

補体と発作性夜間ヘモグロビン尿症

木下タロウ

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・糖鎖免疫、同・微生物病研究所・免疫不全疾患

Complement and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Taroh Kinoshita

Laboratory of Immunoglycobiology Immunology Frontier Research Center

and Department of Immunoregulation Research Institute for Microbial Diseases Osaka University

1. はじめに

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) は、補体によって自己赤血球が破壊される後天性の疾患である。壮中年期を中心に小児期から高年期まで、発症時期には幅があり、いったん発症すると 10 年以上長期に持続する。発生頻度は、人口 10 万人あたり 1~2 人程度の稀な疾患である。発症時には、補体の作用に弱いクローン性の PNH 赤血球が出現していて、血液は正常赤血球と PNH 赤血球のモザイクになっている。この状況で感染等に伴って補体が活性化したとき PNH 赤血球が一度に破壊されることにより溶血発作が起こる。また、第 2 経路の自然活性化による低レベルの溶血が睡眠時に亢進することから、PNH という病名がつけられ、補体による溶血、血栓と骨髄不全を 3 主徴とする。本稿では、PNH の発症メカニズムを概説する。

2. PNH の異常血液細胞における 2 つの補体制御因子の欠損

PNH 患者の赤血球を酸性化した血清と反応させると、膜上で補体第 2 経路が活性化し、一部の細胞が溶血する。正常人の赤血球を同様に反応させても全く溶血しない。すなわち、患者赤血球には、補体に弱い異常な赤血球クローンの集団と、正常血球と同様に補体抵抗性の集団が混在している。酸性化血清を用いて、補体に感受性のクローンの赤血球集団

を検出する方法は、ハム試験と呼ばれ、古くから長く PNH の診断に使われた。PNH の異常赤血球では、decay-accelerating factor (DAF, CD55) と CD59 の 2 つの補体制御因子が欠損している。DAF は、同じ膜上に形成された C3 転換酵素 (C4b2a、C3bBb) から C2a あるいは Bb を速やかに遊離させて失活させることにより、一方 CD59 は、C5b-8 あるいは C5b-9_i に作用して膜障害性複合体 (C5b-9_n) の形成を妨げることにより、赤血球を保護している。ハム試験で溶血する異常赤血球が、DAF と CD59 を欠損した赤血球なので、現在では、フローサイトメトリーによって DAF/CD59 欠損細胞を検出する方法が PNH 診断検査として確立している。異常細胞の割合を定量できる点も優れている。

赤血球を自己補体による溶血から保護する上で、DAF と CD59 のどちらがより重要であるかは、それぞれの単独欠損症が発見されて明らかになった。すなわち、CD59 遺伝子の変異によって起こる CD59 単独欠損症では PNH 様の溶血性疾患を起こし、一方、DAF 単独欠損症では溶血は見られないことから、CD59 の重要性が明らかである¹⁾。以下に記すように、DAF は、赤血球上に C3b が結合して蓄積するのを防いでいることが近年明確になった。

PNH 血球の補体感受性を、血清濃度を変量して測定することにより、極めて補体活性化への感受性が高い集団 (III 型 PNH 血球) とある程度抵抗性を持つ集団 (II 型 PNH 血球) が存在することが明ら

かにされた。フローサイトメトリーによる解析と合わせ、III 型 PNH 血球は、DAF/CD59 を完全に欠損しており、II 型 PNH 血球では、DAF/CD59 がある程度残存していることが示されている。一方で PNH 患者血中の補体に抵抗性の血球は I 型 PNH 血球と呼ばれるが、実際には正常赤血球である。多くの PNH 症例は III 型と I 型の組み合わせで、一部が、II 型と I 型の組み合わせであり、III 型と II 型を両方持つ例も知られている。異常赤血球が占める割合は、数%程度から 90%を超える場合まで症例ごとに様々である。また、溶血発作直後は、異常赤血球が選択的に破壊されているため、ほとんど検出されない場合もある。

3. 血管内溶血と血栓

感染等補体を活性化する事象に伴って、溶血発作が起こる。病原体上や免疫複合体上に形成された C5 転換酵素によって C5b ができ、それが C5b6 複合体となり、一部が自己細胞表面近傍へ達し、そこに C7 が結合して C5b-7 複合体になると脂質結合部位を生じ、自己細胞表面膜に結合する。さらに C8、C9 が順次結合すると膜障害性複合体となり、細胞膜に穴があく。正常赤血球上には CD59 が存在し、C5b-8 複合体になった段階で CD59 が結合して C9 の結合が阻害され、そのため膜障害性複合体が完成しないので、溶血しない。しかし、PNH 型赤血球上では CD59 が存在しないので膜障害性複合体が完成し膜に穴があく。その穴から水が流入し、赤血球は膨張する。膨張の限界を超えると破裂し、ヘモグロビンが放出される。

こうして起こる血管内溶血は貧血だけでなく、遊離したヘモグロビンによる腎障害、遊離ヘモグロビンへの吸着による一酸化窒素の低下が来す倦怠感、嚥下困難や勃起不全等、PNH の諸症状を引き起こす。従って、血管内溶血の防止が PNH の治療の中心になる〔発作性夜間ヘモグロビン尿症診療の参照ガイド（平成 22 年度改訂版）（日本補体学会ホーム

ページからダウンロード可能〕。

エクリズマブは、C5 に結合するヒト化モノクローナル抗体である。エクリズマブが結合した C5 は、C5 転換酵素による C5a と C5b への切断活性化を受けなくなる。エクリズマブの血中濃度が十分維持されると、効果的に PNH 型赤血球の溶血が阻害される。エクリズマブは、その血管内溶血阻害効果が高いことから、多くの PNH 患者に処方され QOL の改善をもたらしている^{2,3)}。

しかし、我が国でエクリズマブが広く用いられるようになった結果、約 3%の症例で溶血阻害効果がほとんど認められないことが明らかになった。これは、日本人の約 3%がヘテロに持つ C5 遺伝子の遺伝的多型性によることが解明された⁴⁾。すなわち、この多型は、C5 タンパク質上のエクリズマブ結合部位のごく近傍のアミノ酸を変化させ、エクリズマブが全く結合できない C5 を作る。このアミノ酸変異は C5 の機能には影響がないので、エクリズマブの阻害を逃れて溶血を起こす。同じアミノ酸をさらに別のアミノ酸に変化させ、エクリズマブ結合を消失させる別の多型がアルゼンチンで 1 人の患者に見つかっている。これらエクリズマブに抵抗性の症例に対しては、今後新たな補体阻害薬の適用（登場）が待たれる。

一方で、エクリズマブの長期使用が行われるようになり、赤血球保護作用における DAF の意義が明らかにされた。すなわち、多くの症例で、エクリズマブの使用開始後 PNH 型赤血球上に C3 の断片が徐々に蓄積していくことが見いだされた⁵⁾。これは、PNH 型赤血球では DAF が欠損しているため膜上に形成された C3 転換酵素が安定に存在し、次々と生成する C3b が結合し蓄積していくことを示している。治療前は PNH 型赤血球が短寿命であるために、C3 断片の蓄積が顕在化することはないが、エクリズマブによって PNH 型赤血球が溶血せずに長く血中にとどまると、顕在化する。C3 断片の蓄積はクームス試験で検出される程度に達する。フローサイトメ

トリーによる解析から、沈着は PNH 型赤血球だけに起こり、共存する正常赤血球には全く起こらないことが示された。これらのことから、DAF は自己細胞上で C3 転換酵素を速やかに失活させており、C3b の蓄積を防いでいることが明確になった。

PNH の 3 主徴の一つの血栓形成は、我が国の患者での頻度は低いが、欧米の患者ではより多く、大きな死因の一つである。エクリズマブの使用によって、血栓形成も有意に抑制されることが示され、血栓形成にも C5 の活性化が関与していることがわかった³⁾。そのメカニズムの詳細はまだ明らかではないが、溶血時に生じるホスファチジルセリンを露出した赤血球ゴースト膜、補体感受性の PNH 型血小板上での補体活性化とそれに伴う凝固反応等が、関与していると推定される。

4. PNH の異常細胞では GPI アンカー型タンパク質が欠損

DAF と CD59 は、どちらも糖脂質であるグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) によって膜にアンカーされている GPI アンカー型タンパク質である。また、古くから PNH では、赤血球アセ

チルコリンエステラーゼと好中球アルカリホスファターゼが低値であることが知られていたが、これらの酵素とともに GPI アンカー型タンパク質であることがわかり、PNH は GPI アンカーの異常によることが 1980 年代の後期には明確になった。

GPI アンカーは、小胞体で 11 段階の反応を経て生合成され (図 1)、DAF や CD59 など GPI アンカー付加シグナル配列を持つタンパク質の C 末端に付加され (図 2)、膜アンカーとして働く⁶⁾。患者由来の PNH 型リンパ球細胞株を用いた解析から、PNH 細胞では GPI 生合成経路の第 1 ステップの反応が欠損しているため、DAF や CD59 に膜アンカーが付加されないことが証明された。アンカーが付加されない前駆体タンパク質は、小胞体関連分解によって分解され、細胞表面に発現されないため、PNH 型細胞ではすべての GPI アンカー型タンパク質が欠損する。

5. GPI アンカー欠損は、PIGA 遺伝子の体細胞変異によって起こる

GPI アンカー生合成の第 1 ステップは、ホスファチジルイノシトール (PI) に、UDP-N アセチルグル

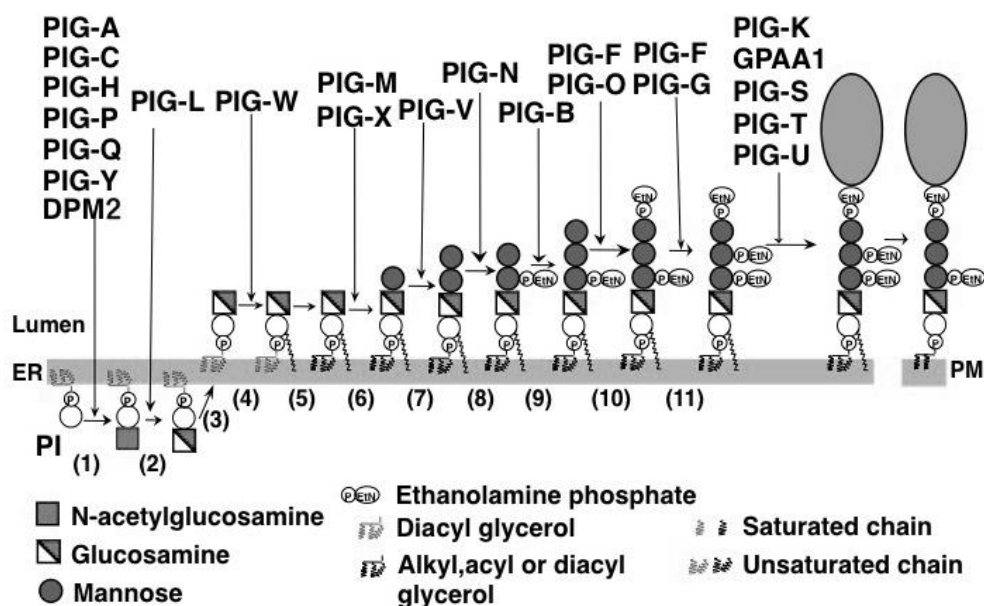


図 1, GPI アンカー型タンパク質の生合成経路⁶⁾

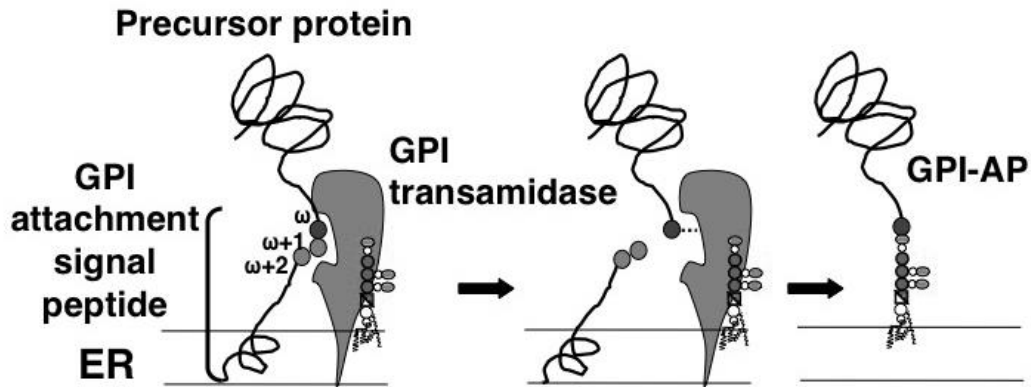


図2. GPI トランスアミダーゼによる GPI アンカーの付加⁶⁾

コサミン (UDP-GlcNAc) から GlcNAc を転移して GlcNAc-PI ができる反応である。これに働く GlcNAc 転移酵素は、7つのタンパク質の複合体で、そのうち *PIGA* が触媒サブユニットである (図 1)⁶⁾。PNH 血球では、*PIGA* に機能喪失型の体細胞突然変異を起こしている⁷⁾。そのため、GPI 生合成の第 1 ステップが進行しない。*PIGA* は、X 染色体遺伝子であり、男性の造血幹細胞ではワンヒットで GPI 欠損細胞ができる。女性であっても体細胞では片方の X 染色体は不活化されているため、活性がある方の *PIGA* に変異が起こればやはりワンヒットで GPI 欠損細胞になる。すなわち、男女ともワンヒットの体細胞突然変異で GPI 生合成を欠損した異常細胞になる⁷⁾。このことは、一部の例外的な国を除き、PNH 患者の男女比がほぼ 1 対 1 であることと符合している。

DAF と CD59 を欠損した異常細胞は、赤血球だけでなく、好中球、単球、血小板、T、B、NK リンパ球にも出現する。しかし、血液系以外の細胞には証明されない。すなわち、異常な多能性造血幹細胞ができ、それ由来のクローン性の異常細胞集団が各血球系統に出現すると理解される。同じ変異が、好中球とリンパ球に存在するので、体細胞突然変異が多能性造血幹細胞で起こっていることが示された⁷⁾。これまでに原因遺伝子が報告された 200 以上の

PNH 症例では、1 例を除きすべてが *PIGA* の変異による GPI 欠損が起こっていた。それは、GPI 生合成に必要な 20 数遺伝子のなかで、*PIGA* だけが X 染色体遺伝子で、他のすべてが常染色体遺伝子であることで説明できる。常染色体遺伝子は両親由来の両方が働くので、同一細胞に 2 つの変異が重なって起こって初めて GPI 欠損細胞になる。このような頻度は極めて低いので、通常は原因遺伝子にならないと考えられる。唯一の例外は、GPI トランスアミダーゼの構成成分である *PIGT* 遺伝子 (図 1、2) が原因であることが証明された 1 例である⁸⁾。この場合は、一方のアレルの変異は、PNH 血球だけでなく正常血球にも存在し、もう一方のアレルの変異が、PNH 血球だけに存在した。すなわち、前者は生殖細胞に存在した変異であり、後者が造血幹細胞に起こった体細胞変異であると考えられる。

6. 骨髓不全：発症への 1 段階

もう一つの主要症状である骨髓不全は、PNH の発症メカニズムに関係していると思われる。一つの異常造血幹細胞由来であるクローン性の PNH 血球は、正常細胞を凌駕して拡大しており、このクローン性の拡大は、PNH 発症に至るキーステップである。造血幹細胞に対する自己免疫によって骨髓不全となる特発性再生不良性貧血と PNH が合併するこ

とが多いことから、PNH で見られる骨髄不全も自己免疫によるものであると考えられる。GPI アンカー型タンパク質欠損細胞は、種々の細胞障害性リンパ球に対して正常細胞より抵抗性であることが示されている。自己反応性の細胞障害性リンパ球によって正常幹細胞が障害されるとき、PNH 型幹細胞が生き残ることにより、相対的に拡大するメカニズムである。骨髄不全を引き起こす自己反応性リンパ球の本体、それが認識する自己抗原と造血幹細胞傷害のメカニズムは、まだ研究途中である。複数のモデルが示され、支持する証拠が報告されているが、未だ完全証明には至っていない。その中で近年注目されているメカニズムは、糖脂質である GPI 自体が自己抗原として認識されたとする Luzzatto らの提案である。GPI は、造血幹細胞上の CD1d に結合して提示され、NKT 細胞によって認識され、造血幹細胞傷害が起こるというメカニズムである (図 3)。PNH 患者の中に、限られた T 細胞レセプター遺伝子を発現する NKT 様の LGL (Large Granular Lymphocytes) クローンを持つ例が見られること、化学合成した GPI が CD1d に結合し、NKT 細胞を活性化すること等が示されている⁹⁾。

7. GPI 欠損造血幹細胞のクローン性拡大

PNH では、好中球や単球のほぼすべてが PNH 細胞で占められていることも少なくない。このような大きな拡大は、自己免疫による選択だけでは説明しにくい。PNH 細胞だけに 12 番染色体異常を持つ 2 症例の解析から、異所性発現すると良性腫瘍を起こす High mobility group AT-hook 2 が、骨髄で異所性発現していることがわかり、これら 2 症例では、良性腫瘍性を獲得した PNH 型サブクローンが大きく拡大していることがわかった¹⁰⁾。

8. 結語

以上紹介した点に基づいて、私たちは、1) 造血幹細胞における *PIGA* の体細胞変異、2) 自己免疫によ

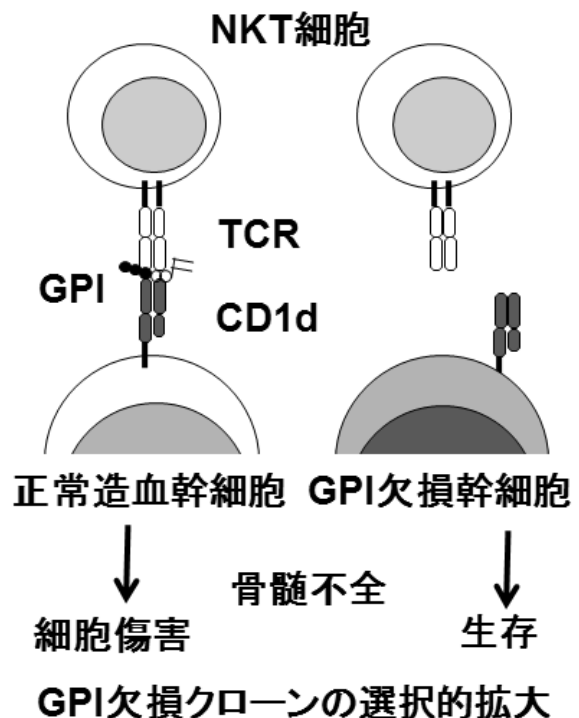


図3. GPIを自己抗原として認識するNKT細胞によるPNHクローンの選択的拡大メカニズム

る正常造血幹細胞の減少、3) *PIGA* 欠損クローンから良性腫瘍性を獲得したサブクローンの大きな拡大、の3段階PNH発症モデルを提唱している (図4)。

今後、第2ステップに関与する責任リンパ球と自己抗原実体解明、さらに大部分の染色体異常を伴わないPNH症例における良性腫瘍性拡大の分子基盤の解明が待たれる。

9. 利益相反

筆者は、本論文内容に関連した開示すべきCOI関係にある企業等はありません。

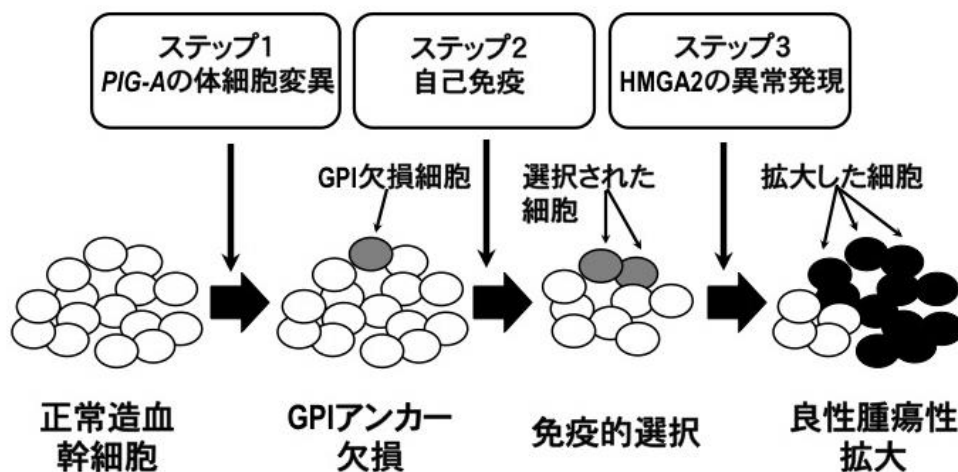


図4. PNHの3段階発症モデル

【文献】

(誌面のスペースの関係から、参考文献は主なものに限定した)

- 1) Hochsmann B, Dohna-Schwake C, Kyrieleis HA, Pannicke U, Schrezenmeier H. Targeted therapy with eculizumab for inherited CD59 deficiency. *N Engl J Med* 370: 90-92 (2014)
- 2) 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* 25: 1256-1264 (2007)
- 3) Hillmen P, Muus P, Roth A, Elebute MO, Risitano AM, Schrezenmeier H, Szer J, Browne P, Maciejewski JP, Schubert J, Urbano-Ispizua A, de Castro C, Socie G, Brodsky RA. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 162: 62-73 (2013)
- 4) Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, Noji H, Kitamura K, Eto T, Takahashi T, Masuko M, Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama H, Hase M, Li L, Johnson K, Lazarowski A, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y. Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med* 370: 632-639 (2014)
- 5) Risitano AM, Notaro R, Marando L, Serio B, Ranaldi D, Seneca E, Ricci P, Alfinito F, Camera A, Gianfaldoni G, Amendola A, Boschetti C, Di Bona E, Fratellanza G, Barbano F, Rodeghiero F, Zanella A, Iori A P, Selleri C, Luzzatto L, Rotoli B. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood* 113: 4094-4100 (2009)
- 6) Kinoshita T. Biosynthesis and deficiencies of

- glycosylphosphatidylinositol. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 90: 130-143 (2014)
- 7) Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, Takahashi M, Kitani T, Kinoshita T. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 73: 703-711 (1993)
 - 8) Krawitz PM, Hochsmann B, Murakami Y, Teubner B, Kruger U, Klopocki E, Neitzel H, Hoellein A, Schneider C, Parkhomchuk D, Hecht J, Robinson PN, Mundlos S, Kinoshita T, Schrezenmeier H. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood* 122: 1312-1315 (2013)
 - 9) Gargiulo L, Papaioannou M, Sica M, Talini G, Chaidos A, Richichi B, Nikolaev AV, Nativi C, Layton M, de la Fuente J, Roberts I, Luzzatto L, Notaro R, Karadimitris A. Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 121: 2753-2761 (2013)
 - 10) Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, Endo Y, Nishimura J, Kurokawa K, Kuwayama M, Shime H, Machii T, Kanakura Y, Meyers G, Wittwer C, Chen Z, Babcock W, Frei-Lahr D, Parker CJ, Kinoshita T. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 108: 4232-4236 (2006)