

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07798

研究課題名(和文) 中等症・軽症血友病Aにおける第Ⅷ因子の凝血学的特性に基づく新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategy based on hemostatic characteristics of FVIII in the patients with moderate/mild hemophilia A

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血液凝固第Ⅷ因子(FVIII)欠乏で生じる血友病Aは、血漿中の残存FVIIIレベルにより、重症、中等症、軽症に分類されるが、重症度やインヒビター発生とFVIII遺伝子(F8)変異との関連が注目されている。本研究では、中等症・軽症血友病A患者のF8変異の同定及び変異により生じる異常FVIIIの構造機能解析による病態解明を行うとともに、凝固反応極初期相における組織因子存在下での活性化第Ⅷ因子によるFVIII活性化反応が、内在性の異常FVIIIに対しても生じることを証明し、それらを活用することにより、中等症・軽症血友病A患者の新たな止血治療戦略の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当教室の多彩な手法を駆使した生化学的アプローチによるFVIIIの構造・機能、病態解析やインヒビター研究は、国内では唯一であり、国際的にもトップの一つに挙げられている。本研究の結果、中等症・軽症血友病Aの凝血学的特性とF8遺伝子変異との関連が明らかとなり、F8遺伝子変異によりその特性を分類・評価し得ることが示され、遺伝子解析の重要性を示すものであった。さらに、外因系凝固と内因系凝固のクロストークに関しては、最近、世界的に注目されており、本研究で明らかとなった、中等症・軽症血友病A患者の有するF8変異型FVIIIの外因系凝固因子による活性化反応は、新たな治療開発の上で極めて有意義である。

研究成果の概要(英文)：Hemophilia(H) A is bleeding disorder caused by quantitative and qualitative factor (F)VIII deficiency, and is classified as severe, moderate and mild type by residual FVIII level in the plasma. The severity and development of inhibitor in the patients with HA are considered to be associated with F8 genotype. In the present study, F8 genotypes were investigated in the patients with moderate/mild HA, and the FVIII mutants with the identified F8 missense variants in the patients with moderate/mild HA were produced by a stable human FVIII expression system utilizing BHK or HEK cells. The functional and structural characteristics of the FVIII mutants were investigated and it was found that mutant FVIII could be catalyzed and activated by FVIIa/TF as well as wild-type FVIII in the early phase of coagulation reaction. The results in the present study will help development of a novel hemostatic therapy for the patients with moderate/mild HA.

研究分野：血液凝固

キーワード：血友病A インヒビター 分子異常症

1. 研究開始当初の背景

血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) は、X 染色体長腕 (Xq28) に存在する *F8* 遺伝子によりコードされる蛋白質で、血液凝固反応において、活性型第 IX 因子 (FIXa) の補因子として働き、第 X 因子 (FX) を活性化させることにより、凝固反応速度を 10^5 倍増強させる。この FVIII の欠乏は *F8* の変異により生じ、先天的に重篤な出血を呈する血友病 A として知られる。血友病 A の止血療法として、FVIII 製剤の補充療法が基本であるが、患者の 20-30% に FVIII 同種抗体 (インヒビター) が出現し、さらには出血症状が重篤化するため重大な問題となっている。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。我々は、軽症血友病 A におけるインヒビター発生例を経験し、*F8* 遺伝子解析の結果、FVIII と FIXa との結合部位におけるミスセンス変異 (Pro1809Leu) を世界で初めて同定し、野生型 FVIII の作用を抑制するが、自己の FVIII に抑制作用を示さないという特徴を有するインヒビターの発生に関連することを証明した。一方、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り、中等症・軽症血友病 A においては、*F8* 変異に基づく FVIII の特性に応じて内在性の FVIII を活用することによって、インヒビター発生リスクの低い、かつ FVIII の構造機能毎に個別化された新規治療戦略の開発が期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、中等症・軽症血友病 A 患者の有する *F8* 遺伝子変異に基づく患者自身の異常 FVIII の特性に注目し、FVIII の構造機能解析によりインヒビターの発生機序を解明するとともに、よりインヒビター出現リスクを低減し得る新たな止血治療法の開発と、たとえインヒビターが存在しても止血効果を発揮する新規治療戦略を開発することを目指す基礎的研究である。

3. 研究の方法

(1) 第 VIII 因子遺伝子変異の同定と異常第 VIII 因子の構造機能解析

① 異常 FVIII の原因となる *F8* 変異の同定 - Long-PCR 法による逆位検索及びダイレクトシーケンス法による従来の解析手法に加えて、MLPA 法等を駆使して血友病 A 患者の遺伝子変異を明らかにする。

② 中等症・軽症血友病 A 患者の異常 FVIII の機能解析 - BHK または HEK 細胞を用いた FVIII の安定発現系により、中等症・軽症血友病 A 患者の異常 FVIII を作成し、純化精製系における FXa 生成試験、ELISA 法、表面プラスモン共鳴法 (BIACORE®) 等を通じて、機能解析を行うとともに、血漿中での FXase 複合体におけるそれぞれの反応軸毎に異常 FVIII との親和性を、Michaelis-Menten の速度反応論に基づいて算出される見かけの K_m 値 ($K_m^{app_{PL}}$ 、 $K_m^{app_{FIXa}}$ 、 $K_m^{app_{FX}}$) により評価・分類する。

(2) FVIIa を用いた中等症・軽症血友病 A の異常 FVIII 特性に基づく新規個別化治療戦略

① FVIIa による TF 依存的 FVIII 活性化反応機序に関する検討 - B ドメインを予め一部以外完全に除去した新たな FVIII 製剤 (FVIII-BDD) に対する TF 存在下での FVIIa の凝固活性化及び不活性化反応を、凝固一段法、FXa 生成試験、電気泳動法 (SDS-PAGE/Western blot) を用いて評価し、全長型 FVIII との比較によって、FVIIa/TF による FVIII 活性化/不活性化反応機序及び B ドメインの役割について再考察する。

② 異常 FVIII に対する FVIIa/TF による活性化/不活性化反応を用いた新規治療戦略 - トロンビンによる FVIII の活性化に重要なアミノ酸残基である、Arg372、Arg740 及び Arg1689 を他のアミノ酸残基に置換した FVIII 変異体を、B ドメインの有無両方の条件下で、BHK または HEK 細胞により発現し、TF 存在下での FVIIa による変異 FVIII の活性化及び不活性化反応を凝固一段法や FXa 生成試験、電気泳動法を用いて詳細に検討する。

4. 研究成果

【第 VIII 因子遺伝子変異の同定と異常第 VIII 因子の構造機能解析】

中等症・軽症血友病 A 患者の有する異常 FVIII の原因となる FVIII 遺伝子変異については、ダイレクトシーケンス法による全エクソン領域における遺伝子解析に加えて、MLPA 法及び Long-PCR 法を駆使して、検索を進めた。中等症血友病 A の兄弟例において、エクソン領域には変異がみられず、重複・欠失もみられず、さらに F8 近傍のテロメア側遺伝子を含んだ構造変異についても検索した結果、一般には重症型を呈すると考えられる遺伝子構造変異の存在が示唆された。

中等症・軽症血友病 A の原因となる F8 変異のうち、R372A、P1809L、R531C についてそれぞれ FVIII 変異体を発現・精製し、FVIII 欠乏血漿に添加して、中等症・軽症 A 患者モデル血漿を作成した。それぞれの血漿における FXa 生成試験を行い、野生型 FVIII を FVIII 欠乏血漿に添加して得た正常血漿モデルを対照として比較検討した。トロンビン開裂異常を伴う R372A では、FIXa、FX、PL に対する見かけの K_m (K_m^{app}) は、それぞれ、 $\sim 12\text{nM}$ 、 $\sim 80\text{nM}$ 、 $\sim 27\text{nM}$ で対照よりも 1.5~30 倍高値であった。P1809L では、PL に対する K_m^{app} のみが対照の 2 倍以上高値であり、リン脂質との結合親和性低下が示唆され、当教室における先行研究で発表している P1809L の機能解析結果と一致した。一方、R531C においては、FX、PL に対する K_m^{app} は対照と同等であったのに対し、FIXa に対する K_m^{app} は $\sim 60\text{nM}$ と対照の 7 倍以上高値で、FIXa との結合親和性が示唆された。このように血漿における FXa 生成試験により、中等症・軽症血友病 A 患者の異常 FVIII の特性が評価・分類できることを示した。

【FVIIa を用いた中等症・軽症血友病 A の異常 FVIII 特性に基づく新規個別化治療戦略】

FVIIa による TF 依存的 FVIII 活性化反応機序に関して、まず、全長型 FVIII (FVIII-FL) と B ドメイン除去型 FVIII (FVIII-BDD) とで比較検討した。FVIII-BDD においても、FVIII-FL と同様に FVIIa/TF により活性化が生じるが、FVIII-BDD では、FVIII-FL に比べて、不活化反応が抑制され、より長時間、凝固活性が保持されることがわかった。また、FVIII-FL における FVIIa/TF による活性化反応では、Arg372→Arg336 の順に開裂が起こるのに対し、FVIII-BDD では、Arg336 が先に開裂することで活性化がおこることを、凝固一段法及び Western blot 法により証明した。さらに、発現実験により得た B ドメイン除去型 FVIII 変異体である Arg372Ala と Arg336Ala を比較すると、いずれの変異体も、FVIIa/TF により野生型 FVIII と同様に活性化され、Arg336 でも FVIII 活性化反応が生じ得ることを証明した。一方、FVIIa/TF による活性化後の不活化反応は、B ドメイン存在時には、A2 解離が主たる機序であるが、FVIII-BDD では、Arg372 開裂よりも Arg336 開裂が先行するために A2 解離が起こりにくく、結果として不活化抑制が起こると考えられた。

これらの結果は、中等症・軽症血友病 A 患者の凝固機能において、F8 変異に基づく内在性の FVIII の特性が強い影響を及ぼすことを改めて示すとともに、凝固反応の極初期相における FVIIa/TF と FVIII のクロストークは、内在性の FVIII にも作用し得ることを示し、これらのクロストークを応用することによる中等症・軽症血友病 A 患者に対する新たな治療可能性を示唆するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yada K, Nogami K	4. 巻 40(5)
2. 論文標題 Novel Insights and New Developments Regarding Coagulation Revealed by Studies of the Anti-Factor IXa (Activated Factor IX)/Factor X Bispecific Antibody, Emicizumab.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.	6. 最初と最後の頁 1148-1154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.120.312919.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Y, Nogami K, Yada K, Furukawa S, Noguchi-Sasaki M, Hirata M, Shima M.	4. 巻 120(6)
2. 論文標題 Emicizumab Improves Ex Vivo Clotting Function in Patients with Mild/Moderate Hemophilia A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 968-976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0040-1710315.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shida Y, Furukawa S, Yaoi H, Takeyama M, Kasai R, Shima M.	4. 巻 110(4)
2. 論文標題 Global coagulation function assessed by rotational thromboelastometry predicts coagulation-steady state in individual hemophilia A patients receiving emicizumab prophylaxis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 419-430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02698-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yada K, Nogami K	4. 巻 10
2. 論文標題 Spotlight on emicizumab in the management of hemophilia A: patient selection and special considerations.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of blood medicine	6. 最初と最後の頁 171-181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/JBM.S175952	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Y, Nogami K, Yada K, Ogiwara K, Furukawa S, Shimonishi N, Shima M.	4. 巻 25(3)
2. 論文標題 Whole blood ristocetin-induced platelet impedance aggregometry does not reflect clinical severity in patients with type 1 von Willebrand disease. Haemophilia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haemophilia	6. 最初と最後の頁 e174-e179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hae.13725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nogami K, Matsumoto T, Yada K, Ogiwara K, Furukawa S, Shida Y, Takeyama M, Shima M	4. 巻 181
2. 論文標題 Factor (F)VIII/VIIa enhances global haemostatic function in the co-presence of bypassing agents and FVIII among patients with haemophilia A with inhibitor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British journal of haematology	6. 最初と最後の頁 528-536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.15209.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 矢田 弘史、野上 恵嗣、坪田 夏芽、嶋 緑倫
2. 発表標題 インヒビター保有血友病A患者における活性型第VII因子による凝固改善に必要な第X因子に関する定量的検討
3. 学会等名 第81回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 由翔、矢田 弘史、野上 恵嗣、嶋 緑倫
2. 発表標題 1.Bドメイン除去(BDD)第VIII 因子(FVIII)においてFVIIa/TF 惹起FVIII 不活化は遷延される
3. 学会等名 第40回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuto Nakajima, Koji Yada, Keiji Nogami, Midori Shima
2. 発表標題 4.A Novel Mechanism of Factor VIIa/Tissue Factor (TF)-Catalyzed Activation and Inactivation of B-Domain-Deleted Factor VIII in the Early Initiation Phases of Coagulation
3. 学会等名 60th American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	野上 恵嗣 (Nogami Nogami) (50326328)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

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
---------	---------