

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

フォンウィルブランド因子マルチマー解析法の標準化

研究分担者 小亀浩市 (国立循環器病研究センター・分子病態部・部長)  
研究協力者 樋口由佳 (国立循環器病研究センター・分子病態部・上級研究員)

研究要旨: ある種の循環器難病や大動脈弁狭窄症、補助人工心臓装着等では、血液に過度の高張り応力がかかり、血漿タンパク質であるフォンウィルブランド因子 (VWF) の分解が亢進する。そのため、後天性フォンウィルブランド症候群 (aVWS) と呼ばれる出血性疾患を合併することがある。これを正確に診断するには、VWF のマルチマー解析が必須である。VWF マルチマー解析では、超巨大分子を解析するための高度な技術が要求されるため、実施可能な施設は限られ、さらに各施設独自の方法で行われる。本研究では、標準化を進めた VWF マルチマー解析方法から得られたデータを 3 施設で比較し、そのマルチマー状態の反映具合や解析精度を精査した。この検討は、aVWS の重症度を見極める目的に適した解析方法の開発に大いに貢献できると期待される。

A. 研究目的

ファロー四徴症や肥大型心筋症、肺動脈性肺高血圧症、慢性肺血栓性肺高血圧症等の循環器難病や大動脈弁狭窄症、補助人工心臓装着等では、血液に過度の高張り応力がかかる。そのため、止血に必要な血漿タンパク質であるフォンウィルブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) の分解が亢進し、出血性疾患を合併することがある。この病態を診断するには、VWF の解析が必須である。

VWF の生合成においては、約 250kDa の VWF モノマー (1 本のポリペプチド鎖) が小胞体でダイマー (二量体、約 500kDa) となり、さらにゴルジ体で数十個が連結したマルチマー (多量体、 $<20000$ kDa) となる。血中に分泌されたのち、血漿プロテアーゼ ADAMTS13 で切断され、様々なサイズの VWF マルチマー (500~15000kDa) として血中を循環する。

VWF マルチマーのサイズが大きいほど、血小板凝集能は高い。ADAMTS13 活性の著減によって超高分子量マルチマーが蓄積すると、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) と呼ばれる血栓性疾患につながる。これと対照的に、高分子量マルチマーが不足すると、フォンウィルブランド病 (von Willebrand disease; VWD) あるいはフォンウィルブランド症候群 (von Willebrand syndrome; VWS) と呼ばれる出血性疾患につながる。

VWF マルチマーは、その構造的特性上、物

理的力 (引張力) を受けることで伸展し、ADAMTS13 による切断効率が上昇する。ある種の循環器難病や大動脈弁狭窄症、補助人工心臓装着等では、VWF マルチマーは引張力を受ける。そのため、ADAMTS13 による切断が異常に亢進し、高分子量マルチマーが不足する。このような病態を後天性 VWS (acquired VWS; aVWS) と呼ぶ。

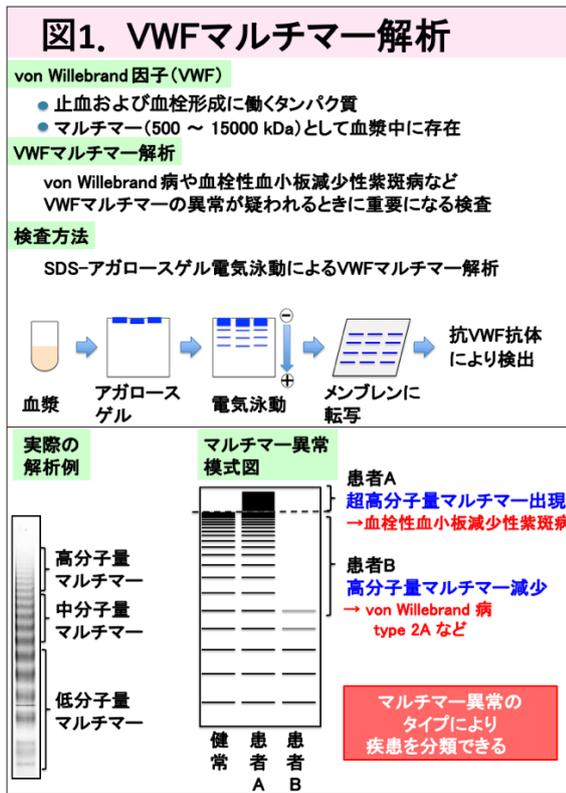
aVWS を正確に診断するには、VWF マルチマーの状態を調べる必要がある。しかし、500~15000kDa におよぶ巨大分子を解析することは、一般のタンパク質化学的手法になく、特殊な技術を要する。そのため、施行可能な研究室は限られている。また、それぞれの研究室で独自の方法で行われてきており、共通の指標でデータを解釈することが難しい。そこで本研究では、3 施設で VWF マルチマーの解析方法および定量法を標準化することを目的とした。

B. 研究方法

VWF マルチマー解析の標準化

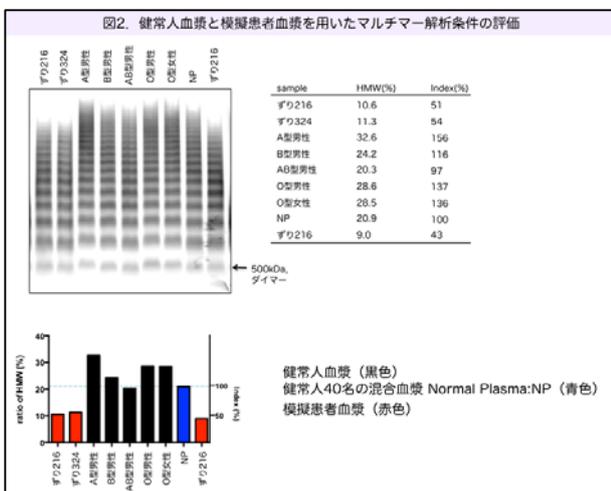
基礎解析を担当する 3 施設 (東北大学、奈良県立医科大学、国立循環器病研究センター) が会合し、マルチマー解析の解析条件について討議した (図 1)。

これら 3 施設には従来からマルチマー解析の実施実績はあったが、その方法には異なる点が多かった。そこで、解析方法を標準化



するために、まず大まかな解析条件を揃え、同一のサンプルを解析した結果を比較検討しつつ、さらに標準化を進めていった。主な内容は、アガロース組成、アガロース濃度、バッファ組成、電気泳動装置、泳動条件、転写条件などであった。また、得られた泳動結果の解析方法についても、デンシトメトリーでのバンドの定義の差異（例えば、どのバンドをVWFマルチマーのダイマーと見なすか、その指標に何をを用いるか）等について検討した。

マルチマー解析結果の数値化（定量化）にあたっては、東北大学堀内教授が提唱しているVWF高分子マルチマーindex (Tamura et

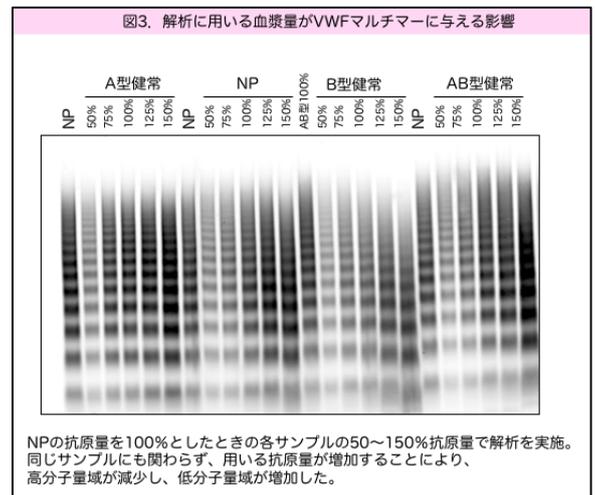


al, J Atheroscler Thromb, 22, 1115-23, 2015) を用いることとした。

標準化した方法を用いて、1) 健常人の血漿、2) 40名の健常人の血漿を混合した標準血漿、3) 人工的なずり応力負荷でVWFマルチマーを切断して高分子量を欠失させた血漿（模擬aVWS患者血漿）で解析し、数値化を試みた（図2）。その結果、健常人と模擬aVWS患者血漿は、どの施設においても分離よく区別されたことから、この方法でさらに次の検討へと進めた。

### マルチマー解析に用いる血漿量の影響

解析のための泳動に供する血漿の量について、VWF抗原量一定、あるいは血漿容量一定のどちらがより適しているかについて検討した。解析を進めるなかで、同じサンプルであっても、用いた血漿量が増加するにつれて高分子量が相対的に減弱していくことが明らかとなった（図3）。このことより、解析に用いる血漿量は解析結果に大きな影響を与えるファクターであり、まずはVWF抗原量一定または血漿容量一定の両方法で解析を実施し、どちらがaVWSの発症リスクや重症度と強く関連するかを判断することとなった。

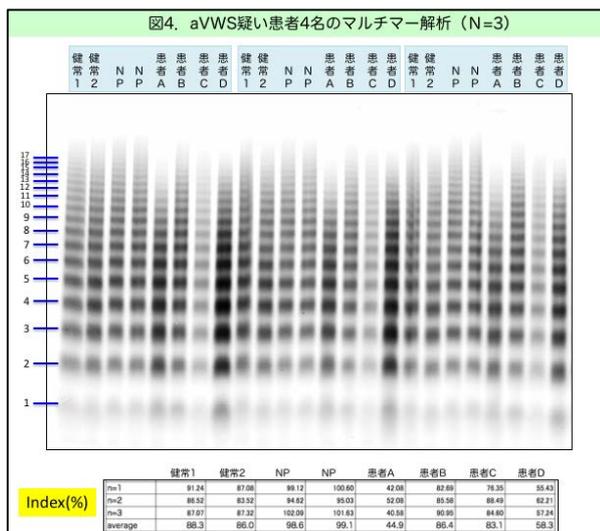


### C. 研究結果

得られたデータの一例を示す。aVWS疑いの患者血漿を用いて、これまでに標準化した方法にて解析をおこなった。まず血漿容量一定での解析をおこなった。その結果、標準血漿に比べて、再現性良く高分子量域の減弱化

を検出し、VWF 高分子マルチマーindex の値も標準血漿に比べて低い数値を示した (図 4)。この結果より、患者間でも VWF 高分子マルチマーindex の値に開きがあることも判明した。aVWS 重症度と関連する可能性があることから、今後の検討課題となった。現在は、大動脈弁狭窄症の患者約 300 名の術前術後等の約 1000 検体について、順次、3 施設での解析を進めているところである。

#### D. 考察



今回、標準化を進めた VWF マルチマー解析方法から得られたデータを 3 施設で比較し、その精度や効果について検討した。また、用いる血漿量が VWF 高分子マルチマーindex に与える影響や、抗原量と血漿容量のどちらが aVWS の重症度を見極める本研究の目的に適した方法かなど、昨年度よりさらに踏み込んだ検討をおこなった。

#### E. 結論

VWF マルチマーの解析法の 3 施設による共同検討を行い、方法の標準化、特に血漿量がマルチマーに与える影響について精査し、重症度の判定に適した解析方法について検討できた。臨床検体を用いた病態解析もすでに開始し、今後も継続して進める予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nirav Dhanesha, Prakash Doddapattar, Mehul R. Chorawala, Manasa K. Nayak, Koichi Kokame, Janice M. Staber, Steven R. Lentz, and Anil K. Chauhan: ADAMTS13 retards progression of diabetic nephropathy by inhibiting intrarenal thrombosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (7), 1332-1338 (2017)

Natalia Torrealba, Mario Navarro-Marquez, Valeria Garrido, Zully Pedrozo, Diego Romero, Yuka Eura, Elisa Villalobos, Juan Carlos Roa, Mario Chiong, Koichi Kokame, and Sergio Lavandero: Herpud1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy by inducing IP3 receptor degradation. *Sci. Rep.* 7 (1), 13402 (2017)

Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Hideo Wada, Koichi Kokame, Yoshitaka Miyakawa, Yasunori Ueda, Satoshi Higasa, Takanori Moriki, Hideo Yagi, Toshiyuki Miyata, and Mitsuru Murata: Diagnostic and Treatment Guidelines for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) 2017 in Japan. *Int. J. Hematol.* 106 (1), 3-15 (2017)

Mario Navarro-Marquez, Natalia Torrealba, Rodrigo Troncoso, Cesar Vasquez-Trincado, Marcelo Rodriguez, Pablo E Morales, Elisa Villalobos, Yuka Eura, Lorena Garcia, Mario Chiong, Amira Klip, Enrique Jaimovich, Koichi Kokame, and Sergio Lavandero: Herpud1 impacts insulin-dependent glucose uptake in skeletal muscle cells by controlling the Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-Akt axis. *Biochim. Biophys. Acta* 1864 (5 Pt A), 1653-1662 (2018)

Madoka Fujisawa, Hideki Kato, Yoko Yoshida, Tomoko Usui, Munenori Takata, Mika Fujimoto, Hideo Wada, Yumiko Uchida, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata, and Masaomi Nangaku: Clinical characteristics and genetic backgrounds

of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. Clin. Exp. Nephrol., in press.

松本雅則, 藤村吉博, 和田英夫, 小亀浩市, 宮川義隆, 上田恭典, 日笠聡, 森木隆典, 八木秀男, 宮田敏行, 村田満: 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 診療ガイド 2017. 臨床血液 58 (4), 271-281 (2017)

舩越康智, 岡田雅彦, 松本雅則, 小亀浩市, 森内浩幸: 先天性血栓性血小板減少性紫斑病の兄弟例. 臨床血液 58, 933-937 (2017)

## 2. 学会発表

小亀浩市: 先天性 TTP の遺伝子解析を通して分かること. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会, 名古屋, 2017 年 6 月 8-10 日.

Hisanori Horiuchi, Masanori Matsumoto, and Koichi Kokame: 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, Germany, July 8-13, 2017.

H Kato, Y Ito, H Kashiwagi, Y Morikawa, K Akuta, N Nishiura, S Honda, K Kokame, T Miyata, Y Kanakura, and Y Tomiyama: Complete failure of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation in kinetic assay associates with severe bleeding problems in a patient with kindlin-3 deficiency. The 26th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.

大和恵子, 中城有香子, 井本(山本)ひとみ, 小亀浩市, 宮田敏行, 片岡大治, 高橋淳, 柳本広二: 活性化プロテイン C (APC) の臨床的用量が実験的脳梗塞の進展を抑制する. 第 40 回日本神経科学大会, 千葉, 2017 年 7 月 20-23 日.

菅原有佳, 加藤秀樹, 藤澤まどか, 吉田瑤子, 内田裕美子, 小亀浩市, 宮田敏行, 秋岡祐子, 三浦健一郎, 服部元史, 南学正臣: 全ゲノム解析により CFHR 領域の新規融合遺伝子を認めた C3 腎症例. 第 54 回日本補体

学会学術集会, 福島, 2017 年 9 月 1-2 日.

Koichi Kokame: Platelet aggregation balanced by von Willebrand factor (VWF) and ADAMTS13. ACCDiS Workshop, Santiago, Chile, September 25, 2017.

Koichi Kokame and Yuka Eura: Genetic, biochemical, and physiological approach to understanding the function of Herp and Derlin family proteins in ER-associated degradation machinery. XL Annual Meeting of Chilean BMB Society, Puerto Varas, Chile September 26-29, 2017.

大和恵子, 中城有香子, 井本(山本)ひとみ, 小亀浩市, 宮田敏行, 片岡大治, 高橋淳, 柳本広二: 活性化プロテイン C (APC) の急性期投与がマウス脳梗塞の進展を抑制する. 日本脳神経外科学会第 76 回学術総会, 名古屋, 2017 年 10 月 12-14 日.

K. Yamato, Y. Nakajo, H. Yamamoto-Imoto, K. Kokame, T. Miyata, H. Kataoka, J.C. Takahashi, and H. Yanamoto: A clinically relevant dose of activated protein C (APC) suppresses the development of experimental cerebral infarction. Neuroscience 2017, Washington, DC, USA, November 11-15, 2017.

大和恵子, 中城有香子, 井本(山本)ひとみ, 小亀浩市, 宮田敏行, 片岡大治, 高橋淳, 柳本広二: 活性化プロテイン C (APC) の脳梗塞縮小効果とそのメカニズム: マウスを用いた検討. 第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会, 大阪, 2017 年 11 月 3-4 日.

根木玲子, 伊田和史, 光黒真菜, 岡本章, 小亀浩市, 宮田敏行: 稀な部位で静脈血栓症を発症した発端者を契機に遺伝子解析を行った先天性アンチトロンビン欠乏症タイプ I 家系の検討. 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 神戸, 2017 年 11 月 15-18 日.

伊田和史, 根木玲子, 光黒真菜, 岡本章, 辻明宏, 小亀浩市, 宮田敏行: 静脈血栓症の再発を認めたプロテイン S 欠乏症患者における PROS1 遺伝子解析. 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 神戸, 2017 年 11 月 15-18

別紙 4

日.

大和恵子, 中城有香子, 井本(山本)ひとみ,  
小亀浩市, 宮田敏行, 片岡大治, 高橋淳,  
柳本広二: エダラボンとの比較における活  
性化プロテインC (APC)の脳保護効果の検討.  
第 43 回日本脳卒中学会学術集会, 福岡,  
2018 年 3 月 15-18 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし