

## ◆トピックス◆

## フォンビルブランド因子の欠損マウス

矢野 寿\*, 友清和彦\*, 水口 純\*

von Willebrand Factor Deficient Mice

Hisashi YANO\*, Kazuhiko TOMOKIYO\* and Jun MIZUGUCHI\*

**Key words:** von Willebrand factor, von Willebrand disease, spontaneous bleeding, platelet, shear stress

## はじめに

von Willebrand factor (vWF) は分子量約25万の単一サブユニットが2~数十個結合し、50万~1千万におよぶ巨大マルチマー分子として存在する。vWFは傷害された血管壁と血小板の接着分子として働くとともに、循環血液中で血液凝固第VIII因子(FVIII)のキャリアー蛋白質として機能し、現在までに次のような知見が得られている<sup>1)</sup>。

① ヒトvWFは2813アミノ酸残基よりなるpre-pro-vWFとして生合成され、D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2のドメイン構造を形成する(図1)。pre-pro-vWFは22アミノ酸残基のシグナルペプチド、741アミノ酸残基のプロペプチド(D1-D2)、2050アミノ酸残基の成熟vWFサブユニット(D'~C2)より構成される。これらpre-pro-vWFサブユニットは、まず分子間のカルボキシル末端同士、アミノ末端同士がS-S結合で重合し、次にプロペプチド部分が切断され、巨大マルチマーとなる。② ヒトvWFは18.7%<sup>2)</sup>(約15%<sup>3)</sup>)の糖を含み、そのうちN-グリコシド結合糖鎖にはABO血液型抗原糖鎖が存在する<sup>3)</sup>。③ vWFは内皮細胞

と骨髄巨核球で発現されており、内皮細胞で産生されたvWFは血中に分泌されるか、Weibel-Palade bodyと呼ばれる内皮細胞特有の小器官に貯えられる。これに対し巨核球由来のvWFは、血小板の中の $\alpha$ 顆粒に蓄積され、その活性化に伴って血流中に放出される。マウスを用いた最近の研究により、内皮細胞由来のvWFは臓器によってその発現量が異なっていることがわかってきた<sup>4)</sup>。④ ヒトvWF遺伝子は12番常染色体の短腕部先端に位置し、約180kbで52個のエクソンからなる。

⑤ vWFとFVIIIおよび血小板との結合部位も明らかにされており、FVIIIとはD'-D3ドメインで結合する。血小板のレセプターであるGPIIb-IXおよびintegrin  $\alpha_{11b}\beta_3$  (GPIIb-IIIa)とは、それぞれA1ドメインおよびカルボキシル末端部のArg-Gly-Asp配列で結合する。このほかvWFは内皮下のコラーゲンとも結合するが、ここではA3ドメインが主要な役割を担っている。最近、vWFの機能部位の結晶解析が報告されたが、それによるとA3ドメインは6つの $\beta$ シートを中心として、そのまわりを7つの $\alpha$ ヘリックスが取り囲む $\alpha/\beta$ オープンシート構造をとっている<sup>5)</sup>。A1ドメインも基本的に同

\* (財)化学及血清療法研究所 血液製剤研究部 [〒860-8568 熊本市大窪1-6-1]  
Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute [1-6-1 Okubo, Kumamoto, 860-8568, Japan.]

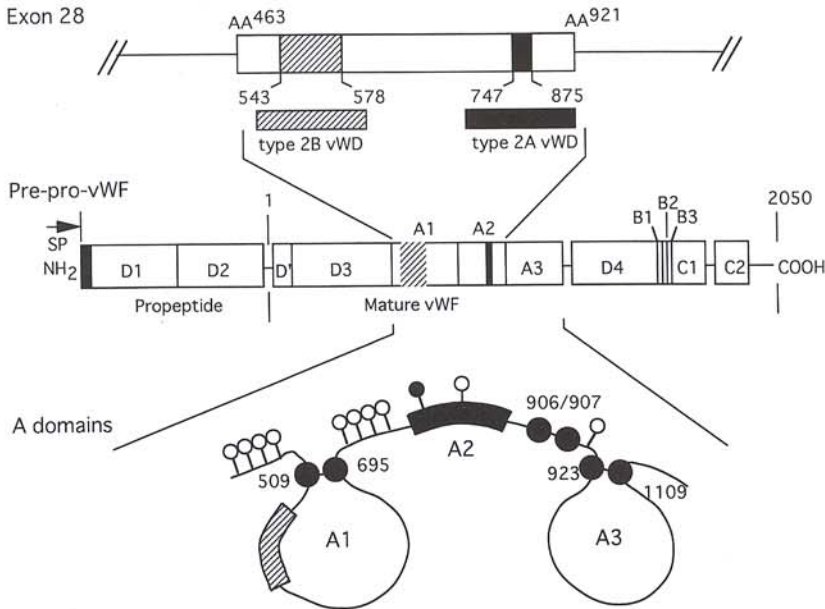


図1 type2A および type2B の von Willebrand 病を引き起こす点変異の集中する部分 (文献1より引用・改変)  
 エクソン 28 には von Willebrand 病を引き起こす点変異が集中している。図中, ■ (type 2A) および ▨ (type 2B).  
 ○: N-結合糖鎖, □: O-結合糖鎖, ●: システイン残基

様の構造であるという<sup>6)</sup>. これらは A ドメインスーパーファミリーの1つである integrin CR3 の A ドメイン構造と極めて似ている<sup>7)</sup>.

⑥ vWF と血小板の相互作用は通常 *in vitro* では起こらず, リストセチンや蛇毒ボトロセチンといった非生理的アゴニストの添加で生じる. 生体内でこれらに相当する因子は発見されていないが, ずり応力 (shear stress) により惹起される GPIb-IX および vWF の A1 ドメインの高次構造変化が両者の結合のひきがねになると考えられている. 人工的な疎水性表面に非特異的に結合した vWF のずり応力に伴う高次構造変化を観察したところ, ずり応力が無いときは球状の形態をとるが, ずり応力下では鎖状に伸展していることが Siedlecki らにより明らかにされた<sup>8)</sup>. また, Ruggeri らは血小板の粘着・凝集のメカニズムについて次のような仮説を提唱している<sup>9)10)</sup>. 血管傷害部の内皮下組織に結合した vWF は, ずり応力が加わることで

高次構造変化を起こし, まず GPIb-IX に結合するようになる. この結合は不安定で剥離 (detachment) も起こるが, 次いで血小板が活性化し  $\alpha_{11b}\beta_3$  が vWF に結合すると, 血小板は完全に粘着し動かなくなる. 粘着した血小板は, 新たな vWF 結合の場を形成し, 同様のプロセスで血小板がさらに結合・活性化・凝集してゆく.

⑦ vWF の量的減少または質的異常を伴う出血性疾患を von Willebrand 病といい, 1993 年の国際血栓止血学会の標準化委員会 (SSC) において提唱された分類法によると, type 1 は優性遺伝する量的欠損で, vWF タンパク質が正常人の 5~30% に低下している. また, type 3 は劣性遺伝するもっとも重症の病態で, 通常 vWF 量は正常人の 1% 以下である. type 2 は vWF の質的異常であり, さらに 3 つに分類される. そのうち, type 2A は GPIb-IX への結合能が減少したもの, type 2B は逆に増大したも

のである。type 2N は FVIII への結合能が低下したものである。type 2 については vWF の構造と機能の関係を調べるために、機能部位をコードするエクソン 28 が精力的に遺伝子解析され、type 2A を引き起こす多くの変異が A2 ドメインに、type 2B に関連する多くの変異が A1 ドメインに集中していることがわかっている (図 1)<sup>11</sup>。

最近、分子的にヘテロな vWF を形成する原因の一つにメタルプロテアーゼによる vWF の分解が報告されている<sup>11</sup>。この酵素は vWF の A2 ドメインの Tyr<sup>842</sup>-Met<sup>843</sup> 部位を切断し、高分子マルチマーを低分子マルチマーに変換する。in vitro において、この酵素の活性発現には低イオン強度や 1 M 尿素といった非生理的条件を必要とするが、こうした条件は vWF の構造変化を促し切断しやすくしていると考えられ、in vivo ではおそらく必ず応力がそれに相当すると推測されている。低分子マルチマーより高分子マルチマーの方が血小板粘着能が高いとされており、消費性血小板減少症を呈する「thrombocytopenic purpura」患者の中にはこの酵素を欠失しているケースもあり、血栓性素因との関連が指摘されている<sup>12</sup>。

type 3 の von Willebrand 病の動物モデルがブタについて作出され、vWF の機能解析に用いられているが、大動物ゆえの取り扱いの煩雑さやコストの問題、ホモ接合体が vWF を完全には欠いておらず、また純系ではないため個体間の遺伝子型が完全に同一とはならないなど、遺伝子の面でも、病態の解析モデルとしても不十分であった<sup>13</sup>。最近、ノックアウトマウスの技術を用いてこれらの欠点を補う小動物モデルが完成した。

### vWF 欠損マウスからの情報

1998 年、Denis らは vWF 欠損 (vWF<sup>-/-</sup>) マウスを作出した<sup>14</sup>。彼らは gene targeting の手法を用いて野生型 (vWF<sup>+/+</sup>) マウスの vWF 遺

伝子エクソン 4, 5 の欠失を試みたが、得られたクローンは意図に反してエクソン 5 の後のイントロン部分に選択用のネオマイシン耐性遺伝子が挿入されたものであった。Denis らは過去に行われたほかのノックアウト実験でも同様の事例があったことをコメントし、また以下に述べるような方法で vWF の欠損を確認している。マウス vWF エクソン 28 をプローブとしたノーザンブロットの結果、欠損マウスは心臓と肺で少量の転写産物を発現したが、そのどれもが正常長ではなかった。翻訳産物について、① vWF の A1 部位を認識する抗体、および② vWF propolypeptide 部位を認識する抗体をもちいて、vWF<sup>+/+</sup> マウスおよび vWF<sup>-/-</sup> マウスの血液、肺、心臓組織の蛍光染色をおこなったところ、vWF<sup>+/+</sup> マウスには血小板  $\alpha$  顆粒、内皮細胞の Weibel-Palade body で vWF の存在が確認されたが、vWF<sup>-/-</sup> マウスでは認められなかった。また、血漿中の vWF について ELISA およびマルチマー解析を行ったが、vWF<sup>-/-</sup> マウス血漿には vWF を検出しなかった (表 1, 図 2)。

ヘテロ接合体 (vWF<sup>+/-</sup>) マウスの掛け合わせによる vWF<sup>-/-</sup> マウスは、メンデルの法則に従って出生した。それ故 vWF 遺伝子を破壊しても胚の発生上、致死的には作用しないと考えられる。外見、健康状態、寿命、繁殖力は正常であり、メスは妊娠期間中を生き延びて通常の大きさの仔を産んだ。しかし、vWF<sup>-/-</sup> マウスでは自発的出血を起しやすい証拠がいくつか認められた。約 10% の vWF<sup>-/-</sup> マウスの新生仔は (8/79 匹) 腹腔内に出血を認めた (図 3)。出血がそれほどひどくない場合、新生仔は回復し、その後正常に生存するが、大量出血した新生仔は死亡した。首と頭部に大量出血を呈した新生仔が 1 例あった。約 7% の成熟 vWF<sup>-/-</sup> マウス (4/55 匹) は大便の潜血を呈したが、野生型 (0/45 匹) には観察されなかった。

マウスの尾の先端部から 3 mm の部分を切断後、尾部を生理食塩水に浸し出血時間を測定

表 1 vWF 欠損マウスの血液学および凝固学的検査成績<sup>1)</sup> (文献 14 より引用・改変)

	vWF <sup>+/+</sup>	vWF <sup>+/-</sup>	vWF <sup>-/-</sup>
vWF 抗原 (%) <sup>2)</sup>	96±5.6	49±3.6	検出されず
FVIII活性 (%) <sup>2)</sup>	139.5±7.5	81±4	27.6±1.1
PT (秒)	14.7±0.42	14.8±0.63	14.9±0.67
APTT (秒)	23.2±0.5	24.4±0.4	34.5±1
出血時間 (秒) <sup>3)</sup>	69.7±5.2	91.9±11.2	499±33.4
血小板 (×10 <sup>9</sup> /l)	837±43	986±86	931±27
赤血球 (×10 <sup>12</sup> /l)	7.88±0.12	7.67±0.21	7.72±0.17
白血球 (×10 <sup>9</sup> /l)	2.8±0.33	3.37±0.36	3.07±0.34
ヘマトクリット値 (%)	37.1±0.6	35.4±1.1	36.9±1
ヘモグロビン (g/dl)	12.8±0.24	12.4±0.22	12.7±0.31

- 1) マウスは 2~3 カ月齢の個体を 8~13 匹使用, 表中の数値は平均値±標準誤差を表している。  
 2) vWF 抗原と FVIII活性は 10 匹の C57BL/6J マウスのプール血漿を 100% と定義した。  
 3) 出血時間はマウスの尾の先端部から 3 mm の部分を切断後, 尾部を生理食塩水に浸し, 止血にかかる時間を測定した。(測定は 15~21 匹) (転載許可取得)

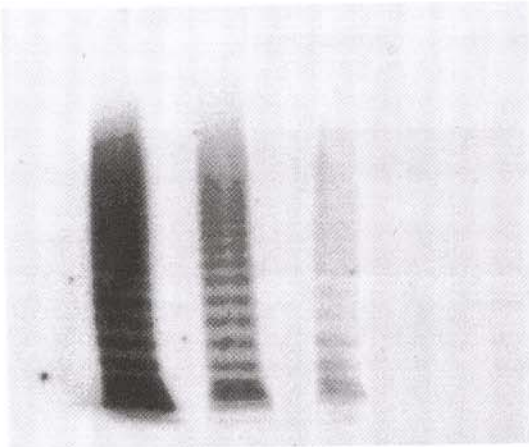


図 2 ヒト血漿およびマウス血漿の vWF マルチマーアッセイ (文献 14 より引用)  
 血漿を 20 倍希釈後, 1%SDS 存在下 agarose gel 電気泳動を行い, 抗ヒト vWF ポリクローナル抗体によって検出した。  
 (Hu) ヒト, (+/+) 野生型マウス, (+/-) ヘテロ接合型マウス, (-/-) vWF 欠損マウス。  
 (転載許可取得)

した。その結果, 野生型および vWF<sup>+/-</sup> マウスは, 70~92 秒と極めて速やかにかつ同程度に止血した (表 1)。一方, vWF<sup>-/-</sup> マウスでは顕著な出血時間の延長を呈し, 大部分のマウスが 10 分近く出血し続けた。焼灼の処置無しで止血できたのは 21 匹のうち 5 匹にすぎなかった。血小板数や, 赤血球数, 白血球数, ヘマトクリット

値, ヘモグロビン量に関しては野生型, vWF<sup>+/-</sup>, vWF<sup>-/-</sup> マウスとも目立った変化は認められなかった。

ヒト von Willebrand 病において血漿中の FVIII 活性レベルは vWF 濃度に依存しており, vWF<sup>-/-</sup> マウスの場合も血漿中の FVIII 活性レベルは野生型の 20% まで低下していた (表 1)。ただし, type 3 のヒト重症 von Willebrand 病では, FVIII は正常人の 2~10% まで低下しているため, vWF<sup>-/-</sup> マウスの FVIII 残存活性はヒトと比較するとかなり高い。また, vWF<sup>+/-</sup> マウスの FVIII 活性は野生型の 57% まで減少しており, これは type 1 のヒト von Willebrand 病と同様の傾向を示した。

vWF 欠損が血栓形成にあたる効果を *in vivo* 血栓症モデルで評価した (図 4, 図 5)。野生型マウスおよび vWF<sup>-/-</sup> マウスに, 同一遺伝子型由来の血小板を蛍光標識後, 静脈へ投与し, 腸管膜細動脈 (直径 60~100  $\mu$ m) を顕微鏡下で観察した。細動脈の平均ずり速度 (shear rate) は, 野生型で 1408±84/秒, vWF<sup>-/-</sup> マウスで 1408±125/秒であり, 両遺伝子系マウスとも動脈壁と血小板の相互作用は確認されなかった。塩化鉄の灌流によって野生型マウスの血管内皮細胞を破壊すると, 血小板はただちに傷害血管壁に結合し始め, 2 分後には細動脈の血管壁の大部分 (10/15 匹) で多数の血小板が結合してい

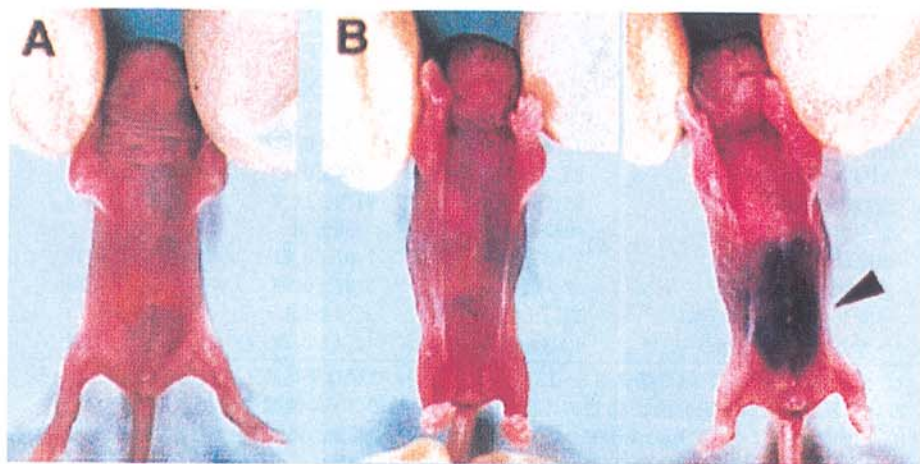


図3 新生仔(1日齢)における腹腔内出血(文献14より引用)

(A) 野生型, (B)  $vWF^{-/-}$  マウス同腹仔の2匹. 右側の新生仔には腹腔内出血が確認できるが(矢印部分), 左側の仔には出血は認められない.(転載許可取得)

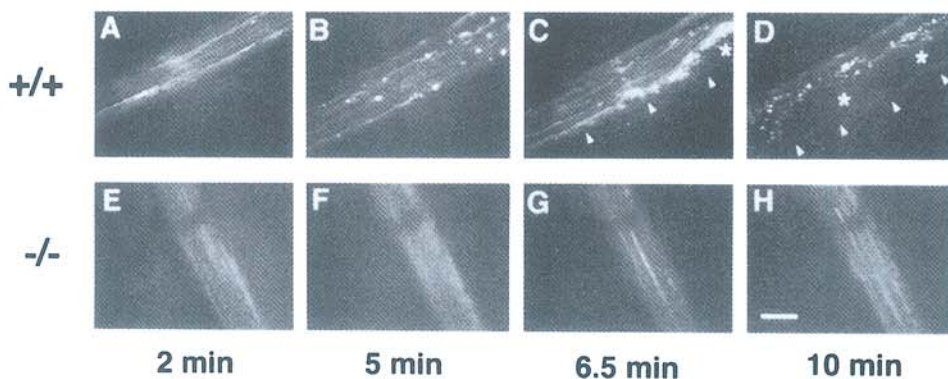


図4 *in vivo* 血栓症モデルにおける血管壁傷害後の細動脈の経時変化(文献14より引用)

野生型および  $vWF^{-/-}$  マウスの細動脈を塩化鉄灌流によって傷害し, 経時変化を観察した. 血管壁と相互作用している血小板量の増加が野生型(A~D)細動脈において観察され, Dでは完全に閉塞しうっ血状態になっている. C, Dの矢印は血栓を形成しつつある血管の縁を, 星印は血栓の中心を示している.  $vWF$  を欠損した細動脈には殆ど血小板との相互作用がみられない(E~H; Hのbarの長さ=50  $\mu\text{m}$ ). (転載許可取得)

た(図4A). 血管壁に結合する血小板数は次第に増加し(図4B, C), ついには細動脈の完全な閉塞に至った(図4D). 10分後には, すべての野生型マウスの細動脈が, 完全に閉塞するか(4/15匹; 図5■), または多数の血小板と血管壁との結合(図5■)が明瞭に観察された. これに対して, 同様の処置を  $vWF^{-/-}$  マウスに行ったが, 測定時間内では, 大部分の細動脈(8/12匹)における血管壁と血小板の結合は殆ど観察

されなかった(図4E~H, 図5□).

加えて, 10分後の  $vWF^{-/-}$  マウスの細動脈のずり速度が, 初期値の  $84 \pm 14\%$  を保ったのに対し, 野生型では初期値の  $53 \pm 9\%$  まで低下していた. このように  $vWF$  欠損マウスを用いた実験から,  $vWF$  が止血と血栓形成の両方に重要な役割を果たしているという *in vivo* での直接的な証拠が得られた.

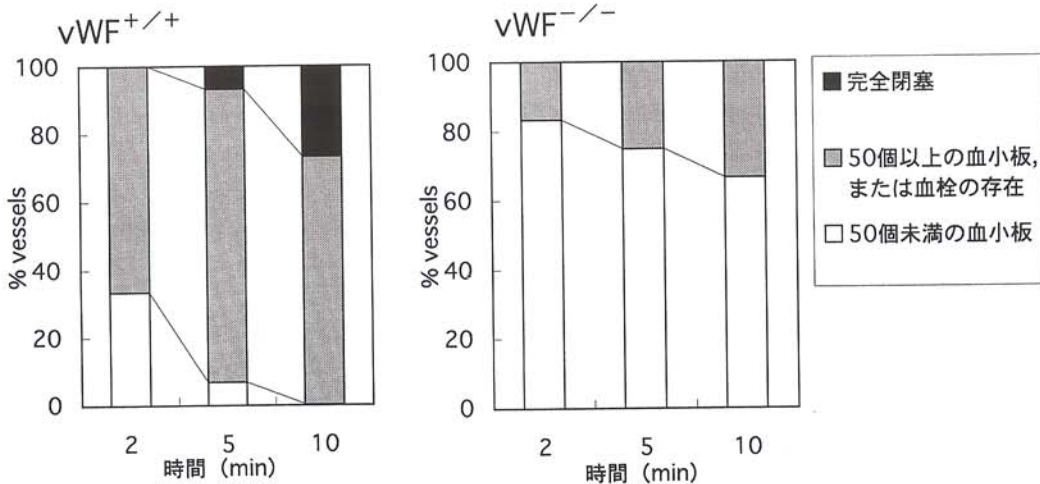


図5 *in vivo* 血栓症モデルにおける血管壁傷害後の血小板-血管壁相互作用 (文献14より引用・改変) 野生型 (vWF<sup>+/+</sup>; n=15) およびvWF欠損マウス (vWF<sup>-/-</sup>; n=12) に遺伝子型の合致した蛍光標識血小板を静注後, 腸間膜を露呈して細動脈 (直径60~100  $\mu$ m) を生体顕微鏡, ビデオレコーダーにて撮影した. 塩化鉄灌流で血管壁を傷害し, 血管壁と相互作用する血小板数を, 短時間作用しているもの, 安定して長時間作用しているもの, すべてについてカウントし, また血小板血栓形成についても記録した. 傷害より2分, 5分, 10分後に相互作用した総血小板数と血栓の存否について調査し, 図中右に示しているように3つのカテゴリーに分類して示した. (転載許可取得)

### おわりに

以上を要約すると, ① vWF欠損マウスは正常に出生し, 生存し, 繁殖力も保持していた. しかし, ② vWF欠損マウスは止血に異常を示し, 出血時間が極度に延長していた. また, 約10%の新生仔に自発的出血症状が観察され, その一部は死亡した. ③ vWF欠損マウスの血漿中FVIII活性レベルは, 野生型の20%程度まで低下していた. ④ vWF欠損マウスは*in vivo* 血栓症モデルにおいて, ずり応力存在下での血栓形成能を欠いていることが示された. これまで述べてきたように, vWF欠損マウスはヒトtype 3の重症 von Willebrand病に極めてよく似た症状を呈した. ただし, ヒトの重症例と比較すると, 残存FVIII活性が高く, 自発的出血の頻度が少ないように思われ, 表現型自体はヒトよりむしろ穏やかである. この理由はヒトとマウスの凝固系における種差か, あるいは管理の行き届いたマウスの飼育環境に由来するのかも知れない. 今後, 薬効判定用のモデルとして,

また血小板粘着や血栓形成に関わる病態時でのvWFの役割の研究へと, その応用が期待される.

謝辞: 御校閲を戴きました藤村吉博先生 (奈良県立医科大学輸血部教授) ならびに岩永貞昭先生 (藤田保健衛生大学客員教授) に感謝いたします.

### 文献

- 1) Ruggeri ZM, Ware J: The Molecular Basis of Von Willebrand Disease, in High KA, Roberts HR (eds): Molecular basis of Thrombosis and Hemostasis. New York, Marcel Dekker, Inc. 197-214, 1995.
- 2) Chopek MW, Girma JP, Fujikawa K, Davie EW, Titani K: Human von Willebrand factor: a multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* 25: 3146-3155, 1986.
- 3) 松井太衛: von Willebrand 因子の糖鎖の構造と機能, 日本血栓止血学会誌 6: 421-432, 1995.

- 4) Aird WC, Edelberg JM, Weiler-Guettler H, Simmons WW, Smith TW, Rosenberg RD: Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J Cell Biol* **138**: 1117-1124, 1997.
- 5) Bienkowska J, Cruz M, Atiemo A, Handin R, Liddington R: The von Willebrand factor A3 domain does not contain a metal ion-dependent adhesion site motif. *J Biol Chem* **272**: 25162-25167, 1997.
- 6) Celikei R, Varughese KI, Madhusudan, Yoshioka A, Ware J, Ruggeri ZM: Crystal structure of the von Willebrand factor A1 domain in complex with the function blocking NMC-4Fab. *Nat Struct Biol* **5**: 189-194, 1998.
- 7) Lee J-O, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R: Crystal structure of the A domain from the  $\alpha$  subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**: 631-638, 1995.
- 8) Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant K, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE: Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* **88**: 2939-2950, 1996.
- 9) Ruggeri ZM: Von Willebrand factor. *J Clin Invest* **99**: 559-564, 1997.
- 10) Goto S, Ikeda Y, Saldivar E, Ruggeri ZM: Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest* **101**: 479-486, 1998.
- 11) 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.
- 12) Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lammle B: Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **91**: 2839-2846, 1998.
- 13) Wu QY, Drouet L, Carrier JL, Rothschild C, Berard M, Rouault C, Caen JP, Meyer D: Differential distribution of von Willebrand factor in endothelial cells. Comparison between normal pigs and pigs with von Willebrand disease. *Arteriosclerosis* **7**: 47-54, 1987.
- 14) Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Cullere M, Hynes RO, Wagner DD: A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9524-9529, 1998.