

本研究では短期的な予後を外科的処置を要したことで評価した。外科的処置が行われた例では、内科的な保存療法が行われた群に比して、血中のLp(a)が有意に高値であったことから、高Lp(a)血症はCDの予後に関与する可能性が考えられた。

【結論】

炎症性大腸疾患であるCDではUC幹事に比して炎症の程度に応じて血漿Lp(a)値が増加していた。手術施行例で増加していたことから、Lp(a)の上昇はCDの予後に関係する可能性が考えられた。

【文献】

1. Akira Matsunaga, Jun Sasaki, Takeo Komatsu, Kazuro Kanatsu, Emiko Tsuji, Kengo Moriyama, Takafumi Koga, Kikuo Arakawa, Shinichi Oikawa, Takao Saito, Toru Kita, Toshio Doi: A novel apolipoprotein E mutation, E2 (Arg25Cys), in lipoprotein glomerulopathy. *Kidney International* 56: 421-427, 1999.
2. Takao Saito, Shinichi Oikawa, Hiroshi Sato, Toshinobu Sato, Sadayoshi, Ito, Jun sasaki: Lipoprotein glomerulopathy: Significance of lipoprotein and ultrastructural features. *Kidney International* 56(Suppl. 71) S37-S41, 1999.
3. Sasaki A, Oikawa S, Takayoshi T: Microalbuminuria is closely related to diabetic macroangiopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 44: 35-40, 1999.
4. Saito T, Oikawa S, Sato H, Sasaki J: Lipoprotein glomerulopathy: Renal lipidosis induced by novel apolipoprotein E variants. *Nephron* 83: 193-201, 1999.
5. Konishi K, Saruta T, Kuramochi S, Oikawa S, Saito T, Han H, Matsunaga A, Sasaki J: Association of a novel 3-amino acid deletion mutation of apolipoprotein E (apoE Tokyo) with lipoprotein glomerulopathy. *Nephron* 83: 214-218, 1999.
6. Ando M, Sasaki J, Hua H, Matsunaga A, Uchida K, Jou K, Oikawa S, Saito T, Nohei H: A novel 18-amino acid deletion in apolipoprotein E associated with lipoprotein glomerulopathy. *Kid Int* 56: 1317-1323, 1999.
7. 豊田隆謙、及川眞一、他. 糖尿病合併慢性動脈閉塞症患者に対するベラストナトリウム(ドルナー®)の効果. *内分泌・糖尿病科* 8:104-114, 1999

Fig. 1 *Plasma Lp(a) level at admission*

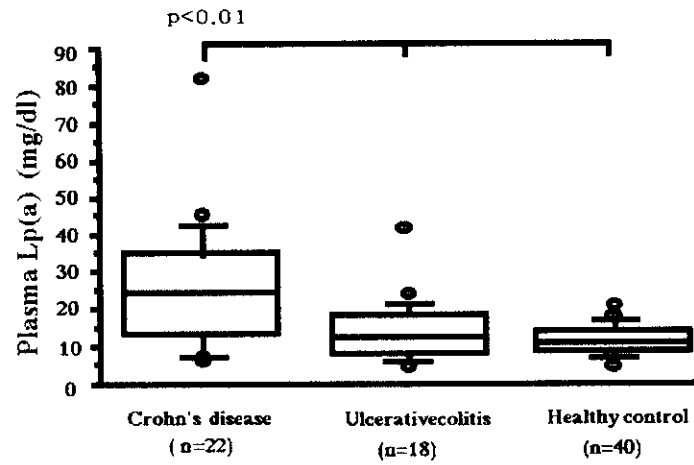


Fig. 2 *Changes of plasma Lp(a) levels after treatment of Crohn's disease*

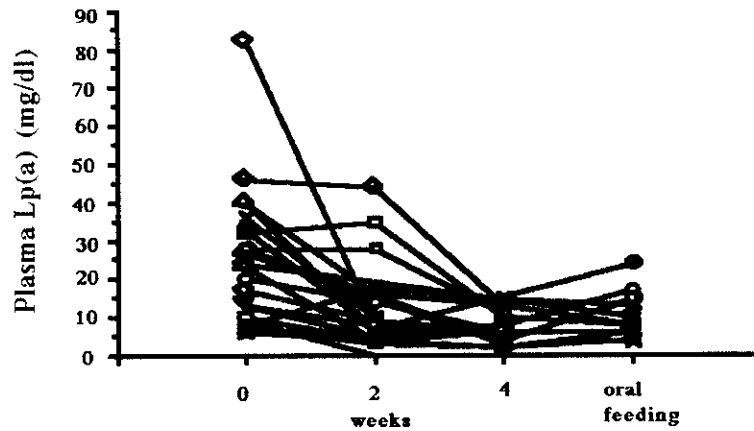
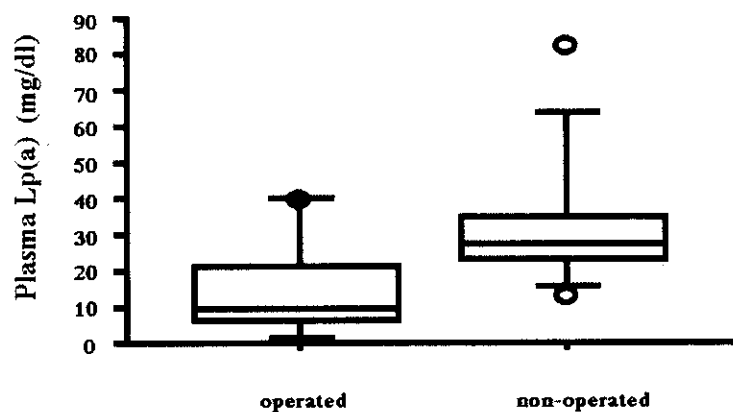


Fig. 3 *Maximum level of plasma Lp(a) in operated CD patients*



研究要旨：スクワレン合成酵素は、コレステロール合成系の中のステロール経路の最初に位置する重要な酵素である。本酵素の欠損症が原発性低脂血症の原因となりうるか否かを明らかにし、高脂血症治療薬のひとつとして期待されている本酵素の阻害剤の有用性と副作用を前臨床的に検証するために、スクワレン合成酵素のノックアウトマウスを樹立した。ホモ接合体は E9.5-10.5 で胎生致死となり、この段階の胎児の多くは神経管の閉鎖不全を呈した。一方、ヘテロ接合体の外見に異常は認めず、肝臓と精巣のスクワレン合成酵素活性は 50% に低下しているにも拘わらず、肝臓におけるアセテートからの総ステロール合成量や血清のリポタンパクプロファイルには変化は認められなかった。従って、スクワレン合成酵素は、神経管閉鎖不全などのヒト奇形症候群の原因遺伝子である可能性があり、また、コレステロール低下療法としてスクワレン合成酵素阻害剤を用いる場合には、50%以上の酵素活性阻害が必要と考えられた。

A. 研究目的

コレステロールは、ステロイドホルモンと胆汁酸の前駆体や生体膜として利用されるなど、広範な用途に利用されている。コレステロール合成系酵素の異常症としては、これまでに、 $\Delta 7$ 還元酵素の欠損症である Smith-Lemli-Opitz (SLO) 症候群などが知られている。

スクワレン合成酵素 (squalene synthase; SS) はファルネシル 2 リン酸を重合してスクワレンを生成する酵素である。この酵素までのコレステロール合成系からは、非ステロール経路が分岐し、ドリコールやユビキノンなどの生成やイソプレニレーションなど多彩な生体機能を司るなど、その欠損症は重篤であることが予測される。SS から下流は、純粋にコレステロール合成のための経路となり (ステロール経路)、その阻害剤はコレステロール低下治療薬として有望視されている。そのような治療法の有用性を検定し、コレステロール合成系酵素の異常症が、SLO 症候群に似た未知の疾患の原因遺伝子である可能性を追求するため、SS のノックアウトマウスを作成した。

B. 研究方法

SS の酵素活性中心を含むエクソン 4-5 をネオマイシン耐性遺伝子の発現カセットで置換するタイプのベクターを構築し、ES 細胞で相同組み換え体を作成した。マイクロインジェクション法でキメラマウスを作成し、ヘテロ接合体同士の交配からホモ接合体の作成を試みた。マイクロゾーム分画の SS 酵素活性、肝臓のコレステロール合成活性はアイソトープ法によって測定した。ノーザン解析、血漿リポタンパク解析などを行った。胎児の病理組織は通常の組織染色法で調べた。普通食以外に、1.25%コレステロール、5%ココアバター、0.5%コール酸を含有する食餌と 2%スクワレン含有食を用いた。

C. 研究結果

ホモの解析：ヘテロ同士の交配の結果生じた新生児と胎児の数を各遺伝型間で比較した (表 1)。ホモの出生は確認されなかった。ホモは胎生 12.5 日以降でも確認されないが、胎生 10.5 日以前で

は確認された。過半数は、胎生 7.5 日の胎児に相当する形態を示した。即ち、成長障害のため小型であり、神経管の閉鎖不全を伴っていた。一部に、胎生 9.5 日に近い形態を示す胎児も確認されたが、成長障害と前脳の形成不全が確認された。それ以外は、小型の肉片のようで、明瞭な形態を識別できなかった。顕微鏡的には、中枢神経の原基に相当する部分に多くのアポトーシス細胞が確認された。コレステロールかスクワレンの欠乏に由来する表現型であれば、妊娠マウスにコレステロールかスクワレンを補充することによって、ホモの出生が可能か否かを調べた。いずれの食餌でもホモの出生は確認されなかった。

ヘテロの解析：野生型に比較してヘテロの肝臓の SS の mRNA は半量に低下していた。一方、LDL レセプター、HMGCoA 還元酵素、コレステロール 7 α 水酸化酵素などの mRNA 量には著明な変化は確認されなかった。SS の酵素活性は、野生型に比較してヘテロの肝臓/精巣で約 50% に減少していた。しかしながら、肝臓におけるアセテートからコレステロールへの合成量は、野生型とヘテロの間で有意差はなく、同様に、血清脂質値や血清リポタンパクの変化も確認されなかった。

D. 考察

SS は生存に必須であることが証明された。ステロール経路が機能していなくとも、胎生 9.5-10.5 日までは生育可能であったことの原因として、その発生段階までは、卵黄嚢を介して母体から供給されるコレステロールが利用されている可能性が高い。この時期に胎盤が形成されるので、更に、発育する胎児に十分量のコレステロールを供給するには胎盤は未成熟であるため、胎生致死になる可能性がある。あるいは、SS が機能しないと、その基質であるファルネゾールの過剰蓄積を招き、その毒性のために致死となる可能性が残される。ホモの胎児のコレステロールやファルネゾールの含量を調べる必要があろう。また、SS は神経管閉鎖不全などの胎児奇形の原因遺伝子である可能性が示唆された。

ヘテロの肝臓では、SS 活性が半減しているにも

関わらず、コレステロール合成に変化がなかった理由として、SSはコレステロール合成の律速となっていないことを裏付ける。血清脂質値にも変化がなく、SS阻害剤のに血清コレステロール低下効果を期待するには、酵素活性を50%以上抑制する必要があることを示している。

E. 結論

スクワレン合成酵素は、神経管閉鎖不全などのヒト奇形症候群の原因遺伝子である可能性があり、また、コレステロール低下療法としてスクワレン合成酵素阻害剤を用いる場合には、50%以上の酵素活性阻害が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N. Targeted disruption of hormone sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy but not in obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:787-792, 2000
- 2) Yuan X, Ishibashi S, Hatakeyama S, Saito M, Nakayama J, Nikaido R, Haruyama T, Watanabe Y, Iwata H, Iida M, Sugimura H, Yamada N, Ishikawa F. The presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. *Genes Cells* 4:563-572, 1999
- 3) Yagyu H, Ishibashi S, Chen Z, Osuga J, Okazaki M, Perrey S, Kitamine T, Shimada M, Ohashi K, Harada K, Shionoiri F, Yahagi N, Gotoda T, Yazaki Y, Yamada N Overexpressed lipoprotein lipase protects against atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *J. Lipid Res* 40:1677-85, 1999
- 4) Tozawa R, Ishibashi S, Osuga J, Yagyu H, Oka T, Chen Z, Ohashi K, Perrey S, Shionoiri F, Yahagi N, Harada K, Gotoda T, Yazaki Y, Yamada N. Embryonic Lethality and Defective Neural Tube Closure in Mice Lacking Squalene Synthase *J. Biol. Chem.* 274: 30843-30848, 1999
- 5) Osuga J, Yonemoto M, Yamada N, Shimano H, Yagyu H, Ohashi K, Harada K, Kamei T, Yazaki Y, Ishibashi S. Cholesterol lowering in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing apolipoprotein E. *J. Clin. Invest.* 102:386-94, 1998

表1 SS ノックアウトマウス遺伝型毎の個体数

胎生日数	<i>SS+/+</i>	<i>SS+/-</i>	<i>SS-/-</i>	吸収	計
E9.5	12	18	2	9	41
E10.5	19	42	8	14	83
E9.5-10.5	4	14	3	12	33
E12.5	6	7	0	4	17
E13.5	12	25	0	21	58
出生後	50	99	0	NA	149

アポ蛋白異常症の解析：変異アポ A-I の発現とその機能解析を中心に
分担研究者 佐々木淳（福岡大学医学部第二内科）

発現精製した変異アポ A-I のうちアポ A-I (Lys107del) およびアポ A-I Nichinan (Glu235del) では人工脂質 DMPC および血清リポ蛋白との親和性低下、 α ヘリックス比率の低下を認めた。アポ A-I Nichinan (Glu235del) では、コレステロール引き抜きと細胞への結合能の低下も見られたが、アポ A-I (Lys107del) は正常アポ A-I と同様であった。また、リポ蛋白糸球体症患者より、新たなアポ E 変異であるアポ E1 (9bp deletion at codons 141-143) とアポ E1 (54bp deletion at codons 156-173) を検出したことにより、複数のアポ E 変異によりリポ蛋白糸球体症が発症することが示された。

A. 研究目的

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。ヒトのアポ A-I 遺伝子は第 11 染色体 q23 に存在し、4 つのエクソンより構成されており、アミノ酸残基の 1 から 43 番目に相当する部分はエクソン 3 に、それ以降はエクソン 4 に存在している。アポ A-I は、リポ蛋白の HDL 分画に親和性が強く、細胞との結合や LCAT 活性化、VLDL や LDL へのコレステロールエステル転送といったコレステロール逆転送系の各段階において重要な役割を果たしており、アポ A-I 異常症の解析によりアポ A-I の機能異常と病態の関係が明かとなる。一方、ヒトのアポ E 遺伝子は、第 19 染色体 q 腕上にあり、アポ E は 299 アミノ酸残基の糖蛋白で、血清中においてカイロミクロンおよび VLDL の主要なアポ蛋白の一つであり、HDL にも存在する。アポ E は、リポ蛋白を構成するのみでなく、アポ B100 と同様に細胞表面に存在する受容体に結合するリガンドとして作用し、細胞表面の LDL 受容体、VLDL 受容体、LDL 受容体関連蛋白などへ結合し取り込ませる役割を果たしており、アポ E 異常症により III 型高脂血症をはじめリポ蛋白糸球体症など種々の病態を引き起こす。本年度の研究では、アポ A-I については我々が検出した種々の変異を大腸菌に発現させ、種々の機能解析を行った。また、アポ E についてはリポ蛋白糸球体症と関係する新たな変異を検出したので報告する。

B. 研究方法

1. アポ E の等電点電気泳動法および制限酵素多型 (RFLP) によるアポ E 遺伝子型アポ 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。アポ E 遺伝子型は 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同定した。

2. 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、5ml 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。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 (ABI373A) を用いてシークエンスを行い変異部位を確定した。

3. 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アポ A-I の cDNA を元にして Kunkel 法にてアポ A-I (Ala95Asp)、アポ A-I (Tyr100His)、アポ A-I (Lys107del)、アポ A-I (Glu110Lys)、アポ A-I (Val156Glu)、アポ A-I (His162Gln)、アポ A-I (Glu235del) 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。

4. アポ A-I の機能解析

1) 変異プロアポ A-I および正常プロアポ A-I の脂質との結合能を人工脂質 DMPC を用いて比較した。

2) リポ蛋白との結合は [125I] でラベルした変異プロアポ A-I および正常プロアポ A-I を血漿とインキュベート後、BioGel A5m アガロースゲルクロマトグラフィーでリポ蛋白分画を分離して比較した。

3) 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た。

4) コレステロール引き抜きは、[3H] コレステロールでラベルした培養ヒト線維芽細胞と変異プロアポ A-I および正常プロアポ A-I をインキュベートして比較した。

5) 細胞との結合は、[125I] でラベルした変異プロアポ A-I および正常プロアポ A-I を LDL 過剰存在下で培養したヒト線維芽細胞とインキュベートして比較した。

(倫理面での配慮)

アポ A-I 及び E の遺伝子解析用血液サンプル採取に当たっては、脂質代謝関連の遺伝子のみの解析を行うこと、また、データの公表時に個人が特定できないかたちで報告することを説明し、患者及

び家族より同意を得た。

C. 結果および考察

1) 今回の研究では、我々が検出したアポ A-I 異常症のうち変異部位が α ヘリックス構造のある C 末端側にあるアポ A-I Hita (Ala95Asp), アポ A-I (Lys107del), アポ A-I Karatsu (Tyr100His), アポ A-I Fukuoka (Glu110Lys), アポ A-I Oita (Val156Glu), アポ A-I Kurume (His162Gln), アポ A-I Nichinan (Glu235del) の 7 種の変異アポ A-I を大腸菌に発現させ精製した。人工脂質 DMPC への結合能の比較では、アポ A-I (Lys107del) およびアポ A-I Nichinan (Glu235del) では脂質との親和性低下を認めたが、アポ A-I Oita (Val156Glu) をはじめとする他の変異では明かな脂質への親和性低下は認めなかった。また、125I-ラベル変異プロアポ A-I および正常プロアポ A-I を血清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、アポ A-I (Lys107del) およびアポ A-I Nichinan (Glu235del) ではリポ蛋白非結合分画の高いことを示した。さらに、DMPC 結合アポ A-I の円二色偏光を用いた 2 次構造比較では、アポ A-I の全アミノ酸における α ヘリックスの比率が正常プロアポ A-I の 73% に対してプロアポ A-I (Lys107del) およびプロアポ A-I Nichinan (Glu235del) ではそれぞれ 64% と 62% へ減少していた。アポ A-I (Lys107del) およびアポ A-I Nichinan (Glu235del) では、線維芽細胞からのコレステロール引き抜きと細胞への結合能を比較したところ、プロアポ A-I (Lys107del) では正常プロアポ A-I と差異が見られなかったが、プロアポ A-I Nichinan (Glu235del) では、コレステロール引き抜きと細胞への結合能の低下を認めた。

2) アポ E については、蛋白レベルでの apo E 表現型と RFLP 法によるアポ E 遺伝子型の比較をリポ蛋白糸球体症が疑われる症例について行いその差異を見出し DNA シークエンスにより、アポ E2 Sendai (Arg145Pro)、アポ E2 Kyoto (Arg25Cys) に加えてアポ E1 (9bp deletion at codons 141-143) とアポ E1 (54bp deletion at codons 156-173) を検出した。

D. 結語

1. 変異部位が α ヘリックス構造のある C 末端側にある 7 種の変異プロアポ A-I を発現精製した。
2. 7 種の変異プロアポ A-I の人工脂質 DMPC への結合能の比較ではプロアポ A-I (Lys107del) およびプロアポ A-I Nichinan (Glu235del) での脂質との親和性低下を認めた。
3. プロアポ A-I (Lys107del) およびプロアポ A-I Nichinan (Glu235del) では、血清リポ蛋白との親和性低下、 α ヘリックス比率の低下を認めた。
4. プロアポ A-I Nichinan (Glu235del) では、コレステロール引き抜きと細胞への結合能の低下を認めたが、プロアポ A-I (Lys107del) は正常プロアポ A-I と同様であった。
5. リポ蛋白糸球体症患者より、新たなアポ E 変異であるアポ E1 (9bp deletion at codons 141-143) とアポ E1 (54bp deletion at codons

156-173) を検出した。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Han H, Sasaki J, Matsunaga A, Hakamata H, Wei Huang, Ageta M, Taguchi T, Koga T, Arakawa K. A novel mutant, apo A-I Nichinan (Glu235 \rightarrow O), associated with low HDL cholesterol levels and reduced cholesterol efflux from cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1447-1455, 1999.

2) Matsunaga A, Sasaki J, Han H, Huang W, Kugi M, Koga T, Ichiki S, Shinkawa T, Arakawa K. Compound heterozygosity for an apolipoprotein A1 gene promoter mutation and structural nonsense mutation with apolipoprotein A1 deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:348-355, 1999.

3) Huang W, Sasaki J, Matsunaga A, Han H, Li W, Koga T, Kugi M, Ando S, Arakawa K. A single amino acid deletion in the carboxy terminal of apolipoprotein A-I impairs lipid binding and cellular interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 20: 210-216, 2000.

4) Matsunaga A, Sasaki J, Komatsu T, Kanatsu K, Tsuji E, Moriyama K, Koga T, Arakawa K, Oikawa S, Saito T, Kita T, Doi T. A novel apolipoprotein E mutation, E2 (Arg25Cys) in lipoprotein glomerulopathy. *Kidney International* 56:421-427, 1999

5) Ando M, Sasaki J, Han H, Matsunaga A, Uchida K, Jou K, Oikawa S, Saito T, Nihei H. A novel 18-amino acid deletion in apolipoprotein E associated with lipoprotein glomerulopathy. *Kidney International* 56:1317-1323, 1999

6) Konishi K, Saruta T, Kuramochi S, Oikawa S, Saito T, Han H, Matsunaga A, Sasaki J. Association of a novel 3-amino acid deletion mutation of apolipoprotein E (apo E Tokyo) with lipoprotein glomerulopathy. *Nephron* 83: 214-218, 1999.

厚生科学研究費補助金（厚生省特定疾患調査研究事業）
（分担）研究報告書
原発性高脂血症に関する研究
分担研究者 江見 充（日本医科大学老人病研究所 教授）

研究要旨

LDL 受容体遺伝子座との強い連鎖を認めた高脂血症大家系において、エキソン 14/イントロン 14 接合部のスプライス変異を同定し、他の 14 家系においてもこの変異が認められたことから、創始者効果を伴う変異であることが示された。同家系の家系構成員 200 余名から DNA を調製し、76 名の同一遺伝子変異を持つ患者群を同定し、アポ B、アポ A1、SCAP、CETP など候補修飾遺伝子の SNP 多型について遺伝子タイピングを行ない、CETP Val 422 Ile 多型などが患者のリポ蛋白分画値に影響を与えることを示した。また、家族性複合型高脂血症 (FCHL) を呈する家系において、FCHL が二遺伝子病であり、IIa、IIb 型患者の高 CH 血症は LDL 受容体 Glu337Lys 変異に起因し、IIb、IV 型患者の高 TG 血症は別の遺伝子の伝播によることを示した。さらに、ヒト SCAP 遺伝子をクローニングし、同遺伝子が約 30Kb 長で、23 のエクソンからなり、プロモーター領域に ADD1/SREBP-1 結合配列が存在すること、染色体領域 3p21.3 に位置することを明らかにした。

A. 研究目的

ヒト高脂血症の各型は、その発症に複数の遺伝因子と環境因子が関与する多因子遺伝病ととらえることができる。高脂血症を呈する大家系を用いて主遺伝因子および修飾遺伝因子における変異解析を行なうことにより、候補遺伝子が種々の表現型に關与する役割を明らかにすることを目的として、IIa 型を中心に種々の高脂血症大家系について LDL 受容体、アポ B、アポ E、アポ CII、リポ蛋白リパーゼなどの遺伝子座の関与を調査し、各種高脂血症における遺伝子因子の役割を解明する。また、細胞内脂質代謝に關わる SCAP など種々の遺伝子を単離し、染色体マッピング、構造解析と DNA 多型の同定を試みた。

B. 研究方法

家系構成員が 50 名以上からなる高脂血症大家系の 20 家系を研究対象として病歴聴取、採血、ECG、血清脂質検査、各リポ蛋白分画の超遠心法による測定、およびリンパ球からの DNA 抽出を行なった。家系構成員のゲノム DNA を用いて LDL 受容体などの遺伝子座の DNA 多形性マーカーによる遺伝的連鎖解析と SSCP 法による変異検索と塩基配列の決定を行ない、各表現型をもたらす遺伝子変異を解析した。また、SCAP 遺伝子について、全長 cDNA クローニングし、染色体遺伝子の単離、プロモーター領域、エキソン/イントロン境界などのシーケンス解析、FISH 法、Radiation hybrid 法による染色体マッピング、マイクロサテライトマーカーおよび SNP マーカーの単離を行なった。

C. D. E. 研究結果、考察、結論

(1) 大家系解析による高脂血症変異の創始者効果の同定

心筋梗塞患者 15 名を含む高脂血症大家系 K653 を中心に LDL 受容体遺伝子座の解析を行なった。まず、LDL 受容体遺伝子座の NcoI および BamHI の RFLP マーカーによる K653 家系の連鎖解析を行なったところ、高コレステロール血症は LOD スコア 4.5 にて LDL 受容体遺伝子座に連鎖し、高コレステロール血症はパロタイプ A と完全にコセグリゲイトした。そこで、PCR-SSCP 法およびダイレクト

シーケンシング法にて発端者の LDL 受容体遺伝子の構造異常を検索したところ、エクソン 14 とイントロン 14 の接合部においてスプライスドナー配列のスプライス変異を同定した。この遺伝子変異を簡便に検出するために点変異特異的遺伝子増幅法 (MASA 法) を開発し、通院中の高脂血症 75 名について遺伝子診断を行なったところ、新たな 14 家系において同じ変異が検出された。ゆえにこの地域において強い創始者効果を示す FH 変異と考えられる。

(2) FH 家系 (K653) 内の多様な表現型への修飾遺伝子の関与

ヒト高脂血症の各型は、その発症に複数の遺伝因子と環境因子が関与する多因子遺伝病ととらえることができる。高脂血症を呈する大家系を用いて主遺伝因子および修飾遺伝因子における変異解析を行なうことにより、候補遺伝子が種々の表現型に關与する役割を明らかにすることを目的として、IIa 型を中心に種々の高脂血症大家系について LDL 受容体、アポ B、アポ A1、SCAP、CETP などの遺伝子座の関与を調査し、家族性高脂血症における遺伝子因子の役割を検討した。IIa 型高脂血症大家系 K653 の家系構成員 200 余名からの採血、リポ蛋白測定、ゲノム DNA 調製を完了した。まず、この家系で同定された LDL 遺伝子のスプライス変異を、家系構成員 200 余名について遺伝子診断を行なったところ、家系内の 76 名において同じ変異が検出された。次いで、この同じ LDLR 変異を有する 76 名の患者を対象に、アポ B Ins/Del 多型、アポ A1 -78bp A/G 多型、SCAP 796AA, Ile/Val 多型、CETP 422AA, Val/Ile 多型について遺伝子型を決定し、各リポ蛋白分画値への影響を検討した。その結果、これら遺伝子多型が高脂血症の様々な表現型の多様性を遺伝子間相互作用によってもたらすことが明らかとなった。特に、CETP Val 422 Ile 多型のリポ蛋白値多様性への関与が有意であった。

(3) FCHL 家系発症への LDLR 変異の関与

家族性混合型高脂血症 (FCHL) は、虚血性心疾患を高率に合併することからゴールドシュタインらにより提唱された疾患概念で、一家系内に IIa 型

(LDL 上昇)、IV型 (VLDL 上昇)、IIb型 (LDL および VLDL 両者の上昇)の多様な表現型を示す患者が混在する。常染色体優性遺伝形式をとるとされているが、未だその病因は明らかでない。今回我々は、ユタ州在住の心筋梗塞多発家系において、24名の内、9名がIIa型、4名がIIb型、3名がIV型の高脂血症を呈するFCHL家系を対象にその遺伝学的要因を検討した。候補遺伝子のうち LDL 受容体遺伝子について検索したところ、エキソン4上、コドン337にGlu→Lysのミスセンス変異を発端者で発見した。採血した18名についてMASA法で検索したところ、IIa型およびIIb型を呈した9名においてこの変異が同定された。この変異がLDL上昇とco-segregateしたことから、本家系のFCHLは二遺伝子病であり、高CH血症は(IIa型、IIb型の型)、LDLR変異に起因し、高中性脂肪血症(IIb型、IV型)は、別の遺伝子の伝播によるものと考えられた。FCHL患者をLDLR変異により分離したりポ蛋白値は、TCおよびLDLcにて有意な差を認めた。

(4) ヒト SCAP 遺伝子の構造

SCAP 遺伝子の長さは約30kbで、23のエクソンと22のイントロンからなる遺伝子であった。プロモーター領域にはCCAT、TATAボックスはなくG/C塩基に富む配列であった。ADD1/SREBP-1結合領域が同定され、SREBP-1により、SCAP遺伝子の転写が調節を受けていることが示唆された。タンパク質ドメインとエクソン構成の関係の検討から、エクソン7、11はステロール感受性ドメインをコードし、WD(Trp-Asp)リピートを含むCOOH末端ドメインはエクソン15、23によりコードされていた。PACゲノムクローンをプローブとしてFISHを行い、蛍光シグナルが染色体3p21.3領域に確認された。イントロン2にCA反復配列が存在しDNA多型マーカーとして有用であることが確認された。また、796番目のコドンがイソロイシン/バリンとなる遺伝子多型を同定した。これらのマーカーは、脂質代謝異常症における遺伝解析において有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakajima, T., Hamakubo, T., Kodama, T., Inazawa, J. & Emi, M. : Genomic structure and chromosomal mapping of the human sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage-activating protein (SCAP) gene. *J. Hum. Genet.* 44, 402-407, 1999.

2) Hopkins, P., Wu, L., Stephenson, S., Xin, Y., Katsumata, H., Nobe, Y., Nakajima, T., Hirayama, T., Emi, M. & Williams, R. : A Novel LDLR Mutation, H190Y, in a Utah Kindred with Familial Hypercholesterolemia. *J. Hum. Genet.* 44,

364-367, 1999.

3) Nobe, Y., Emi, M., Katsumata, H., Nakajima, T., Hirayama, T., Wu, L., Stephenson, S., Hopkins, P. & Williams, R. : Familial Hypercholesterolemia in Utah Kindred with Novel 2412-6 Ins G Mutations in exon 17 of the LDL Receptor Gene. *Jpn. Heart J.* 40, 435-441, 1999.

4) Katsumata, H., Emi, M., Nobe, Y., Nakajima, T., Hirayama, T., Wu, L., Stephenson, S., Hopkins, P. & Williams, R. : Familial Hypercholesterolemia in Utah Kindred with Novel R103W Mutations in Exon 4 of the LDL Receptor Gene. *Jpn. Heart J.* 40, 443-450, 1999.

5) Iwaki, K., Nakajima, T., Ota, N. & Emi, M. : A common Ile796Val polymorphism of the human SREBP cleavage-activating protein (SCAP) gene. *J. Hum. Genet.* 44, 421-422, 1999.

6) Wu, L., Hopkins, P., Xin, Y., Stephenson, S., Williams, R., Nobe, Y., Motonaga, M., Nakajima, T. & Emi, M. : Co-segregation of Elevated LDL with a Novel Mutation (D92K) of the LDL Receptor in a Kindred with Multiple Lipoprotein Abnormalities. *J. Hum. Genet.* 45, (in press), 2000

7) Nakajima, T., Ota, N., Kodama, T. & Emi, M. : Isolation and radiation hybrid mapping of a highly polymorphic CA repeat sequence at the SREBP cleavage-activating protein (SCAP) locus. *J. Hum. Genet.* 44, 350-351, 1999.

8) Nakajima, T., Iwaki, K., Hamakubo, T., Kodama, T., Inazawa, J. & Emi, M. : Genomic structure and chromosomal mapping of the human Site-1 protease (S1P) gene. *J. Hum. Genet.* 45, (in press), 2000

9) Ota, N., Nakajima, T., Takeuchi, T., Shirai, Y. & Emi, M. : A highly polymorphic CA repeat marker at the interleukin-11 locus. *Genes, Immunity.* 1: 159-160. 1999.

10) Mine, N., Bando, K., Utada, Y., Nagai, H., Araki, T. & Emi, M. : Two single nucleotide polymorphisms of the hSNF5/IN11 gene. *J. Hum. Genet.* 44: 354-355. 1999.

2. 学会発表

1) 江見 充、野辺由紀子、中島敏晶、平山恒憲、Wu, L., Hopkins, P., Williams, R. : 混合型高脂血

症の発症関わる遺伝因子の解析. 第9回メディカルジェネティクス研究会 1999.6.19-20. 東京

2) 中島敏晶、太田信孝、江見 充：“ステロールセンサー” SREBP cleavage-activating protein, SCAP, の遺伝子構造の解析と遺伝子多型マーカーの同定. 第9回メディカルジェネティクス研究会 1999.6.19-20. 東京

3) 中島敏晶、岩木喜久美、太田信孝、稲澤譲治、江見 充：“ステロールセンサー” SREBP cleavage-activating protein の遺伝子構造の解析. 第67回日本医科大学医学会. 1999.9. 東京

4) 岩木喜久美、太田信孝、中島敏晶、柴忠義、江見 充：SCAP, NFKB1, IL-11 遺伝子座の DNA 多型性マーカーの単離. 第67回日本医科大学医学会. 1999.9. 東京

5) 元永満子、永井尚生、峯 伸也、横田 隆、宮崎久美、七井 彩、中島敏晶、原田晴仁、江見 充：Sequencher プログラムによるゲノム塩基配列のコンテイング形成. 第67回日本医科大学医学会. 1999.9. 東京

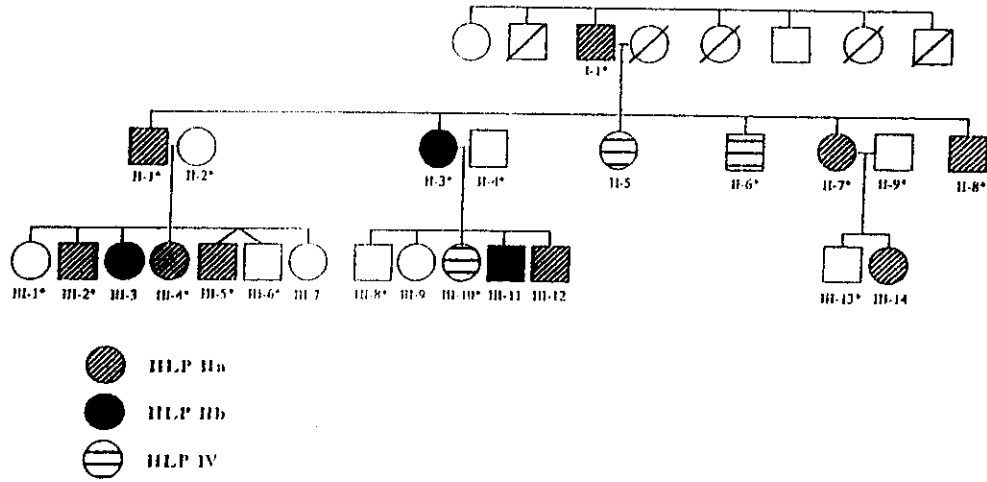
6) 宮崎久美、永井尚生、七井 彩、元永満子、峯 伸也、横田 隆、原田晴仁、江見 充：ABI PRISM377-96 を用いた大量塩基配列解析. 第67回日本医科大学医学会. 1999.9. 東京

7) 七井 彩、永井尚生、宮崎久美、元永満子、峯 伸也、横田 隆、中島敏晶、原田晴仁、江見 充：BLAST および Grail2 によるゲノム配列からの遺伝子予測. 第67回日本医科大学医学会. 1999.9. 東京

8) 江見 充、野辺 由紀子、中島敏晶、平山恒憲、Wu, L., Hopkins, P., Williams, R. 心血管研：混合型高脂血症に関わる遺伝因子の解析. 日本人類遺伝学会第44回大会. 1999.11. 仙台

9) 中島敏晶、岩木喜久美、太田信孝、稲澤譲治、江見 充：“ステロールセンサー” SREBP cleavage-activating protein(SCAP) 遺伝子の構造解析と多型マーカーの同定. 日本人類遺伝学会第44回大会. 1999.11. 仙台

図 1. 混合型高脂血症 K450 の家系図およびリポ蛋白値



ID	I-1	II-1	II-2	II-3	II-4	II-5	II-6	II-7	II-8	II-9	III-1	III-2	III-3	III-4	III-5	III-6	III-7	III-8	III-9	III-10	III-11	III-12	III-13	III-14
age	64	43	44	43	46	39	35	29	24	50	21	19	16	13	9	9	7	22	18	7	12	10	5	4
T.Chol	302	443	222	294	223	226	200	259	292	131	200	268	298	324	326	252	228	222	184	213	248	223	166	204
TG	106	278	94	370	164	240	316	160	193	59	103	149	240	95	98	103	-	107	119	172	183	109	66	55
HDLc	47	40	50	45	48	34	36	37	40	45	57	48	50	54	58	64	-	44	44	45	41	42	56	48
LDLc	237	286	159	168	153	143	101	195	204	74	127	185	185	257	232	157	-	139	121	129	164	170	101	148

図 2. K450 家系における LDLR 変異保因者群および非保因者群間のリポ蛋白値の比較

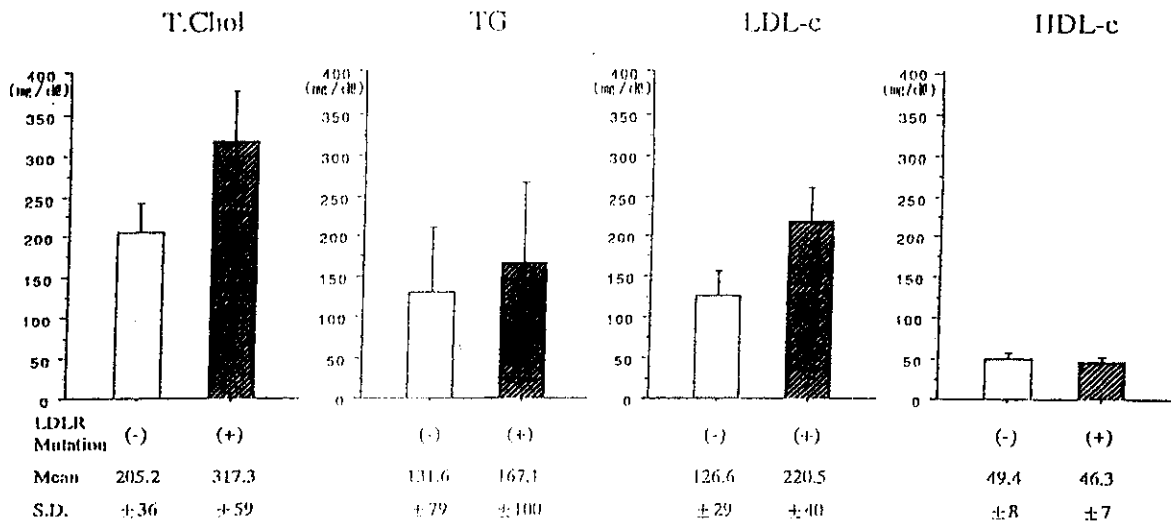


図 3. FH K653 の家系図

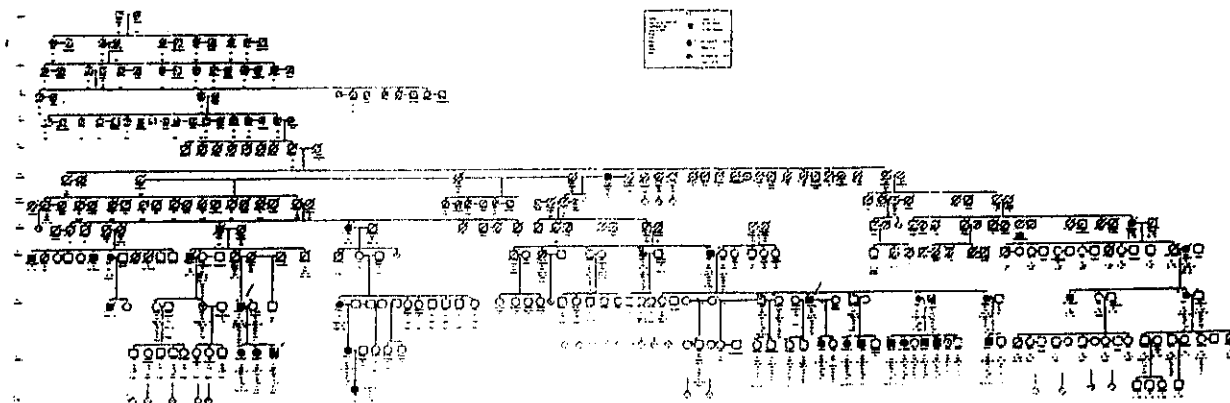
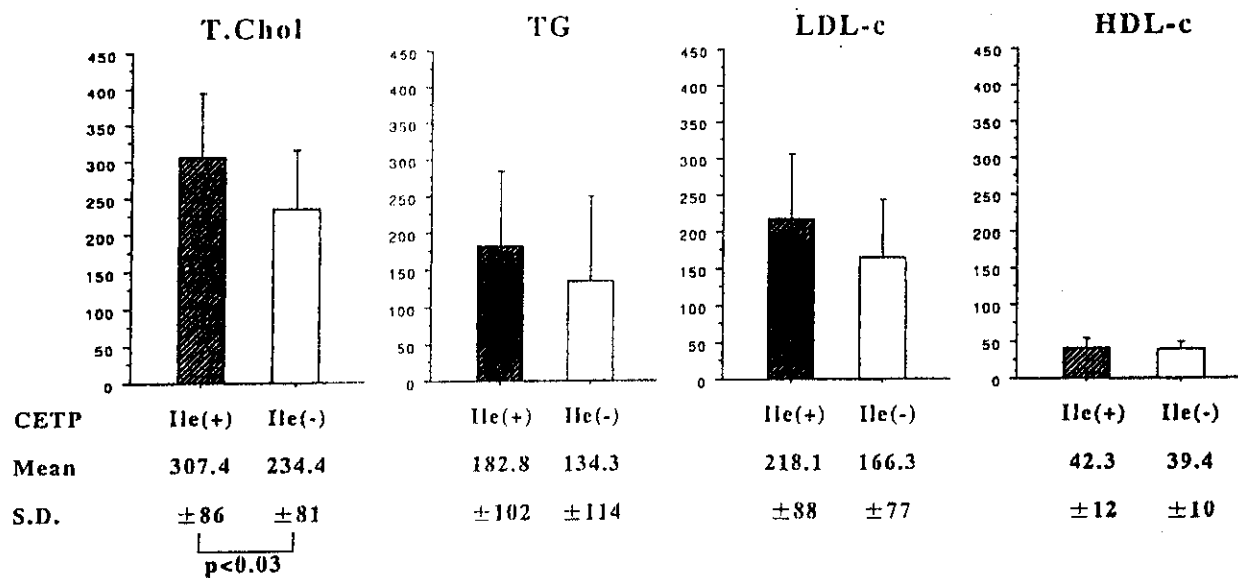


図 4. CETP Val422Ile 遺伝子型で区分した K653 家系内 LDLR 変異保因者 (76 名) のリポ蛋白値



家族性複合型高脂血症の疫学調査
分担研究者 齋藤 康（千葉大学医学部 教授）

研究要旨 家族性複合型高脂血症 FCHL の脂質代謝異常について、特にリポ蛋白リパーゼ LPL との関連から検討を行った。対象は、FCHL32 症例である。FCHL のヘパリン静注後血漿中 LPL 蛋白量は 177 ng/ml であり、nonFCHL 群に比べて有意に低値だった (227 ng/ml、 $P<0.005$)。また LPL 活性は 7.75 mmol/ml/h であり、nonFCHL 群に比較し同様に低値を示した (8.88 mmol/ml/h、 $P<0.05$)。FCHL 症例における LPL 蛋白量および活性の相関を検討したところ、有意な正の相関 ($r=0.744$ 、 $P<0.0001$) がみられた。そこで、LPL 蛋白量および活性正常群 (蛋白量 200ng/ml 以上かつ活性 7.5 mmol/ml/h 以上) と低下群にわけたところ、低下群は正常群に比べ、TG が有意に高値 (263 ± 74 vs 171 ± 59 mg/dl、 $p<0.005$)、HDL-C が有意に低値 (39 ± 7 vs 53 ± 14 mg/dl、 $p<0.005$) だった。以上より、我が国における FCHL 症例において、LPL 蛋白量および活性が低下し、そのレベルが、FCHL の特徴的脂質代謝異常である高 TG 血症や低 HDL 血症と密接に関連することが明らかになった。

A. 研究目的

家族性複合型高脂血症 FCHL は、同一家系内に様々な表現型の高脂血症患者を集積し、冠動脈硬化の発症頻度が高い遺伝性疾患である。欧米の一般人口における頻度は家族性高コレステロール血症より高く、わが国の心筋梗塞発症患者 (65 歳以下) においても約 30% を FCHL が占めることが報告されている。その病因遺伝子は不明だが、本病態として血清低比重リポ蛋白 (LDL)、超低比重リポ蛋白 (VLDL) の増加、アポ(蛋白)B の増加が主にみられ、これらはアポ B 合成増加または異化低下、さらに、トリグリセリドを分解するリポ蛋白リパーゼ (LPL) 活性低下が関与する可能性が示唆されている。また、インスリン抵抗性にに基づく症候群と病態が一部類似することから、シンドローム X や肥満との関連も推測されている。われわれはこれまでに千葉県安房地区での家系調査を行い、厚生省特定疾患原発性高脂血症調査研究班による基準により FCHL 患者を実際に同定し、その有病率は少なくとも 0.54% であることを報告した。そこで本年度は、本疾患のより簡便な診断方法の確立を目的に、FCHL 患者の脂質代謝異常について、特にリポ蛋白リパーゼとの関連から検討を行った。

B. 研究方法

対象は、FCHL32 症例である。FCHL 群と年齢、男女比、BMI、血清総コレステロール(TC)、LDL-コレステロール (LDL-C) および トリグリセライド (TG) を一致させた IIb 型高脂血症患者を対照 (nonFCHL 群、 $n=42$) とした。ヘパリン静注後血漿中 LPL 活性は、Triton X-100 で乳化した Triolein を基質として測定した。LPL 蛋白量は、抗 LPL モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ

EIA 法にて測定した。群間の有意差検定は Unpaired t-test、Chi-square for independence より $P<0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

FCHL の平均血清脂質レベルは、TC 230 mg/dl、LDL-C 138 mg/dl、HDL-コレステロール (HDL-C) 46 mg/dl、TG 255 mg/dl であり、nonFCHL 群に比べ、HDL-C は有意 ($P<0.05$) に低値だった。FCHL 群におけるヘパリン静注後血漿中 LPL 蛋白量は 177 ng/ml であり、nonFCHL 群に比べて有意に低値だった (227 ng/ml、 $P<0.005$)。また LPL 活性は 7.75 mmol/ml/h であり、nonFCHL 群に比較し同様に低値を示した (8.88 mmol/ml/h、 $P<0.05$)。そこで、FCHL 群における LPL と血清脂質値との関連を検討した結果、LPL 蛋白量は、HDL-C と有意な正の相関を ($r=0.754$ 、 $P<0.0001$)、TG と有意な負の相関を ($r=-0.586$ 、 $P<0.005$) を示した。一方、TC、LDL-C とは明らかな相関関係を示さなかった。そこで次に FCHL32 症例における LPL 蛋白量および活性の相関を検討したところ、有意な正の相関 ($r=0.744$ 、 $P<0.0001$) がみられた。そこで、LPL 蛋白量および活性正常群 (蛋白量 200ng/ml 以上かつ活性 7.5 mmol/ml/h 以上) と低下群にわけ、比較検討を行ったところ、低下群は正常群に比べ、TG が有意に高値 (263 ± 74 vs 171 ± 59 mg/dl、 $p<0.005$)、HDL-C が有意に低値 (39 ± 7 vs 53 ± 14 mg/dl、 $p<0.005$) だった。TC、LDL-C は両群において有意差をみとめなかった。

D. 考察

これまでに FCHL の成因としてアポ B の合成亢進、LPL 活性の低下、アポ蛋白遺伝子群変異などの関連が注目されている。特に、複数の研究が

ループより、LPL 蛋白量、活性低下との関連、LPL 遺伝子異常 (Promotor mutation T to C substitution at nt-39, Missense mutation N291S 等) の報告があり、本疾患における LPL の機能異常の存在が推測されている。今回の検討から、我が国における FCHL 症例において、LPL 蛋白量および活性が低下し、さらにそのレベルが、FCHL の特徴的脂質代謝異常である高 TG 血症や低 HDL 血症と密接に関連することが明らかになった。今後、FCHL に特徴的である様々な表現型を示す脂質代謝異常の病態形成における LPL の役割を明らかにする必要があると考えられる。

E. 結論

我が国における FCHL の病因に LPL 異常が関与し、そのレベルが特徴的脂質代謝異常である高 TG 血症や低 HDL 血症と密接に関連することが明らかになった。

F. 研究発表

1. Taira K, Saito Y. et al. Delayed post-prandial lipid metabolism in subjects with intra abdominal visceral fat accumulation. *Eur J Clin Invest.* 29, 301-308, 1999
2. Kobayashi J, Saito Y. et al. Effect of troglitazone on plasma lipid metabolism and lipoprotein lipase. *Br J Clin Pharmacol.* 47, 433-439, 1999.
3. Tashiro J, Saito Y. et al. Modification of lipoprotein lipase catalytic activity by sialic acids. *Scand J Clin Invest.* 59. 71-76. 1999.
4. Komukai M., Saito Y, et al. Carvastatin suppresses intimal thickening of rabbit carotid artery after balloon catheter injury. *Scand J Clin Invest.* 59. 159-166. 1999.
5. Kobayashi, J., Saito, Y., et al. A novel frameshift mutation in exon 6 (the site of Asn 291) of the lipoprotein lipase gene in type I hyperlipidemia. *Clin Chim Acta.* 285:173-182, 1999.
6. Kanaki, T., Saito, Y., et al. Expression of LR11, a mosaic LDL receptor family member, is markedly increased in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2687-95, 1999.
7. Haruno, A., Saito, Y., et al. Extracellular matrix accumulation on the thickened neointima in a rat double-balloon injury model *Scand J Clin Invest.* 59:395-403, 1999.
8. Morisaki, N., Saito, Y., et al. Angiogenic

Interaction between retinal endothelial cells and pericytes from diabetic rabbits, and phenotypic changes of diabetic cells. *Cell. Mol. Biol.* 45:67-77, 1999.

9. Suzuki, H., Saito, Y., et al. Hyperlipidemic effect of NK-104, a potent HMG-CoA reductase inhibitor, in guinea pigs. *Atherosclerosis.* 146:259-270, 1999

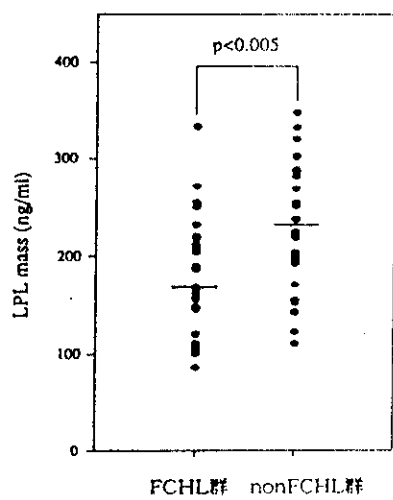
10. Kuramoto, N., Saito, Y., et al. Effect of ACE gene on diabetic nephropathy in NIDDM patients with insulin resistance. *Am. J. Kid. Dis.* 33:276-281, 1999.

11. Matsumoto, T., Saito, Y., et al. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 274:13954-60, 1999.

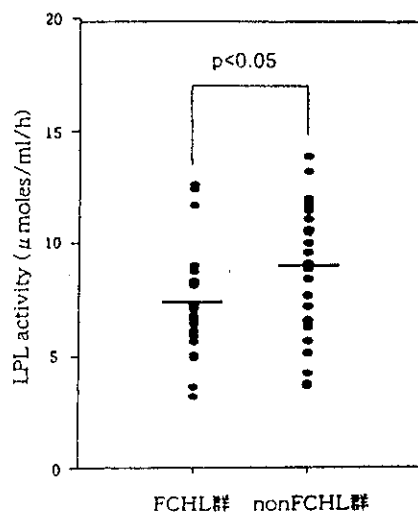
12. Takemoto, M., Saito, Y., et al. Enhanced expression of osteopontin by high glucose in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258:722-726, 1999.

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

LPL 蛋白量の比較



LPL活性の比較



分担研究者 馬淵 宏（金沢大学医学部内科学第二講座）

研究協力者 野原 淳，野末 剛（同上）

稲津明広（金沢大学医学部保健学科）

研究要旨

家族性複合型高脂血症（FCHL）の疫学調査から集団検診における診断基準として TC 228mg/dl 以上，TG 139mg/dl 以上，HDL-C 45.5mg/dl 以下が妥当とし，住民健診受診者において診断基準を満たす症例の頻度および臨床像について検討した。輪島市住民検診連続 3725 例中 171 例が基準を満たした。これらの症例では肥満の有無により，年齢および血清脂質値に有意差は認められてなかったが，肥満者では心疾患既往歴および家族歴が高頻度であった。今回，原因遺伝子として peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) について FCHL40 家系を対象として検討した。FCHL 患者において PPAR α 遺伝子 G395E 変異体が同定され，同変異保持者は家族内調査でコレステロール高値を示した。同遺伝子が FCHL 患者の血清脂質値に関与している可能性がある。

A. 研究目的

家族性複合型高脂血症 (Familial combined hyperlipidemia: FCHL) は，最も頻度の高い遺伝性高脂血症で，高頻度に早発性冠動脈硬化症を合併する¹⁾。本研究班においてこれまでにわれわれは，FCHL の疫学調査からその診断基準として TC 228mg/dl 以上，TG 139mg/dl 以上，HDL-C 45.5mg/dl 以下が妥当であろうと報告した。そこで今回は，一般住民を対象に，この診断基準を満たす症例の頻度および臨床像について検討した。

また本症の病因を遺伝子レベルから検討するために，家系調査により臨床的に確定診断された症例を対象とし，前回我々は本症の原因となる遺伝子変異について LPL 遺伝子，LDL レセプター遺伝子，アポB 遺伝子は，原因遺伝子として関与している可能性は低いと考えられることを報告した。

近年，核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) はフィブラート系薬剤により活性化され高脂血症を是正するだけでなく，生理的にも脂質代謝において重要な働きをしていると考えられるようになっている。また PPAR γ も脂肪細胞分化だけではなく脂質代謝にも影響を及ぼしているとされる。今回我々は PPAR α および γ 遺伝子が家族性複合型高脂血症に関与する可能性について検討した。

B. 研究対象と方法

石川県輪島市における一般住民健診受診者連続 3725 名（男性 1225 名，女性 2500，平均年齢 68 \pm 12 歳）を対象に，TC，TG，HDL-C を測定した。一般住民健診受診者において，われわれが昨年提唱した FCHL の診断基準（TC 228mg/dl 以上かつ

TG 139mg/dl 以上かつ HDL-C 45.5mg/dl 以下）を満たす頻度，さらにこれを満たした症例の臨床像について検討した。

また，下記に示した基準により FCHL と診断され，遺伝子解析に同意を得ることのできた 40 家系の発端者を対象に，PPAR α および γ 2 遺伝子全翻訳

領域について PCR-濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 法を用い塩基置換の有無を検出，直接塩基配列決定を行った。明らかとなった塩基置換の家系内調査は PCR-RFLP 法を用いた。また同様の検討を家族歴の明らかでないその他の原発性高脂血症患者 60 例についても行った。

FCHL 診断基準：① TC が 220mg/dl 以上または/かつ TG が 150mg/dl 以上で臍黄色腫のない原発性高脂血症で，② 近親者（両親，兄弟，子供）を含む家族内に本人も含めて 2 人以上の原発性高脂血症患者が存在し，少なくとも 1 人は IIb 型高脂血症である。

（倫理面への配慮）患者のプライバシー保護の上で学術発表する場合もある旨も説明し，高脂血症に関与しうる遺伝子の解析に同意を得ることのできた症例を対象とした。

C. 研究結果

一般住民健診受診者 3725 名の血清脂質の平均は，TC 199 \pm 36mg/dl，TG 143 \pm 90mg/dl，HDL-C 53 \pm 14mg/dl であった。TC 228mg/dl 以上かつ TG 139mg/dl 以上かつ HDL-C 45.5mg/dl 以下を満たす頻度は，171 名と一般住民健診受診者全体の 4.6% を占めた（表 1）。これら 171 名の血清脂質の平均は，TC 249 \pm 18mg/dl，TG 290 \pm 151mg/dl，HDL-C 39 \pm 5mg/dl と FCHL のそれと類似していた（表 2）。

さらに診断基準を満たした 171 名を肥満者と非肥満者に分けて検討した。年齢，血清脂質値には有意差は認めなかった。血糖値は肥満者でやや高いが有意差は認めなかった。 γ GTP は非肥満者で高い傾向があり，アルコール摂取などを示唆するも有意差は認めなかった。心疾患既往歴および家族歴は肥満者で有意に高頻度であった（表 3）。受診者全体では肥満者で年齢，TC，TG，LDLC，血糖が有意に高値で，HDL-C は有意に低値であった（表 4）。

同様の FCHL 診断基準により石川県珠洲市の一般住民検診で検討したものと比較では，基準を満たす症例は輪島市珠洲市それぞれ 4.6%，3.6% と同程度であり，また血清脂質値も良く類似していることから，安定した結果を得ることのできる基準であるといえた（表 5）。

病因遺伝子に関する検討では、PPAR α 遺伝子で395番目のGlycineがGlutamic acidとなる変異(G395E)がFCHL40家系中に2家系、その他の原発性高脂血症60症例中で1症例確認された。140番目のAspartic acidがAsparagineとなる変異(D140N)がFCHL40家系中の1家系で確認された。家系内調査においてG395E変異は、高脂血症をきたす表現型と高い相関を示し、高いコレステロール値を示した(表6)。

PPAR γ 2 遺伝子ではサイレント変異を検出したが、ミスセンス変異は今回の検討症例には認められなかった。

D. 考察

一般住民健診受診者の4.6%に、われわれが提唱したFCHLの診断基準を満たす症例を認めた。血清脂質に影響を与える因子として肥満があるが、受診者全体の肥満者が1281/3725(34%)であるのに対し、これらの症例では肥満者が89/171(52%)と約半数を占めた。ただしFCHL診断基準を満たす症例中では肥満者と非肥満者の間で血清脂質値に差はないが、心疾患既往歴および家族歴が高頻度であった。必ずしも肥満者の高脂血症はFCHLを検討する診断基準において攪乱因子ではないと考えられる。むしろ集団検診における非肥満者の高脂血症はアルコール摂取や一過性の高脂血症、もしくは食後高脂血症を多く含んでいる可能性があると考えられる。

FCHLにおける遺伝子変異の検討では、PPAR α 遺伝子のG395E変異で高コレステロール血症と相関が見られている。PPAR α 遺伝子は脂質代謝において重要な役割を担っていると推定されているが、これまでPPAR α 変異における臨床像は検討されたことがなかった。PPAR α 遺伝子の生理的役割を考える上で重要な知見と考えられる。

E. 結論

1) 一般住民健診受診者の4.6%(171/3725)に、われわれが提唱したFCHLの診断基準を満たす症例を認めた。

2) これらの症例の血清脂質の平均は、TC 249 \pm 18mg/dl, TG 290 \pm 151mg/dl, HDL-C 39 \pm 5mg/dl, LDL-C 161 \pm 22mg/dlとFCHLのそれに類似していた。

3) これらの症例では肥満の有無による年齢および血清脂質値の有意差は認めないが、肥満者では心疾患既往歴および家族歴が高頻度であった。

4) PPAR α 遺伝子変異体が原発性高脂血症患者において同定された。PPAR α 遺伝子はFCHLの血清脂質値変動に影響を与える遺伝子の一つである可能性がある。

【謝辞】

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

F. 研究発表

1. 論文発表

Kajinami K, Mabuchi H: Therapeutic effects of LDL apheresis in the prevention of

atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*. 10:401-406,1999

Kajinami K, Kasashima S, Oda Y, Mabuchi H, et al: Coronary ectasia in familial hypercholesterolemia histopathologic study regarding matrix metalloproteinases. *Mod Pathol*. 12:1174-1180,1999

Inazu A, Koizumi J, Kajinami K, Mabuchi H, et al: Opposite effects on serum cholesteryl ester transfer protein levels between long-term treatment with pravastatin and probucol in patients with primary hypercholesterolemia and xanthoma. *Atherosclerosis*. 145:405-4

Kawashiri M, Kajinami K, Nohara A, Mabuchi H, et al: Plasma homocysteine level and development of coronary artery disease. *Coronary Artery Disease*. 10:443-447,1999

Yang XP, Inazu A, Yagi K, Mabuchi H, et al: Abetalipoproteinemia caused by maternal isodisomy of chromosome 4q containing an intron 9 splice acceptor mutation in the microsomal triglyceride transfer protein gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19:1950-1955,1999

For the research group on serum lipid survey 1990 in Japan, Mabuchi H, et al: Analysis of serum lipid levels in Japanese men and women according to body mass index. Increase in risk of atherosclerosis in postmenopausal women. *Atherosclerosis*. 143:55-73,1999

2. 学会発表

Nohara A, Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H, et al: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis Of The Low Density Lipoprotein Receptor Gene And The Apolipoprotein B-100 Gene In Japanese Patients With Familial Hypercholesterolemia 71st Congress of the European Atherosclerosis Society May 26-29,1999

Nozue T, Todo Y, Nohara A, Mabuchi H, et al: Lipoprotein Lipase Gene Analysis In Japanese Patients with Familial Combined Hyperlipidemia 71st Congress of the European Atherosclerosis Society May 26-29,1999

Noji Y, Nagasawa S, Inazu A, Mabuchi H, et al: Cholesterol-Lowering Therapy Can Reduce Circulating Levels Of Matrix Metalloproteinases-9 In Familial Hypercholesterolemia(FH) 72nd Scientific Sessions of American Heart Association Nov 7-10, 1999

野原 淳, 井沢 朗, 加藤文彦, 馬淵 宏, 他 :
 家族性高コレステロール血症 common mutation
 K790X 変異の臨床像 第 31 回日本動脈硬化学会
 総会 Jun24-25, 1999

野原 淳, 梶波康二, 稲津明広, 馬淵 宏, 他 :
 日本人家族性高コレステロール血症(FH)におけ
 る共通変異の同定とその臨床像 日本内科学会
 Mar 30, 1999

稲津明広, 黄 志平, 森山ゆり, 馬淵 宏, 他 :
 CETP 遺伝子変異/多型の虚血性心疾患、頸動脈硬
 化に対する影響 第 31 回日本動脈硬化学会総
 会 Jun24-25, 1999

稲津明広, 野原 淳, 馬淵 宏 : 一般人の血清 HDL
 コレステロール値に対する肝性リパーゼ遺伝子
 プロモーター多様性 第 37 回日本臨床分子医

学会学術総会 Mar 8-9, 2000

野路善博, 井沢 朗, 加藤文彦, 馬淵 宏, 他 :
 コレステロール低下療法による血中マトリック
 スメタロプロテアーゼ(MMP)と、その阻害因子
 (TIMP)の変化 第 31 回日本動脈硬化学会総会
 Jun24-25, 1999

藤堂康宏, 江本従道, 井沢 朗, 馬淵 宏, 他 :
 高コレステロール血症者管理における LDL コレス
 テロール直接測定法と Friedwald 式との比較 第
 31 回日本動脈硬化学会総会 Jun24-25, 1999

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

表 1 FCHL 診断基準を満たす輪島市一般住民健診受診者 171 名

	基準を満たす症例	受診者全体	
例数	171 (4.6%)	3725	
TC (mg/dl)	249±18	199±36	p < 0.0001
TG (mg/dl)	290±151	143±90	p < 0.0001
HDLC (mg/dl)	39±5	53±14	p < 0.0001
LDLC (mg/dl)	161±22	119±32	p < 0.0001
血糖 (mg/dl)	117±40	110±37	p = 0.004
γGTP (IU/l)	42±88	31±46	p < 0.0001
肥満度 (%)	23±16	14±16	p < 0.0001
心疾患既往歴 (%)	22 (13%)	370 (10%)	n. s.
心疾患家族歴 (%)	22 (13%)	452 (12%)	n. s.

表 2 FCHL 発端者と FCHL 診断基準を満たす症例の血清脂質値

	FCHL 発端者	基準を満たす症例	
例数	74	171	
TC (mg/dl)	255±74	249±18	n. s.
TG (mg/dl)	206±119	290±151	p < 0.001
HDLC (mg/dl)	44±20	39±5	n. s.
LDLC (mg/dl)	172±61	161±22	n. s.

表 3 FCHL 診断基準を満たす肥満者 (*肥満度 ≥ 20%)

	肥満者*	非肥満者	
例数	89	82	
年齢	69±8	69±11	n. s.
TC (mg/dl)	250±17	248±19	n. s.
TG (mg/dl)	288±153	291±150	n. s.
HDLC (mg/dl)	39±4	39±5	n. s.
LDLC (mg/dl)	162±21	160±23	n. s.
血糖 (mg/dl)	119±42	115±39	n. s.
γGTP (IU/l)	34±47	50±116	n. s.
心疾患既往歴 (%)	17 (19%)	5 (6%)	p = 0.012
心疾患家族歴 (%)	16 (18%)	6 (7%)	p = 0.042

表4 受診者全体における肥満者 (*肥満度 \geq 20%)

	肥満者*	非肥満者	
例数	1281	2444	
年齢	69 \pm 11	67 \pm 13	p<0.0001
TC (mg/dl)	207 \pm 35	195 \pm 36	p<0.0001
TG (mg/dl)	167 \pm 99	131 \pm 82	p<0.0001
HDLC (mg/dl)	50 \pm 13	55 \pm 15	p<0.0001
LDLC (mg/dl)	126 \pm 31	114 \pm 31	p<0.0001
血糖 (mg/dl)	113 \pm 38	109 \pm 36	p=0.002
γ GTP (IU/l)	30 \pm 30	31 \pm 52	n. s.
心疾患既往歴(%)	190 (15%)	295 (12%)	p=0.018
心疾患家族歴(%)	170 (18%)	282 (12%)	n. s.

表5 FCHL 診断基準を満たす症例の血清脂質値

	輪島市	珠洲市
基準を満たす症例	171/3725(4.6%)	101/2913(3.6%)
TC (mg/dl)	249 \pm 18	249 \pm 23
TG (mg/dl)	290 \pm 151	254 \pm 101
HDLC (mg/dl)	39 \pm 5	40 \pm 4
LDLC (mg/dl)	161 \pm 22	159 \pm 29

表6 家系内調査における PPAR α 遺伝子 G395E 変異と血清脂質値

	Wild type	G395E 変異ヘテロ
例数	6	6
TC (mg/dl)	171 \pm 36	264 \pm 20
TG (mg/dl)	106 \pm 33	134 \pm 43
HDLC (mg/dl)	50 \pm 12	49 \pm 11

厚生科学研究費補助金（原発性高脂血症調査研究事業）
分担研究報告書

小児に於ける家族性複合型高脂血症及び CETP 遺伝子変異と HDL の関連について
分担研究者 太田 孝男 （琉球大学医学部 教授）

研究要旨 家族性複合型高脂血症(FCHL)及び CETP 遺伝子変異について小児・若年成人を対象に検討した。FCHL に関しては IIb 型高脂血症児の家族解析を 24 家系について行い、全ての IIb 型高脂血症児が FCHL であることを明らかにした。CETP の遺伝子解析は D442G 変異について行い 13 名のヘテロ小児と 8 名のヘテロ若年成人、1 名のホモ小児を発見した。ホモ小児では高 HDL 血症が認められたが、ヘテロ小児、若年成人には高 HDL 血症は認められなかった。CETP 蛋白量はホモ、ヘテロ共に正常者に比べ有意な低値を示したが、CETP 蛋白量と HDL レベルには相関は認められなかった。以上の結果から、小児・若年成人とこれ迄報告されている中高年者のリポ蛋白代謝には違いが存在することが強く示唆された。

A. 研究目的

家族性複合型高脂血症（FCHL）は未だ原因が解明されていない。本研究で私達は成人に比べ環境因子の影響の少ないと思われる小児を対象に IIb 型高脂血症と FCHL の関連について検討し、病因の解明を試みた。更に、小児に於ける CETP と HDL の関係を明確にするため小児・若年成人を対象に CETP 欠損症(D442G, Int14A) の遺伝子解析を行い、小児に於ける CETP と HDL の関連について検討した。

B. 研究方法

私達は平成 2 年度より熊本市で家族性高コレステロール血症 (FH) の早期発見、将来の動脈硬化性心疾患の発症予防を目的とした高脂血症のスクリーニングを 1 歳 6 ヶ月児を対象として、耳朶より採血し、全血中のアポ B 濃度を ELISA で測定する事で行っている。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 FCHL との関連を検討した。IIb 型高脂血症の診断は LDL-C 120 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 欠損症は若年者を対象とし、琉球大学附属病院小

児科受診者で、CETP 遺伝子解析を保護者が承諾した児及び琉球大学医学部学生について行った。遺伝子解析は頻度の高い D442G, Int14A について PCR-RFLP を用いて行った。また CETP 蛋白定量は SRL に依頼して行った。（倫理面への配慮）本研究での研究対象者には小児の場合は保護者・本人、成人の場合は本人に研究の意義等について充分説明し、同意の得られた者のみについて採血を行ったので倫理的には問題ないと考えた。

C. 研究結果

1. 小児に於ける FCHL について：平成 11 年 3 月現在、IIb 型高脂血症を呈する 119 名の患児をフォローしておりその全員に協力を要請した。これまでに 27 名の保護者が家族解析に同意し両親及び兄弟姉妹の家族解析を行った（3 名は片親のみ）。その結果、両親の解析が終了した 24 名の患児全員の両親いずれかに IIa, IIb, IV 型の高脂血症が認められた。LDL-C > 130 mg/dl を異常とした場合でも 19 名の児は FCHL と診断された。両親、兄弟、姉妹を合わせた高脂血症は IIa 16 名、IIb 9 名、IV 7 名であった。

2. 小児 CETP 欠損症と HDL : Int14A の患児は未だ発見できていないが、D442G 21 名のヘテロ（小児 13