

連鎖解析による May-Hegglin 血小板異常症の責任遺伝子座同定 (分担) 研究者 小嶋 哲人 名古屋大学医学部

研究要旨

May-Hegglin 血小板異常症は、巨大血小板、血小板減少症および顆粒球 Dohle 様封入体を 3 主徴とし、常染色体優性遺伝形式をとる血小板異常症で、特発性血小板減少性紫斑病との鑑別や輸血の適応について問題となることがある。本疾患での生化学的異常は同定されておらず、異常蛋白の同定から異常遺伝子の同定へと解析を進めることができない。本研究では、May-Hegglin 血小板異常症の原因遺伝子同定のために連鎖解析によってその責任遺伝子座を 22q12.3-13.2 (D22S280 から D22S272) の 13.6cM の領域に同定した。今後、さらに症例解析を行い本疾患の原因遺伝子の同定を試みる予定である。

A. 研究目的

May-Hegglin anomaly (MHA)は、巨大血小板、血小板減少症および顆粒球の Dohle 様封入体を 3 主徴とし、常染色体優性遺伝形式をとる血小板異常症である。臨床症状は出血傾向であるが、その程度は一般的に軽微で血小板数に比例する。本疾患での巨大血小板の生成機序は不明で、血小板膜蛋白の解析あるいは電顕的所見においても正常血小板との差異は認められていない。顆粒球封入体は、紡錘形で光顕上青色に染色され、電顕上では脱重合したりポゾームの集積が認められる。本疾患での生化学的異常は同定されておらず、異常蛋白の同定から異常遺伝子の同定へと解析を進めることができない。したがって、本疾患の原因遺伝子を単離するためにポジショナルクローニングを施行することとし、その第一段階として連鎖解析によって本疾患の責任遺伝子座を同定した。

B. 研究方法

対象は MHA 家系 23 名 (MHA13 名、正常 4 名、配偶者 6 名) である。Informed

consent を得た後に末梢血の提供を得た。高分子 DNA は白血球より抽出し、全ての常染色体についてマイクロサテライト多型部位の遺伝子型を決定した。マイクロサテライト解析は、蛍光標識プライマー (ABI PRISM Linkage Mapping Set, PE Applied Biosystems) を用いて PCR 増幅、ABI373A オートシークエンサーにて泳動後、Genescan 672 ソフトウェアにてフラグメントサイズを解析した。

D22S283 ローカスにおいて MHA 表現型との連鎖が認められた後に、22q12-q13 領域において 9 個の多型部位をさらに解析した。

C. 研究結果

全ての常染色体上の 254 箇所のマイクロサテライト多型部位を解析した (平均距離は約 15 cM)。最初に D22S283 ローカスにおいて MHA 表現型との連鎖が認められ、最大ロッド値は 2.68 であった ($\theta = 0$)。さらにこの領域の 9 箇所のマイクロサテライト部位を解析したところ、D22S1142 および D22S277 での最大ロッド値は 4.52

($\theta = 0$)であった。ハプロタイプ解析によって MHA 責任遺伝子座は 22q12.3-13.2 の D22S280 から D22S272 の 13.6cM の領域にマッピングされた (図 1)。

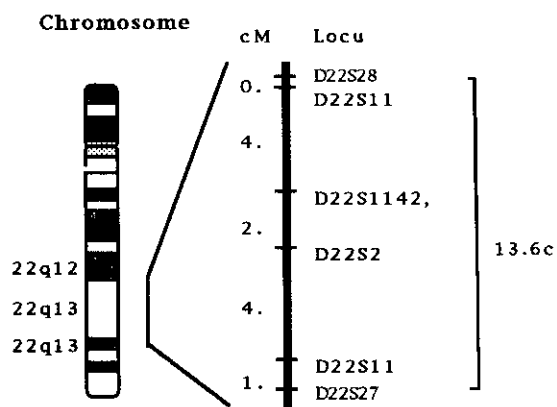


図 1 May-Hegglin 血小板異常症の遺伝子座

D. 考察

巨大血小板血症を呈する疾患は数多くあり、巨大血小板の産生についてはさまざまな機構が働いていると考えられている。先天性巨大血小板血症のなかでも唯一その原因遺伝子が特定されているものに Bernard-Soulier 症候群(BSS)がある。BSS はフォンビルブランド因子の受容体である血小板膜糖蛋白 Ib/IX(GPIb/IX)の先天性な欠如により引き起こされ、重篤な出血症状を呈する。GPIb/IX は I 型の膜貫通型蛋白であり、細胞内では actin-binding protein 280 を介して actin と結合しており、膜骨格と細胞骨格とを繋ぎ止めることにより血小板の形態保持に重要な役割を果たしている。従って血小板は巨大で、血小板膜は脆弱になることにより寿命も短く血小板減少を呈する。巨大血小板血症の動物モデルには Wistar Furth rat があり、talin の異常によることが知られている。talin もまた細胞骨格蛋白の一種であり、膜蛋白と actin に結合している。このように他の先天

性巨大血小板血症も膜蛋白あるいは細胞骨格蛋白に異常があることが十分に考えられる。MHA もこのような遺伝子の異常によることが考えられるが、少なくとも actin-binding protein 280、actin あるいは talin 遺伝子は 22 番染色体に座位しておらず本疾患の原因からは除外される。

白血球封入体を伴う先天性巨大血小板血症には MHA の他、Sebastian 症候群と Fechtner 症候群が知られている。Fechtner 症候群は、巨大血小板、血小板減少症および顆粒球封入体の 3 主徴の他に腎不全を合併することにより MHA および Sebastian 症候群とは区別されている。MHA と Sebastian 症候群では顆粒球封入体の形態が若干異なるとされており、電顕上、封入体での microfilament 構造の有無により鑑別される。しかし、両疾患の鑑別には明らかな境界を引くことができず、中間の形態を示す封入体を持つ症例も報告されている。今後、いずれかの疾患の原因遺伝子が単離されることにより、これら疾患が異なる遺伝子異常により引き起こされるか、あるいは同じ遺伝子の異なる異常により引き起こされるかが明らかになることが期待される。さらに、血小板および顆粒球生成の理解を深める一助にもなると考えられる。

E. 結論

今回同定した MHA 責任遺伝子座はなお広大であり、さらに症例を解析することによって MHA の責任遺伝子が同定されることが期待される。

F. 研究発表

論文発表

1. H.Mizuno, T. Kojima, et al.:

- Successful Culture and Sustainability In Vivo of Gene modified Human Oral Mucosal Epithelium. *Human Gene Therapy* 10: 825-830, 1999.
2. K. Ishiguro, T. Kojima, et al. : Syndecan-4 expression is associated with follicular atresia in mouse ovary. *Histochem. Cell Biol.* 112(1): 25-33, 1999.
 3. K. Yamamoto, T. Kojima, et al.: Regulation of murine protein C gene expression in vivo: effect of tumor necrosis factor- α , interleukin-1, and transforming growth factor- β . *Thromb. Haemost.* 82 (4): 1297-1301, 1999
 4. S. Kunishima, T. Kojima, et al.: Mapping of a gene for May-Hegglin anomaly to chromosome 22q. *Hum. Genet.* 105 (6): 379-383, 1999
 5. A. Katsumi, T. Kojima, et al.: Severe Factor VII Deficiency Caused by a Novel Mutation His348 to Gln in the Catalytic Domain. *Thromb. Haemost.* 83 (2): 239-243, 2000
 6. K. Ishiguro, T. Kojima, et al.: Syndecan-4 Deficiency Impairs Focal Adhesion Formation Only under Restricted Conditions. *J. Biol. Chem.* 275 (8), 5249-5252, 2000
- 学会発表
1. 下川高賢、小嶋哲人ら：マウス Protein SmRNA の組織内発現分布と LPS、TNF- α 、IL-1 投与による変化 第 61 回日本血液学会、東京、平成 11 年 4 月
 2. K. Yamamoto, T. Kojima, et al.: Extra hepatic expression and regulation of protein C in the mouse. XVIIth Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Washington, U.S.A, 平成 11 年 8 月
 3. T. Kojima, E. Kanbe, et al.: Hypoxia treatment up-regulates ryudocan gene expression. International Conference on Molecular Interactions of Proteoglycans, Shonan, Japan, 平成 11 年 8 月
 4. K. Ishiguro, T. Kojima, et al.: Analysis of ryudocan/syndecan-4 function by means of gene targeting. International Conference on Molecular Interactions of Proteoglycans, Shonan, Japan, 平成 11 年 8 月
 5. 小嶋哲人、山本晃士ら：血液疾患に対する臨床検査の進歩 4. 凝固・止血検査について—特に DIC の診断と治療の進歩 第 18 回日本臨床病理学会東海・北陸支部例会のシンポジウム、名古屋、平成 11 年 8 月
 6. 柳田正光、小嶋哲人ら：出血が初発症状となった原発性アミロイドーシスの一例 第 41 回日本臨床血液学会、秋田、平成 11 年 10 月
 7. 高木 明、小嶋哲人ら：血小板膜糖蛋白 I b α の遺伝子多型解析 第 22 回日本血栓止血学会学術集会、宇都宮、平成 11 年 12 月

G. 研究協力者

国島伸治、柳田正光、中山享之、竹下享典、
中山由紀子、清水敦哉、山本晃土、松下正、
齋藤英彦：名古屋大学医学部第一内科

白血球エラスターゼによる線溶機構の解析

(分担) 研究者 坂田洋一

自治医科大学止血血栓

研究要旨

原因不明あるいは種々の原因による血栓症において、解析の進んでいるプラスミノゲンアクチベータープラスミン系を介する線維素溶解反応系に対して、未解明な点の多い白血球エラスターゼなどの細胞由来プロテアーゼを介する線溶機構が止血栓の除去や血栓症の発現に果たす役割について検討した。まずフィブリノゲンおよびフィブリンのプラスミン分解産物 (P-FDP) とは反応せず白血球エラスターゼ分解産物 (GE-FDP) とのみ反応するモノクローナル抗体を作製し、GE-FDP を特異的に測定する系を構築した。GE-FDP は、DIC 症例のなかで APL および敗血症において有意に高値を示した。P-FDP と GE-FDP とには相関がみられたが、両測定値に乖離のある症例が存在し、特に血中 PAI-1 値が高値を呈する症例にみられる FDP はその大部分が GE-FDP である可能性が示唆された。培養細胞を用いた実験において、エラスターゼ産生 HL-60 細胞株における elastase mRNA の発現量は、TNF- α 刺激やプラスミノゲンの派生物であるミニプラスミノゲンにより増加がみられた。これらのことから白血球エラスターゼによる線溶機構は、プラスミノゲンアクチベータープラスミン系の線溶機構を代償する反応系のひとつである可能性のあること、両反応系にプラスミノゲン関連因子を介する密接な連関が存在することが示唆された。

A. 研究目的

何らかの原因で血管内に生じた止血栓が除去されずに長期間存在すると、組織に強い虚血障害を引き起こし血栓症が顕現化してくる。止血栓の主たる構成要素である線維素 (フィブリン) を溶解する反応系が線維素溶解反応系 (線溶系) であり、生理的にはプラスミノゲンアクチベータープラスミンを介する反応系と白血球エラスターゼなどの細胞由来のプロテアーゼを介する系が存在する (図 1)。これまでのところ、細胞由来プロテアーゼによる反応系に関しては、その制御機構を含めて詳細は明らかにされていない。

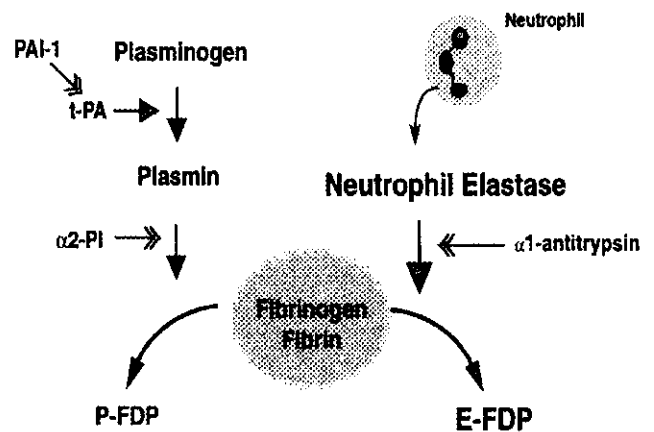


図 1 プラスミノゲンアクチベータープラスミン系による線溶機構の概略

敗血症にともなう播種性血管内凝固症候群 (DIC) では、プラスミノゲンアクチベーター1 (PAI-1) の産生が強く刺激されるために、プラスミノゲンアクチベータープラスミンを介する反応系が低下する。その結果、生体内に生じた血栓が溶解されにくい病態が形成され、多くの場合、虚血性の多臓器不全が惹起される。しかしこのような病態の中にも、フィブリン分解産物が大量に血中に証明されることがある。ところでプラスミノゲン析木で代表されるようなプラスミノゲン分子異常症において、プラスミン活性が低下するために血栓症を反復することが報告されている。ところが、プラスミノゲン欠損マウスや最近ヨーロッパで報告された先天性プラスミノゲン欠損症では、血栓症を起こすことはむしろ稀である。先天性プラスミノゲン欠損症の症例では、血漿中に白血球由来エラスターゼの著明な増加を伴っており、治療目的に精製プラスミノゲンを投与すると白血球由来エラスターゼの血中レベルは著しく低下するという様な両線溶機構の連関を示唆する現象が観察されている。本研究では、まず種々の基礎疾患に併発した DIC 症例において白血球エラスターゼが血栓溶解に果たす役割の解析を試みた。またプラスミノゲンアクチベータープラスミン系を介する線溶機構と白血球エラスターゼを介する線溶機構の連関を解析するために、前者に関与する種々の因子による白血球エラスターゼの産生制御機構の可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

フィブリンノーフィブリンが白血球エラスターゼにより分解されて生じる分解産

物 (GE-FDP) のみを特異的に測定しうる系の作製を試みた。血漿中のエラスターゼ分解産物のみを識別し、フィブリンノーフィブリンのプラスミン分解産物 (P-FDP) を認識しないモノクローナル抗体 (IF-123) の作製に成功し、その抗原認識部位および抗体の特性を解析した。

本学付属病院およびその関連施設における DIC 症例 (基礎疾患 AML 23 例、ALL 6 例、APL 4 例、Malignant Lymphoma 10 例、Cancer 22 例、腔内出血 7 例、感染症 12 例、膠原病 5 例) において、血漿中 P-FDP および GE-FDP をそれぞれ JIF-23 および IF-123 と酵素標識抗ヒトフィブリンノーフィブリンポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELIS A 法により測定した。また、血中顆粒球エラスターゼ抗原量は EIA 法により、血中 PAI-1 抗原量は LPIA-2000 を用いたラテックス凝集法により測定した。

エラスターゼ産生細胞株である HL-60 を用いて、炎症性サイトカイン刺激 (TNF- α 、TGF- β 、IL-1 β) およびプラスミノゲンおよびその派生物である K1+2+3 フラグメント (K1+2+3) や Mini-プラスミノゲン (mini-Plg) 添加によるエラスターゼ mRNA の発現を GAPDH mRNA をコントロールにとり、ABI PRISM7700 を用いた PCR 定量法により測定した。

(倫理面への配慮)

臨床研究を実施する場合は、次のような基本原則を遵守している。遺伝子解析を含め被験者の人権に配慮し、被験者に対する不利益や危険性を出来る限り排除するとともに、インフォームドコンセントをとる。また、学内倫理委員会および必要な場合は国レベルでの審査を経た上で実施する。

C. 研究結果

1. GE-FDP 特異的モノクローナル抗体の抗原認識部位の解析

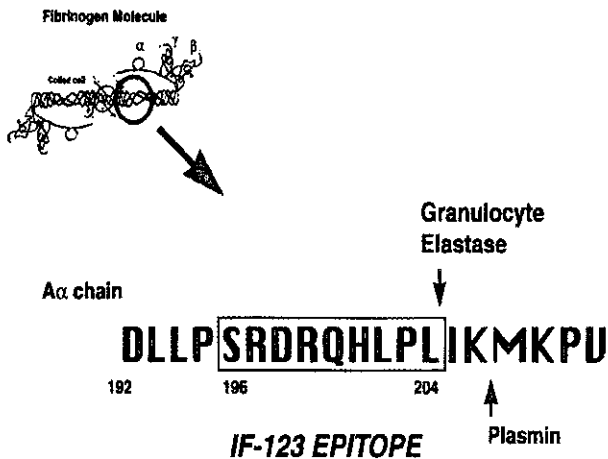
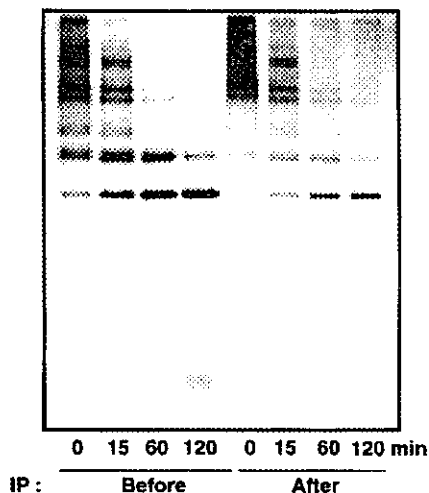


図2 GE-FDP 特異的モノクローナル抗体の抗原認識部位

IF-123 の抗原認識部位は、フィブリノゲン A α 鎖 D ドメインに存在し、A α 196 番から 204 番目のアミノ酸を認識しており (図2)、特にカルボキシ末端側は、白血球エラスターゼによる切断を受けて初めて分子表面上に露呈する neo-antigen と考えられた (図3)。

Digestion of GE-XDP by Plasmin



Digestion of Plasmic XDP by GE

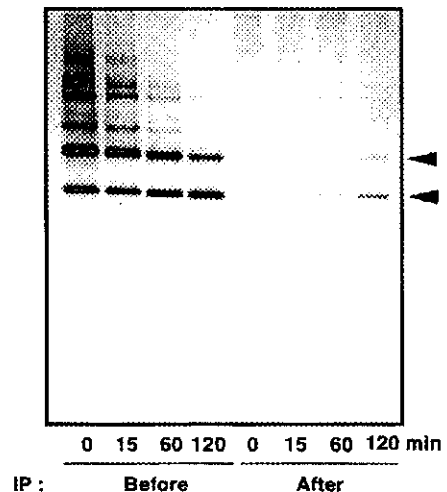


図3 白血球エラスターゼ及びプラスミンに分解による抗原認識部位の表出

GE-XDP をプラスミン分解及び plasmic XDP を白血球エラスターゼ分解を行い、GE-FDP 特異的モノクローナル抗体による免疫沈降前後で SDS-PAGE により分画した。

2. DIC 症例における GE-FDP 値の解析

健康人を対象にした GE-FDP 値の正常域は 0.30 ± 0.17 mg/ml であった。DIC 症例を対象にして、この系による GE-FDP 値と従来の測定法である抗ヒトフィブリノゲンポリクローナル抗体を用いたラテックス凝集法による FDP 値との相関をみると、 $r = 0.652$ と弱い相関がみられたが、その中には GE-FDP 値が高値であるが FDP 値は低い症例や反対に GE-FDP 値はあまり増加しないが FDP 値が高値をとるものが存在した。GE-FDP 値 DIC 症例のうち白血病群では AML や APL で高値を示したが、ALL では軽度の増加に留まった。また非白血病群では胸腔内や腹腔内への出血を合併した症例や骨転移例で GE-FDP 値は増加していた。

3. 白血球エラスターゼによる血栓溶解反応のバックアップ機構

血中 PAI-1 値の低い DIC 症例では、プラスミン- α_2 プラスミンインヒビター複合体 (PIC) レベルと FDP 値は良い相関がみ

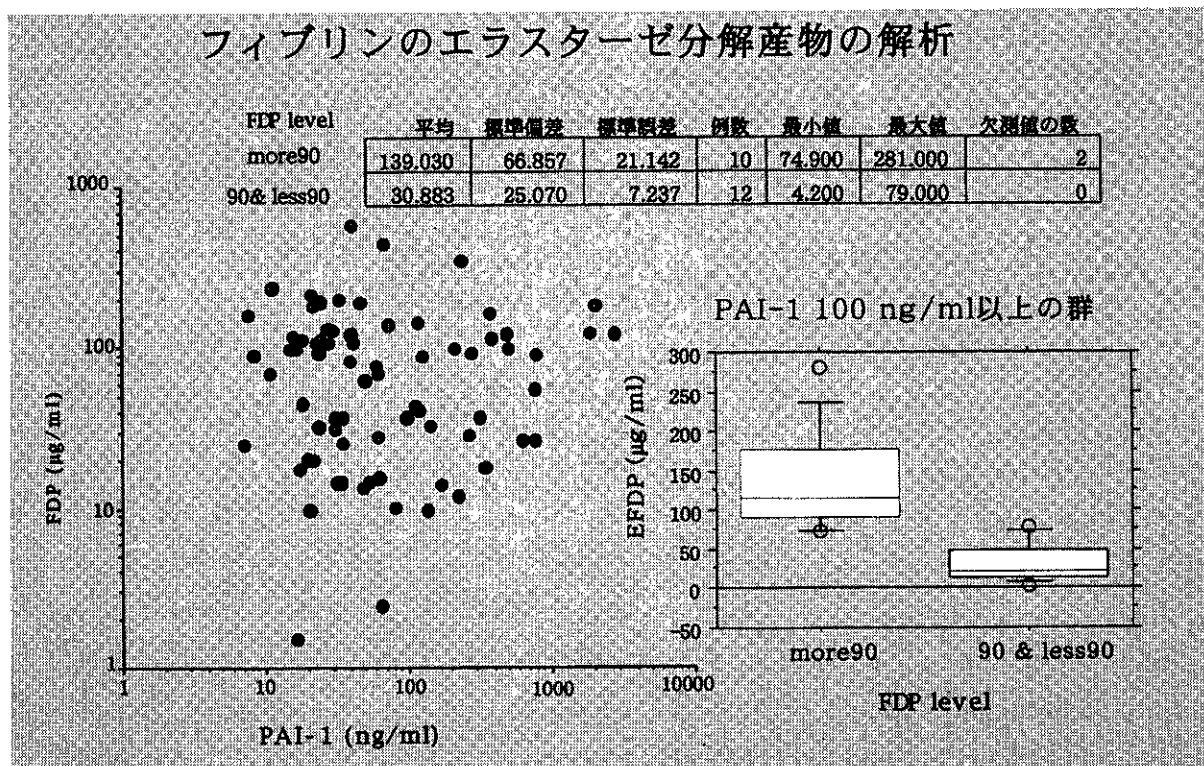
られ、その FDP は P-FDP が主体であった。一方、血中 PAI-1 値が高値を示す症例では PIC 値と FDP 値にはあまり相関がみられず、プラスミン産生が抑制されて PIC 値が低いにもかかわらず、FDP 値の高い症例が存在した。そこでこの FDP の本体を明らかにするために、血中 PAI-1 値が 100 ng/ml 以上の群で FDP 値が 90 mg/ml 以上の群と 90 mg/ml 以下の低値群との 2 群にわけて GE-FDP 値を測定した。その結果 PAI-1 値が高値でプラスミノゲンアクチベータが阻害されているにも関わらず FDP の高い症例においては、フィブリン分解には白血球エラスターゼが深く関わっていることを示す結果が得られた (図 4)。

4. HL-60 細胞を用いた elastase mRNA 発現に及ぼすサイトカインおよびプラスミノゲン関連因子の影響を解析する系の組み立て (初期解析)

エラスターゼ産生細胞株である HL-60 における elastase mRNA 発現に及ぼす炎症性サイトカインの作用を検討した。

HL-60 の elastase mRNA の発現量は TGF- β 刺激や IL-1 β 刺激では影響を受けなかったが、TNF- α 添加後 1 2 時間を最大として elastase mRNA の発現量が約 2.5 倍まで増加した。また、HL-60 にプラスミノゲンおよびその派生物である K1+2+3、クリングル 4 フラグメント (K4) さらに mini-Plg をそれぞれ添加すると、K1+2+3 および K4 添加では elastase mRNA 発現量に有意な変化がみられないが、mini-Plg 添加により約 2 倍まで elastase mRNA 発現量が増強した (図 5)。

図 4



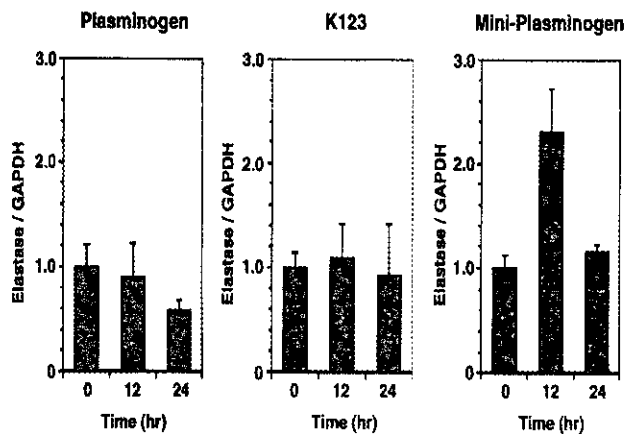


図5 HL-60細胞のelastase mRNA発現に与える
 プラスミノゲン関連因子の影響

D. 考察

プラスミノゲン栃木で代表されるプラスミノゲン分子異常症は、静脈血栓の危険因子であることが知られている。一方、ヨーロッパで報告された先天性プラスミノゲン欠損症では、組織線溶の異常を示唆する組織修復不全を認めるものの血栓症には殆ど罹患しないことが報告されている。この症例では、血中白血球エラスターゼ抗原量が著しく高値を示しているがプラスミノゲンの輸注により白血球エラスターゼ抗原量は正常化することも報告されている。一方我々の施設の栃木型プラスミノゲン異常症例においては、ホモ接合体およびヘテロ接合体いずれも白血球エラスターゼ抗原量の有意な増加を認めなかった。このようなことから、白血球エラスターゼレベルの差が血栓形成を左右する一因である可能性が示唆される。

敗血症に伴うDIC症例では、線溶系制御因子であるPAI-1の産生が亢進しプラスミノゲンアクチベータープラスミン系は抑制され、血栓症による重篤な虚血性臓器不全が引き起こされるが、これらの中には血中

にフィブリノゲン-フィブリン分解産物(FDP)が多量に存在する症例が存在している。今回DIC症例を対象に、GE-FDPを特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたGE-FDP値の測定および従来法によるFDP値の測定結果から、骨髄球性白血病(AML、APL)や白血球浸潤が顕著である腔内出血では、実際に白血球エラスターゼを介するフィブリノゲン-フィブリン分解機構が存在することが明らかになった。特に、PAI-1が高値でプラスミン産生が殆ど白血球由来エラスターゼによる分解された産物に由来しているという新知見を得た。すなわち白血球エラスターゼによる線溶機構が、抑制されたプラスミノゲンアクチベータープラスミン系を補填するように作動している可能性があると考えられる。

HL-60細胞のelastase mRNAの発現機構の解析は未だ緒についたばかりではあるが、得られた結果からは白血球エラスターゼが炎症性サイトカインによりその発現が増強するばかりでなく、プラスミノゲン関連因子により発現量が調節されている可能性がある。今後elastase geneのプロモーター領域の解析を加えプラスミノゲン関連因子による転写機構にどの領域が関与しているのかを明らかにする必要があると思われる。

E. 結論

白血球エラスターゼによる線溶機構は、プラスミノゲンアクチベータープラスミン系の線溶機構を代償する反応系のひとつである可能性のあること、両反応系にプラスミノゲン関連因子を介する密接な連関が存在することが示唆された。今後、白血球エラスターゼ産生の制御機構の解析を中心に、

白血球エラスターゼによる線溶反応の分子機作の全体像を明らかにするとともに、その血栓除去作用の生理的意味について臨床的解析を進めていく予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. Kimura H, Sakata Y, Hamada H, Yoshida Y, Sato O, Deguchi J, Sugawara Y, Makuuchi M, Miyata M: In vivo retention of endothelial cells adenovirally transduced with tissue-type plasminogen activator and seeded on expanded poly-tetrafluoroethylene. *J Vas Surgery* in press
2. Kohno I, Inuzuka K, Itoh Y, Nakahara K, Eguchi Y, Sugo T, Soe G, Sakata Y, Murayama H, Matsuda M: A monoclonal antibody specific to the granulocyte-derived elastase-fragment D species of human fibrinogen and fibrin: its application to the measurement of granulocyte-derived elastase digests in plasma. *Blood* 95:1721-1728, 2000
3. Madoiwa S, Komatsu N, Mimuro J, Matsuda M, Sakata Y: Developmental of expression of plasminogen activator inhibitor-1 associated with thrombopoietin-dependent megakaryocytic differentiation. *Blood* 94: 475-482, 1999.
4. Takeda-Shitaka M, Kamiya K, Miyata T, Ohkura N, Madoiwa S,

Sakata Y, Umeyama H: Structural studies of the interactions of normal and abnormal human plasmins with bovine basic pancreatic trypsin inhibitor. *Chem Pharm Bull* 47: 322-328, 1999.

5. Miyata M, Sakata Y, Madoiwa S, Sato K, Munakata O, Yoshioka R, Hirosaka A, Iwatsuki K, Sato Y, Kasukawa R: Recurrent multiple thrombosis in a patient with abnormal plasminogenemia and Behcet's disease. *Thromb Res* 95: 347-351, 1999.
6. Mimuro J, Kawata Y, Niwa K, Muramatsu S, Madoiwa S, Takano H, Sugo T, Sakata Y, Sugimoto T, Nose K, Matsuda M: A new type of Ser substitution for gamma Arg-275 in fibrinogen Kamogawa I characterized by impaired fibrin assembly. *Thromb Haemost* 81: 940-944, 1999.

学会発表

1. 窓岩清治、三室 淳、諏合輝子、松田道生、中村裕一、古沢新平、小山高敏、坂田洋一：フィブリン形成を伴わないプロトロンビン異常活性化の分子機作の解析—第2報、第61回日本血液学会総会、東京、1999年4月19日。
2. Madoiwa S, Mimuro J, Nakamura Y, Furusawa S, Koyama T, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y. Aberrant activation of prothrombin without fibrinogen-fibrin conversion. XVIIth Congress of the International Society on Thrombosis

and Haemos tasis, Washington DC (USA), August 14, 1999.

3. 窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：循環抗凝血素によりプロトロンビンの消費性低下をきたした症例の病態解析、第46回日本臨床病理学会総会、熊本、1999年11月10日。
4. 窓岩清治、三室 淳、諏合輝子、松田道生、中村裕一、古沢新平、小山高敏、坂田洋一：全く新しい作用機序を有する循環抗凝血素の解析、第22回日本血栓止血学会総会、宇都宮、1999年12月2日。
5. 村松慎一、半田 敦、Kevin E. Brown、中野今治、小松則夫、三室 淳、窓岩清治、坂田洋一、松田道生：3型アデノ随伴ウイルス(AAV-3)ベクターによる血液細胞への遺伝子導入、第22回日本血栓止血学会総会、宇都宮、1999年12月2日。
6. 浜野明栄、諏合輝子、三室 淳、窓岩清治、坂田洋一、北村 登、伊藤武善、松川善博、西成田進、Kathleen P. Pratt、松田道生：血栓症を伴う異常フィブリノゲンTokyo Vの解析、第22回日本血栓止血学会総会、宇都宮、1999年12月2日。
7. 浜野明栄、田中誠司、上野有紀子、梅田 衛、坂田洋一：フィブリンモノマーに対するモノクローナル抗体の作製と血中可溶性フィブリン測定系への応用、第22回日本血栓止血学会総会、宇都宮、1999年12月2日。

RNA/DNAオリゴヌクレオチド法による アンチトロンビンⅢ欠損症の治療に関する研究

(分担) 研究者：辻 肇

京都府立医科大学 輸血部

研究要旨

先天性アンチトロンビンⅢ(AT) type I 欠損症に対する RNA/DNA オリゴヌクレオチド(RDO)法による遺伝子治療の有用性に関する基礎的検討を試みた。本研究では、AT(type I) 欠損症の遺伝子異常データベースより、制限酵素切断部位に変異を認めるものを選択し、これの RDO 法による HuH-7 細胞への変異導入を検討した。

RDO は、Kmiec らの方法に従い、宝酒造に依頼して合成した。すなわち、目的とする置換塩基を 5 塩基の DNA の中心に設定し、その両端に 10 塩基のメチル化 RNA を、3' 側に 5 塩基対の GC クランプと、それぞれ 4 つの thimine を介してこれらに相補的な DNA を配列した。RDO の細胞内への導入は、QIAGEN 社の SuperFect Transfection Reagent (SFTR) を用い、変異導入の確認を *Taq* I を用いた PCR-RFLP 法によりスクリーニングならびに direct sequencing により行った。また、ヒト AT mRNA の HuH-7 における発現を RT-PCR にて確認した。SFTR を用いたオリゴヌクレオチドの導入効率は約 53% であった。PCR-RFLP の結果、48 検体中 2 検体に変異導入が観察され、変異が導入された HuH-7 細胞の AT 遺伝子の direct sequence で、5390 番目の cytosine と共に thimine が確認された。

RDO 法および SFTR を用いて、ヒト AT 遺伝子に変異が導入され、本法は先天性 AT 欠損症の治療法として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

RNA/DNA オリゴヌクレオチド(RDO) を用いた遺伝子置換療法は、1996 年に Kmiec らによって初めて報告された^{1,2}。1998 年には Steer らが *in vivo* で肝細胞における凝固第Ⅸ因子の遺伝子置換に成功し³、本法は血友病のみならず、点突然変異を原因とするような各種特発性血栓症の治療にも有用である可能性が示唆される。そこで、筆者らは先天性アンチトロンビンⅢ(AT)欠損症に対する遺伝子治療の試みとして、RDO を用いて正常ヒト・AT 遺伝子への点変異の導入に関する基礎的検討を試みた。

B. 研究方法

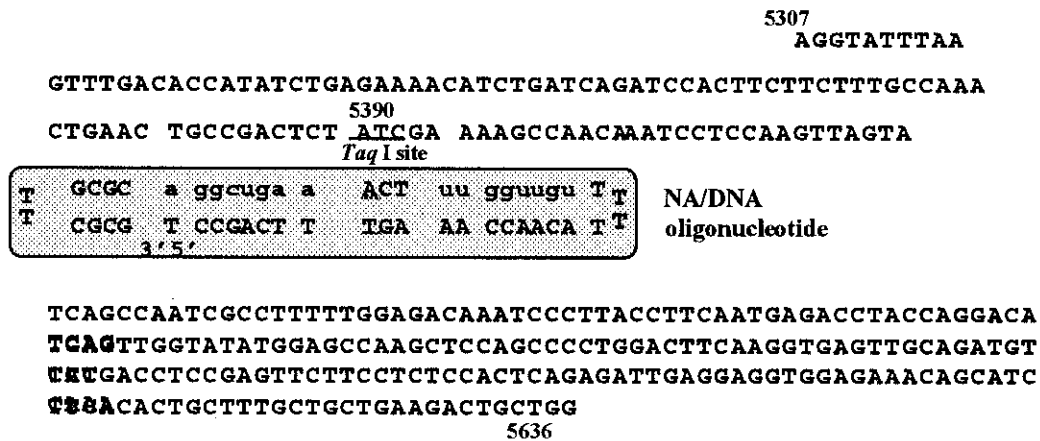
先天性 AT 欠損症 (type I) の遺伝子異常データベースより、制限酵素切断部位に変異を認めるものを選択した。即ち、Exon 3 において第 5390 番目の cytosine が thimine に変異する non-sense mutation で、*Taq* I の切断点が消失すると報告される遺伝子異常の導入を検討した。

実験に用いた RDO は、Kmiec らの方法に従い、宝酒造 (株) に依頼して合成した。即ち、5 塩基の deoxyribonucleotide の中心に目的とする置換塩基を設定し、その両端に 2' O-methylation 化した 10 塩基の ribonucleotide を付け、3' 側には 5 塩基対の GC クランプと、それぞれ 4 つの thimine

を介してこれらに相補的な deoxyribonucleotide を配することによって、hairpin 型かつ二重鎖となるよう設計した (図 1)。

図 1

uman ATIII exon 3



遺伝子変異を導入する標的細胞としてヒトの肝細胞癌から樹立された HuH-7 を用い⁴、AT 発現の有無を RT-PCR にて確認した。

RDO の細胞内への導入は、QIAGEN 社の SuperFect Transfection Reagent (SFTR) を用いた。また、3' 側に FITC をラベルしたオリゴを合成して細胞内に導入し、その取込みを FACS にて測定し、導入効率を検討した。

本法を用いた変異導入の有無は、Taq I を用いた PCR-RFLP によってスクリーニングし、direct sequencing により確認し

C. 研究結果

変異を導入する細胞として用いた HuH-7 におけるヒト・アンチトロンビン III mRNA の発現を RT-PCR にて確認した。

SFTR を用いて FITC 標識のオリゴを導入した結果、gate を掛けた細胞中では 91%、フローを流した全細胞中でも 53% の細胞に FITC の取込みが認められ、比較的高率に遺伝子導入が可能であった。

そこで、本法を用いた変異導入の有無を、Taq I を用いた PCR-RFLP によってスクリーニングしたところ、48 検体中 2 検に変異導入が推察された。即ち、native な sequence では Taq I によって切断された 2 本のバンドのみを認めたのに比して、変異導入に成功した例では Taq I によって切断されないバンドが認められた。

次に、PCR-RFLP によって変異導入が成功したと考えられたサンプルに、direct sequence を行い、5390 番目の cytosine と共に、thimine のバンドが検出され、確かに study design 通りの変異導入に成功していることが確認された (図 2)。以上の結果から、本法を用いてアンチトロンビン III 遺伝子に変異を導入することが可能と考えられた。

図 2



た。

D. 考察

本法の最も大きな特徴は、RNA を用いて DNA とキメラとすることにより、DNA 単独のオリゴよりも哺乳類では誘導しにくいとされる homologous recombination の起こる確立が高くなることである。更に、10 塩基ずつの RNA をメチル化することにより、細胞内での RNase H による代謝が阻害されること、また、hairpin & double strand structure とすることで、オリゴの細胞内での物理的安定性が増すことである。中心に 5 塩基の DNA、その両側に 10 塩基の RNA を配し、目的とする遺伝子配列に対して合計 25 塩基を相補的とすることにより、効率よくかつ選択的に標的遺伝子にオリゴを結合させることも利点である。さらに、多くの遺伝子治療で用いられ、かつ最も問題を秘めるウイルスベクターを用いる必要がないのも、本法の大きな利点と考えられる。

一方、本法には今後解決すべき幾つかの問題も存在する。まず第一に、本法による遺伝子修正の詳細なメカニズム、即ち、どのような配列の遺伝子において最も効率よく遺伝子変異が導入されるのか、あるいはあらゆる遺伝子配列に対して応用可能であるのか、未だ解明されていない。第二に、遺伝子導入の手法として lipofection 法以外の electroporation や gene-gun による導入も検討する必要があると考えられる。更に、変異遺伝子を導入した効果がいつまで持続するのか不明で、今後の重要な課題と考えられる。また、実際に臨床応用する際には、費用や導入方法・経路など、解決すべき点が多く存在する。しかしながら、今回、本法を用いてヒトのアンチトロンビンⅢ遺伝子に変異を導入することが可能で

あったことより、今後先天性アンチトロンビンⅢ欠損症の治療法として有用と推察された。

E. 結論

RNA/DNA オリゴヌクレオチドの導入により、ヒトの肝細胞株においてアンチトロンビンⅢ遺伝子に変異を導入することが可能であった。

参考文献

1. Yoon K, Cole-Strauss A, Kmiec EB.: Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA-DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Mar 5; 93 (5): 2071-6.
2. Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, Byrne BC, Rice MC, Gryn J, Holloman WK, Kmiec EB.: Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 1996 Sep 6; 273(5280): 1386-9.
3. Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ.: In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Med* 1998 Mar; 4(3): 285-90.
4. Kren BT, Cole-Strauss A, Kmiec EB, Steer CJ.: Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphates gene of HuH-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Hepatology* 1997 Jun; 25(6): 1462-8.

活性型ビタミンD₃及びその誘導体の抗凝固作用に関する研究

(分担) 研究者 広沢 信作

東京医科歯科大学 第一内科

研究要旨

臨床的観察に端を発して、ビタミンA誘導体(レチノイド)が白血病細胞における凝固第・因子である組織因子(tissue factor; TF)の発現低下及び抗凝固糖蛋白thrombomodulin(TM)の発現増加をもたらす、抗凝固効果を発揮することを我々は既に報告している。活性型ビタミンD₃[1,25(OH)₂D₃] (以下D₃)についても、単球系細胞においてレチノイドと同様の抗凝固作用が認められることを既に報告している。本研究では、D₃の新規誘導体である22R-Me-20-epi-1,25(OH)₂D₃(KY3)とoxacalcitriol(OCT)が、レチノイドと同様の抗凝固作用を發揮するか否かを検討した。

細胞はU937細胞(単球性白血病細胞株)を主として用い、TF及びTMの抗原量は特異的抗体を用いた酵素免疫抗体法で、mRNAの発現量はreverse transcription-polymerase chain reaction法にて調べた。細胞表面のTF活性はカルシウム再加時間法で、TMのプロテインC活性化補酵素活性は合成基質法にて測定した。細胞溶解液に対して、抗リン酸化c-Jun抗体や抗リン酸化IκB抗体を用い、AP-1(activator protein-1)やNF-κB(nuclear factor-κB)の活性化に対するD₃の効果も検討した。

D₃誘導体は、単球系細胞においてTFの発現低下及びTMの発現上昇を遺伝子転写レベルでもたらし、抗凝固作用を發揮することが判った。また、D₃及びD₃誘導体は、腫瘍壊死因子や酸化低比重リポ蛋白による凝固促進活性を抑制することが判った。D₃は、c-JunやIκBのリン酸化には影響を与えなかった。

現在臨床で使用されているD₃製剤では、血中カルシウム上昇の副作用が見られるため、使用量に限界があるが、D₃による副作用を回避すべく合成されたKY3やOCTもD₃と比較して、同等かそれ以上の効果を發揮することが示され、臨床応用が期待される。D₃誘導体は、TF及びTM発現を調節することにより、血栓症や悪性腫瘍の予防・治療に有効な薬剤として、広く国民の健康に寄与する可能性のある興味深い物質である。

A. 研究目的

ビタミンDは、生体内では活性型ビタミンD₃[1,25(OH)₂D₃] (以下D₃)の形で生物学的活性を示すが、レチノイン酸(retinoic acid; RA)と同様に、特異的な核内レセプター(vitamin D receptor; VDR)との結合によってその作用を發揮する。これは主にカルシウム(Ca)及びリンの代謝平衡の維持に働くが、ホルモンの分泌、細胞の分化・増殖にも関与する。

RA応答領域(retinoic acid responsive element; RARE)とビタミンD応答領域(vitamin D responsive element; VDRE)には類似性が報告されている。そ

こで、D₃についてもその作用を検討したところ、単球系細胞において、レチノイドと同様の抗凝固作用が認められることを既に報告した¹⁾。すなわち、D₃は凝固因子の主役であるtissue factor(TF)の発現減少と抗凝固糖蛋白thrombomodulin(TM)の発現増加を誘導する。しかしながら、現在臨床で使用されているD₃製剤では、血中Ca上昇作用による副作用が見られるため、使用量に限界がある。本研究では、血中Ca上昇作用を弱めたり、生物学的活性を強めたりした新規D₃誘導体における抗凝固作用について検討を行った。

一方、腫瘍壊死因子(tumor necrosis

factor; TNF) は、レチノイドや D₃ と対照的に、血管内皮細胞や単球の TF の発現上昇及び TM の発現低下を引き起こすことが知られている。また、酸化低比重リポ蛋白 (oxidized low-density lipoprotein; ox-LDL) は動脈硬化症の発症に深く関与する、と報告されており、血管内凝固活性の亢進との関連も注目されている。そこで、これらの作用に対する D₃ 及び D₃ 誘導体の作用を併せて検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

U937 及び THP-1 (共に単球性白血病 (acute myelogenous leukemia (AML) M5) 細胞株) を使用し、10% ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 にて培養した。

2) 試薬

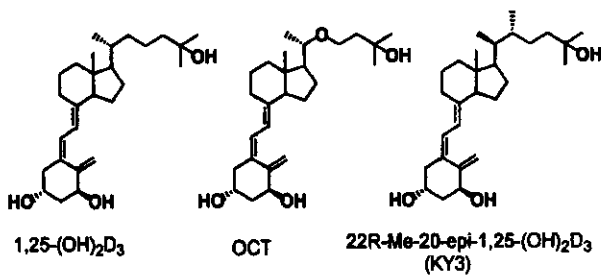


図 1. 活性型ビタミン D₃ 及びその誘導体 (KY3, OCT) の構造式

D₃ 及びその新規誘導体である 22R-Me-20-epi-1,25(OH)₂D₃ (KY3) 及び oxacalcitriol (OCT) の構造を図 1 に示す。D₃、KY3、OCT 及び ATRA はそれぞれエタノールで溶解した。ox-LDL は、LDL を蒸留水にて溶解後、紫外線を 12 時間連続照射して作製した。

3) TM 及び TF 抗原量の測定

0.5% Triton X-100 含有 PBS で細胞溶解液を調製し、TM 抗原量は抗ヒト TM ポリクローナル抗体と抗ヒト TM モノクローナル抗体; KA-4 を使用し、TF 抗原量はイムビンド TF ELISA キット (American

Diagnostica) を用いて酵素免疫抗体法で測定した。

4) 細胞表面 TM 補酵素活性

トロンビンは、TM に結合すると効率よく

プロテイン C を活性化する。活性化プロテイン C により加水分解され発色する合成基質 S-2266 を用いて、TM の補酵素活性を測定した。

5) 細胞表面 TF 活性

細胞を PBS に浮遊させ、健常人血漿を添加してカルシウム再加時間法で測定した。50 秒で凝固するヒト胎盤 TF 量を 1 U と定めて、TF 活性を表した。

6) TM 及び TF mRNA 量の変化

各試薬で 5 時間刺激後の細胞より RNA を分離し、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で mRNA の発現量を比較した。

7) ウェスタンブロット解析

U937 細胞を各試薬で一定時間刺激した後、10% SDS (sodium dodecyl sulfate) を含む細胞溶解緩衝液中にて超音波処理したものをサンプルとした。これを SDS-PAGE

(polyacrylamide gel-electrophoresis) にかけて、抗 c-Jun 抗体、抗リン酸化 c-Jun 抗体、抗 IκB (inhibitor κB) 抗体及び抗リン酸化 IκB 抗体を反応させた後、化学発光によって検出した。

8) 統計処理

2 群間の t 検定を行い、P < 0.05 を有意差があるとみなした。

9) 倫理面への配慮

本研究は *in vitro* のものであり、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

1) U937 細胞の TM 及び TF 抗原に対する D₃ 誘導体の効果

D₃、KY3、OCT (10⁻¹¹-10⁻⁶ M、24 時間) 添加による U937 細胞中の TM 及び TF 抗原量の変化を検討した。KY3、OCT 共に D₃ に匹敵する TM 発現上昇、TF 発現低下を、濃度依存性にもたらした (図 2)。特に KY3 に関しては、より低濃度にてその効果を発揮した。この効果は、RT-PCR 法 (10⁻¹⁰ M、5 時間刺激) により、TM、TF mRNA の変化に並行していることが確認された (図 3)。

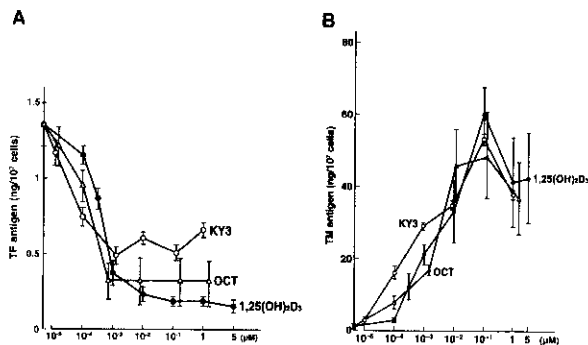


図 2. U937 細胞の TM (A) 及び TF (B) 抗原に対する D₃ 誘導体 (10⁻¹¹—10⁻⁶M, 24 時間) の効果

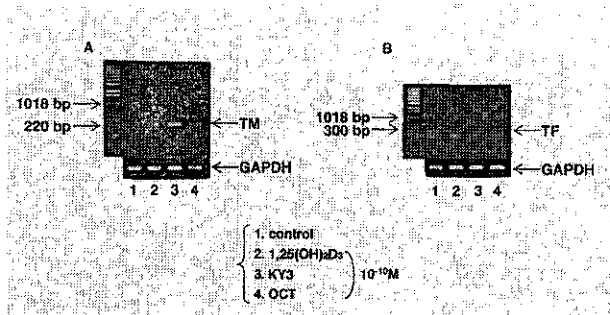


図 3. U937 細胞の TM (A) 及び TF (B) mRNA に対する D₃ 誘導体 (10⁻¹⁰M, 5 時間) の効果

2) ox-LDL, TNF 刺激による U937 細胞の TM, TF 活性の変化及びその凝固促進活性に対する D₃ 誘導体の防御効果

ox-LDL 及び TNF は、血管内皮細胞における TF 発現を増加させ、TM 発現を減少させることが報告されている。この凝固促進作用を D₃ や D₃ 誘導体が抑制するか否かを U937 細胞を用いて検討した。ox-LDL (50 mg/ml) または TNF (1 nM) による刺激の 1 時間前に D₃, KY3, OCT を添加し (1 nM)、24 時間後の TM 及び TF の変化量を細胞表面活性にて検討した。

ox-LDL 刺激では、血管内皮細胞において報告されているような TM 活性の減少は見られず、むしろ若干の上昇が見られたが、TF 活性は上昇した。D₃, KY3, OCT の 1 時間の前処理により、TM 活性の更なる上昇、TF 活性の減少が認められた (図 4)。

TNF 刺激では、TM 活性の減少、TF 活性の増加が顕著に認められた。TNF 刺激の 1 時間前に D₃, KY3, OCT で処理してお

くと、TNF によるこれらの作用は阻害され、特に TF 活性増加に対する KY3 の抑制効果は劇的であり、TF 活性は約 1/10 に抑えられた。

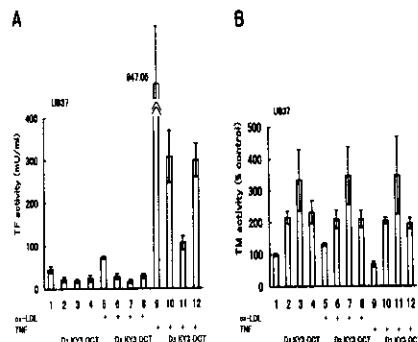


図 4. ox-LDL, TNF 刺激による U937 細胞の TM (A) または TF (B) 活性の変化及びその凝固促進活性に対する D₃ 及び D₃ 誘導体の防御効果

D₃, KY3, OCT (1 nM) を 1 時間前より作用させ、ox-LDL, TNF で 24 時間刺激した。

統計処理の結果は、すべての項目において P<0.01 であった。

ox-LDL あるいは TNF 刺激開始 1 時間後に D₃, KY3, OCT で処理すると、前処理した場合よりも弱いものの、同様に凝固活性の促進を抑制する効果が認められた (図省略)。この効果は U937 のみならず、THP-1 及び健常人末梢血から分離した新鮮な単球においても同様に認められた。なお、ox-LDL 及び TNF の凝固促進作用に対する D₃ の拮抗効果は、mRNA の変化と並行していた (図省略)。

3) c-Jun 及び IκB のリン酸化に及ぼす D₃ の効果

以上の結果より、D₃ は、TNF 誘導による TF 発現上昇を抑制することが判った。ところで、TF 遺伝子の 5 末端側のプロモーター領域には AP-1 (activator protein-1,

Jun/Fos) や NF-κB (nuclear factor-κB) といった種々の転写制御因子との結合部位が存在し、サイトカイン等による TF 発現誘導に関わっている³⁾。TNF による TF 発現の上昇の際には、転写因子 c-Jun のリン酸化及び NF-κB 抑制因子である IκB のリン酸化が起こる。IκB はリン酸化を受けると、速やかにプロテアソームで処理され、NF-κB が活性化する。そこで、D₃ による TNF 作用の防御効果は、TNF によって引

き起こされる c-Jun のリン酸化または IκB のリン酸化を D₃ が抑制する可能性があると考え、ウェスタンブロットにて解析した (図 5、6)。

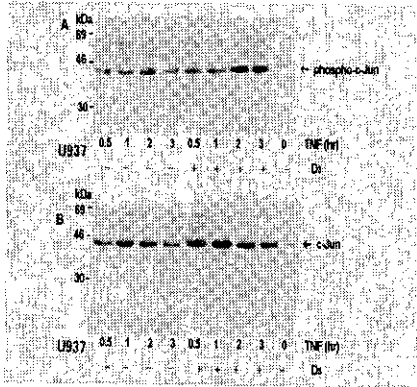


図5. c-Junのリン酸化に及ぼすD₃の効果
(A)はリン酸化c-Jun (Ser73)を、(B)は細胞中c-Junを示す。D₃ (0.1 μM)を1時間前より作用させ、TNFで0.5、3時間刺激した。

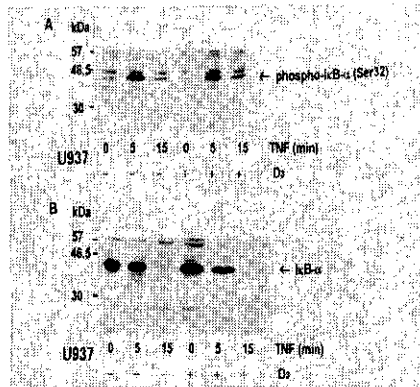


図6. IκBのリン酸化に及ぼすD₃の効果
(A)はリン酸化IκB (Ser32)を、(B)は細胞中IκBを示す。D₃ (0.1 μM)を1時間前より作用させ、TNFで5、15分間刺激した。

U937細胞をTNFで刺激すると、刺激開始から30分でc-Junのリン酸化が起こり、この状態は刺激から3時間後まで継続していた。全c-Jun量はリン酸化c-Junの量に並行していた。一方、IκBのリン酸化は迅速であり、TNF刺激開始後5分で起こり、15分後には減少していた。全IκB量は、TNF刺激開始から15分後に消失した。

TNF刺激前にD₃ (0.1 mM)で1時間処理をしておき、D₃がc-JunあるいはIκBのリン酸化に及ぼす影響を調べたが、c-Jun、IκB共にリン酸化の抑制は認められず、全c-Jun量及び全IκB量にも変化は見られなかった。

D. 考察

D₃はCa・骨代謝調節作用のみでなく、様々な生理的作用を制御している。例えば白血病細胞分化誘導作用、癌細胞や表皮細胞増殖抑制作用、免疫担当細胞調節作用、脂肪・脂質代謝調節作用、そして我々が見出した抗凝固作用である。しかしながら現在臨床で使用されているD₃製剤では、血中Ca上昇による副作用のために、抗凝固作用を発揮する有効血中濃度(1 nM以上)に達するには無理がある。そこで、D₃の構造を修飾することによって血中Ca上昇作用を弱めたり、生物学的活性を強化したりする努力がなされている。

KY3は、本学の山本らによって合成されたもので、VDRへの非常に強い結合性を有するD₃誘導体であり、D₃誘導体の中では最強の生物学的作用を示す²⁾。そのため、微量の使用によってもその効果が期待される。OCTは、構造的にはD₃の22位C原子をO原子に変換しただけの化合物であるが、血中Ca上昇作用が著しく弱いD₃誘導体として合成されたもので、現在、二次性副甲状腺機能亢進症と尋常性乾癬に対する臨床試験が行われている。

本研究では、D₃と同様に、これらのD₃誘導体が単球系細胞におけるTM・TFの発現を調節し、細胞の性質を遺伝子転写レベルで変えて抗凝固効果を発揮することを明らかにした。更に単球性白血病細胞株において、D₃やその誘導体がox-LDL刺激やTNF刺激による凝固促進活性を抑制できることを証明した。またその作用は、D₃と比較して、同等かそれ以上の効果を発揮することが示され、臨床応用への可能性が示唆された。

レチノイドあるいはD₃によるTF発現低下の機序は未だ証明されていないが、レチノイドやD₃と各々のレセプターとの複合体が、転写因子AP-1がTF遺伝子上流のAP-1結合部位に結合するのを抑制するためか、あるいはAP-1の活性化を抑制するため、と推定されている。RARとAP-1の蛋白-蛋白結合が、RAによるコラゲナーゼの発現抑制に関与するという報告がある一方、TF遺伝子上流にはAP-1結合部位が近

接して並ぶ特異な構造が存在し、RXR/RAR や RXR/VDR の複合体が直接 TF 遺伝子と結合する可能性もあり、我々も現在検討を行っている。

TF 遺伝子の発現は、転写因子 AP-1 の構造蛋白質である c-Jun 蛋白の Ser (63) 及び Ser (73) がリン酸化されると転写活性が増強すると考えられている。また、転写因子 NF- κ B は通常、抑制因子 I κ B と会合し、その転写活性が抑制されている。いったん TNF 等のサイトカインによる刺激が加わると、I κ B がリン酸化され変性・解離し、NF- κ B は活性型として TF 遺伝子の転写を活性化するとされている。TNF によって活性化される TF 発現を D₃ が抑制する機序として、TNF 刺激による c-Jun または I κ B のリン酸化を D₃ が抑えるのではないかと考え、ウェスタンブロットにて解析した。しかしながら、D₃ は c-Jun 及び I κ B のリン酸化を抑制することはなかった。したがって、D₃ による TNF 作用の抑制は、c-Jun 及び I κ B のリン酸化には直接関与しないようである。

単球における TF 活性は、感染症や炎症性疾患の際に放出される TNF 刺激で増強する。また、動脈硬化症のアテローム巣に蓄積している ox-LDL によっても TF 活性は増強する。その上、TNF は単球の TM 発現を低下させる。血管内皮細胞や単球・マクロファージにおけるこのような TF 発現上昇及び TM 発現低下が血液凝固活性を亢進させ、血栓が出来やすい状態にしている。本研究では、TNF や ox-LDL によってもたらされる凝固促進活性を D₃ 及び D₃ 誘導体が抑制することを明らかにした。これは、D₃ 誘導体により炎症性疾患や動脈硬化症における血栓症を回避できる可能性を示唆している。

一方、最近、癌細胞における TF の発現が癌の転移・進展を促進し、TM の発現がプロウロキナーゼの分解を促進して癌の進展を抑制することが判ってきた。D₃ 誘導体やレチノイドにより、癌細胞の TF 発現を抑制し、TM 発現を上昇させることが出来れば、癌の転移抑制にも役立つことが考え

られる。本研究は、血栓症の予防と治療のみならず抗腫瘍という点でも注目される。

E. 結語

D₃ 及びその誘導体は、単球系細胞において、TF・TM 発現を遺伝子転写レベルで調節することが判った。ヘパリンに代表される従来の抗血栓症薬は、抗トロンビン作用を主作用としており、出血などの重篤な副作用が避けられなかったが、レチノイドや D₃ の作用機序は、血栓症に対する新しい戦略のあり方を示唆している。レチノイド及び D₃ 誘導体は、TF と TM の発現を調節することにより、血栓症・悪性腫瘍の予防・治療に有効な薬剤として、広く国民の健康に寄与する可能性のある興味深い物質である。

〈参考文献〉

1. Koyama T, Shibakura M, Ohsawa M, et al. Anticoagulant effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on human myelogenous leukemia cells and monocytes. *Blood* 1998; 92: 160-7.
2. Yamamoto K, Sun WY, Ohta M, et al. Conformationally restricted analogs of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and its 20-epimer. *J Med Chem* 1996; 39: 2727-37.
3. Mackman N. Regulation of tissue factor gene. *Thromb Haemost* 1997; 78: 747-54.

F. 研究発表

1. Kumagai T, Miki T, Fukuda T, Kikuchi M, Miyasaka N, Kamiyama R and Hirose S: The proto-oncogene Bcl-6 inhibits apoptosis in differentiating muscle cells. *Oncogene* 18:467-475, 1999
2. 外山圭助、矢口誠、内田淑子、池田康夫、松岡佐保子、押味和夫、川又紀彦、鶴岡延喜、友安茂、広沢信作、山本晃、

- 鈴木憲史、沢登雅一 血液疾患に伴う重症感染症に対する Cefozopran (CZOP)と Tobramycin (TOB)との併用効果の検討.日本抗生物質学術協議会 52(2)153-161, 1999
3. Yoshida T, Fukuda T, Okabe S, Hatano M, Koseki H, Okabe S, Ishibashi K, Kojima S, Arima M, Komuro I, Ishii G, Miki T, Hirosawa S, Miyasaka N, Taniguchi M, Ochiai T, Isono K, and Tokuhisa T. The role of Bcl6 in mature myocytes. *Cardiovascular Research*. 42;670-679, 1999.
 4. Nakazawa F, Saito T, Sakashita C, Yoshinaga H, Dong Hui Chung, Koyama K, and Hirosawa S: Thrombomodulin with the Asp468Tyr mutation is expressed on the cell surface with normal cofactor activity for protein C activation. *Br J Haematol* 106(2)416-420, 1999.
 5. 小山高敏、廣澤信作 DIC 治療の新しい方向性—レチノイドとビタミン D₃ 誘導体による血栓制御—臨床血液 40(5)378-381, 1999.
 6. Dong Hui Chung, Makoto Watanabe, Kazuteru Ohashi, Nobuyuki Miyasaka, and Shinsaku Hirosawa. Mannose trimming directs degradation of mutant α_2 -plasmin inhibitor by proteasome. *J Biol. Chem* 275(7)4981-4987, 2000.
 7. Yamamoto K, Shibata K, Miura O, Kamiyama R, Hirosawa S and Miyasaka N: Physical interaction between interleukin-12 receptor b2 subunit and Jak2 tyrosine kinase; Jak2 associates with cytoplasmic membrane-proximal region on interleukin-12 receptor b2 via amino-terminus. *Biochem Biophys Res Commun* 257:400-404, 1999.
- 〈総説〉
1. 広沢信作 プロトロンビナーゼ活性臨床医 25(1)93, 1999 廣澤信作 当直救急ガイド—抗凝固剤・抗血小板剤使用中の出血 臨床医—中外医学社 東京 25:360-361, 1999 5月
 2. 廣澤信作、吉永治彦 幹細胞移植後にみられる肝中心静脈閉塞症 (VOD) について、その原因と治療について教えてください。血栓と循環 7(3)49-50, 1999、メディカルレビュー社
 3. 小山高敏、廣澤信作 血小板減少 臨床外科 54(11)498-501, 1999.
 4. 広沢信作 播種性血管内凝固、線溶亢進による出血 エッセンシャル 血液学 (第5版) 柴田昭、池田康夫、押味和夫、朝長万長男、堀田友光編 医歯薬出版 p.247-252, 1999.
 5. 広沢信作 凝固線溶系疾患 臨床遺伝子医学ガイダンス—分子医学へのアプローチ 小澤敬也 南山堂 p.139-144, 2000.
 6. 鄭東姫、廣澤信作 蛋白質の細胞内移送の解析 臨床血液実験操作法 血液・腫瘍科 科学評論社 p.176-183, 2000.
 7. 小山高敏、廣澤信作 悪性腫瘍に合併した DIC *Medical Practice* 17(2)279-284, 2000.