

課題番号 73

フォン・ヴィレブランド因子の構造・機能・抗原量と血液型の関連解析

[1] 組織

代表者：橋口 照人

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

対応者：堀内 久徳

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

山口 宗一 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

竹之内 和則 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

東 貞行 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

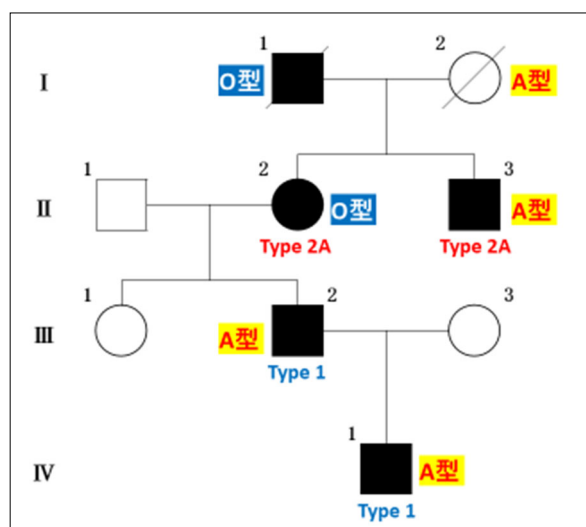
中島 篤人 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

申請者および共同研究者はフォン・ヴィレブランド病 (VWD) の同一家系内において、タイプ 1 である発端者 (母親) とタイプ 2A である発端者の子 (長男) で認められるフォン・ヴィレブランド因子 (VWF) 抗原量の違いに着目し研究を進めている。下記に家系図を示す。

【図1】家系図



既に本家系の発端者および発端者の子については全エクソーム解析まで終了し、VWF に共通の遺伝子変異 (Arg 1374 His) があることを明らかにしている。文献検索の結果、この遺伝子変異に関する報告は、いずれもタイプ 2A であった。また、同一家系内の VWD において、同じ遺伝子変異を有するにも関わらず表現型が異なる報告はこれまでにない。

本研究は、この家系から得られた VWF 抗原量の差について検討を加えるもので、遺伝子変異及び ABO 血液型の観点から VWF 抗原量に影響を及ぼす原因因子の特定及び機序の解明を目的としている。解析を行うにあたり申請者及び共同研究者は、以下の方法を用いた研究計画を立案し、研究を開始した。

- (1) 全エクソーム解析の再検討を行う。本家系における遺伝子変異の解析より、VWF の抗原量を制御する分子の候補を挙げる。これらの候補分子の VWF 抗原量を制御する機序について検討する。
- (2) 当該家系の VWF のマルチマー解析を行い、VWF の機能異常を検討する。
- (3) ABO 式血液型による VWF 抗原量の差異を検討するために、ABO 式血液型に特有な細胞表面糖鎖解析の検討を行う。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて VWF の糖鎖解析を行う。
- (4) 培養血管内皮細胞は VWF を産生・分泌する。培養ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) とヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) からの VWF の産生分泌機構を血液型と上記の候補分子の観点から検討する。また、本家系における VWF 分解酵素 (ADAMTS13) の活性について検討する。

現在、上記(1)、(2)の遂行中である。

また、本研究を遂行するにあたり必要な倫理審査については、本学の倫理委員会の承認を得ている。現時点で遺伝子組換え実験、動物実験は計画していない。

① 受付番号：190123 疫

「出血傾向・血栓傾向を有する患者の血小板機能・凝固機能・血管機能の解析研究 (単施設研究)」

② 受付番号：390 号

「止血異常症を有する患者の止血関連遺伝子の解析研究」

申請者は日本血栓止血学会の評議員であり、同学会の理事である東北大学加齢医学研究所の堀内久徳教

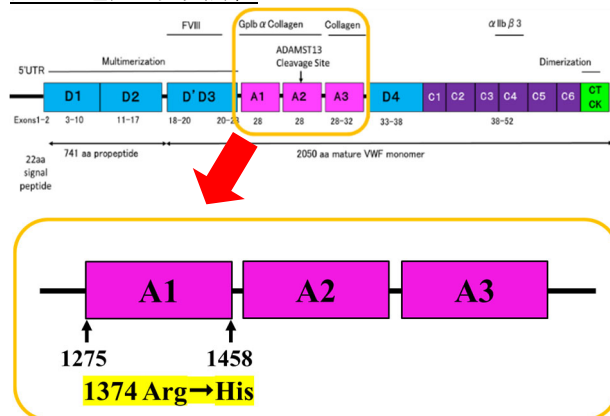
授とは日頃より研究について交信している。また研究分担者との情報共有については、カンファレンスや定期的な研究打ち合わせを行い、本研究の進捗状況の確認を行っている。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

発端者はVWF抗原量及び凝固第Ⅷ因子活性は正常であるが、VWF リストセチンコファクター活性が10%程度と低下していたことからVWDタイプ2Aと診断された。一方で、発端者の子(長男)はVWF抗原量、VWF リストセチンコファクター活性、凝固第Ⅷ因子活性が10%程度と低下していたため、VWDタイプ1と診断された。この両者には共通して、リストセチン添加による血小板凝集能の低下と、遺伝子解析による Arg 1374 His 変異 (c.4121 G > A, Heterozygous) が確認された(図2)。この Arg 1374 His のアミノ酸変異は、血小板膜糖タンパク質 GPIb α と VWF が相互作用する A1 ドメインに位置し、このアミノ酸変異によって VWF と GPIb α の結合能が抑制されて VWF の機能が低下している可能性が示唆された。また、サンガー法によるシーケンス解析においても同様の変異が確認できた。

図2：遺伝子変異部位



本年度は新型コロナウイルス感染拡大の影響を受け、東北大学加齢研究所での血液を用いたVWFマルチマ一解析、ADAMTS13活性測定等の手技取得には至らなかったが、研究経費を用いて今後の解析するにあたり必要な試薬、備品が購入できたため、今後本学においても、堀内教授ご指導の下、手技を確立し、VWF機能解析を行っていく予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

これまで同一家系内のVWDで、異なったタイプの表現型を示す報告はないことから、VWFのSNP変異と糖鎖の関係を明らかにするこの申請は独自性、新規性に富むものであり、また、得られた結果は実臨床

に活かされるため、社会貢献度は高いと考える。また、「血液型O型のヒトにおいてVWF抗原量が低値であるのは何故か」の命題を解決することの意義は大きく、本研究の成果は血漿中の抗原量に関連するVWFの分泌機構と血液型との関連についても新規の知見を与えると考える。

[4] 成果資料

(1) 学会発表

「親子間で病型の異なるフォン・ヴィレブランド病の一家系」:中島 篤人、山口 宗一、吉村 明子、古城 剛、小濱 祐行、竹之内 和則、大山 陽子、政元 いずみ、高嶋 博、橋口 照人
第41回 日本血栓止血学会学術集会, 2019年(奈良市)

(2) 学会発表

「親子間で病型の異なるフォン・ヴィレブランド病の一家系」:中島 篤人、山口 宗一、吉村 明子、古城 剛、小濱 祐行、竹之内 和則、大山 陽子、政元 いずみ、高嶋 博、橋口 照人
第65回 日本臨床検査医学会九州地方会、第31回 日本臨床化学会九州支部会, 2020年(福岡市)
以上