

学位論文審査結果の報告書

氏 名 谷口 康博

生 年 月 日 昭和 55年 9月 18日

本 籍 (国 籍) 宮崎県

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 1261号

学位授与の条件
(博士の学位) 学位規程第5条該当

論 文 題 目

Elevated plasma levels of procoagulant microparticles
are a novel risk factor for thrombosis in patients
with myeloproliferative neoplasms.

骨髓増殖性腫瘍における血清中向凝固性マイクロパーティクルの
増加は血栓症の 新たなリスクファクターである

学位論文受理日 2017年 11月 13日

学位論文審査終了日 2018年 1月 18日

審 査 委 員 (主 査)

池上陽司



(副主査)

梶 博史



(副主査)

福岡 和也



(副 査)



指 導 教 員

松村 到



論文内容の要旨

【目的】

骨髄増殖性腫瘍 (MPN) 患者は高頻度に血栓症を合併することから、MPN における主な治療目標はその予防である。MPN の血栓症のリスク因子として、年齢、血栓症既往、心血管系リスク、*JAK2* 遺伝子変異の有無等が報告されているが、これらは治療目標とはなり得ない。本研究では、MPN の血栓症のリスクを評価でき、かつ治療目標となる新たなマーカーの探索を目的として検討を行った。

【方法】

本研究では、血清中のマイクロパーティクル (MPs) に着目した。MPs は細胞膜から分離される膜小胞体であり、炎症、血栓形成、癌転移など様々な病態に関わっている。MPN 59 例より末梢血を採取し、フローサイトメーターを用いて MPs の定量、向凝固能等の特性を評価した。また、MPs 数と血栓症との関連を統計学的に解析した。

【結果】

MPN 症例と健常人との間で全 MPs 数には有意差はなかったが、MPN、特に血栓症既往のある症例では、既往のない症例と比較して組織因子 (TF) を発現する MPs (TF+MPs) が有意に高値であった。血球数と TF+MPs との間に関連はなかったが、細胞減少療法中の症例では、TF+MPs が有意に減少していた。トロンビン生成試験にて、TF+MPs の量とトロンビン生成量との間で正の、フィブリン形成時間との間で負の相関を認め、TF+MPs の *in vitro* での向凝固能を確認した。TF+MPs と血栓症の関連について ROC 解析を行った結果、感度 100%、特異度 71.4%、曲線化面積 0.917 でカットオフ値 84.7/ μ l が導かれ、単変量解析において TF+MPs > 84.7/ μ l と血栓症との間で有意な相関を認めた。

【考察】

MPN における血栓症のリスク因子 (60 歳以上、心血管系リスク、*JAK2* 遺伝子変異有り) は、未治療例を対象としたものであり、今回の未治療、既治療例を対象として行った解析では、心血管系リスクのみが血栓症と有意な関連を示した。一方、TF+MPs > 84.7/ μ l は、単変量解析で血栓症と有意な相関を示し、他因子を含めた多変量解析では、解析数が少なく有意な相関は得られなかったものの、最も高いオッズ比を示したことから、治療の有無によらず TF+MPs 数が血栓症のリスク因子となる可能性が示唆された。また、多くの症例で治療により TF+MPs 数の減少を認めたが、84.7/ μ l を下回らない症例も存在したことから、治療による TF+MPs 数の変化と血栓症発症を前向きに評価することで、TF+MPs 数の血栓症の発症予測、治療目標における有用性が明らかになると考えられた。

【結論】

TF+MPs 数は MPN における血栓症の新たなリスク因子であり、治療の際のサロゲートマーカーとなる可能性が示唆された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2017年8月5日 公 表 (DOI: 10.1007/s12185-017-2302-5)	博士学位論文 International Journal of Hematology 2017年8月5日 online掲載
	Elevated plasma levels of procoagulant microparticles are a novel risk factor for thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms	
	全 文	

1) 学位論文の要旨

【目的】 骨髄増殖性腫瘍(MPN)は造血幹細胞レベルの未熟な造血細胞にJAK2、CALRなどの遺伝子異常が起こることによって発症する。慢性の経過をとり、一部の患者は急性骨髄性白血病に移行するが、高齢者が多いこともあって、最も高頻度の死亡原因は血栓症の合併である。このため、MPNにおける主な治療目標は血栓症の予防である。これまでにMPNの血栓症のリスク因子として、年齢、血栓症既往、心血管系リスク、JAK2遺伝子変異などが報告されているが、これらは治療に関わらず規定される背景因子であり、治療目標とはなりえない。

マイクロパーティクル(MPs)は白血球や血小板などの細胞膜から分離される膜小胞で、炎症、血栓形成、癌転移など様々な病態に関わっている。本研究では、MPN患者の血栓症のリスクを評価でき、かつ治療目標となる新たなマーカーとして血清中MPsの有用性を検討した。

【対象および方法】 近畿大学医学部附属病院及び近畿大学医学部奈良病院に通院中のMPN患者59例(本態性血小板血症(ET)37例、真性多血症(PV)17例、原発性骨髄線維症(PMF)2例、二次性骨髄線維症(SMF)3例)を対象とした。JAK2、Mpl、CALRの遺伝子変異は次世代シーケンサーあるいはサンガー法で解析した。MPsは、患者末梢血から乏血小板血漿を分離し、フローサイトメーターを用いて単離した。白血球由来のMPsはCD45、血小板由来のMPsはCD41、血管内由来のMPsはCD146を指標として単離し、定量した。これらの抗原と同時に、CD142で検出される組織因子(tissue factor, TF)、AnnexinV (ANV)で検出されるリン脂質を指標として向凝固性MPsを定量した。MPsのin vitroでのトロンビン形成能は、乏血小板血漿をレプチナーゼで処理し、合成基質S-2238、Caを添加した後の吸光度(405nm)の変化で測定した。MPs数と血栓症との関連はStudent's testなどを用いて統計学的に解析し、 $p < 0.05$ を有意と判定した。なお、本研究は近畿大学医学部の倫理委員会の承認のもとに(承認番号26-274)、患者から口頭および文書での同意を得た上で行った。

【結果】 59例の患者背景を解析した結果、女性が39例と男性より多く、年齢中央値は68(範囲: 38-97)歳であった。59例中22例が心血管系の血栓性疾患(脳梗塞11例、心筋梗塞3例、狭心症4例、その他4例)の既往を有していた。血液検査では、PV患者のヘモグロビン値の中央値は15.5(範囲: 7.9-22.8)g/dlであった。ET患者の血小板数の中央値は68.8(範囲: 36.7-106.8)万/ μ lであった。アスピリンなどの抗血小板療法は34例、抗凝固療法は8例に実施されていた。40例が細胞減少療法(瀉血6例、ハイドロキシウレア28例、アナグレリド10例、JAK2阻害薬2例;一部の症例では併用)を受け、19例が無治療であった。遺伝子解析の結果、JAK2変異はPVで17/17例、ET29/37例、PMF1/2例、SMF1/3例で認められ、欧米での報告と比較すると、ETにおいてJAK2変異の比率が高い傾向にあった。CALR変異はETでは2/37例と欧米での頻度より低く、SMFでは2/3例で認められ、PV、PMFでは認められなかった。MPL変異はいずれの疾患でも認められなかった。向凝固性のTF陽性のMPs(TF+MPs)は健常人では由来不明(血小板、血管内皮、白血球由来以外)が最も比率が高かったが、未治療のMPN患者では血小板由来が最も多く、治療例ではその比率は減少していた。一方、ANV陽性のMPs(ANV+MPs)は、健常人では血管内皮細胞由来が最も比率が高く、MPN患者では由来不明が最も比率が高かった。トロンビン生成試験にて、TF+MPsの量とトロンビン生成量との間で正の、フィブリン形成時間との間で負の相関を認め、TF+MPsのin vitroでの向凝固能が確認された。治療の有無にかかわらずMPN患者と健常人との間で総MPs数には差はなかったが、TF+MPsは無治療のMPN患者では健常人と比較して増加していた。MPN患者において血球数とTF+MPs、ANV+MPsとの間に相関はなかった。また、細胞減少療法中のET患者では、治療の有無によって総MPs、ANV+MPsに差はなかったが、治療によりTF+MPsが減少する傾向にあった($p=0.06$)。抗凝固療法を受けている患者では、TF+MPsが治療を受けていない患者より有意に減少していた($p=0.02$)。次に既知の血栓症のリスク因子とMPN患者のMPsの関係を解析した結果、年齢(60歳未満vs. 60歳以上)、JAK2遺伝子変異の有無で、ANV+MPs、TF+MPsに有意な差は認めなかった。一方、血栓症既往のある患者では既往のない患者と比較して、ANV+MPsに差はなかったが、TF+MPsが有意に高値であった(中央値/ μ l plasma: 33.8 vs 47.2, $p=0.02$)。また、血栓症既往のある患者の中では、細胞減少治療によりTF+MPsが有意に減少していた(中央値/ μ l 血漿: 101.2 vs. 42.5, $p < 0.001$)。TF+MPsと血栓症の関連についてROC解析を行った結果、感度100%、特異度71.4%、曲線化面積0.917でカットオフ値84.7/ μ lが導かれた。血栓症の既往と既知のリスク因子との関係を単変量解析した結果、性別(男性) ($p=0.227$)、年齢(60以上) ($p=0.463$)、心血管系リスク ($p=0.078$)、JAK2遺伝子変異 ($p=0.339$)はいずれも有意なリスク因子とはならなかったが、TF+MPs (≥ 84.7)は有意なリスク因子となった($p=0.02$; オッズ比4.37)。しかし、多変量解析では、症例数が少ない影響もあり、有意な因子とはならなかった($p=0.12$)。

【結論】 TF+MPsはMPNにおける血栓症の新たなリスク因子であり、治療の際の新たなサロゲートマーカーとなる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

MPNは高頻度に血栓症を合併することが知られており、年齢、血栓症の既往、JAK2遺伝子変異などの因子を用いて血栓症のリスク分類が行なわれ、抗血小板療法、抗がん剤などによる細胞減少療法が選択される。しかし、これまで用いられてきたリスク因子は、すべて患者の背景因子であり、治療介入できないものである。このため、治療中における血栓症のリスクの評価、治療の目標も明らかではない。また、日本人は欧米人と比較して血栓症の合併が少なく、欧米人でのリスク因子、リスク評価が日本人に適応可能であるかどうか不明である。

論文では、59例のMPN患者を対象として、MPN発症の原因となったJAK2、MPL、CALRの遺伝子変異の頻度がまず明らかにされた。次に、患者血漿中に存在するMPsの起源、機能、量、向凝固能が評価され、最後に、既知の血栓症リスク因子との関連が検討されるという手順で、MPN患者のMPsの特性、MPs測定の意義、有用性が科学的、論理的に解析された。

その結果、健康人、MPN患者における向凝固性MPs(TF+MPs、ANV+MP)の由来の違いが明らかにされ、MPN患者由来のTF+MPsがin vitroでトロンビン活性化能を有することが示された。また、無治療のMPN患者では健康人と比較しTF+MPsが血球数によらず高値であること、細胞減少療法施行群ではTF+MPsが低下していること、血栓症を有するMPN患者ではTF+MPsが高値であること、TF+MPsの上昇はこれまでのリスク因子と比べ高いオッズ比を有することが示された。さらに、血栓症回避のためのTF+MPsのカットオフ値として $84.7/\mu\text{l}$ という治療目標が提言された。

これらの結果は、MPN患者におけるMPsの特性、病的意義を明らかにしたのみではなく、MPsの測定がMPN患者の治療中の血栓症のリスク評価に有用であることを初めて示したものであり、学術的価値は極めて高い。また、血栓症回避のための具体的な閾値が示されたことは、MPN患者の治療中における新たな治療目標が提言されたことであり、臨床的意義も高い。谷口氏は、MPN患者におけるMPsの測定と血栓症の合併を前向きに検討する新たな臨床試験を計画しており、本研究は今後も大きく発展していくことが期待される。

以上のように、本研究は独創性が高く、学術的、臨床的にも極めて重要であり、将来の発展性も高い研究である。

2) 論文審査結果の要旨

谷口康博氏の博士学位論文に対する最終試験は、平成29年12月25日の午後15時30分から研究棟2階カンファレンスルームで福岡教授、梶教授を副主査として実施された。

最終試験では、まず谷口氏が、本研究の学術的背景、対象、方法、結果と考察内容をスライドを用いて口頭発表し、それに対し、副査である両教授がいくつかの質問を行った。

福岡教授からは、1)起源不明のMPsの由来、2)TF+MPsとANV+MPsの生物学的な相違点、3)抗凝固療法によりMPs数が低下する機序、4)TF+MPsの増加と血栓症既往との関連において、多変量解析で統計学的な有意性が消失した原因について質問がなされた。また、梶教授より、5)MPsに着目した理由、6)MPsと他疾患における血栓症との関連性、7)MPsの評価が一般的な凝固検査より有利な点、8)TF+MPsの増加が血栓症を引き起こす機序、9)MPNsで向凝固性MPsが増加する機序、10)JAK2遺伝子変異を共有するにもかかわらずMPNに3つの病態が存在する機序について質問がなされた。

これらの質問に対して、谷口氏は1)起源不明のMPsの大半が赤血球由来であること、2)TF+MPsは凝固を開始する作用を有し、ANV+MPsは凝固カスケードを進めるために必要であり、協調して凝固を促進すること、3)抗凝固療法がトロンビン産生を抑制し細胞の活性化を阻害すること、4)TF+MPsの増加と血栓症既往において心血管リスク因子などが交絡因子となる可能性、5)腺癌などでMPsの関与が報告されており、今回の研究でMPsに着目したこと、6)MPsは、他の癌腫における血栓症のみでなく、生活習慣病などによる動脈硬化や心筋梗塞に関与すること、7)今回の検討ではFDP、D-Dimerなどの凝固系の異常を示す検査結果と血栓症に関連を認めなかったこと、8)TF+MPsが外因系凝固カスケードを開始させ凝固カスケードを活性化し、血栓症発症を促進すること、9)血球の増加や活性化がMPNでは起こっていること、10)3つの異なった病型が引き起こされる理由としてJAK2遺伝子変異のallele burdenが重要であることなど、今回の実験結果、これまでの報告など含め、論理的、科学的な回答を行った。

これらの結果をもとに、主査・副主査は合議の上、提出された学位論文が谷口氏の研究成果であることを確認、また同氏が学位授与にふさわしい知識、研究技術、科学的思考力を有することを評価し、最終試験を合格と判定した。

3) 最終試験の結果：合格

4) 学位授与の可否：可