

『全国規模ネットワークシステムでの患者登録による糖尿病性腎の疾病構造の解析と腎症進展阻止指針作成の為の体制整備に関する研究』

— 糖尿病性腎症進展の病態解析 —

分担研究者 齋藤 康 千葉大学第二内科教授

研究要旨： NIDDM患者において正常血糖クランプ法を用いインスリン抵抗性を評価し、同時にACE遺伝子のInsertion/Deletion 多型を決定したところ、インスリン抵抗性の強い患者においてACE遺伝子が腎症発症進展に強く影響していることが明らかとなった。

研究協力者

倉本 充彦 千葉大学第二内科 医員

橋本 尚武 千葉大学第二内科 講師

A. 研究目的

糖尿病性腎症は糖尿病により腎内に種々の血行動態的、代謝的変化が生じ、メサンギウム細胞基質の肥大を招来し、糸球体硬化に至ると考えられている。同腎症の発症、進展に環境因子、遺伝因子の関与が従来より示唆されてきた。

レニンアンジオテンシン系は腎血行動態の重要な調節系であるが、最近この系を構成する蛋白の遺伝子が多型性を有することが明らかとなり、糖尿病性腎症との関連が検討されてきた。なかでもアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 遺伝子のイントロン16に Insertion/Deletion(I/D)多型が存在することが明らかとなり、血中ACE活性と相関す

ることが報告された。インスリン依存型糖尿病 (IDDM) における腎症発症と同多型が関連することが報告され注目されている。またACE阻害剤が糖尿病性腎症に対し腎保護作用を有することもACE遺伝子と糖尿病性腎症との関連を示唆する。その後IDDMのみならず、インスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) 患者においても同多型と腎症発症進展との関連が解析されてきたが、必ずしも意見は一致していない。一方NIDDM患者においてインスリン抵抗性が腎症の進展に影響を及ぼしているとの報告がある。さらにACE阻害剤がインスリン抵抗性を改善するとの報告もあり、ACE遺伝子とインスリン抵抗性両者の腎症進展への関与が注目される。

そこで本研究ではNIDDM患者において正常血糖クランプ法を用いてインスリン抵抗性について評価した上で、インスリン抵

抗性の強いNIDDM患者におけるACE遺伝子の糖尿病性腎症に及ぼす影響について検討した。またACE遺伝子とインスリン抵抗性の関係について検討した。

B. 研究方法

腎機能正常 (Ccr 70ml/min以上) かつ5年以上の罹病期間をもつ成人NIDDM患者62名のうち、24時間尿中アルブミン排泄率 (AER) 15 μ g/min以下の正常アルブミン尿者 (A群) 29名、AER15~70 μ g/minの微量アルブミン尿者 (B群) 19名、AER70 μ g/min以上の微量アルブミン尿者+蛋白尿者 (C群) 14名とした。1) 正常血糖クランプ法を行いインスリン注入率4.48mU/min/kg 下で70分から90分のグルコース注入率の平均値 (M値) を測定し、この62名を含む132名のNIDDM患者のM値の総平均 (6.49mU/min/kg) 未満のM値を有する者をインスリン抵抗性の強い者とした。2) 末梢血白血球よりDNAを採取し、Rigatらの方法に従い、ACE遺伝子I/D多型を決定した。3) 血中レニン活性 (PRA)、アルドステロン (PAC) を測定した。

C. 研究結果

腎症の危険因子とされる年齢、罹病年数、肥満度、安静時血圧、降圧剤内服者頻度、HbA1c値、T-Cho値、TG値、HDL-Cho値は各群で有意差を認めなかった。PRA、PAC、CPR反応性は各群有意差を認めな

かった。M値はA群、B群に比しC群で有意に低値であった ($p=0.040$)。ACE遺伝子多型におけるII:ID:DD型の分布はA群13:13:3、B群7:7:5、C群1:9:4であった。Iアリール:Dアリールの頻度はA群39:19、B群21:17、C群11:17と弱いながら有意な偏りを認めた ($p=0.047$)。

インスリン抵抗性の強い者はA群15名、B群11名、C群10名で、Iアリール:Dアリールの頻度はA群23:9、B群7:13、C群6:14と強い有意差をもってA群、B群、C群の順にDアリールの頻度が高くなる傾向を認めた ($p=0.0022$)。高血圧症の有無とインスリン抵抗性、ACE遺伝子多型のアリールの頻度に差を認めなかった。

D. 考察

NIDDM患者においてACE遺伝子多型と腎症発症進展の関連に一致した意見がない背景として腎症への危険因子の多様性があり、今回それらが一致した患者群で弱いながら関連を認めた。さらにインスリン抵抗性の強い者で強い関連が認められ、インスリン抵抗性とACE遺伝子が相乗的に腎症進展に影響している可能性がある。

E. 結論

インスリン抵抗性の強いNIDDM患者においてACE遺伝子が糖尿病性腎症進展に関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kuramoto N, Saito Y, et.al

Effect of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene on diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus with insulin resistance.

Am J Kidney Dis 33:1-7,1999

2. 学会発表

倉本充彦、斎藤 康、 他

インスリン抵抗性の強いNIDDM患者の糖尿病性腎症発症進展に及ぼすACE遺伝子多型の影響。

日本糖尿病学会学術総会、1997年5月

Kuramoto N, Saito Y, et.al

Effect of ACE gene on diabetic nephropathy in patients with insulin resistance.

International diabetes and federation congress, July 1997.

全国規模ネットワークシステムでの患者登録による糖尿病性腎症の疾病構造の解析と腎症進展阻止指針作成の為の体制整備に関する研究

— 病 理 画 像 解 析 —

研究者 木田 寛 国立金沢病院診療部長（内科）

研究要旨 糖尿病性腎症では，腎機能障害の進行と蛋白尿の程度との間に乖離がみられることより，その実態ならびに背景因子について検討し，尿細管・間質病変の重要性を明らかにしえた。患者登録用の腎症病変評価マニュアルの作成に当たり，重要な点である。

研究協力者 国立金沢病院内科
吉村光弘，高澤和也，泉谷省晶
能登 裕（医長）

A. 研究目的

糖尿病性腎症（以下腎症と略す）には，非代償性腎不全状態と高度のネフローゼ状態に伴う溢水状態との異なる二つの終末像がある。このことは，腎機能障害と蛋白尿とがそれぞれ別の機序に基づき進展する可能性を示唆している。本研究では，他の腎疾患ではみられない特異な腎症の進展様式の実態と機序を解明する。また一方で，この点を考慮に入れた腎症病変評価マニュアルの作成を目指す。

B. 研究方法

生検により腎病変を観察しえた腎症 55 例を対象に，病理所見と血清クレアチニン値（S-Cr）および 1 日尿蛋白量とを対比した。検討所見には，び漫性病変の程度，mesangiolytic の有無，結節性病変および虚血性硝子化を示す糸球体率，血管病変の程度，尿細管の萎縮・脱落および間質の細胞浸潤・線維化の程度を含めた。

C. 研究結果

1) S-Cr と 1 日尿蛋白量：S-Cr が 1.5mg/dl 以下，1 日尿蛋白量が 1.5g 以下の症例で

は，両者間に相関がみられたが，これを越える症例では，相関はみられなかった（図 1）。

2) 腎機能と腎病変：S-Cr は，糸球体病変（図 2）よりも尿細管・間質病変，とくに尿細管の萎縮や脱落と密接に関連していた（図 3 a,b,c）。結節性病変形成率（図 4）や糸球体硝子化率（図 5）ならびに血管病変（図 6）との間には関連がみられなかった。

3) 尿蛋白と腎病変：1 日尿蛋白量が 4.0g を越える症例では，糸球体病変（図 7），尿細管・間質病変，とくに mesangiolytic，間質の細胞浸潤・線維化（図 8）との間に関連がみられたが，結節性病変形成率（図 9），糸球体硝子化率（図 10）ならびに血管病変（図 11）との間の関連はみられなかった。

D. 考察および結論

腎症の特異な進展様式は，腎機能障害には尿細管・間質病変が，一方の尿蛋白には糸球体病変がより強く反映されることによる可能性が示唆された。ただし，結節性病変・硝子化糸球体の意味づけに関しては，いまだ問題が残されている。

目下のところ，一般化された腎症病変の評価マニュアルはなく，上記の問題点にも対応可能なものを作成したい。

E. 研究発表

1. 木田寛他：糖尿病性腎症にみられる高度蛋白尿の病理学的背景とその成因について．95回日本内科学会講演会，福岡
2. 高澤和也，木田寛他：糖尿病性腎症における結節性病変の再検討と臨床的意義．41回日本腎臓学会学術総会，東京

腎機能と1日尿蛋白量

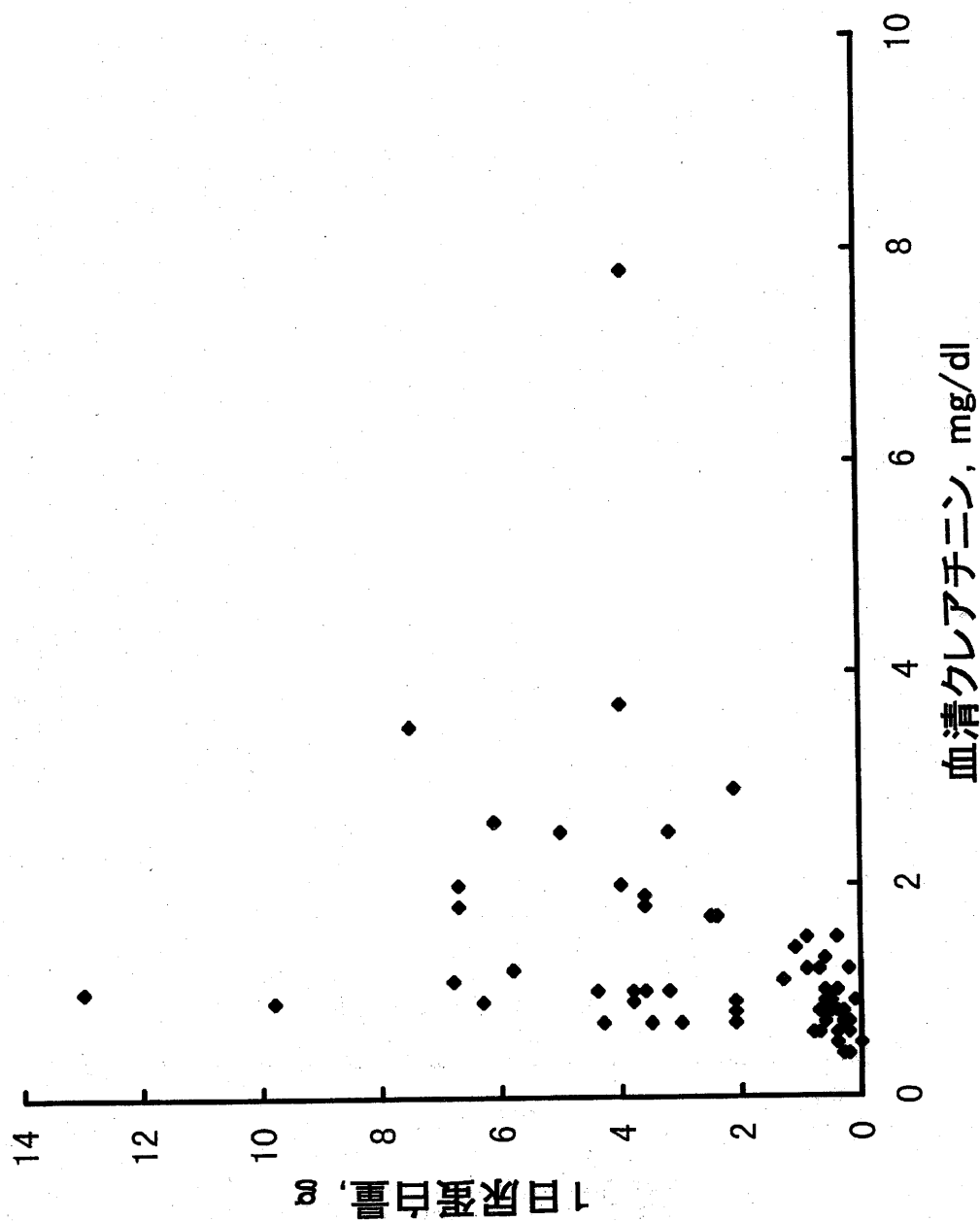


図 1

腎機能と糸球体障害度との対比

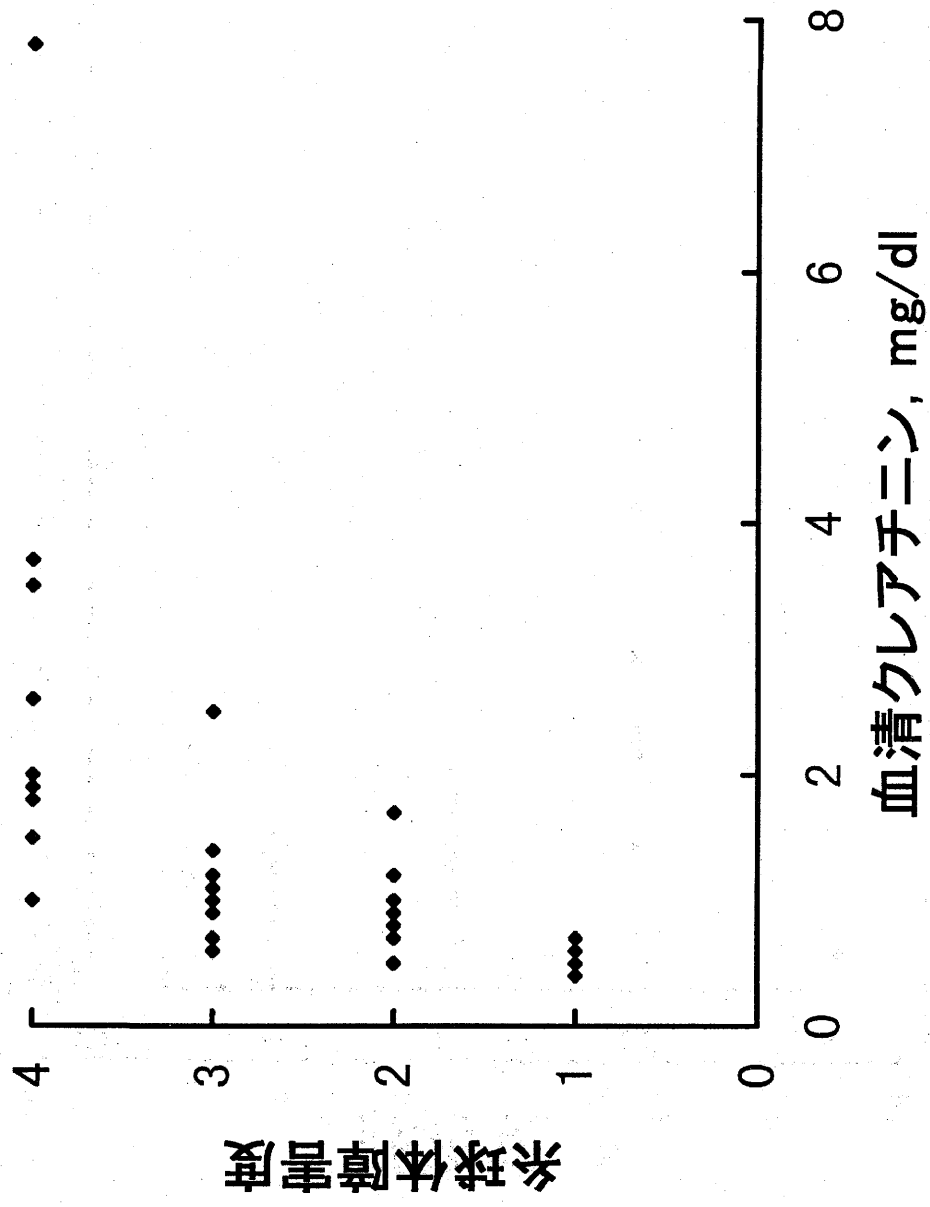


図 2

腎機能と尿細管・間質障害度

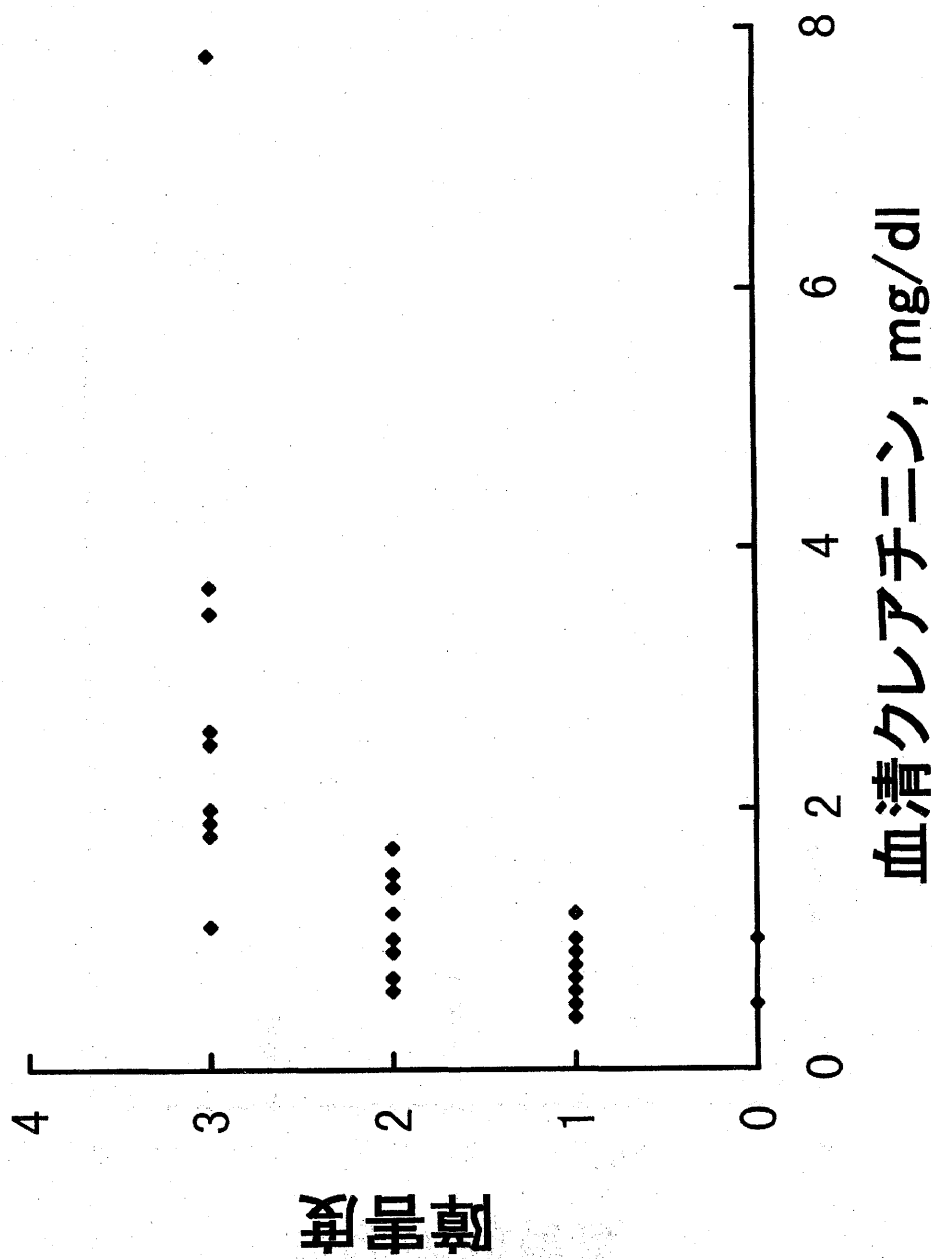


図 3a

腎機能と間質障害度との対比

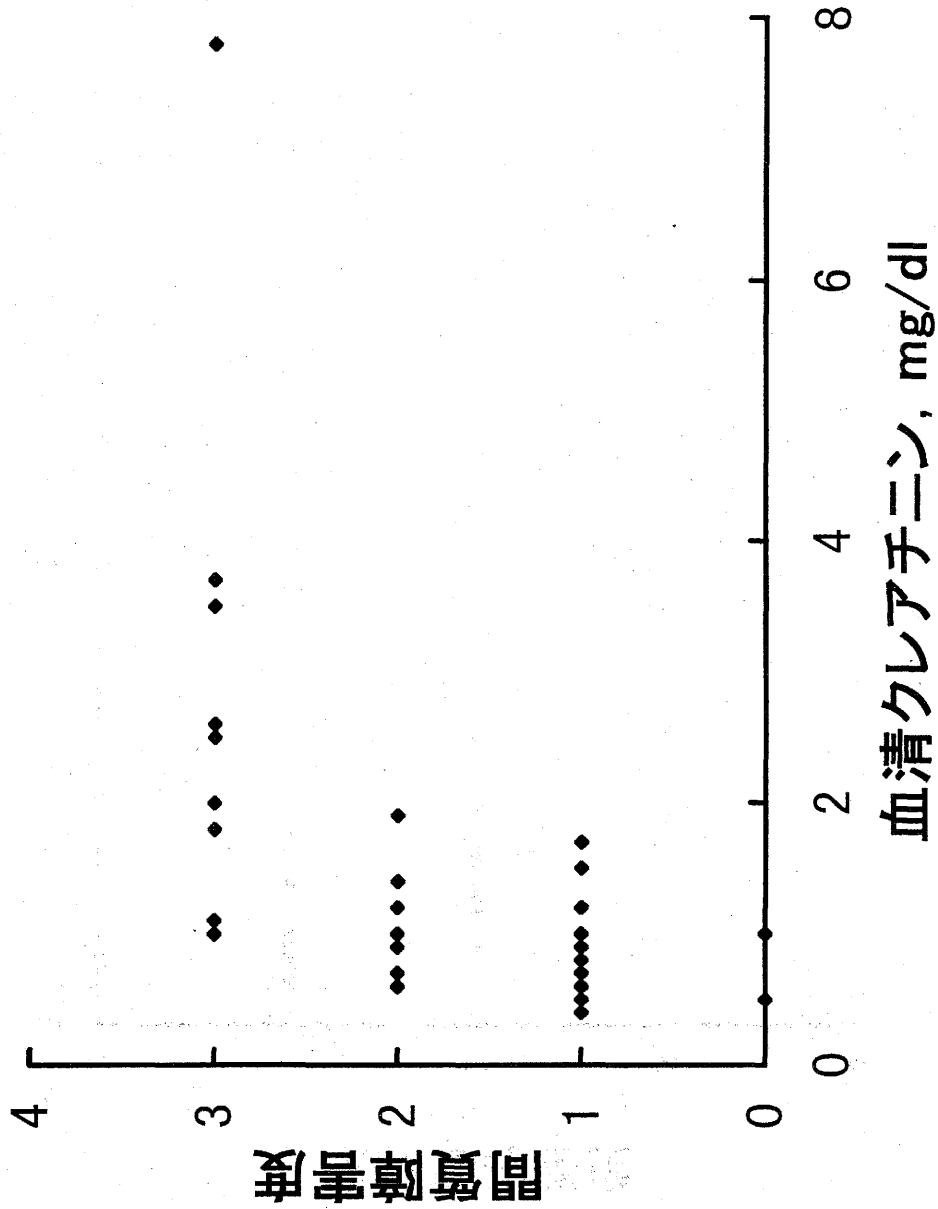
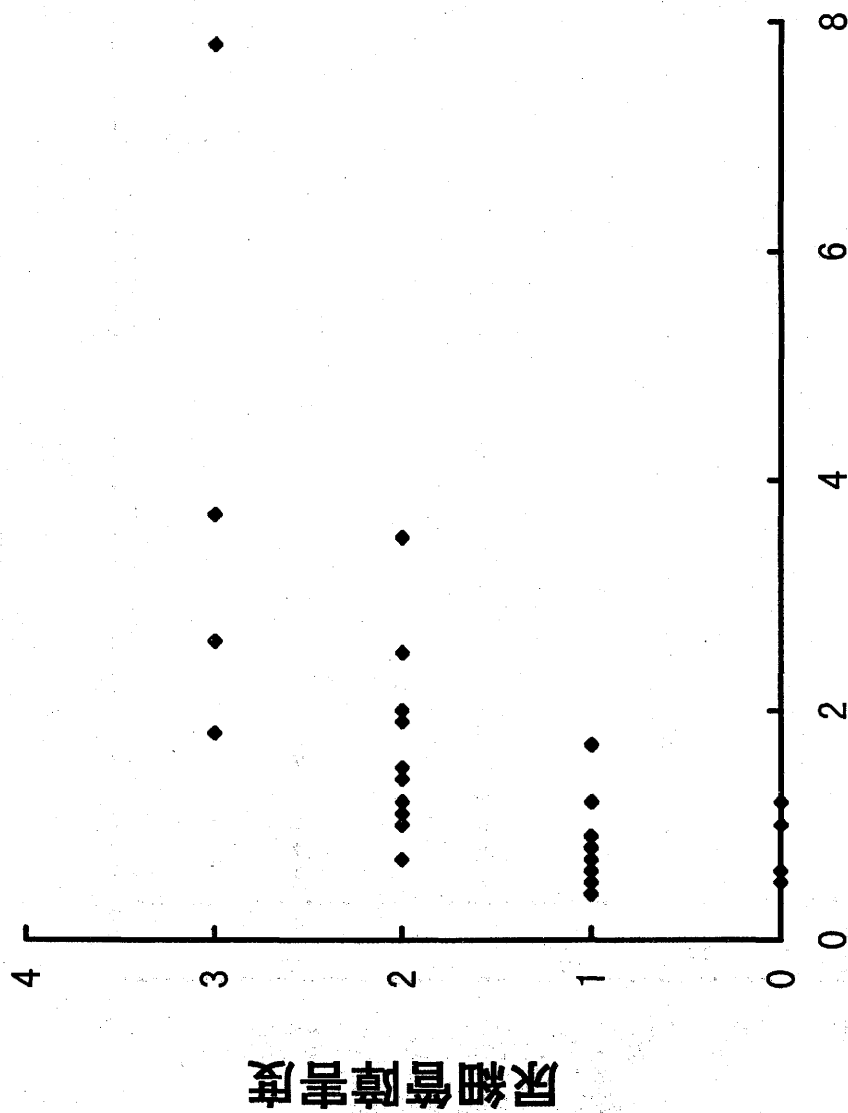


図 3b

腎機能と尿細管障害度との対比



血清クレアチニン, mg/dl

図 3C

腎機能と結節性病変形成率

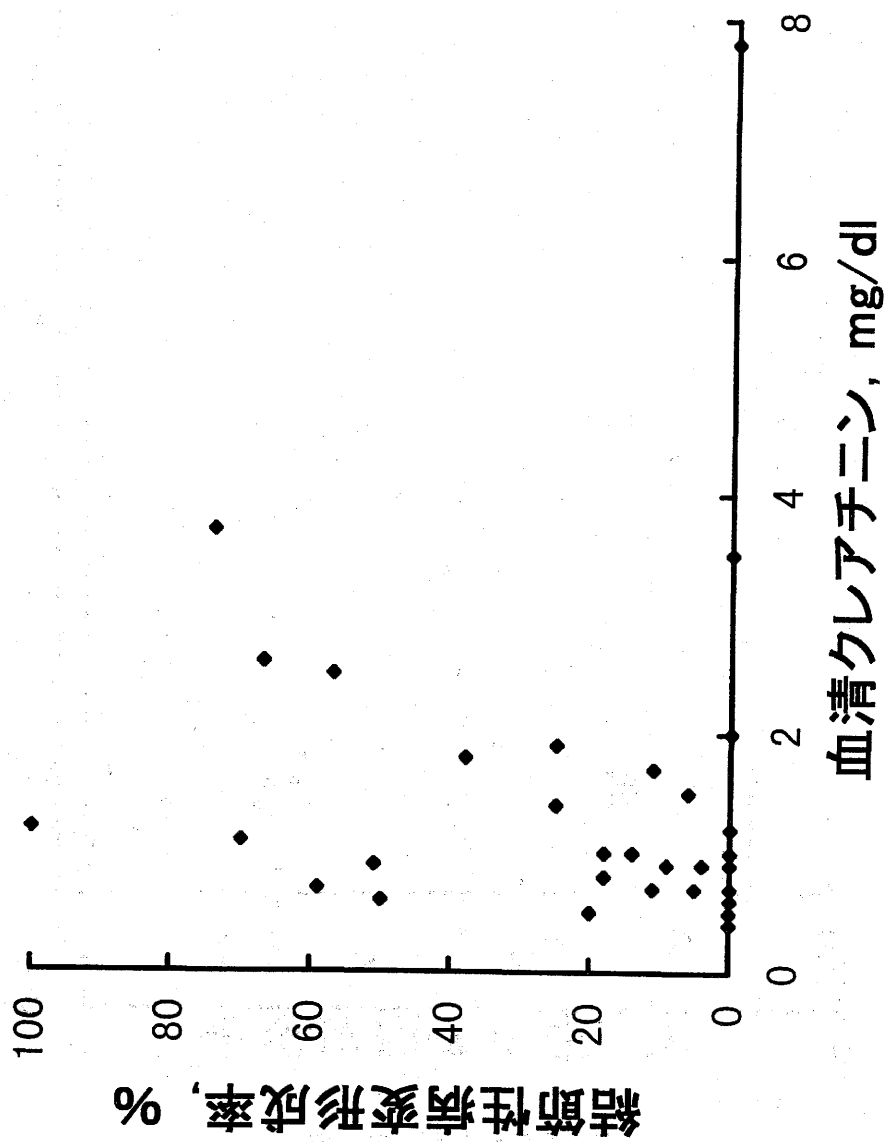


図 4

腎機能と糸球体硝子化率

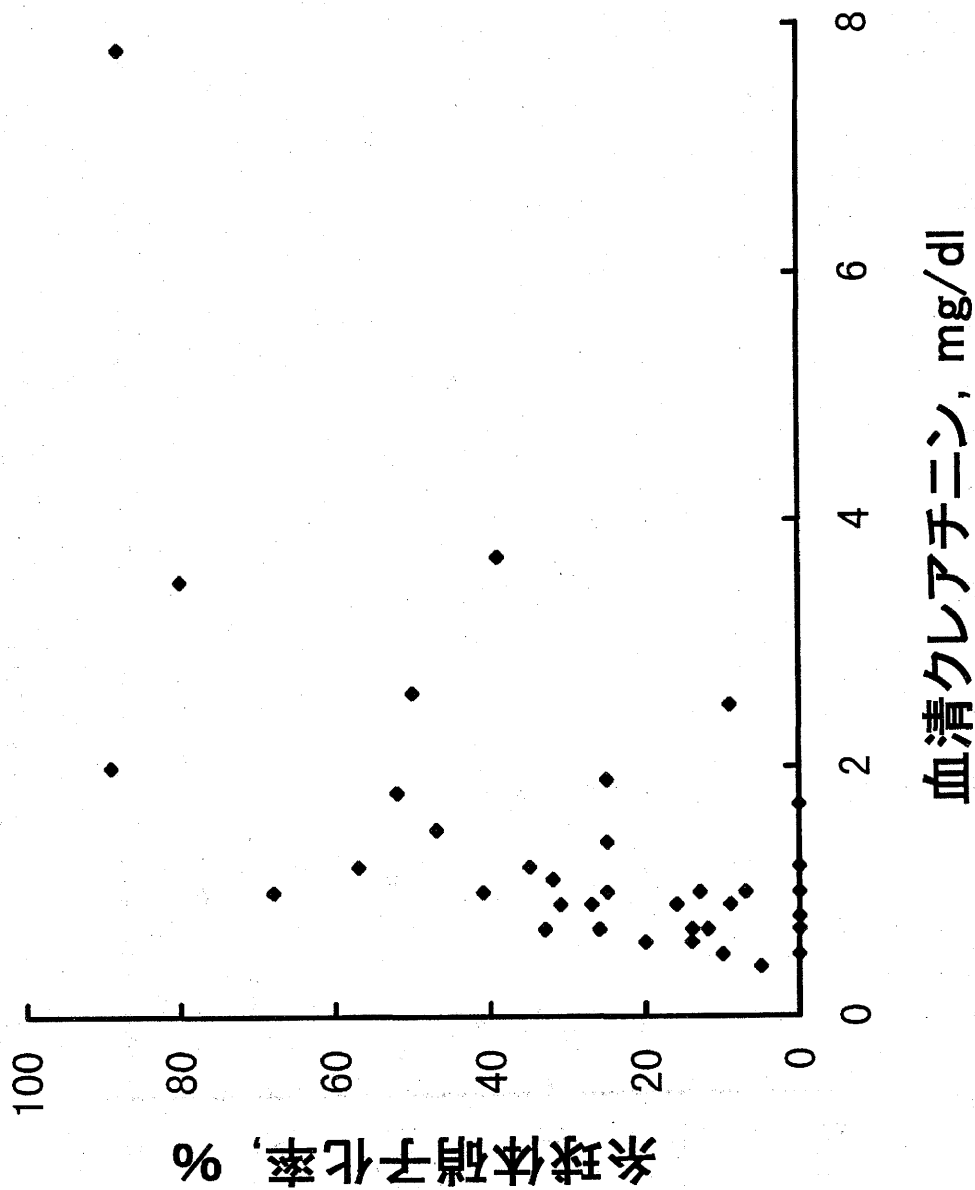


図 5

腎機能と血管病変との対比

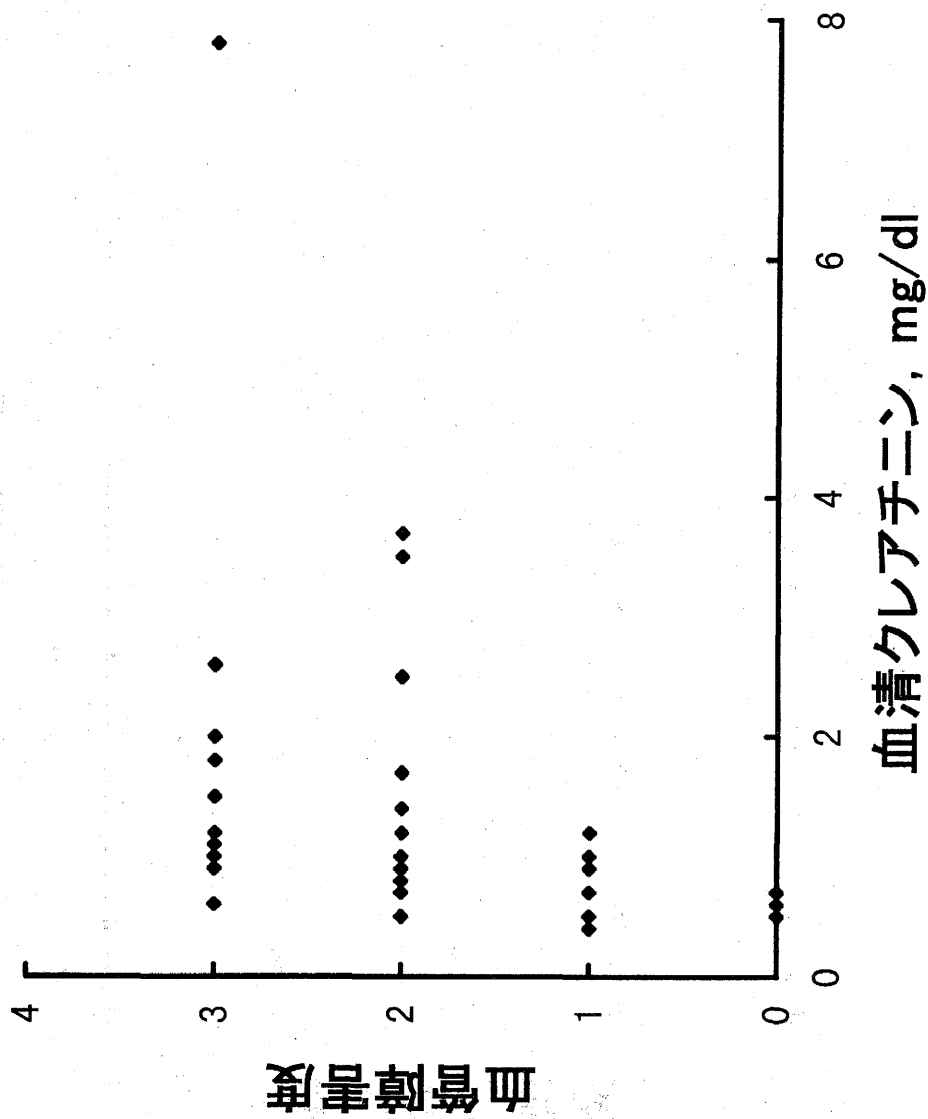


図 6

尿蛋白量と糸球体障害度

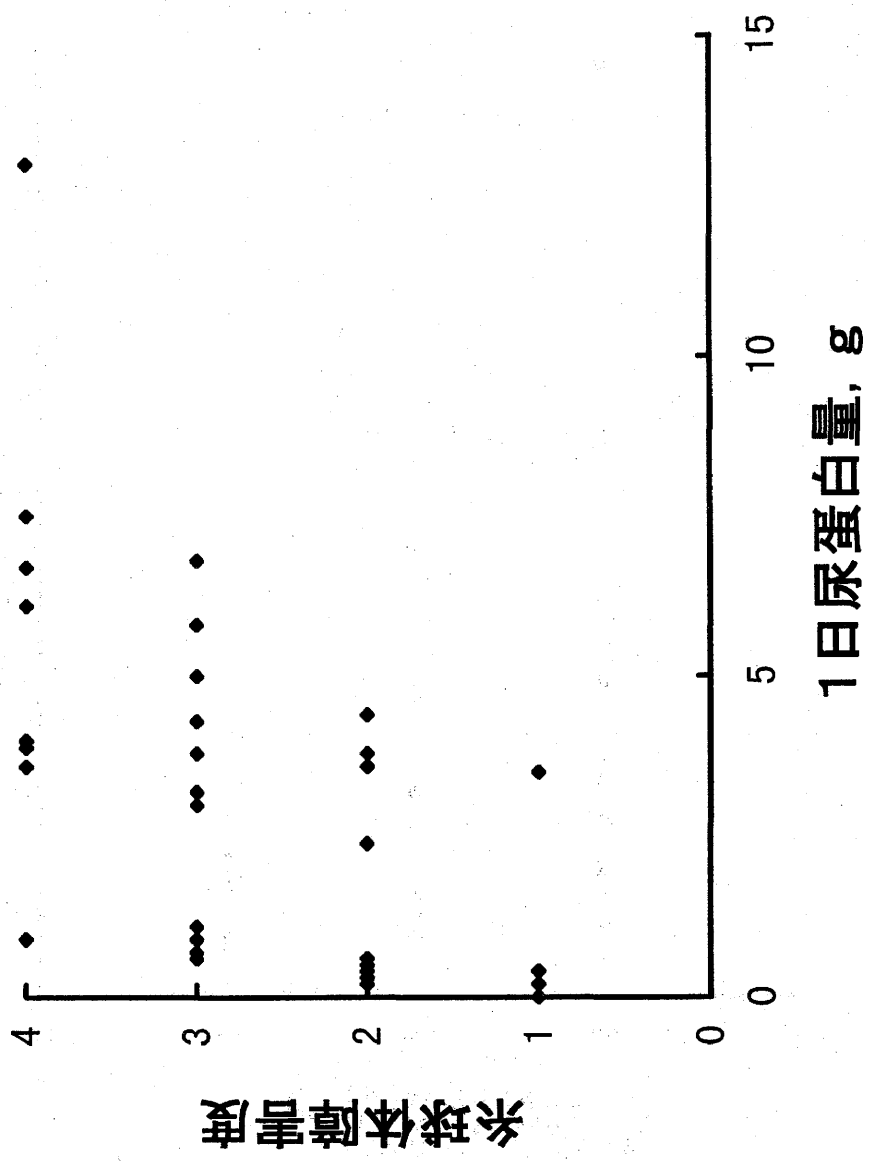


図 7

尿蛋白量と間質病変

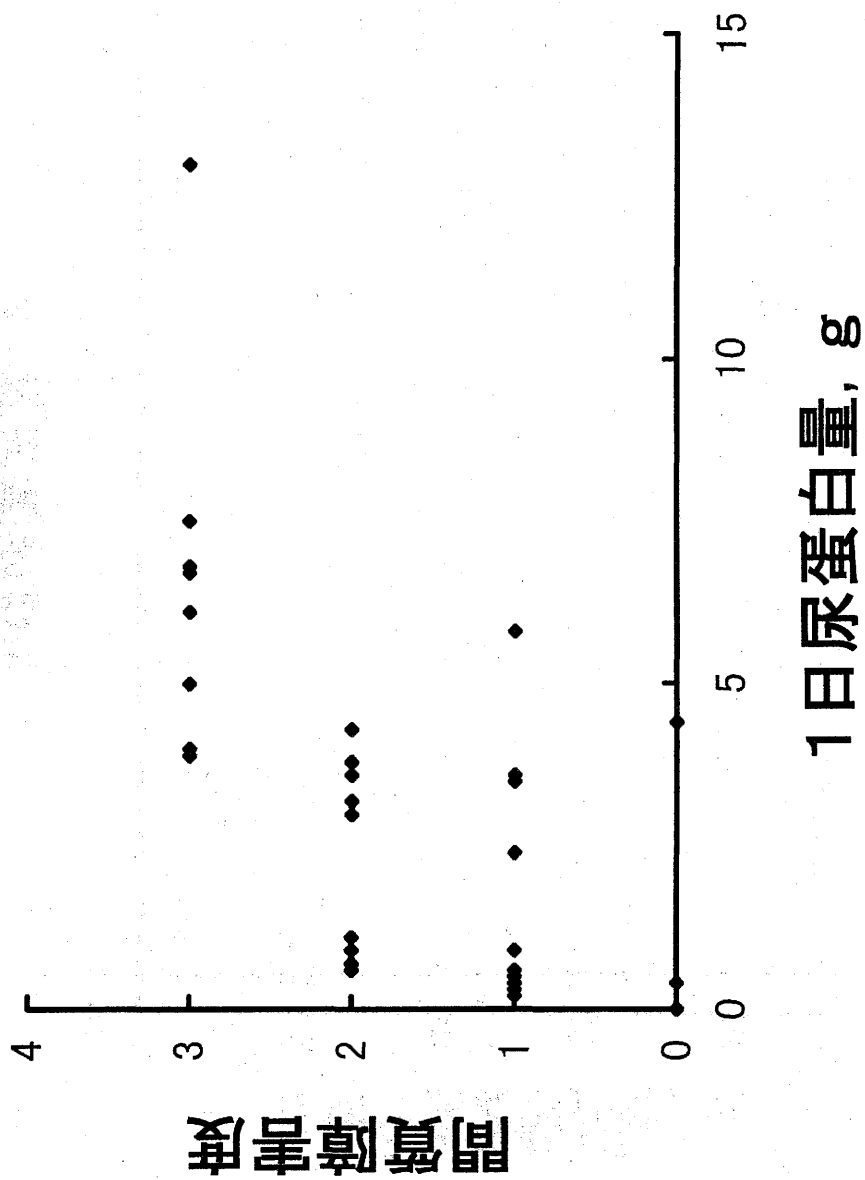


図 8

尿蛋白量と結節性病変形成率

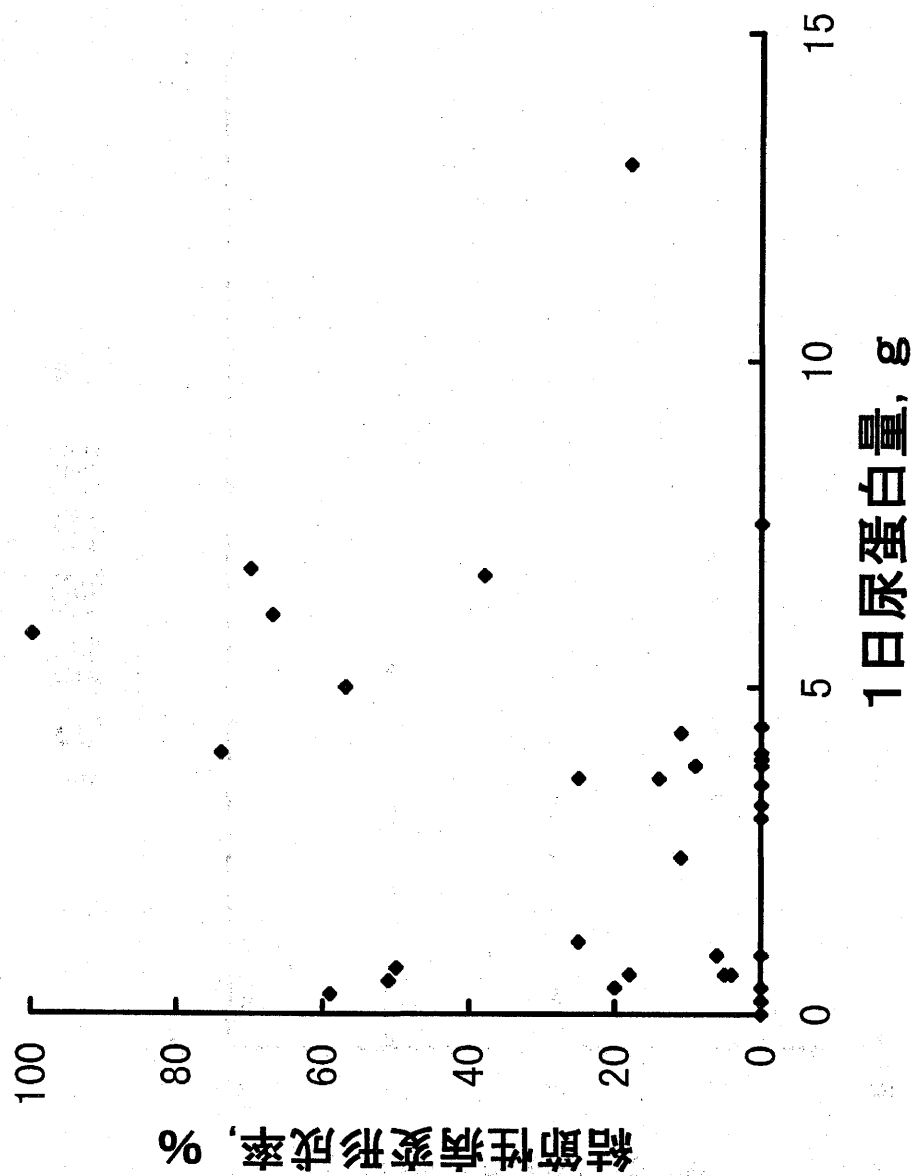


図 9

尿蛋白量と糸球体硝子化率

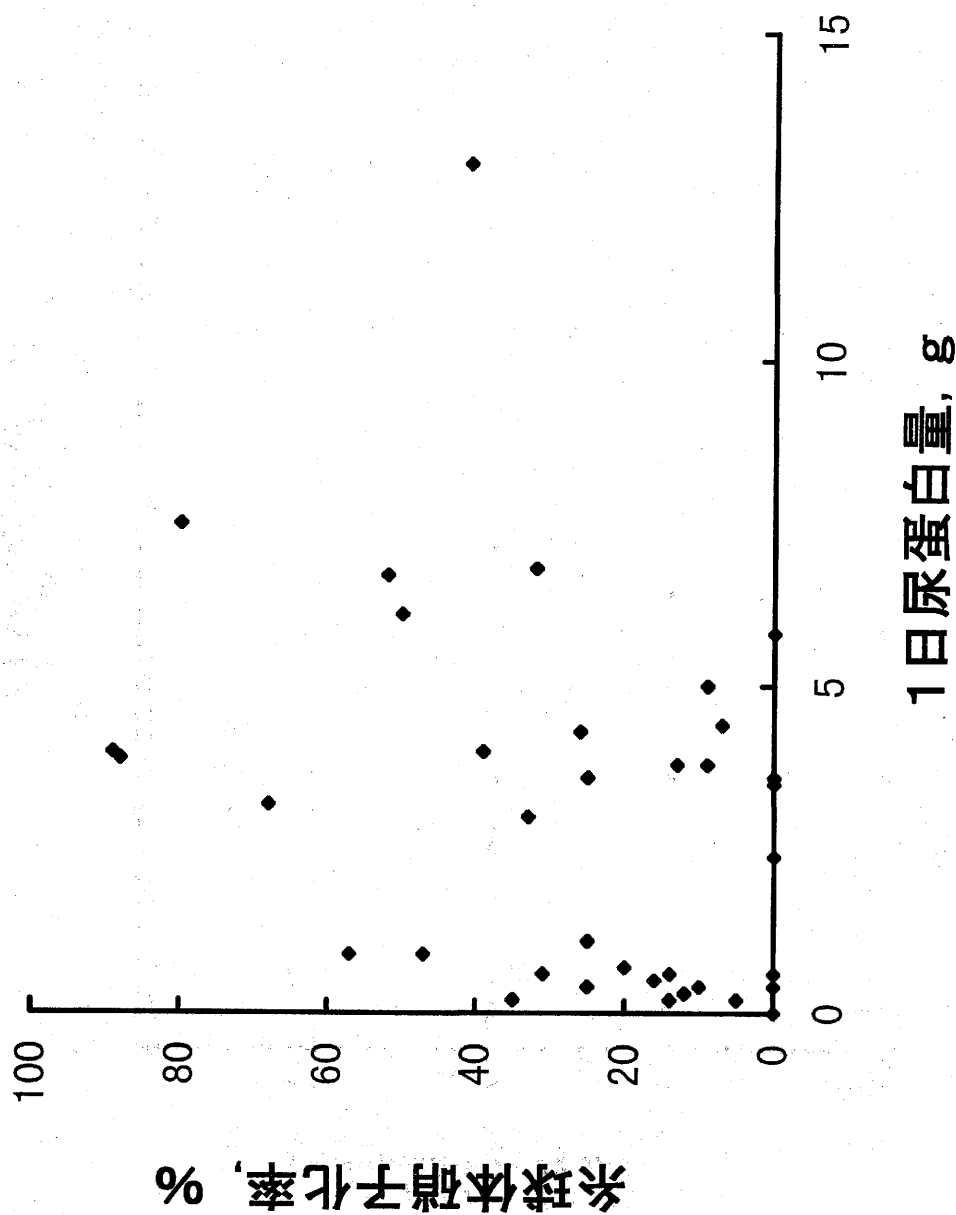


図 10

尿蛋白量と血管病変との対比

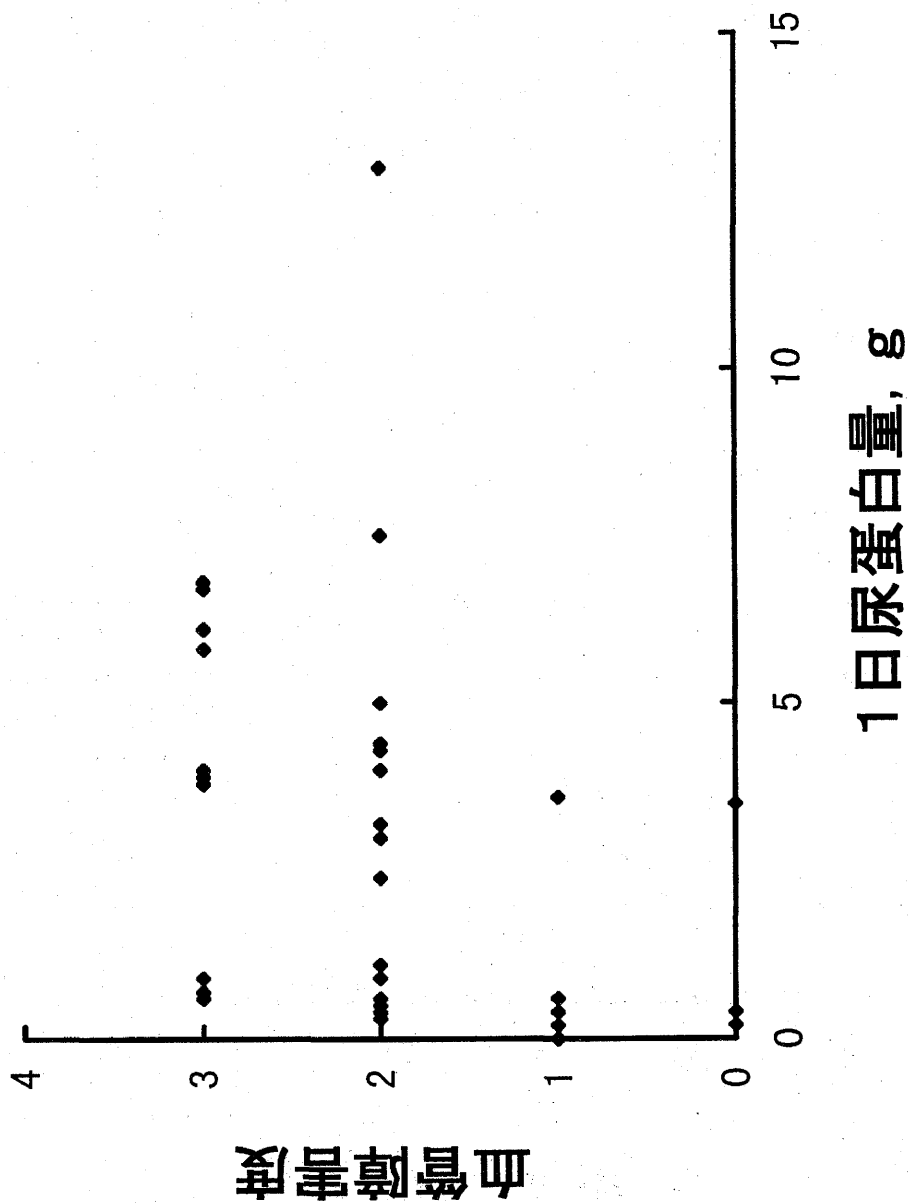


図 11

全国規模ネットワークシステムでの患者登録による
糖尿病性腎症の疾病構造の解析と腎症進展阻止指針
作成のための体制整備に関する研究
遺伝子多型性の解析に関する研究

分担研究者 酒巻建夫 国立佐倉病院臨床研究部 医長

研究要旨 初年度は糖尿病性腎症の進展に関連のあると考えられる遺伝子、ACE, ecNOSなどの多型性解析のためにPCR条件、アッセイ法の決定や検体の収集方法についての検討を行った。

A. 研究目的

糖尿病性腎症患者の腎症進展に関わると考えられる遺伝子(ACE, ecNOSなど)の多型性を調べ、進展への関与の有無、治療との関連を調べる。またHLA-DR遺伝子多型との関連性も同時に調べる。

B. 研究方法

糖尿病性腎症の患者群および正常人対照群(健康診断時採血)(n=140)からDNAを抽出することとした。

遠隔地から患者検体を収集するにあたりDNA抽出することを前提として、検討を行った。輸送コスト、患者の受診日、各病院で中間処理の手間を省く目的で採血検体を室温で回収することを中心にした。

次に末梢白血球細胞から質のよいDNAを抽出する方法を検討した。

遺伝子多型はPCR-SSP法、PCR-RFLP法、SSCP法などを併用して決定する。多型性部位のプライマーを作成し、PCR条件等の決定を行うこととした。

C. 研究結果

院内の正常人の血液を対象に条件決めを行った。DNAの収量、抽出バンドの均一性、PCR反応正否により評価した。その結果、採血にはEDTA採血を用いることにした。EDTA採血にしたのは従来から用いられているヘパリン採血ではキャリーオーバーによりPCR反応を抑制するおそれがあるためである。予備実験よりEDTA採血後、数日間は十分なDNAが採取できることより、図1に示すように採血検体を室温で送付してもらうこととした。当院に到着後、ただちにバッフィーコートを分離し凍結保存し、10検体ほどの数が集まり次第、抽出作業に着手することにした。

凍結バッフィーコートからのDNA抽出にはグアニジン法、プロテナーゼK消化・フェノール/クロロフォルム処理、エタノール沈殿法、プロテナーゼK消化・塩析処理・エタノール沈殿法の3者を比較したが、タンパクの混入、操作の簡便性、溶解性、所用時間などから、図2に示すようにプロテナーゼK処理・塩析処理・エタノール沈殿法を採用することに決定した。採血してから3-4日では

収量とDNAの質は保たれていた。

患者群は20数検体ほど集まり始めたところである。

多型性の解析についてPCR条件や方法についてACEおよびecNOSについて設定を開始した。ACEに対しては図3にPCR条件と泳動法について示した。

D. 考察

全血をそのまま凍結した場合にはDNA抽出時に血漿タンパク、赤血球成分などが多量に混入し、酵素処理も効率的ではないので、buffy coatを分離してスタートすることにした。一方、全国の施設で、buffy coatに分離すると手間もかかり、検体数も少なく、また凍結サンプルの保存と輸送には費用がかさむことから、採血してそのままの輸送が適当である。全血輸送の場合には細菌の増殖もない。多少の溶血があっても白血球、リンパ球の自己融解も3、4日程度ではあまり起こらずに、DNAが抽出できる。プロテナーゼKの処理はDNAに結合したタンパク質を除去し、溶解を容易にし、PCR反応も良好であった。各病院でDNAを抽出できるのであればDNAを送付してもらうのが合理的であるが、各病院に現在ではまだDNA検査が普及していない状況である。HLA検査用のDNA抽出についても各検査センターでも抽出方法が一定ではなく、それらの検体ではPCR反応が均一に起こらない経験がある。ことに大きなサイズのPCR反応を実施する場合に差が出ることが多い。

遺伝子多型の検出法については多型性の部位の配列の特徴やサイズなどから、

かけるだけでよいのかについて検討する必要がある。遺伝子によっては多型性があるその部位にプライマーの3'部位を当ててプライマーの違いによって多型性を決定すること(PCR-SSP法)も可能である。ACE遺伝子のエクソン16の場合にはI型とD型ではサイズが大きく異なるために泳動法のみで十分と考えられる。

F. 研究発表 特になし