

課題番号 54

加齢に伴う巨核球由来 von Willebrand 因子の動態変化の解析

[1] 組織

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

研究費：物品費 10 万円

[2] 研究経過

血栓症の発症リスクは、加齢により上昇する。それには、高血圧や動脈硬化、内皮機能変化、血液凝固系の機能亢進、血液凝固制御系の機能減衰など、多種多様な要因が複雑に絡み合っていると考えられるが、血小板凝集過程で機能するタンパク質 von Willebrand 因子（VWF）の加齢による血中濃度上昇も、血栓症発症リスクの上昇に関わると考えられている。しかし、VWF と加齢の関係性として、血中濃度上昇（量的変化）以外に、VWF の質的变化も関与する可能性が考えられるが、それを解析した研究はない。VWF は主に血管内皮細胞および骨髄巨核球で合成され、血液中に分泌される。本研究では、加齢による VWF の質的变化、特に骨髄巨核球に着目した VWF の解析を実施する。つまり、骨髄巨核球の VWF 産生能や、産生された VWF の構造的性質および機能的性質を解析することで、加齢に伴う巨核球由来 VWF の動態変化を明らかにすることを目的とする。

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

[3] 成果

(3-1) 研究成果

初年度は、作製・樹立済みの VWF-mCherry マウスの交配を進めた。得られた産仔のうち雄マウスを継続飼育し、本研究の遂行に必要な老齢マウスの準備を開始した。現在、生後数ヶ月～1 年程度のマウスが用意できている。また、VWF-mCherry マウスと組み合わせで解析に使用する予定であった

VWF-mGreen マウスの作製も進めたが、得られた産仔の中に目的の配列がノックインされた個体は存在しなかった。複数回の作製を試みたが、残念ながらノックインマウスは得られなかった。同様の方法で VWF-mCherry マウスの作製は成功していたため、mGreen でうまくいかない理由是不明であるが、VWF-mGreen 配列特異的に起こるトラブルであると考え、ノックインするタグを変更することとした。蛍光タンパク質ではないが、特異性の高い抗体が入手可能な HA タグおよび V5 タグを選択し、ノックインマウス作製の準備を進めている。これらが成功すれば、本研究の目的は達成できると考えている。

加齢による VWF の質的变化について、まず血漿中の VWF マルチマーの状態を調べることにした。そのため、3 群 (Young: 8-10 週齢 8 匹, Middle: 31-38 週齢 7 匹, Old: 74-82 週齢 8 匹) のマウスを用意した。Young、Middle、および Old マウス血漿での VWF マルチマーの比較解析を行った (図 1)。

VWF マルチマーのサイズ構成に着目するため、あらかじめ抗 VWF 抗体を用いた還元 WB により

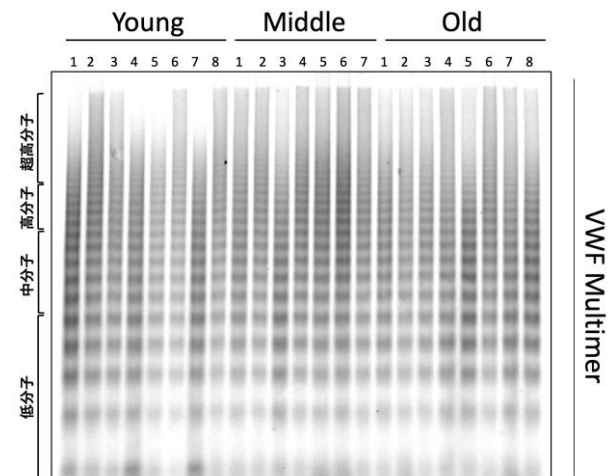


図1

VWF 抗原量を算出し、一定の抗原量をアプライしてマルチマー解析を実施した。VWF マルチマーのバンド強度を、低分子量域 (1-5 本目)、中分子量域 (6-10 本目)、高分子量域 (11-15 本目)、超高分子量域 (16 本目) に分けて算出すると、Young マウスに比べて Middle および Old マウスでは、超高分子量マルチマーの割合が多い傾向が見られた (ただし

p=0.0963, 図2)。

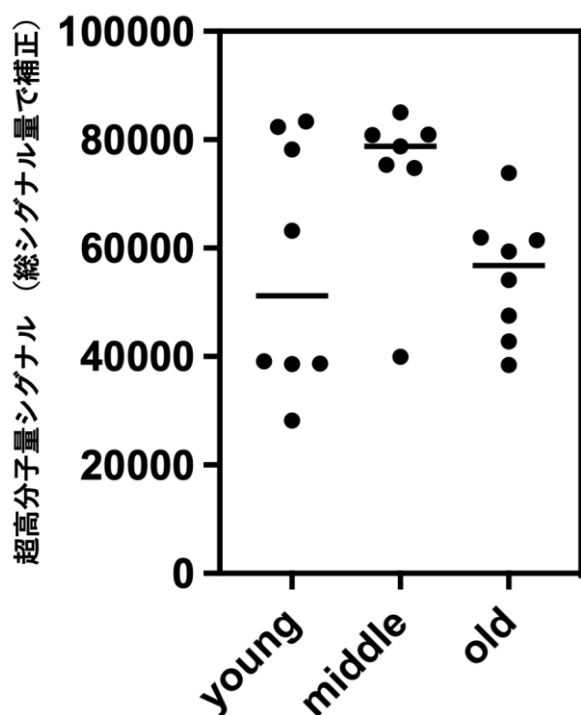


図2

この結果より、加齢はVWF抗原量の増加だけでなく、VWF マルチマーの状態にも影響をおよぼすことが示唆された。Young および Old マウスでは、Middle マウスに比べて、個体によるバラツキが大きい可能性も示唆された (ただし $p=0.0475$, 図2)。

来年度以降、2種類のタグ配列によりVWFの識別が可能なマウスが完成すれば、骨髄由来VWF、血管内皮由来VWFのそれぞれのマルチマーの状態を比較解析することが可能になる予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、これまでのAMED研究班AVeC study等に加えて、堀内教授との共同研究がさらに発展し、加齢によるVWFの機能変化・疾患に絡む新たな展開のきっかけとなった。現在樹立中の遺伝子改変マウスが完成すれば、さらに次のステージへと進むことができると期待される。

[4] 成果資料

(1) V-ATPase V0a1 promotes Weibel-Palade body biogenesis through the regulation of membrane fission. Yamazaki Y, Eura Y, Kokame K *Elife*. 2021, 10: e71526. (2021)

(2) Siglec-5 and Siglec-14 mediate the endocytosis of ADAMTS13. Akiyama M, Eura Y, Kokame K. *Thromb Res.*, 219: 49-59 (2022)