

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591123

研究課題名（和文） 発作性夜間血色素尿症に対する RNA アプタマーを用いた分子標的療法の開発

研究課題名（英文） Development of target therapeutic for PNH using RNA aptamer

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）に対する安全で有効な治療法の確立をめざして、ヒト C8 および C9 を標的に SELEX 法を用い RNA アプタマーの選別を開始し、C8 アプタマーは SELEX 4 ラウンド後の C8-4-101 クローンで 15nM の Kd と 74% の Bmax を、C9 アプタマーは SELEX 16 ラウンド後の C9-16-8 クローンで 3nM の Kd と 67% の Bmax を有し、既知の C5 アプタマーと同等またはそれ以上の溶血抑制活性を認めた。今後の臨床への応用が十分期待される結果であった。

研究成果の概要（英文）：To develop safe and effective therapy inhibiting complement mediated hemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), high affinity nuclease-resistant RNA aptamers that bind specifically to C8 or C9 were identified using SELEX methodology. C8-4-101 aptamer clone bound C8 with a Kd of 15nM and a Bmax of 74% and C9-16-8 aptamer clone bound C9 with a Kd of 3nM and a Bmax of 67%, with inhibiting hemolytic activity similar to or greater than control (C5 aptamers). The development of blocking RNA aptamers, using the SELEX procedure against terminal complement proteins C8 or C9, represents a novel potential therapeutic option for PNH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、RNA アプタマー、補体、溶血、SELEX

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 補体溶血治療薬の開発

発作性夜間ヘモグロビン尿症（paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH）は、血管内溶血、造血不全、血栓症を主徴とする後天性クローン性造血幹細胞疾患である。PNH患者

の赤血球では補体制御因子である CD55 や CD59 が欠損するために、補体の活性化に伴い血管内溶血が起こり、ヘモグロビン尿をきたす。抗マウスヒト化 C5 抗体 eculizumab (Soliris, Alexion 社) は補体第 5 成分 (C5) のエピトープを認識するヒト化モノクロー

ナル抗体で、C5 分子と結合することによって、C5 転換酵素の作用を阻害し、炎症性メディエータである C5a の放出を阻害するとともに、C5b (膜侵襲蛋白) に引き続く膜破壊性の C5b-9 複合体の生成を阻害する。臨床試験の成績から、補体阻害剤が PNH 溶血のコントロールに有効であることが示され、欧米諸国では承認に至っている。

C5 の先天性欠損症では、再発性ナイセリア感染症を繰り返すので、長期に C5 を抑制することは同様の危険性を伴うことが懸念される。一方、C9 の先天性欠損症患者は、一般的に健常である。また、C9 欠損症を伴った PNH 患者では、赤血球のほとんどが PNH 型血球であるにもかかわらず溶血症状をほとんど伴わず、30 年にわたり良好な経過を得ていることから、PNH 溶血の治療には終末分子 (C8 もしくは C9) を標的にするのが最良であると考えられる。

## (2) RNA アプタマー

アプタマーは、20-40ヌクレチドのランダム配列 RNA ライブラリーから、特定の標的に対して強い親和性と特異性を持つ分子を、試験管内で選択・増幅のサイクルを繰り返す SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法によって得られる (図 1)。アプタマーの二次構造は、ヘアピン、ステムバルジ、G カルテットなど比較的単純な構造に見えるが、その 3次元構造は標的特異的であり、自然界のリガンドより強い結合力をもつものが得られることもある。既に、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対するアプタマーが実用化されている。

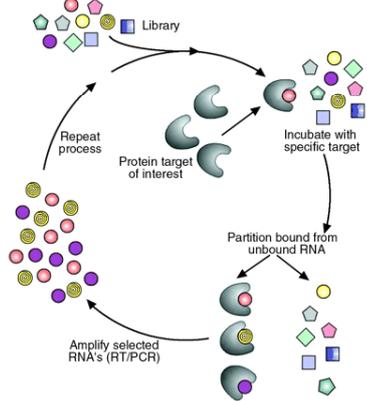


図 1 RNA Aptamer SELEX 法

## 2. 研究の目的

C5 は溶血のみならず、炎症反応の調節や生体防御反応に重要であり、長期にわたる抑制は感染症等の有害事象の危険を伴う。1) PNH 溶血では CD59 (C9 を阻害) が、CD55 (DAF)

に比し重要であること、2) C1-C8 の先天性欠損症患者では免疫複合体病様症状や重症感染症を繰り返すのに対し、C9 先天性欠損症患者は健常であること、3) C9 欠損症を伴った PNH 患者では、赤血球のほとんどが PNH 血球であるにもかかわらず溶血を伴わないことから、PNH 溶血の治療には C8 ないしは C9 を標的にするのが最適と考えられるので、それらに阻害活性を持つ RNA アプタマーを開発することにより、より安全で有効な治療法の確立をめざした。

## 3. 研究の方法

### (1) SELEX 法 (アプタマー選別)

図 1 に示すように、RNA アプタマーライブラリーと標的分子 (C8、C9) を反応させ、標的蛋白と結合した分子のみを分離し、RT-PCR にて増幅した後、in vitro で RNA に転写するというサイクルを繰り返す。数ラウンドの後 (通常 8-12)、選別された RNA リガンドをシーケンスし、標的蛋白に対する結合力と阻害活性を測定する。

### (2) 結合試験 (Binding Assay)

標的蛋白と  $\gamma^{32}$  にて末端標識した RNA アプタマーを反応させた後、RNA 蛋白複合物をニトロセルロース (標的蛋白とそれに結合しているアプタマーが吸着される) とナイロンメンブラン (蛋白、DNA、RNA すべてが回収される) にドットプロットし、それぞれの放射活性を測定し結合率を計算する。

### (3) 溶血試験 (Hemolytic Assay)

EA (抗体付着ヒツジ赤血球) と標的補体成分除去血清に希釈系列標的補体成分を加えて、50-80%溶血を誘導する標的補体分量を決定する。上記の条件を 100%溶血活性とし、RNA アプタマーを加えその溶血阻止活性を算出する。

## 4. 研究成果

### (1) C8 アプタマーの選別

4-7 ラウンド後のアプタマーをクローン化し、溶血試験にて溶血抑制活性を調べたところ、4-101 クローンは 250nM にて 92% の溶血抑制活性を示した (図 2)。

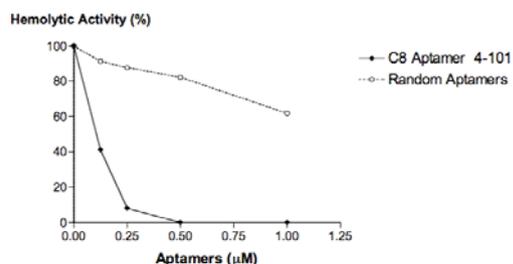


図 2 C8 アプタマーの溶血抑制

4-101 クロオンは、74%の Bmax と 15nM の Kd を有していた (図 3)。

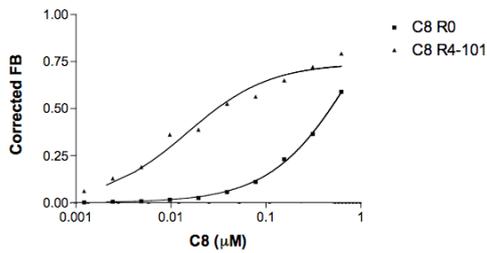
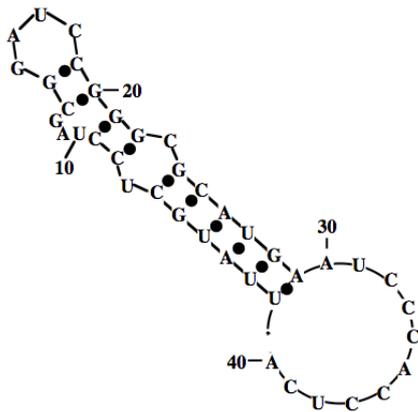


図 3 C8 アプタマーの結合曲線



推定される 2 次構造を図 4 に示す。

図 4 C8 アプタマーの予測 2 次構造

### (2) C9 アプタマーの選別

16 ラウンド後のアプタマーをクローン化し、溶血試験にて溶血抑制活性を調べたところ、16-8 クロオンは 125nM にて 85%の溶血抑制活性を示した (図 5)。

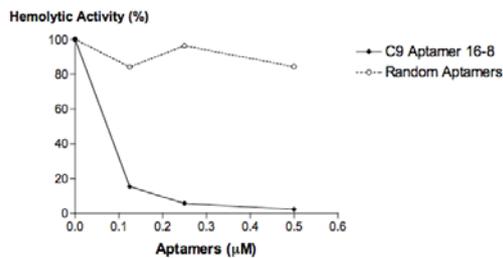


図 5 C9 アプタマーの溶血抑制

16-8 クロオンは、67%の Bmax と 3nM の Kd を有していた (図 6)。

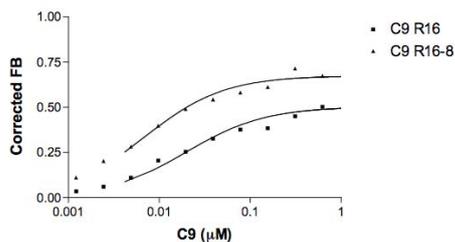


図 6 C9 アプタマーの結合曲線

推定される 2 次構造を図 7 に示す。

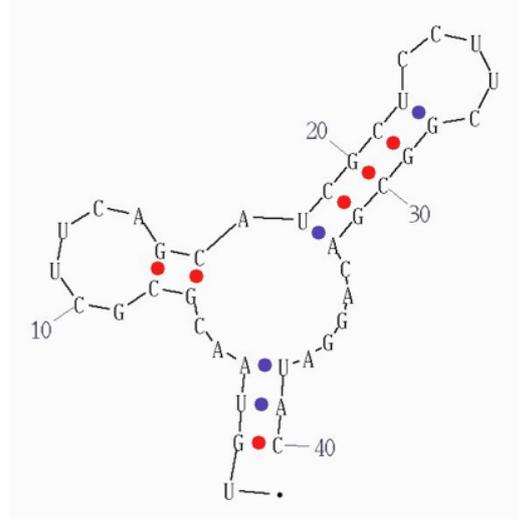


図 7 C9 アプタマーの予測 2 次構造

### (3) まとめ

以上の結果は、今後の臨床への応用が十分期待されるものであった。2010 年に本邦においてもエクリズマブが承認されたが、C3b による赤血球膜のオプソニン化と血管外溶血の顕在化という新たな問題が発生し、十分な貧血の改善につながらない症例が存在する。C5 を標的とするより C8/C9 を標的にした方が感染症のリスクは軽減できると考えられるものの、補体終末成分を阻害するこれらの治療法では、最終的に C3b による赤血球膜のオプソニン化と血管外溶血が顕在化するという新たな問題も判明した。

### 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 14 件)

- ① Kanakura Y (1 番目), Nishimura J (10 番目), 他 14 名. Safety and efficacy of the terminal complement Inhibitor Eculizumab in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: The AEGIS clinical trial. *Int J Hematol.* 93:36-46, 2011. 査読有
- ② 西村純一. 発作性夜間ヘモグロビン尿症. *Medicament News.* 2046:6-7, 2011. 査読無
- ③ Kanakura Y (7 番目), 他 7 名. A potential role for α-actinin in inside-out αIIbβ3 signaling. *Blood.* 117:250-258, 2011. 査読有
- ④ 西村純一, 金倉譲. 発作性夜間ヘモグロビン尿症の病態と治療. *日本医事新報.* 4520:45-49, 2010. 査読無

- ⑤ 西村純一. 発作性夜間血色素尿症に対するエクリズマブ療法. *血液フロンティア*. 20:41-47, 2010. 査読無
- ⑥ Kanakura Y (11 番目), 他 10 名. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1. *J Biol Chem*. 285:31774-31782, 2010. 査読有
- ⑦ 西村純一. 溶血性貧血と QOL. *血液フロンティア*. 13:11-18, 2009. 査読無
- ⑧ Kanakura Y (8 番目), 他 7 名. The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice. *Blood*. 113:2914-2923, 2009. 査読有
- ⑨ 西村純一. 米国における RNA アプタマーによる創薬の現状. *実験医学*. 26:199-204, 2008. 査読無
- ⑩ 西村純一, 弘田稔幸. 発作性夜間血色素尿症の新規治療薬. *総合臨床*. 57:643-646, 2008. 査読無
- ⑪ 西村純一, 金倉譲. 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH). *日本臨床*. 66:490-496, 2008. 査読無
- ⑫ 西村純一, 金倉譲. 発作性夜間血色素尿症の治療. *Mebio*. 25:37-43, 2008. 査読無
- ⑬ Kanakura Y (10 番目), 他 9 名. Soluble frizzled-related protein 1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis. *J Immunol*. 181:6061-6072, 2008. 査読有
- ⑭ Kanakura Y (12 番目), 他 11 名. AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells. *J Biol Chem*. 283:30045-30056, 2008. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ① 西村純一. PNH の診断とマネージメント. 第 50 回日本血液学会春季北海道地方会 ランチョンセミナー. 2011. 3. 12. 岡山
- ② Murakami Y, Nishimura J (5 番目), Kanakura Y (6 番目), 他 5 名. Expression of HMGA2 in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The American Society of Hematology 52nd Annual meeting*. 2010. 12. 4-7. Orlando, USA
- ③ 西村純一. 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) と補体: 日本人 PNH 患者に対するソリリスの有効性および安全性: AEGIS 試験&継続投与試験. 第 47 回補体シンポジウム ランチョンセミナー. 2010. 9. 10-11. 福島
- ④ 西村純一. 血液難病の制御: 発作性夜間ヘモグロビン尿症に対する新規治療薬エクリズマブの開発. 第 93 回近畿血液学地方会 シンポジウム. 2010. 6. 19. 大阪
- ⑤ Kanakura Y (1 番目), Nishimura J (10 番目), 他 13 名. Fatigue and impaired quality of life in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is associated with hemolysis, but not with anemia. *15th Congress of the European Hematology Association*. 2010. 6. 10-13. Barcelona, Spain.
- ⑥ Kanakura Y (1 番目), Nishimura J (10 番目), 他 13 名. Chronic renal insufficiency in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): Improvement with Eculizumab treatment in the long-term follow-up of the AEGIS study. *The American Society of Hematology 51st Annual meeting*. 2009. 12. 5-8. New Orleans, USA
- ⑦ Murakami Y, Nishimura J (5 番目), Kanakura Y (6 番目), 他 5 名. Wnt pathway is upregulated in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The American Society of Hematology 51st Annual meeting*. 2009. 12. 5-8. New Orleans, USA
- ⑧ Kanakura Y (1 番目), Nishimura J (10 番目), 他 13 名. Safety and efficacy of Eculizumab in Japanese PNH patients: AEGIS phase II clinical study results. 第 71 回日本血液学会学術総会. 2009. 10. 23-25. 京都
- ⑨ 金倉譲. PNH の診断と治療. 第 71 回日本血液学会総会 教育講演. 2009. 10. 23-25. 京都
- ⑩ Murakami Y, Kanakura Y (3 番目), Nishimura J (4 番目), 他 5 名. 発作性夜間血色素尿症患者における HMGA2 の発現について. 第 71 回日本血液学会学術総会. 2009. 10. 23-25. 京都
- ⑪ 西村純一. PNH の四方山話 (Inside Story). 第 44 回日本血液学会春季北海道地方会 特別講演. 2009. 4. 18. 旭川
- ⑫ 金倉譲. 発作性夜間血色素尿症の病態と治療. 第 106 回日本内科学会総会・講演会 教育講演. 2009. 4. 10-12. 東京
- ⑬ Kanakura Y (1 番目), Nishimura J (10 番目), 他 13 名. Safety and efficacy of the terminal complement Inhibitor Eculizumab in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Aegis phase II clinical study results. *The American Society of Hematology 50th Annual meeting*. 2008. 12. 6-9. San Francisco, USA

- ⑭ Murakami Y, Nishimura J (5 番目), Kanakura Y (6 番目), 他 5 名.  
Expression of HMGA2 in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **The American Society of Hematology 50th Annual meeting.** 2008.12.6-9. San Francisco, USA
- ⑮ Burnette AD, Nishimura J (2 番目), 他 6 名. RNA aptamer therapy for vaso-occlusion in sickle cell disease. **4th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society.** 2008.10.15-18. Boston, USA
- ⑯ 西村純一. 発作性夜間ヘモグロビン尿症の新規治療法の開発、**第 70 回日本血液学会総会** コーポレートセミナー. 2008.10.10-12. 京都
- ⑰ Murakami Y, Nishimura J (4 番目), Kanakura Y (5 番目), 他 4 名.  
Expression of HMGA2 in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **XXII International Complement Workshop.** 2008.9.28-10.2. Basel, Switzerland

[図書] (計 5 件)

- ① 植田康敬、西村純一. 中外医学社. *Annual Review 血液 2011*. 2011, pp65-72
- ② 西村純一. 医学書院. *今日の治療指針 2011 年版*. 2011, pp584-585
- ③ 西村純一、金倉讓. 南江堂. *血液疾患最新の治療 2011-2013*. 2010, pp7-11
- ④ 西村純一、柴山浩彦、水木満佐央、金倉讓. 羊土社. *ステロイドの使い分け*. 2010, pp215-236
- ⑤ 西村純一、金倉讓. メジカルビュー社. *講義録 血液・造血器疾患学*. 2008, pp146-148

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

金倉 讓 (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