

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07324

研究課題名（和文）血友病Aブタ血漿を用いたヒト凝固因子測定法の開発

研究課題名（英文）Development of a human coagulation factor assay using hemophilia A porcine plasma

研究代表者

柏倉 裕志 (Kashiwakura, Yuji)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：40382890

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血友病Aブタ血漿およびブタFVIII欠乏血漿を用いた、活性化部分トロンボプラスチン時間を利用した凝固一段法による、すべての血友病A患者の測定を可能とする汎用性の高いFVIII測定法の確立を目的とした。血友病Aブタの産出を検討したが産仔は得られなかった。野生型ブタ血漿からブタFVIIIを除去可能なモノクローナル抗体、およびブタVWFに結合するリガンドを得た。これらを利用して作製したブタFVIII欠乏血漿により、目的とした汎用性の高いFVIII測定系が確立が可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における測定法が可能になることで、さまざまな血友病A患者における急性出血や周術期出血に対し、適切な治療が可能となる。また、多くの医療機関が採用する現行の検査法に用いる測定機器を利用し、周術期の迅速な測定が可能となる。さらに、血友病A患者のインヒビター測定にも利用が可能であり、すべての血友病A患者の測定を可能とする汎用性の高いFVIII測定系が確立できる。また本研究は、遺伝子改変動物試料を用いた臨床検査薬開発の先駆的研究であり、遺伝子改変動物試料を利用した新しい開発研究分野の創出にもなる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to establish a versatile FVIII assay for measurement in all hemophilia A patients using hemophilia A porcine plasma and porcine FVIII-deficient plasma, using a coagulation one-step method based on activated partial thromboplastin time. The production of hemophilia A pigs was investigated, but no litters were obtained. Some monoclonal antibodies capable of removing porcine FVIII from wild-type porcine plasma and a ligand that binds to porcine VWF were obtained. Porcine FVIII-deficient plasma prepared using these antibodies will enable the establishment of a highly versatile FVIII assay system.

研究分野：血液凝固学

キーワード：第VIII因子 血友病A

1. 研究開始当初の背景

血友病 A は血液凝固第 VIII 因子(FVIII)の遺伝子異常による出血性疾患で、先天性凝固異常症としては最も多い。治療は FVIII 製剤の投与が中心であるが、半減期が極めて短いため週に 2-3 回の投与が必要である。近年、血友病 A に対して画期的な薬剤としてエミシズマブ(ヘムライブラ®)が誕生した。エミシズマブは、凝固第 IX 因子と凝固第 X 因子を認識し、活性型 FVIII (FVIIIa) の機能を代替するバイスペシフィック抗体である。抗体医薬であるエミシズマブは半減期が長く、皮下投与が可能である。月に 1-2 回の皮下注で止血作用が得られ、FVIII にインヒビターが生じた患者でも治療が可能なため、血友病治療に劇的な変化をもたらした。一方、臨床での使用例が蓄積されるにつれ、エミシズマブの問題点も指摘されるようになった。エミシズマブは完全に FVIII を代替せず、その臨床的止血効果は FVIII 活性で 10-15%である。しかし、エミシズマブは機能として FVIIIa を代替するが、FVIIIa の不活性化機構では不活性化されず常に活性型として存在するため、多くの医療機関で採用されているヒト FVIII 欠乏血漿を用いた検査法では、凝固時間が極めて短縮する。すなわち、エミシズマブ使用患者では、血液中のエミシズマブが、検査用試薬となるヒト FVIII 欠乏血漿と反応してしまい、血液中の FVIII 活性値が測定できず、出血時に投与された外因性のヒト FVIII の活性値が評価できない。そのため、重症出血時や周術期にエミシズマブに加え FVIII 製剤を投与する際に、FVIII 製剤の投与量が適切かどうか判断に難渋する。同様に、血友病 A 患者でしばしば認められる FVIII インヒビターも、エミシズマブ投与下では評価ができず、エミシズマブ投与時にバイパス療法を行うか、通常の FVIII 製剤を投与するかの判断もできない。この問題の解決のため、エミシズマブに影響されない FVIII 測定法の開発が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では、エミシズマブが反応しない血友病 A プタ血漿およびプタ FVIII 欠乏血漿を用い、エミシズマブ存在下でのヒト FVIII 測定法を開発することを目的とした。海外で推進されている合成基質を用いた検査法は国内では普及しておらず、ほとんどの FVIII 活性は活性化部分トロンボプラスチン時間を利用した凝固一段法で測定されている。本研究で提唱する測定系では、ヒト FVIII 欠乏血漿の代わりに血友病 A プタ血漿を用いるだけで、現行の検査法をそのまま利用することができる。血友病 A プタは、体細胞クローン技術により申請者らが世界に先駆けて開発した(自治医科大学・農研機構・株式会社プライムテック 特許公開番号: 2011-229456)。血友病 A プタへのヒト FVIII 製剤の投与は止血効果が認められており(Kashiwakura Y. et al. Plos One)、ヒト FVIII は血友病 A プタの凝固反応を促進する。よって血友病 A プタ血漿は、エミシズマブが影響しない測定系検査試薬としての十分な適性を持つと考えられる。プタ血漿を用いたヒト FVIII 測定法は未だ報告はなく、血友病 A プタの血漿を用いたヒト FVIII 測定法は、申請者らのグループのみが開発可能である。本研究においてエミシズマブ存在下での FVIII 測定が可能になることで、エミシズマブ使用患者における急性出血や周術期出血に対し、適切な治療が可能となる。また、多くの医療機関が採用する現行の検査法に用いる測定機器を利用し、血友病 A プタ血漿およびプタ FVIII 欠乏血漿を用いた測定法を確立することにより、周術期の迅速な測定が可能となる。さらに、血友病 A プタ血漿を用いたヒト FVIII 測定法は、エミシズマブ使用患者のみならず、エミシズマブ非使用患者の FVIII 測定や、血友病 A 患者のインヒビター測定にも

利用が可能であり、すべての血友病 A 患者の測定を可能とする汎用性の高い FVIII 測定系が確立できる。また本研究は、遺伝子改変動物試料を用いた臨床検査薬開発の先駆的研究であり、遺伝子改変動物試料を利用した新しい開発研究分野の創出にもなる。

3. 研究の方法

本研究では、血友病 A プタ血漿およびプタ FVIII 欠乏血漿を検査試薬として用い、エミズマブ存在下でのヒト血漿における FVIII の測定法を確立する。血友病 A プタは重症出血性疾患モデルプタであるため、FVIII 製剤投与なしでの出生後の長期生存維持は難しく、大量の血漿確保には時間と費用がかかる。血友病 A プタの産出を検討し、新生仔プタから血漿を採取するとともに、血友病 A プタ血漿確保の予備的措置として、人工的にプタ FVIII を除いたプタ FVIII 欠乏血漿を作製し、それを用いた測定法の確立を並行して検討する。

4. 研究成果

血友病 A プタは、農研機構にて維持している血友病 A ヘテロ雌プタからの後代産出により検討した。本研究期間内に 3 度の交配を検討したが、これまでに後代の血友病 A プタは得られていない。引き続き農研機構での後代産出を継続し、血友病 A プタが得られた場合にはその血漿を用いた測定系を確立する。

一方、プタ FVIII に対するモノクローナル抗体を得るため、ハイブリドーマの樹立を検討した。初めに、プタ FVIII を安定発現する細胞株を樹立し、細胞上清よりプタ FVIII タンパクを分離・濃縮後、濃縮プタ FVIII タンパクを血友病 A マウスに投与することで、プタ FVIII 活性を阻害する中和抗体を発現するマウス個体を得た。肝臓特異的なプロモーター下流にプタ FVIII cDNA を搭載する AAV ベクターを作製し、血友病 A マウスに投与してプタ FVIII を肝臓で発現させることで、同様にプタ FVIII 活性を阻害する中和抗体を発現するマウス個体を得た。これらプタ FVIII に対する中和抗体を発現する血友病 A マウスの脾臓から細胞を分離し、マウス骨髄腫細胞株とのハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマ上清の ELISA によるスクリーニングにより、プタ FVIII に結合するモノクローナル抗体を産生する 4 種のハイブリドーマを樹立することに成功した。得られたモノクローナル抗体は、3 種それぞれが、A1 ドメイン、a3 ドメイン、C ドメインを認識することが明らかとなり、残りの 1 種は FVIII の立体構造を認識すると推測され、それぞれ FVIII の異なる部位を認識することが推測明らかとなった。これらのモノクローナル抗体は実際にプタ FVIII をプタ血漿から除去が可能であった。これらモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをマウス腹腔内に接種し、マウス腹水から大量のモノクローナル抗体が得られた。この腹水由来のモノクローナル抗体を精製し、抗体カラムを作製した。さらに、これらのモノクローナル抗体の抗体可変部のシーケンスを解析し、それぞれの可変部の配列を同定した。モノクローナル抗体を用い、ヒト血漿からヒト FVIII 欠乏血漿を得た既報では、ヒト FVIII モノクローナル抗体とともに、血中の FVIII と結合している VWF に対するモノクローナル抗体により FVIII 除去率を高めている。そのため、本研究においてもプタ VWF に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立を上記と同様の方法で試みたが、これまでに抗プタ VWF モノクローナル抗体取得には至っていない。抗プタ VWF モノクローナル抗体の機能を補完するため、プタ VWF を除去するためのリガンドタンパクを安定発現する細胞株を樹立した。これを用いてリガンドカラムを作製し、FVIII 除去率を高めるための抗プタ VWF モノクローナル抗体カラムの代用として利用する。

本研究では、エミズマブが反応しない血友病 A プタ血漿およびプタ FVIII 欠乏血漿を用い、エ

ミシズマブ存在下でのヒト FVIII 測定法の開発を目的として検討を進めたが、血友病 A プタの産出に難渋したことから、モノクローナル抗体による FVIII 除去法を検討した。野生型プタ血漿からプタ FVIII を除去できるモノクローナル抗体が得られ、プタ VWF に結合するリガンドも獲得した。これらを利用して作製したプタ FVIII 欠乏血漿により、すべての血友病 A 患者の FVIII 活性測定を可能とする汎用性の高い FVIII 測定系が確立が可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	大森 司 (Ohmori Tsukasa) (70382843)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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