

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17373

研究課題名（和文）血友病A治療におけるインヒビター発生抑制を標的とした新規第VIII因子製剤の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Factor VIII Formulation Targeting Prevention of Inhibitor Development in Hemophilia A Therapy

研究代表者

古川 晶子（FURUKAWA, Shoko）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60596667

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、インヒビター保有軽症・中等症血友病A患者を凝血学的および分子細胞免疫学的に解析しインヒビター発生メカニズムを解明するための基礎的データを得ることを目的として実施した。当施設では研究期間開始までに7例の経験があったが、研究期間中には1例が新たに発生し解析を実施できた。本例の遺伝子変異はE272Kであったが、過去の7例にも同変異を有する症例が存在し、インヒビター発生リスクとなり得る可能性が示唆された。また自験例のひとつであるP1809Lと相同性の高いP1777L変異をマウスにKnock-inすることで軽症血友病Aモデルマウスを作製しインヒビター発生系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で解析できた新規症例では、過去にもインヒビター発生例のあった遺伝子変異が同定され、遺伝子変異がインヒビター発生リスクのひとつであるという過去の報告を支持する結果となった。また希少疾患である血友病A患者のうち軽症・中等症でインヒビターが発生する症例は少ないため、これまで十分な解析が不可能であったが、本研究で軽症血友病Aモデルマウスを作製しインヒビター解析系を確立できたことは、今後のインヒビター関連の解析に大いに役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to obtain basic data to elucidate the mechanism of inhibitor development through hematological and molecular cellular immunological analysis of mild/moderate hemophilia A patients with inhibitors. We had experience with seven cases by the beginning of the study period, and one new case occurred during the study period and could be analyzed. The point mutation in this case was E272K, and the one of 7 previous cases had the same mutation, suggesting that it may be a risk for the development of inhibitors. We also generated a mouse model of mild hemophilia A by knock-in of the P1777L mutation, which is highly homologous to P1809L in one of our own cases, and established the inhibitor generation and analysis model.

研究分野：血液凝固

キーワード：血友病A インヒビター 遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性血友病 A は凝固第 VIII 因子 (FVIII) の量的質的異常に基づく、最も発生頻度の高い先天性凝固障害である。本症は FVIII 活性値によって重症度分類されており、<1% を重症、1~5% を中等症、>5% を軽症と定義し、出血症状の重篤度も概ねその重症度分類に比例する。しかし抗 FVIII 中和抗体すなわちインヒビターが一旦発生するとその FVIII 因子中和作用により、いずれの重症度においても出血頻度および重症度は著明に増悪し、止血治療には困難を伴う。インヒビターは血友病患者に対して FVIII 製剤を投与する治療を行うと、一定の頻度で発生すると報告されているが、FVIII 活性のない重症血友病 A 患者で最も頻度が高い (約 30%)。一方、軽症・中等症患者では患者由来の FVIII が多少とも存在しているため、製剤 FVIII 投与に対しては免疫寛容が起こると考えられるが、重症よりも頻度は下がるもののインヒビターの発生が見られており (約 10%) その発生機序については未だ不明な点も多い。

またインヒビター発生後に消失させる方法としては、免疫寛容導入療法や免疫抑制療法などが行われているがその有効率は十分でなく、インヒビター発生後に重度の出血症状で生涯困難を伴う患者も未だ数多く存在する。したがって、インヒビターを発生させない治療法や製剤の開発が、現在の血友病治療において最も求められている。そこで我々は現在、インヒビター発生に関わるリスクを調査するため、軽症・中等症血友病 A 患者についてインヒビター発生時の状況やそれまでの治療法、発生後の経過などの情報を収集するとともに、以下の凝血的および分子細胞免疫学的解析を含む多面的な評価を行っている (表)。

最近の報告で軽症・中等症血友病 A 患者にインヒビターが発生するリスクの一つとして FVIII 遺伝子 (F8) の変異による FVIII 分子異常が指摘されている (Corien LE et al. Blood. 2013)。自験例の遺伝子解析でもインヒビター発生リスクが高いと報告されている遺伝子変異 (R531C、R1781H、P1809L など) が見つかった (表、図)。F8 変異とインヒビター発生の関連については、遺伝子変異箇所そのものだけでなく F8 変異から引き起こされる FVIII 蛋白全体の構造上の異常をも免疫機構が異物と認識している可能性が示唆されているが、詳細な解析は未だ行われていない。

また、我々の解析したすべての症例においてインヒビター発生の契機となったのは、重症出血や手術の止血治療としての FVIII 短期間多量暴露であった (表)。出血や手術などの侵襲により炎症性サイトカインが上昇し、免疫機構が活性化することでインヒビター発生リスクを上昇させている可能性が考えられるが、このような免疫学的側面からのインヒビター発生・消失メカニズムは未だ明らかになっていない。

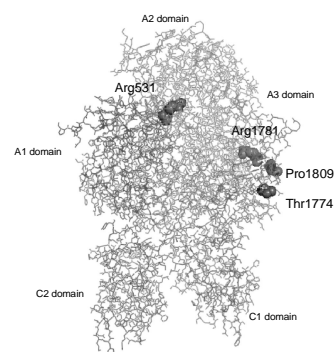


図. 自験例の F8 遺伝子変異部位

Case	年齢	genotype	重症度 FVIII:C	インヒビター発生要因 (推定)	ピークインヒビター (BU/mL)	IgGのFVIII抑制作用 自己FVIII / 非自己FVIII	抗体認識部位	FVIII-PL の結合抑制	FVIII-VWF の結合抑制
1	4	R1781H	中等症 2.4%	膝関節滑膜切除術に対する 製剤大量投与	1.2	+	A2	n.d.	n.d.
2	79	P1809L	軽症 10%	小脳出血に対する 製剤大量投与	5.2	-	C2	-	-
3	16	検索中	軽症 15%	膝関節内出血に対する 製剤大量投与と蜂窩織炎	50.8	+	A1, A2, LCh (C2)	+	+
4	22	P1809L	軽症 21.3%	膝関節内・筋肉内出血に対する 製剤大量投与	316	+	A1 (a1)	+	±
5	42	T1774N	軽症 42%	化膿性股関節炎掻爬術に対する 製剤大量投与	8.7	+	B	+	-
6	62	R531C	軽症 10%	関節手術に対する 製剤大量投与	31	+	B, C2	+	+
7	54	R1781H	中等症 3.0%	交通外傷に対する 製剤大量投与	406	+	A1,A2	+	+

表. インヒビター保有軽症・中等症血友病 A 患者の解析結果 (自験例)

2. 研究の目的

我々は本研究において、これまで蓄積した解析データに加え、さらに同様の症例について引き続き下記の方法による解析を行い、インヒビター発生のメカニズムを明らかにする。さらに本研究の成果を用いて、インヒビター発生を予防する治療戦略や低免疫原性の新規 FVIII 製剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

(I) インヒビターの FVIII 中和機序解析

軽症・中等症血友病患者に発生したインヒビターの FVIII 中和メカニズムについて凝血学的および免疫学的な解析を行った。まず患者由来 FVIII と野生型または製剤由来 FVIII に対するインヒビターの中和効果について凝固一段法を用いて比較し、自己蛋白への寛容が生じているかどうかを検証した。この際、患者由来 FVIII がすでにインヒビターにより中和されており入手困難な場合は、BHK 細胞による FVIII 発現系により患者と同じ変異 FVIII を生成して検討した。また、発生したインヒビターが認識する FVIII 上の領域を、SDS-PAGE および Western Blotting を用いて解析した。さらに、その領域にインヒビターが結合することにより FVIII 活性をどのようなメカニズムで中和しているかを、凝固一段法や SDS-PAGE および Western Blotting を用いて解析した。

(II) 軽症・中等症血友病 A 患者の遺伝子解析および変異 FVIII の発現と解析

軽症・中等症血友病 A 患者にインヒビターが発生するリスクの一つとして *F8* 遺伝子の変異による FVIII 分子異常が指摘されており、その因果関係について詳細に解析することによりインヒビター発生メカニズムを明らかにすることができると考えられる。

そこで本研究では、まずインヒビター保有および非保有軽症・中等症血友病 A 患者を遺伝子解析し、インヒビター発生リスクとなる遺伝子変異を特定する。さらに *F8* 変異を有する例について、その変異体を BHK 細胞による安定発現系を用いて蛋白発現させる。この変異型 FVIII と野生型 FVIII について、分子シミュレーションソフト (MOE®) を用いて立体構造を解析し、またマスペクトルを用いて切断点を解析することにより、変異型 FVIII と野生型または製剤由来 FVIII との構造上の相違点を検出することにより、どのような構造異常が FVIII の免疫原性に影響するかについて検証した。

(III) 軽症血友病 A モデルマウスの作製とインヒビター解析系の確立

研究期間中、軽症・中等症血友病 A 患者にインヒビターが新規に発生するエピソードが少なかったことから、iGONAD 法を用いて軽症血友病 A モデルマウスの作製に着手し、モデルマウスでのインヒビター発生および解析系の確立を行った。

4. 研究成果

研究期間中に軽症血友病 A の 1 例が新たにインヒビター (力価 1.5 BU/mL) を発生し解析を実施できた。本例に対し、まず遺伝子解析を実施したところ、E272K の点変異が検出された。過去の 7 例にも同変異を有する症例が存在し、本変異がインヒビター発生リスクとなり得る可能性が示唆された。本例ではインヒビター発生の直前に関節出血を発症しており、それに対する治療としてルリオクトコグアルファの多量投与を実施していたことから、本エピソードが契機となった可能性が示唆された。このことは、これまでの症例解析から仮説とした、重症出血や手術の止血治療としての FVIII 短期間多量暴露がインヒビター発生リスクである可能性を支持するものであった。

また研究期間中、軽症・中等症血友病 A 患者にインヒビターが新規に発生するエピソードが少なかったことから、iGONAD 法を用いて軽症血友病 A モデルマウスの作製を行った。自験例のひとつである P1809L 変異ではインヒビター発生例を 2 例経験しており、また発生したインヒビターは 1 例では自己由来 FVIII について寛容が成立していたのに対し、もう 1 例では製剤由来 FVIII と同様に自己由来 FVIII をも抑制していた。このことから本変異を有するモデルマウスを作製しインヒビター解析系を確立することで、インヒビター発生メカニズムを解明するための免疫学的解析が可能になり、さらには他の *F8* 変異のモデルマウスの作製とそれに続く解析が可能になると考え、ヒト *F8* 遺伝子上の Pro1809 と相同性の高いマウス *F8* 遺伝子上の Pro1777 を患者と同じく Leu に変異させた P1777L 変異をマウスに Knock-in したところ、FVIII 活性および抗原が患者と同等となり、軽症血友病 A モデルマウスであると考えられた。さらに従来から当教室で保有している重症血友病 A モデルマウス (E16) および野生型マウスを比較対象とし、遺伝子組換えヒト FVIII (rhFVIII) を 1 週間おきに 4 回投与したところ、それぞれのマウスでインヒビターが発生した。特に軽症血友病 A モデルマウスの中に、インヒビターの発生にて FVIII 活性が 1%未満に低下し自己由来 FVIII をも抑制した個体と、高力価のインヒビターが検出されたにも関わらず自己由来 FVIII 活性が残存した個体がそれぞれ観察された。すなわち P1809L 変異を有する患者と同様に、自己抑制型の同種抗体が発生した個体と自己非抑制型の同種抗体が発生した個体が出現した。このことから、インヒビター保有軽症血友病 A をモデルマウスにて再現できたと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shoko Furukawa, Keiji Nogami, Midori Shima
2. 発表標題 Difference molecular profiles of type 1 and 2 inhibitor developed in mild/moderate hemophilia A
3. 学会等名 XXVIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古川晶子、野上恵嗣、嶋緑倫
2. 発表標題 軽症・中等症血友病Aインヒビター解析から示唆された異なる第VIII因子阻害機序の存在
3. 学会等名 日本血栓止血学会
4. 発表年 2020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
---------	---------