

ADAMTS13 遺伝子のホモあるいは複合ヘテロ接合体として解釈することができる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Miyata T, Kokame K, Banno F: Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol*. 12(5) 384-389. 2005.
3. Anderson PJ, Kokame K, Sadler JE: Zinc and calcium ions cooperatively modulate ADAMTS13 activity. *J Biol Chem*. 281(2) 850-857. 2006.
4. 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.
5. 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.

6. Nogalska A, Engel WK, McFerrin J, Kokame K, Komano H, Askanas V: Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein (Herp) is up-regulated in sporadic inclusion-body myositis and in endoplasmic reticulum stress-induced cultured human muscle fibers. *J Neurochem*. In press.
7. 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.
8. 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.
9. 奥田智彦, 小亀浩市, 宮田敏行: ストレス応答遺伝子 NDRG1 の機能解析. *日本生化学会誌*. 77(7) 630-634. 2005.
10. 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.

11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
2. 学会発表
1. Nogalska A, McFerrin J, Engel WK, Kokame K, Komano H, Askanas V: HERP, a novel endoplasmic reticulum (ER) stress-induced protein, is increased in sporadic inclusion body myositis (s-IBM) muscle fibers. *57th American Academy of Neurology Annual Meeting*. Miami, USA. 2005.
 2. 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. 2005.
 3. Kokame K, Miyata T: Fluorogenic substrate for ADAMTS-13. *51st Annual SSC Meeting*. Sydney, Australia. 2005.
 4. Miyata T, Kokame K: Assays for ADAMTS13. *XXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. Sydney, Australia. 2005.
 5. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Generation and characterization of ADAMTS13-deficient mice. *XXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. Sydney, Australia. 2005.
 6. 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. 2005.
 7. 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. 2005.
 8. 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回日本血液学会総会*. 横浜. 2005.
 9. 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回日本血液学会総会*. 横浜. 2005.

10. 菊池唯史, 細川暢子, 永田和宏, 鈴木匡, 宮田敏行, 小亀浩市: 小胞体膜蛋白質 Herp は PNGase と結合し, 小胞体関連分解基質の脱糖鎖を促進する. **第 78 回日本生化学会大会**. 神戸. 2005.
11. 武富芳隆, 須永剛平, 村上誠, 田中智之, 中山真由子, 中村雅典, 荒田悟, 杉本幸彦, 小亀浩市, 宮田敏行, 工藤一郎: マスト細胞の成熟過程に伴って発現誘導される NDRG1 の機能解析. **第 78 回日本生化学会大会**. 神戸. 2005.
12. 小宮山豊, 吉賀正亨, 北澤康秀, 中谷寿男, 小亀浩市, 宮田敏行, 高橋伯夫: FRETS-VWF73 による ADAMTS13 活性測定と臨床検査—プレートおよび標準血漿—. **第 52 回日本臨床検査医学会総会**. 福岡. 2005.
13. Kokame K: TTP pathogenesis, VWF multimers, and ADAMTS13 activity. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**. 福岡. 2005.
14. 松本雅則, 石西綾美, 石指宏通, 秋山暢, 富山順治, 名取一彦, 倉石安庸, 今村豊, 井上信正, 小亀浩市, 宮田敏行, 藤村吉博: 妊娠経過中に診断された Upshaw-Schulman 症候群の 4 家系 7 症例. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**. 福岡. 2005.
15. Nogalska A, Engel WK, McFerrin J, Kokame K, Komano H, Askanas V: Herp mRNA and protein are increased in s-IBM and endoplasmic reticulum stress-induced cultured human muscle fibers. *Neuroscience* 2005. Washington, DC, USA. 2005.
16. 奥田智彦, 田原佐知子, 東智仁, 小亀浩市, 宮田敏行, 北徹, 柳田素子: ストレス誘導遺伝子 NDRG1 の発現パターンは腎障害により変化する. **第 28 回日本分子生物学会年会**. 福岡. 2005.
17. Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuraishi K, Imamura Y, Inoue N, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y: Upshaw-Schulman syndrome: a masqueraded thrombocytopenia during pregnancy. *The 2005 American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting*. Atlanta, USA. 2005.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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

分担研究報告書

血栓性血小板減少性紫斑病の責任遺伝子 *ADAMTS13* 欠損マウスの作製と解析

分担研究者 坂野史明 国立循環器病センター研究所 室員

研究要旨

血小板接着タンパク質フォンビルブランド因子（VWF）は、主に血管内皮細胞で合成され、超高分子量のマルチマーとして血流中へ放出される。マルチマーの分子量が大きいほど血小板凝集活性は強く、*ADAMTS13* により部分的に断片化されることで適度な活性が維持されている。*ADAMTS13* 活性が欠如し、血中に超高分子量 VWF マルチマーが残存すると、血小板が過剰凝集し、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）の発症につながる。本研究では、TTP モデル動物を得る目的で、*ADAMTS13* 欠損マウスを作製、解析した。得られた *ADAMTS13* 欠損マウスは正常に出生し、生殖能力も正常であった。また、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 TTP に特徴的な症状はなく、末梢血管に血栓の沈着もみられなかった。ヒト TTP 症例の臨床情報からも、発症に *ADAMTS13* 以外の要因が関与する可能性が示唆されており、今後、TTP の発症や重症度に関連する別要因の探索が必要である。

A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）は、血小板減少・溶血性貧血・発熱・動揺性精神神経症状・腎機能障害を徴候とする重篤な疾患である。患者

の血中には、超高分子量のフォンビルブランド因子（VWF）マルチマーが蓄積しており、これが血小板を過凝集させる。近年、VWF を切断してマルチマーの分子量を調節する酵素

ADAMTS13 が同定され、その活性の欠乏が TTP の原因となることが明らかにされた。本研究では、TTP モデル動物として、ADAMTS13 欠損マウスを作製し、表現型を解析した。

B. 研究方法

マウス ADAMTS13 遺伝子の触媒ドメインをコードするエキソン 3～6 をネオマイシン耐性遺伝子と置換するターゲティングベクターを構築し、これをマウス ES 細胞に導入後、サザンブロットにより相同組換え体を同定した。得られた組換え体 ES 細胞を胎胚期のマウス胚に顕微注入し、キメラマウスを作製した。このキメラマウスを野生型マウスと交配させることにより、ADAMTS13 欠損マウスを作製した。

ADAMTS13 欠損と TTP 発症との関連を明らかにするため、まず、ADAMTS13 欠損マウスの血球数、血液像、組織像、凝固時間、出血時間、アゴニスト惹起血小板凝集能、血漿 VWF マルチマーパターンを野生型マウスと比較した。さらに、平行板型フローチャンバーを用いて、ずり応力下におけるコラーゲン表面上での血小板血栓形成を経時観察し、*in vitro* での血小板凝集を詳細に解析した。また、コラーゲン静注による血栓誘発モデルを用いて、ADAMTS13 欠損マウスの *in vivo* での血栓傾向を野生型マウスと比較検

討した。

(倫理面への配慮)

実験は、国立循環器病センター研究所・実験動物委員会の承認を得て実施した。また、動物に与える苦痛を最小限にするよう配慮して進めた。

C. 研究結果

ADAMTS13 欠損マウスは正常に出生し、発育にも異常は認められなかった。また、雌雄とも生殖能力は正常であった。ADAMTS13 の主要な発現臓器である肝臓において、ADAMTS13 の mRNA は検出されず、血漿の VWF 切断活性も消失していた。先天性 ADAMTS13 欠損患者と同様に、マウスでも ADAMTS13 欠損により、血中に超高分子量 VWF マルチマーが残存した。しかし、ADAMTS13 欠損マウスの血小板数、血液像、組織像、凝固時間、出血時間、アゴニスト惹起血小板凝集能はいずれも正常で、予想された TTP 症状（血小板減少や溶血性貧血など）はみられなかった。

そこで、全血のずり応力下血小板血栓形成をフローチャンバーシステムを用いて観察した結果、ADAMTS13 欠損マウスでは野生型マウスに比べて血栓形成の亢進が認められた。また、コラーゲン投与による血栓誘発試験においても、ADAMTS13 欠損マウスでは野生型マウスと比較して、処置後の血小板

減少がより顕著であった。したがって、マウスにおいて ADAMTS13 の先天的欠損は、血中に超高分子量 VWF マルチマーの残存を引き起こし、易血栓傾向をもたらすが、それだけでは TTP 症状に結びつかないものと考えられた。

D. 考察

VWF 欠損マウスの表現型は、ヒト VWF 欠損症と比べて穏やかであることが報告されており、ヒトとマウスの止血機構において、ADAMTS13 や VWF への依存度に違いがあり、マウスでは ADAMTS13 を欠損しても病態につながる表現型が現れなかったのかもしれない。

しかし、ヒト TTP 患者においても、妊娠によってはじめて症状が顕在化する先天性 ADAMTS13 欠損症例や同じ ADAMTS13 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などが報告されており、TTP 発症には ADAMTS13 欠損に加えて別の要因も関与する可能性もある。ADAMTS13 が同定される以前には、酸化ストレスや内皮細胞上の受容体に対する抗体が TTP 発症に関与するという報告もあり、また、TTP と臨床症状が酷似する溶血性尿毒症症候群がペロ毒素や補体制御系の破綻に伴う内皮細胞障害により惹起されることが知られている。ADAMTS13 欠損マウスにコラーゲン上での血栓

形成能およびコラーゲン投与による血小板減少の亢進がみられたことを考慮すると、ADAMTS13 欠損による VWF の機能亢進と内皮細胞の機能障害が同時に起こることで、TTP が誘発されるのかもしれない。

E. 結論

ジーンターゲティングにより、ADAMTS13 欠損マウスを作製、解析した結果、マウスにおいて ADAMTS13 欠損は、潜在的な易血栓傾向をもたらすが、それだけでは TTP 発症には至らず、何らかの付加的要因が発症に関与すると推察された。ヒト TTP 患者においても ADAMTS13 欠損を発症の十分条件とする考えに合致しない症例の報告が増えてきており、TTP 発症を促進する要因の探索が必要と思われる。ADAMTS13 欠損マウスはその要因の探索に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyata T, Kokame K, Banno F: Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol*. 12(5) 384-389. 2005.
2. 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.

2. 学会発表

1. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Generation and characterization of ADAMTS13-deficient mice. The XX Congress of the International Society on Thrombosis & Haemostasis, Sydney Australia, August 6-12, 2005.

2. 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 回日本血液学会総会, 横浜, 2005 年 9 月 17-19 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

分担研究報告書

ADP 受容体 P2Y₁、P2Y₁₂ 遺伝子の多型解析

分担研究者 木村 利奈 国立循環器病センター研究所 室員

研究要旨

日本人を対象としてADP受容体であるP2Y₁およびP2Y₁₂遺伝子について多型検索を行ったところ、両遺伝子に複数の遺伝子多型を検出した。これらの遺伝子多型に関してさらに解析を加えることにより、遺伝子多型情報を用いた抗血小板薬の感受性に関する研究や動脈閉塞症の遺伝子背景に関する研究が可能になると考えられる。

A. 研究目的

抗血小板薬感受性の個人差に関する研究を可能にする遺伝子多型データを得ること、および心筋梗塞などの動脈閉塞症に対する遺伝子多型型の寄与を明らかにすることを目的として、ADP受容体であり抗血小板薬の作用点でもあるP2Y₁およびP2Y₁₂についての遺伝子多型解析を行った。

B. 研究方法

ADP受容体であるP2Y₁およびP2Y₁₂遺伝子についてダイレクトシーケンスを行い、遺伝子多型検索を行った。検索を行った領域は、両遺伝子のプロモーター領域および各エキソン（エキソン/イントロン境界領

域含む）。遺伝子検索の対象サンプルとして、P2Y₁₂遺伝子の解析については96検体、P2Y₁遺伝子の解析については163検体の血液由来ゲノムDNAを用いた。全て日本人の検体である。

検出した遺伝子多型のうちP2Y₁₂ 36T>Gについては、一般住民の3655検体を対象にTaqMan法による遺伝子型の決定を行った。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日）」を遵守して行った。全ての検体は、遺伝子解析を行うことに対して書面での同意を得た。

C. 研究結果

96人の脳梗塞患者を対象に行ったP2Y₁およびP2Y₁₂遺伝子の多型検索の結果、P2Y₁遺伝子には26の一塩基多型と1つの挿入多型が、P2Y₁₂遺伝子については9つの一塩基多型が検出された。これらの遺伝子多型のうち、マイナーアレル頻度が0.05を越えるものは、P2Y₁遺伝子で7多型、P2Y₁₂遺伝子では5多型であった。P2Y₁遺伝子の6多型とP2Y₁₂遺伝子の3多型がコーディング領域内に存在した。アミノ酸置換を伴う変異はP2Y₁ 101C>T(Ala34Val)のみであり、P2Y₁₂遺伝子には存在しなかった。

検出した遺伝子多型のうちP2Y₁₂ 36T>Gの遺伝子型決定を、一般住民3655検体を対象にTaqMan法で行った。この多型のマイナーアレル頻度を一般住民と脳梗塞患者の間で比較したところ、両者に有意な違いは認めなかった(一般住民でのマイナーアレル頻度=0.128、脳梗塞患者でのマイナーアレル頻度=0.145)。

D. 考察

今回の遺伝子多型検索によって検出されたP2Y₁およびP2Y₁₂遺伝子の多型には、データベースに登録されていない新規の多型も含まれていた。検出した遺伝子多型のうちP2Y₁₂ 36T>Gについて、出現頻度の比較を一般住民と脳梗塞患者の間で行ったが有意な違

いは検出されず、この多型と脳梗塞発症との関連は検出されなかった。P2Y₁₂ 36T>G以外の多型についても今後、解析を進める必要がある。

E. 結論

ADP受容体であるP2Y₁およびP2Y₁₂遺伝子の多型解析を行い、両遺伝子に複数の多型を検出した。今後、これらの遺伝子多型データや代謝酵素CYP3A4に関するデータ等をふまえて、抗血小板薬の感受性の個人差や動脈閉塞症の遺伝的背景に関する解析が可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T: Genetic Risk Factors for Deep Vein Thrombosis in Japanese, Importance of Protein S K196E Mutation. *Int J Hematol.*, in press.
 4. Kimura R, Iwamoto R, Mekada E: Direct evidence for the contribution of soluble form of HB-EGF in retinoic acid-induced epidermal hyperplasia. *Cell Struct. Funct.* 30(2) 35-42. 2005.
 5. Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, Hashimoto K: Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci.* 118(Pt 11) 2363-2370. 2005.
 6. 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.
 7. 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ーニングとワーファリン用量の最適化. Annual Review血液2006, 259-265. 2006.
2. 学会発表
 1. 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ーファリン投与量との関連」 日本血栓止血学会学術標準化委員会 (Scientific Standardization Committee)2006 シンポジウム、東京、平成 18 年 2 月
 2. 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, 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, 宮田敏行 「日本人の静脈血栓症の危険因子プロテイン S K196E 変異」 第 12 回関西血栓フォーラム、大阪、平成 18 年 1 月
 3. 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、平成17年11月

4. 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ロテイン S K196E 変異とプロテイン S 活性値との相関」第28回日本血栓止血学会学術集会、福岡、平成17年11月

5. 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回日本血液学会総会、横浜、平成17年9月

6. 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 g-carboxylation

system」第20回国際血栓止血学会、Sydney, Australia、平成17年8月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究報告書

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-

分担研究者 松本雅則 奈良県立医科大学輸血部 講師

研究要旨

奈良医大輸血部では、過去8年間に亘り全国の医療機関の依頼によって、血栓性微小血管障害症(TMA)643症例についてADAMTS13活性測定を行った。これらの中で、ADAMTS13活性が3%未満に著減する症例が205例と約1/3であったが、残りの2/3はADAMTS13では病態が説明できないことが明らかとなった。そこで、ADAMTS13以外の病因としてfactor H異常症をスクリーニングを行うため、新たなfactor H活性測定法の開発を目標とした。そのためにfactor Hの基質であるC3に対するモノクローナル抗体を作成し、現在までに10クローンを得た。今後、これらのC3の認識部位を確認し、factor H活性測定法に利用する予定である。

A. 研究目的

血栓性微小血管障害症(TMA)は、細血管障害性溶血性貧血、破壊性血小板減少、細血管内血小板血栓を3徴候とする疾患群である。我々は、過去8年間に全国の医療機関の依頼によって、TMA症例のADAMTS13活性測定を行い、TMA643例でのADAMTS13活性測定を終了した。これらの中で、ADAMTS13活性が3%未満に著減する

症例が205例と約1/3存在したが、残りの2/3はADAMTS13では病態が説明できないことが明らかとなった。これらの原因不明な症例の中には、補体の調節因子であるfactor Hの異常が含まれている可能性がある。Factor H異常症は海外では報告されているものの本邦では報告されていない。この原因として、簡便・鋭敏な活性測定法が無かったことによるものと思われる。そ

こで、まず簡便・鋭敏な factor H 活性測定法の開発を目的とした。

B. 研究方法

Factor H 活性測定法の開発のために、その基質である C3 に対するモノクローナル抗体の作成を行った。抗 C3 ポリクローナル抗体（福島県立医科大学藤田禎三先生より御供与）の IgG 分画を結合したカラムで、血漿 30ml より factor H を精製した。それを、Mono Q カラムで精製後、マウスに免疫した。常法に従い、脾臓を摘出し、骨髄腫細胞と融合させた。モノクローナル抗体産生の有無を確認するスクリーニングは、C3 をコーティングした ELISA で行った。

C. 研究結果

ELISA で 75 個のクローンで陽性が確認されたため、そのうち反応の強い 10 クローンを選択した。次に C3 を電気泳動したウエスタンブロット法を行い、10 クローン全部が C3 を認識することを確認した。今後、これらの 10 クローンについて、C3 における認識部位のエピトープマッピングを行う予定である。

（倫理面への配慮）

今のところ必要ないと考えているが、遺伝子解析を行う段階に備えて、TMA 患者における Factor H を含む遺伝子解析の許可を得ている。

D. 考察

TMA の病因として、ADAMTS13 が関与する症例は 1/3 に留まり、残り 2/3 が病因不明であることが明らかとなった。病因不明症例では、Factor H や CD46 などの補体調節因子、膜結合蛋白 CD46 などの関与が想定される。我々はまず、海外で報告例のある factor H について解析を行う予定である。しかし、factor H 活性を簡便・鋭敏に測定できる方法が存在せず、まず活性測定法の開発を目指し、その基質である C3 に対するモノクローナル抗体を作成している。このモノクローナル抗体の認識部位を利用して factor H の活性測定法を確立したいと考えている。

E. 結論

TMA の病態解明のため Factor H の活性測定法の開発を目指し、Factor H の基質である C3 に対するモノクローナル抗体を 10 クローン作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文原著

1. 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.
2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. Uemura M, Ishikawa M, Matsuyama T, Fujimoto M, Kojima H, Sakurai 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** (in press), 2005.

8. 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.
9. 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 Transplant** (in press) 2006.
10. 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.
11. 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.

日本語原著

1. 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.
2. 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、秋田穂東、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.
3. 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、豊原眞久、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ADAMTS13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.
4. 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.

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.

日本語総説

1. 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 pp122-123, 2005.
2. 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. pp1776-1782, 2005.
3. 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. pp216-227, 2005.
4. 松本雅則. von Willebrand 病. 疾患別最新処方 pp482-483, 2005.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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
9. 松本雅則. 技術講座 VWF 測定. Medical Technology 34: 57-64, 2006.

2. 学会発表

1. 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 SCC Meeting. SSC Sub-committee on VWF. (於 : Sydney Australia, 2005 年 8 月 7 日)
2. 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 & Haemostasis. (於: Sydney Australia, 2005年8月7日)
3. 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. (於: Sydney Australia, 2005年8月8日)
 4. Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y. Upshaw-Schulman syndrome: a masqueraded thrombocytopenic purpura (TTP). 47th ASH Annual Meeting (於 Atlanta Georgia, 2005年12月12日)
 5. Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Hiura H, Fujimura Y. Monoclonal antibodies to a VWF -A2 decapeptide with the C-terminal residue Try1605, generated by ADAMTS13 cleavage, develop a highly sensitive ELISA for its activity and characterize Upshaw-Schulman syndrome. 47th ASH Annual Meeting (於 Atlanta Georgia, 2005年12月12日)
 6. 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 (於: 大阪国際会議場、平成17年4月9日)
 7. 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(於: 大阪国際会議場、平成17年6月16日)
 8. 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 (於: 名古屋大学、平成17年8月19日)
 9. 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 (於: パシフィコ横浜、平成17年9月17日)

10. 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-Tyr 842 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(於：パシフィコ横浜、平成 17 年 9 月 19 日)
11. 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 (於：パシフィコ横浜、平成 17 年 9 月 17-19 日)
12. 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 (於：パシフィコ横浜、平成 17 年 9 月 17 日)
13. 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(於：パシフィコ横浜、平成 17 年 9 月 19 日)
14. 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 (於：橿原オークホテル、平成 17 年 9 月 11 日)
15. 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、小嶋秀之、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(於：神戸国際会議場、平成 17 年 10 月 5 日)
16. 松山友美、植村正人、石川昌利、松本雅則、石指宏道、森岡千恵、加藤誠司、櫻井伸也、浪崎正、藤本正男、小嶋秀之、石井禎暢、安辰一、瀧村力、藤村吉博、福井博. アルコール性肝炎における ADAMTS13 活性と血漿サイトカインの動態. 第 36 回日本肝臓学会西部会(於：鈴鹿サーキット フラワーガーデンホテル、平成 17 年 11 月 25 日)
17. 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 (於：福岡国際会議

場、平成 17 年 11 月 25 日)

18. 古小路英二、田中直子、山下篤、松本雅則、八木秀男、櫻井嘉彦、丸塚浩助、畠山金太、藤村吉博、山本隆一、浅田祐土郎. 胎盤由来 ecto-NTP Diphosphohydrolase 1 は ADP, ATP による障害動脈の収縮を抑制する. 第 28 回日本血栓止血学会学術集会 (於: 福岡国際会議場、平成 17 年 11 月 24 日)
19. 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 1 3 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
(於: 福岡国際会議場、平成 17 年 11 月 25 日)

20. 松本雅則、石西綾美、藤村吉博、石指宏道、秋山暢、富山順治、名取一彦、倉石安庸、今村豊、井上信正、小亀浩市、宮田敏行. 妊娠経過中に診断された Upshaw-Schulman 症候群の 4 家系 7 症例. (於: 福岡国際会議場、平成 17 年 11 月 25 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

分担研究報告書

血小板血栓形成の促進因子と抑制因子に関する研究

分担研究者 富山佳昭 大阪大学大学院医学系研究科 助手

研究要旨

血栓形成の促進因子および抑制因子を解析し、血栓形成のセンサー分子としてADP受容体P2Y₁₂、抑制因子としてSHPS-1、Semaphorin 3Aおよびアディポネクチンを同定した。

A. 研究目的

現代社会において、メタボリック症候群の増加および人口の高齢化により動脈硬化を基盤とした病的動脈血栓症による死因が本邦および世界における死因の約3割を占めるにいたっており、病的血栓制御法の開発は極めて急務の課題である。

血栓は、血栓形成に関してADPなどの促進因子およびNOなどの抑制因子のバランスにより制御されており、病的状態ではそのバランスが破綻していると考えられる。本研究では、病的動脈血栓形成を制御する遺伝子を同定するとともに、血栓形成に関し促進因子および抑制因子を解析し、予防および治療の新たな戦略を構築することを目的としている。

B. 研究方法

血小板活性化物質であるADPに関して、ADP不応例を同定しているが、その症例に関しADP受容体の異常の有無を解析し、血小板機能および血栓形成に関しての詳細な解析を行う。

血小板機能獲得の遺伝子動態を明らかにするため、無核である血小板に替わる新たな実験系として巨核球系細胞株CMKを用いた分化誘導系を用いて、未分化CMKと分化CMKの遺伝子プロファイルに関しcDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。

血小板機能抑制因子として、血管内皮や脂肪細胞由来の分子に注目し、その血小板および血栓形成に対する機能を解析する。