

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

日本人に高頻度に見られる血栓性遺伝子変異をもつ疾患モデルマウスの開発

研究代表者 宮田敏行 国立循環器病研究センター分子病態部 部長

研究要旨

静脈血栓塞栓症は環境因子と遺伝因子が絡み合って発症する多因子疾患であり、生活習慣の欧米化などにより、近年本邦で急速に増加している。臨床的に問題となるのは深部静脈血栓症とそれに起因する肺血栓塞栓症である。肺血栓塞栓症は静脈系の血管内に形成された血栓が遊離して肺動脈を閉塞（塞栓）する疾患であり、その大部分は下肢の深部静脈を塞栓源としている。静脈血栓塞栓症の環境因子として、加齢、がん、長期臥床、妊娠、経口避妊薬、ホルモン補充療法などがあげられており、遺伝因子として血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天的異常があげられる。私達は、これまでに日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝的背景としてプロテイン S-K196E 変異を同定し（オッズ比：3.74-8.56）、本変異は約 55 名に 1 名の頻度で認められ（アレル頻度：0.0089）、約 1 万人がホモ接合体であると報告した。本変異は白人種には見られず、加えて中国人と韓国人にも見られないことから、日本人に特有の血栓性変異であることも明らかにした。また、私達は、日本人には線溶因子プラスミノーゲンの活性の低下を伴う A620T 変異（マウスでは A622T 変異）が約 25 名に 1 名の頻度で認められ、約 5 万人がホモ接合体であると推計されることを示した。本変異は白人種には存在しないものの中国人や韓国人には同定されている。一方、白人種には凝固第 Ⅲ 因子 Leiden(FVL)変異(R506Q 変異)が血栓症のリスクとして報告されている。FVL 変異は白人種の 2-15% に見られ、静脈血栓症に対するオッズ比は 2.7-7.6 と報告されている。このように、静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクには人種差が見られることが明らかとなり、人種間の血栓性リスクの違いが注目されている。本研究では、プロテイン S-K196E 変異マウス、プロテイン S 遺伝子欠損マウス、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスを作製し、日本人の血栓症におけるこれらの変異の位置づけを明確にするとともに、最適な予防・治療法を開発するための疾患モデルとして確立することを目的としている。

前年度までに、C57BL/6J の遺伝的背景をもつプロテイン S-K196E 変異マウス、プロテイン S 遺伝子欠損ヘテロ接合体マウス、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスの作製を完了し、肺塞栓モデル実験および深部静脈血栓モデル実験から、プロテイン S-K196E 変異が静脈血栓症の重症化の原因となることを明らかにした。一方、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスでは脳梗塞巣拡大や創傷治癒遅延は見られなかったため、プラスミノーゲンの A620T 変異は日本人におけるこれらの疾患の増悪要因とはならないと考えられた。

研究の最終年度となる今年度は、プロテイン S-K196E 変異マウスの深部静脈血栓症症状を更に詳しく解析した。電気分解による下大静脈内皮障害による深部静脈血栓モデル実験では、プロテイン S-K196E 変異マウスは、プロテイン S ヘテロ欠損マウスや凝固第 V 因子-R504Q 変異マウスと同様に、野生型マウスに比べて血栓重量が増加し、血小板数が減少し、血漿凝固マーカーおよび炎症マーカー濃度の上昇も認め、PS-K196E 変異が深部静脈血栓症の増悪要因となることを明らかにした。プラスミノーゲン-A622T 変異マウスでは、肺塞栓誘発モデルおよび深部静脈血栓症モデルを用いて、本変異マウスの静脈血栓症症状を解析した。その結果、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスの症状に野生型マウスとの差は見られなかった。日本人を含む東アジア人に高頻度に見られるプラスミノーゲン-A620T 変異は線溶活性低下をもたらすものの、少なくとも単独では静脈血栓症を悪化させる要因とはならないと考えられた。プロテイン S 遺伝子改変マウスとプラスミノーゲン-A622T 変異マウスを（独）医薬基盤研究所メディカル・バイオリソース・データベースに登録した。

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
研究分担者 坂野史明 国立循環器病研究センター分子病態部 研究員
研究協力者 田嶋優子 国立循環器病研究センター分子病態部 流動研究員
研究協力者 井本ひとみ 国立循環器病研究センター分子病態部 非常勤研究員

A. 研究目的

私達は、厚生労働省難治性疾患克服研究事業「血液凝固異常症に関する調査研究班」の活動を通して、プロテイン S の機能低下を伴う K196E 変異が静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであることを同定した。静脈血栓塞栓症に対して、オッズ比 3.7-8.6 を示す。プロテイン S -K196E 変異ヘテロ接合体者は静脈血栓塞栓症患者 173 名中 13 名、ホモ接合体者は 2 名見いだされ、13 名のヘテロ接合体者のうち 5 名は、プロテイン C 遺伝子にも変異が同定されたことから、2 つの遺伝子に変異を持つことで静脈血栓塞栓症のリスクが高まると考えられ、プロテイン S -K196E 変異は血栓症の修飾因子であると考えられた。プロテイン S -K196E 変異保有者はプロテイン S 抗凝固活性が平均で 17% 低下しているものの、野生型保有者のプロテイン S 抗凝固活性値とオーバーラップするので、変異ヘテロ保有者はプロテイン S 抗凝固活性値では判別できないと考えられた。プロテイン S -K196E 変異は日本人約 55 人に 1 人の頻度で存在し、全国で約 1 万人の日本人がホモ接合体であると推定される。これまでに静脈血栓症患者の約 1% (約 85 人に 1 人) にホモ接合体が同定されており、ホモ接合体ではプロテイン S 抗原量は正常であるが、抗凝固活性が 35-39% にまで低下していた。最近の私達の研究では、本変異は白人種には見られず、加えて中国人と韓国人にも見られないことから、日本人に特有の血栓性変異であると考えられる(Yin and Miyata, J Thromb Thrombolysis. Review, 2013 [Epub ahead of print])。

私達は、日本人には線溶因子プラスミノーゲンの A620T 変異 (マウスでは A622T 変異) が広く存在することを報告している。一般住民を対象とした検討では、プラスミノーゲン A620T 変異はアレル頻度 2% (約 25 人に 1 人がヘテロ接合体) と高頻度に認められると報告してきた。本変異は中国人と韓国人にも見られるが、白人種には同定されていない。プラスミノーゲンは、フィブリン分解反応の鍵となる酵素プラスミンの前駆体であり、組織プラスミノーゲン活性化因子やウロキナーゼにより、プラスミンに変換され血栓を溶解する。A620T 変異保有者の血中プラスミノーゲン抗原量は正常値を示すものの、活性は 50-60% 程度の低値を示す。このように、A620T 変異はプラスミノーゲン活性を著減させるため、変異保有者では持続的に血栓溶解能が低下する。現在まで、本変異のヘテロ接合体と血栓症との関連は示されていない。し

かし、プラスミノーゲン活性の低下は血栓発症や創傷治癒を修飾する可能性がある。また、変異ホモ接合体の血栓症との関連については報告がない。

白人では、凝固第 3 因子 Leiden(FVL) 変異 (R506Q 変異) が静脈血栓塞栓症のリスク因子として広く知られている。本変異は白人一般集団に 2-15% の頻度で見られるが、日本人には見られず、人種特異的な血栓性遺伝子変異である。FVL 変異の静脈血栓塞栓症に対するオッズ比は 2.7-7.6 であり、動脈閉塞症との関連も指摘され、小児や若年者での脳梗塞との関連が報告されている。ヒト第 3 因子の R506 残基はマウスでは R504 残基であり、これを Gln 残基に置換した FVL 変異マウス (R504Q 変異マウス) が作製されている。FVL ホモ体マウスは新生児期に臓器に広範に自然発症する血栓を認め、一部のマウスは周産期に死亡する。また、ホモ体マウスは頸動脈の光惹起障害モデルや大脳動脈の FeCl₃ 障害モデルで、動脈血栓の亢進が報告されている。

すでに述べたように、静脈血栓塞栓症の発症リスクとなる遺伝子変異は人種間で異なることが、私達の研究などから明らかとなってきた。これらの人種特異的な血栓性遺伝子変異の研究は、それぞれの人種の血栓症の理解を高めることとなり極めて重要である。また、これらの人種特異的な血栓性遺伝子変異は、血栓症の発症予防と治療に関連すると考えられるが、ヒトを対象とした研究には限界がある。白人種に見られる血栓性変異を有する FVL 変異マウスは、血栓との関連が良く研究されている。そこで、プロテイン S -K196E 変異マウスとプラスミノーゲンの A622T 変異マウスを作製し、その血栓能を FVL 変異マウスと比較しつつ、検討を加えることは、人種間の血栓能の解明に重要であると考えられる。

本研究では、日本人に見られる遺伝子変異を有するマウスを作製し、その血栓能を評価することにより、日本人に特異的な血栓性遺伝子変異がどのように血栓症に関与するか明らかにすることを目的とする。すなわち、本研究では、プロテイン S -K196E 変異マウス、プロテイン S 遺伝子欠損マウス、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスを作製し、これらの血栓形成能を野生型マウスおよび FVL 変異マウスと比較検討することにより、日本人の血栓症における血栓性変異の位置づけを明確にする。また、本研究は変異保有者の血栓症発症の最適な予防・治療法を

開発するための疾患モデルの確立につながる。

最終年度である本年度は、遺伝子改変マウスの血栓能の解析を継続するとともに、これらの疾患モデルマウスを（独）医薬基盤研究所に登録した。

B. 研究方法

使用動物

野生型マウス（C57BL/6J）、プロテイン S-K196E 変異（c.586A>G）ヘテロ接合体マウス（自ら作製）、プロテイン S-K196E 変異ホモ接合体マウス（自ら作製）、プロテイン S 遺伝子欠損ヘテロ接合体マウス（自ら作製）、プラスミノーゲン-A622T 変異（c.1864G>A）ホモ接合体マウス（自ら作製）および凝固第 V 因子-R504Q 変異ホモ接合体マウス（Jackson 研究所から購入）の合計 6 系統を解析対象とした。本研究に使用する全てのマウスは C57BL/6J 系統の遺伝的背景に均一化し、遺伝的背景がそろったマウスで実験を行った。

血漿フィブリン塊溶解活性の測定

マウス血漿にヒト組織型プラスミノーゲンアクチベーターを加えて室温、30 分間反応することによりプラスミノーゲンをプラスミンに活性化後、トロンピンと塩化カルシウムを添加してフィブリン形成を惹起し、波長 405 nm の吸光度変化を 5 分間隔でモニターした。吸光度はフィブリン形成により一旦上昇するが、プラスミンによる分解で緩やかに低下する。この吸光度変化を元にフィブリン塊溶解活性を測定した。

深部静脈血栓モデル

プロテイン S 遺伝子改変マウスでは、下大静脈にステンレス電極を挿入して 200 μ A・10 分間通電した。電極の電気分解の結果生じるフリーラジカルにより、血管内皮細胞が活性化し、血栓形成が誘発される。生じる血栓が最大となる処置 2 日目に採血して末梢血血小板数を測定後、実体顕微鏡下に下大静脈内血栓を取り出し、その重量を測定した。また、血漿中の凝固活性化マーカーとしてトロンピン-アンチトロンピン複合体（TAT）濃度、炎症マーカーとしてインターロイキン-6（IL-6）濃度を測定した。

プラスミノーゲン-A622T 変異マウスでは、下大静脈にステンレス電極を挿入して 250 μ A・15 分間通電した。処置 2 日後に血栓重量および末

梢血血小板数を測定した。また、血栓の退縮、溶解に対する変異の影響を解析するため、処置 7 日後のマウスについても同様の解析を行った。

肺塞栓モデル

プラスミノーゲン-A622T 変異マウスに外因系凝固を活性化する組織因子を下大静脈から投与することで肺塞栓を惹起し、呼吸停止までの時間を 20 分間測定して生存率をもとめた。また、呼吸停止 2 分後に右心室から Evans blue を注入し、肺全体の染色像から肺血管閉塞スコア（0 = 閉塞無し～4 = 完全閉塞の 5 段階）を判定した。

二重変異マウスの作製

プロテイン S-K196E 変異とプラスミノーゲン-A620T 変異は相乗的に作用して病状を悪化させる可能性がある。そこでプロテイン S-K196E 変異マウスとプラスミノーゲン-A622T 変異マウスの交配により、二重変異マウスを作製した。

（倫理面への配慮）

本研究は国立循環器病研究センター遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得て実施した。また、動物愛護の観点から、マウスに与える苦痛を最小限にするよう配慮して進めた。

C. 研究結果

プロテイン S-K196E 変異マウス、プロテイン S 遺伝子欠損マウスおよび FVL ホモ変異マウスの深部静脈血栓モデル

深部静脈血栓症誘発後に形成された血栓重量（平均値 \pm 標準偏差，N = 12）は野生型マウス（ 3.6 ± 1.6 g）に比べて、プロテイン S-K196E ホモ変異マウス（ 15.7 ± 11.9 g）、プロテイン S ヘテロ欠損マウス（ 15.9 ± 10.2 g）、凝固第 V 因子-R504Q ホモ変異マウス（ 15.8 ± 9.7 g）で増加した。これらのマウスでは消耗性と考えられる血小板減少（プロテイン S-K196E ホモ変異マウス： 46.6 ± 31.8 、プロテイン S ヘテロ欠損マウス： 36.6 ± 35.0 、凝固第 V 因子-R504Q ホモ変異マウス： $34.2 \pm 24.2 \times 10^4/50$ ）も野生型マウス（ $116.2 \pm 28.8 \times 10^4/50$ ）に比べて重篤化した。プロテイン S-K196E ヘテロ変異マウスの血栓重量（ 8.1 ± 6.8 g）は野生型マウスと有意差はみられなかったが、血小板数（ $76.3 \pm 33.6 \times 10^4/19$ ）は減少した。プロテイン

S-K196E ホモ変異マウス、プロテイン S ヘテロ欠損マウス、凝固第 V 因子-R504Q ホモ変異マウスでは、血漿 TAT および IL-6 濃度が野生型マウスに比べて上昇しており、凝固反応や炎症反応の活性化に伴って静脈血栓形成が亢進したと考えられた。

プラスミノーゲン-A622T 変異マウスの血漿フィブリン塊溶解活性

血漿フィブリン塊溶解活性を測定した結果、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスでは、野生型マウスに比べて顕著な活性低下が認められた。また、反応系に 2-プラスミンインヒビターを加えることで、吸光度の低下はほぼ完全に抑制されたことから、本測定にてプラスミン依存的なフィブリン溶解が起きていることを確認した。これらの結果から、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスでは、血漿プラスミノーゲンの合成基質切断活性（初年度に測定済）だけでなく、フィブリン溶解活性が低下していることが確認できた。

プラスミノーゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスの深部静脈血栓モデル

深部静脈血栓モデル実験において、処置 2 日後の血栓重量（平均値 ± 標準偏差, N = 10）は、野生型マウスで 8.2 ± 5.4 g、プラスミノーゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで 10.0 ± 6.4 g であり、両群間に有意差は認めなかった。血小板減少の程度も群間で違いがなかったことから、プラスミノーゲン-A620T 変異は深部静脈血栓の増悪要因ではないと考えられた。また、処置 7 日後の血栓重量（N = 5）も野生型マウスで 5.4 ± 3.5 g、プラスミノーゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで 5.4 ± 4.6 g と群間に違いはなく、プラスミノーゲン-A622T 変異による血栓退縮の遅延も見られなかった。

プラスミノーゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスの肺塞栓モデル

肺塞栓モデル実験において、組織因子投与後の生存率は野生型マウス（N = 18）で 83.3%、プラスミノーゲン-A622T 変異ホモ接合体マウス（N = 20）で 80.0% であり、両群間に差は認めなかった。肺血管閉塞スコアも、野生型マウスで 1.86 ± 1.47 、プラスミノーゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで 2.25 ± 1.60 と、群間に有意差はみなかった。したがって、プラスミノーゲン-A620T 変異は肺塞栓症状悪化の原因とはならないと考えられた。

二重変異マウスの作製

プロテイン S -K196E 変異マウスとプラスミノーゲン-A622T 変異マウスの交配により二重変異マウスを作製した結果、両変異共にホモ接合体となったマウスも出生、発育可能なことが確認された。

医薬基盤研究所への遺伝子改変マウスの登録

本研究で樹立したプロテイン S 遺伝子改変マウスおよびプラスミノーゲン-A622T 変異マウスを国内外の研究者に譲渡するため、（独）医薬基盤研究所メディカル・バイオリソース・データベースに登録した。

D. 考察

プロテイン S-K196E 変異マウスは、プロテイン S ヘテロ欠損マウス、凝固第 V 因子-R504Q 変異マウスと同様に、野生型マウスに比べて著明な静脈血栓形成亢進を認めた。肺塞栓モデルでも同様の結果が得られており、これらの結果から、プロテイン S-K196E 変異保有者での静脈血栓症リスク上昇が、本変異に起因することが確認できた。一方、平成 23 年度の結果では、局所脳虚血再灌流モデル実験では、凝固第 V 因子-R504Q マウスでのみ野生型マウスに比して脳梗塞巣の拡大が認められ、プロテイン S-K196E マウスやプロテイン S ヘテロ欠損マウスに症状の悪化は見られなかった。凝固第 V 因子-Leiden 変異は白人の若年性脳梗塞のリスク要因として報告されているが、プロテイン S-K196E 変異と脳梗塞との関連を示す報告はない。プロテイン S-K196E マウスはこれと矛盾しない表現型を呈しており、日本人の血栓傾向の特徴を反映したモデルであると考えられる。

プラスミノーゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスでは、血漿プラスミノーゲン活性が野生型マウスの約 8% に低下しており、血漿フィブリン塊溶解活性も低下した。しかし、深部静脈血栓症モデルおよび肺塞栓モデルを用いた検討では、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスに野生型マウスと比べて症状の悪化は見られなかった。前年度に行った局所脳虚血再灌流モデルおよび皮膚創傷モデルを用いた検討でも、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスに異常は認められなかったため、日本人を含むアジア人に広く分布するプラスミノーゲン-A620T 変異は少なくとも単独では、静脈血栓症、脳梗塞および創傷治癒を悪化させる遺伝的要因とはならないと推定された。本変異とプロテイン S -K196E 変

異の両方を持つ重症静脈血栓症患者が見つかったため、プラスミノゲン-A620T 変異が他の血栓性素因と重なることで、血栓症状の修飾因子として働く可能性が残っている。引き続き、プラスミノゲン-A622T とプロテイン S -K196E の二重変異マウスを解析することでこの点を明らかにしていく必要がある。

本年度に、プロテイン S -K196E 変異とプラスミノゲン-A622T 変異の二重変異マウスの獲得に成功した。今後2つの変異の相乗効果を考慮した検討が可能になった。

本研究で樹立したプロテイン S 遺伝子改変マウスおよびプラスミノゲン-A622T 変異マウスを国内外の研究者に譲渡するため、(独) 医薬基盤研究所メディカル・バイオリソース・データベースに登録した。

研究代表者である宮田敏行は医薬基盤研究所との連携を強化するため、医薬基盤研究所にて「疾患モデルマウスを用いた血栓性疾患の研究」の講演を行った。また、分担研究者である坂野史明は、本研究の成果を国際血栓止血学会 SSC 委員会(アムステルダム)、日本血栓止血学会 SPC 委員会シンポジウム(山形市)、日本血栓止血学会 SSC 委員会シンポジウム(東京都)で報告した(いずれも口演)。研究協力者の田嶋優子は、本研究の成果を国際血栓止血学会(アムステルダム)、日本血栓止血学会(山形市)、Gordon Research Conference, Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis (口演、Ventura, CA)で報告した。

E. 結論

プロテイン S -K196E ホモ変異マウスは、下大静脈内皮障害による深部静脈血栓モデルでは、プロテイン S ヘテロ欠損マウスや凝固第 V 因子-R504Q ホモ変異マウスと同様に、野生型マウスに比べて血栓重量が増加し、血小板数が減少し、血漿凝固マーカーおよび炎症マーカー濃度が上昇した。このことから、日本人にのみ特異的に見られるプロテイン S -K196E 変異は深部静脈血栓症の増悪要因となると考えられた。プラスミノゲン-A622T ホモ変異マウスは、肺塞栓誘発モデルおよび深部静脈血栓症モデルでは、野生型マウスとの差は見られなかった。このことから、日本人を含む東アジア人に高頻度に見られるプラスミノゲン-A620T 変異は線溶活性低下をもたらすものの、少なくとも単独では静脈血栓症を悪化させる要因とはならないと考えられた。プロテイン S -K196E 変異とプラスミノゲン-A622T 変異の二重変異マウスの

樹立に成功した。これらのマウスは日本人の静脈血栓症に対する抗血栓薬の評価や開発を進める基盤になると考えた。

本研究により、プロテイン S -K196E 変異およびプラスミノゲン-A622T 変異のマウスでの血栓症における役割を明らかにできたが、両変異を保有する二重変異マウス、および他の血栓性素因と重なったマウスに関しては、今後検討が必要である。すなわち、プロテイン S -K196E 変異とプラスミノゲン-A622T 変異が、血栓症の modifier として働くことを想定した研究が必要と考えられ、modifier としての遺伝子変異の研究はヒトの血栓症の理解に大きく貢献するものとする。本研究で樹立した遺伝子改変マウスは、こういった modifier の研究に必須であり、日本人の血栓症の特異性を解明する基盤を整備することができた。

プロテイン S 遺伝子改変マウスとプラスミノゲン-A622T マウスを(独) 医薬基盤研究所メディカル・バイオリソース・データベースに登録した。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
1. 論文発表

Miyata T, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y: ADAMTS13 activity and genetic mutations in Japan. *Hämostaseologie*, 33(2), 131-137, 2013.

Fan X, 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.

Satoh Y, Yokota T, Sudo T, Kondo M, Lai A, Kincade PW, Kouro T, Iida R, Kokame K, Miyata T, Habuchi Y, Matsui K, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y: The Satb1 Protein Directs Hematopoietic Stem Cell Differentiation toward Lymphoid Lineages. *Immunity*, 38(6), 1105-1115, 2013.

- Akiyama M, Nakayama D, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T: Crystal structure and enzymatic activity of an ADAMTS-13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism. *J Thromb Haemost*, 11(7), 1399-1406, 2013.
- Mise K, Ubara Y, Matsumoto M, Sumida K, Hiramatsu R, Hasegawa E, Yamanouchi M, Hayami N, Suwabe T, Hoshino J, Sawa N, Ohashi K, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y, Takaichi K: Long term follow up of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) on hemodialysis for 19 years: a case report. *BMC Nephrol*, 14:156, 5 pages, 2013.
- Liu W, Yin T, Okuda H, Harada KH, Li Y, Xu B, Yang J, Wang H, Fan X, Koizumi A, Miyata T: Protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism, is limited to Japanese. *Thromb Res*, 132, 314-315, 2013.
- Muratsu J, Morishima A, Mizoguchi K, Ataka K, Yamamoto H, Fan X, Miyata T, Sakaguchi K: Budd-Chiari syndrome with multiple thrombi due to a familial Arg42Ser mutation in the protein C gene. *Case Reports in Medicine*, Volume 2013, Article ID 270419, 6 pages, 2013.
- Shinozaki S, Chiba T, Kokame K, Miyata T, Kaneko E, Shimokado K: A deficiency of Herp, an endoplasmic reticulum stress protein, suppresses atherosclerosis in apoE knockout mice by attenuating inflammatory responses. *PLoS ONE*, 8(10), e75249, 2013.
- Kamide K, Asayama K, Katsuya T, Ohkubo T, Hirose T, Inoue R, Metoki H, Kikuya M, Obara T, Hanada H, Thijs L, Kuznetsova T, Noguchi Y, Sugimoto K, Ohishi M, Morimoto S, Nakahashi T, Takiuchi S, Ishimitsu T, Tsuchihashi T, Soma M, Higaki J, Matsuura H, Shinagawa T, Sasaguri T, Miki T, Takeda K, Shimamoto K, Ueno M, Hosomi N, Kato J, Komai N, Kojima S, Sase K, Miyata T, Tomoike H, Kawano Y, Ogiwara T, Rakugi H, Staessen JA, Imai Y: Genome-wide response to antihypertensive medication using home blood pressure measurements: a pilot study nested within the HOMED-BP study. *Pharmacogenomics*, 14(14), 1709-1721, 2013.
- Honda S, Shirotani-Ikejima H, Tadokoro S, Tomiyama Y, Miyata T: The integrin-linked kinase-PINCH-parvin complex supports integrin α IIb β 3 activation. *PLoS ONE*, 8(12), e85498, 2013.
- Takizawa Y, Kosuge Y, Awaji H, Tamura E, Takai A, Yanai T, Yamamoto R, Kokame K, Miyata T, Nakata R, Inoue H: Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), silent mating type information regulation 2 homologue 1 (SIRT1) and autophagy-related genes by repeated treatments with resveratrol in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Nutr*, 110(12), 2150-2155, 2013.
- Bernasconi R, Galli C, Kokame K, Molinari M: Autoadaptive ER-Associated Degradation Defines a Preemptive Unfolded Protein Response Pathway. *Mol Cell*, 52(6), 783-793, 2013.
- Tanaka H, Tenkumo C, Mori N, Kokame K, Fujimura Y, Hata T: Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res*, 40(1), 247-249, 2014.
- Yin T, Miyata T. Dysfunction of protein C anticoagulant system, main genetic risk factor for venous thromboembolism in Northeast Asians. *J Thromb Thrombolysis*, 37, 56-65, 2014.
- Morioka M, Matsumoto M, Saito M, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y: A first bout of thrombotic thrombocytopenic purpura triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nulliparous female with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood Transfus*, in press.
- Larkin J, Chen B, Shi XH, Mishima T, Kokame K, Barak Y, Sadovsky Y: EN-13-1425/NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury. *Endocrinology*, in press.
- Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi M, Fujimura Y, Miyata T: Candidate

Gene Analysis Using Genomic Quantitative PCR: Identification of ADAMTS13 Large Deletions in Two Patients with Upshaw-Schulman Syndrome. Mol Genet Genomic Med, in press.

Neki R, Miyata T, Fujita T, Kokame K, Fujita T, Isaka S, Ikeda T, Yoshimatsu J: Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes, Thromb Res, in press.

宮田敏行、森下英理子「先天性血栓性素因」血栓と循環、第21巻、第1号、6-11頁、2013年

宮田敏行、小亀浩市、小久保喜弘「先天性ADAMTS13欠損症」臨床検査、第57巻、第5号、556-561頁、2013年

坂野史明、宮田敏行、藤岡政行、杉本充彦「遺伝子改変血栓モデル: ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを中心に」Thrombosis Medicine、第3巻、第2号、36-43頁、2013年

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と腎移植」日本臨床腎移植学会雑誌、第1巻、第1号、39-44頁、2013年

藤村吉博、吉田瑤子、範 新萍、宮田敏行「非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS)」臨床血液、第54巻、第10号、351(1897)-360(1906)頁、2013年

岡 政史、大塚泰史、稲田由紀子、佐藤忠司、吉田瑤子、藤村吉博、Fan Xinping、宮田敏行、濱崎雄平「抗 CFH 抗体陽性および CFHR1 遺伝子欠失を伴う DEAP-HUS の1例」日本小児腎臓病学会雑誌、第26巻、第2号、109(285)-115(291)頁、2013年

小亀浩市「ADAMTS13 と血栓性血小板減少性紫斑病」循環器病研究の進歩、第34巻、第1号、69-75頁、2013年

吉田瑤子、藤村吉博、宮田敏行「非典型 HUS における補体異常とその解析」細胞、第46巻、第2号、7(57)-10(60)頁、2014年

小亀浩市、樋口由佳「Upshaw-Schulman 症候群の ADAMTS13 遺伝子解析」細胞、第46巻、第2号、11(61)-13(63)頁、2014年

宮田敏行、坂野史明「VI 凝固線溶系 3. 血栓症と炎症におけるポリリン酸の役割」Annual

Review 血液 2014、高久史磨・小澤敬也・坂田洋一・金倉 譲・小島勢二 編集、中外医学社、216-223頁、2014年

藤村吉博、松本雅則、石西綾美、八木秀男、小亀浩市、宮田敏行「血栓性血小板減少性紫斑病」臨床血液、第55巻、第1号、93-104頁、2014年

宮田敏行、水口 純、鈴木敦夫、小嶋哲人「特集: 血液凝固の制御機構と臨床応用への展望、プロテイン C/ プロテイン S の基礎」、日本血栓止血学会誌、2014年 印刷中

宮田敏行、田嶋優子、「4 . 血栓・止血異常の診察、第一章 血栓・止血異常症を理解するために B. 凝固反応を理解する」、シリーズプリンシプル血液疾患の臨床、2014年 印刷中

秋山正志、武田壮一、宮田敏行「トピックス、東アジア人特有の P475S 変異を持つ ADAMTS13 の立体構造と機能解析」日本血栓止血学会誌、2014年 印刷中

2 . 学会発表

宮田敏行、宮田茂樹、長束一行、第35回日本血栓止血学会学術集会、日本血栓止血学会・日本循環器学会ジョイントシンポジウム、抗血小板療法が多様性について、「Pharmacogenomics は抗血小板剤の個別化医療の救世主となり得るか?」2013年5月30日-6月1日、山形市

小亀浩市、秋山正志、宮田敏行、「ADAMTS13 の正常な分泌にはシクロフィリン B によるプロリン残基異性化が必要である」、第35回日本血栓止血学会学術集会、2013年5月30日-6月1日、山形市

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Yuko Tashima, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Generation of protein S-Tokushima mutant mice to provide an *in vivo* evaluation system for thrombosis in Japanese, SPC シンポジウム4 ,第35回日本血栓止血学会学術集会、2013年5月30日-6月1日、山形市

田嶋優子、坂野史明、喜多俊行、松田泰幸、柳本広二、宮田敏行: プラスミノーゲン栃木変異ホモ接合体マウスの血栓傾向の解析. 第35回日本血栓止血学会学術集会、2013年5月、山形市

土井政明、松井英人、竹田征治、斎藤能彦、武田麻衣子、松成泰典、西尾健治、嶋 緑倫、坂野史明、秋山正志、小亀浩市、宮田敏行、杉本

充彦、「マウス急性心筋梗塞モデルにおける ADAMTS13 の心筋保護作用」、第 35 回日本血栓止血学会学術集会、2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日、山形市

松井英人、土井政明、武田麻衣子、松成泰典、西尾健治、嶋 緑倫、副島見事、粕田承吾、坂野史明、宮田敏行、杉本充彦、「マウス骨髄移植モデルにおける ADAMTS13 の移植ドナー細胞生着促進効果」、第 35 回日本血栓止血学会学術集会、2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日、山形市

小堺貴司、森山雅人、布施一郎、柴崎康彦、増子正義、瀧澤 淳、鳥羽 健、吉田邦彦、小亀浩市、宮田敏行、松本雅則、藤村吉博、曾根博仁、「妊娠を契機に診断された新規の遺伝子変異を伴う Upshaw-Schulman 症候群 (USS) の一例」、第 35 回日本血栓止血学会学術集会、2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日、山形市

平井秀憲、秋山正志、宮田敏行、「哺乳類細胞を用いた ADAMTS13 ドメインの一過性大量発現」、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12 日-14 日、鳥取市

宮田敏行、医薬基盤研究所セミナー、「疾患モデルマウスを用いた血栓性疾患の研究」、2013 年 6 月 28 日、箕面市

吉田瑶子、範 新萍、本田繁則、芦田 明、服部元史、松本雅則、大山良文、古久保哲郎、南学正臣、宮田敏行、藤村吉博、「本邦の非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の患者登録とその表現型 - 遺伝子型解析」、第 48 回日本小児腎臓病学会学術集会、2013 年 6 月 28 日-29 日、徳島市

Yoshihiro Fujimura, Yoko Yoshida, Xinping Fan, Toshiyuki Miyata, "Registry of congenital atypical HUS in Japan", ISTH-APSTH joint symposium, XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 29-July 4, 2013, Amsterdam, Netherlands

Jun Muratsu, Atsuyuki Morishima, Masayoshi Kukida, Anzu Tanaka, Xinping Fan, Toshiyuki Miyata, Katsuhiko Sakaguchi, Familial screening in the case of Budd-Chiari syndrome with multiple thrombi due to Arg42Ser mutation in the protein C gene, XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 29-July 4, 2013, Amsterdam, Netherlands

Yuko Tashima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Toshiyuki Miyata, Generation and characterization of homozygous plasminogen-Tochigi mutant mice bearing reduced fibrinolytic activity, XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 29-July 4, 2013, Amsterdam, Netherlands

Hideto Matsui, Masaaki Doi, Yasunori Matsunari, Maiko Takeda, Kenji Nishio, Midori Shima, Kenji Soejima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiko Sugimoto: ADAMTS13 accelerates the cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, Netherlands, 2013 年 7 月.

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Yuko Tashima, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Exacerbated venous thromboembolism in mice with the protein S Tokushima mutation, XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 29-July 4, 2013, Amsterdam, Netherlands

Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiro Takafuta, Ryojiro Tanaka, Hikaru Kobayashi, Fumihiro Ishida, Shuichi Hisanaga, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata, Quantitative PCR assay demonstrated exon deletions of ADAMTS13 in two unrelated patients with Upshaw-Schulman syndrome, XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 29-July 4, 2013, Amsterdam, Netherlands

Fumiaki Banno: Genetic mouse models of venous thrombosis for Japanese. 59th Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, Netherlands, 2013 年 6 月.

宮田敏行、ミニシンポジウム：補体系と凝固系、「凝固系・補体系の接点としての血管内皮細胞障害」、第 50 回補体シンポジウム、2013 年 7 月 5-6 日、旭川市

宮田敏行、心房細動治療 up date、「新規経口抗凝固薬の作用機序とその Antidote」、2013 年

7月21日、大阪市

光黒真菜、根木玲子、岡本章、城ノ内芳枝、宮田茂樹、佐野道隆、宮田敏行、吉松 淳、「妊産婦における長期ヘパリン療法のリモニタリング-APTT および抗 Xa 活性の比較検討」、第 14 回日本検査血液学会学術集会、2013 年 7 月 27 日-28 日、東京都

樋口（江浦）由佳、小亀浩市、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行、「血栓性血小板減少性紫斑病患者の ADAMTS13 遺伝子に伏在していた変異の発見:ゲノム DNA を用いた定量 PCR 法の開発」、第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2013 年 8 月 16 日-17 日、吹田市

田嶋優子、坂野史明、喜多俊行、松田泰幸、柳本広二、宮田敏行、「マウスプラスミノゲン拮抗変異は血漿プラスミン活性を低下させるが血栓塞栓症の原因にはならない」、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日-13 日、横浜市

樋口（江浦）由佳、小亀浩市、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行、「日本における先天性 ADAMTS13 欠損症の遺伝子解析」、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日-13 日、横浜市

宮田敏行、「血栓性細小血管障害症の発症機構と診断・治療」、第 33 回ヒューマンサイエンス基礎研究講習会、「国立循環器病研究センターにおける研究活動、循環器病対策に向けた予防・診断・治療戦略」2013 年 9 月 24 日、吹田市

和田英夫、松本剛史、大石剛史、片山直之、宮田敏行、藤村吉博、「三重大で経験した非典型溶血性尿毒症症候群」、第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 日-13 日、札幌市

宮田敏行、「血栓止血領域における遺伝子変異と多型、どこまで理解が進んだのか、どのように臨床に使うのか」、栄研化学株式会社生物化学研究所、2013 年 10 月 22 日、栃木県下都賀郡

Yoshihiro Fujimura, Yumi Yoshii, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Hideo Yagi, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, A long-term phenotype analysis of 51 patients with Upshaw-Schulman syndrome in Japan, with special references to pregnancy and renal failure that requires hemodialysis, 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, New Orleans, December 7-10, 2013

Yoko Yoshida, Xinping Fan, Yoshifumi Ohyama, Tetsuro Kokubo, Masanori Matsumoto, Hideo Yagi, Hiroko Shirokane-Ikejima, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, Atypical Hemolytic Uremic Syndrome In Japan Characterized By The Inhibitory Antibody-Based Hemolytic Assay and The Gene Analysis, 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, New Orleans, USA, December 7-10, 2013

坂野史明: 日本人の血栓性遺伝素因を持つモデルマウスの樹立と解析. 第 8 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム, 東京都, 2014 年 2 月.

Yuko Tashima "Generation and Characterization of Homozygous Plasminogen-Tochigi Mutant Mice Bearing Reduced Fibrinolytic Activity, 15-min talk", Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis, Gordon Research Seminar, February 8-9, 2014, Ventura, CA, USA.

Yuko Tashima, Flash talk, "Generation and Characterization of Homozygous Plasminogen-Tochigi Mutant Mice Bearing Reduced Fibrinolytic Activity" Gordon Research Conferences, Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis, February 9-14, 2014, Ventura, CA, USA.

Takuya Okata, Kazunori Toyoda, Akira Okamoto, Toshiyuki Miyata, Kazuyuki Nagatsuka, Kazuo Minematsu, Anticoagulation intensity of low-dose rivaroxaban for Japanese patients with nonvalvular atrial fibrillation, International Stroke Conference 2014, San Diego, USA, February 12-14, 2014.

Takuya Okata, Kazunori Toyoda, Akira Okamoto, Toshiyuki Miyata, Junji Takasugi, Masatoshi Koga, Kazuyuki Nagatsuka, Kazuo Minematsu, Successful resolution of the cardiac thrombus using novel oral anticoagulants, International Stroke Conference 2014, San Diego, USA, February 12-14, 2014.

坂野史明: モデルマウスを利用した日本人の静脈血栓症の遺伝的特異性の解明. 第 39 回日本脳卒中学会総会, 大阪市, 2014 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし