

遺伝子多型からみた敗血症性ショックの病態

真弓俊彦*, 有嶋拓郎*, 高橋英夫*, 武澤 純*

はじめに

以前から敗血症性ショックの制御が多数試みられてきたが、現在でもその死亡率は以前として高い。近年、種々の遺伝子多型が解明され、その一部は敗血症との関連も報告されている。そこで、今回はその概略を解説する。

Key word : 遺伝子多型, Single nucleotide polymorphism : SNP, 敗血症, 敗血症性ショック

遺伝子多型とは

臨床の現場では、同じような状態と思える患者でも、軽快、回復する患者もあれば、悪化、死亡する患者も存在する。また、同じような状態の患者に、同じ治療を行っても、それが効果を上げる場合もあれば、副作用を生じてしまう場合もある。近年、このような、経過や反応性の差異の原因のひとつが遺伝子多型によるものであることが判明してきた。顔貌や体型が個人で異なるように、遺伝暗号である塩基配列も人により多くの部位で異なっており、それが一定の頻度以上存在するものを遺伝子多型と呼ぶ。遺伝子多型には以下のような種類がある¹⁾。

1. 1から数十塩基(数千塩基のこともある)が欠損や挿入をしているもの(挿入/欠損型)
2. 1個の塩基が他の塩基に置き換わっているもの(single nucleotide polymorphism : SNP).
3. 2塩基から数十塩基を1単位とする配列が繰り返し存在する部位において、その繰り返し回数が個人間で異なるもの。

2のSNPは数百塩基対から1000塩基対に1ヶ

所程度の割合で存在していると考えられ、ゲノムのなかには300万から1000万のSNPが存在すると考えられる。また、DNAの特定の制限酵素認識配列にSNPがある場合にはRFLP(restriction fragment length polymorphism:制限酵素切断断片長多型)が生ずる。

また、3の繰り返し単位が2~4塩基のものをマイクロサテライト多型、数塩基から数十塩基のものをVNTR(variable number of tandem repeat)という。

RFLPは第1世代のヒト多型マーカー(1980年代前半)、VNTRは第2世代(1980年代後半)、マイクロサテライト多型は第3世代(1990年代)であり、SNPは第四世代の多型マーカーと位置づけられている¹⁾。SNPはマイクロサテライトの出現頻度の数百倍の高頻度を示すこと、ゲノム上に広く高密度に分布するSNPは疾患感受性、人種差、および個人差などの有益なゲノムマーカーであること、また、SNP自身が遺伝子発現物質の質(アミノ酸の種類)や量(転写活性や分解速度によるmRNAの量)の変化をもたらすことなどから、特に近年、診断、治療のターゲットとして注目を浴びている。遺伝子多型の種類とその特徴について表1に示した¹⁾。

敗血症性ショックにおける遺伝子多型の関与

a) Toll-like receptor (TLR)

以前から、エンドトキシン不感受性のマウスが知られていたが、これらのマウスではLPSのレセプターである、Toll-like receptor 4 (TLR4)に関連する多型が存在することが判明した²⁾。エンドトキシン不感受性のC3H/HeJマウスではTLR4に関連する遺伝子(Ips)にpoint mutation(SNP)が存在し、また、エンドトキシン不感受性の

*名古屋大学医学部救急部・集中治療部

C57BL/10ScCr マウスでは TLR 4 に関連する遺伝子 (Ips) が欠損していることが判明した。ヒトでも TLR の多型が存在するものと考えられ、その遺伝情報の活用が敗血症性ショックの制御のブレークスルーになる可能性がある。

b) tumor necrosis factor (TNF)

敗血症に関する tumor necrosis factor (TNF) の遺伝子は最も精力的に研究が行われ、表 2 に示すような数種類の多型が明らかにされてきた³⁻⁸⁾。そのなかには、-308位の G が A に変化している TNFA 2 では他の型に比較し、敗血症性ショックの予後が不良であることや、脳マラリアに罹患しやすいことが報告されている^{3,4)}。また、TNF β の最初のイントロンに存在する制限酵素 NcoI による RFLP が TNFB 2 である患者では、外傷後の重症敗血症発生率が高いことや、血中の TNF 値が高く、multiple organ failure score が高く、敗血

症の予後が悪いことが報告されている⁷⁻⁹⁾。著者らも、CG リピートのマイクロサテライトの一つである TNFa の検討において肝切除術や食道切除術では術後の TNF α 産生は a12型の遺伝子を持っている患者のみで認められ、その他の遺伝子型では認めなかったことを報告している¹⁰⁾。また、a12型の遺伝子を持っている患者ではそれ以外の遺伝子型をもっている患者と比較し、術後の耐糖能も悪化していた。

c) IL-1ra

IL-1ra では VNTR の多型が報告されており、リピート回数が最短で 2 回の A 2 では敗血症の罹患率が高いと報告されている (表 3)¹¹⁾。

d) plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)

PAI-1 にも多型が存在し、プロモーター領域の 1 塩基の有無によって髄膜炎に起因する敗血症の予後の悪化が示されている (表 3)¹²⁾。

表 1 主な遺伝子多型の種類とその特徴 文献¹⁾より引用

	RFLP	VNTR	マイクロサテライト	SNP
必要なサンプル量	数 μ g	数 μ g	10ng	10ng
多様性	+	++	++	+
判定法	サザンプロット法	サザンプロット法	PCR	PCR
判定の容易さ*	2	3	4	1
ゲノム上に存在するコピー数	数万	数千	数万	300万~1000万

*容易な順に 1~4, RFLP: restriction fragment length polymorphism, VNTR: variable number of tandem repeat, SNP: single nucleotide polymorphism.

表 2 TNF 座での主要な多型マーカー (文献¹⁾より引用)

LOCUS	MAKER		頻度 (population based)	報告されている関与
TNF Chr 6 P21.3- p21.1	-238 GA	TNF- α の promoter, BI-ALLELIC	(A/A) 2% (G/A) 15-20% (G/G) 75-80%	-238A: 脳マラリアやマラリアによる重症貧血が少ない ³⁾
	-308 GA	TNF- α の promoter, BI-ALLELIC	TNF1 (G/G) 68-80% TNF1/ TNF2 (G/A) 15-25% TNF2 (A/A) 2-5%	-308A: 敗血症性ショックでの予後悪化 ⁴⁾ 。腹部に由来する敗血症とは相関がない ⁵⁾ 。
	-376 GA	TNF- α の promoter, BI-ALLELIC	(A/A) 0.3% (G/A) 2.4-6.3% (G/G) 93.7-97.6%	-376A: 脳マラリアに罹患しやすい ⁶⁾
	NcoI RFLP	TNF- β の最初の intron, 1064-1069 BI-ALLELIC	TNFB1 10% TNFB1/ TNFB2 40-48% TNFB2 42-50%	B 2: 敗血症の予後悪化 ^{7,8)}
	CG などの repeats	5 種類のマイクロサテライト	リピートの長さは多種	敗血症の罹患と相関?

表3 IL-1ra 座, PAI-1 座での主要な多型マーカー (文献¹⁾より引用)

LOCUS	MAKER		頻度 (population based)	報告されている関与
IL-1ra Chr 2 q14.2	86bp VNTR	2 番目の intron repeats の数により 5 種類	A 1 70-73% A 2 20-25% A 3 3-5% A 4 0.7-1% A 5 0.7-1%	A 2 : 敗血症に陥りやすい ¹¹⁾
PAI-1 Chr 7 q21.3-22	4 G / 5 G 1 塩基の有無	promoter BI-ALLELIC	4 G / 4 G 24-27% 4 G / 5 G 50-53% 5 G / 5 G 20-23%	4 G / 4 G : 髄膜炎による敗血症の予後悪化 ¹²⁾

e) その他

IL-1 β , IL-6, IL-10, 熱ショック蛋白 HSP70, TNFR1 などにも遺伝子多型が報告されているが、現在までのところ、敗血症に関する報告はない。

敗血症性ショックにおける遺伝子多型情報の応用

現在までのところ、遺伝子多型と敗血症性ショックとの関連が明らかになっているものはまだ限られているが、研究が進むにつれて、以下のような応用が可能となると考えられる。

1) 遺伝子多型情報に基づいた治療薬や治療法の開発。遺伝子多型の存在によってその部位の重要性が判明すれば、その部位やその関連部位を modulation する治療薬や治療法が開発でき、臨床応用される可能性がある (ゲノム創薬のひとつ)。

2) 遺伝子多型によって薬物の代謝能が異なることが判明しており、使用する薬物投与量を個々の患者ごとに、調節することが可能となる。

3) 敗血症を起因する侵襲に対する反応性の個人差 (過剰や過少等) が明らかとなる。その情報に基づき、同じ侵襲、疾患、状態でも個々の患者ごとに治療法を選択することになる。例えば、同じ侵襲でもサイトカイン等のメディエーターを過剰に産生する患者では抗メディエーター療法を行ったり、過少にしか産生しない患者では、逆に不足するメディエーターの補充療法を行うことになるかもしれない。

4) 遺伝子多型の解析で対象を敗血症に罹患しやすい、あるいは罹患すると予後不良な患者など対象をより厳密に限定することによって、今まで、有効性を示せなかった種々の治療法や新規の治療

法の有用性が証明されるかもしれない。

5) 敗血症に罹患しやすい、あるいは罹患すると予後不良であるなどの遺伝子多型情報を各個人が所持することによって、あらかじめ予防手段や早期の対処も可能である。

6) 遺伝子多型に関連する部分を標的とした遺伝子治療が可能となる可能性もある。好ましくない多型を持つ患者に、遺伝子導入療法を用いて好ましい型を導入し、多型の影響を軽減することが可能となる。

今後の課題

遺伝子多型情報は、敗血症性ショックにおける救命率の向上の非常に有用な手段としての可能性を秘めているが、まだ解決しなければならない下記のような問題点も多い。

a) 遺伝子多型と疾患との関わり—連鎖不平等—連鎖不均衡 (linkage disequilibrium) は 2 つ (以上) の遺伝子の変異が連鎖して存在していて、メンデルの独立法則に従わないもので、1 つの遺伝子座のアレル (対立遺伝子) の分配と、もう 1 つの遺伝子座のアレルの分配が独立でないものをいう。同じ染色体でアレル間の距離が短いほど、また、新しいものであるほど連鎖不均衡が強いといわれる。このため、ある遺伝子多型がある疾患と関連しているようにみえても、実際には、その近傍の連鎖不均衡の他の遺伝子多型が疾患と関連している可能性は否定できない。実際、今までの TNF の遺伝子多型の報告でも、その多型が TNF 遺伝子の転写速度を直接変化させたり、TNF の産生を増大するという証拠がなくても、疾患と関連するという報告もなされている。TNF 遺伝子は第 6 染色体に存在し、その近傍には他の免疫に

関連する遺伝子も多数存在しているため、一見、TNFの多型がある疾患と関連しているようにみえても、実際は連鎖不均衡による他の遺伝子が関与している可能性もある。既に、TNFの多型とHLA型とは非常に強い相関があることが示されている¹³⁾。このような点から、疾患とある遺伝子多型が直接関連していることの証明は難しく、その判断は慎重にする必要がある。

b) 対照や症例数、大規模な多施設研究の必要性

今までの敗血症に関する多型の検討のほとんどは患者集団と疾患のない一般集団のサンプルを独立に収集したものであり、その間のアレルの頻度の違い、あるいは特定のアレルを持つ個体の頻度の差を分析する相関解析のため false positive である可能性が少なくない。

また、各研究とも症例数が十分ではなく、特に、頻度の多い疾患に関連するSNPの研究では数万人が必要といわれている。このため、アメリカを中心とした多施設のICUの参加によって、年間登録者数1000人規模の敗血症と遺伝子多型の関連を解析する研究が開始されようとしている。

c) 遺伝子診断に対する生命倫理

近年、遺伝子診断に対する市民の関心は非常に高まっており、厚生省もそのガイドラインを公表した¹⁴⁾。ここでは、インフォームドコンセントと、プライバシーの観点からの解析結果の取り扱いに焦点があてられている。しかし、現在のところ敗血症における遺伝子多型の研究ではそのほとんどで疾患との関連が不明確のものが多く、献体提供者には直接の利益がないことも難点である。

d) 人種差、海外でのエビデンスの適応

当然のごとく、遺伝子多型も人種差が存在し、連鎖不均衡の点からも日本人特有な多型分布が考えられ、海外で得られたエビデンスがそのまま日本でも全て通じるとは考えられない。そこで、本邦での遺伝子多型の頻度ならびに疾患との関連も検討する必要がある。上記のようなSNPも含めた研究では非常に多数の症例が必要であり、多施設での共同研究によって多数の症例を解析する必要がある。そのため、前述のアメリカの多施設のICUでの遺伝子多型と敗血症の関連を解析する研究に、日本からも多数の施設から参加し、多数の症例を集積、解析し、日本でのエビデンスを確立することは非常に意義のあることと考えてい

る。この研究に御参加いただける施設を募集しており、詳細につきましては mtoshi@med.nagoya-u.ac.jp までお尋ね下さい。

おわりに

近い将来、遺伝子多型の解析によって個人の反応性の差が明らかになり、それに基づいた医療が可能となるであろう。そのためには、本邦での多施設での多数の症例による共同研究が必要である。前述の研究への御参加によって確固たる情報を得ることが必要と考えており、多数の施設の御参加をお願いしたい。また、その促進のためには、一般市民の理解を深め、協力を得る努力も怠ってはならない。

文 献

- 1) 真弓俊彦, 山田浩二郎, 高橋英夫ら: 分子生物学的診断—遺伝子多型の解析による付随ハイルスク症例の分子生物学的診断—. 日腹救急急誌 21: 87-94, 2001
- 2) Poltorak A, He X, Smirnova I, et al: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088, 1998
- 3) McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, et al: Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 371: 508-510, 1994
- 4) Mira JP, Cariou A, Grall F, et al: Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 282: 561-568, 1999
- 5) Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, et al: A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Car Med* 24: 381-384, 1996
- 6) Knight JC, Udalova I, Hill AV, et al: A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nature Genetics* 22: 145-150, 1999?
- 7) Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, et al: A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Car Med* 24: 381-384, 1996
- 8) Majetschak M, Flohe S, Obertacke U, et al: Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 230: 207-214, 1999
- 9) Flach R, Majetschak M, Heukamp T, et al: Relation of ex vivo stimulated blood cytokine synthesis to post-traumatic sepsis. *Cytokine* 11: 173-178, 1999
- 10) 山田浩二郎, 真弓俊彦, 高橋英夫ら: 侵襲に対する生体反応への遺伝子の多型性の関与. 侵襲と免疫 8: 11-17, 1999
- 11) Fang XM, Schroder S, Hoefl A, et al: Comparison of two

- polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Car Med* 27 : 1330-1334, 1999
- 12) Hermans PW, Hibberd ML, Booy R, et al : 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet* 354 : 556-560, 1999
- 13) Jongeneel CV, Briant L, Udalova IA, et al : Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 : 9717-9721, 1991
- 14) 厚生省ホームページ, 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」について <http://www.mhlw.go.jp/houdou/0103/h0329-3.html>