Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) の新知見と臨床応用

荻原建一, 野上恵嗣*

Novel findings and clinical application of tissue factor pathway inhibitor (TFPI)

Kenichi OGIWARA, Keiji NOGAMI

要約：TFPI(tissue factor pathway inhibitor)にはTFPI α とTFPI β があり、両者の血管内存在様式の詳細が明らかとなり、さらにTFPI α のC末側2つのドメインが第V因子(FV)やプロテインS(PS)と相互作用し、それぞれ血小板プロトロンビナーゼ阻害(活性型FV阻害)、FXa阻害促進(PSのTFPI cofactor作用)といった新機能を有し、臨床像との関連も大きいことがわかってきた。これまで動脈硬化や血栓症におけるTFPI検査の意義の探索や、遺伝子組換えTFPI製剤による敗血症治療が試みられたが、まだ成功していない。一方、TFPI阻害剤を用いた血友病治療は動物モデルで有効性が示され、複数の臨床試験が進行中である。今後、新知見をふまえた新たな臨床応用の展開が期待される。

Key words: tissue factor pathway inhibitor (TFPI), factor V, protein S, hemophilia A

1. はじめに

TFPI(tissue factor pathway inhibitor)はプロテインC(PC)、プロテインS(PS)、アンチトロンビン(AT)と並ぶ主要な生理的抗凝固因子である。1988年に発見されたが、臨床検査としてまだ認可されていない。遺伝性欠損患者の報告例がないことに加えて、疾患との関連が不明であることが一因であろう。2003年に本誌掲載のTFPI総説で加藤は、「新たな展開を期待して」と副題を付して、TFPIの血管壁細胞結合型TFPIの存在様式などを問題提起した¹⁾。その後約10年の間に、文字通り新たな展開が見られた。本稿では、TFPIのドメイン機能と血管内存在様式に関して、この10年で明らかになった新知見を紹介し、臨床応用については特に血友病の止血治療について解説する。

2. TFPIの構造と血管内存在様式

TFPI構造の詳細は本特集別稿に譲る。本稿ではTFPIの臨床的側面や治療応用を考える上での重要事項を述べる。TFPIは276のアミノ酸残基からなる分子量3.2~4.3万(糖鎖修飾による)のセリンプロテアーゼインヒビターであり、酸性残基に富むN末ドメイン、3つのKunitz-type(K1, K2, K3)ドメイン、塩基性残基に富むC末ドメインの5つのドメインから構成される。K1ドメインはFVIIaに、K2ドメインはFXaに結合することで、抗凝固機能を発揮するが²⁾、TFPI-FXa複合体が最初に形成されることで、効率的にTF/FVIIaを阻害する³⁾。K3ドメインとC末ドメインの機能に関連しては重要な発見が相次いでいる(後述)。ヒトTFPIにはスプライシング変異体があり、5つのドメインから成るTFPI α 以外に、K3およびC末ドメインを欠くTFPI β 、TFPI δ の存在が知られている⁴⁾。TFPI β はK2ドメインに続くC末領域にGPI(glycosylphosphatidyl inositol)連結部位があり、GPIを介して細胞表面に存在する⁵⁾。TFPI δ の生理的意義は不明である⁴⁾。TFPI α とTFPI β の構造模式図を図1に示す。

奈良県立医科大学小児科

* 責任者連絡先: roc-noga@naramed-u.ac.jp

図1 TFPIα(左), TFPIβ(右)の構造

TFPIα: N末端ドメイン, 3つのKunitzドメイン(K1, K2, K3), C末端ドメインから構成。C末端ドメインには塩基性残基に富む領域(灰色)があり, 正荷電している。TFPIβ: N末端, K1, K2の3ドメインで構成される。C末端側にGPI連結配列があり, C末端側が遊離され, GPIを介して細胞膜に直接結合できる。

TFPI産生部位は主に微小血管の内皮細胞とされる。血管内皮細胞表面にはプロテオグリカンに結合したTFPIαが存在し, ヘパリン投与によって血漿中に放出され血漿TFPI濃度は1.5~3倍に上昇する⁴⁾。しかしGPIを特異的に切断するphosphatidylinositol-specific phospholipase C(PIPLC)処理を行うと, 血管内皮から放出されるTFPI量はヘパリンによるそれを10倍以上も上回る⁶⁾。このPIPLC反

応性TFPIはC末端ドメインを有するTFPIαであると長らく理解され, GPI連結型のTFPIα受容体(coreceptor)の存在が予想されたが誰も同定できなかった。最近, このPIPLC反応性TFPIがK3ドメインを持たないことが判明し, 血管内皮細胞表面のTFPIの主体が実はTFPIβであると報告された⁷⁾。

一方, 巨核球/血小板も重要なTFPI産生部位である。血小板TFPIはTFPIαであり, 安静時は血小板内のα顆粒以外のどこかに貯蔵され, 活性化の時に血小板膜表面に発現する⁸⁾。TFPIαは血漿に存在するTFPIの約20%を占め, その半分はC末端ドメインが種々の程度に切断されたものであり, したがって完全長TFPIαは血漿TFPIの約10%とされる⁴⁾。血漿TFPIの残り80%はK3ドメインとC末端ドメインが欠如しリポ蛋白(主にLDL)と結合した短縮TFPIで凝固活性は弱い。これがTFPIα, TFPIβ, TFPIδのいずれの由来かは不明である⁴⁾。TFPIの血管内分布について, Brozeの総説⁴⁾とGirardの報告⁷⁾に基づき改変したものを表1に示す。本稿では血漿中の遊離TFPIをTFPIα(C末, K1, K2, K3ドメインを有する), C末端ドメイン全長を有するTFPIαを完全長TFPIαと表記する。

3. TFPIαの機能: 局所止血制御の主体

K2ドメインがFXaと結合し, K1ドメインがFVIIa/TF

表1 血管内TFPIの分布と存在様式

	短縮TFPI	遊離型TFPI(TFPIα)	
構成ドメイン	N末+K1+K2	N末+K1+K2+K3	N末+K1+K2+K3+C末
安静時血漿	80% (リポ蛋白結合*)	10% (短縮TFPIα)	10% (完全長TFPIα)
ヘパリン投与後	80% (リポ蛋白結合*)	10% (短縮TFPIα)	60~210%** (完全長TFPIα)
PIPLC処理後	>250~1000%# (TFPIβ)	10% (短縮TFPIα)	10% (完全長TFPIα)
安静時血小板	-	-	10% (完全長TFPIα)
活性化血小板	-	-	>300%## (完全長TFPIα)

数値%は血漿total TFPI濃度を100%とした場合の相対値であり, Broze総説⁴⁾をもとに算出。* リポ蛋白結合型TFPIの由来は不明。** 正常total TFPIが1.5~3倍に上昇, #ヘパリン投与時の5倍以上の放出効果, 総説⁴⁾ではTFPIαとあるが現在はTFPIβ⁷⁾と認識(Broze私信), ##安静時全長TFPIαが局所的に30倍以上に増加

と結合することで、FXa 依存性に FVIIa/TF を阻害することが TFPI α と TFPI β に共通する抗凝固機能の主体である²⁾。TFPI α の FXa 阻害活性は TFPI β の約 20 倍であり⁹⁾、K3、C 末ドメインの重要性を示す。K3 ドメインは TFPI α と PS との結合に¹⁰⁾、塩基性領域(正荷電)に富む C 末ドメインは、リン脂質膜¹¹⁾、FV¹²⁾ などとの結合に重要である。両ドメインはまた、グリコサミノグリカンやヘパリンとの結合に不可欠であり、ヘパリン投与時に血管内皮細胞から放出される完全長 TFPI α はヘパリンの抗凝固機能の一部を担うとされる¹³⁾。近年、TFPI α の抗凝固機能、特に K3 ドメインと C 末ドメインの役割に関連して重要な発見が相次いでいる。

① FV との相互作用

2008 年、Duckers らは FV 欠乏血漿のトロンビン生成がわずかに 10% の FV で正常化することを手掛かりに、血漿中 FV 活性と遊離 TFPI 値に正の相関があることを見出した¹⁴⁾。そして、TFPI 低値と血小板残存 FV 活性が FV 欠乏血漿のトロンビン生成低下を軽減していることを示した¹⁵⁾。この報告は、FV、TFPI α 、血小板との未知の相互関係を示唆し、2012 年以降の次の 3 論文が答えを見出した。i) Bos らは FV-B ドメインの塩基性領域(basic region: BR)と酸性領域(acidic region: AR)が結合することで FV への FXa 結合が阻止されることを明らかにした(図 2 および図 3A)¹⁶⁾。ii) 12 年前に東テキサスで報告された出血傾向家系では新規 FV 遺伝子変異 A2440G が認められたが、当時は出血と無関係とみなされていた¹⁷⁾。Vincent らの再精査の結果、この FV 変異が選択的スプライシングにより FV 同位体(FV_{short})を発現させることを見出した¹⁸⁾。FV_{short} は B ドメインの大部分(756-1458)を欠くが FV 活性は保たれ(図 2)、驚くべきことに TFPI α との結合能が高く(gain-of-function)、血漿 TFPI α が正常の約 10 倍となり、これが出血傾向の原因であることを証明した¹⁸⁾。iii) Wood らは TFPI α -C 末ドメインの塩基性領域アミノ酸配列(LIKTKRKRK)が FV-B ドメインの BR (LIKTRKRRK)に酷似していること、FV_{short} ではこの BR が欠如しているが AR(負荷電)は温存されていること、血小板 α 顆粒に貯蔵される FV は部分的に活性化された FVa_{AR}(FV_{short} と同様に BR のみが欠如)として存在していること(図 2)、を足掛かりに

図 2 FV および FV_{short} の活性化過程における B ドメイン開裂(左)と立体構造(右)の模式図

FV の B ドメインは塩基性領域(正荷電)と酸性領域(負荷電)との相互作用により FXa 結合部位を保護する。FXa は主に R⁷⁰⁹ と R¹⁰¹⁸ に作用し、酸性領域(AR)の残った活性型 FV(FVa_{AR})となる。さらにトロンビン(FIIa)によって R¹⁵⁴⁵ 開裂を受けて、完全な活性型 FV(FVa)となり、FXa によるプロトロンビンの活性化を促進する。FV_{short} は B ドメインの大部分が欠失するが AR は残存している。

TFPI α 、FV、血小板の相互関係の謎に迫った。そして、TFPI α の C 末ドメイン BR が FV-BR の代わりに FVa_{AR} と結合し、FXa との結合を阻止していることを見出し、これはプロトロンビナーゼ(FXa-FVa-リン脂質複合体)阻害であり、TFPI α の新規抗凝固作用であることを示した(図 3A)¹⁹⁾。この新規作用は従来の K1、K2 ドメイン主体の抗凝固機能と異なり、K2、C 末ドメインによって発揮される TFPI α 独自の抗凝固機能であり、後述する polyphosphate やフコイダンの TFPI α 阻害機序との関連も示唆され興味深い。

② PS の TFPI α cofactor 作用(図 3B)

2006 年、PS には APC cofactor 作用(FVa と FVIIIa の不活化促進)に加え、TFPI α の抗 FXa 作用を増強する TFPI cofactor 作用があることを見出した²⁰⁾。TFPI α の FXa への親和性は PS により約 10 倍にまで増強され(K_i : 4.5 nM $\rightarrow$ 0.5 nM)、生理的血漿濃度(0.3-0.5 nM)の TFPI α が FXa を阻害可能となる²⁰⁾。

A) TFPIα の血小板プロトロンビナーゼ阻害作用

FV は FV_{AR} (図 2A 参照) の状態で血小板 α 顆粒に貯留され、血小板活性化時にプロトロンビナーゼ複合体を形成し、トロンビン生成を促進する(右)。血小板 TFPIα の C 末ドメイン塩基性領域(正荷電)は FV_{AR} B ドメインの AR と結合し、トロンビン生成を阻害するとされる。

B) TFPIα と PS による抗 FXa, 抗 FVIIa/TF 作用

凝固初期段階では TF 発現細胞に FVIIa が結合し微量の FXa が生成されるが、FXa は TFPIα の K2 ドメインと結合し阻害する。PS は TFPIα の K3 ドメインと結合しこの FXa 阻害を促進する。FXa/TFPIα は K1 ドメインを介してさらに FVIIa/TF と結合し阻害する。また局所に凝集・活性化された血小板からは TFPIα が放出される。

C) 血管内皮 TFPIβ による抗 FVIIa/TF 作用

血管内皮表面には TFPIβ が優位に存在し、恒常的な抗凝固作用を発揮すると考えられる。PS や FV との相互作用はないが、GPI を介して細胞表面に結合しているため、TF 発現細胞に共発現することで効率的に TF 経路を阻害し、細胞シグナル伝達も制御する。

図 3 TFPIα と TFPIβ の抗凝固機能機序の模式図

K3 ドメインは PS との相互作用に不可欠である¹⁰⁾。この発見は PS 欠乏患者の血栓傾向に PC 機能低下だけでなく TFPI 機能低下が関与していることを示し、血栓制御における TFPI の役割が新たな視点から見直されつつある。

③好中球セリンプロテアーゼ, polyphosphate (polyP) の関与

好中球のセリンプロテアーゼ(好中球エラスターゼ, カセプシン G)は血小板 TFPI α を分解する²¹⁾。病原体侵入時の局所血栓形成にこの機能が関与し、病原体の血管外浸潤を防ぐことが最近明らかになった²²⁾。好中球が病原体を捕える際に neutrophil extracellular traps (NETs) を放出するが、NETs に含まれるヌクレオソームはこの TFPI α 分解反応を促進する²²⁾。

近年、凝固・線溶系を修飾する新たな生理活性物質として注目されている polyP は血小板 β 顆粒に貯留され活性化時に放出されるが、何らかの機序で血小板 TFPI α を阻害し FVa 機能を促進する²³⁾。polyP は負荷電であり、前述した TFPI α の C 末ドメイン BR との結合が関与しているかもしれない¹⁹⁾。

④血小板 TFPI α の意義

TFPI の抗凝固活性は TFPI α で強く、血漿中とほぼ同量の TFPI α が血小板内に存在し(表 1)、血小板活性化時には TFPI α 局所濃度は約 30 倍に上昇する⁴⁾(図 3B)。Maroney らはマウスモデルにて血球産生細胞のみに TFPI 遺伝子を選択的に欠損させることで血小板 TFPI 欠損マウスを作成し、血小板血栓が増強することを確認した²⁴⁾。そこで、血友病マウスモデルに同様の処理を行い、血小板 TFPI が欠損した血友病マウスでは出血傾向が改善し、止血血栓部位のフィブリン沈着が増加した²⁵⁾。さらに血友病マウスへの抗 TFPI 抗体投与が血漿 TFPI 中和濃度を超えてもなお濃度依存性に有効であること(活性化血小板放出 TFPI α の阻害を示唆)から、血小板 TFPI α の血友病における重要性を説明した²⁵⁾。

4. TFPI β の機能：閉鎖循環の抗凝固維持と細胞シグナル伝達における役割

TFPI β は血管内皮細胞上の主たる TFPI 存在様式である⁷⁾。TFPI β は TF と共発現することでより効

果的に働く(図 3C)。

①血管内皮 TFPI の主体：恒常的な抗凝固作用

K1, K2 ドメインが抗 FVIIa/TF, 抗 Xa 作用の主体であるが、TFPI β の抗凝固活性は TFPI α に比べ弱く、積極的な存在意義は未知であった。TFPI β は K3 ドメインと C 末ドメインを欠く代わりに、GPI を有し、これを介して血管内皮細胞表面に直接係留されている⁵⁾。Maroney らの CHO 細胞を用いた実験では、細胞膜結合 TFPI β は遊離 TFPI α と同等かそれ以上の TF/FVIIa 阻害、FXa 阻害作用を有した²⁶⁾。TFPI β は GPI によって細胞膜の脂質ラフトや caveolae に局在しており²⁷⁾、この局在が TF/FVIIa 阻害作用を増強させている²⁸⁾。また、この caveolae において TFPI と共発現し、TFPI 機能を制御している新たな蛋白(ADTRP: androgen-dependent TFPI-regulating protein)が報告された²⁹⁾。止血血栓における血小板 TFPI α のオンデマンドで局所的な役割と対照的に、TFPI β には全身の微小循環の恒常的な抗凝固状態を保持(TF 発現を制御)する役割があると思われる。

②血管内皮・単球・がん細胞における TF を介する細胞シグナル伝達制御

ヒトの単核球、血管内皮細胞、繊維芽細胞などでは、細胞膜上の TF と血漿中の FVIIa の結合が種々の細胞内シグナル伝達を起こすことが知られており、PAR-1 (protease activated receptor-1)、PAR-2 などの受容体が、トロンبینを介して、あるいは直接 FVIIa/TF によって活性化される^{30, 31)}。PAR の活性化および TF の細胞質ドメインのリン酸化は、細胞の複製、遊走、生存などに関与しており、これらの TF 非凝固機能については、他総説を参照していただきたい^{32, 33)}。

TFPI β はこの PAR システムを制御している。CHO 細胞を用いた実験では、TFPI β は TF シグナルを介した細胞遊走能を制御し、この効果は TFPI α や短縮 TFPI の約 3 倍であった²⁶⁾。さらにこの TF 発現細胞を SCID マウスに投与した際に生じる肺浸潤と消費性凝固障害(血小板低下)は、TFPI β を共発現させることにより抑制された²⁶⁾。このように TFPI β は TF 発現細胞と共発現することで細胞遊走能を制御している。

表2 血漿 TFPI 抗原量の測定方法と正常値

キット名	抗体認識部位		正常値 (ng/mL)	TFPIα/ 総 TFPI [#]	製造者	報告者
	Capture	Detect				
総 TFPI						
Imubind [®] total TFPI	抗 TFPI ポリ	抗 K1 モノ	57.3±17.7		American Diagnostica	Porta ³⁷⁾
			48.6±14.3			Mitchell ³⁸⁾
Asserachrom [®] Total TFPI	抗 K2 モノ	抗 K1K2 モノ	85.3±11.9	○	Diagnostica Stago	Golino ³⁹⁾
			73.7	○		Dahm ⁴⁰⁾
非市販	抗 TFPI ポリ	抗 K1-K2 間モノ	63±21	○	化血研	Furumoto ⁴¹⁾
			81.2±19.1	○		Kawaguchi ⁴²⁾
TFPIα(遊離 TFPI)						
Asserachrom [®] Free TFPI	抗 K2 モノ	抗 K3 モノ	11.3±2.1	13%	Diagnostica Stago	Golino ³⁹⁾
			15	20%		Dahm ⁴⁰⁾
非市販	抗 K3 モノ	抗 K1-K2 間モノ	19±16	30%	化血研	Furumoto ⁴¹⁾
			17.1±6.3	21%		Kawaguchi ⁴²⁾
非市販	抗 C 末モノ	抗 K2 モノ	ng/ml 記載なし		Hackeng, Maastricht Uni.	Maurissen ³⁵⁾
非市販	抗 C 末ポリ*	—	記載なし		Broze, Washington Uni.	Mast ⁶⁾
Human TFPI Quantikine [®]	抗 K3 モノ*	抗 TFPI ポリ	記載なし		R&D system	Girard ⁷⁾

ポリ：ポリクローナル抗体，モノ：モノクローナル抗体，#：総 TFPI の健常値を測定したうち，○で示した 5 報告は同時に TFPI α 値も測定し，総 TFPI に占める TFPI α (遊離 TFPI)の割合を算出，*：抗体認識部位の差により血管内皮表面 TFPI の評価が異なる。

5. TFPI 測定方法と臨床的意義

TFPI の存在様式と機能の複雑さは，TFPI 測定の臨床的意義も複雑にしており，TFPI 測定は未だ臨床応用されていない。臨床的に可能な測定検体は血液であり，血管内皮細胞表面や内部に貯蔵されている TFPI の評価は困難である。血漿(血清)を用いた TFPI 測定法は，抗原量と抗凝固機能評価に大別される。抗原量測定においては，抗凝固活性の強い TFPI α の測定が重視される傾向にある。数種のキットが市販されているが研究使用に限られる。近年，包括的凝固機能測定法(global assay)の一つであるトロンビン生成試験が活用され FV，PS に関する重要な発見につながった。

①抗原量測定

ヒト TFPI を認識する各種ポリクローナル・モノクローナル抗体が用いられる。TFPI のどこを認識しているかが重要である。代表的な測定方法と健常

値を表 2 に示す^{6, 7, 35, 37-42)}。総 TFPI 抗原量測定ではポリクローナル抗体が K1-K2 ドメインを認識するモノクローナル抗体が用いられており，理論的には K1-K2 ドメインを有する全ての TFPI が同定される。健常値はおよそ 50-100 ng/mL (1.2-2.4 nM) で男性のほうが高い。

一方，遊離 TFPI は，完全長 TFPI とほぼ同義として用いられてきたが，用いられる抗体によって時に大きな違いをもたらす。抗 C 末ポリクローナル抗体によって，PIPLC で遊離される TFPI が TFPI α であると同定されていたが⁶⁾，後に抗 K3 モノクローナル抗体を用いた検討によって，これが K3 ドメインを有さず TFPI β であると判明した⁷⁾。前者の使用したポリクローナル抗体は，K3 ドメインの欠如した TFPI_{K1-K2-C 末}を認識するため³⁴⁾，TFPI β に残存する C 末領域を認識していた可能性が考えられる。最近の抗 C 末モノクローナル抗体を用いた完全長 TFPI 測定(完全長 TFPI α)では，抗 K3 モノクローナ

ル抗体を使用した遊離 TFPI 測定(TFPI α)と良好な相関が得られている³⁵⁾.

血漿中で遊離 TFPI と考えられていた TFPI α は、実際は FV, PS 等と結合して存在している可能性が高い. 市販の各凝固・抗凝固因子欠乏血漿の TFPI α 値は測定したところ, FV, FVIII, PS の各欠乏血漿で TFPI α 値は正常血漿の約 20~40%を示した³⁶⁾. これらの結合が抗原測定に影響するかどうか不明である. また, 遊離 TFPI との表記も再考が必要かもしれない. TFPI α の健常値は約 10~25 ng/mL(0.2~0.5 nM)で, 両者を同時測定した報告では, TFPI α の総 TFPI の占める割合は 13%~30%であった³⁹⁻⁴²⁾ (表 2). このような TFPI 抗原量測定は未だ研究用途に限られている. 血小板 TFPI α , 血管内皮 TFPI β , 短縮 TFPI 等の位置づけも今後の課題である.

②活性測定(FVIIa/TF 阻害評価, FXa 阻害評価, 希釈 PT 法)

TFPI の機能評価として, 抗 FVIIa/TF 阻害作用を合成基質で測定するキットが市販されている(Acti-chrome® TFPI activity assay)⁴³⁾. この原理は, 希釈した血漿を一定量の TF, FVIIa と一定時間混和後, FX を添加し, 残存 FVIIa/TF によって活性化された FXa 生成量を測定する. この TFPI 活性値は完全長 TFPI α よりも総 TFPI 抗原量と相関が強く, 短縮 TFPI の機能も反映されるようである⁴⁴⁾. 一方, TFPI の直接的な FXa 阻害効果の測定はあまり重視されてこなかったが, 最近 TFPI α の TF/FVIIa 非依存性かつ PS 依存性の FXa 阻害作用が報告された⁴⁵⁾. より簡便な活性測定法として, 希釈プロトロンビン時間(PT)法(dPT 法)が考案された. これは 400~600 倍に希釈した組織トロンプラスチン試薬を用いて PT を実施すると, TFPI 濃度に依存して PT の延長が見られるというものである⁴⁶⁾. この効果は短縮 TFPI には認められない⁴⁷⁾.

③包括的凝固機能測定法(トロロンビン生成試験)

いわゆる global assay では, 凝固過程を経時的に評価することで, あるいは *in vivo* に近いサンプル(全血あるいは多血小板血漿)やトリガー試薬を用いることで, 従来法で得られなかった新知見が得られている⁴⁸⁾. このうち Hemcker らによって開発された Calibrated Automated Thrombogram(トロロンビン生成試験, CAT)は, TFPI, PS, PC, FV, AT など生理

的抗凝固因子の機能評価に用いられ, 多くの発見に貢献してきた^{14, 20, 49, 50)}. CAT は, 多血小板血漿を用いた評価が可能, 検体希釈率が小さい, という特徴がある. 通常の抗原・活性測定で血漿は 5~20 倍に, dPT では 3 倍(150 μ L あたり 50 μ L)に希釈されるのに比べ, CAT では血漿は 1.5 倍(120 μ L あたり 80 μ L)しか希釈されない. 検体希釈の影響は凝固因子よりも抗凝固因子に鋭敏に現れるため, 低希釈検体を用いるメリットは大きい⁵¹⁾.

CAT では, TFPI の影響は低濃度 TF(<10 pM)トリガーの場合に感度よく認められる. 抗 TFPI 抗体を添加すると, トロンビン生成能は TFPI α 濃度に依存して増加するが, その効果は FVIII 欠乏時(インヒビター保有血友病 A モデル血漿)で顕著に示し⁵²⁾, 血友病患者の凝固能における TFPI の重要性を示している. CAT を用いた TFPI 機能評価の自験例を図 4 に示す. Maurissen らは CAT に抗 TFPI 抗体あるいは抗 PS 抗体添加を組み合わせることで, TFPI-PS システムを総合的に評価した³⁵⁾. また多血小板血漿を用いた CAT では, 血小板 TFPI α の評価に有用であった¹⁵⁾. 一方, 細胞表面に存在する TFPI β を臨床的にどう評価するかは課題である.

6. TFPI を標的とした臨床応用

①遺伝子組換え TFPI 製剤(rTFPI)による敗血症治療

rTFPI による血管内皮保護効果を期待した敗血症制御の臨床試験が 2000 年代初頭に実施された. 敗血症患者を対象にした第 II 相臨床試験(210 名)では, プラセボ群と比較して投与群で 28 日後死亡率が 20%低下し有効性が期待されたが⁵³⁾, 続く第 III 相試験(1754 名)では, 28 日後死亡率にプラセボ群と差がなく, また出血率が上昇した⁵⁴⁾. しかし市中肺炎による敗血症患者を対象を絞った解析でヘパリン非投与患者における有意な生存率の上昇が認められたため, 重症市中肺炎患者を対象を絞った新たな第 III 相試験(2138 名)が実施されたが, 残念ながら有意な死亡率改善は認められなかった⁵⁵⁾. その後新たな rTFPI 製剤の臨床試験は実施されていない. rTFPI 製剤は TFPI α であり, 炎症や細胞シグナル伝達において重要な細胞膜結合型の TFPI β の機能を十分に補完できず, 逆に止血血栓に対する抗凝固機

図4 トロンビン生成試験によるTFPI機能評価の自験例

2名の血友病A血漿(FVIII: C<1%)でトロンビン生成試験(TF 1 pM)を実施した。検体a(○)およびb(△)のトロンビン生成波形とそれぞれのTFPIα値、トロンビン生成ピーク値、TFPI活性値を図内表に示す。抗TFPI添加前(灰色)のピーク値はbのほうが高いが、抗体添加後(白色)は両者のピーク値はほとんど差がない。つまり、a、bの血漿TFPIα活性の差がトロンビンピークの差となって現れている。

能が強く発揮され、出血としての有害事象が現れたのかもしれない⁵⁶⁾。

②動脈硬化・血栓性疾患

動脈硬化症や血栓性疾患におけるTFの病理的意義が明らかになるにつれ、TFPIの臨床応用が期待されるが、具体化には至っていない。これまで種々の疾患におけるTFPI値が評価されてきた。動脈硬化症を対象にしたTFPIに関するヒト臨床研究は多数報告されておりWinckersの総説が詳しく、本邦研究も多数引用されているが⁵⁷⁾、総じてTFPIと病態との正の関連を示している。頸動脈硬化症の83名の検討では、遊離TFPI値が症候性患者、無症候性患者、健常者の順に高値であった⁵⁸⁾。本邦522名の非心血管病変成人を対象にしたコホート研究では、男性において遊離TFPIと無症候性動脈病変(総頸動脈)との正相関が認められた⁵⁹⁾。

一方、静脈血栓症患者において、対照的にTFPI値は低下している⁴⁰⁾。TFPI値が上昇する動脈硬化症やDICでは血管内皮障害によるTFPI放出が優位になるのに対し、静脈血栓ではTFPIの消費が相対的に優位になるためと推測される。静脈血栓症におけるrTFPI投与は、直接的に静脈血栓の発生や進展

を抑制するか、ヘパリン投与効果を間接的に増強させるか、いずれかの機序で効果が期待されるが具体化されていない。経口避妊薬として用いられるエストロゲンは血漿TFPIを低下させる(約25%相当)ことが知られており、静脈血栓症のリスクを増加させる⁶⁰⁾。最近、このリスク増加にはPS低値とTFPI低値が相乗的に作用していることが判明した⁶¹⁾。

③悪性腫瘍

悪性腫瘍におけるTFあるいはトロンビンの役割は、i)TF/FVIIaのPAR2を介した直接的細胞シグナル伝達機能、ii)トロンビンを経たシグナル伝達機構、iii)止血機構全体によるがん転移への関与、に大別される³²⁾。TFはこれらの経路に共通する最上流に位置し、がん細胞に発現したTFを標的とした治療が検討されており、一部は臨床試験に入っている(ALT-836: ClinicalTrials.govの治験ID: NCT01325558)。TFPIはこのTFを経た細胞遊走能を制御する²⁶⁾。TFPIのがん治療応用として動物実験モデルにおけるTFPIの抗がん作用が報告されているが^{62, 63)}、ヒトでの臨床応用はまだない。

④TFPI阻害による出血性疾患(血友病)治療

血友病の治療はこの半世紀で飛躍的に進歩し、

FVIII 製剤の定期補充療法は患者 QOL を向上させたが、頻回(週 2-3 回)静脈投与、抗 FVIII(抗 FIX)インヒビター出現時の治療、後天性血友病の治療などの課題がある⁶⁴⁾。TFPI 阻害によって血友病患者の止血能を改善させようとする試みは、1990 年代初頭からあった⁶⁵⁾。TFPI の構造と機能の解明が進んだことで、血友病治療応用についての理論的根拠も深まった⁶⁶⁾。3 つの臨床治験が挙げられる。

(a) 抗 TFPI アプタマー：BAX499 (ARC19499)

アプタマーとは特定の標的分子に対して高い特異性と親和性を有する核酸やペプチドを指す。抗体製剤と同様に皮下投与が可能なことに加え、試験管内で化学的合成可能、免疫原性が少ないといった利点を有する⁶⁶⁾。BAX499 は TFPI α に特異的に結合するオリゴヌクレオチドであり、TFPI の FXa 阻害と TF/FVIIa 阻害の両者の機能を抑制する⁶⁷⁾。TFPI α の K1, K3, C 末ドメインの 3 ドメインが結合に重要で、TFPI β は阻害しない⁶⁸⁾。サル後天性血友病 A モデルにおける止血効果や⁶⁷⁾、血友病患者全血および血漿での *ex vivo* 添加の有効性が確認されており、後天性血友病 A の患者血でも有効であった⁶⁹⁾。すでに血友病患者を対象とした第 I/II 相治験が終了している (ClinicalTrials.gov の治験 ID：NCT01191372)。

(b) Non-Anticoagulant Sulfated Polysaccharide (NASP) - TFPI inhibitor: BAX513 (AV513)

硫酸化多糖類は自然界に多種多様に存在し、ヘパリン様硫酸化多糖類の多くは抗凝固作用を有するが、そうではないものも存在する (NASP)。この NASP の中から TFPI 特異的阻害活性を有するものとしてフコイダンが見つかり⁷⁰⁾ (Liu Thromb Haemost 2006)、ワカメのフコイダンを原料に製剤化された BAX513 は、血友病 A モデルマウスとモデル犬において、止血効果を発揮した⁷¹⁾。この報告では、皮下注射に加え経口投与の有用性も示されている。BAX513 の TFPI 阻害作用は C 末ドメイン依存性であり⁷²⁾、TFPI α のみに作用する。健常ボランティアを対象とした第 I 相治験が終了している (治験 ID：NCT01063101)。

(c) 抗 TFPI モノクローナル抗体：NN7415 (mAb 2012)

本抗体は K2 ドメインに非常に高い親和性 (K_d 25 pM) で結合し、TFPI の FXa 阻害作用と、続く TF/FVIIa 阻害作用を抑制する。ウサギへの静脈および皮下投与実験で *in vivo* の止血効果を示し、単回投与で効果

が 7 日間持続した⁷³⁾。静脈投与の第 I 相治験が終了 (治験 ID：NCT01228669) し (結果は未公表)、現在は皮下投与第 I 相治験が健常ボランティアと血友病 A 患者を対象に継続中である (治験 ID：NCT01631942)。

7. おわりに

TFPI α の役割を中心に最近の知見を紹介し、臨床応用として TFPI 阻害剤による血友病止血治療を詳しく解説した。臨床治験の結果は今後明らかになるであろうが、その有効性ととも、TFPI の理解が深まることを期待する。本邦の血栓素因として頻度の高い PS 欠損症の臨床像や病態に TFPI がどう影響しているのか、また、TFPI α の抗 FVa 作用 (プロトロンビナーゼ阻害作用) の発見は、血小板と FV の研究にどのような展開をもたらすのか興味深い。一方、敗血症、動脈硬化、血栓症、悪性腫瘍などへの臨床応用においては、血管内皮 TFPI、特に TFPI β の意義が今後解明される必要があると思われる。

著者全員の利益相反 (COI) の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) 加藤久雄：TFPI 研究の最近の進歩－新たな展開を期待して。血栓止血誌 **14**: 220-226, 2003.
- 2) Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, Broze GJ: Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* **338**: 518-520, 1989.
- 3) Crawley JT, Lane DA: The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 233-242, 2008.
- 4) Broze GJ, Girard TJ: Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**: 262-280, 2012.
- 5) Zhang J, Piro O, Lu L, Broze GJ: Glycosyl phosphatidylinositol anchorage of tissue factor pathway inhibitor. *Circulation* **108**: 623-627, 2003.
- 6) Mast AE, Acharya N, Malecha MJ, Hall CL, Dietzen DJ: Characterization of the association of tissue factor pathway inhibitor with human placenta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**: 2099-2104, 2002.
- 7) Girard TJ, Tuley E, Broze GJ: TFPI β is the GPI-anchored TFPI isoform on human endothelial cells and placental microsomes. *Blood* **119**: 1256-1262, 2012.
- 8) Maroney SA, Habichter SL, Friese P, Collins ML, Ferrel JP,

- Dale GL, Mast AE: Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. *Blood* **109**: 1931–1937, 2007.
- 9) Wesselschmidt R, Likert K, Girard T, Wun TC, Broze GJ: Tissue factor pathway inhibitor: the carboxy-terminus is required for optimal inhibition of factor Xa. *Blood* **79**: 2004–2010, 1992.
 - 10) Ndonwi M, Tuley EA, Broze GJ: The Kunitz-3 domain of TFPI- α is required for protein S-dependent enhancement of factor Xa inhibition. *Blood* **116**: 1344–1351, 2010.
 - 11) Hamik A, Setiadi H, Bu G, McEver RP, Morrissey JH: Down-regulation of monocyte tissue factor mediated by tissue factor pathway inhibitor and the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **274**: 4962–4969, 1999.
 - 12) Ndonwi M, Girard TJ, Broze GJ Jr: The C-terminus of tissue factor pathway inhibitor α is required for its interaction with factors V and Va. *J Thromb Haemost* **10**: 1944–1946, 2012.
 - 13) Wesselschmidt R, Likert K, Huang Z, MacPhail L, Broze GJ: Structural requirements for tissue factor pathway inhibitor interactions with factor Xa and heparin. *Blood Coagul Fibrinolysis* **4**: 661–669, 1993.
 - 14) Duckers C, Simioni P, Spiezia L, Radu C, Gavasso S, Rosing J, Castoldi E: Low plasma levels of tissue factor pathway inhibitor in patients with congenital factor V deficiency. *Blood* **112**: 3615–3623, 2008.
 - 15) Duckers C, Simioni P, Spiezia L, Radu C, Dabril P, Gavasso S, Rosing J, Castoldi E: Residual platelet factor V ensures thrombin generation in patients with severe congenital factor V deficiency and mild bleeding symptoms. *Blood* **115**: 879–886, 2010.
 - 16) Bos MH, Camire RM: A bipartite autoinhibitory region within the B-domain suppresses function in factor V. *J Biol Chem* **287**: 26342–26351, 2012.
 - 17) Kuang SQ, Hasham S, Phillips MD, Wolf D, Wan Y, Thiagarajan P, Milewicz DM: Characterization of a novel autosomal dominant bleeding disorder in a large kindred from east Texas. *Blood* **97**: 1549–1554, 2001.
 - 18) Vincent LM, Tran S, Livaja R, Bensed TA, Milewicz DM, Dahlbäck B: Coagulation factor V (A2440G) causes east Texas bleeding disorder via TFPI α . *J Clin Invest* **123**: 3777–3787, 2013.
 - 19) Wood JP, Bunce MW, Maroney SA, Tracy PB, Camire RM, Mast AE: Tissue factor pathway inhibitor- α inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 17838–17843, 2013.
 - 20) Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J: Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3106–3111, 2006.
 - 21) Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ: The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **79**: 1712–1719, 1992.
 - 22) Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT, Engelmann B: Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* **16**: 887–896, 2010.
 - 23) Morrissey JH, Choi SH, Smith SA: Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood* **119**: 5972–5979, 2012.
 - 24) Maroney SA, Cooley BC, Ferrel JP, Bonesho CE, Mast AE: Murine hematopoietic cell tissue factor pathway inhibitor limits thrombus growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**: 821–826, 2011.
 - 25) Maroney SA, Cooley BC, Ferrel JP, Bonesho CE, Nielsen LV, Johansen PB, Hermit MB, Petersen LC, Mast AE: Absence of hematopoietic tissue factor pathway inhibitor mitigates bleeding in mice with hemophilia. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 3927–3931, 2012.
 - 26) Maroney SA, Ellery PE, Wood JP, Ferrel JP, Martinez ND, Mast AE: Comparison of the inhibitory activities of human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) α and TFPI β . *J Thromb Haemost* **11**: 911–918, 2013.
 - 27) Lupu C, Goodwin CA, Westmuckett AD, Emeis JJ, Scully MF, Kakkar VV, Lupu F: Tissue factor pathway inhibitor in endothelial cells colocalizes with glycolipid microdomains/caveolae. Regulatory mechanism(s) of the anticoagulant properties of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2964–2974, 1997.
 - 28) Maroney SA, Ellery PE, Wood JP, Ferrel JP, Bonesho CE, Mast AE: Caveolae optimize tissue factor-Factor VIIa inhibitory activity of cell-surface-associated tissue factor pathway inhibitor. *Biochem J* **443**: 259–266, 2012.
 - 29) Lupu C, Zhu H, Popescu NI, Wren JD, Lupu F: Novel protein ADTRP regulates TFPI expression and function in human endothelial cells in normal conditions and in response to androgen. *Blood* **118**: 4463–4471, 2011.
 - 30) Bromberg ME, Bailly MA, Konigsberg WH: Role of protease-activated receptor 1 in tumor metastasis promoted by tissue factor. *Thromb Haemost* **86**: 1210–1214, 2001.
 - 31) Hjortoe GM, Petersen LC, Albrechtsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV: Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* **103**: 3029–3037, 2004.
 - 32) Ruf W: Tissue factor and cancer. *Thromb Res* **130** (Suppl 1): S84–87, 2012.
 - 33) Ma L, Dorling A: The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol* **34**: 63–72, 2012.
 - 34) Mast AE, Stadanlick JE, Lockett JM, Dietzen DJ, Hasty KA, Hall CL: Tissue factor pathway inhibitor binds to platelet thrombospondin-1. *J Biol Chem* **275**: 31715–31721, 2000.
 - 35) Maurissen LF, Castoldi E, Simioni P, Rosing J, Hackeng TM: Thrombin generation-based assays to measure the activity of the TFPI-protein S pathway in plasma from normal and protein S-deficient individuals. *J Thromb Haemost* **8**: 750–758, 2010.
 - 36) Castoldi E, Simioni P, Tormene D, Rosing J, Hackeng TM: Hereditary and acquired protein S deficiencies are associated with low TFPI levels in plasma. *J Thromb Haemost* **8**: 294–300, 2010.

- 37) Porta B, Baldassarre D, Camera M, Amato M, Arquati M, Brusoni B, Fiorentini C, Montorsi P, Romano S, Tremoli E, Cortellaro M; MIAMI Study Group: E-selectin and TFPI are associated with carotid intima-media thickness in stable IHD patients: the baseline findings of the MIAMI study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **18**: 320–328, 2008.
- 38) Mitchell CT, Kaminen A, Palmas W, Cushman M: Tissue factor pathway inhibitor, vascular risk factors and subclinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* **207**: 277–283, 2009.
- 39) Golino P, Ravera A, Ragni M, Cirillo P, Piro O, Chiariello M: Involvement of tissue factor pathway inhibitor in the coronary circulation of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **108**: 2864–2869, 2003.
- 40) Dahm A, Van Hylckama Vlieg A, Bendz B, Rosendaal F, Bertina RM, Sandset PM: Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood* **101**: 4387–4392, 2003.
- 41) Furumoto T, Fujii S, Saito N, Mikami T, Kitabatake A: Relationships between brachial artery flow mediated dilation and carotid artery intima-media thickness in patients with suspected coronary artery disease. *Jpn Heart J* **43**: 117–125, 2002.
- 42) Kawaguchi A, Miyao Y, Noguchi T, Nonogi H, Yamagishi M, Miyatake K, Kamikubo Y, Kumeda K, Tsushima M, Yamamoto A, Kato H: Intravascular free tissue factor pathway inhibitor is inversely correlated with HDL cholesterol and postheparin lipoprotein lipase but proportional to apolipoprotein A-II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 251–258, 2000.
- 43) Bognacki J, Hammelburger J: Functional and immunologic methods for the measurement of human tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* **6** (Suppl 1): S65–72, 1995.
- 44) Dahm AE, Andersen TO, Rosendaal F, Sandset PM: A novel anticoagulant activity assay of tissue factor pathway inhibitor I (TFPI). *J Thromb Haemost* **3**: 651–658, 2005.
- 45) Thomassen S, Heinzmann A, Herfs L, Rosing J, Hackeng TM, Hartmann R, Scheifflinger F, Dockal M: TFPI expresses anticoagulant activity independent of TF-FVIIa. *ASH abstract # 3563*, 2013.
- 46) Nordfang O, Kristensen HI, Valentin S, Ostergaard P, Wadt J: The significance of TFPI in clotting assays--comparison and combination with other anticoagulants. *Thromb Haemost* **70**: 448–453, 1993.
- 47) Hansen JB, Huseby KR, Huseby NE, Ezban M, Nordoy A: Tissue factor pathway inhibitor in complex with low density lipoprotein isolated from human plasma does not possess anticoagulant function in tissue factor-induced coagulation in vitro. *Thromb Res* **85**: 413–425, 1997.
- 48) Shima M, Matsumoto T, Ogiwara K: New assays for monitoring haemophilia treatment. *Haemophilia* **14** (Suppl 3): 83–92, 2008.
- 49) Castoldi E, Brugge JM, Nicolaes GA, Girelli D, Tans G, Rosing J: Impaired APC cofactor activity of factor V plays a major role in the APC resistance associated with the factor V Leiden (R506Q) and R2 (H1299R) mutations. *Blood* **103**: 4173–4179, 2004.
- 50) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Naoe T, Saito H, Kojima T: Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med* **366**: 2390–2396, 2012.
- 51) De Smedt E, Wagenvoort R, Coen Hemker H: The technique of measuring thrombin generation with fluorogenic substrates: 3. The effects of sample dilution. *Thromb Haemost* **101**: 165–170, 2009.
- 52) Knappe S, Gorczyca ME, Jilma B, Derhaschnig U, Hartmann R, Palige M, Scheifflinger F, Dockal M: Plasmatic tissue factor pathway inhibitor is a major determinant of clotting in factor VIII inhibited plasma or blood. *Thromb Haemost* **109**: 450–457, 2013.
- 53) Abraham E, Reinhart K, Svoboda P, Seibert A, Olthoff D, Dal Nogare A, Postier R, Hempelmann G, Butler T, Martin E, Zwingelstein C, Percell S, Shu V, Leighton A, Creasey AA: Assessment of the safety of recombinant tissue factor pathway inhibitor in patients with severe sepsis: a multicenter, randomized, placebo-controlled, single-blind, dose escalation study. *Crit Care Med* **29**: 2081–2089, 2001.
- 54) Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, Beale R, Svoboda P, Laterre PF, Simon S, Light B, Spapen H, Stone J, Seibert A, Peckelsen C, De Deyne C, Postier R, Pettit V, Artigas A, Percell SR, Shu V, Zwingelstein C, Tobias J, Poole L, Stolzenbach JC, Creasey AA; OPTIMIST Trial Study Group: Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* **290**: 238–247, 2003.
- 55) Wunderink RG, Laterre PF, Francois B, Perrotin D, Artigas A, Vidal LO, Lobo SM, Juan JS, Hwang SC, Dugernier T, LaRosa S, Wittebole X, Dhainaut JF, Doig C, Mendelson MH, Zwingelstein C, Su G, Opal S; CAPTIVATE Trial Group: Recombinant tissue factor pathway inhibitor in severe community-acquired pneumonia: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* **183**: 1561–1568, 2011.
- 56) Maroney SA, Hansen KG, Mast AE: Cellular expression and biological activities of alternatively spliced forms of tissue factor pathway inhibitor. *Curr Opin Hematol* **20**: 403–409, 2013.
- 57) Winckers K, ten Cate H, Hackeng TM: The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis. *Blood Rev* **27**: 119–132, 2013.
- 58) Novo G, Caplice N, Tantiillo R, Bonura F, Simari R, Novo S: TFPI antigen and activity levels in patients with asymptomatic atherosclerosis and target organ acute and chronic complications. *Int Angiol* **24**: 366–371, 2005.
- 59) Sakata T, Mannami T, Baba S, Kokubo Y, Kario K, Okamoto A, Kumeda K, Ohkura N, Katayama Y, Miyata T, Tomoike H, Kato H: Potential of free-form TFPI and PAI-1 to be useful markers of early atherosclerosis in a Japanese general population (the Suita Study): association with the intimal-medial thickness of carotid arteries. *Atherosclerosis* **176**: 355–360, 2004.
- 60) Harris GM, Stendtl CL, Vollenhoven BJ, Gan TE, Tipping PG: Decreased plasma tissue factor pathway inhibitor in women taking combined oral contraceptives. *Am J Hematol* **60**: 175–

- 180, 1999.
- 61) Raps M, Helmerhorst FM, Fleischer K, Dahm AE, Rosendaal FR, Rosing J, Reitsma P, Sandset PM, van Vliet HA: The effect of different hormonal contraceptives on plasma levels of free protein S and free TFPI. *Thromb Haemost* **109**: 606–613, 2013.
 - 62) Amirkhosravi A, Meyer T, Chang JY, Amaya M, Siddiqui F, Desai H, Francis JL: Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemost* **87**: 930–936, 2002.
 - 63) Stavik B, Tinholt M, Sletten M, Skretting G, Sandset PM, Iversen N: TFPI α and TFPI β are expressed at the surface of breast cancer cells and inhibit TF-FVIIa activity. *J Hematol Oncol* **6**: 5, 2013.
 - 64) 嶋 緑倫: 今後の展望(2013年版) – 血小板・凝固・線溶系疾患 – 血友病. *臨床血液* **54**: 189–197, 2013.
 - 65) Nordfang O, Valentin S, Beck TC, Hedner U: Inhibition of extrinsic pathway inhibitor shortens the coagulation time of normal plasma and of hemophilia plasma. *Thromb Haemost* **66**: 464–467, 1991.
 - 66) Bouchard PR, Hutabarat RM, Thompson KM: Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**: 237–257, 2010.
 - 67) Waters EK, Genga RM, Schwartz MC, Nelson JA, Schaub RG, Olson KA, Kurz JC, McGinness KE: Aptamer ARC19499 mediates a procoagulant hemostatic effect by inhibiting tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **117**: 5514–5522, 2011.
 - 68) Waters EK, Genga RM, Thomson HA, Kurz JC, Schaub RG, Scheifflinger F, McGinness KE: Aptamer BAX 499 mediates inhibition of tissue factor pathway inhibitor via interaction with multiple domains of the protein. *J Thromb Haemost* **11**: 1137–1145, 2013.
 - 69) Gorczyca ME, Nair SC, Jilma B, Priya S, Male C, Reitter S, Knoebl P, Gilbert JC, Schaub RG, Dockal M, McGinness KE, Pabinger I, Srivastava A: Inhibition of tissue factor pathway inhibitor by the aptamer BAX499 improves clotting of hemophilic blood and plasma. *J Thromb Haemost* **10**: 1581–1590, 2012.
 - 70) Liu T, Scallan CD, Broze GJ, Patarroyo-White S, Pierce GF, Johnson KW: Improved coagulation in bleeding disorders by Non-Anticoagulant Sulfated Polysaccharides (NASP). *Thromb Haemost* **95**: 68–76, 2006.
 - 71) Prasad S, Lillicrap D, Labelle A, Knappe S, Keller T, Burnett E, Powell S, Johnson KW: Efficacy and safety of a new-class hemostatic drug candidate, AV513, in dogs with hemophilia A. *Blood* **111**: 672–679, 2008.
 - 72) Palige M, Redl C, Knappe S, Ehrlich HJ, Dockal M, Scheifflinger F: Procoagulant activity of Laminaria japonica derived fucoidan (BAX513) depends on the interaction with the C-terminus of tissue factor pathway inhibitor. *ASH abstract# 4417*, 2010.
 - 73) Hilden I, Lauritzen B, Sørensen BB, Clausen JT, Jespersgaard C, Krogh BO, Bowler AN, Breinholt J, Gruhler A, Svensson LA, Petersen HH, Petersen LC, Balling KW, Hansen L, Hermit MB, Egebjerg T, Friedrichsen B, Ezban M, Bjørn SE: Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model. *Blood* **119**: 5871–5878, 2012.