

thrombin induces long-lasting $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation even in the absence of fibrinogen. Although it has been suggested that the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent pathway, the mechanism by which $\alpha_{IIb}\beta_3$ is kept in a high-affinity state still remains elusive [11].

ADP is actively secreted from platelet dense granules upon platelet activation and is passively released from damaged erythrocytes and endothelial cells [12,13]. Platelets possess at least two major G protein-coupled ADP receptors: P2Y₁ is a G_q-coupled receptor responsible for mediating platelet shape change and reversible platelet aggregation through intracellular calcium mobilization [14], whereas P2Y₁₂ is a G_i-coupled receptor responsible for mediating the inhibition of adenylyl cyclase and sustained platelet aggregation [15,16]. We previously identified a patient with P2Y₁₂ deficiency, OSP-1, caused by a point mutation within the translation initiation codon (ATG to AGG) [17]. Based on our findings in the functional analysis of OSP-1 platelets, we thought that P2Y₁₂ might play a role in the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation.

In this study, employing modified ligand-binding assays we analyzed the mechanism of sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and demonstrated the critical role of the continuous interaction of released ADP with P2Y₁₂ receptor in the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation.

Materials and methods

Reagents

ADP, protease-activated receptor 1-activating peptide (PAR1 TRAP, SFLLRNPNDKYEPF), PAR 4-activating peptide (PAR4 TRAP, AYPGKF), thrombin, thromboxane A₂ analog U46619 (9, 11-dideoxy-11 α , 9 α -epoxymethanoprostaglandin F_{2 α}), apyrase, prostaglandin E₁ (PGE₁), and prostaglandin I₂ (PGI₂) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled PAC1, a ligand-mimetic $\alpha_{IIb}\beta_3$ -specific monoclonal antibody (mAb) that binds specifically to activated $\alpha_{IIb}\beta_3$, was purchased from BD Biosciences (Mountain View, CA, USA) [18]. PE-labeled anti-CD62P (P-selectin), PE-anti-CD63, and PE-IgG were purchased from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). AR-C69931MX was a generous gift from Astra-Zeneca (Loughborough, UK). Adenosine 3'-phosphate 5'-phosphate (A3P5P) and yohimbine were purchased from Sigma-Aldrich. The specificities and actions of these antagonists have been described [12]. A specific thromboxane A₂ receptor antagonist, SQ-29548, and a PKC inhibitor, Ro31-8220, were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) and Merck KGaA (Darmstadt, Germany), respectively. MCI-9042, an antagonist for the serotonin (5-HT₂) receptor, was a gift from Mitsubishi Pharma Corporation (Tokyo, Japan) [19]. PT25-2 mAb, which is specific for and activates $\alpha_{IIb}\beta_3$, was a kind gift from Drs Makoto Handa and Yasuo Ikeda (Keio University, Tokyo,

Japan) [20]. FK633, an $\alpha_{IIb}\beta_3$ -specific antagonist, was kindly provided from Astellas Pharma Inc. (Osaka, Japan) [21].

Platelet preparation

Washed human platelets were prepared as previously described [22]. In brief, fresh whole blood anticoagulated with 0.15 volume of acid-citrate-dextrose solution [National Institute of Health (NIH) formula A] was obtained from healthy volunteers who had not taken any medication for at least 1 week and centrifuged at 250 $\times g$ for 10 min to obtain platelet-rich plasma (PRP). After incubation with 20 ng mL⁻¹ PGE₁ for 15 min, the PRP was centrifuged at 750 $\times g$ for 10 min, washed three times with 0.05 M isotonic citrate buffer containing 20 ng mL⁻¹ PGE₁, resuspended in Walsh buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 3.3 mM NaH₂PO₄, 3.8 mM HEPES, 0.1% glucose, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4) without PGE₁, and allowed to rest for 30 min before use.

Flow cytometry

Flow cytometric analysis using monoclonal antibodies (mAbs) was performed as previous described with some modifications [21]. Washed platelets adjusted to 50 $\times 10^3$ μ L⁻¹ were stimulated with 0.2 U mL⁻¹ thrombin or 5 μ M U46619 under static conditions for 15 min. After the stimulation, each of the antagonists or Walsh buffer (for the control) was added to the suspensions for an additional 5 min. The platelet suspensions were then incubated with FITC-PAC1 and PE-anti-CD62P (or PE-anti-CD63) for 30 min and analyzed using a flow cytometer (FACScan; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

In another set of experiments, after a 15-min stimulation with thrombin, stimulated platelets were diluted with buffer containing 0.2 U mL⁻¹ thrombin or 5 μ M U46619 for an additional 5 min. The platelet suspensions were then incubated with FITC-PAC1 for 30 min.

Measurement of released ADP in platelet suspensions by high-performance liquid chromatography (HPLC)

Platelet suspensions (200 $\times 10^3$ platelets μ L⁻¹) were stimulated with thrombin or U46619 for 15 min under static conditions and centrifuged at 1000 $\times g$ for 10 min. The supernatant was collected into ultra-free centrifugal filter units (Millipore, Bedford, MA, USA) and centrifuged at 10 000 $\times g$ for 1 min. Then samples were analyzed by HPLC. The chromatographic separation of ADP was performed using the SMART system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) using an ion-exchange column (mono Q 1.6/5) at room temperature. Aliquots (50 μ L) of samples or standard mixtures were injected into the column, and ADP was separated using a gradient in which the concentration of elution buffer B (20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8.0) was increased from 0% to 50% over a period of 20 min and detected at 254 nm. The

flow rate was 0.1 mL min⁻¹ and retention time for ADP was 11.8 min.

Rap 1B activation assay

The detection of activated Rap 1B was performed using a pull-down assay kit according to the manufacturer's instructions (EZ-Detect™ Rap1 Activation Kit; Pierce, Rockford, IL, USA). In brief, platelets that had been prestimulated with 0.2 U mL⁻¹ thrombin for 15 min were incubated with 1 μ M AR-C69931MX, 1 mM A3P5P, 1 μ M PGI₂, or Walsh buffer for 5 min, and then the platelets were lysed with 0.5% Triton X-100 lysis buffer. The guanosine triphosphate (GTP)-form of Rap 1B was pulled down by incubation with glutathione S-transferase (GST)-RalGDS-Rap 1-binding domain (RBD) and glutathione beads for 1 h at 4 °C. After washing with lysis buffer, proteins were eluted from the precipitates with sodium dodecyl sulfate (SDS)-sample buffer with 2-mercaptoethanol at 100 °C for 5 min, and resolved by electrophoresis on a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After transfer to polyvinylidene fluoride membranes, Rap 1B was detected with rabbit anti-Rap 1B polyclonal antibody. The total Rap 1B in each lysate was detected in samples assayed in parallel. The optical density of the bands was measured using NIH IMAGE software (Bethesda, MD, USA).

PKC activation assay

PKC activation in thrombin-stimulated platelets was detected by immunoblotting using antiphosphoserine PKC substrate antibody (Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA). Conventional PKC isozymes phosphorylate substrates contain serine or threonine, with arginine or lysine at the -3, -2 and +2 positions, and hydrophobic amino acids at position +2. This antibody recognizes conventional PKC substrates only when phosphorylated at the serine residues.

Results

Agonist-induced $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation on P2Y₁₂-deficient platelets

We previously identified a patient with P2Y₁₂-deficiency (OSP-1) as result of a homozygous mutation within the translation initiation codon (ATG to AGG) [17]. We stimulated OSP-1 platelets with different kinds of agonists in the presence of FITC-PAC1 for 30 min and then analyzed PAC1 binding using flow cytometry. As shown in Fig. 1, the amount of PAC1 binding to OSP-1 platelets stimulated with 100 μ M PAR1-TRAP, 200 μ M PAR4-TRAP or 5 μ M U46619 was only 12.5% \pm 1.1%, 4.6% \pm 0.1% and 4.3% \pm 2.3% of the control value (mean \pm SD, n = 4), respectively. In contrast, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced PAC1 binding was only slightly impaired (92.9% \pm 1.9% of control, mean \pm SD, n = 4). PAR1-TRAP and U46619 are able to induce transient aggregation of OSP-1 platelets, indicating that $\alpha_{IIb}\beta_3$ could be transiently activated with these agonists [17].

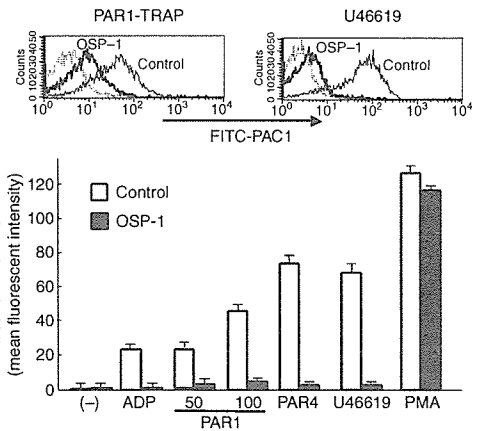


Fig. 1. Agonist-induced $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation on platelets from a P2Y₁₂-deficient patient, OSP-1. Washed platelets obtained from a patient with P2Y₁₂-deficiency (OSP-1) or control subjects (control) were stimulated with 20 μ M adenosine 5'-diphosphate (ADP), 50 or 100 μ M PAR1-TRAP, 200 μ M PAR4-TRAP, 5 μ M U46619, or 0.2 μ M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in the presence of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled PAC1, and bound PAC1 was analyzed using flow cytometry after 30 min of incubation. (upper panel) Representative histograms of PAC1 binding with 100 μ M PAR1-TRAP or 5 μ M U46619 stimulation. PAC1 binding to control platelets in the presence of an $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonist (FK633) is shown by a dotted line. (lower panel) Specific PAC1 binding to OSP-1 (closed columns) or control (open columns) platelets calculated using the following formula is shown (n = 4): (MFI in the absence of FK633) – (MFI in the presence of FK633).

These findings suggest that the $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation may be too short and unstable to be detected by the PAC1-binding assay. From these findings, we assume that released ADP and P2Y₁₂-mediated signaling may play a critical role in the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation.

Effects of antagonists on the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation induced by thrombin

First, we examined PAC-1 binding at different time points between thrombin stimulation and FITC-PAC1 addition and confirmed that there was no difference in PAC1 binding between time 0 min (thrombin and PAC1 were added at the same time) and time 15 min (PAC1 was added 15 min after thrombin stimulation) (data not shown) [11]. To determine the role of P2Y₁₂-mediated signals in the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation, an experimental protocol using platelets preactivated with thrombin was then employed (Fig. 2A). After the completion of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and the induction of α -granules and lysosome secretion by thrombin, each of antagonists was added to the activated platelets. Under these conditions, the stimulated platelets showed long-lasting $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation even in the absence of ligand binding. However, the addition of 1 U mL⁻¹ apyrase, 1 μ M AR-C69931MX (a P2Y₁₂ antagonist) or 1 mM A3P5P (a P2Y₁ antagonist) disrupted the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation by 87.1% \pm 1.4% (mean \pm SD, n = 3), 91.7% \pm 5.3% (mean \pm SD, n = 6) and 38.2% \pm 10.5% (mean \pm SD, n = 4), respectively, without inhibiting CD62P or CD63 expression (Fig. 2B,C). In

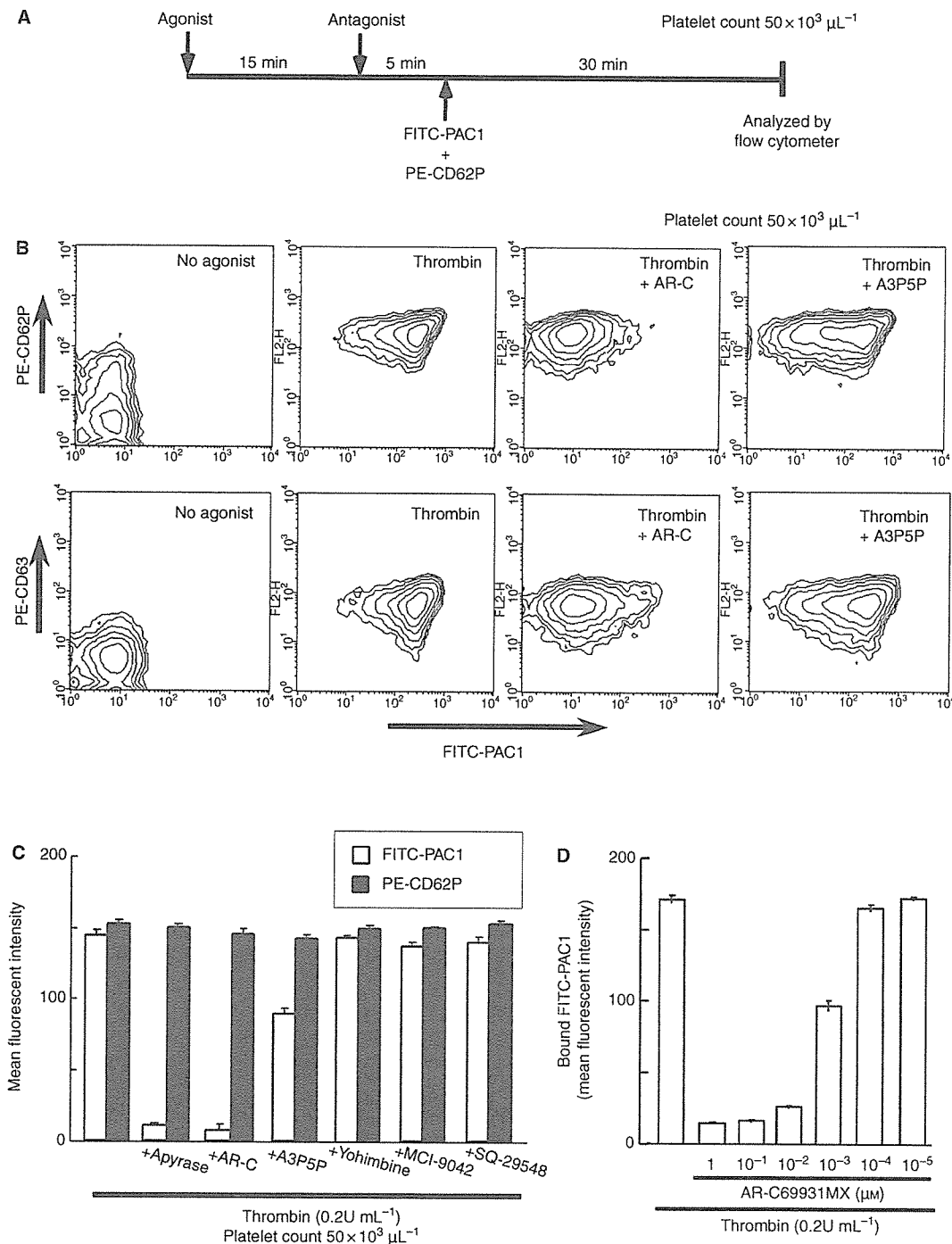


Fig. 2. Effects of receptor antagonists on the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation induced by thrombin. (A) Scheme of the experimental procedure to analyze the effects of antagonists on the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation. (B) One micromolar AR-C69931MX (AR-C) or 1 mM A3P5P was added to thrombin (0.2 U mL^{-1})-stimulated platelets. Representative results obtained using flow cytometry for PAC1 binding and CD62P or CD63 expression are shown. (C) Representative results for specific PAC1 binding in the absence or presence of 1 U mL^{-1} apyrase, 1 mM AR-C, 1 μM A3P5P, 10 μM yohimbine, 1 μM MCI-9042, or 100 nM SQ-29548 (mean \pm SD of triplicates) are shown. Similar results were obtained in at least three independent experiments. (D) Dose-dependent inhibition of AR-C on the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation is shown.

addition, AR-C69931MX dose-dependently inhibited the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation with IC_{50} of approximately 1.6 nM (Fig. 2D). This value is very similar to IC_{50} (3.5 nM) for the inhibition of ADP-induced $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation [23]. We also examined the effect of 10 μM yohimbine (an adrenergic

receptor antagonist), 1 μM MCI-9042 (a 5-HT₂ receptor antagonist) or 100 nM SQ-29548 (a thromboxane A₂ receptor antagonist) on the maintenance of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation. Each of these antagonists showed only negligible effects on PAC1 binding (Fig. 2C).

These results suggest that released endogenous ADP and P2Y₁₂ may be required for the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation induced by thrombin.

Effects of reduction of the platelet concentration on the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation

Next, we examined if reduction of the released ADP concentration might disrupt the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation. As shown in Fig. 3A, after stimulation with 0.2 U mL⁻¹ thrombin for 15 min, platelets ($50 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) were then diluted in Walsh buffer containing 0.2 U mL⁻¹ thrombin to produce different platelet concentrations. The reduction of the platelet concentration after thrombin stimulation attenuated PAC1 binding to activated platelets, and PAC1 binding was only 16.9% \pm 7.8% of the control value at a concentration of 500 platelets μL^{-1} (83.1% \pm 7.8% reduction, mean \pm SD, $n = 9$). On the other hand, the addition of PT25-2 mAb to thrombin-activated platelets markedly increased PAC1 binding even at 500 platelets μL^{-1} , indicating that the attenuation of PAC-1 binding is not because of an artifact of the dilution.

Taken together with the data shown in Fig. 2, these results suggest that released component(s), probably ADP, from thrombin-stimulated platelets are critical for the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation.

Effects of exogenously added ADP on the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation, and measurement of released ADP by HPLC

To further investigate the role of ADP in the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation, we examined the effect of exogenously added ADP on PAC1 binding to platelets at a concentration of 500 platelets μL^{-1} . A series of concentrations of ADP was added to

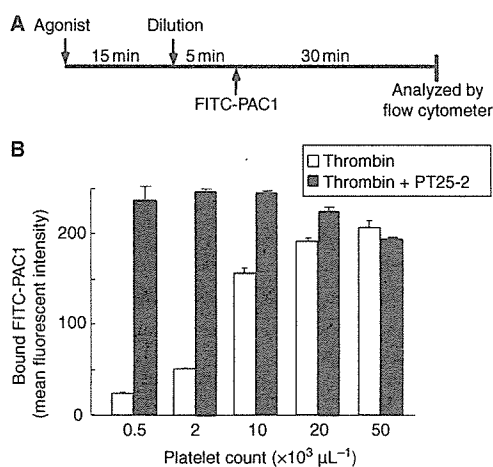


Fig. 3. Effects of platelet dilution on the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation induced by thrombin. (A) Scheme of the experimental procedure to analyze the effects of platelet dilution on the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation. (B) Representative results for specific PAC1 binding to thrombin (0.2 U mL^{-1})-stimulated (open columns) or [thrombin + PT25-2 monoclonal antibody (mAb)]-stimulated platelets (closed columns) at the indicated platelet concentrations (mean \pm SD of triplicates) are shown. Similar results were obtained in at least three independent experiments.

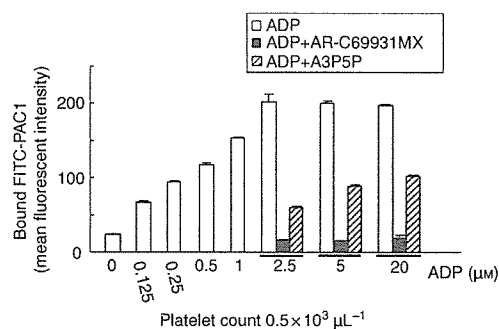


Fig. 4. Effects of exogenously added adenosine 5'-diphosphate (ADP) on the induction of the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation at a platelet concentration of 500 platelets μL^{-1} . After dilution of thrombin (0.2 U mL^{-1})-stimulated platelets to 500 platelets μL^{-1} , the indicated doses of ADP in the absence (open columns) or presence of either 1 μM AR-C69931MX (AR-C, closed columns) or 1 mM A3P5P (shaded columns) were added to the platelet suspension. Representative results for specific PAC1 binding (mean \pm SD of triplicates) are shown. Similar results were obtained in three independent experiments.

the dilution buffer containing 0.2 U mL^{-1} thrombin. As shown in Fig. 4, the amount of PAC1 binding to platelets was positively correlated with the exogenously added ADP concentration. Even $0.125 \mu\text{M}$ ADP significantly increased the PAC1 binding, and only approximately $1 \mu\text{M}$ ADP was sufficient to restore PAC1 binding at 500 platelets μL^{-1} to the levels obtained at 50×10^3 platelets μL^{-1} . The restoration of PAC1 binding by exogenous ADP was almost completely blocked by AR-C69931MX and was partially blocked by A3P5P.

Employing HPLC, we next measured the actual amounts of ADP released from thrombin-stimulated platelets. As shown in Fig. 5, the released ADP concentration was approximately

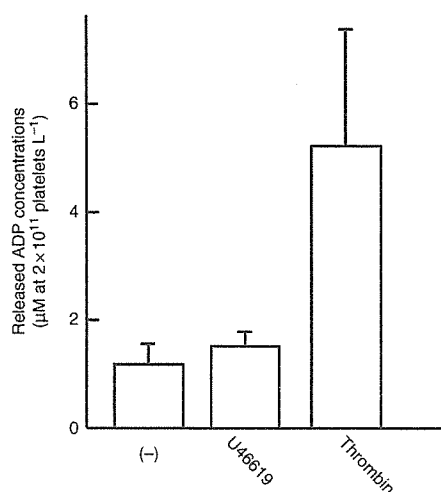


Fig. 5. Measurement of secreted adenosine 5'-diphosphate (ADP) using high-performance liquid chromatography (HPLC). Washed platelets ($200 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) were stimulated with either $5 \mu\text{M}$ U46619 or 0.2 U mL^{-1} thrombin. After 15 min, platelets were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min, and the concentration of ADP in each supernatant was measured using HPLC as described in Materials and methods ($n = 11$).

$5.21 \pm 2.17 \mu\text{M}$ (mean \pm SD, $n = 11$) when platelets were stimulated with 0.2 U mL^{-1} thrombin at 2×10^{11} platelets per liter ($=200 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$). Extrapolation of the data shown in Fig. 5 indicates that an ADP concentration at $50 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ would be approximately $1.30 \mu\text{M}$. These values are compatible with the doses of exogenous ADP that restored the PAC1 binding.

Role of P2Y₁₂ in sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation induced by U46619

We also examined the effect of the released ADP on the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation induced by U46619. The expression levels of CD62P and CD63 as well as the levels of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation on U46619-stimulated platelets were much lower than those on thrombin-stimulated platelets, and not all the platelets expressed CD62P or activated $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. The amount of PAC1 binding was correlated with the CD62P and CD63 expression levels on U46619-stimulated platelets. Again, AR-C69931MX and A3P5P disrupted the U46619-induced sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation by $98.7\% \pm 1.7\%$ and $48.6\% \pm 10.2\%$, respectively (mean \pm SD, $n = 3$) (Fig. 6). The disruption of PAC1 binding was also induced by reduction of the platelet concentration, and supplementation with approximately $0.25 \mu\text{M}$ ADP was sufficient to restore PAC1 binding at 500 platelets μL^{-1} to the levels obtained at 50×10^3 platelets μL^{-1} (Fig. 6). The released ADP concentration induced by U46619 stimulation was only $1.51 \pm 0.06 \mu\text{M}$ at 2×10^{11} platelets per liter (mean \pm SD, $n = 11$, approximately $0.38 \mu\text{M}$ at 50×10^3 platelets μL^{-1}) (Fig. 5). These values are also comparable to the doses of exogenous ADP that restored the PAC1 binding level to that induced by U46619. Moreover, higher levels of exogenous ADP further increased the amount of PAC1 binding. These results demonstrate the critical role of released ADP in the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation on U46619-stimulated as well as thrombin-stimulated platelets.

Role of P2Y₁₂ in the increase of PKC and Rap1B activities in thrombin-stimulated platelets

In order to further clarify the mechanism by which thrombin induces sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation, we examined the effects of AR-C69931MX and A3P5P on the PKC activation induced by thrombin. PKC activation was detected by immunoblot analysis using the antibody specific for phosphorylated serine residues in PKC substrates. As in the experiment shown in Fig. 2A, platelets were stimulated with 0.2 U mL^{-1} thrombin for 15 min, different kinds of antagonists were added for an additional 5 min, and then PKC activation was examined. The phosphorylation of a 47-kDa protein (pleckstrin) was long-lasting, and the addition of AR-C69931MX or A3P5P did not inhibit the phosphorylation of pleckstrin. In contrast, Ro31-8220 markedly inhibited the phosphorylation of pleckstrin (Fig. 7A).

We next examined the activation of Rap1B (GTP-Rap1B) induced by thrombin. Thrombin induced Rap1B activation at

1 min after thrombin stimulation, and the activation was long lasting, even being observed at 30 min (Fig. 7B). In contrast to the PKC activation, AR-C69931MX as well as PGI₂ markedly inhibited the Rap1B activation. However, even in the presence of AR-C69931MX, the addition of epinephrine restored Rap1B activation (Fig. 7C) as well as $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation (data not shown).

Discussion

In the present study, we examined the mechanism by which the high-affinity state of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ is maintained on platelets stimulated with thrombin or U46619 even in the absence of ligand binding. The long-lasting activation of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ induced by thrombin or U46619 was inhibited by $1 \mu\text{M}$ AR-C69931MX by 92% and 99%, and by 1 mM A3P5P by 38% and 49%, respectively. Only negligible inhibitory effects were observed with the tested antagonists for adrenergic receptor, 5-HT receptor or thromboxane A₂ receptor. The $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation was also inhibited by the dilution of the platelet preparation. The disruption of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation by the dilution was abrogated by the addition of small amounts of exogenous ADP. The concentrations of ADP required for the restoration of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation at 500 platelets μL^{-1} were similar to those of endogenous ADP released from activated platelets [24]. These findings demonstrate that G_q- and G_{12/13}-mediated signaling pathways are not sufficient for the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation, and the interaction of secreted ADP with its receptors, especially P2Y₁₂, is necessary for the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation induced by thrombin or U46619.

van Willigen and Akkerman have suggested that the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation is tightly controlled by PKC and a cyclic AMP-sensitive process [11]. However, AR-C69931MX disrupted the $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation without inhibiting PKC activation when it was added 15 min after stimulation. Thus, P2Y₁₂-mediated signaling seems to be a downstream event from PKC activation. PKC activation induces ADP release from dense granules, and then the released ADP additionally induces P2Y₁₂-mediated signaling which is essential for the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation. $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation was not disturbed by inhibiting thrombin by treatment with hirudin, suggesting that a transient interaction between thrombin and thrombin receptors (PAR-1 and PAR-4) is sufficient for the sustained activation. In sharp contrast, the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation could be disrupted by inhibiting P2Y₁₂-mediated signaling even in the presence of thrombin. Desensitization of P2Y₁₂ has recently been demonstrated [25]. However, it is likely that the degree of desensitization is not enough to reduce $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation under our experimental conditions, as the amounts of activated $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ did not alter even after 15 min of thrombin stimulation. Recently, unique regulation and relocalization of P2Y₁₂ after activation have been demonstrated. Although a substantial amount of P2Y₁₂ was rapidly and transiently internalized, most of the P2Y₁₂ receptors remained at the plasma membrane even after ADP stimulation [26]. Taken together, these findings indicate that the P2Y₁₂ remains

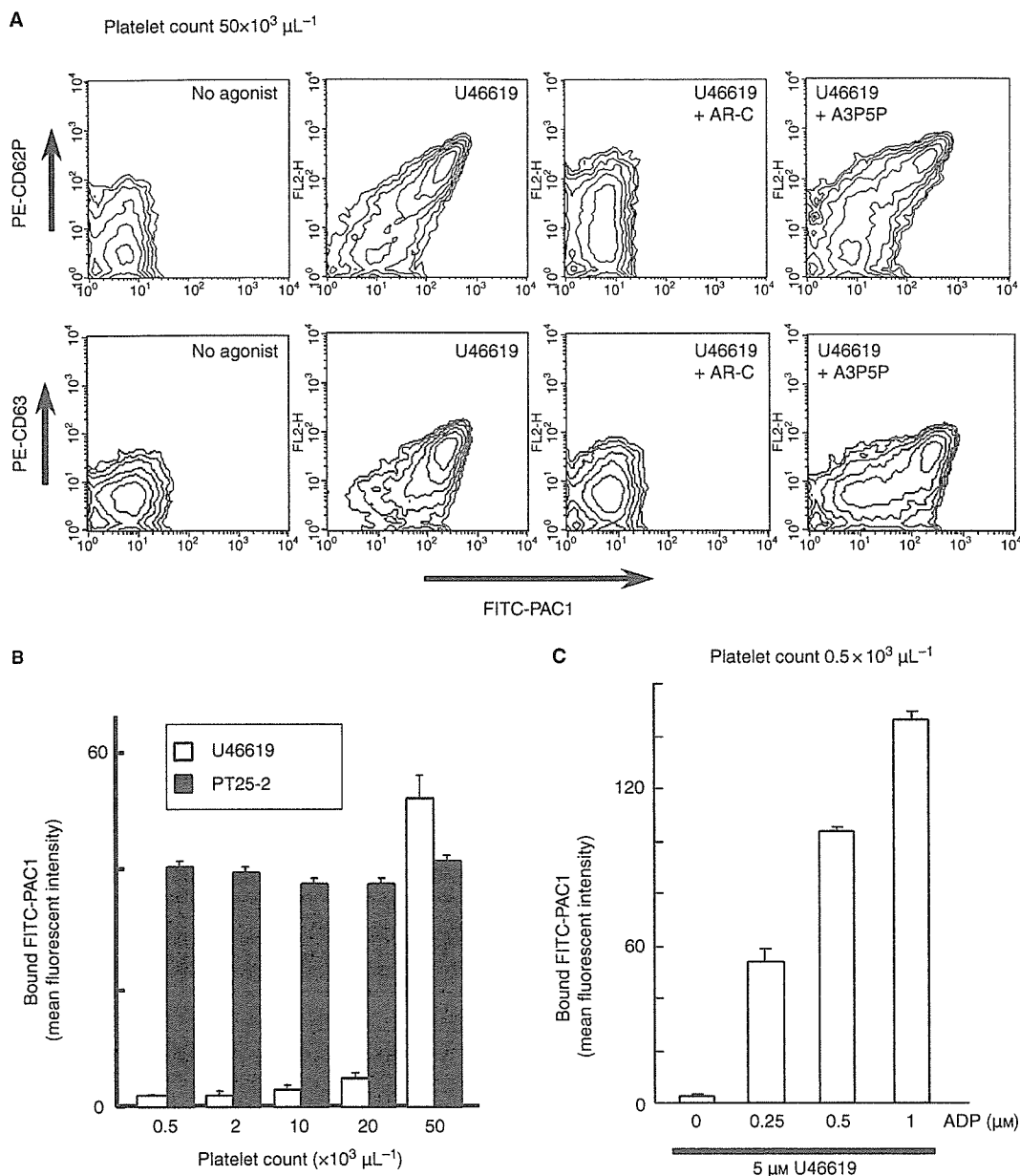


Fig. 6. Sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation on platelets stimulated with U46619. (A) Experiments were performed as in Fig. 2 using $5 \mu\text{M}$ U46619 instead of thrombin. One micromolar AR-C69931MX (AR-C) or 1 mM A3P5P was added to U46619 ($5 \mu\text{M}$)-stimulated platelets. Representative results obtained using flow cytometry for PAC1 binding and CD62P or CD63 expression are shown. (B) Effects of platelet dilution on the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation induced by U46619. Representative results for specific PAC1 binding to U46619 ($5 \mu\text{M}$)-stimulated (open columns) or PT25-2-treated platelets (closed columns) at the indicated platelet concentrations (mean \pm SD of triplicates) are shown. Similar results were obtained in three independent experiments. (C) Effects of exogenously added ADP on the induction of the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation on U46619-stimulated platelets at a concentration of $500 \mu\text{L}^{-1}$. The indicated doses of ADP were added to the U46619-stimulated platelet suspension.

functional after thrombin stimulation and continuous interaction between P2Y₁₂ and the released ADP is critical for the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation.

To further clarify the mechanism of the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation by thrombin, we examined the activation of small GTPase Rap 1B during the sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation, as Rap 1B has recently been demonstrated to be a regulator of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation in platelets [27]. In response to calcium and DAG, CalDAG-GEFI activates Rap 1B by promoting the release of

GDP and the loading of GTP. Both Rap 1B-null mice and CalDAG-GEFI-null mice show impaired $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation in response to different kinds of agonists [28,29]. Thrombin induced sustained Rap 1B activation under our experimental conditions. However, the addition of AR-C69931MX as well as PGI₂ after a 15-min stimulation disrupted the sustained Rap 1B activation and $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation. Because G_z-mediated signaling induced by epinephrine could activate $\alpha_{IIb}\beta_3$ in P2Y₁₂-deficient mice [30], we examined the effect of

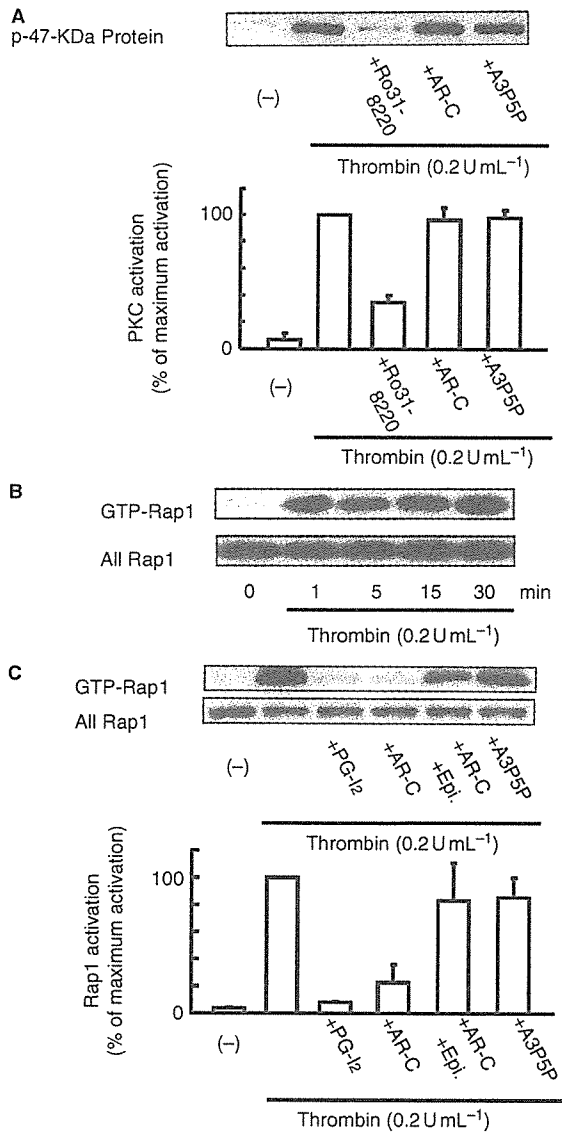


Fig. 7. Effects of P2Y₁₂ antagonist on protein kinase C (PKC) and Rap1B activation. (A) (upper panel) Washed platelets ($200 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) were stimulated with 0.2 U mL^{-1} thrombin, and 15 min later $5 \mu\text{M}$ Ro31-8220, $1 \mu\text{M}$ AR-C69931MX (AR-C), or 1 mM A3P5P was added to the activated platelets. After 5 min, the platelets were lysed, and PKC activation was detected by immunoblotting using antiphosphoserine PKC substrate antibody. The phosphorylation of a 47-kDa protein (pleckstrin) is shown. (lower panel) Optical density of the 47-kDa band was measured using NIH IMAGE software, and relative % compared with PKC activation without antagonist (maximum activation) is shown (mean \pm SD, $n = 3$). (B) Washed platelets ($200 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) were stimulated with 0.2 U mL^{-1} thrombin, and Rap1B activation was detected by the pull-down assay using GST-RalGDS-RBD followed by incubation with rabbit anti-Rap1B polyclonal antibody at indicated time points. Total Rap1B in each lysate was detected in parallel. (C) (upper panel) Washed platelets ($200 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) were stimulated with 0.2 U mL^{-1} thrombin, and 15 min later $1 \mu\text{M}$ PGI₂, $1 \mu\text{M}$ AR-C69931MX (AR-C), $1 \mu\text{M}$ AR-C + $10 \mu\text{M}$ epinephrine, or 1 mM A3P5P was added to the activated platelets. After 5 min, the platelets were lysed, and then Rap1B activation was examined. (lower panel) Optical density of activated Rap1B was measured using NIH IMAGE software, and relative % compared with Rap1B activation without antagonist (maximum activation) is shown (mean \pm SD, $n = 3$).

epinephrine under our experimental conditions. Interestingly, the addition of epinephrine induced Rap1B activation even in the presence of AR-C69931MX. Thus, our data demonstrate that there is a close relationship between the sustained $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation and Rap1B activation. Our data are consistent with previous reports that G_i-mediated signaling is necessary for Rap1B activation [31,32] and also demonstrate for the first time that the continuous stimulation of G_i-mediated signaling is needed for the sustained Rap1B activation. The patient with P2Y₁₂ deficiency (OSP-1) showed the markedly impaired PAC-1 binding in response to different kinds of agonists except for PMA, which is similar to CalDAG-GEFI-null mice [28]. It is possible that PMA may induce CalDAG-GEFI (and Rap1B)-independent signaling pathways to induce and sustain $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation [28].

Our present findings also indicate important cautions regarding $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ligand binding assays. Platelet concentrations and the timing of ligand incubation could influence the ligand-binding capacity of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. This is especially true of U46619 stimulation, because the amount of ADP released from U46619-stimulated platelets was much lower than that released from thrombin-stimulated platelets. Indeed, the ligand-binding capacity of U46619-stimulated platelets was dramatically influenced by the platelet concentration. In addition, the presence of leukocytes in PRP or whole blood may also modify the results, as leukocyte ecto-nucleotidase (CD39) influences the metabolism of released ADP [33]. Thus, several factors influencing the concentration of released ADP should be taken into account during $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ligand-binding assays.

A number of studies, including ours, have demonstrated the important role of P2Y₁₂ in thrombus stability [17,30,34]. Moreover, recent *in vivo* observations demonstrated that during platelet thrombus formation, circulating platelets were tethered to the luminal surface of growing thrombi by VWF-GPIb interaction. However, more than 95% of tethered platelets were subsequently translocated and/or detached [35,36]. In this study, we obtained the novel finding that the $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation could not be sustained at a low concentration of platelets ($500 \text{ platelets } \mu\text{L}^{-1}$) without exogenous ADP. Activated $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ on the detached platelets should become inactivated, because the released ADP is immediately diluted by the blood flow. At the luminal surface, activated $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ on the tethered platelets would be maintained only when the platelets are continuously exposed to ADP released from adjacent activated platelets. At the inside of growing thrombi, it appears that platelets are constantly exposed to such high concentrations of released ADP that $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ can be maintained in its high-affinity state in concert with the effects of thrombin and TXA₂. It is possible that ADP concentrations surrounding platelets may largely influence on determining whether platelets participate in thrombus formation or not. Thus, P2Y₁₂ may serve as a sensor for thrombogenic status surrounding individual platelets.

In summary, our data demonstrate that the continuous interaction between released ADP and P2Y₁₂ is critical for

sustained $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation in platelets activated via G_q and G_{12/13}-coupled receptors.

Acknowledgements

This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan, from the Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan; and by a grant from Mitsubishi Pharma Research Foundation, Osaka, Japan.

References

- Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991; **65**: 359–62.
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; **110**: 673–87.
- Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004; **104**: 1606–15.
- George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood* 1990; **75**: 1383–95.
- Tomiyama Y. Glanzmann thrombasthenia: integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ deficiency. *Int J Hematol* 2000; **72**: 448–54.
- Coller BS. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1467–70.
- Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet* 1999; **353**: 227–31.
- Takagi J, Petre B, Walz T, Springer T. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002; **110**: 599–611.
- Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA. New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* 2003; **102**: 1155–9.
- Peerschke EIB. Ca⁺² mobilization and fibrinogen binding of platelets refractory to adenosine diphosphate stimulation. *J Lab Clin Med* 1985; **106**: 111–22.
- van Willigen G, Akkerman JW. Regulation of glycoprotein IIB/IIIa exposure on platelets stimulated with α -thrombin. *Blood* 1992; **79**: 82–90.
- Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 222–32.
- Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 2004; **113**: 340–5.
- Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, Koller BH. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y₁-deficient mice. *Nat Med* 1999; **5**: 1199–202.
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; **409**: 202–7.
- Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, Zhai Y, Smith MD, Lachowicz JE, Zhang FL, Gustafson E, Monsma Jr FJ, Wiekowski MT, Abbondanzo SJ, Cook DN, Bayne ML, Lira SA, Chintala MS. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest* 2001; **107**: 1591–8.
- Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Impaired platelet function in a patient with P2Y₁₂ deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 2315–23.
- Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 1985; **260**: 11107–14.
- Maruyama K, Kinami J, Sugita Y, Takada Y, Sugiyama E, Tsuchihashi H, Nagatomo T. MCI-9042: high affinity for serotonergic receptors as assessed by radioligand binding assay. *J Pharmacobiodyn* 1991; **14**: 177–81.
- Tokuhira M, Handa M, Kamata T, Oda A, Katayama M, Tomiyama Y, Murata M, Kawai Y, Watanabe K, Ikeda Y. A novel regulatory epitope defined by a murine monoclonal antibody to the platelet GPIIb-IIIa complex ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin). *Thromb Haemost* 1996; **76**: 1038–46.
- Honda S, Tomiyama Y, Aoki T, Shiraga M, Kurata Y, Seki J, Matsuzawa Y. Association between ligand-induced conformational changes of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated intracellular Ca²⁺ signaling. *Blood* 1998; **92**: 3675–83.
- Shiraga M, Tomiyama Y, Honda S, Suzuki H, Kosugi S, Tadokoro S, Kanakura Y, Tanoue K, Kurata Y, Matsuzawa Y. Involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in inside-out signaling through the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Blood* 1998; **92**: 3710–20.
- Nylander S, Mattsson C, Ramstrom S, Lindahl TL. The relative importance of the ADP receptors, P2Y₁₂ and P2Y₁, in thrombin-induced platelet activation. *Thromb Res* 2003; **111**: 65–73.
- D'Souza L, Glueck HI. Measurement of nucleotide pools in platelets using high pressure liquid chromatography. *Thromb Haemost* 1977; **38**: 990–1001.
- Hardy AR, Conley PB, Luo J, Benovic JL, Poole AW, Mundell SJ. P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms. *Blood* 2005; **105**: 3552–60.
- Baurand A, Eckly A, Hechler B, Kauffenstein G, Galzi JL, Cazenave JP, Leon C, Gachet C. Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? *Mol Pharmacol* 2005; **67**: 721–33.
- Bertoni A, Tadokoro S, Eto K, Pampori N, Parise LV, White GC, Shattil SJ. Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2002; **277**: 25715–21.
- Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD, Housman DE, Graybiel AM. Ca/DAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat Med* 2004; **10**: 982–6.
- Chrzanoska-Wodnicka M, Smyth SS, Schoenwaelder SM, Fischer TH, White GC. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *J Clin Invest* 2005; **115**: 680–7.
- Andre P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, Koller B, Phillips DR, Conley PB. P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 2003; **112**: 398–406.
- Lova P, Paganini S, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M. A G_i-dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets. *J Biol Chem* 2002; **277**: 12009–15.
- Woulfe D, Jiang H, Mortensen R, Yang J, Brass LF. Activation of Rap1B by G_i family members in platelets. *J Biol Chem* 2002; **277**: 23382–90.
- Heptinstall S, Johnson A, Glenn JR, White AE. Adenine nucleotide metabolism in human blood – important roles for leukocytes and erythrocytes. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 2331–9.
- Remijn JA, Wu YP, Jenning EH, IJsseldijk MJ, van Willigen G, de Groot PG, Sixma JJ, Nurden AT, Nurden P. Role of ADP receptor P2Y₁₂ in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**: 686–91.
- Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest* 2000; **105**: 783–91.
- Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 2003; **197**: 41–9.

Japanese Ardisia herb 由来の embelin が BIR3 と結合し、抗がん剤などによるがん細胞のアポトーシスを増強することを見いだした¹⁷⁾。

6. おわりに

IAP ファミリータンパク質の中でもカスパーゼ阻害活性が強く、その分子機構がよく解析されている XIAP が、がん治療の新しい分子標的となる可能性が示された。他の IAP についてもがん細胞で過剰発現している例が多いことから、XIAP と同様のがん治療の分子標的となる可能性が考えられる。

- 1) Salvesen, G.S. & Duckett, C.S. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 401-410
- 2) Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., & Reed, J.C. (1997) *Nature* **388**, 300-304
- 3) Riedl, S.J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C., & Salvesen, G.S. (2001) *Cell* **104**, 791-800
- 4) Deveraux, Q.L., Leo, E., Stennicke, H.R., Welsh, K., Salvesen, G.S., & Reed, J.C. (1999) *EMBO J.* **18**, 5242-5251
- 5) Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000) *Cell* **102**, 33-42
- 6) Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., & Takahashi, R. (2001) *Mol. Cell* **8**, 613-621
- 7) Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., & Alnemri, E.S. (2001) *Nature* **410**, 112-116
- 8) Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., & Takahashi, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8662-8667
- 9) Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., & Reed, J.C. (1997) *EMBO J.* **16**, 6914-6925
- 10) Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M., & Ashwell, J.D. (2000) *Science* **288**, 874-877
- 11) Hao, Y., Sekine, K., Kawabata, A., Nakamura, H., Ishiooka, T., Ohata, H., Katayama, R., Hashimoto, C., Zhang, X., Noda, T., Tsuruo, T., & Naito, M. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 849-860
- 12) Bartke, T., Pohl, C., Pyrowolakakis, G., & Jentsch, S. (2004) *Mol. Cell* **14**, 801-811
- 13) Qiu, X.B., Markant, S.L., Yuan, J., & Goldberg, A.L. (2004) *EMBO J.* **23**, 800-810
- 14) Schimmer, A.D., Welsh, K., Pinilla, C., Wang, Z., Krajewska, M., Bonneau, M.J., Pedersen, I.M., Kitada, S., Scott, F.L., Bailly-Maitre, B., Glinsky, G., Scudiero, D., Sausville, E., Salvesen, G., Nefzi, A., Ostresh, J.M., Houghten, R.A., & Reed, J.C. (2004) *Cancer Cell* **5**, 25-35
- 15) Wu, T.Y., Wagner, K.W., Bursulaya, B., Schultz, P.G., & Deveraux, Q.L. (2003) *Chem. Biol.* **10**, 759-767
- 16) Li, L., Thomas, R.M., Suzuki, H., De Brabander, J.K., Wang, X., & Harran, P.G. (2004) *Science* **305**, 1471-1474

- 17) Nikolovska-Coleska, Z., Xu, L., Hu, Z., Tomita, Y., Li, P., Roller, P.P., Wang, R., Fang, X., Guo, R., Zhang, M., Lippman, M.E., Yang, D., & Wang, S. (2004) *J. Med. Chem.* **47**, 2430-2440

内藤 幹彦

(東京大学分子細胞生物学研究所)

Molecular mechanism of apoptosis inhibition by IAPs and its implication to cancer therapy

Mikihiko Naito (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan)

血小板血栓形成を制御するメタロプロテアーゼ ADAMTS-13

1. はじめに

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) は約 80 年前に初めて報告された疾患で、迅速に治療を施さなければ早期に致死経過を辿る。血小板減少と溶血性貧血が主症状であるが、細小血管の血栓性閉塞がしばしば腎臓や中枢神経などに機能障害を併発させる。患者の血漿には、血小板接着タンパク質フォンビルブランド因子 (VWF) が異常高分子量で検出される。血管内皮細胞で合成された VWF は、血小板凝集活性の高い超高分子量ホモマルチマーとして血中に分泌されるが、通常、適度に断片化されることで活性が調節されている。近年、VWF の断片化を担う酵素として ADAMTS-13 が同定され、本酵素活性の欠乏が TTP の原因となることが明らかになった (図 1)¹⁾。本稿では ADAMTS-13 の構造と機能を中心に概説し、さらに、我々が作製した ADAMTS-13 欠損マウスの解析結果を紹介し、本酵素の欠損と TTP 発症との関連について考察する。

2. ADAMTS ファミリー

ADAMTS-13 は亜鉛型メタロプロテアーゼであり、ADAMTS (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif) ファミリーに属する。このファミリーは ADAM ファミリーの亜型であり、トロンボスポンジン 1 型モチーフ (Tsp1) をもつという点で特徴づけられる。ADAM ファミリーのほとんどが膜貫通型

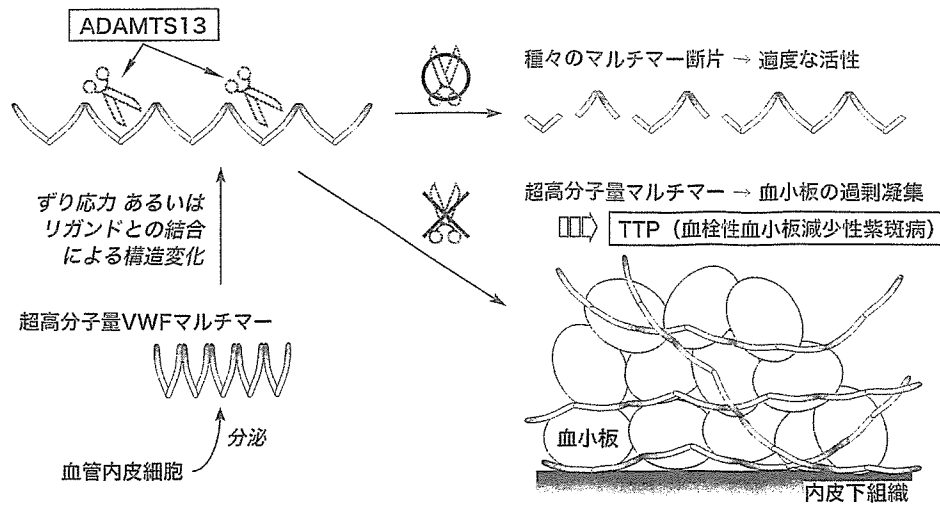


図1 ADAMTS-13と血小板血栓形成

血管内皮細胞から分泌されたVWFは、数十個のサブユニットがジスルフィド結合で連結した超高分子量マルチマーを形成している。マルチマーのサイズが大きいかほど血小板凝集活性は高く、ADAMTS-13による断片化で活性が調節されている。ADAMTS-13活性が低下して超高分子量VWFマルチマーが残存すると、細小血管内で血小板が過剰凝集し、TTP発症へつながる。

プロテアーゼであるのに対し、ADAMTSはすべて細胞外分泌型である。ヒトゲノムには19個のADAMTS遺伝子(ADAMTS1~20, 5と11は同一)が存在する。細胞外マトリックスの構築や分解、血管新生、生殖、臓器形成などに関与すると考えられているが、それぞれの分子機能には多くの不明点が残されている。

ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, 15には軟骨特異的プロテオグリカンであるアグリカンを切断する活性が見いだされており、特にADAMTS-4, 5の活性が高い。関節疾患でみられるアグリカン異常分解には主としてADAMTS-5が関わっており、治療薬開発の標的として注目されている²⁾。ADAMTS-2, 3, 14にはプロコラーゲンのプロペプチドを切断する活性があり、ADAMTS-2の欠乏は皮膚の脆弱性を特徴とするEhlers-Danlos症候群VIIc型を発症させる³⁾。また、ADAMTS-10は短軀や短指、関節硬化、水晶体異常を示すWeill-Marchesani症候群の責任遺伝子である⁴⁾。ADAMTS-13は、ファミリー内で最も配列相同性が低く、止血機構の制御という特異的な役割を担う。

3. ADAMTS-13のドメイン構造

ヒトADAMTS-13は1,427アミノ酸残基からなり(図2)、主に肝臓の星細胞で合成されている⁵⁾。他の分泌型プロテアーゼと同様、N末端にシグナル配列とプロペプチ

ドをもつプレプロ酵素として翻訳される。ADAMTS-13のプロペプチドにはゴルジ体局在プロテアーゼfurinの標的となる配列RX(K/R)Rが存在し、細胞外へ分泌される過程で切断除去される。ADAMTSのプロペプチドは、細胞内で酵素活性を抑制する内在性インヒビターとして、あるいは自身のフォールディングを介助する内在性分子シャペロンとして働く。しかし、ADAMTS-13のプロペプチドは例外的に短く、このような機能をもたない⁶⁾。プロペプチドが切断されないADAMTS-13変異体も分泌可能で、しかもVWF切断活性を保持している。ADAMTS-13のプロペプチドの役割は今のところ不明である。

循環血液中の成熟型ADAMTS-13のN末端はメタロプロテアーゼ触媒ドメインであり、他のADAMTSメンバーと同様、reprolysin型の亜鉛結合配列HEXXHXXGX-XHDをもつ。触媒ドメインのC末端側には、ヘビ毒ディスプレインに類似するディスプレイン様ドメイン、約50残基からなるTsp1、ADAMTSメンバー間で相同性の高いシステインリッチドメイン、Cysを含まないスペーサードメインといったADAMTS共通のドメインが続く(図2)。ADAMTSの多くはC末端側にさらに複数のTsp1をもっており、ADAMTS-13では7個連続している。そのC末端側に続く2個のCUB(cplement C1r/C1s, Uegf, and Bmp1)ドメインは他のADAMTS

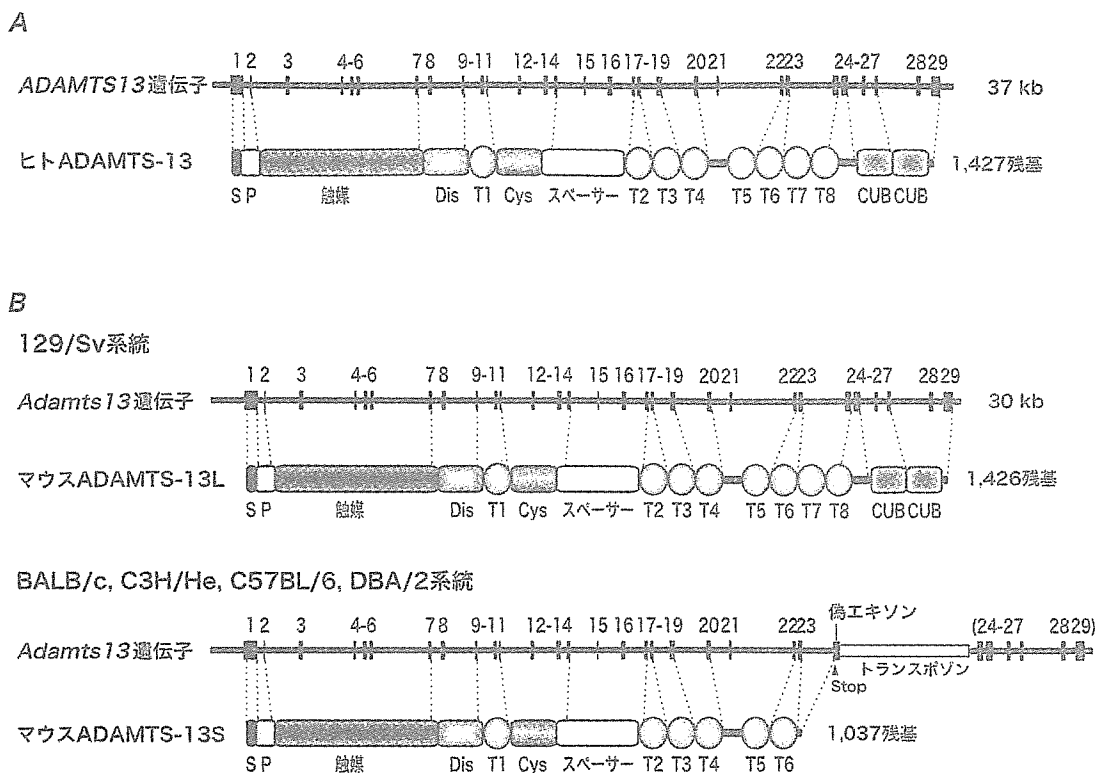


図2 ADAMTS-13の構造

(A) ヒト ADAMTS-13 (B) マウス ADAMTS-13 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: Tsp1-1~Tsp1-8, Cys: システインリッチドメイン.

メンバーにない構造である。ADAMTS-13はN型およびO型糖鎖で修飾されているが、それらの役割はまだ解明されていない。

4. C末端ドメインの役割

ADAMTS-13がVWF切断活性を発揮するには、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^{7,8)}。また、後天性TTPの発症原因は主にADAMTS-13に対する自己抗体の出現であるが、その主要エпитープはシステインリッチおよびスペーサードメインに集中している⁷⁾。したがって、システインリッチ/スペーサードメインはADAMTS-13の酵素機能にとってきわめて重要であると考えられる。

一方、スペーサードメインのC末端側に続く7個のTsp1と2個のCUBドメインは、少なくとも*in vitro*でのVWF切断活性に必須でない⁷⁻⁹⁾。しかし、CUB欠失によりVWF親和性が低下する¹⁰⁾、CUB配列由来のペプチドによってVWF切断が阻害される¹¹⁾という報告もある。

このような一見相反する現象を説明するために、以下の仮説が提唱されている。すなわち、ADAMTS-13のCUBドメインに第1のVWF結合部位が、別のドメイン(スペーサードメイン?)に第2のVWF結合部位が存在し、後者は分子内部に隠れている。第1結合部位にVWFが結合すると、第2結合部位が露出し、この部位を介した結合がVWF切断を可能にするという説である¹¹⁾。正か否か、今後の検証が必要である。

5. マウス ADAMTS-13

我々はマウスADAMTS-13のcDNAをクローニングし、遺伝子構造を明らかにした¹²⁾。意外なことに、マウスでは系統特異的に2種類のADAMTS-13が発現していた。129/Sv系統の*Adamts13*遺伝子は、ヒトと同様、29個のエクソンからなり、1,426アミノ酸残基のADAMTS-13をコードしている。ドメイン構成はヒトと同一である(図2)。一方、BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2系統では、第23エクソンの下流に停止コドンを含むレトロ

トランスポゾン配列が挿入しており、2個の Tsp1 と2個の CUB を欠失した 1,037 残基の ADAMTS-13 が発現している。非近交系種である ICR, 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、個体によって異なる ADAMTS-13 を発現する。両タイプとも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。この自然発生的な欠失変異を利用することで、C 末端領域の *in vivo* での役割を解明できるかもしれない。

6. ADAMTS-13 の酵素学的性質

ADAMTS-13 の生理的基質として同定されているのは VWF のみで、切断部位は VWF の A2 ドメインに存在する Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ 間ペプチド結合である。切断は部分的に起こるため、様々なサイズの VWF マルチマー断片 (500-20,000 kDa) が生じる。

ADAMTS-13 による VWF 切断反応を *in vitro* で効率良く進めるには、適度な濃度のタンパク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。反応液を毛細管に通すことで高圧応力を与えると VWF が切断されやすくなるという現象も、VWF の構造変化に起因すると解釈される。

VWF の切断に2価金属イオンが必要であることは以前から知られていた。最近 Anderson らによって、ADAMTS-13 の活性に対する金属イオンの効果が詳細に検討された¹³⁾。ADAMTS-13 は Zn²⁺ および Ca²⁺ によって相乗的に活性化される。触媒ドメインに保存されている Zn²⁺ 結合モチーフに Zn²⁺ が、それ以外の領域に Ca²⁺ が結合すると考えられる。

至適反応条件における VWF の見かけの K_m は約 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり¹³⁾、ヒト血漿の VWF 濃度 (5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に近い。一方、ADAMTS-13 の特異的基質となる VWF 最小領域 Asp¹⁵⁹⁶-Arg¹⁶⁶⁸ を利用した合成基質 FRET-S-VWF73¹⁴⁾ の K_m は、VWF 全長より 200 倍も大きい。VWF の切断部位の立体構造あるいは切断部位周辺の配列が ADAMTS-13 との親和性に寄与しているらしい。

7. ADAMTS-13 欠損マウス

我々は ADAMTS-13 欠損マウスを作製し、表現型を解析した¹⁵⁾。先天性 ADAMTS-13 欠損患者と同様、マウスでも ADAMTS-13 の欠損によって血漿に超高分子量 VWF マルチマーが残存した (図 3 A)。しかし、予想された TTP 症状 (血小板減少や溶血性貧血など) は見られず、少なくとも通常飼育下では正常に誕生し発育した。

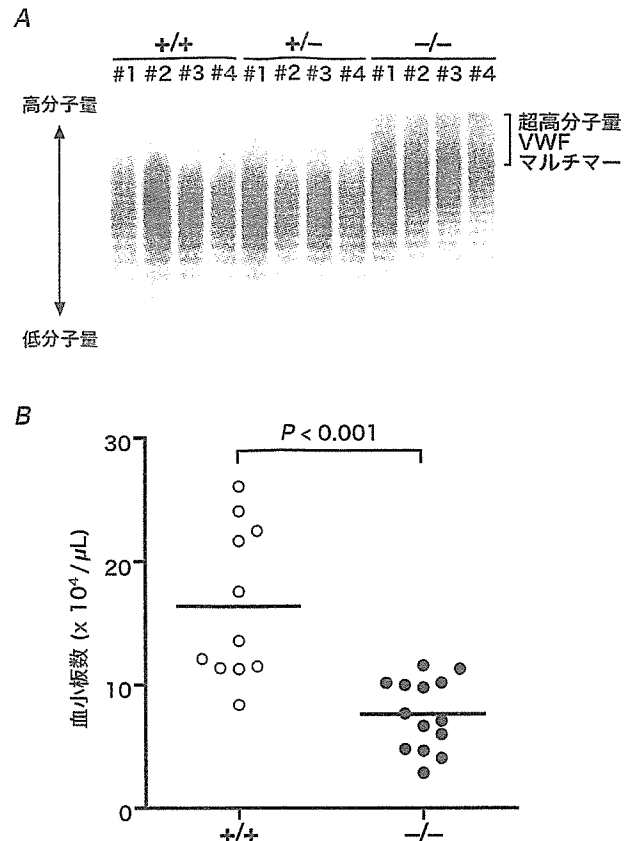


図 3 ADAMTS-13 欠損マウスの表現型

(A) 血漿 VWF マルチマー。野生型マウス (+/+), ADAMTS-13 ヘテロ欠損マウス (+/-), ADAMTS-13 ホモ欠損マウス (-/-) 各 4 個体の血漿を SDS-アガロース電気泳動に供し、抗 VWF 抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。ホモ欠損マウスの血漿には超高分子量 VWF マルチマーが残存している。(B) コラーゲン静脈注射後の血小板数。野生型 (+/+) および ADAMTS-13 ホモ欠損マウス (-/-) の尾静脈からコラーゲン溶液を投与し、15 分後の血小板数を測定した。コラーゲン投与前の血小板数は群間で同等であったが (平均値 \pm SD, +/+ ; $83.7 \pm 3.3 \times 10^4 / \mu\text{L}$, $N=4$, -/- ; $86.2 \pm 3.3 \times 10^4 / \mu\text{L}$, $N=4$, コラーゲン投与後の血小板数はホモ欠損群で有意に低かった (+/+ ; $16.4 \pm 6.2 \times 10^4 / \mu\text{L}$, $N=11$, -/- ; $7.7 \pm 2.9 \times 10^4 / \mu\text{L}$, $N=14$)。横バーは各群の平均値を示す。

そこで、血液を用いた *in vitro* 実験として、ざり応力下血小板血栓形成を観察した結果、欠損マウスでは血小板凝集能が亢進していること、すなわち易血栓形成傾向になっていることがわかった。マウス個体にコラーゲンを静脈注射すると血管内で血小板が凝集し蓄積するため、循環血中に流れる血小板数が減少する。ADAMTS-13 欠損マウスにこの処理を行ったところ、野生型に比べて顕著な血小板

減少が観察された (図3B)。つまり, ADAMTS-13 欠損は潜在的な易血栓形成傾向をもたらすが, それだけではTTP発症に至らず, 何らかの付加的要因が必要であるらしい。

ADAMTS-13 が同定される以前, VWF 切断酵素欠損症=TTP という考えが主流であった。しかし, マウスにおいてADAMTS-13 欠損はTTP発症の十分条件ではなかった。もちろん, マウスの解析結果をそのままヒトTTPの解釈に適用するわけにはいかない。止血機構におけるADAMTS-13 やVWFの重要度にヒトとマウスで大きな違いがあるかもしれない。しかし, ADAMTS-13/TTP研究が進むにつれて, ヒトにおいてもADAMTS-13 活性欠損以外の要因が関わるという考えが主流になってきた。例えば, 妊娠によってはじめて症状が表面化する先天性ADAMTS-13 欠損症例, 同じADAMTS13 変異を保有しながら発症時期や重症度が異なる症例⁶⁾などが報告されている。酸化ストレスなどによる内皮細胞の機能障害がTTP発症に関与するという報告もある。ADAMTS-13 活性低下によるVWFの機能亢進と内皮細胞の機能障害が同時に起こることで, TTPが誘発されるのかもしれない。

8. おわりに

2001年に同定されて以来, ADAMTS-13に関する研究が精力的に進められ, ADAMTSファミリーの中で最もよく調べられた分子の一つとなっている。酵素学的特性やドメイン機能に関する報告も増加しており, 今後は立体構造解析なども進むであろう。従来は煩雑で時間のかかった活性測定も, 種々の改良法が報告されている。我々は簡便な操作で測定できる蛍光法を開発した¹⁴⁾。一方, TTP患者の臨床情報が蓄積されるにつれ, ADAMTS-13 欠損をTTP発症の十分条件とする考えに合致しない症例が増えてきた。TTP発症を促進する要因の探索が必要と思われる。ADAMTS-13 欠損マウスを解析することで, それを明らかにできるかもしれない。

- 1) Levy, G.G., Nichols, W.C., Lian, E.C., Foroud, T., McClintick, J.N., McGee, B.M., Yang, A.Y., Siemieniak, D.R., Stark, K.R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S.B., Chandrasekaran, V., Stabler, S.P., Sabio, H., Bouhassira, E.E., Upshaw, J.D. Jr., Ginsburg, D., & Tsai, H.M. (2001) *Nature* **413**, 488-494
- 2) Glasson, S.S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B., Blanchet, T., Ma, H.L., Flannery, C.R., Peluso, D., Kanki, K., Yang, Z., Majumdar, M.K., & Morris, E.A. (2005) *Nature*

434, 644-648

- 3) Colige, A., Sieron, A.L., Li, S.W., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., Wilcox, W., Krakow, D., Cohn, D.H., Reardon, W., Byers, P.H., Lapiere, C.M., Prockop, D.J., & Nusgens, B.V. (1999) *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 308-317
- 4) Dagoneau, N., Benoist-Lassel, C., Huber, C., Faivre, L., Megarbane, A., Alswaid, A., Dollfus, H., Alembik, Y., Munnich, A., Legeai-Mallet, L., & Cormier-Daire, V. (2004) *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 801-806
- 5) Uemura, M., Tatsumi, K., Matsumoto, M., Fujimoto, M., Matsuyama, T., Ishikawa, M., Iwamoto, T.A., Mori, T., Wanaka, A., Fukui, H., & Fujimura, Y. (2005) *Blood* **106**, 922-924
- 6) Majerus, E.M., Zheng, X., Tuley, E.A., & Sadler, J.E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 46643-46648
- 7) Soejima, K., Matsumoto, M., Kokame, K., Yagi, H., Ishizashi, H., Maeda, H., Nozaki, C., Miyata, T., Fujimura, Y., & Nakagaki, T. (2003) *Blood* **102**, 3232-3237
- 8) Zheng, X., Nishio, K., Majerus, E.M., & Sadler, J.E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 30136-30141
- 9) Tao, Z., Wang, Y., Choi, H., Bernardo, A., Nishio, K., Sadler, J.E., López, J.A., & Dong, J.F. (2005) *Blood* **106**, 141-143
- 10) Majerus, E.M., Anderson, P.J., & Sadler, J.E. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 21773-21778
- 11) Tao, Z., Peng, Y., Nolasco, L., Cal, S., López-Otin, C., Li, R., Moake, J.L., López, J.A., & Dong, J.F. (2005) *Blood* **106**, 4139-4145
- 12) Banno, F., Kaminaka, K., Soejima, K., Kokame, K., & Miyata, T. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 30896-30903
- 13) Anderson, P.J., Kokame, K., & Sadler, J.E. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 850-857
- 14) Kokame, K., Nobe, Y., Kokubo, Y., Okayama, A., & Miyata, T. (2005) *Br. J. Haematol.* **129**, 93-100
- 15) Banno, F., Kokame, K., Okuda, T., Honda, S., Miyata, S., Kato, H., Tomiyama, Y., & Miyata, T. (2006) *Blood* **107**, 3161-3166
- 16) Furlan, M. & Lämmle, B. (2001) *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **14**, 437-454

坂野 史明, 小亀 浩市
(国立循環器病センター研究所)

ADAMTS-13 is a metalloprotease that regulates platelet aggregation in hemostasis
Fumiaki Banno and Koichi Kokame (National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

ADAMTS13の測定

小亀浩市 国立循環器病センター研究所 脈管生理部 血栓研究室 室長

Koichi Kokame Laboratory Chief, National Cardiovascular Center Research Institute

SUMMARY

ADAMTS13は、フォンビルブランド因子を切断する酵素である。遺伝子変異や自己抗体の出現などによるADAMTS13活性の著減は、時に血小板の過剰凝集を引き起こす。血栓性微小血管障害症や播種性血管内凝固症候群など、血小板減少を呈する病態の鑑別診断や治療経過の観察、予後予測において、ADAMTS13は重要な指標になると考えられている。最近の研究成果により、ADAMTS13の活性や抗原量を測定することが容易になってきた。本稿では、ADAMTS13に関する知見を概説するとともに、種々のADAMTS13測定法を紹介する。

はじめに

2001年、止血反応に重要な役割を果たす新役者ADAMTS13(a disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 13)の一次構造が相次いで報告された¹⁾⁻³⁾。ドメイン構成の共通性からADAMTSファミリーに分類され、公式遺伝子シンボルは*Adamts13*と決定された。

ADAMTS13はフォンビルブランド因子(von Willebrand factor: VWF)切断酵素である。1996年に報告された酵素活性測定法⁴⁾⁵⁾によって、活性で酵素を追跡できるようになり、単離精製された酵素の部分アミノ酸配列の決定からcDNAがクローニングされた²⁾³⁾。それと並行して行われた、血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP)患者家系の遺伝子連鎖解析でもADAMTS13が同定された¹⁾。

ADAMTS13とTTP

TTPは、血小板減少と溶血性貧血を主症状とする重篤な疾患である。精神神経症状、腎機能障害、発熱を併せて、TTPの古典的5徴候とされているが、すべてを併発する症例は珍しく、診断の確定が難しい。症状の多様性が大きいため、原因がはっきりしない血小板減少においては、TTP発症の可能性を考慮すべきである。

TTPは、先天性ADAMTS13欠損症とそれ以外という2群に分類できる。前者は常染色体劣性遺伝形式を示し、Upshaw-Schulman症候群とも呼ばれる。出生直後からTTP症状が現れると考えられてきたが、成人になるまで発症しない例が見つかったり、あるいは*Adamts13*破壊マウスがTTP症状を示さない⁶⁾⁷⁾など、ADAMTS13欠損がTTP発症の十分条件ではないことがわかってきた。他の遺伝子や環境要因が発症に関与すると考えられる。一方、先天性ADAMTS13欠損症以外のTTPは、後天性TTPとほぼ同義であり、TTPの大半を占める。多くの場合、ADAMTS13に対する自己抗体が生じており、それによってADAMTS13活

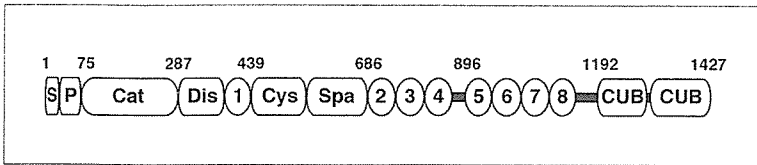


図1 ADAMTS13のドメイン構成

N末端側から順に、シグナル配列(S)、プロペプチド(P)、触媒ドメイン(Cat)、disintegrin様ドメイン(Dis)、Tsp1-1、Cys-richドメイン(Cys)、spacerドメイン(Spa)、Tsp1-2~Tsp1-8、CUBドメイン。図上の数字はヒトADAMTS13におけるアミノ酸残基番号。

性が阻害されている。すなわち、TTPの一部は自己免疫疾患といえる。

ADAMTS13の構造

ADAMTS13は亜鉛型メタロプロテアーゼであり、他のADAMTSメンバーと同様、多くのドメイン構造をもつ(図1)。ヒトゲノムには19個のホモログ(Adamts1~20, 11は欠番)が存在する。細胞外マトリックスの構築や分解、血管新生、生殖、臓器形成などに関与すると考えられているが、それぞれの分子機能の詳細はまだ明らかになっていない。

ヒトADAMTS13は1,427アミノ酸残基からなり、N末端にシグナル配列とプロペプチドをもつプレプロ酵素として翻訳され、プロペプチド部分は細胞外へ分泌される過程で切断除去される。血液中の成熟型ADAMTS13のN末端は触媒ドメインであり、そのC末端側には、disintegrin様ドメイン、thrombospondin type-1 motif(Tsp1)ドメイン、Cys-richドメイン、spacerドメインといったADAMTSに特徴的な構造が続く。ADAMTSの多くはC末端側にさらに複数のTsp1をもっており、ADAMTS13では7個連続している。そのC末端側に続く2個のCUB(complement C1r/C1s, Uegf, and Bmp1)ドメインは他のADAMTSにない構造である。

ADAMTS13の機能

ADAMTS13の生理的基質として知られているのはVWFのみである。血管内皮細胞から血液中に分泌された新生VWFは、共有結合によって超高分子量のホモマルチマーを形成しているが、ADAMTS13によって部分的に切断されるため、さまざまな分子量(500-15,000kDa)の断片となる。マルチマー断片の分子量が大きいほど血小板凝集能が高いため、分子量の分布によって止血反応が影響を受ける。

血中ADAMTS13活性が失われると、超高分子量VWF

マルチマーが血中に残存蓄積し、細小血管で血小板が病的に凝集しやすくなる。これがTTPの発症機序と考えられている。細小血管の血小板閉塞はさまざまな臓器で起こり、また、形成された血小板血栓は崩壊しやすいといった理由から、症状の種類や重症度に多様性が現れる。

ADAMTS13活性の測定

ADAMTS13が切断する位置は、VWFのA2ドメインに存在するTyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶間である。立体構造予測モデル⁸⁾によると、切断部位はドメイン内部に位置しており、そのままではADAMTS13がアクセスしにくいと推定される(図2)。実際、切断反応を*in vitro*で効率良く進めるには、適度な濃度のタンパク質変性剤(尿素や塩酸グアニジン)が必要であるが、これはVWFの立体構造変化を促しているからであろう。反面、酵素であるADAMTS13に対して変性剤は活性抑制的に作用してしまうため、測定系としては不利である。

VWF全長を基質として活性を測定する方法として、アガロースゲル電気泳動法⁴⁾、ポリアクリルアミドゲル電気泳動

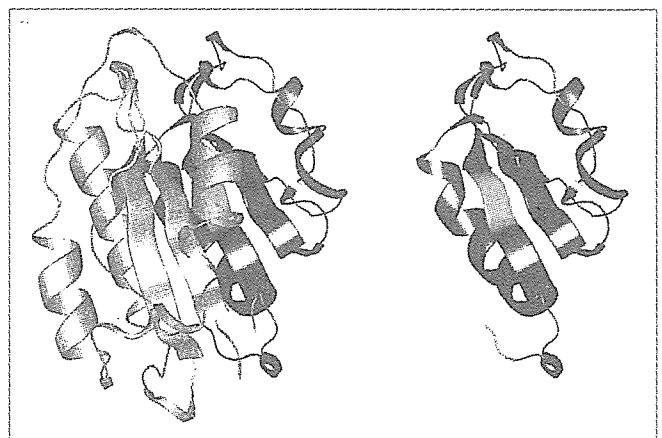


図2 VWFのA2ドメインとVWF73

ヒトVWFのA2ドメイン(Val¹⁴⁹⁶~Cys¹⁶⁰⁹)の立体構造予測モデル(左図)、Sutherlandら⁸⁾のPDBフォーマットデータから作図した。VWF73に相当する領域を青色で示してある。ADAMTS13による切断部位Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶(赤色)は分子内部に隠れているが、VWF73(右図)では表面に露出している。

法⁵⁾, コラーゲン結合能測定法⁹⁾, 部位特異的抗体サンドイッチ法¹⁰⁾, リストセチン血小板凝集測定法¹¹⁾, 平行板型フローチャンバー法¹²⁾がある. これらは複数の研究グループで比較評価され, いずれもADAMTS13活性測定法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¹³⁾¹⁴⁾. しかし, 臨床現場に導入するには技術的ハードルが高く, より簡便な方法が待ち望まれていた.

そこで, VWFの部分配列を基質とする, A1-A2-A3ドメインを利用する方法¹⁵⁾, A2ドメインを利用する方法¹⁶⁾, GST-VWF73を利用する方法¹⁷⁾が開発された. VWF73とは, ADAMTS13の特異的基質として機能するために必要十分な領域として筆者らが実験的に絞り込んだ領域で, VWFのAsp¹⁵⁹⁶からArg¹⁶⁶⁸までの73アミノ酸残基を意味する. 当初, VWF73にタグを付加した大腸菌組み換えタンパク質の切断をウエスタンブロットニングで検出するという方法でADAMTS13活性を見積った. ADAMTS13によって切断される部位は分子表面に露出しているため(図2), VWF73の切断に変性剤は不要である. 最近では, 活性測定法の開発はもっぱらVWF73を利用して進められているようである. 現在, 最も簡便かつ迅速に結果が得られるのは筆者らが開発したVWF73-FRET (fluorescence resonance energy transfer) 法であり¹⁸⁾, 最も高い検出感度をもつのはKatoらが開発したVWF73-ELISA法である¹⁹⁾.

VWF73-FRET法とVWF73-ELISA法

VWF73-FRET法では, 消光性蛍光基質FRETS-VWF73を用いる¹⁸⁾. これは, VWF73のP7位およびP5'位にそれぞれ蛍光基と消光基が導入された化学合成ペプチドである. Tyr-Met間が切断されると, 蛍光基—消光基間のFRET効果が緩和され, 蛍光基から蛍光が生じる. つまり, ADAMTS13活性に比例して蛍光強度が増大する. 測定手順はごく簡単で, FRETS-VWF73溶液に血漿を混合して蛍光変化を検出するのみであり, 1時間以内に結果を得ることができる. FRET法の有用性はすでに複数の論文で実証されており²⁰⁾²³⁾, ADAMTS13活性測定の普及に目処が立ったといえるであろう. 実際, 臨床検査室に本法を導入している医療施設が増加している. FRETS-VWF73単

体はペプチド研究所から販売されており, FRETS-VWF73あるいはその類似物質を含んだ測定キットはGTI社, Technoclone社, American Diagnostica Inc. (ADI) 社から販売されている(表1). また, エスアールエル社では受託測定が実施されているので, 測定環境がない施設ではこれを活用すると良い.

一方, VWF73-ELISA法では組み換えタンパク質GST-VWF73を基質として用いる. ADAMTS13による切断で生じるペプチド末端に特異的に結合するモノクローナル抗体を利用することで, 一般的なELISA測定と同様の手順で測定することができる. 約3時間で結果が得られ, 正常活性の0.5%まで検出できる. カイノス社からキット販売されている(表1).

いずれの方法においても, 標準血漿の希釈系列で標準曲線を作成し, 被検血漿の活性を%値で表すのが通例である.

ADAMTS13活性インヒビターの測定

血漿ADAMTS13活性が著減していた場合(検出限界未満~20%), インヒビターの有無を調べる. この場合, インヒビターは活性阻害抗体とほぼ同義である. もしインヒビターが検出されない場合, その患者は*Adamts13*変異を複合ヘテロ接合体あるいはホモ接合体で保有する先天性ADAMTS13欠損症である可能性が高い. 一方, インヒビターが検出された場合, 後天性TTPであると判断できる.

インヒビターを検出するには, まず, 被検血漿および対照とする正常血漿を非働化処理(56°C, 30分間)することにより, ADAMTS13などのプロテアーゼ類を失活させ, かつ, 抗体を未変性状態に保つ. それぞれを等量の標準血漿と混合し, 室温~37°Cで30~60分間保温する. この操作は, 被検血漿中のインヒビターを標準血漿中のADAMTS13に結合させるためである. その後, それらのADAMTS13活性を測定し, 非働化被検血漿を加えた標準血漿の活性と非働化正常血漿を加えた標準血漿の活性を比較する. 後者を50%阻害する力価を1 Bethesda単位と定義し, 非働化被検血漿中のインヒビター力価を算出する. なお, 現時点では測定方法や力価算出方法に検討の余地が大きい

表1 市販されているADAMTS13測定キット

*: 一連の操作で活性と抗原量の両方を測定するキット。

	活性	インヒビター	抗原量
ペプチド研究所	FRETS-VWF73		
カイノス	ADAMTS13 Activity ELISA		
GTI	ATS13		
Technoclone	TECHNOZYM ADAMTS13*	TECHNOZYM ADAMTS13 INH	TECHNOZYM ADAMTS13*
American Diagnostica Inc.	ACTIFLUOR ADAMTS13 Activity Assay	IMUBIND ADAMTS13 Autoantibody	IMUBIND ADAMTS13
エスアールエル	受託測定		
三菱化学ヤトロン			ADAMTS13 ELISA

め、力価の大小を意識するよりも、むしろ定性的にインヒビターの有無を捉えるのが肝心であろう。

活性測定を利用してインヒビターを検出するのではなく、ELISAで抗ADAMTS13抗体を直接検出する方法もある。すなわち、ADAMTS13でコーティングされたウェルに被検血漿を反応させ、ウェルに結合したIgG成分を定量する。Technoclone社およびADI社からキットとして販売されている(表1)。

患者血漿に存在するインヒビターの中には、ADAMTS13に結合しても活性を阻害しない抗体や、ADAMTS13の血中クリアランスを促進する働きをもつ抗体なども見つかっており、その場合、活性測定系で検出されない可能性がある。一方、ADAMTS13との結合が強い抗体の場合、活性を阻害するにもかかわらず、ELISA法で検出されない可能性がある。インヒビターを活性阻害で検出する方法とELISAで直接検出する方法は、相補的に利用すると良いのかもしれない。

VIII ADAMTS-13抗原量の測定

先天性ADAMTS13欠損症に見られる遺伝子変異の多くは、ADAMTS13の細胞からの分泌不全の原因となっている。また、播種性血管内凝固症候群などの病態下でADAMTS13が切断分解されている例が見つかっている²⁴⁾。活性測定やインヒビター検出と同様、血中ADAMTS13抗原量の測定も病因を推定する上で重要であろう。

測定方法として現在最も簡便で普及が見込まれるのはELISAである。すでにさまざまなラボでモノクローナル抗体

が作製され、ELISA測定系が構築されている²⁴⁾⁻²⁶⁾。活性との相関は良好のようであるが、活性測定に比べてまだ検出数は少ない。ADAMTS13の血中濃度は、報告によってばらつきがあるものの、概ね1 μ g/mLである。Technoclone社、ADI社、三菱化学ヤトロン社から測定キットが販売されている(表1)。

おわりに

まだ試験研究用であるとはいえ、ADAMTS13の活性や抗原量、さらにインヒビターを測定する試薬やキットが市販化され、特殊な試薬類や技術を必要としない解析ツールが揃った。これらを利用して、可能な限りTTPを見逃さないよう努めなければならない。近い将来、ADAMTS13の測定が保険適用され、診断や治療に積極的に生かされるようになれば、基礎研究の成果が臨床応用につながった好例になるであろう。

TTP発症要因の探索と症状との関連づけ、TTPや血栓性微小血管障害症(thrombotic microangiopathy:TMA)の診断基準の確立、安全かつ効果的な治療法の開発など、これから解決すべき課題は山積みである。今後の発展が期待される。

REFERENCES

- 1) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al: Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 413: 488-494, 2001
- 2) Soejima K, Mimura N, Hirashima M, et al: A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possi-

- bly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem* **130**: 475-480, 2001
- 3) 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* **276**: 41059-41063, 2001
 - 4) 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* **87**: 4223-4234, 1996
 - 5) 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
 - 6) Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, et al: Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest* **115**: 2752-2761, 2005
 - 7) Banno F, Kokame K, Okuda T, et al: Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **107**: 3161-3166, 2006
 - 8) Sutherland JJ, O'Brien LA, Lillicrap D, et al: Molecular modeling of the von Willebrand factor A2 Domain and the effects of associated type 2A von Willebrand disease mutations. *J Mol Model (Online)* **10**: 259-270, 2004
 - 9) 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* **82**: 1386-1389, 1999
 - 10) 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* **82**: 1382-1385, 1999
 - 11) Böhm M, Vigh T and Scharrer I: Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor-cleaving metalloprotease (ADAMTS13). *Ann Hematol* **81**: 430-435, 2002
 - 12) 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* **100**: 4033-4039, 2002
 - 13) Studt JD, Böhm M, Budde U, et al: Measurement of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in plasma: a multi-center comparison of different assay methods. *J Thromb Haemost* **1**: 1882-1887, 2003
 - 14) Tripodi A, Chantarangkul V, Böhm 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* **2**: 1601-1609, 2004
 - 15) Remuzzi G, Galbusera M, Noris M, et al: von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Blood* **100**: 778-785, 2002
 - 16) 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* **2**: 485-491, 2004
 - 17) 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* **103**: 607-612, 2004
 - 18) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, et al: FRETTS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* **129**: 93-100, 2005
 - 19) Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, et al: Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* **46**: 1444-1452, 2006
 - 20) Groot E, Hulstein JJ, Rison CN, et al: FRETTS-VWF73: a rapid and predictive tool for thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* **4**: 698-699, 2006
 - 21) Kremer Hovinga JA, Mottini M, Lämmle B: Measurement of ADAMTS-13 activity in plasma by the FRETTS-VWF73 assay: comparison with other assay methods. *J Thromb Haemost* **4**: 1146-1148, 2006
 - 22) Mahdian R, Rayes J, Girma JP, et al: Comparison of FRETTS-VWF73 to full-length VWF as a substrate for ADAMTS13 activity measurement in human plasma samples. *Thromb Haemost* **95**: 1049-1051, 2006
 - 23) Shelat SG, Smith P, Ai J, et al: Inhibitory autoantibodies against ADAMTS-13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura bind ADAMTS-13 protease and may accelerate its clearance *in vivo*. *J Thromb Haemost* **4**: 1707-1717, 2006
 - 24) Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, et al: Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood* **107**: 528-534, 2006
 - 25) Soejima K, Nakamura H, Hirashima M, et al: Analysis on the Molecular Species and Concentration of Circulating ADAMTS13 in Blood. *J Biochem* **139**: 147-154, 2006
 - 26) Rieger M, Ferrari S, Kremer Hovinga JA, et al: Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies (TMA). *Thromb Haemost* **95**: 212-220, 2006

ADAMTS 13 欠損マウスと血栓性血小板減少性紫斑病

坂野 史明 国立循環器病センター研究所脈管生理部室員
小亀 浩市 同脈管生理部室長

Banno, Fumiaki
Kokame, Koichi

はじめに

ADAMTS 13 は血小板接着蛋白質フォンビルブランド因子(VWF)を特異的に切断する血漿プロテアーゼである¹⁾⁵⁾。VWFは主に血管内皮細胞で合成され、ホモマルチマーとして血中へ分泌される。VWFの血小板粘着および凝集活性は分子量が大きいほど強く⁶⁾、特に20,000 kDaを超える超高分子量VWF(UL-VWF)マルチマーは、高ずり応力下で過度の血小板凝集を引き起こす。通常、UL-VWFマルチマーはADAMTS 13により断片化され、血小板凝集活性は抑制されている。しかし、ADAMTS 13活性が欠乏すると、UL-VWFマルチマーが血流中に残存し、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の発症につながる(図1)³⁾⁷⁾⁸⁾。

TTPは血小板減少、溶血性貧血を主症状とし、腎機能障害、動揺性神経症状、発熱を併発する重篤な疾

患である⁹⁾。ADAMTS 13遺伝子の変異によって⁵⁾¹⁰⁾、あるいはADAMTS 13に対する自己抗体の出現によって⁷⁾⁸⁾、ADAMTS 13活性が著減し、病的血栓形成を基盤とする全身性の症状が惹起される。

ADAMTS 13 欠損マウス

われわれはマウスADAMTS 13をクローニングし¹¹⁾、さらに、TTPの発症機序をより詳しく理解する目的でADAMTS 13欠損マウスを作製した¹²⁾。

ADAMTS 13完全欠損マウスは正常に出生、発育した。また、雌雄とも生殖能力は正常であった。これは意外な結果であったが、ADAMTS 13の主要な発現臓器である肝臓においてADAMTS 13のmRNAは検出されず、血漿のVWF切断活性も消失していたため、実験自体は成功したといえる。血漿のVWFを解析したところ、TTP患者と同様、マ

ウスでもADAMTS 13欠損により、血中にUL-VWFマルチマーが残存していた(図2)。しかし、血小板数、血漿ハプトグロビン量、凝固時間、出血時間(表1)、血液像、組織像、アゴニスト惹起血小板凝集能はいずれも正常で、予想されたTTP症状(血小板減少、溶血性貧血、微小血管内血小板血栓)はみられなかった。

ADAMTS 13 欠損マウスの血栓傾向

そこで、平行板型フローチャンバーを用いて、ずり応力下におけるコラーゲン表面上での血小板血栓形成能を解析した。その結果、欠損マウスでは野生型マウスに比べて血栓形成能が亢進していることがわかった(図3)。また、コラーゲン静脈投与による血栓誘発モデルを用いて、*in vivo*での血栓傾向を検討した結果、血栓誘発による消費が原因と考えられる血小板減少が、欠損マウス

でより顕著に認められた(図4)。したがって、マウスにおいて ADAMTS 13 欠損は、血中に UL-VWF マルチマーの残存を引き起こし、潜在的な易血栓形成傾向をもたらすが、それだけでは TTP 発症に至らず、発症に關与する付加的要因が存在すると考えられた。

米国グループの ADAMTS 13 欠損マウス

われわれとは別に、米国の Motto らも ADAMTS 13 欠損マウスを作製しており、通常飼育下で TTP 症状はみられないと報告している¹³⁾。彼らは、C57BL/6 系統に比べて血中 VWF 量が約 10 倍高い CASA/Rk 系統への戻し交配により、一部の ADAMTS 13 欠損マウスに TTP 様

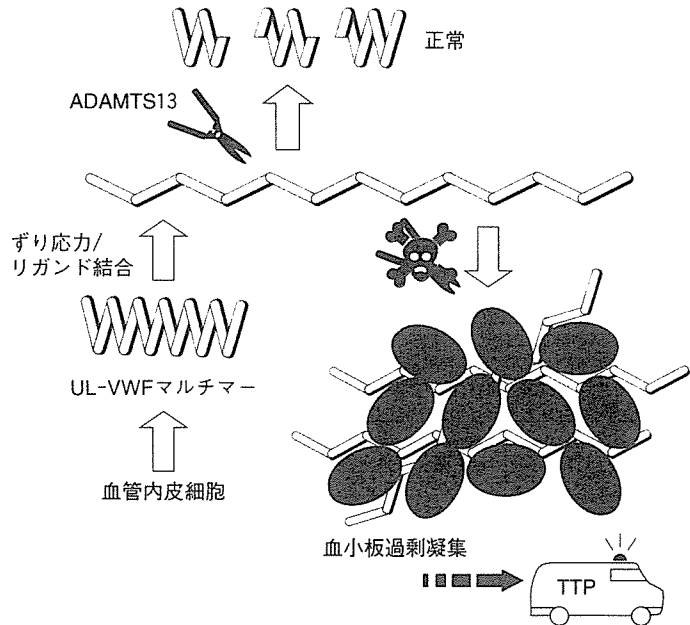


図1 ADAMTS 13 と血小板血栓形成

血管内皮細胞から分泌された UL-VWF マルチマーは、ADAMTS 13 により断片化される。ADAMTS 13 活性が欠乏し、UL-VWF マルチマーが残存すると、微小血管内で血小板が過剰凝集し、TTP 発症へつながる。

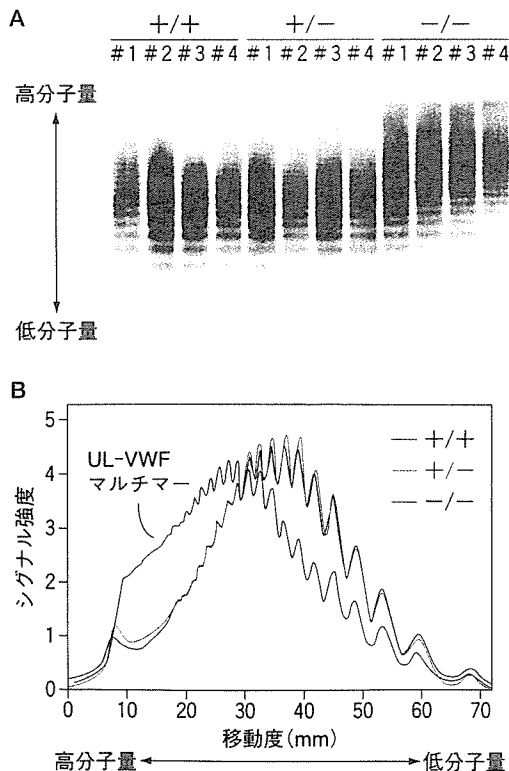


表1 血液学的・凝固学的解析結果(平均値±標準偏差, n = 7-18)

	ADAMTS 13 +/+	ADAMTS 13 +/-
血小板数($\times 10^4/\mu\text{L}$)	51.2 \pm 4.2	53.2 \pm 6.2
赤血球数($\times 10^4/\mu\text{L}$)	819 \pm 41	797 \pm 25
ヘモグロビン量(g/dL)	12.9 \pm 0.5	12.6 \pm 0.4
ヘマトクリット値(%)	42.6 \pm 2.1	42.2 \pm 0.8
ハプトグロビン量(%)	100 \pm 67	103 \pm 69
VWF 量(%)	100 \pm 23	129 \pm 31*
第VIII因子活性(%)	100 \pm 10	146 \pm 22*
フィブリノーゲン量(%)	100 \pm 5	98 \pm 7
プロトロンビン時間(s)	16.1 \pm 0.8	16.0 \pm 1.0
活性化部分トロンボプラスチン時間(s)	44.2 \pm 3.7	43.3 \pm 2.5
尾部切断面出血量(μL)	12.5 \pm 8.4	9.5 \pm 3.1

*p < 0.05, **p < 0.001 (Student t-test)

図2 ADAMTS 13 欠損マウスの血漿 VWF マルチマー

(A)野生型マウス(+/+), ADAMTS 13 ヘテロ欠損マウス(+/-), ADAMTS 13 ホモ欠損マウス(-/-)各4個体の血漿を SDS-アガロース電気泳動に供し、抗 VWF 抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。(B)ブロット上の各レーンのシグナル強度を画像解析プログラム(Image Gauge, Fujifilm)を用いてスキャンし、相対強度を図示した。ホモ欠損マウスの血漿には UL-VWF マルチマーが残存している。