様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年 　５ 月 ２５ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４６１４４７

研究課題名（和文）発作性夜間ヘモグロビン尿症患者のエクリズマブ治療反応性の検討

研究課題名（英文）Investigation of eculizumab therapeutic response to patients with PNH

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本邦PNHの約550例にエクリズマブが投与され、約3.5%の患者がヘテロ接合性塩基置換によるC5遺伝子多型（c.2654G>A、p.Arg885His）が原因で不応症であることが判明した。類似多型を、アルゼンチン人患者（c.2653C>T、p.Arg885Cys）と、オランダ人患者（c.2653C>A、p.Arg885Ser）に同定した。機能解析により、これらの多型によりエクリズマブがC5に結合できず、溶血を抑制出来ないことが証明された。以上、エクリズマブ不応症解析のシステムを構築し稼働している。

研究成果の概要（英文）：Approximately 550 patients in Japan with PNH were treated with eculizumab and about 3.5% of patients were found to be refractory by C5 gene polymorphism due to heterozygous base substitution (c.2654G>A, p.Arg885His). Similar polymorphisms were identified in Argentinian patient (c.2653C>T, p.Arg885Cys) and Dutch patient (c.2653C>A, p.Arg885Ser). Functional analysis proved that eculizumab could not bind to C5 due to these polymorphisms and hemolysis could not be suppressed. Thus, we have constructed and operated a system for analysis of eculizumab inadequacy.

研究分野：血液内科学

キーワード：発作性夜間ヘモグロビン尿症　溶血　エクリズマブ　補体　遺伝子多型

１．研究開始当初の背景

(1)　2010 年に PNH 溶血の治療薬としてエクリズマブが承認され、欧米ではみられなかった不応例が 11 例で確認された。これら**不応例**に共通する C5 遺伝子多型（c.2654G>A）を見いだしており、詳細な機能解析と人種間の広がりについての解析が急がれる状況であった。

(2)　溶血は抑制されるものの、貧血の回復が十分でなく、輸血依存からも脱却出来ない**反応不良例**が一定数存在する。エクリズマブにより C5 以降の補体経路が遮断されたことにより、C3b 蓄積による赤血球のオプソニン化と、引き続く脾臓での血管外溶血が顕在化したことも主要因と考えられた。

２．研究の目的

(1)　これら**不応例**は、C5 の機能自体には異常を示さないものの（遺伝子多型）、エクリズマブが結合出来ないと推察されるので、詳細な機能解析を行う。先行する欧米ではこのような不応例の報告はないことから、日本人（またはアジア人）特有の遺伝子多型ではないかと予想され、多型の広がりを網羅的に解析する。

(2)　エクリズマブ投与による血管外溶血の顕在化は、程度の差はあるもののエクリズマブ投与例全例において、投与後から段階的に進行する。また、臨床的に問題となる症例とそうでない症例が存在する。したがって、C3b の蓄積を経時的にモニターし臨床症状と比較し、C3b の蓄積ならびに血管外溶血を規定している要因を解明し、エクリズマブ治療を最適化する。

３．研究の方法

(1)　エクリズマブ不応例解析：日本人型変異（c.2654G>A）のスクリーニングは、塩基置換により制限酵素 ApaL1 切断部位が形成されるので、当該塩基を PCR にて増幅後、制限酵素で切断することによりスクリーニングする。日本人型変異でない場合は、既知の変異はすべてエクソン 21 に集約しているので、まずはエクソン 21 のシークエンスを優先的に行う。変異が同定出来ない場合は、患者血清にエクリズマブを添加し溶血試験を行い、不応症であることを確認する。不応であることを確認後、全エクソンシークエンスを行い、変異を検索する。変異情報に基づき、機能解析のための組み換え型 C5 蛋白を作成する。C5 除去血清＋組み換え型 C5 にエクリズマブ添加による溶血試験を行う。組み換え型変異 C5 とエクリズマブの結合を Biacore system を用いて解析する。同定した変異の分布を解析する為に、異なる人種の DNA パネル（健常人）を購入し、それぞれの変異をスクリーニングする。

(2)　エクリズマブ反応不良例解析：エクリズマブ投与患者と非投与患者、新規エクリズマブ投与患者においては投与前後において、赤血球膜上の C3b の蓄積と臨床検査所見を経時的に解析する。CR1 の遺伝子多型を解析し、C3b の蓄積、血管外溶血顕在化との関係を明らかにする。

４．研究成果

(1)　塩基置換同定不応例患者リスト：各国から依頼のあった不応例について解析した。
日本人型多型（c.2654G>A,p.Arg885His）：本邦において約 550 例にエクリズマブが投与されており、総計 19 例で日本人型多型が確認された。
アルゼンチン人型多型（c.2653C>T,p.Arg885Cys）：
オランダ人型多型（c.2653C>A,p.Arg885Ser）を新たに同定した
イスラエル人不応例：従来の p.Arg885 には変異無し

(2)　溶血試験 1：鳥赤血球にエクリズマブ投与前の患者血清を加え溶血を誘導する。そこにエクリズマブを添加しても溶血が抑制されないことを確認した（図 1）。

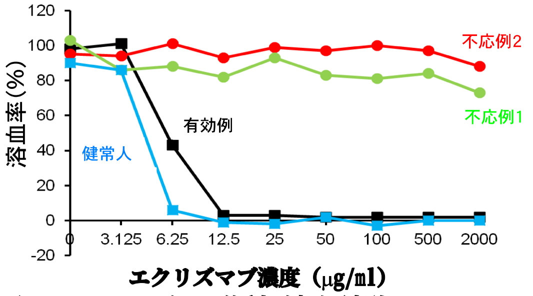
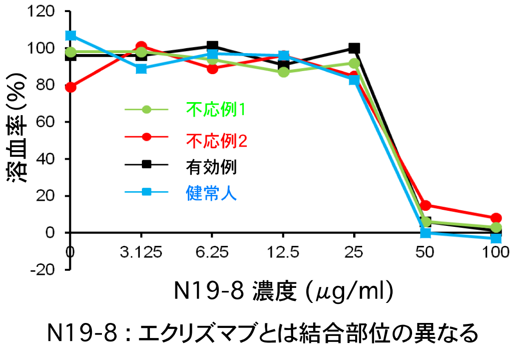


図１．エクリズマブ添加溶血試験

さらに、別のエピトープを認識する抗 C5 抗体に対する反応性も検証した（図 2）。



N19-8：エクリズマブとは結合部位の異なる抗C5抗体

図２．N19-8 抗体添加溶血試験

(3)　機能解析（変異 C5 蛋白の作製、溶血試験 2、結合試験）：日本人型多型、アルゼンチン人型多型、オランダ人型多型について解析した。同定した変異を組み込んだ組み替え型 C5 蛋白を作製した。鳥赤血球に C5 除去血清＋組み換え型 C5 を加え溶血活性を確認す

る。そこにエクリズマブを添加しても溶血が抑制されないことを確認した。さらに、別のエピトープを認識する抗 C5 抗体に対する反応性も検証した。Sensor chip にエクリズマブを付着させ、そこに組み換え型 C5 を流し、Biacore system を用いて結合を解析した（図３）。

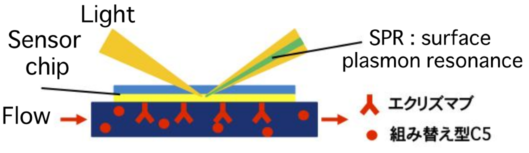


図 3. Biacore system

組み換え型変異 C5 では、エクリズマブに対する結合が消失していた（図４）。

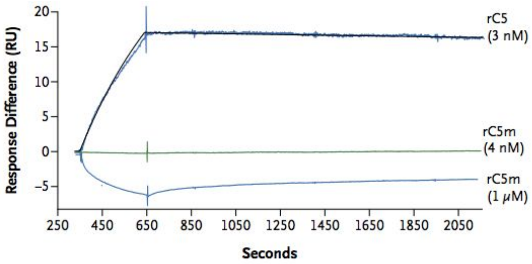


図 4. 結合試験

(4)　人種間、地域間の分布解析：日本人の健常人 288 人を対象に変異スクリーニングを行うと、日本人型多型を 10 人（3.5%）に認めた。日本人型多型（c.2654G>A）、アルゼンチン人型多型異（c.2653C>T）に対し、英国人（100 例）、中国漢民族（120 例）、メキシコ現住民（90 例）の DNA パネルを用いて解析した。本邦 PNH 患者の多型保有率（3.5%）は、健常人（3.5%）と同程度であった。この多型は中国漢民族 DNA パネル中にも同定された。アルゼンチン型 c.2653C>T 変異は、100 例前後の解析では英国人、中国漢民族、メキシコ原住民いずれにおいても検出されず、保有率がさらに低い可能性が示唆された。

(5)　エクリズマブ反応不良例解析：エクリズマブ投与後の血管外溶血顕在化解析のため、当院のエクリズマブ投与患者８例について、PNH 型赤血球膜上の C3b 蓄積の経過を追ったところ、当初の 15 ヶ月の観察では全例で増加傾向を認めていたが、その後の観察では頭打ちとなった（30～60%）。８例中唯一臨床的に血管外溶血が問題となっている症例では、IgG が低値（<500mg/dL）で原因不明の感染症を発症し、網内系が活性化（単球増加；20%→40%）し、貧血増悪を繰り返しているが、必ずしも C3b 蓄積（30%）は多くなかった。エクリズマブ反応不良の要因は多岐に渡るので、症例ごとの詳細な解析が必要と思われた。

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 19 件）

1. Ninomiya H, Obara N, Chiba S, Usuki K, Nishiwaki K, Matsumura I, Shichishima T, Okamoto S, Nishimura JI, Ohyashiki K, Nakao S, Ando K, Kanda Y, Kawaguchi T, Nakakuma H, Harada D, Akiyama H, Kinoshita T, Ozawa K, Omine M, Kanakura Y. Interim analysis of post-marketing surveillance of eculizumab for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. Int J Hematol 104:548-558,2016. 査読有
2. Miyasaka N, Miura O, Kawaguchi T, Arima N, Morishita E, Usuki K, Morita Y, Nishiwaki K, Ninomiya H, Gotoh A, Imashuku S, Urabe A, Shichishima T, Nishimura J, Kanakura Y. Pregnancy outcomes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treated with eculizumab: a Japanese experience and updated review. Int J Hematol 103:703-712,2016. 査読有. doi: 10.1007/s12185-016-1946-x.
3. Sasano T, Tomimatsu T, Nishimura J, Matsumura I, Kanakura Y, Kimura T. Two consecutive pregnancies in a patient with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria treated with anticoagulant therapy at different doses. Blood Coagul Fibrinolysis 27:109-112,2016. 査読有. doi: 10.1097/MBC.0000000000000386.
4. 西村純一、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH : paroxysmal nocturnal hemoglobinuria）：最近の話題、日本検査血液学会雑誌　17：380-387、2016、査読無
5. Nishimura J, Kanakura Y. The C5 gene polymorphism in patients with PNH. Rinsho Ketsueki. 56:103-110,2015. 査読有、doi:10.11406/rinketsu.56.103.
6. 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： 1397-1404、2015、査読無

〔学会発表〕（計 22 件）

1. Nishimura J. PNH and Genetic Variants in C5 Confers Poor response to the Anti-C5 Monoclonal Antibody Eculizumab. The 9th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis. 2016.10.6-9（発表日 10.7), Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan.
2. 西村純一、PNH の診断と治療：最近の話題、日本輸血・細胞治療学会九州支部会　第 63 回総会・第 84 回例会

2016.12.10 (発表日 12.10), KITEN ビルコンベンションホール, 宮崎
3. 西村純一、PNH の新たな見解　PNH:疾患・診断・治療、第 78 回日本血液学会学術集会、2015.10.13-15 (発表日 10.14), パシフィコ横浜, 横浜
4. 西村純一、骨髄不全症の病態解析と治療の最先端　発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH : paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)：最近の話題、第 17 回日本検査血液学会学術集会、2016.8.6-7 (発表日 8.6), 福岡国際会議場, 福岡
5. Nishimura J. Genetic Variants in C5 Confers Poor response to the Anti-C5 Monoclonal Antibody Eculizumab. 2015 Dasan Conference. 2015.12.1-3 (発表日 12.2), Saintmare, Busan, Korea.
6. Nishimura J. Genetic variants in C5 confers poor response to the anti-C5 monoclonal antibody eculizumab. 7th International Conference on Complement Therapeutics. 2014.6.6-11 (発表日 6.8), Aldemar Olympia Hotel, Olympia, Greece.
7. 西村純一、Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab、第 76 回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2 (発表日 10.31), 大阪国際会議場, 大阪

〔図書〕(計 14 件)
1. Nishimura J, Kinoshita T, Kanakura Y. Springer. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. From Bench to Bedside. (Kanakura Y, Kinoshita T, Nishimura J eds) Clinical Effects of Eculizumab in PNH: Poor Responders to Eculizumab. 2017. 358 (297-306).
2. Nakakuma H, Shichishima T, Nishimura J. Springer. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. From Bench to Bedside. (Kanakura Y, Kinoshita T, Nishimura J eds) Diagnosis and Classification of PNH. 2017. 358 (173-183).
3. 西村純一、朝倉書店、内科学　第 11 版、2017、2385 (1954-1959)
4. 西村純一、南江堂、私の論文が『NEJM』に載ったときの話、2015、81(71-75)
5. 植田康敬、西村純一、医薬ジャーナル社、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) ～遺伝子異常の解析から新規治療薬の臨床・開発まで～ (金倉譲、西村純一編)、エクリズマブ不応症、2015、239(174-181)
6. 植田康敬、西村純一、医薬ジャーナル社、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) ～遺伝子異常の解析から新規治療薬の臨床・開発まで～ (金倉譲、西村純一編)、PNH の新規治療薬の開発、2015、239(226-236)

〔その他〕
ホームページ等
大阪大学の研究の今
http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2014/20140213_2

大阪大学大学院医学系研究科　医学部　主要研究成果
http://www.med.osaka-u.ac.jp/activities/results/2014year/article03

6．研究組織
(1)研究代表者
西村　純一（NISHIMURA, Jun-ichi）
大阪大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：80464246

(2)研究分担者
金倉　譲　(KANAKURA, Yuzuru)
大阪大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号： 20177489

研究分担者
柴山　浩彦（SHIBAYAMA, Hirohiko）
大阪大学大学院・医学系研究科・講師
研究者番号： 60346202