

機関番号：24601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591258

研究課題名 (和文) 抗第 VIII 因子インヒビターに対する免疫療法の効果発現機序に関する研究

研究課題名 (英文) Mechanisms underlying the effect of immunotherapy for anti-factor VIII inhibitor antibodies

研究代表者

田中 一郎 (TANAKA ICHIRO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00201616

研究成果の概要 (和文)：免疫寛容導入 (Immune Tolerance Induction; ITI) 療法中のインヒビターIgG サブクラスの推移を検討したところ、ITI の治療効果のモニタリングとして IgG1 および IgG4 が有用であることが示唆された。また、トロンビン生成試験を用いてインヒビター存在下での第 VIII 因子の止血効果発現に関する検討を行ったところ、インヒビター認識部位によってトロンビン生成に差がみられ、ITI 中の第 VIII 因子製剤定期輸注による出血予防効果にも差がみられることを示唆する結果であった。

研究成果の概要 (英文)：The changes of inhibitor IgG subclasses during the course of Immune Tolerance Induction (ITI) therapy were examined. The data obtained suggested that both IgG1 and IgG4 subclasses were useful for the monitoring of therapeutic effect of ITI. Using the thrombin generation test, hemostatic effect of factor VIII in the presence of inhibitor IgG was examined. The thrombin generation pattern varied by the recognition site of inhibitor IgG. These data suggested that there might be a difference in the prophylactic effect of regular infusion of factor VIII concentrate during the ITI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：第 VIII 因子、インヒビター、血友病

1. 研究開始当初の背景

近年の血友病治療は凝固因子製剤の進歩とともに大きく前進しており、患者のQOLは確実に向上している。しかし、これら凝固因子製剤による補充療法中に発生する抗第VIII因子同種抗体(以下、インヒビター)は、一旦出現するとその治療に難渋することが多い。インヒビターを除去するための治療法として、これまで免疫寛容導入 (Immune Tolerance Induction; ITI) 療法が試みられてきたが、ITI に不応性の症例が少なからず存在することから、これら難治例に対する治療法の開発は、今後の血友病治療の残された大きな課題の一つである。

2. 研究の目的

すでに、われわれは ITI に不応の患者において、第 VIII 因子製剤投与後の残存第 VIII 因子活性が治療経過によって変化することを見出した (Haemophilia 10, 341-346, 2004)。これら血友病患者で観察されるインヒビターの存在下での第 VIII 因子活性発現は免疫療法の効果発現のメカニズムを示唆するものであるが、その詳細はいまだ不明な点が多い。本研究では、インヒビターに対する免疫療法の効果発現のメカニズムを解明することで、インヒビター撲滅に向けた新たな治療ストラテジーを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ITI 中の IgG サブクラスの推移の検討

① 対象: インヒビター保有血友病 A 6 例を対象とした。6 例中 3 例は H 鎖 44kDa を認識し、3 例は H 鎖 44kDa と L 鎖 72kDa の両者を認識した。ITI 開始時の年齢は 6-17 歳、インヒビター出現から ITI 開始までの期間は 4.5-15 年、ITI 開始前のインヒビター最高値は 5-532 BU/ml であった。ITI 開始時のインヒビター値は <0.6-3.9 BU/ml、ITI 開始後のインヒビター最高値は 0.9-1,818 BU/ml であった。ITI の成績は 6 例中 3 例でインヒビターが消失し、2 例は継続中で、1,818 BU/ml まで上昇した 1 例は ITI を中止した (Table 1)。

case	1	2	3	4	5	6
ITI 開始年齢(年)	6	17	14	9	8	7
ITI までの期間(年)	4.5	15	10	8	7	6
開始時インヒビター	-	0.8	0.9	2.0	3.9	-
開始前最高値	75	346	532	5	62	460
認識フラグメント	H/L	H	H	H/L	H	H/L
転帰	成功	成功	成功	継続	継続	失敗

②方法: インヒビター力価の測定は Bethesda 法で、インヒビター認識部位の同定はイムノプロット法で、インヒビター-IgG サブクラスの測定はペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG サブクラスモノクローナル抗体を用いた ELISA 法で行った。

(2) インヒビター存在下での第 VIII 因子の止血効果発現に関する検討

① 対象: インヒビター保有血友病 A 4 例を対象とした。このうち 2 例は H 鎖 44kDa を認識し、残り 2 例は L 鎖 72kDa を認識する抗体であった (Fig. 1)。

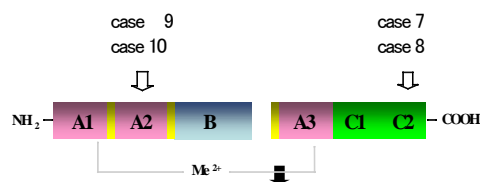


Fig1 The binding sites of alloantibodies to FVIII

②方法: 各患者血漿からプロテイン A カラムを用いてインヒビター-IgG を精製した後、第 VIII 因子欠乏血漿で希釈し、5 BU/ml となるように調整を行い、合成インヒビター血漿を作成した。そこに中和量に満たない 1 U/ml のリコンビナント第 VIII 因子を添加し、37°C で 10、30、60、120 分間、加温した後、トロンビノスコープでトロンビン生成能を測定した。トロンビン生成試験のパラメーターとして、LT (Lag Time)、ETP (Endogenous thrombin potential)、PH (Peak height)、TTpeak (time to peak) を使用した (Fig. 2)。

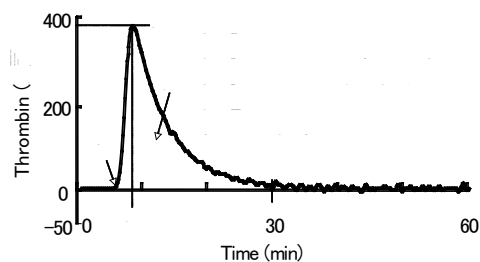


Fig2 Thrombin generation of normal plasma

4. 研究成果

(1) ITI 中の IgG サブクラスの推移の検討

ITI 成功例は ITI 開始後それぞれ 1 か月、5 か月、12 か月でインヒビターが消失したが、成功例と不成功例では認識フラグメントに差は認めなかった。経過中の IgG サブクラス

は6例中3例で IgG1、IgG2、IgG4 を、2例で IgG4 を、1例で IgG2、IgG4 を認識していたが、IgG3 は全例で陰性であった。ITI 後、インヒター上昇がみられた4例では主として IgG4 がインヒター力価に平行して変動した。不成功に終わった1例では IgG4 とともに IgG1 が著明に上昇した。ITI の治療効果のモニタリングとして IgG1 および IgG4 が有用であることが示唆された (Fig. 3~8)。



Fig.3 Anti-FVIII IgG subclass (case 1)

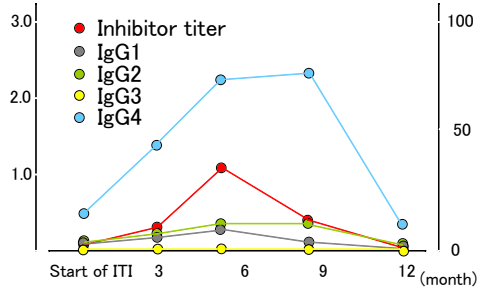


Fig.4 Anti-FVIII IgG subclass (case 2)

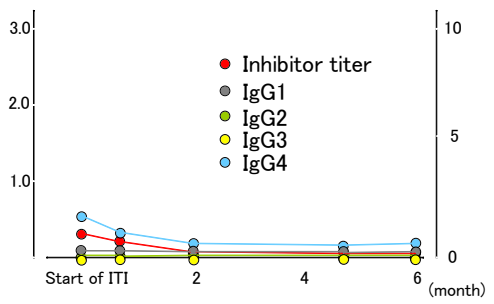


Fig.5 Anti-FVIII IgG subclass (case 3)

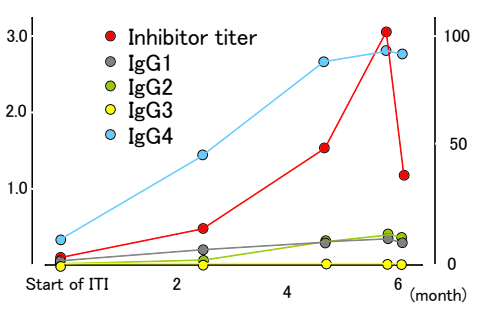


Fig.6 Anti-FVIII IgG subclass (case 4)

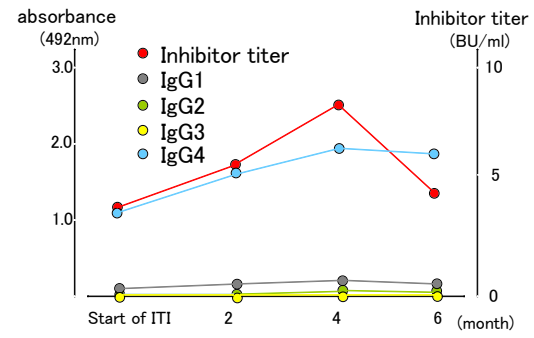


Fig.7 Anti-FVIII IgG subclass (case 5)

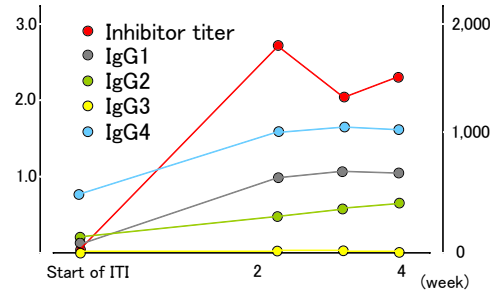


Fig.8 Anti-FVIII IgG subclass (case 6)

(2) インヒター存在下での第 VIII 因子の止血効果発現に関する検討

*in vitro*で ITI と同等の条件を構築し、トロンビン生成試験を用いてインヒター存在下での第 VIII 因子の止血効果発現に関する検討を行った (Fig. 9~12)。

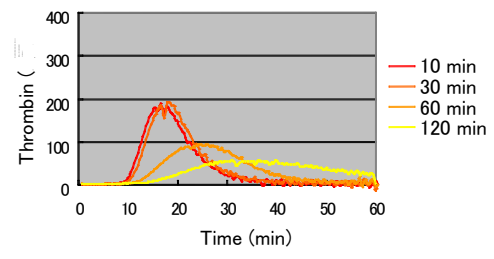


Fig.9 Thrombin generation pattern (case 7)

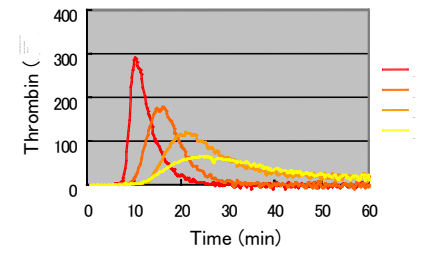


Fig.10 Thrombin generation pattern (case 8)

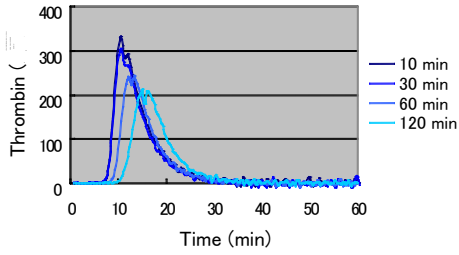


Fig.11 Thrombin generation pattern (case 9)

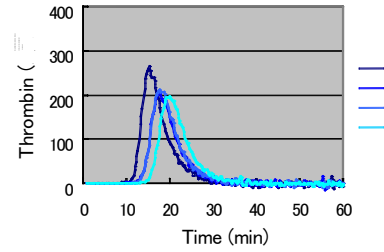


Fig.12 Thrombin generation pattern (case 10)

トロンビン生成試験のパラメーターのうち、LTおよびETPはいずれのインヒビターIgGにおいても差はみられなかった (Fig. 13, 14)。PHはC2ドメインを認識する抗体では時間経過とともに低下し、120分後にはほぼ消失する傾向が見られたのに対し、A2ドメインを認識する抗体では時間経過による減衰が少なく、120分後でもトロンビン生成能は十分に残存していた (Fig. 15)。TTpeakでは10、30分後の値に差はみられなかったが、60、120分後はC2ドメインを認識する抗体の方がA2ドメインを認識する抗体よりも延長する傾向が見られた (Fig. 16)。

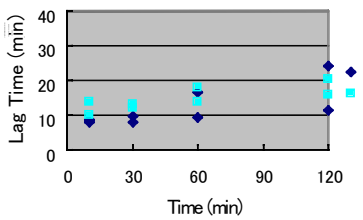
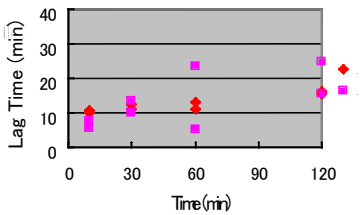


Fig.13 Lag Time of thrombin generation test

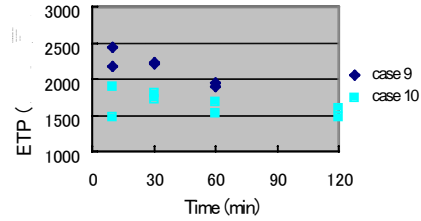
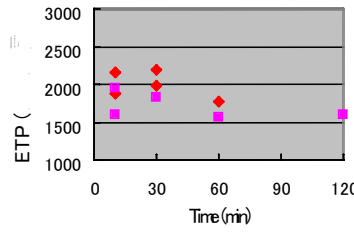


Fig.14 ETP of thrombin generation test

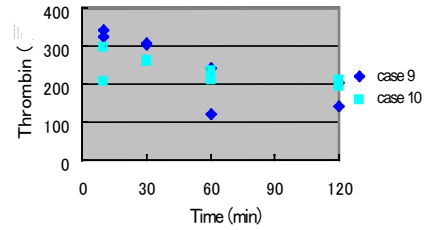
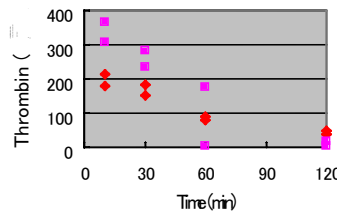


Fig.15 Peak height of thrombin generation test

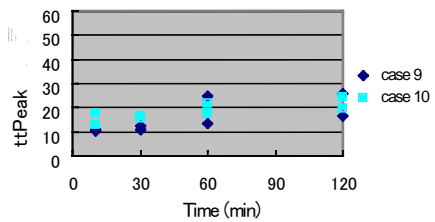
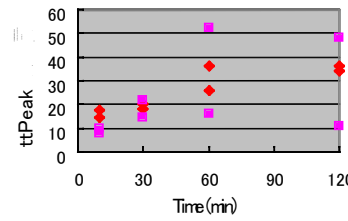


Fig.16 Time to Peak of thrombin generation test

これらの結果は実際の ITI 中における第 VIII 因子活性発現の観察結果と合致するものであり、インヒビター認識部位によって ITI 中の定期輸注の出血予防効果に差がみられることを示唆するものである。

以上、本研究の成果は免疫療法に不応性のインヒビター保有患者に対する新たな治療法の発展に寄与することが期待される。

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 10 件)

- ① 田中一郎、インヒビター保有先天性血友病患者に対する治療の現状と今後、日本血栓止血学会誌、査読無、21 巻、2010、489-495
- ② 田中一郎、天野景裕、瀧 正志、他 14 名 (1 番目)、インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン、日本血栓止血学会誌、査読有、19 巻、2008、520-539
- ③ 田中一郎、嶋 緑倫、海外のガイドラインにみるインヒビター保有血友病患者に対する止血療法の現状-わが国のガイドライン作成に向けて-、日本小児血液学会雑誌、査読無、22 巻、2008、179-187
- ④ 田中一郎、天野景裕、瀧 正志、他 14 名 (1 番目)、わが国における後天性凝固因子インヒビターの実態に関する 3 年間の継続調査-予後因子に関する検討-、日本血栓止血学会誌、査読有、19 巻、2008、140-153
- ⑤ Uchida Y, Sakurai Y, Tanaka I, 他 4 名 (5 番目)、Successful management of Mallory-Weiss syndrome in a hemophilia A patient with inhibitor by recombinant activated factor VII, Haemophilia、査読有、14 巻、2008、841-843

[学会発表] (計 18 件)

- ① 田中一郎、わが国の血友病治療の現状、第 52 回日本小児血液学会総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会、2010 年 12 月 19 日、大阪市
- ② 田中一郎、血友病センター整備案、第 5 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2010 年 10 月 30 日、東京都
- ③ Tanaka I, Amano K, Taki M、他 14 名 (1 番目)、The Japanese guideline for the hemostatic therapy of patients with congenital hemophilia and inhibitors、The 22th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis、2009 年 7 月 15 日、Boston

④ 田中一郎、インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン、第 32 回日本血栓止血学会学術集会、2009 年 6 月 6 日、北九州市

⑤ 田中一郎、インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン、第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会、2008 年 11 月 16 日、東京都

[図書] (計 3 件)

- ① 田中一郎、嶋緑倫、中外医学社、Annual Review 2010 血液、2010、191-195
- ② 田中一郎、吉岡 章、医薬ジャーナル社、みんなに役立つ血友病の基礎と臨床、2009、20-29
- ③ 田中一郎、吉岡 章、文光堂、わかりやすい内科学 第 3 版、2008、293-296

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 一郎 (TANAKA ICHIRO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00201616