

## プロテイン C およびプロテイン S による凝固第 VIII 因子の制御機構の解明

### および新規血友病 A 治療製剤への応用

武山雅博

奈良県立医科大学 小児科

#### 【研究の背景】

我々の研究室で過去に凝固第 VIII 因子 (FVIII) と活性型プロテイン C (APC) の結合部位の同定を行っており<sup>1, 2)</sup>、さらに APC が FVIII 軽鎖に結合し、その結合部位が FX と overlap することを示し<sup>3, 4)</sup>、APC 側の FVIII 結合部位についても同定した<sup>5)</sup>。また、プロテイン S (PS) は APC の補因子として FVIII を不活化するが、単に APC の補因子として働くだけでなく、様々な役割を担っていると考えられており、FVIII と PS が APC 非依存性に関与する可能性を考え研究を行ってきた。活性型 FVIII (FVIIIa) は活性型 FIX (FIXa) と FX とともに tenase complex を形成し、活性型 FX (FXa) を生成し凝固が促進されるが、PS が FVIII の A2 ドメインに結合し FIXa を競合的に阻害する。その結果、PS が FXa 生成を抑制し直接凝固を制御することを示した<sup>6)</sup>。さらに、PS が FVIII 重鎖 A2 ドメインに結合することも明らかにした<sup>7)</sup>。最近、FVIII A2 ドメインに FX 結合部位があり、その結合部位が APC と overlap することも証明した (第 58 回 Annual meeting of American Society of Hematology)。

#### 【目 的】

FVIII は血液凝固において必須の蛋白で、APC および PS により不活化されるが、その機序は完全には解明されていない。本研究では FVIII と APC および PS の結合部位を同定し、FVIII の APC/PS による不活化機序の解明を行う。さらに、FVIII の APC/PS 結合部位のアミノ酸を置換し、APC/PS との結合能が弱い変異 FVIII を作製し、APC/PS により不活化されにくく、安定で長時間作用する血友病 A 製剤の開発を目的とする。

#### 【方 法】

##### ① FVIII A1 ドメイン上の APC 結合部位の同定

現在までに、APC が FVIII 軽鎖に結合し FX と競合し、また FVIII 重鎖 (A2 ドメイン) 上で APC と FX 結合部位が overlap することを証明したが、その他の重鎖 (A1 ドメイン) 上の結合部位は不明である。Prospective な検討で、APC と FVIII a1 ドメイン (アミノ酸残基 336-372) の合成ペプチドが結合することがわかった。本研究では、ELISA や表面 plasmon 共鳴法 (SPR-based assay; Biacore) を用いて APC と FVIII 重鎖や A1 ドメインの合成ペプチドとの結合実験を行う。また、APC と合成ペプチドの EDC cross linking 産物をアミノ酸シーケンサーにかけて、APC が結合するアミノ酸配列を決定する。その結果をもとに、APC 結合部位のアミノ酸を置換した変異 FVIII を作成する。変異 FVIII の APC による不活化速度を western blotting 法を用いて検討し、Biacore で変異 FVIII と APC との  $K_d$  を測定することで、FVIII 上の該当アミノ酸配列が APC との結合およびその不活化に重要であることを示す。

##### ② PS の FVIII 軽鎖上の結合部位の同定

我々は、これまでの検討で PS が APC 非依存性に単独で FVIII の重鎖上 A2 ドメインに結合し、FIXa を競合的に阻害し、FXa 生成を抑制し直接凝固を制御することを明らかにした。現在行っている ELISA および Biacore による検討で、PS が FVIII C2 ドメインに結合することがわかった。今後、上記①と同様の手法を用いて PS の FVIII 軽鎖上の結合部位の同定を行う。

## 【結 果】

## ① FVIII A1ドメイン上の APC 結合部位の同定

凝固一段法および FXa 生成試験にて、a1ドメイン(アミノ酸残基 336-372)のペプチド存在下での FVIIIa の APC による不活化を検討したが、同ペプチドの存在によって APC の FVIII 不活化は抑制されなかった。また、FVIIIa の APC による開裂が同ペプチドにより抑制されるかを western blotting により検討したが、同ペプチド添加によっても、APC による FVIIIa の開裂に変化が見られなかった。ELISA にて APC と同ペプチドの結合を検討したが、結合は確認できず、prospective な結果とは相反するものであった。さらに、EDC cross linker を用いた APC と同ペプチドの結合も検討したが、EDC およびペプチド濃度依存性の結合が確認できなかった。また、SPR-based assay により APC と同ペプチドの結合も検討したが、結合を確認することができなかった。

以上の結果から、a1ドメイン(アミノ酸残基 336-372)には APC 結合部位はない可能性が高いと判断した。

## ② PS の FVIII 軽鎖上の結合部位の同定

PS は ELISA にて固層化 FVIII 軽鎖と濃度依存性に結合し、その apparent  $K_d$  は  $94 \pm 16$  nM であり、PS が FVIII 軽鎖と結合することがわかった。また、ELISA で FVIII 軽鎖と EGR-FIXa の結合が PS の濃度依存性に抑制されることが判明した ( $K_i$ ; 4.6 nM)。FVIII C2ドメインには FIXa 結合部位があるため、FVIII C2ドメインと PS が結合するかを検討した。ELISA により、PS は FVIII C2ドメインと apparent  $K_d$  283 nM で結合し、SPR-based assay でも FVIII C2ドメインは PS と結合することがわかった ( $K_d$ ; 62 nM)。我々は FIXa の結合部位は FVIII C2ドメインのアミノ酸残基 2228-2240 に存在することを以前報告した<sup>8)</sup>。そこで、アミノ酸残基 2228-2240 のペプチドを合成し、PS との結合性を検討した。ELISA によると、本ペプチドは PS と結合することが確認された (apparent  $K_d$ ; 104  $\mu$ M)。SPR-based assay でも、同様に本ペプチドは PS と結合した ( $K_d$ ; 31.4  $\mu$ M)。一方、2228-2240 のスクランブルペプチドは PS と結合しなかった。EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) による本ペプチドと PS の結合が SDS-PAGE により確認され、さらにこの結合は 2228-2240 ペプチドの添加により阻害された。さらに、2228-2240 ペプチドと PS の EDC cross link 産物の N 末端アミノ酸分析では、塩基性アミノ酸である K2239 のみが検出されず、K2239 が 2228-2240 ペプチドと結合していることが想定された。これらの結果から、FVIII C2ドメインのアミノ酸残基 2228-2240、特に K2239 が PS との結合に関与していることが示された。さらに、FVIII C2ドメイン上の PS 結合部位をさらに検討するため、BHK 細胞を用いてアミノ酸を変異させた B ドメイン欠乏変異 FVIII (E2228A, D2233A, K2236A および K2239A) を作成した。変異 FVIII と PS との結合を SPR-based assay で検討したところ、それぞれの変異 FVIII ( $K_d$ ; 2.6 nM, 3.8 nM, 3.8 nM, および 3.4 nM) は Wild type FVIII ( $K_d$ ; 6.1 nM) と比較して有意な差を認めなかった。一方、変異 FVIII (K2239A) の FXa 生成に対する効果を PS 存在下および非存在下で FXa 生成試験を行った。PS 存在下では PS 非存在下と比較して、wild type FVIII および K2239A 変異 FVIII とも FXa 生成は低下したが、K2239A 変異 FVIII の FXa 阻害率(13%)は wild type FVIII の阻害率(31%)と比較して低かった。

これらの結果から、FVIII C2ドメインのアミノ酸残基 K2239 が PS による FVIII 機能阻害に関与していることが示唆された。

なお、以上の研究内容は第 78 回日本血液学会および第 58 回 Annual meeting of American Society of Hematology にて古川晶子、武山雅博らが発表した。

## 【考 察】

従来、PS は APC の補因子として FVIII を不活化し、凝固を制御しているといわれていたが、単に APC の補因子として働くだけでなく、様々な役割を担っていると考えられており、FVIII と PS が APC 非依存性に抗凝固に関与する可能性につき研究を行ってきた。これまでの我々の研究で、FVIIIa は FIXa と FX とともに tenase complex を形成し、FXa を生成し凝固が促進されるが、PS が FVIII の A2ドメイン重鎖に結合し FIXa を競合的に阻害する。その結果、PS が FXa 生成を抑制し直接凝固を制御することを示した。今回、さらに FVIII C2ドメイン上に PS の新規結合部位を同定し、FVIII A2ドメイン結合部位と同様に、FIXa と競合する部位であることが判明した。以上の結果から、FVIII を中心とした凝固・抗凝固機能の解析がさらに進んだ。

今回の研究では、FVIII A1ドメイン上の APC 新規結合部位の同定も試みたが、残念ながら当初想定した a1ドメイン(アミノ酸残基 336-372)は APC 結合部位ではない可能性が高いことが明らかになった。

今後、これまでに得られた FVIII 上の APC および PS 結合部位のアミノ酸配列を変異させた FVIII を作製予定である。これらの変異 FVIII は APC/PS に不活化されにくく、安定化し長時間作用する FVIII 製剤となりうると考えられ、新規 FVIII 製剤として血友病 A 患者のさらなる QOL の向上をもたらす可能性がある。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

PC には抗凝固作用だけでなく抗炎症作用やアポトーシス抑制作用があり、PS にも抗炎症作用がある。血友病の関節出血では、滑膜の炎症が引き起こされることで関節症が進行すると考えられており、FVIII と抗凝固・抗炎症作用を有する APC、PS の関連を明らかにすることは、患者の QOL と密接に関わりのある血友病性関節症の発生病序の解明および、新たな治療戦略に結びつくと考えられる。

また、血友病 A の治療には FVIII 製剤が使用され、近年の定期補充療法の普及で患者の QOL は改善されている。しかし、その半減期の短さから、特に小児などの活動性の高い患者では頻回な静脈注射が必要であり、また製剤投与によるインヒビターの発生など未解決な課題がある。本研究で作成を目標としている安定かつ長時間作用する新規 FVIII 製剤は、患者の QOL 向上に役立つと期待される。

### 【参考・引用文献】

- 1) Nogami K, Shima M, Giddings JC, et al. Circulating factor VIII immune complexes in patients with type 2 acquired hemophilia A and protection from activated protein C-mediated proteolysis. *Blood*. 97, 669-677, 2001.
- 2) Nogami K, Shima M, Nishiya K, et al. A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation. *Blood*. 99, 3993-3998, 2002.
- 3) Takeyama M, Wakabayashi H, Fay P.J. Contribution of factor VIII light-chain residues 2007-2016 to an activated protein C-interactive site. *Thromb Haemost*. 109 (2), 187-198, 2013.
- 4) Takeyama M, Wakabayashi H, and Fay P.J. Factor VIII Light Chain Contains a Binding Site for Factor X That Contributes to the Catalytic Efficiency of Factor Xase. *Biochemistry*. 51 (3), 820-828, 2012.
- 5) Takeyama M, Wintermute JM, Manithody C, et al. Variable contributions of basic residues forming an APC exosite in the binding and inactivation of factor VIIIa. *Biochemistry*. 52(13), 2228-3, 2013.
- 6) Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, et al. Protein S down-regulates factor Xase activity independent of activated protein C: specific binding of factor VIII(a) to protein S inhibits interactions with factor IXa. *Br J Haematol*. 143, 409-420, 2008.
- 7) Takeyama M, Nogami K, Saenko E, et al. Identification of a protein S-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Thromb Haemost*. 102, 645-655, 2009.
- 8) Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, et al. The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor Xase complex. *J Biol Chem*. 284, 3379-3388, 2009.