

Tetsumei Urano: Imaging analysis of the interaction between unusually large von-Willebrand factor multimers and platelets on vascular endothelial cells in living animals. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Fumiaki Banno, Takahiro Nojiri, Sachiko Matsumoto, Kei Kamide, Naoki Mochizuki, Toshiyuki Miyata: A lack of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in mice does not affect thrombus formation at sites of vascular injury. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Koichi Kokame, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata: Generation of knock-in mice carrying a K196E point mutation in protein S. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Toshiyuki Kita, Fumiaki Banno, Yukako Nakajo, Hiroji Yanamoto, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata: Factor V Leiden mice are vulnerable for ischemic stroke, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

喜多俊行, 坂野史明, 中城有香子, 柳本広二, 飯原弘二, 宮田敏行: 血液凝固第V因子 Leiden 変異マウスの虚血性脳梗塞に対する脆弱性. 第84回日本生化学会大会, 京都市, 2011年9月.

宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志, 武田壮一, 坂野史明: ADAMTS13 研究の最先端, シンポジウム6 血栓止血学・血管生物学の最近の進歩, 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋市, 2011年10月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

凝固第V因子 Leiden 変異マウスに関する研究

研究代表者 宮田敏行 国立循環器病研究センター分子病態部 部長
研究分担者 坂野史明 国立循環器病研究センター分子病態部 研究員
研究協力者 喜多俊行 国立循環器病研究センター分子病態部 流動研究員

研究要旨

静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクには人種差が見られ、白人種には凝固第V因子 Leiden (FVL) 変異 (R506Q 変異) が報告されている。本変異は地域差はあるものの白人種の約 2-15%に見られ、静脈血栓症のオッズ比は 2.7-7.6 と報告されている。FVL 変異は小児や若年者の脳梗塞に関連を示すが、成人での脳梗塞との関連は弱い。本研究では、FVL 変異と脳梗塞の関連、および日本人に見られる血栓性遺伝子多型との比較を行なうため、FVL 変異マウスの脳梗塞に対する脆弱性を検討した。野生型マウス、FVL 変異ヘテロ接合体マウス、FVL 変異ホモ接合体マウスに対し、三血管閉塞法により脳虚血再灌流実験を行ったところ、ヘテロ体マウスとホモ体マウスは、野生型に比べ梗塞巣の増大を認めた。ホモ体マウスの脳虚血中の血流量は、ヘテロ体マウスおよび野生型マウスの血流量より明らかに低下を認めた。虚血再灌流後 7 日間のマウスの生存を調べたところ、ヘテロ体マウスとホモ体マウスは野生型マウスに比べ生存率が低かった。これらの結果から、FVL 変異マウスは脳虚血再灌流に脆弱であることが判明した。

A. 研究目的

凝固第V因子 Leiden (FVL) 変異 (R506Q 変異) は静脈血栓塞栓症のリスク因子である。本変異は白人一般集団には 2-15%の頻度で見られるが、日本人には見られず、人種特異的な血栓性遺伝子変異である。FVL 変異の静脈血栓塞栓症に対するオッズ比は 2.7-7.6 である。FVL 変異は動脈閉塞症との関連も指摘されており、小児や若年者の脳梗塞との関連が報告されている。ヒト凝固第V因子の R506 残基はマウスでは R504 残基であり、これを Gln 残基に置換した FVL 変異マウス (R504Q 変異マウス) が作製されている。FVL ホモ接合体マウスは新生児期に臓器に広範な自然に発症する血栓を認め、一部のマウスは周産期に死亡する。また、ホモ体マウスは頸動脈の光惹起障害モデルや大脳動脈の FeCl₃ 障害モデルで、動脈血栓の亢進が報告されている。しかし、このマウスはこれまで脳虚血再灌流モデルで評価されていない。本研究では、日本人に特有の血栓性遺伝子変異 (プロテイン S K196E 変異、プラスミノーゲン A610T 変異) と白人種に特有の血栓性遺伝子変異 (FVL 変異) をマウス個体レベルで比較検討し、血栓症の予防・治療法の開発に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

FVL 変異マウス (C57BL/6J) は Jackson 研究所

から購入した。本研究は国立循環器病研究センター動物実験規則にしたがって行った。

三血管閉塞法による脳中大動脈閉塞は、左中大脳動脈を電気凝固し両側総頸動脈を 15 分間一過性に閉塞することで、中大脳動脈支配領域に局所虚血を生じさせた。虚血負荷の 24 時間後に脳を摘出し 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride 染色を用いて脳梗塞の体積を算出した。虚血 15 分間とその後の再灌流 30 分間の虚血ペナンプラ領域の脳血流を測定した。虚血後 7 日間のマウスの生存を調べた。

C. 研究結果

FVL 変異マウスの脳虚血急性期の梗塞巣

FVL 変異ヘテロ体マウス (12 匹、 $26.7 \pm 4.8 \text{ mm}^3$) と変異ホモ体マウス (12 匹、 $29.9 \pm 4.1 \text{ mm}^3$) の脳虚血 24 時間後の梗塞巣の体積は野生型マウス (11 匹、 $15.9 \pm 5.3 \text{ mm}^3$) の梗塞巣より有意に大きかった。

虚血再灌流時の脳血流量

虚血時の脳血流量は、ホモ体マウス (7 匹、 $9.9 \pm 1.2\%$) ではヘテロ体マウス (7 匹、 $19.5 \pm 2.0\%$) や野生型 (7 匹、 $21.2 \pm 0.5\%$) より有意に低下していた。

虚血後のマウスの生存率

ホモ体マウスは虚血後 2 日目から死亡が観察され、7 日後には 7 匹中 5 匹が死亡した。ヘテロ体マウスは 4 日目から死亡が観察され、7 日

後には7匹中5匹が死亡した。野生型は7日目に2匹が死亡した。ヘテロ体マウスとホモ体マウスの7日目の生存率は野生型マウスより有意に低下していた。

D. 考察

白人種に見られる血栓性遺伝子変異、FVL 変異、を持つマウスの脳虚血に対する反応を調べ、FVL 変異は脳虚血再灌流に脆弱であり、高い死亡率につながることを明らかにした。

ホモ体マウスの虚血時の血流は、ヘテロ体マウスや野生型マウスに比べ低下していた。このことは、ホモ体マウスでは側副血管の発達が悪く、血管系の余量が乏しいことを示唆している。ホモ体マウスでは側副血管の一部が閉鎖している可能性を示唆している。

FVL 変異ヘテロ体マウスとホモ体マウスの虚血再灌流後の脳梗塞巣は、野生型マウスより大きかった。一過性の脳虚血後の再灌流は血液脳関門の透過性の亢進など、多くの現象を誘導する。これらは脳虚血障害に関連した凝固系の活性化を引き起こし、虚血部位に血栓が形成されることで説明される。

FVL 変異は小児および若年者の脳塞栓と関連を示すが、今回のマウスの実験結果はヒトで観察された脳梗塞との関連を説明するものである。

E. 結論

FVL 変異マウスは一過性脳虚血再灌流に対して脆弱であることが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Rybaltowski, Y. Suzuki, H. Mogami, I. Chlebinska, T. Brzoska, A. Tanaka, F. Banno, T. Miyata, T. Urano: In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall. *Pflugers Arch*, 461(6), 623-633, 2011.

Y. Fujimura, M. Matsumoto, A. Isonishi, H. Yagi, K. Kokame, K. Soejima, M. Murata, T. Miyata: Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on *ADAMTS13* gene analysis in Japan (review). *J Thromb Haemost*, 9 (Suppl.

1), 283-301, 2011.

K. Kokame, T. Sakata, Y. Kokubo, T. Miyata: von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population. *J Thromb Haemost*, 9(7), 1426-1428, 2011.

H. Yamamoto, K. Kokame, T. Okuda, Y. Nakajo, H. Yanamoto, T. Miyata: NDRG4 protein-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia. *J Biol Chem*, 286(29), 26158-26165, 2011.

R. Neki, T. Fujita, K. Kokame, I. Nakanishi, M. Waguri, Y. Imayoshi, N. Suehara, T. Ikeda, T. Miyata: Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol*, 94(2), 150-155, 2011.

K. Kokame, Y. Kokubo, T. Miyata: Polymorphisms and mutations of *ADAMTS13* in the Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost*, 9(8), 1654-1656, 2011.

T. Yin, T. Miyata: Pharmacogenomics of clopidogrel: Evidence and perspectives (review). *Thromb Res*, 128(4), 307-316, 2011.

T. Miyata, N. Hamasaki, H. Wada, T. Kojima: More on: racial differences in venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*, 10, 319-320, 2012.

F. Banno, T. Nojiri, S. Matsumoto, K. Kamide, T. Miyata: RGS2 deficiency in mice does not affect platelet thrombus formation at sites of vascular injury. *J Thromb Haemost*, 10, 309-311, 2012.

M. Fujioka, T. Nakano, K. Hayakawa, K. Irie, Y. Akitake, Y. Sakamoto, K. Mishima, C. Muroi, Y. Yonekawa, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, K. Nishio, K. Okuchi, K. Iwasaki, M. Fujiwara, B.K. Siesjö: *ADAMTS13* gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation

in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci*, 2012, in press.

宮田敏行、岡本 章、小久保喜弘「加齢とプロテインS」臨床検査、第55巻、第4号、407-409頁、2011年

宮田敏行「二次止血：凝固のメカニズム」カレントセラピー、第29巻、第6号、12-15頁、2011年

宮田敏行、喜多俊行「DIC と外因系凝固反応、マイクロパーティクル」医学のあゆみ、第238巻、第1号、5-9頁、2011年

宮田敏行、宮田茂樹、嘉田晃子、長東一行「アスピリンレジスタンス」循環器病研究の進歩、第32巻、第1号、43-53頁、2011年

宮田敏行、喜多俊行「VI. 凝固線溶系 3. 内因系凝固反応と血栓症」Annual Review 血液2012、高久史磨・小澤敬也・坂田洋一・金倉 譲・小島勢二 編集、中外医学社、236-244頁、2012年

宮田敏行、小亀浩市、秋山正志、坂野史明、中山大輔、武田壮一：ADAMTS13 研究の最先端。臨床血液、2012年、印刷中

2. 学会発表

Hitomi Yamamoto, Koichi Kokame, Hiroji Yanamoto, Tomohiko Okuda, Yukako Nakajo, Susumu Miyamoto, Toshiyuki Miyata, NDRG4-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia with the decreased level of BDNF in the cortex, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Koichi Kokame, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata, Generation of knock-in mice carrying a K196E point mutation in protein S, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Fumiaki Banno, Takahiro Nojiri, Sachiko Matsumoto, Kei Kamide, Naoki Mochizuki, Toshiyuki Miyata, A lack of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in mice does not affect thrombus formation at sites of

vascular injury, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Mariko Banno, Kei Kamide, Takeshi Horio, Toshiyuki Miyata, Yuhei Kawano, Genetic polymorphisms of endothelin-related genes associated with risk of chronic kidney disease in Japanese hypertensives, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Shigenori Honda, Hiroko Shirotani-Ikejima, Yasuyuki Matsuda, Seiji Tadokoro, Yoshiaki Tomiyama, Toshiyuki Miyata, Role of ILK-PINCH-parvin complex in supporting functional expression of integrin, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Sachika Kameda, Toshiyuki Sakata, Yoshihiro Kokubo, Mana Mitsuguro, Akira Okamoto, Michitaka Sano, Toshiyuki Miyata. Association of platelet reactivity with lipid and PAI-1 levels in a Japanese general population, the Suita Study, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Toshiyuki Kita, Fumiaki Banno, Yukako Nakajo, Hiroji Yanamoto, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata, Factor V Leiden mice are vulnerable for ischemic stroke, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Tomasz Brzoska, Mirosław Rybaltowski, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Iwona Chlebinska, Aki Tanaka, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Tetsumei Urano, Imaging analysis of the interaction between unusually large von-Willebrand factor multimers and platelets on vascular endothelial cells in living animals, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Akira Okamoto, Toshiyuki Sakata, Yoshihiro Kokubo, Michitaka Sano, Toshiyuki Miyata, Age- and gender-related differences in PAI-1 antigen levels in a Japanese general

population, the Suita Study, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Yoshihiro Kokubo, Toshiyuki Miyata, Toshiyuki Sakata, Akira Okamoto, Makoto Watanabe, Yuu Ono, Mariko Banno, Yoshihiro Miyamoto, The Association between Plasma Fibrinogen and Coronary Heart Disease in a Japanese Urban Cohort: The Suita Study, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Yasuyuki Matsuda, Shigenori Honda, and Toshiyuki Miyata, An RNAi screening to identify the molecules involved in integrin α IIb β 3 activation, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Kokame Koichi, Kokubo Yoshihiro, Miyata Toshiyuki, Estimation of the number of individuals with a congenital ADAMTS13 deficiency in Japan, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

井本(山本)ひとみ、小亀浩市、奥田智彦、中城有香子、柳本広二、宮田敏行、NDRG4 欠損マウスは、大脳皮質 BDNF 量の低下とともに、記憶学習能力の低下と局所脳虚血による梗塞巣の増大を示す、第9回血液・血管オルビス、2011年8月20-21日、東京都

中山大輔、秋山正志、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行、P475S型ADAMTS13の非触媒領域の立体構造決定、第16回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2011年8月26日-27日、吹田市

秋山正志、中山大輔、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行、P475S型ADAMTS13タンパク質の部分立体構造決定、第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24日、京都市

喜多俊行、坂野史明、中城有香子、柳本広二、飯原弘二、宮田敏行、血液凝固第V因子Leiden変異マウスの虚血性脳梗塞に対する脆弱性、第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24日、京都市

宮田敏行、小亀浩市、秋山正志、武田壮一、坂野史明、ADAMTS13研究の最先端、シンポジウム6 血栓止血学・血管生物学の最近の進歩、第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14-16日、名古屋市

宮田敏行、特別講演：日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的背景、第7回肺血栓塞栓症研究会、2011年11月1日、宇都宮市

Toshiyuki Miyata, Thrombotic thrombocytopenic purpura and ADAMTS13, 3rd SIRIC-NCVC Joint Symposium, November 11, 2011, Seoul, Korea.

Toshiyuki Miyata, Phenotypes on NdrG KO mice, Seminar at Research Institute National Cancer Center, November 10, 2011, Goyang, Korea.

宮田敏行、特別講演：血栓性血小板減少症とADAMTS13、第6回分子血管研究会、2011年12月1日、東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

(別添5)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
宮田敏行 喜多俊行	VI.凝固線溶系 3. 内因性凝固反応と 血栓症	高久史麿 小澤敬也 坂田洋一 金倉 譲 小島勢二	Annual Review 血液2012	中外医学社	東京都	2012	236-244

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Rybaltowski, Y. Suzuki, H. Mogami, I. Chlebinska, T. Brzoska, A. Tanaka, F. Banno, T. Miyata, T. Urano	In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall.	Pflugers Arch	461(6)	623-633	2011
M. Fujioka, T. Nakano, K. Hayakawa, K. Irie, Y. Akitake, Y. Sakamoto, K. Mishima, C. Muroi, Y. Yonekawa, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, K. Nishio, K. Okuchi, K. Iwasaki, M. Fujiwara, BK. Siesjö	ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury.	Neurol Sci	in press		2012
K. Kokame, T. Sakata, Y. Kokubo, T. Miyata	von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population.	J Thromb Haemost	9(7)	1426-1428	2011
K. Kokame, Y. Kokubo, T. Miyata	Polymorphisms and mutations of <i>ADAMTS13</i> in the Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome.	J Thromb Haemost	9(8)	1654-1656	2011
Y. Fujimura, M. Matsumoto, A. Isonishi, H. Yagi, K. Kokame, K. Soejima, M. Murata, T. Miyata	Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on <i>ADAMTS13</i> gene analysis in Japan (review).	J Thromb Haemost	9(Suppl.1)	283-301	2011
H. Yamamoto, K. Kokame, T. Okuda, Y. Nakajo, H. Yanamoto, T. Miyata	NDRG4 protein-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia.	J Biol Chem	286(29)	26158-26165	2011

T. Yin, T. Miyata	Pharmacogenomics of clopidogrel: Evidence and perspectives (review).	Thromb Res	128(4)	307-316	2011
R. Neki, T. Fujita, K. Kokame, I. Nakanishi, M. Waguri, Y. Imayoshi, N. Suehara, T. Ikeda, T. Miyata	Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum.	Int J Hematol	94(2)	150-155	2011
T. Miyata, N. Hamasaki, H. Wada, T. Kojima	More on: racial differences in venous thromboembolism.	J Thromb Haemost	10(2)	319-320	2012
F. Banno, T. Nojiri, S. Matsumoto, K. Kamide, T. Miyata	RGS2 deficiency in mice does not affect platelet thrombus formation at sites of vascular injury.	J Thromb Haemost	10(2)	309-311	2012
宮田敏行、岡本 章、小久保喜弘	加齢とプロテインS	臨床検査	55(4)	407-409	2011
宮田敏行	二次止血：凝固のメカニズム	カレントセラピー	29(6)	12-15	2011
宮田敏行、喜多俊行	DICと外因系凝固反応、マイクロパーティクル	医学のあゆみ	238(1)	5-9	2011
宮田敏行、宮田茂樹、嘉田晃子、長束一行	アスピリンレジスタンス	循環器病研究の進歩	32(1)	43-53	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

□ VI. 凝固線溶系

3. 内因系凝固反応と血栓症

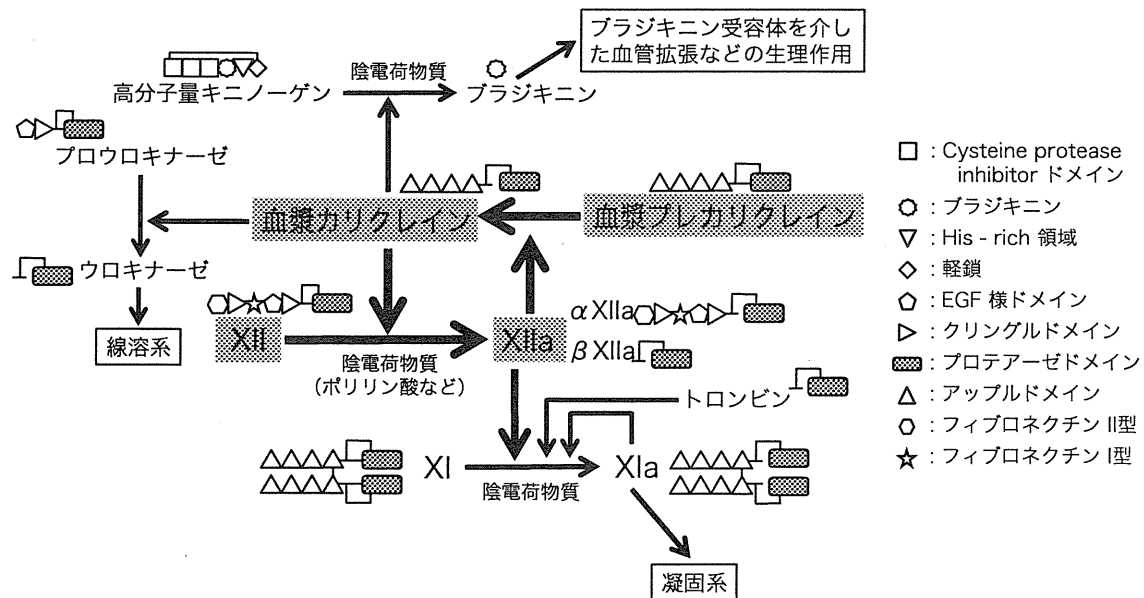
国立循環器病研究センター分子病態部部长 宮田敏行
同 分子病態部研究員 喜多俊行

key words factor XI, intrinsic coagulation, polyphosphate, thrombosis, contaminated heparin

動 向

トロンビンの生成とフィブリン塊の形成を生じる凝固反応は、2つの異なった経路、すなわち傷害された血管壁への血液の接触、および血液内の因子への接触により始まり、それぞれを外因系および内因系凝固反応とよぶ。内因系凝固反応はXII, プレカリクレイン, XI, 高分子キノーゲン

ンという4種のタンパク質が関与する(図1)¹⁾。XIIと高分子キノーゲンは陰電荷表面に結合する性質をもち、XIIは陰電荷表面上で構造変化を起こして活性型XIIaに変換される。血中で高分子キノーゲンはプレカリクレインおよびXIと複合体を形成しており、高分子キノーゲンが陰電荷表面に結合することにより、プレカリクレ



ンとXIが陰電荷表面に濃縮され、XIIaによるプレカリクレインとXIの活性化が素早く進行し、凝固系とキニン系が作動する。生成したカリクレインはXII活性化能をもつので、陰電荷表面上でXIIとプレカリクレインが次々に活性化されることとなる。一方、生成したカリクレインは高分子キノーゲンに作用して炎症メディエーターであるブラジキニンを遊離する(図1)¹⁾。ブラジキニンはブラジキニンB2受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達し、血管拡張、血管透過性亢進を行う。また、カリクレインはプロウロキナーゼを活性化する能力も有する。このように、陰電荷をもつ物質上に酵素とその基質となるタンパク質が濃縮され内因系凝固が起こるので、この反応を接触相での活性化(contact phase activation)とよぶことがある。

陰電荷をもつ物質として、カオリン、ガラス、エラジン酸などが知られていたが、これらは生体内の物質ではないため、内因系凝固反応の意義自体が長い間、疑問視されていた。最近になり、ポリリン酸²⁾、細胞外RNA³⁾、変性タンパク質凝集塊⁴⁾、I型コラーゲン⁵⁾といった生体内の物質が、内因系凝固を惹起する能力を示すことが報告された。中でも、ポリリン酸が長年にわたって追い求められていた真の内因系凝固の惹起物質であることが、次第に明らかになってきた⁶⁾。ポリリン酸はトロンビン刺激により血小板の濃染顆粒中から放出され、XII因子の活性化を行うだけでなく、V因子活性化促進や太いフィブリン線維の形成にも関与する。XI欠損症患者の軽度の出血は、トロンビンによるXIのフィードバック活性化で説明されるが、Vaがこの活性化を促進するコファクターとして機能することが示された。

血小板上でのXIの活性化に関しては古くから研究が進められているが、2007年Walshのグループの4つの報告が撤回され、その存在自体が疑問視された。しかし、XIが血小板のGPIb α の

N末端領域のLeucine-richリピート配列に結合することは確かなようである。また、最近ApoER2というLDL受容体の一種のタンパク質が血小板上の受容体として働くことが示された⁷⁾。このApoER2は活性化プロテインCの受容体であることも示されている。

A. XIの立体構造

XIは607アミノ酸からなるセリンプロテアーゼ前駆体で、血漿中では二量体構造をとる。N末端領域に90-91アミノ酸残基からなるアップルドメインが4回繰返し(A1~A4)、C末端側にトリプシン様の触媒領域をもつ(図1)。このようにXIのドメイン構造はビタミンK依存性凝固因子とは全く異なる。ほぼ全てのXIは血中で高分子キノーゲンと複合体を形成している。プレカリクレインはXIと相同のドメイン構造をもち、単量体として血中に存在し、75~90%のプレカリクレインは高分子キノーゲンと結合している。XIとプレカリクレインは進化上極めて近い⁸⁾。

結晶構造解析によりXIの立体構造が決定された⁹⁾。XIやプレカリクレインのアップルドメインは、PAN(plasminogen, apple, nematode)モジュールファミリーの一員である。アップルドメインは7本の β 鎖と1本の α ヘリックスからできている(図2A)。4つのアップルドメインは平板状の構造をとり(図2B)、その上に球状の触媒領域が乗る構造をとっている。XIの全体の構造(図2C)は“カップとソーサー”構造とよばれる。A2ドメインには高分子キノーゲン結合部位、A3ドメインには血小板GPIb α の結合領域があり、A4ドメインのC321は二量体形成に関与する。

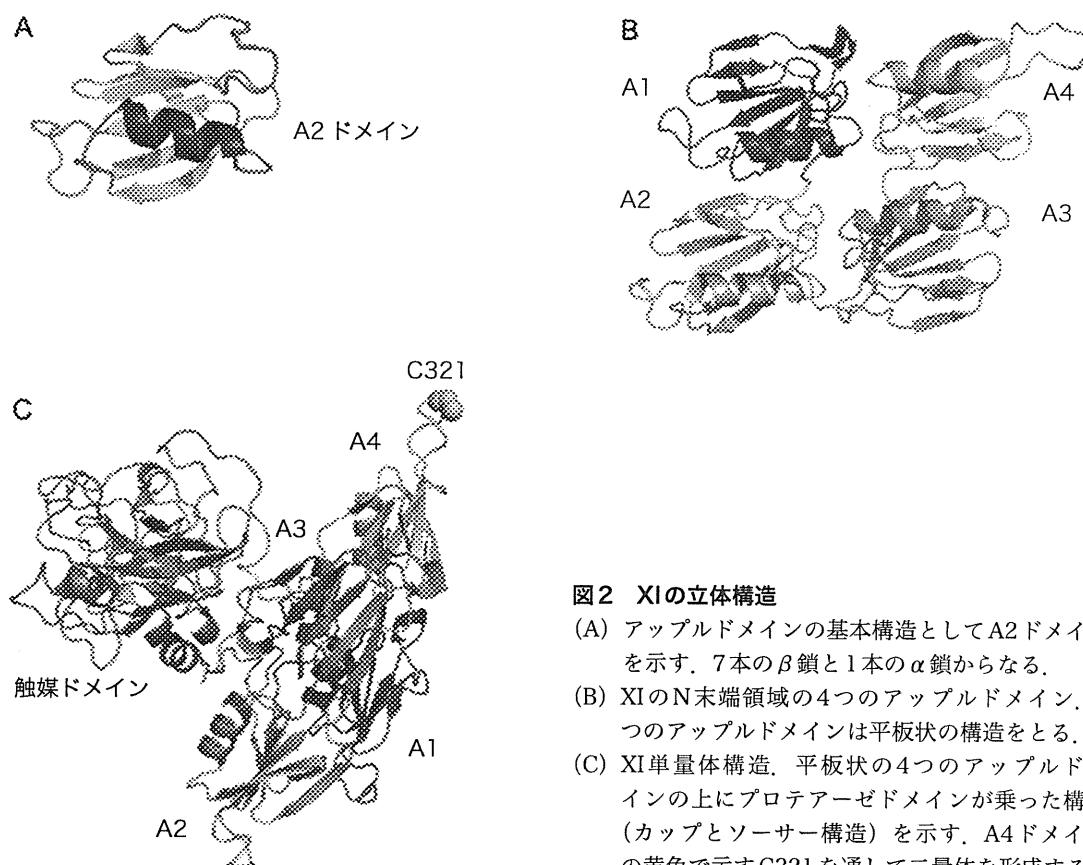


図2 XIの立体構造

- (A) アップルドメインの基本構造としてA2ドメインを示す。7本の β 鎖と1本の α 鎖からなる。
 (B) XIのN末端領域の4つのアップルドメイン。4つのアップルドメインは平板状の構造をとる。
 (C) XI単量体構造。平板状の4つのアップルドメインの上にプロテアーゼドメインが乗った構造(カップとソーサー構造)を示す。A4ドメインの黄色で示すC321を通して二量体を形成する。

B. トロンビンによるXIの活性化

先天性XII欠損症は全く出血傾向を示さないが、先天性XI欠損症は程度の差はあるが出血を示す。これを説明するため、XII以外のXI活性化因子が想定された。1991年内藤、藤川はトロンビンがXIを活性化するという先駆的な報告を行った¹⁰⁾。また同年GailaniとBrozeも同様のフィードバック活性化機構を提唱し注目された¹¹⁾。しかし、その後、血漿中ではこの反応が起こるといふ報告¹²⁾と起こらないといふ報告¹³⁾がなされ、混沌とした状態が続いた。確かに、*in vitro*での反応効率は悪く、何らかのコファクターを要求すると考えられたが、生理的なコファクターは見出されなかった。しかし、ついに2010年

Maasらは、VaがトロンビンによるXIのフィードバック活性化のコファクターとして働くことを見出し¹⁴⁾、約20年間続いた議論に決着がついたと考えられる。*In vitro*系で、トロンビンがXIを活性化する際にVaを添加するとXI活性化が促進される。Vを欠損した血漿ではXI活性化が抑制され、Vaを不活化する活性化プロテインC添加血漿でもXI活性化は抑制された。また、Vaが不活化されにくいV Leiden変異血漿に活性化プロテインCを添加してもXI活性化の抑制はみられなかった。これらの結果は、血漿中でもVaがトロンビンによるXI活性化のコファクターとして働き、XI活性化を促進することを示していた。トロンビンがXIを活性化することは、先天性XI欠損症が出血を示すことをうまく説明する。

C. ポリリン酸による凝固反応の促進機構

ポリリン酸はリン酸が高エネルギー無水結合でつながった直鎖ポリマーである。ポリリン酸は微生物や単細胞真核生物中の酸性でCa²⁺に富む顆粒 (acidocalcisome) 中にmMレベルからMレベルで存在する¹⁵⁾。ヒト血小板では酸性 (pH 5.4) でCa²⁺に富む (2.2 Mと報告されている) 濃染顆粒中に存在する。濃染顆粒は、Ca²⁺、ATP、ADP、セロトニン、ピロリン酸、ポリリン酸を含んでいる。ヒト血小板は3~8個の濃染顆粒を含み、この顆粒をもたない患者は出血を呈する¹⁶⁾。血小板10⁸個当たり0.74nMのポリリン酸 (ポリリン酸のモル数はリン酸基のモル数で示す) を含み、これらはトロンビン刺激により放出され、血中で3μM程度になるという²⁾。血小板凝集が起こる部位では、顆粒内容物の放出によりさらに高いポリリン酸濃度になると考えられる。2006年、このポリリン酸が内因系凝固反応をはじめいくつかの凝固反応の素過程に作用し、反応を促進すると報告された²⁾。最近、細胞の核から放出されるHMGB1やヒストン、DNAが病態の進行に大きくかわると報告され注目されているが^{17,18)}、ポリリン酸も微生物や生体内の細胞から放出される血栓促進メディエーターと位置付けることができる¹⁹⁾。

ポリリン酸の凝固反応への作用を表1にまとめた。ポリリン酸の作用を少し詳しく解説したい。

1) ポリリン酸は内因性凝固開始反応を促進する。内因系凝固開始反応はXIIと高分子キノーゲンが結合する陰電荷物質を必要とするが、ポリリン酸は陰電荷をもち、内因系凝固開始反応を促進する性質をもつ。ポリリン酸はXIIと高分子キノーゲンに強く結合し、XIIはポリリン酸と結合すると活性化し、生成したXIIaが血漿プレカリクレインを活性化する⁶⁾。生じた血漿カリクレインは高分子キノーゲンから炎症メディエー

表1 ポリリン酸の凝固反応への作用

- | |
|----------------------------------|
| 1) ポリリン酸は内因性凝固開始反応を促進する |
| 2) ポリリン酸はトロンビンおよびXaによるV活性化を促進する |
| 3) ポリリン酸は線溶系を遅延させる |
| 4) ポリリン酸存在下で生成したフィブリン線維は太い |
| 5) ポリリン酸はポリマーの長さにより凝固系に異なった効果を示す |

ターであるブラジキニンを遊離させる。事実、マウスにポリリン酸を投与すると血管透過性が亢進するが、この透過性の亢進はXII欠損マウスやブラジキニン受容体欠損マウスでは観察されない。また、XIIaの活性阻害剤やB2受容体アンタゴニストを投与したマウスでも血管透過性の亢進は観察されない。ポリリン酸はXIIの活性化を通してXIを活性化しトロンビン生成に繋がる。野生型マウスにポリリン酸を静脈内投与すると肺の微小循環に致死性のフィブリン血栓が形成された。

2) ポリリン酸はトロンビンとXaによるVの活性化を促進し、これにより迅速にVaが形成される²⁾。生成したVaはXaと複合体を形成する。この複合体中のXaは組織因子経路インヒビター-tissue factor pathway inhibitor (TFPI) による阻害を免れ、凝固反応をさらに促進する (ポリリン酸によるTFPI抗凝固作用の減弱化)。Vは血漿中だけでなく血小板のα顆粒にも存在する。トロンビンは血小板α顆粒からVを放出させ、濃染顆粒からポリリン酸を放出させるので、ポリリン酸存在下で血小板から放出されたVは効率よく活性化され、凝固を促進すると考えられる。

3) ポリリン酸は線溶系を遅延させる²⁾。ポリリン酸は組織プラスミノゲン活性化因子やウロキナーゼによるフィブリン塊の溶解を遅らせる。カルボキシペプチダーゼであるthrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) は、分解されたフィブリンのC末端Lys残基を切り取る

作用をもつ。プラスミノゲンと組織プラスミノゲン活性化因子はC末端Lys残基に結合するので、TAFIはLys残基を切り取りこれらの因子がフィブリン上に集合しないようにして線溶を抑制する。ポリリン酸の線溶抑制機序は、ポリリン酸によりVが迅速に活性化されてトロンピンが生成し、このトロンピンにより素早くTAFIが活性化され、活性化TAFIがフィブリン上のLys残基を切り取り、線溶系が抑制されると考えられる。

4) ポリリン酸はフィブリンの濁度を上げる²⁰⁾。1.5mMポリリン酸存在下で生成したフィブリン線維は太い。重合したフィブリンにはポリリン酸が取り込まれており、ポリリン酸を含んだフィブリンは固さが増し、フィブリン塊の溶解時間も延長していた（ポリリン酸非存在下での溶解時間28.5分、1mMポリリン酸存在下での溶解時間120分）。このようにポリリン酸存在下で形成されたフィブリン塊は溶解しにくい性質を示すので、外科手術の際に出血を止める目的で使用される“フィブリン糊”に、より適しているかもしれない。

5) ポリリン酸は、ポリマーの長さにより、凝固系に異なった効果を示す²¹⁾。微生物が放出するリン酸が500個以上繋がった長鎖ポリマーは内因系凝固開始反応の活性化能がきわめて高い。血小板が放出するリン酸が60~100個程度繋がった短鎖ポリマーはV活性化能が高く、TFPIの抗凝固活性を減弱させる能力を保持している。また、固いフィブリン塊を形成させたいフィブリンを作るには250個以上のリン酸が繋がったポリマーが最適である。リン酸が2個繋がったピロリン酸もポリリン酸と一緒に血小板の濃染顆粒から放出されるが、ピロリン酸はフィブリン塊を固くするポリリン酸の能力を阻害する。このように、ポリリン酸は鎖長の違いにより、凝固反応への作用点が異なる。微生物が放出する長鎖ポリリン酸が内因系凝固反応を開始させることは、微生物の

感染にも重要である可能性がある。

D. XII欠損マウスおよびXI欠損マウスにみられる動脈血栓の抑制

XII欠損マウスおよびXI欠損マウスが作製され、出血症・血栓症との関連が詳細に検討された。その結果、驚くべきことに、XII欠損マウスおよびXI欠損マウスは動脈血栓が起こりにくく、XII欠損マウスの局所脳虚血実験では脳梗塞巣が明らかに小さいことが示された。これまで、XIIやXIは生体内でのフィブリン形成にかかわっていないと思われていたので、この結果は驚きをもって迎えられた^{22,23)}。

2005年、XII欠損マウスおよびXI欠損マウスの血栓形成能が3種の動脈系の血栓モデルを用いて調べられ、どの部位の血栓でも、遺伝子欠損マウスの血小板血栓形成の抑制が観察された²⁴⁾。2006年、XII欠損マウスもしくはXII活性を阻害するPro-Phe-Argクロロメチルケトンを経口投与したマウスの局所脳虚血実験で、脳梗塞巣が明らかに小さいことが報告された²⁵⁾。尾の出血時間を調べたところ、ヘパリン静注マウスでは出血時間は著明に延長するが、XII活性阻害剤静注マウスでは出血時間が延長せず、中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルでも出血は梗塞後7日間にわたってみられなかった。このことから、XIIの阻害剤は出血を伴わない新しい脳梗塞治療薬の候補になる可能性が提案された²⁵⁾。

2008年、重度のXI欠損症患者は虚血性脳梗塞の発症が少ないと報告された²⁶⁾。本研究では、重度のXI欠損患者（15U/dl以下）115名のうち、虚血性脳梗塞の発症はわずか1名であった。コントロール群（9509名）では脳梗塞患者は1528名なので、115名当たり19名の脳梗塞患者となる。このように、XI欠損症患者の脳梗塞発症の割合は明らかに低く、XI欠損により脳梗塞発症

が抑制されると考えられた。一方、このXI欠損症患者115名には19名の心筋梗塞患者がみられたので、XI欠損は心筋梗塞発症を抑制しないと報告された。

E. 接触相の抑制による新規抗血栓薬の開発の流れ

これまでのマウスを用いた研究から、XIIおよびXIの活性を抑制する薬剤は、出血を伴わずに動静脈の血栓症を抑制する抗血栓薬として有望である可能性が指摘されている^{22,23}。これまでに示されたXII活性やXI活性の阻害物質の作用点を(図3)に示す。

ダニの顎下腺に発現するクニッツ型トリプシンインヒビター Ir-CPIは、XIIa, XIa, 血漿カリクレインを特異的に阻害し、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) を延長する。Ir-CPIをラットとマウスに静注すると、動静脈の血栓形成が抑制された²⁷。またコラーゲン惹起肺塞栓症によ

る死亡率を改善した。Ir-CPI投与による出血は観察されなかった。吸血性カメムシはカザール型トリプシンインヒビタードメインを有するインフェスチンをもつ。この第4ドメインであるインフェスチン-4は強力なXIIa阻害活性を示す。インフェスチン4をヒトアルブミンとの融合タンパク質として発現させ、その抗凝固活性が調べられた。融合タンパク質はaPTTを延長させ、マウスとラットへの投与では動脈閉塞を抑制し、出血を伴わずに脳梗塞を抑制した²⁸。

XIの抑制には第2世代のアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) が用いられた²⁹。第2世代のASOは肝で発現する遺伝子を効率よく発現抑制する。このASO投与により、肝でのXI合成能が低下し、それにより血中XI活性が低下し、動静脈の血栓形成能が抑制された²⁹。また、XIの機能を抑制する単クローン抗体をマウスや霊長類であるヒヒに投与し、血中のXI活性を抑制した動物を用いて血栓形成を調べた研究が発表された^{30,31}。ヒヒの動静脈シャントモデルで、内径

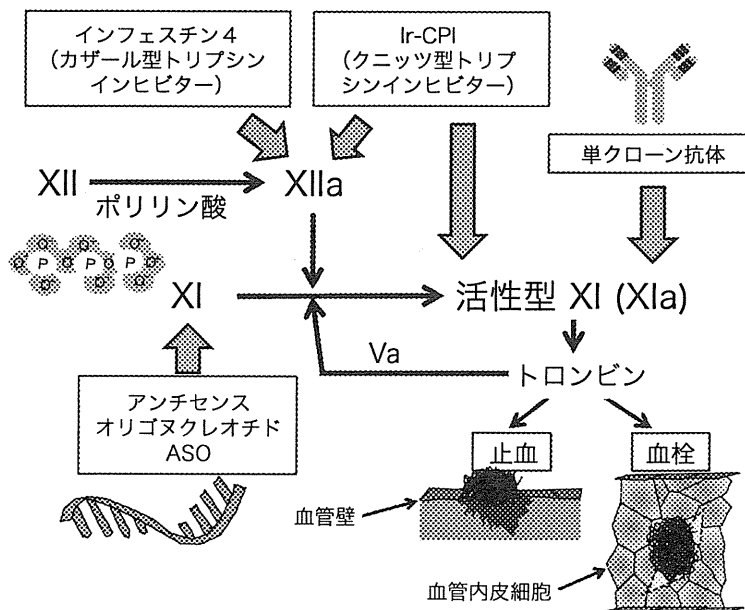


図3 抗血栓薬の創出を目指したXIIおよびXIの活性阻害物質の作用点

4mmのグラフトの内腔に血栓惹起物質コラーゲンを固相化し血栓形成が調べられた。XIの単クローン抗体投与によりXI活性の99%が阻害される系では、トロンビン産生が減少しグラフト内の血小板やフィブリンの沈着が抑制された。内径2mmのグラフトは通常閉塞するが、XIの抗体投与によりグラフトは閉塞しなかった。アスピリンでもグラフトの閉塞は抑制されるが、出血時間の延長が認められる。しかし、単クローン抗体でXIを抑制した系では、出血時間に変化はみられなかった。以上の結果は、コラーゲン表面をもつグラフト表面では、トロンビン産生が増幅され血栓形成に進展するが、XI活性が著しく低下した状態では、この増幅が見られず血栓が進展しないことを示している³⁰⁾。同様の結果は、他の研究者が作成したXIの単クローン抗体を用いた研究でも確認された³¹⁾。

これら研究はいずれも、XIIおよびXIの活性を著しく低下させると、動静脈血栓の抑制につながることを示している。また、XIIおよびXIの活性が低下したマウスに脳虚血を起こさせると、梗塞巣は減少するが出血は観察されないと述べている。

F. ヘパリン中に混入した不純物の XII活性化による有害事象

2007年から2008年にかけて、米国で血液透析の患者に血圧低下などの有害事象が多発し、不幸にも死に至るケースが報告された。この有害事象は、中国産のヘパリン製剤に混入した過硫酸化コンドロイチン硫酸 oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) が原因であり、OSCSによりXIIが活性化され、XIIaによりブラジキニンが産生することにより起こされたと推定されている³²⁻³⁴⁾。

ヘパリンやコンドロイチン硫酸は、ウロン酸-

ヘキソサミンの2糖からなるポリマーがコアタンパク質に結合したプロテオグリカンとして産生される。通常、2糖あたりの硫酸基の数は、ヘパリンは2.5、コンドロイチン硫酸A・B・Cは1.0、コンドロイチン硫酸Eは1.5である。今回ヘパリンに混入していたOSCSは2糖あたり4.0の硫酸基をもち³²⁾、合成ポリマーであるデキストラン硫酸がもつ硫酸基の数に匹敵した。XIIの活性化は陰電荷の密度に依存する。コンドロイチン硫酸E、ヘパリン、デキストラン硫酸はXII活性化能を示すが、デキストラン硫酸とOSCSだけが血漿中でXIIを活性化する。内在性のヘパリンが血漿中でXIIを活性化しないのは、ヘパリンはアンチトロンビンと複合体を形成するので、XII活性化能が減弱するためと考えられる。また、生体内ではヘパリンはマスト細胞の分泌顆粒中で β -トリプターゼ（プロテアーゼ）と複合体を形成して存在するため、このプロテアーゼとの結合により、ヘパリンの陰電荷が中和され、XII活性化能が低下すると考えられる。コンドロイチン硫酸は結合組織（特に軟骨）に豊富にあり、通常血漿に接することはない。

ヘパリン混入物OSCSでは、かゆみやじんま疹がないので、マスト細胞の活性化によるヒスタミンなどのメディエーターを介した反応ではないと考えられる。最も考えられる反応は、陰電荷をもつOSCSによりXIIが活性化され、生成したXIIaによりプレカリクレインがカリクレインとなりキニノーゲンからブラジキニンが産生し血圧低下を起こしたというものである（図1）³⁴⁾。もう1つ別の血圧低下の考え方は、カリクレインやプラスミンによる補体系アナフィラトキシンであるC3aとC5aの産生である³³⁾。これらの複数の物質により、ヘパリンの有害事象が引き起こされたと考えられる。

文献

- 1) Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011; 364: 1746-60.
- 2) Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, et al. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 903-8.
- 3) Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 6388-93.
- 4) Maas C, Govers-Riemslog JW, Bouma B, et al. Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3208-18.
- 5) van der Meijden PE, Munnix IC, Auger JM, et al. Dual role of collagen in factor XII-dependent thrombus formation. *Blood.* 2009; 114: 881-90.
- 6) Muller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell.* 2009; 139: 1143-56.
- 7) White-Adams TC, Berny MA, Tucker EI, et al. Identification of coagulation factor XI as a ligand for platelet apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29: 1602-7.
- 8) Emsley J, McEwan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI. *Blood.* 2010; 115: 2569-77.
- 9) Papagrigoriou E, McEwan PA, Walsh PN, et al. Crystal structure of the factor XI zymogen reveals a pathway for transactivation. *Nat Struct Mol Biol.* 2006; 13: 557-8.
- 10) Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem.* 1991; 266: 7353-8.
- 11) Gailani D, Broze GJ, Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science.* 1991; 253: 909-12.
- 12) Kravtsov DV, Matafonov A, Tucker EI, et al. Factor XI contributes to thrombin generation in the absence of factor XII. *Blood.* 2009; 114: 452-8.
- 13) Pedicord DL, Seiffert D, Blat Y. Feedback activation of factor XI by thrombin does not occur in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 12855-60.
- 14) Maas C, Meijers JC, Marquart JA, et al. Activated factor V is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 9083-7.
- 15) Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, et al. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem.* 2004; 279: 44250-7.
- 16) Hernandez-Ruiz L, Saez-Benito A, Pujol-Moix N, et al. Platelet inorganic polyphosphate decreases in patients with delta storage pool disease. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 361-3.
- 17) Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009; 15: 1318-21.
- 18) Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 15880-5.
- 19) Caen J, Wu Q. Hageman factor, platelets and polyphosphates: early history and recent connection. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 1670-4.
- 20) Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate enhances fibrin clot structure. *Blood.* 2008; 112: 2810-6.
- 21) Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood.* 2010; 116: 4353-9.
- 22) Gailani D, Renne T. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 2507-13.
- 23) Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood.* 2008; 112: 3555-62.
- 24) Renne T, Pozgajova M, Gruner S, et al. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med.* 2005; 202: 271-81.
- 25) Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, et al. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med.* 2006; 203: 513-8.
- 26) Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, et al. Reduced incidence of ischemic stroke in patients

- with severe factor XI deficiency. *Blood*. 2008; 111: 4113-7.
- 27) Decrem Y, Rath G, Blasioli V, et al. Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *J Exp Med*. 2009; 206: 2381-95.
- 28) Hagedorn I, Schmidbauer S, Pleines I, et al. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation*. 2010; 121: 1510-7.
- 29) Zhang H, Lowenberg EC, Crosby JR, et al. Inhibition of the intrinsic coagulation pathway factor XI by antisense oligonucleotides: a novel antithrombotic strategy with lowered bleeding risk. *Blood*. 2010; 116: 4684-92.
- 30) Tucker EI, Marzec UM, White TC, et al. Prevention of vascular graft occlusion and thrombus-associated thrombin generation by inhibition of factor XI. *Blood*. 2009; 113: 936-44.
- 31) Cheng Q, Tucker EI, Pine MS, et al. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood*. 2010; 116: 3981-9.
- 32) Guerrini M, Beccati D, Shriver Z, et al. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotechnol*. 2008; 26: 669-75.
- 33) Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, et al. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N Engl J Med*. 2008; 358: 2457-67.
- 34) Blossom DB, Kallen AJ, Patel PR, et al. Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin. *N Engl J Med*. 2008; 359: 2674-84.

In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall

Mirosław Rybaltowski · Yuko Suzuki · Hideo Mogami ·
Iwona Chlebńska · Tomasz Brzoska · Aki Tanaka ·
Fumiaki Banno · Toshiyuki Miyata · Tetsumei Urano

Received: 15 November 2010 / Revised: 13 February 2011 / Accepted: 9 March 2011 / Published online: 15 April 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract To elucidate how unusually large von Willebrand factor (UL-VWF) multimers facilitate thrombus formation, their behavior was analyzed together with that of platelets in living mice deficient in the gene encoding the protease that cleaves UL-VWF, a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13 (ADAMTS13^{-/-}). By crossing ADAMTS13^{-/-} mice with green fluorescent protein-expressing transgenic mice (GFP mice), GFP-ADAMTS13^{-/-} mice were obtained. The dynamics of GFP-expressing platelets were monitored employing intravital confocal fluorescent microscopy. Administration of a vasopressin derivative, DDAVP, a secretagogue of VWF increased the number of platelets adhered to vascular endothelial cells (VECs) on mesentery at sites recognized by an anti-VWF antibody. Some of these platelets were interconnected and aligned as beads on a string. They reached their maximum length at 5 min and were longer in GFP-ADAMTS13^{-/-} mice than in GFP mice (5.3±4.3, *N*=6 vs 2.9±2.1 μm, *N*=4) (mean±SE). Focal injury of

VECs by topical application of FeCl₃ developed longer (25, 3–50 vs 10, 2–25 μm, *P*<0.01) (mean, 10th–90th percentile) and more stable (1.3, 0.3–6.3 vs 0.3, 0.2–1.3 s, *P*<0.01) connected platelets in GFP-ADAMTS13^{-/-} mice than in GFP mice. This study revealed that ADAMTS13 cleaves platelet-bound UL-VWF multimers, both during their secretion from VECs and after their adherence to injured vascular walls in veins. UL-VWF multimers either being secreted from VECs or circulating in plasma of ADAMTS13^{-/-} mice appeared to facilitate the accumulation of longer and more stable VWF strings with more associated platelets on injured vascular walls.

Keywords Von Willebrand factor (VWF) · A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13 (ADAMTS13) · Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) · Intravital confocal fluorescent microscopy

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00424-011-0958-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Rybaltowski · Y. Suzuki · H. Mogami · I. Chlebńska ·
T. Brzoska · A. Tanaka · T. Urano (✉)
Department of Physiology,
Hamamatsu University School of Medicine,
1-20-1, Handa-yama, Higashi-ku,
Hamamatsu 431–3192, Japan
e-mail: uranot@hama-med.ac.jp

F. Banno · T. Miyata
Department of Molecular Pathogenesis,
National Cerebral and Cardiovascular Center, Research Institute,
5-7-1 Fujishiro-dai, Suita,
Osaka 565-8565, Japan

Introduction

Von Willebrand factor (VWF) is a macromolecular, multi-domain glycoprotein that is synthesized both in vascular endothelial cells (VECs) and in megakaryocytes (see reviews [15, 37]). VWF forms dimers by C-terminal disulphide bonding in the endoplasmic reticulum, and it subsequently forms multimers by N-terminal disulphide bridging in the Golgi apparatus. VWF multimers are either constitutively secreted from VECs or are stored in secretory granules in VECs (Weibel-Palade bodies) [44] as “unusually large” VWF (UL-VWF) multimers [41], having a wide range of molecular masses from 500 to 20,000 kDa [18]. The stored VWF can be secreted from

Weibel-Palade bodies by a variety of secretagogues, such as the vasopressin derivative desmopressin acetate (DDAVP) [25]. VWF plays an essential role in hemostasis by mediating the initial adhesion of platelets at sites of endothelial denudation, through binding of its A3 domain with collagen and of its A1 domain with glycoprotein Ib (GPIb) on platelets, especially under high shear stress conditions [1, 35]. VWF also plays a crucial role in aggregation of fluid-phase platelets by interacting with the platelet glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) [11, 12]. Thus, deficiencies in either the quality or quantity of plasma VWF result in the severe bleeding tendency known as von Willebrand disease [18].

The length of VWF multimers determines their capacity to bind platelets [30], and this is likely due to the existence of multiple interactive sites on VWF for platelets and for vessel wall components [18]. UL-VWF multimers, once released into the circulation, are rapidly cleaved into smaller, less thrombogenic VWF multimers by a metalloprotease called a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13 (ADAMTS13) [24, 40, 48]. ADAMTS13 is a 195-kDa glycoprotein that is primarily synthesized in hepatic stellate cells [43, 49]. It cleaves a peptide bond between Tyr1605 and Met1606 in the A2 domain of VWF, producing VWF subunit fragments of 176 and 140 kDa [13]. This cleavage proceeds more efficiently when the VWF A2 domain is unfolded by mechanical force [46, 47]. A deficiency of ADAMTS13 increases the plasma levels of UL-VWF multimers [29] and is clinically linked to the development of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) [19, 24, 42]. Pathological findings in TTP include the accumulation of platelet-rich multiple thrombi, which are distinct from those in disseminated intravascular coagulation. These thrombi are abundant in VWF antigen but have little or no fibrin, and they occur in multiple organs including heart, brain, kidneys, adrenals, spleen, and liver [3].

It is still not clear, however, how and where ADAMTS13 cleaves UL-VWF in the vasculature, and how UL-VWF multimers facilitate thrombus formation. We have recently established a method having advantages in the analysis of dynamics of platelets on VECs *in vivo*, in which intravital confocal microscopy [17] is applied to green fluorescent protein-expressing transgenic mice (GFP mice) [20]. Specifically, ADAMTS13 knockout mice [6] were crossed with GFP mice [32] to generate GFP-expressing ADAMTS13 knockout mice (GFP-ADAMTS13^{-/-} mice), in which all platelets can be visualized without labeling. This made it possible to analyze the behavior of intact GFP-expressing platelets and to quantify their exact numbers bound to either DDAVP-stimulated VECs or to the injured vascular wall through UL-VWF multimers, in living animals lacking ADAMTS13.

Materials and methods

Animals

Green fluorescent protein-expressing transgenic mice, based on the C57BL/6J strain (GFP mice), were supplied by Dr. Okabe (Osaka University, Osaka, Japan) [32]. ADAMTS13 knock-out mice (ADAMTS13^{-/-} mice: C57BL/6 strain background) [4, 6], which lack its specific activity to cleave recombinant substrate, GST-mVWF73-H, as well as a fluorogenic substrate, FRETs-VWF73 [4, 6], was crossed with GFP mice to obtain hybrid mice lacking the ADAMTS13 gene and expressing GFP (GFP-ADAMTS13^{-/-} mice). Genomic DNA was analyzed to confirm the lack of the ADAMTS13 gene [6]. The experimental protocol was reviewed and approved by the Animal Experiments Committee of the Hamamatsu University School of Medicine.

Materials

Desmopressin ([deamino-Cys¹, D-Arg⁸]-vasopressin acetate hydrate, abbreviated DDAVP) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Polyclonal rabbit anti-human VWF antibody was purchased from DakoCytomation (Glostrup, Denmark) and was labeled with Alexa Fluor 568 obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Hematologic analysis

Blood samples were collected from the inferior vena cava with a syringe containing 0.1 volume of 3.8% trisodium citrate. Blood cell counts and hematocrits were determined using a whole-blood cell counter (Celltac, Nihon Kohden, Tokyo, Japan). Plasma VWF antigen levels were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay as previously reported [34], with a slight modification. The polyclonal rabbit anti-human VWF antibody (DakoCytomation) was used as both a capturing and a tagging antibody. When it was used as a tagging antibody, it was biotinylated using the ECL™ Protein Biotinylation Module (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Human plasma was collected from five normal volunteers, pooled, and then employed to obtain a standard curve for VWF levels after sequential dilution.

In vivo imaging analyses using intravital fluorescence confocal microscopy

For intravital fluorescence microscopy of the microcirculation of a living mouse, we used a Yokogawa Real Time 3D Workstation (Yokogawa Electric Co., Tokyo, Japan), composed of a Nikon TE 600 microscope ($\times 40$, NA 0.8