

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：

ヒトゲノムテーラーメイド研究

**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19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20(2008)年3月

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究)

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3年目

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

平成 20 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

小久保喜弘 国立循環器病センター

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 大阪大学医学部附属病院 輸血部

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……………24
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……………35
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 小久保喜弘……………37
岡 山 明
4. インテグリン活性化に関わるシグナル伝達分子に関する研究 本田 繁則……………43
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……………46
6. In vivo 血栓モデルを用いた ADAMTS13 変異マウスの
表現型解析 坂野 史明……………52
7. ADAMTS13 非依存 TMA 症例における factor H 遺伝子解析 松本 雅則……………55
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……………65

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 70

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 74

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(創薬基盤推進研究事業)
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、ヒトゲノム解析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、タンパク質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。

高ずり応力下の動脈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する(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研究し、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。

本研究は次の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 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ を発現する有核細胞を作製した。この細胞株の $\alpha_{IIb}\beta_3$ は活性化状態であったので、これ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 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ を活性化する遺伝子として Integrin-linked kinase: ILKを単離・同定した。こうして同定したシグナル分子であるILKの解析を行い、本分子がインテグリン活性化に関与することを明らかにした。また、ADP受容体P2Y₁₂に

関してインテグリン $\alpha_{11b}\beta_3$ の機能制御機構を詳細に解析した。その結果、 $\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化にはADP受容体であるP2Y₁₂は必要ではなく、P2Y₁₂欠損血小板では瞬時に $\alpha_{11b}\beta_3$ が活性化するが、P2Y₁₂欠損によりその活性化が維持できないこと、巨核球系細胞株CMKにおいて刺激後数分間は $\alpha_{11b}\beta_3$ が活性化するが、その後急速に非活性化状態に変化すること、P2Y₁₂を遺伝子導入すると $\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化時間が延長する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活性の著減により、微小血管内に血小板血栓を生じる血栓性血小板減少性紫斑病が起こる。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し、Lys-プラスミノゲンを同定した。

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た。私達はADAMTS13活性の簡便な測定法を開発してきたので、これを用いて一般住民のADAMTS13活性を測定した。この活性とミスセンス変異の関連を調べたところ、P475S変異はヘテロ接合体で約15%の活性低下が見られた。また、Q448E変異はヘテロで約6%の活性の上昇が見られた。また、*Adamts13*ノックアウトマウスの作製に続き、ADAMTS13のC末端欠損マウスを作製し、生体顕微鏡観察法により生体内の機能を解析した結果、ADAMTS13完全欠損が強い易血栓形成傾向をもたらすこと、C末端ドメインは血栓誘発状況下にADAMTS13が十分な活性を発揮する上で重要であることを明らかにした。

奈良県立医科大学輸血部では、全国の医療機関から783例の血栓性微小血管障害症(TMA)患者を集積し、これらの1/3の症例でADAMTS13活性が著減していることを明らかにした。残りの2/3の症例ではADAMTS13活性が著減しておらず病因が不明のため、海外でTMAの病因として報告されているfactor Hについて検討を行い、家族性TMA 1家系において同遺伝子解析を行った。

「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、都市部一般住民(男性661名、女性で907名)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。この測定結果から、血小板数と血小板凝集能が正常範囲内であっても、正常高値では動脈硬化を促進させることが示唆された。また、血小板凝集能検査ではADP凝集能と脂質値との関連はみられず、コラー

ゲン凝集能のみ LDL コレステロール、LDL/HDL 比で関連がみられた。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、本年度は血栓形成に重要な役割を果たすアラキドン酸 5-リポキシゲナーゼを取り上げ、全翻訳領域の DNA シークエンスを行い、多型の収集を行った。

分担研究者

森崎隆幸	国立循環器病センター研究所	部長
小久保喜弘	国立循環器病センター	医長
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	准教授
富山佳昭	大阪大学医学部附属病院輸血部	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・治療法を目指すものである。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3年次(平成 19 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: 発現クローニング法を用いた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、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 $\alpha_{11b}\beta_3$ を発現させ、この細胞をモデル系として使用することとした。私達は、 $\alpha_{11b}\beta_3$ を発現する細胞株を作製し、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った。

インテグリン $\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化に関わる因子の同定: ゲノムワイドアプローチ

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、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、血小板インテグリン $\alpha_{11b}\beta_3$ の 2 種のキメラインテグリン、 $\alpha_{11b}\alpha_{6B}\beta_3$ (細胞内領域が α_{6B} と β_3)および $\alpha_{11b}\alpha_{6B}\beta_3\beta_1$ (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 細胞を樹立し、これらにゲノム網羅的に変異を導入して不活性化型

$\alpha_{11b}\alpha_{6B}\beta_3$ を発現す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 $\alpha_{11b}\alpha_{6B}\beta_3$ 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として Integrin-linked kinase (ILK) をクローニングした。

$\alpha_{11b}\beta_3$ 活性化における ILK の役割を明らかにするために、発現クローニングに用いたミュータント細胞の ILK mRNA の全翻訳領域を RT-PCR で増幅し、シーケンス解析を行なったところ、ILK キナーゼドメイン内にヘテロ接合型で Arg317Stop および Trp383Stop の2種類のナンセンス変異を確認した。変異が存在する ILK ゲノム遺伝子の領域を PCR で増幅し、ベクターにサブクローニングした後、シーケンスを解析したところ、両変異は異なる対立遺伝子上に存在しており、複合ヘテロ接合型であることが判明した。ミュータント細胞内の ILK タンパク質の発現はイムノプロット法により解析した。2種類の抗 ILK 抗体を使用した。いずれも細胞内 ILK を検出せず、ILK タンパク質は発現していないことが判明した。次に、化学変異原(EMS)に暴露していない、活性化状態のインテグリンを発現する親株細胞を用いて ILK mRNA のノックダウンを行った。ILK mRNA のノックダウンは細胞内 ILK タンパク質の発現を減じるとともにインテグリン活性化状態を抑制した。以上の研究から、ILK が $\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化に関与することを明らかにした。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、前田裕輔准教授の指導をいただいた。

血小板血栓センサー因子：血小板インテグリン活性化維持にかかわる P2Y₁₂

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た。本年度は、新たにリガンドカイネティックアッセイを開発し、 $\alpha_{11b}\beta_3$ のダイナミックな変化を解析した。その結果、P2Y₁₂ 欠損血小板の刺激直後のリガンド結合速度は正常コントロールと差を認めなかった。30 秒後では、正常コントロールでは結合速度が増加したが、P2Y₁₂ 欠損血小板ではリガンド結合速度が低下し、150 秒後ではその速度は著明に減少した。さらに培養巨核球のみならず巨核系細胞株 CMK においても生理的な PAR1 刺激において 3~5 分をピークとして一過性に $\alpha_{11b}\beta_3$ が活性化することを明らかにした。この活性化は P2Y₁₂ 阻害剤 ARC69931MX によっても抑制されなかった。この CMK 細胞に P2Y₁₂ を発現させると、 $\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化の持続時間が延長した。以上より、P2Y₁₂ が $\alpha_{11b}\beta_3$ 活性化の維持に必須の分子であることが明らかになった。

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 結合タンパク質としての Lys-プラスミノーゲン

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タンパク質で、その局在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、Lys-プラスミノーゲンの同定に成功した。

ADAMTS13 の結合タンパク質を同定するため、酵母ツーハイブリッド法を行い、未知因子の同定を進めた。その結果、ADAMTS13 と相互作用する候補蛋白質としてプラスミノーゲンを同定していた。プラスミノーゲンは Glu-型と Lys-型が存在する。そこで、どちらのプラスミノーゲンが ADAMTS13 に結合するかを調べた。固相化した両プラスミノーゲンは ADAMTS13 が結合した。一方、溶液中では ADAMTS13 は Lys-プラスミノーゲンにのみ結合し、Glu-プラスミノーゲンには結合しなかった。固相化した場合、それに伴い Glu-プラスミノーゲンは構造変化を起こし ADAMTS13 と結合すると考えられた。また、Lys-プラスミノーゲンの結合は ADAMTS13 活性に影響を与えなかった。

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)に関わると考えられる遺伝子変異に関する研究

TTP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 21 家系の先天性TTP患者の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、TTPの遺伝的背景を明らかにしてきた。今年度は一般住民に見られる ミスセンス多型 (T339R、Q448E、P475S、S903L、G1181R)を判別するためのプローブを作製し、一般住民 3,600 人の末梢血液から調製されたゲノム DNA を鋳型にしたタックマン解析を行った。その結果、それぞれのアレル頻度は、T339R: 2.7%、Q448E: 19.2%、P475S: 5.0%、S903L: 4.8%、G1181R: 2.2%と算出された。いずれも Hardy-Weinberg 分布との有意差は見られなかった。血漿 ADAMTS13 活性との関連を分析した結果、P475S 保持者では活性が低下していること(ヘテロ接合体で約 15%の低下)、Q448E 保持者では若干上昇していること(ヘテロ接合体で約 6%の上昇)がわかった。これら以外のミスセンス多型では、ADAMTS13 活性との有意な関連は見られなかった。

血栓性微小血管障害症(TMA)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 TMA 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。このうちの、家族性 TMA1家系の factor H 遺伝子解析を行った。症例は 1 才男児。生後 3 ヶ月より血小板減少を指摘され、母、母方祖父に血小板減少の既往があるため、先天性疾患を疑われ精査を受けたが、原因不明のため奈良県立医科大学輸血部へ精査を依頼された。factor H 抗原量は、独自に作成したポリクローナル抗体を用いたロケット電気泳動にて、ADAMTS13 活性は当ラボで開発した ELISA 法にて測定した。factor H 遺伝子解析は、Marie-Agnes Drafon-Dureyら(J Am Soc Nephrol. 15: 787-795, 2004)の方法を用いた。factor H 抗原量および ADAMTS13 活性は、患者本人、母、母方祖父においても明らかな低下は認めなかった。factor H 遺伝子解析の結果より、患者本人のアミノ酸置換を伴う変異は V62I, H402Y, R493T, V837I の 4 ヶ所であった。V62I と H402Y は、Disease risk polymorphism と海外から報告されている。R493T は、海外からは Non-Disease causing polymorphism と報告され、V837L は未報告の変異であった。これらの 4 つの変異は、健常人でも認められ、日本人において多型であることを確認した。

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)のモデル動物を用いた解析

前年度までに、TTP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TTPを示さないと考えられた。本研究から、TTP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。

本年度は、同一遺伝的背景をもつ全長型 ADAMTS13 発現マウス、C末端欠損型 ADAMTS13 発現マウス、ADAMTS13 完全欠損マウスに、蛍光ラベルした血小板を静注後、ヒスタミン活性化血管内皮細胞上への血小板接着および塩化鉄血管障害部位での血栓形成を生体顕微鏡にて経時観察し、群間の血栓傾向の差違を比較検討した。ADAMTS13 完全欠損マウスでは、活性化内皮細胞上への血小板接着亢進、血管障害部位での血栓初発時間および血管閉塞時間の短縮が顕著に認められ、強い易血栓傾向にあることが示唆された。C末端欠損マウスでは、活性化内皮細胞への血小板接着、血管障害部位での血栓初発時間は正常であったが、血管閉塞時間の短縮がみられた。C末端ドメイン欠損型 ADAMTS13 では血栓形成惹起状況下に、VWF を効率よく切断する機能が、全長型 ADAMTS13 に比べて低下していると考えられた。

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

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た。40歳～69歳の同意された受診者(男性 661名、女性 907名)を対象とし、血小板凝集は、1.7 mg/ml コラーゲンと 1.7 mM ADP を用いて測定した。その結果、男女とも血小板数の一番少ない群を基準に、一番多い群で総コレステロールが有意に高く、女性では血小板数の一番少ない群を基準にして、一番多い群でHDLコレステロール値が低く、LDL コレステロール値が高く、LDL/HDL コレステロール比が有意に高い結果であった。ADP 凝集能では有意なものが男女ともにみられなかった。コラーゲン凝集能の一番低い群を基準に、一番高い群でHDLコレステロール値が有意に低く、女性では、コラーゲン凝集能の一番低い群を基準に、一番高い群で総コレステロール値、LDL コレステロール値、LDL/HDL コレステロール比が高い結果となった。一方、血栓にかかわる遺伝子として、アラキドン酸5-リポキシゲナーゼ(ALOX5)を取り上げ、全翻訳領域の DNA シークエンスを行い、多型の収集を進めた。

D. 考察

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。以下に、各パートの考察をまとめた。

1) ILKがインテグリンの活性化に関与していることが明らかとなった。今後、巨核球系細胞を用いた遺伝子ノックダウンあるいはノックアウトマウスの作製により血小板および生体内血栓止血系におけるILKの役割を明らかにする必要がある。

2) ADP-P2Y₁₂系は $\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化を維持するのに必須の分子であることよりADP-P2Y₁₂系は血栓の大きさを規定するセンサー分子として作用すると考えられた。

3) ADAMTS13はLys-プラスミノゲンに結合するので、プラスミノゲンを介して血管内皮細胞に局在する可能性が考えられた。

4) 日本人のADAMTS13遺伝子ミスマッチ多型は6個であり、ADAMTS13活性との比較から、いずれもTTP発症と関連しないと考えられた。

5) 患者本人でfactor Hに4つのミスマッチ変異を認めたが、この変異に他の因子が加わりTMAを発症することが予想された。

6) ADAMTS13完全欠損は血栓形成亢進状態をもたらす、血管障害性の刺激が重なった場合に、病的血栓形成が惹起されると考えられた。また、C末端欠損型ADAMTS13では生体内でのVWF切断活性が部分的に損なわれていると考えられた。

7) コラーゲン惹起血小板凝集能とLDL/HDL比との正相関が認められ、服薬しない対象者でも、同様の結果が見られた。

E. 結論

血小板活性化のネットワーク研究を、1)血小板凝集の細胞内ネットワーク、2)血小板凝集にかかわる細胞外ネットワーク、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、に分けて進め、次の結論を得た。

1) ILKがインテグリンの活性化に関与することを明らかにした。

2) P2Y₁₂は $\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化維持に必須の分子であり、この作用を介して血栓形成のセンサー分子として機能していることを明らかにした。

3) Lys-プラスミノゲンはADAMTS13に特異的に結合するが、ADAMTS13活性には影響しないことを明らかにした。

4) 日本人一般住民のADAMTS13遺伝子多型が明らかになったことにより、先天性患者の遺伝子解析結果の解釈が従来より正確になった。

5) TMAの病因としてfactor Hの関与は明確ではなかった。

6) ADAMTS13完全欠損は強い易血栓傾向をもたらすこと、C末端ドメイン欠損は血栓誘発条件下での活性低下につながることを見いだした。

7) 血小板数とコラーゲン惹起血小板凝集能が正常高値で動脈硬化を促進させる可能性があることが都市部一般住民を対象とした研究で示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表
論文発表

1. 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.* 120(2) 181-186. 2007
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.* 119(1) 35-43. 2007
3. Yin T, Miyata T: Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 - rationale and perspectives. *Thromb Res.* 120(1) 1-10. 2007
4. Kamide K, Kokubo Y, Yang J, Matayoshi T, Inamoto N, Takiuchi S, Horio T, Miwa Y, Yoshii M, Tomoike H, Tanaka C, Banno M, Okuda T, Kawano Y, Miyata T: Association of genetic polymorphisms of ACADSB and COMT with human hypertension. *J Hypertens.* 25(1) 103-110. 2007
5. Miyake Y, Kimura R, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Yamamura T, Miyata T: Genetic variants in PCSK9 in the Japanese population: Rare genetic variants in PCSK9 might collectively contribute to plasma LDL cholesterol levels in the general population. *Atherosclerosis.* 196(1) 29-36. 2007
6. 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.* 39(3) 192-196. 2007
7. Miyata T, Kokame K, Banno F, Shin Y, Akiyama M: ADAMTS13 assays and ADAMTS13-deficient mice. *Curr Opin Hematol.* 14(3) 277-283. 2007
8. Banno M, Hanada H, Kamide K, Kokubo Y, Kada A, Yang J, Tanaka C, Takiuchi S, Horio T, Matayoshi T, Yasuda H, Nagura J, Tomoike H, Kawano Y, Miyata T: Association of genetic polymorphisms of endothelin-converting enzyme-1 gene with hypertension in a Japanese population and rare missense mutation in preproendothelin-1 in Japanese

- hypertensives. *Hypertens Res.* 30(6) 513-520. 2007
9. Sakata T, Okamoto A, Morita T, Kokubo Y, Sato K, Okayama A, Tomoike H, Miyata T: Age- and gender-related differences of plasma prothrombin activity levels. *Thromb Haemost.* 97(6) 1052-1053. 2007
10. Taketomi Y, Sunaga K, Tanaka S, Nakamura M, Arata S, Okuda T, Moon TC, Chang HW, Sugimoto Y, Kokame K, Miyata T, Murakami M, Kudo I: Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in Ndr^{g1}-deficient mice. *J Immunol.* 178(11) 7042-7053. 2007
11. Yin T, Takeshita S, Sato Y, Sakata T, Shin Y, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Kojima T, Madoiwa S, Sakata Y, Murata M, Ikeda Y, Miyata T: A large deletion of the PROS1 gene in a deep vein thrombosis patient with protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 98(4) 783-789. 2007
12. Kamide K, Kokubo Y, Fukuhara S, Hanada H, Yang J, Kada A, Nagura J, Takiuchi S, Horio T, Kawano Y, Okayama A, Tomoike H, Miyata T: Protein tyrosine kinase 2beta as a candidate gene for hypertension. *Pharmacogenet Genomics.* 17(11) 931-939. 2007
13. Yasuda H, Kamide K, Takiuchi S, Matayoshi T, Hanada H, Kada A, Yang J, Miwa Y, Yoshii M, Horio T, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Tei C, Miyata T, Kawano Y: Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 21(11) 883-892. 2007
14. Kokame K, Aoyama Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T: Inherited and de novo mutations of ADAMTS13 in a patient with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost.* 6: 213-215. 2008
15. Yin T, Hanada H, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Tomoike H, Miyata T: No association between vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) and the variability of warfarin dose requirement in a Japanese patient population. *Thromb Res.* 2007. Nov 8 [Epub ahead of print]
16. Okuda T, Kokame K, Miyata T: Differential Expression Patterns of NDRG Family Proteins in the Central Nervous System. *J Histochem*

- Cytochem.* 2007. Nov 12 [Epub ahead of print]
17. Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Yanai K, Hanada H, Kamide K, Nakura J, Kohara K, Takeuchi F, Mano H, Yasunami M, Kimura A, Kita Y, Ueshima H, Nakayama T, Soma M, Hata A, Fujioka A, Kawano Y, Nakao K, Sekine A, Yoshida T, Nakamura Y, Saruta T, Ogihara T, Sugano S, Miki T, Tomoike H: High-Density Association Study and Nomination of Susceptibility Genes for Hypertension in the Japanese National Project. *Hum Mol Genet.* 2007. Nov 14 [Epub ahead of print]
 18. Truettner JS, Hu B, Alonso OF, Bramlett HM, Kokame K, Dietrich WD: Subcellular stress response after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 24(4) 599-612. 2007
 19. 小亀浩市: ADAMTS13 の測定. *日本血栓止血学会誌* 18(3) 234-240. 2007
 20. 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* 18(1) 36-45. 2007.
 21. Banno F, Miyata T: Biology of an anti-thrombotic factor ADAMTS13. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis.* in press.
 22. 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.* 37(1) 66-69. 2007
 23. Kobayashi T, Wada 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.* 119: 447-452. 2007
 24. 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.* 22(2) 301-305. 2007
 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.* 31:

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.*** 120(3): 381-386. 2007
27. Yagi H, Ito S, Kato S, Hiura H, Matsumoto M, Fujimura M: Plasma levels of ADAMTS13 antigen, determined by an enzyme immunoassay using the neutralizing monoclonal antibody, parallel to those of the activity. ***Int J Hematol.*** 85(5) 403-407. 2007
28. Bennett CL, Benjamin K, Zakarija A, Bandarenko N, Pandey DK, Buffie CG, McKoy JM, Tevar AD, Cursio JF, Yarnold PR, Kwaan HC, De Masi D, Sarode R, Raife TJ, Kiss JE, Raisch DW, Davidson C, Sadler JE, Ortel TL, Zheng XL, Kato S, Matsumoto M, Uemura M, Fujimura Y: Two mechanistic pathways for thienopyridine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura: A report from the Surveillance, Epidemiology, and Risk Factors for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (SERF-TTP) research group and the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. ***J Am Coll Cardiol.*** 50(12) 1138-1143. 2007
29. Matsumoto M, Kawa K, Uemura M, Kato S, Ishizashi H, Isonishi A, Yagi H, Park YD, Takeshima Y, Kosaka Y, Hara H, Kai S, Kanamaru A, Fukuhara S, Hino M, Sako M, Hiraoka A, Ogawa H, Hara J, Fujimura Y: Prophylactic fresh frozen plasma infusion may prevent the development of hepatic VOD after stem cell transplantation via ADAMTS13-mediated restoration of von Willebrand factor plasma levels. ***Bone Marrow Transplant.*** 40(3) 251-259. 2007
30. Furukoji E, Tanaka N, Yamashita A, Matsumoto M, Fujimura Y, Yamamoto R, Tamura S, Asada Y: Ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase inhibits ATP- and ADP-induced vasoconstriction. ***Thromb Res,*** in press.
31. Kato K, Kobayashi C, Katayama Y, Moriyama N, Shiono J, Kudo K, Koide K, Aoki K, Fujisawa K, Okada M, Matsumoto M, Fujimura Y, Tsuchida M. A one-month-old boy with acute idiopathic thrombocytopenic purpura complicated with intracranial hemorrhage in association with minor head trauma. ***J Ped Hematol Onc*** 2007, in press.
32. Shida S, Nishio K, Sugimoto M, Mizuno T, Hamada M, Kato S,

- Matsumoto M, Okuchi K, Fujimura Y, Yoshioka A: Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions. *Blood*. 1(111) 1295-12989. 2008
33. 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* 48: 144-147. 2007
34. 松本雅則、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 診断における ADAMTS13 解析. *日本検査血液学会雑誌* 8: 383-391. 2007
35. 藤村吉博、松本雅則: 血栓性血小板減少性紫斑病の成因と治療. *BIO Clinica* 22: 332-337. 2007
36. 松本雅則: 血栓性血小板減少性紫斑病の分子病態. *分子リウマチ* 4、211-217. 2007
37. 八木秀男、松本雅則、藤村吉博: 血栓症. *Modern Physician* 27: 518-521. 2007
38. 松本雅則. 血栓性微小血管障害症 (TMA) 診断における VWF 切断酵素 (ADAMTS-13) の重要性. *Medical Practice* 24、2153-2155. 2007
39. 八木秀男、松本雅則、藤村吉博: 血栓性微小血管障害症による脳神経症状. *日本内科学会雑誌* 96: 353-362. 2007
40. 松本雅則: 血栓性血小板減少性紫斑病. よくわかる病態生理 5 *血液疾患* (松尾理編集)、136-139 (日本医事新報社). 2007
41. Masaie H, Oritani K, Yokota T, Takahashi I, Shirogane T, Ujiie H, Ichii M, Saitoh N, Maeda T, Tanigawa R, Oka K, Hoshida Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Adiponectin binds to chemokines via the globular head and modulates interactions between chemokines and heparan sulfates. *Exp Hematol*. 35(6) 947-956. 2007
42. Tomiyama Y, Shiraga M, Kashiwagi H: Positive and negative regulation of integrin function. In Tanaka K and Davie EW, eds. *Recent advance in thrombosis and hemostasis*. Springer Japan KK, Japan, Tokyo, 2008, in press
43. 富山佳昭、倉田義之: 血液疾患をどのように診断するか: 血小板減少症. *モダンフィジシャン* 27(4) 511-514. 2007
44. 富山佳昭: EDTA 依存性偽性血小板

減少症. *Medical Practice* 24(5)

917. 2007

45. 富山佳昭:血栓形成のメカニズム
up-to-date. *Angiology Frontier*
6(3) 11-17. 2007

46. 柏木浩和、富山佳昭:Semaphorin
3A による血小板機能抑制.
Angiology Frontier 6(3) 18-24.
2007

47. 富山佳昭:アレルギー性紫斑病.
Selected articles 2008(伊藤和香
子、青木祐美編)、1225-1230. メデ
ィックメディア、東京、2007

48. 富山佳昭:血小板の動態と機能. *内
科学* 第9版. 杉本恒明、矢崎義雄
編、1567-1569. 朝倉書店、東京、
2007

49. 富山佳昭:特発性血小板減少性紫
斑病. *内科学* 第9版. 杉本恒明、
矢崎義雄編、1691-1692、朝倉書
店、東京、2007

50. 富山佳昭:血小板の異常. カラーテ
キスト *血液病学*. 押味和夫編、
428-435. 中外医学社、東京、2007

51. 富山佳昭:血管性紫斑病. カラーテ
キスト *血液病学*. 押味和夫編、
436-437. 中外医学社、東京、2007

52. 富山佳昭:特発性血小板減少性紫
斑病. よくわかる病態生理5 *血液
疾患*松尾 理編、121-112. 日本医
事新報社、東京、2007

学会発表

1. 宮田敏行、宮田茂樹、長束一行、嘉
田晃子:循環器疾患における抗血小
板療法のエビデンスとコンセンサス
ガイドライン改定に向けて、**日本血栓止
血学会学術標準化委員会 2007 シ
ンポジウム**、抗血小板療法部会シンポ
ジウム 7. アスピリンレジスタンス、平成
19年2月17日、東京都

2. 小亀浩市、宮田敏行:VWD と TTP の
診断と治療のガイドライン作成に向
けて、**日本血栓止血学会学術標準化
委員会 2007 シンポジウム**、
VWD/TTP 部会シンポジウム 4. 日本
人一般住民の ADAMTS13 活性、平成
19年2月17日、東京都

3. 藤村吉博、松本雅則、加藤誠司、小
亀浩市、宮田敏行、村田 満:VWD と
TTP の診断と治療のガイドライン作成
に向けて、**日本血栓止血学会学術
標準化委員会 2007 シンポジウム**、
VWD/TTP 部会シンポジウム 5. 本邦
Upshaw-Schulman 症候群の診断と治
療における問題点、平成19年2月17
日、東京都

4. 宮田敏行:抗血小板薬並びに抗凝固

- 薬の標準化に関する遺伝子解析研究、シンポジウム:脳卒中発症の遺伝的要因、第32回日本脳卒中学会総会、平成19年3月22日、福岡市
5. 宮田敏行:日本人の血栓性疾患の遺伝的背景、特別講演、第8回 *Pharmaco-Hematology シンポジウム* (主催:日本薬学会生物系薬学部会)平成19年6月8日、金沢市、薬学雑誌、第127巻、Suppl. 1. 3-4頁 (2007)
 6. 武富芳隆、須永剛平、田中智之、中村雅典、荒田悟、奥田知彦、杉本幸彦、小亀浩市、宮田敏行、村上誠、工藤一郎:マスト細胞の成熟に伴って発現誘導されるNDRG1の解析、第8回 *Pharmaco-Hematology シンポジウム* (主催:日本薬学会生物系薬学部会)平成19年6月8日、金沢市、薬学雑誌、第127巻、Suppl. 1. 31頁 (2007)
 7. Miyata T: APSTH-ISTH joint symposium, Genetic factors related to thrombophilia, Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis among Japanese patients, *XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*, Geneva, July 6-12, 2007
 8. Kokame K, Miyata T: Measurements of ADAMTS13 activity, Subcommittee on vWF (and ADAMTS13) at *53rd Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*, Geneva, July 6, 2007
 9. Kokame K, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T: Activities and polymorphisms of ADAMTS13 in the Japanese general population, *XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*, Geneva, Switzerland, July 6-12, 2007
 10. Ishikawa J, Sato Y, Takeshita S, Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y, Miyata T: Approximately one-third of Japanese patients with deep vein thrombosis carried the genetic mutations in proteins C, S and antithrombin genes: the Sub-group Study of Blood Coagulation Abnormality, the Study Group of Research on Measures for Intractable Diseases in Japan, *XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*, Geneva, July 6-12, 2007
 11. Yin T, Takeshita S, Sato Y, Sakata T, Shin Y, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Kojima T, Madoiwa S, Sakata Y, Murata M, Ikeda Y, Miyata T: A large

- deletion of the *PROS1* gene in a deep vein thrombosis patient with protein S deficiency. ***XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis***, Geneva, July 6-12, 2007
12. Sakata T, Okamoto A, Morita T, Kokubo Y, Sato K, Okayama A, Tomoike H, Miyata T: Age and gender-related differences of plasma prothrombin activity levels. ***XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis***, Geneva, July 6-12, 2007
13. Banno M, Hanada H, Kamide K, Kokubo Y, Kada A, Yang J, Tanaka C, Takiuchi S, Horio T, Matayoshi T, Yasuda H, Nagura J, Tomoike H, Kawano Y, Miyata T: Genetic polymorphisms of endothelin converting enzyme-1 gene associated with hypertension in a Japanese population and a novel missense mutation in preproendothelin-1 in Japanese hypertensives. ***XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis***, Geneva, July 6-12, 2007
14. Banno F, Kokame K, Yang J, Miyata S, Miyata T: The distal domains of ADAMTS13 are required for efficient cleavage of von Willebrand factor under prothrombotic conditions. ***XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis***, Geneva, July 6-12, 2007
15. Neki R, Ikeda T, Fujita T, Ishikawa J, Sato Y, Miyata T: The genetic analysis of deep vein thrombosis during pregnancy and perinatal associated disease in Japanese, ***XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis***, Geneva, July 6-12, 2007
16. 宮田敏行:メタボリックシンドロームと血栓性素因、地域一般住民を対象とした研究に基づく遺伝性素因の解析、**第39回日本動脈硬化学会総会学術集会、ジョイントシンポジウム2(血栓止血学会)**、メタボリックシンドロームと血栓症、平成19年7月14日、大阪市
17. 篠崎昇平、羽鳥薫、小亀浩市、川上明夫、金子英司、宮田敏行、下門顕太郎:小胞体ストレスと動脈硬化:小胞体ストレス蛋白 Herp 欠損は動脈硬化進展を抑制する、**第39回日本動脈硬化学会総会学術集会、シンポジウム10、メタボリックシンドロームの血管合併症の分子機構**、平成19年7月14日、大阪市
18. 篠崎昇平、千葉剛、小亀浩市、宮田