

## 原 著

## IgA腎症患者の末期腎不全進行における腎疾患関連遺伝子多型の影響

小滝 周平

**Impacts of Polymorphisms in Genes Encoding Renal Disease-related Molecules on Progression to End-stage Renal Failure in Patients with IgA Nephropathy**

Shuhei Kotaki (Department of Nephrology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

**Background/Purpose:** Polymorphisms found in genes encoding proinflammatory/profibrotic molecules have been demonstrated to be associated with several kinds of renal diseases. We investigated these polymorphisms in IgA nephropathy (IgAN) patients undergoing hemodialysis (HD) and their significance on progression to end-stage renal failure (ESRF). **Methods:** To evaluate the role of polymorphisms in genes described below, we analyzed the association of these polymorphisms with progression to ESRF in histologically-proven IgAN patients undergoing HD using Kaplan-Meier method. Employed genes are angiotensin-converting enzyme, angiotensinogen, monocyte chemoattractant protein-1, chemokine receptor (CCR5), transforming growth factor- $\beta$  1, E-selectin (SELE), and L-selectin (SELL). **Results:** The duration between renal biopsy and ESRF (induction to HD) was significantly shorter in IgAN patients with T1402 allele at the SELE gene, G(-642) allele or T712 allele at the SELL gene than those without them. Any other polymorphisms were not significantly associated with progression to ESRF in this study. **Conclusion:** This work provides evidence that the T1402C polymorphism of the SELE gene, A(-642)G and C712T polymorphisms of the SELL gene are associated with rapid progression to ESRF in IgAN patients.

**Keywords:** IgA nephropathy, end-stage renal failure, polymorphism, E-/L-selectin

*J Saitama Med School 2004;31:55-66*

(Received December 9, 2003)

## 緒 言

いわゆる慢性糸球体腎炎は我が国における新規透析導入患者の原因疾患として糖尿病性腎症に次いで第2位の位置にあるが、導入患者数は現在も決して減少しているわけではない<sup>1)</sup>。IgA腎症は我が国の慢性糸球体腎炎の大半を占め、その発症、進展機序の解明、有効な治療法の開発について、精力的に研究が行われており、多くの知見が積み重ねられつつある。IgA腎症は1968年J. BergerとN. Hinglaisによって提唱された原発性糸球体疾患で、糸球体メサンギウム領域へのIgAの優位な沈着を認めることを特徴としている<sup>2)</sup>。本症の予後に関しては、長期経過観察によって本症例の40%が腎生検による診断後20年間の経過で末期腎不全へと進行することが明らかとなった<sup>3)</sup>。厚生省特定疾患進行性腎障害調査研究班と日本腎臓学会の合同委員会から出された「IgA腎症診療指針」の予後判定基準

では、腎生検所見をもとに、IgA腎症患者の予後が以下の4群に分けられている<sup>4)</sup>。

- (1) 予後良好群：透析療法に至る可能性がほとんどないもの。
- (2) 予後比較的良好群：透析療法に至る可能性がかなり低いもの。
- (3) 予後比較的不良群：5年以上、20年以内に透析療法に移行する可能性があるもの。
- (4) 予後不良群：5年以内に透析療法に移行する可能性があるもの。

全IgA腎症患者における各群の割合は、(1)+(2)が60%、(3)が30%、(4)が10%である。(1)+(2)群と(3)+(4)群は予後において大きく異なっており、これが単なる進行因子の有無による相違なのか、もしくはsubtypeの異なる疾患なのかは明らかではない。いずれにせよ、この(3)+(4)群に属するIgA腎症患者を早期に判別し、その進行を抑制することが急務とされている。

近年のヒトゲノム解析の進展を踏まえて、腎疾患

領域においても発症や進行に関する遺伝的素因の解析が進められている。IgA腎症に関しても、古くはHLABw35抗原とIgA腎症の関連が指摘されており<sup>5)</sup>、また近年はイタリア人家族内発症例のゲノム解析の結果から6q22-23領域にIgA腎症発症関連遺伝子の存在が推定されている<sup>6)</sup>。我が国においてはIgA腎症患者には慢性糸球体腎炎の家族歴を有する症例が多いという報告は認められるものの<sup>7)</sup>、IgA腎症の家族内集積例が少なく、case-control研究によってHLA classII遺伝子領域ならびにE-/L-セレクチン遺伝子領域の一塩基多型 (single-nucleotide polymorphism (SNP)) が有意なIgA腎症発症リスクとなることが報告されている<sup>8,9)</sup>。また進行素因に関しても、アンギオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme (ACE))<sup>10-12)</sup>、アンギオテンシノーゲン (angiotensinogen (AGT))<sup>12-14)</sup>、インターロイキン-1受容体拮抗蛋白 (interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist)<sup>15)</sup>、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ))<sup>15)</sup>、T細胞レセプター $\alpha/\beta$ 鎖の各遺伝子多型<sup>15-17)</sup>が関連する可能性が報告されている。また糖尿病性腎症に関してはACE<sup>18)</sup>、AGT<sup>19)</sup>、transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1)<sup>20)</sup>やケモカイン受容体 (CCR2/5)<sup>21)</sup>の遺伝子多型が、移植腎拒絶反応に関してはmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)<sup>22)</sup>、CCR2/5<sup>23)</sup>や細胞接着因子 (ICAM-1)<sup>24)</sup>の遺伝子多型が、多発性嚢胞腎でもACEの遺伝子多型<sup>25)</sup>がその発症/進行に有意に影響する可能性が示唆されている。しかし相反する結果や否定的な結果も散見され<sup>25-34)</sup>、対象集団の規模、人種や選択基準、表現形質の評価方法の相違によるものと考えられる<sup>35)</sup>。IgA腎症の進行素因に関しても現在までの報告では、非進行性の患者群と進行性患者群間の比較となっており、「IgA腎症診療指針」による4群で言えば、(1)+(2)群と(3)+(4)群間の検討である。前述のようにこれらの群間では原疾患 (IgA腎症) のsubtypeが異なっている可能性があり、同一と考えられるsubtypeの内での進行素因を明らかにするためには(3)群と(4)群間の検討も重要と考えられる。そこで今回、腎生検によってIgA腎症と診断され末期腎不全に至り透析導入となった症例を対象とし、その診断から透析導入までの期間の長短を表現形質として、腎障害進行に関連し得ると考えられる遺伝子多型の影響を検討した。

## 対象と方法

**対 象：**今回の検討対象として、以下の組み入れ基準を満たす血液透析患者とする。1) 外来の検査において血清クレアチニン値 1.3 mg/dl以下で、少なくとも2回以上蛋白尿 (++) (試験紙法) を認めて腎生検を施行され、IgA腎症と診断を受けていること。2) その後、虚血性心疾患、糖尿病等の透析導入に直接影響する合併症なく血液透析導入となり、現在も埼玉医科

大学およびその関連施設に通院中であること。以上の基準を満たす患者のうち、埼玉医科大学倫理委員会にて受理された文書 (申請番号144) をもとにinformed consentを取得出来た症例に対し、定期採血時に末梢血10 mlを取得する。腎生検から透析導入までの期間の情報を収集する。なお個人情報の保護のために提供試料の匿名化を行い、新たに付ける符号との対応表は個人識別情報管理者 (埼玉医科大学事務部部長 堀口一夫) によって厳重に管理する。

**DNA抽出とPCR法による遺伝子多型診断：**患者末梢血10 mlよりQIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてゲノムDNAを抽出した。このDNAを用いてACE, AGT, MCP-1, CCR5, TGF- $\beta$  1, SELE/SELL遺伝子の遺伝子多型を検出するためのプライマーセット、PCR条件およびgenotypeの判定基準を以下に示す。PCRはTAKARA SHUZO社製のPCR Thermal Cycler 480 (大津、滋賀) を使用した。

### 1) ACE (D/I) 多型;

FW; 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTT-3'  
RV; 5'-GATGTGGCCATCACATTCGT-3'

PCR条件：バッファー組成 (50  $\mu$ l) ; 100 ng DNA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.4, 0.1 mg/ml gelatin, 0.5 mM of dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1  $\mu$ M プライマー, 1 unit Taq polymerase (TAKARA SHUZO)

30サイクル; denaturation 94 °C 1分; annealing 58 °C 1分; extension 72 °C 2分/サイクル

Genotypeの判定基準：1%アガロースゲル電気泳動によるサイズ判定にて、190bpをdeletionタイプアレル (D), 490bpをinsertionタイプアレル (I) とする<sup>36)</sup>。 (Fig. 1a)

### 2) AGT (M235T) 多型;

FW; 5'-CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC-3'  
RV; 5'-CCGTTTGTGCAGGGCCTGGCTCTCT-3'

PCR条件：バッファー組成 (50  $\mu$ l) ; 100 ng DNA, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.4, 0.1 mg/ml gelatin, 0.5 mM of dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1  $\mu$ M プライマー, 1 unit Taq polymerase

30サイクル; denaturation 90 °C 1分; annealing 68 °C 1分; extension 72 °C 30秒/サイクル

Genotypeの判定基準：PCR生成物をTth111にて消化後、2.5%アガロースゲル電気泳動によるサイズ判定にて、165bp (非消化) をMet235アレル, 141bp (消化) をThr235アレルとする<sup>37)</sup>。 (Fig. 2a) (この多型に関しては従来よりアミノ酸表示されることが多く、本文でも慣例に従った。なお、ヌクレオチド表示ではエクソン2の704番塩基のSNPに相当するため、T704Cとなる。)

## 3) AGT (A-20C) 多型;

FW; 5'-AGAGGTCCTCCAGCGTGAGTGTC-3'

RV; 5'-AGCCACAGCTCAGTTACATC-3'

PCR条件: バッファー組成 (50  $\mu$ l); 100 ng DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.4, 0.1 mg/ml geletin, 0.5 mM of dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1  $\mu$ M プライマー, 1 unit Taq polymerase  
 30サイクル; denaturation 94 °C 30秒; annealing 64 °C 1分; extension 72 °C 1分/サイクル

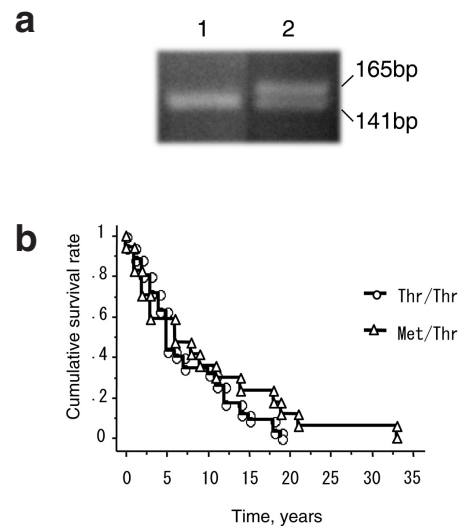
Genotypeの判定基準: PCR生成物をEcoO109Iにて消化後, 3%アガロースゲル電気泳動によるサイズ判定にて, 205bp (非消化) をA(-20)アリル, 137bp (消化) をC(-20)アリルとする<sup>13)</sup>. (Fig. 3a)

## 4) MCP-1 (G-2518A) 多型;

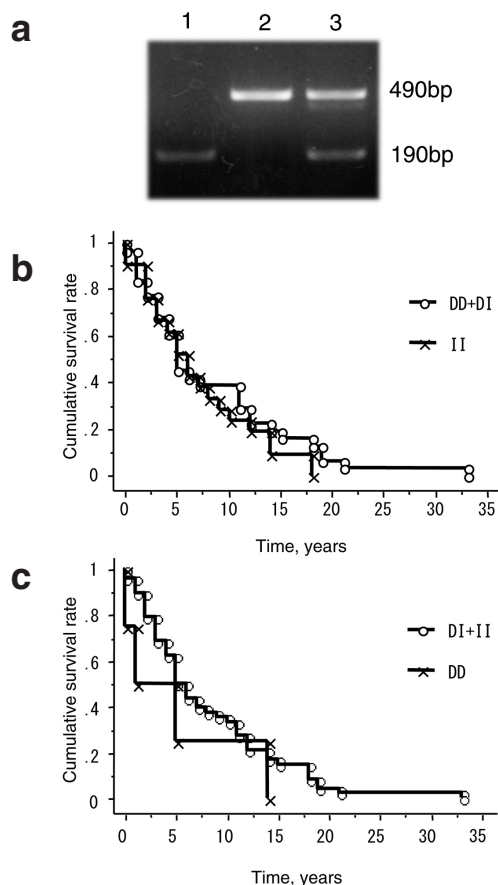
FW; 5'-CCGAGATGTTCCACAGCACATG-3'

RV; 5'-CTGCTTTGCTTGTGCCTCTT-3'

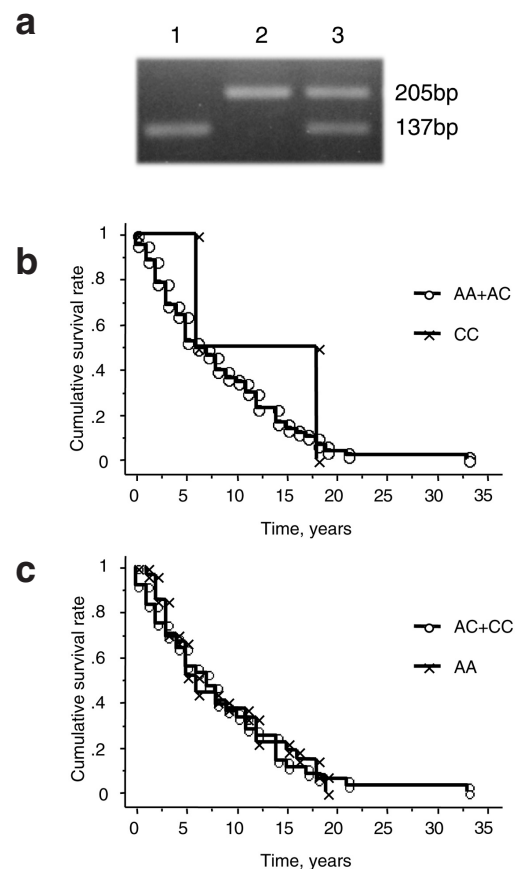
PCR条件: バッファー組成 (50  $\mu$ l); 100 ng DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.4, 0.1



**Fig. 2.** AGT M235T and the progression to ESRF in IgAN patients. a. Gel patterns of AGT M235T polymorphism. Lane 1 shows the homozygous Thr/Thr genotype and lane 2 is heterozygous Met/Thr. b. Met/Thr vs. Thr/Thr. No significant difference was seen between these groups.



**Fig. 1.** ACE D/I and the progression to ESRF in IgAN patients. a. Gel patterns of ACE D/I polymorphism. Lane 1 shows the homozygous DD genotype, lane 2 is homozygous II and lane 3 is heterozygous DI. b. DD+DI vs. II. No significant difference was seen between these groups. c. DI+II vs. DD. No significant difference was seen between these groups.



**Fig. 3.** AGT A(-20)C and the progression to ESRF in IgAN patients. a. Gel patterns of AGT A(-20)C polymorphism. Lane 1 shows the homozygous CC genotype, lane 2 is homozygous AA and lane 3 is heterozygous AC. b. AA+AC vs. CC. No significant difference was seen between these groups. c. AC+CC vs. AA. No significant difference was seen between these groups.

mg/ml geletin, 0.5 mM of dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1  $\mu$ M プライマー, 1 unit Taq polymerase  
40 サイクル; denaturation 94 °C 1 分; annealing 56 °C 1 分; extension 72 °C 1 分 30 秒 / サイクル

Genotype の判定基準: PCR 生成物を PvuII にて消化後, 1 % アガロースゲル電気泳動によるサイズ判定にて, 708bp+222bp (消化) を G (-2518) アリル, 930bp (非消化) を A (-2518) アリルとする<sup>38)</sup>. (Fig. 4a)

#### 5) CCR5 (G59029A) 多型;

FW; 5'-CCCGTGAGCCCATAGTTAAACTC-3'

RV; 5'-TCACAGGGCTTTTCAACAGTAAGG-3'

PCR 条件: バッファー組成 (50  $\mu$ l); 100 ng DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.4, 0.1 mg/ml geletin, 0.5 mM of dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1  $\mu$ M プライマー, 1 unit Taq polymerase  
40 サイクル; denaturation 95 °C 1 分; annealing 58 °C 1 分; extension 72 °C 1 分 / サイクル

Genotype の判定基準: PCR 生成物を Bsp1286I にて消化後, 2 % アガロースゲル電気泳動によるサイズ判定にて, 127 bp (+130bp) (消化) を G59029 アリル, 257 bp (非消化) を A59029 アリルとする<sup>21)</sup>. (Fig. 5a)

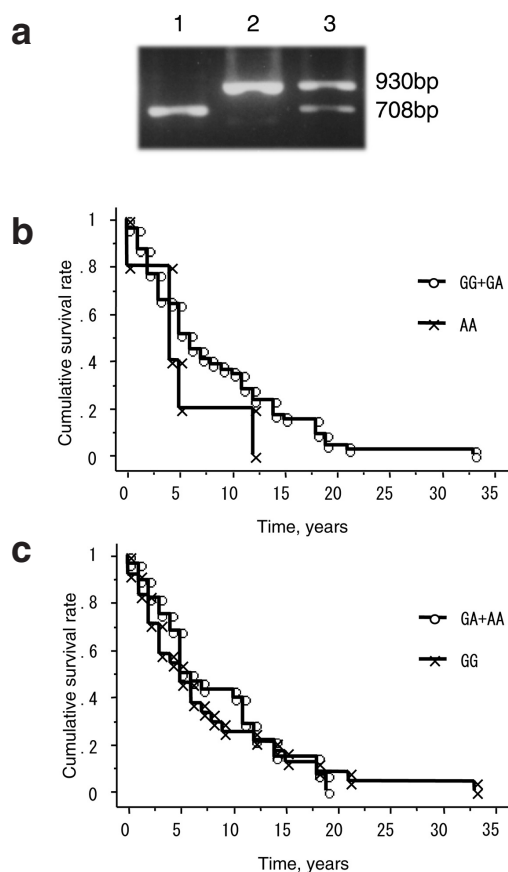
#### 6) TGF- $\beta$ 1 (C-509T) 多型;

FW; 5'-GGGGACACCATCTACAGTG-3'

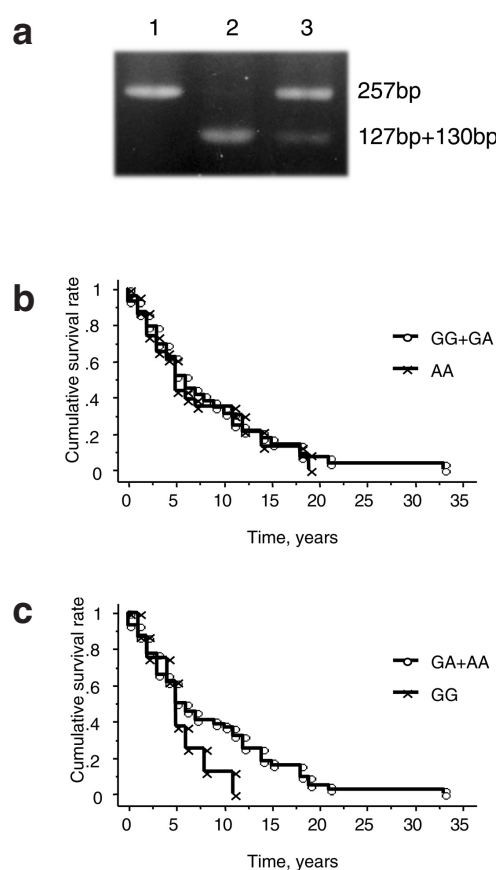
RV; 5'-GGAGGAGGGGGCAACAGG-3'

PCR 条件: バッファー組成 (50  $\mu$ l); 100 ng DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.4, 50 ml/L formamide, 0.5 mM of dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1  $\mu$ M プライマー, 1 unit Taq polymerase  
35 サイクル; denaturation 94 °C 30 秒; annealing 60 °C 30 秒; extension 72 °C 30 秒 / サイクル

Genotype の判定基準: PCR 生成物を AocI にて消化後, 3 % アガロースゲル電気泳動によるサイズ判定にて, 429 bp (+26bp) (消化) を C (-509) アリル, 455 bp (非消化) を T (-509) アリルとする<sup>39)</sup>. (Fig. 6a)



**Fig. 4.** MCP-1 G(-2518)A and the progression to ESRF in IgAN patients. a. Gel patterns of MCP-1 G(-2518)A polymorphism. Lane 1 shows the homozygous GG genotype, lane 2 is homozygous AA and lane 3 is heterozygous GA. b. GG+GA vs. AA. No significant difference was seen between these groups. c. GA+AA vs. GG. No significant difference was seen between these groups.



**Fig. 5.** CCR5 G59029A and the progression to ESRF in IgAN patients. a. Gel patterns of CCR5 G59029A polymorphism. Lane 1 shows the homozygous AA genotype, lane 2 is homozygous GG and lane 3 is heterozygous GA. b. GG+GA vs. AA. No significant difference was seen between these groups. c. GA+AA vs. GG. No significant difference was seen between these groups.



## 7) SELE (C1402T) 多型;

FW (C1402); 5'-TGAGGAGGGATTGAATTAC-3'

FW (T1402); 5'-TGAGGAGGGATTGAATTAT-3'

RV; 5'-ACAACCACCATCAATCAATGC-3'

PCR条件：バッファー組成 (50  $\mu$ l) ; 100 ng DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.4, 0.5 mM of dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1  $\mu$ M プライマー (RVおよびFW (C1402) もしくはFW (T1402)), 1 unit Taq polymerase

25サイクル；denaturation 95 °C 30秒；annealing 62 °C 30秒；extension 72 °C 1分／サイクル

Genotypeの判定基準：1 % アガロースゲル電気泳動によるサイズ判定にて，FW (C1402) プライマーを用いたPCRで502bpの生成物を認めるとC1402アリル，FW (T1402) プライマーを用いたPCRで502bpの生成物を認めるとT1402アリルとする<sup>9)</sup>． (Fig. 7a)

## 8) SELE (A561C) 多型;

FW; 5'-ATGGCACTCTGTAGGACTGCT-3'

RV; 5'-GTCTCAGCTCACGATCACCAT-3'

PCR条件：バッファー組成 (50  $\mu$ l) ; 100 ng DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH8.4, 0.1 mg/ml gelatin, 0.5 mM of dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1  $\mu$ M プライマー, 1 unit Taq polymerase  
35サイクル；denaturation 94 °C 30秒；annealing 60 °C 1分；extension 72 °C 1分／サイクル

Genotypeの判定基準：PCR生成物をPstIにて消化後，3 % アガロースゲル電気泳動によるサイズ判定にて，219bp+138bp (消化) をA561アリル，357bp (非消化) をC561アリルとする<sup>40)</sup>． (Fig. 8a)

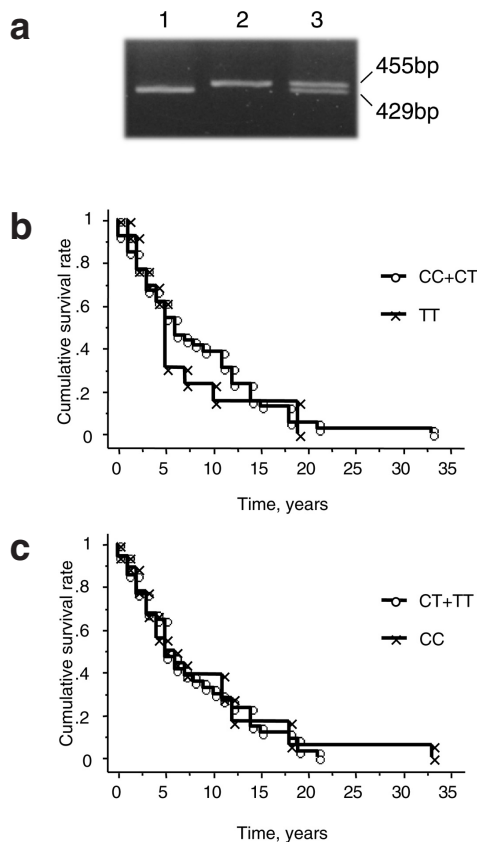
## 9) SELL (A-642G) 多型;

FW (A (-642)); 5'-GCCACTTAACAAGGACGTCCA-3'

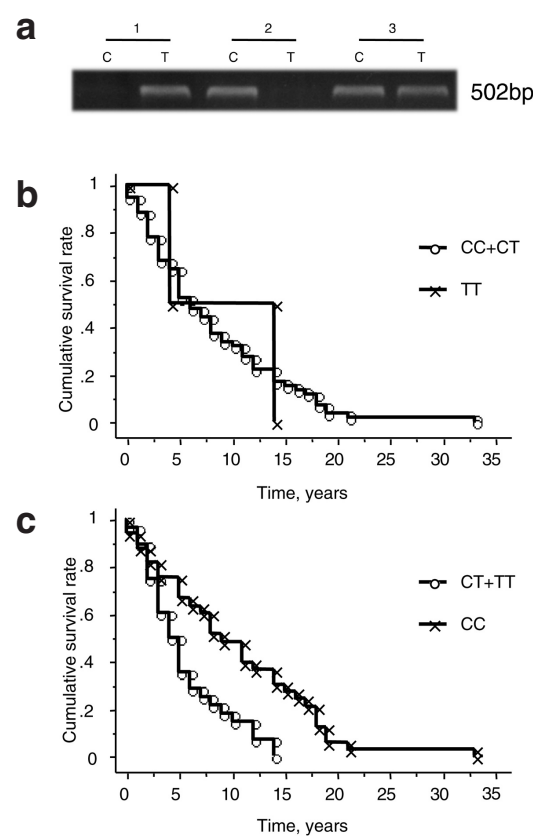
FW (G (-642)); 5'-GCCACTTAACAAGGACGTCCG-3'

RV; 5'-AGTAATGTGACTAGATTCTC-3'

PCR条件：バッファー組成 (50  $\mu$ l) ; 100 ng DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.4, 25 ml/L formamide, 0.5 mM of dNTP (dATP, dTTP, dCTP,



**Fig. 6.** TGF- $\beta$  1 C(-509)T and the progression to ESRF in IgAN patients. a. Gel patterns of TGF- $\beta$  1 C(-509)T polymorphism. Lane 1 shows the homozygous CC genotype, lane 2 is homozygous TT and lane 3 is heterozygous CT. b. CC+CT vs. TT. No significant difference was seen between these groups. c. CT+TT vs. CC. No significant difference was seen between these groups.



**Fig. 7.** SELE C1402T and the progression to ESRF in IgAN patients. a. Gel patterns of SELE C1402T polymorphism. Lane 1 shows the homozygous TT genotype, lane 2 is homozygous CC and lane 3 is heterozygous CT. b. CC+CT vs. TT. No significant difference was seen between these groups. c. CT+TT vs. CC. The progression to ESRF in IgA patients with T1402 was significantly faster than those without T1402. ( $p < 0.0009$ )

dGTP), 1  $\mu$ M プライマー (RVおよびFW (A(-642)) もしくはFW (G(-642))), 1unit Taq polymerase 25サイクル; denaturation 95 °C 30秒; annealing 63 °C 30秒; extension 72 °C 1分/サイクル

Genotypeの判定基準: 1%アガロースゲル電気泳動によるサイズ判定にて, FW (A(-642)) プライマーを用いたPCRで355bpの生成物を認めるとA(-642) アリル, FW (G(-642)) プライマーを用いたPCRで355bpの生成物を認めるとG(-642) アリルとする<sup>9)</sup>. (Fig. 9a)

10) SELL (C712T) 多型;

FW (C712); 5'-TACCATGGACTGTACTCACC-3'

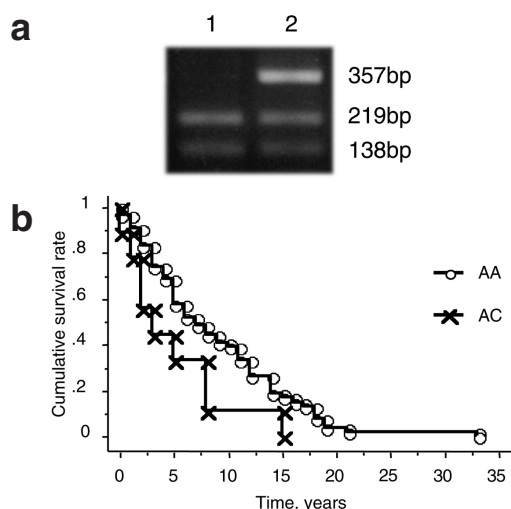
FW (T712); 5'-TACCATGGACTGTACTCACT-3'

RV; 5'-TGCAATGGCAATGAGAAAAA-3'

PCR条件: バッファー組成 (50  $\mu$ l); 100 ng DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.4, 15 ml/L formamide, 0.5 mM of dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1  $\mu$ M プライマー (RVおよびFW (C712) もしくはFW (T712)), 1unit Taq polymerase 25サイクル; denaturation 95 °C 30秒; annealing 62 °C 30秒; extension 72 °C 1分/サイクル

Genotypeの判定基準: 1%アガロースゲル電気泳動によるサイズ判定にて, FW (C712) プライマーを用いたPCRで437bpの生成物を認めるとC712アリル, FW (T712) プライマーを用いたPCRで437bpの生成物を認めるとT712アリルとする<sup>9)</sup>. (Fig. 10a)

**統計処理:** 腎生検から透析導入までの期間 (年) (phenotype) と遺伝子多型情報 (genotype) の相関関係を, 統計解析ソフト (Microsoft ExcelおよびStatview)



**Fig. 8.** SELE A561C and the progression to ESRF in IgAN patients. a. Gel patterns of SELE A561C polymorphism. Lane 1 shows the homozygous AA, and lane 2 is heterozygous AC. b. AC vs. AA. No significant difference was seen between these groups.

によりKaplan-Meier法を用いて検討する. Logrank (Mantel-Cox) 法にて検定し,  $p < 0.05$ を統計学的有意とする.

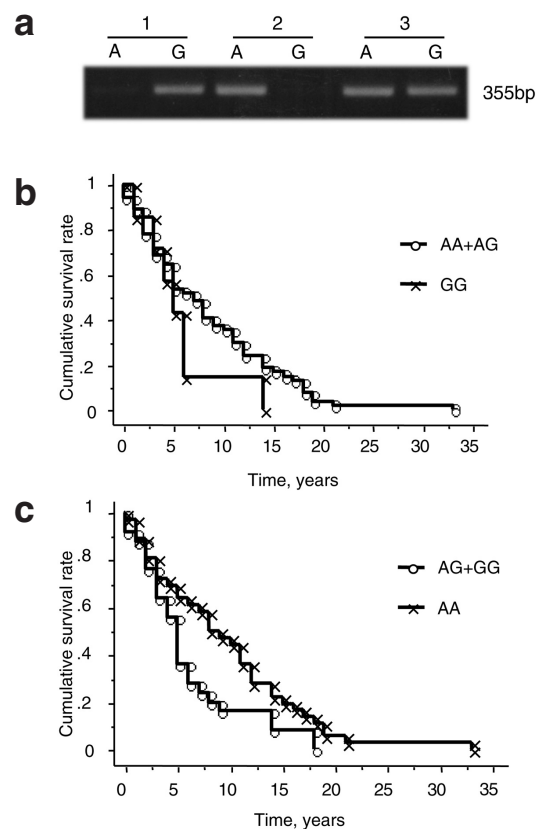
## 結 果

### 対象患者

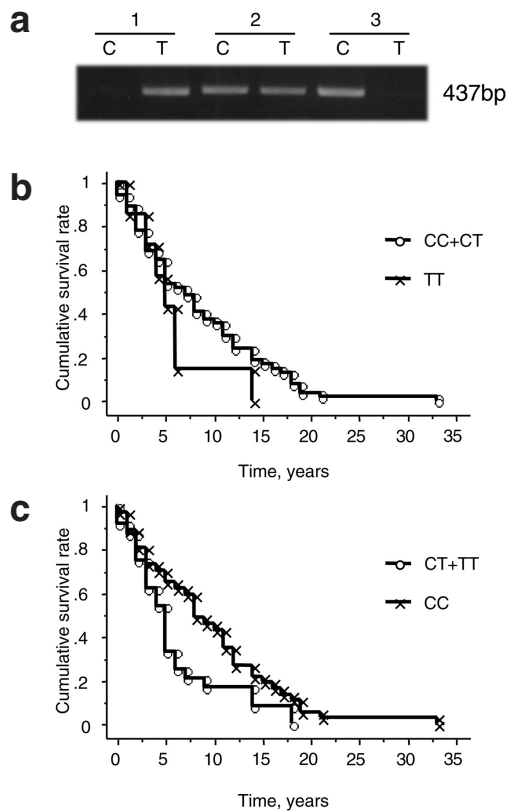
今回検討対象とした血液透析患者は, 平成15年3月31日までに本研究に組み込まれた63名 (男性40名, 女性23名) である. 腎生検時の平均年齢は33.0+13.3歳, 血液透析導入時の平均年齢は41.2+13.8歳. 腎生検から透析導入までの期間は最長で33年, 最短で0年, 平均8.2+6.5年であった. この間の治療内容の詳細は不明である.

### レニンアンギオテンシン系関連分子 (ACE, AGT) 遺伝子多型

対象患者におけるACE遺伝子多型 (D/I) およびAGT遺伝子多型 (M235T, A-20C) の分布をTable 1, 2に示す.



**Fig. 9.** SELL A(-642)G and the progression to ESRF in IgAN patients. a. Gel patterns of SELL A(-642)G polymorphism. Lane 1 shows the homozygous GG genotype, lane 2 is homozygous AA and lane 3 is heterozygous AG. b. AA+AG vs. GG. No significant difference was seen between these groups. c. AG+GG vs. AA. The progression to ESRF in IgA patients with G(-642) was significantly faster than those without G(-642). ( $p < 0.0352$ )



**Fig. 10.** SELL C712T and the progression to ESRF in IgAN patients. a. Gel patterns of SELL C712T polymorphism. Lane 1 shows the homozygous TT genotype, lane 2 is heterozygous CT and lane 3 is homozygous CC. b. CC+CT vs. TT. No significant difference was seen between these groups. c. CT+TT vs. CC. The progression to ESRF in IgA patients with T712 was significantly faster than those without T712. ( $p < 0.0349$ )

**Table 1.** Genotype distribution and allele frequency of the ACE gene

| Genotype | ACE(D/I) |       |
|----------|----------|-------|
|          | DD       | 4     |
|          | DI       | 34    |
|          | II       | 25    |
|          | Total    | 63    |
| Allele   | D        | 0.333 |
|          | I        | 0.667 |

**Table 2.** Genotype distribution and allele frequency of the AGT gene

| Genotype | AGT(M235T) |       | AGT(A-20C) |       |
|----------|------------|-------|------------|-------|
|          | MM         | 0     | AA         | 27    |
|          | MT         | 43    | AC         | 34    |
|          | TT         | 20    | CC         | 2     |
|          | Total      | 63    | Total      | 63    |
| Allele   | M          | 0.341 | A          | 0.698 |
|          | T          | 0.659 | C          | 0.302 |

また各遺伝子多型患者群の透析導入をエンドポイントとしたKaplan-Meier法を用いた比較検討結果をFig. 1~3に示す. ACE遺伝子多型においてはDアリル (DD+DI vs. II), Iアリル (DI+II vs. DD) ともエンドポイントへの到達に対して, 有意な影響は認められなかった (Fig. 1b, c). AGT遺伝子多型のM235Tに関しては, 対象患者内にMet/Metの症例は認められず, またMet/Thr vs. Thr/Thr間にも有意差がなかったため, AGT遺伝子のM235T多型においてはエンドポイントへの到達に対して有意な影響は認められなかった (Fig. 2b). 同様にA-20C多型に関しても, A(-20)アリル (AA+CA vs. CC), C(-20)アリル (CA+CC vs. AA) ともエンドポイントへの到達に対して, 有意な影響は認められなかった (Fig. 3b, c).

### ケモカイン, ケモカイン受容体 (MCP-1, CCR5) 遺伝子多型

対象患者におけるMCP-1遺伝子多型 (G(-2518)A) およびCCR5遺伝子多型 (G59029A) の分布をTable 3に示す. また各遺伝子多型患者群の透析導入をエンドポイントとしたKaplan-Meier法を用いた比較検討結果をFig. 4, 5に示す. MCP-1遺伝子多型においてはG(-2518)アリル (GG+GA vs. AA), A(-2518)アリル (GA+AA vs. GG) ともエンドポイントへの到達に対して, 有意な影響は認められなかった (Fig. 4b, c). またCCR5遺伝子多型のG59029Aに関しても, G59029アリル (GG+GA vs. AA), A59029アリル (GA+AA vs. GG) ともエンドポイントへの到達に対して, 有意な影響は認められなかった (Fig. 5b, c).

### TGF- $\beta$ 1遺伝子多型

対象患者におけるTGF- $\beta$ 1遺伝子多型 (C(-509)T) の分布をTable 4に示す. また各遺伝子多型患者群の透析導入をエンドポイントとしたKaplan-Meier法を用いた比較検討結果をFig. 6に示す. TGF- $\beta$ 1遺伝子多型においてはC(-509)アリル (CC+CT vs. TT), T(-509)アリル (CT+TT vs. CC) ともエンドポイントへの到達に対して, 有意な影響は認められなかった (Fig. 6b, c).

**Table 3.** Genotype distribution and allele frequency of the MCP-1/CCR5 genes

| Genotype | MCP-1(G-2518A) |       | CCR5(G59029A) |       |
|----------|----------------|-------|---------------|-------|
|          | GG             | 29    | GG            | 8     |
|          | GA             | 29    | GA            | 26    |
|          | AA             | 5     | AA            | 29    |
|          | Total          | 63    | Total         | 63    |
| Allele   | G              | 0.690 | G             | 0.333 |
|          | A              | 0.310 | A             | 0.667 |

### セレクチン (SELE, SELL) 遺伝子多型

対象患者におけるSELE遺伝子多型 (C1402T, A561C) およびSELL遺伝子多型 (A(-642)G, C712T) の分布を Table 5, 6に示す. また各遺伝子多型患者群の透析導入をエンドポイントとしたKaplan-Meier法を用いた比較検討結果をFig. 7~10に示す. SELE遺伝子のC1402T多型においてC1402アリル (CC+CT vs. TT) にはエンドポイントへの到達に対して有意な影響は認められなかったが (Fig. 7b), T1402アリルを有するC/TヘテロおよびT/Tホモの患者は有意に短期間で末期腎不全へ進行していた (CT+TT vs. CC;  $p<0.0009$ ) (Fig. 7c). またA561C多型に関しては, 今回の対象患者内にCCの症例は認められず, AC vs. AA間にも有意差がなかったため, エンドポイントへの到達に対して有意な影響は認められなかった (Fig. 8b). 一方, SELL遺伝子のA(-642)G多型においてA(-642)アリル (AA+AG vs. GG)にはエンドポイントへの到達に対して有意な影響は認められなかったが (Fig. 9b), G(-642)アリルには軽度の関連性が認められた (AG+GG vs. AA;  $p<0.0352$ ) (Fig. 9c). またC712T多型に関してもC712アリル (CC+CT vs. TT) にはエンドポイントへの到達に対して有意な影響は認められなかったが (Fig. 10b), T712アリルには軽度の関連性が認められた (CT+TT vs. CC;  $p<0.0349$ ) (Fig. 10c). よってIgA腎症患者において, SELE遺伝子C1402T多型のT1402アリル, SELL遺伝子A(-642)G多型のG(-642)アリルおよびC712T多型のT712アリルが末期腎不全の早期進行リスクとなる可能性が示された.

**Table 4.** Genotype distribution and allele frequency of the TGF- $\beta$ 1 gene

| TGF- $\beta$ 1(C-509T) |       |       |
|------------------------|-------|-------|
| Genotype               | CC    | 22    |
|                        | CT    | 25    |
|                        | TT    | 16    |
|                        | Total | 63    |
| Allele                 | C     | 0.548 |
|                        | T     | 0.452 |

**Table 5.** Genotype distribution and allele frequency of the SELE gene

| SELE(C1402T) |       |       | SELE(A561C) |       |
|--------------|-------|-------|-------------|-------|
| Genotype     | CC    | 34    | AA          | 54    |
|              | CT    | 27    | AC          | 9     |
|              | TT    | 2     | CC          | 0     |
|              | Total | 63    | Total       | 63    |
| Allele       | C     | 0.754 | A           | 0.929 |
|              | T     | 0.246 | C           | 0.071 |

### 考 察

今回, 血管内皮細胞において炎症性細胞の粘着に関与する細胞接着因子であるE-セレクチンのC1402T多型のT 1402アリル, L-セレクチンのA-642G多型のG (-642) アリルおよびC712T多型のT712アリルとIgA腎症の腎不全進行に有意な関連性が認められた. 炎症性細胞の糸球体および間質への浸潤は, IgA腎症を代表とする様々なタイプの糸球体疾患における中心的な病理であり, 特に間質への細胞浸潤は機能予後と相関する所見として注目されている<sup>41, 42</sup>. この細胞浸潤に関与する細胞接着因子は, セレクチン, インテグリンと免疫グロブリンsuperfamily蛋白の3群に大別される. セレクチンは更に, サイトカインによって活性化された血管内皮細胞に発現されるE-セレクチン (SELE), 流血中の白血球に発現されるL-セレクチン (SELL) と活性化された血小板および血管内皮細胞に発現されるP-セレクチン (SELP) に分類される<sup>41</sup>. IgA腎症の腎組織ではその進行度に応じて, 間質血管の内皮細胞におけるSELE/SELP発現およびSELL陽性細胞浸潤が亢進している<sup>43</sup>. 東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターの中村らはこのセレクチンとIgA腎症に着目し, 日本人のSELE, SELLおよびSELP遺伝子に認められるSNPとIgA腎症の発症との関連性を明かするため, case-control相関分析を行った<sup>9</sup>. その結果, SELE遺伝子C1402T多型のT1402アリル, SELL遺伝子A(-642)G多型のG(-642)アリルおよびC712T多型のT712アリルがそれぞれIgA腎症患者において高頻度に認められ, これらの多型の組み合わせであるTGTハプロタイプはIgA腎症発症の有意なリスクファクターと考えられた. このSELE/SELL遺伝子多型のIgA腎症発症に対する直接的な役割は不明であるが, SELE遺伝子C1402T多型およびSELL遺伝子C712T多型ではアミノ酸置換を生じ, またSELL遺伝子A(-642)G多型はプロモーター活性に影響し得る. つまりTGTハプロタイプのヒトでは, SELE分子における468番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに, SELL分子における238番目のアミノ酸がプロリンからセリンに置換されており, それぞれセレクチン分子としての機能

**Table 6.** Genotype distribution and allele frequency of the SELL gene

| SELL(A-642G) |       |       | SELL(C712T) |       |
|--------------|-------|-------|-------------|-------|
| Genotype     | AA    | 37    | CC          | 38    |
|              | AG    | 19    | CT          | 18    |
|              | GG    | 7     | TT          | 7     |
|              | Total | 63    | Total       | 63    |
| Allele       | A     | 0.738 | C           | 0.746 |
|              | G     | 0.262 | T           | 0.254 |



に影響する可能性があり、またプロモーター活性の変化によりSELL遺伝子(分子)発現が変化している可能性がある<sup>9)</sup>。その他、SELE遺伝子A561C多型のC561アリルに関しては心筋梗塞発症との有意な関連性が報告されている<sup>40)</sup>。このC561アリルでは128番目のアミノ酸がセリンからアルギニンに置換されており、*in vitro*の検討よりこのSELE分子の炎症性細胞粘着作用の亢進が認められることから、心筋梗塞の発症に関与するものと想定されている。しかし今回の検討ではCA vs. AA間の比較で有意差は認められず、C561アリルにIgA腎症の腎不全進行との関連性を証明することはできなかった。IgA腎症の腎不全進行と高度の関連性を認めたSELE遺伝子C1402T多型と軽度の関連性を認めたSELL遺伝子A(-642)G多型およびC712T多型は、中村らによってIgA腎症発症素因として報告された多型群であり、これらの多型が発症のみならず進展にも影響している可能性が示唆される。特にSELE遺伝子C1402T多型のT1402アリルとIgA腎症の腎不全進行との関連は特に有意であり、SELL遺伝子A(-642)G多型のG(-642)アリルおよびC712T多型のT712アリルはこのアリルとのハプロタイプ形成の結果として統計学的有意に検出された可能性がある。ただし今回の検討はunivariate analysisであり、T1402アリルが独立した進行促進因子であるかは明らかではない。今後はSELE遺伝子のT1402アリルが直接的にIgA腎症の腎不全進行に関与するのか、またはIgA腎症の腎不全進行に直接的に影響する隣接する未知の遺伝子多型と単にハプロタイプを形成しているのかを明らかにする必要がある。SELE遺伝子のT1402アリル(468番目のチロシン)がSELE分子機能、すなわち炎症性細胞の粘着作用にいかに関与し得るか、*in vitro*の系を用いて検討していく予定である。またSNP以外の可能性のある影響因子を検討項目に加え、Cox比例ハザードモデル等のmultivariate analysisを行う予定である。

今回検討した遺伝子多型の内、レニンアンジオテンシン系(RAS)関連分子、特にACE遺伝子のイントロン16に認められるdeletion/insertion(D/I)多型は様々な疾患との関連性が検討され、一部の疾患では有意な関連が認められている<sup>44)</sup>。Dアリルにより血中ACE濃度が上昇する傾向が認められ、RASの亢進状態が推定されている<sup>45)</sup>。腎疾患においても、IgA腎症、1型および2型糖尿病性腎症、多発性嚢胞腎等において発症、腎不全への進行、ACE阻害薬の有効性といった観点から多くの検討がなされている<sup>26-30, 32-34)</sup>。IgA腎症および2型糖尿病性腎症に関してはDDタイプで腎症が進行性であること、またACE阻害薬が蛋白尿の減少や腎機能障害の抑制に有効であることを示唆する結果が報告されているが<sup>10-12, 18)</sup>、否定的な結果や1型糖尿病性腎症ではIIタイプで上記の形質が認められるという報告もあり<sup>26-30, 32-34)</sup>、いまだ一定の見解には達し

ていない。一方、AGT遺伝子のM235T多型に関しては、IgA腎症および2型糖尿病性腎症においてT235アリルが腎症の進行性やACE阻害薬/アンジオテンシンII受容体拮抗薬の有効性に有意に関連するという結果が優勢である<sup>12-14, 19)</sup>。T235アリルは血清アンジオテンシノーゲン濃度の上昇および本態性高血圧の発症との関連が報告されている<sup>46)</sup>。この点に関して新潟大学の後藤らはAGT遺伝子プロモーター領域のA(-20)C多型に着目し、C(-20)アリルを有するプロモーターは転写活性が高く血中AGT濃度が上昇する傾向が認められ、IgA腎症の進行性に有意に相関し、かつT235アリルとハプロタイプを形成することから、T235アリルとRASの亢進状態との関係のある程度説明できることを報告している<sup>13)</sup>。今回の検討結果では、ACE遺伝子のD/I多型、AGT遺伝子のM235T多型、A(-20)C多型のすべてにおいて、IgA腎症患者の腎生検から透析導入までの期間への有意な影響は証明できなかった。

TGF- $\beta$ 1は臓器線維化を促進する中心的な増殖因子であり、腎疾患に関してはC788T多型のT788アリルと1型糖尿病における腎症の発症に関連性が報告されている<sup>20)</sup>。しかし、この関連性は非常に軽微であり( $p < 0.03$ )、またT788アリル頻度が低いため、今回の検討ではTGF- $\beta$ 1遺伝子プロモーター領域のC(-509)T多型を選択した。T(-509)アリルは血中TGF- $\beta$ 1濃度の上昇およびオステオポロシスの進行や発癌に関連性が報告されている<sup>47)</sup>。炎症性細胞の遊走/浸潤に関連するケモカイン、ケモカインレセプター分子については、多くの腎疾患における関与が検討されており<sup>42, 48)</sup>、近年は炎症性病巣のみではなく、糖尿病性腎症の線維化病巣におけるMCP-1の作用が注目されている<sup>49)</sup>。それぞれの遺伝子多型に関しては、MCP-1遺伝子のG(-2518)A多型およびCCR5遺伝子のG59029A多型が腎疾患との関連性が報告されており、MCP-1遺伝子のG(-2518)アリルとCCR5遺伝子のA59029アリルは移植腎の腎機能低下と有意に相関し<sup>22, 23)</sup>、また後者は2型糖尿病性腎症の発症にも関連性が認められる<sup>21)</sup>。CCR5はMCP-1との結合性は低く、RANTESやMIP-1といったケモカインのレセプターと考えられる。一方、MCP-1のレセプターはCCR2と考えられ、CCR2遺伝子のG46295A多型におけるA 46295アリルは移植腎の腎機能低下との相関が報告されているが<sup>23)</sup>、2型糖尿病性腎症との関連は否定されており<sup>21)</sup>、今回の検討には加えなかった。今回の検討結果では、TGF- $\beta$ 1遺伝子のC(-509)T多型、MCP-1遺伝子のG(-2518)A多型、CCR5遺伝子のG59029A多型のすべてにおいて、IgA腎症患者の腎生検から透析導入(末期腎不全への到達)までの期間への有意な影響は認められなかった。これらの遺伝子多型に関しては、RAS関連分子と異なり現在までのところIgA腎症に対する関連性の報告は認められない。また最終的に透析導入

となった進行性IgA腎症患者のみを対象とする今回の検討からも、やはりRAS関連分子の場合と同様に有意な加速因子であるとは証明できなかった。しかし今回のKaplan-Meier法を用いた検討は、起点を腎生検時としたため腎障害度が不均一な可能性のある症例群を対象としており、かつその症例数も限られたものとなったため、RAS関連分子、増殖因子、ケモカイン、ケモカインレセプター分子等の遺伝子多型、特にその低頻度のアリルとIgA腎症の末期腎不全進行との関連性を否定することはできない。今後、厳選された症例を更に増やした再検討が必要であると考えられる。

各腎疾患の発症機序はそれぞれ仮説が提起されているに過ぎないが、免疫／炎症、代謝異常、循環動態等の関与が疾患毎に大きく異なっており、また各疾患特異的な病理組織像が認められる。一方、各腎臓疾患が末期腎不全へと進行すると、ほぼ同一の荒廃した萎縮腎（腎線維化）となるため、その過程にfinal common pathwayの存在が推定される<sup>42)</sup>。現在までの検討では様々な遺伝子多型と腎疾患の発症／進展および治療への反応性が検討されているが、末期腎不全までの進展をエンドポイントとした疾患予後との関連を検討した報告は認められない。今回の検討ではIgA腎症症例に対象を限定しているが、後ろ向き研究であるという制約はあるものの末期腎不全への進行速度を見ているため、あらゆる腎疾患が末期腎不全へと至る過程で普遍的にたどるfinal common pathwayとしての腎線維化とSELE/SELL遺伝子多型との関連性を検出できた可能性がある。多くの腎疾患において腎機能予後ともっとも相関するのは腎線維化病巣であるが<sup>42)</sup>、セレクチン分子はその線維化病巣に前駆する間質への細胞浸潤形成に関与しており<sup>41)</sup>、その意味でもこれらの多型がfinal common pathwayに影響する遺伝的素因である可能性を示唆している。今後、前向き研究および他の原疾患を対象とした後ろ向き研究によって更に検討を加える必要があるが、このSELE/SELL遺伝子多型はあらゆる腎疾患の予後推定の基本になり、またドナー腎臓の経過にも影響する可能性がある。さらには積極的にこれらの遺伝子産物の作用をmodifyすることで、進行性腎臓疾患の普遍的な治療法の開発にも貢献し得るものと期待される。

## まとめ

透析導入に至ったIgA腎症患者63名を対象に、その腎機能低下の進行性と腎疾患に関連する既知分子の遺伝子多型との関連性を後ろ向きに検討した。検討対象とした既知分子とその多型としては、アンギオテンシン変換酵素遺伝子のD/I多型、アンギオテンシノーゲン遺伝子のM235T、A(-20)C多型、MCP-1遺伝子のG-2518A多型、CCR5遺伝子のG59029A多型、TGF- $\beta$ 1遺伝子のC(-509)T多型、SELE遺伝子

のC1402T、A561C多型、SELL遺伝子のA(-642)G、C712T多型とした。これらの内、SELE遺伝子C1402T多型のT1402アリル、SELL遺伝子A(-642)G多型のG(-642)アリルおよびC712T多型のT712アリルを有する患者群において、腎生検から透析導入までの期間が有意に短かった。これらの多型が独立した影響因子かは明らかではなく、また未知のIgA腎症進行性素因とハプロタイプを形成して間接的に影響している可能性は否定できないが、特に強い相関を認めたSELE遺伝子のT1402アリルではSELE分子の468番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに置換されており、このアミノ酸の構成がSELE分子の機能変化を通じて直接的に炎症性細胞浸潤に影響している可能性があり、今後in vitroの系などを用いた検討で明らかにしていく必要がある。

## 謝 辞

本研究にあたり、御指導、御協力を頂いた埼玉医科大学腎臓内科学教室 鈴木洋通教授、岡田浩一講師、菅野義彦講師および教室員、ならびに関連病院の諸先生各位に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) 川村哲也. 原発性糸球体疾患—IgA腎症を中心に—。日腎会誌 2002;44:514-23.
- 2) Berger J, Hinglais N. Les depots intercapillaires d'IgA-IgG. J Urol Nephrol 1968;74:694-5.
- 3) Koyama A, Igarashi M, Kobayashi M. Natural history and risk factors for immunoglobulin A nephropathy in Japan. Research group on progressive renal diseases. Am J Kidney Dis 1997; 29:526-32.
- 4) 富野康日己. IgA腎症診療指針. 日腎会誌 2002;44: 487-93.
- 5) Berthouix FC, Gagne A, Sabatier JC, Le Petit JF, Marcellin M, Mercier B, et al. HLS-Bw35 and mesangial IgA glomerulonephritis. N Eng J Med 1978;298:1034-5.
- 6) Gharavi AG, Yan Y, Scolari F, Schena FP, Frasca GM, Ghiggeri GM, et al. IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22-23. Nat Genet 2000;26:354-7.
- 7) Wakai K, Kawamura T, Matsuo S, Hotta N, Ohno Y. Risk factors for IgA nephropathy: a case-control study in Japan. Am J Kidney Dis 1999;33:738-45.
- 8) Akiyama F, Tanaka T, Yamada R, Ohnishi Y, Tsunoda T, Maeda S, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the class II region of the major histocompatibility complex in Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. J Hum Genet 2002;



- 47:532-8.
- 9) Takei T, Iida A, Nitta K, Tanaka T, Ohnishi Y, Yamada R, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in selectin genes and immunoglobulin A nephropathy. *Am J Hum Genet* 2002;70:781-6.
  - 10) Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T, Kitajima T, Miyazaki Y, Nagasawa R, et al. Role of the deletion of polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of IgA nephropathy. *J Clin Invest* 1995;96:2162-9.
  - 11) Hunley TE, Julian BA, Phillips JA, Summar ML, Yoshida H, Horn RG, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: potential silencer motif and impact on progression in IgA nephropathy. *Kidney Int* 1996;49:571-7.
  - 12) Gumprecht J, Zychma MJ, Grzeszczak W, Zukowska-Szczechowska E. The End-Sage Renal Disease Study Group: Angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion and angiotensinogen M235T polymorphisms: risk of chronic renal failure. *Kidney Int* 2000;58:513-9.
  - 13) Goto S, Narita I, Saito N, Watanabe Y, Yamazaki H, Sakatsume M, et al. A(-20)C polymorphism of the angiotensinogen gene and progression of IgA nephropathy. *Kidney Int* 2002;62:980-5.
  - 14) Narita I, Goto S, Saito N, Song J, Omori K, Kondo D, et al. Angiotensinogen gene variation and renoprotective efficacy renin-angiotensin system blockade in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2003;64:1050-8.
  - 15) Shu KH, Lee SH, Cheng CH, Wu MJ, Lian JD. Impact of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism on IgA nephropathy. *Kidney Int* 2000;58:783-9.
  - 16) Nagasawa R, Matsumura O, Maruyama N, Mitarai T, Isoda K. T-cell receptor beta-chain gene polymorphism and the prognosis of IgA nephropathy in Japanese patients. *Nephron* 1995;70:502-3.
  - 17) Li PKT, Poon P, Poon ASY, Szeto CC, Yu AWY, Lai KN. Association of IgA nephropathy with T-cell receptor constant alpha chain gene polymorphism. *Am J Kidney Dis* 1997;30:260-4.
  - 18) Dudley CRK, Keavney B, Stratton IM, Turner RC, Ratcliffe PJ. U.K. prospective diabetes study XV: relationship of renin-angiotensin system gene polymorphisms with microalbuminuria in NIDDM. *Kidney Int* 1995;48:1907-11.
  - 19) Freire MBS, Ji L, Onuma T, Orban T, Warram JH, Krolewski AS. Gender-specific association of M235T polymorphism in angiotensinogen gene and diabetic nephropathy. *Hypertension* 1998;31:896-9.
  - 20) Pociot F, Hansen PM, Karlsen AE, Langdahl BL, Johannesen J, Nerup J. TGF- $\beta$ 1 gene mutations in insulin-dependent diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2302-7.
  - 21) Nakajima K, Tanaka Y, Nomiyama T, Ogiwara T, Piao L, Sakai K, et al. Chemokine receptor genotype is associated with diabetic nephropathy in Japanese with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:238-42.
  - 22) Krueger B, Schroeppel B, Ashkan R, Marder B, Zuelke C, Murphy B, et al. A monocyte chemoattractant protein-1 polymorphism and outcome after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2585-9.
  - 23) Abdi R, Huong TTB, Sahagun-Ruiz A, Murphy PM, Brenner BM, Milford EL, et al. Chemokine receptor polymorphism and risk of acute rejection in human renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:754-8.
  - 24) McLaren AJ, Marshall SE, Haldar NA, Mullighan CG, Fuggle SV, Morris PJ, et al. Adhesion molecule polymorphisms in chronic renal allograft failure. *Kidney Int* 1999;55:1977-82.
  - 25) Konoshita T, Miyagi K, Onoe T, Katano K, Mutoh H, Nomura H, et al. Effect of ACE gene polymorphism on age at renal death in polycystic kidney disease in Japan. *Am J Kidney Dis* 2001;37:113-8.
  - 26) Penno G, Chaturvedi N, Talmud PJ, Cotroneo P, Manto A, Nannipieri M, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism on progression of renal disease and the influence of ACE inhibition in IDDM patients: findings from the EUCLID Randomized Controlled Trial. ERUODIAB Controlled Trial of Lisinopril in IDDM. *Diabetes* 1998;47:1507-11.
  - 27) Jacobsen P, Rossing K, Rossing P, Tarnow L, Mallet C, Poirier O, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and ACE inhibition in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1998;53:1002-6.
  - 28) Perna A, Ruggerenti P, Testa A, Spoto B, Benini R, Misefari V, et al. ACE genotype and ACE inhibitors induced renoprotection in chronic proteinuric nephropathies. *Kidney Int* 2000;57:274-81.
  - 29) Suzuki S, Suzuki Y, Kobayashi Y, Harada T, Kawamura T, Yoshida H, et al. Insertion/deletion polymorphism in ACE gene is not associated with renal progression in Japanese patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2000;35:896-903.

- 30)Frimat L, Philippe C, Maghakian MN, Jonveaux P, de Ligny BH, Guillemin F, et al. Polymorphism of angiotensin converting enzyme, angiotensinogen, and angiotensin II type 1 receptor genes and end-stage renal failure in IgA nephropathy: IGARAS-a study of 274 men. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:2062-7.
- 31)Schena FP, D'Altri C, Cerullo G, Manno C, Gesualdo L. ACE gene polymorphism and IgA nephropathy: an ethnically homogeneous study and a meta-analysis. *Kidney Int* 2001;60:732-40.
- 32)Kimura H, Gejyo F, Suzuki Y, Suzuki S, Miyazaki R, Arakawa M. Polymorphisms of angiotensin converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 genes in diabetes and macroangiopathy. *Kidney Int* 1998;54:1659-69.
- 33)Haas M, Yilmaz N, Schmidt A, Neyer U, Arneitz K, Stummvoll HK, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism determines the antiproteinuric and systemic hemodynamic effect of enalapril in patients with proteinuric renal disease. Austrian Study Group of the Effects of Enalapril Treatment in Proteinuria Renal Disease. *Kidney Blood Press Res* 1998;21:66-9.
- 34)van Essen GG, Rensma PL, de Zeeuw D, Sluiter WJ, Scheffer H, Apperloo AJ, et al. Association between angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and failure of renoprotective therapy. *Lancet* 1996; 347:94-5.
- 35)Hsu SIH, Ramirez SB, Winn MP, Bonventre JV, Owen WF. Evidence for genetic factors in the development and progression of IgA nephropathy. *Kidney Int* 2000;57:1818-35.
- 36)Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene. *Nucleic Acids Res* 1992;20:1433.
- 37)Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated Met235Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Genet* 1993;2:609-10.
- 38)Jibiki T, Terai M, Shima M, Ogawa A, Hamada H, Kanazawa M, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 gene regulatory region polymorphism and serum levels of monocyte chemoattractant protein 1 in Japanese patients with Kawasaki disease. *Arthritis Rheum* 2001;44:2211-2.
- 39)Lario S, Inigo P, Campistol JM, Poch E, Rivera F, Oppenheimer F. Restriction enzyme-based method for transforming growth factor-b1 genotyping: nonisotopic detection of polymorphisms in codons 10 and 25 and the 5'-flanking region. *Clin Chem* 1999;45:1290-2.
- 40)Yoshida M, Takano Y, Sasaoka T, Izumi T, Kimura A. E-selectin polymorphism associated with myocardial infarction causes enhanced leukocyte-endothelial interactions under flow conditions. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:783-8.
- 41)Adler S, Brady HR. Cell adhesion molecules and the glomerulonephritis. *Am J Med* 1999;107:371-86.
- 42)Okada H, Strutz F, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Possible mechanisms of renal fibrosis. *Contrib Nephrol* 1996;118:147-54.
- 43)Chaudhury PR, Wu B, King G, Campbell M, Macleod AM, Haites NE, et al. Adhesion molecule interactions in human glomerulonephritis: importance of the tubulointerstitium. *Kidney Int* 1996;49:127-34.
- 44)Baudin B. New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:256-65.
- 45)Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-6.
- 46)Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevstev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992;71:169-80.
- 47)Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type b1. *Hum Mol Genet* 1999;8:93-7.
- 48)Okada H, Moriwaki K, Kalluri R, Imai H, Ban S, Takahama M, et al. Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 expression in tubular epithelium attenuates tubulointerstitial alteration in rat Goodpasture syndrome. *Kidney Int* 2000; 57:927-36.
- 49)Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, et al. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000;58: 1492-9.