

with vehicle or herpes simplex virus thymidine kinase cDNA/GCV therapy alone. These results, therefore, have demonstrated that sensitization of RCC tumor cells with depsiptide increases the efficacy of adenoviral vector-mediated suicide gene therapy.

COMMENT

It is well known that most intravenously infused adenoviruses accumulate in reticuloendothelial organs such as the liver and spleen.¹⁹ Luciferase-based *in vivo* imaging has demonstrated an exclusive real-time and quantitative adenoviral vector-mediated transgene expression in these organs (Fig. 1A). This observation suggests that an efficient tumor-targeting method is required for adenoviral vector-mediated gene therapy.

In the present study, we have demonstrated a selective tissue-targeting method using the catheter-based gene transfer technique. This transduction efficiency was augmented by the use of depsiptide in the rat RCC tumor model. Several studies have reported decreased CAR levels in human RCC cell lines,^{7,8,12,20} suggesting poor adenoviral vector infection of the tumor. The most recent reports have demonstrated that depsiptide increased CAR expression in tumors at the translation level, as well as the transcription level, in xenograft model systems.^{11,12} Intriguingly, transcriptional modulation of CAR expression in normal tissues was almost always considerably less sensitive than tumor cells to depsiptide (Fig. 2C), suggesting this effect might also be specific to malignant cells. Therefore, catheter-based tissue targeting in combination with the HDACi, depsiptide, might be an effective strategy for adenoviral vector-mediated cancer gene therapy.

We also addressed whether augmentation of adenoviral vector-mediated gene transduction using depsiptide could lead to enhanced tumor destruction in a rat model. Subcutaneous RCC tumor growth was significantly inhibited by intratumor adenoviral vector-thymidine kinase injection followed by GCV treatment. This antitumor effect was significantly enhanced after pretreatment with depsiptide. These data strongly support the view that sensitization of RCC tumor with depsiptide can

improve the efficacy of adenoviral vector-mediated suicide gene therapy.

Evidence has shown that bystander effects for tumor killing are abrogated in T-cell-deficient animals, even with adenoviral vector-mediated suicide gene therapy,²¹ suggesting that host cellular immune responses are necessary for tumor destruction. With this viewpoint, our allograft tumor model in an immune-competent animal might be advantageous to study the exact efficacy and safety of viral vectors for cancer gene therapy. Because HDACi can activate components of death receptor pathways, including FasL and TRAIL in tumor cells,^{22,23} the use of depsiptide could result in tumor cells becoming vulnerable to T-cell attack.

The clinical use of depsiptide when administered alone showed only partial responses in patients with solid cancers.^{24,25} However, moving the focus onto the modulation of tumor factors, targeting HDACis could provide great benefits, particularly for selective gene therapy against cancer.

This approach has some shortcomings that should be considered in the future. First, the safety of intra-arterial adenoviral vector delivery has not yet been established. This approach has been in disfavor, since the case of treatment-related death in which an adenoviral vector was injected into the hepatic artery.²⁶ This could have occurred in a specific patient treated for insufficient liver function itself, because a later preclinical study demonstrated that hepatic arterial injection of adenoviral vector caused no liver dysfunction.²⁷ In the latter study, the animals given intra-arterial adenoviral vector injection did not show any bodyweight loss or sickness during the observation period. Nevertheless, the safety should be fully addressed with any method of adenoviral vector delivery. Second, although depsiptide does result in an increase in CAR expression, it is unknown whether the increased CAR expression is the major mechanism for the enhanced transgene efficiency. Depsiptide might possibly amplify a variety of other gene expressions from the viral genome itself, which could independently enhance transgene efficiency. Using adenoviral vectors re-targeted to a CAR-independent pathway could deal with

Figure 2. Effect of depsiptide on transgene expression and CAR mRNA expression. **(A)** Enhanced luciferase expression in subcutaneous tumor. AVC2-luc (2.5×10^8 pfu) injected directly into subcutaneous tumor. Depsiptide (1 mg/kg) injected intravenously 24 hours before adenoviral vector transduction. Each experimental group consisted of 5 rats. One of two independent experiments with similar results shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Mann-Whitney *U* test. **(B)** Enhanced luciferase expression in orthotopic tumor of kidney. AVC2-luc (5×10^8 pfu) administered through left renal artery using catheter. Depsiptide injected intravenously 24 hours before transduction. Each experimental group consisted of 5 rats. One of two independent experiments with similar results shown. * $P < 0.05$, Mann-Whitney *U* test. **(C)** Tumor-selective upregulation of CAR mRNA with depsiptide treatment. CAR mRNA expression was examined in various rat tissues using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR 24 hours after exposure to depsiptide. Each experimental group consisted of 4 rats. * $P < 0.05$, Mann-Whitney *U* test. **(D)** Enhancement of suicide gene therapy by depsiptide treatment. AVC2-tk (1.5×10^9 pfu) injected into established subcutaneous tumor, followed by continuous intraperitoneal infusion of GCV (240 mg/kg/day) for 7 days with or without pretreatment with depsiptide (1 mg/kg, 24 hours before adenoviral vector injection). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Mann-Whitney *U* test. Each experimental group consisted of 5 rats.

this issue.²⁰ Third, it might be worthwhile to study other potential histone deacetylase inhibitors (eg, trichostatin A, sodium phenyl butyrate, and CHAP1), which were reported to increase CAR expression^{10,28} compared with depsi-peptide. Finally, we could not show the efficacy of adenoviral vector-mediated suicide gene therapy in the orthotopic model because of a lack of an objective monitoring tool of tumor growth. However, most other studies have also had the same limitation. Enhanced transgene expression by depsi-peptide in the subcutaneous model could be reproduced clearly in the orthotopic model in this study. We therefore expect that sensitization of tumor cells with depsi-peptide, coupled with site-specific adenoviral vector administration, would also increase the efficacy of suicide gene therapy in the orthotopic model. The use of *in vivo* magnetic resonance imaging²⁹ would be feasible to address this issue.

CONCLUSIONS

Tissue-targeted *in vivo* gene transfer, coupled with depsi-peptide, significantly enhanced adenoviral vector-mediated gene transduction into tumor sites. The catheter-based gene delivery mimics the clinical scenario exactly; therefore, the combinatorial use of depsi-peptide might be a useful adjunct to adenoviral vector-mediated suicide gene therapy against human RCC.

References

- Mulders P, Figlin R, deKernion JB, et al: Renal cell carcinoma: recent progress and future directions. *Cancer Res* 57: 5189-5195, 1997.
- Hutson TE, and Quinn DI: Cytokine therapy: a standard of care for metastatic renal cell carcinoma? *Clin Genitourin Cancer* 4: 181-186, 2005.
- Brody SL, and Crystal RG: Adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer. *Ann NY Acad Sci* 716: 90-100, 1994.
- Morrall N, O'Neal WK, Rice K, et al: Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons. *Hum Gene Ther* 13: 143-154, 2002.
- Chen WY, Bailey EC, McCune SL, et al: Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5798-5803, 1997.
- Marks PA, Richon VM, and Rifkind RA: Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* 92: 1210-1216, 2000.
- Kitazono M, Goldsmith ME, Aikou T, et al: Enhanced adenovirus transgene expression in malignant cells treated with the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Cancer Res* 61: 6328-6330, 2001.
- Goldsmith ME, Kitazono M, Fok P, et al: The histone deacetylase inhibitor FK228 preferentially enhances adenovirus transgene expression in malignant cells. *Clin Cancer Res* 9: 5394-5401, 2003.
- Okegawa T, Nutahara K, Fong RC, et al: Enhanced transgene expression in urothelial cancer gene therapy with histone deacetylase inhibitor. *J Urol* 174: 747-752, 2005.
- Taam K, Yamamoto Y, Nakajima A, et al: Impact of novel histone deacetylase inhibitors, CHAP31 and FR901228 (FK228), on adenovirus-mediated transgene expression. *J Gene Med* 6: 526-536, 2004.
- Goldsmith ME, Aguilu A, Steadman K, et al: The histone deacetylase inhibitor FK228 given prior to adenovirus infection can boost infection in melanoma xenograft model systems. *Mol Cancer Ther* 6: 496-505, 2007.
- Okegawa T, Sayre JR, Nutahara K, et al: A histone deacetylase inhibitor enhances adenoviral infection of renal cancer cells. *J Urol* 177: 1148-1156, 2007.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al: Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320-1323, 1997.
- Okada S, Hamazaki S, Ebina Y, et al: Nephrotoxicity and induction of the renal adenocarcinoma by ferric-nitrosylacetate (Fe-NTA) in rats, in Urushizaki I (Ed): *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins*. Amsterdam, Elsevier Science, 1983, pp 473-478.
- Okada T, Ramsey WJ, Munir J, et al: Efficient directional cloning of recombinant adenovirus vectors using DNA-protein complex. *Nucleic Acids Res* 26: 1947-1950, 1998.
- Kita Y, Li XK, Ohba M, et al: Adenoviral vectors containing the CTLA4G-gene inhibit chronic rejection in heterotopically transplanted rat tracheas. *Transplant Proc* 32: 2036-2037, 2000.
- Takahashi M, Hakamata Y, Takeuchi K, et al: Effects of different fixatives on beta-galactosidase activity. *J Histochem Cytochem* 51: 553-554, 2003.
- Fujishiro J, Takeda S, Takeno Y, et al: Gene transfer to the rat kidney *in vivo* and *ex vivo* using an adenovirus vector: factors influencing transgene expression. *Nephrol Dial Transplant* 20: 1385-1391, 2005.
- Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, et al: Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following *in vivo* administration. *Hum Gene Ther* 8: 37-44, 1997.
- Haviv YS, Blackwell JL, Kanerva A, et al: Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors. *Cancer Res* 62: 4273-4281, 2002.
- Colombo BM, Benedetti S, Ottolenghi S, et al: The "bystander effect": association of U-87 cell death with ganciclovir-mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice. *Hum Gene Ther* 6: 763-772, 1995.
- Kim HR, Kim EJ, Yang SH, et al: Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway. *Exp Mol Med* 38: 616-624, 2006.
- Vanoosten RL, Moore JM, Ludig AT, et al: Depsi-peptide (FR901228) enhances the cytotoxic activity of TRAIL by redistributing TRAIL receptor to membrane lipid rafts. *Mol Ther* 11: 542-552, 2005.
- Sandor V, Bakke SW, Robey RW, et al: Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsi-peptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin Cancer Res* 8: 718-728, 2002.
- Stadler WM, Margolin K, Ferber S, et al: A phase II study of depsi-peptide (FR901228) in refractory metastatic renal cell cancer. *Clin Genitourin Cancer* 5: 57-60, 2006.
- Marshall E: Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 17: 2244-2245, 1999.
- Okimoto T, Yahata H, Itou H, et al: Safety and growth suppressive effect of intra-hepatic arterial injection of AdCMV-p53 combined with CDDP to rat liver metastatic tumors. *J Exp Clin Cancer Res* 22: 399-406, 2003.
- Sachs MD, Ramamurthy M, Poel H, et al: Histone deacetylase inhibitors upregulate expression of the Coxsackie adenovirus receptor (CAR) preferentially in bladder cancer cells. *Cancer Gene Ther* 11: 477-486, 2004.
- Pulkkanen KJ, Parkkinen JJ, Laukkanen JM, et al: HSV-tk gene therapy for human renal cell carcinoma in nude mice. *Cancer Gene Ther* 8: 529-536, 2001.

◆ 原 著 ◆

血友病 B を引き起こす 4 種の新しいミスセンス変異

高 明 志*, 鈴木隆史*, 篠澤圭子*, 稲葉 浩*
辻川昭仁*, 天野景裕*, 新井盛大*, 福武勝幸*

我々は先に血友病 B 患者 20 例の凝固第 IX 因子 (FIX) 遺伝子を解析し, 18 種類の点変異を報告した (血栓止血誌 15:107-113, 2004)。その中で未報告の A28P, Q50K と L300P と, 新たに検出した P193L の計 4 種類の組換え変異体を作成し, これらが血友病 B を引き起こす原因であることを, 発現実験を用いて確認した。変異 FIX 遺伝子プラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクション後の培養上清の FIX 活性と抗原量は, 野生型 100% に対して, A28P が 12% と 58%, Q50K が 4% と 77%, P193L が 1% と 4%, L300P が <1% と 5%, であった。細胞溶解液の抗原量は同様に, A28P が 79%, Q50K が 67%, P193L が 92% で細胞内合成を認めたが, L300P は 20% と他と比較し減少していた。4 種類の未報告変異は, 実験結果と各々の血漿表現型とほぼ一致しており, 病因変異と同一した。

Key words: hemophilia B, factor IX gene (F9), missense mutation, site-directed mutagenesis, recombinant expression experiment

緒 言

血友病 B は, 血液凝固第 IX 因子 (FIX) の量的質的異常に基づく先天性出血性疾患である。本症は, X 連鎖性劣性遺伝形式をとり, その頻度は男児出生 2.5 万人あたり 1 人で, 先天性凝固異常症の中で最も発生頻度が高い血友病 A の約 1/5 に相当する¹⁾。症状は, 血友病 A と同様に関節内出血や筋肉内出血などの深部組織からの出血を特徴とする。重症度は, 血漿 FIX 活性 (FIX:C) と比較的相関し, FIX:C 値により, 1% 未満を重症型, 1~5% を中等症型, 5% 以上を軽症型に分類する²⁾。さらに, 活性値と抗原量に乖離を認める分子異常に基づく病型分類があり, FIX 抗原 (FIX:Ag) の存在様式から, FIX:Ag がほぼ正常量 (50% 以上) 存在するが比活性が低い Cross-Reacting Material (CRM) -positive, FIX:Ag の量的欠損である CRM-negative, FIX:Ag が低値を示す

CRM-reduced 症例に分類する³⁾。CRM-positive や CRM-reduced のように FIX:Ag がほぼ正常に存在し FIX:C が低下している分子異常症例は, 全体の症例数のおよそ 1/4 を占めると推定される⁴⁾⁵⁾。

FIX 遺伝子 (F9) は, X 染色体長腕の遠位部 (Xq26~q27) に存在する⁶⁾⁸⁾。全長約 34kb の F9 の cDNA は約 2.8kb と比較的小さなサイズで, 8 つのエクソンとの 7 つのイントロンにより構成されている⁹⁾¹¹⁾。FIX プレプロ前駆体は 461 アミノ酸残基で構成され, そのうち 46 アミノ酸残基からなるプレプロリーダー領域は, エクソン 1 と 2 の一部のヌクレオチドがコードしている⁶⁾¹¹⁾。FIX は主に肝細胞で合成され, 糖鎖付加, プロセッシング酵素によるプレプロ体の分離, γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメインの 12 個のグルタミン酸の γ -カルボキシル化, 64 番のアスパラギン酸残基の β -ヒドロキシル化などの翻訳後修飾を受け, シグ

* 東京医科大学 臨床検査医学科 [〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1]

Dept. of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University [6-7-1, Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan]
Tel: 03-3342-6111 Ext. 5086 Fax: 03-3340-5448 e-mail: takashi@tokyo-med.ac.jp

受付: 2007 年 1 月 9 日 受理: 2007 年 2 月 2 日

ナルペプチドを遊離し, 415 アミノ酸残基の成熟 FIX 蛋白質として血液中に分泌される^{10) 12)}. 血液中では, 正常濃度約 5 $\mu\text{g/ml}$ (0.09 μM), 分子量 57 kDa の一本鎖糖蛋白質として存在する^{6) 9) 16) 17)}.

FIX の蛋白質構造は, ビタミン K 依存性凝固因子特有のドメイン構造から構成されており, N 末端側から Gla, Epidermal growth factor (EGF)-1, EGF-2, 活性化ペプチド, プロテアーゼドメインとして機能する¹²⁾.

私達は先に日本人血友病 B 患者 20 例の第 IX 因子遺伝子を解析し, 18 種類の点変異 (ミスセンス変異 11 種類, ナンセンス変異 4 種類, スプライスサイト変異 3 種類) を検出し, 報告した¹⁸⁾. これまでに F9 の遺伝子異常は, 点変異, 欠失, 挿入などの変異が認められているが, 検出された変異の 90% 以上が点変異であり, さらにその表現型は多様性を示している⁵⁾. 現在までに, FIX の 461 個のアミノ酸残基中に 425 個のアミノ酸部位から変異が検出されており⁵⁾, 変異は偏ることなく F9 の広範囲から同定されてきた. 私達の遺伝子解析結果では, 5 種類の変異がデータベースにて既存の報告でない, 新しい変異であることを確認した¹⁸⁾. 今回, 私達は新たに未報告の変異を同定し, 先の未報告変異 4 種類のうちエクソン領域に点変異を有する 3 種類と併せ, 4 つの F9 変異体を作製し発現実験を行い, それぞれのタンパク発現様式と表現型について検討した.

方 法

1. 変異の検出

患者 F9 遺伝子解析法は, 佐々木らの報告に従った¹⁸⁾. すなわち, 患者白血球核画分からゲノム DNA を抽出し, F9 の 8 つのエクソンとそのスプライシング部位の各領域を PCR 法にて増幅した. 精製した PCR 産物を鋳型として, ダイレクトシーケンスにより塩基配列の決定を行った. 決定した塩基配列は, Yoshitake ら

の報告¹¹⁾と比較し, 検出した変異については, PCR-制限酵素法とダイレクトシーケンスにより健常人 50 人を解析し, その頻度を評価し, 変異かポリモルフィズムかどうかを判定した. 報告例の有無は, The Haemophilia B Mutation Database-version 13 にて確認した⁵⁾. なお, 遺伝子解析にあたっては, 患者ならびにその家族には文書による説明と同意を得た. 本研究で行った遺伝子解析, 変異体発現実験は, 東京医科大学医学研究倫理委員会, 組換え DNA 実験安全委員会の承認を得ている.

2. 野生型プラスミドの構築

遺伝子組換え型蛋白質発現実験のためのプラスミド作製には, 哺乳系動物細胞発現ベクター pcDNA3.1 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いた. F9 minigene DNA は, 約 0.3 kb のイントロン 1 を含む, 開始コドンから約 10bp 上流に存在する Kpn I 制限酵素部位から, 3' 非翻訳領域に存在する Apa I 制限酵素部位までの, 全長約 2 kb を準備した^{19) 20)}. 2 kb の DNA の両端をそれぞれの制限酵素で切断処理し, 同じ制限酵素処理した pcDNA3.1 ベクターのマルチプルクローニングサイトに挿入し, F9 野生型プラスミド (wild-type, WT) とした. ライゲーションには Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を用いた. 構築したプラスミドは, DH5 α コンピテントセル (Competent high E.Coli DH5 α ; TOYOBO Co. Ltd., Osaka, Japan) でトランスフォーメーションを行い, QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Sciences, Maryland, MD, USA) にて精製した. 精製したプラスミドは, ライゲーションにより連結した塩基配列部位, F9 領域, ベクター領域の各々の領域についての PCR 増幅産物を鋳型として, ダイレクトシーケンスを行い, 塩基配列を確認した. プラスミドベクターはトランスフェクションのために QIA Maxi prep Kit (QIAGEN) を用いて, 大量精製を行った.

Table 1 Sequence of the oligonucleotide primers for preparation of mutant F9 gene.

A28P-FWD	5'- tgt agt ttt gaa gaa cca cga gaa gtt ttt gaa -3'
A28P-REV	5'- ttc aaa aac ttc tgc tgg ttc ttc aaa act aca -3'
Q50K-FWD	5'- gta tgt tga tgg aga taa gtg tga gtc caa tcc -3'
Q50K-REV	5'- gga ttg gac tca cac tta tct cca tca aca tac -3'
P193L-FWD	5'- cca aac cag gtc aat tcc cct ggc agg ttg ttt tga atg -3'
P193L-REV	5'- cat tca aaa caa cct gcc agg gga att gac ctg gtt tgg -3'
L300P-FWD	5'- gaa tac acg aac atc ttc cgc aaa ttt gga tct ggc -3'
L300P-REV	5'- gcc aga tcc aaa ttt ggg gaa gat gtt cgt gta ttc -3'

Bold small letter means mutant base. FWD and REV indicate forward and reverse primer, respectively.

3. 変異体プラスミドの作製

変異体は、野生型を鋳型とした Site-direct mutagenesis kit (Invitrogen) を用い、手順に従って PCR を行った。目的の変異を挿入した 33 から 39mer の 5' および 3' プライマーは **Table 1** に示した。PCR は、puReTaq, Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) を用いた。得られた PCR 溶液は直接 DH5 α コンピテントセル (TOYOBO) ヘトランスフォーメーションし、F9 mutant minigene を組み込んだプラスミドベクターを得た。これらのプラスミドは QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) にて純化精製し、変異配列はダイレクトシーケンスにより確認した。変異部位を確認したプラスミドは、QIA Maxi prep (QIAGEN) を用い大量精製を行った。

4. リコンビナント FIX のトランスフェクション

野生型とそれぞれの変異体を、HEK293 細胞に一過性発現を行った²¹⁾。2 μ g のプラスミド DNA とリポフェクタミン試薬 (Invitrogen) を、室温で 15 分間反応させた。さらに、Plus 試薬を混ぜた Opti-MEM1 (Invitrogen) に、DNA-リポフェクタミンを反応させた後、その混合物を約 80-100% にコンフルエントにした HEK293 細胞にトランスフェクションし

た²²⁾。37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間反応させた後、HEK293 細胞は 10% FBS (Fatal bovine serum; JRH Biosciences, Lexena, KS, USA)、5 μ g/ml のビタミン K1 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) を含む 2ml の DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Invitrogen) にて置換し、48 時間後の培養上清と細胞を回収した。培養上清 (Conditioned medium) は 3,000 g で 5 分間遠心し、その上澄みを蛋白質測定に用いた。細胞は、トリプシン/EDTA (Invitrogen) にて剥がした後 PBS で洗浄し、500 μ l の細胞融解液 (50 mmol/l トリス塩酸 pH7.8, 150 mmol/l NaCl, 1% Nonidet P-40) に再浮遊させ、凍結融解法を行った。細胞残骸を除くために 12,000 g、5 分 4°C で遠心を行い、その上清を細胞溶解液 (Cell lysate) とした。

5. FIX 抗原量および活性の測定

FIX:C は自動血液凝固能測定装置 ACL-9000 (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy.) を用い、APTT 試薬 (IL-test; Instrumentation Laboratory) と FIX 欠乏血漿 (George King Bio-Medical Inc., Overlandpark, KS, USA) と正常ブール血漿 (George King) を用いた凝固一段法で測定した。FIX:Ag は 2 種類の抗体、Rabbit anti-human factor IX polyclonal antibody A0300

Table 2 Summary of the phenotypes and the results from expression study in 4 novel missense mutations.

Mutation	Location	Nucleotide changed	Plasma		Phenotype	Severity	Inhibitor	Culture medium		Cell lysate	
			FIX : C (%)	FIX : Ag (%)				FIX : C (%)	FIX : Ag (%)	FIX : Ag (%)	FIX : Ag (%)
A28P	exon2	g → c	<1	39	CRM reduced	severe	(-)	12	58	79	79
Q50K	exon4	c → a	7	16	CRM reduced	mild	(-)	4	77	67	67
P193L	exon6	t → c	<1	NA*	unknown	severe	(-)	1	4	92	92
L300P	exon8	t → c	<1	<1	CRM negative	severe	(-)	<1	5	20	20

*NA: not available

CRM positive is defined by Peake et al.³¹

(Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark), Goat anti-human factor IX peroxidase labeled whole IgG GAFIX-APHRP (Affinity Biologicals Inc., Hamilton, Ontario, Canada) を用いたサンドイッチ ELISA 法にて測定した²³⁾. 基質反応は 405nm 吸光度の測定をマイクロプレートリーダー (Titertek Multiskan MCC/340, MKII, Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd., Osaka, Japan) を用いた.

6. FIX 分子構造の解析

PDB (Protein Data Bank) の 1PFX と 1EDM を基に, RasMol と Swiss-Pdb Viewer の分子グラフィックスソフトを用いて FIX モデルを作図した (Fig. 2, 3).

結果および考察

1. 新しい変異の検出

FIX:C が 1% 未満であった新規の重症型患者の F9 解析を行い, エクソン 7 に新しいミスセンス変異 P193L (Pro193 (cct) → Leu (ccc)) を同定した. この未報告変異に対しては, ダイレクトシーケンシングによりその頻度を確認し, ポリモルフィズムではなく変異であることを確認した.

2. 野生型と変異体プラスミドの作製

FIX 野生型プラスミドは, 定法にて良好に作製し得た. 変異体は Site-direct mutagenesis 法で良好に作製でき, 本法は簡便かつ有用であった.

3. 組換え型蛋白質発現実験と患者表現型

野生型と 4 つの変異体を HEK293 細胞にトランスフェクションした 48 時間後の培養上清と細胞溶解液の FIX:C と FIX:Ag を測定した (Table 2, Fig. 1). それぞれの一過性発現実験は計 3 回, それぞれ独立して行った. 培養上清の野生型の FIX:Ag (n=8) は 132.6 ± 5.3 ng/ml, FIX:C (n=8) は $33.3 \pm 3.7\%$, Cell lysate の FIX:Ag (n=8) は 35.1 ± 2.7 ng/ml (それぞれ mean \pm SD) であった. それぞれの

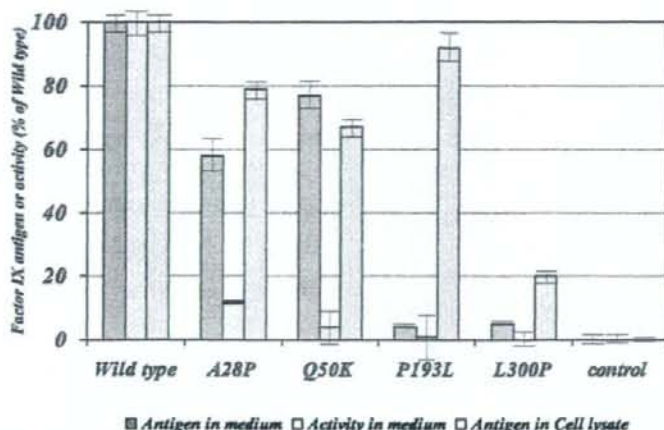


Fig. 1 The level of factor IX antigen (n=8) and activity in culture medium (n=8) and antigen level in cell lysate (n=3) after transfection with HEK 293 cells.

Bars represent mean percent of control (wild type) and the error bars indicate SD.

変異体の測定結果は野生型に対する比率 (mean \pm SD) で示した (Fig. 1).

① A28P

患者の FIX:C は 1% 未満で FIX:Ag は 39% であり、表現型は CRM-reduced であった。発現実験での A28P 変異体の培養上清の FIX:C は、野生型 100% に対して 12%、FIX:Ag は 58% であり、分子異常が考えられた。細胞溶解液の FIX:Ag は野生型の 79% あり、変異タンパクの細胞内合成が認められた。

A28P は、Gla ドメインに検出した新しい変異であるが、データベースには Ala28 におけるプロリン以外のアミノ酸置換例の報告もない⁵⁾。ビタミン K 依存性凝固因子間で Ala28 は保存性が高いが、これまでに第 VII 因子、第 X 因子およびプロテイン C の欠乏症における遺伝子解析例においても、Ala28 と同一性のあるアミノ酸での点変異の報告例はない⁵⁾。これらから、患者表現型が FIX:C 1% 未満であったことと、発現実験の培養上清中の FIX:C が 12% であったこと、両者の乖離について、類似例により推測することは困難であった。一方、FIX の Ala28 に隣接するアミノ酸においては、数例の報告があり、Gla である Glu27 でのミスセン

ス変異の E27K や E27D では CRM-positive の重症型を示しているが、Arg29 のミスセンス変異ではその多くの FIX:C がおよそ 20-47% と軽症型を示していた⁵⁾²⁴⁾。

Gla ドメインは Ca イオンを介してリン脂質膜への結合に重要な役割をするが、Ala28 は EGF-1 ドメインの連結にも重要な位置に存在する (Fig. 2)²⁵⁾²⁷⁾。Ala28 は他のビタミン K 依存性蛋白質と同一性が高かったことにより、FIX の特異的な機能を有するアミノ酸であるというよりも、構造上で重要なアミノ酸であると考えられた。したがって、このミスセンス変異は Gla ドメインの高次構造を不安定化させることにより、結果として機能低下をきたすと考えられた。発現実験の分泌上清に活性があり、生体内においては活性を示さないという差異については、純系ではある程度構造維持はされるが、生体内では抗原として存在するが Gla ドメイン自体の構造が破壊され機能を失うことが推測された²⁵⁾²⁶⁾。

② Q50K

Q50K の患者血漿中の FIX:C は 7%、FIX:Ag が 16% の CRM-reduced の軽症型であり、培養上清中の FIX:C と FIX:Ag はそれぞれ 4% と

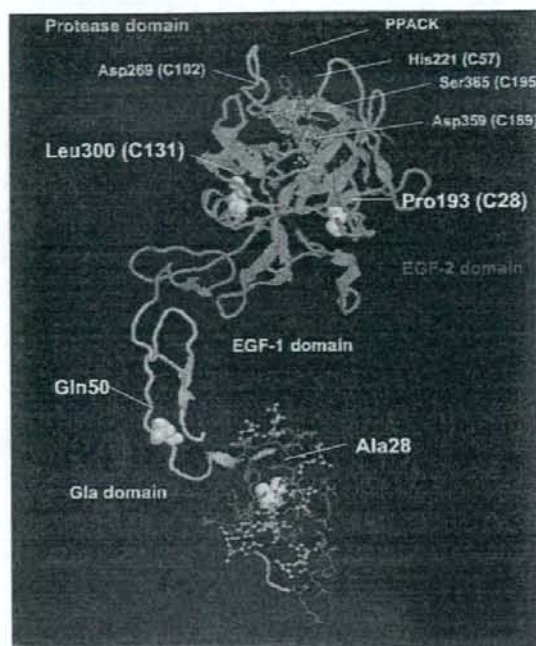
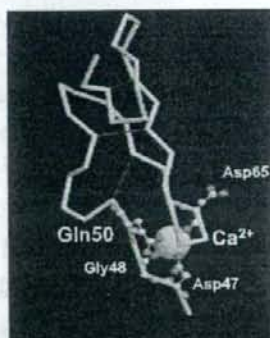


Fig. 2 Location of four FIX mutants with PDB:1PFX.

The location of four FIX mutants in the porcine FIXa molecule (PDB: 1PFX) is shown using RasMol. Amino acid residues of four mutants (Ala28, Gln50, Pro193, and Leu300) are indicated by yellow-spacefill. Main peptide chain is shown by cartoons. Gla domain is gray, and 12 γ -carboxyglutamic acid residues are described in magenta-ball and sticks. EGF-1 and -2 domains are pink and blue respectively. Protease domain is purple. The active triad [His221 (C57), Asp269 (C102), and Ser365 (C195)] are shown as sticks, which color of magenta, red, and magenta, respectively. S1 site [Asp359 (C189)] is shown as cyan-sticks. Ser384-Cys389 (C214-C220) are shown as brown-cartoons. 11 red dotted lines show S-S binding bonds.

A



B

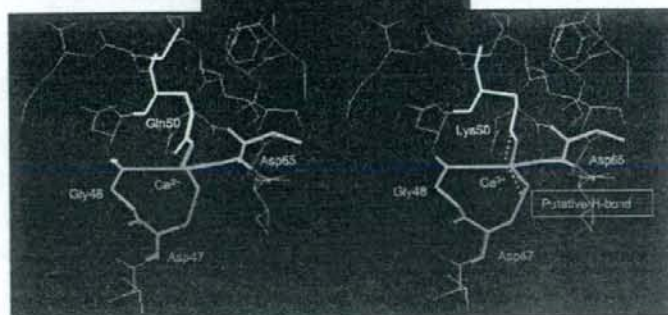


Fig. 3 A: Location of Gln50 in EGF-1 domain

The location of Gln50 in the EGF-1 of human FIXa molecule (PDB: 1EDM) is shown using RasMol. Four amino acid residues (Gln50, Asp47, Gly48, and Asp65) are binding to a Ca^{2+} ion. These amino acids are indicated as ball and sticks. Main peptide chain of EGF-1 domain is shown by backbone. Three purple lines show S-S binding bonds.

B: The conversion of Gln50 to Lys50 by Swiss-Pdb Viewer Ver.3.7.

It is inferred that a hydrogen bond was formed between Lys50 and Asp47.

77%で分子異常と考えられた。

Q50KはEGF-1ドメインのミスセンス変異である。データベースでは、Gln50のミスセンス変異はHisとProへの変異(FIX New London)が報告されている⁵⁾²¹⁾。一般にEGF-1ドメイン内で生じた報告例の変異の多くは軽症型を呈しているが、Proへのミスセンス変異はCRM-positiveの重症型、His置換での2例は軽症型と合い異なるものであった⁵⁾²¹⁾²⁸⁾。Proは α -helical 2次構造を破壊させる影響力が強く、さらにGln50が位置する領域も α -helical領域であることから、報告例のQ50Pはその大きな構造変化により構造自体が破壊され、活性を示さず、さらにFXIaへの結合をもその構造障害により阻害されていることから重症型を呈していることが推測される。

Raoらは、Gln50, Asp47, Gly48, Asp65が1分子のCa²⁺イオンと配位している事をEGF-1ドメイン結晶構造(PDB:1EDM)で明らかにした³⁰⁾。本変異がQ50Pと異なり、軽症型を呈したのは、Q50KとQ50PはともにCa²⁺結合能が失われ、さらに近傍の立体構造変化にも影響を与える事が推測されたが、さらにQ50Pに比べてその構造障害の影響は少ないことによりQ50Kは軽症であるということがその理由と考えられた。EGF-1ドメイン構造を基にGln50にLysの側鎖をつけかえてエネルギーを最小化し変異分子モデルを予測したところ、Lysの側鎖(CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)のアミノ基とAsp47の側鎖(CH₂-COOH)のカルボキシル基の間に新たに水素結合が形成された(Fig. 3)。このことは、近傍の立体構造変化にも影響を与える可能性を示したが、この水素結合が構造維持の一端を担った可能性も考えられる。

③ P193LとL300P

P193LとL300Pは、ともにFIXタンパクにおける最大かつ活性中心であるプロテアーゼドメイン内の変異であり、この部位の変異は多数で多彩な表現型を呈している⁵⁾。Pro193のアミ

ノ酸置換はデータベース上ではP193Sへのミスセンス変異1例が報告されているに過ぎない⁵⁾。Leu300のアミノ酸置換もL300Fへのミスセンス変異1例が報告されているが、詳細は不明である⁵⁾。P193Sの表現型はFIX:Cが3%、FIX:Agは17%のCRM-reducedの中等症型であるが、本症例であるP193Lの表現型はFIX:Cが1%未満の重症型であった。本患者の血漿中のFIX:Agは不明であるが、発現実験の結果では培養液中のFIX:CおよびFIX:Agはそれぞれ1%と4%と低下していた。本症例の血漿表現型は重症型ではあったが、臨床的には出血頻度は高くなかった。臨床的な重症度と発現実験結果は、ほぼ一致すると考えられ、P193Lの表現型は中等症であると推測された。一方、細胞内発現量は92%を示したことから、細胞内分泌されるものの高度の分泌障害を伴っているものと考えられた。

L300Pの患者表現型はFIX:CとFIX:Agはともに1%未満のCRM-negativeの重症型を示した。発現実験での培養液中のFIX:Cは1%未満、FIX:Agは5%と少ないながらもFIX:Agが認められたが、血漿表現型とほぼ一致した結果であった。細胞内発現量は、他の変異体と比べても格段と低く、わずか20%に過ぎず他の変異体に比べて細胞内合成能は低かった。このことからL300Pは合成障害を伴うことが推測された。

結 語

現在、The Haemophilia B Mutation Database-version 13では、2,891症例の血友病Bの遺伝子異常が登録されており、点変異が2,489例、30塩基以下の挿入や欠失が211例、大きな塩基サイズの挿入や欠失が91例報告されている⁵⁾。それらは962種類の遺伝子異常からなる。その中で、シグナルペプチドやプロ蛋白質を含むFIXの461アミノ酸残基には、561種類の点変異によるアミノ酸置換が検出されている⁵⁾³¹⁾。このことは、F9変異のデータは多くが集積さ

れてきたものの, 未だ新しい変異が検出され, すべての変異についてその病因が把握されたとはいえない。さらに患者から検出された変異については, その発現様式, 血液中での表現型や臨床症状との関連性について検討した *in vitro* での研究は基礎研究に比べるとむしろ少ない。変異体の発現実験はその変異が血友病 B の原因変異であることの最終的な確認として意義あるものと考えられた。

謝辞: F9cDNA および 0.3kb のイントロンを含む F9 minigene DNA は Dr.Katherine A. High (Division of Hematology in The Children's Hospital of Philadelphia, University of Pennsylvania) より供与された。また, 本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業「血友病の治療とその合併症の克服に関する研究」を用いて行った。

文 献

- 1) Furie B and Furie BC: The molecular basis of blood coagulation. *Cell* **53**: 505-518, 1988.
- 2) White GC 2nd, Rosendaal FR, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, Factor VIII and Factor IX Subcommittee: Definitions in Hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* **85**: 560, 2001.
- 3) Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briet E, Chan V, Ginter EK, Kraus EM, Ljung R, Mannucci PM, Nicolaidis K, Tuddenham EGD: Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* **4**: 313-344, 1993.
- 4) Roberts HR, Grizzle JE, McLester WD, Penick GD: Genetic variants of hemophilia B: detection by means of a specific PTC inhibitor. *J Clin Invest* **47**: 360-365, 1968.
- 5) Haemophilia B Mutation Database-version 13. <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>, 2004.
- 6) Kurachi K and Davie EW: Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6461-6464, 1982.
- 7) Chance PF, Dyer KA, Kurachi K, Yoshitake S, Ropers HH, Wieacker P, Gartner SM: Regional localization of the human factor IX gene by molecular hybridization. *Hum Genet* **65**: 207-208, 1983.
- 8) Camerino G, Grzeschik KH, Jaye M, De La Salle H, Tolstoshev P, Lecocq JP, Heilig R, Mandel JL: Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (hemophilia B locus). *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 498-502, 1984.
- 9) Jaye M, de la Salle H, Schamber F, Ballard A, Kohli V, Findeli A, Tolstoshev P, Lecocq JP: Isolation of a human anti-haemophilic factor IX cDNA clone using a unique 52-base synthetic oligonucleotide probe deduced from the amino acid sequence of bovine factor IX. *Nucleic Acids Res* **11**: 2325-2335, 1983.
- 10) Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG: The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. *EMBO J* **3**: 1053-1060, 1984.
- 11) Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K: Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* **24**: 3736-3750, 1985.
- 12) Mandel JL, Willard HF, Nussbaum RL, Davies KE, Romeo G: Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome. *Cytogenet Cell Genet* **49**: 107-128, 1988.
- 13) Galeffi P and Brownlee GG: The propeptide region of clotting factor IX is a signal for a vitamin K dependent carboxylase: evidence from protein engineering of amino acid -4. *Nucleic Acids Res* **15**: 9505-9513, 1987.
- 14) Kurachi K, Kurachi S, Furukawa M, Yao SN: Biology of factor IX. *Blood Coagul Fibrinolysis* **4**: 953-973, 1993.
- 15) Roberts HR: Molecular biology of hemophilia B. *Thromb Haemost* **70**: 1-9, 1993.
- 16) Choo KH, Gould KG, Rees DJ, Brownlee GG: Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. *Nature* **299**: 178-180, 1982.
- 17) Thompson AR: Structure, function, and molecular defects of factor IX. *Blood* **67**: 565-572, 1986.
- 18) 佐々木昭仁, 永泉圭子, 稲葉浩, 鈴木隆史, 新井盛夫, 福武勝幸: 日本人血友病 B 患者に認められた 18 種類の遺伝子変異. *血栓止血誌* **15**: 107-113, 2004.
- 19) Kurachi S, Hitomi Y, Midori F, Kurachi K: Role of intron I in expression of the human factor IX gene. *J Biol Chem* **270**: 5276-5281, 1995.
- 20) Hagstrom JN, Couto LB, Scallan C, Burton M, McClelland ML, Fields PA, Arruda VR, Herzog RW, High KA: Improved muscle-derived expression of human coagulation factor IX from a skeletal actin / CMV hybrid enhancer / promoter. *Blood* **95**: 2536-2542, 2000.
- 21) Lozier JN, Monroe DM, Stanfield-Oakley S, Lin S-W, Smith KJ, Roberts HR, High KA: Factor IX New London: Substitution of proline for glutamine at position 50 causes severe hemophilia B. *Blood* **75**: 1097-1104, 1990.
- 22) Lingenfelter SE and Berkner KL: Isolation of the human gamma-carboxylase and a gamma-carboxylase-associated protein from factor IX-expressing mammalian cells. *Biochemistry* **35**: 8234-8243, 1996.
- 23) Walter J, You Q, Hagstrom JN, Sands M, High KA: Successful expression of human factor IX following repeat administration of adenoviral vector in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3056-3061, 1996.
- 24) Chen SH, Thompson AR, Zhang M, Scott CR: Three point mutations in the factor IX genes of five hemophilia B patients. Identification strategy using localization by altered epitopes in their hemophilic proteins. *J Clin Invest* **84**: 113-118, 1989.
- 25) Nelsestuen GL and Suttie JW: The purification and properties of an abnormal prothrombin protein produced by dicumarol-treated cows. A comparison to normal prothrombin. *J Biol Chem* **247**: 8176-8182, 1972.
- 26) Freedman SJ, Blostein MD, Baleja JD, Jacobs M, Furie BC, Furie B: Identification of the phospholipid binding site in the

- vitamin K-dependent blood coagulation protein factor IX. *J Biol Chem* **271**: 16227-16236, 1996.
- 27) Jacobs M, Freedman SJ, Furie BC, Furie B: Membrane binding properties of the factor IX gamma-carboxyglutamic acid-rich domain prepared by chemical synthesis. *J Biol Chem* **269**: 25494-25501, 1994.
- 28) Saad S, Rowley G, Tagliavacca L, Green PM, Giannelli F: First report on UK database of haemophilia B mutations and pedigrees. UK Haemophilia Centres. *Thromb Haemost* **71**: 563-570, 1994.
- 29) Knobe KE, Persson KE, Sjorin E, Villoutreix BO, Stenflo J, Ljung RC: Functional analysis of the EGF-like domain mutations Pro55Ser and Pro55Leu, which cause mild hemophilia B. *J Thromb Haemost* **1**: 782-790, 2003.
- 30) Rao Z, Handford P, Mayhew M, Knott V, Brownlee GG, Stuart D: The structure of a Ca²⁺-binding epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions. *Cell* **82**: 131-142, 1995.
- 31) Giannelli F, Green PM, Sommer SS, Poon M, Ludwig M, Schwaab R, Reitsma PH, Goossens M, Yoshioka A, Figueiredo MS, Brownlee GG: Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions, 8th edition. *Nucleic Acids Res* **26**: 265-268, 1998.

Four novel missense mutations in factor IX gene were identified as causes of hemophilia B

Akeshi KOH^{*}, Takashi SUZUKI^{*}, Keiko SHINOZAWA^{*}, Hiroshi INABA^{*},
Akihito TSUJIKAWA^{*}, Kagehiro AMANO^{*}, Morio ARAI^{*}, Katsuyuki FUKUTAKE^{*}

Key words: hemophilia B, factor IX gene (*F9*), missense mutation, site-directed mutagenesis, recombinant expression experiment

Hemophilia B is the X-linked bleeding disorder caused by an absence or reduced activity of coagulation factor IX (FIX). A number of genetic defects have been shown in FIX gene and the most common type of mutation is point mutation. We identified 18 different point mutations in 20 Japanese subjects (Sasaki, A. et al: *J Jpn Thromb Hemost* **15**: 107-113, 2004.). Three missense mutations, A28P, Q50K, L300P have not been reported previously and furthermore we identified another novel point mutation, P193L recently. Above four single FIX mutant genes were packaged in mammalian plasmid. After transfection was performed, culture medium and cells were harvested to evaluate the expression of FIX mutant proteins and compared with wild type (wt). Cell expression studies revealed that the level of FIX:C (FIX:Ag) in culture medium on these mutants were A28P 12 (58)%, Q50K 4 (77)%, L300P 1 (4)% and P193L <1 (5)% of wt, respectively. An each FIX:Ag in cell lysate were 79%, 67%, 92% and 20% of wt, respectively. Finally we revealed these 4 novel point mutations in FIX gene identified as causes of hemophilia B.

◆原 著◆

わが国におけるインヒビター保有先天性血友病患者に 対するバイパス止血療法の現状

田中一郎^{*1}, 天野景裕^{*2,3}, 瀧 正志^{*2,4}, 岡 敏明^{*2,5}, 酒井道生^{*6},
白幡 聡^{*2,6}, 高田 昇^{*2,7}, 高松純樹^{*2,8}, 竹谷英之^{*2,9}, 花房秀次^{*2,10},
日笠 聡^{*2,11}, 福武勝幸^{*2,3}, 藤井輝久^{*7}, 松下 正^{*2,12}, 三間屋純一^{*2,13},
吉岡 章^{*1,14}, 嶋 緑倫^{*1,2,15}

わが国におけるインヒビター保有先天性血友病患者に対するバイパス止血療法の現状と問題点を
探る目的で、国内の代表的な血友病診療施設9施設にアンケート調査を行った。調査内容はインヒ
ビター治療薬の選択の他、バイパス止血薬の投与方法や保険適外使用、モニタリング検査、
副作用などであった。このうち、治療薬選択に関する設問では5 Bethesda 単位(BU)/ml 未満のロー
レスポンダーおよび現在5BU/ml 未満、5-10BU/ml、10BU/ml 超のハイレスポンダーの4つの場合
に分けて、それぞれ軽度出血、重度出血および手術時における薬剤選択について質問した。その結果、
5BU/ml 未満のローレスポンダーの軽度出血時および現在5BU/ml 未満のハイレスポンダーの重度
出血や手術時において、バイパス止血療法を選択するのか、インヒビター中和療法を選択するの
かで意見が分かれた。今後、わが国のガイドラインを作成するにあたり、これらの意見を集約して
いく必要がある。

Key words: hemophilia, inhibitor, bypassing agents, high-dose FVIII (IX) concentrates

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

Department of Pediatrics, Nara Medical University [840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8522, Japan]
Tel: 0744-29-8881 Fax: 0744-24-9222 e-mail: itanaka@nmu.office.ne.jp

*2 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会

Subcommittee of Hemophilia, Scientific Standardization Committee of The Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis

*3 東京医科大学臨床検査医学科

Department of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University

*4 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科

Department of Pediatrics, St. Marianna University, School of Medicine, Yokohama City Seibu Hospital

*5 札幌医科大学小児科

Department of Pediatrics, Sapporo Tokushukai Hospital

*6 産業医科大学小児科

Department of Pediatrics, University of Occupational and Environmental Health, Japan

*7 広島大学病院輸血部

Division of the Blood Transfusion Services, Hiroshima University Hospital

*8 名古屋大学医学部附属病院輸血部

Department of Transfusion Medicine, Nagoya University Hospital

*9 東京大学医学部研究所附属病院関節外科

Department of Joint Surgery, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

*10 荏荏病院血液科

Department of Hematology, Ogisho Hospital

*11 兵庫医科大学血液内科

Department of Hematology, Hyogo College of Medicine

*12 名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学

Department of Hematology and Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine

*13 静岡県立こども病院血液腫瘍科

Division of Hematology and Oncology, Shizuoka Children's Hospital

*14 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会担当理事

Senior Director of Subcommittee of Hemophilia, Scientific Standardization Committee of The Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis

*15 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会部長

Chairman of Subcommittee of Hemophilia, Scientific Standardization Committee of The Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis

受付日: 2007年6月22日, 受理日: 2007年8月13日

緒 言

先天性血友病A患者に第VIII因子製剤を反復して投与した結果、3.6-21%の患者に第VIII因子に対する同種抗体(以下、インヒビター)が発生する¹⁾²⁾。一方、第IX因子製剤を反復投与された先天性血友病B患者のうち、1.5-2.7%に抗第IX因子インヒビターが発生する³⁾⁴⁾。このうち、第VIII(IX)因子製剤を繰り返し投与してもインヒビターの上昇、いわゆる既往免疫反応(anamnestic response)がみられず、常に5Bethesda単位(BU)/ml未満であるものがローレスポンドー(low responder)と呼ばれ、一度でも5BU/mlを超えたものはハイレスポンドー(high responder)と分類されている⁵⁾。これらのインヒビター保有血友病患者の止血管理として、インヒビターが低力価の場合は高用量の第VIII(IX)因子製剤(high doses of factor VIII(IX) concentrates; HD FVIII(IX))によるインヒビター中和療法を選択する余地があるが、インヒビターが5BU/mlを超える高力価の場合は第VIII(IX)因子を迂回して止血をはかるバイパス止血療法が行われることが多い。しかし、インヒビター保有血友病患者の急性出血や手術時に中和療法を選択するのか、バイパス止血療法を選択するのかといった製剤選択の問題をはじめとするその治療法を選択においては、施設や医師によって異なっているのが現状である。また、現在、わが国で使用可能なバイパス製剤には遺伝子組換え活性型第VII因子(recombinant activated factor VII; rFVIIa)製剤と活性型プロトロンビン複合体製剤(activated prothrombin complex concentrates; aPCC)があるが、その選択基準についても一定の見解が得られていない。そこで、日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会ではガイドライン作成小委員会を組織し、インヒビター止血療法のためのガイドライン作成に着手することになった。作成にあたって、血友病専門医のオピニオンを得る目的で、わが国の代表的な血友病診療

施設を対象にアンケート調査を行い、インヒビター止血療法の現状と問題点を明らかにするとともに海外のガイドラインとの比較検討を行った。

調査方法

平成18年1月10日付けで日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会の部会員の所属する施設を中心にアンケートによる調査を依頼した。依頼した施設は国立病院機構福井病院リハビリテーション科、産業医科大学小児科、静岡県立こども病院血液腫瘍科、聖マリアンナ医科大学小児科、東京医科大学臨床検査医学、名古屋大学血液内科、奈良県立医科大学小児科、兵庫医科大学血液内科、広島大学輸血部の9施設であった(50音順)。アンケート内容は、①インヒビター治療製剤の選択、②バイパス製剤の投与量および投与回数、③rFVIIa製剤使用時のトラネキサム酸の併用、④rFVIIa製剤の持続輸注の経験、⑤バイパス製剤の定期輸注の経験、⑥10BU/ml未満の症例に対するaPCCの使用経験、⑦aPCCを4日以上連続で使用した経験、⑧バイパス療法のモニタリング検査、⑨バイパス製剤使用による副作用の経験、の9項目とした。このうち、①は軽度出血、重度出血もしくは手術時における製剤選択を現在のインヒビター力価(5BU/ml未満、5-10BU/ml、10BU/ml超)とインヒビターの反応性(ハイレスポンドー、ローレスポンドー)に分けて質問した。また、⑥⑦はわが国におけるaPCC使用時の保険診療上の制約(インヒビター力価が10BU/ml以上かつ連続3日以内の使用)に関する質問であったが、アンケート回収後の平成18年5月22日付けで10BU/ml以上の症例に限るという文言が削除された。なお、①②⑧での回答は複数選択可とした。

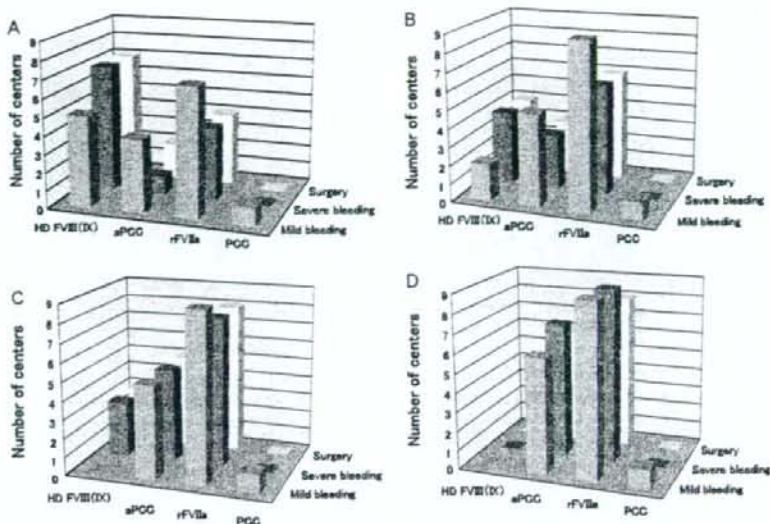


Fig. 1 Treatment choice for bleeding or surgery in patients with congenital hemophilia and inhibitors. These figures show the product choice for bleeding or surgery in patients with congenital hemophilia and inhibitors (multiple answers allowed). Most of the centers use high doses of FVIII (IX) concentrates for the treatment of severe bleeding or surgery in low responder patients with a current titer of <5 BU/ml, whereas they are divided over the product choice in mild bleeding (Fig. 1A). In high responders with a current titer of <5 BU/ml, bypassing agents are used in most of the centers for the treatment of mild bleeding, whereas four of the centers use high doses of FVIII (IX) concentrates for the treatment of severe bleeding or surgery (Fig. 1B). In high responders with a current titer of 5–10 BU/ml, all centers use bypassing agents for mild bleeding, although high doses of FVIII (IX) concentrates are used in three centers for the treatment of severe bleeding or surgery (Fig. 1C). Bypassing agents are used in all centers in high responders with a current titer of >10 BU/ml regardless of the severity of the bleed and the detail of the surgical intervention (Fig. 1D). aPCC: activated prothrombin complex concentrates, PCC: prothrombin complex concentrates, rFVIIa: recombinant activated factor VII, HD FVIII (IX): high doses of factor VIII (IX) concentrates

結 果

1. インヒビター治療製剤の選択 (Fig. 1)

1) 現在 5 BU/ml 未満のローレスボンダー
軽度出血の際に rFVIIa 製剤を選択すると回答した施設は 7 施設, aPCC は 4 施設, HD FVIII (IX) は 5 施設, プロトロンビン複合体製剤 (prothrombin complex concentrates; PCC) は 1 施設であった。一方, 重度出血時は HD FVIII (IX) が 7 施設, rFVIIa 製剤が 4 施設,

設, aPCC は 1 施設であり, 手術時は HD FVIII (IX) が 7 施設, rFVIIa 製剤が 4 施設, aPCC が 2 施設であった。軽度の出血では選択が分かれたが, 重度出血や手術では HD FVIII (IX) による中和療法を選択する施設が多かった (Fig. 1A)。なお, 回答のあった PCC は現在では製造中止となっている。

2) 現在 5 BU/ml 未満のハイレスボンダー

軽度出血の際に rFVIIa 製剤を選択すると回答した施設は 9 施設, aPCC は 5 施設, PCC は 1 施設, HD FVIII (IX) は 2 施設であり, バイ

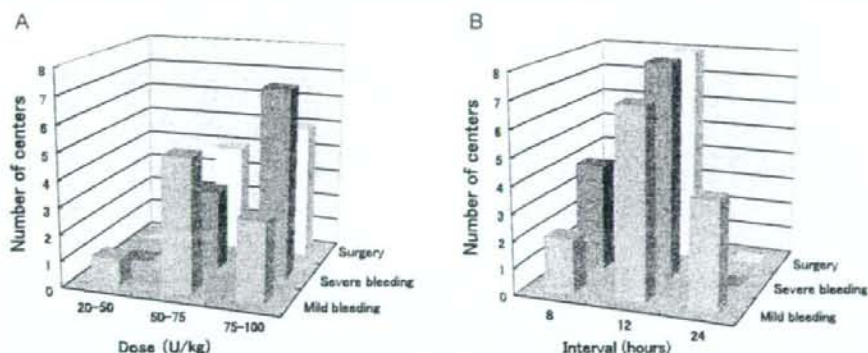


Fig. 2 Dosages and dose intervals of aPCC

Dosages and dose intervals of aPCC are shown in Fig. 2A and B, respectively (multiple answers allowed). These figures indicate that most of the centers use 50-75 U/kg of aPCC with dosing intervals every 12 or 24 hours in mild bleeding episodes, whereas 75-100 U/kg of aPCC is used with intervals every 8 or 12 hours in severe bleeding or surgery.

aPCC: activated prothrombin complex concentrates

バス製剤を選択する施設が多かった。一方、重度出血や手術時は rFVIIa 製剤が 6 施設、aPCC が 3 施設、HD FVIII (IX) が 4 施設と rFVIIa 製剤が最も多かったが、全体としては選択が分かれた (Fig. 1B)。

3) 現在 5-10 BU/ml のハイレソボンダー

軽度出血の際に rFVIIa 製剤を選択した施設が 9 施設、aPCC が 5 施設、PCC が 1 施設とすべてバイパス製剤であり、HD FVIII (IX) を選択した施設はなかった。一方、重度出血や手術時は rFVIIa 製剤が 8 施設、aPCC が 5 施設とバイパス製剤を選択する施設が多かったが、HD FVIII (IX) を選択した施設も 3 施設あった (Fig. 1C)。

4) 現在 10 BU/ml 超のハイレソボンダー

出血の程度や手術にかかわらず、全施設がバイパス製剤を選択しており、HD FVIII (IX) を選択した施設はなかった。軽度出血の際に rFVIIa 製剤を選択すると回答した施設は 9 施設、aPCC は 6 施設、PCC は 1 施設であった。一方、重度出血時は rFVIIa 製剤が 9 施設、aPCC が 7 施設で、手術時は rFVIIa 製剤が 8 施設、aPCC が 6 施設であった (Fig. 1D)。

2. aPCC の 1 回投与量および投与回数

軽度出血の際の aPCC の 1 回投与量は 50-75 U/kg が 5 施設、75-100 U/kg が 3 施設であり、投与回数は 1 日 2 回が 7 施設、1 日 1 回が 4 施設、1 日 3 回が 2 施設であった。重度出血時の 1 回投与量は 75-100 U/kg が 7 施設、50-75 U/kg が 3 施設であり、投与回数は 1 日 2 回が 8 施設、1 日 3 回が 4 施設であった。手術時の 1 回投与量は 75-100 U/kg が 5 施設、50-75 U/kg が 4 施設であり、投与回数は 1 日 2 回が 8 施設、1 日 3 回が 3 施設であった。傾向としては、軽度出血の際は 50-75 U/kg を 1 日 1-2 回、重度出血や手術時は 75-100 U/kg を 1 日 2-3 回投与する施設が多いという結果であった (Fig. 2A, B)。

3. rFVIIa 製剤の投与方法

rFVIIa 製剤は 90-120 μ g/kg を 2-3 時間毎に投与するという施設が最も多かった (軽度出血では 8 施設、重度出血や手術時では 6 施設)。また、重度出血や手術時に 1 回投与量を

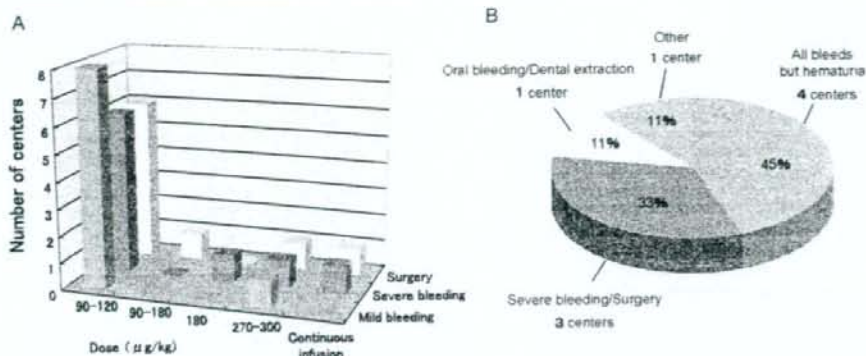


Fig. 3 Dosages of rFVIIa and concurrent use of tranexamic acid

Most of the centers use rFVIIa at an initial dose of 90-120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in any bleeding episode or surgery (Fig. 3A). All centers would consider the use of tranexamic acid together with rFVIIa not only for the treatment of oral bleeding/dental extraction and severe bleeding/surgery, but also for that of every bleed except hematuria (Fig. 3B).
rFVIIa: recombinant activated factor VII

180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ まで増量する施設が1施設あり、出血の重症度や手術にかかわらず、270-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の高用量を使用する施設が1施設あった。ほかに、重度出血や手術時に持続輸注を選択する施設も1施設あった (Fig. 3A)。投与回数は軽度出血時に1日2-3回の投与を行う施設が5施設、止血まで投与するという施設が1施設であった。一方、重度出血時は3施設が止血まで投与、1施設で3日間もしくはそれ以降も投与するという回答であった。手術時は2時間毎の投与を1-2日間行い、以後漸減するという施設が3施設あり、3日間もしくはそれ以降も投与するという施設が1施設であった。

rFVIIa 製剤使用時のトラネキサム酸の併用は全施設で行われていた。血尿以外のすべての出血に使用している施設が4施設、重度出血や手術時が3施設、口腔内出血や抜歯時が1施設、主治医や患者の判断で適宜使用すると回答が1施設であった (Fig. 3B)。トラネキサム酸の併用は海外でもrFVIIa 製剤の止血効果を補完するものとしての位置づけがなされており⁹⁾、わが国でも幅広く使用されていることが明らかとなった。トラネキサム酸の投与ルートについては症例に応じて経口もしくは点滴静注

を使用している施設が多かったが、静注の方法として、時間毎に点滴静注している施設が5施設、24時間持続して点滴静注している施設が3施設あった。

4. rFVIIa 製剤の持続輸注の経験

rFVIIa 製剤は生体内半減期が3.5時間と短いため、重度出血や手術時のように頻回の投与が必要になる場合は、rFVIIa 製剤の持続輸注が行われることがある^{7,9)}。今回のアンケートでも9施設中4施設で持続輸注が行われていた。実際、重度出血や手術時での使用が多く、持続輸注の有効性および安全性に関する評価はいずれも高かった。投与方法は90-120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のボース投与後に30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時}$ で持続輸注する施設が多かった (Table 1)。しかし、海外のガイドラインではrFVIIa 製剤の持続輸注については、いまだに一定の見解が得られていない^{9,11)}。

5. バイパス製剤の定期輸注の経験

9施設中6施設でバイパス製剤の定期輸注の

Table 1 Experience in continuous infusion of rFVIIa

Outline of cases	Dosage of rFVIIa	Efficacy	Adverse events
An intracranial bleed in a 2-year-old boy with hemophilia A and a high responding inhibitor	A bolus dose of 90 µg/kg, followed by 30 µg/kg/h	Effective	Salt deposition only
① Joint bleeds uncontrolled with a single dose of rFVIIa ② Post-synovectomy	15-30 µg/kg/h	Effective	None
A wound bleed after tracheotomy which occurred subsequent to a submanubular hematoma in a 46 year-old male with hemophilia A and a high responding inhibitor	A bolus dose of 120 µg/kg, followed by 30 µg/kg/h	Effective	None
Severe bleeding or surgery in hemophiliacs with inhibitors	A bolus dose of 90 µg/kg, followed by 30 µg/kg/h	Effective	None

rFVIIa: recombinant activated factor VII

Table 2 Experience in prophylactic treatment with bypassing agents

Outline of cases	Dosage	Efficacy	Adverse events
Chronic knee joint synovitis in a 4-year-old boy with hemophilia A and a high responding inhibitor	(a) PCC 50-100 U/kg three times weekly for 6 months	Partially effective	None
Recurrent hemarthroses after discontinuation of ITI treatment	① rFVIIa 90-120 µg/kg three times weekly ② aPCC or PCC 50U/kg	Effective	None
Patients who are undergoing rehabilitation in hospital	aPCC 50-70 U/kg three times weekly	Decrease in number of bleeding episodes	None
An 8-year-old boy with hemophilia B and a high responding inhibitor	① rFVIIa 170 µg/kg daily ② aPCC 70U/kg daily	① Ineffective ② Partially effective	None
Two hemophiliacs with high responding inhibitors	PCC three times weekly for more than 10 years	Improvement in QOL	Not stated
Recurrent bleeds in a patient with hemophilia B and a high responding inhibitor	aPCC 70 U/kg three times weekly	Partially effective	None

aPCC: activated prothrombin complex concentrates, PCC: prothrombin complex concentrates, rFVIIa: recombinant activated factor VII, ITI: immune tolerance induction, QOL: quality of life

経験があった。定期輸注を行った症例の多くは関節内出血などの反復出血例における出血予防が目的で、いずれも有害事象の出現はなかった。(a)PCCの投与量は50-100U/kgが多く、投与回数は週3回が5施設、連日が1施設であり、その効果はいずれも有効かやや有効という結果であった。一方、rFVIIa製剤は2施設で使用され、90-120 µg/kgを週3回、もしくは170 µg/kgを連日投与されていたが、前者は有効、後者は無効であった (Table 2)。コストの問題も含めて、定期輸注の方法については十分

なコンセンサスが得られておらず、今後のエビデンスや経験の蓄積が必要と思われる¹⁰⁾。

6. インヒビター力価が10BU/ml未満の症例に対するaPCCの使用経験

9施設中8施設でインヒビター力価が10BU/ml未満の症例でaPCCを使用した経験があった。このうち過半数の5施設ではrFVIIa製剤による止血が不十分な症例もしくは頻回のrFVIIa製剤の投与が困難な症例に使用されて

Table 3 Experience in using aPCC in patients with a titer of less than 10 BU/ml

Outline of cases	Dosage of aPCC	Efficacy	Adverse events
In the following circumstances, ① response to rFVIIa is not enough to achieve hemostasis ② frequent dosing of rFVIIa is difficult ③ bleeding episodes at night	Not stated	Similarly effective to the patients with a titer of more than 10 BU/ml	None
In the following circumstances, ① response to rFVIIa is not enough to achieve hemostasis ② frequent dosing of rFVIIa is difficult	70-100 U/kg	Generally effective	None
A 38-year-old male with hemophilia A and an inhibitor, who was reluctant to infuse rFVIIa repeatedly, and often failed to respond to rFVIIa	70 U/kg twice daily	Effective	None
Recurrent joint or muscle bleeds unresponsive to rFVIIa in 3 hemophiliacs with inhibitors	50U/kg once or twice daily	Mostly effective except for a case of rebleeding	None
① An oral bleed unresponsive to rFVIIa in a young patient with hemophilia and an inhibitor ② Muscle or oral bleeds in an elderly patient with acquired hemophilia	50 U/kg twice daily for 2 days	Effective	None
① Bleeding episodes which occurred when rFVIIa was unavailable in low responder patients ② Prophylaxis in high responder patients	① 70-100U/kg twice or three times daily ② 50-70 U/kg three times weekly	Effective	None
Knee joint bleeds in a 9-year-old boy with hemophilia B and a high responding inhibitor	Not stated	Sometimes effective	None
Joint bleeds in hemophiliacs with a titer of 5-10 BU/ml	75-100 U/kg twice daily for 3 days	Effective	None

aPCC: activated prothrombin complex concentrates, rFVIIa: recombinant activated factor VII, BU: Bethesda units

いた。結果は概ね有効であり、安全性にも問題はなかったが、1施設で再出血例ありとのコメントがあった (Table 3)。

7. 4日以上連続でaPCCを使用した経験

aPCCを使用する際の保険診療上の制約のうち、インヒビター力価が10BU/ml以上という文言は平成18年5月に削除されたが、連続3日以内の使用という制約は依然存在する。しかし、現実にはrFVIIa製剤不応例で重篤な出血の場合、aPCCを4日以上連続して使用せざるをえないケースが存在するのも事実である。実際、アンケートの結果でも、9施設中7施設で4日以上の使用経験があった。症例の多く

は重篤な出血や反復出血、手術例などで、投与期間の記述の明らかな4施設のうち14日間が最長であった。有効性および安全性とも概ね良好であったが、1施設で7-10日間使用した後に止血効果が消失した症例を、別の1施設で300-600U/kg/日の大量投与時にDICが発症した症例の記載があった (Table 4)。欧米では当然このような制約はなく、わが国の診療現場において、製剤の選択条件を複雑化させている要因の一つとなっている。

8. バイパス止血療法のモニタリング検査

バイパス止血療法では、その止血効果をモニタリングする最適な検査が未だ確立されていな

Table 4 Experience in prolonged use of aPCC for more than four days

Outline of cases	Dosage of aPCC	Efficacy	Adverse events
An intracranial bleed which occurred when rFVIIa was not available in a 2-year-old boy with hemophilia B and a high responding inhibitor	300-600U/kg daily	Effective	DIC
Post-synovectomy	50-100U/kg daily for 10 days	Effective	None
Recurrent joint bleeds in a patient with hemophilia A and a high responding inhibitor	60-120U/kg daily for 4-14 days	Effective or partially effective	None
① A 38-year-old male with hemophilia A and an inhibitor ② A patient with acquired hemophilia	140U/kg daily	Effective	None
Knee joint bleeds in a 9-year-old boy with hemophilia B and a high responding inhibitor	70-100U/kg daily	Sometimes effective	None
A muscle bleed in a patient with hemophilia and an inhibitor, who needed a blood transfusion	75-150U/kg daily for 6 days	Effective	None
① A retroperitoneal hematoma in a patient with hemophilia A and an inhibitor ② Surgical procedures in a patient with acquired hemophilia	70-200U/kg daily for 7-10 days	Disappearance of hemostatic effect	None

aPCC : activated prothrombin complex concentrates, DIC : disseminated intravascular coagulation

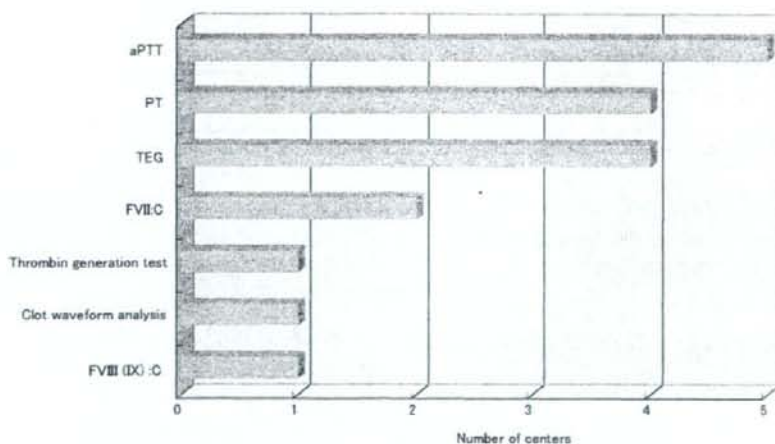


Fig. 4 Monitoring tests for the treatment with bypassing agents

Monitoring tests for the treatment with bypassing agents are shown (multiple answers allowed). PT, aPTT and/or TEG are often used for monitoring. Two centers use FVII : C assay for monitoring rFVIIa treatment. Thrombin generation test and clot waveform analysis are used in one of the centers. aPTT : activated partial thromboplastin time, PT : prothrombin time, TEG : thromboelastography, rFVIIa : recombinant activated factor VII, FVII : C : factor VII activity, FVIII (IX) : C : factor VIII (IX) activity

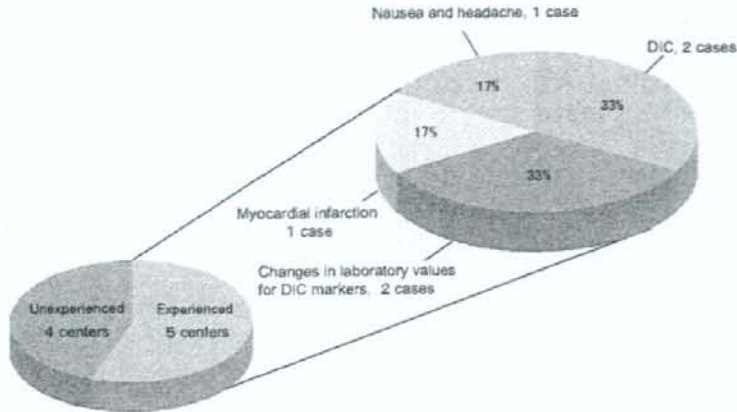


Fig. 5 Adverse effects from the treatment with bypassing agents

Six adverse events were reported in five centers. An event of acute myocardial infarction, two events of DIC, and two events of changes in laboratory data for DIC markers resulted from the treatment with aPCC, whereas an event of nausea and headache resulted from the treatment with PCC. In contrast, no adverse events were observed with rFVIIa treatment. From their comments, the event of DIC and the changes in laboratory data for DIC markers might be caused by massive use and prolonged use of bypassing agents, respectively.

aPCC : activated prothrombin complex concentrates, PCC : prothrombin complex concentrates, rFVIIa : recombinant activated factor VII, DIC : disseminated intravascular coagulation

い¹⁰⁾。アンケート結果では活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time ; aPTT) を用いる施設が5施設, プロトロンビン時間 (prothrombin time ; PT), トロンボエラストグラフィ (thromboelastography ; TEG) を用いる施設がそれぞれ4施設, rFVIIa製剤の使用時は第VII因子活性を測定する施設が2施設あった。しかし, これらの検査は中和療法時の第VIII (IX) 因子活性によるモニタリングと比べると, 止血効果を適正に反映したものとはいえない。一部の施設で行われている凝固波形解析やトロンビン生成試験はより確実に止血状況を反映する検査として期待されているが, 一般的ではない上に方法論もまだ確立されたものがない (Fig. 4)。

9. バイパス製剤に関する副作用の経験

バイパス止血療法の副作用は5施設から6

件の回答があった。このうち, DIC2件, DICマーカーの変動2件および心筋梗塞1件はaPCC使用例であり, 嘔気・頭痛の1件はPCC使用例であった。なお, DICおよびDICマーカーの変動の各1件はそれぞれaPCCの大量投与もしくは長期使用時のものであった。一方, rFVIIa製剤に関する副作用の回答はなかった (Fig. 5)。

考案

海外におけるインヒビター止血療法のガイドラインのうち, カナダのThe Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada (AHCDC)⁹⁾, イタリアのThe Italian Association of Haemophilia Centres (AICE)⁹⁾, 英国のThe UK Haemophilia Centre Doctors' Organization (UKHCDO)¹⁰⁾ およびオーストラリアのAustralian Health Ministers' Advisory Council