

先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析

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

研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) は、von Willebrand 因子切断酵素 ADAMTS13 の活性著減で発症する難治性疾患である。ADAMTS13 活性を著減させる原因の一つとして ADAMTS13 遺伝子異常があり、これは先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群) をもたらす。本研究では、日本における先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析を実施し、発症メカニズムの解明とともに、TTP を含む疾患群である血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の診療ガイド作成・改定に寄与することを目的とする。そのために、新たな先天性 TTP 疑い患者を対象とした従来方法 (PCR ダイレクトシーケンシング法) による ADAMTS13 遺伝子解析と、新たな方法 (ロングリードシーケンシング法) の確立に向けた検討を行った。本研究期間において、先天性 TTP 疑い患者 3 名に対して PCR ダイレクトシーケンシング法によるエクソン解析を行い、いずれも 2 種類の原因バリエーションの複合ヘテロ接合体であることがわかった。これらの結果は診療ガイドラインの改定等に役立つ知見となる。また、従来方法で原因バリエーションを同定できなかった症例の原因解明に向けてロングリードシーケンシング法による解析を進め、種々の工夫を導入することで包括的解析方法の確立に近づくことができたが、新たな課題も明らかになった。

A. 研究目的

全身性の重篤な疾患である血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP、指定難病 64) は、止血タンパク質 von Willebrand 因子 (von Willebrand factor; VWF) を特異的に切断する血漿プロテアーゼ ADAMTS13 の活性著減が原因で発症する。ADAMTS13 活性の損失は、先天的には ADAMTS13 遺伝子異常で、後天的には抗 ADAMTS13 自己抗体 (インヒビター) の出現で起こる。ADAMTS13 遺伝子異常によって潜性遺伝 (劣性遺伝) 様式で発症する TTP を先天性 TTP あるい

は Upshaw-Schulman 症候群 (Upshaw-Schulman syndrome; USS) と呼ぶ。我々は、先天性 TTP 疑い患者の 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、先天性 TTP 疑い患者の遺伝子解析を継続的に行い、遺伝子異常の特徴や発症機構に関する知見を蓄積することともに、TTP を含む疾患群である血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の診療ガイド作成・改定に寄与すること

を目的としている。

ADAMTS13 の酵素活性が 10%未満でインヒビターが陰性であれば、先天性 TTP の可能性が高いと考え、遺伝子解析を行う。我々はこれまで、先天性 TTP 疑い患者および家族を対象に ADAMTS13 遺伝子の塩基配列を調べ、先天性 TTP 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遺伝子の塩基配列は、標的遺伝子の各エクソンを PCR で増幅して塩基配列を解読する方法、すなわち PCR ダイレクトシーケンシング法によって決定される。我々もまず、ADAMTS13 遺伝子の各エクソンの外側に結合するよう設計した PCR プライマーを用いて、検体 DNA から各エクソンを選択的に増幅させ、その塩基配列を決定する。これまでに我々が行った先天性 TTP 患者解析の場合、約 9 割の症例はこの方法で複合ヘテロ接合性あるいはホモ接合性の原因バリエーションが同定された。PCR ダイレクトシーケンシング法で原因バリエーションが一つしか、あるいは一つも見つからない場合、PCR ダイレクトシーケンシング法の弱点を補完する方法として開発したゲノム定量 PCR 法を行ってきた。この方法で、これまでに 3 患者の ADAMTS13 遺伝子にそれぞれ異なる欠失異常を見出した。しかし、それでもなお 2 アレルに原因バリエーションが見つからない家系が残っており、解析方法のさらなる開発が必要な状況である。

本研究期間においては、新たに見出された先天性 TTP 疑い患者 3 名の原因バリエーションを明らかにするために、患者および家族の ADAMTS13 遺伝子解析を実施

した。さらに、これまでに PCR ダイレクトシーケンシング法およびゲノム定量 PCR 法で 2 アレルの原因バリエーションを同定できなかった未解決の 4 家系に対し、新たな方法 (ロングリードシーケンシング法) による解析を継続し、種々の改善や工夫を加えて解析法の確立を目指した。

B. 研究方法

患者および家族から得られた血球成分を凍結した状態で受け取り、解析を始めるまで冷凍保管した。DNA 調製には illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE ヘルスケア) を使用した。血液からの調製を前提とした試薬キットなので、凍結血球 (約 200 μ L) を解凍しながら約 100 μ L の生理食塩水で懸濁して約 300 μ L の血液と見なし、マニュアルに従って調製した。

全 29 個のエクソンを PCR で増幅するために、24 ペアのプライマーを用いた。あとのシーケンシング反応を効率的に行うために、センス方向プライマーの 5' 側に M13F 配列 (TGTAACACGACGGCCAGT) を、アンチセンス方向プライマーの 5' 側に M13R 配列 (CAGGAAACAGCTATGACC) をそれぞれ付加しておいた。エクソン 7 以外は一般的な PCR 条件で容易に増幅させることができた。エクソン 8 および 26-27 の増幅では反応液に DMSO 1 μ L を添加した。エクソン 7 は GC 塩基の割合が非常に高いため、GC-RICH PCR System (ロッシュ) を使用した。PCR 終了後、1 μ L を用いてアガロース電気泳動で予想通りの分子量のバンドを確認した。次

に、PCR 反応液に残った過剰プライマーの除去と未反応 dNTP の不活化を目的として、ExoSAP-IT (アフィメトリクス) 1 μ L を加え、37°C/30 分間、80°C/15 分間反応させた。このうち 1 μ L を鋳型にして、M13F および M13R プライマーでシーケンス反応を行った。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライド・バイオシステムズ) 試薬の 4 倍希釈液を用いて 5 μ L/反応で行った。反応終了後、CleanSEQ ダイターミネータ精製試薬キット (ベックマン・コールター) で精製し、Genetic Analyzer 3500x1 (アプライド・バイオシステムズ) に供して波形データを得た。

解析ソフトウェア Sequencher (ジーンコード) を用いて波形データを観察し、対象領域 (各エクソンとその前後約 20 塩基) のレファレンス配列と比較した。エクソンにバリエーションが見つかった場合、cDNA 配列 (GenBank: AB069698.2) と照合してアミノ酸配列への影響などを調べた。イントロンにバリエーションが見つかった場合、スプライシングに対する影響等を検討した。エクソンのバリエーションでもスプライシングに影響を与える可能性も検討した。バリエーションが先天性 TTP の原因として既知であれば、原因バリエーションとして確定した。未報告であれば、アミノ酸レベルでの変化の特徴から機能への影響を類推した。日本人の ADAMTS13 遺伝子に存在する 6 個のミスセンス多型 (p. T339R, p. Q448E, p. P475S, p. P618A, p. S903L, p. G1181R) は原因バリエーションから除外した。

一方、これまでに PCR ダイレクトシー

ケンシング法およびゲノム定量 PCR 法で 2 アレルの原因バリエーションを同定できなかった 4 家系の原因バリエーションを探索するため、GridION (ナノポア・テクノロジーズ) によるロングリードシーケンシング解析の条件検討を開始した。

ナノポアによる解析では、標的 DNA の両端にシーケンシング用アダプターを付加するステップにおいて、PCR と同時に付加する four-primer PCR 法と、PCR 産物に後付けする ligation 法があるため、両者を比較した。得られたデータは、ショートリードシーケンシングでは判別できない距離のハプロタイプ決定 (フェージング) が可能になることを期待し、WhatsHap など種々のソフトウェアを比較検討しながら解析した。

(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

3 名の患者 (それぞれ別の家系) は、いずれも臨床症状や ADAMTS13 活性検査等から TTP が疑われ、奈良医大輸血部による詳細な検査の結果、ADAMTS13 活性 0.5%未満、インヒビター陰性であったため、先天性 TTP の可能性が強く推定された。そこで、ADAMTS13 遺伝子を PCR ダイレクトシーケンシング法で解析した。

患者 A には、c. 577C>T (p. Arg193Trp) バリエーションと c. 3368G>A (p. Arg1123His) バリエーションがそれぞれヘテロ接合性で

同定された。父に c. 3368G>A バリエントが、母に c. 577C>T バリエントがヘテロ接合性で同定されたため、患者は両変異による複合ヘテロ接合体と推定された。c. 577C>T バリエントはこれまで 11 家系に同定された変異であり、c. 3368G>A バリエントは国内初であるが、デンマークで報告例があった。

患者 B では、c. 3655C>T (p. R1219W) バリエントと c. 4119delG (p. Q1374Sfs*22) バリエントがそれぞれヘテロ接合性で同定された。父と兄に c. 3655C>T バリエントが、母に c. 4119delG バリエントがヘテロ接合性で同定され、患者は両変異による複合ヘテロ接合体であると推定された。c. 3655C>T バリエントは国内初であるが、イタリアで報告例があった。c. 4119delG バリエントは国内の 1 家系で同定されていた。

患者 C は、c. 2259delA (p. C754Afs*24) バリエントと c. 2723G>A (p. C908Y) バリエントをそれぞれヘテロ接合性で保有していた。父と姉に c. 2259delA バリエントが、母に c. 2723G>A バリエントがヘテロ接合性で同定され、患者は両変異による複合ヘテロ接合体であると推定された。いずれもこれまでに同定されたことのある原因バリエントであった。

ロングリードシーケンシング法による解析を進めるにあたり、従来法で 1782 bp 欠失を同定していた家系に対し、GridION を用いたロングリードシーケンシング法を実施した。ADAMTS13 遺伝子全体を含む約 50 kb の領域を、互いに一部重複する 6 本の PCR 産物で解析した結果、期待通り 1782 bp 欠失を同定するこ

とができた。

また、four-primer PCR 法と ligation 法を比較検討した。four-primer PCR 法には PCR 効率が低いという難点があったが、ligation 法では約 10 倍量のデータが得られ、解析精度が大きく向上した。ソフトウェア WhatsHap による解析では、ADAMTS13 遺伝子のほぼ全域に亘って 1 ブロックに連結させることに成功した。これにより、ショートリードシーケンシングでは判別できない距離のハプロタイピングが可能になった。一方、リード選別等のコマンドラインでの解析にさらなる工夫が必要であることも判明した。

試行錯誤の結果、ADAMTS13 遺伝子全長を 1 対のハプロタイプブロックで連結すること、すなわちフェージングに成功した。これにより解析精度が向上し、ロングリードシーケンシング法でイントロンに検出したバリエントが、PCR ダイレクトシーケンシング法でエクソンに同定した病的バリエントと同じアレル上にあるか否かを判定できるようになった。そこで、病的バリエント候補の抽出と絞り込みに着手したところ、1 塩基バリエント (single nucleotide variant; SNV) の検出は非常に高精度であったが、使用するソフトウェアによって抽出結果が完全には一致しないことが分かった。特に同一塩基が連続する領域での InDel は偽陽性の可能性が高く、その原因は PCR 時の塩基取り込みエラーに依ることがわかった。このようなエラーは high fidelity を謳う PCR 酵素でも不可避であり、ロングリードシーケンシング後のバリエント絞り込みの際には要注意である。さらに、

既存のソフトウェアによる解析では長鎖 PCR に特有の問題がフェージングに大きな影響を与えることが判明した。今後、その解決策を検討する。

D. 考察

遺伝性希少疾患の診断を確定する際、原因バリエントを特定することはきわめて重要である。シーケンシング技術の向上に伴い、遺伝子解析の方法は変化していくと予想されるが、希少疾患で、かつ、先天性 TTP のように責任遺伝子が限定されている場合、依然として PCR ダイレクトシーケンシング法がコスト面で優れている。本研究においても、種々の工夫により効率化した PCR ダイレクトシーケンシング法で先天性 TTP 疑い患者 3 名に発症原因と考えられる ADAMTS13 遺伝子異常を同定した。バリエントの種類は、4 種のミスセンスと 2 種のフレームシフトであった。いずれも、ADAMTS13 の本来の機能、すなわち VWF 切断活性を発揮できなくなるバリエントであると考えられる。これまでの知見から考えると、いずれもタンパク質が細胞外に分泌されなくなるバリエントである可能性が高い。

これまでに解析した結果をまとめると、先天性 TTP 疑い患者 67 名 (60 家系) のうち 63 名 (56 家系) に、複合ヘテロ接合性 (45 家系) あるいはホモ接合性 (11 家系) の原因バリエントを同定したことになる。バリエントは 68 種類で、その内訳は、ミスセンス 43 種類 (63.2%)、フレームシフト 11 種類 (16.1%)、ナンセンス 8 種類 (11.8%)、

スプライシング異常 4 種類 (5.9%)、構造異常 2 種類 (2.9%) であった。論文発表されている海外の原因バリエントを含めると全部で約 200 種類となっている。

解析した 60 家系のうち 4 家系には、未発見の遺伝子異常が存在する可能性があり、解決すべき重要課題として残っている。本研究期間の検討により、長鎖 PCR を用いたロングリードシーケンシングによる解析の問題点が明確になってきたので、今後、それらを解決することで ADAMTS13 遺伝子解析力が大きく向上することが期待される。

E. 結論

先天性 TTP 疑い患者 1 名の ADAMTS13 遺伝子をダイレクトシーケンシング法で解析した結果、両アレル性の異常が同定された。さらに、ロングリードシーケンシングによる ADAMTS13 全長解析の問題点が明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Keigo Akuta, Kazunobu Kiyomizu, Hirokazu Kashiwagi, Shinji Kunishima, Nobuko Nishiura, Fumiaki Banno, Koichi Kokame, Hisashi Kato, Yuzuru Kanakura, Toshiyuki Miyata, Yoshiaki Tomiyama: Knock-in mice bearing constitutively active α IIb (R990W) mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction. J.

- Thromb. Haemost. 18, 497-509 (2020)
- 2) Keiko Yamato, Yukako Nakajo, Hitomi Yamamoto-Imoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Jun C Takahashi, Hiroharu Kataoka, Hiroji Yanamoto: Low-dose activated protein C suppresses the development of cerebral infarction and neurological deficits in mice. Neurosurg. Open 1, okaa014 (2020)
- 3) Kazuya Sakai, Yoshihiro Fujimura, Yasuyuki Nagata, Satoshi Higasa, Masato Moriyama, Ayami Isonishi, Mutsuko Konno, Michiko Kajiwara, Yoshiyuki Ogawa, Shigehiko Kaburaki, Tomoko Hara, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Kinta Hatakeyama, Masanori Matsumoto: Success and limitations of plasma treatment in pregnant women with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. J. Thromb. Haemost. 18, 2929-2941 (2020)
- 4) Yuka Eura, Toshiyuki Miyata, Koichi Kokame: Derlin-3 is required for changes in ERAD complex formation under ER stress. Int. J. Mol. Sci. 21, 6146 (2020)
- 5) Keiko Maruyama, Koichi Kokame: Carrier frequencies of antithrombin, protein C, and protein S deficiency variants estimated using a public database and expression experiments. Res. Pract. Thromb. Haemost. 5, 179-186 (2021)
- 6) 宮田敏行, 小亀浩市: TMA の遺伝子診断: TTP と aHUS. 日本血栓止血誌, 31, 17-27 (2020)
- 7) Kazuya Sakai, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata, Ayami Isonishi, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto: Current prophylactic plasma infusion protocols do not adequately reduce long-term microvascular events in Japanese patients with congenital TTP. Br. J. Haematol. 194, 444-452 (2021)
- 8) Makoto Osada, Keiko Maruyama, Koichi Kokame, Ryunosuke Denda, Kohei Yamazaki, Hisako Kunieda, Maki Hirao, Seiji Madoiwa, Nobuo Okumura, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda, Kentaro Watanabe, Yuiko Tsukada, Takahide Kikuchi: A novel homozygous variant of the thrombomodulin gene causes a hereditary bleeding disorder. Blood Adv. 5, 3830-3838 (2021)
- 9) Asano Watanabe, Hikari Hataida, Naoya Inoue, Kosuke Kamon, Keigo Baba, Kuniaki Sasaki, Rika Kimura, Honoka Sasaki, Yuka Eura, Wei-Fen Ni, Yuji Shibasaki, Satoshi Waguri, Koichi Kokame, Yoko Shiba: Arf GTPase-Activating proteins SMAP1 and AGFG2 regulate the size of

- Weibel-Palade bodies and exocytosis of von Willebrand factor. *Biol. Open* 10, bio058789 (2021)
- 10) Yuka Eura, Koichi Kokame: Commonly used anti-von Willebrand factor antibody for multimer analysis cross-reacts with fibronectin, which is difficult to distinguish from VWF. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 5, e12598 (2021)
- 11) Yasuo Yamazaki, Yuka Eura, Koichi Kokame: V-ATPase V0a1 promotes Weibel-Palade body biogenesis through the regulation of membrane fission. *eLife* 10, e71526 (2021)
- 12) Satomi Nagaya, Keiko Maruyama, Atsushi Watanabe, Makiko Meguro-Horike, Yuta Imai, Yuki Hiroshima, Shin-Ichi Horike, Koichi Kokame, Eriko Morishita: First report of inherited protein S deficiency caused by paternal PROS1 mosaicism. *Haematologica* 107, 330-333 (2022)
- 13) 丸山慶子, 小亀浩市: 公開データベースと発現実験を用いたアンチトロンビン, プロテインCおよびプロテインS遺伝子の病的バリエーションの頻度推定. *日本血栓止血誌*, 32, 635-637 (2021)
- 14) Masashi Akiyama, Yuka Eura, Koichi Kokame: Siglec-5 and Siglec-14 mediate the endocytosis of ADAMTS13. *Thromb. Res.* 219, 49-59 (2022)
- 15) Keiko Maruyama, Shigeki Miyata, Koichi Kokame: Alpha-HIT assay: A new assay for heparin-induced thrombocytopenia antibody detection using Fc γ RIIa-coated beads and Alpha technology. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 6, e12818 (2022)
- 16) Kazuya Sakai, Eriko Hamada, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto: Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura: genetics and emerging therapies. *Ann. Blood* 2022, 1-14 (2022)
- 17) Akihiro Tsuji, Toshiyuki Miyata, Akihiro Sekine, Reiko Neki, Koichi Kokame, Tsutomu Tomita, Yumi Kashima, Ryotaro Asano, Jin Ueda, Tatsuo Aoki, Takeshi Ogo: Three cases of unprovoked venous thromboembolism with prothrombin p.Arg596Gln variant and literature review of antithrombin resistance. *Intern. Med.* 62, 885-888 (2023)
- 18) Kazuki Fukuma, Hiroshi Yamagami, Masafumi Ihara, Tomotaka Tanaka, Toshiyuki Miyata, Shigeki Miyata, Koichi Kokame, Kunihiro Nishimura, Yuriko Nakaoku, Haruko Yamamoto, Mikito Hayakawa, Kenji Kamiyama, Yukiko Enomoto, Ryo Itabashi, Eisuke Furui,

Yasuhiro Manabe, Masayuki Ezura, Kenichi Todo, Kazuo Hashikawa, Shinichiro Uchiyama, Kazunori Toyoda, Kazuyuki Nagatsuka: P2Y12 reaction units and clinical outcomes in acute large artery atherosclerotic stroke: a multicenter prospective study. *J. Atheroscler. Thromb.* 30, 39-55 (2023)

2. 学会発表

- 1) 丸山慶子, 小亀浩市: 公開データベースから抽出したアンチトロンビンおよびプロテインC変異の機能解析. 第42回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2020年6月18-20日.
- 2) 山崎泰男, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市: Weibel-Palade小体にはサブユニット構成の異なる2種類のVacuolar H⁺-ATPaseが局在している. 第42回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2020年6月18-20日.
- 3) 秋山正志, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市: 新規ADAMTS13クリアランス受容体SIGLEC5およびSIGLEC14の機能解析. 第42回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2020年6月18-20日.
- 4) 三島優一, 秋山正志, 小亀浩市: 肝星細胞におけるADAMTS13の遺伝子発現調節. 第42回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2020年6月18-20日.
- 5) 三好剛一, 根木玲子, 吉松淳, 宮田敏行, 丸山慶子, 小亀浩市, 浅原彩子, 奥久人: プロテインS(PS)比活性検査およびPS-K196E変異検出ELISAのPS-K196E変異予測精度に関する検討. 第42回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2020年6月18-20.
- 6) Shigeki Miyata, Koichi Kokame: Underlying causes greatly influence the development of HIT antibodies and clinical outcomes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. The 28th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Online, July 11-15, 2020.
- 7) Keiko Maruyama, Koichi Kokame: Carrier frequencies of antithrombin-, protein C-, or protein S-deficient variants estimated using a public database and expression experiments. The 28th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Online, July 11-15, 2020.
- 8) R Neki, T Miyata, K Ohtani, Y Hidaka, K Ida, T Yokouchi-Konishi, A Nakanishi, J Yoshimatsu, K Kokame, N Wakamiya, N Inoue: Alternative complement pathway activation in the severe hypertensive disorders of pregnancy. The 28th Congress of

- the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Online, July 11-15, 2020.
- 9) M Osada, K Maruyama, K Kokame, R Denda, K Yamazaki, H Kunieda, M Hirao, S Madoiwa, M Murata, Y Ikeda, Y Tsukada, T Kikuchi: A hereditary bleeding disorder caused by a novel homozygous mutation of thrombomodulin gene. The 28th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Online, July 11-15, 2020.
 - 10) 斯波真理子, 小林直之, 小亀浩市, 和田郁人: 脂質異常症に対する核酸医薬の開発. 第41回日本臨床薬理学会学術総会, オンライン, 2020年12月3-5日.
 - 11) 丸山慶子, 宮田茂樹, 小亀浩市: Fc γ RIIa固相化ビーズとAlphaLISA技術を用いたHIT抗体検出法の開発. 第43回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021年5月27-29日.
 - 12) 山崎泰男, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市: Weibel-Palade小体の形成におけるプロトンポンプ(V-ATPase) a サブユニットの役割. 第43回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021年5月27-29日.
 - 13) 秋山正志, 小亀浩市: ADAMTS13およびVWFのエンドサイトーシスに関わるSiglecsの機能解析. 第43回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021年5月27-29日.
 - 14) Teena Bhakuni, 秋山正志, 小亀浩市: Protein S attenuates high glucose-induced damage in blood-brain barrier endothelial cells. 第43回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021年5月27-29日.
 - 15) 根木玲子, 伊田和史, 丸山慶子, 辻明宏, 宮田敏行, 小亀浩市: 遺伝カウンセリング外来来談者における遺伝性血栓性素因の遺伝子解析および患者背景に関する検討. 第43回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021年5月27-29日.
 - 16) 辻明宏, 関根章博, 浅野遼太郎, 上田仁, 青木竜男, 保山美由紀, 根木玲子, 小亀浩市, 宮田敏行, 大郷剛: アンチトロンビン抵抗性を示すプロトロンビン変異を伴う3症例の検討. 第43回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021年5月27-29日.
 - 17) Neki R, Ida K, Maruyama K, Tsuji A, Miyata T, Kokame K: Phenotypic and genetic assessment in thrombotic patients with inherited thrombophilia at Genetic Counseling Division. The 29th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Online, July 17-21, 2021.
 - 18) 小亀浩市: DIC/TMA関連分子の遺伝子解析・検査. 第16回日本血栓止血学会学術標準化委員会(SSC)シンポジウム, オンライン, 2022年2月19日.

- 19) 久郷佳央梨, 小亀浩市, 増田弘明, 正木沙賀恵, 古田賢二, 相庭武司: 先天性プロテインS欠乏症に対する遺伝子検査方法の構築. 第71回日本医学検査学会 in 大阪, 大阪, 2022年5月21-22日.
- 20) 小亀浩市: AlphaFoldを使ってみよう. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.
- 21) 丸山慶子, 小亀浩市: プロテインS遺伝子のイントロン1による遺伝子発現調節. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.
- 22) 樋口(江浦)由佳, 松本雅則, 小亀浩市: ロングリードシーケンシングの強みを活かしたADAMTS13遺伝子解析. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.
- 23) 山崎泰男, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市: Weibel-Palade小体はV-ATPase V0a1によって制御される膜分離を経て形成される. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.
- 24) 秋山正志, 小亀浩市: プラスミノゲンのエンドサイトーシスに関わるSiglecsの同定および機能解析. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.
- 25) Teena Bhakuni, 秋山正志, 小亀浩市: Protection of blood-brain barrier endothelial cells by the protein S-TAM receptor(s) axis. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.

H. 知的財産権の出現・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