

FVIII の生合成およびフォン・ヴィレブランド因子との相互作用に関する最新の知見

Recent findings in the biosynthesis of coagulation factor VIII and its interaction with von Willebrand factor

志田泰明*, 野上恵嗣
Yasuaki SHIDA, Keiji NOGAMI

Key words: von Willebrand factor (VWF), von Willebrand disease (VWD), Factor VIII (FVIII)

Points

- ①第 VIII 因子 (FVIII) の主要産生部位は、血管内皮細胞である。
- ②血管内皮細胞の中でもとくに肝類洞内皮細胞 (liver sinusoidal endothelial cells: LSECs) が重要である。
- ③ FVIII のフォン・ヴィレブランド因子 (von Willebrand factor: VWF) との主要な結合部位は VWF D' ドメインに存在する。
- ④ FVIII の安定化のためには VWF D'D3 ドメイン全体が必要である。
- ⑤ VWF の D' ドメインに存在する trypsin-inhibitor-like (TIL') 領域の構造が特に FVIII との結合に重要である。

1. はじめに

血液凝固第 VIII 因子 (factor VIII: FVIII) は内因系凝固因子の一つであり、その欠損は代表的な出血性疾患である血友病 A の原因となる。FVIII はその担体タンパクであるフォン・ヴィレブランド因子 (von Willebrand factor: VWF) と結合することで分解から保護され安定化して血液中に存在する¹⁾。しかしながら FVIII と VWF がいつからどのように結合するかは依然明確になっていない。VWF は血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生されるが、FVIII の産生部位は肝細胞や血管内皮細胞など諸説あり依然不明であ

る。近年、長時間作用型 FVIII 製剤の登場により、FVIII を安定化させる戦略のターゲットとしてその半減期を司る VWF との結合様式も注目されている。しかしながら、VWF における FVIII 結合部位の構造にも不明な点が多い。本稿では FVIII の産生部位および VWF との結合機構に関する最新の知見について解説する。

1) FVIII の産生部位

他の凝固因子と異なり FVIII の産生部位は諸説あり、いまだ結論が出ていない。FVIII が微量かつ不安定なタンパクであるために、検出が技術的に困難であることが主要な原因であると考えられ、産生部位を特定するためには技術の進歩を待たねばならなかった。FVIII がクローニングされたのが 1984 年であるが²⁾、1971 年にはすでに FVIII の産生臓器を特定しようという試みがなされている³⁾。正常犬の肝臓を血友病犬に移植したところ FVIII 活性が正常の

*責任者連絡先:

奈良県立医科大学小児科
〒634-8522 奈良県橿原市四条町 840
Tel: 0744-29-8881, Fax: 0744-24-9222
E-mail: y-shida@narmed-u.ac.jp

50%にまで上昇し、出血傾向が改善した。逆の移植実験で、血友病犬の肝臓を移植された正常犬でもFVIIIレベルは50%を保っていた。

1985年にLewisら⁴⁾は血友病A患者に肝臓移植をした結果、血友病が治癒したことを報告した。その後1987年に同グループはさらに3症例を加えた続報を報告しており⁵⁾、イヌの血友病モデルとあわせて、肝臓が主要なFVIII産生部位であると考えられる根拠となった⁶⁻⁸⁾。肝臓における細胞の約半数は肝細胞であり、残りは非実質細胞である肝類洞内皮細胞(liver sinusoidal endothelial cells: LSECs)、クッパー細胞、伊東細胞の3つである。歴史的には、1985年には、分離された肝細胞からFVIIIのmRNAや抗原が検出できたため、FVIIIは肝細胞由来と考えられてきた^{9,10)}。しかし、当時の技術の限界もあり本当に肝細胞由来なのかという疑念は晴れず、その後LSECs¹¹⁻¹³⁾やクッパー細胞^{14,15)}の報告も見られた。2014年に入り、FVIII活性および抗原が肝臓から分離された血管内皮細胞LSECsから確認され¹⁶⁾、LSECsが主要なFVIII産生細胞であると考えられるようになった。

一方、肝臓外での産生を示す報告も多数存在する。2009年にCharlesら¹⁷⁾は血友病患者の肝臓を非血友病患者へ移植した際、移植後もFVIII活性が正常であったことを報告した。肝疾患の末期状態の患者では、肝機能の低下に反してFVIII活性の上昇が認められており^{18,19)}、FVIII産生が肝臓外でも行われていると考えられる根拠となっている¹⁷⁾。肝臓外のどこの臓器由来かについても様々な検討がなされている。ブタの実験モデルでFVIIIのmRNA発現が脾臓と腎臓で検出された²⁰⁾。また脾臓や肺の移植によりFVIII活性の補正が認められている²¹⁾。他にも肺^{21,22)}、脾臓²³⁻²⁵⁾およびリンパ組織²⁶⁾等がFVIII産生臓器として報告されている。骨髓造血細胞に関しては、血友病Aマウスで骨髓移植した実験結果によれば骨髓移植後にFVIIIレベルの上昇が見られた²⁷⁾ものの、ヒト²⁸⁾やイヌ^{29,30)}においては骨髓移植の有効性は認められていない。血管内皮細胞に関しては、LSECs以外にも様々な解剖部位の血管内皮細胞がFVIIIを産生、分泌するとされる^{31,32)}。このような肝臓外のFVIII産生は恒常的に起こっているものなのか、肝臓での産生低下時に代償的に起こる

ものなのかなどは全く不明である。

2. FVIII産生部位研究の新たな展開

これまでFVIIIの産生部位を特定するために使用されてきた手法や技術としては免疫染色や、*in situ*および細胞分離などがあげられるが、最近、コンディショナル・ノックアウトマウスモデルという新たな分子生物学的手法を用いた実験結果が2つ同時に報告された^{33,34)}。コンディショナル・ノックアウトとは、条件特異的遺伝子破壊とも呼ばれる方法である。標的となる遺伝子領域をCreリコンビナーゼ標的配列*loxP*で挟んだ遺伝子座を持つマウスを作製し、これと組織特異的にCreリコンビナーゼを発現しているマウスとかけ合わせることで、特定の臓器を形成する細胞のみで標的遺伝子の破壊を起こすことができる手法である。すなわち、この手法を用いれば特定の臓器でFVIIIが欠損したマウスを得ることができるのである。

一つ目はFVIIIコンディショナル・ノックアウト(FVIII conditional knockout: FVIII-CKO)マウスモデルである。Fahsら³¹⁾は*loxP*を*F8*エクソン17と18を挟むように配置して、Cre依存性FVIII-CKOマウスを作製した。Creリコンビナーゼが組織特異的に発現するマウスと交配させることで、数種類の組織特異的FVIII-KOモデル(肝細胞FVIII-KO(Alb-Cre)、造血細胞FVIII-KO(Vav1-Cre)および血管内皮細胞FVIII-KO(Cdh5^(Mia)-Cre, Cdh5^(Spe)-Cre, Tek-Cre))を作成した(表1)。これらのマウスのFVIII活性を測定し、表現型正常なFVIII-CKOマウス(*F8^F*)あるいは完全欠損FVIII-CKO(*F8^{KO}*)と比較した(図1)。肝細胞KOであるAlb-CreマウスのFVIII活性は正常マウスと有意差がなく、肝臓からの*F8*mRNAは完全に正常であった。この実験から肝細胞でのFVIIIは否定的と結論された。一方、血管内皮細胞FVIII-KOであるが、最も強いKOであるTek-Cre(概してKO効率はCdh5^(Mia)-Cre<<Cdh5^(Spe)-Cre<Tek-Creとなっていた)ではFVIII活性が確認できず、血管内皮細胞でのFVIII産生が強く示唆される結果であった。しかしながら、これらの血管内皮細胞FVIII-KOは実際には造血細胞KOでもあるため、対照として造血細胞KOであるVav1-Creが使用された。もし造血

表1 Cre 依存性コンディショナルノックアウトマウスモデル(文献³³より改変)

略名	正式名称	組織特異性
Meox2-Cre	B6.129S4-Meox2 ^{tm1(cre)Sor} /J	胚
Alb-Cre	B6.Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn/J	肝細胞
Vav1-Cre	B6.Cg-Tg(Vav1-cre)A2Kio/J	造血細胞(+その他)
Cdh5 ^(Mia) -Cre	B6.Cg-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J	血管内皮+造血細胞
Cdh5 ^(Spe) -Cre	B6.129-Tg(Cdh5-cre)1Spe/J	血管内皮+造血細胞
Tek-Cre	B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J	血管内皮+造血細胞

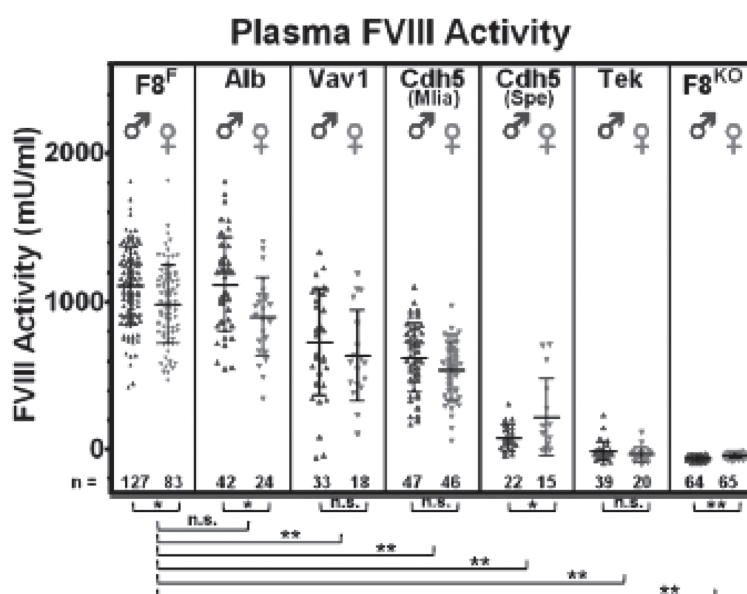


図1 FVIII コンディショナルノックアウトマウスモデルの血中 FVIII 活性(文献³³より抜粋)

青：オス，淡赤：メス，F8^F：Cre^{-/-}コントロールマウス，FVIII レベルに対する Alb-Cre マウスの影響は認められなかったが，すべての血管内皮細胞 CKO マウスでは FVIII 活性の低下が認められた。

細胞が FVIII を産生しているのならば Vav1-Cre マウスで FVIII 活性低値となるはずであるが，若干低値という曖昧な結果であった。この解釈は単純ではないが，追加で行われた実験で，正常マウスの骨髄を移植された FVIII-KO マウスからは FVIII を検出できなかったことから造血細胞における FVIII 産生は限定的と考えられる。

もう一つの実験では *Lman1*-CKO マウスモデルを用いられた。lectin, mannose-binding protein 1 (*Lman1*) は細胞からの初期分泌過程における積み荷受容体で

あり，血液中へ FV や FVIII を分泌するのに必要である。*Lman1* における遺伝子変異は先天性第 V, VIII 因子合併欠損症という常染色体劣性遺伝形式を示す出血性疾患を引き起こす。Everett ら³⁴⁾のグループは *Lman1* のエクソン 2, 3 に *loxP* を配置したマウスを作製し，Alb-Cre マウス，Tek-Cre マウスと交配させることで肝細胞あるいは血管内皮 *Lman1*-CKO モデルを作成した。これらの FV および FVIII 活性を図 2 に示す。肝細胞 *Lman1*-CKO では FV 活性は低下したが，FVIII 活性は正常であった一方，

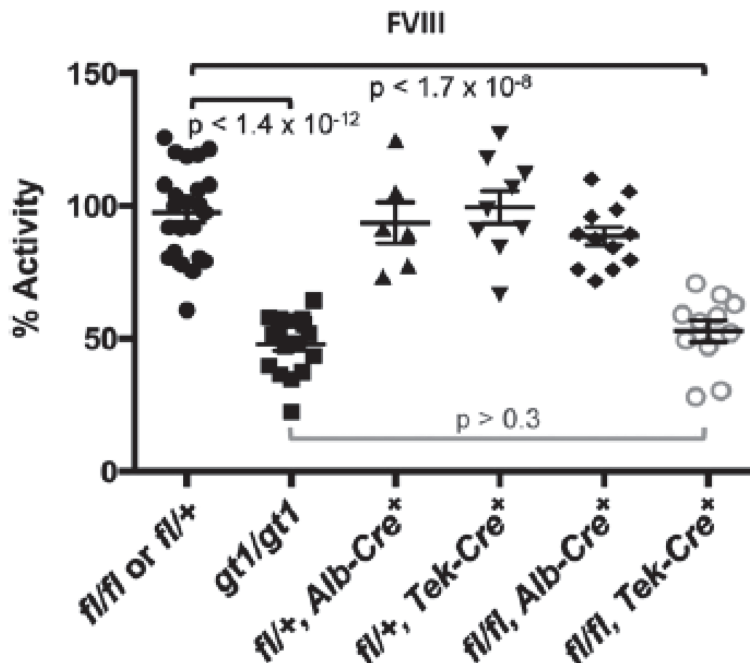


図2 *Lman1* コンディショナルノックアウトマウスの血中FVIII活性(文献³⁴より抜粋)

fl/fl: *Lman1*^{fl/fl}, fl/+ : *Lman1*^{fl/+}, gt1/gt1 : 既報の⁴¹*Lman1* KOマウス. *Lman1*^{fl/fl}+Tek-Cre マウスはコントロールのマウスに比して有意にFVIIIレベルが低かった. 一方 *Lman1*^{fl/fl}+Alb-Cre マウスでは差は認められなかった.

血管内皮 *Lman1*-CKO ではFVIII活性が低下したが、FV活性は正常であった。前述のFVIII-CKOと同様に、FVIIIの産生部位として肝細胞は否定的で、肝臓の血管内皮細胞、LSECsであることを示唆する結果であった。さらに肝臓に加えて、異なる組織(腎臓、心臓、脳)血管においても *F8* mRNA を測定、比較が行われた。肝臓において最も *F8* mRNA レベルは高値を示しており、LSECsの重要性が示唆された。さらに腎臓でも中等度高値であったが、一方、心臓や脳では認められなかった。同じ血管内皮細胞でも異なる組織において異なるレベルの発現が見られる理由は明らかではないが、この事実は組織特異的な血管内皮細胞の機能を考える上で重要である。FVIIIの重要なシャペロンとして機能するVWFも同様に血管内皮細胞で産生されることは、FVIIIの生合成に重要な役割を果たしていると考えられる。*Vwf*の発現が組織によって異なる因子により調節されていることも報告されている³⁵⁾。同様に他の様々な遺伝子も異なる血管内皮で異なる発現パターンを

示すかもしれない、さらなる検討が必要である。

3. FVIII-VWFの相互作用

FVIIIがいつ、どこで、どのようにしてVWFと結合するのかについても不明な点が多い。VWD患者でFVIII活性の低下が見られることはよく知られた事実であり、type 1やtype 3 VWDではVWF量の低下に伴いFVIII活性も低下する。type 2N VWDではVWFのFVIII結合能の低下に起因して著明なFVIII活性の減少を示す。VWD患者にVWF濃縮製剤を注入した場合、FVIII活性は緩徐に上昇する。このことはFVIII-VWF結合は産生された後の血液中でも起こることを意味する。

VWFは血管内皮細胞で産生され、様々な翻訳後修飾を受ける。最終的にVWF分子は多数連なったマルチマー構造という構造をとる。それぞれのマルチマーは2個(ダイマー)から60個以上ものVWF分子が連なっており、それぞれの分子がFVIII結合

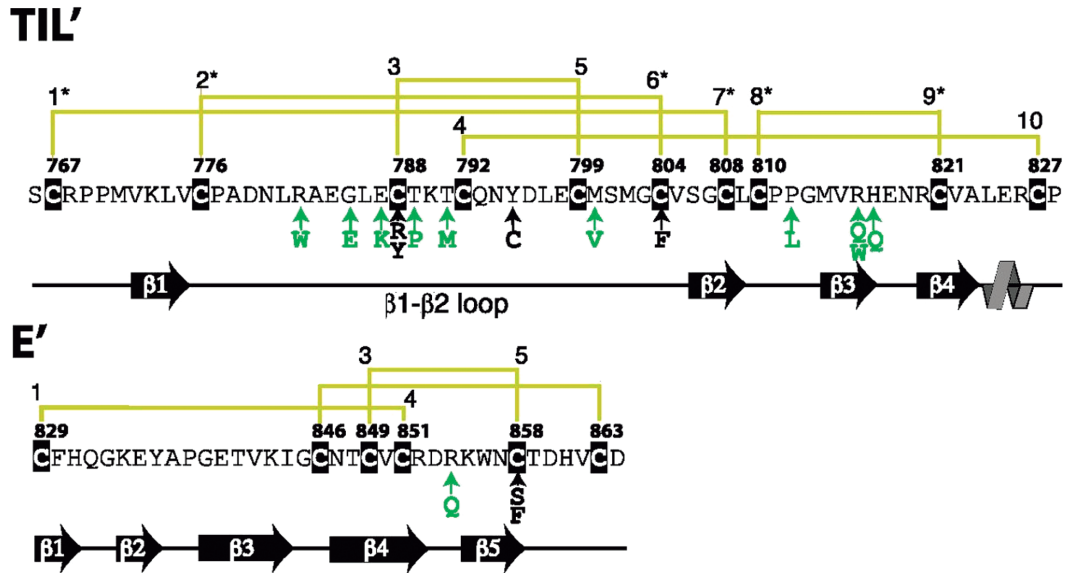


図3 VWFにおける主要なFVIII結合部位(文献³⁹より改変)
VWFのTIL'およびE'ドメイン(766-864). ハイライト表示:システイン残基. 黄色の線:S-S結合.
矢印:Type 2N変異(緑:非システイン変異, 黒:システイン変異)

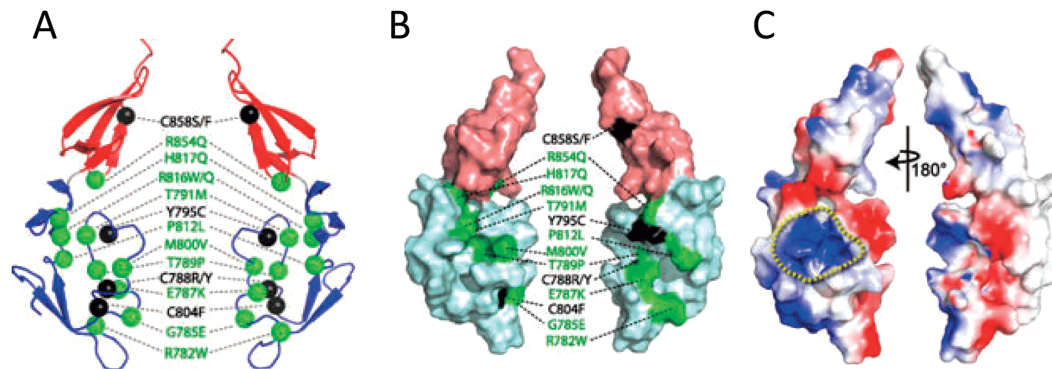


図4 Type 2N VWF 変異の位置(文献³⁹より改変)
(A)青:TIL'ドメイン, 赤:E'ドメイン, Type 2N 変異(緑球:非システイン変異, 黒球:システイン変異) (B)淡青:TIL'ドメイン, 淡赤:E'ドメイン, Type 2N 変異(緑球:非システイン変異, 黒球:システイン変異) (C)青:陽性荷電部位, 赤:陰性荷電部位, 黄色の点線で囲まれたエリア:FVIII軽鎖のa3ドメインへの結合部位と推定されており, 強い陽性荷電を示す.

部位を有している. 血液中のFVIIIはどのサイズのマルチマーにも同様の結合能を有するとされているが($K_D \approx 0.2-0.3$ nM), FVIII:VWFは $\sim 1:50$ の割合で結合する.

FVIIIは重鎖(A1-a1-A2-a2-Bドメイン)と軽鎖(a3-A3-C1-C2ドメイン)からなるヘテロダイマーであるが, 軽鎖のうちa3, C1, C2ドメインがVWFと結合表面を形成する. 逆に, VWF側のFVIII結合領域はD'D3ドメインにある764-1035である. 72%の

type 2N VWDの遺伝子変異はVWF D'ドメイン(764-865)に分布しており, そのVWFのD'領域は二つの独立したTIL'(Trypsin-inhibitor-like, 766-827)とE'(829-864)という折り重なるドメインからなる(図3). Type 2N変異のなかで重症なものはTIL'領域に多く³⁶⁾(図4), モノクローナル抗体を用いたエピトープマッピングの結果からもFVIII結合部位がTIL'ドメインに存在すると考えられている^{37, 38)}. 最近のShiltaghらの報告によれば³⁹⁾, TIL'とE'領域の

β シートは柔軟なTIL'ループの足場を形成する。TIL'では強い陽性荷電部位が形成されており、動的な性質を持つTIL'ドメインは陰性に荷電されたFVIIIの $\alpha 3$ ドメインと結合する構造を有する。

近年、FVIIIタンパクにPEGを結合させたり、IgGのFcドメインを融合させたりすることで、FVIIIの半減期を延長した長時間作用型製剤が血友病治療に利用されている。FIXでも同様の試みがなされており、その半減期は5倍にもおよんでいるにもかかわらず、一方でFVIII製剤の半減期は1.5-1.8倍程度に留まっている。この理由は、FVIIIの血中半減期はその担体タンパクであるVWFに依存しているからであると考えられる。YeeらはFVIII結合部位を有する7種類のVWFフラグメントを作成し、FVIIIの安定化作用があるのかどうかを検討した⁴⁰。FVIIIに結合するVWFの部位は(764-1035)であり、高い親和性を示すにもかかわらず、血中FVIIIを安定化させるためにはD'D3フラグメント全長(764-1247)が必要であった。この理由は明らかではないが、タンパクの立体構造の制御や翻訳後修飾との関連があるのかもしれない。FVIIIとAPCなどのタンパク分解酵素やLRP-1のようなクリアランスレセプターなどとの相互作用による影響なども考えられる。

FVIIIの半減期を延長させるためにVWFフラグメントを使用することを考慮する際、短いフラグメント自体の半減期を改善するために、YeeらはVWF D'D3フラグメントに免疫グロブリンIgG1のFc部分をC末端に融合した(VWF D'D3-Fc)を作成した。期待された通り、VWF D'D3-FcはFcRnエンドソーム経路を介するVWF D'D3フラグメントの再利用により、長い半減期を示した。VWF⁺マウスにこのVWF D'D3-Fcを発現させたところ、FVIIIの安定化が見られ、血中FVIIIレベルは10倍となり少なくとも7日以上持続した。しかしFVIII⁺マウスにVWF D'D3-FcとFVIIIを投与したところ、期待に反してFVIIIは速やかに消失してしまった。理由は不明ではあるが、VWF D'D3-Fcが内因性のVWFと競合する、あるいはVWF D'D3-Fc/FVIII複合体がエンドサイトーシスされた後にVWF D'D3-Fcだけ再利用されFVIIIは分解されるなどが考えられている。VWF D'D3-FcにFVIII-Fcなどの長時間作

用型FVIIIを投与した場合にどのようになるのか興味深いところである。

4. おわりに

FVIIIの産生部位の特定が進められ、LSECsを中心とした血管内皮細胞が主要な部位であることが明らかになった。他の凝固因子が肝細胞で産生されるなか、重要なFVIIIという凝固因子だけが別の細胞で産生されるのは非常に興味深い。FVIIIの重要なパートナーであるVWFも全身の血管内皮細胞で産生されることは無関係ではないだろう。このシステムは肝細胞内での不必要な凝固促進を防止するためのものであるかもしれないし、あるいは局所でFVIIIとVWFを共に速やかに動員することで止血を有効に行うためのものであるのかもしれない。最近明らかになった柔軟なVWF D'ドメインの立体構造は、VWFにおけるFVIII結合という重要な機能を理解する上で重要な一歩であると考えられ注目したい。D'D3フラグメントによる血中FVIIIレベルの最適化はVWF⁺マウスにおいては魅力的な結果であり、VWFの担体機能を調整することでFVIIIを安定化できる可能性が示唆された。

著者の利益相反(COI)の開示：

志田泰明・野上恵嗣：臨床研究(バイエル薬品、中外製薬、バクスター、ノボノルディスクファーマ、CSLベーリング、バイオジェン・アイデック)、研究費(バイエル薬品、中外製薬、バクスター、ノボノルディスクファーマ)

文献

- 1) Koppelman SJ, van Hoesel M, Vink T, Lankhof H, Schiphorst ME, Damas C, Vlot AJ, Wise R, Bouma BN, Sixma JJ: Requirements of von Willebrand factor to protect factor VIII from inactivation by activated protein C. *Blood* **87**: 2292-2300, 1996.
- 2) Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EG, Lawn RM, Capon DJ: Structure of human factor VIII. *Nature* **312**: 337-342, 1984.
- 3) Webster WP, Zukoski CF, Hutchin P, Reddick RL, Mandel SR, Penick GD: Plasma factor VIII synthesis and control as revealed by canine organ transplantation. *Am J Physiol* **220**: 1147-1154, 1971.

- 4) Lewis JH, Bontempo FA, Spero JA, Ragni MV, Starzl TE: Liver transplantation in a hemophiliac. *N Engl J Med* **312**: 1189–1190, 1985.
- 5) Bontempo FA, Lewis JH, Gorenc TJ, Spero JA, Ragni MV, Scott JP, Starzl TE: Liver transplantation in hemophilia A. *Blood* **69**: 1721–1724, 1987.
- 6) Scharrer I, Encke A, Hottenrott C: Clinical cure of haemophilia A by liver transplantation. *Lancet* **2**: 800–801, 1988.
- 7) Ragni MV, Dodson SF, Hunt SC, Bontempo FA, Fung JJ: Liver transplantation in a hemophilia patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **93**: 1113–1114, 1999.
- 8) Lamont PA, Ragni MV: Lack of desmopressin (DDAVP) response in men with hemophilia A following liver transplantation. *J Thromb Haemost* **3**: 2259–2263, 2005.
- 9) Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM: Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* **317**: 726–729, 1985.
- 10) Figueiredo MS, Brownlee GG: cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human factor VIII gene. *J Biol Chem* **270**: 11828–11838, 1995.
- 11) Do H, Healey JF, Waller EK, Lollar P: Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Biol Chem* **274**: 19587–19592, 1999.
- 12) Kumaran V, Benten D, Follenzi A, Joseph B, Sarkar R, Gupta S: Transplantation of endothelial cells corrects the phenotype in hemophilia A mice. *J Thromb Haemost* **3**: 2022–2031, 2005.
- 13) Yadav N, Kanjirakkuzhiyil S, Ramakrishnan M, Das TK, Mukhopadhyay A: Factor VIII can be synthesized in hemophilia A mice liver by bone marrow progenitor cell-derived hepatocytes and sinusoidal endothelial cells. *Stem Cells Dev* **21**: 110–120, 2012.
- 14) Hollestelle MJ, Thinnis T, Crain K, Stiko A, Kruijt JK, van Berkel TJ, Loskutoff DJ, van Mourik JA: Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo—a closer look. *Thromb Haemost* **86**: 855–861, 2001.
- 15) Stel HV, van der Kwast TH, Veerman EC: Detection of factor VIII/coagulant antigen in human liver tissue. *Nature* **303**: 530–532, 1983.
- 16) Shahani T, Covens K, Lavend'homme R, Jazouli N, Sokal E, Peerlinck K, Jacquemin M: Human liver sinusoidal endothelial cells but not hepatocytes contain factor VIII. *J Thromb Haemost* **12**: 36–42, 2014.
- 17) Madeira CL, Layman ME, de Vera RE, Fontes PA, Ragni MV: Extrahepatic factor VIII production in transplant recipient of hemophilia donor liver. *Blood* **113**: 5364–5365, 2009.
- 18) Langley PG, Hughes RD, Williams R: Increased factor VIII complex in fulminant hepatic failure. *Thromb Haemost* **54**: 693–696, 1985.
- 19) Hollestelle MJ, Geertzen HG, Straatsburg IH, van Gulik TM, van Mourik JA: Factor VIII expression in liver disease. *Thromb Haemost* **91**: 267–275, 2004.
- 20) Hollestelle MJ, Poyck PP, Hollestelle JM, Marsman HA, Mourik JA, Gulik TM: Extra-hepatic factor VIII expression in porcine fulminant hepatic failure. *J Thromb Haemost* **3**: 2274–2280, 2005.
- 21) Veltkamp JJ, Asfaou E, van de Torren K, van der Does JA, van Tilburg NH, Pauwels EK: Extrahepatic factor VIII synthesis. Lung transplants in hemophilic dogs. *Transplantation* **18**: 56–62, 1974.
- 22) Jacquemin M, Neyrinck A, Hermanns MI, Lavend'homme R, Rega F, Saint-Remy JM, Peerlinck K, Van Raemdonck D, Kirkpatrick CJ: FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. *Blood* **108**: 515–517, 2006.
- 23) Liu L, Xia S, Seifert J: Transplantation of spleen cells in patients with hemophilia A. A report of 20 cases. *Transpl Int* **7**: 201–206, 1994.
- 24) Aronovich A, Tchorsh D, Katchman H, Eventov-Friedman S, Shezen E, Martinowitz U, Blazar BR, Cohen S, Tal O, Reisner Y: Correction of hemophilia as a proof of concept for treatment of monogenic diseases by fetal spleen transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19075–19080, 2006.
- 25) Groth CG, Ringdén O: Transplantation in relation to the treatment of inherited disease. *Transplantation* **38**: 319–327, 1984.
- 26) Groth CG, Hathaway WE, Gustafsson A, Geis WP, Putnam CW, Björkén C, Porter KA, Starzl TE: Correction of coagulation in the hemophilic dog by transplantation of lymphatic tissue. *Surgery* **75**: 725–733, 1974.
- 27) Follenzi A, Raut S, Merlin S, Sarkar R, Gupta S: Role of bone marrow transplantation for correcting hemophilia A in mice. *Blood* **119**: 5532–5542, 2012.
- 28) Ostronoff M, Ostronoff F, Campos G, Arruda S, Vaz C, Florencio R, Calixto R, Souto Maior AP, Sucupira A, Domingues M, Tagliari C: Allogeneic bone marrow transplantation in a child with severe aplastic anemia and hemophilia A. *Bone Marrow Transplant* **37**: 627–628, 2006.
- 29) Marchioro TL, Hougie C, Ragde H, Epstein RB, Thomas ED: Hemophilia: role of organ homografts. *Science* **163**: 188–190, 1969.
- 30) Storb R, Marchioro TL, Graham TC, Willemin M, Hougie C, Thomas ED: Canine hemophilia and hemopoietic grafting. *Blood* **40**: 234–238, 1972.
- 31) Shahani T, Lavend'homme R, Luttun A, Saint-Remy JM, Peerlinck K, Jacquemin M: Activation of human endothelial cells from specific vascular beds induces the release of a FVIII storage pool. *Blood* **115**: 4902–4909, 2010.
- 32) Shovlin CL, Angus G, Manning RA, Okoli GN, Govani FS, Elderfield K, Birdsey GM, Mollet IG, Laffan MA, Mauri FA: Endothelial cell processing and alternatively spliced transcripts of factor VIII: potential implications for coagulation cascades and pulmonary hypertension. *PLoS ONE* **5**: e9154, 2010.
- 33) Fahs SA, Hille MT, Shi Q, Weiler H, Montgomery RR: A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII. *Blood* **123**: 3706–3713, 2014.
- 34) Everett LA, Cleuren AC, Khoriaty RN, Ginsburg D: Murine coagulation factor VIII is synthesized in endothelial cells. *Blood* **123**: 3697–3705, 2014.
- 35) Liu J, Yuan L, Molema G, Regan E, Janes L, Beeler D, Spokes KC, Okada Y, Minami T, Oettgen P, Aird WC: Vascular bed-specific regulation of the von Willebrand factor promoter in the heart and skeletal muscle. *Blood* **117**: 342–351, 2011.
- 36) Goodeve AC: The genetic basis of von Willebrand disease.

- Blood Rev **24**: 123–134, 2010.
- 37) Piétu G, Ribba AS, Chérel G, Siguret V, Obert B, Rouault C, Ginsburg D, Meyer D: Epitope mapping of inhibitory monoclonal antibodies to human von Willebrand factor by using recombinant cDNA libraries. *Thromb Haemost* **71**: 788–792, 1994.
- 38) Jorieux S, Gaucher C, Piétu G, Chérel G, Meyer D, Mazurier C: Fine epitope mapping of monoclonal antibodies to the NH2-terminal part of von Willebrand factor (vWF) by using recombinant and synthetic peptides: interest for the localization of the factor VIII binding domain. *Br J Haematol* **87**: 113–118, 1994.
- 39) Shiltagh N, Kirkpatrick J, Cabrita LD, McKinnon TA, Thalassinou K, Tuddenham EG, Hansen DF: Solution structure of the major factor VIII binding region on von Willebrand factor. *Blood* **123**: 4143–4151, 2014.
- 40) Yee A, Gildersleeve RD, Gu S, Kretz CA, McGee BM, Carr KM, Pipe SW, Ginsburg D: A von Willebrand factor fragment containing the D' D3 domains is sufficient to stabilize coagulation factor VIII in mice. *Blood* **124**: 445–452, 2014.
- 41) Zhang B, Zheng C, Zhu M, Tao J, Vasievich MP, Baines A, Kim J, Schekman R, Kaufman RJ, Ginsburg D: Mice deficient in LMAN1 exhibit FV and FVIII deficiencies and liver accumulation of α 1-antitrypsin. *Blood* **118**: 3384–3391, 2011.