

氏名	狩野泰輝
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第1176号
学位授与の日付	平成31年3月10日
学位論文題名	Effects of plasma glycosyltransferase on the ABO(H) blood group antigens of human von Willebrand factor 「血漿中糖転移酵素がフォン・ヴィルブラント因子上のABO(H)式血液型抗原に与える影響」 International Journal of Hematology 108(2):139-144,2018.8
指導教授	近藤一直
論文審査委員	主査 教授 宮地 栄一 副査 教授 大槻 眞嗣 教授 土田 邦博

論文内容の要旨

【緒言】

von Willebrand 因子 (VWF) は血管の損傷部位に血小板を粘着させる「分子糊」として作用し、また血漿中においては凝固第Ⅷ因子と結合しこれを保護するという、止血血栓形成において非常に重要な役割を担う糖タンパク質である。VWFの持つ特徴の一つとして、その糖鎖末端にABO(H)式血液型糖鎖抗原を有することが挙げられる。ABO血液型は赤血球表面に存在する糖鎖抗原によって規定されるが、生体内では粘膜上皮細胞や血管内皮細胞などに発現している。しかし数多く存在する血漿糖タンパク質のうちでABO血液型糖鎖抗原を有するものはVWFの他、凝固第Ⅷ因子と一部の α_2 -マクログロブリンの僅か3種類のみであり、希有な性質である。またABO血液型によって血漿中のVWF濃度が異なることが知られており、O型はその他の血液型と比較して25-30%程低値であることが判明している。

ABO血液型は臨床上、古くから輸血時における血液の適合要因として重要視されているほか、最近では血栓性疾患のリスクと関係していることが明らかとなってきており、さらにはVWF自体のABO血液型が血栓性疾患の発生頻度に関係していることも考えられる。しかし、VWFに存在するABO血液型糖鎖抗原の持つ生理的意義は未だ十分に解明されてはいない。

【目的】

我々はVWF上に存在する血液型糖鎖抗原の付加機構解明を目指している。本研究では血漿中に存在するABO血液型糖転移酵素に着目し、それが糖鎖抗原付加反応に関与するかどうかを検討した。

【方法】

健常ボランティアから10 mLずつクエン酸添加採血を行い、10人分ずつを血液型ごとに

混合しプール血漿を作成した(藤田医科大学倫理審査委員会承認No. 10-131)。H型糖鎖を持つヒトO型血漿由来VWF(H-VWF)およびH型糖鎖を人工的に結合させたウシ血清アルブミン(H-BSA)を糖転移酵素のアクセプターとして用いた。これらのH型糖鎖にリコンビナントA型糖転移酵素(r-ATase)またはA型血漿と糖基質ドナーであるUDP-GalNAcを加え、37℃にて18時間糖鎖付加反応を行った後、抗A抗体との反応性をWestern blotting(WB)およびEnzyme-linked Immuno-sorbent assay(ELISA)にて評価した。またノイラミニダーゼで処理することにより糖鎖末端のシアル酸を除去したH-VWF(asialo-H-VWF)を用いて同様に糖鎖付加反応を行い、WBにて抗A抗体との反応性を検討した。

【結果】

基質ドナー存在下において、A型酵素としてr-ATaseを用いて反応させたところ、H-BSA、H-VWFともにA抗原が検出された。また基質ドナー存在下でA型血漿を用いて反応を行うとH-BSA、H-VWFとも確認されないか確認されても弱いものであった。そこでH-VWFの代わりにasialo-H-VWFを用いたところA抗原の反応は増強した。しかしこれらの糖鎖付加反応は、外部からの基質ドナー添加がなければ生じなかった。

【考察】

H-VWFに糖転移酵素を作用させることによってin vitro環境下において血液型を変化させることが明らかとなった。しかしこの変化のためには外部からの基質ドナー添加を必要とした。このことから血漿中に基質ドナーであるUDP-GalNAcはほぼ存在せず、VWFへの血液型糖鎖付加は血中で行われるものではないと考えられた。またVWF上糖鎖末端のシアル酸除去により反応が増強したことから、シアル酸は酵素のアクセスを抑制すると思われる。

【結語】

血漿中の糖転移酵素はVWF上のABO(H)式血液型糖鎖付加には関与せず、血液型糖鎖は分泌前に細胞内で付加される可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

VWFは止血に重要な糖タンパク質であり、糖鎖末端にABO血液型抗原を有するが、VWF上の血液型糖鎖付加経路は未だ十分に解明されていないことから、本研究では血漿中に存在する酵素が糖鎖付加に関与するか否かについて検討した。健常ボランティアから得られたH-VWFおよびコントロールとしてのH-BSAを用い、リコンビナントA転移酵素またはA血漿と、基質ドナーを加えて付加反応を行った後、抗A抗体反応性を評価した。基質ドナー存在下ではリコンビナントA転移酵素またはA血漿ともにH-BSAおよびH-VWFに対しA糖鎖が付加されたが、この反応には基質添加を必要としたことから、血漿中に基質ドナーはほとんど存在せず、VWFへの糖鎖付加は血中で行われないと考えられた。以上の結果から、血漿中の糖転移酵素はVWFへの糖鎖付加には関与せず、血液型糖鎖は細胞内で付加される可能性が高いと結論づけた。今後の展望としては、免疫染色による付加経路の解明と血液型改変VWFを用いた機能評価を挙げた。

VWF量の異常により生じる疾患や、ABO血液型がVWFの機能に及ぼす影響について、質疑応答があった。VWF量と疾患に関してはvon Willebrand病(VWD)と血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)について説明を、血液型の影響に対してはVWF濃度の差や出血リスクについて説明を行った。

血中においてVWFに血液型が付加されるとした報告よりも本研究の解析は優れており、本論文は学位論文としてふさわしいと評価された。