

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 活性を測定することが重要である。

#### E. 結論

先天性 TTP 患者家系の遺伝子解析を行い、ほぼすべての症例において発症の原因と考えられる ADAMTS13 遺伝子の変異が同定された。一方、CFH および MCP 遺伝子に原因変異は発見されなかった。先天性 TTP 患者のほとんどは、異常 ADAMTS13 遺伝子のホモ接合体あるいは複合ヘテロ接合体として解釈することができる。

また、一般住民に見出される ADAMTS13 多型を明らかにしたことにより、TTP 患者の遺伝子解析結果をより正確に解釈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 発症の直接の原因でない可能性が高いと解釈できる。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。ただし、先天性 TTP や後天性 TTP の一部には、これら多型が関与している可能性もあるので、今後の継続的研究が望まれる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T: FRET-S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol.* 129(1) 93-100. 2005.
2. Miyata T, Kokame K, Banno F: Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol.* 12(5) 384-389. 2005.
3. Anderson PJ, Kokame K, Sadler JE: Zinc and calcium ions cooperatively modulate ADAMTS13 activity. *J Biol Chem.* 281(2) 850-857. 2006.
4. 小亀浩市: 血栓性血小板減少性紫斑病/溶血性尿毒症症候群. *分子細胞*

- 治療**. 4(3) 209-215. 2005.
5. 小亀浩市、宮田敏行: TTP 迅速診断を目的とした新規 ADAMTS13 測定法の開発と応用. **臨床病理誌**. 53(7) 639-645. 2005.
  6. 奥田智彦、小亀浩市、宮田敏行: ストレス応答遺伝子 NDRG1 の機能解析. **日本生化学会誌**. 77(7) 630-634. 2005.
  7. 坂野史明、小亀浩市: VWF 切断酵素/ADAMTS13. **図説 血栓・止血・血管学** (一瀬白帝編). 中外医学社. 218-226. 2005.
  8. 小亀浩市: ADAMTS13 活性測定法. **血液疾患**-state of arts Ver.3 (坂田洋一, 小澤敬也編). 医歯薬出版. 421-424. 2005.
  9. 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(8) 3161-3166. 2006.
  10. 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**. 96(5) 1491-1499. 2006.
  11. 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 Transpl**. 21(5) 1289-1292. 2006.
  12. 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**. 66(10) 5012-5020. 2006.
  13. 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**. 4(27) 1-9. 2006.
  14. 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.* 26(21) 7999-8010. 2006.
15. 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.* 4(4) 323-331. 2006.
  16. 小亀浩市: ADAMTS13. 血栓症ナビゲーター (池田康夫監修, 内山真一郎, 後藤信哉, 重松宏, 半田誠編). メディカルレビュー社. 204-205. 2006.
  17. 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.* 50(1) 107-112. 2006.
  18. 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.* 15(2) 30-40. 2006.
  19. 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.* 78(6) 528-532. 2006.
  20. 小亀浩市: ADAMTS-13 の測定. *International Review of Thrombosis.* 1(4) 266-270. 2006.
  21. 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.* 14(4) 258-261. 2006.
  22. 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.* 39(3) 192-196. 2007.
  23. Truettner JS, Hu B, Alonso OF, Bramlett HM, Kokame K, Dietrich WD: Subcellular stress response after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 24(4) 599-612. 2007.
  24. Taketomi Y, Sunaga K, Tanaka S, Nakamura M, Arata S, Okuda T, Moon TC, Chang HW, Sugimoto Y, Kokame K,

- Miyata T, Murakami M, Kudo I: Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in Ndrgl-deficient mice. *J Immunol.* 178(11), 7042-7053. 2007.
25. Okuda T, Kokame K, Miyata T: Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system. *J Histochem Cytochem.* 56(2) 175-182. 2008.
26. Kokame K, Aoyama Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T: Inherited and de novo mutations of ADAMTS13 in a patient with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost.* 6(1) 213-215. 2008.
27. Miyata T, Kokame K, Banno F, Shin Y, Akiyama M: ADAMTS13 assays and ADAMTS13-deficient mouse. *Curr Opin Hematol.* 14(3), 277-283. 2007.
28. 小亀浩市: ADAMTS13 の測定. *日本血栓止血学会誌.* 18(3) 234-240. 2007.
2. 学会発表
1. Nogalska A, McFerrin J, Engel WK, Kokame K, Komano H, Askanas V: HERP, a novel endoplasmic reticulum (ER) stress-induced protein, is increased in sporadic inclusion body myositis (s-IBM) muscle fibers. *57th American Academy of Neurology Annual Meeting*, Miami, USA, 2005.
2. 小亀浩市、宮田敏行: 血栓性血小板減少性紫斑病. *第49回日本臨床検査医学会・近畿支部例会*、平成17年6月11日、神戸市
3. Kokame K, Miyata T: Fluorogenic substrate for ADAMTS-13. *51st Annual SSC Meeting.* Sydney, Australia, 2005.
4. Miyata T, Kokame K: Assays for ADAMTS13. *XXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*, Sydney, Australia, 2005.
5. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Generation and characterization of ADAMTS13-deficient mice. *XXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.* Sydney, Australia, 2005.
6. 松本雅則、藤村吉博、小亀浩市、宮田敏行: TTP/HUS 患者における ADAMTS13 解析. *第42回補体シンポジウム*、名古屋、2005.

7. 小亀浩市、宮田敏行：血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）の診断とADAMTS13 活性測定。第 48 回日本臨床化学会近畿支部例会、大阪、2005.
8. 坂野史明、小亀浩市、奥田智彦、本田繁則、宮田茂樹、加藤恒、富山佳昭、宮田敏行：ADAMTS13 欠損マウスにおける血流下血栓形成の亢進。第 67 回日本血液学会総会、横浜、2005.
9. 今村豊、木村芳三、野見山敬太、長部誠志、松本雅則、藤村吉博、小亀浩市、宮田敏行：妊娠を契機に発症した Upshaw-Schulman 症候群の姉妹例。第 67 回日本血液学会総会、横浜、2005.
10. 菊池唯史、細川暢子、永田和宏、鈴木匡、宮田敏行、小亀浩市：小胞体膜蛋白質 Herp は PNGase と結合し、小胞体関連分解基質の脱糖鎖を促進する。第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005.
11. 武富芳隆、須永剛平、村上誠、田中智之、中山真由子、中村雅典、荒田悟、杉本幸彦、小亀浩市、宮田敏行、工藤一郎：マスト細胞の成熟過程に伴って発現誘導される NDRG1 の機能解析。第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005.
12. 小宮山豊、吉賀正亨、北澤康秀、中谷寿男、小亀浩市、宮田敏行、高橋伯夫：FRETs-VWF73 による ADAMTS13 活性測定と臨床検査一プレートおよび標準血漿一。第 52 回日本臨床検査医学会総会、福岡、2005.
13. Kokame K: TTP pathogenesis, VWF multimers, and ADAMTS13 activity. 第 28 回日本血栓止血学会学術集会、福岡、2005.
14. 松本雅則、石西綾美、石指宏通、秋山暢、富山順治、名取一彦、倉石安庸、今村豊、井上信正、小亀浩市、宮田敏行、藤村吉博：妊娠経過中に診断された Upshaw-Schulman 症候群の 4 家系 7 症例。第 28 回日本血栓止血学会学術集会、福岡、2005.
15. Nogalska A, Engel WK, McFerrin J, Kokame K, Komano H, Askanas V: Herp mRNA and protein are increased in s-IBM and endoplasmic reticulum stress-induced cultured human muscle fibers. *Neuroscience* 2005, Washington, DC, USA, 2005.
16. 奥田智彦，田原佐知子，東智仁，小亀浩市，宮田敏行，北徹，柳田素子：ストレス誘導遺伝子 NDRG1 の発現パターンは腎障害により変化する。第 28 回日本分子生物学会年会，福岡，

- 2005.
17. Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuraishi K, Imamura Y, Inoue N, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y: Upshaw-Schulman syndrome: a masqueraded thrombocytopenia during pregnancy. *The 2005 American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting*, Atlanta, USA, 2005.
18. 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. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. **第 79 回日本生化学会大会. 第 29 回日本分子生物学会年会**, Kyoto, Japan, 2006.
19. 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. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. **第 79 回日本生化学会大会. 第 29 回日本分子生物学会年会**, Kyoto, Japan, 2006.
20. 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. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. **第 79 回日本生化学会大会. 第 29 回日本分子生物学会年会**, Kyoto, Japan, 2006.
21. 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 Ndr1-deficient mice. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. **第 79 回日本生化学会大会. 第 29 回日本分子生物学会年会**, Kyoto, Japan, 2006.
22. Kokame K: ADAMTS13 activities and genetic polymorphisms in the Japanese general population. *The 52nd Annual Scientific and Standardization Committee Meeting*, Oslo, Norway, 2006.
23. Marutani T, Kokame K, Michikawa M,

- Komano H: Herp is involved in the regulation of presenilin complex formation. **第 49 回日本神経化学学会大会**, 名古屋, 2006.
24. 佐藤有希子、木村利奈、小亀浩市、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大会**, 米子, 2006.
25. 小亀浩市、宮田敏行: VWF73 を利用した ADAMTS13 活性測定 of 原理と応用. **第 53 回日本臨床検査医学会学術集会**, 弘前, 2006.
26. 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**, 宇都宮, 2006.
27. 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**, 宇都宮, 2006.
28. 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 32 回日本脳卒中学会総会**, 福岡市, 2007.
29. Shinozaki S, Hatori K, Kokame K, Chiba T, Miyata T, Shimokado K: Deficiency of Herp, an ER stress protein, suppresses atherosclerosis in apoE deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2007*, Chicago, April, 2007.
30. 石川昌利、植村正人、松山友美、松本雅則、石指宏通、加藤誠司、坂野史明、小亀浩市、辻本達寛、北澤利幸、森岡千恵、藤本正男、宮田敏行、藤村吉博、福井博: マウス急性肝不全モデルにおける ADAMTS13 活性の動態. **第 43 回日本肝臓学会総会**, 東京, 2007.
31. Shouno Y, Kuge Y, Yokota C, Kido S, Kokame K, Inoue H, Hotta M, Minematsu K, Saji H: Analysis of gene expression related to enrich environment after ischemic stroke in rats. *The 23rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Brain'07)*, Osaka, 2007.
32. 小亀浩市: 血栓性血小板減少性紫斑病と ADAMTS13. **第 8 回 Pharamaco-Hematology シンポジウム**, 金沢, 2007.

33. 武富芳隆、須永剛平、田中智之、中村雅典、荒田悟、奥田知彦、杉本幸彦、小亀浩市、宮田敏行、村上誠、工藤一郎: マスト細胞の成熟に伴って発現誘導される NDRG1 の解析. **第 8 回 Pharamaco- Hematology シンポジウム**、金沢市、2007.
34. Kokame K, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T: Activities and polymorphisms of ADAMTS13 in the Japanese general population. **XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**, Geneva, Switzerland, 2007.
35. Banno F, Kokame K, Yang J, Miyata S, Miyata T: The distal domains of ADAMTS13 are required in vivo for efficient cleavage of von Willebrand factor under prothrombotic conditions. **XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**, Geneva, Switzerland, 2007.
36. Ishikawa J, Sato Y, Takeshita S, Kokame K, Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y, Miyata T: One-third of Japanese patients with deep vein thrombosis carried the genetic mutations in proteins S, C and antithrombin genes: the sub-group study of blood coagulation abnormality, the study group of research on measures for intractable diseases in Japan. **XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**, Geneva, Switzerland, 2007.
37. 篠崎昇平、羽鳥薫、小亀浩市、川上明夫、金子英司、宮田敏行、下門顕太郎: 小胞体ストレスと動脈硬化: 小胞体ストレス蛋白 Herp 欠損は動脈硬化進展を抑制する. **第 39 回日本動脈硬化学会総会学術集会**、大阪、2007.
38. 篠崎昇平、千葉剛、小亀浩市、宮田敏行、藍真澄、金子英司、吉田雅幸、下門 顕太郎: ob/ob マウス脂肪組織におけるエストラジオールの部位特異的な作用の解明. **第 39 回日本動脈硬化学会総会学術集会**、大阪、2007.
39. 佐藤有希子、石川淳子、木村利奈、小亀浩市、本田繁則、竹下聡、末久悦次、川崎富夫、辻肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田満、池田康夫、巽純子、宮田敏行: 日本人の深部静脈血栓症における遺伝的素因. **第 27 回近畿循環器疾患治療研究会**、大阪、2007.
40. 佐藤有希子、石川淳子、木村利奈、小亀浩市、本田繁則、竹下聡、末

- 久悦次、川崎富夫、辻肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田満、池田康夫、巽純子、宮田敏行：深部静脈血栓症患者における抗凝固因子の遺伝子解析。 **日本人類遺伝学会第52回大会**、東京、2007。
41. 小亀浩市：血栓性血小板減少性紫斑病とADAMTS13。 **第7回岡山循環器勉強会**、岡山、2007。
42. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Effects of complete deficiency and C-terminal deletion of ADAMTS13 on hemostatic function in mice. **21st International Mammalian Genome Conference**, Kyoto, Japan, 2007.
43. 根木玲子、池田智明、石川淳子、佐藤有希子、本田繁則、小亀浩市、宮田敏行、藤田富雄：わが国の妊産婦における静脈血栓塞栓症および関連周産期疾患と遺伝的素因についての解析。 **第30回日本血栓止血学会学術集会**、志摩、2007。
44. 江浦由佳、小亀浩市、宮田敏行：Herp欠損は小胞体ストレス誘導性の ERAD複合体形成を抑制する。 **第80回日本生化学会大会-第30回日本分子生物学会年会-合同年会**、横浜、2007。
45. 坂野史明、小亀浩市、楊進、宮田茂樹、宮田敏行：ADAMTS13のC末端ドメイン欠失はマウスに潜在的な血栓性リスクをもたらす。 **第80回日本生化学会大会-第30回日本分子生物学会年会-合同年会**、横浜、2007。
46. 辛英哲、小亀浩市、秋山正志、副島見事、宮田敏行：ADAMTS13はLys-plasminogenに結合する。 **第80回日本生化学会大会-第30回日本分子生物学会年会-合同年会**、横浜、2007。
47. 奥田智彦、辻井知美、山田佐知子、小亀浩市、宮田敏行、北徹、柳田素子：ストレス誘導タンパク質 NDRG1は腎臓および水晶体において組織保護機能を有する。 **第80回日本生化学会大会-第30回日本分子生物学会年会-合同年会**、横浜、2007。
- G. 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。

血栓性血小板減少性紫斑病の責任遺伝子 ADAMTS13 変異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

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は、血小板減少、溶血性貧血を主症状とし、発熱、動揺性精神神経症状、腎機能障害を伴う重篤な疾患である。患者の血中には超高分子量フォンビルブランド因子(UL-VWF)マルチマーが蓄積しており、これを介して血小板の過剰凝集が引き起こる。近年、VWFを切断してマルチマーの分子量を調節する酵素ADAMTS13が同定され、その活性の欠乏がTTPの原因となることが明らかにされた。本研究ではADAMTS13完全欠損マウスおよびC末端ドメイン欠損マウスを作製し、ADAMTS13本体およびC末端ドメインの生体内での役割を検証した。完全欠損マウスでは、血中にUL-VWFマルチマーの蓄積が認められ、*in vitro* ずり応力下血栓形成能、血管障害部位での*in vivo* 血栓形成およびコラーゲン-エピネフリン誘発血小板減少が著しく亢進していた。しかし、通常飼育下では正常に出生、発育し、血小板数、血漿ハプトグロビン等の血液学的パラメーターや、血液像、組織像も正常で、TTPに特徴的な症状を示す所見は得られなかった。したがって、マウスにおいてADAMTS13欠損は、易血栓傾向をもたらすが、それだけではTTP発症に至らず、付加的要因が発症に関わると考えられる。一方、C末端ドメイン欠損マウスのVWFマルチマー、ずり応力下血栓形成能は正常であったため、C末端欠損型ADAMTS13は生体内で一定の活性を示すと考えられる。しかし、血管障害部位での*in vivo* 血栓形成能およびコラーゲン-エピネフリン誘発血小板減少は野生型マウスより亢進していた。したがって、血栓形成惹起状況下にADAMTS13がVWFを効率よく捕捉、切断するためには、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

血小板接着タンパク質フォンビルブランド因子(VWF)は、主に血管内皮細胞で合成され、超高分子量のマルチマーとして血流中へ放出される。マルチマーの分子量

が大きいほど血小板凝集活性は強く、ADAMTS13により部分的に断片化されることで適度な活性が維持されている。ADAMTS13活性が欠如し、血中に超高分子量VWFマルチマーが残存すると、血

血小板が過剰凝集し、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の発症につながる。本研究では、ADAMTS13 の生理機能を追究する上でのモデル動物として、ADAMTS13 完全欠損マウスおよび C 末端ドメイン欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。

## B. 研究方法

### [ADAMTS13 完全欠損マウスの作製と解析]

ADAMTS13 の触媒ドメインを欠損させるターゲティングベクターを構築し、これを 129/Sv マウス由来 ES 細胞に導入後、常法に従ってキメラマウスを作製した。このキメラマウスを野生型 129/Sv マウスと交配させることにより、129/Sv 系統の遺伝的背景をもつ ADAMTS13 完全欠損マウスを作製した。

ADAMTS13 欠損と TTP 発症との関連を明らかにするため、まず、ADAMTS13 欠損マウスの血球数、血液像、組織像、凝固時間、出血時間、アゴニスト惹起血小板凝集能、血漿 VWF マルチマーを野生型 129/Sv マウスと比較した。次に、平行板型フローチャンバーを用いて、ずり応力下コラーゲン表面上での血小板血栓形成を経時観察し、in vitro での血栓形成を解析した。さらに、ヒスタミン投与により活性化した血管内皮細胞上での血小板接着および塩化鉄処理による血管障害部位での血小板血栓形成を生体顕微鏡にて観察し、in vivo での血栓形成を解析した。また、コラーゲン-エピネフリン静注により、全身性に血栓を誘発した場合の血小板減少を解

析した。

### [C 末端ドメイン欠損マウスの作製と解析]

ADAMTS13 は複数のドメインからなるが、各ドメインの生体内での機能は不明である。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全長型 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。そこで、C57BL/6 と 129/Sv との交配による F1 マウスを、*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、129/Sv 系統の遺伝的背景を持ち、かつ C 末端ドメイン欠損型の ADAMTS13 を発現するコンジュニックマウスを作製した。

この C 末端ドメイン欠損マウスの血漿 VWF マルチマー、in vitro ずり応力下血栓形成、ヒスタミンおよび塩化鉄惹起 in vivo 血栓形成、コラーゲン-エピネフリン誘発血小板減少を野生型 129/Sv マウスおよび 129/Sv 遺伝的背景を持つ ADAMTS13 完全欠損マウスと比較解析した。

(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 完全欠損マウス]

ADAMTS13 完全欠損マウスは正常に出生し、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。ADAMTS13 の主要な発現臓器である肝臓において、ADAMTS13 の mRNA は検出されず、血漿の VWF 切断活性も消失していた。先天性 TTP 患者と同様に、マウスでも ADAMTS13 欠損により、血中に超高分子量 VWF マルチマーが残存した。しかし、ADAMTS13 完全欠損マウスの血小板数、血液像、組織像、凝固時間、出血時間、アゴニスト惹起血小板凝集能はいずれも正常で、予想された TTP 症状はみられなかった。そこで、ヒスタミン活性化血管内皮細胞上への血小板の接着を生体顕微鏡にて観察した結果、ADAMTS13 完全欠損マウスでは野生型マウスには見られない紐状に連なった血小板接着が認められ、UL-VWF マルチマー依存性の血小板接着反応が生体内で進行することが示唆された。しかし、接着血小板がより大きな凝集塊へと進展することは無く、血管内皮が保持された環境下では、病的血栓形成には至らないと考えられた。そこで、コラーゲン表面上での *in vitro* ずり応力下血栓形成能および塩化鉄血管障害部位での *in vivo* 血栓形成能を解析した結果、ADAMTS13 完全欠損マウスでは野生型マウスに比べて血小板血栓形成の亢進が認められた。また、コラーゲン-エピネフリン投与による血栓誘発試験においても、ADAMTS13 欠損マウスでは野生型マウスに比べて、処置後の血小板減少がより顕著であった。したがって、マウスにおいて ADAMTS13 の先天性欠損は、血中に超高分子量 VWF マルチマーの残存を引き

起こし、易血栓傾向をもたらすが、それだけでは TTP 発症に至らず、付加的要因が発症に関与すると考えられる。

#### [C 末端ドメイン欠損マウス]

ADAMTS13 完全欠損マウスとは異なり、C 末端ドメイン欠損マウスの血漿 VWF マルチマー、*in vitro* ずり応力下血栓形成能、ヒスタミン活性化血管内皮細胞上への血小板接着は野生型マウスと同等であった。したがって、C 末端ドメイン欠損型 ADAMTS13 は生体内で VWF 切断活性を持っており、この変異体を発現するマウスにおいても平常時の止血機能は正常域に保たれると考えられる。一方、C 末端ドメイン欠損マウスでは、塩化鉄血管障害部位での血栓形成およびコラーゲン-エピネフリン誘発血小板減少が野生型マウスと比べて顕著に認められた。したがって、C 末端ドメイン欠損型 ADAMTS13 では、生体内で血栓形成が惹起された状況下に、VWF を効率よく切断する機能が、全長型 ADAMTS13 に比べて低下していると考えられる。ADAMTS13 の C 末端ドメインは、VWF 中の特定配列または血小板や内皮細胞、内皮下組織中の分子との結合に寄与しているのかもしれない。

#### D. 考察

先天性 ADAMTS13 欠損症例の多くは、新生児期から乳幼児期に TTP を発症するが、晩発症例の存在も指摘されていた。昨今、患者の臨床症状や遺伝子解析のデータが蓄積されると共に、成人発症例や未発症の成人例が複数見出されるように

なった。同じ ADAMTS13 遺伝子変異を保有する兄妹例であっても、発症時期や重症度は大きく異なることもわかっている。また治療中、依然として ADAMTS13 活性が欠乏し、血中に UL-VWF マルチマーが検出されていながら、TTP 症状は消失する例も見られる。これらの知見は、ADAMTS13 の欠損やそれに伴う UL-VWF マルチマーの残存が、TTP 発症の重大な危険因子であるが十分条件では無いことを示唆している。本研究にて作製した ADAMTS13 完全欠損マウスが、UL-VWF を保持しながら TTP を自然発症せず、血栓性あるいは血管障害性の刺激によりはじめて病的血小板血栓を呈したことも、この見解を支持する。今後、TTP の発症を修飾する要因の探索が必要と思われる。

また、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 切断活性に必須でなく、その生理的意義の解明が期待されていた。これまでに、マウス C 末端ドメイン欠損型 ADAMTS13 は精製ヒト VWF 切断活性が全長型に比べて著しく低下していること、C 末端ドメイン欠損型 ADAMTS13 を発現する C57BL/6 系統遺伝的背景下では、野生型 (C 末端ドメイン欠損型) と ADAMTS13 欠損マウスの VWF マルチマーサイズに違いが認められないことが報告されており、C 末端欠損型 ADAMTS13 は生体内での活性が損なわれている可能性があった。しかし、同一の遺伝的背景下で全長型 ADAMTS13、C 末端ドメイン欠損型 ADAMTS13 および ADAMTS13 完全欠損

の影響を解析した本研究の結果から、C 末端欠損型 ADAMTS13 は生体内で一定の VWF 切断活性を発揮し、この変異体を発現するマウスにおいても平常時の止血機能は正常域に保たれることが明らかとなった。しかし、C 末端欠損型 ADAMTS13 発現マウスは、全長型発現マウスに比べて *in vivo* 血栓誘発刺激に対する応答が顕著であったことから、ADAMTS13 の C 末端ドメインは生体内での VWF 切断に寄与しており、その重要性は血栓形成惹起状況下に顕在化すると考えられる。今後、ADAMTS13 の C 末端ドメインと相互作用する分子や VWF 中の配列の同定が必要である。

#### E. 結論

本研究では、ADAMTS13 の生体内での機能を検証するため、ADAMTS13 完全欠損マウス、C 末端ドメイン欠損マウスを作製した。ADAMTS13 完全欠損マウスの解析から、ADAMTS13 欠損は血中に UL-VWF マルチマーの残存を引き起こし易血栓傾向をもたらすこと、ADAMTS13 欠損は TTP 発症の十分条件では無く、TTP 発症には付加要因が必要となることが示唆された。また、C 末端ドメイン欠損マウスの解析から、C 末端ドメイン欠損 ADAMTS13 は、生体内での VWF 切断活性を有するが、血栓形成惹起状況下での活性が不十分である可能性が示唆された。作製した ADAMTS13 完全欠損マウス、C 末端ドメイン欠損マウスは、ADAMTS13 機能の究明をさらに進める上で有用なモデル動物で

あると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 坂野史明、小亀浩市: VWF 切断酵素 /ADAMTS13. **図説 血栓・止血・血管学** 2005; 218-226.

2. Miyata T, Kokame K, Banno F: Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. **Curr Opin Hematol** 2005; 12: 384-389.

3. 宮田敏行、小亀浩市、坂野史明、本田繁則、宮田茂樹: 血栓性血小板減少性紫斑病と ADAMTS13. **循環器病研究の進歩** 2005; 26: 90-96.

4. 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.

5. 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: 3161-3166.

6. 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. **生化学** 2006; 78: 528-532.

7. 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.

8. 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.

9. 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** 2007; 18: 36-45.

10. Miyata T, Kokame K, Banno F, Shin Y, Akiyama M: ADAMTS13 assays and ADAMTS13 deficient mouse. **Curr Opin Hematol** 2007; 14: 277-283.

11. Banno F, Miyata T: Biology of an anti-thrombotic factor ADAMTS13. **Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis**; in press.

2. 学会発表

1. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T, Generation and characterization of ADAMTS13-deficient mice. **The XX Congress of the International**

- Society on Thrombosis & Haemostasis*, August 6-12, 2005, Sydney, Australia.
2. 坂野史明、小亀浩市、奥田智彦、本田繁則、宮田茂樹、加藤恒、富山佳昭、宮田敏行、ADAMTS13 欠損マウスにおける血流下血栓形成の亢進。**第 67 回日本血液学会総会**、平成 17 年 9 月 17 日-19 日、横浜市。
  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. 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 4th Asian-Pacific Congress on Thrombosis Hemostasis**, September 21 - 23, 2006, Suzhou, China.
  5. 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。
  6. 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。
  7. Banno F, Kokame K, Yang J, Miyata S, Miyata T, The Distal Carboxyl-Terminal Domains of ADAMTS13 are Required In Vivo for Efficient Cleavage of von Willebrand Factor under Prothrombotic Conditions, **The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXI Congress**, July 6-12, 2007, Geneva, Switzerland.
  8. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T, Effects of complete deficiency and C-terminal deletion of ADAMTS13 on hemostatic function in mice, **21st International Mammalian Genome Conference**, October 28-November 1, 2007, Kyoto.

9. Banno F, Kokame K, Yang J, Miyata S, Miyata T: Deletion of the C-terminal domains of ADAMTS13 brings a potential risk for thrombosis in mice,  
**第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会**、平成 19 年 12 月 11 日～15 日、横浜市。

G. 知的所有権の取得状況

なし

ADAMTS13 非依存 TMA 症例における factor H 解析

分担研究者 松本雅則 奈良県立医科大学輸血部 准教授

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 783 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。この結果は、欧米における factor H 抗原量は正常な Type II が多数であるとの報告に一致した。そこで、先天性 TMA と考えられる 1 家系において factor H 遺伝子解析を行った。

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 などに関連してお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 783 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、factor H の抗原量測定法を確立した。また、同活性測定法の開発も計画したが、factor H はヘ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、一つの検査で同活性を評価することは困難であることから、海外では factor H 活性を測定せず、同遺伝子解析が行われている。そこで、計画を変更し、factor H 遺伝子解析を先天性 TMA1 家系にて行った。

factor H 抗原量: 血漿から精製した factor H をウサギに免疫後、血清を採取し、ポリクローナル抗体を作成した。このポリクローナル抗体を用いたロケット電気泳動にて、factor H 抗原量を測定した。

factor H 遺伝子解析: Marie-Agnes Drafon-Durey ら(J Am Soc Nephrol. 15: 787-795, 2004)の方法を用いて行った。22組のプライマーを作成し、PCRを施行した後、ダイレクトシーケンスにて解析した。健常日本人における factor H 遺伝子異常を確認するため、健常人 8 人でも同遺伝子解析を行った。

ADAMTS13 活性: ADAMTS13 によって切断される基質の VWF-A2ドメインの切断部

位を認識するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法を用いて測定した。

## 倫理面への配慮

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 783 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 TTP 244 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 HUS 94 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、4ヶ所のミス

センス変異 (V62I、H402Y、R493T、V837L) をホモやヘテロで確認した。このうち3ヶ所は既に報告された変異であり、残り1ヶ所は新規の変異であった。海外の報告によれば、V62I と H402Y は Disease risk polymorphism と報告されており、TMA との関連は予想されるが、本邦の健常人でも高頻度に認められた。R493T は、海外から Non-Disease causing polymorphism と報告されており、TMA との関連は低いと考えられる。V837L は新規の変異であるが、本邦健常人8人中1人で認めることから、多型であると予想され、疾患との関連は今後多数例での検討が必要である。

#### 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 の検討を計画した。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。

続いて独自の factor H 活性測定法の開発を目指したが、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 factor H 遺伝子解析を行い、4種類の遺伝子変異を発見した、この中には、Disease risk polymorphism と海外から報告されている変異が2種類存在した。また、新規の変異も1種類発見したが、健常人にも同じ変異が認められ、多型であると考えられた。本邦では、HUS での factor H 異常の症例報告はなく、また MPGN 症例での同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。これは、factor H の異常の多くは多型であり、疾患への影響が弱いため、因果関係を明らかにするためには、多数の症例や多数の正常人の factor H 遺伝子解析が必要であると思われる。また、日本人特有の多型などの異常が予想されることより、本邦における多数例の解析が重要であることが認識された。

#### 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。factor H 遺伝子解析を行ったが、複数の多型を発見し、この多型と TMA との関連を明らかにするためには、症例や正常人での多数例の解析が必要であることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furukoji E, Matsumoto M, Yamashita A, Yagi H, Sakurai Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Morishita K, Fujimura Y, Tamura S, Asada Y. Adenovirus-mediated transfer of human placental ecto-ATP diphosphohydrolase I to vascular smooth muscle cells suppresses platelet aggregation in vitro and arterial thrombus formation in vivo. *Circulation* 111: 808-815, 2005.
2. Yagita M, Uemura M, Yamahara H, Kitano T, Kunitomi A, Konaka Y, Nakamura T, Matsumoto M, Ishizashi H, Fukui H, Fujimura Y. Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Hepatology* 42: 420-421, 2005.
3. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto T, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 106: 922-924, 2005.
4. Kosugi S, Matsumoto M, Ohtani Y, Take H, Ishizashi H, Fujimura Y, Kuyama J. Rituximab provided long-term remission in a case with refractory relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 81:433-436, 2005.
5. Fujisaki K, Matsutani K, Yoshimitsu T, Nakanishi K, Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Fujimura Y, Takeda K, Hirakata H, Iida M. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with polyarthritis nodosa: demonstration of the inhibitor against von Willebrand factor-cleaving protease. *Clinical Nephrology* 64: 305-310, 2005.
6. Sugimoto T, Saigo K, Kanenda Y, Manabe N, Narita H, Wakuya J, Imoto S, Murashima T, Matsumoto M, Fujimura Y, Nishimura R, Koizumi T, Kumagai S. Von Willebrand factor-cleaving protease activity remains at the intermediate level in thrombotic thrombocytopenic purpura. A CML case treated with interferon- $\alpha$ . *Acta Haematologica* 113: 198-203, 2005.
7. Uemura M, Ishikawa M, Matsuyama T, Fujimoto M, Kojima H, Sakurai S, Toyohara M, Yamazaki M, Yoshiji H, Yamao J, Matsumoto M, Ishizashi H,