

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09904

研究課題名(和文)発作性夜間ヘモグロビン尿症の病態成立機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

研究代表者

高森 弘之(Takamori, Hiroyuki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80792077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：発作性夜間ヘモグロビン尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria:PNH)は様々なマウスモデルの実験からも、後天的な幹細胞疾患とされている。我々は本邦初となる家族内発症のPNH患者の検体を用いて、全エクソーム解析およびターゲットディープシーケンシングによる遺伝子解析を行ったが、家族内で病態成立機序に關与することを示唆する遺伝子変異は同定できなかった。本症例は極めてまれであるが、家族内でそれぞれ孤発的にPNHを発症した可能性が高く、PNHは後天性疾患であるという従来からの理解は、本症例の遺伝子検査結果からも支持されると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PNHの主たる原因は、PIGA(Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A)遺伝子を始めとした、GPI(glycosylphosphatidylinositol)アンカー型蛋白質の生合成に關わる遺伝子の変異である。PIGAノックアウトマウスは胎生致死を来すため、PNHは後天性疾患であるとされてきた。本症例の遺伝子解析でも親子で異なるPIGA遺伝子変異を認めており、PNHにおいてもPIGA遺伝子変異が遺伝する可能性は極めて低いことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is considered to be an acquired stem cell disease based on series of experiments including those using mouse models. We performed whole exome sequencing and targeted deep sequencing for intrafamilial PNH patients for the first time in Japan. However, we could not identify gene mutations that might be involved in the etiology of PNH in intrafamilial pair. Based on the above, it is highly possible that these cases have developed sporadic PNH in a parent and a child, and the results further support the conventional understanding that PNH is an acquired disease.

研究分野：血液学

キーワード：発作性夜間ヘモグロビン尿症 血液 PNH 骨髓不全症 bone marrow failure

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

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria:PNH) は溶血性貧血、血栓症、骨髓不全を3徴とする後天性クローン性疾患である。PNHの病態成立には、1) 造血幹細胞において *PIGA* (*Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A*) 遺伝子を始めた、GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型蛋白質の生合成に関わる遺伝子変異による、GPI アンカー蛋白質を欠損した PNH クローンの出現と、2) 付加的機序によるこの PNH クローンの拡大、の2ステップが必要であると考えられている。PNH 血球では蛋白質の1種である GPI アンカー型蛋白質の発現が欠損するが、補体制御因子である CD55 や CD59 もこの GPI アンカー型蛋白質に属するため、感染などで補体が活性化すると、これらを欠損する PNH 血球は補体に傷害され血管内溶血を来す。これまで、この PNH 溶血に対する有効な治療法はなかったが、近年、エクリズマブなどの抗補体薬が開発され、PNH 患者の溶血発作とそれに伴う合併症や血栓症が改善され、QOL の大幅な改善がもたらされた (Int J Hematol 93(1):36-46,2011)。しかしながら抗補体薬はあくまで対症療法であり、根治療法ではない。PNH の根治療法開発に迫るためには、PNH の病態成立機序の解明が求められる。

### 2. 研究の目的

申請者は、本邦初となる家族内発症の PNH 症例を経験した。*PIGA* ノックアウトマウスは胎生致死を来すため、PNH は後天性クローン疾患とされている。申請者は、この親子で PNH が遺伝しているのであれば、以下のような仮説が成り立つと考えた。仮説 1: 生殖細胞変異に GPI 生合成に関わる *PIGA* 遺伝子以外 (*PIGX*) の変異 (*mPIGX*) が存在し、体細胞変異に對側のアレルへの遺伝子変異 (*m'PIGX*) が存在する。PNH クローン拡大に関わる遺伝子変異 (*growth advantage: GA*) が同時に存在する可能性もある。仮説 2: 生殖細胞変異に PNH クローン拡大に関する遺伝子変異が存在し、体細胞変異に *PIGA* 遺伝子変異 (*mPIGA*) が存在する。仮説 2 に関しては、PNH クローン拡大に関する遺伝子変異が dominant に働くかどうかで、体細胞変異にも存在している可能性もある。本研究の目的はこれらの症例に対して、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析を行うことにより上記仮説を検証し、PNH 病態成立機序に関する新たな知見を得ることである。

表 1 親子間 PNH 発症機序における作業仮説

	生殖細胞	体細胞
仮説 1	<i>mPIGX/PIGX</i>	<i>mPIGX/ m'PIGX + GA</i>
仮説 2	<i>GA</i>	<i>GA + mPIGA</i>

### 3. 研究の方法

家族内で PNH を発症した親子から、血液細胞および口腔粘膜細胞を得た。血液細胞はフローサイトメトリーを使用し、PNH 血球と正常血球にソーティングを行った。それぞれの細胞に対して、全エクソーム解析を行った。まずは *PIGA* 遺伝子変異が存在するのか、もしくはその他の GPI アンカー型蛋白質の生合成に関与する遺伝子変異が存在するのかを確認した。*PIGA* 遺伝子変異が存在した場合には PNH 血球、正常血球、口腔粘膜細胞の比較から生殖細胞変異と PNH 血球特有の体細胞変異に分類し、PNH クローンの拡大に関与する遺伝子変異の抽出を試みた。

### 4. 研究成果

家族内で PNH を発症した親子 (母、息子) から、口腔粘膜および末梢血液検体 (顆粒球 PNH クローンの) の DNA を採取し、全エクソーム解析を行った。まず仮説 1 を検証した。両者に *PIGA* 変異を認めしたが、母は c.984delT、息子は c.229 C>T、c.1260 C>A と異なることがサンガー法およびターゲットディープシーケンスでも確認され、仮説 1 は否定的であった。次に仮説 2 (PNH クローンの拡大に関わる遺伝子変異の共有) について検証を行った。まずは、*HMGA2* などの PNH クローン拡大に関与する遺伝子変異や、その他の骨髓腫瘍に関わる既報の遺伝子変異の有無を確認したが、いずれも認めなかった。次に、PNH クローンのみが増殖優位性を獲得すると考えられることから、がん抑制遺伝子に生じる 2 ヒットセオリーを参考に、胚細胞変異に 1 ヒット、そして PNH クローンのみに 2 ヒット目として体細胞変異が生じている遺伝子を抽出した。*MADCAM1*、*MAGEC1*、*PRB4*、*SSC5D*、*TPSD1* が抽出されたが、現時点ではいずれの遺伝子もクローン拡大への関与が示唆されるような報告はなかった。また仮説 3 として、クローンの拡大以外の PNH の病態成立機序が遺伝している可能性を考えた。母・息子での発症では常染色体優性遺伝の形式をとると考えられ、ヘテロ接合変異を含む胚細胞変異をすべて確認した。*ANKRD61*、*ZDHHC16*、*AGXT* など truncating な変異が生じている遺伝子も確認されたが、いずれも既報からは PNH の病態成立に関与している可能性は低いと考えられた。PNH は極

めて稀な疾患であるが、本症例においては、孤発例が偶然家族内で発症した可能性が高いと考えられ、既報のマウスモデルの実験同様、PNH の病態成立機序は後天的であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakurai Masatoshi, Jang Jun Ho, Chou Wen-Chien, Kim Jin Seok, Wilson Amanda, Nishimura Jun-ichi, Chiou Tzeon-Jye, Kanakura Yuzuru, Lee Jong Wook, Okamoto Shinichiro	4. 巻 110
2. 論文標題 Comparative study on baseline clinical characteristics of Asian versus non-Asian patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 411 ~ 418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02699-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hochsmann Britta, Murakami Yoshiko, Osato Makiko, etc.	4. 巻 129
2. 論文標題 Complement and inflammasome overactivation mediates paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with autoinflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 5123 ~ 5136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI123501	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Schols Saskia, Nunn Miles A., Mackie Ian, Weston Davies Wynne, Nishimura Jun ichi, Kanakura Yuzuru, Blijlevens Nicole, Muus Petra, Langemeijer Saskia	4. 巻 188
2. 論文標題 Successful treatment of a PNH patient non responsive to eculizumab with the novel complement C5 inhibitor coversin (nomacopan)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 334 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16305	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura J, Kinoshita T, and Kanakura Y.	4. 巻 1
2. 論文標題 Clinical effects of eculizumab in PNH: Poor responders. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 From bench to bedside	6. 最初と最後の頁 297 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-4-431-56003-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yasutaka, Obara Naoshi, Yonemura Yuji, etc.	4. 巻 107
2. 論文標題 Effects of eculizumab treatment on quality of life in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 656 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2409-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosokawa Kohei, Sugimori Chiharu, Ishiyama Ken, Takamatsu Hiroyuki, Noji Hideyoshi, Shichishima Tsutomu, Obara Naoshi, Chiba Shigeru, Ninomiya Haruhiko, Shirasugi Yukari, Nakamura Yoshihiko, Ando Kiyoshi, Ueda Yasutaka, Yonemura Yuji, Kawaguchi Tatsuya, Nishimura Jun-ichi, Kanakura Yuzuru, Nakao Shinji	4. 巻 97
2. 論文標題 Establishment of a flow cytometry assay for detecting paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells specific to patients with bone marrow failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2289 ~ 2297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-018-3443-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R?th Alexander, Maciejewski Jaroslaw, Nishimura Jun-Ichi, Jain Deepak, Weitz Jeffrey I.	4. 巻 101
2. 論文標題 Screening and diagnostic clinical algorithm for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Expert consensus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 3 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejh.13059	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hiroyuki Takamori, Yasutaka Ueda, Makiko Osato, Satoru Hayashi, Junichi Nishimura, Yuzuru Kanakura
2. 発表標題 An optimal management of PNH patients on anti-C5 antibody
3. 学会等名 第80回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植田 康敬、堀田 真希、小林 渉、高森 弘之、西村 純一、日高 洋、金倉 譲
2. 発表標題 抗補体薬C5治療下のPNH患者における尿中ヘモジデリン検出の有用性
3. 学会等名 第80回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasutaka Ueda, Hiroyuki Takamori, Jun-Ho Jang, Chezi Ganzel, Saskia Langemeijer, Makiko Osato, Petra Muus, Jong-Wook Lee, Jun-Ichi Nishimura and Yuzuru Kanakura
2. 発表標題 Current Status and Optimal Management of Eculizumab Poor-Responders Due to C5 Polymorphisms
3. 学会等名 ASH - 60th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishimura J
2. 発表標題 Future Therapeutic Strategies in PNH.
3. 学会等名 9th International Hematologic Malignancies Conference BTG 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村純一
2. 発表標題 補体を標的とする治療の現状と展望 S-3: 発作性夜間ヘモグロビン尿症
3. 学会等名 第55回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名	R&#246;th A, Nagy Z, de Latour RP, Ninomya H, Panse J, Yoon SS, Egyed M, Ichikawa S, Ito Y, Kim JS, Schrezenmeier H, Sica S, Usuki K, Sostelly A, Higginson J, Dieckmann A, Anzures-Cabreras J, Shinomiya K, Klughammer B, Jahreis A, Bucher C, Nishimura J
2 . 発表標題	Long Term Follow-Up of PNH Patients Treated with the Smart Anti-hC5 Antibody (SKY59/Ro7112689) in the Open Label Extension (OLE) of the Composer Trial.
3 . 学会等名	The 24th European Hematology Association
4 . 発表年	2019年

1 . 発表者名	Ueda Y, Hosokawa K, Ishiyama K, Takamori H, Yonemura Y, Obara N, Noji H, Takahashi H, Shirasugi Y, Matsuda T, Ando K, Shichishima T, Ikezoe T, Chiba S, Ninomiya H, Kawaguchi T, Nishimura J, Kanakura Y, Nakao S
2 . 発表標題	The Relationship Between The Pretreatment Pnh Clone Size And Clinical Course In Patients With Bone Marrow Failure Syndromes: Interim Analysis Of Japanese Multicenter Prospective Study.
3 . 学会等名	The 24th European Hematology Association
4 . 発表年	2019年

1 . 発表者名	Hill A, Piatek CI, de Latour RP, Wong LLL, Wells RA, Brodsky RA, Kim JS, Nishimura J, Kuriakose P, Pavani R, Liu P, Ortiz S, Schrezenmeier H, Lee JW, Kulasekararaj A
2 . 発表標題	Breakthrough Hemolysis in Adult Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Treated with Ravulizumab: Results of a 52-Week Extension from Two Phase 3 Studies.
3 . 学会等名	The American Society of Hematology 61th Annual Meeting
4 . 発表年	2019年

1 . 発表者名	Sostelly A, Buatois S, Soubret A, Winter E, Klughammer B, Hsu JC, Jordan G, Bucher C, Charoin JE, Gotanda K, Shinomiya K, Nagy Z, Panse JP, Yoon SS, de Latour RP, Nishimura J, R&#246;th A
2 . 発表標題	Exposure-Response Relationship of the SMART-Ig Anti-hC5 Antibody Crovalimab (SKY59): Results from the Umbrella Phase 1/2 Composer Trial in Healthy Volunteers and PNH Patients.
3 . 学会等名	The American Society of Hematology 61th Annual Meeting
4 . 発表年	2019年

1. 発表者名 A, Maciejewski J, Nishimura J, Jain D, Weitz J
2. 発表標題 Development of a screening and diagnostic algorithm for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using modified delphi panel.
3. 学会等名 22nd Congress of the European Hematology Association
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高森弘之, 大里真幸子, 植田康敬, 西村純一, 金倉 謙
2. 発表標題 遺伝子多型と抗体医薬の反応性
3. 学会等名 第54回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村純一, 高森弘之, 大里真幸子, 林悟, 植田康敬, 金倉 謙
2. 発表標題 発作性夜間ヘモグロビン尿症に対するエクリズマブ治療時代の新たな課題
3. 学会等名 第54回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 植田康敬, 高森弘之, 西村純一, 金倉 謙, 中尾眞二
2. 発表標題 造血不全疾患における微少PNHクローンの臨床的意義 OPTIMA中間解析報告
3. 学会等名 第54回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 植田康敬, 高森弘之, 大里真幸子, 西村純一, 金倉 謙
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第54回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村純一
2. 発表標題 エクリズマブ時代のPNHと血栓症
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高森弘之, 植田康敬, 大里真幸子, 西村純一, 金倉 謙
2. 発表標題 遺伝子多型と抗体医薬の反応性
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 西村純一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 血液内科	5. 総ページ数 6
3. 書名 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) 診療の最前線	

1. 著者名 西村純一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2
3. 書名 発作性夜間ヘモグロビン尿症. 今日の治療指針 2019	

1. 著者名 高森弘之, 植田康敬, 西村純一	4. 発行年 2017年
2. 出版社 最新医学社	5. 総ページ数 13
3. 書名 発作性夜間ヘモグロビン尿症. 診断と治療のABC 125(別冊号)	

1. 著者名 高森弘之, 植田康敬, 西村純一.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医薬ジャーナル	5. 総ページ数 8
3. 書名 発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)に対する抗補体薬療法の現状と展望	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植田 康敬  (Ueda Yasutaka)  (30533848)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	
研究分担者	西村 純一  (Nishimura Junichi)  (80464246)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	

