

usefulness of primary prophylaxis based on strong evidence [8].

However, difficulty in venous access in infants, the hesitancy for venipuncture in infants in a non-bleeding condition, the potential increase in the total dose, and a lack of established guidelines for this therapy (such as appropriate time to initiate, optimal dosing and infusion protocols), and the lack of a standardized method to evaluate the prevention of arthropathy are main reasons which primary prophylaxis for patients with severe haemophilia has not spread in Japan.

Geraghty *et al.* conducted a questionnaire survey in 2003 to determine the status of replacement therapy at 147 institutions from 20 countries. They reported that 19% of patients had started prophylactic therapy either before the age of 2 years or before the occurrence of a second joint haemorrhage. Their survey also indicated that the spread of this therapy varied greatly among different countries [9].

In a survey conducted in 2001 by the Japan Society on Thrombosis and Hemostasis [10], only one of the 11 major institutions reported that they had introduced primary prophylaxis in practice. However, since then, the number of institutions adopting primary prophylaxis has been increasing gradually in Japan [11–13].

In this study, we conducted a questionnaire survey to clarify the present status of prophylactic therapy for patients with haemophilia and to identify the issues associated with this therapy in Japan.

Materials and methods

The January 2006 survey questionnaires were distributed to doctors who participated in the Fourth Seminar on Regular Replacement Therapy (4 March 2006). They belong to 48 Japanese institutions engaged in the care of haemophilic patients. The three-page questionnaires requested answers to questions about haemophilia-treatment topics, including the status of prophylactic therapy, the age of patients at the initiation of therapy, problems regarding the early initiation or continuation of prophylactic therapy, and the future prospects for patients currently receiving prophylaxis.

Responses were collected until the end of February 2006 and were analysed divided into haemophilia type A and B, disease severity and age group of patients described below. For this survey, disease severity was classified into severe (<1%), moderate (1–5%) and mild (>5%) based on baseline factor VIII/IX levels. Furthermore, the patients were categorized into five age groups, that is under

2, 2–5, 6–14, 15–19 years and more than 20 years of age.

Results

Number of institutions and patients collected in this survey

The answers were obtained from a total of 48 institutions including 42 paediatrics, nine internal medicines and two other departments.

The names of the participating institutions, departments and names of the doctors who answered to the questionnaire are shown in Table 1.

Data from 1540 patients were collected, including 1267 with haemophilia A in whom 936 (74%) were severe, 175 (14%) were moderate and 156 (12%) were mild. On the other hand, 273 patients were with haemophilia B in whom 195 (71%) were severe, 48 (18%) were moderate and 30 (11%) were mild.

Status of replacement therapy categorized by disease type, severity and patients' age

The percentage of patients with haemophilia A treated by prophylaxis was 23% (27% of severe patients; 17% of moderate patients; 1% of mild patients), and 17% of haemophilia B patients were under prophylaxis (18% severe; 19% moderate; 3% mild), as shown in Table 2.

The percentage of patients with haemophilia A and B treated by prophylaxis was 17% and 25% under 2 years of age, 41% and 43% between the age of 2 and 5 years, 44% and 42% between the age of 6 and 14 years, 31% and 4% between the age of 15 and 19 years, and 12% and 9% more than 20 years respectively.

Initiation and continuation of prophylaxis

Ages at the initiation of prophylaxis in patients with severe haemophilia A were under 2 years in 24%, 2–5 years in 31%, 6–14 years in 26% and more than 15 years in 19% respectively. On the other hand, these ages in patients with severe haemophilia B were 29%, 24%, 24% and 23% respectively. Approximately, half of the patients had started prophylaxis before their entry into primary school (Fig. 1).

Some issues associated with early initiation of prophylaxis were pointed out the problems associated with peripheral venous punctures and/or management of implantable central venous lines, poor understanding of the therapy by the caregivers, and the time

Table 1. Participating investigators and institutions.

Name	Department	Hospital
Toshiaki Oka	Department of Pediatrics	Sapporo Tokushukai Medical Center
Nobuhiro Suzuki	Department of Pediatrics	Sapporo Medical University
Susumu Iizuka	Department of Pediatrics	National Hospital Organization Hokkaido Cancer Center
Junichi Kitazawa	Department of Pediatrics	Kuroishi General Hospital
Zeko Suzuki	Department of Pediatrics	Morioka Children's Hospital
Norio Ninomiya	Department of Pediatrics	Jusendo General Hospital
Toshihiro Ito	Department of Internal Medicine	Sendai Medical Center
Toshiharu Matsui	Department of Pediatrics	Nagaoka Chuo General Hospital
Takashi Kanazawa	Department of Pediatrics	Gunma University
Hideki Uchiyumi	Third Department of Internal Medicine	Gunma University
Akira Shimada	Division of Hematology and Oncology	Gunma Children's Medical Center
Kazuko Kudo	Department of Pediatrics	Ibaraki Children's Hospital
Masahiro Kikuchi	Department of Pediatrics	Hitachi General Hospital
Atsuko Ono	Department of Pediatrics	Ogawa Red Cross Hospital
Akira Kikuchi	Division of Hematology and Oncology	Saitama Children's Medical Center
Shiro Tsuchiya	Department of Pediatrics	Soka Municipal hospital
Shozo Kotani	Department of Internal Medicine	Soka Municipal hospital
Setsuo Ota	Department of Pediatrics	Teikyo University Chiba Medical Center
Kentaro Okii	Department of Pediatrics	Chiba University Hospital
Katsuyoshi Koh	Department of Pediatrics	The University Tokyo Hospital
Koji Fujisawa	Department of Pediatrics	The Jikei University School of Medicine
Yasutaka Hoshi	Department of Transfusion Service	The Jikei University School of Medicine
Hideji Hanabusa	Department of Hematology	Ogikubo Hospital
Kagehiro Amano	Department of Laboratory medicine	Tokyo Medical University Hospital
Michiko Kajiwara	Department of Pediatrics	Tokyo Medical and Dental University Hospital Faculty of Medicine
Yoko Kato	Department of Pediatrics	The Jikei University, Daisan Hospital
Naoko Ishitoya	Department of Pediatrics	Ishitoya Pediatrics Clinic
Takashi Kaneko	Division of Hematology and Oncology	Kiyose Children's Hospital
Masashi Taki, Chiai Ohi	Department of Pediatrics	St. Marianna University School of Medicine
Eizaburo Ishii	Division of Hematology and Oncology	Nagano Children's Hospital
Michiaki Koike	Department of Hematology	Juntendo University, Shizuoka Hospital
Makoto Yazaki	Department of Pediatrics	Nagoya City Higashi Municipal Hospital
Koji Kato	Department of Pediatric Hematology/Oncology	Japanese Red Cross Nagoya First Hospital
Yutaka Saikawa	Department of Pediatrics	Kanazawa University Hospital
Shuhei Hayashi	Department of Pediatrics	Hayashi Children's Clinic
Koji Matsuzaki	Department of Pediatrics	Suita Municipal Hospital
Park Young-Dong	Pediatric Hematology & Oncology	Osaka City General Hospital
Ritsuko Miyashita	Department of Pediatrics	Izumotsu Municipal Hospital
Seiji Kinoshita	Department of Pediatrics	Higashiosaka City General Hospital
Yusuke Miyata	Hematology-Immunology Center	Ishinkai Yao General Hospital
Motoo Ueda	Department of Internal Medicine	Ueda Clinic
Kazushige Ikeda	Department of Pediatrics	Saiseikai Hyogo Hospital
Satoshi Hikasa	Department of Internal Medicine Division of Hematology	Hyogo College of Medicine
Yoshitoshi Otsuka	Department of Pediatrics	Hyogo College of Medicine
Ikuya Usami	Department of Pediatrics	Kobe City General Hospital
Yoshiyuki Kosaka	Division of Hematology and Oncology	Hyogo Prefectural Kobe Children's Hospital
Midori Shima	Department of Pediatrics	Nara Medical University
Teruhisa Fujii	Transfusion Medicine	Hiroshima University Hospital
Asayuki Iwai	Department of Pediatrics	Kagawa Children's Hospital
Hisamichi Tauchi	Department of Pediatrics	Ehime University
Takaaki Hato	Transfusion Medicine	Ehime University
Naoko Nakano	Department of Pediatrics	Ehime Prefectural Imabari Hospital
Akira Shirahata	Department of Pediatrics	University of Occupational and Environmental Health
Michio Sakai		

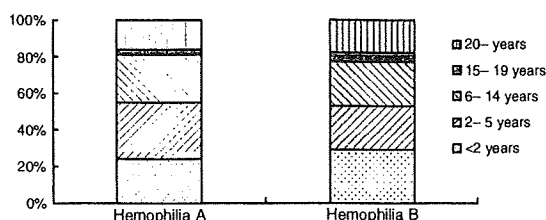


Fig. 1. Age at the initiation of prophylaxis in patients with severe haemophilia A and B.

constraints associated with hospital visits for prophylaxis in patients who were not under home treatment. Issues addressed regarding the continuation of prophylaxis were unknown factors with respect to inhibitor risk, psychological anxiety in the paediatric patients, as well as the issues related to the initiation of the treatment.

Answers to the question regarding the future status of replacement therapy in patients currently receiving prophylaxis were unknown in 16 (43%), continuation of prophylaxis in 13 (35%) and switch to on demand treatment in eight (22%) of responded 37 participants who represent each institutions respectively.

Discussion

This survey covered 1540 of about 5000 haemophilic patients who are living in Japan. As mentioned above prophylaxis has been carried out in 23% and 16% in patients with haemophilia A and haemophilia B surveyed in this study respectively. These data may be more positive for prophylactic therapy because

participants in this seminar are interested in this therapy. The prevalence obtained in this study was very close to the corresponding percentages of 21% and 20% reported by the National Survey on Blood Coagulation Abnormality conducted in 2003 [14], suggesting that the status of this practice has not changed drastically in the recent 3 years. The percentage of starting prophylaxis under 2 years of age, which means primary prophylaxis, was 22% in Japan, which was markedly lower compared to Sweden (73%), but similar to UK (28%) and Canada (27%) [9]. The results of this survey also revealed that about half of the patients received prophylaxis during the age of 2–14 years, which means secondary prophylaxis is widely spread in the age group in Japan.

Prophylaxis may become more common if venous access issues are resolved, guidelines regarding time of initiation or continuation of the therapy are more widely available, and caregivers are educated on the therapy. Concerning on the future prospects for patients currently receiving prophylaxis, approximately half of the participants answered unknown, because it may primarily depends on the patient’s request. A meta-analysis of data from prospective studies to define clearly the indications, optimal time of initiation, and recommended protocol for prophylaxis, as well as addressing the issues relating to inhibitor development, may help treaters in making informed decisions, based on the quality of life of patients and the pharmacoeconomic implications of such a practice. The ‘Prospective study of regular replacement therapy with a coagulation factor preparation in infants with severe hemo-

Table 2. Prophylaxis classified by the severity and age distribution of haemophilia A and haemophilia B.

	Severe			Moderate			Mild			Total		
	No. patients	No. patients on prophylaxis	%	No. patients	No. patients on prophylaxis	%	No. patients	No. patients on prophylaxis	%	No. patients	No. patients on prophylaxis	%
Haemophilia A (years)												
<2	18	4	22	5	0	0	1	0	0	24	4	17
2–5	106	47	44	16	6	38	8	0	0	130	53	41
6–14	160	82	51	23	11	48	28	0	0	211	93	44
15–19	91	38	42	32	7	22	21	0	0	144	45	31
20	561	85	15	99	5	5	98	1	1	758	91	12
Total	936	256	27	175	29	17	156	1	1	1267	286	23
Haemophilia B (years)												
<2	7	2	29	0	0	0	1	0	0	8	2	25
2–5	14	6	43	4	2	50	1	0	0	19	8	43
6–14	32	14	44	8	4	50	5	1	20	45	19	42
15–19	18	1	6	3	0	0	6	0	0	27	1	4
20	124	12	10	33	3	9	17	0	0	174	15	9
Total	195	35	18	48	9	19	30	1	3	273	45	17

philia', which began in 2004 by the Japanese Society of Pediatric Hematology, along with the on-going postauthorization study of the newly approved plasma/albumin-free recombinant factor VIII (Advate; Baxter Bioscience, Westlake Village, CA, USA), is expected to provide important data to evaluate the use and future of prophylaxis in Japan.

Acknowledgements

We would like to express our sincere thanks to the doctors that participated in this survey.

Disclosures

M. Taki and A. Shirahata had acted as paid speakers, and received fees for organising education and reimbursements for attending a symposium.

References

- 1 Nilsson IM, Berntorp E, Lofqvist T, Pettersson H. Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. *J Intern Med* 1992; 232: 25–32.
- 2 Van den Berg HM, Fischer K, Mauser-Bunschoten EP *et al.* Long-term outcome of individualized prophylactic treatment of children with severe haemophilia. *Br J Haematol* 2001; 112: 561–5.
- 3 Royal S, Schramm W, Berntorp E *et al.* Quality-of-Life differences between prophylactic and on-demand factor replacement therapy in European haemophilia patients. *Haemophilia* 2002; 8: 44–50.
- 4 Morado M, Villar A, Jimenez Yuste V, Quintana M, Hernandez Navarro F. Prophylactic treatment effects on inhibitor risk: experience in one center. *Haemophilia* 2005; 11: 79–83.
- 5 Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A *et al.* Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *Br J Haematol* 2005; 130: 422–7.
- 6 Berntorp E, Boulyjenkov V, Brettler D *et al.* Modern treatment of haemophilia. *Bull World Health Organ* 1995; 73: 691–701.
- 7 MASAC. *Medical and Scientific Advisory Council (MASAC) Recommendations Concerning Prophylaxis*. MASAC Medical Bulletin No. 179. NY: NHF, 1994.
- 8 Manco-Johnson M, Abshire TC, Shapiro AD *et al.* Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med* 2007; 357: 535–44.
- 9 Geraghty S, Dunkley T, Harrington C, Lindvall K, Maahs J, Sek J. Practice patterns in haemophilia A therapy – global progress towards optimal care. *Haemophilia* 2006; 12: 75–81.
- 10 Taki M. Mini symposium at the hemophilia standardization subcommittee: present situation of the prophylaxis for hemophilia. *Jpn J Thromb Haemost* 2002; 13: 109–13.
- 11 Yazaki M, Mizutani K, Ito Y. Experiences of prophylaxis replacement therapy for hemophilia. *Jpn Pediatr Hematol* 2006; 20: 22–5.
- 12 Taki M, Ohi C, Yamashita A. Six years' experience of regular continuous prophylactic infusion of clotting factor concentrates in infants and young children with severe hemophilia A and B in Japan. *J Thromb Haemost* 2005; 3(Suppl.1): P0235.
- 13 Okimoto Y, Sunami S, Komori I *et al.* Experience of prophylaxis from infant age of hemophilia. *Jpn J Clin Hematol* 2004; 45: 948.
- 14 Japanese Foundation for AIDS Prevention. *National Survey on Blood Coagulation Abnormality, 2003 Report*. Tokyo: Japanese Foundation for AIDS Prevention, 2002.

血友病に対する一次定期補充療法の動向

瀧 正 志

聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科

A Trend of Primary Regular Replacement Therapy for Hemophilia

Masashi TAKI

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

Abstract A common strategy for replacement therapy in patients with hemophilia is replacement of the deficient coagulation factor (factor VIII or IX) in the event of bleeding, for a certain period until the bleeding stops, which is referred to as on-demand therapy or episodic therapy. The Scandinavian countries have recently begun to employ regular replacement therapy (referred to as prophylaxis in the US and Europe), with regular replacement of the coagulation factor over the long term, even in the absence of hemorrhage, in order to prevent bleeding as well as prevent the development and progression of arthropathy, and the usefulness of this strategy in the prevention of arthropathy has been reported. However, as the outcomes of regular replacement therapy are mainly derived from retrospective observational studies, lack of sufficiently strong evidence for the effectiveness and safety of the therapy has been pointed out. Therefore, the Hemophilia Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology has launched a prospective clinical study. With accumulation of further evidence in regard to the effectiveness of regular replacement therapy from progress reports of the ongoing prospective randomized controlled trials in the US and Europe, replacement therapy for hemophilia is now expected to enter a new era.

要 旨 血友病患者の補充療法は、出血が顕在化した際に止血を目的として欠乏する凝固因子（第 VIII 因子あるいは第 IX 因子）を一定期間補充する方法が一般的に行われており、on demand therapy あるいは episodic therapy と呼ばれる。北欧では、非出血時に出血予防および関節症の発症進展抑止を目的として凝固因子を長期間にわたり定期的に補充する定期補充療法（欧米では prophylaxis と呼ぶ）が行われ、その関節症発症阻止効果などの有用性が報告されている。しかし、定期補充療法に関する成績はおもに後方視的な観察的研究であることより、その有効性および安全性に関するエビデンスに欠けると指摘されていた。そこで、日本小児血液学会血友病委員会では前方視的な臨床研究を開始した。最近欧米で行われている前方視的無作為割り付け比較試験の中間報告により、定期補充療法の有効性にエビデンスが付加され、血友病に対する補充療法はいよいよ新たな時代に突入することが予想される。

Key words: regular replacement therapy, primary regular replacement therapy; primary prophylaxis, prospective randomized control study

I. 血友病の止血管理に対する新たな考え方

血友病の止血管理の原則は、顕在性出血の止血を目的とした補充療法（血友病 A では第 VIII 因子、血友病 B

では第 IX 因子）と一般的に考えられてきた。これを欧米では on demand therapy あるいは episodic therapy と呼び、出血時止血治療のことである。すなわち、出血が顕在化した後に対応する治療法である。しかしながら、この止血法では重症（凝固第 VIII あるいは第 IX 因子活性が 1%未満）患者の多くは、反復する関節内出血の結果としての血友病性関節症を発症する（図 1）。血友病の止血管理に対する新たな治療法、すなわち重症患者に対して顕在性出血、とくに関節出血を阻止すべく、非出血時に欠乏する凝固因子を長期間にわたり定期的に補充す

別刷請求先：〒214-0811 横浜市旭区矢指町 1197-1
聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科 瀧 正志
Reprint requests to Masashi Taki, Department of Pediatrics,
St. Marianna University School of Medicine Yokohama
City Seibu Hospital, 1197-1, Yasashi-cho, Asahi-ku,
Yokohama, 214-0811 Japan

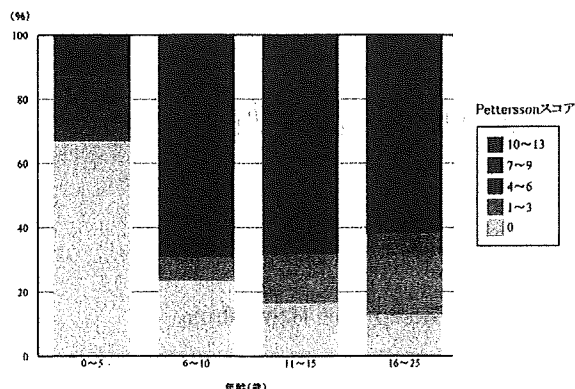


図1 出血時補充療法を行った自験例における年齢別の重症型血友病A患者の足関節のレントゲンスコア(Petterssonスコア)¹⁾。左右足関節のうち、より障害の進行している側のスコアを採用。

止血管理法が、北欧では重症型血友病の標準的治療法となっている。この治療法を欧米では prophylaxis と呼ぶ。軽症・中等症の血友病は、重症とは数%程度の凝固因子活性の相違しかないが、出血頻度、関節障害発生頻度は明らかに少ない。そこで、関節障害の阻止を目的に重症型を軽症化する方法として試みられた方法が prophylaxis である²⁾。わが国では定期補充療法(regular replacement therapy)と呼称する³⁾ことが日本小児血液学会血友病委員会および日本血栓止血学会血友病標準化検討部会で決定された。先天性代謝異常症や免疫不全症候群では定期的に酵素や免疫グロブリンを補充するが、予防治療とはいわず補充療法という。血友病は凝固因子の遺伝性の欠乏症であり、不足した凝固因子を定期的に補充することは本質的な治療法と考えられるからである。また、現時点ではわが国の保険診療に予防治療はなじまないことも理由の1つである。

II. 定期補充療法の定義と分類

定期補充療法とは、出血を未然に防止するため非出血時に欠乏する凝固因子を長期間にわたり定期的に補充する止血管理法である。関節損傷発症前に開始する一次定期補充療法(primary regular replacement therapy)と関節損傷発症以降に開始する二次定期補充療法(secondary regular replacement therapy)に分類⁴⁾される(表1)。一次定期補充療法は、年齢と初回関節出血の観点からさらに2つに分類されている⁴⁾。年齢による定義では、2歳未満および顕在化した関節出血の発症前に開始し、成人になるまで長期間行う治療法である。初回出血による定義では、年齢にかかわらず関節損傷の発症前に開始し、上記と同様に、定期的に成人になるまで長期間行う方法である。関節損傷の発症時期の特定が困難なため、暫定的に過去の関節出血回数は0、あるいは1回の時点で開始する方法と決められている。二次定期補充療法(secondary regular replacement therapy)は、関節損傷発症後に開始し、成人になるまで長期間行う定期補充療法と定義された⁴⁾。手術後のリハビリテーション時や慢性滑膜炎の治療などに行われる短期間の定期的な補充療法は短期補充療法(short-term replacement therapy)に分類し、定期補充療法には含めない。運動会や遠足などのイベントの当日に行う予備的補充療法は、この短期補充療法の範疇に含まれる。

III. 定期補充療法の実際

もっとも有名なスウェーデンの方法⁵⁾は、トラフ値を1%以上に保つことを目標に、血友病Aには体重1kg当たり25~40単位/回を週に3回あるいは隔日、血友病Bには25~40単位/回を週に2回あるいは2日ごとの投与を行う。オランダの方法⁶⁾はトラフ値を考慮せず、用量は出血パターンに基づき調整される。一般的には血友病

表1 定期補充療法の定義(modified from Berntorp E, et al, 2003⁴⁾)

	定義
一次定期補充療法	a) 開始年齢による定義: 2歳未満および顕在化した関節出血の発症前に開始し、成人になるまで長期間、定期的に補充療法を行う治療法。 b) 初回の関節出血による定義: 年齢にかかわらず関節損傷発症以前に開始し、上記と同様長期間行う方法。暫定的には、過去に1回以下の関節出血(0か1回)の時点で開始する。
二次定期補充療法	一次定期補充療法の基準を満たさないが、成人になるまで長期間、定期的に補充療法を行う治療法

註1) 一次、二次ともアドヒアランスは少なくとも1年間52週のうち46週以上。

註2) 手術後のリハビリテーション時や慢性滑膜炎の治療として行われる短期間の定期的な補充療法は定期補充療法には入れず、短期補充療法の範疇に入れる。

註3) 運動会や遠足などのイベントの当日に行う予備的補充療法は、短期補充療法の範疇に含む。

Aには体重1kg当たり15~25単位/回を週に2あるいは3回、血友病Bには30~50単位/回を週に1あるいは2回の投与を行う。カナダの方法⁷⁾は、週1回の注射から開始し、開始後に個々の患者の出血頻度を基に回数を変化させていく方式である。次のステップに進む基準は、3カ月間に同一関節に3回以上の出血、3カ月間に4回以上の軟部組織あるいは関節出血、あるいは同一関節に5回以上の出血である。すなわち、血友病Aにおいて最初はstep 1であるが、体重1kg当たり50単位/回を週に1回の定期補充療法を行う。上記基準を満たすようになると、体重1kg当たり30単位/回を週に2回のstep 2へ、そしてさらにstep 2の基準を満たすようになると、最終ステップである体重1kg当たり25単位/回を週に3回のstep 3へと進む。わが国の乳幼児に対する定期補充療法臨床研究のプロトコル⁸⁾は、スウェーデンの方法を基本とし、一部カナダと同様のステップアップ方式を認めている。すなわち、本治療法の導入開始を目的とした注射練習等の直前数カ月以内の週1回以下の定期補充療法は可能であり、また血管確保の問題などがある場合は、血友病Aに対し週に2回のプロトコルも選択可能である。

IV. 代表的な定期補充療法の後方視的研究報告

定期補充療法の後方視的研究報告は数多くあるが、スウェーデンのNilssonらのグループによるもの⁹⁾がもっとも有名である。1973~78年生まれのグループI(定期補充療法開始年齢が1.5~4.5歳、平均2.6歳)、1979~84年生まれのグループII(定期補充開始年齢が1~2歳、平均1.3歳)、1985~88年生まれのグループIII(定期補充開始年齢が1~1.5歳、平均1.2歳)の3群の比較成績である。おのおのの群の年間関節出血回数、整形外科的関節スコア、関節エックス写真スコアおよび年間欠席/欠勤日数が比較された。これによると、いずれのグループにおいても関節出血回数は著しく減少したことが明らかとなった。さらに、グループIとグループII、IIIには若干の相違がみられた。グループIの年間関節出血回数は平均2.2回であったが、整形外科的関節スコア、関節エックス線写真スコアともに1990年時点より1995年時点で軽度の悪化がみられた。一方、グループII、IIIの年間関節出血回数はともに年間1回未満で、整形外科的関節スコア、関節エックス線写真スコアはともに0点が維持された。年間欠席/欠勤日数は、グループIでは平均0.9日(0.6~7日)、グループII、IIIではともに0日であった。すなわち、いずれのグループにおいても関節障害の進展阻止/遅延効果が観察された。さらに、

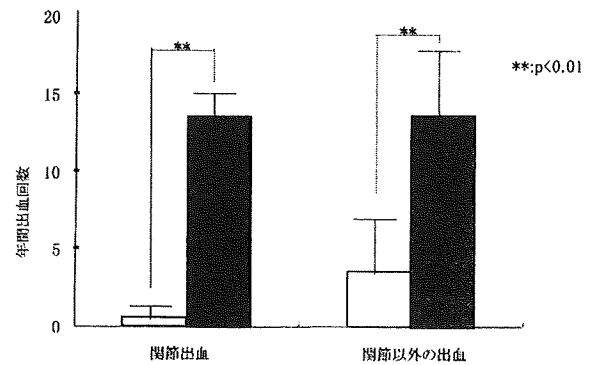


図2 自験例における一次定期補充療法と出血時補充療法の出血回数の比較(白色スクエアは一次定期補充療法群、灰色スクエアは出血時補充療法群)¹⁵⁾

治療開始時期が早期のグループ(グループII, III)においてはほぼ完璧に関節障害発症を阻止する結果であった。

Fischerら⁶⁾の報告は、関節症の進展のみならず医療経済的な面から、前述のスウェーデン方式定期補充療法(スウェーデン群)、オランダ方式定期補充療法(オランダ群)と出血時止血治療(フランス群)と比較したものである。関節障害のないPetterssonスコア¹⁾0点の割合は、スウェーデン群46%、オランダ群14%、フランス群2%の順であった。年間凝固因子製剤使用量は、それぞれ4,301単位/kg/年、1,550単位/kg/年、1,260単位/kg/年と、オランダ群とフランス群では差異はなく、スウェーデン群は両群の約3倍を要した。コストパフォーマンスが同等であるオランダ群とフランス群の比較では、オランダ群が明らかに優れたものと考えられる。

1990年代には欧米各国^{8,12)}から定期補充療法の有効性を示す報告が次々になされた。定期補充療法に関するこれらの報告は観察的研究であるにもかかわらず、1994年全米血友病財団は、一次定期補充療法を重症血友病の小児に対するもっとも適した治療法であると推奨した¹³⁾。世界保健機構および世界血友病連合も本治療法を承認した¹⁴⁾。私たちの施設においても、1999年から重症型血友病に対して積極的に一次定期補充療法を導入している。症例数、観察期間が限られているが、自験例においてもその有用性¹⁵⁾が確認された(図2)。しかし、定期補充療法に関する報告はおもに後方視的な観察的研究であることより、EBMの観点からその有効性および安全性に関して、エビデンスとしては不十分とみなされた¹⁶⁾。

V. 前方視的無作為割り付け比較試験

最近、2つの一次定期補充療法に関する前方視的無作為割り付け比較試験の中間成績^{17,18)}が発表され、過去の

コホート試験の結果が支持された。

1つは米国の血友病センター15施設が参加した Joint Outcome Study (JOS) の研究結果¹⁹⁾の概要を紹介する。この研究は、無作為割り付けオープン試験で行われた。対象は足、膝、肘関節それぞれにつき2回以上出血歴のない6カ月から30カ月齢の重症型血友病A患者で、一次定期補充療法群 (prophylaxis 群; P 群) と、強化された出血時補充療法群 (enhanced episodic therapy 群; E 群) の2群に無作為に分け、(1) 観察期間終了時の6歳時点での指標関節 (足、膝、肘) の状態をMRI およびエックス線による画像解析および関節機能、(2) 関節出血および他の出血の回数、輸注回数、第VIII因子製剤の使用量、(3) 副作用、コンプライアンスなど、を評価項目とした。P 群は体重1kg 当たり25単位/回の遺伝子組換え第VIII因子製剤を隔日投与し、E 群は出血直後に体重1kg 当たり40単位を投与後、24、72時間後にそれぞれ体重1kg 当たり20単位を投与する。症状が消失しない場合は、最大4週間まで体重1kg 当たり20単位の隔日追加投与が許される。観察期間終了時の6歳の時点での指標関節のMRI 所見がすべて正常であった割合は、P 群、E 群それぞれ93%、55%であった ($p=0.002$)。これは、一次定期補充療法を行うことにより関節障害発症のリスクが83%低減することを示唆するものである。エックス線所見でも同様の傾向であり、MRI との一致率は97%であった。また、年齢別の関節出血およびその他の出血回数の比較において、P 群では観察期間中のどの年齢においても関節出血がほとんど認められなかった。一方、E 群においては、1歳時では関節内出血は少ないが、2歳以降は加齢とともに関節出血の回数が増加し、P 群と有意な差異が認められた。関節のMRI スコアと関節出血の回数とは弱い相関が認められた。しかし、E 群で関節出血が自覚されないにもかかわらず、MRI スコアの高値例が18%程度認められたことは興味深い成績である。これは、関節出血が顕在化していなくても微小出血、あるいは subclinical bleeds が関節障害に関与する可能性を示唆する成績と考えられる。また、P 群ではこの現象はみられなかった。短い観察期間で症例数も限られたため統計学的な有意差はなかったが、頭蓋内出血や消化管出血などの重篤な出血がE 群では33例中3例にみられたが、P 群では1例もみられなかったことは注目に値するものと考えられる。微小出血あるいは subclinical bleeds と関節障害との関連については、さらに検討を要する。

もう1つはカナダで行われた研究報告¹⁸⁾である。インヒビターのない第VIII因子活性2%以下の血友病Aを

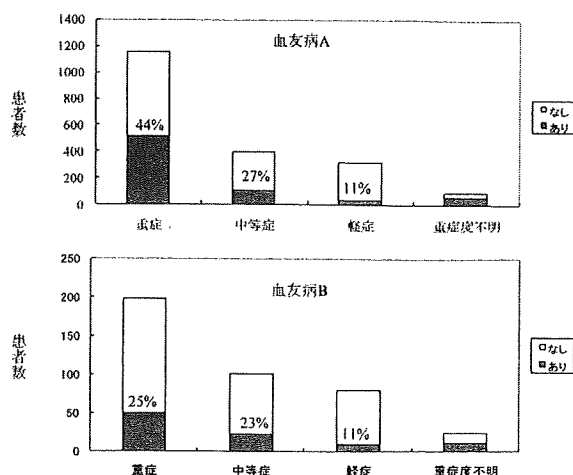


図3 わが国における定期補充療法の重症度別実施率¹⁹⁾

対象とし、前述したIIIの項で示したように、出血頻度により用量・用法をステップアップし、関節症を防ぐ試験である。約40%の患者が週に1あるいは2回の定期補充でコントロールされたと報告された。しかし、対象患者のなかに第VIII因子活性が1~2%の中等症も一部含まれていることを差し引いて評価する必要がある。

VI. わが国の定期補充療法の現状

わが国の定期補充療法の実施率は、2006年度の調査¹⁹⁾では血友病A、Bそれぞれ34%、22%であった。重症度別では、両病型とも重症>中等症>軽症の順で、血友病Aではそれぞれ44%、27%、11%であり、血友病Bでは25%、23%、11%であった (図3)。年齢区分別では、血友病A、Bそれぞれ、2歳未満は27%、0%、2歳以上6歳未満は49%、25%、6歳以上13歳未満は60%、43%、13歳以上20歳未満は50%、26%、20歳以上は30%、19%であった (図4)。2歳未満および20歳以上の実施率は低いが、2歳から20歳までの年齢層における本治療法は血友病A、Bそれぞれ約1/2、約1/3程度に実施されていることが明らかとなった。すなわち、小児の血友病に対する定期補充療法の実施率は高率であるが、2歳以降に開始する二次定期補充療法が主であり、一次定期補充療法の割合はまだ少ないことが示唆された。

VII. わが国の「乳幼児重症型血友病に対する凝固因子製剤の定期補充療法に関する前方視的研究」の進捗状況

わが国における定期補充療法の研究は、日本小児血液

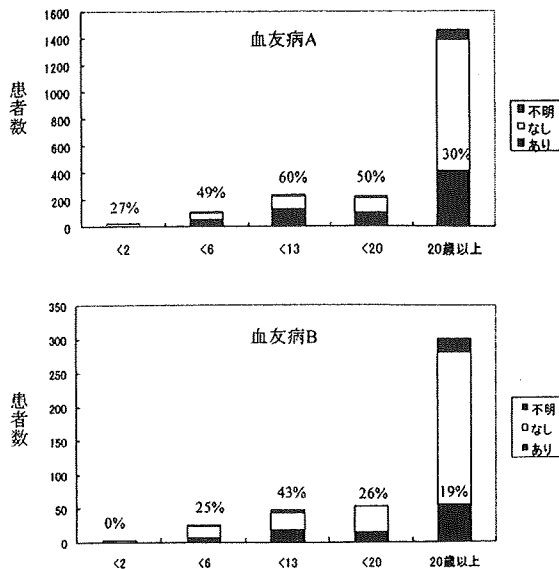


図4 わが国における定期補充療法の年齢別の実施率¹⁹⁾

学会血友病部会で企画され、同学会で2004年11月に承認され、現在進行中である。乳幼児の重症型血友病患者に対して定期補充療法を行い、関節症の進展予防効果、出血予防効果、日常生活活動度 (activity of daily living; ADL) の改善効果を検討し、さらに安全性および利便性に対する検討を加え、定期補充療法の至適な開始年齢を明らかにする。また、定期補充療法開始前の出血歴および凝固因子の精密測定 (0.2~1.0%) を行い、重症型の中でも定期補充療法をより早期に開始する必要がある患者が存在するかどうか、また定期補充療法での適切なトラフレベルについても検討する。対象は、過去に定期補充療法を行ったことがない8歳未満の重症型血友病で、定期補充療法の開始年齢により4群 (0歳から2歳未満: P1群, 2歳から4歳未満: P2群, 4歳から6歳未満: P3群, 6歳から8歳未満: P4群) に分け、各群を経時的に追跡比較する。各群とも25例を予定しているが、2007年11月現在の登録 (予定を含む) 患者数はそれぞれ、P1群9例, P2群12例, P3群6例, P4群1例である。内容の詳細は、日本小児血液学会のウェブサイト (<http://www.med.hokudai.ac.jp/~ped-w/JSPH-hemo.htm>) に掲載している。本研究は、多施設、オープン試験で実施中であり、皆様方の積極的な参加をお願いする次第である。内容の詳細あるいは参加希望の施設は、下記事務局にFAXあるいはE-mailで連絡していただきたい。

研究代表者: 瀧 正志 (聖マリアンナ医科大学小児科)
事務局: 聖マリアンナ医科大学小児科 日本小児血液

学会血友病委員会「定期補充療法プロジェクト」
〒216-8511 川崎市宮前区菅生 2-16-1, FAX: 044-976-8603 E-mail: m2taki@marianna-u.ac.jp

VIII. 今後の課題

定期補充療法 (とくに一次定期補充療法) に関して今後解決すべきいくつかの課題が挙げられている。そのおもなものは、開始時期、中止時期、対象患者、用量用法、評価方法、対費用効果、副反応などである。また、患者の精神発達への影響や親子関係への影響²⁰⁾、患者および保護者のQOLへの影響についても、今後の重要な研究課題であろう。

疾病の最終的なゴールは治癒であり、血友病においては遺伝子治療に期待が寄せられている。しかし、まだ臨床応用までには克服すべき多くの課題が残されている。一次定期補充療法は、新たな発想から生まれた治療法であり、適切に実施することにより治癒に匹敵するQOLをもたらす可能性が期待される。

引用文献

- Pettersson H: Modern radiologic evaluation and follow up of hemophilia. Management of Musculoskeletal Problems in Hemophilia, Wiedel J ed The National Hemophilia Foundation New York 1986, 7-12
- Nilsson IM, Berntorp E, Löfqvist T, et al: Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. J Intern Med 232: 25-32, 1992
- 瀧 正志: 血友病に対する定期補充療法. 日小血会誌 19: 67-73, 2005
- Berntorp E, Astermark J, Björkman S, et al: Consensus perspectives on prophylactic therapy for haemophilia: Summary statement. Haemophilia 9 [Suppl 1]: 1-4, 2003
- Löfqvist T, Nilsson IM, Berntorp E, et al: Haemophilia prophylaxis in young patients: A long-term follow up. J Intern Med 241: 395-400, 1997
- Fischer K, van den Berg M: Prophylaxis for severe haemophilia: Clinical and economical issues. Haemophilia 9: 376-381, 2003
- Manco-Johnson MJ, Blanchette VS: North American prophylaxis studies for persons with severe haemophilia: Background, rationale and design. Haemophilia 9: 44-48, 2003
- Schramm W: Experience with prophylaxis in Germany. Semin Hematol 30: 12-15, 1993
- Manco-Johnson MJ, Nuss R, Geraghty, et al: Results of secondary prophylaxis in children with severe hemophilia. Am J Hematol 47: 113-117, 1994
- van den Berg HM, Nieuwenhuis HK, Mauser-Bunschoten EP, et al: Hemophilia prophylaxis in the Netherland. Semin Haematol 31: 13-15, 1994

- 11) Liesner RJ, Khair K, Hann IM: The impact of prophylactic treatment on children with severe haemophilia. *Br J Haematol* **92**: 937-938, 1996
- 12) Aledort LM, Haschmeyer RH, Pettersson H: A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. *J Intern Med* **236**: 391-399, 1994
- 13) Skolnick AA: Hemophilia Foundation recommends prophylactic use of clotting factors. *JAMA* **272**: 1153-1154, 1994
- 14) Berntorp E, Boulyjenkov V, Bretteler D, et al: Modern treatment of haemophilia. *Bull World Health Organ* **73**: 691-701, 1995
- 15) Taki M, Ohi C, Yamashita A: Six years' experience of regular continuous prophylactic infusion of clotting factor concentrates in infants and young children with severe hemophilia A and B in Japan. XXth ISTH, PO235, 2005
- 16) Stobart K, Iorio A, Wu JK: Clotting factor concentrates given to prevent bleeding and bleeding-related complications in people with hemophilia A or B. *Cochrane Database Syst Rev* **18**: CD003429, 2005
- 17) Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, et al: Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med* **357**: 535-544, 2007
- 18) Feldman BM, Pai M, Rivard GE, et al: Tailored prophylaxis in severe hemophilia A: Interim results from the first 5 years of the Canadian hemophilia primary prophylaxis study. *J Thromb Haemost* **4**: 1228-1236, 2006
- 19) 瀧 正志, 立浪 忍, 三間屋純一, 他: *わが国の血友病の家庭療法および定期補充療法の実施状況について—2006年度血液凝固異常症全国調査より—。臨床血液 **48**: 1015, 2007
- 20) 吉川喜美枝, 森裕紀子, 大井千愛, 他: *家庭輸注による超早期定期補充療法が血友病患者および家族に及ぼす影響。日小血会誌 **18**: 327, 2004

血友病患者インヒビターの産生と制御

瀧 正志¹⁾

【KEYWORDS】 血友病, インヒビター, 免疫寛容導入療法

1. はじめに

血友病の止血治療は20世紀後半大きく進歩し、重篤な出血の止血管理および大手術も可能となった。しかし、21世紀に残された課題もまだ多く、その一つは根治療法である。その方略の一つとして遺伝子治療に大きな期待が寄せられているが、臨床応用までには解決すべき問題が多い。もう一つの大きな課題は、インヒビターに関連することで、インヒビター発生時の止血治療、インヒビターの消失をはかる治療法、さらにインヒビターを発生させない治療法の確立である。インヒビターに関してはまだ不明な点が多く、本稿ではインヒビターの産生と制御について、最近の知見を中心に概説したい。

2. 血友病のインヒビター

血友病患者に発生するインヒビターとは、先天性血友病A、B患者に発生する凝固第Ⅷあるいは第Ⅸ因子に対する同種抗体(インヒビター)であり、治療薬である凝固因子製剤の投与に起因するものである。一方、非血友病患者に突然発生する抗凝固第Ⅷ因子抗体は自己免疫や免疫寛容の破綻の結果として産生される自己抗体であり種類が異なる。

1) インヒビターの発生頻度

一般的に重症型血友病Aで10~20%、血友病Bで1~5%といわれる。わが国の患者のインヒビター発生率に関する資料はないが、保有率は厚

生労働省委託研究事業の血液凝固異常症全国調査の平成17年度報告書によると、血友病Aでは6.1%、(インヒビター不明例を除く1,689例中103例)、血友病Bでは4.4%(338例中15例)であった¹⁾。

2) 発見される契機

凝固因子の補充効果が見られない時に発見されることが多いが、定期的な検査で偶然発見される場合もある。抗第Ⅸ因子抗体の場合、製剤投与時のアナフィラキシー症状を契機に発見されることもある。インヒビターの発生時期としては、凝固因子製剤の使用延べ日数(exposure days)が10~20日の時点に集中している。

3) インヒビターの検査

Bethesda法²⁾が汎用されている。第Ⅷ因子インヒビターの検査は、等量の正常プール血漿と患者血漿を混和し、これを対照とともに37℃で2時間孵置する。対照は正常プール血漿とイミダゾール緩衝液の等量混合液である。両方の反応混合液に残存する第Ⅷ因子活性を測定し、対照混合液の残存第Ⅷ因子活性を100%基準値として用いる。この基準値に対して50%の第Ⅷ因子活性を示す希釈被検混合液を1Bethesda単位(BU)/mlと定義する。インヒビター力価のカットオフ値に関しては一般的に0.5以下を陰性とするが、未だ定まったものでなく施設により一定ではない。その他の検査法としてNijmegen変法³⁾、Oxford法⁴⁾などがある。現在広く用いられているBethesda法は低力価域における精度など問題も多く⁵⁾、今日、国際血栓止血学会/学術標準化委員

1) TAKI Masashi 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科・教授

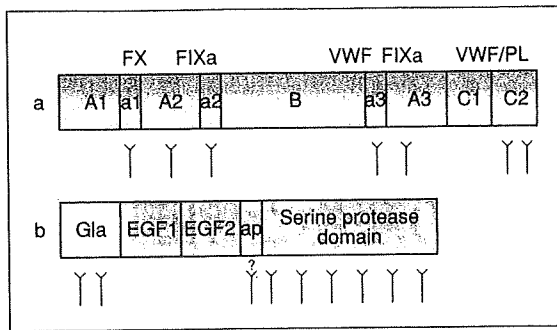


図1 凝固第Ⅷ因子(a)および第Ⅸ因子(b)に対するインヒビターのエピトープ

FX: 第Ⅹ因子, FIXa: 活性型第Ⅸ因子, VWF: von Willebrand 因子, Gla: γ カルボキシグルタミン酸ドメイン, EGF: 上皮増殖因子.

[文献 16]より改変して転載

会では Nijmegen 変法を推奨³⁾している。また、酵素免疫測定 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 法による抗体検出法もあり、この測定法では第Ⅷ因子に対する阻害抗体と非阻害抗体の両者を検出する。後者の抗体の意義は不明な点もあるが第Ⅷ因子のクリアランスおよび半減期に関係することが示唆されている⁶⁾。

4) インヒビターの免疫学的特性

第Ⅷ因子に対するインヒビター、第Ⅸ因子に対するインヒビターはともに主として IgG₄ サブクラスに属する。また、第Ⅸ因子に対するインヒビターはほかに IgG₁ も認められ、アナフィラキシーとの関連⁷⁾が指摘されている。

5) ハイレスポンドー (high responder; HR) とローレスポンドー (low responder; LR)

インヒビター患者は通常 HR と LR に分類され、前者はインヒビター値が 5 Bethesda units/ml (BU/ml) 以上の患者および当該凝固因子製剤の注射後に既往応答で 5 BU/ml 以上に上昇する患者、後者はインヒビター力価が当該凝固因子製剤の注射後においても絶えず 5 BU/ml 未満の患者と定義される。既往応答は通常、凝固因子製剤投与後 5~7 日後に生じる。

6) type I インヒビター、タイプ II インヒビター

インヒビターの濃度依存性に凝固因子を抑制するものを type I、そうでないものを type II と呼ぶ。先天性の血友病患者に発生するインヒビターは主として前者、非血友病患者に突然発生する

インヒビターは主として後者にそれぞれ属する。

7) インヒビターのエピトープ

第Ⅷ因子に対して凝固阻害活性を持つインヒビター IgG の第Ⅷ因子蛋白への結合部位は、重鎖 A2 ドメイン、軽鎖 A3-C1 ドメイン、さらに軽鎖 C2 ドメインに存在する^{8,9)} (図 a)。個々の患者にみられるインヒビターは、これら多数のエピトープに反応するポリクローナルな抗体である。インヒビターの阻害機序は、インヒビターが認識するエピトープにより異なる。抗 A2 抗体は第Ⅹ因子活性化複合体の触媒作用を低下させる¹⁰⁾ ことにより、抗 A3 抗体は第Ⅸa 因子と第Ⅷa の相互作用を阻害する^{8,9)} ことにより、抗 C2 抗体の大半は第Ⅷ因子がリン脂質および von Willebrand 因子 (VWF) に結合するのを阻害する^{11,12)} ことにより第Ⅷ因子の凝固活性を阻害する。C1 または C2 ドメインに結合し VWF への第Ⅷ因子結合を安定化させ、これにより第Ⅷ因子がリン脂質と結合するのを阻害する機序¹³⁾ も報告されている。軽症型や中等症の患者に発生するインヒビターや過去に治療歴のある患者に対して特定の第Ⅷ因子製剤の投与により出現するインヒビターは type II の特性をもち、第Ⅷ因子の軽鎖 C2 ドメインにエピトープ特異性を示す。このインヒビターによる部分的な第Ⅷ因子の不活化の機序は、インヒビターが第Ⅷ因子と結合する際に VWF と競合するため¹⁴⁾ と考えられている。また、蛋白分解により不活化機序¹⁵⁾ を示す抗体もある。一方、第Ⅸ因子インヒビターのエピトープは γ カルボキシグルタミン酸 (Gla) 領域の N 末およびセリンプロテアーゼドメインに局在し¹⁶⁾ (図 b)、Xase 複合体による第Ⅷ因子依存性第Ⅹ因子の活性化を阻害、あるいは、リン脂質および第Ⅷ因子の Gla ドメインへの結合を阻害する。

3. インヒビターの発生要因

インヒビターの発生要因は患者要因と治療要因に大別される (表)。患者要因では、重症度、第Ⅷ因子あるいは第Ⅸ因子の遺伝子変異の種類、インヒビターの家族歴、人種、HLA、IL10 遺伝子の遺伝子多型、ワクチン接種、感染症、母乳など多岐にわたる。遺伝子変異に関して、大欠失、ナンセンス変異、イントロン 22 逆位は重度の分子欠損を示すが、これらの患者ではインヒビター保有

表 インヒビター発生に関与する因子

患者要因	治療要因
重症度	凝固因子製剤の種類(純度, ウイルス不活化法, 遺伝子組換え製剤か血漿由来製剤か, VWFの関与など)
遺伝子変異	初回注射の年齢
インヒビターの家族歴	投与パターン(持続投与)
人種	治療の強度(短期間の集中治療)
IL10 遺伝子の遺伝子多型	定期補充療法か出血時治療か
免疫学的応答	異なる製剤の投与
ワクチン接種	その他
感染症	
母乳	
その他	

率は20~40%と高率である。ミスセンス変異およびプライム部位変異では蛋白が完全に消失することはなく、インヒビター保有率は10%未満である。小欠失や挿入は血友病Aでは中等度のリスクであるが血友病Bでは高リスクとなる。また、大欠失の中でも複数のドメインが影響を受けた場合は単一のドメインの影響を受けた場合よりリスクがさらに高まる。イントロン22逆位は重症型血友病Aで最も頻度の高い変異であり、リスクは高い。ミスセンス変異は全体では最も頻度が高く、重症型以外の患者のほぼすべてを占める。この変異では蛋白の機能はないが、ある程度の蛋白合成があるため免疫寛容が誘導されインヒビターの保有率は低いと考えられている。血友病Aでは全体で5%、血友病Bの重症型では0.5%である。また、第Ⅷ因子のC1およびC2ドメインにおけるミスセンス変異はほかのドメインにおけるミスセンス変異よりも約3倍高いことより、特定の領域がその蛋白の抗原性に重要であると考えられている。

インヒビター発生の免疫応答遺伝子の関与については、人種に関する研究¹⁷⁾、同族親族内での兄弟と遠縁親戚でのインヒビター発生率の比較研究¹⁸⁾があり、これらの2つの研究により免疫応答に参加する遺伝子がインヒビター発生に影響することが間接的に示された。また、MHCクラス遺伝子の影響についても検討されている。クラスII遺伝子の機能は細胞外抗原を患者に提示することであり興味を持たれる。細胞内抗原をプロセッシングするクラスI遺伝子もインヒビター発生に重要な役割を果たす可能性がある。最近、IL-10遺伝子の遺伝子多型とインヒビター発生との関連

性¹⁹⁾、制御性T細胞(Treg)がインヒビター発生に関与する可能性の報告²⁰⁻²³⁾など今後の進展が期待される報告が相次いでいる。

治療要因もインヒビターの発生に重要な影響を及ぼす可能性がある。製剤の種類に関連したインヒビター発生の危険度に関して、純度の問題、加熱処理などのウイルス不活化の問題、遺伝子組み換え製剤か血漿由来製剤か^{24,25)}、第Ⅷ因子製剤ではVWFとの複合体製剤か否か、初回注射の年齢^{26,27)}、治療の強度²⁶⁾、定期補充療法²⁶⁾などが絶えず議論されているが、一定の見解を得るまでには至っていない。インヒビター発生に関して現時点で明らかにされていることはほんの一部であり、病因の大半は未解決のまま、インヒビター発生を予測することはできない。

4. インヒビターの制御に関する治療

血友病患者に発生した同種インヒビター抗体はステロイドなどの免疫抑制剤単独の効果は期待できない。インヒビターの低下あるいは消失を目的とする治療法で現在最も期待されているのは免疫寛容導入(immune tolerance induction: ITI)療法である。基本的には、インヒビター保有血友病Aに対して凝固第Ⅷ因子製剤を、インヒビター保有血友病Bに対して凝固第Ⅸ因子製剤を定期的に静注する。方法は、高用量のBonn方式^{28,29)}、低用量方式³⁰⁾、抗体吸着カラムや免疫抑制剤を併用するMalmö方式^{31,32)}などが代表的である。ITI療法の治療結果に影響する因子として、ITI療法開始時のインヒビター値は最も重要^{33,34)}で、治療成功率、治療成功までの期間の両者に影響を及ぼす。用量^{33,34)}については意見が分かれている。この治療法は長期間の忍耐と高額な

医療を必要とするが、まだ最適なプロトコルが確立されていない。そこで現在、特にインヒビター保有血友病 A 患者に対する用量についての国際的な無作為化多施設共同臨床試験が行われておりわが国も参加している。1日でも早い安全で有効率の高いプロトコルの確立が望まれる。また、インヒビター保有血友病 A に対する ITI の成功率は高いが、インヒビター保有血友病 B に対する ITI の成功率は低くまたインヒビター保有血友病 A にはみられないアナフィラキシー^{7,35)}、ネフローゼ症候群³⁶⁾の発生がみられるため、免疫調節剤を含め新たな治療戦略の開発が望まれる。

5. おわりに

近年、血友病の止血治療は凝固因子製剤の改

良、在宅自己注射療法の導入により大きく進歩した。また、関節障害発症前の乳幼児期から開始する一次定期補充療法が一般的な治療法として最近認識されるようになり、今後ますます血友病患者の QOL は改善されることが想定される。しかし、インヒビターが発生した場合止血治療は難渋することが多く、血友病治療に残された大きな課題である。現在、血友病の根治療法として大いなる期待が寄せられている遺伝子治療に関してもインヒビターの産生、制御を十分に理解し、進めていく必要がある。

文 献

- 1) 血液凝固異常全国調査委員会：血液凝固異常症全国調査 平成 17 年度報告書、エイズ予防財団、pp 9, 2006
- 2) Kasper CK, Aledort L, Aronson D, et al : Proceedings : A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 34 : 612, 1975
- 3) Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, et al : The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII : C inhibitors : improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 73 : 247-251, 1995
- 4) Biggs R, Bidwell E : A method for the study of antihemophilic globulin inhibitors with reference to six cases. *Br J Haematol* 5 : 379-395, 1959
- 5) 山崎哲, 鈴木典子, 山崎法子, 他 : 第 VIII 因子インヒビター測定の特長および不活化処理の有用性. *日本血栓止血学会誌* 19 : 235-243, 2008
- 6) Dazzi F, Tison T, Vianello F, et al : High incidence of anti-FVIII antibodies against non-coagulant epitopes in haemophilia A patients : a possible role for the half-life of transfused FVIII. *Br J Haematol* 93 : 688-693, 1996
- 7) Sawamoto Y, Shima M, Yamamoto M, et al : Measurement of anti-factor IX IgG subclass in haemophilia B patients who developed inhibitors with episodes of allergic reactions to factor IX concentrates. *Thromb Res* 83 : 279-286, 1996
- 8) Fijnvandraat K, Celie PH, Turenhout EA, et al : A human alloantibody interferes with binding of factor VIII to the factor VIII light chain. *Blood* 91 : 2347-2352, 1998
- 9) Zhong D, Saenko EL, Shima M, et al : Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood* 92 : 136-142, 1998
- 10) Lollar P, Parker ET, Curtis JE, et al : Inhibition of human factor VIII a by anti-A2 subunit antibodies. *J Clin Invest* 93 : 2497-2504, 1994
- 11) Arai M, Scandella D, Hoyer LW : Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies. Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid. *J Clin Invest* 83 : 1978-1984, 1989

免疫寛容導入療法 (immune tolerance induction therapy)

免疫寛容 (immune tolerance) とは抗原により誘導される抗原特異的な免疫反応のない状態をさす。血友病患者に発生したインヒビターを駆逐する方法として考案された。具体的には、インヒビター保有血友病 A 患者には第 VIII 因子製剤、インヒビター保有血友病 B 患者には第 IX 因子製剤をそれぞれ定期的に静注する。投与量、投与間隔などのレジメはまだ確立されていない。すべての患者のインヒビターを消失せしめることはできないが、現時点ではインヒビターを消失せしめる最も有効な方法である。

定期補充療法 (regular replacement therapy)

出血時に欠乏する凝固第 VIII あるいは IX 因子製剤を補充する治療法を on demand 療法あるいは episodic 療法と呼び、出血後に止血を図る治療法である。しかしながら、この治療法では多くの重症患者の関節内出血の反復を阻止できず、加齢に伴い血友病性関節症を発症する。この治療法に対し、非出血時に欠乏する凝固因子を長期間にわたり定期的に補充する治療法が北欧を中心に行われ、関節障害の予防効果が示されていた。最近新たなエビデンスが加わり、現在では治療法の主流となろうとしている。この治療法を prophylaxis と欧米では呼ぶが、わが国では定期補充療法とよぶ。関節障害発症前に開始する一次定期補充療法と、関節障害発症後に開始する二次定期補充療法に大別される。

- 12) Shima M, Scandella D, Yoshioka A, et al : A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. *Thromb Haemost* 69 : 240-246, 1993
- 13) Saenko EL, Shima M, Gilbert GE, et al : Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition. *J Biol Chem* 271 : 27424-27431, 1996
- 14) Gawryl MS, Hoyer LW : Inactivation of factor VIII coagulant activity by two different types of human antibodies. *Blood* 60 : 1103-1109, 1982
- 15) Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana Bonnemain C, et al : Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nat Med* 5 : 1044-1047, 1999
- 16) Astermark J : Basic aspects of inhibitors to factor VIII and IX and the influence of non-genetic risk factors. *Haemophilia* 6 : 8-13, 2006
- 17) Scharrer I, Bray GL, Neutzling O : Incidence of inhibitors in haemophilia A patients : a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. *Haemophilia* 5 : 145-154, 1999
- 18) Gill JC : The role of genetics in inhibitor formation. *Thromb Haemost* 82 : 500-504, 1999
- 19) Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, et al : Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 107 : 3167-3172, 2006
- 20) Reding MT, Okita DK, Diethelm-Okita BM, et al : Human CD4+ T cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost* 1 : 1777-1784, 2003
- 21) Lei TC, Scott DW : Induction of tolerance to factor VIII inhibitors by gene therapy with immunodominant A2 and C2 domains presented by B cells as Ig fusion proteins. *Blood* 105 : 4865-4870, 2005
- 22) Rawle FE, Pratt KP, Labelle A, et al : Induction of partial immune tolerance to factor VIII through prior mucosal exposure to the factor VIII C2 domain. *J Thromb Haemost* 4 : 2172-2179, 2006
- 23) Dobrzynski E, Fitzgerald JC, Cao O, et al : Prevention of cytotoxic T lymphocyte responses to factor IX-expressing hepatocytes by gene transfer-induced regulatory T cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 103 : 4592-4597, 2006
- 24) Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, et al : Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* 107 : 46-51, 2006
- 25) Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, et al : Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A : the CANAL cohort study. *Blood* 109 : 4693-4697, 2007
- 26) Gouw SC, van der Bom JG, Marijke van den Berg H : Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A : the CANAL cohort study. *Blood* 109 : 4648-4654, 2007
- 27) Lorenzo JI, López A, Altisent C, et al : Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia : the importance of patient age. *Br J Haematol* 113 : 600-603, 2001
- 28) Brackmann HH : Induced immunotolerance in factor VIII inhibitor patients. *Prog Clin Biol Res* 150 : 181-195, 1984
- 29) Brackmann HH, Oldenburg J, Schwaab R : Immune tolerance for the treatment of factor VIII inhibitors--twenty years' 'bonn protocol'. *Vox Sang* 70 : 30-35, 1996
- 30) Mauser-Bunschoten EP, Nieuwenhuis HK, Roosendaal G, et al : Low-dose immune tolerance induction in hemophilia A patients with inhibitors. *Blood* 86 : 983-988, 1995
- 31) Nilsson IM, Berntorp E, Zettervall O : Induction of immune tolerance in patients with hemophilia and antibodies to factor VIII by combined treatment with intravenous IgG, cyclophosphamide, and factor VIII. *N Engl J Med* 318 : 947-950, 1988
- 32) Freiburghaus C, Berntorp E, Ekman M, et al : Tolerance induction using the Malmö treatment model 1982-1995. *Haemophilia* 5 : 32-39, 1999
- 33) Mariani G, Ghirardini A, Bellocco R : Immune tolerance in hemophilia--principal results from the International Registry. Report of the factor VIII and IX Subcommittee. *Thromb Haemost* 72 : 155-158, 1994
- 34) DiMichele DM, Kroner BL : Analysis of the North American Immune Tolerance Registry (NAITR) 1933-1997 : Current practice implications. *Vox Sang* 77 : 31-32, 1999
- 35) Warrier I, Ewenstein BM, Koerper MA, et al : Factor IX inhibitors and anaphylaxis in hemophilia B. *J Pediatr Haematol Oncol* 19 : 23-27, 1997
- 36) Ewenstein BM, Takemoto C, Warrier I, et al : Nephrotic syndrome as a complication of immune tolerance in hemophilia B. *Blood* 89 : 115-116, 1997



Identification of a plasmin-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain[☆]

Keiji Nogami^{a,*}, Katsumi Nishiya^a, Evgueni L. Saenko^b, Masahiro Takeyama^a,
Ichiro Tanaka^a, Akira Yoshioka^a, Midori Shima^a

^a Department of Pediatrics, Nara Medical University, Kashihara, Nara 634-8522, Japan

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD 21201, USA

Received 13 August 2007; received in revised form 30 January 2008; accepted 31 January 2008

Available online 14 February 2008

Abstract

Factor VIII is activated and inactivated by plasmin by limited proteolysis. In our one-stage clotting assay, these plasmin-catalyzed reactions were inhibited by the addition of isolated factor VIII A2 subunits and by Glu-Gly-Arg-active-site modified factor IXa. SDS-PAGE analysis showed that an anti-A2 monoclonal antibody, recognizing the factor IXa-interactive site (residues 484–509), blocked the plasmin-catalyzed cleavage at Arg³³⁶ and Arg³⁷² but not at Arg⁷⁴⁰. Surface plasmon resonance-based assays and ELISA demonstrated that the A2 subunit bound to active-site modified anhydro-plasmin with high affinity (K_d : 21 nM). Both an anti-A2 monoclonal antibody and a peptide comprising of A2 residues 479–504 blocked A2 binding by ~80% and ~55%, respectively. Mutant A2 molecules where the basic residues in A2 were converted to alanine were evaluated for binding of anhydro-plasmin. Among the tested mutants, the R484A A2 mutant possessed ~250-fold lower affinity than the wild-type A2. The affinities of K377A, K466A, and R471A mutants were decreased by 10–20-fold. The inhibitory effect of R484A mutant on plasmin-catalyzed inactivation of factor VIIIa was ~20% of that of wild-type A2. In addition, the inactivation rate by plasmin of factor VIIIa reconstituted with R484A mutant was ~3-fold lower than that with wild-type A2. These findings demonstrate that Arg⁴⁸⁴ plays a key role within the A2 plasmin-binding site, responsible for plasmin-catalyzed factor VIII(a) inactivation.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Factor VIII; A2 domain; Plasmin; Interactive-site; Inactivation; A2 mutant

1. Introduction

Factor VIII, a plasma protein deficient or defective in individuals with the severe congenital bleeding disorder, hemophilia A, functions as a cofactor in the tenase complex responsible

for phospholipid surface-dependent conversion of factor X to Xa by factor IXa [1]. Factor VIII is synthesized as a multi-domain, single chain molecule (A1-A2-B-A3-C1-C2) consisting of 2,332 amino acid residues [2,3]. It is processed into a series of metal ion-dependent heterodimers by cleavage at the B-A3 junction, generating a heavy chain consisting of the A1 and A2 domains, plus heterogeneous fragments of a partially proteolyzed B domain, linked to a light chain consisting of the A3, C1, and C2 domains [2–4].

Factor VIII, circulating as a complex with von Willebrand factor, is converted into its active form, factor VIIIa, by limited proteolysis, catalyzed by either thrombin or factor Xa [5]. Cleavages at Arg³⁷² and Arg⁷⁴⁰ of the heavy chain produce 50-kDa A1 and 40-kDa A2 subunits. Cleavage of the 80-kDa light chain at Arg¹⁶⁸⁹ produces a 70-kDa A3C1C2 subunit. Proteolysis at Arg³⁷² and Arg¹⁶⁸⁹ is essential for generating factor VIIIa cofactor activity [6]. Cleavage at the former site exposes a functional factor IXa-

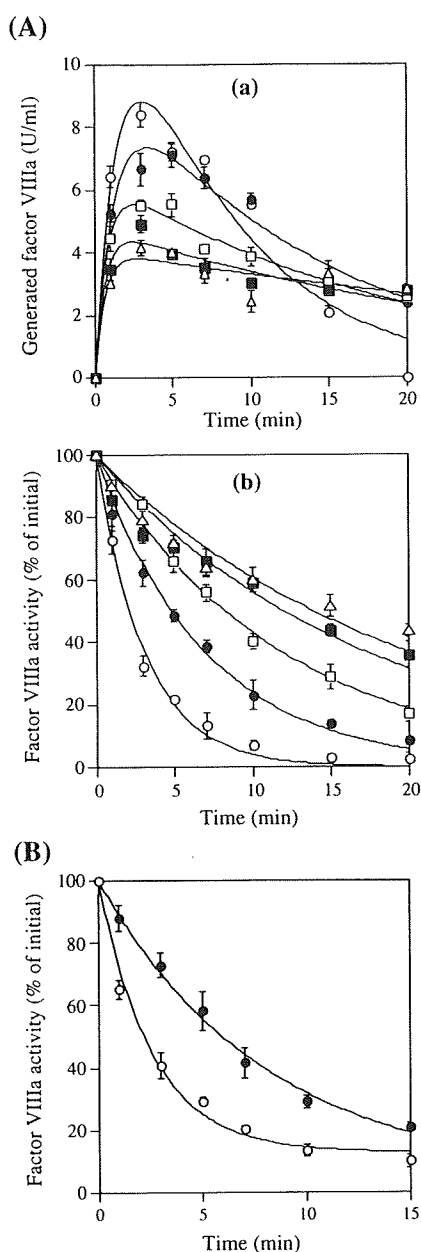
Abbreviations: APC, activated protein C; mAb, monoclonal antibody; EGR-factor IXa, Glu-Gly-Arg-active-site modified factor IXa; 6-AHA, 6-aminohexanoic acid; Ah-plasmin, anhydro-plasmin; wild-type A2, wt-A2; SPR-based assay, surface plasmon resonance-based assay; LRP, low-density lipoprotein receptor-related protein

[☆] This work was supported by grants for MEXT KAKENHI 17390304, 17591110, 19591264, and by grants for AIDS Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. An account of this work was presented at the 47th annual meeting of the American Society of Hematology, December 10, 2005, Atlanta, GA.

* Corresponding author. Tel.: +81 744 29 8881; fax: +81 744 24 9222.

E-mail address: roc-noga@naramed-u.ac.jp (K. Nogami).

interactive site within the A2 domain that is cryptic in the non-activated factor VIII molecule [7]. Cleavage at the latter site liberates the cofactor from von Willebrand factor [8], and contributes to the overall specific activity of the cofactor [9,10]. Serine proteases including activated protein C (APC) [5], factor Xa [5], and factor IXa [11] inactivate factor VIII(a) by cleavage at Arg³³⁶ within the A1 subunit. This inactivation mechanism is related to altered interaction of the A2 subunit with the truncated A1 and an increase in the K_m for substrate factor X [12,13]; the latter reflecting the loss of factor X-interactive site within the A1 residues 337–372 [14].



Plasmin, the most potent fibrinolytic protease, is composed of a heavy chain consisting of five kringle domains and a light chain containing the catalytic domain. The enzyme reacts with numerous proteins, represented typically by fibrin, by mechanisms involving lysine-binding sites [15]. Recent studies have revealed that plasmin proteolytically inactivates several coagulation proteins including factors Va [16,17], factor IXa [18], and factor X [19]. The interactive sites in the coagulation factor substrates are not characterized, however. Recently, our laboratory has demonstrated that plasmin rapidly inactivates factor VIII by proteolytic cleavage at sites identical to those cleaved by factor Xa, in particular Arg³³⁶ [20]. Our data indicated that specific cleavage at Arg³³⁶ was selectively regulated following interaction of the protease with the A2 domain of factor VIII.

In the present study, we identify plasmin-interactive site(s) within the A2 domain using a combination of approaches employing isolated factor VIII subunits, synthetic peptides, antibodies, and recombinant factor VIII A2 mutants. Our results indicate that the A2 domain of factor VIII, in particular residue Arg⁴⁸⁴, contributes to a unique plasmin-interactive site within the heavy chain that promotes plasmin docking during cofactor inactivation cleavage of the heavy chain.

2. Materials and methods

2.1. Proteins and reagents

Purified recombinant factor VIII preparations were generous gifts from Bayer Corp. Japan (Osaka, Japan). The light and heavy chains, A1/A3C1C2 dimer, A1, and A2 subunits of factor VIII were purified as previously described [12,13]. Factor VIIIa was isolated from thrombin-cleaved factor VIII by CM-Sepharose chromatography [21]. SDS-PAGE of the isolated subunits followed by staining with GelCode BlueStain Reagent (Pierce, Rockford, IL) showed >95% purity. An anti-factor VIII A1 monoclonal antibody (mAb) 58.12 was a generous gift from Bayer Corp. [22]. Anti-A2 mAb413 and anti-C2 mAbNMC-VIII/5 were produced as described [7,23]. A second anti-A2 mAbJR8 was obtained from JR Scientific Inc. (Woodland, CA). Human plasmin (Lys-plasmin), devoid of factor Xa and APC, and 6-aminohexanoic acid (6-AHA) was purchased from Sigma (St Louis, MO). Pefabloc (Roche, Basel, Switzerland) and horseradish peroxidase-labeled streptavidin (Chemicon, Australia) were purchased from the indicated vendors. Glu-Gly-Arg-active-site modified factor IXa (EGR-factor IXa) was obtained from Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT), and was shown to contain <0.5% factor IXa activity in a specific chromogenic assay. No unbound chloromethylketone was evident in this product (data not

Fig. 1. Plasmin-catalyzed activation or inactivation of factor VIII(a) — (A) Effect of the addition of exogenous A2 subunit: Factor VIII (panel a) or factor VIIIa (panel b) (25 nM) was incubated with plasmin (1 nM) and phospholipid (10 μ M) in the presence of various concentrations of exogenous A2 (0 nM, open circles; 25 nM, closed circles; 50 nM, open squares; 100 nM, closed squares; 200 nM open triangles). Factor VIII(a) activity was measured at the indicated times using a one-stage clotting assay. The initial activities of factor VIII or factor VIIIa at time zero were \sim 10 U/ml and \sim 50 U/ml (100% level), respectively. The values of factor VIII(a) activity were plotted as a function of incubation time and the data in (panel a) and (panel b) were fitted using the formula Eqs. (2) and (1), respectively, as described in Materials and methods. (B) Effect of the addition of EGR-factor IXa: Factor VIIIa (25 nM) was incubated with plasmin (0.8 nM) and phospholipid (10 μ M) in the absence (open circles) or presence (closed circles) of EGR-factor IXa (40 nM). Factor VIIIa activity was measured at the indicated times using a one-stage clotting assay. The initial activity of factor VIIIa (100% level) was \sim 50 U/ml. The values of factor VIIIa activity were plotted as a function of incubation time and the data were fitted using the formula Eq. (1).

Table 1
Kinetic parameters characterizing plasmin-catalyzed factor VIII(a) activation and inactivation in the presence of exogenous A2 subunit

A2 added nM	Factor VIII activation/ inactivation		Factor VIIIa inactivation
	k_1 min^{-1}	k_2 min^{-1}	k min^{-1}
0	1.01 ± 0.19	0.160 ± 0.032	0.325 ± 0.016
25	0.78 ± 0.10	0.081 ± 0.006	0.144 ± 0.005
50	0.54 ± 0.08	0.052 ± 0.007	0.084 ± 0.003
100	0.26 ± 0.04	0.036 ± 0.002	0.058 ± 0.005
200	0.24 ± 0.04	0.035 ± 0.004	0.050 ± 0.004

Factor VIII(a) (25 nM) was incubated with plasmin (1 nM) and phospholipid (10 μM) in the presence of A2 subunit as described under "Materials and methods". Rate constant values were calculated from the data shown in Fig. 1A. All experiments were performed at least three separate times, and average values and standard deviations are shown.

shown). Phospholipid vesicles containing 10% phosphatidylserine, 60% phosphatidylcholine, and 30% phosphatidylethanolamine (Sigma) were prepared using *N*-octylglucoside [24]. The mAb IgG preparations were biotinylated using *N*-hydroxysuccinimido-biotin (Pierce). F(ab')₂ fragments of mAb413 IgG were prepared using immobilized pepsin-Sepharose (Pierce). Synthetic peptides corresponding to factor VIII A2 residues 479–504, 484–509, and 489–514 were prepared by BioSynthesis (Lewisville, TX).

2.2. Preparation of anhydro-plasmin (Ah-plasmin)

Ah-plasmin, a catalytically inactive derivative of plasmin, was prepared as previously described for the preparation of Ah-factor Xa [25]. Briefly, plasmin was chemically modified with phenylmethylsulfonyl fluoride. Then, to convert phenylmethylsulfonyl-residues of the modified plasmin to dehydroalanine, the product was diluted with 50 mM NaOH, incubated for 10 min at 0 °C, and the pH was adjusted to 7.5. After dialysis against 50 mM Tris–HCl, pH 7.5 containing 1 M NaCl, Ah-plasmin was purified by benzamidine-Sepharose 4B column chromatography. The Ah-plasmin demonstrated <1% plasmin activity, and its molecular weight was similar to that of native plasmin.

2.3. Recombinant factor VIII A2 molecules

Recombinant wild-type and mutants of the A2 domain were constructed and expressed using the Bac-to-Bac baculovirus systems [26]. The mutations predominantly targeted positively charged residues located on the surface of the A2 domain, Lys³⁷⁶, Lys³⁷⁷, His³⁷⁸, Lys³⁸⁰, Lys⁴⁶⁶, Arg⁴⁷¹, Arg⁴⁸⁴, Tyr⁴⁸⁷, Ser⁴⁸⁸, Arg⁴⁸⁹, Arg⁴⁹⁰, Leu⁴⁹¹, Lys⁴⁹³, Lys⁴⁹⁵, His⁴⁹⁷, Lys⁵¹⁰, and Lys⁵¹². The selected residues were replaced by alanine. The A2 expression cassette was assembled on the basis of MHGX vector and subcloned into pFastBac1 vector. The chimeric gene encoded a polypeptide, six His tag and a factor Xa cleavage site at the N-terminus. The protein was expressed in Sf9 cells and purified by affinity chromatography using CNBr-activated Sepharose 4B with immobilized anti-A2 mAb. To remove the poly-His tag portions, the eluate was mixed with factor Xa and treated with Xarrest agarose (Novagen, Madison, WI). The resulting A2 was >90% pure as judged by SDS-PAGE and Western blotting.

2.4. Clotting assay

Factor VIII(a) activity was measured in a one-stage clotting assay using factor VIII-deficient plasma. Reconstitution of factor VIIIa activity from the recombinant A2 molecule and A1/A3C1C2 dimer was performed as previously described [27]. Maximal factor VIIIa levels were obtained after ~20 min. Plasmin-catalyzed activation and inactivation of factor VIII(a) was performed in 20 mM HEPES buffer, pH 7.2, 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.01% Tween 20 (HBS-buffer) containing 0.01% BSA, plus phospholipid (10 μM) at 37 °C. Aliquots were removed from the mixtures at the indicated times and plasmin activity immediately

quenched by the addition of 0.5 mM pefabloc and 1000-fold dilution prior to assays of factor VIII activity. The presence of plasmin and pefabloc in the diluted samples did not affect the measurements of factor VIII activity (data not shown).

2.5. Cleavage of factor VIII and its subunits by plasmin

Plasmin was added to factor VIII(a) and its subunits in a 1:25 ratio (mol/mol) with phospholipid vesicles (10 μM) in a HBS-buffer at 37 °C. Samples were obtained at the indicated times and the reactions were immediately terminated and prepared for PAGE by adding SDS and 2-mercaptoethanol and boiling for 3 min.

2.6. Electrophoresis and Western blotting

SDS-PAGE was performed with 8% gels under reducing conditions. The proteins were transferred to a PVDF membrane by Western blotting [13]. Proteins were probed using a biotinylated anti-A2 mAb, followed by horseradish peroxidase-labeled streptavidin. The signals were detected using an enhanced chemiluminescence system (PerkinElmer LifeScience, Boston, MA).

2.7. Surface plasmon resonance (SPR)-based binding assay

The kinetics of factor VIII and plasmin interaction were determined by SPR using a BIACORE X instrument (Biacore AB, Uppsala, Sweden) [25]. Ah-plasmin was covalently coupled to the CM5 chip surface at a coupling density of 7 ng/mm². Binding (association) of the ligand was monitored in 10 mM HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% polysorbate 20, at a flow rate of 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ for 4 min. The dissociation of bound ligand was recorded over a 2 min period by replacing the ligand-containing buffer with buffer alone. The level of non-specific binding corresponding to the ligand binding to the uncoated chip was subtracted from the signal. Reactions were performed at 37 °C. The rate constants for association (k_{asso}) and dissociation (k_{diss}) were determined by nonlinear regression analysis using the evaluation software provided by Biacore AB. Dissociation constants (K_d) were calculated as $k_{\text{diss}}/k_{\text{asso}}$.

2.8. ELISA-based assay using immobilized Ah-plasmin

Microtiter wells were coated with Ah-plasmin (50 μl , 100 nM) in 20 mM Tris, and 0.15 M NaCl, pH 7.4, overnight at 4 °C. The wells were washed with

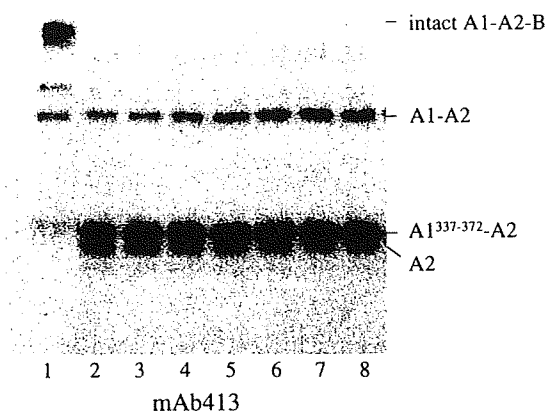


Fig. 2. Effect of anti-A2 mAb413 on plasmin-catalyzed factor VIII cleavage — Factor VIII (100 nM) was preincubated with various concentrations of mAb413 IgG F(ab')₂ for 1 h and was reacted with plasmin (4 nM) for 3 min. Samples were run using 8% SDS-PAGE followed by Western blotting using biotinylated anti-A2 mAbJR8. Lane 1 shows the intact heavy chain. Lanes 2–8 show the cleavage of factor VIII heavy chain in the presence of the increasing concentrations of mAb413 (0, 9, 19, 38, 75, 150, and 300 nM, respectively).

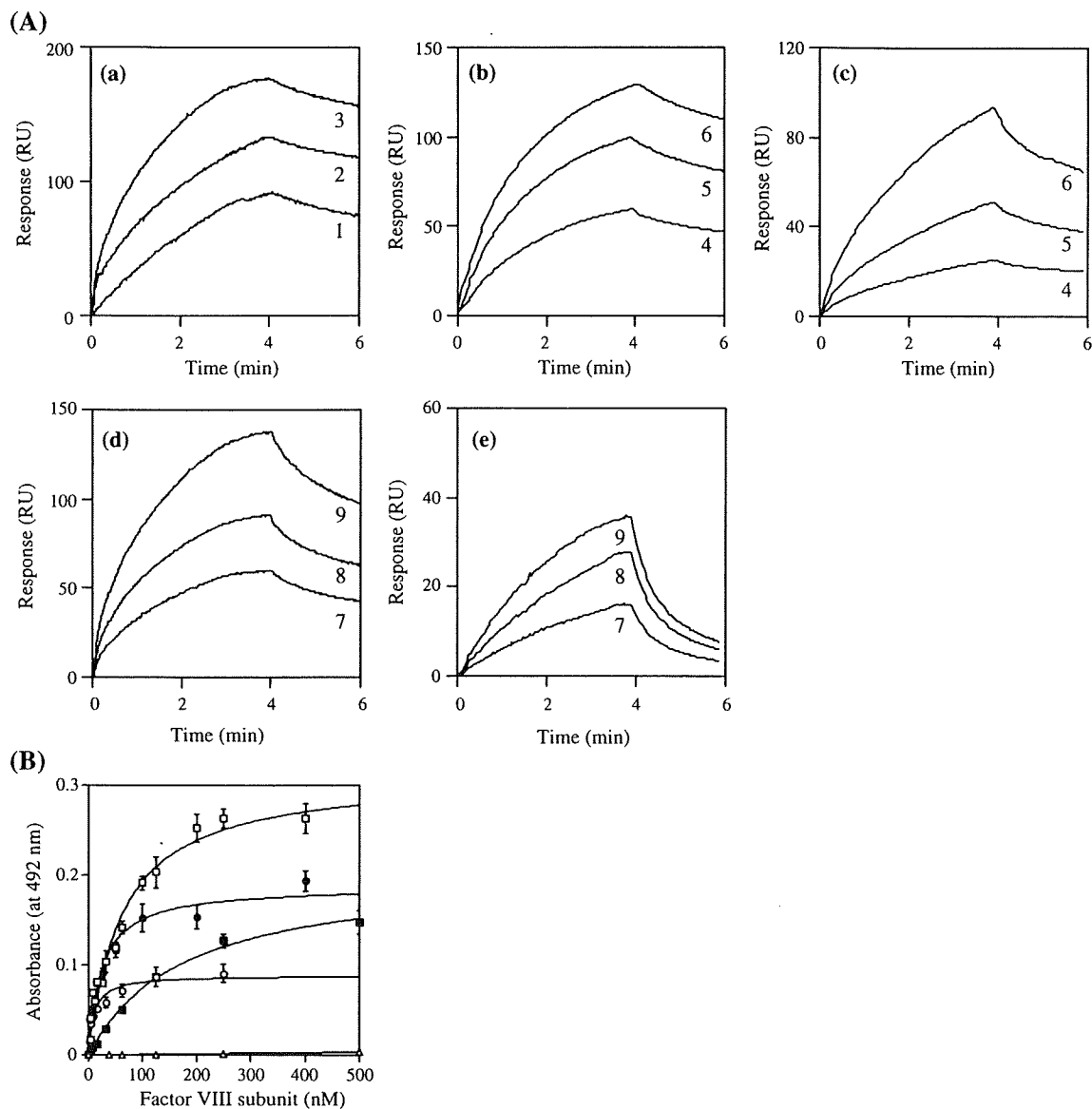


Fig. 3. Direct binding of factor VIII subunits to Ah-plasmin — (A) SPR-based assay for factor VIII subunit binding to Ah-plasmin: Various concentrations of factor VIII (panel a), intact heavy chain (panel b), intact light chain (panel c), the A2 subunit (panel d), and A1 subunit (panel e) were added to Ah-plasmin ($\sim 7 \text{ ng/mm}^2$) immobilized onto the sensor chip for 4 min, followed by the change of running buffer for over 2 min as described in Materials and methods. The lines 1–3 show the association/dissociation curves of factor VIII (12.5, 25, and 50 nM, respectively), lines 4–6 show similar curves for intact heavy chain or light chain (20, 40, and 80 nM, respectively), and lines 7–9 show similar curves for the A2 or A1 (40, 80, and 120 nM, respectively). (B) ELISA for factor VIII subunits binding to Ah-plasmin: Various concentrations of the factor VIII (open circles), the heavy chain (closed circles), A2 subunit (open squares), the light chain (closed squares), and A1 subunit (open triangles) were reacted with Ah-plasmin (100 nM) that had been immobilized onto microtiter wells. Bound factor VIII subunits were detected using biotinylated anti-A1 (58.12), anti-A2 (JR8), anti-C2 (NMC-VIII/5) mAb IgG. Absorbance values were plotted as a function of the concentration of factor VIII subunit, and data were fitted using the Eq. (3) according to a single-site binding model described in Materials and methods.

PBS containing 0.02% Tween 20 and were blocked with PBS containing 5% BSA for 2 h at 37 °C. The indicated factor VIII subunit was then added in HBS-buffer containing 1% BSA for 2 h at 37 °C. Biotinylated factor VIII mAb IgG was added and bound IgG was quantified by the addition of horseradish peroxidase-labeled streptavidin and *O*-phenylenediamine dihydrochloride substrate. Reactions were stopped by the addition of 2 M H_2SO_4 , and absorbances measured at 492 nm using a Labsystems Multiskan Multisoft microplate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). The amount of nonspecific

binding of biotinylated IgG in the absence of factor VIII was <5% of the total signal. Specific binding was recorded after subtracting the nonspecific binding.

2.9. Data analyses

Nonlinear least squares regression analyses were performed using Kaleidagraph (Synergy Reading, PA). All experiments were performed at

Table 2
Binding parameters for the interaction of factor VIII(a) subunit and Ah-plasmin determined in SPR-based assay and ELISA-based assay

Factor VIII fragment	SPR-based assay			ELISA
	k_{ass} $\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{diss} $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	K_d^{appa} nM	K_d^{app} nM
Factor VIII	26.3 ± 0.8	0.8 ± 0.1	3.1	6.7 ± 2.0
Heavy chain	40.2 ± 6.9	2.3 ± 0.1	5.6	13.0 ± 3.1
Light chain	2.9 ± 0.4	2.0 ± 0.7	68.2	115 ± 11
A2	14.3 ± 6.2	3.2 ± 1.3	22.6	40.7 ± 8.7
A1	5.2 ± 0.4	10.9 ± 0.9	208	N.d. ^b

Reactions were performed as described under “Materials and methods”. Parameter values were calculated by nonlinear regression analysis of the kinetic curves shown in Fig. 3A and B using the evaluation software provided by Biacore AB and using Eq. (3) as described under “Materials and methods”. All experiments were performed at least three separate times, and average values and standard deviations are shown.

K_d^{app} : apparent K_d value.

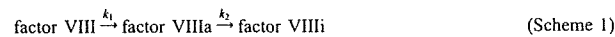
^a Values were calculated as $k_{\text{diss}}/k_{\text{asso}}$.

^b Not determined.

least three separate times and average values and standard deviations are shown. The rate constant (k) for factor VIIIa inactivation by plasmin was determined by employing the Eq. (1),

$$[\text{factor VIIIa}]_t = [\text{factor VIIIa}]_0 \cdot e^{-kt} \quad (1)$$

where $[\text{factor VIIIa}]_t$ is the concentration at time point (t) of factor VIIIa. To evaluate the catalytic efficacy of plasmin for factor VIII, we calculated the activation rate constants based on the values of generated factor VIIIa activity. Assuming that the cleavage event and release of products are rapid, the concentration of free plasmin should be constant. Therefore, the rate constants correlate with the concentration of substrates as follows:



Factor VIIIi represents the inactivated factor VIIIa. These apparent rate constants (k_1 and k_2) in Scheme (1) are based on a series of reactions for factor VIII activation by plasmin and were estimated by nonlinear least squares regression using the Eq. (2) [28],

$$[\text{factor VIIIa}]_t = [\text{factor VIII}]_0 \cdot k_1 \cdot (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) / (k_2 - k_1) \quad (2)$$

where $[\text{factor VIIIa}]_t$ is the concentration at time point (t) of factor VIIIa and $[\text{factor VIII}]_0$ is the initial concentration of factor VIII.

Analyses of factor VIII subunits and Ah-plasmin interaction in ELISA were performed by a single-site binding model using the Eq. (3),

$$\text{Absorbance} = \frac{A_{\text{max}} \cdot [S]}{K_d + [S]} \quad (3)$$

where $[S]$ is the factor VIII subunit; K_d is the dissociation constant; and A_{max} represents maximum absorbance signal when the site is saturated by factor VIII subunit.

Data from studies assessing 6-AHA and A2 synthetic peptide-dependent inhibition of plasmin interaction with isolated factor VIII subunits were analyzed by nonlinear least squares regression using the Eq. (4),

$$\% \text{binding} = \frac{B_{\text{max}} \cdot [\text{factor VIII subunit}]}{K_d \cdot \left[1 + \frac{[L]}{K_i}\right] + [\text{factor VIII subunit}]} + C \quad (4)$$

where L represents the concentration of 6-AHA or peptide; B_{max} represents maximum binding; K_d is the dissociation constant for the interaction between factor VIII subunit and Ah-plasmin; K_i is the (apparent) inhibition constant for L ; and C is a constant for the binding of factor VIII subunit and plasmin that was unaffected by L .

3. Results

3.1. Effect of the exogenous A2 subunit on plasmin-catalyzed factor VIII(a) activation and inactivation

We have recently suggested that plasmin might interact with the A2 subunit of factor VIII, leading to inactivation of the cofactor by proteolytic cleavage at Arg³³⁶ [20]. To investigate whether the A2 subunit contains a plasmin-interactive site responsible for plasmin-catalyzed activation and subsequent inactivation of factor VIII, we examined the effect of isolated A2 subunits on these reactions. Factor VIIIa activity was measured using a one-stage clotting assay. Control experiments showed that the presence of exogenous A2 subunit, plasmin, and the plasmin-inhibitor, pefabloc, did not affect this assay at the dilutions utilized. Activation of factor VIII (25 nM) by plasmin (1 nM) was evaluated in the presence of increasing concentrations of isolated A2 subunit (Fig. 1A, panel a). Rates of formation (activation) and decay (inactivation) of factor VIIIa were determined and are summarized in Table 1. Under physiological conditions, factor VIIIa reacts optimally on a membrane surface, and in the present assay phospholipid vesicles (10 μM) were added to the factor VIII solutions prior to reaction with plasmin. We have previously confirmed that the presence of this phospholipid has little effect on the reaction between factor VIII and plasmin [20]. We observed that plasmin-catalyzed activation of factor VIII was significantly inhibited by the addition of isolated A2 subunit in a dose-dependent manner. At the maximum concentration of A2 employed (200 nM), the peak

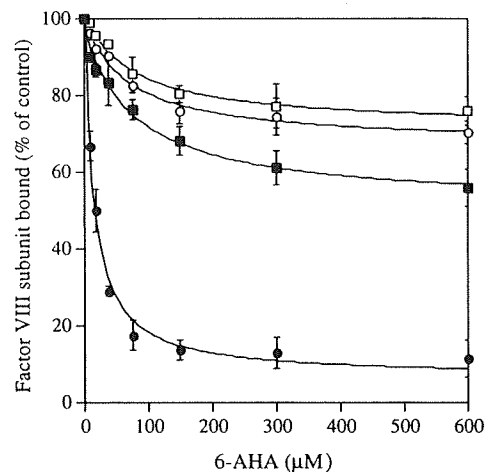


Fig. 4. Effect of 6-AHA on the A2 or light chain subunit binding to Ah-plasmin — The A2 (60 nM, open circles), the light chain (120 nM, closed circles) subunits, the heavy chain (30 nM, open squares), and factor VIII (20 nM, closed squares) in the presence of the indicated levels of 6-AHA were reacted with Ah-plasmin (100 nM) immobilized onto microtiter wells. Bound A2, heavy chain, factor VIII, or light chain was detected using biotinylated anti-A2 (JR8) or anti-C2 (NMC-VIII/5) mAb IgG, respectively. The absorbance values corresponding to the factor VIII subunit binding to Ah-plasmin in the absence of competitor were considered to be 100%. The percentage of factor VIII subunit binding was plotted as a function of 6-AHA concentration, and the plotted data were fitted by nonlinear least squares regression to an Eq. (4).