

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390335

研究課題名（和文） 生体反応関連分子の遺伝子多型解析に基づく個別化治療確立に関する研究

研究課題名（英文） Tailor-made medicine based on genetic polymorphism analyses in relation to biological and immunological responses.

研究代表者

織田 成人 (ODA SHIGETO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90204205

研究成果の概要（和文）：

日本人独自の遺伝子多型からみた重症救急患者に対する個別化治療を確立することを目的としている。多施設共同研究（計 5 施設）で遺伝子情報と臨床情報を収集した。IL1RA 2nd intron VNTR の臨床経過や転帰への影響について検討した。その結果、導出コホート（自施設症例；n=261）および検証コホート（多施設症例；n=793）両方において、IL1RA RN*2 allele の保有数が多くなるにつれて ICU 死亡率、重症敗血症罹患率ともに有意に上昇していた。

研究成果の概要（英文）：

This study aims to establish the tailor-made medicine based on genetic polymorphism analysis in Japanese population. To determine the genetic effects on pathophysiology of severe sepsis, we investigated whether IL-1RA 2nd intron variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism bears influences on the susceptibility to and the outcome of severe sepsis. And, we also evaluated association between the VNTR and *ex vivo* expression of cytokines. Two hundred and sixty one patients who had admitted to an ICU (intensive care unit) were enrolled into a discovery cohort and 793 ICU patients admitted to the 5 different institutes were enrolled into a validation cohort. The IL1RA RN*2, which was suggested to be a less IL-1ra producer, was associated with adverse outcome of severe sepsis *via* lower regulatory potential against some inflammatory cytokine production in Japanese population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：生体反応，遺伝子多型，DNA アレイ，表現型，サイトカイン，個別化治療

1. 研究開始当初の背景

近年、侵襲に対する生体反応の主役として免疫担当細胞から産生されるサイトカインが注目されている。すなわち、感染や外傷、熱傷、手術などの侵襲が生体に加わると、免疫担当細胞が活性化され、TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインが産生される。これら、炎症性サイトカインは本来自然免疫に関与しており侵襲を制御すべく働くが、侵襲の程度が大きかったり、侵襲が持続したりすると血中でサイトカインが高値となる高サイトカイン血症となり、全身性炎症反応症候群（SIRS）を引き起こす。この SIRS が持続すると、好中球や各種メディエータ・カスケードが活性化され、その結果産生された各種メディエータにより血管内皮傷害や凝固異常、臓器灌流異常が引き起こされ、臓器障害を発症すると考えられている。我々は臨床現場で炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン(IL)-6 を 30 分程度で測定できる迅速測定システムを導入し、高サイトカイン血症の診断と治療に用いてきた。さらに高サイトカイン血症対策として PMMA 膜ヘモフィルタを用いた持続的血液濾過透析（PMMA-CHDF）を実用化し、重症患者の治療成績向上に役立てている。

一方、侵襲に対するサイトカインの産生には個体差があり、その原因としてサイトカイン関連遺伝子多型の関与が明らかにされつつある。我々も当 ICU に入室した重症患者において、倫理審査を経たうえでサイトカイン関連遺伝子多型解析を行い、高サイトカイン血症に関与する遺伝子多型の検出と、これら多型が患者の重症化や転帰とどのように関連しているのかについて検討してきた。その結果、TNF- α -308A/G、IL1 β -31CT/TT、IL1RA VNTR などの多型を有する患者では、IL-6 血中濃度が異常高値を示し、PMMA-CHDF 等の高サイトカイン血症対策を行ってもそのコントロールは不良で、多型のない患者群に比し転帰も不良であることが明らかになった。そこで、平成 16 年度から基盤研究 (B) 「遺伝子多型解析に基づいたサイトカイン吸着カラムによる敗血症性多臓器不全の個別化治療」を計画し、敗血症患者を対象にこれらの遺伝子多型を事前にスクリーニングできるシステムを構築し、同時に多型を有する患者に対しては、より強力な高サイトカイン血症対策としてのサイトカイン吸着カラムを用いた治療を行うという個別化治療に向けた研究を行ってきた。さらに平成 19 年

度からは基盤研究 (B) 「サイトカイン関連遺伝子多型解析に基づいた重症化予測と個別化治療の研究」を実施してきた。これら研究の結果、TNF- α -308A/G、IL1 β -31CT/TT、IL1RA VNTR、IL-10-592A/C が、異常な高サイトカイン血症や転帰不良と関連していることが明らかになった。一方、従来欧米で IL-6 血中濃度異常高値と関連する遺伝子多型として報告されていた IL-6-596G/A、IL-6-174G/C は、我々が対照とした日本人における検討では一人も検出されず、日本人と欧米人では高サイトカイン血症に関与する遺伝子多型には大きな違いがあることが明らかになった。これは、欧米で効果のある治療が必ずしも日本人にも有効であるとは限らないことを示しており、遺伝子多型に基づいた治療を行うには日本人独自のデータに基づいて行う必要があることを示している。さらに最近、サイトカイン関連遺伝子だけでなく、生体に進入した病原体を認識する Toll-like Receptor (TLR) や凝固系に関連する遺伝子多型も、これら生体反応に大きく影響することが明らかになりつつある。さらに我々は、上記研究と並行して NEDO 「前処理装置を搭載した高感度遺伝子検出バイオチップ」に関する共同研究にも参加してきた。そして、短時間に複数の遺伝子多型を検出可能なバイオチップの実用化に成功した。

これまでの研究は単独施設での研究であり、解析数が少ないため十分なエビデンスを得るには至っていない。しかし、高感度遺伝子検出バイオチップの実用化により多数の検体を短時間に解析可能となったことから、より多くの個体を対象とした研究を行うことが可能となった。さらに現在、サイトカイン関連遺伝子多型のみでなく自然免疫に拘る TLR や CD14、凝固系因子である APC の多型解析についてもその手法を確立している。

2. 研究の目的

これまでの単独施設の研究では 5 年間で 300 例程度しか集積できていないことから、多施設共同研究でより多くの個体の遺伝子情報と臨床情報を収集する。目標症例数は 1000 例とし、本研究立案当時 8 つの施設を候補として挙げ協力を依頼した。TNF α -308, TNF α -238, TNF β -250, IL-18-511, IL-18-31, IL-18+3953, IL-10-1082, IL-10-819, IL-10-592, IL1RA 2nd intron VNTR, CD14-159, IL-6-634, MIF-173, PROC-1654,

PROC-1641, PROC-1476 の各遺伝子多型を、新しく開発したバイオチップを用いて解析することとした。そしてこれらのデータを解析し、重症化や転帰と関連する遺伝子多型を多数症例で検証し、多変量解析を行ってそのオッズ比をこれまでの重症度評価法や予後予測因子と比較検討する。さらに、これらの結果、ハイリスク遺伝子多型を有すると診断された患者血清を用いて、マイクロビーズアッセイ法を用いてサイトカインを網羅的に解析し、表現型の解析を行う。対象とするサイトカインは INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α , TNF- β を当初予定した。また、同意が得られた患者から採取した全血をエンドトキシン (LPS) で刺激して、末梢血中の TLR, CD14 発現をフローサイトメトリーを用いて解析、さらに MIF 及びプロテイン C を測定する。そしてこれらを、多型のない患者群と比較検討する。そして最終的には、ハイリスク患者において特徴的な変化を制御するための治療法を確立することを目標とする。具体的な方策としては、サイトカイン産生抑制を目的としたステロイドや凝固系因子の投与、サイトカイン除去を目的とした血液浄化法の効果を検討する。

3. 研究の方法

【高感度遺伝子チップを用いた遺伝子多型解析の多施設共同研究】

多施設共同研究を行い生体分子関連遺伝子多型の解析と臨床経過、転帰等を、多型のある群とない群で比較検討する。その結果、現在までに判明している多型の臨床的意義を多数症例を用いて明らかにするとともに、あわせて新たな遺伝子多型の検索も行う。ハイリスク遺伝子多型を持つ患者における

【表現型の検討と治療法の確立】

ハイリスクと診断された症例のサイトカインプロファイルを、非ハイリスク患者と比較検討する。またハイリスク患者から採取した全血をエンドトキシン (LPS) で刺激し、血中サイトカインプロファイル、TLR 発現、MIF、プロテインC濃度を検討し、これらの反応を制御するための治療法の確立を図る。多施設共同研究は、我々の施設を中心として以下の4つの施設が参加した。

>>>

東京医科大学八王子医療センター特定集中治療部

兵庫医科大学救命救急センター

久留米大学医学部救急医学

君津中央病院救命救急センター

<<<

各施設の倫理委員会で承認を得た後、インフォームド・コンセントを得られた患者から検

体 (全血 7 mL) を採取して送付してもらい、我々の研究室で高感度遺伝子検出バイオチップを用いて TNF α -308, TNF α -238, TNF β -250, IL-1 β -511, IL-1 β -31, IL-1 β +3953, IL-10-1082, IL-10-819, IL-10-592, IL1RA 2ndintron VNTR, CD14-159, IL-6-634, MIF-173, PROC-1654, PROC-1641, PROC-1476 の各遺伝子多型の解析を試みた。同時に、連結匿名化した上で転帰を含めた各種臨床情報を収集した。目標症例数は 2000 例とした。これら遺伝子多型解析の結果と臨床経過に関して多変量解析を行い、重症度や転帰と関連する遺伝子多型を同定することとした。

4. 研究成果

2001年10月より2008年9月までに収集された当施設の discovery cohort サンプルは 261 検体、validation cohort として、東京医科大学特定集中治療部、兵庫医科大学救命救急センター、久留米大学救急医学、君津中央病院救命救急センター、および当集中治療室 (ICU) の 5 施設で前向きに収集されたサンプル (2008/10/1~2012/9/30) は、770 検体となった。本研究において収集した症例のサンプルは多施設からの validation cohort であり、以下にそれら validation cohort の患者背景を提示する。年齢 63.8 \pm 17.1 (mean \pm SD), 男性 64.9%, ICU 死亡率 12.3%, ICU 在室日数 17.0 \pm 25.6 日, ICU 入室時 APACHE2 Score 17.3 \pm 8.75, ICU 入室時 SOFA Score 6.43 \pm 4.39, ICU 入室時 SAPS2 Score 41.5 \pm 18.4, 重症敗血症 34.3%であった。主な疾患内訳は、予定手術後 16 例、頭部内因性疾患 59 例、胸部内因性疾患 73 例、心・大血管内因性疾患 48 例、腹部内因性疾患 151 例、血液疾患 4 例、泌尿器内因性疾患 14 例、皮膚・軟部組織疾患 14 例、産婦人科的疾患 3 例、内分泌疾患 12 例、外傷 85 例、院外心停止 30 例、中毒 18 例、熱傷 8 例、などであった。一方、当初予定していた高感度遺伝子チップを用いた遺伝子多型解析に関しては、同チップによる解析精度が不良となり、原因究明・改善に努めたが、今回の研究期間には間に合わなかった。そこで、ウルム大学 Section of Experimental Anesthesiology と共同で、自験例での結果をもとに、炎症反応や自然免疫、凝固線溶系に関わる 40 種類の SNP を選択し、敗血症関連 SNP チップ (ASPER Biotec 社製) を設計し、あらためて解析を開始しているところである。

今回は、我々の過去の検討 (validation cohort) で ICU 入室患者において IL-6 血中濃度異常高値および転帰悪化に関与していることが示唆された *IL1RA* 2ndintron VNTR について、PCR-ゲル電気泳動法を用いて全例について genotype 解析を行った。

その結果、discovery cohort 患者における RN*1.1, RN*1.2, RN*1.3, RN*1.4 の割合は、各々 87.7, 8.8, 2.7, 0.8% であった。一方、validation cohort 患者においては RN*1.1, RN*1.2, RN*1.3, RN*1.4, RN*2.2, RN*2.3 の割合は、各々 86.4, 9.6, 2.7, 0.5, 0.4, 0.4% と RN*2.2, RN*2.3 が validation cohort においてのみ少数認められたが全体の比率に有意差はなかった。

【Genetic association study】

Discovery および validation cohort において、*IL1RA* VNTR の RN*1.1 遺伝子型保有者と RN*1.2 遺伝子型保有者との間で、重症敗血症罹患率に有意差はなかったが、死亡率は RN*2 アレル保有によって有意に上昇した ($P < 0.05$)。

【Ex vivo LPS stimulation study】

また、健康人ボランティア 80 例から採血し、*IL1RA* VNTR を解析すると同時に、全血を lipopolysaccharide (LPS) により *in vitro* で刺激し、血清中 IL-1ra 濃度を測定した。さらに、*IL1RA* VNTR の mRNA 発現量は、qRT-PCR 法を用いて行った。*In vitro* での LPS 刺激実験においては、培養血清中 IL-6, IL-1ra 血中濃度は 2 つの多型間に明らかな差は認めなかったが、*IL1RA* mRNA 発現量を測定したところ、RN*1.2 症例では有意に減少していた ($P = 0.01$)。

したがって、*IL1RA* VNTR の RN*2 などのマイナー・アレルが、抗炎症作用を有する IL-1ra 産生を相対的に減少させ、敗血症患者の炎症反応増悪を介して、転帰悪化に関与している可能性が示唆された。この結果によって、以前我々が discovery cohort で報告した、*IL1RA* VNTR RN*2 の IL-6 血中濃度異常高値発症メカニズムの一つが解明されたと同時に、より大規模な validation cohort で、*IL1RA* VNTR RN*2 の ICU 患者における転帰および臨床経過への影響がリピートされ、検証されたことは一つの成果である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- 1) 島田忠長, 中田孝明, 織田成人: 敗血症の転帰に影響を与える遺伝子多型. 日救急医学会誌. 査読有, 2013; 24: 1-11
- 2) Watanabe E, Zehnbaauer BA, Oda S, Sato Y, Hirasawa H, Buchman TG: Tumor necrosis factor -308 polymorphism (rs1800629) is associated with mortality and ventilator duration in 1057 Caucasian patients. Cytokine 査読有, 2012; 60: 249-56
- 3) 渡邊栄三, 木村友則, 織田成人: 遺伝子多型と生体反応 - 全身性炎症反応症候群

(SIRS) 関連疾患のゲノム情報によるテーラード医療実践へ向けて - 特集: 侵襲に対する生体反応の個体差. 侵襲と免疫, 査読無, 2011; 20: 69-77

4) 渡邊栄三, 織田成人, 島田忠長: 遺伝子多型と生体反応. 特集: 生体防御と自然免疫 - 最近の知見. 侵襲と免疫 査読無, 2010; 19: 87-90

〔学会発表〕 (計 9 件)

1) 木村友則, 渡邊栄三, 織田成人, 寺谷綾子: インターロイキン(IL-1)関連遺伝子多型の sepsis の転帰およびサイトカイン産生能におよぼす影響. 第 25 回日本外科感染症学会 2012 年 11 月. 千葉

2) Watanabe E, Kimura T, Teratani A, Sakamoto T, Ikeda T, Ikeda K, Kotani J, Kitamura N, Oda S: IRGM polymorphisms were associated with mortality and IL-6 blood levels of severely septic patients. The 6th International Symposium on Autophagy 2012, Oct 2012. 沖縄

3) Watanabe E, Zehnbaauer BA, Buchman TG, Hirasawa H, Oda S: Tumor necrosis factor -308 polymorphism is associated with mortality and ventilator free days in 1057 Caucasian patients. The Shock Society's 35th Annual Conference on Shock, June 2012. Miami U.S.A.

4) 渡邊栄三, 織田成人, 木村友則, 寺谷綾子, 貞広智仁, 仲村将高, 安部隆三, 中田孝明, 島田忠長, 大谷俊介: 重症患者における遺伝子多型の多施設共同前向き研究と新規敗血症関連遺伝子多型の検索. 第 39 回 日本救急医学会総会・学術集会 2011 年 10 月. 東京

5) 渡邊栄三, 織田成人, 木村友則, 寺谷綾子, 貞広智仁, 仲村将高, 平山 陽, 立石順久, 服部憲幸, 瀬戸口大典, 仲村志芳, 高橋和香, 高井信幸, 今枝太郎, 内山なつみ, 島居 傑, 島田忠長, 大谷俊介, 北村伸哉, 平澤博之: 重症患者における遺伝子多型の多施設共同前向き研究と新規敗血症関連遺伝子多型の検索. 日本外科代謝栄養学会第 48 回学術集会 2011 年 7 月. 愛知

6) 渡邊栄三, 織田成人, 木村友則, 佐藤泰憲, 平澤博之, Timothy G. Buchman: 重症外傷症例の転帰に影響を与える敗血症関連遺伝子多型 -Critical Care Genomics- 第 25 回 日本外傷学会総会・学術集会 2011 年 5 月. 大阪

7) 木村友則, 渡邊栄三, 織田成人, 貞広智仁, 仲村将高, 平山 陽, 立石順久, 高橋和香, 中田孝明, 島田忠長: 敗血症症例における autophagy 関連遺伝子多型の炎症反応に対する影響. 第 38 回 日本集中治療医学会学術集会 2011 年 2 月. 横浜

8) Watanabe E, Zehnbaauer BA, Oda S,

Hirasawa H, Shimada T, Buchman TG:
Effect of heritable and acquired conditions
on mortality of 854 US patients with
severe sepsis. The Shock Society's 33rd
Annual Conference on Shock, June 2010.
Oregon, U.S.A.

9) Watanabe E, Zehnbauer BA, Oda S,
Hirasawa H, Shimada T, Buchman TG:
Effect of heritable and acquired conditions
on mortality of 854 US patients with
severe sepsis. The Shock Society's 33rd
Annual Conference on Shock, June 2010.
Oregon, U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織田 成人 (ODA SHIGETO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90204205