

特 報

第 45 回
2008年度

ベルツ賞受賞論文

2等賞

動脈血栓症の制圧

—VWF-GPIb 軸依存性血小板血栓形成を調節する
ADAMTS13 の基礎・臨床病態解析—藤村吉博*¹ 松本雅則**¹ 植村正人*²
杉本充彦*³ 小亀浩市*⁴ 宮田敏行*⁵

Summary

The mortality due to arterial thrombosis such as myocardial infarction and cerebral infarction exceeds that of malignant neoplasm, is increasing further, and is also becoming a big social issue in our country. Currently, arterial thrombosis is assumed to be established *in vivo* under rheological conditions where blood flow creates high shear stress. Under such conditions, the von Willebrand factor (VWF)-platelet glycoprotein (GP) Ib interaction plays a definitive role on platelet adhesion and aggregation that could be a key event for the formation of arterial thrombosis. In this regard, the biological activity of VWF under high shear stress is absolutely dependent upon its unique multimeric structure, the size of which is thought to be precisely regulated *in vivo* by the recently identified specific VWF-cleaving protease (ADAMTS13). Thus, the aim of our research project is to overcome arterial thrombosis targeting the functional relationships between the VWF-GPIb axis and ADAMTS13 in platelet thrombus formation.

In the initial stage of our research, we have focused on the structure-function relationships of VWF. We have clarified the several functional sites within the VWF molecule critical for platelet thrombus formation. In addition, our functional studies of VWF using a perfusion chamber system that can reproduce physiologic blood flow *in vitro* elucidated the shear-dependent function of VWF in platelet adhesion and aggregation, as well as the molecular mechanisms of the VWF-GPIb axis regulation by ADAMTS13 under blood flow conditions. Thus, our results altogether contributed to extend our understandings of molecular mechanisms for the arterial thrombosis.

In the progressed stage of our research, our focus was shifted to the pathophysiology of the ADAMTS13 molecule. In particular, analyzing the phenotype-genotype relationships of congenital deficiency of ADAMTS13, termed Upshaw-Schulman syndrome

*¹ 奈良県立医科大学 輸血部 教授 **¹ 同 准教授 *² 同 第三内科 准教授 *³ 同 小児科 講師*⁴ 国立循環器病センター 研究所 脈管生理部 室長 *⁵ 同 病因部 部長

(USS), due to *ADAMTS13* gene mutations, can provide *in vivo* prototypic model of platelet thrombus formation under high shear stress. But USS is an extremely rare disease or often masqueraded as an isolated thrombocytopenia with mild clinical signs during childhood.

During the past 10 years, we have diagnosed 37 patients with USS by assaying *ADAMTS13* activity and its inhibitor titers in the laboratory of Nara Medical University. Further, through analyzing the natural history and *ADAMTS13* gene mutations in these patients, we found that severe neonatal jaundice that requires exchange blood transfusions, a classic hallmark of USS, was seen in only 16 (43%) of 37 patients. Twenty-nine (79%) of the 37 patients had a history of thrombocytopenia during childhood that was misdiagnosed as idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Nine women from 6 families were first diagnosed during pregnancy. Further, we documented that thrombocytopenia inevitably developed during the 2nd or 3rd trimesters of all 16 pregnancies in these 9 women. Often the initial isolated thrombocytopenia was followed by overt signs of microangiopathic hemolytic anemia and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Notably, of their 16 pregnancies, 8 infants were stillborn or died soon after birth; the remaining 8 were all premature but survived. Six of these 9 women had the episodes of severe-to-mild thrombocytopenia during childhood that had been incorrectly diagnosed as ITP.

In extension of the abovementioned studies, we have identified that the following disorders including TTP are related to acquired deficiencies of *ADAMTS13* activity with an appearance of UL-VWFM; brain infarction, renal insufficiency, habitual abortion, liver cirrhosis, liver transplantation, acute severe pancreatitis, hepatic veno-occlusive disease, cardiac infarction, and sleeping apnea syndrome. Thus, during the past few years, Copernican-like conversion has been made on the understanding these diseases. Evolution of new rapid assays evaluating *ADAMTS13* activity developed by our research group certainly accelerated this. Further, the idea of contraindication for platelet transfusions to the patients with severe deficiency of *ADAMTS13* activity has also been well established, because of confident observations on platelet hyperaggregability under high shear stress in the presence of UL-VWFM.

目 次

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> 1. はじめに 2. von Willebrand 因子 <ul style="list-style-type: none"> 1) 構造と機能 2) 高ずり応力下での VWF 依存性血小板血栓形成メカニズム | <ul style="list-style-type: none"> 3. <i>ADAMTS13</i> <ul style="list-style-type: none"> 1) 構造と機能 2) <i>ADAMTS13</i> 産生細胞 3) <i>ADAMTS13</i> 活性測定法の開発 4) ずり応力と <i>ADAMTS13</i> 活性 5) <i>ADAMTS13</i> のずり応力依存性機能特性に基づく止血メカニズム制御理論 |
|--|---|

4. 血小板血栓症の病態解析

1) 血栓性微小血管障害症

(1) Upshaw-Schulman 症候群：USS の病態解明と ADAMTS13 遺伝子解析

(2) 後天性 TMA

i) 特発性 TTP

難治性 TTP

ii) 二次性 TMA

薬剤性 TMA

膠原病合併 TMA

2) 肝臓とその他臓器（脾臓，心臓）における微小循環障害

(1) 造血幹細胞移植後 VOD

(2) 生体肝移植

(3) 慢性肝疾患

(4) アルコール性肝炎

(5) 重症急性膵炎

(6) 虚血性心疾患

5. 動脈血栓克服に向けて

1. はじめに

平成 19 年度の本邦死亡者数の第 2 位と第 3 位を占める心疾患および脳血管疾患の殆どは、心筋梗塞や脳梗塞などの動脈血栓症であり、その制圧は急務である。

動脈血栓症は、粥状硬化などの血管壁の変化・変性を起点とした壁血栓形成が病態生理の基盤で、血管壁のプラーク破裂に引き続く急速な壁血栓成長による破裂部位局所での閉塞、もしくは血流にのった破裂壁血栓塊による下流での血栓性塞栓で引き起こされる。生体での壁血栓形成は、血管破綻部位の血管内皮下組織への血小板粘着で始まり、引き続き、粘着血小板が互いに結合し凝集塊を形成することで血小板血栓（一次血栓）を生じる。近年、動脈などの速い血流における血小板血栓形成に、von Willebrand 因子（VWF）が極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

したがって、VWF 機能の制御は動脈血栓症の制圧に繋がると考えられ、我々は 1980 年代半ばから VWF 研究に関して、特にこの因子

の構造・機能相関や主たる血小板膜受容体 glycoprotein (GP) Ib との結合反応メカニズムの解明を進めてきた（後述）。VWF の血小板凝集・粘着機能は、VWF マルチマー（M）構造に依存し、重合度の低い低分子量 VWF_M は血小板粘着・凝集活性が低く、出血傾向をもたらすことは従来から知られていたが、超高分子量 VWF_M (unusually-large VWF_M : UL-VWF_M) では逆に、血栓傾向を引き起こすことが明らかになってきた¹⁾。2001 年に同定された VWF 特異的切断酵素 - 学術名 ADAMTS13 (後述) - がこの UL-VWF_M を適度に限定分解し、「止血には適切」であるが、「病的血栓とはならない」ように、生体で VWF 機能を精妙に制御していると考えられるようになった。VWF-GPIb 軸反応は、血流環境に強く依存しており、心筋梗塞などが生ずる動脈血流で最も効果的に機能する。すなわち生体動脈内では、VWF-GPIb 軸依存性血小板血栓形成と、そしてこの反応を調節する ADAMTS13 の機能連関が、生体防御に必須である「止血」から、逆に生命維持の脅威となる「動脈血栓症」に至る双方の機構を支配している。これより現在、我々の研究の究極の目的は、「VWF-GPIb 軸/ADAMTS13 依存性血小板血栓形成」を制御することによって動脈血栓症の制圧を行うことにある。

このプロトタイプとなる *in vivo* モデルに先天性 ADAMTS13 活性欠損症（別名 Upshaw-Schulman 症候群：USS）という稀疾患がある。奈良医大輸血部では過去 10 年間に本邦で 882 例の血栓性微小血管障害症（thrombotic microangiopathy : TMA）患者を同定し、これより 37 例の USS 患者を発見した。そこで、USS 患者の natural history 解析と共に ADAMTS13 phenotype-genotype 解析を行い、本患者の殆どは小児期に特発性血小板減少性紫斑病（idiopathic thrombocytopenic purpura : ITP）と誤診断されていること、また USS 女性はその遺伝子変異に関係なく、妊娠中～後期に全例血小板減少を来し、その後 TMA 発作がほぼ必

発であること、さらに胎児側では約半数が死産・流産、また生児であっても全例未熟児という驚愕の事実を明らかにした。

また、この研究の延長線上で、後天性 ADAMTS13 活性低下を来す病態・臓器は、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP) に始まり、脳梗塞、腎不全、習慣性流産、肝硬変、肝移植、重症肺炎、造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症 (veno-occlusive disease : VOD) や TMA、心筋梗塞、そして睡眠時無呼吸症候群など、まさに全身諸臓器での微小循環障害 (血栓症) に関与していることを明らかにした (図 1)。

過去数年間に、これらの病態解析によってもたらされた結果は、まさにコペルニクス的転換であり、この理由の一つとして、それまでは実施が困難で、ルーチン検査化が不可能と考えられた ADAMTS13 活性の簡易・迅速・鋭敏測定法が本研究グループで開発され、普及したことが理由としてあげられる。またこの普及は、TTP のように本来「血小板輸血禁忌」とされる病態を、ほぼリアルタイムで診断できるようになり、不適正な血小板輸血による医療過誤を防止することにも大きく寄与している。本論文では、この間に我々が明らかにした「VWF-GPIb 軸/ADAMTS13 依存性血小板血栓形成」の分子メカニズムとこれを基盤とした種々の病態について、基礎と臨床の立場から紹介する。

2. von Willebrand 因子

1) 構造と機能

von Willebrand 因子 (VWF) は、分子量約 25 万の単量体サブユニットがジスルフィド結合で、head-to-head (アミノ末端同士) そして tail-to-tail (カルボキシル末端同士) 様式で様々の程度に重合した巨大分子からなるマルチマー (M) 構造を特徴とする糖タンパク質である。血液中に循環するほか、血小板の α 顆粒や血管内皮細胞の Weibel-Palade 体に貯蔵されており、細胞外マトリックス構成成分としても血管内皮下組織に広く分布している²⁾。VWF

の先天性機能欠損症は、von Willebrand 病として知られる出血性疾患である。1970 年代の後半から、VWF は血小板膜受容体 (glycôprotein : GP) Ib との結合反応を経て、血小板粘着・凝集を司る生体防御に必須の止血因子と理解されてきた²⁾。

我々は 1985 年頃から、VWF の構造・機能相関、特に血小板 GPIb との結合反応メカニズムの解析に着手した。このために、まず VWF 蛋白をトリプシンで限定分解し、得られたフラグメントの解析にて VWF サブユニット内の GPIb 結合機能ドメインの同定に成功し、並行して行われていた VWF cDNA クローニング結果と照合し、この GPIb 結合部位が VWF A1 ドメインに相当することを明らかにした³⁾ (図 2)。次いで、VWF-GPIb 結合反応を制御あるいは修飾する方向に機能すると考えられるコラゲン⁴⁾、ヘパリン⁵⁾ および蛇毒ボトロセチン結合サイト⁶⁾ も A1 ドメインに局在することを見出した。引き続き、合成ペプチドやモノクローナル抗体を用いた蛋白生化学的解析を進め、VWF 分子の機能解析をアミノ酸レベルにまで発展させた^{7,8)}。また、遺伝子組み換え発現蛋白を用いた遺伝子工学的アプローチで VWF サブユニットの機能解析をさらに進展させ、VWF 分子の GPIb 結合制御 (抑制) メカニズムの概念を確立した⁹⁻¹³⁾。すなわち、正常 VWF 分子には GPIb への結合を正の方向に促進する On 構造と、負の方向に制御する Off 構造が混在し、適正な VWF の GPIb 結合機能を維持していることを見出した¹¹⁻¹³⁾。これらの VWF 分子と GPIb の結合構造と制御メカニズムの詳細な解析成果・情報は、後年、我々のグループ研究員も参画したオランダの研究グループによる「VWF 分子と GPIb 分子との複合体の結晶構造解析による立体構造 (変化) の解明」¹⁴⁾ に結びついた。

また、これら一連の VWF 構造機能相関の研究成果をもとに、VWF の GPIb 結合ドメインの制御をターゲットとする抗血栓療法の開発を目的として、特異的 VWF 結合蛇毒蛋白や

GPIb 結合蛇毒蛋白の精製および機能解析も行った¹⁵⁻²⁰。また、並行して推進した VWF A1 ドメインに対する機能阻害モノクローナル抗体の詳細な解析は、VWF-GPIb 軸をターゲットとする抗血栓戦略における抗体医薬品開発の端緒となった^{21,22}。構造に関しては結晶構造解析で大きな山場を越えたが、*in vitro* 実験系に血液灌流装置（フローチャンバーシステム）が導入された 1990 年代半ばから、VWF の機能の概念はドラスチックに変貌した。すなわち、VWF の GPIb 結合機能は血流状況（ずり応力）に大きく依存することが判明した²³⁻²⁵。

2) 高ずり応力下での VWF 依存性血小板血栓形成メカニズム

生体での血流環境は血管により大きく異なる。特に血液が速く流れている細動脈の狭窄部位や血管径が細い毛細血管などの血管内壁では、ある種の流力学的なストレス [ずり応力 (shear stress), または、ずり速度 (shear rate)] を受ける (図 3)²³。

1990 年代半ばにフローチャンバーによる研究で、VWF は高ずり応力下で特異的に、血小板のローリングから粘着を司っていることが見出された²⁴。さらに、心筋梗塞などの動脈血栓症が成立するとされる高ずり応力下の血小板血栓形成では、マルチマー構造を持つ VWF が極めて重要な役割を果たしていることが判明した。このような理由から、我々がフローチャンバーシステムを導入し、可視的なイメージング手法で、生理的高ずり応力下における血小板血栓生成過程での VWF 分子の機能解析を始めた。

血小板はローリングしている間に次第に活性化され、固相化 VWF 上に停止し強固に粘着する (firm adhesion) 現象が報告されたが、この過程における血小板活性化メカニズムや血小板動態は全く不明であった。我々は固相化 VWF 上での血小板粘着過程における個々の血小板の細胞内カルシウム変化と血小板形態変化を、新たに構築したイメージング手法で解析し

た^{25,26}。

固相化 VWF 上での個々の血小板粘着は、血小板の伸展による非可逆的粘着 (irreversible adhesion) で完結するが、この過程における血小板内カルシウム動態および血小板形態変化は図 4 に示すように進行する。まず、血液を流れている円板状の血小板は、GPIb を介して VWF 表面と最初の接触を持つと同時に、速やかに球状になり偽足を出してローリングを始める。ローリングの間に VWF-GPIb 相互作用によって生じる inside-out シグナルで活性化された $\alpha\text{IIb}\beta_3$ が VWF と結合し、半円球状に形を変えた血小板が固相化 VWF 上に停止する (firm adhesion)。firm adhesion の時点では、粘着は未だ可逆的である。次いで、VWF と結合した $\alpha\text{IIb}\beta_3$ から “outside-in” シグナルが入り、血小板内カルシウムが劇的に上昇する。引き続き、血小板は極端に扁平に伸展 (extensive spreading) し、真の非可逆的粘着が完成する (図 4)^{25,26}。このカルシウム上昇は、細胞外カルシウムの細胞内流入によるものと考えられた。これらの成績によって、VWF-GPIb 相互作用を起点としたインテグリンシグナリングの分子機構を解明し、生理的意義が明らかでなかった VWF 上での血小板の形態変化と機能相関を明らかにできたと考えている。

粘着に引き続き、thrombogenic surface (固相化 VWF やコラゲンなど) に粘着した血小板は次々と血流にのって供給される血小板を捕獲・結合 (血小板凝集反応) し、壁血小板血栓が空間的に成長する。古典的概念では血小板凝集はフィブリノゲンの分子糊機能が司ると考えられていたが、高ずり速度下では粘着過程と同様、VWF-GPIIb α 相互作用と VWF-インテグリン $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 結合反応が主役を演じることを明らかにした (図 5)^{27,28}。高ずり速度下では粘着蛋白も速いスピードで流れており、この状況下でフィブリノゲンをはじめとした VWF 以外の血漿粘着蛋白は、損傷血管壁に粘着した血小板 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ に直接反応し得ない。ここでもまず、VWF が 2 段階メカニズムの特性を発揮し

図1 VWF-GPIIb軸/ADAMTS13との関連が注目されている臓器・疾患

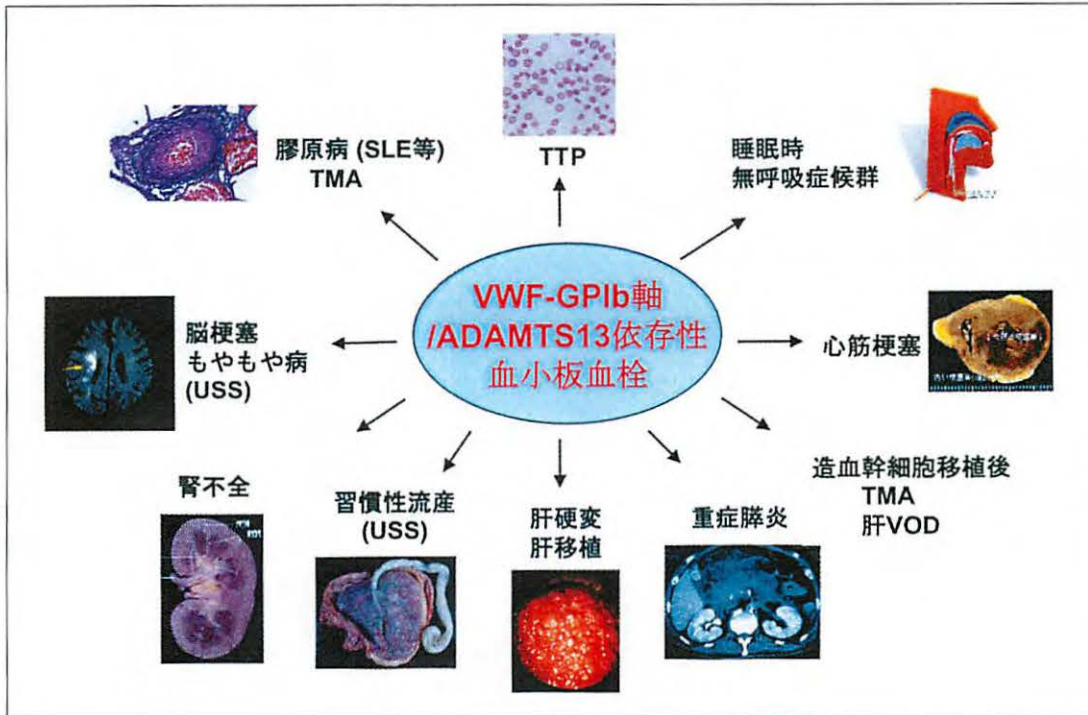
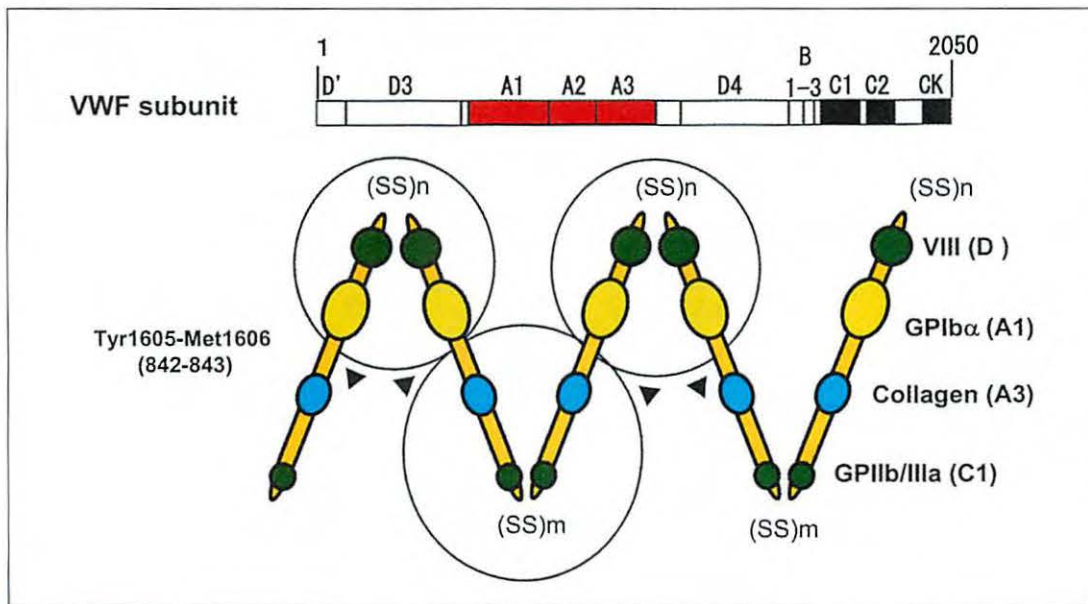


図2 成熟 VWF サブユニットのドメイン構造と VWF のマルチマー重合

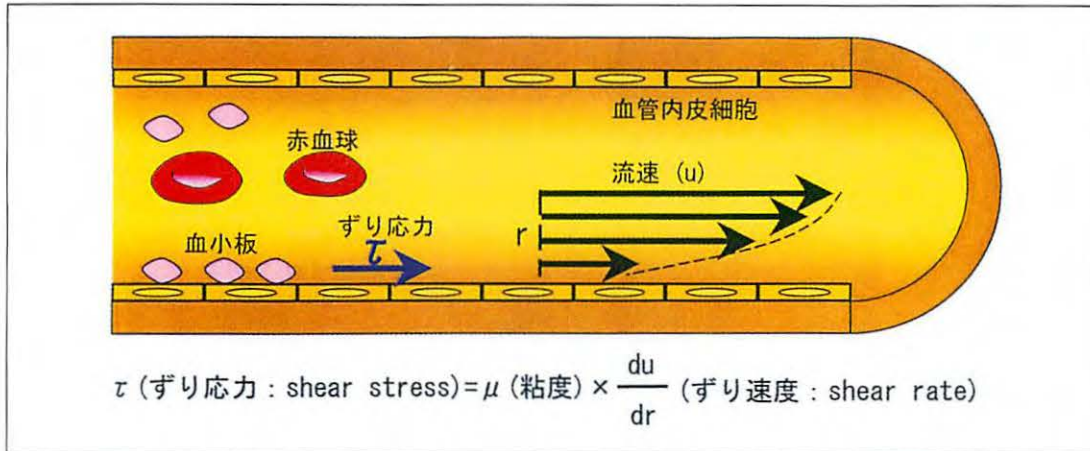


成熟 VWF サブユニットは 2,050 個のアミノ酸残基で構成され、N末端の D' ドメインから始まる繰り返しドメイン構造をとる。A1 ドメインには GPIIb 結合部位、A2 ドメインには ADAMTS13 切断部位が局在する。このサブユニットが各々アミノ末端、カルボキシ末端のジスルフィド結合により、マルチマー構造をとっている。矢印は ADAMTS13 による切断部位。

て粘着血小板上の GPIIb α と相互作用した後、 α IIb β 3 に結合する。すなわち、最初の固相化 VWF への 1 層目の血小板粘着メカニズムの裏返しの現象（固相化血小板への血漿 VWF の

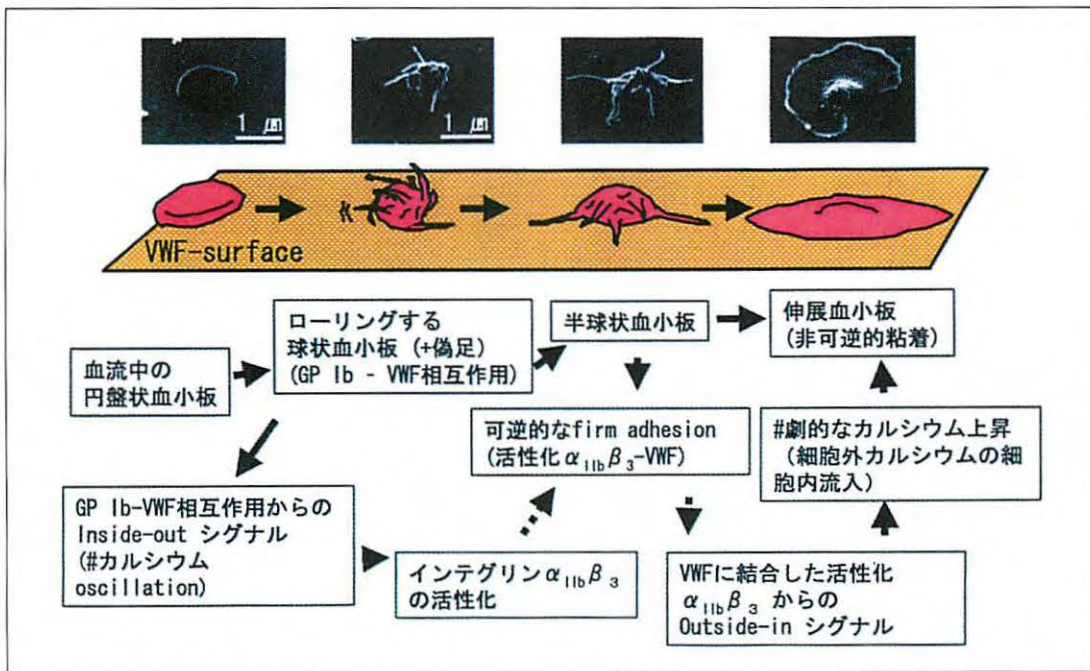
強固な結合）が起こるのである。次いで、粘着血小板に捕獲された VWF 分子上を血流中の血小板が、やはり 2 段階メカニズムでローリングして、これに粘着することで 2 層目の血小板

図3 血管内のずり応力



血管内では部位によるスピードの違い（内腔の中央部は速く，血管壁側は血流が遅い）から，ずり応力（ずり速度）が生じる．ずり応力は血管径に反比例し血流速度に比例するため，一般的に静脈内は低ずり応力であり，細い動脈内では高ずり応力である．

図4 固相化 VWF 上での血小板粘着過程における血小板活性化と形態変化



血流中の円板状の血小板は固相化 VWF に接触し，偽足形成とともに球状に形態変化してローリングする．引き続き図の下部に示すような活性化過程を経て半球状形態 → 伸展へと進み，非可逆的の粘着に至る．

粘着が完成する．高ずり速度下での壁血小板血栓の空間的成長は，VWF の機能で粘着過程を 2 層目，3 層目と繰り返すことで成立すると考えられる（図 5）．VWF が血小板血栓の土台を作った後，やや遅れてフィブリノゲンなどの他の粘着蛋白が，速い血流に暴露されない血栓

深部の活性化インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ と結合し，血栓強度を高めていくと考えられた²⁸⁻³⁰．すなわち，心筋梗塞などが成立する動脈血流においては，VWF-GPIIb 軸が血小板血栓形成機構に重要な役割を演じている．

3. ADAMTS13

1) 構造と機能

VWF を特異的に切断することで血小板血栓形成能を制御している因子として、近年、VWF 切断酵素 ADAMTS13 が同定された。ADAMTS13 遺伝子は、染色体 9q34 に存在し、29 個のエキソンからなる。一次構造の特徴から、細胞外分泌型の亜鉛メタロプロテアーゼである ADAMTS ファミリーの一員として分類される。翻訳されるペプチド鎖は 1,427 アミノ酸残基で、N 末端側から順に、シグナル配列、プロペプチド領域、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリン様ドメイン、トロンボスポンジン 1 型モチーフ (Tsp1) ドメイン、システインリッチドメイン、スパーサードメイン、さらに 7 個連続した Tsp1 ドメイン、2 個の CUB ドメインとなっている (図 6)。細胞外に分泌された ADAMTS13 は、シグナル配列とプロペプチド領域が切断除去されており、1,353 アミノ酸残基からなっている。糖鎖が付加しており、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で約 190kDa のバンドとして検出される。

ADAMTS13 の生理的基質として同定されているのは VWF のみであり、A2 ドメインの Y1605~M1606 間ペプチド結合が切断される (図 7)。我々は、ADAMTS13 が VWF を切断するにはメタロプロテアーゼドメインからスパーサードメインまでが、必要かつ十分な領域であることを示した³¹⁾。ADAMTS13 のシステインリッチドメインおよびスパーサードメインを除去すると VWF 切断活性が消失することと、後天性 TTP 患者の自己抗体の主要エпитープがシステインリッチ/スパーサードメインに集中していることから、これらのドメインは ADAMTS13 の酵素機能にとって極めて重要であることを明らかにした (図 8)³¹⁾。

我々は、前記の Upshaw-Schulman 症候群 (USS, 先天性 TTP) 患者家系の ADAMTS13 遺伝子解析の過程で、健常者にも見られる複数種のミスセンス多型 (missense SNP) を同定

し、その中で P475S は ADAMTS13 の活性を低下させることを見出した³²⁾。現在のところ、ADAMTS13 活性に影響をおよぼすことが明らかになっている唯一の多型である (後述)。

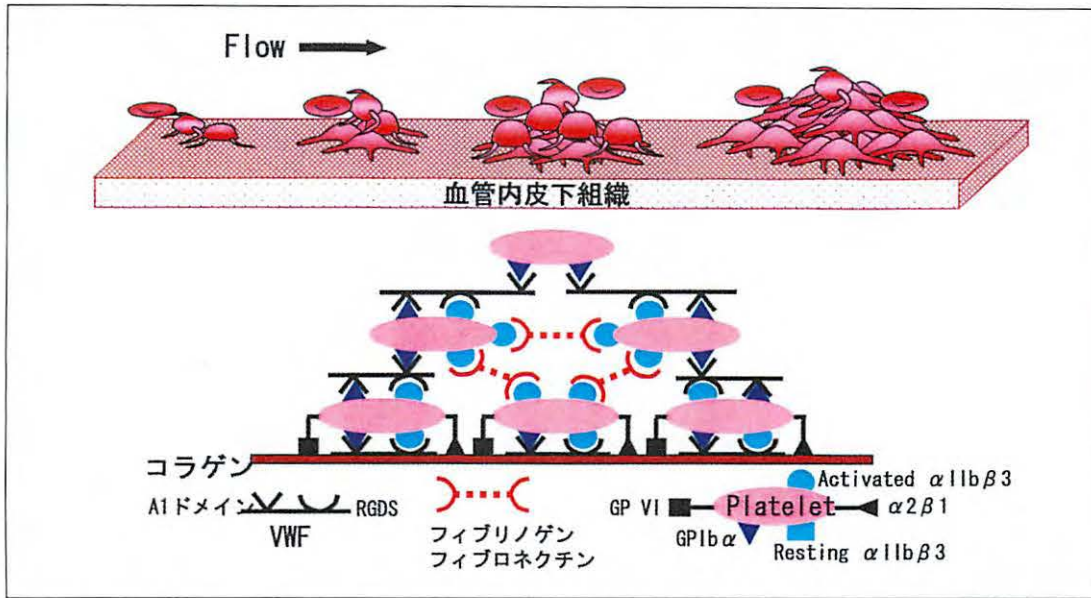
2) ADAMTS13 産生細胞

2000 年、我々の研究グループは「先天性胆道閉鎖症の末期患者では VWF 切断酵素活性が著減すること、また、これらの患者に生体肝移植を行い、生着すると同酵素活性が上昇ないし正常化する」ことを見出し、本酵素の主たる産生臓器は肝臓であることを報告した³³⁾。その後、2001 年に ADAMTS13 cDNA が日米欧の独立した 4 研究グループから報告されたが^{34~37)}、精製酵素の部分アミノ酸配列を用いた cDNA クローニングはいずれも肝臓ライブラリーを用いてなされていた^{36~38)}。この後間もなく、我々は 2 種類の ADAMTS13 マウスモノクローナル抗体 (A10 と C7) の作製に成功したので、これらを用いて C 型慢性肝炎の凍結肝組織切片の免疫染色を行った。これにて肝類洞壁細胞が染色され、形態学的に肝星細胞に合致する所見であった³⁹⁾。さらに、共焦点レーザー顕微鏡により A10 抗体と活性化肝星細胞のマーカーである α -smooth muscle actin 抗体による二重染色を行った結果、両者は完全に一致し、本酵素が肝星細胞 (伊東細胞) で産生されることを同定した³⁹⁾ (図 9)。また *in situ* hybridization を行い、肝星細胞の部分に一致して ADAMTS13 mRNA のシグナルが検出されることを確認した³⁹⁾。肝星細胞はビタミン A 貯蔵や肝線維化のほかに、類洞内微小循環を調節する役割を担っている。後に紹介するが、「肝硬変患者の血小板減少には VWF の著増と、反面 ADAMTS13 活性の著減が関与している」という報告は、この発見が端緒となっている。

3) ADAMTS13 活性測定法の開発

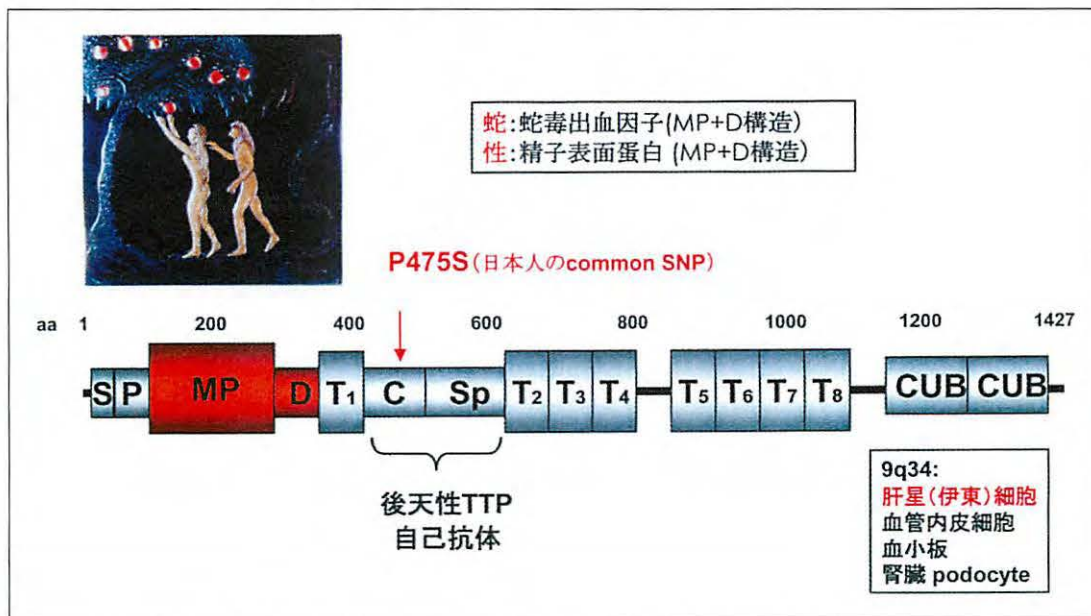
1996 年に報告された最初の ADAMTS13 活性測定法は、アガロースゲル電気泳動法⁴⁰⁾ とポリアクリルアミドゲル電気泳動法⁴¹⁾ であった。

図5 高ずり速度下における壁血小板血栓形成メカニズム



高ずり速度下で血小板は障害血管壁に固相化された VWF 上をローリングする。その間に血小板は徐々に活性化されて、血小板の活性化インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ が VWF C1 ドメインと結合することで、固相化 VWF 上に停止して粘着する。同時に、血小板が内皮下組織コラーゲンと結合し、粘着をより強固にする。その後、粘着サイクルを繰り返すことで血小板血栓は成長し、フィブリノゲンなどの粘着蛋白と活性化インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ との結合が血栓深部を中心に進行し、血栓強度を高めていく。

図6 ADAMTS13 のドメイン構造



S: シグナルペプチド, P: プロペプチド, MP: メタロプロテアーゼ, D: ディスインテグリン, T₁~T₈: トロンボスポニン, C: シス테인リッチ, Sp: スパーサー, CUB: CUBドメイン

いずれも、VWFM を血漿と反応させ、その切断の程度をウエスタンブロッティングで調べる手法である。ADAMTS13 の同定に結びついた

優れた手法であったが、操作が煩雑であり、測定に数日を要することから、臨床検査として広く普及するものではなかった。その後、コラーゲ

図7 ADAMTS13によるVWFの切断とその切断部位を特異的に認識するモノクローナル抗体N10

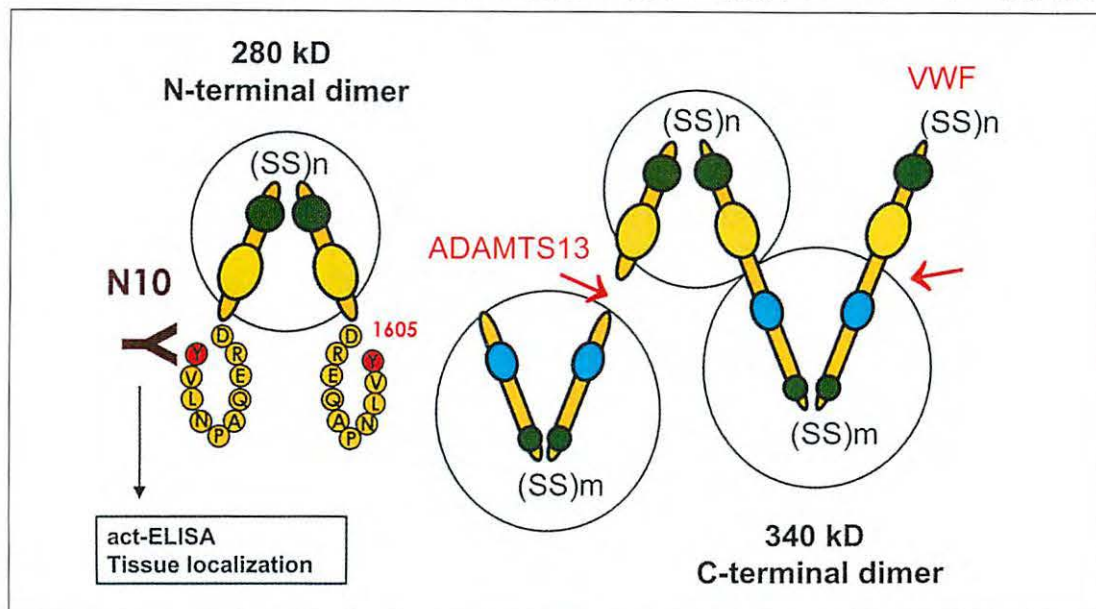
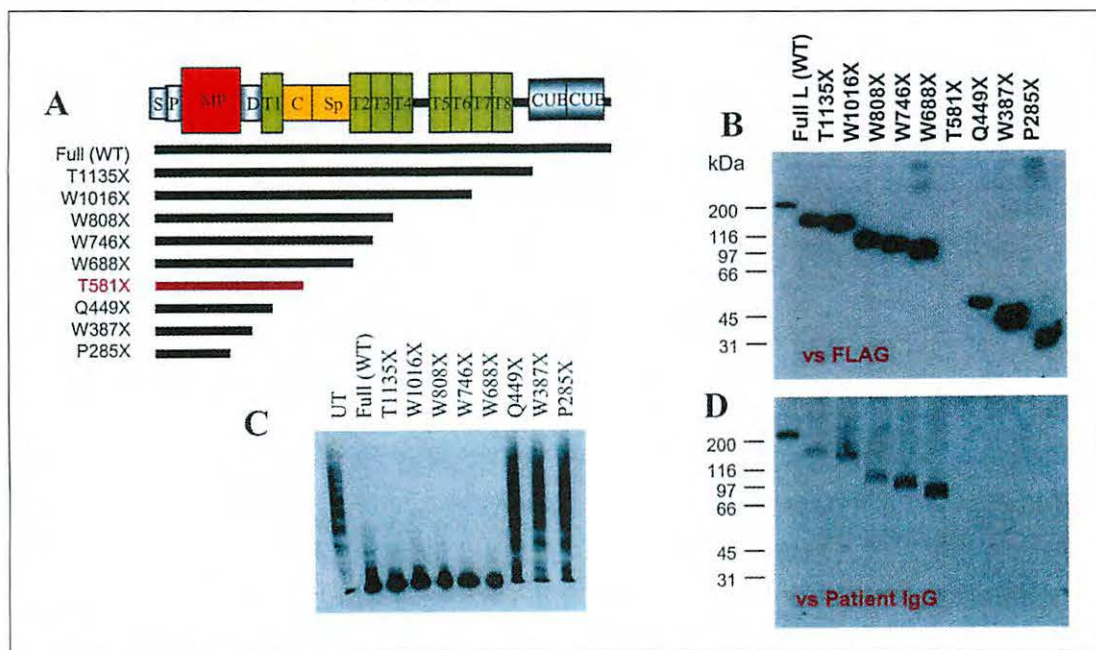


図8 ADAMTS13 ドメインの機能解析



- A : FLAG タグを付けた 10 種類の ADAMTS13 変異体を HeLa 細胞で発現した。
- B : T581X 以外は上清に分泌された。
- C : 発現上清の ADAMTS13 活性を確認するため、VWF 切断反応後 SDS アガロースゲル電気泳動 (マルチマー法) を行い、C/Sp ドメインを欠損すると活性が消失することを確認した。
- D : 患者血漿から精製した IgG との反応性より、C/Sp が後天性 TTP 患者のインヒビターの認識部位であることを確認した。

ン結合能測定法, 抗体サンドイッチ法, リストセチン血小板凝集測定法などが考案されたが, これらも再現性や感度に問題があり, 汎用化されるには至らなかった. そこで我々は,

ADAMTS13 の特異的基質となり得る VWF の最小領域 Asp1596~Arg1668 (73 アミノ酸残基) を特定することに成功し, VWF73 と命名した⁴²⁾. VWF73 に比べるとはるかに短いペ

プチド基質が利用できることになり、活性測定系のデザインの自由度が上がった。VWF73 を利用することにより、我々の研究グループは二つの簡便測定法、すなわち FRET 法⁴³⁾ と act-ELISA 法⁴⁴⁾ を開発した。

最初の FRET 法では、消光性蛍光基質 FRET-VWF73 を用いている。これは、VWF73 の切断部位をはさむように蛍光基と消光基を付加した化学合成ペプチドである (図 10)。蛍光基と消光基の間で起こる蛍光共鳴エネルギー転移 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) により、反応前には励起光を照射しても蛍光は弱いですが、ADAMTS13 によって切断されると蛍光が強くなる。測定手順の簡便性と、結果が得られるまでの迅速性に特に優れており、現在最も普及している方法である。次に開発した chromogenic act-ELISA 法では、VWF73 の N 末端側に GST タグを結合した大腸菌組み換えタンパク質 GST-VWF73 を基質に用いている。本法においては、VWF A2 ドメインが ADAMTS13 で切断された際に生じる断端アミノ酸残基 (Tyr1605) を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 (N10, 後述) の作製に成功したことが、その開発に結びついた。正常活性の 0.5% という低活性を判別できる感度と、汎用的な ELISA 操作で活性を測定することができる利点がある。

FRET 法および act-ELISA 法は、近年、複数社からそれぞれの測定用キットが販売されるようになり、その利便性と実用性から国内外で高く評価されている。我々の研究グループで、まずその「汎用化 ADAMTS13 活性測定法の原理」が明らかにされ、次に「キット化」されて世界に出回るようになり、これにて新規 ADAMTS13 活性依存性疾患が数多く発見されるようになった。それ故、我々はこれらの病態解析で、世界の競合研究のフロントラインにいる。

4) ずり応力と ADAMTS13 活性

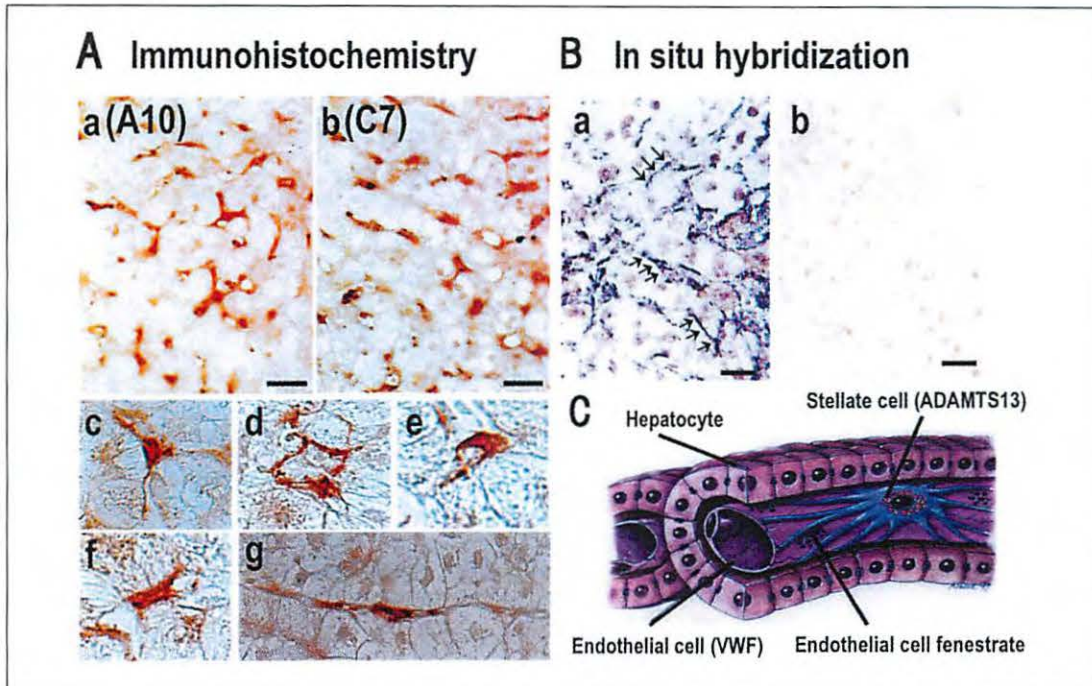
ADAMTS13 の VWF 切断活性の重要性が

広く認識されるようになった当初から、生体における ADAMTS13 活性発現メカニズムについての情報は乏しかった。実際、*in vitro* の静止実験系において、生理的な中性バッファー条件下では、ADAMTS13 は VWF 切断活性を示さない。我々は、生体ではずり応力が ADAMTS13 活性に関与しているのではないかと考え、*in vitro* 血液灌流装置を用いたフロー実験を行った。

ADAMTS13 活性を完全にブロックする抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体 (A10)³⁹⁾ を用いた阻害実験で、高ずり速度血流状況下の固相化コラゲン上での血小板血栓形成過程における ADAMTS13 機能を評価した。12,000 s⁻¹ という VWF-GPIb 結合反応よりもはるかに高いずり応力での血液灌流において、ADAMTS13 活性をブロックした場合のコラゲン上での血栓形成はコントロールに比較して迅速かつ有意に亢進していた (図 11)。この成績は、ADAMTS13 が高ずり応力下における血栓成長を制御していることを明確に示している。

次に、この極めて高いずり応力下で形成された血栓内のどの部位で実際に ADAMTS13 が VWF を切断しているのかを、前述のユニークなモノクローナル抗体 (N10) を用いて検討した。この N10 は、ADAMTS13 により切断される VWF A2 ドメインの断端アミノ酸残基 Tyr1605 からアミノ末端側に連続 10 個のアミノ酸配列からなる合成ペプチドを作製し、これをキャリア蛋白に結合後、免疫原に用いて作成した。特にクローン抗体のスクリーニング時には様々の合成ペプチドを用いることにより、アミノ酸残基 Tyr1605 を特異的に認識する抗体 (N10) が得られた⁴⁴⁾。N10 抗体は切断された VWF にのみ特異的に反応するため、この抗体の反応性は ADAMTS13 の VWF 切断活性を直接的に反映する。形成された血栓に対するこの抗体の反応性を検索したところ、血流に直接暴露され、かつ血栓成長の前線基地である血栓表面部で優先的に VWF が切断されていることが判明した (図 11)⁴⁵⁾。さらに、この血栓外

図9 ADAMTS13 は肝星細胞に局在



C型慢性肝炎の凍結肝組織切片を ADAMTS13 に対する 2 種類のモノクローナル抗体 (A10 と C7) を用いて免疫染色を行った結果、肝類洞壁細胞が同様に染色され、細長い突起を有し形態学的に肝星細胞に合致する所見であった。In situ hybridization では樹枝状に ADAMTS13 mRNA のシグナルが検出され、本酵素が肝星細胞で産生されることが明らかとなった。

図10 VWF73 と ADAMTS13 活性測定法

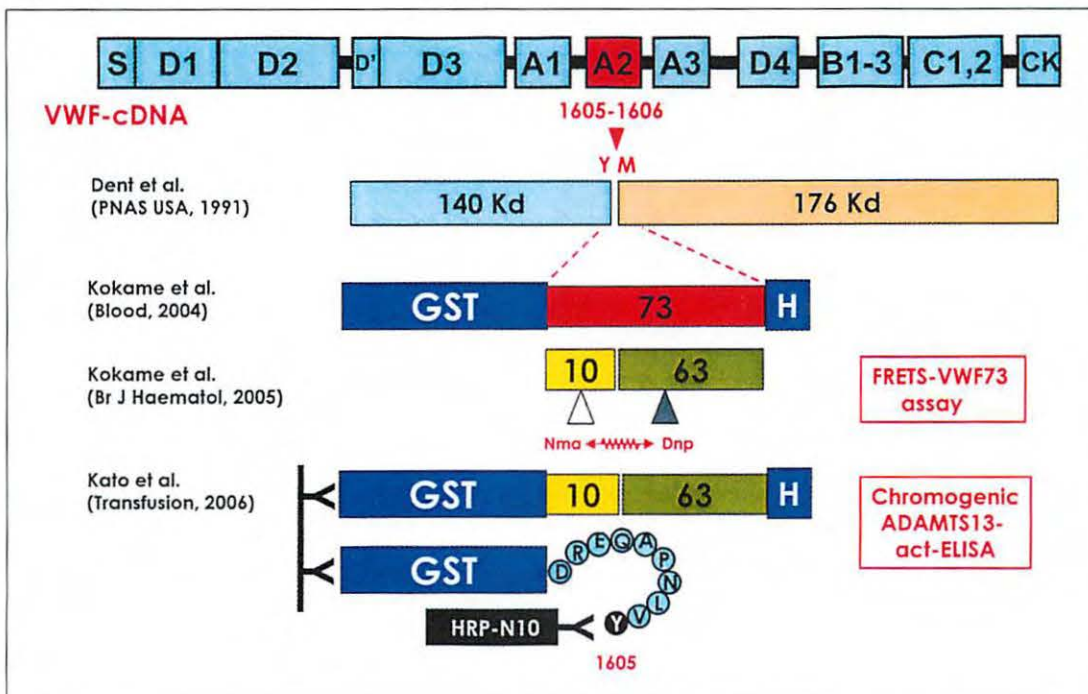
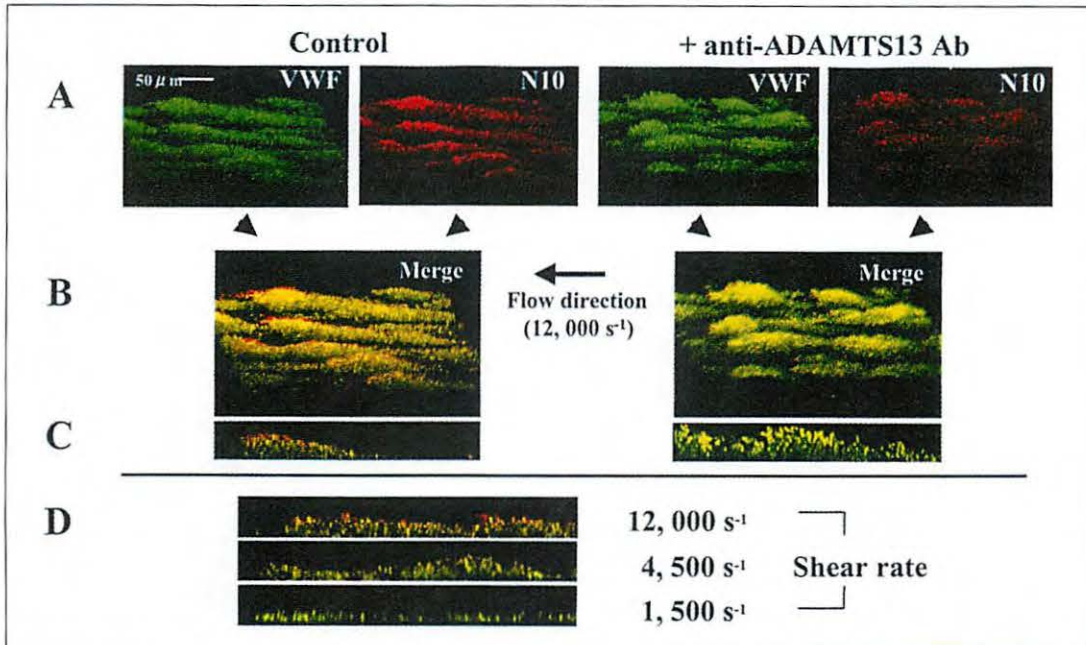


図11 高ずり応力下で形成された血栓における ADAMTS13 による VWF 切断活性の解析



- A: 高ずり速度下で形成された血栓を N10 抗体 (赤色) と VWF ポリクローナル抗体 (緑色) で二重染色した。
- B: コントロール血栓は全体的に黄色調, 抗 ADAMTS13 阻害抗体存在下で形成された血栓は緑色優位である。
- C: B 画像の縦断面. コントロール血栓では, 血栓の外表面辺縁が優位に赤く染色されているが, 抗 ADAMTS13 阻害抗体を添加した場合にはこの傾向は著明ではない。
- D: 種々のずり応力下で形成されたコントロール血栓の二重染色縦断面画像. ADAMTS13 による血栓外表面辺縁での優先的な VWF 切断は, より高いずり速度で顕著である。

表面部に優先的な ADAMTS13 による VWF 切断は, ずり速度が高いほど顕著であった (図 11). 血流に直接暴露する血栓成長先進部では, VWF に血小板が結合することで, ずり応力による VWF へのストレッチング効果が増強され, 切断部位である A2 ドメインがより露出することが推定された⁴⁵⁾. これらの成績から, ADAMTS13 のずり応力依存性の機能特性, およびずり応力による ADAMTS13 による VWF 切断活性増幅メカニズムが明らかとなった。

5) ADAMTS13 のずり応力依存性機能特性に基づく止血メカニズム制御理論

血管壁が傷害を受け, その部位から出血が生じた場合, ここに壁血小板血栓が形成され止血と共に血管傷害部位の修復が起こる. しかしこの反応が無制限に生じた場合には, 血管を閉塞し, 微小循環機能不全から臓器機能不全に至る

(血栓症). この説明は, 前章の実験結果を以下のように解析することにより可能となった。

すなわち, 高ずり応力下でまず VWF-GPIIb 相互作用が促進され, VWF 依存性の血小板粘着・凝集が進行する (止血機転). 血小板粘着・凝集反応の進行につれ, 徐々に血栓が大きくなっていき, 血管内腔のフリースペースが狭小化することになる. 「血管腔が狭いほどずり応力が高い」ことから考えると, 結果として血栓の増大に呼応して局所ずり応力が高くなる. 理論的には, 閉塞直前の血管腔におけるずり応力は無限大に上昇しているはずである. 同時に, 血流に直接暴露する血栓成長先進部では, VWF への On-going な血小板結合で ADAMTS13 による VWF 切断活性が飛躍的に亢進する (図 12). 言い換えれば, 血栓が成長すればするほど, ADAMTS13 の血栓成長ストッパー (制御) 機能が増幅されて致命的な血管閉塞を回避

させることになる (抗血栓機転)⁴⁵⁾。すなわち生体では、VWF, 血小板, および ADAMTS13 の三者が, ずり応力のタクトの下で絶妙なハーモニーを奏でて, 致命的な動脈閉塞を防御しつつ, 適正な止血血栓形成を司っていると想定される⁴⁶⁾。

4. 血小板血栓症の病態解析

1) 血栓性微小血管障害症

血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy: TMA) は, 細血管障害性溶血性貧血, 破壊性血小板減少, 血栓による臓器機能障害を 3 主徴とする病理学的診断名である⁴⁷⁾。血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP) と溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) は, TMA を代表する二大疾患である。しかし今日, この両者を症状から分類することは殆ど不可能かつ無意味と考えられている。しかし, ADAMTS13 活性著減が確認されたものはより特異的に TTP と診断されている。

奈良医大輸血部は, 1998 年以降, 本邦で唯一の TMA 解析センターとして機能し, 2008 年 4 月末までに ADAMTS13 活性, 臨床症状, ルーチン検査データから最終的に TMA と診断した症例は 882 例になった (図 13, 表 1)。このうち, 先天性 TMA と考えられたものは 61 例で, うち 37 例が後述の Upshaw-Schulman 症候群 (USS, 別称先天性 TTP) であった。一方, 後天性 TMA に分類されたものは 821 例であった。

(1) Upshaw-Schulman 症候群 (USS): USS の病態解明と ADAMTS13 遺伝子解析

「幼小児期からの慢性血小板減少と溶血性貧血」を特徴とする USS は, Schulman ら⁴⁸⁾ や Upshaw⁴⁹⁾ によって報告された後も長らく, その病因・病態は不明であった。1982 年, 米国の Moake ら⁵⁰⁾ は Schulman らの症例を解析し, 正常血漿には存在しない UL-VWFM が患者血漿中に出現することを見出し, この疾患の病態形成における UL-VWFM の関与の可能性

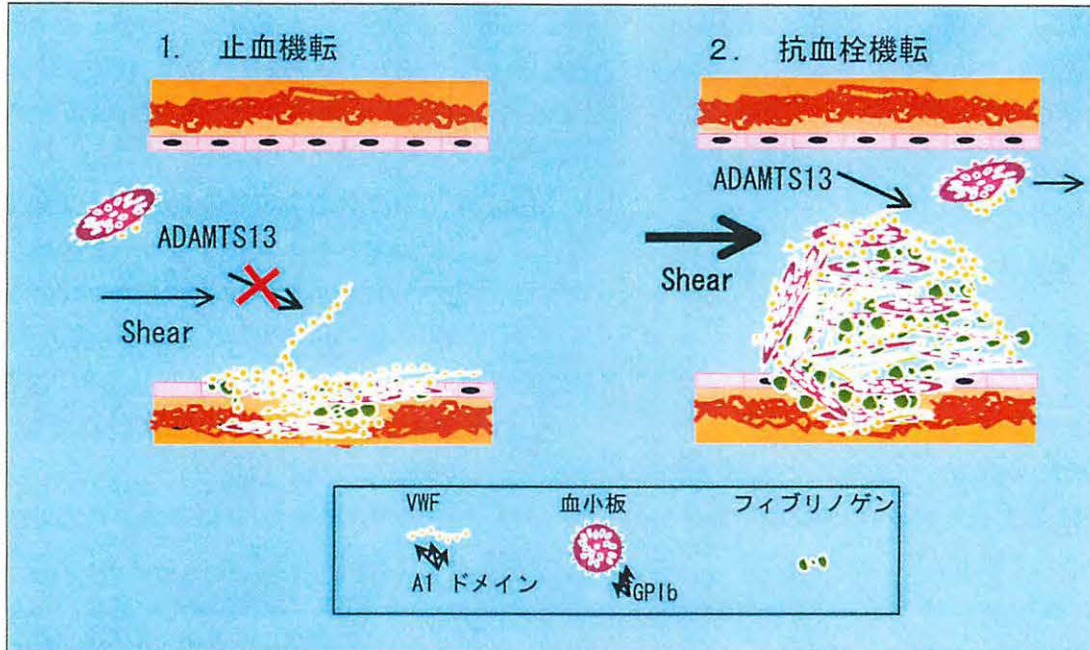
を示唆した。引き続き, 1997 年に Furlan らは, 当時は未だ TTP が先天的に生ずるとの概念がなかったものの, 「慢性再発性 TTP」患者では VWF 切断酵素活性が著減しているとの報告を行った⁵¹⁾。そこで我々は, 本邦で USS と臨床診断されていた 3 家系の同酵素活性を測定し, 患者はいずれも正常の 3% 以下と著減していること, またその両親は正常値の 50% ないしそれ以下に低下していることを発見した⁵²⁾。この後間もなくして, Levy ら⁵³⁾ は家族性 TTP 7 家系の positional cloning で, ADAMTS13 を原因遺伝子として同定した。

ADAMTS13 の cDNA クローニングでは他の 3 グループの後塵を拝することになったが, 我々は引き続き USS の病態解析を進め, USS の一家系 (USS-A) 内に R268P, Q448E, P475S と C508Y の四つの ADAMTS13 変異を同定した。HeLa 細胞を用いた個々の発現実験にて, R268P と C508Y は培養上清に分泌されない責任変異であること, 一方, Q448E と P475S はいずれも培養上清に分泌されるが, Q448E はほぼ正常活性を持ち正常多型 (common SNP) と確認, しかし P475S は, その酵素活性は尿素存在下に測定する VWFM アッセイでは著しい低活性を示すことを示した⁵²⁾。ADAMTS13 遺伝子の野生型と変異型共に, *in vitro* 発現実験にて培養細胞からの蛋白分泌障害やその活性有無の検討を報告したのは, これが世界で最初の論文となった⁵²⁾。

発見されたこの P475S 変異のヘテロ接合体は日本人の約 1 割に見られ, そのアレル頻度は 5.6% であることも示された。また最近の諸外国でのデータでは, P475S アレル頻度は韓国人で 4.0%, 中国人で 1.5%, そして白人 (Caucasian) で 0% の数字が報告されており, この gene flow map はかつてのシルロード上にほぼ一致するようである。

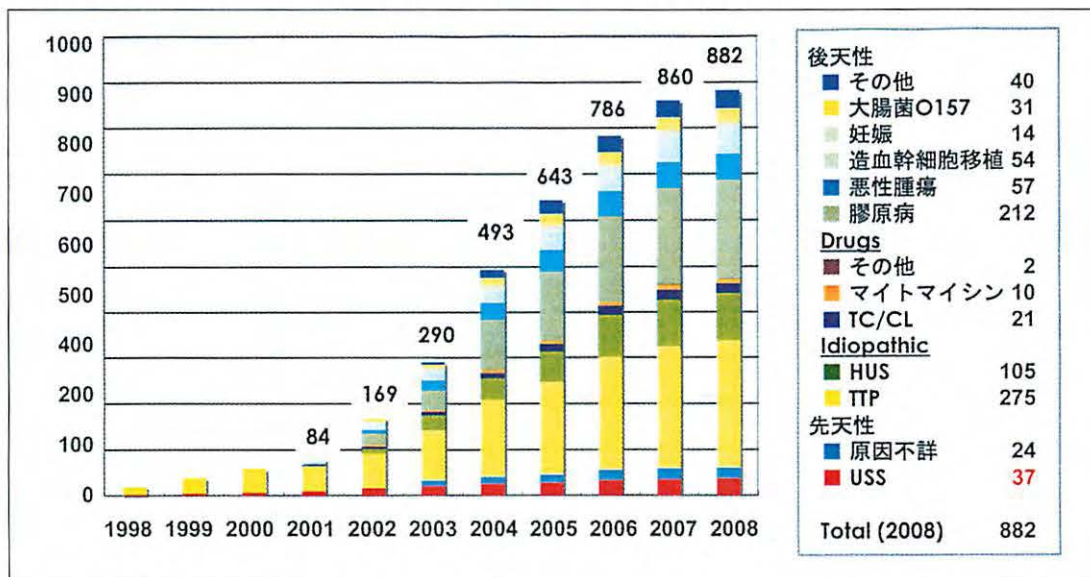
2008 年 4 月末までに, 奈良医大輸血部で診断・登録された USS は, 表 2 に示す如く 32 家系 37 症例である。この中で ADAMTS13 遺伝子解析が実施されたものは 27 家系 32 症例

図12 ADAMTS13 のずり応力依存性機能特性に基づく止血メカニズム制御理論



高ずり応力下で、血管損傷部位における VWF 依存性の血小板粘着・凝集が進行する（止血機転）。血小板粘着・凝集反応の進行につれ、徐々に血栓が増大し、血管内腔のフリースペースが狭小化し、結果として局所ずり応力が高くなる。血流に直接暴露する血栓成長先進部では、ずり応力の ADAMTS13 活性増幅効果が亢進する。すなわち、血栓が成長すればするほど、ADAMTS13 の血栓成長ストッパー（制御）機能が増幅されて致命的な血管閉塞を回避させる（抗血栓機転）。

図13 過去 10 年間に奈良医大輸血部で集積した TMA 症例数の推移



症例数は年々増加しているが、USS の比率 (37/882=4.2%) はここ数年不変である。

である（別の 5 家系 5 症例については未実施）。32 例中 5 例は兄弟同胞で、実数としては異なる 27 個人 (54 アレル数) の ADAMTS13 遺伝子解析を終えたことになる。これら患者の地

理的分布とその結果を図 14 に示す。東京や大阪などの大都市を除いては、患者やその家族の多くが先祖代々その地に居住してきたことを確認している。これらの中で、Sasahara ら⁵³⁾が

表 1 奈良医大輸血部で解析した本邦 TMA 患者 882 例の ADAMTS13 とそのインヒビター活性 (1998.7~2008.4)

	先天性TMA (n=61)		後天性TMA (n=821)											合計
	Upshaw-Schulman 症候群 (n=37)	原因不詳 (n=24)	特発性* (n=380)		薬物** (n=33)			膠原病 (n=212)	悪性腫瘍造血幹細胞移植 (n=57)	妊娠 (n=14)	E. coli 0157:H7 (n=31)	その他 (n=40)		
			TTP (n=275)	HUS (n=105)	TC/GL (n=21)	MMC (n=10)	他の薬物 (n=2)							
ADAMTS13 活性 (%)														
<3	37	0	187	0	17	0	2	44	4	0	4	0	7	302
3~<25	0	4	74	20	2	2	0	64	22	23	4	4	16	235
25~<50	0	9	13	45	1	5	0	65	20	16	3	17	6	200
≥50	0	11	1	40	1	3	0	39	11	15	3	10	11	145
インヒビター (Bethesda U/ml)	(n=37)	(n=23)	(n=233)	(n=40)	(n=21)	(n=7)	(n=2)	(n=103)	(n=24)	(n=14)	(n=7)	(n=16)	(n=15)	(n=542)
<0.5	37	23	23	40	2	7	0	38	11	10	2	16	5	214
0.5~<2	0	0	117	0	8	0	2	45	8	4	2	0	6	192
≥2	0	0	93	0	11	0	0	20	5	0	3	0	4	136

* TTPとHUSの鑑別は臨床データによる。
** TC (チクロピジン)、GL(クロピドグレル)、MMC (マイトマイシンC)、他の薬物: PEG-IFN、バイアグラ

表 2 USS 37 例の臨床検査所見のまとめ

No	Patient	Year of Birth	Sex	Early-Onset Bouts		Late-Onset Bouts	ADAMTS13 :AC by act-ELISA (%)	ADAMTS13 Gene Mutations
				Newborn Severe Jaundice & Exchange Blood Transfusion	Clinical Diagnosis (Age)	Etiology		
1	A	1999	M	+	USS (4m)		<0.5	CH
2	B	1986	F	+	USS (2m)		<0.5	Homo
3	C	1972	M	-	USS (5y)		<0.5	Homo
4	D	1978	F	+	USS (4y)		<0.5	CH
5	E	1985	M	+	TTP (5y)		<0.5	CH
6	F	1993	M	+	ITP (10m) →TTP (3y)		1	CH
7	G	1987	F	+	Evans synd (5y) →TTP (14y)		<0.5	CH
8	H	1951	M	+	None	Idiopathic (51y)	1	CH
9	I	1972	M	-	TTP/HUS (1y)		<0.5	CH
10	J-3	1977	F	-	TTP (3y)		<0.5	CH
11	J-4	1979	M	-	TTP (5y)		<0.5	CH
12	K-3	1976	F	-	ITP (6y)	Pregnancy (27y)	<0.5	CH
13	K-4	1978	F	+	ITP (4y)	Pregnancy (25y)	<0.5	CH
14	L-2	1967	F	-	None	Pregnancy (25y)	<0.5	CH
15	L-3	1972	F	-	ITP (3y)	Pregnancy (25y)	<0.5	CH
16	M-3	1969	F	-	None	Pregnancy (36y)	<0.5	CH
17	M-4	1971	F	-	None	Pregnancy (37y)	<0.5	CH
18	N	1986	F	+	USS (4y)		<0.5	CH
19	O-4	1958	F	-	None	Pregnancy (26y)	<0.5	CH
20	P	1971	M	-	TTP (3y)		<0.5	CH
21	Q (1)	1983	M	+	USS (6y)		<0.5	CH
22	Q (2)	1988	M	+	USS (2y)		<0.5	CH
23	R-5	1982	F	-	ITP suspected (8m)	Pregnancy (23y)	<0.5	CH
24	S	1982	F	-	USS (4y)		1	*
25	T	1981	F	-	USS (1m)		<0.5	*
26	U	1990	F	+	USS (4m)		<0.5	*
27	V	1983	F	+	USS (6y)		<0.5	*
28	W-4	1990	F	-	ITP (2y) →TTP(15y)		<0.5	CH
29	X-5	1963	F	-	None	Idiopathic (40y)	<0.5	UD
30	Y	1960	F	-	ITP (3y)	Idiopathic (45y)	<0.5	CH
31	Z-3	1971	F	-	ITP (7y)	Pregnancy (25y)	<0.5	Homo
32	AA	1987	F	-	None	Idiopathic (19y)	<0.5	*
33	BB	1947	M	-	None	Idiopathic (59y)	<0.5	Homo
34	CC-5	2004	M	+	ITP + AIHA (7m)		<0.5	CH
35	DD	2007	F	-	USS (15d)		<0.5	CH
36	EE	2003	M	+	DIC (newborn)		<0.5	Homo
37	FF	1991	F	+	CR-TTP (6y)		<0.5	Homo

CH: Compound Heterozygotes, Homo: Homozygotes

図14 本邦 USS 患者分布と ADAMTS13 遺伝子異常

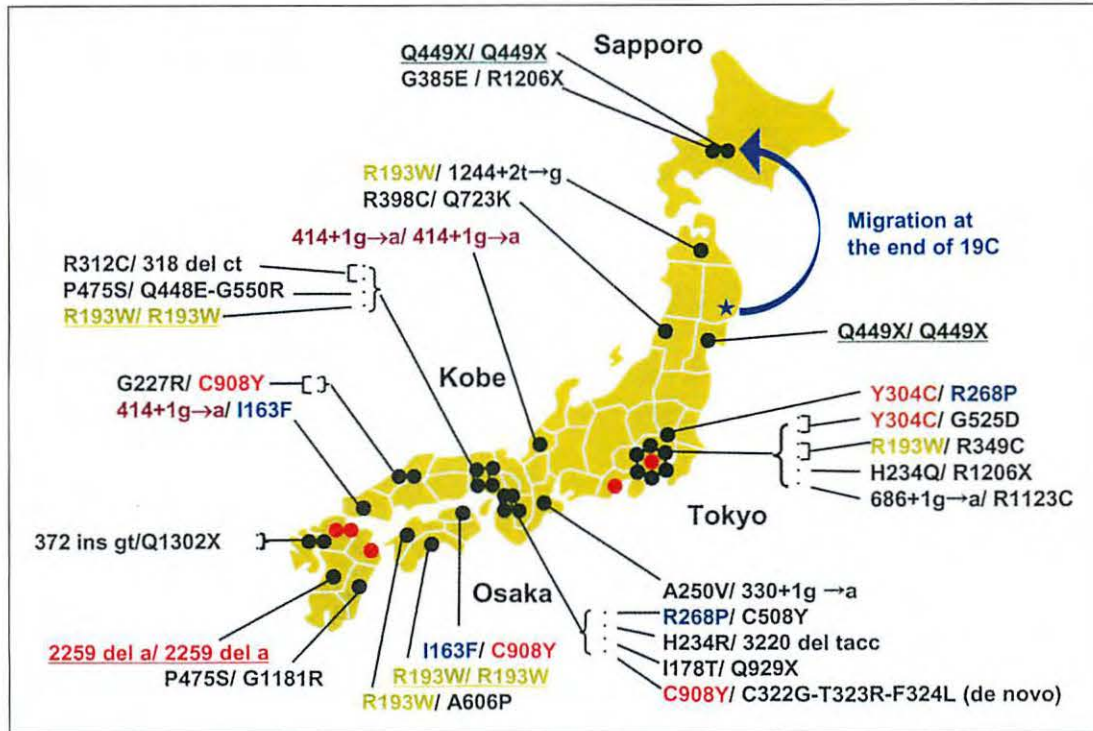


表3 本邦 USS 27 家系で発見された ADAMTS13 遺伝子異常

R193W	7	(n=25)	R312C	1	3220 del tacc	1
Q449X	4		318 del ct	1	I178T	1
414+1g→a	3		Q448E-G550R	1	Q929X	1
C908Y	3		1244+2t → g	1	C322G-T323R-F324L (de novo)	1
R268P	2		R398C	1	G385E	1
Y304C	2		Q723K	1	R1206X	1
I163F	2		G227R	1	(n=26)	
2259 del a	2	372 ins gt	1	Total n=54		
(common SNP)		Q1302X	1			
P475S	2	A606P	1			
G1181R	1	G525D	1			
		R349C	1			
		H234Q	1			
		R1206X	1			
		686+1g → a	1			
		R1123C	1			
		A250V	1			
		330+1g → a	1			
		C508Y	1			
		H234R	1			

2001年に報告した患者 (USS-FF) と全く同じ Q449X ホモ変異を示す患者を、我々も別患者 (USS-B) で発見している³²⁾。これらの両患者家系のルーツは東北のある地方に限定されて

おり⁵⁴⁾。また国内外の他所では報告されていないので、「この地方に限定される特異的変異」と考えている。Q449X 変異を示すアレル数は 4 (54 アレル中) であった。一方、最も多く

見られたのは R193W ミスセンス変異で、本州と四国に広範囲に分布し、内訳は R193W のホモ変異が 2 例、R193W と他の複合ヘテロ変異が 3 例で、アレル数は 7 (54 アレル中) であった。前記 54 アレル数の内訳は表 3 の如くで、アレル数が 2 以上のものは前述の R193W 以下 8 種類であった。また、common SNP は P475S と G1181R が、それぞれアレル数 2 と 1 で発見された。一方、責任変異と判定されたそれぞれアレル数 1 の変異が、計 26 個同定された。この中で一つは、連続 3 アミノ酸残基の変異 (C322G-T323R-F324L) を伴う *de novo* 変異であった⁵⁵⁾。これらの SNP や責任変異で注目すべきは、まず SNP である P475S と G1181R は中国人と韓国人に、さらに責任変異である R268P 変異はカリブ海のハイチ人患者に、また R349C と 330+1 g→a 変異はそれぞれ、香港-中国人と韓国人にあることが最近報告されている。しかし、これらいずれの変異も欧米人では全く認められていないので、アジア人特有変異と考えられる点も興味深い。

本邦 USS 患者の臨床病態解析は、同定した 37 例の USS 患者の genotype-phenotype 解析の一端である。前記の Q449X ナンセンス変異の地域限局性の観察もこの一例であるが、このほか以下の臨床病態が明らかになった。

① 新生児期重症黄疸：USS の hallmark とされてきた、「交換輸血が必要とされるような新生児期重症黄疸」は 37 例中 16 例 (43%) のみに見られた。

② 小児期の反復性血小板減少症状：37 例中 29 例 (78%) と高率に観察された。しかし、残り 8 例については、この時期に「血小板数の計測がなされた機会があったか否か?」-これ自体が不明であった。また、これらの血小板減少症は USS 患者の多くで小児期に ITP と誤診断されていた。

③ 妊娠時血小板減少：異なる 6 家系 9 症例において、計 16 回の妊娠歴が確認された。驚いたことに、これらの妊婦では ADAMTS13 変異遺伝子型に関係なく、妊娠中・後期に血小

板減少が全例に観察された。また、うち 6 回で TTP を発症していた。しかし幸いなことに、いずれも血漿交換療法で救命されていた。一方、児側では 8 例が死産もしくは生誕直後に死亡していた。残りの 8 例はすべて帝王切開で生まれるも、全例未熟児であった。生児 8 例のうち、2 例は母体に新鮮凍結血漿 (FFP) 投与、2 例は FFP 非投与、さらに 4 例はアスピリン服用下に誕生している (図 15)⁵⁶⁾。

④ 女性優位：USS は常染色体劣性遺伝なので、患者の男女比は 1 対 1 となるべきであるが、実数は男女比が 14 対 23 で、圧倒的に女性優位である。

⑤ FFP による発症予防：37 例中 22 例が FFP による ADAMTS13 酵素の補充療法を 2 週間毎に受けていたが、うち 2 例は重篤な血漿アレルギー反応があるため、入院治療を余儀なくされていた。

(2) 後天性 TMA

後天性 TMA には、基礎疾患がなく発症する特発性と、膠原病、薬剤、悪性腫瘍、造血幹細胞移植などに伴って発症する二次性が存在する。表 1 に示すように当ラボで集積した TMA のうち、後天性 TMA は 821 例であった。

i) 特発性 TTP

特発性 TTP は、ADAMTS13 に対する自己抗体 (インヒビター) によって ADAMTS13 活性が著減する症例が多い。世界各国からの報告によると、特発性 TTP での ADAMTS13 活性著減症例の割合は 33%~100% であり⁵⁷⁾、我々の経験の 275 例中 187 例 (68%) は中間的な数字である。当初インヒビターは IgG 型と報告されたが⁵⁸⁾、その後 IgM⁵⁹⁾ や IgA 型⁶⁰⁾ も報告されている。我々は特発性 TTP 患者における IgG 型インヒビターの認識部位を確認するため、エピトープマッピングを行った³¹⁾ (図 8)。その結果、検索可能であった 4 例すべての IgG 型インヒビターは、システインリッチ/スパーサードメインを認識することを世界で初めて報告した。また、診断時の ADAMTS13 活性とインヒビターの結果と短期予後を解析し

図15 妊娠時に初めて USS と診断された症例 (Family L)

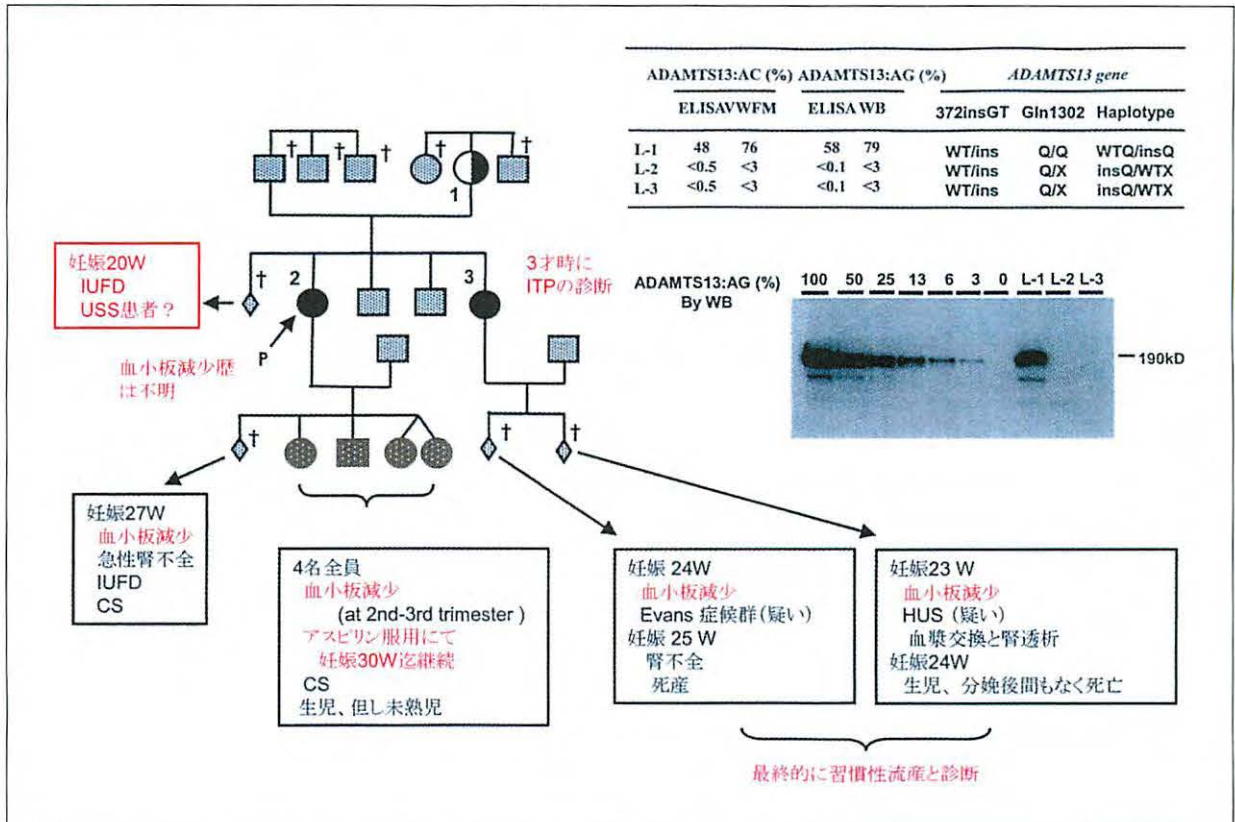


表 4 TTP の治療

1. 血漿交換 (Plasma Exchange, PE)
2. 血漿輸注 (先天性TTP)
3. 免疫抑制療法 (ステロイド<パルス>療法)
4. 抗血小板療法 (血小板数~5万以上に回復時)
 - 1) アスピリン
 - 2) ジピリダモール
5. 難治再発例
 - 1) シクロスポリン(CyA) (保険適用外)
 - 2) シクロフォスファミド(CPA) (保険適用外)
 - 3) ビンクリスチン(VCR) (保険適用外)
 - 4) リツキシマブ (保険適用外)
 - 5) 摘脾: リツキシマブ以降は実施例は少ない模様

たところ, ADAMTS13 活性が 3% 未満に著減しインヒビターを認める 12 例中 10 例が血漿交換治療などで完全寛解に達したが, 同活性が 3% 以上の症例では 6 例中 4 例が死亡し, 予後が悪いことが判明した⁶¹⁾.

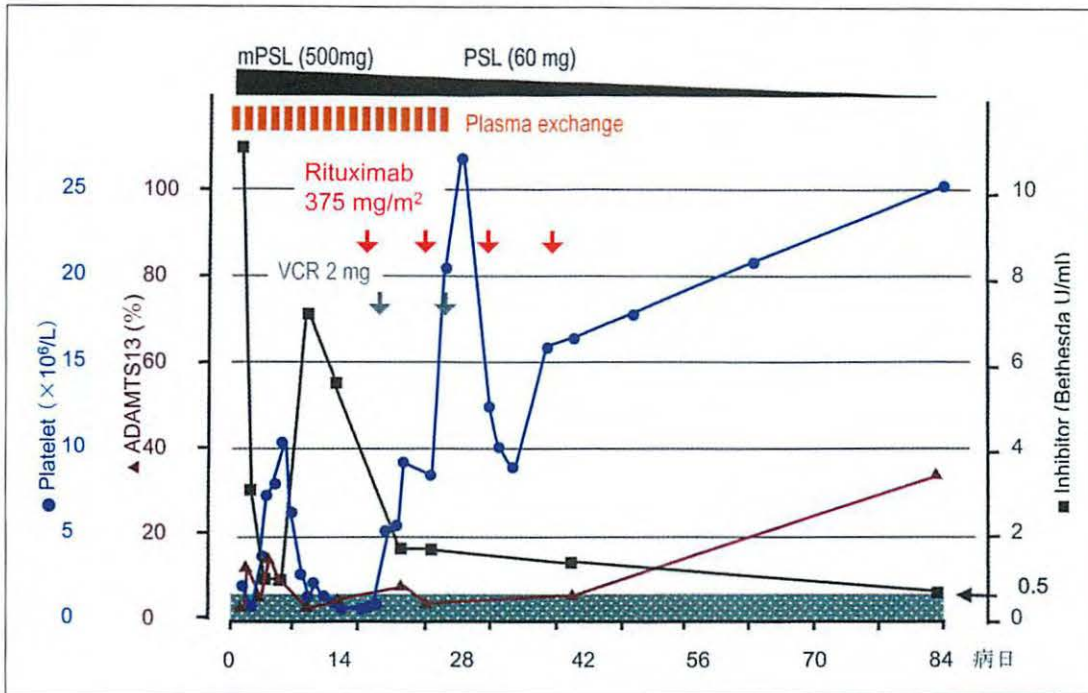
【難治性 TTP】

特発性 TTP の治療は表 4 に示す如くであ

る. 通常は血漿交換療法 (とステロイド併用療法) が卓効する. しかし, 特に難治性のものがあり, 血漿交換療法に抵抗性を示す.

最近我々は, かかる難治性 TTP 患者の中に, 血漿交換にて術後むしろインヒビター (IgG) 力価が急上昇するものがあることを 4 例経験した. かかる例にはいずれも抗 CD20 キメラ抗

図16 リツキサンとビンクリスチンの併用が奏効した難治性 TTP (文献⁶²⁾より引用)



26歳男性の後天性・特発性 TTP に対し、血漿交換療法は初期に有効であったが、間もなく治療抵抗性となり、検索結果にて ADAMTS13 インヒビター力価の急上昇が確認され、リツキサンとビンクリスチンによる抗体産生抑制を行いつつ血漿交換療法を行ったところ、急激な症状回復が確認された。

表5 チクロピジンとクロピドグレルによる TMA の臨床所見の比較

	All Patients (n = 128)	Thienopyridine Rx ≤14 Days (n = 35)	Thienopyridine Rx >14 Days (n = 93)	Ticlopidine (n = 93)	Clopidogrel (n = 35)	ADAMTS13 Deficient (n = 26)	ADAMTS13 Nondeficient (n = 13)
Mean age, yrs (SD)	62.4 (13.9)	59.8 (13.2)	63.4 (14.1)	64.2 (12.9)	58.1 (15.3)	67.1 (12.0)	60.3 (20.2)
Male	53.7%	57.1%	52.3%	53.4%	54.3%	46.2%	61.5%
Thienopyridine Rx ≤14 days	27.3%	—	—	9.7%*	74.3%*	15.4%	38.5%
Thienopyridine Rx >14 days	72.7%	—	—	90.3%	25.7%	84.6%	61.6%
ADAMTS13 deficient	66.7%	44.4%	73.3%	80%*	22.2%		
Platelet count <20,000/mm ³	77.3%	65.7%†	81.7%†	83.9%*	60.0%*	96.2%*	38.5%*
Creatinine >2.5 mg/dl	35.6%	41.9%	32.9%	27.8%*	55.2%*	26.9%	46.2%
Abnormal neurologic findings	29.1%	33.3%	27.3%	27.8%	32.3%	19.2%	15.4%
Received TPE	76.6%	74.3%	77.4%	74.2%	82.9%	84.6%	92.3%
Survival	74.2%	77.1%	73.1%	75.3%	71.4%	84.6%	61.5%

*p < 0.05; †p < 0.07.
Rx = treatment; TPE = therapeutic plasma exchange; TTP = thrombotic thrombocytopenic purpura.

体であるリツキサンの投与でBリンパ球の抗体産生を抑制し、一方で血漿交換療法を併用することが卓効することを示した (図16)⁶²⁾。

ii) 二次性 TMA

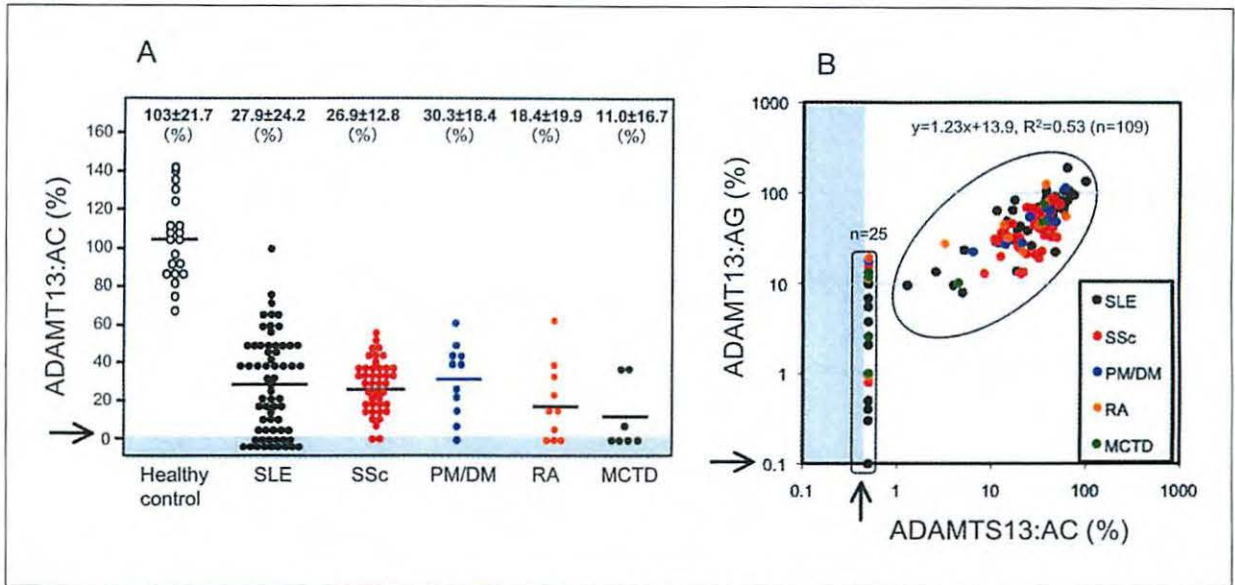
二次性 TMA の中で、悪性腫瘍、造血幹細胞移植後、また HUS と診断される大腸菌 O157 感染合併例などでは、ADAMTS13 活性

の著減例は殆どなかった。一方、抗血小板薬であるチクロピジン内服や膠原病に合併したものでは、活性著減例が認められた。後者の2疾患について述べる。

【薬剤性 TMA】

チクロピジンとその後継薬であるクロピドグレルは共にチエノピリジン誘導体に属する抗血

図17 膠原病合併 TMA における ADAMTS13 解析



A：膠原病合併 TMA 134 例 [SLE 64 例，全身性硬化症 (SSc) 42 例，多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) 11 例，関節リウマチ (RA) 10 例，混合性結合組織病 (MCTD) 7 例] で ADAMTS13 活性を解析し，健常者より有意の低下と 0.5% 未満の著減例を 25 例確認した。
 B：ADAMTS13 活性と抗原を比較し，著減例では活性と抗原が一致しないことを確認した。

血小板で，その使用頻度はアスピリンに次いで世界中で広く使用されている。チクロピジンについてはその薬物の重篤副作用として TTP 発症がよく知られているが，クロピドグレルはその頻度ははるかに少ないと言われている。我々は，米国の Northwestern 大学の Bennett CR 教授と日米共同研究 (surveillance, epidemiology, and risk factors for TTP: SERF-TTP) を行い，チクロピジン TMA は ADAMTS13 活性著減症例が多く，また内服後 2 週以降から約 1 ヶ月の間に発症する例が殆どで，一方，クロピドグレル TMA では ADAMTS13 著減例は少ないこと，また内服後 2 週以内に発症する例が多いことを明らかにした (表 5)⁶³⁾。

【膠原病合併 TMA】

膠原病に TMA が合併することは従来から広く知られていたが，その病態については全く明らかにされていない。我々は，奈良医大輸血部で集積した膠原病合併 TMA 134 例 [全身性エリテマトーデス (SLE) 64 例，全身性硬化症 (SSc) 42 例，多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) 11 例，関節リウマチ (RA) 10 例，混合

性結合組織病 (MCTD) 7 例] について検討した⁶⁴⁾。このうち，IgG 型 ADAMTS13 インヒビターの発現により，ADAMTS13 活性が著減する定型的 TTP 例が 25 例 (19%) あり，その他の 109 例 (81%) は同活性が著減しない非定型的 TTP であることを明らかにした (図 17)⁶⁴⁾。すなわち，膠原病合併 TMA のメジャーは非定型的 TTP で，定型的 TTP をメジャーとする特発性 TTP とは異なる。この理由として，ADAMTS13 が有効に働くためには，同酵素が血管内皮細胞表面に固相化され，同細胞から放出される UL-VWFM を効果的に切断することが予測されているので，膠原病合併 TMA で非定型的 TTP が多い理由として，血管内皮障害による ADAMTS13 の有効利用障害が考えられた。

2) 肝臓とその他臓器 (脾臓，心臓) における微小循環障害

冒頭に述べた如く，我々は極めて早い時期から肝臓が ADAMTS13 の主要産生臓器と考えていたため，まず造血幹細胞移植後の VOD

の解析を行い、その後、生体肝移植、慢性肝硬変、アルコール性肝炎、重症急性膵炎での ADAMTS13 解析を行った。そしてこれらに並行して虚血性心疾患についても検討した。

(1) 造血幹細胞移植後 VOD

造血幹細胞移植 (stem cell transplantation: SCT) 後の VOD は、通常移植後 1 ヶ月以内に黄疸、有痛性肝腫大、腹水を来す致死的な合併症であり、組織学的には中心静脈周囲の肝細胞壊死、類洞周囲の線維化ならびに中心静脈の閉塞を特徴とする。本症の発症機転として、SCT 前に施行される強力な化学療法、放射線照射が、類洞内皮細胞障害を引き起こし中心静脈周囲の循環障害をもたらすと考えられている。我々は、SCT 前後を通じて血漿 ADAMTS13 活性は、VOD 発症群では術前から 12%~32% と低値で、これが 4 週間後には最低値になること、一方、非発症群では術前の活性は 57%~78% と高値で、術後 2 週間で一過性の「低下はあるものの、4 週間後には正常値に復することを報告した (図 18)⁶⁵⁾。これより、VOD の発症機転として、移植直前の強力な化学療法や全身放射線療法にて肝臓と血管内皮細胞障害がもたらされるが、移植後、血管内皮細胞機能が復すると、大量の UL-VWFM が血中に放出されるが、肝障害が強く、ADAMTS13 産生能が十分回復していない場合にはこの大量の UL-VWFM の酵素消化処理ができなくなり、血小板血栓を来すと考えた。そこで次に前方視的研究を行い、移植前から FFP の予防投与を行った群 (n=59) では VOD 発症が一例も見られなかったのに対し、FFP 非投与群 (n=173) では 14 例 (7.3%, p<0.05) に VOD が発症し、FFP の予防投与が VOD 発症を抑制することを多施設無作為試験にて明らかにした (表 6)⁶⁶⁾。

(2) 生体肝移植

先天性胆道閉鎖症の肝硬変末期患者に生体肝移植を行うと、術後回復するにつれ ADAMTS13 活性が上昇する (前述)。一方、他家によって、肝移植後早期の術後 1 週間以内に血小板減少が見られ、その程度が高度な例ほ

ど移植後の予後が不良であるとの成績が出されている。

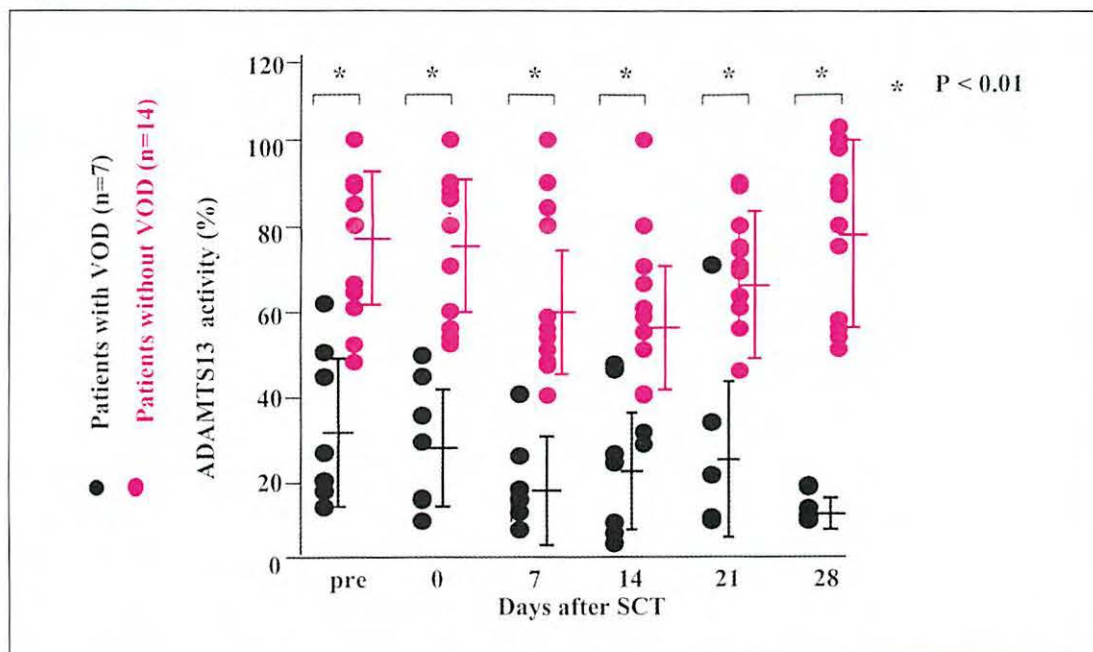
我々は、計 5 例の生体肝移植患者において、移植早期に血小板減少を来し、その時点での ADAMTS13 活性が著しく低下しているも、同インヒビターは陰性であることを確認した。またかかる低下例に FFP を連日大量に投与し、ADAMTS13 酵素の補充療法を続けたところ、ADAMTS13 活性の自力回復と平行して血小板数も正常に復することを報告した⁶⁷⁾。これら 5 例全例は、術後血小板輸血を全く行わずに、FFP 連日投与のみで血小板数が正常化した。移植患者では術後、10 日~1 ヶ月後ぐらいまで、症状増悪時には UL-VWFM が検出されていた。血小板減少が虚血再還流障害や急性拒絶などのグラフト機能不全と密に関連することが想定されており、このようなグラフト機能不全は血管内皮細胞障害によってもたらされ、虚血再還流後の肝類洞内皮細胞への血小板粘着は、類洞内皮細胞に発現する VWF 抗原量と密に関連する。移植後早期の血小板減少ならびにグラフト機能不全の機序は十分解明されていないので今後の検討課題ではあるが、ADAMTS13 活性と VWF 抗原の動態は、肝移植後早期におけるグラフト機能不全の早期診断ならびに適切な治療方針を決定する上で有用なマーカーとなり得るものと考えた。

(3) 慢性肝疾患

肝硬変における ADAMTS13 活性に関しては、最近まで、鋭敏性を欠く collagen binding assay を用いた ADAMTS13 活性測定にて、健常者に比し低値を示すという報告⁶⁸⁾⁶⁹⁾ や、高低幅広く分布し差はないという報告⁷⁰⁾ があり、一定した見解は得られていなかった。

筆者らは慢性肝炎 33 例、肝硬変 105 例において、act-ELISA 法と VWFM 法を用いて ADAMTS13 活性を測定した結果、両方の結果は良好に相関し、慢性肝炎、肝硬変 Child A から Child C と病態が進展するにつれて有意に低下することを示した (図 19~21)⁷¹⁾。矢印で示す Child C の 5 例では酵素活性 3% 以下

図18 造血幹細胞移植後 VOD における ADAMTS13 活性の推移



VOD 発症例では非発症例と比較して、ADAMTS13 活性の有意な低下が移植前から認められた。

表6 FFP 投与・非投与群における VOD 発症頻度比較

	FFP (-)	FFP (+)	P-value
無作為試験	3 ^a /20 ^b (15%)	0/23 (0%)	0.092
アンケート調査	11/173 (6.4%)	0/36 (0%)	0.120
Total	14/193 (7.3%)	0/59 (0%)	0.033

^a 肝 VOD 発症例
^b 肝 VOD ハイリスク例

↓

FFP の予防的投与は、SCT 後の肝 VOD 発症を予防できる。

と著減しており、うち 1 例は TTP 合併 C 型肝硬変であった⁷²⁾。さらに、ELISA 法⁷³⁾で測定した ADAMTS13 抗原は本酵素活性と良好に相関し、抗原も活性と同様の推移を示した。この際、ADAMTS13 活性は、肝予備能、貧血、血小板減少、脾腫大、腎機能障害および炎症反応の程度と関連し、多変量解析の結果、肝の重症度 (Child score) と脾腫の程度が本酵素活性低下に寄与する独立因子であった⁷¹⁾。

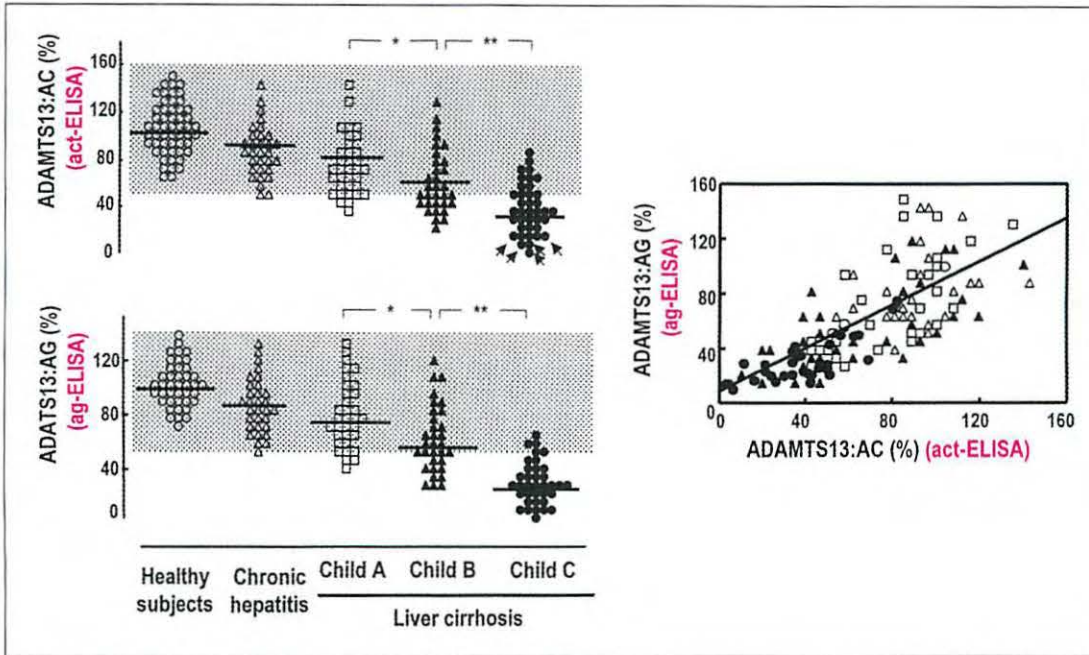
ADAMTS13 の基質である VWF 抗原は、慢性肝炎では健常者の約 2.5 倍、肝硬変では約 3 倍～5 倍増加しており、Child C の中に

は 10 倍高値を示す例も見られた。VWF の血小板凝集能を反映する VWF リストセチンコファクター (VWF:RCo) も肝硬変では健常者の約 2 倍上昇しており、酵素・基質比 (VWF:RCo/ADAMTS13 活性比) は健常者 1.0 に比し、肝硬変 Child A 1.6, Child B 5.0, Child C 16.8 と上昇しており、進展した肝硬変は ADAMTS13 活性と VWF 抗原量の高度な不均衡状態にあることが明らかとなった⁷¹⁾。

(4) アルコール性肝炎

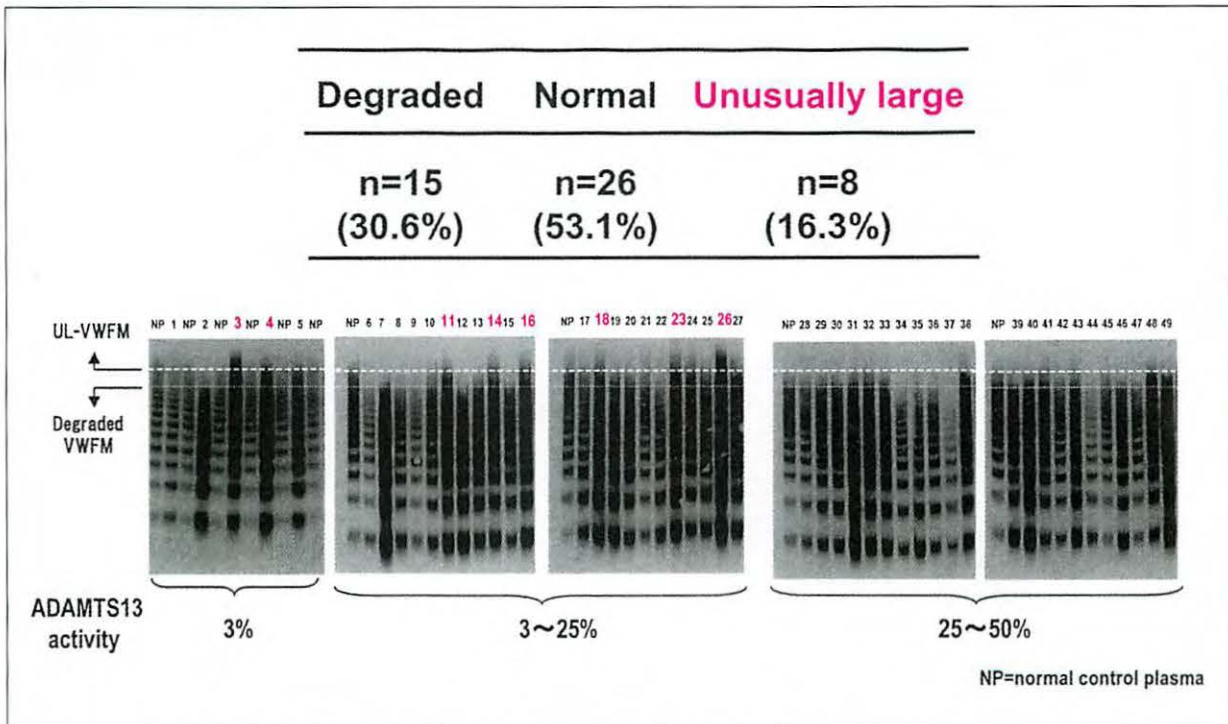
アルコール性肝炎、特に重症アルコール性肝炎 (severe alcoholic hepatitis: SAH) は、劇

図19 肝硬変での ADAMTS13 活性と抗原



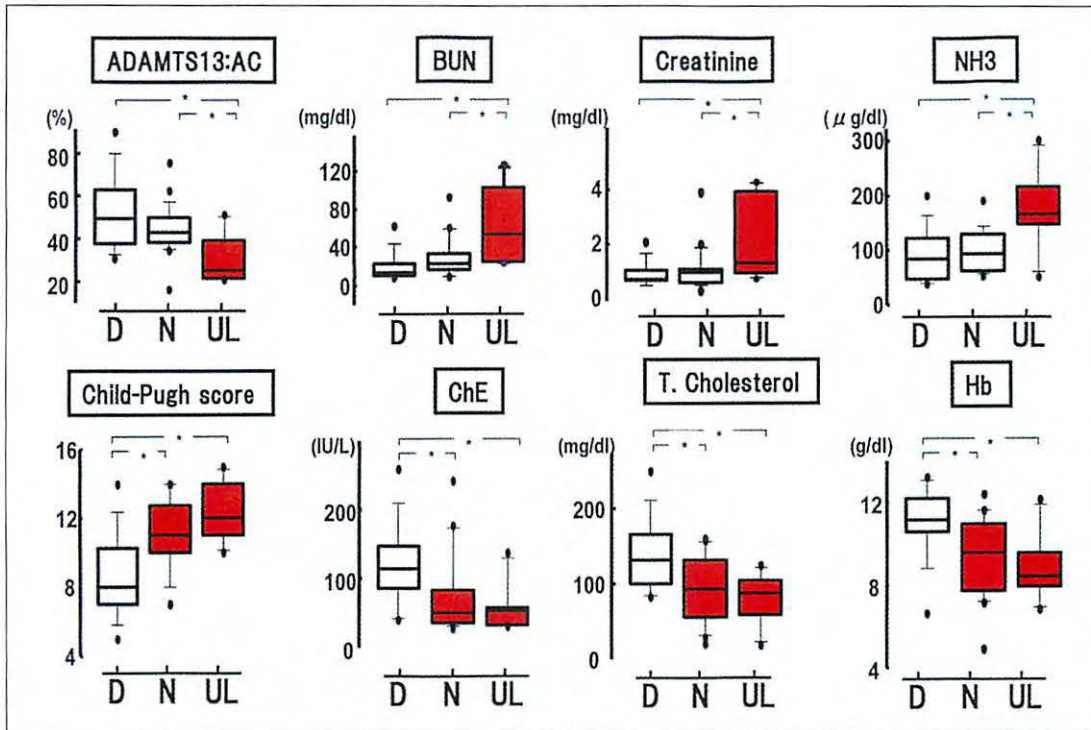
ADAMTS13 活性は慢性肝炎、肝硬変 Child A から Child C と病態の進展と共に低下した。また、ag-ELISA で測定した ADAMTS13 抗原は本酵素活性と良好に相関した。斜線部は正常範囲を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

図20 肝硬変患者における VWFM 解析



ADAMTS13 活性が 50% 未満の肝硬変患者 49 例で VWFM 解析を行った。その結果、高分子量マルチマーを欠損している (Degraded) 症例 15 例, UL-VWFM を認める症例が 8 例であった。

図21 VWFM のパターンによる臨床検査の比較



VWFM は肝不全が進行するにつれてD群からN群，さらにはUL群へと移行することが予想された。
 D : Degraded, N : Normal, UL : Unusually large

症肝炎に類似し，肝性脳症，肺炎，急性腎不全，消化管出血などの多臓器不全を合併し，多くは1ヵ月以内に死亡する予後不良な疾患である。その成因として，肝網内系機能不全と腸管の透過性亢進に基づくエンドトキシン血症が各種サイトカイン血症の引き金となり，全身炎症性反応，微小循環障害を惹起させ，肝不全や多臓器不全に至らしめると考えられている。

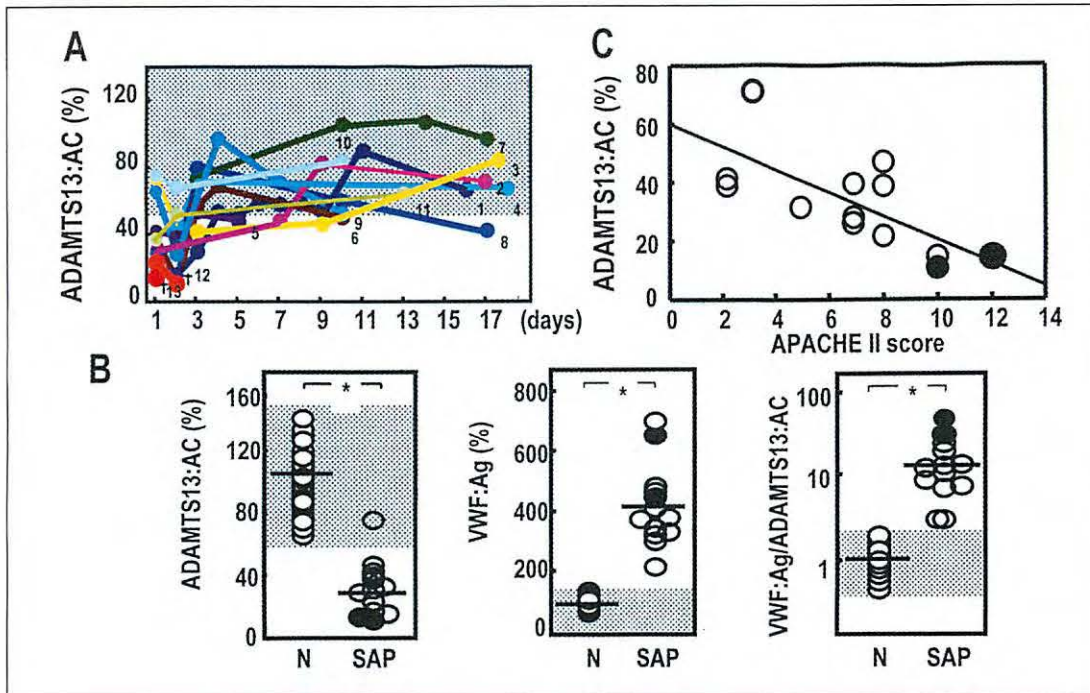
我々は，アルコール性肝炎（AH），SAH（生存2例，死亡3例）の血漿 ADAMTS13 活性を測定した結果，入院時高低幅広く分布するものの健常者に比し有意に低下していた⁷⁴⁾⁷⁵⁾。この際，SAH では AH および肝硬変（Child A/Child B/Child C=5例/3例/2例）に比し低値であり，特に多臓器不全合併死亡例の本酵素活性は著減した。VWF 抗原は健常者に比し AH で約4倍，SAH で約8倍増加しており，VWF 抗原/ADAMTS13 活性比は AH で約10倍，SAH で約100倍高値を示し，特に SAH 死亡例では著増した。また，血小板と最も反応性に富む UL-VWFM は，SAH 5 例中4例，

AH 9 例中5例に検出された。経過観察例において，生存例では ADAMTS13 活性は回復期に上昇し，VWF 抗原は低下するが，SAH 死亡例では本酵素活性の上昇は見られず，VWF 抗原は高値を持続した。また，ADAMTS13 活性の低下は，肝予備能の低下，炎症反応の亢進，腎障害の程度と関連し，VWF 抗原の増加が血小板減少，貧血の程度と関連したことは，本酵素と基質の不均衡がアルコール性肝炎の病態の進展ならびに重症度と密に関連して変動し，予後の指標になる可能性を示唆している。

(5) 重症急性膵炎

急性膵炎は通常軽度～中等度の炎症に留まるが，10～20% が重症化し，重症急性膵炎（SAP）に移行する。SAP は急激に膵組織壊死を来す病態であり，全身炎症性反応が出現し，高率に多臓器不全を来す予後不良な疾患である。最近，急性膵炎の経過中に TTP が発症する例が相次いで報告され，膵虚血・還流障害が重要な発症要因の一つとして注目されている。急性膵炎の重症化は通常，急性膵炎診断後 48 時間以内に

図22 重症急性膵炎における血漿 ADAMTS13 活性と VWF 抗原



A : 重症急性膵炎 13 例における血漿 ADAMTS13 活性の推移. 斜線部は正常範囲を示す.
+ = 死亡例.

B : ADAMTS13 活性は著減し, VWF 抗原は増加する結果, VWF 抗原/ADAMTS13 活性比は 20.8 と著増した.

C : ADAMTS13 活性の低下は APACHE II スコアの上昇と密に関連した ($r = -0.750, p < 0.005$).

N : 健常者, SAP : 重症急性膵炎, * $p < 0.001$, ○ : 生存例, ● : 死亡例

見られ, 重症度は年齢, 肥満度, 多臓器不全の有無等を包含した Ranson スコア, APACHE II スコアおよび厚生省急性膵炎重症度判定基準などにより評価されているが, 簡便な重症化の指標がなく, SAP 早期診断のマーカーが望まれている.

我々は SAP 13 例 (生存 11 例, 死亡 2 例) の血漿 ADAMTS13 活性を測定した結果, SAP 生存例では入院第 2 病日に最低値 (32%) に達した後, 徐々に回復したが, 死亡例では第 1~2 病日に 10%~15% と著減した⁷⁶⁾ (図 22). この際, 多臓器不全合併例の本酵素活性は 17% と非合併例の 40% に比し著減した. 入院 48 時間以内の ADAMTS13 活性の最低値は 28%, VWF 抗原の最高値は 423% であり, VWF 抗原/ADAMTS13 活性比は正常 1.0 に比し 20.8 と著増した (図 22). ADAMTS13 活性の低下は APACHE II スコアの上昇, 血漿 IL-6

および IL-8 の上昇と密に関連した. さらに, 血小板と最も反応性に富む UL-VWFM は, ADAMTS13 活性高度低下例, 高度な低 Ca 血症, acidosis ならびに高サイトカイン血症合併例に高率に検出された. 以上より, ADAMTS13 活性の著減, VWF 抗原の著増ならびに UL-VWFM の出現は, SAP の成因と関連した早期診断ならびに予後の指標の一つになり得る可能性を示した.

(6) 虚血性心疾患

急性心筋梗塞 (AMI) は冠血管の急激な閉塞によって起こる病態であり, VWF 依存性のずり応力惹起血小板凝集は冠動脈血栓形成の初期段階であり, AMI を引き起こす重要な因子と考えられている. 我々は, AMI 発症時に大腿静脈, 大動脈本幹, 冠状静脈洞の 3 部位より採血し, Percutaneous Coronary Intervention (PCI) 前後および慢性期で比較した結果, PCI

前, VWF 抗原は3部位とも同程度に増加しており, PCI 後には慢性期とほぼ同レベルにまで低下すること, ADAMTS13 活性は急性期および慢性期で差は見られないものの, VWF 抗原/ADAMTS13 活性比は, PCI 前, 健常者に比し高値を示した. これらの結果は, AMI 発症時には冠循環のみならず全身循環血液中の血小板凝集能亢進を反映しており, 本酵素活性と基質の不均衡は AMI 発症の危険因子となる可能性を示唆している⁷⁾.

5. 動脈血栓克服に向けて

我々は「VWF の構造・機能相関の基礎研究」の時期を経て, 「先天性 ADAMTS13 活性欠損症 (USS, 先天性 TTP) の病態解析」に至り, これを基盤に「ADAMTS13 活性迅速測定法の開発」を行ってきた. これにて血栓性微小血管障害症 (TMA) 全体の病態解析はもちろんのこと, 今まで想定しなかった動脈血栓性の疾患群が「ADAMTS13 とその基質である超高分子量 VWF マルチマー (UL-VWFM) の量的不均衡」によって生じていることを明らかにした. このように, 本研究で取り扱う疾患群の範囲の拡大については, まさに「目から鱗が落ちる」の心境である. 本研究でもたらされた成果を今後さらに進展させ, 「VWF-GPIb 軸/ADAMTS13 依存性血小板血栓形成」の分子機構をより詳細に明らかにし, 種々の動脈血栓症に対するテーラーメイド仕様の分子標的療法を確立したいと考えている.

文 献

- 1) Sadler JE: von Willebrand factor: two sides of a coin. *J Thromb Haemost* 3: 1702-1709, 2005.
- 2) Fujimura Y, Titani K: Structure and function of von Willebrand factor. *Haemostasis and Thrombosis* 3rd ed, p379-395. Churchill Livingstone, New York, 1994.
- 3) Fujimura Y, Titani K, Holland L Z, Russell S R, Roberts J R, Elder J H, Ruggeri Z M, Zimmerman T S: von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 261: 381-385, 1986.
- 4) Pareti F I, Fujimura Y, Dent J A, Holland L Z, Zimmerman T S, Ruggeri Z M: Isolation and characterization of a collagen binding domain in human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 261: 15310-15315, 1986.
- 5) Fujimura Y, Titani K, Holland L Z, Roberts J R, Kostel P, Ruggeri Z M, Zimmerman T S: A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728. *J Biol Chem* 262: 1734-1739, 1987.
- 6) Fujimura Y, Holland L Z, Ruggeri Z M, Zimmerman T S: The von Willebrand factor domain-mediating botrocetin-induced binding to glycoprotein IB lies between Val449 and Lys728. *Blood* 70: 985-988, 1987.
- 7) Mohri H, Fujimura Y, Shima M, Yoshioka A, Houghten R A, Ruggeri Z M, Zimmerman T S: Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 263: 17901-17904, 1988.
- 8) Sugimoto M, Mohri H, McClintock R A, Ruggeri Z M: Identification of discontinuous von Willebrand factor sequences involved in complex formation with botrocetin. A model for the regulation of von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 266: 18172-18178, 1991.
- 9) Azuma H, Dent J A, Sugimoto M, Ruggeri Z M, Ware J: Independent assembly and secretion of a dimeric adhesive domain of von Willebrand factor containing the glycoprotein Ib-binding site. *J Biol Chem* 266: 12342-12347, 1991.
- 10) Sugimoto M, Ricca G, Hrinda M E, Schreiber A B, Searfoss G H, Bottini E, Ruggeri Z M: Functional modulation of the isolated glycoprotein Ib binding domain of von Willebrand factor expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 30: 5202-5209, 1991.
- 11) Ware J, Dent J A, Azuma H, Sugimoto M, Kyrle

- P A, Yoshioka A, Ruggeri ZM: Identification of a point mutation in type IIB von Willebrand disease illustrating the regulation of von Willebrand factor affinity for the platelet membrane glycoprotein Ib-IX receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2946-2950, 1991.
- 12) Sugimoto M, Dent J, McClintock R, Ware J, Ruggeri ZM: Analysis of structure-function relationships in the platelet membrane glycoprotein Ib-binding domain of von Willebrand's factor by expression of deletion mutants. *J Biol Chem* 268: 12185-12192, 1993.
 - 13) Miura S, Fujimura Y, Sugimoto M, Kawasaki T, Ikeda Y, Titani K, Yoshioka A: Structural elements influencing von Willebrand factor (vWF) binding affinity for platelet glycoprotein Ib within a disperse-digested vWF fragment. *Blood* 84: 1553-1558, 1994.
 - 14) Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, Gros P: Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science* 297: 1176-1179, 2002.
 - 15) Fujimura Y, Titani K, Usami Y, Suzuki M, Oyama R, Matsui T, Fukui H, Sugimoto M, Ruggeri ZM: Isolation and chemical characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 30: 1957-1964, 1991.
 - 16) Usami Y, Fujimura Y, Suzuki M, Ozeki Y, Nishio K, Fukui H, Titani K: Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 928-932, 1993.
 - 17) Yoshida E, Fujimura Y, Miura S, Sugimoto M, Fukui H, Narita N, Usami Y, Suzuki M, Titani K: Alboaggregin-B and botrocetin, two snake venom proteins with highly homologous amino acid sequences but totally distinct functions on von Willebrand factor binding to platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 1386-1392, 1993.
 - 18) Nishida S, Fujimura Y, Miura S, Ozaki Y, Usami Y, Suzuki M, Titani K, Yoshida E, Sugimoto M, Yoshioka A, et al: Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 33: 1843-1849, 1994.
 - 19) Fujimura Y, Ikeda Y, Miura S, Yoshida E, Shima H, Nishida S, Suzuki M, Titani K, Taniuchi Y, Kawasaki T: Isolation and characterization of jararaca GPIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* 74: 743-750, 1995.
 - 20) Kawasaki T, Fujimura Y, Usami Y, Suzuki M, Miura S, Sakurai Y, Makita K, Taniuchi Y, Hirano K, Titani K: Complete amino acid sequence and identification of the platelet glycoprotein Ib-binding site of jararaca GPIb-BP, a snake venom protein isolated from *Bothrops jararaca*. *J Biol Chem* 271: 10635-10639, 1996.
 - 21) Fujimura Y, Usami Y, Titani K, Niinomi K, Nishio K, Takase T, Yoshioka A, Fukui H: Studies on anti-von Willebrand factor (vWF) monoclonal antibody NMC-4, which inhibits both ristocetin- and botrocetin-induced vWF binding to platelet glycoprotein Ib. *Blood* 77: 113-120, 1991.
 - 22) Fujimura Y, Miyata S, Nishida S, Miura S, Kaneda M, Yoshioka A, Fukui H, Katayama M, Tuddenham EG, Usami Y, et al: The interaction of botrocetin with normal or variant von Willebrand factor (types IIA and IIB) and its inhibition by monoclonal antibodies that block receptor binding. *Thromb Haemost* 68: 464-469, 1992.
 - 23) Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL: Platelets and shear stress. *Blood* 88: 1525-1541, 1996.
 - 24) Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM: Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84: 289-297, 1996.
 - 25) Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Miyata S, Yoshioka A: Cytosolic calcium changes in a process of platelet adhesion and cohesion on a von Willebrand factor-coated surface under flow conditions. *Blood* 94: 1149-1155, 1999.

- 26) Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Matsui H, Mizuno T, Miyata S, Yoshioka A: Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 329-334, 2002.
- 27) Sugimoto M, Tsuji S, Kuwahara M, Matsui H, Miyata S, Fujimura Y, Yoshioka A: Shear-dependent functions of the interaction between soluble von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib in mural thrombus formation on a collagen surface. *Int J Hematol* 69: 48-53, 1999.
- 28) Sugimoto M, Miyata S: Functional property of von Willebrand factor under flowing blood. *Int J Hematol* 75: 19-24, 2002.
- 29) Tsuji S, Sugimoto M, Kuwahara M, Nishio K, Takahashi Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Yoshioka A: Role and initiation mechanism of the interaction of glycoprotein Ib with surface-immobilized von Willebrand factor in a solid-phase platelet cohesion process. *Blood* 88: 3854-3861, 1996.
- 30) 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: 3604-3610, 2002.
- 31) Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, Nozaki C, Miyata T, Fujimura Y, Nakagaki T: ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* 102: 3232-3237, 2003.
- 32) Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, Tamai H, Konno M, Kamide K, Kawano Y, Miyata T, Fujimura Y: Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11902-11907, 2002.
- 33) Matsumoto M, Chisuwa H, Nakazawa Y, Ikegami T, Hashikura Y, Kawasaki T, Yagi H, Ishizashi H, Matsui T, Titani K, Fujimura Y: Liver transplantation rescues a deficient state of von Willebrand factor-cleaving protease activity in patients with liver cirrhosis due to congenital biliary atresia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 96: 636a, 2000.
- 34) Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D: Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 98: 1662-1666, 2001.
- 35) Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M: Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 98: 1654-1661, 2001.
- 36) Soejima K, Mimura N, Hirashima M, Maeda H, Hamamoto T, Nakagaki T, Nozaki C: A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem (Tokyo)* 130: 475-480, 2001.
- 37) 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 Jr, Ginsburg D, Tsai HM: Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 413: 488-494, 2001.
- 38) Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K: Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS 13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 276: 41059-41063, 2001.
- 39) Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto TA, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y: Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 106: 922-924, 2005.
- 40) Furlan M, Robles R, Lammle B: Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by *in vivo* proteolysis. *Blood* 87: 4223-4234, 1996.
- 41) Tsai HM: Physiologic cleavage of von Wille-

- brand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 87: 4235–4244, 1996.
- 42) 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* 103: 607–612, 2004.
 - 43) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T: FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 129: 93–100, 2005.
 - 44) Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y: Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* 46: 1444–1452, 2006.
 - 45) 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: 1295–1298, 2008.
 - 46) Hobbs II W, Lopez J: Shear elegance: regulation of thrombus growth by shear stress. *Blood* 111: 972, 2008.
 - 47) Moake J L: Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 347: 589–600, 2002.
 - 48) Schulman I, Pierce M, Lukens A, Currimbhoy Z: Studies on thrombopoiesis. I. A factor in normal human plasma required for platelet production: chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood* 16: 943–957, 1960.
 - 49) Upshaw J D Jr: Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med* 298: 1350–1352, 1978.
 - 50) Moake J L, Rudy C K, Troll J H, Weinstein M J, Colannino N M, Azocar J, Seder R H, Hong S L, Deykin D: Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 307: 1432–1435, 1982.
 - 51) Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammle B: Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 89: 3097–3103, 1997.
 - 52) Kinoshita S, Yoshioka A, Park Y D, Ishizashi H, Konno M, Funato M, Matsui T, Titani K, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y: Upshaw-Schulman syndrome revisited: a concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 74: 101–108, 2001.
 - 53) Sasahara Y, Kumaki S, Ohashi Y, Minegishi M, Kano H, Bessho F, Tsuchiya S: Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Int J Hematol* 74: 109–114, 2001.
 - 54) Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, Miura M, Hayashi S, Fujii Y, Iwai A, Ito E, Tsuji Y, Takeda-Shitaka M, Iwadate M, Umeyama H, Yagi H, Ishizashi H, Banno F, Nakagaki T, Miyata T, Fujimura Y: Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood* 103: 1305–1310, 2004.
 - 55) Kokame K, Aoyama Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T: Inherited and *de novo* mutations of ADAMTS13 in a patient with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost* 6: 213–215, 2008.
 - 56) Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, George J N: 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*: 2008. (in press)
 - 57) Sadler J E: Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 112: 11–18, 2008.
 - 58) Tsai H M, Lian E C: Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 339: 1585–1594, 1998.
 - 59) Scheiflinger F, Knobl P, Trattner B, Plaimauer

- B, Mohr G, Dockal M, Dorner F, Rieger M: Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 102: 3241-3243, 2003.
- 60) Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M, Mudde G, Wolf M, Coppo P, Girma J P, Azoulay E, Brun-Buisson C, Fakhouri F, Mira J P, Oksenhendler E, Poullin P, Rondeau E, Schleinitz N, Schlemmer B, Teboul J L, Vanhille P, Vernant J P, Meyer D, Veyradier A: Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity. *Blood* 109: 2815-2822, 2007.
- 61) Mori Y, Wada H, Gabazza E C, Minami N, Nobori T, Shiku H, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y: Predicting response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF-cleaving protease activity. *Transfusion* 42: 572-580, 2002
- 62) Kaneko H, Matsumoto M, Okamoto K, Chyonabayashi K, Hishizawa M, Watanabe M, Fujimura Y, Tsudo M: Refractory thrombotic thrombocytopenic purpura successfully treated with a combination of rituximab and vincristine. *Rinsho Ketsueki* 48: 144-147, 2007.
- 63) Bennett C L, Kim B, Zakarija A, Bandarenko N, Pandey D K, Buffie C G, McKoy J M, Tevar A D, Cursio J F, Yarnold P R, Kwaan H C, De Masi D, Sarode R, Raife T J, Kiss J E, Raisch D W, Davidson C, Sadler J E, Ortel T L, Zheng X L, Kato S, Matsumoto M, Uemura M, Fujimura Y: Two mechanistic pathways for thienopyridine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura: a report from the SERF-TTP Research Group and the RADAR Project. *J Am Coll Cardiol* 50: 1138-1143, 2007.
- 64) Matsuyama T, Matsumoto M, Isonishi A, Inokuma S, Fujimura Y: Analysis of ADAMTS13 and Its IgG-Autoantibodies in 170 Patients with Connective Tissue Disease-Associated Thrombotic Microangiopathy Indicates More Than 2 Types on Its Pathogenesis. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 111: 1322, 2007.
- 65) Park Y D, Yoshioka A, Kawa K, Ishizashi H, Yagi H, Yamamoto Y, Matsumoto M, Fujimura Y: Impaired activity of plasma von Willebrand factor-cleaving protease may predict the occurrence of hepatic veno-occlusive disease after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29: 789-794, 2002.
- 66) Matsumoto M, Kawa K, Uemura M, Kato S, Ishizashi H, Isonishi A, Yagi H, Park Y D, Takeshima Y, Kosaka Y, Hara H, Kai S, Kanamaru A, Fukuhara S, Hino M, Sako M, Hiraoka A, Ogawa H, Hara J, Fujimura Y: Prophylactic fresh frozen plasma may prevent development of hepatic VOD after stem cell transplantation via ADAMTS13-mediated restoration of von Willebrand factor plasma levels. *Bone Marrow Transplant* 40: 251-259, 2007.
- 67) Ko S, Okano E, Kanehiro H, Matsumoto M, Ishizashi H, Uemura M, Fujimura Y, Tanaka K, Nakajima Y: Plasma ADAMTS13 activity may predict early adverse events in living donor liver transplantation: observations in 3 cases. *Liver Transpl* 12: 859-869, 2006.
- 68) Mannucci P M, Canciani M T, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E: Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 98: 2730-2735, 2001.
- 69) Feys H B, Canciani M T, Peyvandi F, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, Mannucci P M: ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol* 138: 534-540, 2007.
- 70) Lisman T, Bongers T N, Adelmeijer J, Janssen H L, de Maat M P, de Groot P G, Leebeek F W: Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology* 44: 53-61, 2006.
- 71) Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Matsuyama T, Isonishi A, Ishikawa M, Yagita M, Morioka C, Yoshiji H, Tsujimoto

- T, Kurumatani N, Fukui H: Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 99: 1019–1029, 2008.
- 72) Yagita M, Uemura M, Nakamura T, Kunitomi A, Matsumoto M, Fujimura Y: Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Hepatol* 42: 420–421, 2005.
- 73) Yagi H, Ito S, Kato S, Hiura H, Matsumoto M, Fujimura Y: Plasma levels of ADAMTS13 antigen determined with an enzyme immunoassay using a neutralizing monoclonal antibody parallel ADAMTS13 activity levels. *Int J Hematol* 85: 403–407, 2007.
- 74) Uemura M, Matsuyama T, Ishikawa M, Fujimoto M, Kojima H, Sakurai S, Ishii S, Toyohara M, Yamazaki M, Yoshiji H, Yamao J, Matsumoto M, Ishizashi H, Fujimura Y, Fukui H: Decreased activity of plasma ADAMTS13 may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 264S–271S, 2005.
- 75) Matsuyama T, Uemura M, Ishikawa M, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Morioka C, Fujimoto M, Kojima H, Yoshiji H, Takimura C, Fujimura Y, Fukui H: Increased von Willebrand factor over decreased ADAMTS13 activity may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 31: S27–35, 2007.
- 76) Morioka C, Uemura M, Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Ishikawa M, Ishizashi H, Fujimoto M, Sawai M, Yoshida M, Mitoro A, Yamao J, Tsujimoto T, Yoshiji H, Urizono Y, Hata M, Nishino K, Okuchi K, Fujimura Y, Fukui H: Plasma ADAMTS13 activity parallels the APACHE II score, reflecting an early prognostic indicator for patients with severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 43: 1387–1396, 2008.
- 77) Horii M, Uemura S, Uemura M, Matsumoto M, Ishizashi H, Imagawa K, Iwama H, Takeda Y, Kawata H, Nakajima T, Fujimura Y, Saito Y: Acute myocardial infarction as a systemic prothrombotic condition evidenced by increased von Willebrand factor protein over ADAMTS13 activity in coronary and systemic circulation. *Heart Vessels* 23: 301–307, 2008.

Control of Arterial Thrombosis: Basic and Clinical Research on the VWF–GPIIb Axis-dependent Thrombotic Disorders, Modulated by ADAMTS13

Yoshihiro Fujimura¹, Masanori Matsumoto¹, Masahito Uemura²,
Mitsuhiko Sugimoto³, Koichi Kokame⁴, Toshiyuki Miyata⁵

¹ Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University

² Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

³ Department of Pediatrics, Nara Medical University

⁴ Department of Vascular Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute

⁵ Department of Etiology and Pathogenesis, National Cardiovascular Center Research Institute