日本人インスリン依存型糖尿病患者のアンギオテンシン I 変換酵素遺伝子の多型性の意義についての検討

小林 基章・雨宮 伸・志村 由江
東田 耕輔・石原 俊秀・沢登 恵美
小林 浩司・望月 美恵・中澤 眞平

要 旨

アンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) 遺伝子のイントロン16には2種類の多型性が存在することが知られ、その多型性と高血圧、虚血性心疾患、腎症などとの関連が検討が進められている。今回我々は小児インスリン依存型糖尿病 (IDDM) 患者34人を対象に ACE 遺伝子の多型性と血中 ACE 濃度、クレアチニンクリアランス (CCr)、尿中アルブミン排泄率 (AER)、リポプロテイン(a) [Lp(a)], 動脈硬化指数との関連を検討した。genotype により DD; 4人, DI; 18人, II; 12人に分類され、各群の年齢, HbA1c に有意差は認めなかった。ACE はIIでは有意に低下し, DIとDDには有意差を認めなかった。CCr, AER は3群に有意差を認めなかった。Lp(a), 動脈硬化指数ともにII群において有意に低値を示した。ACE の発現調整に関与するイントロン領域の genotypes の違いは、糖尿病の microangiopathy および macroangiopathy の長期予後に影響する可能性がある。今後長期的に経過観察を行い、ACE 多型性の糖尿病合併症の発症または進行への関与を明らかにする必要がある。

序 言

アンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) 遺伝子のイントロン16には alu 配列の有無による2種類の多型性, deletion(D)と insertion(I)が存在することが知られ、その多型性と虚血性心疾患、高血圧、腎障害などとの関連が検討されている^{1)~5)}。DD genotype は冠動脈疾患を中心とした動脈硬化のリスクファクターの1つとして確定されてきている。IgA 腎症については DD genotype は予後が悪いという報告があるが⁶⁾⁷⁾、糖尿病性腎症ではまだ一致した見解は得られていない。インスリン依存型糖尿病 (IDDM) 患者においては、その合併症の1つである糖尿病性腎症の発症はたとえ罹病期間が長くても50%程度にとどまることが知られ⁸⁾、また糖尿病性腎症の発症は同一家系内に好発するとされている⁹⁾。そこで、まだ腎症、高血圧、虚血性心疾患を発症していない小児 IDDM 患者を対象に ACE 遺伝子の多型性と動脈硬化関連因子、腎機能などとの関連を検討した。

対象・方法

IDDM 患者34名 (男性12人, 女性22人, 平均年齢13.4歳) を対象とした。血液から genomic DNA を採取し、イントロン16を2組の primer を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅させ電気泳動法でDとIを区別し、対象患者を genotype により DD, DI, II の3群に分類した。1組の primer はDNAが欠落する配列部分の両側に対応し、Tiret ら¹⁰⁾の方法に従

山梨医科大学 小児科

(〒409-38 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110)

A role of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus

Kisho Kobayashi, Shin Amemiya, Yoshie Shimura,
Kosuke Higashida, Toshihide Ishihara, Emi Sawanobori,
Koji Kobayashi, Mie Mochizuki, Shinpei Nakazawa

Department of Pediatrics. Yamanashi Medical University

Key Words : ACE 遺伝子多型性
インスリン依存型糖尿病
糖尿病性腎症
動脈硬化
イントロン多型性

図1 Determination of ACE genotypes by PCR amplification

い PCR を行った。PCR の条件は denature 94°C, 1 分, annealing 62°C, 1 分, extension 72°C, 2 分で30サイクル行った。Lindopaintner ら¹⁾と同様の方法で欠落

する塩基配列に対応する別の primer を用いてしばしば問題となる DI genotype における I allele の存在を確認した。このときの PCR の条件は denature 94°C, 1 分, annealing 69°C, 1 分, extension 74°C, 2 分で30サイクル行った。

採血は早朝安静時の食事摂取およびインスリン投与前に行い, ACE 濃度, 総レニン濃度 (TRC), ヘモグロビン A1c (HbA1c), 総コレステロール (TC), トリグリセリド (TG), HDL コレステロール (HDLc), リポ蛋白(a) [Lp(a)], アポ蛋白を測定した。また, 当日の夜間尿を用いてアルブミン, クレアチニンを測定し, アルブミン排泄率 (AER), クレアチニンクリ

表1 All parameters divided into three genotype of angiotensin-converting enzyme gene

	age	HbA1c (%)	ACE (IU/l)	TRC (pg/ml)	TG (mg/dl)
II	14.0±5.2	10.1±2.2	18.5±2.8*#	34.6±14.6	41.3±15.8
DI	13.2±3.0	9.8±2.3	24.8±7.5	35.6±19.2	64.2±29.2
DD	12.5±2.6	8.7±1.0	25.6±5.4	45.3±27.3	66.5±12.5

	Lp(a) (mg/dl)	CCr (ml/min/1.73m ²)	AER (μg/min)	AI	apo B/apo A-1
II	7.5±4.5*#	143±40	12.9±22.7	1.32±0.30**#	0.32±0.07**#
DI	17.1±14.8	137±40	14.7±43.6	1.84±0.48	0.43±0.10
DD	30.5±27.4	132±80	2.6±2.3	2.20±0.24	0.50±0.10

abbreviations

HbA1c; hemoglobin A1c, ACE; angiotensin-converting enzyme, TRC; total renin concentration, TG; triglyceride, Lp(a); lipoprotein (a), CCr; creatinine clearance, AER; albumin excretion ratio, AI; atherogenic ind

* P<0.05; vs DD, ** P<0.01; vs DD, # P<0.05; vs DI

図2 Correlations between lipoprotein(a) and apo B/apo A-1, and between lipoprotein(a) and ACE

アランス (CCr) を求めた。腎における ACE 遺伝子の多型性の違いによる発現調整に関連する指標として、ACE 濃度、CCr、AER、TRC を検討した¹¹⁾¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。また、その多型性の動脈硬化に関連する指標として、Lp(a)、apo B/apo A-1 比、動脈硬化指数 (AI) を検討した。

成 績

図 1 に ACE genotype の電気泳動の結果を示す。490 bp にのみバンドを認めるものが II genotype、490bp と 190bp にバンドを認めるものが DI genotype、190bp にのみバンドを認めるものが DD genotype である。I allele の存在を確認するために欠落する塩基配列に対応する別の primer を用いたが矛盾する結果は 1 つもなかった。

表 1 に示すように DD genotype は 4 人、DI genotype は 18 人、II genotype は 12 人で各群の年齢、HbA1c に有意差は認めなかった。血中 ACE 活性は II 群で有意に低値を示し、TRC は DD 群が高値を示していたが有意差は認めなかった。

CCr は 3 群間に有意差を認めず、AER も 3 群に有意差を認めなかったが DD 群で少ない傾向があった。AER が 15 μ g/min 以上の患者は DI 群と II 群に 1 人ずつだった。

動脈硬化進展に関連する指標では、TC の平均値は II 群：167mg/dl、DI 群：185mg/dl、DD 群：154mg/dl で、3 群間に有意差を認めなかったが、TG は II 群が有意に低値で、HDL-C は DD 群が有意に低値だった。Lp(a) は II 群が有意に低値を示し、DD 群が高値を示した。apo A-1 は II 群：180mg/dl、DI 群：174mg/dl、DD 群：146mg/dl で DD 群が有意に低値だった。apo A-2 は II 群：26.9mg/dl、DI 群：28.8mg/dl、DD 群：27.3mg/dl で 3 群間に有意差は認めなかった。apo B は II 群：56.3mg/dl、DI 群：73.6mg/dl、DD 群：72.5mg/dl で II 群が有意に低値だった。apo B/apo A-1 は II 群が有意に低値を示し、また動脈硬化指数 atherogenic index (AI) [(TC-HDL-C)/HDL-C] も II 群が有意に低値を示していた。

図 2 に Lp(a) と apo A-1/apo B および Lp(a) と血中 ACE 濃度との相関図を示す。Lp(a) は apo A-1/apo B と正の相関を認めたが、血中 ACE 濃度とは相関を認めなかった。

考 察

ACE 遺伝子は、17 番染色体に位置し、88~481bp の

26 個のエクソンからなる全長 21kb の遺伝子である¹³⁾。ACE は decapeptide である angiotensin I から octapeptide である angiotensin II への変換に関わる renin-angiotensin 系の重要な酵素のうちの 1 つであり、また血管拡張作用をもつ bradykinin を加水分解する作用をもっている。ACE 遺伝子のイントロン 16 には、287bp の alu repeat の有無により insertion allele と deletion allele が存在し、その組み合わせにより DD、DI、II の 3 つに分けられる。この genotype の違いにより、今回の成績でも得られたごとく血中 ACE 濃度が異なると報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。そこで、ACE 遺伝子の多型性と高血圧、虚血性心疾患、腎機能障害などとの関連が検討されている^{11~15)}。

Zee ら¹⁶⁾の報告によると、本態性高血圧の患者と健常対照者を比較し、本態性高血圧の患者では I allele の頻度が高いという結果であった。血圧と ACE 遺伝子多型性の間には関連がなかったという報告もあり⁵⁾、高血圧のリスクファクターとしては確定していない。

IgA 腎症における腎機能の変化についての検討では、DD genotype の場合予後が悪いと報告され⁶⁾⁷⁾、またこのときの ACE 阻害剤の効果は DD genotype がもっとも高いといわれている⁸⁾。Marre ら¹⁵⁾は、IDDM 患者における糖尿病性腎症の発症頻度と ACE 遺伝子の多型性について検討し、糖尿病性腎症を認める患者では腎症を認めない患者に比べ、II genotype の頻度が有意に低く、血中 ACE 値は II genotype が最も低値を示し、また糖尿病性網膜症については ACE 遺伝子の多型性との関連は認められなかったと報告している。一方、日本人 NIDDM 患者を対象に糖尿病性腎症と ACE 遺伝子の多型性について検討した結果では、糖尿病性腎症の頻度に ACE genotype は関係なかったという報告もある¹⁷⁾。この異なった結果が得られた理由として、IDDM と NIDDM の違い、人種の違いが関与しているのではないかと考察している。我々の以前の検討¹¹⁾およびその後の報告¹²⁾から、糖尿病性腎症の進展の指標として血中プロレニン濃度の増加がある。今回の検討では、まだ糖尿病性腎症を発症していない IDDM 患者を対象としたが、genotype による ACE 活性に影響される可能性のある CCr、AER、TRC の違いは認められなかった。今後これらの患者を長期的に経過観察し、genotype と糖尿病性腎症の発症との間に関連があるかどうかを検討する必要がある。

Rudberg ら¹⁸⁾は、思春期 IDDM 患者において尿中アルブミン排泄率と Lp(a) との相関は認めなかったが、微量アルブミン尿を認める患者は認めない患者より Lp

(a)は高値だったという結果を得ている。糖尿病性腎症発症と Lp(a)との関係についても、微量アルブミン尿の出現を含め今後の検討課題である。

しかし DD genotype であることは冠動脈疾患のリスクファクターの1つであると報告され⁴⁾⁵⁾¹⁷⁾、動脈硬化との関連については確定されてきている。今回の検討では高血圧、虚血性心疾患を合併していない IDDM 患者を対象としたので、高血圧、虚血性心疾患と ACE 遺伝子の多型性との関係については言及できないが、Lp(a), apo A-1/apo B, atherogenic index はいずれも II 群で低値、DD 群で高値を示した。

以上の成績から、糖尿病の腎機能の変化および腎症の合併に ACE 遺伝子のイントロン領域の多型性による ACE 活性の発現調整の違いが直接影響するとの結果は得られなかった。むしろ、その多型性が冠動脈、動脈硬化病変に関与するとの従来の成績と一致して、糖尿病患児における Lp(a)および動脈硬化に関与する各種指標との関連が認められた。これら指標の年齢、性の影響を考慮していく必要がある。また今回の検討の対象は少数例であり、縦断的解析であったが、前述した microangiopathy である腎症合併が macroangiopathy のリスクファクターである Lp(a)と関連があるとの報告¹⁸⁾を支持する可能性もある。糖尿病患児の DD genotype が Lp(a)値に関連して冠動脈疾患など macroangiopathy のリスクファクターとなるか否かは現時点では不明である。今後これらの患者の血圧、動脈硬化の進行について、腎症合併への関与も含めて経年的観察が必要であると考えている。

文 献

- 1) Lindpaintner K., Pfeiffer M. A., Kreutz R., Stampfer M. J., Grodstein F., LaMotte F., Buring J., Hennekens C. H. : A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 332 : 706-711. 1995.
- 2) Badenhop R. F., Wang X. L., Wilcken D. E. L. : Angiotensin-converting enzyme genotype in children and coronary events in their grandparents. *Circulation* 91 : 1655-1658. 1995.
- 3) Raynolds M. V., Bristow M. R., Bush E. W., Abraham W. T., Lowes B. D., Zisman L. S., Taft C. S., Perryman M. B. : Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 342 : 1073-1075. 1993.
- 4) Mattu R. K., Needham W. A., Galton D. J., Clark A. J. L., Caulfield M. : A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly heart study. *Circulation* 91 : 270-274. 1995.
- 5) Cambien F., Poirier O., Lecerf L., Evans A., Cambou J. P., Arveiler D., Luc G., Bard J. M., Bara L., Ricard S., Tiret L., Amouyel P., Alhenc-Gelas F., Soubrier F. : Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359 : 641-644. 1992.
- 6) Yoshida H., Mitarai T., Kawamura T., Kitajima T., Miyazaki Y., Nagasawa R., Kawaguchi Y., Kubo H., Ichikawa I., Sakai O. : Role of the deletion of polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of IgA nephropathy. *J Clin Invest* 96 : 2162-2169. 1995.
- 7) Harden P. N., Geddes C., Rowe P. A., McIlroy J. H., Boulton-Jones M., Rodger R. S., Junor B. J., Briggs J. D., Connell J. M., Jardine A. G. : Polymorphisms in angiotensin-converting-enzyme gene and progression of IgA nephropathy. *Lancet* 345 : 1540-1542. 1995.
- 8) Krolewski A. S., Canessa M., Warram J. H., Laffel L. M., Christlieb A. R., Knowler W. C., Rand L. I. : Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 318 : 140-145. 1988.
- 9) Seaquist E. R., Goetz F. C., Rich S., Barbosa J. : Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 320 : 1161-1165. 1989.
- 10) Tiret L., Rigat B., Visvikis S., Breda C., Corvol P., Cambien F., Soubrier F. : Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 51 : 197-205. 1992.
- 11) Amemiya S., Ishihara K., Higashida K., Kusano S., Ohyama K., Kato K. : Altered synthesis of renin in patients with insulin-dependent diabetes. *Diabet Res Clin Pract* 10 : 115-122. 1990.
- 12) Dareman D., Crompton C. H., Balfe W., Sochett E. B., Chatziliass A., Cotter B. K., Osmond D. H. : Plasma prorenin as an early marker of nephropathy in diabetic (IDDM) adolescents. *Kid Int* 46 : 1154-1159. 1994.
- 13) Hubert C., Houot A., Corvol P., Soubrier F. : Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. *J Biol Chem* 266 : 15377-15383. 1991.
- 14) Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. : An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86 : 1343-1346. 1990.
- 15) Marre M., Bernadet P., Gallois Y., Savagner F., Guyene T., Hallab M., Cambien F., Passa P., Alhenc-Gelas F. : Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes* 43 : 384-388. 1994.
- 16) Zee R. Y., Lou Y. K., Griffiths L. R., Morris B. J. : Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 184 : 9-15. 1992.
- 17) Fujisawa T., Ikegami H., Shen G., Yamato E., Takekawa K., Nakazawa Y., Hamada Y., Ueda H., Rakugi H., Higaki J., Ohishi M., Fujii K., Fukuda M., Ogihara T. : Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism is associated

with myocardial infarction, but not with retinopathy or nephropathy, in NIDDM. Diabetes Care 18 : 983-985. 1995.

- 18) Rudberg S., Persson B. : Association between lipoprotein (a) and insulin-like growth factor- I during puberty and

the relationship to microalbuminuria in children and adolescents with IDDM. Diabetes care 18 : 933-939. 1995.