

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のように, 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, 血流により生じるずり応力が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, 高ずり応力(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, ずり応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のずり応力では観察されず, 5,000 秒⁻¹という高ずり応力下ではじめて観察されたので, ADAMTS13のC末端領域は高ずり応力下で抗血栓性を発揮することが明らかになった²⁶⁾。

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。野性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は高ずり応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

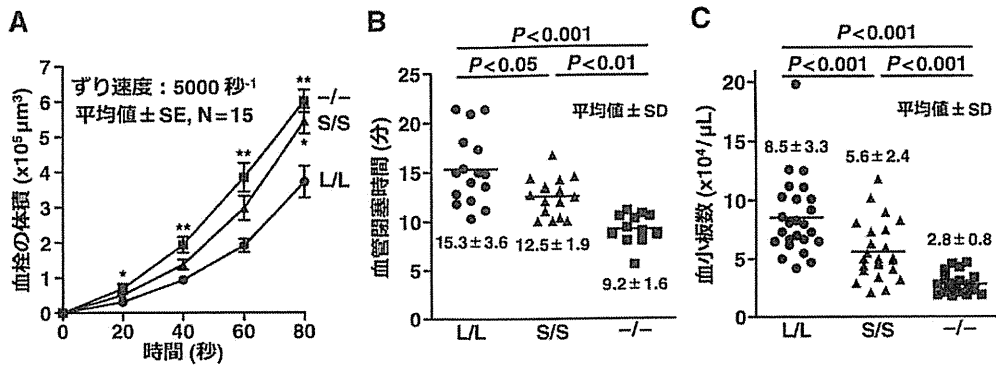


図3 ADAMTS13 ノックアウトマウスとADAMTS13 C末端欠損マウスの抗血栓能²⁶⁾

- 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 s^{-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4①)。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4②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4③)，ADAMTS13内の3つのエクソサイトがVWF73領域に結合し(図4④)，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4⑤)。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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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，生体内ではどういった場面で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/cm^2 (ずり速度で5,000 s^{-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

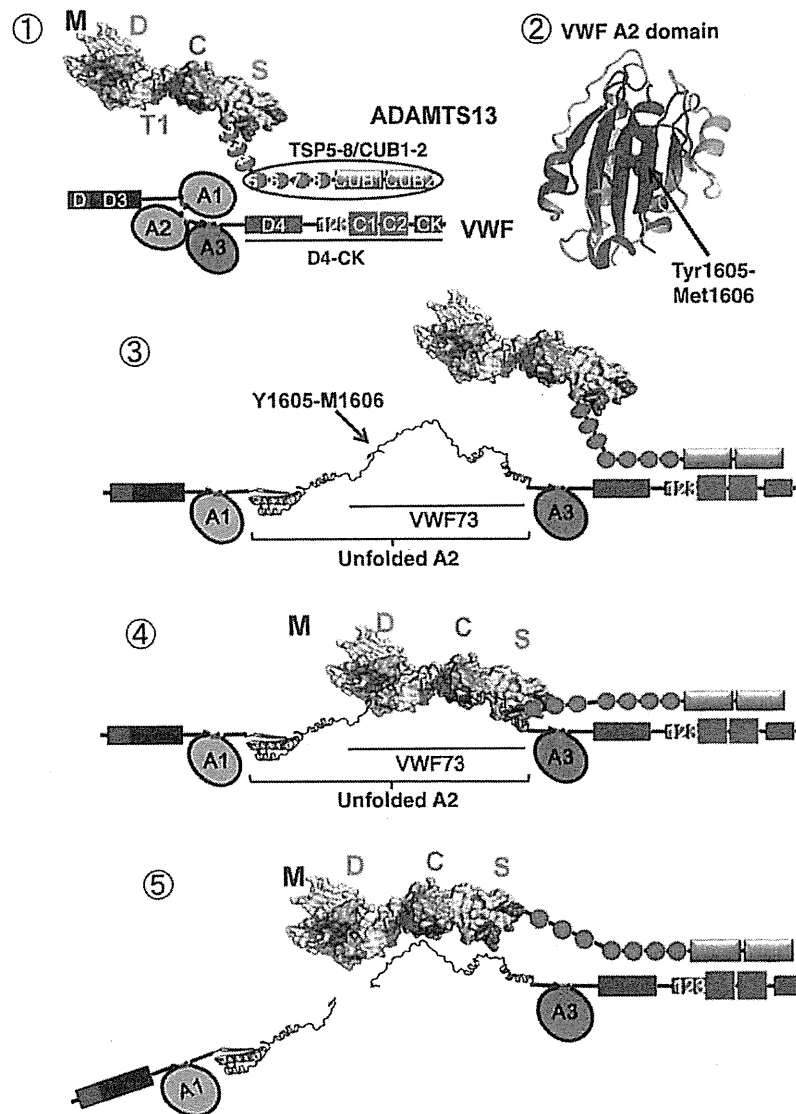


図4 ADAMTS13によるずり応力依存性のVWF切断
 ② VWF A2ドメインの立体構造²³⁾。ADAMTS13切断部位であるTyr1605-Met1606結合は分子内に埋れている。A2ドメインはジスルフィド結合を持たない。
 ①, ③~⑤ 約5%のADAMTS13は血漿中でVWFとC末端領域を介して複合体を形成している^{31, 32)}。VWF A2ドメインはずり応力によりアンフォールドし、ADAMTS13結合部位であるVWF73領域が露出する。ここにADAMTS13のD, C, Sドメインにあるエクソサイトが結合し、MドメインがY1605-M1606結合を切断する¹⁷⁾。このように、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³⁸⁾。

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

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. FRET-S-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, Vermynen 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.

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长 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・ヴィレブランド因子 (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

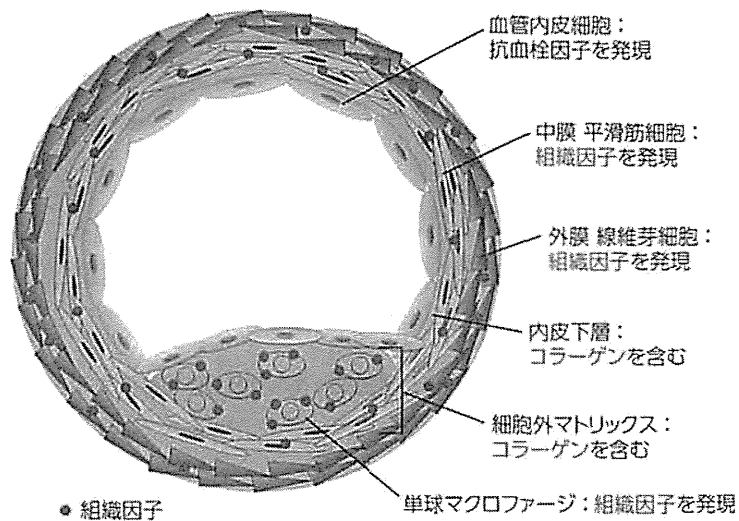


図1 血小板活性化惹起因子であるコラーゲンと凝固開始作用因子の組織因子の発現部位

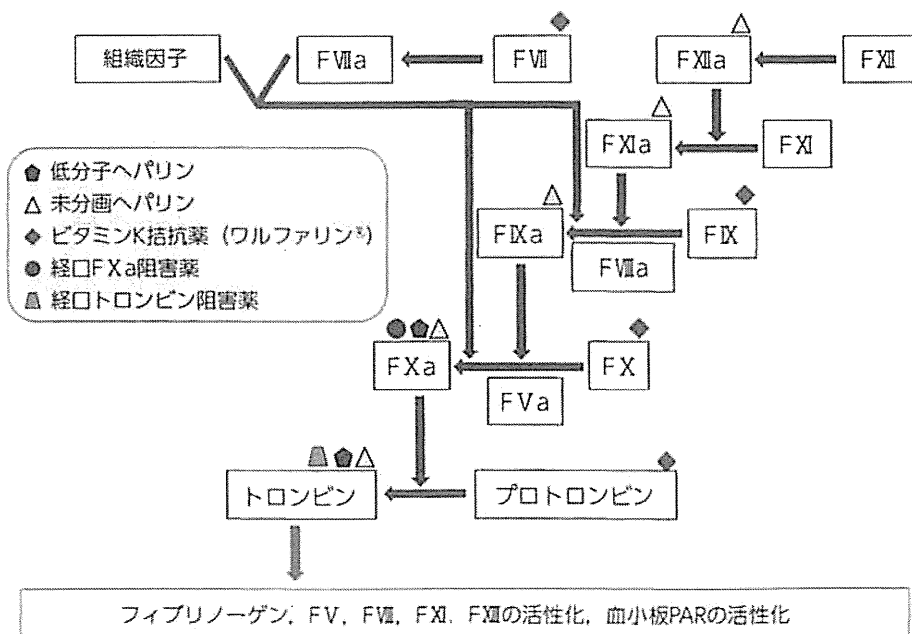


図2 凝固反応とそれを抑制する薬剤の作用点

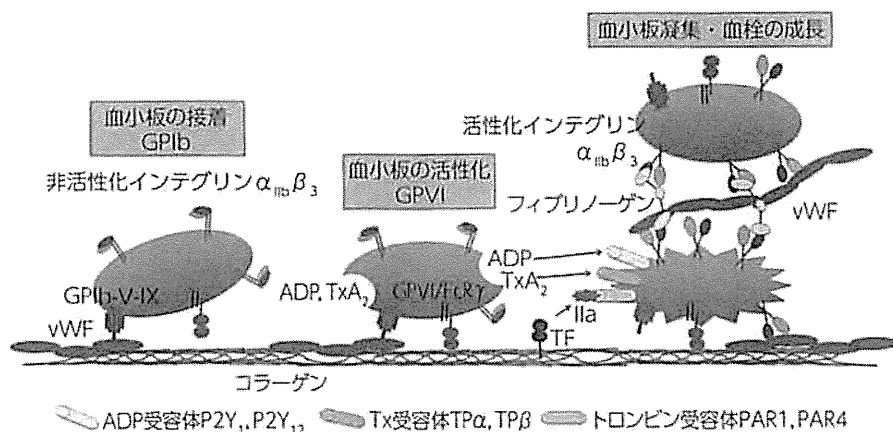


図3 血栓形成における血小板接着・活性化受容体の重要性

プ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。トロンビ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

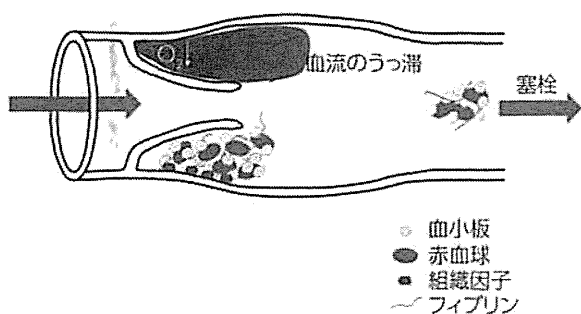


図4 静脈血栓メカニズム (モデル)

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。

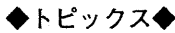
静脈血栓内には血小板も見られ、静脈血栓の形成においても凝固系と血小板の相互作用が重要であると考えられる。この10年間ほどの研究により、組織因子を保有するマイクロパーティクルが

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。こ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相同の成績 (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

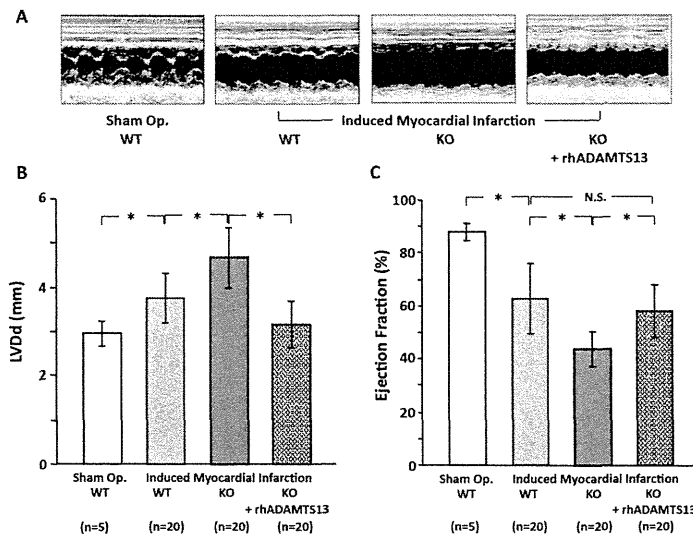


図1 心エコーによる心機能の評価 (文献6の成績をもとに作成)

(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ペーサードメインに至る遺伝子組み換え ADAMTS13-MDTCs 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

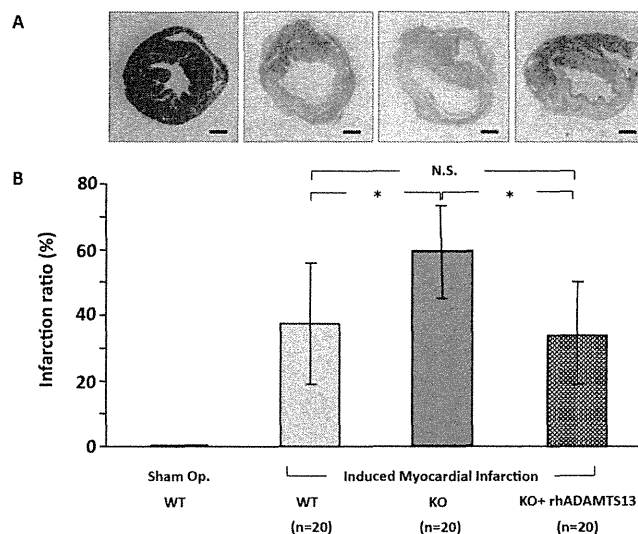


図2 心筋梗塞の組織学的評価 (文献6の成績をもとに作成)

(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⁸⁾. 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, Scheifflinger 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.

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 O 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. +81/6/68335012 EXT: 2512, 8123
Fax +81/6/687351176
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,
- reprolysin-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 anti-thrombotic 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:

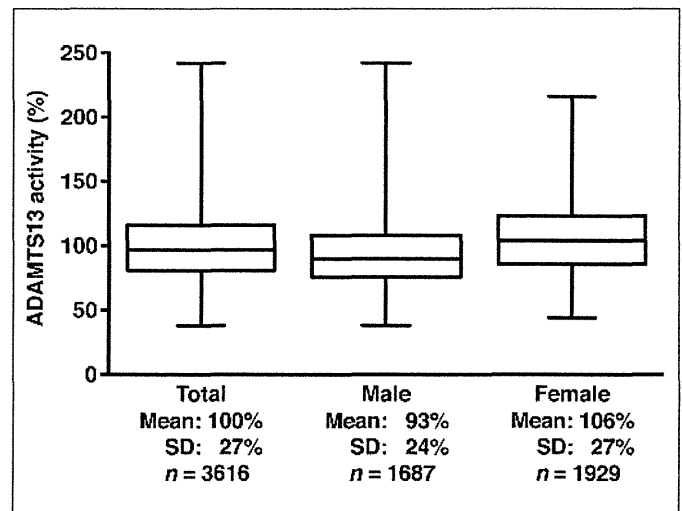
Individuals with blood group O have a lower VWF level than those with non-O groups (32).

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 | causative for congenital ADAMTS13 deficiency (47) |
| | Q773* | – | newly identified |
| | Y1074Afs*46 | – | causative for congenital ADAMTS13 deficiency (46) |
| | R1095Q | probably damaging | newly identified |

*stop codon

As described, the AB0 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 FRETSS-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%).

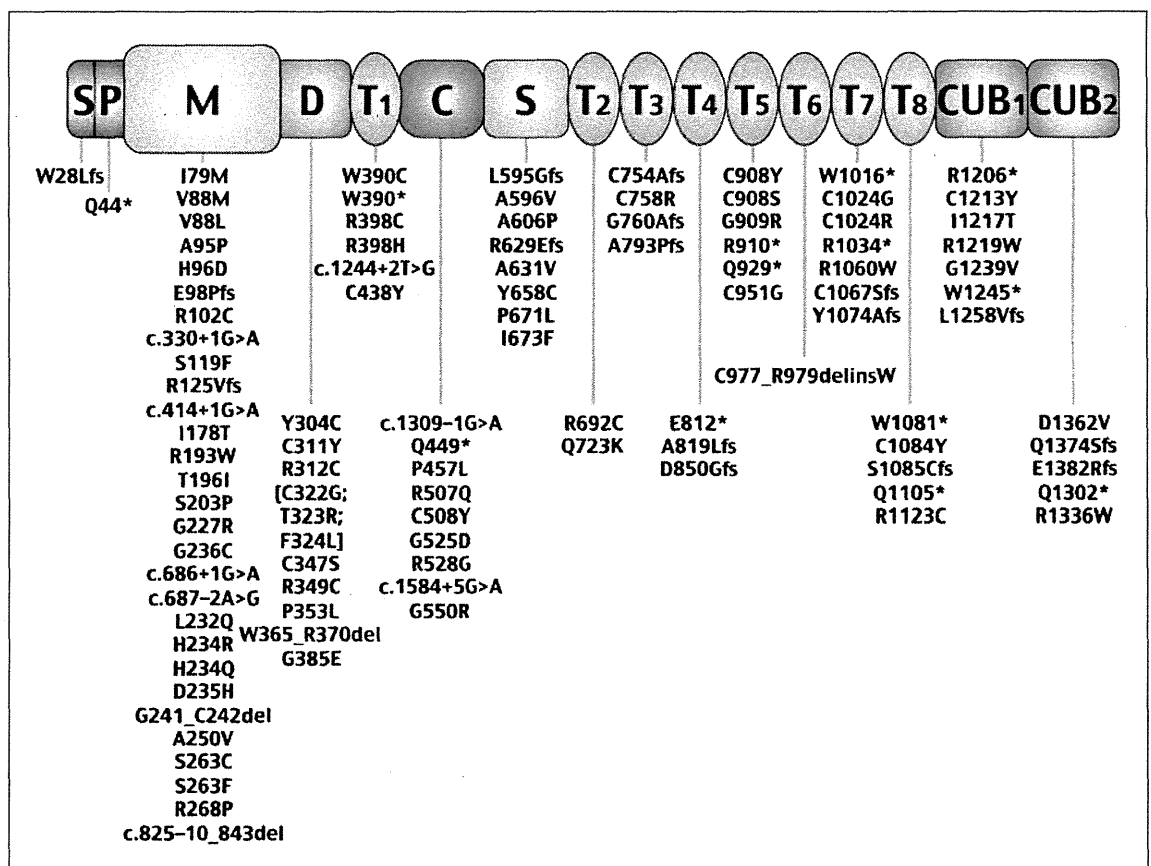


Fig. 2
ADAMTS13 gene mutations responsible for congenital TTP (*stop codons). The description of protein sequence mutation follows the recommendation of the Human Genome Variation Society (www.hgvs.org/mutnomen/recs-prot.html). Mutations in red were identified in Japanese patients.

Sequence analysis of the ADAMTS13 gene in these individuals showed that 14 individuals had rare non-synonymous mutations: seven individuals in the minimum activity group, three individuals in the second minimum activity group, two individuals in the median activity group, and two individuals in the maximum activity group (► Tab. 1). In particular, three of the subjects had causative mutations for congenital ADAMTS13 deficiency, Y1074Afs*46 (46) and I673F (47). These data indicated that 2 of every 32 individuals had a mutation that does not cause a functional defect of ADAMTS13. Therefore, it would be a reasonable assumption that five individuals in the minimum activity group and one individual in the second minimum activity group would be heterozygotes carrying a mutation with a functional defect. If this assumption is valid, 6 out of 3200 individuals would be heterozygotes for ADAMTS13 deficiency. This estimation suggested that ~ 1 individual in 1.1×10^6 should be a homozygote or a compound heterozygote for ADAMTS13 deficiency. If a part of homozygous/compound heterozygous mutation carriers would die during the neonatal period, the prevalence in the surviving population may be lowered. It has been reported that the E1382Rfs*6 mutation (the E1382R frameshift mutation giving rise to the stop codon at six amino acid residues thereafter) due to the 4143insA mutation is frequent among patients with congenital ADAMTS13 deficiency in Northern and Central European countries (48). The estimation of the prevalence of patients with congenital ADAMTS13 deficiency may be biased due to insufficient sample sizes, ethnicity, lethality, and other factors.

ADAMTS13 mutations in congenital TTP

Since the publication of the first genetic analysis in patients with Upshaw-Schulman syndrome in 2001 (3), more than 100 genetic defects in the ADAMTS13 gene have been reported worldwide (36, 37, 49). The genetic variants that lead to TTP are very broadly distributed, occurring everywhere from the N-terminal signal peptide to the C-terminal CUB domain. The missense mutations are most frequent (about

60%), but other non-synonymous mutations such as frameshift mutations (small deletions or insertions), nonsense mutations, abnormal splicing, and insertions/deletions, are also detected (► Fig. 2).

We have so far identified more than 40 genetic mutations in Japanese patients with congenital TTP.

Most of the mutations were found in a single patient, but four mutations, i.e., R193W, Q449*, C754Afs*24 (c.2259delA), and C908Y, were identified in more than four patients, suggesting the accumulation of these mutations in a Japanese population (46).

Acknowledgments

This work was supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor, Welfare of Japan, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and Takeda Science Foundation.

Conflict of interest

The National Cerebral and Cardiovascular Center where TM and KK (inventors) belong has an awarded patent on the use of reagent, FRET-S-VWF73. MM is a clinical advisory board for Alexion Pharmaceuticals, and has a patent on the use of chromogenic ADAMTS13 activity assay using the monoclonal antibody, which specifically recognizes TYR1605 within VWF-A2 domain, exposed by ADAMTS13 cleavage. YF is a clinical advisory board for Baxter Bioscience and for Alexion Pharmaceuticals, and has a patent on the use of chromogenic ADAMTS13 activity assay using the monoclonal antibody, which specifically recognizes TYR1605 within VWF-A2 domain, exposed by ADAMTS13 cleavage.

References

1. 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.

2. Zheng X, Chung D, Takayama TK et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001; 276: 41059–41063.
3. 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.
4. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M et al. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 2005; 106: 922–924.
5. Zhou W, Inada M, Lee TP et al. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2005; 85: 780–788.
6. Soejima K, Nakamura H, Hirashima M et al. Analysis on the molecular species and concentration of circulating ADAMTS13 in Blood. *J Biochem* 2006; 139: 147–154.
7. Rieger M, Ferrari S, Kremer Hovinga JA et al. Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies (TMA). *Thromb Haemost* 2006; 95: 212–220.
8. Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K et al. Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 2088–2095.
9. 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.
10. 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.
11. 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* 1999; 81: 8–13.
12. Shin Y, Akiyama M, Kokame K et al. Binding of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 to Lys-plasmin(ogen). *J Biochem* 2012; 152: 251–258.
13. Sadler JE. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2008; 112: 11–18.
14. Moake JL, Rudy CK, Troll JH et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982; 307: 1432–1435.
15. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lämmle B. Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1998; 91: 2839–2846.
16. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998; 339: 1585–1594.
17. Shim K, Anderson PJ, Tuley EA et al. Platelet-VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress. *Blood* 2008; 111: 651–657.
18. Cao W, Krishnaswamy S, Camire RM et al. Factor VIII accelerates proteolytic cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 7416–7421.

19. Zhou YF, Eng ET, Nishida N et al. A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. *Embo J* 2011; 30: 4098–4111.
20. Zhang Q, Zhou YF, Zhang CZ et al. Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 9226–9231.
21. Tsai HM, Sussman, II, Nagel RL. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* 1994; 83: 2171–2179.
22. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ et al. Mechano-enzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science* 2009; 324: 1330–1334.
23. Dent JA, Berkowitz SD, Ware J et al. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6306–6310.
24. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETTS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 2005; 129: 93–100.
25. Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T et al. Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* 2006; 46: 1444–1452.
26. 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.
27. Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004; 407–423.
28. Miyata T, Kokame K, Banno F. Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol* 2005; 12: 384–389.
29. Peyvandi F, Palla R, Lotta LA et al. ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 631–640.
30. Froehlich-Zahnd R, George JN, Vesely SK et al. Evidence for a role of anti-ADAMTS13 autoantibodies despite normal ADAMTS13 activity in recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2012; 97: 297–303.
31. 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.
32. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69: 1691–1695.
33. Chion CK, Doggen CJ, Crawley JT et al. ADAMTS13 and von Willebrand factor and the risk of myocardial infarction in men. *Blood* 2007; 109: 1998–2000.
34. Matsui T, Titani K, Mizuochi T. Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. Occurrence of blood group A, B, and H(O) structures. *J Biol Chem* 1992; 267: 8723–8731.
35. Hiura H, Matsui T, Matsumoto M et al. Proteolytic fragmentation and sugar chains of plasma ADAMTS13 purified by a conformation-dependent monoclonal antibody. *J Biochem* 2010; 148: 403–411.
36. Kokame K, Miyata T. Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2004; 41: 34–40.
37. Lotta LA, Garagiola I, Palla R et al. ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum Mutat* 2010; 31: 11–19.
38. Kaikita K, Soejima K, Matsukawa M et al. Reduced von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2490–2493.
39. Miura M, Kaikita K, Matsukawa M et al. Prognostic value of plasma von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) antigen levels in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2010; 103: 623–629.
40. Andersson HM, Siegerink B, Luken BM et al. High VWF, low ADAMTS13, and oral contraceptives increase the risk of ischemic stroke and myocardial infarction in young women. *Blood* 2012; 119: 1555–1560.
41. Akiyama M, Takeda S, Kokame K et al. Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 19274–19279.
42. 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.
43. Akiyama M, Kokame K, Miyata T. ADAMTS13 P475S polymorphism causes a lowered enzymatic activity and urea lability in vitro. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1830–1832.
44. Akiyama M, Nakayama D, Takeda S et al. Crystal structure and enzymatic activity of an ADAMTS13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism. *J Thromb Haemost* 2013, in press.
45. Plaimauer B, Fuhrmann J, Mohr G et al. Modulation of ADAMTS13 secretion and specific activity by a combination of common amino acid polymorphisms and a missense mutation. *Blood* 2006; 107: 118–125.
46. 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.
47. Matsumoto M, Kokame K, Soejima K et al. Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood* 2004; 103: 1305–1310.
48. Schneppenheim R, Kremer Hovinga JA, Becker T et al. A common origin of the 4143insA ADAMTS13 mutation. *Thromb Haemost* 2006; 96: 3–6.
49. Lotta LA, Wu HM, Mackie IJ et al. Residual plasmin activity of ADAMTS13 is correlated with phenotype severity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2012; 120: 440–448.