

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成20～22年

課題番号：20591259

研究課題名（和文） 第VIII因子活性増強抗体を用いた血友病A新規抗体療法に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Basic study for establishment of novel antibody therapy for hemophilia A with an antibody enhancing factor VIII activity

研究代表者

嶋 緑倫 (SHIMA MIDORI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30162663

研究成果の概要（和文）：これまでに、第VIII因子活性を増強する抗体の報告はない。抗第VIII因子モノクローナル抗体 mab216 は第VIII因子活性を1.5倍以上増強する抗体である。さらに、第X因子生成反応を1.5倍やトロンビン生成反応を2.5倍増強した。抗体の結合部位はA2ドメインと考えられ、本抗体の存在により Arg372 の開裂が亢進していることが判明した。本抗体は血友病Aの止血治療に有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Antibodies that promote FVIII activity do not appear to have been reported. In this study, anti-FVIII monoclonal antibody, mab216, that enhanced FVIII coagulation activity. The mab216 increased FVIII activity ~1.5-fold dose-dependently, FXa generation and thrombin generation were increased by ~1.4- and ~2.5-fold, respectively. An anti A2 epitope was identified and the antibody enhanced the cleavage at Arg372. The findings may cast new light on new principles for improving the treatment of haemophilia A patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	2,800,000	840,000	3,640,000
21年度	600,000	180,000	780,000
22年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：血液凝固学

科研費の分科・細目：7212

キーワード：小児血液学

1. 研究開始当初の背景

血友病Aは、第VIII因子の質的量的欠乏を病態とする重篤な出血傾向を呈する疾患で、先天性凝固障害症では最も発生頻度が高い。血友病A止血治療の根本は、第VIII因子製剤の補充療法である。近年は、第VIII因子製剤を週に2-3回

定期的に投与することにより出血症状を予防する定期補充療法が重要になりつつある。実際、第VIII因子活性を>1%に維持することで劇的な出血予防効果が得られ、また、頭蓋内出血に代表される重篤な出血は回避される。さらに、最近、幼少期に定期補充を開始することにより、

血友病の合併症で最も重要な関節症の発症や進展を防御することが明らかにされている。定期補充療法の浸透により、わが国の血友病医療は進歩しつつあるが、頻回の静脈注射が必要であり、幼少期の患児の導入が困難である。さらに、投与量増大に伴う医療経済や補充療法が無効となる抗第 VIII 因子同種抗体 (インヒビター) の発生などの問題が残っている。将来の治療法として遺伝子治療が期待されているが、いまだ臨床応用上有効かつ安全なベクターは開発に到っておらず、また、遺伝子導入による白血病などの発生に関する懸念やベクターおよび産生第 VIII 因子に対する抗体やインヒビターの発生の問題もある。したがって、幼少期から安全にかつ容易に実施でき、かつインヒビターの存在に影響を受けない治療法が切望されている。このためには従来の第 VIII 因子製剤による補充療法の効果をより増強かつ長時間に作用させる技術が必須である。

2. 研究の目的

第 VIII 因子の作用を増強させるためには、第 1 に凝固反応系における第 VIII 因子の機能に関する基礎的知見の集積が必要である。第 VIII 因子は、トロンビンや活性型第 X 因子により限定分解を受けて活性型第 VIII 因子に変換される。活性型第 VIII 因子は、活性型プロテイン C (APC) により不活性化される。活性型第 VIII 因子は、凝固反応の第一ステップである第 X 因子活性化反応を 10^5 倍亢進する作用を有することが知られている。したがって、血友病 A の出血症状が先天性凝固障害症で最も重篤であるのは当然である。さらに、 $>1\%$ で出血予防効果が期待されることも説明できる。平成 17~19 年の基盤研究で実施した凝固波形解析に関する研究により、第 VIII 因子が 1% 存在すると凝固時間が短縮するのみならず、凝固開始後フィブリン形成速度や加速度が改善されること、また、この凝固波形の改善がトロンビン生成とも相関していることを初めて明らかにした (*Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4; 377-384, 2006)。さらに、 $0.2\sim<1\%$ の微量レベルでも、第 VIII 因子由来のトロンビン生成能がみられることも判明した。この研究成果は、血友病の臨床的重症度が 1% 未満の重症と 1% 以上の中等症で著しく異なるという従来の経験的概念を凝血的に裏付けるとともに、微量の第 VIII 因子上昇でも出血予防効果が期待されることが確認された。

さらに、第 VIII 因子の活性評価は、凝固時間の短縮効果を基本とする従来の凝血的的方法で判断するのは不十分であり、凝固速度、凝固加速度やトロンビン生成能を包括的に評価することが必要であることも判

明した。

従来の第 VIII 因子を単独で投与する補充療法では、第 VIII 因子の活性を持続的に増強させることは第 VIII 因子の不活性化機構やクリアランス機構のためきわめて困難である。したがって、第 VIII 因子の作用を増強させるためには全く新たな治療ストラテジーが必要である。応募代表者は、第 VIII 因子の構造および機能解析の目的で、様々な抗第 VIII 因子モノクローナル抗体や同種抗体を用いて、エピトープおよび抗第 VIII 因子機能の解析を行ってきた。その結果、第 VIII 因子とトロンビン、活性型第 X 因子、プラスミン、von Willebrand 因子 (VWF)、活性型プロテイン C (APC)、リン脂質の結合を抑制する抗体を発見した。これらの抗体のエピトープ解析に基づき、各種第 VIII 因子フラグメント、ペプチドなどを用いて、それぞれの結合部位の同定に初めて成功した (Nogami K, Shima M et al. *J Biol Chem* 274,31000-31007,2000. Nogami K, Shima M et al. *J Biol Chem* 275,25774-25781,2000. Nogami K, Shima M et al. *Blood* 97, 669-677, 2001. Nogami K, Shima M et al. *Blood* 99, 3993-3998, 2002. Nogami K, Shima M et al. *J Biol Chem* 282,5287-5295,2007.)。モノクローナル抗体は、特定のエピトープ残基を認識して特異的に結合する。従来、モノクローナル抗体は、機能を抑制する抗体のみに注目されていたが、抗原に結合することにより、蛋白分解を抑制し、また、構造変化をきたして、様々なリガンドへの親和性を高める可能性もある。応募代表者は、モノクローナル抗体の活性増強作用の可能性に注目して、本研究を着想した。

第 VIII 因子は、活性型第 X 因子生成系において活性型第 IX 因子、第 X 因子、活性型第 VII 因子、リン脂質、およびフォンヴィレブランド因子 (VWF) と互いに結合することによって、それぞれの因子やリガンドとの相互作用を促進して凝固反応を促進する。そこで、第 VIII 因子に反応する各種抗体をスクリーニングすることにより、第 VIII 因子機能を亢進する抗体が得られる可能性がある。このような抗体は、従来の補充療法と併用することにより、第 VIII 因子活性を持続的に増強し、さらに、インヒビター保有患者にも有効な全く新たな止血療法の実現が期待される。抗体を用いた止血治療は、皮下投与が可能であること、さらに、半減期が 2 週から 1 ヶ月程度あり、長時間作用するという大きな利点がある。これは、特に頻回の経静脈投与が困難な幼少期の血友病 A 患者にとってきわめて有用

である。

そこで本研究では、第 VIII 因子機能を持続的に増強する抗体による新規止血治療法に関する基礎的知見を得ることを目的に、下記の研究を実施する。

- 1) 第 VIII 因子活性やトロンビン生成能を増幅する抗第 VIII 因子モノクローナル抗体の作製
- 2) 抗体エピトープの解析および第 VIII 因子機能増幅機序の解明
- 3) 血友病 A ノックアウトマウスを用いたモノクローナル抗体の *in vivo* 止血効果の評価

血友病 A において抗体を用いた治療法の概念は全く無く、極めて独創的と思われる。また、第 VIII 因子に関する研究でも、活性を亢進する抗体やその臨床応用に関する報告もみられない。本研究は第 VIII 因子を介する凝固機構の解明にも有用である。

3. 研究の方法

1) 抗体作成

抗第 VIII 因子モノクローナル抗体はヒト第 VIII 因子 (FVIII) を免疫してマウスミエローマ細胞 (P3U1) と細胞融合を行い HAT 培地で選択培養を行った。抗体産生クローンは酵素抗体法 (ELISA) で実施した。抗体陽性クローンを 2 回限界希釈した。培養液からプロテイン G セファロースで純化した。得られたモノクローナル抗体 (mAb) の抗凝固作用については aPTT を用いた。比較検討のための抗 FVIII mAb として A1 ドメイン認識抗体 C5, A2 ドメイン認識 mAb413, JR8, C2 認識 NMC-VIII/5, A3 認識 JR5 を用いた。

2) 凝固測定

抗体の抗凝固作用については aPTT を基盤とする凝固波形解析にて検討した。aPTT 実施中の透過度をリアルタイムにモニタリングして最大凝固速度 (min1), 最大凝固加速度 (min2) を測定した。FVIII 活性は FVIII 欠乏血漿を用いた凝固 1 段法にて実施した。

3) 活性化第 X 因子生成反応

活性化第 X 因子 (FXa) 生成反応は純化システムにて測定した。FVIII (30nM) をトロンビンにて活性化させ、活性化第 IX 因子 (FIXa) と第 X 因子を添加して反応を進め、合成発色基質 S2222 にて測定した。

4) トロンビン生成試験

トロンビン生成試験 (TGT) は正常血漿と各抗体を混和後、リン脂質およびトロンビンの蛍光発色基質を添加、リコンビナント組織因子 (TF)、塩化カルシウムで反応を開始した。生成されたトロンビンをリアルタイムにモニタリングし、ピークまでの時間 (Time to peak), トロンビン生成開始までの時間 (lag time), ピークトロンビン (peak thrombin),

総トロンビン生成量 (ETP) などの定量的パラメーターを算出した。

5) 第 VIII 因子活性化と開裂

第 VIII 因子の活性化はトロンビンおよび FXa について検討した。純化 FVIII にトロンビンあるいは FXa を添加後、経時的に検体をとって、FVIII 活性および電気泳動にて FVIII の開裂パターンを検討した。

4. 研究成果

1) 抗第 VIII 因子 mAb と活性化増強作用

特異的抗 FVIII 抗体産生クローンを aPTT および ELISA でスクリーニングを実施し、FVIII には稀有号するものの aPTT を延長しない抗体を検索した。ひとつの抗体、mAb216 は aPTT をむしろ短縮した。また、この aPTT 短縮作用は濃度依存性であった。本抗体の凝固活性化増強作用について凝固波形解析でも検討したところ、濃度依存性に最大凝固速度 (Min1) は増加した。本抗体の増強作用が FVIII 特異的であることを確認するために、純化 FVIII に本抗体を添加して、FVIII 活性化について検討したところ、約 1.5 倍増強した。さらに FXa 生成反応の増強効果もみられた。本抗体の増強作用は F(ab')₂ でも同様であった。

2) トロンビン生成反応への効果

正常血漿に抗体を添加して、微量の TF (5 pM) 惹起 TGT を検討した。トロンビン生成はいずれのパラメーターにおいても抗体の添加により抗体の濃度依存性に増強した。TGT ピーク値や ETP は約 2-3 倍増強した。FVIII 欠乏血漿では増強効果はみられなかった。

3) 抗体の結合部位

本抗体の結合部位の同定を試みた。方法は FVIII 各サブユニット (H 鎖、L 鎖、A1, A2) を固相化して ELISA にて実施した。抗体は H 鎖と A2 ドメインに結合した。したがって、本抗体の結合エピトープは重鎖 A2 ドメインに存在することが判明した。

4) 抗体と第 VIII 因子活性化および開裂に対する影響

本抗体が第 VIII 因子活性化のメカニズムを明らかにするために、トロンビンおよび FXa による活性化増強作用について検討した。トロンビンによる活性化ピークレベルは本抗体の添加により増強した。また、本作用は濃度依存性であった。同様に、FXa 活性化作用も増強した。電気泳動によるトロンビン FXa の開裂パターンを観察したところ、Arg372 の開裂を促進していることが判明した。

5) トロンビンと FVIII への作用

種々の抗体濃度下に FVIII とトロンビンの作用について FXa 生成試験で検討したところ、本抗体の存在下に FXase 活性は増強した。さらに、本抗体の作用によりトロンビンと FVIII との親和性が亢進することが判明した。

したがって、本抗体はトロンピンと FVIII の結合性を高めることにより第 VIII 因子活性化を増強していることが判明した。

6) 抗 FVIII 抑制抗体の影響

本抗体の第 VIII 因子活性増強作用が第 VIII 因子活性を抑制する抗体の影響について検討した。抑制抗体は抗 FVIII 活性抑制作用を 3BU/ml に調整した。本抗体の第 VIII 因子活性化増強作用は各種抑制抗体存在下でも認められた。

7) 抗体の第 VIII 因子安定化作用

本抗体と FVIII を混和して第 VIII 因子活性の推移を検討したところ、抗体非存在下なお場合よりも第 VIII 因子の低下作用は軽減したことから、本抗体は第 VIII 因子活性を安定化する作用を有することが明らかになった。

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 27 件)

Kasuda S, Tatsumi K, Sakurai Y, Kato J, Taminishi S, Takeda T, Ohashi K, Okano T, Hatake K, Shima M. Expression of coagulation factors from murine induced pluripotent stem cell-derived liver cells. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011 (Epub)

2) Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Sakurai Y, Ogiwara K, Yoshioka A, Okano T, Shima M. Regulation of coagulation factors during liver regeneration in mice: Mechanism of factor VIII elevation in plasma. *Thromb Res*. 2011 Feb 11. [Epub]

3) Hayashi T, Sakurai Y, Fukuda K, Yada K, Ogiwara K, Matsumoto T, Yoshizawa H, Takahashi Y, Yoshikawa Y, Hayata Y, Taniguchi S, Shima M. Correlations between global clotting function tests, duration of operation, and postoperative chest tube drainage in pediatric cardiac surgery. *Paediatr Anaesth*. 2011 Jan 21. doi: 10.1111/j.1460-9592.2011.03524.x. [Epub]

4) Hamada M, Sugimoto M, Matsui H, Mizuno T, Shida Y, Doi M, Fukushima H, Nishio K, Yoshioka A, Shima M. Antithrombotic properties of pravastatin reducing intra-thrombus fibrin deposition under high shear blood flow conditions. *Thromb Haemost*. 2011 Feb 1;105(2):313-20.

5) Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Shima M. Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: a crucial role of coagulation factors V and VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2010 Sep;21(6):568-76.

6) Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Takagi S, Shima M, Okano T. Engineering liver tissues under the kidney capsule site provides therapeutic effects to hemophilia B mice. *Cell Transplant*. 2010;19(6):807-13. Epub

7) Nishiya K, Nogami K, Okada K, Matsuo O, Takeyama M, Ogiwara K, Shima M. Determination of a factor VIII-interactive region within plasmin responsible for plasmin-catalysed activation and inactivation of factor VIII(a). *Thromb Haemost*. 2010 Jul 5;104(1):105-17. Epub 2010 Apr 13.

8) Kasuda S, Nishiguchi M, Yoshida S, Ohtsu N, Adachi N, Sakurai Y, Shima M, Takahashi M, Hatake K, Kinoshita H. Enhancement effect of ethanol on lipopolysaccharide-induced procoagulant status in human umbilical endothelial cells.

Soud Lek. 2009 Oct;54(4):44-8.

9) Takeyama M, Nogami K, Matsumoto T, Soeda T, Suzuki T, Hattori K, Shima M. Characterisation of an antibody specific for coagulation factor VIII that enhances factor VIII activity. *Thromb Haemost*. 2010 Jan;103(1):94-102.

10) Ohashi K, Koyama F, Tatsumi K, Shima M, Park F, Nakajima Y, Okano T. Functional life-long maintenance of engineered liver tissue in mice following transplantation under the kidney capsule. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010 Feb;4(2):141-8.

11) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. A modified thrombin generation test for investigating very low levels of factor VIII activity in hemophilia A. *Int J Hematol*. 2009 Dec;90(5):576-82.

12) Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Takagi S, Utoh R, Yoshioka A, Shima M, Okano T. production following primary hepatomitogen-induced direct hyperplasia. *World J Gastroenterol*. 2009 Nov

13) Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Nishiya K, Ogiwara K, Shima M. Identification of a protein S-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. Thromb Haemost. 2009 Oct;102:645-55.

14) Takeyama M, Nogami K, Okuda M, Shima M. von Willebrand factor protects the Ca²⁺-dependent structure of the factor VIII light chain. Br J Haematol. 2009 Sep;146(5):531-7.

15) Yamashita A, Matsuda S, Matsumoto T, Moriguchi-Goto S, Takahashi M, Sugita C, Sumi T, Imamura T, Shima M. Kitamura K, Asada Y. T hrombin generation by intimal tissue factor contributes to thrombus formation on macrophage-rich neointima but not normal intima of hyperlipidemic rabbits. Atherosclerosis. 2009 Oct;206(2):418-26.

16) Takeda T, Sakurai Y, Tatsumi K, Kato J, Kasuda S, Yoshioka A, Shima M. Elevation of B cell-activating factor belonging to the tumour necrosis factor [corrected] family (BAFF) in haemophilia A patients with inhibitor.

Thromb Haemost. 2009 Feb;101(2):408-10. .

17) Nogami K, Nishiya K, Saenko EL, Takeyama M, Ogiwara K, Yoshioka A, Shima M. Identification of plasmin-interactive sites in the light chain of factor VIII responsible for proteolytic cleavage at Lys36. J Biol Chem. 2009 Mar 13;284(11):6934-45.

18) Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M. The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor xase complex. J Biol Chem. 2009 Feb 6;284(6):3379-88.

19) Soeda T, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII.J Thromb Haemost. 2010 Nov;8(11):2494-503.

米国出願特許公開番号: US2009/0297503
発明の名称(英文): Blood Coagulation Factor VIII Activation-Enhancing Antibodies

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Blood Coagulation Factor VIII Activation-Enhancing Antibodies

発明者: 武山雅博, 野上恵嗣, 嶋緑倫, 鈴木司

権利者: 奈良県立医科大学、中外製薬

番号: US2009/0297503

出願年月日: 2009年8月6日(修正版出願中)

国内外の別: 国外(米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋 緑倫 (SHIMA MIDORI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30162663

(2) 研究分担者

柴田 優 (SHIBATA MASARU)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50405388