

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790629  
 研究課題名（和文） TTP患者における抗ADAMTS13自己抗体高感度定量測定系の開発  
 研究課題名（英文） Development of the quantitative analysis of autoantibodies to ADAMTS13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura.  
 研究代表者  
 猪狩 敦子 (IGARI ATSUKO)  
 慶應義塾大学・医学部・研究員  
 研究者番号：60594893

## 研究成果の概要（和文）：

ADAMTS13 に対する自己抗体の産生は後天性血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）の発症と強く関連する。本研究の目的は、後天性 TTP 患者における ADAMTS13 自己抗体を RIA 法により定量測定することである。無細胞タンパク発現系により ADAMTS13 に対する <sup>35</sup>S メチオニン標識抗原を作成した。RI 標識抗原の立体構造は抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体にて免疫沈降を行い確認した。後天性 TTP 患者由来精製 IgG 中の抗 ADAMTS13 自己抗体タイターを測定したところ、コントロールよりも高いタイターを示す結果が得られた。

## 研究成果の概要（英文）：

The production of autoantibodies to ADAMTS13 is considered as a pivotal pathophysiology of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). The aim of this study was to perform a radioimmunoprecipitation assay to quantify the autoantibodies to ADAMTS13 in acquired TTP patients. We generated <sup>35</sup>S-methionine labeled antigens, which were prepared using *in vitro* transcription/translation system. The conformation of the radiolabeled antigens was confirmed using anti-ADAMTS13 monoclonal antibodies and the IgG samples purified from acquired TTP patients were examined. The autoantibody titers of IgG samples were significantly higher than the control samples in the radiolabeled antigens.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ADAMTS13、自己抗体

## 1. 研究開始当初の背景

ADAMTS13 は血漿中に約  $1 \mu\text{g/ml}$  存在する ADAMTS ファミリーに属する亜鉛型 metalloprotease であり、N 末端側から Signal 配列、Propeptide、Metalloprotease、Disintegrin-like、Thrombospondin type 1 motif (TSP1)、Cys-rich、Spacer、7 個の TSP1 repeat および 2 個の CUB ドメインからなるマルチドメイン構造を有する 190kDa の糖蛋白質である。ADAMTS13 は 2001 年に cDNA がクローニングされて (Gerritsen HE, et al. Blood, 2001. Fujikawa K, et al. Blood. Levy GG, et al. Nature, 2001) から現在までに ADAMTS13 産生細胞の同定、先天性 TTP の遺伝子解析、活性測定法・自己抗体価測定法、自己抗体エピトープ部位の解析、結晶構造など多くの研究報告がされている。

ADAMTS13 活性低下は血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の原因となり、TTP の大多数は後天性である。後天性 TTP の血液中には ADAMTS13 に対する自己抗体が存在し、特に Cys-rich~Spacer ドメインに高い頻度で集中することが報告されている (Klaus C, et al. Blood, 2004. Luken BM, et al. Thromb Haemost, 2005)。当研究室においても、ファージディスプレイ法により後天性 TTP 患者血漿中から精製した IgG を用いて自己抗体のエピトープ解析を行った。その結果 ADAMTS13 の広範にわたりエピトープが存在していることを見出し、複数の患者で Spacer ドメインに集中して自己抗体が存在していることを報告した (Yamaguchi Y, et al. Thromb Res, 2011)。しかし、血流中では、ADAMTS13 の C 末端領域である CUB ドメインの欠失により VWF 切断活性が低下、CUB ドメインの配列に由来する合成ペプチドによって VWF 切断が阻害されたという報告もある。これらの事実より、生体内の血流下では、Spacer ドメインより C 末端側を認識する抗 ADAMTS13 自己抗体も TTP 発症

と強く関連しているのではないかと考えた。

そこで予備実験として、スパーサー以降 C 末領域を認識する複数の抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体 (Soejima, et al. J Biochem, 2006) を健常人プール血漿に添加し FRET-S-VWF73 (消光性蛍光基質) を用いて ADAMTS13 活性を測定した。結果は TSP1-3 ~8 ドメインを認識するモノクローナル抗体において 20~40% と軽度の活性阻害効果が認められ、この領域が静止系においても ADAMTS13 活性に関与している可能性を示唆する所見が得られた。以上より、スパーサー以降の C 末領域においても、活性を抑制する抗 ADAMTS13 自己抗体が存在するのではないかと考え、何らかの方法で高感度に定量的に測定できないかと考えた。

当研究室では 1 型糖尿病の自己抗体、抗 ZnT8 抗体について無細胞発現系を用いて RIA 法 (Radioimmunoprecipitation assay : ラジオアイソトープ標識免疫沈降法) による抗体測定を行った経験を有する。無細胞発現系により RI 標識 ZnT8 抗原を作製し、2 型糖尿病患者約 400 検体 (埼玉医科大学・栗田先生より供与) の抗 ZnT8 抗体の検出測定を行った。これまでの報告では、一般的に 2 型糖尿病患者の抗 ZnT8 抗体陽性率は 3% 程度であり、本研究室の測定結果も同様の結果を得ることができた。

現在、抗 ADAMTS13 抗体の検出法は ELISA 法が一般的であるが、感度の問題で検出されない抗体が存在する可能性が考えられる。そこで ELISA 法などに比べて高感度に自己抗体を定量できる RIA 法を用いた測定系を確立し、後天性 TTP 患者血漿中に存在する抗 ADAMTS13 自己抗体を定量的に測定できないかと考えた。

## 2. 研究の目的

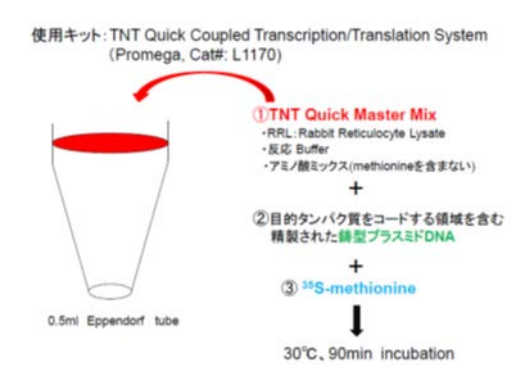
本研究では ADAMTS13 の各ドメインを含む数種類の RI 標識 ADAMTS13 抗原を作製

し、RIA 法（ラジオイムノアッセイ）によりマウス抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体を用いて免疫沈降反応し、高感度定量測定系を構築するための条件検討を行う。次いで TTP 患者血液中の抗 ADAMTS13 自己抗体をドメインごとに定量測定し、TTP の診断のみならず治療方針、予後予測の一手段となるべく ADAMTS13 自己抗体定量測定系の確立を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) アイソトープ試薬により RI 標識抗原作成

全長 ADAMTS13cDNA を含むプラスミドをテンプレートとし、PCR 反応を行い、制限酵素処理後の精製 PCR 断片をベクターとライゲーションさせ、大腸菌にトランスフォーメーションした。プラスミドを精製し、DNA シークエンス解析により塩基配列を確認した。次に目的の領域を含むプラスミド DNA を用いて、無細胞タンパク質発現系により RI 標識抗原を作製した。（図 1）



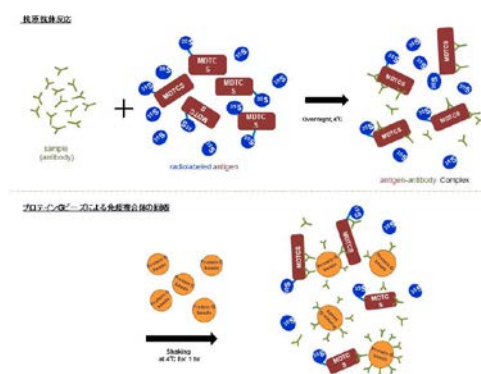
(図 1. RI 標識抗原作成法)

合成した RI 標識抗原は SDS-PAGE にて分子量サイズを確認した。

#### (2) RI 標識免疫沈降法による定量測定

- ① ドメイン特異的なマウス抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体を用いた定量測定
- すでにエピトープが判明している各ドメ

インを認識するマウス抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体を用いて、作製した RI 標識抗原と反応させ免疫複合体を形成させ、96well フィルタープレートにてプロテイン G ビーズを用い免疫複合体を回収した。次いで免疫複合体をシンチレーションカウンターにて定量測定した。（図 2）



(図 2. 免疫沈降反応の流れ)

さらに各抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体を段階希釈し、濃度依存的に免疫複合体を回収することができるかについて定量性の評価を行った。

#### ② 後天性 TTP 患者サンプル中の抗 ADAMTS13 自己抗体の測定

本測定系を用いて TTP 患者由来精製 Ig G (n=12) と対照コントロールとして自己免疫疾患の既往歴のない健常人 IgG (n=5) を作製した各 RI 標識抗原と免疫沈降反応させ、ドメインごとの自己抗体を定量測定し、TTP 患者と健常人の抗体量を比較した。

### 4. 研究成果

本測定系に必要な不可欠なアイソトープ (RI) 標識抗原作製のために ADAMTS13 の MDTCS 領域と T2-8/CUB 領域のプラスミド DNA を作製した。作製した各プラスミド DNA の配列を確認するために DNA シークエンスを行ったと

ころ、配列はどれも完全に一致しており目的のプラスミド DNA を作製することができた。

ウサギ網赤血球由来無細胞タンパク質発現系にて作製したプラスミド DNA と  $^{35}\text{S}$  メチオニンを使用し、MDTCS 領域と T2-8/CUB 領域を含むラジオアイソトープ (RI) 標識抗原の作製を試みた。作製した 2 種類の RI 標識 ADAMTS13 抗原は SDS-PAGE を行い、目的の分子量サイズの位置に単一バンドを確認した。

2 種類の RI 標識抗原をエピトープが判明している各ドメインを認識する数種類のマウス抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体と免疫沈降反応させ、プロテイン G ビーズにより免疫複合体を回収し液体シンチレーションカウンターにて測定した。MDTCS 領域 RI 標識抗原をメタロプロテアーゼ、ディスインテグリン認識モノクローナル抗体で免疫沈降したところ、陰性コントロール (TSP1-3 認識モノクローナル抗体) の測定値と比較して明らかに高い結果が得られたことより MDTCS との免疫複合体が回収されたと考えられる。同様に T2-8/CUB 抗原も TSP1-repeats と CUB を認識する 4 種類のモノクローナル抗体を用いて免疫沈降したところ、陰性コントロール (ディスインテグリン認識モノクローナル抗体) の測定値と比較して明らかに高い結果が得られたことより T2-8/CUB との免疫複合体が回収されたと考えられる。そこでさらに各モノクローナル抗体を段階希釈し再度測定したところ、抗体濃度依存的に免疫複合体を回収することができた。

続いて TTP 患者由来精製 IgG (n=12) と対照コントロール：健常人由来精製 IgG (n=5) を MDTCS 領域 RI 標識抗原・T2-8/CUB 領域 RI 標識抗原と本測定系を用いて免疫沈降し、抗体価を定量測定した。結果は両抗原ともに TTP 患者の抗体価は健常人より高い値を示した。TTP 患者 12 名中、MDTCS 抗原においては 9 名、T2-8/CUB 抗原においては 10 名が健常人 n=5 の平均値 95% 信頼区間を超えていた。

以上の結果より本測定系を用いて後天性 TTP 患者血漿中に存在する抗 ADAMTS13 自己抗体を機能ドメイン別に定量的に検出することが可能であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

1) 猪狩 敦子、森木隆典、山口雄亮、中川央充、和田英夫、松本雅則、藤村吉博、副島見事、村田満

ADAMTS13 機能ドメインを特異的に認識する自己抗体の定量測定系に関する検討  
第 34 回日本血栓止血学会学術集会  
東京 2012 年 6 月 8 日

2) Igari A, Moriki T, Yamaguchi Y, Nakagawa T, Wada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Soejima K, Murata M.

Quantitative analysis of the domain-specific autoantibodies to ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura.

The 53th Annual Meeting and Exposition, American Society of Hematology, San Diego, CA. 2011 年 12 月 10 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

猪狩 敦子 (IGARI ATSUKO)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：60594893