

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860878

研究課題名(和文) インヒビター保有血友病A患者の新たな止血治療戦略における凝血学的基礎研究

研究課題名(英文) Basic reserch on hemostasis to establish a novel hemostatic therapy for hemophilia A patients with inhibitors

研究代表者

矢田 弘史 (Yada, Koji)

奈良県立医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：30635785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：血友病Aは血液凝固第VIII因子(FVIII)の欠乏で生じる重篤な出血性疾患である。FVIII補充治療に伴う抗FVIII同種抗体(インヒビター)の出現は、治療を難渋化し、今日の血友病医療における重要課題である。そこで本研究では、インヒビター保有血友病A患者の治療モデルをin vitroで構築し、その凝固抑制機序の解明とそれに基づく新たな治療戦略の開発検討を行った。その結果、インヒビターの抑制機序の差により抗体中和療法の効果が異なること、インヒビター存在下でもFVIIIがバイパス製剤による治療下で止血増強効果を発揮することを凝血学的に証明し、より効果的な治療法を見出した。

研究成果の概要(英文)：Hemophilia A (HA) is a severe bleeding disease caused by quantitative and/or qualitative defect of factor (F) VIII. The development of anti-FVIII alloantibodies (inhibitors) during the hemostatic treatment with FVIII concentrates, making the hemostatic effect unstable, is one of the most serious events for HA patients. In this study, we prepared the treatment model for HA with inhibitors in vitro and investigated the inhibitory mechanism(s) of the inhibitors as well as the hemostatic effect of the therapy. As results of the several experiments with the various assays, it was found that the differences in epitope(s) and inhibitory kinetics of inhibitors affected the neutralizing effect with high dose of FVIII and that the hemostatic effect of the bypassing agent was significantly enhanced by the presence of FVIII even with the inhibitor. These findings will make a basis for establishment of a novel hemostatic therapy for HA with inhibitors.

研究分野：医歯薬，内科系臨床医学，小児科学，血液血栓止血学

キーワード：血液凝固 新規治療 インヒビター 第VIII因子 出血性疾患

1. 研究開始当初の背景

血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) 欠乏で生じる血友病 A の止血治療は FVIII 製剤補充療法が行われる。その結果、全患者の 10-20%、特に乳幼児を中心に FVIII 同種抗体(インヒビター)が出現し、従来の止血治療が不応となるため、インヒビターは血友病治療で極めて重要な問題である。一方、後天的に FVIII 自己抗体が出現し、重篤な出血を生じる後天性血友病も近年増加している。止血治療としてバイパス止血療法または FVIII 製剤による中和療法が行われるが、その止血効果は安定せず、必ずしも確立されていない。また、インヒビターによる凝固抑制機序に関してもいくつか研究が行われてきたが、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、FVIII インヒビターの発生メカニズム及び凝固抑制機序の更なる解明と、それに基づくインヒビター保有先天性/後天性血友病の新たな止血治療戦略の確立をめざした基礎的凝血的検討を目的とする。また、血友病 A 遺伝子解析を基礎とした分子生物学的解析手法を駆使して、インヒビター発生メカニズムの解明を行い、インヒビター発生を回避できる治療戦略についても同時に確立することを目標とする。

3. 研究の方法

1) インヒビター存在下での FIXa、FVIIa と APCC 製剤による FVIII 活性化/不活性化様式とその機序解明

インヒビター存在下で FIXa、FVIIa および APCC 製剤による FVIII 活性化およびその開裂分解の影響を、凝固一段法や FXa 生成試験、電気泳動法

(SDS-PAGE/Western blot) を用いて検討する。この反応がインヒビター存在下にて VWF/PL 存在下や tenase 複合体に対して

及ぼす影響を調べる。さらに FVIII を活性化するトロンビンや FXa でのインヒビターの影響と比較検討する。

2) 包括的凝固機能検査による血栓凝固動態解析

最近注目されている ROTEM、トロンビン生成試験、凝固波形解析などを用いた包括的凝固機能検査を用いて、FIXa、FXa、FVIIa および APCC 製剤によるインヒビター存在下での FVIII 凝固促進・抑制作用および作用機序を、より生理的条件下で検討する。

3) FVIII 製剤中和療法モデル構築とその血栓凝固動態解析

中和量の FVIII をインヒビター添加 FVIII 欠乏血漿および全血に混和して FVIII 製剤中和療法モデルを構築する。そのモデル血漿および全血を用い、上述した包括的凝固機能検査を用いて、中和療法(モデル)における血栓凝固動態をより詳細に検討する。FVIII インヒビターには、濃度依存性に FVIII 活性を完全に消失させる type 1 と、完全には消失させない type 2 の 2 つのタイプが存在する。またインヒビターの FVIII 認識(結合)部位は A2、A3 または C2 ドメインである。これらの組み合わせにより区別されるインヒビターの特性毎に検討する。

4) 軽症血友病 A に発生したインヒビター抑制機序の解明

血友病 A 患者に発生したインヒビター IgG を、抽出精製し、患者血漿または正常血漿と反応させ、凝固一段法により抑制反応を比較検討する。つづいて、患者と同じ F8 遺伝子変異を有する FVIII ベクターを作成し、BHK(Baby Hamster Kidney)細胞に遺伝子導入して変異 FVIII を発現させる。発現した変異 FVIII 蛋白質を用いて、インヒビター IgG との反応性を凝固一段法や FXa 生成試験により検討する。

4 . 研究成果

【インヒビター存在下での APCC 製剤による FVIII 活性化/不活化様式とその機序】

FVIII が FVIIa/TF により直接活性化・不活化を受けることは以前報告した。今回は、FII,VII,IX,X 及びその活性型因子を含有する APCC 製剤による FVIII の活性化・不活化について検討した。FVIII に APCC(0.05 IU/ml) を TF とともに添加すると、1 分以内に FVIII 活性が約 3 倍上昇し、約 10 分で初期値に低下した。この反応は、リン脂質依存的で、FVIII 重鎖 Arg³⁷² と Arg⁷⁴⁰ の開裂、そして引き続く Arg³³⁶ 開裂によることを同定した。各種 FVIII インヒビター (A2 type1、C2 type1、C2 type2) 存在下でも、その種類に無関係に APCC/TF による FVIII 活性化を示し、さらに C2 type1 抗体の存在により FVIII 活性頂値が 30 分以上持続した。以上から、APCC 含有 FVIIa が主に FVIII を活性化ならびに不活化させ、止血効果を増強することが示された。また通常臨床で用いられる APCC の標準用量(1~2 IU/ml) に比べて極少量の APCC でもインヒビターの存在下で FVIII を直接活性化し得た。

【FVIII 製剤中和療法モデル構築とその血栓凝固動態解析】

FVIII による中和効果は、C2type1 抗体よりも A2type1 抗体の方がより長時間持続すること、C2type2 抗体ではほとんど抑制されないことが分かった。C2type1 抗体の FVIII 認識部位と VWF 結合部位とは重なりを有するが、FVIII/VWF による中和効果は C2type1 抗体では FVIII 単独よりも改善し、A2 抗体では FVIII 単独を用いる場合と変化しなかった。C2type2 抗体においては、FVIII/VWF による中和効果が FVIII 単独による効果よりも低下した。これは、FVIII と VWF の離脱を阻害することによ

り FVIII 活性化を抑制する C2type2 抗体の抑制機序によるものと考えられた。

【軽症血友病 A に発生したインヒビター抑制機序の解明】

新規 FVIII 変異 Pro1809Leu を有する軽症血友病 A 患者に発生したインヒビターは、自己 FVIII を抑制せず非自己 FVIII に対して軽鎖 C2 ドメイン上のアミノ酸残基を認識して type2 抑制様式を示すことを明らかにした。またその抑制機序がトロンビン及び FXa による FVIII 活性化阻害であることを証明した。

BHK(Baby Hamster Kidney)細胞に遺伝子導入し、Pro1809Leu 変異を有する FVIII 変異体を安定発現し得られた変異体の構造機能解析を行った。結果、Pro1809Leu 変異体は VWF やリン脂質との結合能が野生型 FVIII よりも低いことを明らかにした。

以上の結果より、インヒビターの阻害様式及び認識エピトープにみられる特性によって治療への反応性に差があることが明らかとなり、また、インヒビターが存在しても止血増強効果が期待される新たな凝固因子の活性化機構について明らかとなった。さらに、軽症血友病 A におけるインヒビター及び FVIII の特性から、インヒビター発生機序の手がかりを得た。今後も引き続き本研究を継続発展し、より詳細な解明を行っていきたい。

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 4 件)

1: Yada K, Nogami K, 他 3 名. The first case of int1h-related inversion in Japanese haemophilia A patients.

Haemophilia. 20(6), e408-410, 2014 .

2: 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.

3: 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.

4: 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.

[学会発表](計 11 件)

1: Yada K, Nogami K, 他 4 名, Activated protein C-catalyzed factor Va inactivation predominantly contributes to the downregulation of coagulation rather than factor VIIIa inactivation. 56th ASH Annual meeting and Exposition, 2014, San Francisco, USA.

2: Kamiya N, Yada K, 他 2 名, The hemostatic impairment in mild hemophilia A possessing Arg593Cys mutation is caused by the attenuated binding to phospholipid. 56th ASH Annual meeting and Exposition, 2014, San Francisco, USA.

3: Yada K, Nogami K, 他 2 名, Evaluation of the haemostatic potentials in a mild hemophilia A with a novel factor VIII

mutation Thr677Ile, XXIV ISTH, 2013, Amsterdam, Netherlands.

4: Yada K, Nogami K, 他 2 名, Different neutralizing effects of factor VIII concentrates associated with von willebrand factor and the inhibitor epitopes, XXIV ISTH, 2013, Amsterdam, Netherlands.

5: Yada K, Shima M, Management of Bypassing Therapy in Hemophilia Patients with Inhibitors Utilizing Global Coagulation Assay, 2013 East Asia Hemophilia Forum, 2013, Seoul, Korea.

6: Yada K, Nogami K, 他 3 名, Reduced affinity to VWF/PL induced by a novel mutation at P1809L (factor VIII-Tenri) is the cause of mild hemophilia A developing anti-factor VIII inhibitor, 55th ASH Annual meeting and Exposition, 2013, New Orleans, USA.

7: 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 他 1 名, 中等症・軽症血友病 A 患者における血友病性関節症の発生要因に関する検討, 第 101 回近畿血液学地方会, 2014 年 11 月, 大阪.

8: 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 他 4 名, Activated protein C-catalyzed factor Va inactivation is enhanced in the absence of factor VIIIa, 第 76 回 日本血液学会学術集会, 2014 年 10 月, 大阪.

9: 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 他 1 名, MC710 はインヒビター存在下でも第 VIII 因子を直接活性化し, rFVIIa に比して相乗的に凝固機能を改善する, 第 36 回 日本血栓止血学会学術集会, 2014 年 5 月, 大阪.

10: 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 他 1 名, A novel mechanism of development of the inhibitor distinguishing self from non-self associated with P1809L

mutation, 第75回 日本血液学会学術集会, 2013年10月, 札幌.

11: 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 他5名, 凝固一段法による第VIII因子活性(FVIII:C)が臨床的重症度を過小評価した軽症血友病Aの一例, 第35回 日本血栓止血学会学術集会, 2013年5月, 山形.

〔図書〕(計 2 件)

1: 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 血友病に対する治療の進歩(1)-長時間作用型薬剤・抗体医薬の面から- 臨床血液, 第55巻, 893-898, 2014.

2: 矢田 弘史, 嶋 緑倫, 血友病の遺伝子診断, 日本小児血液・がん学会雑誌, 第50巻(3), 2013.

〔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:

出願年月日:

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

矢田弘史(YADA KOJI)

奈良県立医科大学・医学部・特任助教

研究者番号: 30635785

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: