

発作性夜間ヘモグロビン尿症に対する新規補体阻害薬の開発

西村純一, 植田康敬, 大里真幸子, 林 悟, 金倉 譲

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

【研究の背景】

申請者らは、これまで一貫して、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH) に関する独創的な研究を継続して行っている。

PNH の責任遺伝子 *PIGA* の同定には、申請者の樹立した PNH 型 B 細胞株が用いられ、多大な貢献を果たした。米国 Duke 大学に拠点を移動後、PNH の日米比較調査を行い、アジア症例と欧米症例間の臨床像の相違を明らかにし、国際 PNH 専門家会議の一員として、PNH 診断の国際指針、診療ガイドの策定にも関与した。この間、RNA アプタマーを用いた、新規治療薬の開発手技を習得した。大阪大学に帰局後、金倉とともに、PNH に対するヒト化抗 C5 抗体 (エクリズマブ) の本邦第2相臨床試験 AEGIS を主導し、承認に導いた。近年では、本邦のみで見いだされている、エクリズマブに対する不応例の発症機序を分子基盤で明らかにした。

【目 的】

ヒト化抗 C5 抗体エクリズマブが、PNH における補体介在性溶血の治療薬として開発され、顕著な溶血抑制効果が示されている。その一方で、エクリズマブが全く効果を示さない不応例が、本邦において報告されており、これらの患者を救済することが喫緊の課題となったが、合わせてより安全で有効な治療法を確立するために、補体 (C8、C9) を標的に補体阻害活性を有する RNA アプタマーの開発をめざした。

【方 法】

C5 は、補体活性化経路の中心的分子であり、長期抑制は感染症等の危険を伴う。1) PNH 溶血では CD59 (C9 を阻害) が重要であること、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 を標的とするのが最適と考えられる。

- 1) **SELEX 法**: 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。
- 2) **結合試験**: 標的蛋白と gP^{32} 末端標識した RNA アプタマーを反応後、RNA-蛋白複合体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) にブロットし、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**: 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成分量を決定する。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。

【結 果】

- 1) **C8 アプタマー**: SELEX 4 ラウンド後の 4-101 クローンは、既知の C5 アプタマー (f8/c11: TCTCATGCGCCGAGTG TGAGTTTACCTTCGT) と同等の溶血抑制活性を認め (EI 《90% 以上の抑制》 at 63nM)、結合試験において 74% の BMAX と 30nM の Kd を有していた。
- 2) **C9 アプタマー**: SELEX 16 ラウンド後の 16-8 クローンは、既知の C5 アプタマーより強力な抑制活性を認め (EI at 4nM)、結合試験において 67% の BMAX と 3nM の Kd を有していた。
- 3) **改良溶血試験: in vivo study** に向けたこれらのクローンの効率の最適化、安定化をはかる前に、より生体に近い条件下で溶血試験を行った。すなわち、これまでは限界希釈法により標的補体成分の濃度が低い条件下で評価していたが、エクリズマブ不応例の血清そのものを用いて評価を行った (図)。エクリズマブ不応例の血清に対してエクリズマブは、血中有効濃度とされている 35 μ g/mL 以上の 100 μ g/mL の条件下でも溶血抑制活性を示さなかった。一方、新規抗補体阻害薬として開発段階にある FactorD 低分子阻害薬 (ACH4100) は 10 μ M の条件下で強い溶血抑制活性を示した。ところが、C8、C9 アプタマーはこれまでの 80~300 倍以上の濃度である 5 μ M の条件下でも溶血抑制活性は確認できなかった。

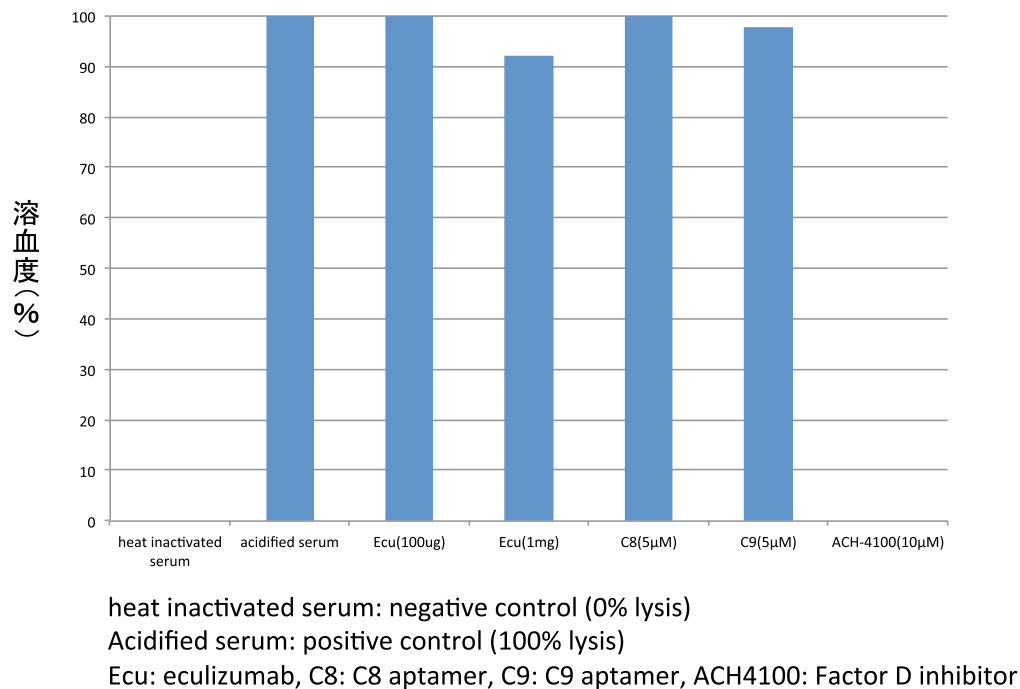


図. 酸性化溶血試験

【考 察】

SELEX 法を用いて C8、C9 に対して溶血抑制活性を有するアプタマークロンの選別を行ったが、より生体に近い条件下での溶血試験において、他の補体阻害薬と比較して十分な溶血抑制活性が得られなかった。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回、十分な溶血抑制活性を有するアプタマークロンの得ることはできなかったが、同時に行った他の新規抗補体阻害薬はエクリズマブ不応例においても有効であると考えられた。