

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07885

研究課題名(和文) 血液凝固における第 VIII 因子制御軸の解明と血友病A及び血栓性疾患の新規治療薬への応用

研究課題名(英文) Identification of mechanism of FVIII-regulated blood coagulation and development on novel therapeutic drugs for hemophilia A and thrombotic disease

研究代表者

野上 恵嗣 (NOGAMI, KEIJI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50326328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血液凝固における出血と止血の両面に関与する凝固第VIII因子(FVIII)において、FVIII開裂による活性化を制御する新規トロンビン結合領域を同定し、その結合領域にfocusした高活性機能獲得型FVIII蛋白の作製に成功した。また、凝固反応初期相において、FVIII-FVIIa/組織因子(TF)機構により内因系凝固機構も同時に発動すること、その発動機序、FVIII上のFVIIa/TFの結合領域も同定した。さらに内因性FX複合体におけるFVIIIa上の新規FIXa結合領域を同定した。FVIIIa-FIXa結合にfocusした機能獲得型FVIII蛋白も作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液凝固第VIII因子は出血と血栓の相反する病態に関わる重要な凝固因子であるため、今回の研究における第VIII因子に関連する機能構造および他の凝固因子との相互反応の解明が、凝固や血栓形成機序の解明と血友病A患者への新規第VIII因子治療製剤開発への応用、また第VIII因子の生体内機能を制御する抗血栓および抗凝固薬の開発に将来的に繋がり、止血血栓学の学問的発展および医療に貢献できると思われる。

研究成果の概要(英文)：1) We have identified novel thrombin-binding sites of factor VIII (FVIII), which is involved in both hemorrhage and hemostasis in blood coagulation, which regulates FVIII activation due to its cleavage. We successfully generated a gain-of-function FVIII protein with high activity, focused on one thrombin-interactive site responsible for cleavage at Arg372 in A1 of FVIII. 2) In the early phase of the coagulation process, we have clarified that FVIII-FVIIa/tissue factor (TF) mechanism activates the endogenous coagulation process as well simultaneously and in addition have identified the FVIIa/TF-binding region on FVIII. 3) Moreover, we have identified a novel FIXa-binding region on FVIIIa in the intrinsic FX complex on the phospholipid surfaces, and have generated a gain-of-function FVIII protein focused on the FVIIIa A3 domain-FIXa interaction.

研究分野：止血血栓学

キーワード：第VIII因子 トロンビン 第VII因子 第IX因子 凝固 遺伝子組み換え 機能獲得

## 1. 研究開始当初の背景

凝固第 因子は、凝固反応過程において血小板膜上で第 因子の補因子として機能し、凝固速度を 20 万倍増強させる糖蛋白である。本因子欠乏は遺伝性に重篤な出血症状を呈する血友病 A であり、治療の基本は第 因子補充療法である。半減期延長製剤が普及しつつあるが、なお頻回補充を要すること、同種抗体 (インヒビター) の出現など課題が多い。一方、本邦は脳梗塞や心筋梗塞の血栓症が死因の上位を占めることから、血栓形成の更なる病態解明と安全かつ有効な抗血栓・抗凝固薬の開発継続は重要である。近年、血栓症患者の第 因子活性レベルが高値を示すことが証明され、第 因子と血栓との関連も重視されている。第 因子は出血と血栓の相反する病態に関わるため、本因子機能構造の解明が、凝固・血栓形成機序の解明と血友病 A 患者への新規第 因子治療製剤や本因子機能制御の抗血栓・抗凝固薬の開発に繋がることが期待できる。従来、凝固研究は、凝固初期相に關与の外因系、トロンビンバーストの増幅相に關与の内因系、プロテイン C 関連凝固抑制系、フィブリン溶解の線溶系と個々に研究され発展してきた。現在、これら複数系が同時に絡み合い進行していく概念であるため、出血・血栓の両病態の鍵である第 因子と各経路系との相互作用について、我々は種々の方法を用いて多くの知見を示した。しかし本因子の機能構造は未だ不明な点が多く、早急な解明が待たれる。

## 2. 研究の目的

血液凝固第 因子は、欠乏では重篤出血 (血友病 A)、逆に増加は血栓形成を惹起するため、血栓制御において重要な役割を担う。凝固促進はトロンビンの第 因子活性化、凝固抑制は活性型プロテイン C による不活化が重要である。凝固は内因系、外因系、線溶系、凝固抑制系が同時に絡み合い進行するため、第 因子と複数系各因子の相互作用に注目し、本因子の機能構造と凝固促進/抑制機序を解明してきた。本研究は、第 因子活性化と活性維持に關与するトロンビン、内因系 (活性型第 因子、第 X 因子)、外因系 (活性型第 因子) 制御軸での第 因子分子上の各因子結合部位の同定と生理的意義の解明、各結合部位をターゲットにした遺伝子組み換え第 因子やペプチド蛋白を作製し、凝血的検討を行う。血友病 A 患者への本因子機能の作用持続や増強の多機能獲得第 因子製剤ならびに血栓形成病態に応じた本因子機能制御の抗凝固・抗血栓薬の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1) 第 因子 (F ) -トロンビン (FIIa) 結合における凝固制御

凝固反応増幅に FIIa による F の Arg372, 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 高親和の hirugen 残基類似のアミノ酸残基が配列する。この残基を中心とした F 合成ペプチドを用いて FIIa による活性化と開裂の抑制能を既確立の系で検討する。その推定した結合領域における F 変異体を BHK 細胞で発現させ、各開裂反応を制御する FIIa の F 上結合領域のアミノ酸残基を同定する。その結合領域を改変した高活性化型 F 変異体を作製する。

### 2) F -活性型第 VII 因子/組織因子 (F a/TF) における凝固制御

凝固初期相における F a/TF による F /von Willebrand 因子 (VWF) への反応促進機序について結合実験 (ELISA, 表面プラスモン共鳴法) 等を用いて、さらに FVIII-FVIIa/TF の凝固初期相制御をさらに解明する。

3) 内因性 FX 複合体での F a-F a 結合制御: F a-F a 結合は凝固活性維持上極めて重要で、F a 結合部位のさらなる同定と結合領域を改変した機能獲得型 F 変異体を 1) の手法で検討する。

## 4. 研究成果

【F<sub>1</sub>-FIIa 制御機構】F<sub>1</sub> 重鎖 Arg372 と軽鎖 Arg1689 を開裂し活性化させる FIIa の F<sub>1</sub> 結合領域（346-349 残基、1680/1683-1684 残基）を初めて同定した。本領域は硫酸化 Tyr 残基を中心の酸性残基領域であった。F<sub>1</sub>-A1 酸性領域を hirugen 配列に完全置換した FVIII-hirugen hybrid 変異体を作製した。本変異は FIIa 活性化が野生株より 1.5 倍以上増強すること、Arg372 開裂がより即時に起こること、両者の結合反応が野生株に比し結合定数が増加していた。一方、1680-1684 領域では Tyr1680 が重要であり、VWF 存在下では本変異体（Y1680A）の FIIa 反応性低下が野生株同等の解離定数に改善しており、VWF 結合による立体構造上変化が結合に影響していることを明らかにした。

【F<sub>1</sub>-F<sub>1</sub>a/TF- F<sub>1</sub> 制御機構】F<sub>1</sub>a/TF- F<sub>1</sub> 制御機構において、凝固極初期相に発動すること、VWF や組織因子経路インヒビター（TFPI）にも影響を受けずに F<sub>1</sub> を活性化させること、その機序に F<sub>1</sub>a-A2 ドメイン結合、TF-C2 ドメイン結合（インヒビターエピトープと overlap していない）が必須であることを解明した。

【内因系複合体】リン脂質膜上での F<sub>1</sub>a/F<sub>1</sub>a/FX 制御：F<sub>1</sub>A3 ドメイン上 1793-1795 領域が F<sub>1</sub>a 結合領域の一つであることを同定した。さらに、従来同定されていた F<sub>1</sub>a 結合部位の 1811-1818 領域内において、F<sub>1</sub>a-F<sub>1</sub>a 結合親和性を高め、内因性 FX 複合体活性を増強する変異体（K1813A/K1818A）は F<sub>1</sub> 欠乏血漿に添加しその凝固能も亢進していることを示すことができた。

F<sub>1</sub> は内因系凝固の制御のみならず、従来の概念にはなかった外因系/組織因子が F<sub>1</sub> と相互作用することにより凝固止血血栓を巧みに制御していることが明らかになった。また、F<sub>1</sub> 活性化機序の鍵になる FIIa 結合部位の同定、そして各結合部位を改変させることにより機能獲得型 F<sub>1</sub> 変異体作製にも成功したことは、今後の F<sub>1</sub> 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

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Nakajima Y, Nogami K	4. 巻 19
2. 論文標題 The C-terminal acidic region in the A1 domain of factor VIII facilitates thrombin-catalyzed activation and cleavage at Arg 372	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis.	6. 最初と最後の頁 677-688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.15201	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 -
1. 著者名 Nakajima Y, Minami H, Nogami K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Acidic Region Residues 1680-1684 in the A3 Domain of Factor VIII Contain a Thrombin-Interactive Site Responsible for Proteolytic Cleavage at Arg1689	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0041-1723996	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 -
1. 著者名 Furukawa S, Nogami K, Ogiwara K, Shima M.	4. 巻 109
2. 論文標題 Potential role of activated factor VIII (FVIIIa) in FVIIIa/tissue factor-dependent FXa generation in initiation phase of blood coagulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 390-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02611-3	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 -
1. 著者名 Minami H, Nogami K, Yada K, Ogiwara K, Furukawa S, Soeda T, Kitazawa T, Shima M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Emicizumab, the bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, potentiates coagulation function in factor XI-deficient plasma in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 126-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14334	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 -

1. 著者名 Nogami K, Matsumoto T, Sasai K, Ogiwara K, Arai N, Shima M.	4. 巻 187
2. 論文標題 A novel simultaneous clot-fibrinolysis waveform analysis for assessing fibrin formation and clot lysis in haemorrhagic disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 518-529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16111.	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 -

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 -

1. 著者名 Nogami K, Matsumoto T, Yada K, Ogiwara K, Furukawa S, Shida Y, Takeyama M, Shima M.	4. 巻 181
2. 論文標題 Factor (F)VIII/VIIa enhances global haemostatic function in the co-presence of bypassing agents and FVIII among patients with haemophilia A with inhibitor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 528-536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.15209	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 -

1. 著者名 Nogami K, Matsumoto T, Tabuchi Y, Soeda T, Arai N, Kitazawa T, Shima M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Modified clot waveform analysis to measure plasma coagulation potential in the presence of the anti-factor IXa/factor X bispecific antibody emicizumab.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 1078-1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14022	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 -

1. 著者名 Nogami K, Soeda T, Matsumoto T, Kawabe Y, Kitazawa T, Shima M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Routine measurements of factor VIII activity and inhibitor titer in the presence of emicizumab utilizing anti-idiotypic monoclonal antibodies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 1383-1390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14135	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 -

1. 著者名 Minami H, Nogami K, Soeda T, Kitazawa T, Hattori K, Shima M.	4. 巻 166
2. 論文標題 The factor VIII heavy chain improves emicizumab-tenase assembly to enhance the factor VIII-mimicking cofactor activity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 77-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres	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5件(うち招待講演 3件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Nogami K
2. 発表標題 Update on factor (F)VIII structure and function-related hemostatic coagulation and its regulatory mechanism(s)
3. 学会等名 82th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakajima Y, Nogami K, Minami H, Sasai K, Shima M
2. 発表標題 Residues 1680-1684 in the A3 Domain of Factor VIII Contain a Novel Thrombin-Interactive Site Responsible for Proteolytic Cleavage at Arg1689
3. 学会等名 the 61st ASH Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiji Nogami
2. 発表標題 Current and Future Prospects on the Hemostatic Treatment for Hemophilia
3. 学会等名 Taiwan Society of Blood and Marrow Tranplantation Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiji Nogami
2. 発表標題 A bispecific antibody, Emicizumab (HEMLIBRA), mimicking factor VIII: A novel alternative therapy for patients with hemophilia A with inhibitor
3. 学会等名 80th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuito Nakajima, Keiji Nogami, Koji Yada, Midori Shima
2. 発表標題 A novel mechanism of factor VIIa/Tissue Factor (TF)-catalyzed activation and inactivation of B-domain-deleted Factor VIII in the early initiation phases of coagulation
3. 学会等名 60th Annual Meeting of the American Society of Hematology
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------