

C 40±4mg/dl、LDL-C 159±29mg/dlとFCHLのそれに類似していた。

3)FCHLの遺伝子解析においては、LDLレセプター遺伝子共通変異(K790X)およびアポB遺伝子(コドン3456～3553領域)の変異を認めなかった。

4)LPL遺伝子変異においては、S447X ホモ接合体1例(1.4%)、ヘテロ接合体11例(14.9%)を認めたが、健常対照者と有意差を認めず(p=0.40)、FCHLの原因遺伝子ではないと考えられた。

【謝辞】

一般住民健診の成績は、珠洲市および珠洲保健所のデータを使用させて頂きました。

【文献】

- 1) Kane JP, Havel RJ: Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. in Scriver CR. et al (ed): The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7th ed. New York, McGraw-Hill Inc. 1995. p1981 - p2030.
- 2)新井智子、塚田敏彦、大久保実、村勢敏郎。日本人の高TG血症におけるLPL遺伝子変異の検索。動脈硬化。1998;25(suppl):141.
- 3)野原 淳、梶波康二、馬淵 宏（発表予定）。
- 4)野原 淳、野路善博、藤堂康宏、川尻剛照、堀田孝裕、松下裕之、稲津明広、梶波康二、小泉順二、馬淵 宏。Denaturing Gradient-Gel Electrophoresis (DGGE)法によるFamilial Defective Apolipoprotein B-100 (FDB)の検討。動脈硬化。1997;25:132.

発生工学的的手法による動脈硬化進展抑制因子の探索

分担研究者 山田信博 (東京大学医学部糖尿病・代謝内科)

研究協力者 石橋 俊、大須賀淳一、野牛宏晃 (同上)

矢崎義雄 (同 循環器内科)

[はじめに]

ヒトの家族性高コレステロール血症ホモ接合体のモデルであるLDL受容体ノックアウトマウス(LDLRKO)はLDLの代謝障害の結果著明な高脂血症を呈しており、食事負荷の追加によって、粥状動脈硬化が短期間に進展する¹⁾。このマウスに動脈硬化進展抑制因子としての候補遺伝子を操作して遺伝子導入し、動脈硬化におこる変化を観察した。遺伝子導入の方法として、遺伝子変異を有するマウスの交配による遺伝子導入方法が、動脈硬化のような病像の完成に長時間を要する疾患の治療には、適切と考えられた。

検定すべき遺伝子変異として、以下の3種類の遺伝子を検討した。1) リポタンパクリパーゼ(LPL)はトリグリセリド(TG)リッチリポタンパクのTGを加水分解する酵素である。このヒトcDNAをCAGプロモーター下に過剰発現するトランスジェニックマウスと交配して、LPLのトランスジーン(Tg)をヘテロに有するLDLRKO(LPLTg/LDLRKO)を作成し、LDLRKOと差異を検討した。血清TG値は著明な抑制が観察され、血清TC値も1/2に抑制された。粥腫面積は1/20に抑制された。2) アポEはTGリッチリポタンパクの肝臓による異化において重要なアポタンパクであり、LDLRのみならずアポEレセプターのリガンドとしての機能を有する。ラットアポE遺伝子をマウスメタロチオネイン(MMT)のプロモーターによって過剰に発現するトランスジェニックマウスと交配して、アポEのTgをヘテロとホモにもつLDLRKO(アポETg/LDLRKO)を作成した。亜鉛によるMMTの活性誘導により、血中のラットアポE濃度は増加し、それに伴い、血清TC値とアポB濃度の低下が観察された。血清TC値の低下率に平行して、粥腫面積も抑制された。3) アポBにはアポB-100とアポB-48の2種類の分子種が存在する。両者は同一遺伝子の産物であるが、アポB-100のmRNAの6666番目のシチジンをウリジンに変換する酵素反応によってストップコドンが導入され、アポB-100のアミノ末端48%に相当する産物であるアポB-48が生成される。この機構はアポBmRNA editingと呼ばれる。われわれは、この酵素反応の触媒活性中心を構成するタンパクであるAPOBEC-1を欠損するマウスであるAPOBEC-1KOを、ジーンターゲティングによって作成した。更に、APOBEC-1KOをLDLRKOに交配してAPOBEC-1/LDLRKOを作成した。APOBEC-1/LDLRKOのLDLはLDLRKOよりも高値であった。また、高脂肪食負荷後の粥腫には差は認められなかった。

LPLやアポEの肝臓での過剰発現は動脈硬化抑制因子であることを明らかにした。

【目的】

動脈硬化症は、脂質代謝、高脂血症、糖尿病などの多様な危険因子が知られている。これらのなかで、どの因子にどのような働きかけをすべきかという問いに対する答えは必ずしも明確ではない。近年、大規模長期臨床試験の結果が次々に明らかにされ、コレステロール低下療法が有力な動脈硬化症の治療のひとつと考えられるに至っている。しかるに、

それ以外のアプローチについては、余りにも多くのパラメーターが存在し、それら全てについて臨床試験の俎上にのせるのは不可能と言わざるを得ない。従って、候補となる攻略方法について、効率よくスクリーニングするシステムが渴望されている。動物を用いた薬効の検定などの古典的方法がそのための有力な方法として注目されている。そこで、本研究では、近年目覚ましい進歩を遂げつつある発生工学的手法がこの領域に応用可能かを検証した。

動脈硬化モデル動物としては、低比重リポタンパク受容体ノックアウトマウス(low density lipoprotein receptor knockout mice; LDLRKO)とアポEKOが普及している。前者は、ヒトの遺伝性高脂血症である家族性高コレステロール血症(Familial hypercholesterolemia; FH)のモデルであり、ヒトFHのホモ接合体と同様な血清LDLコレステロールの著明な増加が観察される。動脈硬化も、高脂肪食餌負荷によって、短期間に著しい粥腫の形成が観察される。

動脈硬化進展抑制因子の候補として、トリグリセリド(TG)リッチリポタンパクの代謝に重要な意義を有する3種類のタンパクを選択した。1) リポタンパクリパーゼ(lipoprotein lipase; LPL)はTGリッチリポタンパクのTGを加水分解する酵素であり、カイロミクロンに作用してカイロミクロンレムナント(CR)を生じ、超低比重リポタンパク(very low density lipoprotein; VLDL)に作用して、中間比重リポタンパク(intermediate density lipoprotein; IDL)や、更にLDLを生じる。一般に、CR、IDL、LDLはカイロミクロンやVLDLに比較して強い動脈硬化促進作用を有すると考えられており、その意味でLPLは動脈硬化惹起性(pro-atherogenic)であるともいえる。一方、アポB含有リポタンパクは肝臓によって血中から除かれる。アポB-100のLDLR結合部位の露出や、LDLRの強力なりガンドであるアポEがリポタンパク上に乗るためには、LPLの作用が必須と考えられている。また、HDL生成の一部は、TGリッチリポタンパクの脂肪分解時に放出されるアポタンパクを核に形成されると考えられている。これらの知見は、LPLの抗動脈硬化(anti-atherogenic)作用を支持する。

2) アポEはTGリッチリポタンパクの主要な構成アポタンパクであり、前述のように、LDLRの強力なりガンドとして、肝臓による代謝を規定する。一方、アポEに富むリポタンパクは、肝臓のLDLRのみならず血管壁のLDLRにも親和性を有するため、状況によっては、アポEが過剰な状態は動脈壁への脂質沈着を促進し、proatherogenicに働く可能性がある。

3) アポBは、カイロミクロン、CR、VLDL、IDL、LDLなどのアポB含有リポタンパクの主要な構成アポタンパクである。ほ乳類においてはアポB-100とアポB-48の2種類のアポBが存在する。特に、ヒトにおいては、小腸で分泌されるアポB含有リポタンパクであるカイロミクロンのアポBはアポB-48のみで、肝臓から分泌されるVLDLはアポB-100のみで構成される。アポB-100とアポB-48の機能上の決定的な相違は、アポB-100にはLDLR結合部位とapo(a)の結合部位があるのに、アポB-48はそれらを欠く点である。アポB-100もアポB-48も、アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸を多量に含有しており、これらの塩基性部位が血管壁のプロテオグリカンに対して親和性を持つために、アポB含有リポタンパクは血管に沈着しやすく、それがアポB含有リポタンパクに動脈硬化惹起性を賦与すると考えられている。従って、アポB-48の約2倍の長さのあるアポB-100の

ほうがより強い動脈硬化惹起性を有すると考えられる。アポB-48はアポBmRNA editing と呼ばれる機序によって生成される。アポB-100mRNAの6666番目のシチジンをウラシルに変換する酵素反応によってストップコドンを生じ、アポB-100のアミノ末端48%に相当する産物であるアポB-48が生成される。この機構をジーンターゲティングにより破壊した場合、血液中のすべてのアポBはアポB-100となる。

【方 法】

2-1. マウス：LDLRKO¹⁾、LPLTg、アポETg、APOBEC-1KO²⁾は既に報告した。

2-2: APOBEC-1KOの作成：APOBEC-1の活性中心に相当する部位をネオマイシン耐性遺伝子(neo)で置換する形のターゲティングベクターを構築した。Sal-Iでベクターを直線化した後、エレクトロポレーションによってES細胞 (JH-1)にトランスフェクションを行った。相同的組み換え体の同定にはPCR法とサザンブロットを用いた。常法により、胚盤胞に変異ES細胞をマイクロインジェクションして、キメラマウスを得た。ヘテロ接合体同士の交配により、ホモ接合体を得た。ノーザンブロットの結果、APOBEC-1 mRNAは検出感度以下に低下していた。抗ペプチド抗体として家兎に免疫して作成した抗APOBEC-1抗体を用い、肝臓と小腸のS100分画をSDS-PAGEに流し、イムノブロットを行った結果、ホモ接合体でのAPOBEC-1タンパクの完全欠損が証明された。また、プライマーエクステンション法によってアポB mRNA editing活性を検討した。肝臓と小腸におけるediting活性はヘテロ接合体で低下し、ホモ接合体で完全に欠損した。

2-3. 交配により、LPLTg/LDLRKO³⁾、アポETg/LDLRKO⁴⁾、APOBEC-1KO/LDLRKOを樹立した。遺伝系の決定にはサザン解析を用いた。

2-4. リポタンパクの解析：マウスは6時間絶食後に眼窩静脈叢から採血し、EDTA血漿を分離した。血漿中の総コレステロール(TC)値とトリグリセリド(TG)値は酵素法により決定した。血漿をTOSOHのLipopropackLXを用いたHPLCにてリポタンパクを分画し、溶出液中のTCとTGをモニターして、リポタンパクのプロフィールを決定した。このパターンからHDLとnon-HDLに分けて各々のコレステロール値を求めた。

2-5. アポタンパクの解析：超遠心法により血漿リポタンパクを分画した、VLDL(d < 1.006 g/ml), IDL(d: 1.006-1.019g/ml), LDL(d: 1.019-1.063g/ml), HDL₂(d: 1.063-1.12g/ml), HDL₃(d: 1.12-1.21g/ml)とした。各リポタンパク分画を透析にて脱塩し、更に、エタノール/エーテルによって脱脂を行い、SDSと尿素を含有する試料用バッファーに溶解してSDS/PAGEを行い、クマシーブルーでタンパク染色を行った。必要に応じて、抗マウスアポBや抗ラットアポEのポリクローナル抗体を用いてイムノブロットを行った。

2-6. リポタンパクカイネティクススタディー：超遠心法で分取したVLDLをMcFarlaneのICI法で¹²⁵Iでタンパク部分を標識し、総経静脈より、注射した。経時的に眼窩静脈叢から採血し、血漿に分離後、イソプロパノール沈澱法によってアポB部分の放射活性を定量した。

2-7. 動脈硬化の定量：方法1) 上行大動脈起始部から総腸骨動脈までの大動脈を摘出し、外膜に付着した結合組織と脂肪組織を実体顕微鏡下に可及的に除去する。動脈内腔を上方に向けて板に固定し、スーダンIVで脂肪を染色した。方法2) 上行大動脈起始部と

心臓を一塊として摘出し、ホルマリン固定後、大動脈弁に水平に6 μ m間隔で、連続切片を作成した。大動脈弁上と弁下のそれぞれ2切片をオイルレッドOで染色して、その脂肪染色部位の面積を算出した。

【結 果】

1) LPLTgの影響：普通食飼育時のリポタンパクプロフィールを比較すると、LPLTg/LDLRKOはLDLRKOに比較して、血漿TG値の著明な低下が観察された。血漿TC値も約1/2に減少した。HPLCによるリポタンパク解析の結果、LPLTg/LDLRKOではVLDLとLDLの間のfraction bのTCが選択的に減少していた。高脂肪食で飼育した場合には著明な高コレステロール血症を呈するが、LPLTg/LDLRKOはLDLRKOに比較して血漿TC値は有意に低下しており、HPLC解析上普通食飼育時に観察されたのと同様にfraction bの選択的低下が確認された。¹²⁵I-VLDLのカイネティックスでは、LPLTg/LDLRKOにおけるVLDLからLDLへの転換が促進されたが、アポB総量としては血中からの消失速度に差は認められなかった。方法2で定量した粥腫面積は、LDLRKOに比較してLPLTg/LDLRKOは約1/20に抑制された。

2) アポETgの影響：アポETg+/+/LDLRKOとアポETg+/-/LDLRKOのラットのアポEはアポETg-/-/LDLRKOに比較して増加した。すべてのリポタンパク分画中のラットアポEが増加するが、特にVLDLとIDLにおける増加が特徴的である。アポETg+/+/LDLRKOとアポETg+/-/LDLRKOでは亜鉛投与前後で血漿TC値の有意な低下が観察された。一方、アポETg-/-/LDLRKOではTCの低下は認められなかった(表2)。アポETg+/+/LDLRKOから採取したVLDLの血中からの消失速度は、アポETg-/-/LDLRKOから採取したVLDLのそれに比較して有意に増加していた。大動脈の粥腫面積は方法1で評価しても方法2で評価しても、アポETg+/+/LDLRKOではアポETg-/-/LDLRKOの約1/2に抑制されていた。

3) APOBEC-1KOの影響：APOBEC-1KO/LDLRKOにおいてはアポB-48は、すべてのリポタンパク分画において消失し、相対的にアポB-100の増加が観察された。普通食飼育下では、APOBEC-1KO/LDLRKOの血漿TCは有意に増加し、これはLDL分画の増加に起因した。一方、HDL-Cは減少した。高脂肪食負荷をするとLDLRKOとAPOBEC-1KO/LDLRKOの血漿TC値は同程度に増加し、方法1で評価した粥腫面積は両者の間で有為な差が確認されなかった。

【考 察】

LPLTgの発現は骨格筋、心筋、脂肪組織において強く観察され、このような発現様態のLPL過剰発現は、血漿TG値のみならず血漿TC値の低下ももたらした。LPLTgの血漿TC値減少作用は、VLDL/IDL分画のうち大粒子のVLDLに強く現れた。この分画はレムナントリポタンパクに相当する可能性があり、LPL過剰発現はレムナント抑制的に作用すると考えられた。TC低下作用は1/2しかないのに、粥腫は1/20に抑制された。この乖離と説明として以下のような考察が可能である。まず、LPL過剰発現によって変化するアポB含有リポタンパク粒子は、TG含量の著明な減少と小粒子化などの性状の変化をきたし、このようなりポタンパクの動脈硬化惹起性が低下した可能性が強く考えられる。第2に、

LPLはHDLの生成増加を伴うはずであり、増加したHDLが抗動脈硬化作用を有する可能性があるが、HPLCによるリポタンパク分析でも超遠心法によるリポタンパク分析でも、LPLTg/LDLRKOにおけるHDLの増加は検出されず、この機序が抗動脈硬化作用の中心機序とは考えにくい。3) LPLTgは筋肉や脂肪組織のみならず大動脈においても弱いながら発現が認められており、血管壁局所のLPLも抗動脈硬化作用を仲介している可能性も否定できない。いずれにせよ、LPLの活性誘導は動脈硬化抑制的であり、LPL活性を誘導するような治療法は新たな動脈硬化治療として有望であると考えられる。事実、LPL活性誘導作用を有するとされるフィブラート系薬剤（ジェムフィプロジルやベザフィブラート）の投与によって動脈硬化が抑制されたとする臨床試験の結果が公表されており、われわれの実験結果を支持する。

アポEについても血漿コレステロール低下作用があり、その程度はLPLと同程度であった。粥腫抑制の程度は血漿TC低下の程度とほぼ同じであり、この場合、抗動脈硬化作用は、アポB含有タンパクの量的な変化のみに帰せられる。LDLR完全欠損の状態においてもアポEの過剰発現にTC低下作用があるのは興味深い。アポEはLDLRのみに結合してリポタンパク異化に与ると考えるだけではこの現象は説明できず、LDLR以外のアポE認識機構の存在を支持する。LRPやプロテオグリカンが有力視される。

我々の実験結果からは、アポB-48とアポB-100の動脈硬化惹起性に差異は証明されなかった。この結果は、Youngらが報告したアポB-100 onlyマウスとアポB-48 onlyマウスを用いた実験結果と一致する結果である。

【結 語】

LPL活性誘導やアポEの発現誘導は、LDLR欠損状態における動脈硬化の治療法として有望視される。動脈硬化モデルマウスの遺伝子改変は、動脈硬化進展抑制因子を探索法として期待される。

【文 献】

1) Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., and Herz, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* 92:883-893 (1993)

2) Osuga, J., Yagyu, H., Ohashi, K., Harada, K., Yazaki, Y., Yamada, N., and Ishibashi, S. Effects of apo E deficiency on plasma lipid levels in mice lacking APOBEC-1. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 236:375-378 (1997)

3) Shimada, M., Ishibashi, S., Inaba, T., Yagyu, H., Harada, K., Osuga, J., Ohashi, K., Yazaki, Y., and Yamada, N. Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:7242-7246 (1996)

4) Osuga, J., Yonemoto, M., Yamada, N., Shimano, H., Yagyu, H., Ohashi, K., Harada, K., Kamei, T., Yazaki, Y., and Ishibashi, S. Cholesterol lowering in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing apolipoprotein E. *J. Clin. Invest.* 102:386-394 (1998)

コレステロールエステル転送蛋白(CETP)欠損症における動脈硬化症の発症について

分担研究者 松澤佑次 (大阪大学大学院医学研究科分子制御内科学)
研究協力者 丸山貴生、平野賢一、山下静也 (同上)
中島規道 (中島内科医院)
伏見悦子 (平鹿総合病院第二内科)
池田芳信 (池田内科医院)
門脇謙 (秋田県成人病医療センター循環器科)

【目 的】

コレステロールエステル転送蛋白(CETP)は、高比重リポ蛋白(HDL)中のコレステロールエステルを、超低比重リポ蛋白(VLDL)や低比重リポ蛋白(LDL)などのアポリポ蛋白B含有リポ蛋白へ転送する機能を有し、コレステロール逆転送系において中心的役割を果たしている。CETPの遺伝的欠損症例では著しい高HDL血症を呈する。CETP欠損症は殆どの症例が本邦で見出されており、我々はCETP欠損症の遺伝子異常として2種の変異(intron 14 splicing defect (1451+1G→A)及びexon 15 D442G missense mutation)がcommon mutationであることを明らかにし¹⁻³⁾、本邦の高HDL血症(HDLコレステロール ≥ 100 mg/dl)症例の約60%がいずれかの変異を有することを報告してきた⁴⁾。

CETP欠損症において著しく増加しているHDLはコレステロールエステルに富んだ大きな粒子であり、抗動脈硬化作用が著明に低下していることが確認されている⁵⁾。本来、HDLは抗動脈硬化作用を有しており、高HDL血症は動脈硬化合併の少ない、リポ蛋白代謝上好ましい状態とされてきたが、我々は動脈硬化性疾患を合併する著明な高HDL血症症例を多数経験しており、高HDL血症にも動脈硬化促進的な病態が存在するものと推察される。我々は一昨年度の本班会議において、高HDL血症における動脈硬化合併に関して、特にCETP欠損症に肝性リパーゼ活性低下を伴った高HDL血症において動脈硬化性疾患の合併が認められることを報告した⁶⁾。また高HDL血症やCETP遺伝子intron 14 splicing defectが高頻度に集積する秋田県大曲地域における疫学調査成績に関して、80歳以上の高齢者群では高HDL血症やCETP欠損症の頻度が低下していたこと、一般検診時の安静時心電図における虚血性変化の出現頻度は高HDL血症ではむしろ増加していたことを報告した(Omagari study)⁷⁾。さらに、経食道エコーを用いた検討で、CETP遺伝子変異群では下行大動脈の動脈硬化指数及びstiffness parameterが有意に高値を示したこと、頸動脈エコーを用いて検討した頸動脈のplaque score、大動脈脈波速度はCETP欠損症に基づく高HDL血症症例では対照群に比し年齢とともに著明に増加を認めたことを、本班会議において報告してきた。

本年度は、大曲地区及びその周辺地域在住の虚血性心疾患(IHD)症例を対象としてCETP分析を行い、CETP欠損症とIHD発症との関連について検討した。

【対象・方法】

秋田県大曲地区及びその周辺地域在住の、冠動脈造影上75%以上の有意狭窄病変を有するIHD症例を対象として調査を行い、血清脂質、HDLコレステロール値、アポ蛋白、CETP活性の測定及びCETP遺伝子変異の解析を施行した。CETP遺伝子解析は、末梢血白血球から抽出したgenomic DNAを用いて、変異部位を挟むプライマーにより遺伝子を増幅し、制限酵素切断後にアガロースゲル電気泳動を行いパターンを比較するPCR-RFLP法により解析した。IHD症例におけるCETP遺伝子変異の頻度は、大曲地区のgeneral populationと比較検討した。

【結 果】

大曲地区在住のIHD症例42例の内訳は、急性心筋梗塞33例、労作性狭心症8例、突然死1例であった。IHD症例の血清HDLコレステロール値は 43 ± 19 mg/dlで、やや低い傾向を示した(表1)。

CETP遺伝子解析の結果、IHD症例42例中13例(33%)にCETP遺伝子異常の存在を認めた。この頻度は、大曲地区のgeneral populationにおけるCETP遺伝子変異の頻度と同程度のものであった(表2)。

IHD症例におけるCETP遺伝子変異(+)群と(-)群の臨床像の比較では、遺伝子変異(+)群で有意にCETP活性が低く($p < 0.05$)、HDL-コレステロール値がやや高い傾向を示し、アポA-Iが変異(-)群に比し有意に高値であった($p < 0.05$)。その他の血清脂質、アポ蛋白値及び冠危険因子の頻度は、両群間で有意差を認めなかった(表3)。

【考 察】

今回の検討により、IHD症例においてもgeneral populationと同程度の頻度でCETP欠損症が存在することが明らかとなった。低HDL血症は独立した冠危険因子として知られており、今回の検討でもIHD群では低HDL傾向を呈していたにもかかわらず、CETP遺伝子変異の頻度は対照群と同程度に認められたことから、CETP欠損症は動脈硬化防御的には働いていないことが推察された。今後症例を重ね、多数例での検討をしていく予定である。

CETP欠損症は本邦における高HDL血症の成因の大部分を占めている⁹⁾。CETP活性の完全欠損例では、血清総コレステロールは中等度の増加、HDLコレステロールは正常の3~6倍と著増する。HDLコレステロールの増加はHDL2分画の増加に由来し、HDL3分画には異常は認められない。HDL粒子はコレステロールエステルに富み、トリグリセライドに乏しい巨大粒子となり、逆にLDLはトリグリセライドに富みコレステロールエステルに乏しく、小粒子化したpolydisperse LDLとして認められる⁸⁾。さらに、CETP欠損症例のLDL、HDL粒子は脂質組成のみならず機能的にも異常であることが知られている。すなわち、CETP欠損症例のLDLは正常LDLに比べ線維芽細胞のLDL受容体に対する親和性が乏しく⁹⁾、一方CETP欠損症例のHDLは正常のHDLが有するマクロファージに対する抗泡沫化能、脱泡沫化能が著しく低下している⁹⁾。CETP

欠損症の大粒子HDLは、患者血清に精製CETPを添加すると消失し、HDL3よりも小さな超高比重リポ蛋白(VHDL)類似の小粒子に変換される。このVHDL類似粒子は主としてリン脂質とアポリポ蛋白A-Iから成り、マクロファージの泡沫化を強く抑制するとともに、一旦コレステロールを蓄積したマクロファージの脱泡沫化を強力に促進した¹⁰⁾。小粒子HDLは抗動脈硬化作用が強いと考えられており、CETPは小粒子HDLの生成に関与していると推察される。以上の結果からは、CETP欠損症例ではHDLコレステロール値が著しく高値であっても機能的に活発なHDL粒子は増加しておらず、動脈硬化防御の観点からはむしろ問題があるものと考えられる。

一昨年度の本班会議で報告したように、秋田県大曲地区の疫学調査成績では⁷⁾、80歳以上の長寿者においては高HDL血症やCETP欠損症の頻度が80歳未満の群に比べ低く、さらにHDLコレステロール値と安静時心電図の虚血性変化との関連では、HDLコレステロール値60 mg/dl付近をボトムとして、これよりHDLが高くなるとむしろ虚血性変化の頻度が増加していた。従ってCETP欠損症による高HDL血症は長寿ではなく抗動脈硬化性ではないと考えられる。また、経食道エコーによる大動脈の動脈硬化性病変の検討により、CETP欠損症例では対照群に比し動脈硬化性変化が進展していることが明らかとなった。さらに、我々は昨年の本班会議で、頸動脈エコーを用いた検討によりCETP欠損症に起因する高HDL血症症例においては対照群よりも動脈硬化性病変の進行を認めたことを報告した。今回の虚血性心疾患症例を対象とした検討においても、CETP欠損症が少なくとも動脈硬化防御的には関与していないことが明らかとなり、我々のこれまでの報告と合わせ、CETP欠損症による高HDL血症はむしろ動脈硬化促進的であることが推察される。一方、ハワイ在住の日系米人を対象とした検討で、CETP欠損症を有する群の方が有さない群よりも冠動脈疾患の合併が多いことが報告されており¹¹⁾、これは我々の成績と合致する。以上の結果より、CETP欠損症による高HDL血症は抗動脈硬化性ではなくむしろ動脈硬化になりやすいことが考えられ、他の動脈硬化性疾患の危険因子を減らす目的でのライフスタイルの改善が必要であり、高LDL血症が存在する場合にはその治療も重要で、さらにはコレステロール逆転送系の活性化を介した治療も考慮すべきであると考えられる。

【まとめ】

本班研究において、CETP欠損症における動脈硬化症の発症に関して我々が検討してきた結果を以下にまとめて示す。

①CETP欠損症に肝性リパーゼ活性低下を伴った高HDL血症症例において著明な動脈硬化性疾患の合併が認められた。

②CETP欠損症や高HDL血症の集積が認められる秋田県大曲地区の疫学調査により、80歳以上の高齢者群では高HDL血症やCETP欠損症の頻度が低下しており、安静時心電図の虚血性変化の頻度は高HDL血症例ではむしろ増加していた。

③経食道エコーを用いた検討で、CETP遺伝子変異群では下行大動脈の動脈硬化指数及びstiffness parameterが対照に比し有意に高値を示した。

④頸動脈エコーを用いた検討で、CETP欠損症に起因する高HDL血症症例における頸動脈のplaque score、大動脈脈波速度は対照群に比し年齢とともに著明に増加を認めた。

⑤虚血性心疾患を有する症例におけるCETP欠損症の頻度は、general populationと同程度に認められた。

以上の結果より、CETP欠損症に起因する高HDL血症では、コレステロール逆転送系が障害されており、むしろ動脈硬化が進行しやすいことが本研究により証明された。

【文 献】

- (1) Hirano, K. et al.: Frequency of intron 14 splicing defect of cholesteryl ester transfer protein gene in the Japanese general population; relation between the mutation and hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 100: 85-90, 1993
- (2) Takahashi, K. et al.: A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins. *J. Clin. Invest.* 92: 2060-2064, 1993
- (3) Sakai, N. et al.: Frequency of exon 15 missense mutation (442D:G) in cholesteryl ester transfer protein gene in hyperalphalipoproteinemic Japanese subjects. *Atherosclerosis* 114: 139-145, 1995
- (4) Maruyama, T. et al.: Mutational analysis of hyperalphalipoproteinemia (HALP) in the Japanese; Cholesteryl ester transfer protein deficiency contributes to approximately 60% of marked HALP. *Circulation* 96: (Suppl) I-107, 1997
- (5) Ishigami, M. et al.: Large and cholesteryl ester-rich high density lipoprotein in cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency can not protect macrophages from cholesterol accumulation induced by acetylated low density lipoprotein. *J. Biochem.* 116: 257-262, 1994
- (6) Hirano, K. et al.: Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia; Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1849-1856, 1995
- (7) Hirano, K. et al.: Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in Omagari area of Japan; Marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1053-1059, 1997
- (8) Yamashita, S. et al.: Small polydisperse low density lipoproteins in familial hyperalphalipoproteinemia with complete deficiency of cholesteryl ester transfer activity. *Atherosclerosis* 70: 7-12, 1988
- (9) Sakai, N. et al.: Decreased affinity of low density lipoprotein (LDL) particles for LDL receptors in patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Eur. J. Clin. Invest.* 25: 332-339, 1995
- (10) Yamashita, S. et al.: Very high density lipoproteins induced by plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) have a potent antiatherogenic function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 748:

606-608, 1995

(11) Zhong, S. et al.: Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J. Clin. Invest.* 97: 2917-2923, 1996

表1. 大曲地区IHD症例の疾患と血清脂質

Subject (n)	42
Acute myocardial infarction (n)	33
Effort angina (n)	8
Cardiac sudden death (n)	1
Age (years)	66 ± 11
Sex (Male/Female)	29 / 13
Total cholesterol (mg/dl)	198 ± 39
Triglycerides (mg/dl)	132 ± 85
HDL-cholesterol (mg/dl)	43 ± 19

表2. 大曲地区のIHD症例におけるCETP遺伝子変異の頻度

	General population	Patients with IHD
n	168	42
Intron 14 splicing defect (1451+1G→A)		
Homozygote	1	0
Heterozygote	47	11
Exon 15 missense mutation (D442G)		
Homozygote	0	0
Heterozygote	7	2
Compound heterozygote	4	1
Total	59	14
Frequency	35%	33%

表3. IHD症例におけるCETP遺伝子変異(+)群と(-)群の臨床像の比較

	Mutation(+)	Mutation(-)
n	14	28
Age (years)	66 ± 12	66 ± 12
Sex (Male/Female)	9 / 5	19 / 9
CETP activity (% of control)	76 ± 25	96 ± 32
Total cholesterol (mg/dl)	202 ± 35	197 ± 42
Triglycerides (mg/dl)	116 ± 53	138 ± 96
HDL-cholesterol (mg/dl)	50 ± 28	39 ± 11
Apolipoprotein A-I (mg/dl)	139 ± 33	116 ± 23
A-II (mg/dl)	29 ± 6	25 ± 5
B (mg/dl)	108 ± 34	113 ± 27
C-II (mg/dl)	4.3 ± 1.4	3.3 ± 1.5
C-III (mg/dl)	7.8 ± 3.2	6.5 ± 2.3
E (mg/dl)	4.2 ± 1.4	3.8 ± 1.0
Risk factor		
Hypertension	40%	29%
Diabetes Mellitus	20%	24%
Smoking	20%	53%

リポ蛋白糸球体症の診断とアポ蛋白 E 異常について

分担研究者 及川眞一 (東北大学第三内科)

研究協力者 齊藤喬雄 (東北大学第二内科), 星 勝彦,
小竹英俊, 関原 右, 刈田明代, 石垣 泰,
鴫田克久, 豊田隆謙 (東北大学第三内科),
松永 彰, 佐々木 淳 (福岡大学第二内科)

【目的】

リポ蛋白糸球体症はこれまでの疾患概念とは異なった、新しい腎糸球体疾患である。すなわち、1988年日本腎臓病学会においてミニシンポジウムが持たれ1)、このときリポ蛋白糸球体症 Lipoprotein Glomerulopathy (LPG) の呼称を用いることが推奨された。現在までに報告された症例は32例 (日本25例、フランス2例、中国2例、台湾2例、アメリカ合衆国1例) である。高アポ蛋白 E (アポ E) 血症とリポ蛋白代謝異常の存在が、これらの症例の共通点として認められる。このようなことから、これまで、異常アポ E の存在が想定されてきた。我々が経験した10例について家族調査などを行い、アポ E の遺伝子異常について解析、その臨床的な特徴から、リポ蛋白糸球体症の診断基準について検討した。

【対象と方法】

リポ蛋白糸球体症の10例を取り上げた。空腹時血清を用いて、超遠心法により各リポ蛋白に分離して採取し、それぞれの脂質 (総コレステロール; TC、トリグリセリド; TG) を酵素法で測定した。血清アポ蛋白 AI、B、および E を免疫沈降法で測定した。KO、MI (25歳)、RE については、家族調査を行い、同様の検討を行った。これらの対象者について、アポ E フェノタイプを等電点電気泳動法で解析した。末梢血白血球からジェノミック DNA を分離し、Emi らの方法に従って PCR 法で増幅した。112あるいは158番目の塩基配列を制限酵素 HhaI を用いて判定し、ジェノタイプを決定した。また、0.8%アガロースゲル電気泳動上から分離した DNA を pT7Blue-T-vector (Novagen, Madison, WI) に組み込んだ。12クローンを得、T7DNA ポリメラーゼを用いて塩基配列のシーケンズを行った。

変異アポ-E DNA の判定は Emi らの方法によって増幅された DNA を制限酵素 DdeI で処理して行った。

【結果】

LPG の10例のアポ E フェノタイプは E2/3 が8例、E2/4 が2例であり、一般のフェノタイプの分布とは明らかに異なっていた。これらのアポ E ジェノタイプはそれぞれ E3/3 および E3/4 であることから等電点電気泳動上認められたイソ蛋白 E2 は112、158番目以外のアミノ酸に変異が存在すると考えられた。そこで、発端者 KO のアポ E-DNA の解析を行ったところ、コドン145の塩基配列が CGT から CCT へ変異し、その結果、145番目のアミノ酸がアルギニンからプロリンに変異したことが認められた。これをアポ E Sendai と名付けた。このことより、他の症例については制限酵素 DdeI で処理し、この変異体を確認したところ、対象とした LPG 全症例でこの変異体が存在することを認めた。(表1)。

家族調査では、LPG未発症例でもアポE Sendaiを有する例を認めた。これらの変異アポEを有する例では、血清アポE値が高値であり、中間型リポ蛋白 (IDL) が増加して、Ⅲ型高脂血症と同様のリポ蛋白組成を示した。

以上のことより、LPGについての本報告のまとめとして、以下の事項を診断基準として提唱したい。特に、電顕所見は重要で、確定診断には必要不可欠である。

1. 尿所見：尿蛋白を認め、しばしばネフローゼ症候群を呈する。

2. 腎組織所見

a) 光顕所見：弱染色性の網状の塊 (いわゆるリポ蛋白血栓) により糸球体係蹄は著明に拡張する。
b) 電顕所見：糸球体毛細管腔内に顆粒状物質 (最大径2 μ程度) が充満し、内皮細胞や、赤血球は管壁に圧排される。泡沫細胞の出現はまれである。

3. 血清脂質、アポ・リポ蛋白所見

a) 必ずしも高脂血症を認めない。また、高脂血症が存在してもその表現型は様々である。

b) リポ蛋白では中間型リポ蛋白 (IDL) が増加する。

c) 血清アポ蛋白Eは高脂血症の有無に関わらず高値である。

4. 身体的特徴

原発性Ⅲ型高脂血症あるいは家族性高コレステロール血症で見られるような黄色腫やアキレス腱肥厚などは認められない。肝障害・早発性動脈硬化は明らかではない。

5. 遺伝学的特徴：発症年齢上の特徴は見られない。家族内発症を認め、アポE遺伝子異常による変異体が存在する。

(註-1) リポ蛋白血栓の証明のためには、腎組織凍結切片により、ズダン染色などで糸球体毛細管腔内に脂肪沈着の存在を示すことが望ましい。

(註-2) アポE変異体の存在を疑うには、アポEフェノタイプとジェノタイプの評価を行い、その乖離を認めることが、参考となる。

今後の問題として、このような組織変化が生じる機序についての解明が必要である。

【文献】

1. 坂口 弘ほか：ミニワークショップ「Lipoprotein Glomerulopathy：特異な組織所見を示す新しい糸球体疾患」日腎会誌31：451-456、1989

Table 1. Laboratory results and apo E Sendai (Arg 145 → Pro) of subjects with lipoprotein glomerulopathy

Case	Age (years)	Apo E		Arg 145 → Pro
		Phenotype	Genotype	
1. KO	16	E2/4	E3/4	(+)
2. YO	44	E2/3	E3/3	(+)
3. MI	25	E2/3	E3/3	(+)
4. SA	56	E2/3	E3/3	(+)
5. MS	45	E2/3	E3/3	(+)
6. RA	38	E2/3	E3/3	(+)
7. HF	69	E2/4	E3/4	(+)
8. RE	10	E2/3	E3/3	(+)
9. MI	6	E2/3	E3/3	(+)
10. YT	27	E2/3	E3/3	(+)

小児に於ける家族性複合型高脂血症、CETP欠損症とHDLとの関連及び小児高脂血症患児の栄養調査について

分担研究者 太田孝男 (琉球大学医学部小児科)

研究協力者 松浦稔展 (同上)

木協弘二 (熊本大学医学部小児科)

【目 的】

私達は平成2年4月より1歳6ヶ月児を対象とし、将来の動脈硬化性心疾患の発症予防を目的とした家族性高コレステロール血症(FH)のマス・スクリーニングを熊本市保健衛生局と熊本大学医学部小児科の共同事業として熊本市で行っている¹⁻³⁾。今回、スクリーニング陽性児のなかでIIb型高脂血症を呈した児の家族調査を行ない家族性複合型高脂血症(FCHL)との関連を検討した。さらに、スクリーニング陽性児についてコレステロール転送蛋白(CETP)欠損症の遺伝子解析を行い、小児に於けるCETP欠損症とHDLの関連について検討した。また、病院栄養士の協力を得て高脂血症児の栄養分析を行ない高脂血症との関連についても検討した。

【方 法】

FHのスクリーニングは1歳6ヶ月児を対象として5つの保健所・保健センターで希望者に対して行っている。採血は耳朶より行い(10ul)、全血中のアポB濃度を私達が開発したELISAで測定し行った。IIb型高脂血症は成人の診断基準(血清総コレステロール(TC)が220 mg/dl以上かつ血清トリグリセライドが150 mg/dl以上)を用いて診断した。FCHLの診断には本研究班の診断基準を用いた。CETPの遺伝子解析はスクリーニング陽性児を対象とし耳朶から濾紙採血を行い乾燥血液濾紙(DBS)を作成し、DBSよりPromega社のReadyAmp Genomic DNA Purification Systemを用いてDNAを抽出した。本年度の研究では我が国で頻度の高いイントロン14のスプライスドナー部位のG-A変異(Int14A)及びエクソン15のアミノ酸がアスパラギン酸からグリシンへの変異(D442G)についてPCR-RFLPを用いて解析した。用いたプライマーはInt14A:センス AGC ATC TGC CTT GTG GGT CAC, アンチセンス CAG TTT CCC CTC CAG CCC ACA CGT

A, D442G:センス GTG TTT ACA GCC CTC ATG AAC, アンチセンス AAG CCA AAG TCC ATC TGC AG. 制限酵素はInt14Aの解析ではRsaI, D442G解析ではTaqIを用いた。栄養分析は40名の高脂血症児について行った。

【結果および考察】

小児に於けるFCHLについて：平成10年10月現在、2～3回（3～6ヶ月間隔）の血液検査でIIb型高脂血症を呈する9名の患児をフォローしているが、今回5名の保護者が家族解析に同意し、その5家系について家族解析を行った。その結果、5名の患児全員に両親いずれかにIIa、IIb、IV型の高脂血症が認められた。結果として、家族検索を行ったIIb型高脂血症の全ての児がFCHL患児であることが判明した（表1）。CETP遺伝子異常の解析は、181名の再検査児について行った。Int14Aの患児はまだ見つからないが、D442G(正常者ではTaqIで消化後、電気泳動で216bp、41bp、28bpの3本のバンドが検出できる。ホモ接合体ではD442G変異でTaqIの切断部位が一つ消失することから216bpと69bpの2本のバンドのみ検出される。ヘテロ接合体では216bp、69bp、41bp、28bpの4本のバンドが検出されることになる)に関しては13名のヘテロ児(7.2%)を発見している。しかしながら、そのHDL-C、アポA-I、アポA-IIレベルは対照児と差がなかった（表2）。成人のD442Gヘテロのデータでは高HDL血症を示す例が多く私達の小児のデータと異なっていることから、小児成人病検診の際79名の10歳児について同様の検索を行ってみた⁴⁾。その結果、6名のD442Gヘテロ児(7.2%)を発見できた。頻度には1歳6ヶ月児と10歳児に差は認められなかった。更に、1歳6ヶ月児の場合と同様HDL-C濃度はヘテロ児の正常児に全く差異は認められなかった。5名の患児については1年間フォローしてHDLの変化を見ているが、HDL-C、アポA-Iいずれもかなりの変動を示し、食事等の環境要因がCETPよりも強くHDLレベルに影響している様に思われた。このことから小児ではD442G変異は成人と異なりHDL濃度の調節因子にはなっていないと考えた。成人でのD442Gヘテロ患者に見られる高HDL血症はCETP遺伝子変異に何らかの要因(アルコール摂取等の)が加わる事で起こると思われた。今後、ヘテロ児を長期に渡ってフォローしていくことで要因が明らかになるであろう。また、CETP蛋白量及び活性の測定を定期的に行ない、小児に於ける遺伝子変異とHDLとの関係を明らかにしていきたい。
高脂血症児（平均3歳）の栄養分析：連続2日間の摂取食事内容を記載してもらい栄養分析を行った（延べ80日の内、71日分が分析可能であった）。総摂取エネルギー

ーに対する摂取脂肪は25%と理想的な値であった。一日コレステロール摂取も141 mgであり、特に問題はなかった。しかし、P/S比は0.76と低値を示し、単価不飽和脂肪酸(M)の摂取量もやや少ない様に思われた(M/S比は0.93であった)(表3)

【結 語】

FCHLは小児には極めてまれな疾患と考えられていた。しかし本研究で示した様にIIb型高脂血症児の殆どがFCHLであった。今回IIb型高脂血症の診断には成人の基準を用いたが、TCの値が高すぎるように見え、今後小児の診断基準も考慮すべきであろう。実際、TCを200 mg/dl以上とすればIIbの小児に於ける頻度は私達のデータでは倍近くになる。今後、此の様な症例の家族検索を行っていく事で、小児のIIbとFCHLの関連を明確にできると思われた。しかしながら、成人と比べても、小児でのIIb型高脂血症はFCHLである確率が高い事から、小児のIIbはFHと同様に注意深い経過観察が必要となるであろう。CETPのHDLに対する影響は小児期では小さく、むしろ食事等の環境因子の方がHDLレベルに大きく影響している様に思われた。高脂血症患児の栄養分析からは飽和脂肪酸の過剰摂取以外は殆ど問題ないようであった。しかしながら、幼児期の栄養所要量等のデータに乏しく、今後正常児の栄養分析データをどのように集積していくかが問題である。CETP遺伝子異常は我が国で数多く報告されている疾患で著明な高HDL血症を呈するが、動脈硬化性心疾患に対して抵抗性があるのか或いはハイリスクであるのかに関しては未だ明確にされていない。成人と異なり、小児では脂質代謝に及ぼす環境要因は少なく、小児での研究からCETPの本来の役割が明らかになる可能性が高いと私達は考えている。本研究で明らかにしたように、小児ではCETP遺伝子異常が高HDL血症とは直接結びつかず、他の環境要因の関与が示唆された。今後、将来に渡ってヘテロおよび発見できればホモ患児を長期に渡ってフォローすることでHDLの構造・機能に及ぼすCETP及び環境要因の意義を明らかにしていきたい。

【文 献】

1) Ohta T, Migita M, Yasutake T, Matsuda I. Enzyme-linked immunosorbent assay for apolipoprotein B on dried blood spot derived from newborn infant: its application to neonatal mass screening for hypercholesterolemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7:524-531, 1988.

2) Nakamura R, Ohta T, Migita M, Umehashi H, Ohtsuka H, Kudoh I, Matsuda I. Mass screening to identify babies with dyslipidemia by measuring the levels of apoA-I, apoB and the ratio of apoB to apoA-I on dried blood spots. *Screening* 1:17-25, 1992.

3) Ohta T, Nakamura R, Ikeda Y, Hattori S, Matsuda I. Follow-up study on children with dyslipidaemia detected by mass screening at 18 months of age: effect of 12 months dietary treatment. *Eur J Pediatr* 152: 939-943, 1993.

4) 山下静也 他 本邦における原発性高脂血症の病態と遺伝子解析. 厚生省特定疾患調査研究 原発性高脂血症調査研究班 平成8年度研究報告書 p 43-50, 1997.

表1. IIb型高脂血症患児の血清脂質とアポ蛋白 (値は mean \pm SDで表した) .

	All IIb Children (n=9)	IIb Children (n=5)	Parents
age(y)	4.0 \pm 1.5	4.2 \pm 2.0	33 \pm 5
TC (mg/dl)	234 \pm 16	234 \pm 7	236 \pm 20
TG (mg/dl)	216 \pm 37	213 \pm 42	259 \pm 88
HDL-C (mg/dl)	44 \pm 7	46 \pm 3	46 \pm 5
ApoA-I (mg/dl)	123 \pm 12	126 \pm 10	128 \pm 12
ApoA-II (mg/dl)	35 \pm 5	34 \pm 5	30 \pm 5
ApoB (mg/dl)	123 \pm 10	122 \pm 7	108 \pm 20

表2. CETP欠損症 (D442G ヘテロ) 患児の脂質・アポ蛋白濃度

	Control (n=65)	D442G (n=13)
T.Chol	167 ± 2	223 ± 11
TG	77 ± 2	110 ± 13
HDL-C	48 ± 1	49 ± 3
LDL-C	103 ± 2	152 ± 9
ApoB	68 ± 1	118 ± 5
ApoA-I	119 ± 2	117 ± 5
ApoA-II	33 ± 1	28 ± 1

Values are expressed in mean ± SEM (mg/dL).

表3. 小児高脂血症児の栄養分析

食品成分	平均値 ± SEM
エネルギー (Kcal)	1153 ± 26
蛋白質エネルギー比 (%)	16.4 ± 0.7
脂質エネルギー比 (%)	24.9 ± 0.9
糖質エネルギー比 (%)	58.3 ± 1.1
コレステロール (mg)	141 ± 12
ビタミンE効力 (mg)	5.4 ± 1.0
S/M/P	1/0.93/0.76
動物性蛋白比 (%)	55 ± 2
動物性脂質比 (%)	48 ± 2
コレステロール指数	63 ± 5

原発性高脂血症アポ蛋白異常症の解析ガイドライン作成

分担研究者 佐々木淳（福岡大学医学部第二内科）

研究協力者 松永 彰（ 同 上 ）

【目的】

アポ蛋白（アポ）A-IおよびアポEは、種々のリポ蛋白に広く分布しているアポリポ蛋白であり、脂質輸送に重要な役割をはたしている。アポA-IIは、抗動脈作用を有する高比重リポ蛋白(HDL)の主要アポ蛋白であり、LCAT (lecithin: cholesterol acyltransferase)活性化、末梢組織からのコレステロール引き抜き作用などの生理的機能が明らかになっている¹⁾。一方、アポEの生理的機能は細胞のリポ蛋白受容体（低比重リポ蛋白（LDL）受容体とアポE受容体）への結合であり²⁾、LDL受容体への結合においてアポEはLDLの主要アポ蛋白であるアポBの数倍の親和性を持つ。このためカイロミクロンや超低比重リポ蛋白（VLDL）などではアポBではなくアポEを介してリポ蛋白受容体に結合し細胞内に取り込まれると考えられている³⁾。我々は原発性高脂血症におけるアポ蛋白異常症の頻度、病態を明らかにするためリポ蛋白異常症の遺伝子解析を行い、構造および機能異常解明を行った。

【方法】

1. アポA-IのおよびアポEの等電点電気泳動法

アポA-IIはMenzelらの方法を改良したpH range 4-6のミニゲルを用いた等電点電気泳動法で分離⁴⁾。アポE表現型は、ノイラミニダーゼ処理後脱脂した血漿サンプルを等電点電気泳動法-イムノブロットにて検出⁵⁾。

2. 制限酵素多型 (RFLP)によるアポE遺伝子型

Hixonらの方法に従いアポE遺伝子エクソン4のコドン112と158を含む領域をPCRで増幅後、制限酵素HhaIで処理後ポリアクリルアミドゲルで分離し遺伝子型を同定した⁶⁾。

3. 変異遺伝子解析

PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP)法は、PCR産物をエタノール沈殿後、5 μ lのTEバッファーに溶解、そのDNAを加熱変性後温度制御装置付き電気泳動装置にて泳動し、銀染色にて変異検体を検出した⁷⁾。

アポA-IおよびアポEをコードする領域をPCR法にて増幅し、T vector法にてサブクロー

ニング後、オートシクエンサーまたはSequenase(アマシャム社)を用いてシークエンスを行い変異部位を確定した。一部はダイレクトシークエンスにて行った。張る

4. 正常および変異アポA-Iの大腸菌からの精製、発現および機能解析

1)アポA-IのcDNAを元にしてKunkel法にて変異を導入、pGEXベクターを用いた発現系により、E.coli (JM109)にトランスフェクションし、GST-アポA-I融合蛋白として発現させた。発現した融合蛋白をファクターXaにより切断、GST蛋白を分離除去し、変異プロアポA-Iおよび正常プロアポA-Iを精製した。発現したプロアポA-Iは、SDS-PAGEで分子量をチェックし、アミノ酸シークエンサーにて変異部分を含むアミノ酸配列を確認した。

2) 機能解析として、アポA-Iの脂質との結合能を人工脂質DMPCを用いて比較した。リポ蛋白との結合は血漿とインキュベート後BioGel A5mアガロースゲルでリポ蛋白分画を分離して比較。DMPC結合アポA-Iの2次構造を円二色偏光を用いて比較。

5. TATA box領域の遺伝子変異のCATアッセイTATA box領域の遺伝子変異のアポA-I発現への影響をCATアッセイを用いて検討した。TATA box及び-75G→A多型を含むアポA-Iプロモータ領域(-333から+119)をCATベクターの上流にライゲーションし、アポA-I/CATベクターを作製し、アポA-I/CATベクターをHepG2細胞にトランスフェクションさせ、発現したCAT活性の測定を行った。

6. 正常および変異アポEのCOS-1細胞からの精製、発現および機能解析

変異アポEはKunkel法を用いて正常アポEのcDNAより作製。アポEcDNAをpSG5ベクターに組み込んだ後、リポフェクチンを用いてCOS-1細胞に発現させた。COS-1細胞にて発現したアポEは、ヘパリンカラムを用いて精製し、ヒト皮膚線維芽細胞を用いてLDLレセプターの結合能を¹²⁵I-LDLとの競合法を用いて比較検討した。

【結果および考察】

アポA-Iの等電点電気泳動を用いたスクリーニングを、虚血性心疾患患者や低また高HDLコレステロール血症患者、一般外来及び健康診断受診者など合計約33,000例に対して行った。これによりアポA-I Yame(Asp13Tyr), アポA-I Kaho(Asp51Val), アポA-I Hita (Ala95Asp, Ala37Thr), アポA-I Marburg (Lys107→0), アポA-I Tsushima (Trp108Arg), アポA-I Karatsu (Tyr100His), アポA-I Fukuoka (Glu110Lys), アポA-I Kurume (His162Gln), アポA-I Nichinan (Glu235→0)の9種12家系(うち8種は世界で初めて発見された)の変異アポA-Iを検出した。また、電荷の変化のない変異を検出するた