

USS 診断に有用な ADAMTS13 遺伝子解析の改良と新たな変異の同定

研究分担者 小亀浩市 国立循環器病研究センター分子病態部 室長
研究協力者 宮田敏行 国立循環器病研究センター分子病態部 部長
研究協力者 樋口(江浦)由佳 国立循環器病研究センター分子病態部 派遣研究員

研究要旨

ADAMTS13 はフォンビルブランド因子を切断する血漿プロテアーゼである。遺伝子異常や自己抗体の出現などによる血漿 ADAMTS13 活性の損失は、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の要因となる。特に ADAMTS13 遺伝子の異常によって発症する TTP を先天性 TTP あるいは Upshaw-Schulman 症候群 (USS) と呼ぶ。これまでに我々は奈良県立医科大学輸血部と共に、USS 患者 41 家系の ADAMTS13 遺伝子解析をダイレクト・シーケンシング法を用いて実施し、38 家系の患者 44 名にホモ接合体あるいは複合ヘテロ接合体の非同義変異を同定した。今回、ダイレクト・シーケンシング法の作業工程の簡略化を試み、解析の迅速化を行った。また、定量 PCR を利用した遺伝子解析法を導入することで、ダイレクト・シーケンシング法では検出できなかったエキソン欠失を 2 家系の患者に同定した。エキソン欠失は USS 患者では初めて同定されたタイプの遺伝子異常であり、今後の USS 遺伝子診断において重要な参考症例になると思われる。

A. 研究目的

ADAMTS13 は、血小板凝集に重要な役割を果たすタンパク質フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) を特異的に切断する血漿プロテアーゼである。遺伝子異常や自己抗体の出現などによる血漿 ADAMTS13 活性の損失は、難治性疾患である血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の要因となる。特に ADAMTS13 遺伝子異常によって劣性遺伝形式で発症する TTP を先天性 TTP あるいは Upshaw-Schulman 症候群 (Upshaw-Schulman syndrome; USS) と呼ぶ。近年我々は、USS 患者の ADAMTS13 遺伝子解析、日本人一般住民の ADAMTS13 活性と遺伝子多型の分析、ADAMTS13 結合タンパク質の探索、ADAMTS13 分子の立体構造解析などに重点をおいて研究を進めてきた。

本研究事業では、USS 患者の遺伝子解析、ADAMTS13 の立体構造未決定ドメインおよび変異体の構造決定、ADAMTS13 遺伝子変異のタンパク質化学的・生物学的影響の解析を主な研究テーマとしている。

我々はこれまでに、USS 患者およびその家系構成員を対象に ADAMTS13 遺伝子の塩基配列を調べ、USS 発症の原因となる遺伝子異常を特定してきた。一般に、遺伝性疾患が疑われる患者の病因候補遺伝子の塩基配列は、標的遺伝子の各エキソンを PCR で増幅して配列を解読する方法、すなわちダイレクト・シーケンシング法

によって決定される。我々も ADAMTS13 遺伝子に対して定法にしたがい、各エキソンの外側に Forward および Reverse 方向の PCR プライマーを設計し、検体 DNA から各エキソンを特異的に増幅させていた。ADAMTS13 遺伝子の塩基配列解析がより一般化される可能性に備え、本研究ではダイレクト・シーケンシング法の簡略化を試みた。

一方、これまでに奈良県立医科大学輸血部と共同で遺伝子解析を行った USS 患者家系は 41 家系であるが、うち 38 家系の患者 44 名にホモ接合体あるいは複合ヘテロ接合体の非同義変異 (ミスセンス、ナンセンス、フレームシフト、スプライシング異常) を同定することができた。ADAMTS13 遺伝子の両アレルに非同義変異が存在することは、劣性遺伝形式を示す USS の発症をうまく説明することができる。しかしながら、残りの 3 家系のうち、2 家系の患者には 1 アレルしか非同義変異が検出できず、1 家系の患者には変異が全く検出されなかった。ダイレクト・シーケンシング法では比較的大きな欠失等を見逃す可能性がある。そこで本研究では、ダイレクト・シーケンシング法を補完する解析法を取り入れ、新たなタイプの遺伝子異常の同定を試みた。

B. 研究方法

ダイレクト・シーケンシング法をより簡略化した作業で実施すること目的として、ゲノム

DNA から各エキソンを増幅するときの PCR プライマーに、従来からクローニング等で汎用されている M13 フェージ由来の塩基配列を連結した。すなわち、各エキソン特異的 Forward プライマーの 5' 末端に M13Fwd 配列 (TGTAACGACGGCCAGT) を、各エキソン特異的 Reverse プライマーの 5' 末端に M13Rev 配列 (CAGGAAACAGCTATGACC) をそれぞれ連結した。PCR による各エキソンの増幅反応後、通常は反応産物に対して固有のプライマーを用いてシーケンシング反応を行うが、本研究では全てのエキソンに対して共通のプライマー、すなわち M13Fwd および M13Rev を使用した。

これと並行して、ダイレクト・シーケンシング法で見逃す可能性がある遺伝子異常の探索を試みた。この目的のためには、しばしば Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法 (MRC-Holland 社) が利用されるが、ADAMTS13 遺伝子を解析するためのプローブ試薬はまだ開発されていない。MLPA 用プローブ試薬のインハウス設計は非効率的であるため、本研究では、条件検討が比較的容易なリアルタイム定量 PCR を利用した。定量 PCR に適したプライマーを各エキソン毎に設計し、一定量の DNA 試料に対してリアルタイム PCR を行った。各反応の Ct 値を算出し、試料間の Ct 値を比較することで、エキソンの相対的コピー数を分析した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立循環器病研究センターおよび奈良県立医科大学の倫理委員会で研究計画の承認を受けた上で実施した。研究参加者からは書面でのインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

M13 フェージ由来の塩基配列を連結した ADAMTS13 各エキソン特異的 PCR 用プライマーは、いずれも従来の各プライマーと同様に機能し、同一の反応条件で目的の領域を増幅することができた。増幅産物の両末端に M13 配列が存在することを利用し、すべてのエキソンに対して共通の M13Fwd プライマーおよび M13Rev プライマーでシーケンシング反応を行った結果、いずれのエキソンも従来法と同等あるいはより良好な波形データが得られた。

一方、ダイレクト・シーケンシング法で発症要因が特定できなかった USS 患者 3 名に対して定量 PCR による ADAMTS13 遺伝子解析を行った結果、1 名の患者ではエキソン 8 が、別の患者ではエキソン 27 が、それぞれ片側アレルで欠失していることが明らかになった。残り 1 名

の患者検体では、ダイレクト・シーケンシング法だけでなく、定量 PCR による解析においても異常は検出されなかった。

D. 考察

次世代シーケンサーの普及に伴い、遺伝子解析の手法も変化していくことが予想されるが、個別の遺伝子解析では、依然としてサンガー法を利用する第一世代シーケンサーを用いたダイレクト・シーケンシング法が主流である。本研究で ADAMTS13 遺伝子のシーケンシングが簡略化できたことは、今後の解析の迅速化だけでなく、正確性の向上にもつながると考えられる。

本研究で定量 PCR を利用した遺伝子解析を導入することにより、これまで検出不可能であったエキソン欠失を 2 名の患者に見出すことができた。いずれの患者も、ミスセンスの原因変異 1 個をヘテロ接合体として保有していることがすでにダイレクト・シーケンシング法で明らかになっていることから、これら 2 名の USS 発症は、ミスセンス変異とエキソン欠失による複合ヘテロ接合体に起因すると推定された。USS の確定診断につながる重要な成果である。国内外を通して ADAMTS13 遺伝子のエキソン欠失異常の報告例はない。本研究の成果は、今後の USS 患者の遺伝子解析に対して有用な影響を与えると予想される。

E. 結論

USS 患者の ADAMTS13 遺伝子解析において、ダイレクト・シーケンシング法の作業工程を簡略化することができた。また、定量 PCR を利用した解析法を導入することにより、ダイレクト・シーケンシング法では検出されなかった遺伝子異常を発見することができた。いずれも今後の解析に寄与する重要な成果であり、今年度の研究目的は達せられたと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masayuki Fujioka, Takafumi Nakano, Kazuhide Hayakawa, Keiichi Irie, Yoshiharu Akitake, Yuya Sakamoto, Kenichi Mishima, Carl Muroi, Yasuhiro Yonekawa, Fumiaki Banno, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Kenji Nishio, Kazuo Okuchi, Katsunori Iwasaki, Michihiro

- Fujiwara, and Bo K. Siesjo: ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci* 33, 1107-1115 (2012)
- 2) Yuka Eura, Hiroji Yanamoto, Yuji Arai, Tomohiko Okuda, Toshiyuki Miyata, and Koichi Kokame: Derlin-1 deficiency is embryonic lethal, Derlin-3 deficiency appears normal, and Herp deficiency is intolerant to glucose load and ischemia in mice. *PLoS One* 7, e34298 (2012)
 - 3) Takashi Sato, Yasuhiro Sako, Misato Sho, Mamiko Momohara, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, Hideki Nishitoh, Tsukasa Okiyoned, Koichi Kokame, Masayuki Kaneko, Manabu Taura, Masanori Miyata, Keisuke Chosa, Tomoaki Koga, Saori Morino-Koga, Ikuo Wada, and Hirofumi Kai: STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. *Mol Cell* 47, 99-110 (2012)
 - 4) Yongchol Shin, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Kenji Soejima, and Toshiyuki Miyata: Binding of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 to Lys-plasmin(ogen). *J Biochem* 152, 251-258 (2012)
 - 5) Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, and Mitsuhiko Sugimoto: ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 108, 1236-1238 (2012)
 - 6) 宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志, 坂野史明, 中山大輔, 武田壮一: ADAMTS13 研究の最先端. *臨床血液* 53, 672-679 (2012)
 - 7) 小亀浩市, 宮田敏行: 小胞体ストレスと循環器疾患. *生体の科学* 63, 390-391 (2012)
 - 8) 小亀浩市: 重度高ホモシステイン血症マウスは血栓傾向を示さないというパラドックス. *日本血栓止血学会誌* 23, 416 (2012)
 - 9) 宮田敏行, 小亀浩市, 小久保喜弘: 先天性 ADAMTS13 欠損症. *臨床検査*, 印刷中
2. 学会発表
 - 1) Koichi Kokame: Gene mutation analysis for Upshaw-Schulman syndrome. The 58th Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Liverpool, UK, June 29, 2012.
 - 2) Masaaki Doi, Mitsuhiko Sugimoto, Hideto Matsui, Midori Shima, Maiko Takeda, Yoshihiko Saito, Kenji Nishio, Fumiaki Banno, Koichi Kokame, and Toshiyuki Miyata: Functional analysis of ADAMTD13 in mouse model of myocardial infarction.
 - 3) ESC Congress 2012, Munich, Germany, August 25-29, 2012
 - 4) 坂野史明, 喜多俊行, 柳本広二, 小亀浩市, 宮田敏行: プロテイン S 徳島(K196E)変異がマウスの肺塞栓症および虚血性脳梗塞に及ぼす影響. 第74回日本血液学会学術集会, 京都, 2012年10月20日
 - 5) Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, and Mitsuhiko Sugimoto. Protective Role of ADAMTS13 for Myocardium in Mouse Model of Experimental Myocardial Infarction. 2012 ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, USA, December 8-11, 2012
 - 6) Hideto Matsui, Masaaki Doi, Yasunori Matsunari, Maiko Takeda, Kenji Nishio, Midori Shima, Kenji Soejima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, and Mitsuhiko

Sugimoto: ADAMTS13 Improving the Cell Engraftment Efficacy in Mouse Model of Bone Marrow Transplantation. 2012 ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, USA, December 8-11, 2012

- 7) 井本(山本)ひとみ, 宮田敏行, 小亀浩市: 脳と心臓に特異的に発現する細胞内タンパク質 NDRG4 は Na⁺/K⁺-ATPase α 3 サブユニットに結合する. 第85回日本生化学会大会, 福岡, 2012年12月14-16日
- 8) 坂野史明, 喜多俊行, 柳本広二, 小亀浩市, 宮田敏行: 日本人の遺伝的血栓性リスクを有するモデルマウスの作製と解析. 第85回日本生化学会大会, 福岡, 2012年12月14-16日
- 9) 小亀浩市: ADAMTS13 の基準値と遺伝子多型. 第7回日本血栓止血学会 SSC シンポジウム, 東京, 2013年1月12日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

特発性血栓症サブグループ

グループリーダー：小嶋哲人 名古屋大学医学部 教授
研究分担者：坂田洋一 自治医科大学医学部 教授
宮田敏行 国立循環器病研究センター研究所 部長
川崎富夫 大阪大学医学部 助教
横山健次 慶應義塾大学医学部 講師
小林隆夫 浜松医療センター 院長
榛沢和彦 新潟大学大学院 講師
研究協力者：中村真潮 三重大学大学院 教授
山田典一 三重大学大学院 講師
太田覚史 三重大学大学院 助教
平井久也 浜松医療センター

サブグループ研究総括

グループリーダー：小嶋哲人 名古屋大学 教授
研究分担者：坂田洋一 自治医科大学 教授
宮田敏行 国立循環器病研究センター 部長
川崎富夫 大阪大学 助教
横山健次 慶應義塾大学 講師
小林隆夫 浜松医療センター 院長
榛沢和彦 新潟大学大学院 講師
研究協力者：中村真潮 三重大学大学院 教授
山田典一 三重大学大学院 講師
太田覚史 三重大学大学院 助教
平井久也 浜松医療センター

研究要旨

本研究班における特発性血栓症サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症のエビデンス収集とともに、その発症要因や発症メカニズムを明らかにし、エコノミークラス症候群として国民から注目される静脈血栓塞栓症の予知・予防の対策確立を目的とする。数年来の本研究班活動を通じた特発性血栓症の診療・予後改善に向けた医療行政上の成果として、日本人に多いプロテイン S 異常症の診断に欠かせない「プロテイン S 活性測定検査の保険収載」、ならびに「ヘパリン在宅自己注射の保険適用」があげられる。また、個別研究として「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究」、「日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略」、「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」、「不育症を対象とした先天性血栓性素因に関する研究」、「ワルファリン療法施行患者におけるプロトロンビン時間 (PT-INR) 自己測定の安全性と有効性に関する臨床研究」、「先天性アンチトロンビン欠損症・*SERPINC1* 解析研究」、「自家移植を施行した比較的若年の日本人多発性骨髄腫患者における血栓症発症の解析」、「震災後の静脈血栓塞栓症に関する研究」が行われた。

A. 研究目的

本研究班における特発性血栓症サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症の日本人でのエビデンスを収集するとともに、静脈血栓塞栓症の発症原因と発症メカニズムを明らかにし、エコノミークラス症候群として国民から注目される静脈血栓塞栓症の予知・予防のための対策確立を目的とする。

B. 研究方法

特発性血栓症研究班／静脈血栓症サブグループ研究は、全国の医療施設を対象にしたアンケート調査研究と日本人静脈血栓塞栓症患者を対象とした調査研究等から構成される。本年度の各個研究においては、それぞれ「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究」、「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」、「不育症を対象とした先天性血栓性素因に関する研究」、「ワルファリン療法

施行患者におけるプロトロンビン時間 (PT-INR) 自己測定的安全性と有効性に関する臨床研究」、「先天性アンチトロンビン欠損症・SERPINC1 解析研究」、「自家移植を施行した比較的若年の日本人多発性骨髄腫患者における血栓症発症の解析」、「日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略」、「震災後の静脈血栓塞栓症に関する研究」が行われた。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の臨床研究の倫理指針および疫学研究の倫理指針に則り、また、遺伝子解析研究においても「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して、各施設の倫理委員会の承認を得た後に実施した。研究対象者には人権を配慮し、研究への参加は自由意思で書面にてインフォームドコンセントを得て施行した。

C. 研究結果

数年来の本研究班活動を通じた特発性血栓症での診療・予後改善に向けた医療行政上での成果として、日本人に多いプロテイン S 異常症の診断に欠かせない「プロテイン S 活性測定検査の保険収載」、ならびに「ヘパリン在宅自己注射の保険適用」があげられる。全国の医療施設を対象にしたアンケート調査研究として「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究」では、9383 施設 (病院 6586 施設, 医育機関 2797 講座) にアンケートを送付し現時点で 2722 施設 (病院 1717 施設, 医育機関 1005 講座) から回答が得られ、リスク因子や治療法などの詳細に関し解析の予定である。「日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略」では、ガイドラインの作成者と使用者は「前書き」を重視する必要がある

ることを提言した。「不育症を対象とした先天性血栓性素因に関する研究」では、反復あるいは習慣流産の患者に先天性血栓性素因を持つ例があることが示された。

「ワルファリン療法施行患者におけるプロトロンビン時間 (PT-INR) 自己測定の有効性と安全性に関する臨床研究」では、日本人患者における PT-INR の自己測定は安全で有効な手法であることが報告された。「先天性アンチトロンビン欠損症・SERPINC1 解析研究」では、SERPINC1 の大規模遺伝子変異に *Alu* 配列が大きな役割を担っていることが示された。「自家移植を施行した、比較的若年の日本人多発性骨髄腫患者における血栓症発症の解析」では、自家移植の対象となる比較的若年の多発性骨髄腫患者での VTE 発症率は欧米と大きな差はなかったことが報告された。「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」では VTE 高リスク患者の APC-sr および PS 抗原と PS 活性の比活性測定が VTE 予知に寄与する可能性が示唆された。「震災後の静脈血栓塞栓症に関する研究」では、イタリア北部地震でも車中泊避難が多数あり肺塞栓症で死亡者もみられ、震災後の車中泊は欧米においても肺塞栓症の危険が明らかになった。

D. 考察

数年来の本研究班活動を通じた「日本人に多いプロテイン S 異常症の診断に欠かせないプロテイン S 活性測定検査の保険収載」、ならびに「ヘパリン在宅自己注射の保険適用」の医療行政上の成果は、日本人での特発性血栓症での診療・予後改善に寄与することが期待できる。司法ではガイドライン (指針) を医療水準としての完成度の高いものをさすが、今後は「前書き」

等を確認するなど配慮が期待され、「前書き」を重視する必要があると思われる。不育症や反復あるいは習慣流産の患者に先天性血栓性素因の関与が指摘されその正確な診断が重要と思われる。日本人患者におけるワルファリン療法中の PT-INR の自己測定は安全で有効な手法であると考えられ、今後の普及が期待される。

アンチトロンビン遺伝子欠失症例での正確な変異診断は病態解析に重要と思われる。自家移植の対象となる比較的若年の多発性骨髄腫患者では欧米人と同様に VTE 発症に注意が必要と思われる。APC-sr および PS 抗原と PS 活性の比活性測定による VTE リスク判定ができれば、抗凝固療法による予防効果が期待できる。震災後の車中泊は欧米においても肺塞栓症の危険性が明らかになり、震災後の車中泊時では肺塞栓症予防が特に重要性と思われる。

E. 結論

日本人での静脈血栓塞栓症のエビデンスを収集するとともに、発症原因・発症メカニズムの解明は、我が国における特発性血栓症の予知・予防のための対策の確立に重要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honda T, Katano, Y Kuzuya T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Toyoda H, Kumada T, Yamamoto K, Matsushita T, Kojima T, Takamatsu J, Goto H: Comparison of the efficacy of ribavirin plus peginterferon

alfa-2b for chronic hepatitis C infection in patients with and without coagulation disorders. *J Med Virol.* 85(2): 228-234, 2013.

- 2) Suzuki A, Miyawaki Y, Okuyama E, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito H, Kojima T: Ribavirin-induced intracellular GTP depletion activates transcription elongation in coagulation factor VII gene expression. *Biochemical J.* 449(1): 231-239, 2013.
- 3) 奥山恵理子、小嶋哲人: 先天性血栓性素因の遺伝子解析の現状と展望 *日本血栓止血学会誌* 23(5), 465-471, 2012.
- 4) 高木明、小嶋哲人: 凝固関連血液マーカーの臨床応用とその特徴 *Geriatr. Med.* 50(10), 1171-1174, 2012.
- 5) Fujita J, Miyawaki Y, Suzuki A, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Suzuki N, Matsushita T, Saito H, Kojima T: A possible mechanism for Inv22-related F8 large deletions in severe hemophilia a patients with high responding factor VIII inhibitors. *J Thromb Haemost.* 10(10), 2099-2107, 2012.
- 6) Matsushita T, Saito H, Kojima T: The author reply. *N Engl J Med.* 367, 1069-1070, 2012.
- 7) 小嶋哲人: 新規抗凝固薬の作用機序と特徴 (基礎の立場から) *血栓と循環* 20(2), 51-54, 2012.
- 8) Tanino Y, Chang MY, Wang X, Gill SE, Skerrett S, McGuire JK, Sato S,

- Nikaido T, Kojima T, Munakata M, Mongovin S, Parks WC, Martin TR, Wight TN, Frevert CW: Syndecan-4 regulates early neutrophil migration and pulmonary inflammation in response to lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 47(2), 196-202, 2012.
- 9) Mizutani N, Ito H, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Nishida Y, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Osawa Y, Ohnishi K, Daibata M, Murate T: Involvement of KRAS G12A mutation in the IL-2-independent growth of a human T-LGL leukemia cell line, PLT-2. *Nagoya J Med Sci.* 74(3-4), 261-271, 2012.
- 10) 奥山恵理子、小嶋哲人：凝固制御因子の分子異常 医学のあゆみ 242(2), 159-162, 2012.
- 11) 小嶋哲人：特集：新しい経口の抗凝固薬・「～経口抗凝固薬療法の新時代～」 血液フロンティア 22(7), 1041-1044, 2012.
- 12) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Naoe T, Saito H, Kojima K: Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med.* 366, 2390-2396, 2012.
- 13) 竹下享典、小嶋哲人：新規経口Xa阻害薬リバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバン *Medicina* 49(6), 970-975, 2012.
- 14) Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Hagiwara K, Ito H, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Iwaki S, Fujii S, Nakamura M, Banno Y, Kannagi R, Tsurumi T, Kyogashima M, Murate T: Role of down-regulated neutral ceramidase during all-trans retinoic acid induced neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biochem.* 151(6), 611-620, 2012.
- 15) Ito H, Tanaka K, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Mizutani N, Takagi A, Kojima T, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Tamiya-Koizumi K, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T: Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 in all-trans retinoic acid-treated human breast cancer cell line, MCF-7. *J Biochem.* 151(6), 599-610, 2012.
- 16) 竹下享典、小嶋哲人：トロンビン阻害薬とXa阻害薬ではなにが違うか *Mebio* 29(4), 70-77, 2012.
- 17) 小嶋哲人：経口Xa阻害薬-新しい抗凝固薬としての特徴 *Life Style Medicine*, 6(1), 2-7, 2012.
- 18) Suzuki A, Nakashima D, Miyawaki Y, Fujita J, Maki A, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Teranishi M, Matsushita T, Saito H, Kojima T: A novel ENG mutation causing impaired co-translational processing of endoglin associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Thromb Res.* 129(5), e200-208, 2012.

- 19) Kita T, Banno F, Yanamoto H, Nakajo Y, Iihara K, Miyata T: Large infarct and high mortality by cerebral ischemia in mice carrying the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost*, 10(7), 1453-1455, 2012.
- 20) Shin Y, Akiyama M, Kokame K, Soejima K, Miyata T: Binding of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 to Lys-plasmin(ogen). *J Biochem*, 152(3), 251-258, 2012.
- 21) Fujioka M, Nakano T, Hayakawa K, Irie K, Akitake Y, Sakamoto Y, Mishima K, Muroi C, Yonekawa Y, Banno F, Kokame K, Miyata T, Nishio K, Okuchi K, Iwasaki K, Fujiwara M, Siesjö BK: ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci*, 33(5), 1107-1115, 2012.
- 22) Doi M, Matsui H, Takeda Y, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M: ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 108(6), 1236-1238, 2012.
- 23) Fan Xinping, Yoshida Y, Honda S, Matsumoto M, Sawada Y, Hattori M, Hisanaga S, Hiwa R, Nakamura F, Tomomori M, Miyagawa S, Fujimaru R, Yamada H, Sawai T, Ikeda Y, Iwata N, Uemura O, Matsukuma E, Aizawa Y, Harada H, Wada H, Ishikawa E, Ashida A, Nangaku M, Miyata T, Fujimura Y: Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*, 54(2), 238-246, 2013.
- 24) 宮田敏行「遺伝子多型と抗凝固・抗血小板薬」*Modern Physician* 第32巻、第6号、749-752頁、2012
- 25) 宮田敏行、松本雅則「von Willebrand 因子とADAMTS13」*内科*、第110巻、第1号、87-90頁、2012
- 26) 宮田敏行、長束一行「抗血栓薬に対する遺伝子多型の影響」*月刊薬事*、第54巻、第7号、71-75頁、2012
- 27) 宮田敏行、小亀浩市、秋山正志、坂野史明、中山大輔、武田壮一「ADAMTS13 研究の最先端」*臨床血液*、第53巻、第7号、672-679頁、2012
- 28) 小亀浩市、宮田敏行「小胞体ストレスと循環器疾患」*生体の科学*、第63巻、第5号、390-391頁、2012
- 29) 秋山正志、平井秀憲、宮田敏行「プラスミノゲンの立体構造」*日本血栓止血学会誌*、第23巻、第5号、516-519頁、2012
- 30) 宮田敏行、樋口由佳「血栓の病理と病態」*Vascular Lab*、第9巻、第6号、70-73頁、2012
- 31) 杉本充彦、土井政明、松井英人、宮田敏行「マウス急性心筋梗塞モデルにおけるADAMTS13の心筋保護作用」*日本血栓止血学会誌*、第23巻、第6号、590-593頁、2012
- 32) 西村 仁、平井秀憲、宮田敏行「凝固XI因子の構造と機能」*日本血栓止血学会誌*、第23巻、第6号、594-598頁、2012
- 33) Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S,

- Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, Sakata Y.: Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther.* 2012 Dec 18. doi: 10.1038/mt.2012.258.
- 34) Makino N, Madoiwa S, Ohmori T, Katoh K, Ookawara S, Kanazawa T, Matsuo O, Ichikawa M, Mimuro J, Ichimura K, Sakata Y.: Tissue plasminogen activator deficiency promotes early phase regeneration in the olfactory epithelium after bulbectomy. *Inpres* 2012 Nov 28. doi: 10.1002/alr.21124.
- 35) Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D, Suzuki S, Suzuki M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Hashimoto M, Yazaki S, Sakata Y.: Porcine model of hemophilia a. *PLoS One.* 7(11):e49450. 2012.
- 36) Makino, N., Ookawara, S., Madoiwa, S., Ohta, Y., Ishikawa, T., Katho, K., Takigami, S., Kanazawa, T., Matsuo, O., Ichikawa, M., Mimuro, J., Sakata, Y., Ichimura, K.: Morphological assessment of the luminal surface of olfactory epithelium in mice deficient in tissue plasminogen activator following bulbectomy. *The Journal of Laryngology & Otology.* 126 (11) 114-1120. 2012. Nov.
- 37) Hosoya, Y., Matsumura, M., Madoiwa, S., Zuiki, T., Matsumoto, S., Nunomiya, S., Lefor, A., Sata, N., Yasuda, Y.: Acquired hemophilia A caused by factor VIII inhibitors: report of a case. *Surg Today.* 2012 Aug 14. [Epub ahead of print]
- 38) Yano, Y., Ohmori, T., Shimada, K., Sakata, Y., Kario, K.: Association of sleep onset of acute coronary syndrome with sleep apnea syndrome and abnormal diurnal variation of hemostasis and adipokine levels. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 23(7):590-596. 2012 Oct.
- 39) Suzuki, S., Iwamoto, M., Saito, Y., Fuchimoto, D., Sembon, S., Suzuki, M., Mikawa, S., Hashimoto, M., Aoki, Y., Najima, Y., Takagi, S., Suzuki, N., Suzuki, E., Kubo, M., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Madoiwa, S., Sakata, Y., Perry, AC., Ishikawa, F., Onishi, A.: I12rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell Stem Cell.* 14;10(6):753-8. 2012 Jun.
- 40) Kashiwakura, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Yasumoto, A., Ishiwata, A., Sakata, A., Madoiwa, S., Inoue, M., Hasegawa, M., Ozawa, K., Sakata, Y.: Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. *J Thromb Haemost.* 10(9):1802-1813. 2012 Sep.

- 41) Norimatsu, Y., Ohmori, T., Kimura, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Seichi, A., Yatomi, Y., Hoshino, Y., Sakata, Y.: FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. *Am J Pathol.* 180(4):1625-1635. 2012 Apr.
- 42) Ohmori, T., Yano, Y., Sakata, A., Ikemoto, T., Shimpo, M., Madoiwa, S., Katsuki, T., Mimuro, J., Shimada, K., Kario, K., Sakata, Y.: Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thromb Res.* 129(4):e36-40. 2012 Apr.
- 43) Madoiwa, S., Kobayashi, E., Kashiwakura, Y., Sakata, A., Yasumoto, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Immune response against serial infusion of factor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. *Haemophilia.* 18(3):e323-30. 2012 May.
- 44) 窓岩清治: PT-INRのポイントオブケア検査. *日本血栓止血学会誌* 23(6): 580-584, 2012.
- 45) Hashimoto N, Yokoyama K, Sadahira K, Ueda T, Tsukada Y, Okamoto S.: Itraconazole may increase the risk of early-onset bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Int J Hematol.* 2012 Nov 22. [Epub ahead of print]
- 46) Ueda T, Iino R, Yokoyama K, Okamoto S, Asakura K, Tsukada Y, Ishizawa J, Matsuki E, Ikeda Y, Hattori Y.: Post-transplant consolidation therapy using thalidomide alone for the patients with multiple myeloma: a feasibility study in Japanese population. *Int J Hematol.* 2012 Oct;96(4):477-84.
- 47) Yokoyama K, Kojima T, Sakata Y, Kawasaki T, Tsuji H, Miyata T, Okamoto S, Murata M.: A survey of the clinical course and management of Japanese patients deficient in natural anticoagulants. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2012 Sep;18(5):506-13.
- 48) 小林隆夫: 肺血栓塞栓症の予防と治療指針. 岡元和文編著, 救急・集中治療ガイドライン—最新ガイドライン—2012-'13, 総合医学社, 東京, pp267-271, 2012
- 49) 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症. 日本周産期・新生児医学会教育・研修委員会編集, 症例から学ぶ周産期診療ワークブック. メディカルビュー社, 東京, pp50-53, 2012
- 50) 小林隆夫: 妊娠と抗凝固療法. 後藤信哉編集, 新しい経口抗凝固薬、どう使う? 日本医事新報社, 東京, 156-158, 2012
- 51) 小林隆夫: 産婦人科領域における予防対策. *Thrombosis Medicine* 2(2): 140-144, 2012
- 52) 小林隆夫: 婦人科がん治療における血栓症対策. *日本臨床* 70 増刊号4: 756-762, 2012

- 53) 小林隆夫：日本における静脈血栓塞栓症予防の現状．月刊ナーシング 32(8)：109-111, 2012
- 54) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症予防一院内での取り組みと安全対策の重要性について．月刊ナーシング 32(8)：114-116, 2012
- 55) 保田知生, 小林隆夫：医療安全全国共同行動によるVTE予防の取り組み．VTE最前線 6：10-11, 2012
- 56) 小林隆夫：研修コーナー．妊産婦死亡報告からみた母体安全への提言 4) 肺血栓塞栓症．日本産科婦人科学会誌64(9) 別冊：N418-N424, 2012
- 57) 小林隆夫：妊娠時の血栓症の予防・治療．産科と婦人科 80(1)：77-83, 2013
- 58) 小林隆夫：肺塞栓症．周産期医学 43(1)：57-60, 2013
- 59) 小林隆夫：妊娠悪阻からの肺塞栓症．周産期医学 43(1)：61-63, 2013
- 60) 榛沢和彦「避難所における肺塞栓症・深部静脈血栓症」日本医師会雑誌第141巻第1号 p84-85, 2012
- 61) 榛沢和彦「福島県外避難者の避難所におけるDVT頻度と高血圧頻度：避難環境との関係」血栓と循環 vol 20(1)；53-61, 2012
- 62) 榛沢和彦「震災時における発症増加の機序を識る・震災と下肢静脈血栓症・肺塞栓症」Heart View 2012；16(7) 35-40
- 63) 榛沢和彦「大震災と下肢深部静脈血栓症・肺塞栓症」呼吸と循環 2012年9月号、60巻9号；897-901
- 64) 榛沢和彦「避難環境と深部静脈血栓症-東日本大震災による検診結果から-」臨床血液 vol. 53 No10, 2012, 1730-36
- 65) 榛沢和彦、岡本竹司、佐藤浩一、林純一、伊倉真衣子、中島 孝、品田恭子「新潟県中越地震6年後のDVT検診結果：DVTと高血圧との関連」静脈学 2012, vol 23, No 4 315-320
- 66) Torita S, Suehisa E, Kawasaki T, Toku M, Takeo E, Tomiyama Y, Nishida S, Hidaka Y.：Development of a new modified Bethesda method for coagulation inhibitors: the Osaka modified Bethesda method. Blood Coagul Fibrinolysis. 22(3)：185-189, 2011.
- 67) 川崎富夫：未熟児網膜症姫路日赤事件最高裁判決と医療現場感覚との落差—司法と医療の認識 統合を求めて。医事法講座 第3巻 医療事故と医事法編 甲斐克則編 信山社 東京 3-27, 2012.
- 68) 川崎富夫：肝硬変の治療にあたり、生体肝移植について説明すべき義務の違反があるとされた事例。年報医事法学 27 143-148, 2012.
- 69) 川崎富夫：混合診療。年報医事法学 27 208-213, 2012.
- 70) 川崎富夫：法学的意思と意志の異同と患者の自己決定権。生命倫理 Vol. 22 No. 1 (通巻 23 号) 42-50, 2012.

2. 学会発表

- 1) Okuyama E, Murata M, Suzuki A, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito T, Kojima T：(2P-0248) Up-regulation mechanisms of syndecan-4, a heparan sulfate proteoglycan, expression by TNF- α in human endothelial like EAhy926

- cells. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、平成24年12月
- 2) Ikesue M, Uede T, Kojima T: (1P-0615) Factor X Deficiency impaired Atherosclerotic Plaque Formation by Reduction of Cellular Cholesterol Absorption. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、平成24年12月
 - 3) Fujita J, Miyawaki Y, Suzuki A, Okuyama E, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Hosaka M, Takagi A, Murate T, Kajiura Y, Suzuki N, Matsushita T, Saito T, Kojima T: (0097) A Possible Mechanism for Inv22-related *F8* Large Deletions in Severe Hemophilia A Patients with High Responding Factor VIII Inhibitors. VIIth Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Melbourne, Australia 平成24年10月28-31日
 - 4) Murata M, Okuyama E, Suzuki A, Miyawaki Y, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Hosaka M, Takagi A, Murate T, Kishimoto M, Suzuki N, Matsushita T, Saito T, Kojima T: (P122) Molecular Basis of Coagulation Factor IX Gene Abnormalities in 16 Japanese Hemophilia B Patients. VIIth Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Melbourne, Australia 平成24年10月28-31日
 - 5) Okuyama E, Murata M, Suzuki A, Miyawaki Y, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito T, Kojima T: (P159) NF-kappaB is essential for Syndecan-4 up-regulation by TNF-alpha in Vascular Endothelial-like EAhy926 Cells. VIIth Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Melbourne, Australia 平成24年10月28-31日
 - 6) Ito H, Ohmori Y, Mizutani N, Inoue M, Nishida Y, Takagi A, Kojima T, Koizumi K, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Nagata K, Murate T: (PS-2-91) The effect of sphingolipids metabolism enzyme by Resveratrol in leukemia cell lines. 第74回日本血液学会学術集会、京都、平成24年10月19-21日
 - 7) Suzuki A, Miyawaki Y, Okuyama E, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito T, Kojima T: (OS-3-88) Immunosuppressant IMP dehydrogenase inhibitors up-regulated coagulation factor VII mRNA. 第74回日本血液学会学術集会、京都、平成24年10月19-21日
 - 8) Okuyama E, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Miyawaki Y, Suzuki A, Takagi A, Murate T, Saito T, Kojima T: (PS-2-280) Molecular mechanisms of syndecan-4 upregulation by TNF- α in the endothelial-like EAhy926 cells 第74回日本血液学会学術集会、京都、平成24年10月19-21日
 - 9) 加藤衣央、安藤裕実、高木夕希、奥山恵理子、村田 萌、鈴木敦夫、高木 明、村手 隆、松下 正、中島忠亮、小嶋哲人: 先天性アンチトロンビン欠損症3症例の *SERPINC1* 遺伝子解析 第13回日本検査血液検査血液学会学術集会、高槻、平成24年7月28-29日

- 10) 高木 明、宮脇由理、鈴木敦夫、藤田 絢子、牧明日加、奥山恵理子、村田 萌、村手 隆、松下 正、小嶋哲人：静脈血栓塞栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性とそのスクリーニング検査法 第 34 回日本血栓止血学会学術集会、東京、平成 24 年 6 月 7-9 日
- 11) 長橋ことみ、岩城孝行、宮脇由理、鈴木敦夫、小林隆夫、高松純樹、松下 正、梅村和夫、浦野哲盟、小嶋哲人、寺尾俊彦、金山尚裕：PAI-1 欠損症患者の半生 第 34 回日本血栓止血学会学術集会、東京、平成 24 年 6 月 7-9 日
- 12) 鈴木敦夫、宮脇由理、奥山恵理子、村田 萌、高木 明、村手 隆、林磨由子、鈴木明伸、山本晃士、松下 正、齋藤英彦、小嶋哲人：抗ウィルス剤リバビリンは血液凝固第 VII 因子の申請 mRNA 合成を促進する 第 34 回日本血栓止血学会学術集会、東京、平成 24 年 6 月 7-9 日
- 13) 奥山恵理子、村田 萌、宮脇由理、鈴木敦夫、高木 明、村手 隆、鈴木明伸、勝見 章、松下 正、小嶋哲人：血管内皮へパラリン硫酸プロテオグリカン・syundeca-4 (ryudocan) の炎症時発現増強機構 第 34 回日本血栓止血学会学術集会、東京、平成 24 年 6 月 7-9 日
- 14) 村田 萌、奥山恵理子、宮脇由理、鈴木敦夫、藤森祐多、山田貴之、高木 明、村手 隆、鈴木明伸、勝見 章、松下 正、小嶋哲人：名古屋大学における血友病 B の血液凝固第 IX 因子遺伝子解析 第 34 回日本血栓止血学会学術集会、東京、平成 24 年 6 月 7-9 日
- 15) Xinping Fan, Shigenori Honda, Toshiyuki Miyata, Yoko Yoshida, Masaki Hayakawa, Masanori Matsumoto, Fumihiko Nakamura, Ryoussuke Hiwa, Yugo Sawada, Yoshihiro Fujimura, “Establishment of a comprehensive approach to genetic analysis in patients with aHUS” 第34回日本血栓止血学会学術集会、2012年6月7日-9日、東京都
- 16) 吉田瑤子、藤村吉博、松本雅則、早川正樹、範新萍、宮田敏行、「本邦における atypical HUS (aHUS) の患者登録と病態解析の状況」、第 34 回日本血栓止血学会学術集会、2012 年 6 月 7 日-9 日、東京都
- 17) 範新萍、本田繁則、宮田敏行、吉田瑤子、沢田勇吾、服部元史、日和良介、中村文彦、藤丸季可、岩田直之、上村治、松隈英治、会沢佳昭、原田浩、石川英二、和田英夫、松本雅則、芦田明、南学正臣、藤村吉博、「日本人の非典型溶血性尿毒症症候群患者10名の遺伝子解析」、第49回補体シンポジウム、2012年8月24-25日、大阪市
- 18) 藤村吉博、吉田瑤子、松本雅則、範新萍、本田繁則、宮田敏行、「本邦での aHUS患者のdiagnostic pathwayと登録状況」、ミニシンポジウム、抗補体薬と疾患、可能性と問題点、第49回補体シンポジウム、2012年8月24-25日、大阪市
- 19) 原田 浩、吉田瑤子、松本雅則、會澤佳昭、萍範新、宮田敏行、藤村吉博、「D-HUSを原疾患とする生体腎移植への適応精査の必要性-補体調節因子の測定を行った1症例の経験」、第48回日本移植学会総会、2012年9月20-22日、名古屋市
- 20) 範新萍、本田繁則、宮田敏行、吉田瑤

- 子、松本雅則、藤村吉博、沢田勇吾、服部元史、久永修一、日和良介、中村文彦、藤丸季可、岩田直之、上村治、松隈英治、芦田明、南学正臣、「非定型溶血性尿毒症症候群を発症した日本人 5 例の遺伝子解析、Genetic analysis of five Japanese patients with aHUS」, 第 74 回日本血液学会学術集会、2012 年 10 月 19-21 日、京都市
- 21) 坂野史明、喜多俊行、柳本広二、小亀浩市、宮田敏行、「プロテイン S 徳島 (K196E) 変異がマウスの肺塞栓症および虚血性脳梗塞に及ぼす影響」、第 74 回日本血液学会学術集会、2012 年 10 月 19-21 日、京都市
- 22) 宮田敏行、「血栓形成の分子機構」、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、シンポジウム: 血液適合性バイオマテリアル、2012 年 11 月 27 日、仙台市
- 23) 宮田敏行、範新萍、吉田瑤子、本田繁則、松本雅則、沢田勇吾、服部元史、久永修一、日和良介、中村文彦、友森麻衣子、宮河真一郎、藤丸季可、山田浩、澤井俊宏、池田勇八、岩田直之、上村治、松隈英治、会沢佳昭、原田浩、和田英夫、石川英二、芦田明、南学正臣、藤村吉博、「非典型溶血性尿毒症症候群の遺伝的背景」、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡市
- 24) 坂野史明、喜多俊行、柳本広二、小亀浩市、宮田敏行、「日本人の遺伝的血栓性リスクを有するモデルマウスの作製と解析」、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡市
- 25) Xinping Fan, Yoko Yoshida, Toshiyuki Miyata, Shigenori Honda, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome, 2012 ASH meeting (Atlanta)
- 26) Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata and Mitsuhiro Sugimoto, Protective role of ADAMTS13 for myocardium in mouse model of experimental myocardial infarction, 2012 ASH meeting (Atlanta)
- 27) 宮田敏行、「aHUS の遺伝子解析」、日本血栓止血学会 SSC シンポジウム 2013 VWD/TTP 部会、2013 年 1 月 12 日、東京都
- 28) 芦田 明、吉田瑤子、範 新萍、松本雅則、服部元史、宮田敏行、藤村吉博、「Atypical HUS における補体制御異常症診断システムの構築」、第 46 回日本臨床腎移植学会、2013 年 1 月 30 日～2 月 1 日、東京都
- 29) 窓岩清治: Development of novel strategies for prevention of inhibitor formation in hemophilia The 9th Nikko International Symposium 2012 Understanding Complex Network Systems in Disease Biology 2012. 10/12 (栃木)
- 30) 窓岩清治: 凝固線溶系データを読み解く (Morning Discussion) 第 74 回日

- 本血液学会学術集会 2012.10/19-21
京都 (10/20 発表)
- 31) 柏倉裕志、大森 司、坂田飛鳥、窓岩清治、井上 誠、長谷川 護、三室 淳、坂田洋一：人工多能性幹細胞を用いた新規血友病治療法に対する基礎的検討 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
- 32) 窓岩清治、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森司、三室 淳、坂田洋一：A role of plasminogen activator-plasmin system for the immune in murine hemophilia A 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
- 33) 水上浩明、三室 淳、塚原智典、卜部匡司、久米晃浩、大森 司、窓岩清治、坂田洋一、小澤敬也：Dose-response relationship of factor IX expression in non-human primates using AAV8-based vector 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
- 34) 坂田飛鳥、大森 司、窓岩清治、三室淳、坂田洋一：Paxillin negatively regulates integrin signaling pathways in mouse platelets 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
- 35) 小山寛介、窓岩清治、坂田飛鳥、大森 司、三室 淳、坂田洋一：敗血症性 DIC における血小板減少の予測因子としての凝固・線溶系マーカーの評価 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
- 36) 窓岩清治、小林英司、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森 司、三室 淳、坂田洋一：第 FVIII 因子感作血友病 A マウスにおけるマイクロボードを用いた連続的抗原投与モデルの構築 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
- 37) 柏倉裕志、大森 司、三室 淳、安本篤史、石渡 彰、坂田飛鳥、窓岩清治、井上 誠、長谷川 護、小澤敬也、坂田洋一：FVIII 遺伝子導入 MSC の関節内移植は血友病 A マウスの血友病性関節症を改善する 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
- 38) 大森 司、矢野裕一郎、坂田飛鳥、池本智一、新保昌久、窓岩清治、勝木孝明、三室 淳、島田和幸、荻尾七臣、坂田洋一：血清パラオキシナーゼ活性は抗血小板薬投与下の凝集能と関連しない 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
- 39) 小山寛介、窓岩清治、坂田飛鳥、大森 司、三室 淳、坂田洋一：敗血症性 DIC-下部消化器官穿孔における凝固障害の特徴- 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
- 40) 小林隆夫：産科領域および外科手術に伴う静脈血栓塞栓症. 第 6 回日本血栓止血学会 SSC シンポジウム血栓性素因部会「血栓性素因とプロテイン S 活性測定」. 東京, 2012.1.21
- 41) 平井久也、杉山和子、岩瀬敏樹、金井俊和、小林正和、岩本竜明、斎藤辰男、金山尚裕、小林隆夫：活性化プロテイン C 感受性比およびプロテイン S 比活性を用いた静脈血栓塞栓症予知に関する研究. 第 34 回日本血栓止血学会. 東京, 2012.6.8

- 42) 小林隆夫: プロテインS比活性と肺塞栓症. 第34回日本血栓止血学会ランチョンセミナー. 東京, 2012.6.9
- 43) 平井久也, 小林隆夫: 浜松医療センターにおける肺塞栓症予知に関する研究. 第30回周産期医療研究会, 静岡, 2012.11.3
- 44) 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予知と早期診断. 第13回肺塞栓症研究会教育セッション. 東京, 2012.11.24
- 45) Yokoyama K, Okamoto S. Thrombosis in Japanese Patients with Multiple Myeloma Receiving Autologous Transplantation. 7th Congress of the Asian Pacific Society on Thrombosis & Hemostasis (2012 October) (口演)
- 46) 榛沢和彦「静脈血栓塞栓症の病態(震災におけるリスクなどを含めて)第31回日本画像医学会教育講演 2012年2月
- 47) 榛沢和彦「東日本大震災避難所のDVT頻度-被災地避難所と遠隔地避難所の比較」第17回日本集団災害医学会シンポジウム「災害医学の方向性」2012年2月
- 48) 榛沢和彦「大震災にみられる深部静脈血栓症-診断と治療-」第60回日本輸血・細胞治療学会総会パネルディスカッション 2012年5月
- 49) 榛沢和彦「新潟県中越地震7年後のDVT検診結果: 肺塞栓症、脳梗塞、虚血性心疾患との関連」第34回日本血栓止血学会学術集会 2012年6月
- 50) 榛沢和彦「遷延する震災後の静脈血栓塞栓症と二次的健康被害: 新潟県中越地震7年間のDVT調査結果から」第32回日本静脈学会ランチョンセミナー 2012年6月
- 51) 榛沢和彦「東日本大震災の避難所における深部静脈血栓症と今後の対策」第34回日本血栓止血学会学術集会: 震災関連シンポジウム 2012年6月
- 52) 榛沢和彦「東日本大震災におけるDVT発生状況と対策」災害とDVT~1年後の総括、第32回日本静脈学会シンポジウム 2012年6月
- 53) 榛沢和彦「新潟県中越地震7年後の被災者DVT検診結果」第32回日本静脈学会 2012年6月
- 54) Kazuhiko Hanzawa, Project for prevention, screening of deep vein thrombosis in evacuation camp. The Japanese experience in Niigata Prefecture, THEMATIC WORKSHOP, Modena, Italy, 2012年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

血栓性素因の調査研究：先天性アンチトロンビン欠損症・*SERPINC1* 遺伝子解析

研究分担者 小嶋 哲人 名古屋大学医学部 教授

研究要旨 アンチトロンビン (AT) 欠損症は、先天性血栓性素因となるまれな疾患である。我々は、これまで深部静脈血栓 (DVT) を発症し先天性 AT 欠損症を疑われた症例において AT 遺伝子 (*SERPINC1*) 変異解析を実施し、種々の遺伝子変異を報告してきた。今回、通常のダイレクトシーケンス法で異常を同定できず遺伝子欠損であった症例を経験したので報告する。症例 1 には MLPA 法にて Exon 5 の片アレル欠失を認め、欠失部を挟む Long PCR 産物の塩基配列解析にて breakpoint を同定した。これは *SERPINC1* のイントロン内に存在する *Alu* 配列中の相同領域 28bp を介して生じていることが判明し、*SERPINC1* に関与する大規模遺伝子変異において *Alu* 配列が大きな役割を担っているとする説を支持する結果であった。症例 2 には MLPA 法にて全 Exon の片アレル欠失を同定し、現在、遺伝子片アレル欠失領域の検索中である。

A. 研究目的

日本人にも決して少なくなく、加齢とともに増加する静脈血栓塞栓症の予知・予防の対策は、高齢化社会を迎えた日本において大きな課題である。特発性血栓症の要因となる日本人での先天性血栓性素因にアンチトロンビン (AT)、プロテイン C (PC)、プロテイン S (PS) などの生理的凝固制御因子の欠乏が知られているが、AT 欠損症、PC 欠損症は欧米人とほぼ同頻度に、PS 欠損症は欧米人に比べ高頻度に見られる。我々は、これまでに本研究班においてこれら凝固制御因子の先天性欠損症が疑われた症例において、それぞれ原因となる遺伝子変異を同定し、さらに同定した変異分子の発現実験などを通して欠損症発症の分子病態解析を行ってきた。

今回我々は、深部静脈血栓 (DVT) を発症し先天性 AT 欠損症を疑われた 3 症例において、*SERPINC1* 遺伝子を解析し、1 例にはミスセンス変異を同定したが、他の 2 症例には通常のダイレクトシーケンス法で異常を同定できず、遺伝子欠損であった症例を経験したので報告する。

B. 研究方法

名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもとでインフォームドコンセントを得た後、それぞれ患者の白血球よりゲノム DNA を抽出し、*SERPINC1* の 7 つの全エクソンをそのイントロンとの境界領域を含めて PCR 増幅後、直接シーケンス法により塩基配列解析を行った。また、塩基配列解析にて AT 欠損症の原因となる変異を認めなかった症例については、MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法を用いて遺伝子欠失の有無を解析した。また、MLPA 法にて遺伝子欠失が示唆された領域において SNPs 解析、real-time PCR (増幅産物量の比較により健常者との遺伝子量の相対定量) を実施し、欠失範囲の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守するとともに、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て解析した。

C. 研究結果

症例 1 には既報の *SERPINC1* 点変異 (c. 442T>C p. Ser148Pro: AT Nagasaki) を同定した。

症例 2 には MLPA 法にて Exon 5 の片アレル欠失を認め (図 1)、欠失部を挟む Long PCR 産物の塩基配列解析にて breakpoint を同定した (図 2)。これは *SERPINC1* のイントロン内に存在する *Alu* 配列中の相同領域 28bp を介して生じていることが判明し、*SERPINC1* に関与する大規模遺伝子変異において *Alu* 配列が大きな役割を担っているとする説を支持する結果であった。

症例 3 には MLPA 法にて全 Exon の片アレル欠失を同定し、現在、遺伝子片アレル欠失領域の検索中であるが、少なくとも 110kb に及び欠失が予想された (図 3)。

D. 考察

症例 1 にダイレクトシーケンス法にて認められた *SERPINC1* Exon 3 のミスセンス変異 c. 442T>C (p. Ser148Pro) は既報の AT Nagasaki 変異で、ヘパリン結合能が悪くヘパリン存在下の活性化凝固因子に対するインヒビター活性が低下する Type II HBS 欠損症の原因と思われた。

症例 2, 3 には、ダイレクトシーケンス法にて *SERPINC1* に変異を検出できず、MLPA 法を用いてそれぞれ Exon 5 および全 Exon 遺伝子欠失を同定した。前者は Intron 4 の *Alu* 4 と Intron 5 の *Alu* 7 の塩基配列を介して発生しており、Exon 5 スキッピングによるフレームシフト (p. Gly255fs*23) により未熟翻訳終了を生じると推測され、Type I 欠損症の原因となると考えられた。また後者は、MLPA 法により *SERPINC1* 全エクソン欠損が検出され、Type I 欠損症の原因となると考えられた。現在、遺伝子片アレル欠失領域の検索中であるが、マウスモデルにて典型的な SLE 病態を示す

RC3H1 遺伝子の一部が欠失していることが判明したことは興味深く、現在遺伝子片アレル欠失領域の検索中である。

E. 結論

先天性 AT 欠損症を疑われた症例の遺伝子解析を実施し、それぞれ既報の点変異ならびに新規の大規模な遺伝子変異を同定した。ダイレクトシーケンス法にて変異を同定できない場合には、MLPA 法などによる片アレル欠失変異の解析が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honda T, Katano Y, Kuzuya T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Toyoda H, Kumada T, Yamamoto K, Matsushita T, Kojima T, Takamatsu J, Goto H: Comparison of the efficacy of ribavirin plus peginterferon alfa-2b for chronic hepatitis C infection in patients with and without coagulation disorders. *J Med Virol.* 85(2): 228-234, 2013.
- 2) Suzuki A, Miyawaki Y, Okuyama E, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito H, Kojima T: Ribavirin-induced intracellular GTP depletion activates transcription elongation in coagulation factor VII gene expression. *Biochemical J.* 449(1): 231-239, 2013.
- 3) 奥山恵理子、小嶋哲人: 先天性血栓性素因の遺伝子解析の現状と展望 *日本血栓止血学会誌* 23(5), 465-471, 2012.
- 4) 高木明、小嶋哲人: 凝固関連血液マーカー