

学位論文題名

Serum Angiotensin I-Converting Enzyme  
Is Reduced in Crohn's Disease  
and Ulcerative Colitis Irrespective of Genotype

(クローン病及び潰瘍性大腸炎における血清アンギオテンシン  
変換酵素活性の検討～ ACE 遺伝子多型性をふまえて～)

学位論文内容の要旨

【研究目的】慢性炎症性腸疾患であるクローン病は、環境要因と、それに対する免疫学的反応あるいはそれを規定する遺伝的要因の関与する疾患と位置づけられている。またサルコイド様肉芽腫の出現が認められるなど、病態的にはサルコイドーシスとの類似性も考えられる。しかし、サルコイドーシスでは angiotensin converting enzyme (以下 ACE) の血清レベルの活性上昇が特徴的とされているのに対して、クローン病における過去の報告は結果が一致していない。血清 ACE レベルは健常者においてもその個体間変動の 47% が ACE 遺伝子多型性によって規定されている。すなわち、遺伝子型は DD、II、ID の 3 型に分かれ、この順に血清 ACE は高い。よって血清 ACE 活性の評価には、この遺伝子型を考慮する必要がある。そこで、本研究では ACE 遺伝子多型性を考慮してクローン病患者での血清 ACE 活性を検討した。また、対象として、潰瘍性大腸炎と感染性腸炎患者についても検討した。さらに疾患活動性や病型と血清 ACE 活性を比較検討することにより、慢性炎症性腸疾患における血清 ACE 活性の臨床的意義を明らかにしようと試みた。ACE はその活性中心に亜鉛を有しており、血清亜鉛濃度の変動が血清 ACE 活性の変動と関連している可能性がある。そこで、血清 ACE 活性と血清亜鉛濃度の検討も併せて行った。

【対象と方法】1994 年 4 月から 1997 年 4 月までに北大第一内科及びその関連病院で診断されたクローン病患者 39 人 (男/女=31/8、年齢全体  $26 \pm 11$  歳、mean  $\pm$  SD)、潰瘍性大腸炎患者 43 人 (男/女=22/21、全体  $35 \pm 16$  歳)、感染性腸炎患者 19 人 (男/女=8/11、全体  $38 \pm 15$  歳) と対照群として人間ドッグで異常を認めなかった健常者 341 人 (男/女=179/162、全体  $42 \pm 12$  歳) を対象とした。被験者の末梢血白血球より分離した genomic DNA  $100 \mu\text{g}$  をテンプレートとして、ACE 遺伝子のイントロン 16 を含む多型存在部位 (約 300 bp の挿入/欠失の多型) を、この部位を挟む 2 種のセンス及びアンチセンスプライマーを用いて PCR 法で増幅した。その後、アガロース電気

泳動により、allele と遺伝子型 (II、ID、DD の三つの遺伝子型) を同定しそれぞれの ACE 遺伝子の多型性を調べた。また笠原法にて血清 ACE 活性を測定し、クローン病患者については疾患活動性の指標として IOIBD score・血清 CRP を用い、緩解期と活動期の 2 点での血清 ACE 活性も検討した。血清亜鉛濃度に関しては原子吸光法で測定した。

【結果】健常者、クローン病患者、潰瘍性大腸炎患者 3 群において、ACE 遺伝子多型性の分布には有意差を認めなかった。血清 ACE 活性は健常者、クローン病患者、潰瘍性大腸炎患者においてそれぞれ遺伝子多型別にみると、II 群では平均値  $11.8 \pm 2.9$  (IU/l)、 $7.0 \pm 2.5$ 、 $7.4 \pm 3.6$ 、ID 群では  $15.2 \pm 3.6$ 、 $9.7 \pm 4.1$ 、 $11.4 \pm 4.6$ 、DD 群では  $19.3 \pm 3.9$ 、 $13.9 \pm 5.8$ 、 $10.7 \pm 3.6$  と、どの遺伝子多型群においてもクローン病患者と潰瘍性大腸炎患者では健常者と比較して有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。しかし、クローン病患者と潰瘍性大腸炎患者間では有意差を認めなかった。感染性腸炎患者群では血清 ACE 活性は平均値 II 群  $10.0 \pm 3.2$ 、ID 群  $16.0 \pm 1.9$ 、DD 群  $15.9 \pm 1.0$  であり、II 群においては健常者とは有意差がなかったが、クローン病患者と潰瘍性大腸炎患者に比べると有意に高かった ( $p < 0.05$ )。ID 群でも健常者や潰瘍性大腸炎患者とは有意差がなかったが、クローン病患者と比べると有意に高かった ( $p < 0.01$ )。クローン病患者において疾患活動性との関係を見ると、活動期には緩解期と比較して血清 ACE 活性は有意に低下していたが ( $p < 0.05$ )、病型とは無関係であった。血清 ACE 活性にステロイド剤投与が影響を及ぼしている可能性もあるため、ステロイド剤を投与していない患者だけを抽出して血清 ACE 活性を検討したが、全被験者の結果と同様にすべての遺伝子多型群においてクローン病患者と潰瘍性大腸炎患者では健常者と比較して有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。血清亜鉛濃度はクローン病患者では平均値  $71.2 \pm 13$  ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) であり、健常者  $87.9 \pm 13$ 、潰瘍性大腸炎患者  $84.8 \pm 15$ 、感染性腸炎患者  $83.6 \pm 17$  と比較して有意に低下していた ( $p < 0.01$ )。しかし、クローン病患者 II、ID 群において血清亜鉛濃度と血清 ACE 活性の間に有意な相関は認めなかった。

【考察】クローン病患者と潰瘍性大腸炎患者においては、血清 ACE 活性は遺伝子多型性を考慮して比較すると健常者や感染性腸炎患者に比べて明らかに血清 ACE 活性は低下していた。血清 ACE 活性は炎症性腸疾患における特異な病態を反映している可能性がある。炎症性腸疾患における血清 ACE 活性低下の原因として、ステロイド投与による影響や吸収不良に伴う血清亜鉛の低下がまず考えられる。しかし、今回の検討結果からは、これらの因子は血清 ACE 活性に影響を与えている可能性はあるものの慢性炎症性腸疾患で血清 ACE 活性が低下する主原因とは考えられなかった。最も可能性が高いと考えられるのは、サイトカインによる調節である。ACE は血管内皮に存在する膜結合蛋白酵素であり、血中に存在する ACE の由来は、血管内皮の細胞膜結合部からの解離によるものが主体と考えられている。Andreas らはヒト血管内皮細胞を使用した実験で、 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}$  が ACE の低下に関与していると報告している。炎症性腸疾患においても  $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  などのサ

イトカインの上昇が報告されており、血清 ACE 活性はこれらのサイトカインにより調節を受けている可能性がある。

【結語】クローン病及び潰瘍性大腸炎患者において、血清 ACE 活性は ACE 遺伝子多型性を考慮すると、どの遺伝子型においても健常者と比較して低下している。また、クローン病における血清 ACE 活性の低下は疾患活動性の影響を受けているが、血清亜鉛濃度の低下によって説明することはできない。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

## Serum Angiotensin I-Converting Enzyme Is Reduced in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Irrespective of Genotype

(クローン病及び潰瘍性大腸炎における血清アンギオテンシン  
変換酵素活性の検討～ ACE 遺伝子多型性をふまえて～)

慢性炎症性腸疾患であるクローン病は、病理学的にもサルコイド様肉芽腫の出現が認められるなど、サルコイドーシスとの類似点も存在する。しかし、サルコイドーシスでは血清 angiotensin converting enzyme(以下 ACE)の活性上昇が特徴的とされているのに対して、クローン病においては相反する報告があり結論がでていない。また、血清 ACE レベルは個体間変動の 47%が ACE 遺伝子多型性 (遺伝子型は II、ID、DD の 3 型に分かれ、この順に血清 ACE は高い) によって規定されていることから、血清 ACE 活性の正確な評価には、この遺伝子多型を考慮する必要がある。そこで、申請者はクローン病患者、潰瘍性大腸炎患者、感染性腸炎患者での血清 ACE 活性を ACE 遺伝子多型性を考慮し検討した。対象はクローン病患者 39 人、潰瘍性大腸炎患者 43 人、感染性腸炎患者 19 人と人間ドッグで異常を認めなかった健康人 341 人を対象とした。被験者の末梢血白血球より分離した DNA をテンプレートとして、ACE 遺伝子の多型存在部位を挟む PCR 法を施行し、遺伝子型(II、ID、DD)を同定した。結果は、健常者、クローン病患者、潰瘍性大腸炎患者 3 群において、ACE 遺伝子多型性の分布には有意差を認めなかった。血清 ACE 活性は健常者、クローン病患者、潰瘍性大腸炎患者においてそれぞれ遺伝子多型別にみると、II 群では 11.8 (平均値)  $\pm$  2.9 (標準偏差) (IU/l)、7.0  $\pm$  2.5、7.4  $\pm$  3.6、ID 群では 15.2  $\pm$  3.6、9.7  $\pm$  4.1、11.4  $\pm$  4.6、DD 群では 19.3  $\pm$  3.9、13.9  $\pm$  5.8、10.7  $\pm$  3.6 と、どの遺伝子型群においてもクローン病患者、潰瘍性大腸炎患者では健常者と比較して有意に低下していた

( $p < 0.05$ )。しかし、クローン病患者と潰瘍性大腸炎患者間では有意差を認めなかった。この傾向はステロイド非投与群を対象にしても同様であった。感染性腸炎患者群では血清 ACE 活性は低下していなかった。クローン病患者において疾患活動性との関係を見ると、緩解期と比較して活動期には血清 ACE 活性は有意に低下していたが( $p < 0.05$ )、病型とは無関係であった。結論としてクローン病患者と潰瘍性大腸炎患者においては、血清 ACE 活性は遺伝子多型性を考慮して比較すると健常者や感染性腸炎患者に比べて明らかに低下しており、更にクローン病に関してはその活動度と関連していた。

発表後、副査上出教授から ACE の転写調節についての質疑があった。申請者は転写調節の機構に関しては、現在のところその詳細は不明であると回答するとともに、年齢、性別などの生理的な変動に関し補足説明した。次に、炎症性腸疾患の ACE 遺伝子多型の民族間での違いについての質疑があったが、本報告以外には炎症性腸疾患の ACE 遺伝子多型に関するものはないと回答した。さらに、血清 ACE の由来について質疑があった。健常人では血清 ACE の主たるものは血管内皮由来であるが、疾患群に関しては免疫担当細胞の産生する ACE も考慮しなければならないと回答した。最後に、免疫を含め炎症性腸疾患の病態に血清 ACE の低下が関与しているか質疑があったが、腸管局所の抗炎症作用低下による難治性下痢などに関連する可能性があるとして回答した。次いで、副査浅香教授から、疾患により低値となる酵素は少数であり、本研究で明らかとなった血清 ACE の低下機序に関しては興味深いとコメントした上で、炎症性腸疾患以外の血清 ACE が低下する疾患・病態さらにはその機序に関し質疑があった。慢性呼吸器疾患の一部で血清 ACE は低下すると回答するとともに、本研究での血清 ACE 低下の機序は不明であるがマクロファージ・T リンパ球などの関与により最終的には  $\text{TNF } \alpha$ 、 $\text{IL-1}$  などの炎症性サイトカインのバランスの乱れが血清 ACE を負の調節へと導いているのではと回答した。これに対し浅香教授からその他の可能性として ACE の inhibitor の存在の可能性についてもコメントがあった。最後に主査西村教授から、血清 ACE 低下の機序に関して、栄養状態や血清アルブミン値との関連についての質疑があった。また、炎症性サイトカインの関与が重要と考えるなら他の炎症性疾患でも低下する可能性があるかとの質問があった。それに対して、血清 ACE 活性と栄養状態・アルブミンとの相関は認めなかったこと、文献上、他疾患における血清 ACE 値の低下は報告がないと解答した。

本論文は、過去の報告では一致していなかった炎症性腸疾患における血清 ACE 活性の変化について、遺伝子多型を考慮することによって疾患により確実に低下することを明らかにしたものであり、過去の論争に決着を与えたものとして高く評価される。今後は疾患における血清 ACE 値の低下機序や ACE 自体の役割に関してさらなる展開

が期待されるテーマである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（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。