慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Von Willebrand因子切断酵素(ADAMTS-13) の発現部位に関する検討
Sub Title	
Author	鈴木, 美佐子(Suzuki, Misako) 池田, 康夫(Ikeda, Yasuo)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.2 (2005. 6) ,p.T81- T94
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050601-0081

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・82(2)：T81～T94，2005

学位論文

Von Willebrand 因子切断酵素（ADAMTS-13）の発現部位に関する検討

慶應義塾大学医学部内科学教室
（指導：池田康夫教授）
鈴木 美佐子（すずき みさこ）

（平成16年9月24日受付）

Key Words：VWF-CP, ADAMTS-13, VWF, TTP, thrombosis

Von Willebrand 因子（以下 VWF と略す）は血液凝固第 VIII 因子の安定化因子/キャリアーとして第 VIII 因子と複合体を形成し血中を循環しているほか細動脈等で生じる高ずり応力のもとで血小板血栓形成の補因子として機能する．すなわち，血管内皮が損傷すると内皮下に露呈したコラーゲンに血漿 VWF が結合し，VWF を標的に血小板粘着・凝集反応がおきるという止血機構を担っている．VWF は血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生される巨大糖タンパクで，血漿中だけでなく血管内皮下組織にも広く分布している．また循環している VWF の 15-25%は血小板のα顆粒中に貯蔵されている．VWF は生合成の過程で 741 残基という長いプレプロ配列が切断され，成熟体として 2050 残基のアミノ酸からなる分子量約 25 万のモノマーが，分子間ジスルフィド結合を介して N 末側と N 末側，C 末側と C 末側で互い違いに重合したマルチマーを形成する．VWF 高分子マルチマーは，血管内皮細胞内では，通常の "large" マルチマーよりさらに高分子量の "unusually large" マルチマーして存在し，血流中へ放出されると速やかに部分分解を受けて分子量 500～20,000 kDa の不連続に分布するマルチマーパターンを示すことが知られている．この分解に働くのが VWF 切断酵素であり VWF の A2 ドメイン内に存在するペプチド結合 Y842-M843 を切断する[1), 2)]．

血栓性血小板減少性紫斑病（thrombotic thrombocytopenic purpura；以下 TTP と略す）は血小板減少，細血管障害性溶血性貧血，動揺性精神神経障害，腎機能障害，発熱の古典的 5 徴候を特徴とする全身性疾患である．近年の研究により，TTP 患者血漿中には "unusually large" VWF マルチマーが存在しており，微小血管内で血小板凝集を惹起し，血小板血栓を心臓，脳，腎臓などの諸臓器に形成することが TTP の病態と考えられている．後天性 TTP では VWF 切断酵素に対する自己抗体が存在するためにその酵素活性が低下し[3), 4)]，先天性 TTP では遺伝子変異による酵素活性の欠損[5)]が病因であることが明らかとなった．

1996 年 Furlan[1)] らや Tsai[2)] は VWF 切断酵素の活性測定法を考案し，その部分精製を行い，ゲル濾過での溶出位置や各種プロテアーゼインヒビターとの反応性あるいは活性発現時の 2 価金属イオン要求性などから，VWF 切断酵素は分子量約 150～300 kDa のメタロプロテアーゼであろうと報告した．2001 年，複数の研究グループがヒト血漿からの VWF 切断酵素の精製に成功し，得られた N 末端アミノ酸配列の情報をもとに，その遺伝子解析から VWF 切断酵素が ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif) ファミリーに属する新規な亜鉛型メタロプロテアーゼの 1 種，ADAMTS-13 であることが判明した[6), 7)]．

一方，ADAMTS-13 の発現部位に関しては，ADAMTS-13 の部分 cDNA 配列が脳や前立腺で確認されており，RT-PCR による検討では卵巣，腎臓，膵臓，脾臓，胸腺，前立腺，精巣，小腸ならびに末梢白血球で弱い mRNA が検出されたと報告されている[8)]．しかし半定量的な PCR による解析の結果では骨髄での ADAMTS-13 の遺伝子発現はみられたものの末梢白血球での発現はみられなかったとされている[10)]．現在までの報告では血小板での発現の有無に関する言及はない．VWF が血小板に結合するという現象は血小板血栓の形成のうえで必須のものであることをふまえると，血小板

におけるADAMTS-13の有無ならびにその機能は大変重要な論点である．前述のとおりVWFが血小板のα顆粒中に存在するという事実も考慮し，我々はADAMTS-13が血小板で発現しているか否か，また血小板での局在に関する研究[11]をおこなった．

一方，全長4.7 kbのmRNAは肝臓で特異的に発現していることから血漿のVWF切断酵素は肝臓由来であろうと考えられているが[6), 8), 9)]，現在まで肝臓でのADAMTS-13の産生についての証明はされていない．Leeらは肝生検，剖検例で*in situ hybridization*を施行した結果からADAMTS-13がperisinusoidal cellsで発現していると報告したが（学会発表）[12]，肝臓におけるADAMTS-13の産生部位がどこであるかについての検討はされていない．肝硬変患者血漿でのADAMTS-13酵素活性は健常血漿に比し低下しており，生体肝移植により血漿ADAMTS-13の酵素活性が変化したという臨床報告[13]を考慮し，我々はADAMTS-13の肝細胞での発現の有無についての検討を行った．

実験方法

1．血小板におけるVWF切断酵素（ADAMTS-13）の発現と局在の検討

1）血液検体

研究に供したヒト血小板，白血球検体は健常者（既往歴，現症を有さない）の末梢血から分離した．これに先立ち研究内容についてインフォームドコンセントを取得した．

2）ウェスタンブロット法

3.8%クエン酸添加血を室温で100×*g* 15分間遠心分離しplatelet-rich plasma（PRP）を得た．血小板凝集防止のため，PRPに3分の2量相当のACD-A溶液（クエン酸ナトリウム2.2 w/v%，クエン酸0.8 w/v%，ブドウ糖2.2 w/v%，pH4.5-5.5，Terumo，Tokyo，Japan），プロスタグランジンE_1（終濃度1.2 μM）とEDTA（終濃度1.2 μM）を加えた．このPRPから白血球を除去する目的で，輸血用フィルターSepacell PLX（Asahi Medical, Tokyo, Japan）を2回通過させ，室温で780×*g*，7分間遠心分離を施行した．得られた血小板のペレットをACD-A，プロスタグランジンE_1存在下でN-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes)-Tyrode's bufferで洗浄し，浮遊させた．洗浄血小板は5％ 2-mercaptoethanolを含むLaemmli sample bufferに1：1の割合で混合し，5-15% gradient gelを用いSDS電気泳動を行った．この際，約2×10^7個の血小板を1レーンにのせた．同時にリコンビナントADAMTS-13を陽性コントロールとして用いた．電気泳動後，polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, CA, USA)に転写し1％のスキムミルクでブロッキングした．その後メンブレンをマウス抗ADAMTS-13モノクローナル抗体（1 μg/ml，化学及血清療法研究所　副島見事先生より提供，exon 25に相当する合成ペプチドを抗原として免疫）でインキュベートした．T-TBS溶液で3回洗浄後，二次抗体としてhorseradish-peroxidase-conjugated sheep IgG against mouse Ig (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA)を反応させた．その後Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer, MA, USA)により発光させた．リコンビナントADAMTS-13はhuman fetal liver cDNA library (Biochain Institute Inc. CA, USA)を用いたオリゴヌクレオチドの合成によって得られたDNA断片をつなぎ合わせ，VWF切断酵素全長cDNAを得，発現ベクターpcDNA 3.1/myc-Hisに導入，HEK293細胞を使用しpcDNA3.1/VWF-CP/myc-Hisを導入し形質転換を行った（HEK293/ rADAMTS-13）[14]．

3）フローサイトメトリーによる解析

PRP（4.8×10^8個血小板/ml）をマウス抗ADAMTS-13モノクローナル抗体（1 μg/ml），抗ヒトCD41抗体（5B12, 2.25 μg/ml, Dako Cytomation, Kyoto, Japan），抗β-actin抗体（AC15, 25 μg/ml, Sigma, MO, USA）または抗ヒトCD45抗体（T29/33, 3 μg/ml, Dako Cytomation）で1時間室温にて反応させた．対照実験としてmouse IgG1（1.125 μg/ml, Dako Cytomation）を1次抗体として使用した．permeabilizationの目的で0.1% NP40で前処理を行った．permeabilization処理した血小板はpermeabilization処理なしの血小板と同条件下で1次抗体と反応させた．1次抗体と反応後，すべての検体を4％％パラホルムアルデヒドで固定し，FITC-conjugated rabbit F (ab)'2 fragments of anti-mouse IgG antibody（10 μg/ml, Dako Cytomation）と室温で30分間反応させた．その後，プロスタグランジンE_1添加PBS（10 mMリン酸ナトリウム，150 mM塩化ナトリウム，pH7.4）で洗浄し，フローサイトメーター（COULTER EPICS XL-MCL Flow-Cytometer；Beckman, FL,USA）で解析，データはSystem II softwareで解析した．

4）免疫電顕法

ヒト正常洗浄血小板を4％パラホルムアルデヒド溶液で固定し，ショ糖に浸漬後，凍結，超薄切片を作製した．

これらの切片をマウス抗 ADAMTS-13 モノクローナル抗体でインキュベートし，さらに金粒子標識ヤギ抗マウス二次抗体でインキュベート後，ウラン染色を行い透過型電顕で観察した．

5）RT-PCR 法と塩基配列決定法

2）で記したと同様に Sepacell PLX を用いて PRP より白血球除去を行い，リアルタイム PCR にて CD20 が増幅されないことにより白血球の混入がないことを確認した．血小板のペレットは TRIZOL (Invitrogen, CA, USA) を用いて処理し，クロロホルムで溶解した血小板のペレットから total RNA を抽出しイソプロパノールで沈降した．血小板 RNA（3 μg）は 70℃で 10 分間処理後 TrueScript II Reverse Transcriptase kit (Sawady Technology, Tokyo, Japan) を使用し，特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用い 42℃で 65 分間逆転写反応を行った．ADAMTS-13 の exon 1－7 に対応する cDNA の増幅に用いたプライマーはセンスプライマーとして RT-1 (5'-ATGCACCAGCGTCACCCCCG-3')，アンチセンスプライマーとして RT-2 (5'-AATGGTGACTCCCAGGTCGA-3') を用いた．PCR は TaKaRa LA Taq (Takara Shuzo, Shiga, Japan) を用い，5分間 96℃で反応後，脱重合に 96℃で 1 分，プライマーの重合に 52℃で 1 分，伸長反応に 72℃で 1 分の条件を用い，35 サイクルの反応を行った．PCR 産物を 2％アガロースゲル上で電気泳動し，エチジウムブロマイド液で染色した．アガロースゲルよりバンドを切り出し GENE CLEAN II kit (Bio 101, CA, USA) を用い DNA を抽出，精製した．塩基配列は ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Chiba, Japan) を用い，Model 310 DNA autosequencer (Applied Biosystems, CA, USA) で決定した．

6）リアルタイム PCR 法

5）に記したように RNA を単離し cDNA を合成したのち，ADAMTS-13 ならびに内部コントロールとしてβ-actin，また白血球の混入のモニターとして CD20 について各々 5' 端に 6-carboxy fluorescein (FAM) ならびに 3' 端に 6-carboxy-tetramethyl rhodamine (TAMRA) を標識した TaqMan Probe とプライマーペアーそして TaqMan Universal Master Mix を用いて，ABI Model 7700 Sequence Dettection System (Applied Biosystems) で増幅し測定した．まずフォワードプライマーとして 5'-CCCAACCTGACCAGTGTCTACA-3' (exon 15)，リバースプライマーとして 5'-CTTCCCAGCCACGACATAGC-3' (exon 16)，およびその間に 2 つの蛍光色素を持った TaqMan probe として 5'-FAM-ACAGGCCTCTCTTCACACACTTGGCG-TAMRA-3' (exon 15-16) を重合させた．この 2 つの色素は TaqManProbe に結合している間は発光しないが，DNA ポリメラーゼ活性と 5'－3'エキソヌクレアーゼ活性を有する Taq ポリメラーゼによりプライマーからの伸長反応が生じ TaqMan Probe が分解されると，TaqMan Probe に結合していた蛍光色素が発光する．この蛍光を検出し，threshold fluorescence intensity に到達するサイクル数が threshold cycle (Ct) と定義される．各々の反応は脱重合に 95℃で 15 秒，プライマーの重合と伸長反応に 60℃で 1 分の条件を用い 40 サイクルの反応を施行した．実験は再現性を得るため三重に施行した．

2．肝臓における ADAMTS-13 の産生部位に関する検討

1）抗 ADAMTS-13 ポリクローナル抗体の作成

第 5 図 a. に示すように ADAMTS-13 の構造上，4 カ所の異なるペプチドに対し抗ペプチドポリクローナル抗体を作製した．ペプチド A は propeptide（アミノ酸番号 42-55），B は cysteine-rich domain（アミノ酸番号 449－462），C は thrombospondin type1domain（アミノ酸番号 712-724），D は CUB2 domain（アミノ酸番号 1312-1322）に相当する．各々の部位は他の ADAMTS タンパクとの相同性を回避すべく選択した．

2）各種細胞の培養

リコンビナント ADAMTS-13 を発現させた HEK293 (HEK293/rADAMTS-13) 細胞と HEK293/Mock を type 1 コラーゲンをコートしたディッシュで 10％ウシ胎児血清と 100 U/mL ペニシリンと 100 μg/mL ストレプトマアイシンを添加した DMEM (Invitrogen, CA, USA) で培養し，24 時間培養後，無血清の OPTI-MEM I (Invitrogen) で置換し 48 時間培養した．ヒト肝細胞癌の細胞株である HepG2 は European Collection of Cell Culutures から購入し，2 mM グルタミン酸，1％必須アミノ酸と 10％ウシ胎児血清を加えた MEM-R 培養液（MP Biomedicals, CA）で培養した．24 時間培養後，無血清の MEM-R 培養液で置換し 48 時間培養した．HEK293 細胞，HepG2 細胞の培養上清を回収し Centricon YM-100 (Millipore Co, MA, USA) を用いて 5 倍濃縮した．正常肝細胞 (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. MD, USA) は type 1 コラーゲンをコートしたディッシュ上で，アスコルビン酸，ウシ血清アルブミン,トランスフェリン，インスリンそして

hEGF を添加した肝細胞基本培地（Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.）を用いて培養した．非腫瘍性の肝細胞を SV40 導入により不死化した細胞株である tPH5CH[15]は type 1 コラーゲンをコートしたディッシュ上で，10%ウシ胎児血清と 100 U/mL ペニシリンと 100 μg/mL ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培養液（Sigma-Aldrich, MO, USA）で培養し，ヒト肝臓類洞毛細血管内皮細胞（Applied Cell Biology Research Institute, WA, USA）は 10%ウシ胎児血清を含む CS-C 培養液を用い type 1 コラーゲンをコートしたディッシュ上で培養した．

3）各種細胞の免疫組織染色

HEK293/rADAMTS-13 と HEK293/Mock，正常肝細胞，tPH5CH と HepG2 細胞を type1 コラーゲンでコートしたカルチャースライド上で培養した．0.1M PBS で洗浄後，細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 1 時間固定し 0.01M PBS で洗浄した．内因性ペルオキシダーゼブロッキングは 0.3%過酸化水素を含む 0.1%アジ化ナトリウム溶液で行った．固定した細胞を 0.01M PBS で洗浄しウシ血清でブロッキングした．1 次抗体として，抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体，HepPar 1 抗体，そして non-immune IgG のいずれかをもちい，4℃で一晩インキュベートした．マウスモノクローナル HepPar 1 抗体（OCH1E5.2.10, 20 μg/ml, DAKO company, CA, USA）は良性悪性，両方の肝細胞に特異的に反応する抗体[16), 17)]であり陽性コントロールとして使用した．HepPar 1 抗体との反応前に，検体を 100 mmol/L クエン酸バッファー（pH6.0），100℃で処理した．抗 ADMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体（10 μg/ml）は前処理なしで使用した．mouse IgG1（10 μg/ml, DAKO company）または rabbit immunoglobulin fraction（10 μg/ml, DAKO company）を陰性コントロールとして使用し，mouse IgG1 については HepPar 1 抗体使用時と同様に前処理を行った．0.01M PBS で 3 回洗浄後 DAKO ENVISION™ System Labelled Polymer, HRP (DAKO company) を用い，室温で 30 分間反応させた．細胞は 0.01M PBS で 3 回洗浄後，DAB 発色を行い，Harris hematoxylin により核染色を行った．

4）肝組織の免疫組織染色

正常肝組織ならびに肝硬変を伴う肝細胞癌組織について免疫組織染色を施行した．脱パラフィン処理後，3）で記したと同様の手順で，1 次抗体として抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体，HepPar1 抗体または rabbit immunoglobulin fraction（陰性コントロール）を用い免疫組織染色を行った．

5）ウェスタンブロット法

HEK293/rADAMTS-13, HEK293/Mock ならびに HepG2 細胞の培養上清を回収し，Centricon YM-100 を用いて 5 倍濃縮し，5 %2-mercaptoethanol を含む 4 ×SDS sample buffer と混合，5 -15%gradient gel を用い SDS 電気泳動を行った．電気泳動後，polyvinylidene difluoride membrane（Bio-Rad, CA, USA）に転写し 5 %スキムミルクでブロッキングした．その後メンブレンを抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体（10 μg/ml）でインキュベートした．T-TBS 溶液で 3 回洗浄後，二次抗体として horseradish-peroxidase-linked whole antibody (Amersham Biosciences, UK) を反応させた．その後 Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer) により発光させた．

6）RT-PCR 法と塩基配列決定法

正常肝細胞，tPH5CH, HepG2 またはヒト肝臓類洞毛細血管内皮細胞についてそれぞれ TRIZOL (Invitrogen) を用いて処理し，クロロホルムで溶解したペレットから total RNA を抽出しイソプロパノールで沈降した．各 RNA (1 μg) は 70℃で 5 分間処理後，ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega Corporation, WI, USA) を使用し，特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用い 42℃で 60 分間逆転写反応を行った．ADAMTS-13 の exon 1 に対応する cDNA の増幅に用いたプライマーはセンスプライマーとして RT-3 (5'-CTGTGTGGCCGGAATCCTT-3'), アンチセンスプライマーとして RT-4 (5'-TTGGAGCCACAGGCCG-3') を用いた．PCR は TaKaRa LA Taq (Takara Shuzo) を用い，5 分間 96℃で反応後，脱重合に 96℃で 1 分，プライマーの重合に 52℃で 1 分，伸長反応に 72℃で 1 分の条件を用い，35 サイクルの反応を行った．PCR 産物を 2 %アガロースゲル上で電気泳動し，エチジウムブロマイド液で染色した．正常肝細胞，tPH5CH, HepG2 の PCR 産物は各々アガロースゲルよりバンドを切り出し GENE CLEAN II kit (Bio 101) を用い DNA を抽出，精製した．塩基配列は ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer) を用い，Model 310 DNA auto-sequencer (Applied Biosystems) で決定した．

実験結果

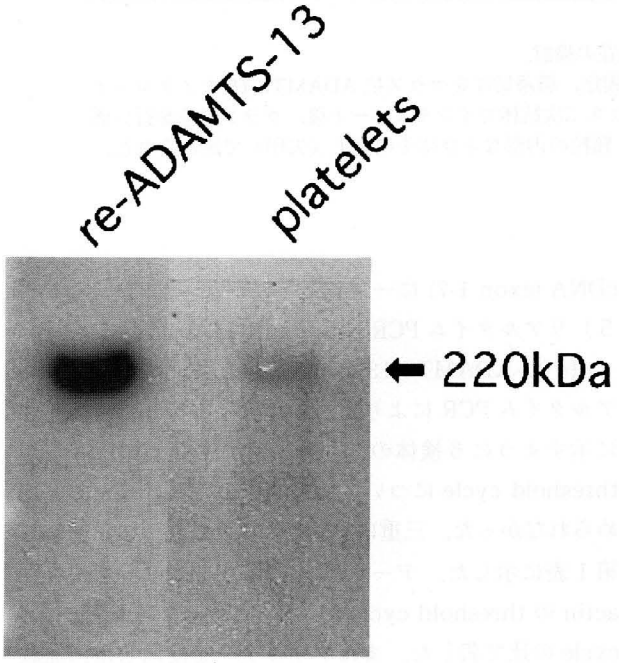
1．血小板における VWF 切断酵素（ADAMTS-13）の発現と局在

1）ウェスタンブロット法

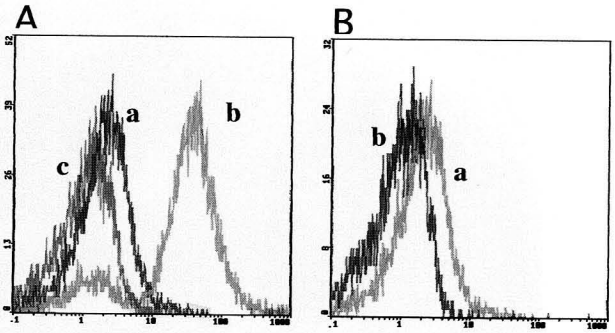
ADAMTS-13 の exon 25 に相当する部位に対するモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットの結果，リコンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清に認められたバンドに一致する約 220 kDa のバンドを血小板で確認した（第 1 図）．これにより血小板での ADAMTS-13 タンパクの発現が示された．

2）フローサイトメトリーによる解析

第 2 図 A で示すように，permeabilization 処理を行った血小板では，陽性コントロールとして用いた抗 β-actin 抗体に対する反応よりは弱いものの，抗 ADAMTS-13 モノクローナル抗体に対し反応性を認めた．第 2 図 B は permeabilization 処理を行った血小板と permeabilization 処理なしの血小板での抗 ADAMTS-13 モノクローナル抗体に対する反応性の違いを示しており，ADAMTS-13 が血小板の内部に存在することを示唆している．permeabilization 処理後の血小板ならびに permeabilization 処理なしの血小板のどちらでも白血球に特徴的な CD45 の発現は認めず，明らかな白血球の混入の可能性は除外された．



第 1 図．ウェスタンブロットによる血小板における ADAMTS-13 発現の証明．約 2×10^7 の洗浄血小板とリコンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清で，実験方法に明記した方法でウェスタンブロットを施行した．レーン左；リコンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清，レーン右；血小板．
Suzuki M et al：Biochem Biophys Res Comm 313：212-216, 2004 の Fig. 1.を許可を得て転載．



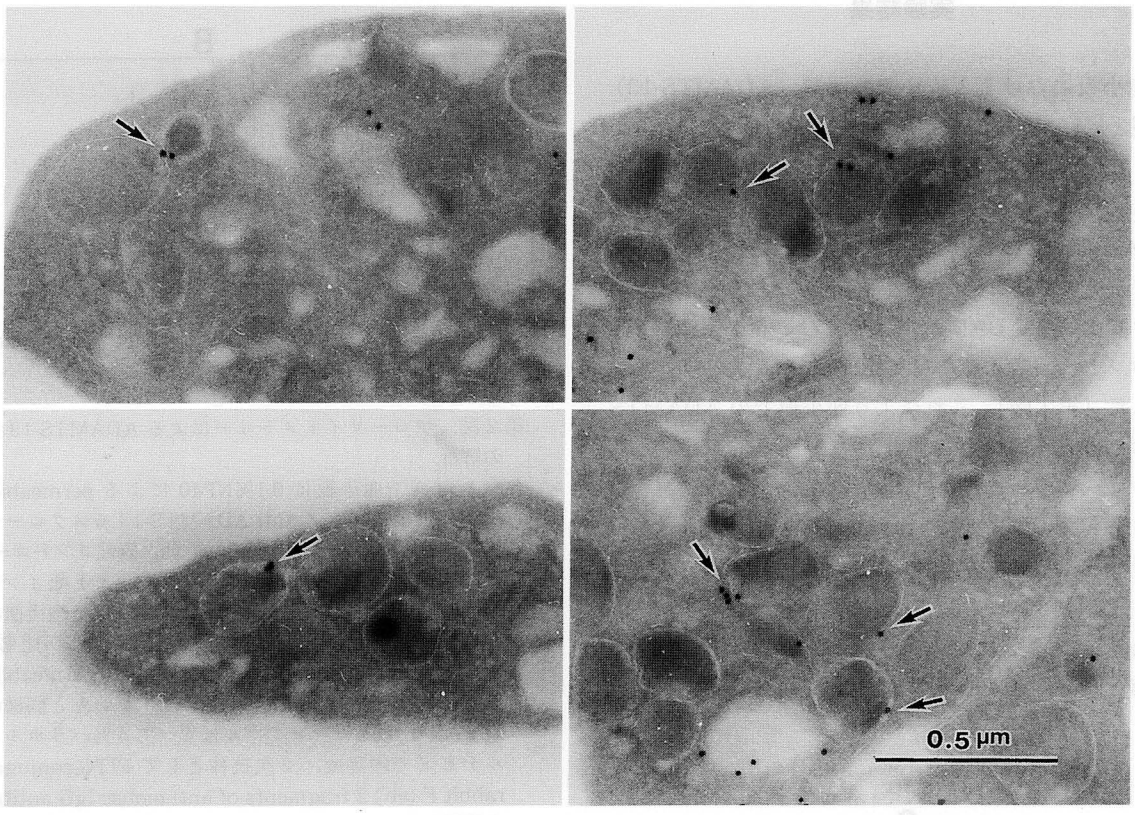
第 2 図．フローサイトメトリーによる ADAMTS-13 発現の解析．
パネル A；血小板は 0.1%NP40 による permeabilization 処理後，マウス anti-ADAMTS-13 モノクローナル抗体（a），マウス抗 β-actin 抗体（b，陽性コントロール）または mouse IgG1（c，陰性コントロール）とインキュベートした．パネル B；permeabilization 処理後血小板と permeabilization 処理なしの血小板の比較．permeabilization 処理後の血小板（a）と permeabilization 処理なしの血小板（b）を用いパネル A と同様の実験を行い比較した．サンプルはすべて 4 %パラホルムアルデヒドで固定後，2 次抗体として FITC-conjugated rabbit F (ab') 2 fragments of anti-mouse IgG antibody を使用した．
Suzuki M et al：Biochem Biophys Res Comm 313：212-216, 2004 の Fig. 2.を許可を得て転載．

3）免疫電顕による ADAMTS-13 の血小板における局在の検討

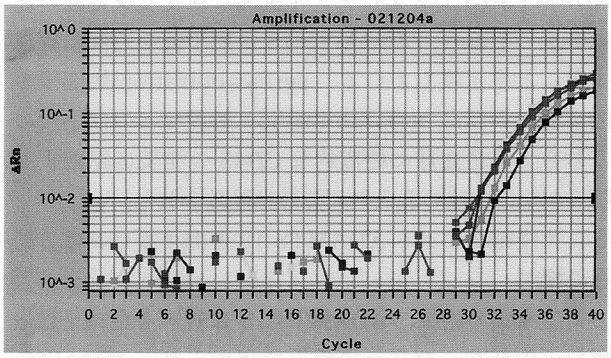
免疫電顕の結果，ADAMTS-13 に対する金粒子は α 顆粒の内部ならびにその膜上で認められ，ADAMTS-13 が血小板の α 顆粒内に存在することが確認された（第 3 図）．

4）RT-PCR による解析と塩基配列の決定

PRP より抽出された血小板 RNA は RT-PCR により増幅された．アガロースゲルより増幅されたバンドを切り出し DNA を抽出，精製した．予想していた 660 bp の cDNA 断片が得られ direct sequencing analysis により決定された塩基配列は，BLAST (Basic local alignment search tool) による検索の結果，ADAMTS-13



第3図．免疫電顕によるADAMTS-13の血小板における局在の検討．
ヒト正常洗浄血小板を4％パラホルムアルデヒド溶液で固定，超薄切片をマウス抗ADAMTS-13モノクローナル抗体でインキュベートし，さらに金粒子標識ヤギ抗マウス二次抗体でインキュベート後，ウラン染色を行い透過型電顕で観察した．ADAMTS-13に対する金粒子はα顆粒の内部ならびにその膜上（矢印）で認められた．bar＝0.5 μm



第4図．リアルタイムPCRによる血小板ADAMTS-13 mRNAの発現量の評価（代表例の提示）．ADAMTS-13に特異的なプライマーとTaqMan Probeを用いて6検体のmRNAについて各々PCRを施行した．縦軸がrelative normalized fluorescence change（⊿Rn），横軸がPCR cycle numberである．threshold fluorescence intensity（0.01，水平線）を決定した後にthreshold cycleが決まる．目的とする遺伝子と内部コントロールのthreshold cycleを測定した．
Suzuki M et al：Biochem Biophys Res Comm 313：212-216, 2004のFig. 3.を許可を得て転載．

cDNA (exon 1-7) に一致した．

5）リアルタイムPCRによるmRNAの定量

血小板ADAMTS-13のmRNAの発現についてはリアルタイムPCRにより定量的に評価を行った．第4図に示すように6検体の血小板について評価を行ったがthreshold cycleについて検体間での差異はほとんど認められなかった．三重に実験を行った結果その平均値を第1表に示した．データは内部コントロールであるβ-actinのthreshold cycleとADAMTS-13のthreshold cycleの比で表した．またフィルターを使用した白血球除去の効果について，リアルタイムPCRによるCD20増幅の欠如により確認を行った（第2表）．

第 1 表　β-actin と ADAMTS-13 の threshold cycle の比

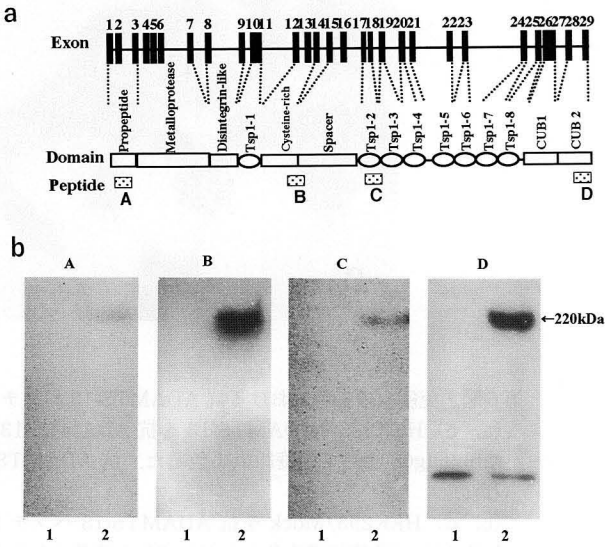
	Ct of β-actin	Ct of ADAMTS-13	β-actin/ADAMTS-13
PRP 1	15.99±0.24	28.52±0.36	0.563±0.007
PRP 2	16.06±0.11	28.16±0.26	0.570±0.005
PRP 3	16.47±0.03	29.08±0.25	0.567±0.005
PRP 4	16.95±0.06	29.62±0.13	0.572±0.003
PRP 5	16.79±0.34	28.83±0.19	0.583±0.004
PRP 6	17.13±0.04	30.47±0.36	0.563±0.007

データは内部コントロールのβ-actin と ADAMTS-13 の threshold cycle (Ct) の比で示している．数値は平均±SD で表した．PRP1～6：6 人の PRP から得た血小板 mRNA を示す．
Suzuki M et al：Biochem Biophys Res Comm 313：212-216, 2004 の Table 1 を許可を得て転載．

第 2 表　リアルタイム PCR による血小板 ADAMTS-13 mRNA と CD20 mRNA の定量．

	Ct of ADAMTS-13	Ct of CD20
Platelet-1	38.75/38.71	40.00/39.49
Platelet-2	36.62/36.59	40.00/40.00
Lym-1	32.47/34.10	26.43/27.29
Lym-2	35.91/35.25	27.30/27.53
Buffy-1	29.34/27.52	26.46/26.27
Buffy-2	34.43/34.57	26.36/26.22

2 名（1，2）の mRNA を用いて ADAMTS-13 と CD20 についてそれぞれリアルタイム PCR を施行した．Platelet-1 と 2 は白血球除去後の血小板 cDNA である．Lym-1 と 2 は Lympho-Prep (AXIS-SHIELD ProC AS, Oslo, Norway) により得られたリンパ球由来の cDNA である．Buffy-1 と 2 は buffy coat 由来の cDNA である．
Suzuki M et al：Biochem Biophys Res Comm 313：212-216, 2004 の Table 2 を許可を得て転載．



第 5 図．抗 ADAMTS-13 ポリクローナル抗体の評価
a．ADAMTS-13 のドメイン構造と抗ペプチドポリクローナル抗体の免疫部位．
ADAMTS-13 タンパクは propeptide, metalloprotease domain, disintegrin, cys-rich，そして spacer domains，2 つの CUB domain，さらに 8 つの Tsp type1 repeats（1-8）から構成されている．4 箇所のペプチドに対し各々抗ペプチドポリクローナル抗体を作製した．部位は以下のとおりである：A, propeptide domain (exon 2) の内部；B, cys-rich domain (exon 12) の内部；C, Tsp1-2 (exon 18)の内部，D，C-terminal (exon 29) 部．

b．ウェスタンブロットにおける抗ペプチドポリクローナル抗体の有用性．
レーン 1，HEK293/Mock の培養上清；レーン 2，HEK293/rADAMTS-13 の培養上清．1 次抗体として 4 種類の抗ペプチドポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った．(A)，抗 ADAMTS-13 ペプチド A ポリクローナル抗体（20 μg/ml）；(B)，抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体（10 μg/ml）；(C)，抗 ADAMTS-13 ペプチド C ポリクローナル抗体（20 μg/ml）；(D)，抗 ADAMTS-13 ペプチド D ポリクローナル抗体（10 μg/ml）．

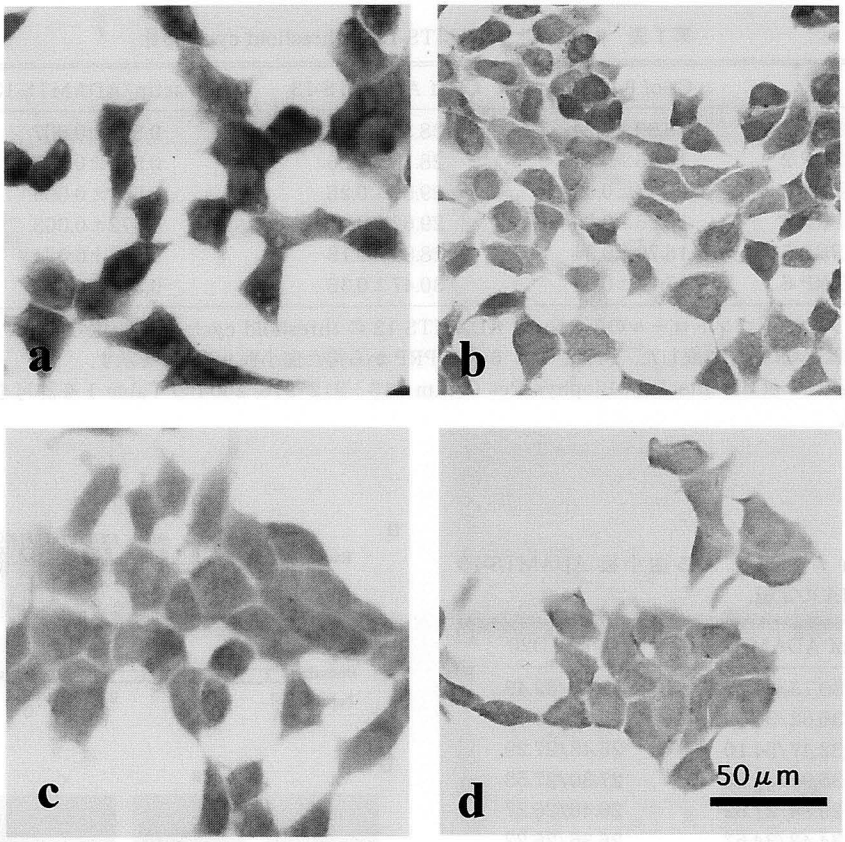
2．肝臓における ADAMTS-13 の産生部位

1）抗 ADAMTS-13 ポリクローナル抗体の評価

1 次抗体として 4 種類のポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果，抗 ADAMTS-13 ペプチド B または D ポリクローナル抗体はリコンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清に強い反応性を示した（第 5 図 a，b）．ウェスタンブロットで特異性が確認された抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体を使って，HEK293/rADAMTS-13 の免疫組織染色を行ったところ，細胞質の染色が確認された（第 6 図）．

2）肝細胞における免疫組織染色

正常肝細胞，tPH5CH 細胞，さらに HepG2 細胞は抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体に対してびまん性に，強い顆粒状の染色パターンを示した（第 7



第6図．免疫組織染色における抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体の有用性．
（a，b）HEK293/rADAMTS-13 を抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体（a）または non-immune rabbit IgG（b）で免疫組織染色した．抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体により細胞質が染色された．
（c，d）HEK293/Mock を抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体（c）または non-immune rabbit IgG（d）で免疫組織染色したがいずれも染色されなかった．bar＝50 μm

図 a，d，g）．一方対照とした抗体では染色されなかった（c，f，i）．HepPar1 抗体（b，e，h）を陽性コントロールとして使用した．

3）肝組織における免疫組織染色

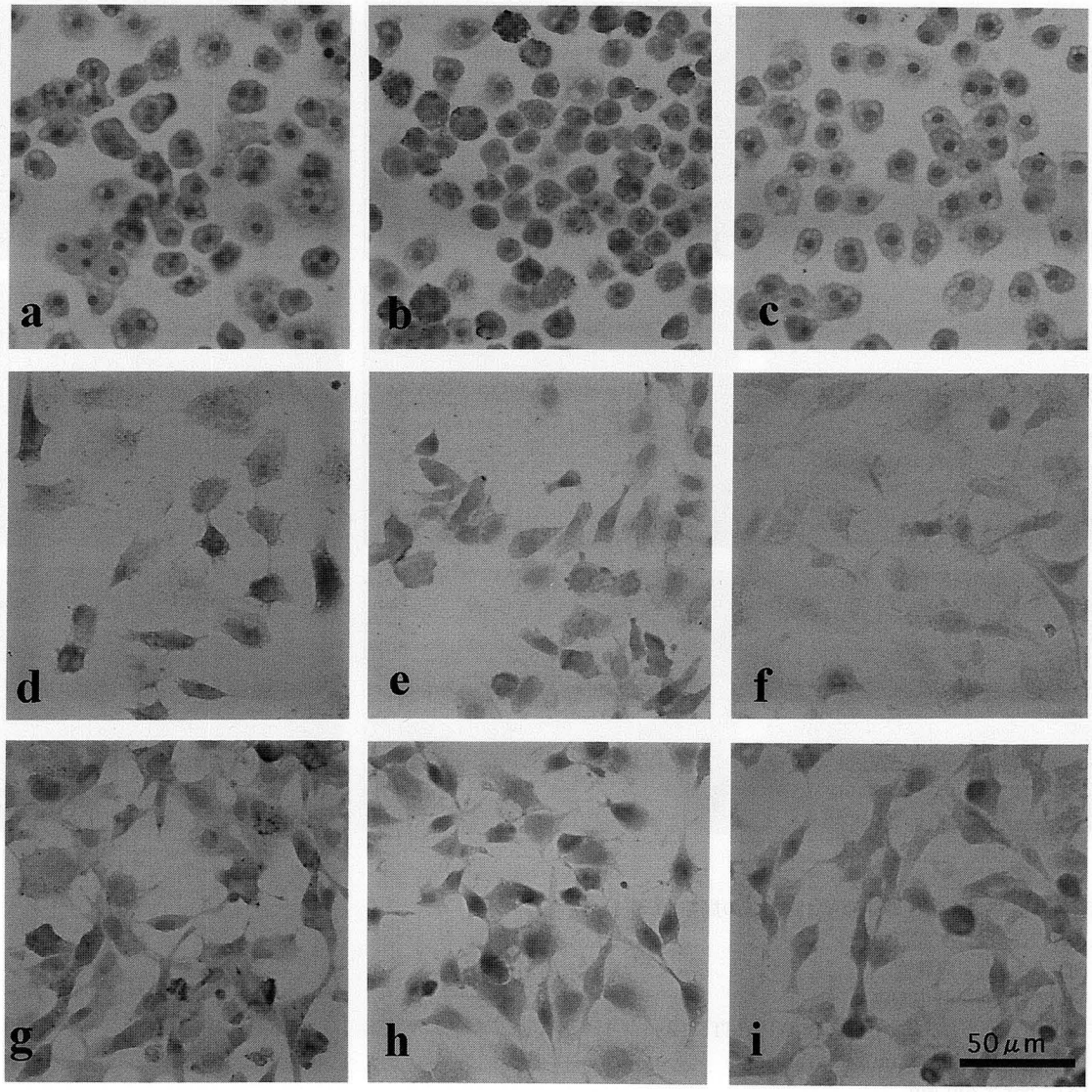
正常肝組織は抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体に対し，びまん性に，強い顆粒状の染色性を示した（第8図 a，b）．特に中心静脈と門脈周囲の肝細胞が強く染まっており，血管内皮細胞や Kupffer 細胞は染まらなかった．肝硬変，肝細胞癌の組織では，再生肝細胞ならびに肝癌細胞の両者とも免疫染色された（第8図 d，e，g，h）．

4）HepG2 の培養上清を用いたウェスタンブロット法

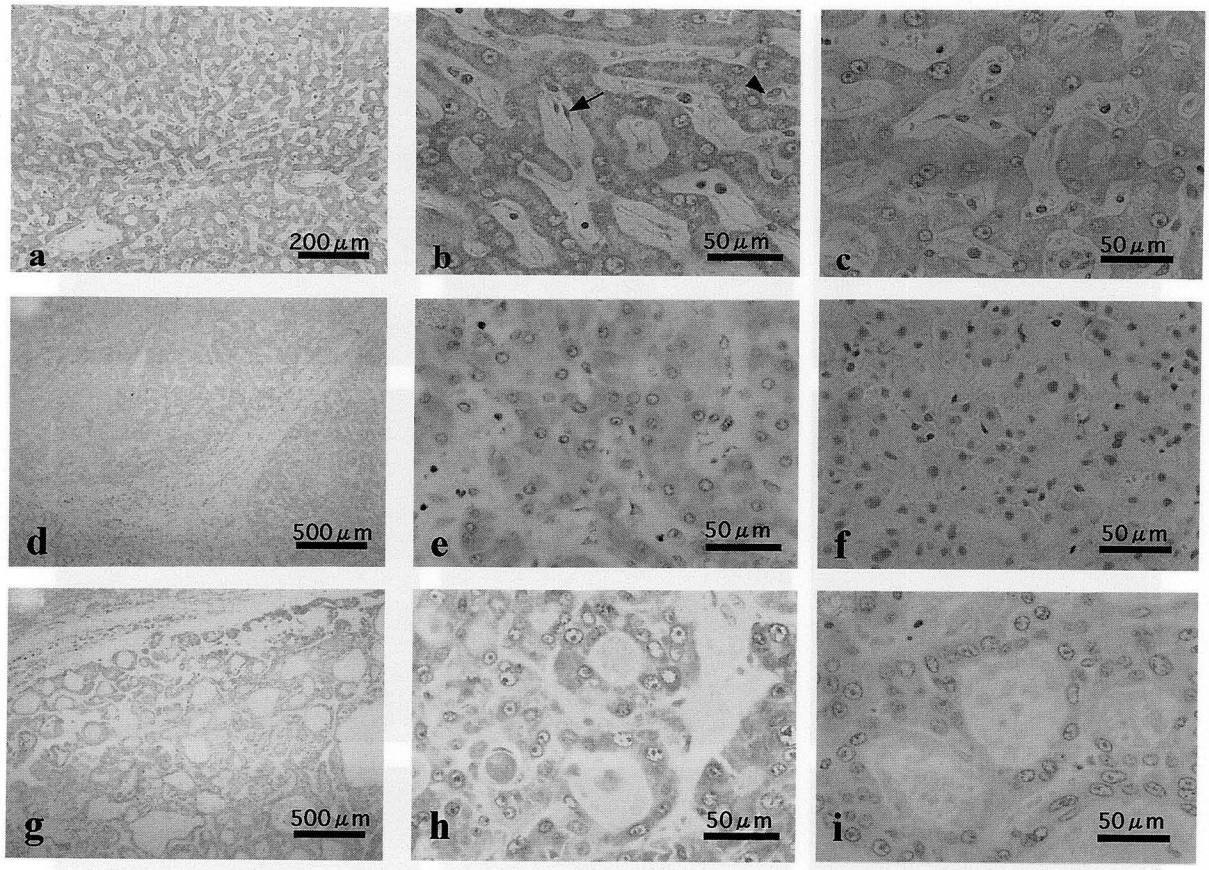
Cystein-rich domain に対する抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体を1次抗体として HepG2 細胞の培養上清でウェスタンブロットを行った結果，リコンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清に認められたバンドに一致する約 220 kDa のバンドを確認した（第9図）．対照とした HEK293/Mock の培養上清ではバンドは検出されなかった．この所見より HepG2 細胞で ADAMTS-13 が発現していることが判明し，ADAMTS-13 タンパクが HepG2 細胞で合成され，培養上清中に分泌されている可能性が示唆された．

5）肝細胞における mRNA の発現

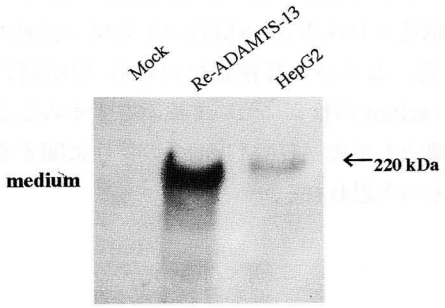
RT-PCR の結果，正常肝細胞，tPH5CH そして HepG2 において ADAMTS-13 の exon 1 に相当する 100 bp の cDNA フラグメントが増幅されたが，ヒト肝臓類洞毛細血管内皮細胞では増幅は認めなかった（第10図）．アガロースゲルより増幅されたバンドを切り出し DNA を抽出，精製した．得られた cDNA 断片について direct sequencing analysis により塩基配列を決



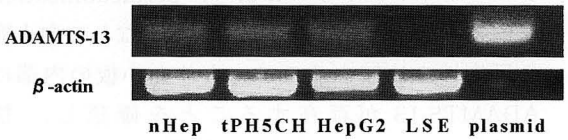
第７図．種々の肝細胞における ADAMTS-13 タンパクの発現．
正常肝細胞：(a)，(b)，(c)；tPH5CH 細胞：(d)，(e)，(f)；HepG2 細胞（g)，(h)，(i)．(a)，(d)，(g)：各々の細胞について抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行ったところびまん性に強く，顆粒状の染色パターンを示した．(b)，(e)，(h)；各々の細胞について HepPar1 抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ顆粒状に細胞質が染色された．(c)，(f)，(i) は non-immune rabbit IgG を用いた陰性コントロールである．(a)-(i) bar＝50 μm



第8図．肝組織における ADAMTS-13 の局在．
(a)（b）(c)：正常肝組織
(d)（e）(f)：肝硬変
(g)（h）(i)：肝細胞癌
(a)（b）(d)（e）(g)（h)：抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体
(c)（f）(i)：non immune rabbit IgG
(a)：bar＝200 μm
(d)（g)：bar＝500 μm
(b)（c）(e)（f）(h)（i)：bar＝50 μm
正常肝組織においてびまん性の強い顆粒状の染色性を示した．特に中心静脈周囲の肝細胞でより強い染色性が認められた（a，b）．血管内皮細胞（矢印）や Kupffer cell（矢頭）では ADAMTS-13 に対する反応はみられなかった（b）．また陰性コントロールでは染色を認めなかった（c）．また肝硬変，肝細胞癌組織において再生肝細胞（e），肝癌細胞（h）の両者が ADAMTS-13 に対してびまん性で強い顆粒状の染色パターンを呈した．一方 non-immune rabbit IgG では染色はみられなかった（f，i）．



第9図．HepG2の培養上清を用いたウェスタンブロット．
抗ADAMTS-13ペプチドBポリクローナル抗体を1次抗体としてHepG2細胞の培養上清でウェスタンブロットを行った．レーン左，HEK293/Mockの培養上清；レーン中央，HEK293/rADAMTS-13の培養上清；レーン右，HepG2細胞の培養上清．



第10図．種々の肝細胞におけるADAMTS-13 mRNAの発現．
正常肝細胞（nHep），tPH5CHまたHepG2細胞株から各々抽出したRNAを用いRT-PCRを施行したところ，リコンビナントADAMTS-13のplasmid cDNAでみられたシグナルと同じシグナルが検出された．しかしヒト肝臓類洞毛細血管内皮細胞（LSE）ではシグナルは検出されなかった．

定した．BLAST (Basic local alignment search tool) による検索の結果，ADAMTS-13 cDNA (exon1) であることを確認した．

考　察

1．血小板におけるVWF切断酵素（ADAMTS-13）の発現および血小板における局在

今回の検討により我々は初めて血小板でのADAMTS-13の発現を証明した．我々の実験結果によりADAMTS-13タンパクが血小板表面ではなく，血小板内部に存在すること，しかもVWFが貯蔵されているα顆粒内に存在していることが明らかとなった．また，ADAMTS-13 mRNAの定量的評価法としてリアルタイムPCRの有用性を示した．ADAMTS-13 mRNAについて6名の健常者間でほとんど定量的差異はみられなかった．これらの結果より血小板には定常量のADAMTS-13 mRNAとタンパクが存在しており，血小板による血漿中のADAMTS-13のエンドサイトーシスの結果ではないことが確認された．

今回の実験ではRT-PCRに際しADAMTS-13のexon 1から7に相当するcDNAの増幅を行った．さらにリアルタイムPCRではADAMTS-13のexon15-16に位置するTaqMan Probeを使用した．これによりゲノムDNAの増幅の可能性は除外され，少なくともexon 1から16に相当するADAMTS-13 mRNAが血小板に発現していることが明らかになった．Alternative splicingはADAMTS遺伝子ファミリーに共通する特徴であり，ADAMTS-13についても肝臓，前立腺，脳でsplice variantの報告がある[6]．血小板におけるsplice variantについても，今後その検討が必要と考えている．

VWFの15～25%は血小板のα顆粒内に貯蔵されておりトロンビンまたはADP刺激により血小板から血漿中に放出される．今回免疫電顕による検討からADAMTS-13がα顆粒内に存在していることが明らかとなり，その意義として血小板のADAMTS-13がVWFのサイズを制御している可能性が考えられる．血小板由来のVWFの性状は局所組織における血小板血栓形成において一つの制御因子となりうると考えられ，今後血小板のADAMTS-13の活性評価法を確立していくことは，易血栓性の予測という点で臨床的意義を有するものと思われる．また今後ADAMTS-13に対する自己抗体がTTP患者の血小板に結合するか，すなわちTTPの診断に血小板でのADAMTS-13に対する自己抗体が有用となりうるかについて検討が必要である．血小板におけるADAMTS-13の存在はTTPのみならず血小板血栓形成の病態において重要な役割を担うものと思われる．

2．肝臓におけるADAMTS-13の産生部位に関する検討

ADAMTS-13は現在までmRNAの解析により全長cDNAが肝臓でのみ特異的に発現したという報告[6), 8), 9)]にもとづき，血漿ADAMTS-13は肝臓由来であろうとされていたが，タンパクレベルでの発現ならびに肝臓のどの細胞がADAMTS-13を産生するかについての実験的証明はされていない．今回我々はヒトの肝臓において主に肝細胞でADAMTS-13が発現していることを新規に証明した．抗ADAMTS-13ペプチドBポリクローナ

ル抗体を1次抗体としてHepG2細胞の培養上清でウェスタンブロットを行った結果，リコンビナントADAMTS-13を含む培養上清に認められたバンドに一致する約220kDaのバンドが確認され，またHepG2におけるADAMTS-13 mRNAの発現が認められた．ヒト肝細胞癌の細胞株であるHepG2は正常肝細胞に帰する種々の機能を表す細胞株である．HepG2は，主要な血漿タンパクであるアルブミンやα-フェトプロテイン，フィブリノーゲンやアポリポタンパク，またプロトロンビンやアンチトロンビンなどの凝固に関わるタンパクを培養上清中に分泌する[18), 19)]．我々は，肝細胞における生合成と分泌を評価する上で有用なモデルとしてHepG2を実験に用いた．

肝硬変患者血漿でのADAMTS-13酵素活性は健常血漿に比し低下しており，生体肝移植により血漿ADAMTS-13の酵素活性が変化したという臨床報告[12)]の中で，血漿ADAMTS-13の酵素活性は肝臓で合成される血清アルブミンや総コレステロール価と相関すると報告されている．この知見はADAMTS-13の産生部位が肝細胞であることを示唆する我々の実験結果に矛盾しないものである．しかしながら，肝硬変患者の多くで血漿中にADAMTS-13のインヒビターが検出されたという口述発表もあり，肝硬変患者の血漿におけるADAMTS-13の活性低下は肝細胞の脱落のみで引き起こされるものではないと考えられる．

肝由来の血漿タンパクは肝細胞の粗面小胞体上のポリソームで合成される．肝細胞は肝臓の60%を占め，多角形をしている．肝細胞には3つの表面があり，1つめは類洞とDisse腔に面し，2つめは毛細胆管に面し，3つめは隣接する肝細胞に接している．我々の実験結果からは，肝細胞と類洞の内皮細胞の間にあるDisse腔ではADAMTS-13の発現はみられなかった．またRappaportによる肝臓のzonalityではzone 1は流入システム（門脈）に隣接，zone 3は流出システム（肝静脈）に隣接しzone 2はその間にある．すなわちzone 1，2，3は酸素と栄養内容の点では第1，第2，第3等級の血液で供給されているといえるが，免疫組織学的検討ではADAMTS-13の発現はzone 2に比しzone 1，3では強いという傾向は示したもののADAMTS-13の発現とzonalityの相関は明らかではなく，ADAMTS-13が流入システム，流出システム両方の近傍の肝細胞で合成されていることが示唆された．さらに，肝硬変を伴う肝細胞癌組織，ならびに種々の肝細胞における検討により，良性，悪性両方の肝細胞で明らかな差異なくADAMTS-13が発現されていることが明らかとなった．

今後肝細胞と血漿におけるADAMTS-13の活性の相関，肝細胞におけるADAMTS-13発現の制御因子に関する研究，ならびに肝細胞におけるADAMTS-13のsplice variantの検索について検討をすすめることにより，酵素としてのADAMTS-13の特性に関する知見が深まるものと思われる．

総　括

血栓形成に重要な役割を担うVWFの機能を制御するVWF切断酵素（ADAMTS-13）の血小板での発現と局在に関する検討，ならびに肝臓でのADAMTS-13の産生部位に関して検討を行い，以下の結果を得た．

1. ウェスタンブロットを用い血小板におけるADAMTS-13タンパクの発現を確認した．
2. フローサイトメトリーにより，permeabilization処理後またはpermeabilization処理なしの血小板の反応性を比較することにより血小板の内部にADAMTS-13が存在することを確認し，抗ADAMTS-13モノクローナル抗体を用いた血小板凍結超薄切片による免疫電顕法でα顆粒内の局在を示した．
3. RT-PCRにより血小板でのADAMTS-13mRNAの発現を示した．得られたcDNAの塩基配列が，ADAMTS-13 cDNA（exon1-7）であることを確認した．
4. 血漿ADAMTS-13の由来に関する検討の一環として肝臓に着目し，正常肝細胞ならびに肝細胞癌の細胞株において免疫組織染色を行い，細胞質におけるADAMTS-13の発現を確認した．
5. 免疫組織染色の結果，肝組織において肝細胞で主にADAMTS-13の発現を認めた．
6. HepG2細胞の培養上清を用いたウェスタンブロットにてADAMTS-13タンパクの発現を確認し，HepG2がADAMTS-13を合成し培養上清に分泌する可能性が示唆された．
7. RT-PCRにより正常肝細胞ならびに肝細胞癌の細胞株でADAMTS-13 mRNAの発現を認めた．

以上の結果より，血小板ADAMTS-13が血栓止血機構において局所でVWFを制御している可能性が示唆された．今後，血小板のADAMTS-13の活性評価法を確立していくことは，易血栓性の予測という点で臨床的意義を有するものと思われる．また血漿ADAMTS-13

の起源として肝細胞での産生が示唆され，今後肝機能とADAMTS-13 の相関，各種疾患における ADAMTS-13 の動態等を検索することにより，血栓形成に関与するADAMTS-13 の特性にさらなる知見が加わることと考えられる．

謝　辞

本稿を終えるにあたり，ご指導，ご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室池田康夫教授に深甚なる謝意を表します．また本研究に際し，直接ご指導，ご校閲をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室村田満先生，同病理学教室岡田保典教授に深謝いたします．また tPH5CH 細胞をご提供くださいました同病理学教室坂元亨宇教授，免疫電顕をご指導頂いた東京都臨床医学総合研究所鈴木英紀先生に感謝の意を表します．

なお本研究は慶應義塾大学リサーチパーク内における（株）第一製薬との共同研究の一環して行われた．

本論文は，Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y：Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. Biochem Biophys Res Comm 313：212-216, 2004. の一部を含む．

文　献

1) 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
2) Tsai HM：Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. Blood 87：4235-4244, 1996
3) Tsai HM, Lian ECY：Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 339：1585-1594, 1998.
4) Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lammle B：Von Willebrand factor cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. N Engl J Med 339：1578-1584, 1998
5) 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
6) Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler E, Fujikawa K：Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. J Biol Chem 276：41059-41063, 2001
7) 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
8) 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 JD, Tsai HM：Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura, Nature 413：488-494, 2001
9) 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
10) Plaimauer B, Zimmermann K, Volkel D, Antoine G, Kerschbaumer R,. Jenab P, Furlan M,Gerritsen H, Lammle B, Schwartz HP, Scheiflinger F：Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). Blood 100：3626-3632, 2002.
11) Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y：Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. Biochem Biophys Res Comm 313：212-216, 2004.
12) Lee TP, Bouhassira EE, Lyubsky S, Tsai HM：ADAMTS13, the Von Willebrand factor cleaving Metalloprotease, is expressed in the perisinusoidal cells of the liver. Blood 100：497 abstract, 2002
13) Matsumoto M, Chisuwa H, Nakazawa Y, Ikegami T, Hashikura Y, Kawasaki S, 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 96：636 abstract, 2000
14) Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M：Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 104：2081-2083, 2004.
15) Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuji H, Kanetaka K, Asaka M, Hirohashi S：Overexpression

of ORPHAN G-Protein-Coupled Receptor, Gpr49, in Human Hepatocellular Carcinomas with β-Catenin Mutations. Hepatology 37 : 528-533, 2003

16) Minervini MI, Demetris AJ, Lee RG, Carr BI, Madariaga J, Nalesnik MA : Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. Mod Pathol10 : 686-692, 1997

17) Siddiqui MT, Saboorian MH, Gokaslan ST, Ashfaq R : Diagnostic Utility of the HepPar 1 antibody to differentiate hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration samples. Cancer 96 : 49-52, 2001.

18) Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G : Further cellular investigation of the human hepatoblastoma derived cell line HepG2 : morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. In Vitro Cellular & Developmental Biology 25 : 267-275, 1989

19) Fair DS and Bahnak BR : Human hepatoma cells secrete single cain factor X, Prothrombin and Antithrombin III. Blood 64 : 194-204, 1984