

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792070

研究課題名(和文)重症SIRSの炎症反応に対するautophagy関連遺伝子の及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of autophagy-related polymorphism on inflammatory reaction of severe SIRS

研究代表者

木村 友則(KIMURA, TOMONORI)

東京女子医科大学・医学部・医療練土研修生

研究者番号：90598236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：Autophagyと重症敗血症との関連を解明する目的で、単施設および多施設の2つのコホートを設定し、autophagy関連遺伝子多型の一つであるIRGM(+313)遺伝子多型と重症敗血症患者の臨床経過、転帰との関連を検討した。

IRGM(+313)のTT homozygotesにおいて、重症敗血症患者の死亡率が有意に高かった。健常人のLPS刺激下でmRNA発現量を比較したところ、TT homozygotesで有意に抑制されていた。したがって、IRGM(+313) TT homozygotesは重症敗血症の病態下でIRGM発現の抑制に関与し、重症敗血症の転帰悪化をもたらしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the association between autophagy-related IRGM (human immunity-related GTPase) polymorphism and clinical course/outcome in patients with severe sepsis. We have set the 2 cohorts and lipopolysaccharide challenge of whole blood from randomly selected healthy volunteers was performed for comparison of IRGM mRNA expression among different genotypes. When mortality were compared, no significant difference was observed in the non-sepsis group, while TT homozygotes exhibited a significantly higher mortality than that of the CC+CT genotype category in the severe sepsis group for both cohorts. Lipopolysaccharide challenge showed a significant suppression of IRGM mRNA expression in TT homozygotes compared with that of the CC+CT genotype category. The data suggest that IRGM(+313) SNP, an autophagy-related polymorphic locus, influences outcome in patients with severe sepsis, with the possible involvement of autophagy in sepsis exacerbation.

研究分野：救急医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：重症敗血症 オートファジー 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

重症敗血症や炎症性疾患の一部の易罹患者性や重症化には遺伝子多型の関与が指摘されている。また、autophagy は細胞内の蛋白質を分解するための仕組みの一つであり、感染防御にも重要な役割を果たしている。本研究では、敗血症病態と autophagy 関連遺伝子多型との関与を解明し、遺伝学的アプローチからテーラーメイド医療を施すことにより、重症化しやすい敗血症患者および従来の治療では救命困難な敗血症患者の救命率を向上させることが最終的な目標である。

重症敗血症患者の genotype 分布が健常者とどの遺伝子多型において異なっているかを解明し、遺伝的にハイリスク患者の選別を図る。また同時に、それらの遺伝子発現も ICU のベッドサイドでモニタリングできるシステムを構築し、敗血症患者の重症化病態への遺伝的関与の確認を行う。そして、重症敗血症患者の遺伝子多型と autophagy との関連性を見出し、ハイリスク症例に対してはそれらの遺伝子発現を抑制したり、臨床症状に表現型として個々の患者特異的に過剰出現する物質を除去したり、その作用をブロックする。さらに、重症敗血症に autophagy が緊密に関連しているならば autophagy を制御する方法を用いて、重症敗血症患者に対する治療の個別化対策を図るような臨床応用への第一歩まで踏み込むことを目標とした。

重症敗血症は臓器障害を伴う感染による全身性炎症反応 (systemic inflammatory response syndrome ; SIRS) と定義され、全世界で現代でも死亡率 30-80% と非常に救命が困難な疾患である。急性炎症反応の時期を乗り越え、SIRS が治まった後の敗血症患者はさらに克服困難な anti-inflammatory phase を迎える (CARS ; compensatory anti-inflammatory response syndrome)。その際に免疫麻痺 (immunoparalysis) の状態に陥り、敗血症の急性期以降の予後に悪影響を及ぼすと考えられている。

敗血症における CARS、immunoparalysis の病態の中で重要な役割を果たしているのが免疫担当細胞の apoptosis (型プログラム細胞死) であり、それらの制御が敗血症の救命率改善につながると期待されている。一方で、型プログラム細胞死である autophagy が敗血症病態へ強く関与していることが注目されている。Autophagy は自食を意味する細胞内のタンパク分解機構の一種であり、不要な organelle の分解、病原微生物の排除、腫瘍抑制などの役割が確認されている。敗血症による臓器不全は、それぞれの細胞死から細胞機能不全の総和によってもたらされているとされ、重要臓器不全は免疫系の異常に関係しているとされている。近年、genome-wide association scans (GWAS) により網羅的な疾患感受性遺伝子検索が可能となり、炎症性腸疾患の crohn 病の病態と密接に関わる疾患感

受性遺伝子として、autophagy 関連遺伝子の一つである autophagy-related protein 16-like 1 (ATG16L1) がはじめて同定された。さらに、IRGM (a human immunity-related GTPase) は主に結核などの細菌感染時に autophagy の誘導・形成に関連し、IRGM の発現量に応じて autophagy の形成能が制御されることが報告されている。そして、近年、その遺伝子多型が炎症性腸疾患の発症と autophagy 発現に関与していることが確認されている。

2. 研究の目的

重症敗血症の病態に autophagy がいかに関わっているかについて検討する目的で、単施設および多施設による 2 つのコホートを設定し、autophagy 関連 SNP と重症敗血症患者の臨床転帰との関連を調査する。また、*ex vivo* での lipopolysaccharide (LPS) による刺激下での autophagy 関連 SNP 遺伝子発現量に関しても検討する。

3. 研究の方法

【Discovery Cohort】

2001 年 10 月より 2008 年 9 月までに千葉大学医学部附属病院 ICU に入室し、インフォームドコンセントによる同意が得られた患者 259 名を対象とした。Inclusion criteria は集中治療室に入室した患者、18 歳以上、本人もしくは家族、代諾者からの文書による同意取得が可能な患者とし、exclusion criteria としては 18 歳以下の子供、妊婦、骨髄腫・リンパ腫などの血液腫瘍で治療中の患者、放射線治療・化学療法中の患者、遺伝子治療の既往を持つ患者、積極的治療の対象とならない患者とした。

血液検体は ICU 入室後に速やかに採取し、血清と血球成分とに分離して血清は -80 で保存した。血球成分からは速やかに DNA を抽出した。

【Multi-center Validation Cohort】

2008 年 10 月より 2012 年 9 月までに当施設を含む 5 施設の ICU に入室し、同意が得られた患者 793 名を対象とした。当施設以外の 4 施設は、久留米大学病院、兵庫医科大学病院、東京医科大学 八王子医療センター、君津中央病院である。Inclusion criteria および exclusion criteria は discovery cohort と同じとし、各施設で ICU 入室時に採血を行い、冷蔵保存した血球成分を当院へ集め、DNA を抽出した。

【患者背景のデータ収集】

対象患者の年齢、性別、ICU 在室日数、ICU 入室後 24 時間以内の SOFA スコアおよび APACHE2 スコアを記録し、さらに、重症敗血症罹患率、ICU 死亡率を調べた。

【IRGM(+313)(rs10065172) 遺伝子多型の同

定】

本研究に同意が得られた患者の全血から genomic DNA を抽出し、TaqMan[®] assay にて IRGM(+313)の遺伝子多型を決定した。

【サイトカイン刺激試験】

本研究に同意が得られた健常者ボランティア 347 名を対象とし、採血および DNA の抽出を行った後に、IRGM 遺伝子多型解析を行った。その中から 70 名を無作為に抽出し、その全血を LPS で刺激した時の IRGM mRNA 発現量の検討を行った。

対象者から 15mL を採血し、そのうちの 5mL を用いて IRGM(+313)遺伝子多型を解析した。また、残った全血 10mL と RPMI 1640 10mL を混合し 12well マイクロプレートに 2 μ L ずつ分注した。LPS の最終濃度が 1ng/mL になるように投与し、37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5%のインキュベーター内で 4 時間培養した。培養液を遠心分離し、遠心分離後の血球成分は -80 $^{\circ}$ C で保管した。

【IRGM(+313) mRNA の定量】

血球成分から mRNA を抽出し、Real-time PCR を施行した。Comparative CT 法にて相対的発現量 (RQ=2^{- Δ CT}) を算出し、mRNA 発現量を RQ(=LPS による刺激後の RQ-刺激前の RQ) で比較した。

4. 研究成果

【2つのコホートの患者背景】

Discovery Cohort では 259 名が、Validation Cohort では 793 名が本研究に登録された。両コホートにおいて、年齢、性別、ICU 在室日数には有意な差は認められなかった。SOFA スコア、APACHE スコアに関しても 2 つのコホートで有意差を認めなかった。さらに、2 つのコホートにおいて、重症敗血症患者に限って患者背景を比較したところ、年齢、性別、ICU 在室日数、SOFA スコアには有意差は認めなかったが、APACHE スコアに関しては discovery cohort において TT homozygotes で有意に高かった。

【IRGM(+313)遺伝子多型分布】

本研究全体の遺伝子多型分布を調査したところ、3 つの genotype の割合は重症敗血症患者で CC:41.7%、CT:48.3%、TT:9.92%であった。非敗血症患者や健常人ボランティアでの割合も重症敗血症患者とほぼ同等であった。

【死亡率の比較】

2 つの cohort の死亡率を重症敗血症患者群と非敗血症患者群に分けて比較した。Discovery cohort において、非敗血症患者群では、CC+CT genotype と TT homozygotes で死亡率に有意な差は認めなかったが、重症敗血症患者に限ってしてみると、TT homozygotes のほうが、有意に死亡率が高い結果となった ($P=0.043$)。それは

multi-center validation cohort においても同様な結果となった ($P=0.037$)。さらに、その 2 つのコホートを combine させて検証したが、死亡率に関する TT homozygote の有意差はより強いものとなった ($P=0.004$)。

【サイトカイン刺激試験と mRNA 発現量の比較】

健常者ボランティア 347 名の遺伝子多型分布も重症敗血症患者群および非敗血症患者群と比べて大きな差は認めなかった。そのうち mRNA の定量を行った 70 名については、mean RQ は CC genotypes では 1.427 (SD=0.5809)、CT genotypes では 0.6702 (SD=0.1702) であるのに対し、TT homozygote では -0.3465 (SD=0.1133) であり、CC+CT genotype に比べて TT homozygotes のほうが有意に低い結果となった ($P=0.019$)。

以上の結果より、autophagy 関連遺伝子多型の一つである IRGM(+313) SNP の TT homozygotes において重症敗血症患者の死亡率が有意に高いことを単施設および多施設での 2 つのコホートで示した。また、2 つのコホートを合わせて評価した結果、その有意差は増大した。さらに、健常人の全血を LPS で刺激し、IRGM(+313) mRNA の発現量を測定した結果、その発現量は TT homozygotes において有意に抑制されていた。

敗血症における autophagy の存在が証明されてきている。Watanabe らは重症敗血症患者の肝細胞における autophagosome の増加を確認し、マウス盲腸結紮穿孔 (CLP) 敗血症モデルにおいて肝における autophagosome の増加を追証した (Watanabe E, *et al*, Lab. Invest., 2009; 89: 549-61)。また、同モデルにおいて、Takahashi らは、敗血症急性期に autophagy が一過性に亢進し、その後 autophagy flux が停滞することを GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用いて確認した (Takahashi W, *et al*, Crit. Care, 2013; 17: R160)。このように、敗血症の病態下で autophagy は何らかの働きを有していることが確認された。

さらに、近年、ミトコンドリアの代謝に IRGM と autophagy が強く関わっていることが判明してきている。正常であるならば、障害を受けたミトコンドリアは IRGM の発現により膜電位の脱分極を起こし、それを契機に autophagy が誘導され代謝されてゆくはずである。しかし、重症敗血症下における TT homozygotes の場合では、IRGM の発現量が低下し、autophagy の誘導も抑えられるため autophagy flux が抑えられることによって障害されたミトコンドリアが細胞内で蓄積することが考えられる。そして惹いては tissue dysoxia を介して臓器不全を惹起し、重症敗血症患者の転帰悪化をもたらしていると考えられた。

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2件)

- 1) Kimura T, Watanabe E, Sakamoto T, Takasu O, Ikeda T, Ikeda K, Kotani J, Kitamura N, Sadahiro T, Tateishi Y, Shinozaki K, Oda S: Autophagy-Related IRGM polymorphism is associated with mortality of patients with severe sepsis. PLoS ONE 2014;9:e91522
- 2) 渡邊栄三, 織田成人, 木村友則, 中田孝明, 大谷俊介, 島田忠長, 平澤博之: 遺伝子多型に起因する免疫異常と重症敗血症. ICUとCCU 2013; 37: 585-92

[学会発表](計5件)

- 1) 木村友則, 渡邊栄三, 織田成人, 坂本照夫, 池田寿昭, 池田一美, 小谷穰治, 北村伸哉, 立石順久, 篠崎広一郎: IRGM 遺伝子多型が Severe Sepsis 患者の転帰に与える影響. 第41回日本集中治療医学会総会・学術集会, 2014年2月28日, 京都国際会議場
- 2) Watanabe E, Kimura T, Teratani A, Sakamoto T, Ikeda T, Ikeda K, Kotani J, Kitamura N, Oda S: An IRGM polymorphism (rs10065172) is associated with mortality of severe sepsis through the down-regulation of IRGM gene expression with LPS challenge. The 11th World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Congress 2013, 30 Aug 2013, Durban, South Africa
- 3) 渡邊栄三, 幡野雅彦, 仲村将高, 高橋和香, 木村友則, Paul E Swanson, 織田成人: Autophagyの重症敗血症における役割とその制御による臨床応用の可能性. 第28回日本 Shock 学会総会 2013, 2013年5月18日, 北里大学薬学部コンベンションホール
- 4) 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, 29 Oct 2012, Okinawa
- 5) 渡邊栄三, 高橋和香, 幡野雅彦, 織田成

人: 敗血症性臓器障害における Autophagy-臨床および基礎医学的研究-. 第21回日本 Cell Death 学会学術集会 2012, 2012年7月28日, 名古屋大学医学部付属病院中央診療棟3階講堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 友則 (KIMURA, Tomonori)
東京女子医科大学・医学部・医療練土研修生
研究者番号: 90598236

(2) 研究協力者

渡邊 栄三 (WATANABE, Eizo)
千葉大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 40375639

織田 成人 (ODA, Shigeto)
千葉大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 90204205