

## 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

### 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 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 PCR ダイレクトシーケンシング解析と、未解決患者を対象としたロングリードシーケンシング法の確立を目指した。先天性 TTP 疑い患者 1 名の解析では p. C908Y と p. C1130S の複合ヘテロ接合性が原因であることがわかった。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したプログラムを開発した。その過程で、未解決患者のうち 1 名の発症原因が p. L274P と de novo の p. C1039Y による複合ヘテロ接合性であることが判明した。

#### 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ントが同定された。PCR ダイレクトシーケンシング法で原因バリエントが一つしか、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、それでもなお両アレルに原因バリエント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 名の原因バリエント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 法で両ア

レルの原因バリエントを同定できなかった未解決の 4 家系に対し、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画分を凍結状態で受け取り、解析開始まで冷凍保管した。DNA 調製には illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (Cytiva) を使用した。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 配列を、アンチセンス方向プライマーの 5' 側に M13R 配列を付加しておいた。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る。エクソン 8 および 26-27 の増幅では反応液に DMSO 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。アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の分子量を確認した。ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific) で PCR 反応液に残ったプライマーの除去と未反応 dNTP の不活化を行った後、M13F および M13R プライマーでシーケンシング反応を行った。反応終了後、CleanSEQ (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。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 法で両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、これまでの検討で PCR 産物に後付けする ligation 法が適していると結論したため、今回もそれを採用した。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) が可能になるよう、種々のソフトウェアを比較しながら解析した。

(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ている。

### 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. 2723G>A (p. C908Y) バリエーションと c. 3389G>C (p. C1130S) バリエーションがそれぞれヘテロ接合性で同定された。母に c. 2723G>A バリエーションが、父に c. 3389G>C バリエーション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。c. 2723G>A は他の家系で同定されたことのある原因バリエーションであり、c. 3389G>C は未報告であった。

ロングリードシーケンシング法においては、これまでに 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、1 塩基バリエーション (SNV) 検出はかなり高精度になったものの、同一塩基が連続する領域では PCR に付随するエラーが存在することを報告していた。今回、ロングレンジ PCR に起因する、より大きな問題を見出した。ロングリードシーケンシング法では、ヘテロ SNV を利用したフェージングにより、2 個のバリエーションの複合ヘテロ性 (別アレルに載っている) を検証することができる。そこで、de novo バリエーションのため複合ヘテロ性の証明が困難であった患者の DNA を解析したところ、遺伝子全長でのフェージングに、一見、成功した。しかし、父母のゲノム DNA で検証すると誤りが生じて

いた。そこで、各リードを個別抽出して手作業で解析した結果、正確なフェージングに成功し、複合ヘテロ接合性であることが明らかになった。つまり、この患者は、母由来のアレルに存在していたミスセンスバリエント c. 821T>C (p. L274P) と父由来のアレルに生じた de novo ミスセンスバリエント c. 3116G>A (p. C1039Y) による複合ヘテロ接合性が発症原因であった。

さらに既存の解析ソフトウェアで誤りが生じた原因も分かった。それは、ロングレンジ PCR をベースとした解析において、1) リード間を跨ぐバリエントの組み合わせ多様性が低い、2) PCR キメラ産物が存在する、3) アレル間で PCR 効率が大きく異なる場合があるなど、特有の攪乱要素が考慮されていないためであった。そこで、バイオインフォマティクス専門家と共同で、PCR 産物のロングリードシーケンシングに最適化した新たなプログラムを開発した。そのプログラムでは、まずプライマー配列を入力して PCR 産物毎に解析した後、互いに重複した PCR 産物を連結するが、その際に必要な調整を行うことに注力した。患者の ADAMTS13 遺伝子で性能を検証した結果、フェージングの正誤もバリエント正答率も既存のプログラムより大きく向上していることがわかった。

#### 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。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、2 種のミスセンス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 68 名 (61 家系) のうち 65 名 (58 家系) に、複合ヘテロ接合性 (47 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 70 種類で、その内訳は、ミスセンス 45 種類 (64.2%)、フレームシフト 11 種類 (15.7%)、ナンセンス 8 種類 (11.4%)、スプライシング異常 4 種類 (5.7%)、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 200 種類となっている。

解析した 61 家系のうち 3 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と解決策が明確になったので、今後 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 全長解析の問題点と解決策が明らかになった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Noriyuki Okubo, Shingo Sugawara, Tohru Fujiwara, Ko Sakatsume, Tsuyoshi Doman, Mihoko Yamashita, Kota Goto, Masaki Tateishi, Misako Suzuki, Ryutaro Shirakawa, Yuka Eura, Koichi Kokame, Masaki Hayakawa, Masanori Matsumoto, Yasunori Kawate, Mizuki Miura, Hiroshi Takiguchi, Yoshimitsu Soga, Shin-ichi Shirai, Kenji Ando, Yoshio Arai, Takaharu Nakayoshi, Yoshihiro Fukumoto, Hiroyuki Takahama, Satoshi Yasuda, Toshihiro Tamura, Shin Watanabe, Takeshi Kimura, Nobuhiro Yaoita, Hiroaki Shimokawa, Yoshikatsu Saiki, Koichi Kaikita, Ken-ichi Tsujita, Shinji Yoshii, Hiroshi Nakase, Shin-ichi Fujimaki, Hisanori Horiuchi: von Willebrand factor Ristocetin co-factor activity to von Willebrand factor antigen level ratio for diagnosis of acquired von Willebrand syndrome caused by aortic stenosis. Res. Pract. Thromb. Haemost. 8,

102284 (2023)

- 2) 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, and 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)
- 3) Akihiro Tsuji, Toshiyuki Miyata, Akihiro Sekine, Reiko Neki, Koichi Kokame, Tsutomu Tomita, Yumi Kashima, Ryotaro Asano, Jin Ueda, Tatsuo Aoki, and 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)
- 4) 秋山正志, 小亀浩市: von Willebrand 因子・ADAMTS13 研究における最近の進歩. Thromb. Med., 印刷中 (2024)
- ### 2. 学会発表
- 1) 樋口(江浦)由佳, 叶盛, 松本雅則, 小亀浩市: Long range PCR を用いた

- ロングリードシーケンシングのフェーシング攻略法. 第69回日本生化学会近畿支部例会, 京都, 2023年5月27日
- 2) 秋山正志, Teena Bhakuni, 小亀浩市: プロテインSとTAM受容体を介した血管内皮細胞における血液脳関門保護機能. 第69回日本生化学会近畿支部例会, 京都, 2023年5月27日
- 3) 樋口(江浦)由佳, 叶盛, 松本雅則, 小亀浩市: ロングリードのターゲットシーケンシングと全ゲノムシーケンシングを併用したADAMTS13遺伝子解析. 第45回日本血栓止血学会学術集会, 北九州, 2023年6月15-17日
- 4) 叶盛, 樋口(江浦)由佳, 松本雅則, 小亀浩市: VWF遺伝子解析の困難性を克服するロングリードシーケンシング法の構築. 第45回日本血栓止血学会学術集会, 北九州, 2023年6月15-17日
- 5) 丸山慶子, 小亀浩市: プロテインS遺伝子のイントロン1に同定した転写調節領域の機能解析. 第45回日本血栓止血学会学術集会, 北九州, 2023年6月15-17日
- 6) 山崎泰男, 小亀浩市: Weibel-Palade小体の形成過程で内腔はV-ATPaseにより酸性化される. 第45回日本血栓止血学会学術集会, 北九州, 2023年6月15-17日
- 7) 堀内久徳, 大久保礼由, 菅原新吾, 藤原亨, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 早川正樹, 松本雅則, 川手康徳, 藤巻慎一: 大動脈弁狭窄症に随伴する後天性フォンヴィレブランド症候群の診断におけるVWF:RCo/VWF:Agの有効性についての検討. 第45回日本血栓止血学会学術集会, 北九州, 2023年6月15-17日
- 8) 堀内久徳, 大久保礼由, 菅原新吾, 藤原亨, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 早川正樹, 松本雅則, 川手康徳, 藤巻慎一. 大動脈弁狭窄症症例における凝固第VIII因子活性とフォンヴィレブランド因子活性(VWF:RCo)、抗原量(VWF:Ag)の関係についての検討. 第45回日本血栓止血学会学術集会, 北九州, 2023年6月15-17日
- 9) Hisanori Horiuchi, Noriyuki Okubo, Shingo Sugawara, Tohru Fujiwara, Yuka Eura, Koichi Kokame, Masaki Hayakawa, Masanori Matsumoto, Yasunori Kawate, Shin-ichi Fujimaki: Comparison of VWF:RCo/VWF:Ag ratios with the VWF large multimer indices in patients with aortic stenosis. The 31st Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Montreal, Canada, June 24-28, 2023
3. 一般向け講演会  
なし
- H. 知的財産権の出現・登録状況
1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他  
該当なし