

200911004A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

: 生物資源・創薬モデル動物研究

血管病モデルマウスと血管新生
可視化マウスの資源化
(H19-生物資源-一般-004)

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 望月直樹
平成 22 (2010) 年 5 月

目 次

I	総括研究報告	
	血管病モデルマウスと血管新生可視化マウスの資源化-----	1
	望月 直樹	
II	分担研究報告	
	1. FoxO 血管発現マウス血管可視化マウスの作製-----	5
	望月 直樹	
	2. ADAM ファミリー欠損マウスによる ADAM の機能解析に関する研究	
	宮田 敏行	-----7
	3. 遺伝子改変動物の作製と生物資源化-----	9
	松田 潤一郎	
III	研究成果の刊行に関する一覧表-----	11
IV	研究成果の刊行物・別刷-----	12

血管病モデルマウスと血管新生可視化マウスの資源化

主任研究者 望月直樹 国立循環器病センター研究所 循環器形態部 部長

研究要旨 医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、疾患研究・創薬研究用疾患モデルバンクとして整備を進め、血管病の研究に資するマウスとして新規に血管病関連モデルマウス5系統が増えた。また凍結胚及び凍結精子の作製を行い資源化するとともに国内外に分譲した。NdrG4 (N-myc downstream-regulated gene 4) 遺伝子欠損マウスを作製し、本マウスは空間学習能力の低下と脳虚血後の梗塞体積の増大を示すことを明らかにした。Vascular endothelial cadherinのプロモーターエンハンサーを用いてCreリコンビナーゼを発現するマウスを作製した。また血管新生に必須なHIFにより発現が増加する分子VD82のトランスジェニックマウスを作製した。

分担研究者

宮田 敏行 国立循環器病センター研究所
病因部 部長
松田潤一郎 医薬基盤研究所

A. 研究目的

国民病といっても過言ではない動脈硬化症、糖尿病、虚血性心疾患の臓器障害は、血管の生理的機能の破綻と考えられる。したがって、これらの血管病ともいえる状態の血管障害病態モデルを動物で作製し、新規薬剤の個体での薬効評価系として資することは今後の治療開発戦略として非常に重要である。特に血管可視化マウスでは、癌では血管新生の抑制効果の判定に、虚血性病変では血管新生促進効果を示す薬剤の判定に用いることも可能になる。本研究では、遺伝子改変マウスを作製し、これを資源化することを目指した。

血管病変の基礎的病態として血栓症が重要視されている。血栓症は国民の健康の大きな不安要因であり、安心・安全な生活を送るため、血栓症制圧に向けた研究が進められている。なかでも脳虚血障害は大きな社会問題であり、医学研究上の最重要課題の一つである。高ホモシステイン血症は、血栓症の危険因子として知られている。私達は以前、培養ヒト血管内皮細胞をホモシステインで処理すると、小胞体ストレスが生じ、特定の遺伝子の発現が誘導されることを見出した。そのうちのひとつNDRG1を欠損したマウスを作製して解析した結果、NDRG1が末梢神経ミエリン鞘の構造維持に必須であることを明らかにした。この研究の過程で、脳に高発現するNDRG4を同定した。今年度はNDRG4欠損マウスを作製し、学習と記憶力および脳虚血障害に対する感受性に関して評価を行った。

医薬基盤研究所では、疾患研究や創薬研究に資するため実験動物研究資源バンクを設立し、疾患モデルマウスを中心に研究資源を収集し、高品質の資源と

して保存するとともに、研究者への提供を行っている。本研究では、国立循環器病センター研究所との共同研究により、血管病研究用モデルマウス等を医薬基盤研究所実験動物バンクにおいて生物資源として収集し、保存、品質管理を行い、研究者に迅速に安定的に供給する体制を構築することを目的とする。血管病モデル動物等を用いた研究が推進されることで、新規治療薬や予防法の開発に繋がり、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

B. 研究方法

NdrG4欠損マウスの作製

常法により、遺伝子ターゲティング法を用いてNdrG4欠損ヘテロマウスを作製し、ヘテロマウス同士を交配させて、欠損ホモマウスを作製した。NdrG4欠損マウスの空間学習能力を調べるために、モリスの水迷路試験を行った。また、虚血ストレスに対する脳の脆弱性を調べるため、三血管閉塞法による虚血・再灌流実験を行った。血管内皮細胞特異的enhanced green fluorescent protein (EGFP)発現マウスの作製:

これまでに、VE-cadherin promoter -Cre発現マウスとloxP-stop-loxP-EGFPレポーターマウスの交配により、VE-cadherinのpromoter依存性にEGFPを発現するマウスを作製していた。

①VE-cadherin promoter (-2.5 kb)とenhancer (1st intronの5'gawa 4kbを含む)下流に直接EGFPをつなげてpromoter活性を可視化できるかどうかを調べるtransgenic mouseを作製した(VEcad -2.5 P/E-EGFP)。

②VE-cadherin promoter (-2.5 kb)とenhancerを含む(first intronの5'側の4kb)領域の下流にCreを発現するマウスを作製した。(VEcad -2.5 P/E-Creマウス)。

CD82を血管内皮細胞特異的に発現するtransgenic mouseの作製

低酸素状態で分解が抑制されることにより発現が増加するHypoxia-inducible factor (HIF)により、転写が増加する分子の一つとして同定したCD82の

overexpressionマウスを作製した。

実験動物研究資源バンクの運営と拡充

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、創薬・疾患研究への貢献を目指した厚生労働省のバンクとして、引き続き、有用なマウス系統の収集、保存、供給、情報発信、マウス資源の保護預かりなどを行っている。とくに今年度は、貴重な自然発症疾患モデルマウスの資源化を進めるとともに、保護預かりサービスなどを通じて、利用者がバンクを有効に利用することで動物実験を効率良く出来るようにアドバイスを行うなど、迅速できめ細かな対応を行い、動物資源を利用しやすい環境整備に努めた。

C. 研究結果

A. Ndr4欠損マウスの作製と個体の解析

Ndr4欠損ヘテロ、ホモマウスとも正常に発育した。モリスの水迷路試験による行動解析では、Ndr4欠損ホモマウスでは、体力的な遊泳能力は正常であるにもかかわらず、野生型に比べて逃避潜時 (N=20, P<0.001) と遊泳距離 (N=20, P<0.001) が遅延していた。また、一過性局所脳虚血による脳梗塞体積の解析では、野生型に比べ、Ndr4欠損ホモマウスでは片側運動麻痺の亢進 (N=10, P=0.001) と脳梗塞体積の増加 (N=10, P=0.006) が観察された。

B. VEcad P/E-EGFP, VEcad P/E-Creマウスの樹立
VEcad P/E EGFPトランスジェニックマウス、VEcad P/E-Creトランスジェニックマウスをそれぞれ5系統、6系統をPCRで確認できた。VEcad P/E EGFPトランスジェニックマウスでは、蛍光実体顕微鏡的にEGFPを血管で検出できなかった。このため同ラインの樹立は意味がないと考えた。また、Creの発現に関しては、現在EGFP レポーターマウスとの交配により血管での発現を確認中である。

C. 血管内皮細胞特異的CD82発現マウスの樹立

HIF1 2をoverexpression可能な、アデノウイルスを用いてヒト臍帯静脈内皮細胞にHIF1, 2を発現させて、cDNAのmicroarray解析を行った。その結果、HIFによって発現が増加する分子としてCD82分子を同定した。この分子は、細胞膜を4回貫通する分子であることが予想される。tetraspaninに属する分子であるが、その機能は未知である。

このために、CD82の血管内皮細胞特異的発現マウスを作製した。PCR 上は、7系統のlineを得ることができた。現在血管内皮細胞での発現を免疫組織化学的に検討している。マクロの観察では、大きな血管の構築に異常は認めていない。

D. 血管病モデル動物等の収集と資源化及び分譲

今年度はVE-cadherin-Creマウス、ADAMTS13^{L/L}マウス、ADAMTS13^{S/S}マウスを含む27系統について、ホームページ上に新たに分譲可能な系統として公開した。公開資源総数は121系統となり、昨年度の94系統に比べ順調に増えた。また今年度は、血管病関連の4件を含む32件の分譲を実施した。さらに凍結胚・凍結精子の保護預かりサービス135件 (継続59件を含む)、保護預かりのためのサポートサービス69件 (胚凍結29件、精子凍結21件、凍結胚から生体作出18件、凍結精子からの生体作出1件) など、保護預かりサービス関連の総件数が昨年度に比べ3倍近く増大した。また、繁殖困難な自然発症疾患モデルマウスなどの飼育法についての問い合わせが引き続き多く、詳細な情報提供、指導を行った。

D. 考察

NDRG4は脳および心臓で特異的に発現し、細胞障害性刺激によって発現誘導される。Ndr4欠損マウスを作製し、脳虚血に対する脳保護効果について評価を行ったところ、Ndr4欠損ホモマウスは野生型に比べてまた片側運動麻痺の亢進と一致して脳梗塞体積が増加していた。

三血管閉塞法による脳虚血モデルでは、血管内の内皮細胞は無傷で保たれるため、血管内に血栓が形成されない。このため、神経細胞、グリア系細胞と血管系細胞からなる機能的ユニットの虚血に対する脆弱性を評価できると考えられる。つまり、Ndr4欠損により脳梗塞体積が増加することは、Ndr4欠損により脳保護作用が低下していると理解される。したがって、脳虚血障害の悪化を示すモデルマウスを資源化できることになった。

血管特異的にEGFPを発現するマウスは、血管新生のイメージングに有用であると考え、本研究を開始した。VEcad-Creマウスにより、血管を明瞭にイメージングすることはできたが、Cre/loxP システムを使用すると、一旦VEcad promoterが活性化した細胞では、絶えずCAG promoterによってEGFPが発現する。したがって、血管から他の細胞に変わった細胞でもEGFPを発現してしまう可能性は否定できなかった。最終年度にVEcad E/Pに直接EGFPをつないでVEcadの転写活性を可視化できるマウスを作製することを試みた。しかし、蛍光の発現が不十分 (顕微鏡観察をするのに) であり本マウスの繁殖・樹立は断念した。

低酸素による血管新生の病態を検討するマウスとしてCD82を血管内皮細胞で発現するマウスを作製した。HIFによってCD82は発現が増加することを認めたのでCD82の血管内皮細胞特異的発現マウスを樹立することによりCD82の機能を検討することを計画した。転写因子HIFは癌、あるいは虚血によって誘導される血管新生において不可

欠な転写因子であり、この転写因子によって誘導される分子が如何にして血管新生を調節するかを理解しようとした。Vascular endothelial growth factor (VEGF) 以外にもHIFによって転写活性が亢進する分子は多数同定されてきており、CD82も今後低酸素による網膜血管病変における機能などを検討する必要があると考えた。

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、疾患研究・創薬研究用疾患モデルバンクとして整備を引き続き進め、今年度新規に血管病モデル関連マウス3系統を含む27系統を分譲可能とし、総公開系統数が121系統に達し、利用者数が順調に増大し事業の拡大を行った。今年度は、とくに新規に血管病関連モデルマウス5系統の遺伝子導入マウスの作製を順調に開始し、血管病研究への貢献が期待される。

基盤研実験動物研究資源バンク事業は、安定した技術と迅速、きめ細かくで効率良いサービスに対する信頼が得られつつあり、今年度、利用者の飛躍的な増大に繋がったものと考えられる。さらに安定的な運営と拡充により、研究者がより利用しやすいバンクを構築するとともに、独自の血管病モデルマウスなどの資源化を進めることで、血管病の研究を始めとして、疾患研究・治療薬開発などが進展するものと期待される。

E. 結論

国立循環器病センター研究所よりVEcad-CreマウスならびにNdr4欠損ホモマウスなど血管研究に必要なマウスを寄託した。これらのマウスを含め、バンク機能（登録、譲渡）を昨年度より充実させた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究業績「英文」

(1) F. Banno, AK. Chauhan, K. Kokame, J. Yang, S. Miyata, DD. Wagner, T. Miyata: The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood*, 113(21), 5323-5329, 2009.

(2) M. Fujioka, K. Hayakawa, K. Mishima, A. Kunizawa, K. Irie, S. Higuchi, T. Nakano, C. Muroi, H. Fukushima, M. Sugimoto, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, M. Fujiwara, K. Okuchi, K. Nishio: ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood*, 115(8), 1650-1653, 2010.

(3) F. Banno, A. K. Chauhan, T. Miyata: The function of ADAMTS13 in thrombogenesis in vivo:

insights from mutant mice. *Int J Hematol*, 91(1), 30-35, 2010.

(4) Takahama H, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asai T, Wakeno M, Sasaki H, Kikuchi H, Hashimoto K, Oku N, Asakura M, Kim J, Takashima S, Komamura K, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. *J. Am. Coll. Cardiol.* 53: 709-717 (2009)

(5) Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD. FBP17 mediates a common molecular step in the formation of podosomes and phagocytic cups in macrophages. *J. Biol. Chem.* 284: 8548-8556, 2009

(6) Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, Fukamizu A, Gutkind JS, Koh GY, Mochizuki N. Angiopoietin-1 Induces Kruppel-like Factor 2 Expression through a Phosphoinositide 3-Kinase/AKT-dependent Activation of Myocyte Enhancer Factor 2. *J. Biol. Chem.* 284: 5592-5601, 2009

(7) Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T. Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev.* 31: 717-724, 2009.

(8) Okado H, Ohtaka-Maruyama C, Sugitani Y, Fukuda Y, Ishida R, Hirai S, Miwa A, Takahashi A, Aoki K, Mochida K, Suzuki O, Honda T, Nakajima K, Ogawa M, Terashima T, Matsuda J, Kawano H, Kasai M. The transcriptional repressor RP58 is crucial for cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex. *Dev. Biol.* 331: 140-151, 2009

(9) Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, Ogawa Y. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ. Res.* 105: 25-32, 2009.

学会発表

(1) 山本ひとみ、小亀浩市、柳本広二、奥田智彦、中城有香子、宮本 享、宮田敏行、「NDRG4欠損は虚血再灌流による脳障害を悪化させる」第32回日本血栓止血学会学術集会、平成21年6月4-6日、北九州市

(2) Hitomi Yamamoto, Koichi Kokame, Hiroji Yanamoto, Tomohiko Okuda, Yukako Nakajo, Susumu Miyamoto, Toshiyuki Miyata. NDRG4-Null

mice are vulnerable to cerebral ischemia. XXII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis. July 11-16, 2009, Boston, USA

(3)井本(山本)ひとみ、小亀浩市、柳本広二、奥田智彦、中城有香子、宮本 享、宮田敏行、「NDRG4 欠損は空間学習能力の低下と脳虚血障害の悪化をひきおこす」 NDRG4-null mice exhibit spatial learning deficits and vulnerability to cerebral ischemia-reperfusion injury. 第82回日本生化学会大会、平成21年10月21-24日、神戸市

(4) 野田一臣、張江暉、福原茂朋、望月直樹。A Rap1 small GTPase enhances VE-cadherin-dependent cell adhesion by inducing actin bundling at cell-cell contacts 第82回生化学会 (神戸)平成21年10月21-24日

(5) 鈴木 治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎、高木博隆「心筋症シリアンハムスター (J2N 系)の心臓における 6 型コラーゲンの増加」第 56 回日本実験動物学会総会、大宮、2009 年 5 月 14 日 -16 日

(6) Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Increased collagen type VI content in the hearts of cardiomyopathic Syrian hamsters (J2N strain). 60th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Denver, CO, USA, November 8-12, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

FoxO血管発現マウス血管可視化マウスの作製

分担研究者 望月直樹 国立循環器病センター研究所 循環器形態部 部長

研究要旨 血管可視化マウスの作製のためにVascular endothelial cadherinのプロモーターエンハンサーを用いてCreリコンビナーゼを発現するマウスを作製した。また血管新生に必須なHIFにより発現が増加する分子VD82のトランスジェニックマウスを作製した。

A. 研究目的

国民病といっても過言ではない動脈硬化症、糖尿病、虚血性心疾患の臓器障害は、血管の生理的機能の破綻と考えられる。また、死因の第一位を占める癌の増殖、転移に重要な血管構築を可視化することで病態を理解することも重要であると考へ本研究を計画した。生活習慣病、癌いずれも血管病変がその病態のかなめとなっているために、血管障害病態モデルを動物で作製し、新規薬剤の個体での薬効評価系として資すること、血管に直接作用して血管新生の抑制を検討可能なマウスを作製することを目標としている。本研究では、血管老化を制御する転写因子FoxOを標的としてまず血管病のモデルとなりうるかを判定して、もし血管老化促進モデルとなるようならば、資源化する。さらに、ほかの生活習慣病モデルマウスの作製を試みる。

B. 研究方法

血管内皮細胞特異的enhanced green fluorescent protein (EGFP)発現マウスの作製:

これまでに、VE-cadherin promoter -Cre発現マウスとloxP-stop-loxP-EGFPレポーターマウスの交配により、VE-cadherinのpromoter依存性にEGFPを発現するマウスを作製していた。

今年度、

①VE-cadherin promoter (-2.5 kb)とenhancer (1st intronの5' gawa 4kbを含む)下流に直接EGFPをつなげてpromoter 活性を可視化できるかどうかを調べるtransgenic mouseを作製した(VEcad -2.5 P/E-EGFP)。

②VE-cadherin promoter (-2.5 kb)とenhancerを含む(first intron の5'側の 4kb)領域の下流にCreを発現するマウスを作製した。(VEcad -2.5 P/E-Creマウス)。

CD82 を血管内皮細胞特異的に発現する transgenic mouseの作製

低酸素状態で分解が抑制されることにより発現が

増加するHypoxia-inducible factor (HIF)により、転写が増加する分子の一つとして同定したCD82の overexpressionマウスを作製した。

Transgeneの発現の確認

マウス tailより、通常の方法によりDNAを分離後PCRでTGの発現を確認した。それぞれのprimerのsequenceは

Cre:

5'-ACATGTTTCAGGGATCGCCAG-3'

5'-TAACCAGTGAACAGCATTGC-3'

CD82

5'-TTTGCTTTCCTGCTCCTGAT-3'

5'-TTCATGAGCTCAGCGTTGTC-3'

である。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立循環器病センターの動物実験委員会の承認を得た後に動物取り扱い規定を遵守して行った。また、動物愛護に配慮して、特に、実験中に動物に苦痛を与えないよう十分な麻酔薬を使用した。遺伝子組換えは、国立循環器病センター内の遺伝子組換え委員会に申請後、承認を得た後に実験を行った。

C. 研究結果

VEcad-P/E EGFPマウス

5系統のVEcad-P/E EGFPトランスジェニックマウスを作製した。しかし、いずれも胎生期から、成獣になるまで顕微鏡的にGFPを可視化できるほどの蛍光は血管で発現しなかった。anti-GFPを用いると、検出ができるが、当初の到達目標にはならないために、本マウスは血管可視化マウスとしては、有効ではないと判断した。

VEcad P/E-Creマウス

6系統以上のVEcad P/E-CreトランスジェニックマウスをPCR上では確認できた。最終年度に作製を開始したために、現在EGFP レポーターマウスとの交配により血管での発現を確認中である。

なし

血管内皮細胞特異的CD82発現トランスジェニックマウス

HIF1 2をoverexpression可能な、アデノウイルスを用いてヒト臍帯静脈内皮細胞にHIF1 2を発現させて、cDNAのmicroarray解析を行った。その結果、HIFによって発現が増加する分子としてCD82分子を同定した。この分子は、細胞膜を4回貫通する分子であることが予想される。tetraspaninに属する分子であるが、その機能は未知である。

このために、CD82の血管内皮細胞特異的発現マウスを作製した。PCR 上は、7系統のlineを得ることができた。現在血管内皮細胞での発現を免疫組織化学的に検討している。マクロの観察では、大きな血管の構築に異常は認めていない。

D. 考察

血管特異的にEGFPを発現するマウスは、血管可視化マウスとして血管新生のイメージングに有用であると考え、本研究を開始した。当初の計画通りVEcad-Creマウスにより、血管を明瞭にイメージングすることはできることは可能となった。しかし、Cre/loxPシステムを使用すると、一旦VEcad promoterが活性化した細胞では、絶えずCAG promoterによってEGFPが発現してしまうために、血管から他の細胞に変わった細胞でもEGFPを発現してしまう可能性は否定できなかった。

このために、最終年度にVEcad E/Pに直接EGFPをつないでVEcadの転写活性を可視化できるマウスを作製することを試みた。しかし、蛍光の発現が不十分(顕微鏡観察をするのに)であり本マウスの繁殖は中止した。

また新たに血管病態を理解するマウスとしてCD82を血管内皮細胞で発現するマウスを作製して、低酸素による血管新生メカニズムの新たな調節機構を理解しようと試みた。転写因子HIFは癌、あるいは虚血によって誘導される血管新生において不可欠な転写因子であり、この転写因子によって誘導される分子が如何にして血管新生を調節するかを理解しようとした。Vascular endothelial growth factor (VEGF) 以外にもHIFによって転写活性が亢進する分子は多数同定されてきており、CD82も今後低酸素による網膜血管病変における機能などを検討する必要があると考えた。

E. 結論

血管を可視化できるようにVEcad-P/E-Creを新たに作製した。またHIFによる血管新生の理解のためのモデルとしてCD82発現マウスを作製した

F. 健康危険情報

G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

(1) Takahama H, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asai T, Wakeno M, Sasaki H, Kikuchi H, Hashimoto K, Oku N, Asakura M, Kim J, Takashima S, Komamura K, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. **J. Am. Coll. Cardiol.** 53: 709-717 (2009)

(2) Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD. FBP17 mediates a common molecular step in the formation of podosomes and phagocytic cups in macrophages. **J. Biol. Chem.** 284: 8548-8556, 2009

(3) Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, Fukamizu A, Gutkind JS, Koh GY, Mochizuki N. Angiopoietin-1 Induces Kruppel-like Factor 2 Expression through a Phosphoinositide 3-Kinase/AKT-dependent Activation of Myocyte Enhancer Factor 2. **J. Biol. Chem.** 284: 5592-5601, 2009

【学会発表】

(1) 野田一臣、張江暉、福原茂朋、望月直樹。A Rap1 small GTPase enhances VE-cadherin-dependent cell adhesion by inducing actin bundling at cell-cell contacts 第82回生化学会 (神戸)平成21年10月21-24日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

ADAM ファミリー欠損マウスによるADAMの機能解析に関する研究

分担研究者 宮田敏行 国立循環器病センター研究所 病因部 部長
研究協力者 柳本広二 国立循環器病センター研究所 病因部 室長
研究協力者 小亀浩市 国立循環器病センター研究所 脈管生理部 室長
研究協力者 井本(山本)ひとみ 国立循環器病センター研究所 病因部 流動研究員

研究要旨 Ndr4 (N-myc downstream-regulated gene 4) 遺伝子欠損マウスを作製し、本マウスは空間学習能力の低下と脳虚血後の梗塞体積の増大を示すことを明らかにした。つまり、脳虚血障害の悪化を示すモデルマウスの資源化を達成した。

A. 研究目的

血栓症は国民の健康の大きな不安要因であり、安心・安全な生活を送るため、血栓症制圧に向けた研究を進めているところである。なかでも脳虚血障害は大きな社会問題であり、医学研究上の最重要課題の一つである。高ホモシステイン血症は、血栓症の危険因子として知られている。私達は以前、培養ヒト血管内皮細胞をホモシステインで処理すると、小胞体ストレスが生じ、特定の遺伝子の発現が誘導されることを見出した。そのうちの一つNDRG1を欠損したマウスを作製して解析した結果、NDRG1が末梢神経ミエリン鞘の構造維持に必須であることを明らかにした。この研究の過程で、脳に高発現するNDRG4を同定した。今年度はNDRG4欠損マウスを作製し、学習と記憶力および脳虚血障害に対する感受性に関して評価を行った。

B. 研究方法

常法により、遺伝子ターゲティング法を用いてNdr4欠損ヘテロマウスを作製し、ヘテロマウス同士を交配させて、欠損ホモマウスを作製した。Ndr4欠損マウスの空間学習能力を調べるために、モリスの水迷路試験を行った。また、虚血ストレスに対する脳の脆弱性を調べるため、三血管閉塞法による虚血・再灌流実験を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立循環器病センターの動物実験委員会の承認を得た後に動物取り扱い規定を遵守して行った。また、動物愛護に配慮して、特に、実験中に動物に苦痛を与えないよう十分な麻酔薬を使用した。

C. 研究結果

Ndr4欠損ヘテロマウスの作製

Ndr4欠損ヘテロマウスを作製し、欠損ヘテロマウス同士を交配させた結果、産仔の遺伝子型はメンデル比とよく一致しており、欠損ヘテロ、欠損ホモマウスとも正常に発育した。

モリスの水迷路試験による行動解析

Ndr4欠損ホモマウスでは、体力的な遊泳能力は正常であるにもかかわらず、野生型に比べて逃避潜時 (N=20, P<0.001) と遊泳距離 (N=20, P<0.001) が遅延していた。

一過性局所脳虚血による脳梗塞体積の解析

野生型に比べ、Ndr4欠損ホモマウスでは片側運動麻痺の亢進 (N=10, P=0.001) と脳梗塞体積の増加 (N=10, P=0.006) が観察された。

D. 考察

NDRG4は脳および心臓で特異的に発現し、細胞障害性刺激によって発現誘導される。本研究では、Ndr4欠損マウスを作製し、空間学習能力および脳虚血に対する脳保護効果について評価を行ったところ、Ndr4欠損ホモマウスは野生型に比べて空間学習能力が低下しており、また片側運動麻痺の亢進と一致して脳梗塞体積が増加していた。

三血管閉塞法による脳虚血モデルとは、血管外からの結紮もしくはクリッピングにより中大脳動脈と両側の総頸動脈を閉塞するものである。血管内の内皮細胞は無傷で保たれるため、血管内凝固は起こらず、血管内に血栓が形成されない。外因により物理的に血流低下を起こさせ虚血領域を形成する手法である。このため、神経細胞、グリア系細胞と血管系細胞からなる機能的ユニットの虚血に対する脆弱性を評価

できると考えられる。つまり、NdrG4欠損により脳梗塞巣体積が増加することは、NdrG4欠損により脳保護作用が低下していると理解される。

本研究により、脳虚血障害の悪化を示すモデルマウスを資源化できることになった。

E. 結論

NdrG4欠損ホモマウスは野生型に比べて空間学習能力の低下、片側運動麻痺の亢進と脳梗塞体積の増加が観察された。NdrG4欠損ホモマウスの資源化は有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

(1) F. Banno, AK. Chauhan, K. Kokame, J. Yang, S. Miyata, DD. Wagner, T. Miyata: The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood*, 113(21), 5323-5329, 2009.

(2) M. Fujioka, K. Hayakawa, K. Mishima, A. Kunizawa, K. Irie, S. Higuchi, T. Nakano, C. Muroi, H. Fukushima, M. Sugimoto, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, M. Fujiwara, K. Okuchi, K. Nishio: ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood*, 115(8), 1650-1653, 2010.

【総説】

F. Banno, A. K. Chauhan, T. Miyata: The function of ADAMTS13 in thrombogenesis in vivo: insights from mutant mice. *Int J Hematol*, 91(1), 30-35, 2010.

【学会発表】

- (1) 山本ひとみ、小亀浩市、柳本広二、奥田智彦、中城有香子、宮本 享、宮田敏行、
「NDRG4欠損は虚血再灌流による脳障害を悪化させる」第32回日本血栓止血学会学術集会、平成21年6月4-6日、北九州市
- (2) Hitomi Yamamoto, Koichi Kokame, Hiroji

Yanamoto, Tomohiko Okuda, Yukako Nakajo, Susumu Miyamoto, Toshiyuki Miyata. NDRG4-Null mice are vulnerable to cerebral ischemia. XXII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis. July 11-16, 2009, Boston, USA

- (3) 井本(山本)ひとみ、小亀浩市、柳本広二、奥田智彦、中城有香子、宮本 享、宮田敏行、
「NDRG4欠損は空間学習能力の低下と脳虚血障害の悪化をひきおこす」
NDRG4-null mice exhibit spatial learning deficits and vulnerability to cerebral ischemia-reperfusion injury. 第82回日本生化学会大会、平成21年10月21-24日、神戸市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

血管病モデルマウスと血管新生可視化マウスの資源化
分担項目：遺伝子改変動物の作製と生物資源化

分担研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー

研究要旨

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、疾患研究・創薬研究用疾患モデルバンクとして整備を進め、血管病の研究、治療法開発等に資するため次のことを行った。（１）国立循環器病センター研究所より寄託を受けた３系統の血管病等の疾患モデルマウスの凍結胚及び凍結精子の作製を行い資源化するとともに国内外に分譲した。（２）新規に血管病関連モデルマウス５系統の遺伝子導入マウスの作製を開始した。（３）公開資源総数（マウス）は121系統と順調に増大し、分譲・保護預かりサービスなどの利用者が顕著に増えた。安定した技術と迅速、きめ細かで効率良いサービスに努め、動物資源を利用しやすい環境整備を行った。

A. 研究目的

医薬品の開発や疾患研究には、種々の疾患モデル動物が使用されており、その開発、系統維持、供給は我が国の医学、医薬品等開発研究の基盤として必須であることから、医薬基盤研究所では、疾患研究や創薬研究に資するため実験動物研究資源バンクを設立し、疾患モデルマウスを中心に研究資源を収集し、高品質の資源として保存するとともに、研究者への提供を行っている。本研究では、国立循環器病センター研究所との共同研究により、血管病研究用モデルマウス等を医薬基盤研究所実験動物バンクにおいて生物資源として収集し、保存、品質管理を行い、研究者に迅速に安定的に供給する体制を構築することを目的とする。血管病モデル動物等を用いた研究が推進されることで、新規治療薬や予防法の開発に繋がり、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

今年度は昨年度に引き続き、血管病モデル動物等の収集と資源化を行うとともに、実験動物研究資源バンクを拡充し、国内外への分譲を行った。さらに、新たな血管病モデル動物として、５系統の遺伝子導入マウスの開発を開始した。

B. 研究方法

1) 血管病モデル動物等の収集・資源化・分譲と新規開発

国立循環器病センター研究所より新たに寄託を受けた次の３系統のマウスについて、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクにて、繁殖系統維持、EFS40による２細胞期胚凍結保存、及びR18S3による精子の凍結保存による資源化を行った。①VE-cadherin-Cre マウス（VE カドヘリン [Vascular endothelial-cadherin, Cdh5] プロモーターにより血管内皮細胞特異的に Cre 酵素を発現するマウス）、② ADAMTS13^{L/L} マウス（129/Sv 系統の Adamts13 遺伝子を戻し交配により C57BL/6 に導入したマウスで、全長型 ADAMTS13 (ADAMTS13L) を発現する）、③ ADAMTS13^{S/S} マウス (C57BL/6 系統の

Adamts13 遺伝子を戻し交配により 129/Sv に導入したマウスで、C 末端ドメイン欠損 ADAMTS13 (ADAMTS13S) を発現する)。さらに血管可視化マウスなど血管病関連遺伝子導入マウス５系統の作製を開始した。

2) 実験動物研究資源バンクの運営と拡充

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、創薬・疾患研究への貢献を目指した厚生労働省のバンクとして、引き続き、有用なマウス系統の収集、保存、供給、情報発信、マウス資源の保護預かりなどを行っている。とくに今年度は、貴重な自然発症疾患モデルマウスの資源化を進めるとともに、保護預かりサービスなどを通じて、利用者がバンクを有効に利用することで動物実験を効率良く出来るようにアドバイスをを行うなど、迅速できめ細かな対応を行い、動物資源を利用しやすい環境整備に努めた。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

1) 血管病モデル動物等の収集・資源化・分譲と新規開発

①VE-cadherin-Cre マウスについては、成熟雄を導入し、精子凍結を行い、融解精子を用いて体外受精により２細胞期胚を作製し凍結保存（180個）した。②ADAMTS13^{L/L} マウスについては、体外受精により２細胞期胚を作製し凍結保存（174個）した。③ADAMTS13^{S/S} マウスは遺伝的バックグラウンドが129系統であるので、体外受精が困難なため基本的に自然交配により２細胞期胚を得、凍結保存（677個）した。今までに資源化した NDRG1flox および ADAMTS13KO マウスについて、それぞれ２件ずつの凍結胚の分譲を行った（NDRG1flox の分譲先はアメリカ）。新たな血管病関連モデル動物としては、血管可視化マウスや血管新生機序解明用モデルマウス等５系統の遺伝子導入マウスの作製を行い、それぞれ複数のファウンダーマウスを得た。

2) 実験動物研究資源バンクの運営と拡充

今年度は VE-cadherin-Cre マウス、ADAMTS13^{L/L} マウス、ADAMTS13^{S/S} マウスを含む 27 系統について、ホームページ上に新たに分譲可能な系統として公開した。公開資源総数は 121 系統となり、昨年度の 94 系統に比べ順調に増えた。また今年度は、血管病関連の 4 件を含む 32 件の分譲を実施した。さらに凍結胚・凍結精子の保護預かりサービス 135 件（継続 59 件を含む）、保護預かりのためのサポートサービス 69 件（胚凍結 29 件、精子凍結 21 件、凍結胚から生体作出 18 件、凍結精子からの生体作出 1 件）など、保護預かりサービス関連の総件数が昨年度に比べ 3 倍近く増大した。また、繁殖困難な自然発症疾患モデルマウスなどの飼育法についての問い合わせが引き続き多く、詳細な情報提供、指導を行った。

D. 考察

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、疾患研究・創薬研究用疾患モデルバンクとして整備を引き続き進め、今年度新規に血管病モデル関連マウス 3 系統を含む 27 系統を分譲可能とし、総公開系統数が 121 系統に達し、利用者数が順調に増大し事業の拡大を行った。今年度は、とくに新規に血管病関連モデルマウス 5 系統の遺伝子導入マウスの作製を順調に開始し、血管病研究への貢献が期待される。

基盤研実験動物研究資源バンク事業は、安定した技術と迅速、きめ細かで効率良いサービスに対する信頼が得られつつあり、今年度、利用者の飛躍的な増大に繋がったものと考えられる。さらに安定的な運営と拡充により、研究者がより利用しやすいバンクを構築するとともに、独自の血管病モデルマウスなどの資源化を進めることで、血管病の研究を始めとして、疾患研究・治療薬開発などが進展するものと期待される。

E. 結論

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、疾患研究・創薬研究用疾患モデルバンクとして整備を進め、血管病の研究、治療法開発等に資するため次のことを行った。（1）国立循環器病センター研究所より寄託を受けた 3 系統の血管病等の疾患モデルマウスの凍結胚及び凍結精子の作製を行い資源化するとともに国内外に分譲した。（2）新規に血管病関連モデルマウス 5 系統の遺伝子導入マウスの作製を開始した。（3）公開資源総数（マウス）は 121 系統と順調に増大し、分譲・保護預かりサービスなどの利用者が顕著に増えた。安定した技術と迅速、きめ細かで効率良いサービスに努め、動物資源を利用しやすい環境整備を行った。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T. Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev.* 31: 717-724, 2009.
2. Okado H, Ohtaka-Maruyama C, Sugitani Y, Fukuda Y, Ishida R, Hirai S, Miwa A, Takahashi A, Aoki K, Mochida K, Suzuki O, Honda T, Nakajima K, Ogawa M, Terashima T, Matsuda J, Kawano H, Kasai M. The transcriptional repressor RP58 is crucial for cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex. *Dev. Biol.* 331: 140-151, 2009.
3. Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, Ogawa Y. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ. Res.* 105: 25-32, 2009.

2. 学会発表

- 1) 鈴木 治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎、高木博隆「心筋症シリアンハムスター (J2N 系) の心臓における 6 型コラーゲンの増加」第 56 回日本実験動物学会総会、大宮、2009 年 5 月 14 日-16 日
- 2) Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Increased collagen type VI content in the hearts of cardiomyopathic Syrian hamsters (J2N strain). 60th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Denver, CO, USA, November 8-12, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
F. Banno, AK. Chauhan, K. Kokame, J. Yang, S. Miyata, DD. Wagner, T. Miyata	The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation.	Blood	113 (21)	5323 -5329	2009
M. Fujioka, K. Hayakawa, K. Mishima, A. Kunizawa, K. Irie, S. Higuchi, T. Nakano, C. Muroi, H. Fukushima, M. Sugimoto, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, M. Fujiwara, K. Okuchi, K. Nishio	ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion.	Blood	115(8)	1650 -1653	2010
F. Banno, A. K. Chauhan, T. Miyata	The function of ADAMTS13 in thrombogenesis in vivo: insights from mutant mice.	Int J Hematol	91(1)	30-35	2010
Takahama H, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asai T, Wakeno M, Sasaki H, Kikuchi H, Hashimoto K, Oku N, Asakura M, Kim J, Takashima S, Komamura K, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M.	Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats.	J. Am. Coll. Cardiol.	53	709-717	2009
Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD.	FBP17 mediates a common molecular step in the formation of podosomes and phagocytic cups in macrophages.	J. Biol. Chem.	284	8548 -8556	2009
Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, Fukamizu A, Gutkind JS, Koh GY, Mochizuki N.	Angiopoietin-1 Induces Kruppel-like Factor 2 Expression through a Phosphoinositide 3-Kinase/AKT-dependent Activation of Myocyte Enhancer Factor 2.	J. Biol. Chem.	284	5592 -5601	2009
Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T.	Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis.	Brain Dev.	31	717-724	2009
Okado H, Ohtaka-Maruyama C, Sugitani Y, Fukuda Y, Ishida R, Hirai S, Miwa A, Takahashi A, Aoki K, Mochida K, Suzuki O, Honda T, Nakajima K, Ogawa M, Terashima T, Matsuda J, Kawano H, Kasai M.	The transcriptional repressor RP58 is crucial for cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex.	Dev. Biol.	331	140-151	2009
Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, Ogawa Y.	Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue.	Circ. Res.	105	25-32	2009

blood

2009 113: 5323-5329
Prepublished online Dec 24, 2008;
doi:10.1182/blood-2008-07-169359

The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation

Fumiaki Banno, Anil K. Chauhan, Koichi Kokame, Jin Yang, Shigeki Miyata, Denisa D. Wagner and Toshiyuki Miyata

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/113/21/5323>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:

[Thrombosis and Hemostasis](#) (55 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published semimonthly by the American Society of Hematology, 1900 M St, NW, Suite 200, Washington DC 20036.

Copyright 2007 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation

Fumiaki Banno,¹ Anil K. Chauhan,^{2,3} Koichi Kokame,¹ Jin Yang,¹ Shigeki Miyata,⁴ Denisa D. Wagner,^{2,3} and Toshiyuki Miyata¹

¹Research Institute, National Cardiovascular Center, Suita, Japan; ²Immune Disease Institute and ³Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA; and ⁴Division of Transfusion Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Japan

ADAMTS13 is a multidomain protease that limits platelet thrombogenesis through the cleavage of von Willebrand factor (VWF). We previously identified 2 types of mouse *Adamts13* gene: the 129/Sv-strain *Adamts13* gene encodes the long-form ADAMTS13 having the same domains as human ADAMTS13, whereas the C57BL/6-strain *Adamts13* gene encodes the short-form ADAMTS13 lacking the distal C-terminal domains. To assess the physiologic significance of the distal

C-terminal domains of ADAMTS13, we generated and analyzed 129/Sv-genetic background congenic mice (*Adamts13^{SS}*) that carry the short-form ADAMTS13. Similar to wild-type 129/Sv mice (*Adamts13^{LL}*), *Adamts13^{SS}* did not have ultralarge VWF multimers in plasma, in contrast to 129/Sv-genetic background ADAMTS13-deficient mice (*Adamts13^{-/-}*). However, in vitro thrombogenesis under flow at a shear rate of 5000 s⁻¹ was accelerated in *Adamts13^{SS}* compared with *Adamts13^{LL}*. Both in vivo

thrombus formation in ferric chloride-injured arterioles and thrombocytopenia induced by collagen plus epinephrine challenge were more dramatic in *Adamts13^{SS}* than in *Adamts13^{LL}* but less than in *Adamts13^{-/-}*. These results suggested that the C-terminally truncated ADAMTS13 exhibited decreased activity in the cleavage of VWF under high shear rate. Role of the C-terminal domains may become increasingly important under prothrombotic conditions. (Blood. 2009;113:5323-5329)

Introduction

ADAMTS13 is a plasma protease that specifically cleaves von Willebrand factor (VWF).¹ VWF is a multimeric plasma glycoprotein that plays a critical role in platelet adhesion and aggregation on vascular lesions.² Endothelial cells and megakaryocytes produce mainly VWF as large multimers that can exceed 20 000 kDa in mass and secrete the multimers into the circulating blood. The adhesive activity of VWF multimers depends on their molecular sizes and in particular the largest multimers, called ultralarge VWF (UL-VWF) multimers, can induce excessive platelet aggregation under shear stress. UL-VWF multimers are normally cleaved by ADAMTS13 to smaller forms, thus restraining platelet thrombus formation. The lack of ADAMTS13 activity allows UL-VWF multimers to persist in the circulation and leads to the development of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP).³⁻⁵

ADAMTS13 consists of multiple domains including a metalloprotease domain, a disintegrin-like domain, a thrombospondin type 1 motif (Tsp1) domain, a cysteine-rich domain, a spacer domain, 7 additional Tsp1 domains and 2 complement components C1r/C1s, urchin epidermal growth factor, and bone morphogenic protein-1 (CUB) domains in order from the N-terminus. So far, the functional roles of ADAMTS13 domains have been studied using in vitro assay systems.⁶⁻¹³ These studies have shown an essential role of the N-terminal region of ADAMTS13 from the metalloprotease domain to the spacer domain, on the VWF cleavage. However, the results from in vitro studies have lacked consistency on the relative importance of the C-terminal Tsp1 and CUB domains in the substrate recognition and the activity of ADAMTS13. The recombinant human ADAMTS13 mutant lacking the C-terminal

Tsp1 and CUB domains maintain almost absolute VWF-cleaving activity under static conditions, indicating that the C-terminal domains are dispensable for the ADAMTS13 activity.⁶⁻⁸ Under flow, the same mutant is hyperactive for the cleavage of newly released VWF multimers anchored on endothelial cells, suggesting that the C-terminal domains negatively regulate the activity of ADAMTS13.¹⁰ Recombinant polypeptides and synthetic peptides derived from the first CUB domain can inhibit the cleavage of VWF multimers on endothelial cells by ADAMTS13 under flow.¹¹ Removal of the C-terminal Tsp1 and CUB domains results in a marked decrease in VWF cleavage by ADAMTS13 in a vortex mixer and in VWF binding to ADAMTS13 in a Biacore system (Uppsala, Sweden),¹³ indicating that the C-terminal domains play a crucial role in the recognition and cleavage of VWF. These results prompted us to investigate the role of C-terminal domains of ADAMTS13 in vivo.

In laboratory mouse strains, 2 kinds of *Adamts13* gene are present.¹⁴⁻¹⁶ The *Adamts13* gene of the 129/Sv strain contains 29 exons like the human *ADAMTS13* gene and encodes the full-length ADAMTS13 with the same domain constitutions as human ADAMTS13. On the other hand, several strains of mice, including the C57BL/6 strain, harbor the insertion of an intracisternal A-particle (IAP) retrotransposon into intron 23 of the *Adamts13* gene. As a result, the distal C-terminally truncated ADAMTS13 lacking the C-terminal 2 Tsp1 domains and 2 CUB domains is predominantly expressed in these strains. Therefore, mice can be suitable animal models for evaluating functions of the distal C-terminal domains, the C-terminal 2 Tsp1 domains, and 2 CUB domains, in vivo.

Submitted July 16, 2008; accepted December 16, 2008. Prepublished online as Blood First Edition paper, December 24, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-07-169359.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

An Inside *Blood* analysis of this article appears at the front of this issue.

© 2009 by The American Society of Hematology

In the present study, through using the spontaneous IAP insertion in mouse *Adamts13* gene, we generated a congenic mouse model that had the distal C-terminally truncated ADAMTS13 on 129/Sv genetic background. While comparing with wild-type 129/Sv mice having full-length ADAMTS13 and ADAMTS13-deficient mice on the same genetic background, we analyzed platelet thrombus formation in the congenic mice to define physiologic significance of the distal C-terminal domains in ADAMTS13 functions. Our results indicate that the distal C-terminal domains of ADAMTS13 contribute to the processing of VWF multimers *in vivo*, and that the importance of these domains becomes obvious after suffering thrombogenic stimuli.

Methods

Animals

The 129/Sv mice were purchased from Clea Japan (Tokyo, Japan). C57BL/6 mice were purchased from Japan SLC (Hamamatsu, Japan). ADAMTS13-deficient mice on the 129/Sv genetic background were described previously.^{17,18} ADAMTS13-congenic mice were developed by introgressing the C57BL/6-*Adamts13* gene onto the 129/Sv genetic background, as follows. C57BL/6 mice were backcrossed to 129/Sv mice for 10 generations while retaining the C57BL/6-*Adamts13* gene. In the resulting N10 heterozygous mice, autosomal chromosomes were theoretically 99.9% identical to those of the 129/Sv strain and sex chromosomes were derived exclusively from the 129/Sv strain. The N10 heterozygous mice were interbred to produce homozygous mice. The *Adamts13*-genotype was determined by polymerase chain reaction (PCR) with HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN, Hilden, Germany). The amplification was carried out using primers: the intron 23-specific forward primer, 5'-ACCTCTCAAGT-GTTTGGGATGCTA-3', the IAP-specific reverse primer, 5'-TCAGCGC-CATCTTGTGACGGCGAA-3', and the primer downstream of the IAP target site, 5'-TGCCAGATGGCCATGATTAACCTCT-3'. For the experiments, all animals were matched for age and sex. All animal procedures were approved by the Animal Care and Use Committees of the National Cardiovascular Center Research Institute and Immune Disease Institute.

Northern blot analysis

Total RNA was extracted from liver using ISOGEN reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan) and poly(A)⁺ RNA was purified using PolyAtract mRNA Isolation Systems (Promega, Madison, WI). The alkaline phosphatase-labeled probe was synthesized from mouse *Adamts13* cDNA (1.3 kb) using AlkPhos Direct labeling module (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Poly(A)⁺ RNA was separated on a 1% agarose gel containing 2% formaldehyde and transferred to a nylon membrane. The probe was hybridized to the blot and detected using CDP-Star detection reagent (GE Healthcare).

Blood sampling

Blood was collected from the retro-orbital plexus into tubes containing a 0.1 volume of 3.8% sodium citrate. Blood cell counts and hematocrit were determined using an automatic cell counter (KX-21NV; Sysmex, Kobe, Japan). Plasma was prepared from blood by centrifugation at 800g for 15 minutes.

Determination of plasma ADAMTS13 activity

Plasma ADAMTS13 activity was measured using GST-mVWF73-H, a recombinant mouse VWF73 peptide flanked by N-terminal glutathione S-transferase (GST) and C-terminal His₆ tags, as described previously.¹⁴ In brief, GST-mVWF73-H (500 ng) was incubated with 0.8 μ L plasma in 40 μ L reaction buffer (10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, and 0.005% Tween 20, pH 7.4) at 37°C for 1 hour. The reaction was stopped by adding 10 μ L sodium dodecyl

sulfate (SDS) sample buffer (50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl, 10 mM EDTA, 10% SDS, 250 mM dithiothreitol, 30% glycerol, and 0.1% bromophenol blue, pH 6.8). The samples were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot using a rabbit anti-GST antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) and a peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibody (KPL, Gaithersburg, MD). Activity was also determined using a fluorogenic human VWF73 peptide of FRETs-VWF73 (Peptide Institute, Minoh, Japan).^{19,20} FRETs-VWF73 (2 μ M) was incubated with 4 μ L plasma in 200 μ L assay buffer (5 mM bis(2-hydroxyethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)methane, 25 mM CaCl₂, and 0.005% Tween 20, pH 6.0) at 30°C. Increases in fluorescence were measured using a 350-nm excitation filter and a 440-nm emission filter in a fluorescence photometer (Mx3000P; Stratagene, La Jolla, CA).

VWF multimer analysis

Plasma VWF multimer patterns were analyzed as described previously.¹⁷ Plasma samples in SDS sample buffer were electrophoresed on a 1% agarose gel (Agarose IEF; GE Healthcare) at a constant current of 15 mA at 4°C. After transfer to a nitrocellulose membrane, the membrane was incubated in peroxidase-conjugated rabbit anti-human VWF (1:500; Dako, Glostrup, Denmark) in 5% skim milk to detect VWF multimers. Bound antibody was detected with Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer, Waltham, MA) on an image analyzer (LAS-3000; Fujifilm, Tokyo, Japan). The chemiluminescent intensities of each lane were scanned using Image Gauge software (version 4.2.2; Fujifilm); the relative intensity profiles were shown.

Parallel plate flow chamber assay

Platelet thrombus formation in flowing blood on immobilized collagen was analyzed using a parallel plate flow chamber as described previously.^{17,21} Acid-insoluble type I collagen-coated glass coverslips were placed in a flow chamber. The chamber was mounted on a fluorescence microscope (Axiovert 200M; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a CCD camera system (DXC-390; Sony, Tokyo, Japan). Blood was collected into tubes containing argatroban (240 μ M; Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan). The fluorescent dye mepacrine (10 μ M; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was added to the blood. Whole blood samples were aspirated through the chamber and across the collagen-coated coverslip at a constant wall shear rate. To analyze the cumulative thrombus volume, image sets at 1.0- μ m z-axis intervals within a defined area (156.4 μ m \times 119.6 μ m) were captured using MetaMorph software (version 6.1.4; Universal Imaging, West Chester, PA). After blind deconvolution of image sets processed by AutoDeblur software package (version 8.0.2; AutoQuant Imaging, Troy, NY), 3D volumetric measurements of thrombi were accomplished using VoxBlast software (version 3.0; Vartek, Fairfield, IA).

Intravital microscopy

Intravital microscopy was performed as described previously.^{22,23} Platelets were isolated from platelet-rich plasma and fluorescently labeled with calcein AM (2.5 μ g/mL; Invitrogen). Recipient mice were anesthetized and labeled platelets were infused through retro-orbital plexus. The mesentery was gently exteriorized through a midline abdominal incision and arterioles of 100- to 150- μ m diameters were visualized with a fluorescence microscope and a CCD camera system. The shear rate was calculated using an optical Doppler velocimeter as described.²⁴ Filter paper saturated with 10% ferric chloride was applied for 5 minutes on an arteriole by topical application. Thrombus formation in the arteriole was monitored for 40 minutes after injury or until complete occlusion occurred and lasted for more than 30 seconds. The following 2 parameters were evaluated: time to first thrombus formation, defined as the time required for formation of a thrombus larger than 30 μ m, and occlusion time, defined as the time required for cessation of blood flow for at least 30 seconds.

Collagen plus epinephrine-induced thrombosis model

A mixture of 600 ng/g collagen (Nycomed, Roskilde, Denmark) and 60 ng/g epinephrine (Sigma-Aldrich) was infused into tail vein of mice.^{17,25}

Blood was collected 5 minutes after the infusion and platelet counts were determined.

Statistical analysis

Statistical significance was assessed by the one-way analysis of variance followed by the Bonferroni multiple comparison tests. Differences were considered to be significant at *P* values less than .05.

Results

Generation of *Adamts13^{S/S}* mice

To address the functional implication of the distal C-terminal domains of ADAMTS13 in vivo, we generated and characterized a congenic mouse model that has the C-terminally truncated form of ADAMTS13 on 129/Sv genetic background (Figure 1A). We confirmed the presence of IAP insertion in the *Adamts13* gene of the congenic (*Adamts13^{S/S}*) mice by PCR (data not shown) and detected an IAP chimeric transcript (~3.5 kb) by Northern blotting of RNA from liver (Figure 1B), primary site of synthesis.¹⁴ An IAP-free ADAMTS13 mRNA (~5 kb) was detected in wild-type 129/Sv (*Adamts13^{L/L}*) mice and no ADAMTS13 mRNA was detected in ADAMTS13-deficient (*Adamts13^{-/-}*) mice on 129/Sv genetic background (Figure 1B). *Adamts13^{S/S}* mouse plasma exhibited higher cleaving activity for both GST-mVWF73-H and FRET5-VWF73 than *Adamts13^{L/L}* mouse plasma, whereas the activity in *Adamts13^{-/-}* mouse plasma was below detection limits (Figure 1C,D). Therefore, the distal C-terminal domains of ADAMTS13 were not necessary for the cleavage of the VWF73-based peptide substrate as observed previously.^{8,14} Platelet counts were not different among the genotypes (*Adamts13^{L/L}*, $744 \pm 180 \times 10^9/L$; *Adamts13^{S/S}*, $693 \pm 44 \times 10^9/L$; *Adamts13^{-/-}*, $672 \pm 39 \times 10^9/L$; mean \pm SD, *n* = 8). Both *Adamts13^{S/S}* mice and *Adamts13^{-/-}* mice were viable and showed no TTP-like symptoms throughout the study.

Adamts13^{S/S} mice have normal VWF multimers

As previously reported,¹⁷ UL-VWF multimers persisted in plasma of *Adamts13^{-/-}* mice on 129/Sv-genetic background (Figure 2). Thus, ADAMTS13 activity is important for the size regulation of VWF multimers in mice at least on this genetic background. However, the VWF multimer patterns in *Adamts13^{S/S}* mice were indistinguishable from those in *Adamts13^{L/L}* mice (Figure 2). These results suggest that the distal C-terminally truncated form of mouse ADAMTS13 exhibits VWF-cleaving activity sufficient for maintenance of normal size distribution of plasma VWF multimers under steady state in vivo.

In vitro thrombogenesis is increased in *Adamts13^{S/S}* mice only at a high shear rate

When whole blood was perfused over a collagen-coated surface in a parallel plate flow chamber at a shear rate of 1000 s^{-1} , platelet thrombus formation was significantly promoted in *Adamts13^{-/-}* mice (Figure 3A) compared with *Adamts13^{L/L}* mice, consistent with the presence of UL-VWF multimers in plasma of *Adamts13^{-/-}* mice. However, whole blood thrombus formation at 1000 s^{-1} was not significantly different between *Adamts13^{S/S}* mice and *Adamts13^{L/L}* mice (Figure 3A), indicating that the distal C-terminally truncated form of mouse ADAMTS13 does not completely lose the activity.

As fluid shear rate increases progressively, the interaction between VWF and platelet GPIIb/IIIa becomes more important in

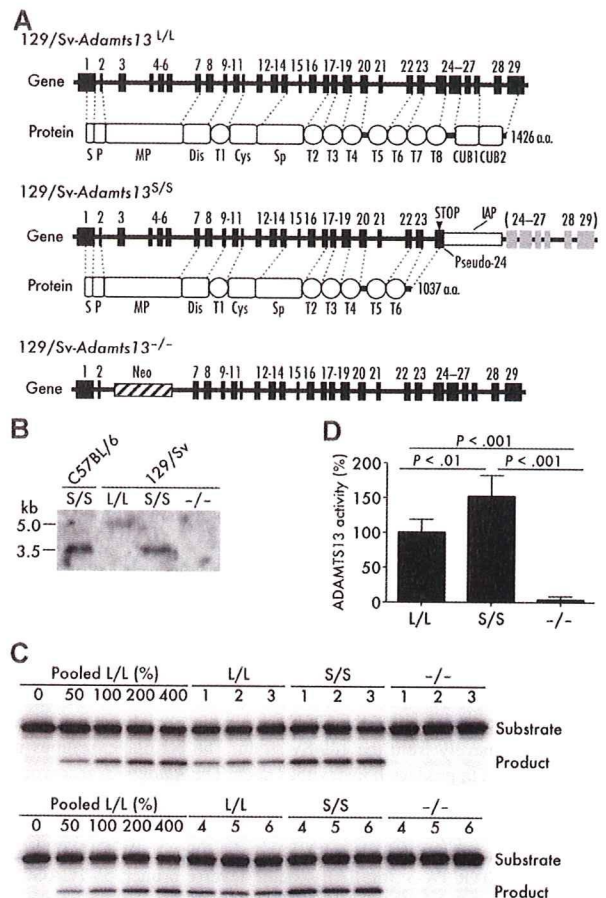


Figure 1. Generation of *Adamts13^{S/S}* mice with 129/Sv-genetic background. (A) Gene and protein structure of ADAMTS13 in the wild-type (*Adamts13^{L/L}*) 129/Sv mice, the *Adamts13^{S/S}* mice on 129/Sv genetic background, and the *Adamts13^{-/-}* mice on 129/Sv genetic background. An intracisternal A-particle (IAP) insertion into intron 23 creates a pseudo-exon 24 including a premature stop codon. ADAMTS13 with a truncated C-terminus is expressed mainly in *Adamts13^{S/S}* mice. S indicates signal peptide; P, propeptide; MP, metalloprotease domain; Dis, disintegrin-like domain; T (numbered 1-8), thrombospondin type 1 motif domain; Cys, cysteine-rich domain; Sp, spacer domain; and CUB, complement components C1r/C1s, urchin epidermal growth factor, and bone morphogenetic protein-1 domain. (B) Expression of *Adamts13* mRNA in liver. Poly(A)⁺ RNA isolated from liver of indicated mice was probed with a 1.3-kb *Adamts13* cDNA corresponding to exons 3 to 13. (C) GST-mVWF73-H assay. Plasma ADAMTS13 activity of indicated mice was measured using a recombinant mouse VWF73 peptide, GST-mVWF73-H. Results from 6 mice for each genotype are shown. Standard reactions using graded amounts of pooled plasma from 10 *Adamts13^{L/L}* mice were performed simultaneously. (D) FRET5-VWF73 assay. Plasma ADAMTS13 activity in indicated mice was determined using a fluorogenic human VWF73 peptide, FRET5-VWF73. Data are mean \pm SD of 6 mice for each genotype. The average activity measured in *Adamts13^{L/L}* mice was arbitrarily defined as 100%.

platelet thrombus formation.²⁶ It has been reported that thrombus formation in mouse blood on collagen surface is completely dependent on the VWF-GPIIb/IIIa interaction above a threshold shear rate between 2000 s^{-1} and 5000 s^{-1} .²⁷ In addition, ADAMTS13 cleaves VWF and down-regulates thrombus formation in shear rate-dependent manner.²⁸ Based on these observations, we further examined thrombus formation at a higher shear rate of 5000 s^{-1} . As expected, thrombus formation in *Adamts13^{-/-}* mice was significantly elevated compared with *Adamts13^{L/L}* mice at 5000 s^{-1} (Figure 3B). In addition, we found accelerated thrombus formation in *Adamts13^{S/S}* mice compared with *Adamts13^{L/L}* mice at this higher shear rate (Figure 3B). These results suggest that the distal C-terminally truncated form of mouse ADAMTS13 has reduced

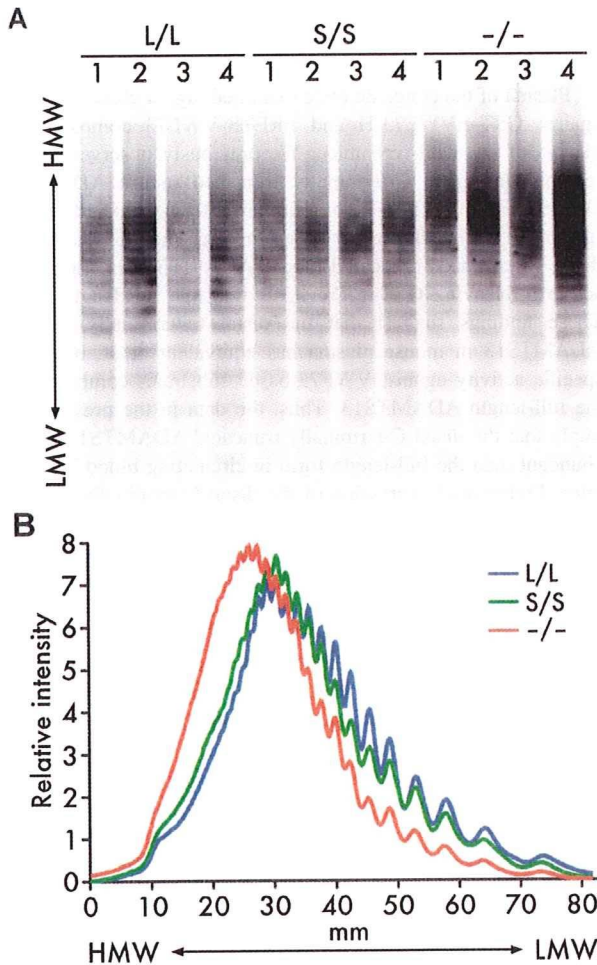


Figure 2. Plasma VWF multimers. (A) VWF multimer patterns. Plasma samples (1 μ L/lane) from *Adamts13^{L/L}*, *Adamts13^{S/S}*, and *Adamts13^{-/-}* mice were electrophoresed on SDS-agarose gels and transferred to nitrocellulose membranes. VWF multimers were detected with anti-VWF antibodies. (B) Relative intensities of plasma VWF multimers. The chemiluminescent intensities of the VWF multimer patterns (A) were scanned using image analysis software. An average of multiple lanes from 4 mice for each genotype is shown. HMW indicates high molecular weight; LMW, low molecular weight.

activity compared with the full-length form and does not sufficiently limit thrombus formation under high shear rate in vitro.

In vivo thrombus growth is accelerated in *Adamts13^{S/S}* mice

To examine whether the truncation of the distal C-terminal domains in ADAMTS13 affects thrombus formation in vivo, we carried out intravital microscopy experiments in a model of experimental arteriolar thrombosis. In this model, vascular injury was induced by topical application of ferric chloride on a mesenteric arteriole, which provoked the generation of free radicals leading to the endothelial disruption.²³ The diameter and shear rate of studied arterioles were 118.0 plus or minus 13.1 μ m and 1362 plus or minus 219 s^{-1} (mean \pm SD, n = 16) for *Adamts13^{L/L}* mice, 122.8 plus or minus 11.1 μ m and 1394 plus or minus 136 s^{-1} (n = 16) for *Adamts13^{S/S}* mice, and 115.6 plus or minus 10.8 μ m and 1405 plus or minus 225 s^{-1} (n = 12) for *Adamts13^{-/-}* mice and not significantly different among the groups. Both time to first thrombus (Figure 4A) and occlusion time (Figure 4B) after injury in *Adamts13^{-/-}* mice (time to first thrombus = 5.1 \pm 1.9 minutes, occlusion time = 9.2 \pm 1.6 minutes; mean \pm SD) were signifi-

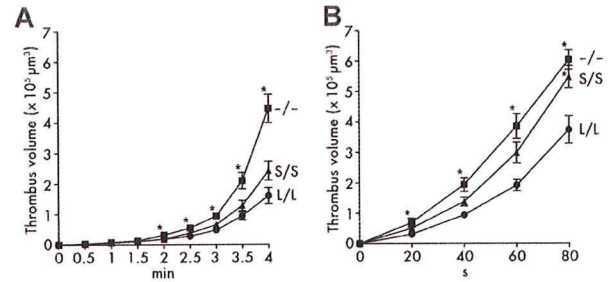


Figure 3. In vitro thrombogenesis on collagen surface under flow. (A) Thrombus formation at 1000 s^{-1} . Whole blood from *Adamts13^{L/L}*, *Adamts13^{S/S}*, or *Adamts13^{-/-}* mice containing mepacrine-labeled platelets was perfused over an acid-insoluble type I collagen-coated surface at a wall shear rate of 1000 s^{-1} . The cumulative thrombus volume, analyzed using a multidimensional imaging system, was measured every 0.5 minutes until 4 minutes. Data are the mean \pm SEM of 25 mice for each genotype. (B) Thrombus formation at 5000 s^{-1} . Whole-blood samples from indicated mice were perfused over an acid-insoluble type I collagen-coated surface at a wall shear rate of 5000 s^{-1} . The cumulative thrombus volume was measured every 20 seconds until 80 seconds. Blood from 2 mice was pooled and used for experiments. Data are the mean \pm SEM of 15 samples for each genotype. * P < .05 in comparison with *Adamts13^{L/L}* mice.

cantly decreased compared with *Adamts13^{L/L}* mice (time to first thrombus = 7.8 \pm 1.3 minutes, occlusion time = 15.3 \pm 3.6 minutes), indicating that ADAMTS13 contributes to down-regulation of thrombogenesis at the site of arteriolar injury in 129/Sv mice. In the case of *Adamts13^{S/S}* mice, time to first thrombus after injury (7.6 \pm 1.2 minutes) was not different from *Adamts13^{L/L}* mice. However, the initial thrombi grew rapidly to occlusive size in *Adamts13^{S/S}* mice and occlusion time was significantly shorter in *Adamts13^{S/S}* mice (12.5 \pm 1.9 minutes) compared with *Adamts13^{L/L}* mice (Figure 4B). These results suggest that the distal C-terminally truncated form of mouse ADAMTS13 is less active in down-regulating thrombus growth in vivo compared with full-length ADAMTS13.

To elucidate the consequences of the lack of the distal C-terminal domains in ADAMTS13 on systemic thrombosis, we performed collagen plus epinephrine infusion model experiments. In this model, widespread intravascular thrombosis was induced by intravenous infusion of collagen fibrils in combination with epinephrine, and the incorporation of platelets into thrombi was monitored by the reduction in circulating platelet counts.²⁹ Consistent with our previous observation,¹⁷ platelet counts after the infusion were significantly lower in *Adamts13^{-/-}* mice

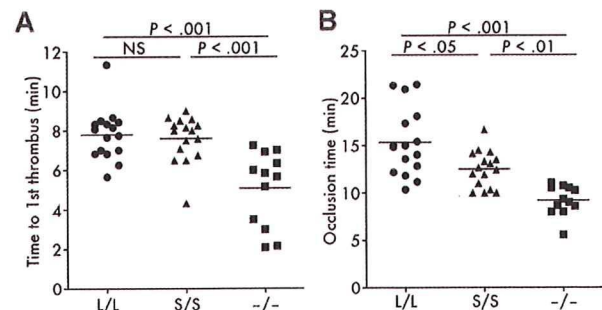


Figure 4. In vivo thrombogenesis in ferric chloride-injured mesenteric arterioles. (A) Time to first thrombus formation. Calcein AM-labeled platelets representing approximately 2.5% of total platelets were observed in mesenteric arterioles of live mice after injury with 10% ferric chloride. The time required for formation of a thrombus more than 30 μ m was measured. (B) Occlusion time. The time required for a complete stop of blood flow was measured after injury with 10% ferric chloride. Symbols represent data from a single mouse. Bars represent the mean values of groups (n = 16 for *Adamts13^{L/L}* mice, n = 16 for *Adamts13^{S/S}* mice, and n = 12 for *Adamts13^{-/-}* mice).

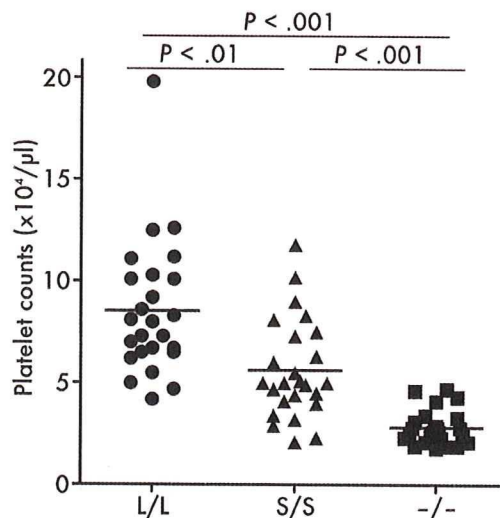


Figure 5. Platelet counts after collagen plus epinephrine infusion. Mice were injected with 600 ng/g collagen plus 60 ng/g epinephrine via tail vein and platelet counts were measured 5 minutes after injection. Symbols represent platelet counts from a single mouse. Bars represent the mean values of 25 mice in each group. Platelet counts of untreated mice were not different among the groups.

($28 \pm 8 \times 10^9/L$, mean \pm SD) than in *Adamts13^{L/L}* mice ($85 \pm 33 \times 10^9/L$), suggesting that ADAMTS13 contributes to inhibition of platelet aggregation in this experimental system (Figure 5). Platelet counts after the infusion in *Adamts13^{S/S}* mice ($56 \pm 24 \times 10^9/L$) were significantly higher than in *Adamts13^{-/-}* mice and lower than in *Adamts13^{L/L}* mice (Figure 5), whereas platelet counts of untreated mice were not different among the groups (*Adamts13^{L/L}*, $666 \pm 44 \times 10^9/L$; *Adamts13^{S/S}*, $770 \pm 65 \times 10^9/L$; *Adamts13^{-/-}*, $710 \pm 49 \times 10^9/L$, mean \pm SD of 4 mice). These findings complement accelerated thrombus growth in *Adamts13^{S/S}* mice compared with *Adamts13^{L/L}* mice, indicating that the distal C-terminally truncated form of mouse ADAMTS13 has significantly reduced activity in vivo.

Discussion

It is now evident that genetic background is an important phenotypic determinant in mutant mice with hemostatic defects. For instance, mice carrying the factor V Leiden (R504Q) mutation have shown increased perinatal thrombotic mortality on the mixed 129/Sv and C57BL/6J background relative to C57BL/6J background.³⁰ Similar effects of genetic backgrounds on phenotypes have been observed in other mutants such as the thrombomodulin G404P-mutant mice,³¹ the fibrinogen-deficient mice,³² and the tissue factor-deficient mice.³³ In ADAMTS13-deficient mice, genetic backgrounds have also been shown to significantly affect their thrombotic phenotypes.³⁴ Thus, phenotypes of ADAMTS13 mutant mice should be compared with control mice on the appropriate and uniform strain background. We have previously demonstrated that ADAMTS13 deficiency in mice results in a prothrombotic state with accumulation of UL-VWF multimers on 129/Sv background.¹⁷ Therefore in this study, we applied a spontaneous mutation in the *Adamts13* gene of C57BL/6 mice onto 129/Sv mice by 10-generation backcrossing, and obtained the congenic mice that were expected to have 99.9% 129/Sv genome and primarily expressed the distal C-terminally truncated ADAMTS13. Then, we compared their phenotypes with positive and negative control animals: the wild-type 129/Sv mice and the

129/Sv-background ADAMTS13-deficient mice. By this approach, we minimized the background effects and defined the significance of the distal C-terminal domains of ADAMTS13 in mice.

Plasma of the congenic mice exhibited higher cleaving activity against GST-mVWF73-H and FRET-S-VWF73 compared with plasma of the wild-type mice. We previously observed that the recombinant distal C-terminally truncated mouse ADAMTS13 cleaves GST-mVWF73-H to a similar extent compared with the full-length form.¹⁴ The other group reported that the recombinant distal C-terminally truncated mouse ADAMTS13 is slightly less active in cleaving GST-mVWF73-H than the full-length form.¹⁵ These findings suggest that the distal C-terminally truncated ADAMTS13 in mouse plasma has equivalent or slightly lower specific activity against VWF73-based substrates compared with the full-length ADAMTS13. Thus, the data in the present study imply that the distal C-terminally truncated ADAMTS13 is more abundant than the full-length form in circulating blood in 129/Sv mice. Preferential expression of the distal C-terminally truncated mouse ADAMTS13 has also been found in HeLa cells¹⁴ and HEK 293T cells.¹⁵ Unfortunately, because we have failed to determine the ADAMTS13 antigen levels in mouse plasma, it remains unclear whether the distal C-terminal truncation of ADAMTS13 actually increases plasma levels of the enzyme. Despite the congenic mice having higher in vitro ADAMTS13 activity in plasma, they showed prothrombotic phenotypes, suggesting the importance of the distal C-terminal domains in ADAMTS13 activity in vivo.

We reconfirmed that ADAMTS13 deficiency in 129/Sv mice allowed the accumulation of UL-VWF multimers in plasma (Figure 2), therefore, promising the essential contribution of ADAMTS13 on preventing the accumulation of UL-VWF multimers in 129/Sv mice. Under these situations, lack of the distal C-terminal domains of ADAMTS13 in 129/Sv mice did not increase plasma VWF multimer sizes (Figure 2), showing that the distal C-terminally truncated ADAMTS13 maintained the VWF-cleaving activity in vivo. Although the distal C-terminally truncated form of mouse ADAMTS13 was reported to show considerably lower activity than the full-length form for purified human VWF multimers under in vitro static conditions,¹⁵ our results show that the distal C-terminal truncation of mouse ADAMTS13 allows retention of normal size distribution of plasma VWF multimers in vivo at least under steady state.

In the parallel-plate flow chamber experiments, ADAMTS13 deficiency in 129/Sv mice markedly enhanced thrombogenic responses (Figure 3), indicating that ADAMTS13 is critical for limiting platelet thrombus formation under whole blood flow conditions. In the same experimental conditions, the distal C-terminal truncation of ADAMTS13 in 129/Sv mice did not promote thrombogenesis at 1000 s^{-1} (Figure 3A) but significantly promoted thrombogenesis at 5000 s^{-1} (Figure 3B). It is conceivable that the distal C-terminally truncated ADAMTS13 is active but not fully competent to cleave VWF within growing thrombus under flow. Because both the interaction of GPIIb-IIIa-VWF and the cleavage of VWF by ADAMTS13 are facilitated by increasing fluid shear rate, the function of the distal C-terminal domains may become vital to down-regulate thrombogenesis under high shear conditions. Actually, similar results were obtained in the in vivo arteriolar injury model experiments (Figure 4). The distal C-terminal truncation of ADAMTS13 in 129/Sv mice did not affect the time to first thrombus formation in the arterioles where fluid shear rates were around 1500 s^{-1} (Figure 4A). However, when thrombus grew to a larger size, the arteriolar lumen was narrowed, which resulted in increase in shear rates.²³ Then, the distal C-terminal truncation of

ADAMTS13 significantly reduced the occlusion time compared with full-length ADAMTS13 (Figure 4B). Therefore, the distal C-terminal domains are important for ADAMTS13 to sufficiently down-regulate thrombogenesis under high shear rate *in vivo* as well as *in vitro*. After the induction of systemic platelet aggregation by challenge with a mixture of collagen and epinephrine, consumptive thrombocytopenia was also enhanced by the distal C-terminal truncation of ADAMTS13 in 129/Sv mice (Figure 5), supporting the idea that the distal C-terminal domains are required for optimal down-regulation of platelet aggregation *in vivo*. The complete deficiency of ADAMTS13 in 129/Sv significantly accelerated thrombus growth to injured vessel wall and systemic thrombi compared with 129/Sv mice with truncation of the distal C-terminal domains in ADAMTS13 (Figures 4,5). Therefore, we can conclude that the distal C-terminally truncated ADAMTS13 has significantly decreased activity in limiting thrombosis *in vivo*.

The binding of platelets to VWF is reported to accelerate the cleavage of VWF by ADAMTS13 under static³⁵ and flow³⁶ conditions *in vitro*. It has also been shown that ADAMTS13 can cleave platelet-bound VWF multimers³⁷ and limit thrombus formation through the cleavage of VWF at the surface of forming thrombi²⁸ in *in vitro* flow chamber systems. Therefore, in our experimental settings, ADAMTS13 attenuates thrombus growth, possibly through the cleavage of VWF multimers bound on the surface of platelet-rich thrombi under high shear rate. The distal C-terminal domains may be necessary for ADAMTS13 to efficiently recognize and cleave platelet-bound VWF multimers on a growing thrombus. Conceivably, the distal C-terminal domains may contribute to the interaction with unidentified ADAMTS13-binding cofactors localized on the surface of platelets or subendothelium, and this interaction may be necessary for ADAMTS13 to control VWF-mediated thrombus formation. However, we cannot rule out the possibility that the distal C-terminal domains of ADAMTS13 contribute to the prevention of thrombosis independent from the VWF-cleaving activity of ADAMTS13, nevertheless VWF has been suggested as the only relevant substrate for ADAMTS13³⁸ and functions of ADAMTS13 other than its VWF-cleaving activity have yet to be reported.

The distal C-terminally truncated ADAMTS13 is expressed in a lot of mouse strains including the BALB/c, C3H/He, C57BL/6, and DBA/2 strains as substitute for the full-length form.^{14,15} Our present results suggest that thrombotic response in these strains would be increased, at least partially, by their incomplete ADAMTS13 activity. This should be taken into account when

studying genetically modified mice with heterogeneous genetic background.

In summary, our results define the role of the distal C-terminal domains in ADAMTS13 *in vivo*. Deletion of the C-terminal 2 Tsp1 and 2 CUB domains permits normal size distribution of plasma VWF multimers under steady state, but exacerbates platelet thrombosis after thrombogenic stimulation in mice. Thus, the distal C-terminally truncated ADAMTS13 is not fully active *in vivo*. These distal C-terminal domains of ADAMTS13 may play a role in the efficient processing of VWF multimers during platelet thrombus growth, and thus their functions may become increasingly important when vascular damage is induced.

Acknowledgments

We thank Ms Miyuki Kuroi and Ms Yuko Nobe (National Cardiovascular Center Research Institute), and Ms Meghan Walsh (Immune Disease Institute) for technical assistance.

This work was supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan, Tokyo, Japan (T.M.); the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, Tokyo, Japan (F.B., K.K., and T.M.); the Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan (K.K. and T.M.); and from the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biochemical Innovation of Japan, Ibaraki, Japan (T.M.); a Sponsored Research Agreement from Baxter Bioscience, Vienna, Austria (A.K.C. and D.D.W.) and a National Heart, Lung, and Blood Institute of the National Institutes of Health grant P01-HL066105 (D.D.W.).

Authorship

Contribution: F.B. designed research, performed experiments, analyzed data, and wrote the paper; A.K.C. performed experiments, contributed vital analytical tools, and analyzed the data; K.K. designed research, performed experiments, and wrote the paper; J.Y. performed experiments and analyzed data; S.M. and D.D.W. contributed vital analytical tools and interpreted the data; and T.M. designed research and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Toshiyuki Miyata, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan; e-mail: miyata@ri.ncvc.go.jp.

References

- Dong JF. Structural and functional correlation of ADAMTS13. *Curr Opin Hematol*. 2007;14:270-276.
- Bergmeier W, Chauhan AK, Wagner DD. Glycoprotein Ibalph and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice. *Thromb Haemost*. 2008;99:264-270.
- Tsai HM. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a thrombotic disorder caused by ADAMTS13 deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007;21:609-632.
- Zheng XL, Sadler JE. Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:249-277.
- Desch KC, Motto DG. Thrombotic thrombocytopenic purpura in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1901-1908.
- Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, et al. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood*. 2003;102:3232-3237.
- Zheng X, Nishio K, Majerus EM, Sadler JE. Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *J Biol Chem*. 2003;278:30136-30141.
- Ai J, Smith P, Wang S, Zhang P, Zheng XL. The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 2005;280:29428-29434.
- Majerus EM, Anderson PJ, Sadler JE. Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 2005;280:21773-21778.
- Tao Z, Wang Y, Choi H, et al. Cleavage of ultra-large multimers of von Willebrand factor by C-terminal-truncated mutants of ADAMTS-13 under flow. *Blood*. 2005;106:141-143.
- Tao Z, Peng Y, Nolasco L, et al. Recombinant CUB-1 domain polypeptide inhibits the cleavage of ULVWF strings by ADAMTS13 under flow conditions. *Blood*. 2005;106:4139-4145.
- Gao W, Anderson PJ, Majerus EM, Tuley EA, Sadler JE. Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:19099-19104.
- Zhang P, Pan W, Rux AH, Sachais BS, Zheng XL. The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood*. 2007;110:1887-1894.