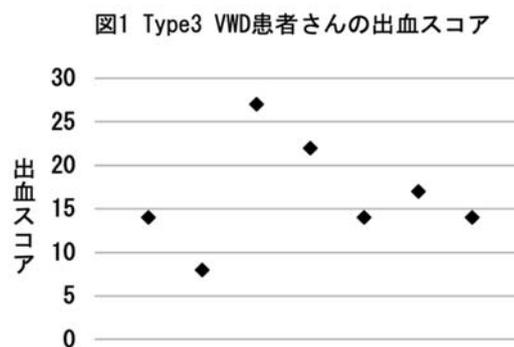


von Willebrand 病(VWD)のユニークな病因遺伝子変異を同定 —Type3 VWD の新たな分子病態が明らかに—

名古屋大学医学部附属病院 輸血部の松下正教授、鈴木伸明講師、医学系研究科 血液・腫瘍内科学の清井仁教授、岡本修一当時大学院生らの研究グループは、von Willebrand 病(VWD)の最重症型である Type3 VWD の発症に関わる新規遺伝子変異 VWF c8254G→A (p.Gly2752Ser)を同定し、その分子病態について検討を行いました。

von Willebrand factor (VWF)は主に血管内皮細胞で産生され、多量体(multimer)構造を呈する糖蛋白質で、血管損傷部位における血小板の粘着・凝集(一次止血)や流血中の第 VIII 因子の安定化作用を担っています。この VWF の量的・質的異常によって出血傾向を生じる病気が VWD です。

VWD は 3 病型に大別されますが、最重症型である Type3 は、「VWF の完全欠損」によって出血傾向を生じ、頻回の VWF 含有製剤の補充を余儀なくされます。松下教授らは、その出血症状の程度には幅があり(図 1)、中には出血症状が軽度で VWF 含有製剤による頻回の補充を必要としない患者さんがいることに注目していました。



今回、その理由を調べるために、患者さんの協力を得て、遺伝子解析、血液と血管内皮細胞レベルにおける VWF 発現の状態を検討する機会を得ました。その結果 p.Gly2752Ser という新たな遺伝子変異を同定しました。

また、この遺伝子異常は、VWF 蛋白を構成する「ダイマー」という分子の形の成り立ちを阻害する可能性があり、p.Gly2752Ser では血液中に健常人の 1/100 程度の VWF が存在し、さらに血管内皮細胞レベルでもわずかに発現していることを確認しました。加えて、この遺伝子変異を強制発現させることで、変異 VWF についてより詳しい検討を行いました。

現在 type3 VWD は「VWF の完全欠損」と理解されていますが、今回の研究成果は、type3 VWD には「VWF の完全欠損」に収斂され得ない、より複雑で多様な病態が包含されている可能性を示すとともに、その病態が出血症状の程度に幅をもたらしていることから、治療に多様性を持たせる必要性を推察できるものです。

本研究は名古屋大学医学部生命倫理委員会の承認を得て行いました。(承認番号 2015-0391, 2016-0477)本研究成果は「Journal of Thrombosis and Haemostasis」誌(2022 年 8 月 20 日版)に掲載されました。

ポイント

- 本研究で、von Willebrand 病(VWD)の最重症型「type3 VWD」の新たな病因遺伝子変異である p.Gly2752Ser を同定しました。
- p.Gly2752Ser は VWF 分子のダイマー形成を阻害し、血液、血管内皮細胞レベルでの微量な VWF の発現を認め、Type3 VWD には「VWF の完全欠損」という既存の概念よりも複雑な分子病態が含まれることを確認しました。
- 本研究結果は、type3 VWD 患者さんの止血治療(製剤選択と投与量、投与間隔を設定)を最適化するための重要な情報となることが期待されます。

1. 背景

von Willebrand factor (VWF) は血管内皮細胞から産生・分泌され、血管損傷部位における血小板粘着・凝集(一次止血)や流血中の第 VIII 因子の安定性を維持する糖蛋白質です。VWF の量的・質的異常によって出血傾向をきたす疾患が von Willebrand 病(VWD)で、3 病型に大別されます。特に、最重症型の type3 VWD は「VWF の完全欠損」を意味し、患者さんは、出血症状のために頻回の製剤輸注を余儀なくされます。しかし、その中には、出血症状が軽度で頻回の製剤輸注を必要としない患者さんがいることに着目し、「VWF の完全欠損」という概念にとどまらない、より複雑な病態が包含されている可能性を考えました。止血治療における製剤選択や投与量、その間隔を最適化する上で、この「出血症状の程度の差」を生じる病態は興味深い点のひとつです。そこで、この出血症状が軽度な type3 VWD 患者さんの協力を得て、遺伝子解析やより詳しい VWF 蛋白質の解析を行い、分子病態の面から出血症状の差について検討を行いました。

2. 研究成果

出血症状が軽度な type3 VWD 患者さんの血液から DNA を抽出し遺伝子解析を行ったところ、新規変異である VWF c8254G→A(p.Gly2752Ser)が同定されました。これは VWF 分子の末端に位置する CK domain というダイマー形成に関わる場所のアミノ酸が変異したものです。

患者さんの血液を調べると、健常人の 1/100 程度の VWF が検出されました。さらに VWF の産生部位である血管内皮細胞レベルでの VWF 発現を確認するために、血液の細胞から endothelial colony forming cell (ECFC)を樹立し実際に VWF が分泌される様子を観察したところ、微量の VWF が発現していることが確認されました(図 2)。即ち、type3 VWD ながら体内で微量の VWF が発現する場合がありますと考えられました。

変異 VWF についてさらに詳しく検討するため、p.Gly2752Ser を変異発現させるための担体(ベクター)を作製して、モデル細胞に強制発現させた VWF(rVWF-Gly2752Ser)を回収し、これを用いて VWF 蛋白質の解析を行いました(図 3)。

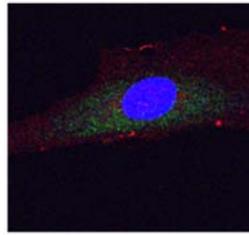
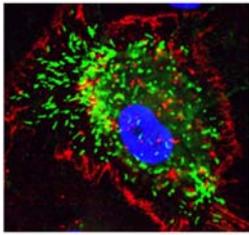


図2 健康人由来ECFC(左側)と患者さん由来ECFC(右側) 緑色がVWF

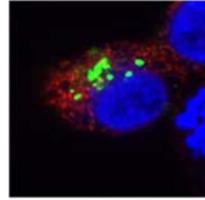


図3 モデル細胞に強制発現させたrVWF 緑色がrVWF

本来、VWF は細胞内の「小胞体」という器官で二量体(ダイマー)を形成します。ダイマーが「Golgi 体」という器官に輸送され、ダイマー同士が重合して多量体(multimer)を形成し細胞外に分泌されていきます(図 4)。

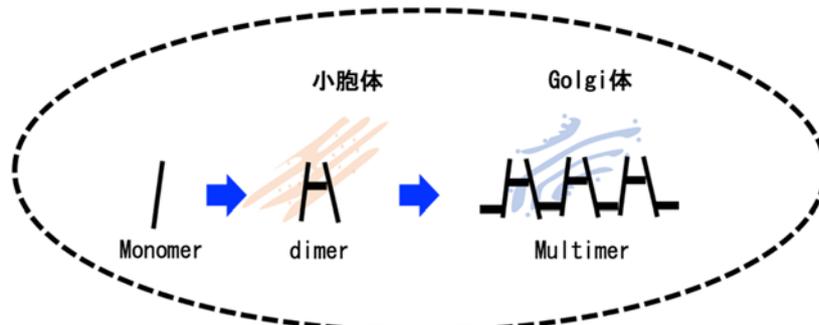


図4 VWF分子の重合過程

p.Gly2752Ser では、小胞体における正常なダイマーの形成が障害され、Golgi 体への輸送がうまくいかずに多量体が形成できないことが明らかとなりました。

血液や強制発現系における検討では、p.Gly2752Ser 変異は VWF の完全欠損型ではありませんでしたが、ダイマーの形成異常によって細胞外へ分泌される VWF が著しく減少し、Type3 VWD の病態を呈していることが判明しました。

この報告は Type3 VWD の分子病態が、「VWF の完全欠損」という既存の概念よりも多様な病態を包含していることを示唆する重要な報告です。また、この微量の VWF が、出血症状が軽度という本例の臨床的な特徴に関与していた可能性が示唆されます。

3. 今後の展開

本研究の結果から、Type3 VWD は一様に「VWF の完全欠損」を意味するのではなく、より複雑で多様な病態を含んでいることが明らかとなりました。松下教授らのグループは、今後も我が国における Type3 VWD の出血症状と遺伝子・変異蛋白の解析から成る包括的な病態解析の集積を進めていきます。そして、得られた情報をもとに、それぞれの患者さんの病態に立脚した、製剤選択とその投与量、投与間隔の調整をはかり、より細やかな止血治療の実現へと展開させていくことが目標です。さらに補充療法における最大の合併症である VWF インヒビター(補充した VWF の効果を打ち消してしまう蛋白質)出現のリスク因子を特定する手がかりをつかみ、患者さんの診療へ還元していきます。

4. 発表雑誌

掲雑誌名 : Journal of Thrombosis and Haemostasis

論文タイトル : VWF-Gly2752Ser, a novel non-cysteine substitution variant in the CK domain, exhibits severe secretory impairment by hampering C-terminal dimer formation

著者・所属名 :

岡本 修一 名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻 血液・腫瘍内科学
田村 彰吾 名古屋大学大学院医学系研究科 総合保健学専攻 オミックス医療科学
大平 晃也 名古屋大学大学院医学系研究科 総合保健学専攻 オミックス医療科学
三田 直美 名古屋大学医学部附属病院 医療技術部 臨床検査部門
早川 友梨 名古屋大学大学院医学系研究科 総合保健学専攻 オミックス医療科学
向出 将人 名古屋大学大学院医学系研究科 総合保健学専攻 オミックス医療科学
鈴木 敦夫 名古屋大学医学部附属病院 医療技術部 臨床検査部門
兼松 毅 名古屋大学医学部附属病院 検査部
早川 文彦 名古屋大学大学院医学系研究科 総合保健学専攻 オミックス医療科学
勝見 章 国立長寿医療研究センター 血液内科
清井 仁 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学
小嶋 哲人 愛知健康推進財団
松下 正 名古屋大学医学部附属病院 輸血部・検査部
鈴木 伸明 名古屋大学医学部附属病院 輸血部

DOI: 10.1111/jth.15746

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Jou_220822en.pdf