

attack complex, MAC) として細胞膜に穴をあける。この一連の補体の活性化は自己細胞にとっては有害であるため、自己細胞は幾つかの補体制御因子により守られている。血管内皮細胞の表面にはグリコサミノグリカンを介して補体 H 因子 (CFH)、膜タンパク質である membrane cofactor protein (MCP) やトロンボモジュリン (THBD) といった補体制御因子が結合している。これらのタンパク質はプロテアーゼである補体 I 因子 (CFI) のコファクターとして働き、I 因子が細胞膜上に固定化した C3b を分解して不活性型の C3i へと変換する反応を補助している。これらの補体制御因子に遺伝子変異が生じて活性が低下すると、自己細胞は補体の攻撃から十分に保護されなくなり、自己細胞が補体で障害を受ける。これが非定型 HUS の細胞障害メカニズムである。また、C3 や B 因子 (CFB) では、補体制御因子結合部位に変異が生じると補体制御因子による制御が働かなくなり、その結果補体の活性化による自己細胞の障害が生じる。したがって、非定型 HUS の発症は、補体調節因子である CFH, MCP, CFI, THBD 遺伝子の機能消失型変異、もしくは補体因子である C3 と CFB 遺伝子の機能亢進型変異が原因となる。これまで欧米で行われた研究では、非定型 HUS 患者には H 因子の遺伝子変異が最も多く見られる。

本研究は、日本人を対象に非定型 HUS を発症した患者の染色体の補体制御遺伝子および補体遺伝子の塩基配列解析を行い、非定型 HUS の遺伝的背景を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

奈良県立医科大学輸血部で非定型 HUS と診断された 5 家系の患者の末梢血から染色体 DNA を調製し、補体調節因子 (CFH, MCP, CFI, THBD) および補体因子 (C3, CFB) のタンパク質をコードする領域の遺伝子の塩基配列解析を行った。6 遺伝子に関する染色体の位置、エクソン数などを表 1 にまとめた。変異が同定された場合、家系構成員の DNA 試料が使える場合は、それらの DNA に変異の有無を Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法などを用いて確認した。同定されたミスセンス変異は PolyPhen2 を用いて機能への影響を推察した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト血液試料およびヒト DNA 試料を取り扱う。こういった研究では、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年 12 月 28 日全部改正)」、「臨床研究に関する倫理指針 (平成 16 年 12 月 28 日全部改正)」、「疫学研究に関する倫理指針 (平成 19 年 8 月 16 日全部改正)」を遵守する。本研究は国立循環器病研究センターおよび奈良県立医科大学の倫理審査委員会において、研究計画の承認を受けて行った。

C. 研究結果

5 家系の非定型 HUS 患者の 6 候補遺伝子の配列解析の結果を表 2 に示す。次に、それぞれの家系の解析結果を説明する。

家系 L の遺伝子解析：

CFH, MCP, CFI, THBD, C3, CFB のタンパク質をコードする領域の遺伝子の塩基配

列解析を行ったが、原因変異と思われる稀な変異は見いだせなかった。CFH に頻度の高い V62I 変異, Y402H 変異, V837I 変異, E936D 変異を同定したが、いずれも一般人口にも見られる変異で原因変異ではないと考えた。

家系 X の遺伝子解析：

CFH, MCP, CFI, THBD, C3, CFB のタンパク質をコードする領域の遺伝子の塩基配列解析を行い、CFH に頻度の高い V62I 変異, Y402H 変異, E936D 変異に加え、稀な R1215Q 変異を同定した。R1215Q 変異は患者に加え、父親（無症状）の塩基配列解析でも同定されたが、母親と兄弟には同定されなかった。また、本変異は、患者と父親に PCR-RFLP 法でも確認された。本変異の PolyPhen2 での予測は Probably damaging であった。奈良医大の測定では、患者の羊溶血活性の亢進を認めており、溶血活性の亢進は CFH 遺伝子の変異でうまく説明された。CFH の R1215Q 変異は、すでにヨーロッパの非定型 HUS 患者に同定されており、4 つの論文が報告されているので、この変異がこの患者の非定型 HUS の原因遺伝子変異と確定した。ヨーロッパの報告によると、本変異保有者の血中 FH 量はウエスタンブロット法で調べると正常であった (Caprioli et al, J Am Soc Nephrol, 2001)。MCP に S13F 変異、CFB に R32W 変異、THBD に A473V 変異を同定したが、いずれも一般人口にも見られる変異で原因変異ではないと考えた。

家系 2-A の遺伝子解析：

CFH, MCP, CFI, THBD, C3, CFB のタンパ

ク質をコードする領域の遺伝子の塩基配列解析を行い、C3 に稀な I1157T 変異を同定した。本変異は患者に加え、父親（脳梗塞後遺症）の塩基配列解析でも同定されたが、母親には同定されなかった。また、本変異は、患者と父親に PCR-RFLP 法でも確認された。本変異の PolyPhen2 での予測は Benign であった。本変異は C3 のチオエステル含有ドメインにある。本変異はこれまでに欧米の非定型 HUS 患者に見いだされているので、本変異も非定型 HUS の原因変異であると考えた。本変異以外に、CFH に Y402H 変異、THBD に A473V 変異を同定したが、いずれも一般人口にも見られる変異で原因変異ではないと考えた。

家系 2-F の遺伝子解析：

CFH, MCP, CFI, THBD, C3, CFB のタンパク質をコードする領域の遺伝子の塩基配列解析を行い、C3 に稀な S562L 変異を同定した。本変異は患者に加え、母親の塩基配列解析でも同定された。また、本変異は、患者と母親に PCR-RFLP 法でも確認された。本変異の PolyPhen での予測は Benign であった。本変異以外に、CFH に V62I 変異, Y402H 変異, E936D 変異を同定したが、いずれも一般人口にも見られる変異で原因変異ではないと考えた。

家系 2-C の遺伝子解析：

CFH, MCP, CFI, THBD, C3, CFB のタンパク質をコードする領域の遺伝子の塩基配列解析を行った。CFH に V62I 変異, Y402H 変異, THBD に A473V 変異を同定したが、いずれも一般人口にも見られる変異で原

因変異ではないと考えた。したがって、原因変異と思われる稀な変異は見いだせなかった。

D. 考察

臨床症状から非定型 HUS と診断された 5 名の患者を対象に、6 遺伝子 (CFH, MCP, CFI, THBD, C3, CB) のタンパク質をコードする領域の塩基配列を解析した。その結果、1 名の非定型 HUS 患者に非定型 HUS の原因変異である CFH R1215Q 変異を同定した。別の非定型 HUS 患者に非定型 HUS の原因変異である C3 I1157T 変異を同定した。また、別の患者に非定型 HUS の原因変異の可能性のある C3 S562L 変異を同定した。CFH R1215Q 変異および C3 I1157T 変異は欧米の非定型 HUS 患者に同定された変異と同一であった。一方、C3 S562L 変異は、非定型 HUS の原因変異であるかどうかは、発現実験などで確認する必要がある。本研究で同定した 3 つの変異が非定型 HUS の原因変異とすると、5 名の非定型 HUS 患者中 3 名に原因となる遺伝子変異を同定できたことになる。これまでの日本人の非定型 HUS 患者の遺伝子解析は極めて少数に限られている。したがって、本研究班の大きな成果として、系統的に日本人の非定型 HUS 患者の遺伝子解析システムを確立できたといえる。変異を同定できていない症例は、CFHR3 遺伝子の欠失もしくは CFH 遺伝子の部分欠失によるキメラタンパク質の形成の可能性があるので、MLPA 法を用いて解析する予定である。

E. 結論

日本人非定型 HUS 患者 5 名の遺伝子解析を行い、原因変異と思われるミスセンス変異を 3 名の患者に同定した。また、それぞれの変異を迅速に鑑別判定する PCR-RFLP 法を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Fujioka, T. Nakano, K. Hayakawa, K. Irie, Y. Akitake, Y. Sakamoto, K. Mishima, C. Muroi, Y. Yonekawa, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, K. Nishio, K. Okuchi, K. Iwasaki, M. Fujiwara, BK. Siesjö: *ADAMTS13* gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci*, 2012, in press.
- 2) K. Kokame, Y. Kokubo, T. Miyata: Polymorphisms and mutations of *ADAMTS13* in the Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost*, 9(8), 1654-1656, 2011.
- 3) Y. Fujimura, M. Matsumoto, A. Isonishi, H. Yagi, K. Kokame, K. Soejima, M. Murata, T. Miyata: Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on *ADAMTS13* gene analysis in Japan (review). *J Thromb Haemost*, 9 (Suppl. 1), 283-301, 2011.

4) K. Kokame, T. Sakata, Y. Kokubo, T. Miyata: von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population. *J Thromb Haemost*, 9(7), 1426-1428, 2011.

5) M. Rybaltowski, Y. Suzuki, H. Mogami, I. Chlebinska, T. Brzoska, A. Tanaka, F. Banno, T. Miyata, T. Urano: In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall. *Pflugers Arch*, 461(6), 623-633, 2011.

6) 宮田敏行、小亀浩市、秋山正志、坂野史明、中山大輔、武田壮一、ADAMTS13 研究の最先端 (総説)、第 73 回血液学会学術集会シンポジウム、臨床血液、印刷中、2012 年

7) 宮田敏行、喜多俊行、内因系凝固反応と血栓症、VI. 凝固線溶系、*Annual Review 血液* 2012、236-244 頁、2012 年

2. 学会発表

1) Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Koichi Kokame, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata, Generation of knock-in mice carrying a K196E point mutation in protein S, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28, 2011

2) Tomasz Brzoska, Mirosław Rybaltowski, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Iwona Chlebinska, Aki Tanaka, Fumiaki

Banno, Toshiyuki Miyata, Tetsumei Urano, Imaging analysis of the interaction between unusually large von-Willebrand factor multimers and platelets on vascular endothelial cells in living animals, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28, 2011

3) Kokame Koichi, Kokubo Yoshihiro, Miyata Toshiyuki, Estimation of the number of individuals with a congenital ADAMTS13 deficiency in Japan, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28, 2011

4) Toshiyuki Miyata, Thrombotic thrombocytopenic purpura and ADAMTS13, 3rd SIRIC-NCVC Joint Symposium, November 11, 2011, Seoul, Korea.

5) 秋山正志、中山大輔、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行、P475S 型 ADAMTS13 タンパク質の部分立体構造決定、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21-24 日、京都市

6) 宮田敏行、小亀浩市、秋山正志、武田壮一、坂野史明、ADAMTS13 研究の最先端、シンポジウム 6 血栓止血学・血管生物学の最近の進歩、第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 14-16 日、名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 本研究で遺伝子配列解析の対象にした 6 遺伝子

Gene name	CFH	MCP	CFI	C3	CFB	THBD
Protein name	complement factor H	membrane cofactor protein, CD46	complement factor I	complement component 3	complement factor B	thrombomodulin
Cytogenetic location	1q32-q32.1	1q32.2	4q25	19p13.3-p13.2	6p21.33	20p11.21
Number of exons	23 exons	14 exons	13 exons	41 exons	18 exons	1 exon
Amino acid residues (including signal peptide)	1,213 amino acids	392 amino acids	583 amino acids	1,663 amino acids	764 amino acids	575 amino acids
Molecular weight of protein	150 kD	55 - 75 kD	88 kD	185 kD	90 kD	74 kD
soluble / transmembrane	soluble	transmembrane	soluble	soluble	soluble	transmembrane
Function	cofactor	cofactor	protease	complement component	complement component	cofactor

表 2. 5 家系の非定型 HUS 患者に同定されたミスセンス変異

Family	aHUS-L	aHUS-X	aHUS-2A	aHUS-2F	aHUS-2C
CFH	V62I	R1215Q*	Y402H	V62I	V62I
	Y402H	V62I		Y402H	Y402H
	V837I	Y402H		E936D	
	E936D	E936D			
MCP	no mutation	S13F	no mutation	no mutation	no mutation
CFI	no mutation	no mutation	no mutation	no mutation	no mutation
C3	no mutation	no mutation	I1157T**	S562L***	no mutation
CFB	no mutation	R32W	no mutation	no mutation	no mutation
THBD	no mutation	A473V	A473V	no mutation	A473V

CFH, R1215Q*: identified in proband and father as hetero, not in mother and brother.

C3, I1157T**: identified in proband and father as hetero, not in mother.

C3, S562L***: identified in proband, mother, and brother as hetero, not in father.

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
吉田瑤子、 松本雅則、 早川正樹、 藤村吉博	Atypical HUS	日本アフェレシ ス学会雑誌	31	27-32	2012
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	283-301	2011
Akiyama R, Komori I, Hiramoto R, Isonishi A, Matsumoto M, Fujimura Y.	H1N1 influenza (swine flu)-associated thrombotic microangiopathy with a markedly high plasma ratio of von Willebrand factor to ADAMTS13.	Intern Med	50	643-647	2011
Yamaguchi Y, Moriki T, Igari A, Nakagawa T, Wada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Murata M.	Epitope analysis of autoantibodies to ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura.	Thromb Res	128	169-173	2011
Uemura M, Fujimura Y, Ko S, Matsumoto M, Nakajima Y, Fukui H.	Determination of ADAMTS13 and Its Clinical Significance for ADAMTS13 supplementation therapy to improve the survival of patients with decompensated liver cirrhosis.	Int J Hepatol		doi:10.406 1/2011/759 047	2011
M. Rybaltowski, Y. Suzuki, H. Mogami, I. Chlebinska, T. Brzoska, A. Tanaka, F. Bannno, T. Miyata, T. Urano	In vivo imaging analysis of the interaction betewwn unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall.	Pflugers Arch.	461	623-633	2011

K. Kokame, T. Sakata, Kokubo, T. Miyata	Von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population.	J Thromb Haemost.	9	1426-1428	2011
K. Kokame, Y. Kokubo, T. Miyata	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
Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y.	Paradigm shift of childhood TTP with severe ADAMTS13 deficiency.	Le Presse Médicale		doi:10.4061/2011/759047	2012
Matsumoto M, Bennett C. L., Isonishi A, Qureshi Z, Hori Y, Hayakawa M, Yoshida Y, Yagi H, Fujimura Y.	Acquired idiopathic ADAMTS13 activity deficient thrombotic thrombocytopenic purpura in a population from Japan.	PLoS ONE	7	E33029	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

Atypical HUS

吉田 瑤子・松本 雅則・早川 正樹・藤村 吉博

奈良県立医科大学付属病院輸血部

Atypical Hemolytic Uremic Syndrome

Yoko Yoshida, Masanori Matsumoto, Masaki Hayakawa and Yoshihiro Fujimura

Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University

Summary Hemolytic uremic syndrome (HUS) is characterized by the triad of microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia, and renal impairment. HUS is classified into two groups: diarrheal-associated (D+HUS) and non-diarrheal [atypical (a)-HUS]. D+HUS is the common form, accounting for 90% of cases of HUS. D+HUS is caused by the infection of Shigatoxin produced by bacteria, such as *E. coli* O157:H7. aHUS is rare and has a poor prognosis, with mortality rates of up to 25% and 50% requiring renal transplantation. Recent studies have revealed that aHUS is a disease of complement dysregulation with 50-60% of cases involving the complement regulatory genes, *factor H* (CFH), *membrane cofactor protein* (MCP; CD46) and *factor I* (FI) and so on. However, to date there are a few reports of aHUS in Japan. This may be caused by paucity of diagnostic strategy for aHUS. Therefore, it is necessary to establish an appropriate diagnostic pathway focusing on the complement system for choosing the most favorable therapeutic approach in Japan.

Key words: hemolytic uremic syndrome, complement system, complement factor H

1. はじめに

溶血性尿毒症症候群 hemolytic uremic syndrome (HUS) は、微小血管障害性溶血性貧血、血小板減少、腎不全を3徴候とする疾患である¹⁾。HUSの約90%は下痢を伴うHUS (diarrheal HUS, D+HUS) であり、O157:H7, O111:H8, O103:H2, O121, O145, O26などの志賀毒素産生細菌に感染することで発症する。

一方HUSの中で約10%の割合を占め、下痢を伴わないHUSをatypical HUS (aHUS)と呼ぶ。D+HUSが比較的小児で多く見られるのに対し、aHUSは小児から大人に至るまで幅広い年齢層で見られ、しばしば家族性に発症する。また、予後は非常に悪く死亡率は約25%、約半数が透析を必要とする高度の腎不全に至ると言われている²⁾。

近年aHUSの病因として補体制御機構の異常が注目され、50~60%の症例でH因子をはじめとする様々な補体調節因子の遺伝子異常が報告されている(表1)^{3,4)}。また、2009年にはaHUS患者にトロンボモジュリン(TM)の遺伝子異常も報告されるなど、aHUSにおける病態解析は急速に進んでいる。本稿で

は、補体系を中心にaHUSの病態・治療等について紹介する。

2. aHUSと補体

2.1 補体系

aHUSの病態を理解するうえで、補体活性化とその制御機構の概略を理解することは必須である。補体系は生体の免疫反応に関連する一群の蛋白質であり、30種類以上の血清及び細胞膜蛋白質から構成される。そのうち補体の名前で呼ばれるものは主に9成分あり、これらはC1~C9で表わされる。生体内に異物が侵入すると、補体は連鎖反応的に次々と活性化されることで機能を発揮し、異物の除去を行う。

補体の活性化には、古典経路(classical pathway)、第二経路(alternative pathway)、レクチン経路と呼ばれる3通りの経路が存在する。これらの経路ではそれぞれ補体活性化の開始機序が異なり、古典経路では抗原と反応した抗体によりC1が活性化されることにより補体の活性化が開始し、第二経路では細菌膜表面でC3が直接活性化されることにより活性化が開始する。また、レクチン経路では血清レクチンの1つであるマンノース結合レクチンが細菌膜表面のマンノース

表1 HUSの分類

分類	原因
D+HUS	感染 腸管出血性大腸菌 (O157: H7 など)
atypical HUS	補体系異常-制御因子 <i>H</i> 因子遺伝子異常 抗 <i>H</i> 因子自己抗体 <i>I</i> 因子遺伝子異常 <i>MCP</i> (<i>CD46</i>) 遺伝子異常 <i>THBD</i> 遺伝子異常 <i>B</i> 因子遺伝子異常 <i>C3</i> 遺伝子異常
	-活性化因子 感染 薬剤 その他
	肺炎球菌 抗がん剤 (mitomycin C など), キニンなど 妊娠関連 臓器移植 悪性腫瘍

MCP: membrane cofactor protein, THBD: thrombomodulin.

(文献4改変)

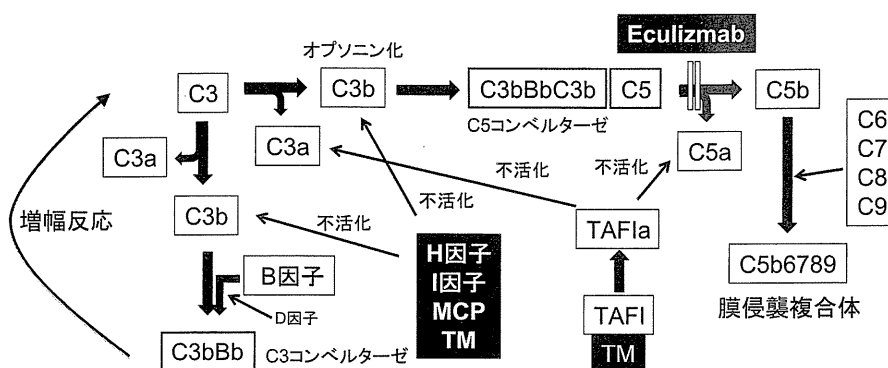


図1 補体第二経路の活性化と制御因子

第二経路ではC3の分解が補体活性化の開始点となる。H因子、I因子、MCP、TMは補体の活性化を抑制する方向に作用し、B因子は活性化する方向に働く。MCP: membrane cofactor protein, TM: thrombomodulin, TAFI: thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (文献4より許可を得て改変)。

に結合することで反応が開始し、C2・C4・C3が選択的に活性化される。いずれの経路においてもC3の分解を経由して反応が進行し、最終的には細胞膜侵襲複合体であるC5b6789 (MAC)を生成する。

2.2 aHUSと補体活性化第二経路

1974年以降、aHUS患者にC3の低下が見られる一方で、C4の低下は見られないとの報告がなされた⁵⁾。第二経路では、活性化反応にC3の分解を伴うが他の経路とは異なりC4の分解は伴わない。これらのことからaHUSには、第二経路の活性化が特異的に関与していることが予想された⁶⁾。

補体活性化第二経路(図1)では、C3が加水分解反応によりC3aとC3bに分解され反応が開始する。C3の分解によって生成したC3bはB因子と結合し、続いてD因子により分解されることでC3bBb(C3コンベルターゼ)を形成する。C3コンベルターゼはC3

の分解を促進させ、生じたC3bとさらに結合してC5コンベルターゼ(C3bBbC3b)を形成する。C5コンベルターゼはC5をC5aとC5bに分解し、生じたC5bがC6~C9と複合体(C5b6789)を形成、膜侵襲複合体として細菌膜に結合し溶菌・細胞膜融解を引き起こす。また、第二経路で活性化されたC3b、C5bはオプソニンとして抗体によるウイルス中和反応作用などを増強する作用を持ち、C3a、C5aは好塩基球や肥満細胞からヒスタミンなどを放出させる、アナフィラトキシンとして働く。

3. 補体調節因子とaHUS

補体の活性化は体内に侵入した病原体を確実に排除し、また過剰な補体の活性化が自身の細胞を傷つけることがないように、補体調節因子によって厳密にコントロールされている。補体調節因子は補体の活性化を促

す活性化因子と、活性化を抑制する制御因子に分類される。活性化因子の代表的なものにはB因子、D因子、プロパージンなどがあり、制御因子には液性調節因子であるI因子、H因子がある。さらに細胞膜上の制御因子として membrane cofactor protein (MCP, CD46), decay accelerating factor (DAF) などが知られている。

aHUSでは、これら補体調節因子の中でも特に第二経路の補体制御因子の異常が数多く報告されている。補体制御因子は regulators of complement activation (RCA) protein と呼ばれ、ヒトでは染色体 1q32 上に gene cluster を形成している。これら因子は共通して complement control protein (CCP) と呼ばれる、約 60 のアミノ酸から成る相同性の高いドメイン構造を持つ。C3 ステップでの制御因子には H 因子、C4 結合蛋白、補体レセプター 1 (CR1), MCP, DAF が含まれる。aHUS におけるこれら補体制御因子の異常は、過剰な補体の活性化や補体による自身の細胞障害を引き起こすと考えられる。

3.1 制御因子異常

3.1.1 H 因子 (Factor H)

H 因子は分子量 150 kDa の血清糖蛋白質であり、

主として肝臓で産生される。その分子は 20 個の CCP から構成され、分子内にそれぞれ 3 か所の C3b 結合ドメインとヘパリン結合ドメインを持つ (図 2)。H 因子は主に第二経路における制御因子として働き、① I 因子による C3b 分解の補助、② C3b への B 因子の接着阻害、③ C3 コンバルターゼ (C3bBb) の解離促進などの機能を持つ。これらの働きは N 末端側の CCP1~4 で行われ、この領域は制御ドメインと呼ばれる。また H 因子はプロテオグリカンなどを介して血管内皮細胞などに結合し、補体による攻撃から自身の細胞を保護するといった役割も持つ⁷⁾。細胞膜表面への結合は C 末端側の CCP19, 20 を介して行われることからこの領域は認識ドメインと呼ばれる。

H 因子と aHUS との関係は 1981 年に初めて報告され⁸⁾、1998 年には Warwicker らにより aHUS 患者に初めて H 因子遺伝子のヘテロ接合体異常が報告された⁹⁾。その後 5 つの大規模なコホート研究の結果 aHUS の 20~30% で H 因子の遺伝子異常が存在することが明らかとなり^{10~15)}、aHUS における遺伝子異常の中で最も頻度が高いことが示された (表 2)。報告された遺伝子異常は分子全体に認められるが、その約 60% が認識ドメインである CCP19, 20 に集中してお

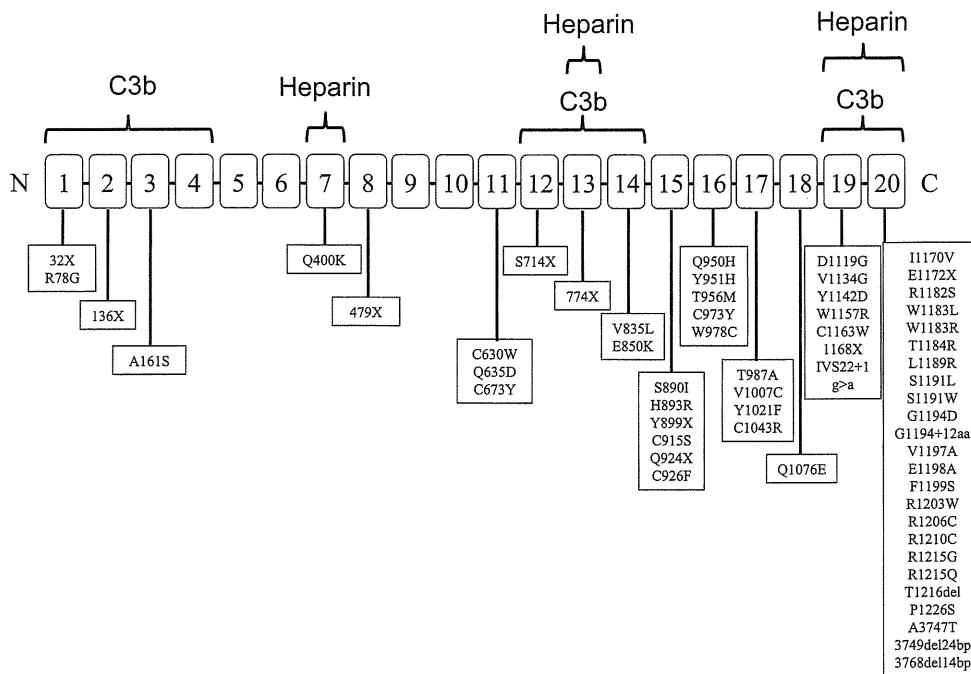


図 2 H 因子の構造と遺伝子異常

H 因子は 20 個の CCP から成り、それぞれ 3 個の C3b 結合部位、ヘパリン結合部位が存在する。CCP1~4 は制御ドメイン、CCP19, 20 は認識ドメインと呼ばれ、補体活性化の制御に重要な役割を果たしている。aHUS で報告された代表的な遺伝子異常の部位を示す (文献 3 より許可を得て改変)。H 因子の遺伝子異常の詳細は、FH aHUS Mutation Database (<http://www.fh-hus.org/>) で紹介されている。

表2 aHUSの遺伝子異常と臨床的特徴

異常蛋白	異常遺伝子	非定型 HUS 中の頻度 (%)	血漿療法に対する短期反応	長期の予後 (死亡率または高度腎障害) (%)	腎移植後の経過
H 因子 CFHR1 と 3 + 抗 H 因子抗体	<i>CFH</i> <i>CFHR1/3</i>	20~30 6	寛解率 60% 血漿交換で寛解率 70~80%	70~80% 高度腎障害 30~40%	再発率 80~90% 再発率 20%
MCP	<i>MCP</i>	10~15	血漿療法の適応なし	20% 未満	再発率 15~20%
I 因子	<i>CFI</i>	4~10	寛解率 30~40%	60~80%	再発率 80~90%
B 因子	<i>CFB</i>	1~2	寛解率 30%	70%	1 例再発
C3	<i>C3</i>	5~10	寛解率 40~50%	60%	再発率 40~50%
トロンボモジュリン	<i>THBD</i>	5	寛解率 60%	60%	1 例再発

(文献 4 引用)

CFH: complement factor H, CFHR: complement factor H-related, MCP: membrane cofactor protein, CFI: complement factor I, CFB: complement factor B, THBD: thrombomodulin.

り (図 2), この領域における遺伝子変異は細胞表面における補体の攻撃からの保護機構の破綻を引き起こすと考えられている。これら遺伝子異常の中で H 因子の量的な減少をもたらす症例は少数であり, 大部分は質的な異常であると考えられている。H 因子の完全欠損症例はきわめて少ないが, 現在まで 16 家系 34 例が報告されている¹⁴⁾。また H 因子の遺伝子異常は健常人でも見られることから, aHUS の発症には他の遺伝的あるいは環境的要因が関与していると考えられている。

また, aHUS 患者の 6~10% で H 因子に対する自己抗体の存在も確認されている¹⁶⁾。H 因子に対する自己抗体は IgG 型で遺伝子異常の好発部位と同じ C 末端領域を認識し, C3b への結合を阻害することで, 補体の過剰な活性化を引き起こす。近年, H 因子に対する自己抗体生成の機序には H 因子関連 (complement factor H related, CFHR) 蛋白質 1~5 の遺伝子異常が深く関わっていることが明らかとなってきた。自己抗体陽性患者では *CFHR1* と *CFHR3* の遺伝子が欠損していることが報告されている¹⁷⁾。これら CFHR 蛋白質の遺伝子は H 因子と同様, 染色体 1q32 上に存在し, H 因子と非常に類似した遺伝子配列を持つ。このように H 因子抗体陽性で, かつ *CFHR* 遺伝子の欠損が見られる aHUS 症例は DEAP (Deficiency of CFHR plasma protein)-HUS として近年注目されている。

3.1.2 MCP

MCP の遺伝子異常は aHUS 患者の約 10~15% で報告されている¹⁵⁾。MCP は膜結合型糖蛋白で, I 因子の補助因子として同一細胞上の C3b や C4b を分解するが, H 因子とは異なり C3 コンベルターゼの崩壊促進には関与しない。MCP 遺伝子異常の患者では, H

因子異常など他の因子の異常に比べ, 比較的予後が良いことが知られている (表 2)。また, 血漿治療の有無による予後の差はなく, 90% 以上の症例で寛解が得られている¹⁵⁾。腎移植後の再発率も低く, これは移植腎に十分な MCP が含まれているためと考えられる。

3.1.3 I 因子

I 因子の遺伝子異常は, aHUS 患者の 4~10% で報告されている¹⁵⁾。I 因子は分子量 88 kDa の血清糖蛋白であり, 主に肝臓で合成される。I 因子は H 因子や MCP, C4 結合蛋白などを補助因子として, C4b や C3b を分解する血漿中のプロテアーゼである。表 2 に示すように, 血漿交換などの治療に対する反応は悪く予後は不良である。

3.1.4 Thrombomodulin (TM)

2009 年に Delvaeye ら¹⁸⁾により, TM の遺伝子異常が aHUS に関与していることが示された。TM は血管内皮細胞上に存在する蛋白で, 抗血栓・抗炎症・細胞保護作用を有している。彼らは 152 例の aHUS 患者のうち 7 例の患者において, 6 種類の *THBD* (*thrombomodulin*) 遺伝子変異を発見した。TM は C3b と H 因子に結合し, I 因子を介した C3b の不活化を促進する。同時に, 血漿 thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) を活性化することにより, C3a, C5a の不活化を促進する働きも持つ (図 1)。TM に遺伝子変異が起こると C3b 不活化能と TAFI の活性化が減弱し, 結果として活性化した補体に対する防御能が低下し aHUS が発症すると言われている。

3.2 活性化因子異常

3.2.1 B 因子, C3

aHUS では補体活性化因子である B 因子と C3 の遺伝子異常により, 機能獲得型異常として補体機能が過剰に活性化する症例も報告されている^{19,20)}。B 因子の

異常は、aHUS の約 1~2% に認められる稀な変異である。変異 B 因子は C3b へ過剰に結合し、C3 コンペルターゼを活性化することで C3b を過剰に産生させる。また、C3 自身の遺伝子変異も aHUS 患者の 4~10% で認められている。この場合、通常 C3 は低値を示すが、C3b の H 因子や MCP への結合が低下し C3b の分解が著減するとされている。

4. aHUS の治療

1970 年代後半から aHUS に対して血漿交換や血漿輸注などの血漿療法が導入され²¹⁾、死亡率は 50% から 25% にまで低下はしたものの、依然として予後不良の疾患である。aHUS の治療ガイドラインによれば、ADAMTS13 活性測定を含めた鑑別診断を行い、aHUS と診断すれば 24 時間以内に血漿交換を行うべきとされている²²⁾。

H 因子の量的異常の治療法として、血漿輸注を早期に開始することで腎機能を維持することができるとの報告がある²³⁾。大多数の補体系機能異常症例では、新鮮凍結血漿 (FFP) を用いた血漿交換が有効であるが²⁴⁾、すべての症例で血漿交換を行う必要はない。血漿交換を継続すると不応になる場合があり²⁵⁾、その結果高度の腎不全となった場合、腎移植単独の再発率は 80~90% と予後は不良である (表 2)¹³⁾。腎臓と肝臓の同時移植では長期予後が良いとの報告もあり²⁶⁾、これは肝移植により正常な H 因子の産生が行われるようになるためと考えられる。

補体調節因子異常の aHUS における血漿療法の効果を表 2 に示すが、いずれも決して満足できるものではない。近年 aHUS、特に血漿療法に抵抗性を示す症例に対して期待されている治療薬が補体第 5 因子に対するモノクローナル抗体、エクリズマブ (Eculizumab) である。エクリズマブは発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) の治療薬として 2007 年に欧米で、本邦では 2010 年に承認されている。最近エクリズマブの aHUS に対する有用性が欧米の複数のグループにより報告されている。これを受けて、米国では大規模な臨床試験が行われ、この 2011 年 9 月に aHUS の治療薬として承認された。エクリズマブの作用機序としては C5 が C5a と C5b に分解されるのを阻害し、C5b6789 による細胞膜侵襲作用を抑制すると考えられている (図 1)。

5. 本邦における aHUS 解析

本稿で紹介した aHUS に関する報告はすべて海外からのものであり、本邦ではこれまで aHUS の系統的解析が殆ど行われていなかった。実際、本邦 aHUS 患者において遺伝子変異が報告されている症例はわずか 2 例であり、うち 1 例はフランスにて解析を実施²⁷⁾、もう 1 例は信州大学にて解析が行われた²⁸⁾。信州大学の症例ではヨーロッパで報告されている遺伝子変異の 1 つが²⁹⁾、患者本人と父親に同定されている。

奈良医大輸血部では 1998 年から ADAMTS13 活性の測定を通して、TMA 患者の診断・登録を行っている。そのうち先天性 TMA と考えられる症例が 86 例存在し、うち 43 例の患者については先天的 ADAMTS13 欠損症である Upshaw-Schulman syndrome (USS) であることを同定した³⁰⁾。残りの 43 例について、その臨床症状、家族歴などから aHUS である可能性が高いと考えている。この 43 例の患者は 27 家系に属し、男性 33 名、女性 10 名であった。H 因子の抗原解析の結果では H 因子完全欠損症例は確認されていないが、家族歴などから遺伝的素因が疑われる症例が数多く存在する。このような現状を踏まえ、我々は現在 aHUS 解析の第一段階として H 因子解析に焦点を当て、溶血アッセイを用いた補体調節因子の機能解析³¹⁾、ELISA 系を用いた抗 H 因子抗体スクリーニング¹⁶⁾などの aHUS スクリーニング検査を立ち上げ、解析を試みている。

6. おわりに

aHUS の診断基準および治療法の確立のために、本邦における aHUS 病態解析は重要である。早期診断・早期治療が可能となれば aHUS 患者の透析導入等を回避することができ、患者の予後や長期間の QOL の改善につながることも期待できる。今後、本邦における aHUS の現状が明らかになることを期待し、前述したスクリーニング系を発展させることで病態解析に努めてゆきたい。

文 献

- 1) Gasser C, Gautier E, Steck A, et al: Hemolytic-uremic syndrome: Bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. *Schweiz Med Wochenschr* **85**: 905-909, 1955
- 2) Noris M, Remuzzi G: Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* **361**: 1676-1687, 2009
- 3) Kavanagh D, Goodship T: Genetic and complement in

- atypical HUS. *Pediatr Nephrol* **25**: 2431-2442, 2010
- 4) 松本雅則：非定型溶血性尿毒症症候群。Annual Review 血液 174-181, 2011
 - 5) Stuhlinger W, Kourilsky O, Kanfer A, et al: Letter: Haemolytic-uraemic syndrome: Evidence for intravascular C3 activation. *Lancet* **2**: 788-789, 1974
 - 6) Noris M, Ruggenenti P, Perna A, et al: Hypocomplementemia discloses genetic predisposition to hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: Role of factor H abnormalities. Italian Registry of Familial and Recurrent Hemolytic Uremic Syndrome/Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *J Am Soc Nephrol* **10**: 281-293, 1999
 - 7) Noris M, Remuzzi G: Hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* **16**: 1035-1050, 2005
 - 8) Thompson RA, Winterborn MH: Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin. *Clin Exp Immunol* **46**: 110-119, 1981
 - 9) Warwicker P, Goodship TH, Donne RL, et al: Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* **53**: 836-844, 1998
 - 10) Richards A, Buddles MR, Donne RL, et al: Factor H mutations in hemolytic uremic syndrome cluster in exons 18-20, a domain important for host cell recognition. *Am J Hum Genet* **68**: 485-490, 2001
 - 11) Caprioli J, Bettinaglio P, Zipfel PF, et al: The molecular basis of familial hemolytic uremic syndrome: Mutation analysis of factor H gene reveals a hot spot in short consensus repeat 20. *J Am Soc Nephrol* **12**: 297-307, 2001
 - 12) Perez-Caballero D, Gonzalez-Rubio C, Gallardo ME, et al: Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet* **68**: 478-484, 2001
 - 13) Neumann HP, Salzmann M, Bohnert-Iwan B, et al: Haemolytic uraemic syndrome and mutations of the factor H gene: A registry-based study of German speaking countries. *J Med Genet* **40**: 676-681, 2003
 - 14) Dragon-Durey MA, Fremeaux-Bacchi V, Loirat C, et al: Heterozygous and homozygous factor H deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulo-nephritis: Report and genetic analysis of 16 cases. *J Am Soc Nephrol* **15**: 787-795, 2004
 - 15) Caprioli J, Noris M, Brioschi S, et al: Genetics of HUS: The impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood* **108**: 1267-1279, 2006
 - 16) Dragon-Durey MA, Loirat C, Cloarec S, et al: Anti-factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* **16**: 555-563, 2005
 - 17) Jozsi M, Licht C, Strobel S, et al: Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood* **111**: 1512-1514, 2008
 - 18) Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, et al: Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* **361**: 345-357, 2009
 - 19) Goicoechea de Jorge E, Harris CL, Esparza-Gordillo J, et al: Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 240-245, 2007
 - 20) Fremeaux-Bacchi V, Miller EC, Liszewski MK, et al: Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* **112**: 4948-4952, 2008
 - 21) Remuzzi G, Misiani R, Marchesi D, et al: Treatment of the hemolytic uremic syndrome with plasma. *Clin Nephrol* **12**: 279-284, 1979
 - 22) Ariceta G, Besbas N, Johnson S, et al: Guideline for the investigation and initial therapy of diarrhea-negative hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* **24**: 687-696, 2009
 - 23) Nathanson S, Fremeaux-Bacchi V, Deschenes G: Successful plasma therapy in hemolytic uremic syndrome with factor H deficiency. *Pediatr Nephrol* **16**: 554-556, 2001
 - 24) Davin JC, Olie KH, Verlaak R, et al: Complement factor H-associated atypical hemolytic uremic syndrome in monozygotic twins: Concordant presentation, discordant response to treatment. *Am J Kidney Dis* **47**: e27-30, 2006
 - 25) Nathansos S, Ulinski T, Fremeaux-Bacchi V, et al: Secondary failure of plasma therapy in factor H deficiency. *Pediatr Nephrol* **21**: 1769-1771, 2006
 - 26) De S, Waters AM, Segal AO, et al: Severe atypical HUS caused by CFH S1191L-case presentation and review of treatment options. *Pediatr Nephrol* **25**: 97-104, 2010
 - 27) Dragon-Durey MA, Sethi SK, Bagga A, et al: Clinical features of anti-factor H auto antibody-associated hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* **21**: 2180-2187, 2010
 - 28) 天野芳郎, 日高義彦, 伊藤有香子, 他: 補体制御因子 factor H の遺伝子変異を持つ非典型的溶血性尿毒症症候群の 1 例. *日小児会誌* **115**(1): 107-112, 2011
 - 29) Caprioli J, Castelletti F, Bucchioni S, et al: Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: The C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease. *Hum Mol Genet* **24**: 3385-3395, 2003
 - 30) Fujimura Y, Matsumoto N, Isonishi A, et al: Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost* **9**: 283-301, 2011
 - 31) Sanchez-Corral P, Gonzalez-Rubio C, Rodriguez de Cordoba S, et al: Functional analysis in serum from atypical hemolytic uremic syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol Immunol* **41**: 81-84, 2004

INVITED REVIEW

Natural history of Upshaw–Schulman syndrome based on *ADAMTS13* gene analysis in Japan

Y. FUJIMURA,* M. MATSUMOTO,* A. ISONISHI,* H. YAGI,* K. KOKAME,† K. SOEJIMA,‡
M. MURATA§ and T. MIYATA†

*Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University, Nara; †Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Osaka; ‡The First Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto; and §Department of Laboratory Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

To cite this article: 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* 2011; 9 (Suppl. 1): 283–301.

Summary. Upshaw–Schulman syndrome (USS) is an extremely rare hereditary deficiency of *ADAMTS13* activity, termed congenital TTP. The clinical signs are usually mild during childhood, often with isolated thrombocytopenia. But their symptoms become more evident when patients have infections or get pregnant. We identified 43 USS-patients in Japan, who ranged in age from early childhood to 79 years of age. Analysing the natural history of these USS patients based on *ADAMTS13* gene mutations may help characterise their clinical phenotypes. Severe neonatal jaundice that requires exchange blood transfusion, a hallmark of USS, was found in 18 of 43 patients (42%). During childhood, 25 of 43 patients were correctly diagnosed with USS without gender disparity. These 25 patients were categorised as having ‘the early-onset phenotype’. Between 15 and 45 years of age, 15 were correctly diagnosed, and, interestingly, they were all female. The remaining three patients were male and were diagnosed when they were older than 45 years of age, suggesting that they were ‘the late-onset phenotype’. Two of these three males developed sudden overt TTP when they were 55 and 63 years old, respectively. These two men had two different homozygous *ADAMTS13* gene mutations, p.R193W/p.R193W and p.C1024R/p.C1024R, respectively. Both of which were not discovered in the US or Western countries. *In vitro* expression studies showed that these two proteins were consistently secreted into the culture medium but to a lesser extent and with reduced activity compared to the wild-type protein. Our results indicate that ‘the late-onset phenotype’ of USS is formed with ethnic specificity.

Keywords: *ADAMTS13* gene mutation, clinical phenotype, natural history, Upshaw–Schulman syndrome.

Introduction

Upshaw–Schulman syndrome (USS) is an hereditary deficiency in the activity of von Willebrand factor-cleaving protease (VWF-CP) [1], termed *ADAMTS13* (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs 13) [2–4]. In the absence of *ADAMTS13*, unusually large VWF multimers (UL-VWFMs) released from vascular endothelial cells are not cleaved appropriately, which induces platelet hyperagglutination under high shear stress [5]. Thus, USS is alternatively called congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). On the other hand, approximately half of congenital atypical haemolytic uremic syndrome (aHUS) cases are caused by genetic mutations in complement regulatory factors, such as factor H, I, and B, and membrane cofactor protein, or thrombomodulin [6]. However, the majority of both TTP and HUS occur in the acquired form, and it has been said that TTP and HUS patients predominantly exhibit neurotropic and nephrotropic signs, respectively. Further, it is often difficult to discriminate between these two diseases in clinical practice [7–9] because both diseases are identified based on common pathological features termed thrombotic microangiopathies (TMAs), which are characterised by organ dysfunction due to platelet thrombi in the microvasculature, consumptive thrombocytopenia, and microangiopathic haemolytic anaemia (MAHA) [10].

The classic hallmarks of USS are severe neonatal jaundice with a negative Coombs test that requires an exchange blood transfusion and repeated childhood episodes of thrombocytopenia and MAHA that are reversed by infusions of fresh frozen plasma (FFP) [11]. However, recent studies indicated that the clinical signs of USS during childhood may be much milder than expected, and often only an isolated thrombocytopenia occurs, causing physicians to sometimes overlook this important disease [12].

Correspondence: Yoshihiro Fujimura, Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara City, 634-8522 Nara, Japan.

Tel.: +81 744 22 3051 ext 3289; fax: +81 744 29 0771.

E-mail: malon@naramed-u.ac.jp

Despite a lengthy history of clinical diagnoses of USS, only 10 years have passed since the disease-related enzyme, ADAMTS13, was discovered [3,4,13,14]. Furthermore, USS is an extremely rare disease, and to date, it is estimated that there have been approximately 100 patients worldwide [15]. In this regard, Nara Medical University has functioned as a TMA referral centre in Japan since 1998 and collected a large dataset of 919 patients with TMA between 1998 and 2008 [16]. In this registry, we identified 41 USS patients in 36 different families who ranged in age from early childhood to 79 years old. Subsequently, until the end of March 2011, we have identified two new USS-patients belonged to different families in Japan. Analysing the natural history of these 43 USS-patients will further our understanding of the clinical significance of ADAMTS13, which functions to regulate the size of platelet-thrombi that form in the microvasculature under high shear stress.

Historical backgrounds

In 1953, Dacie *et al.* [17] reviewed 12 patients with atypical congenital haemolytic anaemia and identified a 6-year-old girl who had experienced repeated episodes of severe jaundice, thrombocytopenia, haemolytic anaemia, and schistocytes since she was a newborn. Before first visiting Dacie, this patient had received a splenectomy but did not improve. She died of renal failure at 7 years of age. This patient was the third of four children, and both the first and second children were jaundiced at birth and died of haemorrhage at 2 years and 4 days old, respectively. The fourth child and the parents were asymptomatic. Thus, the authors concluded that these three patients must have a hitherto unrecognised hereditary blood disease.

In the absence of any known concept of TTP, in 1960, Schulman *et al.* [18] reported an 8-year-old girl who had no coagulation abnormalities but repeated bleeding episodes due to chronic thrombocytopenia and MAHA. These symptoms dramatically improved with fresh plasma infusions, suggested that the patient had a congenital deficiency in a 'platelet-stimulating factor' in her plasma. In 1978, Upshaw [19] reported the case of a 29-year-old female who had repeated episodes of thrombocytopenia and MAHA starting in childhood and was successfully treated with plasma infusions. Of note, both Schulman and Upshaw determined that plasma infusions successfully treated their patients. Rennard and Abe [20] reported a case that was originally identified by Upshaw with 'a slightly decreased level of plasma cold-insoluble globulin (fibronectin) during the acute phase', and proposed a nomenclature of USS for these types of patients. However, no correlation between the fibronectin levels and disease activity in USS patients was reported by Koizumi *et al.* [21] and Goodnough *et al.* [22], including Schulman's original case. Furthermore, after the thrombopoietin assay was established, Miura *et al.* [23] reported five Japanese USS patients with a normal plasma level of thrombopoietin. Thus, all the pathogenic features that were initially postulated for USS have been entirely excluded by subsequent investigations.

For this reason, the term USS was almost forgotten in 1997, when the assay for VWF-CP (now ADAMTS13) activity was established. Instead, the practical diagnostic term of 'chronic relapsing TTP (CR-TTP)' has been historically used. This term was coined by Moake *et al.* [24], who found that UL-VWFMs were present in the plasma of four CR-TTP patients including the Upshaw's case during the remission phase, but disappeared during the acute phase. In 1997, Furlan *et al.* [25] showed that four CR-TTP patients, who were distinct from the cases of Moake *et al.* [24], lacked VWF-CP activity, but did not examine the presence of ADAMTS13 inhibitors. However, it was retrospectively determined that two CR-TTP patients in both the case reports by Moake *et al.* [24] and Furlan *et al.* [25] had congenital TTP, while the remaining two cases in each report had acquired TTP. Under these circumstances, we revisited the term USS [11], which included analysing three Japanese patients with USS, and found that they uniformly had a severe deficiency in VWF-CP activity (determined based on the VWF assay in the presence of 1.5 mol L⁻¹ urea) and no evidence of inhibitors. The parents of these patients were asymptomatic and had moderately decreased VWF-CP activity (17–60% of normal), except for one carrier who had very low VWF-CP activity (5.6% of normal). Later, this carrier was shown to have a unique single nucleotide polymorphism (SNP), a p.P475S mutation in the *ADAMTS13* gene in one allele, which is very common among Japanese people (9.6% of normal individuals are heterozygous for the p.P475S mutation) [26].

In 2001, Levy *et al.* [3] provided solid evidence that linked congenital TTP or USS and *ADAMTS13* gene mutations, and simultaneously other research groups successfully purified this enzyme and/or cloned the encoding cDNA [2,4,13,14].

Patients, materials and methods

USS patients

Forty-three USS patients (28 females and 15 males) belonging to 38 different families and their family members were enrolled in this study.

Assays for plasma ADAMTS13 activity and ADAMTS13 inhibitors

Between 1998 and 2004, our laboratory examined ADAMTS13 activity using a classic VWF assay in the presence of 1.5 mol L⁻¹ urea following the method of Furlan *et al.* [27]. The detection limit of this assay was 3% of the normal control [11]. In 2005, Kato *et al.* [28] developed a novel chromogenic ADAMTS13-act-ELISA using a recombinant VWF substrate (termed GST-VWF73-His). The detection limit of this assay was 0.5% of the normal control [28]. Both assays had a high correlation, and since then, the VWF assay was completely replaced with the act-ELISA. In our patients with USS, the ADAMTS13 activity was determined at least two different occasions, using their plasmas obtained at more than 2 weeks

after the last plasma infusion therapy. Further, in some experiments with normal individuals as described below, FRETTS-VWF73 assays [29] were used.

The ADAMTS13 inhibitor titers were evaluated using the Bethesda method, and the values < 0.5 Bethesda U (BU) mL^{-1} were negative, but those between 0.5 and 1.0 BU mL^{-1} were assumed to be marginal.

Assay for IgG-type plasma ADAMTS13 binding antibody titers

Measurement of plasma anti-ADAMTS13 IgG antibody titers in USS-patients was performed as described by Ferrari *et al.* [30] with a slight modification. Briefly, the recombinant (r) ADAMTS13 was directly coated to micro-titer plates, and after blocking with Protein-Free Blocking Buffers (Pierce, Rockford, IL, USA), the coated plates were incubated with normal and patient plasma dilutions. The IgG-type antibody bound to rADAMTS13 was detected by using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (AbD Serotec, Kidlington, UK) with a TMB substrate kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) at absorbance 450 nm at room temperature for 15 min. The results were calculated as a ratio of sample OD at each dilution divided by normal plasma OD at each dilution. The IgG antibody titer of a sample corresponds to the last dilution at which the ratio is above the cut-off level. This assay kit was kindly provided from Drs Barbara Plaimauer and Friedrich Scheiflinger of Baxter BioScience. In our laboratory, 25 normal plasmas (15 males and 10 males, aged between 20 and 40 years) consistently showed the titer of IgG-type binding antibody with a < 25 -fold dilution (shown as $< 25 \times$ in Table 1).

ADAMTS13 gene analysis

All DNA analyses of the *ADAMTS13* gene were performed as previously described [26], with permission from the Ethics Committees of both the sample-collecting hospitals and the institute that performed the gene analysis. Hereafter, the disease-causing mutations (DCMs) of ADAMTS13 are highlighted in bold.

Results

ADAMTS13 SNPs among Japanese individuals

The human *ADAMTS13* gene is located on chromosome 9q34. The gene consists of 29 exons, and the translated enzyme contains 1427 amino acid residues with a multi-domain structure [2,4]. To date, more than 10 SNPs in *ADAMTS13* have been identified worldwide [3,26]. Among these, Japanese people ($n = 3616$) had six SNPs with the following allele frequencies, respectively: p.T339R (exon 9) (2.7%), p.Q448E (exon 12) (19.2%), p.P475S (exon 12) (5.0%), p.P618A (exon 16) (2.7%), p.S903L (exon 21) (4.8%), and p.G1181R (exon 25) (2.2%) [31]. Both p.T339R and p.P618A are almost completely linked in the

general Japanese population, but this linkage may not exist in the Caucasian population as some reports have described individuals carrying p.P618A but not p.T339R [32,33]. Plasma and rADAMTS13 with the Asian-specific SNP, p.P475S [26,34,35], has markedly reduced activity compared to the wild-type protein in both the VWFM assay in the presence of urea (1.5 mol L^{-1}) [26] and the FRETTS-VWF73 assay in the absence of urea [36], although the contribution of this polymorphism to thrombotic diseases has not been determined.

Recently, we have analysed the nucleotide sequences of *ADAMTS13* in 128 individuals without a history of TTP and identified 14 rare nonsynonymous mutations. Interestingly, among these 14 mutations, three mutations of **p.I673F** (exon 17), **p.Q723K** (exon 18), and **c.3220del TACC**, were also found as DCMs for USS in this study (below). Thus, the remaining 11 mutations may or may not be associated with a reduced activity of plasma ADAMTS13 [31].

Natural history of 43 USS-patients in Japan

Until the end of March 2011, we identified 43 USS patients in 38 different families (Family USS-A~LL) who ranged in age from early childhood to 79 years old. Hence, we present an up-dated natural history of these 43 USS patients together with their family members (Tables 1 and 2).

Family USS-A

Patient

One male (USS-A4) born in 1999.

Brief clinical data

The history of USS-A4 (*ADAMTS13* genotype: **p.R268P**/p.Q448E-**p.C508Y**) before he reached 5 years of age was previously described [11,26,37]. He currently receives biweekly FFP infusions (10 mL kg BW^{-1}) that are prepared from several fixed donors to prevent allergic reactions. He contracted the seasonal influenza A virus in 2010 and became severely ill with a reduced platelet count but did not develop overt TTP. He is currently in good clinical condition and has not had signs of renal or hepatic dysfunction. Both of his parents are asymptomatic carriers, but his father, aged 45 years old, has a **p.R268P**/p.P475S genotype and very low plasma ADAMTS13 activity at 5.6% of normal by the VWFM assay in the presence of 1.5 mol L^{-1} urea [26] and 3.6% by the chromogenic ADAMTS13-act-ELISA in the absence of urea (unpublished data).

Family USS-B

Patient

One female (USS-B3) born in 1986.

Table 1 Forty-three Japanese patients with USS registered in Nara Medical University and their ADAMTS13 gene mutations

No.	Patient	Year of birth	Gender	ADAMTS13			ADAMTS13 gene mutations				Reference numbers and remarks
				Activity (%)	Inhibitor (BU mL ⁻¹)	Titer of IgG-type binding antibody (Year of examination)	Father's origin		Mother's origin		
							DCM	Missence SNP	DCM	Missence SNP	
1	A4	1999	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2001), < 25 × (2011)	p.R268P		p.C508Y	p.Q448E	11,26,37
2	B3	1986	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2005), < 25 × (2008)	p.Q449X		p.Q449X		11,26,38
3	C3	1972	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (1999)	c.414+1G>A		c.414+1G>A		39,40
4	D4	1978	F	< 0.5	< 0.5	25 × (2001), < 25 × (2009)	p.I673F		c.414+1G>A		40,41
5	E4	1985	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2001), < 25 × (2011)	p.I673F		p.C908Y		40
6	F3	1993	M	0.6	< 0.5	< 25 × (2002), < 25 × (2009)	p.R193W		c.1244+2T>G		40
7	G3	1987	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	p.R1123C		c.686+1G>A		40
8	H3	1951	M	0.6	< 0.5	*	p.A250V		c.330+1G>A		42
9	I4	1972	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2003), < 25 × (2009)	p.H234Q		p.R1206X		43
10	J3	1977	F	< 0.5–0.8	< 0.5	< 25 × (2000)	p.R312C		c.3198delCT		†
11	J4	1979	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2000)	p.R312C		c.3198delCT		†
12	K3	1976	F	< 0.5–0.7	< 0.5	200 × (2003), 400 × (2011)	p.Y304C		p.G525D	p.T339R, p.Q448E, p.P618A	12
13	K4	1978	F	< 0.5	< 0.5	25 × (2003), 100 × (2011)	p.Y304C		p.G525D	p.T339R, p.Q448E, p.P618A	12
14	L2	1967	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2003)	p.Q1302X	p.P618A	p.R125VfsX6	p.T339R, p.Q448E	12
15	L3	1972	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2003)	p.Q1302X	p.P618A	p.R125VfsX6	p.T339R, p.Q448E	12
16	M3	1969	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2002)	p.R193W		p.R349C		12
17	M4	1971	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2002)	p.R193W		p.R349C		12
18	N6	1986	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (1999), < 25 × (2005)	p.H234R	p.P475S	c.3220delTACC		11,37
19	O4	1958	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	p.I178T		p.Q929X		12
20	P3	1971	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2003), < 25 × (2005)	p.C908Y				45 <i>de novo</i> mutation (p.C322G, p.T323R, p.F324L)
21	Q1	1983	M	< 0.5–0.7	< 0.5	25 × (2004), 25 × (2009)	p.G227R	p.G1181R	p.C908Y		46
22	Q2	1988	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2007), < 25 × (2009)	p.G227R	p.G1181R	p.C908Y		46
23	R5	1982	F	< 0.5	< 0.5	25 × (2005)	p.R193W		p.A606P	p.T339R, p.Q448E, p.P618A	12
24	S3	1982	M	0.9	< 0.5	< 25 × (1998)	*		*		†
25	T4	1981	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	c.3220delTACC		c.3220delTACC		47
26	U3	1990	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	c.2259delA		c.2259delA		†
27	V3	1983	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	p.W1081X		p.R193W		†
28	W4	1990	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2005), < 25 × (2009)	p.G550R	p.Q448E	*	p.P475S	†
29	X5	1963	F	< 0.5	< 0.5	200 × (2004)	*	p.G1181R	*	p.P475S	†
30	Y3	1960	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2005)	p.G385E		p.R1206X		†
31	Z3	1971	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2006), < 25 × (2009)	p.R193W		p.R193W		12
32	AA3	1987	F	< 0.5	< 0.5	200 × (2006)	*		*		†
33	BB3	1947	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2006)	p.R193W		p.R193W		†
34	CC5	2004	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2007)	p.Q723K		p.R398C		†
35	DD5	2007	F	< 0.5	< 0.5	25 × (2007), < 25 × (2009)	p.R268P		p.Y304C		†
36	EE4	2003	M	< 0.5	< 0.5	200 × (2008), 200 × (2011)	c.2259delA		c.2259delA		†
37	FF3	1991	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2008)	p.Q449X		p.Q449X		48

Table 1 (Continued).

		ADAMTS13					ADAMTS13 gene mutations				
No.	Patient	Year of birth	Gender	Activity (%)	Inhibitor (BU mL ⁻¹)	Titer of IgG-type binding antibody (Year of examination)	Father's origin		Mother's origin		Reference numbers and remarks
							DCM	Missence SNP	DCM	Missence SNP	
38	GG2	1931	M	2.4–3.4	< 0.5	< 25 × (2008)	p.C1024R		p.C1024R		†
39	HH4	2003	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2008)	p.Q449X		c.4119delG		†
40	II3	1977	F	< 0.5	< 0.5	50 × (1998), 50 × (2009)	*		*		†
41	JJ3	1980	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	c.1885delT		p.C908Y		Parent's origin is unknown†
42	KK3	1976	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2011)	*		*		†
43	LL4	1981	F	< 0.5–1.8	< 0.5–1.4	> 400 × (2002), 200 × (2011)	p.C438S		p.G909R	p.T339R, p.Q448E, p.P618A	†

DCM, disease causing mutation; SNP, single nucleotide polymorphism; USS, Upshaw–Schulman syndrome. *Undetermined. †Unpublished.

Brief clinical data

USS-B3 (*ADAMTS13* genotype: **p.Q449X/p.Q449X**) is an only child who was born in Hokkaido to non-consanguineous parents. Her history prior to reaching 5 years of age was previously described [11,26,38]. Since childhood, she has received prophylactic FFP infusions. As a consequence, she was infected with hepatitis C and has received interferon therapy on two different occasions. In both instances, accelerated thrombocytopenia was observed despite the regular prophylactic FFP infusions. Furthermore, during her early childhood, she received DDAVP (1-desamino-8-D-arginine vasopressin) infusion once that immediately aggravated her clinical signs, including haematuria and thrombocytopenia. Currently, her renal function is normal and her liver function is well preserved (communication with Dr Mutsuko Konno). Her parents initially stated that they had a non-consanguineous marriage. However, a subsequent ancestral analysis revealed that two great-grandparents of USS-B3 on the paternal and maternal sides migrated from the same area (a small fisherman's village) of Iwate to Hokkaido at the end of the 19th century when Hokkaido was an undeveloped island, and the pioneers settled from the Japanese mainland (Honshu). This fisherman's village is located in the northern part of Honshu (Tohoku) facing the Pacific ocean, an area severely damaged several times by earthquake and tsunami – most recently in March 11, 2011. In the old days, this small village was isolated from neighbours, and was surrounded by mountains, suggesting that there were many consanguineous marriages within this village.

Family USS-C

Patient

One male (USS-C3) born in 1972.

Brief clinical data

USS-C3 (*ADAMTS13* genotype: **c.414+1G>A/c.414+1G>A**) is the last of four children to consanguineous parents (first cousins). Notably, the patient's elder brother (third sibling) died of melena soon after birth. The history of this patient was previously described [39,40]. At 8 years of age, USS-C3 was clinically diagnosed with USS. Since then, he has received prophylactic FFP (160 mL) infusions every 2–4 weeks. However, his renal function due to chronic nephritis gradually deteriorated, and in 1995 he required continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). Because of repeated peritonitis associated with CAPD, his therapy for renal insufficiency was changed to haemodialysis (three times per week) in 1999. However, his cardiac function decreased, and he eventually died of chronic heart failure in 2010 at 38 years of age.

Family USS-D

Patient

One female (USS-D4) born in 1978.