

## 論 文 要 旨

**Vascular endothelial growth factor corrected for platelet count and hematocrit is associated with the clinical course of aplastic anemia in children**

小児再生不良性貧血患者の臨床経過と血小板数、  
ヘマトクリットで補正した血管内皮増殖因子との関連

児 玉 祐 一

## 【序論および目的】

再生不良性貧血 (AA) 患児の多くは、重症の AA になり輸血依存の状態になる。しかし、一部の AA 患児では、重症に進行しない、または自然回復する症例もある。AA の治療は、輸血依存または重症の診断基準を満たした時に、免疫抑制療法もしくは造血幹細胞移植術を行う。AA の多彩な臨床経過のために、臨床医は、診断初期に特に軽症や中等症の AA の患者で、治療が必要な患者かどうかを判断するのは困難である。そのため、診断時に臨床経過を推測する方法を確立することは重要である。

過去の免疫染色を使用した研究で血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現は AA 患者の巨核球、骨髄球系の細胞で減少していると報告された。また健常人と比較して、血清中の VEGF は AA 患者で低下していることが報告された。しかし血清中の VEGF は、そのほとんどが血小板から放出されていることが知られているので、AA 患者で血清中の VEGF が低いのは当然である。そこで我々は、血清中の VEGF ではなくて、血小板 1 個当たりが放出している VEGF (VEGF per platelet) に注目した。血小板 1 個当たりの VEGF を評価するためには多血小板血漿 (PRP)、乏血小板血漿 (PPP) を必要とする。この方法は時間がかかる、血液を多く必要とするという理由から、まずは健常成人で代替の方法の有用性を確認し、AA 患児ではその代替方法を用いて、血小板 1 個当たりの VEGF を測定し、臨床経過との関連を評価した。

## 【材料および方法】

健常成人 8 名において、PRP、PPP を採取し、VEGF per platelet を (PRP VEGF - PPP VEGF) / PRP 中の血小板数  $\times 1,000$  で算出し、その値と血清中の VEGF、血清中の VEGF を血小板数のみで補正した値、血清中の VEGF を血小板数とヘマトクリットで補正した値 (Corrected VEGF) のそれぞれで相関関係を評価した。なお Corrected VEGF は {血清中の VEGF  $\times (1 - \text{ヘマトクリット})$  } / 血小板数  $\times 1,000$  で算出した。

鹿児島大学病院小児科で診断され治療を受けた 11 名の AA 患児が本研究で評価された。男子 5 名、女子 6 名であった。重症度分類では 2 名が軽症、6 名が中等症、3 名が重症であった。治療は輸血依存、もしくは重症になった時に、免疫抑制療法もしくは造血幹細胞移植が行われた。本研究において、診断後 2 年以内で治療が必要であった症例を Acute

AA、2年以上治療を要しなかった症例を Chronic AA と定義した。コントロール検体として7名の AA でない症例からの検体を使用した。本研究は鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承諾を得て行った。

### 【結果】

まず健常成人8名の検討で、VEGF per platelet と Corrected VEGF が最も強い相関関係にあった ( $R^2=0.806, p=0.001$ )。そのため AA 患児では Corrected VEGF を VEGF per platelet の代替方法として使用した、

Acute AA 患児は6名で3名が重症型の AA、3名が中等症の AA であった。一方、Chronic AA 患児は3名が中等症の AA、2名が軽症の AA であった。Acute AA 患児と Chronic AA 患児での比較で、性、年齢、好中球数、網状赤血球数に有意差はなく、血小板数が Chronic AA 患者で有意に高かった ( $p=0.011$ )。

AA 患児の Corrected VEGF [ $1.32 \times 10^{-6}$  pg (範囲 0.36-1.85)] はコントロール検体の Corrected VEGF [ $0.18 \times 10^{-6}$  pg (範囲 0.12-0.94)] よりも有意に高値であった ( $p=0.002$ )。Chronic AA 患児の Corrected VEGF [ $1.67 \times 10^{-6}$  pg (範囲 1.32-1.85)] は Acute AA 患児の Corrected VEGF [ $0.87 \times 10^{-6}$  pg (範囲 0.36-1.34)] よりも有意に高値であった ( $p=0.011$ )。

AA の重症度による Corrected VEGF に及ぼす影響を除外する目的で、中等症の AA 患児のみで評価した。Acute で中等症の AA 患児3例の Corrected VEGF はそれぞれ 0.36, 0.98,  $0.86 \times 10^{-6}$  pg、Chronic で中等症の AA 患児3例の Corrected VEGF はそれぞれ 1.76, 1.32,  $1.54 \times 10^{-6}$  pg であり、Chronic AA 患児の方が高い傾向にあった。

### 【結論及び考察】

今回我々は AA 患児で血小板1個当たりの VEGF を使用し、臨床経過との関連を評価した。しかし血小板1個当たりの VEGF の測定は PRP や PPP といったある程度の血液量を必要とし、さらに煩雑である。我々はそのため、血清 VEGF を血小板数とヘマトクリットで補正した Corrected VEGF を代替方法として使用した。

今回我々の症例では Corrected VEGF は臨床経過と関連があり、急速に進行する AA の Corrected VEGF より、ゆっくり進行する AA または治療を要しない AA の Corrected VEGF は有意に高値であった。この結果は、診断時の Corrected VEGF がその後の臨床経過を予測することを示唆した。このことをさらに確認するために、多数例で前向きに検討する必要がある。

Chronic AA 患児の Corrected VEGF ではコントロール検体の Corrected VEGF よりも高値であった。このことから AA 発症時に病気の進行を抑えるための代償機構として、VEGF 合成の促進があり、この代償機構が破綻し、VEGF の合成が低下すると AA の病状が進行するかもしれないと推測した。これらを起こしうる分子学的な機序としては、VEGF の転写因子である低酸素性誘導因子 (HIF-1 $\alpha$ ) の関与を考えている。HIF-1 $\alpha$  に関しては、貧血マウスでその発現が誘導されることや、再生不良性貧血患者で上昇するトロンボポエチンが HIF-1 $\alpha$  を安定化させることが過去の報告で明らかになっている。今後これらの分子学的機序を検討する必要がある。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 205 号		学位申請者	児玉 祐一
審査委員	主査	有馬 直道	学位	博士 (医学)
	副査	小賤 健一郎	副査	西 順一郎
	副査	魚住 公治	副査	野村 裕一

**Vascular endothelial growth factor corrected for platelet count and hematocrit is associated with the clinical course of aplastic anemia in children**

(小児再生不良性貧血患者の臨床経過と血小板数、ヘマトクリットで補正した血管内皮増殖因子との関連)

再生不良性貧血の臨床経過は多様であり、診断時にその後の経過を予測することは造血細胞移植や免疫抑制療法などの治療適応を決定する際に重要である。しかし、経過を予測する因子に関する報告はこれまでない。一方再生不良性貧血では、治療前の血清の血管内皮増殖因子 (VEGF) は低下し、治療後では上昇することがすでに報告されており、また別の報告では VEGF は骨髓機能を反映することが示唆されている。そこで本研究では再生不良性貧血における血清 VEGF と臨床経過との関連について検討した。しかし血清中の VEGF のほとんどが血小板由来であり、従って血清中の VEGF は血小板数と血小板 1 個が含む VEGF (VEGF per platelet) の量に依存しているため、血小板数が少ない再生不良性貧血では、血清中の VEGF が低値になるのは当然である。そこで、本研究では血清 VEGF ではなく、VEGF per platelet を測定し、再生不良性貧血の臨床経過との関連を評価することを目的とした。しかし VEGF per platelet を求めるには、多血小板血漿、乏血小板血漿を準備するために多量の血液採取が必要であり、さらにそれらをカルシウムとトロンビン末で処理するという範雑さを伴っており、別個に信頼性における簡便な代替法が求められる。そのため、まず、健常成人 8 名で VEGF per platelet と、いずれも血算と血清で算出可能な 3 つの値 (血清 VEGF 値、血清 VEGF を血小板数で補正した値、血清 VEGF を血小板数とヘマトクリット値で補正した値 (Corrected VEGF)) を測定し、3 者間の関係性を評価した結果、Corrected VEGF を代替法として確立した。次に、再生不良性貧血患児 11 名の臨床経過と Corrected VEGF の関連を検討した。本研究で得られた知見は以下のとおりである。

- 1) 健常成人では、Corrected VEGF が VEGF per platelet と最も強く相関した。
- 2) 再生不良性貧血患児ではコントロール小児に比較して診断時の Corrected VEGF は有意に高値であった。
- 3) 再生不良性貧血の診断から 2 年以内に治療を要した急性群に比較して、2 年以上治療を必要としない慢性群で診断時の Corrected VEGF が有意に高値であった。

以上の結果から、Corrected VEGF は VEGF per platelet を反映し、再生不良性貧血の臨床経過の予測に有用であることが示された。

診断時に Corrected VEGF を用いて再生不良性貧血の臨床経過を予測できることは、造血細胞移植のような準備に時間がかかる治療を行う上で有用である。本研究は、再生不良性貧血においても VEGF が骨髓機能を反映し、その臨床経過を予測できること示し、意義深い研究である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 205 号		学位申請者	児玉 祐一
審査委員	主査	有馬 直道	学位	博士 (医学)
	副査	小賤 健一郎	副査	西 順一郎
	副査	魚住 公治	副査	野村 裕一

主査および副査の 5 名は、平成 24 年 7 月 30 日、学位申請者 児玉 祐一 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) 6 例の中等症患者の経過中の Corrected VEGF の推移はどうか？

(回答) 本研究では経過中の Corrected VEGF を測定していない。慢性の中等症患者が重症に至る際に Corrected VEGF が、本研究で推測しているように経過とともに低下するかどうかは重要なので検討していきたい。

質問 2) 急性の症例と慢性の症例では血小板数の値が異なる。血小板数が Corrected VEGF に影響を及ぼしていないと本当に言えるのか？

(回答) 血小板数による影響を除去するために、症例数は少ないが中等症のみで検討し、血小板数が同じでも Corrected VEGF は急性で低く、慢性で高いことを示した。

質問 3) 免疫染色を用いて検討した過去の報告では、再生不良性貧血患者の骨髄での VEGF は健常人と比較して低い。本研究では血清のみでしか見ていないので比較は困難であるかもしれないが、過去の報告と本研究で結果が異なっているのはなぜか？

(回答) 免疫染色を用いて検討した過去の報告では、急性の経過の症例、慢性の症例で分けて検討しているわけではないので、今回の研究とは比較はできない。現在、再生不良性貧血では骨髄生検を行っているので、急性と慢性で病理的にも変化があるかを検討したい。

質問 4) VEGF をヘマトクリットで補正する意味は何か？

(回答) 症例ごとに程度の異なる貧血を補正する目的、つまり血清量をそろえる目的で、ヘマトクリットで補正した。

質問 5) 急性と慢性の比較でヘマトクリットに差はなかったのか？

(回答) 今回の検討した症例ではなかった。

質問 6) ELISA 法ではどの VEGF を測定しているのか？

(回答) VEGF-A を測定している。

質問 7) ELISA 法では VEGF の他のタイプとの cross-reactivity は考慮しなくてもよいのか？

(回答) VEGF-B、C、D、PDGF も含めて cross-reactivity はないことが証明されている。

質問 8) 再生不良性貧血における骨髄の微小環境の異常とは具体的にどのようなものか？

(回答) 病理学的に再生不良性貧血では洞様毛細血管が乏しいという報告がある。また微小環境の間葉系幹細胞が T 細胞を抑制できていないことも報告されている。

質問 9) 血清の VEGF は末梢でどのような役割を果たしているか？

(回答) 創傷治癒、血栓形成などの役割がある。VEGF は血小板によって創傷部位に運ばれて、VEGF は血管内皮へ取り込まれ創傷治癒を促し、またその局所で血小板を活性化し血栓形成に働い

ている。

質問 10) 他の血管新生増殖因子 (HGF、bFGF など) の再生不良性貧血患者での動態は？

(回答) ともにこれまで全く報告はないが、HGF は VEGF とともに血小板内に含まれているので再生不良性貧血において変動している可能性がある。bFGF が造血に重要な血管新生増殖因子であることは報告されており検討する必要がある。

質問 11) 血管と血球は同じ Hemangioblast から発生していることが明らかになっているが、再生不良性貧血の機序として何か言われていることはないか、また VEGF を遺伝子治療として使用することの可能性についてはどうか？

(回答) Hemangioblast が再生不良性貧血の機序に関連しているという報告はない。Hemangioblast に関連のある VEGFR1、VEGFR2 の発現が再生不良性貧血でどのようになっているかは検討していきたい。また再生不良性貧血患者の骨髄への VEGF による遺伝子治療は、治療技術を新たに研究開発しなければならない。その理由として再生不良性貧血患者の一部が移行する骨髄異形成症候群では微小血管が発達しており、病態を増悪させる可能性があり、単に VEGF 遺伝子を骨髄に導入するだけではよくないと考えるからである。

質問 12) 骨髄の微小環境に存在する間葉系幹細胞が T 細胞を抑制することで再生不良性貧血の症状の悪化を抑えるということであるが、骨髄の微小環境に作用する VEGF は、今回測定した末梢血中の VEGF ではなくて、骨髄に存在するその他の細胞由来の VEGF とは考えられないか？

(回答) その可能性は十分にある。これまで再生不良性貧血の骨髄の VEGF と臨床経過の関連については報告されていないことなので検討したい。

質問 13) VEGF が骨髄機能を刺激するために働いていると考えれば、Corrected VEGF は急性で高く、慢性が急性とコントロールの間くらいであることが予測されるが、どのように考えるか？

(回答) 本研究の結果から、急性では代償機構が機能せず、慢性では発症の段階で代償機構が機能することで、重症に進行しなかったと考察した。

質問 14) VEGF の上昇が骨髄の低酸素に起因する HIF-1 $\alpha$  を介するものであれば、急性の方がより低酸素であるはずなので、HIF-1 $\alpha$  が亢進し、より VEGF の産生が高いのではないかと予測されるがどのように考えるか？

(回答) その機序に関しては今後解明していくべき課題であるが、急性に進行する病態では、低酸素に対する HIF-1 $\alpha$  の上昇が少ない、もしくは HIF-1 $\alpha$  上昇はあるが、それに対しての VEGF の転写が効率よく機能しないなどの問題があり、VEGF の代償機構が機能せずに、急性に進行するのではないかと考えている。

質問 15) 本研究で用いた急性と慢性の定義は、主観的であり客観性に乏しいと考えられるがどうか？

(回答) 観察期間を考慮して急性と慢性を 2 年間で区切ったが、急性の 6 症例は全て 3 か月以内に治療を必要とし、慢性の 5 症例は 2 年以降も治療を要しなかった。そのため、本研究での急性と慢性の群に明らかに臨床経過の違いがあると考えられる。

質問 16) 本研究で診断時の VEGF が高ければ慢性化し、低ければ急性で重症化をすると考えてよいか？

(回答) 再生不良性貧血患者の初診時に Corrected VEGF を測定すれば、Corrected VEGF が低いのでその患者はすぐに重症に至るから造血細胞移植の準備が必要であると判断したり、Corrected VEGF が高いので慢性の経過をとると予測でき、しばらく観察してもよいと判断したりすることが可能になる。

質問 17) 診断時の検体を用いて VEGF を測定したということであるが、当院初診に至るまでの期間や治療の影響はないか？

(回答) 遠方に在住のため前医で観察していた症例もあるが、観察期間は短かった。診断と治療は当科で行ったので、当院に至るまでの期間や治療の影響はないと考える。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。