

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03779

研究課題名（和文）先進的ゲノム網羅解析統合による敗血症遺伝子多型研究の新展開

研究課題名（英文）Integrated genome-wide association study in sepsis

研究代表者

中田 孝明（Nakada, Taka-aki）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20375794

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症患者のgenomic DNAを抽出しSNPアレイを用いて250万箇所のゲノムワイドSNPsのゲノタイピングを行なった。Quality control解析を行い、GWAS解析用SNPデータセットを最終化した。このデータを用い、死亡をアウトカムとしたGWAS解析を行った。その結果ではマンハッタンプロットで敗血症の死亡転帰に関連する4箇所の遺伝子座にピークを認めた。この遺伝子座について既報・他コホート解析結果を調査している。カナダ敗血症コホートのGWAS研究で敗血症とのSVEP1遺伝子多型の関連が発見されており、SVEP1と敗血症の病態との関係についてマウス等を用い実験・解析を行なっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は依然致死率が高く、死亡者数は近年増加傾向である。遺伝的要因が敗血症による死亡に与える影響が大きいことが報告されている。全ゲノムを網羅的に解析するゲノムワイド関連解析は既存の知見に制限を受けずに新しい発見を得られる可能性のある革新的な研究方法であり、敗血症の網羅遺伝的解析は未だ少ない。本研究では新たに4箇所の関連遺伝子座を発見しており、大きな学術的意義が高い。またカナダ敗血症コホートのnon-synonymous SNPを用いたGWAS研究で敗血症とのSVEP1遺伝子多型の関連が発見されているが、敗血症との病態との関連は解明されておらず、明らかとすることは大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：A Japanese sepsis cohort (approximately 800 cases) was collected. Genomic DNA from the collected sepsis patients was extracted, and genotyping of 2.5 million genome-wide SNPs was performed using SNP arrays. Quality control analysis was performed to finalize the SNPs dataset for GWAS analysis. Using these comprehensive SNP genotyping data, we performed a GWAS analysis with death as the outcome, and the GWAS results showed peaks at four loci associated with sepsis mortality in a Manhattan plot. We are investigating the results of previous reports and other cohort analyses for these loci. A GWAS study using non-synonymous SNPs in the Canadian sepsis cohort found an association between sepsis and the SVEP1 polymorphism, and we are conducting experiments and analysis of the relationship between SVEP1 and the pathogenesis of sepsis in mice.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：敗血症 GWAS 遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症は依然致死率が高く、死亡者数は近年増加傾向である。救命率改善を目的とした国内外で取組み(ガイドラインなど)は活発に行われている。また世界保健機構(WHO)は敗血症を世界が取り組む課題に2017年に設定しており、国内外で研究の重要性が広く知られている課題です。日本を含めて先進国では、経時的に救命率改善を示す報告は示されているものの、新規の有効な治療法の確立に関する報告は極めて少なく既存の知見にとらわれない新規発見が必要とされている新規発見が必要な重要課題である。

遺伝的要因の個人差である遺伝子多型は様々な疾患/病態の発症/転帰に影響を及ぼすが、遺伝的要因が敗血症による死亡に与える影響(相対危険度 5.0)は、心脳血管疾患/悪性腫瘍による死亡に与える影響(相対危険度 0.87-1.92)よりもはるかに大きいことが報告されている。このため敗血症の転帰に影響を与える遺伝子多型の解明は、国内外で救命率改善や新規治療法の開発に欠かせない重要な研究課題とされている。

遺伝子多型研究は、解析する候補遺伝子を選定し研究する候補遺伝子アプローチから、SNP アレイを用い全ゲノムを網羅的に解析するゲノムワイド関連解析(Genome-Wide Association Study, GWAS)へと発展し、ゲノム全体を対象とした網羅解析も可能となり、既存の知見に制限を受けずに新しい発見を得られる可能性のある革新的な研究方法である。しかし網羅解析を用いた遺伝子多型研究が高い検出力で新規発見を得るには多くのサンプル数を要し、敗血症を対象とした研究成果は未だほとんど報告されていない。そのため、実施可能な GWAS を有効に活用し、新規発見を行うことが最新の研究手法である。

## 2. 研究の目的

本研究は敗血症細胞モデル・敗血症/関連疾患患者コホートを用いた複数の GWAS の網羅解析結果を用いて敗血症の転帰に影響を与える多くの新規遺伝子多型を発見し、個別化医療の礎を築くことを目的とする。また GWAS は遺伝子多型の発見のみならず、病態と関連する新規遺伝子多型を発見する可能性があり、その遺伝子の機能解析により、新規治療法の開発へと発展する可能性が期待できるため、新規発見された遺伝子に関する機能解析も行う。

## 3. 研究の方法

本研究チームは、千葉大学医学部の生命倫理審査委員会での承認が得られた後から平成 31 年 3 月まで、国内の複数施設に協力を得て、大規模な日本人敗血症コホート(約 800 症例)を作成し、敗血症 GWAS を目的とした血液検体・詳細な患者臨床データの収集をおこなってきた。

また James Russell/Keith Walley 教授ら(ブリティッシュコロンビア大学集中治療医学)は2つの敗血症遺伝子多型研究コホート(St Paul's Hospital cohort n=600, Vasopressin and Septic Shock Trial [VASST] n=600)を SNP アレイを用い genotyping 済みである。研究代表者は同研究室に留学し、多くの遺伝子多型研究を実施してきており、その中で、遺伝子多型がアミノ酸配列に変化を起こすタイプの遺伝子多型に限定した GWAS を行っており、敗血症と関連する遺伝子多型として sushi, von Willebrand factor type A, EGF, and pentraxin domain-containing 1 (SVEP1) 遺伝子を新規に発見している。SVEP1 は遺伝子の機能は明らかとされておらず、敗血症との関連も未解明である。そこで SVEP1 の敗血症刺激下での機能について解析を行う。

## 4. 研究成果

収集した敗血症患者の全血中の白血球より genomic DNA を抽出し、その DNA を SNP アレイ(Illumina Infinium Omni2.5 Exome-8)を用いて 250 万箇所のゲノムワイド SNPs の genotyping を行なった。このゲノムワイド SNPs の genotyping raw data に関して最終的に GWAS 解析を行うための準備として行われる DNA、genotyping のクオリティコントロールに関して、世界標準の先進的なデータ解析を行い、GWAS 解析用 SNPs データセットを最終化した。また GWAS 解析用の臨床データに関しても missing data の再確認などを行い、臨床データセットの最終化し、GWAS 解析準備を完了した。これらの網羅的な SNPs genotyping データを用い、死亡を outcome とした GWAS 解析を行った。GWAS 解析結果では、マンハッタンプロットで敗血症の死亡転帰に関連する 4 箇所の遺伝子座にピークを認めた。これらの結果を含めた内容に関しては、論文投稿の準備を行っており、図表とのデータは本成果報告では記載できないが、論文報告には十分な結果が得られていると考えている。また死亡のアウトカム以外にも臓器不全に関する phenotypes をアウトカムと設定し、複数の GWAS を行い、敗血症のサブグループに関する GWAS 解析も研究結果として得た。

これまで敗血症に関して本研究と同規模の GWAS 報告は数報しかない。敗血症 GWAS の既報に加え、炎症性疾患や感染疾患に関する GWAS の中で、今回検出された遺伝子座に関する既報を調査し、一部オーバーラップする部分を同定した。

Wellcome Trust Case Control Consortium は 28 疾患/病態に対し、数千人規模の患者/健常者の SNP アレイを用いた GWAS を行い、GWAS data を公開している。28 疾患のうち敗血症と共通する経路をもつ 4 疾患(マラリア感染・結核感染[免疫能]、関節リウマチ[炎症]、急性冠動脈症候群[炎症/凝固])の GWAS を公表している。その結果と本研究の成果と関連する部分がないか解析し、同様の遺伝的素因の影響がないか検証を行う作業に取り組んでおり、他の GWAS の活用を行っている。

カナダ敗血症コホートの結果でも、日本人敗血症コホートの GWAS で得られた 4 つの遺伝子座と同領域に、有意な遺伝的関連がないか検証を行っている。

カナダ敗血症コホートの non-synonymous SNP を用いた GWAS 研究で敗血症との SVEP1 遺伝子多型の関連が発見された。引き続き大規模な急性冠症候群 GWAS 研究でも SVEP1 遺伝子多型の関連が報告され注目を集めている。SVEP1 遺伝子に関しては遺伝子の機能自体も全容解明に至っておらず、敗血症の病態との関連も明らかとなっていない。そこで、SVEP1 遺伝子改変マウスなどを用いて、敗血症と SVEP1 の関係性について in-vivo 実験等を下記の方法を用いて、研究結果を得た。

SVEP1 遺伝子多型が急性冠症候群や敗血症の遺伝的危険因子であることが報告されているが、外科的侵襲や敗血症などの全身性炎症における SVEP1 の役割に関する研究はまだ不十分である。そこで、われわれはマウスを用い、外科的侵襲や敗血症後の SVEP1 遺伝子発現と蛋白レベルを調べた。マウスのコントロール(手術なし)、偽手術モデル、セカール結紮穿刺による敗血症モデルで SVEP1 の遺伝子発現と蛋白レベルを比較した。サンプルは術後 2、6、24 時間に採取した。この方法で行った結果、肺ではベースライン時に SVEP1 の遺伝子発現とタンパク質産生が高かった。偽手術と敗血症は、刺激直後から肺の SVEP1 遺伝子発現を低下させた。さらに、敗血症は偽手術と比較して遺伝子発現を有意に低下させた。フローサイトメトリー解析の結果、敗血症マウスでは CD31<sup>high</sup>/SVEP1<sup>high</sup> 細胞およびリンパ管内皮受容体 1 (LYVE-1) <sup>high</sup>/SVEP1<sup>high</sup> 細胞の割合が有意に減少し、CD45.2<sup>high</sup>/SVEP1<sup>high</sup> 細胞の割合が増加していた。これらの結果より敗血症は肺における SVEP1 遺伝子の発現を減少させた。敗血症のマウスでは、SVEP1 高値の血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞の割合が減少し、SVEP1 高値の造血細胞の割合が増加した。同内容は、論文作成、投稿・査読中である (<https://f1000research.com/articles/12-77>) した。

なお、上記の研究成果とは別に、SVEP1 マウス実験は継続して行うべき重要な研究結果を得ており、各種サイトカイン測定や病理学的評価を進めている。今後さらに研究を継続し、論文報告予定である。

また、James Russell/Keith Walley 教授ら(ブリティッシュコロンビア大学集中治療医学)カナダ敗血症コホートで敗血症と遺伝的素因に関して、上記とは別に新たな発見をしている。そこでその研究成果と同様の事象が日本人敗血症コホートで replicate できないかについても解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	関根 章博  (Sekine Akihiro)  (30425631)	千葉大学・大学院医学研究院・特任教授    (12501)	
研究分担者	島田 忠長  (Shimada Tadanaga)  (40436423)	千葉大学・医学部附属病院・助教    (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関