

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390457
 研究課題名 (和文) サイトカイン関連遺伝子多型解析に基づいた重症化予測と個別化治療の研究
 研究課題名 (英文) Order-made therapy based on analysis of genetic polymorphism related to cytokine production
 研究代表者
 織田 成人 (ODA SHIGETO)
 千葉大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号：90204205

研究成果の概要 (和文)：感染や外傷、手術などの侵襲に対する生体反応には個人差がみられ、この生体反応の差が重症病態の罹病率や転帰に影響を与えることが明らかにされている。本研究は、サイトカインをはじめとする生体反応の中心的役割を担うタンパク質の産生に関わる遺伝子多型を解析し、その情報に基づいて患者に応じた個別化治療を実現することを目的としている。本研究ではこれら遺伝子多型を簡便に検出できる DNA チップを開発し、敗血症の罹病率や転帰に関連する遺伝子多型を検討して日本人に特有の遺伝子多型の存在を確認した。そして、これら遺伝子多型の有無が、重症患者の転帰の予測に有用であることを証明した。

研究成果の概要 (英文)：It has been widely recognized that a degree of immuno-inflammatory response to insults, such as infection, trauma and surgery varies individually and the difference influences on morbidity and mortality in critically ill patients. The purpose of this study is to identify genetic polymorphisms of protein production related to immuno-inflammatory response, such as cytokines, and to establish order-made therapy based on genetic informations. In this study, we have developed a new DNA-chip which enables to analyze multiple single nucleotide polymorphisms (SNPs) easily and in a short period of time. Then, we first identified two cytokine related SNPs which significantly affect morbidity and mortality in critically ill ICU patients. These SNPs are unique in Japanese population compared to previously reported SNPs in Caucasian. The genetic information analyzed with this DNA-chip would be useful for more precise prediction of outcome in critically ill patients and is essential to establish future order-made therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学 (細目番号 7313)

キーワード：(1) サイトカイン (2) 遺伝子多型 (3) 臓器障害 (4) DNA チップ (5) 個別化治療

1. 研究開始当初の背景

近年、侵襲に対して免疫担当細胞から過剰に産生されたサイトカインが、臓器障害発症の原因として注目されている。一方、最近侵襲に対するサイトカインの産生には個体差があり、その原因としてサイトカイン関連遺伝子多型の関与が明らかにされつつある。我々はこれまで、サイトカイン産生に関わる遺伝子多型解析を行い、その結果、TNF- α -308A/G、IL-1 β -511C/T、IL-1ra VNTR、IL-10-592A/C 等の多型が、異常な高サイトカイン血症と関連し、転帰に影響を及ぼしていることが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究は、DNA アレイを用いて短時間に複数の遺伝子多型を解析するシステムを確立し、過大手術侵襲を伴う術後 ICU 入室患者や、入室時にはサイトカイン血中濃度がそれほど高くない症例も含めて、基本的にはすべての ICU 入室患者に対してインフォームド・コンセントを得たうえで、DNA アレイを用いた遺伝子多型解析を行い、ハイリスク患者をスクリーニングし、ハイリスク遺伝子を有する患者に対して IL-6 血中濃度を測定しながらより適切な高サイトカイン血症対策を行うという個別化治療の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) インフォームド・コンセントを得られた ICU 入室患者の DNA サンプルを用いて、共同研究で開発中の、新しいラボオンチップ搭載 DNA アレイによる遺伝子多型解析を実施する。そして従来の方法と比較検討し、その精度を検証する。

(2) より効率的な遺伝子多型スクリーニングを行えるように重症患者の罹病率や罹患率により影響を与える遺伝子多型を同定し、DNA アレイに搭載する遺伝子多型を決定する。具体的にはサイトカイン関連遺伝子に加え、活性化プロテイン C、MIF、CD-14 などの生体反応関連分子の遺伝子多型について網羅的解析を行い、ICU 入室患者及び敗血症患者における遺伝子多型と、重症度や転帰との関連を多変量解析を用いて詳細に検討する。

(3) ハイリスク遺伝子多型を持つ症例に対するより強力な高サイトカイン血症対策の確立を目指して、従来の治療に反応しない超重症敗血症患者で、インフォームド・コンセン

トを得た上で 2 台の PMMA-CHDF を用いた治療 (double PMMA-CHDF) を施行し、その効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 新しい DNA アレイを用いた遺伝子多型検出システムの検証

IL-6 -596G/A, -572C/G, -174G/C, TNF- α -308G/A, -238G/A, IL-1 β -511C/T, -31T/C の 8 つの遺伝子多型検出用プローブを設計して DNA アレイに搭載し、その検出結果を従来の PCR 法を用いた結果と比較検証した。新しい DNA チップと検出例を以下に示す。

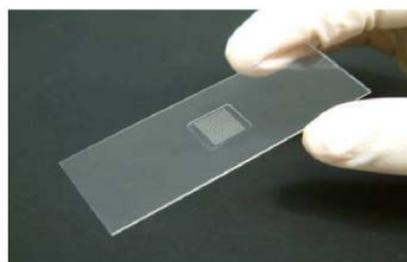


Fig. 1. Tony 3D-Gene DNA chip.



本 DNA チップは、58 検体で目標とした上記 8 種類の多型をいずれも正確に検出可能であり、従来の direct sequencing 法および TaqMan アッセイの結果と完全に一致した。さらに新規に 18 検体を用いた validation set でもその再現性が確認された。

(2) DNA アレイコンテンツ決定のための多変量解析を用いた生体反応関連分子の網羅的検討

先に検討したサイトカイン関連遺伝子多型に加え、その他の生体反応関連分子の遺伝子多型を網羅的に解析し、ICU 入室患者の重症度及び転帰との関連を、多変量解析を用いて検討した。さらに敗血症症例を抽出し、サブグループ解析を行った。

検討した遺伝子多型は以下のとおりである。TNF -308G/A, TNF -238G/A, lymphotoxin (LT) +252T/C, interleukin 1 (IL1) -511A/G, IL1 -31C/T, IL6 -174G/C, IL6 -634G/C, IL10 -1082A/G, IL10-819C/T, IL10-592C/A, macrophage migration inhibitory factor

(MIF) -173G/C, CD14 -159G/A, protein C (PROC) -1654C/T, PROC -1641G/A, PROC -1476A/T

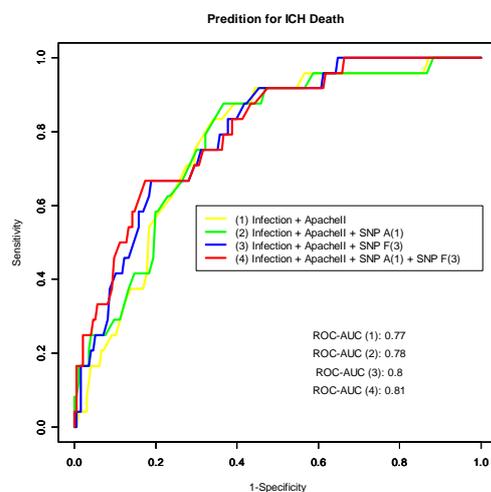
ICU 患者全体及び敗血症患者の転帰に関する多変量解析の結果を以下に示す。

	Parameter	Class	Odds ratio	95%CI	p value
Total (n = 224)	TNF -308	GA	8.07	1.30-49.92	0.025
	IL1 β -31	CT	3.24	1.21-8.72	0.019
	APACHE II 1 point		1.08	1.02-1.13	0.004
	Infection	+	3.21	0.99-10.54	0.053
Sepsis (n = 123)	TNF -308	GA	12.92	1.15-144.79	0.038
	IL1 β -31	CT/TT	9.04	1.12-72.76	0.039
	APACHE II 1 point		1.06	1.01-1.12	0.030

解析したサイトカイン及び生体反応関連分子の遺伝子多型のうち、ICU 患者全体の転帰と有意に関連する多型として、TNF-308GA および IL-1 β -31CT が、また敗血症患者の転帰と有意に関連する多型として TNF-308GA 及び IL1 β -31CT/TT が同定された。

これらの遺伝子多型を組み込んだ予後予測式を新たに作成し、従来用いられている臨床データのみを用いた場合 (APACHE II スコア) と ROC 分析を用いて比較すると、Area Under the Curve (AUC) が、APACHE II スコアと感染のみの場合は 0.77 であるのに対し、これらに遺伝子多型データを加えると 0.81 とその精度が上昇することが明らかになった。

今回同定されたこの 2 つの遺伝子多型は、欧米で報告されているものとは異なる結果であり、今回はじめて日本人独自のデータとしてこの 2 つの遺伝子多型が ICU 患者の転帰と関連していることが確認された。



しかし、今回の検討は単独施設のデータであり、またサンプル数も限られていることより、今後多施設共同研究でサンプル数を増やしてこの結果を検証する必要があると考えられた。

(3)ハイリスク遺伝子多型を有する症例に対するより強力な高サイトカイン血症対策
先に述べた転帰不良な遺伝子多型を有する患者では、高サイトカイン血症を制御できずに転帰不良となる可能性が示唆される。そこで、従来の治療に反応しない著明な高サイトカイン血症をコントロールするための新しい治療法として、サイトカインを吸着除去可能な PMMA-CHDF を 2 台同時に施行する double PMMA-CHDF を考案し、インフォームド・コンセントを得た上で、重傷の治療に抵抗性の超重症敗血症性ショック患者に試行した。その結果、double PMMA-CHDF を施行した 10 例中 6 例 (60%) を救命しえた。この救命率は、重症度をあわせた従来治療群 (single 群) の 12.5% (2/16) よりも有意に高く (p=0.026)、遺伝子多型解析に基づいたオーダーメイド治療のひとつの手段として、double PMMA-CHDF が有効である可能性が示唆された。

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 8 件)

① Otani S, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Watanabe E, Nakada T, Abe R, Tokuhisa T, Hirasawa H: Clinical application of cytokine-related gene polymorphism analysis using a newly developed DNA chip in critically ill patients. *Clinical Biochemistry* (査読有) 42: 1387-1393, 2009

② 織田成人: 多臓器不全の発症予知. 感染・炎症・免疫 (査読無) 39: 58-60, 2009

③ Nakada T, Oda S, Matsuda K, Sadahiro T, Nakamura M, Abe R, Hirasawa H: Continuous hemodiafiltration with PMMA hemofilter in the treatment of patients with septic shock. *Mol Med* (査読有) 14: 257-263, 2008

④ Hirasawa H, Oda S, Matsuda K: Continuous hemodiafiltration with cytokine-adsorbing hemofilter in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Contrib Nephrol* (査読有) 156: 365-370, 2007

⑤ 中田孝明, 織田成人, 志賀英敏, 他: 自然免疫およびサイトカインに関連した遺伝子多型の敗血症へ及ぼす影響. *日外感染症会誌* (査読有) 4: 229-237, 2007

⑥中田孝明、織田成人、平澤博之：サイトカインおよびinnate immunity関連遺伝子多型と敗血症. 救急医学 (査読無) 31: 1400-1410, 2007

⑦中田孝明、織田成人、渡邊栄三、他：サイトカイン・ストームにおける genetic polymorphism. 化学療法の領域 (査読無) 23: 1560-1568, 2007

⑧Kobe Y, Oda S, Matsuda K, et al: Direct hemoperfusion with a cytokine-adsorbing device for the treatment of persistent or severe hypercytokinemia: a pilot study. Blood Purif (査読有) 25: 446-453, 2007

〔学会発表〕(計6件)

①島田忠長、織田成人、貞広智仁、他：重症患者における炎症反応関連分子に関する遺伝子多型が転帰に及ぼす影響. 日本Shock学会、2009年5月30日、金沢市

②渡邊栄三、Buchman TG、織田成人、他：Sepsis易罹患性及び予後に対する遺伝子多型の影響とその人種間格差. 日本Shock学会、2009年5月30日、金沢市

③松村洋輔、織田成人、貞広智仁、他：救命困難なSeptic Shockに対する血液浄化法の強化~Double PMMA-CHDFの有効性とその適応~. 第19回日本急性血液浄化学会学術集会、2008年9月19日、東京

④大谷俊介、織田成人、仲村将高、他：高感度DNAチップを用いた新しい一塩基多型(SNP)解析法. 第35回日本集中治療医学会学術集会、2008年2月16日、東京

⑤大谷俊介、織田成人、貞広智仁、他：敗血症の病態に関する各種遺伝子多型の検討. 第35回日本救急医学会総会・学術集会、2007年10月17日、大阪

⑥仲村将高、織田成人、貞広智仁、他：Hypercytokinemia制御困難例に対する血液浄化法の強化. 第18回日本急性血液浄化学会学術集会、2007年10月6日、大分市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 連携研究者

貞広 智仁 (SADAHIRO TOMOHITO)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00436437

仲村 将高 (NAKAMURA MASATAKA)
千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：30315436

渡邊 栄三 (WATANABE EIZO)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40375639

安部 隆三 (RYUZO ABE)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30375795

立石 順久 (TATEISHI YOSHIHISA)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70375799

大谷 俊介 (OHTANI SHUNSUKE)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：80375790

島田 忠長 (SHIMADA TADANAGA)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40436423