

Fig. 2 Clinical improvement by Eculizumab<sup>TM</sup>. A) Effects on hemolytic marker LDH. B) Improvement in FACIT fatigue score. C) Chronic kidney diseases (CKD) in Japanese PNH patients. D) Improvement in CKD stage.

に及ぶ継続試験の結果も合わせて本邦の結果は、これまでの欧米の結果と同等であり、本邦における eculizumab の有効性と、長期使用の安全性、忍容性が確認された。2002年に英国でパイロット試験が開始され、既に10年以上経過している。英国で治療された79例について累積生存率を解析したところ、年齢、性別対応正常コントロール群と差がなかった。溶血・血栓症状より造血不全症状の強い本邦例においてはどうかという検証をする必要はあるが、eculizumabによりPNH患者の生活は一変したと言っても過言ではない。

### Eculizumab 不応例と C5 遺伝子多型

#### 1. 本邦第2相試験 AEGIS と eculizumab 不応例

本邦 AEGIS 試験においてもこれまでの成績同様、顕著な溶血抑制効果に加え、腎機能改善効果、血栓予防効果、QOL改善効果など様々な臨床効果が確認されたが、溶血の指標である血清 LDH 値が全く低下しない不応症を29例中2例に認めた (Fig. 3A)<sup>4)</sup>。Eculizumab の血中反応濃度である 35  $\mu\text{g/ml}$  は、いずれの eculizumab 投与血清 (ピーク/トラフ) においても維持されていた<sup>4)</sup>。これら血清による *in vitro* 溶血試験では、反応例で投与直後より抑制されたのに対し、不応2例では抑制されな

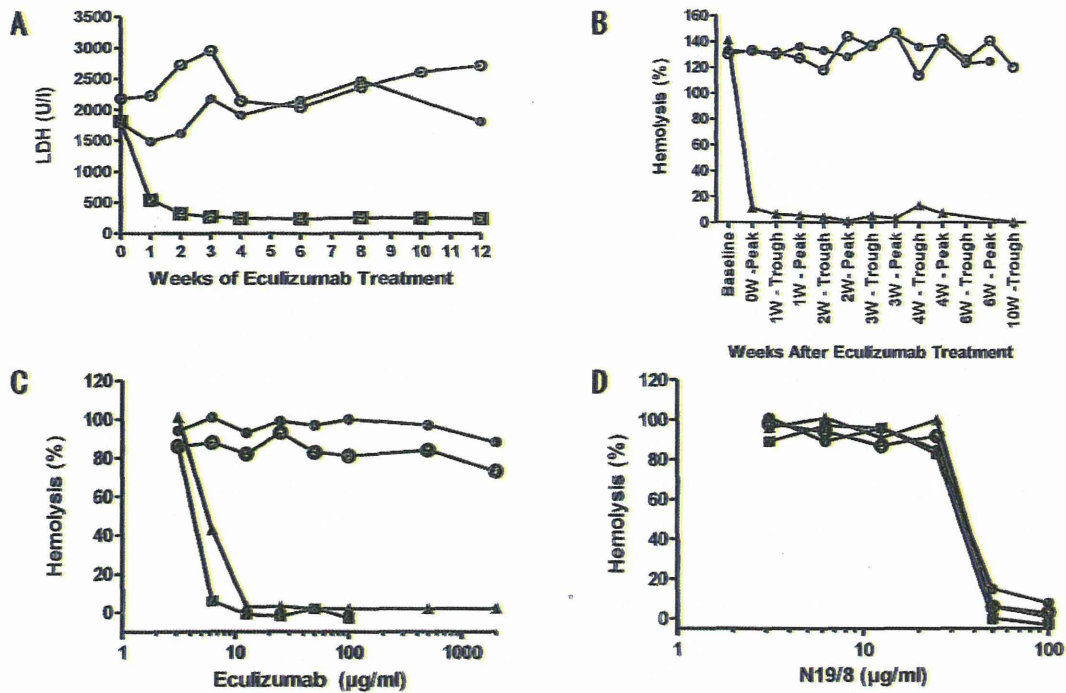
かった (Fig. 3B)<sup>4)</sup>。そこで、eculizumab 投与前血清に eculizumab 添加による濃度勾配溶血試験を行ったところ、健常人と反応例は 12.5  $\mu\text{g/ml}$  で抑制されたが、不応2例では 2,000  $\mu\text{g/ml}$  の高濃度でも抑制されなかった (Fig. 3C)<sup>4)</sup>。Eculizumab と C5 結合部位の異なる抗体 N19/8 を用いた溶血試験では、不応2例も健常人や反応例と同様に抑制された (Fig. 3D)<sup>4)</sup>。そこで、C5 遺伝子の塩基配列を決定したところ、不応症のエクソン 21 にヘテロ変異 c.2654 G>A を認め、p.Arg885His 多型が予測されたが、反応7例には同変異を認めなかった<sup>4)</sup>。

#### 2. 変異 C5 蛋白の機能特性<sup>4)</sup>

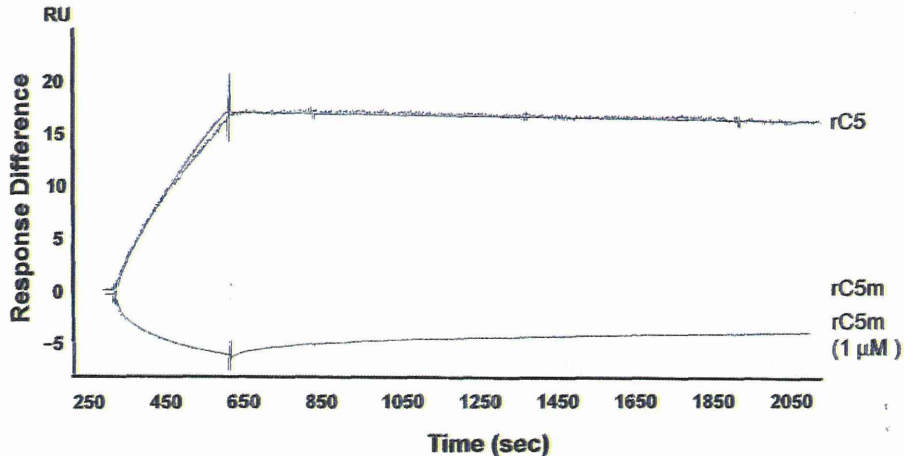
遺伝子組み換え型 C5 蛋白を作成し、蛋白機能特性を解析した。野生型 C5、変異型 C5 はいずれも *in vitro* で十分な溶血活性を示したが、eculizumab と結合し、eculizumab によって溶血が抑制されたのは野生型 C5 のみであった (Fig. 4)。N19/8 抗体に対しては野生型、変異型いずれの C5 によって構築された溶血も同様に抑制された。

#### 3. アルゼンチン不応症例<sup>4)</sup>

アジア系アルゼンチン原住民の eculizumab 不応症患者の紹介を受け、同様に解析を行ったところ、きわめて類似するヘテロ変異 c.2653C>T を認め、p.Arg885Cys



**Fig. 3** Analysis of 2 poor responders in AEGES clinical study<sup>10</sup>. A) Effects on hemolytic marker LDH. B) *In vitro* hemolytic activity using serum on Eculizumab (peak/trough). C) *In vitro* hemolytic activity using exogenous Eculizumab. D) *In vitro* hemolytic activity using a different anti-C5 antibody (N19/8). (●) (○), poor responders; (□), responder in AEGES; (▲), typical responder; (■), healthy individual



**Fig. 4** Effect of Japanese C5 polymorphism on the functional properties of C5<sup>10</sup>. (rC5), wild type; (rC5 m), mutant

が予測された。

**4. C5(Arg885)変異の人種間スクリーニング (Table 1)<sup>10</sup>**

本邦で eculizumab 承認後、さらに 9 例の不応症が確認され、全例で c.2654 G>A ヘテロ変異を確認した。日本人の健常人 288 人 (男性 200 人、女性 88 人) で c.2654 G>A 変異のスクリーニングを行ったところ、ヘテロ変異を 288 人中 10 人 (3.5%) に認めた。これは本

邦 PNH 患者の変異保有率 (345 例中 11 例; 3.2%) と同程度であった。さらに、この多型は中国漢民族集団においても確認された。一方、アルゼンチン患者に見いだされた 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. Eculizumab 奏効不良と新規候補薬剤の開発

Eculizumab はPNHの血管内溶血を強力に抑制するものの、貧血ならびに輸血依存に対する効果は、限定的に留まる症例が一定数存在する。この主たる原因として、PNH患者が本来持ち合わせている造血不全と、新たに発現した血管外溶血の存在が指摘されている<sup>30)</sup>。すなわち、eculizumabを投与したことにより、前期補体成分C3断片であるC3bがPNH血球へ蓄積し、オプソニン化を介して血管外溶血が顕在化したものと理解される(Fig. 1)。この血管外溶血を克服する意味合いも含め、補体レセプター2 (CR2/CD21) とH因子の融合蛋白であるTT30<sup>34, 35)</sup>、C3に結合しその機能を阻害する環状ペプチドであるコンプスタチンの誘導體Cp40<sup>36)</sup>、遺伝性血管性浮腫(HAE)の治療薬として承認されているC1インヒビター(C1INH)<sup>37)</sup>などの候補薬剤による、血管

内溶血抑制に加えC3蓄積抑制効果も報告されており、これらの薬剤はeculizumab不応症にも有効と考えられ、今後の臨床開発への進展が期待される。

### おわりに

日本人(アジア)固有のC5遺伝子多型c.2654G>Aは、C5補体活性自体には異常をきたさないものの、eculizumabの結合に影響する重要な変異であり、その結果、薬剤不応性をきたすと考えられた。このことは、標的蛋白における遺伝子多型が、様々な疾患に対して繁用されている抗体療法の反応性を検討する上で、極めて重要な現象であることを示唆している(Fig. 5)。本邦におけるeculizumabの使用拡大に伴い、不応症も増加している。残念ながら、2名の患者は、PNH関連合併症により既に亡くなられた。また、残りの患者の多くも、

Table 1 Ethnic distribution of genetic variants in C5.

| Origin                               | Analyzed numbers | Japanese<br>c. 2654G>A<br>p. Arg885His | Argentinianc.<br>2653C>T<br>p. Arg885Cys |
|--------------------------------------|------------------|--|--|
| Japanese                             | 288              | 10<br>(3.5%)                           | —  |
| British from<br>England and Scotland | 100              | 0<br>(0%)                              | 0<br>(0%)                                |
| Han Chinese                          | 120              | 1<br>(0.8%)                            | 0<br>(0%)                                |
| Native Mexican<br>American           | 90               | 0<br>(0%)                              | 0<br>(0%)                                |

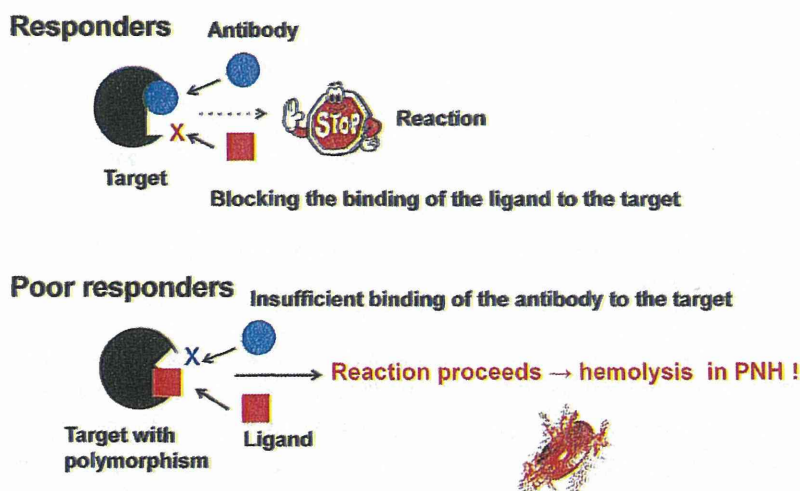


Fig. 5 The mechanism of poor response to antibody therapeutics by genetic polymorphisms of the target molecule.

病状が進行し重篤な状態に噴まれている。故に、一日も早い第2世代の治療法の確立が望まれる。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：西村純一：講演料 (アレクシオンファーマ株式会社), 受託研究・共同研究費 (アレクシオンファーマ株式会社), 奨学寄付金 (アレクシオンファーマ株式会社), 金倉謙：講演料 (アレクシオンファーマ株式会社), 受託研究・共同研究費 (アレクシオンファーマ株式会社), 奨学寄付金 (アレクシオンファーマ株式会社)

## 文 献

- 1) Hillmen P, Muus P, Röth A, et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 2013; **162**: 62-73.
- 2) Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, et al. Long-term efficacy and safety of eculizumab in Japanese patients with PNH: ABCIS trial. *Int J Hematol.* 2013; **98**: 406-416.
- 3) Reiss UM, Schwartz J, Sakamoto KM, et al. Efficacy and safety of eculizumab in children and adolescents with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Pediatr Blood Cancer.* 2014; **61**: 1544-1550.
- 4) Nishinura J, Yamamoto M, Hayashi S, et al. Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med.* 2014; **370**: 632-639.
- 5) DeZern AE, Uknis M, Yuan X, et al. Complement blockade with a C1 esterase inhibitor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol.* 2014; **42**: 857-861.
- 6) Risitano AM, Ricklin D, Huang Y, et al. Peptide inhibitors of C3 activation as a novel strategy of complement inhibition for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2014; **123**: 2094-2101.
- 7) Nicholson-Weller A, Burge J, Austen KF. Purification from guinea pig erythrocyte stroma of a decay-accelerating factor for the classical C3 convertase, C4b, 2a. *J Immunol.* 1981; **127**: 2035-2039.
- 8) Sugita Y, Nakano Y, Tomita M. Isolation from human erythrocytes of a new membrane protein which inhibits the formation of complement transmembrane channels. *J Biochem.* 1988; **104**: 633-637.
- 9) Davies A, Simmons DL, Hale G, et al. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med.* 1989; **170**: 637-654.
- 10) Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA.* 2005; **293**: 1653-1662.
- 11) Parker C, Omine M, Richards S, et al. International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2005; **106**: 3699-3709.
- 12) Krawitz PM, Höchsmann B, Murakami Y, et al. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in *PIGT*. *Blood.* 2013; **122**: 1312-1315.
- 13) Kawagoe K, Kitamura D, Okabe M, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1996; **87**: 3600-3606.
- 14) Rosti V, Tremmi G, Soares V, Pandolfi PP, Luzzatto L, Bessler M. Murine embryonic stem cells without pig-a gene activity are competent for hematopoiesis with the PNH phenotype but not for clonal expansion. *J Clin Invest.* 1997; **100**: 1028-1036.
- 15) Murakami Y, Kinoshita T, Maeda Y, Nakano T, Kosaka H, Takeda J. Different roles of glycosylphosphatidylinositol in various hematopoietic cells as revealed by a mouse model of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1999; **94**: 2963-2970.
- 16) Tremml G, Dominguez C, Rosti V, et al. Increased sensitivity to complement and a decreased red blood cell life span in mice mosaic for a nonfunctional *Piga* gene. *Blood.* 1999; **94**: 2945-2954.
- 17) Keller P, Tremml G, Rosti V, Bessler M. X inactivation and somatic cell selection rescue female mice carrying a *Piga*-null mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; **96**: 7479-7483.
- 18) Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, Nakao S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood.* 2002; **100**: 3897-3902.
- 19) Gargiulo L, Lastraioli S, Cerruti G, et al. Highly homologous T-cell receptor beta sequences support a common target for autoreactive T cells in most patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2007; **109**: 5036-5042.
- 20) Gargiulo L, Papaioannou M, Sica M, et al. Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d1-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2013; **121**: 2753-2761.
- 21) Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; **96**: 5209-5214.
- 22) Nishimura Ji, Hirota T, Kanakura Y, et al. Long-term support of hematopoiesis by a single stem cell clone in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2002; **99**: 2748-2751.
- 23) Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, et al. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood.* 2006; **108**: 4232-4236.
- 24) Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and *HMGA2* activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. *Nature.* 2010; **467**: 318-322.

- 25) Ikeda K, Mason PJ, Bessler M. 3'UTR-truncated Hmga2 cDNA causes MPN-like hematopoiesis by conferring a clonal growth advantage at the level of HSC in mice. *Blood*. 2011; **117**: 5860-5869.
- 26) Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, Brodsky RA, Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol*. 2007; **25**: 1256-1264.
- 27) Hillmen P, Hall C, Marsh JC, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2004; **350**: 552-559.
- 28) Hill A, Hillmen P, Richards SJ, et al. Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; **106**: 2559-2565.
- 29) Hillmen P, Young NS, Schubert J, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006; **355**: 1233-1243.
- 30) Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2008; **111**: 1840-1847.
- 31) Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, et al. Safety and efficacy of the terminal complement inhibitor eculizumab in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the AEGIS clinical trial. *Int J Hematol*. 2011; **93**: 36-46.
- 32) Hillmen P, Muus P, Dührsen U, et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2007; **110**: 4123-4128.
- 33) Risitano AM, Notaro R, Marando L, et al. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood*. 2009; **113**: 4094-4100.
- 34) Fridkis-Hareli M, Storek M, Mazsaroff I, et al. Design and development of TT30, a novel C3d-targeted C3/C5 convertase inhibitor for treatment of human complement alternative pathway-mediated diseases. *Blood*. 2011; **118**: 4705-4713.
- 35) Risitano AM, Notaro R, Pascariello C, et al. The complement receptor 2/factor H fusion protein TT30 protects paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes from complement-mediated hemolysis and C3 fragment. *Blood*. 2012; **119**: 6307-6316.

## The C5 gene polymorphism in patients with PNH

Jun-ichi NISHIMURA, Yuzuru KANAKURA

Osaka University Graduate School of Medicine, Department of Hematology and Oncology

---

Key words: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Complement mediated intravascular hemolysis, Eculizumab, Gene polymorphism

---

This review is a commentary on an article entitled "Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab" (*N Engl J Med*. 2014; **370**: 632-639). The molecular basis for the poor response to eculizumab in Japanese patients is unclear. Of 345 Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) who received eculizumab, 11 showed a poor response. All 11 had a single missense C5 heterozygous mutation, c.2654 G>A, which predicts the polymorphism p.Arg885His. The prevalence of this mutation among patients with PNH (3.2%) was similar to that in healthy Japanese persons (3.5%). This polymorphism was also identified in a Han Chinese population. Non-mutant and mutant C5 both caused hemolysis *in vitro*, but only non-mutant C5 bound to and was blocked by eculizumab. *In vitro* hemolysis due to non-mutant and mutant C5 was completely blocked by N19-8, a monoclonal antibody that binds to a different site on C5 than does eculizumab. The functional capacity of the C5 polymorphism p.Arg885His, together with its failure to undergo blockade by eculizumab, accounts for the poor response to this agent in patients who carry this mutation.

