

プロテイン S K196E は、第 2EGF 様ドメイン内にあり、APC に結合しないのでプロテイン C 抗凝固能が低下すると報告されている。その頻度は、4 つの研究をまとめると (図 4)、健常人 4,371 人中 77 名がヘテロ接合体であったので、ヘテロ接合体は 1.76%に見られ、変異アレル頻度は 0.88%と計算された⁶⁾。したがっ

て、日本人の 55 ~ 60 名に 1 名は本変異のヘテロ接合体である。静脈血栓塞栓症患者に 3 名のホモ接合体が同定されている (表 3)^{8, 12)}。その頻度は静脈血栓塞栓症患者約 85 名に 1 名である。ホモ接合体のプロテイン S 抗原量は正常域に入っているものの、活性は 35%および 39%と低下していた。

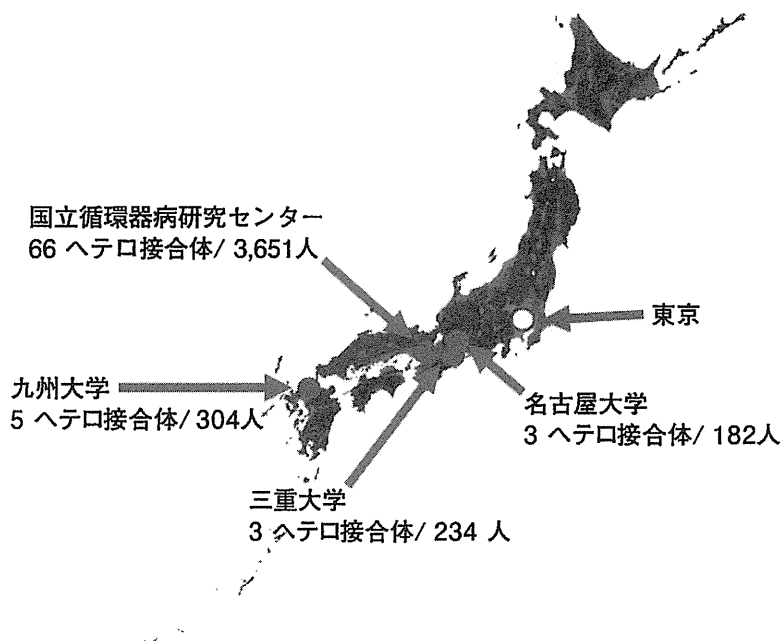


図 4. 日本人に特有の静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるプロテイン S K196E 変異の頻度 4,371 人中 77 人のヘテロ接合体が同定された。したがって、変異 E アレル頻度は 0.88%。この頻度から、日本人にはホモ接合体が約 10,000 人と推定される。

表 3. プロテイン S K196E 変異ホモ接合体

	total Ag, %	free Ag, %	Act, %	prevalence	reference
patient 1	78	94	35	one out of 85 VTE patients	Kinoshita et al, 2005
patient 2	n.d.	n.d.	39	two out of 173 VTE patients	Miyata et al, 2009
patient 3	n.d.	n.d.	n.d.		
n.d.: not determined					

ヘテロ接合体のプロテインS活性は正常人より約16%低い¹³⁾。一般住民1,862名のプロテインS活性を測定し、ヘテロ接合体の活性を調べた報告によると、34名のヘテロ接合体のプロテインS活性は40～110%の広い範囲に分布していた¹³⁾。正常型プロテインS保有者の活性は40～170%を示し、ヘテロ接合体の活性と大きくオーバーラップしていた。これより、ヘテロ接合体はプロテインS活性では確定できないと考えられた。しかし、平均値をみると、ヘテロ接合体は約16%活性が低い。プロテインS活性は妊娠、経口避妊薬、腎障害などで低下することが知られているので、本変異保有者がそういった環境要因に暴露されると、さらにプロテインS活性が低下し、血栓リスクが上昇するのではないかと考えられる。

日本人静脈血栓塞栓症患者173名を対象に、プロテインS、プロテインC、アンチトロンビンのタンパク質コード領域の全シーケンスを解析した(図5)¹²⁾。静脈血栓塞栓症患者173名の32%にあたる55名が、3つの遺伝子のい

ずれかにアミノ酸変異を伴う遺伝子異常を保有していた。3つの遺伝子のなかでも、プロテインS遺伝子変異保有者は29名で最も多かった(図5)。この中には、上述のプロテインS K196E変異のヘテロ接合体13名およびホモ接合体2名が含まれている。このプロテインS遺伝子変異保有者29名のうち、5名はプロテインS遺伝子とプロテインC遺伝子の両方に変異を保有していた。大変興味深いことに、この5名全員はプロテインS K196E変異保有者であった。このことから、プロテインS K196E変異は他の遺伝子変異と重なって静脈血栓症の発症リスクをあげると考えられた。

妊娠および産褥期の深部静脈血栓症における血栓性素因の影響を検討した¹⁴⁾。妊娠・産褥期の深部静脈血栓症患者18名の遺伝子解析を行い、4名にプロテインS遺伝子変異、1名にプロテインC遺伝子変異を同定した。4名のプロテインS遺伝子変異保有者のうち、2名はプロテインS K196E変異を保有していた。このように本変異は周産期領域における深部静脈血栓症のリスクとなる可能性が考えられた。

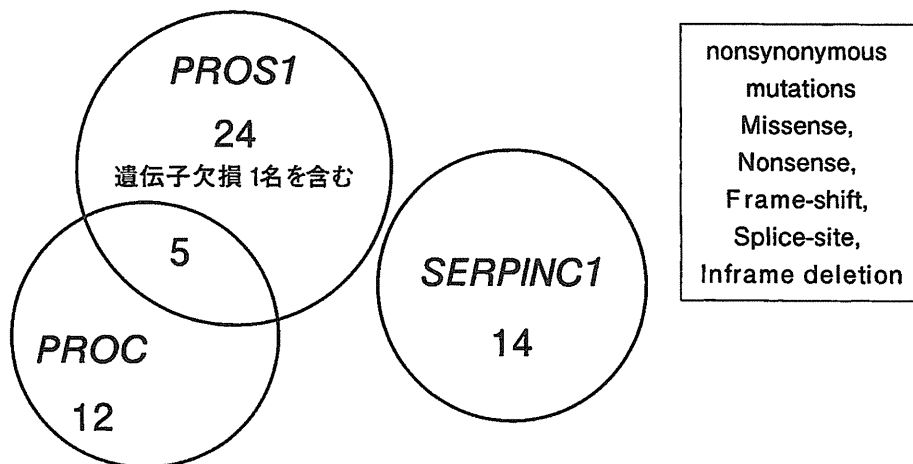


図5. 日本人静脈血栓塞栓症患者を対象にした遺伝子変異¹²⁾

静脈血栓塞栓症患者173名のプロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの遺伝子の塩基配列解析を行った結果を示した。173名中45名に、タンパク質の機能に影響を与える可能性のある遺伝子変異を同定した。なかでも、プロテインS遺伝子の変異は24名に同定した。プロテインS遺伝子の変異は、プロテインCやアンチトロンビンの変異より多くの患者に見られた。1名はプロテインS遺伝子全体が欠損していた。5名はプロテインC遺伝子とプロテインS遺伝子に変異を保有していた。

血栓性血小板減少性紫斑病と ADAMTS13 遺伝子変異

血栓性微小血管障害症には、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) がある (表4)¹⁵⁾。ともに血小板数の減少と破碎赤血球を示す溶血性貧血といった類似した症状を示すものの、全身性の TTP と腎障害性の HUS といった違いがあり、治療も異なる。

TTP は微小血管内に血小板血栓が生じる疾患であり、診断を誤れば死にいたる疾患である。厚生労働省は難治性疾患克服研究の対象としている。TTP では、血中のフォンヴィレブランド因子 (VWF) 切断酵素である ADAMTS13 活性が著減し、超高分子量 VWF マルチマーが血中に蓄積し、これが引き金となり血小板血栓が形成される¹⁵⁾。微小血管の血小板血栓により、消費性に血小板数の減少を示し、赤血球が血栓により損傷を受け、破碎赤血球が見られ溶血性貧血を示す。脳の微小血管が閉塞すると虚血性の障害として動揺する精神・神経症状が観察される。また、腎機能障害が長期に亘ってみられる。TTP は ADAMTS13 の活性阻害自己抗体の出現により ADAMTS13 活性が低下する後天性の症例と、ADAMTS13 遺伝子

変異による先天性の活性の低下に分けることができる (表4)。私達はこの10年間、血漿メタロプロテアーゼ ADAMTS13 の研究を進めてきたので、私達の成果を入れて TTP を紹介したい。

TTP 発症のメカニズムを理解するには、VWF を理解する必要がある。VWF はとても大きい血漿中のタンパク質である。VWF は 2,050 アミノ酸残基のモノマーが N 末端どうし、C 末端どうしでジスルフィド結合を介して直鎖状に繋がり、超高分子量マルチマー (unusually large VWF multimer, UL-VWF マルチマー) として血管内皮細胞で合成され血中に分泌される。血漿中には、これほど大きな分子は VWF 以外にない。この UL-VWF マルチマーは血小板活性化能が高いため、これが血中に蓄積する TTP 患者では、刺激なしで自発的に微小血管に血小板血栓が生じる (図6)^{16, 17)}。この TTP の病態は血漿交換により劇的に改善される。血漿交換により ADAMTS13 に対する抗体が血漿から除去され、かつ ADAMTS13 が補充されることにより ADAMTS13 活性が回復し、超高分子量 VWF マルチマーが通常のマルチマーまで分解され、血小板血栓の形成が抑制される (図6)。このように、通常、UL-VWF マルチマーは ADAMTS13 により適度に切断を受け、血小板凝集能は抑制されている。

表4. 血栓性細小血管障害症の分類

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)

後天性 TTP : ADAMTS13 に対する自己抗体

先天性 TTP : ADAMTS13 遺伝子変異

溶血性尿毒症症候群 (HUS)

定 型 HUS : 大腸菌 O157 などのシガ毒素, シガ様毒素

非定型 HUS :

- 1) 補体制御因子の遺伝子変異
factor H, membrane cofactor protein (MCP), factor I
 - 2) 補体因子の遺伝子変異 C3, B 因子
 - 3) 補体 H 因子に対する自己抗体
 - 4) トロンボモジュリン遺伝子変異
-

ADAMTS13がVWFマルチマーを切断するメカニズムは次のように考えられる¹⁸⁾。VWFのA2ドメイン内のADAMTS13切断部位(Y1605-M1606結合)は分子内部に埋れているので、切断に際して露出する必要がある。血管内で生じるずり応力によりA2ドメインはアンフォールドし、ADAMTS13が切断する領域が露出し、メタロプロテアーゼドメインの触媒基によりY1605-M1606結合が切断される。また、血漿中のADAMTS13の約5%は分子のC末端領域を介してVWFと結合した状態で循環しており、この結合もVWFの切断効率を高めている。このように、ADAMTS13によるVWFの切断にはずり応力によるA2ドメインのアンフォールドが重要である(図6)。では、生体内ではこういった場面でVWFにずり応力がかかるのだろうか。TTPは微小血管内に閉

塞性の血小板血栓を形成するが大血管には血栓は観察されない。微小血管では大血管に比べ大きなずり応力がかかる。高ずり応力がかかったVWFは伸展構造をとり、血小板GPIIb/IIIaや内皮下層のコラーゲンに結合する部位が露出し血栓能が亢進する。血小板、内皮下層のコラーゲン、血管内皮細胞に結合したVWFは張力をより受けやすく、こういったものに係留されたVWFのA2ドメインはアンフォールドし、ADAMTS13により切断されやすい。通常はADAMTS13での切断により、過度な血小板血栓の形成が抑制されている。しかし、ADAMTS13の重度の欠損症では、血小板やコラーゲン、血管内皮細胞に結合し伸展したVWFでも切断されず、さらに血小板の結合が進むこととなり、閉塞性の血小板血栓へと成長すると考えられる(図6)¹⁷⁾。

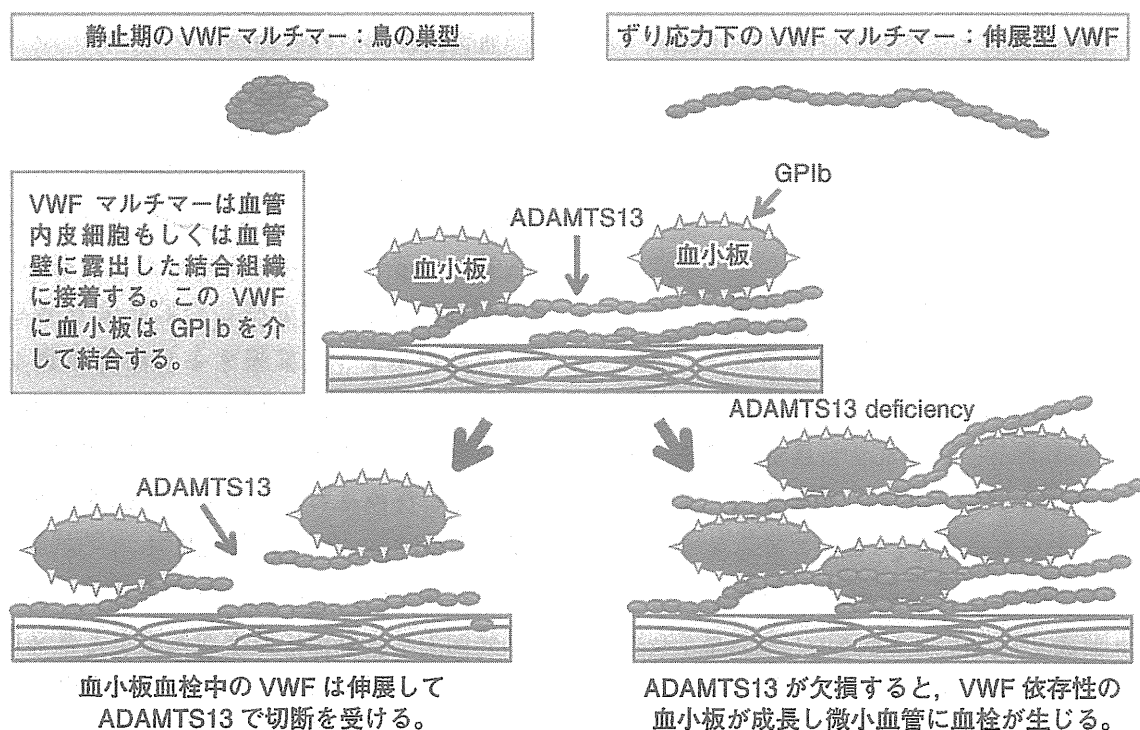


図6. ADAMTS13欠損による血栓性血小板減少性紫斑病の発症機構

VWFマルチマーは血流の流れがない静止状態では鳥の巣型の構造をとり、ずり応力がかかる血流中では伸展構造をとる。伸展型VWFマルチマーは血管内皮細胞もしくは血管壁に露出した結合組織に接着する。内皮細胞のWeibel-Palade bodyから放出されたUL-VWFマルチマーは血管内皮細胞に係留し血小板を数珠上に結合することが観察されている。ADAMTS13は伸展したVWFを切断し血小板血栓形成を抑制するが、先天性・後天性にADAMTS13活性が著減するとVWFは切断されず血小板血栓が生じる¹⁷⁾。

先天性 ADAMTS13 欠損症 (Upshaw-Shulman syndrome, USS) は TTP の原因となる。私達は奈良県立医科大学藤村吉博教授と共同研究を行い、先天性 ADAMTS13 欠損症の遺伝子解析を行った。その結果、患者は ADAMTS13 遺伝子変異のホモ体もしくは複合ヘテロ体、両親は変異ヘテロ体であり、常染色体劣性遺伝形質をうまく説明した¹⁹⁾。これらの結果から、先天性 TTP は ADAMTS13 遺伝子の変異で生じることが明らかとなった。日本人での TTP の発症に繋がる ADAMTS13 欠損症ホモ接合体もしくは複合ヘテロ接合体の頻度は 110 万人に 1 人と推定され、約 110 人の先天性 ADAMTS13 欠損症の存在が推定されている²⁰⁾。これまでのところ、日本人には 43 人の先天性 ADAMTS13 欠損症患者が報告されている¹⁹⁾。白人を対象にした ADAMTS13 の遺伝子研究も広く行われている。ADAMTS13 分子の色々な領域に変異が同定されているが、なかでも 4143insA 変異は TTP の責任変異としてドイツ、ポーランド、スウェーデン、ノールウェーなどで高頻度に見いだされている²¹⁾。こういった国々では、本変異による TTP が多く見られる。

溶血性尿毒症症候群 (HUS) と 補体制御因子の遺伝子変異

HUS は、腎臓小細動脈ならびに糸球体毛細血管の微小血管障害、微小血管性溶血性貧血、血小板減少を示す¹⁵⁾。HUS は、大腸菌 O-157 などの感染によるシガ毒素もしくはシガ様毒素での下痢を伴う定型例と、補体制御因子の遺伝子変異により補体系が内皮細胞を攻撃した結果生じる非定型例 (下痢を伴わない) に分類される (表 4)。定型 HUS では、大腸菌が産生するシガ毒素 (5 量体の B サブユニットと A サブユニット) の B サブユニットが A サブユニットを細胞内へ侵入させ、60S リボソームサブユニットを不活化しタンパク質合成を阻害して細胞死をもたらす。一方、非定型 HUS (atypical HUS, aHUS) では、

本来、H 因子などの補体制御因子により補体の攻撃から守られている内皮細胞が、これら補体制御因子の遺伝子変異によって保護機能が低下し、補体の攻撃を受けることとなり内皮細胞障害が生じることが分かってきた (図 7)。

非定型 HUS の発症メカニズムは次のように考えられる²²⁾。図 7 に示すように、補体 C3 因子は僅かながら生体内で C3b に変換されている。この C3b のほとんどは水と反応して安定化するが、一部は細胞膜の水酸基やアミノ基などとエステル結合を形成し膜上に固定化される。この細胞上の C3b に補体因子 Bb が結合すると C3 convertase となり、更にもう 1 分子の Bb が結合すると C5 convertase となって、C3b が固定化された細胞を攻撃し膜侵襲複合体 (membrane attack complex, MAC) として細胞膜に穴をあける。この一連の補体の活性化は自己細胞にとっては有害であるため、自己細胞は幾つかの補体制御因子により守られている。血管内皮細胞の表面にはグリコサミノグリカンを紹介して補体 H 因子、膜タンパク質である membrane cofactor protein (MCP) やトロンボモジュリンといった補体制御因子が結合している。これらのタンパク質はプロテアーゼである補体 I 因子のコファクターとして働き、I 因子が細胞膜上に固定化した C3b を分解して不活性型の C3i へと変換する反応を補助している。これらの補体制御因子に遺伝子変異が生じて活性が低下すると、自己細胞は補体の攻撃から十分に保護されなくなり、自己細胞が補体で障害を受ける。これが非定型 HUS の細胞障害メカニズムである。また、C3 や B 因子では、補体制御因子結合部位に変異が生じると補体制御因子による制御が働かなくなり、その結果、補体の活性化による自己細胞の障害が生じる。表 5 に非定型 HUS 患者に見られる遺伝子変異の頻度を示した。H 因子の遺伝子変異が最も多く見られる。しかし、非定型 HUS では遺伝子変異を持っていても HUS を発症しない例も多く見られ、まだ十分に解明されていないところも多い。

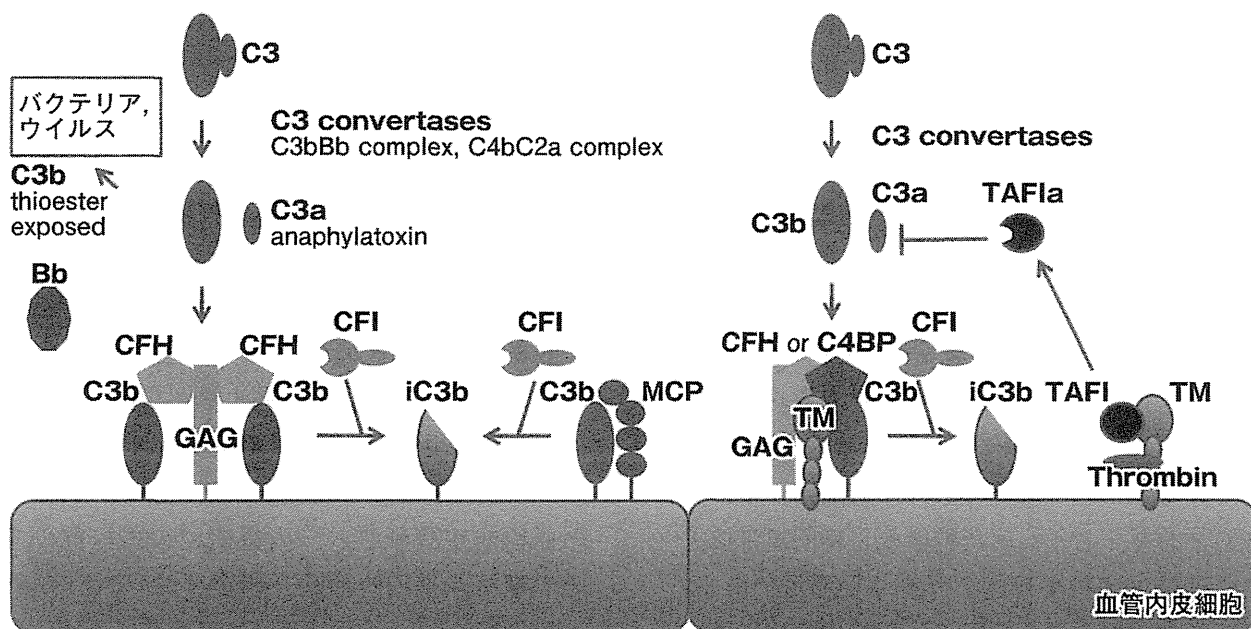


図7. 補体制御因子群による自己細胞の保護機構

C3bはチオエステル結合で微生物などに固定化されるとオプソニン作用を発揮する。C3bはC3 convertaseやC5 convertaseの構成成分であり、補体系の増幅反応を加速する。血管内皮細胞は補体制御因子であるH因子やMCPを表面に結合しており、これらがI因子のプロテアーゼ活性の補酵素となり、C3bをC3iへ不活化する反応を補助することにより、内皮細胞は補体の攻撃を免れている。トロンボモジュリンもI因子のC3b不活化反応を補助する。補体制御因子であるH因子、MCP、I因子、トロンボモジュリンの機能消失型変異はC3bの不活化能が低下し、補体による内皮細胞障害を招く。補体因子C3とB因子の機能亢進型変異は補体による内皮傷害を招く²²⁾。C5に対する単クローン抗体は細胞殺傷性の膜侵襲複合体の形成を阻止することにより内皮細胞を保護するため、非定型HUSの治療薬として有用であると報告されている。

表5. 非定型HUSの頻度

CFH	CFI	MCP	C3	CFB	THBD	抗CFH抗体
20-30%	4-10%	5-15%	2-10%	1-4%	3-5%	6%

補体制御因子である H 因子は short consensus repeat (SCR) とよばれる 60 アミノ酸残基程度のドメインが 20 個繋がった構造をとっている。SCR はジスルフィド結合を平面に示した図からスシドメインともよばれる。H 因子は SCR7 と SCR19-20 の領域で陰電荷を示すグリコサミノグリカンに結合し細胞表面に固定され、SCR14 と SCR19-20 で C3b に結合する。非定型 HUS 患者では、SCR19-20 に多くのミスセンス変異が同定されており、こういった変異によって H 因子の C3b やグリコサミノグリカンへの結合能が低下・消失し C3b 不活化能が低下すると考えられている²³⁾。この H 因子遺伝子は染色体 1q32 に位置している。この領域は複数の反復配列が密に存在しており、こういった特徴から相同組み換えによる遺伝子欠失が起こりやすい領域である。遺伝子欠失により、H 因子に隣接する遺伝子である CFHR3 とのハイブリッド遺伝子、Hybrid CFH-CFHR3 遺伝子、が高頻度に見られ、これが非定型 HUS を起こすとの報告がある。また、Hybrid CFH-CFHR1 遺伝子、CFHR1-CFHR3 欠失、CFHR1-CFHR4 欠失も非定型 HUS 患者に報告されている。染色体 1q32 には SCR を含む遺伝子がクラスターしており、これらの遺伝子は Regulator of complement activation (RCA) gene family と呼ばれている。

非定型 HUS の発症は、C3b 以降の補体因子の機能を抑制することにより抑えることが可能と考えられる。GPI アンカー型細胞表面タンパク質である補体膜制御因子 decay accelerating factor や CD59 の欠損症である発作性夜間血色素尿症の治療のために、C5 に対するヒト化単クローン抗体が開発され、治療に成功を収めている。この C5 単クローン抗体は C5 を抑え膜侵襲複合体の作用を抑えるので、非定型 HUS に対する治療効果も期待され、欧米ではその治療効果が報告されている²⁴⁾。

おわりに

遺伝子変異の関与が明らかとなった静脈血栓塞栓症、血栓性血小板減少性紫斑病、溶血性尿毒症症候群の研究を紹介した。血栓性血小板減少性紫斑病は劣性遺伝形式をとり、ADAMTS13 遺伝子変異のホモ接合体および複合ヘテロ接合体はほぼ必ず発症する。ヘテロ接合体での発症は見られない。一方、静脈血栓塞栓症や非定型溶血性尿毒症症候群では、ヘテロ接合体に発症が観察されているが、必ずしも発症が見られない場合があり、発症を促進する別の因子（環境因子や遺伝因子）の寄与も考えられる。こういった血栓性遺伝子変異の集積により、日本人の血栓能が評価され、人種間での血栓能の違いの理解が進み、治療に貢献することが期待される。

参考文献

- 1) Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008 ; **359** : 938-949
- 2) Borisoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011 ; **364** : 1746-1760
- 3) Muller F, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell.* 2009 ; **139** : 1143-1156
- 4) Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 - rationale and perspectives. *Thromb Res.* 2007 ; **120** : 1-10
- 5) Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood.* 2007 ; **109** : 3161-3172
- 6) Miyata T, Hamasaki N, Wada H, Kojima T. Venous thromboembolism and a race-specific genetic variation, protein S K196E, in Japanese. *J Thromb Haemost.* 2012 ; in press.
- 7) Kimura R, et al. Protein S-K196E mutation as a

- genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood*. 2006 ; 107 : 1737-1738
- 8) Kinoshita S, et al. Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem*. 2005 ; 38 : 908-915
- 9) Ikejiri M, et al. The association of protein S Tokushima-K196E with a risk of deep vein thrombosis. *Int J Hematol*. 2010 ; 92 : 302-305
- 10) Xu-Cai YO, et al. Factor XII gene mutation in the Hageman family. *J Thromb Haemost*. 2011 ; 9 : 2329-2331
- 11) Rogaev EI, et al. Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease". *Science*. 2009 ; 326 : 817
- 12) Miyata T, et al. Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res*. 2009 ; 124 : 14-18
- 13) Kimura R, et al. Plasma protein S activity correlates with protein S genotype but is not sensitive to identify K196E mutant carriers. *J Thromb Haemost*. 2006 ; 4 : 2010-2013
- 14) Neki R, et al. Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol*. 2011 ; 94 : 150-155
- 15) Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *The New England journal of medicine*. 2002 ; 347 : 589-600
- 16) Tsai HM. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol*. 2010 ; 91 : 1-19
- 17) Sadler JE. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2008 ; 112 : 11-18
- 18) 宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志, 坂野史明, 中山大輔, 武田壮一. ADAMTS13 研究の最先端. *臨床血液*. 2012 ; 印刷中
- 19) Fujimura Y, et al. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost*. 2011 ; 9 Suppl 1 : 283-301
- 20) Kokame K, Kokubo Y, Miyata T. Polymorphisms and mutations of ADAMTS13 in the Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost*. 2011 ; 9 : 1654-1656
- 21) Schneppenheim R, et al. A common origin of the 4143insA ADAMTS13 mutation. *Thromb Haemost*. 2006 ; 96 : 3-6
- 22) Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2009 ; 361 : 1676-1687
- 23) Kavanagh D, Goodship T. Genetics and complement in atypical HUS. *Pediatr Nephrol*. 2010 ; 25 : 2431-2442
- 24) Nurnberger J, et al. Eculizumab for atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2009 ; 360 : 542-544

《トピックス》

von Willebrand 因子と ADAMTS13

宮田敏行 松本雅則*

要 旨

- 血栓性血小板減少性紫斑病には、von Willebrand 因子(vWF)切断酵素である ADAMTS13 活性著減で発症する症例がある。
- vWF は血管内皮細胞で合成・貯蔵されており、刺激依存性に超高分子量 vWF マルチマーとして放出され、このマルチマーは血小板活性化能が高い。
- ADAMTS13 は vWF モノマー中の A2 ドメイン内のペプチド結合を部分的に切断し、vWF の血小板凝集能を抑制する。この切断には A2 ドメインがずり応力依存性に unfold する必要がある。
- ADAMTS13 は活性型として血中に存在し、基質 vWF の A2 ドメインが露出されることにより切断するというきわめてめずらしい機構で血栓形成を制御している。

はじめに○

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は細小血管傷害性溶血性貧血、血小板減少、動揺する神経症状、腎障害、発熱の5徴候で診断されていたが、最近では溶血性貧血と血小板減少の2徴候が重要と考えられている¹⁾。TTPは、細小血管に血小板血栓ができることによって発症し、その結果、消耗性に血小板数が減少し、血栓により狭小化した細小血管を赤血球が通過する際に破壊され、破碎赤血球が産生されると考えられている。

TTP の発症機構○

TTP 発症のメカニズムは、血管内皮細胞から放出された超高分子量 von Willebrand 因子(vWF)マルチマー(unusually large vWF multimer: UL-vWF マルチマー)が血中に蓄積し、このマルチマーに血小板が接着し血小板血栓を形成することで説明される(Fig. 1)^{1,2)}。vWF は 2,050 残基から成るが、このモノマーが N 末端および C 末端同士で直線状に繋がった UL-vWF マルチマーとして血管内皮細胞に貯蔵され、これらが刺激依存性

キーワード：血小板凝集，血栓性血小板減少性紫斑病，ずり応力。

* T. Miyata(部長)：国立循環器病研究センター分子病態部(☎565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)；M. Matsumoto(准教授)：奈良県立医科大学輸血部。

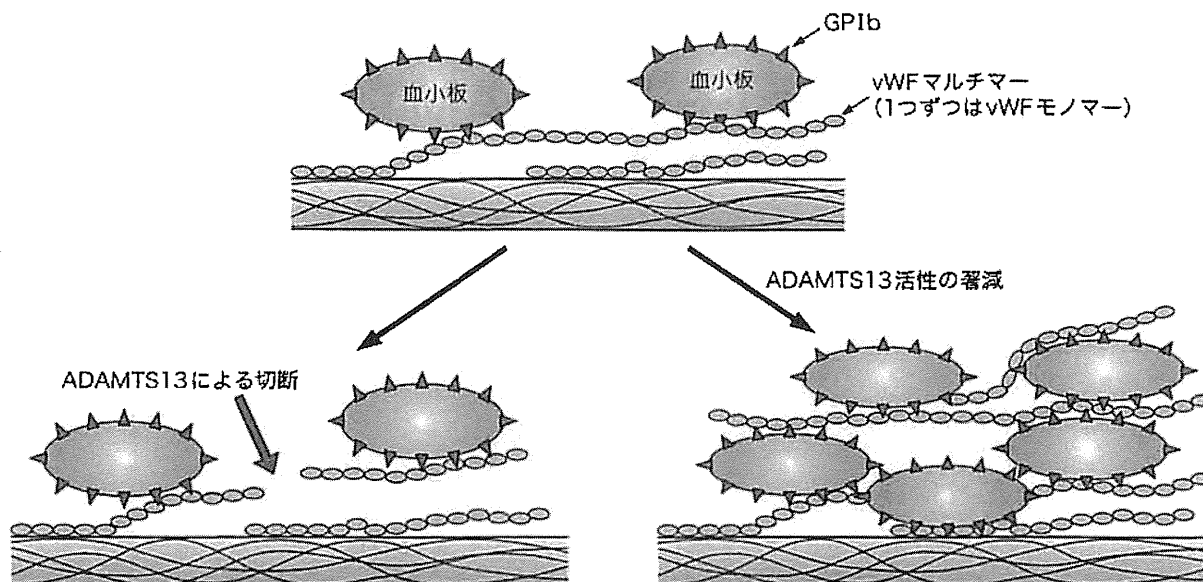


Fig. 1. ADAMTS13 活性の著減による TTP の発症メカニズム

細小血管の内皮細胞が刺激を受け、Weibel-Palade 体に蓄えていた UL-vWF マルチマーを放出する。UL-vWF マルチマー(の一部)は内皮細胞上に糸状に結合した状態となり、障害血管部位に露出したコラーゲンに結合し固相化した vWF とともに血小板が結合する足場となる(上)。ADAMTS13 は、血小板が結合した vWF を切断し、血小板血栓の形成を抑制する(下左)。しかし、ADAMTS13 活性が著減すると vWF が切断されず、vWF に結合した血小板にさらに vWF が結合することとなり、血小板の蓄積が継続し細小血管に血栓が生じる(下右)。

に血中に放出される。UL-vWF マルチマーは血小板活性化能が高い。通常、UL-vWF マルチマーは血中の ADAMTS13 というプロテアーゼにより部分的に分解を受け血中を循環している。TTP 患者ではこの ADAMTS13 活性が著減した結果、UL-vWF マルチマーが分解されずに蓄積することとなり、UL-vWF マルチマー依存性に細小血管内に血小板血栓が生じる。このような ADAMTS13 活性著減による TTP の場合は、新鮮凍結血漿(fresh frozen plasma : FFP)による補充療法が効を奏することが多い。とくに、後天性 TTP 患者には ADAMTS13 に対する自己抗体が産生されているので、血漿交換により酵素を補充し、自己抗体を除去することで病態が劇的に改善される。また、ADAMTS13 検査は TTP の診断および治療効果を判定するうえで重要なマーカーであり、最近簡便・迅速に測定することが可能となった。

先天性および後天性 ADAMTS13 欠損症○

ADAMTS13 活性が著減する原因として先天性と後天性の要因がある。先天性 TTP は Upshaw-Schulman 症候群(USS)とも呼ばれ、ADAMTS13 遺伝子の遺伝子異常のホモ接合体もしくは複合ヘテロ接合体(2つのアレルが異なった変異をもつ)が原因である。USS の両親はヘテロ接合体であり、活性がおおよそ半分に低下するものの TTP を発症しない。日本人には先天性 TTP 患者が約 110 名いると推定されている³⁾。一方、後天性 TTP 患者数は先天性よりかなり多いものの、海外からの報告では 100 万人に 3.7 人発症とまれな疾患である。

ADAMTS13 は 2001 年にわが国の化血研を含め、世界の 3 つの研究グループが同時にクローニングした⁴⁾。ADAMTS13 はドメイン構造をとっており、N 末端の M ドメインがプロテアーゼドメインであり、MDTCS 領域が全長 ADAMTS13 と

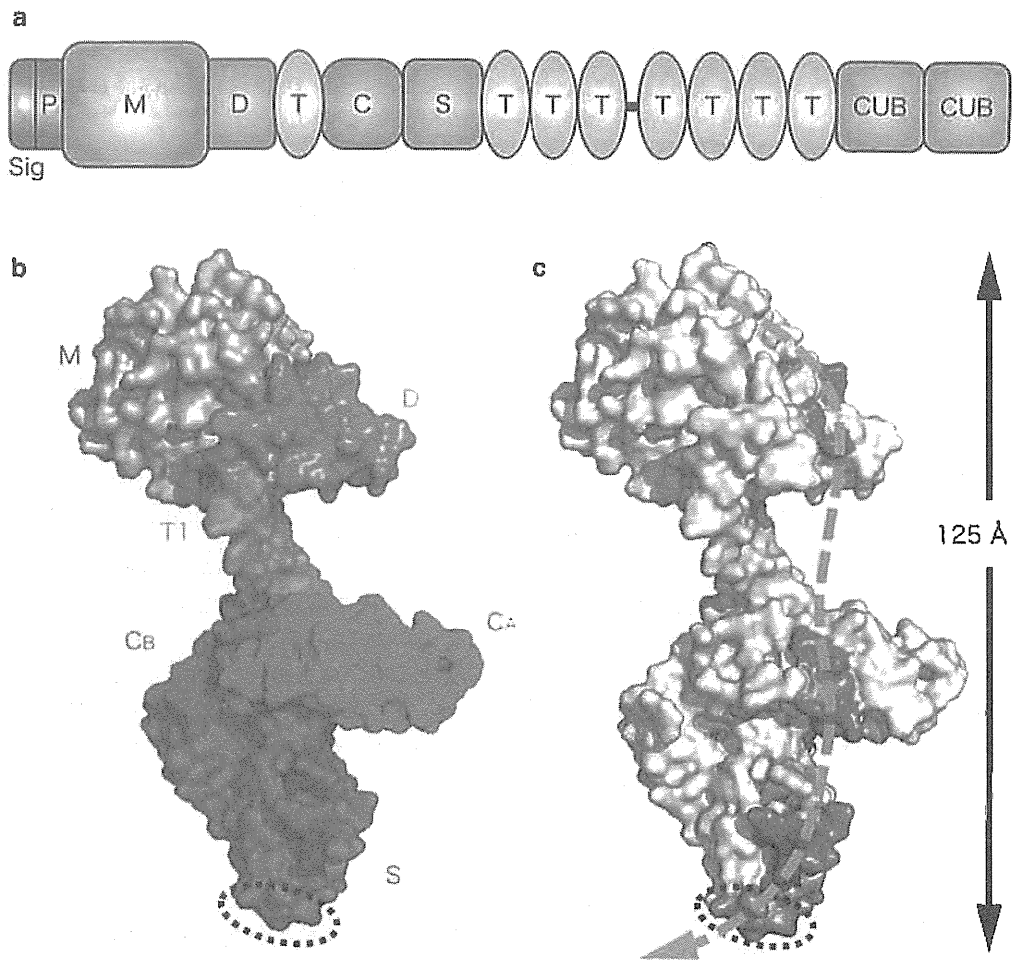


Fig. 2. ADAMTS13 のドメイン構造と部分立体構造

a: ADAMTS13 のドメイン構成。M はプロテアーゼドメインで活性に必須である。MDTCS 領域は全長 ADAMTS13 とほぼ同程度の vWF 切断活性をもつ。b, c: 立体構造が決定された DTCS の構造に M ドメインの立体構造を連結した MDTCS の構造。後天性 TTP 患者の血中には S ドメインの先端部分(点線丸印)を認識する自己抗体がみられ、自己抗体が結合すると ADAMTS13 活性が阻害される。基質ペプチドの結合様式も示した(c のオレンジ色の点線矢印)。MDTCS は広範な領域で基質と結合すると理解される。

ほぼ同程度の vWF 切断活性を示す(Fig. 2)。後天性 TTP 患者の血漿には、ADAMTS13 に対する抗体が検出されるが、患者の多くは S ドメインを認識する抗体を保有することが明らかとなっている。最近、われわれは DTCS ドメインの立体構造を決定した(Fig. 2)⁵⁾。S ドメイン中の抗体結合部位は活性中心から 100 Å以上離れていた。

ADAMTS13 による vWF 切断機構

ADAMTS13 は活性型として血中を循環してお

り、基質 vWF の切断部位である Tyr1605-Met1606 結合は A2 ドメイン内に埋もれている。このペプチド結合が ADAMTS13 で切断を受けるには、vWF が血流中のずり応力を受けて、A2 ドメインが unfold する必要がある。このように、ADAMTS13 による vWF の切断はきわめてユニークな性質を有している。

血液が血管内を流れる際、中央から辺縁部にかけて流速の勾配が発生し、壁側にずり応力が発生する。ずり応力は流速に比例するので動脈で大き

く、また血管径が細いほど大きくなる。大腿動脈では約 10 dyne/cm²のずり応力がかかり、小動脈では 55 dyne/cm²がかかるといわれる。vWF マルチマーは血流が静止している状態では鳥の巣のようなコンパクトな形をしているが、ずり応力がかかると伸展構造をとり A1 ドメインを介して血小板膜上の GPIIb と結合できる形になる。血小板が結合した vWF マルチマーは大きな張力を受け、A2 ドメインがほどけて内部に埋もれていたポリペプチド鎖が露出し、露出した Tyr1605-Met1606 結合が ADAMTS13 で切断を受けて低分子化され、血小板血栓形成が抑制される。

文 献○

- 1) Sadler JE : Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 112 : 11, 2008
- 2) Moake JL : Thrombotic microangiopathies. N Engl J Med 347 : 589, 2002
- 3) Kokame K et al : Polymorphisms and mutations of ADAMTS13 in the Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. J Thromb Haemost 9 : 1654, 2011
- 4) 副島見事ほか : ADAMTS13 物語. 血栓止血誌 20 : 377. 2009
- 5) Akiyama M et al : Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci USA 106 : 19274, 2009

南江堂



■ 多くの危険を伴う「修羅場」である緊急内視鏡を行う際に必要な診断力・判断力が身につく

緊急内視鏡マニュアル (DVD付)

編集 赤松 泰次/長谷部 修

■ B5判・242頁 2012.2. ISBN978-4-524-26282-3

定価 8,925 円 (本体 8,500 円+税 5%)

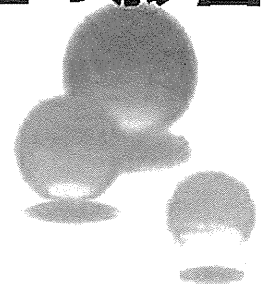
2012

internal medicine

抗血栓薬に対する遺伝子多型の影響

宮田 敏行*, 長束 一行**

MIYATA Toshiyuki, NAGATSUKA Kazuyuki



抗凝固薬ワルファリンと抗血小板薬クロピドグレルの個別化医療を目指す研究が盛んに行われている。ワルファリンは治療域が狭く、患者により維持量が大きく異なる場合があるため、ファーマコゲノミクスのアルゴリズムを投与量に取り入れ、有害事象を回避する戦略の開発が待たれている。ワルファリンでは、遺伝子多型情報を取り入れたアルゴリズムが開発され、これを用いて投薬開始後の有害事象の軽減を評価する研究が発表されている。一方、クロピドグレルはCYP2C19遺伝子多型により血小板凝集抑制能に個人差がみられるものの、イベントとの関連に関して一致した結果が得られていないのが現状である。

Key word ワルファリン, クロピドグレル, ファーマコゲノミクス, 個別化医療, 遺伝子多型

はじめに

ヒトゲノム約31億の塩基配列の解明に続き、ゲノムの多様性に関する研究が進み、ゲノム情報を医療分野に用いるための研究が行われ、その成果を臨床に応用する研究が進んでいる。薬物の選択に先立ち、薬物に対する毒性や治療に対する反応性のリスクを遺伝子多型に基づいて解明するファーマコゲノミクスもその一つである。抗凝固薬であるワルファリンは、白人に比べて日本人は少量でコントロールされるといわれてきたが、これは日本人と白人の間にみられる遺伝子多型頻度の違いで説明されるようになった。また、抗血小板薬であるクロピドグレルは、活性化体へ変換する酵素の遺伝子多型により血小板凝集抑制能に違いがみられ、日本人と白人ではこの遺伝子多型の頻度も異なる。このように多型頻度には人種差がみられるため、それぞれの民族(人種)で研究する必要性が指摘されている。本稿では、日本人を対象にした研究を含めつつ、抗血栓薬の薬効に関わる遺伝子多型について紹介する。

抗凝固薬ワルファリン量の個人差に関わる遺伝子多型

ワルファリンは臨床に用いられてから約60年が経った抗凝固薬で、これまでに極めて多くの患者に処方されている。ワルファリンの血栓発症抑制効果の有効性は広く認められているものの、出血リスクを抑えて望ましい抗凝固効果を得るための治療域が狭いことが指摘されている。適切な抗凝固の治療域を維持するため、プロトロンビン時間を測定しInternational Normalized Ratio (INR)を求めて、患者の抗凝固能をモニターする必要がある。また、標的INRを達成するために必要とされるワルファリンの投与量は、患者により10~20倍の違いがみられることがある。したがって、適切な投与量を決定するため、ワルファリン治療開始直後には頻繁なINRのモニタリングを行い、複数回にわたる投与量の調節が必要である。適切な投与量が決まったにもかかわらず、患者は過度のもしくは不足した抗凝固療法を経験することがある。これがワルファリンの有害事象の原因となったり、患者本

* 国立循環器病研究センター 分子病態部部长

** 同 脳神経内科部长

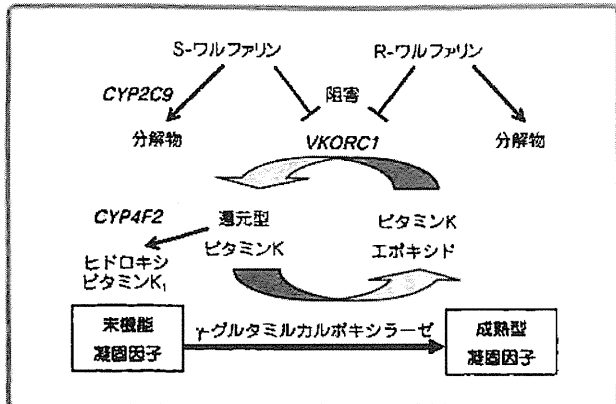


図1 ワルファリンの作用機序
(Yin T, et al: Thromb Res. 120 (1) : 1-10, 2007より引用)

来の使用量より減らした投与につながる事が指摘されている。こうした臨床上の課題の克服を目指して、ファーマコゲノミクスを取り入れたワルファリンの個別化医療の確立が待たれている。

ワルファリンの作用機序を図1に示す。ワルファリンはS-型とR-型のラセミ体の混合物であり、S-ワルファリンは主にCYP2C9で代謝される。S-ワルファリンはR-ワルファリンより3~5倍その作用が強い。日本人では活性が低下するCYP2C9*3多型がアレル頻度3.2%で存在する。すなわち、100人中約6人がCYP2C9*3のヘテロ接合体である。この多型の保有者はCYP2C9活性が低いので、少量のワルファリンでコントロールされる。白人ではCYP2C9多型はワルファリン量の個人差の10%程度を説明するが、日本人では1~5%しか説明しない¹⁾。これは、白人にはCYP2C9*2とCYP2C9*3の両多型が存在するが、日本人にはCYP2C9*3だけがみられCYP2C9*2は存在しないことで説明されている。CYP2C9*3のホモ接合体の頻度は低いものの日本人にもみられ、この遺伝型をもつ患者はワルファリンのオーバーロードになりやすいことが指摘されている²⁾。

ワルファリンはビタミンKエポキシド還元酵素VKORC1を標的酵素とし、本酵素の活性を阻害することにより、エポキシド型ビタミンKの還元型への変換を阻害する(図1)³⁾。ビタミンKはビタミンKサイクルをめぐり、酸化・還元され再利用されている。

ワルファリンがVKORC1活性を阻害すると、プロト

ロンビンなどのビタミンK依存性凝固因子のγ-グルタミルカルボキシル化が阻害され、活性を示す成熟型へと変換されず、凝固能が抑制されることとなる(図1)。VKORC1遺伝子には-1639G>A多型があり、-1639G保有者はワルファリンを多く必要とし、-1639A保有者のワルファリンは少なくてもよい。日本人の80%以上は低用量のワルファリンでコントロールされる遺伝型AAの保有者であり、高用量のワルファリンを要求する遺伝型GGの保有者は1%に満たない。

ワルファリン投与量の個人差の35%程度が遺伝子多型で説明でき、臨床情報(体つき、年齢、併用薬など)を取り入れると50%以上が説明できるという。抗不整脈薬アミオダロンはCYP2C9を阻害するため、アミオダロン併用患者はワルファリンの分解が低下することとなり、少ないワルファリン量でコントロールされる。遺伝型と臨床情報などを用いて、ワルファリンの適切な維持量を予測するいくつかのアルゴリズムが開発されている。国際ワルファリンファーマコジェネティクス共同研究体(International Warfarin Pharmacogenetics Consortium: IWPC)ではIWPC PGアルゴリズムを公開しており⁴⁾、必要な項目を入力すると患者のワルファリン予測量を計算できる(<http://www.warfarindosing.org>)。

最近、CYP4F2遺伝子のV433M多型がワルファリン維持量の個人差に関連すると報告され、日本人を対象にした研究でも確認された⁵⁾。CYP4F2はビタミンK1酸化酵素活性を有し、V433Mアレル保有者はビタミンK酸化酵素活性が低下するため、ビタミンKが代謝されず高用量のワルファリンが必要になるらしい。しかし、CYP4F2遺伝子多型のワルファリン量の個人差に与える影響はCYP2C9とVKORC1に比べて小さい。

■ワルファリンのファーマコゲノミクスアルゴリズム

1. 治療域への導入

ワルファリン治療開始1~3カ月の間は出血リスクが高いため、初期のワルファリン投与量を選択するため、遺伝的・臨床的な情報の使用が期待されている。206名

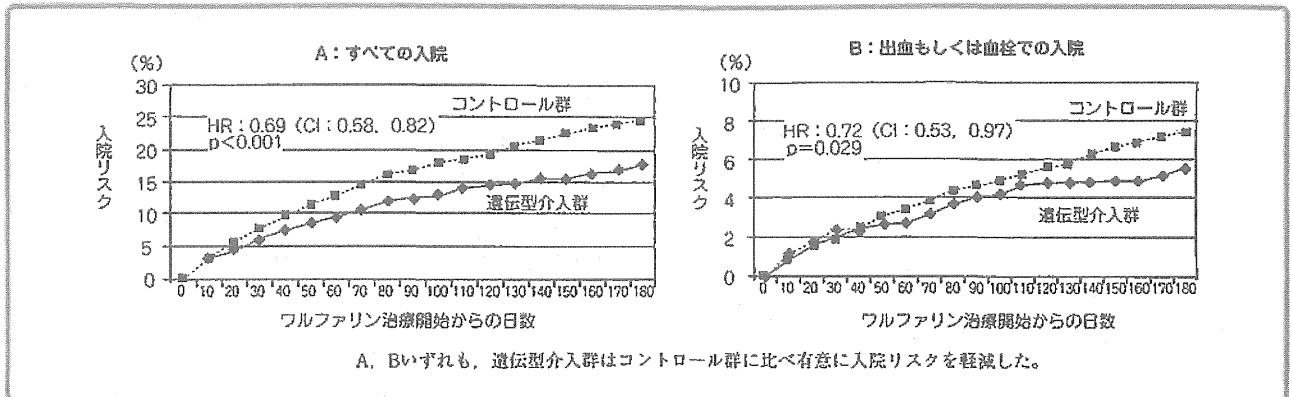


図2 ファーマコゲノミクスアルゴリズムをワルファリン治療に用いた患者群（遺伝型介入群）と用いなかった患者群（コントロール群）のワルファリン治療開始6カ月間の入院リスク [Epstein RS, et al: J Am Coll Cardiol, 55 (25) : 2804-2812, 2010より引用]

のワルファリン投薬開始患者を3カ月間追跡したCoumaGen研究では、従来の経験的手法と遺伝型を取り入れたファーマコゲノミクスアルゴリズム法を比較した⁹⁾。その結果、ファーマコゲノミクスアルゴリズム法のほうが維持量に近い値を示し、投与量を調節する回数も少なく、その有効性が示された。しかし、治療域を外れるINRを示す患者の比率には差がみられなかった。

IWPC PGアルゴリズムを評価する研究も発表されている。このアルゴリズムを用いると、経験的投与に比べ、維持量の20%以内に入る割合が高く、特に週に21mg以下および週に49mg以上を服用する患者には有用であるという⁴⁾。日本人の約78%は同一の遺伝子型、すなわちCYP2C9は野生型、VKORC1は-1639AA型を保有している。多くの日本人は同じ遺伝型をもつので、同じ遺伝型をもつ人のワルファリン維持量は大きく変わらないと考えられるが、少ないながらも別の遺伝型を保有する人もおり、そういった人のワルファリンのコントロールにはIWPC PGアルゴリズムが有用かもしれない。

IWPC PGアルゴリズムが日本人にも適応できる研究が発表された⁷⁾。まず、日本人のアルゴリズムを考えるうえで日本人のワルファリン服用患者200名の実際のワルファリン維持量を求め、次いで年齢、身長、体重、併用薬を用いるアルゴリズム（遺伝型情報を用いない）、および、これらに加えてCYP2C9とVKORC1の遺伝型を取り入れたIWPC PGアルゴリズムからそれぞれワルファリン量を計算し、これらのワルファリン量と実際の

ワルファリン量との間の違いが1mg/日以内に入るかどうかを検討した。その結果、IWPC PGアルゴリズムが低用量および高用量のワルファリンを必要とする患者に対してより有効であることが示された⁷⁾。

2. 有害事象

ファーマコゲノミクスアルゴリズムはワルファリンの維持量に近い値を予測するが、ワルファリンの有害事象の低減に寄与するかどうかは明らかではなかった。最近、このアルゴリズムを取り入れるとワルファリンの有害事象が減るという研究が発表された^{8),9)}。MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness Study) は、遺伝子情報の有効性を、ワルファリン治療開始後から6カ月間の患者の入院で評価した研究である⁹⁾。遺伝型介入群ではワルファリン導入患者896名のVKORC1とCYP2C9の遺伝型をタイピングし、遺伝型とそれから予想される表現型を医師に報告した。コントロール群は、研究に先立って集められていた遺伝情報をもたないワルファリン治療群（年齢と性別がマッチした2,688名）のデータである。主要エンドポイントは、ワルファリン治療の開始後から6カ月間の入院であり、イベントフリーの期間を日数で求めた。図2に示すように、遺伝型介入群はコントロール群と比べて「すべての入院」が31%減少し、「出血もしくは血栓での入院」が28%減少した⁹⁾。しかしこの研究では、医師に遺伝型を伝えるのに約1カ月（中央値：32日、最速：11日）かかったため、この間に

表1 CoumaGen-II 研究での主要エンドポイントの結果

エンドポイント	PG-1群 (n=245)	PG-2群 (n=232)	p値	連結したPG群 (n=477)	コントロール群 (n=1,866)	p値
30日間で治療域のINRから外れていた期間 (%) [平均値 (CI)]	30.6 (27.6~33.7)	31.8 (28.8~34.8)	0.59	31.2 (29.2~33.5)	41.5 (39.9~43.2)	<0.001
3カ月間で治療域のINRから外れていた期間 (%) [平均値 (CI)]	30.3 (27.3~33.2)	30.3 (27.5~33.1)	0.99	30.3 (28.5~32.6)	42.3 (40.8~43.8)	<0.001
30日間で治療域に入っていた期間 (%) [平均値 (CI)]	70.2 (67.2~73.3)	67.5 (64.5~70.6)	0.22	68.9 (67.2~70.6)	58.4 (56.8~60.0)	<0.001
3カ月間で治療域に入っていた期間 (%) [平均値 (CI)]	71.7 (68.7~74.6)	70.8 (67.9~73.6)	0.68	71.2 (69.2~73.3)	58.6 (57.0~60.2)	<0.001

PG: ファーマコゲノミクス, CI: 95%信頼区間

[Anderson JL et al: Circulation, 125 (16): 1997-2005, 2012より引用]

INRに基づいてワルファリンの用量を調節した可能性が指摘された。

CoumaGen-II 研究では、*CYP2C9*と*VKORC1*の遺伝型に基づく投与量の決定は登録6時間（最長24時間）以内に行った⁹⁾。ファーマコゲノミクスに基づき初回投与量だけを調整したPG-1アルゴリズム群と3回調整したPG-2アルゴリズム群を、従来法での投与群と比較した（無作為ランダム化試験）。エンドポイントは、治療開始30日間および3カ月間の治療域を外れたINRおよび治療域内の時間とした。いずれのエンドポイントも、PG-1群とPG-2群に差はみられなかったため、より簡単な1段階PGアルゴリズムでよいと考えられた（表1）。ファーマコゲノミクスガイド投与法は、従来法よりすべての主要エンドポイントで恩恵を示した（表1）。また、重篤な有害事象も少なかった（4.5% vs 9.4%、調整相対リスク:0.44 [CI:0.28~0.70], p<0.001）。このようにファーマコゲノミクス投与法は良い成績を示したので、臨床に適用されるべきだと報告した。

ワルファリン治療開始時におけるファーマコゲノミクスアルゴリズムの有効性を評価するため、これらの研究に加えて、対象登録者や研究デザインなどが異なる3つのランダム化試験が進行中であり、2013年に終了する。これらの試験により、ファーマコゲノミクスアルゴリズムがワルファリン治療の初期の有害事象の抑制に真につながるかどうか明らかとなるだろう。

抗血小板薬クロピドグレルの効き目に関わる遺伝子

心筋梗塞や脳梗塞の再発抑制には抗血小板薬クロピドグレルが有効であるとのエビデンスが報告されている。クロピドグレルはプロドラッグである。クロピドグレルは酵素により2段階の活性化を経て、約15%のみが活性化体へ変換され、血小板のADP受容体であるP2Y₁₂のCys97を修飾し、P2Y₁₂が膜脂質ラフトから離れることにより血小板のADP凝集を抑制する（図3）¹⁰⁾。活性化体への変換はいくつかの酵素が関与するが、なかでも*CYP2C19*は両段階に関わり、活性が消失する遺伝子多型（*CYP2C19**2および*CYP2C19**3）保有者のADP惹起血小板凝集抑制は低いことが広く認められている。*CYP2C19*の両変異は日本人に広くみられ、*2のアレル頻度は0.27、*3のアレル頻度は0.13である。このことから、約40%の日本人のみが野生型*CYP2C19*をもち、残り60%の日本人はいずれかの変異をもつと予想され、そのためクロピドグレルによる血小板凝集抑制が低い可能性がある。

この変異とイベントとの関連はどうであろうか。急性心筋梗塞患者の再発予防のためのクロピドグレル投与において、*CYP2C19*変異保有者は心血管イベントの発症率が高いという関連解析の成績が報告された¹¹⁾。また、*CYP2C19*の機能喪失多型保有者は、クロピドグレルの活性化体の血中濃度が低く、血小板凝集抑制が悪く、ステント血栓を含むイベントが多いという成績が報告され

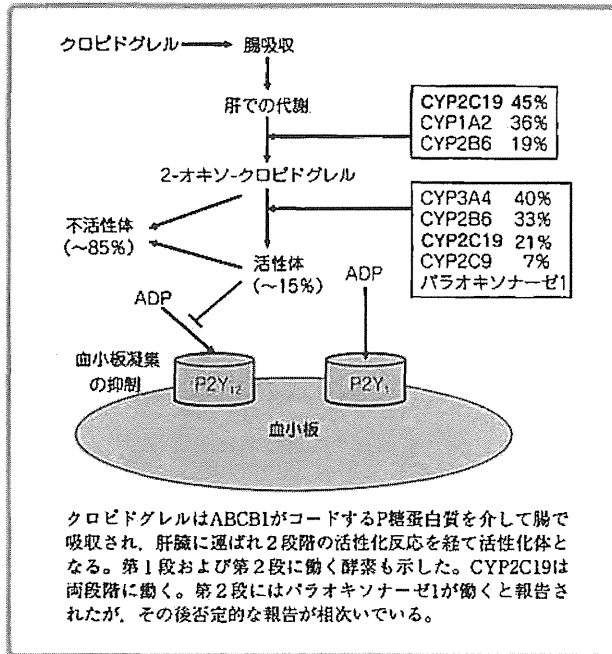


図3 2段階によるクロピドグレルの活性化
 (Yin T, et al : Thromb Res. 128 (4) : 307-316, 2011より引用)

た¹²⁾。しかし、その後、*CYP2C19*遺伝子多型と心血管イベントは関連を示さないという報告がなされ¹³⁾、メタ解析の結果は、小規模の研究を含めると関連を示すが、イベントが200以上みられる大規模研究に絞ると関連がみられないと報告した¹⁴⁾。このように、*CYP2C19*遺伝子多型と心血管イベントの関連はまだまだ議論がある。

おわりに

抗血栓薬に関わる遺伝子多型の研究を紹介した。2011年7月、米国国立心肺血液研究所(NHLBI)はワシントンDCに、心血管疾患のファーマコゲノミクス分野での研究の方向性を示すガイド作成のためのワーキンググループを招集した¹⁵⁾。その報告では、現時点でのファーマコゲノミクスを臨床に用いるための障壁があげられている。こういった問題を克服したうえで、抗血栓薬を含めたファーマコゲノミクス遺伝子多型情報が実臨床に用いられることになると考えられる。

引用文献

- 1) Kimura R, et al : Genotypes of vitamin K epoxide reductase, g- glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res*, 120 (2) : 181-186, 2007
- 2) Goto T, et al : Standard warfarin dose in a patient with the *CYP2C9**3/*3 genotype leads to hematuria. *Clin Chim Acta*, 411 (17-18) : 1375-1377, 2010
- 3) Yin T, et al : Warfarin dose and the pharmacogenomics of *CYP2C9* and *VKORC1* - rationale and perspectives. *Thromb Res*, 120 (1) : 1-10, 2007
- 4) Klein TE, et al : Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*, 360 (8) : 753-764, 2009
- 5) Cha PC, et al : Genome-wide association study identifies genetic determinants of warfarin responsiveness for Japanese. *Hum Mol Genet*, 19 (23) : 4735-4744, 2010
- 6) Anderson JL, et al : Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation*, 116 (22) : 2563-2570, 2007
- 7) Takeuchi F, et al : Evaluation of pharmacogenetic algorithm for warfarin dose requirements in Japanese patients. *Circ J*, 74 (5) : 977-982, 2010
- 8) Epstein RS, et al : Warfarin genotyping reduces hospitalization rates results from the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study). *J Am Coll Cardiol*, 55 (25) : 2804-2812, 2010
- 9) Anderson JL, et al : A randomized and clinical effectiveness trial comparing two pharmacogenetic algorithms and standard care for individualizing warfarin dosing (CoumaGen-II). *Circulation*, 125 (16) : 1997-2005, 2012
- 10) Yin T, et al : Pharmacogenomics of clopidogrel: evidence and perspectives. *Thromb Res*, 128 (4) : 307-316, 2011
- 11) Simon T, et al : Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med*, 360 (4) : 363-375, 2009
- 12) Mega JL, et al : Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med*, 360 (4) : 354-362, 2009
- 13) Pare G, et al : Effects of *CYP2C19* genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med*, 363 (18) : 1704-1714, 2010
- 14) Holmes MV, et al : *CYP2C19* genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 306 (24) : 2704-2714, 2011
- 15) Musunuru K, et al : Cardiovascular pharmacogenomics: Current status and future directions-Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group. *J Am Heart Assoc*, e000554, 2012

ADAMTS13 研究の最先端

宮田 敏行¹, 小亀 浩市¹, 秋山 正志¹, 坂野 史明¹,
中山 大輔¹, 武田 壮一²

Key words : ADAMTS13, Platelet, Thrombotic thrombocytopenic purpura, Von Willebrand factor

はじめに 血栓性血小板減少性紫斑病とは

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) は微小血管内に血小板血栓が生じる致死率の高い疾患である。TTP は血中のフォンビルブランド因子 (VWF) 切断酵素である ADAMTS13 が先天性もしくは後天性の原因により活性が著減し, 超高分子量 VWF マルチマーが血中に蓄積し, これが引き金となり血小板血栓が形成される。微小血管に血小板血栓ができるため, 消費性に血小板数の減少を示し, 赤血球が血栓に衝突し損傷を受けるため, 破碎赤血球が見られ溶血性貧血を示す。脳の微小血管が閉塞すると虚血性または梗塞性の障害として動揺する精神・神経症状が観察される。また, 長期にわたって腎機能障害がみられる。VWF は 2,050 アミノ酸残基のモノマーが N 末端どうし, C 末端どうしでジスルフィド結合を介して直鎖状に繋がり, 超高分子量マルチマー (unusually large VWF multimer, UL-VWF マルチマー) として合成され血管内皮細胞から血中に分泌される。この UL-VWF マルチマーは血小板活性化能が高く, これが血中に蓄積する TTP 患者では, 微小血管に血小板血栓が生じる。この TTP の病態は血漿交換により劇的に改善される。これは血漿交換により ADAMTS13 に対する抗体が血漿から除去されること, かつ ADAMTS13 が補充されることによる。これにより, ADAMTS13 活性が回復し, 超高分子量 VWF マルチマーが通常のマルチマーまで分解され, 血小板血栓の形成が抑制される^{1~4)}。

先天性 ADAMTS13 欠損症の遺伝子解析と ADAMTS13 活性測定基質の開発

TTP の原因遺伝子として, 血漿メタロプロテアーゼ ADAMTS13 が 2001 年にクローニングされた^{5~7)}。私達は奈良県立医科大学藤村吉博教授と共同研究を行い, まず先天性 ADAMTS13 欠損症の遺伝子解析を行った。その結果, C908Y 変異は本州に, R193W 変異は瀬戸内地域と東北地方に, Q449X は東北地方に複数例みられるなど, 変異の地理的な分布も示すことができるまでに ADAMTS13 の遺伝子変異の情報が蓄積された^{8,9)}。これらの先天性 ADAMTS13 欠損症のうち幾人かは, 妊娠時に先天性 ADAMTS13 欠損症による TTP と診断された¹⁰⁾。また, 脳梗塞治療薬として広く用いられていた抗血小板薬チクロピジンの副作用として, 極めて頻度は低いが TTP の発症例が報告された¹¹⁾。ADAMTS13 活性を簡便に測定できれば TTP の診断を早期に行えるが, 当時は活性測定に SDS-アガロース・抗 VWF 抗体ウェスタンブロット法を用いていたので数日を要した。そこで私達は ADAMTS13 の簡易測定法の開発に着手し, VWF の A2 ドメイン内の 73 残基が最小基質であることを明らかにした¹²⁾。その後, 切断部位である Tyr1605-Met1606 結合をはさみ蛍光基と消光基を導入した蛍光基質 FRETS-VWF73 を開発した¹³⁾。本基質は蛍光共鳴エネルギー転移により自家蛍光が抑えられているが, ADAMTS13 により Tyr1605-Met1606 結合が切断されると蛍光を発する。本基質を用いると 30 分以内に ADAMTS13 活性を定量できる。

¹ 国立循環器病研究センター 分子病態部

² 国立循環器病研究センター 心臓生理機能部

日本人一般住民を対象にした ADAMTS13 活性測定と先天性 ADAMTS13 欠損症の推定頻度

簡便で定量性のある ADAMTS13 活性測定基質を開発したので、本基質を用いて日本人 3,616 人（男性 1,687 人、女性 1,929 人）の ADAMTS13 活性の測定を行った¹⁴⁾。ADAMTS13 活性は 40% から 200% 程度まで幅広い分布を示した。男性は女性より活性が低いことが判明した（男性、 $93 \pm 24\%$ 、平均値 \pm 標準偏差、女性、 $106 \pm 27\%$ 、 $P < 0.0001$ ）（図 1A）。また、30 歳台から 80 歳台までで活性を比較すると、男女ともに加齢により特に 60 歳以降、活性は低下した（図 1B）。80 歳台の活性は 30 歳台の活性の約 80% であった。一方、VWF 抗原量は加齢により増加するが、今回の集団でも VWF 量は加齢により増加し、80 歳台の VWF 量は 30 歳台に比べ男性で 1.8 倍、女性で 1.7 倍増加していた（図 1C）。その結果 VWF/ADAMTS13 の比は加齢により劇的に増加

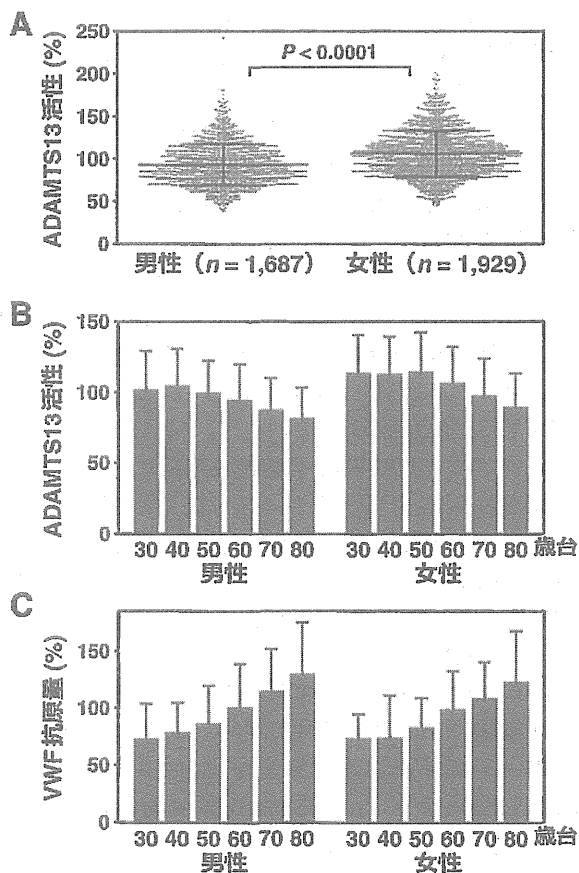


図 1 日本人一般住民の ADAMTS13 活性と VWF 抗原量¹⁴⁾
 A. FRETS-VWF73 を用いて測定した ADAMTS13 活性。
 男性の ADAMTS13 活性は女性の活性より低い。
 B. 年齢別の ADAMTS13 活性。
 C. 性別に分けた年齢別の VWF 抗原量。

することが判明した¹⁴⁾。この比は急性心筋梗塞や肝硬変で上昇するといわれており、高齢者の易血栓性を反映しているものと考えられる。ADAMTS13 の活性測定の基質に VWF を用いた場合、検体試料中の VWF 濃度が活性に影響することが危惧されていた。しかし、FRETS-VWF73 を基質に用いると、ADAMTS13 活性は血中 VWF 濃度に全く影響を受けないことが明らかとなった。また、VWF には ABO 型糖鎖が結合しているため、血中 VWF 濃度は O 型で低いことが知られている。私達の測定でも、O 型の人々の VWF 濃度は明らかな低値を示したが、ADAMTS13 活性は ABO 型で影響を受けなかった。

次に一般住民での ADAMTS13 活性値を用いて、先天性 ADAMTS13 欠損症の頻度の推定を行った¹⁵⁾。一般住民 3,200 人（男性 1,500 人、女性 1,700 人）から、最も活性の低い 32 人、次いで活性の低い 32 人、中央値の活性を示す 32 人、最も活性の高い 32 人（各群、男性 15 人、女性 17 人）合計 128 人を選び、ADAMTS13 の蛋白質コード領域の全塩基配列の決定を行った。その結果、活性最低値群に 7 つのまれなミスセンス変異・ノンセンス変異・フレームシフト変異、次低値群に 3 つのまれなミスセンス変異・フレームシフト変異、活性中央値群と活性高値群にそれぞれ 2 つのまれなミスセンス変異を同定した。この結果から、32 人中には活性に影響を与えないまれなミスセンス変異が 2 つ存在すると考えられた。これを考慮すると、活性最低値群に 5 アレル、および活性次低値群に 1 アレルの機能消失を伴うと考えられる変異アレルが同定されたこととなる。すなわち、対象とした 3,200 人中に 6 人（すなわち 533 人に 1 人）の ADAMTS13 欠損症ヘテロ接合体の存在が推定された。この頻度は家族性高脂血症の頻度によく一致する。これより、TTP の発症に繋がる ADAMTS13 欠損症ホモ接合体もしくは複合ヘテロ接合体の頻度は 110 万人に 1 人と推定され、日本人には約 110 人の先天性 ADAMTS13 欠損症の存在が推定された¹⁵⁾。これまでのところ、日本人には 43 人の先天性 ADAMTS13 欠損症患者が報告されている⁹⁾。

ADAMTS13 の東アジア人特有のミスセンス変異、P475S 変異

私達は先天性 ADAMTS13 欠損症の遺伝子解析を行なう過程で、東アジア人特有のミスセンス変異、P475S、を同定した⁹⁾。日本人約 10 人に 1 人が本変異のヘテロ接合体である。一般住民を対象にした研究から、P475S 変異ヘテロ接合体は ADAMTS13 活性が約 17% 低下していることが判明した¹⁵⁾。組換え変異体 (MDTCS-P475S) は野生型に比べ FRETS-VWF73 に対して Km 値

が2倍大きくなっていたが Kcat 値は変化しなかった。組換え変異体はずり応力をかけた VWF を切断した。これらの結果より、本変異保有者は ADAMTS13 活性を保持しており、本変異が直接 TTP のリスクにはならないと考えられた。

ADAMTS13 による VWF の切断メカニズム：ずり応力による基質 VWF A2 ドメインのアンフォールドと ADAMTS13 による複数のエクソサイトを介した結合

先に述べたように、ADAMTS13 による基質 VWF の切断には VWF の 73 残基が必要であり、より短い 64 残基にするとともに切断しない。例えば、トロンビンは 3 残基から成る合成基質を効率良く切断するし、凝固 Xa 因子は 4 残基から成る基質を切断する。ADAMTS13 が 73 残基という長いアミノ酸配列を要求することは、これまでの凝固プロテアーゼの基質認識とは異なったメカ

ニズムによる切断が考えられた。そこで、ADAMTS13 の立体構造の解析を行った。ADAMTS13 は 1,427 残基で明らかなドメイン構造からなる (図 2A)。MDTCS 領域は全長 ADAMTS13 とほぼ同程度の活性を示す¹⁶⁾。また、S ドメインには ADAMTS13 の活性中和自己抗体の結合部位の存在が指摘されていた¹⁶⁾。そこで、MDTCS 領域を培養細胞で発現させ結晶化を試みた。しかし、不溶性のため結晶化には至らなかった。そこで DTCS 領域の結晶化とその構造解析を行った^{17, 18)}。

ADAMTS13-DTCS は D, C_A, S という 3 つの球状ドメインが T と C_B という長いドメインで連結している構造をとっていた¹⁷⁾ (図 2B)。結晶構造解析から C ドメインは C_A と C_B から成ることが判明した。D ドメインはディスインテグリン様構造をとらず、C_A ドメインと似たフォールディングをしていた。後天性 TTP 患者に見られる ADAMTS13 の活性阻害自己抗体 (抗 ADAMTS13 抗体) のエピトープが S ドメインに報告さ

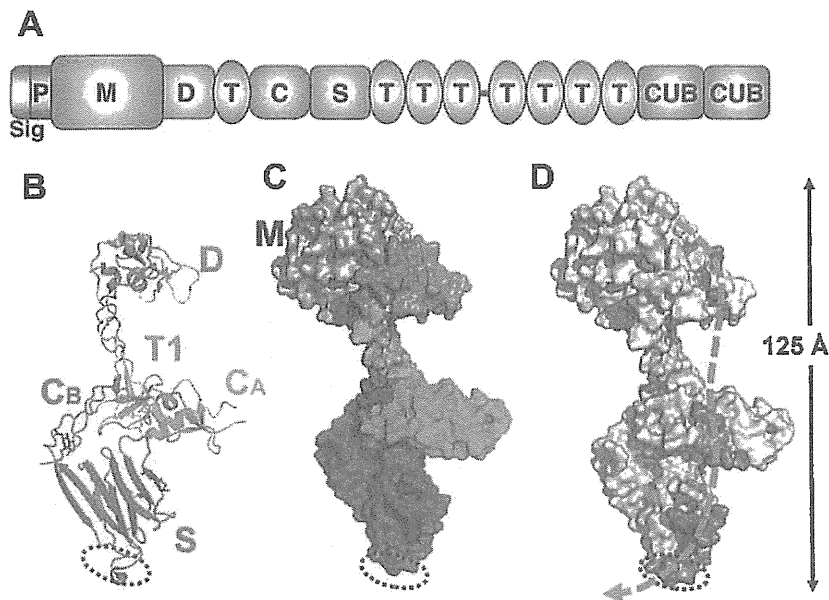


図 2 ヒト ADAMTS13 のドメイン構造と部分立体構造

- A. ADAMTS13 のドメイン構造。MDTCS 領域は全長 ADAMTS13 とほぼ同等の活性を示す。ADAMTS13 は、N 末端から、メタロプロテアーゼドメイン (M)、ディスインテグリン様ドメイン (D)、トロンボスポンジン 1 I 型リピードドメイン (T)、Cys-rich ドメイン (C)、スパーサードメイン (S)、7 つの T ドメイン、2 つの CUB ドメインから成る。シグナル配列 (Sig) とプロ配列 (P) は生合成過程で切断される。
- B. X 線結晶構造解析で決定した ADAMTS13 の DTCS 領域の立体構造¹⁷⁾。S ドメイン先端の点線で囲んだループ (Arg660, Tyr661, Tyr665 を含む) に自己抗体が結合すると TTP を発症する¹⁹⁾。
- C. メタロプロテアーゼ (M) ドメインの構造をモデリングし DTCS に結合させた MDTCS モデル。
- D. MDTCS 構造中の 3 つのエクソサイトを赤色および赤茶色で示した。このエクソサイトに VWF の 73 残基が結合する。基質である VWF はオレンジ色で示した様に MDTCS に結合すると考えられる。