川崎病におけるアンギオテンシンⅠ変換酵素遺伝子多型と冠動脈病変合併に関する検討

新潟大学医学部小児科学教室（主任：内山聖教授）
竹 内 菊 博

Study of Angiotensin I Converting Enzyme Polymorphism in Relation to Coronary Artery Aneurysm Formation in Kawasaki Disease

Kikuhiro TAKEUCHI

Department of Pediatrics,
Niigata University School of Medicine
(Director. Prof. Makoto UCHIYAMA)

ACE (angiotensin I couverting enzyme) gene was examined by polymerase chain reaction (PCR) in 36 subjects who had a past history of Kawasaki disease (16 without coronary aneurysm, 20 with coronary aneurysm). A polymorphism in the ACE gene was characterized by three genotypes : two D alleles (genotype DD), two I alleles (genotype Ⅱ), and heterozygotes allele (genotype DI), Genotype Ⅱ was found in 65% of the subjects with aneurysm and 12.5% of those without aneurysm ($p<0.01$, Odds ratio 13.0, 95% confidence intervals). Although the mechanism of aneurysm formation in Kawasaki disease is unknown, the present study showed that the frequency of Ⅱ genotype is significantly higher in subjects with Kawasaki disease and coronary aneurysm than in those without aneurysm. These findings suggest that Ⅱ genotype may contribute to vascular dilatation, contrary to the predisposition of DD genotype to vascular stenosis.

Key words: Kawasaki disease, coronary artery aneurysm, ACE polymorphism
川崎病，冠動脈瘤，ACE 遺伝子多型

はじめに

アンギオテンシンⅠ変換酵素（ACE）は単一の遺伝子によってコードされており，17番染色体 q23 に位置している[8]．近年イントロン16に Alu 様配列の挿入（I），欠失（D）による遺伝子多型の存在が判明した．これにより，ホモ結合体の DD，Ⅱ表現体とヘテロ結合体の DI 表現体の３種類の遺伝子多型が存在する．DD

Reprint requests to: Kikuhiro TAKEUCHI,
Department of Pediatrics, Niigata
University School of Medicine,
Niigata City, 951-8510, JAPAN.

別冊請求先：〒951-8510 新潟市旭町通１番町
新潟大学医学部小児科学教室　竹 内 菊 博

は心筋梗塞[9]，PTCA 後の再狭窄[10]，心肥大[14]，頸動脈壁肥厚[15]，糖尿病における腎症発症のリスク[22]，IgA 腎症増悪因子[17] などの危険因子であることが報告されている．

川崎病は原因不明の急性熱性疾患であり，特に心血管系合併症，冠動脈病変が特徴的である．冠動脈病変は発症後1から2週で汎血管炎をきたし，さらに血圧のストレスにより，動脈瘤へと進展する[1]．かつて約40%の症例に認められた冠動脈瘤はガンマグロブリン大量静注療法の導入により約13%へと減少したが，いまだ巨大冠動脈瘤の残存，さらに心筋梗塞の発症により0.1%の致命率が報告されている[23]．

一方，動物実験による成績で，ACE に感作されたラットの頸動脈壁は約2週間で肥厚することが報告されている[16]．しかし，川崎病における冠動脈瘤形成と ACE 遺伝子多型との関連を検討した報告は内外ともにまだない．したがって，今回，ACE と血管壁肥厚の関連性に注目し，川崎病における冠動脈瘤形成と ACE 遺伝子多型との関連を検討した．

対象および方法

対　　象

診断基準を満たした川崎病既往者36名（男子22名，女子14名）を対象とした．冠動脈病変の診断には心エコー（東芝社製 ss160A）あるいは冠動脈造影を施行した．冠動脈病変を認めた20名をA群，認めない16名をN群とし，両群で発症年齢，急性期の白血球数の最大値，急性期の CRP の最大値，性，ガンマグロブリン大量静注療法の有無，ACE 遺伝子多型について比較検討した．A群のうち7名（35%）で1年以内に冠動脈病変が改善した．また，狭窄病変は5名（25%）に認め，うち1名は右冠動脈の完全閉鎖であった．

急性期白血球数は，A群では不明3名を除く17名，N群では不明1名を除く15名で検討した．また，急性期 CRP 値は，A群では不明あるいは定性による検査の8名を除く12名，N群では不明あるいは定性による検査の4名を除く12名で検討した．

ガンマグロブリン大量静注は，A群では不明2名を除く18名中12名に，N群では不明1名を除く15名中9名に施行されていた．

両群間の比較は，発症年齢，白血球数，CRP 値は平均値±標準偏差で示し，Welch t-test を用い，統計学的に比較検討した．また，性，ガンマグロブリン大量静注療法施行の有無，ACE 遺伝子多型の比較には Chi-square test を用いた．いずれも相対危険率5%以下を統計学的に有意とした．

なお，末梢血からの DNA 採取にあたり，患児および家族に十分に説明し，承諾を得た．

方　　法

患児の白血球から Nucleon kits (Scotlab Ltd. Strathclyde, Scotland) を用いて DNA を抽出した．100 ng DNA，1 μM ずつのプライマー，10 mM Tris-HCl (pH 8.3)，1.5 mM MgCl2，50 mM KCl，200 μM dNTP，1U Taq polymerase (Takara Shuzo Co., Ltd., Kyoto, Japan) を含む総量 30μl で PCR (polymerase chain reaction) を行った．センスプライマーには CTGGAGACC-ACTCCCATCCTTTCT，アンチセンスプライマーには GATGTGGCCATCACACATTCGTCAGAT のオリゴヌクレオタイドを用いた．PCR は，94℃で90秒，56℃で2分，72℃で2分の各ステップを30回繰り返した．ethidium bromide を含む1%アガロースゲル内で1時間電気泳動させ，紫外線下に泳動パターンを観察した．

結　　果

全症例の臨床的背景と成績を **表 1** に，A群とN群の背景因子の比較を **表 2** にそれぞれ示す．

A群とN群の比較において，発症年齢（p=0.75），性（p=0.87），ガンマグロブリン大量静注療法施行者数（p=0.69）は有意差を認めなかった．また，急性期の CRP の最大値（p=0.56）は有意差は認めなかった（**図 1**）が，急性期の白血球数の最大値（p=0.008）は有意差を認めた（**図 2**）．

対象者全36名での ACE 遺伝子多型の頻度は，I allele 0.66，D allele 0.34 であり，DD 0.08，II 0.42，DI 0.50 であった．

A群20名では，I allele 0.80，D allele 0.20 であったり，DD 0.05，II 0.65，DI 0.30 であった．同様にN群16名では，I allele 0.50，D allele 0.50 であり，DD 0.125，II 0.125，DI 0.75 であった（**表 3**）．

I allele と D allele の比較ではA群に有意に I allele の頻度が高く（p<0.01），オッズ比4倍であった．また，II型はA群では65%，N群には12.5%に認められ，有意にA群に高い頻度であり（p<0.01），オッズ比13倍であった．

考　　察

ACE は肺，血管内皮を中心に分布する酵素で，体液，

表 1 全症例の臨床的背景

No.	sex	age at onset	WBC(/μl)	CRP(mg/dl)	aneurysm	regression	stenosis	ACE genotype
1	M	2y7m	12100	14.1	+ RCA dil.	+		II
2	F	1y11m	20000	10.1	+ LMT dil.	+		DI
3	F	2y11m	21130	15.9	+ LMT dil. LAD an.	+		DI
4	M	4y2m	12000	8	+ LAD an.	−		II
5	F	10m	16000	qualitative	+ LMT an. RCA an.	−	+	II
6	F	1y2m	12200	18.5	+ LMT dil	+		DI
7	M	11m	21600	15.5	+ LMT an.	−		DI
8	M	3y8m	unknown	unknown	+ LCA an. RCA an.	−	+	DD
9	M	4y5m	27700	7.79	+ LCA dil.	+		II
10	F	2y9m	23300	qualitative	+ RCA an.	−		II
11	M	5y0m	10100	qualitative	+ LMT an. RCA an.	−	+	II
12	M	3m	33800	16.3	+ LMT an. RCA an.	−		II
13	M	3y2m	unknowm	unknown	+ LAD an.	−		II
14	M	5m	31100	15.5	+ RCA an.	−		II
15	M	4y8m	18600	17.8	+ RCA an.	+		II
16	F	4m	19300	qualitative	+ RCA an.	−		II
17	F	3y5m	13300	5.4	+ LCA an.	−		DI
18	F	1y0m	unknown	unknown	+ RCA an.	−	+	DI
19	M	1y0m	15830	10.6	+ LMT dil. RCA dil.	+		II
20	M	8y7m	12200	qualitative	+ RCA total occlusion	−	+	II
21	F	1y11m	15500	18	−			DI
22	M	3y4m	13500	13.5	−			DI
23	M	2y11m	15600	6	−			DI
24	M	6m	14700	7.5	−			DI
25	M	2y10m	11300	qualitative	−			DI
26	M	1y0m	unknown	unknown	−			DI
27	M	9m	16400	21.6	−			DI
28	M	1y9m	17300	qualitative	−			DI
29	M	3y7m	13100	3	−			DI
30	M	10m	12400	qualitative	−			DD
31	F	3y5m	13400	26.2	−			DI
32	F	1y5m	7800	3.1	−			DI
33	M	4y4m	10500	5.9	−			II
34	F	1y10m	14900	18.4	−			DD
35	F	3y0m	13800	7	−			DI
36	F	2y1m	13100	7.2	−			II

dil : dilatation, an : aneurysm, RCA : right coronary artery, LCA : left coronary artery, LMT : leftmain coronary trunk, LAD : left anterior descending branch

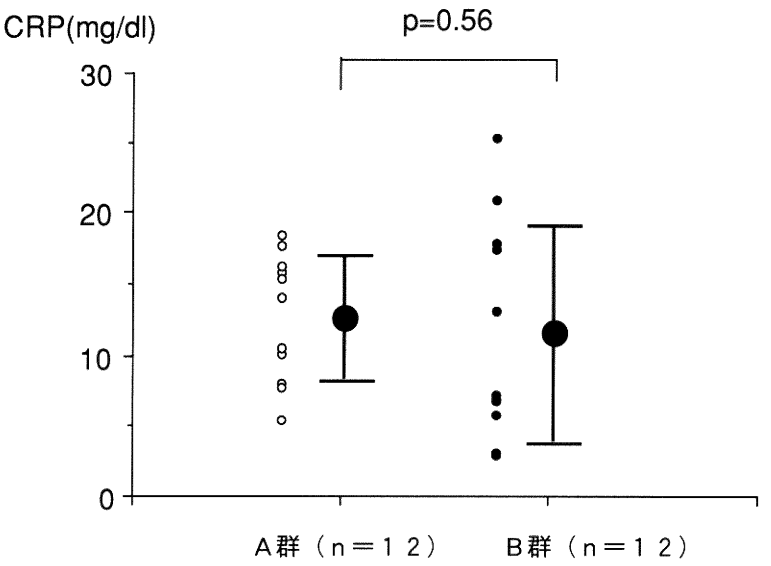


図 1　A群とN群における急性期 CRP 最大値の比較

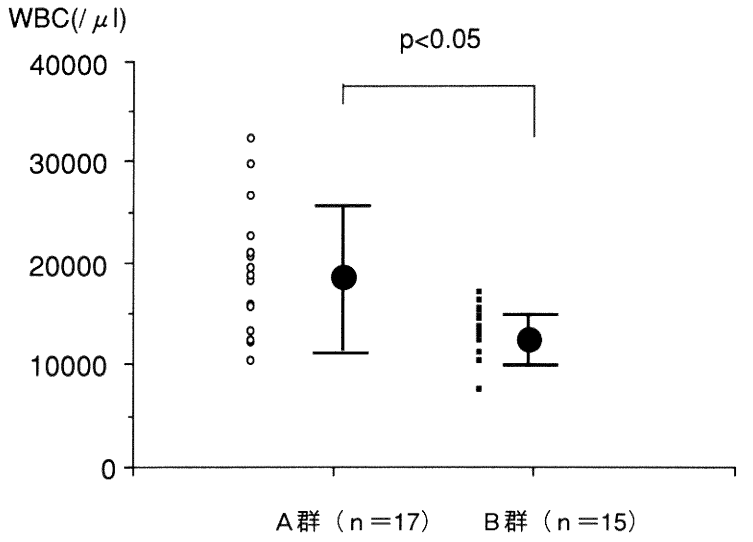


図 2　A群とN群における急性期白血球数の最大値の比較

循環調節に重要な役割を果たしている．ACE は単一の遺伝子によってコードされており，17番染色体 q23 に位置している．近年，イントロン16に Alu 様配列の挿入Ⅰ，欠失Dによる遺伝子多型が存在し，ホモ結合体の DD，Ⅱ表現体とヘテロ結合体の DI 表現体の３種類の遺伝子多型が存在することが判明した[8]．DD は心筋梗塞[9]，PTCA 後の再狭窄[10]，心肥大[14]，頸動脈壁肥厚[15]，糖尿病における腎症発症のリスク[22]，IgA 腎症増悪因子[17] などの危険因子であることが報告されている．また，DD，DI，Ⅱの順で血清 ACE 活性も高くなていることが成人[6] および小児[24] でもわかっている．しかし，DD は心筋梗塞や PTCA 後の再狭窄とは関係

表 2　A群とN群の背景因子の比較

	with aneurysm (n=20)	without aneurysm (n=16)
age at onset(years)*	2.65±2.08	2.21±1.15
peak count of WBC(/μl)†	18838.8±7033.7 (n=17)	13553.3±2428.6 (n=15)
peak CRP conc.(mg/dl)*	12.9±4.3 (n=12)	11.4±7.8 (n=12)
SEX**		
male	12	10
female	8	6
Allele frequencies***		
I allele	32	16
D allele	8	16
High dose γ globulin Tx**	12 (n=18)	9 (n=15)

*：no significant difference by Welch'st-test
**：no significant difference by Chi-square test
†：significant difference by Welch'st-test
***：significant difference by Chi-square test

表 3　A群とN群の ACE 遺伝子多型頻度

	A群(n=20)	B群(n=16)
Allele frequencies		
I allele	0.8	0.5
D allele	0.2	0.5
DD	0.05	0.125
II	0.65	0.125
DI	0.3	0.75

A群において Iallele および II の頻度が高い（各々 $p<0.01$, Oddsratio 4.0, $p<0.01$, Oddsratio 13.0）.

なしと結論した検討[18)19)]や ACE 遺伝子多型が ACE 血中濃度を規定するのは27%にしか過ぎないといった報告[20)]もあり，ACE 遺伝子多型がどの範囲まで関与しているのか議論の余地のあるところである.

今回の川崎病と ACE 遺伝子多型の検討では，冠動脈瘤形成例にII型が多いという特異な結果が得られた.

川崎病における特徴的な冠動脈瘤形成には汎血管炎と，血圧，心拍動といった物理的ストレスが関与すると考えられている[1)]が，炎症反応が弱くても瘤を形成する症例を臨床的に経験することがあり，ホスト要因，局所血管反応性の違いを考えさせる.

川崎病冠動脈炎の病理組織変化は，中膜外層の平滑筋細胞層が水腫のために離開する，水腫性疎開性変化から始まる．その後内膜表層に少数の大単核細胞，リンパ球がみられ，細胞浸潤の程度を増し，内膜深層に炎症細胞が分布するようになる．同時期に外膜の炎症細胞浸潤もみられ，内膜側，外膜側の両方向から炎症が進行する．10病日頃には汎血管炎が完成し，内，外弾性板が破壊され，中膜の平滑筋細胞層も確認できないほど障害をうける．全周性炎を来した冠動脈は内圧および心拍動のストレスに耐えきれず拡張し，動脈瘤を形成する[1)]．動脈瘤形成を予防する治療として，急性期のガンマグロブリン大量静注療法が施行されている.

川崎病急性期のガンマグロブリン大量静注療法は，1984年古庄ら[2)]によって提唱されて以来ほぼ確立された治療法として受け入れられているが，ガンマグロブリン療法を行なっても巨大冠動脈を残したり，死亡する症例の報告があり[3)11)]，厚生省川崎病研究班の報告[23)]では心後遺症合併率は12.8％（冠動脈瘤，拡大は12.3％）であった．また，近畿地区アンケート結果[21)]でも3,275例中403例（12.3％）に冠動脈瘤，拡大を認めた．冠動脈瘤形成には強い炎症の存在が明らかであるが，ガンマグロブリンによる抗炎症作用もある程度限界があり，他の要因があることも否定できない.

今回，対象とした川崎病患者全体の ACE 遺伝子多型の頻度は，日本人ですでに報告された頻度[12)13)24)]とほぼ同じであったにもかかわらず，冠動脈瘤形成群でII型が有意に多いという成績を得た．両群間にガンマグロ

ブリン使用状況や CRP 最高値に有意差はなく，治療や炎症反応の程度が今回の成績に影響した可能性は少ないと考えられる．

ACE により産生されるアンギオテンシンⅡは血管壁肥厚作用，内皮増殖作用を含む血管局所作用を有する．培養平滑筋細胞に対して蛋白合成を増加させて肥大作用を示すことが知られている[4)5)]．また，血管内腔障害モデルでは，アンギオテンシンⅡにより平滑筋細胞の DNA 合成が増加することが報告[7)]されている．Morishita ら[16)]はラットの頸動脈内皮にヒト ACE ベクターを遺伝子導入し，2週間で内皮細胞増殖を来したと報告した．ACE にはアンギオテンシンⅡを介した血管局所作用があると考えられる．アンギオテンシンⅡの組織での反応性の違いや ACE 遺伝子多型による反応性の違いに関しては全く不明であるが，冠動脈瘤形成例にⅡ型が多かったことは血管局所反応の違いが示唆される．

結　　論

川崎病既往者36名を対象として，ACE 遺伝子多型と冠動脈病変合併の有無の関連を検討した結果，以下の成績を得た．

1）対象者全体の ACE 遺伝子多型の頻度は，わが国で報告されてきた頻度とほぼ同じであった．

2）冠動脈病変合併の有無による二群間において，ガンマグロブリン使用状況や CRP 最高値に有意差はなかった．

3）冠動脈瘤形成群で ACE 遺伝子多型の I allele の頻度，およびⅡ型が有意に多かった．

以上の成績より，川崎病における冠動脈病変合併には，ACE 遺伝子多型のⅡ型が関与している可能性が考えられた．

謝　辞

稿を終えるにあたり，御指導御校閲を賜りました新潟大学医学部小児科学教室内山聖教授，ならびに，御指導，御教示頂きました，新潟大学医学部小児科学教室柿原敏夫助手，佐藤誠一助手に謝意を表します．

参 考 文 献

1) **Fujiwara, H. and Hamashima, Y.**: Pathology of the heart in Kawasaki disease. Pediatrics, **61**: 100～107, 1978.

2) **Furusho, K., Kamiya, T., Nakano, H., Kiyosawa, N., Shinomiya, K., Hayashidera, T., Tamura, T., Hirose, O., Manabe, Y., Yokoyama, T., Kawarano, M., Baba, K., Baba, K. and Mori, C.**: High-dose intravenus gammaglobulin for Kawasaki disease. Lancet, **2**: 1055～1057, 1984.

3) **曾根克彦，小林敏宏，田端裕之，鈴木隆，小野真康，田代雅彦**：川崎病ガンマグロブリン大量療法後に認められた冠動脈瘤症例について．小児科臨床，**41**: 2452～2455, 1988.

4) **Genisterfer, A.A.T., Peach , M.J. and Owens, G. K.**: Angiotensin Ⅱ induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. Circ. Res., **62**: 749～756, 1988.

5) **Berk, B.C., Vekshtein, V., Gordon, H.M. and Tsuda, T.**: Angiotensin-stimulated protein synthesis in cultured smooth muscle cells. Hypertension, **13**: 305～314, 1989.

6) **Regat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P. and Soubrier, F.**: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene according for half the variance of serum enzyme levels. J. Clin. Invest., **86**: 1343～1346, 1990.

7) **Daemen M.J.A.P., Lombardi, D.M., Bosman, F. T. and Schwartz, S.M.**: Angiotensin Ⅱ induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. Circ. Res., **68**: 450～456, 1991.

8) **Hubert, C., Houot, A-M., Corvol, P. and Soubrier, F.**: Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. J. Biol. Chem., **266**: 15377～15383, 1991.

9) **Cambien, F., Poirier, O., Lecerf, L., Evans, A., Cambou, J.P., Arveiler, D., Luc, G., Bard, J. M., Bara, L., Ricard, S., Tiret, L., Amouyel, P., A.G. Francois and Soubrier, F.**: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent rik factor for myocardial infarction. Nature, **359**: 641～644, 1992.

10) **Ohishi, M., Fuji, K., Minamino, T., Higaki, J., Kamitani, A., Rakugi, H., Zhao, Y., Mikami, H., Miki, T. and Ogihara, T.**: A potent genetic risk factor for restenosis. Nature Genetics, **5**: 324～25, 1993.

11) 古荘純一，野苛善郎，奥山和男，相沢共樹，神田実喜男，高橋啓，直江史郎：川崎病急性期の経静脈的γグロブリン大量療法施行にもかかわらず死亡した1乳児例—臨床面からの検討—．日小循誌，**9**：481～485，1993.

12) **Higasimori, K., Zhao, Y., Higaki, J., Kamitani, A., Katsuya, T., Nakura, J., Miki, T., Mikami, H. and Ogihara, T.**: Association analysis of a polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene with essential hypertension in the Japanese population. Biochem. Biophys Res. Com., **184**: 399～404, 1993.

13) **Nakai, K., Itoh, C., Miura, Y., Hotta, K., Musha, T., Itoh, T., Miyakawa, T., Iwasaki, R. and Hiramori, K.**: Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanease. Circulation, **90**: 2199～2202, 1994.

14) **Iwai, N., Ohmichi, N., Nakamura, Y. and Kinoshita, M.**: DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. Circulation, **90**: 2622～2628, 1994.

15) **Claire, B.K., Pierre, D., Touboul, P.J., Feve, J.M., Eliane, B., Dominique, C. and Veronique, H.**: Plasma angiotensin-converting enzyme activity and carotid wall thickening. Circulation, **89**: 952～954, 1994.

16) **Morishita, R., Gibbons, G.H., Ellison, K.E., Lee, W., Zhang, L., Yu, H., Kaneda, Y., Ogihara, T. and Dzau, V.J.**: Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy in vivo gene transfer of angiotensin-converting enzyme. J. Clin. Invest., **94**: 978～984, 1994.

17) **Paul, N.H., Colin, G., Peter, A.R., Janet, H. M., Michael, B-J., R. stuart, C.R., Brian, J. R.J., J.D. Briggs, John, M.C. Connell and Alan, G.J.**: Polymorphisms in angiotensin-converting enzyme gene and progression of IgA nephropathy. Lancet, **345**: 1540～1542, 1995.

18) **Lindpaintner, K., Pfeffer, M.A., Kreutz, R., Stampfer, M.J., Grodstein, F., LaMotte, F., Buring, J. and Hennekens, C.H.**: A prospective evaluation of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. N. Engl. J. Med., **332**: 706～711, 1995.

19) **Samani, N.J., Martin, D.S., Brack, M., Cullen, J., Chauhan, A., Lodwick, D., Harley, A., Swales, J.D., Bono, D.P. and Gershlick, A. H.**: Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene and risk of restenosis after coronary angioplasty. Lancet, **345**: 1013～1016, 1995.

20) **McKenzie, C.A., Julier, C., Forrester, T., McFarlane-Anderson, N., Keavney, B., Lathrop, G.M., Ratcliffe, P.J. and Farrall, M.**: Segregation and linkage analysis of serum angiotensin I-converting enzyme levels：evidence for two quantiative trait loci. Am. J. Hum. Genet., **57**: 1426～1435, 1995.

21) 荻野広太郎，清沢伸幸，西岡研哉，尾内善四郎，神谷哲郎，古庄巻史，横山達郎：川崎病におけるガンマグロブリン療法について—近畿地区アンケート調査結果から—．Prog. Med., **16**: 1817～1825, 1996.

22) **Doi, Y., Yoshizumi, H., Yoshinari, M., Iino, M., Ichikawa, K., Iwase, M. and Fujishima, M.**: Association between a polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene and microvascular complication in Japanese patients with NIDDM. Diabetologia, **39**: 97～102, 1996.

23) 厚生省川崎病研究班：第13回川崎病全国調査成績．小児科，**37**: 363～383, 1996.

24) **Yamamoto, k., Kataoka, S., Hashimoto, N., Kakihara, T., Tanaka, A., Kawasaki, T., Kikuchi, T., Takahashi, H. and Uchiyama, M.**: Serum level and gene polymorphism of angiotensin I converting enzyme in Japanese children. Acta. P. Japonica., **39**: 1～5, 1997.

（平成9年10月9日受付）