

令和元年8月30日現在

機関番号：84404  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2016～2018  
課題番号：16K08515  
研究課題名(和文) 血中ADAMTS13のクリアランス機構の解明

研究課題名(英文) Clearance mechanism of ADAMTS13

研究代表者

秋山 正志 (Akiyama, Masashi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：30298179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血中メタロプロテアーゼADAMTS13は血小板血栓形成に重要なVWFを切断することで血栓形成を抑制的に制御している。我々はADAMTS13の新たなクリアランス受容体としてヒトSIGLEC5を同定した。SIGLEC5発現細胞は全長及びC末端側を欠失したADAMTS13をシアル酸非依存的に細胞内に取り込んだ。SIGLEC5の細胞外ドメイン領域はADAMTS13と濃度依存的に結合した。マウス肝臓にハイドロダイナミクス法でヒトSIGLEC5を発現させると、マウスの血中Adamts13活性が減少した。以上の結果から、SIGLEC5がADAMTS13の取り込みに関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子変異もしくは阻害抗体によるADAMTS13活性の著減は重篤な血栓性疾患である血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の病因である。また、ADAMTS13投与はVWFの切断を通じ脳卒中など様々な血栓性疾患モデルマウスにおいて病態を緩和する作用を持つことも明らかになっている。現在先天性TTP患者に組換えADAMTS13製剤を投与し治療する第三相試験が行われている。ADAMTS13のクリアランス機構の解明は投与した組換えADAMTS13の安定性などの改良にも役立つとともに、様々な血栓性疾患の病態改善にも役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The plasma metalloprotease, ADAMTS13 specifically cleaves VWF and negatively regulate platelet thrombus formation. We identified human SIGLEC5 as a clearance receptor candidate. SIGLEC5 expressing HEK293 cells internalized full-length and C-terminal region-deficient ADAMTS13. ADAMTS13 bound extracellular region of SIGLEC5 in vitro. Hydrodynamic-expression human SIGLEC5 in mouse liver lowered plasma Adamts13 activity. These results suggests that SIGLEC5 is involved in the clearance of ADAMTS13.

研究分野：血栓止血学

キーワード：ADAMTS13

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト成熟型 ADAMTS13 は血漿中に存在する 1,398 アミノ酸からなる亜鉛メタロプロテアーゼである。ADAMTS13 は障害を受けたときに血管のコラーゲンと血小板、血小板同士を接着させる役割を持つ von Willebrand 因子 (VWF) を切断し、そのマルチマーサイズを調節することで、血小板血栓形成を抑制的に制御している。ADAMTS13 の活性の著減は超高分子量 VWF 多量体の蓄積をもたらし、過剰な血小板血栓形成、消耗性血小板減少、溶血性貧血を示す全身性の重篤な疾患で国の指定難病でもある血栓性血小板減少性紫斑病の病因となる。血中での ADAMTS13 の半減期は 2-3 日で濃度はおよそ 0.7-1.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調節されているが、ADAMTS13 のクリアランスに関与する機構は研究開始時点において不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では血栓形成を抑制的に制御している血中 ADAMTS13 のクリアランスに関与する受容体を細胞生物学的手法を用いて明らかにし、多様な血栓性疾患の病態の改善につながる可能性が明らかになってきた ADAMTS13 を血中で安定化させる手法の開発基盤を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

凝固因子や VWF のクリアランスに関与することが報告されている LRP-1 や Ashwell-Morell 受容体、Siglec-5 などが ADAMTS13 のクリアランスにも関与する受容体の候補である可能性を検証するために、これらの受容体を発現する細胞株での ADAMTS13 の取り込みを観察する。また HEK293 細胞に候補受容体の発現プラスミドを導入して受容体を発現させた時の ADAMTS13 の取り込みを観察する。候補タンパク質の細胞外ドメインを発現させて *in vitro* での ADAMTS13 との結合を調べる。さらに、ハイドロダイナミクス法を用いてマウス肝臓に候補受容体を強制発現させ、マウス血中の ADAMTS13 活性を測定する。

### 4. 研究成果

(1) ADAMTS13 のクリアランスに関与する受容体を同定するために、上記クリアランス受容体候補を高発現することが知られている細胞もしくはトランフェクションにより候補受容体を発現させた細胞を用い、精製した組換え ADAMTS13 タンパク質の細胞内への取り込みを抗ヒト ADAMTS13 抗体を用いて観察した。具体的には LDL Receptor-related protein 1 (LRP1) を発現する BeWo 細胞、Ashwell-Morell 受容体を発現する HepG2 細胞、ヒト sialic acid-binding Ig-like lectin 5 (SIGLEC5) を外来的に発現させた HEK 293 細胞等を使用した。取り込みには HEK 293 細胞の分泌発現系を用いて精製した C 末端側 mCherry 融合もしくは N 末端側 FLAG タグ付きヒト ADAMTS13 を用いた。受容体への結合は無血清培地下で 4 °C、60 分、取り込みは 37 °C、3 時間培養後、細胞を固定し、結合および取り込みを、抗 FLAG 抗体もしくは抗ヒト ADAMTS13 抗体を用いた免疫蛍光染色により顕微鏡観察した。しかしながらいずれの実験においても明確な取り込みを観察することはできなかった。ADAMTS13 の取り込みに 1 本鎖の膜貫通型タンパク質で、ヘモグロビンスカベンジャーレセプターとして知られるマクロファージ上で発現する CD163 が関与していると報告された (Blood Adv. 1:293-305, 2017)。そこで CD163 を外来性に発現させた CHO-K1 細胞を用いて取り込み実験を行ったが、明確な ADAMTS13 取り込みは観察できなかった。

(2) 取り込み実験に使用した抗体の特異性と感度に問題があると考え、次に組換え ADAMTS13 を直接蛍光ラベルして取り込みを上記の細胞で検証した。その結果、SIGLEC5 発現細胞において ADAMTS13 の全長 (アミノ酸残基番号 76 - 1427) および N 末側領域 MDTCS (アミノ酸残基番号 76-685) の細胞内への取り込みが観察された (図 1)。このことから、ADAMTS13 の N 末側領域内にも SIGLEC5 による取り込みに関与する配列が存在することが示唆された。蛍光標識した ADAMTS13 を培地に加え SIGLEC5 発現細胞と 4 °C、60 分間インキュベーションすると細胞膜上に存在する受容体へ結合したと考えられる ADAMTS13 の蛍光が観察された。一方で ADAMTS13 の取り込みに関与すると報告された 1 本鎖膜貫通型タンパク質 CD163 を発現させた HEK293 細胞において MDTCS を用いて取り込み実験を行ったが、明確な取り込みは観察できなかった。理由は不明だが、ADAMTS13 の全長と MDTCS とで CD163 には取り込みに差がある可能性が考えられる。

(3) SIGLEC はヒトでは 15 の遺伝子から構成されるファミリーを形成しており、主として白血球表面上で発現し、リガンド上の糖鎖シアル酸に結合し、細胞内シグナル伝達を介して免疫機能を調節していることが知られている。一方、シアル酸非依存的な結合様式も報告されている。われわれは ADAMTS13 の SIGLEC5 による取り込みは細胞外 HSP70 などと同様にシアル酸非依存的であることを見出した。抗 Fc 抗体を介して ELISA プレート上に固相化した SIGLEC5 とヒト IgG の Fc ドメインとの融合タンパク質に、ADAMTS13 は *in vitro* で濃度依存的に結合した (図

2). さらに、SIGLEC5 とともに N 末端側細胞外ドメイン配列が SIGLEC5 とほぼ相同な SIGLEC14 も蛍光標識した ADAMTS13 を取り込んだ。SIGLEC5 と SIGLEC14 の「ペア受容体」両方を介した取り込みが示唆された。マウスには SIGLEC5 に相当する遺伝子が存在せずノックアウトマウスを用いた実験が不可能である。そこで生体における SIGLEC5 による ADAMTS13 クリアランスへの役割を明らかにするために、ハイドロダイナミクス法を用いてヒト SIGLEC5 遺伝子をマウス肝臓において発現させ血中マウス ADAMTS13 レベルを FRET5-VWF73 法によって測定した。その結果、肝臓でのヒト SIGLEC5 発現は血中 ADAMTS13 活性を減少させた (図 3)。以上の結果から、生体内での ADAMTS13 クリアランスに SIGLEC5 (および SIGLEC14) が関与する可能性が示唆された。

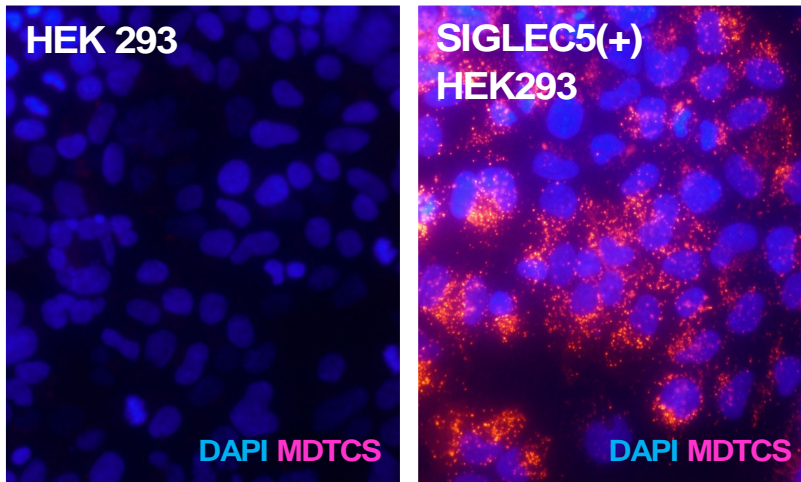


図 1. SIGLEC5 発現細胞による ADAMTS13 MDTCS の取り込み

蛍光標識した MDTCS を培地に加えて 60 分間培養後固定し、通常及び SIGLEC5 発現 HEK293 細胞での MDTCS の取り込みを蛍光観察した。

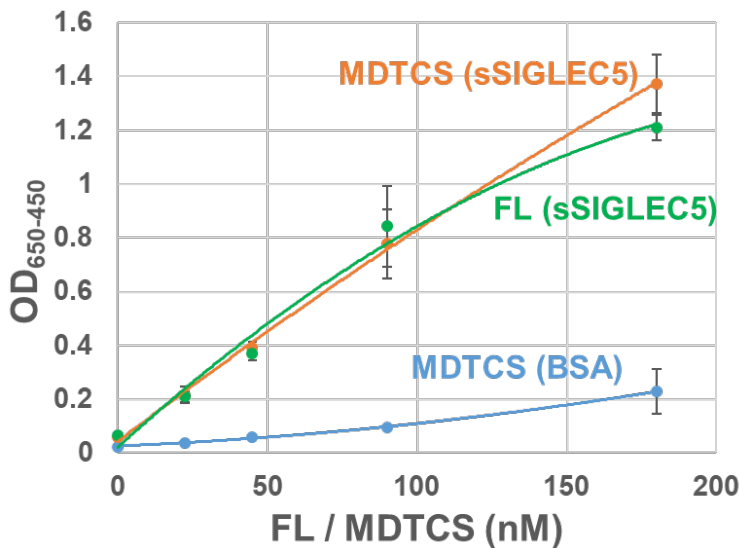


図 2. SIGLEC5-Fc と ADAMTS13 の結合

SIGLEC5-Fc を ELISA プレート上に Fc 抗体を介して固相化後、ADAMTS13 (全長 [FL] および MDTCS) を加え、結合を HRP 標識抗ヒト ADAMTS13 抗体を用いて検出した。

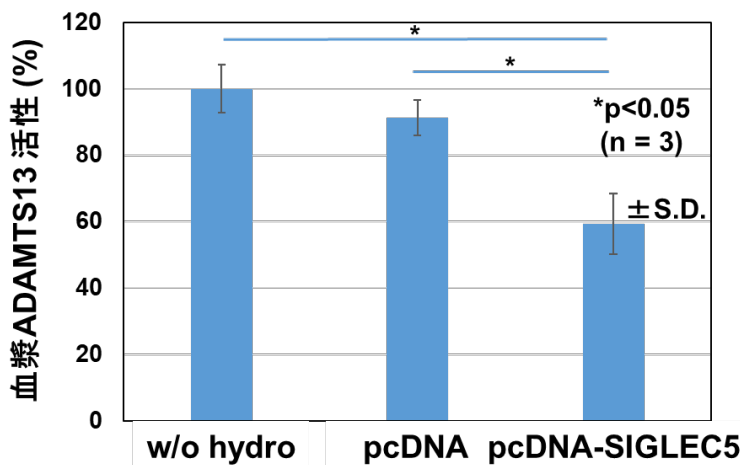


図 3. 血中 ADAMTS13 に対するマウス肝臓での SIGLEC5 発現の影響

ハイドロダイナミクス法でマウス肝臓にヒト SIGLEC5 を発現させ、24 時間後に血中 ADAMTS13 活性を FRET5-VWF73 法で測定した。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1) Maruyama K, Akiyama M, Miyata T, Kokame K. Protein S K196E mutation reduces its cofactor activity for APC but not for TFPI. *Res Pract Thromb Haemost.* 2(4):751-756, 2018.
- 2) Nagaya S, Akiyama M, Murakami M, Sekiya A, Asakura H, Morishita E. Congenital coagulation factor X deficiency: Genetic analysis of five patients and functional characterization of mutant factor X proteins. *Haemophilia.* 24(5):774-785, 2018.
- 3) Urisono Y, Sakata A, Matsui H, Kasuda S, Ono S, Yoshimoto K, Nishio K, Sho M, Akiyama M, Miyata T, Okuchi K, Nishimura S, Sugimoto M. von Willebrand factor aggravates hepatic ischemia-reperfusion injury by promoting neutrophil recruitment in mice. *Thromb Haemost.* 118(4):700-708, 2018.
- 4) 秋山 正志. 血流による物理的力が招く血栓性疾患 TTP と出血性疾患 VWD . *生化学*, 第 89 巻、第 3 号 343-350、2017 年 .
- 5) 前田 琢磨、秋山 正志. HIT の発症を誘導する免疫複合体の構造 . *日本血栓止血学会誌*、第 27 巻、第 6 号、678-782 頁、2016 年 .
- 6) 秋山正志、小亀浩市. ジャーナルクラブ「腸内細菌代謝産物 TMAO は血小板の反応性亢進と血栓症リスクを増強する」. *日本血栓止血学会誌*、第 27 巻、第 3 号、384 頁、2016 年 .

### 〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 長屋聡美、秋山正志、關谷暁子、朝倉英策、森下英里子 . 先天性第 X 因子欠乏症 5 症例から検出された遺伝子変異を有する変異型第 X 因子蛋白の機能解析 . 第 40 回日本血栓止血学会学術総会、2018 年 6 月 28-30 日、札幌 .
- 2) 坂田飛鳥、瓜園泰之、松井英人、柏田承吾、秋山正志、宮田敏行、西村智、杉本充彦 . 肝臓虚血再灌流障害には VWF を介した白血球と血小板、血管内皮の相互作用が重要である . 第 40 回日本血栓止血学会学術総会、2018 年 6 月 28-30 日、札幌 .
- 3) Eriko Morishita, Mao Takata, Fumina Taniguchi, Masashi Akiyama, Akiko Sekiya, Akira Takagi, Toshiyuki Miyata, and Tetsuhito Kojima. Asymptomatic dysprothrombinemia (Prothrombin Himi) with p.M380T and p.R431H shows severely reduced clotting activity, moderate antithrombin resistance and severe thrombomodulin binding defect. *58th ASH Annual Meeting & Exposition*, December 3-6, 2016, San Diego, CA, USA.
- 4) Yasuyuki Urisono, Hideto Matsui, Shogo Kasuda, Shiro Ono, Kenji Nishio, Masashi Akiyama, Toshiyuki Miyata, Kazuo Okuchi and Mitsuhiro Sugimoto. Functional relevance of von Willebrand factor in mouse model of hepatic ischemia- reperfusion injury. *58th ASH Annual Meeting & Exposition*, December 3-6, 2016, San Diego, CA, USA.

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/etiology/akiyama.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 小亀 浩市

ローマ字氏名 : Kokame Koichi

所属研究機関名 : 国立循環器病研究センター

部局名 : 研究所

職名 : 部長

研究者番号 (8 桁) : 40270730

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。