

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・改定に寄与することを目的とする。今年度は、新たな先天性 TTP 疑い患者を対象とした従来方法 (ダイレクトシーケンシング法) による ADAMTS13 遺伝子解析と、新たな方法 (ロングリードシーケンシング法) の確立に向けた検討を行った。先天性 TTP 疑い患者 1 名に対するダイレクトシーケンシング法によるエクソン解析では、p. R1219W と p. Q1374Sfs の複合ヘテロ接合体であることがわかった。p. R1219W はイタリアの家系で報告されていたが国内では初であり、p. Q1374Sfs は国内の 1 家系で同定されていた原因バリエーションである。従来方法で原因バリエーションを同定できなかった家系の解決に向けて検討しているロングリードシーケンシング法については、種々の工夫を導入することで包括的解析方法の確立にかなり近づくことができ、次年度に完成する見込みができた。

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・改定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に設計した 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バリエーションが同定された。ダイレクトシーケンシング法で原因バリエーションが一つしか、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 名の原因バリエーション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

の原因バリエーション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）による解析を昨年度から開始し、今年度は種々の改善や工夫を加え、解析法の確立を目指した。

B. 研究方法

患者および家族から得られた血球成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 (TGTAACGACGCGCCAGT) 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°C/30 分間、80°C/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 3500xl (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。エクソンにバリエーションが見つかった場合、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。イントロンにバリエーションが見つかった場合、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。バリエーションが先天性 TTP の原因として既知であれば、それを原因バリエーションとして確定した。未報告のバリエーションであれば、アミノ酸レベルでのバリエーション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 は原因バリエーションから除外した。

また、これまでにダイレクトシーケンス法およびゲノム定量 PCR 法で 2

アレルの原因バリエーションを同定できなかった 4 家系の原因バリエーションを探索するため、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ス解析の条件検討を進めた。

ナノポアによる解析では、標的 DNA の両端にシーケンス用アダプターを付加するステップにおいて、PCR と同時に付加する four-primer PCR 法と、PCR 産物に後付けする ligation 法があるため、両者を比較した。得られたデータは、ショートリードシーケンスでは判別できない距離のハプロタイピングが可能になることを期待し、WhatsHap というソフトウェアを中心に使用して解析した。

(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

当該患者は、臨床症状や ADAMTS13 活性検査等から TTP が疑われ、奈良医大輸血部による詳細な検査の結果、ADAMTS13 活性 0.5%未満、インヒビター陰性であったため、先天性 TTP の可能性が強く推定された。そこで、ADAMTS13 遺伝子をダイレクトシーケンス法で解析した結果、c. 3655C>T (p. R1219W) バリエーションと c. 4119delG (p. Q1374Sfs*22) バリエーションがそれぞれヘテロ接合性で同定された。父と兄に c. 3655C>T バリエーションが、母に c. 4119delG バリエーションがヘテロ接合性

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であると推定された。c. 3655C>T バリエントは国内初であるが、イタリアから報告例がある。c. 4119delG バリエントは国内の 1 家系で同定されていた。

ロングリードシーケンシング法においては、four-primer PCR 法と ligation 法を比較検討した。four-primer PCR 法には PCR 効率が低いという難点があったが、ligation 法では約 10 倍量のデータが得られ、解析精度が大きく向上した。ソフトウェア WhatsHap による解析では、ADAMTS13 遺伝子のほぼ全域に亘って 1 ブロックに連結させることに成功した。これにより、ショートリードシーケンシングでは判別できない距離のハプロタイピングが可能になった。一方、リード選別等コマンドラインでの解析にさらなる工夫が必要であることも判明したため、現在、最適化を進めている。

D. 考察

遺伝性希少疾患の診断を確定する際、原因バリエント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、1

種のミスセンスバリエントと 1 種のフレームシフトバリエントであった。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バリエント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バリエント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 66 名 (59 家系) のうち 62 名 (55 家系) に、複合ヘテロ接合性 (44 家系) あるいはホモ接合性 (11 家系) の原因バリエントを同定したことになる。バリエントは 68 種類で、その内訳は、ミスセンス 43 種類 (63.2%)、フレームシフト 11 種類 (16.1%)、ナンセンス 8 種類 (11.8%)、スプライシング異常 4 種類 (5.9%)、構造異常 2 種類 (2.9%) であった。論文発表されている海外の原因バリエントを含めると全部で約 180 種類となっている。

解析した 59 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が確立に目処がついたので、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。さらに、ロングリードシーケンシングによる ADAMTS13 全長解析の確立の見込みが立った。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kazuya Sakai, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata, Ayami Isonishi, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto: Current prophylactic plasma infusion protocols do not adequately reduce long-term microvascular events in Japanese patients with congenital TTP. Br. J. Haematol. 194: 444-452 (2021)
- 2) Makoto Osada, Keiko Maruyama, Koichi Kokame, Ryunosuke Denda, Kohei Yamazaki, Hisako Kunieda, Maki Hirao, Seiji Madoiwa, Nobuo Okumura, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda, Kentaro Watanabe, Yuiko Tsukada, Takahide Kikuchi: A novel homozygous variant of the thrombomodulin gene causes a hereditary bleeding disorder. Blood Adv. 5:3830-3838 (2021)
- 3) Asano Watanabe, Hikari Hataida, Naoya Inoue, Kosuke Kamon, Keigo Baba, Kuniaki Sasaki, Rika Kimura, Honoka Sasaki, Yuka Eura, Wei-Fen Ni, Yuji Shibasaki, Satoshi Waguri, Koichi Kokame, Yoko Shiba: Arf GTPase-Activating proteins SMAP1 and AGFG2 regulate the size of Weibel-Palade bodies and exocytosis of von Willebrand factor. Biol. Open 10:bio058789 (2021)
- 4) Yuka Eura, Koichi Kokame: Commonly used anti-von Willebrand factor

antibody for multimer analysis cross-reacts with fibronectin, which is difficult to distinguish from VWF. Res. Pract. Thromb. Haemost. 5: e12598 (2021)

- 5) Yasuo Yamazaki, Yuka Eura, Koichi Kokame: V-ATPase V0a1 promotes Weibel-Palade body biogenesis through the regulation of membrane fission. eLife 10:e71526 (2021)
- 6) Satomi Nagaya, Keiko Maruyama, Atsushi Watanabe, Makiko Meguro-Horike, Yuta Imai, Yuki Hiroshima, Shin-Ichi Horike, Koichi Kokame, Eriko Morishita: First report of inherited protein S deficiency caused by paternal PROS1 mosaicism. Haematologica 107:330-333 (2022)
- 7) 丸山慶子, 小亀浩市: 公開データベースと発現実験を用いたアンチトロンビン, プロテインCおよびプロテインS 遺伝子の病的バリエーションの頻度推定. 日本血栓止血誌, 32:635-637 (2021)

2. 学会発表

- 1) 丸山慶子, 宮田茂樹, 小亀浩市: Fc γ RIIa 固相化ビーズと AlphaLISA 技術を用いた HIT 抗体検出法の開発. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021. 5. 27-29.
- 2) 山崎泰男, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市: Weibel-Palade 小体の形成におけるプロトンポンプ(V-ATPase) a サブユニットの役割. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021. 5. 27-29.

- 3) 秋山正志, 小亀浩市: ADAMTS13 および VWF のエンドサイトーシスに関わる Siglecs の機能解析. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021. 5. 27-29.
- 4) Teena Bhakuni, 秋山正志, 小亀浩市: Protein S attenuates high glucose-induced damage in blood-brain barrier endothelial cells. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021. 5. 27-29.
- 5) 根木玲子, 伊田和史, 丸山慶子, 辻明宏, 宮田敏行, 小亀浩市: 遺伝カウンセリング外来来談者における遺伝性血栓性素因の遺伝子解析および患者背景に関する検討. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021. 5. 27-29.
- 6) 辻 明宏, 関根章博, 浅野遼太郎, 上田 仁, 青木竜男, 保山美由紀, 根木玲子, 小亀浩市, 宮田敏行, 大郷 剛: アンチトロンビン抵抗性を示すプロトロンビン変異を伴う 3 症例の検討. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会, オンライン, 2021. 5. 27-29.
- 7) Neki R, Ida K, Maruyama K, Tsuji A, Miyata T, Kokame K: Phenotypic and genetic assessment in thrombotic patients with inherited thrombophilia at Genetic Counseling Division. The 29th ISTH, Online, July 17-21, 2021.
- 8) 小亀浩市: DIC/TMA 関連分子の遺伝子解析・検査. 第 16 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム, Web, 2022. 2. 19.

H. 知的財産権の出現・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし