

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09663

研究課題名(和文)凝固第Ⅷ因子活性化・不活化機構の解明と新規凝固・抗凝固薬の応用に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms of activation and inactivation of factor VIII:  
Applications of novel (anti-)coagulant therapy

研究代表者

野上 恵嗣 (Nogami, Keiji)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50326328

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)：血液凝固における出血・止血の両面に重要に関与する凝固第Ⅷ因子(FVIII)において、FVIII活性化に極めて重要な開裂を制御するトロンビン結合領域を初めて同定した。また、凝固反応初期相での活性化型第Ⅶ因子/組織因子(FVIIa/TF)制御において、外因系凝固機構のみならず、FVIII-FVIIa/TF制御軸により内因系凝固機構も発動し、両機構において初期相が機能していることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Regards the coagulant factor (F)VIII protein that is essential to both sides of hemorrhage and hemostasis in the blood coagulation, we for the first time identified the thrombin-binding sites responsible for the cleavages at Arg372 and Arg1689 in the FVIII activation. In addition, in terms of activated FVII/tissue factor (FVIIa/TF), we found not only the extrinsic-related coagulation mechanism, the intrinsic-related coagulation mechanism by the FVIII-FVIIa/TF-related regulation exerts, consequently both mechanisms function in the initial phase of coagulation process.

研究分野：血栓止血

キーワード：第Ⅷ因子 トロンビン 活性化型第Ⅶ因子 組織因子 凝固機序 活性化 第Ⅹ因子

## 1. 研究開始当初の背景

血液凝固第 Ⅷ 因子(FVIII)の欠乏により、関節内・筋肉内出血を中心とした重篤出血を繰り返す血友病 A を呈する。止血治療は、FVIII 製剤の補充療法であるが、頻回補充の必要性や止血管理に難渋する同種抗体(インヒビター)出現等の問題点がある。一方、血栓症患者の FVIII 活性値が高値であることがすでに証明され、FVIII と血栓形成の関連が注目されていることから、FVIII は出血と血栓の病態において重要な凝固因子であることがわかる。しかし、FVIII を中心とする凝固血栓形成機序およびその抑制機序には不明な点が多い。FVIII 活性化/不活化機序を含む分子構造機能の解明は、血友病 A の新たな治療戦略と血栓形成の種々の病態に応じた新規抗血栓凝固療法の確立に多いに期待されている。

## 2. 研究の目的

従来の凝固血栓研究は、内因系/外因系/凝固抑制系/線溶系の個々の反応系において研究され発展してきたが、生体内での真の凝固過程はこれら複数が互いに絡み合い進行していくとの概念になりつつある。本研究は、この新たな概念を軸にして、FVIII と内因系、外因系、線溶系、凝固抑制系、炎症系との関連性に注目し、FVIII 分子構造や凝固血栓形成/抑制機序を解明し、長時間作用型または高作用獲得型 FVIII 製剤や血栓形成病態に応じた FVIII を制御する抗血栓・凝固薬開発の基礎研究が目的である。

## 3. 研究の方法

### 1) FVIII-トロンピン (FIIa) 制御軸

凝固反応増幅には FVIIa の FVIII の Arg372, Arg740, Arg1689 開裂に伴う活性化が必須である。各々開裂部位近傍の酸性領域内に FIIa 高親和性の hirugen54-65 残基類似のアミノ酸配列が存在する。この残基の FVIII 合成ペプチドを用い、FIIa による活性化・開裂化の抑制能、FIIa-FVIII 結合の抑制能をすでに確立の系で検討する。その推定した結合領域における F 変異株を BHK 細胞上で発現させ、各開裂反応を制御する FIIa の FVIII 上結合領域のアミノ酸残基を同定する。

### 2) FVIII-活性型第 VII 因子/組織因子 (FVIIa/TF) 関連凝固制御

凝固初期相における FVIIa/TF による FVIII/von Willebrand 因子 (VWF) 活性化、FXa-FVIIa/TF による FVIII/VWF 活性化およびその促進機序について凝固一段法、

SDS-PAGE/Western blot 法、結合実験 (ELISA, 表面プラスモン共鳴法) FXa 生成実験等を用いて、FVIII-FVIIa/TF の凝固初期相の制御軸を最終的に明らかにする。

## 4. 研究成果

### 【FVIII-FIIa 制御機構】

FVIII 活性化に極めて重要な Arg372 開裂を制御する FIIa 結合領域は酸性領域内アミノ酸残基 340-350 内で存在し、特に Asp347-349 領域と硫酸化 Tyr346 が重要に関与していることが明らかになった。一方、VWF が FVIII 活性化の際に遊離するに關与する Arg1689 開裂を制御する FIIa 結合領域は酸性領域内アミノ酸残基 1663-1666 内に存在し、その結合に硫酸化 Tyr1664 が關与していることが明らかになった。

【FVIII-FVIIa/TF 制御機構】今回の研究から、凝固初期相での FVIII-FVIIa/TF 制御において、TF 依存性に FVIIa の FVIII 活性化による intrinsic Xase の発動、FVIIa-FX の extrinsic Xa の発動、FVIIa 非依存性 FVIII 特に C2 ドメイン-TF 結合による内因系 Xase の発動による FXa 生成の促進、FVIIa form に関係なく FXa-FVIIa(/FVIIai)-TF-リン脂質複合体が FVIII/VWF において TF の FVIII-VWF 結合を競合阻害することにより、本複合体 FXa の FVIII 活性化による tenase 生成機序を初めて明らかにした。これら全機序の存在が、FVIII が共存する後天性血友病 A や血友病 A インヒビター患者へのバイパス製剤止血管理中での FVIII 存在下においてのバイパス製剤に含有する FVIIa 作用増強の臨床的特徴を支持した。

FVIIIは内因系凝固の関与のみならず、従来の概念にはなかった外因系/組織因子がFVIIIと相互作用することにより凝固血栓を巧みに制御していることがわかった。また、FVIII活性化機序のessential keyになるFIIa結合部位の同定に成功したことは、今後のFVIII関連新規凝固制御薬の開発に大きなヒントになると考える。今後引き続き本研究を継続し、さらなる解明をしていく予定である。

## 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 8 件)

1. Nogami K, 他6名. Factor (F)VIII/VIIa enhances global haemostatic function in the co-presence of bypassing agents and FVIII among patients with haemophilia A with inhibitor. Brit J Hematol, 2018, accept
2. Furukawa S, Nogami K, 他3名. Successful prophylaxis using activated prothrombin complex concentrates (aPCC) in a severe haemophilia A patient with inhibitor previously unresponsive to on-demand daily infusions of aPCC. Haemophilia. 23; e481-e484; 2017
3. Matsumoto T, Nogami K, 他6名. Clot waveform analysis using CS-2000i™ distinguishes between very low and absent levels of factor VIII activity in patients with severe haemophilia A. Haemophilia. 23; e427-e435; 2017
4. Yaoi H, Nogami K, 他4名. Role of red blood cells in the anemia-associated bleeding under high shear conditions. Haemophilia. 23; 750-758; 2017
5. Nogami K, 他9名. Assessing the clinical severity of type 1 von Willebrand disease patients with a microchip flow-chamber system. J Thromb Haemost. 14; 667-674; 2016
6. Shima M, Nogami K, 他8名. Factor VIII mimetic function of humanized bispecific antibody in hemophilia A. N Engl J Med. 374; 2044-2053; 2016
7. Furukawa S, Nogami K, 他4名. Systematic monitoring of hemostatic management in hemophilia A patients with inhibitor in the perioperative period using rotational thromboelastometry. J Thromb Haemost. 13; 1279-1284; 2015
8. Yada K, Nogami K, 他4名. Mild hemophilia A patient with novel Pro1809Leu mutation develops an anti-C2 antibody inhibiting allogeneic but not autologous factor VIII activity. J Thromb Haemost. 13; 1843-1853; 2015

〔学会発表〕(計6件)

1. 南博明, 野上恵嗣, 他. 第VIII因子A1残基346-349はArg372の開裂を制御する新たなトロンピン結合部位である. 第79回日本血液学会. 2017年10月. 東京
2. 野上恵嗣. 血液凝固第VII因子の軌跡と今後の展望. 第79回日本血液学会.

2017年10月. 東京

3. 古川晶子, 野上恵嗣, 他. 凝固初期相におけるFVIII活性化を介したTF依存性内因系 tenase 促進機序. 第39回日本血栓止血学会. 2017年6月. 名古屋
4. 矢田弘史, 野上恵嗣, 他. Tenase(Xase)反応軸に基づく中等症・軽症血友病Aにおける異常FVIIIの多元的機能解析. 第39回日本血栓止血学会. 2017年6月. 名古屋
5. Nogami K. A novel mechanism on thrombin-catalyzed activation of factor VIII molecule during the clot formation. Nov. 38回血栓止血学会 SPC シンポジウム. 2016年6月. 奈良
6. Nogami K. A novel regulatory mechanism of FVIIa/TF associated with FVIII on the initial phase of coagulation. 第36回血栓止血学会 SPC シンポジウム. 2014年5月. 大阪

〔図書〕(計2件)

1. 野上恵嗣. 第VIII因子と第V因子の基礎と臨床. 新血栓止血血管学 金方堂. 2015
2. 野上恵嗣. 血友病Aの分子病態の進歩 - 第VIII因子構造・機能からみた病態. 日本小児血液・がん学会雑誌. 51; 452-458; 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕  
 ホームページ等: 特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野上恵嗣 (NOGAMI KEIJI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50326328

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：