

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患等政策研究事業) 分担研究報告書

VWFマルチマー解析の標準化とADAMTS13活性測定

研究分担者	松本雅則	奈良県立医科大学	輸血部	教授
研究協力者	早川正樹	奈良県立医科大学	輸血部	助教
	酒井和哉	奈良県立医科大学	輸血部	診療助教

**研究要旨**

von Willebrand因子 (VWF) は、ずり応力依存的にADAMTS13により分解され、様々な分子量で血液中に存在する。VWFは分子量が大きいほど血小板血栓形成能が強く、高分子量VWFマルチマーの欠損は2型のvon Willebrand病 (VWD) として出血傾向を示す。最近、大動脈弁狭窄症 (AS) に合併する消化管出血 (Heyde症候群) の原因が、大動脈弁狭窄部での高いずり応力によりVWFがADAMTS13により過剰に切断される後天性von Willebrand症候群 (AVWS) であることが報告された。AS以外の様々な循環器疾患や、機械的補助循環等でもAVWS合併例が発見されているが、現状では体系的な解析の報告はなく、それぞれの疾患でAVWSや出血傾向を来す頻度すら明らかになっていない。

そこで我々はAVeC studyにおいて、様々な循環器疾患に伴うAVWSの病態解析を多施設共同研究で実施し、症例の登録及び検体の収集をすでに開始している。まず、診断の中心となるVWFマルチマー解析の検査を担当する3施設の標準化を実施し、ほぼ完成した。また、これらの検体のADAMTS13活性の測定は全て奈良医大が実施する予定で、168検体の解析では70.9±21.6%とやや低めの結果であった。

このようにAVeC studyで実施する検査は、準備が整ったので、次年度以降本格的な検査を行い、病態解析を進めて、日本の循環器疾患に伴うAVWSの実体解明を行う予定である。

**A. 研究の目的**

止血因子であるvon Willebrand因子 (VWF) は、主として血管内皮細胞で産生され、ずり応力依存的にADAMTS13により分解され、様々な分子量で血液中に存在するが、最大で2,000万ダルトンの巨大分子である。VWFの先天的欠損や機能異常は、出血性疾患であるvon Willebrand病 (VWD) となる。VWFは分子量が大きいほど血小板血栓形成能が強く、VWFの高分子量マルチマーの欠損は2型VWDとして出血傾向を示す。

最近、大動脈弁狭窄症 (AS) に合併する消化管出血 (Heyde症候群) の原因が、大動脈弁狭窄部での高いずり応力によりVWFが過剰に切断される後天性von Willebrand症候群 (AVWS) であることが報告された。このAVWSは2A型VWDと同様の病態であるが、未だ我が国の多くの診療現場では本病態は存在すら知られていない。さらに、高ずり応力が生じ得る肺動脈性肺高血圧や慢性血栓性肺高血圧症、(閉塞性) 肥大型心筋症等の難病や、重症の拡張型心筋症等による重症心不全治療の最終治療手段である機械的補助循環等でもAVWS合併例が発見されている。このように種々の循環器疾患で驚くほど高頻度に出血素因が出現しているが、現状では体系的な解析の報告はなく、それぞれの疾患でAVWSや出血傾向を来す頻度すら明らかになっていない。

ADAMTS13による過剰切断によるAVWSの診断は、VWFマルチマー解析が中心となる。この解析は、巨大分子のwestern blotであり、高度な技術を要する。本年度我々は、解析施設のVWFマルチマー解析において標準化した結果を得るために検査条件を検討し、AVeC studyで集積した検体でADAMTS13活性の測定を開始した。

**B. 研究方法**

AVeC study は、事務局を東北大加齢学研究所基礎加齢研究分野 (堀内久徳教授) に置き、解析施設3施設 (東北大、奈良医大、国立循環器病研究センター: 国循) と9つの医療施設が参加している。症例登録や検体採取はすでに開始されているが、AS症例が最も多く、2018年3月現在で387症例1728検体を集積し、解析を始めている。その他の疾患では僧帽弁狭窄症が68症例、234検体、肺高血圧症38症例65検体、先天性心疾患25症例、104検体などである。それ以外にも機械的補助循環に発生するAVWSも対象としているが、補助人工心臓 (LVAD) 研究は、東北大学心臓血管外科 齊木佳克先生がAMED研究費を取得され、LVAD-AVWS研究班として発展した。AVeC study と協調しながら症例の登録を進めている。

奈良医大のVWFマルチマー解析では、1.2%アガロ

ースゲル(グリセロール入)を用いて電気泳動を行い、タンク式のプロッティング装置を用いて、ニトロセルロース膜に転写した。検体の泳動は、標準血漿(NP:シーメンス社製)を同じゲル内で実施した。その結果をdensitometryで解析したが、一番低分子のバンドを1番とし、11番目以降を高分子量マルチマーと定義した。患者血漿の高分子量VWFマルチマー領域の面積を標準血漿の高分子量マルチマー面積で除した値を高分子量VWFマルチマーindexとした。

ADAMTS13活性は、Katoら(Transfusion, 2005)によって報告されたELISAを用いた。この方法は、ADAMTS13によってVWFが切断された場合の断端である1605番目のチロシンを特異的に認識するモノクローナル抗体を利用している。

なお、解析した検体の臨床症状は、現在のところ我々には開示されていない。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、奈良医大をはじめ参加施設の倫理委員会の許可を受けて実施した。

### C. 研究成果

2018年3月末までに奈良医大で解析した102検体の高分子量VWFマルチマーindexは $67.7 \pm 24.9\%$  (mean $\pm$ SD)であった。健常人では100%となると考えられるので、今回解析した症例はかなり低いと考えられ、高分子量マルチマーの欠損が予想された。この結果を他の2つの解析施設の結果と比較すると、国循とは $r=0.68$ 、東北大学とは $r=0.59$ であり高い相関を認めた。ただ、国循と東北大との相関は、 $r=0.85$ と非常に高い結果であった。

ADAMTS13活性は168検体で測定し、 $70.9 \pm 21.6\%$ であった。健常人のADAMTS13活性は50-150%と考えられており、やや低いと考えられる。特にADAMTS13活性が50%未満の検体が23/168(13.7%)もあり、今後活性が低い検体はどのような症例であるのか確認する必要がある。

### D. 考察

VWFマルチマー解析は、実施する3施設において、ほぼ標準化できたと考えられる。ただし、奈良医大のVWFマルチマー解析の方法は、他の2施設と全く異なるため、高分子量VWFマルチマーindexの比較では他の2施設と奈良医大の相関係数はやや低かった。散布図で確認すると低いものは低く、高いものは高く一致しているが、今後AVWSの診断基準を決定するときに、このindexのばらつきが問題となる可能性がある。診断基準の境界領域の数値が出た場合は、複数の施設で解析して比較するなどの工夫が必要であるかもしれない。

ADAMTS13活性は、健常人と比較するとやや低い傾向が認められた。50%未満の検体も約10%あり、最低値は30.5%であった。奈良医大で検討した重症ASの手術前のADAMTS13活性は中央値50.5%で、手術後3週間まではさらに低下していた。AVeC studyに登録される症例は、高齢であり、重症AS症例が多いと考えられるため、妥当なADAMTS13活性のレベルかもしれない。今後ADAMTS13活性測定を継続し、解析を重ねていきたい。

### E. 結論

VWFマルチマー解析は、ほぼ標準化できた。ADAMTS13活性は今後も測定を継続するが、やや低い傾向が認められた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

論文発表

1. Akutagawa T, Shindo T, Yamanouchi K, Hayakawa M, Ureshino H, Tsuruoka N, Sakata Y, Shimoda R, Noguchi R, Furukawa K, Morita S, Iwakiri R, Kimura S, Matsumoto M, Fujimoto K. Persistent Gastro-intestinal Angiodysplasia in Heyde's Syndrome After Aortic Valve Replacement. *Intren Med* 56:2431-2433, 2017
2. Yamashita M, Matsumoto M, Hayakawa M, Sakai K, Fujimura Y, Ogata N. Intravitreal injection of aflibercept, an anti-VEGF antagonist, down-regulates plasma von Willebrand factor in patients with age-related macular degeneration. *Sci Rep* 24:1491, 2018
3. Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H, Uike K, Kinjo T, Ochiai M, Yamamura K, Takada H, Tanoue Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Hara T, Ohga S. Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. *Pediatr Neonatol*. In press

学会発表

1. 久保政之, 酒井和哉, 早川正樹, 松本雅則, 八木秀男. 本態性血小板症におけるフォンウィルブランド因子マルチマー解析の重要性について. 第39回日本血栓止血学会学術

#### 別紙 4

集会, 名古屋国際会議場、2017 年 6 月 10 日

2. Horiuchi H, Matsumoto M, Kokame K. A proposal of VWF large multimer index for standardization of the quantitative description of VWF multimers among laboratories. The 63rd Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Berlin, July 8th, 2017.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし