

表9 治療抵抗性 ITP の治療

- ・ダナゾール
- ・アザチオプリン
- ・デキサメタゾン大量療法
- ・メチルプレドニゾン大量療法
- ・IVIg (免疫グロブリン大量静注) 療法
- ・シクロスポリン
- ・ピンカアルカロイド緩速点滴静注
- ・リツキシマブ
- ・TPO (トロンボポエチン) アゴニスト
- ・シクロホスファミド少量, 大量
- ・ダブソン
- ・抗D血清療法
- ・併用化学療法

これらの治療を適宜選択して行っているが, IVIg 療法やステロイド療法 (デキサメタゾン大量療法, メチルプレドニゾン大量療法) を除いて保険適用が認められていない。 (筆者作成)

表10 わが国における難治性 ITP に対する治療効果 (厚生省研究班による)

	著効 (血小板数>10万/ μ L)	血小板数>2万/ μ L 増加
ダナゾール療法 (野村ら, 1984年)	5 /56 (8.9%)	30/56 (53.6%)
ピンカアルカロイド療法 (野村ら, 1987年)	3 /27 (11.1%)	12/27 (44.4%)
アスכולピン酸療法 (蔵本ら, 1989年)	3 /78 (3.8%)	9 /78 (11.5%)

投与終了時の解析結果を示す。

表11 ITP におけるダナゾール療法

報告者	症例数	ダナゾール投与量 (mg/日)	反応良好	持続期間 (月)
Ahn	22	600 ~ 800	13 (59%)	1 ~ 13
McVerry	10	400 ~ 600	3 (33%)	6
Buelli	14	600	7 (50%)	2 ~ 7
Fermand	26	600	14 (54%)	記載なし
Ambriz	25	600	12 (48%)	記載なし
Mazzucconi	10	600	1 (10%)	記載なし
Nalli	14	600	5 (50%)	2 ~ 12
Almagro	9	400 ~ 800	1 (11%)	6
Fenau	22	600	3 (14%)	記載なし
Ruberto	17	100 ~ 600	10 (59%)	記載なし
Schiavotto	17	400 ~ 800	10 (56%)	記載なし
Kotlarek-Haus	16	300	7 (43%)	記載なし
Nozaki	17	50	1 (6%)	記載なし
Maloisel	57	600	27 (46%)	119 ± 45
合計	276	50 ~ 800	114 (41%)	↑ ~ 119

少量よりも 400 ~ 600 mg/日のほうが効果があるように見えるが副作用, 特に肝障害が治療中止の要因になる。わが国では保険適用の問題があり, 男性には使用しにくい。

効果があれば徐々に減量していき, 最終的に中止可能な症例もあると報告されている。

難治性 ITP の治療としては, まず手始めに使用する薬剤となる。

(文献 34 より改変引用)

1 回点滴静注し、これを 2～4 回繰り返す方法である。20 例に対して行われた成績では 13 例 (65%) が血小板数 15 万/μL 以上となり、完全寛解の 13 例中 8 例は 7 カ月から 7 年間 (平均 2.5 年) 完全寛解を維持しており、有用な治療法である。このほか高用量のシクロホスファミドを用いた後に自家末梢血幹細胞移植 (auto-PBSCT: autologous peripheral blood stem cell transplantation) を行う報告もあり、移植に伴うリスクはあるが 50% 以上に良好な血小板数の増加がみられている (表 12)。

(6) 多剤併用化学療法⁴⁰⁾

CMOPP (シクロホスファミド+ビンクリスチン+プロカルバジン+プレドニゾロン), CMV (シクロホスファミド+ビンクリスチン+プレドニゾロン), CEP (シクロホスファミド+エトポシド+プレドニゾロン) 療法など、悪性リンパ腫に準じた化学療法が行われ、長期間の寛解が得られた報告がある。しかし骨髄抑制、消化器症状など副作用が強く支持療法や補充療法を必要とする症例もあり、これら治療による白血病など二次発がんが危惧され、適応を十分に吟味して選択すべきである。

(7) ダブソン療法⁴¹⁾

本剤はハンセン病や乾癬などの治療薬であるが、

難治性 ITP に対し本剤 100 mg/ 日経口服用後 40% の症例に血小板の増加効果が認められ、持続効果もあると報告されている。作用機序は明らかではないが多くの症例に溶血所見が認められることから、赤血球破壊による網内系細胞のブロックが推測されている。

(8) リツキシマブ療法^{42, 43)}

B リンパ球に発現している CD20 抗原を標的としたキメラモノクローナル抗体 (リツキシマブ) で、CD20 陽性悪性リンパ腫の治療薬として化学療法との併用で良好な治療成績をおさめている。最近、抗体産生にかかわる非悪性 B リンパ球もその標的となることから、種々の自己免疫疾患への応用も試みられてきた。ITP においては 1998 年の症例報告以来、各国で散発的に成人の治療抵抗性 ITP に使用されてきたが、今回その効果と副作用が評価可能な 19 報告、313 例についてレビューされた (表 13, 図 12, 表 14)⁴³⁾。それによると、リツキシマブ 375 mg/m² を週 1 回 4 週間点滴静注する方法で完全寛解は 46.3% に認められ、血小板数 5 万/μL 以上の増加反応を示した症例は 62.5% と良好な反応を示した。平均血小板増加反応期間は 10.5 カ月で、10.5% が再発している。一般に CR (complete remission: 完全寛

表 12 ITP に対する auto-PBSCT の成績

対象	
14 例, 17～52 歳, 治療抵抗性 ITP, 血小板数 < 2 万/μL	
治療スケジュール	
PBSC (末梢血幹細胞) 動員: G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) 10 μL/kg/ 日, 静注 白血球除去 day 5 および / もしくは day 6 CD34 陽性細胞選択 (免疫磁気ビーズ法)	
前処置	
シクロホスファミド 50 mg/kg/ 日, 4 日間	
結果	
CR (完全寛解)	血小板数 > 10 万/μL 6 例 (43%) - 死亡 1 例
PR (部分寛解)	血小板数 > 5 万/μL 2 例 (14%) - 死亡 1 例
NR (無反応)	6 例

現時点では自家末梢血幹細胞移植 (auto-PBSCT) しか行われていない。死亡例はいずれも移植に伴うものである。

(文献 39 より引用)

解) 症例は再発が少ないのに対し, PR (partial remission: 部分寛解) 例は再発が多く, ITP としての罹病期間の長い症例 (15 年以上) では反応が悪い傾向にある。

副作用として軽微なものが 306 例中 66 例 (21.6%), grade 3~4 の生命にかかわる重篤例が 10 例 (3.7%), grade 5 の 9 例 (2.9%) が死亡している。死因の多くは本療法に起因した肺感染症による呼吸不全や出血であるが, 治癒に近い症例も多く, 副作用に対する対策を考慮した上で今後使用する価値があると考えられる。

(9) 血小板増殖因子療法^{44~47)}

最近 TPO レセプターアゴニストとしてペプチド

や非ペプチド性の小分子, さらには TPO アゴニスト作用を有する抗体などが開発されている (表 15)。いずれも TPO レセプターに結合し, 巨核球コロニーを増加させ, 巨核球の成熟を促進し血小板産生が亢進することが確認されている。難治性 ITP を中心に 2 つの薬剤 (AMG531 (romiplostim), eltrombopag) について臨床治験の結果が報告された^{44, 45)}。いずれも投与量依存性に 5~7 日目から血小板数が増加し始め, 12~16 日目くらいに最大の血小板増加を認め, 継続使用により血小板数の増加効果を維持することができる。TPO に対する抗体は出現せず, 1 年以上の長期投与においても重篤な副作用は認められていない⁴⁶⁾。難治症例の 80% 以上に血小板

表 13 難治性 ITP 症例に対するリツキシマブ療法の効果

報告者	報告年	症例数	反応症例	CR	PR	NR	長期反応例 (期間)
Stasi R	2001	25	13 (52%)	5 (20%)	5 (20%)	3 (12%)	7 (28%) (6 カ月<)
Giagoumidis A	2002	12	9 (75%)	5 (41%)	2 (17%)	2 (17%)	4 (33%) (320 日<)
Zaja F	2003	20	13 (65%)	9 (45%)	4 (20%)	—	6 (30%) (180 日<)
Cooper N	2004	57	31 (54%)	18 (32%)	13 (23%)	—	16CR (28%) (72.5 週<)
Braedndstrup P	2005	39 クール	17 (44%)	7 (18%)	6 (15%)	4 (10%)	13CR, PR (33%) (47 週)
Penalver F.J.	2006	89	49 (55%)	41 (46%)	8 (9%)	—	31 (35%) (9 カ月)
Bennett C (小児)	2006	36	11 (31%)	—	—	—	—
Parodi E (小児)	2006	19	13 (63%)	13 (63%)	—	—	7 (37%) (33 カ月)

CR: 完全寛解, PR: 部分寛解, NR: 無反応

(文献 43 より引用)

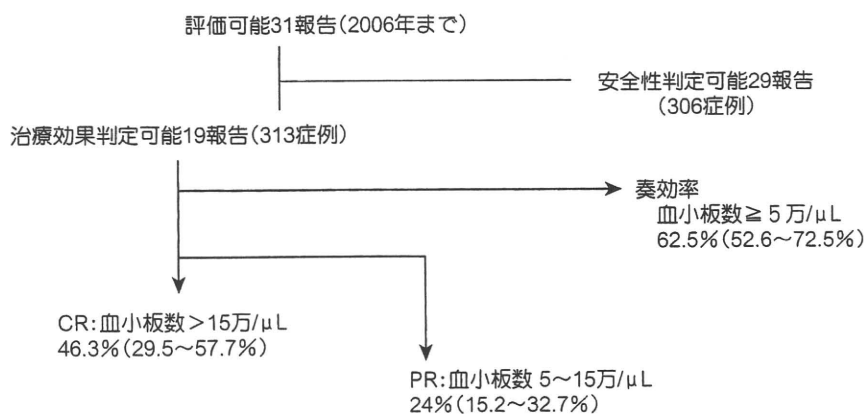


図 12 ITP に対するリツキシマブ療法の系統的 review

2006 年までに報告された評価可能な摘脾成績の論文は 31 であった。この論文の中で治療効果判定可能な 19 報告 313 症例についての治療成績を示したものである。全般的な奏効率は 62.5% となった。

CR: 完全寛解, PR: 部分寛解

(文献 43 より引用)

増加効果が認められ、出血が回避されることから有用性が高い。しかし根本治療でないために使用し続ける必要のあること、使用中後に血小板数は治療前値に戻り、その際出血傾向が増悪する例があること、骨髄で細網線維が増加する症例があること（投与を中止すれば回復するらしい）など、長期投与が余儀なくされる難治性 ITP に関しては、長期使用による副作用の再確認が必要である（図 13, 14）。

(10) 多剤併用療法による出血傾向に対する治療⁴⁸⁾

難治性症例のなかには IVIG (intravenous immunoglobulin: 免疫グロブリン大量静注) 療法に対し

ても抵抗性を示す症例が存在し、出血の回避に難渋することが多い。このような症例に対して IVIG (1 g/kg) に加え副腎皮質ステロイド療法 (30 mg/kg), ビンカアルカロイド点滴静注療法 (VCR 0.03 mg/kg) あるいは抗 D 血清療法⁴⁹⁾ の 3 剤を併用したり、これら 4 剤を併用する治療が行われている。その結果、71% の症例に 3 万 / μ L 以上の血小板増加反応が認められている。さらには引き続いてダナゾール 10 ~ 15 mg/kg), アザチオプリン (2 mg/kg) の併用維持療法が行われた 17 例中 13 例は血小板数が 5 万 / μ L 以上となり日常の出血が回避され、予定

表 14 治療抵抗性 ITP の治療成績

	症例数	CR	PR	NR	長期効果
シクロスポリン A		5 (41.7%)			
2002 Emilina G	12	4 (33.3%) *	1 (8.3%)	2	60% (26.6 カ月)
リツキシマブ					
2003 Shanafeld	12	5 (42%)			
2004 Cooper N	57	18 (32%)	13 (23%) **	26	16/18 (72.5 週)

*維持療法継続

**11 例再発

CR: 完全寛解, PR: 部分寛解, NR: 無反応

(筆者作成)

表 15 血小板増殖因子

第一世代血小板増殖因子
遺伝子組換えヒト血小板増殖因子
rhTPO, PEG-rHuMGDF
遺伝子組換え TPO 融合蛋白
Promegapoeitin (TPO/IL-3 fusion protein)
第二世代血小板増殖因子
TPO 類似ペプチド
Fab59
AMG531
Peg-TPOmp
TPO 類似非ペプチド
eltrombopag (SB-497115)
AKR-501 (YM477)
TPO アゴニスト抗体
Minibodies: c-Mpl に結合するモノクローナル抗体
MA01G4G344: Mpl に対するモノクローナル抗体

(筆者作成)

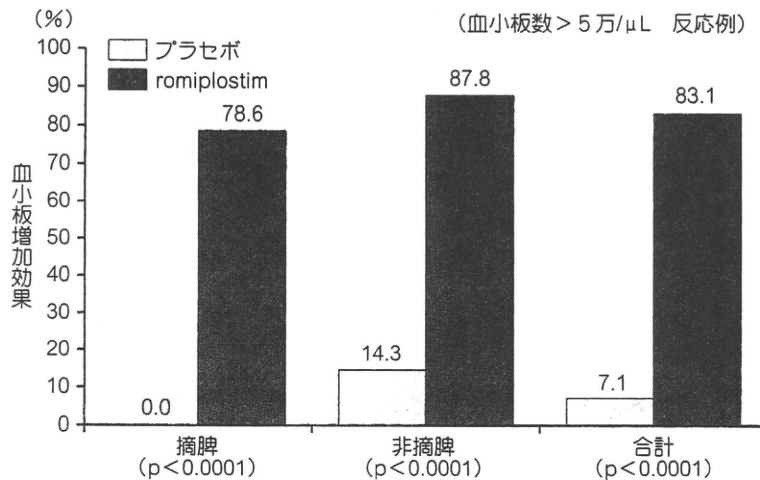


図 13 TPO アゴニストである AMG531 (romiplostim) の ITP に対する血小板増加効果

摘脾の有無にかかわらず 80%以上の症例で血小板増加効果が認められた。本剤は皮下注射薬で、1週間に1回の皮下注射で血小板数の維持が可能である。(文献 44, 46 より引用)

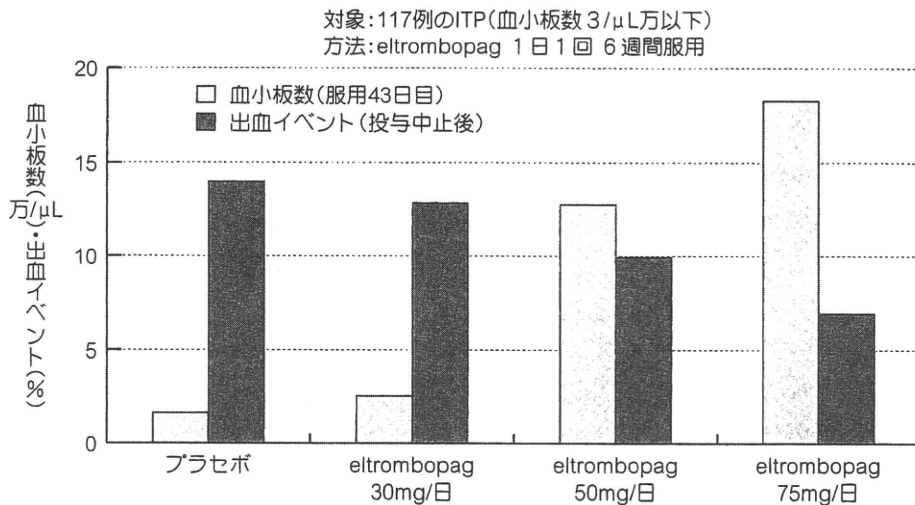


図 14 TPO アゴニスト eltrombopag による ITP に対する血小板数増加効果

本剤は経口薬で、連日服用の結果、服薬量依存性に出血のイベントが減少し、血小板数は増加することが示されている。

(文献 45 より引用)

手術が可能になったと報告されている。

(11) その他

難治性 ITP の治療には十分満足すべき方法がなく種々の治療法が研究的に行われている。抗 RhD 血清を用いて自己赤血球を感作し、この感作赤血球による網内系のブロック作用を利用する方法もある

が、わが国での基礎的検討はなされていない。また免疫抑制薬としてはシクロスポリン (シクロスポリン A) が有効であった症例の報告もみられている (表 14)。さらに、分子標的薬の 1 つとして Syk inhibitor が Fcγ レセプターを介するマクロファージの貪食機能を抑える点に着目し、難治性 ITP に対して良

好な成績が報告され、今後の発展が期待されている⁴⁹⁾。

c) 緊急時あるいは外科的処置、分娩時などにおける治療

重篤な出血傾向を示す急性 ITP や慢性 ITP で経過中、主要臓器内への出血（脳、肺、消化管、腹腔内など）や血小板数 $5 \text{ 万} / \mu\text{L}$ 以下の手術、分娩時には一時的にでも血小板数を増加させることが必要である。これらの状態では血小板数は可能であれば $10 \text{ 万} / \mu\text{L}$ 以上が望ましいが、 $8 \text{ 万} / \mu\text{L}$ 以上でも脳出血など頭部手術を除いて良好な経過をたどることが多い。特に分娩時には血小板数 $5 \text{ 万} / \mu\text{L}$ 前後でも自然分娩が可能で、子宮収縮がよければ出血量は必ずしも多くならない（図 15）⁵⁰⁾。

(1) 血小板輸血

緊急時に血小板を増加させるには有効であるが、血小板抗体が存在するので輸注血小板の寿命は短い。したがって時間的余裕があれば、後述する γ グロブリン大量療法を併用すると血小板増加効果が上がる。

(2) γ グロブリン大量療法 (HIVG)⁵¹⁾

完全分子型免疫グロブリン 400 mg/kg/日 を 5 日間連続点滴静注する。作用機序は、IgG の Fc 部分が網内系細胞の Fc レセプターをブロックするため、

感作血小板の貪食作用が阻止されて血小板が増加すると考えられている。本療法開始 5～10 日後血小板は増加し、平均 7 日後に最大値に達するが、多くは一過性に留まり、持続日数は数日である。64% の症例は血小板数が $10 \text{ 万} / \mu\text{L}$ 以上となり、 $5 \text{ 万} / \mu\text{L}$ 以上の増加を示す例は 83% で、有用性が高い。本療法が無効な例でも血小板輸血を併用すると血小板数は効率よく増加する例が多い。

(3) メチルプレドニゾンパルス療法⁵¹⁾

メチルプレドニゾン 1 g/日 点滴静注を 3 日間行い、以後漸減する。急性 ITP に使用され効果が上がっているが、最近慢性 ITP にも用いられ、約 80% の症例で $10 \text{ 万} / \mu\text{L}$ 以上の血小板数の増加が認められている。反応は 3 日目くらいより現れるが一過性である。副作用は副腎皮質ステロイドに準じる。

VIII 予後

わが国における本症の長期予後は、急性型 62 例中治癒 53 例 (85.4%) である。慢性型 186 例中非摘脾例 127 例の予後は、治癒 45 例 (35.4%)、治療中 70 例 (55.1%)、摘脾群 59 例中では治癒 35 例 (59.3%)、治療中 23 例 (39%) であった⁵²⁾。したがって慢性型全体では約 43% が治癒し、残りは何らかの

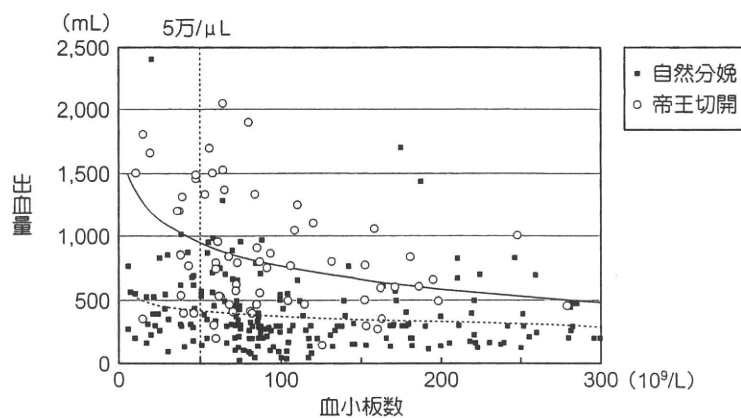


図 15 分娩時の血小板数と出血量

血小板数 $5 \text{ 万} / \mu\text{L}$ 以下でも 1 例を除き自然分娩では出血量が $1,000 \text{ mL}$ 以下であるのに対し、帝王切開では半数以上が $1,000 \text{ mL}$ を超える。帝王切開時には血小板数は少なくとも $5 \text{ 万} / \mu\text{L}$ 以上であることが望ましい。

(文献 50 より引用)

37. 特発性血小板減少性紫斑病

かたちで治療を継続する必要があり、本症が慢性に出血傾向を繰り返して経過する病気であることを裏づけている(図16)。外国における単一施設での長期予後の報告を図17に示す⁵³⁾。

わが国における全体の死亡例は21例(8.5%)で急性型の12.9%、慢性型非摘脾群の9.4%、摘脾群の1.7%であった。死因の多くは脳出血(13例)で、本症の病態をあらわしている(図16)。しかし1983年から始めたプロスペクティブ研究では観察対象症例250例中16例(6.4%)が死亡し、死亡率の減少が認められている。直接死因となった疾病は悪性腫瘍が5例、感染症(炎症)5例、出血が原因となった例は脳出血の1例のみで、死亡直前の血小板数は4例が5万/ μ L以上、6例が10万/ μ L以上に保たれていた(表16)。

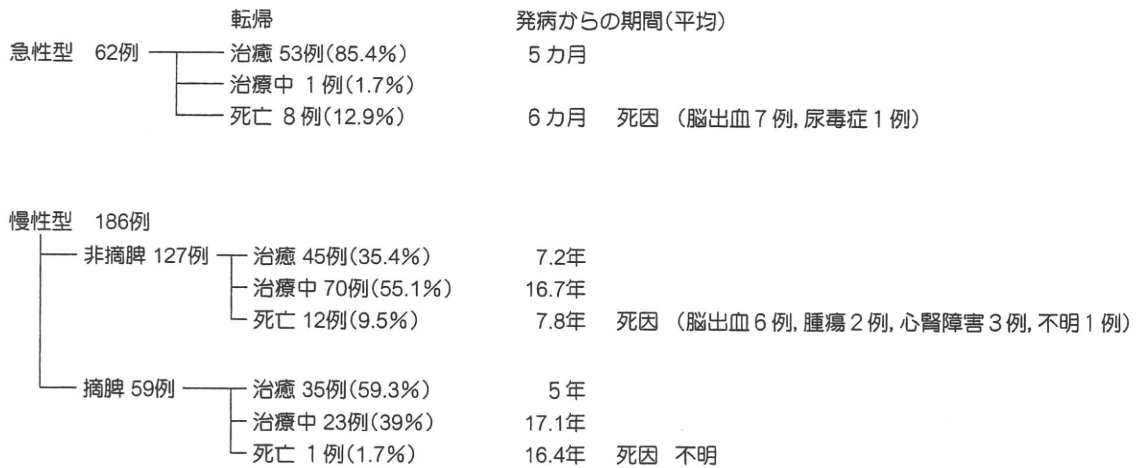
このことより、本症の予後は治療法の進歩によって向上し、特に出血に基づく死因は極端に減少したのに対し、治療薬の副作用が関係している感染症死

や、罹患年齢の高齢化に伴う悪性腫瘍死が増加傾向にある。

外国における長期予後の検討では、Portieljeらによると、2年以上経過観察した134例の予後は、治療後血小板数3万/ μ L以上となり、以後無治療で経過している症例の長期死亡の危険率は一般人と変わらない。しかし3万/ μ L以下の症例では死亡の危険率が一般人に比し4.2と高く、出血や感染が主たる死亡原因であると報告している(表17)⁵⁴⁾。2年以内に4例がITP関連死し、それ以降に17名(15%)が死亡し、2例はITPに関連した出血死や感染症死で、15例はITPとは関連のないがん、心・脳血管障害などであった。また長期間の追跡調査中ITPに関連した入院の頻度は、治療抵抗群や維持療法必要群において高いと報告している(表16)。

また血小板数3万/ μ L以下の症例1,817例のメタ解析の結果、49例の致死性的出血症例が集積された。致死性的出血や重篤な出血は年齢に比例して頻度が増

248例の解析



※当初ITPとされ、その後非ITPとなった症例11例(SLE 7例, 再生不良性貧血 1例, その他 3例)は含まず。

図16 わが国におけるITPの長期予後(1974年以前10年間に集積した症例)におけるアンケート調査による10年後(1983~1984年)の予後調査

アンケートによる予後調査で慢性型の約43%の症例が治癒し、50%が長期にわたって何らかの治療を継続している。死亡は約7%でITP関連した出血死は約半数である。

急性型は多くは治癒するが、死亡例の多くは出血が原因であり急性型は出血傾向が強いことを示している。

SLE: 全身性エリテマトーデス

(文献52および山中 學ほか: 臨床血液 27: 1737-1741, 1986より引用)

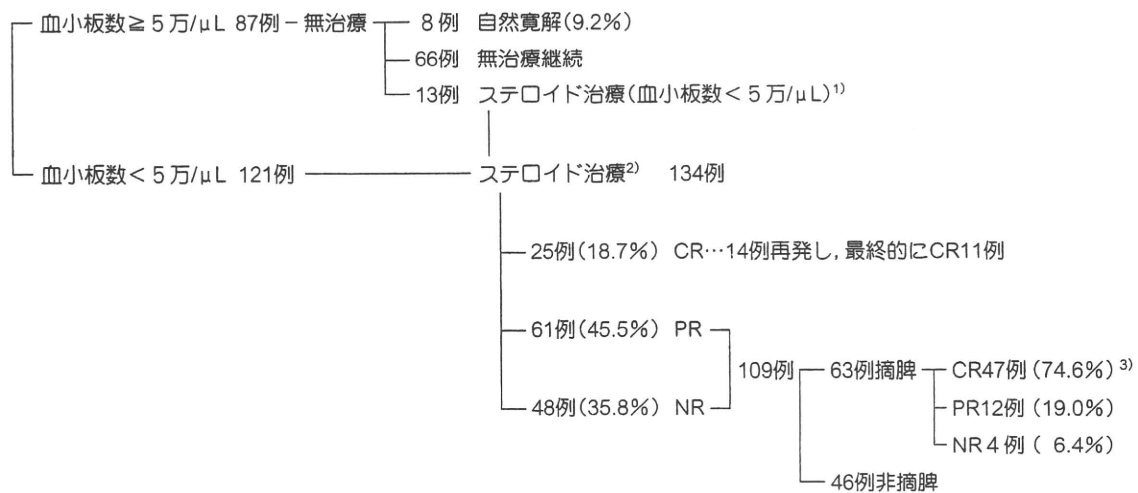


図 17 ITP の治療予後

¹⁾ 経過観察中に血小板数 5 万 / μL 未満となった症例

²⁾ プレドニン 1 mg/kg/ 日

³⁾ 長期間の CR は 23 例となった

CR (完全寛解) : 血小板数 12 万 / μL 以上 PR (部分寛解) : 血小板数 5 ~ 12 万未満 NR (無反応) : 血小板増加なし, 5 万 / μL を超えない

最終的に CR43 例 (20.6%), 死亡 11 例 (5.3%)。このうち ITP 関連死 5 例, 非関連死 6 例

慢性 ITP では血小板数が 5 万 / μL 以上あれば無治療で長期の観察が可能で, なかには自然寛解する症例が 9.2% 存在することが明らかとなった。第一選択薬である副腎皮質ステロイドによる長期の寛解率は低く, また最終的な CR 率も低く, 長期間の治療, 観察が必要な難治性疾患であることがうかがえる。 (文献 53 より引用)

表 16 ITP 治療後の死亡原因

死亡原因	厚生省研究班報告		Portielje, et al
	1973 ~ 1984	1983 ~ 1991	1974 ~ 1996
出血 (脳出血など)	6 例	1 例	2 例
血栓症	1 例	2 例	4 例
悪性腫瘍	2 例	5 例	4 例
炎症	0	5 例	4 例
腎, 心不全	2 例	1 例	
その他			7 例
不明	4 例	2 例	3 例
合計	15 例	16 例	24 例

ITP 治療指針が定まる以前 1984 年までは出血死が多いが, 治療指針が定まってからは悪性腫瘍, 治療関連死 (炎症) が増えてきている。この傾向は外国でも同様である。その他は ITP と関連しない死因である。

(文献 52, 54 より引用)

表 17 一般人口に対する血小板減少症の死亡危険率

治療に対する反応	症例数	死亡危険率 (95%CI)
完全寛解	90	0.7 (0.4 ~ 1.3)
不完全寛解	24	1.8 (0.6 ~ 5.5)
維持療法	8	1.8 (0.6 ~ 5.5)
反応なし	12	4.2 (1.7 ~ 10.0)

I TP の死亡危険率の一般人口との比較。死亡危険率は二次性免疫性血小板減少症で高く、2年間の治療後血小板数が3万/μL未滿で推移する症例は死亡危険率が一般人口に比し4.2倍高い。3万/μL以上維持している症例では一般人口に比しやや高くなる程度である。

完全寛解：15万/μL以上
 不完全寛解：5万～15万/μL未滿
 維持療法：3万～5万/μL未滿
 反応なし：3万/μL未滿

(文献 54 より引用)

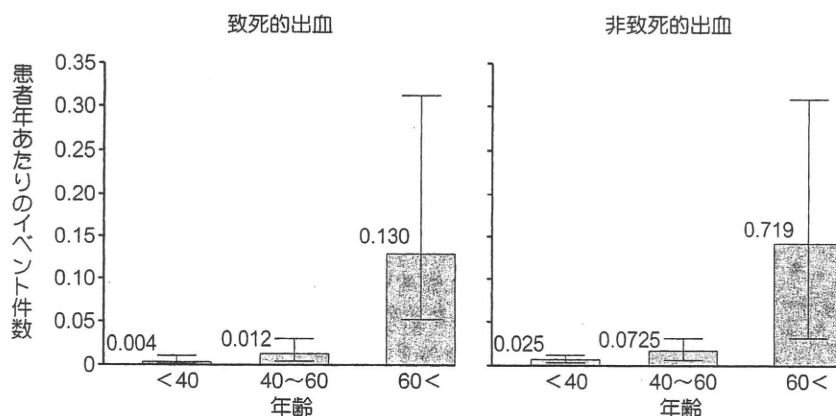


図 18 年齢による致死性的、非致死性的出血の年間発生数の見積もり

既報告論文を集積しメタ解析を行ったもので、患者年あたりの致死性的、非致死性的イベント数を各年齢群別に見積もったものである。

40歳未滿の症例では60歳を超える症例に比し致死性的イベント発生件数が30倍以上高く、非致死性的イベント発生件数も28倍高い。すなわち、加齢が出血イベント発生を増加させる要因である。

(文献 55 より引用)

し、40歳未滿と60歳を超える症例の比較では約30倍違う(図18)。5年間の予測死亡率は40歳以下では患者年あたり2.2%、60歳以上では47.8%と計算されている。また年齢が高くなるに従い経年的に出血のイベントが増加し、予後は年齢と密接に関係している(図19)⁵⁵⁾。

以上のようにITPは難病として扱われているが、

その生命予後は多くの例において決して悪い疾病ではない。しかし、いかなる治療法によっても血小板数のコントロールが困難な難治症例(5~30%)においては、出血傾向にさらされ生命予後は60歳以上で悪い(表18)⁵⁶⁾。

一方、重症ITP130症例に対し血小板数1万/μL以上を維持することを目標に治療し、10年間経過観

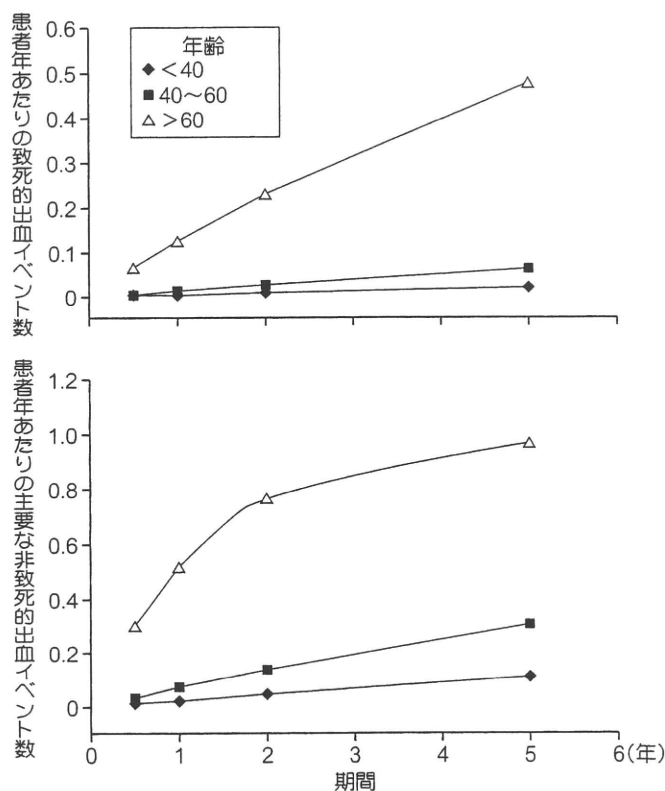


図 19 経年的出血イベントの患者年あたりの累積件数

いずれのイベント数も 60 歳を超えると経年的に累積数が増加するのに対し、それ以下では累積増加件数が非常にゆっくりしている。すなわち加齢に伴って経年的に出血の頻度が増し、特に非致死的な出血は 2 年以内に多く発生する。

(文献 55 より引用)

表 18 生命予後、出血症状を規定する因子

血小板数 3 万 / μL 以下が持続すると

(文献 54)

死亡危険率が 4.2 と一般人に比し高い

(文献 56)

60 歳以上では 40 歳以下に比し出血の危険率(オッズ比)が 28.9 と高い

(文献 55)

5 年間の予測死亡率 60 歳 < 47.8%

40 歳 > 2.2%

生命予後が一般人に比し各年代で短い

血小板数が 3 万 / μL 以下が持続すると死亡危険率が高くなり、特に 60 歳以上では出血の危険率が高まる。したがって血小板数 3 万 / μL 以上を、治療目標にする根拠となっている。

37. 特発性血小板減少性紫斑病

察した成績では出血による死亡はなく、2例が感染、7例はITPと関連のない死亡であった。このことからITPは比較的予後の良い良性の疾患で、アグレッシブな治療は必要なく、血小板数を1万/ μL 以上に保っていれば出血が防げるとの報告もある⁵⁷⁾。

ITPの合併症

合併症としては、出血傾向の結果として、出血性(鉄欠乏性)貧血や臓器出血による臓器障害(たとえば脳出血後遺症)などが認められるが、特に後者の頻度は少ない。一方、各種治療による副作用としての合併症は多くの症例で認められ、特に治療対象年齢が50歳を超えると治療薬による種々の副作用の出現頻度が増加する。副腎皮質ステロイドによる糖尿病、高血圧症、不眠症、内分泌障害、感染症、骨粗鬆症、大腿骨頭壊死などに加えて、免疫抑制薬の併用による感染症の増悪などが日常認められる。またダナゾールによる男性化作用や肝機能障害、ビンカアルカロイドによる末梢神経障害、脱毛などはよく知られている。

わが国のデータはすべて厚生省、厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患研究克服事業)からの補助金を受けて行われたものである。

文献

- 1) Shimomura T, Fujimura K, Takafuta T, et al : Oligoclonal accumulation of T cells in peripheral blood from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 95 : 732-737, 1996
- 2) Kuwana M, Kaburaki J, Kitasato H, et al : Immunodominant epitopes on glycoprotein IIb-IIIa recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 98 : 130-139, 2001
- 3) Ling Y, Cao X, Yu Z, et al : Circulating dendritic cells subsets and CD4 + Foxp3 + regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol* 79 : 310-316, 2007
- 4) Yu J, Heck S, Patel V, et al : Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 112 : 1325-1328, 2008
- 5) Liu B, Zhao H, Poon MC, et al : Abnormality of CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 78 : 139-143, 2007
- 6) 桑名正隆, 池田康夫, 佐藤隆司ほか : 特発性血小板減少性紫斑病の新規マウスモデル作製の試み. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成19年度総括・分担研究報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」. 2008, p99-104
- 7) 倉田義之 : 臨床個人調査票集計による特発性血小板減少性紫斑病の全国疫学調査(3年間のまとめ). 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成19年度総括・分担研究報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」. 2008, p95-98
- 8) Frederiksen H, Schmidt K : The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood* 94 : 909-913, 1999
- 9) Neylon AJ, Saunders PW, Howard MR, et al : Clinically significant newly presenting autoimmune thrombocytopenic purpura in adults ; a prospective study of a population-based cohort of 245 patients. *Br J Haematol* 122 : 966-974, 2003
- 10) 野村武夫ほか : 特発性血小板減少性紫斑病の臨床病態—2次調査個人票の集計成績. 厚生省特定疾患「特発性造血障害」調査研究班 昭和60年度研究業績報告書. 1986, p267-282
- 11) Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, et al : Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 102 : 887-895, 2003
- 12) McMillan R, Nugent D : The effect of antiplatelet autoantibodies on megakaryocytopoiesis. *Int J Hematol* 81 : 94-99, 2005
- 13) 桑名正隆, 池田康夫 : 特異的検査法を取り入れた新しいITPの診断基準. *日本血栓止血学会誌* 16 : 607-613, 2005
- 14) 蔵本 淳 : 特発性血小板減少性紫斑病分科会報告. 厚生省特定疾患「特発性造血障害」調査研究班 平成2年度研究業績報告書. 1991, p59-63
- 15) 桑名正隆 : ITP診断における各種検査法の有用性を検討する多施設前向き調査—中間報告—. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成15年度総括・分担研究報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」. 2004, p57-61
- 16) Kuwana M, Kurata Y, Fujimura K, et al : Preliminary laboratory based diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura : evaluation by multi-center prospective study. *J Thromb Haemost* 4 : 1936-1943, 2006
- 17) 野村武夫 : 特発性血小板減少性紫斑病分科会報告. 厚生省特定疾患「特発性造血障害」調査研究班 昭和58年度研究業績報告書. 1984, p26-31
- 18) 藤村欣吾 : 免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) における治療ガイドライン(案)の提案—ヘリコバクテリ菌除菌療法の成績を踏まえて—. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服

- 服研究事業 平成 16 年度総括・分担研究報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」. 2005, p53-69
- 19) 藤村欣吾, 桑名正隆, 倉田義之ほか: 新規 ITP 治療ガイドラインによる治療成績—平成 19 年度班員アンケート調査から—. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成 19 年度総括・分担研究報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」. 2008, p31-38
 - 20) Gasbarini A, Franceschi F, Tartaglione R, et al : Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 352 : 878, 1998
 - 21) Fujimura K, Kuwana M, Kurata Y, et al : Is eradication therapy useful as the first line of treatment in *Helicobacter pylori*-positive idiopathic thrombocytopenic purpura? Analysis of 207 eradicated chronic ITP cases in Japan. Int J Hematol 81 : 162-168, 2005
 - 22) Fujimura K : *Helicobacter pylori* infection and idiopathic thrombocytopenic purpura Int J Hematol 81 : 113-118, 2005
 - 23) Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, et al : Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of H.pylori-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 124 : 91-96, 2004
 - 24) 桑名正隆, 池田康夫 : ITP における *Helicobacter pylori* 除菌効果発現機序. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成 18 年度総括・分担研究報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」. 2007, p83-88
 - 25) McMillan R : Therapy for adults with refractory chronic immune thrombocytopenic purpura. Ann Intern Med 126 : 307-314, 1997
 - 26) George JN, Woolf SH, Raskob GE, et al : Idiopathic thrombocytopenic purpura : a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. Blood 88 : 3-40, 1996
 - 27) Clines DB, Bussel JB : How I treat idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Blood 106 : 2244-2251, 2005
 - 28) British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force : Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. Br J Haematol 120 : 574-596, 2003
 - 29) 蔵本 淳, 小田健司, 川野宏則ほか: 多施設共同研究による摘脾療法の影響成績. 厚生省特定疾患「特発性造血障害」調査研究班 平成 4 年度研究業績報告書. 1993, p130-133
 - 30) Kojouri K, Vesely SK, Terrell DR, et al : Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura : a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. Blood 104 : 2623-2634, 2004
 - 31) Fabris F, Tassan T, Ramon R, et al : Age as the major predictive factor of long-term response to splenectomy in immune thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 112 : 637-640, 2001
 - 32) McMillan R, Durette C : Long-term outcomes in adults with chronic ITP after splenectomy failure. Blood 104 : 956-960, 2004
 - 33) Bourgeois E, Caulier MT, Delarozee C, et al : Long-term follow-up of chronic autoimmune thrombocytopenic purpura refractory to splenectomy : a prospective analysis. Br J Haematol 120 : 1079-1088, 2003
 - 34) Maloisel F, Andrès E, Zimmer, et al : Danazol therapy in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura : Long-term results. Am J Med 116 : 590-594, 2004
 - 35) 藤村欣吾 : 3. 特発性血小板減少性紫斑病の治療 4) インターフェロン療法およびピンカアルカロイド緩速点滴静注法. 日常診療と血液 8 : 43-53, 1998
 - 36) Andersen JC : Response of resistant idiopathic thrombocytopenic purpura to pulsed high-dose dexamethasone therapy. N Engl J Med 330 : 1560-1564, 1994
 - 37) Cheng Y, Wong RS, Soo YO, et al : Initial treatment of immune thrombocytopenic purpura with high-dose dexamethasone. N Engl J Med 349 : 831-836, 2003
 - 38) Reiner A, Gernsheimer T, Slichter SJ : Pulse cyclophosphamide therapy for refractory autoimmune thrombocytopenic purpura. Blood 85 : 351-358, 1995
 - 39) Huhn RD, Fogarty PF, Nakamura R, et al : High-dose cyclophosphamide with autologous lymphocyte-depleted peripheral blood stem cell (PBSC) support for treatment of refractory chronic autoimmune thrombocytopenia. Blood 101 : 71-77, 2003
 - 40) Figueroa M, Gehlsen J, Hammond D, et al : Combination chemotherapy in refractory immune thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 328 : 1226-1229, 1993
 - 41) Hernández F, Linares M, Colomina P, et al : Dapsone for refractory chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 90 : 473-475, 1995
 - 42) Cooper N, Stasi R, Cunningham-Rundles S, et al : The efficacy and safety of B-cell depletion with anti-CD20 monoclonal antibody in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 125 : 232-239, 2004
 - 43) Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, et al : Systematic review : efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Ann Intern Med 146 : 25-33, 2007
 - 44) Bussel JB, Kuter DJ, George JN, et al : AMG531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP. N Engl J Med 355 : 1672-1681, 2006
 - 45) Jenkins JM, Williams D, Deng Y, et al : Phase 1 clinical study of eltrombopag, an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor ago-

37. 特発性血小板減少性紫斑病

- nist. *Blood* 109 : 4739-4741, 2007
- 46) Kuter DJ, Bussel JB, Lyons RM, et al : Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura : a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 371 : 395-403, 2008
- 47) Bussel JB, Cheng G, Saleh MN, et al : Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J med* 357 : 2237-2247, 2007
- 48) Boruchov DM, Gururangan S, Driscoll MC, et al : Multiagent induction and maintenance therapy for patients with refractory immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Blood* 110 : 3526-3531, 2007
- 49) Podolanczuk A, Lazarus AH, Crow AR, et al : Of mice and men : an open-label pilot study for treatment of immune thrombocytopenic purpura by an inhibitor of Syk. *Blood* 113 : 3154-3160, 2009
- 50) Fujimura K, Harada Y, Fujimoto T, et al : Nationwide study of idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnant women and the clinical influence on neonates. *Int J Hematol* 75 : 426-433, 2002
- 51) Godeau B, Chevret S, Varet B, et al : Intravenous immunoglobulin or high-dose methylprednisolone, with or without oral prednisone, for adults with untreated severe autoimmune thrombocytopenic purpura : a randomized, multicentre trial. *Lancet* 359 : 23-29, 2002
- 52) 山中 學, 野村武夫 : ITPの長期予後について. *臨床血液* 26 : 171-176, 1985
- 53) Stasi R, Stipa E, Masi M, et al : Long-Term Observation of 208 Adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med* 98 : 436-442, 1995
- 54) Portielje JE, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, et al : Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 97 : 2549-2554, 2001
- 55) Cohen YC, Djulbegovic B, Shamai-Lubovitz O, et al : The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. *Arch Intern Med* 160 : 1630-1638, 2000
- 56) Cortelazzo S, Finazzi G, Buelli M, et al : High risk of severe bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 77 : 31-33, 1991
- 57) Sailer T, Weltermann A, Zoghalmi C, et al : Mortality in severe, non aggressively treated adult autoimmune thrombocytopenia. *Hematol J* 4 : 366-369, 2003



BRIEF COMMUNICATION

No association between vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (*VKORC1L1*) and the variability of warfarin dose requirement in a Japanese patient population

Tong Yin ^a, Hironori Hanada ^a, Kotaro Miyashita ^b, Yoshihiro Kokubo ^c, Yasuhisa Akaiwa ^b, Ryoichi Otsubo ^b, Kazuyuki Nagatsuka ^b, Toshiho Otsuki ^b, Akira Okayama ^c, Kazuo Minematsu ^b, Hiroaki Naritomi ^b, Hitonobu Tomoike ^c, Toshiyuki Miyata ^{a,*}

^a Research Institute, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

^b Cerebrovascular Division, Department of Medicine, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

^c Department of Preventive Cardiology, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

Received 29 June 2007; received in revised form 15 September 2007; accepted 15 September 2007
Available online 21 February 2008

Introduction

Warfarin therapy management is challenging due to the greater than 10-fold interindividual variability in the therapeutic dose [1–4]. Haplotypes in the gene of vitamin K epoxide reductase complex (*VKORC1*), encoding vitamin K epoxide reductase which is a target enzyme of warfarin, have been linked to the effective maintenance dose of warfarin [5–8]. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (*VKORC1L1*) is a paralogous gene of *VKORC1* and shares about 50% amino acid identity with *VKORC1* protein [9,10]. The active sites of *VKORC1* are predicted to reside at the thioredoxin-like Cys132-X-X-Cys135 center embedded in the transmembrane

region, and the mutagenesis at one of Cys residues lost their activity [11,12]. A recent study suggested that the complex's protein disulfide isomerase subunit provides electrons for the reduction of the Cys132-X-X-Cys135 center in *VKORC1* [13]. The Cys132-X-X-Cys135 center in *VKORC1* is perfectly conserved in *VKORC1L1* [9,10], suggesting the functional importance of the *VKORC1L1* protein as a reductase for vitamin K recycling. However, the function of *VKORC1L1* is totally unknown, including whether or not the *VKORC1L1* genotypes are associated with the variability of the effective warfarin dose [14].

The International HapMap Project has deposited the patterns of more than 1 million single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genome sequences drawn from four diverse human populations including Japanese, with the data now available worldwide [15]. This data offer new tools for identifying phenotype-related genes and disease-causing genes in humans.

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6833 5012x2512; fax: +81 6 6835 1176.

E-mail address: miyata@ri.ncvc.go.jp (T. Miyata).

Table 1 Characteristics of patients administered warfarin maintenance dose

Number	87
Male/Female	62/25
Age (years)	67.60 ± 10.60
Weight (kg)	60.20 ± 9.40
Warfarin dose (mg/day)	3.00 ± 1.03
Warfarin dose range (mg/day)	1.25–5.50

Age, weight, and warfarin dose are shown as mean ± SD.

In the present study, we constructed haplotype blocks for the *VKORC1L1* gene in a Japanese population using HapMap data and investigated the influence of 8 SNPs in the haplotype blocks on the interindividual variability of warfarin dose. Our data showed that none of the SNPs and haplotypes in the *VKORC1L1* gene showed an association with the variability of the daily warfarin maintenance dose.

Materials and methods

Haplotype block construction and selection of tag SNPs

The *VKORC1L1* gene is located on chromosome 7q11.21 and ranges from 64,975,692 to 65,057,237 bp on the NCBI Build 36

assembly. HapMap data regarding the NCBI Build 36 assembly covering 200 kb length centered on the *VKORC1L1* gene for 45 normal Japanese singletons were downloaded. Haplotype blocks were constructed using Haploview version 3.32 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>) [16]. Strong linkage disequilibrium between a pair of SNPs was defined by r^2 ranging from 0.7 to 0.98. A block was created if 95% of the informative comparisons were in strong linkage disequilibrium. The block-by-block tag SNPs were selected based on Paul de Bakker's Tagger [17] with an LOD score cutoff of 3.0 and r^2 a threshold of 0.80. Frequencies of the constructed haplotype blocks and selected tag SNPs were re-confirmed using SNPalyze v4.0 software (DYNACOM, Kanagawa, Japan).

Genotyping of selected tag SNPs in patients with warfarin dose

The study population consisted of 87 unrelated Japanese patients admitted to the Cerebrovascular Division of the National Cardiovascular Center between November 2003 and March 2004. The patients had all experienced an ischemic stroke within the 7 days prior to admission. Anticoagulation of all patients was stably controlled with a target international normalized ratio of 1.6–2.6 for the prevention of stroke recurrence [18,19]. Inclusion criteria were a confirmed date of initial exposure to warfarin and current anticoagulation therapy. Data collection consisted of inpatient and outpatient medical records. The anticoagulant database was used to obtain information on daily warfarin doses. The patient group had been previously studied for the association of four genes—*VKORC1*, γ -glutamyl carboxylase, calumenin, and *CYP2C9*—with the warfarin maintenance dose [20]. In the present study, we

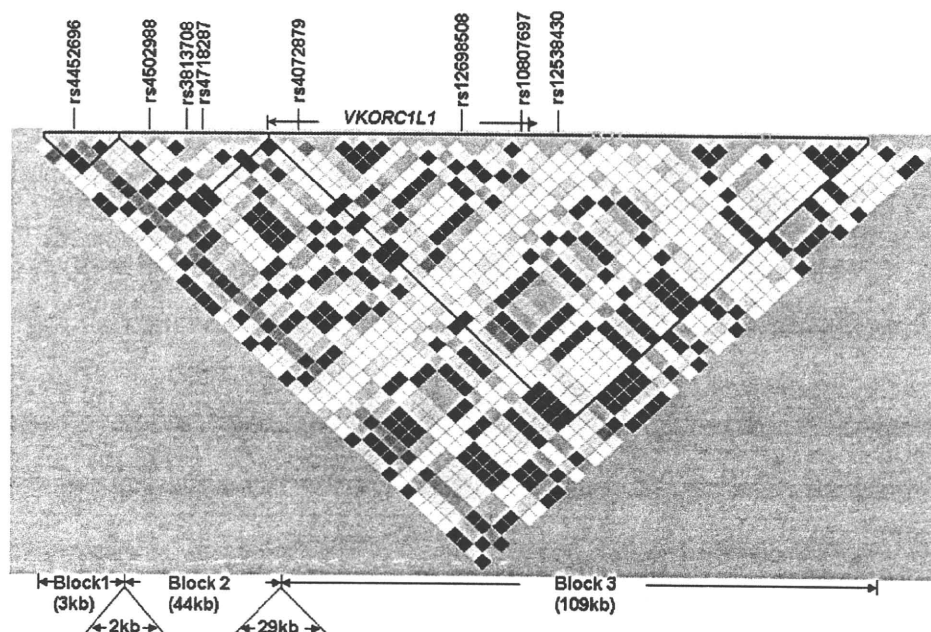


Figure 1 Haploview analysis of linkage disequilibrium structure and haplotype blocks centered on *VKORC1L1*. Pairwise linkage disequilibrium in r^2 was derived from 45 Japanese individuals (HapMap Data phase II, on NCBI Build 36 assembly). Shading represents the magnitude and significance of linkage disequilibrium, with the black-to-white gradient reflecting higher to lower linkage disequilibrium values. Three haplotype blocks were constructed covering a 200 kb length centered on the *VKORC1L1* gene. Based on the strength of linkage disequilibrium among SNP pairs, one SNP tagging the 3-kb block 1, three SNPs tagging the 44-kb block 2, and 4 SNPs tagging the 109-kb block 3 were identified. The interval length is 2 kb between blocks 1 and 2, and 29 kb between blocks 2 and 3. *VKORC1L1* is partly encompassed by block 3.

Table 2 Differences in daily warfarin dose for each SNP of the *VKORC1L1* gene

rs number	Position in reference sequence (bp)	SNP location	Genotype	Allele frequency	n	Mean ±SD (mg/day)	p
rs4452696	64924147	upstream	AA	A/G	39	3.00 ±1.05	0.17
			AG	0.71/0.29	41	3.12 ±1.05	
			GG		7	2.32 ±0.61	
rs4502988	64935181	upstream	GG	G/A	63	2.99 ±1.03	0.87
			GA	0.89/0.11	24	3.03 ±1.07	
			AA		0	–	
rs3813708 ^a	64943067	upstream	GG	G/T	60	3.07 ±1.05	0.44
			GT	0.83/0.17	26	2.89 ±0.99	
			TT		0	–	
rs4718287 ^b	64944462	upstream	CC	C/G	20	3.05 ±1.18	0.70
			CG	0.49/0.51	40	2.90 ±0.95	
			GG		27	3.11 ±1.07	
rs4072879	65011286	intron 1	TT	T/C	47	2.96 ±0.90	0.93
			TC	0.76/0.24	36	3.01 ±1.18	
			CC		3	3.17 ±1.53	
rs12698508 ^a	65049393	intron 1	AA	A/T	60	3.07 ±1.05	0.46
			AT	0.83/0.17	25	2.89 ±1.01	
			TT		1	1.75	
rs10807697	65053605	intron 2	AA	A/G	2	2.63 ±0.53	0.82
			AG	0.13/0.87	24	3.07 ±1.60	
			GG		61	2.99 ±1.05	
rs12538430 ^b	65057623	3' UTR	CC	C/T	18	3.09 ±1.24	0.55
			CT	0.49/0.51	40	2.87 ±0.93	
			TT		29	3.13 ±1.05	

Positions of SNPs in reference sequence are derived from NCBI Mapview Build 36. 2.

P values were calculated by one-way analysis of variance.

UTR: untranslated region. Warfarin daily maintenance dose are shown as mean ±SD.

^a SNPs were in linkage disequilibrium with $r^2=1$.

^b These SNPs were in linkage disequilibrium with $r^2=0.99$.

genotyped 8 SNPs in *VKORC1L1*—rs4452696, rs4502988, rs3813708, rs4718287, rs4072879, rs12698508, rs10807697, and rs12538430—in the same patient group using the TaqMan-PCR system as previously described [21]. The PCR primers and probes used for the TaqMan system are available on request. We also resequenced directly the exon 1 and promoter regions of *VKORC1L1*, which were not covered by the constructed haplotype blocks, in all the patients. This study was approved by the Ethical Review Committee of the National Cardiovascular Center. All patients who participated in the study provided written informed consent for genetic analysis.

Statistical methods

All SNPs identified were tested for deviations from the Hardy-Weinberg disequilibrium through the use of a chi-square test. Pair-wise linkage disequilibrium between two SNPs was evaluated by r^2 . Individual diplotype was estimated by means of an expectation maximization algorithm using SNPalyze v4.0 software. The association of the genotypes and the inferred haplotypes with daily warfarin doses was examined by one-way analysis of variance. Statistical analyses were performed using Prism4 (GraphPad, San Diego, CA) and JMP V 5.1 software and the SAS release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). P values lower than 0.05 were considered to be statistically significant. The association of the genotypes with daily warfarin doses was reconfirmed by quantitative associ-

Table 3 Differences in daily warfarin dose for each haplotype of the *VKORC1L1* gene

Haplotype sequence ^a	Genotype	n	Mean ±SD (mg/day)	p
AGGCTAGC	homo	6	3.04 ±0.49	0.49
	hetero	20	2.74 ±1.10	
	none	58	3.06 ±1.06	
AGGCCAGC	homo	3	3.17 ±1.53	0.95
	hetero	34	2.96 ±1.19	
	none	47	2.98 ±0.91	
AGGGTAGT	homo	4	3.06 ±1.16	0.14
	hetero	32	3.26 ±1.00	
	none	48	2.79 ±1.03	
GGTGTGT	homo	1	1.75	0.30
	hetero	22	2.77 ±1.06	
	none	61	3.04 ±1.03	
GAGGTAAT	homo	0	–	0.79
	hetero	24	3.03 ±1.07	
	none	60	2.96 ±1.04	

^aFor each haplotype sequence, SNPs are listed in sequential order as rs4452696, rs4502988, rs3813708, rs4718287, rs4072879, rs12698508, rs10807697, and rs12538430.

P values were calculated by one-way analysis of variance. Warfarin daily maintenance dose are shown as Mean ±SD.

Hs_VKORC1	MGSTWGSFGWVRLA--LCLTCLVLSL YALHVKAARARDRDYRALCDVGTAISSCSR	53
Hs_VKORC1L1	MAAPVLLRVSVPRWERVAR YAVCAAGILLSI YAYHVEREKERDPEHRALCDLGPWVKCSA	60
Mm_VKORC1L1	MAAPVLLRVSVPRWERVAR YAVCAAGILLSI YAYHVEREKERDPEHRALCDLGPWVKCSA	60
Bt_VKORC1L1	MAAPVLLRVSVPRWERVAR YAVCAAGILLSI YAYHVEREKERDPEHRALXXXGYWF----	56
Gg_VKORC1L1	VSVPRWERVAR SAVCAAGILLSL YACHLEREKGR-----ALCDLSERENCSEA	47
Tr_VKORC1L1	MAAPVL-RVSTPRWERIARVLVCLLGILLSL YAPHVEREHARDPSYKALCDVSSSISCSK	59
Hs_VKORC1	VFSSRWGRGFGLVEHVLGQDSILNQSNSIFGCIFYTLQLLLGLRTRWASVLMMLSSLVS	113
Hs_VKORC1L1	ALASRWGRGFGLLSIFGKDGVLNQPN SVFGLIFY ILQLLLGMTASAVAAL ILMTSSIMS	120
Mm_VKORC1L1	ALASRWGRGFGLLSIFGKDGVLNQPN SVFGLIFY ILQLLLGMTASAVAAL VLMTSSIVS	120
Bt_VKORC1L1	SLFYRWGRGFGLLSIFGKDGVLNQPN SVFGLIFY ILQLLLGLTASAVAAL ILMTSSIMS	116
Gg_VKORC1L1	AITSRWGRGFGLLSIFGKDSAINQSN SVFGLVPY ILQMLLGMTASAVAAL ILMTSSIVS	107
Tr_VKORC1L1	VFGSRWGRGFGLLSIFGNDALNQPN SVYGVVYAFQLLLGMTVSAMAAL ILMTSSIMS	119
Hs_VKORC1	LAGSVYLAWILFFVL YDFEIVVITTYAINVSLMMLWLSFRKVVQEPQKAKRH	163
Hs_VKORC1L1	VVGSLYLAYILYFVLKEFEEIIVVITTYVNLNLLL IIN YKRLVYLNEAWKRLQPKQD	176
Mm_VKORC1L1	VVGSLYLAYILYFVLKEFEEIIVVITTYVNLNLLL IIN YKRLVYLNEAWKRLQPKED	176
Bt_VKORC1L1	VVGSLYLAYILYFVLKEFEEIIVVITTYVNLN ILL IIN YKRLVYLNEAWKRLQPKQD	172
Gg_VKORC1L1	VVGSLYLAYILYFVLKEFEEIIVVITTYLNLN ILL IIN YKRLVYLNEAWKRLQPKQE	163
Tr_VKORC1L1	VVGSLYLGYILYFVLKDLVIVVITTYALNFI L FVLN YKRLVYLNEAWKRLQAKQD	175

Figure 2 Amino acid sequence alignment of VKORC1L1 proteins from different species and from human VKORC1 protein. The proteins are labeled by their gene symbols and a prefix indicating the species (Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Bt, *Bos taurus*; Gg, *Gallus gallus*; Tr, *Takifugu rubripes*). MultAlin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/>) was used to perform the sequence alignment. Hyphens represent the amino acid deletion in the sequences. The active site Cys residues in the Cys132-X-X-Cys135 center of VKORC1 protein are indicated by a black background. The Cys-X-X-Cys center is highly conserved in VKORC1L1 proteins from various species.

ation test using the PLINK v 0.99p software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>).

Results

Patient characteristics are summarized in Table 1. A total of 78 SNPs in the region of 200 kb centered on *VKORC1L1* in 45 normal Japanese has been retrieved from the Phase II HapMap data. Three haplotype blocks were constructed using 41 SNPs on Haploview, as shown in Fig. 1. The interval length between block 1 and 2 was 2 kb and between block 2 and 3 was 29 kb. Block 2 covered the putative promoter region of *VKORC1L1* (except for the 1.4 kb length of sequence in the upstream of exon 1), and block 3 included the region from intron 1 to exon 3 of *VKORC1L1*. Thus, three haplotype blocks covered the gene of *VKORC1L1* except for exon 1.

We identified 8 tag SNPs in three haplotype blocks, as shown in Fig. 1. One SNP, rs4452696, resided in block 1, three SNPs—rs4502988, rs3813708, and rs4718287—in block 2, and four SNPs—rs4072879, rs12698508, rs10807697, and rs12538430—were presented in block 3. Haplotype frequencies and selected tag SNPs were confirmed independently by means of Haplotype Inference analysis.

We genotyped 8 tag SNPs of *VKORC1L1* in 87 patients with warfarin dose. None of the SNPs showed genotype deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium ($p > 0.1$). Two pairs of SNPs (rs3813708 vs rs12698508, and rs4718287 vs rs12538430) were in tight linkage disequilibrium with r^2 values of more than

0.99, which were consistent with HapMap Phase II dataset. Comparisons of minor allele frequency between those found in the current study and those found in the HapMap dataset showed no significant differences ($p > 0.2$).

None of the SNPs exhibited a significant association with the effective daily maintenance dose of warfarin (Table 2). These results were reconfirmed by the PLINK quantitative association test ($p > 0.36$). Five haplotypes were estimated to show a frequency of more than 0.05. None of these haplotypes demonstrated a significant association with the variability of the daily warfarin maintenance dose (Table 3).

The exon 1 and part of the promoter regions of *VKORC1L1* were not covered by the constructed haplotype blocks, we sequenced these regions in all the patients, and a total of 9 SNPs were detected with minor allele frequency ranged from 0.05 to 0.15. No SNP could be detected in the coding region of exon 1. Association analysis showed that none of the detected SNPs had a significant association with the effective daily maintenance dose of warfarin ($p > 0.22$, data not shown).

Discussion

The genes of *VKORC1* (encoding a warfarin target enzyme) and *CYP2C9* (encoding a warfarin metabolizing enzyme) are well established genetic factors for affecting inter-individual variability of the maintenance dose of warfarin [3]. VKORC1 protein

shows a reductase activity for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂, which is essential for γ -glutamyl carboxylation of vitamin K dependent clotting factors [22]. *VKORC1L1* is a paralogous gene of *VKORC1*. Human *VKORC1* and *VKORC1L1* showed about 50% identity at the amino acid level, and the Cys-X-X-Cys center in *VKORC1* is perfectly conserved in *VKORC1L1*. The amino acid sequence of *VKORC1L1* among five different species showed 58% identity (102/176 residues) (Fig. 2).

In our previous study, we sequenced the entire coding regions of the *VKORC1* gene in order to identify the genetic variations and genotyped SNPs in relation to the daily warfarin maintenance dose in a Japanese population. We found that the *VKORC1* genotype can explain an approximately 0.9 mg daily interindividual difference in warfarin maintenance dose [20–23]. In the present study, we utilized the same patient group to evaluate the contribution of the tagging SNPs and the haplotypes of *VKORC1L1* for the interindividual variability of warfarin dose. However, no association of the *VKORC1L1* genotype with warfarin dose requirement was found. Two well known functional SNPs, *CYP2C9*3* and *VKORC1* 1173 C>T, might mask the effect of *VKORC1L1* genotype on the warfarin effective dose. To eliminate this possibility, we analyzed the association of the tagging SNPs and the haplotypes of *VKORC1L1* with interindividual variability of the daily warfarin maintenance dose in 67 patients who did not carry the variations of *CYP2C9*3* and *VKORC1* 1173 C>T. Unfortunately, significant association still could not be found ($p>0.13$, data not shown). These results suggested that *VKORC1L1* is not likely to be involved in the interindividual variability of the therapeutic dose of warfarin.

Tagging SNPs selected on the basis of HapMap data could be most effective only for the common potential functional sequence variations (more than 5% frequency) in the gene [24]. Resequencing the whole *VKORC1L1* gene would be imperative, and alternative ways for finding associations of rare variations (less than 5% frequency) with strong deleterious functional effects to the phenotype of warfarin dose would be necessary [25].

Summary

The *VKORC1* gene has been claimed to determine the interindividual variability in the maintenance dose of warfarin, but it is unknown whether the *VKORC1L1* gene, a paralogous gene of *VKORC1*, sharing about 50% amino acid identity with *VKORC1* protein, also plays a role in the variability of warfarin dose. Our goal was to

study the association of the *VKORC1L1* haplotypes with the warfarin maintenance dose. After constructing haplotype blocks covering a 200 kb length centered on the *VKORC1L1* gene using HapMap data in a Japanese population, we selected eight common tag SNPs in three haplotype blocks and genotyped them in 87 patients on stable anticoagulation with a target international normalized ratio of 1.6–2.6. None of the SNPs or haplotypes exhibited a significant association with the effective daily warfarin dose. Although the *VKORC1L1* protein exhibits a significant amino acid identity with the *VKORC1* protein, no association could be found between the *VKORC1L1* genotype and the variability of the warfarin dose in a Japanese patient population. The genotypes of this gene denied a role in the interindividual variability of the effects of warfarin. Further functional analysis of *VKORC1L1* is warranted.

Conflict of interest

We do not have any direct and indirect conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO) of Japan and by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan, and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

Tong Yin, M.D., is a recipient of Takeda Foundation, from Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing, China.

References

- [1] Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin JL. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *Circulation* 2003;107:1692–711.
- [2] Gage BF. Pharmacogenetics-based coumarin therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:467–73.
- [3] Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of *CYP2C9* and *VKORC1*—rationale and perspectives. *Thromb Res* 2007;120:1–10.
- [4] Millican E, Jacobsen-Lenzini PA, Milligan PE, Grosso L, Eby C, Deych E, Grice G, Clohisey JC, Barrack RL, Burnett RS, Voora D, Gatchel S, Tiemeier A, Gage BF. Genetic-based dosing in orthopaedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 2007;110:1511–5.
- [5] Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE. Effect of *VKORC1* haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005;352:2285–93.
- [6] Geisen C, Watzka M, Sittlinger K, Steffens M, Daugela L, Seifried E, Muller CR, Wienker TF, Oldenburg J. *VKORC1*

- haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost* 2005;**94**:773–9.
- [7] Marsh S, King CR, Porche-Sorbet RM, Scott-Horton TJ, Eby CS. Population variation in VKORC1 haplotype structure. *J Thromb Haemost* 2006;**4**:473–4.
- [8] Osman A, Enstrom C, Arbring K, Soderkvist P, Lindahl TL. Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records. *J Thromb Haemost* 2006;**4**:1723–9.
- [9] Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Petz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharer I, Tuddenham EG, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004;**427**:537–41.
- [10] Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2004;**427**:541–4.
- [11] Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Engineering of a recombinant vitamin K-dependent gamma-carboxylation system with enhanced gamma-carboxylglutamic acid forming capacity: evidence for a functional CXXC redox center in the system. *J Biol Chem* 2005;**280**:10540–7.
- [12] Rost S, Fregin A, Hunerberg M, Bevans CG, Muller CR, Oldenburg J. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost* 2005;**94**:780–6.
- [13] Wajih N, Hutson SM, Wallin R. Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J Biol Chem* 2007;**282**:2626–35.
- [14] Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghori J, Wadelius C, Bentley D, McGinnis R, Deloukas P. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet* 2007;**121**:23–34.
- [15] Consortium. T1H. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;**437**:1299–320.
- [16] Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;**21**:263–5.
- [17] de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* 2005;**37**:1217–23.
- [18] Yamaguchi T. Optimal intensity of warfarin therapy for secondary prevention of stroke in patients with nonvalvular atrial fibrillation: a multicenter, prospective, randomized trial. Japanese Nonvalvular Atrial Fibrillation-Embolism Secondary Prevention Cooperative Study Group. *Stroke* 2000;**31**:817–21.
- [19] Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, Stern BJ, Hertzberg VS, Frankel MR, Levine SR, Chaturvedi S, Kasner SE, Benesch CG, Sila CA, Jovin TG, Romano JG. Comparison of warfarin and aspirin for symptomatic intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med* 2005;**352**:1305–16.
- [20] Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Tomoike H, Miyata T. Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res* 2007;**120**:181–6.
- [21] Tanaka C, Kamide K, Takiuchi S, Miwa Y, Yoshii M, Kawano Y, Miyata T. An alternative fast and convenient genotyping method for the screening of angiotensin converting enzyme gene polymorphisms. *Hypertens Res* 2003;**26**:301–6.
- [22] Chu PH, Huang TY, Williams J, Stafford DW. Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:19308–13.
- [23] Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Sakata T, Nagura J, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Sato K, Tomoike H, Miyata T. Polymorphisms in vitamin K-dependent gamma-carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in the general population. *Int J Hematol* 2006;**84**:387–97.
- [24] Gibbs R. Deeper into the genome. *Nature* 2005;**437**:1233–4.
- [25] Topol EJ, Frazer KA. The resequencing imperative. *Nat Genet* 2007;**39**:439–40.

Original Article

Genetic Variations of *CYP2C9* in 724 Japanese Individuals and Their Impact on the Antihypertensive Effects of Losartan

Tong YIN¹, Keiko MAEKAWA², Kei KAMIDE³, Yoshiro SAITO², Hironori HANADA¹, Kotaro MIYASHITA⁴, Yoshihiro KOKUBO⁵, Yasuhisa AKAIWA⁴, Ryoichi OTSUBO⁴, Kazuyuki NAGATSUKA⁴, Toshiho OTSUKI⁴, Takeshi HORIO³, Shin TAKIUCHI³, Yuhei KAWANO³, Kazuo MINEMATSU⁴, Hiroaki NARITOMI⁴, Hitonobu TOMOIKE⁵, Jun-ichi SAWADA², and Toshiyuki MIYATA¹

CYP2C9, a drug-metabolizing enzyme, converts the angiotensin II receptor blocker losartan to its active form, which is responsible for its antihypertensive effect. We resequenced *CYP2C9* in 724 Japanese individuals, including 39 hypertensive patients under treatment with losartan. Of two novel missense mutations identified, the Arg132Gln variant showed a fivefold lower intrinsic clearance toward diclofenac when expressed in a baculovirus-insect cell system, while the Arg335Gln variant had no substantial effect. Several known missense variations were also found, and approximately 7% of the Japanese individuals (53 out of 724) carried one of the deleterious alleles (*CYP2C9**3, *13, *14, *30, and Arg132Gln) as heterozygotes. After 3 months of losartan treatment, systolic blood pressure was not lowered in two patients with *CYP2C9**1/*30, suggesting that they exhibited impaired *in vivo* *CYP2C9* activity. *CYP2C9**30 might be associated with a diminished response to the antihypertensive effects of losartan. (*Hypertens Res* 2008; 31: 1549–1557)

Key Words: *CYP2C9*, single nucleotide polymorphism, hypertension, losartan

Introduction

CYP2C9, a major isoform of the cytochrome P450 superfamily, accounts for approximately 20% of the total cytochrome P450 protein in liver microsomes and is responsible for the

oxidative metabolism of up to 15% of drugs that undergo phase I metabolism (1, 2). About 30 nonsynonymous variations of *CYP2C9* have been identified. Of these, the effects of *CYP2C9**2 (Arg144Cys) and *CYP2C9**3 (Ile359Leu) have been well studied for their reduced metabolic activities towards substrates such as warfarin, tolbutamide, and losar-

From the ¹Research Institute, ²Division of Hypertension and Nephrology, Department of Medicine, ³Cerebrovascular Division, Department of Medicine, and ⁴Department of Preventive Cardiology, National Cardiovascular Center, Suita, Japan; and ⁵Division of Functional Biochemistry and Genomics, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan.

This study was supported by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO) of Japan and by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. T.Y. is a recipient of Takeda Foundation, from the Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of the People's Liberation Army, Beijing, China.

Address for Reprints: Kei Kamide, M.D., Ph.D., Division of Hypertension and Nephrology, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita 565-8565, Japan. E-mail: kamide@hsp.nvcc.go.jp

Received December 27, 2007; Accepted in revised form April 28, 2008.