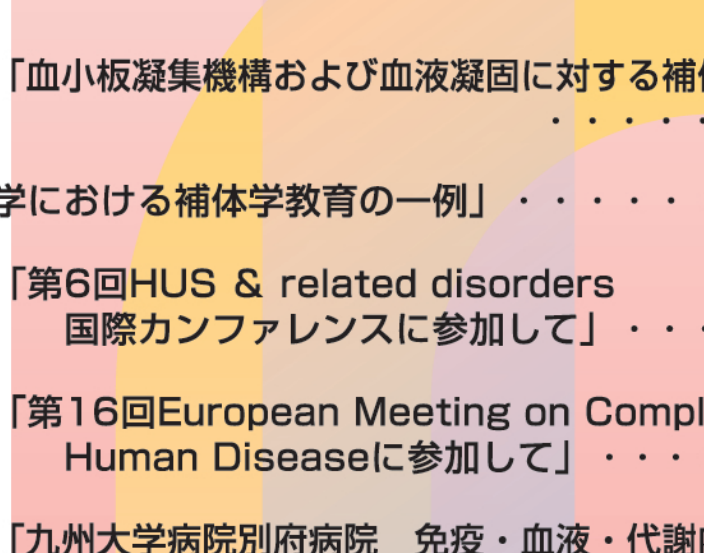


- 
- 会長挨拶「日本補体学会の1年の歩み」 若宮 伸隆
 - 総説「内因系凝固反応活性化機序と遺伝性血管性浮腫」
. 宮田 敏行
 - 受賞寄稿「血小板凝集機構および血液凝固に対する補体系の役割」
. 水野 智博
 - 寄稿「大学における補体学教育の一例」 松下 操
 - 学会報告「第6回HUS & related disorders
国際カンファレンスに参加して」 日高 義彦
 - 学会報告「第16回European Meeting on Complement in
Human Diseaseに参加して」 井上 徳光
 - 教室紹介「九州大学病院別府病院 免疫・血液・代謝内科の紹介」
. 堀内 孝彦
 - 開催案内「第55回日本補体学会学術集会の開催のご案内」
. 塚本 浩

一般社団法人

日本補体学会

The Japanese Association for Complement Research

補体

VOL. 54. No.2 (2017)

目 次

■ 会長挨拶「日本補体学会の1年の歩み」	若宮伸隆 … 1
■ 総説「内因系凝固反応活性化機序と遺伝性血管性浮腫」	宮田敏行 … 4
■ 受賞寄稿「血小板凝集機構および血液凝固に対する補体系の役割」	水野智博 … 23
■ 寄稿「大学における補体学教育の一例」	松下 操 … 29
■ 学会報告「第6回 HUS & related disorders 国際カンファレンスに参加して」	日高義彦 … 31
■ 学会報告「第16回 European Meeting on Complement in Human Disease に参加して」	井上徳光 … 33
■ 教室紹介「九州大学病院別府病院 免疫・血液・代謝内科の紹介」	堀内孝彦 … 37
■ 開催案内「第55回日本補体学会学術集会開催のご案内」	塚本 浩 … 40
■ 論文投稿規定	… 46
■ 学会誌の転載許諾基準および転載許諾申請方法	… 49
■ 編集後記	… 52

日本補体学会の1年の歩み

一般社団法人日本補体学会会長

若宮伸隆

旭川医科大学医学部微生物学講座

今年も、あっという間に、年末報告の時期が来ました。皆様、お変わりございませんでしょうか？ 今年、台風が何度も日本列島を縦断し、各地で台風による災害をもたらしました。被災地におかれましては、一日も早い通常への復興をお祈り申し上げます。さて、昨年の補体第 53 巻で述べましたが、日本補体学会は2回目の国際補体学会 (26th ICW) を 2016 年 9 月に金沢で無事執り行うことができました。高いレベルの発表、特別講演者の講演のすばらしさ、金沢城や白川郷へのエクスカーション等に関して、日本での ICW 開催が、非常に高い評価を受けたことをその後の国際学会で知りました。これらは、藤田先生をはじめとする Local organizing member 諸氏、日本補体学会学会員を含めた関係諸氏すべてのご協力の賜物であったと考えております。ここに深く感謝いたします。学会終了後は、文部科学省科学研究助成金（研究成果公开发表（C））をはじめ、頂戴した多くの国際学会開催の助成金に対する一次会計報告書や業務完了報告書を作成送付し、その後、収入や支出が年末にようやく確定した後、国際補体学会への学会費の支払いと ICW 余剰金の支払いを理事会で決定しました。最後に、ICS への上記の振り込みをもって、ICW2016 の学会業務を無事終了することができました。学会事務を滞りなく、かつ確実に進めていただいた井上事務局長を始めとする ICW 学会事務局の皆様には厚く御礼申し上げます。

2017 年は、9 月 1-2 日に、福島にて、第 54 回日本補体学会学術集会が福島県立医科大学関根英治集会長のもと開催されました。会場は、JR 福島駅近くの「コラッセふくしま」で行われ、2011 年の東日本大震災のあと、初めての東北地方での学術集会となりました。さて、その出席者の内訳ですが、正会員 42 名、学生会員 7 名、非会員 50 名と、総計 99 名でした。近年、抗補体薬が種々の補体関連疾患に適応になる可能性もでてきて、多くの企業関係者やマスコミ関係者が参集したと考えられます。今回は、補体学会企画「補体検査システムの構築—日本補体学会の取り組み—」とミニシンポジウム「補体関連疾患の新展開—補体の関与と新規治療薬戦略の可能性—」の特別企画が組まれたのも、多くの非会員の参加者があった原因だと思います。ミニシンポジウムは、最終日の最終セッションでしたが、多くの方が残り、最後まで活発な議論がなされました。関根先生以下の教室員の皆様の献身的なサポートで大変快適な学会になりました。ここにお礼申し上げます。2018 年は、米国サンタフェで、27th ICW が開かれます。日本からも多くの演題の発表をよろしくお願いいたします。若手の研究者には、日本補体学会で独自に Travel grant に相当するものを用意しておりますので、多くの発表者を期待しています。以下に、簡単に、一年の日本補体学会の歩みをお知らせします。

1. 学術集会、講演会等の開催

1) 第 54 回日本補体学会学術集会を、集会長 関根英治氏（福島医大）により、平成 29 年 9 月 1 日－2 日「コラッセふくしま」で開催。

2) 第 55 回日本補体学会学術集会は、集会長 塚本浩氏（新小倉病院）により、平成 30 年 8 月 31 日－9 月 1 日、北九州国際会議場にて開催予定。

3) 第 56 回日本補体学会学術集会は、集会長 大澤勲氏（埼友会埼友草加病院）により、開催予定。

2. 学会誌等の発行に関しては、

学会誌「補体」第 54 巻第 1 号を平成 29 年 9 月 1 日に発行。学会誌「補体」第 54 巻第 2 号を平成 29 年 12 月に発行予定。

3. 補体関連疾患の診断指針の作成と検査法向上の推進として

1) 研究課題「新しい補体検査システムの構築による補体関連疾患の包括的登録と治療指針確立への展開」を推進。

2) 「補体関連疾患に関する病態解明、それら疾患に対する新規診断方法および治療法の開発に関わる疫学研究、基礎研究、臨床研究」のテーマで、平成 29 年度委託研究を公募し、3 名を採択。

3) 補体タンパク質検査や補体関連遺伝子変異検査を、継続して行う。

4) アレクシオンファーマ合同会社と第二期事業終了後、平成 29 年 5 月 1 日より第三期事業開始。

5) CSL ベーリング社と受委託契約を締結し、第一期事業終了後、平成 29 年 7 月 1 日より第二期事業開始。

6) 補体検査プロジェクトとして、①HAE 研究、②膜性増殖性糸球体腎炎（C3 腎症と関連疾患）のコホート研究、③腎移植後早期に発生した血栓性微小血管症患者を対象とした多施設共同後方視的要因解析研究、④造血幹細胞移植後血栓性微小血管症（TA-TMA）における補体介在性機序の探索、の 4 プロジェクト研究が承認。

7) その他の補体関連疾患に関して、日本移植学会、日本川崎病学会、日本妊娠高血圧学会等の各学会責任者に、補体検査プロジェクトの説明を行い、参加意向について調査。

4. 国際的な研究協力の推進として

1) 平成 29 年 6 月 11 日－13 日までオーストラリアで行われた第 6 回 HUS & related disorders 国際カンファレンスに参加し、日本補体学会の検査プロジェクト発表及び情報収集。

2) 平成 29 年 9 月 8 日－12 日までデンマークで行われた第 16 回 European Meeting of Complement on Human Disease (EMCHD) と C3 Glomerulopathy Satellite Meeting に参加し、補体関連疾患に関する情報収集と日本補体学会の補体検査の取り組みを発表した。また、同時に EQA 関連情報の収集と国際標準化について協議も行った。

3) 日本補体学会が推進する「新しい補体検査システムの構築による補体関連疾患の包括的登録と治療指針確立」事業において、2016 年：8 項目（C3, C4, CH50, sC5b-9, Ba, C5a, CFH, 抗 CFH 抗体）の測定システムを確立。国際補体学会の外部精度評価（External Quality Assessment 2016）が妥当性評価を行っている

4 項目 (C3, C4, sC5b-9(定量), 抗 CFH 抗体(定性)) について、平成 29 年 1 月 9 日付で妥当性評価書(Certificate)を受領。

日本補体学会は、上記のように一年間で着実に、「日本学術会議協力学術研究団体」指定の学会としての活動を進めることができいております。これも、皆様方の温かいご支援とご協力の賜物であると考えております。今後も、皆様方のますますのご支援をよろしくお願い申し上げます。

内因系凝固反応活性化機序と遺伝性血管性浮腫

宮田敏行¹⁾、内田裕美子²⁾、武田壮一³⁾

国立循環器病研究センター 脳血管内科¹⁾、分子病態部²⁾、心臓生理機能部³⁾

Mechanisms of intrinsic blood coagulation reaction and hereditary angioedema

Toshiyuki Miyata¹⁾, Yumiko Uchida²⁾, Soichi Takeda³⁾

¹⁾Department of Cerebrovascular Medicine, ²⁾Department of Pathophysiology, ³⁾Department of Cardiac Physiology, National Cerebral and Cardiovascular Center

1. はじめに

凝固系と補体系はそれぞれに関与する因子の数が極めて多く、また幾つかの因子は両経路に関わっており、大変複雑に絡み合っている。凝固系は組織因子で始まる外因系と、第 XII 因子 (XII) が陰電荷物質 (負電荷物質) に接することで始まる内因系からなる。組織因子がクロニングされ 2017 年で 30 年が経った¹⁾。この間、組織因子および外因系凝固反応に関して、血栓・止血の観点から極めて多くの研究が進められてきた。一方、内因系凝固 (接触相) 反応に関しては、これに関わる因子の先天性欠乏症が出血症を示さないこと、および惹起因子である生体内の陰電荷物質が永らく不明であったことから、研究に停滞感がみられた。しかし、XII や第 XI 因子 (XI) の遺伝子欠損マウスの解析^{2,3)}や、生体内の陰電荷物質としてのポリリン酸の同定⁴⁾などの粘り強い一連の研究の結果、再びこの領域が研究者の注目

を集めている。最近では、XI が次世代の抗凝固の標的因子として脚光を浴び、従来のヘパリン療法に勝る結果を示す XI 抑制剤が発表されている⁵⁾。

凝固系と補体系のクロストークはこれまで多数報告されているが⁶⁾、重要と思われるのは表 1 に示す 6 点であろう。C1 インヒビターは補体反応と凝固反応を開始する酵素群を阻害する能力を有するので、補体系だけでなく内因系凝固系とカリクレイン-キニン系の制御に関わる。C5a は受容体を介して組織因子を誘導することが知られている⁷⁾。sublytic C5b-9 は血管内皮細胞にフォンビルブランド因子の分泌と細胞上への係留、および P-セレクトインの提示を行い、血小板や白血球を局所に集積させる⁸⁾。また、ホスファチジルセリンの露出による第 Va 因子の結合 (プロトロンビナーゼ複合体形成) に繋がる⁹⁾。残りの 3 つは凝固反応および線溶反応の制御に関わる。

本稿では、最近めざましい進展が見られる内因系凝固 (接触相) 反応に関して紹介し、C1 インヒビターの欠乏によるカリクレイン-キニン系の過度な活性化とそれに続く血管性浮腫を接触相の内因系凝固反応の観点から考察したい。遺伝性血管性浮腫 (Hereditary angioedema, HAE) の概要、病態、検査、診断、治療、予防などに関しては、既に本誌に総説として解説されているので¹⁰⁾、本稿では重複はなるべく避けるようにした。また、最近 HAE の成書も

略号一覧

略号	英語	日本語
XII	factor XII	第 XII 因子
XI	factor XI	第 XI 因子
HAE	hereditary angioedema	遺伝性血管性浮腫
PPK	plasma prekallikrein	血漿プレカリクレイン
PK	plasma kallikrein	血漿カリクレイン
HK	high-molecular weight kininogen	高分子キノーゲン
BK	bradykinin	ブラジキニン
LK	low-molecular weight kininogen	低分子キノーゲン
RCL	reactive center loop	反応中心ループ
ExAC	the Exome Aggregation Consortium	
ANGPT1	angiopoietin-1	

表1. 凝固機能と補体機能を有する凝固・補体・線溶因子

因子	凝固機能	補体機能
C1インヒビター	XIIaと血漿カリクレインを阻害	C1s, C1r, MASPsを阻害
C5a, C3a	血管内皮細胞や単球・好中球に発現する受容体を介して、組織因子やPセ렉チンを発現誘導	炎症細胞をリクルートするアナフィラトキシン
sublytic C5b-9	ホスファチジルセリンの細胞表面への表出(プロトロンビナーゼ形成促進)、組織因子の露出	細胞溶解閾値以下(sublytic)の膜侵襲複合体
C4結合タンパク質	プロテインSに結合し、抗凝固能を低下させる	C3転換酵素(C4b2a)の失活化の促進(解離促進)、CFIIによるC4bとC3bの不活化の液性補助因子
Thrombin-activatable fibrinolytic inhibitor (TAFI, 別名CBP2)	塩基性アミノ酸に特異性を有するカルボキシペプチダーゼで、フィブリンのC末端Lysを遊離させる作用により線溶系を阻害	C5aとC3aのC末端Argを遊離させ、それぞれの機能を消失させる
トロンボモジュリン	トロンビンによるプロテインCとTAFI活性化のコファクター、その結果としてトロンビン生成の阻害と線溶系の阻害	C5aとC3aを不活化するTAFIa生成に必須、CFIIによるC3bの不活化を促進

刊行されたので、そちらもご覧いただきたい¹¹⁾。本稿では開始 Met をアミノ酸 1 残基目として数えることとするが、C1 インヒビターのアミノ酸残基番号は、登録されている立体構造および引用原著論文と同様に、シグナル配列 22 アミノ酸を除いた番号を用いることとする。

2. 血液凝固接触相の活性化機序

2-1. 血液凝固接触相の構成要素

接触相の内因系凝固反応の構成要素は、XII、XI、血漿プレカリクレイン (Plasma prekallikrein: PPK)、高分子キニノーゲン (High-molecular weight kininogen: HK)、陰電荷物質である¹²⁾(図 1、2)。表 2 にこれらの因子の性質を示した。XII は陰電荷物質の表面に結合すると、コンフォメーションを変化させ XIIa 活性を示す (自己活性化とよぶ)。PPK と XI は血漿中で HK と 1 : 1 の複合体を形成している。自己活性化した XIIa は陰電荷物質の表面に結合した PPK-HK 複合体の PPK を血漿カリクレイン (Plasma kallikrein: PK) に活性化させる (図 1、2)。生成した PK は陰電荷物質の表面で効率良く XII を活性化し、さらに XIIa は PPK を効率良く活性化するので、陰電荷物質の表面で相互に XII と

PPK の活性化反応が進行する。これが接触相での凝固開始反応である。PK は HK から 9 アミノ酸残基のブラジキニン(BK)を生成し、BK は BK B2 受容体を介して血管透過性亢進や血管拡張を行う (図 1)。XIIa は XI-HK 複合体の XI を活性化し、XIa はトロンビン産生に繋がる。

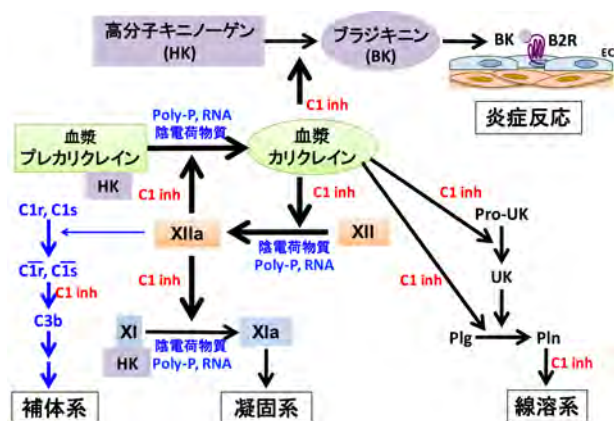


図1 内因系凝固反応・炎症反応・補体系・線溶系における C1 インヒビターの阻害作用点

C1-inh: C1 インヒビター, Pro-UK: プロウロキナーゼ, Plg: プラスミノゲン, Pln: プラスミン, B2R: ブラジキニン B2 受容体

表2. 凝固接触相タンパク質の性質

タンパク質	分子量 Da	血漿濃度 nM	血漿半減期 日	機能
XII	80,000	500	2-3	プロテアーゼ前駆体
血漿プレカリクレイン	85/88,000	486		プロテアーゼ前駆体
高分子キニノーゲン	120,000	670		コファクター
低分子キニノーゲン	66,000	1,300		コファクター
XI*	160,000	30	2.5-3.3	プロテアーゼ前駆体
C1インヒビター	104,000	962	0.07	プロテアーゼインヒビター

文献75を改変した。*ホモ2量体

XII は多種類のドメインを持つ血漿タンパク質である (図 2、3)。XII は PK を主とするプロテアーゼにより α XIIa (分子量 80 kDa) に活性化され、さらに PK により切断され、ほぼプロテアーゼドメインだけから成る β XIIa に変換される (図 2、3)。 β XIIa は陰電荷物質に結合できないが、PKK 活性化能を持ち、XI 活性化能はない¹³⁾。XII の大きな特徴は、陰電荷物質の表面で自己活性化する点である。XII の陰電荷物質に結合する領域は N 末端側重鎖 353 残基中にあるが、その結合する領域は正確には同定できていない。この事実から、XII は幾つかの結合部位を通して異なった陰電荷物質の表面に結合するとも考えられる¹⁴⁾。

XI は PPK と相同のドメイン構造、すなわち N 末端よりアップルドメインと呼ばれる 4 つのドメインに続き C 末端にプロテアーゼドメインを持つが、PPK とは異なりホモ 2 量体のタンパク質である (図 2)。結晶構造解析から、XI はカップとソーサー様構造が示されている¹⁵⁾。すなわち、4 つのアップルドメインがソーサーにあたり、プロテアーゼドメインがカップに相当する (図 4)。XI は HK と複合体を形成して血中を循環している。HK は XI のアップルドメイン 1 に結合する。

ヒト血漿中には 2 種類のキニノーゲン、すなわち高分子キニノーゲン (HK) と低分子キニノーゲン (Low-molecular weight kininogen: LK) が存在する。両キニノーゲンは 1 つの遺伝子から alternative

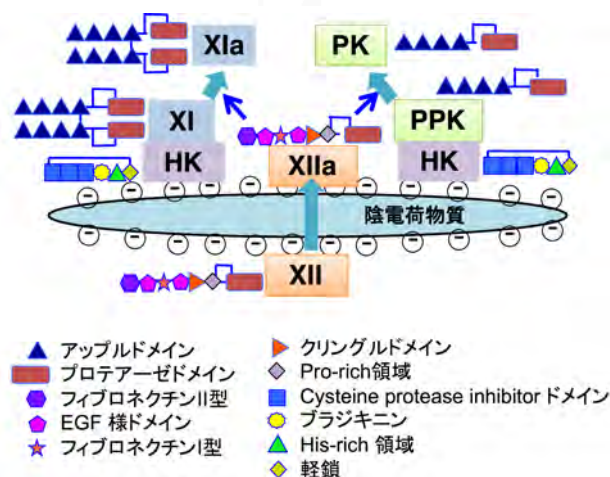


図2 陰電荷物質に集合する XII、XI-HK 複合体、PPK-HK 複合体とそれぞれのドメイン構造

XII は陰電荷物質に結合し XIIa 活性を示し (自己活性化)、XIIa 活性が血漿プレカリクレイン (PPK) を血漿カリクレインへ (PK) と活性化することで接触相の反応が始まる。HK:高分子キニノーゲン

splicing により生成する^{16,17)}。HK と LK は、H 鎖 (362 残基)、BK (9 残基)、L 鎖 12 残基までが同一のアミノ酸配列を持つ (図 5)。エクソン 10 内でスプライシングが生じると LK となり、スプライシングが生じないと HK となる。HK と LK の L 鎖は、255 残基と 38 残基である。HK の L 鎖には、陰電荷物質に結合する His に富んだ領域 (His-rich region) と、PPK および XI が結合する部位が存在する。HK は接触相の活性化に大きな役割を果たす。

HK は PK で切断を受け BK を遊離する (図 1)。一方、LK と HK は組織カリクレインで切断を受けカリジン (Lys-BK, 10 アミノ酸残基) を遊離する。BK

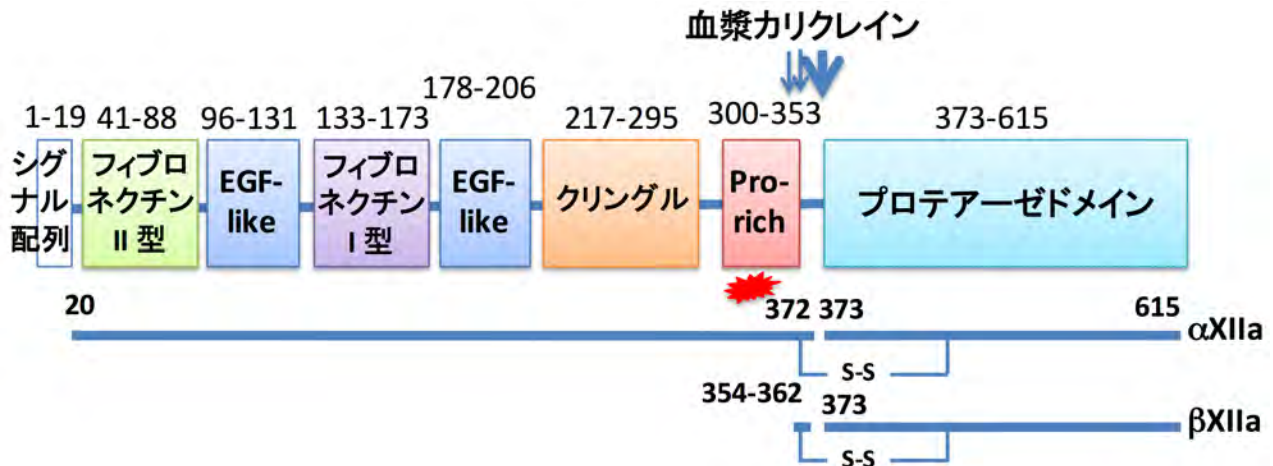


図3 XIIのドメイン構造

XIIはモザイク状のドメイン構造をもちC末端にプロテアーゼドメインがある。XIIは血漿カリクレインにより Arg372-Val373 が切断され2本鎖の活性型 αXIIa (分子量 80 kDa) に変換され、さらに PKにより Arg353-Asn354 と Arg362-Leu363 が切断され、ほぼプロテアーゼドメインだけから成るβXIIa に変換される。プラスミンはXIIの Arg372-Val373 と Lys365-Ser366 を切断し活性化する⁶⁴⁾。XIIの陰電荷表面に結合する領域はN末端側 372 残基中にあるが、結合する領域は正確には同定できていない。XIIaのプロテアーゼドメイン⁷³⁾およびフィブロネクチンI型ドメインと二番目のEGF様ドメイン⁷⁴⁾の立体構造はそれぞれ決定されているが、他の領域の立体構造は決定されていない。FXII-HAE患者に Thr328Lys 変異、Thr328Arg 変異、324-340 残基 (17 残基)欠失/新規 27 残基挿入変異、Pro298-Pro303 重複変異が同定されているが、これらはいずれも Pro-rich 領域に存在する (本文参照)。

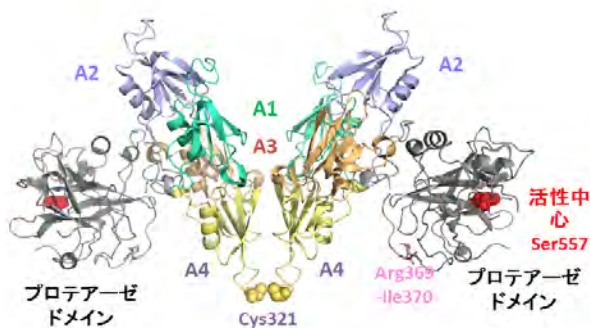


図4 XIの立体構造

XIはN末端よりアップル (A) ドメインと呼ばれる4つのドメインに続きC末端にプロテアーゼドメインを持つ (図2)。XIの構造上の特徴はホモ二量体構造を持つことである (表2)。プロテアーゼドメインがカップで、4つのAドメインがソーサー様構造と呼ばれる¹⁵⁾。XIはAドメインを介してHKと結合し、複合体として血中を循環している (図1, 2)。Ser557:活性中心残基、Arg369-Ile370:活性化に伴い切断される部位、Cys321:二量体を繋ぐジスルフィド結合。

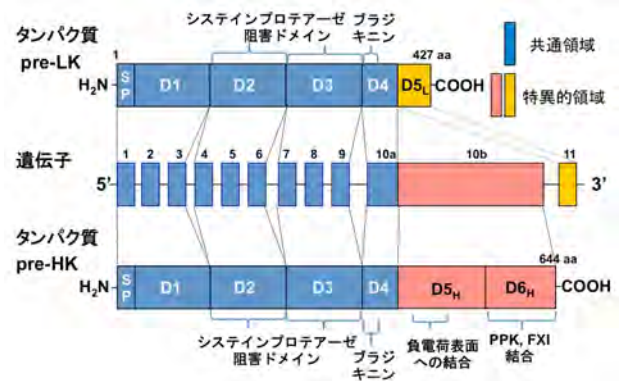


図5 高分子および低分子キノーゲンのドメイン模式図

ヒト血漿中には alternative splicing により生成する高分子キノーゲン (HK)と低分子キノーゲン (LK)が存在する (表2)。キノーゲンのドメインは、BK以外にも多彩な機能が報告されている。特に、HKには、陰電荷表面に結合するHisに富んだ領域 (D5_H) と、PPKおよびXIが結合する領域 (D6_H) が存在し、接触相の活性化に大きな役割を果たす。SP: シグナル配列

とカリジンは BK B2 受容体を介して細胞に作用し、血管内皮細胞を収縮（血管透過性亢進）し、NO を発生し平滑筋の弛緩（血管拡張）を行う。

XII, PPK, HK の各欠乏症患者は出血症状を示さない。一方、XI 欠乏症患者では半数程度に出血症状を示すことから、止血反応ではトロンビンによる XI のフィードバック活性化が重要であると考えられている。このように、XI 欠乏症患者の多くは無症状で出血症状は比較的軽度であるため、XIa を薬剤で阻害しても重大な出血事象は起こりにくいと考えられ、抗血栓症の標的因子として精力的に研究されている。ウサギモデルやノックアウトマウスを使った研究で、XI は病的血栓形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった^{18,19}。XI を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、肝細胞内の XI mRNA を分解し、循環血中の XI 量を減少させ、内因系凝固反応を抑制する。2015 年、膝関節置換術患者に XI のアンチセンスオリゴヌクレオチドを術前に皮下注射し、術後の静脈血栓症発症を調べた結果が報告された⁵。XI 活性を約 38%にまで低下させた患者群では、標準抗凝固療法の患者群と比較し静脈血栓症発症は非劣性だったが、約 20%にまで低下させた患者群では優れた血栓抑制能を示した。

2-2. 生体内の陰電荷物質

陰電荷物質は XII 因子を自己活性化させ、かつ PPK-HK 複合体および XI-HK 複合体に濃縮する表面を提供する重要な因子である。すなわち、陰電荷物質に酵素である XIIa と基質である PPK および XI が濃縮される。接触相反応を開始する陰電荷表面として働く物質を表 3 にまとめた²⁰。

これらの陰電荷物質は 2 つに分けて考えることができる¹⁴。1 つは 'real' surface で、採血管や細胞膜（サルファチド）、カオリンやガラス玉で、これらは可溶性物質ではない。もう 1 つは陰電荷ポリマーで、デキストラン硫酸、過硫酸化コンドロイチン硫酸²¹、マスト細胞からのヘパリン²²、細胞外 RNA²³、

血小板や微生物から放出されるポリリン酸²⁴で、これらは可溶性物質である。エラジン酸は非生理的物質で、活性化部分トロンボプラスチン時間

(activated partial thromboplastin time: APTT)

の活性化試薬として臨床検査現場で広く用いられる。エラジン酸は分子量 302 の低分子量物質だが、Ca²⁺ のような 2 価イオンにより不溶性粒子になる性質を持ち、この性質が接触相の活性化能に重要である¹⁴。

表3. XII活性化物質と凝固と炎症における効果²⁰⁾

化合物	in vitro 効果		in vivo 効果	
	内因系凝固経路	カリクレイン-キニン系	凝固促進能	炎症能
非生理的物質				
ガラス	+	+	+	+
カオリン	+	+	+	+
エラジン酸	+	+	-	+
デキストラン硫酸	+	+	-	+
過硫酸化コンドロイチン硫酸	+	+	-	+
ポリ:C	+	+	+	不明
生体適合物質				
透析膜*	+	+	+	+
血管移植片**	+	+	不明	不明
金属***	+	+	不明	不明
治療用化合物				
アプタマー	+	+	不明	不明
酸化鉄ナノ粒子	不明	+	不明	+
内在性因子				
グリコサミノグリカン	-	+	不明	不明
リボ多糖	-	+	不明	不明
核酸(DNA, RNA)	+	+	不明	不明
スルファチド	+	+	+	+
尿酸結晶	+	+	不明	+
タンパク質凝集体	-	+	-	+
ポリリン酸	+	+	+	+
アミロイドβペプチド	-	+	-	+

*Cuprophane/ Polyacrylonite/ AN69, **Dacron/PTFE/PDMS,

***鋼鉄/チタン/アルミニウム

2-2-1. ポリリン酸による XII の活性化

微生物や血小板などの細胞が放出するポリリン酸は、血栓形成を促進する²⁴。ポリリン酸はリン酸が直鎖状につながった陰電荷物質であり、血小板の濃染顆粒や微生物の細胞内顆粒中に蓄えられている。

血小板ではトロンビンなどの刺激で放出される。最近ではある種のがん細胞から放出され、がんによる血栓形成を促進する可能性が報告されている²⁵⁾。ポリリン酸はXIIを活性化させるだけでなく、トロンビンがXIをフィードバック活性化する際の補助因子としても働く。また、ポリリン酸存在下で生じたフィブリン塊は強い強度を示すなど、多彩な血栓能を示す。微生物中から放出される数百以上のリン酸が繋がっている長鎖ポリリン酸は強い接触相活性化能(XII活性化能)を持つが、血小板は60-100程度のリン酸長をもつ中鎖ポリリン酸しか放出せずその接触相活性化能は弱いといわれていた。しかし最近、血小板も長鎖ポリリン酸を放出し、2価イオンと結合し不溶性ナノ粒子として血小板に付着し、接触相の活性化に働くことが示された²⁶⁾。血小板ポリリン酸が生体内で炎症と凝固を惹起する因子であることは、マウスを用いた研究でも明らかになっている²⁷⁾。

ポリリン酸やRNAなどに結合しその血栓作用を中和する低分子化合物は、新規の抗血栓薬に繋がる可能性が考えられる。ポリリン酸の凝固促進能を中和する物質を探索した研究が発表されている^{28,29)}。これらの化合物はXIIの活性化を抑制するので、BKによる浮腫を抑える効果があるかもしれない。

2-2-2. ヘパリン中に混入した不純物のXII活性化による有害事象

2007年から2008年にかけて、米国とドイツで血液透析の患者に血圧低下などの有害事象が多発し、不幸にも患者が死に至ったと報告された。この有害事象は、ヘパリン製剤に混入した過硫酸化コンドロイチン硫酸(Oversulfated chondroitin sulfate)が原因であり、過硫酸化コンドロイチン硫酸によりXIIが活性化され、XIIaによりPKを通してBKが産生することにより有害事象が生じたと推定されている²¹⁾。

3. C1インヒビター

C1インヒビター(成熟型)は478アミノ酸残基(分子量104 kDa、等電点2.7-2.8)の血漿糖タンパク質で、血漿濃度は962 nmol/L (100 µg/mL)である³⁰⁾(表2)。凝固系プロテアーゼであるXIIa, XIa、カリクレイン-キニン系の血漿カリクレイン(PK)、補体系プロテアーゼであるC1r, C1s, MASP1, MASP2、線溶系プロテアーゼであるプラスミン、組織プラスミノゲン活性化因子を阻害するプロテアーゼインヒビターである³¹⁾。特に、C1rとC1sはC1インヒビターしか血漿中の阻害剤は知られていない。C1インヒビターは、N末端側約100アミノ酸残基の高度に糖鎖修飾を受けた(全体で糖鎖含量が35%と極めて高い)立体構造未知のドメインと、C末端側のセルピン(serpin)と呼ばれる一群のタンパク質スーパーファミリーに共通した構造ドメインからなる。N末端側の糖鎖修飾を受けた領域は、プロテアーゼ阻害活性に影響しないことが知られている³¹⁾。セルピンは最初に同定されたセルピンがキモトリプシン様のセリンプロテアーゼに対して働くことから名付けられた造語(SERine Protease INhibitor)であり、ほとんどのセルピンはプロテアーゼ阻害活性を持つが³²⁾、アンギオテンシノーゲンのようにプロテアーゼ活性をもたないセルピンもある³³⁾。他の一般的なプロテアーゼ阻害剤が酵素の活性中心に結合し塞ぐことで働く競合阻害剤であるのに対して、セルピンは立体構造の大きな変化によりプロテアーゼの活性中心を破壊し、標的を不可逆的に阻害する点でユニークである。

3-1. C1インヒビターの欠損マウスとC1インヒビターを用いたトランスレショナルリサーチ

C1インヒビター遺伝子欠損ホモ体マウスおよびヘテロ体マウスは、正常に成長し繁殖も正常である³⁴⁾。これらのマウスは血管性浮腫を起こさなかったが、エバンスブルーを静注すると血管透過性の亢進が観察された。この血管透過性の亢進は、C1イン

ヒビター、PK 阻害剤、BK B2 受容体アンタゴニストで抑制された。また、血管透過性はアンジオテンシン転換酵素（すなわち BK 分解酵素）阻害剤で増悪し、BK B2 受容体欠損マウスとの掛け合わせると抑制された。これらの結果は、C1 インヒビター欠乏による HAE と酷似し、HAE が凝固接触相の活性化を通して発症することを強く支持した。

マウスを用いた研究で、C1 インヒビターは虚血再灌流障害に保護的に働くという結果が報告されている³⁵⁻³⁷。術前に C1 インヒビターを静注すると、好中球の障害部位への浸潤の減少が観察される。幾つかの研究では反応部位が切断された C1 インヒビターでも同様の保護的な効果が観察されている。これより、C1 インヒビターのプロテアーゼ阻害活性に加えて、Sialyl Lewis^x 構造をもつ一部の N 結合型糖鎖が血管内皮細胞に表出した P-セレクトインや E-セレクトインに結合し、血管内皮細胞と白血球の結合を抑制し、虚血再灌流障害に保護的に働くのではないかと議論されている^{35,36,38}。

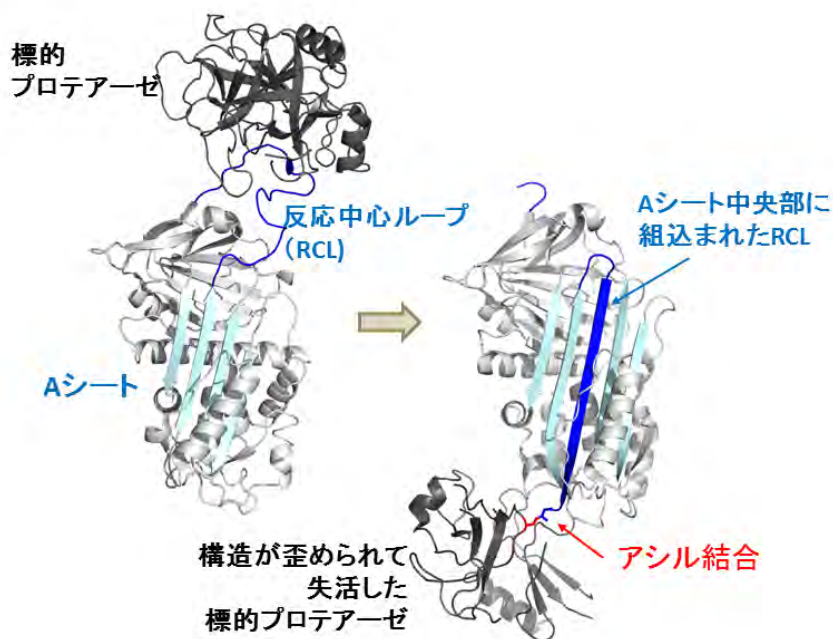
3-2. セルピンのプロテアーゼの阻害機構

図 6 にセルピンによるプロテアーゼの阻害機構を

簡略に示す。セルピンの作用で重要な部位は青色で示す約 20 アミノ酸残基の反応中心ループ (RCL, Reactive Center Loop)と水色で示す複数の β 鎖からなる A シートである。RCL は標的となるプロテアーゼによる切断部位を含み、柔軟性が高く、溶媒に露出して標的プロテアーゼの結合、すなわち Michaelis 複合体の形成 (図 6 左)を待つ³⁹。結合したプロテアーゼは RCL 中の反応部位を切断し、新たに N 末端を形成するとともに、プロテアーゼの触媒 Ser 残基の間に共有結合(アシル結合)を持つアシル-酵素中間体を生じる³²。通常の基質であれば、アシル結合は加水分解され、新たに C 末端が露出し、プロテアーゼは乖離して触媒反応は終了する。しかし、セルピンはプロテアーゼがアシル結合を加水分解するより早くに RCL を A シート中央部へ取り込む大がかりな立体構造変化を引き起こし、プロテアーゼの触媒反応に関わるアミノ酸残基の立体配置を引きはがして切断反応の進行を止める (図 6 右)。複合体の X 線結晶構造解析の結果から、捕捉されたプロテアーゼは分子全体の約 40%の電子密度が消失して分子構造が不安定な状態にあることが示されている⁴⁰。セルピンの反応は不可逆であり、自殺型阻

図 6 セルピンのプロテアーゼ阻害反応に伴う構造変化

セルピンは、露出し疑似餌として働く反応中心ループ (RCL、青色)を使って標的プロテアーゼ (濃いグレー)を補足する (Michaelis 複合体、図左、PDB 1K9O)。これにより切断端のカルボキシル基とプロテアーゼの触媒セリン残基の間に共有結合 (アシル結合)が形成される。アシル結合の加水分解が起こる前に RCL は A シート (水色)に組込まれ、捕捉されたプロテアーゼは大きく位置を変えると同時に、触媒部位は引き伸ばされ、酵素活性が失われる (図右、PDB 1EZXX)。



害剤あるいは仕組みは異なるが $\alpha 2$ マクログロブリンと同様に分子ネズミ捕りと称される。このような大きな構造変化を引き起こせる理由は、セルピンが切断を受ける前 (図 6 左)より切断を受けた後 (図 6 右)の立体構造の方がエネルギー的に安定な状態であるためである。

3-3. C1 インヒビターの立体構造

これまで C1 インヒビターと標的プロテアーゼとの複合体の立体構造は解明されていないが、セルピンドメイン単体 (プロテアーゼ阻害活性に影響しない N 末端領域 96 アミノ酸残基の欠損体) について、付加された精製用タグ以外はほぼ同じアミノ酸配列を持つにもかかわらず、二つの大きく異なる立体構造が決定されている。

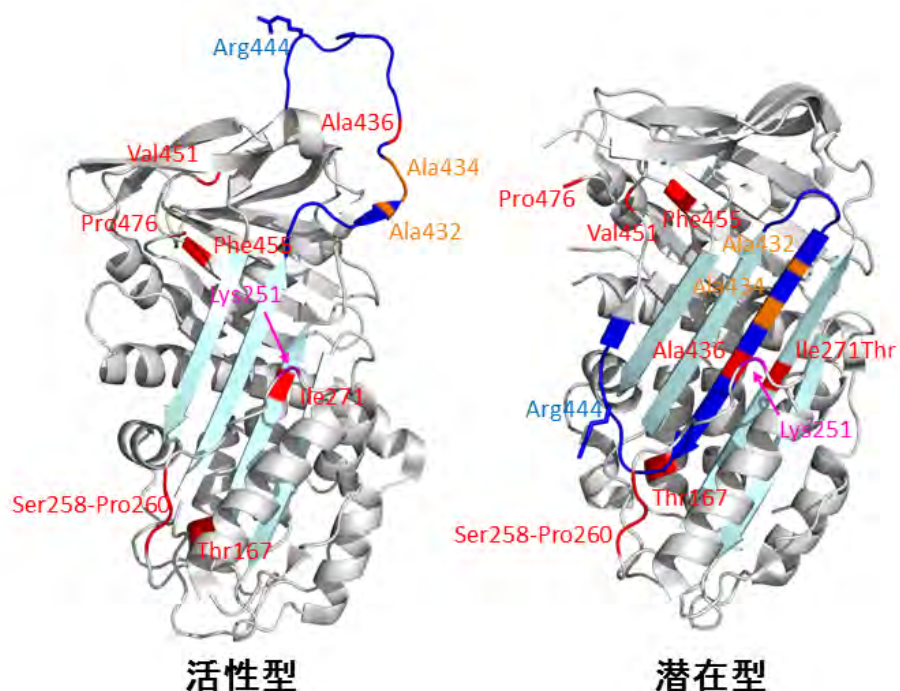
図 7 左は 2016 年に報告された、遺伝子改変ウサギ母乳に発現させたヒト C1 インヒビター (残基番号 97-478) の結晶構造である⁴¹⁾。先に示した図 6 左と同様に、溶媒に露出した RCL と分子中央部の A シートを含むセルピンファミリーに共通した「活性型」の立体構造を示す。C1 インヒビターは RCL 中

の Arg444・Thr445 間で切断を受け標的プロテアーゼを捕捉するが、図では Arg444 (P1 残基とも呼ぶ) は分子最上部に位置する。

それに対して図 7 右は 2007 年に報告された酵母で発現させた「潜在型」(残基番号 97-478、N 末端 6x His タグの付加と Val458Met 変異あり) と呼ばれる結晶構造である⁴²⁾。潜在型では、切断を受けていない RCL が A シートに挿入されており、図 6 右で示したプロテアーゼを補足した後の構造に部分的に非常に似た立体構造を示す。実際、この潜在型は、活性型を認識せず、切断型あるいはプロテアーゼを補足した C1 インヒビターのみを認識するモノクローナル抗体に反応する。潜在型では反応部位である Arg444 の側鎖は溶媒に露出するものの、主鎖は構造に組み込まれておりプロテアーゼによる切断を受けない。上述の原著によると、酵母を用いて分泌発現させたヒト C1 インヒビターには、活性型に混ざり全体の約 30%が潜在型として存在し、その潜在型を単離、精製、結晶化して構造解析を行ったとある⁴²⁾。ヒトの約 30%に Val458Met 変異が見られる。彼らはこの変異を持つ C1 インヒビターの結晶構造

図 7 C1 インヒビターのセルピンドメインの 2 つの立体構造、活性型と潜在型

阻害活性のある活性型 (左、PDB 5DU3)は露出した RCL(青色)を持つのに対し、潜在型(右、PDB 2OAY)では RCL の切断なしに A シート(水色)に挿入された構造を取る。反応部位 P1 位の Arg444 の側鎖と、本文で取り上げた変異残基の位置を示す。



解析を行ったが、この残基はタンパク質内部の余裕のある隙間に存在しているので、変異によって潜在型の構造が誘導されたのではない。このことは、ヒト C1 インヒビターは産生環境によっては潜在型の立体構造を取りうることを示しており、HAE 患者に見られる変異体によっては、活性型より低エネルギーで安定な潜在型として血中に存在し得る可能性が示唆される。また、セルピンは多量化し不活化されやすいタンパク質として知られているが、C1 インヒビターは 65°C で 35 分間処理するだけで多量化することが知られている⁴³⁾。

3-4. C1 インヒビターの遺伝子変異と構造・機能相関から見た分類

C1 インヒビター(遺伝子名 *SERPINC1*)欠乏による HAE は、常染色体優性遺伝形式のまれな疾患で、C1 インヒビター-HAE(C1-INH-HAE)と呼ばれる(表 4)⁴⁴⁾。その約 85%は C1 インヒビター抗原量が低下する I 型で、残りの約 15%は正常な抗原量を示すものの活性が低下する II 型である¹⁰⁾。HAE 患者の C1 インヒビター遺伝子異常は遺伝子全長にわたり 450 種類以上異なるものが見つかった⁴⁵⁾。従来の I 型、II 型の HAE の分類と比較しながら、ここではタンパク質の立体構造から見た機能不全の原因という視点で、変異を大きく 4 種類に分類してみる。立体構造未知の N 末端ドメイン内およびイントロンなど非翻訳領域にも HAE 変異は見つかっているが、ここでは割愛する。

表 4. 遺伝性血管浮腫の分類

C1 インヒビター欠損症	C1-INH-HAE
C1 インヒビター正常量	
XII 変異	FXII-HAE
原因不明	U-HAE

文献 44 を改変した

① 折り畳み不全や分泌障害により濃度低下を生じる変異：HAE I 型

塩基の欠損や挿入、その結果生じるフレームシフト、またナンセンス変異などタンパク質の立体構造を大きく壊す変異は、血漿中の C1 インヒビターの濃度および活性をともに低下する HAE I 型の原因となる。また同様に、ミスセンス変異によりタンパク質分子内部の疎水性残基のコア領域に親水性のアミノ酸残基への置換などが生じると、立体構造の折り畳みができなくなり分泌されない(小胞体におけるタンパク質の品質管理機構で排除される)。このようなミスセンス変異は C1 インヒビター分子全体に散在し、局所性が見られる後述の HAE II 型で見つかる変異群とは対照的である。

② Michaelis 複合体が形成されない変異：HAE II 型

抗原量は正常域を示すが活性が低下する HAE II 型において見出されたミスセンス変異の多くは RCL 領域に集中している。中でも標的プロテアーゼが認識の要とする反応部位 Arg444 の変異は、約 7 割の HAE II 型の症例に同定されている⁴⁶⁾。Arg444 に変異が生じると、C1 インヒビターは標的プロテアーゼから認識されず Michaelis 複合体が生成されないため、C1 インヒビター活性を示さない。Arg444 は一塩基置換のホットスポットである CpG ジヌクレオチド配列を含む。CpG 配列では C→T あるいは G→A への塩基置換が起こりやすく、高頻度で見いだされる Arg444Cys 変異および Arg444His 変異は C→T 置換で説明される。Arg444 について、頻度は低いが、Ser、Leu、Pro および Gly への変異も見つかっている⁴⁷⁾。理由は明らかでないが、Arg444Leu 変異は血漿 C1 インヒビター濃度が健常人の 70%と I 型と II 型の中間的な値を示す。

③ 標的プロテアーゼによる分解を受ける変異：

HAE II 型

切断後に A シートに組み込まれる RCL には、多くの HAE II 型変異が見出されている。Val432Glu 変異および Ala434Glu 変異は A シートに組み込まれる際に側鎖がタンパク質の内部を向く位置の変異である。これらの変異では Michaelis 複合体は形成されるものの、RCL の A シートへの組み込みが阻害されるためにプロテアーゼの構造破壊を引き起こすことができず、その結果アシル結合の切断反応が進行すると予想される。実際に Val432Glu 変異体および Ala434Glu 変異体は、C1 インヒビターの標的プロテアーゼの阻害剤ではなく基質となることが示されている^{48,49)}

④ 潜在型あるいは多量体を形成する変異：HAE II 型（後述のように I 型として報告される例有り）

HAE II 型変異として見つかった Ala436Thr 変異も Val432Glu 変異および Ala434Glu 変異と同様に A シートに組込まれる領域で側鎖がタンパク質内部を向く位置の変異である。しかし、基質として分解反応を受けず、またモノクローナル抗体との反応性や熱安定性などから、Ala436Thr 変異体は潜在型と多量体構造が共存し、それにより阻害活性が消失していると考えられる⁵⁰⁾。潜在型の結晶構造を見ると Ala436 が Thr に変異することで側鎖のヒドロキシル基が周辺のアミノ酸残基と水素結合を形成することが可能となり、Ala436Thr 変異はより潜在型構造を取りやすい変異と考えられる⁴²⁾。

上記分類の 2 つにまたがる変異も見出されている。HAE II 型として見つかった Lys251 欠損 (AAG、3 塩基欠損) 変異では、Asn-Lys-Ile-Ser が Asn-Ile-Ser

となることで Asn250 へ新たに糖鎖が付加される⁵¹⁾。Lys251 欠損組み換え C1 インヒビター変異体には、基質として分解を受ける分子群と潜在型およびダイマーを形成する分子群とが共存していることが示されている⁵²⁾。

他の多くのセルピンでは、隣接した分子同士が RCL あるいは他のドメインの一部を交換し、潜在型が繋がったような多量体構造を取ることが証明されており、セルピンの多量体形成は様々な病態へ関与するといわれている^{32,53,54)}。多量体形成により単にプロテアーゼ阻害活性を失うだけでなく、安定な凝集体自体が細胞障害を引き起こす。即ち、本来異常タンパク質は分泌されず小胞体で徐々に代謝されるが、セルピン多量体は非常に高い安定性を持つため、細胞内に蓄積し細胞死による組織破壊を引き起こすことにより様々な病態の原因となる。Ile271Thr 変異、Thr167Asn 変異および Ser258-Pro260 欠損 (3 アミノ酸残基欠損) 変異を持つ患者血清中では、C1 インヒビターのモノマー以外に、ダイマー、トリマー、それ以上の非共有結合で形成された多量体が観察されている⁴³⁾。潜在型の立体構造と照らし合わせると、Ile271Thr 変異および Ser258-Pro260 欠損変異は挿入された RCL と直接相互作用する部位の変異であり、Thr167Asn 変異は RCL とは直接相互作用はないが、新たな N 型糖鎖修飾部位を生む変異である。これらの変異は全て初期診断で HAE I 型と診断された患者から見つかったものである⁴³⁾。他にも HAE I 型として見つかった Val451Met 変異、Phe455Ser 変異および Pro476Ser 変異は分子の C 末端領域に位置し RCL 挿入部から離れているものの、組み換えタンパク質の解析から潜在型および多量体型を形成することが示された⁵⁵⁾。これらの変異が多量体化を引き起こす可能性を立体構造から予想するのは難しい。別のセルピンでは RCL ではなく分子 C 末端部のドメイン交換により潜在型が多量体化することも知られるが⁵⁴⁾、C1 インヒビターについては未知である。I 型と II 型の HAE の分類は C1

インヒビターの血中抗原量を基に行われているが、その測定に使用される抗 C1 インヒビター抗体あるいは測定法自体が必ずしも多量体型や立体構造が正常型と異なる C1 インヒビター変異体を正しく検出するとは限らず、このことも厳密な I 型と II 型の分類を困難にする原因の一つと考えられる。

4. HAE 発症機序

4-1. C1 インヒビターの先天性欠乏症がなぜブラジキニン (BK) の過剰産生に繋がるか

C1 インヒビターは、補体系プロテアーゼ C1r、C1s、凝固系プロテアーゼ XIIa、カリクレイン-キニン系プロテアーゼ PK を阻害する。その速度定数は、 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ から $10^4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 程度であり、これらのプロテアーゼに対して同程度の阻害能を示す³⁰⁾。

全長型 α XIIa、ほぼプロテアーゼドメインだけの β XIIa、XIa、PK が、各種血漿インヒビターで阻害される割合を表 5 に示した。XIIa 活性は C1 インヒビターで阻害されるので、C1 インヒビター欠乏症では XIIa の抑制は十分ではない可能性がある。PK 活性は C1 インヒビターで 50%-60%が阻害され、 α 2-マクログロブリンで 35%-38%が阻害される。 α 2-マクログロブリンは酵素トラップ型インヒビターと呼ばれ、C1 インヒビターが属するセルピン型プロテアーゼインヒビターよりもプロテアーゼ活性阻害の迅速性に欠ける (プロテアーゼ活性の抑制は緩慢に進行する)。したがって、XIIa が局所に大量に生成した場合には、C1 インヒビター欠乏症では XIIa により生成した PK は迅速にその活性が抑制さ

れず、その結果局所で BK 産生が進み BK B2 受容体が活性化され血管性浮腫を示すと考えられる。この機序解明に至るまでの紆余曲折の歴史は Kaplan の回想に述べられている⁵⁶⁾。

一方、C1 インヒビター欠乏症患者には、補体系の亢進による各種の生体反応や、凝固系の亢進による血栓症や播種性血管内凝固症候群が起こるとは言われていない。C1 インヒビター欠乏により、補体系や凝固系が一部作動したとしても、下流の制御系、たとえば補体系では CFH や MCP の存在下での CFI による C3b の分解や、凝固系ではアンチトロンビンによる凝固プロテアーゼの不活化により、病的な表現型にまでは至らないと考えられる。また、XI の血漿濃度は PPK より 15 倍以上低いので、XIIa による XI の活性化は PPK 活性化より低いと考えられる。

4-2. FXII-HAE : XII Pro-rich 領域中の変異

HAE には C1 インヒビターの量と活性が正常値を示す例 (HAE with normal C1 inhibitor, HAE_{nC1}) が報告されている^{57,58)}。本症は女性に多く見られ妊娠中や経口避妊薬服用中に発症するといわれる。接触相に関わるタンパク質の異常を想定し、XII の遺伝子解析が行われた。その結果、5 家系 20 例 (全員女性) の HAE_{nC1} 患者に、XII の Pro-rich 領域に Thr328Lys 変異 (シグナル配列を除いた残基番号では Thr309Lys 変異) または Thr328Arg (Thr309Arg) 変異が同定された⁵⁹⁾。その後、HAE_{nC1} 患者に XII 変異が次々に報告され、‘HAE with mutations in the F12 gene’ もしくは‘FXII-HAE’と

表5. 内因系凝固(接触相)反応のプロテアーゼに対する血漿プロテアーゼインヒビターの効果

標的酵素	C1インヒビター	α 2-マクログロブリン	他のインヒビター	文献
α XIIa	91%	4%	α 2AP 3%, AT 2%	76)
β XIIa	74%		α 2AP+AT 26%	77)
XIa	8%		α 1PI 68%, AT 16%, α 2AP 8%	78)
血漿カリクレイン	52%	35%	13%	79)
血漿カリクレイン	58%	38%	4%	80)

α 2AP: α 2-antiplasmin, AT: antithrombin, α 1PI: α 1-protease inhibitor

呼ばれるようになった (表 4)。Thr328Lys 変異に比して Thr328Arg 変異は限局した地域 (ドイツ Mainz 市) に 2 家系見いだされているだけである⁵⁷⁾。比較的多くの HAE 患者に XII Thr328Lys 変異が同定されているものの、まだ少数例であり、多くの HAE 症例は遺伝子レベルで解明されたとはいえない⁵⁷⁾。XII の Pro-rich 領域はクリングルドメインとプロテアーゼドメインの間にあり、他の凝固因子には見られず XII に特異的な領域である (図 3)。FXII-HAE 患者の遺伝子変異はこれまでのところ次に述べるように、XII の Pro-rich 領域に限定して同定されている。

4-2-1. FXII-HAE : XII Thr328Lys 変異

XII の Thr328Lys 変異を持つ FXII-HAE 患者の血中の XII 量は正常者と変わらないが、XIIa のアミド水解活性は 4 倍以上増加しており機能獲得変異であると報告された⁶⁰⁾。一方、Thr328Lys 変異保有者の XII 凝固活性は 90% (4.1 ng/ml) であり、健常人と変わらないという報告がある⁶¹⁾。このように、変異保有者の血漿 XII 活性は一致した結果が得られていない。

XII の Pro-rich 領域の Thr328 はムチン型の糖鎖 (O-グリコシル化) が結合している⁶²⁾。Thr328Lys 変異と Thr328Arg 変異は Thr が Lys もしくは Arg に置換するので、Thr328 への糖鎖の付加が起らない。糖付加がないということは、末端のシアル酸がなくなり陰電荷が減ることになり、陰電荷物質への結合能が亢進する可能性がある。事実、Thr328Lys 変異を持つ患者血漿や、組み換え XII-Thr328Lys 変異体や XII-Thr328Arg 変異体を添加した XII 欠乏血漿では、正常血漿に比べ、低濃度のデキストラン硫酸やポリリン酸で XII が活性化され HK が消費 (BK を放出) した⁶²⁾。しかし、2 つの変異体の凝固能および C1 インヒビターでの阻害は正常であった。2 つの変異体を静注した XII 欠損マウスおよび XII-Thr328Lys 変異体を肝で発現する FXII-HAE

マウスでは、接触相依存性の血管透過性の亢進が観察された。Thr328Lys 変異体マウスに XII 活性中和抗体を静注すると BK 産生が見られなくなり浮腫が弱まった。FXII-HAE マウスの動脈血栓形成能は野生型と同様であった。本研究から、FXII-HAE は XIIa の活性を阻害することで抑制できる可能性が示された⁶²⁾。

Thr328Lys 変異、Thr328Arg 変異、c.971_1018+24del72 変異 (後述) の 3 種の XII 変異体を発現させ過剰な BK 産生の機序を解析した⁶³⁾。その結果、3 種類の XII 変異体はいずれもプラスミンで別の部位 (たぶん Lys365-Ser366 と Arg372-Val373⁶⁴⁾) が切断され、C1 インヒビターによる阻害を免れて迅速に活性化型 XIIa に変換され、過剰な BK 産生を行うという。PK は XII の Arg372, Arg353, Arg362 を限定分解し、Arg372 の切断により活性化 (図 3)。これらの PK による切断部位は、3 種類の XII 変異部位の近傍に位置するが、PK による XII 変異体の活性化に差を認めなかった。しかし、XII はプラスミンでは切断されないが、XII 変異体は切断・活性化され、その結果 PK が産生され、HK は消費 (BK 産生を示唆) された。FXII-HAE 患者はプラスミンでの活性化に感受性が高い状態 (HAE 発症時) やそうでない状態があるという。また、プラスミノゲンの活性化を抑制する Lys 誘導体は、この機序を抑制した。これらの結果から、3 種類の変異のいずれかを保有する FXII-HAE 患者での BK の過剰な産生は、プラスミンによる XII の切断・活性化が契機となり、一時的に C1 インヒビターの働きが悪い状態になり BK の過剰産生に繋がるという。この機序が働くとすると、この機序は HAE 患者にトナネキサム酸を予防投与する根拠となろう。血栓溶解剤 tPA で治療された患者の 0.2%-5% に見られる血管性浮腫⁶⁵⁾は、プラスミンによる XII の活性化を通じた過剰な BK 産生で説明されるかもしれない。日本人を含む東アジア人にはプラスミン活性の低下を伴うプラスミノゲン Ala620Thr 変異が見られ、

日本人の約 4%は本変異の保有者である⁶⁶⁾。プラスミノーゲンの変異は血管性浮腫に保護的に働くかもしれない。

約 6 万人の遺伝子情報を公開している the Exome Aggregation Consortium (ExAC)⁶⁷⁾で XII の変異を調べると、Thr328Lys 変異は 95,882 アレル中 1 アレル (すなわち約 48,000 人に 1 人) に同定されていた。Thr328Lys 変異はドイツ、スペイン、フランスなどヨーロッパ諸国で同定されているので、いわゆる創始者効果が考えられている⁶⁰⁾。

4-2-2. FXII-HAE : XII c.971_1018 + 24del72 変異^{68,69)}

C1 インヒビター正常量を示す 1 家系 3 人のトルコ人 HAE 患者に、新規の XII の 72 塩基の欠損 c.971_1018 + 24del72 が同定された。これはエクソン 9 の 48 塩基とイントロン 9 の 24 塩基の欠損に相当する⁶⁹⁾。エクソン 9 の 48 塩基の欠失のため、16 アミノ酸 (Lys324-Gly339) が欠損する。エクソン-イントロン部分の欠失のため正しいスプライスは起こらず、イントロン 9 の残りの 81 塩基が転写され新たに 27 アミノ酸が挿入される。その結果、リンカー領域のアミノ酸長では 11 残基が延長する変異体が翻訳されることになる。本 XII 変異体は活性化の際に切断される Arg372-Val373 やプロテアーゼドメインは残存するので、正常なプロテアーゼ活性を発現すると考えられるので、本遺伝子欠失の詳しい解析が待たれる。

4-2-3. FXII-HAE : XII c.892_909dup 変異⁷⁰⁾

C1 インヒビター正常量を示す HAE 患者に、新規の XII の 18 塩基の重複 c.892_909dup が同定された。この塩基の重複は Pro-rich 領域中の 6 アミノ酸 (p.Pro298-Pro303) の重複を起こす。発端者を入れて 5 人が本変異保有者である。1 人に一度のエピソードがあるものの、発端者以外は変異と浮腫との関連は明らかではない。

4-2-4. FXII-HAE : XII c.1681-1G>A 変異 および Ala343Pro 変異⁷¹⁾

XII c.1681-1G>A 変異 および Ala343Pro 変異が血管性浮腫を再発する患者各 1 人にそれぞれ同定された。c.1681-1G>A 変異は両親が遺伝子解析に同意しなかったので遺伝形式は明らかでない。本変異はスプライス異常を示すので、XII 欠損症を引き起こす変異であり、XII の機能獲得変異とは考えにくい。Ala343Pro 変異は家系構成員に同定されなかったもので、de novo 変異の可能性がある。Ala343Pro 変異は Gly550Glu 変異との複合ヘテロ体として日本人 XII 欠損症に同定されている。XII 欠乏症の原因となる遺伝子変異が HAE を引き起こすことは考えにくいと思われる。Ala343Pro 変異は ExAC では 91,490 アレル中に 314 アレル、すなわち約 300 人に 1 人に同定されていた⁶⁷⁾。

4-3. U-HAE の遺伝子変異⁷²⁾

C1 インヒビター量と活性が正常値を示すが原因不明 (unknown) の症例は U-HAE と呼ばれる (表 4)。最近、U-HAE に新規の遺伝子変異が報告された⁷²⁾。

10 家系の 25 人の U-HAE 患者のうち、U-HAE 患者 1 家系 2 人の全エキソーム解析を行ったところ、angiopoietin-1 (ANGPT1) 遺伝子にヘテロ接合性の Ala19Ser 変異が同定された⁷²⁾。この変異は同じ家系内の U-HAE 症状を示す 4 人にヘテロ接合性で同定され、U-HAE 症状を示さない 7 人の家系構成員には同定されなかった。本変異は頻度が極めて低く、ExAC データベースにはアレル頻度 0.0000082 (約 6 万人中 1 人) であった⁶⁷⁾。患者血漿中の ANGPT1 と ANGPT2 の濃度は健常人より低い値を示したものの有意差は見られなかった。ANGPT1 は multimer で内皮細胞上のリガンド Tie2 に結合する。変異ヘテロ保有者血漿の ANGPT1 の multimer/monomer 比は正常血漿と比べると低下していた。また、変異ヘテロ保有者中の ANGPT1 はリガンドである可溶性 Tie2-Fc キメラタンパク質

への結合が低下していた。組換え体の実験でも、本変異 ANGPT1 は multimer が減少し可溶性 Tie2-Fc キメラタンパク質への結合が低下していた。HAE を起こす遺伝子として新しく ANGPT1 が報告された。今後、他の U-HAE 患者に本遺伝子変異が同定されるかどうか、研究の進展が待たれる。

5. おわりに

この 10 年ほどの間に、接触系凝固反応の研究が大きく進展し、基礎医学上の多くの知識が蓄積した。ここでは C1 インヒビターを中心に HAE の発症機序を解説した。本稿が HAE の病態の理解の助けになれば幸いである。

6. 謝辞

本稿の執筆にあたり、原稿にご助言いただきました埼玉草加病院院長大澤勲先生、CSLベーリング株式会社メディカルアフェアーズ部長桑原光弘博士、執筆の機会を与えていただき原稿にご助言いただきました九州大学教授堀内孝雄先生に感謝申し上げます。

[利益相反]

筆者は本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はありません。

[文献]

- 1) Morrissey JH, Fakhrai H, Edgington TS. Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell*. 50: 129-135 (1987)
- 2) Renne T, Pozgajova M, Gruner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med*. 202: 271-281 (2005)
- 3) Rosen ED, Gailani D, Castellino FJ. FXI is essential for thrombus formation following FeCl₃-induced injury of the carotid artery in the mouse. *Thromb Haemost*. 87: 774-776 (2002)
- 4) Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 903-908 (2006)
- 5) Buller HR, Bethune C, Bhanot S, Gailani D, Monia BP, Raskob GE, Segers A, Verhamme P, Weitz JI, FXI-ASO TKA Investigators. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. *N Engl J Med*. 372: 232-240 (2015)
- 6) Conway EM. Reincarnation of ancient links between coagulation and complement. *J Thromb Haemost*. 13 Suppl 1: S121-132 (2015)
- 7) Redecha P, Tilley R, Tencati M, Salmon JE, Kirchhofer D, Mackman N, Girardi G. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. *Blood*. 110: 2423-2431 (2007)
- 8) Hattori R, Hamilton KK, McEver RP, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem*. 264: 9053-9060 (1989)
- 9) Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for

- assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J Biol Chem*. 265: 3809-3814 (1990)
- 10) 大澤勲. 遺伝性血管性浮腫とその問題点. 補体. 53: 20-30 (2016)
 - 11) 大澤勲. 難病 遺伝性血管性浮腫(HAE). 医薬ジャーナル社. (2016)
 - 12) Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood*. 90: 3819-3843 (1997)
 - 13) Revak SD, Cochrane CG, Bouma BN, Griffin JH. Surface and fluid phase activities of two forms of activated Hageman factor produced during contact activation of plasma. *J Exp Med*. 147: 719-729 (1978)
 - 14) de Maat S, Maas C. Factor XII: form determines function. *J Thromb Haemost*. 14: 1498-1506 (2016)
 - 15) Papagrigoriou E, McEwan PA, Walsh PN, Emsley J. Crystal structure of the factor XI zymogen reveals a pathway for transactivation. *Nat Struct Mol Biol*. 13: 557-558 (2006)
 - 16) Takagaki Y, Kitamura N, Nakanishi S. Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. Primary structures of two human prekininogens. *J Biol Chem*. 260: 8601-8609 (1985)
 - 17) Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T, Nakanishi S. Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J Biol Chem*. 260: 8610-8617 (1985)
 - 18) Yamashita A, Nishihira K, Kitazawa T, Yoshihashi K, Soeda T, Esaki K, Imamura T, Hattori K, Asada Y. Factor XI contributes to thrombus propagation on injured neointima of the rabbit iliac artery. *J Thromb Haemost*. 4: 1496-1501 (2006)
 - 19) Lowenberg EC, Meijers JC, Monia BP, Levi M. Coagulation factor XI as a novel target for antithrombotic treatment. *J Thromb Haemost*. 8: 2349-2357 (2010)
 - 20) Maas C, Oschatz C, Renne T. The plasma contact system 2.0. *Semin Thromb Hemost*. 37: 375-381 (2011)
 - 21) Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, Elankumaran S, Smith S, Pelzer K, Lansing JC, Sriranganathan N, Zhao G, Galcheva-Gargova Z, Al-Hakim A, Bailey GS, Fraser B, Roy S, Rogers-Cotrone T, Buhse L, Whary M, Fox J, Nasr M, Dal Pan GJ, Shriver Z, Langer RS, Venkataraman G, Austen KF, Woodcock J, Sasisekharan R. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N Engl J Med*. 358: 2457-2467 (2008)
 - 22) Oschatz C, Maas C, Lecher B, Jansen T, Bjorkqvist J, Tradler T, Sedlmeier R, Burfeind P, Cichon S, Hammerschmidt S, Muller-Esterl W, Willemin WA, Nilsson G, Renne T. Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. *Immunity*. 34: 258-268 (2011)
 - 23) 中澤文恵. 血液凝固・炎症における RNA. 日本血栓止血学会誌. 27: 301-307 (2016)
 - 24) Morrissey JH. Polyphosphate: a link between platelets, coagulation and inflammation. *Int J Hematol*. 95: 346-352 (2012)
 - 25) Nickel KF, Ronquist G, Langer F, Labberton

- L, Fuchs TA, Bokemeyer C, Sauter G, Graefen M, Mackman N, Stavrou EX, Ronquist G, Renne T. The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis. *Blood*. 126: 1379-1389 (2015)
- 26) Verhoef JJ, Barendrecht AD, Nickel KF, Dijkxhoorn K, Kenne E, Labberton L, McCarty OJ, Schiffelers R, Heijnen HF, Hendrickx AP, Schellekens H, Fens MH, de Maat S, Renne T, Maas C. Polyphosphate nanoparticles on the platelet surface trigger contact system activation. *Blood*. 129: 1707-1717 (2017)
- 27) Muller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renne T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*. 139: 1143-1156 (2009)
- 28) Jain S, Pitoc GA, Holl EK, Zhang Y, Borst L, Leong KW, Lee J, Sullenger BA. Nucleic acid scavengers inhibit thrombosis without increasing bleeding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: 12938-12943 (2012)
- 29) Travers RJ, Shenoi RA, Kalathottukaren MT, Kizhakkedathu JN, Morrissey JH. Nontoxic polyphosphate inhibitors reduce thrombosis while sparing hemostasis. *Blood*. 124: 3183-3190 (2014)
- 30) Davis AE, 3rd. C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu Rev Immunol* 6:595-628 (1988)
- 31) Davis AE, 3rd, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost*. 104: 886-893 (2010)
- 32) Huntington JA. Serpin structure, function and dysfunction. *J Thromb Haemost*. 9 Suppl 1: 26-34 (2011)
- 33) 中山大輔、宮田敏行. アンギオテンシノーゲン-レニン複合体の立体構造：酸化還元によるアンギオテンシン放出の調節. *日本血栓止血学会誌*. 22: 49-52 (2011)
- 34) Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis AE, 3rd. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest*. 109: 1057-1063 (2002)
- 35) Lu F, Chauhan AK, Fernandes SM, Walsh MT, Wagner DD, Davis AE, 3rd. The effect of C1 inhibitor on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 295: G1042-1049 (2008)
- 36) Lu F, Fernandes SM, Davis AE, 3rd. The effect of C1 inhibitor on myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. 22: 75-80 (2013)
- 37) Heydenreich N, Nolte MW, Gob E, Langhauser F, Hofmeister M, Kraft P, Albert-Weissenberger C, Brede M, Varallyay C, Gobel K, Meuth SG, Nieswandt B, Dickneite G, Stoll G, Kleinschnitz C. C1-inhibitor protects from brain ischemia-reperfusion injury by combined antiinflammatory and antithrombotic mechanisms. *Stroke*. 43: 2457-2467 (2012)
- 38) Cai S, Dole VS, Bergmeier W, Scafidi J, Feng H, Wagner DD, Davis AE, 3rd. A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion. *J Immunol*. 174: 6462-6466 (2005)
- 39) Ye S, Cech AL, Belmares R, Bergstrom RC, Tong Y, Corey DR, Kanost MR, Goldsmith EJ. The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nat Struct Biol*. 8: 979-983 (2001)

- 40) Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*. 407: 923-926 (2000)
- 41) Dijk M, Holkers J, Voskamp P, Giannetti BM, Waterreus WJ, van Veen HA, Pannu NS. How Dextran Sulfate Affects C1-inhibitor Activity: A Model for Polysaccharide Potentiation. *Structure*. 24: 2182-2189 (2016)
- 42) Beinrohr L, Harmat V, Dobo J, Lorincz Z, Gal P, Zavodszky P. C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. *J Biol Chem*. 282: 21100-21109 (2007)
- 43) Madsen DE, Hansen S, Gram J, Bygum A, Drouet C, Sidelmann JJ. Presence of C1-inhibitor polymers in a subset of patients suffering from hereditary angioedema. *PLoS One*. 9: e112051 (2014)
- 44) Cicardi M, Aberer W, Banerji A, Bas M, Bernstein JA, Bork K, Caballero T, Farkas H, Grumach A, Kaplan AP, Riedl MA, Triggiani M, Zanichelli A, Zuraw B, on behalf of HAWK, under the patronage of EAACI. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy*. 69: 602-616 (2014)
- 45) Germenis AE, Speletas M. Genetics of Hereditary Angioedema Revisited. *Clin Rev Allergy Immunol*. 51: 170-182 (2016)
- 46) Bafunno V, Bova M, Loffredo S, Divella C, Petraroli A, Marone G, Montinaro V, Margaglione M, Triggiani M. Mutational spectrum of the C1 inhibitor gene in a cohort of Italian patients with hereditary angioedema: description of nine novel mutations. *Ann Hum Genet*. 78: 73-82 (2014)
- 47) Gößwein T, Kocot A, Emmert G, Kreuz W, Martinez-Saguer I, Aygören-Pürsün E, Rusicke E, Bork K, Oldenburg J, Müller CR. Mutational spectrum of the C1INH (SERPING1) gene in patients with hereditary angioedema. *Cytogenet Genome Res*. 121: 181-188 (2008)
- 48) Skriver K, Wikoff WR, Patston PA, Tausk F, Schapira M, Kaplan AP, Bock SC. Substrate properties of C1 inhibitor Ma (Alanine 434->Glutamic acid). Genetic and structural evidence suggesting that the P12-region contains critical determinants of serine protease inhibitor/substrate status. *J Biol Chem*. 266: 9216-9221 (1991)
- 49) Davis AE, 3rd, Aulak K, Parad RB, Stecklein HP, Eldering E, Hack CE, Kramer J, Strunk RC, Bissler J, Rosen FS. C1 inhibitor hinge region mutations produce dysfunction by different mechanisms. *Nat Genet*. 1: 354-358 (1992)
- 50) Aulak KS, Eldering E, Hack CE, Lubbers YP, Harrison RA, Mast A, Cicardi M, Davis AE, 3rd. A hinge region mutation in C1-inhibitor (Ala436->Thr) results in nonsubstrate-like behavior and in polymerization of the molecule. *J Biol Chem*. 268: 18088-18094 (1993)
- 51) Parad RB, Kramer J, Strunk RC, Rosen FS, Davis AE, 3rd. Dysfunctional C1 inhibitor Ta: deletion of Lys-251 results in acquisition of an N-glycosylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 6786-6790 (1990)
- 52) Zahedi R, Aulak KS, Eldering E, Davis AE,

- 3rd. Characterization of C1 inhibitor-Ta. A dysfunctional C1INH with deletion of lysine 251. *J Biol Chem.* 271: 24307-24312 (1996)
- 53) Yamasaki M, Li W, Johnson DJ, Huntington JA. Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization. *Nature.* 455: 1255-1258 (2008)
- 54) Yamasaki M, Sendall TJ, Pearce MC, Whisstock JC, Huntington JA. Molecular basis of alpha1-antitrypsin deficiency revealed by the structure of a domain-swapped trimer. *EMBO Rep.* 12: 1011-1017 (2011)
- 55) Eldering E, Verpy E, Roem D, Meo T, Tosi M. COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. *J Biol Chem.* 270: 2579-2587 (1995)
- 56) Kaplan AP. Bradykinin and the pathogenesis of hereditary angioedema. *World Allergy Organ J.* 4: 73-75 (2011)
- 57) Bork K. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Immunol Allergy Clin North Am.* 33: 457-470 (2013)
- 58) Riedl MA. Hereditary angioedema with normal C1-INH (HAE type III). *J Allergy Clin Immunol Pract.* 1: 427-432 (2013)
- 59) Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 343: 1286-1289 (2006)
- 60) Cichon S, Martin L, Hennies HC, Muller F, Van Driessche K, Karpushova A, Stevens W, Colombo R, Renne T, Drouet C, Bork K, Nothen MM. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet.* 79: 1098-1104 (2006)
- 61) Bork K, Kleist R, Hardt J, Witzke G. Kallikrein-kinin system and fibrinolysis in hereditary angioedema due to factor XII gene mutation Thr309Lys. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 20: 325-332 (2009)
- 62) Bjorkqvist J, de Maat S, Lewandrowski U, Di Gennaro A, Oschatz C, Schonig K, Nothen MM, Drouet C, Braley H, Nolte MW, Sickmann A, Panousis C, Maas C, Renne T. Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. *J Clin Invest.* 125: 3132-3146 (2015)
- 63) de Maat S, Bjorkqvist J, Suffritti C, Wiesenekker CP, Nagtegaal W, Koekman A, van Dooremalen S, Pasterkamp G, de Groot PG, Cicardi M, Renne T, Maas C. Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 138: 1414-1423 e9 (2016)
- 64) Ewald GA, Eisenberg PR. Plasmin-mediated activation of contact system in response to pharmacological thrombolysis. *Circulation.* 91: 28-36 (1995)
- 65) Correia AS, Matias G, Calado S, Lourenco A, Viana-Baptista M. Orolingual angiodema associated with alteplase treatment of acute stroke: a reappraisal. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 24: 31-40 (2015)
- 66) Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T. Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol.* 83: 217-223 (2006)

- 67) <http://exac.broadinstitute.org/about>.
- 68) Bork K, Wulff K, Meinke P, Wagner N, Hardt J, Witzke G. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. *Clin Immunol*. 141: 31-35 (2011)
- 69) Bork K, Wulff K, Hardt J, Witzke G, Lohse P. Characterization of a partial exon 9/intron 9 deletion in the coagulation factor XII gene (F12) detected in two Turkish families with hereditary angioedema and normal C1 inhibitor. *Haemophilia*. 20: e372-375 (2014)
- 70) Kiss N, Barabas E, Varnai K, Halasz A, Varga LA, Prohaszka Z, Farkas H, Szilagyi A. Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. *Clin Immunol*. 149: 142-145 (2013)
- 71) Gelincik A, Demir S, Olgac M, Karaman V, Toksoy G, Colakoglu B, Buyukozturk S, Uyguner ZO. Idiopathic angioedema with F12 mutation: is it a new entity? *Ann Allergy Asthma Immunol*. 114: 154-156 (2015)
- 72) Bafunno V, Firinu D, D'Apolito M, Cordisco G, Loffredo S, Leccese A, Bova M, Barca MP, Santacroce R, Cicardi M, Del Giacco S, Margaglione M. Mutation of the angiopoietin-1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. in press (2017)
- 73) Pathak M, Wilmann P, Awford J, Li C, Hamad BK, Fischer PM, Dreveny I, Dekker LV, Emsley J. Coagulation factor XII protease domain crystal structure. *J Thromb Haemost*. 13: 580-591 (2015)
- 74) Beringer DX, Kroon-Batenburg LM. The structure of the FnI-EGF-like tandem domain of coagulation factor XII solved using SIRAS. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 69: 94-102 (2013)
- 75) Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Jenny NS, Everse SJ, Mann KG. Blood coagulation and fibrinolysis. *Wintrobe's Clinical Hematology 12th edition*, Eds Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, Means Jr RT, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 528-619 (2009)
- 76) Pixley RA, Schapira M, Colman RW. Effect of heparin on the inactivation rate of human activated factor XII by antithrombin III. *Blood*. 66: 198-203 (1985)
- 77) de Agostini A, Lijnen HR, Pixley RA, Colman RW, Schapira M. Inactivation of factor XII active fragment in normal plasma. Predominant role of C-1-inhibitor. *J Clin Invest*. 73: 1542-1549 (1984)
- 78) Scott CF, Schapira M, James HL, Cohen AB, Colman RW. Inactivation of factor XIa by plasma protease inhibitors: predominant role of α 1-protease inhibitor and protective effect of high molecular weight kininogen. *J Clin Invest*. 69: 844-852 (1982)
- 79) van der Graaf F, Koedam JA, Bouma BN. Inactivation of kallikrein in human plasma. *J Clin Invest*. 71: 149-158 (1983)
- 80) Schapira M, Scott CF, Colman RW. Contribution of plasma protease inhibitors to the inactivation of kallikrein in plasma. *J Clin Invest*. 69: 462-468 (1982)

血小板凝集機構および血液凝固に対する補体系の役割

水野 智博

名城大学薬学部 薬効解析学

The roles of complement for platelet aggregation and coagulation systems

Tomohiro Mizuno

Analytical Pharmacology, Meijo University faculty of Pharmacy

[はじめに]

血小板凝集機構および血液凝固系は、創傷時の止血だけではなく、組織の修復にも関与することで、恒常性の維持に大きく貢献している。一方で、動脈硬化の進展による冠動脈疾患だけでなく、播種性血管内凝固症候群（Disseminated intravascular coagulation: DIC）のような急性疾患の発症にも深く関与しており、血小板凝集と凝固系をコントロールすることで、予後が改善する疾患が数多く存在する。補体系と凝固系のクロストークについては、30年以上前よりその存在が指摘されているが、疾患との関わりについては、比較的歴史が浅い。血小板と補体系の関係についても、同様である。本稿では、血小板凝集機構および凝固系について概説し、補体系との関わり、各種関連疾患における治療ターゲットとしての補体の可能性について述べたい。

[血小板凝集と補体]

血管内皮の損傷によりコラーゲンとフォン・ヴィレブランド因子（vWF）が結合し、次に血小板表面に発現する GPIIb 受容体と vWF との結合、GPVI とコラーゲンの結合により、血小板の一次凝集が成立する。一次凝集の成立により、血小板の GPIIb/IIIa 受容体構造が変化し、フィブリノーゲンとの親和性が高まる。この結果、血小板同士の結合が促され、二次凝集が進展する（図 1）。

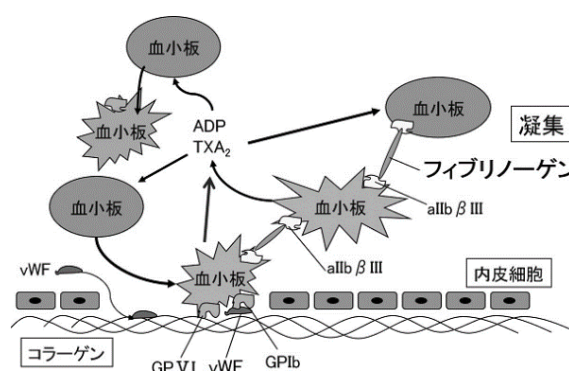


図 1. 血小板凝集機構

ADP: アデノシンニリン酸, GP: グリコプロテイン, TXA₂: トロンボキサン A₂, vWF: ヴォンヴィレブランド因子

上述した血小板凝集機構において、補体の関与が報告されている。血小板の表面には補体関連の受容体が複数発現しており、凝集 IgG の存在下にて、C1q が C1q 受容体へ結合すると、αIIb/β3 インテグリンの活性化、血小板凝集および顆粒の放出が促進される¹⁾。この反応は C1q 単独では起こらないため、循環中の免疫複合体による血小板凝集機構に、C1q および C1q 受容体が関与していることを示唆している。CR2 受容体も血小板凝集および血小板からの ATP 放出に関与している²⁾。また、C3a、C5a 受容体へ C3a および C3a-des-Arg が結合することで、血小板の活性化と凝集が促進されるが³⁻⁵⁾、C5a は血小板のみならず、白血球-血小板複合体の形成も促進する⁶⁾。このように、補体系は血小板を活性化さ

せ、凝集を促進させているが、血小板が補体系を活性化させる経路も存在する。

血小板表面に発現している P-セレクトリンは、C3b と結合し、C3a の生成および膜侵襲複合体の形成を促進する⁷⁾。補体系の活性化に伴い、血小板凝集および止血反応が促進されるため、C3 欠損マウスでは出血時間の延長が確認されている¹⁾。また、トロンビン受容体を介して活性化した血小板は、コンドロイチン硫酸を分泌することで、C1q を介し補体系を活性化する⁸⁾。上述した血小板-補体間の相互作用は、凝固系への影響のみならず、感染防御にも重要な役割を果たしている⁹⁾。

血小板表面には補体系を活性化させる受容体だけでなく、活性を制御するタンパクが多数存在する。CD46¹⁰⁾、CD55¹¹⁾さらには CD59¹²⁾は、血小板表面に発現しており、それぞれ C3 レベル、C9 レベルで補体活性を制御している(図 2)。 α IIb β 3¹³⁾およびトロンボスポンジン 1¹⁴⁾は H 因子と結合し、C3 (H₂O) および C3b を不活化している。

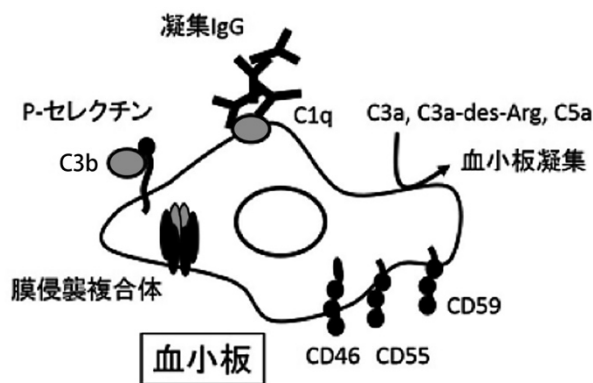


図 2. 血小板と補体関連物質

[血液凝固と補体]

凝固経路は、外因性および内因性経路の 2 つに大別される。外因性経路には組織因子、第 VII 因子が関与し、内因性経路にはカリクレイン、第 IX 因子、第 XI 因子、第 XII 因子が関与する。これらの因子が連鎖的に活性化することで生成された第 Xa 因子および活性型第 XI 因子がプロトロンビンをトロンビンに

変換することで、フィブリノーゲンを分解し、血栓を形成する。

補体経路は古典経路、レクチン経路、第二経路から構成されており、C3、C5 の開裂を経て膜侵襲複合体を形成する。膜侵襲複合体は細胞膜を穿孔させ、細胞溶解を引き起こす。C3 および C5 の開裂の際に生成される C3a、C5a はアナフィラトキシンと呼ばれ、脱顆粒による血管透過性亢進を促進し、好中球の遊走を促進する。

凝固および補体経路は、共に「酵素反応」であり、双方の経路に基質と酵素が存在する。例えば、第 IX 因子、第 X 因子、第 XI 因子、トロンビン、プラスミンは、C3 および C5 の開裂を促進することで、補体活性に関与している(図 3)。一方、MASP-2、C5b-9 はプロトロンビンからトロンビンへの変換を促進し、血液凝固を促進する¹⁵⁾。上述の通り、凝固因子による補体活性化は、セリンプロテアーゼ(第 IX 因子、第 XI 因子、プラスミン)により促進され、組織因子を始めとする内因性経路の補体系への関与は少ないと考えられていた。しかし、細胞膜表面に形成された C5b-7 は、組織因子の活性化に関与することが報告されており¹⁶⁾、補体-凝固系クロストークは多岐に渡ることが示唆されている。

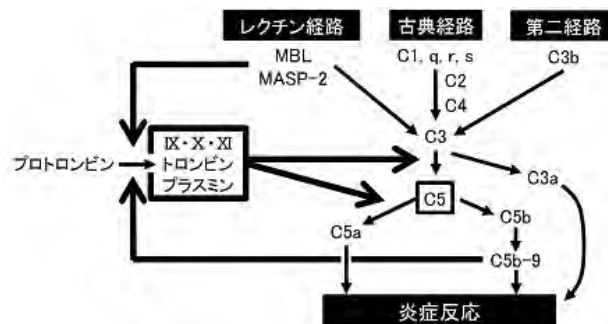


図 3. 補体-凝固系クロストーク

[血栓症と補体]

前述の通り、補体が活性化することにより、血小板凝集および血液凝固反応が促進される。これらの生体反応により引き起こされる血栓症のうち、特に重篤な疾患について概説する。

溶血性尿毒症症候群（HUS）は、感染（病原性大腸菌）や補体制御因子の機能不全が引き金となり、溶血性貧血、血小板凝集に伴う急性腎不全を呈する疾患である。病原性大腸菌によって引き起こされる HUS は、小児に多く、HUS 全体の 9 割以上を占める。腎不全に伴う透析導入例も多いが、基本的に予後は良好であり、経過期間の個人差はあるものの、完全な回復が見込める疾患である。一方、病原性大腸菌以外の要因によって引き起こされる HUS は atypical HUS（aHUS）と呼ばれており、小児のみならず、成人発症もある。患者の 50% 近くが補体関連タンパクの遺伝子変異を持っているとされ¹⁷⁾、大半が末期腎不全に移行し、予後不良な疾患である。

aHUS の発症には、補体第二経路を制御する補体 H 因子（CFH）、I 因子（CFI）、membrane cofactor protein（MCP）の機能異常が関与しており、患者が遺伝的な背景を持っていれば「Primary aHUS」とし、それ以外（薬剤等）の場合は「Secondary aHUS」に大別される¹⁸⁾。どちらの場合も補体活性を抑制することができず、自己の細胞が障害される。特に血管内皮細胞が障害されると、抗血栓作用および抗凝固作用が低下し、血栓が形成されやすくなる。また、補体活性化に伴い凝固系が亢進し、血小板凝集がさらに促進される。非常に稀ではあるが、補体制御因子以外にもトロンボモジュリンの機能異常により aHUS を発症するケースもある¹⁹⁾。

DIC は、生体内の血液凝固および血小板凝集が急激に進行し、全身に血栓が生じる急性疾患である。凝固系が亢進するため、凝固因子が枯渇し、相対的に線溶系が優位となり、出血により命を落とす患者も少なくない。敗血症や悪性腫瘍等の難治性疾患を持つ患者で発症しやすく、発症した場合、基礎疾患の治療が優先される。基礎疾患の治療が奏功すれば、基本的に予後は良好であるが、治療が困難な場合もしくは病勢コントロールが必要な時に、低分子ヘパリン、アンチトロンビン製剤、トロンボモジュリンが使用される。しかし、これらの治療薬が存在する

にも関わらず、DIC 全体の死亡率は約 56% と高率である。

DIC の発症には、Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) と Damage associated molecular patterns (DAMPs) が関与するとされている。PAMPs はリポポリサッカライド (LPS)、dsRNA 等が該当し²⁰⁾、免疫応答細胞がこれらを認識することで、サイトカインや High mobility group box-1 (HMGB1) を放出する。これらの物質は、生体内の異物を排除するために放出されるが、過剰に放出された場合（いわゆるサイトカインストーム）、炎症・凝固反応が著しく亢進し、DIC の発症に繋がる。

DAMPs は、好中球エラスターゼ、壊死細胞由来の HMGB1²¹⁾、neutrophil extracellular traps (NETs) 等の総称であり、炎症や凝固反応、血小板凝集を促進する。PAMPs とは異なり、その名の通り、障害を受けた細胞から放出される²²⁾。NETs は、好中球内の核膜および細胞内小器官の消失、細胞の膨化、形質膜の破綻を介して、細胞外へ放出される（これら一連を NETosis と呼ぶ）。NETs の 1 種であるヒストンは、凝固系の活性化、血小板凝集を促進させ、致死性血栓症の発症・進展に関与している。ヒストンと補体との関連を示す報告は少ないが、C5a 受容体欠損マウスに対して、盲腸結紮および穿刺を行ったところ、野生型マウスに比して、ヒストンの放出が抑制されたことから、C5a がヒストンの放出に関与することが示されている²³⁾。C5 欠損マウスにヒストンを投与し致死性血栓症を誘発させたところ、正常マウスに比して、生存期間が有意に延長したことから、ヒストンによる障害進展に C5 が関与していることも、同様に示されている⁶⁾。加えて、ヒストン投与後の正常マウスにおいて、C5a 濃度が上昇していたことから、凝固系の活性化に伴い、C5 の開裂が促進されたと考えられる（図 4）。

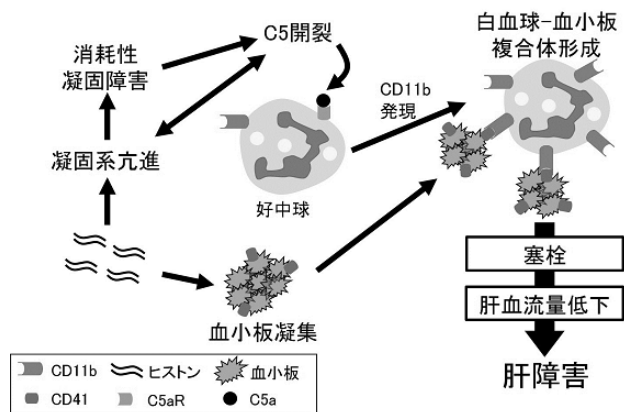


図 4. ヒストン誘発致死性血栓症における C5 の関与⁶⁾

[血栓症治療と補体]

aHUS に対する血漿交換・補充は、30 年以上前から実施されている治療法であり、死亡率の低下、部分寛解が期待できる。しかしながら、変異している遺伝子の種類によって、血漿交換の治療成績が異なる。例えば、CFH、CFI の変異を持つ患者と比較して、MCP の場合は奏効率が低いことが報告されている²⁴⁾。また、CFH に対する自己抗体を持つ患者に対しては、血漿交換に加えて、ステロイドや免疫抑制剤が使用されることもある。いずれのケースにおいても、治療抵抗性および再発例が見受けられるため、新規治療薬の開発が進められてきた。

aHUS の新規治療薬として、抗 C5 モノクローナル抗体であるエクリズマブが挙げられる。エクリズマブは、発作性夜間血色素尿症の治療薬として、本邦でも承認されているが、aHUS に対しても著効例が複数報告されている。補体後期経路が活性化することにより、膜侵襲複合体が形成されることで、血管内皮細胞の障害が進行する。エクリズマブは C5 を阻害するため、補体による細胞障害の軽減作用のみならず、C5 の開裂を介した補体-凝固クロストークの抑制作用も期待できるため、現在、治療の第一選択とされている²⁵⁾。

敗血症性ショックに対して、抗補体薬の有効性が報告されているが、DIC に関しては、抗補体薬は臨

床応用されていない。ただし、血管内皮細胞障害、凝固系の亢進および血小板凝集の促進等、aHUS と共通する点が多い。我々は、C5 欠損マウスにヒストンを投与し、致死性血栓症を誘発させたところ、正常マウスと比べて、肝障害、血球減少が有意に少なく、白血球-血小板複合体の形成も抑制されることを報告した⁶⁾。さらに、C5a 受容体アンタゴニストを正常マウスに投与したところ、ヒストンによる上記障害が軽減したことから、ヒストンによる致死性血栓症の発症に C5 および C5a が関与していることが示唆された⁶⁾。先行研究より、敗血症性 DIC 患者では、血中の DNA-ヒストン複合体濃度と生命予後との関連は低かったものの、非敗血症性 DIC 患者では、関連が認められた²⁶⁾。非敗血症性 DIC は、基礎疾患の治療が困難なケースが特に多いため、悪性腫瘍および薬剤由来の DIC に対する抗 C5 および C5a 療法について、今後の検討が期待される。

[謝辞]

第 54 回日本補体学会学術集会にて、日本補体学会より優秀賞を賜り、また、本受賞寄稿を発表させて頂き、感謝致します。

[利益相反]

筆者は本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はありません。

[文献]

- 1) Peerschke EI and Ghebrehiwet B. C1q augments platelet activation in response to aggregated Ig. *J Immunol.* 159: 5594-5598 (1997)
- 2) Nunez D, Charriaut-Marlangue C, Barel M, Benveniste J, Frade R. Activation of human platelets through gp140, the C3d/EBV receptor (CR2). *Eur J Immunol.* 17: 515-520 (1987)
- 3) Patzelt J, Mueller KA, Breuning S, Karathanos A, Schleicher R, Seizer P, Gawaz M, Lan

- ger HF, Geisler T. Expression of anaphylatoxin receptors on platelets in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 238: 289-295 (2015)
- 4) Polley MJ and Nachman RL. Human platelet activation by C3a and C3a des-arg. *J Exp Med*. 158: 603-615 (1983)
 - 5) Hamad OA, Nilsson PH, Wouters D, Lambris JD, Ekdahl KN, Nilsson B. Complement component C3 binds to activated normal platelets without preceding proteolytic activation and promotes binding to complement receptor 1. *J Immunol*. 184: 2686-2692 (2010)
 - 6) Mizuno T, Yoshioka K, Mizuno M, Shimizu M, Nagano F, Okuda T, Tsuboi N, Maruyama S, Nagamatsu T, Imai M. Complement component 5 promotes lethal thrombosis. *Sci Rep*. 7: 42714 (2017)
 - 7) Del Conde I, Cruz MA, Zhang H, López J A, Afshar-Kharghan V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J Exp Med*. 201: 871-879 (2005)
 - 8) Hamad OA, Ekdahl KN, Nilsson PH, Andersson J, Magotti P, Lambris JD, Nilsson B. Complement activation triggered by chondroitin sulfate released by thrombin receptor-activated platelets. *J Thromb Haemost*. 6: 1413-1421 (2008)
 - 9) Verschoor A and Langer HF. Crosstalk between platelets and the complement system in immune protection and disease. *Thromb Haemost*. 110: 910-919 (2013)
 - 10) Yu GH, Holers VM, Seya T, Ballard L, Atkinson JP. Identification of a third component of complement-binding glycoprotein of human platelets. *J Clin Invest*. 78: 494-501 (1986)
 - 11) Nicholson-Weller A, March JP, Rosen CE, Spicer DB, Austen KF. Surface membrane expression by human blood leukocytes and platelets of decay-accelerating factor, a regulatory protein of the complement system. *Blood*. 65: 1237-1244 (1985)
 - 12) Morgan BP. Isolation and characterization of the complement-inhibiting protein CD59 antigen from platelet membranes. *Biochem J*. 282: 409-413 (1992)
 - 13) Mnjoyan Z1, Li J, Afshar-Kharghan V. Factor H binds to platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *Platelets*. 19: 512-519 (2008)
 - 14) Vaziri-Sani F1, Hellwage J, Zipfel PF, Sjöholm AG, Iancu R, Karpman D. Factor H binds to washed human platelets. *J Thromb Haemost*. 3: 154-162 (2005)
 - 15) Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, Brückner UB, Nilsson B, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J immunol*. 185: 5628-5636 (2010)
 - 16) Langer F, Spath B, Fischer C, Stolz M, Ayuk FA, Kröger N, Bokemeyer C, Ruf W. Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase. *Blood*. 121: 2324-2355 (2013)
 - 17) Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, Mele C, Bresin E, Cassis L, Gamba S, Porrati F, Bucchioni S, Monteferrante G, Fang CJ, Liszewski MK, Kavanagh D, Atkinson JP, Remuzzi G; International Registry of Recurrent and Familial HUS/TTP. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. 10

- 8: 1267-1279 (2006)
- 18) Goodship TH, Cook HT, Fakhouri F, Fervenza FC, Frémeaux-Bacchi V, Kavanagh D, Nester CM, Noris M, Pickering MC, Rodríguez de Córdoba S, Roumenina LT, Sethi S, Smith RJ; Conference Participants. Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 91: 539-551 (2017)
- 19) Sinibaldi S, Guzzo I, Piras R, Bresin E, Emma F, Dello Strologo L. Post-transplant recurrence of atypical hemolytic uremic syndrome in a patient with thrombomodulin mutation. *Pediatr Transplant.* 17: E177-181 (2013)
- 20) Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449: 819-826 (2007)
- 21) Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418: 191-195 (2002)
- 22) Chen GY and Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 10: 826-837 (2010)
- 23) Kalbitz M, Grailer JJ, Fattahi F, Jajou L, Herron TJ, Campbell KF, Zetoune FS, Bosmann M, Sarma JV, Huber-Lang M, Gebhard F, Loaiza R, Valdivia HH, Jalife J, Russell MW, Ward PA. Role of extracellular histones in the cardiomyopathy of sepsis. *FASEB J.* 29: 2185-2193 (2015)
- 24) Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Macher MA, Niaudet P, Guest G, Boudailliez B, Bouissou F, Deschenes G, Gie S, Tsimaratos M, Fischbach M, Morin D, Nivet H, Alberti C, Loirat C; French Society of Pediatric Nephrology. Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 18: 2392-2400 (2007)
- 25) Zhang K, Lu Y, Harley KT, Tran MH. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Brief Review. *Hematol Rep.* 9: 7053 (2017)
- 26) Kim JE, Lee N, Gu JY, Yoo HJ, Kim HK. Circulating levels of DNA-histone complex and dsDNA are independent prognostic factors of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 135: 1064-1069 (2015)

大学における補体学教育の一例

松下 操

東海大学工学部生命化学科

バイオサイエンスの隆盛に伴い、それまでバイオサイエンスとはほとんど無縁であった大学の工学部にもバイオ系の学科が新設された。私が奉職している生命化学科はその先駆けとして 2001 年に東海大学に開設された。座学の専門科目としては生化学や有機化学の他に、遺伝子工学、微生物学、食品工学、薬理学、免疫科学など幅広い領域の学問を教授している。私は免疫科学を担当しているが、これを受講する学生は主に 3 年次生であり、既に生化学や有機化学などの専門基礎科目を受講済みである。免疫科学は 15 回の授業があり、内容としては自然免疫、獲得免疫、アレルギー、免疫寛容、移植免疫などを取り上げる。補体は自然免疫の最後の項目として、抗菌ペプチド、食細胞、病原体関連分子パターンとパターン認識受容体、Toll 様受容体、ナチュラルキラー細胞を順に学んだ後に登場する。免疫科学の 15 回の授業のうち 1 回を補体のみをテーマにした授業に当てている。従って、教科書レベルの補体の基礎的な内容に加えて、多少掘り下げた内容も取り扱っている。11 年前に免疫科学の授業がスタートして暫くは板書をしていたが、その後現在まで基本的には

板書せずにパワーポイントを使用し、毎回レジュメを配布している。教科書は使用していない。授業形態を板書からパワーポイントに変えた理由はいくつかあるが、最大の理由はパワーポイントの特長であるアニメーションを駆使して複雑な免疫を説明することが可能になる点にある。アニメーションの威力は、特に補体の各成分の分解と集合を伴う連鎖反応を説明する際に大いに発揮される。免疫学の教科書に書かれた図と説明では一連の補体反応を理解するのは容易ではない。それをパワーポイントのアニメーション機能は見事に解決してくれる。授業では、独自に作成したパワーポイントのスライドを用いて補体の 3 つの活性化経路と後期経路の反応を説明している (図 1)。しかし、このようにしても、学生にとって補体は免疫学の中ではとっつき難く苦手な分野の一つであるらしい。

生命化学科では専門実習科目が 5 つあり、その 1 つ (生化学実験 C) で免疫の内容を含む実習を行っている。生化学実験 C では、15 回の授業のうち前半は酵素、後半は免疫の実験を行う。免疫については、抗体の機能とその生化学的応用に関連して、(1)

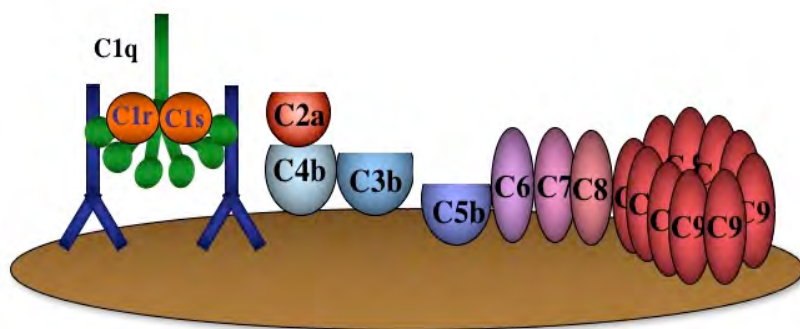


図 1 古典的経路と後期経路

抗原と抗体の *in vitro* での反応 (2) ウェスタンブロット (3) ELISA の3つの項目を実施している。(1)の項目では赤血球凝集反応とゲル内沈降反応(オクタロニー法)を観察する。この項目では、抗体の機能と関連して補体を扱っている。医学部においては、抗体と補体の反応を調べる実験としてプラーク形成細胞アッセイが一般的と思われるが、様々な制約がある工学部ではそれができない。そこで、ヒツジ赤血球を抗原として、これとウサギ抗ヒツジ赤血球抗体と非免疫ウサギ血清(補体)を反応させて生じる

溶血を観察する実験を採用している(図2)。この溶血反応実験は至ってシンプルな系であり、抗体と補体の働きに関して明確な結果が得られることから、学生には概ね好評のようである。

以上、私が現在実践している補体学教育の一部を紹介したが、学生が補体を理解し、更に興味を持つように教育するにはまだまだ授業内容に改善の余地があると感じている。

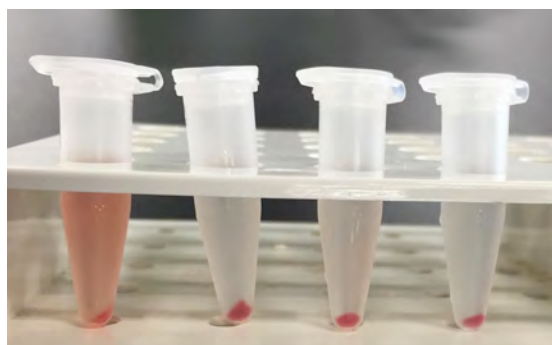


図2 抗体と補体の溶血反応。左より、ヒツジ赤血球+抗ヒツジ赤血球+ウサギ血清、ヒツジ赤血球+抗ヒツジ赤血球、ヒツジ赤血球+ウサギ血清、ヒツジ赤血球のみ

第 6 回 HUS & related disorders 国際カンファレンスに参加して

日高 義彦

信州大学医学部小児医学教室

Report of the 6th international conference “HUS & related disorders”

Yoshihiko Hidaka

Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine

2 年ごとに開催されている HUS & related disorders 国際カンファレンスが、今年の 6 月 11 日から 13 日の 3 日間、オーストリアのインスブルックにて開催され、参加してきました。2 年前にも本学会誌にて第 5 回の様子をご報告しましたが、この研究会は、補体制御異常による非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS)、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) による溶血性尿毒症症候群 (STEC-HUS)、補体機能異常による C3 腎症を研究対象としています。今回は、講義形式で 21 演題、研究成果発表として 12 演題が口演で、21 演題がポスターで発表されました。私は、2015 年から日本補体学会で進めている「補体検査体制構築と血栓性微小血管症 (TMA) レジストリー」についてポスターにて発表いたしました。どの発表も最新のデータが示され、この分野を研究対象としている者にとっては大変興味深く勉強になるものばかりでした。全ての発表についてご紹介したいところですが、紙面の関係もあり、その中からいくつかをご紹介します。

aHUS に関しては、造血幹細胞移植後 TMA (HSCT-TMA) を発症したレシピエントとそのドナーの両者において、補体制御因子の遺伝子について報告されました。そこでは、16 症例中 6 症例で補体制御因子の遺伝子変異が認められ、内訳では 5 症例はドナーのみに、1 症例はドナーとレシピエントの両者に変異が認められたという結果でした。いずれの遺伝子変異も、これまで既に aHUS や加齢黄斑変性症、C3 腎症などの補体制御異常症で報告された

変異であり、ここでは同様に HSCT-TMA 発症との関連が疑われるとのことでした。新たな視点での HSCT-TMA の原因検索で、大変興味深いと思いました。STEC-HUS に関しては、志賀毒素 (Stx) の血球細胞への作用についての知見が印象的でした。Stx は Stx1 と Stx2 が知られていますが、Stx2 には赤血球の産生を促進する造血因子エリスロポエチン (Epo) と反対の作用、つまり赤血球系細胞の成熟を阻害する働きがあることが示されました。このことにより、HUS の貧血は、機械的破壊による微小血管症性溶血性貧血だけでなく、それに赤血球産生の低下が加わり、さらに貧血が進行、遷延すると考えられました。2009 年に「STEC-HUS 発症早期からの Epo の投与が非投与群と比較し赤血球輸血を有意に減らした」という小規模ランダム化比較試験が報告され、STEC-HUS 治療では発症早期から Epo 投与を検討することが推奨されています。今回の報告は、Stx2 による STEC-HUS 患者において Epo 投与が有用であることを裏付けるものと考えられました。他に、Stx の受容体としては細胞表面の糖脂質である Gb3 が知られていますが、それ以外に Toll-like receptor 4 (TLR4) も受容体となります。Stx は TLR4 を有する好中球にも作用し好中球血小板凝集を引き起こすことが知られています。報告では、ポリミキシン B 添加実験により好中球血小板凝集が抑制されることが示され、ポリミキシン B が TLR4 阻害を介して好中球への Stx の作用を抑制することが推測されていました。ポリミキシン B が

STEC 感染者の STEC-HUS への進展や重症化を防ぐ薬剤の一つとなる可能性があり、今後の研究結果に注目したいところです。C3 腎症に関しては、糸球体 C3 沈着物の検討がなされ、C3b の不活化体 iC3b の分解産物である C3dg の沈着が最も多く観察されたとの研究結果が紹介されました。他には、C3 腎症の基本病態は血漿などの液相と糸球体基底膜の glycomatrix における C3 転換酵素と C5 転換酵素の制御異常とされ、糸球体基底膜関連の 25 遺伝子の検討で、健常人に比べて C3 腎症患者で有意に遺伝子変異保有頻度が高い結果は興味深い知見でした。別の C3 腎症の研究では、CR2 の一部 (SCR1-4) と H 因子 (FH) の一部 (SCR1-5) から構成される CR2-FH タンパクの投与が、C3 腎症モデルマウスにおいて糸球体への C3 沈着を抑制したとする実験結果が報告され、新規治療薬としての可能性が感じられました。

今回の研究会には私の他に、旭川医科大学の若宮伸隆先生、大阪国際がんセンターの井上徳光先生、滋賀医科大学の澤井俊宏先生も参加され、澤井先生は口演セッションの座長を堂々と務められました。2 日目の夜には恒例のパーティー「Tyrolean night」が、今回は会場近くの Patscherkofel 山 (標高 2247m) で開催されました。ロープウェイで標高 1952m にある山上駅に上り、その近くのレストランで楽しい夜を過ごしました。パーティー開始時はまだ明るかったので眼下に広がるインスブルックを一望でき、絶景でした。

今回は 2 回目の参加でしたが、前回同様に大いに刺激を受け、この分野でのわが国の研究を、より一層発展させていかなければと感じました。

〔謝辞〕

日本補体学会によるサポートにより、本カンファレンスに参加させていただきましたこと、感謝いたします。

〔利益相反〕

筆者は本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はありません。



ポスター発表



会場内、活発な議論も行われました



座長を務める澤井先生



Tyrolean night 会場にて

第 16 回 European Meeting on Complement in Human Disease

に参加して

井上 徳光

大阪国際がんセンター研究所・腫瘍免疫学部門

Report of The 16th European Meeting on Complement in Human Diseases

Norimitsu Inoue

Tumor Immunology, Osaka International Cancer Institute

2017年9月8日から12日まで、デンマークのコペンハーゲンで、コペンハーゲン大学Peter Garred教授を会長として、第16回 European Meeting on Complement in Human Disease (EMCHD)が開かれた。日本のアカデミアからは、藤田禎三氏、若宮伸隆氏、中尾実樹氏、水野正司氏、澤井俊宏氏、日高義彦氏、植田康敬氏と私の8人が参加した。私は、EMCHDへの参加は、前回のスウェーデンのウプサラに続き2回目である。EMCHDは、ヨーロッパの補体研究者グループ European Complement Network (ECN)が主催する国際会議で、昨年日本で開かれたInternational Complement Workshopと交互に、開催されている。2年前の前回meetingが aHUSやC3腎症の話題で盛り上がっていたのに対し、今回のmeetingは、新たな疾患、新たな抗補体薬が注目されているように感じた。

1日目(9月8日)は、前回と同様 C3 glomerulopathy satellite meeting が開催された。前回 aHUS や C3 glomerulopathy で血管内皮の糖鎖構造 Glycocalyx が非常に注目されたが、その後それほど新しい発見はなかった。しかし、今後、日本で C3 glomerulopathy を診断するためには、組織診断や蛍光染色だけでなく、C3NeF や C5NeF などの自己抗体検査システムの確立が急務である事を痛感した。また aHUS と異なり、C3 glomerulopathy で

は、CFHR 遺伝子群のより複雑な遺伝子異常が報告されており、それらをカバーできるような解析方法を考える必要があると感じた。

2日目(9月9日)は、Teaching day で、午前中の講義は誰でも参加できる形式であった。今回やはり注目は、細胞内補体の活性化とその役割に関する Claudia Kemper 博士の研究だった。彼女らは補体を常に細胞内に保持し、刺激により補体 C3 が Cathepsin L によって活性化されるシステムを報告している。さらに、自己の C3b は、CD46 を介して自己細胞へシグナルを伝え、Inflammasome の活性化や Th 1 誘導に関わるという研究を著名な雑誌に次々に掲載し、注目されている。詳しくは、「腎と透析」10月号にまとめているので参考にして頂けたらと思う。

9月10日～12日の3日間、EMCHD のメインの meeting が行われた(写真1)。その中で、私にとっては Piet Gros 博士の特別講演が、とても刺激的で、圧巻だった。講演を聞いた時はまだ知らなかった今年のノーベル化学賞(Jacques Dubochet 博士、Joachim Frank 博士、Richard Henderson 博士)の対象となった技術であるクライオ電子顕微鏡とX線構造解析を駆使し、IgG と C1q 複合体、membrane attack complex の構造、C3b-CFH-CFI の複合体などの構造を解析し、複合体形成によっておこるダイ



写真1 Hotel Scandic Copenhagen の meeting 会場

ナミックな変化を明らかにしていた。今回、これらの多大なる補体研究における業績が認められ、前 ICS 会長の Zvi Fishelson 博士らと共に ECN メダル 2017 を受賞した。

今回の発表の中で、さらに私にとって exciting だったのは、C4a 受容体の発見である (*PNAS*, 114, 10948-10953, 2017)。C3a と C5a と比較すると弱いですが、古くから C4a にもアナフィラトキシンとしての活性が存在する事が知られている。C4a は、C3a や C5a と非常に似ているため、そのような活性があっても不思議ではない。しかし、極めて不思議な事であるが、今まで C4a 受容体は発見されていなかった。その原因として、研究に用いる C4a に C3a や C5a の混入がある可能性が指摘された。Daniel Ricklin 博士らは、リガンドの知られている G タンパク質共役受容体 (GPCR) と知られていない GPCR240 種以上をスクリーニングし、Protease-activated receptor (PAR) 1 と 4 を同定した。PAR は、トロンビン等で PAR 蛋白の N 末が切断され、活性化するユニークな受容体である。今回、C4a は、切断する事なく活性化し、内皮細胞の膜透過性を特異的に亢進する事を示している。

また、今回の注目の補体に関わる新しい疾患に関して、古典経路に関わるセリンプロテアーゼである C1R と C1S のヘテロ変異で引き起こされる疾患と

して、フランスのグループが、Periodontal Ehlers-Danlos syndrome (pEDS) を報告した (*Am. J. Hum. Genet.* 99, 1005-1014, 2016)。EDS といえ、皮膚の過伸展と過弾力性、皮膚と血管の脆弱性、関節の過可動性を特徴とする疾患で、特定のコラーゲンやコラーゲンの成熟に関わる酵素などの遺伝子異常によって発症し、すでに複数の原因遺伝子が同定されている。今回の pEDS は、歯根膜炎による早期の歯の喪失を伴う顕性（優性）遺伝の疾患で、18 家系の解析を行い、C1R と C1S にヘテロのミスセンス変異または in-frame の挿入や欠失を同定した。一般的には、C1r や C1s タンパク質の機能的な欠損は、易感染性を伴う Systemic lupus erythematosus (SLE) 様症状を示し、ヘテロ変異では異常を示さない。一方、pEDS では、変異が CUB2 ドメインや CCP 1 (Complement control protein 1) に集中している。異常な C1r や C1s タンパク質がどのようにコラーゲンの異常を引き起こすのか非常に興味を持たれる。

また、以前より PNH と同じ溶血発作に加え、末梢神経症状を引き起こす CD59 欠損症を報告したイスラエルの Dror Mevorach 博士が、Late breaking lecture として CD55 欠損症の家系を報告した (*N. Engl. J. Med* 377, 52-61, 2017 と 377, 87-89, 2017)。CD55 欠損症は、血液型 Inab type として既に知られていたが、タンパク漏出性胃腸症を示し、これらの症状がエクリズマブによって改善する事が示された。これらの制御因子が全身で欠損するにも関わらず、なぜ、主な症状が認められる臓器が異なるのか、今後検討されなければならないと考えられる。

第 16 回 EMCHD サポーターであるアレクシオンからは、重症筋無力症 (Myasthenia Gravis, MG) に対するエクリズマブの臨床治験が終了し、MG 患者の約 60% に効果があるという結果の報告があった。自己のタンパク質 (MG の場合は、抗アセチルコリン抗体) に対する抗体ができる疾患に対して初めてエクリズマブが認可される可能性がでてきた。

これまでの補体制御因子異常ではない疾患に対してもエクリズマブが効果を示した事で、今後、自己抗体が惹起する様々な疾患に対する抗補体薬の臨床治験が拡大していく可能性が予測される。現在、エクリズマブ以外にも様々な新しい抗補体薬が開発されている。Novartis 社が開発する CFD と CFB に対する抗補体薬、Achillion 社が開発する CFD に対する小分子阻害剤 ACH-4471 など本 meeting で報告された。今後、疾患対象の拡大、ターゲットの異なる抗補体薬、抗体薬ではない小分子化合物の開発等、新規抗補体薬の臨床試験が進展する可能性を感じた。

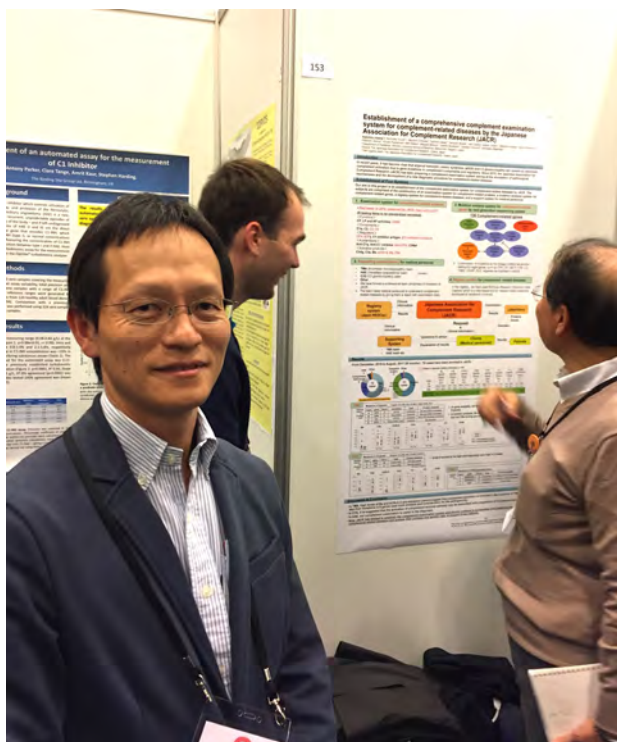


写真 2 ポスターの前で説明する若宮会長と日高義彦氏

日本補体学会からは日高義彦氏が、学会が主導して構築した補体検査システムに関して、ポスター発表を行った（写真 2）。この取り組みに関連する海外報告としては、世界の補体検査の標準化（EQA project）を牽引する Michael Kirschfink 博士のグループが、加齢黄斑変性の患者を健常者と比較し、血漿中と眼房水中の補体を測定し、血漿では有意な

差はないが、眼房水中の Ba と C3a 濃度に差がある事を示した。日本人健常者の血漿中の測定値がかなり彼らの値と差がある事もわかった。同様に EQA を牽引する Zoltan Prohaszka 博士のグループは、造血幹細胞移植後の TMA の小児症例における血漿中の sC5b-9 を経時的に測定した（移植 0, 28, 56, 100 日）。その結果、TMA を発症した人と発症しなかった人で、sC5b-9 の平均値に特に違いはなかったが、移植前から移植後 1 ヶ月時点で著しく sC5b-9 が上昇した人が、TMA を発症しやすいという結果をポスターで示した。日本補体学会も、成人例の解析を進めようとしているが、どのような結果が得られるのか楽しみである。

さて、今回の開催地コペンハーゲンには、非常に歴史のある町で宮殿や王宮を見学する事ができ、観光地としても大変人気のある場所である。また、デンマークは、世界幸福度報告書による世界幸福度ランキングで常に上位にランクされる国である。一緒に参加した若宮会長と藤田元会長は、本 meeting の Peter Garred 教授をはじめ、補体レクチン経路の著名な研究者がいるデンマークを度々訪問しているが、私は meeting のない時間を利用して、コペンハーゲンの名所を初めて訪問した。デンマークと言えば、童話作家のハンス・クリスチャン・アンデルセンが有名で、コペンハーゲンには、世界三大がっかり名所？の 1 つ「人魚姫」像（他はブリュッセルの小便小僧とシンガポールのマールイオン）がある。しかし、私にとっては、ホテルから片道 1 時間を歩いて訪れたので、小さな人魚が海岸に見えたときは本当にうれしかった。また、9月9日の Teaching day 後の短い時間を利用して、9月とは思えない厳しい寒さと雨の中、有名な歩行者天国ストロイエ通りを歩き、カラフルなレストランが並ぶ港のニューハウンドで記念撮影し（写真3）、藤田元会長お薦めのローゼンボー離宮で、エメラルド等の宝石で飾られたティアラやネックレス、王冠を鑑賞し、駆け足でコペンハーゲンの町を堪能した。

今回の第 16 回 EMCHD は、コペンハーゲンが王国という事もあるのか、Peter Garred 教授のおもてなしの気持ちが強いのか、非常に豪華な雰囲気であった。Welcome Party はコペンハーゲン市庁舎内のりっぱな広間で、Gala Dinner は現王宮であるアマリエンボー宮殿の隣の歴史ある Odd Fellow Manor で開かれ、マジシャンによるすばらしいショーもあり、大変楽しく過ごした。しかし、次の日のセッションが早朝からあるのに、23 時半ごろから場所を移してダンスパーティーだと言われた時には、西欧人のパワーには驚かされた。日本人の中にも西欧人に負けず元気に踊られた方がいたと聞いてさらに驚いた。



写真 3 若宮会長とニューハウンの港町の前で

次期 European Complement Network (ECN) の会長としてオーストリアの Reinhard Würzner が選ばれた。Würzner 氏は、2 年に 1 度、HUS & related disorders を地元インスブルックで開催している。ノ

ルウエーの Tom Mollnes 前会長が Teaching day の際に補体の基礎講義をされ、流暢な話は分かりやすく非常に魅力的であった。一方、Würzner が、ECN をどのように牽引して行くのか次回からの EMCHD が楽しみである。2019 年は、Santiago Rodriguez de Cordoba を会長として、9 月 14 日～17 日にスペインのマドリードで開かれる。来年 2018 年 9 月 16～20 日には、Andrea Tenner を会長として Santa Fe で第 27 回 International Complement Workshop (ICW) が開かれる。特別講演を、最近のトピックである神経システムにおける補体に関する役割を明らかにした研究者 Eric Huang 教授と aHUS 研究の第 1 人者である Marina Noris 教授が行う事が決定している。世界遺産にもなっているインディアンのプレプロ住居が美しい Santa Fe での meeting は非常に楽しみである。2020 年の第 28 回 ICW は、ベルリンで行われる事が決定したことを最後に報告する。

[謝辞]

今回、日本補体学会によるサポートにより本 meeting に参加させていただきましたことを感謝いたします。

[利益相反]

著者の COI 開示：講演料（アレクシオンファーマ合同会社）

九州大学病院別府病院 免疫・血液・代謝内科の紹介

堀内 孝彦

九州大学病院別府病院 免疫・血液・代謝内科

我々の研究室では関節リウマチ、膠原病の診療と研究を行っています。その中でも主に TNF の分子機構、補体関連疾患、自己免疫疾患のエピゲノムの研究を行っており、その紹介をさせていただきます。

1. TNF の分子機構と疾患の関連

・関節リウマチにおける TNF 阻害剤の多面的な治療効果の検討

関節リウマチをはじめとする炎症性疾患の治療薬として、複数の TNF 阻害剤が開発され、きわめて高い効果を示しています。作用機序の中心は可溶性 TNF の中和ですが、われわれは TNF 阻害剤が膜型 TNF に作用し、リバースシグナリングを誘導することで膜型 TNF 発現細胞を傷害すること¹⁾、そしてこの作用には製剤間で違いがあることを明らかにしました^{2,3,4)}。TNF 阻害剤は、副作用を含めた臨床効果に製剤間で違いがありますが、この膜型 TNF への作用の違いは、臨床効果の違いをうまく説明できる考えの一つです。

また近年では TNF 阻害剤の 1 つであるアダリムマブが、関節リウマチ患者単球の膜型 TNF の発現を上昇させることで、制御性 T 細胞 (Treg) の増殖を誘導し、治療効果に寄与している可能性が報告されました。私たちは現在関節リウマチ患者において各 TNF 阻害薬における Treg 増殖効果の検討を行い、Treg 増殖効果と TNF 阻害薬への反応性についての検討を行っています。

・TNF 受容体関連周期性症候群 (TNF receptor-associated periodic syndrome: TRAPS) の遺伝子解析

TRAPS は TNF receptor 1 遺伝子 (TNFRSF1A) を原因遺伝子とし、常染色体優性遺伝形式をとる稀

な自己炎症疾患です。自己炎症性疾患とは臨床的には発熱や関節症状などを主体とし、好中球や単球・マクロファージなどの機能亢進により、非特異的な炎症所見を伴います。当科では、全国から紹介された TRAPS 疑い患者の遺伝子解析を行っており、これまでに解析した 169 例についての報告を行っています⁵⁾。今後も研究を進め、TRAPS の病態解明、治療法の開発の理解につなげていきたいと考えています。

2. 補体関連疾患の研究

・遺伝性血管浮腫

遺伝性血管性浮腫 (HAE) は、C1 インヒビター (C1-inhibitor: C1-INH) の先天性異常によって全身のさまざまな部位に発作性の浮腫を生じる遺伝性疾患です。当科では遺伝性血管浮腫の専門外来を行っています。また NPO 法人血管性浮腫情報センター (CREATE、理事長 堀内 孝彦) の活動を通じて C1-INH の遺伝子解析や、患者会「くみーむ」の運営を行っています。

・抗 C1q 抗体と自己免疫疾患の関連

近年 C1q は、補体経路非依存的な免疫調節機能を持つことが知られており、免疫複合体によって誘導される plasmacytoid dendritic cell の IFN α 産生を抑制することなどが報告されています。また抗 C1q 抗体は SLE で高頻度に検出され、特に腎炎と強い関連を認めます。これは抗 C1q 抗体が血清 C1q レベルを低下させることによって IFN α 産生抑制能を低下させることにより IFN signature と呼ばれる interferon-stimulated genes (ISG) の恒常的な発現亢進を誘導していることが想定されます。さらに抗 C1q 抗体は関節リウマチや全身性強皮症といった

SLE 以外の IFN signature を認める疾患との関連も報告されており、血清 C1q 値と抗 C1q 抗体価は複数の自己免疫疾患において IFN signature や病型、疾患活動性と関連することが示唆されています。我々は抗 C1q 抗体価のアッセイ系を確立しており、今後上記の各疾患で測定を行い、病型、疾患活動性、治療反応性や IFN signature との関連を解析する臨床研究を行う予定です。

3. 全身性エリテマトーデス(SLE)におけるヒストン修飾解析

SLE では前述のように IFN signature が病態に深く関与しています。一方 IFN signature 形成とエピゲノム異常との関連が近年示唆されており、我々は、上記の自己免疫疾患の ISG 発現亢進を起こすエピゲノム異常としてヒストン修飾異常に着目して研究を行っています。現在患者免疫細胞を用いてクロマチン免疫沈降を行い、ヒストン修飾レベルについての解析を行っており、将来的にはエピゲノム異常を是正することによる新規薬剤の開発を目標としています。

このように我々は自己免疫疾患、自己炎症性疾患に対して補体関連の研究を含め、様々なアプローチで研究を行っています。

【文献】

- 1) Mitoma H, Horiuchi T, Hatta N, Tsukamoto H, Harashima S, Kikuchi Y, Otsuka J, Okamura S, Fujita S, Harada M. Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF- α . *Gastroenterology*. 128: 376-392 (2005)
- 2) Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Tamimoto Y, Kimoto Y, Uchino A, To K, Harashima S, Hatta N, Harada M. Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab. *Arthritis Rheum* 58: 1248-1257 (2008)
- 3) Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* . 49: 1215-1228 (2010)
- 4) Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Ueda N. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents - Comparison among therapeutic TNF- α antagonists. *Cytokine* 2016 (in press)
- 5) Ueda N, Ida H, Washio M, Miyahara H, Tokunaga S, Tanaka F, Takahashi H, Kusuhara K, Ohmura K, Nakayama M, Ohara O, Nishikomori R, Minota S, Takei S, Fujii T, Ishigatsubo Y, Tsukamoto H, Tahira T, Horiuchi T. Clinical and Genetic Features of Patients With TNFRSF1A Variants in Japan: Findings of a Nationwide Survey. *Arthritis Rheumatol*. 68: 2760-2771 (2016)



・・・編集後記・・・

研究会が一般社団法人日本補体学会として再スタートして早 3 年が経過しました。学会誌「補体」も来年には 5 周年を向かえることになります。これまで寄稿をいただいた先生方、査読にご協力いただいた先生方、そして本誌を支えてくださっている日本補体学会会員であり読者である皆様に深く感謝すると共に、皆様に愛され続ける学会誌であり続ける様に努力していきたいと思っております。今後もこれまでどおり、編集部から、総説や優秀賞受賞演題、教室紹介などの執筆を皆様にお願ひさせていただきます。加えて、是非、皆様からの積極的な投稿もお待ちしております。また、学会員の皆様と築いていく雑誌と考えておりますので、雑誌をより良いものにしていくための学会員の皆様からのご意見をお待ちしております。これからもよろしくお願い致します。

編集委員長

名古屋大学大学院医学系研究科

腎不全システム治療学寄附講座

水野正司

補体 第 54 巻 第 2 号 (2017)

平成 29 年 12 月 20 日 発行

編集委員長 水野正司

発行者 若宮伸隆

発行所 一般社団法人日本補体学会

〒541-8567 大阪府中央区大手前 3-1-69

大阪国際がんセンター研究所 腫瘍免疫学部門内

一般社団法人日本補体学会事務局

Tel & FAX: 06-6314-6802

E-mail: hotai-gakkai@umin.ac.jp

URL: <http://square.umin.ac.jp/compl/index.html>

印刷所 秀光印刷株式会社

〒536-0014 大阪府城東区鴨野西 2 丁目 8-23

TEL: 06-6965-5880 Fax: 06-6965-5881

