

## 先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析

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難治性疾患である。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) をもたらす。本研究では、日本における先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析を実施し、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・改訂に寄与することを目的とする。今年度は、先天性 TTP 疑い患者 1 名を対象として 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、p. R193W 変異と p. R1123H 変異の複合ヘテロ接合体であった。p. R1123H 変異は国内初であるが、デンマークの家系で同定されていた原因変異である。これらの結果は診療ガイドラインの改訂等に役立つ知見となる。さらに今年度は、従来の方法 (ダイレクトシーケンシング法およびゲノム定量 PCR 法) で 2 アレルの原因変異を同定できなかった未解決の 4 家系に対し、新たな方法 (ロングリードシーケンシング法) による解析を開始した。

#### 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潜性遺伝 (劣性遺伝) 様式で発症する 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・改訂に寄与することを目的としている。

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。

今年度は、新たに見出された先天性 TTP 疑い患者 1 名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。さらに、これまでにダイレクトシーケンシング法およびゲノム定量 PCR 法で 2 アレルの原因変異を同定できなかった未解決の 4 家系に対し、新たな方法（ロングリードシーケンシング法）による解析を開始した。

## 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  $\mu$ L) を解凍しながら約 100  $\mu$ L の生理食塩水で懸濁して約 300  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L を加え、37°C/30 分間、80°C/15 分間反応させた。このうち 1  $\mu$ 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  $\mu$ 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、スプライシ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。

また、これまでにダイレクトシーケンシング法およびゲノム定量PCR法で2アレルの原因変異を同定できなかった4家系の原因変異を探索するため、GridION(ナノポア・テクノロジーズ)によるロングリードシーケンシング解析の条件検討を開始した。

(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

患者(3歳、男児)は、発熱の翌日に眼球結膜黄染が出現したためその翌日に受

診し、血小板減少と総ビリルビン上昇からTMAが疑われた。さらに外注検査によるADAMTS13活性2%、インヒビター陰性から、先天性TTPが疑われた。奈良医大輸血部で詳細な検査を行った結果、ADAMTS13活性0.5%未満、インヒビター陰性であった。父はADAMTS13活性25.0%、インヒビター陰性、母はADAMTS13活性32.0%、インヒビター陰性であったため、患者は先天性TTPの可能性が強く推定されたため、ADAMTS13遺伝子をダイレクトシーケンシング法で解析した。その結果、患者にc.577C>T(p.Arg193Trp)変異とc.3368G>A(p.Arg1123His)変異がそれぞれヘテロ接合性で同定された。父にc.3368G>A(p.Arg1123His)変異が、母にc.577C>T(p.Arg193Trp)がヘテロ接合性で同定されたため、患者は両変異による複合ヘテロ接合体と推定された。c.577C>T(p.Arg193Trp)これまで11家系に同定された変異であり、c.3368G>A(p.Arg1123His)は国内初であるが、デンマークからの報告例があった。

ロングリードシーケンシング法による解析を進めるにあたり、今回は、従来法で1782bp欠失を同定していた家系に対し、GridIONを用いたロングリードシーケンシング法を実施した。ADAMTS13遺伝子全体を含む約50kbの領域を、互いに一部重複する6本のPCR産物で解析した結果、期待通り1782bp欠失を同定することができた。今後、未解決の4家系に解析対象を広げ、未知の遺伝子異常の同定を試みる。

### 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。今年度は、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 1 名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、2 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。

これまでに解析した結果をまとめると、先天性 TTP 疑い患者 65 名 (58 家系) のうち 61 名 (54 家系) に、複合ヘテロ接合性 (43 家系)あるいはホモ接合性 (11 家系) の原因変異を同定したことになる。変異は 67 種類で、その内訳は、ミスセンス 42 種類 (62.7%)、フレームシフト 11 種類 (16.4%)、ナンセンス 8 種類 (11.9%)、スプライシング異常 4 種類 (6.0%)、構造異常 2 種類 (3.0%) であった。論文発表されている海外の原因変異を含めると全部で約 180 種類となった。

解析した 58 家系のうち 4 家系には、未発見の遺伝子異常が存在する可能性があり、解決すべき課題として残っている。ロング・リード・シーケンシングによる解析を開始したので、今後明らかになること

が期待される。

## E. 結論

先天性 TTP 疑い患者 1 名の 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、両アレル性の異常が同定された。

## F. 健康危険情報 該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Keigo Akuta, Kazunobu Kiyomizu, Hirokazu Kashiwagi, Shinji Kunishima, Nobuko Nishiura, Fumiaki Banno, Koichi Kokame, Hisashi Kato, Yuzuru Kanakura, Toshiyuki Miyata, Yoshiaki Tomiyama: Knock-in mice bearing constitutively active  $\alpha$  IIb (R990W) mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction. *J. Thromb. Haemost.* 18 (2), 497-509 (2020)
- 2) Keiko Yamato, Yukako Nakajo, Hitomi Yamamoto-Imoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Jun C Takahashi, Hiroharu Kataoka, Hiroji Yanamoto: Low-dose activated protein C suppresses the development of cerebral infarction and neurological deficits in mice. *Neurosurg. Open* 1 (4), okaa014 (2020)
- 3) Kazuya Sakai, Yoshihiro Fujimura, Yasuyuki Nagata, Satoshi Higasa,

- Masato Moriyama, Ayami Isonishi, Mutsuko Konno, Michiko Kajiwara, Yoshiyuki Ogawa, Shigehiko Kaburaki, Tomoko Hara, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Kinta Hatakeyama, Masanori Matsumoto: Success and limitations of plasma treatment in pregnant women with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 18(11):2929-2941 (2020)
- 4) Yuka Eura, Toshiyuki Miyata, Koichi Kokame. Derlin-3 is required for changes in ERAD complex formation under ER stress. *Int. J. Mol. Sci.* 21(17):6146 (2020)
- 5) Keiko Maruyama, Koichi Kokame. Carrier frequencies of antithrombin, protein C, and protein S deficiency variants estimated using a public database and expression experiments. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 5(1):179-186 (2021)
- 6) 宮田敏行, 小亀浩市. TMA の遺伝子診断:TTP と aHUS. *日本血栓止血誌*, 31 (1):17-27 (2020)
- 2) 山崎泰男, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市. Weibel-Palade 小体にはサブユニット構成の異なる 2 種類の Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase が局在している. 第 42 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2020 年 6 月 18-20 日.
- 3) 秋山正志, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市. 新規 ADAMTS13 クリアランス受容体 SIGLEC5 および SIGLEC14 の機能解析. 第 42 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2020 年 6 月 18-20 日.
- 4) 三島優一, 秋山正志, 小亀浩市. 肝星細胞における ADAMTS13 の遺伝子発現調節. 第 42 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2020 年 6 月 18-20 日.
- 5) 三好剛一, 根木玲子, 吉松淳, 宮田敏行, 丸山慶子, 小亀浩市, 浅原彩子, 奥久人. プロテイン S (PS) 比活性検査および PS-K196E 変異検出 ELISA の PS-K196E 変異予測精度に関する検討. 第 42 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2020 年 6 月 18-20 日.
- 6) Shigeki Miyata, Koichi Kokame. Underlying causes greatly influence the development of HIT antibodies and clinical outcomes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. The 28th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Online, July 11-15, 2020.
- 7) Keiko Maruyama, Koichi Kokame.

## 2. 学会発表

- 1) 丸山慶子, 小亀浩市. 公開データベースから抽出したアンチトロンビンおよびプロテインC変異の機能解析. 第 42 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2020 年 6 月 18-20 日.

Carrier frequencies of antithrombin-, protein C-, or protein S-deficient variants estimated using a public database and expression experiments. The 28th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Online, July 11-15, 2020.

- 8) R Neki, T Miyata, K Ohtani, Y Hidaka, K Ida, T Yokouchi-Konishi, A Nakanishi, J Yoshimatsu, K Kokame, N Wakamiya, N Inoue. Alternative complement pathway activation in the severe hypertensive disorders of pregnancy. The 28th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Online, July 11-15, 2020.
- 9) M Osada, K Maruyama, K Kokame, R Denda, K Yamazaki, H Kunieda, M

Hirao, S Madoiwa, M Murata, Y Ikeda, Y Tsukada, T Kikuchi. A hereditary bleeding disorder caused by a novel homozygous mutation of thrombomodulin gene. The 28th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Online, July 11-15, 2020.

- 10) 斯波真理子, 小林直之, 小亀浩市, 和田郁人. 脂質異常症に対する核酸医薬の開発. 第41回日本臨床薬理学会学術総会, オンライン, 2020年12月3-5日.

#### 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