

ADAMTS13 のノックアウトマウス

坂野史明*

Adamts13-knockout mice

Fumiaki BANNO

Key words: ADAMTS13, von Willebrand factor (VWF), thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), stroke, myocardial infarction, venous thrombosis

1. はじめに

ADAMTS13 は、A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 motif ファミリーに属する血漿プロテアーゼであり、血小板接着タンパク質フォンビルブランド因子(VWF)を特異的に切断する。VWF は主に血管内皮細胞および骨髄巨核球で合成され、2,050 アミノ酸残基のモノマーがN 末端同士、C 末端同士で多数繋がったホモマルチマーとして血中へ分泌される。VWF の血小板接着活性はマルチマーの分子量が大きいほど強く、とくに 20,000 kDa を超える超高分子量 VWF(ULVWF)マルチマーは、過度の血小板凝集を引き起こす。ADAMTS13 は ULVWF マルチマーの断片化を介して血小板血栓形成を抑制的に制御しており、ADAMTS13 活性が欠乏すると、重篤な血栓性疾患である血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の発症につながる。

2. ADAMTS13 欠損マウスから得られる情報

1) ADAMTS13 欠損マウスの表現型

われわれは、ADAMTS13 の触媒ドメインをコードするエキソン 3-6 を Neo 遺伝子と置換して ADAMTS13 欠損マウス(*Adamts13*^{-/-}マウス)を作製

した¹⁻³⁾。TTP 患者と同様に、*Adamts13*^{-/-}マウスの血漿中には ULVWF マルチマーの残存がみられた。しかし、*Adamts13*^{-/-}マウスの出生、発育に異常は認められず、血小板数、血漿ハプトグロビン量、凝固時間、出血時間、血液像、組織像、アゴニスト惹起血小板凝集能も正常で、予想された TTP 症状(血小板減少、溶血性貧血、微小血管内血小板血栓)は認められなかった。平行板型フローチャンバーを用いて、固相化コラーゲン表面上での高ずり応力下血小板血栓形成能を解析すると、*Adamts13*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べて血栓形成能が亢進していた(図 1A)。また、塩化鉄内皮傷害モデルを用いて、*in vivo* 血栓形成能を解析した結果、*Adamts13*^{-/-}マウスでは、傷害部位での血栓形成開始時間(図 1B)および血栓による血管閉塞時間(図 1C)がいずれも著明に短縮していた。さらに、コラーゲン-エピネフリン投与により全身性に血栓形成を惹起した場合、血栓誘発による消費性血小板減少が *Adamts13*^{-/-}マウスで顕著に認められた。したがって、マウスにおいて ADAMTS13 欠損は、血中に ULVWF マルチマーの残存を引き起こし、潜在的な易血栓形成傾向をもたらすが、それだけでは TTP 発症に至らないことが明らかとなった。

ミシガン大学の Ginsburg 博士らも *Adamts13*^{-/-}マウスを作製しており、やはり通常飼育下で TTP 症状は見られないと報告した⁴⁾。彼らは、C57BL/6 系統に比べて血中 VWF 量が約 10 倍高い CASA/Rk 系統への戻し交配により、*Adamts13*^{-/-}マウスの血小板数が有意に低下することを見出した。このマウスに

*責任者連絡先:

国立循環器病研究センター 分子病態部
〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1
Tel: 06-6833-5012, Fax: 06-6835-1176
E-mail: banno@ncvc.go.jp

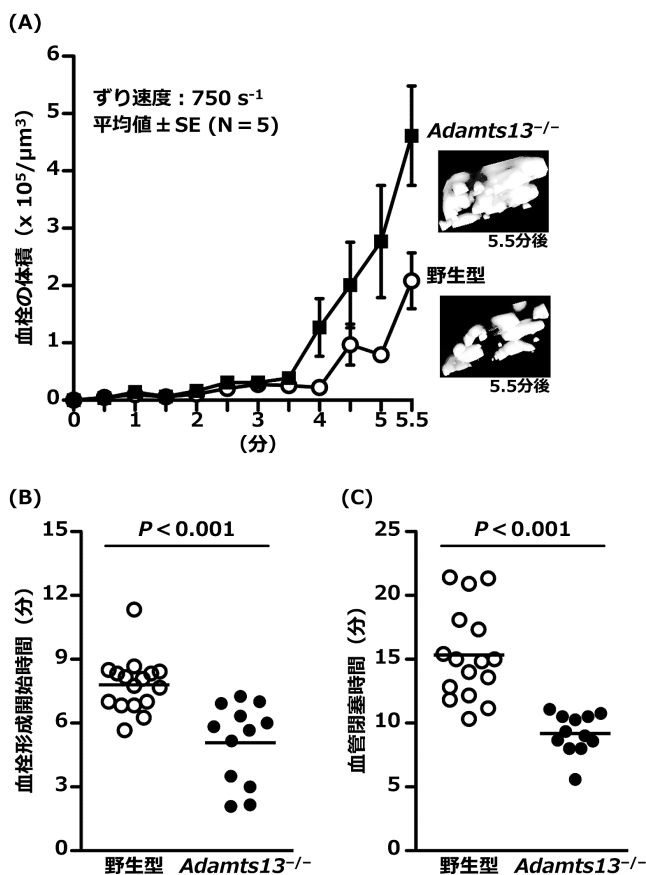


図1 Adamts13^{-/-} マウスの全血ずり応力下血小板血栓形成と塩化鉄内皮傷害部位での血小板血栓形成(文献2および3より改変)

(A)野生型および Adamts13^{-/-} マウスから採取した血液を平行板型フローチャンバーに流し、固相化コラーゲン表面上での血栓形成を経時観察した。Adamts13^{-/-} マウスでは血小板血栓成長の亢進が認められた[*P<0.05]。 (B, C)野生型および Adamts13^{-/-} マウスの腸間膜動脈を、10%塩化鉄溶液にて傷害した部位での血小板血栓形成を経時観察した。Adamts13^{-/-} マウスでは、(B)動脈内に直径 30 μm の血栓が生じるまでの血栓形成開始時間および、(C)動脈が閉塞して30秒以上の血流停止が起こるまでの血管閉塞時間がいずれも野生型マウスに比べて短縮した。

内皮細胞を傷害する志賀毒素を投与すると、血小板減少が重篤化すると共に、一部の Adamts13^{-/-} マウスに破碎赤血球を伴う溶血、微小血管内へのVWFに富む血栓沈着といったTTP様の症状が惹起された。その後、ULVWFを含む組換え体ヒトVWFを Adamts13^{-/-} マウスに大量投与(≥2000単位/kg)することで、TTP様症状が誘起されることが報告された⁵⁾。また、ヒヒではADAMTS13活性阻害抗体の静注によりTTP症状が再現性よく顕れることが報告されており⁶⁾、マウスは霊長類に比べてADAMTS13欠損状態に対する許容度が高いのかもしれない。

当初の予想に反して、Adamts13^{-/-} マウスは別刺激の追加なしにはTTPモデルとして利用できないことが判明したが、VWF依存性の易血栓傾向を持ちながら、通常どおり出生、発育することから、TTP以外の血栓症におけるADAMTS13の働きを調べる上では都合が良く、様々な血栓症モデルを用いた解析に利用されている⁷⁻¹³⁾。

2) 脳梗塞とADAMTS13

奈良県立医科大学の藤岡らは、局所脳虚血におけるADAMTS13の病態生理学的意義を明らかにする目的で、われわれが作製した Adamts13^{-/-} マウスを用いて、脳梗塞モデルの解析を行った^{7,8)}。

小泉ら¹⁴⁾の変法によるintraluminal suture modelを用いて、Adamts13^{-/-} マウスに一過性局所脳虚血を負荷した。まず左側総頸動脈と外頸動脈を結紮後、先端をシリコン樹脂でコーティングしたナイロン糸を、内頸動脈を介して中大脳動脈起始部まで挿入することにより脳虚血を誘導した。虚血誘導30分後にナイロン糸を引き抜いて再灌流を行った。野生型および Adamts13^{-/-} マウス間で虚血中の脳血流量低下は同等であったが、再灌流後の脳血流量は Adamts13^{-/-} マウスで進行性に低下し、著しい虚血後低灌流が認められた。虚血誘導24時間後に脳梗塞巣を観察すると、Adamts13^{-/-} マウスでは脳虚血領域の微小血管内にVWF陽性の血栓が多数認められ、脳梗塞体積が野生型マウスに比べて増大した(図2A)。また、

Adamts13^{-/-} マウスでは炎症性メディエーターである High Mobility Group Box1 (HMGB1) の血漿レベルが顕著に上昇しており、脳虚血領域への HMGB1 を発現する炎症細胞の浸潤と選択的神経細胞死の増大も確認された。これらの結果から、ADAMTS13 が欠損すると脳虚血後の微小血管内血栓形成および炎症反応が増強し、脳機能障害が増強されると考えられた。

ハーバード大学の Wagner 博士らも同様の脳梗塞モデルを用いた解析から、*Adamts13*^{-/-} マウスでは脳梗塞が重症化すると報告している⁹⁾。これまでに行われた症例対照研究の結果を統合したメタアナリシスでも、ADAMTS13 活性低下と虚血性脳梗塞との間に有意な関連 (OR 2.72, 95%CI 1.52–4.86) が認められており¹⁵⁾、やはり ADAMTS13 は脳梗塞抑制に寄与すると考えられる。また、組換え体ヒト ADAMTS13 をマウスに投与すると脳梗塞サイズが縮小したが、脳出血は生じなかった^{8,9)}。ADAMTS13 はずり応力依存的に VWF を切断するため、血管を狭窄する病的血栓のみを溶解し、出血リスクの低い安全な脳保護薬となる可能性を秘めていると考えられる。

3) 心筋梗塞と ADAMTS13

急性心筋梗塞は冠動脈閉塞によって引き起こされるが、心筋障害域の大小には冠動脈以外の側副血行路等の血流血行動態の変化が影響する。奈良県立医科大学の土井らは、冠動脈閉塞後の心筋血行動態に対する ADAMTS13 の影響を調べるため、われわれの *Adamts13*^{-/-} マウスを用いて心筋梗塞モデルの解析を行った¹⁰⁾。

マウスを人工呼吸下に開胸し、冠動脈左前下行枝を結紮して心筋梗塞を誘導した。1週間後の心機能を M モード左心室エコーで評価した後、心臓を摘出して梗塞組織を観察した。その結果、野生型マウスと比較して *Adamts13*^{-/-} マウスで有意な心機能低下と梗塞巣の増大を認め、これらの所見は組換え体ヒト ADAMTS13 の投与で野生型マウスのレベルにまで改善された (図 2B)。Wagner 博士らは、心筋虚血再灌流モデルを用いた解析を行い、やはり *Adamts13*^{-/-} マウスでは野生型マウスに比べて梗塞巣体積が増大すると報告している¹¹⁾。また、アイオワ大学の Chauhan 博士らも、同様の心筋虚血再灌流条件で、*Adamts13*^{-/-} マウスでは心筋梗塞が拡大し、*Vwf*^{-/-} マウスでは逆に縮小することを明らかにした¹²⁾。以上

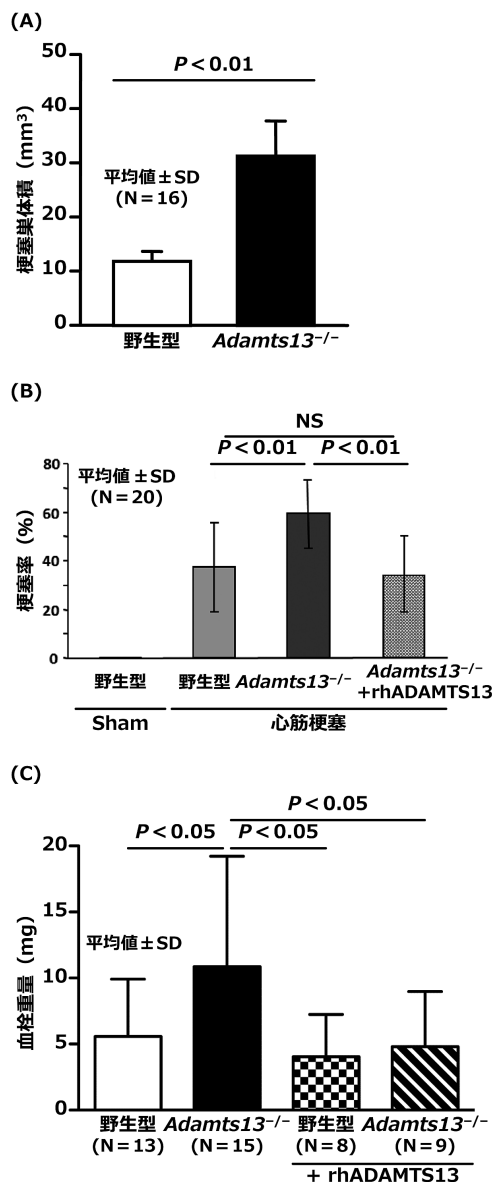


図 2 *Adamts13*^{-/-} マウスの動静脈血栓症状 (文献 7, 10, 13 より改変)

(A) *Adamts13*^{-/-} マウスの脳梗塞症状: 中大脳動脈閉塞再灌流 24 時間後、野生型および *Adamts13*^{-/-} マウスの脳切片を 2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロライドで染色し、梗塞巣の体積を測定した。*Adamts13*^{-/-} マウスでは脳梗塞巣の拡大が見られた。(B) *Adamts13*^{-/-} マウスの心筋梗塞症状: 急性心筋梗塞誘導 1 週間後、野生型および *Adamts13*^{-/-} マウスの心臓切片をアザン染色し、梗塞率 (全左心室面積に対する梗塞巣面積の比率) を測定した。*Adamts13*^{-/-} マウスでは梗塞率が上昇したが、組換え体ヒト ADAMTS13 (rhADAMTS13) の投与で野生型マウスと同等にまで改善した。(NS: 有意差なし) (C) *Adamts13*^{-/-} マウスの静脈血栓症状: 下大静脈血栓誘導 2 日後、野生型および *Adamts13*^{-/-} マウスの静脈血栓重量を測定した。*Adamts13*^{-/-} マウスでは静脈血栓形成が亢進したが、rhADAMTS13 の投与で野生型マウスと同等にまで改善した。

の結果は少なくともマウスでは、ADAMTS13が心筋梗塞における心筋保護に作用することを示している。ADAMTS13によるVWF活性制御はTTPをはじめとする微小血管血栓症だけでなく、脳梗塞や心筋梗塞といった動脈血栓症の病態形成にも深く関わっていると考えられる。

4) 静脈血栓症とADAMTS13

深部静脈血栓症(DVT)や肺塞栓症などの静脈血栓症は、動脈血栓症と並んで重要な血栓性疾患である。病理解剖所見から、静脈血栓はフィブリン主体の赤色血栓とされており、血液凝固系が主役となって形成されると考えられている。しかし、近年のモデルマウスを用いた解析から、とくに静脈血栓形成の初期相で血小板が必須の役割を演じることが判ってきた¹⁶⁾。静脈では血流速度が遅いため、とくに静脈弁裏のポケットに血流の鬱滞が生じやすい。この鬱滞が持続すると低酸素状態となり、血管内皮細胞が活性化してVWFやP-セレクチンなどの接着因子が表在化する。これらの接着因子を介して血小板が内皮細胞に結合し、白血球の内皮細胞へのリクルートを促進する。内皮上に接着、活性化した白血球やそのマイクロパーティクルが発現する組織因子および、好中球が放出するNeutrophil Extracellular Traps (NETs, 核染色体DNAを含む網状物質)が凝固カスケード反応を活性化することで静脈血栓症が引き起こされる。

マウス下大静脈DVTモデルを用いた検討から、*Vwf*^{-/-}マウスではDVTが抑制されること、野生型マウスに血小板とVWFの結合を阻害する抗体を投与するとDVTを予防できることが報告されている¹⁷⁾。これらの結果は、ADAMTS13がVWF活性制御を介して静脈血栓の抑制にも寄与する可能性を示唆している。われわれはこの点を解明すべく、*Adamts13*^{-/-}マウスを用いた下大静脈DVTモデルの解析を行った¹³⁾。

マウス下大静脈にステンレス電極を挿入して200 μ Aまたは100 μ Aで10分間通電した。これにより、電極の電気分解で生じるフリーラジカルが血管内皮細胞を活性化し、血栓形成が誘発される¹⁸⁾。生じる血栓が最大となる処置2日後に採血して末梢血血小板数を測定後、下大静脈内血栓重量を測定した。まず、200 μ A・10分間の通電条件によりDVT

を誘発した結果、*Adamts13*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べて、消耗性と考えられる血小板減少が重症化した。この条件下では、*Adamts13*^{-/-}マウスで処置2日以前に死亡する個体が出現したため(9匹中3匹、野生型マウスは9匹中死亡個体は0匹)、血管障害刺激をより穏やかな100 μ A・10分間の通電条件にすると、野生型、*Adamts13*^{-/-}マウス共に処置2日目までに死亡例は見られず、血小板減少も緩やかに留まった。しかし、下大静脈内に形成された血栓の重量は*Adamts13*^{-/-}マウスで野生型マウスに比べて大きく、ADAMTS13欠損がDVT悪化の原因となることが確認された(図2C)。この*Adamts13*^{-/-}マウスの症状は組換え体ヒトADAMTS13の投与で野生型マウスと同レベルにまで改善した(図2C)。DVT患者の次世代シーケンサーを用いた解析から、ADAMTS13遺伝子変異がDVT発症と有意な関連を示すことも報告されており¹⁹⁾、ADAMTS13によるVWF依存性の血小板接着や、これに引き続く白血球活性化の抑制は、静脈血栓症発症においても重要な役割を担っていると考えられる。

3. おわりに

ADAMTS13欠損マウスに見られる血栓症状について、われわれが得た知見を中心に紹介した。この他にもADAMTS13欠損マウスでは、動脈硬化^{20, 21)}や敗血症^{22, 23)}症状の悪化が認められることが報告されている。マウスの結果は、ADAMTS13が多くの血栓性疾患や炎症性疾患の抑制に重要となることを示唆しており、今後、大規模集団を対象とした疫学研究での確認や、組換え体ADAMTS13を用いた介入試験の実施が期待される。

著者の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) 坂野史明：ADAMTS13の欠損は血栓性血小板減少性紫斑病の十分条件か？：モデルマウスからの知見。血栓止血誌 18: 36-45, 2007.
- 2) Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Complete deficiency in ADAMTS13

- is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **107**: 3161–3166, 2006.
- 3) Banno F, Chauhan AK, Kokame K, Yang J, Miyata S, Wagner DD, Miyata T: The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood* **113**: 5323–5329, 2009.
 - 4) Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, Homeister J, Lamb CB, Desch KC, Zhang W, Tsai HM, Wagner DD, Ginsburg D: Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest* **115**: 2752–2761, 2005.
 - 5) Schiviz A, Wuersch K, Piskernik C, Dietrich B, Hoellriegl W, Rottensteiner H, Scheiflinger F, Schwarz HP, Muchitsch EM: A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood* **119**: 6128–6135, 2012.
 - 6) Feys HB, Roodt J, Vandeputte N, Pareyn I, Lamprecht S, van Rensburg WJ, Anderson PJ, Budde U, Louw VJ, Badenhorst PN, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K: Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (*Papio ursinus*). *Blood* **116**: 2005–2010, 2010.
 - 7) Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, Kunizawa A, Irie K, Higuchi S, Nakano T, Muroi C, Fukushima H, Sugimoto M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Fujiwara M, Okuchi K, Nishio K: ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* **115**: 1650–1653, 2010.
 - 8) Fujioka M, Nakano T, Hayakawa K, Irie K, Akitake Y, Sakamoto Y, Mishima K, Muroi C, Yonekawa Y, Banno F, Kokame K, Miyata T, Nishio K, Okuchi K, Iwasaki K, Fujiwara M, Siesjö BK: ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci* **33**: 1107–1115, 2012.
 - 9) Zhao BQ, Chauhan AK, Canault M, Patten IS, Yang JJ, Dockal M, Scheiflinger F, Wagner DD: von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. *Blood* **114**: 3329–3334, 2009.
 - 10) Doi M, Matsui H, Takeda H, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M: ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* **108**: 1236–1238, 2012.
 - 11) De Meyer SF, Savchenko AS, Haas MS, Schatzberg D, Carroll MC, Schiviz A, Dietrich B, Rottensteiner H, Scheiflinger F, Wagner DD: Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* **120**: 5217–5223, 2012.
 - 12) Gandhi C, Motto DG, Jensen M, Lentz SR, Chauhan AK: ADAMTS13 deficiency exacerbates VWF-dependent acute myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* **120**: 5224–5230, 2012.
 - 13) Tashima Y, Banno F, Akiyama M, Miyata T: Influence of ADAMTS13 deficiency on venous thrombosis in mice. *Thromb Haemost* **114**: 206–207, 2015.
 - 14) Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G: Experimental studies of ischemic brain edema. I. a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* **8**: 1–8, 1986.
 - 15) Sonneveld MA, de Maat MP, Leebeek FW: Von Willebrand factor and ADAMTS13 in arterial thrombosis: a systematic review and meta-analysis. *Blood Rev* **28**: 167–178, 2014.
 - 16) Mackman N: New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest* **122**: 2331–2336, 2012.
 - 17) Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, Yang JJ, De Meyer SF, Köllnberger M, Wakefield TW, Lämmle B, Massberg S, Wagner DD: von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* **117**: 1400–1407, 2011.
 - 18) Diaz JA, Obi AT, Myers DD, Wroblewski SK, Henke PK, Mackman N, Wakefield TW: Critical review of mouse models of venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**: 556–562, 2012.
 - 19) Lotta LA, Tuana G, Yu J, Martinelli I, Wang M, Yu F, Passamonti SM, Pappalardo E, Valsecchi C, Scherer SE, Hale W, Muzny DM, Randi G, Rosendaal FR, Gibbs RA, Peyvandi F: Next-generation sequencing study finds an excess of rare, coding single-nucleotide variants of ADAMTS13 in patients with deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* **11**: 1228–1239, 2013.
 - 20) Gandhi C, Khan MM, Lentz SR, Chauhan AK: ADAMTS13 reduces vascular inflammation and the development of early atherosclerosis in mice. *Blood* **119**: 2385–2391, 2012.
 - 21) Jin SY, Tohyama J, Bauer RC, Cao NN, Rader DJ, Zheng XL: Genetic ablation of Adams13 gene dramatically accelerates the formation of early atherosclerosis in a murine model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**: 1817–1823, 2012.
 - 22) Chauhan AK, Walsh MT, Zhu G, Ginsburg D, Wagner DD, Motto DG: The combined roles of ADAMTS13 and VWF in murine models of TTP, endotoxemia, and thrombosis. *Blood* **111**: 3452–3457, 2008.
 - 23) Lerolle N, Dunois-Lardé C, Badirou I, Motto DG, Hill G, Bruneval P, Diehl JL, Denis CV, Baruch D: von Willebrand factor is a major determinant of ADAMTS-13 decrease during mouse sepsis induced by cecum ligation and puncture. *J Thromb Haemost* **7**: 843–850, 2009.