

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 18 日現在

機関番号： 24601
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2009～2011
 課題番号： 21591370
 研究課題名(和文) 第Ⅷ因子活性化・不活化機構の解明と新規凝固・抗凝固薬への応用に関する基礎的研究
 研究課題名(英文) Studies on the mechanisms of activation and inactivation of factor VIII: Applications of novel (anti-)coagulant therapy
 研究代表者： 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

研究成果の概要（和文）：血液凝固第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、凝固止血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)、炎症性因子(好中球エラスターゼ)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。

研究成果の概要（英文）：Factor VIII (FⅧ) is an extremely important blood coagulation factor in the opposite conditions such as the hemorrhages and thrombi. However, there are still uncertain points on FⅧ-based (anti-)coagulation and thrombus formation. The conventional researches of blood coagulation had been fully done separately by the intrinsic and extrinsic pathway, anti-coagulant pathway, and fibrinolytic pathway, but it is being now supported that all pathways simultaneously participate and progress in coagulation. In this study, we for the first time found the relationship of FⅧ with plasmin (fibrinolytic factor), FⅦa (extrinsic factor), protein S (anti-coagulant factor), neutrophil elastase (inflammatory factor) during the blood coagulation process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
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、F

Ⅷ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、炎症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)、好中球エラスターゼ (HNE) によるFVIII活性化/不活化様式 : FVIIa、PS、Plm、HNE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領域も同定する。他の凝固因子のFVIII結合部位との関連性を3次元FVIIIモデルで検討する。

全血凝固機能評価 : 全血Thromboelastometryを用いて凝固機能の評価を行い、FVIII-線溶系制御軸の生理的意義を明らかにする。

4. 研究成果

【Plm-FVIII制御機構】PlmがFVIIIを凝固初期相で活性化/不活化するFVIII-線溶系制御において、この相互作用様式を初めてmodelingした。この制御軸について全血を用いて次の生理的機序も明らかにした。線溶促進urokinase(uPA)が、向線溶作用と向凝固作用も有していた。その機序はuPAにより生成されたPlmがFVIII/FVを直接活性化していた。Plmの抗線溶作用を阻害するtranexamic acid(TXA)は向凝固作用も示し、血友病A患者の凝固機能はTXAにより促進されることを示した。

【PS-FVIII制御機構】PSはAPCの補因子としてFVIIIを不活化して過凝固抑制するが、APC非依存性にもPSは直接FVIII A2/A3ドメインに結合する。この抗凝固能はC4-binding蛋白がPSに結合してさらに増強することがわかった。

【FVIIa-FVIII制御機構】FVIIa/TFは凝固極早期相にFVIII Arg³⁷²/Arg⁷⁴⁰を開裂して急峻に活性化させる。FVIIaはFVIII A2ドメインと結合し、この活性化はトロンビンより急速であり、VWFとの複合体でも生じるため、FVIIa-FVIII制御軸はFVIIa-FX反応と同様に凝固初期相に働きのうる。抗FVIII同種抗体(インヒビター)存在下でもFVIIaが作用しうること、特にタイプ1 C2認識インヒビター存在下ではFVIIa効果が持続しやすいことも示した。さらにFVIIa作用をより強力かつ長時間維持できるFVIIa analogもFVIIa同様にFVIII活性化も増強させたが、この反応はTF非依存性であった。

【FIXa-FVIII(a)制御機構】FVIII C2ドメイン上のFIXa Glaドメイン結合部位を同定(残基2228-2240)し、このC2-Glaドメイン相互作用は凝固反応のpropagation phaseに関与していることを示した。

【炎症性因子とFVIII】炎症性因子の好中球エラスターゼはFVIIIを急峻に不活化するものの、トロンビンで活性化されたFVIIaは不活化されないなどの、この制御軸の生理的意義の一部を初めて明らかにした。

以上から、FVIIIは内因系凝固の関与のみならず、線溶系、凝固抑制系、外因系、炎症系が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を示した。今後引き続き本研究を継続し解明していきたい。

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 12 件)

1. Soeda T, Nogami K, 他2名. Interactions between residues 2228-2240 within factor VIIIa C2 domain and factor IXa Gla domain contribute to propagation of clot formation. *Thromb Haemost.* 106; 893-900; 2011
2. Ogiwara K, Nogami K, 他1名. Factor VIII activation by factor VIIa analog (V158D/E296V/M298Q) in tissue factor independent mechanisms. *Thromb Haemost.* 106; 665-74; 2011
3. Nogami K, Ogiwara K, 他4名. Mechanisms of human neutrophil elastase-catalysed inactivation of factor VIII(a). *Thromb Haemost.* 105; 968-80; 2011

4. Yada K, **Nogami K**, 他3名. Effects of anti-factor VIII inhibitor antibodies on factor VIIa/tissue factor-catalysed activation and inactivation of factor VIII. *Thromb Haemost.* 105; 989-98; 2011
 5. Soeda T, **Nogami K**, 他3名. Mechanisms of factor VIIa-catalysed activation of factor VIII. *J Thromb Haemost.* 8; 2494-503; 2010
 6. Ogiwara K, **Nogami K**, 他2名. Plasmin induced procoagulant effects in the blood coagulation: a crucial role of coagulation factors V and VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 21; 568-76; 2010
 7. Nishiya K, **Nogami K**, 他5名. Determination of a factor VIII interactive region within plasmin responsible for plasmin-catalysed activation and inactivation of factor VIII (a). *Thromb Haemost.* 104; 105-17; 2010
 8. Takeyama M, **Nogami K**, 他5名. Characterisation of an antibody specific for coagulation factor VIII that enhances factor VIII activity. *Thromb Haemost.* 103; 94-102; 2010
 9. Takeyama M, **Nogami K**, 他3名. Identification of a protein S interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Thromb Haemost.* 102; 645-55; 2009
 10. **Nogami K**, 他6名. Identification of plasmin-interactive sites in the light chain of factor VIII responsible for proteolytic cleavage at Lys36. *J Biol Chem.* 284; 6934-45; 2009
 11. Soeda T, **Nogami K**, 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.* 284; 3379-88; 2009
 12. Matsumoto T, **Nogami K**, 他2名. A modified thrombin generation test for investigating very low levels of factor VIII activity in hemophilia A. *Int J Hematol.* 90; 576-82; 2009
- [学会発表] (計 23 件)
1. **Nogami K**. A role and mechanism of plasmin catalyzed factor VIII activation in blood coagulation and fibrinolysis. 第23回国際血栓止血学会. 2011
 2. Ogiwara K, **Nogami K**, et al. Mechanism of the potent activated protein C resistance of novel factor V mutation with W1920R (FV Nara) relative to R506Q (FV Leiden). 第53回米国血液学会. 2011
 3. Yada K, **Nogami K**, et al. A novel mechanism of enhancing the haemostatic effect in the combination with recombinant factor VIII and activated prothrombin complex concentrate (APCC) in hemophilia A patients with Inhibitor. 第53回国血液学会. 2011
 4. Ogiwara K, **Nogami K**, et al. Evaluation of comprehensive hemostatic function of patients with von Willebrand disease (VWD) under flow using a new microchip flow chamber system. 第53回国血液学会. 2011
 5. Nishiya K, Tanaka I, **Nogami K**, et al. Pharmacokinetics of continuous infusion therapy of factor VIII concentrates in hemophilia A patients with inhibitors. 第53回国血液学会. 2011
 6. Matsumoto T, **Nogami K**, et al. Coagulation velocity and acceleration correlate with clinical phenotype of patients with acquired factor V inhibitors. 第23回国際血栓止血学会. 2011
 7. Furukawa S, Yoshizawa H, Ogiwara K, **Nogami K**, et al. Perioperative hemostatic management for coarctation of aorta in an early infant with severe haemophilia A. 第23回国際血栓止血学会. 2011
 8. Ogiwara K, **Nogami K**, et al. Procoagulant effect of tranexamic acid with minimal urokinase on ex vivo human hemophilia model under blood flow. 第23回国際血栓止血学会. 2011
 9. Yada K, **Nogami K**, et al. Mild clinical phenotype in a severe hemophilia A with Arg1781His substitution associated with increased factor Xa generation. 第23回国際血栓止血学会. 2011
 10. Shinozawa K, **Nogami K**, et al. A novel missense mutation of factor V (factor V Nara: W1920R) manifested thrombosis and demonstrated a positive result of activated protein C resistance assay. 第23回国際血栓止血学会. 2011
 11. Nishiya K, **Nogami K**, et al. Dynamics of plasma factor VIII during the continuous infusion of factor VIII concentrates in twenty patients with hemophilia A. 第23回国際血栓止血学会. 2011
 12. Ogiwara K, **Nogami K**, et al. Tissue factor pathway inhibitor causes unresponsiveness to activated prothrombin complex concentrates for hemophilia A patients with inhibitors. 第52回米国血液学会. 2010
 13. Matsumoto T, **Nogami K**, et al. Determination of coagulation functions and inhibitory mechanisms in acquired hemophilia A with type 1 and type 2 inhibitors. 第52回国血液学会. 2010

14. Ogiwara K, **Nogami K**, et al. Procoagulant activity of antifibrinolytic agents; A novel hemostatic mechanism of tranexamic acid and epsilon-aminocaproic acid. 第52回米国血液学会. 2010
 15. Nishiya K, Tanaka I, **Nogami K**, et al. Dynamics of plasma factor VIII during the continuous infusion of factor VIII concentrates in patients with hemophilia A. East Asia Haemophilia Forum. 2010
 16. Matsumoto T, **Nogami K**, et al. Determination for coagulation functions and novel inhibitory mechanisms in acquired hemophilia A with type 2 inhibitors. 第51回米国血液学会. 2009
 17. Yada K, **Nogami K**, et al. Effects of anti-FVIII inhibitors on factor VIIa tissue factor-catalyzed activation and inactivation of factor VIII. 第51回米国血液学会. 2009
 18. Ogiwara K, **Nogami K**, et al. Interactions of factor VIII with tissue factor contributes to the acceleration of factor Xa generation in the initiation phase of blood coagulation. 第51回米国血液学会. 2009
 19. Nishiya K, **Nogami K**, et al. Mechanisms of human neutrophil elastase-catalyzed inactivation of the factor VIII(a). 第51回米国血液学会. 2009
 20. Ogiwara K, **Nogami K**, et al. Mechanisms of factor VIII activation by factor VIIa and its analog NN1731 (V158D/E296V/M298Q). 第10回Novo Nordisk Symposium on Hemostasis Management. 2009
 21. Nishiya K, **Nogami K**, et al. Deep venous thromboembolism in a patient of factor V deficiency. 第22回国際血栓止血学会. 2009
 22. Takeyama M, **Nogami K**, et al. Anti-A2 monoclonal antibody enhancing thrombin and factor Xa-catalyzed factor VIII activity. 第22回国際血栓止血学会. 2009
 23. Ogiwara K, **Nogami K**, et al. Procoagulant effect of plasmin dependent on factor V and factor VIII during the blood coagulation process. 第22回国際血栓止血学会. 2009
4. **野上恵嗣**. 血友病A-第VIII因子の分子生物学的診断の進歩. Annual Review 2009 血液. 中外医学社. 217-24. 2009
 5. **野上恵嗣**, 嶋緑倫. 小児疾患診療のための病態生理 2 血友病. 小児内科. 41 (増刊号). 1124-9. 2009

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・准教授

研究者番号：50326328

[図書] (計 5 件)

1. **Nogami Keiji**, Shima Midori. Clinical and Laboratory Examination in Hemophilia Sysmex. 1-55. シスメックス. 2010
2. **野上恵嗣**, 嶋緑倫. 血液疾患 血液凝固異常 小児科学レビュー. 総合医学社. 111-6. 2010
3. **野上恵嗣**, 嶋緑倫. 血友病に対する適切な治療. 臨床に直結する血液疾患診療のエビデンス. 文光堂. 187-190. 2009