

ラベル前後で、種々のインヒビターを添加して変異蛋白の変化を観察した。

蛋白が粗面小胞体で翻訳される時、ハイマンノース型の糖鎖が数ヶ所に付く。ハイマンノース型の糖鎖は、3個のグルコース (glucose)、9個のマンノース (mannose)、2個の N-アセチルグルコサミン (N-acetyl-glucosamine)

(Glc3Man9GlcNAc2) から成る。グルコシダーゼ I あるいは II によりグルコースがはずれ、1個のグルコースが付いた状態ではカルネキシン (calnexin, CNX) と結合する。最後のグルコースがはずれると、次にマンノースもマンノシダーゼではずれる。これらの過程が蛋白の分解にどのような影響を与えるかについて検討するために、グルコシダーゼ I あるいは II の阻害薬として castanospermine (CST)、マンノシダーゼの阻害薬としては 1-

-deoxymannojirimycin (dMM)を用いた。プロテアソームの阻害にはラクタシスチン (lactacystin, LCT) や N- α -acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) を用いた。その他、クロロキン、ロイペプチンなどを用いた。

(倫理面への配慮)

培養細胞を使った実験であり、倫理面では全く問題ない。

C. 研究結果

1) 変異 PI の分解

正常蛋白は細胞内では 64 kDa のサイズであり、次第に減少して4時間では細胞内からすべてなくなった (図 1A)。細胞上清をみると、1時間以内に 67 kDa のサイズの蛋白が分泌され始め、その後、さらに増加した。細胞内からすべて上清中に分

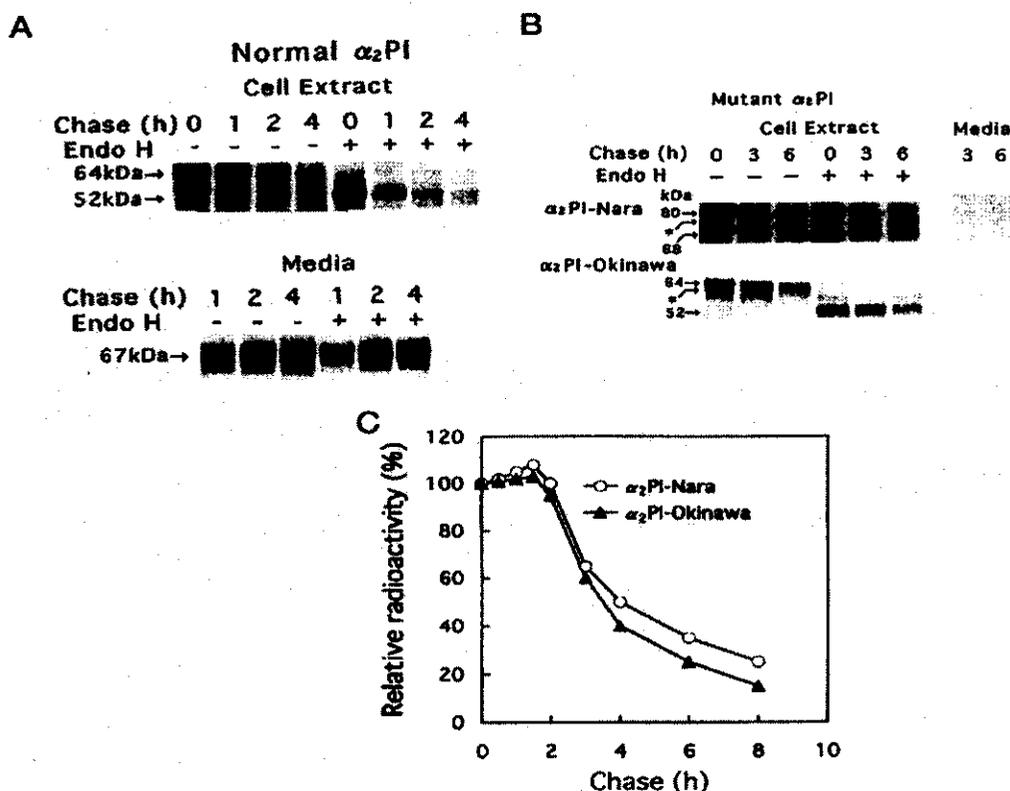


図1 プラスミンインヒビター (PI) 蛋白のパルスチェイス解析

A) 正常PI蛋白の変化; 細胞内には 64 kDa の蛋白が2時間で細胞内から分泌されている。上清中には 67 kDa の蛋白が分泌されている。エンドグルコシダーゼ H (Endo-H) 処理ではすべて同じ 53 kDa の大きさになった。分泌された蛋白は Endo-H 耐性であった。B) 変異PI蛋白の変化のプロット; 80 kDa の変異蛋白は6時間で減少しているが、上清中には分泌されていない。Endo-H) 処理ではすべて同じ 68 kDa の大きさになった。C) 2種類の変異蛋白の分解; 1.5 時間経過すると、分解がみられている。半減期は約4時間であった。

泌されたことになる。一方、変異蛋白 (80 kDa) は細胞内から次第に減少したが、上清中にはほとんど分泌されなかった (図 1 B)。従って、変異蛋白は細胞内に留まり、分泌されずに細胞内で分解されて消失することがわかった。各時間の蛋白量の変化をデンストメーターで測定してプロットしてみると、ラベル後 1.5 時間で分解が始まり、半減期は約 4 時間で細胞内から分解されてなくなることが判明した (図 1 C)。

2) トリミングによる変異 PI のサイズ変化
パルスチェイスの間、サイズが小さくなっていることが判明した。これはハイマンノース型糖鎖のうちの、グルコースやマンノースのトリミングによってサイズ変化がおこっていることが推測された。そこでグルコースやマンノースのトリミングの阻害による変異蛋白の分解を検討した。

まず、CST を添加し 6 時間チェイスする

と、グルコースがトリミングされずに付いているために大きくなるが、分解が促進された。

マンノースのトリミングを阻害する dMM を添加すると、変異蛋白の分解は著明に抑制された (図 2 A)。dMM 添加によるサイズの変化をみてみると、1.5 時間のものとサイズが同じであった。1.5 時間では、グルコースのトリミングのみが進んでおり、この後にマンノースのトリミングがおこることがわかる。糖鎖のトリミングが変異蛋白の分解に重要な役割を果たしている事が確認された。

3) プロテアソームによる分解

各種インヒビターを添加したが、このうちプロテアソームの阻害薬である ALLN と LCT が、変異蛋白の分解を著明に阻害した (図 2 B)。dMM の阻害の程度は LCT と同程度であった (図 2 C)。dMM と LCT との

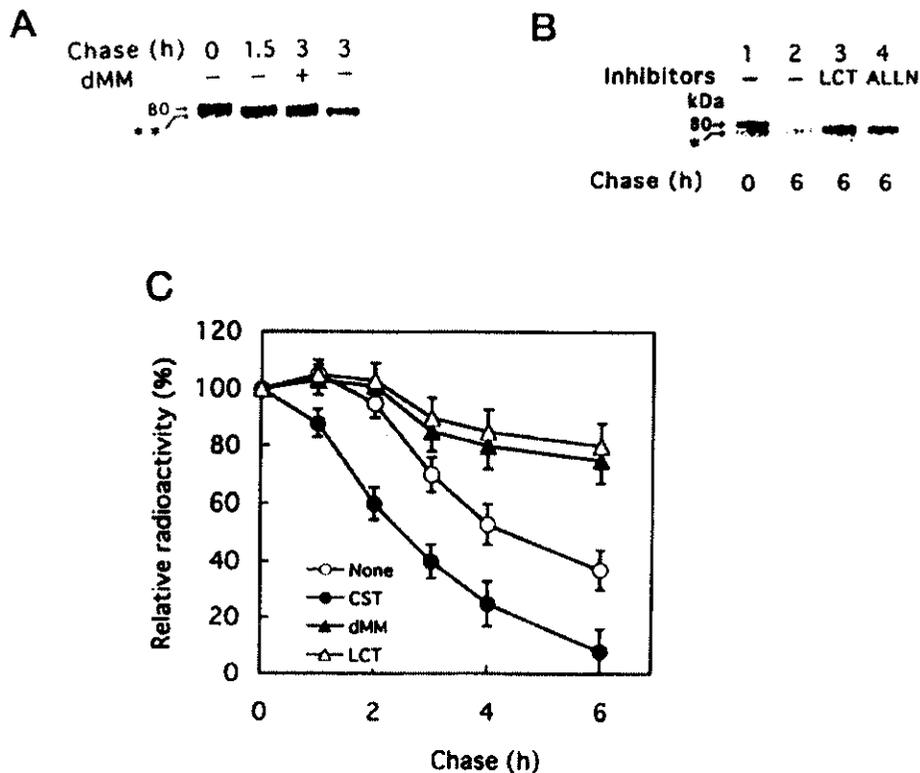


図 2 変異蛋白分解の阻害

A) dMMの影響； dMM添加により変異PI蛋白の分解が阻害された。B) LCTとALLNの影響； LCTとALLNの添加でも変異蛋白の分解は阻害された。C) インヒビターによる変異PI蛋白の変化のプロット； CSTでは分解が促進し、dMMとLCTでは分解が阻害された。

同時添加では阻害は相加的ではなかった。dMM の阻害された変異蛋白のサイズをみると、1.5 時間でなく、6 時間の蛋白のサイズと同じであり、マンノースのトリミングはおこなわれているにもかかわらず、分解が阻害されていることが明らかになった。従って、マンノースのトリミングを阻害しても、プロテアソームによる分解を阻害しても結果としては共通の経路で阻害がおこなっていると推測された。

4) 変異蛋白はユビキチン化されない

プロテアソームはユビキチン化された蛋白を分解するが、変異 PI 蛋白はユビキチン化されていなかった。

5) CNX との結合

正常蛋白は 30 分間 CNX と結合してから、分泌された。変異蛋白は 90 分間と正常より長く結合していた。dMM は変異蛋白と CNX との結合には何の影響も与えなかった。

CST 添加では正常及び変異蛋白とも CNX との結合が阻害された。グルコースが 1 つになると CNX と結合することが報告されているが、そのことを確認したことになる。

D. 考察

今回の実験により、変異蛋白はマンノースがはずれる（トリミング）と分解が開始されること、分解はプロテアソームでおこなうことが明らかにされた。グルコーストリミングが阻害されてもマンノーストリミングはおこり、プロテアソームで分解されることが明らかにされた。

生体の細胞は正常な蛋白は分泌するが、異常な蛋白は細胞外に分泌しない機構が働いている。これは quality of control と考えられている。正常と異常とを識別する機構は生体にとっては生死に関わる重要な機構である。今回の実験系は、この生体の重要なシステムを反映していることになる。

変異蛋白の分解が細胞内のどこでおこなうかという問題については、粗面小胞体の内部、リソソームあるいは、プロテアソームなどが想定されていた。まだ同定されていない、未知のプロテアーゼによっておこなわれる可能性も考えられていた。今回の実

験結果から、粗面小胞体の内部でなく、プロテアソームで分解されることが示された。プロテアソームは細胞質に存在しており、変異蛋白は細胞質の mRNA から翻訳されて蛋白が粗面小胞体内で合成されることから、変異蛋白は合成された後に粗面小胞体から再度細胞質に戻されることが必要になる。この細胞質に戻るメカニズムが実際は何であるかについては今後解明されるべき課題である。

正常の蛋白の分泌過程では、ハイマンノース型の糖鎖は分泌に向かう過程でトリミングされる。変異蛋白も糖鎖のトリミングを受け、マンノーストリミングされることが分解の開始のシグナルになることが明らかになったが、正常のトリミングプロセスも分泌以外に変異蛋白の分解過程に重要なことも明らかにされた。

CST 添加によって、グルコーストリミングを阻害すると分解が促進された。3 つのグルコースが全くトリミングされなくてもマンノースはトリミングされることが報告されている。グルコースをトリミングを阻害する薬剤を添加すると、Glc3Man7GlcNAc2 とマンノースが 2 つはずれて 7 個になった糖鎖が同定されたという報告もある。

CNX は粗面小胞体の内部に局在する蛋白であり、グルコーストリミングが進行して、1 つのグルコースまでになると蛋白は CNX と結合する。正常にフォールディングされていない蛋白は再度正常にフォールディングされる機会を与えられることになる。変異蛋白は合成後、1.5 時間経過してから、分解が開始した。この時間は変異蛋白が再度正常になるように修飾されたり、補正されたりする機会を与えている時間に相当すると考えられる。変異蛋白は異常であるために、正常蛋白と比較して、約 3 倍と長い時間 CNX と結合していたと考えられる。

今後は、さらに正常蛋白と変異蛋白との違いは余分なアミノ酸が付加されたり、1 つのアミノ酸が欠失したりしているのみである。このわずかな違いを生体細胞は識別しており、この精緻な機構の解明は重要な課題である。これらの識別に、何が関与し

ているかについて、今後明らかにしていく必要がある。この点について、さらに検討を加えて行きたい。

E. 結 論

今回の実験により、変異蛋白分解が如何にして始まるかが明らかになった。細胞内に留まる変異蛋白の分解開始シグナルとして、1つのマンノースのトリミングされて外れることが重要であることが示された。また、マンノースのトリミングされた後は、変異蛋白がプロテアソームによって分解されることも明らかになった。今後、すべての変異蛋白の分解に関する機構も明らかになっていくものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshinaga H, Shinsaku Hirose, Dong Hui Chung, Nobuyuki Miyasaka, Nobuo Aoki and Remi Favier: A novel point mutation of the splicing donor site in the intron 2 of the plasmin inhibitor. *Thromb Haemost* 84:307-311, 2000.
- 2) Dong Hui Chung, Kazuteru Ohashi, Makato Watanabe, Nobuyuki Miyasaka and Shinsaku Hirose:

Mannose trimming directs degradation of mutant $\alpha 2$ -plasmin inhibitor by proteasome. *J Biol Chem* 275(7):4981-4987, 2000.

2. 学会発表

- 1) 大澤真似、小山高敏、広沢信作、神山隆一：組織因子発現の制御—各種プロテアーゼインヒビターの効果、第62回日本血液学会総会、福岡、2000年3月16日
- 2) 澤真似、小山高敏、広沢信作、神山隆一、奈良信雄：急性前骨髄球性白血病（APL）細胞の組織因子（TF）・トロポモジュリン（TM）発現に対するヒ素化合物（As₂O₃）の効果、第42回日本臨床血液学会総会、倉敷、2000年11月10日
- 3) 大澤真似、小山高敏、広沢信作、奈良信雄：活性型ビタミンD₃の抗凝固作用、第23回日本血栓止血学会 総会、名古屋、2000年11月22日

G. 知的所有権の取得状況

なし

アンチトロンビン欠損症の遺伝子解析プロトコール

(分担) 研究者 辻 肇

京都府立医科大学 輸血部

研究要旨

特発性血栓症の一つである先天性の凝固阻害因子欠損であるアンチトロンビン欠損症の遺伝子解析を進めてきた。従来より、遺伝子をはじめとする患者情報の管理・人権への配慮は慎重に行ってきたが、近年、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が提唱されたことを受けて、本分科会においても患者の人権とインフォームド・コンセントを尊重した解析プロトコールの確立が望まれる。

A. 研究目的

アンチトロンビン(AT)は、主として肝臓で合成される分子量 58,000 の一本鎖糖蛋白である。血液凝固制御機構における最も重要な血漿セリンプロテアーゼ・インヒビターであり、トロンビンをはじめとする凝固因子の活性を阻害するため、その欠損は主として静脈系血栓症の原因となり得るため、特発性血栓症の一つとして位置づけられる。

AT 遺伝子は、7 個のエクソンと 6 個のイントロンからなり、およそ 13.5 キロ塩基対の長さで、第 1 染色体(1q23.1-q23.9)に局在する。先天性 AT 欠損症患者の遺伝子解析によって各種遺伝子異常が国内外において多数報告され、病態を解明するうえで、遺伝子解析は必須のものと考えられる。

一方、近年「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が提唱されたことを受けて、本分科会においても患者の人権とインフォームド・コンセントを尊重した解析プロトコールが望まれる。

B. 研究方法

血栓症の発症を契機に発見され、AT 抗原量 and/or 活性値が正常の約 50%に低下し、先天性 AT 欠損症(Type I 及び II)と診断された患者ならびにその家族を対象とした。

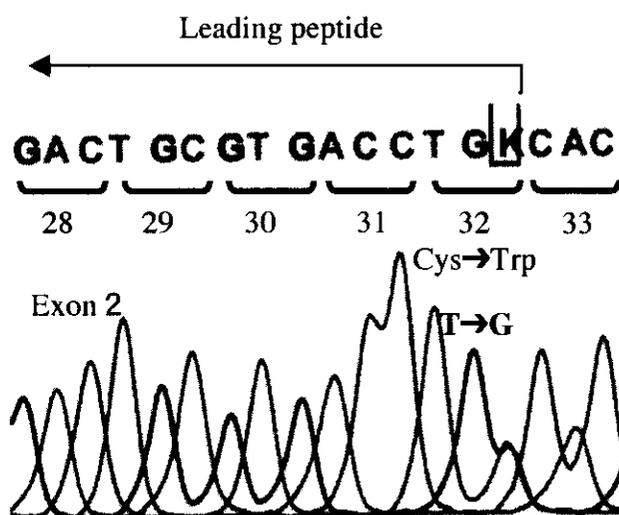
遺伝子解析のプロトコールは大学の倫理審査委員会による承認を受け、主治医により文面によるインフォームド・コンセントを対象者から得た上で、末梢血 20ml を採血し、ヘパリンによる抗凝固処理の上凍結

保存とした。

末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出し、すべてのエクソン (1~6 まで) を対象に、各エクソンを挟む領域を PCR にて増幅した。すべての遺伝子配列を、Thermo Sequenase Cy5.5 dye terminator cycle sequencing kit (Amersham pharmacia biotech)と SEQ4x4 personal sequencing system (Amersham pharmacia biotech)を用いて解析し、遺伝子異常の存在の有無を検討した。

C. 研究結果

症例 A ; 15歳男子、深部静脈血栓症と肺梗塞を発症。AT活性 43%, AT抗原量12.3 mg/dl (22.8~28.1 mg/dl)といずれも50%以下に低下しており、Type I 欠損症と診断された。遺伝子解析の結果、エクソン2においてCys32がTrp (TGT→TGG) へヘテロに変異していることが明らかとなった。



この部位は、ちょうどリーディングペプチドの末端に当たるため、ATの成熟と分泌に支障を来すことが推察された。

症例B：22歳男性、心房中隔欠損を介した深部静脈血栓症からの中大脳動脈閉塞による脳梗塞を発症。AT活性は50%ながら、AT抗原量24.8 mg/dl (22.8~28.1 mg/dl)と正常で、Type II欠損症と診断された。遺伝子解析の結果、ヘパリン結合部位に相当するエクソン3aにおいて、Ser116がPro (TCT→CCT)へ変異していることが明らかとなった。

D. 考察

「特発性血栓症 (Idiopathic thrombosis)」は、血栓症の発症において先天性もしくは後天性の血栓形成素因の存在が強く推定されるが、その詳細な機序を明らかにし得ないものと暫定的に定義される。本分科会において、平成9年に全国医学部、医科大学の内科、外科、小児科、産婦人科、救急部、集中治療部を対象に、過去10年間の特発性血栓症の発症頻度につきアンケート調査を行ったところ、AT欠乏症(104例)は抗リン脂質抗体症候群(1,191例)に次いで最も報告実数の多い疾患であった。

ヨーロッパを中心として、血栓発症を遺

伝的背景で説明するための研究が盛んに行われているが、海外で同定された遺伝子型が日本人集団に適用できるものではない。そこで、血栓発症に関与すると考えられる血栓性素因の遺伝子型を日本人で求め、血栓発症との関連を明らかにする研究が進められている。筆者らは、先天性AT欠乏症のType I及びType IIに関する遺伝子解析をすすめ、本分科会において報告してきた。また、RNA/DNAオリゴヌクレオチド(RDO)による遺伝子変異導入法を用いることで、ヒトの肝細胞(HuH-7)においてAT欠損症の作成が可能であり、本欠乏症おける遺伝子治療が将来可能となるものと昨年度の研究では報告した。従って、現在進められている遺伝子解析は、今後の治療にも結びつくものであり、その重要性は大きいと考えられる。

このような研究を推進して行くに当たり、患者のプライバシーの配慮と、検体の取り扱いに十分注意していくことは、欠かすことができない。

E. 結論

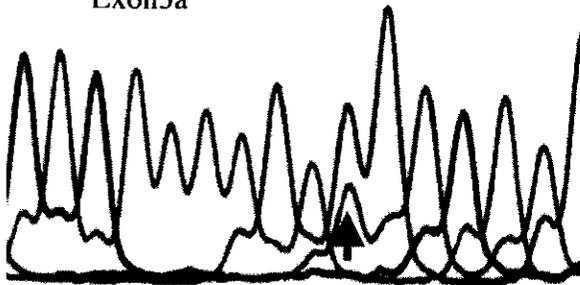
「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を受けて、本分科会においても患者の人権とインフォームド・コンセントを尊重した解析プロトコルの確立が望まれる。

GAGAAAACACT GAT

113 114 115 116 117

Ser→Pro

Exon3a



IV. 発表文献

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Am J Hypertens. 13(10):1125-34. Nitric oxide is an excitatory modulator in the rostral ventrolateral medulla in rats.	2000		Morimoto S, Sasaki S, Miki S, Kawa T, Nakamura K, Itoh H, Nakata T, Takeda K, Nakagawa M, Fushiki S.
J Cardiol. 36(5):331-6. Percutaneous transluminal septal myocardial ablation combined with permanent dual-chamber pacing in hypertrophic obstructive cardiomyopathy: a case report.	2000		Ochiai N, Furukawa K, Ebizawa T, Yagi T, Akashi K, Azuma A, Nakagawa M.
Rinsho Ketsueki. 41(8):671-5. Autologous transplantation of Ph-negative peripheral blood stem cells for treatment of chronic myelogenous leukemia.	2000		Hatsuse M, Okano A, Okamoto A, Shimura K, Takahashi R, Hirai H, Ashihara E, Inaba T, Fujita N, Shimazaki C, Nakagawa M.
Clin Orthop. (378):306-11. Antithrombin III deficiency in a patient with multifocal osteonecrosis.	2000		Kubo T, Tsuji H, Yamamoto T, Nakahara H, Nakagawa M, Hirasawa Y.
Hypertension. 36(2):215-9. Can serum carnitine levels distinguish hypertrophic cardiomyopathy from hypertensive hearts?	2000		Nakamura T, Sugihara H, Kinoshita N, Yoneyama S, Azuma A, Nakagawa M.
Hypertension. 36(2):201-7. Effects of bradykinin on prostaglandin I(2) synthesis in human vascular endothelial cells.	2000		Yamasaki S, Sawada S, Komatsu S, Kawahara T, Tsuda Y, Sato T, Toratani A, Kono Y, Higaki T, Imamura H, Tada Y, Akamatsu N, Tamagaki T, Tsuji H, Nakagawa M.
Br J Haematol. 109(3):592-9. Expression of T-cell-associated antigens in B-cell non-Hodgkin's lymphoma.	2000		Inaba T, Shimazaki C, Sumikuma T, Okano A, Hatsuse M, Okamoto A, Takahashi R, Ashihara E, Hibi S, Sudo Y, Yamagata N, Murakami S, Rin K, Fujita N, Yoshimura M, Nakagawa M.
Respir Med. 94(4):385-90. Timing of lowest and highest peak expiratory flow in patients with asthma: influence of anti-inflammatory treatment.	2000		Iwasaki Y, Kubota Y, Yokomura I, Ueda M, Hashimoto S, Hara H, Nakagawa M.
Jpn Circ J. 64(5):399-403. Transient complete atrioventricular block during catheter ablation of left free wall bypass tract.	2000		Shiraishi H, Shirayama T, Yoshida S, Inoue D, Nakagawa M.
Am J Hypertens. 13(4 Pt 1):431-2. Loperamide therapy in a patient with diarrhea and resistant hypertension.	2000		Morimoto S, Sasaki S, Itoh H, Nakata T, Takeda K, Nakagawa M.
Leuk Lymphoma. 38(1-2):121-30. B-cell lymphoma-associated hemophagocytic syndrome.	2000		Shimazaki C, Inaba T, Nakagawa M.
J Am Coll Cardiol. 35(5):1338-46. Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes.	2000		Tatsumi T, Matoba S, Kawahara A, Keira N, Shiraishi J, Akashi k, Kobara M, Tanaka T, Katamura M, Nakagawa C, Ohta B, Shirayama T, Takeda K, Asayama J, Fliss H, Nakagawa M.

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名， 巻号数，論文名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Rinsho Ketsueki. 41(2):123-8. Review. [Werner's syndrome associated with acute myelofibrosis].	2000		Shimura K, Shimazaki C, Okamoto A, Takahashi R, Hirai H, Sumikuma T, Ashihara E, Inaba T, Fujita N, Komatsu S, Hirano S, Nakagawa M.
Exp Hematol. 28(3):311-7. Mobilization of hematopoietic primitive and committed progenitor cells into blood in mice by anti-vascular adhesion molecule-1 antibody alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor.	2000		Kikuta T, Shimazaki C, Ashihara E, Sudo Y, Hirai H, Sumikuma T, Yamagata N, Inaba T, Fujita N, Kina T, Nakagawa M.
Am J Hypertens. 13(1 Pt 1):83-7. Modulation of endothelin-1 coronary vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats by the nitric oxide system.	2000		Miki S, Takeda K, Kiyama M, Hatta T, Moriguchi J, Kawa T, Morimoto S, Nakamura K, Itoh H, Nakata T, Sasaki S, Nakagawa M.
Br J Pharmacol. 129(5):859-64. Pressor response to pulsatile compression of the rostral ventrolateral medulla mediated by nitric oxide and c-fos expression.	2000		Morimoto S, Sasaki S, Miki S, Kawa T, Itoh H, Nakata T, Takeda K, Nakagawa M.
Intern Med. 39(1):39-44. Successful catheter ablation against ventricular tachycardia associated with myotonic dystrophy.	2000		Shiraishi H, Shirayama T, Inoue K, Tanaka H, Kuwabara H, Inoue D, Nakagawa M.
血液・腫瘍科. 40(2):157-165,止血剤.			西村浩美, 中川雅夫
第2章ヘパリン・低分子量ヘパリン. 櫻川信 男, 青崎正彦, 上塚芳郎, 和田英夫編. 211-232, 抗凝固薬の適正な使い方.		医歯薬出版	辻 肇, 中川雅夫
松田重三編. 384-387, この薬のこの副作 用(第二版)ワルファリンカリウムと止血異 常/ワルファリン症候群.		医歯薬出版	辻 肇, 中川雅夫
Steroids 65: 24-28. Bile acid sulfonate and 7-alkylated bile acid analogs: effect on intestinal absorption of teurocholate and cholesterol 7 α -hydroxylase activity in cultured rat hepatocytes.	2000		Kim Hyun-Guell, Une M., Hino A., Wada H., Yoshii M., Kuramoto T., Fujimura K.
Thromb. Res. 97: 431-440. A new approach to detect reticulated platelets stained with Thiazole Orange in thrombocytopenic patients.	2000		Fujii T., Shimomura T., Fujimoto T.t., Kimura A., Fujimura K.
血液・腫瘍科 40: 49-56, 血小板膜 糖蛋白, GPIIb/IIIa複合体, GPI Ib/IX, Vの分離, 精製法	2000		藤村 欣吾
血液・腫瘍科 40: 242-250, 巨大血小板症候群	2000		藤村 欣吾
medicina 37: 802-804, 血栓性素 因患者のマネージメント	2000		藤村 欣吾

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
日本内科学会雑誌 89:69-73、本態性血小板血症治療の考え方	2000		藤村 欣吾
日本内科学会雑誌 89:97-115、日常診療における血小板疾患	2000		池田 康夫、刘家 利承、井口 豊崇、藤村 欣吾、安藤 泰彦
日本医事新報 3972:108-109、ITPのヒト化モノクローナル抗体による治療	2000		藤村 欣吾
第2回赤十字血漿分画シンポジウム 18-30、血小板減少症の臨床	2000		藤村 欣吾
イアーノート 1031-1041、特発性血小板減少性紫斑病	2000		藤村 欣吾
日本血栓止血学会誌 11:411-419、Bernard-Soulier 症候群	2000		藤村 欣吾、藤元 貴啓、下村 壮司
J. Lipid Res. 41:1562-1567. Structural and biosynthetic studies of a principal bile alcohol, 27-nor-5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α ,24,25-pentol, in human urine.	2000		Une M, Takenaka S, Kuramoto T, Fujimura K, Hoshita T, Kihira K
日本医師会雑誌特別号 血液疾患診療マニュアル 124:228-229、良性単クローン性ガンマグロブリン血症	2000		藤村 欣吾
Blood 95(5);1560-1564. Association between diabetic retinopathy and genetic variations in $\alpha 2 \beta 1$ integrin, a platelet receptor for collagen.	2000		Matsubara Y, Murata M, Maruyama T, Handa M, Yamagata N, Watanabe G, Saruta T, Ikeda Y
Biochem Biophys Res Commun 270(3); 755-760. Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Iba to immobilized von Willebrand Factor under flow conditions.	2000		Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y
Circulation Res 86(5); 1031-1037. Immunoneutralization of glycoprotein Iba attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo.	2000		Katayama T, Ikeda Y, Handa M, Tamatani T, Sakamoto S, Ito M, Ishimura Y, Suematsu M
Int Angiology 19(2); 147-151. Platelet surface P-selectin molecules increased after exposing platelet to a high shear flow.	2000		Goto S, Ichikawa N, Li M, Goto M, Sakai H, Kim J-Y, Yoshida M, Handa M, Ikeda Y, Handa S
Stroke 31; 493-497. Association between platelet glycoprotein Ib α genotype and ischemic cerebrovascular disease.	2000		Sonoda A, Murata M, Ito D, Tanahashi N, Ohta A, Tada Y, Takeshita e, Yosida T, Saito I, Yamamoto M, Ikeda Y, Fukuuchi, Watanabe K

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名，巻号数，論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
J Biol Chem 275(22); 16891-16898. Identification of amino acid sequences in fibrinogen g-chain and tenascin C C-terminal domains critical for binding to integrin α v β 3.	2000		Yokoyama K, Erickson HP, Ikeda Y, Takada Y
Arthritis & Rheumatism 43(1); 65-75. T cell that are autoreactive to β 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome and healthy individuals	2000		Hatori N, Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Ikeda Y, Kawakami Y
Blood 96(6); 2005-2011. Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3.	2000		Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, Koseki T, Nishihara T, Ikeda Y
Blood 96(6); 2116-2124. MgcRacGAP is involved in the control of growth and differentiation of hematopoietic cells.	2000		Kawashima T, Hirose K, Satoh T, Kaneko A, Ikeda Y, Kaziro Y, Nosaka T, Kitamura T
Blood 95(5); 1663-1670. Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Bruton's tyrosine / Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD32 cross-linking.	2000		Oda A, Ikeda Y, Ochs HD, Druker BJ, Ozaki K, Handa M, Ariga T, Sakiyama Y, Sitte ON, Wahl MI
Tissue Antigens 56(12); 337-343. HLA class II alleles in Japanese patients with immune thrombocytopenic purpura: Associations with anti-platelet glycoprotein autoantibodies and responses to splenectomy.	2000		Kuwana M, Kaburaki J, Pandey JP, Murata M, Kawakami Y, Inoko H, Ikeda Y
臨床血液41(6);496-499. Thrombotic microangiopathy (TMA): TMAにおける血液凝固を中心とした臨床病態.	2000		森 毅彦, 池田 康夫
人工血液 8(4);90-95. 粒子径を制御したアルブミン重合体の合成とGPIIb結合体の機能評価.	2000		寺村裕治, 武岡真司, 土田英俊, 池田康夫
日本臨床免疫学会会誌 23(6); 555-557. 特発性血小板減少性紫斑病における病因的自己反応性T細胞の同定	2000		桑名正隆, 河上 裕, 池田康夫
蛋白質 核酸 酵素 45(6); 1174-1181. GPIIb/IIIa 阻害物質	2000		池田康夫
血液・免疫・腫瘍 5(2); 214-220. 大規模臨床試験成績 白血病 - Allo PBSCTとAllo BMTの比較研究	2000		池田康夫
血液・免疫・腫瘍 5(2); 196-202. 人工血小板・血小板代替物	2000		池田康夫
リウマチ科 23(5); 429-434. 病的血栓形成の分子機構	2000		池田康夫
IHDフロンティア 1(1); 33-38. 急性冠症候群に対する抗血栓療法	2000		池田康夫

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Medicina 37(8); 1325-1328. 抗血小板薬	2000		池田康夫
Medicina 37 : 731-734、血栓性血小板減少性紫斑病/溶血性尿毒症症候群-病態の鍵を握る新しい因子-	2000		八木秀男、藤村吉博
日本内科学会雑誌 89 : 85-90、血栓性血小板減少性紫斑病とvon Willebrand 因子特異的切断酵素.	2000		松本雅則、藤村吉博
血液・腫瘍科 41 : 238-244、抗血小板剤とTTP.	2000		松本雅則、八木秀男、藤村吉博
Upshaw-Schulman syndrome revisited: A concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. International Journal of hematology (in press)	2000		Seiji Kinoshita, et al.
American Journal of Hematology 66:105-115. Enhanced low shear stress induced platelet aggregation by Shiga-like toxin 1 purified from Escherichia coli O157.	2000		Hideo Yagi, et al.
Biochimica et Biophysica Acta 1544: 267-277. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from Agkistrodon halys blomhoffii with special reference to platelet aggregation.	2000		Hideo Takatsuka, et al.
Semin. Thromb. Hemost. 26 (1): 67-73 Molecular Biology of Ryudocan, An Endothelial Heparan Sulfate Proteoglycan.	2000		T. Kojima,
Thromb. Haemost. 83 (2): 239-243 Severe Factor VII Deficiency Caused by a Novel Mutation His348 to Gln in the Catalytic Domain.	2000		A. Katsumi, T. Kojima,
J. Cell. Biol. 113 (6), 1110-1100 Thecysteine-rich domain of human ADAM12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that leads to b1-dependent cell spreading.	2000		K. Iba, T. Kojima, et al.
J. Clin. Invest. 106 (7): 873-878 Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality.	2000		K. Ishiguro, T. Kojima, et al.
Thromb. Res. 100 (3): 179-183 Cloning and Characterization of the Murine Antithrombin Gene.	2000		Y. Nakayama, T. Kojima, et al.

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名， 巻号数，論文名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Intromb. Res. 100 (3): 211-221 Down-regulation of murine tissue factor pathway inhibitor mRNA by endotoxin and tumor necrosis factor- α in vitro and in vivo.	2000		T. Shimokawa , T. Kojima, et al.
Fertil. Steril. 74 (6): 1208-1214 Ryudocan expression by luteinized granulosa cells is associated with the process of follicle atresia.	2000		M. Sakata, T. Kojima, et al.
Dev. Dyn. 219, 539-544. Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth.	2000		K. Ishiguro, T. Kojima, et al.
Blood 97 (4): 1147-1149 Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome).	2000		S. Kunishima, T. Kojima, et al.
Sepsis 3, 135-142. The role of leukocytes in disseminated intravascular coagulation associated with sepsis. (a review article)	2000		Okajima K.
J Pharmacol Exp Ther 294; 1034-1042. Adenosine and selective A2A receptor agonists reduce ischemic/reperfusion injury of rat liver mainly by inhibiting leukocyte activation.	2000		Harada N, Okajima K, Murakami K, Usune S, Sato S, Ohshima K, Katsuragi K.
Am J Hematol 65; 210-222. Heterogeneity in the incidence and clinical manifestations of disseminated intravascular coagulation: A study of 204 cases.	2000		Okajima K, Sakamoto Y, Uchiba M.
Am J Respir Crit Care Med 162; 1752-1759. Recombinant tissue factor pathway inhibitor reduces lipopolysaccharide-induced pulmonary vascular injury by inhibiting leukocyte activation.	2000		Enkhbaatar O, Okajima K, Murakami K, Uchiba M, Okabe K, Yamaguchi Y.
Am J Hematol (in press) Recurrent leg ulcers and arterial thrombosis in a 33-year-old homozygous variant of antithrombin.	2001		Shimuzu K, Toriyama F, Ogawa F, Katayama I, Okajima K.
Surgery Frontier 7,41-44. 侵襲と血液凝固異常	2000		岡嶋 研二
血管と内皮 10,51-55. 内皮線溶と臓器障害	2000		岡嶋 研二
臨床病理 48; 510-515. S I R S と凝固異常	2000		岡嶋 研二

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
臨床成人病 30; 1716-1720. 播種性血管内凝固症候群-病態からみた治療のEBM	2000		岡嶋 研二
医学のあゆみ 196;23-28. SIRS, CARSと血液凝固異常-その発症機序と治療	2000		岡嶋 研二
集中医学 12; 240-245. 集中治療における凝固障害の診断と治療	2000		岡嶋 研二
Blood Coagulation & Fibrinolysis, Elevated levels of free tissue factor pathway inhibitor antigen in cases of disseminated intravascular coagulation caused by various underlying diseases, in press	2001		Asakura H, Ontachi Y, Mizutani T, Kato N, Saito M, Morishita E, Yamazaki M, Suga Y, Miyamoto K, Takami A, Nakao S
Blood Coagulation & Fibrinolysis, All-trans Retinoic Acid is Partially Effective against Lipopolysaccharide-Induced but not against Tissue-Factor-Induced DIC in Rat Models, in press	2001		Asakura H, Aoshima K, Ichino T, Suga Y, Saito M, Morishita E, Yamazaki M, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Miyamoto K, Nakao S
Blood Coagulation & Fibrinolysis, Depressed Plasma Activity of Plasminogen or a2 Plasmin Inhibitor is Not Due to Consumption Coagulopathy in Septic Patients with DIC, in press	2001		Asakura H, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Ito T, Saito M, Morishita E, Yamazaki M, Suga Y, Miyamoto K, Nakao S
Int J Hematol, One missense mutation in the factor X gene causing factor X deficiency (factor X Kanazawa), in press.	2001		Morishita E, Yamaguchi K, Asakura H, Saito M, Yamazaki M, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Nakao S
Thromb Haemost 85: 287-290, Beneficial Effect of the Active Form of Vitamin D3 against LPS-Induced DIC but not against Tissue-Factor-Induced DIC in Rat Models.	2001		Asakura H, Aoshima K, Suga Y, Yamazaki M, Morishita E, Saito M, Miyamoto K, Nakao S
Atherosclerosis 54: 203-212, Elevated plasma levels of free-form of TFPI antigen in hypercholesterolemic patients.	2001		Morishita E, Asakura H, Saito M, Yamazaki M, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Matsuda T, Nakao S
臨床血液, Arg169/Trp変異を認めた先天性プロテインC欠乏症, 印刷中	2001		森下英理子, 朝倉英策, 斎藤正典, 山崎雅英, 御館靖雄, 水谷朋恵, 加藤みのり, 中尾真二
Modern Physician 20: 853-856, APLともなうDIC	2000		御館靖雄, 朝倉英策
Medicina 37: 735-737, DIC-病態の多様性	2000		御館靖雄, 朝倉英策
血液・腫瘍科 41: 60-66, ATRAと播種性血管内凝固症候群	2000		水谷朋恵, 朝倉英策

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
血栓と循環 8: 108-112, 血栓準備状態、凝固亢進状態と検査	2000		朝倉英策, 加藤みのり
Modern Physician 20: 1046, 血栓症の病因と抗血栓療法の使い分け	2000		御館靖雄, 朝倉英策
Modern Physician 20: 1165, 播種性血管内凝固症候群 (DIC)	2000		御館靖雄, 朝倉英策
血栓と循環, 血液凝固と血栓, 印刷中	2001		水谷朋恵, 朝倉英策
Clin Appl Thromb Hemostas, 6, 14-17, Elevated tissue factor level in leukemic cell homogenates.	2000		Nakasaki T, Wada H, Watanabe R, Mori Y, Gabazza EC, Kageyama S, Nishikawa M, Shiku H
Semin Thromb Hemostas, 26, 17-22, Diagnosis of disseminated intravascular coagulation by hemostatic molecular markers.	2000		Wada H, Gabazza EC, Nakasaki T, Shimura M, Hiyoyama K, Deguchi K, Nishikawa M, Sakuragawa N, Shiku H
Semin Thromb Hemostas, 26, 23-29, Study of cardiovascular risk factors and hemostatic molecular markers in elderly persons.	2000		Deguchi K, Deguchi A, Wada H, Murashima S
Semin Thromb Hemostas, 26, 109-112, ISI/INR system in Japan: Experience From simultaneous measurement of the same plasma at four different laboratories.	2000		Uetsuka Y, Sakuragawa N, Wada H, Aizawa Y, Aosaki M
Semin Thromb Hemostas, 26, 113-118, Increased hemostatic molecular markers in patients undergoing anticoagulant therapy.	2000		Wada H, Ikuma H, Mori Y, Shimura M, Hiyoyama K, Nakasaki T, Nishikawa M, Onoda K, Yamada N, Ohta T, Nishioka J, Sakuragawa N, Shiku H
Clin Appl Thromb Haemostas, 6, 100-103, Hemostatic abnormalities in patients with thrombotic complications on maintenance hemodialysis.	2000		Inoue A, Wada H, Takagi M, Yamamuro M, Mukai K, Nakasaki T, Shimura M, Hiyoyama K, Deguchi H, Gabazza EC, Mori Y, Nishikawa M, Deguchi K, Shiku H,
Am J Hematol, 64, 145-150, Decreased tissue factor and tissue-plasminogen Activator antigen in relapsed acute promyelocytic leukemia.	2000		Nakasaki T, Wada H, Mori Y, Shimura M, Hiyoyama K, Nishikawa M, Gabazza EC, Miwa H, Kageyama S, Kumeda K, Kato H, Shiku H
Clin Appl Thromb Haemostas, 6, 144-150, Coagulation tests and antiphospholipid antibodies in patients positive for lupus anticoagulant.	2000		Sakakura M, Wada H, Watanabe R, Yamamuro M, Okugawa Y, Nakasaki T, Nakase T, Wakita Y, Minamikawa K, Mori Y, Nishikawa M, Shiku H
Am J Hematol, 65, 35-40, Plasma levels of activated protein C- protein C inhibitor complex in patients with hypercoagulable state.	2000		Watanabe R, Wada H, Mori Y, Nakasaki T, Sawa H, Gabazza EC, Hayashi T, Nishioka J, Suzuki K, Shiku H, Nobori T

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Clin Appl Thromb Haemostas, 6, 197-201, Changes of hemostatic molecular markers after gynecological surgery.	2000		Noda K, Wada H, Yamada N, Noda N, Gabazza EC, Kumeda K, Okugawa T, Yanoh K, Ito M, Nakano T, Shiku H, Kato H, Toyada N
Clin Appl Thromb Haemostas, 6, 202-205, Decreased protein C activation is associated with abnormal collagen turnover in the intraalveolar space of patients with interstitial lung disease.	2000		Yasui H, Gabazza EC, Taguchi O, Risteli J, risteli L, Wada H, Yuda H, Kobayashi T, Kobayashi H, Suzuki K, Adachi Y
Am J Hematol, 65, 210-214, Increased plasma levels of tissue factor pathway inhibitor -activated factor X complex in patients with disseminated intravascular coagulation.	2000		Okugawa Y, Wada H, Noda T, Sakakura M, Nakasaki T, Watanabe R, Deguchi H, Gabazza EC, Mori Y, Nishikawa M, Deguchi K, Nobori T, Shiku H
Crit Care Med, 28, s12-s19, Description of compensated and uncompensated DIC responses (non-overt, and overt DIC) in baboon models of intravenous and intraperitoneal Escherichia coli sepsis and in the human model of endotoxemia (toward a better definition of DIC.	2000		Taylor Jr FB, Wada H, Kinasewitz G
J Biochemistry, 128, 1017-1024, Highly increased plasma concentrations of the nicked form of γ 2 glycoprotein I in patients with leukemia and lupus anticoagulant: Measurement with a monoclonal antibody specific for a nicked form of domain V.	2000		Itoh Y, Inutsuka k, Kohno I, Wada H, Shiku H, Ohkura N, Kato H
Crit Care Med, (in press), Two stage response to endotoxin infusion into normal human subjects: Correlation of blood phagocyte luminescence with clinical and laboratory markers of the inflammatory, hemostatic response.	2001		Taylor Jr FB, Haddad PA, Havck E, Chang AC, Peer GT, Morrissey JH, Li A, Allen RC, Wada H, Kinasewitz GT
Clin Appl Thromb Haemost, 7, 5 - 9, Increased plasma thrombomodulin as a vascular endothelial cell marker in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome.	2001		Mori Y, Wada H, Okugawa Y, Tamaki S, Nakasaki T, Watanabe R, Gabazza EC, Nishikawa M, Minami N, Shiku H
Thromb Haemost, (in press), Correlation of pathology, hemostatic, (DIC), and Endothelial response of baboon to increasing concentrations Escherichia Coli.	2001		Wada H, Yamamuro M, Inoue A, Shiku H, Sakuragawa N, Redl Heinz, Chang ACK, Peer G, Tayler Jr FB
臨床病理、48, 205-216, 高齢者の凝固・線溶異常、シンポジウムS5、高齢者の疾患のデシジョンレベル	2000		出口晃、和田英夫、珠玖洋、浜口均、川村陽

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
臨床病理、48, 301-307, 凝固線溶マーカーの有用性、シンポジウムS1、血液凝固異常の起こるメカニズム	2000		和田英夫、坂倉美穂、登 勉、珠玖洋
循環制御、21, 271-277, プロトロンビン時間測定におけるISI/INRシステムの問題点：同一検体4施設同時測定による検討	2000		上塚芳郎、櫻川信男、和田英夫、相沢義房、小沢哲夫、青崎正彦、大木勝義、井上美幸、笠貫宏
日本検査血液学会雑誌、1: 154-159, シンポジウム1-4、INRと凝固関連分子マーカーとの関係、	2000		和田英夫、西岡淳二、阿部泰典、登 勉
最新医学、55: 223-230, 最新医学、55, 223-230, 播種性血管内凝固症候群、特集：血栓症—基礎と臨床—	2000		森美貴、和田英夫
血液フロンテア、10, 47-56, DICのメイエイター/検査、特集：播種性血管内凝固症候群(DIC)の新展開	2000		森美貴、和田英夫
血栓止血誌、11, 3-15, 国内外における播種性血管内凝固症候群(DIC)の診断基準作成の動きについて	2000		和田英夫
抗凝固療法の適正な使い方, pp58-64, 凝固系分子マーカーの変動	2000, 3, 10	医歯薬出版	森美貴、和田英夫
抗凝固療法の適正な使い方, pp65-74, ヘパリン併用療法、抗血小板薬、併用療法、	2000,		
3, 10	医歯薬出版	森美貴、和田英夫	
抗凝固療法の適正な使い方, pp75-82, ワルファリン療法における合併症とその予防・治療	2000, 3, 10	医歯薬出版	森美貴、和田英夫
抗凝固療法の適正な使い方, p243-245,			
OVERVIEW、第4章合成蛋白分解酵素阻害薬	2000, 3, 10	医歯薬出版	和田英夫
Modern Physician, 20, 848-852, DICの早期診断、凝固線溶系の分子マーカー	2000		森美貴、和田英夫
血管と内皮、10, 63-70, DICと内皮線溶の異常	2000		森美貴、和田英夫、登 勉
静脈学11(4)、283-288、CTscanを利用した簡易法による未治療深部静脈血栓症(DVT)の診断			渋谷 卓、有吉秀男、川崎富夫

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
血液腫瘍科、第40巻、特別増刊号、189-200頁、「臨床血液実験操作法、VI 蛋白質の分離精製、2. カラムクロマトグラフィ」	2000	科学評論社	大蔵直樹、宮田敏行
血液腫瘍科、第40巻、特別増刊号、201-209頁、「臨床血液実験操作法、VI 蛋白質の分離精製、3. 蛋白質の分析に有用な各種の手法」	2000	科学評論社	小亀浩市、大蔵直樹、宮田敏行
最新医学、第55巻、第2号、49-55頁、「ホモシステインと血栓症」	2000	最新医学社	宮田敏行
Annual Review 血液（高久史麿、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉 謙 編）231-239頁「IV.凝固、1.血栓症と遺伝子多型」	2000	中外医学社	宮田敏行
Currents in Hematoimmunology、第16巻、第1号、4-10頁「血栓症と遺伝的素因」	2000	Excerpta Medica	宮田敏行
血栓と循環、第8巻、第2号、22-26頁「血管障害マーカー」	2000	メディカルレビュー社	斎藤正典、宮田敏行
臨床病理、第48巻、第4号、285A292頁「先天性血栓性素因、特にプロテインC 欠乏症を中心に」	2000	日本臨床病理学会	宮田敏行、加藤久雄、阪田敏幸、片山善章、馬場俊六、万波俊文、緒方 紘
血液フロンティア、第10巻、第7号、47-53頁「ホモシステイン異常と血栓傾向」	2000	医薬ジャーナル社	宮田敏行
血栓止血学会誌、第11巻、第3号、276-282頁「ストレプトキナーゼ-ミニプラスミン複合体の立体構造」	2000	日本血栓止血学会	宮田敏行、峯 昇平
血栓止血学会誌、第11巻、第3号、310頁「解裂型アンチトロンビンによる血管新生と腫瘍成長の阻害」	2000	日本血栓止血学会	城谷裕子、宮田敏行
蛋白質核酸酵素、第45巻、第11号、1856-1857頁「血管内皮障害と過酸化脂質の新たな関係」	2000	共立出版	宮田敏行
蛋白質核酸酵素、第45巻、第12号、1967-1968頁「血液凝固反応と細胞内情報伝達：プロテアーゼ活性化受容体2の新規リガンド」	2000	共立出版	宮田敏行
血栓と循環、第8巻、第3号、9頁「特集 加齢と血栓、特集によせて」	2000	メディカルレビュー社	宮田敏行
Nikkei Medical、2000年10月号、64-67頁「Fighting Vascular Events、座談会、遺伝子多型(polymorphism)と日本人の血栓症」	2000	日経BP社	島田和幸、宮田敏行、村田 満、後藤信哉