

血栓性微小血管症(TMA)診断における ADAMTS13検査の重要性

The importance of the examination for ADAMTS13 in the thrombotic microangiopathy (TMA) diagnosis

まつもと まさ のり
松本 雅 則
Masanori MATSUMOTO

はじめに

ADAMTS13という用語は、医療関係者の間ではかなり有名になってきていると感じる。正式な名称は、a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13であり、ADAMTSファミリーで13番目に報告された。von Willebrand因子(VWF)切断酵素と呼ばれていた頃からこの酵素を研究してきた私にとっては、非常に嬉しいことである。ADAMTS13は、血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)の診断のみでなく、非典型型溶血性尿毒症症候群(atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS)などの血栓性微小血管症(thrombotic microangiopathy, TMA)の除外診断に用いられる検査として重要性が増している。にもかかわらず、ADAMTS13検査は、対外診断用医薬品に承認されている検査キットが販売さ

れていないために、今も保険適用となっていない。本稿では、ADAMTS13検査が診断に重要なTMAの病態について説明し、ADAMTS13検査の種類につき概説する。

I. TMAとその分類

TMAとは、血小板減少とクームス試験陰性の溶血性貧血に、腎障害や精神神経障害などの臓器障害を合併する疾患群である¹⁾。TMAに含まれる疾患では、TTPとHUSが有名であるが、それ以外にも造血幹細胞移植や自己免疫疾患などに伴って発症する2次性TMAがある。臨床所見のみでこれらを診断することは困難であったが、次々と新たな病因が報告されている。そこで、最近ではできるだけその病因によって診断することが推奨されるようになった²⁾(表1)。

TTPは、血小板減少、溶血性貧血、腎機能障害、

表1 病因による血栓性微小血管症(TMA)の分類

病因	原因	臨床診断
ADAMTS13活性著減	ADAMTS13遺伝子異常	先天性TTP(Upshaw-Schulman症候群)
	ADAMTS13に対する自己抗体	後天性TTP
感染に伴うHUS	志賀毒素産生大腸菌(STEC)(O157大腸菌など)	STEC-HUS
	肺炎球菌(ニューラミダーゼ分泌)	肺炎球菌HUS
補体系の障害	遺伝的な補体制御因子異常	Atypical HUS
	抗Factor H抗体などの後天的な障害	
病因不明	膠原病(SLE、強皮症など)	膠原病関連TMA
	造血幹細胞移植	移植後TMA
	悪性腫瘍	悪性腫瘍合併TMA
	妊娠	妊娠関連TMA
	薬剤(マイトマイシンなど)	薬剤性TMA
	その他	TTP類縁疾患など

TTP: thrombotic thrombocytopenic pupura
HUS: hemolytic uremic syndrome
SLE: systemic lupus erythematosus

発熱、精神神経症状の古典的 5 徴候で従来は診断されていた³⁾。その後 ADAMTS13 が発見され、現在では ADAMTS13 活性が 10% 未満の症例を指すようになった⁴⁾。TTP には、ADAMTS13 遺伝子に異常がある先天性 TTP (別名 Upshaw-Schulman 症候群, USS) と、主として ADAMTS13 に対する IgG 型の自己抗体 (インヒビター) によって同酵素活性が低下する後天性 TTP が存在する。なお、5 徴候を持つが ADAMTS13 活性が著減していない症例は、従来は TTP と診断されていたが、現在は TTP 類縁疾患と考えられている。

HUS は、血小板減少、溶血性貧血、腎不全の 3 徴候が特徴とされるが⁵⁾、そのほとんどの症例が、O157 などの志賀毒素産生大腸菌 (shigatoxin producing *E. coli*, STEC) 感染に伴う症例である。それ以外を aHUS と診断していたが、最近では補体第二経路の異常活性化による補体関連の症例のみを aHUS と診断する傾向にある。それ以外に肺炎球菌感染に伴って HUS が発症することが知られているが、日本国内での報告はほとんどない。

その他、全身性エリトマトーデス (SLE) や強皮症などの膠原病、造血幹細胞移植などの移植後、悪性腫瘍、妊娠、薬剤などに伴う二次性 TMA が存在する。これらの二次性 TMA は病因不明であり、基礎疾患名で呼ばれることが多い (表 1)。

II. ADAMTS13 とは

ADAMTS13 は亜鉛型のメタロプロテアーゼで、現在までに知られている唯一の基質は VWF のみである。VWF A2 ドメインの 1605 番目のアミノ酸であるチロシンと 1606 番のメチオニン間のペプチド結合を切断する⁶⁾。ADAMTS13 は、図 1 に示すように多くのドメインからなるが、*furin* によりシグナルペプチド、プロペプチド部位が切断され、血液中にはメタロプロテアーゼドメイン (M) から CUB ドメインの部分で存在する⁷⁾。ただし、*in vitro* での VWF の切断は、M からスペーサードメイン (S) のみが必須であることが報告されている⁸⁾。M ドメインで VWF の切断を行い、ディスインテグリンドメイン (D)、シスリッチドメイン (C)、S ドメインで VWF を認識すると考えられている。それより C 末端の機能は不明な部分が多いが、血管内皮細胞への結合などが報告されている⁹⁾。

III. ADAMTS13 活性著減による TTP の病態

ADAMTS13 の基質である VWF は主として血管内皮細胞で分泌される。分泌直後は、非常に大きな

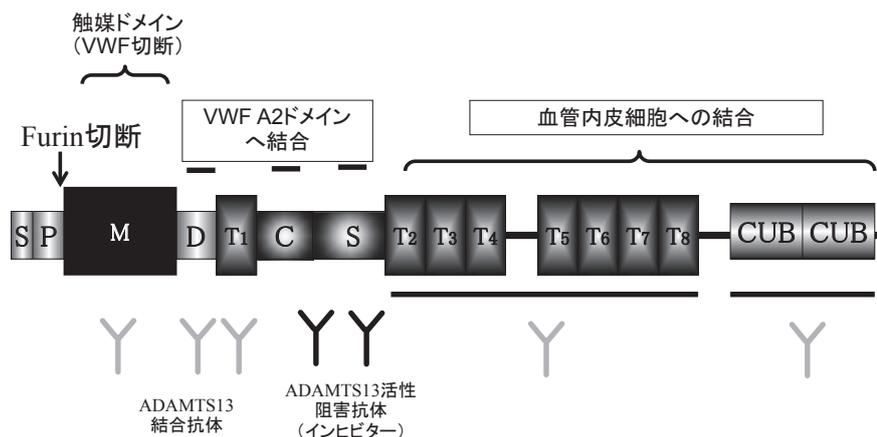


図 1 ADAMTS13 のドメイン構造と自己抗体の認識部位

多くのドメイン構造からなるが、その活性発現には MDTCS が重要である。それより C 末端部分は A2 ドメイン以外の VWF や血管内皮細胞への結合に必要であることが報告されている。ADAMTS13 に対する自己抗体の認識部位は酵素全体に広く分布しているが、インヒビターの認識部位は CS 部分が中心である。

シグナルペプチド (S)、プロペプチド (P)、メタロプロテアーゼドメイン (M)、ディスインテグリン様ドメイン (D)、トロンボスポンジン 1 モチーフ (T)、シスチンリッチドメイン (C)、スペーサードメイン (S)

分子量の超高分子量 VWF マルチマー (unusually large VWF multimers, UL-VWFM) である。VWF の主要な機能として、血小板と結合して血小板血栓を形成して止血することである。この機能は、分子量に比例し、UL-VWFM は血小板血栓を作りやすい分子であるといえる¹⁰⁾。血管内皮細胞から分泌された UL-VWFM は ADAMTS13 によって切断され、適度の分子量の VWF マルチマーとして存在する。また、VWF はずり応力との関連も注目されている。ずり応力とは物体を歪ませる力で、流速が早いほど、血管の半径が小さいほどずり応力が高くなる。つまり、動脈で細い微小血管で高いずり応力がかかることになる。VWF は高ずり応力下で活性化するが、逆に高ずり応力下では ADAMTS13 によって切断されやすくなる。

図 2 に示すように、UL-VWFM は半径の大きい大動脈などのずり応力の低い部分では、折り畳まれた構造で血小板と結合できない。ずり応力の高い微小血管では、伸展構造となり血小板と結合することで血小板血栓を作る危険があるため、ADAMTS13 によって切断される。しかし、TTP では ADAMTS13 活性が著減するため UL-VWFM が切断されず、血小板血栓を形成し、脳の血流が遮断されれば精神

経症状、腎臓であれば腎機能障害などの臓器障害が発生することになり、TTP が発症する。

IV. ADAMTS13 検査

ADAMTS13 の検査で臨床的に頻用されているのが、ADAMTS13 活性と同酵素に対する自己抗体 (インヒビター) である。

1. ADAMTS13 活性測定

ADAMTS13 活性測定は、全長の VWF を *in vitro* で切断することが困難であることから、尿素やグアニジン塩酸などの蛋白変成剤を添加して測定していたが、それでも切断に 1 時間以上を要した。そのあと、切断を定量化するためにウエスタンブロットなどにて確認するため、測定結果を得るために数日を要する検査であった^{11,12)}。2004 年に ADAMTS13 によって切断される VWF の最小基質は、A2 ドメイン内の 73 アミノ酸残基 (VWF73) であることが報告され¹³⁾、簡便な ADAMTS13 活性測定法が報告されるようになった。まず、ADAMTS13 による切断部位を挟むように蛍光基と消光基を導入した化学合成の基質 FRET-S-VWF73 を利用した活性測定法があ

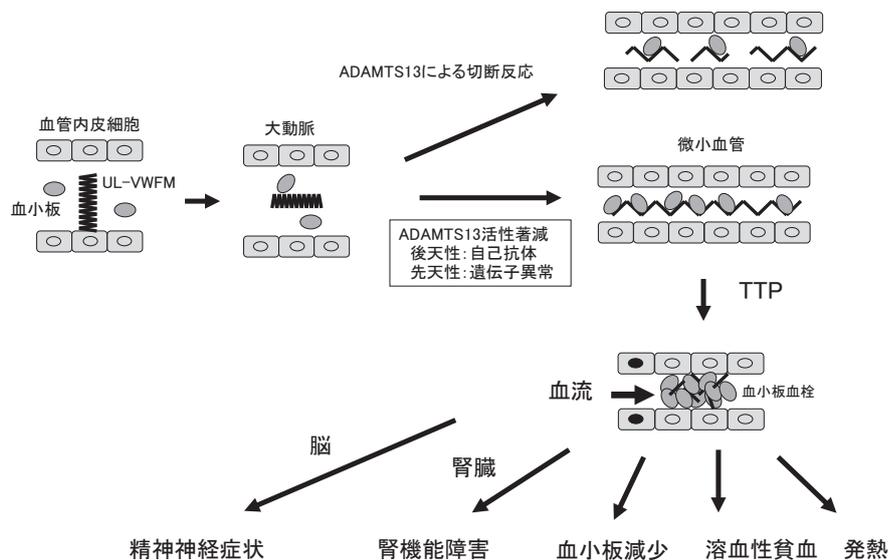


図 2 TTP の発症機序

VWF は主として血管内皮細胞で超高分子量 VWF 重合体 (UL-VWFM) として産生され、血液中に分泌される。大動脈などのずり応力が比較的低い部分では UL-VWFM は折り畳まれて血小板と結合しないが、微小血管ではずり応力が高くなり、伸展構造となって血小板と結合しやすくなる。健康人では ADAMTS13 によって UL-VWFM は適度に切断され血栓は形成しないが、TTP では ADAMTS13 が働かないため血小板血栓を形成する。そのため、脳への血流が遮断されると精神神経障害が発生し、腎臓では腎機能障害を認めるようになり、TTP を発症する。

る(図3左)¹⁴⁾。切断前は、蛍光基と消光基の距離が近いため、FRETs (fluorescence resonance energy transfer) 反応による蛍光を發しないが、ADAMTS13による切断によって距離が遠くなり蛍光を發するようになる。また、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を利用した測定法もある(図3右)¹⁵⁾。これは、ADAMTS13によるVWFの切断断端(チロシン1605番)を特異的に認識する抗体(N10)の作成によって可能となった。プレート上に抗GST抗体を固相化し、基質であるGST-VWF73-Hisを結合させ、ADAMTS13で切断し、N10によって切断生成物を定量するELISAである。この2つの方法の開発により、数時間でADAMTS13活性を計測できるようになった。

2. ADAMTS13 自己抗体測定

ADAMTS13に対する自己抗体として、活性を阻害する抗体(インヒビター)と非阻害抗体が存在する¹⁶⁾。後天性TTP患者で認められる自己抗体の多くはIgG型のインヒビターである¹²⁾。インヒビターは、ADAMTS13活性測定法を用いて、第VIII因子インヒビターに準じたBethesda法で定量化することが多い。一方、非阻害抗体はADAMTS13に結合することで血液中からのADAMTS13のクリアランスを亢進させるなどによってTTPを發症することが予想され、ELISAによって検出される。非阻害抗体としてIgG以外にIgA¹⁷⁾やIgM¹⁶⁾の存在も報告されているが、健常人でも非阻害抗体が検出される

ことがあり、その臨床的意義は明らかではない。

3. ADAMTS13 抗原量測定

ADAMTS13の抗原量測定は、サンドイッチELISAによるものとウエスタンブロットにより測定する方法が報告されている。ADAMTS13抗原量測定は、先天性TTPでは有用であるが、後天性TTPでは有用でない場合がある¹⁸⁾。後天性TTPでは、活性が著減している場合でもADAMTS13抗原が明らかに存在する症例がある。これは、ADAMTS13とインヒビターが複合体として血液中に存在することが原因ではないかと考えられる。

V. ADAMTS13によるTMAの鑑別診断

ADAMTS13検査のTMA診断における役割について述べる(図4)。原因不明の血小板減少と溶血性貧血を認めた場合、TMAを疑うことが重要である。TMAを疑えば、ADAMTS13活性を測定すると同時にSTECについて検索する。ADAMTS13活性が10%未満に著減している症例はTTPと診断する。インヒビターが陰性であれば先天性TTP、陽性であれば後天性TTPであるが、インヒビターを陰性と判断するのは困難な場合がある。そのため、先天性TTPの確定診断はADAMTS13遺伝子解析である。

「ADAMTS13活性が10%以上でSTEC陰性であれば、すべてaHUSと診断する」という誤った考え

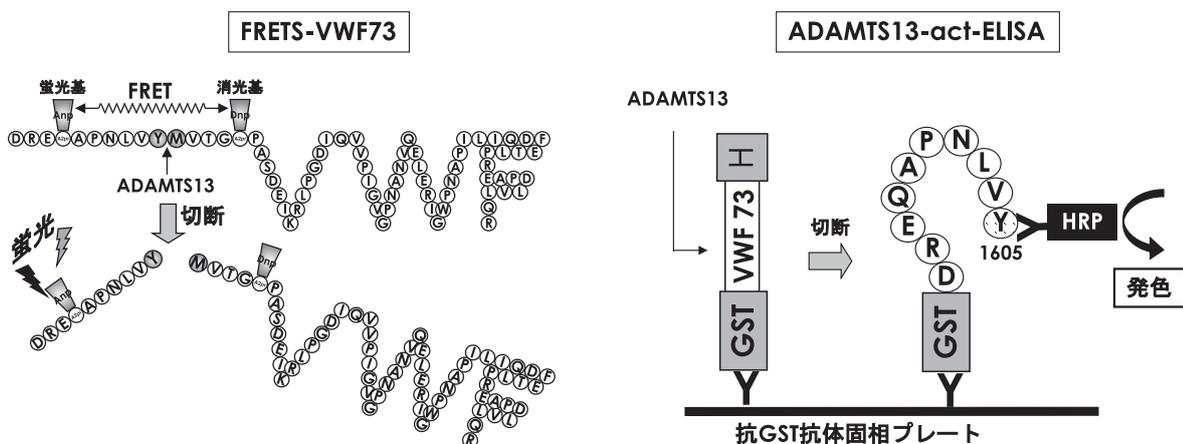


図3 ADAMTS13活性測定法の原理

FRETS-VWF73は、VWF73に蛍光基と消光基を導入した化学合成の基質を利用した活性測定法である(左図)。切断前は、蛍光基と消光基の距離が近いため、蛍光を發しないが、ADAMTS13による切断によって距離が遠くなり蛍光を發するようになる。ADAMTS13-act-ELISA(右図)は、ADAMTS13によるVWFの切断断端を特異的に認識する抗体を利用する方法である。

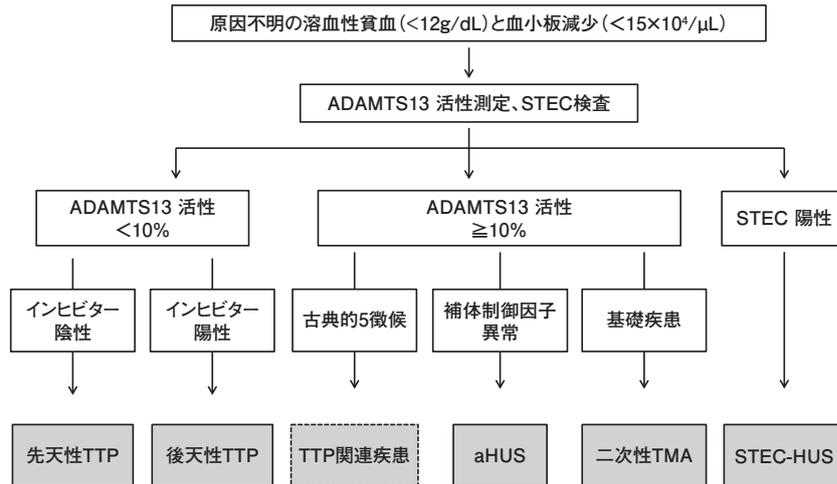


図4 TMA診断におけるADAMTS13検査

ADAMTS13 活性測定は TTP の診断と aHUS の除外診断に必須の検査である。
 ADAMTS13 インヒビター検査は、先天性と後天性 TTP の鑑別診断に重要である。
 STEC : shigatoxin producing *E. coli*

を持っている臨床医がいるが、aHUSは補体制御因子異常のあるTMAのみを指す傾向にある。図4に示すように、二次性TMAなどもこの範疇に入ること認識すべきである。現状では補体異常を判定する特異的な検査が無い状態であるので、専門医であっても臨床的に診断することは容易ではない。なお、古典的5徴候を持つなど臨床的にはTTPであるが、ADAMTS13活性が10%異常の症例が少なからず存在する。このような症例は、従来はTTPと診断され、血漿交換が行われて、ある程度の効果が認められた。今のところ病因が明らかではないが、ADAMTS13の血管内皮細胞への結合部位と考えられるCD36に対する抗体の存在などが予想されるので、TTP関連疾患としてTTPに準じた扱いが必要と考えている。

おわりに

2015年に始まった新しい難病の医療補助制度で、TTPとaHUSは指定難病となった。ADAMTS13活性測定はTTPにおける診断マーカーとして、aHUSにおける除外診断マーカーとして、指定難病の診断基準に取りあげられている。しかし、ADAMTS13活性測定は保険適応になっておらず、その大きな要因として検査キットが対外診断医薬品として製造販売されていないからである。そのため、臨床性能試

験を現在実施中であり、早期にADAMTS13活性およびインヒビター測定が保険適用となることが期待される。

文 献

- 1) Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *The New England journal of medicine* 2002; **347**(8): 589-600.
- 2) George JN, Nester CM. Syndromes of thrombotic microangiopathy. *The New England journal of medicine* 2014; **371**(19): 1847-1848.
- 3) Amorosi EL, Ultmann JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. *Medicine* 1966; **45**(2): 139-159.
- 4) Kremer Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, Lammle B, George JN. Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2010; **115**(8): 1500-1511; quiz 1662.
- 5) Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. [Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia.]. *Schweiz Med Wochenschr* 1955; **85**(38-39): 905-909.
- 6) Dent JA, Galbusera M, Ruggeri ZM. Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J Clin Invest* 1991; **88**(3): 774-782.
- 7) Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001; **276**(44): 41059-41063.
- 8) 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**(9): 3232-3237.
- 9) Banno F, Chauhan AK, Kokame K, et al. The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood* 2009 ; **113**(21): 5323-5329.
 - 10) Matsumoto M, Kawaguchi S, Ishizashi H, et al. Platelets treated with ticlopidine are less reactive to unusually large von Willebrand factor multimers than are those treated with aspirin under high shear stress. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2005 ; **34**(1): 35-40.
 - 11) Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *The New England journal of medicine* 1998 ; **339**(22): 1578-1584.
 - 12) Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *The New England journal of medicine* 1998 ; **339**(22): 1585-1594.
 - 13) Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood* 2004 ; **103**(2): 607-612.
 - 14) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 2005 ; **129**(1): 93-100.
 - 15) Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, et al. Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* 2006 ; **46**(8): 1444-1452.
 - 16) Scheiflinger F, Knobl P, Trattner B, et al. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2003 ; **102**(9): 3241-3243.
 - 17) Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M, et al. 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* 2007 ; **109**(7): 2815-2822.
 - 18) Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, et al. Quantitative Western blot analysis of plasma ADAMTS13 antigen in patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb Res* 2007 ; **120**(3): 381-386.