◆技術講座◆

血漿中の von Willebrand 因子重合体 プロセッシング酵素活性の測定

藤村 吉博* 八木 秀男* 朴 永東*

Assay of Plasma von Willebrand Factor Multimer-processing Enzyme

Yoshihiro FUJIMURA*, Hideo YAGI*, Yong-Dong PARK*

Key words : Plasma, vWF-multimer, BaCl₂, urea, metalloprotease

はじめに

von Willebrand 因子 (vWF) は血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生され、2,050 アミノ酸残基からなる単一サブユニットがSS結合にて結ばれた多重合体構造を持って存在している止血因子である。血管内皮細胞で産生されたvWFは一旦Weibel-Palade体に蓄積され、刺激によって血中に放出されるが、一部は血管内皮細胞下組織の構成成分としても分泌される。また骨髄巨核球で産生されたものは血小板 α 顆粒内に貯蔵される。vWFには2つの大きな止血因子としての機能があり、1つは凝固第VIII因子と結合し、これを安定化させるキャリアー蛋白質としての働き、もう1つは傷害血管壁の血管内皮細胞下組織に血小板を粘着・凝集させ、血小板血栓を形成する機能である。vWFは血中に放出された後、下記プロテアーゼによる分解を受け、分子量15,000 kDaの高分子量vWF重合体 (large vWF multimer, L-vWFM) から分子量500 kDaの低分子量vWF重合体 (small vWF multimer, S-vWFM) まで様々な分子形態を示すようになる。vWFの血中濃度は約10

$\mu\text{g/ml}$ で、機能は主にマルチマー構造により規定され、一般に高分子量のものほどより比活性が高い。また血管内皮細胞培養上清には unusually large vWF multimer (UL-vWFM) が出現し、さらに健常人への酢酸デスマプレシン (DDAVP) 投与によっても一過性にこれが検出されることから、UL-vWFMは血管内皮細胞から放出されて間もないvWFの分子型と考えられる。

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) は1924年Moschcowitzら¹⁾により報告された原因不明の疾患で、臨床的には血小板減少、細小血管障害性溶血性貧血、動揺性精神神経症状、腎機能障害、発熱の5徴候からなる。一方、溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) は、1955年にGasserら²⁾が報告した疾患で血小板減少、細小血管障害性溶血性貧血、急性腎不全を3主徴とする。HUSのほぼ90%は腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) 感染による腸炎などに続発する。EHECの中でも特に血清型O157:H7でHUSが多発するが、これは外毒素である

* 奈良県立医科大学輸血部 [〒634-8522 奈良県橿原市四条町840]

Department of Blood Transfusion Medicine Nara Medical University (Shijyo-cho 840, Kashihara City, Nara 634-8522, Japan)

ペロトキシシン (VT) を産生し, その受容体である糖脂質グロボトリアロシルセラミド (Gb3) を密に発現している腎糸球体内皮細胞の選択的障害を引き起こし, この部位に血栓を形成するため, HUS では腎障害が主体となると考えられている。このように TTP と HUS は共に血栓性細小血管障害 (thrombotic microangiopathy, TMA) として類似した病態と理解され, また臨床的にも両者の鑑別が困難な場合があることから, 近年では HUS/TTP として一括して表現されるようになった。

最近, Furlan ら, Tsai らにより vWF 特異的切断酵素 (vWF-cleaving protease) の測定法が考案され, TTP ではこの酵素活性が低下しており, またこの酵素に対する自己抗体の存在が報告されるようになった³⁾⁴⁾。この vWF 切断酵素は vWF サブユニットの A2 ドメイン領域の Tyr842-Met843 結合を特異的に切断する機能があり, 分子量は約 300 kDa と巨大で, 活性発現に Ba^{2+} などの二価陽イオンを必要とし, EDTA により阻害されることからメタロプロテアーゼとしての特性を持つことが明らかにされたが, 未精製のままである⁵⁾。Furlan らは TTP 30 例と HUS 23 例について vWF 切断酵素活性とこの酵素に対する抑制因子の有無を検討し⁶⁾, 非家族性 TTP の急性期 24 症例中 20 症例にこの vWF 切断酵素活性の著減 (5% 以下), 4 症例に中等度減少 (5~25%) が認められ, 24 症例中 20 症例に抑制因子が検出された。家族性 TTP の 6 症例では急性期と寛解期共にこの酵素活性は著減していたが, 抑制因子は検出されなかった。一方, 非家族性 HUS では急性期 13 症例中 11 症例で酵素活性は正常で, 2 症例にのみ軽度の低下を認めた。寛解期 8 症例の検索でも酵素活性は正常であった。家族性 HUS の 10 症例では急性期, 寛解期ともに酵素活性は正常であった。抑制因子については HUS の全例に存在しなかった。抑制因子陽性の急性期 TTP サンプルをプロテイン A セファロースカラムにかけると, 素通り分画には阻害作用が完全に

消失し, 一方カラムを pH 4.0 で洗浄すると阻害作用が溶出されることからこの抑制因子は IgG 抗体であると考えられた。

すなわち, vWF 切断酵素活性の測定ならびに抑制因子の検出は TTP と HUS の診断ならびに家族性と非家族性の鑑別に有用であり, 治療効果の指標としても必須のものと考えられ, 以下, 当ラボで実施している本酵素活性測定法の実際について述べる。

Protease-free vWF の精製

日本赤十字社血液センターより新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma, FFP) の有効期限切れ製剤 (廃血) を約 30 U (血漿量として 3,000 ml) 譲渡して頂く。この FFP をバッグごと 4°C に静置し一昼夜かけ解凍する。遠心管に移し, 生じた雲絮物を 4°C で 7,000 rpm×20 分間遠心分離する。このクリオ沈殿物を室温で緩衝液 Buffer A* 200 ml にて震とう溶解し, 一旦 7,000 rpm×15 分間, 室温で遠心し上清を得る。この上清を Buffer A* で平衡化した gelatin-sepharose CL-4B カラム (K 5×20 cm) に添加し, フィブロネクチンをカラムに吸着せしめ, 一方素通り分画をプールする。このプールした素通り分画を 4°C で緩やかにスターラー攪拌しながら結晶硫酸を終濃度 40% (243 g/L) になるように添加し, さらに 30 分間静置する。生じた沈殿物は, 4°C で 7,000 rpm×30 分間の遠心操作にて分離する。この 40% 硫酸沈殿分画は 20% sucrose 加 Buffer B** 50 ml で溶解し, 溶解後ベントナイト (15 mg/ml) を加えさらに攪拌操作にてフィブリノーゲンを除去し, その後 7,000 rpm×20 分間の遠心操作を行う。この上清を Buffer B** で平衡化した Sepharose CL-4B カラム (K 5×100 cm) に添加し, 流速 50 ml/h で溶出する。図 1 の如く, void volume (500 ml) の所に vWF がややテーリング気味に溶出されるが, protease-free vWF は分画 I と II であり, 分画 III には若干ではあるが

図1 protease-free vWFの精製

protease-free vWFはSephacrose 4Bカラムの分画IとIIに溶出され、IIIには若干ではあるがvWF-protease活性が認められるので、分画I+IIのvWFをvWF-protease測定のための基質として用いた。

protease活性が溶出されてくるのでvWF-protease測定時の酵素基質としては使用できない。それ故、分画I+IIのvWFを以下の酵素活性測定時の基質として用いている。vWF分画はそれぞれ透析チューブに入れaquacide II (Calbiochem, CA)にて濃縮し、蛋白質濃度を1~3 mg/mlとした後、磷酸緩衝液(PBS, pH 7.3)にて透析後、Eppendorfチューブに分注し、-80°Cにて凍結保存する。

中間精製されたVIII/vWF複合体濃縮製剤が数種市販されているので、このうちvWFマルチマーがよく温存されている製剤を選べば、クリオ沈殿物作成の手間が省けるが、かかる製剤も多量のフィブロネクチンを含んでいるので、gelatin-sepharose CL-4Bカラムでの除去が必要である。なおこのカラムは4 M尿素加緩衝液Aで洗浄後、出発緩衝液Aで平衡化すれば繰り返し使用可能である。

*Buffer A組成: 25 mM Tris -0.5 mM EDTA・Na₂-0.15 M NaCl-1 mM PMSF-0.05% NaN₃ (HCl → pH 7.3)

**Buffer B組成: 20 mM Imidazole-20 mM ε-aminocaproic acid-0.15 M NaCl-10 mM citrate・Na₃-0.05% NaN₃ (HCl → pH 6.5)

vWF-protease活性の測定

vWF切断酵素反応

試剤

① 精製 protease-free vWF (1~3 mg/ml に調製して凍結): 用事 1.5 M 尿素緩衝液に終濃度 20 μg/ml となるように溶解。

② 1.5 M 尿素緩衝液: 5 mM Tris-1.5 M urea-0.02% NaN₃ (HCl で pH 8.0 に調製)

③ 1 M BaCl₂ (Stock 液): 用事 1.5 M 尿素緩衝液で終濃度 100 mM となるように調製。

④ 血漿: 3.8% クエン酸 Na と全血を 1:9 容に混じ、4°C で 3,000 rpm × 15 分間の遠心操作にて乏血小板血漿を分離する。分注して -80°C にて凍結保存。用事 TBS で 1 x ~ 32 x に希釈。

⑤ 500 mM EDTA-Na₄ (pH 8.0 に調製)

⑥ 37°C 恒温層

方法

下記の如く、三試剤を Eppendorf チューブに入れ、攪拌・遠心後、37°C 恒温層で 24 時間反応させる。反応後、Ba²⁺ に対して 5 倍量の EDTA を加え、二価イオンをキレートすると共に酵素失活を計る。

Protease-free vWF (20 μg/ml, 1.5 M 尿素緩衝液中) 100 μl

BaCl₂ (100 mM, 1.5 M 尿素緩衝液中) 10 μl
希釈正常血漿 (TBS で 1 x ~ 32 x に希釈) または被検血漿 10 μl

37°C 恒温層で 24 hr インキュベート

反応停止: 500 mM EDTA-Na₄ 10 μl

SDS-1.4% agarose gel 電気泳動

vWF マルチマー解析法について, ^{125}I 標識抗 vWF 抗体 (IgG) と Laemmli の不連続緩衝液系を用いる Ruggeri & Zimmerman の原法⁷⁾ は, その後 Budde ら⁸⁾ によりペルオキシダーゼ標識抗 vWF 抗体とルミノール化学発光反応を利用する解析法が確立された。この技術を導入している当研究室の方法を紹介する。

試剤

① サンプル緩衝液: 1 mM EDTA- Na_2 加 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)

② Running gel 緩衝液: 375 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8)

③ Stacking gel 緩衝液: 125 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8)

④ 泳動用緩衝液: 0.1% SDS 加 49.5 mM Tris-HCl 緩衝液, 384 mM glycine 緩衝液 (pH 8.35)

⑤ アガロース: Low Gelling Temperature (LGT: Type VII, Sigma) と High Gelling Temperature (HGT: SeaKem) の 2 種。

⑥ その他: 循環冷却式恒温電気泳動装置一式 (Pharmacia-LKB Multiphor II など), ガラスプレート (28×17 cm), ゲルボンДФィルム (12.7×28 cm SeaKem), スペーサー (幅 1.5 mm で長さ 15 cm と 30 cm のもの), バインダークリップ, 電子レンジ。

方法

① アガロースゲルの作製

図 2 にイラストを交え詳述する。Running gel 緩衝液にアガロース (LGT) を 1.4% となるように加え, 電子レンジで煮沸溶解する。溶解後, SDS を終濃度 0.1% となるように加え, 一旦 56°C に保つ。ゲルボンДФィルム (疎水面が内側) を密着させたガラス板の両側と下底にスペーサーをセットし, もう 1 枚のガラス板を重ね合わせクランプで固定する。2 枚のガラス板でできた隙間に溶解した LGT アガロースを注射器で注入し, 4°C で一昼夜静置させゲル平板を作製

する (running gel)。翌日ゲルボンДФィルムを密着させたガラス板を下にセットし, 上のガラス板を下方にスライドさせ, 下部 9.5 cm を残し上部をカミソリで取り除いた後, ガラス板をもとの位置にもどす。Stacking gel 緩衝液で HGT アガロースを 0.8% になるように混じ, 電子レンジで煮沸溶解し, 一旦 56°C に保った後 running gel の上層に注入する。4°C で 3 時間静置し完全にゲル化させた後, 上部の stacking gel の中心ラインに沿って試料孔 (11×2.5 mm) を 10 孔均等に開ける。

② サンプル処理: 下記の試剤を Eppendorf チューブに入れ, 攪拌・遠心後, 56°C 恒温層で 20 分間反応させる。

サンプル緩衝液※	4 μl
20% SDS	4 μl
0.2% BPB	3 μl
上記の反応混合液	3 μl
蒸留水	26 μl
計	40 μl

※サンプル緩衝液: 1 mM EDTA- Na_2 加 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)

③ 電気泳動

試料孔に②で調節したサンプルを 25 μl を注入する。サンプルが試料孔を完全に通過するまでは, 16°C 20 mA/枚の電流で泳動する。試料孔を stacking gel 用の HGT アガロースで満たした後, BPB マーカーがゲル下端に泳動されるまで 13 mA/枚で通電する。この間ゲル表面からの水分蒸発によるゲルの乾燥を防ぐために, ゲル表面より 2~3 mm 上を両側にスペーサーを挟んだ上でガラス板で覆う。

Western blot

試剤

① 転写緩衝液: 0.005% SDS 加 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)

② Blotto 液: 5% スキムミルク (Difco,

図 2 SDS-1.4%アガロースゲルの作製法

Detroit, MI) を PBS (pH 7.3) で溶解。

③ その他: ニトロセルロース (NC) 膜 (Bio-Rad, Hercules, CA), 転写装置 (Hoefer: Transphor electrophoresis unit)。

方法

SDS-1.4% agarose gel 電気泳動後、ゲルを転写緩衝液に 10 分間浸し、転写装置を用いて 4℃, 0.5 A で一昼夜かけて nitrocellulose (NC)

膜に転写する。この NC 膜を, blotto 液に 30 分間浸し、蛋白非転写部位をブロックした後、blotto 液で 1,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト vWF 抗体と 6 時間以上反応させる。この後 blotto 液にて 3 回、最後に PBS にて 1 回洗浄操作を行なう。

ルミノール化学発光法 試剤

① ルミノール化学発光試薬 (Dupont NEN) と H_2O_2

② X線フィルム (Kodak XRP-1)

③ その他: オートラジオグラフィー用カセット (Konica, 205×256 mm), ビニール袋, シーラー, 暗室など.

方法

ルミノール化学発光試薬と H_2O_2 を等量混和し, 化学発光試薬を作製する (0.125 ml/cm^2). ペルオキシダーゼ標識抗ヒト vWF 抗体と反応させた NC 膜と, 用時調整した化学発光試薬をビニール袋に入れ密封. 室温にて 1 分間反応させた後, 余分な試薬を除去し, 暗室にてオートラジオグラフィー用カセットに NC 膜と X 線フィルム (Kodak XRP-1 など) をセットし 30 秒間感光させた後, 現像操作を行う. ルミノール化学発光にて可視化した vWF マルチマー像を図 3 に示す.

被検血漿の vWF 特異的切断酵素活性は検量線として測定した希釈正常血漿 (TBS で $1 \times$ ~ $32 \times$ に希釈) のマルチマー像より, 比活性として計算する.

vWF-protease 抑制因子の測定

方法

被検血漿中の抑制因子の測定は被検血漿を 56°C 恒温層で 30 分間反応させて非動化し, 正常血漿に $4:1$, $1:1$, $1:5$ (被検血漿: 正常血漿) の割合で混合し, 37°C 恒温層で 1 時間反応. 遠心後に混合血漿の vWF-protease 酵素活性を上記と同様の方法で測定する. ここでの検量線は希釈正常血漿に非動化した正常血漿を同じ割合で混合したものをを用いる. 正常血漿 1 ml 中の酵素活性を完全に失活させる被検血漿 1 ml 中の抑制因子活性を 1 U として計算する.

おわりに

以上に述べたとおり, 特に vWF-protease 活

図 3 マルチマー解析による vWF-protease 活性の測定

左図は希釈正常血漿 (TBS で $1 \times$ ~ $32 \times$ に希釈) と精製 vWF を混じて解析した時のマルチマー像で, vWF-protease 活性測定の検量線となる. 右図は Upshaw-Shulman 症候群患者とその両親の $1 \times$ 血漿と精製 vWF を混じ, 前記と同様に処理したものである. Upshaw-Shulman 症候群患者血漿はこの酵素活性をほぼ完全に欠き ($<3\%$), その両親の血漿も著しく低下 ($12.5 \sim 25\%$) を示すことから, 患者は本酵素遺伝子のホモ接合体欠損症であり, また両親はヘテロ接合体欠損症と判断される.

性の測定に難しい点はないものの, 重要なポイントとしては protease-free vWF の精製があげられる. 今後とも HUS, TTP を含めた血栓を巡る様々な病態を解明するために必要な手段と考えられるが, 鮮明なマルチマー像を得るには相応の経験を要するため不明な点があれば連絡されたい (E-mail address: yfujimur@nmu-gw.naramed-u.ac.jp).

文 献

- 1) Moschcowitz E: Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. Proc NY Pathol Soc **24**: 21-24, 1924.
- 2) Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R: Hamolytisch-uramische Syndrome: bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten

- erworbenen hamolytischen Anamien. Schweiz Med Wochenschr 85 : 905-909, 1955.
- 3) Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lammle B : Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 91 : 2839-2846, 1998.
- 4) Tsai MT, Lian ECY : Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 339 : 1585-1594, 1998.
- 5) Furlan M, Robles R, Lammle B : Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by *in vivo* proteolysis. Blood 87 : 4223-4234, 1996.
- 6) Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lammle B : von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. N Engl J Med 339 : 1578-1584, 1998.
- 7) Ruggeri ZM, Zimmerman TS : The complex multimetric composition of factor VIII/von Willebrand factor. Blood 57 : 1140-1143, 1981.
- 8) Budde U, Schneppenheim R, Plendl H, et al : Luminographic detection of von Willebrand factor multimers in agarose gels and on nitrocellulose membranes. Thromb Haemost 62 : 715-717, 1989.
-