

厚生科学研究費補助金（厚生労働省特定疾患調査研究事業）
（分担）研究報告書

アポ E 欠損マウスにおけるアポ E Sendai の強発現と脂質代謝および腎病変の関係

分担研究者 及川眞一（日本医科大学第3内科 教授）

研究協力者 石垣 泰（東北大学分子代謝病態学）

山本徳男（東北大学遺伝子実験施設）

研究要旨：リポ蛋白糸球体症(LPG)は新しい糸球体疾患で、アポ E の変異体であるアポ E Sendai (145 アルギニン→プロリン) がその原因と考えられている。アポ E Sendai をアポ E 欠損マウスに強制発現し、腎における病変出現を組織学的に検討した。糸球体毛細血管内にはリポ蛋白血栓が充満し、ヒトにおける LPG と同様の変化が生じることを認めた。したがって、アポ E Sendai は LPG の原因となる変異体である。

A. 研究目的

ネフローゼを呈する症例の腎生検において、既成の概念では説明できない症例を報告した。その後、同様の症例が報告され、1988年日本腎臓病学会においてリポ蛋白糸球体症 Lipoprotein Glomerulopathy (LPG) の呼称を用いることが推奨された(1)。この病名はその腎糸球体における特徴的な組織学的変化に基づいてなされたものである。このような LPG は従来の糸球体疾患とは全く異なった疾患であると考えられている(2,3)。その後この疾患はアポ E の変異体が発症に関与することが明らかとなった。すなわちアポ E Sendai (145 アルギニン→プロリン) の存在が LPG 発症に強く関与することが考えられた。そこで、アポ E Sendai をアポ E 欠損マウスに強発現する事により、脂質代謝の変化と腎における病変出現に対する作用を検討した。

B. 研究方法

[1] 組み換え体アポ E の作製と精製

アポ E Sendai の変異を持つリポ蛋白糸球体症の患者静脈血を Proteinase K で処理した後、フェノール/クロロホルム処理し、DNA を回収した。

PCR 反応にて患者血液より抽出した genomic DNA のアポ E 遺伝子を増幅した。プライマーはアポ E-Sendai の変異部の 5'側の Forward primer (GGCACGGCTGTCCAAGGAGC) と 3'側の Reverse primer (GCACGCGGCCCTGTTCC ACC)を用いた。PCR にて増幅された DNA 断片を Ava I と Sse8387 I で切断してアポ E3 発現プラスミド pUSFA2 の Ava I と Sse8387 I 部唾にサブクローニングし、アポ E-Sendai 発現プラスミド pUSFAE-Sendai を構築した。このアポ E-Sendai 発現プラスミドを用いて、大腸菌 YK537 株 11)に

トランスフォーメーションした。この大腸菌を 37°C, 16 時間培養し、A600=1.0 まで増殖した時点で 100mM イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を培地の 1/50 裏加え、組み換えタンパクの発現を誘導した。27°C で 16 時間培養後-80°C に保存した。大腸菌 10 g をプロテアーゼ阻害剤存在下で氷冷した urea-phosphate buffer 20 ml に懸濁し、超音波破碎機を用いて氷中で破壊した。4°C, 4700×g, 20 分遠心後、上清を回収しアポ E の精製に用いた。

Heparin Sepharose CL-6B(Pharmacia)を洗浄後、エコノカラム(Bio Rad)に充填した。大腸菌のホモジネートをカラムに展開した。50 mM-0.7 M の NaCl のグラディエント溶液で溶出した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)と免疫ブロッティングにより溶出液中のアポ E を検出した。アポ E を含む画分を硫酸アンモニウムバッファーで透析した。

Octyl Sepharose 4 Fast Flow(Pharmacia)を洗浄後、硫酸アンモニウムバッファーで平衡化し、エコノカラム(Bio Rad)に充填した。ヘパリン・カラムクロマトグラフィーで得たアポ E 画分展開した後、0.8 M の Urea のグラディエント溶液で溶出した。SDS-PAGE)と免疫ブロッティングにより溶出液中のアポ E を検出した。実験での使用まで、-80°C に保存した。

[2] 組み換え体アポ E を用いたレセプター結合実験

1%コレステロール・5%コーンオイルを含むウサギ固形飼料(日本クレア)で2週間以上飼育した日本白色ウサギ(オス)より採血し、血漿を調整した。血漿に DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3',3',3'-tetra-methylindocarbocyanine perchlorate)を含む DMSO (Sigma)を加え、よく攪拌し、フィルター(孔径 0.8 μm)で濾過した後、遮光し 37°C で

10-12 時間インキュベートした。これを 16 時間、遠心分離し、上層の固形層(β -VLDL 画分)を DiI 標識 β -VLDL 液とした。Dimiristdyl phosphatidyl choline (DMPC)を 10 mg/ml の濃度で TEN buffer(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl pH 7.6)に溶解し、リポゾームを作成した。精製したアポ E2,E3,E4,E-Sendai を 0.1 mg/ml の濃度に調整し、アポ E と DMPC の比が 1:7.5 となるように DMPC 溶液を混合した。Saline-EDTA 液に溶解し、Lowry 法にてタンパク量を定めた。

東北大学遺伝子実験施設の Takahashi らによって、LDL レセプター欠損 CHO 細胞である IdIA-7 細胞にリポタンパクレセプター遺伝子を導入することによって、LDL レセプター、VLDL レセプターを恒常的に高発現する細胞株が樹立されている(4)。これらの細胞を 5% FCS を含む Ham-F12 培地にて培養し、結合実験に用いた。PBS と 25 mM HEPES(pH 7.4)-DMEM にて細胞を洗浄し、リガンドである 0-20 Bg/ml DMPC-アポ E 複合体と 2.5 Bg/ml DiI 標識 β -VLDL を上添加し、4°C で 2 時間インキュベートした。0.1 N NaCl, 0.1% SDS 1 ml を加え、15 分間振盪して細胞を溶解し、細胞内タンパク濃度を測定した。また分光蛍光光度計を用いて励起波長 520 nm、蛍光波長 580 nm にて蛍光測定を行い、細胞表面での DiI- β -VLDL の結合に対する DMPC-アポ E 複合体の競合阻害を検討した。[3] 組み換えアデノウイルスを用いたアポ E の発現

アポ E 発現組み換えアデノウイルスは Adenovirus Expression Vector Kit (TaKaRa)を用いて作製した(5)。ヒトアポ E2,E3,E4,および E-Sendai の cDNA をマルチプル・クローニング・サイトに挿入された pUC119(TaKaRa)より、アポ E DNA を HindIII と EcoRI で切り出し、T4 DNA polymerase を用いて末端を平滑化した。アデノウイルスゲノムと CAG プロモーターを有するコスミドベクター pAxCawt の Sma I 部を切断し、アポ E DNA 断片を挿入した。その後 GIGAPACK III Gold (Stratagene)を用いてパッケージングを行い、大腸菌 LE392 株にトランスフォーメーションした。大腸菌よりコスミド DNA を調整し、Cla I にてインサートの有無を確認した。コスミドを Sal I で制限酵素消化し、約 6.5 kbp のプラスミドを得た。このプラスミドを用いて BglII と Not I の切断パターンとシーケンスにてインサートの方向を確認した。大腸菌にコスミドを調整した後、CsCl 密度勾配超遠心法とフィルターチューブ(Millipore)にて精製した。

精製したコスミド DNA 8 Bg と制限酵素処理済

み DNA-TPC 5 Bg とを混合し、培養 293 細胞にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行った。その後、8 日目から 10 日目に 1 次ウイルス液を得、24 ウェルプレートに培養した 293 細胞に感染させた。得られた 2 次ウイルス液から DNA を抽出し、Xho I の切断パターンで組み換えの確認を行った。さらに 293 細胞に感染させ 3 次ウイルス液を得、次いで 293 細胞に感染させ 4 次ウイルス液を得た。4 次ウイルス液を密封型超音波破砕機で処理した後、アデノウイルスの濃縮、精製を行った。回収したウイルスを 293 細胞に感染させ、Karber の式より 50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀)を計算し、ウイルスの力価が充分であることを確認した。

CHO細胞、Hep G2細胞、C6細胞に1×10⁸ PFUのアデノウイルスを1時間感染させて3日間培養し、培地と細胞を回収し免疫ブロッティングにてアポ E の発現を検討した。

4ヶ月齢のアポ E ノックアウトマウスの尾静脈から2×10⁹ PFUのアポ E2, アポ E3, アポ E-Sendai を組み込んだアデノウイルスを注入した。ネガティブ・コントロールとしてLacZを組み込んだアデノウイルスを使用した。2, 4, 6, 10, 14, 20, 26, 32, 40, 50, 60 日目に採血、採尿し、総コレステロール、トリグリセリド、血糖、尿タンパクを測定した。また、ヒトアポ E ポリクローナルウサギ IgG 抗体(SANBIO)を用いて免疫ブロッティングとELISAを行い、アポ E の発現を検討した。

200 B1 に希釈したマウス血清をサンプルとし、TSK gel Lipopack XL(Tosoh)カラムを接続したHPLC システム(CCP&8010,Tosoh)にて、リポ蛋白の組成を検討した。

マウスに対してアデノウイルス感染を誘導した後2ヶ月日に頸椎脱臼にて屠殺し、胸部大動脈、腎臓、肝臓、副腎、精巣、脳、肺の各臓器を摘出した。それぞれの臓器について組織学的に検討するとともに、OilRed-O 染色による脂肪染色性も検討した。

C. 研究結末

大腸菌で発現させたアポ E2, E3, E4, およびアポ E Sendai を HeparinSephrose と Octyl Sepharose を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。

LDL レセプター発現細胞と DiI- β -VLDL の結合に対する精製したアポ E2, E3, E4 と DMPC の複合体の競合阻害実験を行った。その結果アポ E3 と E4 は濃度依存的に DiI- β -VLDL の LDL レセプターへの結合を阻害し、これに対しアポ E2 ではほとんど阻害がかからず、これらの組み換え型アポ E が天然型アポ E とほぼ同じ性質を持つことが示さ

れた。アポ E-Sendai は LDL レセプターに対しては E2 と E3 のほぼ中間程度の(Fig.1A)、VLDL レセプターに対しては E2 とほぼ同程度の結合障害を示した(Fig.1B)。結合障害定数：KI 値を計算すると LDL レセプターに対して E3 が 0.036(B g/ml)E-Sendai が 0.128(B g/ml)であり、VLDL レセプターに対して E3 が 0.082(B g/ml)、E-Sendai が 0.136(B g/ml)であった(Table.1)。いずれのレセプターにおいてもアポ E-Sendai は野生型のアポ E3 に比べて親和性が低いことが示された。

それぞれのアポ E 遺伝子が組み込まれたアデノウイルスをアポ E ノックアウトマウスに導入し、マウス genomicDNA を PCR 反応にて増幅したところ、wild type にてアポ E 遺伝子内のプライマーを用いた場合 245 bp のバンドが、またアポ E ノックアウトマウスにおいてアポ E 遺伝子内とネオマイシン耐性遺伝子内のプライマーを用いた場合 155 bp のバンドが検出され、アポ E 遺伝子のターゲッティングが確認された。アポ E ノックアウトマウスに 2×10^9 PFU アデノウイルスを投与したところ、2 日後からアポ E の発現を認めた。発現は 2-6 日目に最大を示し、若干の個体差はあるものの 40-60 日目までその発現は持続した。最大にアポ E の発現を示した投与 4 日目の血清にてアポ E のタンパク裏を ELISA で定裏したところ、アポ E-Sendai 発現マウスで 794 ± 188 、アポ E2 発現マウスで 723 ± 152 、アポ E3 発現マウスで 838 ± 135 (B g/ml, mean \pm S.E.) で各フェノタイプ間で発現裏に有意差はなかった。

組み換えアデノウイルス投与後 4 日目の総コレステロールの値は LacZ 発現マウスで 529 ± 29 mg/dl、アポ E2 発現マウスで 302 ± 57 mg/dl、アポ E3 発現マウスで 89 ± 11.2 mg/dl、アポ E-Sendai 発現マウスで 262 ± 27 mg/dl (mean \pm S.E.) であった。ウイルス投与後 4 日目の LacZ 発現マウスの総コレステロールの値は投与前とほぼ変化なく、アポ E2 では 57%、アポ E3 では 16%、アポ E-Sendai では 49% に低下していた。同じく投与後 4 日目のトリグリセリドの値は LacZ 発現マウスで 62 ± 10 mg/dl、アポ E2 発現マウスで 528 ± 151 mg/dl、アポ E3 発現マウスで 84 ± 8 mg/dl、アポ E-Sendai 発現マウスで 460 ± 130 mg/dl であった (mean \pm S.E.M)。アポ E2 とアポ E-Sendai でのみ 2-6 日目にかけて一過性にトリグリセリドの上昇が認められた。

HPLC 法を用いたリポ蛋白組成の分析では、アポ E ノックアウトマウスのコレステロールは VLDL, IDL, LDL 画分がほとんどを占めていた。アポ E を発現させることでこれらの画分が減少し、HDL 画分が増加していた。LacZ 発現群に比べアポ E 発現

群では VLDL 画分の減少が最も著しいと考えられた。以上の変化は、アポ E3 発現で最も顕著であったが、アポ E2 とアポ E-Sendai の発現マウスでは差異が認められなかった。

尿タンパク裏は 0.5-1.2 mg/ml 前後で、ウイルス投与前後、また各アポ E フェノタイプ間で明らかな差はなかった。一方、腎の凍結標本の解析ではアポ E-Sendai 発現マウスの腎組織の Oil Red-O 染色において他群に比し糸球体への脂肪の沈着を認めた (Fig.2)。糸球体に占める脂肪沈着陽性糸球体の割合を 4 群間で比較したところ、アポ E-Sendai 群では約 40% の糸球体が陽性であった。光学顕微鏡の観察では、糸球体の腫大、毛細管腔の拡大と管腔内に網状の薄染色物の沈着が認められ、Oil Red-O にてこの血栓様物質に脂肪が含まれていることが確認された (Fig.3)。アポ E 免疫染色ではこの血栓様物質の周囲にアポ E が認められた。電子顕微鏡で観察すると、拡大した毛細管腔内はやや電子密度の高い、細顆粒状の脂肪滴で充満しており、ヒトのリポタンパク糸球体症ときわめて類似した組織像を呈していた (Fig.4)。

胸部大動脈標本では LacZ 発現マウスで強い動脈硬化が観察された。アポ E3 発現マウスでは動脈硬化病変の蔓積は最も小さく、次いでアポ E2、アポ E-Sendai の順であった。この動脈硬化病変の蔓積を画像解析にて定裏したところ、LacZ 発現マウスの動脈硬化病変の蔓積を 100 とすると、アポ E-Sendai 発現マウスで 71.7 ± 18 ($p < 0.05$)、アポ E2 で 63.5 ± 19 ($p < 0.05$)、アポ E3 で 36.7 ± 16 ($p < 0.001$) (mean \pm S.E.) であり、いずれのフェノタイプにおいても有意に動脈硬化病変の蔓積の退縮が認められた。また、肺、肝臓、脳、副腎、精巣のいずれの組織においても、各群の間で特に差を認めず、血栓様物質の沈着も認めなかった。

D. 考察

アポ E のアミノ酸配列のなかで 140 番目から 150 番目の部唾は LDL 受容体を認識する重要な配列であることが知られている [6,7]。この中心の 145 番目の Arg \rightarrow Pro の変異が、近傍の 3 つ連続した α -helix loop の立体構造に大きな変形をもたらしているであろうと考えられる。したがって、LDL 受容体への結合能が低下しており、症例の III 型高脂血症類似のリポタンパクプロファイルの異常をもたらしているのではないかと想定される。

今回おこなった、組み換え体アポ E を用いたリポタンパク受容体への結合障害実験では、アポ E-Sendai は野生型のアポ E3 に比較して、LDL 受容体・VLDL 受容体の両方に対して、その結合障害能が数倍低下していることが示された。このことから、

LPG 患者の血清脂質異常はアポ E の LDL 受容体認識部腫における変異による、リポタンパク受容体への結合能の低下が原因であると考えられた。

また等電点電気泳動にてアポ E-Sendai はアポ E2 とほぼ同じ等電点を持つ[8]が、結合阻害実験の結晶から LDL 受容体に対してはアポ E2 より結合阻害能が高く、VLDL 受容体に対してはほぼ同等の結合阻害能を有しており、受容体に対する性質が異なることが示された。しかし、アデノウイルス感染によるアポ E の発現実験では、マウスのコレステロール、トリグリセリドの推移、また双方のリポタンパクプロファイルはアポ E-Sendai とアポ E2 はほとんど一致しており、生体内においてはほぼ同様の代謝動態をとることが示唆された。また、マウス胸部大動脈の動脈硬化病変の退縮作用を比較するとアポ E3 が最も作用が強く、次いでアポ E2 とアポ E-Sendai の退縮作用はほぼ同等であった。

アポ E-Sendai とアポ E2 を発現したマウスに一過性にトリグリセリドの上昇がみられたが、Tsukamoto らの報告 35)でも、今回と同様の実験系においてやはりアポ E2 にのみこのような結晶が得られている。急激な大裏のアポ E の出現が中性脂肪の代謝を抑制するためではないかと、考察されているが、何故アポ E-Sendai とアポ E2 にのみ、このような変化がみられるのかは不明である。

アポ E-Sendai 発現マウスの腎臓にヒトの LPG と非常に類似した糸球体病変を認めた。光学顕微鏡組織、脂肪染色、電顕所見のいずれもヒト LPG 症例の腎組織所見 36)37)38)と同じ特徴を有していた。このことはアポ E の変異が LPG の原因である直接的な証明といえる。

しかし、糸球体症をおこしているマウスの尿タンパク裏は他の群のマウスの尿タンパク裏と差はなく、ヒトにおいて本症がタンパク尿でもって発見されている状況とは異なっている。ひとつには雄マウスではヒトより大裏の尿タンパクを排出しており、このことにより糸球体病変に伴う尿タンパクの増加がマスクされてしまった可能性がある。また糸球体病変が軽度のため、タンパク尿の出現までいたっていないのかもしれない。

脂質代謝異常に関連した腎障害としてはⅢ型高脂血症性腎障害が知られている 39)。しかし、その組織像はメサングウム領域の多数の泡沫細胞の浸潤が特徴であり、LPG の糸球体の組織像とは明らかに異なる。今回の LPG 類似の標本にても、メサングウム領域に泡沫細胞の浸潤を認めるが、これはアポ E ノックアウトマウス全箱にみられる所見であり、高コレステロール血症のもたらす全身性の変化のひとつと考えられる。しかし、LPG 発症例の

高脂血症の程度も様々であり、またマウスの例を考えてもアポ E-Sendai を発現していることで血清コレステロール値は、発現前よりも確実に低下している。また、肺、肝臓、脳、副腎、精巣の毛細血管にも LPG 糸球体にみられるようなリポタンパク血栓は認められず、アポ E-Sendai が腎臓にのみ局所的に作用し、病変をおこしていると考えられる。糸球体は生体内で唯一、基底膜が露出した部腫である。立体構造が変化したアポ E-Sendai を含むリポタンパクが糸球体に流入し、おそらく変異アポ E と基底膜とのインターアクションが変化しているためにリポタンパクが徐々に捉えられ、リポタンパク血栓が形成されるのではないかと想定される。また、糸球体内腔は急激に液体成分の流入と濾過、濃縮がおこなわれる場所であり、このことが糸球体の特異的な病変の形成に寄与しているのかもしれない。

今回のマウスの検討においてもヒトの場合と同様に、アポ E-Sendai を持っても糸球体病変が出現しない例があり、遺伝的素因の他に何らかの全身的あるいは腎臓局所的要因が関わっていると思われる。しかし、アポ E-Sendai 群の多くに糸球体への脂肪の沈着を認め、糸球体病変はアポ E-Sendai の発現に伴ってのみみられていることから、変異アポ E・アポ E-Sendai が病因と密接に関係していると考えられる。

E. 結論

アポ E-Sendai はアポ E3 に比べて LDL 受容体、VLDL 受容体への親和性が数倍低いことが明らかになった。

アポ E ノックアウトマウスに対して、アポ E3 は強いコレステロール低下作用を示し、アポ E-Sendai の作用は中等度でアポ E2 と同程度であった。動脈硬化病変の退縮作用はアポ E3、アポ E2、アポ E-Sendai の順で認められた。

アポ E-Sendai を発現したマウスにのみ、ヒト LPG にきわめて類似した糸球体病変を認め、アポ E-Sendai が特異的な腎障害を引き起こすと考えられた。

F. 文献

1. Saito T, Sato H, Kudo K, Oikawa S, Sibata T, Hara Y, Yoshinaga K, and Sakaguchi H : Lipoprotein glomerulopathy: Glomerular lipoprotein thrombi in a patient with hyperlipidemia. *Am J Kidney Dis* 13 : 148-153, 1989
2. Koitabashi Y, Ikoma M, Miyahara T, Fujita R, Mio H, Ishida M, Shimizu K, Sakaguchi H : Long-term follow-up of a pediatric case of

lipoprotein glomerulopathy. *Pediatr Nephrol* 4: 122-128, 1990

3. Oikawa S, Suzuki N, Sakuma E, Saito T,

Namai K, Kotake H, Fujii Y, and Toyota T: Abnormal lipoprotein and apolipoprotein pattern in lipoprotein glomerulopathy. *Am J Kid Dis* 18: 553-558, 1991

4. Takahashi S, Kawarabayashi Y, Nakai T, Sakai J, and Yamamoto T: Rabbit very low density receptor; A low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9252-9256, 1992

5. Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, Harada S, Sato Y, Takamori K, Tokuda C and Saito I: Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1320-1324, 1996

4. Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity TL, Rall SC: Genetic defects in lipoprotein metabolism: Evaluation of atherogenic lipoproteins caused by impaired catabolism. *JAMA* 265: 78-83, 1991

5. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA: Three-dimensional structure of LDL receptor binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 252: 1817-1822, 1991

6. Sano R, Abe R, Oikawa S, Fujii Y, Hori S, Suzuki N, Toyota T and Goto Y: Apolipoprotein E phenotypes of normo and hyperlipidemia in Japanese. *Tohoku J Exp Med* 154: 297-303, 1988

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

1) Kinoshita M, Oikawa S, Hayasaka K, Sekikawa A, Nagashima T, Toyota T, Miyazawa T.: Age-related Increases in Plasma Phosphatidylcholine Hydroperoxide Concentrations in Control Subjects and Patients with Hyperlipidemia. *Clin Chem* 46:822-828, 2000

2) Ishigaki Y, Oikawa S, Suzuki T, Usui S, Magoori K, Kim DH, Suzuki H, Sasaki J, Sasano K, Okazaki M, Toyota T, Saito T, and Yamamoto T: Virus mediated transduction of apoE-Sendai develops lipoprotein glomerulopathy in apoE deficient mice.

J Biol Chem 275:31269-31273, 2000

総説

小竹英俊、及川眞一: 糖尿病と脂質代謝、医薬ジャーナル 36:1659-1663, 2000

小竹英俊、及川眞一: 糖尿病と動脈硬化、医学の歩み 193:398-403, 2000

及川眞一、佐藤和美、金井良幸、近藤秀士、大家千波: 高脂血症を呈した各種症例、臨床栄養 96:594-600, 2000

及川眞一: 糖尿病と動脈硬化、Diabetes Frontier 11: 289-294, 2000

小竹英俊、及川眞一: 糖尿病性脂質代謝異常の臨床: エビデンスとガイドラインの設定. Diabetes Frontier 11: 517-522, 2000

小竹英俊、及川眞一: 高脂血症の治療—腎疾患合併例の取り扱い. Modern Physician 20: 1247-1251, 2000

小竹英俊、及川眞一: 糖尿病における心血管疾患のガイドライン. Complication 5: 272-279, 2000

厚川正則、及川眞一、小竹英俊: 高中性脂肪の治療方針. 臨床成人病 12: 1615-1620, 2000

2. 学会発表

第10回内分泌代謝Update(香川)

糖尿病における血管合併症

第482回内科関東地方会(東京)

原発性高カイクロミクロン血症例のインスリン分泌能について

第32回日本動脈硬化学会総会

シンポジウム

動脈硬化危険因子としての高トリグリセリド血症: インスリン抵抗性と動脈硬化

一箱演題

1) 培養血管平滑筋細胞の増殖に対する Heat Shock Protein - 70 (HSP-70)の作用

2) 泡沫化マクロファージにおける過酸化リン脂質の蓄積と HDL の抗酸化防御機能

3) 動脈壁内皮細胞増殖に対する熱ショック蛋白の影響

第43回日本糖尿病学会総会

シンポジウム: 細小血管症と大血管症との関係-腎症と動脈硬化: 相互関連とその因子

一箱演題

1) 高脂血症家兎における酸化ストレスと膵組織変化

2) 2型糖尿病における血中ヒドロパーオキシサイド

第37回日本臨床生理学会総会・奈良

ワークショップ：糖・脂質のながれとその異常・脂肪細胞の役割
第14回日本臨床内科医会
セミナー：高脂血症と臓器障害—動脈から肝・腎へ

第35回日本循環器予防学会危険因子

ワークショップ：重複例の「管理の実際」効率的な見方を工夫する

第15回日本糖尿病合併症学会

シンポジウム：糖尿病の治療と危険因子：過酸化脂質の蔓から

LDLR : E3 $K_I = 0.036$ (μ g/ml)
E-Sendai $K_I = 0.128$ (μ g/ml)

VLDLR : E3 $K_I = 0.082$ (μ g/ml)
E-Sendai $K_I = 0.136$ (μ g/ml)

$K_I = EC_{50} / \{ 1 + ([L] / K_D) \}$
 EC_{50} = effective concentration for 50 % inhibition
[L] = concentration of Dil labeled ligand
 K_D = dissociation constant

Table.1 K_I values

Fig. 1 Apoprotein binding to LDL receptor (A) and VLDL receptor (B)

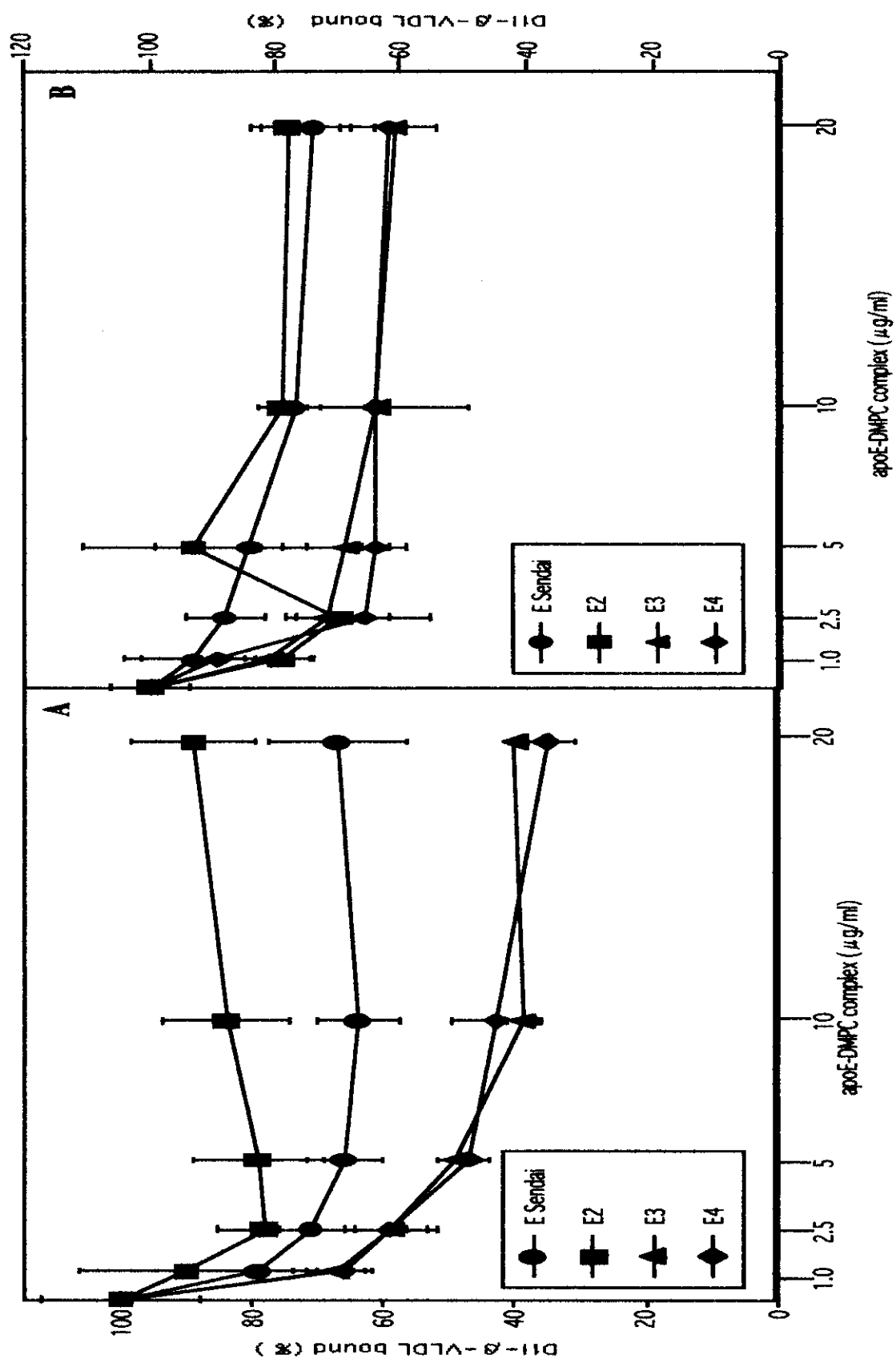


Fig. 2 Oil red-O staining

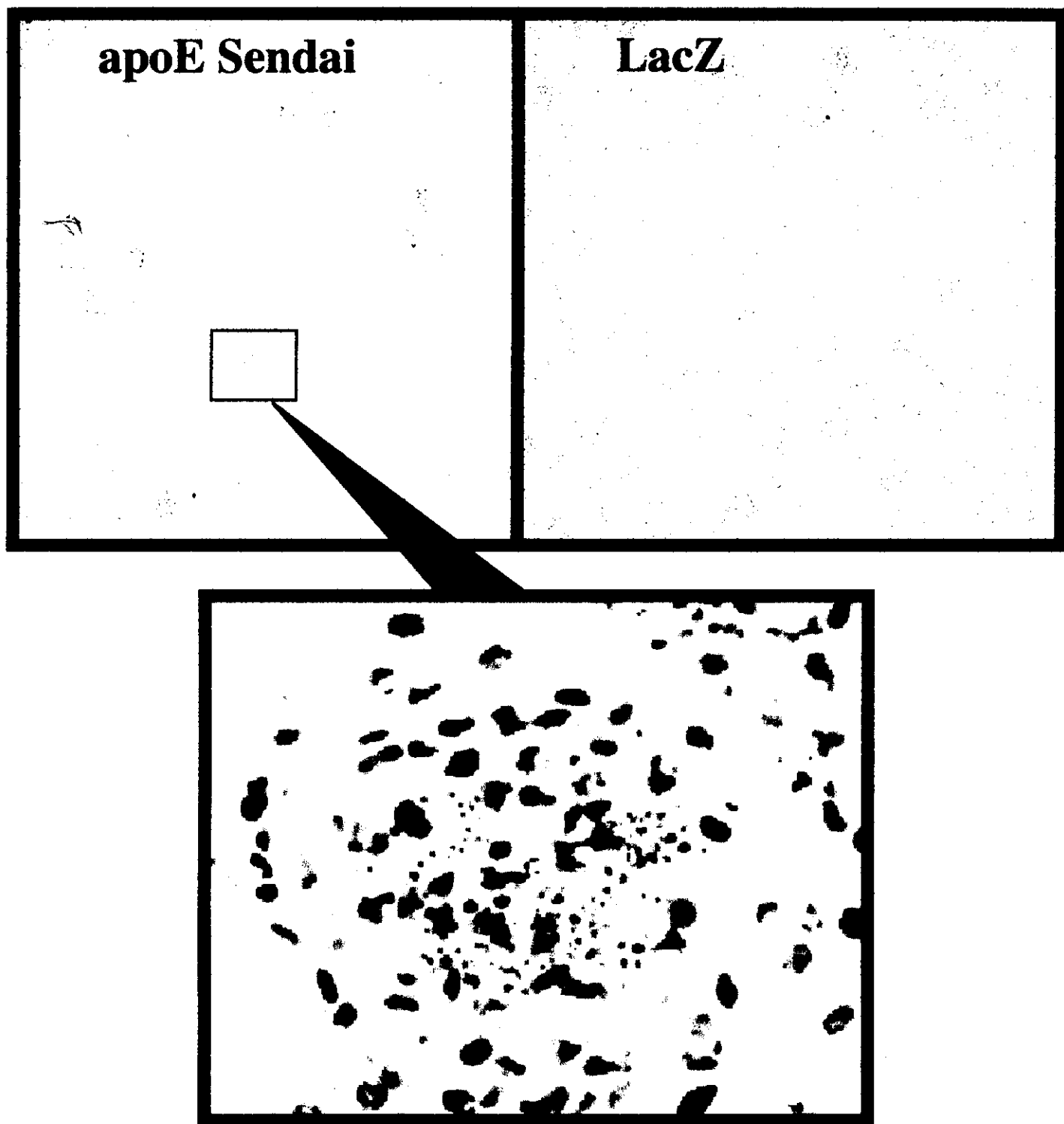
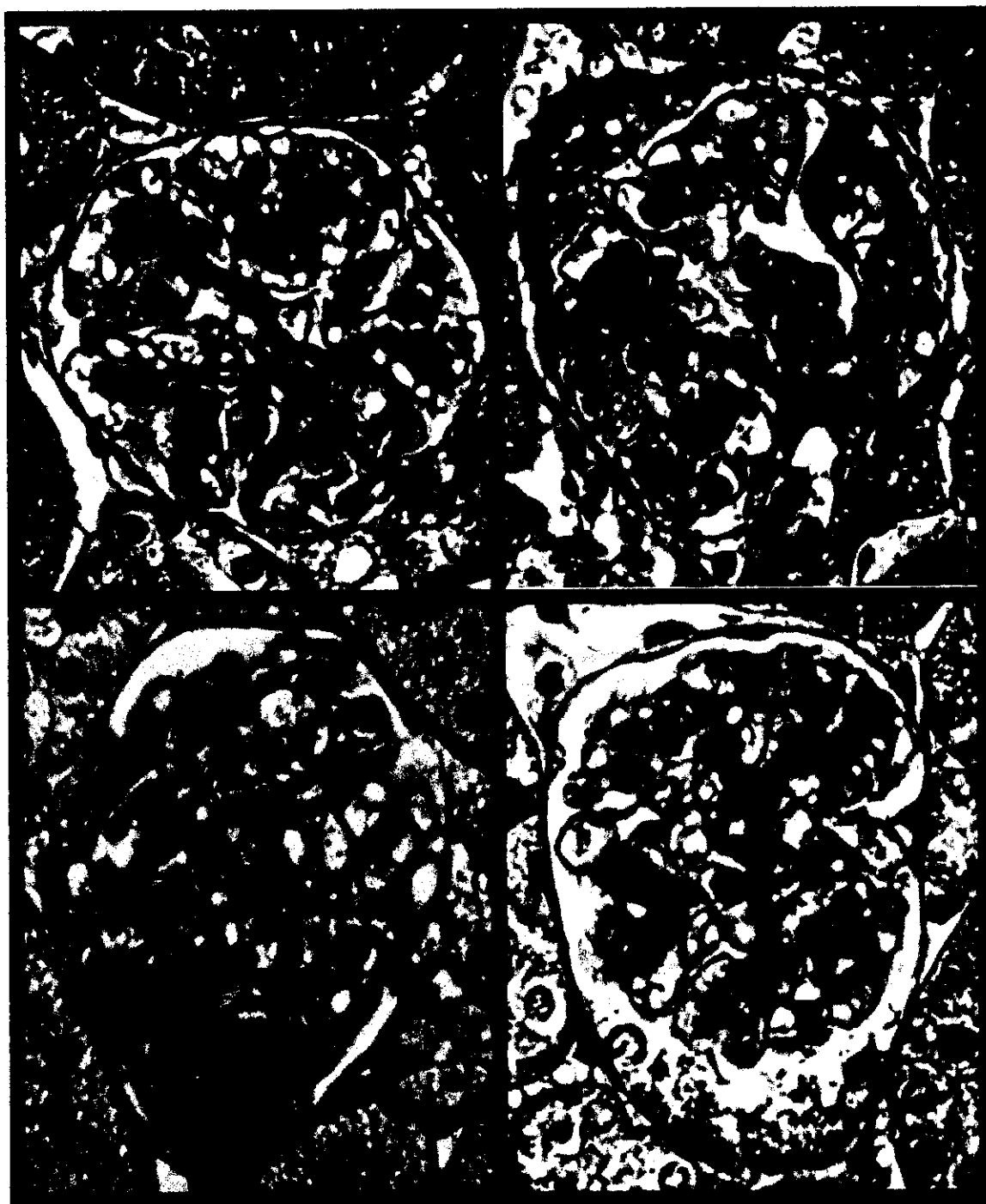


Fig. 3 Renal glomerular capillary dilatation



apoE-Sendai

apoE2

apoE3

LacZ

Fig. 4 Electronmicroscope photograph of apoE Sendai expressed mouse



厚生科学研究費補助金（厚生労働省特定疾患調査研究事業）
（分担）研究報告書
ホルモン感受性リパーゼノックアウトマウスの樹立と解析

分担研究者 山田信博 筑波大学医学系内科教授
研究協力者 石橋 俊（筑波大学医学系内科）

研究要旨 脂肪細胞に蓄積したトリアシルグリセロール(TG)を分解する酵素はホルモン感受性リパーゼ(HSL)と呼ばれ、その活性異常は肥満・高脂血症・糖尿病の原因として提唱されてきた。その仮説の真偽を明らかにするために、ジーンターゲットングの手法を用いてHSLノックアウトマウスを作成した。ホモ接合体は乏精子症に起因する男性不妊を呈した。体重や白色脂肪組織(WAT)重量の増加は観察されず、肥満は呈さない。しかしながら、脂肪細胞の肥大はWATでも、褐色脂肪細胞でも顕著に観察された。脂肪組織や精巣のコレステロールエステル分解酵素活性は完全に欠損していたが、TGリパーゼ活性はWATで40%までの低下を、BATでは有意な低下を認めなかった。更に、WATにおいてイソプロテレノール添加によって促進されるTG分解活性も減少するものの、残存活性を認め、HSL以外にもホルモン感受性にTGを分解する酵素の存在が推定された。

A. 研究目的

脂肪細胞はトリアシルグリセロール(TG)を細胞内に蓄積し、必要に応じて、TGを遊離脂肪酸とグリセロールに分解する。このTGリパーゼ活性を触媒する酵素として同定されたのがホルモン感受性リパーゼ(hormone sensitive lipase; HSL)である。HSLはTGのみならず、ジアシルグリセロール(DG)やコレステロールエステル(CE)にも作用する。また、脂肪細胞のみならず、心筋、骨格筋、副腎皮質、精巣、卵巣などの諸臓器に広汎に発現している。その酵素活性はプロテインキナーゼA(PKA)を介して、カテコラミンなどのホルモンによる急性調節を受ける。従って、HSLは肥満の発症において重要な役割が想定されているのみならず、その活性異常と家族性複合型高脂血症(FCHL)の関連が想定されてきた。そこで、肥満や高脂血症におけるHSLの意義を明らかにするために、ジーンターゲットングの手法によってHSLノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。

B. 研究方法

マウスHSLのゲノムDNAをクローニングし、セリン蛋白分解酵素の活性中心とPKAによるリン酸化を受ける活性調節モジュールを含むエクソン5、6をネオマイシン耐性遺伝子発現カセットで置換するベクターを構築した。ネガティブ選択マーカーとしてTKを用いた。相同的組み換えを生じたES細胞の胚盤胞へマイクロインジェクションによってキメラを作成し、ヘテロ接合体(HSL+/-)同士との交配によってホモ接合体(HSL-/-)を作成した。これらのマウスの成長曲線、エネルギー消費、

寒冷感受性、白色脂肪組織(WAT)と褐色脂肪組織(BAT)の重量や組織学的検索、WATよりコラゲナーゼを用いて脂肪細胞の懸濁培養液を作り、これに α -アドレナリンアゴニストであるイソプロテレノール(ISO)を添加した前後の培養液中のグリセロールとFFAを測定した。マウスの頸静脈にISOを注射した前後の血漿中のグリセロールとFFAも測定した。WATとBATのS100分画におけるTGリパーゼ活性と中性コレステロールエステル加水分解酵素(NCEH)活性をアイソトープ標識した基質を用いて測定した。TGリパーゼ活性については、2M NaCl添加し、リポタンパクリパーゼ(LPL)活性を阻害して、LPL以外のTGリパーゼ活性値として測定した。

リポタンパク分析：TCとTGを測定し、HPLC法でリポタンパクプロファイルを評価した。

生殖能評価：テストステロン、FSH、LHの血中濃度の測定、精巣上体中の精子数の計数、精巣・精巣上体の組織学、脂質含量などを評価した。

C. 研究結果

HSL-/-の外見は正常で雌雄別の週齢別体重増加曲線も、HSL+/+との間に差は認められなかった。同様に、エネルギー消費や寒冷感受性についても、HSL+/+とHSL-/-の間に有意な差は確認されなかった。しかしながら、BAT重量は増加し、WAT重量には減少傾向が認められた。それぞれの脂肪組織における脂肪細胞の平均径は、BATで5倍、WATで2倍に増加し、WATにおいては肥大した細胞の増加以外に、小細胞の増加も確認された。

脂肪細胞へISOを添加後のグリセロールとFFAの放出は、HSL+/+においてもHSL-/-においても

確認されたが、HSL^{-/-}はHSL^{+/+}に比較して、前値・後値共に低下が認められた。ISO 静脈注射に対する反応も同様に、HSL^{-/-}における脂肪分解のISOに対する反応性は、HSL^{+/+}に比較して減少はするものの、明らかに残存した。

NCEH 活性はWATでもBATでも完全に欠損したが、2M NaCl 存在下でのTGリパーゼ活性は、WATで半分近く残存し、BATではほとんど減少しなかった。

HSL^{-/-}の血漿中のFFA濃度は、HSL^{+/+}に比較して低値であり、絶食後にその傾向が顕著となった。血清TGに低下傾向が認められたが有意ではなく、リポタンパクプロフィールにも有意な変化は認められなかった。

HSL^{-/-}同士の雌雄の交配によっても妊娠はなく、HSL^{-/-}の雄もHSL^{+/+}の雌を妊娠さないが、HSL^{+/+}の雄はHSL^{-/-}の雌を妊娠させた(男性不妊)。HSL^{-/-}の精巣重量は軽く、精子数は正常の1/10万に著減していた。精巣上皮の多層構造は菲薄化し、空胞化も顕著に認められた。CE含量の増加が増加した。精子形成不全が確認された。テストステロンやFSH・LHの血中濃度に変化はなく、精子形成不全は低ゴナドトロピン血症の結果ではない。

D. 考察

HSLは精子形成に必須の酵素であることが明らかになった。精巣のNCEH活性の欠損によって、コレステロール、遊離脂肪酸あるいはレチノールの供給が障害された結果と解釈される。必須脂肪酸やビタミンAの欠乏で観察される精子形成不全と共通の機序が背景にあるかもしれない。(HSLがレチニルエステル分解活性を有することが報告されている。)

HSL欠損によって、BATやWATの個々の脂肪細胞の肥大化が生じ、HSLがこれらの細胞におけるTG分解活性の一部を担っていることが支持された。BATに認めた臓器肥大はWATには認められず、むしろ萎縮傾向すら呈しており、WATの脂肪細胞における脂肪分解活性の多様性が示唆された。ISOに反応性のTG分解活性が残存する事実や、寒冷感受性に差が認められなかった事実から、HSL以外に、TGを特異的に作用するがCEに作用しないTGリパーゼの存在が推測された。この第2のHSLともいべき酵素は、HSLと同様のホルモン感受性を有している。この酵素の存在のために、HSL^{-/-}は寒冷感受性の亢進がなく、肥満も呈さないと考えられた。

リポタンパクについては、HSL^{-/-}のTGに低下傾向を認めるが、高脂血症は呈さず、従来提唱されてきた、FCHL発症におけるHSL遺伝子の関与の可能性は少ないと考えられた。

E. 結論

HSLの欠損マウスを作成した。HSLは精子形成に重要であることが明らかになった。また、脂肪細胞にはHSL以外にもTGをホルモン感受性に分解する酵素の存在が示唆された。臨床的な研究からHSLは肥満や家族性複合型高脂血症をはじめとする原発性高脂血症の原因と予想されていたが、そのような仮説は本研究結果からは支持されなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 U S A. 97(2):787-92, 2000

遺伝子変異によるリポ蛋白異常症の病態解析：アポ E, ABCA1 遺伝子異常を中心として

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 ）

【研究要旨】

アポリポ蛋白(アポ)E 変異とリポ蛋白系球体症の関連及び発症機序を解明するため、トランスジェニックマウス作製を行った。現在までに4種のアポE変異がリポ蛋白系球体症患者で検出されたが、今回はアポE1 (del 141-143)モデルマウス作製を試み、F1マウスまで得られた。Tangier病患者的ABCA1変異の解析を行い、症例1の姉妹(HDL-C 約 2.7mg/dl)より、Asp1229→Asn および Arg2021→Trp 変異のホモ接合体を検出。症例2の62歳男 HDL-C7mg/dl のHDL欠損症症例より、c-DNA3787より4塩基の欠失によるフレームシフトでコドン1224がストップコドンとなる変異のホモ接合体を検出した。

【目的】

アポリポ蛋白(アポ)Eは、リポ蛋白の主要なアポ蛋白の一つであり、細胞表面に存在するLDL受容体などへ結合するリガンドである。アポEには等電点の異なる3つのイソタンパク(E2, E3, E4)があり、受容体結合に重要なアポEの構造部位は136-160番目のアミノ酸であるとされ、158番目のアルギニンがシステインに置換されているアポE2では、LDL受容体への結合がアポE3に比べ著しく低下し、III型高脂血症の原因となる。我々は、これまでにリポ蛋白系球体症を引き起こす4種類のアポE変異を報告し、優性遺伝型式でIII型高脂血症を発症するアポE変異やE5, E7などE2, E4以外のアポE変異も報告してきた。本年度の研究では、新たなアポE変異を報告し、リポ蛋白系球体症のモデル動物として変異アポEトランスジェニックマウスを作製経過を示す。

ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1)は、ATP-binding cassette ファミリー

の一つであり、1994年にLucianiらによりABC2と共に報告された。発見当初は、その生理的役割は不明であったが、HDL欠損症と網内系へのコレステロールエステル蓄積を伴うことを特徴とするTangier病患者においてABCA1遺伝子に変異が報告され、また、家族性HDL欠損症の患者にもABCA1遺伝子変異が検出され、同一遺伝子の異常による病態であることが明らかとなってきた。我々は、本邦におけるTangier病およびHDL欠損症家系の遺伝子解析を行い、新たなABCA1変異を見いだしたので報告する。

【対象と方法】

アポEの解析

- 1) 各検体の血漿脂質、アポ蛋白値を測定し、等電点電気泳動でアポE表現型を決定した。
- 2) PCR-RFLP：全血より白血球のDNAを抽出。PCR法にてアポE遺伝子を増幅後、制限酵素HhaIで切断し8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離。

3) SSCP 法 : PCR 産物を 50%ホルムアミド溶液 1 中で 95 度 5 分間加熱後急冷し一本鎖 DNA に変性させ、電気泳動後、銀染色にて変異検体を検出。

4) 変異遺伝子決定 : サブクローニング後シーケンスを行い変異部位を確定した。

5) 導入アポ E 遺伝子の作製 : プロモータ部位を含む正常アポ E4 遺伝子 (11.5kb) は、Dr. Breslow との共同研究にて入手。これを正常アポ E3 とした後、アポ E2 Tokyo 変異を site directed mutagenesis を用いて変異を導入した。アポ E 遺伝子の全配列をオートシーケンサーにて確認し、変異を導入されたアポ E 遺伝子は、制限酵素 HindIII で切断し、直線鎖 DNA として精製。

6) トランスジェニックマウスの作製 : 単離直線化アポ E 遺伝子をマイクロマニピュレーターにより受精卵の前核に注入し、偽妊娠仮親 C57BL/6J 雌マウスの卵管に移植 (熊本大学 鈴木操先生との共同研究)。生後 6 週齢で得られたマウス 7 匹より尾の先端を離断し、ゲノム DNA を抽出後、PCR 法にてスクリーニングを行い、遺伝子が組み込まれたマウスを同定した。

ABCA1 遺伝子の解析

1) 患者末梢血 60ml より Lymphoprep にて単球を分離。更に培養ディッシュに接着しない細胞を除いたのち 10%のヒト AB 型血清を含む RPMI1640 培地にて 7 日間培養後、単球の全 RNA を抽出。

2) 患者単球 RNA より RT-PCR 法にて ABCA1 の c-DNA を 9 つのフラグメントに分け増幅。サブクローニング後オートシーケンサーで変異部位を同定した。

【結果】

1. リポ蛋白糸球体症のモデル動物として変異

アポ E1Tokyo (codon 142-144 del)のトランスジェニックマウス作製 :

今回の研究ではアポ E 変異とリポ蛋白糸球体症の関連及び発症機序を解明するため、アポ E1 (del 141-143)モデルマウスを作製することとした。プロモータ部位を含む正常アポ E 遺伝子 (11.5kb) に、アポ E1 (del 141-143)変異を site directed mutagenesis を用いて導入した。アポ E 遺伝子の全配列をオートシーケンサーにて確認し、変異を導入されたアポ E 遺伝子は、制限酵素 HindIII で切断し、直線鎖 DNA として精製。共同研究を行うため、熊本大学動物資源開発研究センターに輸送した。熊本大学にて単離直線化アポ E 遺伝子をマイクロマニピュレーターにより受精卵の前核に注入し、偽妊娠仮親 C57BL/6 雌マウスの卵管に移植した。しかし、センターで病原ウイルス感染に遭遇し、初回に得られたトランスジェニックマウスは屠殺された。2 回目の作製にて 7 匹のマウスが得られ、スクリーニングを行ったところ、雌 1 匹でヒトアポ E 遺伝子を確認した。その後繁殖を行い、3 回の出産で計 21 匹のスクリーニングを実施し、現在までに雄 2 匹でヒトアポ E 遺伝子発現を認めた。F1 マウスでのヒトアポ E 遺伝子発現率が低く、雌の F1 発現マウスが得られていないため、さらに繁殖を行っている。今後、アポ E1 (del 141-143)変異ホモ接合体マウスを確立し、血清リポ蛋白分析、糸球体病変の解析を行う予定である。

2. ABCA1 変異 : 症例 1 1983 年に本邦で最初に報告された Tangier 病の姉妹 (HDL-C 約 2.7mg/dl) より、Asp1229→Asn および Arg2021→Trp 変異のホモ接合体を検出。症例 2 62 歳男 HDL-C 7mg/dl の HDL 欠損症症例より、c-DNA3787 より 4 塩基の欠失によるフレームシ

フトでコドン 1224 がストップコドンとなる変異のホモ接合体を検出した。症例 1、2 ともアポ A-I 遺伝子は正常であった。

【考察】

リポ蛋白糸球体症 (Lipoprotein glomerulopathy) は、日本で発見された新しい腎疾患である¹⁾。我々は、多施設共同研究により、このリポ蛋白糸球体症の原因と密接に関係するアポ蛋白 E 変異体、アポ E2 Sendai (Arg145Pro) に続いて、アポ E2 Kyoto (Arg25Cys)、アポ E1 (del 141-143)、アポ E1 (del 156-173) の計 4 種を発見した²⁾⁻⁵⁾。また、未発表であるが 8 家系 15 例のアポ E2 Sendai (Arg145Pro) キャリアーを検出し、うち 10 例をリポ蛋白糸球体症と診断した。すべての変異がヘテロ接合体で発症しており、すべてのリポ蛋白糸球体症症例でアポ E 変異を検出したが、家族採血では変異を持つがリポ蛋白糸球体症を発症していない例も多数認められた。アポ E は、カイロミクロン、カイロミクロンレムナント、超低比重リポ蛋白 (VLDL)、中間比重リポ蛋白などに存在し、高比重リポ蛋白 (HDL) にも少量あり、LDL 受容体およびレムナント受容体へ強い親和性を示すリガンドとしてリポ蛋白代謝に重要な役割をしている。アポ E は、等電点の異なる 3 つの表現型 (E2, E3, E4) からなるが、アポ E3 が野生型であり、アポ E4 は 112 番目のシステインがアルギニンに変異しており、E2 は 158 番目のアルギニンがシステインに変異した多型である。受容体結合に重要なアポ E の構造部位は 136-160 番目のアミノ酸であるとされ、アポ E2 では、ヒト線維芽細胞の LDL 受容体への結合が野生型であるアポ E3 に比べ著しく低下しており、このためにアポ E2 ホモ接合体 (E2/2) で早発性粥状動脈硬化を来す

III 型高脂血症の原因となる。リポ蛋白糸球体症を発症した 4 種の変異のうちアポ E2 Sendai (Arg145Pro)、アポ E1 (del 141-143)、アポ E1 (del 156-173) の 3 種は、細胞の受容体と結合すると考えられているアポ E アミノ残基 136-160 番目付近の変異であり、アポ E2 Kyoto (Arg25Cys) でも LDL 受容体との結合能の低下が見られていることから、いずれも受容体との結合障害を有するアポ E 変異である可能性が高い。さらに結合能の低下を証明していないアポ E1 (del 141-143)、アポ E1 (del 156-173) についても受容体との結合実験が必要である。また、すべてのリポ蛋白糸球体症症例で血清アポ E が高値となることは一致しているが、アポ E1 (del 141-143) では、明らかな高脂血症が認められておらず、アポ E 変異の差異による血清脂質レベルへの影響の違いが考えられた。

アポ E 変異とリポ蛋白糸球体症の関連及び発症機序を解明するため、アポ E1 (del 141-143) モデルマウスを作製することとした。プロモータ部位を含む正常アポ E 遺伝子 (11.5kb) は、Dr. Breslow との共同研究にて入手。この遺伝子を用いたトランスジェニックマウスでは腎臓を中心にヒトアポ E4 が発現されることがすでに報告されている (Nature, 1990)。これを正常アポ E3 に変換した後、アポ E1 (del 141-143) 変異を site directed mutagenesis を用いて変異を導入した。直鎖鎖 DNA として精製後、共同研究にて熊本大学動物資源開発研究センターに輸送し、単離直鎖化アポ E 遺伝子を受精卵の前核に注入し、偽妊娠仮親 C57BL/6 雌マウスの卵管に移植し、トランスジェニックマウスを得た。しかし、センターで病原ウイルス感染に遭遇し、初回に得られたトランスジェニックマウスは屠殺され、本研究は大幅に遅れるこ

ととなった。その後、再度 11.5kb の直鎖 DNA を精製し、2 回目の受精卵への注入、偽妊娠仮親 C57BL/6 雌マウスへの移植により、7 匹のトランスジェニックマウスを得、うち雌 1 匹でヒトアポ E 遺伝子を確認。その後の繁殖にて F1 マウス 2 匹が得られた。現在、繁殖とスクリーニングを続けている段階である。

ヒトのアポ E1 (del 141-143) 発現 F1 マウスを作製した。今後は、さらに交配を行い個体数を増やし、ホモ型アポ E (del 141-143) 変異発現マウスを作製、確立し、さらに各種臓器の RNA を抽出し、変異アポ E 発現マウスの臓器特異性を評価し、また、腎臓のスライスより糸球体病変を検索する予定である。

ABCA1 は、イオン、糖、ビタミン、脂質、蛋白など種々の物質の膜輸送を制御する ATP-binding cassette ファミリーの一つであり、1994 年に Luciani らにより ABC2 と共に報告された。最近新しい名称が用いられるようになり、ABC1 は ABCA1 と呼ばれている。発見当初は、その生理的役割は不明であったが、1999 年に、Tangier 病患者において ABCA1 遺伝子に変異が報告され、注目されてきた。Tangier 病は、本邦を含め世界中で 40 家系以上が報告されている。以前より細胞内のコレステロール輸送に障害があるために、コレステロール引き抜きが障害され、血清 HDL 値が低下するのではないかと考えられていたが、ABCA1 遺伝子変異が同定された。また、明らかな Tangier 病の表現型を伴わない家族性 HDL 欠損症の患者にも ABCA1 遺伝子変異が検出され、同一遺伝子の異常による病態であることが明らかとなった。

今回の研究により、Tangier 病および HDL 欠損症例より、それぞれホモ型の ABCA1 変異を検

出した。Tangier 病例の変異は 2 カ所認めており、今後それぞれの変異の影響を検討する必要があると考えられた。

【文 献】

1. Saito T, Sato H, Kudo K, Oikawa S, Shibata T, Hara Y, Yoshinaga K, Sakaguchi H: Lipoprotein glomerulopathy: Glomerular lipoprotein thrombi in a patient with hyperlipoproteinemia. *Am J Kidney Dis* 13: 148-153, 1989.
2. Oikawa S, Matsunaga A, Saito T, Sato H, Seki T, Hoshi K, Hayasaka K, Kotake H, Midorikawa H, Sekikawa A, Hara S, Abe K, Toyota T, Jingami H, Nakamura H, Sasaki J: Apolipoprotein E Sendai (Arginine 145 → Proline): A new variant associated with lipoprotein glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 8:820-823, 1997.
3. Matsunaga A, Sasaki J, et al.: A novel apolipoprotein E mutation, E2 (Arg25Cys) in lipoprotein glomerulopathy. *Kidney International* 56:421-427, 1999.
4. Ando M, Sasaki J, Han H, Matsunaga A, et al.: A novel 18-amino acid deletion in apolipoprotein E associated with lipoprotein glomerulopathy. *Kidney International* 56:1317-1323, 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 a polipoprotein 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

細胞内脂質代謝に関わるヒト SCAP, S1p, HMGCoA Red, LXR α について各々の染色体構造遺伝子をクローニングし、プロモーター、エキソン-イントロン構造、DNA 多形の同定、染色体マッピングを行った。LDL 受容体遺伝子座のスプライス変異を同定し、高脂血症大家系において同一家系の家系構成員 265 名から DNA を調製し、107 名の同一遺伝子変異を持つ患者群を同定し、アポリポタンパクなどの脂質代謝関連因子などの候補修飾遺伝子の SNP 多型について遺伝子タイピングの実験条件を種々検討し確認するとともに、種々のアミノ酸置換が患者のリポ蛋白分画値に影響を与えることを示した。

A. 研究目的

近年の脂質代謝研究の進歩に伴い細胞内のコレステロール量を調節するフィードバック機構が明らかにされてきている。これらに関わる遺伝子として、SCAP, S1P, HMGCoA reductase を始めとする SREBP の発現調節機構に関わる種々の遺伝子群と LXRs, RXRs を始めとする oxysterol により発現調節をうける多様な核内レセプター群が深く関与すると考えられるが、それらの高脂血症発症における意義を明らかにする。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関与する役割を明らかにすることを目的として、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した。

B. 研究方法

(1) 脂質代謝異常候補の染色体遺伝子をクローニングし、構造を決定した。(2) SNP 同定法をダイレクトシーケンス法を主に検討した。また、大規模 SNP タイピング法を一塩基伸長反応を主ににより試みるためその条件を検討した。(3) 家系構成員が 265 名、患者 107 名からなる高脂血症大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。

（倫理的配慮）

研究検体の収集にあたっては、政府 3 省庁の遺伝子研究ガイドラインに従い、当大学倫理委員会および遺伝子研究審査委員会の承認を受け、その規定に従っている。具体的には倫理委員会に対しては「遺伝子研究倫理審査申請書」による研究申請を行い、また患者およびその家族に対しては「遺伝子研究への協力のお願ひ」、「遺伝子解析に関する同意書」を作製しており、口頭と文書による説明を行い同意を得たものを対象としている。

C. D. E. 研究結果、考察、結論

(1) PAC, BAC クローンを用いたゲノム構造の解析により、SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein), S1P (human Site - 1 Protease), HMGCoA red (HMGCoA reductase), LXR α (Liver X Receptor alpha), 各々のヒト遺伝子構造を決定し、染色体マッピングをするとともに、プロモーター構造の解析を行い、さらにエキソンとタンパク質ドメインとの関係を調べた。Site-1 Protease (S1P) は、細胞内のコレステロールホメオスターシスの制御に中心的な役割を担っている。S1P 遺伝子は chromosome 16q24 に位置し、23 個の exon からなる遺伝子であった。HMG CoA reductase の調節機構の破綻は脂質代謝異常をきたすことが知られてる。HMG CoA reductase 遺伝子は 20 個の exon からなる遺伝子であった。また、その Exon-intron 構造は、SCAP, NPC1, Patched 遺伝子と類似していた。

(2) 日本人 16 人のゲノム DNA を対象にダイレクトシーケンス法を施行し、種々の候補遺伝子について SNP を同定するとともに、各対立遺

伝子の頻度を確定した。SNP タイピング法の塩基伸長反応は、Big dye ラベル化ダイデオキシ基質のプライマー伸長法 (SnaPshot 法)、ABI377 自動シーケンサー電気泳動、GeneScan ソフトを組み合わせ、Millipore 96well Fb 法にて前処理することや、プライマーの濃度、テンプレートの量の至適量を決定すること、伸長反応の後処理で Shrimp Al-P により未取り込みダイデオキシ基質の除去を行うことにより 96 ウェルによる大規模 SNP タイピングが可能となった。

(3) 高脂血症大家系 (K653) 内の多様な表現型への修飾・遺伝子の関与

高脂血症大家系 K653 の家系構成員 265 名からの採血、リポ蛋白測定、ゲノム DNA 調製を完了し、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 265 名について遺伝子診断を行なったところ、家系内の 107 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 107 名の患者を対象に、脂質代謝関連遺伝子の SNPs を検索した。候補遺伝子としては apolipoprotein をはじめ、脂質代謝に関係が深いと思われる 50 個程度の遺伝子を選択した。検索する SNPs は報告されているものの中から allele frequency が比較的高く、なおかつ promotor 領域や exon 上のものを選び、exon の中でも特にアミノ酸置換をともなう c-SNP (coding SNP) や r-SNP (regulatory SNP) を多く選択し、同定法としてはダイレクトシーケンス法および SNaP shot 法を用いた。各リポ蛋白分画値への影響を検討したところ、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、アポ H, HTGL, アポ AII などのアミノ酸置換のリポ蛋白値多様性への関与が有意であった。SNPs と血清脂質値との間の相関関係は、これらの遺伝子が疾患関連遺伝子として、高脂血症を増悪させるなんらかの修飾因子として働いている可能性を示唆する。今後、遺伝子は候補遺伝子に限らず、その他現在まで関与が報告されていない遺伝子も幅広く検索することにより、新たな候補遺伝子の同定を目指したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iida, A., Emi, M., Matsuoka, R.¹⁾, Inazawa, J.²⁾, Ohashi, H.³⁾, Fukishima, Y.⁴⁾, Nakamura, Y.⁵⁾ (¹⁾ Tokyo Women's Med. Univ., ²⁾ Tokyo Med. Dent. Univ., ³⁾ Saitama Child. Med. Ctr., ⁴⁾ Shinshu Univ. ⁵⁾ Univ. Tokyo) : Disruption in the human UVRAG/DHTX gene at 11q13.5 associated with left-right axis malformations. Hum. Genet. 2000; 106: 277-87.
- 2) Nakajima, T., Iwaki, K., Kodama, T.¹⁾, Inazawa, J.²⁾, Emi, M. (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Tokyo Med. Dent. Univ.) : Genomic structure and chromosomal mapping of the human Site-1 protease (S1P) gene. J. Hum. Genet. 2000; 45: 212-217.
- 3) Ogawa, S.¹⁾, Hosoi, T.^{1),2)}, Shiraki, M.³⁾, Orimo, H.²⁾, Emi, M., Muramatsu, M.⁴⁾, Ouchi, Y.¹⁾, Inoue, S.¹⁾ (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Tokyo Metropol. Geriat. Hosp. ³⁾ Res. Inst. Prac. Involu. Dis., ⁴⁾ Saitama Med. Sch.) : Association of Estrogen Receptor β Gene Polymorphism with Bone Mineral Density. Biochem. Biophys. Res. Comm. 2000; 269: 537-541.
- 4) Wu, L.¹⁾, Hopkins, P.¹⁾, Xin, Y.¹⁾, Stephenson, S.¹⁾, Williams, R.¹⁾, Nobe, Y., Kajita, M., Nakajima, T., Emi, M. (¹⁾ Univ. Utah) : Co-segregation of elevated LDL with a novel mutation (D92K) of the LDL receptor in a kindred with multiple lipoprotein abnormalities. J. Hum. Genet. 2000; 45: 154-158.
- 5) Yoshida, K.¹⁾, Ishigami, T., Nakazawa, I., Ohno, A.¹⁾, Tamura, K.¹⁾, Fukuoka, M.¹⁾, Mizushima, S.¹⁾, Umemura, S.¹⁾ (¹⁾ Yokohama City Univ.) : Association of essential hypertension in elderly Japanese with I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene. J. Hum. Genet. 2000; 45: 294-298.
- 6) Nakajima, T., Iwaki, K., Hamakubo, T.¹⁾,

- Kodama, T.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Univ. Tokyo) : Genomic structure of the gene encoding human 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase: comparison of exon/intron organization of sterol-sensing domains among four related genes. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 284-289.
- 7) Ikeda, K.¹⁾, Sato, M.¹⁾, Tsutsumi, O.²⁾, Tsuchiya, F.¹⁾, Tsuneizumi, M., Emi, M., Imoto, I.³⁾, Inazawa, J.³⁾, Muramatsu, M.¹⁾, Inoue, S.¹⁾ (¹⁾ Saitama Med. School, ²⁾ Univ. Tokyo, ³⁾ Tokyo Med. Dent. Univ.) : Promoter analysis and chromosomal mapping of human EBAG9 gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2000; 273: 654-660.
- 8) Ogawa, S.¹⁾, Emi, M., Shiraki, M.²⁾, Hosoi, T.³⁾, Ouchi, Y.¹⁾, Inoue, S.¹⁾ (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Res. Inst. Prac. Involu. Dis., ³⁾ Tokyo Metropol. Geriat. Hosp.) : Association of estrogen receptor β (ESR β) gene polymorphism with blood pressure. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 327-330.
- 9) Orimo, H.¹⁾, Nakajima, E.¹⁾, Yamamoto, M.¹⁾, Ikejima, M.¹⁾, Emi, M., Shimada, T.¹⁾. (¹⁾Dept. Biochem. II.) : Association between single nucleotide polymorphisms in the hMSH3 gene and sporadic colon cancer with microsatellite instability. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 228-230.
- 10) Ezura, Y., Chakravarti, S.²⁾, Oldberg, A.³⁾, Chervoneva, I.¹⁾, Birk, D.¹⁾ (¹⁾ Thomas Jefferson Univ., ²⁾ Johns Hopkins Univ., ³⁾ Univ. Lund) : Differential Expression of Lumican and Fibromodulin Regulate Collagen Fibrillogenesis in Developing Mouse Tendons. *J. Cell Biol.* 2000; 151: 779-787
- 11) Tsukamoto, K., Yoshida, H.¹⁾, Watanabe, S.¹⁾, Suzuki, T.¹⁾, Miyao, M.²⁾, Hosoi, T.²⁾, Orimo, H.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Tokyo Metropol. Inst. Gerontol., ²⁾ Univ. Tokyo) : Association of Bone Mineral Density with Polymorphism of the Human Matrix Gla protein locus in elderly women. *J. Bone. Mener. Metab.* 2000 ; 18: 27-30.
- 12) Yokota, T., Nakata, T., Minami, S., Inazawa, J.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Tokyo Med. Dent. Univ.) : Genomic organization and chromosomal mapping of ELKS, a gene rearranged in a papillary thyroid carcinoma. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 6-11.
- 13) Keicho, N.¹⁾, Ohashi, J.¹⁾, Tamiya, G.²⁾, Nakata, K.³⁾, Taguchi, Y.⁴⁾, Azuma, A.⁵⁾, Ohishi, N.¹⁾, Emi, M. Park, M.⁶⁾, Inoko, H.²⁾, Tokunaga, K.¹⁾, Kudoh, S.⁵⁾ (¹⁾ Univ. Tokyo., ²⁾ Tokai Univ., ³⁾ Toranomon Hosp. ⁴⁾ Tenri Hosp., ⁵⁾ Dept. Intern. Med. IV., ⁶⁾ Seoul Nat. Univ.) : Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 66: 501-507.
- 14) Tsukamoto, K., Orimo, H.¹⁾, Hosoi, T.¹⁾, Miyao, M.¹⁾, Ota, N., Nakajima, T., Yoshida, H.²⁾, Watanabe, S.²⁾, Suzuki, T.²⁾, Emi, M. (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Tokyo Metropol. Inst. Gerontol.) : Association of Bone Mineral density with Polymorphism of the Human Calcium-Sensing Receptor Locus. *Calcif. Tissue Int.* 2000; 66: 181-183.
- 15) Ota, N., Hunt, S.²⁾, Nakajima, T., Suzuki, T.³⁾, Hosoi, T.³⁾, Orimo, H.³⁾, Shirai, Y.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Dept. Orthoped. ²⁾ Univ. Utah, ³⁾ Tokyo Metropol. Inst. Gerontol.) : Linkage of human tumor necrosis factor- α to human osteoporosis by sib-pair analysis. *Genes, Immunity.* 2000; 1: 260-264.
- 16) Miyao, M.¹⁾, Hosoi, T.¹⁾, Emi, M., Nakajima, T., Inoue, S.¹⁾, Hoshino, S.¹⁾, Shiraki, M.³⁾, Orimo, H.^{1,2)}, Ouchi, Y.^{1,2)} (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Tokyo Metropol. Geriat. Hosp., ³⁾ Res. Inst. Prac. Involu. Dis.) : Association of bone mineral density with a dinucleotide repeat polymorphism at the calcitonin locus. *J. Hum.*