

### C. 研究結果

ADP 受容体の解析にて、本症例が本邦初の P2Y<sub>12</sub> 受容体異常症であることを同定し、その遺伝子異常が P2Y<sub>12</sub> 遺伝子の開始コドン ATG の AGG への点突然変異であることを明らかにした。本症血小板は ADP の反応性の障害のみならず、低濃度のコラーゲンやトロンボキサン A<sub>2</sub> など ADP 以外の血小板活性化物質にて惹起される血小板凝集が障害されていること、流動下での血栓形成が障害されており、形成される血栓が脆弱で不安定であることを明らかにした。

CMK 細胞株を用いた検討にて、GPIb の発現増加とともに、b1-tublin や CKIP-1、cortactin、PKCd、PKCb1、WAVE-1、Rab27B などの分子が増加することを同定した。WAVE に関しては、血小板において WAVE-1,2 の発現は見られたが WAVE-3 は検出されなかった。また臍帯血を用いた巨核球分化の系で WAVE-1 は分化に従いその発現が増加するが、WAVE-2 の発現は変化しないこと、WAVE-1 および 2 は血小板の lamellipodia の辺縁に局在することより、これらが血小板の進展時、アクチンを制御していることが示唆された。

血管内皮に発現している SHPS-1 および分泌される Semaphorin 3A の機能解析を行い、これらの分子がフィブリノーゲン上での血小板の扁平・伸展化を抑制することを明らかにした。その

機序として、SHPS-1 は FAK の活性化以降のシグナルを抑制すること、Semaphorin 3A は Rac の活性化および Rac により制御されるアクチン再構成を抑制することを明らかにした。

アディポネクチンは、脂肪特異的に産生分泌され抗動脈硬化作用、抗糖尿病作用を有することが知られているが、本研究では急性の血栓形成に対する作用について、アディポネクチン欠損マウスを用いて He-Ne 惹起頸動脈血栓モデルにて検討した。その結果、アディポネクチンが抗血栓作用を有すること、リコンビナントアディポネクチンが血小板凝集を抑制すること、さらに野生型マウスへのアデノベクターを用いたアディポネクチン投与が、血栓形成を抑制することを明らかにした。

### D. 考案

本研究にて、血小板機能発現を制御する分子の動態およびその制御機構に関して、ADP の受容体異常症の解析を基盤として、その一部を明らかにした。さらに、新規血小板機能抑制分子として、SHPS-1、Semaphorin 3A、アディポネクチンを同定したことは、今後の血栓研究の新たな進展に大きなインパクトを与えると考えられる。

### E. 結論

血栓は促進因子および抑制因子のバランスにより制御されている。血小板活性化物質としての ADP の重要性が

明らかとなった。さらに新規血小板機能抑制分子の同定に成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Kashiwagi H, Shiraga M, Kato H, Honda S, Sako M, Kurata Y, Kanakura Y, Tomiyama Y: Expression and subcellular localization of WAVE isoforms in the megakaryocyte/platelet lineage. *J Thromb Haemost.* 3(2): 361-368. 2005.
- 2 Kato H, Honda S, Yoshida H, Kashiwagi H, Shiraga M, Honma N, Kurata Y, Tomiyama Y: SHPS-1 negatively regulates integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  function through CD47 without disturbing FAK phosphorylation. *J Thromb Haemost.* 3(4): 763-774. 2005.
- 3 Tomiyama Y, Kosugi S: Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol* 81(2): 100-105, 2005.
- 4 Ishida N, Oritani K, Shiraga M, Yoshida H, Kawamoto S, Ujiie H, Masaie H, Ichii M, Tomiyama Y, Kanakura Y: Differential effects of a novel IFN- $\gamma$ /limitin and IFN- $\alpha$  on signals for Daxx induction and Crk phosphorylation that couple with growth control of megakaryocytes. *Exp Hematol.* 33(4): 495-503. 2005.
- 5 Kashiwagi H, Shiraga M, Kato H, Kamae T, Yamamoto N, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: Negative regulation of platelet function by a secreted cell repulsive protein, semaphorin 3A. *Blood.* 106(3): 913-921. 2005.
- 6 Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: Impaired platelet function in a patient with P2Y<sub>12</sub> deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost.* 3(10): 2315-2323. 2005.
- 7 Aoki T, Tomiyama Y, Honda S, Mihara K, Yamanaka T, Okubo M, Moriguchi A, Mutoh S: Association of the antagonism of von Willebrand factor but not fibrinogen by platelet  $\alpha_{IIb}\beta_3$  antagonists with prolongation

of bleeding time. *J Thromb Haemost.* 3(10): 2307-2314. 2005.

- 8 Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kamae T, Ujiie H, Honda S, Miyata S, Ijiri Y, Yamamoto J, Maeda N, Funahashi T, Kurata Y, Shimomura I, Tomiyama Y, Kanakura Y: Adiponectin Acts as an Endogenous Antithrombotic Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(1): 224-230. 2006.

(2005.12.10-13, Atlanta, USA, George JN) Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, Kato H, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Critical Role of Endogenous ADP Via P2Y12 Receptor in Maintenance of Iib $\beta$ 3 Activation. *Blood.* 106(11): 472a. 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

## 2. 学会発表

1. The XXth Congress of International Society of Thrombosis and Haemostasis (2005.8.6-12, Sydney, Australia, Chesterman C) Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kamae T, Honda S, Miyata S, Yamamoto J, Kurata Y, Funahashi T, Shimomura I, Tomiyama Y, Kanakura Y. Enhanced platelet aggregation and thrombogenic tendency in adiponectin-deficient mice. *J Thromb Haemost.* 3(supple 1): OR285. 2005.

2. The American Society of Hematology 47th Annual Meeting

# Ⅲ. 研究成果の刊行に 関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
坂野史明 小亀浩市	VWF 切断酵素 /ADAMTS13	一瀬白帝	図説 血栓・止 血・血管学	中外医学社	東京	2005	218- 226
小亀浩市	ADAMTS13 活性測定 法	坂田洋一 小澤敬也	血液疾患-state of arts Ver.3	医歯薬出版	東京	2005	421- 424
松本雅則 藤村吉博	血栓性血小板減少性 紫斑病(TTP).	浅野茂隆 池田康夫 内山卓	三輪血液病学	文光堂	東京	2005	1776- 1782
松本雅則 藤村吉博	血栓性血小板減少性 紫斑病.	吉田弥太郎	血液疾患ハン ドブック	医薬ジャー ナル社	大阪	2005	216- 227
松本雅則	von Willebrand 病	矢崎義雄 菅野健太郎	疾患別最新処 方	MEDICAL VIEW	東京	2005	482- 483
木村利奈 宮田敏行	日本人の血栓性素因	岡芳知 内山真一郎 倉林正彦	Molecular Medicine 臨時 増刊号 42	中山書店	東京	2005	407- 411
小亀浩市	ADAMTS13	内山真一郎 後藤信哉 重松宏 半田誠	血栓症ナビゲ ーター	メディカル レビュー社	東京	2006	204- 205

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T.	FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay.	Br J Haematol	129 (1)	93- 100	2005
Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto T, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y.	Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver.	Blood	106 (3)	922- 924	2005
Yagita M, Uemura M, Yamahara H, Kitano T, Kunitomi A, Konaka Y, Nakamura T, Matsumoto M, Ishizashi H, Fukui H, Fujimura Y.	Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura.	J Hepatol	42(3)	420- 421	2005
Kosugi S, Matsumoto M, Ohtani Y, Take H, Ishizashi H, Fujimura Y, Kuyama J.	Rituximab provided long-term remission in a case with refractory relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura.	Int J Hematol	81(5)	433- 436	2005
Matsumoto M, Kawaguchi S, Ishizashi H, Yagi H, Iida J, Sakaki T, Fujimura Y.	Platelets treated with ticlopidine are less reactive to unusually large VWF multimers than are those treated with aspirin under high shear stress.	Pathophyiol Haemost Thromb	34(1)	35-40	2005
Kashiwagi H, Shiraga M, Kato H, Kamae T, Yamamoto N, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y.	Negative regulation of platelet function by a secreted cell repulsive protein, semaphoring 3A.	Blood	106 (3)	913- 921	2005

Aoki T, Tomiyama Y, Honda S, Mihara K, Yamanaka T, Okubo M, Moriguchi A, Mutoh S.	Association of the antagonism of von Willebrand factor but not fibrinogen by platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonists with prolongation of bleeding time.	J Thromb Haemost	3(10)	2307-2314	2005
Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y.	Impaired platelet function in a patient with P2Y <sub>12</sub> deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon.	J Thromb Haemost	3(10)	2315-2323	2005
Miyata T, Kokame K, Banno F.	Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors.	Curr Opin Hematol	12(5)	384-389	2005
Anderson PJ, Kokame K, Sadler JE.	Zinc and calcium ions cooperatively modulate ADAMTS13 activity.	J Biol Chem	281(2)	850-857	2006
Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kamae T, Ujiie H, Honda S, Miyata S, Ijiri Y, Yamamoto J, Maeda N, Funahashi T, Kurata Y, Shimomura I, Tomiyama Y, Kanakura Y.	Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	26(1)	224-230	2006
Shibagaki Y, Matsumoto M, Kokame K, Ohba S, Miyata T, Fujimura Y, Fujita T.	Novel compound heterozygote mutations (H234Q/R1206X) of the ADAMTS13 gene in an adult patient with Upshaw-Schulman syndrome showing predominant episodes of repeated acute renal failure.	Nephrol Dial Transpl	in press		2006
宮田敏行、小亀浩市、坂野史明、本田繁則、宮田茂樹	血栓性血小板減少性紫斑病とADAMTS13	循環器病研究の進歩	26(1)	90-96	2005
小亀浩市	血栓性血小板減少性紫斑病/溶血性尿毒症症候群	分子細胞治療	4(3)	209-215	2005
小亀浩市、宮田敏行	TTP 迅速診断を目的とした新規ADAMTS13 測定法の開発と応用	臨床病理	53(7)	639-645	2005
大渡五月、松本雅則、高塚祥芝、竹内章吾、牧野虎彦、魚住公治、藤村吉博、宇都宮興	胃癌の骨髄転位に併発した血栓性血小板減少性紫斑病	臨床と研究.	82	1379-1382	2005
松山友美、植村正人、石川昌利、藤本正男、小嶋秀之、櫻井伸也、石井禎庸、浪崎正、豊原眞久、山崎正晴、吉治仁志、山尾純一、福井博、松本雅則、石指宏通、加藤誠司、藤村吉博、瀧村力	アルコール性肝炎におけるADAMTS13 と von Willebrand 因子の動態—重症度との関連—	アルコールと医学生物学	25	112-117	2005
黒田裕行、木田雅也、渡辺秀樹、松永卓也、新津洋司郎、松本雅則	Evans 症候群を合併した Basedow 病	臨床血液	46	1118-1122	2005

# IV. 研究成果の 刊行物・別刷り

### ■ 1. vWF と vWF 切断酵素

フォンビルブランド因子(von Willebrand factor ; vWF)は、血小板血栓の形成を促進する重要な蛋白質である(2章11項参照)。血管内皮細胞から分泌された直後のvWFは、モノマー同士がジスルフィド結合を介して多数連なった超高分子量マルチマー(>20,000 kDa)を形成しているが、循環血液中のvWFは、広範囲かつ不連続の分子量(500~20,000 kDa)をもつマルチマーとして存在する。超高分子量マルチマーを血漿中で断片化する酵素すなわちvWF切断酵素の実体がADAMTS13である(図2-70)。

vWFマルチマーの分子量が大きいほど血小板凝集活性は強いので、高分子量マルチマーの量的不足は、出血性疾患であるフォンビルブランド病の要因となる(2章11項参照)。逆に、超高分子量マルチマーが血液中に蓄積すると、細小血管で血小板が過剰に凝集し、血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic

thrombocytopenic purpura, TTP)を引き起こす(2章13項参照)。したがって、vWFマルチマーの分子量の調節は、正常な止血機能を維持する上で重要な要素であり、その一翼を担うADAMTS13の重要性も注目される。

### ■ 2. ADAMTS13の発見

TTPは、血小板減少、細血管障害性溶血性貧血、腎機能障害、発熱、動揺性精神神経症状を特徴とする疾患で、1924年にE. Moschcowitzによって初めて報告された<sup>1)</sup>。そして1982年、J. L. Moakeらによって、TTP患者の血漿中にvWFの超高分子量マルチマーが見出された<sup>2)</sup>。それ以来、vWF切断酵素の存在が信じられていたが、その実体が明らかになるのに約20年を要した。

2001年、複数の研究グループによって、ヒト血漿からvWF切断酵素が単離され<sup>3-5)</sup>、その部分アミノ

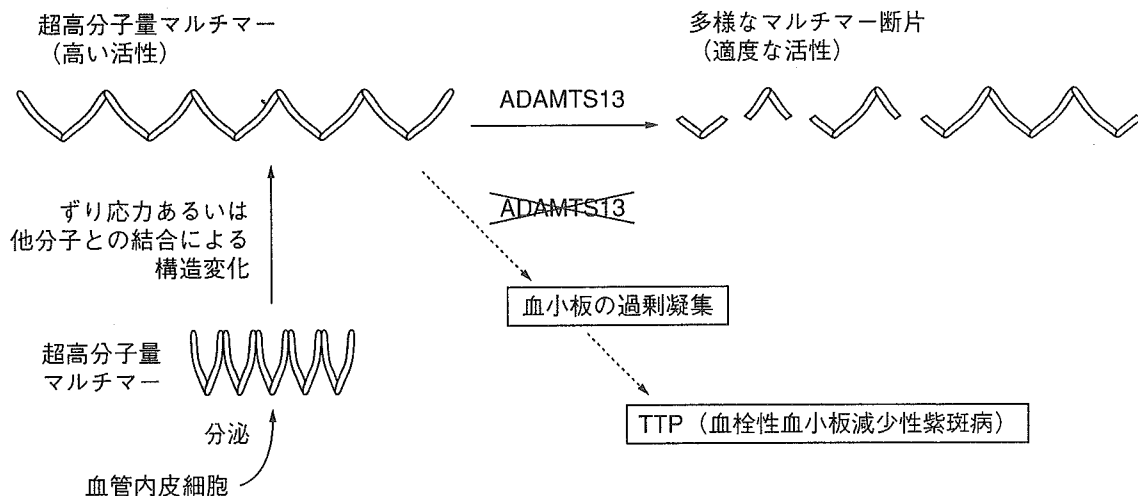


図 2-70 vWF と ADAMTS13

vWFは超高分子量マルチマーとして血管内皮細胞から分泌される。循環血液中でずり応力を受けたり血管壁損傷部位や血小板に結合すると、伸展構造に変化し、高い血小板凝集活性をもつようになる。その活性は分子量が大きいほど高いが、正常血漿中ではADAMTS13により断片化されて適度な活性をもつ。何らかの要因でADAMTS13の機能が失われると、超高分子量マルチマーによる血小板の過剰凝集が起こり、これがTTPを誘発する。



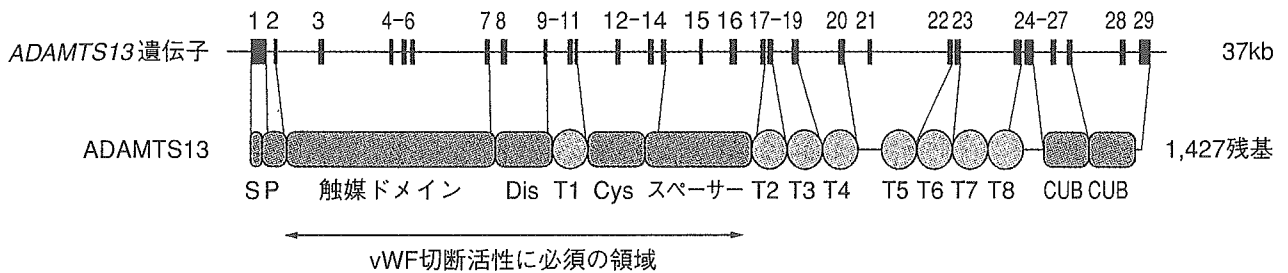


図 2-71 ヒト ADAMTS13 の構造

ヒト *ADAMTS13* 遺伝子は 29 個のエキソンからなり、1,427 アミノ酸残基の金属プロテアーゼ ADAMTS13 をコードしている。ADAMTS13 は主に肝臓で産生され、プロペプチドが切断除去された状態で血液中を循環する。vWF 切断活性を保持するには、触媒ドメインからスペーサードメインまでが必須である。S: シグナルペプチド, P: プロペプチド, Dis: ディスインテグリン様ドメイン, T1-T8: トロンボスポンジン 1 型モチーフ, Cys: システインリッチドメイン。

酸配列を基にしたクローニングにより cDNA 塩基配列が決定された<sup>5-7)</sup>。時を同じくして、先天性 TTP 患者家系の遺伝子連鎖解析という異なるアプローチから、責任遺伝子として *ADAMTS13* が突き止められた<sup>8)</sup>。いずれのグループも同一の遺伝子あるいは遺伝子産物の発見に到達しており、vWF 切断酵素 = ADAMTS13 と結論づけられた。

### ■ 3. ADAMTS13 の一次構造

ADAMTS13 は、ADAMTS (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif) とよばれる一群の金属プロテアーゼファミリーに属する。互いに共通のドメイン構造をもつが、C 末端領域はバラエティに富んでいる。現在、ヒトゲノム中に 19 個の遺伝子 (*ADAMTS1*~*20*, 5 と 11 は同一) が同定されている。プロコラゲナーゼやアグリカナナーゼといった酵素活性が見出されているものもあるが、多くの分子機能(標的とする基質など)は不明である。

ヒト ADAMTS13 は 1,427 アミノ酸残基からなり、N 末端側から順に、シグナル配列、プロペプチドドメイン、金属プロテアーゼ触媒ドメイン、ディスインテグリン様ドメイン、トロンボスポンジン 1 型 (Tsp1) モチーフ、システインリッチドメイン、スペーサードメインといった、ADAMTS ファミリー共通のドメイン構造をもつ<sup>5,6,8)</sup>(図 2-71)。ADAMTS ファミリーの多くは C 末端側にさらに複数の Tsp1 モチーフをもっており、ADAMTS13 では 7 個連続

している。また、他のメンバーにない CUB ドメインが C 末端に 2 個存在する。ADAMTS13 には糖鎖が結合しており、アミノ酸配列上、10 カ所の N 型糖鎖結合部位と 7 カ所の O 型糖鎖結合部位が推定される。

ADAMTS13 をコードする遺伝子 *ADAMTS13* は染色体 9q34 に位置し、29 個のエキソンからなる(図 2-71)。約 4.6 kb の mRNA が主に肝臓で発現しているが、最近、血小板での発現も報告された<sup>9)</sup>。ADAMTS13 の血中濃度は約  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>3)</sup>、血中半減期は 2~3 日<sup>10)</sup>と推定されている。

### ■ 4. 各ドメインの役割

ADAMTS ファミリーなど金属プロテアーゼの多くに存在するプロペプチドドメインは、細胞から分泌される過程で切断除去される。ADAMTS13 のプロペプチドの C 末端側にも、ゴルジ体局在プロテアーゼであるフューリンに切断され得るコンセンサス配列 RX(K/R)R が存在し、実際、血漿に存在する ADAMTS13 にプロペプチドはない。プロペプチドは、しばしばプロテアーゼ自身のフォールディングを援助する内在性分子シャペロンとして、あるいは細胞内で酵素活性を抑制しておく内在性インヒビターとしてはたらく。しかし、ADAMTS13 のプロペプチドは例外的に短く、また酵素活性を調節するためのシステインスイッチモチーフを欠くため、そのような機能をもつことが疑問視されていた。事実、ADAMTS13 のプロペプチドは分子シャペロンやイ

ンヒビターとしての機能をもたないこと、プロペプチド切断は分泌に必須でないことが示された<sup>11)</sup>。現在のところ、ADAMTS13のプロペプチドの役割は不明である。

ADAMTS13の金属プロテアーゼ触媒ドメインは、他のADAMTSメンバーと同様、reprolysin型の亜鉛結合部位を含んでおり、vWFの切断に2価金属イオンを必要とする観察と一致する。

触媒ドメインのC末端側に存在する領域は、蛇毒のディスインテグリンドメインと一次構造が類似していることから、ディスインテグリン様ドメインとよばれるが、役割は不明である。そのC末端側には、約50アミノ酸残基からなるTsp1モチーフ、RGD配列を含むシステインリッチドメイン、ADAMTSメンバー間で類似性の低いスペーサードメインが続く。C末端から順次欠失させた変異体の発現実験により、vWF切断活性の保持にはスペーサードメインまでが必須であると判明した<sup>12,13)</sup>。後天性TTP患者がもつ活性阻害抗体の主要エピトープがシステインリッチ/スペーサードメインに集中していることから、この領域の重要性がうかがえる<sup>12,14)</sup>。基質認識を担っているのかもしれない。

一方、スペーサードメインのC末端から続く7個のTsp1モチーフと2個のCUBドメインがなくても、vWF切断活性は正常に保たれる<sup>12,13)</sup>。ただし、これはin vitroでの活性測定で得られた結果であるため、ADAMTS13のin vivoでの機能にそれらのドメインが不要であることを示すわけではない。より生体に近いと思われるフローチャンバーを用いた実験系では、Tsp1モチーフおよびCUBドメイン配列由来のペプチドが血管内皮細胞上でのvWF切断を阻害する<sup>15)</sup>。内皮細胞表面にADAMTS13が局在するためにC末端領域がアンカーとしての役割をはたすのかもしれない。in vitroの実験系から得られた結果をもとに、in vivoにおける各ドメインの役割を検討する必要がある。

## ■ 5. ADAMTS13の酵素学的性質と活性測定法

ADAMTS13の基質として同定されているのはvWFのみで、切断部位はA2ドメインに存在するTyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup>間ペプチド結合である<sup>7,16)</sup>(図2-

72A)。切断は血漿中で部分的に起こるため、様々なサイズのvWFマルチマーが生じる。したがって、正常血漿中のvWFをアガロースゲル電気泳動で分離すると、500~20,000 kDaにわたるラダー状のバンドが観察される。

1996年、M. FurlanらおよびH. M. TsaiによりvWF切断酵素活性の測定法が発表された<sup>17,18)</sup>。いずれの方法も、精製ヒトvWFマルチマーを、2価金属イオンと蛋白質変性剤の存在下、低張緩衝液中で血漿と反応させる。Furlanらは、反応後の溶液をSDS-アガロースゲル電気泳動に供し、抗vWF抗体を用いたウエスタンブロットでマルチマーラダーの分子量低下を観察した。一方、Tsaiは反応溶液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、vWF断片の増加をウエスタンブロットで観察した。いずれの方法も、TTPに関する研究を飛躍的に進展させ、ADAMTS13の精製とクローニングの突破口を開いた。

ADAMTS13がvWF切断活性を発揮するには2価金属イオンが必要であり、実験的にはBa<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>が適する。EDTAなど金属キレート剤は活性を完全に阻害し得るが、それ以外のプロテアーゼ阻害剤はほとんど影響しない。広範囲のpHで活性を示し、至適pHは8付近といわれる。イオン強度が低いほど強い活性を示す。

切断反応をin vitroで効率的に進めるには、適度な濃度の蛋白質変性剤が必要である。これは、基質であるvWFの立体構造変化を促していると考えられている。つまり、インタクトなvWFのTyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup>付近は分子内部に隠れており、ADAMTS13の触媒ドメインが接近しにくく、ここに蛋白質変性剤が存在すると切断部位が外部に露出するという解釈である。vWFに高ずり応力を与えると切断されやすくなるという現象<sup>19)</sup>はこの解釈を支持する。切断反応に低イオン強度が適することも、vWFの構造変化に関与しているのかもしれない。

フォンビルブランド病2A型をもたらずvWF変異体は、高ずり応力や変性剤にさらされなくても切断されやすい<sup>20)</sup>。変異が切断部位付近の立体構造に影響し、ADAMTS13に攻撃されやすくなっていると考えられる。

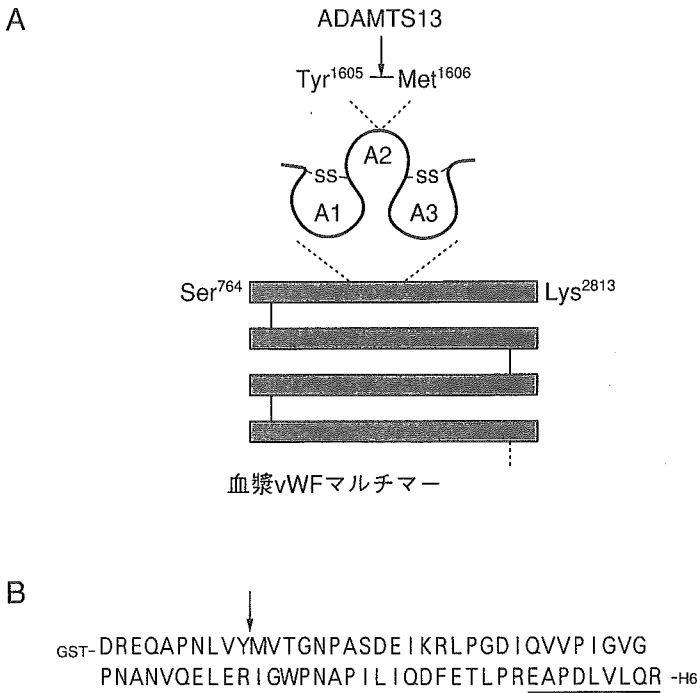


図 2-72 ADAMTS13 の機能

(A) vWF の切断. ADAMTS13 は, 血漿中の vWF マルチマーを部分的に断片化する. 切断部位は A2 ドメインの Tyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup>間ペプチド結合である. 開始 Met を 1 としてナンバリングしてある.

(B) タグ付き vWF73 の構造. vWF の Asp<sup>1596</sup>から Arg<sup>1668</sup>までに相当する領域「vWF73」は ADAMTS13 に効率よく切断される(↓部位). 下線部を欠失すると切断されない. GST: グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグ, H6: ヒスチジンタグ.

## ■ 6. 新しい活性測定法

上述の方法は TTP 研究の進展に大きく寄与したが, 操作が煩雑で手間を要するため, 疫学研究や臨床応用に適していない. 別法として, 血漿と反応させた後の残存 vWF マルチマーのコラーゲン結合能を測定する方法<sup>21)</sup>, vWF 切断産物を部位特異的モノクローナル抗体ではさむサンドイッチ ELISA 法<sup>22)</sup>, 残存 vWF マルチマーのリストセチンコファクター活性を測定する方法<sup>23)</sup>が開発された. いずれもオリジナル法に比べると簡素化されているが, 感度や定量性で優れているとも言えなく, さらなる発展が期待されていた.

そこで我々は, リコンビナント蛋白質を基質として利用する方法を考案した<sup>24)</sup>. まず, vWF A2 ドメインの種々の部分領域を, 両末端にタグ配列を付与した状態で大腸菌に発現させ, アフィニティー精製した. これと ADAMTS13 との反応性を調べた結果, 特異的基質として認識され得るほぼ最小限の領域は, vWF の Asp<sup>1596</sup>から Arg<sup>1668</sup>までの 73 アミノ酸残基であることが判明した. この領域を vWF73 とよんでいる(図 2-72B). vWF73 の C 末端 9 残基(Glu<sup>1660</sup>~Arg<sup>1668</sup>)を欠失させると切断されなくなるので, この 9 残基周辺領域の役割に興味をもたれる.

タグ付き vWF73 を基質としたウエスタンブロット法により, 従来より簡便に血漿 ADAMTS13 活性を測定できるようになった<sup>24)</sup>. 正常血漿の 1%の活性も検出できるので, 感度も良好といえる. 実際, TTP 診断の補助データを得るために本法が利用され始めている. さらに, 我々が開発したタグ付き vWF73 測定法を 96 ウェルプレートの系へ発展させた方法<sup>25)</sup>や, vWF73 より長い基質(A2 ドメイン全長)を利用した方法<sup>26)</sup>も報告されている. しかし, 疫学研究に適した定量性とハイスループット性, 臨床医療に適した簡便性・迅速性などの観点から, まだ改善の余地は大きい. 我々は現在, 次世代版の開発を進めている.

## ■ 7. ADAMTS13 遺伝子の変異

これまで, ADAMTS13 遺伝子が解析された先天性 TTP 患者のほぼすべてに原因変異が同定されており, 計 49 カ所にのぼる<sup>8,27-36)</sup>(表 2-10). このうち 9 種類の変異(R193W, A250 V, R268P, P353L, Q449X, C508Y, I673F, C908Y, R1123C, 4143insA)の性質が培養細胞発現系で調べられた. Q449X 以外の変異体は細胞外への分泌不全を示し, Q449X は効率よく分泌されるものの, 活性はほぼ消失していた<sup>27,31,33)</sup>.

表 2-10 TTP の原因となる ADAMTS13 遺伝子の変異

種類	場所	塩基	アミノ酸	ドメイン	文献
ミスセンス	エキソン 3	237C>G	I79 M	触媒	(32)
	エキソン 3	286C>G	H96D	触媒	(8)
	エキソン 3	304C>T	R102C	触媒	(8)
	エキソン 6	577C>T	R193W	触媒	(31)
	エキソン 6	587C>T	T196I	触媒	(8, 33)
	エキソン 6	607T>C	S203P	触媒	(32)
	エキソン 7	695T>A	L232Q	触媒	(28)
	エキソン 7	703G>C	D235H	触媒	(36)
	エキソン 7	749C>T	A250 V	触媒	(34)
	エキソン 7	788C>G	S263C	触媒	(28)
	エキソン 7	803G>C	R268P	触媒	(27, 32)
	エキソン 8	932G>A	C311Y	ディスインテグリン様	(36)
	エキソン 9	1058C>T	P353L	ディスインテグリン様	(28, 36)
	エキソン 10	1193G>A	R398H	Tsp1-1	(8)
	エキソン 12	1370C>T	P457L	システインリッチ	(36)
	エキソン 13	1520G>A	R507Q	システインリッチ	(32)
	エキソン 13	1523G>A	C508Y	システインリッチ	(27)
	エキソン 13	1582A>G	R528G	システインリッチ	(8)
	エキソン 16	1787C>T	A596 V	スパーサー	(32)
	エキソン 17	2017A>T	I673F	スパーサー	(31)
	エキソン 17	2074C>T	R692C	Tsp1-2	(8)
	エキソン 19	2272T>C	C758R	Tsp1-3	(32)
	エキソン 21	2723G>A	C908Y	Tsp1-5	(31)
	エキソン 21	2723G>C	C908S	Tsp1-5	(32)
	エキソン 22	2851T>G	C951G	Tsp1-5	(8)
	エキソン 24	3070T>G	C1024G	Tsp1-7	(8)
	エキソン 25	3367C>T	R1123C	Tsp1-8	(31)
	エキソン 26	3638G>A	C1213Y	CUB-1	(8)
エキソン 28	4006C>T	R1336W	CUB-2	(29)	
ナンセンス	エキソン 2	130C>T	Q44X	プロペプチド	(29)
	エキソン 10	1169G>A	W390X	Tsp1-1	(28)
	エキソン 12	1345C>T	Q449X	システインリッチ	(27)
	エキソン 21	2728C>T	R910X	Tsp1-5	(28, 36)
	エキソン 24	3100A>T	R1034X	Tsp1-7	(28, 35)
挿入・欠失	エキソン 7	719del6	G241C242del	触媒	(36)
	エキソン 15	1783delTT	フレームシフト	スパーサー	(30)
	エキソン 19	2279delG	フレームシフト	Tsp1-3	(36)
	エキソン 19	2376del26	フレームシフト	Tsp1-3	(8)
	エキソン 20	2459delAT	フレームシフト	Tsp1-4	(28)
	エキソン 25	3252delCT	フレームシフト	Tsp1-8	(32)
	エキソン 27	3769insT	フレームシフト	CUB-1	(8)
	エキソン 29	4143insA	フレームシフト	CUB-2	(28, 33, 35, 36)
スプライス異常	イントロン 3	330+1G>A		触媒	(34)
	イントロン 4	414+1G>A		触媒	(31)
	イントロン 6	686+1G>A		触媒	(31)
	イントロン 7-エキソン 8	del29		ディスインテグリン様	(32)
	イントロン 10	1244+2T>G		Tsp1-1	(31)
	イントロン 11	1309-1G>A		システインリッチ	(32)
	イントロン 13	1584+5G>A		システインリッチ	(8)

健康人にみられるミスセンス多型は8カ所知られている<sup>8,27,29,37)</sup>。我々が同定したP475S多型はvWF切断活性を低下させるが、たとえホモで保有してもTTP発症の原因とはならない<sup>27)</sup>。この多型の日本人におけるアレル頻度は約5%であり、約10人に1人の割合でヘテロ接合体が存在する。ADAMTS13活性の低下はvWFマルチマーを増加させることが予想されるので、P475S多型は血栓性疾患の危険因子であるかもしれない。なお、この多型は欧米人にみられない<sup>37)</sup>。

## ■ 8. マウスのADAMTS13

最近、我々はマウスADAMTS13のcDNAをクローニングし、さらにそのゲノム構造を明らかにした<sup>38)</sup>。意外なことに、マウスでは系統特異的に2種類のADAMTS13が発現していた。129/Sv系マウスの*Adamts13*遺伝子は、ヒトと同様、29個のエキソンからなり、1,426アミノ酸残基からなる酵素mADAMTS13Lをコードしている。ドメイン構造はヒトと同一である。一方、BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2系統の場合では、第23エキシンの下流にレトロトランスポゾン配列が挿入しており、その結果、Tsp1モチーフ2個とCUBドメインを欠失した1,037残基の酵素mADAMTS13Sが発現している(図2-73)。非近交系種のICRおよびSW系統は、集団として両タイプのアレルを保有しているため、個体によって発現するADAMTS13が異なる。両タイプとも、ヒトADAMTS13と同様、主に肝臓で発現しており、*in vitro*でのvWF切断活性は同程度である。この自然発生的な変異がマウスの止血機能に影響を及ぼしているか否か興味深い。ADAMTS13のC末端領域の生理的役割を研究する上で、よいモデル動物となるかもしれない。

## ■ 9. 最新の動向・展望

長い間謎に包まれていたTTPの発症要因がADAMTS13活性の欠如であることが判明して以来、ADAMTS13研究は血栓止血分野のホットトピックとなっている。しばらくの間、目が離せない状況が続くと思われる。

すでに多くの原因変異がTTP患者の

ADAMTS13遺伝子に同定されてきたが、ADAMTS13で切断されなくなるvWFの変異もTTPの要因となるはずである。しかし、そのような変異は一例も報告されていない。方法論的な問題(ADAMTS13の活性が検出されない場合のみ遺伝子解析の対象になるなど)か、あるいは切断されないvWFをもつと胎性致死になるのか。今後の研究によって明らかになるかもしれない。

TTP発症の大半は後天性であり、そのほとんどの症例でADAMTS13に対する活性阻害抗体が血漿中に検出される。後天性TTPは、薬剤副作用や妊娠などが契機になることもあるが、原因不明の特発性であることが多く、阻害抗体産生の機序は全く解明されていない。血漿中に存在しないはずのプロペプチド領域に結合する自己抗体もみつがっている<sup>14)</sup>。そのような場合、TTP発症に先だって、ADAMTS13合成の場である肝臓に障害が起こっているのかもしれない。後天性TTPの発症に、ADAMTS13あるいは他の遺伝子の多型が関与している可能性もある。

一方、臨床症状などからTTPと診断するのが妥当であっても、血漿のADAMTS13活性は保持されている症例が少なからず存在する。それをTTPとよぶべきでないという考えもあるし、非典型的TTPとよぶ考えもある。溶血性尿毒症症候群など類似疾患との相違を考慮しながら、TTPという診断名の定義をいっそう明確にする必要があるかもしれない。

ADAMTS13活性の消失あるいは著減はTTPを引き起こすが、発症に至らないレベルの活性低下でも何らかの病態と関連するかもしれない。冠動脈疾患患者の血漿ADAMTS13活性は低いという報告もある<sup>39)</sup>。疫学研究に適用できる活性測定法や抗原量測定法の開発と普及が鍵を握っている。また、P475Sのような遺伝子多型の調査も重要であろう。

ADAMTS13研究は、発見の経緯もあって、患者の血漿や遺伝子の解析といった臨床ベースの解析が中心であった。今後もその傾向は続くであろうし、それは重要なことである。一方、これまでモデル動物を用いた解析はほとんど行われていない。ヒトとモデル動物の違いを考慮する必要は避けられないが、

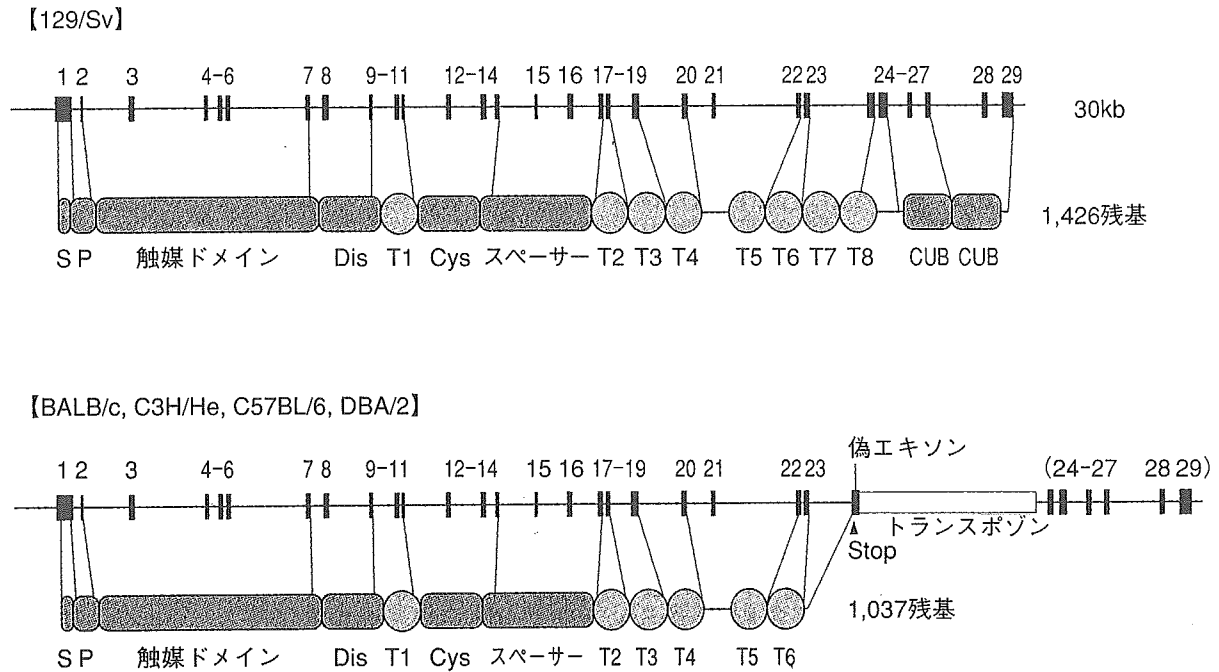


図 2-73 マウス ADAMTS13 の構造

129/Sv 系統の *Adamts13* 遺伝子は 29 個のエキソンからなり、ヒト ADAMTS13 と同一のドメイン構造をもつ金属プロテアーゼ mADAMTS13L をコードしている。一方、BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2 系統の *Adamts13* 遺伝子の第 23 イントロンにはトランスポゾンが挿入されているために、偽エキソンが生じる。ここに Stop コドンが含まれるため、C 末端の一部を欠失した金属プロテアーゼ mADAMTS13S が発現する。ICR と SW 系統は両タイプのアレルをもつ集団である。

ADAMTS13 の生理機能を理解する上で、ノックアウトマウスなどの利用も有効であると思われる。クローニングされて数年が経過した今、立体構造解析や反応速度論的解析なども進むであろう。

## ●文献

- 1) Moschowitz E. Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries; a hitherto undescribed disease. *Proc N Y Pathol Soc.* 1924; 24: 21-4.
- 2) Moake JL, Rudy CK, Troll JH, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1982; 307: 1432-5.
- 3) Gerritsen HE, Robles R, Lämmle B, et al. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood.* 2001; 98: 1654-61.
- 4) Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, et al. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloprotease family. *Blood.* 2001; 98: 1662-6.
- 5) Soejima K, Mimura N, Hirashima M, et al. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem.* 2001; 130: 475-80.
- 6) Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem.* 2001; 276: 41059-63.
- 7) Plaimauer B, Zimmermann K, Volkel D, et al. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood.* 2002; 100: 3626-32.
- 8) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature.* 2001; 413: 488-94.
- 9) Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, et al. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313: 212-6.
- 10) Furlan M, Robles R, Morselli B, et al. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 1999; 81: 8-13.
- 11) Majerus EM, Zheng X, Tuley EA, et al. Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity. *J Biol Chem.* 2003; 278: 46643-8.
- 12) Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, et al. ADAMTS-

- 13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood*. 2003; 102: 3232-7.
- 13) Zheng X, Nishio K, Majerus EM, et al. Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *J Biol Chem*. 2003; 278: 30136-41.
  - 14) Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004.
  - 15) Bernardo A, Nolasco L, Ball C, et al. Peptides from the C-terminal regions of ADAMTS-13 specifically block cleavage of ultra-large von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flow. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 405a.
  - 16) Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, et al. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 6306-10.
  - 17) Furlan M, Robles R, Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*. 1996; 87: 4223-34.
  - 18) Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*. 1996; 87: 4235-44.
  - 19) Dong JF, Moake JL, Nolasco L, et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*. 2002; 100: 4033-9.
  - 20) Tsai HM, Sussman II, Ginsburg D, et al. Proteolytic cleavage of recombinant type 2A von Willebrand factor mutants R834W and R834Q: inhibition by doxycycline and by monoclonal antibody VP-1. *Blood*. 1997; 89: 1954-62.
  - 21) Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, et al. Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Thromb Haemost*. 1999; 82: 1386-9.
  - 22) Obert B, Tout H, Veyradier A, et al. Estimation of the von Willebrand factor-cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to vWF. *Thromb Haemost*. 1999; 82: 1382-5.
  - 23) Böhm M, Vigh T, Scharrer I. Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor-cleaving metalloprotease (ADAMTS13). *Ann Hematol*. 2002; 81: 430-5.
  - 24) Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, et al. vWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood*. 2004; 103: 607-12.
  - 25) Zhou W, Tsai HM. An enzyme immunoassay of ADAMTS13 distinguishes patients with thrombotic thrombocytopenic purpura from normal individuals and carriers of ADAMTS13 mutations. *Thromb Haemost*. 2004; 91: 806-11.
  - 26) Whitelock JL, Nolasco L, Bernardo A, et al. ADAMTS-13 activity in plasma is rapidly measured by a new ELISA method that uses recombinant vWF-A2 domain as substrate. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 485-91.
  - 27) Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, et al. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 11902-7.
  - 28) Schneppenheim R, Budde U, Oyen F, et al. von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP. *Blood*. 2003; 101: 1845-50.
  - 29) Antoine G, Zimmermann K, Plaimauer B, et al. ADAMTS13 gene defects in two brothers with constitutional thrombotic thrombocytopenic purpura and normalization of von Willebrand factor-cleaving protease activity by recombinant human ADAMTS13. *Br J Haematol*. 2003; 120: 821-4.
  - 30) Savasan S, Lee SK, Ginsburg D, et al. ADAMTS13 gene mutation in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with previously reported normal vWF cleaving protease activity. *Blood*. 2003; 101: 4449-51.
  - 31) Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, et al. Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood*. 2004; 103: 1305-10.
  - 32) Veyradier A, Lavergne JM, Ribba AS, et al. Ten candidate ADAMTS13 mutations in six French families with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 424-9.
  - 33) Pimanda JE, Maekawa A, Wind T, et al. Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in association with a mutation in the second CUB domain of ADAMTS13. *Blood*. 2004; 103: 627-9.
  - 34) Uchida T, Wada H, Mizutani M, et al. Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004; 104: 2081-3.
  - 35) Kentouche K, Budde U, Furlan M, et al. Remission of thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with compound heterozygous deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease by infusion of solvent/detergent plasma. *Acta Paediatr*. 2002; 91: 1056-9.

- 36) Assink K, Schiphorst R, Allford S, et al. Mutation analysis and clinical implications of von Willebrand factor-cleaving protease deficiency. *Kidney Int.* 2003; 63: 1995-9.
- 37) Kokame K, Miyata T. Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.* 2004; 41: 34-40.
- 38) Banno F, Kaminaka K, Soejima K, et al. Identification of strain-specific variants of mouse *Adamts13* gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem.* 2004; 279: 30896-903.
- 39) Yoo G, Blomback M, Schenck-Gustafsson K, et al. Decreased levels of von Willebrand factor-cleaving protease in coronary heart disease and thrombotic thrombocytopenic purpura: study of a simplified method for assaying the enzyme activity based on ristocetin-induced platelet aggregation. *Br J Haematol.* 2003; 121: 123-9.

〈坂野史明 小亀浩市〉



## ADAMTS13活性測定法

ADAMTS13 assay

### Key point

- ◎血漿 vWF 切断酵素 ADAMTS13 の活性測定は血栓性血小板減少性紫斑病の診断において重要な判断材料となる。
- ◎これまでに多くの方法が考案されてきたが、技術的な障壁が高く、臨床検査レベルでの普及が困難であった。
- ◎消光性蛍光基質 FRETS-VWF73 を用いる FRET 法は測定作業が簡便であり、短時間で ADAMTS13 活性値を知ることができる。

### von Willebrand因子とADAMTS13

血漿中には von Willebrand 因子 (von Willebrand factor: vWF) とよばれる糖蛋白質が存在しており、血管壁損傷部位に露出したコラーゲンや血小板表面の受容体に結合することで血小板を粘着凝集させる。vWF はおもに血管内皮細胞で合成され、分泌直後は鎖状の超高分子量ホモマルチマー構造を形成している。マルチマーの分子量が大きいほど、コラーゲン接着能や血小板凝集能が高い。

一方、血漿には vWF を切断する酵素 ADAMTS13 (「サイドメモ」参照) が存在する。おもに肝の星細胞で合成されている。ADAMTS13 は超高分子量 vWF マルチマーを切断することによって、vWF の活性を調節している(本書中、第1章「36. VWF 切断酵素 (ADAMTS 13) の構造と機能」の項を参照)。

### 血栓性血小板減少性紫斑病

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP) は血小板減少と溶血性貧血をおもな症状とし、しばしば動揺性精神神経症状、腎機能障害、発熱を併発する。先天性と後天性に分類されるが、多くは原因不明の後天性である。1982年、TTP患者の血漿に超高分子量 vWF マルチマーが見出された<sup>1)</sup>。以来、血小板凝集能の高い超高分子量マルチマー

が細小血管において過剰な血小板凝集を引き起こし TTP を発症させるという考え方が定着している(本書中、第4章「32. TTP・HUS」の項を参照)。超高分子量 vWF マルチマーの蓄積は血漿 ADAMTS13 活性の欠如が原因であり、ADAMTS13 活性の欠如は ADAMTS13 遺伝子の変異(先天性 TTP)<sup>2)</sup>あるいは抗 ADAMTS13 自己抗体の出現(後天性 TTP)が原因である。

TTP の臨床的特徴は溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) のそれと類似している。実際、鑑別不可能な症例も多く、TTP/HUS という表記も頻繁に用いられる。また、播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation: DIC) などとの鑑別が困難な例もある。ADAMTS13 活性値は TTP 診断の判断材料として有用である。

### これまでのADAMTS13活性測定法

血漿試料と反応させた vWF の切断程度をどのように定量的に検出するかという観点から、さまざまな方法が考案されてきた。

① アガロースゲル電気泳動法<sup>3)</sup>: 精製ヒト vWF と血漿を 37°C で 24 時間反応させ、非還元 SDS アガロースゲル電気泳動で分離した後、抗 vWF 抗体を用いた Western blot で vWF マルチマーを検出する。

② ポリアクリルアミドゲル電気泳動法<sup>4)</sup>: 塩酸グアニジンで処理した vWF を血漿と 37°C で 1 時間反応させ、非還元 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、Western blot で vWF 断片を検出する。

### サイドメモ

#### ADAMTS13? ADAMTS-13?

vWF 切断酵素 ADAMTS13 は一次構造上、ADAMTS メタロプロテアーゼファミリーに属している。ADAMTS は、a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif に由来する名称で、ヒトの場合、ADAMTS1 から ADAMTS20 まで 19 のメンバーが知られている (ADAMTS5 と ADAMTS11 は同一)。HUGO 遺伝子命名委員会で定められたヒト ADAMTS13 の公式遺伝子シンボルは ADAMTS13 である (マウスでは *Adamts13*)。一方、蛋白質の表記としては ADAMTS13 と ADAMTS-13 が混在しており、統一されていない。研究者や学会誌などの方針が定まっていなかったようである。したがって、PubMed で検索すると一方でしかヒットしない文献が少なからずみつかれる。キーワードで網羅的に検索する場合、“ADAMTS13 or ADAMTS-13”の使用をお勧めする。

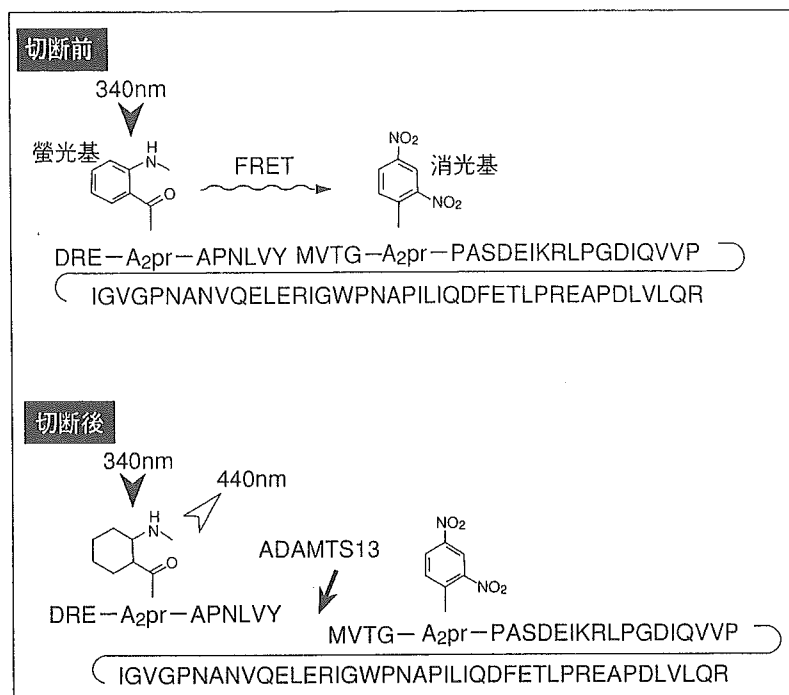


図 1 FRETs-VWF73 の構造と測定原理

VWF73 の P7 位 Gln と P5' 位 Asn に相当する残基をジアミノプロピオン酸残基 (A2pr) に置換し、それぞれの側鎖に蛍光基 2-(N-methylamino)benzoyl (Nma) と消光基 2,4-dinitrophenyl (Dnp) を結合させた。FRETs-VWF73 に 340 nm の励起光を照射すると FRET 現象が起るため、蛍光は生じない。ADAMTS13 によって Tyr-Met 間が切断されると蛍光基から 440 nm の蛍光が発生する。

③ コラーゲン結合法<sup>5)</sup>: vWF を血漿と反応させた後、コラーゲンコートしたウェルに添加し、結合した vWF 量をペルオキシダーゼ標識抗 vWF 抗体で定量する。vWF マルチマーの分子量が小さくなるほどコラーゲン結合能が低下する性質を利用している。

④ 抗体サンドイッチ法<sup>6)</sup>: vWF を血漿と反応させた後、vWF の C 末端に対するモノクローナル抗体をコートしたウェルに添加する。洗浄後、放射性ラベルした抗 N 末端モノクローナル抗体を反応させ、結合した放射活性を測定する。

⑤ 血小板凝集法<sup>7)</sup>: vWF を血漿と反応させた後、リストセチン添加による血小板凝集検査を行う。vWF マルチマーの分子量が小さくなるほど血小板凝集能が低下する性質を利用している。

⑥ フローチャンバー法<sup>8)</sup>: 平行板型フローチャンバー内で培養した血管内皮細胞にヒスタミンを添加すると vWF マルチマーが分泌され、細胞表面に保持される。ここに洗浄血小板を流すと液流方向と平行に連なった血小板が観察される。血漿試料を流すと ADAMTS13 活性に応じて血小板が離脱するので、それを定量する。

これらの方法は世界各地の研究室で採用され、TTP/ADAMTS13 研究に大きく貢献してきた。しかし、時間

がかかる、技術的に難しい、特殊な材料や器具がいる、などといった理由で臨床レベルで広く普及してこなかった。以下に紹介する蛍光共鳴エネルギー転移 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) 法は蛍光リーダーさえあれば測定可能であり、臨床検査現場での普及が期待される。

### FRET法の原理

著者らは活性測定法の簡便化をめざし、まず ADAMTS13 の基質となりうる vWF の最小領域を特定した<sup>9)</sup>。その領域、すなわち vWF の Asp<sup>1596</sup>~Arg<sup>1668</sup> (73 アミノ酸残基) を VWF73 とよんでいる。

VWF73 は化学合成しうる鎖長であり、しかも品質保持に問題となりがちな Cys 残基を含んでいない。また、単体では特定の高次構造を形成しないため、フォールディングを考慮する必要もない。このようなメリットを生かし、VWF73 に蛍光基と消光基を導入したペプチド基質 FRETs-VWF73 を作製した<sup>10)</sup> (図 1)。

340 nm 付近の励起光を照射された FRETs-VWF73 では蛍光基に蓄えられたエネルギーが近傍の消光基へ転移するため、蛍光は発生しない。これを FRET 現象という。しかし、蛍光基と消光基の間にある Tyr-Met 結合が ADAMTS13 によって切断されると、両基の物

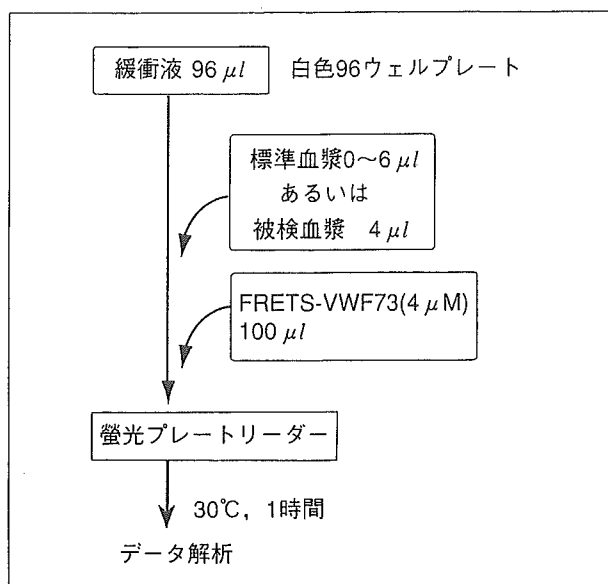


図 2 FRET法の操作手順

理的距離が大きくなるために FRET 現象が起こらなくなり、蛍光基から 440 nm 極大の蛍光が発生する。つまり、ADAMTS13 による切断に比例して蛍光強度が増大する。この FRET 法は、現在 ADAMTS13 の反応初速度をリアルタイムに検出できる唯一の方法である。

### FRET法の測定手順

すべての操作は室温で行ってよい(図 2)。

- ① 緩衝液 (5 mM Bis-Tris, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.005% Tween-20, pH6.0) を準備する。
- ② 白色 96 ウェルプレートのウェルに緩衝液 96 μl を添加し、ここに被検血漿 4 μl を加える。
- ③ 標準血漿用のウェル (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 μl) も用意しておく。
- ④ 緩衝液で希釈した FRETS-VWF73 溶液 (4 μM) を 100 μl 加える (終濃度 2 μM)。
- ⑤ 蛍光プレートリーダーにセットする。励起 340 nm/測定 440 nm, あるいはその近辺のフィルターセットを用い、経時的に (たとえば 5 分ごとに) 蛍光強度を測定する。プレートリーダーに保温機能があれば 30°C で 60 分間、なければ室温で 90~120 分間測定する。
- ⑥ 蛍光値は反応時間に対してほぼ直線的に増加するので、その直線の傾き、すなわち Δ蛍光値/min (ΔF/min) を算出する。
- ⑦ 標準血漿から得られた ΔF/min 値をプロットして回帰曲線を作成し、被検血漿 4 μl の ΔF/min 値から標準血漿に対する相対活性を求める。標準血漿 0~6 μl で回帰曲線を作成すれば 0~150% の活性値が得られる。

### FRET法における留意点

FRETS-VWF73 は (株) ペプチド研究所で製造販売されている (<http://www.peptide.co.jp/jpn/new/pinews/FRETS-VWF73.htm>)。バイアルに入った粉末を 100 μM となるよう 25% ジメチルスルフォキシド水溶液で溶解し、エッペンドルフタイプのチューブに移す。-20°C で保存すれば、すくなくとも数カ月間は問題なく使用できる。前述の緩衝液で必要量を 25 倍希釈し、測定に供する。1 バイアルは約 30 反応分に相当する。

使用する 96 ウェルプレートは白色プラスチック製がよく、黒色では感度不足である。励起用および測定用フィルターさえ適合すれば、プレートリーダーの代わりにリアルタイム PCR 装置 (たとえばストラタジーン社 Mx3000P) を使用することも可能である。

ADAMTS13 活性測定に共通することであるが、通常、血漿試料にはクエン酸ナトリウム血漿が用いられる。ヘパリン血漿も使用可能であるが、対照とする標準血漿も同じ条件にすべきである。血清でも測定できるが実施例は少ない。EDTA を含む試料ではキレート作用が強く、金属酵素である ADAMTS13 の活性を測定できない。

ADAMTS13 は血漿中で比較的安定であり、数日間冷蔵保管しても活性にほとんど影響はなく、凍結融解操作の影響も少ない。ただし、ADAMTS13 の安定性を損なわせる病態がないとはいえないので、なるべく新鮮な血漿を用いるのがよいと思われる。

最近、エスアールエル社が、FRET 法による ADAMTS13 活性受託測定サービスを開始した。測定環境が整っていない場合や時間的余裕がある場合などに役立つであろう。

## 今後の課題

TTP 確定診断のための cut-off 値は標準血漿の 5% といわれている。しかし、用いる標準血漿や測定法の相違などによって異なる可能性があり、その値はまだ絶対的なものではない。著者らがこれまでに測定した結果から判断すると、もうすこし高く設定すべきかもしれない。TTP 診断のガイドライン作成を視野に入れた cut-off 値の検討が必要である。

## 文献

1) Moake, J. L. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **307** : 1432-1435, 1982.

- 2) Kokame, K. and Miyata, T. : *Semin. Haematol.*, **41** : 34-40, 2004.
- 3) Furlan, M. et al. : *Blood*, **87** : 4223-4234, 1996.
- 4) Tsai, H. M. : *Blood*, **87** : 4235-4244, 1996.
- 5) Gerritsen, H. E. et al. : *Thromb. Haemost.*, **82** : 1386-1389, 1999.
- 6) Obert, B. et al. : *Thromb. Haemost.*, **82** : 1382-1385, 1999.
- 7) Böhm, M. et al. : *Ann. Haematol.*, **81** : 430-435, 2002.
- 8) Dong, J. F. et al. : *Blood*, **100** : 4033-4039, 2002.
- 9) Kokame, K. et al. : *Blood*, **103** : 607-612, 2004.
- 10) Kokame, K. et al. : *Br. J. Haematol.*, **129** : 93-100, 2005.

\* \* \*