

報告されているが、本邦ではこれらの報告は皆無である。そこでADAMTS13非著減例を中心に factor H の解析を行い、先天性TMA 症例にて同遺伝子解析を施行した。

## B. 研究方法

昨年度までは、factor H 活性、抗原によってスクリーニングするため、新規の同活性測定法の開発を目指した。しかし、factor H はヘパリンや血管内皮細胞など様々な部位に結合して機能を発揮するため、1 つの検査で factor H 活性を評価することは困難であることから、海外では活性を測定せず、factor H の遺伝子解析が行われている。そこで我々も、遺伝性 TMA 症例にて、factor H 遺伝子解析を行う計画に変更した。倫理委員会承認後、factor H の遺伝子解析を家族性 TMA 1 家系において行った。

症例:1 才男児。生後 3 ヶ月より血小板減少を指摘され、経過観察されていた。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、原因不明のため当院へ精査を依頼された。対象患者以外に、両親、姉、兄 2 人、母方祖父母の解析も同時に行った。

factor H 抗原量: 血漿から精製した factor H をウサギに免疫後、血清を採取し、ポリクローナル抗体を作成した。このポリクローナル抗体を用いたロケット電気泳動にて、factor H 抗原量を測定した。

factor H 遺伝子解析: Marie-Agnes Drafon-Durey ら (J Am Soc Nephrol. 15: 787-795, 2004) の方法を用いて行った。22 組のプライマーを作成し、PCR を施行した

後、ダイレクトシーケンスにて解析した。健康日本人における factor H 遺伝子異常を確認するため、健康人 8 人でも同遺伝子解析を行った。

ADAMTS13 活性: ADAMTS13 によって切断される基質の VWF-A2 ドメインの切断部位を認識するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法を用いて測定した。

[倫理面への配慮]

遺伝子解析は、奈良県立医大の倫理委員会の承認を得た後、対象者に書面での同意を得た。

## C. 研究成果

本家系における factor H 抗原と ADAMTS13 活性の結果のまとめを表 1 に示す。患者本人において、factor H 抗原、ADAMTS13 活性の低下は認めなかった。また、血小板減少の既往歴のある母、母方祖父においても factor H 抗原が祖父で 65% とやや低下している以外、明らかな異常を認めなかった。

factor H 遺伝子解析の結果より、患者本人に認められたアミノ酸置換を伴う変異は V62I, H402Y, R493T, V837L の 4 ヶ所であった。表 2 にこれらの変異と Short Consensus Repeat (SCR) の部位、海外からの報告を示した。V62I 変異は、患者ではヘテロで認められ、Disease risk polymorphism と海外から報告されている。母ホモ、祖父ヘテロで認められ、症状と一致していると考えられるが、検査が終了した健康人 3 人中 2 人でヘテロ変異が認められ、日本人に多い多型である可能性が高い。H402Y 変異は、

患者にホモで認められ、Disease risk polymorphism と報告されている。患者家族では祖父でヘテロ以外はすべてホモで、健常人 8 人中 7 人がホモで異常を持つことより、この多型も日本人で非常に多いと考えられた。R493T は、患者でホモ変異が認められているが、海外からは Non-Disease causing polymorphism と報告され、我々の調べた家族、健常人全員がホモ変異であった。V837L は未報告の変異で、患者、父、姉がヘテロで、健常人 1 人でヘテロ変異を認めた。

#### D. 考察

ADAMTS13 が、TTP の病因として明らかとなったほぼ同時期に、factor H などの補体調節因子が HUS の病因として報告された。本邦では、奈良医大輸血部で ADAMTS13 について検討を行い、TMA の約 1/3 の症例で同酵素活性が著減していることを明らかにした。しかし、現在までのところ factor H の異常は、本邦 TMA では報告されていない。また、factor H に関連した疾患として、HUS 以外に膜増殖性糸球体腎炎(MPGN) や加齢黄斑変性症などが知られているが、これらの疾患との関連も本邦では報告されていない。

当初我々は、factor H の抗原量と活性測定を計画し、抗原量はポリクローナル抗体作成により測定可能となった。先天性と後天性特発性 TMA 症例において、同抗原量を測定したが、抗原欠損例(type 1)は発見できなかった。factor H 活性は、同酵素の機能が多彩であることから単一の方法では評価できないとの意見が聞かれるようになった

ため、本年度は先天性 TMA1 家系において factor H 遺伝子解析を行った。対象患者において 4 つの変異を認めたが、家族や健常人での検討から、V62I と V837L が責任変異としての可能性が示唆された。このうち、V62I 変異は Disease risk polymorphism と海外から報告され、V837L は全く新規の変異であった。しかし、この 2 つの変異とも健常人 8 人程度の検討でも認められることから、この変異のみで TMA を発症するのではなく、危険因子として存在し、他の因子が加わることで発症することが予想された。

#### E. 結論

本邦 TMA の ADAMTS13 非依存例において、factor H 抗原量を測定したところ、完全欠損の症例は発見できなかった。先天性 TMA と診断された 1 家系にて factor H 遺伝子解析を行い、2 つの遺伝子変異が TMA の病因として関与している可能性が予想された。しかし、この変異のみで TMA が発症している可能性は低く、今後、多数の健常人での検討や他の家系でのさらなる factor H の解析が重要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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. *Thomb Res.* 119: 447-452. 2007.
  3. 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.
  4. 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: 27S-35S. 2007.
  5. 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.
  6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
9. 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(1) 213-215. 2008.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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* 111(3) 1295-1298. 2008.
  13. 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
  14. 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
  15. 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
  16. 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

17. 八木秀男、松本雅則、藤村吉博: 血栓症. *Modern Physician* 27: 518-521、2007
18. 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
19. 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
20. 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
2. 学会発表
1. Matsumoto M, Fujimura Y: The ADAMTS13 analysis on thrombotic microangiopathies in Japan, *6<sup>th</sup> World Congress of the International Society for Apheresis/World Apheresis Association 11<sup>th</sup> Congress*, Yokohama (Japan), 2007
2. 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
3. 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 significant in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*, Geneva, July 6-12, 2007
4. 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
5. 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. *49<sup>th</sup> ASH annual meeting*. Atlanta,

- Georgia (USA), December 8–11, 2007
6. 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. **49<sup>th</sup> ASH annual meeting**. Atlanta, Georgia (USA), December 8–11, 2007
  7. 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. **49<sup>th</sup> ASH annual meeting**. Atlanta, Georgia (USA), December 8–11, 2007
  8. 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. **49<sup>th</sup> ASH annual meeting**. Atlanta, Georgia (USA), December 8–11, 2007
  9. 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. **49<sup>th</sup> ASH annual meeting**. Atlanta, Georgia (USA), December 8–11, 2007
  10. 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
  11. 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

12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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

21. 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
22. 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
23. 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
24. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表1 factor H抗原量とADAMTS13活性

	Factor H抗原 (%)	ADAMTS13活性 (%)
本人*	100	120
父	100	94
母*	65	118
姉	75	96
兄1	65	118
兄2	65	110
祖父(母方)*	100	104
祖母(母方)	65	93

\*血小板減少の既往歴があり

表2 発端者に認められたfactor H遺伝子異常

Mutation	Domain	Homo/ Hetero	Remarks
V62I	SCR1	Hetero	Disease risk polymorphism
H402Y	SCR7	Homo	Disease risk polymorphism
R493T	SCR8	Homo	Non-Disease causing polymorphism
V837L	SCR14	Hetero	New

SCR: Short Consensus Repeat

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

分担研究者 富山佳昭 大阪大学医学部附属病院輸血部 講師

研究要旨

本年度では、前年度に引き続き、血栓形成のセンサー分子として同定した ADP 受容体 P2Y<sub>12</sub> に関してインテグリン  $\alpha_{11b}\beta_3$  の機能制御機構につき、新たな解析法の考案および巨核系細胞を用いた実験系により詳細に解析した。まず、リガンド結合に 30 分を要する従来のリガンド結合実験ではダイナミックに変化するインテグリン  $\alpha_{11b}\beta_3$  の機能変化を把握することが困難であるため、あらたにリガンドカイネティックアッセイを考案した。その結果、 $\alpha_{11b}\beta_3$  の活性化には P2Y<sub>12</sub> は必要ではなく、P2Y<sub>12</sub> 欠損血小板では瞬時に  $\alpha_{11b}\beta_3$  が活性化するが、P2Y<sub>12</sub> 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、P2Y<sub>12</sub> 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。以上より、P2Y<sub>12</sub> 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。

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た。現在までの実績として、血栓形成のセンサー分子として ADP 受容体 P2Y<sub>12</sub>、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。本年度は、昨年度に引き続き P2Y<sub>12</sub> に関して、新規実

験系を用いてさらに詳細な分子機序を解析した。

## B. 研究方法

$\alpha_{IIb}\beta_3$  の時間依存性のダイナミックな機能変化は、リガンドを 30 分間反応させて解析するリガンド結合法では解析できない。この問題を克服するため、新たにリガンドカイネティックアッセイを開発した。つまり、リガンド結合速度はその時刻における活性化 $\alpha_{IIb}\beta_3$  数に比例するため、その時刻におけるリガンド結合速度を求めた。具体的には、血小板をリガンド非存在化で刺激後のそれぞれの時刻にリガンドである PAC1 を加え、その結合速度を 30 秒間の PAC1 結合量で算定した。この新規解析法により、 $\alpha_{IIb}\beta_3$  のダイナミックな変化が解析可能となる。一方、巨核球および巨核球系細胞株 CMK における $\alpha_{IIb}\beta_3$  の機能変化も同様に解析した。CMK 細胞は GPIb 高発現分画を用いて解析した。遺伝子導入にはリポフェクション法を用いた。

## C. 研究成果

P2Y<sub>12</sub> 欠損血小板は PAR1 での刺激時、一過性の血小板凝集を示すがその凝集は直ぐに解離した。この成績は $\alpha_{IIb}\beta_3$  の一過性の活性化を示唆している。しかしながら、活性化 $\alpha_{IIb}\beta_3$  を認識する PAC-1 抗体の結合は 30 分を有するため PAR1 刺激において P2Y<sub>12</sub> 欠損血小板に対する結合は検出されなかった。この成績は、P2Y<sub>12</sub> が欠損すると PAR1 刺激において $\alpha_{IIb}\beta_3$  は一過性に活性化する

ものの、 $\alpha_{IIb}\beta_3$  の活性化を維持できないことを示唆している。しかしながら、従来のリガンド結合実験では $\alpha_{IIb}\beta_3$  の時間依存性のダイナミックな変化を捉えることはできない。

新たに考案したリガンドカイネティックアッセイにて正常コントロール血小板と P2Y<sub>12</sub> 欠損血小板の刺激直後のリガンド結合速度は、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、P2Y<sub>12</sub> 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。

従来、巨核系細胞では $\alpha_{IIb}\beta_3$  が発現しているものの、極めて大量のアゴニスト刺激によってのみ $\alpha_{IIb}\beta_3$  が活性化すると考えられていた。しかしながら、 $\alpha_{IIb}\beta_3$  の活性化を時間軸で細かく観察すると、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 $\alpha_{IIb}\beta_3$  が活性化することが初めて明らかとなった。この活性化は P2Y<sub>12</sub> 阻害剤 ARC69931MX によっても抑制されなかった。この CMK 細胞に P2Y<sub>12</sub> を発現させると、 $\alpha_{IIb}\beta_3$  の活性化の持続時間が延長した。

## D. 考案

本年度の検討にて、 $\alpha_{IIb}\beta_3$  はダイナミックにその機能を変化させること、ADP-P2Y<sub>12</sub> のシグナルにより $\alpha_{IIb}\beta_3$  の活性化が制御されていることが明らかとなった。 $\alpha_{IIb}\beta_3$  の初期の活性化は P2Y<sub>12</sub> 非依存性であり、P2Y<sub>12</sub> が欠損していても $\alpha_{IIb}\beta_3$  は活性化する。しかし、その活性化は一過性であり、その活性化の持続には P2Y<sub>12</sub> が必須であることが、血小板のみ

ならず巨核球系細胞を用いた実験系でも明らかになった。血小板は活性化時ADPを放出するが、血小板1個あたりの放出ADP濃度が低いために、autocrine作用によっては $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化を維持することはできず、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化にはparacrine的にあるまとまった血小板(血栓)からのADPが必要である。ADP-P2Y<sub>12</sub>系は $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化を維持するのに必須の分子であることよりADP-P2Y<sub>12</sub>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る。

#### E. 結論

P2Y<sub>12</sub>は $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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が明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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
2. 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

3. 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
4. 富山佳昭:EDTA依存性偽性血小板減少症. *Medical Practice* 24(5) 917、2007
5. 富山佳昭:血栓形成のメカニズム up-to-date. *Angiology Frontier* 6(3) 11-17、2007
6. 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
7. 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
8. 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

9. 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
  10. 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
  11. 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
  12. 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
2. 学会発表
1. 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
  2. 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13-14日、大阪市
  3. 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 謙:Talin と  $\alpha$ -actinin による血小板インテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  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
  4. 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:PAIgG 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
  5. 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
  6. 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

議:  $\alpha$ -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

7. 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

# Ⅲ. 研究成果の刊行に 関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	<i>Thromb Res</i>	120 (2)	181- 186	2007
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.	<i>Thromb Res</i>	119 (1)	35- 43	2007
Yin T, Miyata T.	Warfarin dose and the pharmacogenomics of <i>CYP2C9</i> and <i>VKORC1</i> - rationale and perspectives.	<i>Thromb Res</i>	120 (1)	1- 10	2007
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 <i>ACADSB</i> and <i>COMT</i> with human hypertension.	<i>J Hypertens</i>	25 (1)	103- 110	2007
Miyata T, Kokame K, Banno F, Shin Y, Akiyama M.	ADAMTS13 assays and ADAMTS13-deficient mice.	<i>Curr Opin Hematol</i>	14 (3)	277- 283	2007
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.	<i>Hypertens Res</i>	30 (6)	513- 520	2007
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.	<i>Thromb Haemost</i>	97 (6)	1052 - 1053	2007

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 <i>Ndr1</i> -deficient mice.	<i>J Immunol</i>	178 (11)	7042 - 7053	2007
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 <i>PROS1</i> gene in a deep vein thrombosis patient with protein S deficiency.	<i>Thromb Haemost</i>	98 (4)	783- 789	2007
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 2 $\beta$ as a candidate gene for hypertension.	<i>Pharmacogenet Genomics</i>	17 (11)	931- 939	2007
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.	<i>J Hum Hypertens</i>	21 (11)	883- 892	2007
Morishita T, Matsumoto M, Honoki K, Yoshida A, Takakura Y, Fujimura Y.	Successful Treatment of Primitive Neuroectodermal Tumor-associated Microangiopathy with Multiple Bone Metastases.	<i>Jpn J Clin Oncol</i>	37	66- 69	2007
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.	<i>Thromb Res</i>	119	447- 452	2007
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.	<i>Thromb Res</i>	120	381- 386	2007
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.	<i>Int J Hematol</i>	85	403- 407	2007

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.	<i>Bone Marrow Transplant</i>	40	251-259	2007
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.	<i>Blood</i>	111 (3)	1295-1298	2007
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.	<i>Exp Hematol</i>	35 (6)	947-956	2007
Kokame K, Aoyama Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T.	Inherited and de novo mutations of <i>ADAMTS13</i> in a patient with Upshaw-Schulman syndrome.	<i>J Thromb Haemost</i>	6	213-215	2008
Okuda T, Kokame K, Miyata T.	Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system.	<i>J Histochem Cytochem</i>	56 (2)	175-182	2008
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.	<i>Hum Mol Genet</i>	17 (4)	617-627	2008

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.	<i>Atherosclerosis</i>	196 (1)	29- 36	2008
小亀浩市	ADAMTS13 の測定.	日本血栓止血学会誌	18 (3)	234- 240	2007
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

## IV. 研究成果の 刊行物・別刷