

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462813

研究課題名(和文)心肺停止蘇生後症候群の予後予測因子としての遺伝子多型の関与に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of genetic polymorphisms and gene expression profiles of post-cardiac arrest syndrome as predictive indicators for prognosis

研究代表者

渡邊 栄三 (Eizo, Watanabe)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40375639

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)：心停止後症候群(PCAS)に、高サイトカイン血症を主体とした各種高メディエータ血症が関与しているといわれており、敗血症(sepsis)の病態に類似していることから、sepsis-like syndromeとして注目されている。その背景病態に遺伝的因子が如何に関与しているかを検討する目的で、PCAS急性期を対象に、全血mRNAを用いた遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、転帰に関連すると思われる遺伝子を約90個同定し、中でも特に好中球に関連する遺伝子の経時的変化と転帰に興味深い関連を認めた。また重症病態の転帰に関連する炎症反応関連遺伝子多型も同定された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to investigate association between outcome and genetic factor in the pathophysiology of post-cardiac arrest syndrome (PCAS), which is recognized as "sepsis-like syndrome". Therefore, we performed gene expression profiling analyses for acute phase of the PCAS and compare them with respect to neurologic outcome of the patients. As the results, 90 transcripts were extracted with 14400 oligo DNA microarray by classifying according to neurologic outcome, i.e., cerebral performance category (CPC). Moreover, we identified 4 neutrophil function-related transcripts which altered over time (from ICU day 1 to day 5) according to 90 day outcome. We further analyzed inflammation-related gene polymorphisms using a single nucleotide polymorphism (SNP) chip which we designed, and found several candidate SNPs which were associated with outcome of critically ill patients including PCAS.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：心肺停止 心停止後症候群 予後予測 敗血症 遺伝子多型 一塩基多型 遺伝子発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

心肺停止 (CPA) は、大多数が死の転帰をたどる最重症の病態であり、海外では院外 CPA の発生頻度は年間 61/100,000 と報告されている。本邦における過去の検討では院外 CPA 症例のうち原因が心原性で、目撃者が存在した場合の ROSC 率は 27.4% ~ 34.1% と報告されている。しかしながら、生存退院率は 1.6% ~ 3.5% と極めて低い。すなわち心肺蘇生 (cardiopulmonary resuscitation; CPR) により自己心拍再開 (return of spontaneous circulation; ROSC) を得ても、そのほとんどが、低酸素性の蘇生後脳症をはじめとした様々な病態変化 (心停止後症候群 (post-cardiac arrest syndrome; PCAS)) に陥り、結果的に救命できないのが現状である。PCAS により、自己心拍が一旦再開しても 24 時間以内に心筋機能不全が生じ、80% が院内で死亡してしまい、植物状態などの重度後遺症も含めると 90% が不幸な転帰を辿るとされる。近年、これらの CPA の ROSC 後にみられる病態に高サイトカイン血症を主体とした各種高メディエータ血症が関与しているといわれており、敗血症 (sepsis) の病態に類似していることから、sepsis-like syndrome として注目されている。我々は、S-100B と neuron-specific enolase (NSE) が ROSC を得られた CPA 患者の神経学的予後予測因子であることを見出し、かつその転帰を左右するバイオマーカーであると主張している。一方、敗血症をはじめとする様々な重症病態に遺伝的因子が影響を及ぼしていることが確認されており、各種炎症性サイトカイン産生に関する遺伝子多型は中でも最も多く検討されてきたもののひとつである。そして、我々は、敗血症をはじめとする重症病態における遺伝子多型の関与を本邦で初めて発表し、その後も様々な重症疾患について検討を重ねてきた。また、敗血症の合併有無や転帰によって全血遺伝子発現プロファイルが他の全身炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome) を来たす疾患と異なることも報告されていることから、sepsis-like syndrome と呼ばれる PCAS において、(神経学的) 予後と関連するような遺伝子発現パターンの存在が予想された。そして、心肺停止蘇生後の患者においても、経過良好で社会復帰に至る症例もあれば、急激な経過で死に至る症例も少なからず経験してきた。

2. 研究の目的

CPA はその発生場所が病院内・病院外を問わず、大多数が死の転帰をたどる最重症の病態である。そして、それら救命率の向上及び神経学的予後の改善のためには高度な集学的治療を要する。そのような CPA 蘇生後の重症病態の背景には、多くの疾病重症度を反映するといわれる高サイトカイン血症も存在すると考えられる。一方、様々な重症病態に

遺伝的因子が影響を及ぼしていることが近年示唆されているため、今回、PCAS の予後予測因子として遺伝子発現プロファイリングと遺伝子多型を検討することとした。そして、炎症反応関連遺伝子発現を含めて網羅的に解析・検証するとともに、いまだ確立されていない PCAS 関連バイオマーカー (診断、重症度、予後予測) を網羅的遺伝子発現解析によって検出し、将来的には PCAS 症例に対するテーラーメイド医療実現へ発展させることを目的とした。

3. 研究の方法

【対象】

網羅的遺伝子発現解析では、千葉大学医学部附属病院救急部・集中治療部 ICU に入室した目撃のある成人心停止後症候群 (post-cardiac arrest syndrome; PCAS) 患者 (心停止イベント前の ADL が自立 (CPC1-2 の患者)) で ROSC 後の mGCS (Glasgow Coma Scale motor score) が 5 以下の患者を対象とした。遺伝子多型解析では、インフォームド・コンセント (IC) を得た ICU 患者を疾患問わず対象とした。末梢静脈血 9cc より mRNA とゲノム DNA を抽出し、これらを解析に用いた。

【網羅的遺伝子発現解析】

mRNA 発現は、入院後、脳低温療法開始前に 1 回、低体温 (<33) 維持終了後復温開始前に 1 回、復温終了後 (>36) 1 回の計 3 回解析した。また循環動態不安定なために低温療法が施行できない症例に対しては、第 1 病日、第 2 病日、第 5 病日に解析することとした。また脳低温療法期間中、人工心肺など特殊な治療を行った場合には、その前後で mRNA 解析を行った。なお、被験者への説明および同意取得は、千葉大学医学部附属病院にて行った。本研究では、患者本人が意思表示不能なため、代諾者への説明および同意取得をもって研究を行うこととした。試料は匿名化された後、共同研究施設である福島県立医科大学医療・産業トランスレーショナルリサーチ (TR) センター (伊藤恵美講師、渡辺慎哉教授、今井順一准教授) へ送付され解析が進められた。

14400 種類の合成オリゴ DNA 搭載のマイクロアレイを用いて、PCAS 患者 19 名、対照として健常者 1 名および下垂体腺腫に対する予定術後患者 9 名の末梢血の発現プロファイル (Reference RNA に対する比) を取得した。PCAS 症例の中では、神経学的転帰良好群 (*CPC 1-2)、不良群 (CPC 3-4)、死亡群 (CPC 5) との比較を行った (*CPC: Cerebral Performance Category 比は対数に変換し、標準偏差が 1 となるように補正した。対照の平均値に比べて発現に 1.5 以上の変動がある症例が 3 つ以上あり、かつ神経学的転帰の良好群と死亡群で差のある遺伝子 ($p < 0.05$) を抽出した。

【遺伝子多型解析】

2001年より2008年までの当ICU入室患者導出コホート(n=253,うち敗血症/敗血症性ショックn=125),及び2008年より2012年までの*5施設のICU入室患者検証コホート(n=767,うち敗血症/敗血症性ショックn=271)を設定し,遺伝子多型解析を行った.今回我々は,ウルム大学 Experimental Anesthesiology ラボと共同で,過去の自験例での結果をもとに,炎症反応や自然免疫に関わる56種類のSNPを選択し,炎症反応関連SNPチップ(ASPER Biotech社製)を設計した.そこで,sepsis-like syndromeの転帰との関連を検討する第一歩として,敗血症/敗血症性ショックを対象を限定し,転帰に影響を及ぼしているSNPを両患者コホートで抽出することとした.

*多施設研究参加5施設

1. 千葉大学 救急集中治療医学
2. 久留米大学医学部 救急医学
3. 兵庫医科大学医学部 救急・災害医学
4. 東京医科大学八王子医療センター 特定集中治療部
5. 君津中央病院 救急・集中治療科

4. 研究成果

【網羅的遺伝子発現解析】

PCASの転帰に関連すると思われる遺伝子を約90個同定し,中でも特に好中球に関連する遺伝子の経時変化(第1病日~第5病日)と転帰に興味深い関連を認めた(図).今後,これら炎症反応にかかわる遺伝子発現上昇がPCASの予後予測や重症度判定に用いられる可能性がある.ひいてはこれらの遺伝子発現制御による転帰改善が将来的に期待される.



【遺伝子多型解析】

敗血症(sepsis)/敗血症性ショックにおいて, autophagyに関連する *IRGM* の exon 2 に位置する rs10065172 (導出コホート P=0.043, 検証コホート P=0.037, 全体コホート P=0.004), トロンボモジュリン遺伝子 *THBD* の promoter に位置する rs2239562 (導出コホート P=0.033, 全体コホート P=0.028) と, *P2X7* His155Tyr アミノ酸変異を来たす exonic rs208294 (検証コホート P=0.049, 全

体コホート P=0.042) の3つのSNPsがICU死亡率と有意に相関していた.よって,重症敗血症患者の転帰に遺伝子多型が関与していたことから,今後 sepsis-like syndrome と呼ばれる PCAS 症例の genome data をより多く集積し,これらSNPsとPCAS転帰との関連を詳細に検討する方針である.そして,遺伝情報を基にしたPCASへのtailor-made医療展開へ繋げてゆきたい.

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) 渡邊栄三 (2015) ARDSにおける遺伝子多型とは. 特集 ARDS Berlin その後 INTENSIVIST 7, 157-167. (査読無)
- 2) Kimura T, Watanabe E, Sakamoto T, Takasu O, Ikeda T, Ikeda K, Kotani J, Kitamura N, Sadahiro T, Tateishi Y, Shinozaki K, Oda S (2014) Autophagy-Related IRGM Polymorphism Is Associated with Mortality of Patients with Severe Sepsis. PLoS One 9, e91522 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 渡邊栄三, 坂本照夫, 高須 修, 池田寿昭, 小谷穰治, 北村伸哉, 寺竹洋一, 幡野雅彦, 織田成人: トロンボモジュリン遺伝子多型を介した重症敗血症転帰に関する検討. 第43回日本集中治療医学会学術集会 2016年2月12日 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市).
- 2) 渡邊栄三, 織田成人, 坂本照夫, 池田寿昭, 小谷穰二, 北村信哉, 高須 修, 安部隆三, 服部憲幸, 松村洋輔, 高橋和香: 侵襲時のサイトカイン産生に関わる遺伝子多型の影響 - 本邦ICU多施設研究までの15年間の結果 - 日本外科代謝栄養学会第52回学術集会 外科侵襲とサイトカイン研究会 joint シンポジウム 2015年7月2日 品川区民会館きゅりあん(東京都品川区).
- 3) Watanabe E, Oda S, Sakamoto T, Ikeda T, Kotani J, Kitamura N, Sato Y, Schneider ME: Genetic Polymorphisms and Severe Sepsis - A Multi-Center Study in the Japanese ICU Population- The Shock Society's 38th Annual Conference on Shock, June 8, 2015. Grand Hyatt Denver (Denver, U.S.A.)

〔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

渡邊 栄三 (WATANABE, Eizo)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号： 40375639

(2) 研究分担者

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