

## 論 文 要 旨

## Platelet vascular endothelial growth factor is a useful predictor for prognosis in Kawasaki syndrome.

〔 血小板血管内皮細胞増殖因子は  
川崎病血管炎の重要な予測因子である 〕

上野 健太郎

### 【序論および目的】

川崎病は主に5歳未満の小児に発症する原因不明の全身性の血管炎で、日本では年間10,000人の発症がある。冠動脈瘤後遺症は最も重要な合併症であり、免疫グロブリン超大量療法(IVIG)等の治療でその頻度は減少してきたが、約10~20%の症例で冠動脈病変をきたす。重症例での治療強化を行うことで、冠動脈瘤の頻度を減らす試みが考えられているが、川崎病における重症度評価は、白血球数やCRP値等の臨床検査値で単純には評価できない。

血管内皮細胞増殖因子-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) は血小板に多く含まれ、血管炎症部位で血小板凝集に伴い放出され、血管透過性の亢進、血管新生を誘導する。血小板の活性化、凝集に伴い、巨核球や血小板に豊富に含まれるVEGF、PDGFなどの炎症性サイトカインが多量に放出される。我々は血小板に含まれるVEGF-Aをplatelet VEGFと定義した。platelet VEGFは動脈硬化や播種性血管内凝固症候群など血管炎症性疾患での評価が行われており、病態の重症度や予後を検討する上で有用と報告されている。川崎病はマクロファージ/単球が関与し重症例で冠動脈瘤をきたす全身性の血管炎症性疾患で、炎症・細胞障害のネットワークが複雑に絡んでいる。

我々は川崎病におけるplatelet VEGFと炎症病態や重症度評価との関連性について検討した。

### 【材料および方法】

年齢、白血球数、CRP値に差のない急性期川崎病患児80例(KS群)と発熱コントロール児26例(Control群)において、platelet VEGFを測定し比較を行った。血清VEGFはELISA法で測定した。血清VEGFはそのほとんどが血小板に含まれることを確認(Platelet-rich plasmaを用いて、human-thrombin / calcium chloride solution 5Uml<sup>-1</sup>/10mMで活性化を起こし、30分反応後に遠心、実際の血小板中に含まれるVEGF<sub>165</sub>の濃度を確認)し、platelet VEGFを血清VEGFと血小板数、ヘマトクリットから以下のように算出した(総VEGF量(pg)=血清VEGF(pg/ml)×血清量(ml)=血清VEGF(pg/ml)×総血液量(ml)×(100-Ht)/100, 総血小板数=血小板数(×10<sup>4</sup>/μl)×総血液量(ml)×10<sup>3</sup>, platelet VEGF(血小板1個あたりに含まれるVEGF量)(pg×10<sup>-8</sup>)=血清VEGF(pg/ml)×血清量(ml) / 総血小板数)。得られたplatelet VEGF値と免疫グロブリン(IVIG)反応性、冠動脈後遺症(Coronary artery abnormalities; CAA)との関連性について、統計学的解析を行った。また血小板活性化の指標となる平均血小板容積(Mean Platelet Volume; MPV)とplatelet VEGFとの関連性についても検討した。

## 【結果】

患者背景、白血球数、CRP 値は KS 群と Control 群の間に有意差はみられなかったが、血清 VEGF 値、platelet VEGF 値は KS 群で有意に高値であった ( $P=0.470$ ,  $P=0.170$ )。治療反応性についての検討では IVIG 反応群と不応群で、治療前の血清 VEGF、platelet VEGF はいずれも高値ではあったが有意差は認めなかった。血清 VEGF は治療後も両群共に高値が持続するが、platelet VEGF は治療反応群で有意な低下がみられ治療不応群で有意に増加した。冠動脈後遺症 (CAA) (発症 1 か月間の最大 CAA z-score) についての検討では、治療前の血清 VEGF と CAA z-score との間に相関はみられなかったが、platelet VEGF と CAA z-score では有意な正の相関 ( $r=0.524$ ,  $P<0.001$ ) がみられた。また platelet VEGF と MPV には、有意な正の相関がみられた ( $r=0.752$ ,  $p<0.001$ )。

## 【結論及び考察】

血管炎症部位では活性化された血小板から大量の VEGF、PDGF が放出される。重症であればあるほど、血小板の凝集、活性化が促進される。platelet VEGF は治療反応群で治療後有意に低下し、治療不応群で治療後有意に増加したことから、川崎病血管炎の病態を鋭敏に反映している可能性が示唆された。また IVIG 不応群で治療後も platelet VEGF が高値を示すことは、MMP の産生亢進など悪循環を来し、治療不応性にも関与しているのではないかと考えられた。

VEGF と冠動脈病変 (CAA) との関連についてはこれまで一定の見解はない。VEGF は転写因子 ETs-1 を介して MMP の産生を亢進し、細胞外器質の分解を促進する。また川崎病冠動脈病変部位の病理所見では、VEGF、Flt-1、MMP の発現が亢進していることが報告されている。platelet VEGF は CAA と有意な相関を呈していたことから、血管炎症部位での MMP 産生を介して炎症細胞の浸潤、血管透過性の亢進、内膜の増殖関与を起こし、冠動脈病変発症に関与している可能性が考えられた。

MPV は血小板の活性化の指標として報告されている。platelet VEGF は MPV と有意な正の相関があることから、血管内皮細胞の炎症が強いほど、血小板の凝集、活性化、それに伴う消費が激しく代償性に骨髄での血小板産生が亢進していると考えられた。

platelet VEGF は川崎病血管炎の炎症病態や重症度評価に有用であると考えられた。今後更に、川崎病血管炎における急性期の血小板機能、活性能を解析し、新たな治療戦略を検証していきたい。

# 論文審査の要旨

報告番号	総研第 84 号		学位申請者	上野 健太郎
審査委員	主査	有馬 直道	学位	博士 (医学)
	副査	坂本 泰二	副査	上村 裕一
	副査	有村 公良	副査	岡本 康裕

## Platelet vascular endothelial growth factor is a useful predictor for prognosis in Kawasaki syndrome

(血小板血管内皮細胞増殖因子は川崎病血管炎の重要な予測因子である)

血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) は血管炎症部位で血小板の凝集、活性化に伴い放出され、血管透過性の亢進、血管新生を誘導する。VEGF 産生の主体である血小板中に含まれる VEGF は Platelet VEGF と定義され、血管炎の重症度評価で有用と報告されている。

学位申請者は、川崎病の臨床検体を用いて Platelet VEGF と川崎病血管炎の病態や重症度評価との関連性について検討した。多血小板血漿をトロンピンで活性化し、血小板中から放出された総 VEGF 量を測定したところ、既存の報告と同様に血清 VEGF 量とほぼ同値であり、血清で測定される VEGF 値は血小板由来であると確認した。血小板 1 個当たりの VEGF 量 (Platelet VEGF) を血清 VEGF と血小板数、ヘマトクリットから以下のように算出した (① 総 VEGF 量 (pg) = 血清 VEGF (pg/ml) × 血清量 (ml) = 血清 VEGF (pg/ml) × 総血液量 (ml) × (100-Ht)/100, ② 総血小板数 = 血小板数 ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ ) × 総血液量 (ml) ×  $10^3$ , ③ Platelet VEGF (血小板 1 個当たりに含まれる VEGF 量) ( $\text{pg} \times 10^{-8}$ ) = 血清 VEGF (pg/ml) × 血清量 (ml) / 総血小板数)。川崎病患児 80 例 (KS 群) と発熱コントロール児 26 例 (Control 群) で、Platelet VEGF を測定し、その値と治療としての免疫グロブリン (IVIG) 反応性、冠動脈異常 (Coronary artery abnormalities; CAA) 発症、血小板活性化、造血の指標である平均血小板容積 (Mean Platelet Volume; MPV) との関連性を検討し統計学的解析を行った。CAA は小児での心エコー検査における左右冠動脈平均径を参照し、CAA z-score = (川崎病患児冠動脈径値 - 標準冠動脈径値) / 標準偏差を利用して検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) KS 群と Control 群で白血球数、CRP 値に有意差はなかったが、血清 VEGF 値、Platelet VEGF 値は KS 群で有意に高値であった (共に  $P < 0.001$ )。
- 2) 治療前の血清 VEGF、Platelet VEGF はいずれも IVIG 不応群で高値であったが有意差は認めなかった。血清 VEGF は治療後も両群共に高値が持続するが、Platelet VEGF は治療反応群で有意な低下がみられ、治療不応群で有意に増加した ( $P < 0.001$ )。
- 3) 治療前の血清 VEGF と CAA z-score との間に相関はみられなかったが、Platelet VEGF と CAA z-score では有意な正の相関 ( $r = 0.524, P < 0.001$ ) がみられた。
- 4) Platelet VEGF と MPV には、有意な正の相関がみられた ( $r = 0.752, p < 0.001$ )。

Platelet VEGF は治療反応群で治療後有意に低下し、治療不応群で治療後有意に増加したことから、川崎病血管炎の病態を鋭敏に反映している可能性が示唆された。IVIG 不応群で治療後も高値が続くことは、血管炎症部位での血小板活性化、凝集が続いていることが示唆された。Platelet VEGF と CAA z-score は有意な正の相関を呈していたことから、Platelet VEGF は Matrix metalloproteinase (MMP)-9 などの産生を介して、炎症細胞浸潤、血管透過性亢進、内膜増殖、弾性板の破壊を起こし、冠動脈異常発症に密接に関与している可能性が考えられた。また、Platelet VEGF は MPV と有意な正の相関があることから、血管内皮細胞の炎症が強いほど、血小板の凝集、活性化、それに伴う消費が激しく代償性に骨髓での血小板産生が亢進していると考えられた。

本研究は、川崎病における Platelet VEGF と臨床病態、治療反応性、冠動脈異常との関連を検討したものであり、その結果 Platelet VEGF は、小児における後天性心疾患で最も頻度の高い川崎病冠動脈異常発症に関与している可能性が示された。Platelet VEGF は MPV との相関も明らかになった。Platelet VEGF は血小板活性能を反映する点で非常に興味深い。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 84 号	学位申請者	上野 健太郎
審査委員	主査	有馬 直道	学位 博士 (医学)
	副査	坂本 泰二	副査 上村 裕一
	副査	有村 公良	副査 岡本 康裕

主査および副査の5名は、平成21年12月25日、学位申請者 上野 健太郎 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) 川崎病は全身の中型筋型動脈が炎症を起こすとされるが、冠動脈異常が多いのはなぜか？

(回答) 川崎病は全身の血管炎で腎動脈瘤形成などの報告もある。冠動脈には shear stress などの物理的な要因が関連しているので多いと思われる。

質問2) 川崎病の主要症状と VEGF との関連性はあるのか？

(回答) 川崎病では眼球結膜の充血や四肢末端の紅斑、硬性浮腫を認める。VEGF は血管透過性亢進、血管拡張、血管新生作用を有する糖蛋白であり、病態に密接に関与していると考えられる。

質問3) MPV との関連は川崎病特異的なのか？

(回答) 冠動脈疾患では心筋梗塞、他に動脈硬化、高血圧などで指標とする報告がある。

質問4) MMP は酵素の総称か？

(回答) 細胞外マトリックス分解酵素の総称で、川崎病では MMP-2,-9 高値と関連する報告が多い。

質問5) MMP が活性されると蛋白を破壊するのか？

(回答) 血管炎モデルマウスで MMP-9 活性に伴い、弾性板が破壊され瘤形成に繋がる報告がある。

質問6) 川崎病は原因が分からないのに、IVIG が効く理由は？

(回答) 末梢血で急性期に CD14+単球/マクロファージおよび CD3+T リンパ球の NF- $\kappa$ B の活性化がみられるが、IVIG 投与後低下する。また正常冠動脈内皮細胞培養細胞に TNF $\alpha$  刺激を行い、その後 IVIG を投与すると、抑制蛋白である I $\kappa$ B $\alpha$  の分解が抑制された。IL-6 産生と E-selectin 発現も IVIG 後で有意に抑制される。以上の報告はあるが、完全なメカニズムの解明はなされていない。

質問7) 川崎病で responder と non-responder は違う病態なのか？

(回答) 患児における VEGF を含めた炎症性サイトカインの状態、重症度、また兄弟例、再発例などの報告もあることから遺伝学的背景なども治療反応性を分ける因子となっていると考えられる。

質問8) 川崎病の病因はどのように考えているか？

(回答) 川崎病は症候群と考えている。多種の細菌、ウイルスの関与が報告されているが、熱傷などの外的要因に伴う発症も報告されている。様々な要因がトリガーとなり、高サイトカイン血症をきたし、川崎病特有の病態を呈すると考えている。

質問9) 川崎病におけるレミケードの使用に関しては？

(回答) 日本ではまだ確立されていない。川崎病 IVIG 不応例で使用されることもあるが、TNF $\alpha$  モノクローナル抗体単独で全ての川崎病の炎症のカスケードを抑えるのは困難ではないかと思う。

質問 10) TLR4 を介した報告もあるが、川崎病とのメカニズムについてどう考えるか？

(回答) 川崎病患者末梢血単核球の TLR mRNA の発現などをみた報告では、TLR4 の発現が関与しているとは断定できず、必ずしも TLR4 を介したシグナル伝達単独ではない。

質問 11) VEGF が関与しているのであれば、抗 VEGF モノクローナル抗体であるアバスタチンの投与は考えられないか？

(回答) 冠動脈異常を減らす目的では理に適っている。今後検討していく必要はあると思う。

質問 12) 川崎病で、急性期でなく亜急性期に血清 VEGF が増加する理由は？

(回答) 川崎病は急性期に血小板数が低下し、治療後の亜急性期から遠隔期にかけて血小板数が異常に増加する。血清 VEGF は血小板 1 個あたりの VEGF 含有量である Platelet VEGF と血小板数に規定される。亜急性期の血清 VEGF 増加は血小板数が増加してくるため高値を示すと考えられる。

質問 13) CAA z-score と Platelet VEGF の相関をどう考えるか？

(回答) 血管内皮細胞炎症部位では多くの血小板凝集が起こり、代償性に骨髄から  $\alpha$  顆粒を多く含む活性化された新生血小板が炎症部位に粘着、凝集する。今回の検討からも血小板から Platelet VEGF が多量に放出されるほど、冠動脈異常をきたす割合が高く一因になっていると考えている。

質問 14) 血管炎で VEGF がマクロファージ、リンパ球からも発現するが、血小板が主体なのか？

(回答) 今回用いた PRP の検体ではマクロファージ、リンパ球の contamination は 1% 未満であり、VEGF 産生の主体は血小板だと考えている。

質問 15) 川崎病における Platelet VEGF 高値の理由は？

(回答) 川崎病急性期には幼若血小板が多い。本疾患の内皮細胞傷害部位での病変が何かしらのシグナルを介して骨髄内で血小板内の VEGF 量を増加させる機序があるのではないかと考えている。

質問 16) 炎症後血小板が減少し、タイムラグがあって血清 VEGF が増加し血管障害へつながるのか？血小板の増加を抑えることで、冠動脈異常発症を防ぐことが可能か？

(回答) 炎症の急性期には血小板数は低い、血管炎症部位では Platelet VEGF を豊富に含む血小板が多い。炎症がおさまると Platelet VEGF も低下し血小板も resting な状態になると考えられる。川崎病では急性期から血管内皮細胞障害は起こっていると考えられるため、血小板の数を抑えるよりも、過剰に亢進した血小板機能を抑えることが冠動脈異常発症を防ぐため有用だと考えている。

質問 17) Platelet VEGF は MPV が大きいほど高い。また Fig1 でも血小板数が低いほど Platelet VEGF が高い。川崎病合併症との関連性は？

(回答) Platelet VEGF が高値を示すほど血小板数が低く MPV が高い傾向にある。合併症としての冠動脈異常発症との関連性はあると考えている。

質問 18) 川崎病の病態で Platelet VEGF が高いのは体質的な要因、遺伝的な素因はあるのか？

(回答) ITPKC 遺伝子の SNP の報告があるが、遺伝的な素因だけで説明は困難である。

質問 19) VEGF が関与するとすれば、ステロイド投与は効果があるのではないか？

(回答) ステロイド自体は NF- $\kappa$ B を阻害する働きがあり、また炎症は抑えるが、冠動脈病変部位での修復機転の異常をきたすため冠動脈異常発症につながると言われてきた経緯がある。しかしステロイドの効果が近年見直されてきており、日本でも重症川崎病患者に対するステロイド初期併用療法の効果をみる大規模なスタディが始まった。初期併用療法の有用性、ステロイド投与を全例に行うかどうかを今後検討していきたい。

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。