

先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析に関する研究

研究分担者 小亀 浩市 国立循環器病研究センター分子病態部 部長
研究協力者 宮田 敏行 国立循環器病研究センター脳血管内科 シニア研究員

研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) は、von Willebrand 因子切断酵素 ADAMTS13 の活性著減で発症する指定難病である。ADAMTS13 活性を著減させる原因の一つとして ADAMTS13 遺伝子異常があり、これは先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群) を引き起こす。本研究では、日本における先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、発症メカニズムの解明とともに、TTP を含む疾患群である血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の診療ガイド作成に寄与することをめざしている。今年度は、先天性 TTP 疑い患者 2 名 (2 家系) を対象として ADAMTS13 遺伝子解析を行った。ダイレクト・シーケンシング法による塩基配列解析の結果、1 名は p.R193W と p.C1213R の複合ヘテロ接合体であった。もう 1 名にはヘテロ接合性の p.C1039Y が同定されたが、別アレルの異常はゲノム定量 PCR を行っても見出せなかった。p.C1213R と p.C1039Y は海外も含めて未報告の変異であった。今回のように片アレルしか異常が見つからない症例が過去にも数家系あった。これらの症例に潜む遺伝子異常を効率よく検出する方法の開発が望まれる。

A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の発症は、フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) を特異的に切断する血漿プロテアーゼ ADAMTS13 の活性著減で起こる。ADAMTS13 活性の損失は、先天的な ADAMTS13 遺伝子異常あるいは後天的に生じる抗 ADAMTS13 自己抗体 (インヒビター) によって起こる。特に ADAMTS13 遺伝子異常によって劣性遺伝形式で発症する TTP を先天性 TTP あるいは Upshaw-Schulman 症候群 (Upshaw-Schulman syndrome; USS) と呼ぶ。我々は、先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析、日本人一般住民の ADAMTS13 活性と遺伝子多型の分析、ADAMTS13 結合タンパク質の探索、ADAMTS13 分子の立体

構造解析などに重点をおいて研究を進めてきた。本研究事業では、先天性 TTP 患者の遺伝子解析を継続的に行い、遺伝子異常の特徴や発症メカニズムに関する知見を蓄積することとともに、TTP を含む疾患群である血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の診療ガイド作成に寄与することをめざしている。

ADAMTS13 の酵素活性が 10% 未満でインヒビターが陰性であれば、先天性 TTP の可能性を考え、遺伝子解析を行う。我々はこれまで、先天性 TTP 疑い患者および家族を対象に ADAMTS13 遺伝子の塩基配列を調べ、先天性 TTP 発症の原因となる遺伝子異常を特定してきた。一般に、遺伝性疾患が疑われる患者の遺伝子の塩基配列は、標的遺伝子の各エクソンを PCR で

増幅して塩基配列を解読する方法、すなわちダイレクト・シーケンシング法によって決定される。我々もまず、ADAMTS13 遺伝子の各エクソンの外側に結合するよう設計した PCR プライマーを用いて、検体 DNA から各エクソンを選択的に増幅させ、その塩基配列を決定する。これまでに我々が行った先天性 TTP 患者解析の場合、約 9 割の症例はこの方法で複合ヘテロ接合性あるいはホモ接合性の原因変異が同定された。ダイレクト・シーケンシング法で原因変異が一つしか、あるいは一つも見つからない場合、ダイレクト・シーケンシング法を効率よく補完する方法として開発したゲノム定量 PCR 法を行っている。この方法で、これまでに 3 患者の ADAMTS13 遺伝子にそれぞれ異なる欠失異常を見出した。

本研究では、新たに見出された先天性 TTP 疑い患者 2 名 (2 家系) の原因変異を明らかにするために、患者および家族の ADAMTS13 遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

患者および家族から得られた血球画分を凍結した状態で受け取り、解析を始めるまで冷凍保管した。DNA 調製には illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE ヘルスケア) を使用した。血液からの調製を前提とした試薬キットなので、凍結血球 (約 200 μ L) を解凍しながら約 100 μ L の生理食塩水で懸濁して約 300 μ L の血液と見なし、マニュアルに従って調製した。

全 29 個のエクソンを PCR で増幅するために、24 ペアのプライマーを用いた。センス方向プライマーの 5' 側に M13F 配列 (TGTAACGACGGCCAGT) を、アンチセン

ス方向プライマーの 5' 側に M13R 配列 (CAGGAAACAGCTATGACC) を、それぞれ付加しておいた。これは、あとのシーケンシング反応を効率的に行うためである。エクソン 7 以外は一般的な PCR 条件で容易に増幅させることができた。エクソン 8 および 26-27 の増幅では反応液に DMSO 1 μ L を添加した。エクソン 7 は GC 塩基の割合が非常に高いため、GC-RICH PCR System (ロッシュ) を使用した。PCR 終了後、1 μ L を用いてアガロース電気泳動でバンドを確認した。次に、PCR 反応液に残った過剰プライマーの除去と未反応 dNTP の不活化を目的として、ExoSAP-IT (アフィメトリクス) 1 μ L を加え、37 /30 分間、80 /15 分間反応させた。このうち 1 μ L を鋳型にして、M13F および M13R プライマーでシーケンス反応を行った。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライド・バイオシステムズ) 試薬の 4 倍希釈液を用いて 5 μ L / 反応で行った。反応終了後、CleanSEQ ダイターミネータ精製試薬キット (ベックマン・コールター) で精製し、Genetic Analyzer 3730xl (アプライド・バイオシステムズ) に供して波形データを得た。

解析ソフトウェア Sequencher (ジーンコード) を用いて波形データを観察し、対象領域 (各エクソンとその前後約 20 塩基) のレファレンス配列と比較した。エクソンに変異が見つかった場合、cDNA 配列 (GenBank: AB069698.2) と照合してアミノ酸配列への影響などを調べた。イントロンに変異が見つかった場合、ス 0 プライミングに対する影響等を検討した。なお、エクソンの異常でもスプライシングに影響をおよぼす可能性もあるので、

注意深く検討した。変異が先天性 TTP の原因として既知であれば、それを原因変異として確定した。未報告の変異であれば、アミノ酸レベルでの変異の特徴から機能への影響を類推した。日本人の ADAMTS13 遺伝子に存在する 6 個のミスセンス多型、p.T339R、p.Q448E、p.P475S、p.P618A、p.S903L、p.G1181R は原因変異から除外した。

(倫理面への配慮)

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委員会で研究計画の承認を受けた上で実施した。研究参加者からは書面でのインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

USS-AAA 家系の患者は女性で、出産時に TTP と診断され血漿交換治療が施された。その後、周期性の血小板減少が観察されていた。異なる採血日の測定で血漿 ADAMTS13 活性はいずれも 10% 未満であり (1.0、1.1、<0.5%)、インヒビターは検出されなかったため、先天性 TTP である可能性が高いと考えられた。ダイレクト・シーケンシング法による解析の結果、c.577C>T (p.R193W) および c.3637T>C (p.C1213R) のヘテロ接合体であった。両親の遺伝子解析を行っていないために断定できないが、臨床症状や検査結果等を考慮すれば、患者は両変異の複合ヘテロ接合体であると考えてよいと判断した。c.577C>T (p.R193W) はこれまで日本の 10 家系に見出された変異で、c.3637T>C (p.C1213R) は国外含めて未報告の変異である。

USS-S 家系の患者は男性で、異なる採血日の測定で血漿 ADAMTS13 活性はいずれ

も 10% 未満であり (2.9、3.4%)、インヒビターは検出されなかったため、この患者も先天性 TTP である可能性が高いと考えられた。患者家族の血漿 ADAMTS13 活性は、父 (48.2、87.0%)、母 (23.3、37.1%)、兄 (33.1%) であり、いずれもインヒビターは陰性であった。ダイレクト・シーケンシング法による解析の結果、患者に c.3116G>A (p.C1039Y) がヘテロ接合体で同定された。これは国外含めて未報告の変異である。患者にはもう一つの異常が存在すると予想されたため、ダイレクト・シーケンシング法を補完するゲノム定量 PCR 法による解析を行った。しかし、この方法でも異常は見つからなかったため、本患者には希少なタイプの遺伝子異常が存在する可能性が考えられた。これを解決するには、次世代シーケンシング技術等を利用する必要があるかもしれない。

D. 考察

遺伝性希少疾患の診断を確定する際、原因変異を特定することはきわめて重要である。次世代シーケンサーの普及に伴い、遺伝子解析の方法は変化していくと予想されるが、希少疾患で、かつ、先天性 TTP のように責任遺伝子が限定されている場合、依然としてダイレクト・シーケンシング法がコスト面等で優れている。本研究では、種々の工夫により効率化したダイレクト・シーケンシング法を行い、先天性 TTP 疑い患者 2 名 (2 家系) に、発症原因と考えられる ADAMTS13 遺伝子異常を同定した。今回同定されたのは、3 種のミスセンス変異であった。いずれも、ADAMTS13 の本来の機能、すなわち VWF 切断活性を発揮できなくなる変異であると

考えられる。これまでの知見から考えると、いずれもタンパク質が細胞外に分泌されなくなる変異である可能性が高い。

E. 結論

先天性 TTP 疑い患者 2 名 (2 家系) の ADAMTS13 遺伝子をダイレクト・シーケンシング法で解析した結果、1 名には両アレル性の異常が、もう 1 名には片アレル性の異常が同定された。後者にはゲノム定量 PCR 法も適用したが、別アレルの異常は見つからなかった。このような症例に潜む遺伝子異常を効率よく検出する方法の開発が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Toshiyuki Miyata, Yumiko Uchida, Yoko Yoshida, Hideki Kato, Masanori Matsumoto, Koichi Kokame, Yoshihiro Fujimura, and Masaomi Nangaku: No association between dysplasminogenemia with p.A1a620Thr mutation and atypical hemolytic uremic syndrome. *Int. J. Hematol.* 104 (2), 223-227 (2016)

Koichi Kokame: Subsequent Response of VWF and ADAMTS13 to Aortic Valve Replacement. *J. Atheroscler. Thromb.* 23 (10), 1141-1143 (2016)

Nobuyuki Tsujii, Isao Shiraishi, Koichi Kokame, Midori Shima, Yoshihiro Fujimura, Yukihiro

Takahashi, Masanori Matsumoto: Severe hemolysis and pulmonary hypertension in a neonate with Upshaw-Schulman syndrome. *Pediatrics* 138 (6), e20161565 (2016)

Takuma Maeda, Katsura Nakagawa, Kuniko Murata, Yoshiaki Kanaumi, Shu Seguchi, Shiori Kawamura, Mayumi Kodama, Takeshi Kawai, Isami Kakutani, Yoshihiko Ohnishi, Koichi Kokame, Hitoshi Okazaki, and Shigeki Miyata: Identifying patients at high risk of heparin-induced thrombocytopenia-associated thrombosis with a platelet activation assay using flow cytometry. *Thromb. Haemost.* 117 (1), 127-138 (2017)

堀内久徳, 松本雅則, 小亀浩市: 循環器疾患随伴後天性フォンウィルブランド症候群の臨床的インパクト. *日本血栓止血学会誌* 27 (3), 316-321 (2016)

秋山正志, 小亀浩市: 腸内細菌代謝産物 TMAO は血小板の反応性亢進と血栓症リスクを増強する. *日本血栓止血学会誌* 27 (3), 384 (2016)

2. 学会発表

小亀浩市: 先天性 TTP / USS の遺伝子解析の現状. 第 10 回日本血栓止血学会 SSC シンポジウム, 東京, 2016 年 2 月 20 日

小亀浩市, 内田裕美子, 宮田敏行, 松本雅則, 藤村吉博, 吉田瑤子, 加藤秀樹, 南学正臣: デジタル PCR を用いた aHUS 関連遺伝子異常の検出. 第 38 回日本血栓止

血学会学術集会, 奈良, 2016年6月16日
-18日

大和恵子, 中城有香子, 井本(山本)ひとみ, 小亀浩市, 宮田敏行, 片岡大治, 高橋淳, 柳本広二: Activated protein C (APC) in the acute phase suppresses the development of cerebral injuries after focal cerebral ischemia. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016年7月20日-22日

Toshiyuki Miyata, Yumiko Uchida, Yoko Yoshida, Hideki Kato, Masanori Matsumoto, Koichi Kokame, Yoshihiro Fujimura, and Masaomi Nangaku: No association between dysplasminogenemia with p.Ala620Thr mutation and atypical hemolytic uremic syndrome. The 26th International Complement Workshop, Kanazawa, September 4-8, 2016.

堀内久徳, 坂爪公, 松本雅則, 小亀浩市, 齋木佳克: 人工心臓内の高ずり応力が引き起こす出血性疾患: 後天性フォンウィルブランド症候群. 第89回日本生化学会大会, フォーラム企画「生体材料・人工臓器の現状と未来」, 仙台, 2016年9月25日-27日

Masanori Matsumoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, and Yoshihiro Fujimura: Analysis of thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency in a Japanese registry. The 9th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Taipei, Taiwan, October 6-9, 2016.

Keiko Yamato, Yukako Nakajo, Hitomi Yamamoto-Imoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Hiroharu Kataoka, Jun C. Takahashi, and Hiroji Yanamoto: Activated protein C (APC) in the acute phase suppresses the development of cerebral infarction after focal cerebral ischemia. Neuroscience 2016, San Diego, USA, November 12-16, 2016.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし