慢性腎不全血液透析患者における angiotensin converting enzyme (ACE) 遺伝子多型性についての検討

—透析歴、臨床学的背景との関連について—

齋 木 豊 徳

川崎医科大学腎臓内科

key words: 血液透析患者, ACE 遺伝子多型性, 透析期間, Kt/V, 多変量解析

〈要旨〉

当院を含む関連5施設の血液透析(HD)患者120名を対象とし、末梢血リンパ球よりDNAを抽出し polymerase chain reaction (PCR) を用いて ACE 遺伝子多型性を検索し、健常者と比較検討した。また ACE genotype 別に分類し、年齢、透析期間、血液検査成績の観点から検討した。

結果は健常人と比較すると ACE genotype では、HD 患者 Deletion/Deletion (D/D) 多型が有意に多く、Insertion/Insertion (I/I) type が少なかった。また D Allele が有意に多く、I Allele が有意に少なかった。

HD 10 年未満群 (以下 <10 群) と HD 10 年以上群 (以下 10 ≤ 群) の比較では、血液検査値のみの多変量解析比較では最も有意差を示したのは Kt/V であった。また血液検査値ならびに遺伝子多型を加えた多変量解析比較で、Kt/V > I/I の順に有意差を示した。また D/D を含んだその他の血液検査値との比較検討ではいずれの検定においても有意差はみられなかった。このことは従来から危険因子といわれる D/D は透析導入までには深く関与しているが、導入後は D/D であっても他の検討因子に透析期間別で有意差を認めない事実から長期透析が不可能であるとは考えにくかった。むしろ Kt/V を高く保つことで D/D であっても長期透析の可能性を考えさせられるものであり、D/D よりも深く関与している I/I の存在が長期透析の可能性に重要な因子であることが示唆された。

Polymorphism in angiotensin converting enzyme (ACE) gene in hemodialytic patients—association with hemodialytic periods—

Toyonori Saiki

Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Kawasaki Medical School Hospital

Polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme (ACE), especially the D/D type, is associated with a risk of cardiovascular disease and progressive deterioration of renal function in previous reports. In this paper, ACE polymorphism was investigated in 120 patients on maintenance hemodialysis (HD) in comparison with normal controls. Uninterruptedly, the association of these polymorphisms with serological parameters in the hemodialytic period (less than 10 years/more than 10 years) were examined. In conclusion, D/D type in ACE polymorphism was significantly ($p < 0.001$) higher in HD patients than in normal control ($n = 100$), but the D/D type was not significantly higher in the longer HD periods. Patients receiving HD for more than 10 years were characterized as the high Kt/V and low I/I type. In conclusion, patients with D/D type in ACE polymorphism were introduced to hemodialysis relatively early, although this type was not associated with HD-period. The I/I type was strongly associated with the levels of Kt/V. Association of genetic factors and laboratory data in patients on maintenance HD were confirmed in this study.

緒 言

ACE D/D genotype は、心疾患や腎機能悪化遺伝因子として知られている¹⁻⁷⁾。

しかし一旦腎不全に陥り透析療法を必要とする患者において、その遺伝学的頻度や血液データとの比較について現在まで報告はなく、先天的因子から予後を含めた解析がなされていないのが現状である。

そこで慢性腎不全血液透析患者の遺伝学的背景として ACE genotype を決定し、健常人と比較しどの程度の頻度であるか、また透析期間を目的因子とし年齢、血液学的パラメーター (Cr, BUN, UrA, Kt/V, Cho, Ht, Ca, P, Plt), 原疾患との間にどのような関連を有しているかを検討し、遺伝学的危険因子の検討ならびに長期透析に関与する因子の検討を目的とした。

I. 対象と方法

対象は当院を含む関連施設の慢性腎不全血液透析患者 120 名。平均年齢 57.6 ± 13.5 歳、男性 70 名、女性 50 名である。平均透析期間は、 7.6 ± 6.4 年であった。原疾患の内訳は腎生検にて確認された慢性糸球体腎炎

(CGN) 48 例、糖尿病性腎症 (DM) 17 例、逆流性腎症 8 例、腎硬化症 4 例、ならびに原因不明 33 例であった。

まずは、定期採血に血液学的パラメーター (Cr, BUN, UrA, Kt/V, Cho, Ht, Ca, P, Plt) を採血し、同日に遺伝子用採血を行い以下の手順で処理を行った。

方法は血液を 5 ml ヘパリン化血にて採取し、リンパ球よりフェノール/クロロホルム法にて DNA を抽出した。遺伝子増幅については、ACE は polymerase chain reaction (PCR) を用いて遺伝子増幅し (表 1), 2% Nu Sieve gel にて電気泳動し Etidium Bromide 染色後 UV 法にて観察し、ACE genotype を決定した^{1,2)}。また D/D の決定には I Allele の確認を行った⁸⁾。

まず、ACE genotype 決定後に健常人の頻度と比較した。ACE genotype は当院で無作為抽出した健常人 100 名との比較を行い χ^2 検定を用いて比較検討した。

次に各種血液学的パラメーターは特に年齢、透析期間は無視できない変数であり、透析期間 10 年未満群と 10 年以上群の 2 群を目的変数にし、年齢を含んで多重ロジスティック解析を行った。また Kt/V は Gotch ら⁹⁾の報告に基づいて計算し、遺伝子解析については関連施設長ならびに患者の口頭による同意を得て行った。

表 1 PCR methods in ACE polymorphism

① ACE Primer Design		③ PCR Reaction	
Antisense primer : 5'-GATGTGGCCATCATTCGTCAGAT-3'		1. Denature	94°C 30 sec
Sense primer : 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'		2. Annealing	58°C 30 sec
② PCR Mix Containing (TOTAL in 10 μ l)		3. Extension	72°C 30 sec
Tris-HCl (PH8.3)	10 mM	30cycles from 1. to 3.	
KCl	50 mM		
MgCl ₂	1.5 mM		
dNTP mix	62.5 μ M		
each primers	50 pM		
DNA	50 ng		
Taq DNA polymerase	2.5 U		
DMSO	5 %		

表 2 Comparison between HD patients with normal control in ACE genotype and Allele frequency

		Normal control	HD (In this study)	χ^2 検定
From data		Kawasaki Medical School Hospital (Division of Nephrology)	Kawasaki Medical School Hospital (Division of Nephrology)	
Number		100	120	
ACE genotype	D/D	6.0%	21.7%	p < 0.001
	I/I	39.0%	21.7%	p < 0.01
	I/D	55.0%	56.6%	NS
ACE Allele	D Allele	33.5%	50.8%	p < 0.01
	I Allele	66.5%	49.2%	p < 0.01

図 Electrophoresis stained by etidium bromide in ACE genotype (2% Nu sieve agarose gel)

表 3 Comparison of ACE genotype (Different from HD periods)

Total DD 26	No	Age	HD 歴	透析前/透析後		BUN 前	後	Kt/V	UrA 前	後	TP	Alb	BS	Ht	Cho	Plt	Ca	P	ACE Polymorphism		
				Cr 前	後														I/I	I/D	D/D
M=13 F=13	AV SD	57.35 14.72	7.04 6.01	10.42 2.42	4.38 1.19	66.03 15.75	23.53 6.60	1.05 0.22	7.01 1.26	2.26 0.45	6.60 0.53	3.81 0.40	110.14 40.93	28.92 4.32	168.92 29.36	17.43 5.55	9.31 1.06	5.24 1.66			26 (21.7%)
<10 n=18		58.39 15.12	3.56 2.81	10.06 2.73	4.49 1.26	64.39 17.55	24.42 7.02	0.99 0.18	6.78 1.08	2.29 0.48	6.67 0.57	3.86 0.46	119.08 48.70	28.70 4.89	172.72 30.64	16.72 5.75	9.18 0.94	4.92 1.82			
10≤ n=8		55.00 14.49	14.88 2.90	11.23 1.35	4.15 1.07	69.70 10.75	21.63 5.51	1.19 0.25	7.53 1.55	2.19 0.41	6.46 0.39	3.75 0.33	95.63 18.22	29.43 2.86	160.38 26.03	19.01 5.06	9.59 1.30	5.91 1.07			
Total II 26	No	Age	HD 歴	透析前/透析後		BUN 前	後	Kt/V	UrA 前	後	TP	Alb	BS	Ht	Cho	Plt	Ca	P	ACE Polymorphism		
				Cr 前	後														I/I	I/D	D/D
M=13 F=13	AV SD	57.50 12.01	8.81 6.89	10.40 2.85	4.65 1.44	62.19 17.31	23.71 7.24	0.98 0.18	6.57 1.08	2.26 0.57	6.76 0.49	4.03 0.36	118.21 71.41	29.85 3.73	167.68 44.35	18.20 4.52	9.55 1.12	5.80 1.99	26 (21.7%)		
<10 n=14		60.57 13.28	3.36 2.56	9.74 3.26	4.63 1.58	57.80 15.25	23.86 6.91	0.89 0.13	6.77 1.06	2.49 0.52	6.86 0.51	4.23 0.28	155.25 101.49	29.06 3.00	166.79 49.36	17.35 4.18	9.12 0.86	5.39 1.84			
10≤ n=12		53.92 9.68	15.17 4.26	11.16 2.18	4.67 1.32	67.31 18.78	23.52 7.98	1.09 0.17	6.34 1.11	1.96 0.51	6.65 0.47	3.90 0.36	91.27 8.61	30.78 4.39	168.82 39.38	19.19 4.88	10.06 1.22	6.28 2.14			
Total ID 68	No	Age	HD 歴	透析前/透析後		BUN 前	後	Kt/V	UrA 前	後	TP	Alb	BS	Ht	Cho	Plt	Ca	P	ACE Polymorphism		
				Cr 前	後														I/I	I/D	D/D
M=44 F=24	AV SD	57.76 13.80	7.28 6.36	10.73 2.46	4.74 1.41	68.34 15.94	25.33 6.81	1.00 0.22	7.25 1.23	2.81 2.38	6.63 0.51	3.90 0.46	118.75 50.59	30.16 4.57	167.82 34.40	17.93 6.40	9.35 1.27	5.96 1.49		68 (51.7%)	
<10 n=50		59.76 13.80	3.94 3.05	10.23 2.46	4.62 1.29	67.17 16.33	25.43 6.55	0.97 0.21	7.17 1.26	2.60 0.65	6.59 0.54	3.88 0.47	125.98 57.53	30.19 3.95	168.73 31.76	18.47 6.65	9.18 1.35	5.87 1.53			
10≤ n=18		52.22 12.54	16.56 2.97	12.10 1.95	5.07 1.67	71.52 14.79	25.06 7.64	1.07 0.22	7.46 1.15	3.36 4.44	6.74 0.42	3.95 0.42	100.88 17.93	30.09 6.10	165.33 41.69	16.49 5.61	9.77 0.94	6.21 1.38			

II. 結 果

泳動結果の一部を示す(図)。まず健常人と今回対象となった透析患者との ACE genotype, allele の比率

比較を示す(表2)。Genotype において ACE では D/D が透析患者で多く I/I が有意に少なかった。また allele においては D allele が有意に多く、I allele が有意に少なかった。全例を ACE genotype 別に分類し、さらに透析期間 10 年未満群と 10 年以上群の 2 群に分け

表 4 Multiple logistic regression analysis for serological genetic factors in HD patients
(Outcome variable : More than 10 years)

血液学的パラメーターのみの多変量解析 <多重ロジスティック回帰分析>						血液学的パラメーター/遺伝子多型を含めた多変量解析 <多重ロジスティック回帰分析>					
有効データ数=91						有効データ数=91					
	変数名	β	SE (β)	Z 値	P		変数名	β	SE (β)	Z 値	P
従属変数	※ 透析10年以上	5.35274	10.8135	0.495	0.62060	従属変数	※ 透析10年以上	-1.57357	4.70368	-0.335	0.73791
説明変数	1 Age	-0.02992	0.03201	-0.935	0.35004	説明変数	1 Age	-0.01012	0.02225	-0.455	0.64917
	2 Kt/V	8.63518	3.29538	2.620	0.00878 *		2 I/I	1.27101	0.62587	2.031	0.04228 *
	3 TP	2.18604	1.13805	1.921	0.05475		3 Cr	0.22109	0.15277	1.447	0.14784
	4 Alb	-7.38258	3.22407	-2.290	0.02203 *		4 Kt/V	3.61481	1.50379	2.404	0.01623 *
	5 Cho	0.04138	0.02151	1.924	0.05433		5 DM	-2.16379	1.12545	-1.923	0.05453
	6 HDL-Cho	-0.05112	0.03138	-1.629	0.10333		6 Alb	-1.18120	0.80795	-1.462	0.14375
	7 Plt	-0.24919	0.11716	-2.127	0.03343 *						
	8 DM	-4.73882	2.14270	-2.212	0.02699 *						
<回帰適合度指標>						<回帰適合度指標>					
AIC = 56.86573						AIC = 110.8930					

* は有意差 $p < 0.05$ を示している

た血液データの平均値、標準偏差を表3に示した。この結果ではどの genotype においても、一般に10年未満群に血糖が高く、10年以上群では血清 Cr, Kt/V, P が高い傾向がでている。しかしこれらは年齢、原疾患の影響を強く受けるパラメーターであるがゆえ単純な比較での検討は無意味と考えられるので以下の多変量解析（多重ロジスティック解析）にて統計処理を行った。

透析期間10年未満群と10年以上群の2群を目的変数とした血液学的パラメーターのみの比較ならびに ACE genotype を含む遺伝子学的パラメーターと血液学的パラメーターを含んだ比較を示す(表4)。血液学的パラメーターのみの比較で有意差を認めたのは Kt/V > Alb > DM > Plt の順であった。また遺伝子学的パラメーターと血液学的パラメーターを含んだ比較では、Kt/V > I/I の順だった。また今回提示はしないが、D/D type を目的変数として年齢、透析期間を含んだ各種変量との多変量解析比較では、何の関連も認められなかった。

III. 考 察

ACE 遺伝子は第17常染色体上17q23に存在し、その第16 intron の Alu 配列での I/D genotype は心疾患、腎疾患との関連について近年急速に研究がなされてきた^{1-7,10)}。彼らは D/D が心筋梗塞の危険因子となりうることや²⁾、各種心筋症において重症化しやすく突然死の多い予後不良群であることを示してきた^{3,4)}。また腎関係の報告において、Riget ら¹⁾は D/D は血中 ACE レベルが高い事実を示し、ついで Essen ら⁶⁾が D/D に対する ACE 抑制剤の効果を検討したが抵

抗性であったとする報告や、一方では IgA 腎症における5年間の観察で腎機能悪化群は D/D に多く、ACE 抑制剤を使用した D/D では有意に蛋白尿が減少し効果が期待できるとしている⁷⁾。また IgA 腎症の D/D は他の遺伝子多型と比較し、若年で透析導入し腎機能悪化に関連が強いという報告もある⁵⁾。しかしいずれの報告も透析導入までの検討であり、透析導入後の患者からみた retrospective な研究は少なく、また血液透析患者の遺伝子学的背景を含めてその臨床的背景ならびに検査を加えて報告した例はない。日本透析医学会統計調査委員会による報告においては予後に与える影響として体重減少率、Kt/V、透析時間、Cr インデックス等の患者背景や血液データから調査しており¹¹⁾、予後に与え得る影響に年齢、原疾患としての糖尿病等を考慮した上で体重減少率6%未満、Kt/V 1.6以上、透析時間5時間以上、Cr インデックス100%以上が予後良好としている。我々の血液学的パラメーターのみの比較では Kt/V > Alb > DM > Plt の順であり、この結果は透析学会の示すところと大きく差はないものの、その各々の関連の強さについては未だ報告されていない。さらに透析学会では Cr インデックスを掲げているが、今回の検討では有意な関連はみられず Plt に有意な関連を認め最も関連が強いのは Kt/V であった。この結果は長期透析者に最も重要なパラメーターが Kt/V であるという裏づけとともに血清 Cr が年齢や運動量に強く影響をうけるため有意性の欠如を示したものと思われる。Plt については従来より透析期間に依存して低値をとるとはいわれ原因ははっきりしないが、長期透析に伴うエリスロポイエチンを始めとする造血因子の連続的使用あるいは骨皮質減少ということが骨髓抑制に起因している可能性を考えさせら

れる。ついで今回血液データと遺伝子学的な背景から血液透析患者にはどのような特徴があるか、また長期透析に関連する影響は何であるかの観点に基づき検討を行った。唯一仁科ら¹²⁾は CAPD を中心とした維持透析患者における ACE genotype 頻度の検討を行い有意に D/D が多く、I/I が少ないという結果を示してきた。

今回我々は邦人の血液透析患者 120 名のみを対象としたが、遺伝子学的背景の観点からは D/D が多く、I/I が少ないという同様の結果を得た。このことは従来 of 報告と一致するように透析導入には D/D の関与が考えられるが、透析期間別で 10 年以上/未満と比較してもその他のパラメーターでは有意差を示さず Kt/V のみが有意差を示した事実は興味深く、Kt/V を高く保つことが D/D という危険因子を持ち合わせても長期透析に重要な因子であるという結果だった。また逆に I/I が Kt/V の次に有意差を示した事実は長期透析にはいかなる遺伝子多型よりも Kt/V が重要ではあるが、I/I であることが長期透析に少なからず影響を与えている可能性を示唆していた。

今回の検討では、生存に対する影響を検討していないので予後解析は不可能であるが、各種血液パラメーターのうち Kt/V のみが I/I より有意であったことは、透析導入後の長期透析の要因には Kt/V の次に他の血液学的パラメーターや D/D よりも I/I の存在が重要であることが示唆され、予後に重要な因子でもある可能性を示唆しているものと思われた。そして長期透析を目的とした場合先天因子としての I/I の重要性とともに後天的素因としての Kt/V の重要性を改めて認識する結果であった。

今回は ACE genotype が一般にいわれるところの予後不良因子とどの程度関連があるかを検討してきたが、むしろ I/I が重要であった事実は血管障害に対して防御因子として働いている可能性を示唆していた。しかしこの事実は興味深い反面、長期透析患者数が少ないことや、短期透析患者における DM 症例数の違いなどが原因であった可能性も否定できない。したがって本研究の結果からは血液透析患者においては D/D よりも I/I の方がより良い指標になるという糖尿病性腎症における Marre ら¹³⁾の I/I 防御説を支持するという結果であった。しかし今後上記の I/I 防御説を支持するうえでは、ACE genotype の血管障害に対する影響を心血管パラメーター等の説明変数から検討し D および I のどちらが関連が強いかを検討したうえで理論的根拠を今後検討する必要があると思われる。

なお本論文の要旨は、第 42 回日本透析医学会総会(札幌、1997 年 7 月)において発表した。

謝辞：稿を終えるにあたり当大学腎臓内科大澤源吾教授ならびに堅村信介先生、検査診断学市原清志助教授また関連施設の佐藤記念病院佐藤正隆先生、笛木内科笛木久雄先生、玉野クリニック岡村修先生各透析施設のスタッフの方々に深謝致します。

文献

- 1) Riget B, Hurbert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F : An insertion/deletion polymorphism in angiotensin I-converting enzyme accounting for half the variance of serum enzyme level. *J Clin Invest* 86 : 1343-1346, 1990
- 2) Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Richard S, Tired L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F : Deletion polymorphisms in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359 : 641-644, 1992
- 3) Raynald MV, Bristoe MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, Taft CS, Perryman MB : Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or dialated cardiomyopathy. *Lancet* 342 : 1073-1075, 1993
- 4) Marian AJ, Yu Q, Workman R, Grave G, Roberts R : Angiotensin converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* 342 : 1085-1086, 1993
- 5) Harden PN, Geddes C, Rowe PA, MacIroy JH, Jones M, Rodger RSC, Junor BJR, Briggs JD, Connell JMC, Jardine AG : Polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene and progression of IgA nephropathy. *Lancet* 345 : 1540-1542, 1995
- 6) Essen GV, Rensma PL, Zeeuw DD, Sluiter WJ, Scheffer H, Apperloo A : Association between angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and failure of renoprotective therapy. *Lancet* 347 : 94-95, 1996
- 7) Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T, Kitajima T, Miyazaki Y, Nagasawa R, Kawaguchi Y, Kubo H, Ichikawa I, Sakai O : Role of deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of IgA nephropathy. *J Clin Invest* 96 : 2162-2169, 1995
- 8) Lindpaintner K, Pfeiffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH : A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 332 : 706-711, 1995
- 9) Gotch F, Sargent LA : A mechanistic analysis of the

- National Cooperate Dialysis Study (NCDS). *Kidney Int* 28 : 526-534, 1985
- 10) 檜垣寛男, 萩原俊男 : ACE polymorphism は何を意味するか. *医学のあゆみ* 174 : 819-823, 1995
 - 11) 日本透析医学会統計調査委員会 : わが国の慢性透析療法の現況 (1994 年 12 月 31 日現在). *透析会誌* 29 : 1-22, 1996
 - 12) 仁科 良 : CAPD 患者におけるアンギオテンシン変換酵素遺伝子の多型性に関する検討. *日本腎臓学会誌* 38 : 595-602, 1996
 - 13) Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, Dusselier L, Kahal Z, Chaillous L, Harimi S, Muller A, Sackmann H, Bauduceau B, Bled F, Passa P, Alhenc-Gelas F : Contribution of genetic polymorphism in the Renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 99 : 1585-1595, 1997