

血栓止血タンパク質 von Willebrand 因子の分泌制御因子の探索

山崎泰男

国立循環器病研究センター 分子病態部

【研究の背景】

細胞内で合成されたタンパク質は、オルガネラ間を輸送されながら最終的な機能タンパク質へと成熟する。von Willebrand 因子 (VWF) は、血管内皮細胞で産生される分子量約 250 kDa の止血反応を担うタンパク質である。VWF は Weibel-Palade 小体 (WPB) と呼ばれる葉巻形状のオルガネラにマルチマーとして貯蔵され、ヒスタミンなどの刺激により適時血液中へと分泌される。分泌された VWF マルチマーは、互いに絡み合うことで VWF strings と呼ばれる超構造体を血管内皮細胞上に形成し、そこに血小板を粘着し止血を行う。WPB は血管内皮細胞にのみ含まれるオルガネラで、内腔は約 pH 5.4 の酸性である。in vitro において VWF は酸性環境下でマルチマー化する¹⁾。また WPB に貯蔵された VWF は、分泌にあたり酸性 (pH 5.4) から弱アルカリ性 (pH 7.4) へと大きな pH 変化に曝されることで、効率的に VWF strings を形成する²⁾。すなわち WPB 内腔の酸性環境は VWF の機能発現に必須であるが、それが如何にして形成・維持されているかについては全く不明である。

【目 的】

本研究課題では、WPB 内腔の酸性環境の形成・維持を担う分子を同定し、WPB の形成および VWF の分泌機構の一端を明らかにすることを目的とする。

【方 法】

臍帯静脈内皮細胞 HUVEC をフィブロネクチンコート上で 5-7 日間培養し、培養上清および細胞を解析に用いた。この培養条件では、各細胞は VWF を一様に発現し、細胞間にはタイトジャンクションおよびアドヘレンスジャンクションが形成されることから、生体内の血管内皮に近い細胞構造を有していると考えられた。

【結 果】

WPB 内腔の酸性環境の重要性を評価する目的で、HUVEC を塩化アンモニウムに暴露し WPB の形態を観察した。塩化アンモニウムは中性では分子形のため細胞膜を通過しうるが、酸性オルガネラ内へ取り込まれるとイオン化し、生じたアンモニウムイオンによりその酸性環境を中和する。HUVEC を塩化アンモニウムで処理すると、WPB は葉巻形状から球状へと変化した。すなわち、WPB の酸性環境はそのオルガネラ形態の維持に重要であると考えられた。Vacuolar-type H⁺-ATPase (V-ATPase) はリソソームなどの酸性オルガネラに局在し、そのプロトンポンプ機能によってリソソーム内腔を酸性化している。WPB 内腔の酸性化における V-ATPase の寄与の有無を調べる目的で、V-ATPase の特異的阻害剤である Bafilomycin A1 および Concanamycin A で HUVEC を処理した。その結果、塩化アンモニウム処理の場合と同様に、いずれの V-ATPase 阻害剤の処理によっても WPB の形態に変化が生じた。実際に V-ATPase は WPB に局在することが免疫蛍光法で確認できたことから、V-ATPase は WPB 内腔の酸性環境の形成を担う分子であると考えられた。

次に VWF strings の形成における V-ATPase 活性の影響について調べた。コントロールの HUVEC をヒスタミンで処理すると、細胞膜上に直ちに VWF strings の形成が観察された。一方、Bafilomycin A1 および Concanamycin A で前処理した細

胞ではヒスタミンに暴露しても、貧弱な VWF strings しか形成されなかった。Western blot およびマルチマー解析によって培地中に分泌された VWF の量的および質的な変化について調べたところ、総分泌量およびマルチマー状態に大きな影響は見られなかった。以上の結果から、V-ATPase 活性はヒスタミンによる誘導的な分泌そのものには必要はないが、正常な VWF strings の形成には必須であると考えた。

VWF はヒスタミンなどによる刺激のない状態でも血管内皮細胞から恒常的に分泌される。これにより循環血液中の VWF 量は維持されていて、即時の止血反応に対応している。コントロールの細胞では VWF マルチマーの分泌が観察されるのに対し、Bafilomycin A1 もしくは Concanamycin A によって V-ATPase 活性を阻害した細胞では、二量体 VWF のみが選択的に分泌されていた。化学阻害剤を用いた実験から、V-ATPase 活性の非存在下で起こる二量体の分泌はゴルジ体から生じていることが判明した。すなわち V-ATPase 活性が存在しないと VWF のマルチマー化は起こらず、二量体のままゴルジ体から分泌されることが考えられた。

【考 察】

今回、HUVEC において V-ATPase は WPB に局在しており、WPB の酸性環境を形成・維持する因子の一つであることが明らかとなった。その活性は、血小板止血に重要な VWF strings の形成にも必須であった。興味深いことに、V-ATPase 活性は VWF のマルチマー化に必須であることを示唆するデータが得られた。VWF のマルチマー化はゴルジ体もしくはトランスゴルジネットワークで起こると考えられていることから^{1, 3, 4)}、V-ATPase の活性依存的に何らかの分子がリクルートされ、VWF のマルチマー化、さらには WPB の形成に関与しているのではないかと考えた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

VWF の量的もしくは質的異常は、von Willebrand 病と呼ばれる出血症を引き起こす。したがって WPB の形成機構を含む VWF の合成および分泌機構を明らかにすることは、von Willebrand 病の病理機構の解明、さらにはその制圧に重要であると考えられる。今回我々が同定したプロトンポンプ V-ATPase は、von Willebrand 病のみならず、血栓症・出血症などの循環器病への関与が示唆されたことのない分子である。したがって、その新たな役割を明らかにすることは臨床的意義が大きいと期待している。

【参考・引用文献】

1. Mayadas, T. N., and Wagner, D. D. (1989) In vitro multimerization of von Willebrand factor is triggered by low pH. Importance of the propolypeptide and free sulfhydryls. *J Biol Chem* **264**, 13497-13503
2. Michaux, G., Abbitt, K. B., Collinson, L. M., Haberichter, S. L., Norman, K. E., and Cutler, D. F. (2006) The physiological function of von Willebrand's factor depends on its tubular storage in endothelial Weibel-Palade bodies. *Dev Cell* **10**, 223-232
3. Huang, R. H., Wang, Y., Roth, R., Yu, X., Purvis, A. R., Heuser, J. E., Egelman, E. H., and Sadler, J. E. (2008) Assembly of Weibel-Palade body-like tubules from N-terminal domains of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 482-487
4. Zhou, Y. F., Eng, E. T., Nishida, N., Lu, C., Walz, T., and Springer, T. A. (2011) A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. *EMBO J* **30**, 4098-4111