

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 18 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 19 (2007) 年 3 月

平成 18 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の個別化

[H17-ゲノム-一般-005]

3年計画の2年目

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

平成 19 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

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 予防と治療の個別化に関する研究	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……………21
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……………27
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……………30
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……………35
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……………39
6. ADAMTS13 ドメイン欠損マウスの作製と解析	坂野史明……………46
7. TMA の病態解析 -factor H の解析-	松本雅則……………50
8. 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	富山佳昭……………58

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	63
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り……………	67
-----------------------	----

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

近年、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進められている。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・治療法を目指すものである。

動脈血流下、即ち高ずり応力下での病的血小板凝集は、血漿タンパク質であるフォンビルブランド因子（VWF）依存性に起こる。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おり、これが血栓性血小板減少性紫斑病の病因である。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ことは周知である。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（インサイド→アウトシグナル）。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および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、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。

本研究は大きく 3 つ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、研究手法に制限があり、研究の大きな障害になっていた。そこで、血小板インテグリン α IIb β 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たので、 α IIb β 3 が活性化状態で発現していた。この細胞株にメチル化剤を用いてゲノムワイドな変異を導入し、不活性化型の α IIb β 3 を発現する細胞株を単離した。ついで、この細胞に cDNA を導入することにより、 α IIb β 3 を活性化する遺伝子を単離することに成功した。今後、この遺伝子の重要性を追究する。また、血栓形成のセンサー分子として同定した ADP 受容体 P2Y12 と、抑制因子として同定したセマフォリン 3A の作用機構を詳細に解析した。その結果、これまで明らかでなかった P2Y12 を介した ADP の持続的な刺激が、インテグリン α IIb β 3 の活性化の維持に必須である事が判明した。

「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 の研究を進めた。血管内皮細胞で合成された極めて重合度の高い超高分子量 VWF 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 であり、ADAMTS13 の活性の著減により、血栓性血小板減少性紫斑病が生じる。ADAMTS13 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、ADAMTS13 に結合し活性を抑制する血漿因子（プロテイン X とする）を同定した。

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、今年度は一般住民を対象に変異の集積を行い、6 個のミスセンス変異を同定し、現在これらの変異と活性の関連を解析している。また、Adamts13 ノックアウトマウスの作製に続き、ADAMTS13 の C 末端部分を欠失したコンジェニックマウスを作製し、生体内の機能を解析した。

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、血栓性微小血管障害症のうち、先天性が疑われる 18 例の factor H 抗原量を測定したところ、完全欠損者は見いだせなかった。先天性血栓性微小血管障害症の ADAMTS13 活性非著減例で生後 3 ヶ月から原因不明の血小板減少を示す患児の factor H の遺伝子解析を行い 6 つのミスセンス変異を同定したものの、これらは正常人にも同定される事から、その意義は定まらなかった。

「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、一般住民を対象に ADP とコラーゲンを惹起物質とした血小板凝集能を測定し、そのデータベース化を行った。一般住民を対象にした血小板凝集能のデータベースは、世界的にも類を見ない大変貴重な血栓関連データである。血小板凝集能に影響を与える遺伝子多型の研究を進めるため、本年度は昨年につき、血小板血栓に重要な役割を果たす 2 つの遺伝子のシーケンスを行い遺伝子多型を収集した。最終年度である次年度は、血小板凝集能と遺伝子多型の関連解析を行う。

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
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	講師

A. 研究目的

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。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」研究を進めるものである。

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タンパク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。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タンパク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2年次（平成18年度）の研究実施成果を述べる。

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

血小板は核を持たないので、分子生物学・細胞生物学で広く用いられるトランスフェクション等の手法を使うことができない。そこで、有核細胞に血小板インテグリンである α IIb β 3を発現させ、これをモデル系として使用することとした。

私達は、血小板インテグリンである α IIb β 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し、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にした。

インテグリン α IIb β 3の活性化に関わる因子の同定：ゲノムワイドアプローチ

血小板インテグリン α IIb β 3のシグナル伝達分子を同定するため、私達は2種のキメラインテグリン、 α IIb α 6B β 3（細胞内領域が α 6Bと β 3）および α IIb α 6B β 3 β 1（細胞内領域が α 6Bと β 1）、を恒常的に活性化型として発現する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 α IIb β 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、 α IIb β 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た（平成17年度の成果）。

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。そこで、これらの樹立株を用いて、ゲノム網羅的に変異を導入し、 α IIb α 6B β 3が不活性化されている細胞株を単離した。この細胞に、cDNAライブラリーをトランスフェクションし、活性化型 α IIb α 6B β 3を示す細胞をソーティングし、最終的に血小板インテグリンの活性化にかかわる因子をクローニングすることに成功した。

この研究は、本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、前田裕補助教授の指導をいただいた。

血小板血栓センサー因子および抑制因子：血小板インテグリンの活性化に関する従来のメカニズムの一新

上記のゲノムワイドアプローチに加え、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、抑制因子としてセマフォリン3Aの機能を詳細に解析した。研究の結果、P2Y12阻害剤により α IIb β 3が不活性化されることが判明した。即ち、 α IIb β 3の活性化はADP-P2Y12のシグナルにより制御されており、 α IIb β 3の持続的な活性化には血小

板からのADPが必要であることが明らかとなった。この血小板インテグリンの活性化のメカニズムは、これまでの概念を一新するものであり、大きな成果として2006年の米国血液学会でも注目された。また、血管内皮細胞から分泌されるセマフォリン3Aは、アゴニストの種類に関係なくAktやRap1の活性化を制御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結合タンパク質

ADAMTS13はVWFを切断するプロテアーゼであるが、何らかの血漿因子もしくは細胞表面に発現しているタンパク質で、その活性が制御されていると考えられる。本因子をゲノムワイドな手法を用いて単離する研究を進めており、本年度、その因子の同定に成功した。

ADAMTS13の結合タンパク質を同定するため、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、未知因子の同定を進めていた。ベイト領域として、ADAMTS13のCysリッチドメインとスペ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、189個の遺伝子（既知遺伝子165個、新規遺伝子24個）を得ていた。今年度は、これらの候補タンパク質との結合実験を行い、ADAMTS13結合タンパク質の同定に成功した。この結合タンパク質は、ADAMTS13活性を部分的に阻害した。

血栓性血小板減少性紫斑病にかかわると考えられる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。昨年度までに、私達は18家系の先天性患者の遺伝子解析を行い、血栓性血小板減少性紫斑病の遺伝的背景を明らかにしてきた。今年度は一般住民を対象に変異の集積を行い、6個のミスセンス変異を同定した。これらの変異が疾患と関連するかに関して、現在、変異と活性の関連を解析している。

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 に関する研究

これまでに血栓性微小血管障害症786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であり、残りの3分の2の症例は、ADAMTS13活性の非著減例であった。この非著減例のなかで、先天性血栓性微小血管障害症が23例存在した。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 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、これらの症例の factor H 抗原量を自家製のポリクローナル抗体を用いて測定したところ、抗原欠損例はない事を確認した。ついで、生後3ヶ月から原因不明の血小板減少を示す先天性血栓性微小血管障害症と考えられる患児の factor H の遺伝子解析を行い6つのミスセンス変異を同定した。しかし、これらは正常人にも同定される事から、その意義は定まらなかった。

血栓性血小板減少性紫斑病のモデル動物を用いた解析

前年度までに、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、欠損マウスは正常に出生し生殖能力も正常であることを明らかにした。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。本研究から、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。

今年度は、ADAMTS13のC末端領域

域に位置する2つのTsp1ドメインと2つのCUBドメインを欠いたADAMTS13を持つマウスの遺伝的背景を129/Sv系統にして、ヒトと同じドメイン構造を持つADAMTS13を持つ129/Sv系統と、129/Sv系統の遺伝的背景を持つAdamts13ノックアウトマウスで、生体内での血栓性の差異を詳細に検討した。その結果、ADAMTS13のC末端ドメインを欠損しても平常時は循環血中に存在するVWFマルチマーは、野生型と同等に維持され、血栓形成傾向も正常域に保たれることが明らかになった。しかし、C末端ドメインが欠損すると、ADAMTS13の機能が部分的に損なわれ、血栓性の刺激が加わった状況下に顕在化することが示された。

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。私達は、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し、血小板凝集能と遺伝子多型の関連を解析する研究を進めている。これまでに、696名の血小板凝集能を測定した。その結果、男女とも血小板数と総コレステロールが正相関であり、女性では血小板数と収縮期・拡張期血圧が正相関であった。また、男女ともコラーゲン凝集能とHDLコレステロール値との間に逆相関がみられた。一方、

血小板血栓にかかわる遺伝子として、トロンボキサンA2受容体とCalDAG-GEF1を取り上げ、全翻訳領域のDNAシーケンスを行い、多型の収集を進めた。前年度と本年度の研究により、6候補遺伝子の遺伝子変異の収集を完了した。次年度に行う凝集活性と遺伝子多型の関連解析の準備が整った。

D. 考察

本研究では、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」にかかわる研究を進めた。

本年は、3年計画の2年度であり、ゲノムワイドな手法を用いて、血小板インテグリンの活性化にかかわる新規因子を同定することに成功した。また、ゲノムワイドな手法を用いて、血栓性血小板減少性紫斑病の原因遺伝子であるADAMTS13の活性を抑制する血漿タンパク質の同定に成功した。ADAMTS13に幾つかの遺伝子変異を同定した。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を測定し、データベース化を進めた。血小板の膜受容体遺伝子や情報伝達因子の多型解析を進めた。

これらの2年間の進捗を基盤に、最終年度は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つに分けて進めた。ゲノム網羅的な解析を行い、血小板インテグリンの活性化にかかわる因子の同定に成功した。また、血栓性血小板減少性紫斑病の原因遺伝子であるADAMTS13に結合し活性を抑制する因子の同定に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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* 2006; 107(8):3161-3166.
2. 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* 2006; 107(4):1737-1738.
3. Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Tomoike H, Miyata T: Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res* 2006; Oct 16: Epub.
4. Kimura R, Sakata T, Kokubo Y, Okamoto A, Okayama A, Tomoike H, Miyata T: Plasma protein S activity correlates with protein S genotype but is not sensitive to identify K196E mutant carriers. *J Thromb Haemost* 2006; 4(9):2010-2013.
5. Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T: Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol* 2006; 83(3):217-223.
6. 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* 2006; 21(5):1289-1292.
7. Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Sakata T, Nagura J, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Sato K, Tomoike H, Miyata T: Polymorphisms in vitamin K-dependent γ -carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in general population. *Int J Hematol* 2006; 84(5):387-397.
 8. 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* 2007; 119(1):35-43.
 9. 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* 2006; 107(8):3161-3166.
 10. 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* 2006; 96(5):1491-1499.
 11. 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* 2006; 21(5):1289-1292.
 12. Hendriksen PJM, Dits NFJ, Kokame K, Veldhoven A, van Weerden WM, Bangma CH, Trapman J, Jenster G: Evolution of the androgen receptor pathway during progression of prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66(10):5012-5020.
 13. Abe Y, Sinozaki H, Takagi T, Minegishi T, Kokame K, Kangawa K, Uesaka M, Miyamoto K: Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-inducible genes in human amniotic epithelial cells. *Reprod Biol Endocr* 2006; 4(27):1-9.
 14. Liang G, Audas TE, Li Y, Cockram GP, Dean JD, Martyn AC, Kokame K, Lu R: Luman/CREB3 induces

- transcription of the endoplasmic reticulum stress response protein Herp through an ERSE-II element. *Mol Cell Biol* 2006; 26(21):7999-8010.
15. Date Y, Shimbara T, Koda S, Toshinai K, Ida T, Murakami N, Miyazato M, Kokame K, Ishizuka Y, Ishida Y, Kageyama H, Shioda S, Kangawa K, Nakazato M: Peripheral ghrelin transmits orexigenic signals through the noradrenergic pathway from the hindbrain to the hypothalamus. *Cell Metabolism* 2006;4(4):323- 331.
 16. Shinozaki S, Chiba T, Kokame K, Miyata T, Ai M, Kawakami A, Kaneko E, Yoshida M, Shimokado K: Site-specific effect of estradiol on gene expression in the adipose tissue of ob/ob mice. *Horm Metab Res*; In press.
 17. Miyata T, Kokame K, Banno F, Shin Y, Akiyama M: ADAMTS13 assays and ADAMTS13-deficient mouse. *Curr Opin Hematol*; In press.
 18. 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* 2006; 12(5):859-869.
 19. 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* 2006; 46(8):1444-1452.
 20. Sato T, Hanaoka R, Ohshima M, Miwa Y, Okazaki Y, Yajima N, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Inokuma S: Analyses of ADAMTS13 activity and its inhibitor in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura secondary to connective tissue diseases: Observations in a single hospital. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24(4):454-455.
 21. Morishita T, Matsumoto M, Honoki K, Yoshida A, Takakura Y, Fujimura Y: Successful Treatment of Primitive Neuroectodermal Tumor-associated Microangiopathy with Multiple Bone Metastases. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37(1):66-69.
 22. Kobayashi T, Wad H, Kamikura Y, Matsumoto T, Mori Y, Kaneko T, Nobori T, Matsumoto M, Fujimura Y, Shiku H: Decreased ADAMTS13 activity in plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* 2007; 119(4): 447-452.
 23. Ito S, Okuyama K, Nakamura T, Tetanishi JI, Saito K, Matsumoto M,

- Fujimura Y, Aihara Y, Yokota S: Intravenous gamma globulin for thrombotic microangiopathy of unknown etiology. *Pediatr Nephrol* 2007; 22(2): 301-305.
24. Kitano K, Gibo Y, Kamijo A, Furuta K, Oguchi S, Joshita S, Takahashi Y, Ishida F, Matsumoto M, Uemura M, Fujimura Y: Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with pegylated-interferon alpha-2a by an ADAMTS13 inhibitor in a patient with chronic hepatitis C. *Haematologica* 2007; in press
25. Matsuyama T, Uemura M, Ishikawa M, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Morioka C, Fujimoto M, Kojima H, Yoshiji H, Fujimura Y, Fukui H: Increased von Willebrand factor over decreased ADAMTS13 activity may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; in press.
26. Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, Soejima K, Nakagaki T, Fujimura Y: Quantitative western blot analysis of plasma ADAMTS13 antigen in patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb Res* 2007; in press.
27. 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* 2006; 26(1):224-230.
28. Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, Kato H, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: Critical role of ADP interaction with P2Y₁₂ receptor in the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation: association with Rap1B activation. *J Thromb Haemost* 2006; 4(6):1379-1387.
29. 安部由美子、小亀浩市、寒川賢治、宮本薫: ダイオキシシンにより羊膜上皮細胞で誘導される遺伝子の DNA マイクロアレイと Quantitative real-Time PCR による探索. *臨床検査* 2006; 50(1):107-112.
30. 松本雅則、松山友美、石指宏通、植村正人、秋山暢、富山順治、名取一彦、倉石安庸、今村豊、井上信正、日笠聡、清家雅子、小塚輝彦、原雅道、小亀浩市、宮田敏行、藤村吉博: Upshaw-Schulman 症候群: 妊娠時の仮面を被った血小板減少症. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* 2006; 15(2):30-40.
31. 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* 2006; 78(6):528-532.
32. 小亀浩市: ADAMTS-13 の測定. *International Review of Thrombosis* 2006; 1(4):266-270.
33. 坂野史明、小亀浩市: ADAMTS13 欠損マウスと血栓性血小板減少性紫斑病. *血栓と循環* 2006; 14(4):258-261.
34. 坂野麻里子、坂野史明、宮田敏行: ビタミン K 含有食品とワーファリン. *日本血栓止血学会誌* 2006; 17:83-87.
35. 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. *生化学* 2006; 78:528-532.
36. 坂野史明: VWF, ADAMTS13 と血栓性血小板減少性紫斑病. *血液・腫瘍科* 2006; 53: 203-209.
37. 坂野史明、小亀浩市: ADAMTS13 欠損マウスと血栓性血小板減少性紫斑病. *血栓と循環* 2006; 14:258-261.
38. 坂野史明: ADAMTS13 の欠損は血栓性血小板減少性紫斑病の十分条件か?: モデルマウスからの知見. *日本血栓止血学会誌* In press.
39. 松山友美、植村正人、石川昌利、森岡千恵、藤本正男、櫻井伸也、小嶋秀之、吉治仁志、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血漿 ADAMTS13 活性低下の機序—サイトカインならびにインヒビターの面からの検討—. *アルコールと医学生物学* 2006; 26: 100-107.
40. 洪鉉寿、青山泰孝、山村亮介、太田忠信、麥谷安津子、山根孝久、日野雅之、松本雅則、藤村吉博: Rituximab 投与が奏効し、長期寛解を維持している血漿交換抵抗性重症血栓性血小板減少性紫斑病. *臨床血液* 2006; 47: 1528-1532.
41. 金子仁臣、松本雅則、岡本浩平、蝶名林和久、菱沢方勝、渡邊光正、藤村吉博、通堂満: Rituximab と vincristine 併用が奏効した難治性血栓性血小板減少性紫斑病. *臨床血液* 2007; 印刷中.
42. 松本雅則: 技術講座 VWF 測定. *Medical Technology* 2006; 34:57-64.
43. 松本雅則、石指宏通、八木秀男、藤村吉博: ADAMTS13 解析による TTP/HUS の診断. *奈良医学雑誌* 2006; 57:1-10.
44. 松本雅則、松山友美、石指宏通、植村正人、秋山 暢、富山順治、名取一彦、倉石安庸、今村 豊、井上信正、日笠 聡、清家雅子、

- 小塚輝彦、原雅道、小亀浩市、宮田敏行、藤村吉博：Upshaw-Schulman 症候群：妊娠時の仮面を被った血小板減少症。**日本産婦人科・新生児血液学会誌** 2006; 15: 30-40.
45. 松本雅則：TTP の診断と治療の進歩。**日本血栓止血学会誌** 2006; 17 : 393-401.
46. 八木秀男、伊藤武文、児山紀子、松本雅則、木村弘、椿和央、藤村吉博：ヘパリン起因性血小板減少症の病態と診断、治療。**血液・腫瘍科** 2006; 53:451-458.
47. 富山佳昭：インテグリン阻害剤。**Surgery Frontier** 13(2):60-63, 2006.
48. 富山佳昭：アスピリンの pleiotropic 効果。**治療学** 2006; 40(3):269-272.
49. 富山佳昭、加藤 恒、山本順一郎：アディポネクチン欠損マウスを用いた血小板血栓の解析。**血栓と循環** 2006; 14(3):184-188.
50. 富山佳昭：インテグリンと病態。**実験医学増刊** 2006; 24(13):237-243.
51. 富山佳昭、船橋 徹：アディポサイトカインと血栓症。**血栓と循環** 2006; 14(4):286-290.
- 学会発表**
1. 松本雅則：ADAMTS13 による TMA の病態解析、第 60 回兵庫血栓・止血研究会 特別講演、平成 18 年 4 月 22 日、神戸市
 2. 松本雅則、藤村吉博：膠原病における TMA、第 50 回 (中) 日本リウマチ学会総会 第 15 回国際リウマチシンポジウム、平成 18 年 4 月 23 日、長崎市
 3. 松本雅則：原病 TMA における ADAMTS13 の病態解析、第 3 回膠原病倶楽部 特別講演、平成 18 年 5 月 24 日、名古屋市
 4. 宮田敏行：血栓症の遺伝子素因、ビタミン K サイクル遺伝子多型とワルファリン療法の今後の動向、第 9 回ビタミン K フォーラム、第 16 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会、平成 18 年 6 月 9 日、甲府市
 5. 松本雅則、藤村吉博：ADAMTS13 研究の展望：多彩表現型 TMA の病態解析、第 54 回日本輸血学会シンポジウム、平成 18 年 6 月 9 日、大阪市
 6. 伊藤晋、竹嶋俊介、山本茂一、千葉桂子、林司、川瀬雅子、和田光雄、加藤誠司、日裏久英、松本雅則、藤村吉博：ADAMTS13 活性測定試薬の開発、第 54 回日本輸血学会、平成 18 年 6 月 9 日、大阪

市

7. Kokame K, Kikuchi T, Okuda T, Yanamoto H, Miyamoto S, Miyata T: Enhanced susceptibility to glucose load and cerebral ischemia in mice lacking ER-stress protein Herp. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
8. Kikuchi T, Hosokawa N, Nagata K, Suzuki T, Miyata T, Kokame K: Herp accelerates the endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins by promoting the retrotranslocation and deglycosylation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
9. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: ADAMTS13-deficient mice have potential risks for thrombosis but do not spontaneously develop thrombotic thrombocytopenic purpura. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
10. Taketomi Y, Sunaga K, Tanaka S, Nakamura M, Okuda T, Arata S, Sugimoto Y, Kokame K, Miyata T, Murakami M, Kudo I: Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in Ndrp1-deficient mice. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
11. Matsumoto M, Kato S, Hiura H, Fujimura Y, Japanese experience of novel ADAMTS13 activity-ELISA on patients with TMA and liver transplantation, 52nd Annual SSC meeting, June 28, 2006, Oslo, Norway.
12. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: ADAMTS13-deficient mice have potential risks for thrombosis but do not spontaneously develop thrombotic thrombocytopenic purpura, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
13. Kokame K: ADAMTS13 activities and genetic polymorphisms in the Japanese general population. 52nd Annual Scientific and Standardization Committee Meeting. June 28-July 1, 2006, Oslo, Norway.
14. Miyata T: ADAMTS13: Deficiency, assay method, and mouse model,

- Lecture at University of Michigan,
July 7, 2006, Ann Arbor, USA.
15. Miyata T: ADAMTS13 and its related issues, Invited lecture, Gordon Research Conference Hemostasis, July 11, 2006, Colby College, Waterville, ME, USA.
 16. 富山佳昭、加藤 恒、柏木浩和、白鹿正通、田所誠司、釜江 剛、秋山正夫、宮田茂樹、本田繁則、山本順一郎、倉田義之、船橋徹、下村伊一郎、金倉 讓: アディポネクチンの抗血栓作用、第43回日本臨床分子医学会学術集会、平成18年7月20日、札幌市
 17. Koyama N, Suzuki T, Yamauchi M, Makinodan K, Tamaki S, Fukuoka A, Tomoda K, Yoshikawa M, Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Kimura H: Unusually large von Willebrand factor multimers might be involved in cardiovascular events in patients with obstructive sleep apnea syndrome, European Respiratory Society Annual Congress 2006, September 2, 2006, Munich, Germany.
 18. Marutani T, Kokame K, Michikawa M, Komano H: Herp is involved in the regulation of presenilin complex formation. 第49回日本神経化学学会大会. 平成18年9月14—16日、名古屋市
 19. 松本雅則: ADAMTS13 による TMA の病態解析、第3回倉敷血液カンファレンス 特別講演、平成18年9月15日、倉敷市
 20. 松本雅則: ADAMTS13 による TMA の病態解析、第44回東北血栓・止血研究会 特別講演、平成18年9月16日、仙台市
 21. Tomiyama Y: Positive and negative regulation of GPIIb/IIIa function, Symposium. The 4th Asian-Pacific Congress on Thrombosis and Hemostasis, September 21-22, 2006, Suzhou, China.
 22. Miyata T: Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese, Symposium 2: Thrombophilia and some related factors. Invited lecture. The 4th Asian-Pacific Congress on Thrombosis Hemostasis, September 21 - 23, 2006, Suzhou, China.
 23. 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. (Poster presentation) The 4th Asian-Pacific Congress on

- Thrombosis Hemostasis, September 21 - 23, 2006, Suzhou, China.
24. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: ADAMTS13 deficiency generates prothrombotic state but is not sufficient to evoke thrombotic thrombocytopenic purpura in mice. The 4th Asian-Pacific Congress on Thrombosis Hemostasis, September 21 - 23, 2006, Suzhou, China.
 25. Miyata T: Genetic risk factors for thrombosis in Japanese, The Second Sweden-NCVC Symposium on Cardiovascular Disease and Metabolic Syndrome, September 26, 2006, Stockholm, Sweden.
 26. 松本雅則: Update in post-transplantation TMA and its future prospect、第68回日本血液学会第48回日本臨床血液学会合同総会 シンポジウム、平成18年10月6日、福岡市
 27. 加藤誠司、今野武津子、田中亮二郎、日裏久英、松本雅則、石西綾美、藤村吉博: 高感度 ADAMTS13 活性 ELISA で測定した同活性血中半減期、第68回日本血液学会第48回日本臨床血液学会合同総会、平成18年10月6日、福岡市
 28. 志田泰明、杉本充彦、水野智寛、濱田匡章、西尾健治、加藤誠司、松本雅則、藤村吉博: 血流下での ADAMTS13 活性測定法の確立、第68回日本血液学会第48回日本臨床血液学会合同総会、平成18年10月6日、福岡市
 29. 松山友美、松本雅則、猪熊茂子、加藤誠司、石指宏通、石西綾美、植村正人、藤村吉博: 膠原病に合併した血栓性微少血管障害症 (TMA)の ADAMTS13 解析、第68回日本血液学会第48回日本臨床血液学会合同総会、平成18年10月6日、福岡市
 30. 上條敦、北野嘉良、城下智、宜保行雄、石田文宏、植村正人、松本雅則、藤村吉博: ADAMTS13 inhibitor 出現により発症した Peginterferon 関連血栓性血小板減少性紫斑病、第68回日本血液学会第48回日本臨床血液学会合同総会、平成18年10月6日、福岡市
 31. 岩重淳司、葛城武文、東丈裕、毛利文彦、森本浩章、松浦愛、田中綾、溝部高光、塚田順一、田中良哉、松本雅則、加藤誠司、藤村吉博: リツキシマブ抵抗性を示した重症血栓性血小板減少性紫斑病、第68回日本血液学会第48回日本臨床血液学会合同総会、平成18年10月6日、福岡市
 32. 小林稔彦、松本剛史、森美貴、兼児敏浩、和田英夫、登勉、珠玖洋、