

## 加齢に伴う巨核球由来 von Willebrand 因子の動態変化の解析

### [1] 組織

代表者：樋口(江浦) 由佳  
(国立循環器病研究センター)  
対応者：堀内 久徳  
(東北大学加齢医学研究所)  
分担者：小亀 浩市  
(国立循環器病研究センター)

研究費：物品費 13 万円

### [2] 研究経過

血栓症の発症リスクは、加齢により上昇する。それには、高血圧や動脈硬化、内皮機能変化、血液凝固系の機能亢進、血液凝固制御系の機能減衰など、多種多様な要因が複雑に絡み合っていると考えられるが、血小板凝集過程で機能するタンパク質 von Willebrand 因子 (VWF) の加齢による血中濃度上昇も、血栓症発症リスクの上昇に関わると考えられている。しかし、VWF と加齢の関係性として、血中濃度上昇 (量的変化) 以外に、VWF の質的变化も関与する可能性が考えられるが、それを解析した研究はない。VWF は主に血管内皮細胞および骨髄巨核球で合成され、血液中に分泌される。本研究では、加齢による VWF の質的变化、特に骨髄巨核球に着目した VWF の解析を実施する。つまり、骨髄巨核球の VWF 産生能や、産生された VWF の構造的性質および機能的性質を解析することで、加齢に伴う巨核球由来 VWF の動態変化を明らかにすることを目的とする。巨核球由来 VWF の動態を調べるためには、もう一つの VWF 供給源である血管内皮細胞由来の VWF と区別して検出することが重要となる。タグ配列を付加した VWF を発現する遺伝子改変マウス系統を複数作製し、これらを組み合わせた骨髄移植実験により、巨核球由来 VWF と血管内皮由来 VWF を判別することとした。昨年度は、VWF-mCherry マウスの樹立成功と VWF-mGreen マウスの樹立断念を報告していた。

代表者および分担者は、堀内教授が代表者である AMED 研究班 AveC study の枠組みで共同研究を進めてきた実績があり、本研究において共同研究を連携して進めることが出来た。共通の学会や、メール・電話等で打ち合わせ等のやり取りを行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

今年度は、mGreen に替わる別のタグ配列を VWF に付加したマウスの作製を進めた。その結果、VWF-HA マウス、および、VWF-V5 マウスの 2 系統を樹立することに成功した。現在、ホモ系統樹立まで進んでおり、ホモマウスを用いてこれらの性状を確認した。具体的には、野生型 VWF、VWF-HA、VWF-V5、VWF-mCherry の各系統の VWF 抗原量、マルチマー構成について比較検討した。同時に、骨髄移植後の生着確認として、血漿 VWF に加えて骨髄および脾臓に存在する巨核球に発現する VWF を解析できるかどうかについても検討した。

血漿、骨髄、および脾臓のサンプルにて VWF マルチマー解析、および還元条件でのウェスタンブロットを実施した。その結果、マルチマーのパターンに系統間での違いは認められなかった (data not shown)。一方、VWF-mCherry マウスでは、野生型や、VWF-HA、VWF-V5 と比較して、血漿中における抗原量の著しい低下が観察された (図 1)。一方、VWF を産生する巨核球が存在する骨髄や脾臓

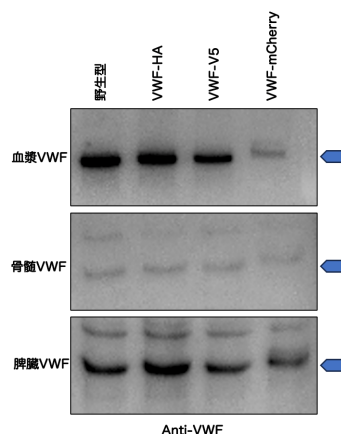


図 1

における VWF-mCherry 量に大きな減少は見られなかった (図 1)。これらの結果により、細胞における発現量に変化はないが、何らかの機序 (品質管理機構?) により、血中への分泌量が低下している可能性が考えられた。これらの結果より、組み合わせて使うタグ付き VWF として、野生型と同等の分泌量を有する VWF-HA と VWF-V5 の組み合わせが良いと考えられる。

また、加齢による VWF の質的変化について、昨年度は、血漿中の VWF 抗原量およびマルチマーの性状を比較し、老齢マウスでの抗原量の増加と超高分子領域（ダイマーから数えて 16 本目以上の分子）の増加を報告した。今年度は、還元ウエスタンブロットでの old マウスと young マウスの比較により、血漿だけでなく、骨髄、脾臓においても加齢による VWF 発現量の増加を検出した（図 2）。

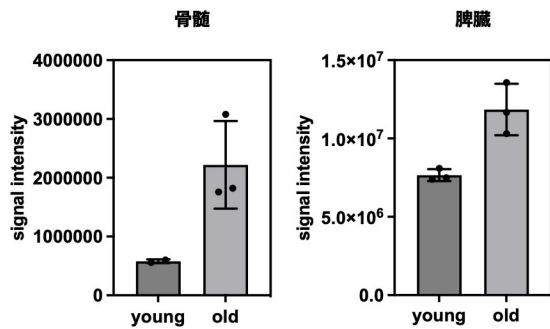


図2

### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、これまでの AMED 研究班 AVeC study 等に加えて、堀内教授との共同研究がさらに発展し、加齢による VWF の機能変化・疾患に絡む新たな展開へと進む準備が整った。タグ付加 VWF 遺伝子改変マウスを活用し、さらに次のステージへと研究が進むことができると期待される。

### [4] 成果資料

(1) von Willebrand factor Ristocetin co-factor activity to von Willebrand factor antigen level ratio for diagnosis of acquired von Willebrand syndrome caused by aortic stenosis. Okubo N, Sugawara S, Fujiwara T, Sakatsume K, Doman T, Yamashita M, Goto K, Tateishi M, Suzuki M, Shirakawa R, Eura Y, Kokame K, Hayakawa M, Matsumoto M, Kawate Y, Miura M, Takiguchi H, Soga Y, Shirai S, Ando K, Arai Y, Nakayoshi T, Fukumoto Y, Takahama H, Yasuda S, Tamura T, Watanabe S, Kimura T, Yaoita N, Shimokawa H, Saiki Y, Kaikita K, Tsujita K, Yoshii S, Nakase H, Fujimaki SI, Horiuchi H. *Res Pract Thromb Haemost.*, 8: 102284. (2023)