◆原 著◆

血漿 von Willebrand 因子の還元フラグメントの検討

野 並 京 子^{*1,*2}, 高 橋 幸 博^{*3}, 西 久 保 敏 也^{*2}
 森 井 直 之^{*2}, 吉 岡 章^{*2}

Reduced von Willebrand Factor Fragment in Plasma

Kyoko NONAMI, Yukihiro TAKAHASHI, Toshiya NISHIKUBO,
 Naoyuki MORII, Akira YOSHIOKA

Key words: von Willebrand Factor (vWF), reduced vWF, vWF subunit

Zimmerman et al reported that normal plasma vWF contains proteolytic fragments of 225, 189, 176, and 140 kDa with anti-vWF monoclonal antibodies in the presence of protease inhibitors and partial cleavage of the plasma vWF subunit is a normal event. Now we report here the analysis of normal plasma vWF with home-made polyclonal anti-reduced vWF antibody by using a small amount of normal plasma itself. With this reference, the vWF fragments with mobility corresponding to 240, 216 (220, 210), 194, 164, and 144 kDa were detected. Also by means of employing anti-reduced SP III and SP II antibody, we suggested that the 164 kDa fragment is located close to the carboxy terminal and the 194 and 144 kDa fragments are located close to the amino terminal. Furthermore, the vWF fragments showed no difference in mobility with or without protease inhibitor. In vivo proteolytic degradation of vWF occurring normally was also shown by our technique.

結 言

von Willebrand 因子 (vWF) は一次止血に関与する血漿高分子糖蛋白である。高ずり応力下での損傷血管内皮下組織への血小板粘着に働くと共に血液凝固第 VIII 因子のキャリアー蛋白として、また、第 VIII 因子を分解・不活化するプロテイン C からの保護蛋白として作用す

る¹⁾。更に vWF は高ずり応力下での血小板凝集にも関与する²⁾。

vWF の生合成は 12 番遺伝子の支配下に血管内皮細胞および巨核球で分子量約 360 kDa からなる pre-pro vWF として蛋白合成される。その後 signal peptide が分離され、糖付加を受けたのち、pro vWF のカルボキシ末端側に存在するシステインにより 2 つの pro vWF が tail

*1 奈良県立五條病院小児科〔〒 637 奈良県立五條市野原町 197〕: Department of Pediatrics, Nara Prefectural Gojo Hospital, Gojo, Nara

*2 奈良県立医科大学小児科〔〒 634 奈良県橿原市四条町 840〕: Department of Pediatrics, Nara Medical College, Kashihara, Nara

*3 奈良県立医科大学新生児集中治療部〔〒 634 奈良県橿原市四条町 840〕: Division of Neonatology, Nara Medical College, Kashihara, Nara 受付: 1995. 3. 31, 受理: 1995. 6. 13.

to tail に disulfide 結合してダイマーを形成する。さらに propeptide 間の結合により vWF サブユニットのアミノ末端側のシステインで head to head に disulfide 結合することでダイマー間での重合が繰り返され、propeptide が分離を受けたのち、マルチマー構造を形成する。その結果、vWF は血漿中では分子量 500 kDa ~2,000 kDa におよぶマルチマー構造をなしている¹⁾。一方、vWF の先天的量的・質的異常症である von Willebrand 病 (vWD) の亜型ではマルチマー構造の異常がみられ、vWD の診断および病型分類にはマルチマー解析が必須である²⁾。

Zimmerman らにより血漿 vWF を部分純化後還元処理することにより、vWF サブユニットレベルでの構造解析法が開発された³⁾。また、エピトープの明らかな抗 vWF モノクローナル抗体を用いることで各フラグメントの構成が明らかにされ、その応用として vWD type II A の異常部位の発見につながった⁴⁾。しかし、彼らの方法は血漿 vWF を部分純化する必要があり、そのために大量の血漿を要した。そこでわれわれは直接血漿を還元処理して vWF を観察することで純化過程による分解をおさえ、わずか数十 μ l の血漿より還元フラグメントを観察し得る方法を確立した。さらにわれわれは、この方法を用いた検索により正常血漿中の vWF は直接還元処理を行う以前に既に一定の蛋白分解が生じていることを明らかにし得たので報告する。

対象および方法

1. 対象: 健康成人 50 名 (男性 25 名, 女性 25 名) および重症 vWD 患者 (vWD type III: W 奈 (16) 4-i) の乏血小板血漿 (PPP) を検索対象とした。

2. 血漿採取: 予め 1/10 容の 3.8% クエン酸ナトリウムを加えたプラスチック注射筒に肘静脈より採血した 9/10 容の全血を混和後、3,000 rpm, 10 分間遠心しその上清として PPP を得た。同時にプロテアーゼ・インヒビターとして phenylmethylsulfanyl fluoride (PMSF; 和光純薬, 京都), EDTA, Nethylmaleimide (NEM;

和光純薬, 京都) のそれぞれ終濃度 1 mM, 5 mM, 10 mM を添加した PPP も得た。抗凝固剤による影響を検討するために EDTA (終濃度 5 mM) あるいはヘパリン (終濃度 200 u/ml) 採血による PPP も得た。プール血漿は健康成人 10 名 (男性 5 名, 女性 5 名) のクエン酸ナトリウム加 PPP を等量混合し作成した。これら PPP は直ちに使用されたが、一部、凍結保存の影響を検討するため -80°C に保存された。

3. vWF の純化: vWF の純化は Thorell and Blombäck の方法⁵⁾ に準じ 第 VIII 因子濃縮製剤 (RCG 5; 日本赤十字社より供与) より純化した。vWF サブユニットのアミノ末端側 (アミノ酸残基 1~1365) のホモダイマーからなる SP III およびカルボキシ末端側 (アミノ酸残基 1366~2050) のホモダイマーからなる SP II の純化は, Girma らの方法⁶⁾ に準じ 10 mg の純化 vWF を Staphylococcus aureus V8 protease (SP-V8; ICN Inc., CA) 消化することにより作成した。

4. 還元 vWF, 還元 SP III および還元 SP II に対するポリクローナル抗体の構成: 純化 vWF, SP III および SP II をそれぞれ 50 mM dithiothreitol (DTT) で還元し, 100 mM NEM でアルキル化後, 家兎に免疫してそれぞれの抗体を作成した³⁾。

5. 血漿 vWF の還元試料の作成: 正常血漿あるいは重症 vWD 患者血漿 30 μ l に 90 μ l の試料緩衝液 (10% β -mercaptoethanol, 2.5% SDS, 6 M 尿素加リン酸緩衝液, pH 7.4) を加え, 75°C で 15 分間加湿して SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 試料とした。

6. SDS-PAGE およびイムノブロッティング: 還元処理後の血漿試料 100 μ l を SDS-5% PAGE 後, PVDF 膜 (Clear Blot Membrane-P; アトー株式会社, 東京) に転写 (0.5 A, 16 時間; 0.1 M tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol 緩衝液) した。

7. 抗原検出: PVDF 膜に転写後, 5% 脱脂粉乳添加リン酸緩衝液 (1 mM PMSF; BLOTT と略) で PVDF 膜の非特異結合部位をブロックし, 次に BLOTT 中でそれぞれの還元抗体 (抗

Fig. 1 Reduced vWF fragments detected with polyclonal anti-reduced vWF: Reduced normal plasma (first lane), Reduced vWD type III plasma (second lane), Reduced SP II; the carboxy terminal fragment of vWF (third lane), Reduced SP III; the amino terminal fragment of vWF (fourth lane)

還元 vWF 抗体: 終濃度 $5.3 \mu\text{g/ml}$, 抗還元 SP III 抗体: 終濃度 $4.2 \mu\text{g/ml}$, 抗還元 SP II 抗体: 終濃度 $17.1 \mu\text{g/ml}$ と反応させた。その後 BLOTT で 3 回洗浄後, ペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG 抗体 (TAGO Inc., CA; 終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$) と反応させ, さらに洗浄後, RENAISSANCE™ NEN, MA) を用いた蛍光抗体法により X-ray film (Kodak) に暴露し抗原を検出した。抗原量の定量は X-ray film を Digital densitometry DMU-33C (アドバンテック, TOYO) を用い, 各フラグメントの吸光度を 565 nm で測定した。

結 果

1. 正常ヒト血漿 vWF の還元フラグメント

正常ヒト血漿 vWF の還元フラグメントはメインフラグメントである 240 kDa の他に 216 kDa, 194 kDa, 164 kDa および 144 kDa にバ

Fig. 2 Reduced vWF fragments in normal plasma collected with several protease inhibitors, detected with polyclonal anti-reduced vWF

1. no protease inhibitor
2. 1 mM PMSF
3. 5 mM EDTA
4. 1 mM PMSF + 10 mM NEM + 5 mM EDTA

ンドが認められた。このうち 216 kDa のバンドは泳動条件により更に 220 kDa および 210 kDa の 2 本のバンドに分かれ, 血漿 vWF の還元フラグメントは 5 ないし 6 本から構成されていた。また, この還元 vWF フラグメントの構成は健康成人 50 名すべてにおいて同様であった。一方, 重症 vWD ではこれらのフラグメントは欠如していた (Fig. 1)。本法により, 市販の抗 vWF 抗体 (A-082; Dako, 京都) あるいは非還元 vWF を免疫し作成した自家製抗 vWF 抗体を用いて正常ヒト血漿 vWF の還元フラグメントの検出を試みたが検出できなかった (Fig. 略)。

2. プロテアーゼ・インヒビター添加 PPP の検討

採血後のプロテアーゼによる血漿 vWF の分解を検討するため, 各種プロテアーゼ・インヒビター非添加および添加 PPP を用い, 還元 vWF フラグメントの観察を行ったが差異を認めなかった (Fig. 2)。

Fig. 3 Reduced vWF fragments in normal plasma incubated for several hours, detected with polyclonal anti-reduced vWF

Fig. 4 Reduced vWF fragments in normal plasma diluted with vWD type III plasma, detected with polyclonal anti-reduced vWF

3. 抗凝固剤による還元 vWF フラグメントの検討

1/10 容クエン酸ナトリウム加血漿, EDTA 加血漿およびヘパリン加血漿について還元 vWF フラグメントを検討したが, 抗凝固剤による還元 vWF フラグメント間には差異を認め

なかった (Fig. 略)。

4. 採血後の経時的な還元 vWF の変化

血漿分離後 37°C 恒温槽に静置し, 経時的に血漿を採取し還元緩衝液を添加して還元 vWF フラグメントの変化を観察した。37°C, 48 時間後に 240 kDa の低下と 216 kDa および 164

kDa フラグメントの増加を観察した (Fig. 3). これはプロテアーゼ・インヒビター存在下においても同様の結果であったことから, 使用したプロテアーゼ・インヒビターでは抑制されない蛋白分解酵素の存在により蛋白変性をきたしたものと考えられた. また, -80°C に凍結保存検体について還元 vWF フラグメントの安定性を検討したが, 2 年間保存の検体においても変化を認めなかった (Fig. 略).

5. 検出感度の検討

正常プール血漿を重症 vWD 血漿で段階希釈し, 還元 vWF フラグメントの検出感度を検討した. すべてのフラグメントを検出するには血漿 vWF 濃度として 5% が限界であった (Fig. 4).

6. 正常ヒト血漿 vWF の各還元フラグメント量の検討

X-ray film に抽出された各フラグメントの濃度をデンシトメーターで測定した. 240 kDa, 216 kDa, 194 kDa, 164 kDa, 144 kDa の各フラグメントが全 vWF 還元フラグメントに占める割合はそれぞれ $69.2 \pm 6.3\%$, $17.3 \pm 3.6\%$, $6.5 \pm 1.3\%$, $3.7 \pm 1.1\%$, $2.9 \pm 1.4\%$ であった (Fig. 5).

7. 抗還元 SP III 抗体および抗還元 SP II 抗体による正常ヒト血漿 vWF の還元フラグメントの観察

抗還元 SP III 抗体は 240 kDa, 216 kDa, 194 kDa, 164 kDa および 144 kDa のすべてを認識した. 一方, 抗還元 SP II 抗体は 240 kDa, 216 kDa および 164 kDa と反応したが, 194 kDa とは淡く, 164 kDa とはより強く反応した. また, 144 kDa は認識しなかった (Fig. 6). なお, 正

Fig. 5 The relative proportions of each vWF fragment in normal plasma

Fig. 6 Reduced vWF fragments detected with polyclonal anti-reduced vWF, polyclonal antireduced SP II and polyclonal anti-reduced SP III

In each group; Reduced normal plasma (first lane)

Reduced vWF type III plasma (second lane),

Reduced SP II (third lane),

Reduced SP III (fourth lane)

常ヒト血漿において抗還元 SP II 抗体と 100 kDa に反応がみられたが、vWD type III 血漿でも認められており、これは抗還元 SP II 抗体と血漿中の何らかの非特異的蛋白が反応したものと考えられた。

考 案

純化 vWF を還元した際、vWF サブユニットそのものに相当するメインフラグメント以外にも数本のサブフラグメントの存在することは既に知られていた⁹⁾。しかし、それらが純化過程によるものか、*in vivo* において既に分解をうけたものかは明らかではなかった。Zimmerman らはプロテアーゼ・インヒビター存在下に数 ml の血漿よりモノクローナル抗体を結合させたアフィニティー・ゲルを用いて vWF を吸着させ、その後還元処理と同時に溶出したフラグメントを 55 種のモノクローナル抗体で検出する方法を確立した。その結果、正常血漿 vWF には主たる 225 kDa フラグメントの他に、189 kDa、176 kDa および 145 kDa の 3 本のサブフラグメントの存在することを明らかにし、血漿中において vWF はすでに蛋白分解を受けていることを指摘した⁴⁾。また彼らは、アミノ末端側あるいはカルボキシ末端側のそれぞれを認識するモノクローナル抗体を用い各フラグメントの構成を検討し、176 kDa は主として vWF サブユニットのカルボキシ末端側から、145 kDa はアミノ末端側からなることを明らかにした⁵⁾。しかし、彼らの方法は血漿 vWF を予め抗体カラムで免疫純化する必要があり、そのため数 ml の血漿を要する上、溶出に際して抗原抗体反応を解離させるのに SDS を用いる必要があった。

われわれは純化することなくより微量の血漿から直接還元 vWF フラグメントを観察する方法を検討した。従来の vWF に対する抗体は非還元 vWF を免疫して作製されており、得られた抗体は抗原である vWF を還元処理することでその結合能は著しく阻害される。したがって血漿 vWF の還元状態を観察することはほとんど不能であった。そこでわれわれは純化 vWF あるいはその SP-V8フラグメント (SP III ある

いは SP II) を予め還元アルキル化した後、それぞれを家兎に免疫することで、還元 vWF 全体、vWF のアミノ末端側あるいはカルボキシ末端側のそれぞれによりアフィニティの強いポリクローナル抗体を得ることができた。これらの抗体を用いることでわずか数十 μ l の血漿を材料に還元 vWF フラグメントを観察することが可能となった。また、同時に血漿を純化することなく直接還元処理することで純化に伴う vWF の分解を防ぎ得たと考えられる。

われわれは本法を用いることで正常血漿還元 vWF フラグメントにはメインフラグメントの 240 kDa の他に 216 kDa、194 kDa、164 kDa および 144 kDa のサブフラグメントを常に検出した。216 kDa のフラグメントは泳動条件によりさらに 220 kDa と 210 kDa の 2 本のフラグメントとして観察され、少なくとも血漿 vWF は主たるフラグメントと 5 本のサブフラグメントから構成されているものと考えられた。これらのフラグメントは健康成人 50 名のすべての vWF について観察された。しかし、重症 vWD では全く認められず、したがってここで観察されるフラグメントは vWF に特異的と考えられた。また、プロテアーゼ・インヒビター存在下、非存在下においてもその構成は同様であり、Zimmerman らの指摘したごとく⁴⁾ *in vivo* においてすでにほぼ同部位での分解をうけているものと考えられた。抗凝固剤の影響を検討するためクエン酸ナトリウム加血漿と EDTA 加血漿あるいはヘパリン加血漿とを比較したが、同様のフラグメント構成であったことから、DIC 患者におけるヘパリン投与時や透析患者等でも比較検討が可能なものと考えられる。また微量の血漿で観察されることから低出生体重児や新生児においても検出が可能であると考えられた。凍結保存の影響を検討するため、初期に採取した血漿を 2 年間、 -80°C に保存した。各フラグメントの構成は新鮮血漿とほぼ同様であったことから、凍結保存による影響は認めなかった。また、本研究の予備実験ではこれらの還元抗体を直接放射性ヨードで標識したオートラディオグラフィーに行っていたが、安全性と簡便性を考慮して蛍光抗体法に変更した。この蛍光抗

体法にても同様の結果が得られたため、今後の解析は後者を用いて検討することになっている。今回述べた方法による vWF フラグメントの検出感度は、重症 vWD 血漿で希釈した検討で正常血漿 vWF の 5% まで測定可能であると考えられる。そのため vWF 抗原量の低下した vWD type I においても血漿還元 vWF の分析は可能である。

抗還元 SP III 抗体あるいは抗還元 SP II 抗体を用いて先に検出された各フラグメントの vWF サブユニット分子上の分布を検討した。抗還元 SP III 抗体は 240 kDa, 216 kDa, 194 kDa, 164 kDa および 144 kDa のすべてを認識したが、抗還元 SP II 抗体は 240 kDa, 216 kDa, 194 kDa および 164 kDa と反応し、194 kDa とは淡く、164 kDa にはより強く反応し、144 kDa には反応しなかった。194 kDa はメインフラグメント (240 kDa) より低分子であり抗還元 SP II 抗体との反応に低下がみられることから主に SP III 部分から構成されていると考えられた。一方、164 kDa は抗 SP III 抗体との反応性は弱く、むしろ抗還元 SP II 抗体との反応が強いことから SP II から構成されていると考えられた。一方、144 kDa は抗還元 SP II 抗体と全く反応しなかったことから vWF のアミノ末端側 (アミノ酸残基 1~1365) 内のフラグメントのみから構成されていると考えられた。われわれの成績をさらに Berkowitz らの成績⁵⁾と比較すると、彼らの示した 176 kDa はわれわれの 164 kDa に相当し、145 kDa がわれわれの 144 kDa に相当するものと考えられる。しかし、彼らの方法では 225 kDa から 176 kDa までに 189 kDa の 1 本のフラグメントしか観察されていないが、われわれはこの間に更に 3 本のフラグメントの存在を見いだした。また、Berkowitz らは 225 kDa, 189 kDa, 176 kDa および 140 kDa の各フラグメントの割合をそれぞれ $83.3 \pm 16.34\%$, $2.3 \pm 5.01\%$, $11.3 \pm 9.225\%$, $3.1 \pm 5.923\%$ と報告している。一方、われわれの成績では 240 kDa, 216 kDa, 194 kDa, 164 kDa および 144 kDa の各フラグメントの割合はそれぞれ $69.2 \pm 6.3\%$, $17.3 \pm 3.6\%$, $6.5 \pm 1.3\%$, $3.7 \pm 1.1\%$, $2.9 \pm 1.4\%$ であったことか

ら 176 kDa に関して両者間に大きな相違がみられた。この違いは泳動条件の違いによるものか、用いた抗体の性状の違いによるものか、あるいは Berkowitz らの方法である血漿 vWF を一旦抗体カラムで部分純化していることによる影響なのかは今後の検討を必要とする。今回開発したわれわれの方法は、vWF の構造解析として従来のマルチマー分析に加え、新たに vWF サブユニットレベルでの分析を容易にしたものと考えられ、特に、vWD の病因・病態解析に有用と考えられる。

本論文の要旨は第 54 回日本血液学会総会および第 34 回日本臨床血液学会総会において発表した。また本研究の一部は文部省科学研究費 (一般研究 (C) 06670820, 主任研究者: 高橋幸博) の助成によった。

文 献

- 1) Fujimura, Y. and Titani, K.: Structure and function of von Willebrand factor. in Bloom AL et al. (eds) Haemostasis and Thrombosis, Vol 1, 3rd ed: 379-397, 1993.
- 2) Ikeda, Y., Handa, M., Kawano, K., Kamata, T., Murata, M., Araki, Y., Ando, H., Kawai, Y., Watanabe, K., Itagaki, I., Sakai, K. and Ruggeri, Z.M.: The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* **87**: 1234-1240, 1991.
- 3) Takahashi, Y., Kalafatis, J., Girma, J.P. and Meyer, D.: Abnormality of the N-terminal portion of von Willebrand factor in type II A and II C von Willebrand disease. *Thromb Haemostas* **60**: 498-505, 1988.
- 4) Zimmerman, T.S., Dent, J.A., Ruggeri, Z.M. and Nannini, L.H.: Subunit composition of plasma von Willebrand factor; Cleavage is present in normal individuals, increased in II A and II B von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types II C, II D, and II E). *J Clin Invest* **77**: 947-951, 1986.
- 5) Berkowitz, S.D., Dent, J., Roberts, J., Fujimura, Y., Plow, E.F., Titani, K., Ruggeri, Z.M. and Zimmerman, T.S.: Epitope mapping of the von

- Willebrand factor subunit distinguishes fragments present in normal and type II A von Willebrand disease from those generated by plasmin. *J Clin Invest* **79**: 524-531, 1987.
- 6) Thorell, L. and Blombäck, B.: Purification of the factor VIII complex. *Thromb Res* **35**: 431-450, 1984.
- 7) Girma, J.P., Chopek, M.W., Titani, K. and Davie, E.W.: Limited proteolysis of human von Willebrand factor by staphylococcus aureus V-8 protease; Isolation and partial characterization of a platelet-binding domain. *Biochemistry* **25**: 3156-3163, 1986.
- 8) 富山朔二, 安東民衛編: 単クローン抗体実験マニュアル. 講談社サイエンティフィク 153-159, 1987.
- 9) Chopek, M.W., Girma, J.P., Fujikawa, K., Davie, E.W. and Titani, K.: Human von Willebrand factor; A multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* **25**: 3146-3155, 1986.
-