

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09502

研究課題名(和文) 抗補体薬の臨床応用に向けた網羅的解析

研究課題名(英文) Exhaustive analysis for clinical application of anti-complement drugs

研究代表者

植田 康敬 (Ueda, Yasutaka)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：30533848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：発作性夜間ヘモグロビン尿症に対して、抗補体薬であるエクリズマブは極めて有効に血管内溶血を阻止し、貧血を改善させるが不応例や効果不十分例もあり、新たな治療薬の開発が待たれている。

我々は新規の候補薬として、抗C5作用を持つ遺伝子組換えダニ唾液タンパク質と環状ペプチド、第2経路の活性化を促進するFactor Dの阻害薬、古典経路阻害薬としてC1-インアクチベーター製剤、またC3阻害薬を入手した。これらを用いてin vitroの評価を行った結果、補体活性化経路のうち第2経路の分子を標的とすることが有効性、安全性から有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Eculizumab, an anti-C5 antibody, effectively blocks complement-mediated intravascular hemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), but some patients show poor response to the drug, and others show insufficient recovery from hemolytic anemia possibly due to extravascular hemolysis manifested by eculizumab. We obtained new candidate drugs for PNH including an anti-C5 recombinant protein secreted in tick saliva, an anti-C5 circular peptide, a Factor D inhibitor, C1-inactivator, and a C3 inhibitor, and tested, in vitro, those efficacy in inhibiting intravascular and extravascular hemolysis. Our data suggest that targeting a molecule in the alternative pathway may be promising in its potency and safety in treating PNH.

研究分野：血液および腫瘍内科学

キーワード：発作性夜間ヘモグロビン尿症 PNH 補体 溶血性貧血 抗補体薬

### 1. 研究開始当初の背景

発作性夜間血色素尿症 (Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, PNH) は後天性の疾患で、貧血、造血不全、血栓症などを特徴とする難病である。GPI アンカー生合成の重要遺伝子である *PIGA* 遺伝子の変異をもった造血幹細胞のクローン性拡大により、GPI アンカー型タンパク質である補体制御因子が欠損した血球が増加する。ヒト血液中には補体と呼ばれるタンパク質が存在し、生体の病原体に対する自然免疫に重要な役割を果たしている。補体は同時にヒト細胞膜を傷害する能力を持っているが、健康者の赤血球膜上では GPI アンカー型タンパク質である補体制御因子 (CD55, CD59) により補体の活性化と膜傷害複合体形成が阻害され、溶血が起こらないように制御されている。PNH 患者では、膜に補体制御因子を発現していない赤血球が多数を占めているため、感染などをきっかけに補体系が活性化され、赤血球膜が傷害されることにより血管内溶血を来す。溶血により貧血やその他の臨床的症状 (血栓症、倦怠感など) が引き起こされると考えられている。従来この溶血発作に対しての特異的な治療薬はなく、患者の生活の質 (Quality of Life: QOL) は大きく損なわれていた。ところが初の抗 C5 補体薬である eculizumab (Soliris, Alexion 社) の登場により、PNH 患者の治療方針は大きく変わった。eculizumab 投与により多くの患者で貧血が改善し、患者 QOL の大幅な改善につながった。現在 eculizumab は、溶血による症状を伴う PNH 患者の第 1 選択薬として多くの患者に恩恵をもたらしているが、一方で eculizumab 投与により貧血が改善しない患者が存在することも明らかとなった。近年そのメカニズムの一端が明らかとなり、補体 C5 の遺伝子多型により eculizumab が C5 に作用しない例 (無効例) が研究分担者の西村、金倉らによって報告された (N Engl J Med 370(7):632-639, 2014)。また、eculizumab の投与患者を調べると、全例で赤血球表面に C3 の蓄積が認められた (Blood 113(17):4094-4100, 2009)。これは C5 以降の反応を eculizumab により阻害したため、補体反応系の上流に位置する C3 が蓄積し、かつ PNH 血球では C3 の分解を制御する補体制御因子が存在しないためと考えられた。このことから、eculizumab 投与にもかかわらず貧血の改善が十分でない患者 (効果不十分例) の中には、脾臓などで C3 を介した血管外溶血を来している例があると考えられた。eculizumab は画期的な治療薬として PNH 患者の QOL を改善しているが、無効例、効果不十分例に対して新たな対策が求められている。

### 2. 研究の目的

PNH 治療において最適な治療標的が補体経路のどこに位置するのかを評価、検討し、複

雑な補体系の解明につなげるのが本研究の目的である。

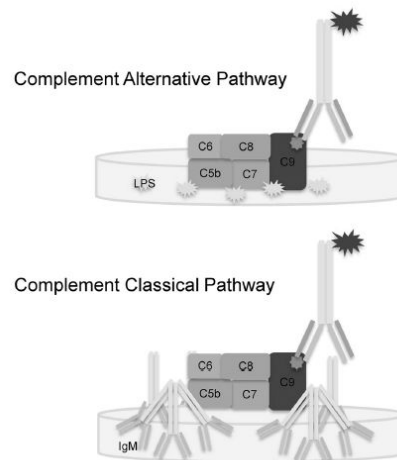
### 3. 研究の方法

(1) 新規抗補体候補薬を共同研究先から入手した。

(2) 補体経路活性化の評価方法の確立。

補体の活性化経路は抗原・抗体反応を起点とした classical pathway、微生物の細胞表面に存在するレクチン・マンナンを起点としたレクチン経路 (MBL pathway)、補体成分 C3 の加水分解により起こる alternative pathway の 3 つが知られている。新規抗補体薬により、どの pathway が影響を受けるかを詳細に解析するため、The Wieslab Complement System Alternative / Classic / MBL Pathway Enzyme ELISA kit (Euro-Diagnostica 社) を用いた。これは従来の赤血球溶血に基づいた実験系ではなく、C5b-9 複合体の形成を定量化することで、補体 alternative, classical, または MBL pathway の活性度を評価した (Blood 118(17):4705-4713, 2011、図 1 参照)。

(図 1)



(3) alternative pathway 活性化による溶血試験

ウサギ赤血球はヒト血清との接触で直ちにヒト血清中の alternative pathway を活性化させることが知られている。ウサギ赤血球を gelatin veronal buffer (GVB) 下に最終濃度が 20% となるようにヒト血清と混和後、各抗補体薬を段階希釈し加えた。37 で 1 時間反応させた後遠心分離した上清を、分光光度計を用いて (波長 415nm) 計測した (Blood 78(3):820-9, 1991)。抗補体薬を加えなかったものを 100% 溶血、加熱 (65、30 分) により非働化した血清を用いたものを 0% 溶血として溶血率を評価した。

PNH 赤血球を用いる場合は、生理食塩水で洗浄した PNH 患者赤血球を、ABO 血液型一致の健康者血清 (3 人以上の血清をプールしたもの) でヘマトクリットが 2% となるように希

積し、alternative pathway が活性化するように希塩酸で酸性化 (pH 6.7-6.9) し、37 で 24 時間反応させたのち、上清を分光光度計を用いて (波長 415nm) 計測した。抗補体薬を加えなかったものを 100% 溶血、加熱 (65、30 分) により非働化した血清を用いたものを 0% 溶血として溶血率を評価した。

(4) alternative pathway 活性化時の PNH 赤血球への C3 蓄積の評価  
 (3) の溶血試験で残存した PNH 赤血球を回収し、蛍光標識した抗 CD55、CD59 抗体と蛍光標識した抗 C3 抗体 (Abcam 社: Ab14396) で標識し、FACS flow で計測した (Blood, 2012 Jun 28; 119(26): 6307-16)。この抗体は、C3b とその分解産物である iC3b と C3dg の両方に反応することが報告されている (Blood 119(26): 6307-6316, 2012)。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規抗補体薬の入手

抗 C5 薬としてエクリズマブ、遺伝子組換えダニ唾液タンパク質と環状ペプチド、alternative pathway の活性化を促進する Factor D の阻害薬、古典経路阻害薬として C1-インアクチベーター製剤、また C3 阻害薬として Compstatin を入手した。

##### (2) 補体経路活性化の評価方法の確立

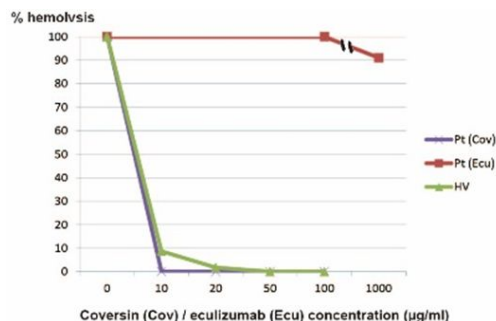
補体活性化における古典経路、alternative pathway、レクチン経路の各経路の活性化を評価するために、The Wieslab Complement System の ELISA Kit を用いた。抗 C5 薬はいずれの経路も阻害し、Factor D 阻害薬は alternative pathway を阻害し、C3 阻害薬は全ての経路を阻害することが判明した。

ウサギ赤血球を用いて補体による溶血を評価する系を確立した。12 週齢以上、体重 3kg 以上のニュージーランドホワイトウサギ個体より無菌的に採取した赤血球を用いると、少なくとも 3 週間は再現性のある安定したヒト血清による溶血結果を得ることが出来た。これにより C1 インアクチベーター製剤以外は良好な溶血阻止効果を得た。エクリズマブは高濃度下でも約 20% の残存する溶血を認めたと、Factor D 阻害薬、C3 阻害薬はいずれも残存する溶血の程度は低かった。

抗補体薬の投与を受けていない PNH 患者の赤血球と、ABO, Rh 型を一致させたヒト血清を用い、塩酸を用いた酸性化により alternative pathway を活性化することで、in vitro での溶血を評価する系を確立した。ヒト血清には健常者、PNH 患者、エクリズマブ不応の PNH 患者血清を用いた。

遺伝子組換えダニ唾液タンパク質 (Coversin) はエクリズマブ不応の患者血清においても PNH 赤血球の溶血を有効に阻止した。(図 1: HV; 健常者血清, Pt; エクリズマブ不応患者血清, Ecu; エクリズマブ, Cov; Coversin)

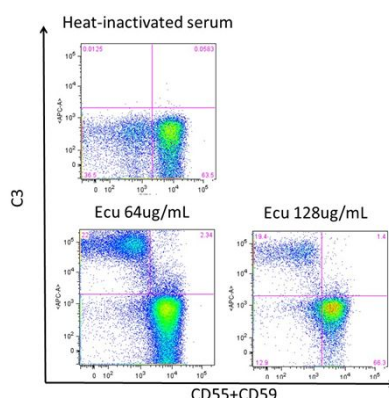
(図 1)



同様に環状ペプチド、Factor D 阻害薬でも溶血阻止効果を認めたと、C1-インアクチベーター - 阻害薬では十分な溶血阻止効果が認められなかった。

PNH 赤血球上の C3 の蓄積を評価する系を確立した。エクリズマブを投与していない PNH 患者の赤血球は通常 C3 の蓄積は認められないが、試験管内でエクリズマブを含む血清で incubation すると、PNH 赤血球上に C3 の蓄積が認められた。(図 2: Ecu: エクリズマブ、陰性コントロールには加熱により不活化した血清を使用した) Factor D 阻害薬、C3 阻害薬ではこうした C3 の蓄積は認められなかった。

(図 2)



##### (3) PNH における最適な治療標的の評価

上記の実験から、C3 阻害薬は血管内溶血を阻止するのみならず、PNH 赤血球への C3 蓄積を来さないことで血管外溶血を阻止することも期待された。しかし C3 は全補体活性化経路の結節点となるため、これを抑えることは、全補体経路に影響するため感染増加などのリスクが懸念された。一方 Factor D 阻害薬は、血管内溶血と同時に血管外溶血を阻止する点で C3 阻害薬と同等の効果が期待できるが、作用機序から古典経路、レクチン経路の補体活性化経路が保持されるため、感染防御の点からより安全性が高い可能性があると考えられた。以上より PNH に対する次世代抗補体薬として、alternative pathway を標的とすることが有望である可能性が示唆された。

#### 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 12 件)

Ueda Y, Obara N, Yonemura Y, Noji H, Masuko M, Seki Y, Wada K, Matsuda T, Akiyama H, Ikezoe T, Chiba S, Kanda Y, Kawaguchi T, Shichishima T, Nakakuma H, Okamoto S, Nishimura JI, Kanakura Y, Ninomiya H. Effects of eculizumab treatment on quality of life in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. Int J Hematol. 2018 Jun;107(6):656-665. 査読有り、doi: 10.1007/s12185-018-2409-3.

植田 康敬、西村 純一、PNH 診療の参照ガイド改訂の要旨、PNH フロンティア (4) 36-42、2017、査読無し

植田 康敬、補体活性化 alternative pathway を標的とする小分子 D 因子阻害薬、PNH フロンティア(4)68, 2017 査読無し

植田 康敬、「補体」シリーズ(第4回)補体とPNH、シュネラー(104)33-38、2017、査読無し

植田 康敬、西村 純一、発作性夜間血色素尿症：病態と治療の最前線、日本内科学会雑誌 104(7), 1397-1404, 2015 査読無し

〔学会発表〕(計 9 件)

植田 康敬、高森 弘之、大里 真幸子、西村 純一、金倉 譲、発作性夜間ヘモグロビン尿症の治療におけるエクリズマブ時代の新たな課題、第54回日本補体学会学術集会、2017年、福島

Ueda Y, Nishimura J, Kanakura Y, et al., The First Follow-up Data analysis of Patients with Acquired Bone Marrow Failure Harboring a Small Population of PNH-Type Cells in the Japanese, Multicenter, Prospective Study Optima., The American Society of Hematology 58<sup>th</sup> Annual Meeting, 2016, San Diego, U.S.A.

Ueda Y, Nishimura JI, Kanakura Y, et al., Coversin Blocked in Vitro Hemolysis in an Eculizumab-Resistant PNH Patient with the C5 Polymorphism (c.2654G>A), The American Society of Hematology 57<sup>th</sup> Annual Meeting, 2015, Orlando, U.S.A.

〔図書〕(計 3 件)

植田 康敬、西村 純一(金倉 譲編)最新ガイドライン準拠 血液疾患 診断・治療指針、中山書店、2015年、560(180-185)

植田 康敬、西村 純一、ブラッシュアップ骨髄不全、中外医学社、2015年、193(148-157)

植田 康敬、西村 純一(金倉 譲編)発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH) 医薬ジャーナル社、2015年、239(174-181, 226-236)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hematology.pro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 康敬(UEDA, Yasutaka)  
大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)  
研究者番号：30533848

(2) 研究分担者

西村 純一(Nishimura, Jun-ichi)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80464246

金倉 譲(Kanakura, Yuzuru)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20177489

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし