

れ¹⁹⁾, このエピトープはSドメインの先端に位置することが判明した(図2B)。結晶構造で決定したDTCS構造にMドメインをモデリングにより連結させたMDTCS領域の構造を図2Cに示す^{17, 20)}。この図から、自己抗体の結合部位であるSドメインの先端とMドメインの活性中心は120 Å程度離れているにもかかわらず、抗体の結合によりADAMTS13活性が阻害されることが判明した。次いで、MDTCS領域の分子表面に位置するアミノ酸残基や複数のアミノ酸から構成されるループに変異を導入し、FRETS-VWF73基質を用いて変異の影響を調べた。その結果、VWFへの結合にかかわる3つの領域(エクソサイトとよぶ)が存在することが判明した(図2Dの赤および赤茶色で示す部分)。なかでもSドメイン中のエクソサイトは自己抗体結合部位と重複しており、このエクソサイトに抗体が結合すると活性が阻害されることをうまく説明した¹⁷⁾。

ADAMTS13によるVWFの切断において重要なポイントは、酵素であるADAMTS13は活性型として血中に循環しており、基質であるVWFの切断されるペプチド結合は分子内部に隠れているという点である。立体構造から明らかなように、ADAMTS13の3つのエクソサイトは露出していて基質を結合する準備ができており、メタロプロテアーゼドメインは触媒活性を示す。しかし、切断されるペプチド結合はA2ドメインの内部に埋っており、切断を受けるにはA2ドメインがアンフォールドを起こしてTyr1605-Met1606結合が露出する必要がある。生体内では、血流により生じる高圧力がA2ドメインをアンフォールドし、Tyr1605-Met1606結合を露出させ、ADAMTS13がこの結合を切断すると考えられている。ごく最近、A2ドメインの立体構造が決定された²¹⁾。A2ドメインはジスルフィド結合を持たないのでアンフォールドしやすいと考えられていたが、結晶構造のデータでは、切断部位を含むC末端のペプチドの温度因子が高く、この部分はアンフォールドしやすいことが判明した²¹⁾。また、レーザーピンセットを用いた実験から、単独のA2ドメインは11 pN程度の力でアンフォールドすることも明らかにされた²²⁾。

ADAMTS13 ノックアウトマウスおよび ADAMTS13 C末端ドメイン欠損マウスの血栓能の評価を通じた ADAMTS13 の抗血栓能の確立

私達はADAMTS13遺伝子欠損マウスを作製しその表現型を解析した²³⁾。遺伝子欠損マウスは正常に妊娠出産し、産仔も正常に成長した。欠損ホモ体はメンデルの法則にしたがった数で出産した。欠損マウスの血中には超高分子量VWFマルチマーの蓄積を認めしたが、TTP様の微小血管内血小板血栓は観察されなかった²³⁾。ミシガ

ン大学のグループもADAMTS13ノックアウトマウスを作製したが、彼らのマウスもTTP様の血栓を示さなかった²⁴⁾。私達はノックアウトマウスの作製の過程でマウスADAMTS13のcDNAクローニングを行ったところ、系統特異的にトランスポゾンが挿入され、C57BL/6などではC末端に位置する2つのTドメインと2つのCUBドメインが欠損したADAMTS13を持つことを明らかにした²⁵⁾。そこで、C末端ドメインを欠損するC57BL/6マウスを、全長ADAMTS13を持つ129/Svマウスに10世代戻し交配することでC末端欠損ADAMTS13をもつ129/Svマウスを作製し、野生型129/Svマウスおよび129/Sv遺伝型背景を持つADAMTS13欠損マウスと血栓能を比較した^{26, 27)}。

図3Aに、高圧力(5,000 秒⁻¹)下の*in vitro*血栓形成能を示す。これはコラーゲンを固相化した平行板型フローチャンバーに蛍光標識した血小板を含む全血を流し、高圧力下での血小板血栓形成をモニターしたものである。ノックアウトマウス(-/-)は最も血栓量が大きく血栓能が高く、野生型マウス(L/L)は最も血栓量が少ない。このことは、ADAMTS13は抗血栓因子として働き、血小板血栓の形成を抑制することを示している。一方、C末端欠損マウス(S/S)の80秒後の血栓量は野生型より有意に大きな血栓を示した。この差は2,000 秒⁻¹の低圧力では観察されず、5,000 秒⁻¹という高圧力下ではじめて観察されたので、ADAMTS13のC末端領域は高圧力下で抗血栓性を発揮することが明らかになった²⁸⁾。

次いで、塩化鉄による血管障害モデルを用いて、血管の閉塞に至るまでの時間を測定することにより3種のマウスの血栓能を評価した(図3B)。野生型マウス(L/L)は障害血管が閉塞されるまでに最も長い時間を必要とし、ノックアウトマウス(-/-)は最も早く閉塞した。C末端欠損マウス(S/S)はその中間であった。野生型マウスが血管閉塞に至るまでに長い時間を必要とすることは、ADAMTS13が抗血栓因子として働き、血管閉塞に抵抗することを示している。私達のこの結果は、平行板型フローチャンバーを用いて以前に示されていた現象、すなわちADAMTS13は高圧力がかかる血栓成長部位での血栓の成長を阻止する、という知見を強く支持している²⁸⁾。コラーゲンとエピネフリンの混液を静注し、血小板数の減少を調べた実験では、野生型>C末端欠損型>ノックアウトの順に、血小板減少の重症度が増大した(図3C)。

TTP様症状を示す動物モデルは有用である。ADAMTS13ノックアウトマウスはTTP様の症状を示さないことを述べた²³⁾。このマウスにTTP様症状を起こさせるには、高い濃度のVWFを持つCASAマウスとの

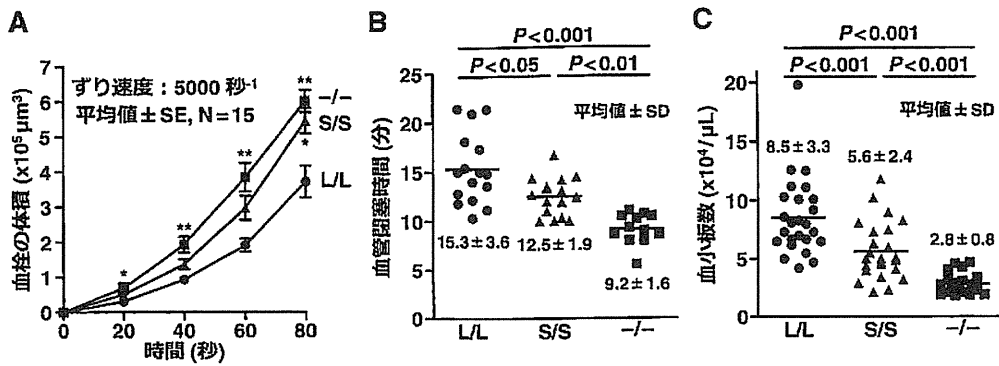


図3 ADAMTS13 ノックアウトマウスと ADAMTS13 C 末端欠損マウスの抗血栓能²⁶⁾

- A. 平行板型フローチャンバーを用いた固定化コラーゲン上の血小板血栓量。ずり速度：5,000 秒⁻¹。 -/-：ノックアウトマウス，S/S：C 末端欠損マウス，L/L：野生型マウス。
 B. 塩化鉄による腸間膜細動脈障害後の血流の停止までにかかる時間の比較。血流の停止が30 秒以上になるまでに要する時間を求めた。
 C. コラーゲン・エピネフリンの静注による血小板数の減少。

交配²⁴⁾，溶血性尿毒症症候群の原因となるシガ毒素の静注^{24, 29)}，ADAMTS13 抗体の静注，といった方法がある。また，ヒヒに抗ヒト ADAMTS13 抗体を静注するとTTP 様の症状を示す³⁰⁾。

ADAMTS13 が VWF マルチマーを切断するメカニズム

VWF マルチマーが ADAMTS13 により切断を受けるメカニズムは次のように考えられる。血漿中の ADAMTS13 の約 5% は VWF と結合した状態で循環している^{31, 32)}。この結合は ADAMTS13 の C 末端領域のドメインと VWF の C 末端領域のドメインの間で行われる (図 4 ①)。前述したように，C 末端ドメイン欠損 ADAMTS13 をもつマウス (C57BL/6 マウスなど) は全長 ADAMTS13 をもつマウスに比べ血管閉塞に要する時間の短縮などが見られ，抗血栓能の低下が観察された。このことから，血管内での血小板血栓形成において，ADAMTS13 の C 末端ドメインは一定の働きをしていることが理解された。図 4 ②に示すように，VWF の A2 ドメイン内の ADAMTS13 切断部位 (Tyr1605-Met1606 結合) は分子内部に埋れている。A2 ドメインは血管内のずり応力によりアンフォールドし，ADAMTS13 が結合する A2 ドメインの VWF73 領域が露出し (図 4 ③)，ADAMTS13 内の 3 つのエクソサイトが VWF73 領域に結合し (図 4 ④)，メタロプロテアーゼ (M) ドメインの触媒基により Tyr1605-Met1606 結合が切断される (図 4 ⑤)。このように，ADAMTS13 は N 末端の M ドメインから C 末端の VWF 結合ドメインまで，全領域を使って基質 VWF を認識し 1ヶ所のペプチド結合を正確に切断する。VWF の血中濃度は約 10 μg/ml であり，血漿

総タンパク質は約 80 mg/ml である。このように，8,000 倍も少ないタンパク質を特異的に切断するために，血中濃度 0.5~1 μg/ml である ADAMTS13³³⁾ は全領域を用いて VWF を認識するよう進化を遂げたものと考えられる。

ADAMTS プロテアーゼは 19 種のファミリータンパク質から成り，全ての ADAMTS プロテアーゼは MDTCS 領域を含む³⁴⁾。このファミリーのプロテアーゼはここで述べたように，複数のエクソサイトを介して特異的に基質を認識していると考えられる^{17, 18)}。ADAMTS13 が VWF 切断酵素としてクローニングされて以来，多くの ADAMTS ファミリータンパク質が疾患に関連すると報告された^{34, 35)}。こういった疾患発症の解明に DTCS 領域の立体構造の解析が大きく寄与している³⁵⁾。

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ことを述べた。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。VWF はモノマーがジスルフィド結合で架橋されたマルチマーとして血中に分泌される。VWF マルチマーは静止状態ではゆるいコイル状の鳥の巣のような形をしている^{36, 37)}。生体内の正常血管内で見られる最大のずり応力は，100 dyn/cm² (ずり速度で 5,000 秒⁻¹) といわれる。実験によると，モノマーが 200 個程度繋がった VWF マルチマーの中央にあるモノマーには，10 pN の張力がかかると推定された²²⁾。単独の A2 ドメインは約 11 pN の張力でアンフォールドし ADAMTS13 により切断を受けると考えられる²²⁾。血漿中の VWF は最大で ~200 モノマーが繋がっている^{36, 37)}。これらの結果は血漿中の最大の VWF マルチマーは 200 モノマーからなることをうまく説明している。しかし，A2 ドメインは他

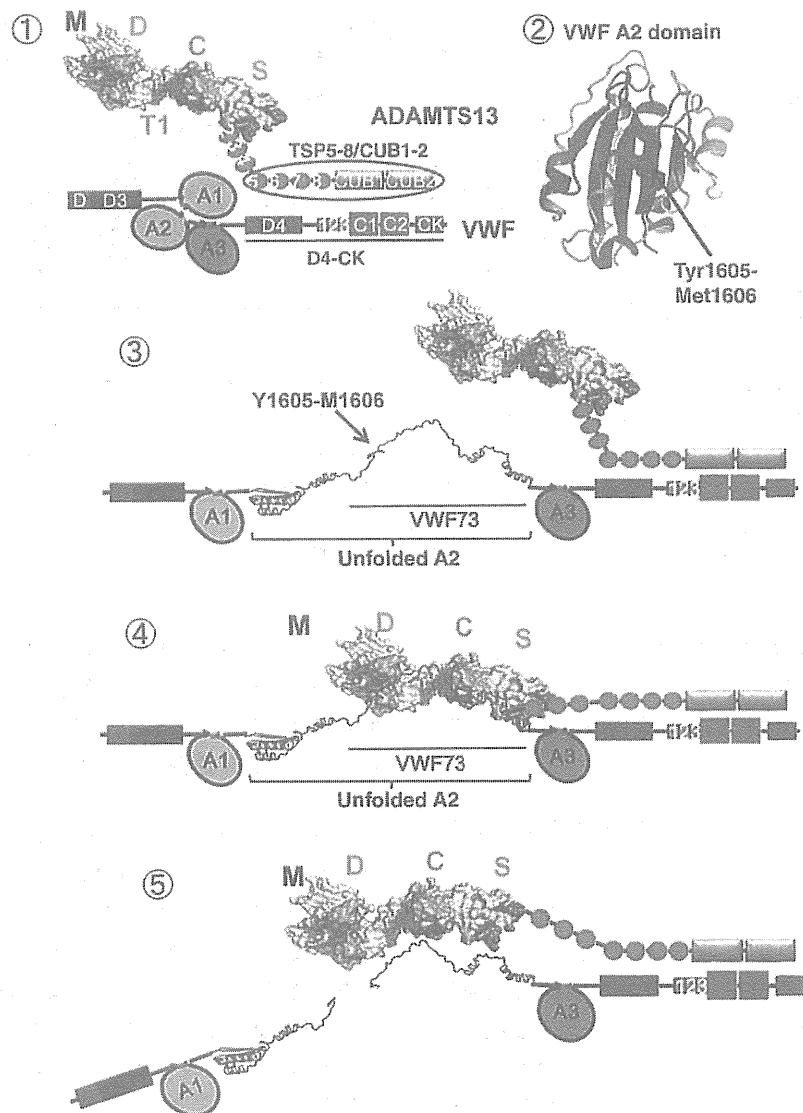


図4 ADAMTS13によるずり応力依存性のVWF切断

② VWF A2ドメインの立体構造²¹⁾。ADAMTS13切断部位であるTyr1605-Met1606結合は分子内に埋れている。A2ドメインはジスルフィド結合を持たない。

①, ③~⑤ 約5%のADAMTS13は血漿中でVWFとC末端領域を介して複合体を形成している^{31, 32)}。VWF A2ドメインはずり応力によりアンフォールドし、ADAMTS13結合部位であるVWF73領域が露出する。ここにADAMTS13のD, C, Sドメインにあるエクソサイトが結合し、MドメインがY1605-M1606結合を切断する¹⁷⁾。このように、酵素であるADAMTS13は活性型として血中を循環しており、基質であるVWFがアンフォールドするとA2ドメイン内の特定の残基を切断するという、めずらしい基質切断のメカニズムが明らかとなった。

のドメインで安定化され、アンフォールドに21 pNを要するという研究もあり、より慎重な解釈が求められる³⁹⁾。

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 GPIb α 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

血小板³⁹⁾, 内皮下層のコラーゲン⁴⁰⁾, 血管内皮細胞^{41, 42)}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。

おわりに

ADAMTS13を中心に, TTP発症のメカニズムを解説した。2001年にADAMTS13がクローニングされて以来, TTPに関して多くの研究がなされ, TTPの発症メカニズムの理解が大きく進んだ。本稿ではTTPの治療に関して述べなかった。治療に関しては他書を参照されたい^{1, 43~45)}。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示: 本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Sadler JE. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2008; **112**: 11-18.
- 2) 副島見事, 小亀浩市, 松本雅則. ADAMTS13物語. *日血栓止血会誌*. 2009; **20**: 377-397.
- 3) 松本雅則, 藤村吉博. ADAMTS13とTTP最近の進歩. *Annu Rev 血液*. 2009; **2009**: 209-216.
- 4) Tsai HM. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol*. 2010; **91**: 1-19.
- 5) Soejima K, Mimura N, Hirashima M, et al. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem*. 2001; **130**: 475-480.
- 6) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001; **413**: 488-494.
- 7) Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*. 2001; **276**: 41059-41063.
- 8) Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, et al. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**: 11902-11907.
- 9) Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, et al. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene

- analysis in Japan. *J Thromb Haemost*. 2011; **9 Suppl 1**: 283-301.
- 10) Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, et al. Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol*. 2009; **144**: 742-754.
- 11) Bennett CL, Weinberg PD, Rozenberg-Ben-Dror K, Yarnold PR, Kwaan HC, Green D. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine. A review of 60 cases. *Ann Intern Med*. 1998; **128**: 541-544.
- 12) Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood*. 2004; **103**: 607-612.
- 13) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol*. 2005; **129**: 93-100.
- 14) Kokame K, Sakata T, Kokubo Y, Miyata T. von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population. *J Thromb Haemost*. 2011; **9**: 1426-1428.
- 15) 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.
- 16) Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, et al. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood*. 2003; **102**: 3232-3237.
- 17) Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T. Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; **106**: 19274-19279.
- 18) 秋山正志, 武田壮一, 小亀浩市, 高木淳一, 宮田敏行. VWF切断酵素ADAMTS13のエキソサイト認識機構. *生化学*. 2010; **82**: 950-956.
- 19) Pos W, Crawley JT, Fijnheer R, Voorberg J, Lane DA, Luken BM. An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood*. 2010; **115**: 1640-1649.
- 20) Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2012; **1824**: 164-176.
- 21) Zhang Q, Zhou YF, Zhang CZ, Zhang X, Lu C, Springer TA. Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; **106**: 9226-9231.
- 22) Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*. 2009; **324**: 1330-1334.
- 23) 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*. 2006; **107**: 3161-3166.
- 24) Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, et al. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest*. 2005; **115**: 2752-2761.
 - 25) Banno F, Kaminaka K, Soejima K, Kokame K, Miyata T. Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 30896-30903.
 - 26) Banno F, Chauhan AK, Kokame K, et al. The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of *in vivo* thrombus formation. *Blood*. 2009; **113**: 5323-5329.
 - 27) Banno F, Chauhan AK, Miyata T. The function of ADAMTS13 in thrombogenesis *in vivo*: insights from mutant mice. *Int J Hematol*. 2010; **91**: 30-35.
 - 28) Shida Y, Nishio K, Sugimoto M, et al. Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions. *Blood*. 2008; **111**: 1295-1298.
 - 29) Huang J, Motto DG, Bundle DR, Sadler JE. Shiga toxin B subunits induce VWF secretion by human endothelial cells and thrombotic microangiopathy in ADAMTS13-deficient mice. *Blood*. 2010; **116**: 3653-3659.
 - 30) Feys HB, Roodt J, Vandeputte N, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (*Papio ursinus*). *Blood*. 2010; **116**: 2005-2010.
 - 31) Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K, Majerus EM, Sadler JE. Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*. 2009; **7**: 2088-2095.
 - 32) Zanardelli S, Chion AC, Groot E, et al. A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood*. 2009; **114**: 2819-2828.
 - 33) Soejima K, Nakamura H, Hirashima M, Morikawa W, Nozaki C, Nakagaki T. Analysis on the molecular species and concentration of circulating ADAMTS13 in Blood. *J Biochem*. 2006; **139**: 147-154.
 - 34) Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem*. 2009; **284**: 31493-31497.
 - 35) Kuchtey J, Olson LM, Rinkoski T, et al. Mapping of the disease locus and identification of ADAMTS10 as a candidate gene in a canine model of primary open angle glaucoma. *PLoS Genet*. 2011; **7**: e1001306.
 - 36) Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA. Substructure of human von Willebrand factor. *J Clin Invest*. 1985; **76**: 1491-1500.
 - 37) Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, et al. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; **104**: 7899-7903.
 - 38) Ying J, Ling Y, Westfield LA, Sadler JE, Shao JY. Unfolding the A2 domain of von Willebrand factor with the optical trap. *Biophys J*. 2010; **98**: 1685-1693.
 - 39) Shim K, Anderson PJ, Tuley EA, Wiswall E, Sadler JE. Platelet-VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress. *Blood*. 2008; **111**: 651-657.
 - 40) Bonnefoy A, Romijn RA, Vandervoort PA, VAN Rompaey I, Vermeylen J, Hoylaerts MF. von Willebrand factor A1 domain can adequately substitute for A3 domain in recruitment of flowing platelets to collagen. *J Thromb Haemost*. 2006; **4**: 2151-2161.
 - 41) Padilla A, Moake JL, Bernardo A, et al. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood*. 2004; **103**: 2150-2156.
 - 42) Huang J, Roth R, Heuser JE, Sadler JE. Integrin alpha(v)beta(3) on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress. *Blood*. 2009; **113**: 1589-1597.
 - 43) George JN. Clinical practice. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 2006; **354**: 1927-1935.
 - 44) Zakarija A, Kwaan HC, Moake JL, et al. Ticlopidine- and clopidogrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): review of clinical, laboratory, epidemiological, and pharmacovigilance findings (1989~2008). *Kidney Int Suppl*. 2009: S20-24.
 - 45) Kiss JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: recognition and management. *Int J Hematol*. 2010; **91**: 36-45.



小胞体ストレスと循環器疾患

小 亀 浩 市 宮 田 敏 行

循環器疾患は心臓を中心とする血管系の疾患を指すが、実際には脳、肺、腎臓など多くの器官の病態を対象とするため種類は多岐にわたる。本稿では虚血性心疾患、脳卒中、動脈硬化に対象を絞り、小胞体ストレスとの関連を概述する。

●小胞体ストレスと虚血性心疾患

心臓に血液を供給する血管が動脈硬化や血栓などで狭窄すると、心筋に必要な酸素や栄養が届かなくなる。激しい運動や強いストレスでも心筋は一時的に血液不足となる。この状態が虚血性心疾患である。

ほかの細胞と同様、心筋細胞においても小胞体はタンパク質の合成や成熟、脂質合成、 Ca^{2+} 濃度調節など多機能を担う。心臓では低酸素、低グルコース、虚血再灌流、薬物性発作などで小胞体ストレス応答(unfolded protein response; UPR)経路が活性化する¹⁾。なお、心筋細胞では小胞体を筋小胞体(sarcoplasmic reticulum; SR)とも呼ぶ。筋細胞では Ca^{2+} 濃度調節機能が強化されており、SRは小胞体が特化したものといえるが、SRがほかの細胞の小胞体と同様にUPR発信の場となるのか、あるいは筋細胞にはSRと異なる(通常の)小胞体が存在してUPRを担うのかは不明である。

虚血による低酸素は小胞体の酸化還元状態に影響を与え、小胞体ストレスの要因となる。重度の低酸素では嫌氣的代謝が起こり、活性酸素種が増加する。さらに虚血後の血流再開、すなわち再灌流が問題になる。急激な酸素供給は酸化ストレスを誘導し、活性酸素種を増加させる。また、虚血状態ではグルコースやATPの欠乏による小胞体ストレスでUPRが活性化する。PERK経路によるCHOPの発現誘導に依存したアポトーシスも

心筋細胞で観察されている。

適応的ストレス応答(adaptive stress response)という概念がある。対処できるレベルのストレスに対する応答であり、細胞保護作用やストレス耐性、ストレス順化ともいわれる。この概念は循環器系では虚血障害に対する治療としてプレコンディショニングという言葉で表される。心筋細胞をあらかじめ軽度の低酸素状態にしておく(プレコンディショニング)、より強いストレスを受けたときにプレコンディショニングなしに比べてアポトーシスが低減する。虚血時の小胞体ストレス応答がその後の障害に対して保護的効果を発揮するのかもしれない。薬剤によって心臓に軽いストレスを負荷することで、その後のダメージの軽減を期待する療法が臨床で実施されている。

●小胞体ストレスと脳卒中

脳卒中は脳血管が動脈硬化や心原性塞栓で閉塞したり、高血圧などで破裂することで起こる。脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、一過性脳虚血発作に分類される。虚血を伴う脳梗塞および一過性脳虚血発作では、酸素やATPなどの欠乏で生じる小胞体ストレスが病態に関与する²⁾。神経細胞はストレスに対して脆弱であるため、ストレスの強度が梗塞巣の形成に大きく影響する。大きな血管が閉塞すると、その血管がカバーする領域の深部は重度の虚血となる。一方、周囲の血管でカバーできる周辺領域は軽度の虚血となる。血管の閉塞が可逆的であれば再灌流が起こる。虚血継続時間や血流回復程度などによって細胞が受ける影響は異なるため、各細胞が受ける小胞体ストレスの強度や応答は様々であり、その集合体である組織の予後予測は難しい。

小胞体ストレス下では、活性化した PERK による eIF2 α のリン酸化を通してタンパク質翻訳が抑制される。小胞体にさらなる負荷がかからないようにするための機能である。この翻訳抑制が脳虚血による神経細胞死と強く関連するらしい。細胞にとって翻訳抑制は一時的な応答であり、ストレスからの回復には分子シャペロンなどの増量が重要である。つまり、細胞は翻訳を再開する必要がある。虚血が持続すると回復期への移行が遅延し、細胞死に向かう。したがって、翻訳抑制から回復に向かう段階での虚血状態が脳梗塞の重症度を左右する。翻訳の再開には GADD34 依存性の eIF2 α 脱リン酸化が重要であり、虚血後に生存した細胞とアポトーシスを起こした細胞では、前者で GADD34 発現量が多いという報告がある。

小胞体内腔に生じた構造異常タンパク質は小胞体関連分解 (ERAD) で除去される。筆者らは、ERAD 因子 Herp のノックアウトマウスを解析し、脳虚血再灌流障害によって形成される梗塞巣が野生型に比べて拡大することを見出した³⁾。Herp は小胞体ストレスによる発現誘導が顕著なタンパク質である。虚血時に Herp が存在しないことが梗塞巣拡大につながったのか、あるいは虚血が起こる前から Herp 欠損により小胞体機能が低下していたのかは不明であるが、一過性のストレスに対する細胞の生存能に ERAD が関連していることは興味深い。

脳においてもプレコンディショニングは重要である。あらかじめ軽度の虚血負荷を与えておくと、その後の虚血による神経細胞死が軽減される。一過性脳虚血発作の既往患者群では、非既往群に比べて脳梗塞発症後の予後良好例が多い。プレコンディショニングの分子機構はまだわかっていないが、UPR 下流遺伝子の転写誘導が観察されている。軽度虚血時の UPR 活性化によって GRP78 や GADD34, Herp などが増量し、その後のストレスに対して耐性ができるのかもしれない。

●小胞体ストレスと動脈硬化

アテローム性動脈硬化の進展は動脈内皮下にリポタンパク質が蓄積することで開始する。リポタンパク質は酸化修飾などを受けて炎症性反応を惹

起し、その結果、単球が内皮細胞に接着し、内皮下でマクロファージに分化する。マクロファージはリポタンパク質を取り込むが処理しきれない場合、泡沫化して炎症惹起性となる。そして、種々のサイトカインによる細胞相互反応が起こり、病変部位が拡大して線維化が進む。

この過程への小胞体ストレスの関与が明らかになってきた⁴⁾。動脈硬化部位ではマクロファージや内皮細胞で UPR が活性化されている。その要因は酸化ストレスやコレステロールの蓄積などである。病変部位の内皮細胞では XBP1 の持続的発現が細胞機能を変化させる。マクロファージでは CHOP の発現上昇および IRE1-JNK 経路によるアポトーシスが起る。内皮下に死細胞が蓄積すると病変部位のネクローシスにつながる。

動脈硬化は高ホモシステイン血症によっても進展する。血中ホモシステイン濃度はメチオニン代謝関連酵素の機能低下で上昇し、虚血性心疾患や脳卒中など血栓性疾患の危険因子となる。高ホモシステイン血症による動脈硬化進展に小胞体ストレスが関与するという説がある⁵⁾。最近、遺伝子改変マウスの解析で、高ホモシステイン血症は血管内皮の機能障害を起こすが、それだけでは血栓症を誘発しないと報告された。高ホモシステイン血症の病態発症機構はほとんどわかっていないといえるかもしれない。

*

細胞のストレス応答にはその細胞がストレスを克服して生き残る目的と、アポトーシスで消失することで個体を守る目的がある。病態時にはそれらがプラスに働く場合とマイナスに働く場合がありそうである。小胞体ストレスの研究が循環器疾患の新たな治療法開発につながることを期待する。

文 献

- 1) Groenendyk J et al : *Circ Res* 107 : 1185-1197, 2010
- 2) Paschen W et al : *Curr Pharm Design* 13 : 1887-1902, 2007
- 3) Eura Y et al : *PLoS ONE* 7 : e34298, 2012
- 4) Tabas I : *Circ Res* 107 : 839-850, 2010
- 5) Zhou J, Austin RC : *BioFactors* 35 : 120-129, 2009

プラスミノゲンの立体構造

秋山正志*, 平井秀憲*, 宮田敏行*

Three dimensional structure of full-length plasminogen

Masashi AKIYAMA*, Hidenori HIRAI*, Toshiyuki MIYATA*

Key words: plasminogen, crystal structure, kringle domain

◆ Points ◆

- ①ヒトの閉構造プラスミノゲン (PLG) 全長の結晶構造が決定され, PLG はダイヤモンド形の分子構造であることが明らかにされた.
- ②分子表面に露出したクリングル (KR) 1 ドメインのリジン結合部位が, PLG とフィブリンの相互作用の開始点であると考えられる.
- ③ 2 個の Cl⁻ イオンがプラスミノゲンの閉構造を安定化させている.
- ④活性化の際に切断される Arg561-Val562 結合は, 複数の構造要因により切断されにくい構造をとっている.
- ⑤ PLG は KR1 ドメインの LBS を介してフィブリンの C 末端リジン残基に結合しフィブリン血栓に動員される. さらに, 安定性の低い KR5 ドメインが PAp ドメインから離れ, PLG は開構造へとコンフォメーションを変化させ切断を受けて活性化する.

1. はじめに

プラスミノゲン (PLG) は組織型もしくはウロキナーゼ型 PLG アクチベーター (tPA, uPA) によって Arg561-Val562 間のペプチド結合が分解されて二本鎖の活性型セリンプロテアーゼ (プラスミン) となり, フィブリンを分解して血栓を溶解する線溶反応を担う¹⁾. プラスミンは生理的中和因子である α 2-プラスミンインヒビターによって非可逆的に失活される. PLG の血中濃度は日本人ではおよそ 160mg/L である. 溶血性連鎖球菌はストレプトキナーゼ (SK) を分泌し, SK は PLG と 1:1 で複合体を形成し, この複合体は PLG をプラスミンに活性化しフィブ

リンを溶解する. 病原菌は菌体外に分泌した SK 様タンパク質による PLG の活性化, 次いでマトリクスメタロプロテアーゼの活性化を通して全身性の感染を成し遂げる. また, PLG はノックアウトマウスを用いた研究などから, 線溶反応以外にも基底膜および細胞外基質の分解を通じ創傷治癒やガンの浸潤・転移, 血管形成など様々な生体機能に参与している²⁾.

2. プラスミノゲン (PLG)

PLG は主に肝臓で合成され, 19 アミノ酸残基のシグナルペプチドが切断されて, 791 アミノ酸残基からなる分子量 80,000~87,000 の糖タンパ

*国立循環器病研究センター研究所分子病態部 [〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]
Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center
[5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan]
Tel: 06-6833-5012 (ext. 2477) Fax: 06-6835-1176 e-mail: akiyamam@ri.ncvc.go.jp

ク質として血中に分泌される。2カ所の糖鎖付加部位が存在し, Asn289とThr346に糖鎖が付加されたI型とThr346のみに糖鎖が付加されたII型のPLGが血中におよそ2:3の割合で存在する。PLGはN末側から高次構造の維持に重要なPan-apple (PAP) ドメイン (preactivation peptideとも呼ばれる), 約80個のアミノ酸から構成され3組のS-S結合を有するクリングル (KR) ドメインが5つ (KR1-KR5), セリンプロテアーゼ (SP) ドメインからなる。KR3を除くKRドメインにはリジン結合部位 (LBS) が存在し, プラスミンによる分解を受けてC末端がリジンとなったフィブリンや α 2-プラスミンインヒビターとの結合に関与する。リジンアナログである ϵ -アミノカプロン酸やtAMCHA (トラネキサム酸, トランサミン) はLBSとフィブリンの結合を抑制するため, 抗線溶活性を示す。

3. PLGの立体構造とドメイン間相互作用

PLGはtPAとともに凝固反応により析出したフィブリンに結合することで, 酵素と基質がフィブリン塊という固相に濃縮され効率よく活性化される。PLGはフィブリン非存在下では不活性化状態の閉構造を保持する。LawらはPLG活性化の構造基盤を明らかにするために, 血漿から精製した閉構造のヒト・II型PLG (Thr346のみ糖付加) 全長の結晶構造を2.45Åの分解能で決定した (PDB: 4DUU)³⁾ (図1)。PLGの7つのドメインはジグザグに集合してダイヤモンド形をとり, N末側のPAPドメインはKR4およびKR5ドメインと広範囲で相互作用していた。特にPAPドメインのLys50, Arg68およびArg70とKR4およびKR5のLBSとの間の相互作用が重要である (図2)。生化学的な実験から, PAPドメインと他のドメインとの相互作用がPLGの閉構造の維持に必要であると考えられてきた。実際, プラスミンによってLys77-Lys78結合が限定分解を受けPAPドメインが外れると, 開構造を取るLys-PLGを生じる⁴⁾。閉構造のPLGでは切断されるLys77は内部に埋もれているため, Lys77の切断には立体構造の変化が切断に先立って必要であると推測された。また, KR4ドメインは

PAPドメイン, 活性化ループ, SPドメインと相互作用して, PLGが不必要に活性化しないように, KR3/KR4リンカー領域を固定していた (図3)。また, SPドメインの2つのループ (672-678と703-713) はKR2ドメインと広範囲に相互作用していた。

血漿中の塩素イオンは閉構造のPLGの安定化に重要である⁵⁾。生理的なCl⁻イオン濃度条件 (150mM NaCl) 下で生成した結晶には4つのCl⁻イオンが含まれていた。そのうちの2つはKR4/PAPおよびSP/KR2ドメイン接触面の形成に関与していた。KR3ドメインのLBSは変異を持ち, *in vitro*においてリジン残基に結合せず, これまでその役割ははっきりしなかった。KR3ドメインはKR2ドメインとS-S結合を含む広範囲な相互作用の結果, SPドメインに隣接するように配位されていた。KR3とSPドメイン間にはKR3ドメインのAsn289の δ -NとSPドメインのGlu714の側鎖間の水素結合しか明確な相互作用が存在しなかった。I型PLGでは, このAsn289はN-グリコシル化されているのでこの結合は存在しないと考えられた。そこで, 分解能が良くないが (5.2Å) I型PLGの結晶構造を調べたところ (PDB: 4DUU), KR3を除く6つのドメインはII型とほぼ同じ位置にあったが, KR3ドメインの電子密度は見えなかった。I型PLGはAsn289のN-グリコシル化によりKR3ドメインの可動性が大きくなり, II型PLGよりも開構造をとりやすいことが示唆された。

4. PLG活性化の構造基盤

PLGのプラスミンへの変換にはtPAおよびuPAによる活性化ループ内のArg561-Val562結合の切断が必要であるが, 無秩序なPLGの活性化を防ぐ機構は明らかではなかった。PLGの立体構造から, 活性化ループはKR3/KR4リンカーで遮蔽され, 切断されにくい構造をとることが分かった (図4)。さらに, O-グリコシル化されているThr346もArg561の側鎖と相互作用し活性化部位が切断されにくい構造にしていた。またII型PLGではKR3ドメインも活性化を妨害する位置にあった。このように, 閉構造をとる

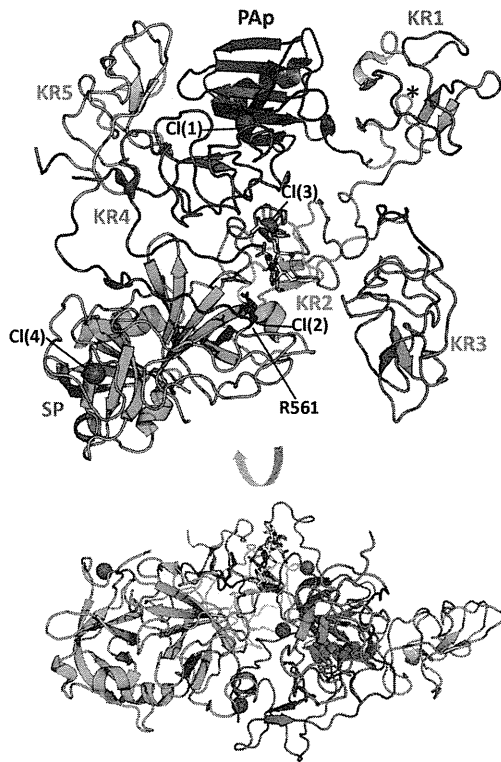


図1 プラスミノゲン (PLG) の全体構造. 各ドメインを色分けして表示している. (PAp: 赤; KR1: ピンク; KR2: 橙; KR3: 黄緑; KR4: 青; KR5: 黄; SP: シアン). 4個のCl⁻イオンをマゼンダの球体で, Thr346のO型糖鎖ならびに活性化ループのR561(赤)を球棒モデルで, KR1のLBSをアスタリスクで示す.

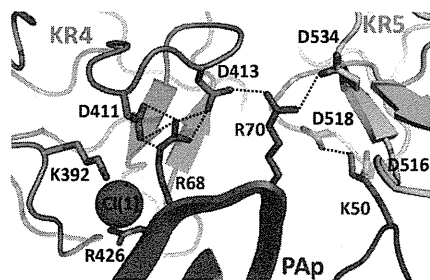


図2 PApドメインとKR4およびKR5ドメインとの相互作用. PApドメインのLys50はKR5ドメインのLBSのDXDモチーフのAsp518と極端に短い塩橋を形成している. PApドメインのArg70はAsp413ならびにAsp534を介してKR4およびKR5ドメインを配位させている. Arg68はKR4ドメインのLBSをDXDモチーフのAsp411とAsp413と相互作用することでブロックしている. Cl⁻(1)はPApドメインのArg68の主鎖のN, Arg426, Lys392の側鎖とそれぞれ水素結合を形成している.

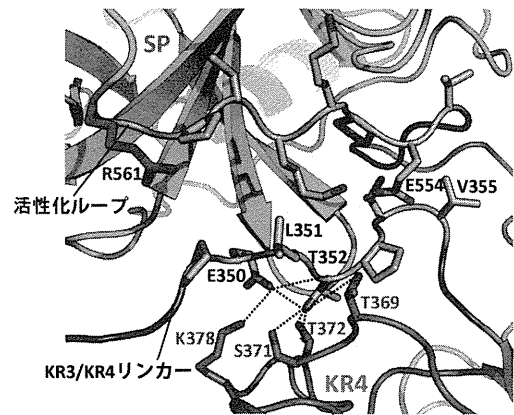


図3 KR4ドメイン, KR3/KR4リンカー, 活性化ループ, SPドメイン間の接触面. KR4ドメインはKR3/KR4リンカーとGlu350-Thr352を筆頭に複数箇所相互作用している. 一方, 活性化ループは唯一Glu554を介して, KR3/KR4リンカーループのVal355の主鎖の窒素と相互作用している.

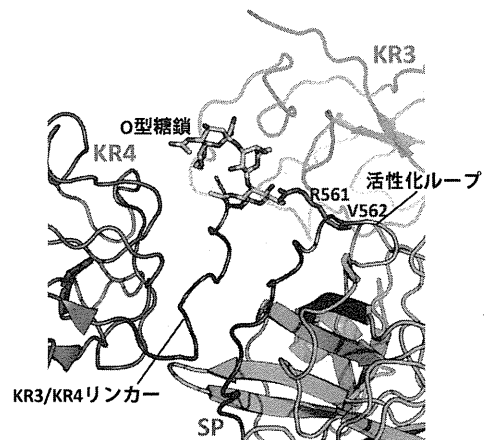


図4 閉構造において遮蔽されている活性化ループ. 閉構造のPLGでは, 活性化部位(R561-V562)の存在する活性化ループ(赤)はKR3/KR4リンカーループによってtPAおよびuPAから保護されている. Thr346のO結合型糖鎖もArg561の遮蔽に関与している.

PLGはtPAやuPAで活性化されにくい構造をとっていた。しかし、溶血性連鎖球菌が産生・分泌するSKはこういった活性化されにくい構造要素には捕らわれず、PLGのSPドメインと複合体を形成することによりPLGを活性化する能力を示す⁶⁾⁷⁾。

KRドメイン内に存在する4つのLBSのうち、KR1ドメインのLBSのみが閉構造のPLGで露出しているので、KR1ドメインがフィブリンもしくは細胞表面への最初の結合に関与すると考えられた。PLGの標的への動員後、他のKRドメイン中のLBSとフィブリンのC末端のリジン残基とで更に相互作用が起こり、大きな立体構造変化が引き起こされ、PLGは閉構造から伸展した開構造へと変化すると考えられる。PLG結晶の非対称ユニット中には2種のPLG分子(分子Aおよび分子B)が存在する。これまで述べてきた構造は分子Aを元としている。分子Bを分子Aと比較すると、KR5ドメインが分子Aと比べてPAPドメインから約7Å外側に動きPLGのコア構造から外れ、KR5ドメインのLBSがリジン残基を含むリガンドと相互作用しうる状態に露出していた。Lawらは分子Bをプラスミノゲンの立体構造変化の中間体であると推測している。完全に閉構造の分子Aにおいて、PAPドメインのLys50はKR5ドメインのLBSを構成するDXDモチーフの2つのアスパラギン酸のうちAsp518と相互作用しているが、もう一方のAsp516とは約4Å離れており(図3)、PAPドメインがKR5ドメインを安定的につなぎ止めておくには両ドメインの相互作用は弱いと考えられた。この弱い結合が破れ、KR5ドメインが露出し、フィブリンに結合すると、PLGは不可逆的な開構造への立体構造変化の経路に入るものと推察された。

5. おわりに

全長PLGの結晶構造解析により、以下のよう

なPLGの活性化機構が考えられる。(1)閉構造のPLGがKR1ドメインに露出しているLBSとフィブリンのC末端のリジン残基との相互作用を介してフィブリン血栓に動員される。(2)動員されたPLGでは、安定性の低いKR5ドメインが開構造となりフィブリン内の別のリジン残基に結合し、コンフォメーション変化が起こる。(3)開構造となったPLGは活性化ループが露出し、Arg561-Val562結合がtPAやuPAによって切断される。(4)こうして生成したプラスミンがフィブリンを分解する。結晶構造解析から、KR1のLBSがPLGのフィブリンのC末端リジン残基への動員に重要な役割を果たすこと、およびKR5ドメインがPAPドメインから離れ、自身のLBSを露出することがPLGの構造変化の開始に重要であることが理解された。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Rijken DC, Lijnen HR: New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* **7**: 4-13, 2009.
- 2) Castellino FJ, Ploplis VA: Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* **93**: 647-654, 2005.
- 3) Law RHP, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, Steer D, Cowan A, Zhang Q, Lu BGC, Pike RN, Smith AI, Coughlin PB, Whisstock JC: The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell rep* **1**: 185-190, 2012.
- 4) Miles LA, Castellino FJ, Gong Y: Critical role for conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen for optimal stimulation of plasminogen activation on cell surfaces. *Trends Cardiovasc Med* **13**: 21-30, 2003.
- 5) Urano T, Chibber BA, and Castellino FJ: The reciprocal effects of ϵ -aminohexanoic acid and chloride ion on the activation of human [Glu¹] plasminogen by human urokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 4031-4034, 1987.
- 6) Wang X, Lin X, Loy JA, Tang J, Zhang XC: Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* **281**: 1662-1665, 1998.
- 7) 宮田敏行, 峰昇平: ストレプトキナーゼミニプラスミン複合体、血栓止血学会誌: **11**: 276-282, 2000.

最新! 血管疾患の生理と病理

血栓の病理と病態

国立循環器病研究センター分子病態部部長 宮田敏行 研究員 樋口由佳

- | | |
|---------|--|
| POINT 1 | 血栓は血小板と血液凝固反応の相互作用によって形成される。 |
| POINT 2 | 動脈硬化巣の破綻により生じる動脈血栓は、コラーゲンによる血小板の活性化が主役として働く。 |
| POINT 3 | 静脈血栓は血流のうっ滞に加えて、他の要因が重なって発症すると考えられる。 |
| POINT 4 | 日本人には静脈血栓塞栓症のリスクとなるプロテイン S K196E 変異保有者が多い。 |

はじめに

血栓の形成は、Virchow's triad と呼ばれる3つの要素、すなわち血管壁の傷害、血流のうっ滞、血液凝固能の亢進が重要とされている。この考えは、現在でも血栓形成の基本概念として受け入れられている。

血栓は血小板と血液凝固反応の相互作用によって形成される。動脈系では、速い血流に耐え得るように、血小板がフィブリノーゲンやフォン・ウィレブランド因子 (von Willebrand factor : vWF) を介して強い凝集塊をつくる。静脈では流れが緩徐で血液凝固系が主役を務める。しかし、必ずしもこのように明確に区別できるものではない。

血栓惹起因子：コラーゲンと組織因子

血栓形成の引き金となる因子はコラーゲンと組織因子である。コラーゲンは血管内皮下層にある細胞外マトリックスに豊富に含まれ、強い血小板凝集惹起活性を有する (図1)。組織因子は1回膜貫通領域をもつ糖タンパク質であり、血中の活性型 VII (VII a) 因子に結合することで外因系凝固反応を作動させる。組織因子は血管外膜の線維芽細胞や中膜の血管平滑筋細胞に恒常的に発現し、血管損傷時の止血に働く (図1)。単球・マクロファージや血管内皮細胞は、リポ多糖や炎症性サイトカインの刺激により組織因子を誘導・発現する。組織因子で開始される外因系凝固反応は、トロンビンを生成する (図2)。トロンビンはフィ

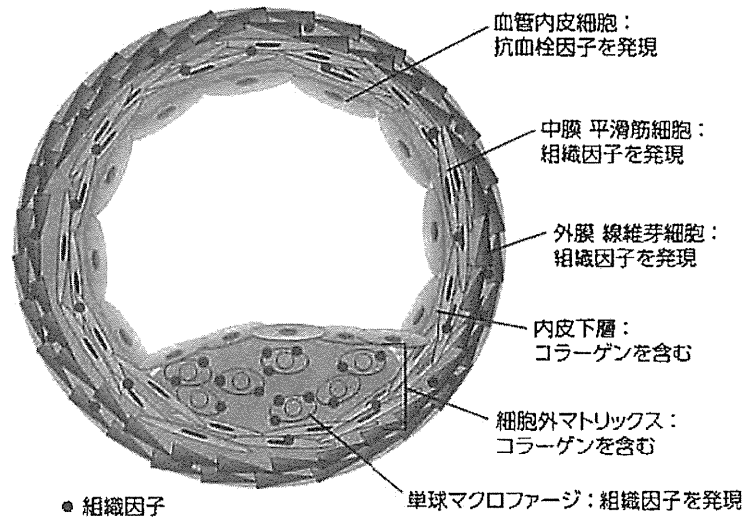


図1 血小板活性化惹起因子であるコラーゲンと凝固開始作用因子の組織因子の発現部位

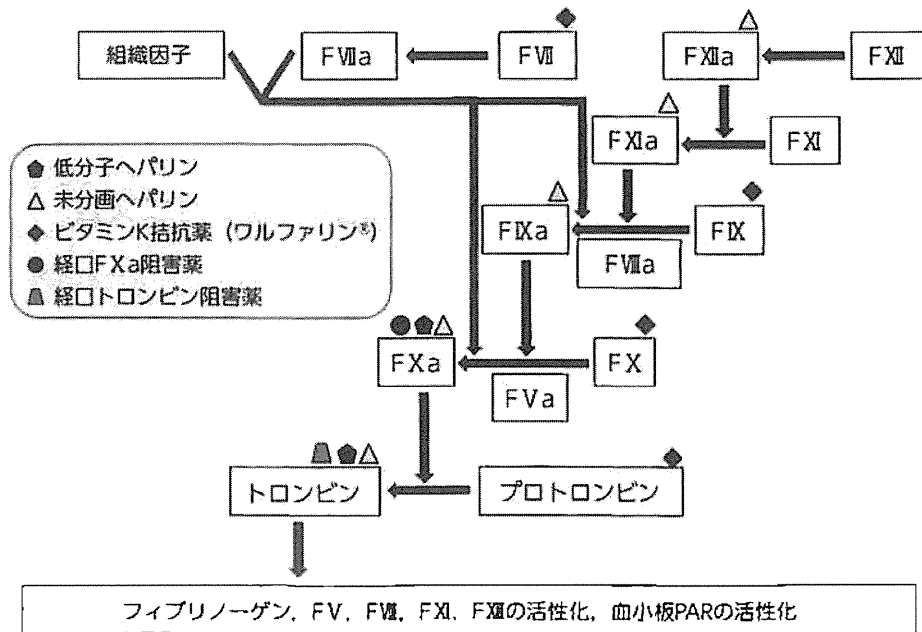


図2 凝固反応とそれを抑制する薬剤の作用点

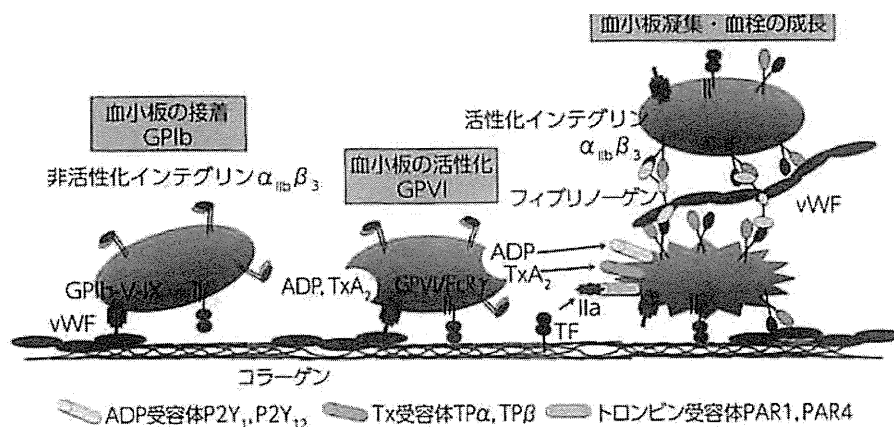


図3 血栓形成における血小板接着・活性化受容体の重要性

ブリン形成と各種凝固因子の活性化に加えて、血小板上の受容体を介した強力な血小板活性化能を有しており、血栓形成の中心的役割を果たす。

動脈血栓形成メカニズム

動脈血栓の形成は、血管内皮細胞が剥がれて内皮下のコラーゲンが血流へ露出することにより始まる(図3)。高ずり応力下では、露出したコラーゲンに血中のvWFが結合し、固相化したvWF上を血小板がGPIbを介して結合と解離を繰り返す(GPIbとvWFとの結合は弱いため)(図3左)。その間にコラーゲンからGPVIを介して血小板にシグナルが入り、GPVIに会合しているFc受容体(FcR)γ鎖を介してシグナルが血小板内に伝達され、顆粒内容物の放出やインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化が起こる(図3中央)。その結果、ADPやトロンボキサンが放出され、それぞれの受容体を介してさらに血小板を活性化し、インテグリンの活性化を増幅する。トロンピンも血小板受容体に作用して血小板活性化を促す。これらの

シグナルはインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ に立体構造変化を惹起し、vWFやフィブリノーゲンの結合部位が形成され、強固な血小板凝集が形成される(図3右)¹⁾。この血小板血栓はフィブリン網に埋め込まれて高ずり応力に堪える血栓へと成長し安定化する。この段階には、CLEC-2、CD40L、SLAM、セマホリン4Dなどのタンパク質が関与する。

静脈血栓形成メカニズム

静脈は血流が緩徐であるため、特に静脈弁の裏にできるポケット(弁尖部)では血流のうっ滞が起こりやすい。うっ滞状態が長くなると、低酸素状態を起こしhypoxia inducible factor 1 α やP-セレクチンなどの接着因子の発現が誘導される(図4)。その結果、内皮は炎症反応を促進する性質、すなわち、単球、顆粒球、血小板、マイクロパーティクルをリクルートする能力を獲得する。集積したこれらの細胞とその活性化により、凝固因子が局所に発現することとなり、凝固系が活性

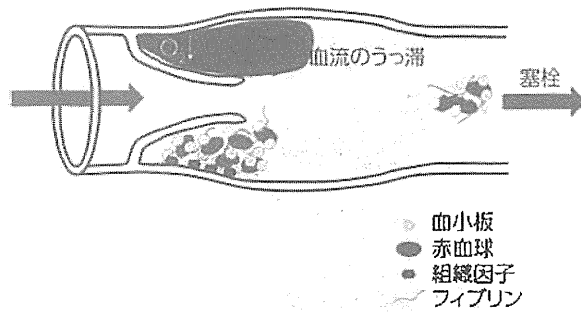


図4 静脈血栓メカニズム (モデル)

化される。顆粒球は傷害を受けると、neutrophil extracellular traps, DNA, RNAを放出し、こういった高分子量の物質が内皮細胞表面で血小板をトラップし、静脈血栓の促進因子として働く。また、凝固Ⅶ因子は、DNA, RNA, および血小板濃染顆粒から放出されるポリリン酸により活性化され、内因系凝固反応機構を介してトロンビンの形成に繋がる。しかし、静脈のうっ滞だけで血栓症が発症するものではなく、他の要因と重なって血栓形成にかかわる。

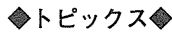
静脈血栓内には血小板も見られ、静脈血栓の形成においても凝固系と血小板の相互作用が重要であると考えられる。この10年間ほどの研究により、組織因子を保有するマイクロパーティクルが

血栓塞栓の形成に重要であることが明らかになってきた²⁾。マイクロパーティクルは、血小板、血管内皮細胞、白血球の細胞表面がちぎれるようにしてできる細胞の断片である。このため、マイクロパーティクルは元の細胞に発現しているタンパク質を保持しており、なかには組織因子を持つものがある。これを組織因子保有マイクロパーティクルと呼ぶ。敗血症のような病態下では、単球などに組織因子が発現し、この細胞から生じるマイクロパーティクルは組織因子を保持する。

静脈血栓塞栓症の要因として凝固能の亢進および抗凝固能の低下が挙げられる。プロテインC, プロテインS, アンチトロンビンの各欠損症は静脈血栓症のリスク因子として確立している。日本人にはプロテインS K196E変異が約55人に1人見られ、静脈血栓塞栓症のリスク(オッズ比: 3.7-8.6)と報告されている。日本人で約25人に1人に見られるプラスミノゲン異常症は、静脈血栓症との関連が見られない。

●参考文献

- 1) Jackson, SP. Arterial thrombosis--Insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med.* 17, 2011, 1423-36.
- 2) Mackman, N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest.* 122, 2012, 2331-6.



マウス急性心筋梗塞モデルにおける ADAMTS13 の心筋保護作用

杉本充彦^{*1}, 土井政明^{*1}, 松井英人^{*1}, 宮田敏行^{*2}

Myocardial protective role of ADAMTS13 in a mouse model of acute myocardial infarction

Mitsuhiro SUGIMOTO^{*1}, Masaaki DOI^{*1}, Hideto MATSUI^{*1}, Toshiyuki MIYATA^{*2}

Key words: ADAMTS13, von Willebrand factor, acute myocardial infarction, mouse

1. はじめに

ここ数年来、マウスモデルでの研究で、von Willebrand 因子 (VWF) が脳梗塞の病態形成・進展に大きく関与することが明らかになった。すなわち、実験的脳虚血/再灌流モデルにおいて、① VWF-ノックアウト (KO) マウスは野生型 (WT) に比して、梗塞体積が有意に縮小している。②逆に、VWF 機能をマイナス方向に制御する ADAMTS13 の KO マウスでは脳梗塞程度は有意に悪化する。③ ADAMTS13-KO マウスにおける脳梗塞の増悪は遺伝子組み換え ADAMTS13 の投与で WT レベルにまで改善する。との成績が私たちのグループをはじめ次々と報告され、ADAMTS13 の脳神経保護作用 (neuroprotective role) が注目されるようになった^{1)~3)}。

これらの成績は新たに、「この ADAMTS13 の機能は脳梗塞特異的なものか? 脳梗塞と並んで 2 大血栓性疾患ともいえる 心筋梗塞 についてはどうなのか?」という命題を提起した。

2. 心筋梗塞と VWF-ADAMTS13 軸

ごく最近ほぼ同時期 (2012 年 8 月末から約 1 か月間) に、これに関する論文が私たちのグループをふくめて 3 篇たてつづけに報告された^{4)~6)}。結論からのべると、脳梗塞の場合とほぼ同様の成績 (VWF-ADAMTS13 軸の重要な関与) がマウス心筋梗塞モデル実験でも確認された。

De Meyer ら⁴⁾ は 心筋虚血/再灌流 (0.5 時間虚血+23.5 時間再灌流) のマウス実験系で、ADAMTS13-KO マウスでは WT に比して有意に梗塞体積が増大することを見出した。また、WT マウスに遺伝子組み換えヒト ADAMTS13 (rhADAMTS13) を前処置投与した場合、梗塞体積が有意に減少することも報告している。また、Gandhi ら⁵⁾ は、完全に同一の虚血/再灌流実験セッティングで、rhADAMTS13 投与成績は示さなかったが、ADAMTS13-KO マウスにおける同様の成績に加えて VWF-KO マウスの成績を報告している。すなわち、VWF-KO マウスでは ADAMTS13-KO とは逆に、心筋梗塞体積が縮小していることを示した。両論文とも

^{*1} 奈良県立医科大学血栓制御医学 [〒 634-8521 奈良県橿原市四条町 840]
Department of Regulatory Medicine for Thrombosis, Nara Medical University
[840, Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan]
Tel: 0744-23-9961 Fax: 0744-23-9962 e-mail: sugi-ped@naramed-u.ac.jp

^{*2} 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]
Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center
[5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan]
Tel: 06-6833-5012 (2294) Fax: 06-6835-1176 e-mail: miyata@ri.ncvc.go.jp
受付日: 2012 年 10 月 9 日, 受理日: 2012 年 10 月 23 日

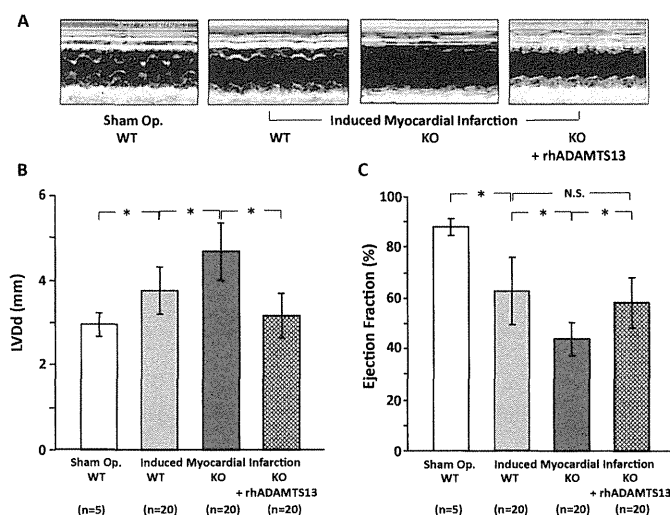


図1 心エコーによる心機能の評価 (文献6の成績をもとに作成)

(A) Mモード左心室エコーの典型像, (B) 拡張期左心室径 (left ventricular end-diastolic diameter: LVDd), (C) 左心室駆出率 (Ejection Fraction): コントロール (Sham Op.) に比して心筋梗塞を誘起されたマウス (Induced Myocardial Infarction) の左心室収縮能は明らかに低下している. 心筋梗塞を誘起された ADAMTS13 ノックアウトマウス (KO) の左心室機能は野生型 (WT) よりも有意に (*: $P < 0.01$) 悪化しており, 遺伝子組み換え ADAMTS13 (rhADAMTS13) の投与で WT レベル (N.S.) にまで改善される.

に, ADAMTS13 の心筋虚血/再灌流障害に対する効果は, トロポニン I 放出の低下に反映される心筋細胞のアポトーシスの軽減や, マウス虚血心筋への好中球の浸潤の著明な抑制をもたらす ADAMTS13 の抗炎症作用に起因すると結論している. ここまでに報告された脳梗塞モデルの実験や, 今回の De Meyer ら⁴⁾, Gandhi ら⁵⁾ の心筋梗塞の成績はいずれもすべて虚血/再灌流の実験条件下でなされている. 虚血/再灌流障害の発生メカニズムに関してはいまだ不明な点が多いが, 再灌流時の過剰炎症機転が重要な役割を果たすと考えられており, 改めて ADAMTS13 の抗炎症作用の重要性が明らかとなった.

これらに対して私たち⁶⁾ は, 虚血のみで再還流を誘導しない心筋梗塞モデルを用いた. マウス冠動脈左前下行枝を結紮して心筋梗塞を誘起し, 1 週後のマウス心機能を M モード心エコーで評価したのち, 心筋梗塞を組織学的に検索した. その結果, WT と比較して ADAMTS13-KO マウスで有意の心機能低下 (図 1) と梗塞範囲の増大 (図 2) を認めた. これら ADAMTS13-KO マウスの心所見は, 遺伝子組み換え ADAMTS13 分子の

投与で WT レベルにまで改善された (図 1,2). 私たちの実験では, メタロプロテアーゼドメインからスパーサドメインに至る遺伝子組み換え ADAMTS13-MDTC3 フラグメント (アミノ酸残基 75-685) を用いたが, 全分子型とほぼ同等の VWF 切断活性が *in vitro* アッセイで確認されている.

この成績で, ADAMTS13 の虚血時の心筋保護作用は必ずしも虚血/再灌流障害に限定されないことが明らかとなった. さらに特記すべきは, 私たちの実験では遺伝子組み換えフラグメントを心筋梗塞誘起後に投与して得られたものであり, この分子の急性冠症候群に対する治療応用ポテンシャルの高さを示唆している.

3. 考案

VWF は血管損傷部位での血小板粘着・凝集をつかさどる止血因子であり, この因子の先天性機能異常症である von Willebrand 病は出血兆候を示す⁷⁾. 逆に, 過剰な VWF 機能は病的血栓症のトリガーとなる⁷⁾. VWF の生物学的活性は

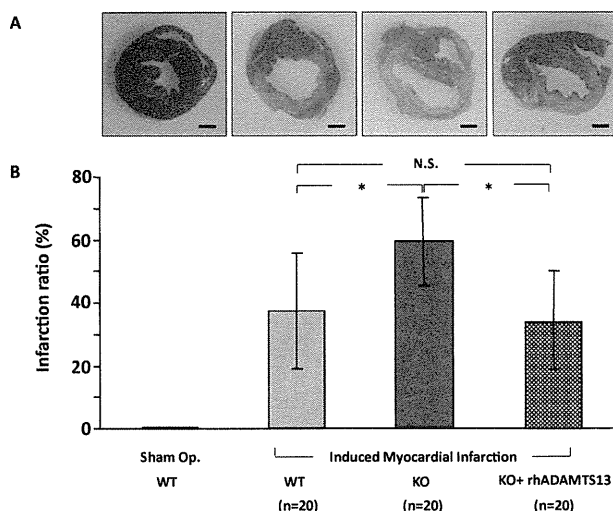


図2 心筋梗塞の組織学的評価 (文献6の成績をもとに作成)

(A) マウス心臓のアザン染色像 (×20): 赤く染色されるのは健全な心筋組織であり, 青っぽく染色される線維化像は梗塞部位に一致する。(B) 梗塞率 (Infarction ratio): 全左心室面積に対する梗塞面積の比率. 図1に示した心エコー所見に一致して, 心筋梗塞を誘起されたADAMTS13-KOマウスではWTよりも有意に (*: $P < 0.01$) に梗塞範囲が広がっており, この所見はrhADAMTS13の投与でWTレベル (N.S.) にまで改善される.

VWF分子に特異的なマルチマー構造に依存しており, この分子の血栓形成活性はマルチマー重合度 (分子量) に比例する. 生体では, VWF切断酵素であるADAMTS13がVWFを適度に切断してマルチマーサイズを調節し, VWFの血栓形成機能をバランスよく制御していると考えられている. 血栓形成機能に加えて, VWFの炎症進展作用が最近注目されている. 詳細なメカニズムに不明な点が多いが, VWFは炎症部位における血管壁でのローリングや粘着などの白血球リクルートに関与していることが報告された⁹⁾. したがって, ADAMTS13はVWF依存性の炎症機転も精妙に制御していると考えられる⁸⁾.

VWFは生体血管内では高ずり応力下で特異的に機能する^{7) 9) 10)}. 興味あることに, VWFを制御するADAMTS13もずり応力依存性に機能することが最近判明した¹¹⁾. ずり応力は血管径に逆比例することから, 動脈性毛細血管などの極端に細い微小循環系においてVWF-ADAMTS13軸バランスの生理的意義がもっとも際立つと考えられる. 実際, ADAMTS13機能欠損症は微小循環系の血栓性閉塞に基づく血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) として知られている¹²⁾.

今回明らかとなったADAMTS13の心筋梗塞における心筋保護機能の作用メカニズムに関しては依然として解明すべき点が多いが, ADAMTS13によるVWF依存性血栓形成反応および炎症反応の制御・軽減が微小循環の改善に大きく貢献し, 臓器機能の保持・改善に直結したものと考えられた.

近年の治療成績の向上により, 脳梗塞や心筋梗塞においては救命後の後遺障害の改善も課題となっている. VWF-ADAMTS13軸が心筋梗塞発症の病因論として成立するか否かはいまだ不明な点が多いが, すくなくとも病態進展に重要な役割を果たすことは明らかである. ADAMTS13によるVWF依存性の血栓反応および炎症反応の制御は, これら臓器障害の軽減・予後の改善に直結する新機軸治療法として期待される.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no conflict of interest.

文献

- 1) Zhao B-Q, Chauhan AK, Canault M, Patten IS, Yang JJ, Dockal M, Scheiflinger F, Wagner DD: von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experi-

- mental stroke. *Blood* **114** (15) : 3329-3334, 2009.
- 2) Kleinschnitz C, De Meyer SF, Schwarz T, Austinat M, Vanhoorelbeke K, Nieswandt B, Deckmyn H, Stoll G : Deficiency of von Willebrand factor protects mice from ischemic stroke. *Blood* **113** (15) : 3600-3603, 2009.
 - 3) Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, Kunizawa A, Irie K, Higuchi S, Nakano T, Muroi C, Fukushima H, Sugimoto M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Fujiwara M, Okuchi K, Nishio K : ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage : a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* **115** (8) : 1650-1653, 2010.
 - 4) De Meyer S F, Savchenko AS, Haas MS, Schatzberg D, Carroll MC, Schiviz A, Dietrich B, Rottensteiner H, Scheiflinger F, Wagner DD : Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* ; published ahead of print August 22, 2012, doi : 10.1182/blood-2012-06-439935
 - 5) Gandhi C, Motto DG, Jensen M, Lentz SR, Chauhan AK : ADAMTS13 deficiency exacerbates VWF-dependent acute myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* ; published ahead of print September 14, 2012, doi : 10.1182/blood-2012-06-440255
 - 6) Doi M, Matsui H, Takeda Y, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M : ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* ; prepublished online October 10, 2012 ; doi : 10.1160/TH12-09-0674
 - 7) Sadler JE : von Willebrand factor : two sides of a coin. *J Thromb Haemost* **3** (8) : 1702-1709, 2005.
 - 8) Chauhan AK, Kisucka J, Brill A, Walsh MT, Scheiflinger F, Wagner DD : ADAMTS13 : a new link between thrombosis and inflammation. *J Exp Med* **205** (9) : 2065-2074, 2008.
 - 9) Matsui H, Sugimoto M, Mizuno T, Tsuji S, Miyata S, Matsuda M, Yoshioka A : Distinct and concerted functions of von Willebrand factor and fibrinogen in mural thrombus growth under high shear flow. *Blood* **100** (10) : 3604-3610, 2002.
 - 10) Sugimoto M, Matsui H, Mizuno T, Tsuji S, Miyata S, Matsumoto M, Matsuda M, Fujimura Y, Yoshioka A : Mural thrombus generation in type 2A and 2B von Willebrand disease under flow conditions. *Blood* **101** (3) : 915-920, 2003.
 - 11) Shida Y, Nishio K, Sugimoto M, Mizuno T, Hamada M, Kato S, Matsumoto M, Okuchi K, Fujimura Y, Yoshioka A : Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions. *Blood* **111** (3) : 1295-1298, 2008.
 - 12) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD, Ginsburg D, Tsai HM : Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* **413** (6855) : 488-494, 2001.

◆凝固・線溶・血小板タンパク質の機能発現機構◆

凝固 XI 因子の構造と機能

西村 仁^{*1}, 平井秀憲^{*2}, 宮田敏行^{*2}



西村 仁

Structure and function of blood coagulation factor XI

Hitoshi NISHIMURA^{*1}, Hidenori HIRAI^{*2}, Toshiyuki MIYATA^{*2}

昭和63年 九州大学理学部生物学科卒業
平成4年 九州大学大学院医学系研究科
単位取得退学 (岩永貞昭教授
(現九州大学名誉教授)研究室)
平成5年 理学博士
平成23年4月より摂南大学工学部生命
科学科教授 この間、日本学術振興会特別
研究員、北海道大学薬学部助手、日本学術
振興会海外特別研究員、筑波大学応用生物
化学系講師、カリフォルニア大学デービス
校およびエモリー大学博士研究員を務める

Key words: factor XI, apple domain, serine protease, thrombin, polyphosphate

◆ Points ◆

- ①凝固 XI 因子は内因系で働くホモ 2 量体のセリンプロテアーゼ前駆体であり、IX 因子を活性化する。
- ②XI 因子の立体構造は、“cup(セリンプロテアーゼドメイン) & saucer (4 個のアップルドメイン)” 構造であり、活性化に伴いドメイン間に大きな空間的再編成が起こる。
- ③XI 因子の 2 量体化は、(i) XI 因子の細胞内における成熟、(ii) XI 因子の活性化、(iii) XIa 因子による IX 因子の活性化、に必要である可能性が高い。
- ④血小板の濃染顆粒から放出されるポリリン酸は、XII 因子の活性化を通して凝固系とキニン系を活性化する。
- ⑤トロンビンによる XI 因子の活性化は、XI 因子欠損症患者の出血症を説明する。ポリリン酸と活性型 V 因子は、この活性化反応の補助因子として機能する。

1. 凝固系の概要

凝固系は、外因系 (extrinsic pathway) と内因系 (intrinsic pathway) に大別される (図 1)。外因系は組織因子 (TF) が血流に露出することで開始される。TF は血中の VII 因子 (FVII) または活性型 FVII (FVIIa) と結合し、FVIIa-TF 複

合体が IX 因子 (FIX) および X 因子 (FX) を活性化する。

一方、内因系は、陰性電荷物質に結合した XII 因子 (FXII) の活性化によって惹起される。活性型 FXII (FXIIa) は、高分子キニノーゲン (HMWK) を介して陰性電荷上に濃縮された XI 因子 (FXI) を活性化する。これらの陰性電荷表

^{*1} 摂南大学工学部生命科学科 [〒 572-8508 大阪府寝屋川市池田中町 17-8]
Department of Life Science, Faculty of Science and Engineering, Setsunan University
[17-8 Ikeda-Nakamachi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan]
Tel: 072-800-1152 Fax: 072-838-6599 e-mail: nishimura@lif.setsunan.ac.jp

^{*2} 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]
Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center
[5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan]
Tel: 06-6833-5012 Fax: 06-6835-1176
e-mail: hirai.hidenori.ri@mail.ncvc.go.jp, miyata@ri.ncvc.go.jp