

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栃木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, Xiping Fan, Yoshifumi Ohyama, Tetsuro Kokubo, Masanori Matsumoto, Hideo Yagi, Hiroko Shirohani-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.

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.

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

プロテインS-K196E 変異をもつモデルマウスの作製と解析

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 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 喜多俊行 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

研究要旨

プロテインSは活性化プロテインCの補酵素として機能する血漿タンパク質であり、プロテインSの機能が低下すると血栓形成傾向になる。我々は、日本人の静脈血栓症の遺伝的背景としてプロテインS-K196E 変異を同定した。本研究では、プロテインS-K196E 変異マウスおよびプロテインS欠損マウスを作製し、これらの血栓形成能を白人型血栓症モデルである凝固第V因子-R504Q 変異マウスと比較検証することで、抗血栓薬の評価や開発につながる知見を得ることを目的としている。まず、C57BL/6J 系統マウスと共通の遺伝的背景をもったプロテインS-K196E 変異マウスおよびプロテインS欠損ヘテロ接合体マウスを作製し、プロテインSは正常な胚発生に必須の因子であるが、K196E 変異は胚発生に影響を与えないことを明らかにした。さらに、これらのマウスでは血漿プロテインS活性が低下しており、血栓症の動物モデルとして有用であることを示した。肺塞栓モデルを用いた検討の結果、プロテインS-K196E 変異マウスでは、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肺血管閉塞が進行し、高い死亡率を示した。また、深部静脈血栓モデルを用いた検討においても、プロテインS-K196E 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 変異マウスは野生型マウスに比べて重篤な症状を呈したことから、プロテインS-K196E 変異が静脈血栓症の増悪要因となることが明確になった。一方、脳虚血再灌流モデルを用いた検討では、凝固第V因子-R504Q 変異マウスはヘテロ体、ホモ体共に野生型マウスに比べて脳梗塞巣が拡大したが、プロテインS-K196E 変異マウス、プロテインSヘテロ欠損マウスには症状の悪化は見られなかった。プロテインS-K196E 変異は脳梗塞を悪化させる遺伝的要因にならないと考えられ、ヒトの臨床情報と矛盾しない結論が得られた。プロテインS-K196E 変異マウスを日本人型血栓症の疾患モデルマウスとして（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。

A. 研究目的

プロテインSは、血液凝固制御系で機能する約 75 kDa の糖タンパク質である。リン脂質膜上で活性化プロテインCと複合体を形成し、活性化第V因子および第VIII因子を分解することで、血液の凝固活性を抑制する。プロテインSの機能が質的あるいは量的に低下すると、止血系のバランスは血栓形成傾向に傾く。

我々は、静脈血栓症の遺伝的背景として、プロテインSの機能低下を伴う K196E 変異を同定した。静脈血栓症の発症に対して、オッズ比 4.7-5.6 を示す。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。

本研究では、プロテインS遺伝子を K196E 変異型に置換したノックインマウスおよびプロテインSを欠損したマウスを樹立し、日本人の血栓症に最適な予防・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。このため、樹立したプロテインS-K196E 変異マウスおよびプロテインS欠損マウスの血液凝固能を解析後、深部静脈血栓症モデル、肺塞栓モデル、局所脳虚血再灌流モデルを用いて *in vivo* 血栓形成能を評価し、その症状を白人型血栓症モデルである凝固第V因子-Leiden (R504Q) 変異マウスと比較検証した。また、血栓性遺伝素因の相互作用を

検討するためのモデルマウスとして、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を作製した。本研究にて樹立した疾患モデルマウスは（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、外部研究者に広く使用して頂く体制を構築した。

B. 研究方法

プロテイン S-K196E 変異マウスおよびプロテイン S 欠損マウスの作製

プロテイン S-K196E 変異マウスは *Pros1* 遺伝子のエキソン 6 に一塩基置換 c. 586A>G を導入したターゲティングベクターを用いて、プロテイン S 欠損マウスは *Pros1* 遺伝子のエキソン 3 を欠失させるベクターを用いて作製した。それぞれ野生型 C57BL/6J マウスとの戻し交配を 10 世代行い、遺伝的背景が十分に均一化された系統を確立した。また、C57BL/6J マウスの遺伝的背景を持つ凝固第 V 因子-R504Q 変異マウスをジャクソン研究所から購入した。

遺伝的背景がそろったマウス系統を用いて、野生型マウス群、プロテイン S-K196E 変異ヘテロ接合体マウス群、プロテイン S-K196E 変異ホモ接合体マウス群、プロテイン S 欠損ヘテロ接合体マウス群および凝固第 V 因子-R504Q 変異ホモ接合体マウス群を準備した。プロテイン S 欠損ホモ接合体マウスは胎生致死となったため、本研究の解析対象から外した。

血漿プロテイン S 活性および抗原量の測定

マウスからクエン酸採血後、1000×g、10 分間遠心分離して血漿を回収した。マウス血漿に段階希釈した組換え体マウス活性化プロテイン C を添加して 37°C、1 分間反応後、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬を加えて凝固時間を測定し、活性化プロテイン C 添加による凝固時間延長を指標にプロテイン S 活性を算出した。また、抗ヒトプロテイン S ポリクローナル抗体を用いた ELISA により、血漿プロテイン S 抗原量を測定した。

深部静脈血栓症モデル

マウス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ビン-アンチトロンビン複合体濃度、炎症マーカーとしてインターロイキン-6 濃度を測定した。

肺塞栓モデル

マウスに外因系凝固を活性化する組織因子または内因系凝固を活性化する長鎖ポリリン酸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調べた。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。

局所脳虚血再灌流モデル

マウス左中大脳動脈 M1 末端部を電気焼灼して閉塞した。両側総頸動脈を血管クリップで一過性に閉塞することで、左中大脳動脈支配領域に局所虚血を誘導し、15 分後にクリップを外して再灌流させた。虚血負荷 24 時間後に神経学的スコアの判定を行い、脳を摘出した。脳スライスの生細胞をトリフェニルテトラゾリウムクロライドにより染色し、脳梗塞巣体積、浮腫率を判定した。脳梗塞巣体積に野生型マウスと違いが見られたマウスについては、虚血 15 分間と再灌流後 30 分間のペナンプラ領域脳血流量を確認した。また、虚血負荷後 7 日間の生存率も測定した。

二重変異マウスの作製

日本人に高頻度で認められるプロテイン S-K196E 変異とプラスミノゲン-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 変異のヘテロ接合体マウスおよびホモ接合体マウスは正常に誕生し、

繁殖能力も正常に維持されていた。少なくとも通常の飼育条件下では、野生型マウスと見かけ上の差異は見られなかった。一方、プロテインS欠損のホモ接合体マウスは予想通り胎生致死であり、ヘテロ接合体マウスは正常に誕生した。

血漿プロテインS活性を測定した結果 (N = 10)、プロテインS-K196E 変異のヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウス、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウスでは、いずれも野生型マウスに比べて活性の低下が認められた。プロテインS-K196E 変異ヘテロ接合体マウスの活性は野生型マウスの $82.0 \pm 9.5\%$ (平均値 \pm 標準偏差) であり、ヒトの本変異ヘテロ接合体 (コントロールの約 16% 低下) と同様であった。ホモ接合体の活性はさらに $67.1 \pm 7.8\%$ まで低下した。プロテインS欠損ヘテロ接合体マウスの活性は $54.3 \pm 8.3\%$ に低下した。一方、血漿プロテインS抗原量 (N = 10) は、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウスでは野生型マウスの $57.7 \pm 3.5\%$ と、活性と同レベルに低下していたが、プロテインS-K196E 変異マウスの抗原量はヘテロ接合体、ホモ接合体共に正常であった。したがって、K196E 変異はプロテインSの発現量には影響せず、部分的な活性低下を引き起こすことが明らかとなった。

深部静脈血栓症モデルによる検討 (N = 12) の結果、下大静脈に形成された血栓重量は野生型マウス ($3.6 \pm 1.6\text{g}$) に比べて、プロテインS-K196E 変異ホモ接合体マウス ($15.7 \pm 11.9\text{g}$)、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウス ($15.9 \pm 10.2\text{g}$)、凝固第V因子-R504Q 変異ホモ接合体マウス ($15.8 \pm 9.7\text{g}$) 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 変異ホモ接合体マウス: 46.6 ± 31.8 、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウス: 36.6 ± 35.0 、凝固第V因子-R504Q 変異ホモ接合体マウス: $34.2 \pm 24.2 \times 10^4/\mu\text{L}$) も野生型マウス ($116.2 \pm 28.8 \times 10^4/\mu\text{L}$) に比べて重篤化した。プロテインS-K196E 変異ヘテロ接合体マウスの血栓重量 ($8.1 \pm 6.8\text{g}$) は野生型マウスと有意差はみられなかったが、血小板数 ($76.3 \pm 33.6 \times 10^4/\mu\text{L}$) は減少した。プロテインS-K196E 変異ホモ接合体マウス、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウス、凝固第V因子-R504Q 変異ホモ接合体マウスでは、血漿トロンビン-アンチトロンビン複合体およびインターロイキン-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。

肺塞栓モデルを用いた検討の結果、組織因子投与後の生存率 (N = 17) は、野生型マウスで 88.2%、プロテインS-K196E 変異ヘテロ接合体マウスで 47.1%、ホモ接合体マウスで 35.3%、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウスで 35.3%、凝固第V因子-R504Q 変異ホモ接合体マウスで 23.5% であり、4 種類すべての遺伝子改変マウスで野生型マウスに比べて低下した。同様に、長鎖無機ポリリン酸投与後の生存率 (N = 16) も野生型マウス (81.3%) に比べて、プロテインS-K196E 変異ヘテロ接合体マウス (37.5%)、ホモ接合体マウス (25%)、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウス (31.3%)、凝固第V因子-R504Q 変異ホモ接合体マウス (18.8%) で低下した。これらの遺伝子改変マウスでは、いずれも肺血管閉塞スコアが野生型マウスに比べて上昇しており、肺塞栓症状が重症化していた。以上の結果から、プロテインS-K196E 変異はプロテインSヘテロ欠損や凝固第V因子-R504Q 変異と同様に、マウス静脈血栓症の増悪要因となることが明らかとなった。

局所脳虚血再灌流障害モデルを用いた検討 (N = 10-12) の結果、虚血負荷 24 時間後の脳梗塞巣体積は、プロテインS-K196E 変異のヘテロ接合体、ホモ接合体、プロテインS欠損のヘテロ接合体マウスでは野生型マウスと違いは認められなかった。脳浮腫率および神経学的スコアも 3 種類のプロテインS遺伝子改変マウスと野生型マウスで違いは無かった。一方、同じ脳虚血再灌流障害モデルを用いて凝固第V因子-R504Q 変異マウスを解析した場合、ホモ接合体マウスだけでなくヘテロ接合体マウスでも、野生型マウスと比べて著明な脳梗塞症状の悪化が認められた。野生型マウスは虚血負荷 6 日後までは全個体が生存し、7 日後の生存率は 71.4% であった。一方、凝固第V因子-R504Q 変異ヘテロ接合体マウスでは 4 日後から、ホモ接合体マウスでは 2 日後から死亡個体が現れ、7 日後の生存率は共に 28.6% であり、野生型マウスに比べて低下した。このように凝固第V因子-R504Q 変異はマウスの虚血性脳梗塞を悪化させるが、プロテインSK196E 変異およびヘテロ欠損は脳梗塞症状に影響しないことが明らかとなった。

プロテインS-K196E 変異マウスとプラスミノゲン-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できた。

本研究で樹立したプロテインS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

戻し交配により遺伝的背景を均一にしたマウス系統を比較することにより、プロテインSはマウスの正常な胚発生に必須の因子であるが、K196E変異はホモ接合体であっても胚発生に影響を与えないことが明確になった。プロテインSの生物学的作用を考える上で興味深い結果である。また、マウスの血漿プロテインS活性および抗原量を測定した結果、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウスでは、活性と抗原量が共に野生型マウスの約50%に低下するのに対し、プロテインS-K196E変異マウスでは、活性のみが部分的に低下し、抗原量は正常であることが判った。K196E変異はプロテインSの発現や血中への分泌には影響しないと考えられる。プロテインSは活性化プロテインCの補酵素としての機能だけでなく、TFPIの補酵素機能や受容体リガンドとしての働きを持つことが知られている。プロテインS-K196E変異ホモ接合体マウスとプロテインS欠損ヘテロ接合体マウスは、ほぼ同等の活性化プロテインC補酵素活性を持ち、プロテインS抗原量は欠損ヘテロ接合体でのみ低下するため、両マウスの比較により、活性化プロテインC補酵素活性に基づく表現型とそれ以外による表現型を分別して解析可能と考えられる。

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の結果、プロテインS-K196E変異マウスではヘテロ接合体、ホモ接合体共に、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウス、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が認められた。この結果はヒトの関連解析の結果と一致しており、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、変異に起因することが確認できた。一方、局所脳虚血再灌流モデル実験では、凝固第V因子-R504Q変異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変異マウスやプロテインS欠損ヘテロ接合体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変異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マウスであると考えられる。

プロテインS-K196E変異とプラスミノーゲン-A622T変異の二重変異マウスの獲得に成功したことから、今後変異の相乗効果を考慮した検討が可能になった。

E. 結論

本研究により、プロテインS-K196E変異マウスが日本人型血栓症の適切なモデル動物であることが明らかとなった。プラスミノーゲン-A622Tとの二重変異マウスの樹立も成功した。これらのマウスを活用することにより、日本人の静脈血栓症に対する抗血栓薬の評価や開発を動物個体レベルで進めることが可能になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yuji Shono, Chiaki Yokota, Yuji Kuge, Shinsuke Kido, Akina Harada, Koichi Kokame, Hiroyasu Inoue, Mariko Hotta, Kenji Hirata, Hideo Saji, Nagara Tamaki, and Kazuo Minematsu: Gene expression associated with an enriched environment after transient focal ischemia. *Brain Res*, 1376, 60-65, 2011.

Megumi Hatori, Tsuyoshi Hirota, Michiko Iitsuka, Nobuhiro Kurabayashi, Shogo Haraguchi, Koichi Kokame, Ryuichiro Sato, Akira Nakai, Toshiyuki Miyata, Kazuyoshi Tsutsui, and Yoshitaka Fukada: Light-dependent and circadian clock-regulated activation of SREBP, XBP1 and HSF pathways in the pineal gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(12), 4864-4869, 2011.

Kenji Hirata, Yuji Kuge, Chiaki Yokota, Akina Harada, Koichi Kokame, Hiroyasu Inoue, Hidekazu Kawashima, Hiroko Hanzawa,

Yuji Shono, Hideo Saji, Kazuo Minematsu, and Nagara Tamaki: Gene and protein analysis of brain derived neurotrophic factor expression in relation to neurological recovery induced by an enriched environment in a rat stroke model. *Neurosci Lett*, 495(3), 210-215, 2011.

Mirosław Rybaltowski, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Iwona Chlebńska, Tomasz Brzoska, Aki Tanaka, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Tetsumei Urano: In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall. *Pflugers Arch*, 461(6), 623-633, 2011.

Koichi Kokame, Toshiyuki Sakata, Yoshihiro Kokubo, and Toshiyuki Miyata: von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population. *J Thromb. Haemost*, 9(7), 1426-1428, 2011.

Toshihiro Marutani, Tomoji Maeda, Chiaki, Tanabe, Kun Zou, Wataru Araki, Koichi Kokame, Makoto Michikawa, and Hiroto Komano: ER-stress-inducible Herp, facilitates the degradation of immature nicastrin. *Biochim Biophys Acta*, 1810(8), 790-798, 2011.

Yoshihiro Fujimura, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Hideo Yagi, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Mitsuru Murata, and Toshiyuki Miyata: Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost*, 9(Suppl 1), 283-301, 2011.

Hitomi Yamamoto, Koichi Kokame, Tomohiko Okuda, Yukako Nakajo, Hiroji Yanamoto, and Toshiyuki Miyata: NDRG4 protein-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia. *J Biol Chem*, 286(29), 26158-26165, 2011.

Koichi Kokame, Yoshihiro Kokubo, and Toshiyuki Miyata: Polymorphisms and mutations of ADAMTS13 in Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost*, 9(8), 1654-1656, 2011.

Toshiaki Takeichi, Mika Takarada-Iemata, Koji Hashida, Hirofumi Sudo, Tomohiko Okuda, Koichi Kokame, Taku Hatano, Masashi Takanashi, Sayaka Funabe, Nobutaka Hattori, Osamu Kitamura, Yasuko Kitao, and Osamu Hori: The effect of Ndr2 expression on astroglial activation. *Neurochem Int*, 59(1), 21-27, 2011.

Reiko Neki, Tomio Fujita, Koichi Kokame, Isao Nakanishi, Masako Waguri, Yuzo Imayoshi, Noriyuki Suehara, Tomoaki Ikeda, and Toshiyuki Miyata: Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol*, 94(2), 150-155, 2011.

Xinghua Hou, Yuko Tashima, Pamela Stanley: Galactose differentially modulates manic and manic fringe effects on Delta1-induced NOTCH signaling. *J Biol Chem*, 287(1), 474-483, 2012.

Fumiaki Banno, Takahiro Nojiri, Sachiko Matsumoto, Kei Kamide, Toshiyuki Miyata: RGS2 deficiency in mice does not affect platelet thrombus formation at sites of vascular injury. *J Thromb Haemost*, 10(2), 309-311, 2012.

Yuka Eura, Hiroji Yanamoto, Yuji Arai, Tomohiko Okuda, Toshiyuki Miyata, 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(3), e34298, 2012.

Kaoru Orihashi, Hiromasa Tojo, Katsuya Okawa, Yuko Tashima, Takashi Morita, Gen Kondoh: Mammalian carboxylesterase (CES)

releases GPI-anchored proteins from the cell surface upon lipid raft fluidization. *Biol Chem*, 393(3), 169-176, 2012.

Takashi Sato, Yasuhiro Sako, Misato Sho, Mamiko Momohara, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, Hideki Nishitoh, Tsukasa Okiyoneda, Koichi Kokame, Masayuki Kaneko, Manabu Taura, Masanori Miyata, Keisuke Chosa, Tomoaki Koga, Saori Morino-Koga, Ikuo Wada, Hirofumi Kai: STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. *Mol Cell*, 47(1), 99-110, 2012.

Toshiyuki Kita, Fumiaki Banno, Hiroji Yanamoto, Yukako Nakajo, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata: Large infarct and high mortality by cerebral ischemia in mice carrying the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost*, 10(7), 1453-1455, 2012.

Yongchol Shin, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Toshiyuki Miyata: Binding of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 to Lys-plasmin(ogen). *J Biochem*, 152(3), 251-258, 2012.

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, Bo K. Siesjö: ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci*, 33(5), 1107-1115, 2012.

Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiro Sugimoto: ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*,

108(6), 1236-1238, 2012.

Toshiyuki Miyata, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura: ADAMTS13 activity and genetic mutations in Japan. *Hämostaseologie*, 33(2), 131-137, 2013.

Yusuke Satoh, Takafumi Yokota, Takao Sudo, Motonari Kondo, Anne Lai, Paul W. Kincade, Taku Kouro, Ryuji Iida, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoko Habuchi, Keiko Matsui, Hirokazu Tanaka, Itaru Matsumura, Kenji Oritani, Terumi Kohwi-Shigematsu, Yuzuru Kanakura: The Satb1 protein directs hematopoietic stem cell differentiation toward lymphoid lineages. *Immunity*, 38(6), 1105-1115, 2013.

Masashi Akiyama, Daisuke Nakayama, Soichi Takeda, Koichi Kokame, Junichi Takagi, Toshiyuki Miyata: 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.

Koki Mise, Yoshifumi Ubara, Masanori Matsumoto, Keiichi Sumida, Rikako Hiramatsu, Eiko Hasegawa, Masayuki Yamanouchi, Noriko Hayami, Tatsuya Suwabe, Junichi Hoshino, Naoki Sawa, Kenichi Ohashi, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, Kenmei Takaichi: 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.

Shohei Shinozaki, Tsuyoshi Chiba, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Eiji Kaneko, Kentaro Shimokado: 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.

Yoshie Takizawa, Yukiko Kosuge, Hiroyo Awaji, Emi Tamura, Ayako Takai, Takaaki Yanai, Reiko Yamamoto, Koichi Kokame,

Toshiyuki Miyata, Rieko Nakata, Hiroyasu Inoue: 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.

Riccardo Bernasconi, Carmela Galli, Koichi Kokame, Maurizio Molinari: Autoadaptive ER-Associated Degradation Defines a Preemptive Unfolded Protein Response Pathway. *Mol Cell*, 52(6), 783-793, 2013.

Hirokazu Tanaka, Chiaki Tenkumo, Nobuhiro Mori, Koichi Kokame, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Hata: 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.

Masanobu Morioka, Masanori Matsumoto, Makoto Saito, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura: 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.

Jacob Larkin, Baosheng Chen, Xiao-Hua Shi, Takuya Mishima, Koichi Kokame, Yaacov Barak, Yoel Sadovsky: EN-13-1425/NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury. *Endocrinology*, in press.

Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiro Takafuta, Ryojiro Tanaka, Hikaru Kobayashi, Fumihiko Ishida, Shuichi Hisanaga, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata: 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 D, Isaka S, Ikeda T, Yoshimatsu J: Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes, *Thromb Res*, in press.

小亀浩市: 日本人のADAMTS13. *日本血栓止血学会誌*, 22(6), 368-373, 2011.

宮田敏行, 喜多俊行: DIC と外因系凝固反応, マイクロパーティクル. *医学のあゆみ*, 238(1), 5-9, 2011.

宮田敏行, 喜多俊行: 内因系凝固反応と血栓症. *Annual Review 血液 2012*, 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, 236-244, 2012.

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(7), 672-679, 2012.

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(5), 390-391, 2012.

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(4), 416, 2012.

宮田敏行, 小亀浩市, 小久保喜弘: 先天性ADAMTS13欠損症. *臨床検査*, 57(5), 556-561, 2013.

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* 3(2), 216-223, 2013.

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*, 34(1), 69-75, 2013.

宮田敏行, 坂野史明: 血栓症と炎症におけるポリリン酸の役割. *Annual Review 血液* 2014, 高久史麿・小澤敬也・坂田洋一・金倉譲・小島勢二 編集, 中外医学社, 132-139, 2014.

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*, 55(1), 93-104, 2014.

小亀浩市, 樋口由佳: Upshaw-Schulman 症候群の ADAMTS13 遺伝子解析. *細胞*, 46(2), 61-63, 2014.

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 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 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 印刷中

2. 学会発表

Fumiaki Banno: Genetic mouse models for evaluating pathophysiological roles of ADAMTS13. 57th Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Koichi Kokame: Findings from ADAMTS13 activity assay. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Koichi Kokame, Yoshihiro Kokubo, and

Toshiyuki Miyata: Estimation of the number of individuals with a congenital ADAMTS13 deficiency in Japan. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Hitomi Yamamoto, Koichi Kokame, Tomohiko Okuda, Yukako Nakajo, Hiroji Yanamoto, and Toshiyuki Miyata: NDRG4-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia with the decreased level of BDNF in the cortex. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Tomasz Brzoska, Mirosław Rybaltowski, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Iwona Chlebinska, Aki Tanaka, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Tetsumei Urano: Imaging analysis of the interaction between unusually large von-Willebrand factor multimers and platelets on vascular endothelial cells in living animals. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Fumiaki Banno, Takahiro Nojiri, Sachiko Matsumoto, Kei Kamide, Naoki Mochizuki, Toshiyuki Miyata: A lack of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in mice does not affect thrombus formation at sites of vascular injury. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Koichi Kokame, Koji Iihara, and Toshiyuki Miyata: Generation of knock-in mice carrying a K196E point mutation in protein S. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Toshiyuki Kita, Fumiaki Banno, Yukako Nakajo, Hiroji Yanamoto, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata: Factor V Leiden mice

are vulnerable for ischemic stroke. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

井本（山本）ひとみ，小亀浩市，奥田智彦，中城有香子，柳本広二，宮田敏行：NDRG4 欠損マウスは、大脳皮質 BDNF 量の低下とともに、記憶学習能力の低下と局所 脳虚血による梗塞巣の増大を示す。第 9 回血液・血管オルビス，東京都，2011 年 8 月。

中山大輔，秋山正志，武田壮一，小亀浩市，高木淳一，宮田敏行：P475S 型 ADAMTS13 の非触媒領域の立体構造決定。第 16 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会，豊中市，2011 年 8 月。

井本（山本）ひとみ，小亀浩市，奥田智彦，中城有香子，柳本広二，宮田敏行：NDRG4 は大脳皮質中の BDNF 量を正常に保ち、記憶学習能力の維持作用と虚血性脳卒中に対する脳保護作用を示す。第 84 回日本生化学会大会，京都市，2011 年 9 月。

秋山正志，中山大輔，武田壮一，小亀浩市，高木淳一，宮田敏行：P475S 型 ADAMTS13 タンパク質の部分立体構造決定。第 84 回日本生化学会大会，京都市，2011 年 9 月。

喜多俊行，坂野史明，中城有香子，柳本広二，飯原弘二，宮田敏行：血液凝固第 V 因子 Leiden 変異マウスの虚血性脳梗塞に対する脆弱性。第 84 回日本生化学会大会，京都市，2011 年 9 月。

宮田敏行，小亀浩市，秋山正志，武田壮一，坂野史明：ADAMTS13 研究の最先端。第 73 回日本血液学会学術集会，名古屋市，2011 年 10 月。

Yusuke Satoh, Takafumi Yokota, Hirokazu Tanaka, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Itaru Matsumura, Kenji Oritani, and Yuzuru Kanakura: SATB1 induces early lymphocyte differentiation from primitive hematopoietic progenitors. 第 73 回日本血液学会学術集会，名古屋市，2011 年 10 月。

Yoshihiro Fujimura, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Mitsuru Murata, and Toshiyuki Miyata. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. 第 73 回日本血液学会学術集会，名古屋市，2011 年 10 月。

樋口（江浦）由佳・宮田敏行・小亀浩市：ハイドロダイナミクス法による in vivo 遺伝子導入を用いた ERAD 基質の解析。第 34 回日本分子生物学会年会，横浜市，2011 年 12 月。

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，京都市，2012 年 10 月。

Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiro Sugimoto: Protective role of ADAMTS13 for myocardium in mouse model of experimental myocardial infarction. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, USA, December 2012.

Hideto Matsui, Masaaki Doi, Yasunori Matsunari, Maiko Takeda, Kenji Nishio, Midori Shima, Kenji Soejima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiro Sugimoto: ADAMTS13 improving the cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, USA, December 2012.

田嶋優子，Pamela Stanley: Detection of O-GlcNAc on cell surface glycoproteins. 第 85 回日本生化学会大会，福岡市，2012 年 12 月。

山本（井本）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 $\alpha 3$ サブユニットに結合する. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012 年 12 月.

庄 美里, 佐藤卓史, 西頭英起, 小亀浩市, 金子雅幸, 和田郁夫, Mary Ann Suico, 首藤剛, 甲斐広文: 変異トランスサイレチンの翻訳後 N 型糖鎖修飾における制御因子の探索. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012 年 12 月.

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, 福岡市, 2012 年 12 月.

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, 東京都, 2013 年 1 月.

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. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 SPC シンポジウム 4, 山形市, 2013 年 5 月.

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, 山形市, 2013 年 5 月.

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, 山形市, 2013 年 5 月.

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, 山形市, 2013 年 5 月.

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, 山形市, 2013 年 5 月.

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, 山形市, 2013 年 5 月.

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

Koichi Kokame: Quantitative PCR-based analysis of ADAMTS13 genetic defects. The 59th Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, Netherlands, June 2013.

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

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

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. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

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. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

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, 豊中市, 2013 年 8 月.

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, 横浜市, 2013 年 9 月.

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栃木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, 横浜市, 2013 年 9 月.

Yoshihiro Fujimura, Yumi Yoshii, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Masaki Hayakawa, Yoko Yoshida, Hideo Yagi, Koichi Kokame, and 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. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, USA, December 2013.

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, Ventura, CA, USA, February 2014.

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

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.

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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

プラスミノージェン-A622T 変異をもつモデルマウスの作製と解析

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 喜多俊行 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

研究要旨

血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天的異常は血栓症のリスクとなる。日本人には線溶因子プラスミノージェンの A620T 変異（マウスでは A622T 変異）が約 25 人に 1 人の頻度で認められ、約 5 万人がホモ接合体であると推計される。本変異は日本人を含む東アジア人に特異的であり、白人には存在しない。現在まで、本変異と血栓症との関連は示されていないが、変異保有者では持続的に線溶活性が低下するため、潜在的な血栓性リスクとなっている可能性がある。本研究では、プラスミノージェン-A622T 変異マウスを作製し、日本人の血栓症における本変異の位置づけを明らかにすることを目的としている。まずジーンターゲットングにより、C57BL/6J マウス系統の遺伝的背景を持つプラスミノージェン-A622T 変異マウスの作製に成功した。得られた変異マウスはヘテロ接合体およびホモ接合体ともに、正常に出生し、繁殖力も保持した。しかし、変異マウスでは血漿プラスミノージェン活性が低下しており、ホモ接合体の活性は野生型マウスの約 8% に低下していた。変異マウスではフィブリン塊溶解活性も低下したことから、プラスミノージェン-A620T 変異が線溶活性低下の原因となることをマウス個体で確認できた。さらに、深部静脈血栓症モデルおよび肺塞栓モデルを用いて静脈血栓症に対する変異の影響を、局所脳虚血再灌流モデルを用いて脳梗塞形成に対する変異の影響を、背部皮膚創傷モデルを用いて組織修復に対する変異の影響を解析したが、いずれもプラスミノージェン-A622T 変異マウスと野生型マウスの症状に違いは見られなかった。したがって、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ジェン-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これらの疾患の一次的なリスクとはならないと考えられた。プラスミノージェン-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、外部機関に提供する体制を確立した。

A. 研究目的

血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天的異常は血栓症のリスクとなるが、原因となる遺伝子変異は人種間で大きく異なる。白人種では凝固第 V 因子の R506Q 変異が血栓症の遺伝的リスクとなっており、変異を保有するモデルマウスも確立されているが、この変異は日本人には存在しない。日本人には線溶因子プラスミノージェンの A620T 変異（マウスでは A622T 変異）が広く存在し、我々が一般住民を対象に行った検討でもアレル頻度 2%（約 25 人に 1 人がヘテロ接合体）と高頻度に認められた。

プラスミノージェンは、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、組織型プラスミノージェ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 変異はプラスミノージェン活性を著

減させるため、変異保有者では血栓溶解能が低下する。現在まで、本変異と血栓症との関連は示されておらず、一次的なリスクとはならないと予想されるが、変異保有者は感染や外傷、手術等に引き続いて血栓症を発症する例があり、血栓形成を助長する要因が重なった場合には血栓症が引き起こると考えられる。

本研究ではジーンターゲットングにより、プラスミノージェン遺伝子を A622T 変異型に置換したマウスを作製し、日本人の血栓症における本変異の位置づけを明確にすることを目的としている。また、作製したマウスは（独）医薬基盤研究所に登録して、国内外の研究者に譲渡する。

このため、まず C57BL/6J マウスの遺伝的背景を持つプラスミノージェン-A622T 変異ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスを樹立し、こ

これらのマウスでは血漿プラスミノゲン活性およびフィブリン塊溶解活性が低下することを確認した。また、プラスミノゲン-A622T 変異がマウスの静脈血栓症に及ぼす影響を調べるため、下大静脈障害による深部静脈血栓症モデルおよび、組織因子投与による肺塞栓モデルを用いた解析を行った。さらに、脳梗塞および組織修復に及ぼす変異の影響を調べるため、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解析を行った。また、プラスミノゲン-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。

B. 研究方法

プラスミノゲン-A622T 変異マウスの作製

プラスミノゲン-A622T 変異マウスは、マウス *Plg* 遺伝子のエキソン 15 に一塩基置換 c. 1864G>A を導入したターゲティングベクターを、C57BL/6J マウス由来の ES 細胞にエレクトロポレーションして得られた相同組換え ES クローンを用いて作製した。ES 細胞スクリーニングのために導入した Neomycin 耐性遺伝子 (loxP 配列で挟まれている) は、Cre リコンビナーゼを発現する C57BL/6J マウスとの交配により除去し、外来遺伝子挿入によるプラスミノゲン遺伝子発現への影響を排除した。

野生型 C57BL/6J マウスおよび C57BL/6J 遺伝的背景のプラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスを本研究の解析対象とした。

血漿プラスミノゲン活性および抗原量の測定

マウスからクエン酸採血後、1000×g、10 分間遠心分離して血漿を回収した。マウス血漿に 0.1N 塩酸を加えて酸性化後、等量の 0.1N NaOH で中和した。この血漿にヒトウロキナーゼを添加してプラスミノゲンをプラスミンに活性化した後、合成基質 (S-2403) 切断活性を血漿プラスミノゲン活性として測定した。また、血漿プラスミノゲン抗原量を Mouse Plasminogen Total Antigen EIA Kit (Oxford Biomedical Research) を用いて測定した。

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ゲンアクティ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ゲンをプラスミンに活性化後、トロンビ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。

深部静脈血栓症モデル

マウス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。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、血栓の収縮、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

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。

局所脳虚血再灌流モデル

マウス左中大脳動脈 M1 末端部を電気焼灼して閉塞した。両側総頸動脈を血管クリップで一過性に閉塞することで、左中大脳動脈支配領域に局所虚血を誘導し、15 分後にクリップを外して再灌流させた。虚血負荷 24 時間後に神経学的スコアの判定を行い、脳を摘出した。脳スライスの生細胞をトリフェニルテトラゾリウムクロライドにより染色し、脳梗塞巣体積、浮腫率を判定した。

皮膚創傷モデル

マウス背部を剃毛し、生検トレパンを用いて直径 5 mm の皮膚全層欠損創を一匹あたり 4 ヶ所作製した。各創部の面積を経日的に 2 週間測定し、治癒過程の進行度に違いが見られるか解析した。

(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

プラスミノージェン-A622T 変異マウスは、ヘテロ接合体およびホモ接合体ともに、正常に出生し、発育にも異常は認められなかった。また、雌雄とも生殖能力は正常であった。

血漿プラスミノージェン抗原量 (N = 10) は、プラスミノージェン-A622T 変異ホモ接合体マウスで野生型マウスの $47.5 \pm 23.2\%$ (平均値 \pm 標準偏差) に低下した。ヒトプラスミノージェン-A620T 変異保有者に明らかなプラスミノージェン抗原量低下はみられないため、マウスプラスミノージェン-A622T 変異体に特有の現象と考えられる。血漿プラスミノージェン活性 (N = 10) は、プラスミノージェン-A622T 変異マウスで低下が認められ、ホモ接合体マウスの活性は野生型マウスの $8.1 \pm 4.1\%$ と著減した。さらに、血漿フィブリン塊溶解活性 (N = 8) を測定した結果、プラスミノージェン-A622T 変異ホモ接合体マウスでは、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 $\alpha 2$ -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、プラスミノージェン-A622T 変異マウスでは、血漿プラスミノージェンの合成基質切断活性だけでなく、フィブリン溶解活性が低下していることが明らかとなった。

深部静脈血栓症モデル実験において、処置 2 日後の血栓重量 (N = 10) は、野生型マウスで $8.2 \pm 5.4\text{g}$ 、プラスミノージェン-A622T 変異ホモ接合体マウスで $10.0 \pm 6.4\text{g}$ であり、両群間に有意差は認められなかった。血小板減少の程度も群間で違いが無かったことから、プラスミノージェン-A620T 変異は深部静脈血栓症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 $5.4 \pm 3.5\text{g}$ 、プラスミノージェン-A622T 変異ホモ接合体マウスで $5.4 \pm 4.6\text{g}$ と群間に違いは無く、プラスミノージェン-A622T 変異による血栓退縮の遅延も見られなかった。

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%、プラスミノージェン-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

められなかった。肺血管閉塞スコアも、野生型マウスで 1.86 ± 1.47 、プラスミノージェン-A622T 変異ホモ接合体マウスで 2.25 ± 1.60 と、群間に有意差は見られなかった。したがって、プラスミノージェン-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。

局所脳虚血再灌流実験において、虚血負荷 24 時間後の脳梗塞巣体積 (N = 10) は、野生型マウスで $28.8 \pm 5.8\text{mm}^3$ 、プラスミノージェン-A622T 変異ホモ接合体マウスで $30.5 \pm 7.1\text{mm}^3$ であり、両群間に有意差は認められなかった。脳浮腫率および神経学的スコアも群間で違いが無かったことから、プラスミノージェン-A620T 変異は脳梗塞の増悪要因ではないと考えられた。

皮膚創傷モデル実験において、作製した皮膚創は野生型マウス、プラスミノージェン-A622T 変異ホモ接合体マウスで共に 12~14 日でほぼ完全に修復された。創面積の経日変化にも、両群間で違いは無く、プラスミノージェン-A620T 変異は創傷治癒遅延の原因とはならないと考えられた。

本研究で樹立したプラスミノージェン-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

プラスミノージェン-A622T 変異マウスは、少なくとも SPF 飼育環境下では正常に発育し、外見上明らかな異常は呈さなかった。プラスミノージェン欠損マウスでは、成長遅延や寿命の短縮、生殖能の低下、脱腸などの異常が報告されているが、プラスミノージェン-A620T 変異はこうした異常の原因にはならないことが明らかとなった。本変異は胚発生および個体の成育には影響を与えないと考えられる。

プラスミノージェン-A622T 変異ホモ接合体マウスでは、血漿プラスミノージェ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、プラスミノージェン-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。日本人を含むアジア人に広く分布するプラスミノージェン-A620T 変異は少なくとも単独では、静脈血栓症を悪化させる遺伝要因とはならないと推定される。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まっているため、プラスミノージェン

-A620T 変異が他の血栓性素因と重なることで、血栓症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、プラスミノージェン-A622T とプロテイン S-K196E の二重変異マウス (前章参照) 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。

局所脳虚血再灌流モデルを用いた検討の結果、プラスミノージェン-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。プラスミノージェン-A620T 変異は脳梗塞を悪化させる遺伝要因にもならないと推定される。急性期脳梗塞の治療薬として唯一承認されている組換え体組織プラスミノージェン活性化因子は、プラスミノージェン活性化を介して治療効果を発揮する。プラスミノージェン-A620T 変異はこの治療効果の減弱あるいは出血副作用の軽減に寄与する可能性がある。今後、プラスミノージェン-A622T マウスの脳梗塞における組換え体組織プラスミノージェン活性化因子投与の影響についても検討が必要と思われる。

プラスミノージェンの活性化は血栓溶解だけでなく、細胞外マトリックスの分解を介した組織の再構築にも寄与しており、プラスミノージェン欠損ホモ接合体マウスでは、皮膚創傷治癒の著しい遅延が認められる。しかし、プラスミノージェン-A622T 変異ホモ接合体マウスに同様の皮膚創傷治癒遅延は認められなかった。プラスミノージェン-A620T 変異体は創傷修復に必要な活性を残存しており、本変異は組織再構築異常にはつながらないと推定される。

E. 結論

プラスミノージェン-A622T 変異マウスを樹立し、本変異が線溶活性低下を引き起こすことを個体レベルで確認した。本変異マウスに深部静脈血栓症、肺塞栓、脳梗塞症状および創傷治癒の悪化は見られず、プラスミノージェン-A620T 変異はこれらの疾患の一次的なリスクとはならないことが明らかとなった。今後、他の血栓性素因と本変異が重なった場合の症状修飾作用の検証が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mirosław Rybaltowski, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Iwona Chlebinska, Tomasz Brzoska, Aki Tanaka, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata,

Tetsumei Urano: In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall. *Pflugers Arch*, 461(6), 623-633, 2011.

Xinghua Hou, Yuko Tashima, Pamela Stanley: Galactose differentially modulates lunatic and manic fringe effects on Deltal-induced NOTCH signaling. *J Biol Chem*, 287(1), 474-483, 2012.

Fumiaki Banno, Takahiro Nojiri, Sachiko Matsumoto, Kei Kamide, Toshiyuki Miyata: RGS2 deficiency in mice does not affect platelet thrombus formation at sites of vascular injury. *J Thromb Haemost*, 10(2), 309-311, 2012.

Kaoru Orihashi, Hiromasa Tojo, Katsuya Okawa, Yuko Tashima, Takashi Morita, Gen Kondoh: Mammalian carboxylesterase (CES) releases GPI-anchored proteins from the cell surface upon lipid raft fluidization. *Biol Chem*, 393(3), 169-176, 2012.

Toshiyuki Kita, Fumiaki Banno, Hiroji Yanamoto, Yukako Nakajo, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata: Large infarct and high mortality by cerebral ischemia in mice carrying the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost*, 10(7), 1453-1455, 2012.

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, Bo K. Siesjö: ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci*, 33(5), 1107-1115, 2012.

Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiro Sugimoto: ADAMTS13 safeguards the

myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 108(6), 1236-1238, 2012.

宮田敏行, 喜多俊行: DIC と外因系凝固反応, マイクロパーティクル. *医学のあゆみ*, 238(1), 5-9, 2011.

宮田敏行, 喜多俊行: 内因系凝固反応と血栓症, *Annual Review 血液* 2012, 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, 236-244, 2012.

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(7), 672-679, 2012.

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* 3(2), 216-223, 2013.

宮田敏行, 坂野史明: 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, 132-139, 2014.

2. 学会発表

Fumiaki Banno: Genetic mouse models for evaluating pathophysiological roles of ADAMTS13. 57th Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Tomasz Brzoska, Mirosław Rybaltowski, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Iwona Chlebinska, Aki Tanaka, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Tetsumei Urano: Imaging analysis of the interaction between unusually large von-Willebrand factor multimers and platelets on vascular endothelial cells in living animals. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Fumiaki Banno, Takahiro Nojiri, Sachiko Matsumoto, Kei Kamide, Naoki Mochizuki, Toshiyuki Miyata: A lack of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in mice does not affect thrombus formation at sites of vascular injury. XXIII Congress of the

International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Koichi Kokame, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata: Generation of knock-in mice carrying a K196E point mutation in protein S. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Toshiyuki Kita, Fumiaki Banno, Yukako Nakajo, Hiroji Yanamoto, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata: Factor V Leiden mice are vulnerable for ischemic stroke, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

喜多俊行, 坂野史明, 中城有香子, 柳本広二, 飯原弘二, 宮田敏行: 血液凝固第 V 因子 Leiden 変異マウスの虚血性脳梗塞に対する脆弱性. 第 84 回日本生化学会大会, 京都市, 2011 年 9 月.

宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志, 武田壮一, 坂野史明: ADAMTS13 研究の最先端, シンポジウム 6 血栓止血学・血管生物学の最近の進歩, 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋市, 2011 年 10 月.

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, 京都市, 2012 年 10 月.

Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiro Sugimoto: Protective role of ADAMTS13 for myocardium in mouse model of experimental myocardial infarction. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, December 2012.

Hideto Matsui, Masaaki Doi, Yasunori Matsunari, Maiko Takeda, Kenji Nishio, Midori Shima, Kenji Soejima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiro Sugimoto: ADAMTS13

improving the cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, December 2012.

田嶋優子, Pamela Stanley: Detection of O-GlcNAc on cell surface glycoproteins. 第85回日本生化学会大会, 福岡市, 2012年12月.

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, 福岡市, 2012年12月.

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. 第35回日本血栓止血学会学術集会 SPC シンポジウム4, 山形市, 2013年5月.

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, 山形市, 2013年5月.

土井政明, 松井英人, 竹田征治, 齋藤能彦, 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, 山形市, 2013年5月.

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, 山形市, 2013年5月.

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

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Yuko Tashima, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata: Exacerbated venous

thromboembolism in mice with the protein S Tokushima mutation. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

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. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

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

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栃木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, 横浜市, 2013年9月.

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,