

200500153A

別添1

**厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業**

**血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と  
その成果を用いた予防と治療の個別化**

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮田敏行  
国立循環器病センター研究所

平成18(2006)年3月

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

## 血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

### その成果を用いた予防と治療

[H17-ゲノム-005]

3年計画の1年目

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

平成 18 年 3 月

\* \* \* \* \* 研 究 組 織 \* \* \* \* \*

主任研究者 宮田敏行 国立循環器病センター研究所

分担研究者 森崎隆幸 国立循環器病センター研究所

岡山 明 国立循環器病センター

本田繁則 国立循環器病センター研究所

小亀浩市 国立循環器病センター研究所

坂野史明 国立循環器病センター研究所

木村利奈 国立循環器病センター研究所

松本雅則 奈良県立医科大学 輸血部

富山佳昭 大阪大学大学院 医学系研究科

# 目 次

## I. 総括研究報告書

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定とその成果を用いた 予防と治療に関する研究	宮田敏行……………1
--	------------

## II. 分担研究報告書

1. 血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定に関する研究	宮田敏行……………19
2. 血小板膜蛋白質と情報伝達タンパク質の心筋梗塞や脳梗塞に 関する研究	森崎隆幸……………24
3. 血小板血栓能評価のための地域一般住民を対象にした血小板 凝集能の検討	岡山 明……………27
4. インテグリン活性化に係わるシグナル伝達分子に関する研究	本田繁則……………31
5. 血栓性血小板減少性紫斑病の新規原因遺伝子変異の同定	小亀浩市……………33
6. 血栓性血小板減少性紫斑病の責任遺伝子 <i>ADAMTS13</i> 欠損マウ スの作製と解析	坂野史明……………39
7. ADP 受容体 $P2Y_1$ 、 $P2Y_{12}$ 遺伝子の多型解析	木村利奈……………43
8. 血栓性微小血管障害症 (TMA) の病態解析 -補体制御因子 factor H の活性測定法の開発-	松本雅則……………47
9. 血小板血栓形成の促進因子と抑制因子に関する研究	富山佳昭……………55

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	59
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り……………	61
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

総括研究報告書

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化に関する研究

主任研究者 宮田 敏行 国立循環器病センター研究所 部長

#### 研究要旨

生命現象を多様な遺伝子・タンパク質の協調的な相互作用（ネットワーク）として捉え、ヒトゲノムの成果に基づいた複雑な生命現象の解明が待たれている。本研究は、遺伝子・タンパク質の間のネットワーク研究を通して、血小板血栓の形成機構を解明することにより、国民の大きな健康上の不安要因である心筋梗塞や脳卒中の革新的予防法・治療法を目指す。

動脈血流下の血小板凝集は、血漿タンパク質であるフォンビルブランド因子（VWF）依存性にコラーゲン上で凝集反応を起こす。この際、重合度の高いVWF マルチマーは血小板凝集能が極めて強いことが知られている。血小板の凝集反応は、血小板インテグリンが重要な役割を果たしている。各種アゴニストの刺激により血小板内部にシグナルが伝達されインテグリンが活性化する。VWF やフィブリノーゲンは活性化インテグリンに結合し、血小板血栓が形成される。したがって、血小板血栓形成を人為的に制御するには、血小板を活性化させる血小板の外部と内部のシグナル伝達にかかわる因子を中心に研究を展開し、それらが血小板の凝集機能にどのように関与するのかを明らかにして、脳梗塞・心筋梗塞の予防と治療の個別化を目差す必要がある。

本研究は研究を大きく3つのグループに分けて進めるものである。「血小板凝集の細胞内ネットワーク」の研究は、血小板血栓形成で中心的役割を果たす血小板インテグリンの活性化にかかわる新規因子の同定、および血栓センサー因子や抑制因子に関する研究である。血小板は無核細胞なので、研究方法に制限がある。そこで、血小板インテグリン $\alpha$  IIb $\beta$ 3 を発現する有核細胞を作製し研究を進めることとした。作製した細胞株は、活性化インテグリンを認識するモノクローナル抗体と反応し、この結合は $\alpha$  IIb $\beta$ 3 アンタゴニストによりほぼ完全に阻害された。こうして樹立した細胞株を用いて、血小板

インテグリンの活性化にかかわる因子のスクリーニングを行うこととした。一方、ADP 凝集を起こさない患者に、ADP 受容体 P2Y<sub>12</sub> 遺伝子の異常を同定した。患者の血小板血栓は脆弱で、高ずり応力に耐えられないものであった。SHPS-1 とセマフォリン 3A は、フィブリノーゲン上での血小板の扁平・伸展化を抑制することを明らかにした。アディポネクチン遺伝子欠損マウスの解析から、アディポネクチンは抗血栓作用をもつことを明らかにした。

「血小板凝集にかかわる細胞外ネットワーク」の研究として、高ずり応力下の動脈血栓で中心的役割を果たす VWF マルチマーとその切断酵素である ADAMTS13 の研究を進める。血管内皮細胞で合成された VWF は、極めて重合度の高い超高分子量 VWF マルチマーである。本マルチマーは血小板凝集能が強く、微小血管内に血小板血栓を形成する。これが血栓性血小板減少性紫斑病である。この超高分子量 VWF マルチマーを適度に切断する酵素が ADAMTS13 であるため、本酵素の活性制御因子や局在性を決める因子の同定は、高ずり応力下で生じる動脈血栓の解明に重要である。私達は ADAMTS13 に結合する因子をゲノム網羅的手法を用いてスクリーニングを行い候補となる因子を同定した。今後、生化学的手法を用いて結合を確認する。

私達はこれまでに先天性血栓性血小板減少性紫斑病患者の ADAMTS13 遺伝子解析を行ってきたが、今年度は新たに 11 家系の遺伝子解析を行い変異を同定した。欧米の研究では、血栓性血小板減少性紫斑病に似た臨床症状を示す溶血性尿毒症症候群の亜型に、補体制御因子 factor H と Membrane cofactor protein (MCP, CD46) の遺伝子変異が報告された。そこで、私達の一部の症例について、これら 2 つの遺伝子も解析したが、機能異常につながると考えられる変異は見出せなかった。血栓性微小血管障害症を対象に、factor H 活性測定の重要性を痛感したので、活性測定に必要となる補体 C3 因子の精製とそのモノクローナル抗体の作製を行った。

「血小板血栓にかかわる遺伝子を対象とした脳梗塞発症に関する遺伝子」の研究では、脳梗塞と遺伝子との間にある中間形質として、血小板凝集能に注目し、多数の試料の血小板凝集能の測定を始めた。また、血小板血栓に重要な役割を果たす 4 つの遺伝子をシークエンスし、4 つのミスセンス変異を含む 81 個の遺伝子多型を同定した。

## 分担研究者

森崎隆幸	国立循環器病センター研究所	部長
岡山 明	国立循環器病センター	部長
本田繁則	国立循環器病センター研究所	室長
小亀浩市	国立循環器病センター研究所	室長
坂野史明	国立循環器病センター研究所	室員
木村利奈	国立循環器病センター研究所	室員
松本雅則	奈良県立医科大学輸血部	講師
富山佳昭	大阪大学大学院医学系研究科	助手

### A. 研究目的

ポストゲノム時代の研究として、米国では ENCODE 計画が実施されており、それに呼応した形で日本では文部科学省ゲノムネットワークプロジェクトが平成 16 年度予算で開始された。本プロジェクトは多種多様な遺伝子やタンパク質の間の協調的な相互作用（ネットワーク）の解明を目標とし、ポストゲノムシーケンシング研究の発展を目指しているが、その対象は疾患に特化したものではない。病態解明や画期的な薬剤の探索などを目指した疾患に特化した「病態ネットワーク」研究の進展を強力に進める必要がある。

本研究は、2004 年に完成したヒトゲノム配列の成果を用いて、遺伝子・タンパク質の間のネットワーク研究を通して、血小板血栓の形成機

構を解明することにより、国民にとって大きな健康上の不安要因である心筋梗塞や脳卒中の、革新的予防法・治療法を開発することを目的とする。これらの血栓性疾患の予防と治療は、高齢化社会を迎えた日本にとって急務であり、ゲノム研究の成果に基づいた革新的な医薬品の開発が待たれている領域である。脳梗塞の再発予防などのため、抗血小板療法が広く行われることから推察されるように、血小板機能の制御は研究の重要な位置を占める。即ち、血小板凝集メカニズムの解明は、抗血小板薬のシーズの探索に直結している。最近では、血小板のシグナル伝達を複数の蛋白質のネットワークとして捉え、その解明が血小板凝集機構の解明につながると考えられている。しかし、現在までのところ世界

的に未だそのような研究成果は発表されていない。血小板の中で起こる血小板活性化シグナル伝達系のネットワークや、血小板の外で起こる血小板活性化につながる蛋白質間のネットワークの解明は、国民への安全で安心できる医療の提供に貢献するものであり、ゲノム科学研究の疾患予防の向上や最適な治療の選択に資するものである。

## B.研究方法および C.研究成果

本研究は3本の柱から構成される。それぞれの1年次（平成17年度）の研究実施経過を述べる。

### 1) 血小板凝集の細胞内ネットワーク：インテグリンシグナル伝達分子の同定

血小板は無核なので、分子生物学・細胞生物学で広く用いられる手法、例えばトランスフェクション等の手法を使えない。そこで、核をもつ細胞をモデル系として使用することとなるが、広く認められたモデル系は存在しない。そこで、私達は、血小板インテグリンである $\alpha IIb\beta 3$ を発現する細胞株を作成し、これに化学変異原で変異を導入することにより、インテグリンシグナルにかかわる因子を同定する戦略を取ることとした。

インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ を発現する

## 有核細胞株の樹立

血小板インテグリンである $\alpha IIb\beta 3$ の発現は、血小板と巨核球系細胞に限局している。巨核系細胞および株化された巨核系細胞は、遺伝子導入効果が良くないことが知られており、本研究には適さない。そこで、血小板インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ のシグナル伝達分子を同定するため、 $\alpha IIb\beta 3$ を恒常的に発現するCHO細胞株の樹立を行った。CHO細胞は、多くの遺伝子が機能性半接合体であるため、EMS等の化学変異原でゲノム網羅的に変異を導入し機能破壊細胞を単離後、この破壊された機能を戻すという手法で新規遺伝子が単離されている。私達は、このシステムを用いて多くの実績を挙げておられる大阪大学微生物病研究所木下タロウ教授、前田裕輔助教授の指導をいただいている。

私達は2種のキメラインテグリン、 $\alpha IIb\alpha 6B\beta 3$ （細胞内領域が $\alpha 6B$ と $\beta 3$ ）および $\alpha IIb\alpha 6B\beta 3\beta 1$ （細胞内領域が $\alpha 6B$ と $\beta 1$ ）、を恒常的に発現するCHO細胞の樹立に成功した。これらの細胞株は、非刺激下でも活性化 $\alpha IIb\beta 3$ インテグリンを認識するモノクローナル抗体、PAC-1、に高親和性を示した。この結合は、 $\alpha IIb\beta 3$ アンタゴニストによりほぼ完全に阻害された。これらの性質は、これらの樹立株が血小板インテグリンの性質を備えている



ことを示している。これらの樹立株を用いて、ゲノム網羅的に変異を導入し、血小板インテグリンのシグナルにかかわる因子を同定する段階へと進むこととした。

## 血小板血栓センサー因子および抑制因子

候補遺伝子アプローチによる血小板血栓の制御メカニズムの解明も進めている。本年度は、血栓センサー分子として ADP 受容体である P2Y12、抑制因子として Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 (SHPS-1)、セマフォリン 3A、アディポネクチンを同定した。これまでの研究で、血小板活性化のアゴニストである ADP に反応しない ADP 不応例を同定していた。本研究で、本症例の ADP 受容体 P2Y12 に遺伝子変異 (M1V 変異のホモ体) を同定した。患者血液の高ずり応力下でのコラーゲン固相上での血小板血栓量は小さく脆弱であり、高ずり応力に耐えることができなかった。このことから、P2Y12 受容体は血栓センサー分子であると考えた。また、血管内皮細胞に発現している SHPS-1 および分泌されるセマフォリン 3A は、フィブリンゲン上での血小板の扁平・伸展化を抑制することを明らかにした。アディポネクチン遺伝子欠損マウス

を用いて急性の血栓形成における機能を解析したところ、アディポネクチンは抗血栓作用を有し、組み換え体は血小板凝集を抑制し、アデノベクターを用いたアディポネクチン投与が血栓形成を抑制することを明らかにした。

## 2) 血小板凝集にかかわる細胞外ネットワークに関する研究

超高分子量フォンビルブランド因子 (VWF) マルチマーは血小板凝集能が高い。VWF 切断酵素であるメタロプロテアーゼ、ADAMTS13、の先天性・後天性欠損症では、血中に超高分子量 VWF マルチマーが蓄積し、血小板の過凝集が起こる。これが血栓性血小板減少性紫斑病の発症メカニズムである。ADAMTS13 と VWF を中心に、血小板凝集のネットワークの研究を進めた。

## 血小板血栓を制御する遺伝子の同定

ADAMTS13 が VWF を切断する際、ADAMTS13 分子は血管内皮細胞に係留して反応が進むことが観察されている。足場となる因子は ADAMTS13 活性を制御すると考えられる。本因子を単離するため ADAMTS13 の機能に重要な 2 つのドメインを「ベイト」にして、酵母ツーハイブリッド法を行い、未知因

子の同定を試みた。ベイト領域として、ADAMTS13のCysリッチドメインとスパーサドメインを用い、ヒト肝cDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果558個の陽性クローンを得た。塩基配列解析の結果、189個の遺伝子を得た。このうち57個は分泌もしくは膜蛋白質をコードしており、ADAMTS13の結合蛋白質の候補であると考えた。次年度に、これらの遺伝子産物とADAMTS13との結合を検討し、血小板血栓へのかかわりを解明する。

#### 血栓性血小板減少性紫斑病の新規原因遺伝子変異に関する研究

血栓性血小板減少性紫斑病は、血小板数減少と細小血管障害性溶血性貧血を主徴とする重篤な全身性疾患である。私達はこれまでに7家系の先天性患者の遺伝子解析、頻度の高い活性低下を伴うP475S変異の同定、酵素活性に必須のドメインの同定、後天性患者が有する自己抗体のエピトープ領域の解析等を進めてきた。本年度は、新たに11家系の先天性患者の遺伝子解析を行った。その結果、すでに報告した変異に加え、新たに13個のミスセンス変異と3個のナンセンス変異、3個のフレームシフト変異を同定した。いずれも一般住民には検出されなかった。解析した11家系のうち、

5家系については補体制御因子factor H遺伝子、4家系については補体系膜蛋白質Membrane cofactor protein (MCP、CD46)遺伝子を解析したが、機能異常につながると考えられる変異は見出せなかった。血栓性血小板減少性紫斑病は溶血性尿毒症症候群と似た症状を示すことから、血栓性微小血管障害症に包含される。欧米の研究では、溶血性尿毒症症候群の亜型である先天性溶血性尿毒症症候群の原因遺伝子として、factor HとMCPが報告された。今回、私達が血栓性血小板減少性紫斑病と判定した患者には、ADAMTS13遺伝子に変異が同定され、factor H遺伝子とMCP遺伝子には変異を見出せなかった。

#### 血栓性微小血管障害症の原因と考えられる補体制御因子factor H

これまでに血栓性微小血管障害症643例を収集しADAMTS13活性を測定した。その結果、本症の病因としてADAMTS13の活性が3%未満に著減する症例は約3分の1(205例)であり、残りの症例は、ADAMTS13活性で説明できなかった。欧米の研究では、先天性溶血性尿毒症症候群の原因遺伝子として補体制御因子であるfactor HとMCPが報告され、特に最近factor Hの遺伝子異常が複数例報告された。そこで、簡便かつ鋭敏なfactor H活

性測定法を開発するため、基質である補体因子 C3 を精製し、10 種の抗ヒト C3 モノクローナル抗体の作製に成功した。このモノクローナル抗体を用いた factor H 活性測定系を確立し、血栓性微小血管障害症患者の factor H 活性をスクリーニングする予定である。

### 血栓性血小板減少性紫斑病のモデル動物を用いた解析

血栓性血小板減少性紫斑病の責任遺伝子である ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを作製し表現型を解析した。欠損マウスは正常に出生し生殖能力も正常であった。血中には超高分子量 VWF マルチマーの蓄積がみられ、潜在的に易血栓形成傾向を保持していた。しかし、血小板減少や溶血性貧血といった血栓性血小板減少性紫斑病に特徴的な症状はなく、末梢血管に血栓の沈着も見られなかった。しかし、欠損マウスは全血を用いたずり応力下血小板血栓能の亢進を示し、コラーゲン静注による血栓誘発試験においても血小板減少がより顕著であった。これらの所見より、ADAMTS13 遺伝子欠損マウスは、血中に超高分子量 VWF マルチマーの蓄積を認め易血栓傾向をもたらすが、それだけでは血栓性血小板減少性紫斑病を示さないと考えられた。最近、先天性 ADAMTS13 欠損症患者でも妊娠に

よって初めて症状が顕在化する例や、同じ遺伝子変異を保有しながら発症時期や重症度が異なる症例が報告された。血栓性血小板減少性紫斑病発症を促進する別の要因が想定され、私達が作製した遺伝子欠損マウスはこの要因の探索に有用と考えられた。

### 3) 血小板血栓にかかわる遺伝子を対象とした脳梗塞発症に関する遺伝子の研究

血小板が脳梗塞等の閉塞性疾患の発症に重要な役割を果たしていることは、アスピリン等の抗血小板薬の有効性からも明らかである。ポストゲノム時代の研究として、脳梗塞を対象にした遺伝子多型研究が進められたが、これまでの研究は、一人一人の血小板凝集能等を中間形質として収集していないため、同定された遺伝子多型の評価がなされていない。私達はこのような現状を打破するため、国立循環器病センター予防健診部が進めている大都市近郊の疫学研究である「吹田研究」参加者を対象に、コラーゲンと ADP をアゴニストにした血小板凝集能を測定することとした。平成 18 年 3 月 9 日までで、約 300 名の血小板凝集能を測定した(月に約 70 名)。平成 18 年度末には目標数を達成できる見込みである。一方、血小板血栓にかかわる遺伝子として、イン

テグリンβ3、細胞内情報伝達タンパク質 Rap1B、血小板凝集アゴニストである ADP の受容体である P2Y1 および P2Y12 を取り上げ、全翻訳領域の DNA シークエンスを行った。本研究により、4 遺伝子に 81 個の遺伝子変異を同定した。このうち、機能の変化にかかわる可能性のあるミスセンス変異は 4 つ（インテグリンβ3:L59P、R169Q、E654K、P2Y1:A34V）であった。

#### D. 考察

本研究は、ポストゲノム研究として進められる遺伝子・タンパク質の相互作用（ネットワーク）の研究のなかでも、疾患ネットワーク研究として重要な位置を占める「血小板活性化」にかかわる研究である。抗血小板薬であるアスピリンは、心血管疾患の2次予防として有効であることは周知の事実である。ADP 受容体のアンタゴニストであるチクロピジンやクロピドグレルも、心血管疾患患者に広く用いられている。このような抗血小板薬の有用性を背景に、血小板の活性化に特化した遺伝子・タンパク質のネットワーク研究を進めるものである。

本年は、3年計画の初年度であり、血小板の活性化にかかわる新規因子のスクリーニングのためのシステムの構築が終了した。また、一般住民を対象にするという極めてユ

ニークな対象者の血小板凝集能の測定も、約3ヶ月を過ぎたところで、約300名の測定を完了した。先天性血栓性血小板減少性紫斑病患者の遺伝子解析では、原因遺伝子 ADAMTS13 に遺伝子変異を同定した。血小板の膜受容体遺伝子や情報伝達因子の多型解析も進んだ。これらの進捗を基盤に、次年度以降、堅実な成果を積み上げていく。

#### E. 結論

血小板活性化のネットワーク研究を開始した。本研究を、「血小板凝集の細胞内ネットワーク」、「血小板凝集にかかわる細胞外ネットワーク」、「血小板血栓にかかわる遺伝子を対象とした脳梗塞発症に関する遺伝子」の3つに分けて進め、ゲノム網羅的な解析の遂行に必要なシステムを確立するとともに、幾つかの候補となる遺伝子を絞りこんだ。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Anderson PJ, Kokame K, Sadler JE: Zinc and calcium ions cooperatively modulate ADAMTS13 activity. *J Biol Chem.* 281(2) 850-857. 2006.

Aoki T, Tomiyama Y, Honda S, Mihara

- K, Yamanaka T, Okubo M, Moriguchi A, Mutoh S: Association of the antagonism of von Willebrand factor but not fibrinogen by platelet  $\alpha_{IIb}\beta_3$  antagonists with prolongation of bleeding time. *J Thromb Haemost.* 3(10): 2307-2314. 2005.
- Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* in press, 2006.
- Fujisaki K, Matsutani K, Yoshimitsu T, Nakanishi K, Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Fujimura Y, Takeda K, Hirakata H, Iida M: Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with polyarthritis nodosa: demonstration of the inhibitor against von Willebrand factor-cleaving protease. *Clinical Nephrology.* 64: 305-310. 2005.
- Furukoji E, Matsumoto M, Yamashita A, Yagi H, Sakurai Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Morishita K, Fujimura Y, Tamura S, Asada Y: Adenovirus-mediated transfer of human placental ecto-ATP diphosphohydrolase I to vascular smooth muscle cells suppresses platelet aggregation in vitro and arterial thrombus formation in vivo. *Circulation.* 111: 808-815. 2005.
- Ishida N, Oritani K, Shiraga M, Yoshida H, Kawamoto S, Ujiie H, Masaie H, Ichii M, Tomiyama Y, Kanakura Y: Differential effects of a novel IFN- $\gamma$ /limitin and IFN- $\alpha$  on signals for Daxx induction and Crk phosphorylation that couple with growth control of megakaryocytes. *Exp Hematol.* 33(4): 495-503. 2005.
- Kashiwagi H, Shiraga M, Kato H, Honda S, Sako M, Kurata Y, Kanakura Y, Tomiyama Y: Expression and subcellular localization of WAVE isoforms in the megakaryocyte/platelet lineage. *J Thromb Haemost.* 3(2): 361-368. 2005.
- Kashiwagi H, Shiraga M, Kato H, Kamae T, Yamamoto N, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: Negative regulation of platelet function by a secreted cell repulsive protein, semaphorin 3A. *Blood.* 106(3): 913-921. 2005.
- Kato H, Honda S, Yoshida H, Kashiwagi H, Shiraga M, Honma N, Kurata Y, Tomiyama Y: SHPS-1 negatively regulates integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  function through CD47 without

disturbing FAK phosphorylation. *J Thromb Haemost.* 3(4): 763-774. 2005.

Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kamae T, Ujiie H, Honda S, Miyata S, Ijiri Y, Yamamoto J, Maeda N, Funahashi T, Kurata Y, Shimomura I, Tomiyama Y, Kanakura Y: Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(1): 224-230. 2006.

Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y: Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion.* in press, 2006.

Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Hayashi T, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T: Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood.* 107(4) 1737-1738. 2006.

Ko S, Okano E, Kanehiro H, Matsumoto M, Ishizashi H, Uemura M, Fujimura Y, Tanaka K, Nakajima Y: Plasma ADAMTS13 activity may

predict early adverse events in living donor liver transplantation: Observations in three cases. *Liver Transplant.* in press, 2006.

Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T: FRET-S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol.* 129(1) 93-100. 2005.

Kosugi S, Matsumoto M, Ohtani Y, Take H, Ishizashi H, Fujimura Y, Kuyama J: Rituximab provided long-term remission in a case with refractory relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol.* 81: 433-436. 2005.

Matsumoto M, Kawaguchi S, Ishizashi H, Yagi H, Iida J, Sakaki T, Fujimura Y: Platelets treated with ticlopidine are less reactive to unusually large VWF multimers than are those treated with aspirin under high shear stress. *Pathophys Haemost Thromb.* 35: 35-40. 2005.

Miyata T, Kokame K, Banno F: Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol.* 12(5) 384-389. 2005.

Shibagaki Y, Matsumoto M, Kokame K, Ohba S, Miyata T, Fujimura Y, Fujita T: Novel compound heterozygote

mutations (H234Q/R1206X) of the ADAMTS13 gene in an adult patient with Upshaw-Schulman syndrome showing predominant episodes of repeated acute renal failure. *Nephrol Dial Transpl.* in press, 2006.

Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: Impaired platelet function in a patient with P2Y<sub>12</sub> deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost.* 3(10): 2315-2323. 2005.

Sugimoto T, Saigo K, Kanenda Y, Manabe N, Narita H, Wakuya J, Imoto S, Murashima T, Matsumoto M, Fujimura Y, Nishimura R, Koizumi T, Kumagai S: Von Willebrand factor-cleaving protease activity remains at the intermediate level in thrombotic thrombocytopenic purpura. A CML case treated with interferon- $\alpha$ . *Acta Haematologica.* 113: 198-203. 2005.

Sugiyama S, Hirota H, Kimura R, Kokubo Y, Kawasaki T, Suehisa E, Okayama A, Tomoike H, Hayashi T, Nishigami K, Kawase I, Miyata T: Haplotype of thrombomodulin gene associated with plasma thrombomodulin level and deep vein

thrombosis in the Japanese population. *Thromb Res.* in press, 2006.

Tomiyama Y, Kosugi S: Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol.* 81(2): 100-105. 2005.

Uemura M, Matsuyama T, Ishikawa M, Fujimoto M, Kojima H, Sakurai S, Ishii S, Toyohara M, Yamazaki M, Yoshiji H, Yamao J, Matsumoto M, Ishizashi H, Fujimura Y, Fukui H: Decreased activity of plasma ADAMTS13 may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res.* 12 Suppl: 264S-271S, 2005.

Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto T, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y: Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood.* 106: 922-924. 2005.

Yagita M, Uemura M, Yamahara H, Kitano T, Kunitomi A, Konaka Y, Nakamura T, Matsumoto M, Ishizashi H, Fukui H, Fujimura Y: Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic

thrombocytopenic purpura. *J Hepatology*. 42: 420-421. 2005.

宮田敏行、木村利奈. ワーファリン標的酵素ビタミンKエポキシド還元酵素のクロニングとワーファリン用量の最適化. *Annual Review血液*2006, 259-265. 2006.

黒田裕行、木田雅也、渡辺秀樹、松永卓也、新津洋司郎、松本雅則. Evans 症候群を合併した Basedow 病. *臨床血液* 46 : 1118-1122. 2005.

坂野史明, 小亀浩市: VWF 切断酵素/ADAMTS13. 図説 血栓・止血・血管学 (一瀬白帝編). 中外医学社. 218-226. 2005.

坂野史明, 小亀浩市: 血小板血栓形成を制御するメタロプロテアーゼ ADAMTS-13. *日本生化学会誌*. 印刷中.

山根隆志、田中千尋、村田美紀、柱本照、三浦靖史、塩沢俊一、宮本宣友、前川修司、金澤健司、橋本正良、秋田穂束、松本雅則、石指宏通、藤村吉博. 血漿交換が著効した SLE に合併した TTP の 1 例. *臨床リウマチ* 17 : 48-52.2005.

小亀浩市, 宮田敏行: TTP 迅速診断を目的とした新規 ADAMTS13 測定法の開発と応用. *臨床病理誌*. 53(7) 639-645. 2005.

小亀浩市: ADAMTS13. 血栓症ナビゲーター (池田康夫監修, 内山真一郎, 後藤信哉, 重松宏, 半田誠編). メディカルレビュー社. 204-205. 2006.

小亀浩市: ADAMTS13 活性測定法. 血液疾患-state of arts Ver.3 (坂田洋一, 小澤敬也編). 医歯薬出版. 421-424. 2005.

小亀浩市: 血栓性血小板減少性紫斑病/溶血性尿毒症症候群. *分子細胞治療*. 4(3) 209-215. 2005.

松山友美、植村正人、石川昌利、藤本正男、小嶋秀之、櫻井伸也、石井禎庸、浪崎正、豊原真久、山崎正晴、吉治仁志、山尾純一、福井博、松本雅則、石指宏通、加藤誠司、藤村吉博、瀧村力. アルコール性肝炎における ADFAMTS13 と von Willebrand 因子の動態—重症度との関連—. *アルコールと医学生物学* 25 : 112-117. 2005.

松本雅則、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP). *三輪血液病学*. 1776-1782. 2005.

松本雅則、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病. *血液疾患ハンドブック*. 216-227. 2005.

松本雅則、藤村吉博. 周術期の輸液・輸血療法. 遅発型輸血副作用.



麻酔科診療プラクティス 18  
122-123. 2005.

松本雅則. von Willebrand 因子切断酵素(ADAMTS13)と血栓性血小板減少性紫斑病. 日本検査血液学会雑誌 6: 280-287. 2005.

松本雅則. von Willebrand 病. 疾患別最新処方 482-483. 2005.

松本雅則. 技術講座 VWF 測定. Medical Technology 34: 57-64. 2006.

松本雅則. 血管内皮細胞からみた血栓性微小血管障害症(TMA)とADAMTS13. 血管医学 6:279-286. 2005.

松本雅則. 血栓性微小血管障害症におけるADAMTS13活性測定の有用性について教えてください. 血栓と循環 13: 166-169. 2005.

大渡五月、松本雅則、高塚祥芝、竹内章吾、牧野虎彦、魚住公治、藤村吉博、宇都宮興. 胃癌の骨髄転位に併発した血栓性血小板減少性紫斑病. 臨床と研究 82:1379-1382. 2005.

藤村吉博、石西綾美、石指宏道、八木秀男、松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP) 血液フロンティア 15: 725-736. 2005.

木村利奈、宮田敏行 日本人の血栓性素因 Molecular Medicine 臨時増

刊号「生活習慣病の最前線」42.  
407-411. 2005.

## 2. 学会発表

宮田敏行: シンポジウム 2. 脳卒中と血液凝固異常. 血栓性素因の遺伝的背景. **第30回日本脳卒中学会総会**. 盛岡, 4月, 2005.

洪鉉寿、青山泰孝、山村亮介、太田忠信、麦谷安津子、日野雅之、松本雅則、八木秀男、石指宏道、藤村吉博: Rituximab 投与が非常に有効であった血漿交換抵抗性の難治性 TTP. **第102回日本内科学会講演会**. 大阪, 4月, 2005.

Miyata T: ADAMTS13: patient analysis, assay method, and knockout mouse, *5<sup>th</sup> BIC 2005 Fifth Bari International Conference on Hemophilia and Allied Disorders, von Willebrand factor (including ADAMTS-13) and Platelet Glycoproteins*, Invited speaker, Pizzomunno, Italy, May, 2005.

小亀浩市、宮田敏行: 血栓性血小板減少性紫斑病. **第49回日本臨床検査医学会近畿支部例会**. 神戸, 6月, 2005.

松山友美、植村正人、石川昌利、松

本雅則、石指宏道、森岡千恵、櫻井伸也、藤本正男、小嶋秀之、安辰一、石井禎暢、藤村吉博、福井博: アルコール性肝炎における von Willebrand factor 抗原と ADAMTS13 の動態. *第41回日本肝臓学会総会*. 大阪, 6月, 2005.

Miyata T: Assays for ADAMTS13, Symposium: Regulation of von Willebrand factor function, invited speaker, *The XXth Congress of International Society of Thrombosis and Haemostasis*. Sydney, Australia, August, 2005.

Miyata T, Kokame K: Assays for ADAMTS13. *The XXth Congress of International Society of Thrombosis and Haemostasis*. Sydney, Australia, August, 2005.

Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Generation and characterization of ADAMTS13-deficient mice. *The XXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. Sydney, Australia, August, 2005.

Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki S, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H,

Honda S, Tomoike H, Miyata T: Identification of genetic variations in genes comprised in vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation system. *The XXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. Sydney, Australia, August, 2005.

Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kamae T, Honda S, Miyata S, Yamamoto J, Kurata Y, Funahashi T, Shimomura I, Tomiyama Y, Kanakura Y: Enhanced platelet aggregation and thrombogenic tendency in adiponectin-deficient mice. *The XXth Congress of International Society of Thrombosis and Haemostasis*. Sydney, Australia, August, 2005.

Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Isikawa M, Iwamoto T, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y: Stellate cells produce ADAMTS13 in human liver. *The XXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. Sydney, Australia, August, 2005.

Furukoji E, Matsumoto M, Yamashita A, Yagi H, Sakurai Y, Marutsuka K, Hatakeyama H, Morishita K, Fujimura Y, Tamura S, Asada Y: Adenovirus-

mediated transfer of human placental ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase to vascular smooth muscle cells suppresses platelet aggregation in vitro and arterial thrombus formation in vivo. *The XXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. Sydney, Australia, August, 2005.

Kokame K, Miyata T: Fluorogenic substrate for ADAMTS-13. *51st Annual SSC Meeting*. Sydney, Australia, August, 2005.

Matsumoto M, Kato S, Hiura H, Fujimura Y: Novel ELISA assay for ADAMTS13 activity using MoAbs against the N-terminal decapeptide of VWFA2 domain. *51st Annual SSC Meeting*. Sydney, Australia, August, 2005.

小亀浩市、宮田敏行: 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の診断と ADAMTS13 活性測定. *第 48 回日本臨床化学会近畿支部例会*. 大阪, 8 月, 2005.

松本雅則、藤村吉博、小亀浩市、宮田敏行: TTP/HUS 患者における ADAMTS13 解析. *第 42 回補体シンポジウム*. 名古屋, 8 月, 2005.

坂野史明、小亀浩市、奥田智彦、本田繁則、宮田茂樹、加藤恒、富山佳

昭、宮田敏行: ADAMTS13 欠損マウスにおける血流下血栓形成の亢進. *第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会*. 横浜, 9 月, 2005.

松本雅則、石指宏道、松山友美、加藤誠司、八木秀男、藤村吉博: 奈良医大輸血部にて集積した本邦 TMA564 例の ADAMTS13 解析. *第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会*. 横浜, 9 月, 2005.

今村豊、木村芳三、野見山敬太、長部誠志、松本雅則、藤村吉博、小亀浩市、宮田敏行: 妊娠を契機に発症した Upshaw-Schulman 症候群の姉妹例. *第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会*. 横浜, 9 月, 2005.

加藤誠司、松本雅則、日裏久英、藤村吉博: ADAMTS13 活性の新規 ELISA 測定系の開発: VWF-Tyr842 を特異的に認識する新規モノクローナル抗体作成を利用. *第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会*. 横浜, 9 月, 2005.

木村利奈、宮田敏行、本田繁則、川崎富夫、辻 肇、小嶋哲人、窓岩清治、坂田洋一、村田 満、池田康夫: 日本人の静脈血栓症の危険因子、プロテイン S K196E: 血液凝固異常症

に関する調査研究班の成績. **第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会**. 横浜, 9 月, 2005.

野村明彦、大賀正一、高田英俊、松本雅則、藤村吉博、原寿郎: TTP と複数の抗血球・凝固因子抗体による血液障害で発症した SLE 小児例. **第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会**. 横浜, 9 月, 2005.

本間圭一郎、高井和江、新國公司、布施一郎、松本雅則、和田英夫、相澤義: Rituximab が有効であった難治性血栓性血小板減少性紫斑病の一例. **第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会**. 横浜, 9 月, 2005.

松本雅則: EBM に基づいた血小板輸血. **第 10 回近畿輸血検査研修会**. 橿原, 9 月, 2005.

植村正人、辰巳晃子、松本雅則、石川昌利、松山友美、藤本正男、岩本顕聰、森敏俊雄、小寫秀之、吉治仁志、和中明夫、藤村吉博、福井博: ADAMTS13 は肝星細胞(伊藤細胞)で産生されている. **DDW-JAPAN 2005**. 神戸, 10 月, 2005.

宮田敏行: 病的血栓の遺伝的背景. モーニングレクチャー. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**. 福岡,

11 月, 2005.

小亀浩市: TTP pathogenesis, VWF multimers, and ADAMTS13 activity. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**. 福岡, 11 月, 2005.

植村正人、辰巳晃子、松本雅則、石川昌利、松山友美、藤本正男、福井博、藤村吉博: ADAMTS 13 は肝星細胞(伊東細胞)で産生されている. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**. 福岡, 11 月, 2005.

加藤誠司、松本雅則、日裏久英、藤村吉博: 新規 ADAMTS13 活性測定 ELISA の開発 - VWF の R834EQAPNLVY842 に特異的エピトープを有するモノクローナル抗体の産生と利用-. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**. 福岡, 11 月, 2005.

木村利奈、小久保喜弘、宮下光太郎、大坪亮一、長束一行、大槻俊輔、峰松一夫、成富博章、岡山明、友池仁暢、本田繁則、宮田敏行: 日本人におけるビタミン K サイクル関連遺伝子の多型とワルファリン投与量との関連. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**. 福岡, 11 月, 2005.

木村利奈、阪田敏幸、岡本章、小久保喜弘、岡山明、友池仁暢、本田繁則、宮田敏行: 一般人口におけるプ