

論 文 要 旨

Increased serum vascular endothelial growth factor levels in microscopic poly angiitis with pulmonary involvement.

肺病変を伴う MPO-ANCA 陽性 Microscopic polyangitis における血清 VEGF 値の検討

岩川 純

【序論および目的】

Microscopic polyangitis (MPA) では高率に肺病変を合併するが、肺病変の指標になる血清マーカーは少ない。血管増生因子の一つである VEGF は川崎病などの血管炎との関与が指摘されている。1993 年から 2005 年まで当科に入院した MPA 患者 22 例(厚生労働省診断基準)を対象とし、血清 VEGF 値と肺病変の広がり、予後を検討した。MPA の疾患活動性には BVAS(Birmingham Vasculitis Activity Score)を使用した。肺病変については HRCT の画像所見を解析し、Composite Physiologic Index: CPIを使用した。VEGF は治療前値を ELISA 法にて測定し、15 例については治療前後で血清 VEGF 値を測定した。気管支肺胞洗浄 BALF を施行した 11 例で BALF 中の VEGF 陽性細胞、CD11b, CD25 陽性細胞を FACS で検討し、さらに VATS を施行した 2 例で免疫組織学的に検討した。

【材料および方法】

患者 当科に入院した MPA 患者 22 例を対象とした。9 例が男性、13 例が女性であった。平均年齢は 68.0 ± 9.14 歳であった。すべての患者は、プレドニゾンと免疫抑制剤で治療されていた。比較対照として、気道感染患者 16 例(男女比 7:9 平均年齢 67.9 ± 10.3 歳 肺炎 10 例 急性気管支炎 6 例) 尿路感染 13 例(男女比 5:8 平均年齢 68.2 ± 11.1 歳) 健常者 10 例(男女比 4:6 平均年齢 64.9 ± 12.3) とした。MPA の診断は 1992 Chapel Hill Consensus Conference の診断基準と病理学的診断とした。血管炎の病勢については全身症状と臓器症状をもととする Birmingham Vasculitis Activity Score(BVAS)を用いた。MPA、気道感染、尿路感染については末梢血液中の CRP,ESR,KL-6,PaO₂ を測定した。

VEGF 測定

MPA 患者 15 例で治療前と治療開始 3 ヶ月後の VEGF を測定した。VEGF₁₂₁ VEGF₁₆₅ を認識する enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D System)を用いた。血清中、BALF 中の VEGF は 2 回測定し平均を用いた。同時に P-40,p70 を認識する IL-12 ELISA kit を用いて血清中の IL-12 を測定した。450nm の吸光度を測定し、VEGF,IL12 濃度は GraphPad Software を用いて検量直線を作成した。

Composite physical index (CPI)

MPA 患者の肺病変の広がりを検討するため、CPI を用いた。CPI は Wells らの方法によった。CPI の計算式は $CPI = 91.0 \times (0.65 \times \%DLCO) - (0.53\%FVC) + 0.34\%FEV1.0$ とした。

画像分析

HRCT を用いて検討した。1cm ごと 30 スライスを独立して呼吸器内科医、放射線科医 2 人で検討した。意見が分かれる点については、再度 2 人で検討した。

BALF 免疫染色

11 例の MPA 患者の BALF を検討した。BALF は 44g、5 分間 Cytometer を用いて細胞を回収し、細胞分画は May-Giemsa 染色で検討した。上清については VEGF 測定まで -20°C で保存した。PBS50 μ l で 1×10^5 個の細胞を懸濁し、CD3 または CD18 と CD25 または CD11b で染色し、FACS を行った。

Video-associated thoracoscopic surgery を受けた 2 例の MPA 患者からの検体を用いた。VEGF rabbit polyclonal antibody を使用し通常の DAB 発色法で免疫染色を施行した。

【結果】

生存率 5 年生存率は 50% で平均生存期間は 31.9 ± 28.1 ヶ月であった。6 例は呼吸不全で死亡し、4 例は感染症、1 例は DIC で死亡した。

VEGF 測定 血清中の VEGF 値は MPA 患者と他疾患の患者と比較して有意に上昇していた (Mean 1104.5 ± 684.3 pg/ml 気道感染 391.2 ± 133.8 pg/ml 尿路感染 364.1 ± 118.9 pg/ml 健常者 98.3 pg/ml)。血清 VEGF 値 527.5 pg/ml を Cut-off とすると感度 90%、特異度 87.9% で MPA と今回検討した気道感染、尿路感染を鑑別することが可能であった。また、5 年以内で死亡した MPA 患者と 5 年以上生存例で治療前の血清 VEGF 値を比較すると死亡例では有意に高く (死亡例 1491.3 ± 705.9 pg/ml、生存例 786.1 ± 511.9 pg/ml)、 802.5 pg/ml を Cut-off とすると感度 90.9% 特異度 81.8% で予後不良を予測しえた。治療前後での比較では有意に治療により血清 VEGF 値は低下していた (治療前 1084.7 ± 345.9 pg/ml 治療後 339.1 ± 156.9 pg/ml $p < 0.05$)。IL-12, CRP は健常者との比較では有意に上昇していたが、気道感染、尿路感染患者と比較して有意差は認められなかった。

CPI, BVAS と血清 VEGF 値 血清 VEGF 値と肺病変の指標となる CPI は正の相関を示した ($r = 0.801, p < 0.001$)。また血管炎の指標である BVAS と血清 VEGF 値も正の相関を示した ($r = 0.583, p < 0.05$)。**画像所見と血清 VEGF 値** 画像所見の検討ではスリガラス陰影 (GGA) 14 例 (63.6%)、牽引性気管支拡張像 19 例 (86.4%)、蜂巣肺 11 例 (50%)、浸潤影 9 例 (40.9%)、気管支血管周囲の肥厚 9 例 (40.9%) を認めた。スリガラス陰影、浸潤影を認めた患者での血清 VEGF 値は認めない患者と比較して有意に上昇していたが (GGA + 1368.1 ± 705.9 pg/ml GGA - 723.1 ± 402.5 pg/ml、浸潤影 + 1523.6 ± 681.3 pg/ml 浸潤影 - 685.5 ± 364.7 pg/ml) 蜂巣肺のあるなしでは有意差を認められなかった。

FACS、VEGF 免疫染色 BALF 中の細胞では VEGF と顆粒球のマーカーである CD11b が共染色されている細胞が有意に多かったが単核球のマーカーである CD25 は染色されなかった。BALF 中の VEGF+/CD11b+ 細胞の割合と CD11b+/CD18+ 細胞との割合は正の相関を示した。BALF 中の CD11b+/CD18+ 細胞の割合と血清 VEGF 値は正の相関を示し ($r = 0.721, p < 0.05$)、BALF 中の VEGF 値は CPI と正の相関を示した ($r = 0.812, p < 0.01$)。VEGF 免疫染色では浸潤している炎症細胞、肺胞マクロファージ、肺胞上皮細胞に VEGF 陽性細胞を認めた。

【結論及び考察】

血清 VEGF 値は MPA 患者では他疾患と比較して有意に上昇していた。特に MPA 患者の中で 5 年以内に死亡した患者では有意に高く 802.5 pg/ml を Cut-off とすると感度 90.9% 特異度 81.8% で予後不良を予測しうることを示唆され、血清 VEGF 値が MPA のマーカーとなりうることを示された。画像所見では GGA、浸潤影、蜂巣肺、牽引性気管支拡張所見と多彩な病変をきたしていた。画像所見と血清 VEGF 値の関連では、比較的に活動性が高いと判断される GGA、浸潤影を来している患者では血清 VEGF 値が高値であるのに対して、肺組織が破壊された後の蜂巣肺を来している患者では血清 VEGF 値は高値を示さなかった。これは肺病変の活動性と VEGF との因果関係があることが示唆している可能性がある。BALF 中の CD11b 陽性顆粒球が VEGF を発現し、BALF 中の VEGF+/CD11b+ 細胞の割合と CD11b+/CD18+ 細胞の割合は正の相関を示した。CD11b, CD18 は好中球の血管内皮細胞への接着、rolling に関与すること知られている。したがって CD11b 顆粒球は内皮細胞へ接着、浸潤しうる活性化された好中球であり、この好中球が VEGF を産生している可能性が示唆された。また川崎病などでは VEGF が初期の血管障害に関与することが報告されており、MPA の進展で重要な TNF α -が VEGF の発現で up-regulation されることが報告されていることから VEGF が MPA の病勢に何らかの影響を与えている可能性がある。

論文審査の要旨

報告番号	医研第 636 号	氏名	岩川 純
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	出雲 周二	上村 裕一

Increased serum vascular endothelial growth factor levels in microscopic polyangiitis with pulmonary involvement.

(肺病変を伴うMPO-ANCA陽性 Microscopic polyangiitis における血清 VEGF 値の検討)

Respiratory Medicine 100, 724-1733, 2006

Microscopic polyangiitis (MPA) では高率に肺病変を合併するが、肺病変の指標になる血清マーカーは少ない。血管増生因子の一つである Vascular endothelial growth factor (VEGF) は川崎病などの血管炎との関与が指摘されている。著者らは肺病変を伴う MPA 症例 22 例について血清 VEGF 値と肺病変について検討した。MPA 患者の血清 VEGF 値は呼吸・尿路感染症患者、健常人よりも有意に高いことを示した (Mean 1104.5±684.3 pg/ml 気道感染 391.2±133.8 pg/ml 尿路感染 364.1±118.9pg/ml 健常者 98.3pg/ml)。MPA 患者の血清 VEGF 値は治療に伴い有意に低下し、治療効果の判定に寄与する可能性を指摘し、5 年以内に死亡した MPA 患者と 5 年以上生存例での治療前の血清 VEGF 値から死亡例では有意に高く (死亡例 1491.3±705.9pg/ml、生存例 786.1±511.9pg/ml)、802.5pg/ml を Cut-off とすると感度 90.9% 特異度 81.8% で予後不良を予測しえたとしている。肺病変の広がりを著者らは Composite physical index (CPI) を使い、CPI は血清 VEGF 値と有意な正の相関関係を示したことから、胸部 CT 上 Ground Grass Opacity または consolidation を認めた症例では血清 VEGF 値が有意に高かったが Honeycomb を認めた症例では有意差はなかったことから、活動性のある肺病変と血清 VEGF 値は関連している可能性を指摘した。著者らは MPA における血清 VEGF 値は肺病変の指標になる可能性があるとしている。また、肺胞洗浄液 (BALF) 中の FACS で VEGF と顆粒球マーカーである CD11b が共染色されている細胞が有意に多く、単核球マーカーである CD25 は染色されなかったことを示した。CD11、CD18 は好中球の血管内皮細胞への接着、rolling に関与すること知られているが著者らは BALF 中の VEGF+/CD11b+ 細胞の割合と CD11b+/CD18+ 細胞の割合は正の相関を示したことから、CD11b 顆粒球は内皮細胞へ接着、浸潤しうる活性化された好中球であり、この好中球が VEGF を産生している可能性を示唆し、VEGF が MPA の病勢に何らかの影響を与えている可能性があることを結論づけている。

最終試験結果の要旨

報告番号	医研第 636 号	氏名	岩川 純
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	出雲 周二	上村 裕一

Increased serum vascular endothelial growth factor levels in microscopic polyangiitis with pulmonary involvement.

(肺病変を伴うMPO-ANCA 陽性 Microscopic polyangitis における血清 VEGF 値の検討)

肺病変を伴うMPO-ANCA 陽性 Microscopic polyangitis における血清 VEGF 値の検討
主査および副査の3名は、平成18年9月21日、学位請求者 岩川 純に面接し、学位請求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。

① MPO-ANCA 陽性 Microscopic polyangitis (MPA)の頻度について

- 1) 地域性はあるのか?
- 2) 日本と欧米との頻度の比較は?

MPA の頻度については現在まで詳細な報告はない。欧米、日本での頻度についても現在のところ不明である。

② 腎病変の活動性のパラメーターと vascular endothelial growth factor (VEGF)の関係はあるのか?

腎病変のパラメーターのひとつであるクレアチニン(Cr)と血清 VEGF 値について Cr 値が各患者間であまり差が無いので統計学的には有意な相関は認められなかった。

③ 本研究では患者平均年齢が 68 歳と高齢であった。MPA 患者年齢は一般的に高齢なのか? 60 歳台、70 歳代の報告が多く一般的に高齢者に発症する。

④ VEGF 測定について

- 1) ストック検体の状態
-20℃で検体は保存し、保存検体を用いて測定した。
- 2) 測定の時期は?
同時に測定しており、検体採取時期と測定時期の差は症例によりさまざまである。

⑤ 肺胞洗浄液(BALF)については病変部位と非病変部位で比較は可能か?

BALF を行える部位が右中葉、左舌区に限られており、比較は困難である。BALF を施行した部位に病変があるか、ないかを今後検討する。それにより、VEGF 値に差があるか検討する。

⑥ VEGF と血小板の関与についてはどう検討したか？

血小板については末梢血での血小板の値と VEGF 値の相関関係を調べたが相関がなかった。本研究では関与しないと考えている。

⑦ 母集団が高齢のため、VEGF の基礎値は年齢により影響を受けるか？

本研究では年齢で有意差がない健常者を陰性コントロールとしているので、年齢による基礎値の変化はないと考えている。

⑧ 肺病変の有無での VEGF 値の検討は行ったか？ また、肺病変がない症例でも血清 VEGF 値は高値を示すのか？

本研究では肺病変を有する MPA における VEGF 値の検討を行っている。すべての患者が肺病変を有しているため肺病変の有無での検討は行っていない。今後、肺病変のない MPA 患者での検討が必要と考えている。

⑨ VEGF の誘導には炎症と低酸素血症に起因する可能性がある。VEGF 値と呼吸不全との関係、特に低酸素血症についての検討は行ったか？

血中の動脈酸素分圧と VEGF 値との相関関係は認められなかった。

⑩ VEGF のソースとしては末梢血中では血小板が起源となる。血漿での測定ではどうか？

11 例の血漿の VEGF 値では血清と差がなかった。肺病変の広がりとの相関関係も認められた。

⑪ 末梢血中と BALF 中 VEGF 値とを比較して BALF 中が非常に多いようなら肺起源で VEGF が産生されている可能性があるのでは？

末梢血中の VEGF 値が 1104.5 ± 684.3 pg/ml であったが BALF 中の VEGF 値は 441.8 ± 273.7 pg/ml であった。VEGF 値の単純比較では肺が VEGF 産生の起源とは結論できなかった。

⑫ VEGF がこの病態の原因か？

VEGF が病態の原因か、血管炎により惹起されているものかは今後の検討が必要である。VEGF 値の上昇と肺病変の広がりが相関していることから、VEGF をコントロールすることで MPA 患者の肺病変の病勢を抑えることが可能かもしれない。

⑬ 免疫抑制剤等による治療の反応性はあるのか？

治療については当初は反応し炎症所見ともに VEGF 値も低下する。5 年以内に死亡した患者群でも治療により VEGF CRP などは低下していた。しかし、長期予後は不良である。

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。