

平成21年4月29日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591264
 研究課題名（和文）凝固第Ⅷ因子活性化/不活化機構の解明と凝固/抗凝固療法に応用に関する研究
 研究課題名（英文）Studies on the mechanisms of activation and inactivation of factor VIII: applications of novel coagulant and anticoagulant therapy
 研究代表者
 野上 恵嗣（NOGAMI KEIJI）
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：50326328

研究成果の概要：血液凝固内因系第Ⅷ因子(FⅧ)は、欠乏では重篤出血(血友病A)を、逆に増加は血栓形成を惹起する。従来凝固研究は、内因系/外因系/凝固抑制系/線溶系に分けて研究されてきたが、実際の凝固過程は複数系が互いに絡み合い進行していくと支持されつつある。本研究で、凝固反応で最も鍵を握る FⅧが、内因系のみならず、線溶系因子(プラスミン)、凝固抑制因子(プロテインS)、外因系因子(FⅦ)と相互作用することで凝固血栓が巧みに制御されていることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：血液凝固、第Ⅷ因子、外因系、線溶系、凝固抑制系、酵素、相互作用

1. 研究開始当初の背景

血液凝固第Ⅷ因子(FⅧ)の欠乏は、先天的な重篤出血を呈する血友病Aを引き起こす。治療は、FⅧ製剤補充療法であるが、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)出現等の問題点が多い。一方、血栓症患者のFⅧが高値であることが証明され、FⅧと血栓形成の関連が注目されている。よってFⅧは出血と血栓の相反する病態にて極めて重要な因子であるが、FⅧを中心とする凝固血栓形成や抑制機序は未だ不明な点が多

い。FⅧ活性化/不活化機序を含む分子構造の解明は、血友病Aの新治療戦略と血栓形成の種々の病態に応じた新規抗血栓凝固療法の確立につながるとされる。

2. 研究の目的

従来の凝固血栓研究は、内因系/外因系/凝固抑制系/線溶系に分けて研究されて著しく発展してきたが、生体内での凝固過程は複数系が互いに絡み合い進行していると最近では

支持されてきている。本研究は、FVIIIと線溶系、外因系、凝固抑制系との関連性に注目し、FVIII分子構造や新たな凝固血栓形成/抑制機序を解明し、長時間作用型 FVIII製剤や血栓形成病態に応じた FVIIIを制御する抗凝固血栓薬開発の基礎研究が目的である。

3. 研究の方法

活性型 FVII (FVIIa; 外因系)、プロテイン S (PS; 凝固抑制系)、プラスミン (Plm; 線溶系) による FVIII活性化/不活化様式

FVIIa、PS、Plm による FVIII活性の影響とその開裂分解を凝固測定法と電気泳動法で検討する。分解 FVIIIフラグメントのアミノ酸配列を同定する。また VWF/PL 存在下や FX 複合体に及ぼす影響を検討する。さらにトロンビン、FXa、APC の FVIII活性化/不活化機序と比較し、凝固過程での外因系/凝固抑制系/線溶系反応と内因系反応との関連性や生理的意義を明らかにする。

FVIIa、PS、Plm の FVIII分子上結合部位の同定

Anhydro 化した Ah-FVIIa/Ah-Plm、PS の FVIIIとの結合実験を表面 plasmon 共鳴法や ELISA で確立する。FVIIIフラグメントや monoclonal 抗体、合成ペプチド、発現 FVIII変異株を用い、各因子の FVIII上結合領域のアミノ酸残基を同定する。また FVIIa、PS、Plm フラグメントと FVIII結合実験も行い、FVIIIの各因子分子上結合部位との関連性を3次元FVIIIモデルで検討する。

4. 研究成果

① Plm による FVIII活性化/不活化機序

ごく少量 Plm でも FVIII活性を極めて初期段階で約 2 倍上昇させ、その後速やかに低下させるが、VWF/PL 存在下でも影響しなかった。Plm は FVIII重鎖 Lys³⁶、Arg³³⁶、Arg³⁷²、Arg⁷⁴⁰ 軽鎖 Arg¹⁶⁸⁹、Arg¹⁷²¹ を開裂させるが、同部位を開裂させる APC や FXa に比べ FVIII活性化/不活化は急速に認めた。この機序は、Plm が FVIII A2 と A3 両ドメインに結合して制御することがわかり、その結合部位は A2 の Arg⁴⁸⁴、A3 の 1691-1705、1804-1818 の Lys 残基が中心であった。またこの部位は FIXa 結合部位であり、凝固過程での Plm-FVIII相互作用は、FIXa により制御されていた。この A2 は Plm の catalytic ドメインの非 Lys 結合部位 (LBS) に、また A3 は kringle 1-3 ドメインの LBS に結合して反応することもわかった。

② PS による FVIII制御機序

PS は APC の補因子として過凝固抑制するが、APC 非依存的でも PS は FVIIIへ直接結合することにより、凝固活性を惹起させるリン脂質膜

上 FVIII-FIXa 結合を競合的に阻害して凝固抑制することが明らかになった。その際、PS は FVIII A2 および A3 ドメインに結合することにより作用を発揮する。なおその A2 上の PS 結合部位は、残基 488-490 に存在することがわかった。

③ FVIIa による FVIII活性化/不活化機序

FVIIa は FVIIIを凝固初期相で極めて早く活性を 4-5 倍上昇させ、その機序には重鎖 Lys³⁶、Arg³³⁶、Arg³⁷²、Arg⁷⁴⁰ 開裂が寄与していることがわかった。この反応はトロンビンによる活性化より極めて急速で、凝固初期相に強く関与している可能性が考えられる。

以上から、FVIIIは内因系凝固の関わりのみならず、線溶系、凝固抑制系、外因系が FVIIIと相互作用することにより凝固血栓を巧みに制御している可能性が強く示唆した。今後引き続き本研究を継続し解明していくつもりである。

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 9 件)

1. Nogami K, Nishiya K, et al (他5名). Identification of plasmin-interactive sites in the light chain of factor VIII responsible for proteolytic cleavage at Lys36. *J Biol Chem.* 2009; 284: 6934-45.
2. Soeda T, Nogami K, et al (他6名). The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor Xase complex. *J Biol Chem.* 2009; 284: 3379-88.
3. Nogami K, Shima M, et al (他5名). Identification of a plasmin-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1784: 753-63.
4. Takeyama M, Nogami K, et al (他5名). Protein S down-regulates factor Xase activity independent of activated protein C: specific binding of factor VIII(a) to protein S inhibits interactions with factor IXa. *Br J Haematol.* 2008; 143: 409-20.
5. Takeyama M, Nogami K, et al (他5名). Selective factor VIII and V inactivation by iminodiacetate ion exchange resin through metal ion

- adsorption. *Br J Haematol.* 2008; 142: 962-70.
6. Nogami K, Saenko EL, et al (他4名). Identification of a thrombin-interactive site within the FVIII A2 domain that is responsible for the cleavage at Arg372. *Br J Haematol.* 2008; 140: 433-43.
 7. Nogami K, Shima M et al (他4名). Relationship between the binding sites for von Willebrand factor, phospholipid, and human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies within the factor VIII C2 domain. *Int J Hematol.* 2007; 85: 317-22.
 8. Nogami K, Shima M, et al (他4名). Mechanisms of plasmin-catalyzed inactivation of factor VIII. *J Biol Chem.* 2007; 282: 5287-95.
 9. 野上恵嗣. 血友病Aの分子病態. 第VIII因子の分子構造および機能の最近の知見. 血栓止血誌 2008; 19: 779-87

[学会発表] (計8件)

1. Soeda T, Nogami K, et al. Tissue factor-dependent activation of factor VIII by factor VIIa in the early phase of bloodcoagulation. 50th Annual meeting of American Society of Hematology. 2008/12/6, San Francisco, CA
2. Soeda T, Nogami K, et al. Identification of a factor IXa-interactive site within the C2 domain of factor VIIIA and a crucial role of these associations for the process of clot formation. 50th Annual meeting of American Society of Hematology. 2008/12/6, San Francisco, CA
3. 荻原建一、野上恵嗣、他. 「血友病の分子病態の進歩と臨床応用の展望」 FVIIa、FVIIIを介する止血メカニズムの新たな展開. 第31回日本血栓止血学会学術集会. 2008/11/20. 大阪市
4. 荻原建一、野上恵嗣、他. 6-aminohexanoic acid (6-AHA)の凝固亢進作用. 第31回日本血栓止血学会学術集会. 2008/11/20. 大阪市
5. Nishiya K, Nogami K, et al. Localization of factor VIII-interactive site within

plasmin/plasminogen which is responsible for plasmin-catalyzed activation and inactivation of factor VIII. 49th Annual meeting of American Society of Hematology. 2007/12/9. Atlanta, GA

6. Takeyama M, Nogami K, et al. Identification of protein S-interactive site on the factor VIII A2 domain. 49th Annual meeting of American Society of Hematology. 2007/12/9. Atlanta, GA
7. 野上恵嗣. 血友病 A インヒビターの免疫生化学的側面. 第30回日本血栓止血学会学術集会. 2007/11/15 三重県賢島市
8. 荻原建一、野上恵嗣他. 凝固初期相におけるプラスミンの向凝固作用. 第30回日本血栓止血学会学術集会. 2007/11/17 三重県賢島市

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

(3)連携研究者