

め、PCR-SSCP法を用いたスクリーニングも低HDLコレステロール血症患者を対象に46例と少数だけ行った。この方法によりアポA-I (Gln84X)を検出した。さらに解析を行い同症例は、アポA-I (Gln84X)とTATA boxのAからCへの変異とのコンパウンドヘテロ接合体であることが明かとなり、TATA box変異の影響をCATアッセイで証明した。また、低HDLコレステロール血症例より、アポA-I Sasebo (コドン81以後のフレームシフト、ホモ接合体)、アポA-I Oita (Val156Glu、ホモ接合体)、Cが1個コドン5に挿入し以後のフレームシフトでコドン37がストップ(ホモ接合体)を発見した。スクリーニングにより検出された変異アポA-Iは、ほとんどがヘテロ接合体であるためか、最近発見されたアポA-I Nichinan (Glu235→0)を除き、血漿リポ蛋白値の異常は見られなかった。また、アポA-I Nichinan (Glu235→0)については、大腸菌を用いて発現精製し、人工脂質DMPCへの結合能低下を証明し、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し、リポ蛋白非結合分画の高いことを示した。また、DMPC結合アポA-Iの2次構造を円二色偏光を用いて比較し、アポA-I Nichinan (Glu235→0)では $\alpha$ ヘリクスが8から7へ減少していることを示した。低HDL-C値、低アポA-I値の患者の検索において、比較的高率にリポ蛋白値に影響する変異が検出された。これに対し、高HDL-C値の例からは変異アポA-Iは検出されなかったことから、変異アポA-I異常症の解析は、低HDL-C、低アポA-I例において行う必要が考えられた。更に合成低下による低アポA-I血症も世界で初めて見出されたことから、今後この変異の頻度も明らかにする必要があると考えられる。

アポEについては、等電点電気泳動法及びイムノブロットにより、蛋白レベルでのapo E表現型を比較的容易に決定する方法を確立し、約1300例のアポE表現型の分類を行いアポE5 (Glu3Lys) 2例、アポE7 (Glu244Lys, Glu245Lys) 18例を検出し報告した<sup>8)</sup>。また、RFLP法によりアポE遺伝子型を決定する方法を用い、アポE表現型及びアポE遺伝子型の比較を約250例の高脂血症、動脈硬化性疾患患者、透析患者について行ない、透析患者よりアポE4Tokyo(Gln46His)を検出した。また、III型高脂血症、リポ蛋白糸球体症が疑われる症例のアポE表現型とアポE遺伝子型の比較により、アポE1 Harrisburg (Lys146Glu)、アポE2 Fukuoka (Grg224Gln)、アポE2 Sendai (Arg145Pro)、アポE2 Kyoto (Arg25Cys)を検出した。血清より抽出精製したアポE1 Harrisburg (Lys146Glu)のLDL受容体への結合低下を証明し、アポE2 Kyoto (Arg25Cys)についてはCOS-1細胞より発現精製し、LDL受容体への結合能低下を証明した。変異アポEについては、多型として高率に認められるアポE2 (Arg156Cys)、アポE4 (Cys112Arg)も血清脂質値に影響

を及ぼす事が明らかになっており、高脂血症例におけるアポE表現型、遺伝子型の意義は大きい。我々の検出した変異アポEについても、アポE2 Fukuokaを除いて高脂血症への関与が考えられ、一部についてはすでにその関与を証明した。特にIII型高脂血症、リポ蛋白糸球体症が疑われる症例については、アポE表現型、遺伝子型の比較を行い、アポE2 (Arg156Cys)、アポE4 (Cys112Arg)以外の変異の有無を確認する必要があると考えられた。

#### 【結語】

1. 等電点電気泳動法による検出では、約3,000例に1例のアポA-Iの遺伝子変異が検出された。
2. 約33,000例のスクリーニングにおいて血漿リポ蛋白値に影響する変異アポA-Iの検出は、アポA-I Nichinan (Glu235→0)のみであった。
3. 低HDL-C値、低アポA-I値の患者の検索において、比較的高率にリポ蛋白値に影響する変異が検出されたことから、変異アポA-I異常症の解析は、低HDL-C、低アポA-I例において行う必要が考えられた。
4. 変異アポEについては、多型として高率に認められるアポE2 (Arg156Cys)、アポE4 (Cys112Arg)も血清脂質値に影響を及ぼす事が明らかになっており、高脂血症例におけるアポE表現型、遺伝子型の意義は大きい。
5. 特にIII型高脂血症、リポ蛋白糸球体症が疑われる症例については、アポE表現型、遺伝子型の比較を行い、アポE2 (Arg156Cys)、アポE4 (Cys112Arg)以外の変異の有無を確認する必要がある。

#### 【文献】

- 1) Fielding CJ, Fielding PE: Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36:211-228, 1995
- 2) Mahley RW: Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622-30, 1988
- 3) Weisgraber K: Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv. Protein. Chem.* 45:249-302, 1994
- 4) Araki K, et al.: Characterization of two new human apolipoprotein A-I variants: apolipoprotein A-I Tsushima (Trp-108→Arg) and A-I Hita (Ala-95→Asp). *Biochim*

Biophys Acta 1214:272-278, 1994

5) Moriyama K, Sasaki J, et al.: Apolipoprotein E1 Lys146 → Glu with type III hyperlipoproteinemia. *Biochim Biophys Acta* 1128:58-64, 1992

6) Hixson J and Vernier D: Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 31:545-548, 1990

7) Orita M, et al.: Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879, 1989

8) Matsunaga A, Sasaki J, et al.: Population frequency of apolipoprotein E5 (Glu3→Lys) and E7 (Glu244→Lys, Glu245→Lys) variants in western Japan. *Clin Genet* 48:93-99, 1995

# 冠動脈疾患患者の血中酸化LDL

分担研究者 永井良三（群馬大学医学部第二内科）

## [はじめに]

ヒト動脈硬化巣内の酸化LDLの存在が確認されること1)、動物実験において抗酸化薬により動脈硬化の進展が抑制されること2)、抗酸化薬と冠動脈疾患発生率との負の関係があること3)などの成績より、酸化LDLが動脈硬化の成り立ちに重要な役割を演じていることが明らかとなってきた。一方、酸化LDLに対する自己抗体が動脈硬化進展の指標である4)、或いは心筋梗塞の予測因子である5)と報告されており、血液中の酸化LDLと冠動脈硬化病変との関連が注目されていた。Itabe等はヒト動脈硬化巣のホモジネートを抗原として得られたモノクローナル抗体(DLH3)がヒトの動脈硬化巣の泡沫細胞内の物質と反応し、ホスファチジルコリンの酸化物を認識することを報告し、この抗体とアポBを認識する抗体を用いたELISAにより血中の酸化LDLを測定した6)7)。この測定法を用いて冠動脈疾患患者の血中の酸化LDLを測定し臨床的意義について検討した。

## [方法]

モノクローナル抗体(DLH3)を固相化したプレートに血漿検体と標準液を分注し、反応・洗浄後にアポB-100に対する抗体を反応させるELISAにより酸化LDLを測定した。同時に総コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロールを測定した。人間ドック受診者で、明かな心疾患の既往が無い人間ドック例(人間ドック群:204例、平均年齢53.1歳、男性149例)と人間ドック例のうち糖尿病、高脂血症、高血圧、肝疾患などの疾患を認めない健常例(健常群:81例、平均年齢53.1歳、男性56例)、冠動脈造影検査で主要冠動脈に75%以上の狭窄性病変を有する冠動脈疾患例(冠動脈疾患群:103例、平均年齢62.9歳、男性3例)を対象とした。

## [結果]

### 1、健常群・人間ドック群の成績

健常群の酸化LDLは $10.9 \pm 4.0 \mu\text{g/dl}$ で、年齢との関連は認めなかった。また、男女差との関連も認めなかった(図1)。人間ドック群の酸化LDLは総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪との明らかな関連は認めなかった(図2)。

## 2、人間ドック群と冠動脈疾患群との比較

冠動脈疾患群は人間ドック群に比較して酸化LDLが明らかに上昇し ( $17.3 \pm 8.3$  vs  $11.4 \pm 4.3 \mu\text{g/dl}$ ,  $p < 0.01$ )、HDLコレステロールが低下 ( $44.2 \pm 14.1$  vs  $50.4 \pm 13.3 \text{ mg/dl}$ ,  $p < 0.01$ )していた (図3)。

冠動脈疾患例を診断するための感度と特異度よりROC曲線を求めたところ、冠動脈疾患の診断の検出力は酸化LDLが他の脂質項目と比較して明らかに優れていた (図4)

### [考案]

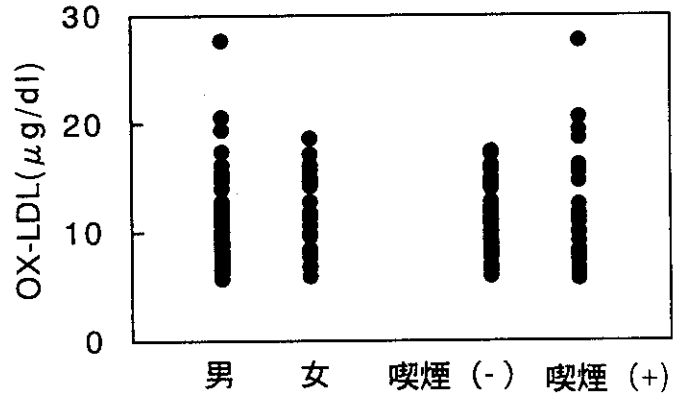
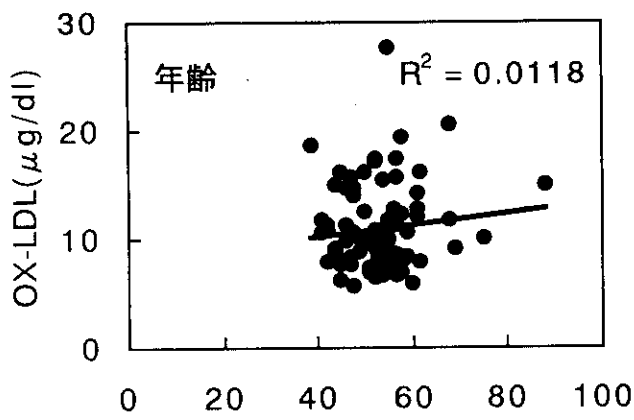
Itabe等により得られたモノクローナル抗体はリポ蛋白のリン脂質分画中のホスファチジルコリンの酸化物を認識するとされており、この抗体とアポBに対する抗体を用いたELISAにより血中の酸化LDLの測定を行った。健常者では年齢や性別とは関連無く、他の脂質との間に明らかな関連は認めなかった。また、冠動脈疾患患者では酸化LDLが明らかに上昇しており、従来考えられていた冠疾患の危険因子と言われる総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪とは異なる冠動脈硬化のマーカである可能性が考えられた。血管壁内では酸化LDLは動脈硬化と関連が深いことが明かとなっているが、今回の検討で血中の酸化LDLと冠動脈硬化についての関連が明らかとなったが、酸化LDLの産生部位、代謝過程などの検討とともに、酸化LDLの意義についての更なる検討が必要である。

### [参考文献]

- 1、Yla-Herttuala-S; Palinski-W; Rosenfeld-ME; Parthasarathy-S; Carew-TE; Butler-S; Witztum-JL; Steinberg-D; Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J-Clin-Invest.* 1989 Oct; 84(4): 1086-95
- 2、Kita-T; Nagano-Y; Yokode-M; Ishii-K; Kume-N; Ooshima-A; Yoshida-H; Kawai-C; Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1987 Aug; 84(16): 5928-31
- 3、Stephens-NG; Parsons-A; Schofield-PM; Kelly-F; Cheeseman-K; Mitchinson-MJ; Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease. : Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet.* 1996 Mar 23; 347(9004): 781-6
- 4、Salonen-JT; Yla-Herttuala-S; Yamamoto-R; Butler-S; Korpela-H; Salonen-R; Nyyssonen-K; Palinski-W; Witztum-JL. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1992 Apr 11; 339(8798): 883-7

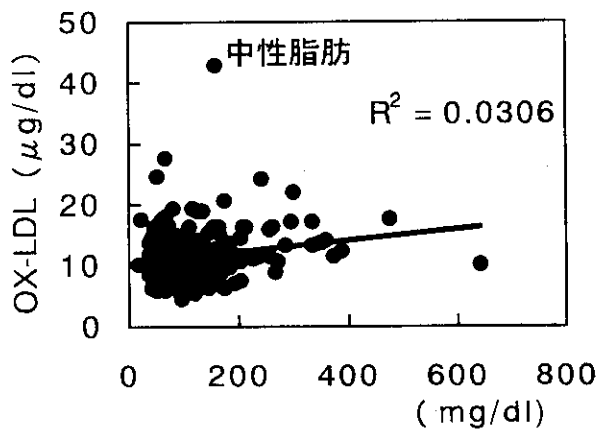
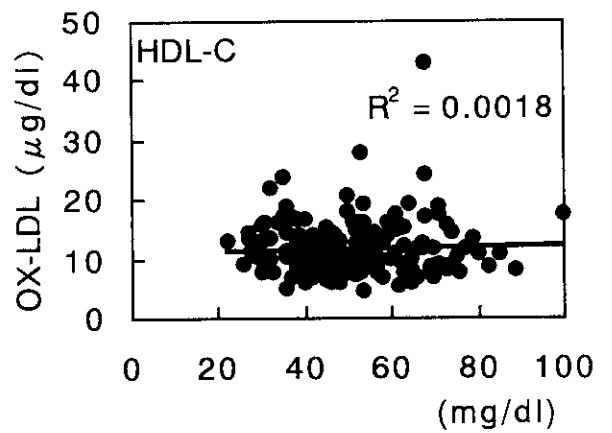
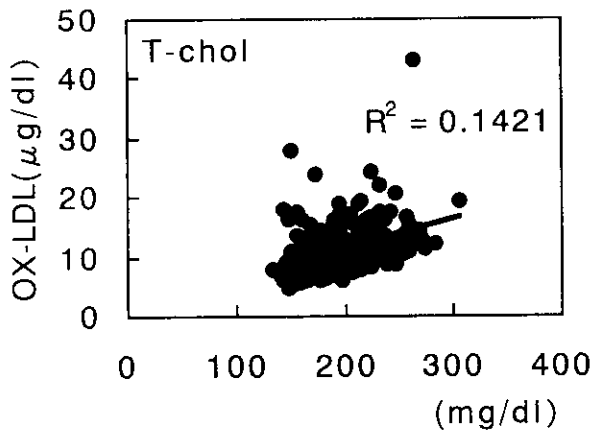
- 5、 Puurunen-M; Manttari-M; Manninen-V; Tenkanen-L; Alfthan-G; Ehnholm-C; Vaarala-O; Aho-K; Palosuo-T. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. Arch-Intern-Med. 1994 Nov 28; 154(22): 2605-9
- 6、 Itabe-H; Takeshima-E; Iwasaki-H; Kimura-J; Yoshida-Y; Imanaka-T; Takano-T A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation of oxidized phosphatidylcholines and polypeptides. J-Biol-Chem. 1994 May 27; 269(21): 15274-9
- 7、 Itabe-H; Yamamoto-H; Imanaka-T; Shimamura-K; Uchiyama-H; Kimura-J; Sanaka-T; Hata-Y; Takano-T; Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. J-Lipid-Res. 1996 Jan; 37(1): 45-53

(図1)

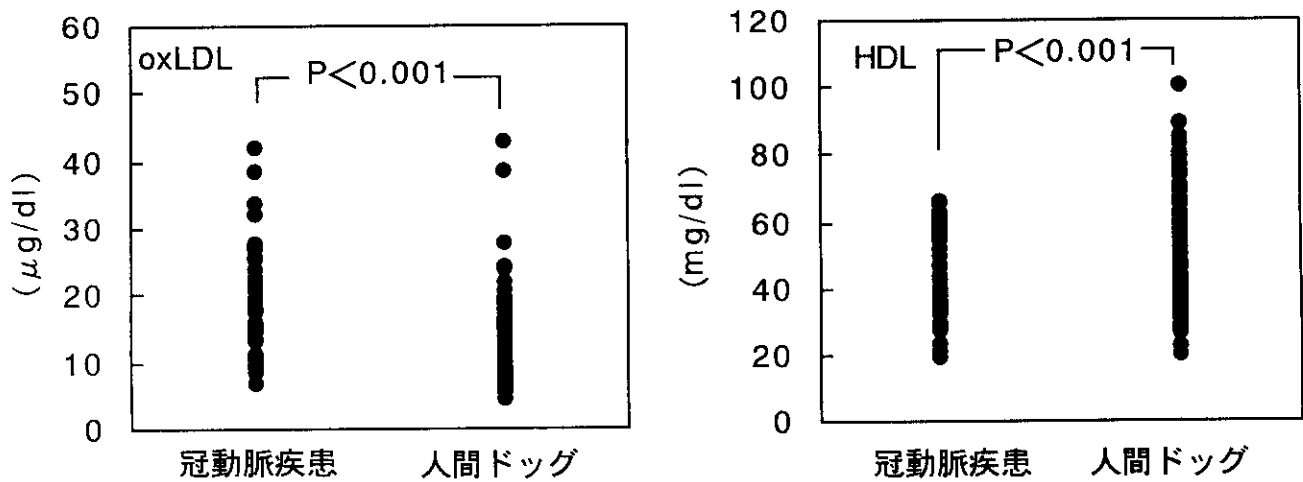


健常人 OX-LDL  $10.9 \pm 4.0$  ( $\mu\text{g/dl}$ )

(図2)

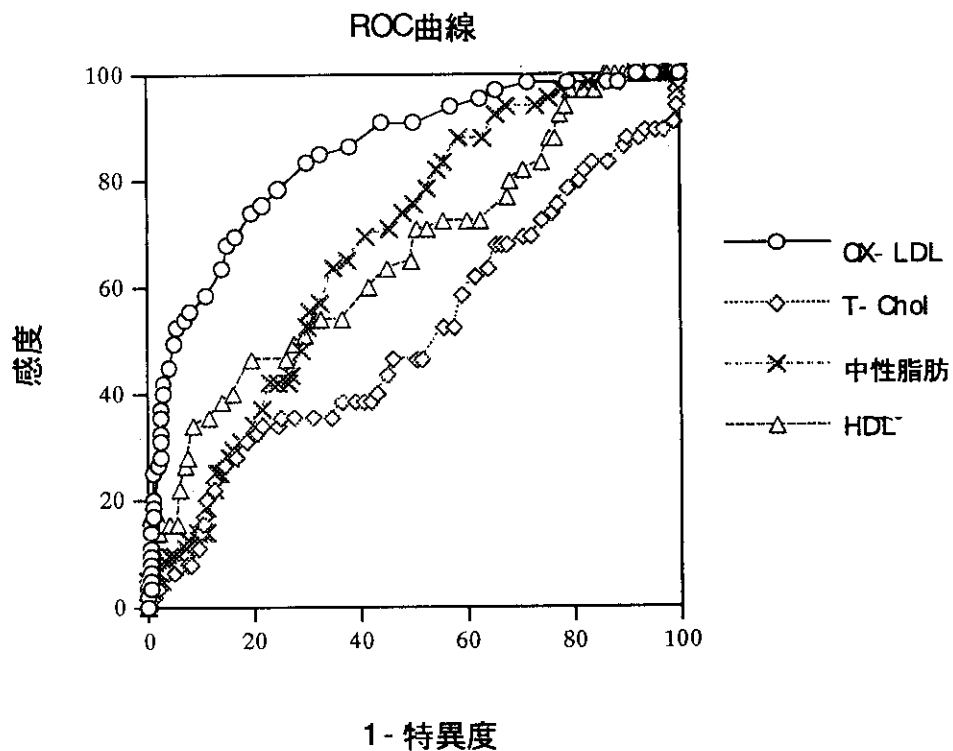


(図3)



	冠動脈疾患	人間ドッグ
OX-LDL	$17.3 \pm 8.3$	$11.4 \pm 4.3$
T-Chol	$207.6 \pm 35.9$	$198.4 \pm 35.6$
HDL-C	$44.2 \pm 14.1$	$50.4 \pm 13.3$
中性脂肪	$149.4 \pm 90.1$	$125.4 \pm 85.1$

(図4)





# ステロール反応性転写因子 (SREBP) の小胞体ループ切断プロテアーゼの精製

分担研究者 児玉 龍彦 (東京大学先端科学技術研究センター  
分子生物医学部門)

研究協力者 浜窪 隆雄, 山口美峰子, 白井丙午郎 (同上)

## 【目 的】

動脈硬化症は我が国で死亡原因の上位を占める心血管系疾患の基礎病変であり、その原因究明と予防法および治療法の確立は、高齢化社会を迎えている先進諸国にとって急務となっている。血中コレステロールレベル、とくに低比重リポ蛋白 (LDL) の濃度と急性心筋梗塞のイベント発症率とは正の相関があり血中コレステロール濃度の制御が予防および治療効果があると考えられている。実際、細胞内コレステロール合成系の律速酵素である HMG-COA 還元酵素の阻害剤は、イベント発症率を下げ、心血管系疾患による死亡率を下げることで報告されている。しかし、この阻害剤は酵素の阻害活性に比べ低濃度で臨床的に効果があることなどから、還元酵素阻害の直接的効果よりも、コレステロール応答性の転写調節因子 (SREBP) を介して LDL 受容体の濃度をあげ、血中コレステロール濃度を低下させている可能性が指摘されるようになった。

SREBP は bHLH 型の転写調節因子で、LDL 受容体、HMG-COA 合成酵素および還元酵素などの細胞内コレステロール調節に重要な酵素群の、プロモーター領域に存在する SRE (ステロールレスポンスエレメント) を認識し結合することによって、これらの酵素の転写活性を上げる。テキサス大学のブラウンとゴールドシュタインらは、この SREBP がコレステロールによる調節を受けていることを明らかにした<sup>1)</sup>。

SREBP は分子量約 120kd の前駆体蛋白質として合成され、小胞体膜上に 2 回膜貫通型蛋白として釣り針が刺さった様な形で分布する。小胞体膜は細胞膜に比べ、コレステロール含量が乏しく、細胞内コレステロールが欠乏したときは未知のプロテアーゼが活性化され、SREBP を小胞体ループ部で切断する (サイト 1)。この切断により、第二のプロテアーゼが働いて、SREBP の N 端断片はさらに膜貫通部分で切断を受け (サイト 2)、膜から離れて細胞質に移行し、さらに N 端に存在する核移行シグナルによって核内に輸送される<sup>2)</sup>。

以上の様に、SREBP をコレステロール濃度依存的に切断する機構が、細胞内のコレステロールフィードバック調節で最も重要な役割を果たしている。したがって、この酵素の同定およびコレステロールによる調節の分子機構の解明は新しい治療法、予防法の確立につながるものと期待される。そこでわれわれはペプチド性基質を用いた新しい *in vitro* のアッセイ法と緑色蛍光蛋白 (GFP) を活用した *in vivo* のアッセイ法を開発することにより、SREBP 変換酵素の同定に向けて蛋白精製法からのアプローチを試みた。

### 【方法】

SREBP には 1 と 2 の 2 種類のホモロジーの高いアイソフォームが存在する。SREBP 1 は主として脂肪酸合成系の酵素の発現に関連し、SREBP 2 の発現が LDL 受容体の発現と関連していることから<sup>3)</sup>、コレステロール調節には SREBP 2 が重要であると考え、ヒト SREBP 2 の ER ループのサイト 1 切断部位を含むペプチド性の消光性基質 (Moc-GRSVLSF-Dnp) を合成した。この基質はトリプシンなどの非特異的なプロテアーゼによっても切断を受けるため、さらにアセチル-GRSVL-アルデヒドを阻害剤として合成し、ER ループアミノ酸配列特異的な活性の指標とした。

SREBP は第一膜貫通部位の N 端側にアポト-シスプロテアーゼにより認識される部位があり、N 端からこの部位までを GFP (緑色蛍光蛋白質) に置き換え、さらに核移行シグナル (NLS) を付加した、GFP-NLS-SREBP 前駆体 C 端側フュージョン蛋白のコンストラクトを作成し、コレステロール代謝の研究に最適である CHO 細胞に遺伝子導入した。GFP の蛍光は、SREBP 前駆体の ER ループでの切断により、ER 膜から核内へと移行するので、これを共焦点顕微鏡で観察することにより、*in vivo* のアッセイが可能となる。

### 【結果および考察】

上記の消光性ペプチド基質を用いたアッセイ系で、CHO 細胞の ER 膜画分に凍結融解により活性化される容量依存性のペプチダーゼ活性を認めた。この活性はアセチル-GRSVL-アルデヒドで阻害され ( $IC_{50}$  = 約 50nM)、アミノ酸配列特異性があると考えられた。そこで、ハムスター肝臓のマикроゾーム画分からこの酵素活性の精製を試みた。遠心分画したマイクロゾーム画分から、0.5% MEGA9 を用いて可溶化し、Superdex 200 のゲル濾過にかけたところ、分子量約 400kd 付近、および 60kd, 30kd の

3 ピークに分離され、400kd 付近と 30kd の2つの活性は上記の合成阻害剤で阻害された。活性量の最も多い 30kd 分画を陰イオン交換、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより SDS-PAGE で単一バンド (32kd) に精製し (図 1), 内部アミノ酸配列を決定したところ、得られた3種のペプチド配列はマウスカテプシン B (シングルチェーン) の配列にほぼ一致した。

また分子量 40 万付近の活性は 0.5% lubrol により可溶化し、陰イオン交換カラムで分離すると、活性が ATP 依存性 (エネルギー依存的ではない) となり、アセチル-GRSVL-アルデヒドで阻害されなくなった。さらにブルーセファロース、ConA などのカラムクロマトグラフィーにより精製を進め、monoQ カラムの活性画分の SDS-PAGE 上 109kd のバンドの濃度と活性の相関が認められた。そこでこの 109kd の蛋白バンドを in gel digestion により内部アミノ酸配列を決定したところ、ラットの neprilysin と一致した。

ヒトカテプシン B を GFP-NLS-SREBP 恒常発現 CHO 細胞に強制発現させたところ、コントロールに比べ、核内 GFP 蛍光を持つ細胞数の増加が見られた。一方 LDL 受容体遺伝子プロモーター部位のルシフェラーゼによるレポーターアッセイでは、リポ蛋白欠乏血清刺激による内在性の SREBP の活性化に対して、ヒトカテプシン B による容量依存的な抑制がみられた。

## 【結 語】

SREBP 2 前駆体蛋白の ER ループ切断部位のペプチド配列をもとに消光性蛍光基質を作成し、肝ミクロソーム画分より、SREBP 切断プロテアーゼを分離、同定した。今回同定したプロテアーゼで、アセチル-GRSVL-アルデヒドに特異的に阻害されるのは、32kd のカテプシン B のみであった。

ルシフェラーゼを用いるレポーター遺伝子による内在性 SREBP の切断アッセイ系の結果から、カテプシン B はむしろ SREBP の分解系としての活性を持っていると考えられた。

また最近 Sakai らによって CHO 細胞のミュータントを用いてサイト 1 プロテアーゼ (S1P) が同定された<sup>5)</sup>。われわれのアッセイ系で活性が確認されるかどうかおよびカテプシン B との関連がないかどうか、今後の検討課題である。

## 【文 献】

1) Brown, M.S. and Goldstein, J.L.: The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism

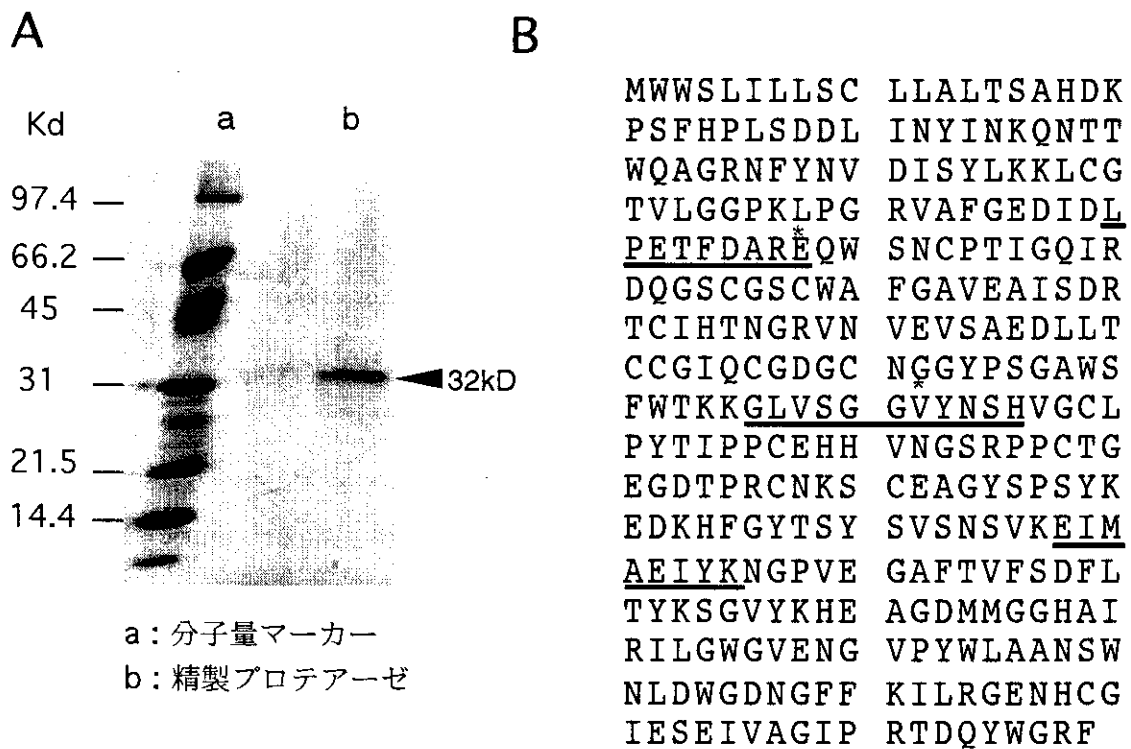
by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* 89: 331-340, 1997

2) Sakai, J, Duncan E A, Rawson R B, Hua X, Brown M S, and Goldstein, J L.: Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* 85; 1037-1046, 1996

3) Kawabe,Y., Honda,M. et al: Sterol mediated regulation of SREBP-1a,1b,1c and SREBP-2 in cultured human cells. *B.B.R.C.* 202: 1460-1467,1994

4) Pai,J-T., Brown,M.S., and Goldstein,J.L.: Purification and cDNA cloning of a second apoptosis-related cystein protease that cleaves and activates sterol regulatory element binding proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93: 5437-5442, 1996

5) Sakai, J. Rawson, R B, Espenshade, P J, Cheng D, Seegmiller, A C, Goldstein, J L, and M S Brown: Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Molecular Cell* 2, 505-514, 1998.



図：ハムスター肝の 32kd プロテアーゼの精製。

A：SDS-PAGE B：マウスカテプシン B 前駆体のアミノ酸配列。下線部は決定されたアミノ酸配列，\*はハムスターとの不一致部位を示す。

# 本邦における原発性高脂血症の病態と遺伝子解析

分担研究者 石橋 俊（東京大学医学部内科）

研究協力者 塩之入太、大橋 健、後藤田貴也、山田信博（同上）

武城英明（千葉大学医学部）、山下静也（大阪大学医学部）、

北 徹（京都大学医学部）

## [目的]

本邦における原発性高脂血症の病態と遺伝子解析の実態調査を行った。これまでに本邦において報告された原発性高脂血症および関連疾患の遺伝子異常を集計し、現時点におけるデータベース作成を試みた。更に、登録データもとづいて、各原発性高脂血症における病態と遺伝子変異との関連についての解析を行った。特に、登録数の多い家族性高コレステロール血症(FH)とコレステロールエステル転送タンパク(CETP)欠損症について、動脈硬化性疾患に注目して合併疾患を解析した。

## [対象と方法]

遺伝子変異登録の対象：動脈硬化学会評議員の所属施設および関連の諸施設に調査表を送付し、平成 10 年までに返送された調査表にもとづいて集計解析を行った。更に、動脈硬化学会などの国内学会や学会誌に報告された変異についても、可能な範囲で蒐集に努めた。遺漏の有無については、主要な報告施設に直接問い合わせた。病態解析の対象：調査表にもとづいて集計解析を行った。

病態解析の対象疾患：合併症として、特に動脈硬化性疾患に注目して、調査表から得られたデータを解析した。平均値の比較は、2 群では t 検定を、3 群以上では ANOVA を用いた。頻度の比較にはカイ二乗検定を用いた。

## [結果]

1) 登録症例の特徴：疾患別の登録数は、FH、アポ E 異常症/欠損症、CETP 欠損症、リポタンパクリパーゼ(LPL)欠損症、アポ A-I 異常症/欠損症の順に多く、特にホモ接合体についてみると、アポ E 異常症/欠損症、CETP 欠損症、FH、LPL 欠損症の順であった(表 1)。遺伝子異常が同定された症例の絶対数の多い疾患は、アポ E 異常症/欠損症、CETP 欠損症、アポ A-I 異常症/欠損症の順となっている。遺伝子変異が同定されている割合は、リポ蛋白糸球体症と無ベータリポ蛋白血症は 100% であり、次いで、アポ E 異常症/欠損症、アポ A-I 異常症/欠損症、アポ CII 欠損症、LCAT 欠損症、CETP 欠損症の順に高い遺伝子診断率を示した。FH は全体では 7%と低率であるが、ホモと compound heterozygotes では 88%と高率であった。原因遺伝子が未知である FH-like、FCHL の遺伝子診断率が 0 であるのは当然だが、LPL 欠損症の遺伝子診断率は 34%と比較的低率であった。

2) 本邦における遺伝子変異の種類：遺伝子解析によって同定された遺伝子変異の種類を表 2 に示した。変異の種類が多い順に、FH が 43、LPL 欠損症が 21、アポ A-I 異常症/欠損症が 17、LCAT 欠損症が 12 となっており、これらの疾患の変異は多様であることを示している。一方、アポ E 異常症/欠損症は 12、CETP 欠損症は 7 と、登録症例数に比較して変異の多様性が少ない。

3) 原発性高脂血症登録例における動脈硬化性疾患の合併

3-1) 虚血性心疾患：計 213 例が登録された。FH に 166 例(ホモ ヘテロ)、アポ E 異常症に 22

例(アポ E 2, 12例; アポ E 7, 7例; アポ E 4, 2例; アポ E 5, 1例)、CETP 欠損症に 11 例(D442G, 8例; intron 14, 2例)、FH-like に 6 例、アポ A-I 変異に 3 例(ホモ型 2 例、ヘテロ型 1 例)の IHD が登録された。IHD 発症の平均年齢は FH が  $55 \pm 12$  才、アポ E 変異が  $60 \pm 12$  才、CETP 変異が  $68 \pm 7$  才であった。IHD の割合は FH-like が 6/12 と FH ホモが と最も多く、FH 全体では 166/636、アポ E 変異は 23/83 といずれも 25%強、CETP 欠損症、アポ A-I 異常症/欠損症、FCHL、高シトステロール血症は 10-20%の頻度であった。一方、IHD ありと記載された症例で心カテーテル検査によって冠動脈硬化病変を否定されたのは、CETP 変異で 4 例(D442G, 3 例; intron 14, 1 例)、FH で 2 例、FH-Like で 2 例であった。

FH ヘテロについて IHD の危険因子を解析した。年齢、性、糖尿病、高血圧、肥満、喫煙、家族歴、高 LDL コレステロール血症、低 HDL 血症、高トリグリセリド血症などの conventional な危険因子と IHD との相関関係を調べると、年齢、男性、喫煙、糖尿病、高血圧、肥満、低 HDL 血症については有意差が認められた。血清脂質については IHD 群で HDL-C の低値が観察された。一方、血清 TC 値、LDL-C 値、TG 値には有意差はなかった。しかし、男女に分けて解析すると、女性において、IHD 群で血清 TC 値、LDL-C 値、TG 値の高値が認められ、アポ B の高値とアポ A-I の低値が観察された。他の冠危険因子をもつ場合、IHD 群のは HDL-C が低いが、血清 TC 値、LDL-C 値、TG 値には差は認められなかった。他の冠危険因子が無い場合、IHD 群の HDL が低く、血清 TC 値、LDL-C 値、TG 値は有意に高値であった。年齢、性別、高血圧、糖尿病、BMI、脂質データを独立変数とし、IHD を従属変数として多変量解析すると、年齢と性別が独立な危険因子として抽出された。FH ヘテロのアポ E 多型は、IHD 群で、 $\epsilon 4$  は 7/15、 $\epsilon 2$  は 1/3、 $\epsilon 3/3$  は 6/27 であり、 $\epsilon 4$  が多い傾向が認められたが有意差はなかった。

CETP 欠損症については、D442G と intron 14(1451+1 G→A)のいずれかをヘテロにもつ症例は 51 例と遺伝子解析された登録症例 58 例の内 88%を占めた。各変異の組み合わせによって 5 種類に分けて各々の間の特徴を比較した。ホモについてみると D442G 変異は intron14 変異に比べて、CETP 活性が高く、HDL-C 値が低い。ヘテロにおいても同様に D442G 変異の HDL-C は intron14 変異に比べて低いが、CETP 活性は高い傾向を認めるも有意差はなかった。intron14 変異のホモのアポ E 値は他の遺伝型の 2 倍と、極端な高値を示した。IHD の内訳は異型狭心症が 1/3 を占め、intron14 変異よりも D442G 変異に多い( $p < 0.05$ )。また IHD が登録された症例 11 例のうち 100mg/dl 以上の高 HDL 血症を示した症例は 3 例のみであった。

3-2) 脳血管障害: 27 例の脳血管障害が登録された。FH に 13 例(2.7%)、アポ E 異常症 10 例(17%)で、他の疾患群はあっても 1 例ずつで、アポ E 異常症は脳血管障害のリスクといえる。アポ E 遺伝型間ではアポ E 2 が 6 例; アポ E 7 が 2 例; アポ E 4 が 1 例; アポ E 5 が 1 例であった。

脂質データは、FH で TC  $409 \pm 15$ mg/dl, TG  $146 \pm 10$ mg/dl, HDL-C  $43 \pm 1.5$ mg/dl で、IHD 例より TC は高値であった。アポ E 異常症で、血清 TC 値は  $279 \pm 23$ mg/dl, TG 値は  $279 \pm 47$ mg/dl, HDL-C 値は  $38 \pm 2.9$ mg/dl で、TG 値は IHD 例より低く、TC 値, HDL-C 値に有意差は無かった。

3-3) その他の動脈硬化性病変: 閉塞性動脈硬化症は 10 例(FH 5 例、CETP 欠損症 3 例)で、糖尿病が 2 例に合併した。腹部大動脈瘤は 4 例(FH 2 例、LPL 欠損 1 例、アポ E 2 1 例)が登録された。

#### [考察]

登録変異総数は 123 種類にのぼり、2 年前に報告された 86 種類に比べて 37 (43%) 増加している

(表2) 1)。新たな変異報告例の登録以外に、登録漏れの変異を別途に調査し追加登録した分が含まれる。変異を同定してはいるが公表を希望しない施設もあり、同定されてはいるがリストに掲げられていない変異も少なからず存在すると思われる。大部分の変異は疾患の原因と考えられるが、遺伝子多型も含まれている可能性がある。各疾患毎の common mutation の存在については、山下、武城らの報告に詳しい 1, 2)。LPL 欠損症において W382X、リポ蛋白糸球体症においてアポ E Sendai(R145P)、アポ E Kyoto(R25C)がそれぞれ2例ずつ報告され、これらの変異は common mutation かもしれない。

リポ蛋白糸球体症は本邦に特異な新たな疾患として注目される。その原因はアポ E に存在することが及川らによって明らかにされ(アポ E Sendai(R145P))3)、その後、アポ E Kyoto(R25C)4)と 9bp deletion 変異 (deletion of R142-K143-L144) 5)が報告され、遺伝子変異の多様性が明らかになりつつある。

これまで、諸外国では報告されているが、本邦での報告がなかった疾患には、低ベータリポタンパク血症や家族性欠陥アポ B(familial defective apolipoprotein B-100; FDB)におけるアポ B 変異、無ベータリポタンパク血症における MTP 変異などがある。低ベータリポタンパク血症についてはアポ B-38.7 が報告され 6)、MTP 変異も既に4種類報告された。一方、FDB の原因とされている Arg<sup>3500</sup>→Glu のアミノ酸置換(FDB3500)は依然報告されておらず、本邦には本疾患が存在しない可能性もある 7)。

多くの原発性高脂血症において遺伝子診断が行われているが、FH-like syndrome や FCHL についての原因遺伝子は同定されておらず、これらの疾患の原因解明は今後の重要な課題である。

IHD は FH、FH-like およびアポ E 異常症の重要な合併症である。CETP 欠損症、アポ A-I 異常症/欠損症、FCHL、シトステロール血症においても比較的高率に合併している。ただし、これらの結果は症例のサンプリング方法の差を反映している可能性もあり、慎重な解釈が必要である。

IHD の危険因子解析の結果、FH ヘテロにおいても、年齢、性、喫煙、糖尿病、高血圧、肥満、低 HDL 血症などは重要な冠危険因子であることが明らかになった。血清 TC 値、LDL-C 値、TG 値の影響が弱い、女性においては、これらの値は有意に高値を示した。一方、男性においては有意差は認められなかった。しかるに、一般を対象にしたスタディーでは、LDL-C 値と冠動疾患合併との間に容量依存関係が存在することが明らかになっている。今回の解析では、LDL-C 値が男性 FH ヘテロの冠危険因子として抽出されなかった理由として、登録された脂質データが治療後の値である可能性、症例数の不足なども考慮する必要がある。遺伝子変異間での臨床像の差については、common mutation とされる LDL 受容体変異が、十分な登録数がなく解析不能であった。大阪地区、千葉地区、金沢地区において独自に実施された調査結果によると、1847TC、K790X、P664L (Kanazawa-2)、C317S の4変異で FH の30%を説明し、CAD の合併頻度は、ヘテロ接合体 FH 全体の全国平均よりも高頻度であると報告されている 2, 8)。

CETP 欠損症については、各遺伝型毎に解析に足る症例数が登録された。D442G 変異は intron14 変異に比較して CETP 活性が残存し、高 HDL 血症の程度も軽度であった。CHD の内訳は異型狭心症が 1/3 を占め、intron14 変異よりも D442G 変異に多い傾向が認められた。また、CHD 合併例に HDL-C の高値例は少なく、概して、CETP 欠損症と考えられないくらいの低値を示す症例が多かった。これらの結果は、CETP 欠損症が動脈硬化惹起性であるという最近の論調と合致せず、さらなる解析が必要と考えられた 9)。脳血管障害はアポ E 異常症に有意に多いことが確認された。

[結論] 本邦における原発性高脂血症の病態と遺伝子解析についての実態が明らかになった。



[参考文献]

- 1) 山下静也、丸山貴生、松沢佑次：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 原発性高脂血症調査研究班平成 8 年度研究報告書 p43-50.
- 2) 武城英明、高橋和男、斎藤 康：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 原発性高脂血症調査研究班平成 9 年度研究報告書 p50-58.
- 3) Oikawa S, Matsunaga A, Saito T et al.: Apolipoprotein E Sendai (Arginine145 Proline): A new variant associated with lipoprotein glomerulopathy. J Am Soc Nephrol 1997;8:820-823.
- 4) Komatsu T, Kanatsu K, Ochi H et al.: Lipoprotein glomerulopathy with a new apolipoprotein E phenotype. Am J Kidney Dis 1995;25:952-953.
- 5) 小川哲史、新井英夫、渡部敏男 他：リポタンパク系球体症における新たなアポ E 変異体。日児腎誌 1998;11:171-175.
- 6) Ohashi K, Ishibashi S, Yamamoto M, et al.: A truncated species of apolipoprotein B (B-38.7) in a patient with homozygous hypobetalipoproteinemia associated with diabetes mellitus. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1988;18:1330-1334.
- 7) Nohara A, Yagi K, Inazu A et al.: Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Japanese patients with familial hypercholesterolemia. Lancet 1995;345:1438.
- 8) Maruyama T, et al. Common mutations in the low-density-lipoprotein-receptor gene causing familial hypercholesterolemia in the Japanese population. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15:1713-1718.
- 9) 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 1997;17:1053-1059.

表1 登録症例の疾患別集計

	計	臨床診断			遺伝子診断		
		ホモ	ヘテロ	不明	ホモ	複合ヘテロ	ヘテロ
家族性高コレステロール血症	636	17	617	2	12	3	28
アポE異常症	103	32	71	0	32	6	65
CETP欠損症	77	26	45	6	22	30	6
リポタンパクリパーゼ欠損症	23	16	7	0	5	3	0
アポA-I異常症	18	3	15	0	3	12	2
家族性複合型高脂血症	14	0	0	14	0	0	0
FH-like	12	0	0	12	0	0	0
LCAT欠損症	6	6	0	0	4	0	0
アポC-II欠損症	6	4	2	0	3	2	0
リポ蛋白系球体症	5	0	5	0	0	0	5
無ベータリポ蛋白血症	3	3	0	0	3	0	0
低ベータリポ蛋白血症	1	1	0	0	1	0	0
HTGL欠損症	1	0	0	0	0	0	0
その他	17	8	3	6	1	0	0



# IV. 総合研究報告

## 総合研究報告書

### 原発性高脂血症調査研究班

主任研究者氏名 北 徹

#### 1 研究目的

平成8年度に新たに発足した研究班は以下の5つの課題を掲げた。すなわち、

- (1) 原因が明らかにされていない原発性高脂血症の実態調査と病態解析
  - (2) わが国における脂質代謝異常症の遺伝子解析の集計と登録
  - (3) 高脂血症及び粥状動脈硬化発症進展の分子機構の解析ならびに発生工学的手法を用いた新たな動物モデルの作出
  - (4) HMG-CoA還元酵素阻害剤ならびにフィブレート系薬剤の副作用調査
  - (5) 高脂血症の治療法としての食事療法のガイドラインの作成
- さらに、厚生省の要請により(6)重症度基準の作成に着手した。

#### 2 研究方法

##### (1) 原発性高脂血症の実態調査と病態解析

研究の対象として以下の三つの疾患に焦点を絞り検討した。

a) 家族性高コレステロール血症 (FH) の患者間にはその予後、治療反応性などその病態像に大きな違いがあることが知られている。近年、遺伝子解析が行われるようになり、LDL受容体遺伝子の変異の起こっている部位が明らかにされてきた。そこで、FHの病態と遺伝子レベルの解析結果を比較検討し、両者の関係をはっきりさせ予後判定、治療方針へ反映させること。

b) 家族性複合型高脂血症 (FCHL) の原因は単一遺伝子異常と考えられていたが、その後いくつかの遺伝子の異常が重なり合っている可能性が示唆され、その基準が単純でないことが明らかにになった。そこで、特定のフィールドでまずFCHLが含まれることを前提としたゆるい診断基準を設定し、その疫学調査を行った。そこから症例の絞り込みをはかり、最終的にはFCHLの頻度、病態、病因にせまることを目標とした。また、FCHLと関係が深いとされる遺伝子アポCIII、リポタンパクリパーゼ、ミクロゾームトリグリセリド転送蛋白などに異常があるかを検討をする。

c) 日本人に比較的多い高HDL血症の発症頻度、病態、病因の解析については、原因として明らかにされてきたCETP遺伝子異常、肝性トリグリセリドリパーゼ遺伝子異常の頻度調査を目指した。また、動脈硬化との関連の不明なCETP欠損症について、疫学調査を中心に動脈硬化との関連につき検討を進めた。

##### (2) 我が国における脂質代謝異常の遺伝疫学、および遺伝子レベルの解析

すでに多く単離されている脂質代謝関連の遺伝子の知見をもとに我が国における高脂血症における遺伝子レベルでの研究をまとめ、遺伝子異常が病態とどの様に関わるかを解明する。

(3) 高脂血症及び粥状動脈硬化発症進展の分子機構の解析ならびに発生工学的手法を用いた新たな動物モデルの作出を通じて、脂質代謝に重要と考えられる基礎研究の推進、および発生工学的手法を用いた脂質代謝異常の病態解析を通して、高脂血症の病態解析および治療法への応用を考える。

##### (4) 高脂血症治療薬の副作用調査

有効な高脂血症治療薬が広く使用されるようになってきたが一方で副作用の慎重な観察が必