様　式　C－19、F－19、Z－19　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：２１６０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３７９１２３２
研究課題名（和文）臍帯血中ヒトグルココルチコイドレセプターの発現とステロイド抵抗性に関する検討

研究課題名（英文）A Polymorphism in the Glucocorticoid Receptor Gene Is Associated With Clinical Outcomes in Premature Infants

研究代表者
小笠原　啓（Ogasawara, Kei）

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：００５１０３４８
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円、（間接経費）　　900,000円

研究成果の概要（和文）：福島医大および関連施設で出生した在胎30週未満で出生した４１名の児において、グルココルチコイド受容体（GR)の遺伝子多型と周産期予後の関連性を検討した。対象児から、血液を採取し、ＤＮＡの抽出した後、4種類のＧＲの遺伝子多型を調べた。そのうち、3種類は検出されず、BclIのみ検出された。BclIの遺伝子多型の割合は、G/G：33名(以下ＧＧ群)，G/C：8名(以下ＧＣ群)、 C/C：0名だった。Ｇ/Ｇ群とＧ/Ｃ群の2群に分け、様々な周産期因子との関連を調べた。その結果、難治性低血圧 、生後48時間以内の塩酸ドパミン最大量、塩酸ドブタミン最大量は、Ｇ/Ｃ群に比較し有意にＧ/Ｇ群で少なかった。

研究成果の概要（英文）：We enrolled preterm infants (n = 41) born at two hospitals in Fukushima. Four glucocorticoid receptors (GR) gene polymorphisms were analyzed by TaqMan SNP genotyping assay; their effects on clinical outcomes during hospitalization were evaluated retrospectively. The primary clinical outcomes were the presence of refractory hypotension, the maximum dose of dopamine (DOA) and dobutamine (DOB), the total hydrocortisone dose used in the first 48 h of life, and severe bronchopulmonary dysplasia.
Among the four GR polymorphisms, only the BclI polymorphism was detected, with a genotype distribution of 33 G/G, 8 G/C, and 0 C/C. The following were significantly different between the G/G and G/C genotypes of BclI: refractory hypotension, DOA dose and DOB dose. This study indicates an association between BclI genotypes and refractory hypotension incidence in premature infants.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学　胎児・新生児医学

キーワード：一塩基多型　グルココルチコイド受容体　BclI多型　難治性低血圧

１．　研究開始当初の背景

グルココルチコイド（GC）は人体の恒常性を維持するために必要なホルモンである。GCのなかでもハイドロコルチゾン(HDC)は、急性期難治性低血圧、晩期循環不全などの循環管理、慢性肺疾患、そして低血糖などの治療において欠かせない薬剤になってきている。HDCによる治療は、極低出生体重児の予後改善に大きく関わっている。

臨床において、我々はしばしば、HDC 投与への反応の個体差を経験する。容量負荷やカテコラミンに加え、HDC の単回投与で速やかに昇圧する場合もあるが、HDC を反復投与しても昇圧効果が乏しい場合がある。

グルココルチコイド受容体（glucocorticoid receptor:GCR）の一塩基多型（single nucleotide polymorphism：SNP）には、*N363S* 、*BclI*、*ER22/23EK*、*GR-9β*の4種類がある。*N363S* 、*BclI* はGCに対するGCRの感受性を増加させ、*ER22/23EK*、*GR-9β*は逆に減弱させる。

我々は、GCRの遺伝子多型の違いにより「HDC投与に対する個体差」が生じると仮説を立て、GCRの遺伝子多型と周産期因子、出生後因子との関連性を検討した。

２．研究の目的

(1)在胎 30 週未満で出生した児の GCR の SNP4 種の頻度を調べること。

（2）在胎 30 週未満で出生した児において、GCR の SNP が急性期難治性低血圧や慢性肺疾患などを含む周産期因子、出生後因子に影響を及ぼしているかを検討すること。

３．研究の方法

（1）対象症例の抽出

平成 22 年 10 月から平成 25 年 7 月まで当院 NICU と独立行政法人国立福島病院 NICU に入院した在胎 30 週未満で出生した児のうち、保護者の書面による同意を得られた 44 名を対象とした。染色体異常、外科疾患、先天性心疾患の児は除外した。また両親ともに日本人の症例に限った。最終的に、双胎間輸血症候群 2 名を除外した 41 名を対象として研究を行った。本研究は当院および独立行政法人国立福島病院の倫理委員会の承認のもと行った。

（2）当院での急性期循環管理指針

在胎30週未満の極低出生体重児が入院した場合、速やかに観血的血圧測定を開始する。生後48時間以内の血圧の目標を平均血圧＞在胎週数とし、それに満たない場合は以下の管理を行う。

① 心臓超音波検査での左心室容量が明らかに少ない場合、生理食塩液10ml/kgを1時間で投与する。
② DOAを5～10μg/kg/min投与する。

上記治療後も目標血圧に満たない場合、

③ HDCを2mg/kgを経静脈投与する。

HDCの単会投与で目標血圧を維持できず、反復投与を要した場合、急性期難治性低血圧と定義する。

（3）遺伝子多型の検出

対象児の臍帯血、または出生後採血した血液から QIAmp DNA Blood Kit を用い、検体からDNAを抽出した。the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて DNA を増幅し、TaqMan SNP Genotyping Assays を用いて 4 種類のＧＲの遺伝子多型(*N363S, BclI, ER22/23EK, GR-9β*)を検出した。

（4）研究デザインおよびデータ収集

研究デザインは症例対照研究で、入院診療録を用いて後方視的に検討した。

周産期背景因子として、在胎週数、出生体重、性別、分娩様式、出生前ステロイド投与を調べた。出生後因子として、臍帯動脈血ｐH、

Apgar score(1分値および5分値)、容量負荷、塩酸ドパミン（DOA）最大投与量、塩酸ドブタミン（DOB）最大投与量、生後48時間のHDC投与量、急性期難治性低血圧、敗血症、呼吸窮迫症候群(respiratory dstress syndrome:RDS)、重症（3度以上）脳室内出血(intraventricular hemorrhage:IVH)、嚢胞性脳室周囲白質軟化症(cystic periventricular leukomalacia:cPVL)、高血糖、腸穿孔、人工呼吸器管理期間、重症慢性肺疾患chronic lung disease:CLD)、死亡に関して調べた。また重症慢性肺疾患(bronchopulmonary dysplasia:BPD)はNIHのBPD重症度分類のsevere BPDを満たすものとした。

（5）統計学的解析

2群の連続変数に比較には、t-test もしくは、Mann-Whitney U-test を、2 群の名義変数の比較には Fisher の直接確立計算法を用いて行った。有意水準は p<0.05 とした。本検討には、統計処理ソフトとして、Dr.SPSS Ⅱfor Windows 11.0J を用いた。

４．研究成果

（1）　遺伝子多型の頻度

41名の対象者の検討において、4種類のGCRの遺伝子多型のうち、3 種類（*N363S, ER22/23EK, GR-9β*）は全て野生型であり、*BclI* でのみ SNP が検出された。*BclI* の遺伝子多型(G/G、G/C、C/C)の割合は、G/G：33名(以下G/G群)，G/C：8名(以下G/C群)、C/C：0名だった。

（2）30週未満で出生した41名の早産児おいて、*BclI* の遺伝子多型であるG/G群とG/C群の2群に分け、様々な周産期因子、出生後因子との関連を調べた（表1、表2）。

表１　周産期背景因子

	G/G 多型 (N=33)	G/C 多型 (N=8)	p
在胎週数	26.1(23.0-29.9)	27.0(23.9-28.9)	0.86
出生体重	872 (686-1014)	1024(758-1046)	0.51
性別	13(39%)	5(62%)	0.22
帝王切開	30(91%)	8(100%)	0.51
Apgar 1分	3(2-4)	4(1-4)	0.63
Apgar 5分	6(4-7)	7(4-7)	0.45
臍帯動脈血 pH	7.36(7.30-7.41)	7.30(7.26-7.32)	0.16
母体因子			
妊娠高血圧症候群	5(15%)	1(13%)	0.67
出生前ステロイド	15(45%)	5(63%)	0.38

周産期背景因子に関しては、2群間で有意な差は認めなかった（表１）。

表２　出生後因子

	G/G多型 (N=33)	G/C 多型 (N=8)	p
急性期難治性低血圧	2(6%)	4(50%)	<0.01
DOA最大投与量 (μg/kg/min)	3.0(2.0-4.0)	4.8(4.0-7.5)	<0.01
DOB最大投与量 (μg/kg/min)	2.4(0-3.6)	5.0(2.5-7.5)	<0.01
生後４８時間のHDC総投与量 (mg/kg)	2.2(0-4.0)	4.0(0-10.0)	0.21
入院中のHDC総投与量 (mg/kg)	74.5(2.2-101.8)	70.6(38.3-78.8)	0.69
RDS	32(97%)	8(100%)	0.81

重症BPD	22(67%)	3(38%)	0.13
人工呼吸器管理日数	46(36-66)	34(21-49)	0.18
敗血症	1(3%)	1(13%)	0.36
IVH	1(3%)	1(13%)	0.36
PVL	1(3%)	0(0%)	0.81
腸穿孔	2(6%)	0(0%)	0.64
壊死性腸炎	0(0%)	0(0%)	—
高血糖(≧180mg/dl)	13(39%)	3(38%)	0.63
死亡	0(0%)	1(13%)	0.21

出生後因子に関しては、DOA最大投与量(p=0.001)、DOB最大投与量(p=0.003)、難治性低血圧(p=0.009)がG/G群で有意に少なかった（表２）。生後48時間以内のHDC投与量、重症CLDに関しては有意差を認めなかった。腸穿孔、NEC、高血糖も2群間で有意差を認めなかった。また、死亡率にも差を認めなかった。

（３）結論

我々は、GCR の４種の遺伝子多型の中で、*BclI*のG/G群で急性期難治性低血圧の頻度と強心剤の投与量が有意に少なかったことを見出した。*BclI*遺伝子多型と急性期難治性低血圧発症との関連性が示唆された。

６．研究組織

(1)研究代表者

小笠原 啓（OGASAWARA KEI）
公立大学法人福島県立医科大学　小児科学講座　助手
研究者番号：00510348