◆ 総 説 ◆

血友病 A の分子病態 —第 VIII 因子の分子構造および機能の最近の知見—

野上 恵 嗣*

Molecular pathogenesis on Hemophilia A; factor VIII structure and function

Keiji NOGAMI*

Key words: factor VIII, hemophilia A, structure and function, activation and inactivation, mutation

1991年 自治医科大学卒業
 1991~2000年 地域医療（一般病院や僻地診療所など）に従事
 2000~2002年 奈良県立医科大学救急科
 2002~2005年 米国 NY 州 Rochester 大学生化学教室留学
 2005年~ 奈良県立医科大学小児科

はじめに

血液凝固反応は、内因系と外因系の2経路からなり、共通系を経由してトロンビンが産生され、フィブリノーゲンがフィブリンに変換して終結する。この凝固反応は現在では次の機序が支持されつつある。始まり (initiation) は出血部位に露出される組織因子 (TF) が、活性型第 VII 因子 (FVIIa) と複合体を形成し、第 IX 因子 (FIX) や第 X 因子 (FX) を活性化して微量のトロンビンが生成される。このトロンビン量では十分なフィブリン形成に至らず、止血機能は不十分であるが、同時に第 VIII 因子 (FVIII) や第 V 因子 (FV) や血小板を活性化させる。これにより活性化血小板上で凝固因子の活性化が起こりトロンビン生成反応は増大する (propagation)。この血小板依存性のトロンビンバーストは線溶抵抗性の安定したフィブリンが形成する。この活性化された FVIII (FVIIIa) は FIXa による FXase 反応系の反応速度 (V_{max}) を $\sim 10^6$ 倍増幅する。したがって、FVIII 欠乏症として知られている血友病 A は、

トロンビン生成が大きく低下するために生成するフィブリンも極めて少なく、かつ不安定であるため重大な出血傾向をきたすことになる。1984 年に、FVIII 遺伝子が初めて cloning された。さらに世界中の FVIII 研究グループが、免疫生化学的および生物学的手法を駆使することにより、FVIII 分子の機能構造解析は著しい発展を遂げた。またこのことは、血友病 A の病態解明ならびに治療にも大きく貢献した。本稿では、血友病 A における FVIII の機能構造ならびに遺伝子レベルの病態について、最近の知見も含めて概説する。

1. FVIII の構造

FVIII 遺伝子は Xq28 に存在する全長 186 kb に及ぶ大型の遺伝子で、26 個の exon と介在する 25 個の intron からなる。mRNA は約 9 kb で、7,053 bp によって 2,351 個のアミノ酸からなる FVIII 前駆体が合成される¹⁾。小胞体内腔への移行時に 19 個のシグナルペプチドが遊離し、種々の翻訳後修飾がおこる。小胞体内腔

*奈良県立医科大学小児科 [〒 634-8522 奈良県橿原市四条町 840]

Dept. of Pediatrics, Nara Medical University [840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8522, Japan]

Tel: 0744-29-8881 Fax: 0744-24-9222 e-mail: roc-noga@naramed-u.ac.jp

図1 FVIII ドメインと活性化および不活化

で、S-S bond 等の protein folding や Asn 残基の糖付加，ゴルジ体への移行後に Ser と Thr 残基の糖付加，Asn 残基に結合した糖鎖修飾，Tyr 残基の硫酸化が生じ，Arg¹⁶⁴⁸-Glu¹⁶⁴⁹ で分解を受け，重鎖（heavy chain；H鎖）と軽鎖（light chain；L鎖）の二本鎖からなる成熟 FVIII となり分泌される。FVIII はアミノ酸組成の相同性から A1-A2-B-A3-C1-C2 のドメイン構造をとる。循環血漿中では，A1-A2-B ドメインの H 鎖（90-210 kDa）と，A3-C1-C2 ドメインの L 鎖（80 kDa）が heterodimer を形成して存在している²⁾（図1）。また FVIII は von Willebrand 因子（VWF）と循環血漿中でと非共有結合下に複合体を形成して循環している。

A ドメインはセルロプラスミンと相同性があり，その構造を鋳型として A ドメインの立体構造が推定されていた³⁾。また C1 および C2 ドメインの結晶構造は明らかにされており，特に C2 ドメインでは，底面からのびるスパイク様ループは疎水性残基を有し，リン脂質膜結合部位と考えられている⁴⁾。一方，B ドメインは相同性の高い蛋白はなく，活性発現に関与しないとき

れる。今年になって，FVIII の B-ドメインの欠いた A1-A2 と A3-C1-C2 ドメインの dimer form の結晶解析により立体構造が Shen らにより明らかにされた⁵⁾。これによると，以前報告されていた FV（A2 ドメインを欠いた）の立体構造と極めて類似していた⁶⁾。H 鎖内の 4 つの領域（アミノ酸残基 34-38，213-227，335-366，A2C 末を含む 155 残基）は含まれてはいないが，これまでセルロプラスミンを鋳型として考えられていた A ドメインの立体構造と類似していた。また，L 鎖も同様に類似しており，さらに C1 ドメインが非常に tight に A3 ドメインと結合していることがわかった。この結合には，4 つの aromatic 残基（Tyr¹⁷⁴⁸，Tyr²⁰¹⁷，Tyr²¹⁰⁵，Trp²¹¹²），3 つの Pro 残基（Pro¹⁸⁶⁵，Pro²¹⁴²，Pro²¹⁴³），5 つの aliphatic 残基（Leu¹⁷⁴⁷，Leu¹⁷⁵²，Val¹⁹³³，Leu²⁰¹⁵，Ile²¹⁴⁵）からなる多くの疎水性残基が関与していた。一方，C2 ドメインは FVIII 分子，特に A3 および C1 ドメインと極めて loose に結合しており，広範囲の動きが可能であることを示した。

H 鎖と L 鎖の両鎖は metal ion 依存性かつ非依存性に結合しているが，thermodynamic

stability の観点から、後者由来の結合が約 80 % を占めるとされる⁷⁾。最近、site-directed mutagenesis を用いることにより、両鎖間の結合部位が、H 鎖は A1 ドメインの残基 97-105 内に、L 鎖は A3 ドメインの残基 1954-1961 内に同定された⁸⁾⁹⁾。一方、metal ion、特に Cu^+ と Ca^{2+} (あるいは Mn^{2+}) の FVIII 結合は、分子構造およびその機能発現に重要な役割を果たしている¹⁰⁾。 Cu^+ 結合は、両鎖結合の親和力を 100 倍以上増加させるが、活性発現にはあまり働いていないとされる。その結合部位は、結晶解析から A3 ドメイン上の His¹⁹⁵⁴、His²⁰⁰⁵、Cys²⁰⁰⁰ により coordinate されている type 1 binding site と、A1 ドメイン上の His²⁶⁷、His³¹⁵、Cys³¹⁰ により coordinate されている type 2 site にあるとされるが、面白いことに FV とは異なっている⁵⁾。一方、 Ca^{2+} (あるいは Mn^{2+}) は FVIII の活性発現に重要であるが、両鎖の結合親和力に影響を与えない。これら結合部位は A1 ドメインの残基 110-126 内の Glu¹¹⁰、Asp¹¹⁶、Glu¹²²、Asp¹²⁵、Asp¹²⁶ が結合に必須であることが site-direct mutagenesis により明らかにされた¹¹⁾。これは FVIII の結晶構造解析でも一致していた。この領域は C2 ドメインに極めて近接していることから、これらイオンを介する両ドメインの構造上の安定性が FVIII の活性発現に寄与すると推測される。

2) FVIII の活性化と不活化

FVIII は Ca^{2+} 存在下で FIXa の補因子としてリン脂質とともに FXase 複合体を形成し、FX 活性化に重要な働きをする。FVIII はトロンビンや FXa により、Arg³⁷²、Arg⁷⁴⁰、Arg¹⁶⁸⁹ で開裂される。H 鎖 (90~210 kDa) は 50 kDa A1 ドメインと 40 kDa A2 ドメイン、L 鎖 (80 kDa) は 70 kDa A3-C1-C2 ドメインに分解され、heterotrimer の活性型 FVIIIa となり、FIXa による FX 活性化の Vmax を 20 万倍増幅する。Vmax の増加には、A2 ドメインに加え A1 ドメインの存在が非常に関与している。Arg³⁷² と Arg¹⁶⁸⁹

図 2 Thrombin-interactive sites within the FVIII A2 domain

The residues, Region A and B, require for FVIII cleavage at Arg³⁷² and Arg⁷⁴⁰, respectively.

開裂は FVIII 活性化に必須であり、その前段階での Arg⁷⁴⁰ 開裂は Arg³⁷² と Arg¹⁶⁸⁹ 開裂を律速させる役割があるとされる¹²⁾。しかし、トロンビンによる活性化は VWF や Ca^{2+} に非依存性であるのに対して、FXa は VWF 存在下で抑制され、さらに Ca^{2+} やリン脂質により左右されるなどの相違点があり、両者の FVIII 活性化の異なる生理的意義が考えられる。

著者らは、トロンビンと FXa の活性中心 Ser 残基を、PMSF でアルカリ条件下で処理しアンヒドロ化した不活化誘導体を作成し、FVIII との結合様式を初めて明らかにした¹³⁾¹⁴⁾。トロンビンと FXa による L 鎖の Arg¹⁶⁸⁹ 開裂を制御するには、それぞれ異なった C2 ドメイン領域に結合することがわかった。特に、FXa の C2 ドメイン結合部位はペプチドレベル (Thr²²⁵³-Gln²²⁷⁰) まで明らかにされており、また本ペプチド存在下では凝固反応も抑制されることから¹⁵⁾、FXa による独立した FVIII 活性化機構の重要性が示唆される。さらに、FXa による Arg³⁷² 開裂は、A1 ドメイン内酸性領域 (残基 337-372)、特に Asp³⁶¹⁻³⁶³ との結合により制御されている¹⁶⁾。一方、トロンビンによる H 鎖 Arg³⁷² と Arg⁷⁴⁰ 開裂の制御にはともに A2 ドメ

図3 各セリンプロテアーゼによるFVIII H鎖開裂パターン

インへの結合が必須であることも明らかになった(図2)。Site-direct mutagenesisにより、Arg³⁷²開裂には、塩基性残基がclusterした残基484-509のArg⁴⁸⁴, Arg⁴⁸⁹, Arg⁴⁹⁰, His⁴⁹⁷, Lys⁴⁹⁹が¹⁷⁾、一方、Arg⁷⁴⁰開裂には、酸性残基がclusterした389-394領域内のGlu³⁸⁹, Glu³⁹⁰, Glu³⁹¹, Asp³⁹², Asp³⁹⁴が¹⁸⁾、その結合の中心的役割を果たしている。A2ドメイン上にトロンビンの異なった結合部位が存在していることは非常に興味深い。またトロンビン分子上にはsubstrateに結合するための塩基性残基が集まった領域(exosite)が存在しており、2つのanion-binding exosite (ABE)がある。389-394残基への結合には、トロンビン内のheparin-binding exosite (ABE-II)が関与しており、一方、FVIIIのA1ドメインもトロンビンのexosite I (ABE-I)を介して結合しており、この領域はA1ドメインのC末側と推測される。

また最近、当教室の添田らは、FVIIaがTF存在下では、外因系凝固反応のinitiation phaseとして働くのみならず、同時にFVIIIも活性

化させることを初めて明らかにした¹⁹⁾。このFVIII活性化反応は、リン脂質存在下では著明に増強し、血漿中濃度の微量のFVIIa (0.1 nM)でさえTF存在下では、FVIIIを極めて急峻に活性化させ、VWF存在下でも部分的に抑制される程度であった。同様に活性化させるトロンビンと比較しても、FVIIIへのactivation rateは10倍以上大きいことがわかっている。今後、FVIIaのFVIIIへの関与が明らかになることを期待する。

FVIIIaの不活化機序として、主にA2ドメインのFVIIIaからの解離がある。A2ドメインはFVIIIaの活性発現に必須であるが、A1ドメインとは非共有結合の弱い力(静電氣的結合)でしか結合しておらず(K_d; ~300 nM²⁰⁾)、血漿中のFVIIIは~0.3 nMであるため、容易にFVIIIaから遊離してその活性を失う(Self-dampening)。それは遊離A2ドメインはFXase複合体上では、FIXaと結合するのが抑制されるためである。この生理的な重要性は、下記で述べるが、ある血友病A患者のFVIII活性が凝

図 4 FVIII 分子上の結合部位の mapping

固 1 段 法 (FVIII procoagulant activity) と 2 段 法 (FVIIIa activity) とで discrepancy を示すこと で知られている。また一方、酵素分解的には、活性型プロテイン C (APC) / プロテイン S (PS), FXa, FIXa をはじめ、線溶系因子の プラスミン (Plm), さらに外因系因子 FVIIIa の ようなセリンプロテアーゼは、いずれも A1 ドメイン内の Arg³³⁶ を開裂させ、FXa や Plm はさら に Lys³⁶ も開裂させることで、分子内 A1-A2 ドメイン結合および A1 ドメイン-FX 結合をより急速に解離させる¹⁹⁾²¹⁾⁻²³⁾。また APC は A2 ドメイン内の Arg⁵⁶² も開裂することにより、FIXa との結合を抑制させる。図 3 は各セリンプロテアーゼによる FVIII の H 鎖開裂のパターンを示すが、その開裂パターンがセリンプロテアーゼによりすべて異なっているのがわかる。さらに最近、当教室の武山らは²⁴⁾、APC の補因子である PS が、APC-independent に PS 単独で A2 ドメインの FIXa 結合部位 (残基 484-509) に結合することにより、FVIIIa-FIXa 結合を直接競合阻害することにより、FXase 活性を失活させる新しい抑制機序を初めて明らかにした。このように、多くの抑制機序により FVIIIa は急速に失活させて、FVIII (a) 活性化と不活化をバランス良く制御し、過凝固を防いでいる。

3) 他因子との結合 (図 4)

① VWF との結合…VWF は循環血漿中で FVIII と非共有結合下に複合体を形成しており、FVIII の産生、活性およびクリアランス機構を制御している。実際、VWF 欠乏症であるフォン・ヴィレブランド病では FVIII 活性は低下している。VWF の FVIII 結合部位は、L 鎖 A3 ドメイン N 末の酸性領域内 (残基 1673-1689) と C2 ドメイン内 (残基 2303-2317) が主要結合部位であり、両者は立体構造上近傍に位置する²⁵⁾²⁶⁾。さらに最近、C1 ドメインも VWF 結合に関与するとされており²⁷⁾、VWF 結合はこれら 3 領域にまたがる interface でおこると考えられている。また、A3 ドメイン酸性領域内に硫酸化部位の Tyr¹⁶⁸⁰ があり、この硫酸化を抑制した FVIII は VWF との結合能が低下することから、Tyr¹⁶⁸⁰ の硫酸化は VWF 結合に重要であるとされている²⁸⁾。

② リン脂質との結合…FVIII 活性を発現するうえでリン脂質との結合は必須であり、C2 ドメインがそれに関与している。C2 ドメインの結晶構造から⁴⁾、その結合機序は疎水性かつ静電的に生じている。Met²¹⁹⁹/Phe²²⁰⁰, Val²²²³, Leu²²⁵¹/Leu²²⁵² の疎水基からなる spike が膜を貫通し、Arg²²¹⁵, Arg²²²⁰, Lys²²²⁷, Lys²²⁴⁹ の塩基性残基が膜に結合している²⁾。また、結晶

解析から C2 ドメイン上結合部位の位置から、C1 ドメインの Lys²⁰⁹², Phe²⁰⁹³ がリン脂質結合部位の可能性があげられる⁵⁾。

- ③ FIXa との相互作用…FVIII は活性化され FVIIIa となり FIXa の補因子として働き、A2 ドメイン内の残基 489-493, 558-565 と 708-715, および A3 ドメイン内の残基 1811-1818 に広がる surface 上で FIXa と結合するとされている¹²⁾。特に 558-565 領域は FIXa のプロテアーゼドメイン内 330 ヘリックスに結合し、一方 1811-1818 領域は FIXa の L 鎖 (EGF ドメイン) に結合する。FIXa は A3 ドメインと強い結合親和性 (Kd~15 nM) を示し、複合体形成中心として作用する。一方、親和性の極めて弱い A2 ドメインは (Kd~300 nM), FIXa の活性中心構造の変化をもたらし、FIXa 活性に影響を与える。最近、C2 ドメイン上の残基 2228-2240 が FIXa の Gla ドメインとの結合に関与することも報告されている²⁹⁾。

- ④ FX との結合…FVIII が FXase 複合体として FX に関係することは前述した。FX との結合部位は、A1 ドメイン C 末の酸性領域 (残基 337-372), 特に Asp³⁶¹⁻³⁶³ を中心として存在する²¹⁾。またこの部位は、FXa による不活化機序でもある Arg³³⁶ や Lys³⁶ 開裂を同時に制御する。この結合には、FX (または FXa) の heparin-binding exosite を形成する Arg²⁴⁰ が中心的に関与するとされている³⁰⁾。

4) FVIII の異化作用

FVIII の血漿中からのクリアランスは、肝臓、胎盤、肺などに発現している low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) が関与して行われる。FVIII の LRP 結合部位は、LRP と高い親和性を示す 2 つの領域、A2 ドメイン内の残基 484-509 と A3 ドメイン内の残基 1811-1818, および低い親和性を示す C2 ドメインである。一方、VWF と結合した FVIII では LRP 結合を抑制する。最近、A2 ドメインとの結合には、H 鎖がトロンビンによって開裂され、結

表 1 血友病 A の患者から検出された変異の種類と頻度

変異	数	%
イントロン 22 逆位	302	35.7
遠位型	260	30.7
近位型	37	4.4
希少型	5	0.6
イントロン 1 逆位	8	1.0
点変異	402	47.5
ミスセンス	323	38.2
ナンセンス	79	9.3
小規模な欠失 / 挿入	86	10.2
欠失	63	7.5
挿入	22	2.6
組み合わせ	1	0.1
大規模な欠失	25	3.0
スプライシング変異	22	2.6
イントロン	20	2.4
クリプティック	2	0.2

合部位が露出することが必要であると報告されている³¹⁾。

2. FVIII 遺伝子異常

血友病 A の遺伝子解析は、FVIII の cDNA 発見以来報告され、さらに PCR や SSCP などの遺伝子解析法の進歩により解析率が大きく向上した。ただし、重症血友病 A の半数が、遺伝子異常がゲノム DNA 解析では検出されなかった。Taylor らは、これら症例の mRNA 解析過程で exon 22 と 23 を跨いで遺伝子増幅できないことを報告し³²⁾、intron 22 内で出現する逆位を発見した。これは重症型の約 40 % にみられる遺伝子異常で、intron 22 内の遺伝子 (int22h-1) と 500 kb 以上離れた遺伝子 int22h-2 (近位側) および int22h-3 (遠位側) との組み替えが起こって生じたものである。前者を近位型、後者を遠位型とよび、重症血友病 A では遠位型 (35 %) は近位型 (7 %) の約 5 倍の頻度で見られるとされる³³⁾。逆位以外の遺伝子異常では、欠失、点変異や挿入などが検出されている。点変異例は PCR/SSCP 解析で 90

%以上が解析可能である (表 1)。FVIII が低下するが検出可能な中等～軽症のほとんどの症例がミスセンス変異である。遺伝子異常と血友病 A phenotype との関係は、逆位、欠失やナンセンス点変異例では重症を呈する。実際、当教室で明らかにされた逆位 25 例の FVIII を測定感度 0.2% にあげて FVIII 活性を測定すると、全例検出感度以下であった。しかし、ミスセンス点変異例では、重症型でも微量に FVIII を有する可能性もあり、今後血友病 A の病態を明らかにするためにも、それぞれの症例の臨床的重症度、正確な FVIII 測定および遺伝子解析の情報が必要である。

ミスセンス変異による FVIII 機能異常

血友病 A では、遺伝子解析により同定された遺伝子異常、蛋白質解析により発見された機能異常、そして近年可能となった立体構造解析、これらをもとに考察することは、FVIII の構造機能、さらに血友病 A の病態解明に極めて重要である。

- ① トロンビン開裂部位の変異…FVIII はトロンビンにより Arg³⁷²-Ser³⁷³ と Arg¹⁶⁸⁹-Ser¹⁶⁹⁰ が限定分解されて活性化される。Arg³⁷² と Arg¹⁶⁸⁹ は CGC にコードされており、CG ダイヌクレオチドは点変異の hotspot であるため、Arg から His (CAC) や Cys (TGC) への P1 部位の変異が多数報告されている。アミノ酸置換によりトロンビン開裂に抵抗性を示し、FVIII 活性化が障害される³⁴⁾³⁵⁾。Arg → His 置換は、塩基性残基同士の置換であり、緩徐に (約 80 倍遅延³⁶⁾) 開裂するため軽症～中等症を示す。
- ② VWF との結合障害…Tyr¹⁶⁸⁰ の硫酸化は VWF 結合に重要であることは前述したが、このアミノ酸の Phe や Cys への変異が報告されている。これらの変異では VWF 結合が障害され、FVIII の血漿中からのクリアランスが高まると推測されている。軽症血友病 A を呈する Arg2150His は、インヒビター出現頻度

が高い。このインヒビターは VWF 結合 FVIII のみ認識する抗体であることが確認されている。Arg²¹⁵⁰ は C1 ドメインに位置するが、C2 ドメイン内の VWF 結合に間接的に異常をきたしているとされる²⁷⁾。これ以外の C1 ドメインのミスセンス変異でも VWF 結合障害を来すことが報告されている³⁷⁾。

- ③ リン脂質との結合障害…Ala2201 欠失軽症血友病 A ではリン脂質結合能が低下していると報告されているが³⁸⁾、リン脂質との結合障害の報告は極めて少ない。これは、リン脂質結合領域は、多くの疎水性や塩基性残基から構成されており、点変異がひとつ起きた程度では影響を及ぼさない可能性が考えられる。
- ④ 新しい糖鎖付加構造の出現による異常…Aly らは、FVIII の H 鎖と L 鎖の分子量が通常より大きい CRM+ 変異 (Ile566Thr, Met1722Thr) を見出した³⁹⁾。これら変異 FVIII を N-Glycanase 処理により糖鎖を切断すると、分子量は正常化して FVIII 活性が出現した。変異により新たな N-linked glycosylation 部位 (Asn-X-Thr) が出現し、余剰糖鎖付着が FVIII 活性を障害したと考えられる。
- ⑤ 細胞内分解の促進による分泌障害…Arg-2159Cys, Arg2307Gln の発現実験で、細胞内から初期翻訳産物が消失するも、培養上清には FVIII は検出しなかった。しかし、Cysteine protease inhibitor 存在下では用量依存性に初期翻訳産物の細胞内蓄積が観察されたことから、これら変異 FVIII は、ubiquitin-proteasome system により細胞内分解が生じて分泌が阻害されていると考えられる⁴⁰⁾。両アミノ酸は、C ドメイン構造に重要で、その変異により構造の不安定や misfolding が生じると推測される。
- ⑥ A ドメイン間 interface 上の変異…軽症型血友病 A の中で、FVIII 活性が凝固 1 段法と 2 段法の間に乖離がある症例が観察される。それら遺伝子解析から、Ala284Glu/Pro, Ser289Leu, Glu321Lys, Try346Cys, Arg527Trp,

Arg531His, Asn694Ile, Arg698Trp/Leu, Leu1932Phe, Met1947Ile/Val, His1954Leuが報告されている。これらの変異は各Aドメイン同士の interface にあることが立体構造解析からわかる。A1/A2/A3-C1-C2 ドメインの heterotrimer からなる FVIIIa は, A2 は A1/A3-C1-C2 と弱い結合で保たれている。実際, A1/A2 ドメイン interface 上の Arg²⁸⁴, Ser²⁸⁹, Arg⁵³¹ の変異 FVIII (Ala284Glu, Ser289Leu, Arg531His) では, A2 ドメインの解離が亢進して不活化し易かった⁴¹⁾。また A1/A3 ドメイン interface 上の His¹⁹⁵⁴ の変異 FVIII (His1954Leu) ではやはり A1-A3 ドメインの解離が亢進しており不安定であった⁸⁾。

⑦ C ドメインとの interface 上の変異…FVIII の結晶解析が明らかになったことから, 各ドメイン間の interface (C1-A3 ドメイン; Arg²¹¹⁶, Thr²¹²²), (A1-C2 ドメイン; Thr¹¹⁸, Glu¹²², Asp¹¹⁶), (C1-C2 ドメイン; Gly²⁰²⁶, Gly²¹⁷⁹, Gly²³²⁵, Ile²⁰³²) での point mutation が報告されており, これらにより FVIII のコンフォメーションの変化が生じ, 活性が低下することが推測される。

⑧ FIXa との結合障害…FVIII の FIXa 結合領域はすでに前述したが, 特に A2 ドメイン 556-565 領域についてよく検討されている。Ser558Phe, Val559Ala, Asp560Ala, Gln565Arg の変異 FVIII では, Fxase 複合体での FIXa との親和性は保たれているが, FIXa を modulate することによりその cofactor 活性を低下させる⁴²⁾。他に, 708-715 領域に近接した Glu720Lys も同様の機序であるとされる。

おわりに

FVIII 分子機能構造および遺伝子レベルでのめざましい研究により, 血友病 A の病態解明は飛躍的に発展した。これらの知見は, 新たな血友病 A の治療製剤の開発のみならず, 治癒をめざした肝臓移植や遺伝子治療などの基礎研

究にも密接に関連しているといっても過言ではない。しかし, 構造機能のさらなる解析を要する部分が未だ存在することも事実である。今後のさらなる研究成果が期待される。

文 献

- 1) Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amphlett GW, Foster WB, Coe ML, Knutson GL, Fass DN, Hewick RM : Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* **312** : 342-347, 1984.
- 2) Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EGD, Lawn RM, Capon DJ : Structure of human factor VIII. *Nature* **312** : 337-342, 1984.
- 3) Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EG, Kemball-Cook G : A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood* **89** : 2413-2421, 1997.
- 4) Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL : Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* **402** : 439-442, 1999.
- 5) Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL : The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* **111** : 1240-1247, 2008.
- 6) Adams TE, Hockin ME, Mann KG, Everse SJ : The crystal structure of activated protein C-inactivated bovine factor Va : Implications for cofactor function. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101** : 8918-8923, 2004.
- 7) Wakabayashi H, Koszelak ME, Mastro M, Fay PJ : Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity. *Biochemistry* **40** : 10293-10300, 2001.
- 8) Ansong C, Fay PJ : Factor VIII A3 domain residues 1954-1961 represent an A1 domain-interactive site. *Biochemistry* **44** : 8850-8857, 2005.
- 9) Ansong C, Miles SM, Fay PJ : Factor VIII A1 domain residues 97-105 represent a light chain-interactive site. *Biochemistry* **45** : 13140-13149, 2006.
- 10) Fay PJ : Reconstitution of human factor VIII from isolated subunits. *Arch Biochem Biophys*. **262** : 525-523, 1988.
- 11) Wakabayashi H, Freas J, Zhou Q, Fay PJ : Residues 110-126 in the A1 domain of factor VIII contain a Ca²⁺ binding site required for cofactor activity. *J Biol Chem*. **279** : 12677-12684, 2004.
- 12) Fay PJ : Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev*. **18** : 1-15, 2004.
- 13) Nogami K, Shima M, Hosokawa K, Suzuki T, Koide T, Saenko EL, Scandella D, Shibata M, Kamisue S, Tanaka I, Yoshioka A : Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *J Biol Chem*. **274** : 31000-31007, 1999.
- 14) Nogami K, Shima M, Hosokawa K, Nagata M, Koide T, Saenko EL, Tanaka I, Shibata M, Yoshioka A : Factor VIII C2 domain contains the thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at Arg1689. *J Biol Chem*. **275** : 25774-25780, 2000.
- 15) Nogami K, Shima M, Nishiya K, Hosokawa K, Saenko EL, Giddings JC, Tanaka I, Yoshioka A : Anticoagulant effects of

- a synthetic peptide containing residues Thr-2253-Gln-2270 within factor VIII C2 domain that selectively inhibits factor Xa-catalyzed factor VIII activation. *Br J Haematol.* **116** : 868-874, 2002.
- 16) Nogami K, Lapan KA, Zhou Q, Wakabayashi H, Fay PJ : Identification of a factor Xa-interactive site within residues 337-372 of the factor VIII heavy chain. *J Biol Chem.* **279** : 15763-15771, 2004.
 - 17) Nogami K, Saenko EL, Takeyama M, Giddings JC, Yoshioka A, Shima M : Identification of a thrombin-interactive site within the FVIII A2 domain that is responsible for the cleavage at Arg372. *Br J Haematol.* **140** : 433-443, 2008.
 - 18) Nogami K, Zhou Q, Myles T, Leung LL, Wakabayashi H, Fay PJ : Exosite-interactive regions in the A1 and A2 domains of factor VIII facilitate thrombin-catalyzed cleavage of heavy chain. *J Biol Chem.* **280** : 18476-18487, 2005.
 - 19) 添田哲弘, 野上恵嗣, 荻原健一, 嶋緑倫 : 活性型第 VII 因子 / 組織因子による第 VIII 因子制御機構. *日本血栓止血学会雑誌* **19** : 651, 2008.
 - 20) Fay PJ, Smudzin TM : Characterization of the interaction between the A2 subunit and A1/A3-C1-C2 dimer in human factor VIIIa. *J Biol Chem.* **267** : 13246-13250, 1992.
 - 21) Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA : Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* **25** : 505-512, 1986.
 - 22) Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ : Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage of the factor VIIIa A1 subunit resulting in cofactor inactivation. *J Biol Chem.* **278** : 16502-16509, 2003.
 - 23) Nogami K, Shima M, Matsumoto T, Nishiya K, Tanaka I, Yoshioka A : Mechanisms of plasmin-catalyzed inactivation of factor VIII : a crucial role for proteolytic cleavage at Arg336 responsible for plasmin-catalyzed factor VIII inactivation. *J Biol Chem.* **282** : 5287-5295, 2007.
 - 24) Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Soeda T, Nishiya K, Ogiwara K, Yoshioka A, Shima M : 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.
 - 25) Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, Van Mourik JA, Mertens K : The interaction between human blood coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochem J.* **257** : 679-683, 1989.
 - 26) Saenko EL, Shima M, Rajalakshmi KJ, Scandella D : A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J Biol Chem.* **269** : 11601-11605, 1994.
 - 27) Jacquemin M, Benhida A, Peerlinck K, Desqueper B, Vander Elst L, Lavend'homme R, d'Oiron R, Schwaab R, Bakkus M, Thielemans K, Gilles JG, Vermynen J, Saint-Remy JM : A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood* **95** : 156-163, 2000.
 - 28) Pittman DD, Wang JH, Kaufman RJ : Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry* **31** : 3315-3325, 1992.
 - 29) 添田哲弘, 野上恵嗣, 武山雅博, 吉岡章, 嶋緑倫 : 活性型第 VIII 因子軽鎖 C2 ドメイン上における活性型第 IX 因子結合部位の同定. *日本血液学会雑誌* **49** : 901, 2008
 - 30) Nogami K, Freas J, Manithody C, Wakabayashi H, Rezaie AR, Fay PJ : Mechanisms of interactions of factor X and factor Xa with the acidic region in the factor VIII A1 domain. *J Biol Chem.* **279** : 33104-33113, 2004.
 - 31) Bovenschen N, van Stempvoort G, Voorberg J, Mertens K, Meijer AB : Proteolytic cleavage of factor VIII heavy chain is required to expose the binding-site for low-density lipoprotein receptor-related protein within the A2 domain. *J Thromb Haemost.* **4** : 1487-1493, 2006 ; .
 - 32) Naylor JA, Nicholson P, Goodeve Anne, Hassock S, Peake I, Giannelli F : A novel DNA inversion causing severe hemophilia A. *Blood* **87** : 3255-3261, 1996.
 - 33) Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, Ketterling RP, Kazazian HH Jr, Négrier C, Vinciguerra C, Gitschier J, Goossens M, Girodon E, Ghanem N, Plassa F, Laverne JM, Vidaud M, Costa JM, Laurian Y, Lin SW, Lin SR, Shen MC, Lillicrap D, Taylor SA, Windsor S, Valleix SV, Nafa K, Sultan Y, Delpech M, Vnencak-Jones CL, Phillips JA 3rd, Ljung RC, Koumbarelis E, Gialeraki A, Mandalaki T, Jenkins PV, Collins PW, Pasi KJ, Goodeve A, Peake I, Preston FE, Schwartz M, Scheibel E, Ingerslev J, Cooper DN, Millar DS, Kakkar VV, Giannelli F, Naylor JA, Tizzano EF, Baiget M, Domenech M, Altisent C, Tusell J, Beneyto M, Lorenzo JJ, Gaucher C, Mazurier C, Peerlinck K, Matthijs G, Cassiman JJ, Vermynen J, Mori PG, Acquila M, Caprino D, Inaba H : Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A : results of an international consortium study. *Blood* **86** : 2206-2212, 1995.
 - 34) Arai M, Inaba H, Higuchi M, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr, Fujimaki M, Hoyer LW : Direct characterization of factor VIII in plasma : detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (arginine-372-histidine). *Proc Natl Acad Sci USA.* **86** : 4277-4281, 1989.
 - 35) Shima M, Ware J, Yoshioka A, Fukui H, Fulcher CA : An arginine to cysteine amino acid substitution at a critical thrombin cleavage site in a dysfunctional factor VIII molecule. *Blood* **74** : 1612-1617, 1989.
 - 36) Nogami K, Zhou Q, Wakabayashi H, Fay PJ : Thrombin-catalyzed activation of factor VIII with His substituted for Arg372 at the P1 site. *Blood* **105** : 4362-4368, 2005.
 - 37) Liu ML, Shen BW, Nakaya S, Pratt KP, Fujikawa K, Davie EW, Stoddard BL, Thompson AR : Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure. *Blood* **96** : 979-987, 2000.
 - 38) d'Oiron R, Laverne JM, Lavend'homme R, Benhida A, Bordet JC, Negrier C, Peerlinck K, Vermynen J, Saint-Remy JM, Jacquemin M : Deletion of alanine 2201 in the FVIII C2 domain results in mild hemophilia A by impairing FVIII binding to VWF and phospholipids and destroys a major FVIII antigenic determinant involved in inhibitor development. *Blood* **103** : 155-157, 2004.
 - 39) Aly AM, Higuchi M, Kasper CK, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Hoyer LW : Hemophilia A due to mutations that create new N-glycosylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89** : 4933-4937, 1992.
 - 40) Pipe SW, Kaufman RJ : Factor VIII C2 domain missense mutations exhibit defective trafficking of biologically functional proteins. *J Biol Chem.* **271** : 25671-25676, 1996.
 - 41) Pipe SW, Eickhorst AN, McKinley SH, Saenko EL, Kaufman RJ : Mild hemophilia A caused by increased rate of factor VIII A2 subunit dissociation : evidence for nonproteolytic inactivation of factor VIIIa in vivo. *Blood* **93** : 176-183, 1999.
 - 42) Jenkins PV, Freas J, Schmidt KM, Zhou Q, Fay PJ. Mutations associated with hemophilia A in the 558-565 loop of the factor VIIIa A2 subunit alter the catalytic activity of the factor Xase complex. *Blood* **100** : 501-508, 2002.