

## ADAMTS13

藤村 吉博

**要 旨：**ADAMTS13 は von Willebrand 因子(VWF) 特異的切断酵素で，血液難病の血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の原因となる鍵酵素である。また，ADAMTS13 と VWF の均衡破綻は血小板血栓による微小循環障害を生じ，様々な疾患の基礎病態形成に重要である。本稿では TTP のほか，炎症，脳梗塞，インフルエンザ重篤化，膠原病や妊娠に合併する血栓症，そして播種性血管内凝固と ADAMTS13 の関連について最近の知見を紹介し，また VWF 機能を特異的に調節する分子標的薬の開発状況について紹介する。(J Jpn Coll Angiol, 2011, **51**: 321-331)

**Key words:** ADAMTS13, UL-VWFM, microcirculation disturbance, thrombosis, inflammation

## はじめに

ADAMTS13(a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13)は，止血因子 von Willebrand 因子(VWF)の特異的切断酵素で，2001 年に ADAMTS ファミリーに属する亜鉛型メタロプロテアーゼとして第 13 番目に発見された<sup>1)</sup>。

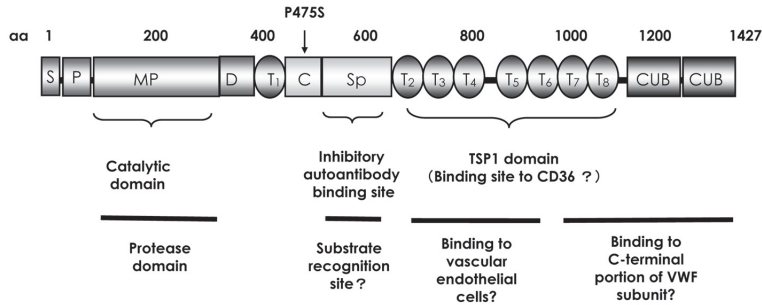
VWF は 2050 アミノ酸残基からなる単一サブユニットが N 末端同士，また C 末端同士の様式でジスルフィド結合し，特有な高分子量構造を持ち，超高分子量 VWF 多重体(unusually-large VWF multimer; UL-VWFM)として産生される<sup>2)</sup>。ADAMTS13 は VWF サブユニットの Ty842-Met843(cDNA 表記では Tyr1605-Met1606)結合を特異的に切断することにより，VWF の分子量サイズを減じ，これにて UL-VWFM による過剰な血小板凝集を防止し，「止血血栓形成には適切であるが，病的血栓形成とはならないように」調節する作用を持つ<sup>3)</sup>。

ADAMTS13 は，本来，血液難病である血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP)の原因となる鍵酵素として同定されたが<sup>4)</sup>，この疾患の病態解明の経過で明らかにされた ADAMTS13/VWF(酵素 / 基質)の均衡破綻による「血小板血栓による微小循環障害」は様々な疾患の基礎病態を形成していることが明らかになってきた。本稿ではとくに，先天性および後天性

TTP，炎症，脳梗塞，インフルエンザ重篤化，膠原病や妊娠に合併する血栓合併症，そして播種性血管内凝固(disseminated intravascular coagulation; DIC)と ADAMTS13 の関連について最近の知見を紹介し，また UL-VWFM 機能を特異的に阻害し，病的血小板血栓の形成を阻害する薬物としての ADAMTS13 製剤や新しい分子標的治療薬の開発状況について紹介する。

## TTP 病態の成因

**ADAMTS13 産生細胞：**ADAMTS13 遺伝子は染色体 9q34 にあり，cDNA は 29 exon からなり，開始コドンから停止コドンまで 4281 bp で，アミノ酸では 1427 残基という大きな蛋白質である。また分子内に 10 個の Asn 結合型糖鎖があり，分子量の総計は約 190 kD となる<sup>4)</sup>。一次構造は N 末端より signal peptide(S)，propeptide(P)，reprolysin タイプの metalloprotease ドメイン(MP)，disintegrin-like ドメイン(D)，thrombospondin type-1 (Tsp1) motif(T1~8)，cysteine-rich ドメイン(C)，spacer ドメイン(Sp)，再度 Tsp1 motif の繰り返し，そして C 末端の 2 つの CUB ドメインに至る(Fig. 1)。同酵素の Asn 結合型糖鎖は細胞からの分泌機能に重要と考えられている<sup>5)</sup>。ADAMTS13 の産生臓器として最初に肝臓が同定され，産生細胞として肝星細胞(旧 伊東細胞)<sup>6)</sup>が同定された。肝星細胞は線維芽細胞への形質転換を通じて肝硬



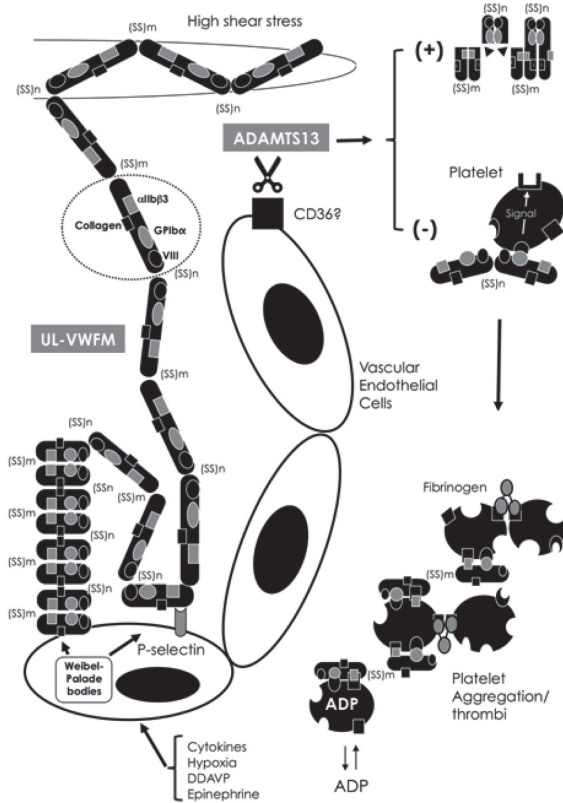
**Figure 1** Structure and functional domains of human ADAMTS13.

Human ADAMTS13 cDNA consists of 4281 bp from 29 exons, and the enzyme contains 1427 amino acid residues, including a signal peptide (S), a propeptide (P), a metalloprotease (MP) domain, a disintegrin-like (D) domain, a thrombospondin type-1 (Tsp1) motif (T1), a cysteine (Cys)-rich domain, and a spacer (Sp) domain in order from the N-terminus. In addition, ADAMTS13 has seven more Tsp1 motifs and two C-terminal CUB (complement components C1r/C1s, urchin epidermal growth factor, and bone morphogenic protein-1) domains. The calculated molecular mass of the polypeptide is 145 kDa, whereas the apparent molecular mass of the polypeptide is 190 kDa. This difference is largely due to glycosylation. ADAMTS13 has 10 potential N-glycosylation sites and 7 potential O-glycosylation sites. (From ref. 4 with a slight modification.)

変進展に密接に関連していることが示されている。これより、肝硬変進展に伴う ADAMTS13 活性低下が示された<sup>7)</sup>。本酵素はこのほか、血小板<sup>8)</sup>、血管内皮細胞<sup>9)</sup>、そして腎臓の podocyte<sup>10)</sup>にその存在が報告されている。これら各臓器・細胞における同酵素産生の意義は明らかにされていないが、血中の ADAMTS13 濃度を維持するのに最も重要な臓器については肝臓であると筆者らの研究グループは考えている。この根拠には以下の2つがあげられる。(1)先天性胆道閉鎖症で胆汁性肝硬変に陥った末期患者では血中 ADAMTS13 活性が20~30%に低下し、溶血性貧血、血小板減少、腎機能障害等、血栓性微小血管障害症(thrombotic microangiopathy; TMA)の病理所見である3徴候を示すが、患者に生体肝移植を行い生着すると、前記 TMA 所見が消失する<sup>11)</sup>。(2)主にC型肝炎による肝硬変成人患者の臨床症状の重篤度は血中 ADAMTS13 活性と平行し、また末期例ではその活性は20~30%に低下する<sup>6)</sup>。

**UL-VWFM 切断:** ADAMTS13 活性著減を示す TPP の病因が完全には解明されていないが、蓄積されたデータから **Fig. 2** のように仮想される。すなわち、このモデルでは、UL-VWFM は主に血管内皮細胞で産生され、一旦、細胞内小器官である Weibel-Palade body (WPB) に蓄積され、そして刺激により血中に放出される。WPB は

電子顕微鏡で「蓮根」によく似た多孔性構造を有することが示されている。また、UL-VWFM は最も生物学的活性が高く、血小板膜受容体 glycoprotein Ib (GPIb) とも過剰に反応し、血小板血栓を形成しやすくなる。UL-VWFM 放出の刺激物質として、生理学的環境下ではエピネブリンが重要と考えられるが、その他については知られていない。一方、病的環境下での同刺激物質としては、酢酸デスマプレシン (DDAVP)<sup>12)</sup>、IL-2、IL-6、IL-8、そして TNF $\alpha$  等のサイトカイン<sup>13)</sup>、またより最近には低酸素<sup>14)</sup>が重要と考えられるようになった。血管内皮細胞がかかる物質で刺激されると、ともに WPB に貯蔵されている UL-VWFM と P-selectin が細胞膜表面に移動し、P-selectin が UL-VWFM を膜表面に繫留(フック)する<sup>15)</sup>。かかる状況で、細小動脈で生じる高ずり応力を受けると、UL-VWFM は立体構造変化をおこし、球状から進展型に転じる。この進展した VWF-A2 ドメインと反応するのは ADAMTS13-DTCS ドメイン内にある多数の exosite である。この際、ADAMTS13 は血管内皮細胞表面に固相化されている型のもので、遊離型のものより効果的に UL-VWFM を切断すると考えられてきた。この ADAMTS13 の細胞への固相化因子として、従来から CD36 が注目されている。前者については1994年に Tandon ら<sup>16)</sup>が「後天性 TPP 患者血清中には抗 CD36 自己



**Figure 2** Proposed mechanism of platelet thrombi under high shear stress in the absence of ADAMTS13:AC.

Unusually large von Willebrand factor multimers (UL-VWFMs) are produced in vascular endothelial cells (ECs) and stored in Weibel-Palade bodies (WPBs). UL-VWFMs are released from WPBs into the circulation upon stimulation by cytokines, hypoxia, DDAVP, and epinephrine. P-selectin that co-migrates from WPBs anchors UL-VWFMs on the vascular EC surface. Under these circumstances, high shear stress changes the molecular conformation of UL-VWF from a globular to an extended form, allowing ADAMTS13 to access this molecule. In the absence of ADAMTS13:AC, UL-VWFMs are left uncleaved, allowing them to excessively interact with platelet glycoprotein (GP) I $\beta$  and activate platelets via intra-platelet signaling, which results in the formation of platelet thrombi. The dotted circle indicates a VWF subunit, which contains a set of domains that bind with factor VIII, subendothelial collagen, platelet GPIIb $\alpha$ , and integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3. (From ref. 57.)

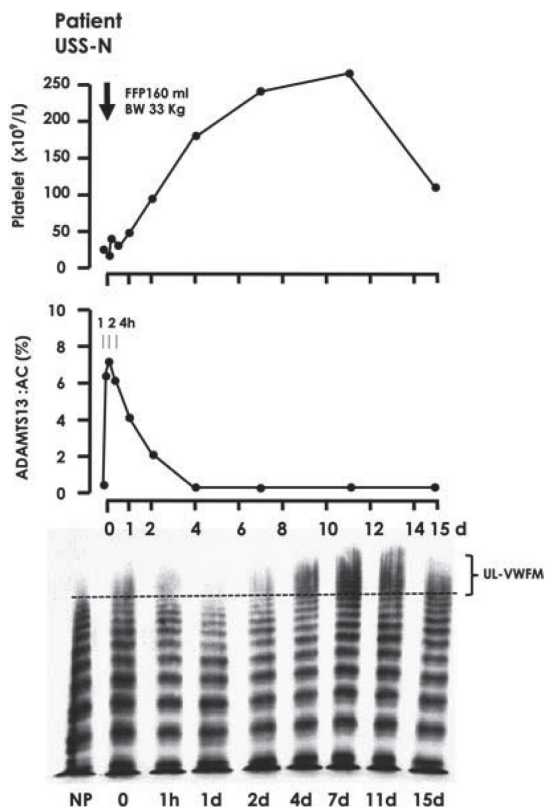
抗体が約 80%の高頻度で検出される」という興味ある報告を行っている。CD36 は thrombospondin-1(Tsp1)の受容体であることから、Tsp1 ドメインを分子内に持つ ADAMTS13 は「ADAMTS13(Tsp1)-CD36 結合」を介して内皮細胞に結合することが考えられる。逆に、抗 CD36 自己抗体はこの結合を阻害することも想定されるが、この点は未だ証明されていない。

筆者らは 2001 年に先天性 TTP/ADAMTS13 活性欠損症(Upshaw-Schulman 症候群, USS)患者に新鮮凍結血漿を輸血し、ADAMTS13 を補充すると、患者血中の UL-VWF は注入後 1 時間で消失し始め、24 時間で完全に消失することを示した<sup>17)</sup>(Fig. 3)。後方視的に、この結果は外因性 ADAMTS13 が循環血中に既存の UL-VWF を切断し、また血管内皮細胞から新たに産生される UL-VWF も効果的に切断できることを示したものと考えられる。

Zhang ら<sup>18)</sup>による VWF-A2 ドメインの結晶構造解析の結果では、このドメインは分子表面に露出していないた

めに、ADAMTS13 は「非活性型」VWF-A2 ドメインに直接的には接近できないことを示している。この考え方をさらに進展したのが、Zanardelli ら<sup>19)</sup>の「ADAMTS13-VWF 相互反応の初期相における 2 段階反応説」である。これは Fig. 4 に示すように、まず第一段階として、VWF の C 末端側(D4CK ドメイン)は絶えず分子外表面に露出しており、これに ADAMTS13 の C 末端側[TSP1(5-8)/CUB ドメイン]が結合して複合体を形成する。そして第二段階として、高ずり応力下に VWF-A2 ドメインの立体構造変化が起き、分子外表面に露出したこのドメインに ADAMTS13 の Sp ドメインが高親和性結合をする。これにて ADAMTS13-MP ドメインが VWF-A2 ドメインに接近することができ、Tyr1605-Met1606 が切断される。

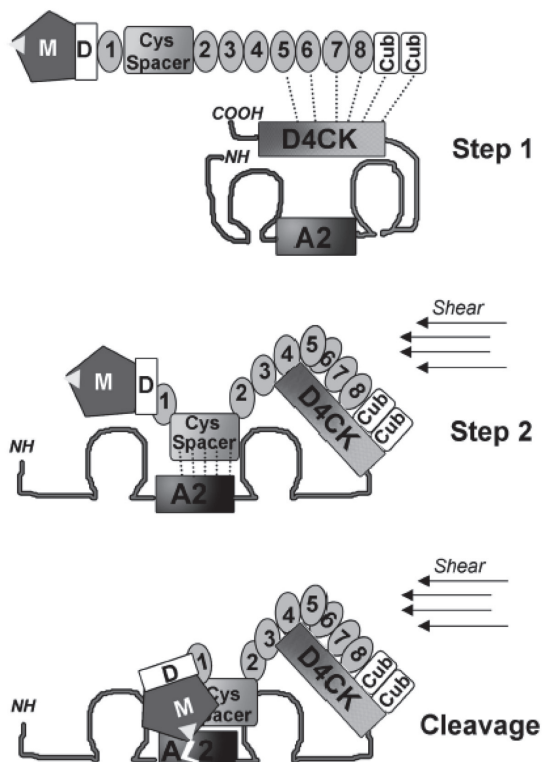
**抗 ADAMTS13 同種抗体**：後天性 TTP 患者に生じる抗 ADAMTS13 自己抗体のエピトープは Cys-rich/Sp ドメインにあることを最初に報告したのは Soejima ら<sup>20)</sup>であったが、Klaus ら<sup>21)</sup>はその後、かかる自己抗体は ADAMTS13 のほぼすべてのドメインに対して生じうるこ



**Figure 3** Effect of fresh frozen plasma (FFP) infusion on platelet counts, ADAMTS13:AC, and VWF patterns in patient USS-N.

A total of 160 mL of FFP was transfused into a female patient USS-N (BW 33 kg). As shown in the top panel, her platelet count increased from  $23 \times 10^9/L$  before the FFP infusion to  $251 \times 10^9/L$  at 11 days after the infusion. The middle panel shows the plasma levels of ADAMTS13:AC that were re-examined using a chromogenic act-ELISA (ref. 56) and deep-frozen plasma samples. Note that 4 days after the infusion, the plasma ADAMTS13:AC decreased to the pre-infusion level ( $<0.5\%$ ). In the lower panel, the pre-existing UL-VWFM levels before the FFP infusion rapidly disappeared 24 hours after the infusion, and 4 days later, the UL-VWFMs re-appeared in the plasma. Note that the platelet count began to decrease concomitantly with the re-appearance of UL-VWFMs. (From refs. 17 and 57.)

とを示した。しかし、最終的には抗 ADAMTS13 自己抗体の中で活性阻害抗体のエピトープが Sp ドメインにあること、また Posら<sup>22)</sup>によりさらにその狭小化にて、Arg660, Tyr661, Tyr665 の 3 アミノ酸残基が抗体エピトープ形成に重要であることが判明した。



**Figure 4** The proposed 2-site initial binding interaction mechanism between VWF and ADAMTS13. (A) A schematic diagram of ADAMTS13 that shows its domains. VWF is represented in its globular conformation. The ADAMTS13 cleavage site in the VWF A2 domain is buried in the center of the molecule and not accessible to be cleaved by the metalloprotease. However, a binding site in the C-terminal region (D4CK) of VWF is constitutively exposed, allowing interaction with the ADAMTS13 distal domains (TSP5-8 and CUBs). (B) Under conditions of high shear, VWF unravels. The initial anchoring of the distal domains of ADAMTS13 to the C-terminal region of VWF may help expose the VWF A2 domain binding site and favor the correct positioning of the ADAMTS13 spacer domain. (C) Once the higher-affinity interaction between the spacer domain and the A2 domain is established, the ADAMTS13 protease domain can access and cleave the Y1605-M1606 bond in the A2 domain of VWF. (From ref. 19.)

### Upshaw-Schulman 症候群 (USS)

USS は Schulman ら (1960 年)<sup>23)</sup> として Upshaw (1978 年)<sup>24)</sup> により、その特徴として、「交換輸血が必要とされる Coombs 試験陰性の新生児期重症黄疸」と、この時期

以降の「新鮮凍結血漿の輸血で劇的に改善する慢性血小板減少」の2点が示された。これらの結果より、USSは当初血漿中に含まれる血小板刺激因子の欠損症と誤って考えられた。しかし、2001年にUSSは先天性ADAMTS13活性欠損症であることが改めて示され、歴史に再登場した<sup>25)</sup>。

1998～2008年の奈良医大輸血部での集計では、この期間に診断・登録しているUSS患者数は41名であった<sup>26)</sup>。また、これらUSS患者のnatural historyでは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例が多いことから、患者実数は遥かに多いものと推定される。事実、USSは常染色体劣性遺伝で、男女出現比は1対1であるべきだが、登録者41名の比率は男15対女26で、女性優位である。この結果は前期推定の裏付けの一つであるとともに、USS女性は妊娠すると血小板減少やTTPがほぼ必発であることにより、男性よりも発見されやすいことが考えられる。興味あることに、一過性の脳虚血発作や梗塞を繰り返し、その結果、脳動脈末枝に側副路が形成される「もやもや病」を発症して発見された小児USS例もある<sup>27)</sup>。「また、後述のようにUSS女性では20～30歳代の初回妊娠時に突然様々な精神神経症状を伴うTTP発作を起こすが、USSの正確な診断がなされていないと、重症妊娠合併症である子癇やHELLP症候群(hemolysis, elevated liver-enzymes, low platelets syndrome)と誤診される場合も多い。一方、男性では50～60歳の初老期に些細な感染症等を契機に、脳梗塞や腎不全等の重篤血栓合併症を生じ、USSと診断される。以上の結果は小児期の「仮面血小板減少症」患者を診察した際にはADAMTS13活性を測定し、TTP素因を除外しておくことの重要性を示す。

### 血栓と炎症の連関

2008年にChauhanら<sup>28)</sup>はADAMTS13が血栓と炎症の双反応をdown-regulationしているとの成績を報告した。すなわち、彼らは野生型マウスの細小動脈では血管内皮細胞表面を白血球が高速でローリングしながら下流に移動しているが、ADAMTS13 K/O マウスでは、ヒスタミン刺激で血管内皮細胞からUL-VWFMを血管表面に誘導放出させると、白血球の血管表面でのローリングが著しく減速し、粘着が充進し、引き続いて白血球の血管外遊走(炎症)が起こることを示した。これはUL-VWFM

が血小板血栓のみならず、白血球のローリングを抑制することにより、白血球を炎症病変部へ誘導するという解釈ができ、上記の結論が導かれた。

### 脳梗塞治療薬としての可能性

ADAMTS13は上記のごとく、抗血栓と抗炎症の双作用も有していることが示されたことから、脳梗塞の治療薬として有望視されるようになった。すなわち、Zhaoら<sup>29)</sup>そしてFujiokaら<sup>30)</sup>はマウス中大脳動脈閉塞モデルで脳虚血再灌流実験を行い、脳梗塞を人工的に作成し、脳梗塞体積を計算したところ、野生型マウスに比べてADAMTS13 K/O マウスは有意に脳梗塞体積が増加した<sup>29)</sup>。また、脳梗塞部分の組織所見では、K/O マウス群では微小血栓が多く、炎症細胞の浸潤が多いことが確認された。これらの血栓はVWFを豊富に含む血栓であることが示され、K/O マウスで脳梗塞の範囲が大きくなった原因として、VWFを多く含む血小板血栓と白血球の過剰浸潤であることが想定された。さらに、野生型マウスに対して、再灌流直前に遺伝子発現ヒトADAMTS13製剤を投与すると、脳梗塞範囲が有意に縮小することも報告された<sup>30)</sup>。以上のごとく、マウス実験の結果より、ADAMTS13製剤の脳梗塞治療および予防薬としての可能性が示された。

### インフルエンザ重篤化との関連

インフルエンザやインフルエンザワクチン接種に関連してTTP病態が生じることは随分古くから報告されてきたが、いずれもADAMTS13の関与について解析された報告はない<sup>31-33)</sup>。一方、インフルエンザは様々なサイトカインの血中への大量放出、すなわちサイトカインストームを起こす代表疾患の一つである。

筆者らは近年、インフルエンザA感染に合併した後天性の定型的TTP(ADAMTS13活性著減、ADAMTS13活性中和自己抗体陽性)<sup>34)</sup>と、新型(H1N1)インフルエンザ感染による非定型TTP(ADAMTS13活性軽度低下、同抗体陰性、VWF著増)<sup>35)</sup>の2病型の存在を報告した。前者の定型的TTPはADAMTS13活性を中和する自己抗体陽性であることから、この抗体エピトープはADAMTS13 Spドメインにあると考えられる。この理由としてインフルエンザのウイルス蛋白は様々な抗体を産生しうるuniversal epitopes<sup>36)</sup>として機能し、その中にはSpドメインと相同性のあるエピトープ(例えば前記のSp

ドメイン内の3アミノ酸: Arg660, Tyr661, Tyr665 など)が含まれているのではと推測される。また後者の非定型TTPはADAMTS13活性軽度低下とVWF著増があり、このため酵素/基質比が著減し、高ずり応力下では大きく血栓側に傾くと考えられる。さらに、インフルエンザは強いノイラミニダーゼ(シアリダーゼ)活性を持っているため、分子質量全体の18.7%を糖鎖が占めるVWF<sup>37)</sup>は感染者血中でこの糖分解酵素の作用を受け、脱シアル酸化されることが考えられる。かかるVWFはasialo-VWF<sup>38)</sup>と呼ばれるが、「活性型VWF」の一種で、血小板膜受容体GPIbに直接結合する能力がある。これ故、asialo-VWFが形成されると、VWF-GPIb軸依存性の血小板凝集は亢進し、血小板血栓形成は助長される。

さて、インフルエンザ脳症は重症合併症の一つであるが、従来、知られていることは、1)脳組織病変部でウイルスが検出されることは稀である、2)細血管ではしばしば硝子膜血栓が見られる、3)DICを合併しやすい、等である<sup>39)</sup>。DICは凝固血栓が主体で、血小板血栓が主体のTTPとは一線を画するが、血小板血栓は凝固血栓の「核」となりうるので、TTPからDICへの移行はしばしばありうる。しかし、DICからTTPへという逆移行は考えにくい。すなわち、サイトカインストームに起因するTMA、そしてこれに合併するDIC等の微小循環障害が脳症等のインフルエンザ重篤化の基盤形成に重要な働きをしているのではないかという疑問が生じてきた。

### 妊娠関連 TMA

妊娠期は一般に血栓合併症が多い。この理由として、正常妊娠経過での凝固能亢進と線溶能低下があげられている<sup>40)</sup>。血小板数は軽度の低下にとどまる。凝固-止血因子の中で、とりわけ凝固VIII因子(VIII:C)とvon Willebrand因子抗原(VWF:Ag)は妊娠経過中に著増する。妊娠上半期においては両者の増加は平行しているが、後半期においてはVWF:Ag量の増加が著しく、VWF:Ag/VIII:C比は1から2に上昇する(妊娠末期の血中VWF量は300~500%に増加)<sup>40)</sup>。また、ADAMTS13活性の妊娠時の変化については2004年にSánchez-Lucerosら<sup>41)</sup>が、経過とともに低下し、妊娠末期には58%にまで低下することを報告した。

妊娠期に特有なTMAとして前掲のHELLP症候群がある。本症は妊娠高血圧症候群(pregnancy-induced hypertension; PIH:旧妊娠中毒症)の中で溶血、肝遊離酵

素上昇、そして血小板減少を伴う最重症型として位置づけられている。このHELLP症候群は全妊娠の0.2~0.6%に見られ、母児双方の重要な罹病・死亡原因の一つとなっている。2003年にLattuadaら<sup>42)</sup>は17例のHELLP症候群、25例の正常妊婦、そして50例の非妊婦を解析し、各群の平均ADAMTS13活性は31%(12~43%)、71%(48~105%)、そして101%(45~152%)、とHELLP症候群で中等度に低下していることを報告した。しかし、この低下群のいずれにもADAMTS13インヒビターは検出されなかった。さらに、VWF:Ag量は著しく増加していたが、UL-VWFMは検出されなかったことから、ADAMTS13活性の中等度低下は消耗性によるものと結論している。一方、Hulsteinら<sup>43)</sup>はVWF-AIドメイン(血小板GPIb結合ドメイン)が分子表面に露出している「活性型VWF」を特異的に認識する抗VWF nanobody(後述)を作成し、これを用いた測定系で、HELLP症候群の血漿中には「活性型VWF」が正常妊婦の2.1倍、また子癩前症と比べると、1.6倍増加していることを報告した。またHELLP症候群ではVWF:AgとVWFプロペプチドも著増しているため、これら患者においては血管内皮細胞活性化と中等度のADAMTS13活性低下によって、「活性型VWF」の産生をさらに増加させ、これが血小板の消耗性減少を起しTMAを引き起こしていると推論している。

さて、妊娠期の定型的TTPの発症要因にも先天性(USS)と後天性とがある。USS女性は妊娠により血小板減少が必発で、この正確な診断とADAMTS13の適切な補充を行っていないと、妊婦側ではTTP発作が必発で、また胎児側では早産、死産、未熟児などの原因となる<sup>44)</sup>。

### 膠原病関連 TMA

代表的な膠原病の一種であるSLE(systemic lupus erythematosus)と古典的5徴候(classic pentad)で診断される「旧」TTPの間に密接な関係があることは1939年にGitlow & Goldmark<sup>45)</sup>によって最初に報告された。1999年にBrunnerら<sup>46)</sup>は自験例5例の小児期「旧」TTPと文献から得られた30例の同患者について解析したところ、9例(9/35, 26%)はSLE診断基準である>4 ACRを満たしており、また8例(8/35, 23%)はSLE発症初期段階にあることを述べた。さらに、彼らの自験例5例中、3例は3年以内にSLEと診断され、また残り2例も4年以内に

SLEのACR診断基準を満たすようになった。しかし、当時はADAMTS13活性測定が普及しておらず、これについての解析は皆無であった。

筆者らは1998～2008年の間に奈良医大輸血部で登録したTMA患者919名の中で、221例(221/919, 24.0%)が膠原病関連TMAであること、またその中で92名はSLE関連TMAであることを報告した<sup>26)</sup>。またそれぞれのカテゴリーで、定型的TTPは46名(46/221, 20.8%)と24名(24/92, 26.1%)であった。すなわち、これらの結果はSLE関連TMAの20%強はADAMTS13活性著減を示すことを実証した<sup>47)</sup>。

### 敗血症性DICとの関連

2006年にOnoら<sup>48)</sup>は敗血症性DIC患者109例を解析し、そのうち17例(17/109, 15.6%)は旧測定法の「VWFMアッセイ」で5%以下と著減していること、また同活性が20%以下を示す51例中26例(26/51, 51%)にUL-VWFMを検出したと報告した。また活性低下群のほうが非低下群にくらべると腎機能などの臓器障害程度も重度であったという。一方、ADAMTS13インヒビター測定については記載されておらず、活性著減の原因の一つとしてDIC時に検出されるプラスミンやトロンビン、あるいは顆粒球由来のエラスターゼなどのプロテアーゼによるADAMTS13の分解によるものではないかと推論している。なお、これらプロテアーゼによるADAMTS13の切断点は最近Hiuraら<sup>49)</sup>により同定された。次に、Nguyenら<sup>50)</sup>は小児の敗血症性DIC患者21例について、ADAMTS13活性を「フローアッセイ」で測定した場合、30%以下の有為な低下を示す症例は7例(7/21, 31%)で、その実測値は9.2～28.7%であったと報告している。彼らは30%以下の活性低下を「著減(severe deficiency)」と記載しているが、このフローアッセイは半定量的測定法であることに留意すべきである。すなわち、その後2007年にKremer-Hovingaら<sup>51)</sup>は敗血症性DICおよび敗血症性ショックの患者40例のADAMTS13活性を、旧測定法のVWFMと新測定法のFRETS-VWF73の双方で行い、「活性著減例は皆無であった」と報告している。さらに筆者らも敗血症性DICの自験例38例をchromogenic act-ELISAの高感度測定法で実施し、Kremer-Hovingaら<sup>51)</sup>と略同等の結果を得ている(論文未発表)。

これら敗血症性DICのADAMTS13活性の解釈につ

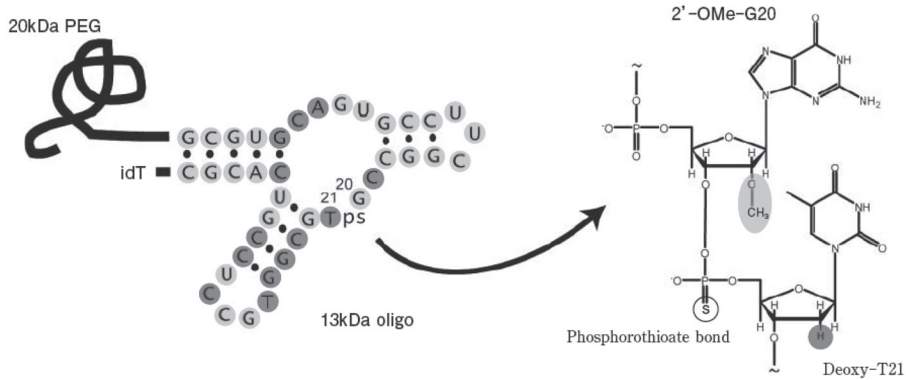
いて研究者間に相違が見られることに関して、筆者らは病態進展の機序から、TMA病態からDICへの移行はあり得るが、逆は考えにくいことから、今後、敗血症性DIC患者のADAMTS13活性測定と解釈においては再検討が必要で、その際には、原疾患の種類、病期、その後の臨床経過等の背景を十分に吟味したうえで行うことが必須と考えている。

### ADAMTS13活性欠損症の治療

**ADAMTS13補充療法：**先天性ADAMTS13活性欠損症であるUSSの場合、治療は欠損している酵素活性補充を目的として、新鮮凍結血漿10 ml/kg体重を2～3週ごとに輸注する。この補充療法はADAMTS13が発見される遙か以前から慣例的に行われてきたが、現時点で活性中和抗体(インヒビター)が発生したという報告は皆無である。近い将来この治療は遺伝子発現ADAMTS13製剤にとって変わられるものと考えられる。しかし、後天性の定型的TTPはADAMTS13に対する自己抗体(活性中和抗体)陽性であるため、血漿輸注のみでは不十分で、治療の基本は、血漿交換とステロイドパルス療法の併用が基本となる。しかし抗体力価が高い、また血漿交換療法によって逆に抗ADAMTS13中和抗体(インヒビター)の力価が急上昇(inhibitor boosting)するような難治性TTPの場合には、現時点では保険適応外であるが、抗CD20キメラ抗体であるリツキサン投与でインヒビター産生を抑制し、同時に血漿交換を併用する療法が行われている(論文未発表)。

**UL-VWFM機能阻害薬：**ADAMTS13はUL-VWFMの機能モジュレーターで、作用物質はUL-VWFMである。これよりUL-VWFMや「活性型」VWFのみを選択的に阻害し、正常サイズVWFMの作用を阻害しない薬物は「出血時間を延長することなく、強い抗血栓作用を発揮する優れた抗血栓薬となりうる」と考えられ、近年この種の分子標的療法剤として2種類の薬物が注目されており、これらの治験が欧米で進行中である。

一つは、ARCI179(Archemix社)と呼ばれるアプタマーである<sup>52)</sup>。アプタマーとはRNA断片の一種で、VWF-A1ドメインに特異的に結合し、VWFと血小板GPIb受容体との結合を阻害し、血小板凝集を抑制する。ARCI179は40ヌクレオチドのアプタマーでFig. 5<sup>53)</sup>のような二次構造が報告されている。VWF機能を長時間にわたって阻害すると、出血リスクが高まるので、血



**Figure 5** VWF-A1 aptamer ARC1779.

ARC1779 is a therapeutic aptamer antagonist of the A1 domain of VWF, the ligand for receptor glyco-protein Ib on platelets. This figure shows a proposed secondary structure of ARC 1779, which is a synthetically manufactured, modified RNA aptamer conjugated to a polyethylene glycol (PEG, molecular weight, 20 kDa) moiety at the 5' terminus. (From ref. 53.)

中半減期を2時間程度に調節するのに適切な大きさである直鎖状20kDaのポリエチレングリコール(PEG)が5'末端に付けられている<sup>53)</sup>。

他の一種は、より最近に現れたALX-0681と呼ばれる皮下投与型の抗VWF nanobodyである<sup>54)</sup>。Nanobodyとは通常のIgGがそれぞれ2本のH鎖とL鎖が結合した形で構成されているのに対し、H鎖2本のみの単純な構造を持つ特異抗体である<sup>55)</sup>。これは1989年にラクダや水牛での寄生虫感染に対する免疫獲得機構を研究中に発見された。その後、南米のラマにも同様の抗体が産生されることが見出され、ALX-0681はラマで産生された。この抗体は分子量も小さく、酵母などを使って大量発現することが可能である。現在、TTPに対して欧米で治験中のnanobodyはAbylynx NV社(Belgium)から提供されている静脈投与型である。

### おわりに

本稿ではADAMTS13と、TTP、炎症、脳梗塞、インフルエンザ重篤化、膠原病や妊娠に合併する血栓症、そしてDICとの関連について最近の知見を紹介した。すなわち、UL-VWFMによる血小板過凝集や血栓過形成を制御する分子標的薬の開発は、TTPのほか、様々な微小循環障害による臓器障害に対する新しい分子標的治療薬として期待されている。

### 文 献

- 1) Sadler JE: Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2008; **112**: 11–18
- 2) Fujimura Y, Titani K: Structure and function of von Willebrand factor. Bloom AL et al, ed. *Haemostasis and Thrombosis*. 3rd ed, Churchill Livingstone, London, 1994, 379–395
- 3) Moake JL: Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002; **347**: 589–600
- 4) 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 (Tokyo)* 2001; **130**: 475–480
- 5) Zhou W, Tsai HM: N-Glycans of ADAMTS13 modulate its secretion and von Willebrand factor cleaving activity. *Blood* 2009; **113**: 929–935
- 6) Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al: Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 2005; **106**: 922–924
- 7) Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, et al: Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 2008; **99**: 1019–1029
- 8) Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, et al: Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **313**: 212–216
- 9) Turner N, Nolasco L, Tao Z, et al: Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 1396–1404



- 10) Manea M, Kristoffersson A, Schneppenheim R, et al: Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2007; **138**: 651–662
- 11) Matsumoto M, Chisuwa H, Nakazawa Y, et al: Liver transplantation rescues a deficient state of von Willebrand factor-cleaving protease activity in patients with liver cirrhosis due to congenital biliary atresia. *Blood* 2000; **96**: 636a (abstract).
- 12) Veyradier A, Meyer D, Loirat C: Desmopressin, an unexpected link between nocturnal enuresis and inherited thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *J Thromb Haemost* 2006; **3**: 700–701
- 13) Bernardo A, Ball C, Nolasco L, et al: Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* 2004; **104**: 100–106
- 14) Wilkie M, Stevens C, Cunninham J, et al: Hypoxia-induced von Willebrand factor release is blocked by verapamil. *Miner Electrolyte Metab* 1992; **18**: 141–144
- 15) 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
- 16) Tandon NN, Rock G, Jamieson GA: Anti-CD36 antibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1994; **88**: 816–825
- 17) Yagi H, Konno M, Kinoshita S, et al: Plasma of patients with Upshaw-Schulman syndrome, a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease, enhances the aggregation of normal platelets under high shear stress. *Br J Hematol* 2001; **115**: 991–997
- 18) 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 U S A* 2009; **106**: 9226–9231
- 19) 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
- 20) 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
- 21) Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, et al: Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004; **103**: 4514–4519
- 22) Pos W, Crawley JT, Fijnheer R, et al: 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
- 23) Schulman I, Pierce M, Lukens A, et al: Studies on thrombopoiesis I. A factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood* 1960; **16**: 943–957
- 24) Upshaw JD: Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1978; **298**: 1350–1352
- 25) Kinoshita S, Yoshioka A, Park YD, et al: Upshaw-Schulman syndrome revisited: a concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2001; **74**: 101–108
- 26) Fujimura Y, Matsumoto M: Registry of 919 patients with thrombotic microangiopathies across Japan: Database of Nara Medical University during 1998–2008. *Inter Med* 2010; **49**: 7–15
- 27) Park HW, Oh D, Kim N, et al: Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura associated with unilateral moyamoya disease. *Pediatr Nephrol* 2008; **9**: 1555–1558
- 28) Chauhan AK, Kisucka J, Brill A, et al: ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. *J Exp Med* 2008; **205**: 2065–2074
- 29) Zhao BQ, Chauhan AK, Canault M, et al: von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. *Blood* 2009; **114**: 3329–3334
- 30) Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, et al: ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* 2010; **115**: 1650–1653
- 31) Wasserstein A, Gary H, Goldfarb S, et al: Recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura after viral infection. *Arch Intern Med* 1981; **141**: 685–687
- 32) Brodin-Sartorius A, Guebre-Egziabher F, Fouque D, et al: Recurrent idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a role of vaccination in disease relapse? *Am J Kidney Disease* 2006; **48**: e31–e34
- 33) Dias PJ, Gopal S: Refractory thrombotic thrombocytopenic purpura following influenza vaccination. *Anaesthesia* 2009; **64**: 444–446
- 34) Kosugi N, Tsurutani Y, Isonishi A, et al: Influenza A infection triggers thrombotic thrombocytopenic purpura by producing the anti-ADAMTS13 IgG inhibitor. *Inter Med* 2010; **49**: 689–693
- 35) Akiyama R, Komori I, Hiramoto R, et al: H1N1 influenza (swine flu)-associated thrombotic microangiopathy due to a remarkably high plasma ratio of von Willebrand factor to ADAMTS13. *Intern Med* 2011; **50**: 643–647

- 36) Wang T-T, Palese P: Universal epitopes of influenza virus hemagglutinins? *Nat Struct Mol Biol* 2009; **16**: 233–234
- 37) Titani K, Kumar S, Takio K, et al: Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 1986; **25**: 3171–3184
- 38) DeMarco L, Shapiro SS: Properties of human asialo-factor VIII. A ristocetin-independent platelet-aggregating agent. *J Clin Invest* 1981; **68**: 321–328
- 39) Morishima T, Togashi T, Yokota S, et al: Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan. *Clin Infect Dis* 2002; **35**: 512–517
- 40) Stirling Y, Woolf L, North WRS, et al: Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1984; **52**: 176–182
- 41) Sánchez-Luceros A, Farías CE, Amaral MM, et al: von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost* 2004; **92**: 1320–1326
- 42) Lattuada A, Rossi E, Calzarossa C, et al: Mild to moderate reduction of a von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. *Hamatologica* 2003; **88**: 1029–1034
- 43) Hulstein JJJ, van Rinnard-Heimel PJ, Frank A, et al: Acute activation of the endothelium in increased levels of active von Willebrand factor in hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 2569–2575
- 44) 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 Hematol* 2008; **144**: 742–754
- 45) Gitlow S, Goldmark C: Generalized capillary and arteriolar thrombosis. Report of two cases with a discussion of the literature. *Ann Intern Med* 1939; **13**: 1046–1067
- 46) Brunner HI, Freedman M, Silverman ED: Close relationship between systemic lupus erythematosus and thrombotic thrombocytopenic purpura in childhood. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 2346–2355
- 47) Matsuyama T, Kuwana M, Matsumoto M, et al: Heterogeneous pathogenic processes of thrombotic microangiopathies in patients with connective tissue diseases. *Thromb Haemost* 2009; **102**: 371–378
- 48) Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, et al: Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood* 2006; **107**: 528–534
- 49) 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; **4**: 403–411
- 50) Nguyen TC, Liu A, Liu L, et al: Acquired ADAMTS-13 deficiency in pediatric patients with severe sepsis. *Haematologica* 2007; **92**: 121–124
- 51) Kremer-Hovinga JA, Zeerleder S, Kessler P, et al: ADAMTS-13, von Willebrand factor and related parameters in severe sepsis and septic shock. *J Thromb Haemost* 2007; **11**: 2284–2290
- 52) Gilbert JC, DeFeo-Fraulini T, Hutabarat RM, et al: First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation* 2007; **116**: 2678–2686, Epub 2007 Nov 19
- 53) 宮川 伸, 藤原将寿, 西山道久: RNA アプタマーを用いた分子標的医療医薬の開発. *Drug Delivery System* 2008; **23**: 534–543
- 54) Abd-Elaziz K, Kamphuisen PW, Lyssens C, et al: Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-VWF nanobody ALX-0681 after single and multiple subcutaneous administrations to healthy volunteers. 51st ASH annual meeting and exposition Abs. 2009; 1063
- 55) Wolfson W: Ablynx makes nanobodies from llama bodies. *Chem Biol* 2006; **13**: 1243–1244
- 56) 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
- 57) Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y: Paradigm shift of childhood TTP with severe ADAMTS13 deficiency. *La Presse Medicale* (in press), 2011

## ADAMTS13

Yoshihiro Fujimura

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

---

**Key words:** ADAMTS13, UL-VWFM, microcirculation disturbance, thrombosis, inflammation

ADAMTS13 is a metalloprotease that specifically cleaves a Tyr1605-Met1606 bond of a von Willebrand factor (VWF) subunit and plays a key role in the pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura, a generally life-threatening disease. Further, an extreme low ADAMTS13/VWF (enzyme-to-substrate) ratio generates microcirculation disturbances through the formation of platelet thrombi under high shear stress. These platelet thrombi often aggravate various underlying clinical conditions such as inflammation, cerebral infarction, influenza, collagen disease, pregnancy, and disseminated intravascular coagulation. This review introduces the recent progress in these research fields and the development of molecular-targeting drugs that specifically block VWF from binding to platelet glycoprotein Ib to prevent platelet thrombi formation.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2011, **51**: 321–331)