

平成 27 年 4 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591558

研究課題名(和文) 第 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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)を呈し、逆に増加で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/線溶系に分け各々研究されてきたが、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ている。本研究は、この新概念を基に、凝固止血反応で出血・止血に重要に関与するFVIIIが、内因系因子(トロンビン、FIXa)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(FVIIa/組織因子)、炎症性因子(好中球プロテアーゼ3)と相互作用することにより凝固血栓が巧みに制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Factor VIII (FVIII) is an important key factor on blood coagulation 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 found the relationship of FVIII(a) with thrombin and FIXa (intrinsic factors), FVIIa/tissue factor (extrinsic factor), plasmin (fibrinolytic factor), protein S (anti-coagulant factor), neutrophil proteinase 3 (inflammatory factor) during the blood coagulation process.

研究分野：医歯薬，内科系臨床医学，小児科学，血液止血血栓学

キーワード：血液凝固 第 因子 蛋白相互作用 出血性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

血液凝固第 因子(FVIII)の欠乏は、関節内出血を中心とした重篤出血を呈する血友病 A を引き起こす。止血治療は、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 値が高値であることが証明され、FVIII と血栓形成の関連も注目されている。よって FVIII は出血と血栓の相反する病態において極めて重要な凝固因子であるが、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多に期待されている。

## 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、生体内での真の凝固過程はこれら複数が互いに絡み合って進行していると最近では支持されている。本研究は、この新概念を基に、FVIII と内因系、外因系、線溶系、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

トロンピン、FIXa、活性型 FVII (FVIIa) / 組織因子(TF) 好中球プロテアーゼ 3(PR3) /aPCC や FVIIa/FX による FVIII 活性化/不活化様式 : FIIa、FIXa、FVIIa/TF、PR3 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。同定部位の合成ペプチドを作成し、その抑制機序を解明する。また VWF/PL 存在下や FX 複合体に及ぼす影響を検討する。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/TF の F 分子上結合部位の同定 : 不活化 FVIIa および TF 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 F 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、TF 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。

## 4. 研究成果

### 【トロンピン(FIIa)-FVIII 制御機構】

血液凝固には FIIa の FVIII 活性化は必須である。この反応に極めて重要な FVIII の Arg372 開裂を制御する FIIa 結合領域は酸性領域内アミノ酸残基 340-350 内であり、さらにその結合に硫酸化 Tyr346 が重要に関与していることが明らかになった。

【FVIIa-FVIII 制御機構】FVIIa-FVIII 制御軸は FVIIa-FX 反応と同様に凝固初期相に働きのことは以前報告した。今回組織因子(TF)存在下での制御軸について検討した。FVIIa-FVIII 反応に TF が必須であるが、FVIIa 同様に TF も FVIII に直接高親和性で結合し、特に、軽鎖との結合が重要であることがわかった。この機序のため VWF と競合阻害しえること、その結果 FVIIa が極めて作用しやすくすることがわかった。なお、この TF が FVIII の軽鎖 A3 酸性領域が関与している可能性が挙げられた。

ところで、FVIII インヒビター治療薬である活性型プロトロンピン複合体製剤(aPCC)および FVIIa/FX 複合体製剤が FVIII を活性化することを初めて示した。これには FVIIa が極初期に FVIII 活性化を引き起こし、それに続き FXa が FVIII を sequential に活性化させる機序であることが分かった。この機序のより、FVIII 同種または自己抗体(インヒビター)存在下でも FVIIa が FVIII を活性化し阻害されない、特に抗 C2 エピトープ認識タイプ 1 抗体では活性化効果がより持続しやすいことも示した。このことは新規治療方針の展開をも示唆し得るものであった。

【FIXa-FVIII(a)制御機構】FIXa 結合領域にある Pro1809 Leu の新規変異 FVIII を有する軽症型血友病 A が FVIII インヒビターを出現する機序を同定した。Pro1809 は C2 ドメインの抗原性を制御するとともに、この変異 FVIII は C2 エピトープ 2248-2285 残基認識抗体出現させること、この変異のため C2 ドメイン両末端の領域の構造を変化させることにより VWF やリン脂質結合部位を disturb することも明らかになった。

【炎症性因子と FVIII】炎症性因子(好中球プロテアーゼ 3)は FVIII をリン脂質非依存性に不活化するが、VWF 存在下ではこの反応

は抑制される生理的意義および、他の好中球プロテアーゼの働きと少し異なることを示した。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、外因系/組織因子、線溶系、凝固抑制系、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さらなる解明していきたい。

#### 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10件)

1. Nogami K, Shinozawa K, 他5名. Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden. *Blood*. 123; 2420-2428; 2014
2. Haku J, Nogami K, 他3名. Optimal monitoring of bypass therapy in hemophilia A patients with inhibitors by the use of clot waveform analysis. *J Thromb Haemost*. 12; 355-362; 2014
3. Matsumoto T, Nogami K, 他1名. Coagulation function and mechanisms in various clinical phenotypes of patients with acquired factor V inhibitors. *J Thromb Haemost*. 12; 1503-1512; 2014
4. Ogiwara K, Nogami K, 他2名. Tissue factor pathway inhibitor in activated prothrombin complex concentrates (aPCC) moderates the effectiveness of therapy in some severe hemophilia A patients with inhibitor. *Int J Hematol*. 99; 577-587; 2014
5. Yada K, Nogami K, 他3名. The first case of int1h-related inversion in Japanese haemophilia A patients. *Haemophilia*. 20; e408-410; 2014
6. Yada K, Nogami K, 他2名. Activated prothrombin complex concentrate (APCC)-mediated activation of factor (F)VIII in mixtures of FVIII and APCC enhances hemostatic effectiveness. *J Thromb Haemost*. 11; 902-910; 2013
7. Yada K, Nogami K, 他3名. The mild phenotype in severe hemophilia A with Arg1781His mutation is associated with enhanced binding affinity of factor VIII for factor X. *Thromb Haemost*. 109; 1007-1015; 2013
8. Matsumoto T, Nogami K, 他1名. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost*. 110; 761-768; 2013
9. Yada K, Nogami K, 他1名. Different factor VIII neutralizing effects on anti-factor VIII inhibitor antibodies associated with epitope specificity and von Willebrand factor. *Br J Haematol*. 163; 104-111; 2013
10. Matsumoto T, Nogami K, 他1名. A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired haemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies. *Thromb Haemost*. 107; 288-301; 2012

[学会発表](計6件)

1. Nogami K. Application of clot waveform analysis to hemostatic monitoring of bypassing therapy. 60<sup>th</sup> Annual Scientific and Standardization Committee (SSC). June 2014, Milwaukee, IL
2. Nogami K. Bispecific antibody mimicking factor VIII. European Haemophilia Consortium. Nov. 2014, Dublin, Ireland
3. Nogami K. A novel regulatory mechanism of FVIIa/TF associated with FVIII on the initial phase of coagulation. 第36回血栓止血学会 SPC シンポジウム. 2014年5月.大阪
4. Nogami K. Development and future challenge in treatment for hemophilia with inhibitors. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会. 2014年11月岡山
5. 野上恵嗣. 後天性凝固因子インヒビターの基礎と病態. 第56回日本血液学会学術集会. 2013年10月.札幌
6. 野上恵嗣. 後天性凝固因子インヒビターの基礎と病態. 第34回日本血栓止血学会学術集会. 2012年6月.東京

[図書](計5件)

1. 野上恵嗣. 血液凝固の動的把握と血友病診療の進歩. 血栓止血誌. 25; 371-379: 2014
2. 野上恵嗣. 血友病 A の分子病態の進歩 - 第 VIII 因子構造・機能からみた病態. 日本小児血液・がん学会雑誌. 51; 452-458: 2014
3. 野上恵嗣. 後天性凝固因子インヒビターの基礎と病態. 臨床血液. 54; 361-368: 2013
4. 野上恵嗣. 血友病インヒビター：最新の進歩. Annual Review 血液 2013. 238-244: 2013
5. 野上恵嗣. 第 VIII 因子と血液凝固制御- 第 VIII 因子の機能・構造に関する最近の知見. 医学のあゆみ. 242; 188-193: 2012

( )  
研究者番号：

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：特になし

## 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

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者