

別添1

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 17 年度～19 年度 総合研究報告書

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]

平成 17 年度～19 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告書

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

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…………… 49
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…………… 79
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…………… 82
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…………… 88
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…………… 93
6. 血栓性血小板減少性紫斑病の責任遺伝子 *ADAMTS13* 変異マウスの作製と解析 坂野 史明…………… 106
7. *ADAMTS13* 非依存 TMA 症例における factor H 解析 松本 雅則…………… 113
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…………… 131

II. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 146

III. 研究成果の刊行物・別刷…………… 152

厚生労働科学研究費補助金

I. 総合研究報告書

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

総合研究報告書

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、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。

本研究は次の3つに分けて進めた。

「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、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 の活性化にかかわる遺伝子として Integrin-linked kinase: ILK を単離・同定した。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 の作用機構を詳細に解析し、ADP による P2Y12 を介した持続的な刺激が、インテグリン α IIb β 3 の活性化の維持に必須であることを明らかにした。血栓形成の抑制因子として SHPS-1、セマフォリン 3A およびアディポネクチンを同定することに成功した。

「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 の局在性を決める結合蛋白質の同定は、高ずり応力下で生じる動脈血栓の解明に重要である。そこで、ADAMTS13 に結合するタンパク質をゲノム網羅的手法を用いてスクリーニングし、プラスミノーゲンを同定した。

先天性血栓性血小板減少性紫斑病患者の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、ADAMTS13 の機能不全を起こす遺伝子変異を同定した。このことから、典型的先天性 TTP はほぼ全て異常 ADAMTS13 遺伝子のホモもしくは複合ヘテロ接合体と解釈することができるようになった。また、一般住民における多型およびその出現頻度を算出し、ADAMTS13 活性との関連を明らかにした。ADAMTS13 完全欠損マウスと C 末端ドメイン欠損マウスを作製し解析したところ、ADAMTS13 欠損により、血中に超高分子量 VWF (UL-VWF) マルチマーが残存し、易血栓傾向となること、ADAMTS13 欠損は血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 発症の十分条件では無く、TTP 発症には付加要因が必要となることが示唆された。また、C 末端ドメイン欠損 ADAMTS13 は、生体内での VWF 切断活性を有するが、血栓形成惹起状況下での活性が不十分である可能性が示唆された。奈良医大輸血部では、全国の医療機関から血栓性微小血管障害症 (TMA) 患者を 783 例集積し ADAMTS13 活性測定を終了した。この結果、同活性著減例は全体の 1/3 で、残り 2/3 は非著減例であった。後者の中で先天性 TMA が 23 例存在し、factor H ポリクローナル抗体を用いた同抗原量測定を行い、抗原欠損例は無い事を確認し、その 1 家系において factor H 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、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た。その結果、血小板数、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 凝集と脂質値との関連はみられず、コラーゲン凝集のみ 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ろう。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、血栓形成に重要な役割を果たす遺伝子群のシーケンスを行い遺伝子多型を収集した。

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。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、この細胞株に EMS を暴露させ、非活性状態のインテグリンを発現する細胞群をセルソーターで分取し、限界希釈法によりクローン化した。得られた細胞を用いて発現クローニングを行い、インテグリン活性化に係わる遺伝子、ILK を同定した。EMS による変異導入の有無を発現クローニングに用いたミュータント細胞において確認した。2 種類のナンセンス変異が ILK mRNA のキナーゼドメイン内にヘテロ接合型で認められた (Arg317Stop および Trp383Stop)。これら 2 種類の変異は ILK ゲノム遺伝子の解析により、異なる対立遺伝子上に存在する複合ヘテロ接合型であった。ミュータント細

胞の ILK 蛋白の発現をイムノブロットで解析した結果、欠如していた。次に、EMS の暴露前の親株細胞を用いて 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 蛋白の発現を減少させるとともにインテグリン活性化状態を抑制した。

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を進めた。

ADP 刺激に対する不応例での P2Y12 解析や巨核球系細胞株 CMK を用いた網羅的解析を行った。さらに血小板機能抑制因子として、血管内皮や脂肪細胞由来の分子に注目し、その血小板および血栓形成に対する機能を解析した。その成果として、血栓形成のセンサー分子として ADP 受容体 P2Y12、抑制因子として SHPS-1、セマフォリン 3A およびアディポネクチンを同定した。ADP 受容体 P2Y12 に関しては、その新たな機能として、血小板インテグリン α IIb β 3 の活性化には関与しないものの、その活性化の維持に極めて重要な分子であることを明らかにした。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。一方、セマフォリン 3A の抑制は Rac1 の抑制による細胞骨格系の変化の抑制のみならず、PI3K 系を抑制し血小板凝集や α IIb β 3 の活性化を抑制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、ADAMTS13（結合蛋白質）としてLys-プラスミノゲンを同定することに成功した。

ADAMTS13に相互作用する蛋白質を酵母ツーハイブリット法を用いてスクリーニングした結果、ADAMTS13結合蛋白質の候補遺伝子は200を超える事が明らかとなった。幾つかの候補遺伝子について、精製蛋白質を入手し固相化した後、ADAMTS13との結合を調べた。その結果、血漿蛋白質プラスミノゲンとADAMTS13が結合する事を見いだした。血液中にはGlu-プラスミノゲンとLys-プラスミノゲンが存在するが、ADAMTS13はLys-プラスミノゲンにのみ結合する事が明らかとなった。また、Lys-プラスミノゲンはADAMTS13活性に影響しない事を明らかにした。

血栓性血小板減少性紫斑病に関わると考えられる遺伝子変異に関する研究

先天性TTP患者および家系構成員のADAMTS13遺伝子を解析したところ、多数の原因変異を同定することができ、いずれも先天性TTPの原因と考えられた。新生変異が一例含まれていた。また、一部の家系において解析したCFHおよびMCP遺伝子に原因変異は見出されなかった。一方、遺伝子多型を探索するため、一般住民のADAMTS13遺伝子を解析し、同定された多型の出現頻度を求めた。ミスセンス多型のアレル頻

度は、T339R: 2.7%、Q448E: 19.2%、P475S: 5.0%、S903L: 4.8%、G1181R: 2.2%と算出された。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、Q448E保持者では若干上昇していることがわかった。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の原因と考えられる補体制御因子 factor Hに関する研究

奈良医大輸血部で集積したTMA 783例のうち、先天性が疑われる症例は56例存在し、33例はADAMTS13活性著減よりUpshaw-Schulman症候群と診断された。残りの23例中18例でfactor H抗原量を測定し、最低値は健常人の42%であり、完全欠損であるtype 1の症例は認めなかった。また、後天性特発性は338例存在し、主治医の診断によりTTPとHUSに分類した。後天性特発性TTP244例のうち、91例でfactor H抗原量を測定したところ12例で50%以下に低下を認めたが、最低値は17%であった。また、後天性特発性HUS94例中32例でfactor H抗原量を測定し、50%以下はわずか2例で、最低値は27%であった。

先天性TMAのADAMTS13活性非著減例の中から、原因不明の血小板減少を繰り返す1才1ヶ月の症例のfactor H遺伝子解析を行った。その結果、4ヶ所

のミスセンス変異 (V62I、H402Y、R493T、V837L) を確認したが、健常人でも認められ、多型であると考えられた。

血栓性血小板減少性紫斑病のモデル動物を用いた解析

ADAMTS13 完全欠損マウスおよびC末端ドメイン欠損マウスを作製し、止血機能を解析した。完全欠損マウスでは、血中にUL-VWF マルチマーの蓄積が認められ、血栓形成能が著しく亢進していた。しかし、通常飼育下では正常に生育し、TTP に特徴的な症状を示す所見は得られなかった。したがって、マウスにおいてADAMTS13欠損は易血栓傾向をもたらすが、それだけではTTP発症に至らず、付加的要因が発症に関わると考えられた。一方、C末端ドメイン欠損マウスのVWFマルチマーは正常であり、C末端欠損型ADAMTS13は生体内で一定の活性を示すと考えられる。しかし、血管障害部位での血栓形成能が野生型マウスより亢進しており、血栓形成惹起状況下にADAMTS13がVWFを効率よく切断するためにはC末端ドメインが重要と考えられた。

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

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た。

吹田市一般住民の中から、性年齢階層別に無作為抽出し、空腹時採血を実施した2,591名を対象にメタボリックシンドロームとフィブリノーゲンとの関連について断面研究を実施した。メタボリックシンドロームは、日本の診断基準を用いた。また、40歳～69歳の同意された受診者（男性661名、女性907名）を対象とした。血小板凝集は、1.7 $\mu\text{g/ml}$ コラーゲンと1.7 μM ADPを用いて測定した。

メタボリックシンドローム群の中で、喫煙、禁煙、非喫煙の順に、血漿フィブリノーゲン値が男女とも高値であった。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惹起血小板凝集能では有意なものが男女ともにみられなかった。コラーゲン惹起血小板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、コラーゲン惹起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 などの血小板凝集にかかわる 7 遺伝子の全翻訳領域の DNA シーケンスを行い、多型の収集を進めた。

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。

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として ILK を同定することに成功した。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。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として Lys-プラスミノーゲンの同定に成功した。ADAMTS13 は Lys-プラスミノーゲンに特徴的なコンフォメーションを認識し結合していると考えられる。先天性 TTP 患者のほとんどが ADAMTS13 遺伝子に原因変異を保有しており、一般住民に見出されるミスセンス多型は TTP 発症と関連しないと考えられた。factor H の遺伝子多型は、TMA の発症の危険因子であることが予想され、今後多数例での解析が必要であると考えられた。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、データベース化を行い、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。血小板の膜受容体遺伝子や情報伝達因子の多型を収集した。

E. 結論

血小板活性化のネットワーク研究を行い、下記の結論を得た。

- 1) ゲノム網羅的な解析を行い、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) ADP 受容体 P2Y₁₂、SHPS-1、セマフォリン 3A およびアディポネクチンを血栓制御分子として同定した。
- 3) ゲノム網羅的な探索法と生化学的解析により、ADAMTS13 結合蛋白質として Lys-プラスミノーゲンを同定した。
- 4) 先天性 TTP 患者の ADAMTS13 原因変異だけでなく、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) マウスでは ADAMTS13 欠損は TTP 発症の十分条件ではないこと、ADAMTS13 の C 末端ドメインは生体内での VWF 切断に寄与することが示唆され、ヒト TTP 発症の基盤を与えた。
- 6) 本邦の TMA 患者において、factor H 抗原量の完全欠損の症例は認めず、軽度から中等度の低下が 11% の症例で認められた。

7) 血小板血栓にかかわる遺伝子の変異を収集し、関連解析の準備が終了した。

8) 都市部一般住民を対象に大規模な血小板凝集能のデータベースを構築し、血小板数、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示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kalaydjieva L, Lochmuller H, Tournev I, Baas F, Beres J, Colomer J, Guergueltcheva V, Herrmann R, Karcagi V, King R, Miyata T: Mullner-Eidenbock A, Okuda T, Milic Rasic V, Santos M, Talim B, Vilchez J, Walter M, Urtizberea A, and Merlini L: 125th ENMC International Workshop: Neuromuscular disorders in the Roma (Gypsy) population, 23-25 April 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 15(1) 65-71. 2005.

2. Tanaka C, Mannami T, Kamide K, Takiuchi S, Kokubo Y, Katsuya T, Kawano Y, Miyata T, Ogihara T, Tomoike H: Single nucleotide polymorphisms in the interleukin-6 gene associated with blood pressure and atherosclerosis in a Japanese

general population. *Hypertens Res.*28(1) 35-41. 2005.

3. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T: FRETTS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol.* 129(1) 93-100. 2005.

4. Kamide K, Kokubo Y, Yang J, Tanaka C, Hanada H, Takiuchi S, Inamoto N, Banno M, Kawano Y, Okayama A, Tomoike H, Miyata T: Hypertension susceptibility genes on chromosome 2p24-p25 in a general Japanese population. *J Hypertens.* 23(5) 955-960. 2005.

5. Miwa Y, Takiuchi S, Kamide K, Yoshii M, Horio T, Tanaka C, Banno M, Miyata T, Sasaguri T, Kawano Y: Insertion/ deletion polymorphism in clusterin gene influences serum lipid levels and carotid intima-media thickness in hypertensive Japanese females. *Biochem Biophys Res Commun.* 331(4) 1587-1593. 2005.

6. Yang J, Kamide K, Kokubo Y, Takiuchi S, Tanaka C, Banno M, Miwa Y, Yoshii M, Horio T, Okayama A, Tomoike H, Kawano Y, Miyata T: Genetic variations of regulator of G-protein signaling 2 in hypertensive patients and in the general population.

- J Hypertens.* 23(8) 1497–1505. 2005.
7. Kamide K, Yang J, Kokubo Y, Takiuchi S, Miwa Y, Horio T, Tanaka C, Banno M, Nagura J, Okayama A, Tomoike H, Kawano Y, Miyata T: A novel missense mutation, F826Y, in the mineralocorticoid receptor gene in Japanese hypertensives: its implications for clinical phenotypes. *Hypertens Res.* 28(9) 703–709. 2005.
 8. Miyata T, Kokame K, Banno F: Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol.* 12(5) 384–389. 2005.
 9. Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Hayashi T, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T: Protein S–K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* 107(4) 1737–1738. 2006.
 10. Kamide K, Kokubo Y, Hanada H, Nagura J, Yang J, Takiuchi S, Tanaka C, Banno M, Miwa Y, Yoshii M, Matayoshi T, Yasuda H, Horio T, Okayama A, Tomoike H, Kawano Y, Miyata T: Genetic variations of HSD11B2 in hypertensive patients and in the general population, six rare missense/frameshift mutations. *Hypertens Res.* 29(4) 243–252. 2006.
 11. 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.* 83(3) 217–223. 2006.
 12. 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* 107(8) 3161–3166. 2006.
 13. 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.* 21(5) 1289–1292. 2006.
 14. Kokubo Y, Tomoike H, Tanaka C, Banno M, Okuda T, Inamoto N, Kamide K, Kawano Y, Miyata T: Association of sixty-one non-synonymous polymorphisms in

- forty-one hypertension candidate genes with blood pressure variation and hypertension. *Hypertens Res.* 29(8) 611-619. 2006.
15. 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.* 4(9) 2010-2013. 2006.
 16. 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 gamma - carboxylation - related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in the general population. *Int J Hematol.* 84(5) 387-397. 2006.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Tomoike H, and 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.
 20. Yin T, Miyata T: Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 - rationale and perspectives. *Thromb Res.* 120(1) 1-10. 2007.
 21. 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.

22. 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.
23. Miyata T, Kokame K, Banno F, Shin Y, and Akiyama M: ADAMTS13 assays and ADAMTS13-deficient mice. *Curr Opin Hematol.* 14(3) 277-283. 2007.
24. 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.
25. Sakata T, Okamoto A, Morita T, Kokubo Y, Sato K, Okayama A, Tomoike H, and Miyata T: Age- and gender-related differences of plasma prothrombin activity levels. *Thromb Haemost.* 97(6) 1052-1053. 2007.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.

30. 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.
31. 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.* 2008, in press.
32. 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.* 2008, in press.
33. 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.
34. H. Kato, H. Kashiwagi, M. Shiraga, S. Tadokoro, T. Kamae, H. Ujiie, Honda S, S. Miyata, Y. Ijiri, J. Yamamoto, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Kurata, I. Shimomura, Y. Tomiyama, Y. Kanakura: Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(1): 224-230, 2006
35. Anderson PJ, Kokame K, Sadler JE: Zinc and calcium ions cooperatively modulate ADAMTS13 activity. *J Biol Chem.* 281(2) 850-857. 2006.
36. 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.* 96(5) 1491-1499. 2006.
37. 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.* 66(10) 5012-5020. 2006.

38. 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.** 4(27) 1-9. 2006.
39. 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.** 26(21) 7999-8010. 2006.
40. 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** 4(4) 323-331. 2006.
41. 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.
42. 小亀浩市: 血栓性血小板減少性紫斑病/溶血性尿毒症症候群. **分子細胞治療** 4(3) 209-215. 2005.
43. 小亀浩市、宮田敏行: TTP 迅速診断を目的とした新規 ADAMTS13 測定法の開発と応用. **臨床病理誌** 53(7) 639-645. 2005.
44. 奥田智彦、小亀浩市、宮田敏行: スレス応答遺伝子 NDRG1 の機能解析. **日本生化学会誌** 77(7) 630-634. 2005.
45. 坂野史明、小亀浩市: VWF 切断酵素/ADAMTS13. **図説 血栓・止血・血管学** (一瀬白帝編). 中外医学社. 218-226. 2005.
46. 小亀浩市: ADAMTS13 活性測定法. **血液疾患**-state of arts Ver.3 (坂田洋一, 小澤敬也編). 医歯薬出版. 421-424. 2005.
47. 小亀浩市: ADAMTS13. **血栓症ナビゲーター** (池田康夫監修, 内山真一郎, 後藤信哉, 重松宏, 半田誠編). メディカルレビュー社. 204-205. 2006.
48. 安部由美子、小亀浩市、寒川賢治、宮本薫: ダイオキ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** 50(1) 107-112. 2006.
49. 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** 15(2) 30-40. 2006.
50. 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**. 78(6) 528-532. 2006.
51. 小亀浩市：ADAMTS-13 の測定. **International Review of Thrombosis**. 1(4) 266-270. 2006.
52. 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** 14(4) 258-261. 2006.
53. 小亀浩市：ADAMTS13 の測定. **日本血栓止血学会誌** 18(3) 234-240. 2007.
54. Banno F, Miyata T: Biology of an anti-thrombotic factor ADAMTS13. **Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis** in press.
55. 宮田敏行、小亀浩市、坂野史明、本田繁則、宮田茂樹：血栓性血小板減少性紫斑病と ADAMTS13. **循環器病研究の進歩** 26: 90-96. 2005.
56. 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** 17: 83-87. 2006.
57. 坂野史明：VWF, ADAMTS13 と血栓性血小板減少性紫斑病. **血液・腫瘍科** 53: 203-209. 2006.
58. 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: 36-45. 2007.
59. Furukoji E, Matsumoto M, Yamashita A, Yagi H, Sakurai Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Morishita K, Fujimura Y, Tamura S, Asada Y. Adenovirus-mediated transfer of human placental ecto-ATP diphosphohydrolase I to vascular smooth muscle cells suppresses platelet aggregation in vitro and arterial thrombus formation in vivo. **Circulation** 111: 808-815. 2005.
60. Yagita M, Uemura M, Yamahara H, Kitano T, Kunitomi A, Konaka Y, Nakamura T, Matsumoto M, Ishizashi H, Fukui H, Fujimura Y.

- Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Hepatology* 42: 420-421. 2005.
61. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto T, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 106: 922-924. 2005.
62. Kosugi S, Matsumoto M, Ohtani Y, Take H, Ishizashi H, Fujimura Y, Kuyama J. Rituximab provided long-term remission in a case with refractory relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol.* 81:433-436. 2005.
63. Fujisaki K, Matsutani K, Yoshimitsu T, Nakanishi K, Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Fujimura Y, Takeda K, Hirakata H, Iida M. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with polyarthritis nodosa: demonstration of the inhibitor against von Willebrand factor-cleaving protease. *Clinical Nephrology* 64: 305-310. 2005.
64. Sugimoto T, Saigo K, Kanenda Y, Manabe N, Narita H, Wakuya J, Imoto S, Murashima T, Matsumoto M, Fujimura Y, Nishimura R, Koizumi T, Kumagai S. Von Willebrand factor-cleaving protease activity remains at the intermediate level in thrombotic thrombocytopenic purpura. A CML case treated with interferon- α . *Acta Haematologica* 113: 198-203. 2005.
65. Uemura M, Ishikawa M, Matsuyama T, Fujimoto M, Kojima H, Sakurai S, Toyohara M, Yamazaki M, Yoshiji H, Yamao J, Matsumoto M, Ishizashi H, Fujimura Y, Fukui H. Decreased activity of plasma ADAMTS13 may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res.* 29(12Suppl) 264S-271S. 2005.
66. Matsumoto M, Kawaguchi S, Ishizashi H, Yagi H, Iida J, Sakaki T, Fujimura Y. Platelets treated with ticlopidine are less reactive to unusually large VWF multimers than are those treated with aspirin under high shear stress. *Pathophysiology Haemost Thromb.* 35: 35-40. 2005.