フォン・ヴィレブランド病の分子生物学的診断と診療への応用

志田泰明*, 野上恵嗣

Molecular diagnosis of von Willebrand disease for clinical management

Yasuaki SHIDA and Keiji NOGAMI

要約：フォン・ヴィレブランド病(von Willebrand disease; VWD)は最も頻度の高い遺伝性出血性疾患である。フォン・ヴィレブランド因子(von Willebrand factor; VWF)が量的あるいは質的に欠損することで多様な形式を示す疾患である。1970年代にVWFが同定され、1985年にクローニングがなされて以来、VWDおよびVWFに対する理解は飛躍的に進歩してきた。近年では分子生物学の進歩により遺伝子解析がすすめられ、病型ごとに責任変異の特定が試みられてきた。これらの成果により、VWD Type 2 および 3 では遺伝子診断が病型診断に有用となってきた。とくに Type 2 では、重症度の判定や治療への反応の予測にまで応用でき得る状況になってきた。一方、VWD Type 1 は複雑な疾患群であることが明らかになってきた。2006年にはコホート研究や Genetic linkage and association (GWAS) study, 2010年には Cohort for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology (CHARGE) study により、新たな病因が提唱されるに至っているが、まだ遺伝子診断を臨床に応用するには時間が必要であると考えられる。

Key words: von Willebrand factor (VWF), von Willebrand disease (VWD), molecular diagnosis

1. はじめに

1926年、フィンランド人医師である Erik von Willebrand が遺伝性出血性疾患として von Willebrand 病(von Willebrand disease; VWD)を世界で初めて報告した。Erik が注目したのは、バルト海、Åland 諸島にある Föglö 島と呼ばれる島出身の患者家族「S」であった。この家族では4児中2児が消化管出血、1児が舌出血で死亡している。発端者も重篤な症状を呈しており、5歳までに口唇や複数の足関節の出血をみとめ、14歳の時には月経過多で瀕死の状態までに悪化した。Erik は家族66人を調べ、第1報では明確な結論に至っていないものの、この疾患は常染色体優性形質として遺伝し、とりわけ女性に発

現すると考えた。また、この症状は重度な血小板機能障害と血管壁の異常によるものであろうと考え、hereditary pseudo-hemophilia という病名で報告するに至った。この家族「S」は現在では VWD Type 3 であり、その症状はフォン・ヴィレブランド因子(von Willebrand factor; VWF)の欠損に起因するものだったことが知られている。

続いて VWD が報告されたのは1957年である。ストックホルムの医師 Inge Marie Nilsson と Margareta Blombäck が、出血時間延長と anti-hemophilic globulin (後に第 VIII 因子(FVIII)であることが判明した)の低下を特徴とする症例を報告したのであった。その後、1971年に VWF というタンパクの存在が明らかになり、1985年には4つのラボがほぼ同時期に VWF cDNA のクローニングを成功させ、VWD の分子生物学的解析の幕開けとなった¹⁻⁴⁾。本稿では VWD の分子生物学的特徴とその臨床応用の可能性を中心に解説する。

奈良県立医科大学小児科

*責任者連絡先:

奈良県立医科大学小児科

〒634-8522 奈良県橿原市四条町 840

Tel: 0744-29-8881, Fax: 0744-24-9222

E-mail: y-shida@naramed-u.ac.jp

図1 von Willebrand factor (VWF) の構造

プレプロ VWF (2813 個のアミノ酸) から 22 個のシグナルペプチド, 741 個のプロペプチドが外れ, 2050 個のアミノ酸からなる成熟サブユニットとなる。これらが N 末, C 末同士で結合し最終的にマルチマー構造をとる。

2. VWF の基礎的背景

VWF の遺伝子は 12 番染色体短腕に存在し, 178 kb の遺伝子をコードしており, 52 個のエクソン, 約 9 kb の VWF の mRNA を含んでいる。22 番染色体には VWF のエクソン 23 から 34 遺伝子と 97% の相同性を示す pseudo 遺伝子があり, VWD の遺伝子解析をやや困難にしている⁵⁾。

VWF タンパクは血管内皮と巨核球で合成され, その産生までには様々な合成後修飾を経る (図 3)。2813 個のアミノ酸からなるプレプロ VWF とよばれる前駆タンパクが生成されると, 小胞体 (ER) まで輸送され, 22 個のシグナルペプチドが外れ, ゴルジ装置に移される。ここで 741 個のプロペプチドが外れ, 2050 個のアミノ酸からなる成熟サブユニットとなる。この成熟サブユニットの各々が以下の結合部位を有している (図 1) ; FVIII (D'D3 ドメイン), 血小板 GPIIb (A1 ドメイン), コラーゲン (A1, A3 ドメイン), 血小板 GPIIb/IIIa (C4 ドメイン)。これらにより血小板粘着凝集に貢献し, また不安定な凝固因子 FVIII を安定化し, 分解から守っている⁶⁾。

このような VWF 成熟サブユニットは, VWF 産生過程で C 末, N 末どうしが結合して多数連なっ

たマルチマー構造をとる。2000 万 Da にもおよぶ超巨大なマルチマーであるが, VWF の機能と密接に関連しているため VWF の機能を考える上で非常に重要である (図 1)。マルチマーのサイズが大きければ大きいほど血小板結合能が強くなる (図 2)。とくに high molecular weight multimer (HMWM) と呼ばれるサイズのマルチマーが止血に重要で, それよりも小さいものは血小板粘着の役割を果たさない。しかし, 逆に血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) にみられるように, 超巨大マルチマー (ultra-large VWF; ULVWF) が存在すると過剰な血小板凝集を引き起こすことになる。すなわち, マルチマーのサイズは大きすぎず, 小さすぎず, という微妙な調節が必要になっている。この調節の主役を ADAMTS13 が担っている。ADAMTS13 は VWF の A2 ドメインにある Tyr1605-Met1606 を切断してマルチマーサイズを調節する。産生された VWF マルチマーは血中に直接分泌されるか, あるいは血管内皮細胞の Weibel-Palade Body (WPB), 血小板の α 顆粒に貯蔵され, 必要時に放出されることとなるが, いずれにせよ血中に出た直後の VWF マルチマーは ULVWF を含んでいる。ULVWF は部分的に ADAMTS13 に切断され, 適切

図2 適切な止血には適切な VWF マルチマーサイズの制御が必要

TTP: 血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura)

に止血が行われるサイズに調節されて血中に存在する。他の酵素-基質反応とは異なり、ADAMTS13の活性発現には血流という流体力学的な要素が重要であると考えられている。毛糸の玉のように丸くたまれている VWF マルチマーが血流により部分的に引き延ばされ、A2 ドメインが露出したときにのみ切断されるというメカニズムが考えられている^{7,8)}。適切なサイズに調節された VWF マルチマーは血液中を巡回するわけであるが、その後どのように代謝されていくのかについても不明な点が多い。近年クリアランスレセプターの存在も注目されており、一部の VWD の病因となっていると考えられている。

3. VWF の分類

VWD は VWF の量的欠損(低下: Type1, 完全欠損: Type 3), 質的欠損(Type 2)に定義, 分類される(表1, 2)。

Type 1 は VWD 患者の 70–80% を占め, VWF:Ag の低下を認めるが, VWF:RCo/VWF:Ag 比は異常を認めない。

Type 2 は機能異常の種類により 4 型(2A, 2B, 2M, 2N)に分類される。Type 2A, 2B, 2M では VWF:Ag の低下も認めることが多いが, VWF:RCo の低下の方が著明で, VWF:RCo/VWF:Ag<0.6 となる。Type 2A と 2M では血小板粘着能の低下を認める。Type

2A では HMWM の消失によるが, Type 2M では VWF における血小板に結合する部位の遺伝子変異に起因するもので, マルチマー構造は正常である。Type 2B は A1 ドメインにおけるミスセンス変異により血小板結合が異常亢進する gain-of-function 変異により発症する。しかしながら実際の症状は血栓症ではなく, 逆に血小板減少と HMWM 消失により出血症状を認める。これは過剰に発生する血小板凝集のために, 血小板や VWF が消費されるためと考えられるが, 他の機序として ADAMTS13 による切断亢進や血小板, VWF のクリアランスの亢進なども報告されている。Type 2N は VWF パラメーターには異常がなく, FVIII:C の低下(5–40%)を認める。診断には FVIII 結合試験が必要である。

Type 3 は VWF:Ag が 2% 以下で定義される重篤な VWF の欠損であり, 最も稀な病型である。VWF が非存在化では FVIII も不安定となり FVIII:C は 10% 未満である。頻度は地域によるが, 100 万人に 0.1–5 人といわれる。

4. 各病型における分子生物学的特徴

近年の分子生物学の進歩により, VWD の遺伝的背景は徐々に明らかになってきた。とくに Type 2 および 3 に関する理解は相当に進んできたが, 一方で Type 1 は, まだその理解は十分ではない。現在の遺伝子検査の役割を表2, 遺伝子異常の分布を図3に示す。

① Type 1 :

VWF の合成, 分泌, クリアランスのステップのどこかで異常があれば VWD Type 1 を発症する可能性があると考えられている(図4)。これだけでも多様な疾患であることが容易に想像できるように, VWD Type 1 は後述する VWD Type 2, 3 とははっきり異なり, 遺伝的背景は非常に複雑で, 解析も困難である。いくつか, あるいは多数の優性形質からなるとされ, 浸透率や表現度にもばらつきがある。血中 VWF レベルの推定される遺伝率は~30%から 75%と, 解析手法により異なる^{9,10)}。

2006 年に後述するコホート研究の結果が発表されるまでは, VWD Type1 における遺伝子異常は明らかではなかった。当時から最も影響が大きい因子

表1 VWDの検査上の特徴および治療

	正常	Type 1	Type 2A	Type 2B	Type 2N	Type 2M	Type 3	血小板型
VWF:Ag	N	↓	↓	↓	↓またはN	↓またはN	↓↓↓	↓
VWF:RCO	N	↓	↓↓↓	↓	↓またはN	↓↓↓	↓↓↓	↓
FVIII:C	N	↓またはN	↓またはN	↓またはN	↓↓	N	↓↓↓	N
RIPA	N	↓またはN	↓	N	N	↓	N	N
血小板数	N	N	N	↓	N	N	N	↓
マルチマー構造	N	N	↓↓	↓	N	N	欠如	↓
治療	—	DDAVP			FVIII/VWF 濃縮製剤			血小板輸血

N：正常

表2 VWDの分類と各病型における遺伝子解析の意義

VWD の病型		有病率 (%)	遺伝子解析の成功率 (%)	遺伝子解析の意義
1	軽度/中等度の量的欠損	75	～65	不明
2A	質的欠損	～8	～85	病型診断
2B		～8	～85	病型診断 重症度判定
2M		～2	～85	病型診断
2N		～8	～85	病型診断 重症度判定
3	重度の量的欠損	<1	～85	病型診断, 遺伝カウンセリング

図3 VWDの遺伝子変異部位

として知られていたのはABO(H)血液型であった。VWD Type 1における遺伝的な影響因子の30%を占めると言われ^{9, 11)}、O型グループにおけるVWFレベルはその他の血液型に比べて約25%低値を示す

ことはよく知られた事実である¹¹⁾。そのメカニズムとしてはVWFクリアランスの亢進が考えられており¹²⁾、VWF合成時における複雑な糖鎖付加現象と関連していると考えられている。VWFサブユニットには12個のN型、10個のO型糖鎖が存在し、VWFの重量の20%をも占めると言われている^{13, 14)}。ABO(H)抗原はN糖鎖のほとんどに結合しており、さらに不均一ではあるが～13%程度は他の糖鎖にも存在する。ABO(H)血液型以外に、糖鎖に関連して血中VWFレベルに影響する因子が存在するかどうかは依然不明である。

近年、VWD Type 1患者の中にVWFクリアランスが亢進する病型(VWD Type 1C)が存在することが明らかになった。VWFプロペプチド(VWFpp)/

図4 VWFのライフサイクル
血管内皮細胞で産生されたVWFは種々の修飾を経て直接分泌されるか、WPB (Weibel-Palade-Body) に貯蔵され、放出される。血中に出たVWFはADAMTS13による調節をへて血中を巡回し、最終的に代謝される。クリアランスレセプターによる肝細胞、肝臓類洞内皮細胞、マクロファージによる取り込みなどが考えられている。

VWF:Ag比を間接的なVWFクリアランスの指標として解析された報告によれば、Type 1C患者はType 1のうち約15%存在する^{23, 24)}。この新概念のプロトタイプはヴェチェンザ変異(*p.R1205H*)として知られており²⁵⁾、その特徴は以下のようなものである。VWF:Agは～15%、著明に上昇するVWFpp/VWF:Ag比(しばしば10以上)、デスモプレシン(DDAVP)に対する異常な反応(DDAVPの投与に反応して血中VWFレベルは4-10倍程度と過剰な上昇が見られるものの、その半減期は3時間以内と短い)、VWFマルチマーの異常は限定的であるが、時に超高分子マルチマーを認める²⁶⁾。他のVWF Type 1Cに分類される変異はVWFのD3領域に報告されており、この領域がVWFクリアランスに重要であることが推測される。DDAVPに対する反応が異なるため、臨床的にもこのTypeの診断は重要である。

2006年VWD Type 1の遺伝的背景を解析した4つのコホート研究の結果が発表された¹⁵⁻¹⁷⁾。約500人のVWDタイプ1患者の発端者において、VWFのコーディング領域、スプライス部位、プロモーター領域が解析されたところ、患者の65%にVWDの

発症に関連していると考えられる責任遺伝子変異の候補が同定された。これらの結果はこれら4研究で一貫していただけてだけでなく、2006年に発表されたGenetic linkage and association study (GWAS study)とも一致していた^{18, 19)}。15%の発端者に1つまたはそれ以上の変異の存在が確認されている。VWFレベルが低値であるほうが変異が同定される確率は上がるようで、VWF:Agが30%以上であれば75%、30%以下であれば50%の発端者に変異が認められたとの報告もある¹⁷⁾。ここで指摘された変異の中には、*p.Y1584C*、*p.R1205H*、*p.R924Q*、*p.R1315C*など、何度もVWD責任遺伝子変異として報告されているものも含まれていたが²⁰⁾、これらが実際にVWD Type1の発症に関与しているかどうかは明確にはなっていない。変異のなかには*in vitro*、*in vivo*の実験において重要性が指摘されているものがある^{21, 22)}。大多数の変異に関しては実際の症状との関連は不明である。さらに複雑なことに、同じ変異でも人種によってもその意義が異なる。実際、アフリカ系アメリカ人の60%以上に、VWDの責任変異とされていた遺伝子異常が健常人にも発見され、出血

症状とは関連がなかったと報告された。VWD Type1の疾患背景の複雑さを物語っており、更なる解析が待たれる。

遺伝子解析が進められるにしたがって、今後 phenotype と genotype との関連は徐々に明らかになってくるものと思われる。前述の大規模研究において、～35%の発端者である患者において VWF のコーディング領域、スプライス部位、プロモーター領域には変異が検出されていないことから、今後は VWF インترون領域や、より離れた場所に存在する転写調節領域の解析も進むものと思われる。1つの遺伝子変異ではなく、SNP の組み合わせが VWD の発症に重要であるかもしれない²⁷⁾。

最近、VWF 遺伝子以外の部位が VWF レベル影響を与えることが注目され始めた。このきっかけになったのが、2010 年に発表された Cohort for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology (CHARGE) study である²⁸⁾。健常人における血中 FVII, FVIII, VWF レベルと遺伝子の関連が解析されているのだが、特記すべき結果として、新しい 5 つの遺伝子部位が同定された(表 3)。STXBP5 (Syntaxin binding protein 5), STX2 (Syntaxin 2), SCARA5 (Scavenger receptor class A member 5), STAB2 (Stabilin 2), CLEC4M (C-type Lectin Type 4 member M) である。前者 2 つの遺伝子は VWF の生合成時の、小胞輸送、貯蔵、放出にかかわるタンパクを、後者 3 つはレセプタータンパクをコードしていることがわかった。さらに CLEC4M に関しては、VWF に結合して細胞内に取り込むことが証明された。CLEC4M 遺伝子における polymorphism が血中 VWF レベルに影響すると報告されており²⁹⁾、これらの因子も VWD の発症に関連している可能性があり興味深い。

② Type 2 :

Type 2 は 4 つの Subtype (2A, 2B, 2N, 2M) に分類されるが、いずれもタンパクは産生されるもののその機能に異常が認められる。2N 以外の 3 種類は常染色体優性遺伝形式、2N は常染色体劣性遺伝形式をとる。大部分の Type 2 における異常は図 3 に示すように、それぞれの機能異常を示す部分に異常を認める。すなわち、血小板 (2A, 2B, 2M)、コラーゲン (2M)、FVIII (2N) という具合である。遺伝子診断が確定診断に有用であるだけでなく、重症度や治

表 3 CHARGE study により明らかになった血中 VWF レベルに影響する遺伝子部位

小胞輸送、貯蔵、放出に関連するタンパク	受容体タンパク
STXBP5	SCARA5
STX2	STAB2
	CLEC4M

STXBP5 (Syntaxin binding protein 5), STX2 (Syntaxin 2), SCARA5 (Scavenger receptor class A member 5), STAB2 (Stabilin 2), CLEC4M (C-type Lectin Type 4 member M)

療への反応性の予測などに使用されることが期待される。

Type 2A :

Type 2A は高分子マルチマー (HMWM) の喪失により血小板粘着障害が生じる。HMWM 消失の機序は 1) VWF マルチマーを産生、分泌する過程での障害と、2) ADAMTS13 による切断の亢進、二つに大きく分けて考えられているが、実際にはこれらが複雑に絡み合っている症例もあるようである。70 種類以上の異常が報告されており、その 95% がミスセンス変異で、さらにその 80% の変異はエクソン 28 に存在する。これらのほとんどは A2 ドメインにおけるアミノ酸変異である(図 3)。この部分以外にも少数ではあるが、プロペプチドや C 末側の最末端における異常も存在し、マルチマーやダイマーの形成を阻害しているものと考えられる。

Type 2A の診断は VWF:Ag, VWF:RCO, マルチマー解析, RIPA (ristocetin-induced platelet aggregation) によって通常は可能である。今後は遺伝子解析が進めば、DDAVP 治療への反応性や臨床的重症度の予測などへの使用が期待される。

Type 2B :

Type 2B 変異は VWF の A1 ドメインの血小板 GPIIb/IIIa に対する結合が増強している gain-of-function 変異である。常に VWF が Active な状態となり、自然に血小板凝集を認め、血小板減少、HMWM 消失へとつながる。これまで 20 種類以上の変異が報告されているが、すべて VWF 遺伝子のエクソン 28 にあり、血小板 GPIIb/IIIa と反応する A1 ドメインの異常がほとんどである。p.R1341Q, p.R1308C, p.R1306W

などの頻度が高いが、*p.V1316M* 変異は以前に Montreal platelet disorder (現在では VWD Type 2B のひとつと理解されている)の原因であったことは興味深い。

遺伝子異常と重症度には相関があることが知られており、ストレスや妊娠等に伴い悪化する血小板減少やそれに伴う出血を予測するのに有益である。変異部位がエクソン 28 に集中しているために比較的遺伝子検索は容易であり、VWD のサブタイプ診断にも有用である(図 3)。すなわち、初期検索で VWF Type 2B を疑う症例(VWF:RCo/VWF:Ag 比の低下、高分子マルチマーの欠損、RIPA の増強等)ではエクソン 28 を検索することで診断を確定することができる。逆に遺伝子検査で異常をみとめない場合には血小板型 VWD の可能性を考慮すべきである。

Type 2M :

Type 2M は Type2B とは逆の、血小板粘着関連機能における loss-of-function 変異により引き起こされる。血小板 GPIIb 結合サイトである VWF A1 ドメインの頂部全体にわたりミスセンス変異が報告されており、血小板 GPIIb の β switch 領域との反応が阻害されていると考えられる(図 3)。25 種類以上の報告があり、他の Type の VWD よりも出血症状は軽いことが報告されている。Type 2M はマルチマー構造が正常であり、これにより Type 2A との鑑別が可能である。マルチマー構造が正常である Type 1 と鑑別が難しい症例もあると思われ、確定診断には遺伝子解析が期待される。

もともと Type 2M は血小板 GPIIb に対する結合が低下する病態を意図された分類であったが、近年コラーゲンに対する結合低下を認める新たな VWD が報告されており、これらも Type 2M に分類されている^{30, 31)}。これらの患者は VWF A3 ドメインの異常を有しており、軽度-中等度の出血傾向を呈し、その遺伝パターンは常染色体優性遺伝をとる。VWF A3 ドメインは VWF の主要なコラーゲン結合部位を有しており、I および III 型コラーゲンに結合する。A1 ドメインもコラーゲン結合サイトを有し、I および III 型コラーゲンに加えて VI 型にも結合することが報告されている。ごく最近 VI 型コラーゲンに対する結合が低下する遺伝子異常(*p.R1399H*, *p.S1387I*, *p.Q1402P*)を有する患者が初めて報告さ

れた³²⁾。これらの異常は A1 ドメインに存在する。しかしながらこれらの異常は出血症状のない健常人にも検出されており、その意義については更なる解析を要する状況である。いずれにしても患者によっては VWF:CB が唯一の異常所見であることがあり³³⁾、この検査は出血傾向のスクリーニングに加えていくべきものと考えられる³⁴⁾。重要性を再認識されつつある VWF:CB であるが、使用するコラーゲンのタイプだけでも結果にばらつきが大きく、意義まで異なってくるため測定法の標準化が望まれる。

Type 2N :

Type 2N は常染色体劣性遺伝形式をとり、現在までに 25 種類以上の遺伝子異常が発見されている。遺伝子異常の部位は FVIII に結合する D'D3 領域にあるものが大部分だが、これらに加えて VWF プロペプチドの C 末端での異常も稀ではあるが報告されている(図 3)。生産過程で切り離されるはずのプロペプチドが結合したままになっており、FVIII との結合を阻害するものと思われる³⁵⁾。

VWD Type 2N は劣性遺伝形式であるため、同じ異常が二つ重なったホモ接合体、あるいは別々の異常の組合わさった複合ヘテロ接合体が考えられるが、これに加えてミスセンス + ヌル変異という組み合わせの報告も多い。臨床的に重要な点としては、FVIII:C や DDAVP に対する反応と遺伝子異常には関連があると指摘されている³⁶⁾。頻度の最も高い *p.R854Q* では FVIII:C <25% であり、DDAVP への反応は通常良好であり、軽度の出血は対応可能と考えられる。一方重症例に見られる *p.R816W* や *p.T791M* では FVIII:C <10% であり DDAVP は通常無効である。

③ Type 3 :

Type 3 は元々常染色体劣性遺伝と考えられてきたが、そう単純ではないことがわかってきた。Montgomery らの調査によれば、ヘテロ接合体であるはずの患者においても出血傾向が見られた。約半数の患者は典型的な常染色体劣性遺伝の特徴を見せる一方、残り半数は片方、または両方の親が検査上、あるいは臨床上的 VWD Type 1 の特徴を示し、共優性遺伝しているように推察される³⁷⁾。いずれにせよ、2 つのアレルが Type 3 の発症には必要である。

Type 3 の遺伝子解析は 1987 年に初めて報告されており、遺伝子の完全あるいは部分欠損が、治療用

VWF 製剤に対するインヒビターの発生と関連していたとされている^{38, 39)}。しかし以降、前向き研究などは行われておらず、実際のこのような免疫反応の起こる頻度は不明である。

その後 100 種類以上の異なる Type 3 を引き起こす変異が報告されており、詳細は ISTH データベースで確認可能である。これらの変異部位はプレプロ VWF の N 末端から VWF サブユニットの C 末端まで、と VWF 全長にわたっている(図 3)。これらの変異のほとんどはヌル変異であるが、ミスセンス変異も報告されている。繰り返し報告されている異常としては、1) Åland 島でみつかった小さな欠失(c.2435delC)⁴⁰⁾や、2)エクソン 1-3 をスキップする部分欠失⁴¹⁾、3)エクソン 4-5 の欠失⁴²⁾、があげられる。Type 3 で遺伝子解析を受けている症例数は限られており、その解析範囲は VWF のコーディング領域、スプライス部位、近位のプロモーター領域に限られている。更なる解析が進めばイントロン内の奥深くや、離れた調節因子における異常も特定される可能性もあり更なる研究が待たれる。Type 3 の診断は臨床症状、VWD のルーチン検査と FVIII:C の測定によってされるが、VWF:Ag を低値まで測定できる感度の良い測定系が必要であり、判断が難しい場合には遺伝子診断が有用であろう。また臨床的に重症な病型であるため遺伝カウンセリングにも重要な役割を果たすと考えられる。将来的にはインヒビター発生の予測にも有用かもしれない。

5. おわりに

VWD はヒトの重要な遺伝性疾患モデルといえる。単一遺伝子の劣性遺伝、共優性遺伝、優性遺伝を明快に説明できる病型から、Type 1 のように複雑に多因子が絡み合っている病型まで存在する。遺伝子診断は VWD の確定的診断に有用なだけでなく、病型によっては臨床的重症度や特徴を予測する際に有用であり、今後も発展が期待される。

著者全員の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GA, Latt SA, Orkin SH: Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* **228**: 1401-1406, 1985.
- 2) Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ, Brown M, Morin MJ, Ling EH, Livingston DM: Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method. *Cell* **41**: 49-56, 1985.
- 3) Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW: Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6394-6398, 1985.
- 4) Verweij CL, de Vries CJ, Distel B, van Zonneveld AJ, van Kessel AG, van Mourik JA, Pannekoek H: Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. *Nucleic Acids Res* **13**: 4699-4717, 1985.
- 5) Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE: Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* **30**: 253-269, 1991.
- 6) Koppelman SJ, van Hoeij M, Vink T, Lankhof H, Schiphorst ME, Damas C, Vlot AJ, Wise R, Bouma BN, Sixma JJ: Requirements of von Willebrand factor to protect factor VIII from inactivation by activated protein C. *Blood* **87**: 2292-2300, 1996.
- 7) Shida Y, Nishio K, Sugimoto M, Mizuno T, Hamada M, Kato S, Matsumoto M, Okuchi K, Fujimura Y, Yoshioka A: Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions. *Blood* **111**: 1295-1298, 2008.
- 8) Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA: Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science* **324**: 1330-1334, 2009.
- 9) Orstavik KH: Genetics of plasma concentration of von Willebrand factor. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* **117**: 527-531, 1990.
- 10) de Lange M, Snieder H, Ariens RA, Spector TD, Grant PJ: The genetics of haemostasis: a twin study. *Lancet* **357**: 101-105, 2001.
- 11) Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Montgomery RR: The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* **69**: 1691-1695, 1987.
- 12) Gallinaro L, Cattini MG, Sztukowska M, Padrini R, Sartorello F, Pontara E, Bertomoro A, Daidone V, Pagnan A, Casonato A: A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. *Blood* **111**: 3540-3545, 2008.
- 13) Canis K, McKinnon TA, Nowak A, Panico M, Morris HR, Laffan M, Dell A: The plasma von Willebrand factor O-glycome comprises a surprising variety of structures including ABH antigens and disialosyl motifs. *J Thromb Haemost* **8**: 137-145, 2010.
- 14) Canis K, McKinnon TA, Nowak A, Haslam SM, Panico M, Morris HR, Laffan MA, Dell A: Mapping the N-glycome of

- human von Willebrand factor. *Biochem J* **447**: 217–228, 2012.
- 15) Cumming A, Grundy P, Keeney S, Lester W, Enayat S, Guilliatt A, Bowen D, Pasi J, Keeling D, Hill F, Bolton-Maggs PH, Hay C, Collins P; UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation: An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost* **96**: 630–641, 2006.
 - 16) Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Habart D, Vorlova Z, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Hashemi Soteh M, Baronciani L, Hallden C, Guilliatt A, Lester W, Peake I: Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood* **109**: 112–121, 2007.
 - 17) James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, Brown C, Andrews C, Labelle A, Chirinian Y, O'Brien L, Othman M, Rivard G, Rapson D, Hough C, Lillicrap D: The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood* **109**: 145–154, 2007.
 - 18) Eikenboom J, Van Marion V, Putter H, Goodeve A, Rodeghiero F, Castaman G, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Peake I: Linkage analysis in families diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD. *J Thromb Haemost* **4**: 774–782, 2006.
 - 19) James PD, Paterson AD, Notley C, Cameron C, Hegadorn C, Tinlin S, Brown C, O'Brien L, Leggo J, Lillicrap D; Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada: Genetic linkage and association analysis in type 1 von Willebrand disease: results from the Canadian type 1 VWD study. *J Thromb Haemost* **4**: 783–792, 2006.
 - 20) O'Brien LA, James PD, Othman M, Berber E, Cameron C, Notley CR, Hegadorn CA, Sutherland JJ, Hough C, Rivard GE, O'Shaunessey D, Lillicrap D; Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada: Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease. *Blood* **102**: 549–557, 2003.
 - 21) Eikenboom J, Hilbert L, Ribba AS, Hommais A, Habart D, Messenger S, Al-Buhairan A, Guilliatt A, Lester W, Mazurier C, Meyer D, Fressinaud E, Budde U, Will K, Schneppenheim R, Obser T, Marggraf O, Eckert E, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Goudemand J, Ingerslev J, Lethagen S, Hill F, Peake I, Goodeve A: Expression of 14 von Willebrand factor mutations identified in patients with type 1 von Willebrand disease from the MCMDM-1VWD study. *J Thromb Haemost* **7**: 1304–1312, 2009.
 - 22) Pruss CM, Golder M, Bryant A, Hegadorn CA, Burnett E, Lavery K, Sponagle K, Dhala A, Notley C, Haberichter S, Lillicrap D: Pathologic mechanisms of type 1 VWD mutations R1205H and Y1584C through in vitro and in vivo mouse models. *Blood* **117**: 4358–4366, 2011.
 - 23) Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, Morateck P, Gavazova S, Bellissimo DB, Manco-Johnson MJ, Gill JC, Montgomery RR: Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood* **108**: 3344–3351, 2006.
 - 24) Haberichter SL, Castaman G, Budde U, Peake I, Goodeve A, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Eikenboom J, Schneppenheim R, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill FG, Montgomery RR: Identification of type 1 von Willebrand disease patients with reduced von Willebrand factor survival by assay of the VWF propeptide in the European study: molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD (MCMDM-1VWD). *Blood* **111**: 4979–4985, 2008.
 - 25) Castaman G, Tosetto A, Rodeghiero F: Reduced von Willebrand factor survival in von Willebrand disease: pathophysiologic and clinical relevance. *J Thromb Haemost* **7** (Suppl 1): 71–74, 2009.
 - 26) Mannucci PM, Lombardi R, Castaman G, Dent JA, Lattuada A, Rodeghiero F, Zimmerman TS: von Willebrand disease "Vicenza" with larger-than-normal (supranormal) von Willebrand factor multimers. *Blood* **71**: 65–70, 1988.
 - 27) Campos M, Sun W, Yu F, Barbalic M, Tang W, Chambless LE, Wu KK, Ballantyne C, Folsom AR, Boerwinkle E, Dong JF: Genetic determinants of plasma von Willebrand factor antigen levels: a target gene SNP and haplotype analysis of ARIC cohort. *Blood* **117**: 5224–5230, 2011.
 - 28) Smith NL, Chen MH, Dehghan A, Strachan DP, Basu S, Soranzo N, Hayward C, Rudan I, Sabater-Lleal M, Bis JC, de Maat MP, Rumley A, Kong X, Yang Q, Williams FM, Vitart V, Campbell H, Mälarstig A, Wiggins KL, Van Duijn CM, McArdle WL, Pankow JS, Johnson AD, Silveira A, McKnight B, Uitterlinden AG; Wellcome Trust Case Control Consortium; Aleksic N, Meigs JB, Peters A, Koenig W, Cushman M, Kathiresan S, Rotter JJ, Bovill EG, Hofman A, Boerwinkle E, Tofler GH, Peden JF, Psaty BM, Leebek F, Folsom AR, Larson MG, Spector TD, Wright AF, Wilson JF, Hamsten A, Lumley T, Witteman JC, Tang W, O'Donnell CJ: Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium. *Circulation* **121**: 1382–1392, 2010.
 - 29) Rydz N, Swystun LL, Notley C, Paterson AD, Riches JJ, Sponagle K, Boonyawat B, Montgomery RR, James PD, Lillicrap D: The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels. *Blood* **121**: 5228–5237, 2013.
 - 30) Riddell AF, Gomez K, Millar CM, Mellars G, Gill S, Brown SA, Sutherland M, Laffan MA, McKinnon TA: Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. *Blood* **114**: 3489–3496, 2009.
 - 31) Ribba AS, Loisel I, Lavergne JM, Juhan-Vague I, Obert B,

- Cherel G, Meyer D, Girma JP: Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thromb Haemost* **86**: 848–854, 2001.
- 32) Flood VH, Gill JC, Christopherson PA, Bellissimo DB, Friedman KD, Haberichter SL, Lentz SR, Montgomery RR: Critical von Willebrand factor A1 domain residues influence type VI collagen binding. *J Thromb Haemost* **10**: 1417–1424, 2012.
 - 33) Flood VH, Gill JC, Christopherson PA, Wren JS, Friedman KD, Haberichter SL, Hoffmann RG, Montgomery RR: Comparison of type I, type III and type VI collagen binding assays in diagnosis of von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* **10**: 1425–1432, 2012.
 - 34) Shida Y, Rydz N, Stegner D, Brown C, Mewburn J, Sponagle K, Danisment O, Crawford B, Vidal B, Hegadorn CA, Pruss CM, Nieswandt B, Lillicrap D: Comprehensive analysis of the role of von Willebrand factor and platelet glycoprotein VI- and $\alpha 2\beta 1$ -mediated collagen binding in thrombus formation. *Blood*. 2014. (in press)
 - 35) Casonato A, Sartorello F, Cattini MG, Pontara E, Soldara C, Bertomoro A, Girolami A: An Arg760Cys mutation in the consensus sequence of the von Willebrand factor propeptide cleavage site is responsible for a new von Willebrand disease variant. *Blood* **101**: 151–156, 2003.
 - 36) Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, Caron C, Fressinaud E, Meyer D: Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* **14**: 337–347, 2001.
 - 37) Montgomery RR: When it comes to von Willebrand disease, does $1 + 1 = 3$? *J Thromb Haemost* **4**: 2162–2163, 2006.
 - 38) Shelton-Inloes BB, Chehab FF, Mannucci PM, Federici AB, Sadler JE: Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. *J Clin Invest* **79**: 1459–1465, 1987.
 - 39) Ngo KY, Glotz VT, Koziol JA, Lynch DC, Gitschier J, Ranieri P, Ciavarella N, Ruggeri ZM, Zimmerman TS: Homozygous and heterozygous deletions of the von Willebrand factor gene in patients and carriers of severe von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2753–2757, 1988.
 - 40) Zhang ZP, Blombäck M, Nyman D, Anvret M. Mutations of von Willebrand factor gene in families with von Willebrand disease in the Åland Islands. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7937–7940, 1993.
 - 41) Mohl A, Marschalek R, Masszi T, Nagy E, Obser T, Oyen F, Sallai K, Bodó I, Schneppenheim R: An Alu-mediated novel large deletion is the most frequent cause of type 3 von Willebrand disease in Hungary. *J Thromb Haemost* **6**: 1729–1735, 2008.
 - 42) Sutherland MS, Cumming AM, Bowman M, Bolton-Maggs PH, Bowen DJ, Collins PW, Hay CR, Will AM, Keeney S: A novel deletion mutation is recurrent in von Willebrand disease types 1 and 3. *Blood* **114**: 1091–1098, 2009.