

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462841

研究課題名(和文)日本人の重症病態とTLR/IL-1RファミリーのIL-18遺伝子多型と性差の関係

研究課題名(英文)The relationship between IL-18 polymorphism and gender difference in emergency intensive care unit

研究代表者

小谷 穰治 (Kotani, Joji)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80360270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：救急領域重症患者のIL-18遺伝子多型とIL-18血中濃度、性別、重症度、病態との関連を検討した。IL-18 -607/-137のCA/GC, CA/GG型は死亡例でIL-18濃度が高値となる可能性が示唆された。しかし、敗血症、敗血症性ショック、非敗血症の病態別では、IL-18の遺伝子多型がIL-18濃度の増加や予後に関係するような結果は得られなかった。好中球機能や性差とこれらの遺伝子多型には有意な関連は認められなかった。一方で、血漿IL-18濃度は多変量解析では性別、APACHE IIスコアと同様にICUにおける予後関与因子であった。IL-18の血中濃度は予後予測に貢献するかもしれない。

研究成果の概要(英文)：This study examined the relationship between the plasma IL-18 levels, IL-18 promoter polymorphism, and outcomes or pathological conditions of the patients in the emergency intensive care unit (ICU). Only sex, APACHE II score, and plasma IL-18 level were identified as independent predictors of mortality by multivariate analysis. The plasma IL-18 levels were correlated with APACHE II score, and the patients who did not survive showed significantly higher levels of plasma IL-18 as compared with survivors. Patients who did not survive and had the -607 CA genotype (CA/GC or CA/GG) showed significantly higher plasma IL-18 levels than survivors with the same genotype. However, there were no relationship between IL-18 promoter genotypes and pathological conditions (non-sepsis, sepsis, septic shock). And there were also no relationship between IL-18 promoter genotypes and the neutrophil ability or gender difference. Plasma IL-18 levels may be predictive of outcome in patients with sepsis.

研究分野：救急・災害医学

キーワード：IL-18 遺伝子多型 敗血症 性差

1. 研究開始当初の背景

重症感染症や重症外傷などの重症救急疾患では、サイトカインなどの炎症性メディエーター産生が生体防御反応を惹起・促進するが、この反応が過剰であれば臓器不全や免疫抑制を引き起こす。従って、メディエーター対策が治療の鍵であり、血液浄化やステロイド投与などが議論されてきた。しかし同じ侵襲でもこれらのメディエーター産生には関連遺伝子多型に基づく個体差が存在する(Watanabe E, et al. J Trauma 59: 1181-1190, 2005)。よって、過剰な炎症性メディエーターの制御による治療の有効性は、これら遺伝子多型の存在に左右され、侵襲反応の個人差に合わせた個別化医療(tailor-made medicine)が病態制御に必須である。実際、欧米では重症救急疾患でも遺伝子多型解析や遺伝子プロファイリングの研究が進み、遺伝子多型の有無に基づいた個別化医療が導入されつつある。しかし、遺伝子多型分布は人種間の差が大きく、特に日本人とCaucasianでは大きな差がある。

一方で大侵襲後の予後の女性の優位性も明確な個体差であるが、その機序は明確ではない。我々は、IL-18 レセプターが、強力な活性を持つ toll like receptors (TLRs)と同じ toll-like receptor/IL-1 R (TIR) family に属し、共通の細胞内シグナル伝達経路を持つこと、侵襲後血液中に持続的に高値で重症度を反映すること、caspase-1 によるインフラマソームとしての役割から自然免疫における重要な因子であることに着目して基礎的検討を重ね、IL-18 が(1)肺炎下の NO 産生と臓器障害、(2)好中球 apoptosis 抑制、(3)エンドトキシン血症下の骨髄細胞と脾細胞の apoptosis 誘導、(4)侵襲後のインスリン抵抗性の改善に関与する可能性、などを明らかにしており、IL-18 は敗血症のような自然免疫が大きく関係するような重症病態において重要な役割を示すと考えている。

2. 研究の目的

本研究では個体差の機序を、IL-18 を中心に遺伝子多型や性別と重症度との関連を見ることで病態別に検討し、新しい診断マーカーの発見および性差に基づく治療標的としての IL-18 の可能性について臨床検討する。

3. 研究の方法

兵庫医科大学救命救急センターに搬入された以下の症例について、インフォームドコンセントによって研究への参加の同意が得られた場合に採血し、血漿を採取した。対象症例は、Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) 症例、敗血症(感染巣に基づく SIRS であるもの)、重度外傷 (ISS が 15 以上、または AIS が 3 以上の部

位が 2 つ以上の多発外傷)、ショック(収縮期血圧 90 mmHg 以下、Shock Index が 1 以上、血中乳酸値が 4 mmol/L 以上、のいずれかを満たすもの)、多臓器不全(2 臓器以上の臓器不全)、重症急性膵炎、外科手術患者とした。APACHE II スコアは搬入後 24 時間での値を算出した。

血漿または血球から DNA を抽出し(DNA extractor WB-Rapid kit, DNA extractor SP-kit, WAKO)、TaqMan SNP Genotyping Assays, TaqMan Genotyping Master Mix を用いてリアルタイム PCR(7900HT Fast Real Time PCR system, Applied Biosystems または Light Cycler 480, Roche)にて IL-18-607 及び-137 の一塩基多型解析を行った。

統計学的解析は、IL-18 濃度と APACHE II の相関はピアソンの相関係数を用い、IL-18 濃度の比較は t 検定を用いた。また、多変量解析は年齢、性別、BMI、APACHE II スコア、血漿 IL-18 濃度、IL-18-607 及び-137 の遺伝子多型を因子として JMP software version 9 (SAS Institute Incorporated) を用いて解析した。p<0.05 を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) IL-18 の遺伝子多型と ICU 搬入患者予後の関係についての検討

70 名の男女(男性 40 名、女性 30 名)について、IL-18 の遺伝子多型と予後についての関連を調べた。予後は ICU 退出時での生存例と死亡例を示す。70 名の年齢は 64.5 ± 16.8 歳であり、非敗血症症例が 5 例、敗血症が 15 例、敗血症性ショックが 30 例、外傷が 2 例、重症急性膵炎が 8 例、出血性ショックが 7 名、熱傷が 3 名であった。これらの患者の採血時の APACHE II スコアと血漿 IL-18 濃度は弱い正の相関が確認され(図 1)、さらに非生存例では生存例に比べ血漿 IL-18 濃度が有意に高いことが明らかとなった(図 2)。

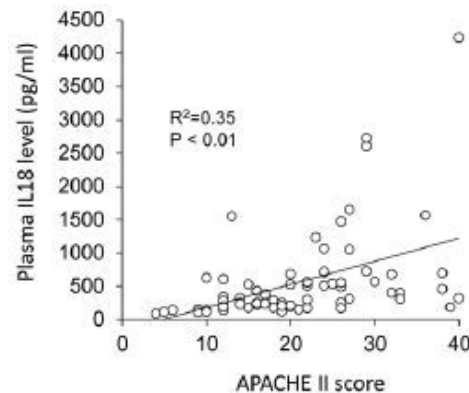


図 1. 患者 70 名の血漿 IL-18 濃度と APACHE II スコアの相関

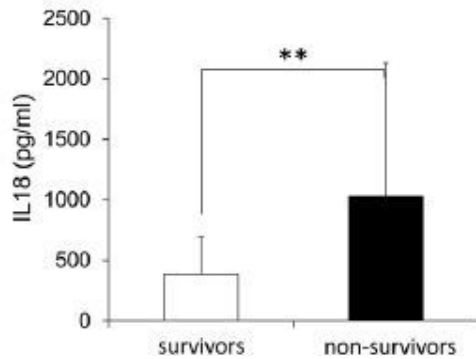


図2. 生存例と非生存例における血漿 IL-18 濃度
**p<0.01 by t-test

一方、70名のIL-18の遺伝子多型は表1の通りであり、それぞれの生存例と死亡例で血漿IL-18濃度を比較すると、IL-18-607/-137がCA/GCまたはCA/GGの場合は生存例に比べ死亡例で血漿IL-18濃度が有意に高いことが明らかとなった(図3)。

表1. IL-18 -607/-137 の遺伝子多型と ICU における予後

IL18 -607/-137	Number of patients (ICU survivors/non-survivors)	
	AA/CC	2 (2/0)
AA/GC	7 (4/3)	
AA/GG	14 (9/5)	
CA/GC	12 (7/5)	
CA/GG	22 (18/4)	
CC/GG	13 (11/2)	
Total	70 (51/19)	

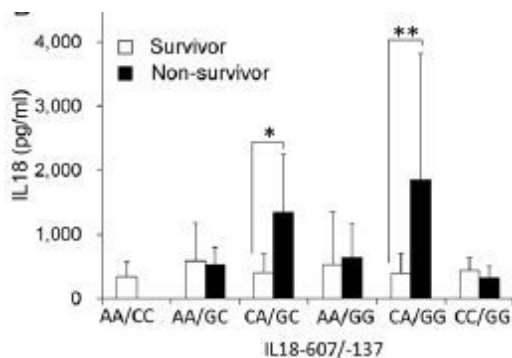


図3. 生存例と非生存例の遺伝子多型ごとの血漿 IL-18 濃度の比較
*;p<0.05, **p<0.01 by t-test

年齢、性別、BMI、APACHE II スコア、血漿IL-18濃度、IL-18-607の一塩基多型、IL-18-137の一塩基多型について、死亡率との関連を多変量解析で検討した結果、表2の通り、性別、APACHE II スコア、血漿IL-18濃度で有意差が認められ、これら3つの因子はICUにおける生存率に与える可能性が示唆された。

表2. ICUにおける予後予測因子の多変量解析

	p-Value	Odds ratio (95% CI)
Age	0.8938	0.996 (0.946-1.052)
Gender (male/female)	0.0019	16.471 (2.501-234.298)
BMI	0.9133	0.989 (0.806-1.225)
APACHE II score	0.0013	1.155 (1.053-1.300)
Plasma IL18 level (pg/ml)	0.0080	1.002 (1.000-1.003)
IL18 -607		
CA vs. AA	0.1813	0.301 (0.041-1.721)
CA vs. CC	0.8409	0.786 (0.075-10.002)
AA vs. CC	0.3947	3.325 (0.581-24.195)
IL18 -137		
GC vs. GG	0.4004	2.126 (0.362-13.809)

(2)病態別によるIL-18遺伝子多型解析と血漿IL-18濃度及び好中球機能の関心の検討

次に、NETs やアポトーシスといった好中球機能との関連を調べるため、36名の男女(男性24名、女性12名)から新たに採血し、好中球機能、病態とIL-18の遺伝子多型について関連を調べた。

採血した36名中、7名(男性4名、女性3名)が非敗血症、13名(男性11名、女性2名)が敗血症、16名(男性9名、女性7名)が敗血症性ショックであった。IL-18の遺伝子多型は、-607/-137がAA/CC:0名、AA/GC:4名、AA/GG:8名、CA/GC:1名、CA/GG:15名、CC/GG:8名であり、(1)の検討における存在比率(表1)とほぼ同様であった。病態別では、敗血症症例の場合、複数の遺伝子多型が確認できたが、敗血症性ショックは16名全員が-137のGG型であった。IL-18遺伝子多型別での血漿IL-18濃度は図4のようになり、CA/GG型では敗血症症例では他の型よりもやや高い傾向が見られたが、非敗血症、敗血症性ショック症例では他の型と同様であり、有意な差も認められなかった。好中球アポトーシス、NETsについても解析を行ったが、いずれも遺伝子多型との関連は認められなかった。また、性別でも解析を行ったが、敗血症症例の女性が2名と少なく、統計学的に意義のある解を行うことは出来なかった。

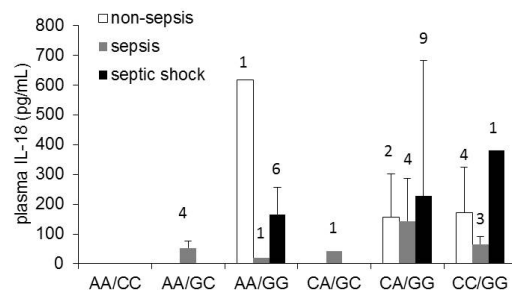


図4. 病態別に分けたときの遺伝子多型ごとの血漿IL-18濃度の比較
棒グラフ上の数字はそれぞれの人数

(1)(2)の結果より、IL-18 -607/-137 の CA/GC, CA/GG 型は死亡例で IL-18 濃度が高値となる可能性が示唆されたが、敗血症、敗血症性ショック、非敗血症で特定の IL-18 の遺伝子多型が IL-18 濃度を増加させるような結果は得られなかった。また、本研究では好中球機能や性差にこれらの遺伝子多型が関連する結果は得ることが出来なかったが、n 数を増やし、さらに検討する余地はあると考えている。一方、血漿 IL-18 濃度は性別、APACHE II スコアと同様に ICU における予後に関与する因子である可能性が示唆されたことから、ICU における血中 IL-18 濃度の把握は治療方針の決定などに役立つかもしれない。敗血症病態における IL-18 の役割については、今後もさらに詳細な検討を進めていく必要があると考えている。

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 2 件)

1. Yamada T, Aoyama-Ishikawa M, Yamashita H, Fujiwara M, Usami M, Ueda T, Terashima M, Kohama K, Nakao A, Kotani J. IL-18 production and IL-18 promoter polymorphisms correlate with mortality in ICU patients. In Vivo, 2014, 28; 391-396.
2. Ueda T, Aoyama-Ishikawa M, Nakao A, Yamada T, Usami M, Kotani J. A simple scoring system based on neutrophil count in sepsis patients. Med Hypothesis 2014, 82; 382-386. DOI: 10.1016/j.mehy.2014.01.007. Epub 2014 Jan 18.

〔学会発表〕(計 1 件)

山田太平、小濱佳祐、寺嶋真理子、上田敬博、中尾篤典、小谷穰治 血中 IL-18 濃度と IL-18 プロモーター領域遺伝子多型は ICU 患者における死亡率と相関する 第 42 回日本救急医学会総会・学術集会 福岡国際会議場(福岡県 福岡市) 2014 年 10 月 28 日 - 30 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：
取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 穰治 (KOTANI, Joji)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：80360270

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

久保山 一敏 (KUBOYAMA Kazutoshi)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00299116

上田 敬博 (UEDA, Takahiro)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：80412055

宇佐美 眞 (USAMI, Makoto)
神戸大学大学院・保健学研究科・教授
研究者番号：00193855

石川 倫子 (ISHIKAWA, Michiko)
神戸大学大学院・保健学研究科・研究員
研究者番号：40566121

山田 勇 (YAMADA, Isamu)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：20593990

宮脇 淳志 (MIYAWAKI, Atsushi)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：90418963

中尾 篤典 (NAKAO, Atsunori)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：40648169

寺嶋 真理子 (TERASHIMA, Mariko)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：00412015

橋本 篤徳 (HASHIMOTO, Atsunori)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：50461083