

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461592

研究課題名(和文) APC及びPSによる第VIII因子制御機構の解明及び新規血友病A治療薬の開発

研究課題名(英文) Research for the 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・助教

研究者番号：30572010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：凝固第VIII因子(FVIII)はトロンビンや活性型第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。本研究では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。

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 that inactivates FVIII(a) and FV(a). We have reported a new regulatory mechanism on coagulation that PS directly impaired the FXase complex by competing the FIXa-FVIIIa interaction (Takeyama, Br J Haematol. 2008 Nov;143(3):409-20), and identified the PS-interactive site on the FVIII A2 domain. However, the contribution of FVIII light chain (LC) to PS-binding has not been determined. In this study, several approaches were employed to assess a PS-FVIII LC interaction. In conclusion, FVIII C2 domain, in particular K2239, was possible to play an important role of the inhibitory mechanism to FVIII function by PS, due to the binding to PS.

研究分野：血液凝固

キーワード：第VIII因子 血友病 活性型プロテインC プロテインS 第IX因子 第X因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) は、血液凝固反応において必須の糖蛋白であり、この先天性欠乏により血友病 A を引き起こす。その治療は欠乏する 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、改善すべき問題が多い。また、最近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 が出血傾向だけではなく血栓形成にも関与していることが注目されている。よって 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といえる。しかし、FVIII を中心とする凝固血栓形成や制御機序は未だ不明な点が多い。

これまで我々の研究室では FVIII の活性化および不活化機序や FVIII インヒビター病態の解明に結びつく研究成果を次々に発表しており、最近では、血液凝固/線溶/不活化因子などが複雑に絡み合う生体内反応における FVIII の生理的役割に注目している。

(2) FVIII はトロンピンや活性型第 X 因子により活性化されるが、活性型 FVIII (FVIIIa) は活性化プロテイン C (APC) による不活化により負に制御される。プロテイン C はトロンピン-トロンボモジュリン複合体により APC へと変換され、APC は活性型凝固第 V 因子 (Va) と FVIIIa を限定分解により不活化し、凝固反応を抑制する。この不活化作用はプロテイン S (PS) により増強される。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といわれている。このように、APC は抗凝固作用だけではなく、炎症などにも係わる重要な因子であり、FVIII と APC の関連を研究することは非常に意義のあることである。さらに、PS は炎症時に上昇し、炎症を抑制する働きがあることがいわれており、従来いわれていたように、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。

(3) 血友病の関節出血では、単に出血だけではなく、滑膜炎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。

(4) 現在までに、FVIII の APC による不活化の機序については、その詳細が明らかにされつつあり、APC が FVIII 重鎖および軽鎖に結合することが証明されている。私は、さらに 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.* 109, 187-198, 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.* 52, 2228-2233, 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、FVIII のアミノ酸を一部置換させた変異 FVIII を用いた実験により示されている (Varfaj F. et al. *Biochem J.* 396, 355-62, 2006)。しかし、FVIII 重鎖と APC の直接的な結合については未だ明らかにされていない。一方、PS は凝固抑制因子で、APC の補因子として FVIII を不活化する。また、PS 欠乏症は血栓症を引き起こすことが知られている。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、従来いわれていたように、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。

(5) そこで、私は 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 が存在すると PS が FVIII の A2 および A3 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が分かった (Takeyama M, *Br J Haematol.* 143, 409-420, 2008)。さらに、PS が FVIII 重鎖 A2 ドメインに結合することも明らかにした (Takeyama M, *Thromb Haemost.* 102, 645-655, 2009)。

(6) 現在までのところ、血友病の治療は欠乏する FVIII の補充が行われており、Peg 化 FVIII 製剤など新しい製剤も開発されつつあるが、製剤の投与により発生する同種抗体 (インヒビター) は、未だに血友病治療の大きな課題である。インヒビターは重症血友病 A 患者ではその約 30% に発生する。インヒビターが出現すると製剤の止血効果が激減～消失するため治療効果を著しく減弱させ、出血の危険が増大する。インヒビター高値の症例では活性型プロトロンピン複合体製剤 (aPCC) や活性型遺伝子組み換え第 VII 因子製剤 (rFVIIa) などのバイパス製剤が使用されるが、止血効果は必ずしも確実ではなく治療に難渋することも多い。

(7) FVIII と APC/PS の結合様式、またその制御機構を詳細に明らかにし、その結果を基に FVIII 上の APC/PS 結合部位 (アミノ酸配列) を変異させた FVIII を作成することを目指す。このような変異 FVIII は APC や PS による不活化をうけにくく、さらに長時間作

用型の FVIII 製剤となりうる。

(8) 我々が目指す APC および PS などの抗凝固因子と FVIII の相互作用を考慮した治療薬については全く新しいアプローチの方法であり、インヒビター発生の可能性がない、新たな血友病治療薬となり得ると考えられる。

## 2. 研究の目的

血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) は、血液凝固反応において必須の糖蛋白であり、この欠乏により血友病 A を引き起こす。また、最近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 が出血傾向だけではなく血栓形成にも関与することが注目されている。よって 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といえる。しかし、FVIII を中心とする凝固血栓形成や制御機序は未だ不明な点が多い。一方、抗凝固因子である活性型プロテイン C (APC) はその補因子であるプロテイン S (PS) とともに、FVIIIa や活性型第 V 因子を不活化し凝固を負に制御する。本研究では、FVIII と APC/PS 相互作用に起因する凝固制御機構を解明するとともに、今後 APC/PS と FVIII の結合を制御する新規 FVIII 製剤の開発にむけての基礎研究を行う。

## 3. 研究の方法

FVIII 軽鎖上の PS 結合部位の同定：

すでに、PS が FVIII 重鎖 A2 ドメインに結合することを明らかにした (Takeyama M, Thromb Haemost. 102, 645-655, 2009)。今回は FVIII 軽鎖上 PS 結合部位を同定する。

そのための具体的な手法としては、我々がすでに確立している種々の strategy (電気泳動、ウエスタンブロット、蛋白純化およびそのフラグメントの精製法、種々の測定法とそのデータ解析など) を駆使することにより実験を行っていく。さらに、変異 FVIII を作成して APC、PS との結合部位の詳細な同定を行うとともに、他の凝固因子などとの結合実験をも行う。

## 4. 研究成果

(1) ELISA を用いた検討で、FVIII 軽鎖と EGR-FIXa の結合は PS の濃度依存性的に阻害され、 $K_i$  は約 5 nM であった。FVIII C2 ドメインには FIXa の結合部位があるため、FVIII C2 ドメインが PS と直接結合するかを検討し、FVIII C2 ドメインは PS と結合することがわかった ( $K_d$ ; 283 nM)。また、表面プラスモン共鳴法により、FVIII C2 ドメインは PS と直接結合することも示した ( $K_d$  62 nM)。

(2) FIXa の FVIII C2 上の結合部位は、アミノ酸残基 2228-2240 であるとすでに報告されている。そこで、2228-2240 ペプチドを合成し、本ペプチドと PS が結合するかを検討した。ELISA で、本ペプチドは PS と結合し、 $K_d$  は

104 nM であった。また、EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) を用いた結合実験でも、本ペプチドは PS と直接結合した。

(3) 本ペプチドと PS の EDC による結合体を用いて、N 末アミノ酸分析を行ったところ、アミノ酸 K2239 が検出されず、K2239 が PS との結合に関与していることが想定された。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 K2239 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予定)。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。

(4) 本研究の検討により、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。今後 APC/PS と FVIII の結合を制御する新規 FVIII 製剤の開発にむけてさらに研究を続けていく。

## 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Shoko Furukawa, Masahiro Takeyama, Keiji Nogami, and Midori Shima  
Identification of a protein S-interactive site on the factor VIII light chain.  
第 78 回 日本血液学会

Shoko Furukawa, Masahiro Takeyama, Keiji Nogami, and Midori Shima  
Identification of a protein S-interactive site on the factor VIII light chain.  
The 58<sup>th</sup> American Society of Hematology

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武山雅博 (TAKEYAMA Masahiro)

奈良県立医科大学小児科・助教

研究者番号：30572010

(2) 研究分担者

野上恵嗣 (NOGAMI Keiji)

奈良県立医科大学小児科・准教授

研究者番号：50326328

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ( )