

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、昨年度に引き続き、新たな先天性 TTP 疑い患者を対象とした従来方法 (PCR 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. C754Afs*24 と p. C908Y の複合ヘテロ接合体であることがわかった。いずれもこれまでに同定されたことのある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症例の原因解明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近づくことができたが、新たな課題も明らかになった。

A. 研究目的

全身性の重篤な疾患である血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP、指定難病 64) は、止血タンパク質 von Willebrand 因子 (von Willebrand factor; VWF) を特異的に切断する血漿プロテアーゼ ADAMTS13 の活性著減が原因で発症する。ADAMTS13 活性の損失は、先天的には ADAMTS13 遺伝子異常で、後天的には抗 ADAMTS13 自己抗体 (インヒビター) の出現で起こる。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 疑い患者の 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 疑い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機構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 の可能性が高いと考え、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 PCR 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バリエーションが同定された。PCR 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、PCR ダイレクトシーケンシング法の弱点を補完する方法として開発したゲノム定量 PCR 法を行ってきた。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。しかし、それでもなお 2 アレルに原因バリエーションが見つからない家系が残っており、解析方法のさらなる開発が必要な状況である。

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 PCR 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）による解析を継続し、種々の改善や工夫を加えて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。あとのシーケンシング反応を効率的に行うために、センス方向プライマーの 5' 側に M13F 配列 (TGTA AACGACGCCAGT) 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。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予想通りの分子量のバンドを確認した。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 3500x1 (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。エクソンのバリエーションでもスプライシングに影響を与える可能性も検討した。バリエーションが先天性 TTP の原因として既知であれば、原因バリエーションとして確定した。未報告であれば、アミノ酸レベルでの変化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。

一方、これまでに PCR 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 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) によるロングリードシーケンシング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 の両端にシーケンシング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。昨年度の検討により ligation 法が適していると結論したため、今年度はそれを採用した。得られたデータは、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プ決定 (フェージング) が可能になることを期待し、種々のソフトウェアを比較検討しながら解析した。

(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 PCR ダイレクトシーケンシング法で解析した結果、c. 2259delA (p. C754Afs*24) バリエーションと c. 2723G>A (p. C908Y) バリエーションがそれ

ぞれヘテロ接合性で同定された。父と姉に c.2259delA バリアントが、母に c.2723G>A バリアントがヘテロ接合性で同定され、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。いずれもこれまでに同定されたことのある原因バリアントであった。

ロングリードシーケンシング法においては、ADAMTS13 遺伝子全長を1対のハプロタイプブロックで連結すること、すなわちフェージングに成功した。これにより解析精度が向上し、ロングリードシーケンシング法でイントロンに検出したバリアントが、PCR ダイレクトシーケンシング法でエクソンに同定した病的バリアントと同じアレル上にあるか否かを判定できるようになった。そこで、病的バリアント候補の抽出と絞り込みに着手したところ、1塩基バリアント (single nucleotide variant; SNV) の検出は非常に高精度であったが、使用するソフトウェアによって抽出結果が完全には一致しないことが分かった。特に同一塩基が連続する領域での InDel は偽陽性の可能性が高く、その原因は PCR 時の塩基取り込みエラーに依ることがわかった。このようなエラーは high fidelity を謳う PCR 酵素でも不可避であり、ロングリードシーケンシング後のバリアント絞り込みの際には要注意である。さらに、既存のソフトウェアによる解析では長鎖 PCR に特有の問題がフェージングに大きな影響を与えることが判明した。

D. 考察

遺伝性希少疾患の診断を確定する際、

原因バリアントを特定することはきわめて重要である。シーケンシング技術の向上に伴い、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 PCR 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。今年度も、種々の工夫により効率化した PCR ダイレクトシーケンシング法で先天性 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アントと1種のフレームシフトバリアントであった。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ア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ア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 67 名 (60 家系) のうち 63 名 (56 家系) に、複合ヘテロ接合性 (45 家系) あるいはホモ接合性 (11 家系) の原因バリアントを同定したことになる。バリアントは 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アントを含めると全部で約 200 種類となっている。

解析した 60 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。今年度の検討で、ロングリードシーケンシングによる解析の問題点が明確になってきたので、今後それらを解決することで ADAMTS13 遺伝子解析力が大きく向上す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 全長解析の問題点が明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masashi Akiyama, Yuka Eura, Koichi Kokame: Siglec-5 and Siglec-14 mediate the endocytosis of ADAMTS13. *Thromb. Res.* 219, 49-59 (2022)
- 2) Keiko Maruyama, Shigeki Miyata, Koichi Kokame: Alpha-HIT assay: A new assay for heparin-induced thrombocytopenia antibody detection using Fc γ RIIa-coated beads and Alpha technology. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 6, e12818 (2022)
- 3) Kazuya Sakai, Eriko Hamada, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto: Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura: genetics and emerging therapies. *Ann. Blood* 2022, 1-14 (2022)

- 4) Akihiro Tsuji, Toshiyuki Miyata, Akihiro Sekine, Reiko Neki, Koichi Kokame, Tsutomu Tomita, Yumi Kashima, Ryotaro Asano, Jin Ueda, Tatsuo Aoki, Takeshi Ogo: Three cases of unprovoked venous thromboembolism with prothrombin p.Arg596Gln variant and literature review of antithrombin resistance. *Intern. Med.* 62, 885-888 (2023)
- 5) Kazuki Fukuma, Hiroshi Yamagami, Masafumi Ihara, Tomotaka Tanaka, Toshiyuki Miyata, Shigeki Miyata, Koichi Kokame, Kunihiro Nishimura, Yuriko Nakaoku, Haruko Yamamoto, Mikito Hayakawa, Kenji Kamiyama, Yukiko Enomoto, Ryo Itabashi, Eisuke Furui, Yasuhiro Manabe, Masayuki Ezura, Kenichi Todo, Kazuo Hashikawa, Shinichiro Uchiyama, Kazunori Toyoda, Kazuyuki Nagatsuka: P2Y12 reaction units and clinical outcomes in acute large artery atherosclerotic stroke: a multicenter prospective study. *J. Atheroscler. Thromb.* 30, 39-55 (2023)

2. 学会発表

- 1) 久郷佳央梨, 小亀浩市, 増田弘明, 正木沙賀恵, 古田賢二, 相庭武司: 先天性プロテイン S 欠乏症に対する遺伝子検査方法の構築. 第 71 回日本医学検査学会 in 大阪, 大阪,

2022年5月21-22日.

- 2) 小亀浩市: AlphaFold を使ってみよう. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.
- 3) 丸山慶子, 小亀浩市: プロテインS 遺伝子のイントロン1による遺伝子発現調節. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.
- 4) 樋口(江浦)由佳, 松本雅則, 小亀浩市: ロングリードシーケンシングの強みを活かした ADAMTS13 遺伝子解析. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.
- 5) 山崎泰男, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市: Weibel-Palade 小体はV-ATPase V0a1 によって制御される膜分離を経て形成される. 第44回日本血栓

止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.

- 6) 秋山正志, 小亀浩市: プラスミノゲンのエンドサイトーシスに関わる Siglecs の同定および機能解析. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.
- 7) Teena Bhakuni, 秋山正志, 小亀浩市: Protection of blood-brain barrier endothelial cells by the protein S-TAM receptor(s) axis. 第44回日本血栓止血学会学術集会, 仙台, 2022年6月23-25日.

H. 知的財産権の出現・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