

論文要旨

Serum VEGF – as a prognostic factor of atherosclerosis.

(動脈硬化予測因子としての血清 VEGF)

木村 久理子

【VEGF と動脈硬化についての背景】

Vascular endothelial growth factor(VEGF)は、血管透過性を高め血管内皮細胞の増殖を促す多機能なサイトカインであり、また動脈硬化は血管の慢性炎症により引き起こされる。VEGF と動脈硬化の関連についての報告は散見されるが、VEGF の動脈硬化における役割については未知の部分が多い。また、末梢循環血液中の VEGF は、その大半が血小板由来であるため、凝固反応完了後である血清を測定するのが適切と考えられるが、血漿と血清の VEGF の違いについて言及した上での研究は少ない。我々は、血清 VEGF 濃度が末梢血における VEGF の測定として最も適切であることを明らかにした上で、健常人および動脈硬化予測因子としての可能性について調べた。

【対象および疫学・実験方法】

対象は 2000 年 10 月～11 月と 2001 年 7 月～9 月に生活習慣病予防検診のため鹿児島県総合保健センターを訪れ、同意を得た成人男女 443 名 (男性 304 名、女性 139 名、平均年齢各 49.31 ± 8.81 歳、 50.68 ± 8.40 歳)。身長・体重などの身体データ、喫煙・飲酒などの生活習慣や病歴を聴取し、血液検査については、末梢血検査と生化学検査を行い、それぞれのデータ項目と血清 VEGF 濃度との相関について調べた。うち 324 名については血清 CRP 濃度を測定し、各項目との相関について調べた。血清 VEGF 濃度の測定には、ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, Mn) を用い、標準回帰曲線より値を算定した。血小板由来の血清 VEGF の定量分析については、13 名の健常人より同日採取した血清および血漿を用いた。血漿は PRP (血小板に富んだ血漿) と PPP (血小板をほとんど含まない血漿) に分けて用意し、血小板の凝固反応を完了させた後に各々の VEGF 濃度を測定した。

【結果】

血清 VEGF 濃度の平均値は、男性が 229 ± 147 pg/ml、女性が 182 ± 112 pg/ml と、男性が女性に比べて有意に高かった ($p=0.0008$)。しかし、非喫煙者同士で比較した場合には性差が消失した。また、血清 VEGF 濃度には、男女共に血小板数とのゆるやかな相関関係が認められた (男性 $r=0.287, p<0.0001$ 、女性 $r=0.288, p=0.0029$)。また、血清 VEGF 濃度は、男性において、血小板数、体脂肪率、白血球数にゆるやかな正の相関、HDL コレステロール濃度に負の相関を持つ (体脂肪率 $r=0.204, p=0.0004$ 、白血球数 $r=0.236, p<0.0004$ 、HDL コレステロール濃度 $r=-0.183, p=0.0013$)。多変量解析を行ったところ、決定係数 R^2 は、血小板数に白血球数、体脂肪率、HDL コレステロール濃度を加えると最大 ($R^2=0.173, r=0.416$) となった。一方、女性においては、血小板数以外のどの項目についても血清 VEGF 濃度との相関はみられなかった。また、男性の血清 VEGF 濃度を喫煙者と非喫煙者で比較

したところ、喫煙者の平均値は 255pg/ml、非喫煙者は 209pg/ml ($p=0.0063$) と有意差が認められた。その他、白血球数と HDL コレステロール濃度も喫煙者・非喫煙者間において有意差が認められた。血清 VEGF と同様に血清 CRP 濃度についても各項目との相関を調べたところ、喫煙者と非喫煙者で有意差が見られ (喫煙者 $0.094 \pm 0.114\text{mg/dl}$ 非喫煙者 $0.059 \pm 0.084\text{mg/dl}$, $p=0.0063$)、血清 VEGF 濃度、白血球数、HDL コレステロール濃度にゆるやかな相関を示したが (血清 VEGF 濃度 $r=0.181$, $p=0.0052$ 、白血球数 $r=0.318$, $p<0.0001$ 、HDL コレステロール $r=-0.142$, $p=0.0290$)、血小板数や体脂肪率とは無関係であった。

また、13 名の健常人における血清、血漿、PPP それぞれの VEGF 濃度の平均値は、順に $146 \pm 74\text{pg/ml}$ 、 $12 \pm 9\text{pg/ml}$ 、 $16 \pm 14\text{pg/ml}$ となり、血清 VEGF 濃度は有意に高いことが確認された。また、PRP の凝固反応を完了させると血漿や PPP に比較して非常に高い値となり、直接血清より測定した VEGF 濃度と血清中の血小板由来の VEGF は強い相関関係にあることも分かった ($r=0.726$, $p=0.0006$)。また、1 個の血小板から放出される VEGF の総量も血清 VEGF に同様の強い相関を示した ($r=0.766$, $p=0.0023$)。

【考察】

検診患者 443 名において、男性の血清 VEGF 濃度は女性に比べて有意に高く、多変量解析を行ったところ、決定係数は、血小板数単独ではなく、白血球数、体脂肪率、HDL コレステロールを加えた場合に最大となった。これらの因子はすべて動脈硬化や炎症に深く関連していることから、血清 VEGF の動脈硬化のマーカーとしての可能性が示唆された。動物実験においては VEGF 遺伝子が外傷後の内膜の肥厚を抑制し血管修復を促すことや、逆にレセプターである flt-1/Flt-1 と共に動脈硬化巣においてプラーク内の微小血管の増殖を促進することなどが報告されているが、ヒトにおける VEGF と動脈硬化との関係は明らかではない。我々の研究においては、VEGF はヒトで動脈硬化を促進するサイトカインと考えられた。男性の喫煙者の血清 VEGF 濃度は非喫煙者に比較して高いが、喫煙は動脈硬化の強力な促進因子であることから VEGF 濃度が上昇したと考えられる。炎症マーカーとして知られている血清 CRP 濃度も喫煙者で高く、血清 VEGF 濃度や白血球数、そして HDL コレステロールに緩やかな相関を持つ。しかし、体脂肪率や血小板数とは無関係であった。血清 VEGF は血清 CRP に比べより早い段階で動脈硬化の進展を予測できるかもしれない。

血小板数は男女ともに血清 VEGF 濃度に緩やかな正の相関を持つ。VEGF は骨髓巨核球中に存在することが証明され、悪性腫瘍についての報告では、末梢循環血液中の VEGF の大半は血小板に含まれることが証明されている。我々は、健常人においても VEGF の主な供給源は血小板であることを示した。また、1 つの血小板から放出される VEGF の総量も血清 VEGF 濃度に強い相関を持ち、血清 VEGF 濃度は、血小板数のみならず血小板が含む VEGF の量にも比例する血清 VEGF 濃度は、健常人においても動脈硬化のリスクファクターと密接な関係があることが示唆され、早期の段階で動脈硬化進展を予測する新しいマーカーとなり得る。

論文審査の要旨

報告番号	医研第	656	号	氏名	木村 久理子
審査委員	主査	乾 明夫			
	副査	出雲 周二		上村 裕一	

Serum VEGF – as a prognostic factor of atherosclerosis

(動脈硬化予測因子としての血清 VEGF)

Vascular endothelial growth factor (VEGF)は、血管内皮の増殖、血管の新生や透過性を亢進させる生体内の様々な細胞で発現される糖タンパク質である。慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、悪性腫瘍などで血中濃度が上昇し、Crow-Fukase 症候群においては異常高値を示し、動脈硬化との関連を示唆する報告もある。しかし、健常人における VEGF の動態やヒトの動脈硬化との関わりについては未知の部分が多く、また VEGF の定量法も検体として血漿と血清が混在し、統一されていない。

本研究では、2000年10月～11月と2001年7月～9月に鹿児島県民総合保健センターを生活習慣病予防検診のために訪れ同意を得た443名の血清 VEGF 濃度と各々の検診データを分析した。動脈硬化のリスクファクターである血清 CRP 濃度との比較も行った。また、13名の健常人ボランティアより採取した血清および血漿を用い、血漿を血小板に富んだ血漿と血小板をほとんど含まない血漿に分けて VEGF 定量法について検討し、以下の結果を得ている。

血清 VEGF 濃度は、男性の値が高く男女で性差が認められた。しかし、非喫煙者同士では性差が消失する。血清 VEGF は、男女とも同程度、血小板数に緩やかな正の相関を認めた。男性の血清 VEGF は、血小板数、体脂肪率、白血球数に正の相関、HDL コレステロールに負の相関を示し、多変量解析を用いると4つの因子の加算で決定係数 R^2 が最大となった。また、男性の血清 VEGF は喫煙者で高く、白血球数と HDL コレステロール濃度にも有意差を認めた。血清 CRP 濃度も同様に喫煙者で高く、血清 VEGF 濃度、白血球数、HDL コレステロール濃度に緩やかな相関を認めたが、血小板数や体脂肪率とは無関係であった。VEGF 定量法についての検討では、血清 VEGF が最も高く、多血小板血漿も血清同様に高い値を示し、血清 VEGF 濃度と強い比例関係にあった。血小板 1 個あたりの VEGF 含有量も血清 VEGF 濃度に比例していた。

以上の結果より、血清 VEGF 濃度は、男性で高く、血小板数、白血球数、体脂肪率、HDL コレステロール濃度の4因子および喫煙に関連しており、動脈硬化予測因子としての可能性が示唆された。血清 CRP 濃度は、血清 VEGF 濃度、白血球数、HDL コレステロールに相関するが、体脂肪率や血小板数とは無関係であり、血清 VEGF 濃度の方が、より包括的に動脈硬化を予測できる可能性がある。VEGF は、悪性腫瘍や Crow-Fukase 症候群のみならず、健常人においてもその大半が血小板由来である。血清 VEGF 濃度は、血小板数のみならず血小板 1 個あたりの VEGF 含有量とも強く相関しており、何らかの機序で VEGF を多く含む血小板が作られていると推察している。また、播種性血管内凝固症候群(DIC)のような血小板が極端に減少した場合の VEGF の動態より、血漿で測定される VEGF は、血小板以外からの VEGF ではなく、血小板から漏れ出した VEGF である可能性が高い。VEGF の定量は、血漿ではなく血清で行うべきであり、血清 VEGF 濃度は、早期の段階で動脈硬化進展をとらえる新しい動脈硬化予測因子となり得ると結論している。

本研究は、健常人における血管内皮細胞増殖因子(VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor)と血小板の関係を明らかにし、動脈硬化関連サイトカインとして VEGF に新しい視点を与えた。

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	医研第 656 号	氏名	木村 久理子
審査委員	主査	乾 明夫	
	副査	出雲 周二	上村 裕一
<p>主査および副査の3名は、平成19年3月22日、学位請求者 木村久理子 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、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。</p> <p>質問1) VEGFは色々な組織にあるが、その中で血小板の含有量が一番多いのか? (回答) 組織内での VEGF の発現は生体内の至るところにあるが、循環血中の VEGF は桁違いに多く血清から採取される。血清中の大半の VEGF は血小板由来であるので、血小板の VEGF 含有量が一番多いと考える。</p> <p>質問2) VEGF のサブタイプについての検討はなされているのか? (回答) 使用キットで測定しているのは分泌型である VEGF-A の 121 と 165 である。中でも Crow-Fukase 症候群で VEGF165 が大半であるというデータがあるので、この研究で測定されたものも大半が VEGF165 であると考ええる。</p> <p>質問3) 喫煙が VEGF の値に影響を与えることについて、どのような機序によるものかと考えるのか? (回答) 喫煙は、血管の至るところに内皮の低酸素状態を作り出し、その低酸素状態が VEGF を増加させ、内膜の肥厚につながっていると考える。ニコチンなどの物質との関わりについては分からない。</p> <p>質問4) 他のサイトカインにも VEGF のように喫煙で影響を受けるものがあるか? (回答) 論文にも記載されていたように血清 CRP も高くなる。他にもいくつか喫煙を反映して高くなるサイトカインの報告は散見される。</p> <p>質問5) 論文の考察で記載されている Flt-1/KDR というレセプターはどこに存在するのか? (回答) Flt-1/KDR は血管内皮のレセプターで、内皮に存在する。</p> <p>質問6) VEGF と IMT(intima-media thickness)や PWV(pulse wave velocity)のデータを比較検討した研究はあるのか? (回答) 動脈硬化のテーマで VEGF と IMT を比較した研究はあるが、検体が血漿で測定されている。血清 VEGF での測定ならば、より大きな有意差が出たのではないかと推察する。VEGF については過去、多くの研究が血漿でなされている。血清 VEGF と動脈硬化との関連をヒトで報告している研究は今のところ確認していない。</p> <p>質問7) 血中の VEGF の安定性について、測定するまで、あるいは、ストックされている期間によってデータに差はなかったのか? (回答) 実験結果は2~3回時期を変えて測定しなおしており、その限りにおいて差は見られなかったが、血清 VEGF と言えども測定の際に 30 分以上放置して測らなければ、値に差が出ることは予測される。</p>			

質問8) 血小板中の VEGF は、どの時点で血小板に発現し、蓄えられた状態になると考えるか?

(回答) Crow-Fukase 症候群のように VEGF が慢性的に高い人は、骨髄で VEGF 含有量の高い megakaryocyte が作られていると推察するが、末梢血液中に骨髄の細胞が出現するという報告などから、血管内皮の状態により VEGF が過剰消費される状態が起これば骨髄からの産生に反映されるのではないかと考える。

質問9) VEGF は、動脈硬化が起こっている際や炎症部位で血小板から放出される間接的な反応であるので、VEGF が動脈硬化促進因子であるとは言えないのではないか?

(回答) ご指摘の通りであるが、VEGF 分泌の制御の利かない状態というのが動脈硬化をコントロールできない(促進する)ことになるのではないかと考える。

質問10) 喫煙者や Crow-Fukase 症候群で血小板からの VEGF の放出量は増えるのか?

(回答) 血清 VEGF 濃度は、血小板数にも血小板 1 個あたりの VEGF 放出量にも比例して増える。

質問11) 血小板由来の VEGF の濃度が、血清の VEGF に比べて少ない理由は何か?

(回答) 血小板はフィブリンクロットを作るので、血小板由来の VEGF と血清 VEGF は 1:1 にならないのだと考える。また、血漿で測定される VEGF は血小板以外から分泌されているものではないと考える。

質問12) VEGF は特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) や肝硬変でも減少するのか?

(回答) VEGF は、ITP においても減少し、血清も血漿も測定感度以下となる。肝硬変で血小板が極端に減少した場合の VEGF を測定した経験はないが、尿毒症症候群や夜間血色素尿症など他の病態においても、血小板が少ない場合、血清 VEGF も血漿 VEGF も測定感度以下となる。

質問13) VEGF は極めてクリアランスが早いのか?

(回答) ご指摘の通りで、VEGF は、内皮に発現された特異レセプターに取り込まれて、たちどころに血中からクリアランスされると考える。

質問14) 脳脊髄液には VEGF は存在するのか?

(回答) 脳脊髄液にも VEGF は存在するが、Crow-Fukase 症候群においても健常人においても値に差は認めない。

質問15) VEGF は、血小板を凝固させずに測定しても血漿中には存在しないのか? 血漿 VEGF の値はアーチファクトなのか?

(回答) 血小板凝固は完全には防ぎ得ない。播種性血管内凝固症候群のように血管内で血小板が壊れ VEGF が多く放出されている状態でさえも血漿 VEGF 濃度は測定感度以下となるので、血漿の VEGF というのは存在し得ないのではないかと考える。また、アーチファクトとは、使用している測定キットの感度のレベルから述べたもので、キットの感度次第では組織で分泌される微量の VEGF の測定も可能となるかもしれない。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。