

eNOS 遺伝子多型が透析患者の動脈硬化進展に与える影響の検討

浅木森幸晃* 頼岡徳在* 高杉敬久** 辰川自光**

* 広島大学大学院医歯薬総合研究科 病態制御医科学講座 ** 広島県透析連絡協議会

要 旨

透析患者の死因としては動脈硬化進展が深く関連する心血管疾患の頻度が最も高く、そして動脈硬化進展には一酸化窒素 (NO) 合成阻害が一因となっている。そこで NO 合成を規定する eNOS イントロン 4 遺伝子多型および T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型が透析患者の動脈硬化進展に与える影響を検討した。対象は原疾患が糖尿病でない血液透析患者 108 名である。動脈硬化の指標としての頸動脈内膜中膜複合体厚 (IMT) を測定し、IMT が 0.75 mm 以上を動脈硬化ありとした。動脈硬化あり群 (N=60)、動脈硬化なし群 (N=48) の 2 群に分け、動脈硬化進展に影響を与える因子を検討した。イントロン 4 遺伝子多型は PCR 法で、T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型は PCR-RFLP 法で決定した。イントロン 4 遺伝子多型と T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型には強い連鎖不平衡を認めた。動脈硬化進展のリスクは *a* アレル (イントロン 4 遺伝子多型) を有さない患者を 1 とすれば、*a* アレルを有する患者は 2.92 倍となった。さらに *C* アレル (T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型) を有さない患者を 1 とすれば、*C* アレルを有する患者は 3.05 倍まで高くなった。

以上より、イントロン 4 遺伝子多型と T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型は糖尿病でない透析患者の動脈硬化進展に関連することが示された。

はじめに

透析患者の死因としては動脈硬化進展が深く関連する心血管疾患の頻度が最も高く、その発症防止が重要課題となっている。動脈硬化進展には高血圧が密接にかかわっていると考えられており、血行動態に影響する遺伝子を候補遺伝子として選択し、その遺伝子多型と動脈硬化進展との関連性について研究が進められている。

一酸化窒素 (NO) は血小板凝集を阻害し、平滑筋細胞の増殖を抑制するなどの機序で動脈硬化進展を抑制すると考えられている。血管内皮由来の NO は、内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) により L-arginine と酸素を基質とし合成される。これまで、NO 合成を阻害することにより高血圧、動脈硬化進展が認められることが動物において報告されている^{1,2)}。これらのことより、NO 産生と関連する eNOS 遺伝子多型が動脈硬化進展に影響を与えるのではないかという仮説が導き出せる。

eNOS 遺伝子はヒトでは第 7 染色体に存在し³⁾、数種類の遺伝子多型がある。われわれはイントロン 4 遺伝子多型とプロモーター領域の -786 番目の塩基 T から C への変異 (T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型)⁴⁾に注目した (図 1)。イントロン 4 には 27 bp の繰り返し配列を 5 つ含む 420 bp の DNA 配列 *b* アレルと、繰り返し配列が 4 回の 393 bp の DNA 配列 *a* アレルで特徴



イントロン遺伝子多型

27bp のオリゴヌクレオタイド：4～5 回のくり返し配列

b アレル：420 bp

a アレル：393 bp

図1 eNOS 遺伝子多型

づけられる遺伝子多型が存在する⁵⁾。両遺伝子多型ともに動脈硬化進展との関連性がいくつか示されている。

そこでわれわれは、eNOS イントロン 4 遺伝子多型および T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型が透析患者の動脈硬化進展に与える影響を検討した。

1 方法

対象は原疾患が糖尿病でない血液透析患者 108 名である。動脈硬化の指標として頸動脈内膜中膜複合体厚 (IMT) を測定し、IMT が 0.75 mm 以上を動脈硬化ありとした⁶⁾。動脈硬化あり群 (N=60)、動脈硬化なし群 (N=48) の 2 群に分け、動脈硬化進展に影響を与える因子を検討した。動脈硬化進展に対する次に示す独立した因子の影響を解析するために多重ロジスティック回帰分析を行った。

血圧はエントリー後からの透析前の血圧 12 回分を用いて評価した。毎回の平均血圧を計算しその平均値を求め、その値が 114 mmHg 以上の場合、あるいは降圧薬を服用している場合に高血圧ありとした⁷⁾。現在喫煙しているか、あるいはエントリーする 3 ヶ月以内に禁煙した場合に喫煙ありとした⁸⁾。

すべての患者においてエントリー時に空腹時採血を行った。脂質代謝異常の有無は日本動脈硬化学会の診断基準に基づいて分類し、高脂血症改善薬を服用している場合も、脂質代謝異常ありとした⁹⁾。副甲状腺摘出術の既往がある場合、あるいは i-PTH が 500 pg/ml より高値の場合に副甲状腺機能亢進症ありとした。

遺伝子多型については末梢血よりゲノム DNA を抽出し、各症例のイントロン 4 遺伝子多型は PCR 法で¹⁰⁾、T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型は制限酵素 *MspI* を用いた PCR-RFLP 法で決定した¹¹⁾。イントロン 4 遺伝子型

表 1 多重ロジスティック回帰分析因子

動脈硬化	(なし=0, あり=1)
年齢	(40-49 歳, 0; 50-59 歳, 1; 60-70 歳, 2)
性別	(女性=0, 男性=1)
透析期間	(1-60 月, 0; 61-120 月, 1; 121 月>, 2)
高血圧	(なし=0, あり=1)
喫煙	(なし=0, あり=1)
脂質代謝異常	(なし=0, あり=1)
副甲状腺機能亢進症	(なし=0, あり=1)
イントロン 4 遺伝子多型	(b/b, 0; a/a+b/a, 1)
T ⁻⁷⁸⁶ →C 遺伝子多型	(T/T, 0; C/C+T/C, 1)

は aa, ba, bb に、T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子型は CC, TC, TT に区分された。

統計解析については、結果は平均値 ± 標準偏差で表した。2 群の比較は t 検定と χ^2 検定を用いた。Hardy-Weinberg 法則に従っているかの検討やイントロン 4 遺伝子多型と T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型の連鎖解析には χ^2 検定を用いた。さらに、動脈硬化進展に対する独立した因子の影響を解析するために多重ロジスティック回帰分析を用いた。多重ロジスティック回帰分析を行う因子の定義を表 1 に示した。解析は StatView 4 software (Abacus Concepts, Inc., CA) と JMP Version 3.2 software (SAS Institute Inc., Cary, NC) で行った。P<0.05 にて有意差ありとした。

2 結果

患者背景は、動脈硬化あり群となし群には有意差を認めなかった (表 2)。イントロン 4 遺伝子多型と T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型の出現頻度を表 3 に示したが、いずれの遺伝子多型も Hardy-Weinberg の法則に従っ

表 2 患者背景

	動脈硬化		
	あり (N=60)	なし (N=48)	P value
年齢 (歳)	56.4±7.6	54.3±8.8	0.18
男性/女性	32/28	17/31	0.06
透析期間 (月)	133.5±95.1	108±80.1	0.14
高血圧 (%)	51.7	39.6	0.21
喫煙 (%)	33.3	23.1	0.23
総コレステロール (mg/dl)	190.2±47.9	193.4±47.3	0.73
HDL-コレステロール (mg/dl)	49.6±15.8	46.7±15.4	0.33
中性脂肪 (mg/dl)	131.9±76.6	136.8±73.2	0.74
副甲状腺機能亢進症 (%)	30.0	20.8	0.28
IMT (mm)	1.16±0.48	0.64±0.06	

表 3 イントロン 4 遺伝子多型と T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型の出現頻度

	T ⁻⁷⁸⁶ →C 遺伝子多型		
	C/C	T/C	T/T
イントロン 4 遺伝子多型			
a/a	1	0	0
b/a	0	24	1
b/b	0	0	82

数字は患者数を示す

表 4 イントロン 4 遺伝子多型による動脈硬化進展リスクの検討

	動脈硬化		オッズ比 (95% 信頼区間)
	あり (N=60)	なし (N=48)	
a/a+b/a	17 (28.3%)	9 (18.7%)	2.92 (1.03-9.09)
b/b	43 (71.7%)	39 (81.3%)	1

年齢, 性別, 透析期間, 高血圧, 喫煙, 脂質代謝異常, 副甲状腺機能亢進症を補正した

表 5 T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型による動脈硬化進展リスクの検討

	動脈硬化		オッズ比 (95% 信頼区間)
	あり (N=60)	なし (N=48)	
C/C+T/C	17 (28.3%)	8 (16.7%)	3.05 (1.08-9.44)
T/T	43 (71.7%)	40 (83.3%)	1

年齢, 性別, 透析期間, 高血圧, 喫煙, 脂質代謝異常, 副甲状腺機能亢進症を補正した

ていた。イントロン 4 遺伝子多型と T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型の連鎖解析を行った結果, a/a の 1 名は C/C を, b/a の 25 名のうち 1 名は T/T を, 24 名は T/C を有し, b/b の 82 名はすべて T/T を有していた。以上より, イントロン 4 遺伝子多型と T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型には強い連鎖不平衡を認めた。イントロン 4 遺伝子多型の a アレルを有する頻度の割合は動脈硬化あり

群で 28.3% に対し, なし群で 18.7% であり, 動脈硬化あり群で有意に高く (表 4), 動脈硬化進展のリスクは a アレルを有さない患者を 1 とすれば a アレルを有する患者は 2.92 倍となった。また, T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型の C アレルを有する頻度の割合は動脈硬化あり群で 28.3% に対し, なし群で 16.7% であり, 動脈硬化あり群で有意に高く (表 5), 動脈硬化進展のリスクは C アレルを有さない患者を 1 とすれば C アレルを有する患者は 3.05 倍まで高くなった。

3 考察

今回の成績より, イントロン 4 遺伝子多型と T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型は糖尿病でない透析患者の動脈硬化進展に関連することが示された。また, イントロン 4 遺伝子多型と T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型には強い連鎖不平衡を認めた。

血管内皮機能障害による NO 合成経路の障害は動脈硬化進展への一つのイベントと考えられている¹²⁾。これまでにイントロン 4 遺伝子多型は白人の喫煙者において冠動脈疾患の発症に関与しているとの報告⁵⁾や, 日本人において本態性高血圧の発症¹³⁾, 腎障害進展に関与している¹⁰⁾との報告がある。しかしながら, 本来イントロンの多型は機能を発現しない領域での変化であり, 機能になんらかの影響を与える可能性を有するエクソンやプロモーター領域の多型がより重要と考えられている。プロモーター領域の T⁻⁷⁸⁶→C 遺伝子多型は NO 産生量と関連しており, 実際 C アレルは eNOS 遺伝子の転写活性低下と関連することが示されており⁴⁾, より重要な候補遺伝子多型と考える。

今回, 動脈硬化進展のリスクは a アレルを有さな

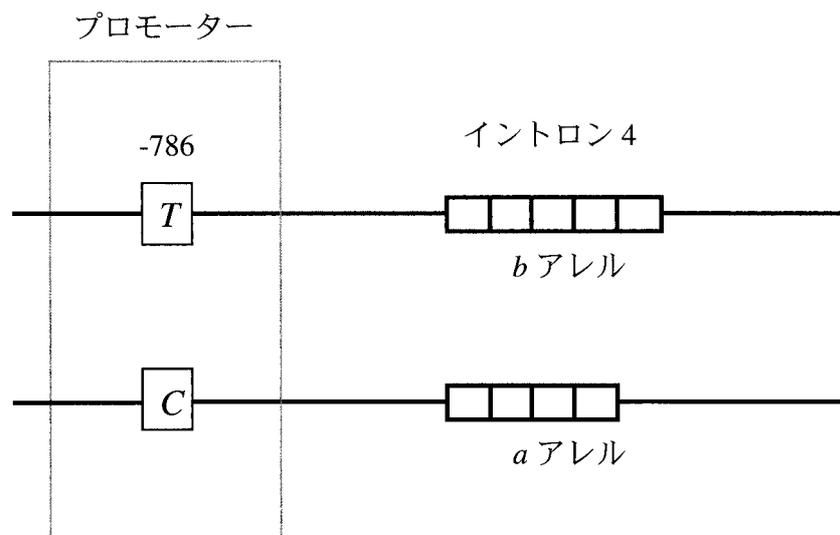


図2 イントロン4 遺伝子多型と $T^{-786} \rightarrow C$ 遺伝子多型の関係

い患者を1とすれば *a* アレルを有する患者は2.92倍となり、また、*C* アレルを有さない患者を1とすれば *C* アレルを有する患者は3.05倍まで高くなった。このことは日本人において、イントロン4 遺伝子多型および $T^{-786} \rightarrow C$ 遺伝子多型は糖尿病ではない透析患者の動脈硬化進展に関連していることを示している。また、イントロン4 遺伝子多型と $T^{-786} \rightarrow C$ 遺伝子多型には強い連鎖不平衡を認め、イントロン4 遺伝子多型の *a* アレルと $T^{-786} \rightarrow C$ 遺伝子多型の *C* アレルはほとんどカップリングしており、イントロン4 遺伝子多型は転写活性に影響を与える $T^{-786} \rightarrow C$ 遺伝子多型と連鎖するマーカーとして考えられる (図2)。これまでに、日本人の健常者と冠動脈攣縮を起こす患者においてイントロン4 遺伝子多型と $T^{-786} \rightarrow C$ 遺伝子多型には強い連鎖不平衡を認めるとの報告¹⁴⁾があるが、スペイン人においてはイントロン4 遺伝子多型と $T^{-786} \rightarrow C$ 遺伝子多型には連鎖不平衡を認めないとの報告¹⁵⁾が最近あり、人種差があることがうかがえる。今後、種々な人種においてeNOS 遺伝子多型性と透析患者の動脈硬化進展との関係について検討が進むことが望まれる。

結 語

日本人において、イントロン4 遺伝子多型および $T^{-786} \rightarrow C$ 遺伝子多型は糖尿病ではない透析患者の動脈硬化進展に関連していることが示され、動脈硬化進展の予測マーカーとなりうる可能性があると考えられる。

本研究は平成13年度日本透析医会の研究助成金によってなされた。

文 献

- 1) Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al: Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, 377; 239, 1995.
- 2) Baylis C, Mitruka B, Deng A: Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*, 90; 278, 1992.
- 3) Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, et al: Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 268; 17478, 1993.
- 4) Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, et al: $T^{-786} \rightarrow C$ mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, 99; 2864, 1999.
- 5) Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, et al: A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*, 2; 41, 1996.
- 6) Olmer M, Renucci JE, Planells R, et al: Preliminary evidence for a role of apolipoprotein E alleles in identifying haemodialysis patients at high vascular risk. *Nephrol Dial Transplant*, 12; 691, 1997.
- 7) Salem MM, Bowew J: Hypertension in the hemodialysis population: Any relation to one-year survival?. *Am J Kidney Dis*, 28; 737, 1996.
- 8) Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al: Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*, 99; 1141, 1999.

- 9) Kawagishi T, Nishizawa Y, Konishi T, et al: High-resolution B-mode ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia. *Kidney Int*, 48; 820, 1995.
- 10) Asakimori Y, Yorioka N, Yamamoto I, et al: Endothelial nitric oxide synthase intron 4 polymorphism influences the progression of renal disease. *Nephron*, 89; 219, 2001.
- 11) Asakimori Y, Yorioka N, Taniguchi Y, et al: T⁻⁷⁸⁶→C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene influences the progression of renal disease. *Nephron* (in press).
- 12) Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, et al: Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 75; 71B, 1995.
- 13) Uwabo J, Soma M, Nakayama T, et al: Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *Am J Hypertens*, 11; 125, 1998.
- 14) Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, et al: Genetic risk factors for coronary artery spasm: Significance of endothelial nitric oxide synthase gene T⁻⁷⁸⁶→C and missense Glu298Asp variants. *J Investig Med*, 48; 367, 2000.
- 15) Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, et al: Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. *Nitric Oxide*, 5; 343, 2001.