

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461444

研究課題名(和文)自己免疫性血友病13の分子病態；抗FXIII自己抗体の解析と発生機序の解明

研究課題名(英文)The Pathogenesis of Autoimmune Hemorrhaphilia XIII/13: Analysis of Anti-FXIII/13 Autoantibodies and Elucidation of Their Generation Mechanisms

研究代表者

一瀬 白帝 (ICHINOSE, Akitada)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：10241689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1. 自己抗体の性状：15症例中10例はAa型のみ、1例はB型のみ、4例は両方の型の抗体を持っており、Ab型は検出されなかった。組換えF13-Aタンパク質をAa型14症例の血漿存在下でプロテアーゼ消化して生成ペプチド量を比較し、エピトープマッピングしたところ、自己抗体が切断部位近傍に結合するためトロンビンによる活性化が抑制されることが示唆された。

2. 自己抗体生成の背景：Aa型6症例、Ab型2症例のF13A遺伝子の全エクソーム塩基配列を解析し、多型が抗原性の違いの原因になる可能性を指摘した。免疫応答関連遺伝子CTLA-4やHLAクラスIIの多型についても解析したが、一定の傾向は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：1. Types of anti-factor 13 (F13) autoantibodies: 1) Among 15 autoimmune hemorrhaphilia 13 (AH13) cases, 10 patients had Aa type, one had B type, and the remaining 4 cases had both types. 2) After recombinant F13 A subunit (F13-A) was digested with proteases in the presence or absence of patient's plasma, their autoantibodies' epitopes were mapped by comparing the amounts of digested peptides (through protection of digestion). It was suggested that F13 activation by thrombin might be inhibited by binding of these antibodies, especially by Aa type.

2. Genetic backgrounds for autoantibody generation: 1) By analyzing the whole exome sequences for the F13-A gene of 6 Aa- and two Ab-type patients, a possibility that its genetic polymorphisms result in differential antigenicity was suggested. 2) When immune response related genes such as CTLA-4 and HLA class II were analyzed, their genetic polymorphisms did not show any tendency toward production of autoantibodies against the F13-A protein.

研究分野：血液内科学

キーワード：自己免疫性出血病 高齢化社会 慢性難治性弛緩 分子病態 自己抗体 エピトープ解析 ユニバーサルエピトープ 質量分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の動向と位置付け

第 XIII 因子 (FXIII) は、トロンビンによって活性化され (FXIIIa)、フィブリン分子同士やフィブリンと α_2 -plasmin inhibitor (α_2 -PI) を架橋結合して安定化する酵素である。FXIII は酵素活性部位を持つ A サブユニット (FXIII-A) とそれを安定化する B サブユニット (FXIII-B) から構成されるので、どちらかが先天的に欠損すると生涯続く重篤な出血傾向を示す (図 1 左)。本申請者は、その分子病態学的研究を 1980 年代から長年にわたりリードしてきた (Ichinose, STH 1996; TH 2001; IJH 2012)。

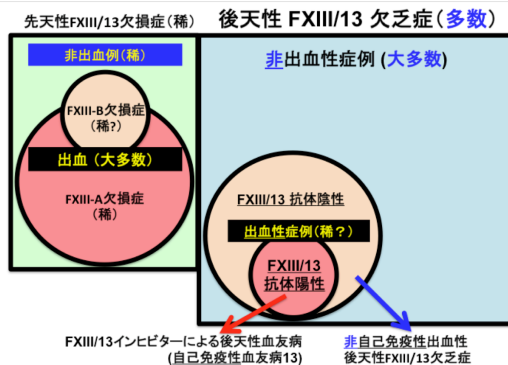


図 1. 自己免疫性血友病 XIII/13 (AH13) の概念

一方、後天性の FXIII 欠乏症は、その産生低下、消費亢進をもたらす多くの疾患に二次的に合併するが、出血症状を呈することは少ない。これに対して後天性に抗 FXIII 自己抗体を生じる自己免疫性血友病 XIII/13 (autoimmune hemorrhaphilia 13, AH13 と略す) 症例 (図 1 右) は稀と従来は考えられており、1996 年までは全世界で我が国の 2 例を含む合計 22 例が報告されていたに過ぎなかった (Egbring, Haemostaseologie 1996)。

ところが、21 世紀初頭から本申請者への AH13 疑い症例の相談が増加し、毎年 1 例ずつ確定診断するようになった。そこで、2009 年から 3 年間にわたって厚生労働省科学研究費補助金の班研究による全国調査を実施したところ、より多くの AH13 症例が発見されるようになり、2012 年 10 月現在通算 34 例を確認あるいは確定診断している。これは、日本を除く全世界の報告症例の合計 (約 30 例) を凌駕しており、AH13 は日本人に多い疾患である可能性がある。

(2) これまでの研究成果と経緯

本申請者は、我が国での調査結果を国際血栓止血学会、その科学及び標準化委員会、主宰している国際 FXIII シンポジウムなどで毎年発表し、本疾患の診断基準、検査アルゴリズム、治療指針などを提案してきた。

2012 年 7 月には米国での Gordon Research Conference でこれらをまとめて「AH13 Japan Criteria 2012」を提唱している。

我が国の AH13 症例は、平均年齢 66 才で、半数以上は「特発性」で原因不明である。検査/診断は、高度の FXIII 活性低下と、正常血漿との混合試験での FXIII 活性抑制所見で疑診となり、イムプロット (あるいは ELISA や後述するイムノクロマトグラフィなど) による抗 FXIII 抗体の証明により確定診断となる。早期に AH13 の確定診断ができれば、「止血の為の FXIII 濃縮製剤の投与」と同時に「抗体根絶の為の免疫抑制療法」を開始して予後良好であるが、検査、診断、治療が遅れて通算 4 例が死亡している。また、別の 4 例は免疫抑制療法に抵抗性で年余にわたり抗 FXIII 抗体が消失しない難治例である。

(3) 本研究課題の申請時における動機

抗 FXIII 自己抗体の殆どは抗 FXIII-A 抗体であるが、3 例では抗 FXIII-B 抗体が検出されている。多くは抗体の作用で FXIII 活性が低下してフィブリン架橋 α_2 -PI 量が減少することが抗線溶能低下をもたらし、出血に至るものと考えられるが (Ichinose, 2012 IJH)、「これらの抗 FXIII 自己抗体がどのようにして FXIII 活性低下を惹起するのか?」、その性状や原因は解析の途上にある。より根源的な「どのようにして抗 FXIII 自己抗体が形成されるのか?」という疑問に対しては、全く解答が得られていない。

2. 研究の目的

後天性血友病は致死性の出血性疾患である。抗 FXIII 自己抗体による後天性血友病類似疾患が近年徐々に増加している。本申請者らが実施した全国調査活動や広報活動によって認識が高まり、確定診断に至る例が増加しているものと思われる。しかし、その原因である抗体の性状や発生機序については不明であり、超高齢化社会を迎え益々増加することが予想される本疾患の本態を解明する必要がある。この自己抗体の FXIII 阻害作用と抗体産生の分子機序を解明して世界に発信し、診断、治療、予防に貢献することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 抗 FXIII-A 抗体の性状の詳細な解析

① 機能的抗体の解析

FXIII-A の細胞外での FXIII-B との結合、トロンビンによる FXIII-A の活性化ペプチドの切断、カルシウム存在下での FXIII-A の非酵素的活性化、FXIII-B との解離、フィブリン/フィブリノゲンへの結合、フィブリン/フィブリノゲン

鎖の架橋結合／2量体化、フィブリン／フィブリノゲン α 鎖の架橋結合／多量体化、フィブリン／フィブリノゲン α 鎖と α_2 -PIとの架橋結合、フィブリン／フィブリノゲン α 鎖とフィブロネクチンとの架橋結合、その他の基質の架橋結合などへの影響（図2）を、主にタンパク質化学的実験にて詳細に解析する。

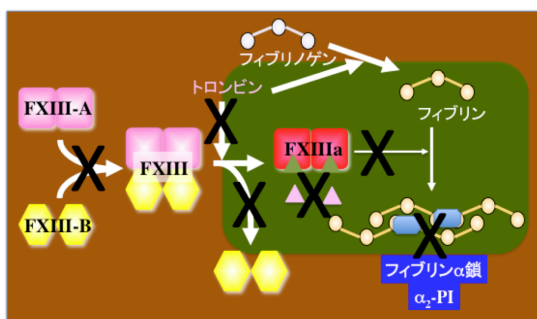


図2. 抗FXIII抗体の阻害様式（仮説）

② 非機能性抗体の解析

FXIII 抗原抗体複合体を形成して、そのクリアランスが亢進している AH13 症例もあると推定される。結合はするが FXIII 機能を阻害しない抗体も免疫ブロットや ELISA などの免疫学的アッセイを組み合わせて検出し、解析する。

③ 抗体のエピトープマッピング（マウスモノクローナル抗体の解析）

症例の検体は貴重なので、先ず作製済みのマウス抗ヒト FXIII-A モノクローナル抗体を用いて方法論を確立する。種々の酵素で切断した FXIII-A 断片を認識するか否かを Western blot 法や ELISA で判定し、そのアミノ酸配列を質量分析で同定する。

マウス抗体を用いて、現在共同開発中の抗 FXIII-A 抗体の新免疫クロマトグラフィ検査法を完成させる。

④ AH13 症例の自己抗体のエピトープマッピング

A. AH13 症例の抗 FXIII-A 抗体の解析

マウス抗体用に平成 25 年度に開発した方法で、ヒト抗体で実際に分析する。

B. 抗体認識配列の同定

FXIII-A と相同性のある組織トランスグルタミナーゼの各ドメインを入れ替えたキメラタンパク質や抗体が結合した領域からデザインした合成ペプチドを作製して、マッピングに用いる。

C. AH13 症例 3 例から得られた抗 FXIII-B 抗体の解析

8 種類の作製済みのマウス抗ヒト FXIII-B モノクローナル抗体と共に、

上述した抗 FXIII-A 抗体と同様に解析する。

(2) 抗 FXIII 自己抗体を生成する根本的な原因（免疫寛容の破綻）の追究

① 抗原性の検討

F13A（及び F13B）遺伝子の多型性／変異を解析する。

A. AH13 症例の F13A（及び F13B）遺伝子の塩基配列を決定し、健常対照と比較して抗原性の違いの原因となる可能性がある遺伝的多型性や変異を同定する。

B. AH13 症例に共通の遺伝的多型性や変異を含むペプチドを合成して、それぞれの症例の自己抗体との反応性を検討する。

② 自己抗体産生の遺伝的背景の解析

以下の免疫応答関連遺伝子の多型性を解析する。

A. CTLA (Cytotoxic T-lymphocyte antigen/associated protein)-4 はインテグリンの一種であり、活性化された T 細胞表面に発現して活性化を制御するので、その遺伝子多型（例えば CTLA-4 遺伝子の+48G アレル）を健常者と比較する。

B. Human leukocyte antigen (HLA) クラス II は外来性抗原由来ペプチドの抗原提示に関与しているので、AH13 症例の HLA クラス II 遺伝子の DRB1*と DQB1*サブタイプを決定する。特に DRB1*16 や DQB1*0502 などのサブタイプを健常者と比較する。

③ 免疫抑制療法に抵抗性で難治性症例の解析

長期にわたって抗 F13 自己抗体産生を継続している難治例の分子機序を追究する為に、自己抗体の IgG サブクラスを解析して完全寛解例と難治例の間で比較し、IgG サブクラス量と抗体価の相関関係や時間的推移を調べる。

4. 研究成果

(1) マウスモノクローナル抗体のマッピング

① 研究の方法に記したように、マウスモノクローナル抗体と結合する合成 FXIII-A ペプチドを同定したり（図 3 A）、種々の酵素で切断した FXIII-A 断片を認識するペプチドを同定して（図 3 B）、結合部位を決定した（図 4）。

② これらのマウス抗体を用いて、厚労省と日本医療研究開発機構（AMED）の支援により、抗 F13XIII-A 自己抗体検出免疫クロマトグラフィ検査キットを開発した。

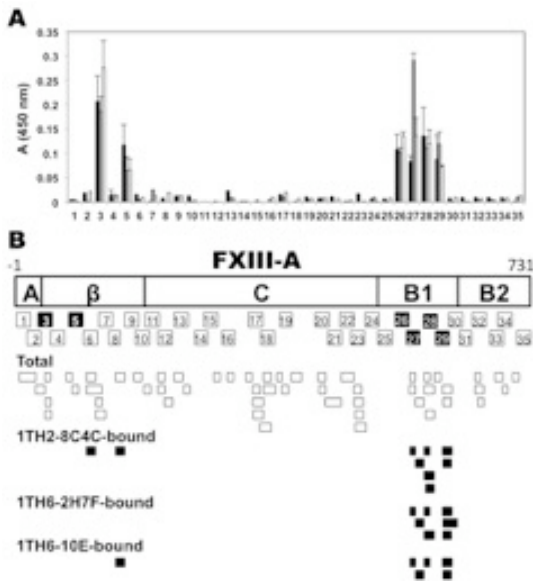


図3. マウスモノクローン抗体のエピトープマッピング

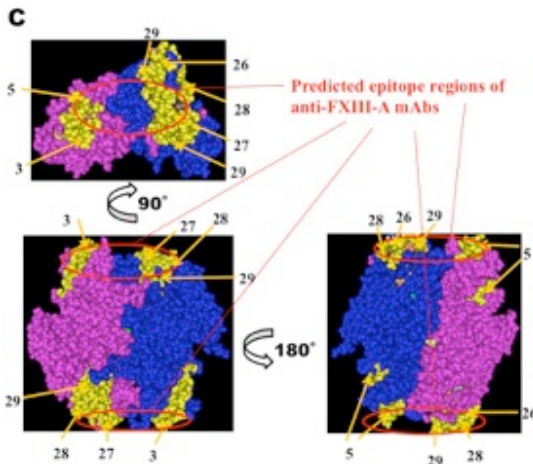


図4. 抗FXIII-A抗体の結合領域

(2) 抗F13自己抗体の解析

① 自己抗体のタイピング

AH13 疑い症例の実験的精密検査によって、新たに4例に抗F13-A自己抗体を検出した。その内2例では抗F13-B自己抗体が同時に検出された。論文未発表の15例の詳細な解析では、10例はAa型のみ、1例はB型のみ、4例は両方のタイプの抗体を持っていることが判明した。発表論文7に記載済みのAb型は新たに診断されていないので、活性部位自体に対する抗体は少ないものと推測される(図5、図6)。

病初期と長期経過後に複数回検体を解析することができた症例では、抗体の性状(図6)が変化しているため、病原性と抗体の標的部位の変化がその基盤となっている可能性が高い。

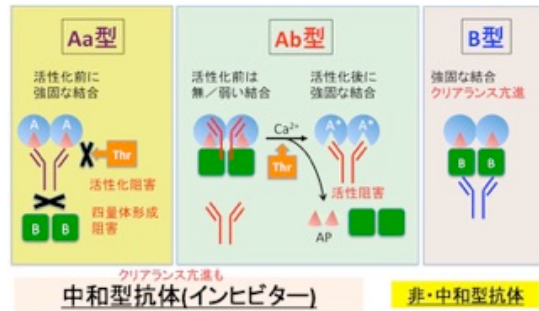


図5. 抗FXIII抗体の阻害様式

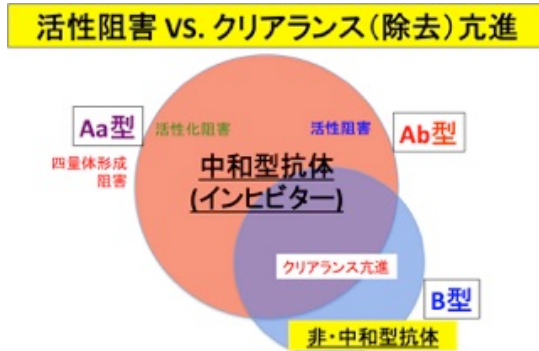


図6. 自己抗体の性状

② Aa型自己抗体のエピトープマッピング

組換えFXIII-Aタンパク質をプロテアーゼ消化して50ペプチドを同定した。次にAH13症例(Aa型14例)、あるいは健康人血漿の存在下でプロテアーゼ消化後に生成される上述の50ペプチド量を比較し、健康人血漿存在下に比べて0.5未満になるペプチドを同定した。各症例の血漿存在下で2~17ペプチドの減少が認められ、7症例以上で減少が認められたペプチドは5種類であった。2種類はコアドメイン由来のペプチドで、1種類がバレル1、2種類はバレル2由来であった。バレル1、2由来のペプチドはFXIII-Bと結合する合成ペプチドの近傍に存在しており、自己抗体が結合することによりFXIII-Bとの結合が阻害されると同時に、トロンビンの接近を妨害して活性化が抑制されることが示唆された。

(3) 抗FXIII自己抗体を生成する遺伝的背景の追究

① FXIII遺伝子の多型性

AH13 Aa型6症例、Ab型2症例の全エクソームシーケンスを解析した。F13A遺伝子は各症例0~2箇所(計4箇所)多型が認められた。データベースに登録されている健康者内頻度はいずれも0.06~0.31と非常に低かったため、これらの多型が抗原性の違いの原因になっている可能性がある。また、バレル1か2に変異が認められた5症例はいずれもFXIII-Bとの複合体形成を阻害するAa型の症例であった。一方、F13B遺伝子では

アジア人種に多い多型 (R95H) が全症例にホモ接合性に認められた。

② 免疫応答関連遺伝子の多型性

CTLA-4 の多型 (T17A) 解析を行ったところ、1 症例はホモ接合性で T、2 症例がホモ接合性で A、5 症例がヘテロ接合性で、特に頻度が高くはなかった。HLA クラス II 遺伝子の DRB1 と DQB1 についても解析したが、一定の傾向は認められなかった。

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 19 件)

1. Souri M, Mokuda S, Inanami H, Osaki T, Takasugi K, Ichinose A. Non-autoimmune combined factor XIII A and B subunit deficiencies in rheumatoid arthritis patients treated with anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody (tocilizumab). *Thromb Res*. 2016;140:100-5. doi:10.1016/j.thromres.2016.02.026. 査読あり
2. 自己免疫性出血病 FXIII/13 日本血栓止血学会診断基準作成委員会 (一瀬白帝, 和田英夫, 惣宇利正善, 橋口照人, 矢富 裕, 小川孔幸, 北島 勲, 朝倉英策, 岡本好司, 家子正裕, 山本晃士, 江口 豊): 自己免疫性出血病 FXIII/13 診断ガイド. 日本血栓止血学会誌. 2015; 26(6): 658-68. doi: 10.2491/jjsth.26.658 査読なし
3. 一瀬白帝: 後天性第 XIII/13 因子欠乏症の診断と治療 - 全ての難病指定医のために -. 臨床血液 2015;56(10):2110-22. doi: 10.11406/rinketsu.56.2110. 査読なし
4. Ichinose A, Osaki T, Souri M; Japanese Collaborative Research Group (JCRG) on AH13 (supported by the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare). Clinical features of 32 new Japanese cases with autoimmune haemorrhaphilia due to anti-factor XIII antibodies. *Haemophilia*. 2015;21(5): 653-8. doi: 10.1111/hae.12677. 査読あり
5. Osaki T, Sugiyama D, Magari Y, Souri M, Ichinose A. Rapid immunochromatographic test for detection of anti-factor XIII A subunit antibodies can diagnose 90 % of cases with autoimmune haemorrhaphilia XIII/13. *Thromb Haemost*. 2015;113(6):1347-56. doi: 10.1160/TH14-09-0745. 査読あり
6. Souri M, Osaki T, Ichinose A. The Non-catalytic B Subunit of Coagulation

Factor XIII Accelerates Fibrin Cross-linking. *J Biol Chem*. 2015; 290(19):12027-39. doi: 10.1074/jbc.M114.608570. 査読あり

7. Souri M, Osaki T, Ichinose A. Anti-factor XIII A subunit (FXIII-A) autoantibodies block FXIII-A2 B2 assembly and steal FXIII-A from native FXIII-A2 B2. *J Thromb Haemost*. 2015;13(5):802-14. doi: 10.1111/jth.12877. 査読あり
 8. Ichinose A; Japanese Collaborative Research Group (JCRG) on AH13 Hemorrhagic Acquired Coagulopathies. Inhibitors of Factor XIII/13 in Older Patients. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40(6):704-11. doi: 10.1055/s-0034-1390151. 査読あり
- 他 11 件

[学会発表] (計 90 件)

1. 一瀬白帝: 後天性第 XIII/13 因子欠乏症の診断と治療 - 全ての難病指定医のために -. 第 77 回日本血液学会学術集会 教育講演, 2015 年 10 月 16 日, 石川県立音楽堂、他 (石川県金沢市)
2. Ichinose A, Kohler H, Muszbek L, Philippou H: Proposal of ISTH/SSC Diagnostic Criteria 2015 for Autoimmune Hemorrhaphilia Due to Anti-FXIII/13 Antibodies. The 25th International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Congress with 61st Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting, June 20-25, 2015, Toronto (Canada)
3. Souri M, Osaki T, Ichinose A: Development of a novel assay method of coagulation factor XIII activity for the detection of its inhibitor in plasma. The 25th International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Congress and 61st Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting, June 20-25, 2015, Toronto (Canada)
4. 一瀬白帝: 後天性第 XIII 因子欠乏症. 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 教育講演, 2015 年 5 月 21~23 日, 甲府市総合市民会館 (山梨県甲府市)
5. Ogawa Y, Yanagisawa K, Osaki T, Souri M, Ichinose A: Management of autoimmune hemorrhaphilia XIII/13 (AH13) complicated by pulmonary thromboembolism. The 59th Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research, February 24-27, 2015, Düsseldorf (Germany)

6. Ichinose A: The current status of autoimmune hemorrhaphilia due to anti-FXIII/13 antibodies and its related diseases in Japan. The 59th Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research, February 24-27, 2015, Düsseldorf (Germany)
7. Ichinose A: Acquired Hemorrhaphilia Due to Anti-Factor XIII Autoantibodies. Grand Rounds Lecture for the Division of Hematology/Oncology and the Robert H. June 27, 2014, Chicago, (USA)
8. Ichinose A, Souri M, Osaki T, Sugiyama D, Magari Y: Molecular Studies on Acquired Hemorrhaphilia Due to Anti-FXIII Autoantibodies (AH13). The annual International Factor XIII Symposium, February 12, 2014, Vienna (Austria)
9. Kasahara K, Ichinose A, Yamamoto N: Clot retraction is mediated by factor XIII-dependent fibrin- α IIb β 3-myosin axis in platelet sphingomyelin-rich membrane rafts. Keystone Symposia Conference, January 26-30, 2014, Keystone, (USA)
10. 尾崎 司, 惣宇利正善, 杉山大輔, 曲 泰男, 一瀬白帝: Epitope analysis of anti-factor XIII autoantibodies to characterize molecular bases for the acquired hemorrhaphilia XIII/13. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月11日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
11. Ichinose A: An update on Japanese criterion 2012 for the diagnosis and treatment of autoimmune/acquired hemorrhaphilia XIII/13; a proposal of algorithm of laboratory tests and differential diagnosis. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, SSC Program, June 29-July 4, 2013, Amsterdam (Netherlands)
12. Souri M, Osaki T, Ichinose A: The B subunit for coagulation factor XIII accelerates the crosslinking of fibrin in human plasma. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 29-July 4, 2013, Amsterdam (Netherlands)

他 78 件

〔図書〕(計 7 件)

1. 一瀬白帝: 自己免疫性出血病 XIII/13 と出血性後天性第 XIII/13 因子欠乏症. 一瀬白帝, 丸山征郎, 家子正裕 編著, 新・血栓止血血管学 分冊 2 : 凝固と炎症. 京

都; 株式会社金芳堂, 2015; 189 (115-125)
他 6 件

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 2 件)
名称: FXIII 活性測定法
発明者: 一瀬白帝, 惣宇利正善
権利者: 山形大学
種類: 特許
番号: 特許願 2015-236432
出願年月日: 2015年12月3日
国内外の別: 国内
- 名称: 抗第 XIII/13 因子 B サブユニット抗体検出法
発明者: 一瀬白帝, 尾崎司, 曲泰男, 杉山大輔
権利者: 山形大学, 株式会社キューメイ研究所
種類: 特許
番号: 特許願 2016-011035
出願年月日: 2016年1月22日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

- 山形大学に以下 4 件の発明届を提出した。
- (1) 凝固第 XIII/13 因子 (A₂B₂ 四量体) と遊離 B サブユニット (B₂) を同時に測定する方法
 - (2) スマートフォンを用いたイムノクロマトグラフィ法による検査結果の数値化システム (いつでもどこでもインスタント・イムノクロマト)
 - (3) 凝固第 XIII 因子 (FXIII) の生理的基質を模倣した発色酵素 (タンパク質) 融合基質
 - (4) 新しい抗凝固第 XIII/13 因子-B サブユニット (FXIII-B) 抗体の検出方法の開発

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
一瀬 白帝 (ICHINOSE, Akitada)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 10241689
- (2) 連携研究者
惣宇利 正善 (SOURI, Masayoshi)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号: 20292419
- 尾崎 司 (OSAKI, Tsukasa)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 60380565