

the general Japanese population. Seven heterozygotes carrying S903L were found in 64 subjects, suggesting that the mutation is a common polymorphism with an allele frequency of 5.5%. On the other hand, both H234Q and R1206X mutations were excluded as common polymorphisms by the screening of 64 subjects.

Discussion

USS, which may be alternatively called congenital chronic relapsing TTP or familial HUS/TTP, is characterized by repeated episodes of thrombocytopenia and haemolytic anaemia which ameliorate quickly by PI [13]. Typically, patients have episodes of hyperbilirubinaemia with negative Coombs test during infancy followed by repeated episodes of TTP [14]. In 1997, Furlan *et al.* [10] reported four cases of chronic relapsing TTP lacking ADAMTS13 activity. Since then, ADAMTS13 has been known to have a central pathogenic role in TTP and a defect in its gene was reported to cause USS, which is a form of TTP with a neonatal onset, although there is also an adult onset disease caused by *ADAMTS13* gene defect [15,7]. Patients with USS either have homozygous or compound heterozygous gene mutations [11,12,15]. Another familial or inherited form of HUS/TTP is associated with factor H deficiency. Patients with factor H deficiency have, predominantly, renal impairment and low level of serum C3. Factor H deficiency seems to aggravate C3 activation, which potentiates autoantibody-mediated or immune complex-mediated glomerular injury. While some patients with factor H deficiency were reported to accompany low ADAMTS13 level and renal involvement [16], our case showed normal factor H level (data not shown).

In the present study, we identified two novel mutations, H234Q in exon 7 and R1206X in exon 26, in the *ADAMTS13* gene. The missense mutation, H234Q, resides in the metalloprotease domain. The conserved active site sequence HEXXHXXGXXHD (amino acids 224–235) in this domain contains 3 His residue that coordinate the catalytic Zn²⁺ ion [17]. It is a reasonable assumption that if one His residue is replaced with Gln, the mutant lacks its protease activity. The nonsense mutation, R1206X, resides in the CUB1 domain of the *ADAMTS13* gene. This mutant lacks 222 amino acids in the C-terminal that include a part of the CUB1 domain and the entire CUB2 domain. The deletion of these regions may cause secretion defects during synthesis. It has been suggested that the CUB domains are important for interactions between ADAMTS13 and VWF [18]. Therefore, deletion of the C-terminal region may affect substrate recognition. In the previous study, we sequenced exon 7 in 364 Japanese individuals and found no H234Q mutation [9]. The R1206X mutation was not observed in

the 12 Japanese families with USS so far determined in our laboratory [11,12]. However, recombinant ADAMTS13 reproducing the patient's mutations has not been performed; the above-mentioned mechanisms of inducing ADAMTS13 deficiency are only speculative at this point.

Unusually large VWF multimers (UL-VWFMs) are secreted from vascular endothelial cells. UL-VWFMs tend to aggregate platelets to form UL-VWFm–platelet complexes, which may embolize microvessels and cause organ ischaemia. ADAMTS13 cleaves UL-VWFMs to a series of smaller multimers, which lack the tendency to aggregate platelets. Therefore, loss of ADAMTS13 activity caused either by genetic defects (USS) or by its inhibitors causes intravascular platelet aggregation, leading to TMA.

Thus, theoretically, early intervention with PE or PI should be effective in these disorders by supplementing ADAMTS13 with or without removal of its inhibitors, respectively. In fact, there has been evidence that extremely low levels of ADAMTS13 activity were associated with excellent response to PE and good prognosis [12,17], although there also are reports challenging this view [2]. Our experience of 20 patients with USS indicates that all are doing quite well with regular infusion of plasma, except one patient who died of TTP that became refractory to plasma after cholecystectomy.

Patients with TMA tend to be labelled as having TTP if clinical features are predominated by neurological dysfunction or HUS if renal impairment is the predominant feature. However, renal impairment accompanies as much as 44% of patients with TTP [19]. Even if the predominant feature of these patients with TMA is renal dysfunction, we need to consider diagnosis of TTP and check ADAMTS13 activity, especially if an inherited form of the disease is suspected. If ADAMTS13 activity is very low, PE in patients with inhibitors or PI in cases with USS would be justified and should be done as early as possible. Tsai has proposed that the definition of TTP should be a pro-thrombotic state in the microvasculature caused by severe ADAMTS13 deficiency, such that we can easily identify a group of patients who have a common pathogenetic mechanism for the future enzyme replacement or gene therapy [4]. Although some challenge this notion, it is still important to develop rapid and simple assay methods for ADAMTS13 activity so that the appropriate therapy can be given immediately.

Our experience appears to indicate that assays of ADAMTS13 activity and its inhibitor should be considered in patients who have repeated episodes of renal insufficiency as well as thrombocytopenia.

Acknowledgements. The case of the patient was presented briefly in a review paper published in *Hypertension Research* journal [20].

Conflict of interest statement. None declared.

References

1. 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: 4033–4039
2. George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura–hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2000; 96: 1223–1229
3. Kasper CK, Aledort L, Aronson D *et al.* Proceedings: a more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34: 612
4. Tsai HM. Advances in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1072–1081
5. Furlan M, Robles R, Galbusera M *et al.* Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998; 339: 1578–1584
6. Tsai HM, Lian BC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998; 339: 1585–1594
7. Tripodi A, Chantarangkul V, Bohm M *et al.* Measurement of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13): results of an international collaborative study involving 11 methods testing the same set of coded plasmas. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1601–1609
8. Kinoshita S, Yoshioka A, Park YD *et al.* Upshaw–Schulman syndrome revisited: a concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2001; 74: 101–108
9. Mori Y, Wada H, Gabazza EC *et al.* Predicting response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF-cleaving protease activity. *Transfusion* 2002; 42: 572–580
10. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammler B. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1997; 89: 3097–3103
11. 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: 11902–11907
12. Matsumoto M, Kokame K, Soejima K *et al.* Molecular characterization of *ADAMTS13* gene mutations in Japanese patients with Upshaw–Schulman syndrome. *Blood* 2004; 103: 1305–1310
13. Upshaw JD, Jr. Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1978; 298: 1350–1352
14. Fujimura Y, Matsumoto M, Yagi H, Yoshioka A, Matsui T, Titani K. Von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw–Schulman syndrome. *Int J Hematol* 2002; 75: 25–34
15. Levy GG, Nichols WC, Lian EC *et al.* Mutations in a member of the *ADAMTS* gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413: 488–494
16. Noris M, Bucchioni S, Galbusera M *et al.* Complement factor H mutation in familial thrombotic thrombocytopenic purpura with ADAMTS13 deficiency and renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1177–1183
17. Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001; 276: 41059–41063
18. Zhang W, Motto D, Ginsburg D. ADAMTS13 binds VWF via its C-terminal CUB2 domain. *Blood* 2004; 104: 126a
19. Thompson CE, Damon LE, Ries CA, Linker CA. Thrombotic microangiopathies in the 1980s: clinical features, response to treatment, and the impact of the human immunodeficiency virus epidemic. *Blood* 1992; 80: 1890–1895
20. Shibagaki Y, Fujita T. Thrombotic microangiopathy in malignant hypertension and hemolytic uremic syndrome (HUS)/thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): can we differentiate one from the other? *Hypertens Res* 2005; 28: 89–95

Received for publication: 2.8.05

Accepted in revised form: 22.12.05

血栓性血小板減少性紫斑病とADAMTS13

宮田敏行*, 小亀浩市*¹, 坂野史明*¹, 本田繁則*, 宮田茂樹*²

はじめに

血管が傷害されると、その局所に血小板プラグが形成される(一時止血)。心筋梗塞や脳梗塞が生じる内径が狭くなった病的血管では、血流により高いずり応力がかかる。高ずり応力下での血小板粘着は、フォンビルブランド因子(VWF)に完全に依存することが明らかになっている。VWFは、モノマーがジスルフィド結合で連結したマルチマー構造をしている。高ずり応力下では、このマルチマーが伸展した形となり、傷害部位に露出したコラーゲンに結合し、血小板の粘着・凝集を起こす。このように、VWFは血小板凝集

で中心的な役割を果たすので、血中VWF量が低下するフォンビルブランド病では出血を呈し、巨大VWFマルチマー量が増加すると血小板が過凝集を起こす。細小血管に血小板の過凝集が起こり、血小板数が減少し、破碎赤血球が見られる病態が血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP)である。

本稿では、今世紀に入り、急速に進展したTTPとその原因遺伝子であるADAMTS13の研究について解説する。

I. TTP

TTPは、血小板数の減少、細小血管傷害性の溶血性貧血、腎機能障害、動揺性精神神経症状、発熱を5徴候とする全身性の疾患である。最近では腎障害と神経症状が見られない場合でも、他の3徴候があればTTPと診断しようとする傾向がある。治療は血漿交換である。TTPは、先天的なADAMTS13の欠損またはADAMTS13に対する自己抗体の出現による巨大VWFマルチマーの血液中の蓄積と、それによる血小板の過凝集が原因である。したがって、血漿交換により自己抗体を除去し、ADAMTS13を補充することが極めて効果のある治療法である¹⁾。

TTPと似た臨床症状を示す疾患に、溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome: HUS)がある。HUSは血小板数の減少、溶血性貧血、腎不全の3徴候で知られ、最近ではO157:H7による食中毒に伴う発症で話題となったように、この大腸菌が産生するペロ毒

Key word

thrombotic thrombocytopenic purpura
platelet thrombi
von Willebrand factor
ADAMTS13 deficiency
congenital disease

Thrombotic thrombocytopenic purpura and ADAMTS13

*Toshiyuki Miyata, Shigenori Honda :

Department of Etiology and Pathogenesis,
National Cardiovascular Center Research Institute
国立循環器病センター研究所 病因部

*¹Koichi Kokame, Fumiaki Banno :

Department of Vascular Physiology,
National Cardiovascular Center Research Institute
国立循環器病センター研究所 脈管生理部

*²Shigeki Miyata :

Division of Transfusion Medicine,
National Cardiovascular Center
国立循環器病センター 輸血管理室

素が主に腎を傷害する。臨床的には両疾患の鑑別は困難であり，血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy : TMA) という診断が用いられることが多い。

1982年，Moakeらは慢性再発性のTTP患者の血漿中に巨大VWFマルチマーを見出しTTP発症との関連を報告した²⁾。これが契機となり，TTPの原因遺伝子としてVWF切断酵素ADAMTS13がクローニングされた³⁻⁵⁾。

Ⅱ. VWF

VWFは，血管内皮細胞や巨核球で合成される巨大血漿蛋白質である (図1)。小胞体内でC末端領域間のジスルフィド結合により2量体が形成され，ゴルジ体に移送される。そこでプロ配列が切断されるとともに，D3ドメイン間にジスルフィド結合が形成され巨大VWFマルチマーが形成される。この巨大VWFマルチマーは血中に分泌されADAMTS13で切断を受け，適当な大きさのVWFマルチマーとなり血中を循環する。その分子量は2,000万Da以上で，4 μ mの長さと言われている。VWFマルチマーは血管傷害部位に露出したコラーゲン，次いで血小板膜

蛋白質 GPIb に結合することにより可逆的な血小板凝集を起こす。VWF依存性の血小板凝集は，細小血管に広く見られる高ずり応力下で起こる。また，動脈硬化などで狭窄した血管でも高ずり応力が見られ，血管閉塞の原因となる。VWF切断酵素であるADAMTS13が先天性もしくは後天性に欠損すると，血小板凝集の高い巨大VWFマルチマーが循環し，細小血管で血小板血栓が起こる。

Ⅲ. ADAMTS13

2001年にVWF切断酵素として，ADAMTS13がクローニングされた³⁻⁵⁾。ADAMTSとは，a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifの略号であり，その13番目の遺伝子であった (図2)。3つのグループはこの蛋白質を精製し部分アミノ酸配列を決定し，この遺伝子をクローニングした。また，別のグループは先天性TTP患者のポジショナルクローニングにより本遺伝子をクローニングした。ADAMファミリーは膜貫通領域を持つ金属プロテアーゼであり，発生や分化に関与するが，ADAMTSファミリーは可溶性である。

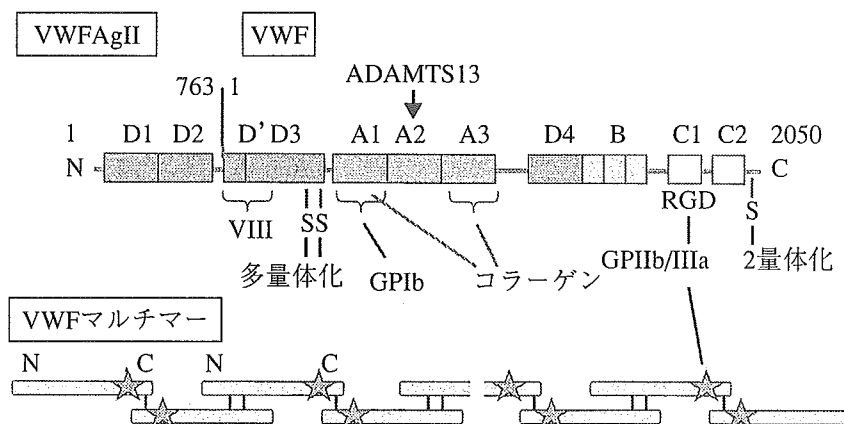


図1. VWFの機能

VWFは複数のドメインからなり，ジスルフィド結合を介してマルチマーとなる。コラーゲンやGPIb，GPIIb/IIIaの結合部位を示す。GPIb：血小板膜蛋白質Ib，GPIIb/IIIa：血小板膜蛋白質IIb/IIIa。

ヒト *ADAMTS13* 遺伝子は 9q34 に位置し、29 エクソンから構成される。cDNA 配列から 1427 アミノ酸残基の 145kDa と予想される。精製標品は約 190kDa を示す。主に肝で合成され、なかでも星細胞で合成される⁶⁾。

先天性 TTP 患者の遺伝子解析が精力的に行われ、原因となる遺伝子変異が同定された。私達はこれまでに 8 家系の先天性 TTP 患者の遺伝子解析を行い、6 つのミスセンス変異 (R193W, R268P, C508Y, I673F, C908Y, R1123C)、1 つのナンセンス変異 (Q449X)、3 つのプライス部位変異 (414 + 1G > A, 1244 + 2T > G, 686 + 1G > A) を同定した^{7,8)}。ミスセンス変異の多くは、哺乳動物培養細胞を用いた発現実験で分泌せず細胞内に貯留した。Q449X 変異体は分泌するものの、VWF 切断活性を示さなかった。本変異は Cys-rich ドメイン内に停止コドンが生じるので、Cys-rich ドメインより C 末端領域のドメインが VWF 切断活性に重要な役割を果たすことが示された。これらの変異のうち、414 + 1G > A と I673F は 2 つの家系に同定されたので、日本人の TTP 患者に集積しているのかもしれない。

私達は、*ADAMTS13* 遺伝子に日本人に広

く見られる P475S 変異を同定した (図 2)⁹⁾。本変異は、Cys-rich ドメインにある。アレル頻度は 5% なので、約 1 割の日本人がこの変異のヘテロ体であり、約 400 人に 1 人がホモ体である。発現実験で、VWF 切断活性が低下していた。この変異は *ADAMTS13* の酵素活性を低下させるものの、TTP を惹起するものではない。血栓性の病態との関連は明らかではない。

後天性 TTP は、*ADAMTS13* の自己抗体の出現により起こる。3 人の日本人の後天性 TTP 患者の IgG を調製しそのエピトープを調べたところ、いずれも Cys-rich ドメイン-スパーサードメインを認識していた (図 2)⁹⁾。自己抗体のエピトープ領域は、欧米の研究でも追認された。これらの結果から、両ドメインは *ADAMTS13* の基質となる GST-VWF73-H (後述) に結合することが最近報告された¹⁰⁾。また、C 末端から順次ドメインを欠如させた一連の変異体を作成し、その VWF 切断活性を調べたところ、Cys-rich ドメイン-スパーサードメインを欠いた変異体は活性を示さず、このドメインの重要性が確認された⁹⁾。

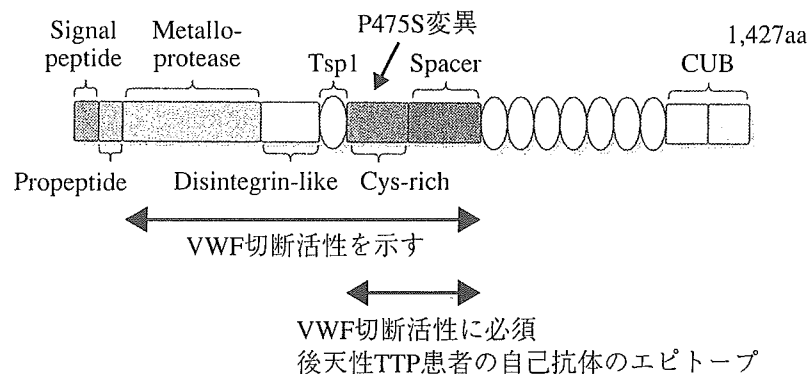


図 2. *ADAMTS13* の構造

ADAMTS13 はドメイン構造をとる。分子の中央部分に位置する Cys-rich ドメインとスパーサードメインは、VWF 切断活性に必須である。この部分は、後天性 TTP 患者の血中に生じる自己抗体のエピトープ部位でもある。

私達は、マウス ADAMTS13 の cDNA クローニングを行った¹¹⁾。BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2 といった系統は、イントロン 23 に intracisternal A particle というレトロトランスポゾンが挿入されており、それにより翻訳停止コドンが生じた。その結果、この cDNA は C 末端の 2 つの Tsp1 様ドメインと 2 つの CUB ドメインが欠如した 1,037 アミノ酸から成る ADAMTS13 をコードしていた。一方、129/SV 系統はレトロトランスポゾンの挿入がないので、ヒト ADAMTS13 と同様のドメイン構造を持つ ADAMTS13 をコードしていた。近交系ではない ICR 系統は、個体により保有するアレルが異なっていた。いずれの系統でも血漿 VWF 切断活性には差が見られなかったため、C 末端領域のドメインは活性に必須ではないと考えた。

IV. ADAMTS13 の活性測定法の開発

ADAMTS13 の基質は、VWF である。VWF はジスルフィド結合で架橋されたマルチマー構造をとり、通常条件下ではそれらが丸く縮んだ構造をとっていると考えられる。したがって、これまでに用いられてきた ADAMTS13 の測定系は、尿素などの変性剤存在下で基質 VWF と長時間 (例えば終夜) のインキュベーションを必要とした。切断された VWF は、アガロースゲルによる VWF マルチマーの分子量の低下やコラーゲンへの結合量の低下という間接的な測定法で調べられた。これらの方法は、いずれも定量性に欠けていた。

私達は ADAMTS13 の簡便で迅速な測定系を確立するため、まず、基質となる最小領域の同定を行った¹²⁾。ADAMTS13 は、VWF の A2 ドメイン内の Tyr-Met 結合を切断する。そこで、切断部位を含む A2 ドメインやそれを短くしたペプチドを大腸菌で発現させ切断を調べたところ、D1596-R1668 の 73 残基が最

小領域であることが判明した。発現蛋白質の精製と検出のため、N 末側にグルタチオン S 転移酵素 (GST) と C 末側に His タグを付けているので、この基質を GST-VWF73-H と呼ぶ。この測定法は、GST-VWF73-H と血漿 1 μ L を 1 時間反応させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で反応物を分離後、抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロット法にて切断産物を可視化するものであった。反応は、尿素を含まない低イオン強度のバッファー中で行う。全行程は 5 時間で終了するが、ウェスタンブロット法を用いるため、正確な定量性には問題を残していた。そこで、この 73 残基の配列をもとに、より定量性のある基質を開発した。

私達は、「FRET-VWF73」と名付けた蛍光基を導入した VWF73 を化学合成した (図 3)¹³⁾。この基質は、切断部位の P7 位の Gln1599 と P5' 位の Asn1610 を 2-(N-methylamino) benzoyl (Nma) 基と 2,4-dinitrophenyl (Dnp) 基が結合したジアミノプロピオン酸で置換したものである。この基質に 340nm の励起光を照射すると、蛍光基 Nma に蓄えられたエネルギーが近傍の消光基 Dnp へ転移するため、蛍光は生じない。これを蛍光共鳴エネルギー転移 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) 現象という。ADAMTS13 により Tyr-Met 結合が切断されると、Nma 基と Dnp 基の距離が遠くなりエネルギー転移が起こらない。その結果、Nma 基から 440nm の蛍光がリアルタイムで生じる。この蛍光強度の上昇から、ADAMTS13 の酵素反応の初期速度を求めることができる。この初期速度は酵素の用量依存性 (正確には、用いた標準血漿の量への依存性) を示すので、初期速度と使用血漿量の標準曲線が得られ、これを用いて血漿中の ADAMTS13 の活性を定量することが可能となった。用いるバッファーは、尿素を含まず、低イオン強

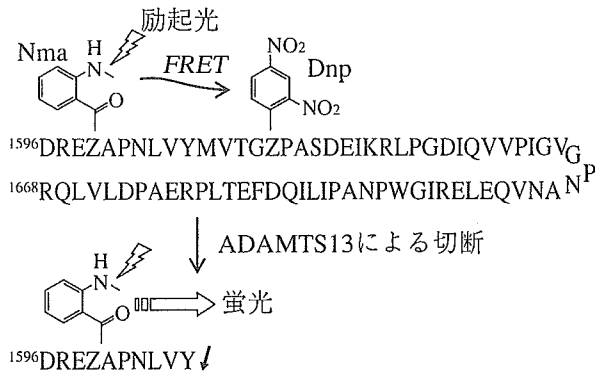


図3. ADAMTS13の蛍光性基質 FRET-VWF73の構造

73 残基からなる VWF 由来の配列に、ADAMTS13の切断部位である Tyr-Met 結合をはさんで蛍光基と消光基を導入した。Tyr-Met 結合が切断を受けると、蛍光基が発光する。

度の 5mM Bis-Tris, 25mM CaCl₂, 0.005 % Tween-20, pH6.0 が最適であった。本法は、TTP の研究のうえで永く待ち望まれていた、簡便な ADAMTS13 定量法である。本基質は (株) ペプチド研究所から市販され、本測定法の受託測定は (株) SRL が行っている。

ADAMTS13 は金属プロテアーゼなので、採血時の抗凝固剤として EDTA を用いることはできない。通常、測定にはクエン酸血を用いる。Nma 基と Dnp 基の間にある 10 個のアミノ酸をつなぐペプチド結合のいずれが切断を受けても、FRET-VWF73 の蛍光の上昇が観察されることも念頭に置く必要がある。

FRET-VWF73 を用いた ADAMTS13 測定法は、簡便で再現性が高い (CV が 2 ~ 6 %) ¹³⁾。7 名の先天性 TTP 患者血漿はいずれも 1 % 以下の活性しか示さず、特発性 TTP 患者 41 名中 33 名は 5 % 以下の活性しか示さず、残りも 25 % 以下の活性であった (図 4)。しかし、HUS 患者 (12 名) 血漿には 100 % を超える活性も見られた。一方、100 名の健常人の活性は 50 ~ 180 % までの広い範囲に入っており、

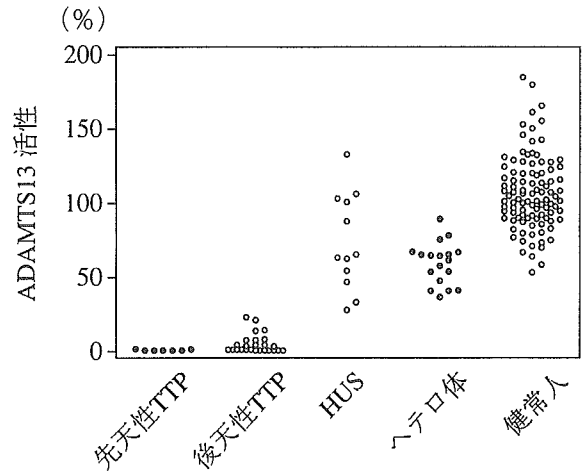


図4. 各種血漿の ADAMTS13 活性

ADAMTS13 活性は、FRET-VWF73 を用いて測定した。ヘテロ体：先天性 TTP 患者の家系構成員で ADAMTS13 遺伝子にヘテロ接合体変異を有する人。

50 % 以下の活性はなかった。また、ADAMTS13 活性は性差を示し、男性が女性より低値を示した。ADAMTS13 活性は、加齢により低値を示した (図 5)。このように、先天性および後天性の TTP 患者の ADAMTS13 活性は極めて低く、たとえ活性が見られたとしても、健常人集団の下限の値より低かった。TTP の診断を ADAMTS13 活性の低値だけで判断するのは危険であり、診断は破碎赤血球の出現や血小板数の減少などを考慮して行われるべきであるが、ADAMTS13 活性が再現性よく定量できるようになったので、この活性値も診断の一項目に加えられるであろう。

V. TTP から血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy) へ

先天性や後天性の TTP 患者に関する知見が蓄積されるに従い、ADAMTS13 の欠損だけで TTP が発症するという考えからはずれる症例が報告され始めた。遺伝子変異が同定された先天性 TTP 患者のほとんどは新生児

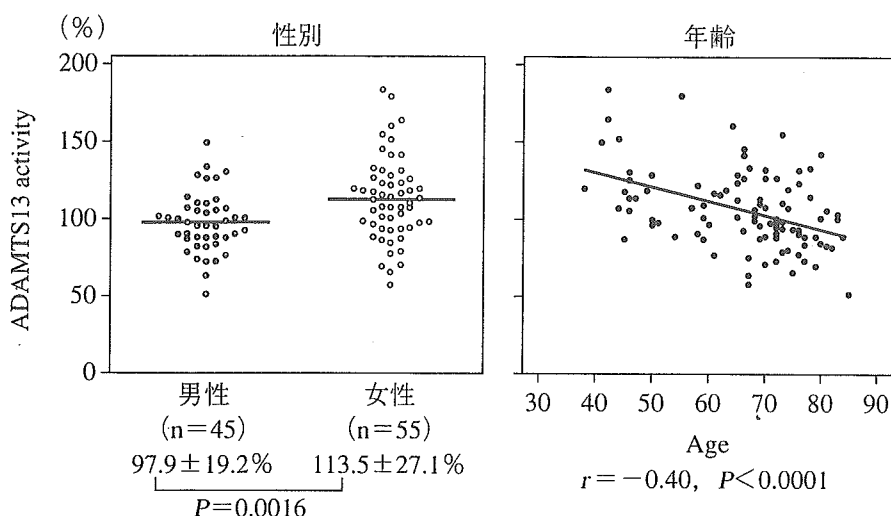


図5. 健常人100名のADAMTS13活性(男性45名, 女性55名)

期に重症もしくは中等度の黄疸を示し、その後血小板数の減少が見られるが、20歳代までそのような症状を示さない例が見られた。また、一卵性双生児(姉妹)で23歳と24歳時にADAMTS13の自己抗体が生じTTPを発症したスイスの例では、寛解期に入りTTPの症状がなくなっても、ADAMTS13活性の著減が続いた¹⁴⁾。フランスの姉弟例では、ADAMTS13遺伝子に同じ異常が存在するにもかかわらず、14歳の弟は血漿交換を必要とする慢性の溶血や血小板数の減少が見られるが、18歳の姉は新生児期に溶血があり軽度な血小板数の減少($80 \times 10^9/L$)が見られるだけで治療は必要としていない¹⁵⁾。また、私達はADAMTS13遺伝子欠損マウスを作製したが、ホモ接合体マウスは正常に出生育成し、TTP様の症状を示さなかった。これらの事例は、ADAMTS13活性の著減だけでTTPが発症するものではなく、他の要因も発症に関与することを示していると考えられた。

VI. まとめ

細小血管に血小板血栓を形成するTTPは、先天性もしくは後天性のADAMTS13欠損症

が原因である。ADAMTS13の酵素活性の定量的かつ迅速な測定法が確立された。研究が進むにつれて、ADAMTS13遺伝子の先天性欠損症にもかかわらず、乳児期にTTPを発症しない例が報告された。ADAMTS13活性を定量的に測定し、TTPの発症との関連を検討する臨床研究が必要と考えられる。

§ 文 献

- 1) Moake JL : Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002;347:589-600.
- 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;307:1432-1435.
- 3) 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 (Tokyo)* 2001;130:475-480.
- 4) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al : Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413:488-494.
- 5) 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;276:41059-41063.
- 6) Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al : Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 2005;106:922-924.
 - 7) 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;99:11902-11907.
 - 8) Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, et al : Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood* 2004;103:1305-1310.
 - 9) Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, et al : ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* 2003;102:3232-3237.
 - 10) Ai J, Smith P, Wang S, et al : The Proximal Carboxyl-terminal Domains of ADAMTS13 Determine Substrate Specificity and Are All Required for Cleavage of von Willebrand Factor. *J Biol Chem* 2005;280:29428-29434.
 - 11) 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;279:30896-30903.
 - 12) 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;103:607-612.
 - 13) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, et al : FRETSS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS 13 assay. *Br J Haematol* 2005;129:93-100.
 - 14) Studt JD, Hovinga JA, Radonic R, et al : Familial acquired thrombotic thrombocytopenic purpura : ADAMTS13 inhibitory autoantibodies in identical twins. *Blood* 2004;103:4195-4197.
 - 15) 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;2:424-429.

血栓性血小板減少性紫斑病/溶血性尿毒症症候群

小亀浩市*

血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP)と溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome : HUS)は、血小板減少・溶血性貧血・腎機能障害を主徴とする疾患であり、血栓性微小血管障害症(thrombotic microangiopathy : TMA)と一括することができる。しかし、両疾患の発症原因に関する研究が進むにつれ、基盤となる生理機能は異なっていることが明らかになってきた。TTPはフォンビルブラント因子(von Willebrand factor : VWF)を介した血小板の異常凝集が原因である。一方、HUSの多くは病原性大腸菌による志賀様毒素が原因であるが、一部のHUSは補体系の制御異常で説明できそうである。疾患の成り立ちを精査したうえで、戦略的な診断法および治療法を開発することが重要である。

はじめに

血栓性血小板減少性紫斑病と溶血性尿毒症症候群は、いずれも血小板減少・溶血性貧血・腎機能障害を呈する疾患で、血栓性微小血管障害症としてまとめることができる。精神神経症状が認められればTTP、腎機能障害が顕著であればHUSとみなされてきたが、両者の区別がつかず、TTP/HUSと並記されることもある。依然として不明点が多いものの、それぞれの発症機構が分子レベルで説明できるようになってきた。

Key Word

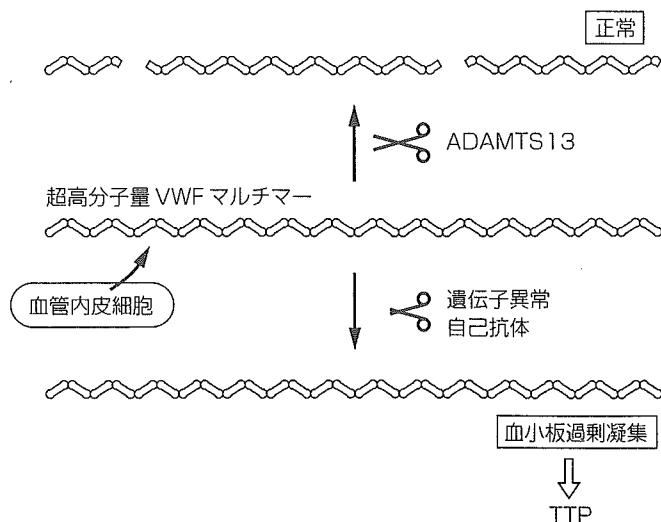
血栓性血小板減少性紫斑病
溶血性尿毒症症候群
血栓性微小血管障害症
ADAMTS13
補体

1. TTPの臨床症状

TTPは、血小板減少・溶血性貧血・腎機能障害・動揺性精神神経症状・発熱という5症状を主徴とする重篤な全身性疾患である¹⁾。1924年に、高熱と多臓器障害で死亡した患者の病理解剖所見として記述されたのが最初の報告である²⁾。末梢の細小血管に広範なヒアリン血栓が見出されていたが、1985年、血小板が主体の血栓であることが示された³⁾。

血小板血栓が多数形成されると、血小板が消費された結果として循環血液中の血小板数が減少する。血栓によって生じた血管狭窄部位を通過すると、赤血球は破碎される(細小血管障害性溶血性貧血)。血栓が生じた臓器では機能障害が起こる。腎臓の細小血管が閉塞すると腎機能障害が現れ、大脳の細小血管が閉塞すると精神神経症状が現れる。初期段階の血小板血栓は自然に崩壊する

* KOKAME Koichi/国立循環器病センター研究所



図① VWF-ADAMTS13 と TTP(筆者作成)

血管内皮細胞から分泌された超高分子量 VWF マルチマーは、ADAMTS13 によって切断される。遺伝子異常あるいは自己抗体により ADAMTS13 活性が著減すると、VWF を介した血小板の過剰凝集が起こり、TTP を発症する。

こともあるので、一時的に精神神経症状が改善することもあり、動揺性という現象となる。

2. TTP と VWF

正常な止血には、VWF とよばれる血漿糖蛋白質が不可欠である。VWF はさまざまな分子と結合することで、糊のような役割を果たす。すなわち、血管壁が損傷して内皮下コラーゲン組織が露出すると、そこに VWF が結合する。VWF は血小板表面の膜蛋白質 GPIb とも結合するため、その結合を介して血小板が粘着する。この粘着反応で血小板が活性化すると、さらに血小板膜蛋白質 GPIIb/IIIa が VWF と結合するようになり、その VWF にまた別の血小板が結合する。このようにして VWF を介した血小板凝集塊が形成され、一次止血が達成される。

VWF はおもに血管内皮細胞で合成されるが、分泌直後は超高分子量ホモマルチマー (> 20,000 kDa) を形成している。一方、循環血液中の VWF は不連続の分子量 (500 ~ 20,000 kDa) をもつマルチマーとして存在する。つまり、内皮細胞から分泌された超高分子量 VWF マルチマーは、血液の中で適度に断片化されている。マルチマー 1 分子あたりのモノマー数が多いほど、すなわちマルチマーが大きいほど、血小板の粘着凝集活性は高い。

VWF 遺伝子に高分子量マルチマーが形成できない変異があったり、過度に断片化される変異があると、血小板凝集が不完全になるために出血傾向を示す(フォンビルブランド病 2 A 型)。逆に、超高分子量マルチマーが切断されずに蓄積すると、血小板が凝集しやすくなる。これが TTP である(図①)。1982 年、Moake ら⁴⁾ が TTP 患者の血漿中に超高分子量マルチマーを見出したことで明らかになった。

3. 先天性 TTP と ADAMTS13

1996 年、Furlan ら⁵⁾ および Tsai⁶⁾ により VWF 切断活性の測定法が開発された。それを機に VWF 切断酵素が精製され、cDNA 塩基配列が決定された⁷⁻⁹⁾。一次構造の特徴から、ADAMTS ファミリーの一員として ADAMTS13 と命名された。同時期、先天性 TTP 患者家系の遺伝子連鎖解析からも ADAMTS13 が突き止められた¹⁰⁾。

ヒト ADAMTS13 は、染色体 9q34 に位置する ADAMTS13 遺伝子によってコードされており、おもに肝臓で発現している。1,427 アミノ酸残基からなり、いくつものドメインで構成されている。VWF 切断活性を発揮するには、触媒ドメインからスパーサードメインま

で必須である^{111,12)}。

TTP は先天性と後天性に大別される。これまで解析された先天性 TTP 患者のほぼすべてに ADAMTS13 遺伝子変異が同定されており、合計で約 50 ヶ所にのぼる。先天性 TTP は劣性遺伝性疾患であるが、発症に ADAMTS13 以外の遺伝的背景や環境要因がかかわっているか否か、現在のところ不明である。

4. 後天性 TTP と ADAMTS13

TTP の大半は後天性であり、ほとんどの患者血漿に ADAMTS13 に対する活性阻害抗体が検出される。つまり、TTP の大半は自己免疫疾患ととらえることもできる。膠原病・悪性腫瘍・感染・妊娠・骨髄移植・薬剤投与などが一次要因としてあげられる場合と、原因不明の特発性である場合があるが、いずれも抗体産生の機序は解明されていない。本来抗原として認識されるはずのない領域が、何らかの要因で抗原として提示される状況が起こるのであろう。活性阻害抗体のエピトープは、システインリッチ/スパーサードメインに集中している^{113,14)}。

日本人には、約 5% のアレル頻度で出現する多型 P475S が存在する¹⁵⁾。中国人にも検出されるが頻度は低く、欧米人にはまったく検出されない¹⁶⁾。この変異は ADAMTS13 の活性を低下させるが、ホモで保有したからといって TTP を発症するわけではない。しかし、後天性 TTP やほかの血栓性疾患と関連する可能性があり、今後の研究課題である。

5. ADAMTS13 の活性測定法

最初に開発された測定法は、Furlan ら³⁾ と Tsai⁹⁾ による電気泳動法である。いずれも、VWF マルチマーを血漿と反応させ、電気泳動後にウェスタンブロットをおこなう。これらの方法は TTP 研究の突破口を開いたが、操作が煩雑であり、臨床検査レベルで普及するには無理がある。のちに、コラーゲン結合能測定法、サンドイッチ ELISA 法、リストセチンコファクター活性測定法など簡素化が図られたが、より簡便な方法が望まれていた。

われわれ¹⁷⁾ は、73 アミノ酸残基からなる VWF 部分配列が ADAMTS13 の基質となる最小領域であることを見出した。この領域を VWF73 とよんでいる。さらに、

VWF73 の 2 残基を修飾した合成ペプチド FRET5-VWF73 を開発した¹⁸⁾。これは、蛍光共鳴エネルギー転移 (fluorescence resonance energy transfer : FRET) 技術を利用した消光性蛍光基質であり、ADAMTS13 による切断に比例して蛍光強度が増加する。これを用いた測定法は操作が簡便であるため、臨床検査レベルでの普及が期待される。

6. TTP の治療

先天性 TTP の場合、新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma : FFP) の輸注で症状は改善する。しかし、2~3 週に一度のペースで輸注をくり返す必要があり、C 型肝炎など感染症のリスクが高い。患者に欠損している ADAMTS13 を補充するという原理の治療なので、遺伝子組換え ADAMTS13 製剤が登場すれば FFP 輸注と置きかわるであろう。

後天性 TTP の場合、治療の中心は血漿交換である。患者血漿に含まれる抗 ADAMTS13 自己抗体や超高分子量 VWF マルチマーを除去すると同時に、ADAMTS13 を補充するという意味がある。3~5 日間連日でおこない、血小板数の正常化を確認しながら回数を減らす。寛解したようにみえても再発することがあるので要注意である。血漿交換以外の治療法として、免疫抑制剤の投与や脾臓摘出が有効であった報告もあるが、確立した治療法になっていない。

先天性、後天性、いずれにおいても、血小板輸血は症状を悪化させる可能性が高く、禁忌である。

7. HUS の臨床症状

HUS は、血小板減少・溶血性貧血・腎機能障害という 3 症状を主徴とする重篤な疾患と一般に定義されている。1955 年に、溶血性貧血と腎不全で死亡した患者の病理解剖所見として記述されたのが最初の報告である¹⁹⁾。病理学的には、腎臓の細小血管病変が主体とされている。HUS は小児の急性腎不全の原因として最も頻度が高い疾患で、とくに乳幼児では重症化しやすい。TTP と同様、先天性と後天性に分類できるが、便宜上、典型的 (感染性) と非典型的 (非感染性) に分類されることが多い。それぞれ D + (diarrhea-positive) HUS, D - (diarrhea-

negative)HUS とも表記される。

8. 典型的 HUS と O157 : H7

典型的 HUS とは、おもに病原性大腸菌の感染による腸管出血性下痢症を伴う HUS を指す。HUS 患者の 9 割を占め、その多くは志賀様毒素を産生する腸管出血性大腸菌 O157 : H7 の感染症である。

志賀様毒素は、ペロ毒素ともよばれ、志賀毒素とともにファミリーを形成している²⁰⁰。いずれも、約 320 アミノ酸残基からなる A サブユニットと、約 90 アミノ酸残基からなる B サブユニットで構成される細胞傷害性蛋白質である。宿主細胞表面のレセプター Gb3/CD77 を介して細胞内に侵入し、60S リボゾームの機能を阻害することで細胞の蛋白質合成を停止させる。

病原性大腸菌感染が必ずしも HUS 発症につながるわけではなく、また、HUS 発症の機序も明確になっていない。現在のところ、志賀様毒素が血管内皮細胞や尿管上皮細胞、単球などに作用し、細胞死やサイトカイン放出を促し、その結果として生じる病的血栓の形成や臓器障害が HUS 症状の原因であろうと推定されている。

9. 非典型的 HUS と補体系

非典型的 HUS とは、病原性大腸菌の感染を伴わない HUS を指す。非典型的 HUS の一部は家族性であり、劣性遺伝形式を示す場合と優性遺伝形式を示す場合が知られている。

1998 年、Goodship らのグループ²⁰¹は、HUS 家系の連鎖解析から 1 番染色体長腕に HUS と強く関連する領域を見出し、さらに、その領域に含まれる *CFH* 遺伝子にミスセンス変異を同定した。翌年、Landau らのグループ²⁰²も同様の方法で同遺伝子に別のミスセンス変異を同定した。*CFH* 遺伝子は補体因子 factor H をコードしているが、この領域周辺すなわち染色体 1q32 には複数の補体関連遺伝子が存在する。事実、2003 年に Goodship らのグループ²⁰³は、*MCP* 遺伝子にも HUS 原因変異を見出した。*MCP* 遺伝子は補体制御因子 CD46/MCP をコードしている。

補体系は、補体成分・補体レセプター・補体制御因子など 30 種類以上の蛋白質群からなっており、侵入した微

生物の標識や破壊、食細胞の動員などを担っている。補体系にはおもに三つの経路、すなわち古典経路・レクチン経路・代替経路(第 2 経路)が存在する(図 2)。古典経路は抗原抗体複合体に補体成分 C1 が結合することで、レクチン経路は微生物表面の糖鎖にレクチンが結合することで、代替経路は微生物表面の水酸基に C3b が結合することで活性化され、いずれも C3 の活性化(C3 → C3a + C3b)につながる。代替経路は C3 活性化の自己増幅回路にもなっている。いずれの経路でも微生物が多数の C3b で標識されることになり、補体レセプターをもつ食細胞によって処理される。また、C3 の活性化は最終的に細胞膜傷害性複合体の形成につながり、これが微生物を直接破壊する。

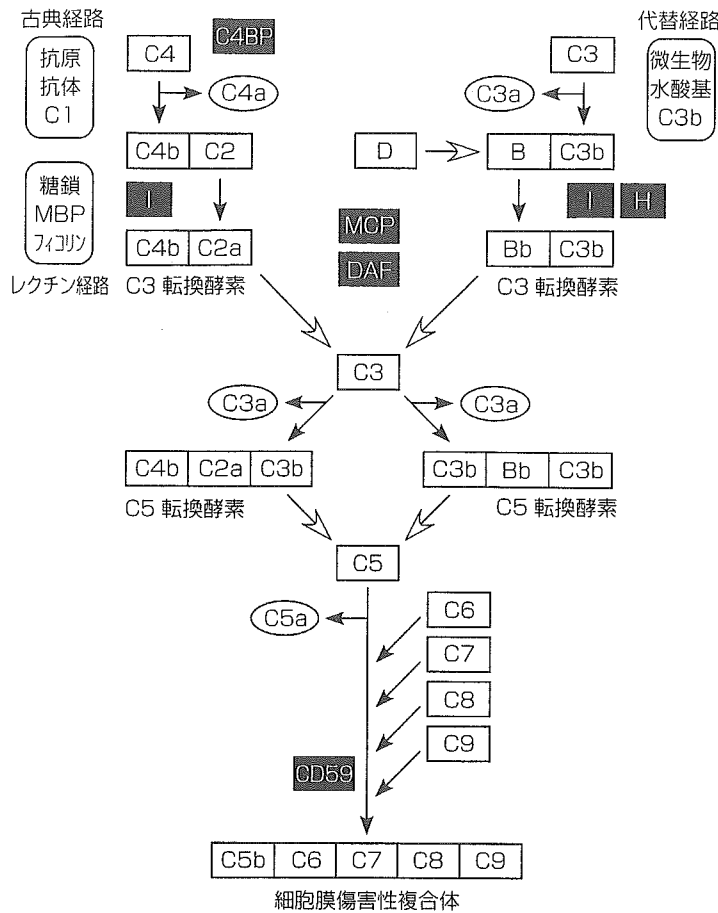
C3b の水酸基への結合は非特異的であり、また、細胞膜傷害性複合体は自己細胞も破壊しうるので、補体系の活性化は非自己に限定される必要がある。C3b の過剰生成を防ぐために分解酵素 factor I がはたらいているが、その補助因子として factor H が存在する。factor H は自己細胞の表面に結合し、補体活性化を抑制する機能ももっている。さらに、自己細胞には補体成分を不活化する補体制御因子として、CD55/DAF、CD46/MCP、CD59 が発現している。これら制御因子の機能が低下すると、補体系が過剰に活性化してしまう。

10. factor H と CD46/MCP

factor H は、1231 残基の血漿糖蛋白質であり、20 個の SCR(short consensus repeat)ドメインからなる。C3b やヘパリンと結合する複数の機能的領域が同定されている。現在、約 30 種類の factor H 遺伝子異常が家族性あるいは孤発性 HUS 患者に見つかっている。とくに、C 末端に位置する SCR20 に変異が集中していることは、発症機序を考えるうえで興味深い。HUS 発症と相関する高頻度多型も報告されている²⁰⁴。

CD46/MCP は、392 残基の細胞膜貫通蛋白質であり、factor I とともに C3b と C4b を切断分解する。これまで、HUS3 家系に 2 ヶ所の遺伝子異常が見出されている²⁰⁵。

factor H の遺伝子異常が見出されるのは、非典型的 HUS 患者の 1 ~ 2 割である。CD46/MCP の遺伝子異常も、同じく 1 割程度のものである。非典型的 HUS には、



図② 補体系と HUS (筆者作成)

古典経路, レクチン経路, 代替経路により, 種々の補体成分(□)が活性化する. C3b による微生物の標識, C5a による食細胞の動員, 細胞膜傷害性複合体による微生物の破壊が補体系の主要な役割である. 補体系から自己細胞を保護するために, 種々の補体制御因子(■)が存在するが, そのうち factor H および CD46/MCP の遺伝的欠損は HUS の原因となる.

factor H と CD46/MCP 以外の補体因子の遺伝子異常がかかっている可能性も高く, 補体系以外の遺伝子異常による可能性もある. 先天性 TTP のほぼ全例で ADAMTS13 変異が検出されるのと異なり, HUS 発症にかかわる遺伝子変異は多岐にわたるのかもしれない.

11. HUS の治療

典型的 HUS の場合, 腎機能障害に対処するための輸液や透析といった体液管理がおこなわれる. 急速に症状が悪化することもあるので, 1日2回以上の血液検査をおこなうよう推奨されている. 血圧のコントロールも重要である. 血漿交換がおこなわれることも多いが, 典型的 HUS に対する有効性は確立されていない. 多くの場合, 支持療法をおこなっているうちに快復する. 近年, 薬剤や抗体を用いた毒素中和療法の有効性が調べられている²⁵⁾²⁶⁾.

一方, 非典型的 HUS の場合, 脳症を併発する場合があります. 予後が悪い傾向がある. 上述のように, factor H

欠乏による補体経路の亢進が原因となっている場合, FFP の輸注では不足分を補充しきれず, 効果が低い. このような場合は血漿交換が有効かもしれない. ごく最近, 非典型的 HUS 患者のなかに factor H に対する自己抗体を保有している例が見つかった²⁷⁾. 免疫抑制療法も視野に入れた治療法の選択が重要になるかもしれない.

おわりに

本稿を読んでいただいても, TTP と HUS をどのように区別して診断・治療すればいいのかわかり, 明確にご理解いただけないと思われる. 筆者の理解不足もあるが, 現在の研究がまだそういう段階だからである.

冒頭でも述べたように, TTP と HUS を臨床症状のみから鑑別するのは専門家でもむずかしいことがある. ADAMTS13 活性が著減していれば TTP であると確定でき, 大腸菌感染による腸管出血性下痢症を併発していれば HUS と確定できる. しかし, ADAMTS13 活性が認められる TTP や, factor H 異常がみられない非典型

的 HUS など、精査しても鑑別できない症例が少なからず存在する。

TTP と HUS は、もともと臨床症状と病理所見で分類されたものであり、発症機序で分類されたものではない。原因や症状において互いにオーバーラップしている面があり、完全に区別できないともいえる。最も重要なことは患者を早く完治させることであり、そのためには、適切な治療に対応しやすい診断名や、診断ガイドラインを作成する必要がある。TTP と HUS はともに TMA に属するので、原因に重点を置いた分類、たとえば ADAMTS13 欠損型 TMA, O157 感染型 TMA, factor H 欠損型 TMA などという診断名が適しているのかもしれない。今後、国際的な基準作成が必要と思われる。

文 献

- 1) Sadler JE *et al* : Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology* (Am Soc Hematol Educ Program) 407-423, 2004
- 2) Moschcowitz E : Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries ; a hitherto undescribed disease. *Proc N Y Pathol Soc* 24 : 21-24, 1924
- 3) Asada Y *et al* : Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res* 38 : 469-479, 1985
- 4) Moake JL *et al* : Unusually large plasma factor VIII : von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 307 : 1432-1435, 1982
- 5) Furlan M *et al* : Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by *in vivo* proteolysis. *Blood* 87 : 4223-4234, 1996
- 6) Tsai HM : Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 87 : 4235-4244, 1996
- 7) Soejima K *et al* : A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood : possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem* 130 : 475-480, 2001
- 8) Zheng X *et al* : Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 276 : 41059-41063, 2001
- 9) Plaimauer B *et al* : Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood* 100 : 3626-3632, 2002
- 10) Levy GG *et al* : Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 413 : 488-494, 2001
- 11) Soejima K *et al* : ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* 102 : 3232-3237, 2003
- 12) Zheng X *et al* : Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *J Biol Chem* 278 : 30136-30141, 2003
- 13) Klaus C *et al* : Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 103 : 4514-4519, 2004
- 14) Luken BM *et al* : The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 93 : 267-274, 2005
- 15) Kokame K *et al* : Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 : 11902-11907, 2002
- 16) Kokame K *et al* : Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 41 : 34-40, 2004
- 17) Kokame K *et al* : VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood* 103 : 607-612, 2004
- 18) Kokame K *et al* : FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 129 : 93-100, 2005
- 19) Gasser C *et al* : [Hemolytic-uremic syndrome : bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia]. *Schweiz Med Wochenschr* 85 : 905-909, 1955
- 20) Nakao H *et al* : Escherichia coli Shiga toxin. *J Natl Toxins* 9 : 299-313, 2000
- 21) Warwicker P *et al* : Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 53 : 836-844, 1998
- 22) Ying L *et al* : Complement factor H gene mutation associated with autosomal recessive atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet* 65 : 1538-1546, 1999
- 23) Richards A *et al* : Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 12966-12971, 2003
- 24) Caprioli J *et al* : Complement factor H mutations and



gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome : the C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease. *Hum Mol Genet* 12 : 3385-3395, 2003

- 25) MacConnachie AA *et al* : Potential therapeutic agents for the prevention and treatment of haemolytic uraemic syndrome in shiga toxin producing *Escherichia coli* infection. *Curr Opin Infect Dis* 17 : 479-482, 2004
- 26) Tzipori S *et al* : Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Clin Microbiol Rev* 17 : 926-941, table of contents, 2004
- 27) Licht C *et al* : Successful plasma therapy for atypical

hemolytic uremic syndrome caused by factor H deficiency owing to a novel mutation in the complement cofactor protein domain 15. *Am J Kidney Dis* 45 : 415-421, 2005

KOKAME Koichi

こかめ・こういち

1967年、広島県生まれ

1994年、京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了

同年、日本学術振興会特別研究員

同年、国立循環器病センター研究所病因部動脈硬化研究室員

2002年より、同研究所脈管生理部血栓研究室長(現職)

専門は生物化学・血栓止血学

研究テーマは血栓止血機能および細胞ストレス応答に関する研究

▷ 薬剤起因性血小板減少症の病態と検査 (ITP, HIT, TTP) (4) ◁

TTP 迅速診断を目的とした 新規 ADAMTS13 測定法の開発と応用

小 亀 浩 市*1 宮 田 敏 行*2

Development and Application of a New ADAMTS13 Assay for TTP Diagnosis

*Koichi KOKAME*1 and Toshiyuki MIYATA*2*

A plasma glycoprotein, von Willebrand factor (VWF), is essential for normal platelet aggregation. In healthy individuals, the homo-multimeric forms (VWF multimers) are partially cleaved by a plasma metalloprotease, ADAMTS13. Congenital or acquired deficiency of ADAMTS13 activity leads to the accumulation of hyperactive large VWF multimers, inducing a life-threatening disease, thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). As measuring ADAMTS13 activity is important in TTP diagnosis, a number of assay methods have been developed in the past few years. However, the time and skill required for these methods prohibited the progress of clinical usage. Recently, we have developed a fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay for ADAMTS13 activity. A synthetic 73-amino-acid peptide, FRET-S-VWF73, which is now commercially available, is used as a substrate. Cleavage of this peptide between two modified residues relieves the fluorescence quenching in the intact form. Incubation of FRET-S-VWF73 with normal plasma quantitatively increased fluorescence over time, while TTP-patient plasma had little or no effect. The measurement can be achieved within a one-hour period using a 96-well format in commercial plate readers with common filters. The FRET assay will be useful not only for TTP diagnosis but also characterization of thrombotic microangiopathies.

[Rinsho Byori 53 : 639~645, 2005]

*1National Cardiovascular Center Research Institute, Suita 565-8565

【Key Words】 thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP (血栓性血小板減少性紫斑病), ADAMTS13, von Willebrand factor : VWF (フォンビルブランド因子), platelet (血小板), fluorescence resonance energy transfer (蛍光共鳴エネルギー転移)

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP) は、血小板減少と細小血管障害性溶血性貧血を主な症状とし、しばしば動揺性精神神経症状、腎機能障害、発熱を併発する重篤な疾患である。常染色体劣性遺伝を示す先天性 TTP と

後天性 TTP に分類されるが、大半は原因不明の後天性である。血漿交換によって効果的に治療できることが知られて以来、致死率は減少しているが、回復治療が必要となる場合が多く、身体的負担や感染リスクの増大など患者の負担は大きい。

*1,2 国立循環器病センター研究所 (〒565-8565 吹田市藤白台 5-7-1)

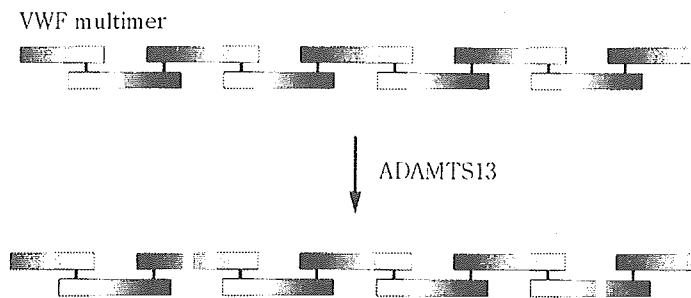


Figure 1 Cleavage of VWF multimers by ADAMTS13.

I. TTP 発症と ADAMTS13

血中には、フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor : VWF) と呼ばれる血漿糖蛋白質が存在する。血管壁の損傷によって露出したコラーゲンや、血小板表面の受容体蛋白質に結合することによって、血小板を凝集させる働きをもつ。主に血管内皮細胞で合成されて血中へ分泌されるが、分泌直後は VWF 同士が N 端-N 端、C 端-C 端でジスルフィド結合した、超巨大ホモマルチマー構造を形成している (Fig. 1)。VWF マルチマーの分子量が大きいほど、すなわち、結合しているサブユニット数が多いほど血小板凝集能は高い。通常、血漿に存在する VWF 切断酵素 ADAMTS13 で部分的に切断されることによって適度に断片化されており、正常な止血機能が維持されている。

1982 年 Moake らは、TTP 患者の血漿に異常な超高分子量 VWF マルチマーを見出した¹⁾。TTP 症状の程度と超高分子量 VWF マルチマーの存在に強い相関が見られたことから、このマルチマーが TTP を惹き起こす機序が提唱され、現在もそのように考えられている。すなわち、血小板凝集能の高い超高分子量 VWF マルチマーが細小血管において過剰な血小板凝集を惹き起こすという考えである。

2001 年にヒト VWF 切断酵素の単離精製が成功し、cDNA 塩基配列が決定された²⁾³⁾。一次構造上、金属プロテアーゼである ADAMTS ファミリーに属していたため、その 13 番目のメンバーとして ADAMTS13 と命名された。先天性 TTP 家系の連鎖解析でも責任遺伝子として ADAMTS13 が同定された⁴⁾。マウス ADAMTS13 もすでにクローニングされている⁵⁾。ADAMTS13 同定に結びつく大きなきっかけとなったのは、1996 年に発表された活性測定法の考案であった⁶⁾⁷⁾。先天性 TTP の原因は ADAMTS13 遺伝子の変異による VWF 切断活性の欠如であり⁴⁾⁸⁾⁹⁾、後天

性 TTP の原因は ADAMTS13 に対する活性阻害性自己抗体の出現である。

II. 従来の血漿 ADAMTS13 活性測定法

ADAMTS13 の VWF 切断活性を測定する方法として、まず以下の二つの方法が開発された。いずれも VWF の切断物を可視化して ADAMTS13 活性を見積もる。

A. SDS アガロースゲル電気泳動法

1996 年に Furlan らによって報告された⁶⁾。フォンビルブランド病患者の血漿 VWF を調べるために行われるマルチマー分析を利用する。1M 尿素および 10mM 塩化バリウムを含む低張緩衝液中で精製ヒト VWF と血漿試料を混合し、37°C で 24 時間反応させる。これを非還元 SDS アガロースゲル電気泳動で分離した後、ニトロセルロース膜へ転写し、抗 VWF 抗体を用いたウェスタンブロットで VWF マルチマーを検出する。ADAMTS13 活性に応じてラダーが低分子量側へシフトする。

B. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

1996 年に Tsai によって報告された⁷⁾。1.5 M 塩酸グアニジンであらかじめ処理した精製ヒト VWF を、5mM 塩化カルシウムを含む緩衝液中で血漿試料と混合し、37°C で 1 時間反応させる。これを非還元 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、ニトロセルロース膜へ転写し、抗 VWF 抗体を用いたウェスタンブロットで VWF 断片を検出する。ADAMTS13 活性に応じて約 350kDa のバンドが出現する。

これら二つの方法によって、それまで実体が捉えられなかった VWF 切断酵素 (=ADAMTS13) の存在が明確になり、以後の精製やクローニングへ結びついた。しかし、手間や習熟を要する方法であるため、研究レベルでは有用性が高いものの、臨床レベルで普及させるのは困難であった。そこで、以下のよう

な方法が開発された。

C. コラーゲン結合能測定法

1999年に Gerritsen らによって報告された¹⁰⁾。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減弱する性質を利用する。VWF を血漿試料と反応させた後、あらかじめコラーゲンでコートした 96 ウェルプレートに添加し、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。血漿試料の ADAMTS13 活性に応じてペルオキシダーゼ活性が低下する。

D. 部位特異的抗体サンドイッチ法

1999年に Obert らによって報告された¹¹⁾。VWF の C 端側と N 端側それぞれに対するモノクローナル抗体を利用する。リコンビナント VWF を血漿試料と反応させた後、あらかじめ VWF の C 端に対する抗体でコートした 96 ウェルプレートに添加する。次に、放射性ラベルした抗 N 端抗体を反応させ、結合した放射活性を測定する。血漿 ADAMTS13 活性に応じて放射活性が減少する。

E. リストセチン血小板凝集測定法

2002年に Böhm らによって報告された¹²⁾。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ことを利用する。VWF を血漿試料と反応させた後、リストセチン添加による血小板凝集テストを行う。ADAMTS13 活性に応じて血小板凝集が減弱する。

ここまで紹介した五つの方法は、いずれも VWF の切断反応を進めるために適度な濃度の蛋白質変性剤(尿素あるいは塩酸グアニジン)を添加する必要がある。これは、基質である VWF の立体構造を変化させるためと考えられている。つまり、ADAMTS13 によって切断される Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ 間結合は分子内部に隠れており、効率よく切断させるには外部に露出させる必要があるという考えである。VWF に高ずり応力を与えると切断されやすくなることや、VWF の立体構造予測もこの考えを支持する。また、いずれの方法でも 2 価金属イオンを添加する。亜鉛イオン結合型金属プロテアーゼである ADAMTS13 の活性を保持するためと考えられるが、その効果の詳細については今後解析が進むであろう。ADAMTS13 による VWF の切断が非生理的な低イオン強度を好むことも興味深い。

以上の方法に加え、より *in vivo* に近い系での測定法も考案されている。

F. 平行板型フローチャンバー法

2002年に Dong らによって報告された¹³⁾。培養細胞上に VWF マルチマーを介して結合した血小板が ADAMTS13 活性によって離脱する現象を観察する。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、超高分子量 VWF マルチマー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、液流方向と平行に糸状に連なった血小板が観察される。つまり、糸状に伸びた VWF マルチマーに沿って多数の血小板が結合した状態である。ここに血漿試料を流すと、ADAMTS13 活性に応じて(おそらく VWF マルチマーが切断され)血小板が離脱していく。

以上の方法を複数の研究グループで比較評価する試みがなされた¹⁴⁾¹⁵⁾。概していずれも ADAMTS13 活性測定として適用可能であり、TTP の診断に有効であることが示されたが、方法間あるいは研究グループ間による差や再現性のばらつきも見られた。

III. VWF 部分配列を利用する活性測定法

ADAMTS13 による切断部位は VWF の A2 ドメインと呼ばれる領域内に存在する。A2 ドメインは、主に血小板表面蛋白質 GPIb と結合する A1 ドメインと、主にコラーゲンと結合する A3 ドメインに挟まれている。

A. A1-A2-A3 ドメインを利用する方法

2002年に Remuzzi らによって報告された¹⁶⁾。昆虫細胞で発現させた A1-A2-A3 ドメイン(約 80kDa)を尿素存在下で血漿試料と反応させ、SDS-PAGE の後、抗 A3 ドメイン抗体を用いたウェスタンブロットで検出する。血漿 ADAMTS13 活性に応じて約 30kDa 断片のバンドが出現する。

B. A2 ドメインを利用する方法

2003年に Whitelock らによって報告された¹⁷⁾。N 端に 6xHis タグ、C 端に Tag-100 タグを付加した A2 ドメインを大腸菌で発現させ、精製する。これをニッケルイオンでコートした 96 ウェルプレート上で血漿試料と反応させ、洗浄後、ウェルに結合した基質を抗 Tag-100 抗体とペルオキシダーゼ標識 2 次抗体で検出する。血漿の ADAMTS13 活性に応じてペルオキシダーゼ活性が低下する。

C. VWF73 を利用する方法

2004年に筆者らが報告した¹⁸⁾。N 端に GST タグ、C 端に 6xHis タグを付加した種々の長さの VWF 部

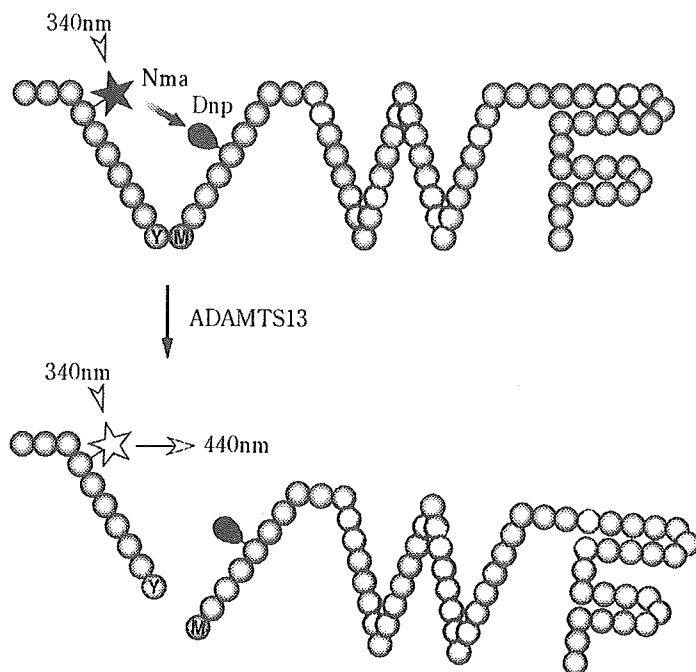


Figure 2 Cleavage of FRETs-VWF73 by ADAMTS13.

分領域を大腸菌で発現させ、血漿との反応性を調べた結果、ADAMTS13の特異的基質として認識されるのに必要十分な領域は、VWFのAsp¹⁵⁹⁶からArg¹⁶⁶⁸までの73アミノ酸残基であることが明らかになった。この領域をVWF73と呼んでいる。基質GST-VWF73-6xHis(約36kDa)と血漿を1時間反応させ、SDS-PAGEの後、抗GST抗体を用いたウェスタンブロットで検出する。ADAMTS13活性に応じて約28kDa断片のバンドが出現する。

さて、ここまで紹介した方法はいずれも1996年のオリジナル法に比べて簡便であるが、実際に臨床の現場で利用するには依然として導入のハードルが高い。できるだけ迅速な治療開始が望まれるTTPにおいては、容易に導入できる測定法が必要である。そこで、ADAMTS13の最小基質であるVWF73を核とした、できるだけ簡便な測定法の開発を進め、以下の方法を確立した。

IV. FRETs-VWF73を基質とするFRET法

2005年に筆者らが報告した方法である¹⁹⁾。73アミノ酸残基から成るVWF73は、VWF全長(約2,000残基)やA2ドメイン全体(約200残基)といった長鎖ペプチドではなく、しかもCys残基を全く含まないため、化学合成し易い。さらに、VWF73は少なくとも単体では高次構造を形成していないため、フォ

ールディングを考慮する必要もない²⁰⁾。このようなメリットを生かし、VWF73の2残基を修飾したペプチド「FRETs-VWF73」をデザインした(Fig. 2)。

VWF73のうちP7位Gln¹⁵⁹⁹とP5'位Asn¹⁶¹⁰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2-(N-methylamino)benzoyl(Nma)と2,4-dinitrophenyl(Dnp)を結合させた。このFRETs-VWF73溶液に340nmの励起光を照射すると、蛍光基Nmaに蓄えられたエネルギーが近傍の消光基Dnpへ転移するため、蛍光は生じない。これを蛍光共鳴エネルギー転移(fluorescence resonance energy transfer : FRET)現象という。ADAMTS13によってTyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶間が切断されるとNmaとDnpの距離が大きくなるためにエネルギー転移が起こらなくなり、Nmaから440nmの蛍光が生じる。つまり、ADAMTS13による切断に比例して蛍光強度が増大するのである。

実際の測定手順は簡単である(Fig. 3)。まず96ウェルプレートのウェルに緩衝液96μlを添加し、ここに血漿4μlを加える。さらにFRETs-VWF73溶液(4μM)を100μl加え、蛍光プレートリーダーにセットする。340nm励起/440nm測定、あるいはそれに近いフィルターセットを用い、経時的に蛍光強度を測定する(例えば5分ごとに)。プレートリーダー内を30℃に保温することが可能であれば60分間、室