

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）

「特発性造血障害に関する調査研究」

分担研究報告書

エクリズマブ奏功不良例の解析

研究分担者：金倉 譲（大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学講座 教授）

研究要旨

エクリズマブは発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）の溶血を効果的に抑制し、患者 QOL を劇的に改善した。その一方で、本邦患者の 3～4% にエクリズマブ奏功不良例が見いだされ、標的分子である C5 のヘテロ接合性遺伝子多型（c.2654G>A, p.Arg885His）が原因であることを報告した。その後、各国の奏功不良例を解析したところ、複数の類似の変異が見いだされている。

A．研究目的

H27 年より新たに指定難病に認定された発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）は、補体介在性の血管内溶血に起因する貧血、ヘモグロビン尿を主徴とする後天性の造血幹細胞疾患である。溶血の治療薬としてヒト化抗 C5 抗体（エクリズマブ）が開発され、溶血抑制のみならず、QOL や予後を劇的に改善した。ところが、本邦 AEGIS 試験において、全く溶血抑制効果を示さない不応例が見いだされ、C5 のヘテロ接合性塩基置換 c.2654G>A

(p.Arg885His) が原因で、標的分子の遺伝子多型は分子標的療法の効果発現を規定する重要な要因であることを報告した(NEJM, 370, 632, 2014)。我々は、エクリズマブ奏功不良例解析のシステムを構築し、日本全国、世界各国の奏功不良例を解析している。

B．研究方法

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 のシーケンスを優先的に行う。変異が同定出来ない場合は、全エクソンシーケンスを行い、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。

(倫理面への配慮)

臨床研究については、当該倫理委員会の承認を受け、インフォームド・コンセントを取得している。ゲノム解析については、大阪大学ヒトゲノム研究審査の承認を受けており、検体採取、保存、及び研究への使用については、適切に包括的同意取得を行っている。

C．研究結果

(1) 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)：1 例報告済み。

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 には変異は無かった。

(2) 機能解析 (変異 C5 蛋白の作製、溶血試験、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換え型 C5 蛋白を作製した。鳥赤血球に C5 除去血清 + 組み換え型 C5 を加え溶血活性が構築されることを確認した。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は、変異 C5 も野生型 C5 と同様に抑制されることを確認した。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ところ、いずれの変異 C5 も、エクリズマブに対する結合が消失していた。

D . 考察

日本人型 C5 遺伝子多型は漢民族でも同定されていたが、約 550 例にエクリズマブが投与されている本邦において 19 例 (3.5%) が確認され、健常人保有率 (3.5%) と同程度で、アジア固有の多型と考えられた。アルゼンチン原住民に類似の C5 多型 (c.2653C>T, p.Arg885Cys) を見だしていたが、オランダ人に新たな類似多型 (c.2653C>A, p.Arg885Ser) が確認された。日本人型変異 C5 と同様に、これらの変異型 C5 は野生型 C5 とともに溶血活性を保持していたが、野生型 C5 のみがエクリズマブと結合し溶血抑制を受けた。ところが、エクリズマブと異なる C5 結合部位を有する抗体 N19-8 を用いると、野生型 C5、変異型 C5 とともに溶血抑制を示した。

E . 結論

C5 多型 (p.Arg885) は、補体活性自体に異常を示さないが、エクリズマブの結合に重要な影響を与

え、不応性を来すと考えられた。このことは、標的分子の遺伝子多型が、抗体医薬の反応性を規定する極めて重要な因子であることを強く示唆している。

F . 研究発表

1. 論文発表

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.* 2016; 104 (548-558)

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.* 2016; 103 (703-712)

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.* 2016; 27 (109-112)

2. 学会発表

Langemeijer S, Davies WW, Nunn M, Nishimura J, Kanakura Y, Blijlevens N, Nijziel M, Muus P. 12 weeks safety and efficacy results of a novel C5 inhibitor coversin in PNH with resistance to eculizumab due to complement C5 polymorphism. 21st Congress of the European Hematology Association, 2016.6.9-12, Copenhagen, Denmark

Shirasugi Y, Sugimori C, Noji H, Shichishima T, Obara N, Chiba S, Ninomiya H, Nakamura Y, Ando K, Yonemura Y, Kawaguchi T, Hosokawa K, Ueda Y, Nishimura J, Kanakura Y, Nakao S. A clinical significance and time-dependent change of PNH clone size in patients with bone marrow failure syndrome: Japanese multi-centre prospective study. 21st Congress of the European Hematology Association, 2016.6.9-12, Copenhagen, Denmark

Ueda Y, Nishimura J, Sugimori C, Hosokawa K, Yonemura Y, Obara N, Noji H, Nakamura Y, Shirasugi Y, Ando K, Shichishima T, Ninomiya H, Chiba S, Kawaguchi T, Kanakura Y, Nakao S. 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 58th Annual Meeting, 2016.12.3-6, San Diego, USA

Murakami Y, Kawamoto M, Inoue N, Osato M, Murata S, Murase S, Yoshimura H, Ueda Y, Nishimura J, Kanakura Y, Kohara N, Kinoshita T. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria caused by PIGT mutations; atypical PNH. The American Society of Hematology 58th Annual Meeting, 2016.12.3-6, San Diego, USA

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし