慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	2型糖尿病の腎症進展・増悪に関する遺伝学的研究： NADPHオキシダーゼ遺伝子およびRAGE遺伝子多型の関与
Sub Title	
Author	入江, 聖子(Irie, Seiko) 猿田, 享男(Saruta, Takao)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.1 (2005. 3) ,p.T28- T38
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050301-0027

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・82(1)：T29～T38，2005

学位論文

2型糖尿病の腎症進展・増悪に関する遺伝学的研究
－NADPHオキシダーゼ遺伝子およびRAGE遺伝子多型の関与－

慶應義塾大学医学部内科学教室
（指導：猿田享男教授）
入江聖子

（平成16年8月27日受付）

Key Words：type 2 diabetes mellitus, diabetic nephropathy, oxidative stress, gene polymorphism

糖尿病性腎症は糖代謝異常により発症・進展し，慢性の経過をたどる腎合併症である．臨床的にはアルブミン尿で発症し，徐々に顕性蛋白尿に進展し，腎不全にいたる経過を示すことが多い[1]．糖尿病性腎症は末期腎不全の主たる原因とされており，現在わが国の新規透析導入患者の原因疾患の第一位を占め，なお増加傾向を示している．糖尿病性腎症の発症・進展には網膜症，神経障害と同様長期的な血糖コントロールの不良が主要な原因となっていることは議論のないところであり[1]，加えて高血圧，高脂血症，蛋白過剰摂取などの関連も指摘されている[2]．また，家族内集積が認められること[3]，人種により罹患率に差があること[4]，腎症の発症が一部の患者に限られていること[5]などから遺伝因子もその一因であると推測されている．現在のところ，糖尿病性腎症に影響を与える遺伝子群について明らかなものはないが，候補遺伝子として糖代謝，脂質代謝，血圧調節，糸球体構成成分に関与する遺伝子[6]などに加え，superoxide dismutase 2[7]，paraoxonase2[8]などの酸化ストレスに関与している遺伝子と糖尿病性腎症の関連も報告されている．

酸化ストレスとは，生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ前者に傾いた状態と定義され，近年，酸化ストレスの亢進が糖尿病患者の細小血管障害や大血管障害の発症・進展に強く関わっていることが明らかになってきている[9]．高血糖状態においては，ポリオール代謝の活性化[10]，終末糖化産物（advanced glycation end-product：以下AGEと略す）の形成およびAGE受容体（receptor for AGE：以下RAGEと略す）の関与[11]，ミトコンドリア伝達系の関与[12]，そしてプロテインキナーゼCの活性化とそれに伴うnicotinamide adenine dinucleotide phospate（以下NADPHと略す）オキシダーゼの活性化による活性酸素産生[13]が酸化ストレス亢進の原因として注目されている．

NADPHオキシダーゼは好中球やマクロファージなどの貪食細胞，血管平滑筋細胞，腎メサンギウム細胞などにおいてスーパーオキシドを産生している膜型酵素である[14]．NADPHオキシダーゼは貪食細胞型を中心に研究が進んでおり，免疫機構に重要な役割を果たす酵素と考えられているが，酵素活性を担う細胞膜貫通型蛋白チトクロームb558を構成するgp91phox，p22phox，および細胞質分画に存在するp47phox，p67phox，p40phoxおよびsmall G protein racから構成され，そのうちp22phoxの遺伝的欠損は慢性肉芽腫症の原因であることが知られている[15]．またこのp22phoxは貪食細胞系，血管細胞系に共通したコンポーネントであることも明らかにされている[16]．近年，NADPHオキシダーゼp22phox C242T遺伝子多型が冠動脈疾患の頻度[17]とその患者における血管壁におけるスーパーオキシドの産生[18]に関連していると報告され，本多型の血管障害における重要性が注目されるようになった．さらに糖尿病性腎症に関してEtohらにより，糖尿病ラットにおいて腎メサンギウム細胞にp22phoxの発現が強く認められることが報告された[19]．

一方，AGEは糖尿病性網膜症，腎症の進展・増悪における一因となることが推測されている．AGEの組織障害機序としては，非酵素的なグリケーションや蛋白の架橋形成による直接の細胞外マトリックス構造変化に伴う組織障害メカニズムに加え，AGEを特異的リガンド

とするAGE特異的細胞表面受容体によって仲介される細胞応答の機序が考えられている[20]．AGE特異的細胞表面受容体には，RAGEをはじめ60kDa蛋白oligosaccharyltransferase (OST-48)[21]，90kDa蛋白80K-H[21]，32kDa蛋白ガレクチン3[22]，スカベンジャー受容体ファミリークラスA[23]，クラスB[24]などが知られている．RAGEは血管内皮細胞，平滑筋細胞，腎メサンギウム細胞などに発現が認められ[25]，生理的条件下ではその発現は低いが，AGE蓄積部位ではRAGEの発現増強が認められ糖尿病状態で発現が増強されることが知られており[26]，そのAGE-RAGE系シグナルが糖尿病性細小血管障害に関与していると考えられている[27]．RAGE遺伝子に関して多くの遺伝子多型の報告[28~32]があるが，イントロンに位置するG1704T遺伝子多型は糖尿病患者の細小血管性皮膚炎，抗酸化状態と関連していることが報告されている[31, 32]．さらに近年，AGE刺激によるRAGEの活性酸素産生はNADPHオキシダーゼを介していることが示唆されている[33]．

そこで本研究[34]では，日本人2型糖尿病患者を対象とし，糖尿病性腎症におけるNADPHオキシダーゼp22phox遺伝子C242T多型とRAGE遺伝子G1704T多型の臨床的意義について検討した．

対象と方法

1990年より埼玉社会保険病院にて定期的に外来で経過観察されており，世界保健機構（WHO）の基準[35]により診断された2型糖尿病患者691名を対象とした．このうち以下に示す基準を満たす181名を対象患者として登録し，糖尿病性腎症のない正常群108名（グループN）と，糖尿病性腎症の発症進展を認めた進行群73名（グループD）の2群に分類した．グループNは以下の定義，すなわち，1）2型糖尿病と診断されて10年以上経過しており，2）経過観察期間を通して正常アルブミン尿である患者，を満たすものとした．一方，グループDは以下の定義，すなわち，1）経過観察のはじめの段階で正常アルブミン尿（ステージ0）あるいは微量アルブミン尿（ステージ1）の患者，2）経過観察中に，正常アルブミン尿（ステージ0）から微量アルブミン尿（ステージ1）あるいは顕性蛋白尿（ステージ2），あるいは微量アルブミン尿（ステージ1）から顕性蛋白尿（ステージ2）に進行した患者，を満たすものとした．腎症のステージは尿中微量アルブミン値を基に，正常アルブミン尿<20mg/gCrをステージ0，微量アルブミン尿30-300 mg/gCrをステージ1，顕性蛋白尿>300 mg/gCrをステージ2と分類した．微量アルブミン20-30 mg/gCrの糖尿病患者は境界線領域と考え本研究からは除外した．糖尿病以外の腎障害の患者を除外するために，顕微鏡的血尿，臨床的膿尿，尿培養による細菌感染を認めた患者は本研究から除外した．糖尿病性網膜症は，少なくとも1年に1回は眼科医によって診断した．糖尿病性網膜症のステージは単純性，前増殖性，増殖性に分類した．HbA1c値，脂質，血圧，微量アルブミン値は少なくとも1年に1回は測定した．糖尿病発症年齢，糖尿病診断時のBody mass index（以下BMIと略す），糖尿病診断後の罹病期間，HbA1c値，血圧，脂質，糖尿病治療歴などの臨床データは医事記録より得た．インフォームドコンセントは本研究の目的，性質，すべての手順での危険性を説明した上で本研究への同意を得た患者より得た．本研究のプロトコールは埼玉社会保険病院の倫理委員会により承認された．

検体収集とp22phox多型とRAGE多型の解析

DNAは181名の患者の末梢血白血球より抽出・精製した[36]．NADPHオキシダーゼp22phox遺伝子C242T遺伝子変異はエクソン4に存在しており，

Taqman polymerase chain reaction（以下PCRと略す）法[37]により同定した．Forwardプライマーは5'-TTC CTC CCT CCC CCA GG-3'，reverseプライマーは5'-CCT GGT AAA GGG CCC GAA-3'を使用し，またT-アレル特異的プローブは，5'-Vic-ACA GAA G<u>T</u>A CAT GAC CG-3'；C-アレル特異的プローブは，5'-Fam-AGA AG<u>C</u> ACA TGA CCG-3'を使用した．RAGE遺伝子G1704T遺伝子変異はイントロン7に存在しており，同じくTaqmanPCR法により同定した．Forwardプライマーは5'-AGG ATG TGA GTG ACC TGG AGA GA-3'，reverseプライマーは5'-TCA GCT CCT AGC CTG CCT TTC-3'を使用し，またT-アレル特異的プローブは5'-Vic-CCA TAA CTA <u>T</u>CA ACA GGG-3；G-アレル特異的プローブは5'-Fam-CAT AAC TA<u>G</u> CAA CAG GG-3'を使用した．反応組成はUniversal Master Mix（Applied Bio System；USA）12.5 μl，プライマー各22.5pmol，プローブ各5 μmolとし，蒸留水を加えて全量で25 μlとして反応させた．PCRはABI Prism 7700を用いて50℃2分1サイクル，95℃15分1サイクルの後，95℃15秒，58℃1分（p22phox）/60℃1分（RAGE）を40サイクルで行った．

統計学的解析

本研究のサンプルサイズはパイロット研究をもとに確立した．p22phox に関しては，パイロット研究では CT＋TT の患者の頻度はグループ D で 0.10 であるのに対し，グループ N は 0.28 であった．この値より 2 群間の比較において 80%の検出力で有意な結果を得るために必要なサンプルサイズは 59 であった．また RAGE に関しては，パイロット研究では GT＋TT の患者の頻度はグループ D で 0.30 であるのに対し，グループ N は 0.13 であった．この値より 2 群間の比較において 80%の検出力で有意な結果を得るために必要なサンプルサイズは 72 であった．

すべてのデータは平均値±標準偏差として示した．平均値の統計学的有意差は Student t 検定あるいは Mann-Whitney U 検定を使用した．各群におけるアレルまたは遺伝子多型の頻度の比較には x^2 検定を使用した．ロジスティック多重回帰分析はオッズ比の計算および遺伝子多型をその他の危険因子の関連性の評価に用いた．すべての統計学的解析には Statview ソフトウェア（Ver5.0J，SAS インスティチュート社，米国カリフォルニア州）を使用した．

第 1 表　各群の臨床的特徴

	Group N (n＝108)	Group D (n＝73)	p
Sex (M/F) (n)	52/56	39/34	NS
Onset age (years)	44.3±7.2	45.2±8.2	NS*
Disease duration (years)	18.4±5.4	18.5±5.5	NS*
BMI at onset (Kg/m^2)	23.4±3.7	24.0±3.2	NS
HbA1c (%)	7.3±1.1	8.0±1.2	0.0002
Total cholesterol (mmol/l)	5.11±0.73	5.15±0.78	NS
Triglyceride (mmol/l)	1.25±0.73	1.53±0.97	0.0137*
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.08±0.71	3.06±0.74	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	134.0±15.2	149.6±18.0	<0.0001
Diastolic blood pressure (mmHg)	81.2±8.8	86.2±9.5	0.0004
Retinopathy (%)	43	67	0.0014
Medication (diet/OHA/insulin) (n)	43/36/29	9/29/34	0.0002

表の数値は平均値±標準偏差を示す．* Mann-Whitney U test で検討した．OHA：経口血糖降下薬
(Matsunaga-Irie et al：Diabetes Care 27：303-307, 2004 Table 1 を許可を得て転載)

第 2 表　p22phox C242T と RAGE G1704T 遺伝子多型の頻度

		Group N	Group D	x^2	p
p22phox242	CC	85 (79%)	66 (90%)		
	CT＋TT	23 (21%)	7 (10%)	4.318	0.0427
RAGE1704	GG	94 (87%)	54 (74%)		
	GT＋TT	14 (13%)	19 (26%)	4.987	0.0313

(Matsunaga-Irie et al：Diabetes Care 27：303-307, 2004 Table 2 を許可を得て転載)

第3表　糖尿病性腎症危険因子のロジスティック多重回帰分析

Variables	OR (95% CI)	p
HbA1c (%)	1.50 (1.10-2.03)	0.0089
Triglyceride (mmol/l)	1.01 (1.00-1.01)	0.041
Systolic blood pressure (mmHg)	1.06 (1.04-1.09)	<0.0001
Retinopathy	1.87 (0.89-3.91)	0.0976
p22phox CC	2.45 (0.85-7.12)	0.0991
HbA1c (%)	1.54 (1.13-2.10)	0.0069
Triglyceride (mmol/l)	1.01 (1.00-1.01)	0.0639
Systolic blood pressure (mmHg)	1.06 (1.04-1.09)	<0.0001
Retinopathy	1.85 (0.88-3.91)	0.1049
RAGE GT+TT	2.47 (0.99-6.17)	0.0522

独立変数：発症年齢，罹病期間，診断時BMI，HbA1c，総コレステロール　中性脂肪，収縮期血圧，網膜症の有無，p22phoxおよびRAGE遺伝子多型，網膜症；無＝0，有＝1，p22phox遺伝子多型；CT+TT=0, CC=1　RAGE遺伝子多型 GG=0, GT+TT=1

第4表　各群におけるp22phox C242TとRAGE G1704T遺伝子多型の組み合わせの頻度

p22phox and RAGE	Group N	Group D	χ^2	p
CT+TT and GG	18 (17%)	54 (5%)		
CT+TT and GT+TT/CC and GG	81 (75%)	53 (73%)		
CC and GT+TT	9 (8%)	16 (22%)	10.338	0.0057

(Matsunaga-Irie et al：Diabetes Care 27：303-307, 2004 Table 3を許可を得て転載)

第5表　糖尿病性腎症危険因子のロジスティック多重回帰分析

Variables	OR (95% CI)	p
HbA1c (%)	1.54 (1.13-2.10)	0.0034
Triglyceride (mmol/l)	1.01 (1.00-1.01)	0.0388
Systolic blood pressure (mmHg)	1.06 (1.03-1.09)	<0.0001
Retinopathy	1.78 (0.83-3.80)	0.067
p22phox CC and RAGE GT+TT	2.93 (1.34-6.41)	0.0073

独立変数：発症年齢，罹病期間，診断時BMI，HbA1c，総コレステロール，中性脂肪　網膜症の有無，p22phox and RAGE遺伝子多型，収縮期血圧　R^2（決定係数）=0.267，p<0.0001　網膜症の有無；無=0，有=1　p22phoxとRAGE遺伝子多型：CT+TT and GG=0, CT+TT and GT+TT/CC and GG=1, CC and GT+TT=2.

(Matsunaga-Irie et al：Diabetes Care 27：303-307, 2004 Table 4を許可を得て転載)

結　果

第1表に登録した患者の臨床的特徴を示した．HbA1c値，脂質，血圧，糖尿病治療歴，網膜症の有無を含む臨床データは2001年に測定したものを使用した．糖尿病発症年齢，糖尿病診断後の罹病期間，糖尿病診断時のBMI，総コレステロールおよびLDLコレステロールに関しては2群間で有意な差は認めなかったが，血圧，HbA1c値，中性脂肪値，網膜症を有する患者の割合，糖尿病治療群の割合はグループDにおいてグループNよりも有意に高値を示した．

各群におけるこれらの遺伝子多型の分布を第2表に示した．多型の頻度は両群においてHardy-Weinbergの法則に合致していた．p22phoxのCC，CT，TTのゲノタイプの割合は，グループNにおいて79%，20%，1%であり，グループDにおいて90%，8%，2%であった．Cアレル，Tアレルの頻度はグループDで95%と5%であるのに対し，グループNでは89%と11%であった．TTゲノタイプの頻度は少なかったため，登録患者をCC群とCT+TT群の2群に分けることとした．CT+TTの頻度はグループNにおいてグループDより有意に高値を示した（第2表；$x^2=4.318$，$p=0.0427$，2×2）．加えて，糖尿病発症年齢，糖尿病診断後の罹病期間，糖尿病診断時のBMI，HbA1c値，総コレステロール値，中性脂肪値，血圧，網膜症の有無，p22phox遺伝子多型を独立変数としてロジスティック多重回帰分析を行ったところ，HbA1c値，収縮期血圧値，中性脂肪値は糖尿病性腎症の発症，進展に関する独立した危険因子であることが示されたが，p22phox CCは独立した危険因子とは認められなかった（第3表）．RAGEのGG，GT，TTのゲノタイプの割合はグループNにおいて87%，12%，1%であり，グループDにおいて74%，23%，3%であった．Gアレル，Tアレルの頻度はグループDで87%と13%であるのに対し，グループNでは93%と7%であった．TTゲノタイプの頻度は少なかったため，登録患者をGG群とGT+TT群の2群に分けることとした．GT+TTの頻度はグループDにおいてグループNより有意に高値を示した（第2表；$x^2=4.987$，$p=0.0313$，2×2）．加えて，前述の項目およびRAGE遺伝子多型を独立変数としてロジスティック多重回帰分析を行ったところ，HbA1c値，収縮期血圧値が糖尿病性腎症の発症，進展に関する独立した危険因子であることが示されたが，RAGE GT+TTは独立した危険因子とは認められなかった（第3表）．

次にこれらの遺伝子多型の組み合わせと糖尿病性腎症との関連性について解析を行った．第2表の結果に基づきこれらのゲノタイプの組み合わせを糖尿病性腎症の進展を予測する危険因子として，高リスク群（p22phox CCとRAGE GT+TT），中リスク群（p22phox CCとRAGE GG，p22phox CT+TTとRAGE GT+TT），低リスク群（p22phox CT+TTとRAGE GG）の3群に分類した．グループDにおけるp22phox CCとRAGE GT+TT（高リスク群）の割合はグループNに比して有意に高値を示した（$x^2=10.338$，$p=0.0057$，2×3）（第4表）．加えてロジスティック多重回帰分析を行ったところHbA1c値，中性脂肪値，収縮期血圧値に加え，p22phox CCとRAGE GT+TTの組み合わせも独立した危険因子であることが認められた（$p=0.0073$）（第5表）．これらの解析によりこの遺伝子多型の組み合わせは糖尿病性腎症の発症進展における重要な危険因子であることが示された．

考　案

糖尿病性腎症は糖尿病患者の死因の10～15%を占め，糖尿病慢性合併症の中でも予後を規定する重要な疾患の一つである．その成因には遺伝素因の関与が想定され，さまざまな候補遺伝子が検討されている[6]．糖尿病性腎症の発症・進展には血糖コントロール，血圧コントロールとは独立して個人差があることをふまえ，著者もその一因として遺伝的素因があると予測し遺伝子多型を検討することとした．

糖尿病性腎症は臨床的にアルブミン尿で発症し，徐々に進行して腎不全にいたる経過を示すことが多い．2型糖尿病においては，アルブミン尿を発症した患者の20～40%が5～10年の経過で顕性蛋白尿に進展するものの，その後20年の間に末期腎不全にいたる患者は20%程度であると報告されている[2]．蛋白尿が糖尿病性腎症に由来するものか，他の腎疾患の偶発合併かを鑑別する必要があり，確定診断を下すためには腎生検が望ましいとされているが，すべての症例に行うことは困難である．そこで診断は，罹病期間，血糖を含めた血液化学検査，尿所見（血尿，膿尿の有無），眼底所見などを参考にして臨床的判断が下されることが多い．糖尿病性網膜症は通常糖尿病性腎症に先行して生じるとされ，糖尿病性腎症の診断の上で重要であるとされているが，網膜症を欠く2型糖尿病患者に腎生検を施行し70%に糖尿病性変化を認めたとの報告もあり[38, 39]完全とはいえない．そこで本研究では網膜症の有無を必須条件とはせず，臨

床経過から糖尿病性腎症と考えられる症例を選択するため，10年間以上のアルブミン尿の経過を追った．その中で微量アルブミン尿の漸増が認められ，糖尿病性腎症の経過と考えられた患者を進行群（グループD）とした．そして正常群（グループN）と進行群を臨床的に比較したところ，糖尿病性腎症の原因と考えられている血圧，中性脂肪値，HbA1c値が進行群で有意に高く，このことはこの2群の分類の正当性を裏付けるものと考えられた．

そこで，この2群において遺伝子多型の検討をすることとし，その中でも近年糖尿病性腎症との関与が注目されている酸化ストレスに関連したNADPHオキシダーゼおよびRAGEについて検討した．

NADPHオキシダーゼは近年，血管壁における酸化ストレス亢進に重要な役割を果たしていると考えられている膜型酵素であり，Guzikらは糖尿病患者におけるヒト血管壁でのスーパーオキシドの産生はPKCを介したNADPHオキシダーゼ活性によると報告した[18, 40]．そのp22phoxのC242T多型はヘム結合部位に位置しており，72番目のヒスチジン残基をチロシンに変化させるアミノ酸変異である[41]．ヒスチジン残基はチトクロームbのヘム補欠分子群のリガンドの候補と考えられており[41]，この遺伝子多型は直接的にp22phoxの機能，NADPHオキシダーゼの酵素活性と関連していると推測されている[42]．Inoueらは日本人における心血管疾患のリスクは242Tアレルを有している方が低いと報告している[17]が，他の研究者たちは心血管疾患，脳血管疾患においてさまざまな見解を示している[43~48]．また，Guzikらは動脈硬化の患者の大伏在静脈を用いてTアレルを有する患者がNADPH誘導性の血管スーパーオキシド産生が有意に低下していることを報告している[18]．このことは，本多型が血管壁において機能的な役割を果たしていることを証明するものであり，242Tアレルを有する患者は242Cアレルを有する患者に比しスーパーオキシド産生が低下している結果として血管障害が軽減しているのではないかと考えられている．またNakanoらは糖尿病患者においてCT+TTを有する群がCCを有する群に比し有意に酸化HDLの産生が低いことを報告している[49]．本研究では242Tを有している患者が糖尿病性腎症の進展のリスクが低いことを示したが，この結果はNADPHオキシダーゼの機能に関する現在までの報告や1型糖尿病患者における腎症と本多型との関連性との報告とも一致している[50]．更に，今回我々は本多型の生体における酸化ストレスに対する影響を検討するため，対象者のうち129名（正常群79名，進行群50名）の早朝随時尿の尿中8-Hydroxydeoxy-Guanosineの測定を行ったが，2群間で有意な差が認められなかった．この原因としては，24時間尿ではなく随時尿での検討であったこと，既に一部の患者は抗酸化作用を有していると考えられている薬剤を服用していたことなどが影響していたと考えられるが，今後本多型の機能，酵素活性などについて更なる検討を要すると考えられた．なお，本研究でのコントロール群のTアレルの頻度は0.11であったが，この値は日本人の以前の報告と近似していた[17, 45, 48]．

AGEは，持続的な高血糖により生体内で形成される物質であり，糖尿病血管障害の発生に関わる可能性が示唆されている．AGEが糖尿病性腎症の病態生理に役割を果たしていることが明らかになってきており，AGE形成阻害薬のアミノグアニジンやOPB-9195といった薬剤が糖尿病性腎症の予防に効果的であることが報告されている[51, 52]．AGEが糖尿病合併症の発症進展に関わるメカニズムの一つとしてRAGEをはじめとしたAGEを特異的リガンドとするいくつかの細胞表面受容体に結合することにより細胞応答を引き起こすことが考えられている[20]．Yamamotoらにより，血管内皮細胞にRAGEを過剰発現させたトランスジェニックマウスとインスリン依存性糖尿病発症トランスジェニックマウスを交配させたダブルトランスジェニックマウスでは同程度の血糖コントロールにも関わらず糖尿病性腎症の有意な進行を認めたことが報告された[53]．このことは，AGE-RAGE系が糖尿病性腎症の発症進展に機能的に関与していることを示している．メサンギウム細胞や壁細胞におけるAGE-RAGE系の相互関係は酸化ラジカルの生成に影響し，続くNF－κBの活性化や催炎症性サイトカイン，接着分子の放出を促し，メサンギウム細胞のコラーゲン遺伝子の発現へと導くとされている[54]．RAGEにはいくつかの多型が報告されているが，G1704T遺伝子多型は糖尿病患者の細小血管性皮膚炎，抗酸化状態と関連していることが報告されている[31, 32]．RAGE 1704Tアレルを有している患者は1704Gアレルを有している患者に比しいくつかの抗酸化物質（トータルカロチン，ルテイン，リコピン，トコフェロール）の血清レベルが有意に低く，このことは，本遺伝子多型が酸化ストレス制御と関与していることを示しており，1704Tアレルを有している患者が糖尿病性腎症の発症進展のハイリスク群であるという本研究の結果を支持するものである．イントロン部位の機能的な役割は明らかではないが，オルタナティブスプライシングやmessenger RNA安定性の変化，近接のコーディングsingle

nucleotide polymorphism（SNP）とのリンケージなどのメカニズムに影響する可能性が考えられる．

本研究では，生体での両者の役割を考え，糖尿病性腎症の感受性と p22phox C242T，RAGE G1704T 遺伝子多型の組み合わせの関連性も検討した．p22phox CC と RAGE GT＋TT ゲノタイプの組み合わせを有する患者は p22phox CT＋TT と RAGE GG ゲノタイプの組み合わせを有する患者よりも有意に糖尿病性腎症の危険性が高いことを示した．本研究では p22phox 遺伝子多型単独では糖尿病性腎症の感受性との関連性は弱い（p＝0.991）が p22phox と RAGE の遺伝子多型を組み合わせることによってより有意な糖尿病性腎症との関連性が示された．NADPH オキシダーゼと RAGE はともにメサンギウム細胞に発現していることが知られており，近年 AGE が RAGE に結合した後，NADPH オキシダーゼを活性化し活性酸素を産生し，p21[ras]，erk1/2MAPK，NF-κB などのシグナルを活性化するという機序が報告されている[33]．本研究は，こうした NADPH オキシダーゼと RAGE の関連性の報告を支持するものと考えられる．

結論として，NADPH オキシダーゼ p22phox C242T と RAGE G1704T 遺伝子多型の組み合わせは糖尿病性腎症の発症・進展と関係していることを提唱した．微量アルブミンが糖尿病性腎症の最もよい予知因子であることは明らかである[55]．しかしながら本研究のような遺伝子多型に基づくリスクアセスメントも重要であると提唱する．糖尿病性腎症の候補遺伝子として数多くの報告がなされているがいずれも決定的なものではなく，複数の遺伝子による複合的な関与が考えられる．こうした遺伝子多型から糖尿病性腎症の発症進展の危険性を予知し，腎症予防により有効な治療を必要とする患者を同定するため，今後本研究をもとに更なる研究を行う必要があると考えられた．

総　括

酸化ストレスと糖尿病性腎症の関連性に注目し，NADPH オキシダーゼ p22phox 遺伝子，RAGE 遺伝子 G1704T 多型と糖尿病性腎症の発症・進展の関連性に関して日本人 2 型糖尿病患者 181 名を対象として検討し，以下の結論を得た．

1．NADPH オキシダーゼ p22phox 遺伝子 C242T 多型において C アレルを有している患者が糖尿病性腎症の発症・進展のリスクが有意に高いことが示された．

2．RAGE 遺伝子 G1704T 遺伝子多型において T アレルを有している患者が糖尿病性腎症の発症・進展のリスクが有意に高いことが示された．

3．両遺伝子多型の組み合わせで検討したところ，p22phox CC と RAGE GT＋TT ゲノタイプの組み合わせを有する患者は p22phox CT＋TT と RAGE GG ゲノタイプの組み合わせを有する患者よりも有意に糖尿病性腎症の危険性が高いことが示された．またロジスティック多重回帰分析を行ったところ HbA1c 値，中性脂肪値，収縮期血圧値と並びこの遺伝子多型の組み合わせも独立した危険因子であることが認められた．

本稿を終えるにあたり，ご指導，ご高閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究に関してご指導，ご高閲を頂きました埼玉社会保険病院内科丸山太郎先生に深謝いたします．ご協力いただきました研究室の諸先生方に感謝いたします．

本論文は，Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, Motohashi Y, Hirose H, Shimada A, Murata M, Saruta T：Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. Diabetes Care 27：303-307, 2004 の一部を含む．

文　献

1) Krolewski AS, Warram JH：Natural history of diabetic nephropathy. Diabetes Reviews 3：446-459, 1995
2) American Diabetes Association：Diabetic Nephropathy. Diabetes Care 25 Suppl 1：S85-89, 2000
3) Seaquist ER, Goetz FC, 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
4) Teutsch S, Newman J, Eggers P：The problem of diabetic renal failure in the United States：an overview. Am J Kidney Dis 13：11-13, 1989
5) Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR ：UKPDS GROUP：Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes：the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). Kidney Int 63：225-232, 2003
6) Chowdhury TA, Dyer PH, Kumar S, Barnett AH, Bain SC：Genetic determinants of diabetic nephropathy. Clin Sci (Lond) 96：221-230, 1999
7) Nomiyama T, Tanaka Y, Piao L, Nagasaka K, Sakai K, Ogihara T, Nakajima K, Watada H, Kawamori R：The polymorphism of manganese superoxide dismu-

tase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. J Hum Genet 48 : 138-141, 2003

8) Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, Temler E, Gaillard RC, Ruiz J : Paraoxonase2 polymorphisms are associated with nephropathy in Type II diabetes. Diabetologia 44 : 104-107, 2001

9) Baynes JW, Thorpe SR : Role of oxidative stress in diabetic complications : a new perspective on an old paradigm. Diabetes 48 : 1-9, 1999

10) Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK : Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. J Am Soc Nephrol 14 : S233-236, 2003

11) Sakurai S, Yonekura H, Yamamoto Y, Watanabe T, Tanaka N, Li H, Rahman AK, Myint KM, Kim CH, Yamamoto H : The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 14 : S259-263, 2003

12) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M : Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 404 : 787-790, 2000

13) Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H : High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes 49 : 1939-1945, 2000

14) Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M : NAD(P)H oxidase : role in cardiovascular biology and disease. Circ Res 86 : 494-501, 2000

15) Babior BM : NADPH oxidase. Curr Opin Immunol 16 : 42-47, 2004

16) Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griedling KK : p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. 271 : 23317-23321, 1996

17) Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M : Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. Circulation 97 : 135-137, 1998

18) Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM : Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. Circulation 102 : 1744-1747, 2000

19) Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H, Nawata H : Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibity by interventive insulin treatment. Diabetologia 46 : 1428-1437, 2003

20) Wendt T, Tanji N, Guo J, Hudson BI, Bierhaus A, Ramasamy R, Arnold B, Nawroth PP, Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM : Glucose, glycation, and RAGE : implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 14 : 1383-1395, 2003

21) Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H : Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors : relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 93 : 11047-11052, 1996

22) Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, Cerami A : Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE) : a new member of the AGE-receptor complex. Mol Med 1 : 634-646, 1995

23) Horiuchi S, Higashi T, Ikeda K, Saishoji T, Jinnouchi Y, Sano H, Shibayama R, Sakamoto T, Araki N : Advanced glycation end products and their recognition by macrophage and macrophage-derived cells. Diabetes 45 : S73-76, 1996

24) Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H : Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. J Biol Chem 276 : 3195-3202, 2001

25) Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D : RAGE : a novel cellular receptor for advanced glycation end products. Diabetes 45 Supple 3 : S77-80, 1996

26) Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, Abel M, Sido B, Allenberg J, Otto G, Roth H, Bierhaus A : Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. Am J. Pathol 146 : 688-694, 1995

27) Yamamoto Y, Yamagishi S, Yonekura H, Doi T, Tsuji H, Kato I, Takasawa S, Okamoto H, Abedin J, Tanaka N, Sakurai S, Migita H, Unoki H, Wang H, Zenda T, Wu PS, Segawa Y, Higashide T, Kawasaki K, Yamamoto H : Roles of the AGE-RAGE system in vascular injury in diabetes. Ann N Y Acad Sci 902 : 163-170, 2000

28) Pettersson-Fernholm K, Forsblom C, Hudson BI, Perola M, Grant PJ, Groop PH : Finn-Diane Study Group. The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. Diabetes 52 : 891-894, 2003

29) Poirier O, Nicaud V, Vionnet N, Raoux S, Tarnow L, Vlassara H, Parving HH : Cambien Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation

end-product putative receptors. Association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. Diabetes 50 : 1214-1218, 2001

30) Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ : Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. Diabetes 50 : 1505-1511, 2001

31) Kankova K, Zahejsky J, Marova I, Muzik J, Kuhrova V, Blazkova M, Znojil V, Beranek M, Vacha J : Poly morphisms in the RAGE gene influence susceptibility to diabetes-associated microvascular dermatoses in NIDDM. J Diabetes Complications 15 : 185-192, 2001

32) Kankova K, Marova I, Zahejsky J, Muzik J, Stejskalova A, Znojil V, Vacha J : Polymorphisms 1704G/T and 2184A/G in the RAGE gene are associated with antioxidant status. Metabolism 50 : 1152-1160, 2001

33) Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL : Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. Am J Physiol Endocrinol Metab 280 : E6 85-694, 2001

34) Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, Motohashi Y, Hirose H, Shimada A, Murata M, Saruta T : Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. Diabetes Care 27 : 303-307, 2004

35) Alberti KG, Zimmet PZ : Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1 : Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 15 : 539-553, 1998

36) Blin N, Stafford DW : A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryocytes. Nucleic Acids Res 3 : 2303-2308, 1976

37) Whitcombe D, Brownie J, Gillard HL, McKechnie D, Theaker J, Newton CR, Little S : A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons : its application to real-time, single-tube genotyping. Clin Chem 44 : 918-923, 1998

38) Christensen PK, Larsen S, Horn T, Olsen S, Parving HH : Causes of albuminuria in patients with type 2 diabetes without diabetic retinopathy. Kidney Int 58 : 1719-1731, 2000

39) Kanauchi M, Kawano T, Uyama H, Shiiki H, Dohi K : Discordance between retinopathy and nephropathy in type 2 diabetes. Nephron 80 : 171-174, 1998

40) Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM : Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus : role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxidase synthase. Circulation 105 : 1656-1662, 2002

41) Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH : Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. J Clin Invest 86 : 1729-1737, 1990

42) Wolin MS : How could a genetic variant of the p22 phox component of NAD(P)H oxidases contribute to the progression of coronary atherosclerosis? Circ Res 86 : 365-366, 2000

43) Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W : The p22 phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. Atherosclerosis 145 : 315-323, 1999

44) Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, Gotto A, Marian AJ : A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. Circ Res 86 : 391-395, 2000

45) Ito D, Murata M, Watanabe K, Yoshida T, Saito I, Tanahashi N, Fukuuchi Y : C242T polymorphism of NADPH oxidase p22 PHOX gene and ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population. Stroke 31 : 936-939, 2000

46) Stanger O, Renner W, Khoschsorur G, Rigler B, Wascher TC : NADH/NADPH oxidase p22phox C242T polymorphism and lipid peroxidation in coronary artery disease. Clin Physiol 21 : 718-722, 2001

47) Cai H, Duarte N, Wilcken DE, Wang XL : NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population. Eur J Clin Invest 29 : 744-748, 1999

48) Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Sakamoto K, Ohtoshi K, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Hatazaki M, Hazama Y, Hori M : Association of NAD(P)H oxidase p22 phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. Diabetes Care 26 : 458-463, 2003

49) Nakano T, Matsunaga S, Nagata A, Maruyama T : NAD(P)H oxidase p22phox Gene $C^{242}T$ polymorphism and lipoprotein oxidation. Clin Chim Acta 335 : 101-107, 2003

50) Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG : Association of the p22phox component of NAD(P)H oxidase with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. Diabetes Care 26 : 3111-31115, 2003

51) Soulis T, Cooper ME, Vranes D, Bucala R, Jerums G : Effects of aminoguanidine in preventing experimental diabetic nephropathy are related to the duration of treatment. Kidney Int 50 : 627-634, 1996

52) Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, Yasumura K, Fujii W, Yanagisawa K, Kawata T, Koike T : Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is

prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. Diabetes 46 : 895-899, 1997
53) Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, Watanabe T, Yamagishi S, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H : Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. J Clin Invest 108 : 261-268, 2001
54) Heidland A, Sebekova K, Schinzel R : Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. Am J Kidney Dis 38 : S100-106, 2001
55) Parving HH, Chaturvedi N, Viberti G, Mogensen CE : Does microalbuminuria predict diabetic nephropathy? Diabetes Care 25 : 406-407, 2002