

課題番号 37

止血タンパク質 von Willebrand 因子の加齢に伴う構造変化

[1] 組織

代表者：小亀 浩市

(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：

樋口(江浦) 由佳 (国立循環器病研究センター)

研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

von Willebrand 因子 (VWF) は血小板凝集を仲介する血漿タンパク質である。VWF の機能障害は出血症の原因に、機能亢進は血栓症の原因になるため、VWF 機能検査は重要な臨床的指標となる。

VWF の機能は、血中濃度だけでなく、特殊な構造にも依存する。VWF は数十個の VWF ポリペプチド鎖が共有結合した巨大マルチマー (約 20,000kDa) として血管内皮細胞から分泌される。VWF マルチマーは、血小板表面分子への結合を介して血小板を凝集させるが、その凝集能はマルチマーのサイズが高いほど高い。血漿には VWF 切断酵素 ADAMTS13 が存在し、マルチマーのサイズ調整を行う。したがって、VWF は合成やマルチマー形成、分泌、分解等によって多段階に機能調節される。

血漿 VWF のサイズ分布を調べる方法として、VWF マルチマー解析法があり、これは SDS 含有アガロースゲル電気泳動とウエスタンブロッティングを組み合わせた手法である (図)。しかし、手技的な困難性等のため、解析法の標準化や疫学研究は非常に難しい。加齢医学研究所の堀内久徳教授は、マルチマー解析法の標準化を提唱されており、その具体的方法を模索しながら、各種循環器疾患と VWF マルチマーの関連を見出す研究を主導しておられる。そこで本研究では、加齢に伴う VWF マルチマーの構造変化を明らかにすることを目的とした。

前年度までに、堀内教授と共に、VWF マルチマー解析の詳細な手技や結果分析法等の標準化をおこない、その信頼度の高さも証明してきた。手技や結果分析法については、堀内教授らの方法と我々の方法を詳

細に比較し、必要な場合は相違点等を調整・修正した。血漿検体については、堀内教授が高齢者を含め収集された約 2000 検体の一部を利用した。

堀内教授とは現在進行中の共同研究を開始する以前から学会等で接点があり、血小板機能や血液凝固、循環器疾患に関する議論をしばしば行ってきた。本年度も、電子メールおよび電話による頻回の連絡だけでなく、共通の学会活動や研究班会議においてオンラインを用いた対面の打ち合わせを実施することで、効率よく計画を進めることができた。

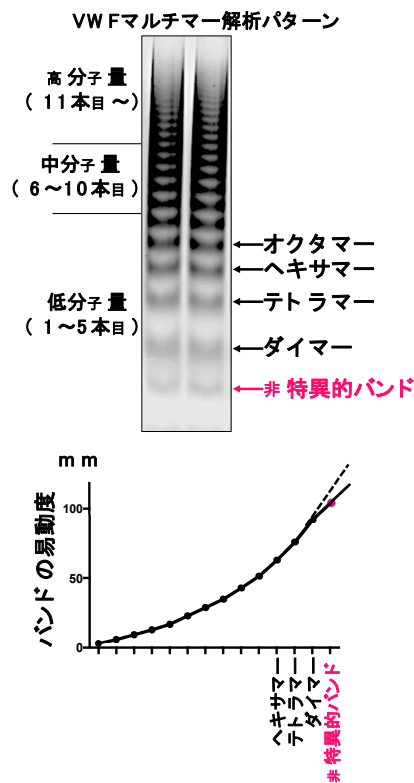


図. VWFマルチマー解析におけるダイマーとその直下の非特異的バンド

[3] 成果

(3-1) 研究成果

VWF マルチマー解析を複数の施設で実施しても、その解析結果を適正に比較検討することができるように、前年度までに、詳細な手技や結果分析法等の標準化を堀内教授らと共に進め、その信頼度についても、VWF マルチマー解析、および他の VWF 量測定法との相関を指標に検討し、本研究の信頼度が高いことを

証明した。

今年度は、それにしたがって、堀内教授が中心となって収集した約 2000 の血漿検体の一部と標準血漿を定抗原量にて解析した。その解析のなかで、頻用される VWF 抗体で検出される非特異的バンドの影響についても精査した。我々は、VWF マルチマーを定量的に評価するため、VWF ダイマーのバンドから 5 本ずつ区切り、低分子量 (1~5 本目)、中分子量 (6~10 本目)、高分子量 (11 本目~) に分けて、それらのバンド強度の割合を算出している。このとき、ダイマーがどのバンドであるかを正しく特定できなければ、その結果は誤った割合を導き出してしまふ。そして、我々は、このダイマーの特定に影響を及ぼす非特異的バンドを見出した (図)。この非特異的バンドは、あたかも VWF マルチマーの一つのようなシグナルを呈するが、その易動度が、ほかの VWF マルチマーバンドと異なる性質を持つことから見分けることができた (図)。これは、VWF 抗体に由来する非特異的バンドであり、国内外で頻用される複数の VWF 抗体で見られることも確認した。VWF マルチマーを定量評価する際には、ダイマーの特定に慎重になることが重要である。また、昨年度までの結果により、高分子量 VWF マルチマーの割合を示す値、すなわち Large Multimer Index (LMI) は、被検血漿の VWF 抗原量に依存することが明らかになっており、定血漿容量と定抗原量のどちらが、より臨床症状に合致した結果を導けるかについては、引き続き検討中である。さらに、疾患による VWF マルチマー異常の違いや普遍性を見出すため、さまざまな疾患の患者での解析を実施している。

(3-2) 波及効果と発展性など

VWF の機能評価は凝固系検査として有用であるが、方法の標準化の困難性や疫学的研究データの不足等により、検査結果の解釈に問題がある。病態判断の指標となる正常値 (基準値) も明確でなく、臨床利用するには多くの課題を解決する必要がある。本共同研究では、VWF 機能に影響をもたらすマルチマー構造が加齢と共にどのように変化するかを調べることで、各年齢層の基準値設定に寄与することができる。両施設 (加齢研と国循) で共通の方法で解析を行い、その結果を比較検討することは、臨床検査として必要な標準化への準備になると期待できる。

VWF マルチマー構造を年齢層別に比較検討することで、血栓形成傾向や VWF 抗原量が加齢に伴って上昇することとの関連を見出し、さらに、将来の臨床検査に有用な基礎データを確立したい。今後、さらに解析数を増やし、LMI を年齢層別に比較検討することで、血栓形成傾向や VWF 抗原量が加齢に伴って上昇することとの関連を見出したい。

[4] 成果資料

- (1) Experience of the use of octreotide for refractory gastrointestinal bleeding in a patient with Jarvik2000® left ventricular assist device. Nakajima-Doi S, Seguchi O, Shintani Y, Fujita T, Fukushima S, Matsumoto Y, Eura Y, Kokame K, Miyata S, Matsuda S, Mochizuki H, Iwasaki K, Kimura Y, Toda K, Kumai Y, Kuroda K, Watanabe T, Yanase M, Kobayashi J, Fukushima N: *J. Artif. Organs*, 22(4): 334-337 (2019)
- (2) Acquired von Willebrand syndrome associated with cardiovascular diseases. Hisanori Horiuchi, Tsuyoshi Doman, Koichi Kokame, Yoshikatsu Saiki, and Masanori Matsumoto: *J. Atheroscler. Thromb.*, 26(4): 303-314 (2019)