

- et al : Inherited thrombophilia : Part 1. *Thromb Haemost* 76 : 651-662, 1996
- 4) Okamoto A, Sakata T, Mannami T, et al : Population-based distribution of plasminogen activity and estimated prevalence and relevance to thrombotic diseases of plasminogen deficiency in the Japanese : the Suita Study. *J Thromb Haemost* 1 : 2397-2403, 2003
  - 5) Tapson VF : Acute pulmonary embolism. *N Engl J Med* 358 : 1037-1052, 2008
  - 6) Furie B, Furie BC : Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 359 : 938-949, 2008
  - 7) Morrissey JH : Polyphosphate : a link between platelets, coagulation and inflammation. *Int J Hematol* 95 : 346-352, 2012
  - 8) Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, et al : Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 361 : 345-357, 2009
  - 9) Sakata T, Okamoto A, Mannami T, et al : Protein C and antithrombin deficiency are important risk factors for deep vein thrombosis in Japanese. *J Thromb Haemost* 2 : 528-530, 2004
  - 10) Mitsuguro M, Sakata T, Okamoto A, et al : Usefulness of antithrombin deficiency phenotypes for risk assessment of venous thromboembolism : type I deficiency as a strong risk factor for venous thromboembolism. *Int J Hematol* 92 : 468-473, 2010
  - 11) Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH : The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 109 : 3161-3172, 2007
  - 12) Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al : Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 15 : 1318-1321, 2009
  - 13) Hackeng TM, Sere KM, Tans G, et al : Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 : 3106-3111, 2006
  - 14) 小嶋哲人 : 血栓性素因の病因と病態. *臨床血液* 55 : 1454-1460, 2011
  - 15) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, et al : Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med* 366 : 2390-2396, 2012

# 先天性 ADAMTS13 欠損症

Congenital deficiency of ADAMTS13

宮田 敏行 小亀 浩市 小久保 喜弘

〔臨床検査 57 : 556-561, 2013〕

## POINT

- 血漿 ADAMTS13 活性は、40%程度という低値から 240%程度という高値まで幅広く分布し、男性の ADAMTS13 活性は女性より低値を示した。また、男女共に血漿 ADAMTS13 活性は加齢により低下し、特に 60 歳以降に低下がみられた。
- 日本人における ADAMTS13 欠損症ヘテロ接合体は約 530 人に 1 人と推定された。これから計算すると、TTP を発症する可能性をもつ ADAMTS13 欠損症の複合ヘテロ接合体もしくはホモ接合体は、約 110 万人に 1 人と計算された。
- 先天性 TTP 患者の遺伝子解析は 2001 年に初めて報告され、現在では 100 種以上の遺伝子変異が世界中から報告されている。1 アミノ酸置換であるミスセンス変異が最も多いが(約 60%)、それ以外の非同義変異も多数同定されており、日本人研究者の貢献は極めて大きく、40 種以上の変異を同定している。

## Keywords

血栓性血小板減少性紫斑病, 微小血管障害症, フォン・ヴィレブランド因子, ADAMTS13

## はじめに

血漿中のプロテアーゼである ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motifs 13) は、フォン・ヴィレブランド因子(von Willebrand factor ; VWF)切断酵素であり、血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura ; TTP)では ADAMTS13 活性が著減する症例が多い。TTP の診断は、血小板減少と溶血性貧血の 2 徴候が重要であるが、精神神経症状、腎障害、発熱を示す場合もあり、これらは古典的 5 徴候といわれる。

TTP の発症機構は次のように説明される。血中の ADAMTS13 活性が著減することにより、強い血小板凝集能を有する超高分子量 VWF マルチマーが切断されずに血中に残存し、全身の微小血管内に血小板血栓が生じる。ADAMTS13 は VWF の A2 ドメインにある Tyr-Met 結合を特異的に切断して VWF マルチマーを低分子量化し、VWF マルチマーの血小板凝集能を抑制する。この切断には、直鎖状の VWF マルチマーにずり応力が作用して、A2 ドメインの立体構造が崩れる必要があり、ずり応力依存性の切断という極めて

珍しい機構として注目される<sup>1,2)</sup>。

最近、筆者らは日本人集団で大規模に ADAMTS13 活性を測定し、遺伝子変異と酵素活性の関連を解析した。この研究から、先天性 TTP 患者 (Upshaw-Schulman 症候群ともよばれる) にみられる ADAMTS13 遺伝子変異の複合へ

テロ接合体もしくはホモ接合体の頻度を求めることができた。

本稿では、世界でも類をみない大規模な集団を用いた ADAMTS13 活性測定から得られた成果を紹介したい。

## ADAMTS13 と VWF

ADAMTS13 遺伝子は 29 のエクソンから構成され、染色体 9q34.2 にマップされる。ADAMTS13 は 1,427 アミノ酸残基からなるプロテアーゼで<sup>3,4)</sup>、主に肝星細胞で合成・分泌される<sup>5)</sup>。分泌された ADAMTS13 はシグナル配列とプロ配列をもたず、血中には阻害因子が存在しないため、恒常的に活性型として血中に存在する極めて特殊な酵素である。これまでのところ、ADAMTS13 の基質は VWF 以外に報告されていない。

血漿 ADAMTS13 濃度は、日本人では 0.5~1.0 mg/mL、オーストリア人では 0.74~1.42 mg/mL と報告されており<sup>6)</sup>、約 1.0 mg/mL と考えられる。血漿 ADAMTS13 の分子量は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-polyacryl-

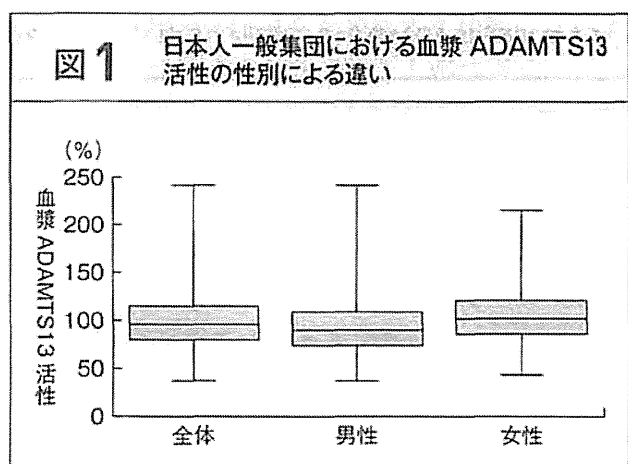
amide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) により 150 kDa と推定されるので、血漿 ADAMTS13 濃度は約 6.7 nmol/L と考えられる。これは、凝固第 VII 因子の血中量 (10 nmol/L) よりも少ない。ADAMTS13 の血中での半減期は 3.3 日もしくは 2.1 日と報告されている<sup>7)</sup>。

一方、VWF はプレプロ体として主に血管内皮細胞で合成され、ジスルフィド結合で連結された VWF は、超高分子量 VWF マルチマーとして Weibel-Palade 小体に蓄積され、刺激依存性に血中に放出される。この超高分子量 VWF マルチマーは血小板凝集活性が極めて高く、ADAMTS13 により適度に切断を受けることにより、血小板凝集能は抑制される。

## 日本人一般住民の ADAMTS13 活性値

吹田研究は、大阪府吹田市の住民を対象として 1989 年に始まったコホート研究である。住民台帳から 30~70 歳台まで 10 歳台ごとに男女別に無作為に対象を抽出し、健診案内を郵送し参加を呼びかけた。15,200 人を抽出した中で、初診時に 8,360 人が健診受診している (ボランティア集団 546 人を含む)。日本の多くのコホートが農漁村の在住者を対象とするのに対し、吹田研究は都市部の住民を対象とする点に特徴がある。本研究の特徴は、計画健診により無作為に抽出された 30~70 歳台の広い年齢層の対象者の ADAMTS13 活性を測定した点にあり、国民の 2/3 を占める都市部住民の年齢と性別による ADAMTS13 活性の変化を把握できる。

健診受診した 3,616 人 (男性 1,687 人、女性 1,929 人、33~89 歳) の ADAMTS13 活性を、筆者らが開発した合成基質 FRETS-VWF73 を用い

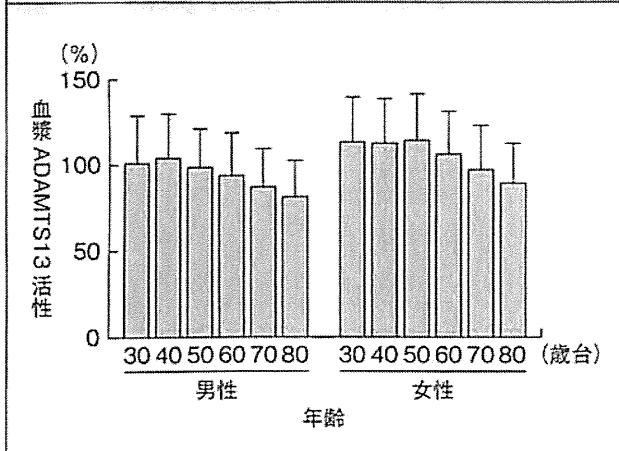


男性 1,687 人、女性 1,929 人、合計 3,616 人の血漿 ADAMTS13 活性を FRETS-VWF73 で測定し、箱ひげ図として結果を示した。箱の上と下は 25 パーセンタイルと 75 パーセンタイルを示す。ひげは最高値および最低値を示す。

て測定した。血漿 ADAMTS13 活性の平均値を 100% として、一般住民を対象にした血漿 ADAMTS13 活性値を図 1 に示した<sup>8)</sup>。活性は、

図2

日本人一般集団における血漿 ADAMTS13 活性の年齢にともなう変化



男性と女性の血漿 ADAMTS13 活性を 10 歳ごとの年齢で分けて示した。

40%程度という低値から 240%程度という高値まで、幅広く分布した。男性の ADAMTS13 活性は

女性より低値を示した。また、男女共に血漿 ADAMTS13 活性は加齢により低下し、特に 60 歳以降に低下がみられた (図 2)。この集団の VWF 抗原量を測定したが、VWF 抗原量は既報通り加齢により上昇した。したがって、VWF 抗原量: ADAMTS13 活性値の比をとると、この比は加齢により劇的に上昇することとなった。これは高齢者の血栓傾向を部分的に説明するかもしれない。

ABO 血液型は血漿 VWF 抗原量の遺伝的な決定因子である。O 型の人非 O 型の人より VWF 抗原量が低いことが知られ、それは吹田研究の集団でも確認された。ABO 血液型遺伝子は ADAMTS13 遺伝子と約 129 kb しか離れていないが、この 2 つの遺伝子上の多型は連鎖不平衡を示さなかった。VWF は ABO 血液型糖鎖をもつが (note1 参照)<sup>9)</sup>、ADAMTS13 はもたない。

note1

VWF の ABO 血液型糖鎖

VWF は 12 個の N 型糖鎖と 10 個の O 型糖鎖をもち、分子量の 20%程度を糖鎖が占める。VWF の N 型糖鎖と O 型糖鎖は ABO 血液型糖鎖をもつものがある。これは分泌蛋白質では極めて珍しい。ABO 血液型は VWF の血中濃度に影響を与え、非 O 型の人非 O 型の人に比べて血中 VWF 量が 20~30%高い。これは非 O 血液型糖鎖をもつ VWF は血中でのクリアランスが遅いためといわれており、非 O 血液型糖鎖をもつ VWF は ADAMTS13 で切断されにくいというデータも

示されている<sup>9)</sup>。ABO 血液型は静脈血栓塞栓症のリスク因子であり、非 O 型は静脈血栓塞栓症のリスクを上昇させる (O 型に比べオッズ比は 1.6~2.6)。VWF は凝固第 VIII 因子と血中で複合体を形成し、不安定で分解されやすい VIII 因子の安定化に寄与する。したがって、VWF 量が高い非 O 型の人では、VIII 因子がより安定に血中に存在し、VIII 因子量の増加が静脈血栓塞栓症のリスクになると考えられている。

ADAMTS13 遺伝子のミスセンス多型と ADAMTS13 活性

ADAMTS13 遺伝子はいくつかの頻度の高いミスセンス変異をもつ。ここでは TTP の原因となるまれな変異と区別するため、これらの変異をミスセンス多型と呼ぶことにする。これらのミスセンス多型は多少なりとも活性に影響する可能性が考えられる。ADAMTS13 活性の低値と VWF 抗原量の高値が重なると虚血性脳梗塞や心筋梗塞に関連するとの報告があり<sup>10)</sup>、ミスセンス多型の有無による活性の増加・減少は重要となるかもしれない。そこで、筆者らはまず一般住民 346 人を対象に ADAMTS13 遺伝子のシーケンスを行い、アレル頻度が 0.01 以上の 6 個のミスセンス

多型を同定した。次いで、3,616 人の一般住民を対象にこれらを遺伝子タイピングし、ADAMTS13 活性との関連を検討した<sup>11)</sup>。ミスセンス多型のアレル頻度は、T339R 多型は 0.027、Q448E 多型は 0.192、P475S 多型は 0.05、P618A 多型は 0.027、S903L 多型は 0.048、G1181R 多型は 0.022 であった。T339R 多型と P618A 多型は完全に連鎖不平衡していた。次に、活性との関連を調べたところ、Q448E 多型では E アレル保有者は血漿中の ADAMTS13 活性は数%程度増加していた (表 1)。一方、P475S 多型では、S アレルホモ接合体は日本人の約 400 人に 1 人みられ、ADAMTS13 活性

表1 ADAMTS13 ミスセンス多型の頻度と血漿中 ADAMTS13 活性

Q448E 多型		P475S 多型	
E アレル頻度	0.192	S アレル頻度	0.05
血漿中 ADAMTS13 活性		血漿中 ADAMTS13 活性	
QQ	97.6%±25.9%	PP	101.4%±26.6%
QE	104.2%±27.4%	PS	87.2%±23.3%
EE	105.7%±27.5%	SS	73.3%±20.3%

T339R 多型, P618A 多型, S903L 多型, G1181R 多型は血漿中の ADAMTS13 活性に影響しなかった。

は 73% にまで低下していた<sup>11)</sup>。6 つのミスセンス多型のうち、P475S 多型は人種特異性を示し、中

国人・韓国人を含め、東アジア人にのみ見いだされている。

### 先天性 ADAMTS13 欠損症の推定頻度

ADAMTS13 活性を測定した日本人 3,200 人のデータを用いて、日本人における先天性 ADAMTS13 欠損症の頻度を推定した<sup>11)</sup>。3,200 人の中から、活性が最も高い 32 人(平均活性値: 183%)、活性が中央値を示す 32 人(平均活性値: 97.6%)、活性が最も低い 32 人(平均活性値: 47.1%)、活性が次に低い 32 人(平均活性値: 53.1%)、合計 128 人を選び、ADAMTS13 遺伝子のシーケンスを行い、活性に影響を与えると考えられるまれな非同義変異(note2 参照)の同定を試みた。非同義変異の保有者は、最大活性値群に 2 人、中央値群に 2 人、最低活性値群に 7 人、2 番目低活性値群に 3 人、合わせて 14 人であった。

最大活性値群や中央値群の各 32 人のそれぞれ 2 人ずつに非同義変異が同定されたというシーケンスの結果は、最低活性値群と 2 番目低活性値群のそれぞれ 32 人のうち 2 人は ADAMTS13 活性に影響を与えないまれな非同義変異を保有することを示していた。このことは、最低活性値群の 5 人、2 番目低活性値群の 1 人、合わせて 6 人の非同義変異保有者は機能消失変異を保有するヘテロ接合体であると見なすことができる。この仮定が正しいとすると、3,200 人中で 6 人が ADAMTS13 欠損症ヘテロ接合体と考えられる(すなわち、約 530 人に 1 人)。これから、ADAMTS13 欠損症の複合ヘテロ接合体もしくはホモ接合体は、約

110 万人に 1 人みられると計算された。日本の人口を 1 億 2,700 万人とすると、TTP を発症する可能性をもつ先天性 ADAMTS13 欠損症は 112 人程度と推定される。この推定はいくつかの制限がある。例えば、ADAMTS13 欠損症ヘテロ接合体の頻度が 3,200 人中に 8 人だとすると、先天性 ADAMTS13 欠損症は約 200 人となる。本研究の対象者は、都市部の地域から無作為に抽出した一般住民である。都市部の住民は比較的移動がみられるため、地方の住民を対象にする研究より、より全体性を反映すると考えることができる。

本研究で求めた先天性 ADAMTS13 欠損症の頻度(約 110 万人に 1 人)は、家族性高コレステロール血症の頻度に近い。家族性高コレステロール血

#### note2

#### 非同義変異 (nonsynonymous mutation)

アミノ酸の変化を伴う DNA の変異を指す。具体的には、ミスセンス変異(アミノ酸が置換する変異)、ナンセンス変異(蛋白質翻訳の停止コドンを生じる変異)、数塩基の欠失や挿入、フレームシフト変異(翻訳の読み枠が変わる変異)、スプライス部位変異(スプライス異常が生じる変異)がある。同義変異に比べて非同義変異は蛋白質の機能異常を伴う場合が多い。蛋白質に対するミスセンス変異の影響を予測する PolyPhen-2 (polymorphism phenotyping v2) などのプログラムがインターネットで公開されている。

症では、ヘテロ接合体は約 500 人に 1 人、ホモ接合体は 100 万人に 1 人といわれている。

ヨーロッパ北部・中央部在住の先天性 TTP 患者には、ADAMTS13 遺伝子の c.4143insA による E1382Rfs\*6 変異(E1382R のフレームシフト

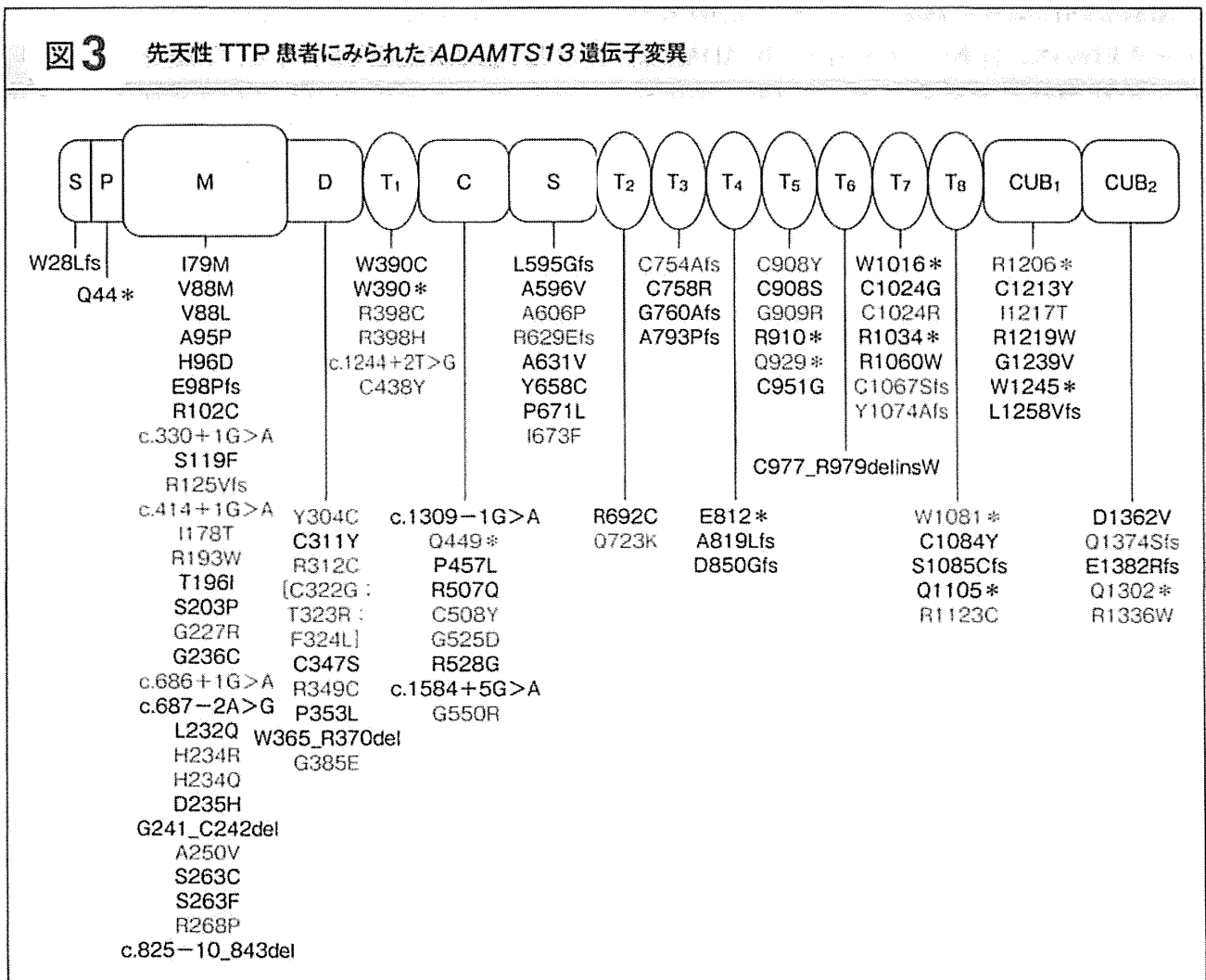
変異により 6 アミノ酸あとに停止コドンが生じる変異)が頻繁にみられる<sup>12)</sup>。このように、疾患原因変異の集積がみられる地域では、先天性 ADAMTS13 欠損症の頻度は少し高いだろう。

### 先天性 ADAMTS13 欠損症の遺伝子変異

Upshaw-Schulman 症候群ともよばれる先天性 TTP 患者の遺伝子解析は 2001 年に初めて報告され<sup>4)</sup>、現在では 100 種以上の遺伝子変異が世界中から報告されている<sup>13)</sup>。TTP 発症につながる変異は ADAMTS13 の N 末端のシグナル配列から C 末端の CUB ドメインまで至る所に同定されている。1 アミノ酸置換であるミスセンス変異が最も多いが(約 60%)、それ以外の非同義変異も

多数同定されている(図 3)。この研究での日本人研究者の貢献は極めて大きく、筆者らは 40 種以上の変異を同定している<sup>14)</sup>。多くの変異は 1 人の患者にだけみられるが、4 つの変異、R193W、Q449\*、C754Afs\*24(c.2259delA)、C908Y は 4 人以上の患者にみられ、これらの変異は日本人集団に集積していると考えられる。先に、先天性 TTP 患者に同定された変異 (Y1074Afs\*46、

図 3 先天性 TTP 患者にみられた ADAMTS13 遺伝子変異



アミノ酸変異の表記は Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-prot.html>) に従った。日本人にみられた変異は青で示した。  
\* : 停止コドン。

I673F)が一般住民にも同定されたと述べたが、Y1074Afs\*46変異は3人の患者に、I673F変異は2人の患者に、それぞれ同定されている。これらの変異も日本人に集積していると思われる。

最近、アイスランドの78家系のトリオ(両親と子ども1人)の全ゲノム塩基配列解析の結果が報告された<sup>15)</sup>。それによると、1世代当たり1塩基

当たりの *de novo* 変異率は  $1.20 \times 10^{-8}$  だったので、1世代に平均60個の新規変異が導入されることを示している。変異のうち10%程度は機能低下を伴うといわれているので、子は平均して6つの新しい機能を低下する遺伝子変異をもつと考えられる。

## おわりに

一般住民を対象にした大規模なADAMTS13の活性と遺伝子の研究から、ADAMTS13欠損症ヘテロ接合体は約530人に1人であることが判明した。また、ADAMTS13のミスセンス多型であるP475S多型のSアレルホモ接合体の血漿中のADAMTS13は73%程度に低下し、約400人に1人の割合で見られることも明らかになった。このように、ADAMTS13の遺伝子変異により活性の

低下を説明できる場合もあるが、それは少数例にとどまり、活性が約50%を示す低値例でも、その多くは遺伝子変異を伴わず、活性低下の原因が明らかではないことが判明した。50%程度のADAMTS13活性の低値を示す例が何らかの疾患に関連する可能性があり、今後の検討が待たれるところである。

## 文 献

- 1) 秋山正志, 武田壮一, 小亀浩市, 他: VWF切断酵素ADAMTS13のエキソサイト認識機構. 生化学 82: 950-956, 2010
- 2) 宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志, 他: ADAMTS13研究の最先端. 臨床血液 53: 672-679, 2012
- 3) Soejima K, Mimura N, Hirashima M, et al: A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? J Biochem 130: 475-480, 2001
- 4) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al: Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature 413: 488-494, 2001
- 5) Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al: Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. Blood 106: 922-924, 2005
- 6) Soejima K, Nakamura H, Hirashima M, et al: Analysis on the molecular species and concentration of circulating ADAMTS13 in Blood. J Biochem 139: 147-154, 2006
- 7) Furlan M, Robles R, Morselli B, et al: Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost 81: 8-13, 1999
- 8) Kokame K, Sakata T, Kokubo Y, et al: von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population. J Thromb Haemost 9: 1426-1428, 2011
- 9) Bowen DJ: An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. J Thromb Haemost 1: 33-40, 2003
- 10) Kaikita K, Soejima K, Matsukawa M, et al: Reduced von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in acute myocardial infarction. J Thromb Haemost 4: 2490-2493, 2006
- 11) 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 9: 1654-1656, 2011
- 12) Schneppenheim R, Kremer Hovinga JA, Becker T, et al: A common origin of the 4143insA ADAMTS13 mutation. Thromb Haemost 96: 3-6, 2006
- 13) Lotta LA, Garagiola I, Palla R, et al: ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. Hum Mutat 31: 11-19, 2010
- 14) Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, et al: Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. J Thromb Haemost 9(Suppl 1): 283-301, 2011
- 15) Kong A, Frigge ML, Masson G, et al: Rate of *de novo* mutations and the importance of father's age to disease risk. Nature 488: 471-475, 2012

みやた としゆき・こかめ こういち  
国立循環器病研究センター 分子病態部

こくぼ よしひろ  
国立循環器病研究センター 予防健診部  
〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1

# 遺伝子改変血栓モデル： ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを中心に

坂野史明\* 宮田敏行\* 藤岡政行# 杉本充彦\$

Banno Fumiaki, Miyata Toshiyuki, Fujioka Masayuki, Sugimoto Mitsuhiro

\* 国立循環器病研究センター分子病態部

# 奈良県立医科大学救急医学講座

\$ 奈良県立医科大学血栓制御医学講座

## Summary

ADAMTS13は血漿中の血小板凝集制御因子であり、ADAMTS13欠損は血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)という難治性血栓症の原因となる。近年、ADAMTS13遺伝子改変マウスを用いて、脳梗塞や心筋梗塞をはじめとする血栓性疾患への本因子の影響や、治療薬としての可能性が盛んに検討されている。本稿では、遺伝子改変血栓モデルマウスの解析例として、ADAMTS13遺伝子改変マウスの表現型を概説する。

## Key Words .....

- ・ ADAMTS13
- ・ *Adamts13* 欠損マウス
- ・ 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)
- ・ 脳梗塞
- ・ 心筋梗塞

## はじめに

ADAMTS13は、A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 motif ファミリーに属する血漿プロテアーゼであり、血小板接着蛋白質フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor: VWF) を特異的に切断する。VWFはおもに血管内皮細胞で合成され、ホモマルチマーとして血中へ分泌される。VWFの血小板粘着および凝集活性は分子量が大きいほど強く、とくに20,000kDaを超える超高分子量VWF (unusually large VWF: ULVWF) マルチマーは、過度の血小板凝集を引き起こす。ADAMTS13は

ULVWF マルチマーの断片化を介して血小板血栓形成を抑制的に制御しており、ADAMTS13活性が欠乏すると、重篤な血栓性疾患である血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP) の発症につながる。

ADAMTS13研究におけるモデル動物としてADAMTS13遺伝子 (*Adamts13*) 改変マウスが樹立され、血流イメージングや病態モデルを用いた検討から、ADAMTS13の生体内血栓形成への影響や血栓性疾患との関連性が明らかとなってきた。本稿では、遺伝的血栓傾向を有するマウスの解析例として、*Adamts13*欠損マウスおよびC末端ドメイン欠損*Adamts13*マウスの表

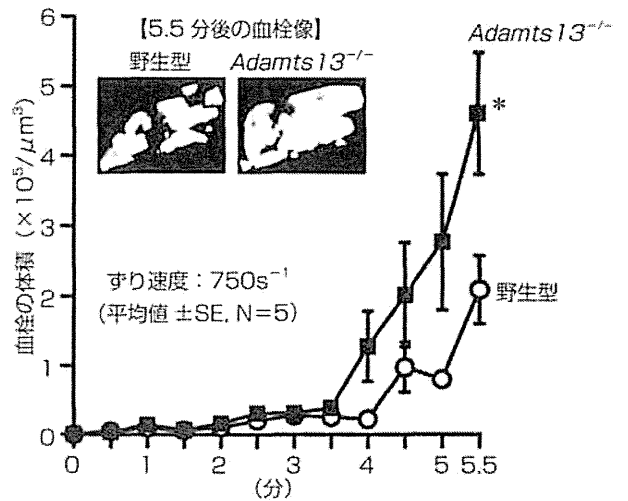


現型を紹介する。

## 1. ADAMTS13 遺伝子欠損マウスの潜在的な血栓傾向

*Adamts13* 欠損マウス (*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウス) は、われわれと Motto らにより別々に独立して樹立された<sup>1)2)</sup>。われわれは、触媒ドメインをコードするエクソン 3-6 を Neo 遺伝子と置換して *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスを作製した<sup>1)</sup>。TTP 患者と同様に、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスの血漿中には ULVWF マルチマーの残存がみられた。しかし、意外にも *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスの出生、発育に異常は認められず、血小板数、血漿ハプトグロビン量、凝固時間、出血時間、血液像、組織像、アゴニスト惹起血小板凝集能も正常で、予想された TTP 症状（血小板減少、溶血性貧血、微小血管内血小板血栓）は認められなかった。平行板型フローチャンバーを用いて、固相化コラーゲン表面上での高ずり応力下血小板血栓形成能を解析すると、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスにくらべて血栓形成能が亢進していた（図①）。また、コラーゲン-アドレナリン溶液の静注による血栓誘発モデルを用いて、*in vivo*での血栓傾向を検討した結果、血栓誘発による消費性血小板減少が *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスで顕著に認められた。したがって、マウスにおいて ADAMTS13 欠損は、血中に ULVWF マルチマーの残存を引き起こし、潜在的な易血栓形成傾向をもたらすが、それだけでは TTP 発症に至らないことが明らかとなった。

Motto ら<sup>2)</sup>は、エクソン 1-6 を Neo 遺伝子に置き換えて *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスを作製しており、やはり通常飼育下で TTP 症状はみられないと報告している。彼らは、C57BL/6 系統にくらべて血中 VWF 量が約 10 倍高い CASA/Rk 系統への戻し交配により、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスの血小板数が有意に低下することを見出した。このマウスに血管内皮細胞を傷害する志賀毒素を投与すると、血小板減少が重篤化するとともに、一部の *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスに破碎赤血球を伴う溶血、微小血管内への VWF に富む血栓沈着といった TTP 様の症状



図① *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウス全血のずり応力下血小板血栓形成

野生型マウスおよび *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスより採取した血液を平行板型フローチャンバーに流し、固相化コラーゲン表面上での血栓形成を経時観察した。*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスでは、血小板血栓成長の亢進が認められた [\*p<0.05]。

(Banno F et al, 2006<sup>3)</sup>より作成)

が惹起された。また、ULVWFを含むヒトVWFを *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスに大量投与(≥2,000単位/kg)すると、TTP様症状が再現性よく誘起されることが報告されている<sup>3)</sup>。したがって、少なくともマウスではADAMTS13欠損に血中VWF濃度上昇や内皮機能障害が重なることで、TTP症状が顕在化すると考えられる。一方、ヒビではADAMTS13活性阻害抗体の静注によりTTP症状が観察されており<sup>4)</sup>、霊長類はマウスにくらべてADAMTS13欠損に対する感受性が高い可能性が示唆される。

## 2. ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを用いた脳梗塞モデル

急性期脳虚血の治療では、血管狭窄・閉塞の原因となる血栓を溶解し、脳組織への血流を再開することが最も重要である<sup>5)</sup>。この血栓溶解療法とは、おもに血栓溶解薬を静脈内に投与し、局所脳虚血に対応する責任動脈の閉塞・狭窄を解除して、虚血ペナンプラ領域が脳梗塞へ進

展するのを防ぐことを指す。しかし、発症から4.5時間以内に投与できる薬物として承認されているのは、組換え体組織プラスミノゲン活性化因子（アルテプラゼ）だけであり、副作用として脳出血のリスクを伴う。さらに、血栓溶解により再灌流が得られても、虚血によって傷害された血管内皮細胞上に微小血栓が形成され、二次性の脳虚血傷害が増強されるという問題がある<sup>6)</sup>。われわれは、ADAMTS13の血栓形成制御能に着目し、ADAMTS13の脳虚血における病態生理学的意義を検討してその治療応用の可能性を検証する目的で、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスを用いた脳梗塞モデルの解析をおこなった<sup>7) 8)</sup>。

VWFマルチマーは、傷害された血管内皮細胞上で血小板を血管内皮細胞に結合させ、VWF-血小板血栓を形成する。このVWF-血小板血栓は白血球と相互反応して炎症反応を促進すると報告されている<sup>9)</sup>。VWFがもつこれらの作用は、脳虚血-再灌流後に生じる脳の微小循環障害と炎症反応にも寄与すると考えられる。ADAMTS13は、VWFマルチマーを切断してその活性を抑制することで、脳虚血において神経保護作用を発揮することが期待される。そこで、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスを使用し、Koizumiら<sup>10)</sup>の変法により0.5時間中大脳動脈閉塞モデルを作製した。具体的には、頸部内頸動脈から頭蓋内中大脳動脈起始部に至る経路にシリコン樹脂で先端を太くしたナイロン糸を挿入し、一時的に中大脳動脈の血流を低下させる方法である。野生型および*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウス間で虚血中の脳血流低下は同等であったが、再灌流後の脳血流は*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスで進行性に低下し、著しい虚血後低灌流が認められた。また、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスでは脳虚血領域の微小血管内にVWF免疫反応陽性の血栓が多数観察された<sup>7)</sup>。

さらに、虚血導入24時間後に、血漿HMGB1 (high-mobility group box 1) レベル、大脳皮質組織のHMGB1/NeuN (neuron-specific nuclear protein)、HMGB1/MPO (myeloperoxidase) に対する二重免疫染色性および、脳梗塞体積を検証した(図2)<sup>8)</sup>。*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスに比較して、血漿HMGB1レベルが顕著に上昇した。脳虚血-再灌流

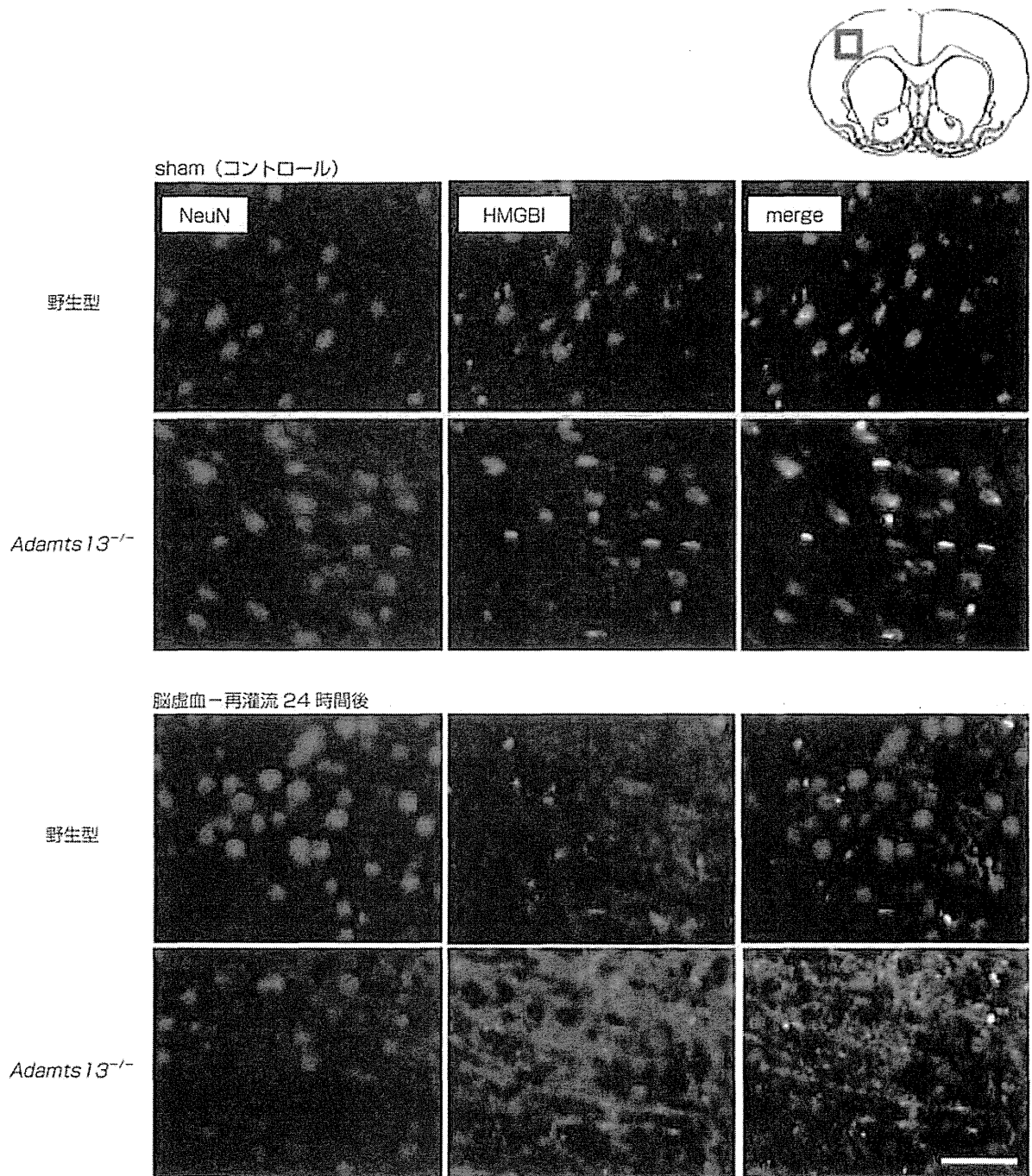
後、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスでは、大脳皮質の梗塞に陥っていない虚血領域で、HMGB1/MPOを共発現する炎症細胞が顕著に認められ、より多くの選択的神経細胞死が確認された。また、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスの脳梗塞体積は野生型マウスより増大した。これらの結果から、ADAMTS13が欠損すると脳虚血後の微小血栓形成および炎症反応が増強し、炎症性メディエーターHMGB1による神経傷害効果が強まり、脳障害を増強する可能性が示された。

ADAMTS13はずり応力依存性に作用するため、血管狭窄の原因となる病的血栓のみを溶解し、生体の防御に必要な止血血栓を分解せず、出血性梗塞を誘導するリスクが低いと考えられる。実際、ADAMTS13を静脈内投与したマウスでは非投与群と比較して、脳梗塞サイズが縮小したが、脳出血は生じなかった<sup>8)</sup>。これらの結果は、ADAMTS13が虚血に対して脳を保護する安全な薬剤となる可能性を示している。

### 3. ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを用いた心筋梗塞モデル

最近、脳梗塞とならんで2大動脈血栓症ともいえる心筋梗塞についても、脳梗塞の場合とほぼ相同の結果が*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスを用いた心筋梗塞モデル実験で確認された<sup>11) 13)</sup>。

De Meyerら<sup>11)</sup>は“0.5時間心筋虚血-23.5時間再灌流”の実験系で、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスにくらべて有意に梗塞体積が増大することを見出した。また、野生型マウスにヒトADAMTS13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<sup>12)</sup>は、同一の虚血-再灌流実験条件で、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスにおける同様の成績に加えてVWF欠損マウスの結果を報告している。すなわち、*Vwf*<sup>-/-</sup>マウスでは*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスとは逆に、心筋梗塞体積が縮小していることを示した。両論文ともに、ADAMTS13の心筋虚血-再灌流障害に対する効果は、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抑制をもたらすADAMTS13の抗炎症作



図② 脳虚血-再灌流後の *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウス大脳皮質ベナンブラ領域における NeuN/HMGB1 二重免疫染色  
 中大脳動脈閉塞-再灌流 24 時間後、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較して、大脳皮質ベナンブラ  
 領域（右上赤い四角）で NeuN 陽性の神経細胞数が減少していた。HMGB1 免疫反応性は、野生型および  
*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスともに神経細胞核で減少しており、虚血ストレスによって細胞核内の HMGB1 が細胞質  
 もしくは細胞外へ移動・遊出したと考えられた。さらに、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスにくらべ、虚  
 血大脳皮質での HMGB1 免疫染色性が増加しており、神経細胞以外の HMGB1 陽性細胞がより顕著に活性化  
 していることが示唆された [scale bar = 50 μm, NeuN = 赤, HMGB1 = 緑, merge = 黄]。  
 HMGB1 : high-mobility group box 1, NeuN : neuron-specific nuclear protein

(Fujioka M et al, 2012<sup>8)</sup> より作成)

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や心筋梗塞モデルの実験は、いずれも虚血-再灌流の実験条件下でなされている。虚血-再灌流障害の発生機序につい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、ADAMTS13の抗炎症作用の重要性を示す結果が得られている。

これに対してわれわれは、“虚血のみで再灌流を誘導しない心筋梗塞モデル”を用いた検討をおこなった<sup>13)</sup>。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週間後の心機能をMモード心エコーで評価した後、心筋梗塞を組織学的に検索した。その結果、野生型と比較して *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスで有意な心機能低下と梗塞巣の増大を認め、これらの所見は遺伝子組換えヒトADAMTS13の投与で野生型マウスのレベルにまで改善された(図③)。これにより、ADAMTS13の心筋保護作用は必ずしも虚血-再灌流障害に限定されることが判明した。

これらの結果から、ADAMTS13によるVWF活性の制御は微小血管血栓症だけでなく、脳梗塞や心筋梗塞など、太い動脈に生じる血栓症の病態形成にも関与していることが明らかになった。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。ADAMTS13によるVWF依存性の血栓および炎症反応の制御は、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。

#### ● 4. C末端ドメイン欠損ADAMTS13マウスの血栓傾向

ADAMTS13は触媒ドメイン以外に複数のドメインをもつが、C末端ドメインは *in vitro*での基質切断に必須ではなく、その生理的意義は不明であった。われわれは、C57BL/6マウスなどの *Adamts13*にADAMTS13のC末端ドメイン欠損を引き起こす変異が自然発生していることを見出し<sup>14)</sup>、この自然発生変異を利用して129/Svマウスの遺伝的背景をもち、C末端ドメイン欠

損ADAMTS13を発現するコンジュニックマウス(*Adamts13*<sup>S/S</sup>マウス)を作製した。野生型129/Svマウスはヒトと同じドメイン構成の全長型ADAMTS13をもつため、129/Sv遺伝的背景の下、*Adamts13*<sup>S/S</sup>マウスの血栓傾向を野生型マウスおよび *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスと比較することで、C末端ドメインの生理的意義を検証した<sup>15)</sup>。*Adamts13*<sup>S/S</sup>マウスの血漿VWFマルチマーは野生型129/Svマウスと同等の分子量分布を示し、ULVWFマルチマーは検出されなかった。また *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスでは、ずり速度1,000s<sup>-1</sup>における *in vitro*血栓形成が亢進していたが、*Adamts13*<sup>S/S</sup>マウスでは野生型マウスとの違いはみられなかった。したがって、C末端ドメイン欠損ADAMTS13は *in vitro*での切断と同様に生体内でもVWFを切断し、血漿中のULVWFマルチマーを除去するのに十分な活性を保持していると考えられる。

VWFは血流が速く、高ずり応力が発生する環境下での血小板血栓形成に不可欠な分子であり、VWFの血小板凝集活性は、ずり速度の上昇に伴って亢進することが知られている。また、ADAMTS13によるVWFマルチマーの切断も、ずり速度の上昇によって亢進する。そこで、ずり速度5,000s<sup>-1</sup>における *in vitro*血栓形成を解析すると、このずり速度では *Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスだけでなく、*Adamts13*<sup>S/S</sup>マウスにおいても血栓形成の亢進が観察された。また、塩化鉄内皮傷害モデルを用いて、*in vivo*血栓形成能を解析した結果、*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスでは、傷害部位での血栓形成開始時間および血栓による血管閉塞時間がいずれも著明に短縮していた(図④)。一方、*Adamts13*<sup>S/S</sup>マウスでは血栓形成開始時間は正常であったが、野生型マウスにくらべて血栓成長が加速し、血管閉塞時間が短縮していた(図④)。測定した血管のずり速度は当初1,000~1,500s<sup>-1</sup>であるが、生じた血栓が大きくなるにつれ、血管内腔が狭まり、ずり速度が局所的に上昇する。*Adamts13*<sup>S/S</sup>マウスでは、高ずり応力下に血小板血栓形成を抑制する機能が低下しているため、血管閉塞時間の短縮がみられたと考えられる。さらに、コラーゲン-アドレナリン投与により全身性に血栓形成を惹起した場合、処置後に観察される消費性血小



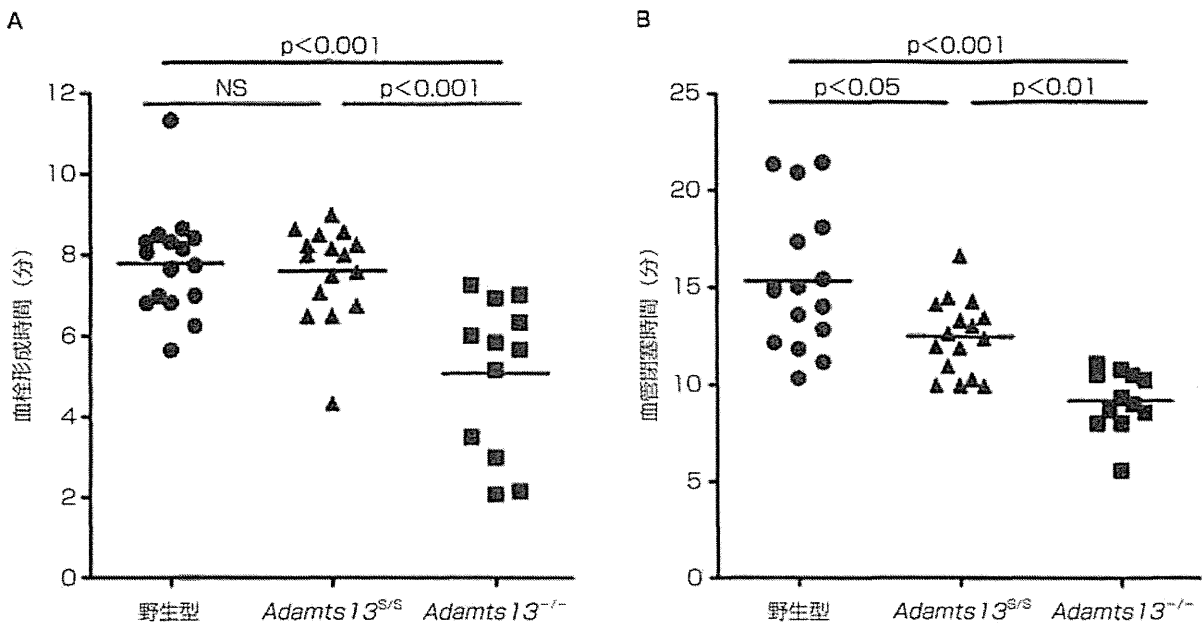


図1 Adamts13<sup>S/S</sup>マウスの塩化鉄内皮傷害部位での血小板血栓形成

野生型、Adamts13<sup>S/S</sup>、Adamts13<sup>-/-</sup>マウスの腸間膜動脈（ずり速度：1,000～1,500s<sup>-1</sup>）を、10%塩化鉄溶液にて傷害した局部での血小板血栓形成を経時観察した。（A）動脈内に直径30μmの血栓が生じるまでの血栓形成開始時間および、（B）動脈が閉塞して30秒以上の血流停止が起こるまでの血管閉塞時間を測定し、各マウスの血栓形成能を評価した〔NS：有意差無し〕。

（Banno F *et al.* 2009<sup>15)</sup>より作成）

板減少はAdamts13<sup>-/-</sup>マウスで最も顕著であり、Adamts13<sup>S/S</sup>マウスでも野生型マウスより顕著であった。ADAMTS13のC末端ドメインは高ずり応力下でのVWF切断に寄与しており、とくに血管障害部位での過剰血小板血栓形成を効率よく抑制する上で、重要な機能をもつと考えられた。

## おわりに

Adamts13<sup>-/-</sup>マウスの血栓傾向、脳梗塞モデルおよび心筋梗塞モデルを用いた解析結果、Adamts13<sup>S/S</sup>マウスの表現型を紹介した。現在、これらのマウスはいずれも独立行政法人医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクより入手可能である。

## 文献

- 1) Banno F *et al.* : Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **107** : 3161-3166, 2006
- 2) Motto DG *et al.* : Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest* **115** : 2752-2761, 2005
- 3) Schiviz A *et al.* : A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura : correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood* **119** : 6128-6135, 2012
- 4) Feys HB *et al.* : Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (*Papio ursinus*). *Blood* **116** : 2005-2010, 2010
- 5) Hacke W *et al.* : Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **359** : 1317-1329, 2008
- 6) Ames A, 3rd *et al.* : Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* **52** : 437-453, 1968
- 7) Fujioka M *et al.* : ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage : a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* **115** : 1650-1653, 2010

- 8) Fujioka M *et al* : ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci* **33** : 1107-1115, 2012
- 9) Chauhan AK *et al* : ADAMTS13 : a new link between thrombosis and inflammation. *J Exp Med* **205** : 2065-2074, 2008
- 10) Koizumi J *et al* : Experimental studies of ischemic brain edema, I : a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* **8** : 1-8, 1986
- 11) De Meyer SF *et al* : Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* **120** : 5217-5223, 2012
- 12) Gandhi C *et al* : ADAMTS13 deficiency exacerbates VWF-dependent acute myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* **120** : 5224-5230, 2012
- 13) Doi M *et al* : ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* **108** : 1236-1238, 2012
- 14) Banno F *et al* : Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem* **279** : 30896-30903, 2004
- 15) Banno F *et al* : The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of *in vivo* thrombus formation. *Blood* **113** : 5323-5329, 2009

## ADAMTS13と血栓性血小板減少性紫斑病

小亀浩市

### はじめに

難病(厚生労働省が難治性疾患克服研究事業の対象としている疾患)の一つに血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP)がある。血小板減少症と溶血性貧血を呈し、時に腎障害や精神神経障害、発熱を併発する疾患で、長いあいだ原因不明とされてきた。その病態はO157等の病原性大腸菌感染による溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome : HUS)と類似しており、両者とも血栓性微小血管障害症(thrombotic microangiopathy : TMA)に属する。von Willebrand factor (VWF) 切断酵素ADAMTS13の存在が明らかになって以来、TTPに関する研究は飛躍的に進展した。本稿では、ADAMTS13研究に初期から携わってきた筆者らの成果を中心に、TTP研究の進歩を紹介する。

#### Key word

ADAMTS13  
von Willebrand factor  
血小板  
血栓  
血栓性血小板減少性紫斑病

ADAMTS13 and thrombotic thrombocytopenic purpura  
Koichi Kokame :  
Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute  
国立循環器病研究センター研究所 分子病態部

### I. TTPの初報告からADAMTS13の発見まで

16歳の少女が突然に全身性の症状に襲われ、数日で死に至った経過が1924年に報告された<sup>1)</sup>。病理検査で諸臓器の細小動脈に硝子様血栓が観察されたことなどを踏まえ、TTPの最初の報告とされている。その約60年後、TTP患者の血漿に異常に高分子量化したVWFが存在すること<sup>2)</sup>や、TTPの血栓はVWFを多く含むこと<sup>3)</sup>が示された。

なぜ患者血漿に異常高分子量VWFが存在するのかという疑問は、血漿のVWF切断活性を測定する方法の発明<sup>4)</sup>で解決に向かい、VWF切断酵素の活性低下がTTP発症の原因となると予想された。そして数年後、VWF切断酵素の精製とcDNAクローニングが報告された<sup>5)</sup>。一方、先天性TTP患者家系の遺伝子連鎖解析が行われ、責任遺伝子としてADAMTS13が同定された<sup>6)</sup>。VWF切断酵素とADAMTS13の一次構造が完全に一致したことで、TTP = ADAMTS13欠損症という概念が生まれ、TTPの分子病態研究が本格化した。

### II. VWFとADAMTS13とTTPの関係

止血反応の初期には、血小板凝集が起こる。VWFは、血小板同士の結合を橋渡しする重要なタンパク質である。主に血管内皮細胞や骨髄巨核球で合成され、ポリペプチド鎖(モノマー)が数十個、直鎖状に共有結合した巨大マルチマー(>20,000kDa)として分泌され



る。分子量が大きいほど、血小板凝集能は高い。通常、ADAMTS13で適度に切断されて500~15,000kDaという分子量分布で存在するが、何らかの理由でADAMTS13の活性が失われると異常高分子量VWFマルチマーが残存する。異常高分子量VWFマルチマーは血小板を過剰に凝集させるため、細小血管に血栓が生じる(図1)。TTPの病態は、以下のように説明できる。過剰凝集により血小板が消費されると循環血液中の血小板数は減少し(血小板減少症)、血栓で生じた血管狭窄部位を通過することで赤血球は破碎される(溶血

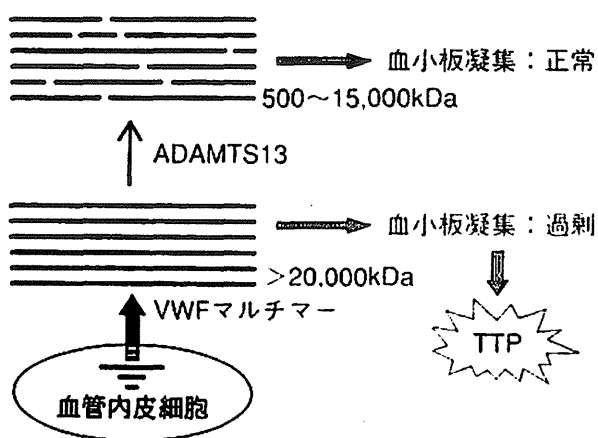


図1. TTPの発症メカニズム

性貧血)。多数の血栓で腎臓の細小血管が閉塞すると腎機能が障害され、大脳の細小血管が閉塞すると精神神経障害が起こる。

TTPは、先天性と後天性に分類される。先天性TTPはUpshaw-Schulman syndrome (USS)とも呼ばれ、ADAMTS13遺伝子異常を原因とする劣性遺伝様式の疾患である。一方、後天性TTPではADAMTS13活性に対する阻害性抗体が生じていることが多く、そのため、自己免疫疾患の一種とすることができる。

### Ⅲ. ADAMTS13の構造

ADAMTS13は、その名が示す通りADAMTSファミリー(ヒトの場合19遺伝子)に属する亜鉛型メタロプロテアーゼである。主に肝臓の星細胞で合成され、1,427アミノ酸残基、分子量約190kDaで、多くの構造単位を持つ(図2)。VWFを切断するにはMドメインからSドメインまでが必須であり、それよりC末端側部分は*in vitro*の反応系では必要ない。我々は、VWF認識に重要なDドメインからSドメインまでの立体構造をX線解析で決定した<sup>3)</sup>。その結果、予想外にもDドメインはディスインテグリン様の構造ではないこと、CドメインとDドメインの骨格構

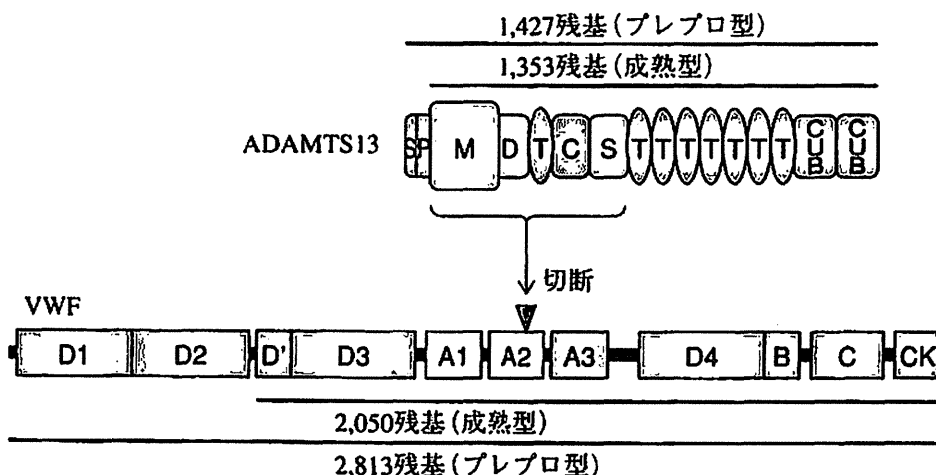


図2. ADAMTS13およびVWFのドメイン構成

造は相同であること、Sドメインは球状構造であること、空間的に離れた3カ所のVWF結合エキソサイトが直線状に並んでいることなど、様々な特徴を明らかにした。基本構造はADAMTSファミリー内で保存されていると考えられるので、複数のエキソサイトを介した基質認識機構はADAMTS分子に共通の特性であると予想された。事実、ADAMTS5でも類似の基質認識機構が示唆された<sup>10)</sup>。

#### IV. ADAMTS13によるVWFの切断

VWFも、複数のドメイン構造からなる(図2)。血管損傷部位の内皮下組織(コラーゲン)と血小板の結合あるいは血小板同士の結合には、主にA1およびA3ドメインが直接関与する。ADAMTS13が切断するのはA2ドメインであるが、その切断部位は分子内部に埋もれており、そのままではADAMTS13は接近できない。VWFが血小板に結合し、血流によって発生するずり応力が加わると、VWFは部分的に伸展し、切断部位が表面に現れる

(図3)。これでADAMTS13が、A2ドメインを切断できるようになる。このことは、ADAMTS13によってVWFを*in vitro*で切断させる際、タンパク質変性剤の共存、あるいはボルテックス等による強い攪拌を必要とすることと一致する。ずり応力でA2ドメインがほぐれ、新たに露出した領域がADAMTS13の複数のエキソサイトと広範囲で相互作用することで、VWFの切断が生理的条件下で特異的かつ調節的に起こると考えられる。つまり、生理的には、VWFにかかるずり応力の強さが切断反応を調節し、血小板凝集の程度をうまく制御するのかもしれない。

#### V. VWF73を用いたADAMTS13活性測定

ADAMTS13はVWFのTyr<sup>1605</sup>~Met<sup>1606</sup>間を切断するが、その反応においてADAMTS13とVWFは互いの分子構造を広範囲で認識する。ADAMTS13が活性を発揮するにはMドメインからSドメインまでが必須であり、一方、

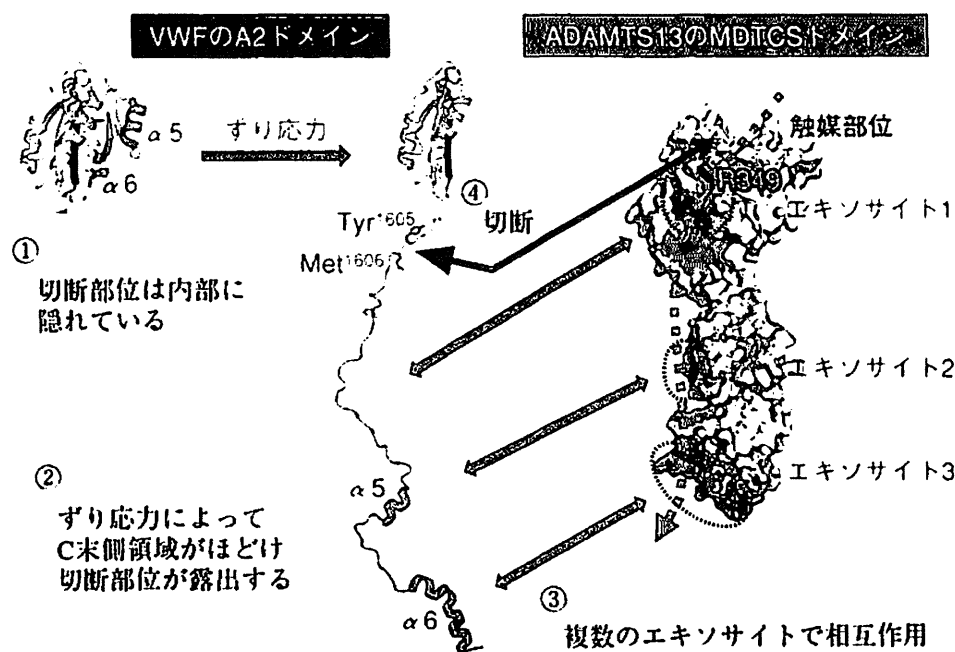


図3. ADAMTS13によるVWFの切断

VWF側ではA2ドメインに含まれる73アミノ酸残基(Asp<sup>1596</sup>~Arg<sup>1668</sup>:VWF73と呼ぶ)が必要十分であることを明らかにした(特許取得)<sup>11)</sup>。VWF全長を基質として利用する従来の活性測定法は、いずれも操作が煩雑などの理由で臨床検査として普及しなかったが、VWF73を利用した測定法はいくつも開発され、なかでも我々が開発したFRET法<sup>12)</sup>とAct-ELISA法<sup>13)</sup>は研究および臨床の場に普及している。

FRET法では、化学合成ペプチドFRET-S-VWF73を基質として用いる。ADAMTS13で切断される前は、切断部位の両側に付加された蛍光基と消光基の間で蛍光共鳴エネルギー転移(fluorescence resonance energy transfer:FRET)が起こるため、基質溶液に励起光を照射しても蛍光は弱い。ADAMTS13によって切断されると、FRET効果が緩和されて蛍光が強くなる(図4)。したがって、蛍光強度の増大を観察することでADAMTS13の活性を検出することができる。Act-ELISA法では、VWF73がADAMTS13で切断されて生じる末端部分のみに結合するモノクローナル抗体を利用する。96ウェルプレートにGST-VWF73融合タンパク質を結合させ、ここに血漿を添加して切断反応を行う。HRP標識した上述の抗体を添加するとウェル上のGST-VWF73断片に定量的に結合するので、発色基質で検出する(図4)。

## VI. 先天性TTP患者の遺伝子解析

先天性TTP(=USS)はADAMTS13欠損症であり、患者はADAMTS13遺伝子異常の複合ヘテロあるいはホモ接合体である。我々は奈良県立医科大学と共同で、日本人USS患者の遺伝子解析を行っている<sup>14-16)</sup>。これまでUSS患者47名(41家系)を解析し、44名(38家系)に複合ヘテロあるいはホモの原因変異を同定した。世界的には130を超える原因変

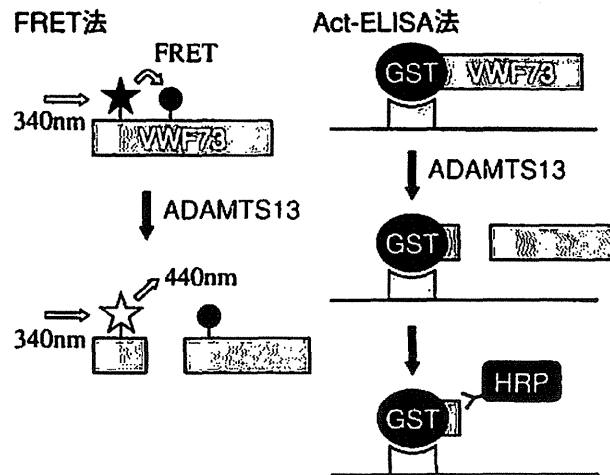


図4. FRET法およびAct-ELISA法によるADAMTS13活性測定

異が報告されているが、我々の報告は、その4割近くを占める。全例において、ダイレクトシークエンシング法が用いられている。変異の種類としてはミスセンス変異が最も多いが、ナンセンス変異やフレームシフト変異、スプライシング異常なども同定されている。エクソン全体の欠失や、遺伝子全体の欠失あるいは転座といった大きな領域の異常はまだ報告されていない。我々は最近、原因変異を特定できていなかった患者に対し、プライマーデザインを工夫した定量PCRによるコピー数解析を行い、729塩基および1,782塩基の欠失を見つけた(Eura et al, 論文投稿中)。ADAMTS13だけでなく全ての遺伝子に適用可能な方法なので、普及(宣伝)に努めたい。

## VII. 日本人のADAMTS13遺伝子多型と活性

我々は日本人一般住民のADAMTS13遺伝子解析を行い、健常者にも見出されるミスセンス多型として、T339R, Q448E, P475S, P618A, S903L, G1181Rを同定した<sup>14,17)</sup>。これらがUSS患者に見つかっても原因変異とは考えない。ただし、P475SはADAMTS13

の活性を少し低下させる<sup>14, 16, 19)</sup>。韓国人および中国人にも存在するが、欧米人には見られない多型である。現在のところ、ADAMTS13遺伝子多型と疾患との関連は見出されていない。

国立循環器病研究センターで1989年から実施されている一般住民を対象とした吹田研究の一部として、3,616人の血漿ADAMTS13活性を測定した<sup>20)</sup>。男性のADAMTS13活性平均値は女性に比べて有意に低く、男女とも60歳台以上で徐々に低下した。一方、VWF量は加齢によって増加するため、血栓傾向の指標となるVWF量/ADAMTS13活性比では加齢に伴う増加傾向が顕著に現れた。ABO血液型がO型の人には他に比べてVWF量が低い、ADAMTS13活性は血液型と有意な相関を示さなかった。

## Ⅷ. 先天性TTP患者数の推定

日本に、先天性TTP患者は何人いるのか。類似疾患の多い、希少な遺伝性疾患の患者数を明らかにすることは意外に難しい。浸透率(遺伝子異常を持っている場合に発症する率)が不明なので、先天性ADAMTS13欠損者数=先天性TTP患者数とは言えないが、吹田研究の活性データと遺伝子解析データを組み合わせて、先天性ADAMTS13欠損者数の推定を試みた<sup>17)</sup>。その結果、いくつかの前提条件を仮定すれば、日本人の先天性ADAMTS13欠損症者(複合ヘテロあるいはホモ接合体)の頻度は約100万人に1人と推定された。これがどのくらい正確か分からないが、これまでに日本で同定されたUSS患者が50人程であることを考えると妥当な数である。

## Ⅸ. マウスのADAMTS13

我々はマウスADAMTS13のcDNAをクローニングし、遺伝子構造を明らかにした<sup>21)</sup>。

さらに、ADAMTS13欠損マウスを作製し表現型を解析した<sup>22)</sup>。先天性ADAMTS13欠損患者と同様、マウスでも血中に異常高分子量VWFマルチマーが存在した。しかし、先天性TTPモデルとして作製したにもかかわらず、予想した血小板減少や溶血性貧血は見られなかった。つまり、マウスにおいてはADAMTS13完全欠損以外の要因がTTP発症に必要であった。その後、ヒトにおいてもADAMTS13欠損だけではTTPを発症せず、内皮障害や妊娠など他の要因が加わって症状が顕在化する場合もあることが分かった。ADAMTS13欠損マウスは自然にTTPを発症しないとは言え、潜在的な血栓形成傾向は示した。同時期に米国のグループも欠損マウスを作製しており、通常飼育下でTTP症状は見られないが、血中VWF量が高い系統への戻し交配により一部の個体にTTP様症状が出現することを報告した<sup>23)</sup>。我々が作製したADAMTS13欠損マウスは、脳虚血再還流障害モデル<sup>24)</sup>や急性心筋梗塞モデル<sup>25)</sup>などに利用されている。

マウスでは、系統特異的に2種類のADAMTS13が発現する<sup>21)</sup>。129/Sv系統のADAMTS13遺伝子は、ヒトと同様、29個のエクソンからなり、ドメイン構成もヒトと同じである。一方、BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2系統では、イントロン23にレトロトランスポゾン配列が挿入しており、7番目のドメイン以降を欠失したADAMTS13が発現する。これを利用して、ADAMTS13のC末端領域は高張り応力下での血小板血栓形成を抑制するために機能することを証明した<sup>26)</sup>。

## おわりに

ここに述べたように、ADAMTS13やVWFの解析を通じてTTPの研究がかなり進んだ。ADAMTS13活性測定法の進歩で診断が正確