



【日本血栓止血学会サイト お役立ちリンク集】

日本血栓止血学会サイトに掲載しているおすすめコンテンツのリンクをご紹介します。

- ・ [診療ガイドライン](#)
- ・ [研修医のお役立ち論文コンテンツ](#)
- ・ [用語集](#)
- ・ [1\) 血栓止血の臨床-研修のために【第2版】（前編）](#)
2018年29巻6号 p. 537-764, 2018.
 - ・ オーバービュー 1編
 - ・ 検査 14編
 - ・ 血小板・血管の異常による出血性疾患 12編
 - ・ 凝固・線溶系異常による出血性疾患 17編
 - ・ 出血性疾患の治療（血液製剤など） 8編
- ・ [2\) 血栓止血の臨床-研修のために【第2版】（後編）](#)
2019年30巻1号 p. 3-247, 2019.
 - ・ 血栓性疾患 17編
 - ・ 血栓性疾患の治療薬 13編
 - ・ 血小板減少を伴う血栓性疾患 18編

本編は次ページより掲載しております。

静脈血栓塞栓症と TTP/aHUS に関する研究

宮田敏行*

Venous thromboembolism and thrombotic microangiopathy

Toshiyuki MIYATA

要約: 静脈血栓塞栓症(venous thromboembolism: VTE)は環境因子と遺伝因子が関わる多因子疾患である。VTE の遺伝的リスクとして凝固制御因子異常症が知られている。私たちは VTE 患者の遺伝子解析を行い、複数の VTE 患者にプロテイン S p.Lys196Glu 変異を同定し、本変異が VTE のリスク変異であることを明らかにした。本変異は日本人約 55 人中 1 人に見られ、日本人にだけ見つかっている。一方、血栓性微小血管症は溶血性貧血、血小板減少、微小血管の血栓による臓器障害を示し、血栓性血小板減少性紫斑病と非典型溶血性尿毒症症候群が含まれる。血栓性血小板減少性紫斑病はフォンビルブランド因子切断酵素 ADAMTS13 の活性著減により発症する。私たちは ADAMTS13 の活性測定法の開発、*Adamts13* 遺伝子欠損マウスの解析、ADAMTS13 の基質結合領域の立体構造の決定を行った。非典型溶血性尿毒症症候群の発症は補体制御異常が原因である。私たちは本疾患患者の遺伝子解析を行い、白人と異なり補体 C3 遺伝子に p.Ile1157Thr 変異を保有する例が多いことを明らかにした。日本人にはプロテイン S p.Lys196Glu 変異や C3 p.Ile-1157Thr 変異のように、特有の遺伝子変異が見られることがある。これらの存在はユーラシア大陸から隔離された極東の島に住むという地理的な要因による創始者効果であろう。

Key words: ADAMTS13, プロテイン S, 血栓性素因, 補体

1. はじめに

静脈血栓塞栓症(venous thromboembolism: VTE)は多因子疾患である。なかでも、特発性血栓症と呼ばれる一群は、家系内多発、40 歳以下の若年性発症、繰り返す再発、まれな発症部位の血栓という特徴を示し、治療に抵抗性を示す場合がある。特発性血栓症は VTE 中でも暴露された明らかな誘因がない血栓症で、日常診療においては確定診断に至るのに時間がかかる場合も多く、解決すべき重大疾患の一つである。

血栓性微小血管症(thrombotic microangiopathy: TMA)は溶血性貧血、血小板減少、微小血管の血栓による臓器障害を示し、血栓性血小板減少性紫斑病

(thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP)と非典型溶血性尿毒症症候群(atypical hemolytic uremic syndrome: aHUS)を含む。TTP はフォンビルブランド因子(von Willebrand factor: VWF)切断酵素である ADAMTS13 の活性の著減(10%未満)が発症の原因となる。ADAMTS 13 の活性著減により、血管内皮細胞から分泌された超高分子量 VWF マルチマーが切断されないために血中に残存し、この VWF を起点にして高張り応力が発生する微小血管で血小板血栓が形成され、血栓が腎臓や脳などの流入血管に形成されると臓器障害を発症する。aHUS は補体の制御異常により血管内皮細胞上で補体が過剰に活性化され、細胞膜上に膜侵襲複合体が形成され細胞障害が起こり、微小血管に血栓を生じる。

本稿では、VTE, TTP, aHUS に関して、私たちの研究室で進めた研究を紹介する。

*責任者連絡先:
国立循環器病研究センター脳血管内科
〒564-8565 大阪府吹田市岸部新町 6 番 1 号
Tel: 06-6170-1070
E-mail: miyata@ncvc.go.jp

2. VTEの先天性素因とプロテイン S p.Lys196Glu (PS K196E) 変異

1) 日本人を対象にした VTE の先天性素因の研究

VTE 患者の遺伝子解析より、凝固制御因子であるアンチトロンビン (antithrombin: AT), プロテイン C (protein C: PC), プロテイン S (protein S: PS) の機能喪失変異は、先天性血栓性素因として広く知られている。私たちは日本人の遺伝的背景を明らかにするため、厚生労働省難治性疾患克服研究事業の支援を受け、多施設共同で VTE 患者 173 人を収集し、活性値や抗原量を考慮せず、全員の AT, PC, PS の遺伝子解析を行った¹⁾。その結果、AT 遺伝子は 13 種の変異が 14 人に、PC 遺伝子は 10 種の変異が 17 人に、PS 遺伝子は 15 種の変異が 28 人に、それぞれ同定することができた。

PS の p.Lys196Glu (PS K196E) 変異は多くの患者に見られ、13 人がヘテロ接合体、2 人がホモ接合体であり、5 人のヘテロ接合体は PC 遺伝子にも変異を保有していた。また、PS p.Val87Leu, PC p.Lys-193del (本変異保有者の合成基質分解活性は正常値を示す), PC p.Arg211Trp, PC p.Val339Met, AT p.Leu256fs*9 が複数の患者に同定された。この VTE コホートには 1 人の PS 遺伝子の完全欠損が同定されたので²⁾、VTE 患者 173 人の 32% にあたる 55 人が 3 種の凝固制御因子のいずれかに遺伝子変異を保有することが判明した¹⁾。

次に、妊娠関連の深部静脈血栓症および不育症を示す患者 348 人を収集し 3 つの凝固制御因子の遺伝子解析を行った。静脈血栓症を発症した 18 人の患者では、5 人が PS 遺伝子もしくは PC 遺伝子に変異を保有しており、そのうち 2 人は PS K196E 変異を保有していた³⁾。変異を有する 5 人はいずれも妊娠の初期もしくは中期に静脈血栓症の発症を認めた。不育症患者 (330 人) を対象に PS K196E 変異が不育症と関連を示すかを検討したところ、不育症の患者集団群と一般住民群での PS K196E 変異の頻度に差を認めなかったため、本変異は不育症のリスクではないと考えられた⁴⁾。これは白人種の先天性血栓性素因である凝固第 V 因子 Leiden 変異は不育症のリスクではないという結果によく一致した⁵⁾。また、不育症患者の 11 人 (3.3%) に極めてまれな non-

synonymous 変異を認めた。一般住民群では凝固制御因子のまれな変異は 3.3% (30 人に 1 人) も同定されないと思われるので、これらは不育症のリスクになる可能性が考えられるが、頻度は高くないので主な原因ではないと考えた^{4,5)}。また、凝固制御因子のまれな nonsynonymous 変異を認めた症例はいずれも静脈血栓症を起こしていなかったため、nonsynonymous 変異が必ずしも血栓症につながるものではないことを示した⁵⁾。

2) プロテイン S p.Lys196Glu (PS K196E) 変異

PS K196E 変異 (rs121918474, c.586A>G, PS 徳島変異, 成熟 PS のアミノ酸番号では PS K155E 変異) は、PS の第 2EGF 様ドメイン内の Lys196 の Glu への変異を指す^{6,7)}。つまり、塩基性アミノ酸が酸性アミノ酸へ置換している。

国立循環器病研究センター予防検診部は性別と年齢を考慮した地域一般住民を対象とした吹田研究を進めている。私たちは予防検診部の協力をいただき、吹田研究の参加者 (約 3,650 人) を日本人の一般集団として、前述の多施設で収集した VTE 患者 161 人を症例集団として、VTE の遺伝的リスクを探索する症例対照研究を行った。これより、PS K196E 変異は VTE のリスクであることを明らかにした (VTE 患者 161 人でのアレル頻度 0.053, 一般住民 3,651 人でのアレル頻度 0.009, 年齢と性で調整したオッズ比 4.72, 95% 信頼区域 2.39-9.31)^{8,9)}。その後報告された研究成果を加えると、本変異の一般住民でのアレル頻度は 0.0091 であり、約 55 人に 1 人がヘテロ接合体、約 12,000 人に 1 人がホモ接合体と計算され、国内にはホモ接合体が約 10,000 人と推定された⁷⁾。これまでにホモ接合体は VTE 患者の 3 人にしかに見出されておらず、VTE 患者での頻度は 0.0118 である (VTE 患者 85 人にホモ接合体 1 人)^{6,7)}。

次に、地域一般住民を対象に PS 抗凝固活性と PS K196E 変異との関係を検討した。その結果、PS K196E 変異保有者 (34 人) の PS 抗凝固活性の平均値は 72% であり、正常 PS 保有者 (1,828 人) の平均値 88% に比べわずかに 16% しか低下していなかった¹⁰⁾。正常 PS 保有者は幅広い PS 抗凝固活性 (約 40~170%) を示し、34 人の変異保有者の PS 抗凝固活性 (約 40~110%) はすべてこの範囲に入っている。

た。このことは PS 抗凝固活性では変異保有者を同定できないことを示していた。その後、私たちは PS K196E 変異体を特異的に認識する単クローン抗体を作製し、これを用いて血漿中の変異体を同定する ELISA 系の構築に成功した¹¹⁾。この PS K196E 変異体の測定系は血漿中の PS K196E 変異体を検出するので、遺伝子解析を行う必要がなく、妊娠中や抗凝固療法中でも PS 量低下の影響を受けずに変異体の有無を判定できる。

前述の一般住民の PS 抗凝固活性値は年齢と性別に大きく影響を受けた⁹⁾。この PS 抗凝固活性値の標準偏差は 20.8% であり、AT(標準偏差 12.3%) や プラスミノーゲン(標準偏差 15.9%) より高い値を示したが、PC 活性の標準偏差(21.1%) に近い値を示した。一般に、PS 抗凝固活性は年齢と性別に加え、妊娠、経口避妊薬、DIC、肝疾患、腎疾患に影響を受けるとされており、多種の要因で影響を受けることが大きい標準偏差につながっていると考えられた。

白人では、凝固第 V 因子 Leiden 変異保有者の VTE は経口避妊薬の内服により増加すると報告されており、VTE 発症には遺伝因子と環境因子の相乗作用が認められている。そこで、同様のことが認められるかどうかを日本人で検討したところ、PS K196E 変異保有者が経口避妊薬を内服するとさらに PS 活性の低下が認められた¹²⁾。しかし、症例数が少ないため、経口避妊薬による VTE 発症の増加は検討できていない。今後の課題である。

私たちはヒトおよびマウスの組み換え PS K196E タンパク質を調製しその性状を検討した^{13,14)}。ヒト PS K196E タンパク質の活性化プロテイン C のコファクター活性は 41% に低下していたが、第 Xa 因子不活性化反応における TFPI コファクター活性は低下せず、C4BP への結合能も正常に保持しており、トロンビンでも同様に切断を受けた¹³⁾。マウス PS K196E タンパク質の活性化プロテイン C のコファクター活性は測定系により異なるが 49% から 60% に低下していた¹⁴⁾。

PS K196E 変異の日本人におけるアレル頻度は前述のように 1% 未満である。PS K196E 変異は中国人と韓国人の一般集団(それぞれ 509 人、492 人) および中国人 VTE 患者(122 人)には同定できなかった¹⁵⁾。

約 6 万人のシーケンズデータが搭載されている ExAC Browser を見ると、東アジア人の 4 名以外には本変異は同定されていない。これらのことは、本変異は日本人に特有の変異であることを示唆しており、いわゆる創始者効果により日本人集団に固定したと思われる。現代では血栓症は死に至るリスクであるが、医学が進歩する以前の時代では出血症が生命を脅かし、特に産後出血は致命的な脅威であったと想像される。そういった環境では先天性血栓性素因は生存に有利であろう。凝固第 V 因子 Leiden 変異も同じような理由で生存に有利であったと考えられるだろう。

最近、日本人の大規模ゲノム解析の成果をもとにジャポニカアレイという SNP タイピングフォーマットが開発された。しかし、ジャポニカアレイは PS K196E 変異を搭載しておらず、このアレイを使っても PS K196E 変異をタイピングできない。このことは、例えば脳卒中の大規模遺伝子解析をジャポニカアレイで行ったとしても、PS K196E 変異はタイピングされないで、そのリスクは評価されないことになり誠に残念である。

前述のように、日本人の約 10,000 人が PS K196E 変異ホモ接合体と推定されるので、PS K196E 変異ホモ体マウスを用いて本変異と疾患の関連を検討することは意義がある。私たちは PS K196E 変異をもつマウスを作製し、その血栓能を検討した¹⁴⁾。PS K196E マウスは正常に成長し子孫を残した。血栓症の自然発症は認めなかった。PS K196E 変異ヘテロ体マウスおよびホモ体マウスの活性化プロテイン C コファクター活性は、野生型に比べそれぞれ 18% および 33% 低下していた。このヘテロ体マウスの活性低下(18%) はヒトヘテロ体の平均 16% の活性低下に酷似していた。次いで、PS K196E 変異ホモ体マウスの血栓能を、PS 遺伝子欠損ヘテロ体マウス(ホモ体マウスは致死)、凝固第 V 因子 Leiden 変異ホモ体マウス、野生型マウスと比較検討した。その結果、静脈血栓モデルと肺塞栓モデルで 3 種の遺伝子改変マウスはいずれも高い血栓能を示した。しかし、脳梗塞モデルでは PS K196E 変異ホモ体マウスと PS 遺伝子欠損ヘテロ体マウスは野生型マウスとの差を認めなかった。

東アジア人にはプラスミノーゲン異常症が多く

見られ、その多くは p.Ala620Thr (A620T) 変異 (rs121918027, c.1858G>A, プラスミノージェン 栃木変異, 成熟プラスミノージェンのアミノ酸番号では A601T 変異) を保有している¹⁶⁾。日本人での本変異のアレル頻度は 0.020 である⁹⁾。私たちは最近本変異マウスを作製した¹⁷⁾。プラスミノージェン A620T 変異ホモ体マウスはプラスミノージェン活性が約 8% にまで低下するものの静脈血栓症, 肺塞栓症, 脳梗塞といった血栓症を増悪しなかった。そこで, PS K196E 変異とプラスミノージェン A620T 変異の両変異をホモ体として保有するダブルホモマウスを作製し血栓症を調べたところ, 肺塞栓モデルで PS K196E 変異ホモ体マウスとの差を認めなかった¹⁷⁾。すなわち, マウスモデルではプラスミノージェン A620T 変異は PS K196E 変異ホモ体マウスの血栓症を増悪することはなかった。これまでのところ, プラスミノージェン A620T 変異はヒトおよびマウスで血栓症のリスクになるとの報告は見られない。

PS K196E 変異は VTE を発症していないヒトにも見られるので, 強い血栓性素因ではないと思われる。一方, 強い血栓性素因は AT I 型欠損症である¹⁸⁾。私たちは AT 活性低下例の AT 抗原量を測定し, 活性と抗原量がともに低下する I 型欠損症と活性だけが低下する II 型異常症に分類し, VTE イベントの発症年齢を比較した。その結果, I 型欠損症は明らかに II 型異常症より若年で VTE を発症していた (ハザード比 7.2, 95% 信頼区域 1.88-12.17)。さらに, VTE 患者群と一般住民群での I 型と II 型の頻度を比較すると, I 型欠損症の VTE のオッズ比は 132 (95% 信頼区域 26.5-666.1) であり, II 型異常症のオッズ比は 3.8 (95% 信頼区域 0.2-68.9) であった。これは臨床家が抱いている AT I 型欠損症患者が VTE を起こしやすいという印象を支持している。I 型欠損症はナンセンス変異やフレームシフト変異, スプライス異常変異に加え, 大きな DNA 領域の挿入・欠失・逆位・転座 (いわゆる structural variation, 構造バリエーション) により生じる。私たちは VTE 遺伝子解析に Long read シークエンサーを取り入れ, イントロンもシークエンスすることにより構造バリエーションの同定も視野に入れ, 現在その解析精度の向上に取り組んでいる。

3. 血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy: TMA)

TMA は, 微小血管障害性溶血性貧血, 消費性血小板減少, 微小血管の血小板血栓による臓器障害という 3 徴を示し, その発症機序により TTP, 志賀毒素産生性大腸菌感染による溶血性尿毒症症候群, 補体による血管内皮細胞の活性化による aHUS, その他に分類することができる^{19,20)}。私たちは奈良県立医科大学藤村吉博教授 (当時) から TTP の研究へお誘いいただき, 今世紀に入ってから TMA 研究を開始した。当時は, TMA の原因遺伝子やパスウェイははっきりしていなかった。

1) 血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP)

私たちは藤村教授から, VWF 切断酵素活性の著しい低下が微小血管に血小板血栓を惹起するとご教授いただき, TTP の研究, すなわち VWF 切断酵素である ADAMTS13 の研究を開始した。この研究は, 奈良県立医科大学で先天性 TTP を疑われる患者症例を収集し (TMA コホート), 国立循環器病センター (当時) の小亀浩市博士が患者の遺伝子解析を行い変異を同定し, VWF 切断酵素の cDNA クローニングを行った化学及血清療法研究所 (当時) の副島見事博士が変異体を発現させるという 3 施設の共同で進められた²¹⁾。この VWF 切断酵素は 2001 年に世界の 3 施設でほぼ同時期にクローニングされ ADAMTS13 と命名された。本酵素が先天性 (遺伝子変異) もしくは後天性 (自己抗体) により活性が著しく低下すると TTP を発症する。TTP は稀少疾患であり現在では難治性疾患に数えられる²⁰⁾。当初 TTP/ADAMTS13 の研究は, 患者数より研究者数の方が多いのではないかとされるほど, 世界中の研究者が参入した。私たちの TTP 研究への貢献は, 先天性 TTP 患者の遺伝子解析, ペプチド基質を用いる ADAMTS13 活性測定法の開発, *Adams13* 遺伝子欠損マウスの作製と性状の検討, ADAMTS13 の VWF 結合を担うドメインの立体構造決定などである。

(1) 先天性 TTP 患者の遺伝子解析

まず国内の先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析を行った。先天性 TTP は常染色体劣性遺伝形式を示すので, TTP 発症患者には 2 つのアレルに機

能喪失変異が同定される。これにより類似の病型を示す TMA コホートの中から TTP を確定診断できるようになった。遺伝子で確定診断がつくことは臨床面では極めて重要であり、藤村教授のグループによる TTP の臨床研究に貢献できたと考えている²²⁻²⁴⁾。国際先天性 TTP 患者登録研究では 2017 年までに世界各国より 123 例が登録されており、その中の 40%弱(47 例)は日本からの登録である。これは本邦での先天性 TTP 研究が活発であることを示している²⁴⁾。

多くの先天性 TTP 患者にサンガー法で 2 つの機能喪失変異を同定できた。しかし、少数ではあるものの片方のアレルにしか変異を同定できない症例があった。2 つ目の変異を同定するため、定量 PCR 法を用いた解析法を新しく開発し、この手法を用いて構造バリエーションを同定した²⁵⁾。これまでに、構造バリエーションとして 3 つの大きな欠失(1 例はスイスの症例)を認めている^{25,26)}。この定量 PCR を用いた構造バリエーションの同定法は優れた手法である。血栓止血学会誌で紹介しているので、多くの研究者に使っていただきたい²⁷⁾。

(2) ADAMTS13 活性測定法の開発

以前の ADAMTS13 の VWF 切断活性測定法は、天然基質である VWF を用いたウエスタンブロット法で行われていた。そのため手法が煩雑で定量性に乏しいと指摘されていた。当時、血小板 ADP 受容体 P2Y₁₂ に対するチエノピリジン系抗血小板薬クロピジンの内服により、頻度は低いものの抗 ADAMTS13 抗体が出現し後天性 TTP が見られ臨床問題になっており、こういった面からも簡便・迅速な ADAMTS13 活性の定量法の開発が望まれていた。

ADAMTS13 は VWF(2,050 アミノ酸)の A2 ドメインの Met1604-Tyr1605 結合を特異的に分解する。この A2 ドメインを短くして ADAMTS13 が認識する最小領域を 73 残基に絞り込み²⁸⁾、次いで Met1604-Tyr1605 結合の上流 7 残基目と下流 5 残基目にそれぞれ蛍光基と消光基を導入し、Met1604-Tyr1605 結合が切断されると蛍光が生じるペプチド性蛍光性合成基質 FRET-S-VWF73 を開発した²⁹⁾。本蛍光基質は 1 時間以内で ADAMTS13 活性を定量でき、現在世界中で ADAMTS13 活性の測定に用いられている。

私たちは FRET-S-VWF73 を用いて、日本人の一般住民 3,616 人の ADAMTS13 活性を測定し、年齢と性別の影響を明らかにした³⁰⁾。男性は女性より ADAMTS13 活性が約 13%低く、性別にかかわらず 60 歳を過ぎると年齢とともに活性が低下する。VWF 抗原量は、逆に年齢とともに増加するので、“VWF 抗原量/ADAMTS13 活性”比は年齢とともに増加し 30 歳代と 80 歳代では 2 倍程度の違いになる。これは加齢による血栓傾向を説明するかもしれない。

次いで、この ADAMTS13 活性値を用いて、日本の先天性 TTP 患者数の推定を試みた³¹⁾。一般住民 3,200 人の中で、ADAMTS13 活性が低い 64 人の ADAMTS13 遺伝子の遺伝子解析を行った。同定された nonsynonymous 変異の中から機能を喪失すると考えられる変異の頻度を約 533 人に 1 人と求めた。この頻度を用いると、日本人の先天性 TTP 患者は約 110 万人に 1 人と推定され、患者数は国内で 110 人程度であろうと推定した。こういった研究を展開できたのは、ひとえに国立循環器病研究センター予防検診部の協力があつたからである。

(3) *Adamts13* 遺伝子欠損マウスの作製とその性状の解析

私たちは *Adamts13* 遺伝子欠損マウスを作製しその表現型を解析した³²⁾。*Adamts13* 遺伝子を完全欠損したマウスは、予想に反して TTP を自然発症せず、ヒトとの表現型の違いを示した。*Adamts13* 遺伝子完全欠損マウスの血中には野生型マウスに比して巨大な超高分子量 VWF マルチマーが観察されたが、血小板数は減少していなかった。遺伝子欠損マウスの血小板をボトロセチンやコラーゲンで活性化させても、その血小板凝集能に野生型マウスとの差を見出せなかった。しかし、全血での平板型フローチャンバーを用いた下流の固相化コラーゲン表面での血栓形成能は遺伝子欠損マウスで明らかに亢進しており、遺伝子欠損マウスにコラーゲン/エピネフリン混液を注射すると野生型より明らかに顕著な血小板減少を認めた。これより、*Adamts13* 遺伝子欠損マウスは超高分子量 VWF マルチマーの存在により血小板凝集能が亢進状態にあることが明らかになった。

私たちはマウス ADAMTS13 の cDNA と遺伝子の

構造を検討したところ、129/Sv 系統マウスはヒト ADAMTS13 と同じドメイン構造をもつが、BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2 といった多くの系統のマウスはトランスポゾン intracisternal A particle がイントロン 23 に挿入され停止コドンが出現し、4 つの C 末端ドメイン(2 つの Tsp1 ドメインと 2 つの CUB ドメイン)を欠いた短鎖 ADAMTS13 をコードすることを見出した³³⁾。

ADAMTS13 の C 末端に位置する CUB ドメインは基質 VWF の結合部位の一つであり、血漿中で約 5% の ADAMTS13 は VWF に結合している。また、CUB ドメインは S ドメインと相互作用することにより S ドメインの基質認識部位を覆い隠している。そこで、C 末端ドメインの生体内での機能を解析するため、i) 遺伝的背景が 129/Sv の *Adamts13* 遺伝子欠損マウス (*Adamts13*^{-/-})、ii) 遺伝的背景が 129/Sv で 4 つの C 末端ドメインが欠損している短鎖 ADAMTS13 を発現する congenic マウス (*Adamts13*^{SS})、iii) 全長型 ADAMTS13 を発現する 129/Sv マウス (*Adamts13*^{LL})、を用いて 3 種のマウスの血栓能を評価した³⁴⁾。その結果、ずり速度 1000 s⁻¹ では *Adamts13*^{-/-} マウスは大きな血栓を示したが、*Adamts13*^{SS} マウスと *Adamts13*^{LL} マウスの血栓は *Adamts13*^{-/-} マウスより小さく、両系統マウスの血栓の大きさには差が見られなかった。一方、高ずり速度 5000 s⁻¹ では、*Adamts13*^{SS} マウスの血栓形成能は *Adamts13*^{-/-} マウスに近くなり *Adamts13*^{LL} マウスより有意に亢進していた。このことは、高ずり応力下では、C 末端ドメインが欠損している短鎖 ADAMTS13 は全長型 ADAMTS13 より、血小板血栓形成の抑制能が低いことを示している。これを支持する結果は、FeCl₃ 血管傷害による血管閉塞実験およびコラーゲン/エピネフリン混液による血小板数減少実験からも得られた。短鎖と全長型の ADAMTS13 をもつマウスの表現型の違いは、全長型 ADAMTS13 は VWF に結合し血小板血栓に取り込まれるので血小板血栓の形成をよく抑制するが、短鎖 ADAMTS13 は VWF に結合できないので血小板血栓形成の抑制能が低いことで説明されよう。

VWF は高ずり速度下で血小板の粘着・凝集機能を発揮する³⁵⁾。VWF はサブユニットが直鎖状につながったマルチマー構造を取り、ずり応力がかかる

と VWF 内部に隠れていた血小板への結合部位、特に GPIb への結合部位が露出すると考えられる。すなわち、ずり応力が高くなればなるほど VWF の血小板粘着・凝集活性が増強する。奈良県立医科大学杉本充彦教授(当時)らは、*Adamts13* 遺伝子欠損マウスに実験的な脳梗塞モデルや心筋梗塞モデルを施し、*Adamts13* 遺伝子欠損による超高分子 VWF マルチマーが病態の形成と進展に大きく関わることを明らかにした³⁶⁻³⁹⁾。

(4) ADAMTS13 の基質結合を担うドメインの立体構造

VWF 切断酵素がクローニングされた当時、ADAMTS プロテアーゼはすでに 12 種類同定されていたので、13 番目の酵素として ADAMTS13 と命名された。ADAMTS13 はドメイン構造をとり、metalloprotease domain (M), disintegrin-like domain (D), thrombospondin-1 type-1 repeat (T), cysteine-rich region (C), spacer domain (S) を N 末端側にもつ。M ドメインだけでは VWF を十分に切断できないが、MDTCS は全長 ADAMTS13 と同程度の切断活性を示す。したがって、DTCS ドメインは基質 VWF を認識して結合する領域と考えられていた。私たちが研究を開始した当時、ADAMTS ファミリータンパク質の立体構造は ADAMTS1, 4, 5 の MD ドメインの構造が明らかになっていただけで、それに続く基質結合を担うドメインの構造は明らかではなかった。そこで、私たちは ADAMTS13 の立体構造の決定に着手し、ADAMTS13 の天然基質 VWF の結合領域である DTCS ドメイン(399 アミノ酸残基：残基番号 287-685)の立体構造を決定した⁴⁰⁾。その後、東アジア人にもみられる p.Pro475Ser 変異をもつ ADAMTS13-DTCS 変異体の立体構造も決定した⁴¹⁾。

ADAMTS13-DTCS は W 型の構造をとり、3 つの領域 D, C_A, S が T と C_B でつながった構造をしていた。C ドメインは構造的に C_A と C_B に分かれていた。D ドメインは驚いたことにその名前とは異なりディスインテグリン様の構造ではなく、C_A ドメインに似た構造をとっていた。ADAMTS13-DTCS の D ドメインの立体構造はディスインテグリン様構造ではないので、ADAMTS という名前の中の“D”は誤解を招く misnomer である⁴⁰⁾。名前の類似性より、ADAMTS ファミリーは ADAM ファミリーと構

造が似ていると思われがちだが、私たちの研究は ADAMTS ファミリーと ADAM ファミリーの立体構造は明らかに異なることを示した。DTCS の立体構造をもとに、ADAMTS13 活性発現の最小領域である MDTCS の立体構造モデルを作製した。後天性 TTP 患者の血中に存在し ADAMTS13 活性の阻害能を有する抗 ADAMTS13 抗体は S ドメインに結合すると報告されていたが、その領域は M ドメインの活性中心から 125Å 程度遠くに離れていた⁴⁰⁾。

立体構造に基づき MDTCS の表面に位置する残基に変異を導入し、前述の蛍光性合成基質 FRET-S-VWF73 の切断活性への影響を調べ、D、C_A、S の各ドメインにそれぞれ基質結合部位(エクソサイトと呼ぶ)を同定した^{40, 42)}。すなわち、これら3つのエクソサイトは立体構造上直線的に並んでおり VWF の結合に直接関わることを明らかにした。その後、主に英国のグループからそれぞれのエクソサイトについて詳細な研究が報告された。

2) 非典型溶血性尿毒症症候群 (atypical hemolytic uremic syndrome: aHUS)

aHUS は血管内皮細胞上での過剰な補体の活性化によって惹起される内皮細胞傷害が病因と考えられている⁴³⁾。補体 C3b は非特異的に水酸基に反応する性質をもつ。C3b が血管内皮細胞上の糖鎖などの水酸基に結合すると、細胞上で補体の活性化反応が進行する。内皮細胞は補体活性化を抑制するために複数の抑制因子を細胞表面にもつ。抑制因子である CFH は内皮細胞上の硫酸基やシアル酸などの陰電荷に結合し、プロテアーゼである CFI による C3b の分解を促進し補体活性化を抑制する。また、膜タンパク質である Membrane cofactor protein (MCP, CD46) も同様に補体活性化を抑制する。これらの補体制御因子に機能が低下する変異(機能喪失変異)が生じる、もしくは補体因子に機能が亢進する変異(機能獲得変異)が生じた場合、補体が血管内皮細胞上で過剰に活性化することとなり aHUS が発症する⁴³⁾。

前述の奈良県立医科大学の TMA コホートには aHUS の診断基準に合致する症例が含まれていたのので、私たちは 2010 年以降 aHUS の遺伝的背景を明らかにする研究を行った。当時すでに、欧米の研究から aHUS 患者に補体制御因子である CFH などに

機能喪失変異、補体因子である C3 などに機能獲得変異が同定されていた。私たちは奈良県立医科大学および東京大学によって集積された日本人 aHUS 患者コホートの遺伝子解析を行い、これまでに 100 例を超える遺伝子解析を終えることができ、ようやく欧米の結果と比較することができるまでになった⁴⁴⁻⁴⁸⁾。特筆すべき点として、C3 p.Ile1157Thr 変異が多くの人 aHUS 患者に見られることが挙げられる(患者 118 人の 23%)⁴⁸⁾。本変異保有者は aHUS を再発するものの良好な転帰を示す例が見られた。C3 p.Ile1157Thr 変異により CFH の C3 変異体への結合能が低下するため、CFI による C3b 変異体の分解が低下し内皮細胞傷害が進むと考えられる。また、1 歳までに aHUS を発症する高血圧を示す患者に diacylglycerol kinase epsilon (DGKE) 遺伝子に常染色体劣性遺伝形式を示す変異を同定することができた⁴⁹⁾。プラスミノゲンの遺伝子変異が aHUS を起こす可能性を示唆する研究が米国より報告されたが、前述の東アジア人に見られるプラスミノゲン A620T 変異は aHUS に関連を示さなかった⁵⁰⁾。

4. おわりに

本稿では、VTE と TMA に関する私たちの研究を紹介した。私はプラスミノゲン異常症に A620T 変異を同定し¹⁶⁾、それ以降血栓止血の領域で研究を続けてきたが、研究の進展には隔世の感がある。私は厚生労働省が進めたミレニアムゲノムプロジェクトである高血圧感受性遺伝子の探索研究⁵¹⁻⁵³⁾、ファーマコゲノミクスが最も期待されていたワルファリン感受性遺伝子の研究⁵⁴⁾、海外では中立的な研究費で行われていなかったアスピリン抵抗性に関する研究⁵⁵⁾、およびクロピドグレルの薬効に関する研究⁵⁶⁾(ともに遺伝子研究を含んだ多施設前向き研究)など、幾つかの血栓症に関する多施設共同研究を行った。これらの研究は誌面の都合で述べなかつたので、原著論文などを参照していただければ幸いです。

謝辞

ここに紹介した研究は、国立循環器病研究セン

ターおよび国内外の数え切れないほど多くの研究者や医師の協力と援助で進めることができました。また、多くの方々から絶え間ないご支援と温かい激励をいただき、狭い領域に留まることなく広く血栓症を対象に研究を進めることができました。ここに多くの皆様に厚く御礼申し上げます。これまで研究とともに進め、本稿をまとめるに当たりご助言をいただきました国立循環器病研究センター小亀浩市部長、小久保喜弘博士、根木玲子博士、秋山正志博士、日本女子大学坂野史明博士に感謝します。本研究の一部は、厚生労働科学研究費、文部科学省科学研究費、日本学術振興会科学研究費助成事業、循環器病委託研究費、循環器病研究開発費、医薬基盤研究所保健医療分野における基盤研究推進事業、公益財団法人武田科学振興財団などの助成を受けました。ここに深く御礼申し上げます。私は短い期間でしたが米国 Washington University の J Evan Sadler 教授のもとに留学しました。Sadler 教授は 2018 年 12 月 13 日にお亡くなりになりました。ここに Sadler 教授よりいただきました多大なご支援に御礼申し上げるとともに、ご冥福をお祈り申し上げます。引用文献は誌面の制限から私たちの研究だけに留めました。

著者の利益相反(COI)の開示：

特許使用料(ペプチド研究所, カイノス, Peptide International)

文献

- Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, Okada H, Takeshita S, Sakata T, Kokame K, Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y: Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res* **124**: 14–18, 2009.
- Yin T, Takeshita S, Sato Y, Sakata T, Shin Y, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Kojima T, Madoiwa S, Sakata Y, Murata M, Ikeda Y, Miyata T: A large deletion of the PROS1 gene in a deep vein thrombosis patient with protein S deficiency. *Thromb Haemost* **98**: 783–789, 2007.
- Neki R, Fujita T, Kokame K, Nakanishi I, Waguri M, Imayoshi Y, Suehara N, Ikeda T, Miyata T: Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol* **94**: 150–155, 2011.
- 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* **133**: 914–918, 2014.
- 根木玲子, 宮田敏行: 不育症と先天性血栓性素因. *血栓止血誌* **27**: 339–348, 2016.
- 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.
- Miyata T, Maruyama K, Banno F, Neki R: Thrombophilia in East Asian countries: are there any genetic differences in these countries? *Thromb J* **14**: 25, 2016.
- Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Hayashi T, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T: Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* **107**: 1737–1738, 2006.
- Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T: Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol* **83**: 217–223, 2006.
- Kimura R, Sakata T, Kokubo Y, Okamoto A, Okayama A, Tomoike H, Miyata T: Plasma protein S activity correlates with protein S genotype but is not sensitive to identify K196E mutant carriers. *J Thromb Haemost* **4**: 2010–2013, 2006.
- Maruyama K, Akiyama M, Kokame K, Sekiya A, Morishita E, Miyata T: ELISA-based detection system for protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism. *PLoS ONE* **10**: e0133196, 2015.
- Miyoshi T, Oku H, Asahara S, Okamoto A, Kokame K, Nakai M, Nishimura K, Otsuka F, Higashiyama A, Yoshimatsu J, Miyata T: Effects of low-dose combined oral contraceptives and protein S K196E mutation on anticoagulation factors: a prospective observational study. *Int J Hematol* **109**: 641–649, 2019.
- Maruyama K, Akiyama M, Miyata T, Kokame K: Protein S K196E mutation reduces its cofactor activity for APC but not for TFPI. *Res Pract Thromb Haemost* **2**: 751–756, 2018.
- Banno F, Kita T, Fernández JA, Yanamoto H, Tashima Y, Kokame K, Griffin JH, Miyata T: Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying a protein S K196E mutation. *Blood* **126**: 2247–2253, 2015.
- 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.
- Miyata T, Iwanaga S, Sakata Y, Aoki N: Plasminogen Tochigi: inactive plasmin resulting from replacement of alanine-600 by threonine in the active site. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6132–6136, 1982.
- Tashima Y, Banno F, Kita T, Matsuda Y, Yanamoto H, Miyata T: Plasminogen Tochigi mice exhibit phenotypes similar to wild-type mice under experimental thrombotic conditions. *PLoS ONE* **12**: e0180981, 2017.
- Mitsuguro M, Sakata T, Okamoto A, Kameda S, Kokubo Y, Tsutsumi Y, Sano M, Miyata T: Usefulness of antithrombin deficiency phenotypes for risk assessment of venous thromboembolism: type I deficiency as a strong risk factor for venous thromboembolism. *Int J Hematol* **92**: 468–473, 2010.
- Kremer Hovinga JA, Coppo P, Lämmle B, Moake JL, Miyata

- T, Vanhoorelbeke K: Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nat Rev Dis Primers* **3**: 17020, 2017.
- 20) Matsumoto M, Fujimura Y, Wada H, Kokame K, Miyakawa Y, Ueda Y, Higasa S, Moriki T, Yagi H, Miyata T, Murata M; For TTP group of Blood Coagulation Abnormalities Research Team, Research on Rare and Intractable Disease supported by Health, Labour, and Welfare Sciences Research Grants: Diagnostic and treatment guidelines for thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) 2017 in Japan. *Int J Hematol* **106**: 3–15, 2017.
 - 21) Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, Tamai H, Konno M, Kamide K, Kawano Y, Miyata T, Fujimura Y: Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 11902–11907, 2002.
 - 22) Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, George JN: Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol* **144**: 742–754, 2009.
 - 23) Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, Yagi H, Kokame K, Soejima K, Murata M, Miyata T: Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost* **9 Suppl 1**: 283–301, 2011.
 - 24) van Dorland HA, Mansouri Taleghani M, Sakai K, Friedman KD, George JN, Hrachovinova I, Knöbl PN, von Krogh AS, Schneppenheim R, Aebi-Huber I, Bütikofer L, Largiadèr CR, Cermakova Z, Kokame K, Miyata T, Yagi H, Terrell DR, Vesely SK, Matsumoto M, Lämmle B, Fujimura Y, Kremer Hovinga JA; Hereditary TTP Registry: The International Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Registry: Key findings at enrolment until 2017. *Haematologica* 2019. doi: 10.3324/haematol.2019.216796. [Epub ahead of print]
 - 25) Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto 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* **2**: 240–244, 2014.
 - 26) Fan X, Kremer Hovinga JA, Shirovani-Ikejima H, Eura Y, Hirai H, Honda S, Kokame K, Taleghani MM, von Krogh AS, Yoshida Y, Fujimura Y, Lämmle B, Miyata T: Genetic variations in complement factors in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with renal insufficiency. *Int J Hematol* **103**: 283–291, 2016.
 - 27) 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 宮田敏行: ターゲット領域の異常を見逃さないゲノム定量 PCR 法の確立: ダイレクトシーケンシング法の弱点を補う解析方法として. *血栓止血誌* **25**: 615–618, 2014.
 - 28) Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T: VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood* **103**: 607–612, 2004.
 - 29) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T: FRET-S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* **129**: 93–100, 2005.
 - 30) Kokame K, Sakata T, Kokubo Y, Miyata T: von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population. *J Thromb Haemost* **9**: 1426–1428, 2011.
 - 31) Kokame K, Kokubo Y, Miyata T: Polymorphisms and mutations of ADAMTS13 in the Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost* **9**: 1654–1656, 2011.
 - 32) Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **107**: 3161–3166, 2006.
 - 33) Banno F, Kaminaka K, Soejima K, Kokame K, Miyata T: Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem* **279**: 30896–30903, 2004.
 - 34) Banno F, Chauhan AK, Kokame K, Yang J, Miyata S, Wagner DD, Miyata T: The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood* **113**: 5323–5329, 2009.
 - 35) 宮田敏行, 樋口(江浦)由佳, 杉本充彦: 血栓形成機序の新概念と次世代型抗血栓療法. *生化学* **89**: 333–342, 2017.
 - 36) Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, Kunizawa A, Irie K, Higuchi S, Nakano T, Muroi C, Fukushima H, Sugimoto M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Fujiwara M, Okuchi K, Nishio K: ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* **115**: 1650–1653, 2010.
 - 37) Doi M, Matsui H, Takeda H, 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**: 1236–1238, 2012.
 - 38) Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, Shima M, Banno F, Miyata T, Sugimoto M: Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. *Haematologica* **99**: e211–213, 2014.
 - 39) Urisono Y, Sakata A, Matsui H, Kasuda S, Ono S, Yoshimoto K, Nishio K, Sho M, Akiyama M, Miyata T, Okuchi K, Nishimura S, Sugimoto M: von Willebrand factor aggravates hepatic ischemia-reperfusion injury by promoting neutrophil recruitment in mice. *Thromb Haemost* **118**: 700–708, 2018.
 - 40) Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T: Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 19274–19279, 2009.
 - 41) 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**: 1399–1406, 2013.
 - 42) 秋山正志, 武田壮一, 小亀浩市, 高木淳一, 宮田敏行: VWF 切断酵素 ADAMTS13 のエキソサイト認識機構.

- 生化学 **82**: 950–956, 2010.
- 43) 宮田敏行, 井上徳光: 血栓と補体. 補体 **55**: 13–45, 2018.
 - 44) 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**: 238–246, 2013.
 - 45) Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T: Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: concentration of C3 p.I1157T mutation. *Int J Hematol* **100**: 437–442, 2014.
 - 46) Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirofuchi-Ikejima H, Uchida Y, Ohyama Y, Kokubo T, Fujimura Y: A novel quantitative hemolytic assay coupled with restriction fragment length polymorphisms analysis enabled early diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome and identified unique predisposing mutations in Japan. *PLoS ONE* **10**: e0124655, 2015.
 - 47) Matsumoto T, Toyoda H, Amano K, Hirayama M, Ishikawa E, Fujimoto M, Ito M, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Kawamura N, Ikejiri M, Kawakami K, Miyata T, Wada H: Clinical manifestation of patients with atypical hemolytic uremic syndrome with the C3 p.I1157T variation in the Kinki region of Japan. *Clin Appl Thromb Hemost* **24**: 1301–1307, 2018.
 - 48) Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, Nangaku M: Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin Exp Nephrol* **22**: 1088–1099, 2018.
 - 49) Miyata T, Uchida Y, Ohta T, Urayama K, Yoshida Y, Fujimura Y: Atypical haemolytic uraemic syndrome in a Japanese patient with DGKE genetic mutations. *Thromb Haemost* **114**: 862–863, 2015.
 - 50) Miyata T, Uchida Y, Yoshida Y, Kato H, Matsumoto M, Kokame K, Fujimura Y, Nangaku M: No association between dysplasminogenemia with p.Ala620Thr mutation and atypical hemolytic uremic syndrome. *Int J Hematol* **104**: 223–227, 2016.
 - 51) Kamide K, Kokubo Y, Yang J, Tanaka C, Hanada H, Takiuchi S, Inamoto N, Banno M, Kawano Y, Okayama A, Tomoike H, Miyata T: Hypertension susceptibility genes on chromosome 2p24–p25 in a general Japanese population. *J Hypertens* **23**: 955–960, 2005.
 - 52) Kokubo Y, Tomoike H, Tanaka C, Banno M, Okuda T, Inamoto N, Kamide K, Kawano Y, Miyata T: Association of sixty-one non-synonymous polymorphisms in forty-one hypertension candidate genes with blood pressure variation and hypertension. *Hypertens Res* **29**: 611–619, 2006.
 - 53) Tabara Y, Kohara K, Kita Y, Hirawa N, Katsuya T, Ohkubo T, Hiura Y, Tajima A, Morisaki T, Miyata T, Nakayama T, Takahashi N, Nakura J, Kawamoto R, Takahashi N, Hata A, Soma M, Imai Y, Kokubo Y, Okamura T, Tomoike H, Iwai N, Oghihara T, Inoue I, Tokunaga K, Johnson T, Caulfield M, Munroe P; Global Blood Pressure Genetics Consortium, Umemura S, Ueshima H, Miki T: Common variants in the ATP2B1 gene are associated with susceptibility to hypertension: the Japanese Millennium Genome Project. *Hypertension* **56**: 973–980, 2010.
 - 54) Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Tomoike H, Miyata T: Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res* **120**: 181–186, 2007.
 - 55) Nagatsuka K, Miyata S, Kada A, Kawamura A, Nakagawara J, Furui E, Takiuchi S, Taomoto K, Kario K, Uchiyama S, Saito K, Nagao T, Kitagawa K, Hosomi N, Tanaka K, Kaikita K, Katayama Y, Abumiya T, Nakane H, Wada H, Hattori A, Kimura K, Isshiki T, Nishikawa M, Yamawaki T, Yonemoto N, Okada H, Ogawa H, Minematsu K, Miyata T: Cardiovascular events occur independently of high on-aspirin platelet reactivity and residual COX-1 activity in stable cardiovascular patients. *Thromb Haemost* **116**: 356–368, 2016.
 - 56) Tanaka T, Yamagami H, Ihara M, Miyata T, Miyata S, Hama-saki T, Amano S, Fukuma K, Yamamoto H, Nakagawara J, Furui E, Uchiyama S, Hyun B, Yamamoto Y, Manabe Y, Ito Y, Fukunaga R, Abumiya T, Yasaka M, Kitagawa K, Toyoda K, Nagatsuka K: Association of CYP2C19 polymorphisms with clopidogrel reactivity and clinical outcomes in chronic ischemic stroke. *Circ J* **83**: 1385–1393, 2019.