

- 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(12 Suppl) 264S-271S, 2005.
8. 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. *Pathophys Haemost Thromb* 35: 35-40, 2005.
 9. Shibagaki Y, Matsumoto M, Kokame K, Ohba S, Miyata T, Fujimura Y, and 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: 1289-1292. 2006.
 10. Ko S, Okano E, Kanehiro H, Matsumoto M, Ishizashi H, Uemura M, Fujimura Y, Tanaka K, Nakajima Y. Plasma ADAMTS13 activity may predict early adverse events in living donor liver transplantation: Observations in three cases. *Liver Transplant* 12: 859-869. 2006.
 11. Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y. Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* 46: 1444-1452. 2006.
 12. Sato T, Hanaoka R, Ohshima M, Miwa Y, Okazaki Y, Yajima N, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Inokuma S. Analyses of ADAMTS13 activity and its inhibitor in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura secondary to connective tissue diseases: Observations in a single hospital. *Clin Exp Rheumatol*. 24: 454-455. 2006.
 13. 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: 66-69. 2007.
 14. Kobayashi T, Wad H, Kamikura Y, Matsumoto T, Mori Y, Kaneko T, Nobori T, Matsumoto M, Fujimura Y, Shiku H. Decreased ADAMTS13 activity in plasma from patients with

- thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* 119: 447-452. 2007.
15. 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: 301-305. 2007.
 16. Kitano K, Gibo Y, Kamijo A, Furuta K, Oguchi S, Joshita S, Takahashi Y, Ishida F, Matsumoto M, Uemura M, Fujimura Y. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with pegylated-interferon alpha-2a by an ADAMTS13 inhibitor in a patient with chronic hepatitis C. *Haematologica.* 91; ECR34. 2006
 17. 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.
 18. 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; 381-386, 2007.
 19. 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: 403-407. 2007.
 20. 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: 1138-1143. 2007.
21. 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: 251-259. 2007.
22. 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)
23. 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.
24. 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).
25. 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* (in press)
26. 大渡五月、松本雅則、高塚祥芝、竹内章吾、牧野虎彦、魚住公治、藤村吉博、宇都宮興。胃癌の骨髄転位に併発した血栓性血小板減少性紫斑病。 *臨床と研究*。 2005 ; 1379-1382.
27. 山根隆志、田中千尋、村田美紀、柱本照、三浦靖史、塩沢俊一、宮本宣友、前川修司、金澤健司、橋本正良、秋田穂束、松本雅則、石指宏通、藤村吉博。血漿交換が著効したSLEに合併したTTPの1例。 *臨床リウマチ* 2005; 17: 48-52

28. 松山友美、植村正人、石川昌利、藤本正男、小寫秀之、櫻井伸也、石井禎庸、浪崎正、豊原眞久、山崎正晴、吉治仁志、山尾純一、福井博、松本雅則、石指宏通、加藤誠司、藤村吉博、瀧村力. アルコール性肝炎における ADFAMTS13 と von Willebrand 因子の動態-重症度との関連-. **アルコールと医学生物学**.2005;25: 112-117
29. 松山友美、植村正人、石川昌利、森岡千恵、藤本正男、櫻井伸也、小寫秀之、吉治仁志、福井博、松本雅則、石指宏通、加藤誠司、藤村吉博、瀧村力. アルコール性肝炎における血漿 ADAMTS13 活性低下の機序-サイトカインならびにインヒビターの面からの検討-. **アルコールと医学生物学**. 2006; 26: 100-107
30. 洪鉉寿、青山泰孝、山村亮介、太田忠信、麥谷安津子、山根孝久、日野雅之、松本雅則、藤村吉博. Rituximab 投与が奏効し、長期寛解を維持している血漿交換抵抗性重症血栓性血小板減少性紫斑病. **臨床血液** **2006**; 47: 1528-1532, 2006.
31. 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.
32. 松本雅則、藤村吉博. 周術期の輸液・輸血療法. 遅発型輸血副作用. **麻酔科診療プラクティス** 18 pp122-123、2005.
33. 松本雅則、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP). **三輪血液病学**. pp1776-1782, 2005
34. 松本雅則、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病. **血液疾患ハンドブック**. pp216-227
35. 松本雅則. von Willebrand 病. **疾患別最新処方** 2005: 482-483
36. 藤村吉博、石西綾美、石指宏道、八木秀男、松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP) **血液フロンティア** 2005;15 :725-736
37. 松本雅則. 血管内皮細胞からみた血栓性微小血管障害症(TMA)と ADAMTS13. **血管医学** 2005;6: 279-286
38. 松本雅則. 血栓性微小血管障害症における ADAMTS13 活性測定の有効性について教えて下さい. **血栓と循環** 2005;13:166-169
39. 松本雅則. 技術講座 VWF 測定.

- Medical Technology* 2006; 34: 57-64.
40. 松本雅則. von Willebrand 因子切断酵素(ADAMTS13)と血栓性血小板減少性紫斑病. *日本検査血液学会雑誌* 2005; 6: 280-287
41. 松本雅則、石指宏通、八木秀男、藤村吉博. ADAMTS13 解析による TTP/HUS の診. *奈良医学雑誌* 2006;57:1-10.
42. 松本雅則、松山友美、石指宏通、植村正人、秋山 暢、富山順治、名取一彦、倉石安庸、今村 豊、井上信正、日笠 聡、清家雅子、小塚輝彦、原雅道、小亀浩市、宮田敏行、藤村吉博. Upshaw-Schulman 症候群:妊娠時の仮面を被った血小板減少症. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* 2006; 15: 30-40.
43. 松本雅則. TTP の診断と治療の進歩. *日本血栓止血学会誌* 2006; 17: 393-401.
44. 八木秀男、伊藤武文、児山紀子、松本雅則、木村弘、椿和央、藤村吉博. ヘパリン起因性血小板減少症の病態と診断、治療. *血液・腫瘍科* 2006; 53: 451-458.
45. 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
46. 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
47. 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
48. 八木秀男、松本雅則、藤村吉博. 血栓症. *Modern Physician* 27: 518-521, 2007
49. 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
50. 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. *日内会誌* 96: 353-362, 2007
51. 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) pp136-139 (日本医事新報社)2007
2. 学会発表
1. Matsumoto M, Kato S, Hiura H, Fujimura Y. Novel ELISA assay for ADAMTS13 activity using MoAbs

- against the N-terminal decapeptide of VWFA2 domain. **51st Annual SCC Meeting. SSC Sub-committee on VWF.** Sydney Australia, August 7, 2005.
2. Furukoji E, Matsumoto M, Yamashita A, Yagi H, Sakurai Y, Marutsuka K, Hatakeyama H, Morishita K, Fujimura Y, Tamura S, Asada Y. Adenovirus-Mediated Transfer of Human Placental Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase to Vascular Smooth Muscle Cells Suppresses Platelet Aggregation in vitro and Arterial thrombus Formation in vivo. **The XXth Congress of the International Society on Thrombosis & Haemostasis.** Sydney Australia, August 7, 2005.
 3. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Isikawa M, Iwamoto T, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y. Stellate cells produce ADAMTS13 in human liver. **The XXth Congress of the International Society on Thrombosis & Haemostasis.** Sydney Australia, August 8, 2005.
 4. Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y. Upshaw-Schulman syndrome: a masqueraded thrombocytopenic purpura (TTP). **47th ASH Annual Meeting,** Atlanta Georgia, December 12, 2005.
 5. Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Hiura H, Fujimura Y. Monoclonal antibodies to a VWF -A2 decapeptide with the C-terminal residue Try1605, generated by ADAMTS13 cleavage, develop a highly sensitive ELISA for its activity and characterize Upshaw-Schulman syndrome. **47th ASH Annual Meeting,** Atlanta Georgia, December 12, 2005.
 6. Matsumoto M, Kato S, Hiura H, Fujimura Y. Japanese experience of novel ADAMTS13 activity-ELISA on patients with TMA and liver transplantation. **52nd Annual SSC meeting.** Oslo Norway, June 28, 2006.
 7. Koyama N, Suzuki T, Yamauchi M, Makinodan K, Tamaki S, Fukuoka A, Tomoda K, Yoshikawa M, Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Kimura H. Unusually large von Willebrand factor multimers might be

- involved in cardiovascular events in patients with obstructive sleep apnea syndrome. ***European Respiratory Society Annual Congress*** 2006. Munich, Germany, September 2, 2006.
8. B. Kim, C. Davidson, H.C. Kwaan, A. Zakarija, N. Bandarenko, D.K. Pandey, R. Sarode, J.M. McKoy, A.D. Tevar, J.F. Cursio, T.J. Raife, J.E. Kiss, D.W. Raisch, J.E. Sadler, T.L. Ortel, X.L. Zheng, S. Kato, M. Matsumoto, M. Uemura, Y. Fujimura, C.L. Bennett. Characteristics of Two Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) Syndromes Associated with Ticlopidine and Clopidogrel: Results From the Surveillance, Epidemiology, and Risk Factors for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (SERF-TTP) Research Group. ***AHA Scientific Sessions 2006***, Chicago, Illinois, November, 12, 2006.
 9. N. Bandarenko, A. Zakarija, B. Kim, H.C. Kwaan, J.M. McKoy, D.K. Pandey, S.N. Hay, R. Sarode, A.D. Tevar, J.F. Cursio, T.J. Raife, J.E. Kiss, C. Davidson, J.E. Sadler, T.L. Ortel, X.L. Zheng, S. Kato, M. Matsumoto, M. Uemura, Y. Fujimura, C.L. Bennett. Two Mechanistic Pathways of Ticlopidine- and Clopidogrel-associated TTP: Results From the Surveillance, Epidemiology, and Risk Factors for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (SERF-TTP) Research Group. ***59th AABB Annual Meeting***, Miami Beach, Florida, October, 21, 2006.
 10. Uemura M, Kato S, Matsumoto M, Isonishi A, Ishizashi H, Hiura H, Matsuyama T, Yagi H, Ishikawa M, Fujimoto M, Kojima H, Yoshiji H, Fujimura Y, Fukui H. Increased plasma VWF antigen over decreased ADAMTS13 activity in patients with liver disturbance and clinical features. ***The 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology***, Orlando, Florida, December 9, 2006.
 11. Matsumoto M, Kawa K, Yagi H, Yong-Dong Park, Takeshima Y, Kosaka Y, Hara H, Kai S, Yamamoto M, Kanemaru A, Fukuhara S, Hino M, Sako M, Hiraoka A, Ogawa H, Hara J, Fujimura H. Infusions of fresh frozen plasma to the patients with a high-risk group for hepatic VOD associated with stem cell transplantation reduce its occurrence. ***The 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology***, Orlando, Florida, December 9, 2006.

- Geneva, July 6–12, 2007.
12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
19. 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.
20. 洪鉉寿、青山泰孝、山村亮介、太田忠信、麦谷安津子、日野雅之、松本雅則、八木秀男、石指宏道、藤村吉博。rituximab 投与が非常に有効であった血漿交換抵抗性の難治性 TTP. **第 102 回日本内科学会講演会**、平成 17 年 4 月 9 日、大阪市
21. 松山友美、植村正人、石川昌利、松本雅則、石指宏道、森岡千恵、櫻井伸也、藤本正男、小嶋秀之、安辰一、石井禎暢、藤村吉博、福井博。アルコール性肝炎における von Willebrand factor 抗原と ADAMTS13 の動態. **第 41 回日本肝臓学会総会**、平成 17 年 6 月 16 日、大阪市
22. 松本雅則、藤村吉博、小亀浩市、宮田敏行。TTP/HUS 患者における ADAMTS13 解析. **第 42 回補体シンポジウム**、平成 17 年 8 月 19 日、名古屋市
23. 野村明彦、大賀正一、高田英俊、松本雅則、藤村吉博、原寿郎。TTP と複数の抗血球・凝固因子抗体による血液障害で発症した SLE 小児例. **第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会**、平成 17 年 9 月 17 日、横浜市
24. 加藤誠司、松本雅則、日裏久英、藤村吉博。ADAMTS13 活性の新規 ELISA 測定系の開発: VWF-Tyr842 を特異的に認識する新規モノクローナル抗体作成を利用. **第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会**、平成 17 年 9 月 17 日、横浜市
25. 本間圭一郎、高井和江、新國公司、布施一郎、松本雅則、和田英夫、相澤義。Rituximab が有効であった難治性血栓性血小板減少性紫斑病の一例. **第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会**、平成 17 年 9 月 17 日-19 日、横浜市
26. 今村豊、木村芳三、野見山敬太、長部誠志、松本雅則、藤村吉博、小亀浩市、宮田敏行。妊娠を契機に発症した Upshaw-Schulman 症候群の姉妹

- 例. **第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会**、平成 17 年 9 月 17 日、横浜市
27. 松本雅則、石指宏道、松山友美、加藤誠司、八木秀男、藤村吉博. 奈良医大輸血部にて集積した本邦 TMA564 例の ADAMTS13 解析. **第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会**、平成 17 年 9 月 19 日、横浜市
28. 松本雅則. EBM に基づいた血小板輸血. **第 10 回近畿輸血検査研修会**、平成 17 年 9 月 11 日、橿原市
29. 植村正人、辰巳晃子、松本雅則、石川昌利、松山友美、藤本正男、岩本顕聰、森敏俊雄、小寫秀之、吉治仁志、和中明夫、藤村吉博、福井博. ADAMTS13 は肝星細胞(伊藤細胞)で産生されている. **DDW-JAPAN 2005**、平成 17 年 10 月 5 日、神戸市
30. 松山友美、植村正人、石川昌利、松本雅則、石指宏道、森岡千恵、加藤誠司、櫻井伸也、浪崎正、藤本正男、小寫秀之、石井禎暢、安辰一、瀧村力、藤村吉博、福井博. アルコール性肝炎における ADAMTS13 活性と血漿サイトカインの動態. **第 36 回日本肝臓学会西部会**、平成 17 年 11 月 25 日、鈴鹿市
31. 加藤誠司、松本雅則、日裏久英、藤村吉博. 新規 ADAMTS13 活性測定 ELISA の開発 : VWF の R834EQAPNLVY842 に特異的エピトープを有するモノクローナル抗体の産生と利用. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 17 年 11 月 25 日、福岡市
32. 古小路英二、田中直子、山下篤、松本雅則、八木秀男、櫻井嘉彦、丸塚浩助、畠山金太、藤村吉博、山本隆一、浅田祐士郎. 胎盤由来 ecto-NTP Diphosphohydrolase 1 は ADP, ATP による障害動脈の収縮を抑制する. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 17 年 11 月 24 日、福岡市
33. 植村正人、辰巳晃子、松本雅則、石川昌利、松山友美、藤本正男、福井博、藤村吉博. ADAMTS13 は肝星細胞(伊東細胞)で産生されている. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 17 年 11 月 25 日、福岡市
34. 松本雅則、石西綾美、藤村吉博、石指宏道、秋山暢、富山順治、名取一彦、倉石安庸、今村豊、井上信正、小亀浩市、宮田敏行. 妊娠経過中に診断された Upshaw-Schulman 症候群の 4 家系 7 症例. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 17 年 11

月 25 日、福岡市

35. 松本雅則. ADAMTS13 からみた TMA の病態解析. **第 4 回九州 BMT 研究会**、平成 18 年 3 月 11 日、福岡市
36. 松本雅則. ADAMTS13 による TMA の病態解析. **第 60 回兵庫血栓・止血研究会**(特別講演)、平成 18 年 4 月 22 日、神戸市
37. 松本雅則、藤村吉博. 膠原病における TMA. **第 50 回(中)日本リウマチ学会総会 第 15 回国際リウマチシンポジウム**(シンポジウム)、平成 18 年 4 月 23 日、長崎市
38. 松本雅則. 膠原病 TMA における ADAMTS13 の病態解析. **第 3 回膠原病倶楽部**(特別講演)、平成 18 年 5 月 24 日、名古屋市
39. 松本雅則、藤村吉博. ADAMTS13 研究の展望: 多彩表現型 TMA の病態解析. **第 54 回日本輸血学会**(シンポジウム)、平成 18 年 6 月 9 日、大阪市
40. 伊藤晋、竹嶋俊介、山本茂一、千葉桂子、林司、川瀬雅子、和田光雄、加藤誠司、日裏久英、松本雅則、藤村吉博. ADAMTS13 活性測定試薬の開発. **第 54 回日本輸血学会**、平成 18 年 6 月 9 日、大阪市
41. 松本雅則. ADAMTS13 による TMA の病態解析. **第 3 回倉敷血液カンファレンス**(特別講演)、平成 18 年 9 月 15 日、倉敷市
42. 松本雅則. ADAMTS13 による TMA の病態解析. **第 44 回東北血栓・止血研究会**(特別講演)、平成 18 年 9 月 16 日、仙台市
43. 松本雅則. Update in post-transplantation TMA and its future prospect. **第 68 回日本血液学会総会 第 48 回日本臨床血液学会総会**(シンポジウム)、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
44. 加藤誠司、今野武津子、田中亮二郎、日裏久英、松本雅則、石西綾美、藤村吉博. 高感度 ADAMTS13 活性 ELISA で測定した同活性血中半減期 **第 68 回日本血液学会総会 第 48 回日本臨床血液学会総会**、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
45. 志田泰明、杉本充彦、水野智寛、濱田匡章、西尾健治、加藤誠司、松本雅則、藤村吉博. 血流下での ADAMTS13 活性測定法の確立. **第 68 回日本血液学会総会 第 48 回日本臨床血液学会総会**、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市

46. 松山友美、松本雅則、猪熊茂子、加藤誠司、石指宏通、石西綾美、植村正人、藤村吉博。膠原病に合併した血栓性微小血管障害症(TMA)のADAMTS13 解析。 **第 68 回日本血液学会総会 第 48 回日本臨床血液学会総会**、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
47. 上條敦、北野嘉良、城下智、宜保行雄、石田文宏、植村正人、松本雅則、藤村吉博。ADAMTS13 inhibitor 出現により発症した Peginterferon 関連血栓性血小板減少性紫斑病。 **第 68 回日本血液学会総会 第 48 回日本臨床血液学会総会**、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
48. 岩重淳司、葛城武文、東丈裕、毛利文彦、森本浩章、松浦愛、田中綾、溝部高光、塚田順一、田中良哉、松本雅則、加藤誠司、藤村吉博。リツキシマブ抵抗性を示した重症血栓性血小板減少性紫斑病。 **第 68 回日本血液学会総会 第 48 回日本臨床血液学会総会**、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
49. 小林稔彦、松本剛史、森美貴、兼見敏浩、和田英夫、登勉、珠玖洋、松本雅則、藤村吉博。血栓性血小板減少性紫斑病における、各種測定方法による ADAMTS13 測定、 **第 68 回日本血液学会総会 第 48 回日本臨床血液学会総会**、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
50. 坂井薫、松本雅則、藤村吉博。病理腎からは血管内皮障害がはっきりしなかった塩酸チクロピジン関連血栓性血小板減少性紫斑病の症例。 **第 68 回日本血液学会総会 第 48 回日本臨床血液学会総会**、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
51. 松山友美、植村正人、松本雅則、石指宏通、加藤誠司、石川昌利、森岡千恵、田村信宏、櫻井伸也、藤本正男、小畷秀之、吉治仁志、瀧村力、藤村吉博、福井博。健常人における中等量エタノール摂取後の ADAMTS13 活性と VWF 抗原の動態。 **DDW-JAPAN 2006**、平成 18 年 10 月 11 日～14 日、札幌市
52. 松本雅則、松山友美、加藤誠司、石西綾美、八木秀男、日裏久英、藤村吉博。ADAMTS13 の臨床応用-測定とその解釈 適正な血小板輸血医療を行うのに必須の ADAMTS13 活性と HIT 抗体の測定。 **第 29 回血栓止血学会学術集会** (学術推進 SPC シンポジウム)、平成 18 年 11 月 16 日、栃木市
53. 加藤誠司、今野武津子、田中亮二郎、石指宏通、松本雅則、石西綾美、松山友美、八木秀男、日裏久英、藤村

- 吉博. 新規 ADAMTS13act-ELISA の
応用. **第 29 回血栓止血学会学術
集会** (学術推進 SPC シンポジウム)、
平成 18 年 11 月 16 日、栃木市
54. 松本雅則、西田幸世、前田美和、辻
内智美、門池真弓、結石杏奈、丹羽
欣正、藤村吉博、杉山幸正、谷奥正
俊. 当院におけるアルブミン製剤使用
削減の取り組みについて. **第 50 回
日本輸血学会 近畿支部総会** (シ
ンポジウム)、平成 18 年 12 月 2 日、
大阪市
55. 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
gravid develop thrombocytopenia,
often followed by thrombotic
microangiopathy with stillbirth. **49th
ASH annual meeting**. Atlanta,
Georgia (USA), December 8-11, 2007
56. 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
57. 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
58. 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
59. 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
60. 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
61. 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
62. 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
63. 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
64. 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
65. 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—ずり速度との機能連関解析. **第 30 回血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15 日、志摩市
66. 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 回血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15 日、志摩市
67. 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 回血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15 日、志摩市
68. 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 回血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15 日、志摩市
69. 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 回血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月 15 日、志摩市
70. 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

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 講師

研究要旨

本研究では、病的血栓制御に関する新たな制御分子や制御機構を明らかにすることを目的とした。血栓形成はその促進因子と抑制因子のバランスにより制御されていると考えられるため、巨核球系細胞株 CMK において分化成熟過程により発現が変化する分子や血管内皮や脂肪細胞に発現する分子を中心として、病的動脈血栓形成を制御する遺伝子の同定を試みた。その結果、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、Semaphorin 3A およびアディポネクチンを同定することに成功した。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 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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。一方、Semaphorin 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 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化を抑制することを明らかにした。

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いる。このことから、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 やコラーゲンなどの促進因子および NO やプロスタサイクリン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、巨核球系細胞株 CMK において分化成熟過程により発現が変化する分子や血管内皮に発現する分子を中心として、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、さらにその分子機構の解明を目指すことにより、血栓形成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。

B. 研究方法

報告者は既に先天性血小板機能異常症の解析過程の中で ADP 刺激に対する不応例を

同定しているが、その症例に関し ADP 受容体異常の分子機構を解析した。本例は ADP 刺激における血小板の shape change は正常であり、cAMP の低下が障害されていたため、ADP 受容体である P2Y₁₂ の欠損例が疑われた。一方では、本症例の血小板機能異常の詳細および血栓形成に関しての解析を行った。

血小板機能獲得の遺伝子動態を明らかにするため、無核である血小板に替わる新たな実験系として巨核球系細胞株 CMK を用いた分化誘導系を用いて、未分化 CMK と分化 CMK の遺伝子プロファイルに関し cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。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。

一方、血小板機能の制御機構の詳細を明らかにするためにインテグリン $\alpha_{11b}\beta_3$ に関して新たな解析方法を考案した。 $\alpha_{11b}\beta_3$ 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従来の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。リガンドカイネティックアッセイでは $\alpha_{11b}\beta_3$ の時間における機能変化の解析を試みる。つまり、リガンド結合速度はその時刻における活性化 $\alpha_{11b}\beta_3$ 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、 $\alpha_{11b}\beta_3$ 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 $\alpha_{11b}\beta_3$ 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

本研究プロジェクトの成果として、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、Semaphorin 3A およびアディポネクチンを同定した。

1) P2Y₁₂ に関する成果

軽度の出血傾向を有する ADP に対する血小板不応例が本邦初の P2Y₁₂ 受容体異常症であることを同定し、その遺伝子異常が P2Y₁₂ 遺伝子の開始コドン ATG の AGG への点突然変異であることを明らかにした。さらに、この遺伝子異常が P2Y₁₂ 欠損の原因であることを発現実験により明らかにした。本症血小板は ADP に対する反応性の極度の障害のみならず、低濃度のコラーゲンやトロンボキサン A₂ など ADP 以外の血小板活性化物質にて惹起される血小板凝集が障害されていること、流動下での血栓形成が障害されており、形成される血栓が脆弱で不安定であることを明らかにした。さらに P2Y₁₂ の阻害剤である AR-C69931MX は P2Y₁₂ 欠損血小板に対してさらなる機能異常を誘導しなかったことより、AR-C69931MX の特異性は極めて高いことが示された。P2Y₁₂ 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血小

板凝集は直ぐに解離し、活性化 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ を認識する PAC-1 抗体の結合は PAR1 刺激において検出されなかった。この成績は、P2Y₁₂が欠損すると PAR1 刺激において $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ は一過性に活性化するものの、 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ の活性化を維持できないことを示唆している。この現象より、報告者らは $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ の活性化を維持するには血小板から放出された ADP とその受容体である P2Y₁₂ からのシグナルが必須であるとの仮説をたて、この仮説を検証するために、初めに正常血小板をトロンビンにて刺激し放出反応および $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 活性化を完了させた後に、P2Y₁₂ 阻害剤 AR-C69931MX 1 μ M などの種々阻害剤を加え PAC1 抗体結合フローサイトメーターにて測定した。また、トロンビンの濃度を一定に保ち、血小板数を減少させ $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 活性化を観察した。血小板をトロンビンで刺激すると、血小板の放出反応が完了し P セレクチンが発現すると共に $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ が活性化する。この条件では、 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ の活性化は数時間持続する。しかしながら、興味深いことに血小板が活性化した後に P2Y₁₂ 阻害剤 AR-C69931MX 1 μ M を加えると、P-selectin の発現は変化しないが、 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ が不活性化されることが本研究で明らかになった。この $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ の不活性化は、P2Y₁₂ 阻害剤特異的であり、セロトニン受容体やトロンボキサン A2 受容体、 α_2 -アドレナリン受容体の阻害剤では認められなかった。さらに血小板数を 50,000/ μ l から 500/ μ l まで希釈すると、トロンビンで刺激しても $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 活性化は観察されないこと、ここに少量の ADP を加えると $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ が再活性化することが明らかになった。また、 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ の活性化、

不活性化と rap1 の活性化、不活性化と関連していることが示された。

P2Y₁₂ 欠損血小板において $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ は一過性に活性化していると考えられる。しかしながら、活性化 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 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 P2Y₁₂ 欠損血小板に対する結合は検出されなかった。このように、従来のリガンド結合実験では $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 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。そのため新たにリガンドカイネティックアッセイを考案した。このアッセイ系にて正常コントロール血小板と P2Y₁₂ 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、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。この成績は P2Y₁₂ が欠損しても $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ の活性化には支障がないものの、その活性化の持続が障害されることを示している。この成績は次の巨核球系細胞を用いた実験でも確認された。従来、巨核系細胞では $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 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 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ が活性化すると考えられていた。しかしながら、 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 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 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 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 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、 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ の活性化の持続時間が延長した。

2) CMK 細胞を用いた分化成熟過程の解析

CMK 細胞株を用いた検討にて、GPIb の発現増加とともに、 $\beta 1$ -tubulin や CKIP-1、cortactin、PKC δ 、PKC $\beta 1$ 、WAVE-1、Rab27B などの分子が増加することを同定した。WAVE に関しては、血小板において WAVE-1,2 の発現は見られたが WAVE-3 は検出されなかった。また臍帯血を用いた巨核球分化の系で WAVE-1 は分化に従いその発現が増加するが、WAVE-2 の発現は変化しないこと、WAVE-1 および 2 は血小板の lamellipodia の辺縁に局在することより、これらが血小板の進展時、アクチンを制御していることが示唆された。

3) 血小板機能抑制分子

a) SHPS-1

血管内皮に発現している SHPS-1 の機能解析は以下のとおりである。SHPS-1 は膜蛋白であるため SHPS-1 細胞外領域とヒト IgG-Fc 部分との融合蛋白をそれぞれヒトおよびマウス SHPS-1 に対して作製してリガンドとして用いた (hSHPS-1-Ig、mSHPS-1-Ig)。ヒト IgG-Fc 部分と血小板上の Fc レセプターとの結合は抗 Fc レセプター抗体である IV.3 Fab により阻害した。

hSHPS-1-Ig のヒト血小板への結合は抗 CD47 抗体 B6H12 により阻害され、さらに mSHPS-1-Ig は Wild Type マウス血小板のみに結合し、CD47 欠損血小板には結合しないことより SHPS-1 は血小板 CD47 特異的に結合することが確認された。

SHPS-1-Ig の血小板機能に対する作用と

してまずヒト血小板凝集への影響を検討したところ、低濃度の ADP、コラーゲン、トロンビン刺激において hSHPS-1-Ig は血小板凝集を抑制したが高濃度の ADP、コラーゲン、トロンビン刺激ではその抑制効果は明らかではなかった。フローサイトメトリーによる検討において、hSHPS-1-Ig は血小板インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化 (いいかえると inside-out シグナル) および顆粒放出反応を軽度抑制したのみであった。

次にインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の outside-in シグナルの解析としてフィブリノーゲン固相化プレート上へ接着した血小板 spreading を検討した。hSHPS-1-Ig は血小板のフィブリノーゲンへの結合は抑制しなかったが、コントロール血小板では接着後に $71.2 \pm 6.2\%$ (n=5) の血小板が spreading したが、hSHPS-1-Ig 結合血小板では $17.3 \pm 4.9\%$ (n=5, $p < 0.001$) しか spread しなかった。さらにマウスの血小板を用いた検討では、Wild type マウス血小板ではヒト血小板同様に mSHPS-1-Ig による spread の抑制が見られたが、CD47 欠損マウス血小板では mSHPS-1-Ig を加えても spread は抑制されなかった。SHPS-1 は細胞表面に発現する膜蛋白で、可溶化リガンドとしての存在様式は現在のところ確認されていないため、より生理的条件に近い状態での作用を見るため 293T 細胞上に発現させた hSHPS-1 および mSHPS-1 を用いて、それぞれヒトおよびマウス血小板への spread 抑制作用を検討した。293T 細胞表面に発現した SHPS-1 においても SHPS-1-Ig を用いた場合と同様に CD47 を介してフィブリノーゲン上での血

血小板 spread の抑制が見られた。以上より SHPS-1 の血小板 spread の抑制は CD47 を介した特異的な作用であることが明らかとなった。

$\alpha_{IIb}\beta_3$ を介してフィブリノーゲンに接着した血小板では Src、Syk のリン酸化に続いて FAK のチロシンリン酸化が誘導される。これにより細胞骨格の再構成に関与する cortactin、 α -actinin の活性化が spread につながると考えられる。SHPS-1 の血小板 spread の抑制作用の分子機構を明らかにするために、spread しているコントロール血小板と hSHPS-1-Ig により spread の抑制されている血小板において免疫沈降後の western blotting を用いた蛋白チロシンリン酸化を検討した。興味深いことに SHPS-1 により spread が抑制された血小板においても、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ を介するシグナル伝達において上流に位置する Src、Syk のチロシンリン酸化のみならず下流に位置する FAK のチロシンリン酸化は正常に惹起されていた。また、Src 依存性に活性化する cortactin は hSHPS-1-Ig 処理においてもリン酸化が惹起されたが、FAK 依存性に活性化する α -actinin のリン酸化は hSHPS-1-Ig 処理により著明に抑制されていた。以上より、SHPS-1 は FAK の下流の経路に作用した結果、血小板 spread を抑制することが示唆された。

b) Semaphorin 3A

血管内皮より分泌される Semaphorin 3A に関しての解析は以下のとおりである。Semaphorin 3A は IgG の Fc 部分との融合

蛋白を作製し解析した。Sema3A/Fc は種々のアゴニスト刺激による $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化および P-セレクチン発現を濃度依存性に抑制した。さらにフィブリノーゲン上での血小板の進展を著明に抑制した。その機序の一つとして、Sema3A/Fc が Rac の活性化および Rac により制御されるアクチン再構成を抑制することを抑制することを明らかにした。しかしながら、Rac の抑制のみでは $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化の抑制を説明できないため、次に血小板活性化シグナルに関して解析を行った。その結果、1) Sema/Fc はトロンビン刺激による血小板内 Ca^{2+} 濃度変化や PKC 活性化には影響しない。2) Sema/Fc はトロンビン刺激による Akt のリン酸化および Rap 活性化を抑制した。一方、convulxin 刺激に対しては、Sema3A/Fc は GPVI 下流のシグナル伝達分子である LAT・SLP-76・PLC γ のリン酸化には影響を与えなかった。Sema/Fc はトロンビン刺激時と同様に convulxin による Akt リン酸化および Rap 活性化を抑制した。一方、Sema3A/Fc はトロンビン刺激時とは異なり convulxin による血小板内 Ca^{2+} の増加を抑制した。以上の成績を総合すると、Semaphorin 3A はアゴニストの種類に関係なく Akt や Rap1 の活性化を抑制することから、その上流の PI3K 経路を抑制していることが示唆された。

c) アディポネクチン

アディポネクチンは、脂肪特異的に産生分泌され抗動脈硬化作用、抗糖尿病作用を有することが知られているが、本研究では急性の血栓形成に対する作用について、ア

ディポネクチン欠損マウスを用いて He-Ne 惹起頸動脈血栓モデルにて検討した。その結果、アディポネクチンが抗血栓作用を有すること、リコンビナントアディポネクチンが血小板凝集を抑制すること、さらに野生型マウスへのアデノベクターを用いたアディポネクチン投与が、血栓形成を抑制することを明らかにした。この成績よりアディポネクチンが抗血栓作用を有していることが明らかとなった。

D. 考案

本プロジェクトにより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、Semaphorin 3A およびアディポネクチンを同定した。

血小板インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ はダイナミックにその機能を変化させること、ADP-P2Y₁₂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 P2Y₁₂非依存性であり、P2Y₁₂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 P2Y₁₂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-P2Y₁₂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-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る。

SHPS-1 の血小板 CD47 への結合は FAK のチロシンリン酸化を抑制することなく、おそらくその下流シグナルを抑制することにより、血小板の spread を抑制した。本研究において、SHPS-1-CD47 システムによる血小板機能抑制作用を初めて明らかにした。一方、Semaphorin 3A は血小板機能を抑制するが、その抑制は 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 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化を抑制することが明らかとなった。さらにアディポネクチンは、その抗動脈硬化作用や抗糖尿病作用に加え、抗血栓作用を有することが明らかとなった。本プロジェクトにて血小板機能を抑制する分子を明らかにした。今後これらの分子に関して、種々の血栓モデルを用いてその抗血栓作用を解析する必要があると考えられる。

E. 結論

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、Semaphorin 3A およびアディポネクチンを同定した。血栓形成はこれらの制御因子によりコントロールされていると考えられる。本研究成果は、新たな抗血栓療法の開発に有用であると考えられる。

F. 研究発表

論文発表

1. Kashiwagi H, Shiraga M, Kato H, Honda S, Sako M, Kurata Y, Kanakura Y, Tomiyama Y: Expression and subcellular localization