

乙 第 号

添田 哲弘 学位請求論文

審 査 要 旨

奈 良 県 立 医 科 大 学

論文審査の要旨及び担当者

報告番号	乙第号	氏名	添田 哲弘
論文審査担当者	委員長	教授	吉栖 正典
	副委員長	教授	斎藤 能彦
	委員	教授	杉本 充彦
	委員	教授	高澤 伸
	委員	教授	嶋 緑倫
	(指導教員)		

主論文

The Factor VIIIa C2 Domain (Residues 2228-2240) Interacts with the Factor IXa Gla Domain in the Factor Xase Complex

活性化第VIII因子のC2ドメイン(残基2228-2240)はFactor Xase複合体における活性化第IX因子のGlaドメインと相互作用する

添田 哲弘、野上 恵嗣、西屋 克己、武山 雅博、荻原 健一、坂田 洋一、

吉岡 章、嶋 緑倫

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

284 巻, 3379 - 3388 頁、

2009 年 2 月 発行

論文審査の要旨

活性化血液凝固第 VIII 因子 (FVIIIa) は、リン脂質膜上で活性化第 IX 因子 (FIXa) と Factor Xase 複合体を形成し、第 X 因子 (FX) 活性化を約 10^6 倍促進する。FVIII 又は FIX の先天的欠乏症として知られる血友病 A 又は B では、Factor Xase 複合体の活性が低下し、安定したフィブリン形成の障害により重大な出血症状をきたす。従って、Factor Xase 複合体における FVIIIa 及び FIXa の機能解析は、その複合体の凝固反応における機能ならびに血友病の病態解明において重要である。FVIII はアミノ酸組成の相同性により A、B、C の 3ドメインに分類され、中でも C 末端の C2ドメインはリン脂質への結合に関与し、FX 活性化に必須なドメインである。さらに、FIXa の Gla ドメインもリン脂質との結合に関与している。FIXa Gla ドメインが FVIIIa と結合することは既に知られていたが、FVIIIa の結合領域は不明であった。そこで学位申請者らは、C2ドメインが FIXa Gla ドメインと同様リン脂質結合ドメインであり、立体構造的に近い位置にあることに着目し、両者の相互作用について検討した。

ELISA にて、固相化したリコンビナント C2ドメイン (rC2) に対し FIXa は直接結合した。また表面プラズモン共鳴法により、sensor chip に固相化した FIXa に対する rC2 との K_d は 107 nM であった。この結合反応は、キモトリプシンにより Gla ドメインを除去した FIXa では認められず、抗 FIXa Gla ドメイン抗体により抑制されたことから、FIXa Gla ドメインに対する FVIIIa の結合領域は C2ドメインであることがわかった。さらに V8 プロテアーゼ処理後精製した rC2 フラグメントや合成 C2 ペプチドを用いた結合競合実験により、C2ドメイン上の FIXa 結合部位は残基 2228-2240 であることも明らかになった。本領域は、C2 ドメイン内のリン脂質膜との結合に重要な残基と近接していたが、overlap していなかった。残基 2228-2240 の合成 C2 ペプチドはリン脂質存在下での FIXa/FVIIIa による FX 活性化を濃度依存的に 95%まで抑制したことから、本領域が Factor Xase 複合体活性発現に重要な役割を果たしていることが示された。

本研究内容は、血液病学の基礎・臨床において有用な発見であり、生理的な止血機構や血友病の病態解明の進歩に寄与するところが大きいと判断される。

参 考 論 文

1. Interactions between residues 2228–2240 within factor VIIIa C2 domain and factor IXa Gla domain contribute to propagation of clot formation.

Tetsuhiro Soeda, Keiji Nogami, Kenichi Ogiwara, Midori Shima

Thromb Haemost 106(5):893–900, 2011

2. Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII

Tetsuhiro Soeda, Keiji Nogami, Tomoko Matsumoto, Kenichi Ogiwara, Midori Shima

J Thromb Haemost 8(11):2494–503, 2010

3. Characterisation of an antibody specific for coagulation factor VIII that enhances factor VIII activity

Masahiro Takeyama, Keiji Nogami, Tomoko Matsumoto, Tetsuhiro Soeda, Tsukasa Suzuki, Kunihiro Hattori, Midori Shima

Thromb Haemost 103(1):94–102, 2010

4. 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.

Masahiro Takeyama, Keiji Nogami, Evgueni L Saenko, Tetsuhiro Soeda, Katsumi Nishiya, Kenichi Ogiwara, Akira Yoshioka, Midori Shima

Br J Haematol 143(3):409–20, 2008

5. FXase 複合体における第 VIII 因子と活性化第 IX 因子間の相互作用に関する新たな知見
添田 哲弘, 野上 恵嗣

日本血栓止血学会誌 20(4):453–455, 2009

以上、主論文に報告された研究成績は、参考論文もあわせて止血機構の機序解明と血友病の病態解明の進歩に寄与するところが大きく、十分に学位に相当する内容であると考えられる。

平成 24 年 5 月 8 日

学位審査委員長

情報伝達薬理学

教授 吉栖 正典

学位審査副委員長

循環器・腎臓病態制御医学

教授 斎藤 能彦

学位審査委員

血栓制御医学

教授 杉本 充彦

学位審査委員

分子医化学

教授 高澤 伸

学位審査委員（指導教員）

発達・成育医学

教授 嶋 緑倫