

学位論文題名

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the cytokines causative and predictive of hepatic veno-occlusive disease (VOD) in stem cell transplantation.

(Vascular endothelial growth factor (VEGF) は造血幹細胞移植時の肝中心静脈閉塞症 (VOD) の原因および予測因子のひとつである。)

学位論文内容の要旨

造血幹細胞移植(SCT)は広く普及している治療法である。肝中心静脈閉塞症(VOD)は SCT の重篤な合併症のひとつであるが、その原因は不明で治療方法も未だに確立されたものはなく、発症を SCT 前に予知することも不可能であった。Vascular endothelial growth factor (VEGF)は、血管内皮細胞に作用して血管新生や血管透過性を亢進させたりする因子として知られている。今回我々は VEGF が VOD の原因のひとつではないかと考え、SCT を受けた患者を対象として血清 VEGF 値および VOD の指標のひとつである血漿 protein C(PC)値を経時的に測定した。

【対象と方法】1996年4月から2000年3月までの間にSCTを受けた50例の小児(男32例、女18例、平均年齢8.3歳)を対象とした。23例はヒト白血球抗原(HLA)一致の同胞からの移植、18例はHLA一致の非血縁者からの移植、9例は自家骨髄あるいは自家末梢造血幹細胞移植であった。疾患別では急性リンパ性白血病12例、再生不良性貧血および急性骨髄性白血病各8例、骨髄異形成症候群5例、非ホジキンリンパ腫および神経芽腫各3例、横紋筋肉腫およびWiskott-Aldrich症候群各2例、慢性骨髄性白血病、若年性慢性骨髄性白血病、線維肉腫、肝芽腫、卵黄嚢癌、およびハンター症候群が各1例であった。20例の年齢および性別の一致した健康児を対照とした。移植前処置は全身放射線照射(TBI)を中心としたレジメンが24例、ブスルファン(BU)を中心としたレジメンが14例で、TBIとBUを併用したのは1例であった。メルファラン+エトポシド+カルボプラチンが5例、全身リンパ節照射+シクロホスファミド(CY)が2例であった。VOD予防は前処置中から移植後30日まで全例に低分子ヘパリン100単位/kg/日持続点滴静注を行った。VODの診断および重症度はMcDonaldらの基準に拠った。VODの治療は輸血、アンチトロンビン-III製剤、利尿剤など対症療法で行ったが、1例のみ組織プラスミノゲンアクチベーター30万単位/kg/日を3日間行った。VEGFは酵素免疫測定法(ELISA法)で、PCは比色定量法で測定した。

【結果】移植を受けた50例中6例(12%)がVODを発症した。4例が重症、2例が中等症であった。発症は移植後6日から10日に集中し、いずれの症例も好中球の回復時期と一致していた。血清VEGF値はVODの進行と一致して上昇し、改善と一致して低下した。逆に血漿PC値はVODの進行と一致して低下し、改善と一致して上昇した。VOD例では非VOD

例や健康児と比較しての経過中の VEGF 頂値は有意に高かった( $p<0.001$ )。VOD 例では VEGF 値は移植前から既に高値( $p=0.0012$ )を示していたこともわかった。経過中の CRP 頂値( $p=0.0046$ )、38 度以上の有熱期間( $p=0.0019$ )は VOD 例で有意に高値であった。

血漿 PC 値は移植前は VOD 例と非 VOD 例に差はなかったが、移植後の最低値は VOD 例で有意に低下した( $p<0.001$ )。我々は、PC 値が 40%未満に低下することが VOD 発症の危険因子であることを見出した。すなわち PC 値が 40%未満低下例に VOD 発症例が有意に多かった。そこで PC 値が 40%未満となる危険因子を解析した。PC 値が 40%未満低下した 14 例においては、移植後の血清 VEGF 頂値( $p<0.001$ )、CRP 頂値( $p=0.0057$ )、38 度以上の有熱期間( $p=0.001$ )が有意に高値あるいは延長していた。またこの 14 例では移植前の VEGF 値( $p=0.0016$ )も有意に高値であった。

【考案】今回我々は SCT 後の VOD を合併した患者の経過中の血清 VEGF 頂値が非合併例に比べて有意に高値となることを初めて報告した。しかも VOD を合併した患者においては前処置前の段階で既に VEGF 値が非合併例や健康児に比べて有意に高値であり、VEGF 値は VOD の臨床的指標のみならず予測因子にもなり得ることがわかった。これら VEGF 高値は、移植前後における内皮細胞障害の程度を反映しているものと推察される。

VOD 合併時の VEGF の由来は明らかではない。すべての患者において SCT 後は血小板数が減少しているので、VEGF のすべてが血小板に由来しているとは考えにくい。血小板数は血清 VEGF 値に影響を及ぼすことは明らかであるものの、SCT 後 30 日までの血小板輸血回数に VOD 例と非 VOD 例に差はなく、VOD 時の VEGF 値は血小板減少時においても高値であり、VEGF 値は VOD 自体の進行を反映しているものと思われる。全例において、VEGF 値は前処置開始後徐々に低下して移植当日頃にはほとんど正常化し、好中球の回復と一致して上昇し始めた。このことから VEGF の由来のひとつは顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)や他のサイトカインに刺激された好中球である可能性がある。SCT 後の出血や VOD などの合併症は移植前処置終了直後におこることは少なく、前処置終了後数日から発症することが多い。我々が以前報告したようにこれら合併症のおこる時期が好中球の回復時期と一致することも判明している。この点において、VOD の危険が高い症例においては移植後の G-CSF 使用の適応についても再評価すべきものと思われる。

SCT 後に肝静脈に血栓を形成し VOD に進展するのはなぜだろうか。肝は腸管からの細菌やエンドトキシン(LPS)の侵入に常にさらされており、とりわけ SCT 後で粘膜障害が強い腸管からの侵入は著明なものと考えられる。我々は SCT 後の患者血中 LPS 高値を確認しており、LPS が肝類洞内皮細胞の組織因子の発現を増強したり、LPS がマクロファージの VEGF 発現を増強したりすることも報告している。また BU や CY、およびシクロスポリンなどの薬剤は肝細胞で代謝されたり活性化されたりするので、肝類洞や肝静脈の内皮細胞はこれらの薬剤に高濃度に暴露されることになる。障害された血管内皮細胞は VEGF の標的でありまた VEGF の分泌を促すことが推察される。VEGF は内皮細胞に組織因子の発現を増強することもわかっている。VEGF の血管透過性亢進作用が腹水を引き起こし、また肝類洞内の血流の減少や血液粘度の上昇がおこるものと考えられる。このような状況下で VEGF の血栓形成作用が血管新生作用を凌駕することにより VOD を発症するものと思われる。VOD 例で CRP 値や有熱期間が有意に高値である事実は、腸管からの細菌や LPS の侵入が VOD の引き金となっている可能性を強く示唆するものである。

血漿 PC 値は VOD の臨床的指標と認められている。PC 低下例は VOD の危険症例ということになるが、我々は PC 値が 40%未満に低下することが VOD 発症に重要であることを見出した。PC 値が 40%未満に低下した 14 例において血清 VEGF 値は移植前も移植後も有

意に高値を示し、VEGF 高値も VOD の危険因子のひとつであることが示された。VEGF と PC の相互作用は不明であるが、protein C 低下と VEGF 上昇というふたつの状況が VOD 発症に関与しているものと推察される。今後 VEGF の除去を目的とした治療が VOD の新しい治療方法を拓く可能性がある。

【結論】 VOD の患者の血清 VEGF 頂値は非 VOD 例に比べて有意に高値であった。この VEGF 値の推移は SCT 後の VOD の臨床的経過と一致した。このことから VEGF 値は VOD の原因因子のひとつであり、VOD の臨床的指標になり得るものと考えられる。さらに VOD 例および PC40%低下例における VEGF 値は移植前からも有意に高値であり、血清 VEGF 値は VOD の予測因子にもなり得るものと考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 佐々木 文 章

副 査 教 授 小 林 邦 彦

### 学 位 論 文 題 名

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the cytokines causative and predictive of hepatic veno-occlusive disease (VOD) in stem cell transplantation.

(Vascular endothelial growth factor (VEGF) は造血幹細胞移植時の肝中心静脈閉塞症 (VOD) の原因および予測因子のひとつである。)

肝中心静脈閉塞症(VOD)は造血幹細胞移植(SCT)の重篤な合併症のひとつであるが、その原因や治療方法は未だ明確なものはなく、発症の予知も不可能である。Vascular endothelial growth factor (VEGF)は、血管内皮細胞に作用して血管新生や血管透過性を亢進させる因子として知られている。申請者は VOD における VEGF 関与の可能性を明らかにする目的で、SCT を受けた患者を対象として血清 VEGF 値および VOD の指標の一つである血漿 protein C (PC)値を経時的に測定した。

1996年4月から2000年3月までの間にSCTを受けた50例の小児(男32例、女18例、平均年齢8.3歳)を対象とした。23例はヒト白血球抗原(HLA)一致の同胞からの移植、18例はHLA一致の非血縁者からの移植、9例は自家骨髄あるいは自家末梢血幹細胞移植であった。疾患別では急性リンパ性白血病12例、再生不良性貧血および急性骨髄性白血病各8例、骨髄異形成症候群5例、非ホジキンリンパ腫および神経芽腫各3例、横紋筋肉腫およびWiskott-Aldrich症候群各2例、慢性骨髄性白血病、若年性慢性骨髄性白血病、線維肉腫、肝芽腫、卵黄嚢癌、およびハンター症候群が各1例であった。20例の年齢および性別の一致した健康児を対照とした。移植前処置は全身放射線照射(TBI)を中心としたものが24例、ブスルファン(BU)を中心としたものが14例で、TBIとBUを併用したのは1例であった。メルファラン+エトポシド+カルボプラチンが5例、全身リンパ節照射+シクロホスファミド(CY)が2例であった。VOD予防として前処置中から移植後30日まで全例に低分子ヘパリン100単位/kg/日持続点滴静注を行った。VODの診断および重症度はMcDonaldらの基準に拠った。VODの治療は輸血、アンチトロンピン-Ⅲ製剤、利尿剤など対症療法で行ったが、1例のみ組織プラスミノゲンアクチベーター30万単位/kg/日を3日間行った。VEGFは酵素免疫測定法(ELISA法)で、PCは比色定量法で測定した。

移植を受けた50例中6例(12%)がVODを発症した。4例が重症、2例が中等症であった。発症は移植後6日から10日に集中し、いずれの症例も好中球の回復時期と一致していた。血清VEGF値はVODの進行と一致して上昇し、改善とともに低下した。逆に血漿

PC 値は VOD の進行と一致して低下し、改善とともに上昇した。VOD 例では非 VOD 例や健康児と比較しての経過中の VEGF 頂値は有意に高かった( $p < 0.001$ )。VOD 例では VEGF 値は移植前から既に高値( $p = 0.0012$ )を示していた。VOD 例では、経過中の CRP 頂値( $p = 0.0046$ )が有意に高く、38 度以上の有熱期間( $p = 0.0019$ )も有意に長期であった。

移植前の血漿 PC 値は VOD 例と非 VOD 例で差はなかったが、移植後の最低値は VOD 例で有意に低下した( $p < 0.001$ )。一方、PC 値の 40%未満低下例に VOD 発症例が有意に多く、これが VOD 発症の危険因子であることを見出した。

本研究で、申請者は SCT 後の VOD を合併した患者の経過中の血清 VEGF 頂値が非合併例に比べて有意に高値となることを初めて見出した。しかも VOD を合併した患者においては前処置前の段階で既に VEGF 値が非合併例や健康児に比べて有意に高値であり、VEGF 値は VOD の臨床的指標のみならず予測因子にもなり得ることを明らかにした。VEGF 高値は、移植前後における内皮細胞障害の程度を反映しているものと推察される。

VOD 合併時の VEGF の由来は明らかではないが、全例において、VEGF 値は好中球の回復と一致して上昇し始めたことから、VEGF の由来のひとつは顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)や他のサイトカインに刺激された好中球である可能性がある。SCT 後の出血や VOD などの合併症は移植前処置終了直後におこることは少なく、前処置終了後数日してから発症することが多い。我々が以前報告したようにこれら合併症のおこる時期が好中球の回復時期と一致することも判明している。従って、VOD の危険が高い症例においては移植後の G-CSF 使用の適応についても再評価すべきものと思われる。

血漿 PC 値は VOD の臨床的指標と認められている。実際、我々は VOD 発症例では PC 値が 40%未満に低下することを見出した。VEGF と PC の相互作用は不明であるが、PC 低下と VEGF 上昇という二つの状況が VOD 発症に関与しているものと推察される。今後、VEGF 値を低下させることが VOD の新しい治療法になり得るものと考えられる。

公開発表に際し、副査の佐々木教授から、本測定系と VEGF family の関係、VEGF と前処置の関係、内皮細胞障害マーカーとしての適否、組織染色など発現組織の検討の有無など、次いで副査の小林教授から、VEGF と PC 間での逆相関および PC 低下のメカニズムについて、VEGF 測定時期と VOD 発症予測の関係など、最後に主査の今村教授から、移植前後での VEGF 値と VOD 発症の関係、前処置と VOD 発症の関係、とくに低分子ヘパリン投与との関係、VOD 予防のための PC 投与の妥当性、シクロスポリン脳症などと VEGF 値の変化などについての質問があった。申請者は何れの質問に対しても、自らの実験結果と文献を引用し、概ね妥当な回答を行った。

本論文は、造血幹細胞移植における重篤な合併症である肝中心静脈閉塞症の発症予測因子および臨床的指標としての VEGF 測定の意義を明らかにしたものであり、今後の臨床の場における応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。