

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07804

研究課題名（和文）血液凝固の第Ⅷ因子制御に基づく血友病A及び血栓性疾患の新規治療薬開発の基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research on development of novel therapeutic products for hemophilia A and thrombotic disorders based on the regulation of factor VIII function in the blood coagulation

研究代表者

野上 恵嗣 (Nogami, Keiji)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50326328

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）：血液凝固における出血と止血の両面に関与する凝固第Ⅷ因子（F<sub>Ⅷ</sub>）において、F<sub>Ⅷ</sub> 開裂による活性化を制御するトロンビン結合領域を同定し、その結合領域に着目した高活性機能獲得型F<sub>Ⅷ</sub> 蛋白の作製に成功した。内因性FX複合体におけるF<sub>Ⅷa</sub>上の新規F<sub>Ⅷa</sub>結合領域を同定した。さらに、F<sub>Ⅷa</sub>-F<sub>Ⅷa</sub>結合に着目した高活性維持型F<sub>Ⅷ</sub> 蛋白を作製した。さらにインヒビター結合回避F<sub>Ⅷ</sub> 蛋白の作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液凝固第Ⅷ因子は出血と血栓の相反する病態に関わる重要な凝固因子であるため、今回の研究における第Ⅷ因子に関連した機能構造および他の凝固因子との相互反応の解明が、凝固や血栓形成機序の解明と血友病A患者への新規第Ⅷ因子治療製剤開発への応用、また第Ⅷ因子の生体内機能を制御する抗血栓および抗凝固薬の開発に将来的に繋がり、止血血栓学の発展並びに医療に貢献できるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：In coagulation factor F<sub>Ⅷ</sub>, which is involved in both bleeding and hemostasis in blood coagulation, we identified a thrombin-binding region that regulates activation by F<sub>Ⅷ</sub> cleavage and successfully produced a highly active gain-of-function F<sub>Ⅷ</sub> protein focusing on this binding region. We identified a novel F<sub>Ⅷa</sub>-binding region on F<sub>Ⅷa</sub> in the intrinsic tenase complex, and also generated a high active-sustained F<sub>Ⅷ</sub> protein focusing on the F<sub>Ⅷa</sub>-FIXa interaction. In addition, an inhibitor-binding-avoiding F<sub>Ⅷ</sub> protein was also generated.

研究分野：止血血栓学

キーワード：第Ⅷ因子 トロンピン 第Ⅸ因子 凝固 遺伝子組み換え型 インヒビター ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

血液凝固第 Ⅲ因子は、凝固反応過程において血小板膜上で第 Ⅲ因子の補因子として機能して凝固速度を 20 万倍以上増強させる。本因子欠乏は遺伝性に重篤な出血症状を反復する血友病 A であり、止血治療の基本は第 Ⅲ因子製剤の補充療法である。半減期延長第 Ⅲ因子製剤が普及しているが、なおも頻回補充を要すること、同種抗体(インヒビター)の出現の課題がある。一方、本邦では脳梗塞や心筋梗塞の血栓症が死因の上位を占めるため、血栓形成の更なる病態解明と安全かつ有効な抗血栓および抗凝固薬の開発継続は重要である。血栓症患者の第 Ⅲ因子活性レベルが高値を示すことがすでに証明され、第 Ⅲ因子と血栓の関連も重視されている。ゆえに、第 Ⅲ因子は出血と血栓の相反する病態に関わるため、本因子の機能構造の解明が、凝固や血栓形成機序の解明と血友病 A 患者への新規第 Ⅲ因子治療製剤や本因子の機能制御につながる抗血栓・抗凝固薬の開発を加速することが期待できる。従来、凝固研究は、凝固初期相に關与する外因系、トロンビンバースト増幅相に關与する内因系、プロテイン C 関連凝固制御系、フィブリン溶解をもたらす線溶系と個々に研究され発展してきた。現在、これら複数系が同時に絡み合い進行していく概念が主軸であるため、我々は出血・血栓の両病態の鍵である第 Ⅲ因子と各経路系との相互作用について多くの知見を示した。しかし本因子の機能構造はまだ不明な点が多く、早急な解明が待たれている。

## 2. 研究の目的

血液凝固第 Ⅲ因子は欠乏では重篤出血(血友病 A)、一方、増加は血栓形成を惹起するために血栓制御において重要な役割を担うことになる。凝固促進過程にはトロンビンの第 Ⅲ因子活性化機構、凝固抑制は活性型プロテイン C による不活化機構が重要である。凝固は内因系、外因系、線溶系、凝固制御系が同時に絡み合いながら進行するため、第 Ⅲ因子と複数系各因子の相互作用に特に注目し、本因子の機能構造と凝固促進/抑制機序を解明してきた。本研究は、第 Ⅲ因子活性化と活性維持に關与するトロンビン、内因系(活性型第 Ⅲ因子、第 X 因子)、外因系(活性型第 Ⅲ因子)制御軸での第 Ⅲ因子分子上の各因子結合部位の同定と生理的意義の解明、各結合部位を標的にした遺伝子組み換え第 Ⅲ因子やペプチド蛋白を作製し、凝血的検討を行う。血友病 A 患者への本因子機能の作用持続や増強の多機能獲得第 Ⅲ因子製剤ならびに血栓形成病態に応じた本因子機能制御の抗凝固・抗血栓薬の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 第 Ⅲ因子-トロンビン制御に基づく第 Ⅲ因子蛋白作製

トロンビン結合関連部位変異第 Ⅲ因子:第 Ⅲ因子上トロンビン結合部位を Ala 置換やトロンビン高親和結合ヒルジン残基 54-65 配列に全(部分)置換した変異第 Ⅲ因子を作製する。また、トロンビン開裂に影響を与える P3-P3' およびその隣接領域の役割を明らかにするため、変異第 Ⅲ因子を作製する。変異体の第 Ⅲ因子活性を測定し、トロンビンによる活性化および開裂化の抑制や増強効果の評価する。ROTEM、トロンビン生成試験、凝固波形解析の包括的凝固機能評価や可視化

血流下血栓形成装置を用いて、第Ⅲ因子-トロンビン制御が全凝固過程に及ぼす影響を検討する。

#### (2) 活性化第Ⅲ因子活性安定機序に基づく第Ⅲ因子蛋白作製

ドメイン内結合増強変異体第Ⅲ因子:第Ⅲ因子ドメイン間結合領域のシミュレーションから推定した高親和結合変異第Ⅲ因子を設計し作製する。変異体の第Ⅲ因子活性を評価し、トロンビンによる活性化反応維持を評価する。包括的凝固能や血流下血栓形成による機能評価を検討する。

活性型第Ⅲ因子/第Ⅹ因子結合関連:第Ⅲ因子上の活性型第Ⅲ因子結合部位と第Ⅹ因子結合部位を最終的に同定するに。これらを基盤とした本活性に強影響を及ぼす結合部位に関して、他のアミノ酸置換による第Ⅲ因子活性の影響を検討し、高活性維持の発現アミノ酸を選択し作製する。変異体の第Ⅲ因子活性を測定し、FXa生成能が高活性で維持するか検討する。

#### (3) インヒビター結合回避第Ⅲ因子蛋白作製

Hybridを含む変異第Ⅲ因子蛋白を作製し、インヒビター反応性を評価する。トロンビンによる第Ⅲ因子活性化開裂反応もインヒビターIgG存在下にて評価する。これら変異第Ⅲ因子とリン脂質やvon Willebrand因子との結合能をインヒビター有無で比較する。第Ⅲ因子欠乏血漿および全血に変異第Ⅲ因子を添加、インヒビターIgG有無での包括的凝固機能の評価する。

#### (4) F8-KOマウスでの機能獲得型第Ⅲ因子蛋白のin vivo凝血学的検討

変異第Ⅲ因子蛋白をF8-KOマウスに投与し、凝血学的効果を凝固時間や尾静脈止血時間にて野生型と評価する。

## 4. 研究成果

### 1. FⅢ-トロンビン制御機構

FⅢ R372とR1689を開裂し活性化させるトロンビンのFⅢ結合領域(346-349残基、1680/1683-1684残基)を初めて同定した。FⅢ-A1酸性領域をhirugen配列に完全置換したFVIII-hirugenハイブリッド変異体を作製した。本変異はトロンビン活性化が野生株(WT)より1.5倍以上増強し、R372開裂はより早期に生じ、両者結合反応はWTに比し結合定数が増加していた。一方、1680-1684領域ではY1680が重要であり、VWF存在下では本変異体(Y1680A)のトロンビン反応性低下がWT同等の解離定数に改善しており、VWF結合による立体構造上変化が結合に影響していることを明らかにした。また、FⅢのK1693N変異がその近傍のR1689開裂を抑制することでFⅢ活性化障害をきたすFⅢ分子異常症を報告した。P4'領域でトロンビン開裂に影響を及ぼす機序としてN変異の開裂領域への間接的な構造変化が挙げられた。同じP4'のK376NはR372開裂が正常であるが活性化は極めて減弱していた。A2ドメインの早期解離がその機序であり、同じP4'で異なる機序を明らかにした。

### 2. 活性化第Ⅲ因子に基盤とした凝固・抗血栓薬開発への応用

F<sub>12a</sub>上のFIX結合部位の一つに1793-1795残基領域を同定した。さらにF<sub>12a</sub>結合部位の1残基を置換することにより、F<sub>12a</sub>-F<sub>12a</sub>結合親和性を高め、内因性FX複合体活性を増強させる変異体の作製に成功した。このK1813A変異体はF<sub>12a</sub>の安定性を保ち、活性化F<sub>12a</sub>からのA2ドメイン解離を遅延させ、WTに比してF<sub>12a</sub>の凝固機能を2倍程度高め、F8-KOマウスにおける尾切断出血モデルにおいて止血効果が野生株の4倍近い高凝固能を示した。最終報告論文は国際雑誌に掲載された。

### 3. インヒビター結合回避F<sub>12a</sub>蛋白の作製

F<sub>12a</sub>インヒビターの主要エピトープ(A2とC2ドメイン)認識インヒビターの存在時でも、F<sub>12a</sub>機能を発揮するporcine-hybrid変異F<sub>12a</sub>蛋白の作製に成功し、インヒビター反応性をin vitro実験(血漿、全血)にて減弱させ、インヒビター存在下で凝固能を持続することがわかった。本結果は国際雑誌に掲載された。

F<sub>12a</sub>活性化機序の鍵になるトロンピンやFIXa結合部位の同定、そして各結合部位を改変させることにより機能獲得型F<sub>12a</sub>変異体作製に成功したことは、今後のF<sub>12a</sub>関連新規凝固制御薬の開発に大きなヒントになると考える。さらにインヒビター結合回避蛋白を作製できたことは、インヒビター止血治療の大いに役立つものと思われる。今後引き続き本研究を継続し、さらなる解明をしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9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 Mizumachi K, Nakajima Y, Shimonishi N, Furukawa S, Ogiwara K, Takeyama M, Nogami K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Hybrid human-porcine factor VIII proteins partially escape the inhibitory effects of anti-factor VIII inhibitor alloantibodies having A2 or C2 domain specificity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Haemophilia	6. 最初と最後の頁 140-150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hae.14911	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 Takeyama M, Furukawa S, Sasai K, Horiuchi K, Nogami K.	4. 巻 1867
2. 論文標題 Factor VIII A3 domain residues 1793-1795 represent a factor IXa-interactive site in the tenase complex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Gen Subj.	6. 最初と最後の頁 130381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2023.130381	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 Oda A, Takeyama M, Kitazawa T, Nogami K.	4. 巻 237
2. 論文標題 The emicizumab-bridged ternary complex with activated factor IX and factor X evaluated by fluorescence resonance energy transfer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Thromb Res.	6. 最初と最後の頁 108-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2024.03.030.	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.	4. 巻 1868
2. 論文標題 The role of proteolytic cleavage at Arg336 and Arg372 of the A1 domain in factor VIIIa/tissue factor-catalyzed reactions of B domain-deleted factor VIII	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Gen Subj.	6. 最初と最後の頁 130501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2023.130501.	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, Takeyama M, Oda A, Shimonishi N, Nogami K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Factor VIII mutated with Lys1813Ala within the factor IXa-binding region enhances intrinsic coagulation potential	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 1436-1445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022008187	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, Minami H, Nogami K.	4. 巻 121
2. 論文標題 Acidic Region Residues 1680-1684 in the A3 Domain of Factor VIII Contain a Thrombin-Interactive Site Responsible for Proteolytic Cleavage at Arg1689.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thromb Haemost.	6. 最初と最後の頁 1274-1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0041-1723996.	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	4. 巻 19
2. 論文標題 The C-terminal acidic region in the A1 domain of factor VIII facilitates thrombin-catalyzed activation and cleavage at Arg 372.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Thromb Haemost.	6. 最初と最後の頁 677-688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.15201	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 Shimonishi N, Ogiwara K, Oda Y, Kawabe T, Emmi M, Shima M, Nogami K.	4. 巻 121
2. 論文標題 Inhibitor Index in the Clot Waveform Analysis-Based Mixing Test Differentiates among Hemophilia A without and with Inhibitors, and Lupus Anticoagulant.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thromb Haemost.	6. 最初と最後の頁 792-799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0040-1721776.	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 Shimonishi N, Ogiwara K, Oda Y, Kawabe T, Okazaki S, Shima M, Nogami K.	4. 巻 121
2. 論文標題 A Novel Assessment of Factor VIII Activity by Template Matching Utilizing Weighted Average Parameters from Comprehensive Clot Waveform Analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thromb Haemost.	6. 最初と最後の頁 164-173,
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0040-1715838.	査読の有無 無
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 Takeyama M, Furukawa S, Yada K, Ogiwara K, Shimonishi N, Nakajima Y, Mizumachi K, Noguchi-Sasaki M, Shima M, Nogami K.	4. 巻 121
2. 論文標題 Ex Vivo Prediction of Comprehensive Coagulation Potential Using Simulated Blood Concentrations of Emicizumab in Patients with Acquired Hemophilia A.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thromb Haemost.	6. 最初と最後の頁 1289-1298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0041-1725009	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8件(うち招待講演 3件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 水町 邦義, 中島 由翔, 下西 成人, 古川 晶子, 荻原 建一, 武山 雅博, 野上 恵嗣
2. 発表標題 A2/C2 domain をブタ第VIII 因子相同配列に組み換えたhybrid ヒト第VIII 因子のインヒビター回避能
3. 学会等名 第44回 日本血栓止血学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakajima Y, Takeyama M, Oda A, Nogami K
2. 発表標題 Factor VIII K1813A has high affinity for activated factor IX and enhances global coagulation function
3. 学会等名 International Society of Thrombosis and Hemostasis Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Furukawa S, Horiuchi K, Nogami K
2. 発表標題 A role of P'4 residue on cleavage at Arg372 and Arg1689 in thrombin-catalyzed factor VIII activation
3. 学会等名 第84回 日本血液学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakajima Y, Takeyama M, Oda A, Nogami K
2. 発表標題 FVIII mutated with Lys1813Ala within the FIXa-binding region enhances coagulation potentials
3. 学会等名 第84回 日本血液学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mizumachi K, Nakajima Y, Shimonishi N Furukawa S, Ogiwara K, Takeyama M, Shima M, Nogami K
2. 発表標題 Escaping ability of human-porcine hybrid factor VIII from anti-human factor VIII inhibitors with A2 or C2 epitope
3. 学会等名 The 64th American Society of Hematology ( 国際学会 )
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keiji Nogami
2. 発表標題 Latest Treatment for Hemophilia A and B in Japan
3. 学会等名 ICKSH ( 招待講演 ) ( 国際学会 )
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Keiji Nogami
2. 発表標題 Current topics on hemophilia and fibrinolysis system
3. 学会等名 日本血栓止血学会学術集会SPCシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野上恵嗣
2. 発表標題 血友病治療の新展開
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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

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