

Emicizumab の基礎

萩原建一*, 野上恵嗣

Basic aspect of emicizumab

Kenichi OGIWARA, Keiji NOGAMI

要約：遺伝子組換えヒト化二重特異性モノクローナル抗体 emicizumab は、一方で FIX/FIXa の EGF1 ドメインを、他方で FX/FXa の EGF2 ドメインを認識する。この結合特性をもって特異的生理機能である FVIIIa 機能 (FIXa による FX 活性化の促進) を代替させるという画期的かつ高難度の課題は、多くの技術革新によって成就した。FIX/FIXa および FX/FXa に対する emicizumab の結合解離定数は μM レベルであり、通常の抗体製剤の pM ~ nM レベルと比べ、その結合親和性は弱い。この '強すぎない' 適度な親和性によって、臨床使用下では血漿中 FIX および FX のうち FIX-Emicizumab-FX を形成するものは概ね 1% 未満にとどまる。血漿中三量体濃度は、emicizumab の等価 FVIII 活性と相関し、止血における酵素-補因子-基質複合体 FIXa-Emicizumab-FX の形成量を反映すると推察される。Emicizumab と FVIIIa の相違点の理解は、実臨床における emicizumab の有効性と安全性に関する様々な事象の解釈に有用である。

Key words: emicizumab, non-factor replacement therapy, hemophilia A, inhibitor, factor VIII

はじめに

Emicizumab の開発成功^{1,2)} は、血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) が先天的に欠乏する血友病 A の治療に大きな変化をもたらした。本稿では、emicizumab の基礎的事項についてこれまでの知見を整理した。ここで取り上げたのは、第一に、二重特異性抗体としての emicizumab の構造と機能についてであり、特に凝固第 IX 因子 (FIX), 第 X 因子 (FX), これらの活性型 (FIXa, FXa) と emicizumab の結合親和性と血漿中における存在様式について詳述した。第二に、FVIII ではなく活性型 FVIII (FVIIIa) 機能の一部を代替する emicizumab と FVIII/FVIIIa との相違点を整理し、臨床的に話題にあがることが多い等価 FVIII 活性について言及した。その他の基礎的事項や臨床に関する事項については他の総説を参照されたい。

*責任者連絡先：

奈良県立医科大学小児科

〒634-8522 奈良県橿原市四条町 840

Tel: 0744-29-8881, Fax: 0744-24-9222

E-mail: ogiwarak@naramed-u.ac.jp

1. Emicizumab の構造と機能

Emicizumab は遺伝子組換えヒト化二重特異性モノクローナル抗体であり、ラット抗ヒト FIXa 抗体及びマウス抗ヒト FX 抗体の相補性決定部、ヒトフレームワーク部及びヒト $\text{IgG}_4\kappa$ のフレームワーク部及び定常部からなる分子量約 148,000 の糖タンパクである³⁾。

1) 二重特異性 (bispecific) 抗体とは

一般にモノクローナル抗体製剤の多くは、アンタゴニストとして、あるいは細胞傷害を誘導してその薬理作用を発揮する。アゴニスト機能、アロステリック活性、触媒活性などを有する抗体の研究報告もあるが⁴⁻⁶⁾、医薬品として承認された例は限定的である。

二重特異性抗体は、2 種の異なる抗原に同時に結合する抗体であり、抗体製剤の持つ可能性を並び、腫瘍免疫療法などの分野で精力的に開発が進んでいる⁷⁾。二重特異性抗体には Fc 部分を有する全長 IgG 型とこれを有さない抗体断片型に大別され、emicizumab は全長 IgG 型である (図 1)。全長 IgG 型には、抗体依存性細胞障害活性や補体依存性細胞障

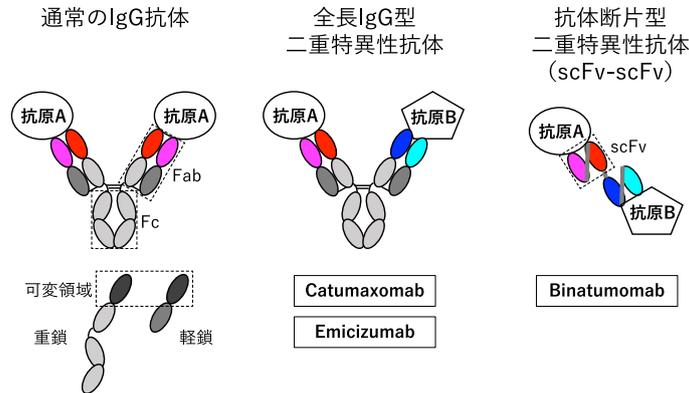


図1 通常のIgG抗体，全長IgG型二重特異性抗体，抗体断片型二重特異性抗体の例（著者作成）. Catumaxomab, emicizumab, blinatumomabは2020年までに市販化された二重特異性抗体. Fab：fragment antigen-binding (or antigen-binding fragment), Fc：fragment crystallizable, scFv：single-chain variable fragment.

害活性を付与できる，血中半減期が長い，といった利点がある．一方，抗体断片型は分子量が小さく組織浸透性が向上する利点があり，また半減期が短いことが有利に働く場合もある⁷⁾．腫瘍免疫療法の分野では，破壊対象である腫瘍細胞と細胞傷害性リンパ球の膜表面上の分子に同時に結合し，これらを橋渡しして近接させ抗腫瘍効果を発揮する作用機序が想定されている．臨床応用されている blinatumomab は，抗体断片型の二重特異性抗体であり，悪性B細胞上に存在するCD19抗原とT細胞上に存在するCD3抗原に特異的に結合し，T細胞を活性化して標的細胞に対する細胞傷害活性を惹起する⁷⁾．

2) 二重特異性抗体としての emicizumab の意義

FVIIIaは活性化血小板リン脂質膜上において，一方でFIXaと，他方でFXと結合することにより，FIXaによるFXa生成効率を飛躍的に増大させる．この補因子作用が「二重特異性抗体で代替できるのではないか？」という服部有宏氏（中外製薬(株)研究本部シニアフェロー）の独創的なアイデアから emicizumab の研究開発は始まった．公知の構造解析データから，FVIIIa分子内のFIXa結合部位とFX結合部位との間の距離と，IgG分子内の二つの抗原認識部位間の距離は同じ程度であることも本試みを後押しした^{8,9)}．抗体の一般特性として，長い血中半減期および高い皮下吸収性を有する．FVIII補因子作用を代替する emicizumab は，長期持続型の皮下投与製剤となり，FVIIIとは抗原性が異なることからFVIII

インヒビターの有無に関わらず効果を発揮することができた．現在，臨床応用されている抗体製剤は100を超えるが，二重特異性抗体製剤は2020年までに3製剤と極めて少ない．Emicizumabは市販化された全長IgG型遺伝子組換え二重特異性抗体製剤として世界初の製剤となり，また人体における特異的な生理機能を代替する世界初の抗体製剤となった．

3) Emicizumabの抗FIX/FIXa部位と抗FX/FXa部位の特性と血漿中における存在様式

Emicizumabの抗FIX/FIXa部位は，448個のアミノ酸残基からなるH鎖と214個のアミノ酸残基からなるL鎖，抗FX部位は，444個のアミノ酸残基からなるH鎖と214個のアミノ酸残基からなるL鎖から構成される³⁾．FIX/FIXaおよびFX/FXaに対する emicizumab の結合親和性は，emicizumabの抗FIX/FIXa部位，抗FX/FXa部位それぞれを両腕に有する単特異性抗体を作成，固相化した後，これら凝固因子を液相中のアナライトとして反応させる表面プラズモン共鳴法で解析された¹⁰⁾．結果，FIX，FIXa，FX，FXaに対する K_D 値は，順に1.58，1.52，1.85，0.978 μM であった（**図2**）．通常の抗体製剤がアンタゴニストとして作用する場合の K_D 値（pM～nMレベル）を大きく上回り，FVIIIaよりも明らかに弱い結合親和性を示した．また，イムブロットィング法を用いた解析により，emicizumabに対するFIX/FIXaおよびFX/FXaの結合ドメインは，それぞれEGF1ドメインとEGF2ドメインであることが判明

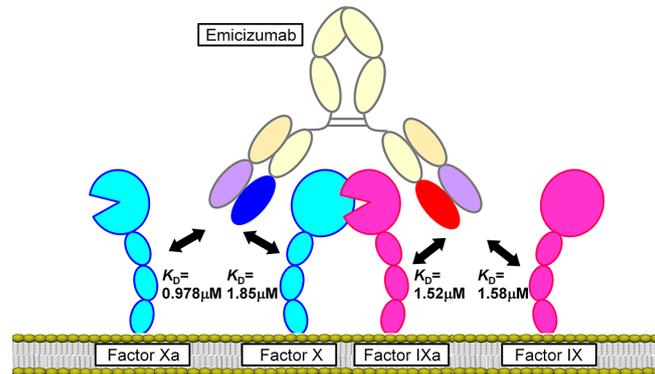


図2 Emicizumab に対する FIX/FIXa および FX/FXa の結合親和性 (文献 10 より一部改変して引用)。

した¹⁰⁾。さらに、EGF 様ドメインを有する他の凝固／抗凝固因子である FVII, FXII, プロテイン C に対して Emicizumab は結合しないことが ELISA を用いて確認された¹⁰⁾。

このように FIX/FIXa や FX/FXa に特異的親和性を有する Emicizumab は、血漿中でどのように存在しているのだろうか。血漿中の正常 FIX および正常 FX 濃度をそれぞれ 90 nM と 135 nM に設定し、emicizumab 濃度を変化させた場合の血漿中存在様式が上述の K_D 値をもとにシミュレーションされた(図 3)。Emicizumab の臨床使用時に想定される血漿濃度 (10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) において、FIX-Emicizumab-FX の三量体の存在濃度はおよそ 0.3~1.3 nM (血漿 FIX および FX のおよそ 1.0~1.5% 未満) と推定され、血漿 FIX および FX の大部分 (およそ 70~95%) は単体で存在し、およそ 5~30% は二量体 (FIX-Emicizumab, FX-Emicizumab) として存在していると推定され、この構成比率は FIX あるいは FX の血漿濃度を正常の 20% から 200% の間で変化させてもほとんど変わらなかった¹⁰⁾。このことは他の血液凝固反応に対する emicizumab の干渉が、仮にあったとしても小さいことを示す。興味深いことに、FVIII 欠乏血漿において FXIa 惹起トロンビン生成試験で評価したトロンビンピークの値は emicizumab 添加濃度に応じてベル型の推移を示し、上述の FIX-Emicizumab-FX 三量体の推定存在濃度の推移と類似した¹⁰⁾。FIX-Emicizumab-FX 三量体の血漿中存在濃度が emicizumab の薬理活性に重要であることを示すこの知見は、例えば FIX および FX の濃度が低い新生児や乳児における有効

性について¹¹⁾、あるいは FIX/FIXa および FX/FXa を含有する活性化プロトロンビン複合体製剤併用時の血栓性有害事象について¹²⁾ 考える際に重要な示唆を与えると考える。

4) Emicizumab の FVIIIa 代替機能

FVIIIa は活性化血小板 (ホスファチジルセリン (PS) が露出したリン脂質膜) 表面において、FIXa のプロテアーゼ活性中心を FX の切断部位に正確に配置させることで補因子活性を示す (という仮説が emicizumab の開発成功により証明されたとも言える)。Emicizumab と FVIIIa の違いは後述するが、emicizumab が FVIIIa 代替機能を有することは各種の *in vitro* 実験で示されている。純化凝固因子を用いた FIXa 触媒 FX 活性化アッセイにおいて、FIXa または PS 露出リン脂質膜が存在しない場合は FX 活性化反応は促進されず、emicizumab は PS 露出リン脂質膜依存性に機能した¹⁰⁾。Emicizumab 自体が PS 露出リン脂質膜と結合しないにも関わらず PS 露出リン脂質膜依存性がある理由は、FIXa-Emicizumab-FX の三量体のみでは FIXa と FX を正しい位置関係に配向できず、FIXa および FX の Gla ドメインを介して PS 露出リン脂質膜に結合し四量体を形成することによって初めて FX 活性化を促進できるためであろうと推察される。

Emicizumab の FVIIIa 代替機能活性は、反応速度論に基づき定量的に解析された¹⁰⁾。FIXa 触媒 FX 活性化アッセイにおいて emicizumab が及ぼす影響を表 1 に示す。1,000 nM (\equiv 146 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の emicizumab は、補因子のない反応条件 (FIXa, PS 露出リン脂質膜、

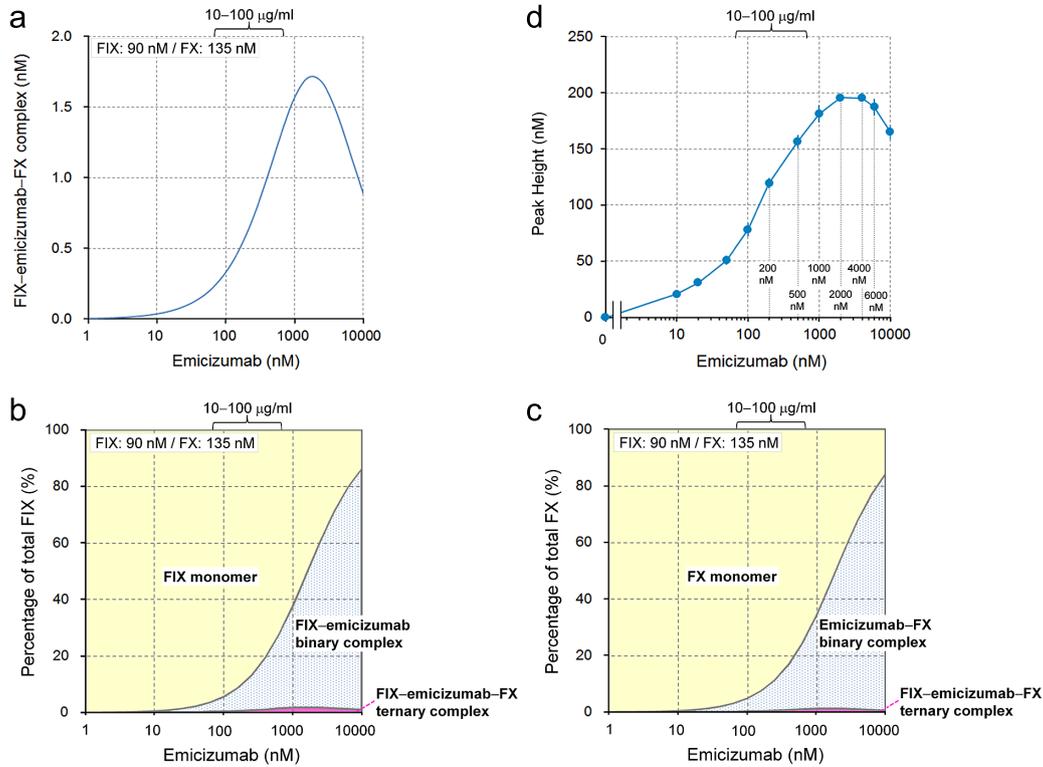


図 3 結合親和性に基づいた emicizumab, FIX, FX の血漿中存在様式の推測. 血漿中の FIX および FX 濃度をそれぞれ 90 nM, 135 nM と設定し, emicizumab 濃度を変化させた場合の血漿中存在様式が前述 (図 2) の K_D 値をもとに計算された. (a) Emicizumab 濃度を変化させた場合の, FIX-Emicizumab-FX の三量体の存在濃度の予測, (b), (c) FIX あるいは FX が, 単体として, emicizumab との二量体として, FIX-Emicizumab-FX の三量体として存在する分布率の予測. (d) Emicizumab 添加 FVIII 欠乏血漿において, FXIa 惹起トロンビン生成試験で評価したトロンビンピーク値の実測値 (文献 10 より一部改変して引用).

表 1 FIXa 触媒 FX 活性化反応において emicizumab が反応速度パラメータに及ぼす影響. K_m 値と V_{max} 値は 3 回測定 of 平均値 \pm SD 値を示す. FIXa 濃度は, no cofactor では 40 nM, その他では 1 nM に設定 (文献 10 の Supplemental Table より引用).

	K_m (μ M)	V_{max} (nM/min)	k_{cat} (/min)
No cofactor	0.0986 \pm 0.00509	0.0257 \pm 0.00256	0.000643
+Emicizumab	0.00505 \pm 0.000165	2.88 \pm 0.275	2.88
+FVIIIa	0.0195 \pm 0.00118	126 \pm 9.10	126

CaCl₂, FX のみ) の場合と比べ, FXa 生成における k_{cat} を 4,480 倍, K_m を 19.5 倍改善し, 酵素反応効率 k_{cat}/K_m を 87,400 倍改善した. 30 IU/dL の FVIIIa がこれらのパラメータへ及ぼす影響と比較すると, emicizumab の k_{cat} 改善率は約 44 分の 1 と弱い, K_m

改善率は約 4 倍と FVIIIa よりも高い親和性を示し, 総合的な k_{cat}/K_m 改善率は FVIIIa の約 11 分の 1 という結果であった.

5) 臨床応用と工業製造にあたっての改良

二重特異性抗体の開発には幾多の困難があった¹³⁾. FVIIIa 機能の代替を実現させるためには, FIXa のプロテアーゼ活性中心を FX の切断部位に精密に配置させる必要があった. まず, 複数の動物種に FIXa または FX を免疫し, 各抗原に対する抗体を約 200 ずつ取得し, これら抗体の変領域をクローニングすることに始まり, 約 4 万のバイスペシフィック抗体のスクリーニングと絞り込み (純化凝固因子を用いた FIXa 触媒 FX 活性化反応, FVIII 欠乏血漿における内因系凝固時間短縮能など) を行い, プロトタイプのバイスペシフィック抗体 BS15 が同定された. さらに, 臨床応用に耐えうる医薬品として完

成させるために、薬理活性（補因子活性）の向上、抗体のヒト化、製剤の保存安定性、溶解性の向上、高濃度化、非特異結合の低下（皮下吸収性の向上）、*in silico* 免疫原性予測値の改善など、多様な要素について改良を行う必要があった。研究開発チームは、大胆なアミノ酸置換によって抗体分子の改変を繰り返しながらこれらの要素を改良し、約2,400のバリエーション抗体を評価し、FVIIIa 機能代替活性に優れ、かつ他の要素も優れたヒト化バイスペシフィック抗体“ACE910（一般名：emicizumab）”が同定された¹³⁾。

一方で、工業製造の課題を解決する必要もあった。emicizumab は全長 IgG 型二重特異性抗体の形態を有するため、本抗体をそのまま遺伝子組換え細胞内で発現させると、2種の重鎖（A、Bとする）と2種の軽鎖（a、bとする）がランダムに組み合わせられ、目的の抗体（Aa/Bb）以外に9種類の不純抗体（Aa/Aa, Aa/Ab, Aa/Ba, Ab/Ab, Ab/Bb, Ab/Ba, Ba/Ba, Ba/Bb, Bb/Bb）が形成されることになる。形成された10種の抗体特性の類似性から、抗体医薬製造に用いられる通常的手法では不純抗体の分離除去が困難であった。研究開発チームは新たに3種の抗体工学技術（FR/CDR シャフリングによる軽鎖共通化、重鎖界面エンジニアリング、等電点エンジニアリング）を開発し emicizumab に適用した¹³⁾。

2. FVIIIa と emicizumab の比較

細胞基盤型血液凝固モデル¹⁴⁾において、FVIII は、凝固開始相で生じる少量のトロンビンにより活性化されると FVIIIa となり、同じく少量トロンビンにより活性化された血小板表面において FIXa による FX の活性化を促進させる（FVIIIa の補因子作用）。活性化された FXa は、同じく少量トロンビンにより活性化された FVa 存在下に、プロトロンビンの活性化を飛躍的に増大させる（凝固増幅相、トロンビンバースト）。トロンビンにより活性化されたフィブリノゲン（フィブリン）は血液凝固反応の最終産物であるが、フィブリンはトロンビンバーストによって初めて止血に耐えうる十分な質を備えたフィブリンポリマーとして機能する。Emicizumab が FVIIIa の代替作

用を有することは証明されたが、例えば emicizumab 投与中の患者血漿の APTT が過剰に短縮し、一方で臨床的な止血効果は中等症～軽症血友病 A 患者相当にとどまることが知られており、FVIII 製剤の完全な代替製剤とはならない。このことへの理解には両者の相違点を整理することが役立つであろう。

1) FVIIIa と Emicizumab の相違点（表2）

① FVIIIa は FIXa および FX とそれぞれ複数の結合部位を介して相互作用している。これまで明らかになった FVIIIa と FIXa および FX との相互作用部位の模式図を示す（**図4**）。FIXa と FX は FVIIIa の重鎖と軽鎖に渡る立体構造上の表面に位置する数か所の部位で¹⁵⁻²³⁾、FVIIIa を伸介としてその左右に対峙するように並ぶことがこの模式図から理解できる。一方、emicizumab は FIXa の EGF1 ドメイン、FX の EGF2 ドメインとそれぞれ1箇所ずつ結合している（**図2**）。

② FVIIIa は von Willebrand 因子に保護された血漿 FVIII がトロンビンによる限定分解を受けるまで血漿中には存在せず、同じくトロンビンにより活性化される血小板（PS 露出リン脂質膜）が存在する局所に時空間的に制限された中で出現する。一方、emicizumab にはこの on/off スイッチがないため、FVIIIa 機能代替活性が常に on の状態で存在する。このことは、emicizumab 使用中の患者で APTT が過剰に短縮する理由であり、また emicizumab 単独、あるいは FVIII 製剤やバイパス止血製剤との併用時の凝固能を各種検査によって評価する際に重要なポイントとなる。さらに emicizumab は FIX と FIXa を区別することなく、ほぼ同等の結合親和性で相互作用していると考えられ、FIXa のみに特異的に結合する FVIIIa とは異なるが、それがどのような薬理作用の違いとなって現れているのかは不明である。

③ FIXa や FX はそれぞれ単独でも Gla ドメインを介して PS 露出リン脂質膜へ結合するが、FVIIIa はより強力に（FIXa のおよそ 50 倍）リン脂質膜に結合する^{24,25)}。したがって FVIIIa には FIXa（と FX）を PS 露出リン脂質膜表面に局在化させる役割を有する。さらに FVIIIa は FIXa との数箇所の結合部位を介して FIXa の活性中心部位を適切な方向に向け安定化させ、最後に FIXa と FX を橋渡しする役割を有する。この3つの役割のうち、emicizumab は最後の

表2 FVIIIaとemicizumabの相違点（文献26より一部改変して引用）

	FVIIIa	Emicizumab
FIXaやFXとの結合	<ul style="list-style-type: none"> ・重鎖と軽鎖の複数箇所での結合 ・nMレベルの高親和性 ・特異性が高い 	<ul style="list-style-type: none"> ・単箇所での結合 ・μMレベルの低親和性 ・Zymogenとenzymeの区別なくFIXやFIXaとも結合
FIXa/FXとの複合体形成時の補因子としての役割	<ul style="list-style-type: none"> ・リン脂質膜結合促進 ・FIXaの活性中心部位の適切な配向と安定化 ・FIXaとFXの橋渡し 	<ul style="list-style-type: none"> ・FIXaとFXの橋渡し
血漿濃度 (FIXは90 nM, FXは135 nM)	<ul style="list-style-type: none"> ・低い ・FVIIIとして0.3~0.4 nM 	<ul style="list-style-type: none"> ・高い ・10~100 μg/mL \doteq 68.5~685 nM
Onスイッチ	<ul style="list-style-type: none"> ・あり ・前駆体として存在し必要に応じて活性化 	<ul style="list-style-type: none"> ・なし ・常に活性型として存在
Offスイッチ	<ul style="list-style-type: none"> ・あり ・A2ドメイン自然解離やAPCによる不活化 ・FVIII半減期は8~12時間, FVIIIa半減期は極めて短い 	<ul style="list-style-type: none"> ・なし ・半減期は27日
FIXa生成における律速段階	<ul style="list-style-type: none"> ・FVIIIa活性 	<ul style="list-style-type: none"> ・FIXa活性（推定）

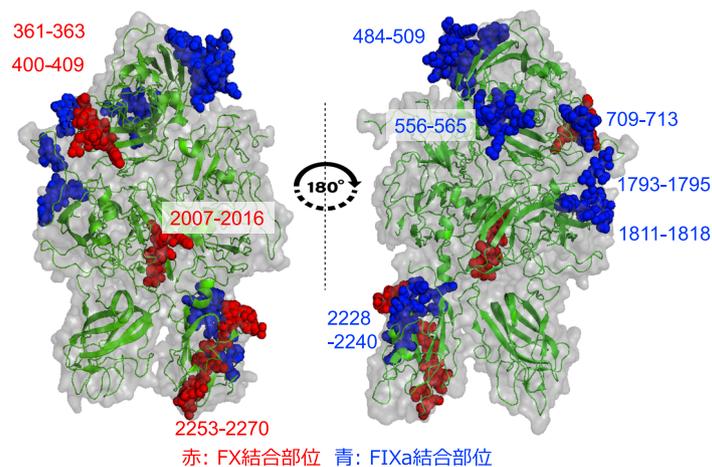


図4 FVIIIaにおけるFIXaおよびFXとの結合部位。

FVIIIaの立体構造模式図中にFIXa結合部位（青、右図の amino 酸番号）とFX結合部位（赤、左図の amino 酸番号）を示す。カラーはオンライン版参照。（奈良県立医科大学小児科，武山雅博作成）

一つのみを代替している。

④ FVIIIaは不活化されるがemicizumabは不活化されない。FVIIIaの不活化はA2ドメインが自然に解離していくことと、活性化プロテインC（APC）等による限定分解による2つの経路を介してなされる（後述）。

このようなFVIIIaとemicizumabの相違の結果、「内因性FIXa生成経路が、FVIIIa-dependentからFIXa-dependentに変更されている」とのLentingらの指摘²⁶⁾は、emicizumabの至適治療法を考えるうえで、またemicizumab投与中の患者血を用いた各種一般検査や包括的凝固検査結果の理解に役立つと思われる

る。このFIXa生成が律速段階であるという仮説は、FXI欠乏血漿を用いた検討において特に興味深い。FXI欠乏血漿にemicizumabを添加し、外因系トリガー（組織因子）と内因系トリガー（エラグ酸）の混合トリガー試薬を用いたトロンビン生成試験を実施したところ、emicizumabによる凝固能改善効果が認められた。この時、FVII欠乏血漿あるいはFIX欠乏血漿に抗FXI抗体を添加し、FVIIあるいはFIXの欠乏と同時にFXIも欠乏した血漿を用いたところ、emicizumabによるトロンビン生成改善効果は消失した。このことから、FXI欠乏血漿におけるemicizumabのFVIIIa機能代替活性発現において、FIXはもちろん必須であるが、かつFVIIa/TFによるFIXa生成が不可欠であることが示された²⁷⁾。

前述のFIX-Emicizumab-FX三量体での血漿中存在様式がemicizumabのFVIIIa機能代替活性発現に重要であるとの仮説で考えるならば、リン脂質膜結合能を有さないemicizumabは、三量体としてFIXおよびFXのGlaドメインを介して活性化血小板膜上に局在化し、FVIIa/TFあるいはFXIaによって活性化されたFIXaが近接しFIXと置き換わり、FIXa-Emicizumab-FX三量体が形成されFXaが生成されるといった機序が想定される。

2) 凝固制御機構（抗凝固反応と線溶反応）との関連

EmicizumabはFVIIIaのように不活化されることがないという点からは、この製剤が生理的抗凝固機能に抵抗性を示すのではないかという懸念を生じさせる。本邦初のAPC抵抗性FV分子異常症として報告されたFV_{Nara}は、FV活性が低値であるにもかかわらず重篤な深部静脈血栓症を若年性に発症させており、APC/プロテインS/FV複合体がFVaおよびFVIIIaを不活化する抗凝固機能の重要性を再認識させた²⁸⁾。したがって、emicizumabのFVIIIa機能代替活性がたとえFVIIIaと比べて弱いにしても、emicizumab存在下の抗凝固機能が適切に働くことは、emicizumabの安全性、つまり病的血栓を惹起する可能性を除外する上で重要である。

この点については、emicizumab存在下FVIII欠乏血漿のトロンビン生成試験において、APC/プロテインSによるトロンビン生成抑制効果は十分に認められていることが示され、PC経路によるFVa不活化が

十分に作用していることが推察された²⁹⁾。また、生理的抗凝固因子として重要なアンチトロンビンがFIXaおよびFXaに、さらにtissue factor pathway inhibitor (TFPI)がFXaに作用することから、これらに対するemicizumabの拮抗作用について検討された結果、emicizumabはアンチトロンビン、TFPIの作用を阻害しないことが示された³⁰⁾。

Emicizumabが線溶反応に及ぼす影響についても*in vitro*で検討された。抗FVIII抗体添加健常全血を用いたトロンボエラストメトリ (ROTEM) 測定時にtPA同時添加を行い、emicizumab存在下の線溶反応を評価したところ、tPAに対する止血栓安定性は健常全血（すなわちFVIII存在下）と同等であった³¹⁾。また、emicizumab存在下に形成されたフィブリン塊について走査型電子顕微鏡撮影と凝固波形解析で評価したところ、FVIII欠乏血漿におけるFVIII添加時とemicizumab添加時のフィブリン塊が質的に同等であることが示された³²⁾。

3) 等価FVIII活性をめぐる

Emicizumabの治療濃度域（血漿濃度として10～100 µg/mL）のFVIIIa機能代替活性は、FVIII換算でどの程度であろうか？この問いは、臨床的には極めて重要であり、FVIII製剤やバイパス止血製剤との併用時の薬効を議論する上でも土台になる問題である。Lentingらは、インヒビター保有患者を対象としたHAVEN-1の臨床試験結果で示されたemicizumab投与群の年間出血率³³⁾ 2.9が、無治療血友病A患者の自然歴における年間出血率との比較³⁴⁾において、中等症血友病A患者（2.0）と同等であることから、emicizumabの効果は中等症血友病Aレベル（FVIII:C～5.0 IU/dL）ではないかと推測した²⁶⁾。その後インヒビター非保有患者を対象に実施されたHAVEN-3試験では年間出血率は1.3～1.5であり、また年間出血ゼロを達成した患者の割合は55.6～60%であった³⁵⁾。自然歴の調査からはFVIII:Cが約12%以上で年間関節出血回数がゼロになるとの結果³⁴⁾を考慮すると、emicizumabのFVIII等価活性はおおよそ軽症血友病Aレベルと言ってよいのではないと思われる。

血漿を用いた各種の解析では、検査法や検査条件によって等価FVIII活性が異なる³⁶⁾。FVIII活性0.1 U/mLの上昇に必要なemicizumab濃度は、APTT

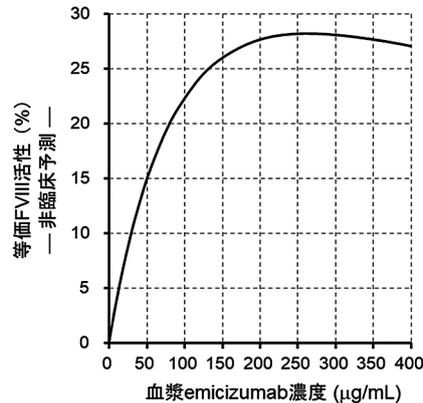


図5 FIX-Emicizumab-FX 三量体計算値に基づく emicizumab 濃度-等価 FVIII 活性 (予測) (文献 13 より一部改変して引用)。

に基づく解析では 4.0 nM 程度, TF 惹起トロンビン生成生成試験では 250 nM 程度, FXIa 惹起トロンビン生成試験では 500 nM 程度とされている¹³⁾。この計算でいくと, 治療濃度域上限に近い血漿濃度 100 μg/mL ≒ 685 nM) の emicizumab 添加は, それぞれのアッセイによる FVIII 活性換算で, それぞれ 1,710 U/dL, 27 U/dL, 14 U/dL となる。Nogami らが報告した PT 試薬と APTT 試薬を希釈混合したトリガー試薬を用いた凝固波形解析において, フィブリン濃度差を考慮した補正凝固速度最大値 (Adjusted |minI|) による換算³⁷⁾ では, emicizumab 100 μg/mL の添加の効果は FVIII 活性およそ 20 IU/dL 相当であった。

この問いに明確な回答を与えることは難しいが, 日本血栓止血学会の「血友病患者に対する止血治療ガイドライン: 2019 年補遺版」³⁸⁾ では, emicizumab 投与中の凝固機能は「FVIII 等価活性 15% と推測され」とし, その根拠として次の非臨床データをもとにした活性予測を挙げている。後天性血友病 A モデルのカニクイザルを用いた動物実験では, emicizumab 3 mg/kg 単回静脈内投与が遺伝子組換えブタ FVIII 10 U/kg 1 日 2 回静脈内投与と同程度の止血効果を有することを示した³⁹⁾。この結果から emicizumab の等価 FVIII 活性について 2 つのタイムポイントで比較し推定を試みたところ, emicizumab 61 μg/mL が FVIII 活性 25% に相当し (emicizumab 1 μg/mL あたり FVIII 活性が +0.4% 上昇), また emicizumab 36 μg/mL が 7.4% の FVIII に相当した

(emicizumab 1 μg/mL あたり FVIII 活性が +0.2% 上昇)。この 2 ポイントの emicizumab 濃度の平均値 48.5 μg/mL 付近における等価 FVIII 活性換算係数の平均値 0.3 を用いて, 48.5 μg/mL における等価 FVIII 活性を 14.8% (0.3×48.5) と推定した³⁹⁾。この推定に基づき, 図 3 で示した FIX-Emicizumab-FX の三量体の存在濃度のグラフに当てはめると, 血漿 emicizumab 濃度と等価 FVIII 活性予測値との関係は図 5 のようになり¹³⁾, emicizumab 10~100 μg/mL は等価 FVIII 活性 5~20% 相当となる。臨床試験の年間出血率から類推した「emicizumab の効果は軽症血友病 A 相当」という臨床的使用感に近いものと言える。

おわりに

Emicizumab が 2013 年に臨床試験として血友病 A 患者に初めて投与されてから 8 年, 2018 年に本邦で市販化されてから 3 年が経過し, emicizumab は血友病 A 患者における標準的治療の一つに位置付けられるようになった。その研究開発においては, 前例のない困難を乗り越えるべく, 多数の基礎研究の積み重ねがあった。基礎研究の多くは, emicizumab の研究開発チームからのものであるが, 患者診療を担当する臨床医の関心事に関連すると思われる基礎的側面を中心に取り上げた。実臨床におけるさまざまな課題を考えるにあたって, 基礎研究を振り返ることは有意義であり, 本稿がその一助になれば幸いである。

著者全員の利益相反 (COI) の開示 :

萩原建一 : 研究費 (受託研究, 共同研究, 寄付金等)
(中外製薬)

野上恵嗣 : 講演料・原稿料など (中外製薬, Sanofi, Bioverativ, Novo Nordisk, Shire), 臨床研究 (治験)
(中外製薬, Sanofi, Bioverativ, Novo Nordisk, Takeda, Fujimoto Seiyaku, KM Bio, Pfizer), 研究費
(受託研究, 共同研究, 寄付金等) (中外製薬, Sanofi, Bioverativ, Novo Nordisk, Takeda, Shire, Bayer, KM Bio, Sekisui Medical), 企業などが提供する寄附講座 (CSL, Takeda, 中外製薬)

文献

- 1) Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, et al.: A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med* **18**: 1570–1574, 2012.
- 2) Shima M, Hanabusa H, Taki M, et al.: Factor VIII-mimetic function of humanized bispecific antibody in hemophilia A. *N Engl J Med* **374**: 2044–2053, 2016.
- 3) 医薬品インタビューホーム「抗血液凝固第 IXa/X 因子ヒト化二重特異性モノクローナル抗体血液凝固第 VIII 因子機能代替製剤 エミシズマブ (遺伝子組換え注)」2019 年 10 月改訂 (第 5 版).
- 4) Liu Z, Stoll VS, Devries PJ, et al.: A potent erythropoietin-mimicking human antibody interacts through a novel binding site. *Blood* **110**: 2408–2413, 2007.
- 5) Mayorov AV, Amara N, Chang JY, et al.: Catalytic antibody degradation of ghrelin increases whole-body metabolic rate and reduces refeeding in fasting mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 17487–17492, 2008.
- 6) Bhaskar V, Goldfine ID, Bedinger DH, et al.: A fully human, allosteric monoclonal antibody that activates the insulin receptor and improves glycemic control. *Diabetes* **61**: 1263–1271, 2012.
- 7) 門脇則光 : 二重特異性抗体によるがん治療. *臨床血液* **59**: 1942–1947, 2018.
- 8) Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, et al.: The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* **111**: 1240–1247, 2008.
- 9) Saphire EO, Stanfield RL, Crispin MD, et al.: Contrasting IgG structures reveal extreme asymmetry and flexibility. *J Mol Biol* **319**: 9–18, 2002.
- 10) Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, et al.: Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens. *Thromb Haemost* **117**: 1348–1357, 2017.
- 11) Barg AA, Livnat T, Budnik I, et al.: Emicizumab treatment and monitoring in a paediatric cohort: Real-world data. *Br J Haematol* **191**: 282–290, 2020.
- 12) Hoffman M: Thrombosis and novel hemophilia therapies: The fine line between clotting and bleeding. *Blood Adv* **5**: 3736, 2021.
- 13) 北沢剛久, 嶋緑倫 : バイスペシフィック抗体を用いた血友病 A 治療への新たな挑戦. *Journal of Japanese Biochemical Society* **89**: 325–332, 2017.
- 14) Hoffman M, Monroe DM: A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* **85**: 958–965, 2001.
- 15) Nogami K, Lapan KA, Zhou Q, et al.: Identification of a factor Xa-interactive site within residues 337–372 of the factor VIII heavy chain. *J Biol Chem* **279**: 15763–15771, 2004.
- 16) Takeyama M, Nogami K, Sasai K, et al.: Contribution of factor VIII A2 domain residues 400–409 to a factor X-interactive site in the factor Xase complex. *Thromb Haemost* **118**: 830–841, 2018.
- 17) Takeyama M, Wakabayashi H, Fay PJ: Factor VIII light chain contains a binding site for factor X that contributes to the catalytic efficiency of factor Xase. *Biochemistry* **51**: 820–828, 2012.
- 18) Nogami K, Shima M, Hosokawa K, et al.: Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *J Biol Chem* **274**: 31000–31007, 1999.
- 19) Fay PJ, Scandella D: Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem* **274**: 29826–29830, 1999.
- 20) Fay PJ, Beattie T, Huggins CF, et al.: Factor VIIIa A2 subunit residues 558–565 represent a factor IXa interactive site. *J Biol Chem* **269**: 20522–20527, 1994.
- 21) Jenkins PV, Dill JL, Zhou Q, et al.: Contribution of factor VIIIa A2 and A3-C1-C2 subunits to the affinity for factor IXa in factor Xase. *J Biochemistry* **43**: 5094–5101, 2004.
- 22) Lenting PJ, van de Loo JW, Donath MJ, et al.: The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem* **271**: 1935–1940, 1996.
- 23) Soeda T, Nogami K, Nishiyama K, 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.
- 24) Spaargaren J, Giesen PL, Janssen MP, et al.: Binding of blood coagulation factor VIII and its light chain to phosphatidylserine/phosphatidylcholine bilayers as measured by ellipsometry. *Biochem J* **310**: 539–545, 1995.
- 25) Mertens K, Cupers R, Van Wijngaarden A, et al.: Binding of human blood-coagulation factors IXa and X to phospholipid membranes. *Biochem J* **223**: 599–605, 1984.
- 26) Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD: Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: How does it actually compare to factor VIII?. *Blood* **130**: 2463–2468, 2017.
- 27) Minami H, Nogami K, Yada K, et al.: Emicizumab, the bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, potentiates coagulation function in factor XI-deficient plasma in vitro. *J Thromb Haemost* **17**: 126–137, 2019.
- 28) Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, et al.: Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden. *Blood* **123**: 2420–2428, 2014.
- 29) Yada K, Nogami K, Shinozawa K, et al.: Emicizumab-mediated haemostatic function in patients with haemophilia A is down-regulated by activated protein C through inactivation of activated factor V. *Br J Haematol* **183**: 257–266, 2018.

- 30) Noguchi-Sasaki M, Soeda T, Ueyama A, et al.: Emicizumab, a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, does not interfere with antithrombin or TFPI activity in vitro. *TH Open* **2**: e96–e103, 2018.
- 31) Ogiwara K, Horiuchi H, Nogami K, et al.: Assessment of emicizumab-driven clot stability in hemophilia a model. *Blood* **132** (suppl 1): 2478, 2018.
- 32) Shimonishi N, Nogami K, Ogiwara K, et al.: Emicizumab improves the stability and structure of fibrin clot derived from factor VIII-deficient plasma, similar to the addition of factor VIII. *Haemophilia* **26**: e97–e105, 2020.
- 33) Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, et al.: Emicizumab prophylaxis in hemophilia A with inhibitors. *N Engl J Med* **377**: 809–818, 2017.
- 34) den Uijl I, Biesma D, Grobbee D, et al.: Outcome in moderate haemophilia. *Blood Transfus* **12**(Suppl 1): s330–s336, 2014.
- 35) Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, et al.: Emicizumab prophylaxis in patients who have hemophilia A without inhibitors. *N Engl J Med* **379**: 811–822, 2018.
- 36) Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto N, et al.: A modified thrombin generation assay to evaluate the plasma coagulation potential in the presence of emicizumab, the bispecific antibody to factors IXa/X. *Int J Hematol* **112**: 621–630, 2020.
- 37) Nogami K, Matsumoto T, Tabuchi Y, et al.: Modified clot waveform analysis to measure plasma coagulation potential in the presence of the anti-factor IXa/factor X bispecific antibody emicizumab. *J Thromb Haemost* **16**: 1078–1088, 2018.
- 38) 徳川多津子, 石黒靖, 大平勝美, 他 : 血友病患者に対する止血治療ガイドライン : 2019年補遺版. *血栓止血誌* **31**: 93–104, 2020.
- 39) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, et al.: Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): Hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J Thromb Haemost* **12**: 206–213, 2014.