

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10125

研究課題名(和文) APCおよびPSによる第VIII因子制御機構の解明および新規血友病製剤への応用

研究課題名(英文) Regulation of factor VIII by activated protein C and protein S

研究代表者

武山 雅博 (Takeyama, Masahiro)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30572010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：FVIIIの活性型プロテインC (APC)及びプロテインS (PS) による不活化機序は完全には解明されていないため、APC/PSの結合部位を同定し不活化機序の解明を目指した。APCの新規結合部位がFVIII A1ドメインのアミノ酸残基420-429に結合することがわかった。また、PS結合部位である、FVIII A2ドメインアミノ酸残基488-490およびC2ドメインアミノ酸残基2239をアラニンに変異させたFVIIIを作成した。この変異FVIIIはPSとの結合性は低下するものの、FIXaとの結合性はある程度保持されている事がわかり、新規FVIII製剤としての可能性を示唆していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血友病Aは凝固第VIII因子(FVIII)の欠乏によっておこる。治療に用いるFVIII製剤は半減期が短く頻回な投与が必要である。FVIIIは活性型プロテインC (APC)及びプロテインS (PS) により不活化される。従って、FVIIIとAPC/PSの結合を制御することは、新規FVIII製剤の開発につながる。FVIIIのAPC/PS結合部位のアミノ酸を置換することで、APC/PSとの結合能が弱い変異FVIIIを作製した。この変異FVIIIによる新規製剤はAPC/PSに不活化されにくいいため、従来の製剤より安定性が高く、長時間作用すると考えられ、患者のQOLの向上に役立つものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Factor (F) VIII functions as a cofactor in the tenase complex responsible for phospholipid (PL) surface-dependent conversion of FX to FXa by FIXa. On the other hand, protein S (PS) functions as a cofactor of activated protein C (APC) that inactivates FVIII(a) and FV(a). In this study, several approaches were employed to assess APC-FVIII A2 interaction and PS-FVIII LC interaction. Amino acid residues 420-429 in FVIII A2 domain might be the new APC binding site. On the other hand, FVIII mutant, S488A/S489A/R490A/K2239A, showed the low affinity to PS comparing to wild type FVIII. However, this FVIII mutant had a moderate affinity to FIXa. Therefore, FVIII mutant, S488A/S489A/R490A/K2239A, could be new FVIII concentrate which has the longer half-life.

研究分野：血液凝固

キーワード：血友病 第VIII因子 プロテインS 活性型プロテインC

1. 研究開始当初の背景

凝固第 VIII 因子 (FVIII) は、血液凝固反応において必須の糖蛋白であり、先天的欠乏により血友病 A を引き起こす。その治療は FVIII の補充療法であるが、製剤の頻回補充の必要性や治療に難渋する同種抗体 (インヒビター) 出現等、改善すべき課題が山積している。また、血栓症患者において FVIII が高値であることが統計学的に証明され、FVIII は出血傾向のみならず血栓形成にも関与している。従って、FVIII は出血と血栓の相反する病態において極めて重要な因子である。しかし、FVIII を中心とする凝固制御機序は未だにすべては解明されていない。これまで我々の研究室では FVIII の活性化・不活化機序やインヒビターの病態解明に結びつく研究を行っている。最近、血液凝固/線溶/不活化因子が複雑に絡み合う生体内反応における FVIII の役割を研究している。

FVIII はトロンピンや活性型第 X 因子により活性化される。活性型 FVIII (FVIIIa) は活性化プロテイン C (APC) およびその補因子であるプロテイン S (PS) により不活化され、凝固を負に制御される。従って FVIII と APC/PS の相互作用を研究することは、凝固・抗凝固機序を解明する事につながる。また、プロテイン C は抗炎症作用やアポトーシス抑制作用も有する。さらに、PS は炎症を抑制する働きがあるといわれており、単に APC の補因子としての働きだけでなく、それ単独で様々な役割を担っていると考えられる。血友病の関節出血では、滑膜の炎症が引き起こされることで関節症が進行すると考えられている。従って、FVIII と抗凝固・抗炎症作用を有する APC、PS の関連を明らかにすることは、血友病の病態解明、およびその治療戦略に非常に意義があると考えられる。

現在までに、APC の FVIII 結合部位の詳細な同定を行い、APC が FVIII 軽鎖アミノ酸残基 2007-2016 に結合することを示した (Takeyama M, Thromb Haemost, 2013)。また、APC 側の FVIII 結合部位についても検討を行い、APC 上の exosite の塩基性アミノ酸に FVIII が結合することを証明した (Takeyama M, Biochemistry, 2013)。これらの研究により、FVIII の APC による凝固制御機構が一段と明らかになった。FVIII 重鎖については、APC は FVIII 重鎖アミノ酸残基 336-372 に結合する可能性があると、FVIII のアミノ酸を一部置換した変異 FVIII を用いた実験により示されていた (Varfaj F. Biochem J, 2006)。そこで、平成 26~28 年度の基盤研究 C において、APC の FVIII 重鎖上の結合部位の同定を試みた。しかし、336-372 ペプチドを用いた実験で、本ペプチドと APC は結合せず、FVIII 重鎖アミノ酸残基 336-372 は APC の結合部位ではない可能性が高いと考えられた。最近、FVIII 重鎖 A2 ドメインに新規 FX 結合部位があることを証明した (第 56 回米国血液学会で発表)。さらに、FVIII A2 のペプチド (400-409) および変異 FVIII を用いた検討により、FVIII アミノ酸残基 408, 409 が FX との結合に重要であることを示した (第 58 回米国血液学会で発表予定)。以前行った研究で、FVIII 軽鎖上の FX 結合部位 (アミノ酸残基 2007-2016) と APC 結合部位がオーバーラップしていた (Takeyama M, Thromb Haemost, 2013) こと、さらに FVIII の 3D 構造から、重鎖 A2 ドメインのアミノ酸残基 400-409 がアミノ酸残基 2007-2016 と同一平面上に位置するため、アミノ酸配列 400-409 も APC 結合部位である可能性があり、今後検討を行う。

PS は APC の補因子として FVIII を不活化するとともに、その欠乏症は血栓症を引き起こす。さらに PS は炎症時に上昇し、炎症を抑制する働きがあるといわれており、単に APC の補因子としての働きだけでなく、それ単独で様々な役割を担っていると考えられる。現在までに、FVIII と PS が APC 非依存性に関与する可能性を考え研究を行ってきた。FVIIIa はリン脂質上で FIXa と FX とともに tenase complex を形成し、FX を Fxa に変換させて凝固は促進されるが、PS は FVIII の重鎖 A2 ドメインに結合することで、FIXa が FVIIIa に結合することを競合的に阻害する。その結果 tenase complex が形成されず、Fxa 生成を抑制し直接凝固を制御することを示した (Takeyama M, Br J Haematol, 2008)。また、PS が FVIII 重鎖 A2 ドメイン (アミノ酸残基 488-490) に結合することも証明した (Takeyama M, Thromb Haemost, 2009)。さらに、平成 26~28 年度の基盤研究 C において、FVIII 軽鎖上の PS の結合部位の同定を行った。PS は FVIII C2 ドメインに結合し、その結合部位は FIXa の結合部位 (アミノ酸残基 2228-2240) とオーバーラップしていることを明らかにした。さらに、アミノ酸残基をアラニンに置換した変異 FVIII を用いた検討により、FVIII アミノ酸残基 2239 が PS との結合に寄与していることを証明した (第 78 回日本血液学会で発表、第 58 回米国血液学会で発表)。以上の結果から、PS の FVIII 重鎖および軽鎖上結合部位が明らかになった。また、PS と APC の FVIII 上の結合部位は、FVIII をはさんで対極に位置することがわかった。これらの結果から、FXase complex において、APC が FVIIIa を不活化する作用、PS が FVIII と FIXa の結合を競合的に阻害する作用、APC が FVIII と FX(a) の作用を競合的に阻害する作用、という PS/APC による全く新しい凝固・抗凝固メカニズムが明らかになってきた。

一方、PS 上の FVIII 結合部位は明らかにされていない。すでに、APC 上の FVIII 結合部位が APC 上の exosite の塩基性アミノ酸であることは証明されており (Takeyama M, Biochemistry, 2013)、PS 上の FVIII 結合部位を同定することは、FVIII の APC/PS による不活化機序のさらなる解明につながると考えられ、本研究で究明を目指す。

以上の背景を踏まえ、FXase 複合体における FVIII, FX, FIXa の相互作用、および APC/PS の相互作用を検討することは、凝固・抗凝固機構の解明につながると考えられる。さらにその結果をもとに、作成した FVIII と APC/PS の結合部位を変異させた FVIII は、凝固・抗凝固を制御す

る新規血友病製剤としての可能性を秘めている。

2．研究の目的

凝固第 VIII 因子 (FVIII) は凝固反応において必須であり、欠乏により血友病 A を起こす。治療に用いる FVIII 製剤は半減期が短く頻回な投与が必要である。一方、FVIII は活性型プロテイン C (APC) 及びプロテイン S (PS) により不活化されるが、その不活化機序は完全には解明されていない。本研究では FVIII と APC/PS の結合部位を同定し不活化機序の解明を行う。FVIII と APC/PS の結合を制御することは、新規 FVIII 製剤の開発につながると考えられるため、FVIII の APC/PS 結合部位のアミノ酸を置換することで、APC/PS との結合能が弱い変異 FVIII を作製する。この変異 FVIII による新規製剤は APC/PS に不活化されにくいため、従来の製剤より安定性が高く、長時間作用すると考えられ、患者の QOL の向上に役立つものと期待できる。

3．研究の方法

結合部位の同定は、ELISA, 電気泳動, Western blotting, Biacore などを用いて行った。変異 FVIII は BHK を用いた system により発現させ、得られた FVIII の解析は FIXa 生成、Western blotting などを行った。

4．研究成果

まず、FVIII 重鎖上の APC 結合部位の同定をおこなった。SPR-based assay によると、FVIII A1 は APC と結合しなかったが、FVIII A2 ドメインには結合した (Kd 37 nM)。FVIII A2 ドメインのアミノ酸残基 400-429 が APC 結合部位である可能性を想定していたが、ELISA で、DEGR-APC と FVIII A2 の結合が、400-409, 409-420 および 420-429 の各ペプチドにより抑制されるかを検討したが、いずれのペプチドも抑制しなかった。SPR-assay で、FVIII A2 ドメイン 420-429 ペプチドのみが APC と結合した (約 300 μ M)。このことから、FVIII A2 ドメイン 420-429 に APC の新規結合部位が存在する可能性を証明した。また、FVIII 重鎖・軽鎖上の APC/PS 両結合部位である、FVIII A2 ドメインアミノ酸残基 488-490 および C2 ドメインアミノ酸残基 2239 をアラニンに変異させた FVIII を作成作製した。PS を非添加・添加した場合の FVIII と FIXa との結合性を Xa 生成試験で検討した。Wild type は PS 添加により、FIXa との結合性は約 2.4 倍低下した。S488A/S489A/R490A と FIXa との結合性は、PS 添加によりその結合性は約 1.1 倍低下した。K2239A と FIXa との結合性は PS 添加によりその結合性は約 1.75 倍低下した。以上のことから、S488A/S489A/R490A および K2239A の変異を有する変異 FVIII は PS 添加によっても、WT ほどは FIXa との結合性が低下しないことが示された。以上の結果から、FVIII A2 ドメインアミノ酸残基 488-490 および C2 ドメインアミノ酸残基 2239 をアラニンに変異させた変異 FVIII は PS との結合性は低下するものの、FIXa との結合性はある程度保持されている事がわかり、新規 FVIII 製剤としての可能性を示唆していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeyama M, Nogami K, Sasai K, Furukawa S, Shima M.	4. 巻 118
2. 論文標題 Contribution of Factor VIII A2 Domain Residues 400-409 to a Factor X-Interactive Site in the Factor Xase Complex.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 830-841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0038-1637745	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 武山雅博
2. 発表標題 小児血友病患者のnormalizationを目指して
3. 学会等名 第59回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masahiro Takeyama, Keiji Nogami, Kana Sasai and Midori Shima
2. 発表標題 Contribution of factor VIII A3 domain residues 1793-1795 to a factor IXa-interactive site
3. 学会等名 第60回アメリカ血液学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Takeyama, Keiji Nogami, Kana Sasai and Midori Shima
2. 発表標題 Identification of new factor IXa-interactive site on the factor VIII A3 domain
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	野上 恵嗣 (Nogami Keiji) (50326328)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	