

- 敏行、藍真澄、金子英司、吉田雅幸、
下門顕太郎:ob/ob マウス脂肪組織に
おけるエストラジオールの部位特異的
な作用の解明、**第 39 回日本動脈硬
化学会総会学術集会**、平成 19 年 7
月 14 日、大阪市
19. 辛英哲、小亀浩市、副島見事、宮田
敏行:ADAMTS13 結合蛋白質の網羅的
探索、**血液・血管オルピス**、Young
Investigation Award 最優秀賞、平成
19 年 8 月 25 日～26 日、東京都
20. 佐藤有希子、石川淳子、木村利奈、
小亀浩市、本田繁則、竹下聡、末久
悦次、川崎富夫、辻肇、窓岩清治、坂
田洋一、小嶋哲人、村田満、池田康
夫、巽純子、宮田敏行:深部静脈血栓
症患者における抗凝固因子の遺伝子
解析、**日本人類遺伝学会第 52 回
大会**、平成 19 年 9 月 13 日～15 日、
東京都
21. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda
S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y,
Miyata T: Effects of complete
deficiency and C-terminal deletion of
ADAMTS13 on hemostatic function in
mice, **21st International
Mammalian Genome Conference**,
October 28–November 1, 2007, Kyoto
22. 花田 裕典、宮田敏行、山本 勝広、
嘉田 晃子、神出 計、河野 雄平:
GEANE 研究グループ、GEANE 研究
(降圧薬感受性遺伝子同定のための
多施設前向き臨床試験)ゲノムワイド
SNP 遺伝子型決定チップの実際と検
体集団の遺伝子的特性、**第 30 回日
本高血圧学会総会**、平成 19 年 10
月 25 日～27 日、沖縄市
23. 神出計、楊進、花田裕典、又吉哲太
郎、安田久代、堀尾武史、吉原史樹、
中田裕人、中村敏子、中濱肇、宮田
敏行、河野雄平:L 型カルシウムチャ
ネル α_{1c} ならびに α_{1D} サブユニット遺伝
子多型はジヒドロピリジン系カルシウム
拮抗薬の降圧効果に関与する、**第 30
回日本高血圧学会総会**、平成 19 年
10 月 25 日～27 日、沖縄市
24. 根木玲子、池田智明、石川淳子、佐
藤有希子、本田繁則、小亀浩市 宮
田敏行、藤田富雄:わが国の妊産婦に
おける静脈血栓塞栓症および関連周
産期疾患と遺伝的素因についての解
析、**第 30 回日本血栓止血学会学
術集会**、平成 19 年 11 月 15 日～17
日、志摩市
25. Yin Tong、竹下聡、佐藤有希子、阪田
敏幸、辛 英哲、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:A
large deletion of the *PROS1* gene in a
deep vein thrombosis patient with
protein S deficiency、**第 30 回日本血
栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11
月 15 日～17 日、志摩市
26. Yin Tong、花田裕典、宮下光太郎、小

- 久保喜弘、赤岩靖久、大坪亮一、長東一行、大槻俊輔、岡山明、峰松一夫、成富博章、友池仁暢、宮田敏行: No Association of VKORC1L1 Haplotypes with Warfarin Dose in a Japanese Patient Population、**第30回日本血栓止血学会学術集会**、平成19年11月15日～17日、志摩市
27. 石川淳子、加藤久雄、岡田浩美、竹下聡、本田繁則、川崎富夫、末久悦次、辻肇、小嶋哲人、窓岩清治、坂田洋一、村田満、池田康夫、小久保喜弘、岡山明、友池仁暢、宮田敏行: 日本人の深部静脈血栓症患者における TFPIb Asn221Ser 変異の頻度、**第30回日本血栓止血学会学術集会**、平成19年11月15～17日、志摩市
28. 阪田敏幸、岡本章、佐藤清、小久保喜弘、岡山明、宮田敏行: 血漿中フィブリノーゲンおよび PAI-1 濃度の年代および性別にみた喫煙の影響(吹田研究)、**第30回日本血栓止血学会学術集会**、ポスターセッション優秀賞、平成19年11月15日～17日、志摩市
29. 菊池唯史、小久保喜弘、阪田敏幸、岡本章、岡山明、友池仁暢、宮田敏行: 日本人一般住民におけるフォンビルブランド因子抗原量と循環器疾患危険因子との関連、**第30回日本血栓止血学会学術集会**、平成19年11月15日～17日、志摩市
30. 坂野史明、小亀浩市、楊進、宮田茂樹、宮田敏行: ADAMTS13のC末端ドメイン欠失はマウスに潜在的な血栓性リスクをもたらす、**BMB2007 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会**、2007年12月11日～15日、横浜市
31. 辛英哲、小亀浩市、秋山正志、副島見事、宮田敏行: ADAMTS13はLys-Plasminogenに結合する、**BMB2007 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会**、2007年12月11日～15日、横浜市
32. 江浦由佳、小亀浩市、宮田敏行: Herp欠損は小胞体ストレス誘導性のERAD複合体形成を抑制する、**BMB2007 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会**、2007年12月11日～15日、横浜市
33. 奥田智彦、辻井知美、山田佐知子、宮田敏行、北徹、柳田素子: ストレス誘導遺伝子 NDRG1は腎臓および水晶体において組織保護機能を有する、**BMB2007 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会**、2007年12月11日～15日、横浜市
34. Fujimura, Y, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Isonishi A, Matsuyama T, Kato S, Ishizashi H, Shida Y, Kenji N, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K,

- Kuraishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Sugimoto M, Wada H, Murata M, Miyata T, Ikeda Y. Natural history of 33 patients with Upshaw-Schulman syndrome has revealed that all the gravida develop thrombocytopenia, often followed by thrombotic microangiopathy with stillbirth. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition*, Atlanta USA, December 8-11, 2007
35. 神出 計、小久保喜弘、福原茂人、花田裕典、嘉田晃子、堀尾武史、友池仁暢、河野雄平、宮田敏行: アンジオテンシン II 情報伝達分子である Protein Tyrosine Kinase 2beta 遺伝子多型は日本人本態性高血圧に関連する、**第 13 回アンジオテンシンカンファレンス**、平成 20 年 2 月 8 日、東京都
36. Shinozaki S, Hatori K, Kokame K, Chiba T, Miyata T, Shimokado K: Deficiency of Herp, an ER stress protein, suppresses atherosclerosis in apoE deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2007*, Chicago, April, 2007
37. 石川昌利、植村正人、松山友美、松本雅則、石指宏通、加藤誠司、坂野史明、小亀浩市、辻本達寛、北澤利幸、森岡千恵、藤本正男、宮田敏行、藤村吉博、福井博: マウス急性肝不全モデルにおける ADAMTS13 活性の動態。 **第 43 回日本肝臓学会総会**、平成 19 年 5 月 31-6 月 1 日、東京都
38. Shouno Y, Kuge Y, Yokota C, Kido S, Kokame K, Inoue H, Hotta M, Minematsu K, Saji H: Analysis of gene expression related to enrich environment after ischemic stroke in rats. *The 23rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Brain'07)*, Osaka, 2007
39. 小亀浩市: 血栓性血小板減少性紫斑病と ADAMTS13. **第 8 回 Pharamaco-Hematology シンポジウム**、平成 19 年 6 月 8 日、金沢市
40. Matsumoto M, Fujimura Y: The ADAMTS13 analysis on thrombotic microangiopathies in Japan, **6th World Congress of the International Society for Apheresis/World Apheresis Association 11th Congress**, Yokohama (Japan), 2007
41. Hiura H, Isonoshi A, Kato S, Matsumoto M, Fujimura Y: Immuno-purification of ADAMTS13 and its physico-chemical characterization. **XXIst Congress of the International Society on**

- Thrombosis and Haemostasis***, Geneva, July 6–12, 2007
42. Koyama N, Makinodan K, Tamaki S, Fukuoka A, Hamada K, Matsumoto M, Fujimura Y, Kimura H: Alternation of von Willebrand factor and ADAMTS13 activity and its clinical significance in patients with obstructive sleep apnea syndrome. ***XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis***, Geneva, July 6–12, 2007
 43. Matsuyama T, Matsumoto M, Isonishi A, Uemura M, Inokuma S, Fujimura Y: Analysis of ADAMTS13 in patients with collagen disease-associated TMAs. ***XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis***, Geneva, July 6–12, 2007
 44. Matsuyama T, Matsumoto M, Isonishi A, Inokuma S, Fujimura Y: Analysis of ADAMTS13 and its IgG-autoantibodies in 170 patients with connective tissue disease-associated thrombotic microangiopathy indicates more than 2 types on its pathogenesis. ***49th ASH annual meeting***. Atlanta, Georgia (USA), December 8–11, 2007
 45. Bennett CL, Luu TH, Zakarija A, Kwaan HC, Bandarenko N, Pandey DK, Curio JF, McKoy JM, Buffie C, Winters JL, Ortel TL, Sarode R, Zheng XL, Raife TJ, Matsumoto M, Fujimura Y. Rock GA: Clinical and outcomes findings for thrombotic thrombocytopenic purpura among 467 persons with severely versus not severely deficient ADAMTS-13 levels. ***49th ASH annual meeting***. Atlanta, Georgia (USA), December 8–11, 2007
 46. Richey EA, Bennett CL, Kwaan HC, Zakarija A, Bandarenko N, Pandey DK, Yarnold PR, Raisch DW, Winters JL, Raife TJ, Curio JF, Fisher MJ, Ortel TL, Tallman MS, Matsumoto M, Fujimura Y, Moake JL. Ticlopidine- and Clopidogrel- associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): final results from the surveillance epidemiology and risk factor- TTP study group. ***49th ASH annual meeting***. Atlanta, Georgia (USA), December 8–11, 2007
 47. Morioka C, Uemura M, Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Ishikawa M, Ishizashi H, Fujimoto M, Tsujimoto T, Nishio K, Okuchi K, Fujimura Y, Fukui H. Plasma ADAMTS13 activity markedly decreased in patients with severe acute pancreatitis: Its potential role on the development of multiorgan failure. ***49th ASH annual***

meeting. Atlanta, Georgia (USA),
December 8-11, 2007

48. 松本雅則:ADAMTS13 活性・抗原解析法の開発進歩状況、**日本血栓止血学会学術標準化委員会** 2007シンポジウム、平成19年2月18日、東京都
49. 松本雅則. TMA 診断におけるADAMTS13 活性測定の意義. **第25回宮崎血液研究会**(特別講演)、平成19年3月9日、宮崎市
50. 松本雅則:奈良医大病院におけるアルブミン製剤使用削減の取り組み. **第55回日本輸血・細胞治療学会総会**(ランチョンセミナー)、平成19年6月1日、名古屋市
51. 竹山佳織、川本紀子、辻博之、永峰知子、中村恵子、松本雅則、藤村吉博: Upshaw-Schulman 症候群患者への小分け調整 FFP 投与の試み. **第55回日本輸血・細胞治療学会総会**、平成19年6月2日、名古屋市
52. 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、**第8回日本検査血液学会学術集会**(シンポジウム)、平成19年7月22日、福井市
53. 松本雅則:血小板血栓による疾患の病態と臨床検査(TTP, HUS, HIT). **第26回日本臨床検査医学会** 東海・北陸支部例会(シンポジウム)、平成19年9月1日、名古屋市
54. 志田泰明、杉本充彦、水野智寛、濱田匡章、吉岡 章、西尾健治、福島英賢、奥地一夫、加藤誠司、松本雅則、藤村吉博:全血流動下におけるADAMTS13 活性発現メカニズムの解析. **第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会**、平成19年10月11日、横浜市
55. 松本雅則、加藤誠司、石西綾美、松山友美、藤村吉博、植村正人、石川昌利、森岡千恵、福井博:慢性肝疾患における血漿 ADAMTS-13 活性および抗原の動態解析.**第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会**、平成19年10月11日、横浜市
56. 柳生友浩、永田泰之、大谷知穂、玉島貞宏、松本雅則、藤村吉博:紫斑を初発症状とした成人期 Upshaw-Schulman 症候群の一例. **第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会**、平成19年10月11日、横浜市
57. 志田泰明、杉本充彦、水野智寛、濱田匡章、吉岡章、西尾健治、奥地一夫、加藤誠司、松本雅則、藤村吉博:血流下でのADAMTS13による壁血栓成長制御メカニズム-ずり速度との機能関連解析. **第30回日本血栓止血学会学術集会**、平成19年11月

- 15日、志摩市
58. 松本雅則、植村正人、加藤誠司、石指宏通、石西綾美、八木秀男、藤村吉博：新鮮凍結血漿 (FFP) の予防的投与は造血肝細胞移植後の肝 VOD 発症を予防する **第30回日本血栓止血学会学術集会**、平成19年11月15日、志摩市
59. 八木秀男、山口直子、松本雅則、志田泰明、西尾健治、杉本充彦、椿和央、藤村吉博：妊娠発症型 Upshaw-Schulman 症候群における TTP 発症機序の検討。 **第30回日本血栓止血学会学術集会**、平成19年11月15日、志摩市
60. 日裏久英、石西綾美、加藤誠司、松本雅則、松井太衛、藤村吉博：ADAMTS13 の血漿からの精製とその物理的及び化学的性質。 **第30回日本血栓止血学会学術集会**、平成19年11月15日、志摩市
61. 植村正人、森岡千恵、松山友美、松本雅則、加藤誠司、石指宏通、石川昌利、藤本正男、辻本達寛、奥地一夫、福井博、藤村吉博：重症急性膵炎における血漿 von Willebrand 因子特異的切断酵素 (ADAMTS13) 活性の動態。 **第30回日本血栓止血学会学術集会**、平成19年11月15日、志摩市
62. 石西綾美、松本雅則、松山友美、児山紀子、西田幸世、前田美和、辻内智美、門池真弓、結石杏奈、加藤誠司、丹羽欣正、藤村吉博：適正な血小板輸血を行うための ADAMTS13 活性と HIT 抗体の測定。 **第51回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会学術講演会**、平成19年12月1日、和歌山市
63. Akiyama M, Kashiwagi H, Kamae T, Shiraga M, Tadokoro S, Honda S, Tomiyama Y, Kanakura Y: Semaphorin 3A antagonizes agonist-induced PI3 kinase pathway. **XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**, Geneva, July 6-12, 2007
64. 富山佳昭：アテローム血栓症発症における血小板の役割：アディポネクチンの抗血栓作用 (シンポジウム)、 **第39回日本動脈硬化学会総会・学術集会**、平成2007年7月13日-14日、大阪市
65. 田所誠司、秋山正夫、釜江剛、白鹿正通、柏木浩和、富山佳昭、金倉讓：Talin と α -actinin による血小板インテグリン $\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化調節機構の解析、 **第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会合同開催**、平成19年10月11日-13日、横浜市

66. 東道公人、清沢伸幸、長村敏生、今村俊彦、森本 哲、東道伸二郎、柏木浩和、富山佳昭、今宿晋作:PAIg G 高値を認めた GPVI 欠損症の 1 女児例、**第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会**合同開催、平成 19 年 10 月 11 日～13 日、横浜市
67. 白杉由香理、小川吉明、安藤潔、橋野聡、長澤俊郎、小島寛、倉田義之、富山佳昭、岸本裕司、岩戸康治、藤村欣吾、北村聖、曾根原裕介、大倉征幸、大津智子、Janet L. Nichol: 新規血小板造血刺激たん白製剤 AMG 531 の慢性 ITP に対する安全性と有効性に関する検討、**第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会**合同開催、平成 19 年 10 月 11 日～13 日、横浜市
68. 田所誠司、秋山正夫、釜江 剛、白鹿正通、柏木浩和、富山佳昭、金倉 讓: α -actinin による血小板インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化制御機構の解析、**第 30 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15 日～17 日、三重市
69. 秋山正夫、柏木浩和、東道公人、清沢伸幸、東道伸二郎、諸井将明、釜江 剛、田所誠司、白鹿正通、富山佳昭、金倉 讓: 抗 GPVI 抗体に起因

すると思われる GPVI 欠損症の一例。
第 30 回日本血栓止血学会学術集会、平成 19 年 11 月 15 日～17 日、三重市

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

Ⅱ. 分担研究報告書

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定の分野に関する研究

主任研究者 宮田 敏行 国立循環器病センター研究所 部長
研究協力者 辛 英哲 国立循環器病センター研究所 研究員

研究要旨

血小板凝集は、血漿接着蛋白質フォンビルブランド因子(VWF)の重合度による調節をうけており、通常、超高分子量VWFはVWF切断酵素によってその重合度を制御されている。近年、血栓性血小板減少性紫斑病の原因遺伝子として同定されたメタロプロテアーゼADAMTS13がVWF切断酵素である事が明らかとなった。この酵素は他の蛋白質との相互作用により活性が制御されていると考えられるが、そのメカニズムは不明である。そこでADAMTS13と相互作用し、その活性を制御する蛋白質をゲノム網羅的に探索した。その結果、200を超えるADAMTS13結合蛋白質の候補を得た。幾つかの候補遺伝子について、精製蛋白質を入手し結合実験を行った。その結果、血漿蛋白質プラスミノゲンとADAMTS13が結合する事を確認した。今年度はさらにその結合様式について詳細な解析を試みた。正常血漿中にはアミノ末端がグルタミン酸のGlu-プラスミノゲンが存在するが、線溶亢進時にはプラスミンによってアミノ末端が切断除去されたLys-プラスミノゲンが出現する。そこでADAMTS13とこれらプラスミノゲンとの結合を調べた。まず、固相化した2種のプラスミノゲンに対し、ADAMTS13は特異的に結合した。次に、免疫沈降法で溶液中での結合を調べると、ADAMTS13はLys-プラスミノゲンにのみ結合した。また、Lys-プラスミノゲンはADAMTS13活性に影響しなかった。Glu-プラスミノゲンとLys-プラスミノゲンの立体構造は大きく異なっている事が知られており、ADAMTS13はLys-プラスミノゲンに特徴的なコンフォメーションを認識すると考えられた。血管内皮細胞上にはプラスミノゲン受容体が存在するが、ADAMTS13はLys-プラスミノゲンを介して血管内皮細胞上に局在化し、VWFを切断している可能性が考えられた。

A.研究目的

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈閉塞性疾患では血小板は中心的な役割を果たしている。血小板は動脈の血流下では、血漿蛋白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。血小板凝集は、血漿接着蛋白質VWFの重合度による調節を受け、超高分子量VWF重合体は微小血管内で血小板凝集を誘導する。通常、生体内では超高分子量VWFは

VWF 切断酵素によってその重合度を制御されている。切断酵素の実体は長い間、不明であったが、近年血栓性血小板減少性紫斑病の原因遺伝子として同定されたメタロプロテアーゼ ADAMTS13 が VWF 切断酵素である事が明らかとなった。この酵素は他の蛋白質との相互作用により活性が制御されていると考えられるが、相互作用する蛋白質は明らかになっておらず、活性調節メカニズムは全く不明である。そこで本研究では ADAMTS13 と相互作用する蛋白質をゲノム網羅的に探索し同定する事、さらに当該蛋白質と ADAMTS13 の結合様式、さらには当該蛋白質の ADAMTS13 活性への影響を調べる事を目的とした。

B. 研究方法

前年度までに、ADAMTS13 と相互作用する200を超える候補蛋白質の中から、幾つかの候補遺伝子について、精製蛋白質を入手し結合実験を行った結果、血漿蛋白質プラスミノゲンと ADAMTS13 が結合する事を確認していた。正常血漿中にはアミノ末端がグルタミン酸の Glu-プラスミノゲンが存在するが、線溶亢進時にはプラスミンによってアミノ末端が切断除去された Lys-プラスミノゲンが出現する。そこで ADAMTS13 とこれらプラスミノゲンとの結合を生化学的手法を用いて調べた。また、ADAMTS13 の VWF 切断活性にこれらプラスミノゲンが及ぼす影響を調べた。

C. 研究成果

前年度までの研究から、血漿蛋白質プラ

スミノゲンと ADAMTS13 が結合する事を確認していた。

プラスミノゲンは Glu-型と Lys-型が知られている。そこで ADAMTS13 とこれら2種のプラスミノゲンの結合を調べた。まず、2種のプラスミノゲンをプラスチックプレートに固相化し、ADAMTS13 と混合し、結合した ADAMTS13 を抗 ADAMTS13 抗体にて検出した。その結果、ADAMTS13 は Glu-プラスミノゲンと Lys-プラスミノゲンの両者に結合した。

次に溶液中での ADAMTS13 と Glu-プラスミノゲン、Lys-プラスミノゲンとの相互作用を確認するため、免疫沈降法を用いた。まず、FLAG タグをカルボキシル末端に付加した組換え ADAMTS13 と Glu-プラスミノゲンあるいは Lys-プラスミノゲンを混合した。次に抗 FLAG 抗体を結合した担体を用いて、ADAMTS13 と ADAMTS13 に結合した蛋白質を遠心法により回収した。抗プラスミノゲン抗体及び抗 ADAMTS13 抗体を用いた Western blotting 法により、ADAMTS13 と Glu-プラスミノゲンあるいは Lys-プラスミノゲンとの結合を調べた。その結果、ADAMTS13 は Lys-プラスミノゲンにのみ結合し、Glu-プラスミノゲンには結合しない事が明らかとなった。

さらに Lys-プラスミノゲンと ADAMTS13 との結合を確認するため、抗プラスミノゲン抗体を用いた免疫沈降実験を行った。ADAMTS13 と Glu-プラスミノゲンあるいは Lys-プラスミノゲンを混合し、一定時間室温に放置した後、抗プラスミノゲン抗体を加えた。抗体結合能を有する

蛋白質、protein G、を共有結合した担体を用い、抗体とプラスミノゲンさらにプラスミノゲンに結合した蛋白質を遠心法により回収した。特異的抗体を用いた Western blotting 法により、ADAMTS13 と Glu-プラスミノゲンあるいは Lys-プラスミノゲンとの結合を調べた、その結果、やはり Lys-プラスミノゲンのみが ADAMTS13 と共沈した。

次に、ADAMTS13 の VWF 切断活性に Lys-プラスミノゲンが及ぼす影響を調べた。まず、ADAMTS13 の最小基質である VWF の部分ペプチドを用いた測定系に Lys-プラスミノゲンあるいは Glu-プラスミノゲンを加えた。その結果、Lys-プラスミノゲン、Glu-プラスミノゲン共に ADAMTS13 活性に影響しなかった。さらに天然基質である超高分子量 VWF を用いた ADAMTS13 活性の測定系に Lys-プラスミノゲンあるいは Glu-プラスミノゲンを加え、影響を調べた。その結果、この測定系においても Lys-プラスミノゲン、Glu-プラスミノゲン共に ADAMTS13 活性に影響しなかった。

D. 考察

血漿蛋白質プラスミノゲンは生体内で Glu-プラスミノゲンと Lys-プラスミノゲンの2種類の存在様式を示す。固相化したこの2種のプラスミノゲンは ADAMTS13 に結合した。一方、より生理的条件に近い液相中での結合実験では、ADAMTS13 は Lys-プラスミノゲンのみに結合し、Glu-プラスミノゲンには結合しなかった。Glu-プラスミノゲンと Lys-プラスミノゲンの立体

構造は大きく異なっている事が知られており、ADAMTS13 は Lys-プラスミノゲンに特徴的なコンフォメーションを認識しているのかもしれない。固相化した Glu-プラスミノゲンに ADAMTS13 が結合したのは、固相化によって Glu-プラスミノゲンの立体構造が変化したためだと考えている。

血管内皮細胞上にはプラスミノゲン受容体が存在する事が知られており、プラスミノゲンは多くの場合、クリングルドメインを介してプラスミノゲン受容体に結合している。血管内皮細胞から VWF が合成分泌され、ADAMTS13 は Lys-プラスミノゲンとプラスミノゲン受容体を介して血管内皮細胞上に局在化する事によって、VWF を効率よく切断している可能性が考えられた。

今後、プラスミノゲン受容体、Lys-プラスミノゲン、ADAMTS13 の3者複合体の形成について調べる必要がある。

E. 結論

Lys-プラスミノゲンと ADAMTS13 が結合する事を試験管内で確認した。ADAMTS13 は Lys-プラスミノゲンに特徴的なコンフォメーションを認識している可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura R, 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. 2008.
 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 Ndr1-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*. 56(2) 175-182. 2008.
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*. 17(4) 617-627. 2007.
2. 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), *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, July 6–12, 2007.
10. Junko Ishikawa, 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、宮田敏行、藍真澄、金子英司、吉田雅幸、下門顕太郎:ob/ob マウス脂肪組織におけるエストラジオールの部位特異的な作用の解明、**第39回日本動脈硬化学会総会学術集会、平成19年7月14日、大阪市**
19. 辛英哲、小亀浩市、副島見事、宮田敏行:ADAMTS13 結合蛋白質の網羅的探索、**血液・血管オルピス、Young Investigation Award 最優秀賞、平成19年8月25日、東京都**

20. 佐藤有希子、石川淳子、木村利奈、小亀浩市、本田繁則、竹下聡、末久悦次、川崎富夫、辻肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田満、池田康夫、巽純子、宮田敏行:深部静脈血栓症患者における抗凝固因子の遺伝子解析、**日本人類遺伝学会第 52 回大会**、平成 19 年 9 月 13 日～15 日、東京都
21. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Effects of complete deficiency and C-terminal deletion of ADAMTS13 on hemostatic function in mice, **21st International Mammalian Genome Conference**, October 28–November 1, 2007, Kyoto
22. 花田 裕典、宮田敏行、山本 勝広、嘉田 晃子、神出 計、河野 雄平: GEANE 研究グループ、GEANE 研究(降圧薬感受性遺伝子同定のための多施設前向き臨床試験)ゲノムワイド SNP 遺伝子型決定チップの実際と検体集団の遺伝子的特性、**第 30 回日本高血圧学会総会**、平成 19 年 10 月 25 日～27 日、沖縄市
23. 神出計、楊進、花田裕典、又吉哲太郎、安田久代、堀尾武史、吉原史樹、中田裕人、中村敏子、中濱肇、宮田敏行、河野雄平:L型カルシウムチャンネル al_c ならびに al_D サブユニット遺伝子多型はジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の降圧効果に関与する、**第 30 回日本高血圧学会総会**、平成 19 年 10 月 25 日～27 日、沖縄市
24. 根木玲子、池田智明、石川淳子、佐藤有希子、本田繁則、小亀浩市 宮田敏行、藤田富雄:わが国の妊産婦における静脈血栓塞栓症および関連周産期疾患と遺伝的素因についての解析」、**第 30 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15 日～17 日、志摩市
25. Yin Tong、竹下聡、佐藤有希子、阪田敏幸、辛 英哲、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:A large deletion of the *PROS1* gene in a deep vein thrombosis patient with protein S deficiency」、**第 30 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15 日～17 日、志摩市
26. Yin Tong、花田裕典、宮下光太郎、小久保喜弘、赤岩靖久、大坪亮一、長束一行、大槻俊輔、岡山明、峰松一夫、成富博章、友池仁暢、宮田敏行: No Association of VKORC1L1 Haplotypes with Warfarin Dose in a Japanese Patient Population、**第 30 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15 日～17 日、志摩市

27. 石川淳子、加藤久雄、岡田浩美、竹下聡、本田繁則、川崎富夫、末久悦次、辻肇、小嶋 哲人、窓岩清治、坂田洋一、村田満、池田康夫、小久保喜弘、岡山明、友池仁暢、宮田敏行: 日本人の深部静脈血栓症患者における TFPIb Asn221Ser 変異の頻度、**第 30 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15-17 日、志摩市
28. 阪田敏幸、岡本 章、佐藤 清、小久保喜弘、岡山 明、宮田敏行: 血漿中フィブリノーゲンおよび PAI-1 濃度の年代および性別にみた喫煙の影響(吹田研究)、**第 30 回日本血栓止血学会学術集会**、ポスターセッション優秀賞、平成 19 年 11 月 15 日-17 日、志摩市
29. 菊池唯史、小久保喜弘、阪田敏幸、岡本章、岡山明、友池仁暢、宮田敏行: 日本人一般住民におけるフォンビルブランド因子抗原量と循環器疾患危険因子との関連、**第 30 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15 日-17 日、志摩市
30. 坂野史明、小亀浩市、楊進、宮田茂樹、宮田敏行: ADAMTS13 の C 末端ドメイン欠失はマウスに潜在的な血栓性リスクをもたらす、**BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会**、2007 年 12 月 11 日-15 日、横浜市
31. 辛 英哲、小亀浩市、秋山正志、副島見事、宮田敏行: ADAMTS13 は Lys-Plasminogen の C 末端領域に結合する、**BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会**、2007 年 12 月 11 日-15 日、横浜市
32. 江浦由佳、小亀浩市、宮田敏行: Herp 欠損は小胞体ストレス誘導性の ERAD 複合体形成を抑制する、**BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会**、2007 年 12 月 11 日-15 日、横浜市
33. 奥田智彦、辻井知美、山田佐知子、宮田敏行、北 徹、柳田素子: ストレス誘導遺伝子 NDRG1 は腎臓および水晶体において組織保護機能を有する、**BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会**、2007 年 12 月 11 日-15 日、横浜市
34. Fujimura, Y, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Isonishi A, Matsuyama T, Kato S, Ishizashi H, Shida Y, Kenji N, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuraishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Sugimoto M, Wada H, Murata M,

Miyata T, Ikeda Y. Natural history of 33 patients with Upshaw-Schulman syndrome has revealed that all the gravida develop thrombocytopenia, often followed by thrombotic microangiopathy with stillbirth. ***The American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition***, Atlanta USA, December 8-11, 2007.

35. 神出 計、小久保喜弘、福原茂人、花田裕典、嘉田晃子、堀尾武史、友池仁暢、河野雄平、宮田敏行: アンジオテンシン II 情報伝達分子である Protein Tyrosine Kinase 2beta 遺伝子多型は日本人本態性高血圧に関連する、**第13回アンジオテンシンカンファレンス**、平成20年2月8日、東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

なし

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
分担研究報告書

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

分担研究者 森崎隆幸 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨

生理活性物質であるロイコトリエンの生合成は、アラキドン酸 5-リポキシゲナーゼ (ALOX5) の作用により始まる。5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質(5-lipoxygenase activating protein, FLAP)はアラキドン酸と結合して ALOX5 への転送を助けることによりロイコトリエン合成を促進する。FLAP をコードする遺伝子 *ALOX5AP* の多型は心筋梗塞や脳梗塞のリスクを約 2 倍高めると報告された。そこで、FLAP により活性化される *ALOX5* の遺伝子多型と虚血性疾患の関連を検討するため、日本人の *ALOX5* 遺伝子の塩基配列再解析を行った。その結果、*ALOX5* 遺伝子に 27 の遺伝子変異を同定した。

A. 研究目的

アラキドン酸 5-リポキシゲナーゼ(ALOX5)は生理活性物質であるロイコトリエンの生合成の初発酵素である。ALOX5 タンパク質は 674 アミノ酸残基から成り、アラキドン酸の5位に酸素を添加する。この ALOX5 の活性を促進するタンパク質として 5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質(5-lipoxygenase activating protein, FALP)が知られている。FLAP をコードする遺伝子 *ALOX5AP* の遺伝子多型が心筋梗塞や脳梗塞のリスクを2倍高めると報告された(Helgadottir et al., Nat Genet, 36, 233-239, 2004)。5-リポキシゲナーゼ経路は喘息との関連が広く知られ

ているものの、新しく虚血性疾患との関連が指摘された。そこで、本研究では FLAP により活性が促進される ALOX5 に焦点をあてて、本遺伝子と虚血性疾患との関連を調べるため、シーケンスにより遺伝子多型の同定を行った。

B. 研究方法

日本人 48 人の DNA を用いて、エクソンとプロモーター領域のシーケンスを行い、遺伝子多型を収集した。DNA シーケンスは、ABI3730 シーケンサーおよび ABI3100 シーケンサーで行った。遺伝子多型は Sequencher (Gene Code 社)で同定