

## 第 70回 SSC 学術報告 - 22 -

小委員会名: SSC 22 Subcommittee on Von Willebrand Factor

報告者: 松本雅則 (奈良県立医科大学輸血部)

開催日: 2024 年 6 月 25 日

開催時間: 16:30-18:30

**Chairman:** Ross Baker (オーストラリア)

**Co-chairmen:** Renhao Li (米国), Christopher Ng (米国), Jamie O'Sullivan (アイルランド), X. Long Zheng (米国), Atiq Ferdows (アイルランド), Dino Mehic (オーストラリア), Megan Brown (米国)

### Novel insights form combined analysis of Lovic and WIN studies by Ferdows Atiq

Ferdows Atiq は、低 von Willebrand 因子 (VWF)、1 型 von Willebrand 病 (VWD)、およびこれらに対する加齢の影響に関する新たな知見を報告した。

#### <背景>

VWF レベルは一般集団では正規分布に従い、非常に低い場合には易出血性の傾向がある。初期のガイドライン(Sadler et al. JTH 2006、 Nichols et al. haemophilia 2008、 Castaman et al. haematologica 2013、 Laffan et al. Br J Haem 2014) では、VWF レベルに基づいて 1 型と 3 型 VWD、低 VWF を分類していたが、2021 年のガイドライン(Makris et al. Haemophilia 2022)では変更が加えられ、特に出血表現型と 30-50 IU/dL の VWF レベルを持つ患者を VWD として再分類したことは最も議論を呼んだ。現在、1 型 VWD 患者における加齢による VWF レベルの増加のメカニズムは完全には理解されていない。

#### <目的>

WiN 研究(Willebrand in the Netherlands)と LoVIC 研究(Low VWF in Ireland Cohort)の統合解析を行った。この目的は低 VWF が臨床的に独立した存在であるのか、1 型 VWD が加齢に伴って進行する表現型の一部であるのかを明らかにすることである。統合解析には 565 人の患者が含まれ、403 人が WiN 研究、162 人が LoVIC 研究から参加した。

#### <主要な発見>

##### 1. VWF レベルと加齢

初期の VWF レベル(VWF:Ag)が 30U/dL 未満であった患者は、加齢に伴い VWF レベルが変動した。47%は 30U/dL 未満のままであったが、30%は 30-50U/dL に増加し、23%は正常化 (>50U/dL) した。診断年齢を考慮に入れると、WiN 研究におい

て VWF レベルが正常化した患者と LoVIC 研究の患者には VWF レベルに有意な差が見られなかった。

## 2. 病態生理学と遺伝子解析

持続的な低 VWF の患者は、Ⅷ因子-VWF 抗原比(Ⅷ:C/VWF:Ag)が高く、VWF の合成または分泌の減少を示した。また、持続的な低 VWF の患者では高い割合で VWF 遺伝子変異を認めたが、他のグループ、すなわち LoVIC 研究の患者群、WiN 研究で VWF レベルが正常化ないし部分的に正常化した患者群の比較では VWF 遺伝子変異の有病率に大きな違いはみられなかった。

## 3. デスマプレシン反応

持続的な低 VWF の患者はデスマプレシンに部分的な反応を示したが、正常化患者は完全な反応を示した。これは、加齢によるデスマプレシンへの反応性の改善や、VWF の生合成と分泌の増加、VWF クリアランスの減少を示唆している。

## 4. 正常化の予測

後ろ向きコホート研究では、初期の VWF レベルが低く病原性変異が顕著である患者は正常化の可能性が低いことが示された。デスマプレシン反応性は正常化の強力な予測因子であり、不完全な反応を示す患者は VWF レベルが正常化する可能性が低いことが示された。

### <結論>

低 VWF は独立した臨床的存在ではなく、1 型 VWD の加齢依存的に進行する表現型の一部であり、2021 年のガイドライン再分類を支持している。VWF の加齢による増加は VWF の生合成/分泌の増加とクリアランスの減少の両方によるものである。加齢とともにデスマプレシンの反応が改善することは、1 型 VWD の高齢患者に対するデスマプレシンの投与量の調整につながる可能性がある。VWF レベルの正常化が出血表現型を必ずしも減少させない可能性がある一方で、持続的な低 VWF は一貫した出血表現型と関連している。

## **Co-localisation of VWF with fibrin under shear forces by Hongxia Fu**

この発表では von Willebrand 因子 (VWF) とフィブリンのずり応力下での相互作用に焦点を当てた。VWF とフィブリンはどちらも血流内での流体力にさらされ、特に病変血管ではこれらの力が増加することがある。研究の主な目標は、2つのプラットフォームを使用して、剪断流下での VWF とフィブリン (フィブリノーゲン) の相互作用を調べることである。

## 1.人工的につくられた微小血管システム

内皮細胞を人工微小血管に播種し、約 200 マイクロメートルの断面を持つ管腔構造を作成した。これにより培地やタンパク質を注入して血流を再現することが可能となった。内皮細胞が PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)で活性化されると、VWF スtringと呼ばれる構造体が形成された。また、フィブリノーゲンとトロンビンを追加すると、フィブリンが VWF Stringと共局在した。一方で、フィブリノーゲン単独では内皮細胞が活性化されない限り、VWF と共局在しなかった。さらに、固定された細胞 (VWF Stringを形成できない細胞) では共局在が見られず、活性化された VWF Stringがフィブリンネットワークの物理的な足場を提供することを示唆した。

## 2.単一分子イメージングシステム

チャンネル表面をストレプトアビジンでコーティングし、Alexa Fluor 488 およびビオチンで標識された VWF マルチマーを付着させた。これに剪断流を適用し、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF 顕微鏡)を使用して相互作用を可視化した。VWF 汚染を除去した精製フィブリノーゲンは、VWF との有意な共局在を示さなかった。一方、剪断流の存在下では、VWF とフィブリンの相互作用が観察され、これらの相互作用は張力依存的事であることが判明した。さらに、高いずり応力下での VWF モノマーは、フィブリノーゲンとの結合および解離の挙動を示し、動的な相互作用を示唆した。また、剪断流下で VWF の自己会合が観察され、free VWF が固定化 VWF と会合する様子も確認された。

## 結論

この研究は、人工微小血管システムでは VWF Stringとフィブリンネットワークが共局在する一方で、この相互作用は主に物理的であり、VWF がフィブリンの足場を提供することを示した。単一分子実験では、VWF とフィブリノーゲンまたはフィブリンの共局在は最小限であり、張力依存的事であることが明らかとなった。少量の VWF でも VWF の自己会合により相互作用が誘発される可能性があり、精製フィブリノーゲンを使用する必要性が強調された。

## VWF binding to fibrin in DIC? by Miguel Cruz

Miguel Cruz は、播種性血管内凝固 (DIC) における von Willebrand 因子 (VWF) とフィブリンの相互作用について発表し、凝固障害と全身性炎症のメカニズムを強調した。

## <背景・方法>

DICは広範なフィブリン血栓の形成を伴い、重篤で持続的な全身性炎症が臓器不全や死亡に至ることが特徴である。特定の治療法はなく、VWFのフィブリン結合のメカニズムは長年不明であった。本研究では、VWFを欠く3型 von Willebrand 病 (VWD) 患者の血漿を使用し、以下の手法を用いてVWFがフィブリン血栓構造に及ぼす影響を調査した。

### 1. 共焦点顕微鏡および走査電子顕微鏡(SEM)

健康なドナーの血漿と3型VWD血漿を比較し、健康な血漿ではより多くの空隙とより厚いフィブリン繊維が観察され、ロックアウトマウスでも同様のパターンが確認された。

### 2. VWFとフィブリンの相互作用

VWFがフィブリン構造内にメッシュ状に入り込む、特定の結合パターンが観察された。VWFのC1-C2ドメインにはフィブリンの結合部位があり、A1およびA2ドメインもフィブリンと相互作用する。

## <主要な発見>

### 1. フィブリン血栓構造に対するVWFの影響

VWFはフィブリン重合に影響を与え、血栓の空隙を増やし、フィブリンネットワークの形成を促進した。リストセチン添加下では、VWFとフィブリノーゲンの相互作用が張力依存的であり、特定の結合部位が露出した。

### 2. A2ドメインとフィブリン結合

VWFのA2ドメインはフィブリンに結合し、特定の変異がこの結合親和性を低下させた。A2ドメインの変異はVWFの全体構造やほかのリガンドへの結合能力には影響を与えなかった。

### 3. フィブリン重合と分解

VWFはフィブリンの重合と分解を促進し、なかでもA2ドメインが重要な役割を果たした。DICモデルでは、VWFのA2ドメインが生存率を有意に向上させ、臓器内のフィブリン沈着を減少させた。

## <本研究の意義と今後の方向性>

この研究は、特にA2ドメインがフィブリンの重合と分解に重要であることを示した。DICおよび全身性炎症におけるVWFの役割は、VWFとフィブリンの相互作用を標的とする治療戦略の可能性を示唆している。今後もVWFとフィブリンの相互作用の詳細なメカニズムを探求し、様々な臨床シナリオでのフィブリン重合と分解の調節を調査する予定である。

## **Innovative VWD treatments and future clinical trials by Caterina Casari**

Casari は、VWD (von Willebrand 病) の現在の治療法の限界を指摘し、さらなる研究と臨床試験の必要性を強調した。

### **<現在の治療状況>**

現在の VWD 治療法には VWF 濃縮物、デスマプレシン、抗線溶療法、ホルモン療法が含まれるが、これらは限界があり、効果も普遍的ではない。予防的治療の提案はほとんどされず、多くの VWD 患者の QOL は低いままである。投与プロトコルに関するコンセンサスも欠けている。

### **<現在の臨床試験>**

Casari は、VWD に関する臨床試験が 132 件あり、その多くは組換え VWF に焦点を当てていると述べた。出血問題を抱える小児と女性を対象とした試験も多い。一方で、臨床試験の課題として小規模な患者集団や個別化された治療の必要性などが挙げられる。Casari は、出血評価ツールや患者報告アウトカムの改善の必要性を強調した。

### **<将来の治療戦略>**

#### **1.内因性 VWF レベルの増加**

- ・リサイクリングアプローチ: VWF をアルブミンに橋渡しするナノボディ KB-V13A12 が開発され、VWF の半減期を延長させる 1 型 VWD マウスモデルでは VWF レベル(VWF:Ag)が増加し、出血合併症が改善された。
- ・クリアランスへの干渉: BT200 は VWF の A1 ドメインに結合し、VWF クリアランスを妨ぐことが出来る。臨床試験では VWF および第Ⅷ因子活性の上昇が示された。

#### **2.凝固能の増加**

- ・第Ⅷ因子模倣物: エミシズマブは VWD 患者の止血効果を示し、現在臨床試験中である。3 型 VWD マウスでトロンビン生成が改善されたが、2A 型 VWD マウスでは効果を認めなかった。
- ・一般的な止血剤: VGA039 はプロテイン S に対するモノクローナル抗体で、VWD 患者血漿でのトロンビン生成を改善する。現在第 I 相試験が行われている。

#### **3.その他の革新的アプローチ**

血小板インスパイアナノ粒子: VWF、リン脂質、コラーゲンに結合するナノ粒子が VWD マウスモデルで投与され、出血表現型が減少した。

遺伝子研究および治療: siRNA が VWD における遺伝子発現を抑制するために使用され、内皮をターゲットとした siRNA も研究されている。

## Criteria for the definition of severe VWD by Tung Wynn

Tung Wynn は重度 von Willebrand 病 (VWD) の定義に関する基準に焦点を当て、患者ケアや疾患の認識、治療提供の改善には明確な定義が必要であることを強調した。

### <研究の背景・目的>

2001 年の診断ガイドラインは VWD のタイプごとの基準を示しているが、重度 VWD を特定する具体的なガイドラインはない状況である。既存の資料や研究は出血表現型、診断分類、検査結果、遺伝学に焦点を当てているが、一貫性に欠けている。明確な定義がない場合の課題として、まず臨床医が重度 VWD の症状を特定するのが難しく、患者も自身の症状の重症度を認識しにくい点が挙げられる。次に明確な基準がないと特定の治療を正当化して提供するのが難しい状況が生じる。加えて均質な患者グループが存在しないため、重度 VWD 治療の研究が困難になり、研究結果の臨床応用に影響を及ぼすことが考えられる。

この研究の主目的は、専門家パネルの合意を通じて重度 VWD の基準を確立することで、このプロセスには、多様な意見を集め、統一されたコンセンサスを形成することが含まれる。

### <方法>

Delphi 法を採用し、専門家パネル間で複数回のアンケートを通じてコンセンサスに達する手法を用いた。プロジェクトは 1 年半にわたり、著名な研究者が参加した。専門家パネルは 23 人の招待された専門家で構成され、そのうち 17 人が積極的に参加した。参加者は多様な専門分野および世界各地を代表しており、包括的な意見が収集された。

### <アンケート結果>

パネルは、遺伝学、診断分類、検査結果、出血表現型など、いくつかの分野を取り上げた。最初のアンケートの主な調査結果は次のとおりである。

遺伝学: 遺伝学単独では重度の VWD を定義するための情報が不十分であり、基準から遺伝学が除外されている。

診断分類: 重症度を単独で決定することはできなかった。ほとんどの 3 型 VWD 患者は重症であったが、2 型の多くが重症で、1 型にも重症が存在した。

プロジェクトで議論された重症の定義は下記のとおりである。

A. von Willebrand 病の診断基準に該当する患者

B.

- ・ 任意の VWF 抗原または活性が 20%未満

または

- ・ VWF 抗原または活性が 30%未満で以下の過剰な出血症状がある場合
- a. 入院を要する、手術が必要、RBC 輸血が必要、ヘモグロビンが 2g/dL 以上減少
- b. 頭蓋内、脊髄内、心膜内、後腹膜内、筋肉内の区画症候群を伴う場合
- c. 通常の機能を妨げる持続的または再発性の出血

<結論>

最終的な基準は、VWD コミュニティ内で広く受け入れられ、さらなる研究の基盤を提供し、臨床および研究の実践を改善することを目指している。重度 VWD の定義を策定する努力は継続中であり、これらの基準が患者ケアと治療成果を向上させることが期待されている。

### **Developing an International ADAMTS-13 Antibody Standard by Helen Wilmot**

Helen Wilmot は、ADAMTS-13 および血漿中の自己抗体に関する国際標準試薬の開発について発表した。この取り組みは、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）の診断とモニタリングを標準化することを目指している。

<iTTP の診断>

iTTP の診断は以下の 2 つのステップで行われる。

1. ADAMTS-13 活性検査: 患者の ADAMTS-13 活性が 10%未満であることを確認。
2. 抑制抗体の検出: 機能的抑制法（ベセズダ法）または結合抗体検出 ELISA を用いる。

・ベセズダ法

患者の血漿を熱不活化し、正常血漿と混合して ADAMTS-13 活性の低下を測定し、インヒビター力価を決定する。

・結合抗体検出法

ELISA を使用して患者の抑制および結合抗体を捕捉し、蛍光で総量を測定する。ベセズダ法と結合抗体検出法の間には共通の単位がなく、診断の一貫性が問題となる。

<標準試薬の必要性>

TTP 患者は再発のリスクがあるため、定期的なモニタリングが必要である。インヒビター力価を持つ標準試薬は、検査間の比較を改善し、継続的なモニタリングを容易にする。このプロジェクトは、Ross Baker が主導した IMATAS プロジェクトから派生した。

<標準試薬の開発>

血漿交換を受けている iTTP 患者から血漿を収集し、プールしてアンプルに分配し、凍結乾燥させる。標準の値を割り当てるための共同研究が行われる。Wilmot は、抗

体価の高い iTTP 患者の治療にあたる臨床医に対し、ウイルス検査が陰性である血漿の提供を呼びかけた。

#### <値割り当て方法>

アンプルあたりのインヒビター力価は、ADAMTS-13 の国際標準単位に基づく。結合抗体の単位は、結合アッセイが結合および抑制抗体の両方を検出するため、別個に割り当てられる。システム適合性標準は、研究室がアッセイ感度を評価するために使用される。

#### <プロジェクトタイムライン>

血漿収集はすぐに開始され、小規模なサンプル準備は今年後半または来年初めに計画されている。コンセプト実証研究は少数の専門研究室で実施される予定である。最終的なサンプルの準備は 2025 年末に向けて大規模に計画されており、共同研究は 2026 年に開始される予定である。ADAMTS13 活性および阻害アッセイは非常に高額であり、多重希釈が必要となるため、参加できる研究室の数が制限される可能性がある。

### **Challenges of automated ADAMTS-13 assays by Thomas Pitchford**

#### <序論>

ADAMTS13 活性自動測定の潜在的な利点と重要な課題に焦点を当て、この測定法が血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の診断において重要であることを強調し、感度、特異性、および方法の不一致に関連する問題を議論した。

#### <自動測定の利点と手動技術と比較した課題>

ADAMTS13 活性の自動測定により、結果返却までの時間が短縮され、この重要な診断検査が利用しやすくなる。これらのアッセイにより、ADAMTS-13 活性の低下により発症する TTP を効率的に診断できる可能性がある。手動技術 (例: ELISA 法および FRET 法) は、特に ADAMTS13 活性が 10 IU/dL 未満の場合、TTP 診断に対する高い感度と特異性を示す。このカットオフ値は強力な診断指標であり、現在のガイドラインでも強調されている。しかし、自動測定はこの性能に匹敵することが難しいという課題に直面している。

#### <ACL ACUSTAR での化学発光測定の経験>

Pitchford は、自施設で 2019 年より導入した ACL ACUSTAR を用いた化学発光測定の実験を報告した。この測定法は TTP 診断に対して高感度である一方、ADAMTS13 活性が偽低値を示す患者のサブグループのため、特異性に欠けると述べた。2019 年 9 月から 2023 年 4 月までに、767 人の初診患者の検体の測定が行われた。そのうち 72 人が ACUSTAR による測定で ADAMTS13 活性が 10 IU/dL 未満であった。これ

らのうち 50 例が新規 iTTP 例で、ADAMTS13 活性は 1.1 IU/dL 未満と著減していた。また、この数値範囲で 1 例先天性 TTP 例を認めた。ACUSTER で測定されたほかの 21 人の患者では 1 人のみが先天性 TTP であり、ほかの患者は ACUSTAR と手動 ELISA との間に結果の不一致を認めた。これらの 21 例中 16 例では、患者の臨床像をより正確に反映する ELISA の結果が有意に高く、多くの場合、ADAMTS13 活性は 20 IU/dL 以上であった。測定干渉の正確な原因は不明であるが、偽低値を示すサブグループには D-ダイマーの著増やアンチトロンビン活性の減少を認めた。これらは DIC（播種性血管内凝固）または敗血症の可能性を示唆している。

また、Pitchford は、Severon S100 での FRET ベースの別の自動測定法について言及し、ACUSTAR と同様の不一致パターンを示さないことを述べた。

#### <推奨事項と結論>

ACUSTAR 使用者は D-ダイマー値が高い場合、ADAMTS-13 活性結果(特に 1.5-10 IU/dL の範囲)に注意する必要がある。初診患者の約 2%で方法間の不一致があることを認識する必要がある。先天性 TTP および少数の iTTP 例で 1.5-10 IU/dL の値を示すことがある。

### **BAT scores for VWD in normal children and adolescents by Maha Othman**

#### <序論>

0 歳から 18 歳までの子供および思春期に対する正常な出血評価ツール (BAT) スコアを確立することを目的とした新しい SSC プロジェクトについての発表である。この年齢層における正常参照値の知識のギャップを解消し、出血障害の診断に混乱を来しうる用語のばらつきを解釈することが目標である。

#### <研究の必要性>

ISTH-BAT は、出血スコアおよび出血障害の客観的評価に不可欠であり、成人男性および女性のための参照範囲が確立されている。しかし、0 歳から 18 歳までの個人に対する正常参照値は、年齢範囲と止血の課題が異なるため、明確に定義されていない。さらに、小児、子供、思春期といった用語の違いが混乱を招いている。

#### <用語と年齢範囲>

- ・WHO による定義: 思春期は 10-19 歳であり、18 歳未満は多くの場合子供と見なされる。
- ・CRC による定義: 出生から思春期までの人間を子供とする。思春期は男性(9-14 歳)と女性(8-13 歳) で異なる。
- ・思春期の指標: 女性の思春期は乳房と恥毛の発育で始まり、その後初潮が 10 歳から 16 歳の間に発生する。

#### <プロジェクトの目標>

主な目標は、子供および思春期に対する正常な BAT スコアの参照範囲を確立し、VWD や他の出血障害の診断を改善することで、0-18 歳の多様な地理的および社会経済的背景を持つ 1,000 人のデータを収集することを目指している。

#### <方法>

この研究は、Paura James のグループが 2023 年に発表した方法に従う。参加者は出血障害の既往歴・家族歴がなく、ホルモン療法を受けておらず、他の併存疾患も持っていないことが条件である。

#### <予備データ>

過去 7-8 ヶ月間で 582 人のデータが収集され、そのうち約半数が女性であった。低、中、高所得国いずれからも参加があり、主要な参加国はカナダ（288 人）、ナイジェリア（146 人）、エジプト（96 人）、イタリア（52 人）であった。性差はみられなかった。低中所得国と高所得国の間でスコアの差が見られ、低所得国ではスコアが高い傾向にあった。

全体の BAT スコアは 0 から 2 の範囲で、国ごとにわずかなばらつきがみられた(エジプト：0-1、カナダ：0-2、イタリア：0-1.76、ナイジェリア：0-3)。最も一般的なスコアは 0 ならびに 1 で、高スコア（3,4）は高年齢のグループおよび低中所得国でより頻繁に見られた。

#### <今後の方向性>

プロジェクトは継続中であり、世界中の追加の協力者からのデータ収集を目指している。