

学位論文題名

Deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme(ACE)gene as a genetic risk factor for sarcoidosis

(サルコイドーシスの遺伝的危険因子としての
アンジオテンシン1変換酵素(ACE)の欠失多型)

学位論文内容の要旨

1975年のLiebermanの報告以来、血清のアンジオテンシン1変換酵素値は、サルコイドーシスの診断や活動性の指標として重要な位置を占めている。しかし、活動性のサルコイドーシス患者における血清ACE値の陽性率は33%~88%とかなり報告によって差が認められている。また黒人患者は白人患者より血清ACE値が高値を示す傾向にあることが報告されている。これらの知見はサルコイドーシス患者の血清ACE値には、遺伝的または人種的な影響がある可能性を示している。健常成人の血清ACE値の個体間の変動は5倍以上の差があると報告されているが、同一個体ではほとんど変化せず一定の値をとることが知られている。従って、個体間変動が個体内変動よりあまり大きいと一般健常集団のサンプルを用いて血清ACE値の基準値を設定しても、正常か異常かを判定すること自体に限界が生じてくる。Cambienらは大規模な家系分析の結果から血清ACE値が家系内で類似していることを報告した。さらにヒト血管内皮由来のACE遺伝子がクローニングされたのち、ACE遺伝子内に挿入/欠失(I/D)多型が同定され、この多型が遺伝的に健常人の血清ACE値を規定していることが明らかになった。そこでわれわれは、健常人とサルコイドーシス患者の血清ACE値の遺伝的調節とサルコイドーシスの危険因子としての意義をACE遺伝子多型の観点から検討したので報告する。

341人の健常な非血縁日本人(男性179人、女性162人)、平均年齢42.5才を検診受診者より正常対照として選択した。サルコイドーシスや他の疾患で治療をうけているものは、理学所見、胸部レントゲン写真、心電図、一般血液・尿検査などから除外した。また1974年1月から1993年11月まで当科を受診した103人のサルコイドーシス患者(男性33人、女性70人)、平均年齢39.5才を対象とした。初診時の胸郭内病変は、Stage Iが60例、Stage IIが29例、Stage IIIが9例で、5例には胸郭内病変を認めなかった。サルコイドーシスの診断は、臨床的にまたは病理学的(75例)に確定した。他の肉芽腫を形成する疾患は除外し、サルコイドーシスに矛盾しないことを確認した。

血清ACE値は比色法(ACE Color, Fujirebio Inc. Tokyo)で測定した。全ての対照群と84人の患者群の血清ACE値を測定した。19人のサルコイドーシス患者は、この測定法を採用する以前か、受診時にすでにコルチコステロイドを投与されていたため除外した。

ACE遺伝子多型は、genomic DNAを対象者の白血球より抽出し、これを鋳型としてPCR法で同定した。すなわち、ACE遺伝子のイントロン16に存在する287bpのI/D多型部位を挟むセンスおよびアンチセンスプライマーを用いて増幅し、これをアガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色して対立遺伝子と遺伝子型を確認した。

正常対照群と患者群の各遺伝子型ごとの新しい血清ACE値の95%区間を求めた。血清ACE値とACE遺伝子多型との関連は一元配置分散分析とScheffe's F testで検討した。対照群と患者群の血清ACE値の比較は、Unpaired Student's t testでおこなった。正常対照群と患者群の対立遺伝子と遺伝子型の比較は、カイ二乗検定でおこなった。さらに、サルコイドーシスの相対危険度を推定するため、オッズ比を性と年齢で補正したロジスティック回帰モデルで検討した。

190bpの対立遺伝子Dと490bの対立遺伝子Iが検出され、それぞれのホモ接合体である、DDおよびヘテロ接合体であるIDの3種類の遺伝子型が同定された。正常対照群の各遺伝子型(II, ID, DD)ごとの平均血清ACE値(IU/L/37°C, SD)は、それぞれ11.8(2.9)、15.2(3.6)、19.3(3.9)で、患者群でも18.7(4.7)、27.5(11.9)、32.7(9.8)と同様な傾向を示した。ACE遺伝子多型と血清ACEの関連(association)は、対照群($p < 0.0001$)でも患者群($p < 0.0001$)でも認められた。正常対照群では、任意の二つの遺伝子型で血清ACE値に有意差を認めた(II < ID, ID < DD, II < DD, $p < 0.0001$)。しかし、患者群では、遺伝子型IIに比して遺伝子型ID、DDが有意に高値を示したが、遺伝子型IDとDDの間に有意差は認めなかった。遺伝子型を揃えて比較するといずれも患者群で血清ACE値は高値を示した($P < 0.0001$)。

正常対照群の遺伝子型II、ID、DDの分布は、46%、40%、14%で、対立遺伝子I、Dの頻度は0.67と0.33であった。これらはHardy-Weinbergの法則に従った。患者群の遺伝子型II、ID、DDの分布は、35%、51%、14%で、対立遺伝子I、Dの頻度は0.61と0.39であった。正常対照群の男女間に遺伝子型および対立遺伝子の分布に差を認めなかった。しかし、女性において正常対照群と患者群に遺伝子型($p < 0.05$)と対立遺伝子($p < 0.05$)の頻度に有意差を認めた。対立遺伝子Dを含む遺伝子型IDとDDのIIに対するオッズ比は2.18であった(95%信頼区間1.18~4.01; $p = 0.01$)。

われわれは、正常対照群と患者群の両者においてACE遺伝子多型と血清ACE値の有意な関連を認めた。この日本人における結果は、次の3点に集約される。第一に、正常対照の日本人では白人に比較して対立遺伝子Iの頻度が高く、遺伝的に血清ACE値の低い集団である可能性がある。第二に、サルコイドーシスにおける血清ACE値の正確な上昇機序は明らかにされていないが、患者における血清ACEの誘導もACE遺伝子多型で規定されており、血清ACE値が上昇しやすいか否かが対立遺伝子Dの有無に関係している。第三に、ある正常集団全体の血清ACE値の基準値はその集団のACE遺伝子型の分布に依存するが、遺伝子型ごとの基準値を設定することにより、より正確に異常値を検出可能になった。さらに興味深いことは、女性において健常人とサ症患者では対立遺伝子の頻度が異なり、患者群で対立遺伝子Dの頻度が高い可能性が示唆された。遺伝子型IDおよびDDの遺伝子型IIに対する相対危険度は約2倍になる。サルコイドーシスでは性差や人種差が知られているが、今回の検討だけではACE遺伝子多型がサルコイドーシスの危険因子となる機序を推定することはできない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 皆 川 知 紀
副 査 教 授 松 田 英 彦
副 査 教 授 川 上 義 和

学 位 論 文 題 名

Deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme(ACE)gene as a genetic risk factor for sarcoidosis

(サルコイドーシスの遺伝的危険因子としての
アンジオテンシン1変換酵素(ACE)の欠失多型)

1975年のLiebermanの報告以来、血清ACE活性は、サルコイドーシスの診断や活動性の指標として重要な位置を占めている。しかし、活動性のサルコイドーシス患者における血清ACE値の陽性率は33%~88%とかなり報告によって差が認められている。さらに黒人患者は白人患者より血清ACE値が高値を示す傾向にあることなどが報告されており、血清ACE値には、遺伝的または人種的な影響がある可能性が推定される。ヒトACE遺伝子内に挿入/欠失(I/D)多型が同定され、この多型が遺伝的に健常人の血清ACE値と関連していることが明らかになった。そこで本研究では、サルコイドーシスにおけるACE遺伝子多型性の意義を検討した。検診受診者より341人の健常な非血縁日本人(男性179人、女性162人)と103人のサルコイドーシス患者(男性33人、女性70人)を対象とした。全ての対照群と84人の患者群の血清ACE値を笠原法で測定した。19人のサルコイドーシス患者は、受診時にすでにコルチコステロイドを投与されていた等の理由で除外した。ACE遺伝子多型は、genomic DNAを対象者の白血球より抽出し、ACE遺伝子のイントロン16に存在する287bpのI/D多型部位を挟むプライマーを用いてPCR法で同定した。

190bpの対立遺伝子Dと490bの対立遺伝子Iが検出され、それぞれのホモ接合体である、DDおよびヘテロ接合体であるIDの3種類の遺伝子型が同定された。正常対照群の各遺伝子型(II,ID,DD)ごとの平均血清ACE値(IU/L/37°C,SD)は、それぞれ11.8(2.9)、15.2(3.6)、19.3(3.9)で、患者群でも18.7(4.7)、27.5(11.9)、32.7(9.8)と同様な傾向を示した。ACE遺伝子多型と血清ACEの関連(association)は、対照群($p<0.0001$)でも患者群($p<0.0001$)でも認められた。遺伝子型毎に新しい基準値を作成すると、診断感度の上昇が認められた。さらに、正常対照群の遺伝子型II、ID、DDの分布は、46%、40%、14%で、対立遺伝子I,Dの頻度は0.67と0.33であった。患者群の遺伝子型II、ID、DDの分布は、35%、51%、14%で、対立遺伝子I、Dの頻度は0.61と0.39であった。女性において正常対照群と患者群に遺伝子型($p<0.05$)と対

立遺伝子 ($p < 0.05$) の頻度に有意差を認めた。対立遺伝子Dを含む遺伝子型IDとDDのIIに対するオッズ比は2.18であった (95%信頼区間1.18~4.01 ; $p = 0.01$) 。

以上より、対照群および患者群いずれでもACE遺伝子多型と血清ACE値の関連を認め、遺伝子型ごとの基準値を設定することにより、より正確に異常値を検出可能になった。また、女性において対立遺伝子Dを持つことが弱いながら危険因子になる可能性が示唆された。

審査に当たっては、副査松田教授より、1、1974年から1993年までの間のサルコイドーシスの診断基準に差がないかについて、2、血清ACE値測定を除外した19人の患者年齢や性別などの背景について、3、女性でのオッズ比の有意差が、サルコイドーシスの性差と関連があるか否かについて、4、眼病変を合併するものが予後不良である理由について質問があった。また、副査川上教授より、1、個体間の血清ACE値の変動に対するACE遺伝子多型性の寄与度について、2、ACE遺伝子多型性がどのような機序で危険因子となりうるかについて質問があった。さらに主査皆川教授より、1、他の肉芽腫性疾患における検討の有無について、2、ACE遺伝子型DDの多い黒人で疾患予後が悪いとする報告の有無について、3、血清ACE値の変動幅の大きさと疾患活動性についての質問があった。申請者はこれらの質問に対しておおむね適切な回答をおこなった。

さらに、ACE遺伝子の詳細な発現機序やACEの免疫学的機能を検討することにより、サルコイドーシスの新しい宿主側の遺伝的要因として解明されることが期待される。

審査員一同は、本研究を、サルコイドーシスにおけるACE遺伝子多型性の意義を解析した研究として高く評価し、博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。