

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670758

研究課題名(和文) 侵襲に伴う過剰な血管透過性亢進を制御する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Association of angiopoietin-1 genetic polymorphisms with altered clinical outcome in septic shock

研究代表者

中田 孝明 (NAKADA, Taka-aki)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20375794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症性ショック520症例を対象に血管透過性制御16遺伝子(ANGPT1, ROBO1, ROBO4, CTNNA1, SLIT2N, F2R, FLT1, TEK, S1PR1, S1PR3, KDR, NPPA, VEGFA, RAC1, CDH5, PROCR)の一塩基多型を解析した。ANGPT1 rs4324901 A alleleを有する敗血症性ショック患者はC alleleに比べ28日死亡率が有意に高く、輸液負荷を多く必要とした。このAA genotypeを有する敗血症性ショック患者はそれ以外に比べ呼吸不全と中枢神経障害をより長期間合併し、より長期間腎補助療法を必要とした。

研究成果の概要(英文)：Controlling endothelial permeability are important in pathogenesis of the complications and outcome of inflammatory processes such as septic shock. Polymorphisms of permeability genes could alter outcomes of septic shock. Thus, we hypothesized that polymorphisms of genes that modulate endothelial permeability are associated with increased percent fluid overload and mortality of septic shock. We genotyped SNPs of 16 permeability genes (ANGPT1, ROBO1, ROBO4, CTNNA1, SLIT2N, F2R, FLT1, TEK, S1PR1, S1PR3, KDR, NPPA, VEGFA, RAC1, CDH5, and PROCR) in 520 patients with septic shock. We tested for associations of SNPs with 28-day mortality and percent fluid overload. We evaluated organ dysfunction as secondary outcomes of explanatory interest. Only A allele of rs4324901 of angiopoietin-1 was associated with increased 28-day mortality and fluid overload. ANGPT1 rs4324901 AA genotype patients had increased respiratory and neurologic dysfunction and need for increased renal replacement therapy.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：Septic shock polymorphisms vascular permeability

1. 研究開始当初の背景

敗血症、外傷、熱傷、手術などの侵襲は血管透過性を亢進する。過剰な血管透過性亢進は輸液量増加、間質浮腫の増大を招く。血管透過性亢進は古くから認識されている病態であるが過剰な透過性亢進を制御する治療法は確立しておらず、治療対象の基準も明らかではない。

近年 *robo4* 遺伝子が過剰な透過性亢進を抑制することが発見され (Nature Medicine 2008, Science Translational Research 2010), 過剰な血管透過性亢進制御は近未来の治療法として国内外で注目されている。

血管透過性亢進を呈する代表的疾患である重症敗血症患者において輸液量増加と生命予後悪化には関連があることを報告されている (Boyd and Nakada, Crit Care Med 2011)。

最近の血管透過性亢進に関する知見と侵襲による過剰な血管透過性亢進の抑制は輸液量増加を防ぎ、生命予後を改善し得るとの仮説をたて、血管透過性亢進制御という新しい治療法の開発に挑戦する本萌芽研究を計画した。

2. 研究の目的

重症患者の生命予後に遺伝的要素が影響を与えていることをふまえ、過剰な血管透過性亢進を起こし得る新規の遺伝子多型を発見することを主目的とした本研究を計画した。

3. 研究の方法

(対象)

血管透過性制御に働く遺伝子の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) が敗血症性ショックの臨床経過と関連するか解析した。敗血症性ショック 520 例 (European ancestry) を対象とした。

(血管透過性関連遺伝子)

血管透過性制御に働く下記の 16 遺伝子を選択した。

ANGPT1: angiotensinogen-converting enzyme 1
ROBO1: roundabout guidance receptor 1
ROBO4: roundabout guidance receptor 4
CTNNB1: catenin beta 1
SLIT2N: Slit Guidance Ligand 2
F2R: Coagulation Factor II Receptor
FLT1: fms related tyrosine kinase 1
TEK: Tyrosine Kinase, Endothelial
S1PR1: Sphingosine-1-phosphate receptor 1
S1PR3: Sphingosine-1-phosphate receptor 3

KDR: kinase insert domain receptor
NPPA: natriuretic peptide A
VEGFA: vascular endothelial growth factor A
RAC1: Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
CDH5: Cadherin 5
PROC: Protein C

(遺伝子多型の genotyping)

これらの血管透過性関連遺伝子の 1441 ヶ所の SNPs を Illumina 1M-Duo DNA Chip assay (Illumina, San Diego, CA) を用いて genotyping した。

(Primary outcome)

Primary outcomes は 28 日生存率と敗血症性ショック発症 2 日間の percent fluid overload = $((\text{intake} - \text{output} / \text{体重}) \times 100)$ の 2 つとした。これら 2 つの outcomes に対して SNPs との関連解析を行った。

(Secondary outcome)

Secondary outcomes として重要臓器 (中枢神経, 心, 肺, 肝, 腎) の臓器不全期間, 必要とした人工補助療法 (血管作動薬, 人工呼吸器, 血液浄化療法) 期間とし, primary analysis で得られた ANGPT1 SNP との関連を解析した。

(Statistical analysis)

Primary outcome の初めの解析として, まず 28 日生存率と敗血症性ショック発症 2 日間の percent fluid overload に関して, Armitage test を用いて genetic association study を行い, 統計学的に有意な SNPs を導出した。

次にこの導出された SNP を対象に, cox-regression analysis を用いて age, sex, diagnosis category を covariates として baseline characteristics を調整し, 生存曲線と導出された遺伝子多型が関連するか解析した。なおこの解析を本研究の主解析とした。

Secondary outcome の解析として臓器不全, 人工臓器に関しては SOFA (sequential organ failure assessment) score を用いて評価した。この SOFA score で modest 以上を臓器不全ありと定義した。この臓器不全に関して, Days alive and free out of 28-day を算出した。また人工呼吸器, 腎代替療法を人工補助療法として評価した。臓器不全と同様に, 人工臓器サポートに関しても, Days alive and free out of 28-day を算出した。これらの数値を primary analysis で導出した遺伝子多型の genotype 群間で Kruskal-Wallis test を用いて解析し, 遺伝子多型が臓器不全に与える影響に関して評価した。

4. 研究成果

(Primary outcome に関する Armitage test を用いた導出解析)

Armitage test を用いた 1-st screening 解析では ANGPT1 s4324901 A allele を有する敗血症性ショック患者は 28 日死亡率 (P=0.017) と percent fluid overload が有意に増加する結果が示された (P=0.0078) .

(Primary analysis of the study)

つぎに confounding factors を調整して遺伝的素因の影響を解析してみたが、ANGPT1 s4324901 A allele は転帰不良と関連する結果が得られた (Hazard ratio 1.295 95% CI [1.043-1.608]) .

(Secondary outcomes)

次に、臓器障害・人工臓器サポートに関する解析を行った。この ANGPT1 rs4324901 AA genotype を有する敗血症性ショック患者はそれ以外の genotype に比し有意に長期に呼吸不全 (P=0.013) , 中枢神経障害 (P=0.029) を呈しており、腎不全のために長期間血液浄化療法を要することが明らかとなった (P=0.027) .

(データベースを用いて発見された遺伝子多型の Linkage disequilibrium などの特徴の解析)

ANGPT1 の Haplotype block を遺伝子情報に関する公開されているデータベースの UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) を用いて確認すると、ANGPT1 rs4324901 は巨大な Haplotype block の中に位置することが明らかとなった。すなわち、この遺伝的素因は rs4324901 自身、またはこの巨大な haplotype block 内にあり Linkage disequilibrium にある他の SNPs に起因する可能性が示唆された (HapMap Data Rel27 Phase II+III CEU を使用) .

(研究成果の結語)

16 種類の血管透過性関連遺伝子の 1441 ヶ所の SNPs を用いた genetic association study を行い、ANGPT1 rs4324901 A allele を有する敗血症性ショック患者は C allele を有する患者に比べて、血管透過性が亢進に関連する初期輸液負荷が増加し、28 日死亡率は高いことが明らかとなった。また呼吸不全、中枢神経障害などの臓器障害は長期におよび、腎代替療法を長期間要した。

(今後の研究の推進方策)

遺伝子多型関連解析で得られた ANGPT1 rs4324901 の機能解析を今後推進していく予定である。具体的な細胞実験を用いてこの遺伝子多型あるいは Linkage

disequilibrium にあり機能性を有する可能性がある遺伝子多型を対象として行う予定である。

使用する細胞は Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Matrigels コートした transwell filter 上で単層培養し、FITC 標識デキストランをチャンバー内に添加しチャンバー外への透過量を測定し、in vitro vascular permeability を算出するアッセイが存在するため、そのアッセイを用いて機能性を明らかとしていく方針である。

さらに遺伝子多型の機能性が明らかとした後は recombinant ANGPT1 あるいは阻害剤などを用いて血管透過性亢進を阻害する実験を行い、血管透過性亢進に対する治療への発展を目指す実験を行っていく予定である。

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6件)

1. Nakada TA, Russell JA, Boyd JH, Thair SA, Walley KR, Identification of a non-synonymous polymorphism in the SVEP1 gene associated with altered clinical outcomes in septic shock, Crit Care Med., 査読有, Vol.43, 2015, 101-108.
DOI: 10.1097/CCM.0000000000000604
2. Nakada TA, Boyd JH, Russell JA, Aguirre-Hernández R, Wilkinson MD, Thair SA, Nakada E, McConechy MK, Fjell CD, Walley KR, VPS13D gene variant is associated with altered IL-6 production and mortality in septic shock, J Innate Immun., 査読有, Vol.7, No.5, 2015, pp.545-553.
DOI: 10.1159/000381265.
3. Walley KR, Thair SA, Russell JA, Reilly MP, Meyer NJ, Ferguson JF, Christie JD, Nakada TA, Fjell CD, Thair SA, Cirstea MS, Boyd JH., PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome, Sci Transl Med., 査読有, Vol.6, 2014, 258ra143.
DOI: 10.1126/scitranslmed.3008782
4. 中田孝明. 敗血症と遺伝子多型. Intensivist, 査読無, 2014; 6: 2014-201.
5. 中田孝明, 織田成人. 敗血症の初期治療の指針 -重症敗血症と敗血症性ショック-. 感染と抗菌薬, 査読無, 2013; 16: 22-25.
6. 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. 日本

救急医学会雑誌，査読有，2013；24：1-11.

〔学会発表〕(計5件)

1. 中田孝明，平澤博之，織田成人，Keith Walley，James Russell．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)
2. Nakada TA．Shigeto Oda，Hiroyuki Hirasawa，John Boyd，Keith Walley，James Russell．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，2013/10/24，東京国際フォーラム(Tokyo，Chiyoda Japan)
3. Nakada TA．The impact of genetic polymorphisms on the outcome of septic shock．Australian New Zealand Intensive Care Society/ Australian College of Critical Care Nurses (ANZICS/ACCCN) Intensive Care Annual Scientific Meeting 2013，2013/10/18，Hotel Grand Chancellor Hobart(Hobart，Tasmania)
4. 中田孝明，織田成人，平澤博之，Keith Walley，James Russell．敗血症性ショックとangiotensin-1 遺伝子多型 第113回日本外科学会総会 2013年4月13日 マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)
5. Nakada TA，Boyd JH，Walley KR，Russell JA．Polymorphism of angiotensin-1 rs4324901 is associated with increased fluid overload and mortality of septic shock．Society of Critical Care Medicine 42nd Critical Care Congress，2013/1/21，Puerto Rico Convention Center(San Juan，Puerto Rico)

〔図書〕(計1件)

1. 中田孝明，松岡哲也．「敗血症における薬剤開発・臨床試験の実践．治験デザインの実際事例」敗血症の診断/治療の実際と病態・メカニズムをふまえた開発戦略」，技術情報協会，東京，2013，pp328-332

〔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 無

6. 研究組織

(1)研究代表者

中田 孝明 (NAKADA, Taka-aki)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20375794

(2)研究分担者

橋田 知明 (HASHIDA, Tomoaki)
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号：60507375