

12. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM (1996) Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 87(9):3531–3544
13. Liu HW, Kwong YL, Bourke C, Lam CK, Lie AK, Wei D, Chan LC (1994) High incidence of thrombophilia detected in Chinese patients with venous thrombosis. *Thromb Haemost* 71(4):416–419
14. Shen MC, Lin JS, Tsay W (2000) Protein C and protein S deficiencies are the most important risk factors associated with thrombosis in Chinese venous thrombophilic patients in Taiwan. *Thromb Res* 99(5):447–452
15. Ho CH, Chau WK, Hsu HC, Gau JP, Yu TJ (2000) Causes of venous thrombosis in fifty Chinese patients. *Am J Hematol* 63(2):74–78
16. Suehisa E, Nomura T, Kawasaki T, Kanakura Y (2001) Frequency of natural coagulation inhibitor (antithrombin III, protein C and protein S) deficiencies in Japanese patients with spontaneous deep vein thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 12(2):95–99
17. Chen TY, Su WC, Tsao CJ (2003) Incidence of thrombophilia detected in southern Taiwanese patients with venous thrombosis. *Ann Hematol* 82(2):114–117
18. Sakata T, Okamoto A, Mannami T, Tomoike H, Miyata T (2004) Prevalence of protein S deficiency in the Japanese general population: the Suita study. *J Thromb Haemost* 2(6):1012–1013
19. Sakata T, Okamoto A, Mannami T, Matsuo H, Miyata T (2004) Protein C and antithrombin deficiency are important risk factors for deep vein thrombosis in Japanese. *J Thromb Haemost* 2(3):528–530
20. Kinoshita S, Iida H, Inoue S, Watanabe K, Kurihara M, Wada Y, Tsuda H, Kang D, Hamasaki N (2005) Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem* 38(10):908–915
21. Angchaisuksiri P, Atichartakarn V, Aryurachai K, Archararit N, Rachakom B, Atamasirikul K, Tiraganjana A (2007) Risk factors of venous thromboembolism in Thai patients. *Int J Hematol* 86(5):397–402
22. Zhu T, Ding Q, Bai X, Wang X, Kaguelidou F, Alberti C, Wei X, Hua B, Yang R, Wang X, Wang Z, Ruan C, Schlegel N, Zhao Y (2011) Normal ranges and genetic variants of antithrombin, protein C and protein S in the general Chinese population. Results of the Chinese hemostasis investigation on natural anticoagulants study I group. *Haematologica* 96(7):1033–1040
23. Tang L, Lu X, Yu JM, Wang QY, Yang R, Guo T, Mei H, Hu Y (2012) *PROC* c.574_576del polymorphism: a common genetic risk factor for venous thrombosis in the Chinese population. *J Thromb Haemost* 10(10):2019–2026
24. Shen MC, Lin JS, Tsay W (1997) High prevalence of antithrombin III, protein C and protein S deficiency, but no factor V Leiden mutation in venous thrombophilic Chinese patients in Taiwan. *Thromb Res* 87(4):377–385
25. Gandrille S, Borgel D, Sala N, Espinosa-Parrilla Y, Simmonds R, Rezende S, Lind B, Mannhalter C, Pabinger I, Reitsma PH, Formstone C, Cooper DN, Saito H, Suzuki K, Bernardi F, Aiach M (2000) Protein S deficiency: a database of mutations—summary of the first update. *Thromb Haemost* 84(5):918
26. Yin T, Takeshita S, Sato Y, Sakata T, Shin Y, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Kojima T, Madoiwa S, Sakata Y, Murata M, Ikeda Y, Miyata T (2007) A large deletion of the *PROS1* gene in a deep vein thrombosis patient with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 98(4):783–789
27. Kimura R, Sakata T, Kokubo Y, Okamoto A, Okayama A, Tomoike H, Miyata T (2006) Plasma protein S activity correlates with protein S genotype but is not sensitive to identify K196E mutant carriers. *J Thromb Haemost* 4(9):2010–2013
28. Ikejiri M, Wada H, Sakamoto Y, Ito N, Nishioka J, Nakatani K, Tsuji A, Yamada N, Nakamura M, Ito M, Nobori T (2010) The association of protein S Tokushima-K196E with a risk of deep vein thrombosis. *Int J Hematol* 92(2):302–305
29. Miyata T, Hamasaki N, Wada H, Kojima T (2012) More on: racial differences in venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 10(2):319–320
30. Yamazaki T, Sugiura I, Matsushita T, Kojima T, Kagami K, Takamatsu J, Saito H (1993) A phenotypically neutral dimorphism of protein S: the substitution of Lys155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. *Thromb Res* 70(5):395–403
31. Shigekiyo T, Uno Y, Kawachi S, Saito S, Hondo H, Nishioka J, Hayashi T, Suzuki K (1993) Protein S Tokushima: an abnormal protein S found in a Japanese family with thrombosis. *Thromb Haemost* 70(2):244–246
32. 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 (2006) Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* 107(4):1737–1738
33. Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T (2006) Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol* 83(3):217–223
34. Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, Okada H, Takeshita S, Sakata T, Kokame K, Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y (2009) Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res* 124(1):14–18
35. Neki R, Fujita T, Kokame K, Nakanishi I, Waguri M, Imayoshi Y, Suehara N, Ikeda T, Miyata T (2011) Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol* 94(2):150–155
36. Hayashi T, Nishioka J, Suzuki K (1995) Molecular mechanism of the dysfunction of protein S(Tokushima) (Lys155→Glu) for the regulation of the blood coagulation system. *Biochim Biophys Acta* 1272(3):159–167
37. Liu W, Yin T, Okuda H, Harada KH, Li Y, Xu B, Yang J, Wang H, Fan X, Koizumi A, Miyata T (2013) Protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism, is limited to Japanese. *Thromb Res* 132(2):314–315
38. Tsay W, Shen MC (2004) R147W mutation of *PROC* gene is common in venous thrombotic patients in Taiwanese Chinese. *Am J Hematol* 76(1):8–13
39. Tang L, Guo T, Yang R, Mei H, Wang H, Lu X, Yu J, Wang Q, Hu Y (2012) Genetic background analysis of protein C deficiency demonstrates a recurrent mutation associated with venous thrombosis in Chinese population. *PLoS ONE* 7(4):e35773
40. Tsay W, Greengard JS, Montgomery RR, McPherson RA, Fucci JC, Koerper MA, Coughlin J, Griffin JH (1993) Genetic mutations in ten unrelated American patients with symptomatic type I protein C deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 4(5):791–796
41. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, Conkie JA, Bertina RM (1995) Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 73(1):87–93
42. Miyata T, Sakata T, Yasumuro Y, Okamura T, Katsumi A, Saito H, Abe T, Shirahata A, Sakai M, Kato H (1998) Genetic analysis of protein C deficiency in nineteen Japanese families: five recurrent defects can explain half of the deficiencies. *Thromb Res* 92(4):181–187
43. Matsuda M, Sugo T, Sakata Y, Murayama H, Mimuro J, Tanabe S, Yoshitake S (1988) A thrombotic state due to an abnormal protein C. *N Engl J Med* 319(19):1265–1268
44. Miyata T, Zheng YZ, Sakata T, Tsushima N, Kato H (1994) Three missense mutations in the protein C heavy chain causing type I and type II protein C deficiency. *Thromb Haemost* 71(1):32–37

45. Sakata T, Kario K, Katayama Y, Matsuyama T, Kato H, Miyata T (2000) Studies on congenital protein C deficiency in Japanese: prevalence, genetic analysis, and relevance to the onset of arterial occlusive diseases. *Semin Thromb Haemost* 26(1):11–16
46. Heit JA, Petterson TM, Owen WG, Burke JP, DE Andrade M, Melton LJ 3rd (2005) *Thrombomodulin* gene polymorphisms or haplotypes as potential risk factors for venous thromboembolism: a population-based case-control study. *J Thromb Haemost* 3(4):710–717
47. Sugiyama S, Hirota H, Kimura R, Kokubo Y, Kawasaki T, Suehisa E, Okayama A, Tomoike H, Hayashi T, Nishigami K, Kawase I, Miyata T (2007) Haplotype of thrombomodulin gene associated with plasma thrombomodulin level and deep vein thrombosis in the Japanese population. *Thromb Res* 119(1):35–43
48. Tang L, Wang HF, Lu X, Jian XR, Jin B, Zheng H, Li YQ, Wang QY, Wu TC, Guo H, Liu H, Guo T, Yu JM, Yang R, Yang Y, Hu Y (2013) Common genetic risk factors for venous thrombosis in the Chinese population. *Am J Hum Genet* 92(2):177–187
49. Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, Del-Favero J, Plaisance S, Claes B, Lambrechts D, Zoja C, Remuzzi G, Conway EM (2009) Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *New Engl J Med* 361(4):345–357
50. Dennis J, Johnson CY, Adediran AS, de Andrade M, Heit JA, Morange PE, Tregouet DA, Gagnon F (2012) The endothelial protein C receptor (*PROCR*) Ser219Gly variant and risk of common thrombotic disorders: a HuGE review and meta-analysis of evidence from observational studies. *Blood* 119(10):2392–2400
51. Ireland HA, Cooper JA, Drenos F, Acharya J, Mitchell JP, Bauer KA, Morrissey JH, Esnouf MP, Humphries SE (2009) FVII, FVIIa, and downstream markers of extrinsic pathway activation differ by EPCR Ser219Gly variant in healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(11):1968–1974
52. Chen XD, Tian L, Li M, Jin W, Zhang HK, Zheng CF (2011) Relationship between endothelial cell protein C receptor gene 6936A/G polymorphisms and deep venous thrombosis. *Chin Med J (Engl)* 124(1):72–75
53. Yin G, Jin X, Ming H, Zheng X, Zhang D (2012) Endothelial cell protein C receptor gene 6936A/G polymorphism is associated with venous thromboembolism. *Exp Ther Med* 3(6):989–992
54. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, Catanese J, Young BA, Reitsma PH, Devlin JJ, Rosendaal FR (2008) Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA* 299(11):1306–1314
55. Tregouet DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Juhan-Vague I, Alessi MC, Tiret L, Lathrop M, Emmerich J, Morange PE (2009) Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood* 113(21):5298–5303
56. de Haan HG, Bezemer ID, Doggen CJ, Le Cessie S, Reitsma PH, Arellano AR, Tong CH, Devlin JJ, Bare LA, Rosendaal FR, Vossen CY (2012) Multiple SNP testing improves risk prediction of first venous thrombosis. *Blood* 120(3):656–663

ORIGINAL ARTICLE

Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of *ADAMTS13* large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndromeYuka Eura¹, Koichi Kokame¹, Toshiro Takafuta², Ryojiro Tanaka³, Hikaru Kobayashi⁴, Fumihiro Ishida⁵, Shuichi Hisanaga⁶, Masanori Matsumoto⁷, Yoshihiro Fujimura⁷ & Toshiyuki Miyata¹¹Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan²Department of Hematology and Clinical Immunology, Nishi-Kobe Medical Center, Kobe, Hyogo, Japan³Department of Nephrology, Hyogo Prefectural Kobe Children's Hospital, Kobe, Hyogo, Japan⁴Department of Hematology, Nagano Red Cross Hospital, Nagano, Japan⁵Department of Biomedical Laboratory Sciences, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Nagano, Japan⁶Department of Nephrology, Koga General Hospital, Miyazaki, Japan⁷Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University, Kashihara, Nara, Japan**Keywords***ADAMTS13*, genetic analysis, hereditary disease, mutation, quantitative PCR, thrombotic thrombocytopenic purpura, Upshaw-Schulman syndrome**Correspondence**Koichi Kokame, Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Osaka 565-8565, Japan.
Tel: +81 6 6833 5012; Fax: +81 6 6835 1176; E-mail: kame@ncvc.go.jp**Funding Information**

Y. E. was a research resident supported by the Association for Preventive Medicine of Japan at the National Cerebral and Cardiovascular Center. This work was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan; from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; from Japan Society for the Promotion of Science; and from the Takeda Science Foundation.

Received: 1 November 2013; Revised: 18 December 2013; Accepted: 19 December 2013

doi: 10.1002/mgg3.64

Abstract

Direct sequencing is a popular method to discover mutations in candidate genes responsible for hereditary diseases. A certain type of mutation, however, can be missed by the method. Here, we report a comprehensive genomic quantitative polymerase chain reaction (qPCR) to complement the weakness of direct sequencing. Upshaw-Schulman syndrome (USS) is a recessively inherited disease associated with severe deficiency of plasma *ADAMTS13* activity. We previously analyzed *ADAMTS13* in 47 USS patients using direct sequencing, and 44 of them had either homozygous or compound heterozygous mutations. Then, we sought to reveal more extensive defects of *ADAMTS13* in the remaining three patients. We quantified copy numbers of each *ADAMTS13* exon in the patients by using genomic qPCR. Each primer pair was designed to contain at least one of the two primers used in direct sequencing, to avoid missing any exonic deletions. The qPCR demonstrated heterozygous loss of exons 7 and 8 in one patient and exon 27 in the other, and further analysis revealed c.746_987+373del1782 and c.3751_3892+587del729, respectively. Genomic qPCR provides an effective method for identifying extensive defects of the target genes.

Target exon resequencing using direct sequencing is a popular method to discover causative mutations in the candidate genes responsible for hereditary diseases. Homozygous or compound heterozygous mutations are

often identified in the corresponding genes of the patients with autosomal-recessive diseases. In some cases, however, only one or no causative mutation is identified in the responsible gene: (an)other mutation(s) may be

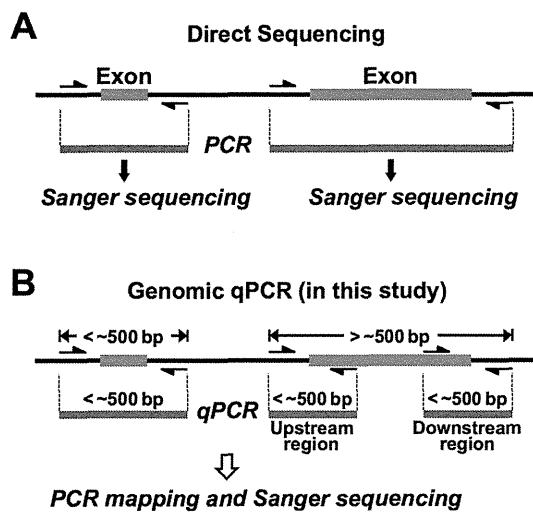


Figure 1. Principles of direct sequencing and genomic qPCR for genetic analysis. (A) In direct sequencing, target regions are amplified by PCR using primer pairs (arrows) usually designed from the intronic sequences flanking each exon, and the PCR products are directly sequenced by the Sanger method. (B) In genomic qPCR, copy numbers of target regions are quantified by real-time PCR. Each primer pair contains at least one of the two primers used in direct sequencing: common primer pairs are used for the regions smaller than ~500 bp, and, for accurate qPCR, one common and one specific primer are used for the regions larger than ~500 bp. If abnormal copy numbers are detected, PCR mapping and sequencing are performed to determine the precise sites of defects.

missed by the method. Although next-generation sequencing may be useful in such cases, it needs special equipments and is still expensive. In this study, we report a comprehensive genomic quantitative PCR (qPCR), which will be a powerful tool in combination with direct sequencing.

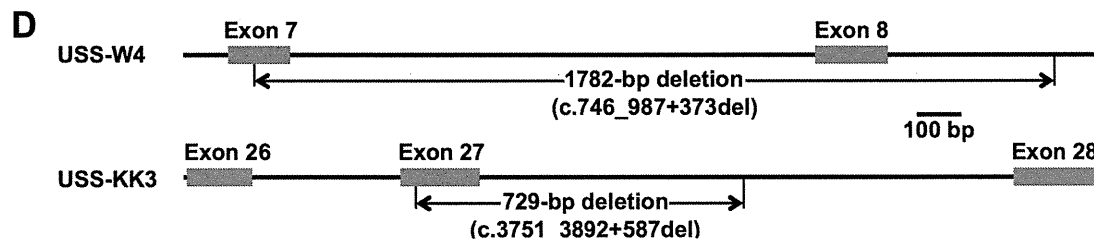
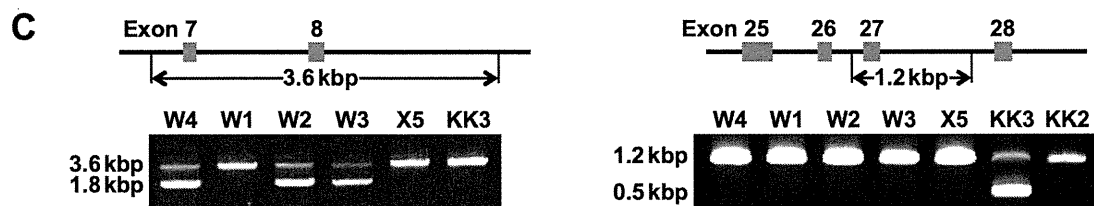
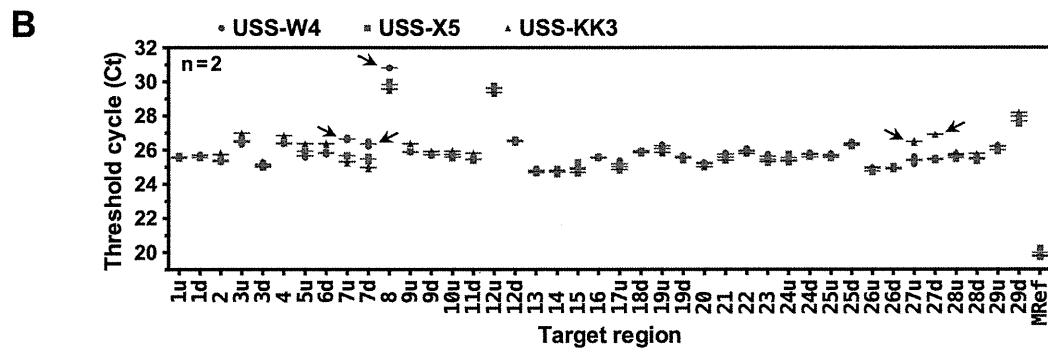
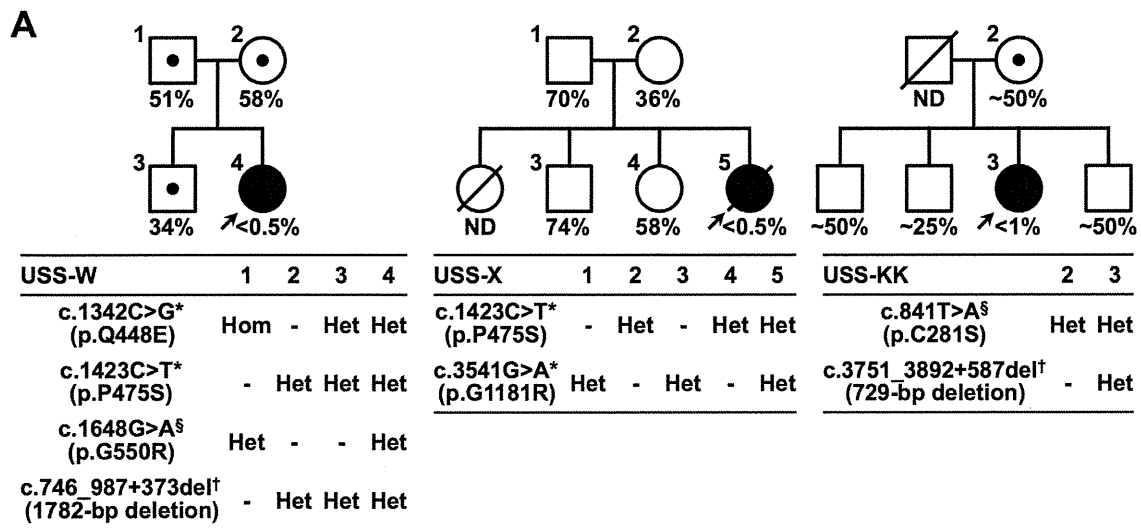
Upshaw-Schulman syndrome (USS), also called hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), is an autosomal-recessive trait associated with severely deficient plasma ADAMTS13 activity. Homozygous or compound heterozygous mutations in the *ADAMTS13* gene (OMIM

604134) are identified in most patients with USS (Levy et al. 2001; Kokame et al. 2002; Kokame and Miyata 2004; Matsumoto et al. 2004; Lotta et al. 2010; Fujimura et al. 2011; Hing et al. 2013). So far, more than 130 causative mutations have been identified by direct sequencing. Using that method, we previously analyzed *ADAMTS13* in 47 Japanese USS patients from 41 unrelated families (Fujimura et al. 2011). Of those, 44 patients from 38 families had either homozygous or compound heterozygous mutations in *ADAMTS13*. In the remaining three patients, however, only single missense mutations (two patients) or no mutation (one patient) was detected. In this study, we sought to reveal more extensive defects of *ADAMTS13* in these three patients by using genomic qPCR.

In general, PCR primer pairs for direct sequencing are designed to hybridize within the intronic sequences flanking each exon (Fig. 1A). Mutations such as substitutions, insertions, and deletions occurring in exons and exon-intron boundaries are identified by Sanger sequencing following genomic PCR, regardless of their heterozygosity or homozygosity (Fig. S1A). Direct sequencing, however, misses heterozygous mutations on the allele that contains no or mismatched primer target sequences: not only whole or partial deletion but also point mutations including single-nucleotide polymorphisms of primer target sequences can hamper PCR-amplification of the mutant allele, which may contain other critical mutations in the exon or exon-intron boundary (Fig. S1B). In these cases, only the target region of the other (normal) allele is PCR-amplified and sequenced, and the results are interpreted as if the regions of both alleles are normal.

Copy number analysis may overcome the limitations of direct sequencing. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis (Schouten et al. 2002) is often used for this purpose. Although MLPA is suitable for detection of genetic defects including exon deletions and duplications, it may still miss mutations that occur outside the probe target sequences. Therefore, to comple-

Figure 2. Genetic analysis of three USS families. (A) Pedigrees and genotypes of the USS patient families. Circles with arrows indicate the probands, USS-W4, -X5, and -KK3. Clinical data of the patients and the basis of diagnosis were described previously (Fujimura et al. 2011); the description of USS-KK3 being the second of three children needs to be corrected. Plasma ADAMTS13 activities were measured by us (USS-W and -X) or by Dr. Miha Furlan at University of Bern in 1999 (USS-KK), and are shown as a percentage of the normal control. ND, not determined. No subjects had ADAMTS13 inhibitors. Squares and circles with numbers indicate the subjects for genetic analysis. Each mutation was assigned a name for cDNA according to the nomenclature recommendations of the HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) based on the reference sequences AB069698.2 (cDNA) and NC_000009.11 (genomic). *[§]Missense substitutions identified by direct sequencing. [†]Deletions identified by genomic qPCR in this study. *Pathologically unrelated missense polymorphisms. (B) Identification of exon deletions in *ADAMTS13*. Ct values of genomic qPCR are plotted by dots with lines at the mean ($n = 2$) for each target region. The letters u and d following the exon numbers indicate upstream and downstream region of each exon, respectively. Red circles, USS-W4; green squares, USS-X5; blue triangles, USS-KK3. Arrows indicate the dots with Ct values higher than those of the other two patients. (C) *Left*: PCR-amplification of the 3.6-kbp band from the normal *ADAMTS13* allele produced a 1.8-kbp band from USS-W4, her mother (W2) and her brother (W3), but not from her father (W1). *Right*: PCR-amplification of the 1.2-kbp band from the normal *ADAMTS13* allele produced a 0.5-kbp band from USS-KK3, but not from her mother (KK2). (D) Sequencing of the 1.8- and 0.5-kbp bands in (C) indicated a 1782-bp deletion in USS-W4 and a 729-bp deletion in USS-KK3, respectively.



ment direct sequencing, we selected genomic qPCR (Aldape et al. 2002; Kuramitsu et al. 2012), using primer pairs containing at least one of the two primers used in direct sequencing (Fig. 1B). Combining direct sequencing and genomic qPCR should reveal any defects occurring within or between primer target sequences.

The study protocol was approved by the ethical committee of the National Cerebral and Cardiovascular Cen-

ter; only subjects who provided written informed consent for genetic analyses were included. This study involved three USS families, USS-W, -X, and -KK (Fig. 2A). Clinical data of the patients (USS-W4, -X5, and -KK3) and the basis of diagnosis were described previously (Fujimura et al. 2011). Plasma ADAMTS13 activities for patients and family members are shown in Figure 2A. No subjects had ADAMTS13 inhibitors. The results of direct sequenc-

ing are also shown in Figure 2A. USS-W4 was a heterozygote with paternal c.1648G>A (p.G550R), USS-X5 had no causative mutations, and USS-KK3 was a heterozygote with maternal c.841T>A (p.C281S). Pathologically unrelated missense polymorphisms (p.Q448E, p.P475S, p.G1181R) (Kokame et al. 2011) were also identified in them (Fig. 2A).

Genomic DNA was prepared from blood and subjected to real-time PCR to quantify the copy numbers of each *ADAMTS13* exon. Each primer pair was designed, using Primer-BLAST (NCBI), to contain at least one of two primers used in direct sequencing (Table S1). A primer pair for the qBiomarker Multicopy Reference Copy Number Assay (MRef, Qiagen, Valencia, CA), which recognizes a stable sequence that appears >60 times throughout the human genome, was used to precisely normalize sample DNA input (~4 ng/reaction). PCR was performed using the QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) for all regions except exon 7 and the KOD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan) for exon 7. Dimethyl sulfoxide was added (final concentration, 5%) for amplification of exon 8. Fluorescence intensities were detected using the Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), and each threshold cycle (Ct) value was calculated using the MxPro software (Agilent Technologies).

In genomic qPCR, the difference in Ct among subject DNAs is important information. An increase in Ct value of 1.0 indicates a heterozygous deletion of the target region, whereas a decrease of 0.58 indicates a heterozygous duplication. Ct values of the *ADAMTS13* qPCR indicated that exons 7 and 8 were heterozygously absent in USS-W4 and that exon 27 was heterozygously absent in USS-KK3 (Fig. 2B). By contrast, genomic qPCR revealed no abnormalities in USS-X5.

To confirm the deletions and narrow the deleted regions, we performed PCR using primer pairs specific to regions surrounding the deleted exons. Primers 5'-CACCTCCCCACAGACTCCTA-3' (intron 6) and 5'-AGGCGGGCAAATCATGAGG-3' (intron 8) amplified a 3.6-kbp band from the normal allele and a 1.8-kbp band from the mutant allele of USS-W4 (Fig. 2C, left). Thus, ~1.8 kbp was deleted within the region straddling exons 7 and 8 in USS-W4. The precise sites where the deletions occurred were determined by sequencing the lower PCR band, which revealed that loss of exons 7 and 8 was caused by a 1782-bp deletion ranging from the 60th nucleotide of exon 7 to the 373rd nucleotide of intron 8 (c.746_987+373del1782) (Figs. 2D, S2A). We confirmed the compound heterozygosity of p.G550R and c.746_987+373del1782 in USS-W4 by genomic PCR of the family members. The patient's mother and brother, but not father, had c.746_987+373del1782 (Fig. 2C, left).

Direct sequencing indicated that the patient's father, but not mother and brother, had p.G550R (Fig. 2A, left).

On the other hand, primers 5'-AGTCACATAGCCA GCAGTGG-3' (intron 26) and 5'-GCACTGAGCAGAG TGGTCTT-3' (intron 27) amplified a 1.2-kbp band from the normal allele and a 0.5-kbp band from the mutant allele of USS-KK3 (Fig. 2C, right). Thus, ~0.7 kbp was deleted within the region straddling exon 27 in USS-KK3. Sequencing the lower band revealed that loss of exon 27 was caused by a 729-bp deletion ranging from the 36th nucleotide of exon 27 to the 587th nucleotide of intron 27 (c.3751_3892+587del729) (Figs. 2D, S2B). Although the patient's father could not be genetically analyzed, her mother had p.C281S (Fig. 2A, right), but not c.3751_3892+587del729 (Fig. 2C, right). Thus, it was likely that USS-KK3 was a compound heterozygote of p.C281S and c.3751_3892+587del729.

In conclusion, this study identified two USS patients carrying *ADAMTS13* alleles bearing exon deletions. Extensive defects of *ADAMTS13* may be more common than we expect, and genomic qPCR analysis will be effective for identifying such defects in USS patients. Of the three patients we examined, one did not exhibit abnormalities detectable by either direct sequencing or genomic qPCR. Because these combined analytical methods cannot detect large-scale events such as inversions and translocations that do not affect sequences or copy numbers of target regions, the patient may carry such a defect in *ADAMTS13*. Alternatively, plasma *ADAMTS13* deficiency in the patient may be brought about by defects other than *ADAMTS13*, for example, genes involved in synthesis, folding, or secretion of *ADAMTS13*. Finally, we propose well-designed comprehensive genomic qPCR to complement the weakness of direct sequencing of candidate genes.

Acknowledgments

We thank Ayami Isonishi for her technical assistance. Y. E. was a research resident supported by the Association for Preventive Medicine of Japan at the National Cerebral and Cardiovascular Center. This work was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan; from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; and from Japan Society for the Promotion of Science.

Conflict of Interest

M. M. is a clinical advisory board for Alexion Pharmaceuticals. Y. F. is a clinical advisory board for Baxter Bioscience and for Alexion Pharmaceuticals.

References

- Aldape, K., D. G. Ginzinger, and T. E. Godfrey. 2002. Real-time quantitative polymerase chain reaction: a potential tool for genetic analysis in neuropathology. *Brain Pathol.* 12:54–66.
- Fujimura, Y., M. Matsumoto, A. Isonishi, H. Yagi, K. Kokame, K. Soejima, et al. 2011. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on *ADAMTS13* gene analysis in Japan. *J. Thromb. Haemost.* 9(Suppl. 1):283–301.
- Hing, Z. A., T. Schiller, A. Wu, N. Hamasaki-Katagiri, E. B. Struble, E. Russek-Cohen, et al. 2013. Multiple in silico tools predict phenotypic manifestations in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 160:825–837.
- Kokame, K., and T. Miyata. 2004. Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin. Hematol.* 41:34–40.
- Kokame, K., M. Matsumoto, K. Soejima, H. Yagi, H. Ishizashi, M. Funato, et al. 2002. Mutations and common polymorphisms in *ADAMTS13* gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11902–11907.
- Kokame, K., Y. Kokubo, and T. Miyata. 2011. 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.
- Kuramitsu, M., A. Sato-Otsubo, T. Morio, M. Takagi, T. Toki, K. Terui, et al. 2012. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 119:2376–2384.
- Levy, G. G., W. C. Nichols, E. C. Lian, T. Foroud, J. N. McClintick, B. M. McGee, et al. 2001. Mutations in a member of the *ADAMTS* gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 413:488–494.
- Lotta, L. A., I. Garagiola, R. Palla, A. Cairo, and F. Peyvandi. 2010. *ADAMTS13* mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum. Mutat.* 31:11–19.
- Matsumoto, M., K. Kokame, K. Soejima, M. Miura, S. Hayashi, Y. Fujii, et al. 2004. Molecular characterization of *ADAMTS13* gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood* 103:1305–1310.
- Schouten, J. P., C. J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwijnenburg, F. Diepvens, and G. Pals. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30:e57.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Primer pairs for *ADAMTS13* genomic qPCR.

Figure S1. Combinatorial analysis of direct sequencing and genomic qPCR should catch any defects occurring on and between the primer target sequences. Direct sequencing detects mutations such as point mutations (including substitutions, insertions, and deletions), short insertions, and deletions in the exons and exon–intron boundaries (A), but misses mutations on the allele that contains no or mismatched primer target sequences (B). Genomic qPCR for quantifying the copy numbers of target regions complements the results of direct sequencing.

Figure S2. Deleted regions and flanking sequences of *ADAMTS13* identified in two patients with USS. The 1782- and 729-bp regions (red letters) were deleted in patients USS-W4 (A) and USS-KK3 (B), respectively. Lowercase and uppercase sequences indicate introns and exons, respectively. Underlined sequences adjacent to the breakpoints may cause microhomology-mediated end joining (MMEJ) (McVey and Lee. *Trends Genet.* 2008;24:529–538).

I. 易血栓傾向とは？

1. 先天性血栓性素因



国立循環器病研究センター分子病態部部长 宮田 敏行 (Miyata, Toshiyuki)
金沢大学医薬保健研究域保健学系病態検査学准教授 森下英理子 (Morishita, Eriko)

THROMBOSIS and Circulation

§ 論文のポイント

- [1] 先天性血栓性素因として、遺伝性のアンチトロンビン欠損症、プロテインC欠損症、プロテインS欠損症が知られている。いずれもヘテロ接合体が先天性血栓性素因となる。
- [2] アンチトロンビン、プロテインC、プロテインSはいずれも血管内皮細胞上で抗凝固能を発揮し血液の流動性維持に働いている。
- [3] 最近、プロトロンビン遺伝子に機能獲得変異である Arg596Leu 変異を持ち、アンチトロンビン抵抗性を示す血栓症家系が本邦で報告され、世界的に注目を集めている。
- [4] 遺伝子解析に多用される PCR-DNA シークエンス法は、小さい変異は同定できるが、欠失などの大きな変異の同定は難しい。変異が同定できなかったとしても、遺伝子欠失などが生じている可能性を考慮する必要がある。

§ キーワード

静脈血栓塞栓症/アンチトロンビン欠損症/プロテインC欠損症/プロテインS欠損症/遺伝子変異

血栓性素因とは

血流の流動性はむやみに血栓ができないよう、血栓制御機構により保たれており、血栓を生じさせる能力とそれを制御し阻止する能力のバランスの上に成り立つ。150年以上前に Virchow 博士は、血栓は血流・血管壁・血液成分の異常により生じると述べ、今日でもこの考えは支持されている。血栓性素因とは血栓を生じやすい傾向とされ、先天性と後天性に分類される。先天性血栓性素因としては、遺伝性のアンチトロンビン(AT)欠損症、プロテイン C (PC) 欠損症、プロテイン S (PS) 欠損症が知られている^{1)~3)}。日本における発症頻度は、一般住民を対象とした報告によると PC 欠損症 0.13%、AT 欠損症 0.15% と欧米人と差はないが、PS 欠損症は 1.12% と 5~10 倍高いのが特徴である。特に、PS 分子異常症である PS Tokushima 変異 (PS Lys196Glu 変異) ヘテロ接合体は一般住民の約 55 人に 1 人認められ、日本人の遺伝子多型と考えられる。白人種には凝固 V 因子 Leiden 変異とプロトロンビン G20210A 変異も先天性血栓性素因として知られているが、これらは日本人を含む東アジア人にはみられない。日本人の約 4% にみられるプラスミノゲン異常症 (Ala601Thr 変異) は静脈血栓塞栓症患者に高率にみられるものではないので、先天性血栓性素因と考えられていない⁴⁾。

先天性血栓性素因の保有者は若年 (40~45 歳より前) に血栓を発症し、しばしば血栓は再発し家族歴を示す

ことが多い。血栓は静脈血栓塞栓症や肺塞栓などが主であるが、腸間膜静脈や脳静脈にもまれに生じる。AT、PC、PS はいずれも血管内皮細胞上で抗凝固能を発揮し血液の流動性維持に働いている。血栓は手術、妊娠、長期臥床、悪性腫瘍などの環境因子や薬剤 (ホルモン補充療法や経口避妊薬) の使用などの環境因子が重なることにより発症することが多い⁵⁾。

凝固カスケード反応

凝固カスケード反応では、組織因子が最も重要な血栓惹起因子である。組織因子は、血液に接する細胞 (血球系細胞、血小板、血管内皮細胞) に通常発現していない。組織因子は血管外膜の繊維芽細胞、中膜の血管平滑筋細胞に恒常的に発現し血管損傷の際の止血に働く。また、粥状硬化巣に集積する単球マクロファージも組織因子を発現し、粥腫巣の破綻に伴い凝固因子を活性化させる。

血液中には活性化型 VII (VIIa) が VII の 0.5~1% 程度存在し、これが組織因子に結合することにより VIIa-組織因子複合体が形成され、IX 活性化能と X 活性化能を発揮する (凝固開始反応と呼ぶ) (図 1)。この VIIa はわずかな量なので、凝固の開始時に形成される VIIa-組織因子複合体もわずかであり、こうして生成した Xa からは少量のトロンビンしか生成しない。しかし、少量のトロンビンは凝固の補助因子である VIII と V を活性化させる。活性化型である VIIa と Va が生成されると、X やプロトロンビンの活性化が効率よく進行す

る。更に、トロンビンは XI を活性化し凝固反応を促進する。このトロンビンによる XI 活性化反応は生理的にも重要であると考えられている。また、VIIa-組織因子複合体は VII の活性化も行い、これにより凝固がさらに進行することになる。これらの活性化反応が進んだ結果、大量のトロンビンが生成する (凝固増幅反応と呼ぶ)⁶⁾。

トロンビンは多機能プロテアーゼである。フィブリノーゲンのフィブリンへの変換やトランスグルタミナーゼである XIII の活性化を行うだけでなく、血小板膜上のトロンビン受容体 protease activated receptor (PAR) を活性化することにより血小板の活性化を行う (図 1)⁶⁾。トロンビンにより活性化された血小板は濃染顆粒から ADP の放出を行い、血小板インテグリンの活性化が起こるとともに、濃染顆粒からポリリン酸が放出され、内因系凝固反応を活性化させる。このポリリン酸は、トロンビンや Xa による V 活性化を促進するなど、多彩な活性を示し、凝固系に極めて重要な役割を果たしていると報告されている⁷⁾。

血管内皮細胞上の抗凝固機構

血管内皮細胞上の抗凝固機構は、内皮細胞上のヘパラン硫酸グリコサミノグリカン上での反応 (ヘパラン硫酸依存性抗凝固機構) と PC 抗凝固機構がある (図 2)。

血管内皮細胞はヘパリン様の構造を持つヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan: HSPG) をもつ。このヘパラン硫酸

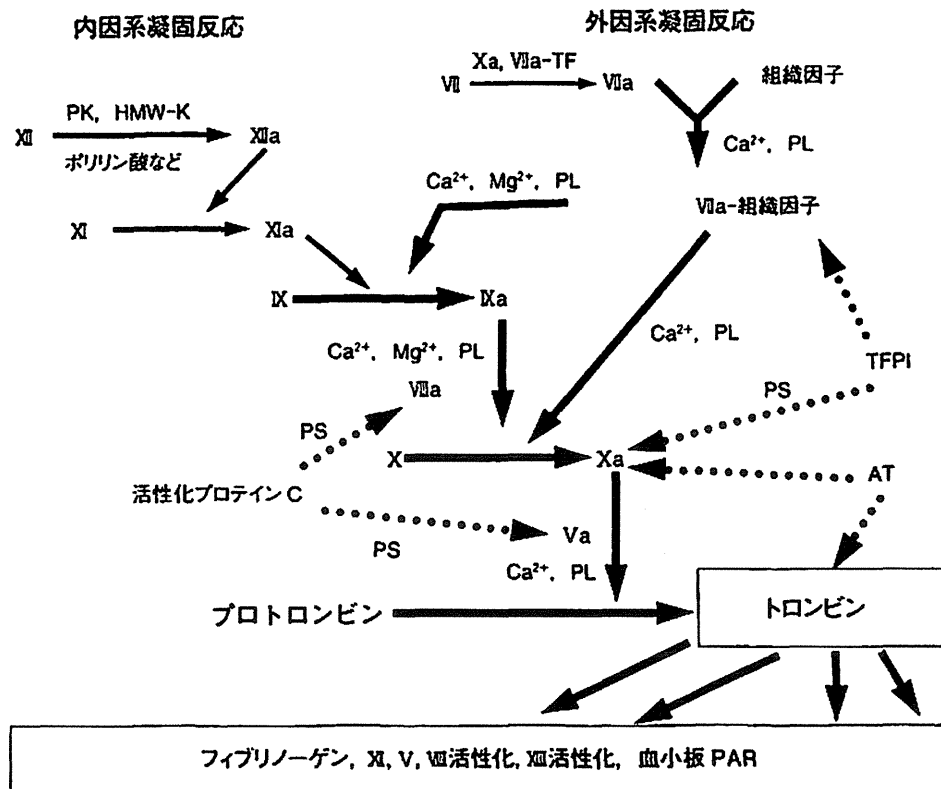


図1 凝固カスケード反応と制御因子の作用点

にATや組織因子経路インヒビター (Tissue factor pathway inhibitor: TFPI)が結合し、トロンビンやXaを効率良く阻害することにより、凝固反応を抑制している。一方、内皮細胞は1回膜貫通蛋白質であるトロンボモジュリンを恒常的に発現している。トロンビンはトロンボモジュリンに結合すると、フィブリノーゲンのフィブリン変換能が極度に低下しPC活性化能を獲得する。この際、1回膜貫通蛋白質である内皮細胞PC受容体(Endothelial cell protein C receptor: EPCR)がPCを内皮細胞表面に濃縮させ、トロンボモジュリンに結合したトロンビンによる活性化反応を促進させる(図2)。この反応で生じた活性化PC(Activated

protein C: APC)は、活性型V(Va)と活性型VIII(VIIIa)を限定分解により不活性型へと変換することにより凝固反応を抑制する。

このように血管内皮細胞は強い抗血栓能を示し、血液の流動性に大きく寄与している。図2に登場する抗凝固因子のうち、AT、PC、PSの遺伝子異常による欠損症はしばしば静脈血栓塞栓症患者にみられることから、先天性血栓性素因として知られている¹⁻³⁾。TFPI、トロンボモジュリン、EPCRの遺伝子異常は静脈血栓塞栓症患者に散発的にみられる程度であり、血栓性素因と考えられていない。最近、トロンボモジュリンのミスセンス変異が非典型溶血性尿毒症症候群にみられ、遺伝的素因で

あるとの報告がなされた⁸⁾。

AT欠損症

ATはセリンプロテアーゼインヒビター(セルピンと総称される)で、トロンビンに加え、Xa、IXa、VIIa-組織因子複合体、XIa、VIIIaを阻害する¹⁾。ATの血漿中濃度は2.4 μmol/Lであり、プロトロンビン(血漿中濃度、1.4 μmol/L)より豊富に循環している。血中半減期は2.5-3.0日である。トロンビンなどのプロテアーゼと1:1で複合体を形成し活性を失活させる。ATによるプロテアーゼ阻害はヘパリンやヘパラン硫酸により増強され、ヘパリンはプロテアーゼ阻害を1万倍程度にまで加速

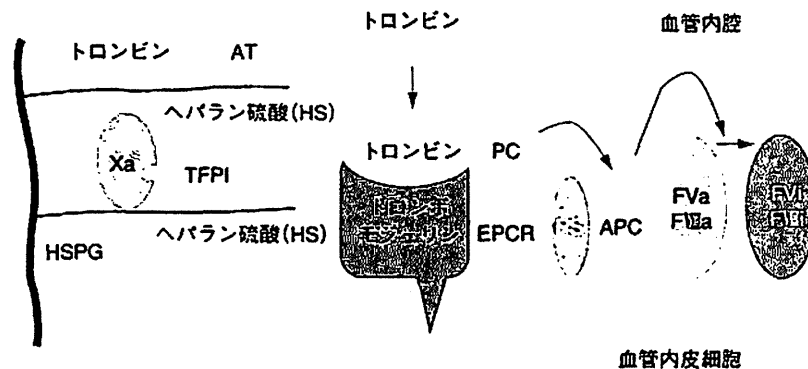


図2 血管内皮細胞上の抗血栓蛋白質群

させる。このようにヘパリンの抗凝固作用はATを介して発揮される。

AT欠損症は、活性と抗原が共に低下するI型欠損症と、活性は低下するものの抗原量は正常値を示すII型異常症に分類される。II型異常症は、①反応部位に障害をもつもの、②ヘパリン結合部位に障害をもつもの、③ヘパリン結合部位と反応部位の両方に障害をもつ多面的なものに分けられる。血漿中のAT活性はヘパリン存在下でXa活性もしくはトロンビン活性の阻害能を合成基質を用いて測定する。この測定法はヘパリン依存性のATを測定しているため、II型異常症を更に3種のタイプに分けることは実質的に難しい。

日本人の一般住民を対象にヘパリン依存性のAT活性を測定した研究では、約650人に1人が欠損症と考えられる低活性を示した⁹⁾。この頻度はイギリスで得られたものとはほぼ同じであった。日本で行われた静脈血栓症患者群と一般住民群にみられるAT欠損症の頻度の比較から、AT欠損症は静脈血栓塞栓症の強いリスクであった。これをI型とII型に分けてみると、AT欠損症I型は

極めて強い血栓症のリスクであったが、II型はそれほど強いリスクを示さなかった¹⁰⁾。

PC欠損症

PCはビタミンK依存性因子であり、軽鎖はGlaドメインと2つのEGF様ドメインから成り、重鎖は活性化ペプチドにつづいてセリンプロテアーゼドメインをもつ。血漿濃度は65nmol/L、血中半減期は6～8時間とかなり短い。抗凝固薬ワルファリンはビタミンKエポキシド還元酵素を阻害しGla残基の形成を抑制するため、ワルファリンを服薬するとプロトロンビン等の凝固因子だけでなく、PCやPSといった凝固制御因子も低下する。このため、血栓性素因を疑う症例でのPCやPSの活性・抗原量の測定は、ワルファリン投与前の検体で行う必要がある。また、PCの血中半減期はプロトロンビンなどの他のビタミンK凝固因子の半減期より短いため、先天性PC欠損症では、急性期のヘパリン類による治療からワルファリンに切り換える際にPCが低下し皮膚

壊死を起こす可能性がある。ヘパリン併用下にワルファリンを少量から治療域に導き、安定した後にヘパリンを中止する必要がある。

EPCRに結合したPCは血管内皮細胞上でトロンビン-トロンボモジュリン複合体によりAPCに活性化され、APCがVaとⅧaを分解不活化することにより、凝固カスケード反応を制御するが、これに加えて、APC-EPCR複合体は内皮細胞のPARを活性化し内皮細胞に保護的に働く¹¹⁾。また、APCはアポトーシスを起こした細胞から放出されるヒストンを切断し、ヒストン依存性の細胞死を減弱させる機能を持つと報告されている¹²⁾。

PC活性は凝固時間法と合成基質法で測定できる。多くのPC欠損症では両活性がともに低下するが、Gla領域に変異を認める例では凝固時間法のみが低値を示す。PCの抗原量を求め、活性と抗原が共に低値を示す例をI型欠損症、活性のみ低値を示し抗原量は正常値を示す例をII型欠損症(異常症)と呼ぶ。

PS 欠損症

PS は本因子が精製された米国シアトル市にちなんで命名された。本因子も生合成にビタミン K を要求する。血中半減期は 42 時間である。PS は抗凝固機能と細胞保護作用を示す多機能蛋白質である。抗凝固機能は APC 依存性と TFPI 依存性がある。

PS は APC による VIIa と Va の分解・不活化を促進することにより抗凝固機能を発揮する。PS の血中濃度は 300 nmol/L であり、約 60% の PS は C4b 結合蛋白質 (C4BP) と 1:1 で結合して血中を循環している。残りの約 40% は遊離型として循環している。C4BP の約 80% は 6~7 本の α 鎖に 1 本の β 鎖がジスルフィド結合で繋がった分子 (C4BP β +) であるが、残りの約 20% は β 鎖をもたない。 β 鎖を含む C4BP β + は PS と 1:1 で複合体 (PS-C4BP 複合体) を形成し血中に循環する。この複合体中の PS は APC コファクター活性、すなわち抗凝固活性が極めて低い。PS の抗凝固活性は主に遊離型 PS が担う。PS は TFPI による Xa 活性の阻害を促進する作用を示し、外因系凝固反応を抑制する抗凝固機能も示す¹³⁾。

PS の細胞保護作用は、分子の C 末端領域の性ホルモン結合グロブリン様ドメインを介して細胞膜上の 3 種のチロシンキナーゼ型受容体 Tyro3, Axl, Mer (頭文字をとって TAM 受容体とも呼ばれる) に結合することにより発揮される。

PS 活性は APC のコファクター活

性を凝固時間法で測定できる。PS 抗原量は総抗原量、遊離型抗原量、C4BP 結合型抗原量の 3 通りを測定できる。一般的に遊離型 PS 抗原量は PS 活性と一致するが、異常分子では乖離する例も報告されている。活性と抗原量が共に低値を示す例を I 型欠損症、活性のみ低値を示し抗原量は正常値を示す例を II 型欠損症 (異常症) とよぶ。PS 活性測定で最も注意すべき点は、妊娠時の生理的変動として活性が低下する点である。正常妊婦でも 30% 程度まで低下する場合があります。欠損症との鑑別が困難である。

遺伝子解析結果の解釈

近年の遺伝子解析技術の向上により、先天性血栓性素因の遺伝子解析が世界的に進められ、多くの遺伝子変異が同定されている。AT 欠損症、PC 欠損症、PS 欠損症の遺伝子解析は、本邦でも広く進められている¹⁴⁾。広く行われている遺伝子解析法は、主にエクソン領域を PCR 法で増幅し、塩基配列を DNA シークエンサーで読解する手法をとる。このため、次のような手法の限界があるので注意を払う必要がある。

PCR-DNA シークエンس法はアミノ酸変異を生じるミスセンス変異、停止コドンに変化するナンセンス変異、数塩基の欠失・挿入によるフレームシフト変異、スプライスのコンセンサス配列に生じる変異といった小さい変異を同定することができ、しかし、本法ではエクソンや遺伝子全体の欠失といった大きな遺伝子上の異常を同定することは難しい。

また、重症血友病 A 患者に広くみられるエクソンの逆位も同定できない。PCR-DNA シークエンス法で変異が同定できなかったとしても、遺伝子欠失などが生じている可能性を考えておくことも必要である。ミスセンス変異では、それが蛋白質の機能を損なうかどうかを詳しく調べる必要がある。このように、活性や抗原量の低下を示す患者の遺伝子解析の結果が得られたとしても、その遺伝子変異を慎重に解釈する必要がある。

新しい血栓性素因： アンチトロンビン抵抗性

最近、アンチトロンビン抵抗性という新しい血栓性素因が本邦の血栓症を示す家系から報告された。この家系では、プロトロンビン遺伝子に Arg596Leu 変異をもち、凝固活性は少し低下するが、アンチトロンビンによる活性阻害を受けない機能獲得変異であった¹⁵⁾。本変異保有者は今のところこの家系に限られているが、今後より詳細な研究により、その頻度などが明らかになり、日本人の静脈血栓塞栓症の発症にどの程度関わるかが明らかになるだろう。

References

- 1) De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM: Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 87: 3531-3544, 1996
- 2) Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, et al: Inherited thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost* 76: 824-834, 1996
- 3) Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA,

- et al : Inherited thrombophilia : Part 1. *Thromb Haemost* 76 : 651-662, 1996
- 4) Okamoto A, Sakata T, Mannami T, et al : Population-based distribution of plasminogen activity and estimated prevalence and relevance to thrombotic diseases of plasminogen deficiency in the Japanese : the Suita Study. *J Thromb Haemost* 1 : 2397-2403, 2003
- 5) Tapson VF : Acute pulmonary embolism. *N Engl J Med* 358 : 1037-1052, 2008
- 6) Furie B, Furie BC : Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 359 : 938-949, 2008
- 7) Morrissey JH : Polyphosphate : a link between platelets, coagulation and inflammation. *Int J Hematol* 95 : 346-352, 2012
- 8) Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, et al : Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 361 : 345-357, 2009
- 9) Sakata T, Okamoto A, Mannami T, et al : Protein C and antithrombin deficiency are important risk factors for deep vein thrombosis in Japanese. *J Thromb Haemost* 2 : 528-530, 2004
- 10) Mitsuguro M, Sakata T, Okamoto A, et al : Usefulness of antithrombin deficiency phenotypes for risk assessment of venous thromboembolism : type I deficiency as a strong risk factor for venous thromboembolism. *Int J Hematol* 92 : 468-473, 2010
- 11) Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH : The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 109 : 3161-3172, 2007
- 12) Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al : Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 15 : 1318-1321, 2009
- 13) Hackeng TM, Sere KM, Tans G, et al : Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 : 3106-3111, 2006
- 14) 小嶋哲人 : 血拴性素因の病因と病態. *臨床血液* 55 : 1454-1460, 2011
- 15) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, et al : Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med* 366 : 2390-2396, 2012

遺伝子改変血栓モデル： ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを中心に

坂野史明* 宮田敏行* 藤岡政行# 杉本充彦\$

Banno Fumiaki, Miyata Toshiyuki, Fujioka Masayuki, Sugimoto Mitsuhiko

* 国立循環器病研究センター分子病態部

奈良県立医科大学救急医学講座

\$ 奈良県立医科大学血栓制御医学講座

Summary

ADAMTS13は血漿中の血小板凝集制御因子であり、ADAMTS13欠損は血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)という難治性血栓症の原因となる。近年、ADAMTS13遺伝子改変マウスを用いて、脳梗塞や心筋梗塞をはじめとする血栓性疾患への本因子の影響や、治療薬としての可能性が盛んに検討されている。本稿では、遺伝子改変血栓モデルマウスの解析例として、ADAMTS13遺伝子改変マウスの表現型を概説する。

Key Words

・ ADAMTS13 ・ *Adamts13* 欠損マウス ・ 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) ・ 脳梗塞
・ 心筋梗塞

はじめに

ADAMTS13は、A Disintegrin-like And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 motif ファミリーに属する血漿プロテアーゼであり、血小板接着蛋白質フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor: VWF) を特異的に切断する。VWFはおもに血管内皮細胞で合成され、ホモマルチマーとして血中へ分泌される。VWFの血小板粘着および凝集活性は分子量が大きいほど強く、とくに20,000kDaを超える超高分子量VWF (unusually large VWF: ULVWF) マルチマーは、過度の血小板凝集を引き起こす。ADAMTS13は

ULVWFマルチマーの断片化を介して血小板血栓形成を抑制的に制御しており、ADAMTS13活性が欠乏すると、重篤な血栓性疾患である血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP) の発症につながる。

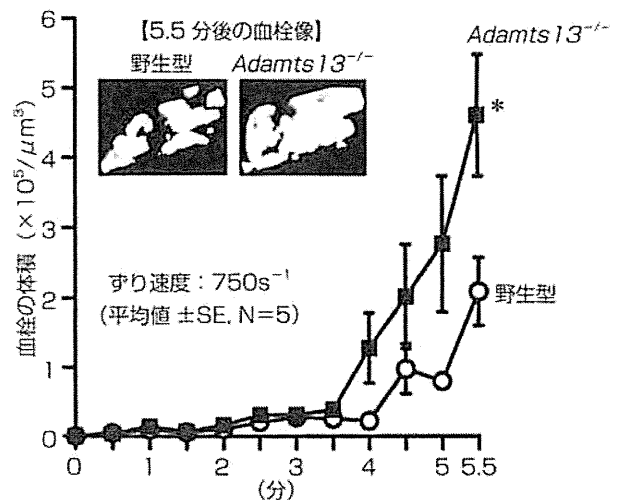
ADAMTS13研究におけるモデル動物としてADAMTS13遺伝子 (*Adamts13*) 改変マウスが樹立され、血流イメージングや病態モデルを用いた検討から、ADAMTS13の生体内血栓形成への影響や血栓性疾患との関連性が明らかとなってきた。本稿では、遺伝的血栓傾向を有するマウスの解析例として、*Adamts13*欠損マウスおよびC末端ドメイン欠損*Adamts13*マウスの表

現型を紹介する。

● 1. ADAMTS13 遺伝子欠損マウスの潜在的な血栓傾向

Adamts13 欠損マウス (*Adamts13*^{-/-}マウス) は、われわれと Motto らにより別々に独立して樹立された^{1) 2)}。われわれは、触媒ドメインをコードするエクソン 3-6 を Neo 遺伝子と置換して *Adamts13*^{-/-}マウスを作製した¹⁾。TTP 患者と同様に、*Adamts13*^{-/-}マウスの血漿中には ULVWF マルチマーの残存がみられた。しかし、意外にも *Adamts13*^{-/-}マウスの出生、発育に異常は認められず、血小板数、血漿ハプトグロビン量、凝固時間、出血時間、血液像、組織像、アゴニスト惹起血小板凝集能も正常で、予想された TTP 症状（血小板減少、溶血性貧血、微小血管内血小板血栓）は認められなかった。平行板型フローチャンバーを用いて、固相化コラーゲン表面上での高ずり応力下血小板血栓形成能を解析すると、*Adamts13*^{-/-}マウスでは野生型マウスにくらべて血栓形成能が亢進していた（図①）。また、コラーゲン-アドレナリン溶液の静注による血栓誘発モデルを用いて、*in vivo*での血栓傾向を検討した結果、血栓誘発による消費性血小板減少が *Adamts13*^{-/-}マウスで顕著に認められた。したがって、マウスにおいて ADAMTS13 欠損は、血中に ULVWF マルチマーの残存を引き起こし、潜在的な易血栓形成傾向をもたらすが、それだけでは TTP 発症に至らないことが明らかとなった。

Motto ら²⁾は、エクソン 1-6 を Neo 遺伝子に置き換えて *Adamts13*^{-/-}マウスを作製しており、やはり通常飼育下で TTP 症状はみられないと報告している。彼らは、C57BL/6 系統にくらべて血中 VWF 量が約 10 倍高い CASA/Rk 系統への戻し交配により、*Adamts13*^{-/-}マウスの血小板数が有意に低下することを見出した。このマウスに血管内皮細胞を傷害する志賀毒素を投与すると、血小板減少が重篤化するとともに、一部の *Adamts13*^{-/-}マウスに破碎赤血球を伴う溶血、微小血管内への VWF に富む血栓沈着といった TTP 様の症状



図① *Adamts13*^{-/-}マウス全血のずり応力下血小板血栓形成

野生型マウスおよび *Adamts13*^{-/-}マウスより採取した血液を平行板型フローチャンバーに流し、固相化コラーゲン表面上での血栓形成を経時観察した。*Adamts13*^{-/-}マウスでは、血小板血栓成長の亢進が認められた [*p<0.05]。

(Banno F et al, 2006¹⁾より作成)

が惹起された。また、ULVWFを含むヒトVWFを *Adamts13*^{-/-}マウスに大量投与 (≥2,000 単位/kg) すると、TTP 様症状が再現性よく誘起されることが報告されている³⁾。したがって、少なくともマウスでは ADAMTS13 欠損に血中 VWF 濃度上昇や内皮機能障害が重なることで、TTP 症状が顕在化すると考えられる。一方、ヒビでは ADAMTS13 活性阻害抗体の静注により TTP 症状が観察されており⁴⁾、霊長類はマウスにくらべて ADAMTS13 欠損に対する感受性が高い可能性が示唆される。

● 2. ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを用いた脳梗塞モデル

急性期脳虚血の治療では、血管狭窄・閉塞の原因となる血栓を溶解し、脳組織への血流を再開することが最も重要である⁵⁾。この血栓溶解療法とは、おもに血栓溶解薬を静脈内に投与し、局所脳虚血に対応する責任動脈の閉塞・狭窄を解除して、虚血ペナンプラ領域が脳梗塞へ進

展するのを防ぐことを指す。しかし、発症から4.5時間以内に投与できる薬物として承認されているのは、組換え体組織プラスミノゲン活性化因子（アルテプラゼ）だけであり、副作用として脳出血のリスクを伴う。さらに、血栓溶解により再灌流が得られても、虚血によって傷害された血管内皮細胞上に微小血栓が形成され、二次性の脳虚血傷害が増強されるという問題がある⁶⁾。われわれは、ADAMTS13の血栓形成制御能に着目し、ADAMTS13の脳虚血における病態生理学的意義を検討してその治療応用の可能性を検証する目的で、*Adamts13*^{-/-}マウスを用いた脳梗塞モデルの解析をおこなった^{7) 8)}。

VWF マルチマーは、傷害された血管内皮細胞上で血小板を血管内皮細胞に結合させ、VWF-血小板血栓を形成する。このVWF-血小板血栓は白血球と相互反応して炎症反応を促進すると報告されている⁹⁾。VWFがもつこれらの作用は、脳虚血-再灌流後に生じる脳の微小循環障害と炎症反応にも寄与すると考えられる。ADAMTS13は、VWFマルチマーを切断してその活性を抑制することで、脳虚血において神経保護作用を発揮することが期待される。そこで、*Adamts13*^{-/-}マウスを使用して、Koizumiら¹⁰⁾の変法により0.5時間中大脳動脈閉塞モデルを作製した。具体的には、頸部内頸動脈から頭蓋内中大脳動脈起始部に至る経路にシリコン樹脂で先端を太くしたナイロン糸を挿入し、一時的に中大脳動脈の血流を低下させる方法である。野生型および*Adamts13*^{-/-}マウス間で虚血中の脳血流低下は同等であったが、再灌流後の脳血流は*Adamts13*^{-/-}マウスで進行性に低下し、著しい虚血後低灌流が認められた。また、*Adamts13*^{-/-}マウスでは脳虚血領域の微小血管内にVWF免疫反応陽性の血栓が多数観察された⁷⁾。

さらに、虚血導入24時間後に、血漿HMGB1 (high-mobility group box 1) レベル、大脳皮質組織のHMGB1/NeuN (neuron-specific nuclear protein)、HMGB1/MPO (myeloperoxidase) に対する二重免疫染色性および、脳梗塞体積を検証した(図2)⁸⁾。*Adamts13*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比較して、血漿HMGB1レベルが顕著に上昇した。脳虚血-再灌流

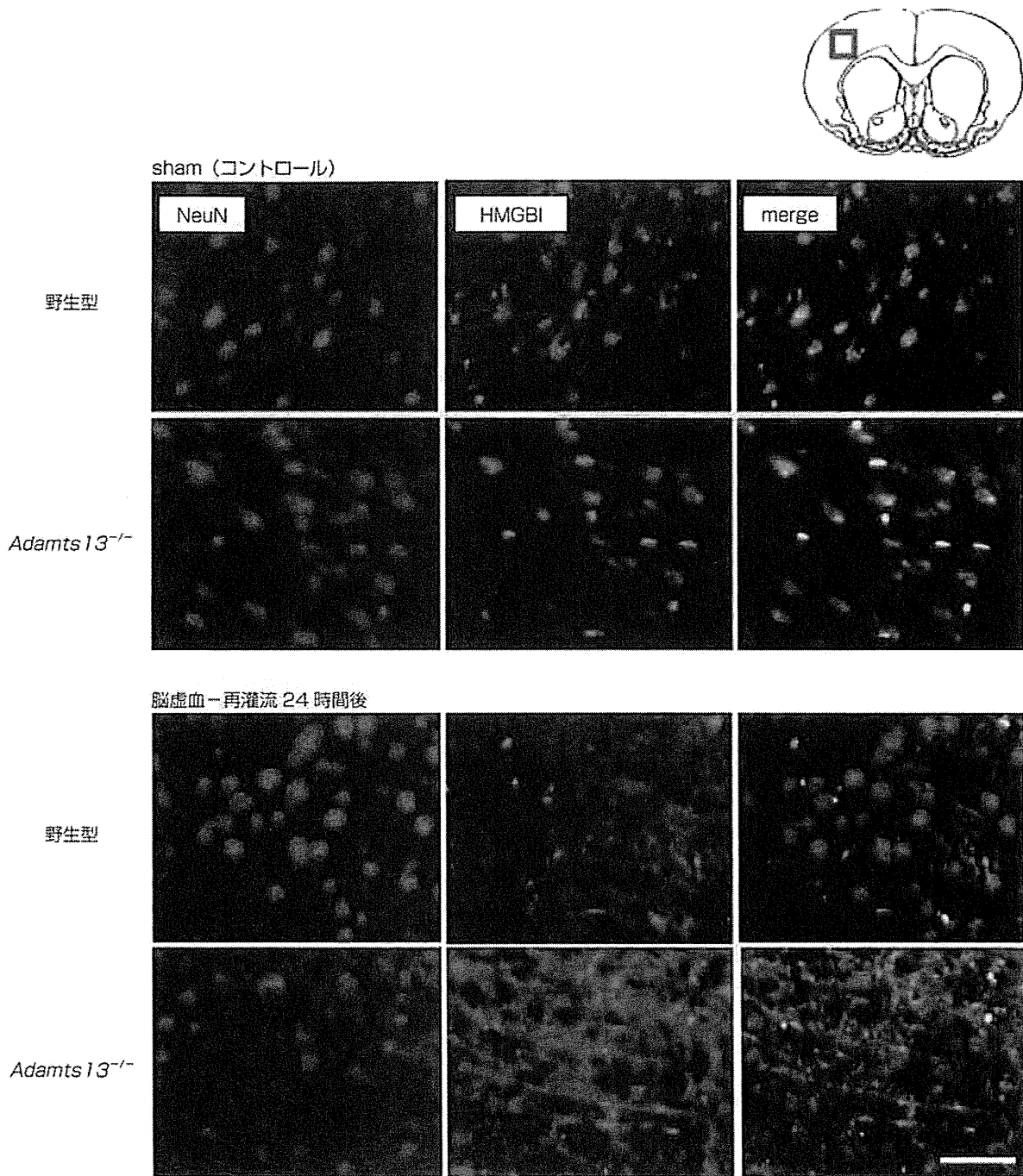
後、*Adamts13*^{-/-}マウスでは、大脳皮質の梗塞に陥っていない虚血領域で、HMGB1/MPOを共発現する炎症細胞が顕著に認められ、より多くの選択的神経細胞死が確認された。また、*Adamts13*^{-/-}マウスの脳梗塞体積は野生型マウスより増大した。これらの結果から、ADAMTS13が欠損すると脳虚血後の微小血栓形成および炎症反応が増強し、炎症性メディエーターHMGB1による神経傷害効果が強まり、脳障害を増強する可能性が示された。

ADAMTS13はずり応力依存性に作用するため、血管狭窄の原因となる病的血栓のみを溶解し、生体の防御に必要な止血血栓を分解せず、出血性梗塞を誘導するリスクが低いと考えられる。実際、ADAMTS13を静脈内投与したマウスでは非投与群と比較して、脳梗塞サイズが縮小したが、脳出血は生じなかった⁸⁾。これらの結果は、ADAMTS13が虚血に対して脳を保護する安全な薬剤となる可能性を示している。

● 3. ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを用いた心筋梗塞モデル

最近、脳梗塞とならんで2大動脈血栓症ともいえる心筋梗塞についても、脳梗塞の場合とほぼ相同の結果が*Adamts13*^{-/-}マウスを用いた心筋梗塞モデル実験で確認された^{11)~13)}。

De Meyerら¹¹⁾は“0.5時間心筋虚血-23.5時間再灌流”の実験系で、*Adamts13*^{-/-}マウスでは野生型マウスにくらべて有意に梗塞体積が増大することを見出した。また、野生型マウスにヒトADAMTS13を前処置投与した場合、梗塞体積が有意に減少することも報告している。また、Gandhiら¹²⁾は、同一の虚血-再灌流実験条件で、*Adamts13*^{-/-}マウスにおける同様の成績に加えてVWF欠損マウスの結果を報告している。すなわち、*Vwf*^{-/-}マウスでは*Adamts13*^{-/-}マウスとは逆に、心筋梗塞体積が縮小していることを示した。両論文ともに、ADAMTS13の心筋虚血-再灌流障害に対する効果は、心筋細胞のアポトーシスの軽減や、マウス虚血心筋への好中球の浸潤抑制をもたらすADAMTS13の抗炎症作



図② 脳虚血-再灌流後の *Adamts13^{-/-}* マウス大脳皮質ペナンプラ領域における NeuN/HMGB1 二重免疫染色
 中大脳動脈閉塞-再灌流 24 時間後、*Adamts13^{-/-}* マウスでは野生型マウスと比較して、大脳皮質ペナンプラ
 領域（右上赤い四角）で NeuN 陽性の神経細胞数が減少していた。HMGB1 免疫反応性は、野生型および
Adamts13^{-/-} マウスともに神経細胞核で減少しており、虚血ストレスによって細胞核内の HMGB1 が細胞質
 もしくは細胞外へ移動・遊出したと考えられた。さらに、*Adamts13^{-/-}* マウスでは野生型マウスにくらべ、虚
 血大脳皮質での HMGB1 免疫染色性が増加しており、神経細胞以外の HMGB1 陽性細胞がより顕著に活性化
 していることが示唆された [scale bar = 50 μ m, NeuN = 赤, HMGB1 = 緑, merge = 黄].
 HMGB1 : high-mobility group box 1, NeuN : neuron-specific nuclear protein

(Fujioka M *et al.* 2012⁸⁾ より作成)

用に起因すると結論している。ここまでに報告された脳梗塞モデルや心筋梗塞モデルの実験は、いずれも虚血-再灌流の実験条件下でなされている。虚血-再灌流障害の発生機序についてはいまだ不明な点が多いが、再灌流時の過剰炎症機転が重要な役割を果たすと考えられており、ADAMTS13の抗炎症作用の重要性を示す結果が得られている。

これに対してわれわれは、“虚血のみで再灌流を誘導しない心筋梗塞モデル”を用いた検討をおこなった¹³⁾。マウス冠動脈左前下行枝を結紮して心筋梗塞を誘起し、1週間後の心機能をMモード心エコーで評価した後、心筋梗塞を組織学的に検索した。その結果、野生型と比較して *Adamts13*^{-/-}マウスで有意な心機能低下と梗塞巣の増大を認め、これらの所見は遺伝子組換えヒトADAMTS13の投与で野生型マウスのレベルにまで改善された(図3)。これにより、ADAMTS13の心筋保護作用は必ずしも虚血-再灌流障害に限定されないことが判明した。

これらの結果から、ADAMTS13によるVWF活性の制御は微小血管血栓症だけでなく、脳梗塞や心筋梗塞など、太い動脈に生じる血栓症の病態形成にも関与していることが明らかになった。近年の治療成績の向上により、脳梗塞や心筋梗塞においては救命後の後遺障害の改善も課題となっている。ADAMTS13によるVWF依存性の血栓および炎症反応の制御は、臓器障害の軽減、予後の改善に直結する新機軸治療法として期待される。

● 4. C末端ドメイン欠損ADAMTS13マウスの血栓傾向

ADAMTS13は触媒ドメイン以外に複数のドメインをもつが、C末端ドメインは *in vitro*での基質切断に必須ではなく、その生理的意義は不明であった。われわれは、C57BL/6マウスなどの *Adamts13*にADAMTS13のC末端ドメイン欠損を引き起こす変異が自然発生していることを見出し¹⁴⁾、この自然発生変異を利用して129/Svマウスの遺伝的背景をもち、C末端ドメイン欠

損ADAMTS13を発現するコンジェニックマウス(*Adamts13*^{S/S}マウス)を作製した。野生型129/Svマウスはヒトと同じドメイン構成の全長型ADAMTS13をもつため、129/Sv遺伝的背景の下、*Adamts13*^{S/S}マウスの血栓傾向を野生型マウスおよび *Adamts13*^{-/-}マウスと比較することで、C末端ドメインの生理的意義を検証した¹⁵⁾。*Adamts13*^{S/S}マウスの血漿VWFマルチマーは野生型129/Svマウスと同等の分子量分布を示し、ULVWFマルチマーは検出されなかった。また *Adamts13*^{-/-}マウスでは、ずり速度 $1,000\text{s}^{-1}$ における *in vitro*血栓形成が充進していたが、*Adamts13*^{S/S}マウスでは野生型マウスとの違いはみられなかった。したがって、C末端ドメイン欠損ADAMTS13は *in vitro*での切断と同様に生体内でもVWFを切断し、血漿中のULVWFマルチマーを除去するのに十分な活性を保持していると考えられる。

VWFは血流が速く、高ずり応力が発生する環境下での血小板血栓形成に不可欠な分子であり、VWFの血小板凝集活性は、ずり速度の上昇に伴って充進することが知られている。また、ADAMTS13によるVWFマルチマーの切断も、ずり速度の上昇によって充進する。そこで、ずり速度 $5,000\text{s}^{-1}$ における *in vitro*血栓形成を解析すると、このずり速度では *Adamts13*^{-/-}マウスだけでなく、*Adamts13*^{S/S}マウスにおいても血栓形成の充進が観察された。また、塩化鉄内皮傷害モデルを用いて、*in vivo*血栓形成能を解析した結果、*Adamts13*^{-/-}マウスでは、傷害部位での血栓形成開始時間および血栓による血管閉塞時間がいずれも著明に短縮していた(図4)。一方、*Adamts13*^{S/S}マウスでは血栓形成開始時間は正常であったが、野生型マウスにくらべて血栓成長が加速し、血管閉塞時間が短縮していた(図4)。測定した血管のずり速度は当初 $1,000\sim 1,500\text{s}^{-1}$ であるが、生じた血栓が大きくなるにつれ、血管内腔が狭まり、ずり速度が局所的に上昇する。*Adamts13*^{S/S}マウスでは、高ずり応力下に血小板血栓形成を抑制する機能が低下しているため、血管閉塞時間の短縮がみられたと考えられる。さらに、コラーゲン-アドレナリン投与により全身性に血栓形成を惹起した場合、処置後に観察される消費性血小

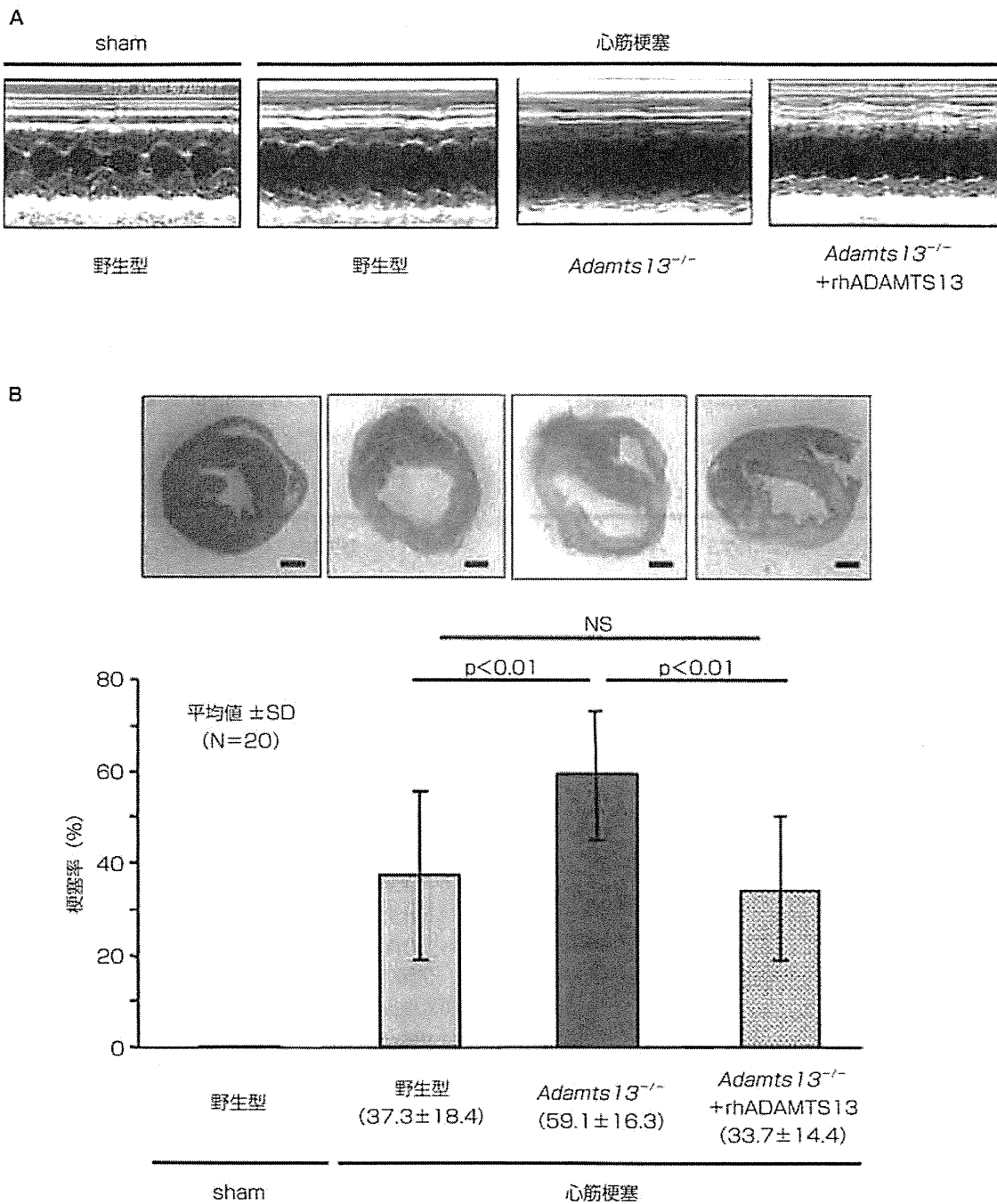


図 4 心筋梗塞を誘起した *Adamts13*^{-/-} マウスの心機能と心筋組織の評価

(A) Mモード左心室エコーの典型像 コントロール (sham) にくらべて、心筋梗塞を誘起されたマウスの左心室収縮能は顕著に低下していた。心筋梗塞誘起後の *Adamts13*^{-/-} マウスの左心室機能は野生型マウスより悪化しており、遺伝子組換えヒト ADAMTS13 (rhADAMTS13) の投与で野生型マウスと同程度まで改善された。(B) 心筋梗塞の組織学的評価 上段：マウス心臓のアザン染色像 [scale bar = 1mm, 赤 = 健全な心筋組織, 青 = 線維化した心筋組織 (梗塞部位)], 下段：梗塞率 (全左心室面積に対する梗塞面積の比率) 心エコー所見に一致して、心筋梗塞誘起後の *Adamts13*^{-/-} マウスでは野生型マウスよりも有意に梗塞範囲が広がっており、rhADAMTS13 の投与で野生型レベルにまで改善される [NS: 有意差無し]。

(Doi M *et al.*, 2012¹³⁾ より作成)

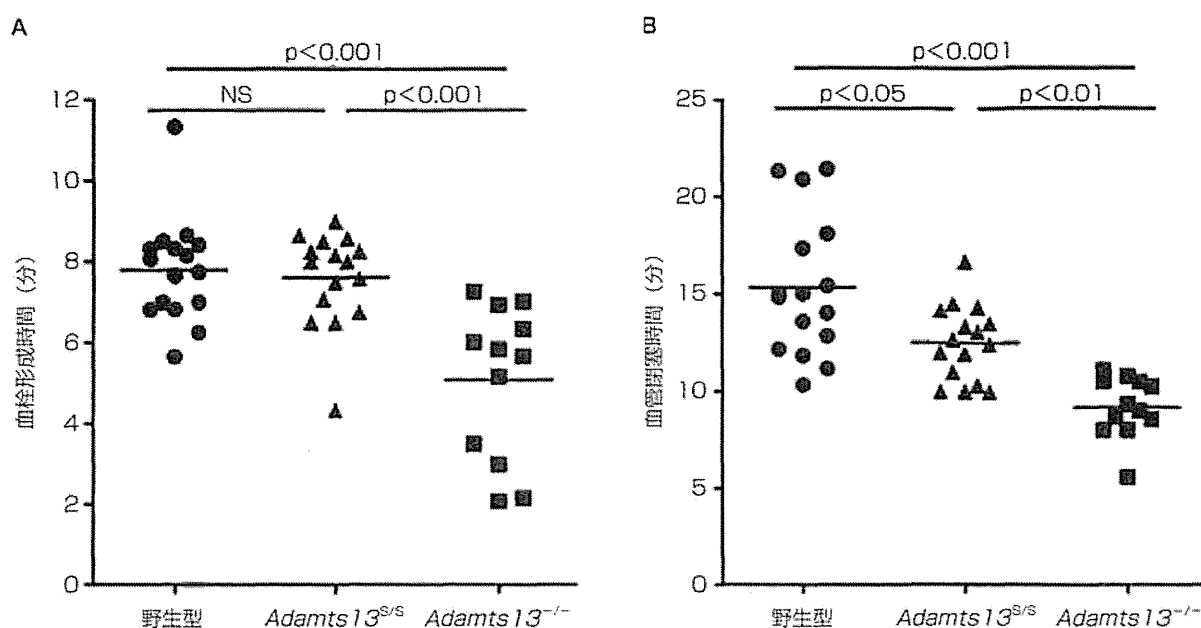


図4 Adamts13^{S/S}マウスの塩化鉄内皮傷害部位での血小板血栓形成

野生型, Adamts13^{S/S}, Adamts13^{-/-}マウスの腸間膜動脈(ずり速度:1,000~1,500s⁻¹)を, 10%塩化鉄溶液にて傷害した局部での血小板血栓形成を経時観察した。(A)動脈内に直径30μmの血栓が生じるまでの血栓形成開始時間および,(B)動脈が閉塞して30秒以上の血流停止が起こるまでの血管閉塞時間を測定し,各マウスの血栓形成能を評価した[NS:有意差無し].

(Banno F *et al.* 2009⁵¹より作成)

血小板減少はAdamts13^{-/-}マウスで最も顕著であり, Adamts13^{S/S}マウスでも野生型マウスより顕著であった。ADAMTS13のC末端ドメインは高ずり応力下でのVWF切断に寄与しており,とくに血管障害部位での過剰血小板血栓形成を効率よく抑制する上で,重要な機能をもつと考えられた。

おわりに

Adamts13^{-/-}マウスの血栓傾向,脳梗塞モデルおよび心筋梗塞モデルを用いた解析結果,Adamts13^{S/S}マウスの表現型を紹介した。現在,これらのマウスはいずれも独立行政法人医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクより入手可能である。

文献

- 1) Banno F *et al.*: Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 107: 3161-3166, 2006
- 2) Motto DG *et al.*: Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest* 115: 2752-2761, 2005
- 3) Schiviz A *et al.*: A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood* 119: 6128-6135, 2012
- 4) Feys HB *et al.*: Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (*Papio ursinus*). *Blood* 116: 2005-2010, 2010
- 5) Hacke W *et al.*: Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359: 1317-1329, 2008
- 6) Ames A, 3rd *et al.*: Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52: 437-453, 1968
- 7) Fujioka M *et al.*: ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* 115: 1650-1653, 2010