

合体マウスを解析対象とした。

血漿フィブリン塊溶解活性の測定

マウス血漿にヒト組織型プラスミノゲンアクチベーターを加えて室温、30分間反応することによりプラスミノゲンをプラスミンに活性化後、トロンビンと塩化カルシウムを添加してフィブリン形成を惹起し、波長 405 nm の吸光度変化を 5 分間隔でモニターした。吸光度はフィブリン形成により一旦上昇するが、プラスミンによる分解で緩やかに低下する。この吸光度変化を元にフィブリン塊溶解活性を測定した。

深部静脈血栓症モデル

マウス下大静脈にステンレス電極を挿入して 250 μ A・15 分間通電した。電極の電気分解の結果生じるフリーラジカルにより、血管内皮細胞が活性化し、血栓形成が誘発される。生じる血栓が最大となる処置 2 日後に血栓重量および末梢血血小板数を測定した。また、血栓の退縮、溶解に対する変異の影響を解析するため、処置 7 日後のマウスについても同様の解析を行った。

肺塞栓モデル

マウスに外因系凝固を活性化する組織因子を下大静脈から投与することで肺塞栓を惹起し、呼吸停止までの時間を 20 分間測定して生存率をもとめた。また、呼吸停止 2 分後に右心室から Evans blue を注入し、肺全体の染色像から肺血管閉塞スコア (0 = 閉塞無し~4 = 完全閉塞の 5 段階) を判定した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立循環器病研究センター遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得て実施した。また、動物愛護の観点から、マウスに与える苦痛を最小限にするよう配慮して進めた。

C. 研究結果

血漿フィブリン塊溶解活性を測定した結果、プラスミノゲン-A622T 変異マウスでは、野生型マウスに比べて顕著な活性低下が認められた。また、反応系に α 2-プラスミンインヒビターを加えることで、吸光度の低下はほぼ完全に抑制されたことから、本測定にてプラスミン依存的なフィブリン溶解が起きていることを確

認した。これらの結果から、プラスミノゲン-A622T 変異マウスでは、血漿プラスミノゲンの合成基質切断活性 (初年度に測定済) だけでなく、フィブリン溶解活性が低下していることが確認できた。

深部静脈血栓症モデル実験において、処置 2 日後の血栓重量 (平均値 \pm 標準偏差, N = 10) は、野生型マウスで 8.2 ± 5.4 g、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで 10.0 ± 6.4 g であり、両群間に有意差は認められなかった。血小板減少の程度も群間で違いが無かったことから、プラスミノゲン-A620T 変異は深部静脈血栓症の増悪要因ではないと考えられた。また、処置 7 日後の血栓重量 (N = 5) も野生型マウスで 5.4 ± 3.5 g、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで 5.4 ± 4.6 g と群間に違いは無く、プラスミノゲン-A622T 変異による血栓退縮の遅延も見られなかった。

肺塞栓モデル実験において、組織因子投与後の生存率は野生型マウス (N = 18) で 83.3%、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウス (N = 20) で 80.0% であり、両群間に差は認められなかった。肺血管閉塞スコアも、野生型マウスで 1.86 ± 1.47 、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで 2.25 ± 1.60 と、群間に有意差は見られなかった。したがって、プラスミノゲン-A620T 変異は肺塞栓症状悪化の原因とはならないと考えられた。

本研究で樹立したプラスミノゲン-A622T 変異マウスを国内外の研究者に譲渡するため、(独) 医薬基盤研究所メディカル・バイオリソース・データベースに登録した。

D. 考察

プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスでは、血漿プラスミノゲン活性が野生型マウスの約 8% に低下しており、血漿フィブリン塊溶解活性も低下した。しかし、深部静脈血栓症モデルおよび肺塞栓モデルを用いた検討では、プラスミノゲン-A622T 変異マウスに野生型マウスと比べて症状の悪化は見られなかった。前年度に行った局所脳虚血再灌流モデルおよび皮膚創傷モデルを用いた検討でも、プラスミノゲン-A622T 変異マウスに異常は認められなかったため、日本人を含むアジア人に広く分布するプラスミノゲン-A620T 変異は少なくとも単独では、静脈血栓症、脳梗塞および創傷治癒を悪化させる遺伝要因とはならないと推定される。本変異とプロテイン S-K196E

変異の両方を持つ重症静脈血栓症患者が見つかるため、プラスミノゲン-A620T 変異が他の血栓性素因と重なることで、血栓症状の修飾因子として働く可能性が残っている。引き続き、プラスミノゲン-A622T とプロテイン S-K196E の二重変異マウスを解析することでこの点を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

プラスミノゲン-A622T 変異マウスを樹立し、本変異が線溶活性低下を引き起こすことを個体レベルで確認した。本変異マウスに深部静脈血栓症、肺塞栓、脳梗塞症状および創傷治癒の悪化は見られず、プラスミノゲン-A620T 変異はこれらの疾患の一次的なリスクとはならないことが明らかとなった。今後、他の血栓性素因と本変異が重なった場合の症状修飾作用の検証が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

坂野史明, 宮田敏行, 藤岡政行, 杉本充彦: 遺伝子改変血栓モデル: ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを中心に. *Thrombosis Medicine* 3(2), 216-223, 2013.

宮田敏行, 坂野史明: 血栓症と炎症におけるポリリン酸の役割. *Annual Review 血液* 2014, 高久史磨・小澤敬也・坂田洋一・金倉讓・小島勢二 編集, 中外医学社, 132-139, 2014.

2. 学会発表

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Yuko Tashima, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata: Generation of protein S-Tokushima mutant mice to provide an in vivo evaluation system for thrombosis in Japanese. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 SPC シンポジウム 4, 山形市, 2013 年 5 月.

田嶋優子, 坂野史明, 喜多俊行, 松田泰幸, 柳本広二, 宮田敏行: プラスミノゲン 1 変異ホモ接合体マウスの血栓傾向の解析. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形市, 2013 年 5 月.

土井政明, 松井英人, 竹田征治, 斎藤能彦, 武田麻衣子, 松成泰典, 西尾健治, 嶋緑倫, 坂野史明, 秋山正志, 小亀浩市, 宮田敏行, 杉本充彦: マウス急性心筋梗塞モデルにおける ADAMTS13 の心筋保護作用. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形市, 2013 年 5 月.

松井英人, 土井政明, 武田麻衣子, 松成泰典, 西尾健治, 嶋緑倫, 副島見事, 粕田承吾, 坂野史明, 宮田敏行, 杉本充彦: マウス骨髄移植モデルにおける ADAMTS13 の移植ドナー細胞生着促進効果. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形市, 2013 年 5 月.

Fumiaki Banno: Genetic mouse models of venous thrombosis for Japanese. 59th Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, Netherlands, June 2013.

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Yuko Tashima, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata: Exacerbated venous thromboembolism in mice with the protein S Tokushima mutation. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

Yuko Tashima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Toshiyuki Miyata: Generation and characterization of homozygous plasminogen-Tochigi mutant mice bearing reduced fibrinolytic activity. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

Hideto Matsui, Masaaki Doi, Yasunori Matsunari, Maiko Takeda, Kenji Nishio, Midori Shima, Kenji Soejima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiko Sugimoto: ADAMTS13 accelerates the cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

田嶋優子, 坂野史明, 喜多俊行, 松田泰幸, 柳本広二, 宮田敏行: マウスプラスミノゲン栃木変異は血漿プラスミン活性を低下させるが血栓塞栓症の原因にはならない. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜市, 2013 年 9 月.

Yuko Tashima "Generation and Characterization of Homozygous Plasminogen-Tochigi Mutant Mice Bearing Reduced Fibrinolytic Activity, 15-min talk", Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis, Gordon Research Seminar, Ventura, USA, February 2014.

Yuko Tashima, Flash talk, "Generation and Characterization of Homozygous Plasminogen-Tochigi Mutant Mice Bearing Reduced Fibrinolytic Activity" Gordon Research Conferences, Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis, Ventura, CA, USA, February 2014.

坂野史明: 日本人の血栓性遺伝素因を持つモデルマウスの樹立と解析. 第 8 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム, 東京都, 2014 年 2 月.

坂野史明: モデルマウスを利用した日本人の静脈血栓症の遺伝的特異性の解明. 第 39 回日本脳卒中学会総会, 大阪市, 2014 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(別添5)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
宮田敏行、坂野史明	VI凝固線溶系3. 血栓症と炎症におけるポリリン酸の役割	高久史磨 小澤敬也 坂田洋一 金倉 讓 小島勢二	Annual Review 血液2014	中外医学社	東京都	2014	216-223

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyata T, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y	ADAMTS13 activity and genetic mutations in Japan.	Hämostaseologie	33(2)	131-137	2013
Fan X, Yoshida Y, Honda S, Matsumoto M, Sawada Y, Hattori M, Hisanaga S, Hiwa R, Nakamura F, Tomomori M, Miyagawa S, Fujimaru R, Yamada H, Sawai T, Ikeda Y, Iwata N, Uemura O, Matsukuma E, Aizawa Y, Harada H, Wada H, Ishikawa E, Ashida A, Nangaku M, Miyata T, Fujimura Y	Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome.	Mol Immunol	54(2)	238-246	2013
Akiyama M, Nakayama D, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T	Crystal structure and enzymatic activity of an ADAMTS-13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism.	J Thromb Haemost	11(7)	1399-1406	2013
Liu W, Yin T, Okuda H, Harada KH, Li Y, Xu B, Yang J, Wang H, Fan X, Koizumi A, Miyata T	Protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism, is limited to Japanese.	Thromb Res	132	314-315	2013
Muratsu J, Morishima A, Mizoguchi K, Ataka K, Yamamoto H, Fan X, Miyata T, Sakaguchi K	Budd-Chiari Syndrome with multiple thrombi due to a familial Arg42Ser mutation in the protein C gene.	Case Reports in Medicine	Vol.2013, Article ID 270419	6 pages	2013
Honda S, Shirohani-Ikejima H, Tadokoro S, Tomiyama Y, Miyata T	The integrin-linked kinase-PINCH-parvin complex supports integrin α IIb β 3 activation.	PLoS ONE	8(12)	e85498	2013
Yin T, Miyata T	Dysfunction of protein C anticoagulant system, main genetic risk factor for venous thromboembolism in Northeast Asians.	J Thromb Thrombolysis	37	56-65	2014

Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi M, Fujimura Y, Miyata T	Candidate Gene Analysis Using Genomic Quantitative PCR: Identification of ADAMTS13 Large Deletions in Two Patients with Upshaw-Schulman Syndrome.	Mol Genet Genomic Med	in press		2014
宮田敏行、森下英理子	先天性血栓性素因	血栓と循環	21(1)	6-11	2013
宮田敏行、小亀浩市、小久保喜弘	先天性 ADAMTS13 欠損症	臨床検査	57(5)	556-561	2013
坂野史明、宮田敏行、藤岡政行、杉本充彦	遺伝子改変血栓モデル：ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを中心に	Thrombosis Medicine	3(2)	36-43	2013
小亀浩市	ADAMTS13 と血栓性血小板減少性紫斑病	循環器病研究の進歩	34(1)	69-75	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

3. 血栓症と炎症におけるポリリン酸の役割

国立循環器病研究センター分子病態部部长 宮田敏行
同 分子病態部 坂野史明

key words factor XII, intrinsic coagulation, polyphosphate, thrombosis, kinin

動 向

血液凝固の内因系経路はXII, XI, プレカリクレイン, 高分子キニノーゲンの4種のタンパク質が関与し, 陰電荷物質の表面でXIIが活性化され, 生成したXIIaがXIと血漿プレカリクレインを活性化する。しかし, 内因系経路の活性化に要求される陰電荷物質が永らく同定されていなかったため, 内因系経路の生体内での意義が説明できなかった。2004年, 血小板濃染顆粒中にポリリン酸が貯蔵されており, トロンビンなどの血小板活性化刺激により放出されると報告された¹⁾。次いで, 2006年に, ポリリン酸が内因系経路を活性化する陰電荷物質として報告された。加えて, ポリリン酸は内因系経路だけでなく, 凝固反応の多段階で極めて強力で凝固促進的に働くことが示された²⁾。ポリリン酸の作用をまとめると, ポリリン酸は, 1) XIIの自己活性化, 2) トロンビンによるVの活性化の促進, 3) トロンビンによるXIのフィードバック活性化の促進, 4) 太くて強いフィブリン線維の形成, 5) プレカリクレインの活性化を通じたブラジキニンの遊離, 6) ブラジキニンによる血管透過性の亢進, などに関与する³⁻⁵⁾。すなわち, ポリリン酸は血液凝固の内因系経路の活性化を通してトロンビン形成とフィブリン塊の形成を行うだけでなく, プレカリクレイ

ンの活性化を通してブラジキニン産生を介した炎症も惹起することが明らかになった。活性化血小板は60~100個のリン酸が結合した中鎖ポリリン酸を放出する。一方, ポリリン酸は全ての生物にあまねく存在する物質であり, 原核生物の顆粒中には数百個~数千個のリン酸が繋がった長鎖ポリリン酸が存在する。この長鎖ポリリン酸は血小板由来のポリリン酸に比べ, 極めて強力なXIIとプレカリクレインの活性化物質であるため, 凝固と炎症を強く惹起する。ポリリン酸の生物活性を中和する物質の開発も進められている。

A. ポリリン酸とは

ポリリン酸はリン酸が高エネルギー無水結合でつながった陰電荷をもつ直鎖ポリマーである(図1)。生物種によって, 数個から数千個のリン酸が繋がったものまで存在し, 長さに大きな違いがみられる。ポリリン酸は, 原核生物や単細胞真核生物から高等動物細胞まで, あまねく存在する。ポリリン酸は酸性で Ca^{2+} に富むacidocalcisomeとよばれる細胞内顆粒中にmMレベルからMレベルで存在する¹⁾。ポリリン酸はATPから酵素的に合成される。原核生物では, 飢餓や環境ストレス時にポリリン酸からATP合成を行うので,

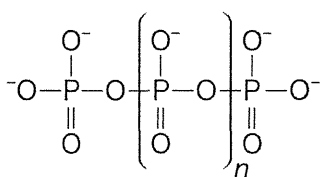


図1 ポリリン酸の化学構造

ポリリン酸は陰電荷をもつリン酸が繋がった直鎖ポリマーである。ヒト血小板の濃染顆粒中には60～100個のリン酸が繋がった中鎖ポリリン酸が存在し、微生物中には数百～数千個のリン酸が繋がった長鎖ポリリン酸が存在する。

生存に不可欠な物質とされている。ポリリン酸は脱リン酸化酵素で容易に分解を受ける。哺乳動物のアルカリ性脱リン酸化酵素 (alkaline phosphatase) は強力なポリリン酸分解酵素であり、ポリリン酸の血中半減期は1.5～2時間である。ポリリン酸は、1) 鎖長が大きく異なり、2) 陰電荷をもち、3) 各種金属イオンをキレートし、4) 柔軟な構造をもち、5) ある種のタンパク質への結合能をもつ足場物質である⁶⁾。原核生物の主要なポリリン酸合成酵素 polyphosphate kinase は真核微生物にも同定されているが、哺乳動物には存在せず、何らかの別酵素が合成を担うと考えられる。微生物はポリリン酸が欠乏すると、成長、運動、集団感知、バイオフィーム (菌膜) 形成、毒性が低下する。ポリリン酸は病原菌を含む微生物の生存に必要なので、ポリリン酸の合成に関わる polyphosphate kinase は病原菌に対する新規の創薬標的と考えられる。

B. ポリリン酸による凝固促進機構

ポリリン酸はヒト血小板では、酸性 (pH 5.4) で Ca^{2+} に富む濃染顆粒 (デルタ顆粒ともよばれる) 中に存在する。濃染顆粒は、 Ca^{2+} 、ATP、ADP、セロトニン、ピロリン酸、ポリリン酸を含んでいる。ヒト血小板は、3～8個の濃染顆粒を含む。健常者では、 10^8 個の血小板には約1

nmolのポリリン酸 (ポリリン酸のmol数はリン酸基のmol数で示す) を含むが、濃染顆粒の形成不全を示す delta storage pool disease 患者のポリリン酸量は健常者の約1/10であった⁷⁾。血小板のポリリン酸はトロンピン、ADP、コラーゲン刺激により放出される。血小板凝集が起こる部位では、顆粒内容物の放出によりポリリン酸が高濃度になると考えられる。2006年、このポリリン酸が凝固内因系経路をはじめ、凝固反応のいくつかの段階を促進すると報告された²⁾。最近、細胞の核から放出された HMGB1 やヒストン、染色体DNAが血栓を含めた病態の進行に大きくかかわると報告され注目されているが^{8,9)}、ポリリン酸も微生物や生体内の細胞から放出される血栓促進メディエーターと位置づけることができる¹⁰⁾。ポリリン酸の凝固反応への作用を順に紹介する。

1. ポリリン酸は血液凝固の内因系経路を活性化し、凝固と炎症を促進する

ポリリン酸は陰電荷をもつので、XIIと高分子キニノーゲンが結合する。XIIはポリリン酸に結合すると自己活性化し、生成したXIIaが高分子キニノーゲンに結合したXIとプレカリクレインをそれぞれ活性化する。生成した血漿カリクレインはXIIの活性化能を示すので、ポリリン酸の陰電荷表面でXIIとプレカリクレインが相互に活性化する反応が進行する (図2)。ポリリン酸による内因系経路の活性化能は、ポリリン酸の鎖長で異なり、リン酸が500個以上繋がった微生物が放出する長鎖ポリマーは活性化能が極めて高く、60～100個のリン酸からなる血小板が放出する中鎖ポリリン酸の活性化能は弱い。

野生型マウスにポリリン酸を静注すると血栓により死亡する。この際、肺にフィブリン血栓が観察されることから、これは急性肺塞栓モデルと考えられる。このマウスモデルでは、生体内でポリリン酸がXIIを活性化し、XIの活性化を介してト

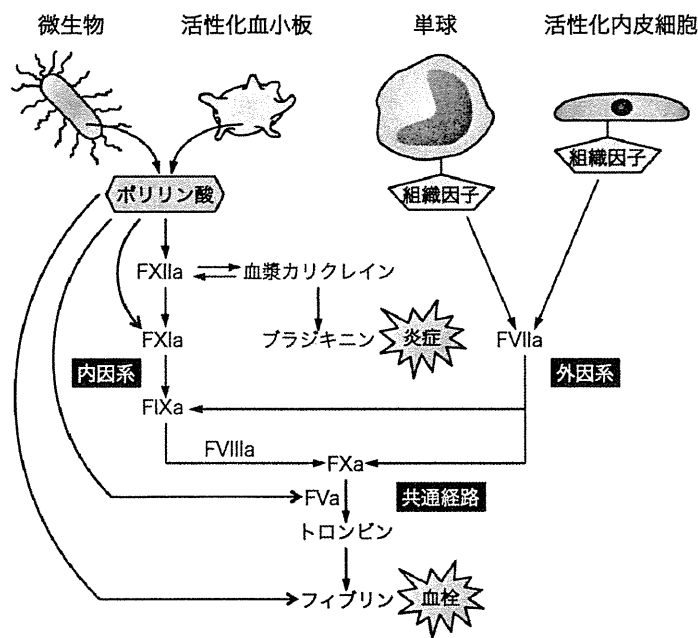


図2 ポリリン酸による凝固カスケードの活性化

微生物や血小板から放出されたポリリン酸は陰電荷物質としてXIIを活性化し、凝固内因系経路の惹起物質として働く。形成されたXIIaはXIを活性化し、トロンビン産生とフィブリン形成を通して血栓形成に働く。また、XIIaはプレカリクレインの活性化とそれに続くブラジキニンの産生を通して炎症に働く。ポリリン酸の血栓惹起物質としての機能は、組織因子-VIIa複合体だけで説明されていた凝固開始反応を考え直す契機となっている。

ロンビンが生成、フィブリンが形成したと考えられる。XII 遺伝子欠損マウス、XIIa 活性阻害剤前投与マウス、XI 遺伝子欠損マウスにこの急性肺塞栓モデルを用いると、生存率が大きく改善した³⁾。

マウスを用いた研究から、ポリリン酸はプレカリクレインを活性化させ、高分子キニノーゲンから炎症メディエーターであるブラジキニンを遊離させることが明らかになった (図2)³⁾。マウスにポリリン酸を投与すると血管透過性が亢進するが、この透過性の亢進はXII 欠損マウスやブラジキニン受容体B2欠損マウスでは観察されなかった。また、XIIaの活性阻害剤やB2受容体アンタゴニストを投与したマウスでも血管透過性の亢進は観察されなかった。

2. ポリリン酸はトロンビンによるVの活性化を促進する

ポリリン酸はトロンビンによるVの活性化を極めて強く促進する (図2)。トロンビンにより迅速に大量のVaが形成されると、VaとXaはプロトロンビナーゼ複合体を形成する。この複合体のXaは組織因子経路インヒビター (tissue factor pathway inhibitor: TFPI) による阻害を免れ、凝固反応を更に促進する (ポリリン酸によるTFPI抗凝固作用の減弱化・無効化) とともに、トロンビンの爆発的な大量産生に繋がる²⁾。

トロンビンには2カ所の陽性に荷電したエクソサイトが存在し、エクソサイトIはフィブリノーゲンなどの基質結合部位、エクソサイトIIはヘパリンなどの陰電荷ポリマーの結合部位である。ポリリン酸はトロンビンに強く結合し (Kdは約5

nM), 結合部位はエクソサイトIIである¹¹⁾. しかし, ポリリン酸はヘパリンと部分的に競合する程度であり, ヘパリンによるアンチトロンビン依存性のトロンビン不活化を阻害しない.

3. ポリリン酸はトロンビンによるXIの活性化を促進する

先天性XI欠損症患者は出血傾向を示すが, XII欠損症患者は出血を示さない. この症状の違いは, XIがXIIa以外の因子で活性化されることを示唆していた. 1991年に2つのグループがトロンビンによるXIのフィードバック活性化を報告し, これが凝固系の爆発的な活性化に要求されるとした^{12,13)}. しかし, トロンビンによるXIの活性化反応は未知の陰電荷物質を要求するため, 生理的な反応であるかどうかに関して議論があった. そこで, 陰電荷物質であるポリリン酸がこの反応を促進するか調べられたところ, 血小板から放出される中鎖ポリリン酸はトロンビンによるXI活性化反応を著しく促進した(図2)¹⁴⁾. したがって, これまで疑問視されていた「トロンビンによるXIのフィードバック活性化機構」は, 血小板から放出されるポリリン酸を補助因子として進行することが明らかになった.

4. ポリリン酸存在下のフィブリン線維は太く, 溶解に抵抗する

ポリリン酸は直接フィブリノーゲンと可溶性フィブリンに結合する(図2)¹⁵⁾. ポリリン酸存在下で形成したフィブリン線維は太い. ポリリン酸は重合したフィブリンに取り込まれ, フィブリンの固さを増し, フィブリン塊の溶解時間を延長した(ポリリン酸非存在下での溶解時間28.5分, 1 mMポリリン酸存在下での溶解時間120分)¹⁶⁾. XIIIaによる架橋は変化しないが, ポリリン酸存在下のフィブリン線維網は線維の結び目がみられ, 線維が存在しない大きなポアが点在するなど,

特徴のあるフィブリン線維網を示した. このようにポリリン酸存在下で形成されたフィブリン塊は溶解しにくい性質を示すので, 外科手術の際に出血を止める目的で使用される“フィブリン糊”に適しているかもしれない. また, 塞栓の発症と関係があるかもしれない.

5. ポリリン酸は線溶系を遅延させる

ポリリン酸は組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)やウロキナーゼによるフィブリン塊の溶解を遅らせる. カルボキシペプチダーゼであるThrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)は, プラスミンで切断されたフィブリンのC末端Lys残基を遊離させるカルボキシペプチダーゼ活性を持つ. プラスミノゲンとtPAはC末端Lys残基に結合するので, TAFIはLys残基を切り出しこれらの因子がフィブリン上に集合しないようにして線溶を抑制する. ポリリン酸の線溶抑制機序は, ポリリン酸によりVが迅速に活性化されてトロンビンが生成し, このトロンビンにより素早くTAFIが活性化され, 活性化TAFIaがフィブリン上のLys残基を切り出し, 線溶系を抑制すると考えられる²⁾. ポリリン酸は2段階で線溶を抑制すると考えられる. まず, ポリリン酸存在下でフィブリンの構造が変化し, プラスミンによる分解に抵抗する. 次いで, 部分的に分解されたフィブリン上のLys残基がTAFIaにより遊離することにより, 有効なLys結合部位が減り, tPAとプラスミノゲンの結合が低下しプラスミン産生と線溶が低下すると考えられた¹⁵⁾.

6. ポリリン酸はフォンビルブランド因子(VWF)に結合する

ポリリン酸はVWFに結合する. 脱リン酸化酵素で処理したVWFのリストセチンコファクター活性, すなわち血小板GPIIbに結合するVWFの機能は低下した. VWFのコラーゲン結合能と多

表1 長鎖と中鎖のポリリン酸の作用の違い

	中鎖ポリリン酸	長鎖ポリリン酸
ポリリン酸の鎖長	60~100のリン酸長	数百~数千のリン酸長
局在性	血小板の濃染顆粒中	微生物中のacidocalcisome中
フォスファターゼによる分解	受ける	受ける
凝固内因系経路の活性化能	弱い	強い
強固なフィブリンの形成能	弱い	強い
トロンビンによるXIのフィードバック活性化能	強い	強い
トロンビンによるV活性化能	強い	強い
多量のVa産生によるTFPI活性中和能	強い	強い

量体化には変化がなかった。このことから、ポリリン酸はVWFの血小板GPIbとの結合に関与する可能性が指摘されている¹⁷⁾。

7. ポリリン酸はポリマーの長さにより凝固系に異なった効果を示す

微生物が放出するリン酸が500個以上繋がった長鎖ポリマーは血液凝固の内因系経路の活性化能が極めて強い(表1)。血小板が放出するリン酸が60~100個程度繋がった中鎖ポリマーはV活性化能が高く、TFPIの抗凝固活性を減弱させる能力を保持している¹⁸⁾。また、固いフィブリン塊を形成させ太いフィブリンを作るには250個以上のリン酸が繋がったポリマーが最適である。リン酸が2個繋がったピロリン酸もポリリン酸とともに血小板の濃染顆粒から放出されるが、ピロリン酸はフィブリン塊を固くするポリリン酸の能力を阻害する。このように、ポリリン酸は鎖長の違いにより、凝固反応への作用点が異なる。微生物が放出する長鎖ポリリン酸が内因系経路を強力に開始させることは、微生物の感染にも重要である可能性がある。

8. ポリリン酸はfactor VII-activating protease(FSAP)を活性化する

FSAPは肝で合成されるVIIとプロウロキナーゼを活性化するセリンプロテアーゼである(血漿濃度, 12 $\mu\text{g/mL}$)。当初, ヒアルロン酸に結合

する性質を用いて精製されたので, hyaluronic acid binding protein 2 (HABP-2) ともよばれる。FSAPはArg313-Ile314結合が切断されて活性化される。この切断は, FSAPがヘパリン, 核酸, デキストラン硫酸といった陰電荷物質に結合し, 自己触媒的に生じる。生成した活性型FSAPaは更にFSAPを活性化する。ポリリン酸はFSAP活性化能を示し, リン酸が65個程度の合成ポリリン酸は未分画ヘパリンより強いFSAP活性化能を示した¹⁹⁾。しかし, 血小板由来のポリリン酸(リン酸数は60~100個程度)のFSAP活性化能は低かった。合成品と精製品との結果に齟齬がみられ, 更に検討が必要と思われる。

C. ポリリン酸の低分子中和剤の開発

既に述べたように, ポリリン酸は強力な凝固促進物質である。ポリリン酸に結合しその血栓作用を中和する低分子化合物は, 新規の抗血栓薬に繋がる可能性が考えられる。最近, ポリリン酸の凝固促進能を中和する物質を探索した研究が発表された^{20,21)}。

核酸結合ポリマー(nucleic acid-binding polymer: NABPs)はRNAからなるアプタマーに結合し, その活性を中和する物質として注目されている。NABPsは, ポリリン酸, RNA, DNAに結合する。NABPsの中の, 陽イオン性ポリマーPAMAM G-3は, FeCl_3 傷害によるマウスの頸動

脈の閉塞を抑制しコラーゲン・エピネフリン混合液の静注によるマウスの死亡を減弱させた²⁰⁾。この物質は出血量には影響しないことから、血栓を惹起するポリリン酸を迅速に中和する抗血栓物質と考えられた。また、17万個以上の低分子化合物ライブラリーと42個の陽イオン性化合物をスクリーニングすることにより、generation 1.0 cationic PAMAM dendrimerを含め、数種の化合物がポリリン酸阻害剤として同定された²¹⁾。今後、これらの低分子化合物の抗血栓作用に関する研究が進むと考えられる。

D. ポリリン酸の生合成にかかわる酵素とその遺伝子欠損マウスの解析

酵母ではポリリン酸は乾燥重量の10～20%にまで達し、主に液胞に蓄えられている⁶⁾。酵母のポリリン酸の量はイノシトールピロリン酸に依存している。最も豊富に含まれているイノシトールピロリン酸は、イノシトールピロリン酸5-IP₇ (5-diphosphoinositol pentakisphosphate) であり、これはinositol hexakisphosphate (IP₆) からIP₆キナーゼの作用により合成される。IP₆キナーゼを欠損している酵母はイノシトールポリリン酸が欠乏し、ポリリン酸量が大きく減少する。哺乳動物にはIP₆キナーゼ遺伝子は3つある。そのうち、IP₆キナーゼ1遺伝子欠損マウスは低体重、インスリン量低下、精子形成欠損を示し、胚性線維芽細胞のIP₇量が30%にまで減少した。この遺伝子欠損マウスのATPとADPに量的な変化はなかったが、ポリリン酸量は明らかに減少していた。血小板機能や血栓能を調べたところ、トロンビン刺激による血小板Pセレクトインの表出とADP刺激によるインテグリンの活性化には差がみられなかったものの、トロンビン刺激による洗浄血小板の凝集能は低下し、ADP刺激した血小板の上清は血漿の凝固時間の延長能を示した。こ

の遺伝子欠損マウスでは、尾の出血時間が延長し、ADP静注による肺塞栓モデルで高い生存率を示した。これらの結果から、IP₆キナーゼは血小板のポリリン酸濃度を制御し、哺乳動物の止血に働いていることが明らかになった²²⁾。哺乳動物では、ポリリン酸の生合成に関わる酵素類は明らかではなく、IP₆キナーゼがどのような機構でポリリン酸量を変化させるかは不明である。

むすび

ここで述べたように、ポリリン酸は内因系凝固反応惹起物質であり、トロンビンによるXIとVのフィードバック活性化の促進物質である。また、プレカリクレインを活性化することによりブラジキニンを産生する炎症惹起物質でもある。ポリリン酸は血小板放出反応の結果として凝固系に作用するので、ポリリン酸の血小板由来の凝固促進因子としての機能は、永らく不明であった1次止血と2次止血の間を繋ぐものであり、血栓塞栓症と炎症性疾患の治療に新しい考えを示すものである。

さて、止血反応や血栓形成におけるポリリン酸の役割を考えてみたい。組織因子が露出した部位にフィブリンができる。その部位に接着した血小板は、組織因子を覆って隠してしまう。3次元に成長する血栓内でフィブリン形成が継続的に進むためには、凝固の開始反応が継続する必要がある。血小板から放出されるポリリン酸はXII活性化を惹起して継続的なフィブリンの形成に寄与すると考えられる。フィブリン形成時にポリリン酸がないと機械的に弱いフィブリン線維になり、塞栓のリスクが高くなるとも考えられる。これまで、凝固反応は組織因子-VIIa複合体でだけ始まると記述されてきたが、ポリリン酸-XIIでもトロンビン産生とフィブリン形成が起こるので、生体内の血栓形成時の凝固反応機構をもう一度考え直す必要があるだろう。組織因子-VIIaとポリリン酸-XII

のどちらがフィブリン形成に重要であるかは、直接比べることはできないが、血管床と血管障害機序によって異なるだろうと考えられる。

ポリリン酸は血小板にだけ含まれているのではない。約60個のリン酸からなるポリリン酸がラット basophilic leukemia (好塩基性白血病) マスト細胞に同定された²³⁾。このポリリン酸はヒスタミン含有顆粒中ではなく、セロトニン含有顆粒中に存在した。この顆粒は acidocalcisomes に酷似する。マスト細胞由来のポリリン酸はブラジキニン形成能をもつ。ポリリン酸はヒト好塩基球中にも検出された²³⁾。

DNA複製の研究でノーベル賞を受賞した故 Arthur Kornberg 博士は、1990年代になってDNA複製から微生物のポリリン酸へ研究を移し、ポリリン酸の研究を進め、亡くなる2カ月前にポリリン酸に関する総説をまとめた²⁴⁾。ポリリン酸の凝固や炎症での機能は、いまだ discovery phase である。最近、ポリリン酸は細胞外ヒストンによる血小板の活性化を増強し²⁵⁾、NF- κ B 活性化を介した炎症反応を引き出す²⁶⁾と報告された。今後、更に多くのポリリン酸の病態生理学的な機能が同定されると考えられる。ポリリン酸は血栓領域だけでなく、多くの分野の医薬品開発の標的物質と考えられるであろう。

文献

- 1) Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, et al. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem.* 2004; 279: 44250-7.
- 2) Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, et al. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 903-8.
- 3) Muller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell.* 2009; 139: 1143-56.
- 4) Morrissey JH. Polyphosphate: a link between platelets, coagulation and inflammation. *Int J Hematol.* 2012; 95: 346-52.
- 5) Morrissey JH, Choi SH, Smith SA. Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood.* 2012; 119: 5972-9.
- 6) Brown MR, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 16085-7.
- 7) Hernandez-Ruiz L, Saez-Benito A, Pujol-Moix N, et al. Platelet inorganic polyphosphate decreases in patients with delta storage pool disease. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 361-3.
- 8) Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009; 15: 1318-21.
- 9) Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 15880-5.
- 10) Caen J, Wu Q. Hageman factor, platelets and polyphosphates: early history and recent connection. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 1670-4.
- 11) Mutch NJ, Myles T, Leung LLK, et al. Polyphosphate binds with high affinity to exosite II of thrombin. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 548-55.
- 12) Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem.* 1991; 266: 7353-8.
- 13) Gailani D, Broze GJ, Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science.* 1991; 253: 909-12.
- 14) Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood.* 2011; 118: 6963-70.
- 15) Mutch NJ, Engel R, de Willige SU, et al. Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood.* 2010; 115: 3980-8.
- 16) Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate enhances fibrin clot structure. *Blood.* 2008; 112: 2810-6.
- 17) Montilla M, Hernandez-Ruiz L, Garcia-Cozar FJ, et al. Polyphosphate binds to human von Willebrand factor in vivo and modulates its interac-

- tion with glycoprotein Ib. *J Thromb Haemost.* 2012; 10: 2315-23.
- 18) Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood.* 2010; 116: 4353-9.
- 19) Muhl L, Galuska SP, Oorni K, et al. High negative charge-to-size ratio in polyphosphates and heparin regulates factor VII-activating protease. *FEBS J.* 2009; 276: 4828-39.
- 20) Jain S, Pitoc GA, Holl EK, et al. Nucleic acid scavengers inhibit thrombosis without increasing bleeding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 12938-43.
- 21) Smith SA, Choi SH, Collins JNR, et al. Inhibition of polyphosphate as a novel strategy for preventing thrombosis and inflammation. *Blood.* 2012; 120: 5103-10.
- 22) Ghosh S, Shukla D, Suman K, et al. Inositol hexakisphosphate kinase 1 maintains hemostasis in mice by regulating platelet polyphosphate levels. *Blood.* 2013; 122: 1478-86.
- 23) Moreno-Sanchez D, Hernandez-Ruiz L, Ruiz FA, et al. Polyphosphate is a novel pro-inflammatory regulator of mast cells and is located in acidocalcisomes. *J Biol Chem.* 2012; 287: 28435-44.
- 24) Rao NN, Gomez-Garcia MR, Kornberg A. Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 605-47.
- 25) Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood.* 2011; 118: 1952-61.
- 26) Bae JS, Lee W, Rezaie AR. Polyphosphate elicits pro-inflammatory responses that are counteracted by activated protein C in both cellular and animal models. *J Thromb Haemost.* 2012; 10: 1145-51.

ADAMTS13 activity and genetic mutations in Japan

T. Miyata¹; K. Kokame¹; M. Matsumoto²; Y. Fujimura²

¹Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center, Japan;

²Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University, Japan

Keywords

ADAMTS13, genetic mutation, thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP

Summary

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), a life threatening disease, can be induced by congenital or acquired deficiency of plasma metalloprotease ADAMTS13. Since the publication of the first genetic analysis in patients with congenital ADAMTS13 deficiency in 2001, more than 100 genetic defects in the ADAMTS13 gene have been reported worldwide. Genetic analysis in patients with ADAMTS13 deficiency has greatly contributed to the understanding of the etiology of TTP. A rapid and quantitative assay method for the plasma ADAMTS13 activity was developed recently in 2005 and opened a new area of TTP research – namely genetic research using a general population to evaluate age and gender differences of ADAMTS13 activity as well as phenotype – genotype correlations of genetic polymorphisms and estimation of a homozygote or a compound heterozygote ADAMTS13 deficiencies. The Japanese general population study included 3616 individuals with an age between 30 – 80 years confirming other studies that while ADAMTS13 activity decreased with age, VWF antigen increased and VWF antigen levels are lowest in blood group O individuals, whereas ADAMTS13 activity levels were not associated with the ABO blood group. 25 polymorphisms with a minor

allele frequency of more than 0.01 were found, among them 6 missense mutations and 19 synonymous mutations, except P475S missense polymorphisms that was only identified in an East Asian population, characterized by reduced ADAMTS13 activity. Prevalence of congenital ADAMTS13 deficiency in the Japanese population was estimated about one individual in 1.1×10^6 to be homozygote or compound heterozygote for ADAMTS13 deficiency. So far more than 40 mutations in Japanese congenital TTP patients were found, but R193W, Q449*, C754Afs*24 (c.2259delA) and C908Y were identified in more than four patients suggesting the precipitation of these mutations in the Japanese population.

Schlüsselwörter

ADAMTS13, Mutation, thrombotisch-thrombozytopenische Purpura, TTP

Zusammenfassung

Die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP), eine lebensbedrohliche Erkrankung, kann durch kongenitalen oder erworbenen Mangel an Metalloprotease ADAMTS13 im Plasma ausgelöst werden. Seit 2001 die erste genetische Analyse bei Patienten mit kongenitalem ADAMTS13-Mangel publiziert wurde, sind weltweit mehr als 100 Gendefekte im ADAMTS13-Gen beschrieben worden. Die Genanalyse bei Patienten mit ADAMTS13-Mangel hat viel zum Verständnis der Ätiologie

von TTP beigetragen. Ein schnelles und quantitatives Testverfahren wurde 2005 für die Aktivität von ADAMTS13 im Plasma entwickelt und damit ein neues TTP-Forschungsgebiet begründet – und zwar die genetische Erforschung alters- und geschlechtsbedingter Unterschiede bei der ADAMTS13-Aktivität in der Allgemeinbevölkerung, von Zusammenhängen zwischen Phäno- und Genotyp bei genetischen Polymorphismen sowie der Bewertung des homozygoten bzw. kombinierten heterozygoten ADAMTS13-Mangels. In der japanischen Bevölkerungsstudie an 3616 Personen im Alter von 30 bis 80 Jahren wurden die Ergebnisse anderer Studien bestätigt, dass zwar die ADAMTS13-Aktivität mit dem Alter abnimmt, das VWF-Antigen jedoch ansteigt, und dass die Konzentration des VWF-Antigens bei Personen mit Blutgruppe 0 am niedrigsten ist, während das ADAMTS13-Aktivitätsniveau keinen Zusammenhang mit der Blutgruppe AB0 aufwies. Es wurden 25 Polymorphismen mit einer Allelfrequenz über 0,01 gefunden, darunter 6 Missense-Mutationen und 19 synonyme Mutationen, außer dem P475S-Missense-Polymorphismus, der ausschließlich in einer ostasiatischen Population identifiziert wurde und durch reduzierte ADAMTS13-Aktivität gekennzeichnet ist. Bei der Prävalenz des kongenitalen ADAMTS13-Mangels in der japanischen Bevölkerung schätzt man, dass 1 von $1,1 \times 10^6$ homozygot oder kombiniert heterozygot für einen ADAMTS13-Mangel ist. Bislang wurden mehr als 40 Mutationen bei japanischen Patienten mit kongenitaler TTP entdeckt; jedoch fand man R193W, Q449*, C754Afs*24 (c.2259delA) und C908Y bei mehr als vier Patienten und nimmt daher an, dass diese Mutationen gehäuft in der japanischen Bevölkerung vorkommen.

Correspondence to:

Toshiyuki Miyata, Ph.D.
Department of Molecular Pathogenesis,
National Cerebral and Cardiovascular Center,
5–7–1 Fujishirodai, Suita 565–8565, Japan
Tel. +81/6/68 33 50 12 EXT: 2512, 8123
Fax +81/6/68735 11 76
E-mail: miyata@ri.ncvc.go.jp

ADAMTS13-Aktivität und Mutationen in Japan

Hämostaseologie 2013;33: 131–137

DOI:10.5482/HAMO-12-11-0017

received: November 12, 2012

accepted in revised form: March 13, 2013

VWF cleavage by ADAMTS13

A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif-13 (ADAMTS13) is a plasma metalloprotease that cleaves a specific Tyr-Met bond in the A2 domain of von Willebrand factor (VWF). The gene, which consists of 29 exons, is located on chromosome 9q34.2, and is only 129 kb distant from the ABO blood group gene.

ADAMTS13 is 1427 amino acid residues in length and consists of a

- signal peptide, a propeptide,
- repolysin-like metalloprotease domain,
- disintegrin-like domain,
- thrombospondin type 1-like domain,
- cysteine-rich domain,
- spacer domain,
- seven additional thrombospondin type 1-like domains, and
- two CUB domains (1–3).

ADAMTS13 is mainly synthesized in stellate cells in the liver and secreted into plasma (4, 5). In humans, the plasma concentration of ADAMTS13 (6, 7) ranges from

- 0.5 to 1.0 µg/ml in Japanese and
- 0.74 to 1.42 µg/ml in Austrians.

The molecular weight of plasma ADAMTS13 was estimated to be 150 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (6). Thus, an ADAMTS13 plasma concentration of about 1 µg/ml is equivalent to about 6.7 nmol/l, which is less than the human plasma concentration of factor VII (10 nmol/l). Approximately 3% of ADAMTS13 in human plasma is bound to plasma VWF through its C-terminal domains (8, 9). Some mouse strains have a C-terminally truncated ADAMTS13 mutant that is probably unable to bind to VWF. Mice having a C-terminally truncated ADAMTS13 mutant show less antithrombotic activity under certain pathophysiological condition *in vivo* (10). Therefore, the ADAMTS13-VWF complex in plasma is functionally important for the antithrombotic activity.

The plasma half-lives of ADAMTS13 were determined as 3.3 and 2.1 days in patients with congenital ADAMTS13 deficiency following the last plasma exchange

(11). The half-lives of 3.3 and 2.1 days represent the lowest known clearance rates of proteases in circulating human plasma. Plasma ADAMTS13 can bind to Lys-plasminogen *in vitro* but the physiological significance of the resulting compound is unknown (12).

VWF, a plasma glycoprotein of 2050 amino acid residues in length, is a large multimeric plasma glycoprotein that mediates platelet adhesion at sites of vascular injury.

VWF mediates initial platelet adhesion to the injured vessel wall by forming a bridge between subendothelial collagen and platelets in circulation (13). VWF is synthesized primarily in endothelial cells and secreted into plasma as an ultra-large (UL-VWF) multimer (>20 000 kDa), some of which remains attached to the endothelial surface.

The UL-VWF multimer possesses a strong platelet aggregation ability and can spontaneously bind and aggregate platelets to generate widespread microthrombi in circulation, leading to a life-threatening disease, thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) (14–16). Under normal conditions, the UL-VWF multimer can be depolymerized by ADAMTS13. Congenital or acquired deficiency of ADAMTS13 leaves the UL-VWF multimer intact, leading to TTP. Platelets and coagulation factor VIII can accelerate the VWF cleavage by ADAMTS13 (17, 18). The plasma concentration of VWF is about 10 µg/ml, which is 10-fold higher than the concentration of ADAMTS13.

VWF has a discrete domain structure that can be clearly observed by an electron microscope (19). In the central region of the polypeptide chain, VWF has three successive A domains, A1–A3, with a high sequence identity. Each A domain is about 90 amino acid residues in length. The A1 domain has a binding region for platelet glycoprotein Ib and the A3 domain has a binding site for subendothelial collagen (13). The A1 and A3 domains have a disulfide bond that forms a link between the N- and C-terminal regions. The A2 domain, however, does not have a corresponding disulfide bond and instead has a

vicinal disulfide bond in the C-terminal region. The crystal structure of the A2 domain suggested that the C-terminal half of the domain can be easily unfolded so that the scissile bond, Tyr1605-Met1606, for ADAMTS13 is exposed (20). As to how ADAMTS13 specifically cleaves this unique single peptide bond in the A2 domain of VWF, new information has been accumulating.

The basic concept for the cleavage is that the scissile bond in the A2 domain is cryptic and sequestered and the shear stress partially unfolds the A2 domain, resulting in exposure of this bond (21, 22).

ADAMTS13 is constitutively active in plasma and the exposed scissile bond in VWF can be easily cleaved by ADAMTS13. Thus, the shear stress-dependent substrate-binding mechanism of ADAMTS13 *in vivo* is very unique.

VWF73 as a minimal substrate for ADAMTS13

Although identification of the proteolytic cleavage site, the Tyr1605-Met1606 bond, in VWF was reported more than two decades ago (23), a plasma assay for the ADAMTS13 activity was a laborious and time-consuming work (24, 25). In order to develop a fast, quantitative, and synthetic substrate for the VWF-cleaving activity of ADAMTS13, a minimal sequence specifically recognized and cleaved by ADAMTS13 should be determined in VWF.

To identify the region in VWF required for ADAMTS13 cleavage, we expressed a series of deletion mutants of the A2 domain and found that a 73-amino-acid fragment from Asp1596 to Arg1668 was essential for the cleavage of the Tyr1605-Met1606 bond by ADAMTS13 (26). We named this fragment VWF73. A 64-amino-acid fragment from Asp1596 to Arg1659 was not efficiently cleaved by ADAMTS13. We determined the solution structure of the ¹H and ¹⁵N double-labeled substrates VWF73 and VWF64, each of which included a C-terminal 6xHis tag, by nuclear magnetic resonance. The results

indicated an extended structure for both peptides, suggesting an induced-fit substrate recognition mechanism (27).

VWF73 has all the characteristics of an ADAMTS13 substrate. We developed a chemically modified VWF73 for use in a fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay for ADAMTS13 activity. This substrate, FRET-VWF73, quantitatively and reproducibly yielded the activity of plasma ADAMTS13 within one hour (24), which constitutes a remarkable improvement in rapidity and accuracy over the previous assays (28, 29). Using this assay, we were able to show that patients with congenital TTP exhibited severely decreased (<5% of the reference value) or undetectable ADAMTS13 activities. A slightly modified method using FRET-VWF73 can quantitatively detect ADAMTS13 activity of less than 5% of the reference value (30).

An enzyme immunoassay of ADAMTS13 activity using a monoclonal antibody that specifically recognizes Tyr1605, the C-terminal residue of the cleaved A2 domain, has been developed and a chromogenic ADAMTS13-act-ELISA using a glutathione-conjugated VWF73 peptide as the substrate has also been reported (25).

These assays are utilized for the clinical diagnosis of TTP.

ADAMTS13 activity in the Japanese population

The Suita Study is an epidemiological study consisting of Japanese residents between the ages of 30 and 79 years who were randomly selected from the municipality population registry and stratified into groups by sex and age in 10-year increments. We have used FRET-VWF73 to measure the plasma ADAMTS13 activity in 3616 individuals from this general population with age ranged from 30 to 80 years.

- When the mean of all plasma ADAMTS13 activity values was set at 100%, the mean activity of men ($93 \pm 24\%$, $n = 1687$) was significantly lower than that of women ($106 \pm 27\%$, $n = 1929$) (31).

- The plasma ADAMTS13 activity tended to decrease with age, especially after age 60, in both men and women. The mean ADAMTS13 activity value was
 - 110% for subjects in their 40s,
 - 109% for those in their 50s,
 - 101% for the 60s,
 - 93% for the 70s, and
 - 85% for the 80s.

We also measured the plasma VWF antigen level in this population. The VWF antigen level increased with age, as reported previously. Because of the combined effects of the increase in VWF antigen level and the decrease in ADAMTS13 activity, the ratio of VWF antigen-to-ADAMTS13 activity was dramatically increased with age (31). This may partly explain the prothrombotic state of elderly men and women. As the FRET-VWF73 assay itself was not affected by VWF concentration in plasma samples (0–160 $\mu\text{g/ml}$) (31), the reduced ADAMTS13 activity in the plasma of elderly subjects was not considered to be due to the assay-dependent artifactual phenomenon. In fact, when age-adjusted VWF antigen level was compared among quartiles of ADAMTS13 activity in the population, no significant association between VWF antigen and ADAMTS13 activity levels was observed in men or in women.

The ABO blood group is a well-known genetic determinant for plasma VWF antigen levels:

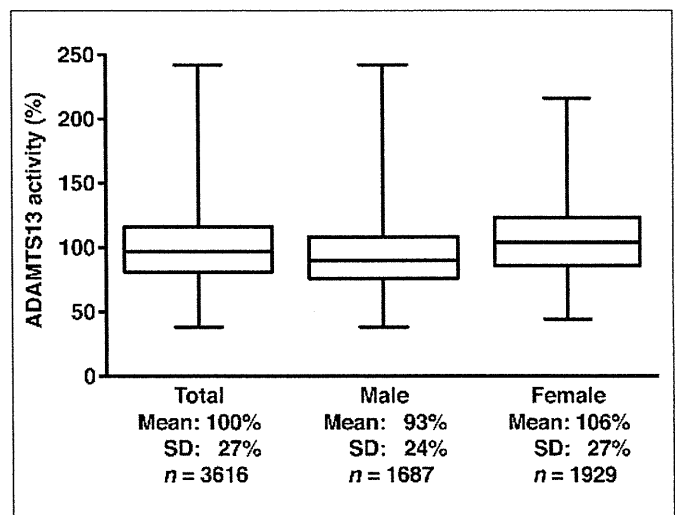
Individuals with blood group O have a lower VWF level than those with non-O groups (32).

The ABO blood group gene is located approximately 129 kb from the ADAMTS13 gene, and this may suggest a possible correlation between the two genes. In our population, the individuals with blood group O exhibited a significantly lower VWF antigen level than those with non-O groups, as shown in previous studies. In contrast, the plasma ADAMTS13 activity was not associated with the ABO blood group (31). This was consistent with the observation that ADAMTS13 antigen levels were not associated with ABO blood group in 387 male Dutch individuals (33). The results are also consistent with the fact that VWF (34), but not ADAMTS13 (35), contains ABO blood group-related N-linked oligosaccharides.

Control plasma for ADAMTS13 assay

The level of ADAMTS13 activity in the general population varied widely, ranging from approximately 40% to 240% of the normal level (► Fig. 1). In general, the plasma ADAMTS13 activity is expressed as a percentage of the activity in commercially available or locally prepared, pooled normal plasma (control plasma). Therefore, if there is a wide range of ADAMTS13 activity among the control plasma samples be-

Fig. 1 Plasma ADAMTS13 activity in a Japanese population. Box-and-whisker plots of the plasma ADAMTS13 activities in men, women, and all subjects are shown. The mean of all values in total subjects was set at 100%. The top and bottom of the box are the 75th and 25th percentiles. The whiskers go down to the smallest value and up to the largest.



fore pooling, this can create a serious problem for ADAMTS13 measurement. It is easy to assume that the control plasma samples prepared from a relatively small number of individuals would show large deviation. In order to estimate the ideal number of individuals for the preparation of the control plasma, we randomly selected the ADAMTS13 activity values from 10 individuals (5 men and 5 women) in the general population cohort consisting of 3616 individuals, and repeated this selection 10 times to obtain the mean \pm 2 standard deviation. The results of the 10-times repeated selection showed that 80% was the value of the mean $-$ 2 standard deviations and 125% was the value of the mean $+$ 2 standard deviations. These results indicated that the control plasma randomly prepared from 10 individuals represented a wide variation of activity and thus was not suitable for use as a control.

When we selected the activities of 20 individuals (10 men and 10 women), the activities of the mean $+$ and $-$ 2 standard deviations were narrowed down to 89% and 113%, respectively, which might have been sufficient for diagnostic purposes.

When we selected 40 individuals or 100 individuals, the activity ranges were reasonably narrowed and were useful for the rigorous analysis of the ADAMTS13 activity (40 individuals: mean \pm 2 standard deviations, 91–108%; 100 individuals: mean \pm 2 standard deviations, 94–104%). As described, sex and age influence plasma ADAMTS13 activity. Therefore, the control plasma for plasma ADAMTS13 activity can be prepared from at least 20 individual plasma samples in consideration of age and sex.

Currently, a new project, "Development of the WHO 1st International Standard for ADAMTS13 in Plasma" led by the VWF Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis has been initiated by Dr. Johanna Kremer Hovinga.

Genotype-phenotype correlation of polymorphisms

The ADAMTS13 gene contains several genetic missense polymorphisms (3, 36, 37) some of which may influence the VWF

cleaving activity. Since low plasma ADAMTS13 and high VWF levels are related to ischaemic stroke and myocardial infarction (38–40), missense polymorphisms in the ADAMTS13 gene could be important. Twenty missense polymorphisms of the ADAMTS13 gene have been listed (37), and some of their possible structural defects have been examined in silico (41).

To identify genetic polymorphisms in the Japanese population, we sequenced the ADAMTS13 gene in 346 individuals and identified 25 polymorphisms with a minor allele frequency of $>$ 0.01 (42):

- 6 were missense polymorphisms and
- 19 were synonymous mutations.

We further genotyped six missense polymorphisms in a large Japanese cohort consisting of 3616 individuals whose plasma ADAMTS13 activities had been measured. We found that the minor allele frequencies were

- 0.192 for Q448E (c.1342C>G),
- 0.05 for P475S (c.1423C>T),
- 0.048 for S903L (c.2708C>T),
- 0.027 for T339R (c.1016C>G),
- 0.027 for P618A (c.1852C>G) and
- 0.022 for G1181R (c.3541G>A).

The T339R and P618A polymorphisms were in absolute linkage disequilibrium. When we examined the association of these polymorphisms with plasma ADAMTS13 activity, the ADAMTS13 activity of Q448E heterozygotes (QE) and minor allele homozygotes (EE) was significantly higher than that of major allele homozygotes (QQ):

- QQ: 97.6% \pm 25.9%;
- QE: 104.2% \pm 27.4%;
- EE: 105.7% \pm 27.5%.

In contrast, the ADAMTS13 activity of P475S heterozygotes (PS) and minor allele homozygotes (SS) was significantly lower than that of major allele homozygotes (PP):

- PP: 101.4% \pm 26.6%;
- PS: 87.2% \pm 23.3%;
- SS: 73.3% \pm 20.3% (42).

Four other missense polymorphisms did not affect the ADAMTS13 activity.

Tab. 1 Non-synonymous mutations identified in four segregated groups with different ranges of ADAMTS13 activity

group (average activity)	mutation	predicted damage	references
maximum (183%)	L19F	benign	newly identified
	R268Q		
median (97.6%)	Q723K		
	N1321S		
2 nd minimum (53.1%)	I380T		causative for congenital ADAMTS13 deficiency (46)
	Y1074Afs*46	–	
minimum (47.1%)	R1274C	possibly damaging	newly identified
	F324L	probably damaging	
	F418L		
	I673F	possibly damaging	
	Q773*	–	
	Y1074Afs*46	–	
	R1095Q	probably damaging	newly identified

*stop codon

As described, the ABO blood group gene is located near the ADAMTS13 gene. T339R and P618A were associated with the blood group A allele and P475S and S903L tended to be associated with the blood group O allele in our study (42).

The P475S missense polymorphism is ethnic specific, having only been identified in an East Asian population. The reduced plasma ADAMTS13 activity in individuals with the P475S mutation is consistent with the finding that the recombinant ADAMTS13-P475S mutant showed approximately 70% of the activity of the wild-type ADAMTS13 (43). To further elucidate the molecular basis of the reduced activity of the ADAMTS13-P475S mutant, we recently determined the enzymatic parameters of ADAMTS13-MDTCs (residues 75–685) and MDTCs-P475S and solved the crystal structure of the P475S mutant of the ADAMTS13-DTCS domain (44). MDTCs-P475S exhibited a reaction rate similar to that of wild-type MDTCs but showed twofold lower affinity for FRETs-VWF73, indicating that Pro475 is involved

in formation of the substrate-binding exosite. The crystal structures showed that the conformation of the P475S-containing loop was significantly different between the mutant and the wild-type. This explains the higher susceptibility of the enzymatic activity of MDTCs-P475S to environmental conditions such as denaturants and high temperature. MDTCs-P475S can moderately cleave shear-treated VWF.

Incompatible evidences between in vivo and in vitro studies are accumulating on one of the missense polymorphisms, P618A. PolyPhen-2, an in silico tool which predicts the possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein, predicted P618A as a damaging mutation. The crystal structure of the S domain of ADAMTS13 showed that Pro618 adopted the *cis* conformation (41), and the substitution of Pro618 with Ala, which cannot adopt the *cis* conformation, may cause structural distortion. Indeed, a transient expression study of the ADAMTS13-P618A mutant showed lower levels of activity and antigen

in the conditioned media of HEK293 cells (45). However, as described, the P618A mutation was not associated with plasma ADAMTS13 activity in the general population. This inconsistent observation should be properly addressed in the future experiments.

ADAMTS13 deficiency in a Japanese population

The ADAMTS13 activity-genotype analysis based on ~3200 individuals enabled us to estimate the frequency of congenital ADAMTS13 deficiency. We selected 128 individuals according to their plasma ADAMTS13 activity:

- 32 individuals of the “minimum” activity group (average activity, 47.1%),
- 32 individuals of the “second minimum” activity group (average activity, 53.1%),
- 32 individuals of the “median” activity group (average activity, 97.6%), and
- 32 individuals of the “maximum” activity group (average activity, 183%).

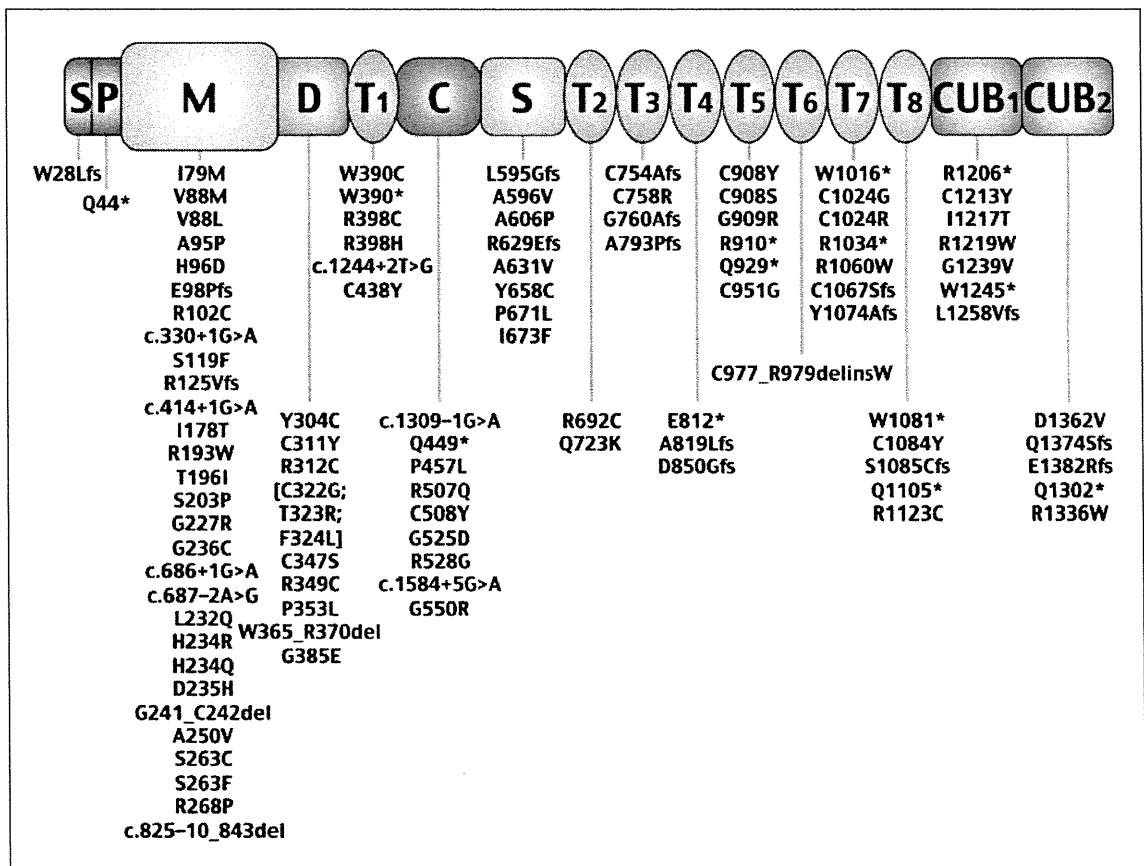


Fig. 2 ADAMTS13 gene mutations responsible for congenital TTP (*stop codons). The description of protein sequence mutation follows the recommendation of the Human Genome Variation Society (www.hgvs.org/mutnomen/recs-prot.html). Mutations in red were identified in Japanese patients.