

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792083

研究課題名(和文) 血液検査の妥当性と未知の診断項目発見のための遺伝子プロファイル活用

研究課題名(英文) Validity of blood tests and use of genetic profiles for detection of unknown diagnostic items

研究代表者

秋富 慎司 (Akitomi, Shinji)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：重症敗血症患者の治療前後における遺伝子プロファイリングを行った。対象はエンドトキシン吸着療法(PMX-DHP)などの重症敗血症治療を行い敗血症性ショックを離脱した患者と、ショック状態が遷延した患者を比較検討した。ショック状態の改善に関係なく上昇したmiRNAは10種類、下降したものは8種類であった。そのうち治療に反応して血圧上昇したものは7種類存在し、その7種類のmiRNAに対して明らかに血圧上昇した患者で変化のあったmiRNAのターゲット遺伝子を解析対象とした。

血圧上昇をしたと血液関連の遺伝子は94種類の存在を確認した。現在、mRNA、miRNAの両方でpathway解析中である。

研究成果の概要(英文)：We carried out gene profiling before and after treatment in patients with severe sepsis. The results obtained were evaluated and compared between those who recovered from septic shock with treatments for severe sepsis, such as endotoxin adsorption therapy (polymyxin-B direct hemoperfusion) and those who were in prolonged shock without responding to treatment. Regardless of shock state improvement, 10 types of miRNA increased, and 8 types decreased, with intensive care. Among them, there were 7 types of miRNA in cases with blood pressure elevation in response to treatment. Regarding these 7 types, we analyzed the target genes of miRNA that was changed in patients with definitely elevated blood pressure. We confirmed 94 types of blood-related genes contributing to blood pressure elevation. At present, we are analyzing the pathways of mRNA and miRNA.

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

キーワード：sepsis mRNA miRNA microarray

1. 研究開始当初の背景

救急領域における診断・治療の時間的制約は患者の予後を左右する。ひとたび治療開始時期を見誤り、重症化する前の治療介入の機会を逸することにより集中治療を余儀なくされ、医療費高騰をまぬがれない状況である。現代社会において急激な高齢化社会などを背景とし、今後の現代医学においても脅威である。救急疾患においても発症時期、生体反応相関への対策は必要になって来ている。

2. 研究の目的

刻一刻と変化してくる病態を診断するために、臨床的技術を磨いていかなければならないが、その補助的、確定的診断として血液検査を行う。しかしながら、そこには当然のことながら特異度、感度等の問題が生じ、また迅速性を求められる集中治療領域における重症患者の場合、様々な生体反応を得て出てくる血液結果では、数値が変化してくるまで時間がかかり、その時点での病態との間にタイムラグが生じ得る。今回の研究で明らかにしたいことは

未知の有効な血液検査項目を突き止める

数多い検査項目を絞り迅速且つ繊細に出る血液項目を検討する

その結果、早期診断、早期治療を可能にして医療費増大を抑制する

である。その研究で使用する手段として、遺伝子プロファイルの活用を提案した。

3. 研究の方法

重症敗血症患者において治療前後における遺伝子プロファイリングを行った。対象はエンドトキシン吸着療法 (PMX-DHP) などの重症敗血症治療を行い、敗血症性ショックを離脱した患者と、治療に反応せずにショック状態が遷延した患者を比較検討した。今回は特に敗血症性ショック患者の迅速な昇圧報

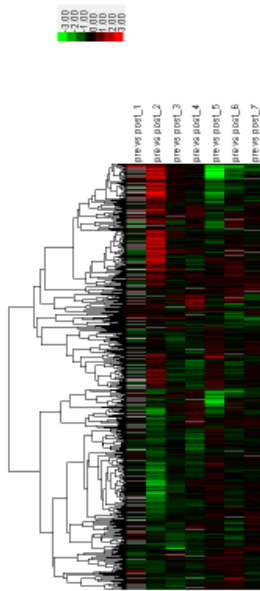
告がある PMX-DHP 施行前後、および 24 時間後での、ショック離脱の有無で検討した。

検体は PMX-DHP 施行前後の 2 ポイント、および場合により 24 時間後で採血を行った。ヘパリンを加えた検体を遠心分離器にかけ血漿を得た。血漿検体からの RNA 抽出とマイクロ RNA の検出・解析については、300 μ L の血漿より RNA 抽出を実施した。抽出した RNA は Cy5 色素で標識し、標識された RNA を、DNA チップを使用して網羅的な miRNA の検出を行った。miRNA データベースである miRbase (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) に対応させ、検出された生データは、ブランクスポットの平均値をバックグラウンドとし、バックグラウンド + 2SD 以上の値を有効スポットとして、生データからブランクスポットの平均値を差分して、解析用のシグナル強度として使用した。サンプル間のシグナル強度を比較 (発現比) する際には、全ての遺伝子の発現比の中央値が 1 になるように補正した後、サンプル間の発現比を算出した。

4. 研究成果

重症敗血症患者において治療前後における遺伝子プロファイリングを行った。対象はエンドトキシン吸着療法 (PMX-DHP) などの重症敗血症治療を行い、敗血症性ショックを離脱した患者と、治療に反応せずにショック状態が遷延した患者のヒートマップ (表 1) を作成し比較検討した。

pre vs post クラスター
(ヒートマップ)



pre vs post & post vs post24h
クラスター

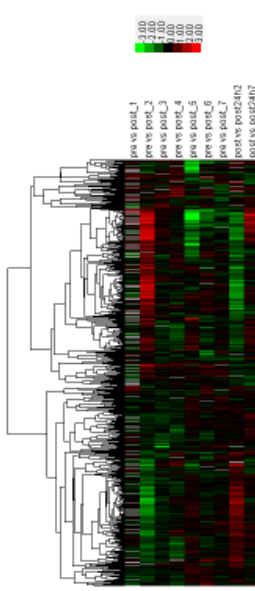
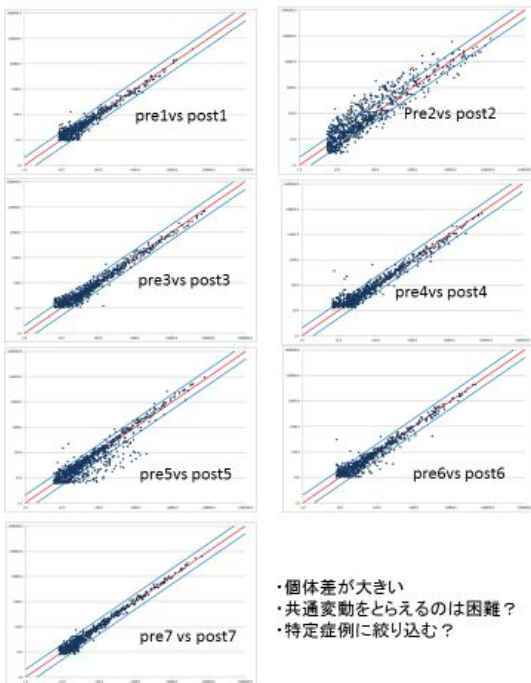


表 1

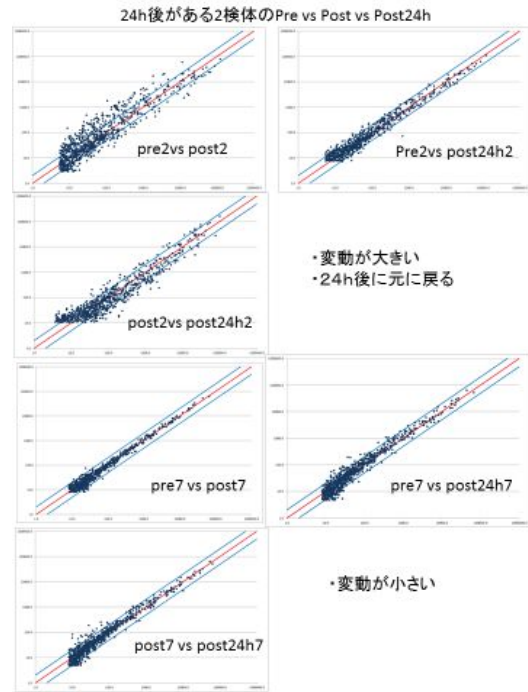
ショック状態の改善に関係なく、集中治療を行うことにより上昇した miRNA は 10 種類、下降したものは 8 種類であった。そのうち治療に反応して血圧上昇したものは 7 種類存在した (表 2、3)。

Pre vs Post 7検体の対比



- ・個体差が大きい
- ・共通変動をとらえるのは困難?
- ・特定症例に絞ら込む?

表 2



- ・変動が大きい
- ・24h後に元に戻る

- ・変動が小さい

表 3

その 7 種類の miRNA に対して明らかに血圧上昇した患者で変化のあった miRNA のターゲット遺伝子を解析対象とした (表 4)

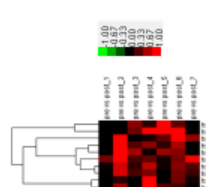
pre vs post で 7検体で上昇傾向があるmiRNA 10種類

ID	Name	pre vs post_1	pre vs post_2	pre vs post_3	pre vs post_4	pre vs post_5	pre vs post_6	pre vs post_7
MMAT030611	hsa-miR-195-3p	0.9848932	0.9833917	0.1937173	0.1641700	0.0827841	0.1938959	0.3412982
MMAT006496	hsa-miR-323a-5p	1.0348948	1.0348948	0.0957284	0.3771785	0.1754948	0.1754948	0.5715678
MMAT0216947	hsa-miR-278c	1.7282582	0.3245359	0.6474645	0.18766416	0.4702451		
MMAT0018982	hsa-miR-278a	0.5622078	0.4880071	1.0773069	0.3057271			
MMAT0190158	hsa-miR-4450	0.4578733	1.0015578	0.2086174	0.3903259	0.0848216	0.4898676	0.9986938
MMAT0019074	hsa-miR-278b	1.0784413	0.6748811	0.3063992	0.102788	0.2851642		
MMAT0018023	hsa-miR-471-8	0.4309081	1.0718778	1.2730049	1.0707279			
MMAT0190689	hsa-miR-472d-5p	0.1517521	1.0727453		0.4413335	0.0778588		
MMAT0081120	hsa-miR-518a	0.8383388	0.2870803	0.4912439	0.05412347	0.4824624	0.2288733	
MMAT024121	hsa-miR-819b	0.6178056		1.7003185	0.3181970	0.2462018		

pre vs post で 7検体で下降傾向があるmiRNA 8種類

ID	Name	pre vs post_1	pre vs post_2	pre vs post_3	pre vs post_4	pre vs post_5	pre vs post_6	pre vs post_7
MMAT000725	hsa-miR-372-5p	-0.3000223	-1.0810207	-0.7080207	-0.8481131	-0.4844809	-0.1737853	-0.2517288
MMAT000732	hsa-miR-308	-0.2031388	-0.8382370	-0.2651869	-0.3079787	-0.5738262	-0.1432838	-0.2008274
MMAT0019098	hsa-miR-473-3p	-0.4038144	-1.4080130	-0.0222499	-0.3908893	-0.1238448	-0.3448827	-1.0091408
MMAT0019015	hsa-miR-470a-3p			-0.9536547	-1.1779492	-1.0935247	-1.0095739	-0.5203718
MMAT0019037	hsa-miR-472c-3p	-0.1349074	-0.4541264	-0.5013742	-0.4621413	-0.3418791	-0.0983129	-0.0344703
MMAT0020498	hsa-miR-370a		-0.8312192		-1.4621384	-0.3302021	-0.0918439	-0.0599818
MMAT0020594	hsa-miR-8071		-1.2141333		-0.5272839	-1.2041038		-0.40031
MMAT0020644	hsa-miR-871-8-3p		-0.8830045		-0.2029806	-0.6176848	-0.1813716	-0.3348370

UP 10種miRNAクラスター



DOWN 8種miRNAクラスター

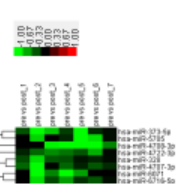


表 5

血圧上昇をしたと血液関連の遺伝子は
94 種類の存在を確認した (表 6, 7)

UP 10種miRNAのターゲット遺伝子の中で血液関連の遺伝子

TGM2	GATA2	MMP2
ANGPTL2	LYVE1	ANGPTL3
THY1	TFPI	THBD
LTBP3	F2RL1	MTUS1
MEIS1	NUS1	F2R
GNAI3	FOXC1	CD36
PTEN	MEF2C	PABPC4
CHD7	FGF1	CDX4
FBN1	POFUT1	MYH9
CMKLR1	GPI	
JAG1	P2RY2	
SCUBE3	ADRA1D	
BCAM	COL1A1	
BMPR2	OLR1	
AMOTL2	ABAT	
PLXDC1	HMCN1	
MMP14	SERPING1	
SEMA7A	EDN3	
NISCH	RHD	
AMOTL1	EFEMP1	
KCNJ12	EDNRB	
SEMA5A	SOAT1	
P2RY6	SERPIND1	
ERAP1	PROP1	
MAPK7	GJA5	
VWF	FGF9	
CLASRP	APLNR	

表 6

DOWN 8種miRNAのターゲット遺伝子の中で血液関連の遺伝子

MIB1	EPHB4
SCUBE3	GBX2
PTEN	MEIS1
TCF7L2	ADRB2
CDH5	SEMA5A
LYVE1	ENPEP
CSPG4	OXTR
FOXA2	EFNB2
AQP1	BMPR2
WASF2	NPR1
LRP6	KCNE1
HCN4	CRKL
VASH1	F13A1
MEGF6	COL1A1
PCSK5	
LEPR	
ADRA1D	
OLR1	
BVES	
KLF5	
F13B	
DICER1	
ITGAV	
GPI	
FBN2	
ANGPTL7	
MAP3K7	
EPHB4	

表 7

現在、mRNA、miRNA の両方で pathway 解析中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

秋富 慎司 (AKITOMI Shinji)
岩手医科大学・救急医学講座・助教
研究者番号：00509028

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：