

## B. 研究方法

前年度はエネルギー依存性に活性化状態のキメラインテグリン  $\alpha\text{IIb}\alpha6\text{B}\beta3$  ( $\alpha\text{IIb}$  鎖の細胞内領域のみを  $\alpha6\text{B}$  の同領域で置換)を発現する CHO 細胞株を樹立し、化学変異原 (EMS) の暴露により  $\alpha\text{IIb}\alpha6\text{B}\beta3$  が非活性化状態となるクローン細胞を獲得した。本年度は得られたクローン細胞を用いて以下の手順で実験を行った。クローン細胞への cDNA ライブラリー (大阪大学微生物研究所、前田博士より分与) の導入はエレクトロポレーションにより行った。導入3日後に活性化したインテグリン  $\alpha\text{IIb}\beta3$  を特異的に認識するモノクローナル抗体 (PAC-1) を用いてフローサイトメトリーを行い、PAC-1 が結合した細胞分画を分取した。分取した細胞は可溶化しプラスミドを回収した。回収したプラスミドは大腸菌に導入し増幅した後、再びクローン細胞にトランスフェクションした。次に、PAC-1 を用いたフローサイトメトリーを前回と同様に行った。この一連のステップを数回繰り返して、陽性プラスミドを濃縮した。濃縮したプラスミドから目的遺伝子をクローニングするため、プラスミドを導入した大腸菌を用いてプレート上にコロニーを作成し、約 1000 個の単一コロニーから陽性プラスミドのスクリーニングを行った。

## C. 研究成果

活性化状態の血小板キメラインテグリン  $\alpha\text{IIb}\alpha6\text{B}\beta3$  を発現する CHO 細胞に、ゲノムワイドに変異を導入し、不活性型となる  $\alpha\text{IIb}\alpha6\text{B}\beta3$  を発現する細胞をクローン化した。次に、クローン細胞を用いて発現クローニングを行い、インテグリンの活性化にかかわる遺伝子を1つ同定した。発現クローニングに用いたクローン細胞において、同定した遺伝子の配列を解析し、変異を確認した。

## D. 考察

同定した遺伝子がインテグリン活性化のシグナル伝達経路に必須であることを明らかにするため、遺伝子ノックダウンによる解析が必要と考える。また、新たな遺伝子を同定すべく発現クローニングを引き続き行う予定である。

## E. 結論

インテグリンの活性化にかかわる遺伝子を1つ同定した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文

1. 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* 2006; 107(8):3161-3166.
2. 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* 2006; 107(4):1737-1738.
  3. Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Sakata T, Nagura J, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Sato K, Tomoike H, Miyata T: Polymorphisms in vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in general population. *Int J Hematol* 2006; 84(5):387-397.
  4. Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kamae T, Ujiie H, Honda S, Miyata S, Ijiri Y, Yamamoto J, Maeda N, Funahashi T, Kurata Y, Shimomura I, Tomiyama Y, Kanakura Y: Adiponectin Acts as an Endogenous Antithrombotic Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(1):224-230.

## 学会発表

1. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: ADAMTS13-deficient mice have potential risks for thrombosis but do not spontaneously develop thrombotic thrombocytopenic purpura. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
2. 石川淳子、木村利奈、本田繁則、川崎富夫、末久悦次、辻 肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田 満、竹下 聡、池田康夫、宮田敏行、「日本人静脈血栓症における関連遺伝子の変異解析」、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
3. 富山佳昭、加藤 恒、柏木浩和、白鹿正通、田所誠司、釜江 剛、秋山正夫、宮田茂樹、本田繁則、山本順一郎、倉田義之、船橋 徹、下村伊一郎、金倉 讓: アディポネクチンの抗血栓作用、第43回日本臨床分子医学会学術集会、平成18年7月20日、札幌市
4. 白鹿正通、釜江 剛、秋山正夫、田所誠司、柏木浩和、本田繁則、富山佳昭、倉田義之、金倉 讓: インテグリン  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化における P2Y<sub>12</sub> の重要性 - 巨核球系細胞株 CMK を用いた解析、第68回日本血液学会総会・第48回

日本臨床血液学会総会 合同開催、平成  
18年10月6日、福岡市

5. 釜江 剛、富山佳昭、清井映男、田所  
誠司、本田繁則、秋山正夫、白鹿正通、  
柏木浩和、倉田義之、金倉 譲: 本邦  
における血小板無力症の遺伝子異常:  
第68回日本血液学会総会・第48回  
日本臨床血液学会総会 合同開催、平成  
18年10月6日、福岡市
6. 白鹿正通、釜江 剛、秋山正夫、田所  
誠司、柏木浩和、本田繁則、倉田義之、  
富山佳昭、金倉 譲: 培養巨核球にお  
けるインテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  活性化は一過

性である: 第29回日本血栓止血学会  
学術集会、平成18年11月16日、  
宇都宮市

7. 秋山正夫、柏木浩和、白鹿正通、田所  
誠司、釜江 剛、本田繁則、倉田義之、  
富山佳昭、金倉 譲: Semaphorin 3A は  
PI3 kinase 系を介して血小板機能を抑  
制する: 第29回日本血栓止血学会学  
術集会、平成18年11月16日、宇  
都宮市

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等 研究事業）  
血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と  
その成果を用いた予防と治療の個別化

分担研究報告書

血栓性血小板減少性紫斑病の新規原因遺伝子変異の同定

分担研究者 小 亀 浩 市 国立循環器病センター研究所 室長

研究要旨

特定疾患の一つである血栓性血小板減少性紫斑病（thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP）は、血漿中の異常高分子量フォンビルブランド因子（von Willebrand factor, VWF）が過剰な血小板凝集を引き起こすことで発症する。異常高分子量 VWF が血漿中に生じる主な原因は、VWF 切断酵素である ADAMTS13 の活性低下である。我々はこれまで、先天性 TTP 患者家系の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、活性低下をもたらす遺伝子変異を多数同定してきた。本研究では、日本人一般住民における ADAMTS13 遺伝子の多型を探索した。その結果、アレル頻度 1%以上の多型が 25 個同定され、このうちミスセンス多型は、T339R、Q448E、P475S、P618A、S903L、G1181R の 6 個であった。TTP 患者の遺伝子解析の結果を解釈する上で有益な参考情報となる。今後、ADAMTS13 の遺伝子多型と活性あるいは種々の疾患との関連を明らかにすることが重要である。

A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病（thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP）は、血小板減少と細小血管障害性溶血性貧血を主徴とする重篤な全身性疾患であり、しばしば腎機能障害、動揺性精神神経症状、発熱を併発する。常染色体劣性遺伝を示

す先天性（家族性、遺伝性）の症例と、孤発的に現れる後天性の症例が存在する。

正常な止血反応の一部である血小板凝集において、血漿タンパク質フォンビルブランド因子（von Willebrand factor, VWF）は重要な役割を果たす。VWF は

主に血管内皮細胞で合成され、分泌直後には数十個のVWFポリペプチド鎖が互いに共有結合した超高分子量ホモマルチマーを形成している。VWFマルチマーの重合度が大きいほど、すなわち分子量が大きいほど、その血小板凝集活性は高い。

今から約20年前、TTP患者の血漿に異常高分子量のVWFが存在することが明らかにされた。この異常高分子量VWFは種々の臓器の細小血管で過剰な血小板凝集を起こすため、全身性の症状をもたらす。2001年、高分子量VWFを適度に切断して血小板凝集活性を調節する酵素ADAMTS13が同定された。つまり、ADAMTS13の活性欠如がTTPの主因であることが明らかになった。

我々は、奈良県立医科大学輸血部と共同で、日本における先天性TTP患者家系のADAMTS13遺伝子を解析し、原因変異を同定するとともに、それらのVWF切断酵素活性に対する影響を調べてきた。これまで21家系の解析で、20個のミスセンス変異（I178T, R193W, G227R, H234R, H234Q, R268P, Y304C, R312C, C322G, T323R, F324L, R349C, G385E, C508Y, G525D, G550R, A606P, I673F, C908Y, R1123C）、4個のナンセンス変異（Q449X, Q929X, R1206X, Q1302X）、3個のフレームシフト変異

（372insGT, 3198delCT, 3220delTACC）、3個のスプライシング変異（414+1G>A, 686+1G>A, 1244+2T>G）を同定した。これらのうち一部の変異については、組換えタンパク質の発現実験を行い、ADAMTS13の分泌異常や機能損失をもたらすことを明らかにした。しかしながら、患者に見つかった変異が発症の原因になっているか否かを判断する際に、その変異が一般人口において高頻度に存在するのか、あるいは稀有害な変異であるのかを併せて考慮する必要がある。

そこで本研究では、日本人一般住民におけるADAMTS13遺伝子の多型を詳細に探索し、さらにその頻度を明らかにすることを目的とした。その成果により、TTP患者の遺伝子解析結果を正しく解釈できるようになり、さらに遺伝子多型と活性との関連や、他の疾患との関連を調べることが可能になる。

## B. 研究方法

一般住民の末梢血液から調製されたゲノムDNAを鋳型にして、ADAMTS13遺伝子のプロモーター領域および全エキソン領域（エキソンとイントロンの境界周辺を含む）をPCR法にて増幅後、直接シーケンシング法を行って塩基配列を決定した。

[倫理面への配慮] 本研究の実施は、試

料採取施設および国立循環器病センターの倫理委員会で承認された。遺伝子解析研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日）」を遵守して行った。

### C. 研究成果

346 人の ADAMTS13 遺伝子をシーケンシング解析した結果、アレル頻度 1% 以上の多型が 25 個同定された。いずれも 1 塩基多型（single nucleotide polymorphism, SNP）であった。遺伝子領域による内訳は、プロモーター領域に 2 個、エクソンに 10 個、イントロンに 13 個で、25 個のうち 11 個は高い連鎖不平衡を示す 4 群に分類された。エクソンに同定された 10 個はいずれもタンパク質コーディング領域に位置しており、アミノ酸残基レベルで変異を伴うミスセンス変異が 6 個含まれていた。

6 個のミスセンス多型は、T339R（アレル頻度 2.9%）、Q448E（19.4%）、P475S（5.6%）、P618A（2.9%）、S903L（5.9%）、G1181R（2.0%）であった。このうち T339R と P618A は、346 人中、同じ 20 人にヘテロ接合体として見出されたため、ほぼ 100% の確率で連鎖しているミスセンス多型と考えられた。

一方、頻度の低い変異として、ミスセンス変異 R59H（アレル頻度、0.1%）と

ナンセンス Q773X（0.1%）が見出された。いずれも、346 人中 1 人にヘテロ接合体として見出されたため、多型というより稀有な変異であると考えられた。これらが ADAMTS13 の影響を及ぼすか否か、現在のところ不明である。

### D. 考察

本研究で見出された 6 個のミスセンス多型のうち、Q448E は ADAMTS13 活性に大きな影響を与えないこと、P475S は活性を減少させることがこれまでの我々の研究で示唆されている。今回新たに同定された 4 個のミスセンス変異（T339R、P618A、S903L、G1181R）が ADAMTS13 の機能にどのような影響を及ぼすか、今後検討すべき重要課題である。

本研究の成果により、TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析の結果解釈がより正確にできるようになった。つまり、患者に同定された変異が一般住民に見出されない稀有な変異であれば、それが TTP 発症の原因である可能性がきわめて高いと判断できる。一方、患者に同定された変異が一般住民にも高頻度に存在する多型であれば、TTP 発症の直接の原因になっていない可能性が高いと解釈できる。今回同定された 6 個のミスセンス多型（T339R、Q448E、P475S、P618A、

S903L, G1181R) は、先天性 TTP の原因変異から除外すればよいと考えられる。

また本研究では、一般住民 346 人中 2 人に、それぞれ R59H、Q773X という変異が見つかった。現在のところ直接的証拠はないが、これまでの知見から、特に Q773X 変異は ADAMTS13 の活性を損失させる可能性が高い。したがって、346 人に 1-2 人の割合で、活性のない ADAMTS13 遺伝子の保有者が存在すると仮定すると、日本人約 12-50 万人に 1 人の割合、つまり日本人全体で約 300-1000 人のホモあるいは複合ヘテロ接合体 ADAMTS13 遺伝子変異保有者が存在すると算出される。奈良県立医科大学輸血部には ADAMTS13 の先天的欠損による TTP 患者の情報が日本全国から集積されているが、その 10 倍を超える人数の先天性 ADAMTS13 欠損症者がまだ発見されずにいることになる。ADAMTS13 欠損症は TTP 発症の最大の危険因子である。TTP 様の症状が認められた場合は、迅速に血漿 ADAMTS13 活性あるいは抗原量を測定することが重要である。

#### E. 結論

日本人一般住民 346 人の ADAMTS13 遺伝子解析により、アレル頻度 1%以上の多型が 25 個同定された。うち、ミス

センス多型は、T339R、Q448E、P475S、P618A、S903L、G1181R の 6 個であった。TTP 患者の遺伝子解析の結果解釈において有益な情報となる。これら ADAMTS13 遺伝子多型と活性あるいは種々の疾患との関連を明らかにすることは今後の重要課題である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文

1. 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* 2006; 107(8):3161-3166.
2. Nogalska A, Engel WK, McFerrin J, Kokame K, Komano H, Askanas V: Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein (Herp) is up-regulated in sporadic inclusion-body myositis and in endoplasmic reticulum stress-induced cultured human muscle fibers. *J Neurochem* 2006; 96(5):1491-1499.
3. Shibagaki Y, Matsumoto M, Kokame K, Ohba S, Miyata T, Fujimura Y, Fujita T: Novel compound heterozygote mutations (H234Q/R1206X) of the ADAMTS13 gene in an adult patient with Upshaw-Schulman syndrome

- showing predominant episodes of repeated acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(5):1289-1292.
4. Hendriksen PJM, Dits NFJ, Kokame K, Veldhoven A, van Weerden WM, Bangma CH, Trapman J, Jenster G: Evolution of the androgen receptor pathway during progression of prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66(10):5012-5020.
  5. Abe Y, Sinozaki H, Takagi T, Minegishi T, Kokame K, Kangawa K, Uesaka M, Miyamoto K: Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-inducible genes in human amniotic epithelial cells. *Reprod Biol Endocr* 2006; 4(27):1-9.
  6. Liang G, Audas TE, Li Y, Cockram GP, Dean JD, Martyn AC, Kokame K, Lu R: Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum stress response protein Herp through an ERSE-II element. *Mol Cell Biol* 2006; 26(21):7999-8010.
  7. Date Y, Shimbara T, Koda S, Toshinai K, Ida T, Murakami N, Miyazato M, Kokame K, Ishizuka Y, Ishida Y, Kageyama H, Shioda S, Kangawa K, Nakazato M: Peripheral ghrelin transmits orexigenic signals through the noradrenergic pathway from the hindbrain to the hypothalamus. *Cell Metabolism* 2006;4(4):323- 331.
  8. Shinozaki S, Chiba T, Kokame K, Miyata T, Ai M, Kawakami A, Kaneko E, Yoshida M, Shimokado K: Site-specific effect of estradiol on gene expression in the adipose tissue of ob/ob mice. *Horm Metab Res*; In press.
  9. 安部由美子、小亀浩市、寒川賢治、宮本薫: ダイオキシンにより羊膜上皮細胞で誘導される遺伝子の DNA マイクロアレイと Quantitative real-Time PCR による探索. *臨床検査* 2006; 50(1):107-112.
  10. 松本雅則、松山友美、石指宏通、植村正人、秋山暢、富山順治、名取一彦、倉石安庸、今村豊、井上信正、日笠聡、清家雅子、小塚輝彦、原雅道、小亀浩市、宮田敏行、藤村吉博: Upshaw-Schulman 症候群：妊娠時の仮面を被った血小板減少症. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* 2006; 15(2):30-40.
  11. 坂野史明、小亀浩市: 血小板血栓形成を制御するメタロプロテアーゼ ADAMTS-13. *日本生化学会誌* 2006; 78(6):528-532.
  12. 小亀浩市: ADAMTS-13 の測定. *International Review of Thrombosis* 2006; 1(4):266-270.
  13. 坂野史明、小亀浩市: ADAMTS13 欠損マウスと血栓性血小板減少性紫斑病. *血栓と循環* 2006; 14(4):258-261.
  14. Miyata T, Kokame K, Banno F, Shin Y, Akiyama M: ADAMTS13 assays and ADAMTS13-deficient mouse. *Curr Opin Hematol*; In press.

学会発表



1. Kokame K, Kikuchi T, Okuda T, Yanamoto H, Miyamoto S, Miyata T: Enhanced susceptibility to glucose load and cerebral ischemia in mice lacking ER-stress protein Herp. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
2. Kikuchi T, Hosokawa N, Nagata K, Suzuki T, Miyata T, Kokame K: Herp accelerates the endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins by promoting the retrotranslocation and deglycosylation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
3. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: ADAMTS13-deficient mice have potential risks for thrombosis but do not spontaneously develop thrombotic thrombocytopenic purpura. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
4. Taketomi Y, Sunaga K, Tanaka S, Nakamura M, Okuda T, Arata S, Sugimoto Y, Kokame K, Miyata T, Murakami M, Kudo I: Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in Ndrp1-deficient mice. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
5. Kokame K: ADAMTS13 activities and genetic polymorphisms in the Japanese general population. 52nd Annual Scientific and Standardization Committee Meeting. June 28-July 1, 2006, Oslo, Norway.
6. Marutani T, Kokame K, Michikawa M, Komano H: Herp is involved in the regulation of presenilin complex formation. 第49回日本神経化学会大会. 平成18年9月14—16日、名古屋市
7. 佐藤有希子、小亀浩市、木村利奈、竹下 聡、末久悦次、川崎富夫、巽 純子、宮田敏行: 深部静脈血栓症患者におけるプロテイン S 遺伝子の解析、第51回日本人類遺伝学会、平成18年10月17日-20日、米子市
8. 小亀浩市、宮田敏行: VWF73 を利用した ADAMTS13 活性測定 の原理と応用. 第53回日本臨床検査医学会学術集会. 平成18年11月9-11日、弘前市
9. 小亀浩市、小久保喜弘、岡山明、宮田敏行: 日本人一般住民における ADAMTS13 の遺伝子多型と活性、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
10. 坂野史明、小亀浩市、宮田敏行: ADAMTS13 を C 末端ドメイン欠損型に置換したコンジェニックマウスの作製と解析、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
11. 木戸慎介、久下裕司、横田千晶、井

上裕康、原田晃名、生野雄二、堀田  
真理子、小亀浩市、峰松一夫、佐治  
英郎：脳虚血障害後の環境刺激によ

る神経機能回復に関する検討. 第3  
2回日本脳卒中学会総会, 平成19  
年3月22-23日、福岡市

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

分担研究報告書

ADAMTS13 ドメイン欠損マウスの作製と解析

分担研究者 坂野 史明 国立循環器病センター研究所 室員

#### 研究要旨

ADAMTS13 はフォンビルブランド因子（VWF）の断片化を介して、過剰な血小板凝集を抑制しており、本酵素活性の欠乏は血栓性血小板減少性紫斑病の発症につながる。ADAMTS13 は触媒ドメイン以外に複数のドメインを持つが、*in vitro*でのVWF切断には遠位のC末端側ドメインは必須でない。本研究では、ADAMTS13をC末端ドメイン欠損型に置換したコンジェニックマウスを作製し、C末端ドメインが生理的に重要であるか否かを検討した。その結果、通常飼育かつ無刺激の状況下では、ADAMTS13のC末端ドメインはVWFの断片化および止血機能に必須とならないことが示唆された。しかし、VWFの分泌や血栓形成を誘発した場合、C末端ドメインの欠損によりVWF断片化の遅延、血栓形成の亢進が認められた。したがって、血栓形成が惹起された状況下にADAMTS13が十分なVWF切断活性を発揮するためには、C末端ドメインが生理的に重要と考えられる。

#### A. 研究目的

ADAMTS13 はフォンビルブランド因子（VWF）の断片化を担う血漿プロテアーゼである。この酵素は複数のドメインからなるが、個々のドメインの*in vivo*での役割は不明である。我々はマウス *Adamts13* をクロ

ーニングし、ヒト ADAMTS13 と同じドメイン構成の ADAMTS13 を持つ系統（129/Sv など）と、C末端側の TSP1 ドメイン 2 個と CUB ドメイン 2 個を欠損した ADAMTS13 を持つ系統（C57BL/6 など）が存在することを見出した（Banno et al. JBC, 2004）。本研究

では、ADAMTS13 の C 末端ドメインの生理的意義を探求するため、同じ遺伝的背景を持ち、かつ異なる ADAMTS13 を発現するコンジェニック系統を作製、解析した。

## B. 研究方法

129/Sv と C57BL/6 の交配による F1 を、*Adamts13* 遺伝子タイピングで個体選別を行いながら、129/Sv と 10 世代戻し交配することで、ADAMTS13 が C 末端欠損型に置換された 129/Sv マウスを作製した。このマウスの血漿 VWF マルチマーを、野生型 129/Sv マウスおよび 129/Sv 遺伝的背景を持つ ADAMTS13 完全欠損マウスのマルチマーと比較した。また、平行板型フローチャンバーを用いて、ずり応力下におけるコラーゲン表面上での血小板血栓形成能をマウス群間で比較した。さらに、C 末端ドメインの病態生理学的意義を明確にするため、DDAVP 投与により血管内皮細胞からの VWF の放出を促進した場合の VWF マルチマーならびに血栓形成能の変化を解析すると共に、コラーゲン投与による血栓誘発モデルを用いて、*in vivo* での血栓傾向をマウス群間で比較検討した。

(倫理面への配慮)

実験は、国立循環器病センター研究所・実験動物委員会の承認を得て実施した。また、動物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

ADAMTS13 欠損マウスの VWF マルチマーは野生型マウスのマルチマーより高分子量で検出されたが、C 末端欠損マウスのマルチマーは野生型マウスとほぼ同等の分子量分布を示した。また、ずり応力下血栓形成能も ADAMTS13 欠損マウスでは亢進していたが、C 末端欠損マウスと野生型マウスに違いは認められなかった。したがって、少なくとも平常時のマルチマーサイズの制御には、欠損した C 末端ドメインは必須ではないと考えられる。

一方、DDAVP 投与後の VWF マルチマーサイズの変化を経時的に追跡すると、C 末端欠損マウスでは、放出された VWF マルチマーの断片化が遅延する傾向がみられた。そこで、DDAVP 投与後に採血を行い、ずり応力下血栓形成能を解析した結果、ADAMTS13 欠損マウスだけでなく C 末端欠損マウスにおいても血栓形成の亢進が観察された。さらに、コラーゲン投与による消費性血小板減少も ADAMTS13 欠損マウスならびに C 末端欠損マウスで野生型マウスと比べて顕著に認められた。したがって、ADAMTS13 の C 末端ドメインは、VWF の分泌や血栓形成が惹起された状況下に VWF を効率よく切断する上で重要な機能を担うと考えられる。

#### D. 考察

ADAMTS13 の C 末端の TSP1 ドメインおよび CUB ドメインは、*in vitro* での VWF 切断活性に必須ではないことが示されている。しかし、C 末端ドメインが VWF との相互作用に重要となる可能性も *in vitro* の実験から指摘されていた。我々のマウスを利用した検討から、C 末端ドメインを欠損しても、少なくとも平常時に循環血中に存在する VWF マルチマーは野生型と同等に維持され、血栓形成傾向も正常域に保たれることが明らかとなった。C 末端ドメインを欠く ADAMTS13 も生体内である程度の活性を發揮しうると考えられる。しかし、C 末端ドメインが欠損すると DDAVP 投与により過剰分泌された VWF マルチマーの断片化が遅延し、血栓傾向の増大につながることも明らかとなった。また、コラーゲン投与による血小板減少も C 末端ドメイン欠損マウスで顕著に認められた。つまり、C 末端ドメインは生理的に不要という訳ではなく、これらのドメインの欠損により ADAMTS13 の機能が部分的に損なわれ、血栓性の刺激が加わった状況下に顕在化する可能性がある。C 末端ドメインが具体的に如何なる機能を担っているのか、さらに検討を進めたいと考えている。

#### E. 結論

ADAMTS13 の C 末端ドメインを欠損させ

たコンジェニックマウスを作製した。このマウスの解析から、C 末端ドメインは血栓形成惹起状況下に効率よく VWF を断片化する上で生理的に重要となる可能性が示唆された。前年度に作製した ADAMTS13 完全欠損マウスと共に、C 末端ドメイン欠損マウスは ADAMTS13 の生体内での機能を追求する上で有用なモデル動物と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文

1. 坂野麻里子、坂野史明、宮田敏行: ビタミン K 含有食品とワーファリン. **日本血栓止血学会誌** 2006; 17:83-87.
2. 坂野史明、小亀浩市: 血小板血栓形成を制御するメタロプロテアーゼ ADAMTS-13. **日本生化学会誌** 2006; 78(6):528-532.
3. 坂野史明: VWF, ADAMTS13 と血栓性血小板減少性紫斑病. **血液・腫瘍科** 2006; 53: 203-209.
4. 坂野史明、小亀浩市: ADAMTS13 欠損マウスと血栓性血小板減少性紫斑病. **血栓と循環** 2006; 14:258-261.
5. 坂野史明: ADAMTS13 の欠損は血栓性血小板減少性紫斑病の十分条件か? : モデルマウスからの知見. **日本血栓止血学会誌** In press.

## 学会発表

1. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T, ADAMTS13-deficient mice have potential risks for thrombosis but do not spontaneously develop thrombotic thrombocytopenic purpura, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
2. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T, ADAMTS13 deficiency generates prothrombotic state but is not sufficient to evoke thrombotic thrombocytopenic purpura in mice. The 4<sup>th</sup> Asian-Pacific Congress on Thrombosis Hemostasis, September 21 - 23, 2006, Suzhou, China.
3. Banno F, Generation and characterization of Adamts13-knockout mice. 第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
4. 坂野史明、小亀浩市、宮田敏行: ADAMTS13をC末端ドメイン欠損型に置換したコンジェニックマウスの作製と解析、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等 研究事業）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

分担研究報告書

TMA の病態解析

- factor H の解析 -

分担研究者 松本雅則 奈良県立医科大学輸血部 講師

#### 研究要旨

奈良医大輸血部では、過去8年間で全国の医療機関から TMA 患者を 786 例集積し ADAMTS13 活性測定を終了した。この結果、同活性著減例は全体の 1/3 で、残り 2/3 は非著減例であった。後者の中で先天性 TMA が 23 例存在した。これらの症例で Factor H ポリクローナル抗体を用いた抗原量測定を行い、抗原欠損 (Type I) 例は無い事を確認した。欧米の報告例ではその殆どが抗原量は正常な Type II とされているので、今後 Factor H の遺伝子解析を中心に解析を行う予定である。

#### A. 研究の目的

血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy, TMA) は、細血管障害性溶血性貧血、破壊性血小板減少、細血管内血小板血栓を 3 主徴とする病態である。TMA には神経症状優位とされる血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) と腎症状優位とされる溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) があり、この両者は特発性と、基礎病態として妊

娠、薬剤、膠原病、悪性腫瘍、造血幹細胞・臓器移植、HIV などに関連して起こる二次性とが存在する。臨床症状だけでは明確に両者を鑑別出来ない場合も多く、TMA と呼ばれることもある。2001 年に、止血因子である von Willebrand 因子 (VWF) を特異的に切断する VWF 切断酵素 (VWF-cleaving protease, VWF-CP)、別名 ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13)、が発見され、定型的 TTP で

は同酵素活性が著減しているが、HUS ではこのような所見は殆ど見られないことから、両者を客観的に鑑別できる指標として有用であることが判明した。

奈良医大輸血部は、1998年からADAMTS13活性測定を開始し、日本国内のTMA解析センターとしての役割を果たしてきた。2006年12月末段階で集積したTMA患者は786例となった。これらの中でADAMTS13活性が著減している症例は261例で全体の33%に過ぎず、残りの2/3の症例はADAMTS13以外の機序が予想されている。欧米ではこのような症例でFactor H, factor I, MCPなどの補体調節因子の異常が報告されているが、本邦ではこれらの報告は皆無である。そこでADAMTS13非著減例を中心にFactor Hの解析を行った。

## B. 研究方法

我々は現在まで、血漿からFactor Hを精製し、それを抗原としてFactor Hに対するポリクローナル抗体を作成した。その抗体を用いてLaurell法によるFactor Hの抗原量測定法を確立した。また、Factor Hの活性測定法の開発を計画したが、Factor Hはへパリンや血管内皮細胞など様々な部位に結合して機能を発揮するため、Factor H活性を評価することは困難であることから、海外ではFH活性を測

定せず、Factor Hの遺伝子解析が行われている。そこで、我々もFactor H遺伝子解析を行う計画に変更した。

本年度は、ADAMTS13非依存性TMAのFactor H抗原量を測定し、倫理委員会承認の得られた症例からFactor Hの遺伝子解析を開始した。Factor Hの遺伝子解析はMarie-Agnes Drafon-Dureyら(J Am Soc Nephrol. 15: 787-795, 2004)の方法を用いて行った。また、Factor Hには多くの遺伝子多型が報告されているので、発見された異常が責任変異であることを確認するために、正常人での解析も行った。倫理面への配慮

本研究を実施するにあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守し、遺伝子解析は、奈良県立医大の倫理委員会の承認を得た後、対象者に書面での同意を得た。

## C. 研究成果

過去8年間に奈良医大輸血部で集積したTMA 786例のうち、家系内にTMAが認められるなどの先天性が疑われる症例は56例存在した。そのうち、33例はADAMTS13活性が著減しており、Upshaw-Schulman症候群と診断された。残りの23例は現在までは病因が不明であった。この23例中18例でFactor H抗原量を測定し、最低値は健常人の42%の



抗原量であり、完全欠損である type 1 の症例は認めなかった。また、後天性の中で明らかな基礎疾患を有しない特発性は 338 例存在し、紹介病院の主治医の診断により TTP と HUS に分類した。後天性特発性 TTP244 例のうち、91 例で Factor H 抗原量を測定したところ 12 例で 50% 以下に低下を認めたが、最低値は 17% であった。また、後天性特発性 HUS94 例中 32 例で Factor H 抗原量を測定し、50% 以下はわずか 2 例で、最低値は 27% であった。

先天性 TMA の ADAMTS13 活性非著減例の中から、生後 3 ヶ月から原因不明の血小板減少を繰り返す 1 才 1 ヶ月の症例の Factor H 遺伝子解析を倫理委員会の承認を得て行った。その結果、6 ヶ所のミスセンス変異をホモやヘテロで確認した。このうち 4 ヶ所は既に報告された変異であり、残り 2 ヶ所は新規の変異であった。対象として行った正常人 8 人の遺伝子解析でも、この 6 ヶ所の変異を認めることから、責任変異としての同定には至っていない。

#### D. 考察

Factor H は、補体を調節する中心的な役割を果たすことが知られている。Factor H に関連した疾患として、HUS 以外に、膜増殖性糸球体腎炎(MPGN)や加

齢黄斑変性症などが知られている。HUS 患者における Factor H 異常が海外の研究者より報告されていることから、ADAMTS13 活性が著減していない TMA 患者で Factor H の検討を行った。当初、Factor H の抗原量と活性測定を計画し、抗原量はポリクローナル抗体により測定可能となった。先天性と後天性特発性 TMA 症例において、Factor H 抗原量を測定したが、抗原欠損例(type 1)は発見できなかった。

Factor H 活性は、Factor H の機能が多彩であることから単一の方法では評価できないとの意見が聞かれるようになったため、Factor H 遺伝子解析を行うことに計画を変更した。倫理委員会承認後に、1 家系のみ解析を開始した段階であるが、患者で発見されたミスセンス変異が家族や正常人でも認められ、責任遺伝子変異を同定するには至っていない。本邦では、HUS での Factor H 異常報告はなく、また MPGN 症例での FH 遺伝子解析の報告があるが、責任遺伝子異常は同定されていない。以上のことより、1 つの可能性として本邦における Factor H 遺伝子異常の頻度は欧米に比べて遥かに低いことが予想された。また、Factor H 遺伝子異常は、単独では TMA 発症に対して弱い危険因子でしかなく、他の因子が加わることで TMA が発症する可能性が予想された。

#### E. 結論

本邦の TMA 患者において、Factor H 抗原量を測定したところ、完全欠損の症例は発見できなかった。今後、Factor H 遺伝子解析によって、TMA 患者における FH の関与について解析する予定であるが、正常人を含めた多数例での解析が必要であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 英文原著

1. Shibagaki Y, Matsumoto M, Kokame K, Ohba S, Miyata T, Fujimura Y, and Fujita T: Novel compound heterozygote mutations (H234Q/R1206X) of the ADAMTS13 gene in an adult patient with Upshaw-Schulman syndrome showing predominant episodes of repeated acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(5):1289-1292.
2. Ko S, Okano E, Kanehiro H, Matsumoto M, Ishizashi H, Uemura M, Fujimura Y, Tanaka K, Nakajima Y: Plasma ADAMTS13 activity may predict early adverse events in living donor liver transplantation: Observations in three cases. *Liver Transplant* 2006; 12(5):859-869.
3. Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y: Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* 2006; 46(8):1444-1452.
4. Sato T, Hanaoka R, Ohshima M, Miwa Y, Okazaki Y, Yajima N, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Inokuma S: Analyses of ADAMTS13 activity and its inhibitor in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura secondary to connective tissue diseases: Observations in a single hospital. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24(4):454-455.
5. Morishita T, Matsumoto M, Honoki K, Yoshida A, Takakura Y, Fujimura Y: Successful Treatment of Primitive Neuroectodermal Tumor-associated Microangiopathy with Multiple Bone Metastases. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37(1):66-69.
6. Kobayashi T, Wad H, Kamikura Y, Matsumoto T, Mori Y, Kaneko T, Nobori T, Matsumoto M, Fujimura Y, Shiku H: Decreased ADAMTS13 activity in plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* 2007; 119(4): 447-452.
7. Ito S, Okuyama K, Nakamura T, Tetanishi JI, Saito K, Matsumoto M, Fujimura Y, Aihara Y, Yokota S: Intravenous gamma globulin for thrombotic microangiopathy of unknown etiology. *Pediatr Nephrol* 2007; 22(2): 301-305.
8. Kitano K, Gibo Y, Kamijo A, Furuta K,

- Oguchi S, Joshita S, Takahashi Y, Ishida F, Matsumoto M, Uemura M, Fujimura Y: Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with pegylated-interferon alpha-2a by an ADAMTS13 inhibitor in a patient with chronic hepatitis C. *Haematologica* 2007; in press
9. Matsuyama T, Uemura M, Ishikawa M, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Morioka C, Fujimoto M, Kojima H, Yoshiji H, Fujimura Y, Fukui H: Increased von Willebrand factor over decreased ADAMTS13 activity may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; in press.
  10. Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, Soejima K, Nakagaki T, Fujimura Y: Quantitative western blot analysis of plasma ADAMTS13 antigen in patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb Res* 2007; in press.
  2. 洪鉉寿、青山泰孝、山村亮介、太田忠信、麥谷安津子、山根孝久、日野雅之、松本雅則、藤村吉博: Rituximab 投与が奏効し、長期寛解を維持している血漿交換抵抗性重症血栓性血小板減少性紫斑病. *臨床血液* 2006; 47: 1528-1532.
  3. 金子仁臣, 松本雅則, 岡本浩平, 蝶名林和久, 菱沢方勝, 渡邊光正, 藤村吉博, 通堂満: Rituximab と vincristine 併用が奏効した難治性血栓性血小板減少性紫斑病. *臨床血液* 2007; 印刷中.

#### 日本語総説

#### 日本語原著

1. 松山友美、植村正人、石川昌利、森岡千恵、藤本正男、櫻井伸也、小寫秀之、吉治仁志、福井博、松本雅則、石指宏通、加藤誠司、藤村吉博、瀧村力: アルコール性肝炎における血漿 ADAMTS13 活性低下の機序—サイトカインならびにインヒビターの面からの検討—. *アルコールと医学生物学* 2006; 26: 100-107.
1. 松本雅則: 技術講座 VWF 測定. *Medical Technology* 2006; 34:57-64.
2. 松本雅則、石指宏通、八木秀男、藤村吉博: ADAMTS13 解析による TTP/HUS の診断. *奈良医学雑誌* 2006; 57:1-10.
3. 松本雅則、松山友美、石指宏通、植村正人、秋山 暢、富山順治、名取一彦、倉石安庸、今村 豊、井上信正、日笠 聡、清家雅子、小塚輝彦、原雅道、小亀浩市、宮田敏行、藤村吉博: Upshaw-Schulman 症候群:妊娠時の仮面を被った血小板減少症. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* 2006; 15: 30-40.
4. 松本雅則: TTP の診断と治療の進歩. *日本血栓止血学会誌* 2006; 17 : 393-401.
5. 八木秀男、伊藤武文、児山紀子、松本雅則、木村弘、椿和央、藤村吉博:

へパリン起因性血小板減少症の病態  
と診断、治療. 血液・腫瘍科 2006;  
53:451-458.

#### 学会発表

1. Matsumoto M, Kato S, Hiura H, Fujimura Y, Japanese experience of novel ADAMTS13 activity-ELISA on patients with TMA and liver transplantation, 52<sup>nd</sup> Annual SSC meeting, June 28, 2006, Oslo, Norway.
2. Koyama N, Suzuki T, Yamauchi M, Makinodan K, Tamaki S, Fukuoka A, Tomoda K, Yoshikawa M, Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Kimura H, Unusually large von Willebrand factor multimers might be involved in cardiovascular events in patients with obstructive sleep apnea syndrome, European Respiratory Society Annual Congress 2006, September 2, 2006, Munich, Germany.
3. Bandarenko N, Zakarija A, Kim B, Kwaan HC, McKoy JM, Pandey DK, Hay SN, Sarode R, Tevar AD, Cursio JF, Raife TJ, Kiss JE, Davidson C, Sadler JE, Ortel TL, Zheng XL, Kato S, Matsumoto M, Uemura M, Fujimura Y, Bennett CL, Two Mechanistic Pathways of Ticlopidine- and Clopidogrel-associated TTP: Results From the Surveillance, Epidemiology, and Risk Factors for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (SERF-TTP) Research Group, 59<sup>th</sup> AABB Annual Meeting, October 21, 2006, Miami Beach, Florida, USA.
4. Kim B, Davidson C, Kwaan HC, Zakarija A, Bandarenko N, Pandey DK, Sarode R, McKoy JM, Tevar AD, Cursio JF, Raife TJ, Kiss JE, Raisch DW, Sadler JE, Ortel TL, Zheng XL, Kato S, Matsumoto M, Uemura M, Fujimura Y, Bennett CL, Characteristics of Two Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) Syndromes Associated with Ticlopidine and Clopidogrel: Results From the Surveillance, Epidemiology, and Risk Factors for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (SERF-TTP) Research Group, AHA Scientific Sessions 2006, November 12, 2006, Chicago, Illinois, USA.
5. Uemura M, Kato S, Matsumoto M, Isonishi A, Ishizashi H, Hiura H, Matsuyama T, Yagi H, Ishikawa M, Fujimoto M, Kojima H, Yoshiji H, Fujimura Y, Fukui H, Increased plasma VWF antigen over decreased ADAMTS13 activity in patients with liver disturbance and clinical features, The 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 9, 2006, Orlando, Florida, USA.
6. Matsumoto M, Kawa K, Yagi H, Park YD, Takeshima Y, Kosaka Y, Hara H, Kai S, Yamamoto M, Kanemaru A, Fukuhara S, Hino M, Sako M, Hiraoka A, Ogawa H, Hara J, Fujimura H, Infusions of fresh frozen plasma to the patients with a high-risk group for hepatic VOD associated with stem cell transplantation reduce its occurrence, The 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 9, 2006, Orlando,