

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09664

研究課題名(和文) インヒビター保有軽症血友病Aの凝血学的特性と新規治療戦略に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research on establishment of a novel hemostatic treatment based on the hemostatic potential for mild hemophilia A with inhibitor

研究代表者

矢田 弘史 (Yada, Koji)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30635785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血液凝固第VIII因子(FVIII)の欠乏症である血友病A患者にとって、止血治療に伴い出現する抗FVIII抗体(インヒビター)は止血治療を困難にし、臨床上、極めて重要な問題である。インヒビター保有血友病A患者の止血治療に用いるバイパス止血製剤は、一般に、FVIIIの作用を迂回して止血効果を発揮すると考えられている。当教室では、バイパス製剤に含有するFVIIaが凝固反応初期相において、FVIIIを活性化することをこれまで報告しており、今回全血においてもこの反応が生じることを証明した。また、インヒビターを有する軽症血友病Aの自己FVIIIの特性を解析し、FXase複合体における機能異常を証明した。

研究成果の概要(英文)：Development of an anti-factor(F) VIII allo-antibody (inhibitor), making hemostatic effect unstable during FVIII replacement therapy, is one of the serious events for hemophilia A patients. Bypassing agents such as rFVIIa, APCC and pdFVIIa/FX are generally considered to facilitate the hemostatic effect by enhancing the extrinsic coagulation pathway not by the intrinsic one. We have recently reported that FVIIa, an extrinsic factor included in the bypassing agents, could contribute to the hemostatic enhancement by activating FVIII with tissue factor in the early phase of coagulation. In this study, we have confirmed the crosstalk between FVIIa/TF and FVIII under the near physiological condition in the whole blood. We further investigated the function of self-FVIII in the mild hemophilia A with inhibitor, and confirmed that the change in binding to each component of FXase complex caused the variety of hemostatic function.

研究分野：血栓止血学

キーワード：インヒビター 血友病 第VIII因子 活性化・不活性化 活性化第VII因子 第X因子

## 1. 研究開始当初の背景

血液凝固第VIII因子(FVIII)欠乏で生じる血友病Aの止血治療として、一般にFVIII製剤補充療法が行われる。その結果、全患者の10-20%、特に乳幼児を中心にFVIII同種抗体(インヒビター)が出現し、従来の止血治療が不応となる。そのためインヒビターは血友病治療で極めて重要な問題である。インヒビター発生は一般にFVIII活性が1IU/dl未満の重症型血友病に多いが、FVIII活性の残存する中等症・軽症血友病においても特定のFVIII遺伝子(F8)変異とインヒビターの関連について注目されている。止血治療としてバイパス止血療法またはFVIII製剤による中和療法が行われるが、止血効果が不十分なことも多い。また、インヒビターによる凝固抑制機序に関しては未だ不明な点が多い。最近、我々の教室では、従来の血液凝固の概念を超え、外因系凝固因子であるTF/FVIIaと内因系因子であるFVIIIとの凝固極初期相におけるクロストークの重要性を見出しつつある。

## 2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、FVIIIインヒビターの発生メカニズム及び凝固抑制機序の更なる解明と、それに基づくインヒビター保有血友病の新たな止血治療戦略の確立をめざした基礎的凝血的検討を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) FVIIa/FX複合体製剤によるFVIII活性化機序の解明と、インヒビター保有血友病Aモデルにおけるバイパス製剤によるFVIII活性化/不活化についての包括的凝固機能解析

APCC及びrFVIIaと並ぶバイパス製剤であるFVIIa/FX複合体製剤(FVIIa/X)は、FVIIa、FX(a)を含有する。APCC及びFVIIaによるFVIII活性化とその機序についてこれまで検討し、FVIII活性化には組織因子存在下でFVIIaとFXが重要であることを明らかにしてきた。さらに、より含有する凝固因子が限定的であるFVIIa/Xを用い、凝固反応初期相におけるFVIII活性化について、凝固一段法やFXa生成試験、電気泳動法(SDS-PAGE/Western blot)を用いて詳細に検討する。また、これまで純化精製系を用いた検討により得られた知見について、より生理的条件下に近い全血測定系において再現性を含めて検討する。

### 2) 軽症(中等症)血友病AにおけるFVIIIの凝血的・分子生物学的検討及びインヒビター発生機序に関する検討

当教室で経験した軽症(中等症)血友病Aに対して、凝固一段法、合成発色基質法、包括的凝固機能評価手法(トロンボエラストグラム、トロンピン生成試験、凝固波形解析)を駆使して網羅的に凝固機能解析を行うとともに、F8遺伝子解析を進め、遺伝子変異に基づきBHK細胞を用いた安定発現系によりFVIII変異体を発現し、FXa生成試験、ELISA法、表面プラスモン共鳴法(BIACORE®)を通じて、分子構造上の変化を探究する。また、血漿を用いたFXa生成反応を応用して、患者の異常FVIIIの機能を、FXa複合体における各構成要素との親和性を軸として評価する新規測定系を構築する。さらに、インヒビターの出現した軽症(中等症)血友病A自験例について、インヒビターの凝固抑制様式及びエピトープ解析を行い、FVIIIの分子構造解析と併せてインヒビター発生メカニズムについて考察する。

## 4. 研究成果

### 【FVIIa/X, APCC, rFVIIaによるFVIII活性化/不活化についての凝固機能解析】

インヒビター保有血友病A患者について、FVIIa/FX複合体製剤による凝固機能改善効果が微量のFVIIIが共存するとFVIII非存在時よりもさらに増強すること、またその増強効果は、FVIIa単独よりも優れることを、ROTEMを用いた全血凝固機能及びトロンピン生成試験を用いた血漿レベルでの凝固機能により証明した。つづいて健常人または血友病A患者の全血に抗FVIII抗体を添加し、後者には、更にrFVIIIを添加して、後天性血友病Aまたはインヒビター保有中等症・軽症血友病Aモデルとした。これらにバイパス製剤を添加し、凝固反応初期相のFVIII活性化反応を、ROTEMを用いてより生理的条件下で評価した。結果、バイパス製剤をFVIII存在下で添加時には、単独添加時に比して凝固開始時間がより短縮し、インヒビターエピトープに関わらずFVIIaによりFVIIIは活性化することをより生理的条件下でも証明し、これらの成果を原著論文に報告した。

### 【軽症(中等症)血友病AにおけるFVIIIの凝血的・分子生物学的検討及びインヒビター発生機序に関する検討】

当教室において初めて同定したFVIIIのミスセンス変異Pro1809Leuを伴う患者に発生したインヒビターについて、その特性を詳細に解析し、また患者の変異FVIIIを純化精製系により発現し、FVIIIの凝固障害メカニズムについて検討した結果を原著論文にて報告することができた。また、

インヒビター発生との強い関連性が知られている FVIII 重鎖 A2 ドメインにおけるミスセンス変異である Arg593Cys を有する当科症例における凝固障害機序について解明し、その成果を学会にて公表することができた。さらに、FVIII(a)の FXase 複合体における補酵素作用に着目し、軽症・中等症血友病 A 患者の血漿を用いた多元的な凝固機能解析手法を開発した。

これらの成果は、今後更に純化精製系による発現 FVIII を用いて、より FVIII 特異的な凝固障害機序及びインヒビター発生機序を証明する上で極めて重要な礎となった。また、バイパス製剤に含まれる外因系凝固因子による凝固反応極初期における FVIII 活性化反応が全血系の包括的凝固機能によっても証明されたことは、この外因系因子と内因系因子のクロストークの重要性をより強く裏付けるものであり、インヒビター保有血友病 A 患者の新規治療戦略への応用可能性を示唆した。

今後これらの研究を引き続き進行し、患者の FVIII 特性に基づく tailor made 治療の開発に向けて一層努力していきたい。

#### 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 5 件)

- 1: Nogami K, Matsumoto T, Yada K, 他 5 名. Factor (F)VIII/VIIIa enhances global haemostatic function in the co-presence of bypassing agents and FVIII among patients with haemophilia A with inhibitor. *Br J Haematol.* 181, 528-536, 2018.
- 2: Furukawa S, Nogami K, Yada K, 他 2 名. Successful prophylaxis using activated prothrombin complex concentrates (aPCC) in a severe haemophilia A patient with inhibitor previously unresponsive to on-demand daily infusions of aPCC. *Haemophilia.* 23, e481-e484, 2017.
- 3: Nogami K, Yada K, 他 8 名. Assessing the clinical severity of type 1 von Willebrand disease patients with a microchip flow-chamber system. *J Thromb Haemost.* 14, 667-674, 2016.
- 4: Yada K, Nogami K, 他 4 名. Mild hemophilia A patient with novel Pro1809Leu mutation develops an anti-C2 antibody inhibiting

allogeneic but not autologous factor VIII activity. *J Thromb Haemost.* 13,1843-1853, 2015.

- 5: Furukawa S, Nogami K, Yada K, 他 3 名. Systematic monitoring of hemostatic management in hemophilia A patients with inhibitor in the perioperative period using rotational thromboelastometry. *J Thromb Haemost.* 13, 1279-1284, 2015.

[学会発表](計 7 件)

- 1: Yada K. 他 4 名. Mode of enhancement in the global hemostatic potentials with concomitant use of bypassing agents and emicizumab in hemophilia A patients with inhibitor evaluated by ROTEM. XXVI ISTH, 2017, Berlin, Germany.
- 2: 矢田 弘史, 他 4 名. Tenase (Xase) 反応軸に基づく中等症・軽症血友病 A における異常 FVIII の多元的機能解析, 第 39 回 日本血栓止血学会学術集会, 2017 年 6 月, 愛知.
- 3: Yada K. 他 4 名. Increasing of ternary complex formation by predominant accumulation of factor (F)X accompanied by increase of FIXa contributes to enhancement of clotting function by APCC in combination with emicizumab. 59th ASH Annual meeting and Exposition, 2017, Atlanta, USA.
- 4: 矢田 弘史. 血友病の病態解析の進歩, 第 38 回 日本血栓止血学会学術集会 会長シンポジウム, 2016 年 6 月, 奈良.
- 5: Yada K, 他 4 名. A New Classification of Mild/Moderate Hemophilia Based on a Multi-Dimensional FVIII(a) Functions Evaluated By a Plasma-Based Factor Xa Generation, 58th ASH Annual meeting and Exposition, 2016, Sandiego, USA
- 6: Kamiya N, Yada K, 他 2 名. A Novel Plasma-based Factor Xa Generation Assay Defines Interaction Between FVIIIa and Each Component of Xase Complex in Mild Hemophilia A. XXV ISTH, 2015, Tronto, Canada.
- 7: 矢田 弘史, 他 3 名. Arg593Cys 変異を伴う軽症血友病 A における凝固障害はリン脂質との結合親和性低下に関連する,

第 37 回日本血栓止血学会学術集会，  
2015 年 5 月，山梨。

〔図書〕(計 2 件)

- 1: 矢田 弘史, 野上 恵嗣. 血栓止血性疾患の遺伝子診断 出血性疾患, 日本血栓止血学会誌, 26 巻, 513-517, 2015.
- 2: 矢田 弘史, 嶋 緑倫. 小児科診療, 78 巻, 1780-1788, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢田 弘史 (YADA KOJI)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30635785

### (2) 研究分担者

野上 恵嗣 (NOGAMI KEIJI)  
奈良県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50326328