

令和元年6月19日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10745

研究課題名(和文)ハプトグロビン-ジェノタイピングによる脳血管疾患予防/予後予測法の確立

研究課題名(英文) Established of Prevention or Prediction of Clinical outcome in Cerebrovascular disease by Haptoglobin-genotyping

研究代表者

青木 孝親 (Aoki, Takachika)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70330842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管疾患275人の血液サンプルを用いて、ハプトグロビン(HP)の表現型、遺伝型(rs2000999)、血中濃度の解析を行った。統計学的解析を行ったところ、くも膜下出血(SAH)症例以外では有意な相関は得られなかった。SAH発症6か月後の予後は、血中濃度が有意に相関($p=.0067$)したが、表現型($p=0.12$)およびrs2000999($p=0.27$)単独では予後と関連しなかった。しかし、HP2-2かつrs2000999(G/G以外)であることは、予後不良となる強い傾向を認め($p=0.06$)、SAHの予後不良となるGenetic markerとなる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

くも膜下出血は、破裂すると高確率で死に至り、また重篤な神経症状を後遺する疾患である。今後も症例を重ねてさらなる検討が必要であるが、ハプトグロビンの血中濃度、Common多型およびSNP(rs2000999)の測定は、予後予測因子となる可能性がある。さらにHPの血中濃度が低い事、Common多型がHP2-2であり、かつrs2000999がG/G以外であることはくも膜下出血の予後不良となるGenetic markerである可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We collected blood samples of 275, and their blood haptoglobin (HP) concentration, HP subtypes (HP1-1, HP2-1 and HP2-2), and rs2000999 SNP statuses were determined. Only subarachnoid hemorrhage (SAH) patients showed significantly relation of prognosis except for other disease. SAH patients that we conducted statistical analysis of prognostic values at six months after onset. Multivariate analysis showed significant changes in blood concentration ($p=.0067$) and we observed strong correlations for HHG ($p=.064$) and intracerebral hematoma ($p=0.073$). HP subtype ($p=0.12$) and rs2000999 status ($p=0.12$) alone did not associate with prognosis; however Hp2-2 along with rs2000999 (except G/G) correlated strongly with prognosis ($p=0.06$). Thus associated with HP blood concentration and Hp2-2 along with rs2000999 (except G/G) can potentially be genetic markers for poor prognosis in SAH.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ハプトグロビン くも膜下出血 rs2000999 予後予測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は、脳出血、脳梗塞、くも膜下出血などの脳血管障害の総称であり、現在わが国ではこれらの脳血管障害は、癌、心疾患について死因の第4位を占めている。脳卒中における危険因子としては、高血圧症、不整脈、高脂血症、糖尿病などが指摘されているが、脳卒中の起こるメカニズムはいまだ不明である。脳血管障害は発症後種々の後遺症を惹起することから、その予防と発症後の神経症状を軽減させることは患者の社会生活への復帰に非常に重要である。患者の脳卒中の発症および予後を何らかの方法で予測することができれば、早期に適切に予防的治療が可能となる。

ハプトグロビンは、主に肝臓で合成され血漿中に30-190 mg/dl の濃度で存在する血清糖たんぱく質で、溶血により放出された遊離型ヘモグロビンと結合し、体内からの鉄の喪失を防ぎ、ヘモグロビンの酸化作用による腎臓障害を軽減する機能を担っている。また、ハプトグロビンは、血液型のように個々人で違う型を持った多型タンパクであり、2つの対立遺伝子HP1、HP2に規定されるHP1、HP2-1、HP2の3つの多型(common多型)を呈し、多型による血中濃度差や機能差が報告されている¹。さらにcommon多型以外にもハプトグロビンの血中濃度に関係する遺伝子多型(遺伝子配列の個人差)が報告されている^{2,3}。ハプトグロビンが異常高値を示す代表的な疾患として、HP1型:急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、アルコール性肝硬変、HP2-1型:肺腺癌、卵巣癌、急性心筋梗塞、糖尿病性網膜症、HP2-2型:SLE、本態性高血圧症、高コレステロール血症、型糖尿病、静脈血栓症、ビタミンC欠乏などが言われている。また、上述の危険因子を有する脳梗塞や脳出血の再発の恐れのある人を対象に血圧測定並びにハプトグロビン定量を含めた血液検査をした場合、正常値よりも著しく低下している場合があることが言われている。

近年、くも膜下出血の予後に深く関与する遅発性脳血管攣縮の発現、機能転帰、死亡率とハプトグロビンのcommon多型が関係するという報告がなされた^{4,5}。ヨーロッパ人と日本人の両集団とも、HP2群は他のタイプに比べて有意に遅発性脳血管攣縮発現をおこしやすく、機能転帰が悪く、死亡率についてはヨーロッパ人集団のみの検討であるが、HP2群で高い。くも膜下腔の遊離型ヘモグロビンが脳血管攣縮の発症に関与するとされており、上述のようにハプトグロビンは遊離ヘモグロビンに結合しその酸化作用を中和するが、ハプトグロビンのcommon多型により遊離ヘモグロビンの結合能が異なるという結果が実験的に示されており、このことによるものと推定されている。

2. 研究の目的

これらの研究により示されたcommon多型による差異が、ヘモグロビン結合能ではなく、むしろ、ハプトグロビン蛋白量の差異を反映しているのではないかと推察している。このことから、本研究計画では、common多型のみならず、血中ハプトグロビン濃度、common多型に加え、日本人集団に認められるハプトグロビン遺伝子欠失、さらに、血中ハプトグロビン濃度に関与する一塩基多型(SNP)rs2000999との関連を解析するものである。一方、ハプトグロビンと脳梗塞および脳出血発症とのメカニズムは明らかではないが、諸蛋白質の生理活性から考えると、内皮細胞由来血管弛緩因子の阻害剤であるオキシヘモグロビンの除去、脳血管内皮細胞の保護、腎臓保護による脳循環の改善などによるものと推察される。よって、ハプトグロビンの定量や多型解析が、脳卒中の発症および予後予測、そして新しい治療法に役立つ可能性が期待される。

3. 研究の方法

脳血管障害疾患により久留米大学病院脳神経外科を受診もしくは入院した患者のうち、本研究

についての十分な説明を行い同意が得られた患者のみを対象とする。採血された血液から、血漿ハプトグロビンの測定と、白血球から抽出したゲノムDNA を用いてcommon多型解析、血清濃度に影響を与えることが報告されているハプトグロビン遺伝子欠失とrs2000999 多型解析を行う。

具体的には以下の研究を実施する。

(1) 臨床検体の採取と保護

患者(もしくは代諾者)に対して本研究の十分なインフォームドコンセントを行い、書面にて同意を得る。採血(約7ml)した研究用サンプルを4℃で冷蔵保存。

(2) ハプトグロビンの定量、common 多型、遺伝子型解析

採血した末梢血から、血漿を分離し(A とB に使用)、DNA(C とD に使用)を抽出する。

HP の定量: 搬入時、4 日後、14 日後の採血血液の血漿を用い、ELISA 法³⁾と、業者に委託(ネフェロメトリー法)し定量値を得る。

多型のタイピング(蛋白多型): 搬入時、4 日後、14 日に採取した血液のいずれかの血漿を用いポリアクリルアミドゲル電気泳動によりHP の多型解析(HP1-1、HP2-1、HP2-2)を行う。

SNPs の解析: これまでの研究からHP 濃度との関連が認められた、HP 遺伝子プロモーター多型であるrs5472 と、HP 遺伝子近傍に存在するrs2000999 (G/G、A/G、A/A)のジェノタイピングを、リアルタイムPCR 法によりおこなう³⁾。

HP 遺伝子欠失及びHP common 多型解析: リアルタイムPCR 法を用いて、HP 遺伝子欠失とcommon 多型の同時解析を行う³⁾。

ハプトグロビン多型が予後予測因子となりうるかを、統計学的手法を用いて解析する。基本的にはJMP pro Ver 9.0.2 (SAS Institute)を用いて行うが、必要に応じて他のソフトウェアを用いる。

4. 研究成果

(1) 採取できたSampleの内訳

採取したサンプル中、ハプトグロビン(HP)の表現型(HP1-1、2-1、2-2)、遺伝型(rs2000999)、血中濃度の解析ができたのは、頭部外傷60例、脳内出血56例、くも膜下出血94例、未破裂脳動脈瘤77例、脳動静脈奇形11例、虚血性脳卒中25例、もやもや病12例の全335例となった。脳動静脈奇形、虚血性脳卒中、もやもや病はSample数が少なく、ばらつきも大きかったため統計学的解析には至らなかった。頭部外傷、脳内出血についてはそれぞれで予後と統計学的有意差は得られなかった。くも膜下出血においては、発症時の血中濃度が予後不良群で有意に低値を示した。よって、以下はくも膜下出血に関する研究成果を述べる。

(2) 開頭クリッピング術(NC)が血中濃度に与える影響

これまでの報告ではくも膜下出血との予後についての報告がほとんどであり、その治療法はNCと血管内治療(CE)を含んでいる。しかし、CEに比べてNCは身体に与える侵襲が大きく、NCがHPの血中濃度に影響を与える可能性がある。NCを施行した未破裂脳動脈瘤(UA)9例(男性3人、女性6人の平均64.1歳(55-71歳))を用いて術前、術直後、術翌日でHPの血中濃度変化を検討したところ、血中濃度はcommon多型にかかわらず、いずれにおいても差が認められなかった。したがってNC自体がHpの血中濃度には影響しないものと考えられた。

(3) ハプトグロビン血中濃度のくも膜下出血急性期の継時的変化

破裂急性期の28例を用いた検討では、発症時のHp血中濃度は未破裂群と予後良好群に差はなかつ

たが($p=0.534$)、予後不良群で低下していた($p=0.01$)。そして4日目まで急速に血中濃度は増加し、4日目から14日目にかけて両群でほぼ同程度の値となった64 ($p=0.47$)。以上を踏まえ、くも膜下出血の場合は発症時のハプトグロビン血中濃度が予後予測には重要であることが考えられた。

(4) くも膜下出血予後予測におけるハプトグロビン血中濃度およびSNP(rs2000999)測定の有用性

破裂脳動脈瘤 94 例(男性 24 例 年齢 62.3 ± 13.5 歳)を対象とし、HP 血中濃度、HP Subtype、rs2000999 を測定した。発症 6 か月後の mRS (0-2)を予後良好群として予後予測因子の統計学的解析を行った。予後良好群は 70 例 (74.4%) で、予後と関連したのは年齢 ($p=.013$)、HP 血中濃度 ($p=.0059$)、発症時の重症度 (Hunt & Hess Grade (HHG)) ($p<.0001$)、脳内血腫 (ICH) の有無 (Fisher CT 分類 (Fg)) ($p=.00003$) であり、多変量解析では、血中濃度に有意差を認め ($p=.0067$)、HHG ($p=.064$)、Fg ($p=.073$) で強い傾向がみられた。HP Subtype ($p=0.12$) および rs2000999 ($p=0.27$) 単独では予後との関連は認めなかった。しかし、HP2-2 かつ rs2000999(G/G 以外)であることは、予後と強い傾向がみられた ($p=0.06$)。

SAH 予後と HP の血中濃度は関連しており、HP2-2 かつ rs2000999 (G/G 以外)であることは予後不良となる Genetic marker である可能性が示唆される。

引用文献

1. Carter K and Worwood M, Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol*, 29, 92-110, 2007.
2. Froguel P et al., A genome-wide association study identifies rs2000999 as a strong genetic determinant of circulating haptoglobin levels. *PLoS One*. 7, e32327, 2012.
3. Soejima M et al., Genetic factors associated with serum haptoglobin level in a Japanese population. *Clin Chim Acta*, 433, 54-57, 2014.
4. Ohnishi H et al., Haptoglobin phenotype predicts cerebral vasospasm and clinical deterioration after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis.*, 22, 520-526, 2013.
5. Leclerc JL et al., Haptoglobin phenotype predicts the development of focal and global cerebral vasospasm and may influence outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 1155-1160, 2015.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

杉 圭祐、青木孝親、藤森香奈、野口 慶、山本真文、副島美貴子、神田芳郎、森岡基浩、くも膜下出血の予後予測に対する血中ハプトグロビン濃度測定の有用性、脳卒中の外科学会機関誌、査読有、47巻5号、2019、in press

〔学会発表〕(計 6 件)

青木孝親、杉圭祐、山本真文、野口慶、副島美貴子、神田芳郎、森岡基浩、Haptoglobin-genotyping (rs2000999) による くも膜下出血の予後予測、第48回日本脳卒中の外科学会、2019

青木孝親、副島美貴子、杉圭祐、神田芳郎、森岡基浩、Haptoglobin phenotypeによる 脳出血

後の予後予測、第77回日本脳神経外科学会総会、2018

青木孝親、山本真文、野口 慶、副島美喜子、神田芳郎、森岡基浩、症候性脳血管攣縮に対する血中・髄中ハプトグロビン測定の有用性の検討、第34回 スパズム・シンポジウム、2018

青木孝親、山本真文、野口 慶、副島美喜子、神田芳郎、森岡基浩、Haptoglobin-genotyping (rs2000999) によるくも膜下出血の予後予測、第76回 日本脳神経外科学会総会、2017

青木孝親、山本真文、野口 慶、副島美貴子、折戸公彦、廣畑 優、神田芳郎、森岡基浩、くも膜下出血の予後予測に対する血中ハプトグロビン濃度計測の有用性、第46回 脳卒中の外科学会、2016

青木孝親、山本真文、野口 慶、副島美貴子、神田芳郎、森岡基浩、くも膜下出血の予後予測に対する血中ハプトグロビン濃度計測の有用性、第75回 脳神経外科学会総会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：野口 慶

ローマ字氏名：(NOGUCHI, kei)

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：50597416

研究分担者氏名：折戸 公彦

ローマ字氏名：(ORITO, kimihiko)

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部

職名： 助教

研究者番号（8桁）： 50597408

研究分担者氏名：森岡 基浩

ローマ字氏名：(MORIOKA, motohiro)

所属研究機関名： 久留米大学

部局名： 医学部

職名： 教授

研究者番号（8桁）： 20295140

研究分担者氏名：副島 美貴子

ローマ字氏名：(SOEJIMA, mikiko)

所属研究機関名： 久留米大学

部局名： 医学部

職名： 講師

研究者番号（8桁）： 80279140

研究分担者氏名：神田 芳郎

ローマ字氏名：(KODA, yoshiro)

所属研究機関名： 久留米大学

部局名： 医学部

職名： 教授

研究者番号（8桁）： 9023130

研究分担者氏名：山本 真文

ローマ字氏名：(YAMAMOTO, masafumi)

所属研究機関名： 久留米大学

部局名： 医学部

職名： 助教

研究者番号（8桁）： 50569431

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。