

山田

1. Joint AHA/APSC, Symposium: The Rising Tide of Diabetic CVD, Cardiovascular Complications of Diabetes Mellitus: East (Nov 13, 2001, American Heart Association, Anaheim, California)

馬淵

1. Hong Lu, Toshinori Higashikata, Hiroshi Mabuchi et al. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. XIV International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism, Sep 9-12, 2001.

2. Zhi-Ping Huang, Akihiro Inazu, Hiroshi Mabuchi et al. Decreased SR-BI and increased LDL receptor expressions by CETP antisense treatment in HepG2 cells. XIV International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism, Sep 9-12, 2001.

3. Yoshihiro Noji, Akihiro Inazu, Hiroshi Mabuchi, et al. Clinical manifestation and gene analysis of a case of pseudoxanthoma elasticum (PXE) associated with familial hypercholesterolemia (FH). XIV International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism, Sep 9-12, 2001.

4. Yu Wenxin, Atsushi Nohara, Hiroshi Mabuchi, et al. LDL-receptor gene mutations in Japanese patients with familial hypercholesterolemia. XIV International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism, Sep 9-12, 2001.

5. Atsushi Nohara, Kenji Miwa, Hiroshi Mabuchi, et al. A novel gain-of-function polymorphism in peroxisome proliferator

activated receptor-alpha gene associated with elevated plasma cholesterol levels. XIV International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism, Sep 9-12, 2001.

6. Akimichi Asano, Kunimasa Yagi, Hiroshi Mabuchi. A novel dominant-negative mutation in the hepatocyte nuclear factor-1alpha in diabetic patients with familial combined hyperlipidemia. XIV International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism, Sep 9-12, 2001.

7. Toshinori Higashikata, Atsushi Nohara, Hiroshi Mabuchi, et al. Weaning from LDL-apheresis treatment in two hypercholesterolemic patients with coronary heart disease by using atorvastatin. XIV International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism, Sep 9-12, 2001.

8. Junji Koizumi, Masami Shimizu, Hiroshi Mabuchi, et al. XIV International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism, Sep 9-12, 2001.

9. Tatsuo Haraki, Kosei Ueda, Hiroshi Mabuchi, et al. XIV International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism, Sep 9-12, 2001.

10. 野末 剛、東方 利徳、馬淵 宏他. 脳髄黄色腫症 (Cerebrotendinous xanthomatosis; CTX) の遺伝子解析とケノデオキシコール酸 (CDCA) の治療効果. 第 33 回日本動脈硬化学会総会, 2001.

11. 野末 剛、東方 利徳、馬淵 宏他. Pravastatin・Simvastatin 併用療法から Atorvastatin 単独療法への切り替え. 第 33 回日本動脈硬化学会総会, 2001.

12. 呂 紅、東方 利徳、馬淵 宏他. Association of estrogen receptor alpha gene

polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. 第33回日本動脈硬化学会総会, 2001.

13. 于文新、野原 淳、馬淵 宏他. 家族性高コレステロール血症におけるLDLレセプター遺伝子変異解析. 第33回日本動脈硬化学会総会, 2001.

14. 堀田 孝裕、東方 利徳、馬淵 宏他. 家族性高コレステロール血症における大血管瘤形成について? LDL受容体遺伝子高頻度変異(K790X)症例における検討?. 第33回日本動脈硬化学会総会, 2001.

15. 野原 淳、水野美保子、馬淵 宏他. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) ミスセンス変異体が一般人の血清脂質値に与える影響. 第33回日本動脈硬化学会総会, 2001.

16. 東方 利徳、三輪 健二、馬淵 宏他. 家族性高コレステロール血症(FH)に対する全血 LDL 吸着器(direct adsorption of lipoproteins, DALI)を用いたLDLアフェレーシス(LDL-A)治療. 第33回日本動脈硬化学会総会, 2001.

17. 馬淵 宏. 「動脈硬化診療ガイドライン」の提案. 第33回日本動脈硬化学会総会, 2001.

18. Atsushi Nohara, Mihoko Mizuno, Hiroshi Mabuchi, et al. PPAR- α variant is associated with primary hyperlipidemia.. 第65回日本循環器学会, 2001.

岡田

1. 星恵美, 今高麻理子, 有阪治, 他: LDL粒子サイズからみた生活習慣病に伴う脂質異常値の検討. 第22回日本肥満学会プログラム・抄録集, 2000

2. 小嶋恵美, 今高麻理子, 有阪治, 他: 新生児, 学童, 成人および冠動脈疾患患者におけるSDDLの頻度. 第23回日本肥満学会プ

ログラム・抄録集, 2001

3. Fujiwara S, Kojima M, Arisaka O: Association of small dense LDL and hypertriglyceridemia firms with age (in preparation)

4. 杉原茂孝, 伊藤けい子, 寒川賢治, 他. ミニシンポジウム1. 肥満臨床-3. 単純性肥満児における血中グレリンの検討. 第22回日本肥満学会, 2001年, 10月, 前橋

5. 杉原茂孝, 岩間彩香, 三浦直子, 池崎綾子, 松岡尚史, 近藤千里, 伊藤けい子. 単純性肥満児におけるacanthosis nigricansとインスリン抵抗性, 腹囲, adipocytokineの関連, 及びその性差. 第15回日本小児脂質研究会, 2001年11月30日, 北九州市.

6. 原 光彦, 岩田富士彦, 岡田 知雄, 原田 研介. 小児生活習慣病と高脂血症. 第15回日本小児脂質研究会. 2001年12月1日

7. Kuromori Y, Okada T, Hara M, Iwata F, Karasawa K, Ayusawa M, Noto N, Sumitomo N, Harada K. Relationship between the lowering of serum HDL-cholesterol and altered function of HDL subclasses in male childhood obesity. 23th International congress of Pediatrics, Beijing, September 9-14, 2001

8. 岡田知雄. 小児肥満と高脂血症. 第22回日本肥満学会 シンポジウム: 小児肥満の判定と健康障害(肥満症). 平成13年10月11日

H. 知的所有権の取得状況
なし

III. 分担研究報告

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

新規 ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1) 変異体の発見とその発現機能異常解析

分担研究者 松澤佑次 大阪大学大学院医学系研究科 分子制御内科教授

研究要旨

高比重リポ蛋白 (HDL) を介する動脈硬化防御機構として末梢組織に蓄積したコレステロールをくみ出し (Cholesterol efflux, CE)、最終的に肝臓へと輸送するいわゆるコレステロール逆転送系 (Reverse cholesterol transport, RCT) が最も重要である。CE は、RCT の第一段階にあたりその重要性はいうまでもない。近年、家族性 HDL 欠損症の原因遺伝子として ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1) が同定された。本研究において、我々は日本人 HDL 欠損症患者において、新規 ABCA1 変異体を発見し、その機能解析を行った。

A. 研究目的

高比重リポ蛋白 (HDL) を介する動脈硬化防御機構として、末梢組織に蓄積したコレステロールをくみ出し、最終的に肝臓へと輸送するいわゆるコレステロール逆転送系 (Reverse cholesterol transport, RCT) が重要である。我々は、角膜混濁と狭心症を伴う高 HDL コレステロール血症を発見 (Matsuzawa Y, et al. Atherosclerosis. 1984) して以来、コレステリルエステル転送蛋白 (CETP) 欠損症をはじめとする種々の HDL 代謝異常症の病態解析によりその機構を明らかにしてきた。RCT の第 1 段階は、Cholesterol efflux (CE) と呼ばれる、末梢の泡沫細胞からのコレステロール引き抜きであるがその分子機構は、最近までほとんど明らかではなかった。そこで、我々は、コレステロール引き抜きが低下または欠損している種々の患者由来細胞を用いて、Cholesterol efflux の分子機構を解明しようとしている

B. 研究方法

HDL 欠損症として有名なタンジール病 (TD) は、患者細胞からの CE が低下している RCT の障害モデルである。1999 年、TD の原因遺伝子として ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1) が同定された。今回、我々は、3 家系の日本人 HDL 欠損症患者において ABCA1 遺伝子変異及びその機能解析を行った。

C. 研究結果

症例 1、2 はオレンジ扁桃などのタンジール病の表現型を有していたが、症例 3 には認めな

かった。症例は、いずれも以下に述べる新規変異体のホモ接合体であった。症例 1 は、1158 番目のグアニンがアデニンに置換する結果、255 番目のアラニンがスレオニンに置換されるミスセンス変異、症例 2 は、5946 番目のシトシンがチミンに置換される結果、アルギニンが停止コドンになり短縮 ABCA1 が生じる、症例 3 は、5226 番目のアデニンがグアニンに置換する結果、1611 番目のアスパラギンがアスパラギン酸に置換するミスセンスである。3 例とも HDL コレステロール、アポ AI の著明な低下、明らかな動脈硬化性病変を認めた。我々は、症例由来皮膚線維芽細胞の解析及び発見した ABCA1 変異 cDNA を COS-7 細胞に発現させ、その機能解析を行った。症例 1、2、3、いずれも皮膚線維芽細胞からのアポ AI のコレステロール引き抜きは欠損しており、ABCA1 発現異常、機能異常が生じていると考えられた。が、その分子機構は分析した各症例において大きく異なっていた。症例 1 では ABCA1 mRNA 発現の低下が、症例 2 では短縮型 ABCA1 蛋白の発現量の低下及びヌクレオチド結合部位の欠失が、症例 3 ではアスパラギンからアスパラギン酸への置換が機能障害の中心であると考えられる。

D & E. 考察及び結論

タンジール病の atherogenicity については、その表現型の 1 つとして LDL コレステロールの低下が高頻度に認められることから動脈硬化との関連が比較的弱いとする意見もある。しかしながら、我々が呈示した症例は、明らかな動脈硬化性病変を有している。このことは、

我が国においても、コレステロール逆転送の第1段階の障害が動脈硬化発症に強いインパクトを持つことを示すものと考えられる。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

論文発表

Nishida Y, Hirano K, Tsukamoto K, Nagano M, Roomp K, Ishihara M, Sakane N, Zhang Z, Tsujii K, Matsuyama A, Ohama T, Matsuura F, Ishigami M, Sakai N, Hiraoka H, Hattori H, Wellington C, Yoshida Y, Misugi S, Hayden MR, Egashira T, Yamashita S, Matsuzawa Y. Expression of functional analyses of novel mutations in ATP-binding cassette transporter-1 in Japanese patients with high density lipoprotein deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* **290**: 713-721, 2002

Tsukamoto K, Hirano K, Tsujii K, Ikegami C, Zhang Z, Matsuura F, Yamashita S, Matsuzawa Y. ATP-binding Cassette Transporter-1 (ABCA1) Induces Rearrangement of Actin Cytoskeletons through Possible Interaction between ABCA1 and Cdc42. *Biochem Biophys Res Commun.* **287**: 757-765, 2001

Zhang Z, Yamashita S, Hirano K, Nakagawa-Toyama Y, Miyagawa J, Nishida M, Sakai N, Matsuzawa Y. Expression of cholesteryl ester transfer protein in human atherosclerotic lesions and its implication in the reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* **159**: 67-75, 2001.

Hirano K, Yamashita S, Sakai N, Matsuzawa Y. Low and high HDL syndrome. *The encyclopedia of endocrinology and endocrine disease.* In press.

H. 知的財産権の出願、登録状況
特になし。

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

家族性高コレステロール血症に対する生体肝移植

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 白幡康弘・里見 進（東北大学大学院医学系研究科・先進外科学分野）

石垣 泰（東北大学大学院医学系研究科・分子代謝病態学）

研究要旨：家族性高コレステロール血症ホモ接合体に対する薬物療法の効果は期待できず、プラズマアフェレーシスが施行される。しかし、乳児においてはこのような治療法は困難である。著明な結節性黄色腫を有する乳児に対して生体部分肝移植を行い、現在のところ大きな問題がなく経過している症例についてまとめた。乳幼児のFHホモ接合体に対する治療法の一つとして考慮されるべきものと考えられる。

A. 研究目的

家族性高コレステロール血症（FH）は早発性の粥状動脈硬化症を発症し、心筋梗塞の原因となる。FHの原因は常染色体優性遺伝に基づくLDL受容体異常である。このため著明な高LDL血症を呈する。これに対する治療としてLDL受容体を増加させるスタチン系の薬剤が第一選択となる。しかし、ホモ接合体で薬物療法によるLDL受容体増加は期待できず、2週間に1度のプラズマアフェレーシスを生涯にわたって行うことが必要となる。このような対外循環を必要とする治療法を乳児に行うには臨床上限界があると考えられる。そこで、肝移植によるLDL代謝の正常化を期待して、生体肝移植を行うこととした。

B. 症例

2歳男児

家族歴：父・母・父方および母方祖父が高コレステロール血症を指摘されている。

既往歴：特記すべきもの無し

現病歴：生後5ヶ月頃より四肢関節伸側に皮膚結節性黄色腫を認めた。生後8ヶ月時に血清コレステロール値の高値（1128mg/dl）を指摘された。その後の精査で家族性高コレステロール血症ホモ接合体の診断がなされた。

臨床経過：本症例に対する治療法としてプラズマアフェレーシスが適応となるが、対外循環を施すプラズマアフェレーシスを定期的に長期間行うことは困難であると判断された。また、乳児ではあるが黄色腫の存在と高コレステロール血症の重症であることから、すでに粥状動脈硬化が進展

している可能性が考えられた。そこで、治療法としては生体肝移植が適応と考えられ、東北大学医学部倫理委員会の承認を経て、生体肝移植を行うこととなった。

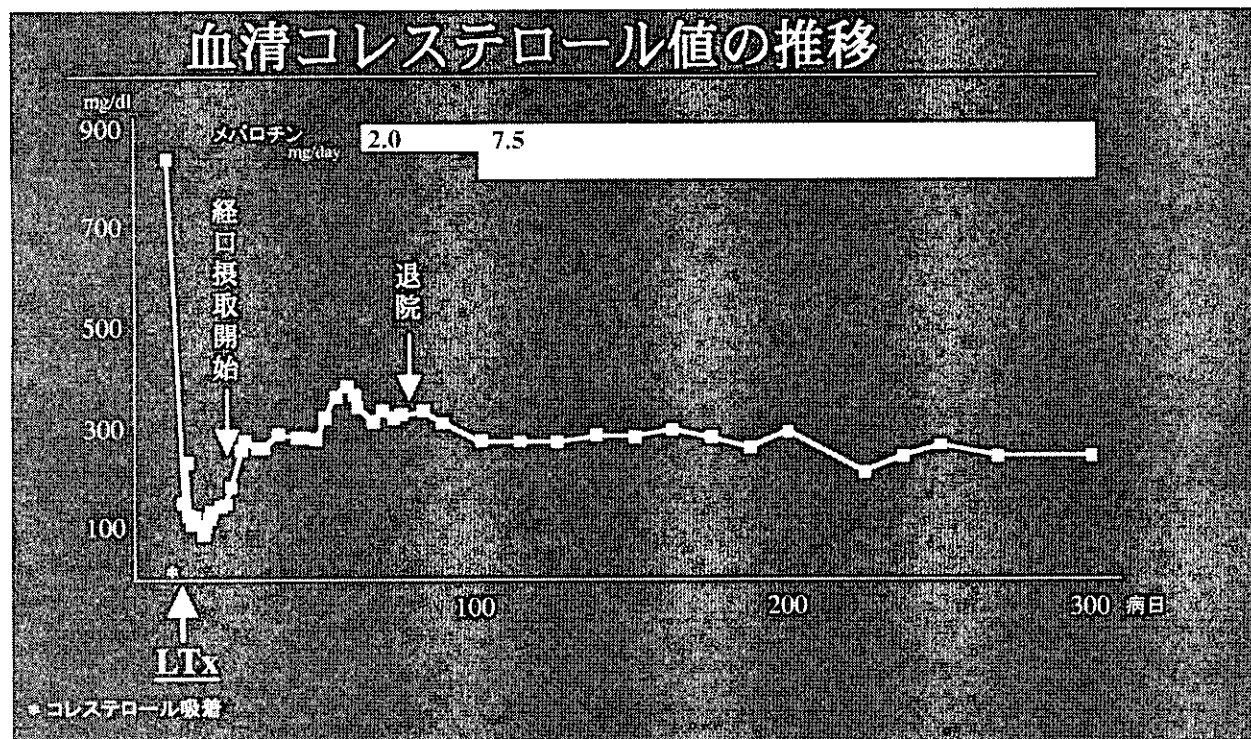
FHヘテロ接合体である父親をドナーして移植術が行われた。これは、組織適合性、スタチン系薬剤に対する反応性などを考慮して選考された。

C. 結果

父親のT-Choは323mg/dlと高く、リポバス10mg/day内服していた。母親はT-Choは311mg/dlにて、クレストラン18g/day内服していた遺伝的検索では、父親にイントロン12に変異が認められたヘテロ接合体であった。母親の遺伝的検索では既知の変異に合致するものは認められなかった。遺伝子検索は金沢大学・馬淵先生ら協力で行った。本症例は前述のごとく高コレステロール血症認め、遺伝的検索では父親と同じ変異が認められた。このようなことから本症例では遺伝子ではイントロン12に変異を有するコンパウンド・ヘテロであるが、臨床的な表現型ではホモに合致すると考えられた。治療として生体肝移植を行うこととしたが諸事情により、父親の肝を移植した。その後の経過を図に示した。生体部分肝移植を行う前日、プラズマアフェレーシスを一度行い、血中コレステロール値を低下させた。その後、父親の肝臓約2分の1を患児に移植された。その後はプラバスタチン7.5mg/日のと投与により、血清コレステロール値は300?350mg/dlに保たれており、肝移植は成功したと考えられた（図1）。患

児の成長を待って、さらにプラズマアフェレーシスを行うことが必要と考えられた。

metabolism in patients with impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus. A



E. 結論

海外では FH ホモ接合体などに対する根本的な治療法として体内 LDL レセプターの 70% を占める肝移植手術が有効と考えられ、試みられている。本症例では LDL 受容体正常のドナーからの供与が検討されたが、提供者がないことから血液型の一一致するヘテロタイプの父親をドナーとする生体肝移植が検討され、東北大学倫理委員会の審査を受けて行われた。難治例ではこのような生体部分肝移植が治療の選択の一つとして考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

- 1) Shuto Y, Shibasaki T, Wada K, Parhar I, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I: Generation of polyclonal antiserum against the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) evidence that the GHS-R exists in the hypothalamus, pituitary and stomach of rats. *Life Science* 68: 991-996, 2001
- 2) Toyota T, Oikawa S, Abe R, Sano R, Suzuki N, Hisamichi S, Fukao A, Cilostazol Diabetes Mellitus Lipids Study Group: Effect of cilostazol on lipid, uric acid and glucose

double-blind, placebo-controlled study. *Clin Drug Invest* 21(5): 325-335, 2001

- 3) Jun Kamegai, Hideki Tamura, Takako Shimizu, Shinya Ishii, Hitoshi Sugihara, and Shinichi Oikawa: Regulation of the ghrelin gene: Growth hormone-releasing hormone upregulates ghrelin mRNA in the pituitary. *Endocrinology* 142(9): 4154-4157, 2001
- 4) Naito T, Oikawa S, Kotake H, Hayasaka K, Toyota T: Effect of glucose concentration on foam cell formation in THP-1 cell. *J Athero Thromb* 8(2) 55-62, 2001
- 5) Toyota T, Oikawa S, the Beraprost Sodium Study Group Effects of beraprost Sodium (Dorner) in patients with diabetes mellitus complicated by chronic arterial obstruction. *Angiology* 53(1) 7-13, 2002

総説

- 1) Saito T, Ishigaki Y, Oikawa S, Yamamoto T: Role of apolipoprotein E variants in lipoprotein glomerulopathy and other renal diseases. *Clin Exp Nephrol* 5(4) 201-208, 2001
- 2) Saito T, Ishigaki Y, Oikawa S, Yamamoto T:

Etiological significance of apolipoprotein E mutations in lipoprotein glomerulopathy. Trends Cardiovasc Med 12 (2) 63-67, 2002

3) 及川眞一: 高脂血症と臓器障害: 動脈から膝・腎へ. 日本臨床内科医会誌 15 (5) 355-358, 2001

4) 岡島史宜、及川眞一: インスリン抵抗性症候群・Syndrome X・死の四重奏・内臓脂肪症候群の定義と病像. 内科 87: 850-854, 2001

5) 及川眞一、小竹英俊: 高脂血症診療ガイドライン. カレントセラピー 19 (6) 679-685, 2001

6) 小竹英俊、及川眞一: プロブコール、ニコチン酸製剤、陰イオン交換樹脂. 臨床と研究 78: 895-900, 2001

7) 田村秀樹、及川眞一: 肥満のメカニズム. 血圧 8 (6) 619-623, 2001

8) 岡島史宜、及川眞一: インスリン抵抗性症候群・Syndrome X・死の四重奏・内臓脂肪症候群の定義と病像. 内科 87 (5) 850-854, 2001

9) 及川眞一: 外国人の成績を日本人に適用できるか. The Lipids 12 (4) 391-394, 2001

10) 及川眞一、鈴木健司: マルチプルリスクファクターとしての IGT. Diabetes Fronyier 12 (3) 332-334, 2001

11) 及川眞一: 各種ガイドラインの使い方. 日本内科学会雑誌 90 (10) 2003-2009, 2001

12) 小竹英俊、及川眞一: 原発性高脂血症の薬物療法 CLINIC MAGAZINE 2001年11月号、50-54

13) 谷村恭子、及川眞一: 細小血管症と大血管症との関係. 内分泌・糖尿病科 4 (10) 422-426, 2001

14) 小竹英俊、及川眞一: 脂質代謝からみた糖代謝調節への関わりと発症の予防. プラクティス 18 (6) 633-638, 2001---11月

15) 小竹英俊、及川眞一: 日本人の体位の推移ー肥満の日常化. 総合臨床 50:3146-3152 (12) 2001

2. 学会発表

第44回日本糖尿病学会総会

高齢2型糖尿病における血中レプチン濃度と体重変化

肥満者に対する短期間食事、運動療法の体脂肪分布に与える影響

糖尿病初診時に合併する高脂血症の意義

コレステロール食、フルクトース水負荷家兎における膵組織学的変化と耐糖能異常

第33回日本動脈硬化学会硬化学会

コレステロール、フルクトース負荷家兎における動脈硬化巣の組織学的変化と過酸化脂質

動脈硬化症発症におけるマルチプルリスクファクターの意義

原発性高カイロミクロン血症例のインスリン分泌能について

DALM (Drug Affecting Lipid Metabolism) 9月 NY

SIGNIFICANCE OF THE LIPID LOWERING THERAPY IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS IN J-LIT STUDY

第41回日本糖尿病学会関東甲信越地方会

Insulin lisproによる持続皮下注入療法 (CSII) を試みた糖尿病性胃症合併糖尿病の一例

低ガンマグロブリン血症を伴った hypersensitivity syndromeを生じた1型糖尿病の一例

肝硬変に対する transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) 施行後の低血糖発症

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 |

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
糖尿病における動脈硬化症の発症予防と進展抑制に関する研究

分担研究者 山田信博 筑波大学臨床医学系内科教授

研究要旨 現代の高カロリー、高脂肪、さらに運動不足の環境では、インスリン抵抗性病態から複数の冠危険因子を重積する場合が多い。この重積状態は冠危険因子の偶発的な重積ではなく、生活習慣の欧米化に伴う肥満やインスリン抵抗性を共通の病態として発症すると考えられている。冠危険因子の中でも、糖尿病および境界型は冠危険因子を重積し易い病態であることから、その臨床的重要性が強調されている。本研究は、糖尿病患者の生命予後と QOL を悪化させる血管合併症を抑制するための治療手段を確立し、同時に本邦における糖尿病患者の病態の特徴や、糖尿病診療の現況を明らかにすることである。今回は日本における前向き大規模介入試験である Japan Diabetes Complications Study について、動脈硬化性疾患を中心に中間解析の結果を示す。動脈硬化性合併症（虚血性心疾患及び脳血管障害）の発症は、非糖尿病患者の約 3 倍に増加し、血糖コントロールのほか、血圧や LDL コレステロールが独立したリスクファクターであることなども明らかになった。

A. 研究目的

糖尿病における虚血性心疾患などの動脈硬化症は非糖尿病患者の約 3 倍であるといわれており、明らかに糖尿病の存在が発症を増加させている。虚血性心疾患を発症した人々を調べると約半分に糖尿病を認め、境界型を加えると相当数に耐糖能異常を認めると考えられている。従って、動脈硬化性疾患は糖尿病とオーバーラップする部分の大きいことから、糖尿病に特徴的な病態を抽出することはしばしば困難である。糖尿病では細小血管症に基づく病態が病像を修飾する場合があります。罹病期間の長い糖尿病における虚血性心疾患では、患者の訴える症状以上に病態が重篤である場合が多く、無痛性の心筋梗塞として知られる。また潜在的な心筋障害を伴い、心不全を生じ易く、予後不良である。一般に、糖尿病患者における動脈硬化症は境界型糖尿病、肥満を伴う糖尿病、軽症糖尿病にもよく発症することから、一次予防では境界型糖尿病の段階より耐糖能異常の診断を行い、食事療法や運動量法を開始するべきである。

現代の糖尿病診療の進歩にも関わらず、合併症で苦しむ糖尿病患者の増加が著しい。今後の糖尿病医療においては、これら合併症の発症・進展をいかに抑制するかということが重要である。合併症の現況を正確に把握し、その対策を講じるためには、大規模な無作為割付け前向き試験が必須である。1 型糖尿病を対象にした米国の DCCT、2 型糖尿病を対象にした英国の UKPDS は、糖尿病診療における多くの重要なエビデンスを生み出し、糖尿病診療に多大な貢献をした。しかし、UKPDS で介入群、非介入群ともにみら

れた体重の増加、血糖コントロールの悪化に関しては課題が残されたとともに、わが国の糖尿病患者の実態とは一部異なっており、その結果を、そのまま本邦の糖尿病診療に当てはめてよいのかという疑問は以前から指摘されていた。今回の JDCS では日本全国より症例を抽出して、患者教育を介入手段として研究を進めている。

B. 研究方法

登録症例は全て中央管理し、患者には糖尿病手帳を渡し、HbA1c 値、食事量、体重、運動量などを記録させ中央から 2 週間に一度、保健婦が一回に約 15 分間電話をかけ患者を指導する。生活習慣改善に向け積極的に介入する介入群と通常の外來管理の非介入群で、血管合併症の発症進展にいかに関与があったかを検討する。いずれの群でも設定された治療目標値を達成すべく努力することである。HbA1c、肥満度、血中脂質の各指標のいずれか、または複数のものにおいて一定の値を超えた患者に対しては、中央より患者指導用パンフレットを郵送するなどして指導強化を計った。さらに、これらの症例については主治医にも報告し、来院頻度を増し、治療をより充実するよう求めた。

① 治療目標値の設定 1. 糖代謝の管理: stableA1c 6.0% 以下、2. 肥満の解消: BMI 22 以下、3. 高脂血症の管理: コレステロール 220mg/dl 未満、TG 150 mg/dl 未満、HDL コレステロール 40 mg/dl 以上、4. 血圧の管理: 140/85 mm Hg 未満、5. 喫煙の制限: 禁煙、6. アルコール摂取の制限: 基本的には禁酒 (2 単位/日未満)、7. ウエストヒップ比の低下: 男 0.9 以下、女 0.8

以下 ②エンドポイント:大血管症については虚血性心疾患あるいは脳血管障害の発症とし、別途診断基準を設定している。③検査項目 1. HbA1c、血圧、体重は来院の都度測定する。2. 空腹時血糖値、血中CPRは登録時及び少なくとも6ヶ月に1回測定する。3. 総コレステロール、空腹時トリグリセリド、HDLコレステロール、Lp(a)を少なくとも年1回測定する。4. ウエスト/ヒップ比は最低年1回測定する。5. 血清尿素窒素、血清クレアチニンは最低年2回測定する。6. 尿中アルブミン、尿蛋白は最低年2回測定する。7. ECG、胸部X線写真は最低年1回検査する。各種データはコンピューターにインプットし、諸因子間の相関関係を解析し、また、治療効果の判定を行う。

C. 研究結果

JDCSでは予備研究より2000例の2型糖尿病患者を対象に血管合併症の発症予防と進展抑制に関する調査研究の実施方法を確立した。全国59施設の積極的参加を得て、平成8年4月1日より積極的に糖尿病治療の介入を行う群と通常治療群とに分けて本試験が開始され、5年間の経過した。5年次までの調査データについては平成14年2月5日現在で、1848症例のデータがコンピューターに入力されている。さらにその後もデータの送付、追加報告がなされている。ここに解析の成績について報告する。脱落症例は1年次が103名、2年次が26例、3年次が22例、4年次が9例、5年次が21例と、この規模の研究としてはきわめて少数に止まっている。介入群のHbA1cの平均値は7.53%であり、登録時の7.62%より有意に低下した。また非介入群では平均7.69%（登録時7.78%）であり、介入群で有意に低値を示した($p=0.008$)。このほかの指標では、合併症に関するものを含めて、両群間に有意差を認めない。全登録者において、肥満度(BMI)がわずかながら登録時より有意に低下しており、これは欧米の調査結果ではみられず、本邦の糖尿病患者の特徴の一つと考えられる。虚血性心疾患と脳血管障害をエンドポイントとしたが、4年間で44名の虚血性心疾患(6.1/1000人・年:男性8.0/1000人・年, 3.8/1000人・年)と40名の脳血管障害(5.3/1000人・年:男性5.5/1000人・年, 女性5.1/1000人・年)を認めた。両者の発症頻度は非糖尿病の約3倍であり、明らかに糖尿病で高かった。虚血性心疾患では男女差を認めたが、脳血管障害には性差を認めなかった。また、虚血性心疾患の発症頻度は欧米の約1/3であり、脳血管障害は同等であ

った。4年間の心血管イベントの解析より、虚血性心疾患の発症にはLDLコレステロールとHbA1cが重要な危険因子であり、脳血管障害においては血圧と空腹時インスリン値が有意な危険因子であることを示した。さらに本研究よりLDLは140mg/dl以下、理想的には100mg/dl以下にすべきこと、収縮期血圧は140mmHg以下に、理想的には130mmHg以下にすべきことを提案した。

D. 考察

わが国におけるこれまでの糖尿病に関する無作為割り付け前向き臨床試験の中では最も規模の大きいJapan Diabetes Complications Study(JDCS)を進行させている。この度の5年目の追跡では、非介入群と介入群の間に、差は僅かながら、HbA1cの有意差を認めた。本年度も両群ともに体重の管理、脂質代謝についても良好な経過を認めた。今後も本年度試みた血糖、体重、血中脂質、血圧のコントロール不良群の抽出と主治医への働きかけを強めて行く。

このような大規模介入試験ではいくつかの困難な点があげられる。血糖コントロール、脂質代謝、体重調整、血圧管理などの不良な患者には特に指摘して、治療成果を上げるよう主治医に連絡した。各血管障害のエンドポイントに達する症例が年々増加してきているので、血管障害出現への介入効果が現れてくるものと思われる。糖尿病教育の介入効果については現時点ではまだ確認できず、今後さらに介入内容の強化を検討する必要がある。大血管症に関しては、加齢、高脂血症、内臓脂肪蓄積型の肥満、収縮期血圧との関係が深いことが明白に示された。

E. 結論

現在のところ大血管症の発症、進展において2群間に有意差を認めなかったが、UKPDSの結果とは異なり、体重の増加、血糖コントロール状態の悪化などは認められなかった。このことは両国の結果の大きな相違点であり、人種による糖尿病の病態の差、糖尿病診療の質などが影響しているものと考えられ、今後の本邦の糖尿病診療の内容や進め方に大きく貢献するものと思われる。大血管症の発症率をみると、虚血性心疾患は6.1/1000人/年、脳血管障害は5.3/1000人/年であった。虚血性心疾患発症がやや優位であったことは、今後の虚血性心疾患の発症の増加、すなわち欧米型の疾病構造への移行を示唆するものと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

・Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga JI, Harada K, Gotoda T, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N.

Identification of Liver X Receptor-Retinoid X Receptor as an Activator of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c Gene Promoter.

Mol Cell Biol. 2001 May;21(9):2991-3000.

・Iida KT, Shimano H, Kawakami Y, Sone H, Toyoshima H, Suzuki S, Asano T, Okuda Y, Yamada N. Insulin upregulates tumor necrosis factor- α production in macrophages through an extracellular-regulated kinases-dependent pathway.

J Biol Chem. 2001 Aug 31;276(35):32531-7

・Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga Ji, Gotoda T, Kitamine T, Tamura Y, Okazaki H, Yahagi N, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Shimano H, Nagai R, Yamada N.

Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Mar;21(3):372-7.

2. 学会発表

Joint AHA/APSC, Symposium: The Rising Tide of Diabetic CVD, Cardiovascular Complications of Diabetes Mellitus: East (Nov 13, 2001, American Heart Association, Anaheim, California)

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

研究要旨

アポ A-I (Lys107del) は変異による二次構造の変化を来し、脂質への結合能低下の結果、HDL コレステロール値の低下を来していると考えられた。家族性 HDL 欠損症患者より新たな ABCA1 変異を検出した。

A. 研究目的

我々は脂質輸送に主要な役割を果たしているアポ蛋白を始めとするリポ蛋白代謝関連分子の構造と機能の検討を行ってきた。本年度は HDL 代謝異常で低 HDL コレステロール血症を来すアポ A-I 異常症、アポ A-I (Lys107del) の機能解析と家族性 HDL 欠損症例の ABCA1 の構造解析を行なった。

B. 方法

1. 変異アポ A-I 作成：アポ A-I の cDNA をもとに Kunkel 法にてプロアポ A-I (Lys107del) を導入し、pGEX ベクターを用い大腸菌 (JM109) に発現させ、精製した。

2. アポ A-I 機能解析

- 1) 脂質との結合能には人工脂質 DMPC を用いた。
- 2) リポ蛋白との結合能は [125I] でラベルしたアポ A-I を用い、BioGel A5m カラムを用分分離した。
- 3) α ヘリックスは円二色偏光を用い測定した。
- 4) コレステロールの引き抜きおよび細胞との結合はそれぞれ [3H]、[125I] でラベル測定した。
- 5) 遺伝子解析：患者単球より RNA を抽出し、RT-PCR 法にて ABCA1 の cDNA を 9 つのフラグメントに分け増幅。サブクローニング後シーケンスを行なった。

（倫理面での配慮）

家族性 HDL 欠損症の遺伝子解析用血液サンプルの採

取にあたっては、脂質代謝関連の遺伝子解析のみを行なうこと、またデータの公表時に個人が特定できない形で報告することを説明し、患者および家族の同意を得た。

C, D. 結果および考察

1. プロアポ A-I (Lys107del) の機能解析

1) 人工脂質 DMPC との親和性の低下、2) 血清中で 26% が脂質フリーとして存在していること、3) α ヘリックスの減少、4) 変異アポ A-I と DMPC 複合体の粒子サイズの低下が認められたが、LCAT 活性化能と rHDL を用いたコレステロール引き抜き能にはコントロールと差が認められなかった。また、LCAT 活性化能にも異常を認めなかった。これらの結果より、アポ A-I (Lys107del) は二次構造の変化により脂質との結合能の低下を来した結果、異化の亢進し HDL コレステロール値の低下を来したと考えられた。

2) 家族性 HDL 欠損症の構造解析

冠動脈疾患を有する HDL 欠損症 (HDL コレステロール値 3.5mg/dl, アポ A-I 値 6mg/dl) 患者の ABCA1 遺伝子解析を行なった。発端者に扁桃肥大、肝・脾腫、リンパ節腫大、黄色腫は認めずタンジール病とは異なっていた。ABCA1 遺伝子の解析の結果、エクソン 47, 3787-3790 に 4bp 欠失の結果、コドン 1224 でフレームシフトを起こした新たな短縮型変異体を検出した。アポ A-I および LCAT 遺伝子には異常を認めなかった。家族調査の結果、発端者は本変異のホモ接合体であり、母親と 4 人の子供全員はヘテロ接合体であった。ヘテロ接合体の HDL コレステロール

値は37-51mg/dl, アポA-I値は89-117mg/dlであり、冠動脈疾患は認めなかった。

E. 結語

1. 大腸菌に発現したプロアポ A-I (Lys107del) は DMPC への結合能低下、血清リポ蛋白との親和性低下、 α ヘリックス減少を認めた。組織からのコレステロール引き抜き能および LCAT 活性化能には異常を認めなかった。
2. 家族性 HDL 欠損症患者より新たな ABCA1 変異 (3787-3790del) を検出した。

F. 研究発表

(1) Wei Huang, Kengo Moriyama, Takafumi Koga, Han Hua, Masato Ageta, Seiro Kawabata, Koji Mawatari, Takuro Imamura, Tanenao Eto, Mitsunobu Kawamura, Tamio Teramoto, Jun Sasaki: Novel mutations In ABCA1 gene In Japanese patients with Tangier disease and familial high density lipoprotein deficiency with coronary heart disease, *Biochim Biophys Acta*, 1537: 71-78, 2001.

(2) Sahiko Shinoyama, Jun Sasaki, Chikako Kiyohara, Emiko Tsuji, Hisako Inoue, Tomomi Marugame, Koichi Handa, Hitomi Hayabuchi, Hiroaki Hamada, Hiroyuki Eguchi, Yoshitake Fukushima, Suminori Kono: Apolipoprotein E genotype, serum lipids, and colorectal adenomas in Japanese men, *Cancer Letters*, 164: 33-40, 2001.

(3) Wei Huang, Akira Mastunaga, Wei Li, Hua Hun, Anh Hoang, Mari Kugi, Takafumi Koga, Dmitri Sviridov, Noel Fridge, Jun Sasaki: Recombinant proapoA-I (Lys107del) shows impaired lipid binding associated with reduced binding to plasma high density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 159: 85-91, 2001.

(4) Akira Yamamoto, Kikuo Arakawa, Jun Sasaki, Yuji Matsuzawa, Kaoru Takemura, Motoo Tsushima, Takeo Fujimami, Hiroshi Mabuchi, Hiroshige Itakura, Nobuhiro Yamada, Takayoshi Toyota, Shinichi Oikawa, Mitsuyoshi Nakashima for the Rosuvastatin Dose Ranging Trialist Group:

Clinical Effects of Rosuvastatin, a New HMG-CoA reductase Inhibitor in Japanese Patients With Primary Hypercholesterolemia; an Early Phase II Study, *J Atheroscler Thromb*, 9: 48-56, 2002.

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 |

研究要旨

動脈硬化を修飾すると考えられる種々のケモカイン、サイトカイン、シグナル伝達因子の候補遺伝子上に100個以上の新規 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 タイピング法について short allele-specific oligo を用いたマイクロアレイ法を行い、99%の精度の大規模 SNP タイピング法を確立した。ApoA2 のプロモーター変異-492 (C/T)、HTGLVal215Ile)、ApoH (Val226Leu)、FSHR (Ser679Asn) について、家系構成員の FH 患者群における血清脂質値との間に有意な相関関係を同定した。ApoA2 の遺伝子変異 (C/C genotype) は FH 患者群における LDL-C 値の著明な低下を来し、LDL-C 値の上昇を特徴とする FH の表現型の LDL-C 値の正常化を来した。また ApoH、HTGL、FSHR の遺伝子多型は中性脂肪値の上昇と有意に相関し、II a 型高脂血症 (LDL-C?) から II b 型高脂血症 (LDL-C+TG?) へと表現型の変化が認められた。FH 群でのみ相関が認められたことより、LDL 受容体遺伝子とこれらの遺伝子との間に遺伝子間相互作用の存在が示唆された。現在、一塩基多型 (SNP) をマーカーとした連鎖不平衡マッピングを進めている。

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 C II、リポ蛋白質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検討した。原発性高脂血症において最も頻度が高いといわれる家族性高コレステロール血症 (FH) は、LDL 受容体遺伝子の異常により LDL コレステロール値の上昇を来すものと定義されるが、実際 FH の呈する血清脂質値の表現型は複雑で、一様ではない。中性脂肪値の上昇、HDL コレステロール値の低下など、様々な表現型をきたす患者が存在することは臨床の場において非常にしばしば認められる。これらの疑問に対し我々は、LDL 受容体以外に表現型へ影響を及ぼす修飾遺伝子の存在を想定した。特に脂質代謝との関係が明らかでない種々のサイトカイン、キモカイン、ステロイドホルモンその受容体などが高脂血症に与える影響について検討した。

B. 研究方法

(1) これら種々の候補遺伝子上の一塩基多型 (SNP) の同定を行った。即ち SNP 同定法をダ

イレクトシーケンス法などの種々の大規模 SNP タイピング法を試みるためその条件を検討した。また、(2) それらの SNP のタイピングを FH 大家系において行い、修飾遺伝子の同定を試みた。即ち、家族性高コレステロール血症 (FH) の一大家系内サンプル 220 人を用いて、種々の候補遺伝子座が血清脂質値に及ぼす効果について検討を行った。LDL 受容体遺伝子の intron14 の 1 番目に突然変異を同定したこの FH 家系の表現型に影響を及ぼす修飾遺伝子を同定するため、LDL 受容体に変異をもつ 100 名、及び同家系内で変異を持たない 120 名を用い、年齢、性別によって補正された血清脂質値と候補遺伝子の一塩基多型 (SNPs) との間で相関解析を行った。候補遺伝子として 100 個を選択し解析に用いた。検索する一塩基多型 (SNPs) は、公的 データベース及び文献を利用し、allele frequency が高くなおかつアミノ酸置換を伴う coding- SNPs、promoter-SNPs を中心に選択する。SNP の同定法は、ダイレクトシーケンス法を中心に行った。統計学的処理については、血清脂質値と 3 群の genotype 間における相関解析を行うため、ANOVA (Scheffe's post hoc test) を用いて厳密に有意差を検定した。

（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) tissue-type plasminogen activator (TPA), LXRalpha, tumor necrosis factorA (TNFA), colony stimulating factor2 (CSF2), nuclear factor kappa-B28NFkB2), signal recognition particle 68 (SRP68), ubiquitin-conjugating enzyme (E2-230K), interleukin-6 (IL-6), Adrenomedulin osteopontin (OPN), leukemia inhibitory factor (LIF) などのキモカイン、サイトカイン、シグナル伝達因子の候補遺伝子上に100個以上の新規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 タイピング法の一塩基伸長反応は、Big dye ラベル化ダイデオキシ基質のプライマー伸長法 (Snaphot 法)、ABI377 自動シークエンサーによる Direct sequence 法を試みるとともに、Ilmer の short allele-specific oligo を用いたマイクロアレイ法を行い、99%の精度の大規模SNPタイピングを確立した。(2) LDL 受容体変異の機能的効果を調べるため、末梢血液中のリンパ球より mRNA を抽出し RT-PCR を行い、異常長 LDLmRNA を検出した。さらに LDL 受容体の機能異常を証明するために FACS cytometry 法を用いて、LDL 受容体活性と細胞上に発現する受容体発現量が減少していることを示した。ApoA2 のプロモーター変異 -492 (C/T)、HTGL8Val1215Ile)、ApoH (Val226Leu) について、家系構成員の FH 患者群における血清脂質値との間に有意な相関関係が認められた。ApoA2 の遺伝子変異 (C/C genotype) は FH 患者群における LDL-C 値の著明な低下を来し、LDL-C 値の上昇を特徴とする FH の表現型の LDL-C 値の正常化を来した。また ApoH、HTGL の遺伝子多型は中性脂肪値の上昇と有意に相関し、(II) a 型高脂血症 (LDL-C?) から (II) b 型高脂血症 (LDL-C? + TG?) へと表現型の変化が認められた。これらのうち ApoA2、HTGL は FH 群でのみ相関が認められたことより、LDL 受容体遺伝子とこれらの遺伝子との間に遺伝子間相互作用の存在が示唆された。ApoH では FH 群、non-FH 群共に相関が認められたため、一般人における高脂血症感受性遺伝子である可能性が示唆された。また、FH 患者における卵胞刺

激ホルモン受容体 (FSHR) の遺伝子多型 (Ser679asn) が、中性脂肪値に対し有意な上昇効果を認めることが判明し、統計学的に有意に FSHR が中性脂肪値を上昇させる効果を持つことが示唆されたので、さらに詳細な検討を加えるため現在一塩基多型 (SNP) をマーカーとした連鎖不平衡マッピングを進めている。すなわち FSHR 遺伝子に近接する遺伝子群の一塩基多型 (SNPs) を網羅的に解析して詳細な SNP 地図を作成し、連鎖不平衡マッピングの手法を用いて真の修飾遺伝子座を絞り込み、連鎖不平衡関係にある SNP に関してはハプロタイプ頻度を推定し、ハプロタイプと疾患の相関解析を行っている。今後、疾患修飾遺伝子座として有力視されたものに対しては発現解析、機能解析を行い、主遺伝子に相互作用を及ぼす修飾遺伝子の同定を試みていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida, S., Fukino, K., Harada, H., Nagai, H., Imoto, I.²⁾, Inazawa, J.²⁾, Takahashi, H.¹⁾, Teramoto, A.¹⁾, Emi, M.¹⁾ (Dept. Neurosurg.,²⁾ Tokyo Med. Dent. Univ.): The c-Jun NH2-terminal kinase3 (JNK3) gene: genomic structure chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 182-187.
- 2) Nakazawa, I., Nakajima, T., Ishigami, T., Umemura, S.¹⁾, Emi, M.¹⁾ (Yokohama City Univ.): Linkage disequilibrium and haplotype analysis among eight novel single nucleotide polymorphisms of human Tissue-type plasminogen activator gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 367-371.
- 3) Iwasaki, H., Shinohara, Y., Ezura, Y., Kodaira, M., Kajita, M., Nakajima, T., Shiba, T.¹⁾, Emi, M.¹⁾ (Kitasato Univ.): Thirteen single nucleotide polymorphisms of human osteopontin identified by sequencing of the entire gene in Japanese. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 544-546.
- 4) Shinohara, Y., Ezura, Y., Iwasaki, H., Nakazawa, I., Ishida, R., Kodaira, M., Kajita, M., Shiba, T.¹⁾, Emi, M.¹⁾ (Kitasato Univ.): Linkage disequilibrium

- and haplotype analysis among ten single nucleotide polymorphisms of interleukin 11 identified by sequencing of the gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 494-497.
- 5) Ishida, R., Ezura, Y., Iwasaki, H., Nakazawa, I., Kajita, M., Kodaira, M., Ito, H.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Dept. Orthop.) : Linkage disequilibrium and haplotype analysis among novel four single nucleotide polymorphisms in human Leukemia inhibitory factor (LIF) gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 557-559.
 - 6) Kohro, T.¹⁾, Nakajima, T., Wada, Y.¹⁾, Sugiyama, A.¹⁾, Ishii, M.¹⁾, Tsutsumi, S.¹⁾, Aburatani, H.¹⁾, Imoto, I.²⁾, Inazawa, J.²⁾, Hamakubo, T.¹⁾, Kodama, T.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Tokyo Med. Dent. Univ.) : Genomic Structure and Mapping of Human Orphan Receptor LXR Alpha: Upregulation of LXR α mRNA During Monocyte to Macrophage Differentiation. *J. Atheroscler. Thromb.* 2001; 7: 145-151.
 - 7) Shinohara, Y.¹⁾, Ezura, Y., Iwasaki, H., Nakazawa, I., Ishida, R., Nakajima, T., Kodaira, M., Kajita, M., Shiba, T.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Kitasato Univ.) : Human Tumor necrosis factor A gene: three single nucleotide polymorphisms among Japanese and ethnic difference of their allele frequencies. *Annals Hum. Bio.* 2002; (in press)
 - 8) Ota, N., Nakajima, T., Ezura, Y., Iwasaki, H., Suzuki, T.²⁾, Hosoi, T.²⁾, Orimo, H.²⁾, Inoue, S.³⁾, Ito, H.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Dept. Orthoped., ²⁾ Tokyo Metropol. Inst. Gerontol. Hosp., ³⁾ Univ. Tokyo) : Association of a single nucleotide variant in the human tumor necrosis factor alpha promoter region with decreased bone mineral density. *Annals Hum. Bio.* 2002; (in press)
 - 9) Hirano, A., Nagai, H., Harada, H., Terada, Y., Haga, S.¹⁾, Kajiwar, T.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Tokyo Women's Med. Univ.) : Nine novel single-nucleotide polymorphisms of the Intergrin beta4 gene in the Japanese population. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 35-37.
 - 10) Kajita, M., Iwasaki, H., Ota, N., Shinohara, Y., Kodaira, M., Nakajima, T., Emi, M. : Novel single nucleotide polymorphisms of the human Colony-stimulating factor 2 (CSF2) identified by sequencing entire gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 48-49.
 - 11) Shinohara, Y., Iwasaki, H., Ota, N., Nakajima, T., Kodaira, M., Kajita, M., Shiba, T.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Kitasato Univ.) : Novel single nucleotide polymorphisms of human nuclear factor kappa-B 2 identified by sequencing the entire gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 50-52.
 - 12) Harada, H., Nagai, H., Mine, N., Terada, Y., Fujiwara, H., Mikami, I., Tsuneizumi, M., Yabe, A., Miyazaki, K., Yokota, T., Imoto, I.¹⁾, Inazawa, J.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Tokyo Med. Dent. Univ.) : Molecular cloning, tissue expression, and chromosomal assignment of a novel gene encoding a subunit of the human signal-recognition particle. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 70-75.
 - 13) Yokota, T., Nagai, H., Harada, H., Mine, N., Terada, Y., Fujiwara, H., Yabe, A., Miyazaki, K., Emi, M. : Identification, tissue expression, and chromosomal position of a novel gene encoding human ubiquitin-conjugating enzyme E2-230k. *Gene.* 2001; 267: 95-100.
 - 14) Ota, N., Nakajima, T., Suzuki, T.²⁾, Hosoi, T.²⁾, Orimo, H.²⁾, Inoue, S.³⁾, Shirai, Y.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Dept. Orthoped., ²⁾ Tokyo Metropol. Inst. Gerontol., ³⁾ Univ. Tokyo) : A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone-mineral density. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 267-272.
 - 15) Nakazawa, I., Nakajima, T., Ishigami, T.¹⁾, Umemura, S.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Yokohama City

- Univ.): Human calcitonin receptor-like receptor for Adrenomedullin: genomic structure, eight single nucleotide polymorphisms, and haplotype analysis. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 132-136.
- 16) Hirano, A., Nagai, H., Harada, H., Haga, S.¹⁾, Kajiwara, T.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Tokyo Women's Med. Univ.): Two novel single-nucleotide polymorphisms of the Caspase-9 (CASP9) gene in the Japanese population. *Genes, Immunity.* 2001; 2: 117-118.
- 17) Hattori, H.¹⁾, Hirayama, T., Nobe, Y., Nagano, M.¹⁾, Kujiraoka, T.¹⁾, Egashira, T.¹⁾, Ishii, J.²⁾, Tsuji, M.²⁾, Emi, M. (¹⁾ R&D Center, BML, ²⁾ Hokkaido Cent. Hosp.): Eight Novel Mutations and Functional Impairments of the LDL Receptor in Familial Hypercholesterolemia in the North of Japan. *J. Hum. Genet.* 2002; 47: 80-87.
- 18) Harada, H., Yoshida, S., Nobe, Y., Ezura, Y., Atake, T., Koguchi, T., Emi, M.: Genomic Structure of the Human NLK (nemo-like kinase) Gene and Analysis of its Promoter Region. *Gene* 2002; (in press)
- 19) Nakajima, T., Jorde, BL.¹⁾, Ishigami, T.¹⁾²⁾, Umemura, S.²⁾, Emi, M., Lalouel, JM.¹⁾, Inoue, I. (¹⁾ Univ. Utah Health Sciences Ctr, ²⁾ Yokohama City Univ.): Molecular variants, haplotypes, and linkage disequilibrium within the human angiotensinogen gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 70: 108-123.
- 20) Sugiyama, H.¹⁾, Ogawa, S.¹⁾, Emi, M., Shiraki, M.²⁾, Hosoi, T.³⁾, Orimo, H.³⁾, Ouchi, Y.¹⁾, Inoue, S.¹⁾ (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Res. Inst. Prac. Invol. Dis., ³⁾ Tokyo Metropol. Geriatr. Hosp.): Ethnic difference in contribution of alleles of the Interleukin-1 Receptor Antagonist (IL-1RA) gene to predisposition to osteoporosis. *Geriatr. Gerontol. Int.* 2002; (in press)
- 21) Iwasaki, H., Ezura, Y., Ishida, R., Kodaira, M., Kajita, M., Knight, J.¹⁾, Daniel, S.¹⁾, Shi, M.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Genometrix Inc., The Woodlands): Accuracy of Genotyping for Single Nucleotide Polymorphism Typing Method Involving hybridization of Short Allele-Specific Oligonucleotides. *DNA Reserch.* 2002; (in press)
- 22) Takada, D., Emi, M., Nobe, Y., Kawamura, K., Iino, Y., Katayama, Y., Xin, Y.¹⁾, Wu, LL.¹⁾, Larringa-Shum, S.¹⁾, Stephenson, SH.¹⁾, Hunt, SC.¹⁾, Skolnick, MH.²⁾, Lalouel, JM.²⁾, Hopkins, PN.¹⁾ (¹⁾ Cardiovascular Genetics Research Center, ²⁾ Univ. Utah Health Sciences Ctr.): Gene-gene interaction between a novel LDL receptor mutation and an apolipoprotein A-II promoter variant: A molecular study in a familial hypercholesterolemia kindred consisting of 1135 members. *J. Clin. Invest.* 2002; (in press)
- 23) Ogawa, S.¹⁾, Emi, M., Shiraki, M.²⁾, Hosoi, T.¹⁾³⁾, Orimo, H.³⁾, Ouchi, Y.¹⁾, Inoue, S.¹⁾ (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Reseach Institute and Practice for Involutional Diseases, ³⁾ Tokyo Metropol. Geriatr. Hosp.): Association of amino acid variation (Yrp64Arg) in the beta3-adrenergic Receptor Gene with Bone Mineral Density. *An. Hum. Biol.* 2002; (in press)
- 24) Harada, H., Kimura, A.¹⁾, Fukino, K., Yasunaga, S.²⁾, Nishi, H.³⁾, Emi, M. (¹⁾ Med. Res. Inst., ²⁾ Tsukumi Central Hosp., ³⁾ Kurume Univ.): Genomic structure and eight novel exonic polymorphisms of human N-cadherin gene. *J. Hum. Genet.* 2002; (in press)
- 25) 永井尚生、江見 充: ゲノム地図の作製による癌および疾患遺伝子の同定 「蛋白質核酸 酸素」 2001; 16: 2306-2312.
- 26) 中島敏晶、江見 充: 動脈硬化と遺伝子多型 「今日の老年医学 2001-臨床と基礎」 2001; 177-180.

27) 江見 充 : CDNA マイクロアレイと SNP 解析
「Journal of Nippon Medical School」 2001;
68: 411-412.

28) 江面陽一、岩崎公典、石田良太、江見 充 :
SNP の解析? 解析法の技術的進歩と疾患遺伝子の
解析 「ゲノム医学」 2001; 1: 85-89.

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 |

厚生労働省特定疾患調査研究原発性高脂血症調査研究班
平成13年度分担研究報告書

我が国における家族性複合型高脂血症の調査研究

分担研究者 齋藤 康 (千葉大学大学院医学研究院細胞治療学 教授)

研究要旨 家族性複合型高脂血症 (FCHL) における small dense LDL 生成に関わる肝性リパーゼ (HTGL) のプロモーター遺伝子多型を検討した。さらに、新たな冠動脈硬化の指標として酸化 LDL である Malondialdehyde (MDA)-LDL の血中濃度の臨床的意義について検討した。FCHL は健常者と異なった HTGL-514C/T 遺伝子多型の分布がみられ、TT 型が有意に高頻度だった。HTGL-514 多型 TT 型は、男性において HTGL 活性の低下と高 TG 血症を示した。血中 MDA-LDL 濃度は、冠動脈疾患および頸動脈硬化の進展とともに高値を示し、LDL サイズと負の相関がみられた。以上より、FCHL の特徴的病態である small dense LDL は、その生成は HTGL 遺伝子多型を基盤にし、MDA-LDL 生成を介して動脈硬化の進展を引き起こす可能性がある。

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。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 (TG) 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。その病態は、高 TG 血症や低 HDL 血症に加え、アポ B / LDL コレステロール > 1.0 の頻度が全症例の 44%、Small, dense LDL が 73% と高頻度に存在することを示した。今回、FCHL における肝性リパーゼ (HTGL) プロモーター遺伝子多型の検討成績とともに、新たな冠動脈硬化の指標として酸化 LDL である血中 Malondialdehyde (MDA)-LDL 濃度の臨床的意義について検討した成績を報告する。

B. 研究方法および結果

1. FCHL 症例における HTGL 遺伝子多型の検討

原発性高脂血症高脂血症研究班による診断基準による問診から診断した FCHL 34 症例と対照 180 症例について HTGL 遺伝子多型 HTGL-514C/T 変異を解析した。遺伝子解析は末梢血液より DNA 抽出後、変異部位を挿む特異的配列のプライマーを用いて PCR 増幅し、得られた DNA 断片のシーケンスを解読することにより決定した。遺伝子多型頻度は CC、CT、TT 型各々、FCHL 症例 14、47、39%、FCHL 対照症例 24、51、25% であり、T アリール (62%) が FCHL において高値 ($p < 0.05$) だった。各多型の血清脂質は、男性で、TT 型 (276mg/dl) および TC 型 (242mg/dl) が CC 型 (186mg/dl) に比べ高値を示した。各アリールにおけるヘパリン静注後 HTGL 活性を測定した結果、TT 型および TC 型は、CC 型に比べ有意に低値 ($p < 0.05$) だった。

2. 血中 MDA-LDL 濃度の臨床的意義

血管造影を行なった冠動脈疾患 62 症例と対照 42 症例の血中 MDA-LDL 濃度を抗 MDA-LDL 抗体 ML25 を

用いた ELISA 法により測定した。血中 MDA-LDL 値は冠動脈疾患症例 113U/l、対照 85U/l と前者で有意に高値 ($p < 0.001$) だった。男女共に高値であり、MDA-LDL/LDL-C 値も冠動脈疾患で有意に高値を示した。MDA-LDL 濃度は頸動脈内膜中膜肥厚度と正の相関を示した ($R = 0.41$, $p < 0.001$)。MDA-LDL 濃度は、LDL-C および TG と正の相関 ($R = 0.402$, $P < 0.0001$ および $R = 0.312$, $P < 0.001$) を示し、HDL-C と負の相関 ($R = 0.227$, $P < 0.02$) を示した。年齢とは有意な相関はみられなかった。LDL サイズの相関を検討したところ、負の相関を示した ($R = 0.24$, $p < 0.01$)。超遠心法により分離同定した LDL 亜分画における MDA-LDL 濃度を検討したところ、MDA-LDL は主に高比重画分である LDL3 と LDL4 に存在していた。

C. 考察

これまでに我々は、FCHL の病態として、高 TG 血症および低 HDL 血症に加え、アポ B/LDL コレステロール > 1.0 、Small, dense LDL の存在する症例が高頻度であることを示した。今回、HTGL プロモーター多型を検討した結果、FCHL 症例において異なった遺伝子変異の分布がみられた。特に男性で HTGL 活性の低下と高 TG 血症が遺伝子多型と密接に関連した。さらに、新たな動脈硬化の指標として、MDA-LDL の血中濃度を解析した結果、冠動脈疾患および頸動脈硬化の進展とともに高値を示し、LDL サイズと有意な相関がみられた。このことは、これまでの疫学検討より同定した FCHL の特徴的病態の指標である small dense LDL が、酸化 LDL である MDA-LDL の生成を介して動脈硬化の進展を引き起こす可能性を示す。今後、様々な症例における検討とともに、詳細な病態解析と遺伝子相互作用の検討が必要と考えられる。

D. 研究成果

1. Kobayashi J, Tashiro J, Bujo H, Morisaki

N, Saito Y. (2001) Effect of lipoprotein lipase on binding of chylomicrons to LDL receptor-deficient Chinese hamster ovary cells. *Ann Clin Biochem* 38:124-128

2. Kobayashi J, Saito Y, Taira K, Hikita M, Takahashi K, Bujo H, Morisaki N, Saito Y. (2001) Effect of apolipoprotein E3/4 phenotype on postprandial triglycerides and retinyl palmitate metabolism in plasma from hyperlipidemic subjects in Japan. *Atherosclerosis* 154:539-546.

3. Zhu Y, Bujo H, Takahashi K, Taira K, Kobayashi J, Koshikawa H, Sasaki Y, Kanoh T, and Saito Y. (2001) Severe hypertriglyceridemia with plasma inhibitory factor(s) on lipoprotein lipase activity in a patient with a common Ser(447)-Ter LPL mutation. *Clin Chim Acta*. 308:139-146.

4. Kobayashi J, Saito K, Fukamachi I, Taira K, Takahashi K, Bujo H, and Saito Y. (2001) Pre-Heparin Plasma Lipoprotein Lipase Mass: Correlation With Intra-Abdominal Visceral Fat Accumulation. *Horm Metab Res*. 33:412-416.

5. Taira K, Bujo H, Hirayama S, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, Ishii I, Miida T, Schneider WJ, and Saito Y. (2001) LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of apoE-rich lipoproteins in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 21:1501-1506.

6. Tashiro J, Morisaki N, Kobayashi J, Bujo H, Kanzaki T, Murano S, and Saito Y. (2001) Significance of a Polymorphism (G \rightarrow A transition) in the -75 Position of the Apolipoprotein A-I Gene Promoter on Serum High Density Lipoprotein-Cholesterol Levels in Japanese Hyperlipidemic Subjects. *J Atheroscler Thromb*. 8: 95-100.

7. Takahashi K, Hikita M, Taira K,