

分担課題名:日本人の不育症におけるプロテイン Z と プロテイン Z 依存性プロテアーゼインヒビターの解析

研究分担者 一瀬 白帝 山形大学医学部 分子病態学講座 教授

研究要旨

妊娠期におけるプロテイン Z (PZ) 依存性タンパク質分解酵素インヒビター(PZ-dependent Protease Inhibitor; ZPI)と PZ の血中レベルの変動のメカニズム、それらが妊娠維持に果たす役割、意義を解明し、不育症の診断や予防に貢献するために、ZPI の新しいアッセイ系を開発した。また、本測定系を用いて、ZPI と PZ の血中レベルが妊娠期に上昇すること、非妊娠健常女性に比べて不育症では増加しないこと、子宮内胎児死亡例や抗リン脂質抗体症候群では PZ が有意に低値であることなどの事実を見出した。更に、遊離 ZPI(総 ZPI—PZ)を概算し、妊娠期や不育症であるのに拘らずほぼ一定であることなどを発見した。ZPIとPZは、更年期における女性ホルモン補充療法や卵巣摘出術の前後で変化しないことから、肝癌細胞培養系での検討結果とは異なり、エストロゲンとプロゲステロンなどホルモンの ZPIとPZ 産生への関与は否定的であり、ZPI と PZ の血中レベルの変動のメカニズムや妊娠維持に果たす役割、意義を更に追究する必要がある。

A. 研究目的

[目的と意義]

日本人におけるプロテイン Z(PZ)とプロテイン Z 依存性タンパク質分解酵素インヒビター(ZPI)の正常値を決定し、これらの妊娠における変動と不育症との関係を明らかにすることが目的である。本研究の実施により、それらの何れかの、あるいは両者の異常値が不育症の原因である可能性や不育症のマーカーになる可能性に結論が下され、臨床的に貢献するか否かを判定する。

[背景]

PZ は、肝臓で合成される偽セリンプロテアーゼであり、N 末端領域に γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基を有するビタミン K 依存性タンパク質の一つである。PZ は、血中では serpin ファミリーに属する ZPI との複合体として存在し、リン脂質上でカルシウム依存性に活性型 FX(FXa) を効果的に不活性化する。PZ と ZPI の血中濃度は個人差が大きい、その原因の一部はゲノムの塩基配列の多型に基づいており、少なくとも一部は実際に血漿 PZ レベルに影響を及ぼす。

当初、低 PZ 血症は出血に関与していると報告

されたが、FXa を不活性化するという PZ-ZPI 系の機能からは、両者の減少はむしろ血栓形成を促進すると推測される。事実、PZ 欠乏症例は虚血性脳血管障害の相対危険度が高いこと、急性冠症候群に相関することなどが報告されている。我々は、深部静脈血栓症や自然流産を繰り返した世界初の先天性 PZ 欠乏症(白人)の遺伝子変異を同定したが、これは Gla ドメイン内の Glu30 アミノ酸を Gln に置換し、変異タンパク質の細胞内輸送を障害するので、細胞外への分泌を阻害する。また、ZPI 遺伝子のナンセンス変異保持者は静脈血栓症のオッズ比が高いことも報告されている。このように、血中 PZ レベル低値と血栓症の関係は濃厚である。

妊娠中は凝固亢進状態にあるが、胎盤の血液循環は凝固・線溶のバランスの上に成り立っており、出血性素因である凝固 XIII 因子欠損症は反復性自然流産を、血栓傾向である抗凝固因子プロテイン C や S の欠損症も流産を合併する。従って、血栓症を惹起する低 PZ 血症も胎盤機能不全を惹起する可能性が高い。事実、欧米では、正常妊娠では血中 PZ 濃度が増加するのに対して、再発性流産、早期胎児死亡などの症例の一部は逆

に低値を示し、特に後者ではPZ欠乏の割合が高いという複数の報告がある。また、抗PZ抗体の存在が胎児死亡に関与しているという論文もある。これらには異論もあるが、最近、低PZ血症が早産や子癩に関与しているという報告、更に上述した遺伝的多型性は再発性流産に関係があるという論文が加わった。

また、PZはほぼ全てZPIと結合して複合体として血中に存在するが、ZPIの一部は遊離型として単独で存在する。因みに、PZ-ZPI複合体は活性型X因子を、遊離ZPIは活性型XI因子を阻害することが知られている。従って、妊娠期の抗凝固状態の変動を理解する為には、PZ-ZPI複合体と遊離ZPIの濃度やバランスを知ることが必要である。

ところが、我が国では、妊娠合併症と血中PZ濃度との関係はおろか、正常妊娠、更に健常人における正常値さえ決定されていないので、日本人独自の解析が不可欠である。

B. 研究方法

(1) 対象と検体

本研究は、山形大学及び名古屋市立大学、富山大学の倫理委員会の承認を得て実施された。文書によるインフォームドコンセントが得られた、生殖年齢にある正常非妊娠女性(n=42)、正常妊婦(n=32)および不育症症例(n=146)を対象とした。対象者の肘静脈からクエン酸採血を行い、遠心して血漿を得た。周産期におけるPZおよびZPIの変動を追跡するため、同一症例の妊娠初期(6~12週)、中期(20~25週)、後期(30~37週)および産褥期に採血を行った。

(2) PZのELISAによる測定測定方法

PZの抗原量は、特異抗体を用いたサンドイッチELISA法にて測定した[ZYMUTEST Protein Z (Hyphen BioMed社)]。抗ヒトPZ抗体固相化済みのELISAプレートに希釈した血漿検体を注入して、2時間インキュベートした。その後各ウェルを洗浄し、抗原検出用抗体(ペルオキシダーゼ標識ヒツジ由来抗PZ抗体)を加え、1.5時間インキュベートした。5回洗浄した後に、3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を加え、15-20分反応を行った後に、希硫酸を加えて反応を停止し、450nmの吸光度をプレート

リーダーにて測定した。

(3) 組換えZPIの哺乳類細胞と昆虫細胞での発現

新しいZPIのアッセイ系を開発し、標準タンパク質として用いる為に必要な組換えタンパク質を発現する細胞株を樹立した。DsRedタグとの融合ZPI cDNAをBHK細胞に一過性に導入し、無血清培地で24時間インキュベートした後に回収した培地および細胞溶解物を、抗ZPIポリクロナール抗体MQ-126(共同研究者より供与されたもの)あるいはH-137(市販のもの)を用いたウエスタンブロットにより解析した。

安定発現株を樹立する為に、BHK細胞にZPI発現ベクターを導入後G418で選別し、得られたクローンの培養上清を抗ZPI抗体MQ-126を用いてウエスタンブロット解析によりスクリーニングした。次に、株化したZPI安定発現BHK細胞の培養上清90 mLから75%硫酸で沈殿したタンパク質を透析脱塩後、Heparin-Sepharoseカラム(0.5 mL)にアプライした。0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.4)で洗浄後、0.1-1 Mリン酸緩衝液の濃度勾配で吸着タンパク質を溶出した。

バキュロウイルス発現系でより大量の組換えタンパク質を得る為に、組換え型ウイルスを製作した。組換えウイルスをSf21細胞に感染後、3日間血清フリー培地で培養して培地を回収し、抗ZPI抗体MQ-126を用いてウエスタンブロット解析を行った。

(4) ヒト血漿からのZPIタンパク質精製の検討

Hanらによって報告されている精製手順(Proc Natl Acad Sci USA, 1998)を参考にして、Step 1: クエン酸バリウム沈殿によるビタミンK依存性タンパク質の除去

Step 2: 硫酸分画(45-75%画分)

Step 3: ポリエチレングリコール(PEG)分画(7.5~18%画分)

Step 4: 陽イオン交換クロマトグラフィー(Phosphocellulose)

Step 5: ヘパリンセファロース

について、一部のステップを組み合わせて別々に実施し、精製効率の検討を行った。

Step 3については、ヒト凍結血漿10 mLをクエン酸バリウム吸着後、上清について硫酸分画を行った。沈殿を10 mLの20 mM Tris (pH

7.5), 150 mM NaCl, 1 mM diisopropylfluorophosphate (DFP)に溶解した。次に、各硫酸画分に PEG を添加して分画した。沈殿は 5 mL の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4), 1 mM DFP に溶解した。Step 4 については、90 mL の凍結血漿をバリウム吸着後、30-75%硫酸画分、7.5-18% PEG 画分を順次回収し、40 mL の 0.1% Tween 20, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4), 1 mM DFP に溶解したものを Phosphocellulose P-11 (15 mL) を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。20~500 mM リン酸緩衝液の濃度勾配にて吸着タンパク質を溶出した。Step 5 については、Phosphocellulose 画分 (6-10)を 0.1% Tween 20 で3倍に希釈後、Heparin-Sepharose カラム (4 mL) にアプライした。20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4)で洗浄後、20~500 mM リン酸緩衝液の濃度勾配にて吸着タンパク質を溶出した。各精製のステップの前後で、ZPI を抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 を用いたウエスタンブロットにより検出した。

(5) ELISA によるヒト血漿の ZPI タンパク質量測定

抗 ZPI ポリクロナール抗体 (MQ-126)を固相化した 96 穴プレートに、2% BSA で 200 倍に希釈した血漿 0.1 ml を入れて、4 時間反応した。血漿を除去後 Tween-TBS で5回洗浄し、ビオチン標識抗 ZPI ポリクロナール抗体 (MQ-191) 希釈液 (1:1,000) 0.1 ml を加えて 2 時間反応させた。Tween-TBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン希釈液 (1:1,000) を入れて 1 時間反応した。Tween-TBS で洗浄後、TMB を反応させ、希硫酸にて反応を停止した後、450 nm の吸光度を測定した。BHK 細胞にヒト ZPI cDNA を安定導入し発現、部分精製した組換え体 ZPI を標準物質として測定し、濃度を算出した。

(6) RT-PCR による PZ および ZPI 発現量の解析

ヒト由来肝癌細胞株 HepG2 を用いてエストラジオールおよびプロゲステロン添加時における PZ および ZPI の発現への影響について調べた。エストラジオールおよびプロゲステロンは 1 μ g/mL 濃度で培養液に添加し、48 時間後に RNA を抽出し発現の変化を調べた。HepG2 よりの RNA の抽出は、グアニジンチオシアネート

法を用い、オリゴ(dT)20 プライマーおよび M-MLV 逆転写酵素を用いて逆転写を行った。得られた cDNA および PZ, ZPI および GAPDH の特異プライマーを用いて PCR をおこない各成分の発現を調べた。用いたプライマーは下記の通りである。

PZ センス:

5' -CACCGGATCTACAGGACCTC-3'

PZ アンチセンス:

5' -CATGGACGTGCGTTATCTTG-3'

ZPI センス:

5' -CATGGAGAAAATGGGTGACC-3'

ZPI アンチセンス:

5' -AGTGCCCCTTTCATCAACTTC-3'

GAPDH センス:

5' -CATCACCATCTTCCAGGAGC-3'

GAPDH アンチセンス:

5' -TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG-3'

PZ, ZPI および GAPDH はそれぞれ、28, 25, および 18 サイクルの PCR を行った後に、PCR 産物を 2.0%アガロースゲル泳動にて検出した。デンシトメーターを用いて各バンドの濃さを半定量的に測定した。

(7) PZ 発現調節のルシフェラーゼアッセイによる解析

プロゲステロンが PZ の発現に寄与する機構を明らかにするため、PZ 遺伝子の 5' -上流領域(-3058/+11)を挿入した pGL3-basic ルシフェラーゼベクターを用いてルシフェラーゼ活性測定をおこなった。10 μ g のレポーターベクターおよび β ガラクトシダーゼベクターを 3×10^5 個の HepG2 細胞にトランスフェクトし、24 時間培養した後に 1 μ g/mL の濃度となるようプロゲステロンを添加し、48 時間後にルシフェラーゼアッセイに供した。

得られたデータは、正規性の検定および F 検定の後に、Student's t-test あるいは Welch's t-test を用いて有意差検定を行った。

(8) 統計解析法

各検体を3回ずつ測定し、統計ソフト JMP6.0 を用いて各統計解析を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究の組換えDNA実験については山形大学遺伝子組換え実験安全委員会の、臨床研究については山形大学医学部倫理委員会の審議と承認を得て行った。血液検体は、共同研究者が対象者の同意書を得て採取した。

C. 研究結果

(1) 組換え ZPI の哺乳類細胞及び昆虫細胞での発現

抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 によって、DsRed 融合 ZPI が約 80 kDa の位置にウエスタンブロットで培養上清中に検出された。別の抗 ZPI 抗体 H-137 を用いたウエスタンブロットでも、DsRed 融合 ZPI が約 80 kDa の位置に検出されたが、やや感度は低かった。これにより、哺乳動物細胞発現系で分泌型組換え ZPI タンパク質を発現することが可能であることが確認された。次に、安定発現細胞株を樹立して、組換えタンパク質をより多く発現するクローンを得た。組換え ZPI は、0-45%より 0-75%硫安分画に多く、0-20%より 0-10%PEG 分画に多く得られた。Heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィーでは、組換え ZPI はフラクション 4-7 に溶出された。

単離した組換えバキュロウイルス (rbvZPI) を感染させた Sf21 細胞の培地を回収し、抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、分子量約 58kDa と哺乳類細胞で発現した組換え ZPI よりやや小さかった。これは、昆虫細胞では、炭水化物付着部位に糖の付加がされていないためと思われる。

(2) ヒト血漿からの ZPI タンパク質精製

硫安分画では、0-45%、45-75%の両分画に ZPI タンパク質が現れ、Han らの報告と異なり 0-45%により多く得られた。PEG 分画では、0-7.5%、7.5-17.5%の両分画に ZPI タンパク質が現れ、0-7.5%により多く得られた。Phosphocellulose P-11 (15 mL) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーでは、フラクション 7-10 に ZPI タンパク質が溶出された。Heparin-Sepharose クロマトグラフィーでは、フラクション 6-8 に ZPI タンパク質が溶出された。ただし、フラクション 4, 5 にも大量のアルブミンの干渉を受けたと思われるバンドの痕跡が認められた。

(3) プロテイン Z (PZ) 依存性プロテアーゼインヒビター (ZPI) の ELISA による測定システムの開発

ヒト ZPI cDNA を培養細胞に導入して組み換えタンパク質を産生させ、ELISA システムの標準物質として用いて絶対濃度を決定した。

(4) 日本人健常対照の血中 ZPI 及び PZ 濃度の測定とドイツ人との比較

平均年齢 34 歳の健康な非妊娠日本人女性において ZPI 濃度を測定したところ、平均年齢 28 歳の健康な非妊娠ドイツ人女性より有意に低かった。PZ 濃度も、ドイツ人女性より低い傾向にあった。年齢による ZPI と PZ の変化はなかったため、平均年齢の違いによるものではない。

(5) 血中 ZPI 及び PZ 濃度の関係

血中では全ての PZ が ZPI と結合していることが知られており、両者の濃度に相関があることが報告されているので、非妊娠日本人女性のデータを統計的に解析したところ、有意な相関が認められた。これは、非妊娠ドイツ人女性においても同様であった。

(6) 日本人の正常妊娠における ZPI 及び PZ 濃度の変動

日本人正常妊娠女性において ZPI 及び PZ 濃度を測定したところ、非妊娠女性よりも妊娠初期の ZPI は高く、初期よりも中期、中期よりも後期と有意に増加し、産褥期には有意に低下した。一方、PZ 濃度は、妊娠初期は非妊娠女性と有意差はなかったが、中期は初期より有意に高くなり、後期は更に増加して、産褥期には有意に低下した。

(7) ZPI 及び PZ 濃度とホルモンの関係

妊娠に伴って増加するエストロゲンとプロゲステロンが ZPI 及び PZ 濃度に影響を与えている可能性が高いので、日本人更年期女性においてホルモン補充療法開始前後で測定したところ、両抗凝固タンパク質濃度に有意な変化は認められなかった。

(8) 不育症における ZPI 及び PZ 濃度

日本人の不育症において ZPI 及び PZ 濃度を測定したところ、健常非妊娠女性と有意差はなく、全ての正常妊娠期間の値よりも有意に低かった。

(9) 正常妊娠と不育症における遊離 ZPI 濃度と PZ/ZPI 比

新開発したELISAシステムがZPI絶対濃度を定量することを可能にしたので、遊離ZPI濃度を算出して比較したところ、全妊娠期間中一定レベルであった。不育症においても、正常な非妊娠女性との差はなかった。一方、不育症のPZ/ZPI比は正常妊娠の中期と後期と比較すると有意に低かった。これは、正常妊娠の中期と後期においてZPIよりPZの増加が大きいことを反映している。

妊娠により両抗凝固タンパク質は増加するのに拘らず不育症では増加しないので、今後、別の抗凝固タンパク質であるプロテインSとの関係を解析する必要がある。

(10) PZ および ZPI の発現量に対するエストラジオールおよびプロゲステロンの影響

PZ および ZPI のエストラジオールおよびプロゲステロンによる発現の変化を調べたところ、PZ は、エストラジオールの添加では有意な発現の増加が見られなかったが、プロゲステロンの添加により有意に発現が亢進した($p < 0.05$)。エストラジオールとプロゲステロンを同時に添加すると、更に発現が亢進する傾向が見られた。一方、ZPI は、エストラジオールおよびプロゲステロンを添加しても、その発現に有意な差が見られなかった。

(11) PZ 遺伝子発現に対するエストラジオールおよびプロゲステロンの影響

ルシフェラーゼアッセイの結果でも、RT-PCRと同様に、PZ 遺伝子を導入した細胞をプロゲステロンで処理すると有意に発現活性が亢進することが観察された ($p < 0.005$)。一方、エストラジオール添加では有意な差は見られなかった。

D. 考察

本研究の主な成果は、以下の3点である。

ZPI の組換えタンパク質の生合成に成功し、これを検出する特異的抗体も確認したので、新ELISAアッセイ系の開発に成功した。

我が国における血漿PZ、ZPIのレベルの測定を初めて実施し、白人との違いがある可能性、妊娠時に増加するという事実、不育症では増加しないという知見を得た。

なお、少数例ではあるが、子宮内胎児死亡例(5

例)や抗リン脂質抗体症候群(12例)ではPZが有意に低値であった。更に症例数や対象疾患を増やして各種の病態にZPIとPZの果たす役割を追究し、意義やZPIとPZの血中レベルの変動のメカニズムを解明する必要がある。

哺乳動物細胞発現系及びバキュロウイルス発現系の両者で、組換えZPIタンパク質を発現することが可能であることが確認された。昆虫細胞で発現された組換えZPIのバンドの分子量は約58kDaと哺乳類細胞で発現されたものよりやや小さかったが、炭水化物付着部位に糖の付加がないためと思われる、このバンドは目的のZPIタンパク質であることを示していると考えられた。

さて、PZと同様にZPIの測定値を濃度としてmg/mL(質量/容量)で表現し、不育症における遊離ZPI(総ZPI-PZ)の意義を検討するためには、既知の量のZPIが必要であり、これを標準物質として各個人の血中濃度を校正しなければならない。そこで、まず、組換えZPIタンパク質を発現する哺乳類細胞安定株を樹立した。多くの種類のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を詳細に検討し、特異性と感受性を共に満足するものを選択し、新しい定量方法を開発した。この方法により、総ZPI量からPZ量を差し引いて、遊離ZPI量を概算することが可能になった。

総ZPI量は、PZ量に先駆けて妊娠初期から増加し、分娩後1週間で非妊娠正常健常者のレベルに低下する。総ZPI量はPZ量と同様不育症では増加せず、遊離ZPI量も周産期、不育症でほぼ一定であった。妊娠に伴って総ZPI量とPZ量が増加するので、更年期を過ぎた女性で、女性ホルモン製剤を服用している症例と服用していない症例で、PZ、ZPIレベルを測定したが、明らかな変化は認められなかった。また、病変卵巣を外科的に摘出した症例と保存的に治療した症例において、治療前後のPZ、ZPIレベルを比較したが、後述する肝癌細胞培養系での検討結果とは異なり、卵巣ホルモンの影響は認められなかった。ホルモン以外の、例えばサイトカインなどの影響を今後は追究する必要がある。

本研究により、ZPIとPZの血中レベルが妊娠期に上昇すること、不育症においては不変であることが発見されたが、その正常妊娠における生理

的意義、不育症における因果関係は不明であり、妊娠時に増加する両遺伝子の発現調節機構も全く解明されていない。

両者を発現する肝癌細胞の培養系で、エストロゲンとプロゲステロンの影響を調べたところ、プロゲステンによって PZ 遺伝子の発現が有意に増加すること、ZPI 遺伝子の発現は不変であることが判明した。ただし、本実験系では肝癌細胞株を用いて、かつ過剰量のホルモンを投与しているので、必ずしも生体内の両遺伝子の発現状態を反映しているとは言えない。

E. 結論

不育症の原因の一部として重要な凝固異常の実態が明らかになりつつある。特に、正常日本人女性の血中 ZPI 及び PZ 濃度を決定したこと、不育症では ZPI 濃度が増加しないことは、本研究による新知見である。抗凝固系の持続的機能低下も胎盤循環不全に関与しているので、他の原因が同定されない症例では両抗凝固タンパク質を測定して、必要に応じて抗凝固療法を行うという新しい道を拓くことが期待される。

不育症の原因の全てが解明されているとは言いがたく、症例とその家族の苦痛はいまだ除かれてはいない。不育症に関連している候補因子を一つ一つ解析して、分子機序を解明して、治療法を確立し、国民にお知らせすることにより、症例とその家族に希望を持って頂くことが可能になる。ZPI 及び PZ の研究は、その長い階段の一段である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Souri M, Iwata H, Zhang WG, Ichinose A: Unique secretion mode of human protein Z: Its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. *Blood* 2009, 113(6): 3857-3864.
 - 2) 一瀬白帝: 不育症と凝固 XIII 因子. *日本血栓止血学会誌*, 2009; 20(5): 519-526.
 - 3) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝: ヒト protein Z の分泌様式. *血液・腫瘍科*, 2010; 60(2): 183-91.
 - 4) 惣宇利正善: ヒト protein Z の独特な分泌様式: GLA ドメインによる非効率、ビタミン K 依存性かつワーファリン感受性な分泌. *日本血栓止血学会誌*, 2010; 21(3): 327-33.
 - 5) 一瀬白帝: 血液凝固と凝固制御. *臨床検査*, 2011; 印刷中
- ### 2. 学会発表
- 1) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: 分泌型ルシフェラーゼを用いたビタミン K 依存性タンパク質分泌メカニズムの解析. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪; 2008 年 11 月 20-22 日
 - 2) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: γ -グルタミルカルボキシラーゼはビタミン K 依存性タンパク質の Cargo receptor である. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸; 2008 年 12 月 9-12 日
 - 3) 岩田宏紀, 杉浦真弓, 一瀬白帝: 正常妊娠と不育症におけるプロテイン Z およびプロテイン Z 依存性プロテアーゼインヒビターの動態. 第 9 回 TTM フォーラム学術集会, 東京: 2009 年 3 月 7 日
 - 4) 岩田宏紀, 杉浦真弓, 一瀬白帝: 妊娠および不育症におけるプロテイン Z およびプロテイン Z 依存性プロテアーゼインヒビターの動態. 第 32 回日本血栓止血学会学術集会, 北九州; 2009 年 6 月 4-6 日
 - 5) Souri M, Iwata H, Zhang WG, Nakagaki T, Ichinose A: γ -Glutamyl carboxylase is a cargo receptor for vitamin K-dependent proteins. XXII International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Congress with 55th Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting, July 11-16, 2009, Boston, MA, USA
 - 6) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: 翻訳後修飾反応を触媒する γ -グルタミルカルボキシラーゼは基質タンパク質の細胞内輸送における積荷受容体として働く. 第 17 回山形分子生物学セミナー, 鶴岡; 2009 年 12 月 16 日
 - 7) 一瀬白帝: 血栓止血に関わる最近の話題. VTE Protection Seminar in MIYAGI 2010 特別講演, 仙台; 2010 年 1 月 29 日

- 8) 惣宇利正善, 張 偉光, 岩田宏紀, 一瀬白帝: Unique secretion mode of human protein Z: its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 ISTH 2011 Memorial Award, 鹿児島; 2010 年 4 月 22-24 日
- 9) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝: ヒト Protein Z のユニークな分泌様式. 第 6 回麒麟塾, 東京; 2010 年 6 月 5 日
- 10) 惣宇利正善, 杉浦真弓, 齋藤 滋, 吉田隆之, 倉智博久, Bettina Kemkes-Matthes, Joost Meijers, 一瀬白帝: プロテイン Z 依存性タンパク質分解酵素インヒビターの新しい測定法の開発と周産期、不育症、更年期、卵巣摘出術における検討. 第 11 回 TTM フォーラム学術集会, 東京: 2011 年 3 月 5 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

山形大学に以下の発明届を提出して手続き中である。

プロテイン Z(PZ)依存性プロテアーゼインヒビター(ZPI)とPZのELISAによる測定値を用いたフリーZPIおよびPZ/ZPI比の決定法(2010年8月)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Souri M, Iwata H, Zhang WG, <u>Ichinose A:</u>	Unique secretion mode of human protein Z: Its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion.	Blood	113(6)	3857-3864	2009
<u>一瀬白帝</u>	不育症と凝固XIII因子.	日本血栓止血学会誌	20(5)	519-526.	2009
惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, <u>一瀬白帝</u>	ヒトprotein Zの分泌様式.	血液・腫瘍科	60(2)	183-191	2010
惣宇利正善	ヒトprotein Zの独特な分泌様式: GLAドメインによる非効率、ビタミンK依存性かつワーファリン感受性な分泌.	日本血栓止血学会誌	21(3)	327-333	2010
<u>一瀬白帝</u>	血液凝固と凝固制御.	臨床検査			2011 in print