

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689066

研究課題名(和文)ゲノムワイド関連解析に基づく重症敗血症の個別化医療に関する研究

研究課題名(英文)Genetic polymorphisms in severe sepsis

研究代表者

中田 孝明(Takaaki, Nakada)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：20375794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症敗血症の転帰には遺伝的素因が影響していることが知られている。個々の遺伝的素因として遺伝子多型が知られている、しかし未だどの遺伝子のどの遺伝子多型が重症敗血症の遺伝的素因に影響を与えているか判然としない。そこで全ゲノム(ゲノムワイド)を関連解析した。この探索的解析では、SVEP1という遺伝子の遺伝子多型が重症敗血症の転帰と関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mortality from septic shock is highly heritable. The identification of causal genetic factors is insufficient. To discover key contributors, we first identified non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in conserved genomic regions that are predicted to have significant effects on protein function. We then test the hypothesis that these non-synonymous SNPs across the genome alter clinical outcome of septic shock. Septic shock patients (n=520) were genotyped for the 843 non-synonymous SNPs. Patients with septic shock having the SVEP1 C allele of non-synonymous SNP, SVEP1 rs10817033 had a significant increase in the hazard of death over the 28-day and increased organ dysfunction, and needed more organ support (P<0.05). Silencing SVEP1 significantly increased IL-8, GRO-alpha, MCP-1 and MCP-3 production in HUVECs under LPS stimulation (P<0.01). C allele of SVEP1 SNP was associated with increased 28-day mortality and organ dysfunction of septic shock.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

重症敗血症の致命率は依然高く、致命数は近年増加傾向である。この致命率の改善を目的として日本を含めた国際的な取り組み (Surviving Sepsis Campaign) が活発に継続的に行われており、重症敗血症は国内国外で重要な研究課題に位置づけられている。

遺伝的要因の個人差である遺伝子多型が、様々な病態・疾患の発症・臨床経過に影響を及ぼすことが知られている。敗血症の死亡に与える遺伝的要因は心血管系、脳血管疾患、悪性腫瘍の死亡に与える遺伝的要因に比べても大きいことが報告されている。近年、重症敗血症に影響を及ぼす遺伝的要因として遺伝子の一塩基遺伝子多型 (single nucleotide polymorphisms [SNPs]) が国内外で研究され、重症敗血症の罹患性や転帰に影響を及ぼすことが報告されてきている。

これまで敗血症の病態に重要な役割を果たすと知られている、自然免疫機構、細胞内シグナル伝達および転写因子活性化、サイトカイン等の humoral mediators 産生、各種重要臓器不全に関連する遺伝子を対象とした遺伝子多型研究が行われてきた。自然免疫機構に関しては toll-like receptor, CD14, Interleukin-1 receptor associated kinase 4 (IRAK4)、敗血症発症時に活性化される重要転写活性因子の NF- κ B および各種サイトカイン (TNF alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-10)、敗血症性臓器不全に関しては心血管系の制御に関連する beta-2 adrenergic receptor, angiotensin II pathway genes および vasopressin pathway genes の遺伝子多型が研究され、敗血症の罹患や転帰との関連が報告されてきている。

しかしながら現在までに報告されている重症敗血症を対象とした遺伝子多型研究は、重要な役割を果たすことが知られている特定の候補遺伝子をはじめに選び、その遺伝子の一塩基多型に関して研究を行う candidate gene approach という手法を用いて行われてきた。この方法ははじめに選ぶ遺伝子を限定し解析を行うため、結果は選んだ候補遺伝子に限定される欠点をもっており、今後の個人化医療の発展には、この欠点を克服した研究成果が必要不可欠である。

近年、この欠点を克服する genome-wide association study (GWAS) が開発されてきている。この GWAS は全ゲノム上 (genome-wide) の遺伝子を網羅的に解析するため、幅広く、既存の知見によるバイアスを受けることなく新規の重要な SNPs を発見することが可能である。

例えばスタチン誘発ミオパチー患者を対象

とした GWAS は新たな病態解明につながる、新規の SLCO1B1 の遺伝子多型を発見している。

2. 研究の目的

そこで、全ゲノム上 (genome-wide) の遺伝子を網羅的に解析する GWAS を用いて重症敗血症に影響を与える新規の遺伝子多型を発見し、個別化医療を実現することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Genome wide functional SNPs selection

下記の A-C の3つの方法を用い全ゲノム上の機能的 SNP を選定した。

A. Non-synonymous SNPs

B. Conserved DNA region in vertebrates

C. Predicted to have damaging effects on protein function.

(2) 敗血症性ショック 498 例を Illumina 1M-Duo DNA Chip assay を用いて genotyping し、関連解析を行う。

(3) 有意な関連を認められた SVEP1 遺伝子は遺伝子の機能が判明していないため、siRNA による遺伝子制御を (Human umbilical vein endothelial cells [HUVECs]) を用いて行った。HUVECs が産生する IL-8, GRO-alpha, MCP-1 and MCP-3 を Luminex magnetic beads kits を用いて測定し、群間比較を行った。

(4) また敗血症性ショック群での血中 IL-8 濃度を測定し、生存群と死亡群の比較および SVEP1 遺伝子多型による genotype 別の比較を行った。

(5) SVEP1 SNP の機能性を検証する為に、UCSC Genome Browser の Most Conserved tracks (PhastCons Vertebrate Conserved Elements, 28-way Multiz Alignment) を用いて the multiple sequence alignments 解析を行い、蛋白の damaging effect を評価する為に PolyPhen2 解析 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) を行った。

4. 研究成果

(1) dbSNP build 130 database の全 non-synonymous SNPs (n=100,986) を用いた。これらの中 21,134 SNPs は the Illumina 1M-Duo DNA Chip assay に含まれていた。

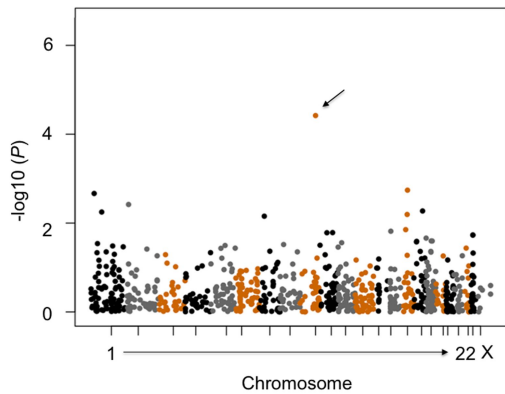
その中で, UCSC Genome Browser の “Most Conserved” tracks (PhastCons Vertebrate Conserved Elements, 28-way Multiz Alignment) を用いて, 11,281 SNPs が vertebrates の conserved elements に含まれることを同定した。

そしてこれらの 2,125 SNPs が PolyPhen-2 が damaging effect を持つことが予測された (highest category “probably damaged” defined by probabilistic score >0.85)。

GWAS の data quality control を行い, 本研究の解析で用いる 843 の non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) を同定した。

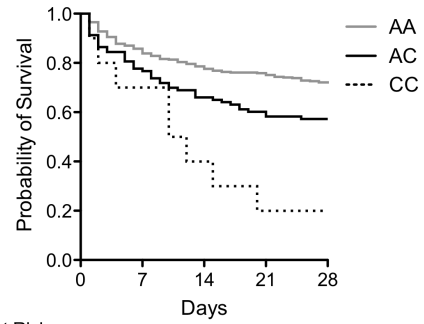
(2) 敗血症性ショック 498 例を genotyping し, 関連解析を行った SVEP1 rs10817033 SNP と 28 日死亡率は有意な関連が認められた (図 1, 図 2)。

図 1 .



(Uncorrected $P=3.8 \times 10^{-5}$, Bonferroni corrected $P=0.032$)

図 2 .

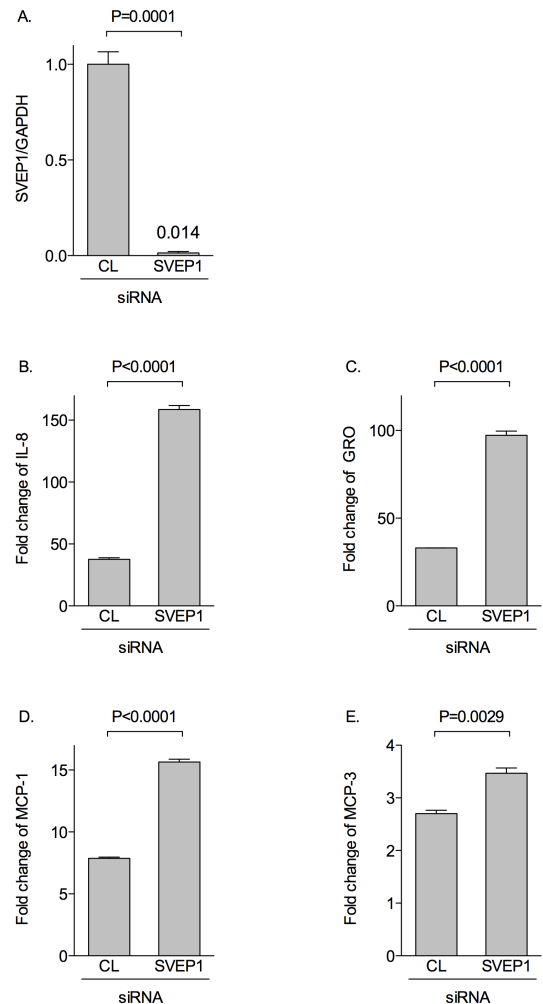


Number at Risk					
	0	7	14	21	28
AA	406	345	316	305	290
AC	104	80	71	62	60
CC	10	8	5	3	2

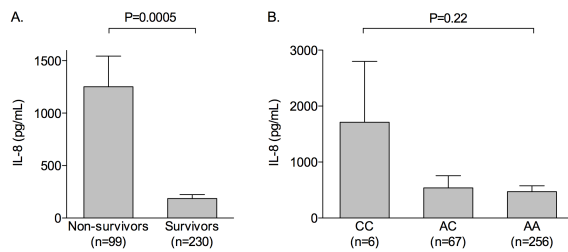
(C allele: Hazard ratio 1.72, 95%CI 1.31-2.26, $P=9.7 \times 10^{-5}$).

(3) HUVECs に siRNA を用いて SVEP1 gene silencing を行い, 白血球接着に関連するケモカイン産生を比較した。その結果, SVEP1 gene silencing は IL-8, GRO, MCP-1, MCP-3 fold change を上昇させる結果が得られた。

図 3 .



(4) 敗血症性ショック患者では死亡群および C allele を有する患者の血中 IL-8 濃度は高値であった。



(5) Multiple sequence alignments 解析や PolyPhen2 解析では SVEP1 rs10817033 SNP は機能性を持つことが示唆された (図 4)

図 4

F.

Species	Accession	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
Human	(NP_699197)	560	KDVEAPQINC	PKDIEAKTLE	QQDSANVTWQ	IPTAKNSGE	599					
Chimpanzee	(XP_520182)	560	KDVEAPQINC	PKDIEAKTLE	QQDSANVTWQ	IPTAKNSGE	599					
Mouse	(NP_073725)	560	KDVEAPQISC	PNDIEAKTGE	QQDSANVTWQ	VPTAKNSGE	599					
Dog	(XP_532030)	560	KDVEAPQISC	PKDIEAKTQE	QQDSANITWQ	IPTAKNSGE	599					
Lizard	(XP_003227374)	564	KDIEFPNISC	PDDIEASTLE	VQNSANISWE	VPEANDNSRD	603					

PolyPhen2 analysis, HumDiv score 0.995, Humvar score 0.958

【まとめ】

- ゲノムワイド解析により、敗血症性ショックの生命転帰と関連する新規の SNP (SVEP1 rs10817033 SNP) を同定した。
- SVEP1 C allele を有する敗血症性ショック患者は高い 28 日死亡率と長期に臓器不全を合併した。
- SVEP1 は白血球接着経路に働く分子を制御することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nakada TA, Russell JA, Boyd JH, Thair SA, Walley KR. Identification of a nonsynonymous polymorphism in the SVEP1 gene associated with altered clinical outcomes in septic shock. Crit Care Med. 2015;43:101-8. (査読有)

Wacharasint P, Nakada TA, Boyd JH, Russell JA, Walley KR. AA genotype of IL-8 -251A/T is associated with low

PaO₂/FiO₂ in critically ill patients and with increased IL-8 expression. Respirology. 2012;17:1253-60. (査読有)

Thain KR, Nakada TA, Boyd JH, Russell JA, Walley KR. A common polymorphism in the 5' region of the human protein c gene binds USF1. Thromb Res. 2012;130:451-7. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

Taka-aki Nakada. SVEP1 c.2080A>C (p. Gln581His) gene is associated with altered mortality of septic shock. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2014 年 10 月 20 日 San Diego (U.S.A.)

中田孝明. SVEP1 遺伝子多型と敗血症性ショックの転帰との関連. 第 41 回日本集中治療医学会学術集会 2014 年 2 月 27 日 国立京都国際会館(京都市・京都府)

Taka-aki Nakada. A genome-wide scan of functional SNPs identifies novel loci associated with altered clinical outcome of septic shock. The 7th Asian Conference on Emergency Medicine. 2013 年 10 月 24 日 東京国際フォーラム(品川区・東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
<http://chiba-u-eccm.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 中田 孝明 (Nakada, Takaaki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号: 20375794

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし