

主論文の要旨

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

CK domainにおける非cysteine残基の1塩基置換である
VWF p.Gly2752Ser変異はC末端における二量体形成を阻害し
重度の細胞外分泌障害を呈する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

岡本 修一

【緒言】

von Willebrand factor (VWF) は、主に血管内皮細胞で産生され、血管損傷部位での血小板粘着や流血中での第Ⅷ因子の維持に関わる多量体 (multimer) 構造を呈する糖蛋白質である。VWF の multimer 構造は止血機能に必須の構造であり、cysteine 残基を介した disulfide (S-S) 結合によって形成される。VWF monomer が小胞体において C 末端 (CK domain) の S-S 結合を介して C-terminal dimer を形成後、Golgi 体への移送を経て N 末端 (D'D3 domain) の S-S 結合を介し N-terminal dimer 形成することで multimer 構造を生じる。血中に分泌された VWF は A Disintegrin-like and Metalloproteinase with Thrombospondin type I motifs 13 (ADAMTS13) によって multimer が適切な大きさに切断されることで血栓形成性が調節される。

VWF の量的・質的異常によって止血障害をきたす疾患が von Willebrand disease (VWD) である。VWD は 3 病型に大別される。最重症型の Type3 VWD は、血中 VWF 抗原量 (VWF:Ag) <5% で強い出血傾向を呈する。その分子病態は多様であるが、例えば CK domain の cysteine 残基に missense 変異を生じると、C-terminal dimer に関わる S-S 結合が破綻し type3 VWD を生じることがある。しかし CK domain における cysteine 残基以外の missense 変異が type3 VWD の病因となった例は報告されていない。

【目的】

VWF サブユニットの CK domain における新規変異である *VWF* c.8254 G>A (p.Gly2752Ser) をホモ接合体で有する type3 VWD の 1 例について、変異 VWF の分子病態について検討を行った。

【対象および方法】

患者は 49 歳男性、幼少期の繰り返す鼻出血を機に VWD と診断、血中 VWF:Ag は検出感度未満と報告されていた。国際血栓止血学会による ISTH/SSC 出血評価スコアは 8 点と他の type3 VWD 患者に比して出血傾向は軽度であった。

患者由来検体を用いた検討

遺伝子解析は、患者血液から DNA を抽出し Next generation sequence と Sanger 法によって行った。患者血中 VWF 蛋白について、enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) による VWF:Ag 測定、SDS-agarose 電気泳動と Western blot による multimer 解析を行った。血管内皮細胞における VWF の発現状態は、患者末梢血単核球から樹立した endothelial colony forming cell (ECFC) の免疫蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

変異遺伝子の強制発現実験による検討

野生型 VWF (VWF-WT) を一過性に発現させるベクターである pSVVWF1 をもとに変異型ベクター (pSVVWFG2752) を作製し、COS-7 細胞または HEK293 細胞に一過性

に導入して recombinant VWF (rVWF) の強制発現系を構築した。発現した rVWF について、ELISA 法による細胞外分泌量の測定と multimer 解析、小胞体/Golgi 体との細胞内共局在について免疫蛍光染色を行い検討した。

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った(承認番号 2015-0391、2016-0477)。

【結果】

患者由来検体を用いた検討

患者は *VWF* c.8254G→A (p.Gly2752Ser) 変異をホモ接合体で有し、父・母・長男・次男はヘテロ接合体で有していた (Figure1 A-B)。combined annotation dependent depletion (CADD) と Grantham score はそれぞれ 32 点、56 点で本変異が VWF の構造や機能に与える影響は比較的強いと考えられた。

患者血中 VWF の検討では、健常人の 1.2% (0.12 μ g/mL) の VWF:Ag が検出された。multimer 解析では高分子量域から中分子量域が広範に欠損し、monomer と dimer から成る特徴的な構造を呈した (Figure1C)。

ECFC の免疫蛍光染色では、微量ながら核周囲に限局した VWF の発現を認めた (Figure2)。

病因遺伝子の強制発現系による検討

強制発現系における検討では、rVWF-Gly2752Ser は患者血中 VWF と同様に細胞外分泌が著しく低下し (Figure3A)、multimer 構造は高分子量域から中分子量域にかけて広範に欠損していた (Figure3B)。HEK293 細胞を用いて rVWF と小胞体/Golgi 体との細胞内局在の程度を検討したところ、rVWF-Gly2752Ser では rVWF-WT に比して小胞体と強く共局在していたが、Golgi 体との共局在はほとんど認めなかった (Figure4)。

CK domain において Gly2752 は Ser2756 と水素結合を形成する (Figure5A)。Gly2752Ser は cysteine 残基の直接的な障害はないが、Ser2756 との水素結合の破綻が C-terminal dimerization の障害に影響している可能性が考慮された。Ser2756 を alanine に置換した rVWF-Ser2756Ala、rVWF-Gly2752Ser-Ser2756Ala について multimer 解析を行ったところ、Gly2752Ser 変異の病態に Gly2752-Ser2756 間の水素結合の破綻が関与していることが示された (Figure5B)。

【考察】

VWF c.8254 G>A (p.Gly2752Ser) 変異では、multimer 構造が広範に障害された微量の VWF が検出され、病型分類は type3 VWD であった。

rVWF-Gly2752Ser の検討では、小胞体から Golgi 体への細胞内移送障害によって Golgi 体における N-terminal dimer の形成不全を生じ、multimer 構造の形成が障害されていると考えられた。また、Gly2752-Ser2756 との水素結合の破綻が病態に関与していることが示唆された。

【結語】

Type3 VWD の新規変異である *VWF* c.8254 G>A (p.Gly2752Ser)変異は、CK domain における C-terminal dimer の形成障害と、それに伴う小胞体から Golgi 体への細胞内移送障害によって重度の細胞外分泌障害を呈した。